

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS VERDES E  
SUSTENTÁVEIS PARA A OBTENÇÃO DE AGENTES  
QUIMIOTERÁPICOS A PARTIR DE RESÍDUOS DE  
PROCESSAMENTO DE MANGA (*Mangifera indica L.*)**

**Karine Zanotti\***

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de  
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

**Orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim**

**\*bolsista CAPES**

**São Carlos - SP  
2025**



---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Karine Zanotti, realizada em 02/04/2025.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Roberta Cerasi Urban (UFSCar)

Profa. Dra. Renata Colombo (USP)

Profa. Dra. Barbara Sayuri Belleite (UFLA)

*Dedico este trabalho a todas as pessoas  
que entendem a Química como uma  
poderosa ferramenta de transformação.*

*Aos pioneiros, que abriram os  
caminhos, e às gerações que estão por  
vir – e têm muito a fazer por um futuro  
sustentável.*

## **Agradecimentos**

Dedico este espaço a todas as pessoas que tornaram esta jornada possível, tanto dentro quanto fora do laboratório. Obrigada pelo incentivo, apoio e contribuição para o desenvolvimento e a conclusão desta etapa.

Primeiramente, agradeço à minha família, meu porto seguro. Aos meus pais, Magali e Wagner, e à minha irmã, Mariane, por sempre acreditarem em mim incondicionalmente e apoiarem cada um dos meus sonhos. Ao meu namorado, Diego, por estar ao meu lado em todos os momentos, sendo minha maior fonte de incentivo e me lembrando, dia após dia, que tudo é possível. Obrigada pela força, carinho e amor.

Às minhas amigas de longa data, Carol, Giovanna e Yara, que, apesar da distância, sempre estiveram presentes, acompanhando e torcendo por mim, oferecendo tanto apoio e carinho.

Aos amigos que a pesquisa me presenteou e que se tornaram companheiros de vida, minha eterna gratidão. Aos que vieram antes, Aylon e Mateus, pelo compartilhamento de conhecimento, discussões científicas e conselhos valiosos. E àqueles que trilharam este caminho comigo, Karoline e Carlos, obrigada pelo incentivo diário, incontáveis momentos de ajuda e aprendizados e pelo apoio constante, vocês foram essenciais nessa trajetória.

Agradeço também aos colegas do Laboratório de Química Farmacêutica e Ecologia Química e do Laboratório de Produtos Naturais, em especial ao Luís, por sua dedicação em ensinar e suas contribuições primordiais nas análises por espectrometria de massas, você foi fundamental neste processo. Aos parceiros do Laboratório de Compostos de Coordenação em Química Medicinal, Dário e Tamara, pelos ensinamentos em relação aos ensaios biológicos com células tumorais, vocês também foram fundamentais nesta etapa.

Meu reconhecimento especial ao professor Moacir Rossi Forim, por me acolher em seu grupo de pesquisa com generosidade e por confiar em mim

para desenvolver um projeto desafiador e novo para o grupo. Ao professor Fillipe Vieira Rocha, por me receber em seu laboratório, proporcionando não apenas o suporte técnico e científico essencial, mas também um ambiente acolhedor que enriqueceu imensamente este trabalho. Obrigada pelas contribuições.

Sou profundamente grata à Universidade Federal de São Carlos, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de estudar e pesquisar. Aos docentes que contribuíram para minha formação acadêmica, tanto na graduação quanto na pós-graduação – e aos que vieram antes.

Também agradeço imensamente à CAPES, pelo financiamento que tornou este doutorado possível.

Por fim, a cada pessoa que, de alguma forma, fez parte desta caminhada, meus sinceros agradecimentos. Este trabalho é também um reflexo do conhecimento, do apoio e da inspiração que recebi ao longo do caminho.

## Lista de tabelas

TABELA 3.1 – Variáveis estudadas e seus valores adotados em níveis máximo (1) e mínimo (-1) para a extração assistida por homogeneização. ....	36
TABELA 3.2 – Descrição dos experimentos com as variáveis em valores reais e codificados dada pelo planejamento fatorial completo para a extração assistida por homogeneização.....	37
TABELA 3.3 – Variáveis estudadas e seus valores adotados em níveis máximo (1) e mínimo (-1) para a extração assistida por micro-ondas. ....	38
TABELA 3.4 – Descrição dos experimentos com as variáveis em valores reais e codificados dada pelo planejamento fatorial completo para a extração assistida por micro-ondas.....	39
TABELA 3.5 – Gradiente de eluição adotado para as análises por LC-MS.....	48
TABELA 3.6 – Energias de colisão para as análises de MS/MS dos extratos com foco nos analitos de interesse. ....	48
TABELA 3.7 – Energias de colisão para as análises de MS/MS dos metabólitos presentes nos extratos otimizados. ....	59
TABELA 4.1 – Comparação entre os valores de IC <sub>50</sub> do extrato-teste e suas frações e dos fármacos de referência obtidos no ensaio de viabilidade celular com MTT realizado em 48 h.....	72
TABELA 4.2 – Parâmetros de regressão, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) das curvas construídas.....	88
TABELA 4.3 – Valores do parâmetro $\alpha$ para avaliar o efeito de matriz. ....	90
TABELA 4.4 – Porcentagens de recuperação de ácido gálico e metil galato a partir do ensaio de adição de padrão aos extratos obtidos pelas extrações assistidas por homogeneização (EAH) e por micro-ondas (EAM). ....	90
TABELA 4.5 – Parâmetros de precisão intra-dia e inter-dia e exatidão das curvas construídas.....	91

TABELA 4.6 – Resultado do planejamento fatorial completo do método de extração assistida por homogeneização para ácido gálico e metil galato. ....	92
TABELA 4.7 – Resultado do planejamento fatorial completo do método de extração assistida por micro-ondas para ácido gálico e metil galato. ....	98
TABELA 4.8 – Valores de desejabilidade global calculados para todos os extratos obtidos com ambas as técnicas de extração. ....	103
TABELA 4.9 – Valores de IC <sub>50</sub> e IS do extrato-teste EAH em diversas linhagens celulares a partir do ensaio de viabilidade com MTT realizado em 48 h. ....	107
TABELA 4.10 – Comparação dos valores de IC <sub>50</sub> dos padrões de ácido gálico e metil galato com os dos fármacos cisplatina e doxorrubicina obtidos a partir do ensaio de viabilidade com MTT realizado em 48 h. ....	108
TABELA 4.11 – Comparação dos valores de IC <sub>50</sub> dos extratos-teste e otimizados a partir do ensaio de viabilidade com MTT realizado em 48 h, obtidos com as técnicas de extrações assistida por homogeneização (EAH) e por micro-ondas (EAM). ....	109
TABELA 4.12 – Comparação dos valores de IC <sub>50</sub> dos extratos otimizados EAH 1 e EAM 7 com os dos fármacos cisplatina e doxorrubicina obtidos no ensaio de viabilidade celular com MTT realizado em 48 h. ....	112
TABELA 4.13 – Comparação das concentrações de ácido gálico e metil galato nos extratos otimizados a partir de seus valores de IC <sub>50</sub> com os valores de IC <sub>50</sub> dos padrões analíticos, ambos obtidos nos ensaios de viabilidade celular. ....	113

## Lista de figuras

FIGURA 1.1 – Principais compostos bioativos encontrados nos resíduos de manga. ....	5
FIGURA 1.2 – Agentes quimioterápicos comerciais cisplatina e doxorubicina.	9
FIGURA 1.3 – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU). ....	13
FIGURA 1.4 – Amostras de resíduo de manga antes da secagem (A), depois da secagem (B) e depois da moagem e peneiramento (C). ....	27
FIGURA 1.5 – Etapas do processamento dos dados de MS/MS para anotação de metabólitos secundários presentes nos extratos. ....	34
FIGURA 3.1 – Procedimento experimental realizado para a extração assistida por homogeneização. ....	41
FIGURA 3.2 – Procedimento experimental realizado para a extração assistida por micro-ondas. ....	43
FIGURA 3.3 – Procedimento experimental realizado para o ensaio de viabilidade celular (IC <sub>50</sub> ). ....	64
FIGURA 3.4 – Procedimento experimental realizado para o ensaio morfológico. ....	65
FIGURA 3.5 – Procedimento experimental realizado para o ensaio clonogênico. ....	67
FIGURA 4.1 – Distribuição dos íons de $m/z$ 169,0145 e $m/z$ 183,0312 no extrato-teste, suas frações e no branco utilizando o <i>software</i> MSDIAL. ....	74
FIGURA 4.2 – Espectros de íons detectados no extrato-teste EAH e sua fração F2 comparados com espectros <i>in silico</i> utilizando o <i>software</i> MSFINDER, sendo ácido gálico (A), metil galato (B), ácido siríngico (C) e 3-O-galloyl gallic acid methyl ester (D). ....	76

FIGURA 4.3 – Cromatograma BPC referente à separação do extrato obtido pela extração assistida por micro-ondas. ....	79
FIGURA 4.4 – Cromatograma BPC referente à separação do extrato obtido pela extração assistida por homogeneização. ....	79
FIGURA 4.5 – Cromatograma BPC do íon com $m/z$ 169,0141 referente ao ácido gálico gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por homogeneização. ....	80
FIGURA 4.6 – Cromatograma BPC do íon com $m/z$ 183,0925 referente ao metil galato gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por homogeneização. ....	80
FIGURA 4.7 – Espectro de MS/MS do íon de $m/z$ 169,0141 referente ao ácido gálico gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por homogeneização. ....	81
FIGURA 4.8 – Espectro de MS/MS do íon com $m/z$ 183,0925 referente ao metil galato gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por homogeneização. ....	81
FIGURA 4.9 – Aumento da área do pico após fortificação do extrato obtido pela extração assistida por micro-ondas com o padrão analítico de ácido gálico. ....	83
FIGURA 4.10 – Aumento da área do pico após fortificação do extrato obtido pela extração assistida por micro-ondas com o padrão analítico de metil galato. ....	83
FIGURA 4.11 – Espectro de MS/MS do íon com $m/z$ 169,0141 referente ao ácido gálico gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por micro-ondas. ....	84
FIGURA 4.12 – Espectro de MS/MS do íon com $m/z$ 183,0295 referente ao metil galato gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por micro-ondas. ....	85
FIGURA 4.13 – Espectro de massas MS/MS e fragmentação do íon de $m/z$ 169,0141, referente ao ácido gálico. ....	85

FIGURA 4.14 – Espectro de massas MS/MS e fragmentação do íon de $m/z$ 183,0295 referente ao metil galato.....	86
FIGURA 4.15 – Representação gráfica das curvas analíticas com os padrões de ácido gálico e metil galato construídas no solvente.....	87
FIGURA 4.16 – Representação gráfica das curvas analíticas com os padrões de ácido gálico e metil galato construídas na matriz obtida pela extração assistida por homogeneização. ....	87
FIGURA 4.17 – Representação gráfica das curvas analíticas com os padrões de ácido gálico e metil galato construídas na matriz obtida pela extração assistida por micro-ondas. ....	88
FIGURA 4.18 – Efeitos percentuais das três variáveis estudadas na extração assistida por homogeneização de ácido gálico (AG) e metil galato (MG), sendo quantidade de amostra (1), porcentagem de etanol em água (2) e número de extrações (3). ....	93
FIGURA 4.19 – Efeitos absolutos das três variáveis estudadas na extração assistida por homogeneização de ácido gálico (AG) e metil galato (MG), sendo quantidade de amostra (1), porcentagem de etanol em água (2) e número de extrações (3). ....	94
FIGURA 4.20 – Efeitos percentuais das três variáveis estudadas na extração assistida por micro-ondas de ácido gálico (AG) e metil galato (MG), sendo quantidade de amostra (1), porcentagem de etanol em água (2) e temperatura do micro-ondas (3). ....	99
FIGURA 4.21 – Efeitos absolutos das três variáveis estudadas na extração assistida por micro-ondas de ácido gálico (AG) e metil galato (MG), sendo quantidade de amostra (1), porcentagem de etanol em água (2) e temperatura do micro-ondas (3). ....	100
FIGURA 4.22 – Ensaio morfológico com o extrato otimizado EAH 1 na linhagem celular não-tumoral MRC-5. Micrografias obtidas com microscópio CELENA® S (zoom de 10x).....	116

FIGURA 4.23 – Ensaio morfológico com o extrato otimizado EAH 1 na linhagem celular tumoral de pulmão A549. Micrografias obtidas com microscópio CELENA <sup>®</sup> S (zoom de 10x).....	117
FIGURA 4.24 – Ensaio morfológico com o extrato otimizado EAH 1 na linhagem celular tumoral de ovário A2780. Micrografias obtidas com microscópio CELENA <sup>®</sup> S (zoom de 10x).....	118
FIGURA 4.25 – Ensaio morfológico com o extrato otimizado EAH 1 na linhagem celular tumoral de ovário resistente à cisplatina A2780cis. Micrografias obtidas com microscópio CELENA <sup>®</sup> S (zoom de 10x).....	119
FIGURA 4.26 – Ensaio morfológico com o extrato otimizado EAM 7 na linhagem celular não-tumoral MRC-5. Micrografias obtidas com microscópio CELENA <sup>®</sup> S (zoom de 10x).....	121
FIGURA 4.27 – Ensaio morfológico com o extrato EAM 7 na linhagem celular tumoral de pulmão A549. Micrografias obtidas com microscópio CELENA <sup>®</sup> S (zoom de 10x).....	122
FIGURA 4.28 – Ensaio morfológico com o extrato EAM 7 na linhagem celular tumoral de ovário A2780. Micrografias obtidas com microscópio CELENA <sup>®</sup> S (zoom de 10x).....	123
FIGURA 4.29 – Ensaio morfológico com o extrato EAM 7 na linhagem celular tumoral de ovário resistente à cisplatina A2780cis. Micrografias obtidas com microscópio CELENA <sup>®</sup> S (zoom de 10x).....	124
FIGURA 4.30 – Imagens das colônias MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações do extrato otimizado EAH 1. ....	127
FIGURA 4.31 – Distribuição do número de colônias (%) para cada concentração do extrato otimizado EAH 1. Valores de significância: * $p = 0,01$ ** $p = 0,004$ *** $p = 0,0003$ e **** $p < 0,0001$ .....	128
FIGURA 4.32 – Imagens das colônias MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações do extrato otimizado EAH 1. ....	130

FIGURA 4.33 – Distribuição do número de colônias (%) para cada concentração do extrato otimizado EAM 7. Valores de significância: * $p = 0,01$ ** $p = 0,004$ *** $p = 0,0003$ e **** $p < 0,0001$ .....	131
FIGURA 4.34 – Diagrama de Venn comparando a quantidade de entidades químicas detectadas em cada um dos extratos otimizados. ....	135
FIGURA 4.35 – Metabólitos anotados exclusivamente no extrato EAH 1. ....	136
FIGURA 4.36 – Metabólitos anotados exclusivamente no extrato EAM 7. ....	136

## Resumo

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VERDES E SUSTENTÁVEIS PARA A OBTENÇÃO DE AGENTES QUIMIOTERÁPICOS A PARTIR DE RESÍDUOS DE PROCESSAMENTO DE MANGA (*Mangifera indica* L.). A produção agroindustrial brasileira gera quantidades alarmantes de resíduos. Nos últimos anos, o cultivo de manga cresceu significativamente e o estado de São Paulo está entre os maiores produtores, descartando anualmente toneladas de resíduos. Estes são ricos em compostos bioativos de alto valor agregado e estudos têm investigado seu potencial antitumoral devido à presença de metabólitos secundários. Considerando a projeção de aumento nos casos de câncer, explorar resíduos de manga como fonte de novos fármacos é uma abordagem promissora. Deve-se adotar práticas alinhadas ao desenvolvimento sustentável, com destaque para o uso de métodos baseados na Química Verde e Sustentável, promovendo a criação de produtos e processos que previnem a geração e o uso de substâncias prejudiciais ao ambiente. Conceitos como biorrefinaria e economia circular são aplicáveis nesse contexto, utilizando biomassa como matéria-prima para se obter novos produtos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver métodos analíticos verdes e sustentáveis para a obtenção de um agente quimioterápico por meio da extração de metabólitos secundários em resíduos de manga. Ensaio bioguiados em linhagens tumorais combinados às análises espectrométricas, utilizando extratos-teste e suas frações, permitiram definir os analitos de interesse: ácido gálico e metil galato. Utilizando técnicas quimiométricas, dois métodos de extração foram avaliados e otimizados: por homogeneização e por micro-ondas, usando apenas solventes verdes, como água e etanol, e considerando a influência das variáveis envolvidas. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os analitos foram quantificados com base em curvas analíticas, apresentando seletividade, linearidade ( $R^2 > 0,999$ ), limites de detecção e quantificação adequados à faixa linear de trabalho, além de precisão

(< 2%), exatidão (> 96%) e recuperação (> 94%). Dentre as variáveis avaliadas, a composição de etanol (40% v.v<sup>-1</sup>) em água e o número de extrações (1×) foram as mais relevantes para o extrato otimizado obtido por homogeneização. Para o extrato otimizado obtido por micro-ondas, destacaram-se a composição de etanol (80% v.v<sup>-1</sup>) em água e a temperatura (70°C). As propriedades antitumorais dos extratos-teste, extratos otimizados e padrões de ácido gálico e metil galato foram avaliadas em linhagens tumorais de pulmão e ovário e em células não tumorais de pulmão. Os extratos otimizados apresentaram valores de IC<sub>50</sub> menores em comparação aos extratos-teste e demonstraram maior seletividade para células tumorais. O extrato otimizado obtido por micro-ondas foi o mais promissor, com valores de IC<sub>50</sub> de 6,09 e 0,21 µg.mL<sup>-1</sup> para células tumorais de pulmão e ovário, respectivamente. Os extratos otimizados apresentaram valores de IC<sub>50</sub> próximos aos dos fármacos cisplatina e doxorrubicina, com seletividade para as células tumorais significativamente superior. A comparação entre os extratos e os padrões analíticos revelou uma forte interação sinérgica entre os compostos da matriz. Ensaio morfológicos e clonogênicos demonstraram que os extratos otimizados possuem perfil citostático e citotóxico, indicando morte celular. Os resultados evidenciam o potencial de reaproveitamento de resíduos de manga para a obtenção de agentes antitumorais utilizando metodologias analíticas verdes.

## Abstract

DEVELOPMENT OF GREEN AND SUSTAINABLE METHODS FOR OBTAINING CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS FROM MANGO (*Mangifera indica* L.) PROCESSING WASTE. Brazilian agro-industrial production generates alarming amounts of waste. In recent years, mango production has grown significantly, with the state of São Paulo among the largest producers, discarding tons of waste annually. These residues are rich in high-value bioactive compounds, and studies have investigated their antitumor potential due to the presence of secondary metabolites. Given the projected increase in cancer cases, exploring mango waste as a source of new anticancer drugs is a promising approach. Practices aligned with sustainable development should be adopted, with emphasis on using Green and Sustainable Chemistry principles, promoting the creation of products and processes that prevent the generation and use of environmentally harmful substances. Concepts such as biorefinery and circular economy are applicable in this context, utilizing biomass as a raw material to obtain new products. This study aimed to develop green and sustainable analytical methods for obtaining a chemotherapeutic agent through the extraction of secondary metabolites from mango waste. Bioassay-guided experiments on tumor cell lines, combined with spectrometric analyses using test extracts and their fractions, allowed the annotation of the target analytes: gallic acid and methyl gallate. Using chemometric techniques, two extraction methods were evaluated and optimized: homogenization-assisted extraction and microwave-assisted extraction, employing only green solvents such as water and ethanol, and considering the influence of the variables in the extraction. The extracts were analyzed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The analytes were quantified based on analytical curves, demonstrating selectivity, linearity ( $R^2 > 0.999$ ), detection and quantification limits suitable for the linear range, as well as precision ( $< 2\%$ ), accuracy ( $> 96\%$ ), and recovery ( $> 94\%$ ). Among the

evaluated variables, ethanol composition (40% v.v<sup>-1</sup>) in water and the number of extractions (1×) were the most relevant for the optimized extract obtained by homogenization. For the optimized extract obtained by microwave-assisted extraction, ethanol composition (80% v.v<sup>-1</sup>) in water and temperature (70°C) were the most critical factors. The antitumor properties of test extracts, optimized extracts, and analytical standards of gallic acid and methyl gallate were evaluated in lung and ovarian cancer cell lines, as well as in non-tumor lung cells. The optimized extracts presented lower IC<sub>50</sub> values compared to the test extracts, demonstrating greater selectivity for tumor cells. The optimized extract obtained by microwave-assisted extraction was the most promising, with IC<sub>50</sub> values of 6.09 and 0.21 µg.mL<sup>-1</sup> for lung and ovarian tumor cells, respectively. The optimized extracts showed IC<sub>50</sub> values comparable to the drugs cisplatin and doxorubicin, with significantly higher selectivity for tumor cells. A comparison between the extracts and analytical standards revealed a strong synergistic interaction among the matrix compounds. Morphological and clonogenic assays demonstrated that the optimized extracts exhibit cytostatic and cytotoxic profiles, indicating cell death. The results highlight the potential for reusing mango waste to obtain antitumor agents using green analytical methodologies.

## Sumário

1 – Introdução.....	1
1.1 – A cadeia de alimentos no Brasil e o impacto dos resíduos gerados .....	1
1.2 – Resíduos do processamento de manga: valorização e reaproveitamento	3
1.3 – O câncer e o papel dos produtos naturais na busca por quimioterápicos	7
1.4 – Química Verde, Química Analítica Verde e Química Sustentável.....	11
1.4.1 – Desenvolvimento e otimização de métodos verdes e sustentáveis .....	15
1.4.1.1 – Extração Assistida por Homogeneização (EAH).....	16
1.4.1.2 – Extração Assistida por Micro-ondas (EAM) .....	17
1.4.1.3 – Quimiometria e espectrometria.....	18
2 – Objetivos .....	21
2.1 – Geral .....	21
2.2 – Específicos.....	21
3 – Metodologia.....	23
3.1 – Materiais e equipamentos.....	23
3.1.1 – Condicionamento da amostra.....	23
3.1.2 – Extrações assistidas por homogeneização e por micro-ondas .....	23
3.1.3 – Análises cromatográficas e espectrométricas .....	24
3.1.4 – Ensaio biológico.....	24
3.2 – Condicionamento da amostra.....	26
3.3 – Definição dos analitos de interesse: extrações e análises iniciais.....	27
3.3.1 – Extrações-teste .....	28
3.3.1.1 – Extração assistida por homogeneização.....	28

3.3.1.2 – Extração assistida por micro-ondas.....	29
3.3.2 – Fracionamento .....	29
3.3.3 – Ensaio bioguiado .....	31
3.3.4 – Triagem dos analitos por espectrometria de massas .....	32
3.4 – Planejamento experimental .....	35
3.4.1 – Planejamento fatorial completo para a extração assistida por homogeneização .....	35
3.4.2 – Planejamento fatorial completo para a extração assistida por micro- ondas.....	37
3.5 – Extrações .....	39
3.5.1 – Extração assistida por homogeneização.....	39
3.5.2 – Extração assistida por micro-ondas.....	41
3.6 – Análises quimiométricas: definição dos extratos otimizados .....	43
3.6.1 – Efeito das variáveis .....	44
3.6.2 – Função desejabilidade .....	45
3.7 – Análises cromatográficas e espectrométricas otimizadas .....	46
3.8 – Curvas de calibração e validação do método analítico .....	49
3.8.1 – Seletividade e especificidade .....	50
3.8.2 – Linearidade.....	52
3.8.3 – Limites de detecção e quantificação .....	52
3.8.4 – Efeito de matriz .....	53
3.8.5 – Recuperação .....	54
3.8.6 – Precisão e exatidão .....	55
3.9 – Comparação dos metabólitos presentes nos extratos otimizados .....	57

3.10 – Ensaio biológicos.....	61
3.10.1 – Ensaio de viabilidade celular (IC <sub>50</sub> ) .....	62
3.10.2 – Ensaio morfológico .....	64
3.10.3 – Ensaio clonogênico .....	65
4 – Resultados e discussão .....	69
4.1 – Definição dos analitos de interesse: extrações e análises iniciais.....	69
4.1.1 – Extrações-teste .....	69
4.1.2 – Fracionamento .....	70
4.1.3 – Ensaio bioguiado.....	71
4.1.4 – Triagem dos analitos por espectrometria de massas .....	73
4.2 – Análises cromatográficas e espectrométricas otimizadas, curvas de calibração e validação do método analítico .....	77
4.2.1 – Seletividade e especificidade .....	82
4.2.2 – Linearidade e limites de detecção e quantificação.....	86
4.2.3 – Efeito de matriz .....	89
4.2.4 – Recuperação .....	90
4.2.5 – Precisão e exatidão .....	90
4.3 – Extrações e análises quimiométricas.....	91
4.3.1 – Extração assistida por homogeneização (EAH).....	92
4.3.2 – Extração assistida por micro-ondas (EAM).....	97
4.3.3 – Função desejabilidade: definição dos extratos otimizados .....	103
4.4 – Ensaio biológicos.....	105
4.4.1 – Ensaio de viabilidade celular (IC <sub>50</sub> ) .....	106
4.4.1.1 – Concentração dos analitos nos extratos otimizados.....	113

4.4.2 – Ensaio morfológico .....	115
4.4.3 – Ensaio clonogênico .....	126
4.5 – Comparação dos metabólitos presentes nos extratos otimizados .....	133
5 – Conclusões.....	141
6 – Referências bibliográficas .....	145
Apêndice A .....	173
Apêndice B .....	175

## **1 – Introdução**

Esta seção apresenta uma revisão teórica sobre os principais temas deste estudo, abordando: um panorama da cadeia de alimentos no Brasil e os impactos ambientais gerados pelos resíduos desse processo, com ênfase na produção de manga no estado de São Paulo; o potencial de valorização desses resíduos devido à presença de compostos bioativos, tornando-os uma matéria-prima promissora para a obtenção de produtos de interesse em diversas indústrias, como a farmacêutica; o desenvolvimento de novos quimioterápicos e o panorama do câncer no Brasil e no mundo; e os princípios da Química Verde e Sustentável, aliados às estratégias de biorrefinaria e economia circular, com foco no desenvolvimento de métodos analíticos para extração e identificação de substâncias, otimizados pelo uso de ferramentas estatísticas e técnicas espectrométricas.

### **1.1 – A cadeia de alimentos no Brasil e o impacto dos resíduos gerados**

A cadeia de alimentos no Brasil desempenha um papel central na economia do país, representando uma parcela significativa do Produto Interno Bruto (PIB). A agroindústria contribui com 22% do PIB – sendo a agricultura responsável pela maior parte dessa fatia – enquanto a indústria de processamento de alimentos e bebidas responde por 10,8%<sup>1</sup>. Dessa forma, a produção de alimentos se consolida como a principal atividade econômica e a maior indústria nacional, evidenciando sua relevância no país. Apenas em 2024, o setor produziu 283 milhões de toneladas de alimentos e bebidas, processando 62% de toda a produção agrícola nacional e 68% da agricultura familiar. A estrutura do setor é composta por aproximadamente 41 mil empresas, das quais 94% são micro, pequenas e médias – as quais geram, no total, mais de 10 milhões de empregos formais e informais<sup>2</sup>.

É inegável a contribuição do setor de alimentos para o crescimento econômico do país. No entanto, a robustez dessa cadeia produtiva também gera desafios ambientais significativos, especialmente no que se refere à geração de resíduos. Grandes quantidades de subprodutos são descartadas ao longo de todas as etapas produtivas, desde a produção agrícola até o processamento industrial, impactando o meio ambiente e exigindo investimentos substanciais em gestão de resíduos. Embora não se tenham dados concretos contabilizando a quantidade de resíduos gerados pela cadeia de alimentos especificamente no Brasil, pode-se ter uma ideia ao analisar essa tendência global. O desperdício de alimentos no mundo resulta, anualmente, no descarte de mais de US\$ 1 trilhão em produtos alimentícios<sup>3</sup>. Na fase de produção agrícola, 35% dos resíduos são gerados, seja por perdas no cultivo, colheita ou transporte de alimentos. Já no processamento industrial, o percentual de resíduos gerados é ainda maior, chegando a 40%<sup>4</sup>.

Além dos custos relacionados ao manejo e destinação dos resíduos, há também impactos diretos nas mudanças climáticas. A decomposição de matéria orgânica proveniente de resíduos agroindustriais, gerados tanto por perdas quanto por desperdícios, libera quantidades alarmantes de gases de efeito estufa (GEE), como metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), correspondendo de 8 a 10% das emissões globais<sup>3</sup>. Ademais, vale ressaltar que a atividade agrícola ocupa cerca de 30% das terras cultiváveis do planeta, e a conversão de ecossistemas naturais para a expansão da produção agrícola continua a se intensificar, configurando-se como a principal causa da perda de habitats<sup>3</sup>. No Brasil, esse processo é particularmente significativo, uma vez que a maior parcela das emissões GEE do país decorre das mudanças no uso do solo, sobretudo do desmatamento para a criação de novas áreas agrícolas<sup>5</sup>. Esse fenômeno não apenas contribui para o aquecimento global, mas também influencia diretamente a frequência e a intensidade de eventos climáticos extremos, que se tornam cada vez mais recorrentes.

Paralelamente, o desperdício de alimentos também agrava questões sociais, pois cerca de 783 milhões de pessoas enfrentam a fome anualmente no mundo<sup>3</sup>, apesar do descarte em larga escala. Dessa forma, a adoção de soluções tecnológicas integradas voltadas à redução do desperdício e à valorização de resíduos no setor alimentício é fundamental para mitigar os impactos ambientais, econômicos e sociais decorrentes da geração de resíduos e suas múltiplas formas de poluição, sendo uma estratégia particularmente relevante para um país agrícola como o Brasil.

## **1.2 – Resíduos do processamento de manga: valorização e reaproveitamento**

A produção agrícola brasileira se destaca tanto pela diversidade quanto pelo alto volume, especialmente no cultivo de grãos e frutas tropicais. As frutas provenientes de plantas tropicais possuem grande importância econômica, atendendo tanto ao mercado interno quanto ao setor de exportação, com destaque para gêneros como citrus, banana, tomate, abacaxi e manga<sup>6</sup>. Nesse cenário, a manga (*Mangifera indica L.*) assume um papel de destaque, figurando entre as frutas tropicais de maior produção no Brasil. O crescimento da cultura de manga tem sido significativo, com um aumento acelerado a partir de 2022, refletido no valor da produção registrado em diferentes estados brasileiros. Apenas em 2023, o Brasil produziu mais de 200 mil toneladas de manga. Dentre os estados brasileiros com maior produção, São Paulo vem registrando um crescimento expressivo desde 2021, consolidando-se atualmente entre os quatro maiores produtores do país – tendência que deve se manter nos próximos anos<sup>7</sup>.

No entanto, a produção extensa desse fruto gera desafios ambientais e econômicos relacionados ao desperdício e à gestão de resíduos, como mencionado anteriormente em relação ao impacto da cadeia de alimentos no Brasil e no mundo. Estima-se que, somente em 2023, mais de 30 mil toneladas de resíduos tenham sido geradas durante a produção e o processamento de manga no

país<sup>8</sup>. Mesmo com a implementação de políticas para a redução do desperdício, a geração de quantidades alarmantes de resíduos de difícil eliminação ainda persiste, especialmente nas indústrias de processamento, conhecidos como resíduos inevitáveis. Esses resíduos são compostos por cascas, caroços e sementes, sendo classificados como inevitáveis por sua geração ser inerente ao processamento da manga para a obtenção de diversos produtos, como sucos e doces variados.

O grande volume de resíduos gerados destaca a necessidade de estratégias eficazes para reaproveitamento e destinação sustentável, considerando também que a destinação desses resíduos apresenta grandes desafios devido à elevada concentração de carboidratos e açúcares, o que resulta em altos custos operacionais para as indústrias alimentícias<sup>9</sup>. Assim, o desenvolvimento de soluções voltadas para a valorização de resíduos de origem vegetal torna-se essencial e pode contribuir significativamente para a redução do impacto ambiental da cadeia produtiva da manga e de outros alimentos.

Embora geralmente sejam descartados, esses resíduos possuem um alto valor agregado devido à riqueza em compostos bioativos, com enorme potencial para reaproveitamento. Isso se deve à presença de metabólitos secundários, compostos químicos orgânicos de baixo peso molecular que apresentam atividade biológica e são sintetizados pelas plantas, desempenhando funções essenciais em seus mecanismos de defesa contra organismos diversos – como para sua proteção contra herbívoros, insetos, fungos, bactérias, algas, nematoides e patógenos, além de contribuírem para o aroma, sabor e cor das espécies vegetais<sup>10</sup>. Por atuarem diretamente no mecanismo de defesa das plantas, esses compostos apresentam diversas propriedades biológicas também benéficas para a saúde humana, sendo de interesse de várias indústrias, incluindo farmacêutica, nutracêutica e agrícola. Dentre os principais grupos de metabólitos secundários presentes em frutas tropicais, destacam-se os compostos fenólicos – com ênfase para os flavonoides, xantonas, cumarinas e ácidos fenólicos –

amplamente estudados por suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antiviral, antifúngica, antitumoral, entre muitas outras<sup>11-14</sup>.

A manga, em particular, tem sido amplamente estudada como fonte de metabólitos secundários, tanto em sua polpa quanto em seus resíduos, evidenciando seu potencial para aplicações farmacológicas diversas<sup>15-18</sup>. Seus resíduos apresentam uma composição rica em compostos fenólicos, como quercetina, mangiferina, hesperidina, catequina, ácido gálico e metil galato<sup>19,20</sup> (FIGURA 1.1), reforçando o potencial de reaproveitamento para a obtenção de produtos bioativos.

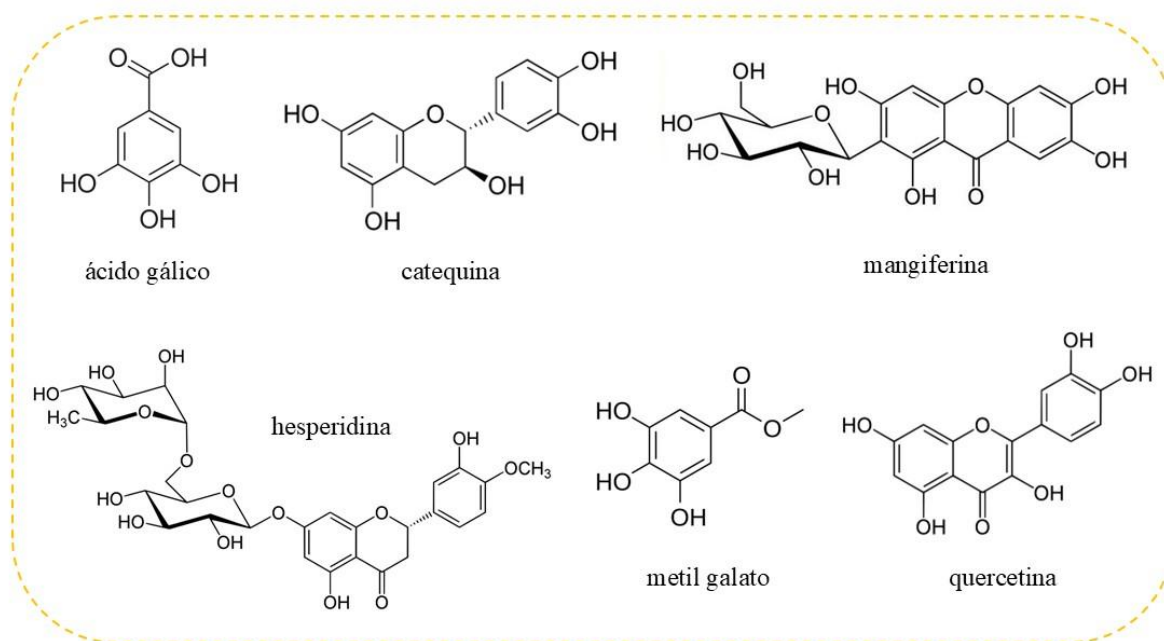


FIGURA 1.1 – Principais compostos bioativos encontrados nos resíduos de manga.

De maneira geral, os resíduos vegetais são frequentemente empregados em aplicações de baixo valor agregado e com limitado controle técnico, como alimentação animal, geração de energia e compostagem. Embora essas sejam estratégias válidas para o reaproveitamento desses materiais, elas não exploram integralmente o potencial químico presente nos resíduos. As principais

frações dos resíduos da manga podem ser convertidas em produtos de alto valor agregado, consolidando-se como uma estratégia promissora dentro do conceito de biorrefinaria. Por meio dessa plataforma, é possível obter compostos funcionais, como celulose, amido e pectina, além de extrair compostos bioativos específicos ou obter extratos otimizados com diversos compostos, promovendo o aproveitamento integral das diferentes frações da manga<sup>21</sup>. Estudos atuais têm se dedicado, ainda, à avaliação dos aspectos econômicos relacionados à implementação de biorrefinarias de manga, visando estabelecer parâmetros que possibilitem o máximo aproveitamento de seus resíduos, tornando o processo economicamente viável e sustentável<sup>22,23</sup>.

Um dos aspectos mais promissores do reaproveitamento dos resíduos da manga tem sido sua atividade antitumoral. Pesquisas recentes têm explorado o potencial da polpa e, especialmente, dos resíduos dessa fruta devido à alta concentração de metabólitos secundários, com destaque para os compostos fenólicos<sup>19,20</sup>. O mecanismo de ação desses compostos vai além da modulação do estresse oxidativo, pois também atuam em outras estratégias quimiopreventivas ao influenciarem os processos que são desregulados durante o desenvolvimento do câncer, interagindo com diferentes alvos celulares. Dentre estas estratégias, pode-se destacar: inativação de radicais de oxigênio; ligação de eletrófilos; indução de enzimas protetoras; aumento da taxa de morte celular; inibições da proliferação celular, da peroxidação lipídica, da angiogênese e da oxidação de DNA; inativação de carcinógenos; parada do ciclo celular e reversão da resistência à múltiplas drogas<sup>24,25</sup>.

Assim, os resíduos da manga despontam como uma fonte natural promissora de compostos bioativos com potencial aplicação como agentes quimioterápicos, ao mesmo tempo em que agregam valor aos subprodutos inevitáveis da cadeia produtiva e promovem a sustentabilidade nos setores agrícola e de processamento de alimentos.

### **1.3 – O câncer e o papel dos produtos naturais na busca por quimioterápicos**

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo, sendo uma das principais causas de morte – na maioria dos países, corresponde à primeira ou à segunda posição entre as causas de morte antes dos 70 anos<sup>26</sup>. Dentre os tipos de câncer mais incidentes globalmente, destacam-se os relacionados ao pulmão, mama, colorretal, próstata e estômago, nessa ordem. A estimativa mundial aponta o câncer de pulmão como líder no índice de mortalidade<sup>27</sup>. No Brasil, o cenário não é diferente. De acordo com as estimativas mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Instituto Nacional de Câncer (INCA) de 2023-2025, o câncer de próstata e de mama ocupam e tendem a se manter nas primeiras posições em incidência em homens e mulheres, respectivamente, em todas as regiões brasileiras, o câncer de pulmão ocupa a quarta posição, enquanto o câncer de ovário está na décima nona posição em número de casos novos. Embora não seja o mais predominante no Brasil, o câncer de pulmão também ocupa a primeira posição em mortalidade no país<sup>26,27</sup>.

O câncer refere-se a um conjunto de patologias caracterizadas pela proliferação celular desregulada e pela falha nos mecanismos que regulam a morte celular, gerando um acúmulo de células alteradas, caracterizado pelo tumor. O processo de desenvolvimento tumoral, denominado carcinogênese ou oncogênese, é progressivo e multifatorial. Esse processo se inicia com células normais sendo expostas a agentes carcinogênicos, os quais promovem alterações genéticas responsáveis pela transformação celular, gerando células mutadas, e subsequente proliferação desregulada e irreversível<sup>28</sup>. Diversos fatores podem atuar como promotores da carcinogênese – influenciando o crescimento da incidência e da mortalidade pela doença – incluindo predisposição hereditária, mudança de comportamento e do ambiente, incluindo mudanças estruturais que afetam a dieta e aumentam a exposição a poluentes ambientais<sup>26</sup>.

O tratamento do câncer abrange uma ampla gama de abordagens terapêuticas, sendo as mais empregadas na prática clínica a cirurgia, radioterapia e a quimioterapia. Com destaque, a quimioterapia baseia-se na administração oral ou intravenosa de fármacos, produtos químicos, permitindo sua distribuição sistêmica por meio da circulação sanguínea, com o objetivo de eliminar ou inibir o crescimento e a disseminação das células tumorais. A escolha do protocolo terapêutico depende das características específicas de cada paciente, podendo envolver a aplicação isolada de uma única modalidade ou a combinação estratégica de diferentes abordagens para potencializar a eficácia do tratamento<sup>29</sup>.

Dentre os principais agentes utilizados na quimioterapia, destacam-se os metalofármacos, como a cisplatina, e as moléculas derivadas de plantas e microrganismos, como a doxorrubicina (FIGURA 1.2). A descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina e sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do câncer estimularam o avanço na pesquisa de metalofármacos<sup>30</sup> como potenciais agentes quimioterápicos, incluindo a carboplatina e oxiplatina. A cisplatina – um dos fármacos mais utilizado globalmente –, possui um amplo espectro de ação contra diversos tumores, incluindo câncer de pulmão, ovário, mama, testículo, bexiga, colorretal, cabeça e pescoço<sup>31</sup>. Apesar da sua eficácia na remissão desses tumores, sua ação está associada à resistência e efeitos colaterais severos devido à baixa especificidade em células tumorais, afetando também células saudáveis. Muitos ganham resistência durante o tratamento com cisplatina devido à baixa absorção do fármaco, desvio ou reparo de danos causados pela cisplatina, entre outros. Os efeitos colaterais gerados afetam as funções renais, gastrointestinais e neuronais, limitando significativamente a dose permitida para alguns pacientes<sup>31</sup>. Embora a carboplatina e a oxiplatina tenham sido desenvolvidas visando reduzir os efeitos colaterais da cisplatina, esses ainda permanecem significativos<sup>32</sup>. Por isso, a busca por novos agentes quimioterápicos mais eficazes e com menor toxicidade continua sendo uma necessidade urgente.

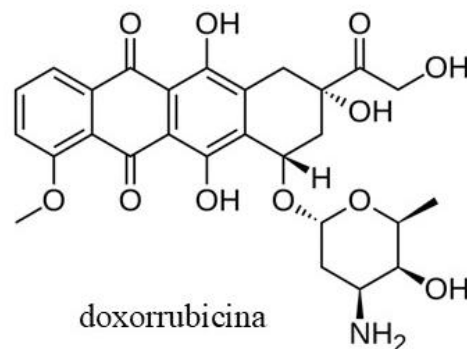
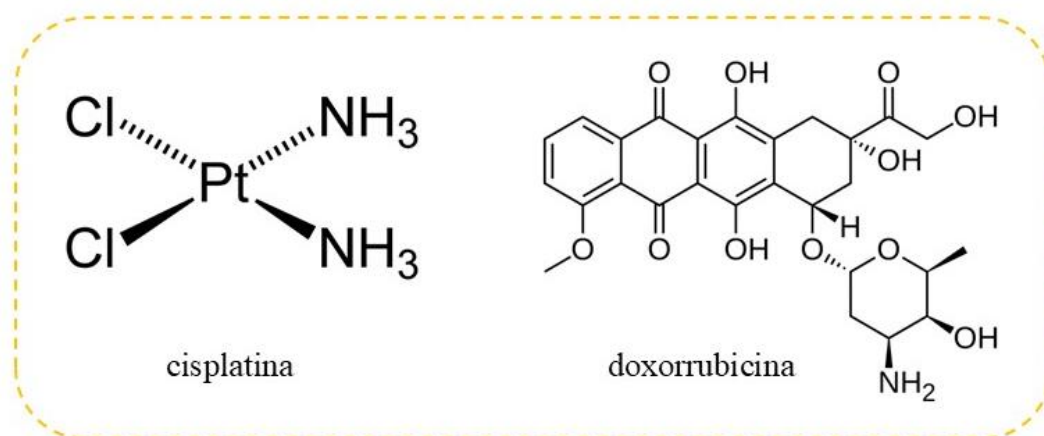


FIGURA 1.2 – Agentes quimioterápicos comerciais cisplatina e doxorubicina.

Antes mesmo do avanço dos estudos sobre metalofármacos com ação antitumoral, a pesquisa de novas moléculas para o tratamento do câncer sempre esteve concentrada em compostos orgânicos derivados de plantas e microrganismos. Isso se deve à vasta diversidade química encontrada na natureza, que torna os produtos naturais uma valiosa fonte de compostos bioativos com potencial terapêutico. Nas últimas décadas, esforços significativos foram dedicados à descoberta de novas moléculas baseadas em produtos naturais. Entre 1981 e 2019, por exemplo, 65% dos fármacos aprovados para o tratamento do câncer tinham origem em produtos naturais. Em 2016, 75% das 175 moléculas com potencial quimioterápico aprovadas pela FDA eram derivadas desses recursos<sup>33</sup>.

Entre os exemplos mais notáveis estão camptotecina, paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), irinotecano, etoposídeo e vincristina, obtidos a partir de plantas; bleomicina, derivada de organismos marinhos; além da mitomicina e doxorubicina, extraídas de bactérias<sup>34</sup>. A doxorubicina, por exemplo, pertencente à classe de medicamentos quimioterápicos conhecidos como antraciclinas, foi descoberta na década de 1970 a partir da bactéria do gênero *Streptomyces peucetius var. caesius* e, desde então, vem sendo usada para tratar uma variedade de cânceres em pacientes adultos e pediátricos, incluindo câncer

de ovário, sarcomas de tecidos moles e ósseos, leucemia, linfoma, entre outros<sup>35</sup>. Seus efeitos colaterais incluem problemas cardíacos recorrentes e baixas contagens de células sanguíneas<sup>36</sup>. Portanto, novas formulações com a doxorrubicina estão sendo amplamente estudadas, bem como a terapia combinada com outros agentes anticancerígenos, a qual demonstrou efeitos sinérgicos e melhores resultados de tratamento em relação ao convencional.

O cenário da utilização de produtos naturais se expande para o tratamento de outras doenças, elencando-os como a principal fonte de descoberta de novos medicamentos, tendo sua importância refletida nos sistemas de saúde ao redor do mundo. De acordo com a OMS, cerca de 80% da população mundial depende de medicamentos à base de plantas como principal cuidado de saúde<sup>37</sup>, evidenciando a relevância desses compostos no tratamento de diferentes enfermidades. O Brasil se destaca nesse cenário devido à sua enorme biodiversidade, que está entre as maiores do mundo, sendo um dos países que mais publica artigos científicos sobre plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos<sup>38</sup>. Apesar disso, o desenvolvimento de fármacos a partir de fontes naturais continua sendo um grande desafio no Brasil e no mundo devido à falta de procedimentos de padronização, dificuldades no isolamento de compostos em larga escala, na compreensão dos mecanismos biológicos de ação e nas longas etapas do desenvolvimento farmacêutico, incluindo ensaios clínicos controlados padronizados<sup>39</sup>.

É importante destacar que a busca por novos candidatos a fármacos a partir de produtos naturais é frequentemente dificultada pela complexidade das misturas moleculares envolvidas. A atividade terapêutica de extratos vegetais geralmente resulta da interação sinérgica e simultânea de diversos compostos químicos. Considerando a natureza complexa de várias doenças, incluindo o câncer e enfermidades degenerativas, é notável que a abordagem tradicional baseada na identificação de um único composto ativo muitas vezes não é suficiente para proporcionar curas eficazes. Dessa forma, destaca-se que a

descoberta de novos fármacos a partir de plantas deve adotar uma abordagem combinatória, levando em conta a ação conjunta dos diferentes constituintes bioativos. O avanço de tecnologias emergentes no campo da química com técnicas avançadas de perfil molecular, associadas à biologia computacional, *big data* e inteligência artificial, por exemplo, amplia as possibilidades para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes<sup>39</sup>.

Em relação ao câncer, considerando a projeção de aumento nos casos superior a 70% até 2050<sup>40</sup>, a busca por novos agentes quimioterápicos mais efetivos é urgente. Nesse contexto, com destaque aos produtos naturais, o reaproveitamento de resíduos de manga como fonte de moléculas bioativas surge como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, considerando a riqueza de toda a matriz vegetal e não apenas de compostos isolados. A partir disso, com o desenvolvimento de tecnologias inovadoras e sustentáveis – incluindo metodologias analíticas para a identificação de metabólitos e para o controle de qualidade de extratos bioativos – superar os desafios colocados torna-se cada vez mais viável, abrindo caminho para tratamentos mais seletivos e eficazes de diversos tipos de câncer.

#### **1.4 – Química Verde, Química Analítica Verde e Química Sustentável**

O desenvolvimento de novos produtos químicos deve seguir práticas sustentáveis para garantir sua viabilidade a longo prazo, tanto ambiental quanto economicamente. Por isso, é essencial que pesquisas na área adotem abordagens sustentáveis em todas as etapas desse processo. No contexto deste estudo, essas diretrizes orientaram todo o projeto, com base nos conceitos e princípios da Química Verde, Química Analítica Verde e Química Sustentável.

A Química Verde (QV) é uma filosofia, e tem se tornado uma prática, dentro das ciências que visa potencializar avanços a partir da transformação nos produtos e processos analíticos e da indústria através da mudança de seus

*designs*<sup>41</sup>. Fundamentada em 12 princípios estabelecidos por Anastas e Warner na década de 1990, utilizados amplamente nos dias de hoje, essa abordagem prioriza a prevenção da geração de resíduos, sendo mais vantajoso evitar sua formação do que tratar depois de produzidos, e a substituição de substâncias nocivas ao meio ambiente e à saúde humana por alternativas sustentáveis<sup>42</sup>.

A aplicação desses princípios busca minimizar impactos através de estratégias como a redução do consumo de energia, a eliminação ou substituição de solventes tóxicos e substâncias auxiliares, o desenvolvimento de produtos seguros e biocompatíveis, priorizando matéria-prima renovável, além de metodologias inovadoras, como rotas sintéticas mais limpas, incluindo o uso de catalisadores<sup>42</sup>. Ao adotar uma postura preventiva em vez de corretiva, a QV se estabelece como um pilar essencial para a sustentabilidade nas pesquisas e indústrias químicas, promovendo práticas que aliam inovação tecnológica e responsabilidade ambiental.

A Química Analítica, alinhada aos princípios da QV, culminou na Química Analítica Verde (QAV), surgindo nos anos 2000 com o objetivo de tornar as práticas laboratoriais mais sustentáveis. Essa abordagem busca reduzir o impacto ambiental das análises químicas por meio do desenvolvimento de instrumentação e metodologias mais eficientes. Seus 12 princípios devem ser considerados tanto quanto possível desde o preparo da amostra até a identificação e caracterização dos compostos em estudo<sup>43</sup>, promovendo a integração de processos para otimizar o uso de energia e minimizar o consumo de reagentes, quantidade de amostras, resíduos e riscos. Como exemplo, está a aplicação de técnicas diretas para evitar etapas desnecessárias de tratamento de amostras, a redução do tamanho e número de análises e a adoção de métodos automatizados e miniaturizados. Além disso, incentiva o uso de reagentes provenientes de fontes renováveis, a eliminação ou substituição de substâncias tóxicas e a implementação de métodos multianalíticos, que possibilitam a análise simultânea de diferentes compostos<sup>43</sup>. Assim, a QAV se estabelece como um campo fundamental para o

avanço da Química Analítica, equilibrando a busca por resultados precisos com a necessidade de práticas mais seguras e sustentáveis.

A Química Sustentável (QS), por sua vez, adota uma abordagem holística ao considerar não apenas os produtos químicos em si, mas também seu ciclo de vida, os serviços associados, os modelos de negócio e os impactos socioeconômicos envolvidos<sup>44</sup>. Seu propósito é minimizar os danos ambientais e sociais decorrentes das atividades humanas, alinhando-se diretamente aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) elencados pela Organização das Nações Unidas (ONU) (FIGURA 1.2) – que através de 17 objetivos, busca definir metas a serem alcançadas para minimizar os impactos das atividades humanas no meio ambiente, concretizadas na Agenda 2030.



FIGURA 1.3 – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU)<sup>45</sup>.

Ao avaliar o ciclo de vida dos produtos químicos de forma abrangente, considerando fluxos globais de materiais dos diferentes setores industriais, essa abordagem permite atuar em todos os ODS, incluindo aqueles que parecem mais distantes, como os voltados para a erradicação da pobreza

(ODS 1), igualdade de gênero (ODS 5) e redução das desigualdades (ODS 10). Assim, o desenvolvimento de novos produtos, processos e serviços químicos deve considerar não apenas sua eficiência e viabilidade econômica, mas também seu impacto ambiental e social.

Enquanto a QV e a QAV concentram-se na redução do impacto ambiental dentro de indústrias e laboratórios de pesquisa, a QS expande seu alcance para abranger todas as etapas do processo químico. Isso inclui desde a seleção das matérias-primas até o descarte ou reaproveitamento dos produtos finais<sup>44</sup>, considerando não apenas os processos envolvidos, mas também a finalidade dos produtos e seu impacto na sociedade. Dessa maneira, a QS incorpora aspectos sociais e econômicos da química, buscando promover um desenvolvimento sustentável que garanta qualidade de vida tanto para as gerações presentes quanto para as futuras<sup>46</sup>.

Essas vertentes da Química ganharam destaque na sociedade em geral com os avanços nas discussões relacionadas aos movimentos *zero waste* e, mais atualmente, ao modelo de economia circular. A ideia de circularidade implica na reintrodução daquilo que é considerado resíduo à cadeia de produção, a fim de minimizar a geração dos mesmos e reduzir a exploração de recursos naturais para a obtenção de novos materiais<sup>47</sup>. Quando esse modelo é associado ao uso de recursos biológicos, como biomassa, surge o conceito de biorrefinaria<sup>48</sup>. A biomassa passa a ser utilizada como matéria-prima para geração de diferentes produtos com alto valor agregado atendendo às demandas da indústria química, de materiais e de combustíveis<sup>49</sup>.

Logo, ao utilizar biomassa residual, como aquela proveniente da agroindústria e do processamento de alimentos, é possível integrar o conceito de biorrefinaria a uma abordagem circular. Na prática, essa combinação requer uma reestruturação das relações de consumo e das linhas de produção, que, nesse modelo, deixam de ser lineares para se tornarem círculos produtivos<sup>47</sup>. Nesse contexto, os resíduos agroindustriais de manga podem muito bem atender aos

conceitos de biorrefinaria e circularidade, podendo ser convertidos em matéria-prima para a obtenção de novos produtos, como os quimioterápicos. Essa aplicação reflete os fundamentos da QS e se alinha aos princípios da QV e da QAV, uma vez que adota metodologias verdes e sustentáveis em todas as etapas do processo.

### **1.4.1 – Desenvolvimento e otimização de métodos verdes e sustentáveis**

Sob a ótica da sustentabilidade, tão importante quanto obter moléculas bioativas para o tratamento de doenças complexas como o câncer são as formas de conduzir o estudo e os impactos que ele gera nos ambientes físico e social. Para evitar tais impactos, é essencial aplicar, tanto quanto possível, as abordagens verdes e sustentáveis mencionadas anteriormente em todas as etapas do estudo. Esse objetivo pode ser alcançado por meio do desenvolvimento e da otimização de métodos analíticos – desde o preparo da amostra até as etapas de caracterização.

A adoção de métodos analíticos verdes envolve, sobretudo, a redução do consumo energético por meio de técnicas mais rápidas e eficientes, a minimização do uso de reagentes por meio de análises em escala analítica e multivariadas, a consequente diminuição da geração de resíduos e a substituição de solventes convencionais por alternativas ambientalmente amigáveis. Nesse contexto, diretrizes como as estabelecidas no *GSK Solvent Sustainability Guide*<sup>50</sup> desempenham um papel fundamental na seleção de solventes mais seguros.

As extrações verdes representam uma estratégia fundamental para a sustentabilidade dos processos químicos. O preparo de amostras, que pode corresponder de 40% a 80% do custo total dos recursos aplicados aos processos analíticos, constitui uma fonte primária de erros e, portanto, requer cuidado e otimização contínua<sup>51</sup>. A otimização dessa etapa impacta diretamente a eficiência na obtenção dos compostos de interesse, aspecto crucial para matrizes complexas,

como os produtos naturais. Métodos de extração aprimorados permitem maior eficácia na recuperação dessas substâncias, e estudos recentes têm explorado técnicas sustentáveis para a extração de compostos bioativos a partir de biomassa residual. Essas pesquisas vêm demonstrando resultados promissores ao aperfeiçoar métodos convencionais, tornando-os verdes, como a extração por homogeneização, além de avançar no uso de abordagens inovadoras, como a extração assistida por micro-ondas, para a obtenção de compostos fenólicos de alto valor agregado a partir de resíduos de frutas, incluindo os de manga<sup>21,51-53</sup>.

#### **1.4.1.1 – Extração Assistida por Homogeneização (EAH)**

Os procedimentos convencionais, tais como as extrações sólido-líquido, são reconhecidamente adequados para a extração de matrizes vegetais, mas também podem ser trabalhosos e demorados. Dessa forma, o uso de um sistema desintegrador da matriz, como o Ultra-Turrax<sup>®</sup>, se apresenta como uma técnica de interesse e cujo uso tem sido descrito na literatura com excelentes resultados para vários conjuntos matriz-analitos – especialmente matrizes de origem vegetal e com destaque para a extração de compostos fenólicos –, incluindo resíduos de manga, laranja, banana, maracujá e pêssego<sup>21,52,54-56</sup>, utilizando majoritariamente etanol e água como solvente extrator.

Na extração assistida por homogeneização, também denominada turbólise, os compostos solúveis presentes em uma amostra sólida são extraídos através do contato com um solvente apropriado enquanto a amostra é submetida a um intenso processo de homogeneização. Durante esse procedimento, a extração ocorre simultaneamente à redução do tamanho das partículas, um efeito resultante da aplicação de elevadas forças de tensão mecânica geradas pelas rotações do equipamento Ultra-Turrax<sup>®</sup>. Esse processo promove o rompimento das estruturas celulares da amostra de maneira acelerada e sem aquecimento, facilitando a rápida interação entre soluto e solvente<sup>54,57</sup>.

Devido ao baixo consumo de energia, à rapidez do processo, que pode ocorrer em apenas alguns minutos, e à possibilidade do uso de solventes ambientalmente amigáveis, a extração assistida por homogeneização pode ser considerada uma técnica verde e sustentável para matrizes vegetais. Além disso, com a viabilidade de escalonamento industrial desta técnica utilizando dispersores em batelada, ela se torna uma opção de baixo custo e com alta eficiência para a extração de compostos bioativos para além do laboratório, contribuindo para o desenvolvimento de biorrefinarias industriais<sup>21</sup>.

#### **1.4.1.2 – Extração Assistida por Micro-ondas (EAM)**

A extração assistida por micro-ondas também consiste em um método sólido-líquido, porém se diferencia das técnicas convencionais por realizar a extração a partir de um processo térmico e não mecânico. Esta técnica tem sido amplamente descrita na literatura como substituta a métodos convencionais, apresentando resultados promissores para diversos conjuntos matriz-analitos empregando etanol e água como solvente extrator, especialmente matrizes de origem vegetal, como resíduos de manga, laranja, maracujá e uva<sup>21,52,55,58</sup>. É uma técnica bastante utilizada na extração de fenólicos, indicando que esses compostos são estáveis para a utilização dessa metodologia, uma vez que sua degradação é minimizada<sup>59</sup>.

A extração assistida por micro-ondas acontece por meio de ondas eletromagnéticas, as quais propiciam o aquecimento dielétrico em moléculas com alta constante dielétrica, como a água. O calor gerado se deve às rotações e vibrações quando os dipolos de íons ou moléculas interagem com o campo eletromagnético das micro-ondas. Esse processo promove transferências de massa e calor no mesmo sentido, de dentro da matriz do sólido para fora<sup>60</sup>. A partir do aquecimento dielétrico das moléculas de água presentes dentro das células vegetais, há a evaporação da água e o rompimento das paredes celulares na estrutura das células do sólido, causando a extração dos compostos. Nesse

processo, também ocorre o aumento da temperatura do sistema soluto-solvente, acelerando ainda mais a entrada do solvente nas células, o que melhora a difusão do soluto para o solvente, sugerindo uma melhora na eficiência de extração de compostos bioativos pelo efeito das micro-ondas<sup>20,60,61</sup>.

Este método proporciona extrações relativamente simples, menor tempo e menor consumo de solvente, sendo até 10 vezes menor do que o volume empregado nas técnicas convencionais de aquecimento<sup>62</sup>, minimizando os resíduos gerados, além de promover maior segurança de operação. Portanto, a extração assistida por micro-ondas é amplamente considerada uma técnica verde e sustentável para matrizes vegetais. Ademais, este método já vem sendo aplicado com sucesso em escala industrial<sup>61</sup>, contribuindo também para o desenvolvimento de biorrefinarias industriais.

### **1.4.1.3 – Quimiometria e espectrometria**

Além da etapa crucial de extração, outras ferramentas contribuem significativamente para o desenvolvimento de metodologias verdes e sustentáveis, como a quimiometria e a espectrometria. A quimiometria é parte importante da Química Analítica moderna. Além da simplificação experimental significativa e da redução de custos nos procedimentos, há um impacto verde considerável a partir de seu emprego<sup>63</sup>. Sua aplicação está alinhada aos princípios da QAV ao empregar estatística e matemática para extrair informações relevantes de dados químicos complexos, possibilitando a redução do uso de reagentes, do consumo energético e, conseqüentemente, da geração de resíduos<sup>64</sup>.

Na etapa de extração, a quimiometria aplicada ao planejamento fatorial desempenha um papel fundamental na otimização e no estudo de condições experimentais ideais. Essa abordagem supera o modelo convencional geralmente empregado, no qual apenas uma variável é alterada por vez, permitindo a análise simultânea de múltiplas variáveis por meio de combinações experimentais estruturadas e a avaliação dos efeitos dessas variáveis na extração

de analitos específicos. A aplicação de métodos de otimização multiobjetivos, como as funções desejabilidade, contribuem ainda mais na incorporação dos princípios da QAV, favorecendo a obtenção de extratos otimizados e enriquecidos com diversos compostos de interesse a partir de um único procedimento experimental<sup>65</sup>. Além de melhorar a eficiência dos processos, a interpretação estatística dos resultados aumenta a confiabilidade e a precisão das respostas obtidas, tornando as metodologias mais robustas e reproduzíveis<sup>63</sup>.

A determinação de metabólitos secundários em matrizes vegetais continua sendo um desafio analítico devido às suas baixas concentrações e à ampla diversidade estrutural. A complexidade dessas moléculas frequentemente dificulta sua detecção e quantificação por métodos analíticos que não envolvem etapas preliminares de separação. Para superar essas limitações, são frequentemente empregadas técnicas cromatográficas extensas, que demandam grandes volumes de solventes de diferentes polaridades, além de tempo e energia consideráveis para o isolamento e a caracterização dos metabólitos.

Considerando esses desafios, a adoção de analisadores mais sensíveis e seletivos torna-se essencial, destacando-se a espectrometria de massas de alta resolução, geralmente acoplada à cromatografia líquida. Essa abordagem possibilita a análise abrangente de matrizes complexas, eliminando, em muitos casos, a necessidade de fracionamento e isolamento para a caracterização completa da amostra<sup>66</sup>. Por essa razão, a espectrometria de massas de alta resolução está entre as técnicas mais empregadas em *foodomics* e nas áreas farmacêutica e ambiental, sendo uma ferramenta-chave para a detecção, quantificação e caracterização estrutural de polifenóis de baixo peso molecular<sup>67,68</sup> – destacando-se como uma ferramenta essencial na anotação de metabólitos secundários em produtos naturais<sup>69</sup>. Além disso, assim como a quimiometria, essa técnica está alinhada aos princípios da QAV, contribuindo para a redução de procedimentos extensivos e, conseqüentemente, minimizando o consumo de reagentes, a demanda energética e a geração de resíduos.

O sucesso da espectrometria de massas de alta resolução deve-se à sua capacidade de caracterização e elucidação estrutural, permitindo a identificação rápida e precisa dos analitos por meio da fragmentação. O ponto de partida desta técnica é a formação de íons no estado gasoso. Para que a fragmentação dos íons formados ocorra, é necessário o acoplamento de dois analisadores de massas com uma célula de colisão entre eles, no chamado modo MS/MS. No primeiro analisador, ocorre a seleção dos íons de interesse, que é então direcionado para a célula de colisão, onde colide com um gás inerte, como nitrogênio, promovendo sua fragmentação. Os fragmentos gerados são, então, analisados pelo segundo analisador de massas acoplado, possibilitando uma caracterização mais detalhada da estrutura do composto<sup>66</sup>.

O modo MS/MS aprimora significativamente a sensibilidade e a precisão das medições de massa, permitindo a diferenciação entre fórmulas moleculares que possuem as mesmas massas nominais<sup>67</sup>. Graças à sua alta resolução e precisão na medição de massa, geralmente abaixo de 5 ppm, essa técnica aumenta a possibilidade de determinar inequivocamente a composição elementar de compostos conhecidos e inéditos com elevado grau de confiança, distinguindo analitos-alvo de outros compostos coeluídos<sup>68</sup>. Além disso, a técnica permite a análise exploratória de perfis metabólicos, facilitando a identificação de variações sutis entre amostras obtidas sob diferentes condições de extração, por exemplo.

A integração entre quimiometria e espectrometria de massas representa um avanço significativo para a QV, impulsionando o desenvolvimento da Química Analítica e da pesquisa de produtos naturais. Essa abordagem não apenas reduz o impacto ambiental das análises químicas, minimizando o consumo de reagentes e a geração de resíduos, mas também maximiza a eficiência na obtenção de compostos bioativos em matrizes complexas.

## **2 – Objetivos**

Este trabalho tem como objetivos:

### **2.1 – Geral**

Desenvolver métodos analíticos verdes e sustentáveis para a obtenção de potenciais agentes quimioterápicos a partir da extração de compostos bioativos presentes nos resíduos de manga.

### **2.2 – Específicos**

- Extrair metabólitos secundários com atividade antitumoral presentes no resíduo de manga utilizando duas técnicas de extração: assistidas por homogeneização e por micro-ondas, comparando-as;
- Realizar ensaios bioguiados em linhagens tumorais, combinados a análises espectrométricas, para definir os metabólitos secundários com atividade antitumoral de interesse;
- Utilizar ferramentas quimiométricas no planejamento dos experimentos e na análise dos resultados para obter extratos otimizados com os metabólitos secundários de interesse;
- Desenvolver e validar métodos cromatográficos e espectrométricos para análise dos extratos;
- Avaliar a eficácia dos extratos obtidos por meio de ensaios biológicos no controle de células saudáveis e tumorais de pulmão, ovário e ovário resistente à cisplatina, comparando-os;
- Utilizar técnicas espectrométricas para anotar os metabólitos presentes nos extratos otimizados.



### **3 – Metodologia**

Nesta seção, são detalhados os procedimentos experimentais adotados ao longo da pesquisa, além dos materiais e equipamentos empregados em cada etapa do estudo.

#### **3.1 – Materiais e equipamentos**

Todos os materiais e equipamentos utilizados são listados em detalhes nesta seção. Nas seções posteriores, estes serão mencionados de forma resumida, apenas pela marca ou tipo de material.

##### **3.1.1 – Condicionamento da amostra**

- Estufa com circulação e renovação de ar TE-394/3 (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Liquidificador industrial (Fiochi, São Carlos, São Paulo, Brasil);
- Moinho analítico de batelada A11 basic (IKA, Staufen im Breisgau, Alemanha).

##### **3.1.2 – Extrações assistidas por homogeneização e por micro-ondas**

- Solventes: água purificada por sistema de filtragem Reverse Osmosis Water Filter (Kemflo, Pingtung, Taiwan) e etanol padrão analítico  $\geq 99,5\%$  (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Balança BEL HPBG-2285Di (BEL Equipamentos Analíticos, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Ultra-Turrax<sup>®</sup> T10 basic (IKA, Staufen im Breisgau, Alemanha);
- ETHOS<sup>®</sup> X com rotor de extração FastEX<sup>®</sup> (Milestone, Sorisole, Itália);
- Centrífuga 5810 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha);
- Evaporador rotativo Rotavapor<sup>®</sup> R-215 (BÜCHI, Flawil, St. Gallen Switzerland);

- Cartuchos e filtros analíticos: Solid Phase Extraction (SPE) Bond Elut PSA (500 mg, 3 mL, partícula de 40 µm) e filtro Captiva EMR-Lipid (40 mg e 1 mL) (ambos da Agilent Technologies Inc, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos).

### 3.1.3 – Análises cromatográficas e espectrométricas

- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência Agilent 1290 Infinity II acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Agilent 6545B Q-TOF MS/MS (ambos da Agilent Technologies Inc, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos);
- Solução de calibração com padrões de referência (*Tuning Mix*), Part Number: G1969-85000 (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos);
- Coluna: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1x100 mm, 1.8 µm, 600 bar), Part Number: 928700-902 (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos);
- Solventes: ácido fórmico grau LC-MS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), água grau LC-MS, acetonitrila grau LC-MS e metanol grau LC-MS (todos da Supelco<sup>®</sup> Merck, Hesse, Darmstadt, Alemanha);
- Padrões analíticos: ácido gálico ≥ 98,0% e metil galato ≥ 98,0% (ambos da Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos);
- Filtro de seringa PTFE hidrofílico de 0,22 µm (Analítica, São Paulo, São Paulo, Brasil).

### 3.1.4 – Ensaios biológicos

- Linhagens celulares humanas: não-tumoral de pulmão MRC-5 (ATCC N. CCL-171), tumoral de pulmão A549 (ATCC N. CCL-185), tumoral de ovário A2780 (ECACC No. 93112519), tumoral de ovário resistente à cisplatina A2780cis (ECACC No. 93112517), tumoral de próstata DU145

(ATCC N. HTB-81), tumoral de mama MCF-7 (ATCC N. HTB-22) e tumoral de mama triplo-negativo MDA-MB-231 (ATCC. HTB-26) (todas da American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos);

- Cultivo celular: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute), soro fetal bovino (FBS), tripsina e solução tampão fosfato-salina (PBS) (todos da Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil);
- Reagentes: azul de tripano e MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) (ambos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), iodeto de propídio (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, Estados Unidos), cristal violeta, álcool isopropílico padrão analítico, ácido acético padrão analítico e metanol padrão analítico (todos da Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Placas de 96 poços e placas de 6 poços (ambas da Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil);
- Incubadora de CO<sub>2</sub> modelo 3429 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos);
- Microscópio invertido Eclipse TS100 (Nikon, Melville, Nova Iorque, Estados Unidos);
- Espectrofotômetro de microplacas Epoch (Biotek, San Jose, Califórnia, Estados Unidos);
- Microscópio inverso CELENA<sup>®</sup> S Digital Imaging System (Logos Biosystems, Annandale, Virgínia, Estados Unidos);
- Sistema de imagem Invitrogen iBright (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

### 3.2 – Condicionamento da amostra

Nesta seção serão apresentadas as etapas de tratamento do resíduo de manga, desde sua aquisição e preparo até a obtenção do material devidamente condicionado para as extrações subsequentes. É importante ressaltar que a escolha das amostras de resíduo de manga se deu pelo interesse econômico e científico envolvidos – tanto pela disponibilidade local, com grande volume de produção no país, quanto para o desenvolvimento das hipóteses levantadas e dos objetivos deste projeto de pesquisa.

As amostras de resíduo de manga, constituídas de casca, caroço (endocarpo) e semente ou amêndoa (encontrada dentro do caroço) foram simuladas a partir da obtenção de mangas maduras – uma vez que não foi possível estabelecer parcerias com as indústrias de processamento de manga contatadas para se obter os resíduos industriais. Dessa forma, mangas da variedade Palmer foram adquiridas em um comércio local da cidade de São Carlos, São Paulo, sendo previamente selecionadas com base no estágio de maturação e em características externas adequadas.

As frutas foram lavadas em água corrente para remover impurezas e, posteriormente, enxaguadas com água destilada. A polpa foi cuidadosamente separada da casca e do caroço utilizando uma faca de aço inoxidável, priorizando sua remoção máxima. Os resíduos gerados foram triturados em liquidificador industrial (Fiochi) para reduzir o volume e facilitar a abertura dos caroços e a liberação das sementes.

Os resíduos foram colocados em bandejas de alumínio recobertas com papel manteiga para secagem em estufa de circulação de ar (Tecnal) a 35°C (FIGURA 1.4 A). Uma pequena fração do resíduo foi separada e disposta de maneira semelhante no intuito de acompanhar a evolução da secagem, sendo pesada constantemente. A secagem completa foi indicada pela massa constante da fração do resíduo, que ocorreu após 72 h (FIGURA 1.4 B).

A amostra obtida, seca e de granulometria variada por conter diferentes partes da fruta, foi novamente processada em liquidificador industrial (Fiochi) para reduzir ainda mais seu volume e promover a trituração parcial dos caroços – a maior parte dos caroços não foi completamente triturada, sendo separada manualmente. Para homogeneização da amostra, esta foi triturada em moinho analítico (IKA) e, posteriormente, peneirada em peneira de inox de 35 *mesh* para se obter partículas menores do que 500  $\mu\text{m}$  (FIGURA 1.4 C). Finalmente, a amostra de resíduo de manga obtida, a ser utilizada nas extrações, foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  em recipiente de vidro devidamente vedado e protegido da umidade, calor e luz.



FIGURA 1.4 – Amostras de resíduo de manga antes da secagem (A), depois da secagem (B) e depois da moagem e peneiramento (C). Fonte: elaboração própria.

### 3.3 – Definição dos analitos de interesse: extrações e análises iniciais

Esta seção contempla a realização das extrações e análises espectrométricas iniciais para a definição dos analitos de interesse – a serem quantificados e otimizados. Para isso, foram efetuadas extrações-teste, as quais foram fracionadas para reduzir a complexidade das amostras e concentrá-las com determinados metabólitos secundários. Os extratos e frações foram direcionados a ensaios biológicos de viabilidade celular e análises espectrométricas, realizando uma triagem para identificar quais dos metabólitos secundários presentes na fração mais ativa, de acordo com o ensaio biológico, poderiam ser responsáveis pela atividade antitumoral observada.

### **3.3.1 – Extrações-teste**

Extrações iniciais foram efetuadas com os dois métodos em estudo, extração assistida por homogeneização (EAH) e extração assistida por micro-ondas (EAM). Denominadas extrações-teste, estas foram realizadas previamente ao planejamento experimental, mantendo todos os parâmetros de extração fixos: 3 g de resíduo de manga, 10 mL de uma solução etanólica a 80% (v.v<sup>-1</sup>) como solvente extrator e 5 min de extração – para a extração por micro-ondas, há um acréscimo no tempo devido à rampa para aquecimento e resfriamento, ambas de 10 min.

#### **3.3.1.1 – Extração assistida por homogeneização**

Para a extração assistida por homogeneização (EAH), 3,0 g da amostra de resíduo de manga foram pesados e inseridos em tubo Falcon de 50 mL. Neste, foram adicionados 10 mL de uma solução contendo etanol de pureza analítica e água purificada na composição etanólica de 80% (v.v<sup>-1</sup>). A amostra e a solução extratora foram homogeneizadas por 5 min com o auxílio do Ultra-Turrax® (IKA) a uma velocidade de rotação de 20.500 rpm.

A solução resultante foi centrifugada nas condições de 10°C, 10 min e 12.000 rpm. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionado em frasco de vidro de 20 mL, sendo encaminhado para secagem utilizando um evaporador rotativo (BÜCHI) a 35°C. O extrato obtido foi armazenado a -4°C para ensaios biológicos e análises espectrométricas. Previamente às análises, o extrato foi resuspenso em solvente adequado e filtrado em membrana PTFE de 0,22 µm.

### **3.3.1.2 – Extração assistida por micro-ondas**

Para a extração assistida por micro-ondas (EAM), 3,0 g da amostra de resíduo de manga foram pesados e inseridos em tubo de vidro de 100 mL revestido com frasco de teflon TFM™-PTFE, adequados para o sistema micro-ondas. Ao tubo, foram adicionados 10 mL de uma solução contendo etanol de pureza analítica e água purificada na composição etanólica de 80% (v.v<sup>-1</sup>). O tubo foi então fechado e inserido no equipamento.

A extração foi realizada utilizando-se o equipamento ETHOS® X com rotor de extração FastEX® (Milestone), sistema de micro-ondas para uso laboratorial. O tempo e a temperatura de extração foram configurados no controlador do equipamento, considerando que as extrações devem partir de uma rampa de temperatura, a qual permite seu aumento até a temperatura desejada. O gradiente de temperatura empregado se iniciou com uma rampa de 10 min até a temperatura final de 30°C, permanecendo nesta temperatura por 5 min, seguido por 10 min de resfriamento. Após este tempo, os frascos foram retirados do equipamento e deixados para resfriamento até temperatura ambiente em uma capela.

A solução resultante foi vertida em tubo Falcon de 50 mL e centrifugada nas condições de 10°C, 10 min e 12.000 rpm. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionado em frasco de vidro de 20 mL, sendo encaminhado para secagem utilizando um evaporador rotativo (BÜCHI) a 35°C. O extrato obtido foi armazenado a -4°C para ensaios biológicos e análises espectrométricas. Previamente às análises, o extrato foi resuspendido em solvente adequado e filtrado em membrana PTFE de 0,22 µm.

### **3.3.2 – Fracionamento**

Para se obter amostras menos complexas com a possibilidade de concentração de analitos de interesse, foram realizados fracionamentos com o extrato-teste obtido pela EAH – por ser considerado, dentre as duas técnicas

estudadas, o método de extração convencional e por apresentar maior rendimento de extração. O fracionamento foi feito com o auxílio de dois cartuchos analíticos comerciais por direcionarem as separações com base em interações específicas utilizando misturas simples de solventes, o SPE Bond Elut PSA, um sorbente de amina alquilada que retém compostos mais polares, e o filtro Captiva EMR, que retém lipídios e outros compostos mais apolares.

Foi utilizado o cartucho Bond Elut PSA com 500 mg em massa e 3 mL em volume seguindo os protocolos padrões, considerando a massa e o volume morto. Dessa forma, 3 mL de solvente foram empregados para a ativação do cartucho – sendo 1200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila padrão analítico, 600  $\mu\text{L}$  de água purificada, seguido de 1200  $\mu\text{L}$  de uma solução de acetonitrila e água 4:1 ( $\text{v.v}^{-1}$ ) para condicioná-lo na primeira fase móvel a ser utilizada. Em seguida, 25 mg do extrato-teste EAH (5% da massa do cartucho) foram pesados e solubilizados para serem inseridos no cartucho. A eluição foi realizada adicionando-se 200  $\mu\text{L}$  de uma solução acetonitrila e água 4:1 ( $\text{v.v}^{-1}$ ), por três vezes consecutivas, totalizando 600  $\mu\text{L}$  (20% do volume do cartucho), fluindo sob pressão positiva. Após a coleta da fração, o cartucho foi limpo com uma mistura de acetonitrila e água 4:1 ( $\text{v.v}^{-1}$ ) e depois somente com acetonitrila. Todo este procedimento se repetiu por três vezes, totalizando 75 mg de extrato-teste utilizado. A fração obtida, denominada F1, seguiu para secagem em evaporador rotativo a 35°C e foi armazenada a -4°C até as análises posteriores.

Foi utilizado o filtro Captiva EMR com 40 mg em massa e 1 mL em volume. Foram pesados 2 mg do extrato-teste EAH (5% da massa do cartucho) e solubilizados para serem inseridos no cartucho. A eluição foi realizada adicionando-se, por três vezes consecutivas, um total de 200  $\mu\text{L}$  (20% do volume do cartucho) de uma solução acetonitrila e água 4:1 ( $\text{v.v}^{-1}$ ), fluindo sob pressão positiva. Este procedimento se repetiu por cinco vezes (utilizando cinco cartuchos semelhantes), totalizando 10 mg de extrato-teste utilizado. A fração obtida,

denominada F2, seguiu para secagem em evaporador rotativo a 35°C e foi armazenada a -4°C até as análises posteriores.

### 3.3.3 – Ensaio bioguiado

O extrato-teste EAH e as frações F1 e F2 foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular. Este ensaio avalia a citotoxicidade das amostras em células tumorais através da quantificação das células viáveis após o tratamento, permitindo calcular o valor da concentração mínima necessária para inibir em 50% o crescimento celular ( $IC_{50}$ ) e identificar amostras bioativas. A determinação da atividade citotóxica das amostras foi realizada apenas na linhagem celular humana tumoral de pulmão (A549) como teste inicial por meio do método colorimétrico utilizando brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) como reagente de viabilidade celular.

Para a realização deste ensaio, as células foram semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade celular de  $1,5 \times 10^4$  células/poço, em 150  $\mu$ L de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). Após 24 h de incubação sob as condições de 5% de  $CO_2$  a 37°C, as células foram tratadas com 0,75  $\mu$ L das soluções das amostras solubilizadas em água purificada em oito concentrações diferentes (200, 100, 50, 25, 12,50, 6,25, 3,13 e 1,56  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) sendo realizadas 6 réplicas de cada concentração. As células também foram tratadas separadamente com o controle, solvente utilizado na solubilização das amostras, constituído apenas de água purificada no caso do extrato-teste e de metanol padrão analítico no caso das frações.

Após o tratamento com as amostras, as placas foram novamente mantidas na incubadora sob as mesmas condições por 48 h. Posteriormente, foram adicionados 50  $\mu$ L de uma solução de MTT (1 mg.mL<sup>-1</sup>) em cada poço e as placas foram incubadas por mais 4 h. Após este período, a solução de cada poço foi cuidadosamente descartada e foram adicionados 100  $\mu$ L de isopropanol por poço

para solubilizar os cristais formados. Então, a absorvância foi determinada no comprimento de onda de 540 nm com o auxílio de um espectrofotômetro de microplaca (Epoch). Os valores de  $IC_{50}$ , desvio padrão (SD) e coeficiente de determinação ( $R^2 > 0,95$ ) foram calculados utilizando o *software* GraphPad Prism 8.0.1.

### 3.3.4 – Triagem dos analitos por espectrometria de massas

Pesou-se 1 mg das amostras secas do extrato-teste EAH e das frações F1 e F2 em *vials* separados, as quais foram ressuspendidas em 1 mL de metanol grau LC-MS, produzindo soluções-estoque de cada uma das amostras na concentração de 1000 ppm. As amostras foram filtradas em membrana PTFE de 0,22  $\mu$ m e diluídas em metanol grau LC-MS de modo a atingir a concentração de 30 ppm para o extrato-teste e 7 ppm para as frações.

Previamente às análises, realizou-se a calibração do espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF MS/MS, Agilent Technologies) empregando uma solução de calibração constituída de uma mistura multicomponente de padrões de referência (*Tuning Mix*). Esta etapa é fundamental para garantir a exatidão e a precisão das medições de massa, sendo realizada periodicamente para assegurar a confiabilidade dos resultados.

Durante esse processo, o equipamento ajusta a relação massa/carga ( $m/z$ ) dos íons detectados com base nos valores teóricos dos compostos presentes na solução de calibração. Os íons gerados percorrem a trajetória do espectrômetro e são detectados de acordo com o tempo necessário para atingir o detector. O *software* do equipamento, então, compara os tempos de voo medidos com os valores de referência e realiza os ajustes necessários na calibração, garantindo que as massas detectadas correspondam com alta precisão aos valores esperados. Além disso, a calibração corrige erros sistemáticos, reduzindo os resíduos primários (diferença entre a massa teórica e a massa medida antes da correção) e ajustando-os para valores muito próximos de zero nos resíduos corrigidos. Esses

resíduos corrigidos indicam o nível de exatidão da calibração, assegurando que as massas detectadas estejam dentro dos limites de erro aceitáveis.

Posteriormente, as amostras foram direcionadas às análises utilizando um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC, Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF MS/MS, Agilent Technologies) equipado com uma fonte de ionização *eletrospray* (ESI). Também foi analisado o branco, constituído apenas por metanol grau LC-MS. As fases móveis foram constituídas por: água grau LC-MS acidificada com 0,1% (v.v<sup>-1</sup>) de ácido fórmico (linha A) e acetonitrila grau LC-MS acidificada com 0,1% (v.v<sup>-1</sup>) de ácido fórmico (linha B). Para a separação, foi utilizada a coluna Acquity ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies) mantida a 33°C. O volume de injeção foi de 5 µL e o fluxo a 0,3 mL.min<sup>-1</sup>, com o seguinte gradiente: 5% a 100% de B em 20 min, mantendo a condição de gradiente a 100% de B durante 5 min, retornando para a condição inicial em 1 min e sendo mantido em 5% de B por 4 min para recondicionamento, totalizando 30 min de corrida.

Foram adquiridos os dados de MS utilizando o *software* MassHunter Workstation B.09.00 (Agilent Technologies) nos modos de ionização positivo e negativo utilizando o modo auto MS/MS. Durante o progresso da análise, o monitoramento dos íons foi feito no intervalo de *m/z* 150-1500. Os seguintes parâmetros de ionização foram empregados: pressão do gás nebulizador 35 psi, fluxo do gás de secagem 10 L.min<sup>-1</sup>, temperatura do gás de secagem 300°C, fluxo do *sheath gas* 11 L.min<sup>-1</sup> e temperatura do *sheath gas* 320°C. Os parâmetros da fonte foram: voltagem do capilar 3200 V, voltagem do fragmentor 110 V, voltagem do *nozzle* 500 V e voltagem do *skimmer* 65 V. A taxa de aquisição dos espectros foi de cinco espectros por segundo. Estes foram parâmetros gerais empregados a fim de se observar diversas classes químicas, não sendo otimizados para nenhum analito em específico por se tratar de uma etapa de triagem.

A partir da análise por UHPLC QTOF-MS/MS, os dados brutos adquiridos utilizando o *software* MassHunter Workstation geraram arquivos em uma extensão no formato (.d), os quais foram convertidos para o formato (.mzML) utilizando a ferramenta MSConvert (ProteoWizard<sup>®</sup>). Com o formato adequado, os dados foram submetidos a um pré-processamento utilizando o *software* MSDIAL, onde foi feita a deconvolução dos dados e alinhamento em um único *feature*, resultando em uma matriz de dados única<sup>70</sup>. Então, a matriz obtida foi extraída no formato de entrada (.msp) para o *software* MSFINDER. Nele, foram geradas anotações por meio do agrupamento dos dados de MS/MS por similaridade ao compará-los com espectros de referência de bancos de dados de metabólitos secundários (espectros *in silico*) (FIGURA 1.5). Os bancos de dados utilizados foram: FooDB, PlantCyc, ChEBI, LipidMAPS, DrugBank, KNApSACk, NANPDB, NPA, COCONUT, PubChem, UNPD e METLIN.



FIGURA 1.5 – Etapas do processamento dos dados de MS/MS para anotação de metabólitos secundários presentes nos extratos.

Para um melhor entendimento das próximas seções, é importante ressaltar que, após esta etapa de definição dos analitos de interesse, ácido gálico e metil galato foram selecionados – o que será discutido em detalhes na seção Resultados. As próximas seções irão tratar das extrações e análises cromatográficas e espectrométricas otimizadas para estes analitos em específico.

### **3.4 – Planejamento experimental**

Nesta seção serão apresentados os planejamentos experimentais desenvolvidos para as extrações assistida por homogeneização e por micro-ondas, incluindo a seleção das variáveis mais relevantes a serem investigadas.

O planejamento experimental se iniciou com a seleção das variáveis a serem analisadas em cada uma das técnicas de extração em estudo. Foi realizado um levantamento bibliográfico com artigos que utilizaram matrizes vegetais complexas como matéria-prima na extração de fenólicos utilizando métodos de extração semelhantes, a fim de identificar quais variáveis tiveram maior influência nas extrações. Com base nisso, também foram definidos os valores a serem adotados para as variáveis selecionadas. Os artigos utilizados neste levantamento bibliográfico são frutos de trabalhos anteriores com participação ativa da autora desta tese, os quais tiveram como foco o desenvolvimento de métodos de extração otimizados para se obter polifenóis utilizando resíduos de frutas, como manga, laranja e maracujá<sup>21,52,53,55</sup>.

#### **3.4.1 – Planejamento fatorial completo para a extração assistida por homogeneização**

Para a extração assistida por homogeneização (EAH) foram selecionadas três variáveis, sendo elas:  $V_1$  = quantidade de amostra (massa de resíduo de manga utilizada),  $V_2$  = composição da solução usada como solvente extrator (porcentagem de volume de etanol em água, v/v) e  $V_3$  = número de extrações (quantidade de extrações a serem realizadas com a mesma amostra).

Com as variáveis e seus valores definidos, um planejamento fatorial completo foi empregado. O planejamento fatorial completo é uma das primeiras etapas a ser realizada no intuito de identificar, dentre uma quantidade elevada de variáveis, aquelas que apresentam maior importância sobre a resposta em questão, sendo necessário selecionar de 2 a 4 variáveis para serem testadas em dois

níveis<sup>71</sup>. Portanto, um planejamento fatorial completo 2<sup>n</sup> experimentos foi realizado, sendo n o número de variáveis em estudo. O valor real adotado para as variáveis, suas respectivas unidades de medida e a codificação dos níveis máximo (1) e mínimo (-1) estudados são mostrados na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 – Variáveis estudadas e seus valores adotados em níveis máximo (1) e mínimo (-1) para a extração assistida por homogeneização.

<b>Variáveis</b>	<b>V<sub>1</sub></b>	<b>V<sub>2</sub></b>	<b>V<sub>3</sub></b>
	Quantidade de amostra (g)	Composição do solvente (% EtOH/H <sub>2</sub> O)	Número de extrações
<b>Níveis</b>			
<b>1</b>	3	80	3
<b>-1</b>	1	40	1

A partir das condições descritas, o planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> resultou em 8 experimentos, os quais foram efetuados em triplicata e em ordem aleatória, de acordo com o planejamento exposto na TABELA 3.2.

TABELA 3.2 – Descrição dos experimentos com as variáveis em valores reais e codificados dada pelo planejamento fatorial completo para a extração assistida por homogeneização.

Experimentos	Variáveis					
	V <sub>1</sub>		V <sub>2</sub>		V <sub>3</sub>	
	Quantidade de amostra (g)		Composição do solvente (% EtOH/H <sub>2</sub> O)		Número de extrações	
	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.
1	1	-1	40	-1	1	-1
2	3	1	40	-1	1	-1
3	1	-1	80	1	1	-1
4	3	1	80	1	1	-1
5	1	-1	40	-1	3	1
6	3	1	40	-1	3	1
7	1	-1	80	1	3	1
8	3	1	80	1	3	1

### 3.4.2 – Planejamento fatorial completo para a extração assistida por micro-ondas

Para a extração assistida por micro-ondas (EAM), também foram selecionadas três variáveis, sendo elas: V<sub>1</sub> = quantidade de amostra (massa de resíduo de manga utilizada), V<sub>2</sub> = composição da solução usada como solvente extrator (porcentagem de volume de etanol em água, v/v) e V<sub>3</sub> = temperatura do equipamento micro-ondas.

Com as variáveis e seus valores definidos a partir do levantamento bibliográfico, um planejamento fatorial completo foi empregado de maneira similar à descrita anteriormente para a EAH. O valor real adotado para as variáveis, suas respectivas unidades de medida e a codificação dos níveis máximo (1) e mínimo (-1) estudados são mostrados na TABELA 3.3.

TABELA 3.3 – Variáveis estudadas e seus valores adotados em níveis máximo (1) e mínimo (-1) para a extração assistida por micro-ondas.

<b>Variáveis</b>		<b>V<sub>1</sub></b>	<b>V<sub>2</sub></b>	<b>V<sub>3</sub></b>
		Quantidade de amostra (g)	Composição do solvente (% EtOH/H <sub>2</sub> O)	Temperatura (°C)
<b>Níveis</b>	<b>1</b>	3	80	70
	<b>-1</b>	1	40	30

O planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> resultou em 8 experimentos, os quais foram efetuados em triplicata e em ordem aleatória, de acordo com o planejamento exposto na TABELA 3.4.

TABELA 3.4 – Descrição dos experimentos com as variáveis em valores reais e codificados dada pelo planejamento fatorial completo para a extração assistida por micro-ondas.

Experimentos	Variáveis					
	V <sub>1</sub>		V <sub>2</sub>		V <sub>3</sub>	
	Quantidade de amostra (g)		Composição do solvente (% EtOH/H <sub>2</sub> O)		Temperatura (°C)	
	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.
1	1	-1	40	-1	30	-1
2	3	1	40	-1	30	-1
3	1	-1	80	1	30	-1
4	3	1	80	1	30	-1
5	1	-1	40	-1	70	1
6	3	1	40	-1	70	1
7	1	-1	80	1	70	1
8	3	1	80	1	70	1

### 3.5 – Extrações

Nesta seção serão descritos os procedimentos experimentais adotados para cada um dos métodos de extração empregados, a extração assistida por homogeneização (EAH) e a extração assistida por micro-ondas (EAM), seguindo os planejamentos fatoriais completos descritos anteriormente.

#### 3.5.1 – Extração assistida por homogeneização

Inicialmente, a amostra de resíduo de manga foi pesada, de acordo com a quantidade de massa em questão ( $V_1 = 1,0$  ou  $3,0$  g), e inserida em tubos Falcon de 50 mL, previamente numerados, correspondentes a cada um dos experimentos do planejamento fatorial completo. Uma ordem aleatória foi definida para a realização dos experimentos. Então, aos tubos contendo a amostra, um por vez, foram adicionados 10 mL (volume fixo) de uma solução contendo

etanol de pureza analítica e água purificada, de maneira a atingir a composição etanólica do solvente extrator requerida ( $V_2 = 40$  ou  $80\%$ ).

A amostra e a solução extratora foram homogeneizadas por 5 min (tempo fixo de extração) com o auxílio do Ultra-Turrax® à uma velocidade de rotação específica de 20.500 rpm. A extração ocorreu de acordo com o número de extração em questão ( $V_3 = 1$  a 3 vezes) – no caso de mais de uma extração, o sobrenadante foi retirado após centrifugação e a amostra residual foi submetida a uma nova extração com 10 mL da solução extratora de mesma composição.

A solução resultante foi submetida à centrifugação nas condições de  $10^\circ\text{C}$ , 10 min e 12.000 rpm. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionado em frasco de vidro de 20 mL, sendo encaminhado para secagem utilizando um evaporador rotativo a  $35^\circ\text{C}$ . O extrato obtido foi armazenado a  $-4^\circ\text{C}$  para as análises posteriores por LC-MS e ensaios biológicos (FIGURA 3.1). Previamente às análises, o extrato foi ressuspenso em solvente adequado e filtrado em membrana PTFE de  $0,22\ \mu\text{m}$ .

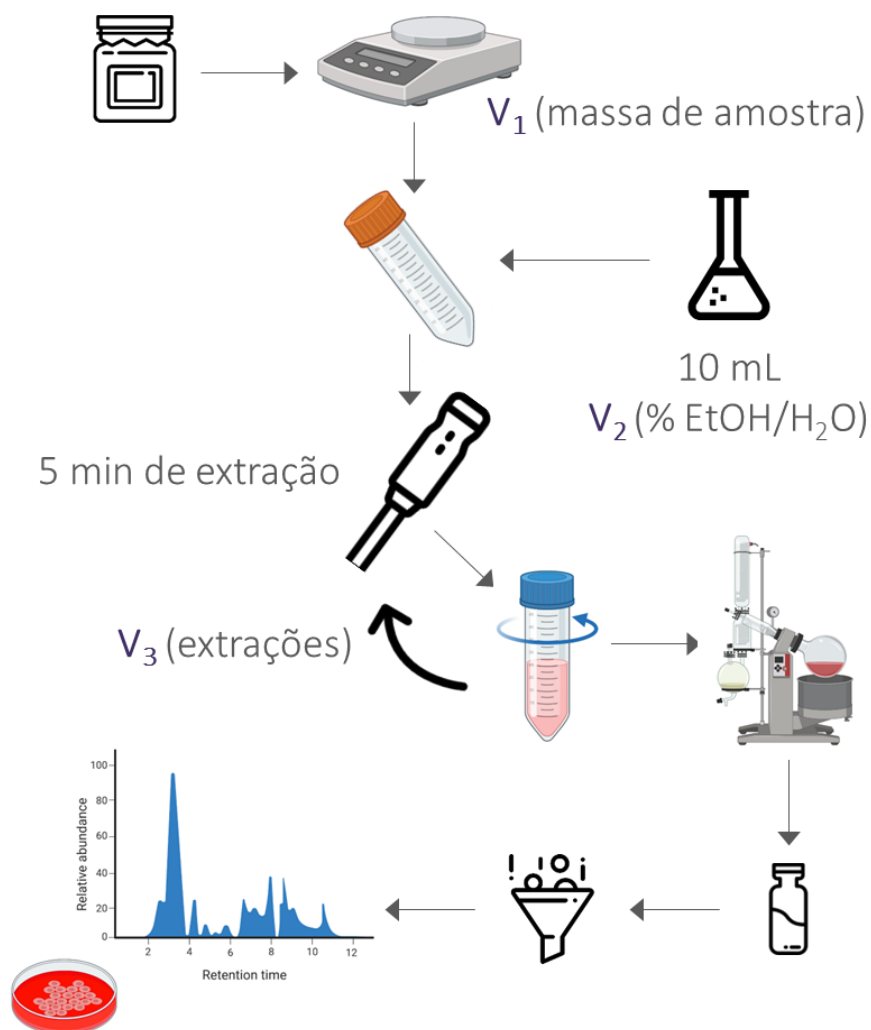


FIGURA 3.1 – Procedimento experimental realizado para a extração assistida por homogeneização. Fonte: elaboração própria.

### 3.5.2 – Extração assistida por micro-ondas

Inicialmente, a amostra de resíduo de manga foi pesada, de acordo com a quantidade de massa em questão ( $V_1 = 1,0$  ou  $3,0$  g), e inserida em tubos de vidro de 100 mL revestidos com frascos de teflon TFM™-PTFE adequados para o sistema micro-ondas. Os tubos de vidro foram previamente numerados, correspondentes a cada um dos experimentos do planejamento fatorial completo. Uma ordem aleatória foi definida para a realização dos experimentos. Então, aos tubos contendo a amostra, um por vez, foram adicionados 10 mL (volume fixo) de uma solução contendo etanol de pureza analítica e água purificada, de maneira

a atingir a composição etanólica do solvente extrator requerida ( $V_2 = 40$  ou  $80\%$ ). Os tubos foram então fechados e inseridos no equipamento.

A extração foi realizada utilizando-se o equipamento ETHOS® X com rotor de extração FastEX®, sistema de micro-ondas para uso laboratorial. O tempo e a temperatura de extração foram configurados no controlador do equipamento, de acordo com cada experimento do planejamento fatorial completo. Para isso, as extrações devem ser configuradas partindo de uma rampa de temperatura, a qual permite seu aumento até a temperatura desejada. O gradiente de temperatura empregado em todos os experimentos se iniciou com uma rampa de 10 min até a temperatura final requerida ( $V_3 = 30$  ou  $70^\circ\text{C}$ ), permanecendo nesta temperatura por 5 min (tempo fixo de extração), seguido por 10 min de resfriamento. Após este tempo, os fracos foram retirados do equipamento e deixados para resfriamento até temperatura ambiente em uma capela.

A solução resultante foi vertida em tubo Falcon de 50 mL e submetida à centrifugação nas condições de  $10^\circ\text{C}$ , 10 min e 12.000 rpm. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionado em frasco de vidro de 20 mL, sendo encaminhado para secagem utilizando um evaporador rotativo a  $35^\circ\text{C}$ . O extrato obtido foi armazenado a  $-4^\circ\text{C}$  para as análises posteriores por LC-MS e ensaios biológicos (FIGURA 3.2). Previamente às análises, o extrato foi ressuspenso em solvente adequado e filtrado em membrana PTFE de  $0,22\ \mu\text{m}$ .

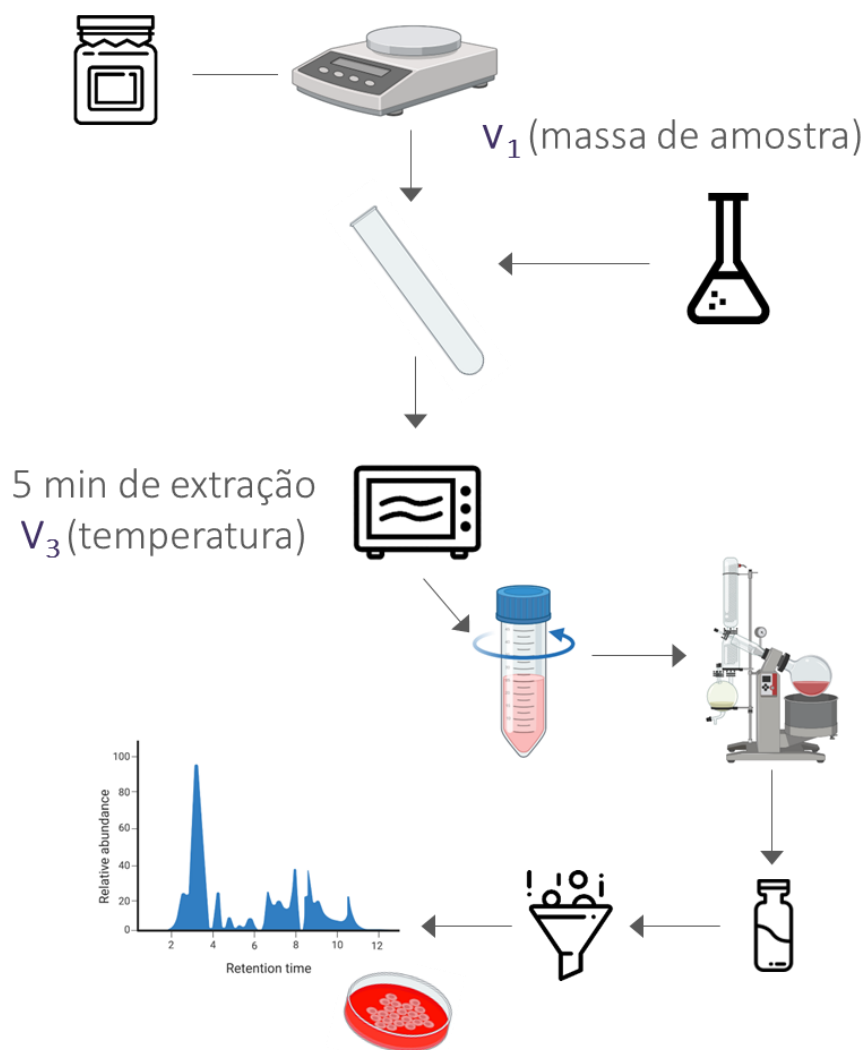


FIGURA 3.2 – Procedimento experimental realizado para a extração assistida por microondas. Fonte: elaboração própria.

### 3.6 – Análises quimiométricas: definição dos extratos otimizados

Nesta seção serão apresentadas as metodologias utilizadas para calcular a influência ou efeito das variáveis selecionadas para estudo na extração de ácido gálico e metil galato, além dos cálculos para se obter um extrato otimizado com ambos os analitos de interesse simultaneamente.

As análises quimiométricas se iniciaram com o planejamento experimental, efetuando-se os planejamentos fatoriais completos para cada um dos métodos de extração, como explicitado na subseção 3.4. A utilização de planejamentos fatoriais completos permite a avaliação multivariada da influência das variáveis

selecionadas na eficiência de extração dos analitos de interesse. A partir destes planejamentos e dos resultados obtidos para cada experimento, é possível realizar análises estatísticas para avaliar como cada variável influencia na eficiência de extração de cada analito individualmente. Todos os cálculos e gráficos aqui apresentados foram efetuados utilizando o *software* Microsoft Office Excel (Professional Plus 2019).

### **3.6.1 – Efeito das variáveis**

Para que os planejamentos fatoriais completos possibilitem o cálculo dos efeitos das variáveis, é necessário que estas sejam codificadas de acordo com os níveis avaliados. As variáveis selecionadas em cada técnica de extração foram estudadas em dois níveis: máximo (codificado como 1) e mínimo (codificado como -1), resultando em diferentes combinações experimentais, como mostrado anteriormente. Uma vez que todas as extrações foram realizadas e os analitos de interesse quantificados, foram obtidas as respostas experimentais desejadas: a concentração destes analitos extraída.

O cálculo dos efeitos de cada variável se dá a partir da diferença entre as respostas de cada variável em níveis máximos e mínimos. Para isso, os níveis máximos e mínimos são determinados pela multiplicação entre os valores reais das respostas (concentração do analito) e os valores codificados de cada variável (1 ou -1) para cada experimento. No caso de interações entre as variáveis, em cada experimento é calculada a variável codificada  $y_{12}$ , por exemplo, que é resultante do produto entre as variáveis codificadas  $y_1$  e  $y_2$ . Então, são feitas as médias de todas as respostas obtidas em níveis máximos e mínimos para cada uma das variáveis.

A estimativa dos efeitos de cada variável resulta da diferença entre a média das respostas em nível máximo pela média das respostas em nível mínimo, como mostra a Equação I, obtendo-se os efeitos principais (relacionados às

variáveis individualmente) e os efeitos secundários e de terceira ordem (interações entre duas e três variáveis, respectivamente).

$$\text{Efeito} = \bar{X}_+ - \bar{X}_- \text{ (Equação I)}$$

sendo:

$\bar{X}_+$  = média das respostas quando a variável está no nível máximo;

$\bar{X}_-$  = média das respostas quando a variável está no nível mínimo.

Os valores dos efeitos em percentagem ( $E_i \%$ ) são calculados a partir do quadrado dos valores de efeito em relação à soma dos quadrados de todas as variáveis e suas interações, como mostra a Equação II:

$$\text{Porcentagem } (E_i \%) = \left( \frac{\text{Efeito}_i^2}{\sum \text{Efeito}_i^2} \right) \cdot 100 \text{ (Equação II)}$$

A partir destes resultados, foram plotados gráficos de efeitos percentuais e absolutos. Os gráficos de efeito permitem avaliar quantitativamente a influência das variáveis na extração de cada um dos analitos. Para os efeitos percentuais, os efeitos principais e de interação foram analisados e comparados quanto ao seu valor (influência daquela variável na extração) – um valor mínimo equivalente a 10% foi adotado para considerá-los significativos. No caso dos efeitos absolutos, os efeitos principais, secundários e de terceira ordem foram analisados quanto ao seu sinal (influência positiva ou negativa na extração do analito).

### **3.6.2 – Função desejabilidade**

Quando as melhores respostas obtidas para cada um dos analitos em estudo derivam de parâmetros significativamente distintos, como, por exemplo,

experimentos diferentes, a função desejabilidade é aplicada. Esta tem como objetivo unificar as eficiências de extração em uma única resposta, obtendo parâmetros que otimizem a extração dos analitos simultaneamente. Para isso, são calculadas a desejabilidade individual ( $d_i$ ) e a desejabilidade global (D), como mostram as Equações III e IV, respectivamente. Valores de desejabilidade global (entre 0 e 1) mais próximos do máximo são desejáveis, evidenciando que ambas as respostas estão próximas do valor máximo obtido.

$$\text{Desejabilidade individual } (d_i) = \frac{(y_i - L)^s}{T - L} \text{ (Equação III)}$$

$$\text{Desejabilidade global } (D) = \sqrt[2]{d_1 \cdot d_2} \text{ (Equação IV)}$$

sendo:

$y_i$  = respostas obtidas em cada experimento;

L = menor valor aceitável (menor resposta);

T = valor alvo (maior resposta);

s = peso (no caso, s=1 para função linear, importância igual dos analitos);

d = função desejabilidade de cada resposta.

A partir da aplicação da função desejabilidade global aos extratos obtidos com cada uma das técnicas, obtêm-se extratos otimizados, caracterizados por concentrações máximas ou próximas do valor máximo para ambos os analitos de interesse de forma simultânea.

### **3.7 – Análises cromatográficas e espectrométricas otimizadas**

Nesta seção serão descritos os métodos analíticos cromatográficos e espectrométricos desenvolvidos e otimizados considerando os analitos de interesse utilizados como marcadores de referência, ácido gálico e metil galato, cuja seleção será descrita na subseção 4.1.

Inicialmente, foram preparadas soluções-estoque ao pesar 1 mg dos extratos otimizados obtidos (definidos a partir da função desejabilidade) com cada uma das técnicas de extração em *vials* separados, os quais foram ressuspensos em 1 mL de metanol grau LC-MS, produzindo soluções na concentração de 1000 ppm. As soluções foram filtradas em membrana PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$  e diluídas em metanol grau LC-MS de modo a atingir a concentração de 30 ppm.

Posteriormente, os extratos otimizados foram direcionados às análises utilizando um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC, Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF MS/MS, Agilent Technologies) equipado com uma fonte de ionização *eletrospray* (ESI). Todos os parâmetros descritos a seguir foram otimizados especificamente para os analitos de interesse.

Adotou-se a cromatografia em fase reversa e o modo gradiente de eluição. As fases móveis foram constituídas por: água grau LC-MS acidificada com 0,1% (v.v<sup>-1</sup>) de ácido fórmico (linha A) e acetonitrila grau LC-MS acidificada com 0,1% (v.v<sup>-1</sup>) de ácido fórmico (linha B). Um gradiente amplo foi utilizado na análise cromatográfica<sup>72</sup>, como mostra a TABELA 3.5. Para a separação, foi utilizada a coluna Acquity ZORBAX Eclipse XDB-C18, com dimensões de 2.1x100 mm e tamanho de partícula de 1.8  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies), mantida a 40°C. O volume de injeção foi de 5  $\mu\text{L}$  e o fluxo de 0,250 mL.min<sup>-1</sup>.

TABELA 3.5 – Gradiente de eluição adotado para as análises por LC-MS.

<b>Tempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
0	95	5
3	95	5
4	0	100
6	0	100
7	95	5
15	95	5

Foram adquiridos os dados de MS utilizando o *software* MassHunter Workstation B.09.00 (Agilent Technologies) no modo negativo de ionização empregando o modo auto MS/MS. Durante o progresso da análise, o monitoramento dos íons foi feito no intervalo de  $m/z$  100-200. A taxa de aquisição dos espectros foi de cinco espectros por segundo. Os parâmetros de ionização foram: pressão do gás nebulizador 38 psi, fluxo do gás de secagem 11 L.min<sup>-1</sup>, temperatura do gás de secagem 350°C, fluxo do *sheath gas* 12 L.min<sup>-1</sup> e temperatura do *sheath gas* 325°C; e os parâmetros da fonte foram: voltagem do capilar 3000 V, voltagem do fragmentor 95 V, voltagem do *nozzle* 245 V e voltagem do *skimmer* 35 V. As energias de colisão foram organizadas em rampa, como pode ser visto na TABELA 3.6.

TABELA 3.6 – Energias de colisão para as análises de MS/MS dos extratos com foco nos analitos de interesse.

<b>Energias de colisão</b>			
<b>Massa</b>	<b>Z1</b>	<b>Z2</b>	<b>Z3</b>
100	9	5	3
150	13	9	7
180	20	13	11
200	25	20	15

### 3.8 – Curvas de calibração e validação do método analítico

Nesta seção serão descritos os métodos analíticos para detecção e quantificação dos analitos de interesse – ácido gálico e metil galato – nos extratos de resíduo de manga, bem como as figuras de mérito avaliadas para validar os métodos desenvolvidos.

A fim de quantificar os analitos de interesse presentes na amostra, foi utilizado o método da curva de calibração ou curva analítica. Para isso, foram construídas curvas analíticas, sendo uma elaborada com soluções dos padrões analíticos de ácido gálico e metil galato em metanol (curva no solvente) e as outras produzidas a partir da adição destas soluções com os padrões aos extratos otimizados obtidos com cada uma das técnicas de extração, solubilizados em metanol (curvas na matriz).

Para a construção das curvas de calibração, foram selecionadas sete concentrações com base em análises preliminares por LC-MS com os extratos e padrões analíticos. As concentrações, que correspondem aos pontos das curvas, foram: 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Para isso, uma solução-mãe foi preparada pesando 5 mg de ácido gálico e de metil galato em um mesmo frasco, solubilizando em 25 mL de metanol grau LC-MS em balão volumétrico (concentração dos analitos igual a 200 ppm). Após solubilização, uma alíquota de 0,125 mL da solução-mãe foi diluída em 25 mL de metanol grau LC-MS em balão volumétrico, resultando em uma solução-estoque de concentração dos analitos igual a 1 ppm.

Para a construção da curva no solvente, alíquotas da solução-estoque foram inseridas em diferentes *vials* e diluídas com metanol grau LC-MS para atingir as sete concentrações delimitadas. Para a curva na matriz, a solução-estoque foi diluída em uma quantidade fixa de extrato metanólico de resíduo de manga (extratos otimizados obtido por EAH e EAM) e complementada com metanol grau LC-MS até um volume final fixo. Os extratos otimizados foram definidos após análises quimiométricas e obtidos em condições semelhantes às

dos experimentos EAH 1 (1,0 g de amostra, 40% de EtOH e extração realizada uma vez) e EAM 7 (1,0 g de amostra, 80% de EtOH e temperatura de 70°C), como será discutido na subseção 4.3.3. Desta forma, todos os pontos da curva na matriz apresentaram a mesma concentração de extrato, porém diferentes concentrações dos padrões analíticos adicionados em cada *vial*. Todos os pontos preparados nestes procedimentos foram feitos em triplicata.

A partir das curvas analíticas construídas, os dados obtidos com os padrões analíticos de concentrações conhecidas foram utilizados para gerar um modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Esse modelo correlaciona a concentração dos analitos de interesse com a área dos picos cromatográficos correspondentes. Os cálculos do coeficiente angular ( $a$ ) e do intercepto ( $b$ ) da equação da reta ( $y = a.x + b$ ) foram realizados com as funções “PROJ.LIN” utilizando o *software* Microsoft Office Excel. Para isso, as áreas dos picos foram inseridas como valores de  $y$ , enquanto as concentrações dos analitos em cada ponto representaram os valores de  $x$ .

A validação do método analítico foi realizada a partir da avaliação das figuras de mérito: seletividade e especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, efeito de matriz, recuperação, precisão e exatidão. Esta avaliação foi feita seguindo os critérios definidos por guias de validação de métodos analíticos<sup>73-76</sup>, com destaque para o documento do Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano<sup>77</sup> (ICH, na sigla em inglês) e o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica - Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários<sup>78</sup>, elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

### **3.8.1 – Seletividade e especificidade**

A seletividade de um método analítico refere-se à sua capacidade de identificar e medir os compostos de interesse presentes em uma determinada

amostra (como metabólitos secundários, por exemplo). Um método específico tem a habilidade de responder exclusivamente ao analito de interesse, dentre outros presentes na amostra, minimizando interferentes<sup>75</sup>.

Na cromatografia, para atingir seletividade e especificidade em um método analítico, é essencial adotar medidas que garantam uma adequada resolução dos picos ajustando os diversos parâmetros cromatográficos. Em análises de amostras complexas, como as de produtos naturais, a sobreposição de sinais cromatográficos é um desafio frequente. A espectrometria de massas de alta resolução contribui para o desenvolvimento de métodos mais seletivos e específicos, auxiliando na separação desses sinais e na confirmação de que um pico observado corresponde ao analito de interesse, minimizando interferências de compostos coeluídos. Isso se deve à deconvolução espectral, processo de resolução de sinais sobrepostos em seus constituintes únicos<sup>79</sup>. Assim, mesmo que a cromatografia não consiga separar completamente os picos, a espectrometria de massas, associada à deconvolução, permite a correta atribuição dos analitos e fornece informações detalhadas sobre os diferentes perfis de fragmentação.

A seletividade e a especificidade foram avaliadas de forma integrada por três abordagens: (1) comparando os tempos de retenção dos cromatogramas obtidos com os padrões analíticos e com os extratos; (2) realizando a fortificação da matriz (adição de uma quantidade conhecida dos padrões analíticos ao extrato) e comparando as áreas dos picos dos cromatogramas dos extratos fortificados com aquelas obtidas apenas com os padrões analíticos; e (3) analisando os perfis de fragmentação dos padrões analíticos (característicos de cada composto com base em sua estrutura molecular), confirmando-os através das bases de dados de espectrometria de massas integradas ao *software* utilizado nas análises MassHunter Qualitative Analysis 10.0 (Agilent Technologies) e, em seguida, comparando-os com os perfis de fragmentação dos analitos nos extratos.

### 3.8.2 – Linearidade

A qualidade de um método analítico é altamente dependente da linearidade da curva de calibração construída. A linearidade reflete a capacidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, buscando correlacionar o aumento de concentração com a área de um pico em um cromatograma. A concentração do analito (variável independente) corresponde aos valores conhecidos das soluções de padrões analíticos, enquanto a área do pico cromatográfico (variável dependente) representa a resposta do detector ao analito presente na amostra<sup>77</sup>.

A linearidade pode ser avaliada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ )<sup>80</sup>, calculado para cada uma das curvas analíticas construídas através da função “PROJ.LIN” do *software* Microsoft Office Excel. Este coeficiente permite avaliar a qualidade do ajuste da curva construída, medindo a proporção da variabilidade da variável dependente que é explicada pela variável independente no modelo de regressão, ou seja, indica a confiabilidade do modelo matemático aplicado. O valor de  $R^2$  varia entre 0 e 1, sendo que valores mais próximos de 1 indicam um melhor ajuste do modelo de regressão linear aos dados experimentais, refletindo uma maior correlação entre a concentração do analito e a resposta analítica.

### 3.8.3 – Limites de detecção e quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de um analito que pode ser medida com precisão e exatidão. Este valor deve ser igual ou inferior ao menor ponto da curva de calibração. Para garantir a robustez da análise, é recomendado que o LQ seja, idealmente, de 2 a 5 vezes inferior ao menor ponto da curva. O limite de detecção (LD) refere-se à menor concentração do analito que gera uma resposta acima do nível de ruído do detector, podendo ser detectada com significância estatística, mas não quantificável de forma precisa. É

recomendado que o LD seja de 3 a 10 vezes menor do que o menor ponto da curva, dependendo da sensibilidade do método e do equipamento utilizado<sup>73,74</sup>.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados utilizando o *software* Microsoft Office Excel a partir dos valores de  $s$  (desvio padrão do intercepto) e dos valores de  $a$  (coeficiente angular)<sup>77</sup>. O desvio padrão do intercepto representa a variação do sinal de fundo quando a concentração do analito é zero, ou seja, o ruído do equipamento – pode influenciar os valores de LD e LQ, pois reflete a incerteza na medição de concentrações muito baixas. Já o coeficiente angular da equação da reta representa a sensibilidade analítica, capacidade do detector em responder a pequenas variações na concentração do analito na amostra. Os valores de  $s$  e  $a$  foram obtidos empregando a função “PROJ.LIN” do *software* Microsoft Office Excel, de acordo com as Equações V e VI:

$$LD = \frac{3,3 s}{a} \text{ (Equação V)}$$

$$LQ = \frac{10 s}{a} \text{ (Equação VI)}$$

sendo:

$s$  = o desvio padrão do intercepto;

$a$  = a inclinação da curva analítica.

### **3.8.4 – Efeito de matriz**

O efeito matriz refere-se à influência dos componentes da matriz da amostra na resposta do detector. Essas interferências podem resultar em alterações na resposta instrumental, causando a ampliação ou redução do sinal do analito. A análise do efeito matriz é um procedimento essencial para avaliar a seletividade do método analítico, garantindo que as respostas obtidas sejam representativas da

concentração real do analito, sem viés causado por interferências da matriz. Isso é particularmente crítico em análises quantitativas, onde variações na resposta instrumental podem comprometer a confiabilidade dos resultados.

Para estimar a intensidade do efeito de matriz em uma análise, deve-se fazer uma comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas construídas na matriz e no solvente<sup>78,81</sup>, sendo a razão entre as curvas denominada parâmetro  $\alpha$ . Valores próximos a 1 indicam igualdade entre as curvas, não havendo efeito de matriz proeminente. O parâmetro  $\alpha$  pode ser obtido a partir da Equação VII:

$$\alpha = \frac{\text{coeficiente angular da curva na matriz}}{\text{coeficiente angular da curva no solvente}} \quad (\text{Equação VII})$$

### 3.8.5 – Recuperação

O estudo de recuperação tem como objetivo avaliar e corrigir os resultados analíticos de erros sistemáticos decorrentes da eficiência de extração e perdas ao longo das etapas de uma metodologia, como secagem, filtragem, diluição e outros procedimentos realizados até a leitura da resposta instrumental. Em análises de matrizes complexas, onde não é possível obter uma matriz isenta de analitos, o ensaio de recuperação pode ser realizado por meio da fortificação da matriz, adicionando padrões analíticos de referênci<sup>78</sup>. Este processo permite avaliar a eficiência com que o analito é detectado e quantificado em uma matriz específica após a fortificação. Geralmente, utilizam-se três níveis de fortificação, baixa, média e alta concentração, dentro da faixa linear de trabalho, para calcular o percentual de recuperação. Valores entre 80% e 120% são considerados adequados em ensaios de recuperação<sup>77</sup>.

No ensaio de recuperação com fortificação da matriz, prepararam-se concentrações de 100, 500 e 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cada padrão analítico, que foram adicionadas ao extrato antes do processo de extração, sendo feito em triplicata.

Após as etapas experimentais, os extratos fortificados foram analisados, e as áreas dos picos resultantes foram calculadas. Em seguida, subtraíram-se as áreas dos picos correspondentes aos extratos não-fortificados, obtidos de maneira similar, porém sem a adição dos padrões analíticos. Com estes dados, a recuperação foi determinada comparando a razão entre as concentrações dos analitos encontradas com aquelas adicionadas, permitindo o cálculo da porcentagem de recuperação conforme apresentado na Equação VIII:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{ad}} \cdot 100 \quad (\text{Equação VIII})$$

sendo:

$C_f$  = concentração medida após fortificação da matriz;

$C_{nf}$  = concentração medida na matriz não-fortificada;

$C_{ad}$  = concentração do padrão analítico adicionado à matriz não-fortificada.

### **3.8.6 – Precisão e exatidão**

A precisão e a exatidão determinam os erros de uma medida analítica e são critérios fundamentais para avaliar a qualidade de um dado método. A precisão refere-se à habilidade do método analítico em reproduzir os mesmos resultados sempre que o procedimento é executado, enquanto a exatidão representa a concordância entre os resultados obtidos pelo método e os valores nominais aceitos como referência. Para os ensaios de precisão e exatidão, soluções de concentrações intermediárias às dos pontos da curva de calibração (baixa, média e alta) foram preparadas em quintuplicata utilizando os padrões analíticos, sendo elas: 60, 500 e 950  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

O parâmetro de precisão foi determinado com base nos erros intra-dia e inter-dia. Para isso, as áreas dos picos cromatográficos obtidos foram comparadas entre três injeções efetuadas no mesmo dia (erro intra-dia) e entre

cinco injeções feitas em três dias não consecutivos (erro inter-dia). Os resultados obtidos em um mesmo dia são usados para avaliar a repetibilidade sob as mesmas condições de análise. Já os resultados de três dias não consecutivos determinam a precisão intermediária, avaliando a habilidade do método em fornecer resultados consistentes quando as análises são realizadas em dias diferentes, mas no mesmo laboratório. A precisão pode ser expressa em termos percentuais como uma estimativa do desvio padrão (DP) ou do desvio padrão relativo, também conhecido como coeficiente de variação (CV), calculado a partir de uma série de repetições da mesma amostra em diferentes preparações, como mostra a Equação IX.

$$CV (\%) = \frac{DP}{\bar{X}} \cdot 100 \text{ (Equação IX)}$$

sendo:

DP = desvio padrão entre as replicatas;

$\bar{X}$  = média entre as replicatas.

A exatidão pode ser calculada a partir da razão entre a média da área dos analitos obtida a partir dos cromatogramas e a média da área teórica utilizada como referência, de mesma concentração, como mostra a Equação X.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{média da área experimental}}{\text{área teórica}} \cdot 100 \text{ (Equação X)}$$

Valores de exatidão entre 80% e 120%, assim como coeficientes de variação inferiores a 5%, são considerados critérios adequados para a avaliação da exatidão e precisão de um método analítico, respectivamente<sup>77</sup>.

### **3.9 – Comparação dos metabólitos presentes nos extratos otimizados**

Nesta seção serão apresentados os métodos analíticos cromatográficos e espectrométricos previamente desenvolvidos e otimizados, porém com ajustes em relação aos parâmetros espectrométricos para ampliar as faixas de detecção dos analitos. Também serão descritas as finalidades dos *softwares*, algoritmos e testes estatísticos empregados na análise dos dados obtidos a partir dos extratos otimizados. O objetivo principal foi ampliar a investigação sobre a diversidade de analitos presentes nos extratos, com ênfase na anotação dos metabólitos exclusivos extraídos por cada técnica, possibilitando uma melhor compreensão das diferenças na composição química dos extratos EAH 1 e EAM 7.

De maneira semelhante à descrita na subseção 3.7, soluções dos extratos otimizados EAH 1 e EAM 7 diluídas em metanol grau LC-MS, com concentração final de 30 ppm, foram direcionadas às análises utilizando um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC, Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF MS/MS, Agilent Technologies) equipado com uma fonte de ionização *eletrospray* (ESI).

Em relação ao método cromatográfico, os mesmos parâmetros foram empregados para manter as condições utilizadas nas análises focadas nos analitos de interesse. As fases móveis foram constituídas por água grau LC-MS acidificada com 0,1% (v.v<sup>-1</sup>) de ácido fórmico (linha A) e acetonitrila grau LC-MS acidificada com 0,1% (v.v<sup>-1</sup>) de ácido fórmico (linha B). Para a separação, foi utilizada a coluna Acquity ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies) mantida a 40°C. O volume de injeção foi de 5 µL e o fluxo a 0,25 mL.min<sup>-1</sup>, com o mesmo gradiente utilizado anteriormente: iniciando com 5% de B mantido por 3 min, indo de 5% a 100% de B em 1 min, mantendo a condição de 100% de B durante

2 min e retornando para 5% de B em 1 min, sendo mantido por 8 min para recondição, totalizando 15 min de corrida.

Os parâmetros espectrométricos também foram mantidos para assegurar as mesmas condições utilizadas nas análises focadas nos analitos de interesse. Foram adquiridos os dados de MS utilizando o *software* MassHunter Workstation B.09.00 (Agilent Technologies) no modo negativo de ionização e no modo auto MS/MS. Os parâmetros de ionização e da fonte foram mantidos: pressão do gás nebulizador 38 psi, fluxo do gás de secagem 11 L.min<sup>-1</sup>, temperatura do gás de secagem 350°C, fluxo do *sheath gas* 12 L.min<sup>-1</sup> e temperatura do *sheath gas* 325°C, voltagem do capilar 3000 V, voltagem do fragmentor 95 V, voltagem do *nozzle* 245 V e voltagem do *skimmer* 35 V.

O único ajuste realizado foi em relação ao monitoramento dos íons, sendo feito em um intervalo mais amplo de  $m/z$ , de 50-1500. Logo, as energias de colisão também foram estendidas, como mostra a TABELA 3.7, porém mantendo as energias empregadas anteriormente no intervalo de  $m/z$  de 100-200 para manter a detecção adequada dos analitos de interesse. A energia de colisão determina a qualidade e quantidade de informações nos espectros de fragmentação gerados, o que permite uma análise detalhada da estrutura dos compostos. Dessa forma, a partir de um método *target* focando na otimização da fragmentação dos íons referentes ao ácido gálico e metil galato, o método foi expandido para um *untarget*, permitindo a detecção e anotação de outros analitos presentes na matriz.

TABELA 3.7 – Energias de colisão para as análises de MS/MS dos metabólitos presentes nos extratos otimizados.

<b>Energias de colisão</b>			
Massa	Z1	Z2	Z3
50	5	2	1
100	9	5	3
150	13	9	7
180	20	13	11
200	25	20	15
250	26	20	20
350	29	25	25
450	33	26	26
500	35	26	26
550	37	28	28
700	39	33	33
1000	55	45	45
1500	70	60	60

Após a aquisição dos dados a partir das análises com os extratos otimizados EAH 1 e EAM 7, os resultados obtidos foram processados utilizando o *software* MassHunter Qualitative Analysis 10.0 (Agilent Technologies). Os compostos detectados foram extraídos dos dados brutos usando o algoritmo *Molecular Feature Extraction* (MFE) utilizando bases de dados de MS/MS, como METLIN *Personal Compound Database and Library* (PCDL) – incluindo HMP, KEGG e LMP – e *Molecular Formula Generation* (MFG, Agilent Technologies), todos contidos no *software* MassHunter Qualitative Analysis 10.0.

O algoritmo MFE é uma técnica de descoberta de compostos que localiza componentes individuais da amostra (características moleculares), mesmo quando os cromatogramas são complexos e os picos não estão bem resolvidos. Ou seja, é uma análise que não se baseia exclusivamente em informações de pico cromatográfico, mas sim na localização de íons altos e baixos em abundância<sup>82</sup>. O algoritmo usa a precisão das medições de massa para agrupar

íons relacionados, seja por estado de carga, distribuição isotópica e/ou presença de adutos e dímeros, podendo localizar múltiplos compostos dentro de um único pico cromatográfico<sup>83</sup>. Já o *software* MFG utiliza uma ampla gama de informações de MS, e não apenas medições de massa precisas, para produzir uma lista de fórmulas moleculares candidatas que são classificadas de acordo com suas probabilidades relativas. Dessa forma, elimina candidatos improváveis e fornece classificação relativa para os candidatos restantes<sup>84</sup>. Quando usados em conjunto, o MFE pode localizar múltiplas espécies covariantes da mesma característica, o que cria informações adicionais a serem utilizadas na determinação da fórmula molecular pelo MFG.

Ainda na etapa de processamento dos dados com o *software* MassHunter Qualitative Analysis, foram estabelecidos diversos parâmetros para avaliar a similaridade e a confiabilidade dos dados em relação às bibliotecas de espectrometria de massas. Os critérios adotados incluem a presença de cinco fragmentos derivados do íon produto, índice de similaridade igual ou superior a 70% e erro menor que 5 ppm, visando uma maior precisão na anotação dos metabólitos.

Com o objetivo de visualizar padrões de similaridade e, principalmente, identificar diferenças significativas entre os extratos, foram realizadas análises multivariadas, como o Diagrama de Venn, utilizando o *software* Mass Profiler Professional<sup>®</sup> B.08.00 (MPP, Agilent Technologies). A análise foi conduzida com a lista de potenciais metabólitos filtrados que apresentaram significância estatística. Para isso os dados foram alinhados, corrigindo diferenças no tempo de retenção e massa exata entre amostras, e normalizados para promover um ajuste dos dados e eliminar variações técnicas, garantindo comparabilidade. As entidades químicas detectadas foram filtradas de acordo com sua presença nas quintuplicatas de uma mesma amostra, estabeleceu-se o *cut-off* de 2.0 para identificar apenas os dados significativamente representativos e diminuir o impacto de valores discrepantes entre as réplicas e o

$p$ -valor  $< 0,05$ . A análise de variância (ANOVA) foi realizada por *Teste-t* para determinar se há diferença significativa entre os grupos de amostras, e por teste de correção *Benjamin & Hochberg* FDR (do inglês, *False Discovery Rate*) para avaliar e controlar a taxa de falsos positivos, comum em análises com muitos dados, como as metabolômicas. Dessa forma, foram detectados e anotados os metabólitos presentes em cada um dos extratos otimizados, sendo possível comparar as diferenças entre eles.

### **3.10 – Ensaios biológicos**

Nesta seção serão apresentados todos os ensaios biológicos com diferentes linhagens celulares realizados. Estes ensaios foram feitos no intuito de avaliar a citotoxicidade das diversas amostras em estudo na proliferação celular e na capacidade de formar de colônias, bem como verificar as alterações morfológicas geradas às células tumorais e saudáveis.

Os ensaios com os extratos-teste obtidos através das extrações assistidas por homogeneização e por micro-ondas e com as frações F1 e F2 na linhagem tumoral de pulmão (A549) foram descritos anteriormente na subseção 3.3.3. Aqui, serão apresentados os ensaios realizados com os extratos-teste em outras linhagens, com os padrões comerciais de ácido gálico e metil galato, com os fármacos cisplatina e doxorrubicina, e com os extratos otimizados a partir das análises quimiométricas.

O ensaio de viabilidade celular foi utilizado como uma triagem para identificar as linhagens mais interessantes para estudo. Para isso, ele foi realizado com os extratos-teste em todas as linhagens celulares humanas disponíveis no laboratório biológico, sendo elas: não-tumoral de pulmão (MRC-5), tumoral de pulmão (A549), tumoral de ovário (A2780), tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis), tumoral de próstata (DU145), tumoral de mama (MCF-7) e tumoral de mama triplo-negativo (MDA-MB-231). As linhagens MRC-5, A549, DU145 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's*

*Modified Eagle Medium* (DMEM), enquanto as linhagens A2780, A2780cis e MCF-7 foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), ambos os meios suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS).

Com base em uma revisão bibliográfica realizada na base *Web of Science*, a qual investigou estudos dos últimos 10 anos sobre o uso de extrato de manga em ensaios biológicos com células cancerígenas de pulmão, ovário, próstata e mama, e ao considerar os resultados obtidos com os extratos-teste, que serão descritos na subseção 4.4.1, foram escolhidas as seguintes linhagens celulares humanas: não-tumoral de pulmão (MRC-5), tumoral de pulmão (A549), tumoral de ovário (A2780) e tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis) para dar sequência a este estudo. Ensaios de viabilidade celular com os extratos otimizados, com os padrões comerciais de ácido gálico e metil galato e com os fármacos cisplatina e doxorubicina foram realizados na sequência apenas com as linhagens selecionadas. Os ensaios complementares morfológico e clonogênico também foram feitos com estas linhagens utilizando somente os extratos otimizados.

### **3.10.1 – Ensaio de viabilidade celular (IC<sub>50</sub>)**

Assim como descrito na subseção 3.3.3, o ensaio de viabilidade celular permite avaliar a citotoxicidade dos compostos nas células tumorais e saudáveis a partir da mudança de coloração do agente de viabilidade utilizado e através da quantificação das células viáveis após o tratamento com os compostos, direcionando ao valor da concentração mínima necessária para inibir em 50% o crescimento celular (IC<sub>50</sub>).

A determinação da atividade citotóxica das amostras – extratos-teste, frações, padrões analíticos, fármacos e extratos otimizados – foi realizada nas linhagens celulares humanas tumorais e não-tumorais descritas anteriormente por meio do método colorimétrico utilizando brometo de 3-(4,5- dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) como reagente de viabilidade celular. O número de

células viáveis é proporcional ao número de cristais formados após o tratamento com as amostras, permitindo quantificar as células vivas e calcular o valor do IC<sub>50</sub>.

Para a realização do ensaio de viabilidade celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade celular de 1,5×10<sup>4</sup> células/poço, em 150 µL de meio de cultura suplementado adequado à cada linhagem. Após 24 h de incubação sob as condições de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, as células foram tratadas com 0,75 µL das soluções das amostras solubilizadas em água purificada em oito concentrações diferentes (distintas para cada amostra em cada linhagem, com a concentração máxima testada de 400 µg.mL<sup>-1</sup>) sendo realizadas 9 réplicas de cada concentração. As células também foram tratadas separadamente com o controle, consistindo em água purificada.

Após o tratamento com as amostras, as placas foram novamente mantidas na incubadora sob as mesmas condições (5% de CO<sub>2</sub> a 37°C) por 48 h. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de uma solução de MTT (1 mg.mL<sup>-1</sup>) em cada poço e as placas foram incubadas por mais 4 h. Após este período, a solução de cada poço foi descartada e foram adicionados 100 µL de isopropanol por poço para solubilizar os cristais formados. Então, a absorbância foi determinada no comprimento de onda de 540 nm com o auxílio de um espectrofotômetro de microplaca (Epoch) (FIGURA 3.3). Os valores de IC<sub>50</sub>, desvio padrão (SD) e coeficiente de determinação ( $R^2 > 0,95$ ) foram calculados utilizando o *software* GraphPad Prism 8.0.1. O índice de seletividade (IS), que determina quão seletiva a amostra é às células tumorais em relação às células saudáveis, foi calculado a partir da Equação XI:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ linhagem não tumoral}}{IC_{50} \text{ linhagem tumoral}} \quad (\text{Equação XI})$$

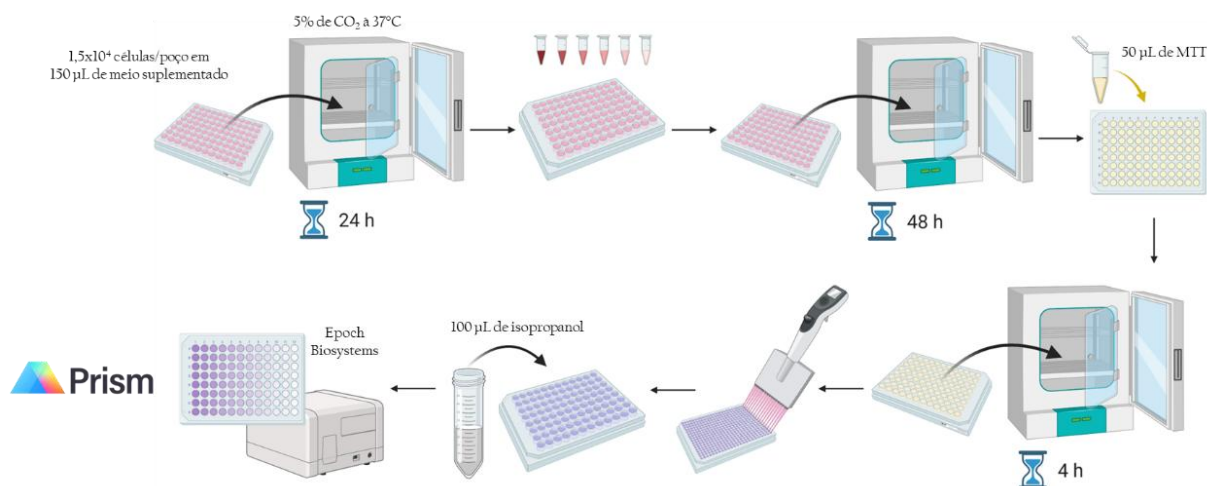


FIGURA 3.3 – Procedimento experimental realizado para o ensaio de viabilidade celular ( $IC_{50}$ ). Fonte: elaboração própria.

### 3.10.2 – Ensaio morfológico

O ensaio morfológico permite avaliar, em células tumorais e saudáveis, as alterações na morfologia celular que ocorrem a curto prazo a partir da ação das amostras usadas no tratamento, indicando danos celulares importantes.

A avaliação das alterações morfológicas das células tratadas com os extratos otimizados foi realizada com as linhagens celulares humanas tumorais e não-tumorais selecionadas – não-tumoral de pulmão (MRC-5), tumoral de pulmão (A549), tumoral de ovário (A2780) e tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis) –, as quais foram monitoradas ao longo do tempo (0, 24 e 48 h) por microscopia de campo claro (detecção de alterações morfológicas) e por microscopia de fluorescência ao final do tratamento (detecção de células mortas ou em processo de morte celular).

Para a realização deste ensaio, as células foram semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade celular de  $1,5 \times 10^4$  células/poço, em 150 µL de meio de cultura suplementado adequado à cada linhagem. Após 24 h de incubação sob as condições de 5% de  $CO_2$  a  $37^\circ C$ , micrografias em campo claro foram registradas com o microscópio inverso (CELENA<sup>®</sup>) antes do tratamento com as

amostras (foto em 0 h). As células foram então tratadas com 0,75 µL das soluções das amostras solubilizadas em água purificada em três concentrações diferentes, sendo elas  $\frac{1}{2}.IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e  $2.IC_{50}$  (distintas para cada amostra em cada linhagem), com 3 réplicas de cada concentração. Após 24 h de incubação sob as condições de 5% de  $CO_2$  a  $37^\circ C$ , novas micrografias em campo claro foram registradas (foto em 24 h) e as placas foram incubadas por mais 24 h. Após um total de 48 h de tratamento, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (PI) para observar morte celular. Foram adicionados 100 µL de PI em cada poço e as placas foram incubadas por 1 h. Em seguida, as células foram micrografadas tanto em campo claro (foto em 48 h) quanto por fluorescência utilizando o microscópio inverso (CELENA<sup>®</sup>) (FIGURA 3.4).

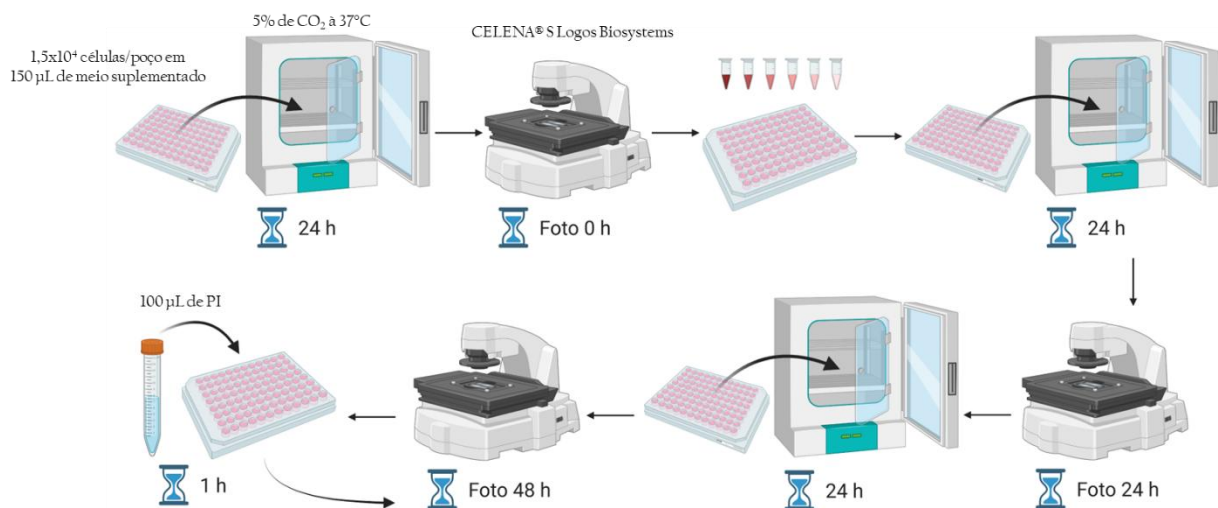


FIGURA 3.4 – Procedimento experimental realizado para o ensaio morfológico. Fonte: elaboração própria.

### 3.10.3 – Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico, também conhecido como ensaio de formação de colônias, permite avaliar os efeitos citostáticos e citotóxicos das amostras em células tumorais e saudáveis a longo prazo. Este ensaio feito com os extratos otimizados foi realizado nas linhagens celulares humanas tumorais e não-tumorais selecionadas – não-tumoral de pulmão (MRC-5), tumoral de pulmão (A549),

tumoral de ovário (A2780) e tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis). A partir dele, é possível visualizar as colônias de células que sobreviveram e proliferaram, bem como quantificá-las.

Para a realização deste ensaio, as células foram semeadas em placas de 6 poços com uma densidade celular de  $4 \times 10^2$  células/poço em 2 mL de meio de cultura suplementado adequado à cada linhagem e mantidas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com 10 µL das soluções das amostras solubilizadas em água purificada em três concentrações diferentes, sendo elas  $\frac{1}{2} \cdot IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e  $2 \cdot IC_{50}$  (distintas para cada amostra em cada linhagem), com 3 réplicas de cada concentração, e incubadas por 48 horas. No controle, foi adicionado apenas água purificada nas mesmas condições. Depois, o meio foi cuidadosamente retirado e substituído por 2 mL de meio fresco adequado à linhagem (sem uma nova adição de extrato) e as placas foram incubadas por 10 dias.

Após este período, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e fixadas com 1 mL de uma solução contendo metanol e ácido acético (3:1 v/v) por 10 min. Esta solução foi então removida dos poços e as células foram coradas com 1 mL de corante cristal violeta por 20 min. Por fim, o corante foi removido e os poços foram lavados com água destilada. As placas foram fotografadas utilizando equipamento de imagem (Invitrogen iBright) e a contagem das colônias formadas foi feita com o auxílio do *software* ImageJ (FIGURA 3.5).

A análise estatística dos dados foi realizada no *software* GraphPad Prism 8.0.2, utilizando ANOVA e o teste de *Dunnett* para verificar se os grupos apresentam diferenças significativas em relação ao controle.

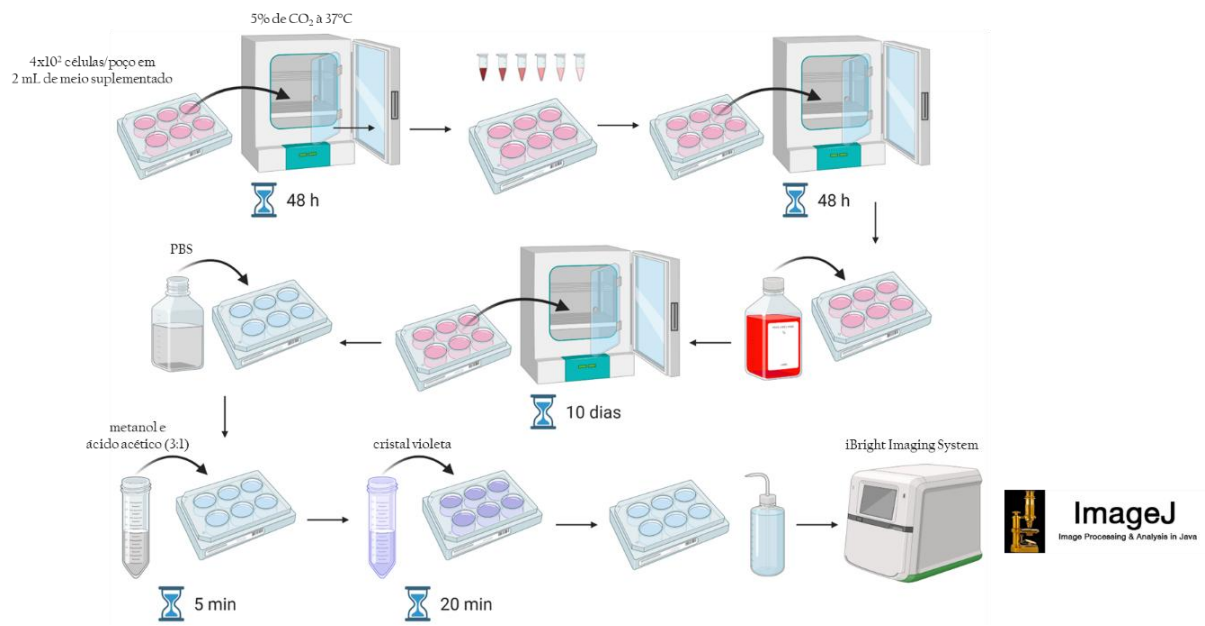


FIGURA 3.5 – Procedimento experimental realizado para o ensaio clonogênico. Fonte: elaboração própria.



## **4 – Resultados e discussão**

Esta seção abordará os resultados obtidos a partir do emprego dos procedimentos descritos na metodologia, trazendo comparações com dados relatados na literatura científica.

### **4.1 – Definição dos analitos de interesse: extrações e análises iniciais**

Nesta seção serão mostrados os resultados das extrações-teste e análises espectrométricas iniciais para a definição dos analitos de interesse – que envolve a etapa de fracionamento, ensaio de viabilidade celular com o extrato-teste e suas frações e triagem dos analitos presentes nestas amostras.

#### **4.1.1 – Extrações-teste**

Após o condicionamento das amostras de resíduo de manga, extrações iniciais foram efetuadas utilizando os dois métodos de extração em estudo: extração assistida por homogeneização (EAH) e por micro-ondas (EAM) empregando parâmetros fixos – os quais foram selecionados considerando-se as condições comumente utilizadas para a extração de compostos fenólicos em resíduos de frutas diversas<sup>21,52,55</sup>, incluindo resíduos de manga<sup>20,53</sup>. As extrações-teste com os resíduos de manga foram fundamentais para o desenvolvimento do projeto, pois permitiram avaliar, nos ensaios subsequentes, a presença ou ausência de atividade antitumoral nessas amostras.

As extrações foram efetuadas sob as condições experimentais: 3,0 g de amostra, 10 mL de solução 80% EtOH/H<sub>2</sub>O (v.v<sup>-1</sup>) e 5 minutos de extração, sendo que para a EAM há um acréscimo no tempo devido à rampa para aquecimento até a temperatura de 30°C, bem como de resfriamento, ambas de 10 min. O rendimento de extração para a EAH foi de 19,53% (m.m<sup>-1</sup>), enquanto o rendimento de extração para a EAM foi de 17,33% (m.m<sup>-1</sup>).

A extração por homogeneização, muitas vezes mencionada na literatura como extração por maceração – que consiste em submeter a amostra seca em um solvente sob agitação constante, seguido de uma etapa de separação da fase líquida da fração sólida – é o método mais utilizado para recuperar compostos fenólicos em matrizes vegetais por ser simples e eficaz<sup>20</sup>. No caso deste estudo, a EAH apresentou um maior rendimento em relação ao método EAM, resultado comumente observado em pesquisas comparativas entre métodos de extração. O estudo desenvolvido por Rocchetti et al. (2019)<sup>69</sup>, avaliou uma maior eficiência de extração de compostos fenólicos em folhas de *Moringa oleífera* utilizando extração por homogeneização. O estudo de revisão conduzido por Tacias-Pascacio et al. (2021)<sup>20</sup> analisou a popularidade da técnica convencional sólido-líquido na extração de compostos fenólicos em resíduos de manga, sendo superior em eficiência de extração comparada a métodos emergentes como as extrações assistidas por ultrassom e por micro-ondas.

#### **4.1.2 – Fracionamento**

Após as extrações, o extrato-teste foi direcionado a um fracionamento utilizando cartuchos analíticos. Para isso, utilizou-se apenas o extrato-teste obtido pela EAH tanto por ser considerado o método de extração convencional dentre as duas técnicas estudadas quanto por ter apresentado um maior rendimento na extração. O fracionamento foi empregado a fim de reduzir a complexidade da amostra, concentrando-a apenas com determinados analitos.

Os cartuchos analíticos utilizados foram o SPE Bond Elut PSA e o filtro Captiva EMR. Ambos direcionam as separações com base em interações específicas utilizando misturas simples de solventes, como acetonitrila e água<sup>85</sup>, retirando a necessidade de usar solventes potencialmente perigosos e tóxicos comumente usados em protocolos de separações, como diclorometano, hexano e clorofórmio. Além disso, por serem cartuchos analíticos, utilizam pouca massa de extrato e requerem um baixo consumo de solvente. Portanto, a utilização destes

cartuchos se alinha aos objetivos sustentáveis deste projeto, pois reduzem uso e geração de resíduos perigosos, tornando-os adequados em abordagens verdes.

O cartucho SPE Bond Elut PSA, por ser um sorbente de amina alquilada, retém ácidos orgânicos, açúcares, pigmentos e outros compostos polares presentes em matrizes complexas<sup>86</sup>. No fracionamento realizado com este cartucho, dos 75 mg de resíduo de manga utilizados na eluição, 52 mg foram obtidos na fração mais apolar, denominada F1. O filtro Captiva EMR, que retém lipídios e outros compostos apolares por meio de interações hidrofóbicas<sup>85</sup>, permitiu a obtenção de uma fração mais polar, denominada F2, resultando em 7 mg a partir dos 10 mg empregados na filtração.

#### **4.1.3 – Ensaio bioguiado**

O extrato-teste EAH e as frações F1 e F2 foram direcionadas ao ensaio de viabilidade celular no intuito de avaliar a citotoxicidade das amostras na célula tumoral de pulmão (A549). Esta linhagem foi selecionada inicialmente por se tratar do câncer mais comum no mundo, ocupando o primeiro lugar no índice de mortalidade global e também no Brasil<sup>26,27</sup>.

O ensaio de viabilidade celular permite quantificar as células viáveis após o tratamento, obtendo o valor da concentração mínima necessária para inibir em 50% o crescimento celular ( $IC_{50}$ ). As concentrações testadas foram de 200 a  $1,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para efeito de comparação, essas concentrações foram analisadas em relação aos valores de referência de  $IC_{50}$  dos fármacos comerciais cisplatina e doxorubicina, amplamente utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer<sup>31,35</sup>. Os valores de  $IC_{50}$  obtidos para cada amostra e para os fármacos estão apresentados na TABELA 4.1.

TABELA 4.1 – Comparação entre os valores de IC<sub>50</sub> do extrato-teste e suas frações e dos fármacos de referência obtidos no ensaio de viabilidade celular com MTT realizado em 48 h.

		IC <sub>50</sub> µg.mL <sup>-1</sup> (± DP)
<b>Amostras</b>	extrato-teste EAH	18.86 ± 1.41
	fração F1	> 100
	fração F2	8.50 ± 0.37
<b>Fármacos</b>	cisplatina	4.32 ± 1.40
	doxorrubicina	2.21 ± 0.15

Quanto menor o valor de IC<sub>50</sub>, mais ativa é a amostra, pois uma menor concentração desta é necessária para inibir o crescimento celular. Como mostrado na TABELA 4.1, as menores concentrações foram obtidas com o extrato-teste, de 18,86 µg.mL<sup>-1</sup>, e com a fração mais polar F2, de 8,50 µg.mL<sup>-1</sup>, indicando que ambos possuem atividade antitumoral, atuando na inibição de 50% do crescimento das células tumorais de pulmão com as concentrações apresentadas.

Embora seus valores sejam superiores aos dos fármacos, ainda são comparáveis, pois envolvem matrizes complexas (extratos e frações) que contêm diversas moléculas ao invés de um único composto isolado, como no caso dos fármacos. Em contraste, a fração mais apolar F1 apresentou um IC<sub>50</sub> superior a 100 µg.mL<sup>-1</sup>, indicando uma atividade antitumoral menor, com um valor de IC<sub>50</sub> superior a mais de 11 vezes em comparação à F2. Com base nestes resultados, conclui-se que o extrato-teste e a fração F2 contêm os analitos responsáveis pela maior atividade antitumoral apresentada – ao extrair analitos específicos ou analitos em maior concentração – tornando-se as amostras mais promissoras para avaliação, enquanto a fração F1 apresenta menor relevância para este estudo.

É interessante destacar que a realização de ensaios bioguiados para a definição dos analitos de interesse representa uma abordagem alinhada aos

objetivos da Química Verde. Esse método permite a identificação direcionada e eficiente de compostos bioativos, reduzindo etapas de metodologias convencionais – as quais envolvem o isolamento de moléculas com posterior avaliação biológica. Dessa forma, minimiza-se o uso de grandes volumes de reagentes químicos, muitas vezes tóxicos e, conseqüentemente, a geração de resíduos, otimizando o processo de descoberta de substâncias com potencial terapêutico. Essa estratégia não apenas aprimora a eficiência da pesquisa, como também integra princípios sustentáveis ao desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos.

#### **4.1.4 – Triagem dos analitos por espectrometria de massas**

O extrato-tese e as frações foram direcionadas às análises espectrométricas no intuito de realizar uma triagem dos metabólitos secundários presentes em cada porção. Com isso, foi feita a anotação de analitos específicos em cada uma das amostras e comparou-se os analitos em comum nas porções mais ativas biologicamente.

Após a aquisição dos dados por UHPLC Q-TOF-MS/MS, utilizando parâmetros cromatográficos e espectrométricos gerais, e de sua conversão para formatos compatíveis com os *softwares* de processamento, foi possível identificar metabólitos secundários potencialmente responsáveis pela atividade antitumoral observada no ensaio biológico. Esse tratamento completo dos dados foi realizado considerando ambos os modos de ionização, positivo e negativo, a fim de avaliar os melhores resultados. Então, o modo de ionização negativo foi selecionado por se mostrar mais adequado, permitindo a anotação de um maior número de íons. Essa escolha se justifica pelo fato das amostras apresentarem grandes quantidades de compostos fenólicos, que são mais facilmente desprotonados e, portanto, são melhor detectados nesse modo de ionização<sup>87-89</sup>.

Para compreender melhor o processo desde a aquisição dos dados até a definição dos analitos de interesse, é fundamental detalhar os *softwares*

utilizados, explicando seu funcionamento e como eles processam e fornecem as informações. No *software* MSDIAL, primeiramente é realizado o filtro dos interferentes contidos no branco, constituído apenas por metanol grau LC-MS. Em seguida, ocorre o alinhamento dos dados, onde o *software* compara os espectros obtidos experimentalmente e agrupa os espectros de um mesmo íon que esteja contido em diferentes amostras, gerando uma tabela com informações sobre os íons detectados e sua distribuição nas amostras.

Com isso, foi possível observar quais íons desprotonados  $[M-H]^-$  estavam presentes apenas no extrato e na fração ativa, sendo eles:  $m/z$  169.0145,  $m/z$  171.0304,  $m/z$  173.0460,  $m/z$  183.0312,  $m/z$  189.0411,  $m/z$  191.0570,  $m/z$  193.0732,  $m/z$  197.0456,  $m/z$  207.0517 e  $m/z$  335.0418. Um exemplo de como estas informações são apresentadas pelo *software* pode ser visto na FIGURA 4.1 com os íons de  $m/z$  169.0145 e  $m/z$  183.0312. As barras azuis indicam que os íons respectivos foram identificados na fração mais polar F2, enquanto as barras vermelhas indicam que estes íons estão presentes também no extrato-teste EAH. As demais barras representam a fração mais apolar F1 e o branco constituído apenas de metanol, as quais não podem ser visualizadas, indicando a inexistência dos íons em questão nestas porções.

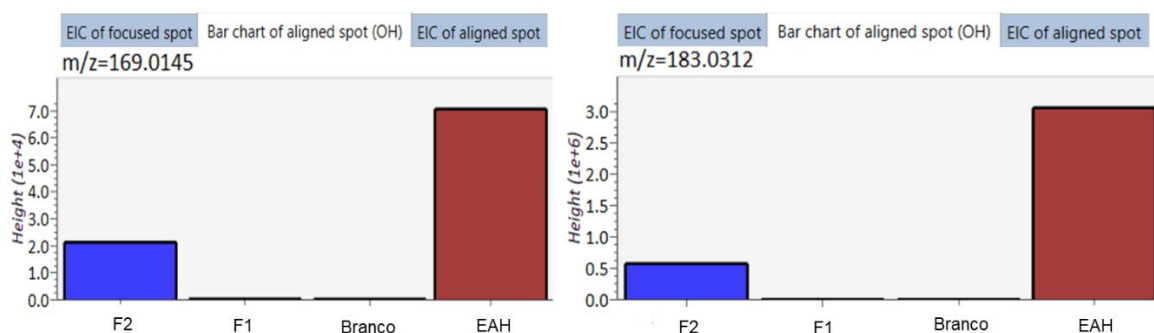


FIGURA 4.1 – Distribuição dos íons de  $m/z$  169,0145 e  $m/z$  183,0312 no extrato-teste, suas frações e no branco utilizando o *software* MSDIAL.

Estas informações são exportadas para o MSFINDER. Utilizando este *software*, os espectros de todos os íons detectados no extrato e nas frações foram comparados com espectros *in silico* de diversos banco de dados de MS/MS, sugerindo possíveis classes, fórmulas moleculares e estruturas a partir de um *score*, sendo padronizado como aceitáveis os valores acima de 5. Dentre os íons de interesse presentes apenas no extrato-teste EAH e na fração ativa F2, apenas os com  $m/z$  169.0145,  $m/z$  183.0312,  $m/z$  197.0456 e  $m/z$  335.0418 foram agrupados com espectros de referência, anotando-os como ácido gálico, metil galato (methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate), ácido siríngico e 3-O-galloyl gallic acid methyl ester, respectivamente, como mostra a FIGURA 4.2.

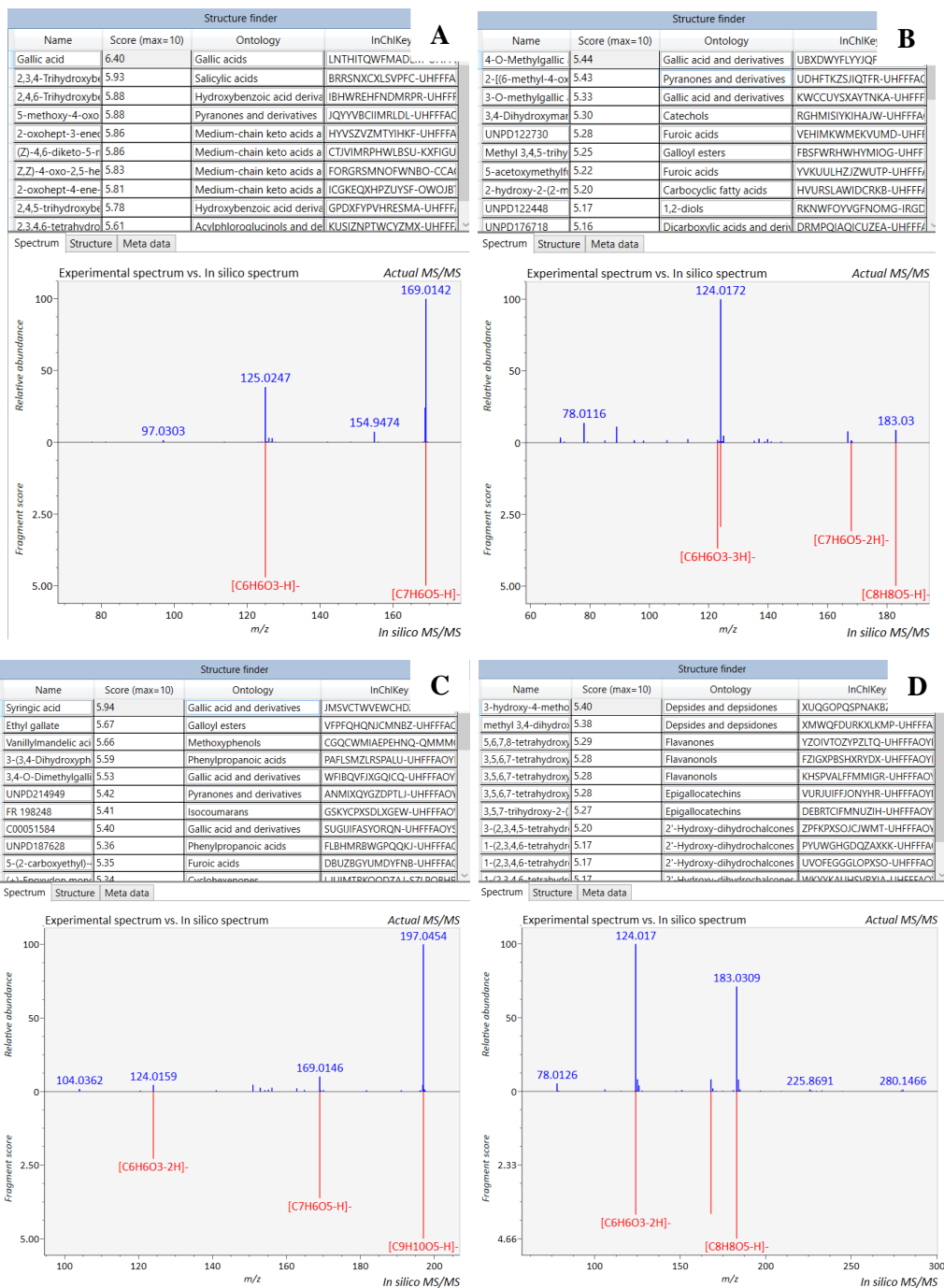


FIGURA 4.2 – Espectros de íons detectados no extrato-teste EAH e sua fração F2 comparados com espectros *in silico* utilizando o *software* MSFINDER, sendo ácido gálico (A), metil galato (B), ácido siríngico (C) e 3-O-galloyl gallic acid methyl ester (D).

Com base nestes resultados, ácido gálico e metil galato foram selecionados como os analitos de interesse deste estudo, sendo utilizados como marcadores de referência dos extratos. O ácido gálico foi escolhido devido à sua atividade antitumoral, relatada em vários estudos com diversas linhagens

celulares<sup>90-92</sup>. Quanto às demais moléculas, o 3-O-galloyl gallic acid methyl ester não foi encontrado disponível comercialmente para aquisição, enquanto o ácido siríngico e o metil galato poderiam ser obtidos como padrões analíticos. No entanto, o metil galato foi selecionado e adquirido comercialmente para os experimentos, uma vez que diversos estudos também relatam sua ação antitumoral frente à diferentes linhagens celulares<sup>90,93,94</sup>.

## **4.2 – Análises cromatográficas e espectrométricas otimizadas, curvas de calibração e validação do método analítico**

Uma vez tendo os analitos de interesse definidos, os métodos cromatográfico e espectrométrico focados na detecção e quantificação de ácido gálico e metil galato foram desenvolvidos. Para isso, empregou-se o sistema composto por um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (do inglês, UHPLC, Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF MS/MS, Agilent Technologies) equipado com uma fonte de ionização *eletrospray* (ESI) no modo negativo. Os métodos desenvolvidos em UHPLC são frequentemente mais econômicos, pois consomem cerca de 80% menos solventes em comparação aos métodos convencionais de cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, HPLC)<sup>68</sup>.

As análises foram realizadas com os padrões comerciais dos dois analitos selecionados como marcadores de referência e os extratos otimizados de resíduo de manga obtidos com cada um dos métodos de extração – os quais serão detalhados na subseção 4.3.3. Os métodos desenvolvidos foram otimizados e alguns ajustes foram feitos, englobando, principalmente, os parâmetros espectrométricos.

Primeiramente, em relação às condições cromatográficas, devido à complexidade da matriz, optou-se pelo modo gradiente de eluição, enquanto o modo de fase reversa foi adotado levando em conta a estrutura das moléculas, suas polaridades e as possíveis interações com a fase estacionária – sendo o modo

de separação mais amplamente empregado para a análise de compostos fenólicos em amostras de alimentos<sup>68</sup>. O uso de acetonitrila na composição da fase móvel se mostrou adequado para as análises e vantajoso devido à sua pontuação – definida como a média geométrica das pontuações de resíduos, impacto ambiental, saúde e segurança – de acordo com o guia GSK para escolhas mais seguras de solventes<sup>50</sup>.

Em relação aos parâmetros espectrométricos, selecionou-se o modo de ionização negativo, sendo mais eficiente do que o modo positivo para ambos os analitos em questão, uma vez que substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos fenólicos, são mais facilmente desprotonadas e, conseqüentemente, são analisadas no modo negativo de ionização<sup>68,87-89</sup>. Os parâmetros de ionização e da fonte foram otimizados para o ácido gálico e metil galato, resultando nas condições descritas na subseção 3.7.

Além disso, as energias de colisão também foram otimizadas para o intervalo de  $m/z$  de 100-200, como exposto em detalhes na subseção 3.7, resultando nos valores de 18,8 eV para ácido gálico e 20,6 eV metil galato. A energia de colisão é um parâmetro essencial na otimização, pois determina a quantidade de fragmentos gerados a partir da colisão dos íons com um gás inerte, como o nitrogênio. Esse processo promove a quebra de ligações químicas, reduzindo o íon molecular a fragmentos menores e permitindo uma análise detalhada da estrutura dos compostos.

Após as otimizações, as separações obtidas (com a subtração do branco) podem ser visualizadas nas FIGURA 4.3 e 4.4, sendo possível verificar os picos relativos ao ácido gálico (AG) e ao metil galato (MG) nos extratos produzidos por ambas as técnicas, a partir dos cromatogramas do tipo BPC (*Base Peak Chromatogram*). Os cromatogramas BPC extraídos para cada analito específico são mostrados nas FIGURAS 4.5 e 4.6.

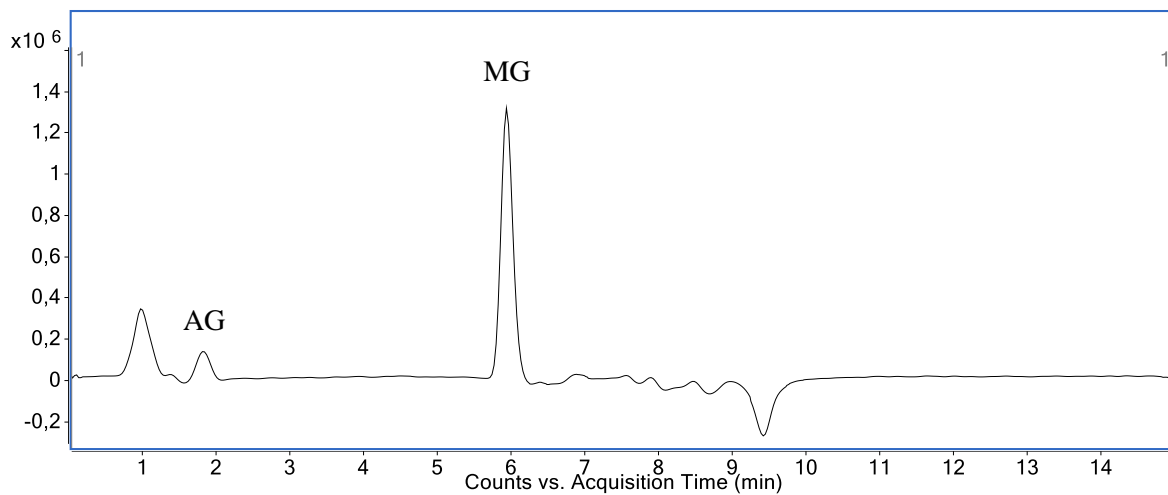


FIGURA 4.3 – Cromatograma BPC referente à separação do extrato obtido pela extração assistida por micro-ondas.

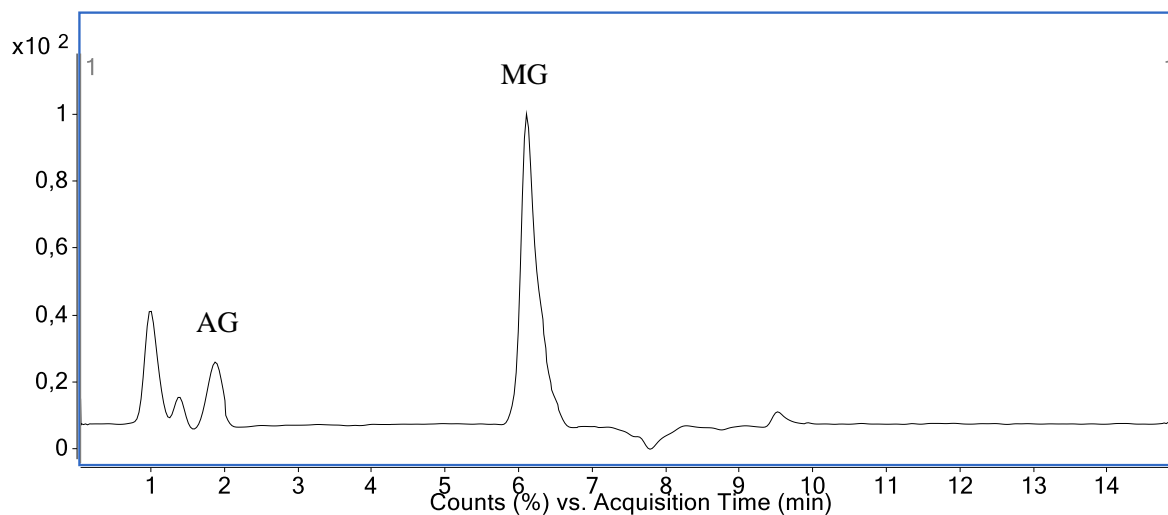


FIGURA 4.4 – Cromatograma BPC referente à separação do extrato obtido pela extração assistida por homogeneização.

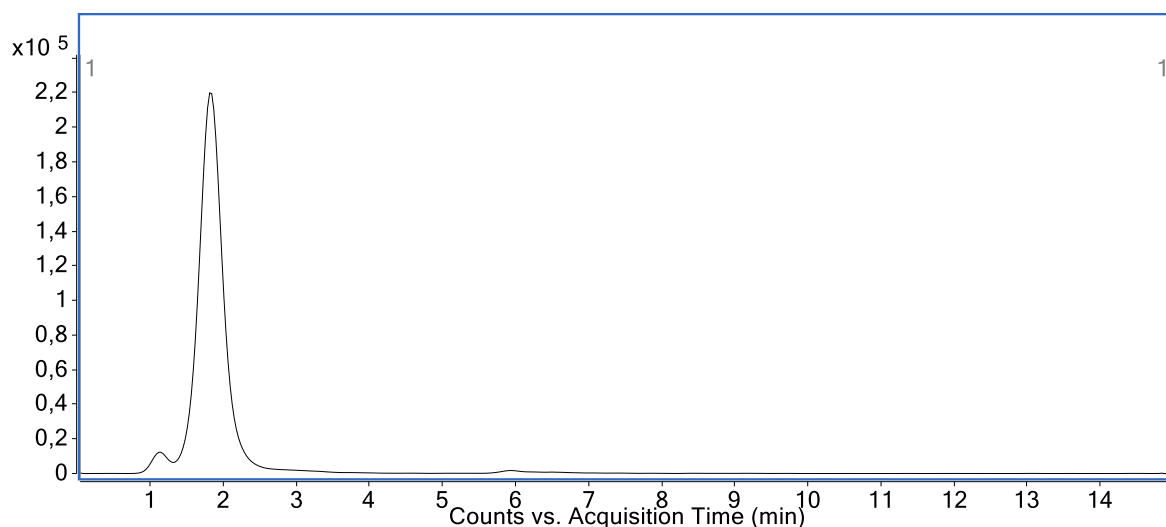


FIGURA 4.5 – Cromatograma BPC do íon com  $m/z$  169,0141 referente ao ácido gálico gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por homogeneização.

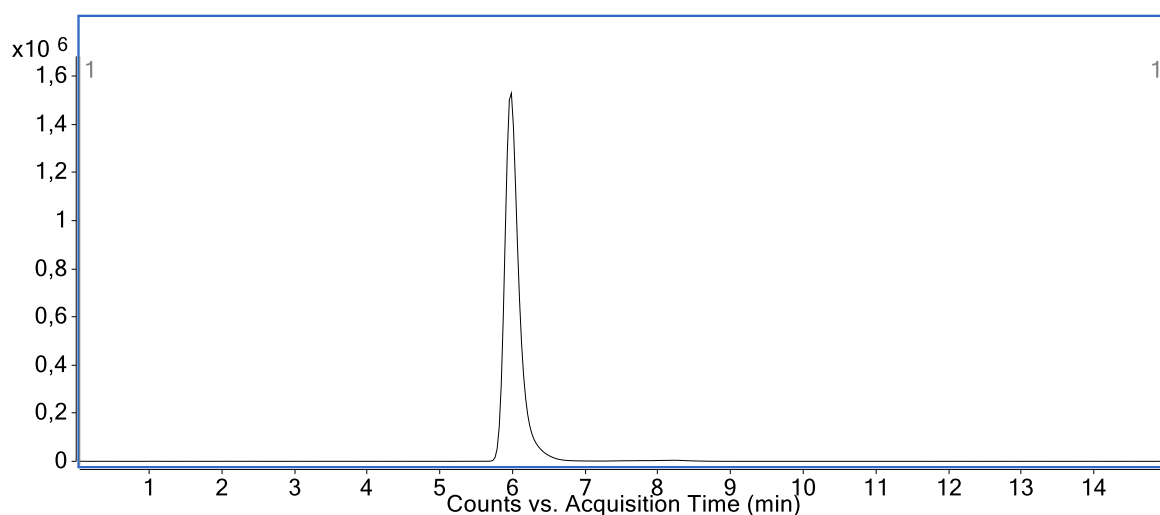


FIGURA 4.6 – Cromatograma BPC do íon com  $m/z$  183,0925 referente ao metil galato gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por homogeneização.

A partir da extração dos dados no cromatograma selecionando o tipo EIC (*Extracted Ion Chromatogram*) e o nível MS/MS para extrair um  $m/z$  de íon precursor específico, foram gerados os espectros de fragmentação que podem ser visualizados nas FIGURAS 4.7 e 4.8.

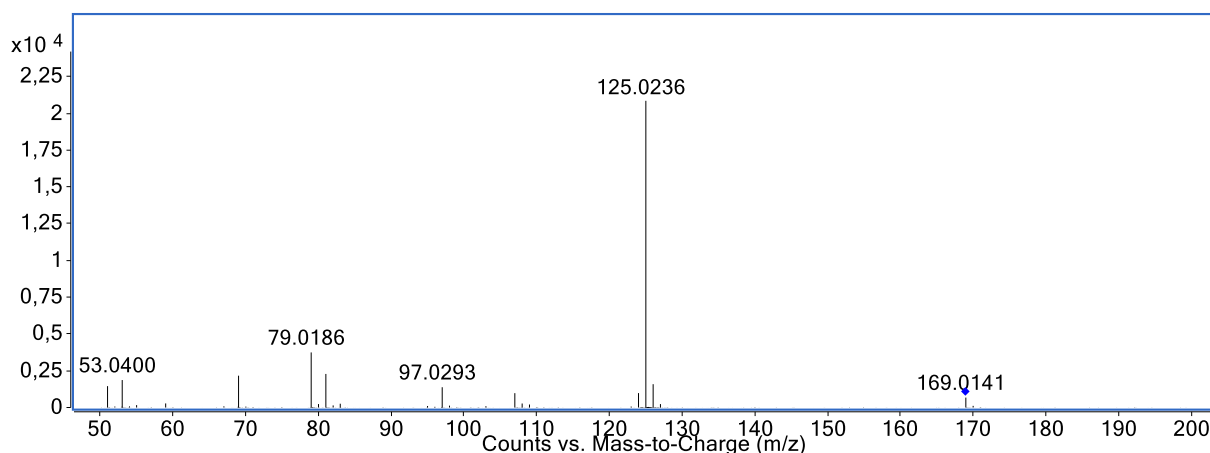


FIGURA 4.7 – Espectro de MS/MS do íon de  $m/z$  169,0141 referente ao ácido gálico gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por homogeneização.

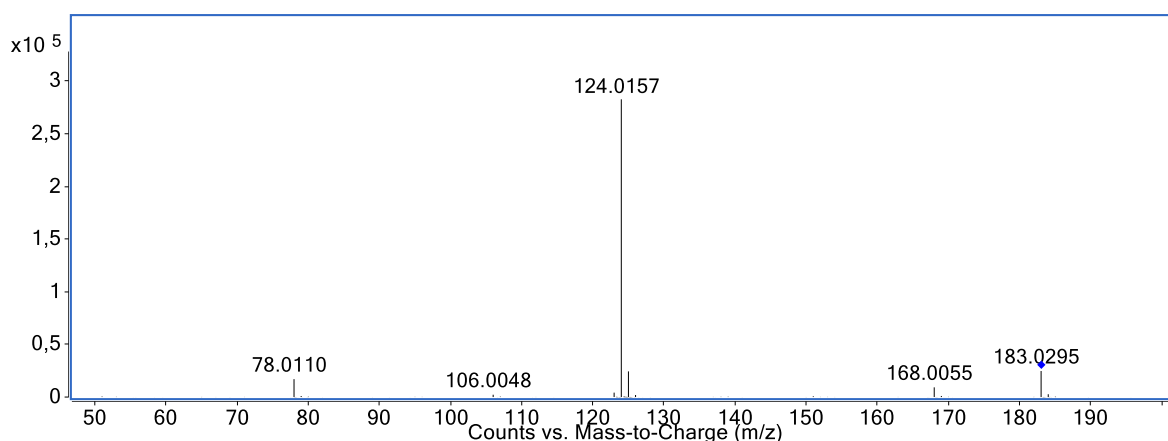


FIGURA 4.8 – Espectro de MS/MS do íon com  $m/z$  183,0295 referente ao metil galato gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por homogeneização.

No espectro apresentado na FIGURA 4.7, pode-se observar o íon de massa monoisotópica  $[M-H]^-$  experimental com  $m/z$  169,0141 referente à fórmula molecular  $C_7H_6O_5$ . Este composto foi anotado como ácido gálico, que possui  $[M-H]^-$  teórico com  $m/z$  169,0142, apresentando um erro de 0,6 ppm. Da mesma forma, na FIGURA 4.8, observa-se o espectro o íon de massa monoisotópica  $[M-H]^-$  experimental com  $m/z$  183,0295 referente à fórmula molecular  $C_8H_8O_5$ . Este composto foi anotado como metil galato, que possui  $[M-H]^-$  teórico com  $m/z$  183,0299, apresentando um erro de 2 ppm.

Os mesmos procedimentos foram realizados com o extrato obtido por EAM e com os padrões de ácido gálico e metil galato, gerando espectros similares aos mostrados para cada analito, com erros  $\leq 2$  ppm.

#### **4.2.1 – Seletividade e especificidade**

Para avaliar a seletividade e especificidade do método desenvolvido para a detecção de ácido gálico e metil galato, verificou-se se os picos cromatográficos analisados correspondiam a estes compostos.

O primeiro critério considerado foi o tempo de retenção, que representa o tempo necessário para que um analito seja eluído do sistema cromatográfico e é característico para cada composto dentro de um método analítico. Assim, em uma matriz complexa, os picos investigados devem apresentar tempos de retenção semelhantes aos dos padrões analíticos, desde que estes compostos estejam presentes na amostra<sup>95</sup>. Para esta avaliação, compararam-se as médias dos tempos de retenção das soluções metanólicas de ácido gálico e metil galato com os tempos de retenção dos picos dos analitos detectados nos extratos. As médias dos tempos de retenção ( $t_r$ ) nos cromatogramas dos extratos foram 1,847 min para o ácido gálico e 5,922 min para o metil galato, enquanto nos cromatogramas dos padrões analíticos foram 1,840 min para o ácido gálico e 5,920 min para o metil galato. Estes resultados mostram que os tempos de retenção nas soluções padrão e na matriz foram similares, evidenciando a seletividade do método.

O segundo critério utilizado para avaliar a seletividade e especificidade do método foi a fortificação da matriz, realizada pela adição de uma quantidade conhecida dos padrões analíticos ao extrato. Esse procedimento permitiu a comparação das áreas dos picos cromatográficos entre o extrato puro, também chamado de matriz não-fortificada, e a matriz fortificada. A introdução de ácido gálico e metil galato no extrato deve resultar no aumento da área dos picos correspondentes a esses compostos<sup>96</sup>. Este aumento foi observado após a

adição da solução padrão, evidenciando que os picos investigados nos extratos correspondem ao ácido gálico e ao metil galato. As FIGURAS 4.9 e 4.10 apresentam esta comparação a partir dos cromatogramas sobrepostos do extrato (em verde) e do padrão analítico (em preto), com os respectivos tempos de retenção dos analitos assinalados. As mesmas análises foram realizadas com o extrato obtido por EAH, gerando cromatogramas com as áreas dos respectivos picos fortificadas, similares aos mostrados para cada analito.

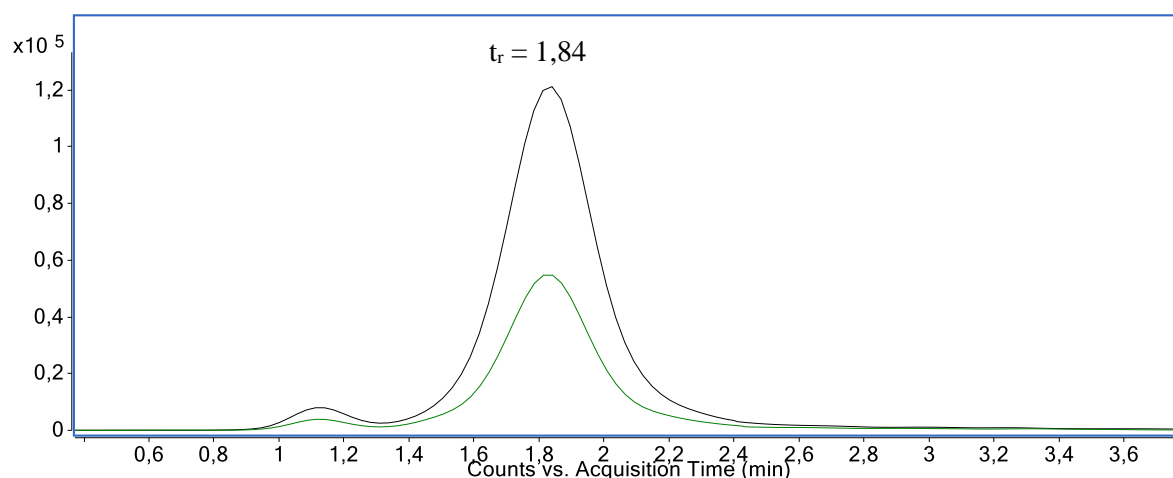


FIGURA 4.9 – Aumento da área do pico após fortificação do extrato obtido pela extração assistida por micro-ondas com o padrão analítico de ácido gálico.

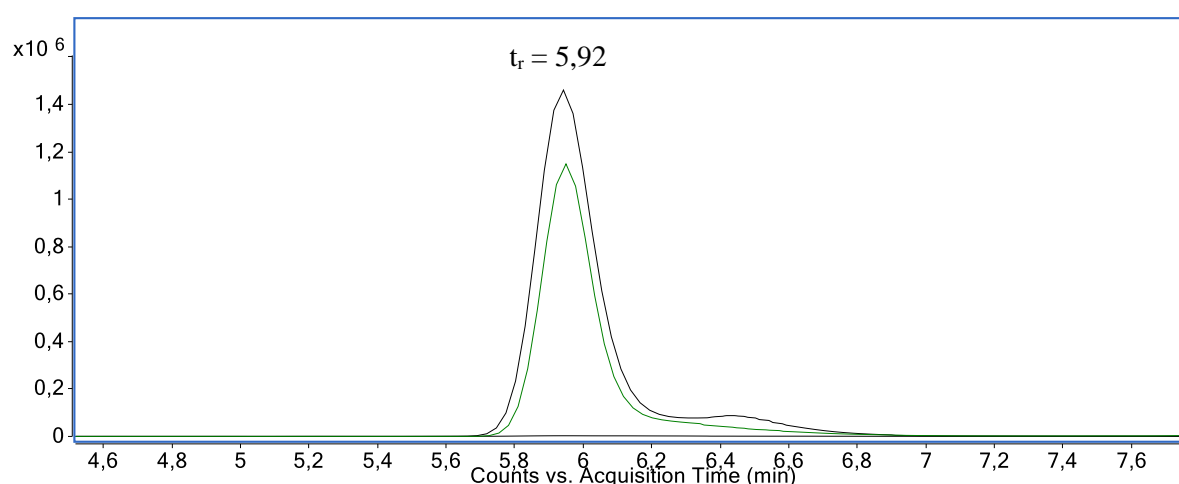


FIGURA 4.10 – Aumento da área do pico após fortificação do extrato obtido pela extração assistida por micro-ondas com o padrão analítico de metil galato.

A última etapa da avaliação envolveu a análise do perfil de fragmentação dos padrões analíticos de ácido gálico e metil galato. Este perfil é característico de cada composto, refletindo sua estrutura molecular e permitindo sua identificação. Os perfis de fragmentação foram inicialmente comparados com as bases de dados integradas ao *software* MassHunter Qualitative Analysis 10.0 para validação, bem como com espectros da literatura<sup>97,98</sup>. Em seguida, foram confrontados com os perfis dos analitos presentes nos extratos obtidos com cada técnica de extração, confirmando a identidade dos compostos investigados e atestando a especificidade do método analítico. Os espectros com os perfis de fragmentação de cada analito decorrente das análises com os extratos podem ser visualizados nas FIGURAS 4.11 e 4.12.

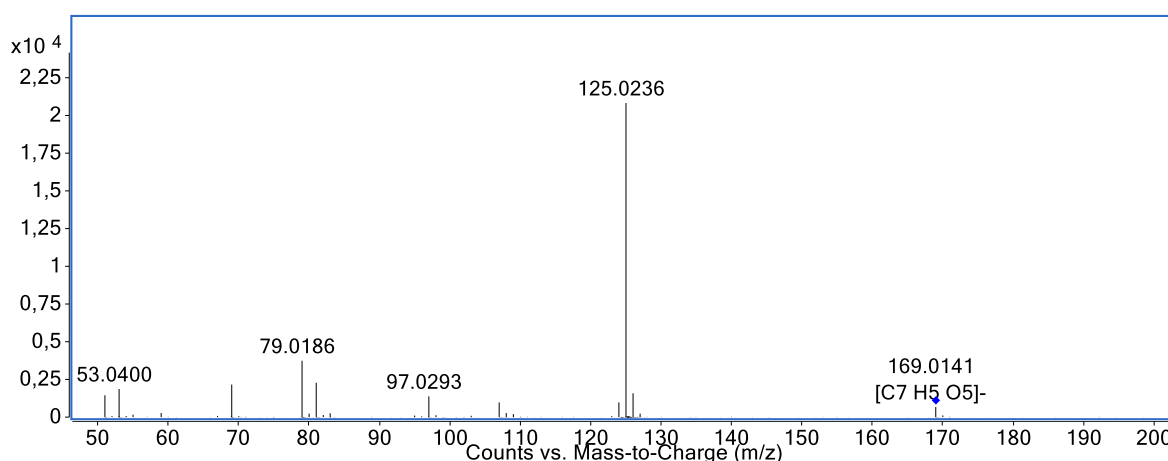


FIGURA 4.11 – Espectro de MS/MS do íon com  $m/z$  169,0141 referente ao ácido gálico gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por micro-ondas.

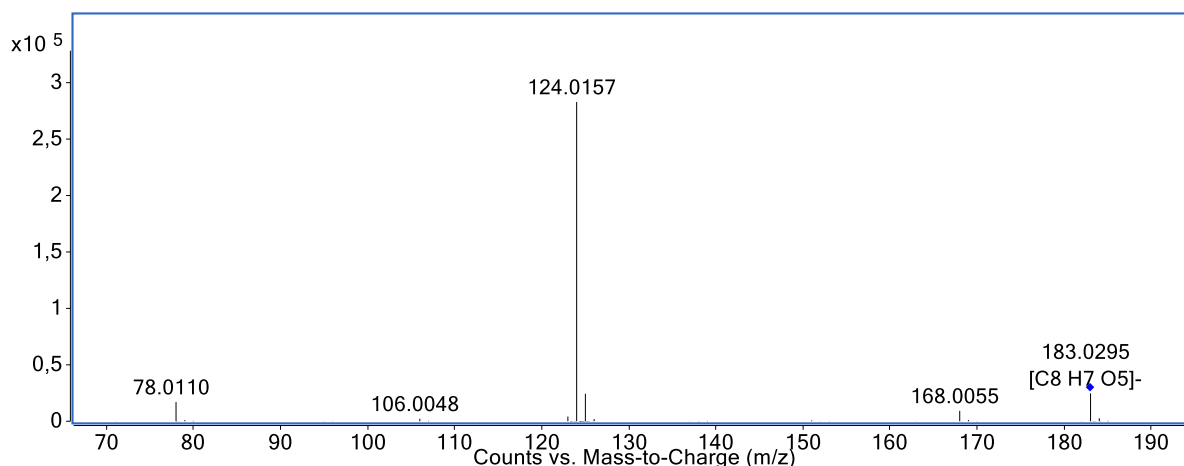


FIGURA 4.12 – Espectro de MS/MS do íon com  $m/z$  183,0295 referente ao metil galato gerado a partir do extrato obtido pela extração assistida por micro-ondas.

A partir dos espectros de MS/MS, pode-se observar que os perfis de fragmentação dos analitos são bastante característicos de compostos fenólicos, sendo possível identificar processos de clivagem de grupos funcionais carboxílicos e metoxi a partir dos íons fragmentos gerados. Dessa forma, elaborou-se uma proposta dos fragmentos formados e suas respectivas perdas, como pode ser visualizada nas FIGURAS 4.13 e 4.14.

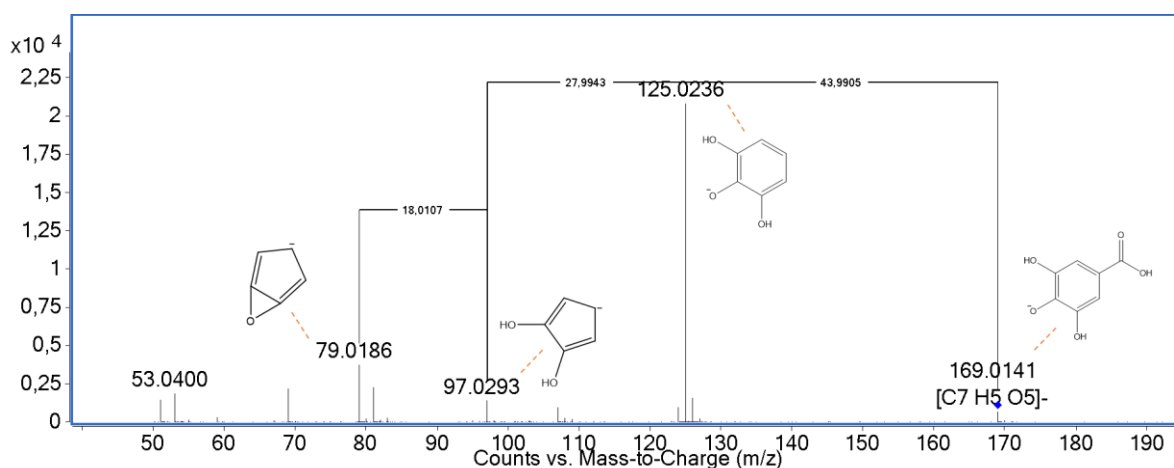


FIGURA 4.13 – Espectro de massas MS/MS e fragmentação do íon de  $m/z$  169,0141, referente ao ácido gálico.

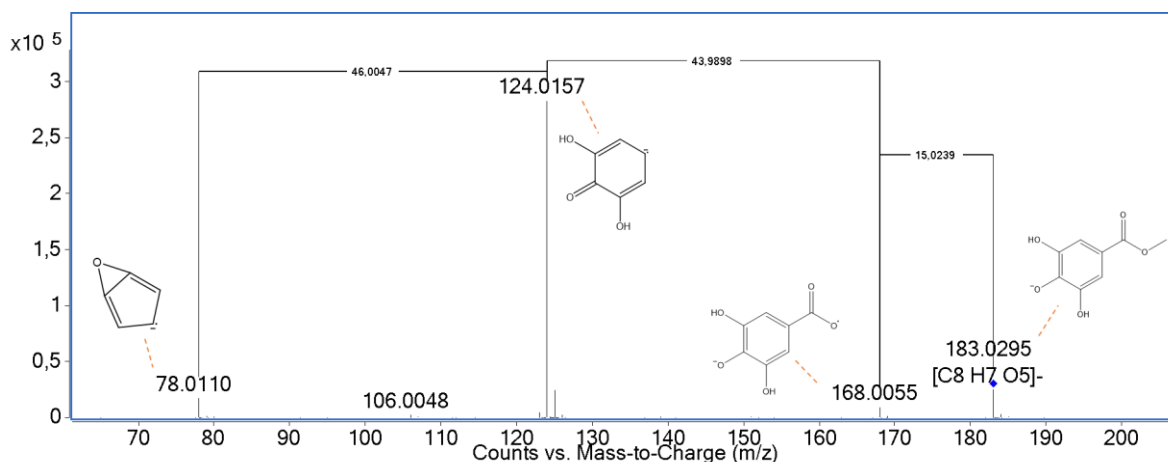


FIGURA 4.14 – Espectro de massas MS/MS e fragmentação do íon de  $m/z$  183,0295 referente ao metil galato.

Em relação ao ácido gálico, a partir do íon precursor com  $m/z$  169,0141, ocorre a formação do íon base com  $m/z$  125,0236, referente à perda de  $\text{CO}_2$  (-44 Da), típica de ácidos carboxílicos. O íon fragmento com  $m/z$  97,0293 é então formado devido à perda de  $\text{CO}$  (-28 Da), seguido pela formação do íon fragmento com  $m/z$  79,0186, decorrente de uma perda de  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da). Em relação ao metil galato, a partir do íon precursor com  $m/z$  183,0295, ocorre a formação do íon fragmento com  $m/z$  168,0055, referente à perda de um radical metil  $\cdot\text{CH}_3$  (-15 Da), confirmando a presença do grupo metoxi. O íon base com  $m/z$  124,0157 é então formado devido à perda de  $\text{CO}_2$  (-44 Da), seguido pela formação do íon fragmento com  $m/z$  78,0110, a partir da perda de  $\text{CO}$  (-28 Da), seguida da perda de  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da), somando -46 Da.

#### 4.2.2 – Linearidade e limites de detecção e quantificação

As curvas de calibração foram construídas tanto a partir de soluções contendo apenas os padrões analíticos (curva no solvente) quanto em presença de uma quantidade fixa dos extratos obtidos por homogeneização (curva na matriz EAH) e por micro-ondas (curva na matriz EAM) e podem ser visualizadas na FIGURA 4.15 a 4.17. Todas apresentaram coeficientes de determinação muito próximos de 1 ( $R^2 > 0,999$ ), demonstrando que as regressões calculadas explicam

com alta precisão a variação dos dados. Estes resultados indicam a linearidade das curvas, estabelecendo uma relação consistente entre a área do pico cromatográfico e a concentração do analito nos níveis avaliados.

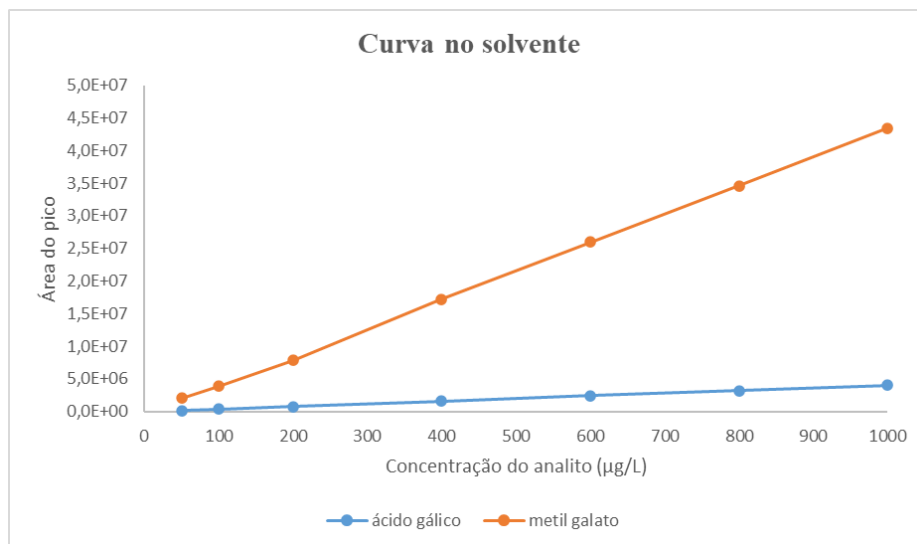


FIGURA 4.15 – Representação gráfica das curvas analíticas com os padrões de ácido gálico e metil galato construídas no solvente.

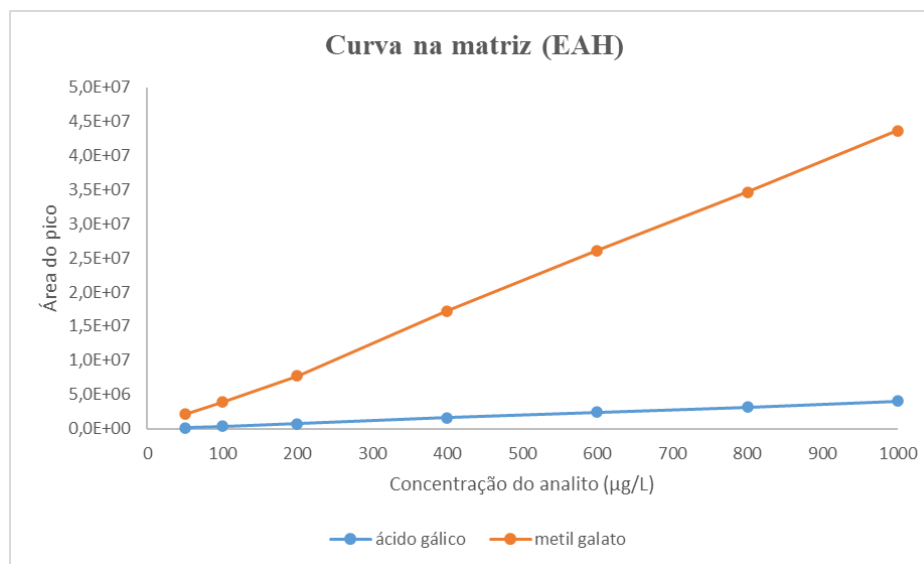


FIGURA 4.16 – Representação gráfica das curvas analíticas com os padrões de ácido gálico e metil galato construídas na matriz obtida pela extração assistida por homogeneização.

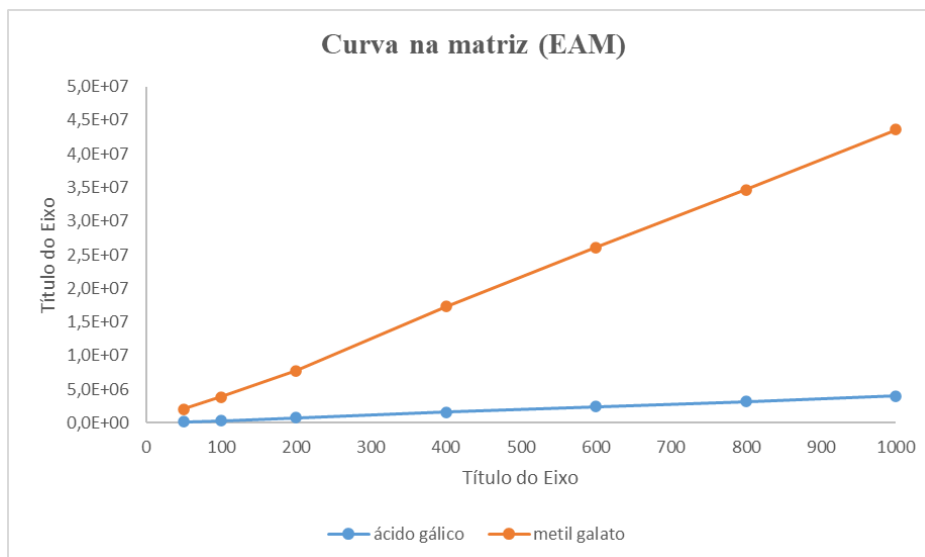


FIGURA 4.17 – Representação gráfica das curvas analíticas com os padrões de ácido gálico e metil galato construídas na matriz obtida pela extração assistida por micro-ondas.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) demonstraram adequação para as curvas analisadas. O LD apresentou valores significativamente baixos, situando-se entre 3 e 10 vezes abaixo da menor concentração da curva ( $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), como visto no  $\text{LD} = 12,8683 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Da mesma forma, o LQ variou de 2 a 5 vezes abaixo deste mesmo ponto, com valores de  $\text{LQ} = 38,6437 \mu\text{g.L}^{-1}$ , evidenciando a sensibilidade de quantificação do método desenvolvido.

A TABELA 4.2 apresenta um resumo dos parâmetros obtidos nas curvas analíticas no solvente e na matriz, os quais estão em conformidade com os critérios estabelecidos pelos principais guias de desenvolvimento e validação de metodologias analíticas, com destaque para as diretrizes do ICH<sup>77</sup>.

TABELA 4.2 – Parâmetros de regressão, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) das curvas construídas.

	Analito	Equação	$R^2$	LD $\mu\text{g/L}$	LQ $\mu\text{g/L}$
<b>Curva no solvente</b>	ácido gálico	$y = 4079,56 x - 64293,6$	0,999764	12,8683	38,6437
	metil galato	$y = 43857,2 x - 462295$	0,999738	13,5572	40,7124
<b>Curva na matriz (EAH)</b>	ácido gálico	$y = 4090,54 x - 6704,99$	0,999666	15,3031	45,9552
	metil galato	$y = 44083,5 x - 510905$	0,999615	16,4356	49,3561
<b>Curva na matriz (EAM)</b>	ácido gálico	$y = 4082,26 x - 59302,5$	0,999739	13,5253	40,6165
	metil galato	$y = 44089,6 x - 525710$	0,999674	15,1278	45,4289

As tabelas de ANOVA das regressões calculadas, que contêm os parâmetros estatísticos garantindo a confiabilidade das curvas, estão disponíveis no Apêndice A. A significância estatística foi estabelecida em  $p$ -valor  $< 0,05$ , indicando que o modelo é adequadamente explicado pela regressão proposta, com um intervalo de confiança de 95%.

### **4.2.3 – Efeito de matriz**

Para selecionar a curva mais adequada para a quantificação dos analitos de interesse, foi calculado o efeito de matriz, que representa a variação na resposta instrumental devido à presença de um ou mais analitos que compõe a matriz analisada. Sua estimativa foi feita comparando os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas, determinando a razão entre eles<sup>78</sup>. Esse cálculo resulta no parâmetro  $\alpha$ , utilizado para quantificar a influência da matriz na resposta analítica.

Os valores do parâmetro  $\alpha$  obtidos para o ácido gálico e metil galato foram equivalentes a 1, como pode ser visto na TABELA 4.3, demonstrando que os coeficientes angulares para ambos os analitos são semelhantes, havendo igualdade entre as curvas, e que não há efeito de matriz proeminente. Sendo assim, tanto a curva no solvente quanto as curvas na matriz poderiam ser empregadas para a quantificação dos analitos de interesse. Porém, a curva realizada apenas em solvente foi selecionada para ambos os analitos por apresentar os melhores parâmetros dentre os discutidos anteriormente ( $R^2$ , LD e LQ).

TABELA 4.3 – Valores do parâmetro  $\alpha$  para avaliar o efeito de matriz.

$\alpha$		
Curvas na matriz		
Analito	EAH	EAM
ácido gálico	1,003	1,001
metil galato	1,005	1,005

#### 4.2.4 – Recuperação

O ensaio de recuperação foi realizado por meio da fortificação dos extratos obtidos com ambos os métodos de extração (EAH e EAM), adicionando concentrações conhecidas dos padrões analíticos de ácido gálico e metil galato. Valores entre 94 e 99% foram obtidos para o ácido gálico, e de 94 a 98% para metil galato, estando dentro do intervalo de 80% a 120% determinados pelo ICH como aceitável<sup>77</sup> (TABELA 4.4).

TABELA 4.4 – Porcentagens de recuperação de ácido gálico e metil galato a partir do ensaio de adição de padrão aos extratos obtidos pelas extrações assistidas por homogeneização (EAH) e por micro-ondas (EAM).

Analito	Recuperação (%)	
	(n=3)	
	EAH	EAM
ácido gálico	96,84	94,27
	94,35	97,45
	98,58	99,01
metil galato	95,20	96,55
	96,33	94,85
	98,60	98,87

#### 4.2.5 – Precisão e exatidão

A partir dos dados obtidos com a construção da curva no solvente, também foram analisados os parâmetros de exatidão e precisão. A precisão foi

determinada comparando as áreas dos picos cromatográficos em três injeções realizadas no mesmo dia (erro intra-dia) e em cinco injeções distribuídas ao longo de três dias distintos (erro inter-dia). Já a exatidão foi avaliada pela razão entre a média das áreas experimentais dos analitos e as áreas teóricas calculadas para a mesma concentração.

A partir dos dados da TABELA 4.5, é possível observar que os resultados estão em conformidade com os critérios estabelecidos pelos principais guias de desenvolvimento e validação de metodologias analíticas, com destaque para as diretrizes do ICH<sup>77</sup>. O parâmetro de exatidão apresentou valores dentro da faixa aceitável de 80 a 120%, enquanto a precisão resultou em variações inferiores a 5% entre as injeções (CV %). Estes resultados indicam a confiabilidade do método, demonstrando sua consistência na quantificação de ácido gálico e metil galato.

TABELA 4.5 – Parâmetros de precisão intra-dia e inter-dia e exatidão das curvas construídas.

Analito	Concentração µg.L <sup>-1</sup>	Precisão inter-dia (CV %)			intra-dia (CV %) (n = 5)	Exatidão (%) (n = 5)
		Dia 1	Dia 2	Dia 3		
ácido gálico	60	0,61	0,91	0,81	0,81	99,15
	500	0,31	0,55	0,27	0,50	98,11
	950	0,29	0,23	0,25	0,34	99,92
metil galato	60	0,46	0,90	1,46	0,93	97,12
	500	0,17	0,45	0,54	1,62	96,19
	950	0,16	0,01	0,60	1,04	96,13

### 4.3 – Extrações e análises quimiométricas

Esta seção apresenta os resultados das extrações com base na quantificação dos analitos de interesse obtida por ambas as técnicas em estudo. A análise é conduzida a partir dos planejamentos fatoriais aplicados, discutindo-se os efeitos das variáveis envolvidas nos processos de extração.

### 4.3.1 – Extração assistida por homogeneização (EAH)

O planejamento fatorial completo foi aplicado para a EAH. As variáveis avaliadas foram:  $V_1$  = quantidade de amostra (massa de resíduo de manga utilizada),  $V_2$  = composição da solução usada como solvente extrator (porcentagem de etanol em água, v/v) e  $V_3$  = número de extrações (quantidade de extrações a serem realizadas com a mesma amostra), cada uma em nível máximo (1) e mínimo (-1). Aplicando as metodologias analíticas desenvolvidas para a detecção e quantificação de ácido gálico e metil galato, foi possível calcular a concentração dos analitos em cada um dos extratos resultantes do planejamento fatorial. Os resultados obtidos podem ser visualizados na TABELA 4.6 (os experimentos foram realizados em triplicata e apresentam o desvio padrão,  $\pm$  DP).

TABELA 4.6 – Resultado do planejamento fatorial completo do método de extração assistida por homogeneização para ácido gálico e metil galato.

Exp.	Variáveis						Respostas	
	Quantidade de amostra		Composição solvente (% EtOH/H <sub>2</sub> O)		Número de extrações		Média da concentração ( $\pm$ DP)	
	(g)		(v/v)				$\mu\text{g.L}^{-1}$	
	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	ácido gálico	metil galato
EAH 1	1	-1	40	-1	1	-1	871,26 $\pm$ 0,15	448,53 $\pm$ 0,13
EAH 2	3	1	40	-1	1	-1	603,25 $\pm$ 1,00	491,77 $\pm$ 0,07
EAH 3	1	-1	80	1	1	-1	434,88 $\pm$ 0,65	371,83 $\pm$ 0,09
EAH 4	3	1	80	1	1	-1	369,67 $\pm$ 0,65	368,42 $\pm$ 0,12
EAH 5	1	-1	40	-1	3	1	335,42 $\pm$ 0,42	472,55 $\pm$ 0,08
EAH 6	3	1	40	-1	3	1	375,00 $\pm$ 0,59	494,34 $\pm$ 0,10
EAH 7	1	-1	80	1	3	1	539,48 $\pm$ 0,73	452,45 $\pm$ 0,11
EAH 8	3	1	80	1	3	1	463,82 $\pm$ 1,10	425,72 $\pm$ 0,09

A maior concentração de ácido gálico foi alcançada no experimento EAH 1, com 871,26  $\mu\text{g.L}^{-1}$  extraídos, seguido pelo experimento EAH 2, que extraiu 603,25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . A maior concentração de metil galato foi obtida no experimento EAH 6, com 494,34  $\mu\text{g.L}^{-1}$  extraídos, seguido também pelo experimento EAH 2, obtendo 491,77  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . É possível notar que, em todos os experimentos citados, a variável composição de etanol em água está no nível mínimo.

A partir do planejamento fatorial completo aplicado, gráficos de efeito percentual e absoluto da influência das variáveis na extração de cada um dos analitos foram plotados. A FIGURA 4.18 mostra os efeitos percentuais das variáveis primárias (efeitos principais), secundárias (efeito de interação entre duas variáveis) e de terceira ordem (efeito de interação das três variáveis) para o ácido gálico (AG) e metil galato (MG).

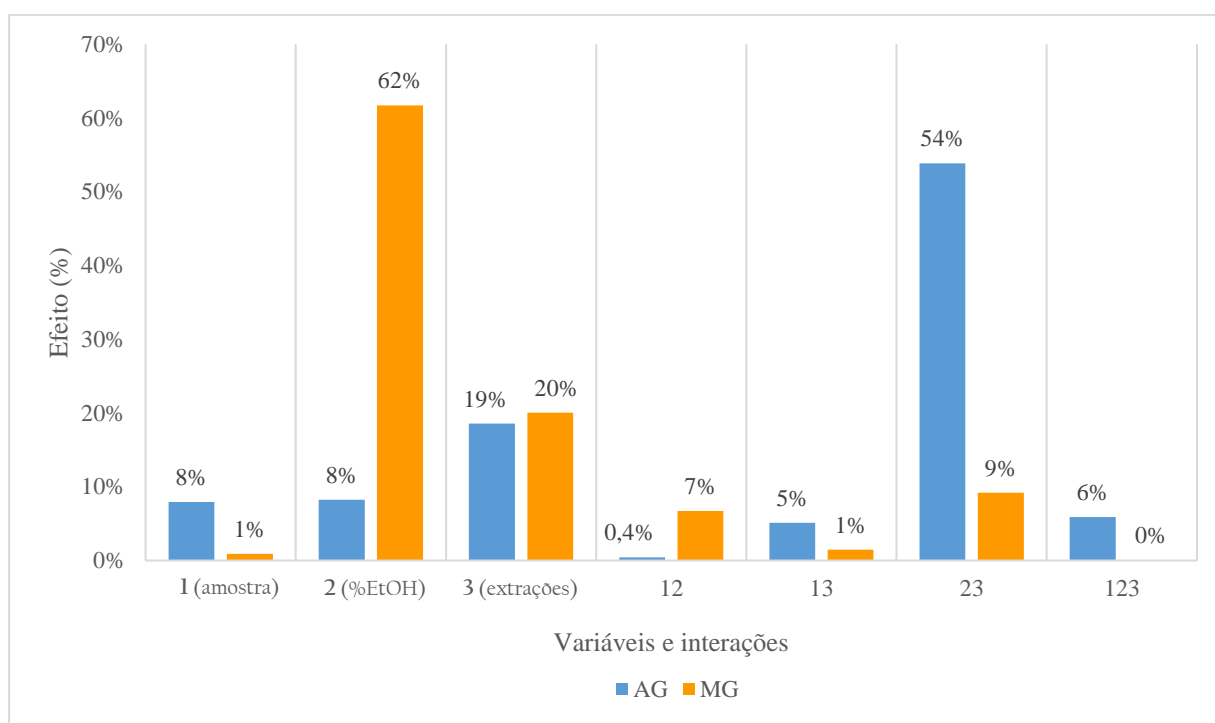


FIGURA 4.18 – Efeitos percentuais das três variáveis estudadas na extração assistida por homogeneização de ácido gálico (AG) e metil galato (MG), sendo quantidade de amostra (1), porcentagem de etanol em água (2) e número de extrações (3).

Analisando os resultados do efeito percentual na extração de ácido gálico: a variável 3 apresentou a maior influência na extração como efeito principal, correspondendo a 19%. Enquanto efeito secundário, a interação das variáveis 23 apresentou 54% de influência na extração. Juntas, as variáveis 3 e a interação 23 correspondem a 73% da influência na extração de AG. Analisando os resultados de extração do metil galato: a variável 2 teve destaque, correspondendo a 62% da influência na extração, seguida da variável 3 que

influenciou em 20%. Juntas, estas variáveis correspondem a 82% da influência na extração de MG. A variável 1 e suas interações não exibiram efeitos significativos (>10%) para os analitos. Isso pode ser atribuído à pequena variação na massa de amostra utilizada, com níveis mínimo e máximo de 1,0 e 3,0 g, respectivamente, o que pode não ter sido suficiente para evidenciar efeitos consideráveis na extração.

A FIGURA 4.19 mostra os efeitos absolutos das variáveis primárias (efeitos principais), secundárias (efeito de interação entre duas variáveis) e de terceira ordem (efeito de interação das três variáveis) para o ácido gálico (AG) e metil galato (MG), os quais são equivalentes à unidade utilizada na resposta, no caso, concentração dos analitos ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Importante ressaltar que o efeito é a diferença da média das respostas do nível alto pela média do nível baixo, como descrito na subseção 3.6.1.

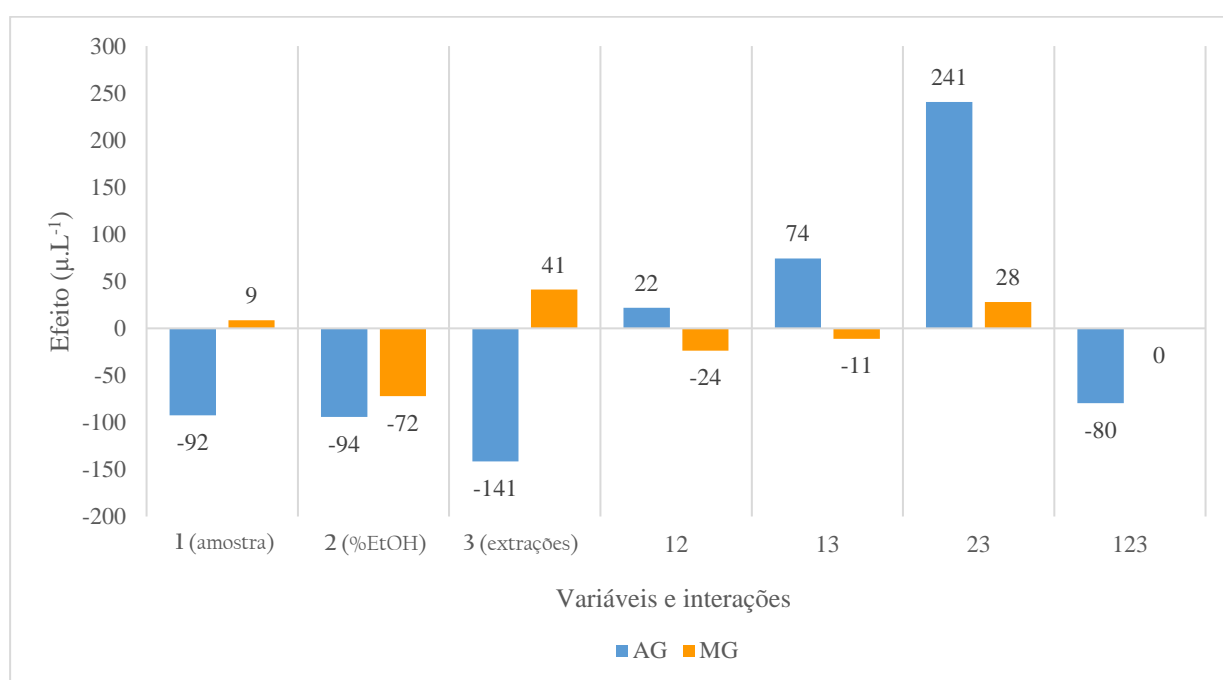


FIGURA 4.19 – Efeitos absolutos das três variáveis estudadas na extração assistida por homogeneização de ácido gálico (AG) e metil galato (MG), sendo quantidade de amostra (1), porcentagem de etanol em água (2) e número de extrações (3).

Analisando os resultados do efeito absoluto para o ácido gálico: ao considerar as variáveis que mais influenciaram na extração descritas anteriormente, observa-se que a variável 3 apresenta uma influência negativa, isto é, a melhor resposta é obtida quando ela está no nível mínimo (pode-se interpretar que, quando a variável 3 está no nível máximo, a concentração de AG diminui em  $141 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). O efeito de interação 23 apresenta uma influência positiva, ou seja, a melhor resposta é alcançada quando ambas as variáveis estão no mesmo nível, no caso, no nível mínimo. Isso pode ser observado no experimento EAH 1, que apresentou a maior concentração de ácido gálico empregando estas condições. Analisando os resultados para o metil galato: ao considerar as variáveis que mais influenciaram em sua extração, observa-se que variável 2 apresenta uma influência negativa, mostrando que a melhor resposta é obtida quando ela está no nível mínimo, enquanto a variável 3 apresenta uma influência positiva, ou seja, a melhor resposta é alcançada no nível máximo. Isso pode ser observado no experimento EAH 6, que obteve a maior concentração de metil galato ao empregar estas condições.

Com base nestes resultados, a partir das condições estudadas, observa-se a grande influência da composição de etanol em água (variável 2) e do número de extrações (variável 3) na extração de ambos os analitos. Para o ácido gálico, a extração mais eficiente ocorreu empregando-se a solução extratora na composição de 40% de etanol em água (v.v<sup>-1</sup>) e realizando o procedimento apenas uma vez. A maior concentração de metil galato também foi obtida ao se utilizar a solução extratora de 40% de etanol em água (v.v<sup>-1</sup>), mas realizando três extrações consecutivas.

É importante destacar que não foram identificados estudos cujos resultados de extração pudessem ser diretamente comparados aos obtidos nesta pesquisa. Isso se deve à natureza específica da amostra, composta por uma mistura de casca, semente e partes do caroço de manga, e à escolha dos analitos de interesse, cuja seleção foi conduzida de forma bioguiada, tornando-se, portanto,

particular à aplicação deste estudo. Além disso, a ausência de uma nomenclatura padronizada para o método de extração assistido por homogeneização leva à dispersão dos estudos que o utilizam, dificultando sua identificação na literatura. Diante disso, serão discutidos os resultados de pesquisas que utilizaram diferentes porções de resíduos manga na extração de compostos fenólicos em geral utilizando o método de extração por homogeneização, mas também empregando técnicas de extração sólido-líquido similares.

Estudos iniciais sobre o tema, como o realizado por Dorta, Lobo e Gonzalez (2012)<sup>99</sup>, investigaram a obtenção de compostos antioxidantes da casca de manga por meio da extração por homogeneização, conduzindo três ciclos independentes. Dentre as variáveis analisadas, a solução extratora composta por 50% de etanol em água (v.v<sup>-1</sup>) resultou no maior teor de antioxidantes, enquanto a temperatura não apresentou influência. Embora o número de extrações não tenha sido especificamente investigado, o estudo ressaltou a importância da realização de, no mínimo, três ciclos para maximizar a obtenção dos compostos. Em outro estudo conduzido pelas mesmas autoras (2013)<sup>100</sup>, a influência do número de extrações foi avaliada, demonstrando que a realização de três ciclos resultou em extratos da casca de manga com maior teor de fitoquímicos, tanto na extração convencional quanto na assistida por micro-ondas.

O estudo conduzido por Lin et al. (2019)<sup>101</sup> investigou a extração de compostos fenólicos da semente do caroço de manga por meio do método de agitação à temperatura ambiente, utilizando diferentes proporções de água e etanol como solução extratora. Os resultados indicaram que a solução composta por 50% de etanol em água foi a mais eficiente, sendo executada apenas uma vez, apresentando o maior teor de fenólicos, dentre os quais ácido gálico e seus derivados foram identificados. Outro estudo, realizado por Siacor, Lobarbio e Taboada (2020)<sup>102</sup>, investigou a otimização da extração de compostos fenólicos a partir da semente do caroço de manga, empregando extração sólido-líquido convencional e uma abordagem estatística para se obter condições ótimas. Entre

as variáveis analisadas, além da temperatura, a concentração de etanol teve impacto positivo no rendimento da extração, sendo a condição otimizada de 53,21% de etanol em água (v.v<sup>-1</sup>). Por fim, ao comparar os teores de compostos fenólicos extraídos de semente de manga por meio de uma extração sólido-líquido convencional e por ultrassom, o estudo desenvolvido por Martínez-Olivo et al. (2023)<sup>103</sup> revelou que a técnica convencional apresentou maior eficiência na extração de galatos e galotaninos, sendo realizada apenas uma vez empregando uma solução extratora na composição de 20% de etanol em água (v.v<sup>-1</sup>) à 60°C.

Os estudos discutidos apresentam resultados compatíveis com os obtidos neste trabalho, demonstrando que a utilização de etanol em água em baixas concentrações é eficaz na extração de compostos fenólicos por meio de extrações sólido-líquido convencionais. No que se refere à influência do número de extrações, há uma relativa escassez de estudos que avaliem esse efeito estatisticamente utilizando resíduos de manga como matriz vegetal. Entretanto, observa-se que a otimização da obtenção de analitos específicos por meio de múltiplos ciclos está intrinsecamente relacionada às demais variáveis do processo de extração. Além disso, a eficiência da extração depende da disponibilidade do composto na matriz, tornando-se, portanto, uma característica particular de cada metodologia e analito envolvido, considerando as diversas e complexas interações solvente-matriz.

#### **4.3.2 – Extração assistida por micro-ondas (EAM)**

O planejamento fatorial completo foi aplicado para a EAM. As variáveis avaliadas foram:  $V_1$  = quantidade de amostra,  $V_2$  = composição da solução extratora (porcentagem de etanol em água, v/v) e  $V_3$  = temperatura do equipamento micro-ondas, cada uma em nível máximo (1) e mínimo (-1). Aplicando as metodologias analíticas desenvolvidas para a detecção e quantificação de ácido gálico e metil galato, foi possível calcular a concentração dos analitos em cada um dos extratos resultantes do planejamento fatorial. Os

resultados obtidos podem ser visualizados na TABELA 4.7 (os experimentos foram realizados em triplicata e apresentam o desvio padrão,  $\pm$  DP).

TABELA 4.7 – Resultado do planejamento fatorial completo do método de extração assistida por micro-ondas para ácido gálico e metil galato.

Exp.	Variáveis						Respostas	
	Quantidade de amostra		Composição solvente (% EtOH/H <sub>2</sub> O)		Temperatura (°C)		Média da concentração ( $\pm$ DP)	
	(g)		(v/v)				$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	ácido gálico	metil galato
MAE 1	1	-1	40	-1	30	-1	766,54 $\pm$ 0,76	337,25 $\pm$ 0,18
MAE 2	3	1	40	-1	30	-1	780,16 $\pm$ 1,17	396,85 $\pm$ 0,09
MAE 3	1	-1	80	1	30	-1	714,24 $\pm$ 1,30	313,19 $\pm$ 0,11
MAE 4	3	1	80	1	30	-1	597,74 $\pm$ 0,95	316,37 $\pm$ 0,10
MAE 5	1	-1	40	-1	70	1	17,70 $\pm$ 0,01	66,65 $\pm$ 0,06
MAE 6	3	1	40	-1	70	1	17,95 $\pm$ 0,01	64,86 $\pm$ 0,14
MAE 7	1	-1	80	1	70	1	912,69 $\pm$ 1,16	312,36 $\pm$ 0,03
MAE 8	3	1	80	1	70	1	893,66 $\pm$ 0,76	318,41 $\pm$ 0,05

A maior concentração de ácido gálico foi 912,69  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , obtida no experimento EAM 7, seguido pelo experimento EAM 8, que extraiu 893,66  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Em ambos os experimentos, as variáveis composição de etanol em água e temperatura estão nos níveis máximos. A maior concentração de metil galato foi alcançada no experimento EAM 2, com 396,85  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  extraídos, seguido pelo experimento EAM 1, obtendo 337,25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . É possível notar que, ao contrário do observado para o ácido gálico, ambos os experimentos apresentam as variáveis composição de etanol em água e temperatura em níveis mínimos.

A partir do planejamento fatorial aplicado, gráficos de efeito percentual e absoluto da influência das variáveis na extração de cada um dos analitos foram plotados. A FIGURA 4.20 mostra os efeitos percentuais das variáveis primárias (efeitos principais), secundárias (efeito de interação entre duas variáveis) e de terceira ordem (efeito de interação das três variáveis) para o ácido gálico (AG) e metil galato (MG).

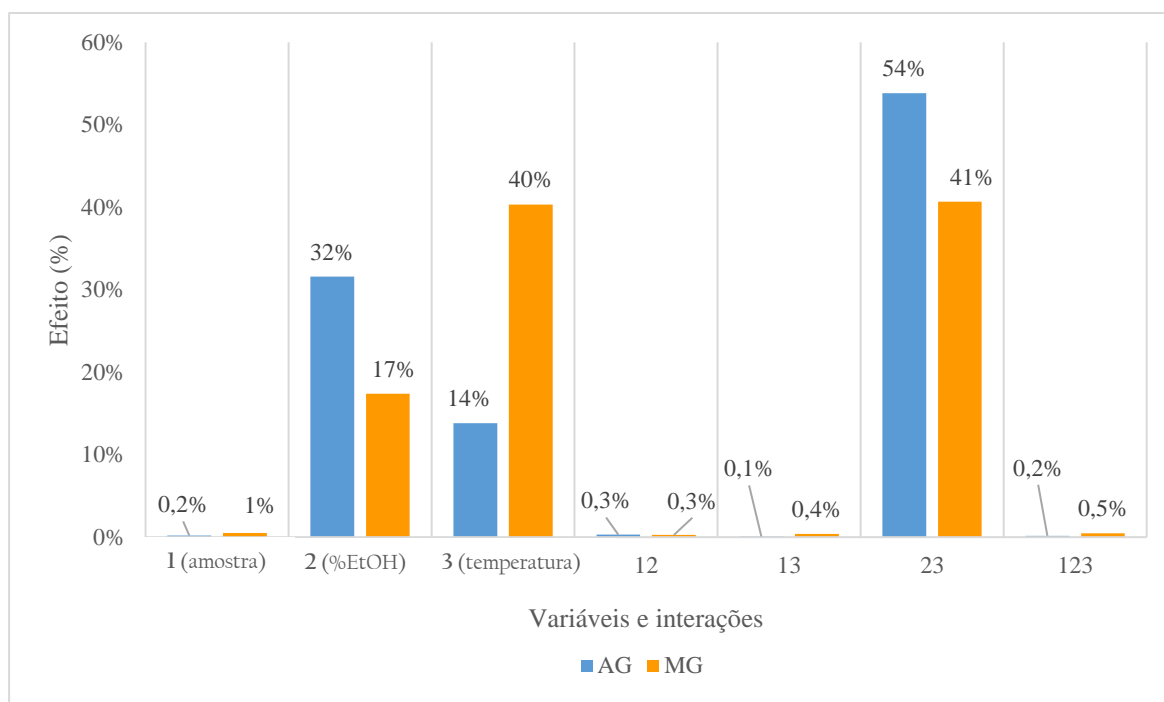


FIGURA 4.20 – Efeitos percentuais das três variáveis estudadas na extração assistida por micro-ondas de ácido gálico (AG) e metil galato (MG), sendo quantidade de amostra (1), porcentagem de etanol em água (2) e temperatura do micro-ondas (3).

Analisando os resultados do efeito percentual na extração de ácido gálico: a variável 2 apresentou a maior influência na extração como efeito principal, correspondendo a 32%. Enquanto efeito secundário, a interação das variáveis 23 apresentou 54% de influência na extração. Juntas, as variáveis 2 e a interação 23 correspondem a 86% da influência na extração de AG. Analisando os resultados de extração do metil galato: a variável 3 teve destaque, correspondendo a 40% da influência na extração, seguida da interação 23 que influenciou em 41%. Juntas, estas variáveis correspondem a 81% da influência na extração de MG. De forma similar ao encontrado para a EAH, a variável 1 e suas interações não exibiram efeitos significativos (>10%) para os analitos, o que pode ser justificado pela pequena variação na massa de amostra entre os níveis mínimo e máximo, podendo não ter sido suficiente para evidenciar efeitos significativos na extração.

A FIGURA 4.21 mostra os efeitos absolutos das variáveis primárias (efeitos principais), secundárias (efeito de interação entre duas variáveis) e de

terceira ordem (efeito de interação das três variáveis) para o ácido gálico (AG) e metil galato (MG).

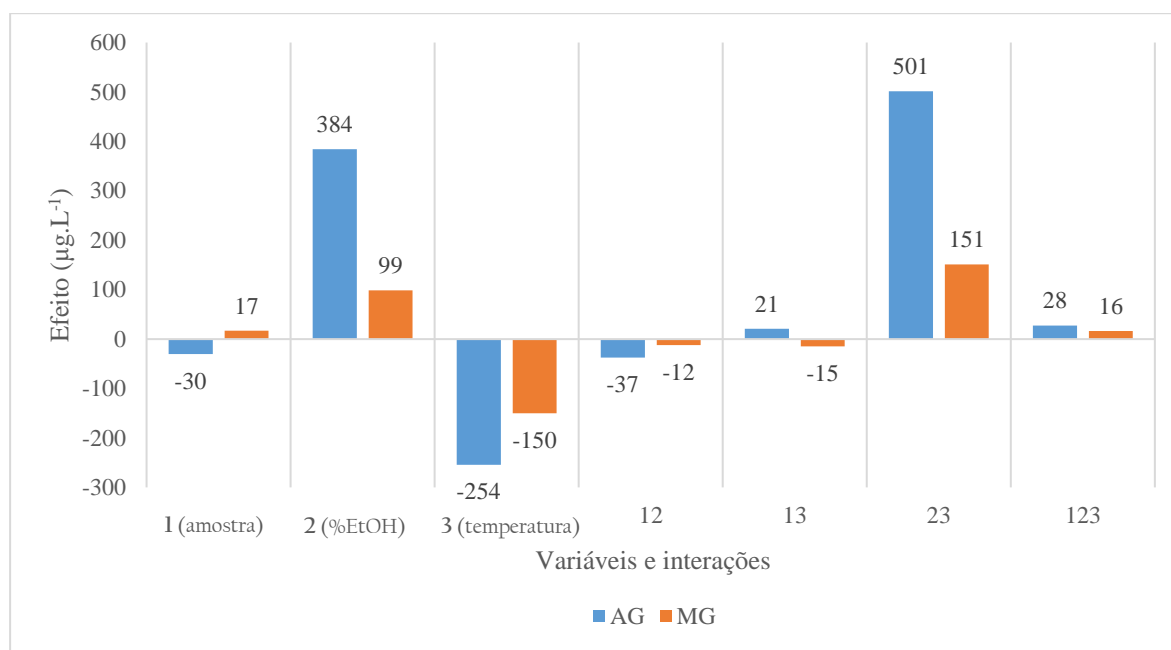


FIGURA 4.21 – Efeitos absolutos das três variáveis estudadas na extração assistida por micro-ondas de ácido gálico (AG) e metil galato (MG), sendo quantidade de amostra (1), porcentagem de etanol em água (2) e temperatura do micro-ondas (3).

Analisando os resultados do efeito absoluto para o ácido gálico: ao considerar as variáveis que mais influenciaram na extração descritas anteriormente, observa-se que a variável 2 apresenta uma influência positiva, isto é, a melhor resposta é obtida quando ela está no nível máximo. O efeito de interação 23 apresenta uma influência positiva, ou seja, a melhor resposta é alcançada quando ambas as variáveis estão no mesmo nível, no caso, no nível máximo. Isso pode ser observado no experimento EAM 7, que apresentou a maior concentração de ácido gálico empregando estas condições. Analisando os resultados para o metil galato: ao considerar as variáveis que mais influenciaram em sua extração, observa-se que variável 3 apresenta uma influência negativa, onde a melhor resposta é obtida quando ela está no nível mínimo. O efeito de interação 23 apresenta uma influência positiva, ou seja, a melhor resposta é

alcançada quando ambas as variáveis estão no mesmo nível, no caso, no nível mínimo. Isso pode ser observado no experimento EAM 2, que obteve a maior concentração de metil galato ao empregar estas condições.

Com base nestes resultados, a partir das condições estudadas, observa-se a grande influência da composição de etanol em água e da temperatura do equipamento para a extração de ambos os analitos. Para o ácido gálico, a extração mais eficiente ocorreu empregando-se uma solução extratora na composição de 80% de etanol em água (v.v<sup>-1</sup>) com a temperatura de 70°C. Por outro lado, a maior concentração de metil galato foi obtida ao utilizar uma solução extratora de 40% de etanol em água (v.v<sup>-1</sup>) com a temperatura de 30°C.

Novamente, é importante destacar que não foram encontrados estudos cujos resultados de extração pudessem ser diretamente comparados aos obtidos nesta pesquisa. Isso se deve à natureza específica da amostra, composta por uma mistura de casca, semente e partes do caroço de manga, e à escolha dos analitos de interesse, cuja seleção foi conduzida de forma bioguiada, tornando-se, portanto, particular à aplicação deste estudo. Diante disso, serão discutidos os resultados de pesquisas que utilizaram diferentes porções de resíduos manga na extração de compostos fenólicos em geral utilizando a técnica de extração assistida por micro-ondas.

Assim como nos resultados obtidos na extração de ácido gálico, no estudo desenvolvido por Segatto et al. (2021)<sup>53</sup> utilizando uma mistura similar das porções de resíduos de manga, as concentrações de 75% e 90% de etanol em água (v.v<sup>-1</sup>) foram identificadas como as mais adequadas para a extração de compostos fenólicos específicos, com temperatura de 70°C. O estudo conduzido por Torres-León et al. (2017)<sup>104</sup> investigou a extração de compostos fenólicos da semente do caroço de manga, com ênfase em galotaninos. Para otimizar o processo, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, identificando a temperatura de 75°C como a variável de maior influência. Outro estudo, realizado por Ramírez-Brewer et al. (2024)<sup>105</sup>, investigou a influência de diversas variáveis na extração

de compostos fenólicos em extratos de casca de manga, também utilizando gráficos de superfície de resposta. As condições ótimas determinadas corresponderam à utilização de uma solução extratora contendo 75% de etanol em água (v.v<sup>-1</sup>).

Estudos também apresentam resultados similares quanto às variáveis que otimizaram a extração de metil galato. A resposta ótima obtida para a extração de fenólicos específicos foi alcançada empregando-se temperaturas em torno de 40°C no mesmo estudo desenvolvido por Segatto et al. (2021)<sup>53</sup> com resíduos de manga, embora com concentração de etanol em água superior a 70% (v.v<sup>-1</sup>). O estudo conduzido por Zou et al. (2013)<sup>106</sup> investigou a influência de diferentes variáveis na extração compostos fenólicos a partir da casca de manga, empregando a metodologia de superfície de resposta. As condições ótimas identificadas indicaram o uso de uma solução extratora composta por 45% de etanol em água (v.v<sup>-1</sup>). Outro estudo desenvolvido por a Vélez-Erazo et al. (2021)<sup>107</sup> avaliou a influência de variáveis na extração de compostos fenólicos a partir da casca de manga, obtendo os maiores rendimentos ao empregar uma solução extratora de 50% de etanol em água (v.v<sup>-1</sup>) à temperatura ambiente, independentemente da potência de micro-ondas.

Embora as condições ótimas de extração para o ácido gálico e o metil galato tenham sido obtidas em níveis opostos – máximo e mínimo, respectivamente – há estudos que indicam ambas as condições como favoráveis à extração de compostos fenólicos. Portanto, o que se depreende dessa discussão é que a otimização da obtenção de analitos específicos está diretamente relacionada a dois fatores principais: (1) as particularidades da matriz do resíduo de manga – incluindo a parte do resíduo analisada, o método de cultivo, a variedade da fruta e outros fatores – que podem influenciar a disponibilidade dos analitos na matriz, o que reforça a importância de um método analítico validado, e (2) as demais variáveis do processo de extração, evidenciando que os extratos obtidos são

altamente dependentes da metodologia empregada – a qual, por sua vez, resulta das múltiplas e complexas interações entre o solvente e a matriz.

### 4.3.3 – Função desejabilidade: definição dos extratos otimizados

A partir da análise dos melhores parâmetros de extração para cada analito dentro de uma mesma técnica, é possível observar que as respostas obtidas em termos de concentração foram alcançadas com níveis distintos para cada analito, máximos ou mínimos. Desta forma, foi calculada a função desejabilidade para estas respostas (TABELA 4.8) no intuito de se obter parâmetros que otimizem a extração de ácido gálico e metil galato simultaneamente, levando a uma única resposta: os extratos otimizados para ambos os analitos em cada um dos métodos de extração.

TABELA 4.8 – Valores de desejabilidade global calculados para todos os extratos obtidos com ambas as técnicas de extração.

<b>Exp</b>	<b>Desejabilidade global</b>	<b>Exp</b>	<b>Desejabilidade global</b>
EAH 1	0,80	EAM 1	0,66
EAH 2	0,70	EAM 2	0,76
EAH 3	0,07	EAM 3	0,53
EAH 4	0,00	EAM 4	0,00
EAH 5	0,00	EAM 5	0,00
EAH 6	0,27	EAM 6	0,00
EAH 7	0,50	EAM 7	0,86
EAH 8	0,33	EAM 8	0,85

Como discutido na subseção 3.6.2, valores de desejabilidade global (D) mais próximos a 1 são desejáveis, pois evidenciam que ambas as respostas estão próximas ao valor máximo obtido. A partir disso, pode-se observar que o experimento utilizando o método de EAH que otimiza a extração de ambos os

analitos é o EAH 1 ( $D = 0,80$ ), enquanto o experimento feito com a EAM que tem a mesma função é o EAM 7 ( $D = 0,86$ ). As condições empregadas na EAH 1 foram: 1,0 g de amostra, 40% de etanol em água ( $v.v^{-1}$ ) com a extração realizada apenas uma vez, obtendo-se as concentrações de  $871,26 \mu\text{g.L}^{-1}$  para AG e  $448,53 \mu\text{g.L}^{-1}$  para MG. As condições empregadas na EAM 7 foram: 1,0 g de amostra, 80% de etanol em água ( $v.v^{-1}$ ) e temperatura do micro-ondas a  $70^{\circ}\text{C}$ , obtendo-se as concentrações de  $912,69 \mu\text{g.L}^{-1}$  para AG e  $312,36 \mu\text{g.L}^{-1}$  para MG.

A distinção das condições otimizadas para a extração de ácido gálico e metil galato entre os dois métodos pode ser explicada pelas diferenças nos mecanismos de extração e interação do solvente com a matriz. O método de extração assistido por homogeneização promove uma forte agitação mecânica, criando forças de cisalhamento que aumentam o contato entre o solvente e a matriz<sup>54</sup>. A intensa turbulência mecânica proporcionada pelo Ultra-Turrax<sup>®</sup> rompe as estruturas celulares de forma severa, liberando o soluto para o solvente. Sob estas condições intensas, uma menor proporção de etanol (no caso, 40% EtOH/H<sub>2</sub>O) pode se mostrar eficaz na extração, apesar da maior solubilidade de ácido gálico e metil galato em etanol do que em água<sup>108</sup>. Também devido a este mecanismo de extração por forças mecânicas que quebram as paredes celulares vegetais de forma abrupta, extrações consecutivas podem ser desnecessárias. Um único procedimento de extração pode ser suficiente para proporcionar a remoção completa dos analitos, mesmo se tratando de uma matriz vegetal complexa – como apresentado em diversos estudos similares discutidos na subseção 4.3.1.

Por outro lado, o método de extração assistido por micro-ondas se dá através de um processo térmico. A extração ocorre a partir de ondas eletromagnéticas irradiadas pelo equipamento, promovendo um aquecimento localizado em moléculas com alta constante dielétrica. Esta interação entre dipolos elétricos depende das propriedades dielétricas das moléculas do solvente e da matriz. A maior proporção de etanol na solução extratora (no caso, 80% EtOH/H<sub>2</sub>O) se mostra mais eficaz, uma vez que a água tem uma alta constante

dielétrica e absorve micro-ondas eficientemente, podendo, em maiores proporções, superaquecer e gerar interações indesejadas com a matriz. O etanol, que tem uma menor constante dielétrica<sup>109</sup>, estando em maior proporção, pode equilibrar o aquecimento gerado, promovendo a extração e evitando a degradação térmica dos analitos<sup>105</sup>. A temperatura tem papel importante na otimização da extração de ácido gálico e metil galato, uma vez que temperaturas mais elevadas proporcionam um aumento na solubilidade de ambos os analitos<sup>110</sup>. Devido ao fornecimento de mais energia a partir deste aumento, o rompimento das paredes celulares vegetais é acelerado, disponibilizando eficientemente o soluto para o solvente<sup>111</sup>.

Em suma, pode-se concluir que as melhores condições de extração são muito particulares a cada caso, estando intrinsecamente relacionadas a três fatores principais: (1) à técnica de extração sólido-líquido e seu mecanismo, permitindo extrações mais seletivas através de processos térmicos ou mais agressivas por meio de processos mecânicos intensos, (2) às propriedades da solução extratora e (3) às propriedades dos analitos que se quer extrair, ambas relacionadas à interação do solvente com a matriz, especialmente no que se refere à solubilidade e a outros aspectos físico-químicos que impactam os fenômenos de transporte envolvidos no processo de extração<sup>112</sup>. Dessa forma, reafirma-se a importância da investigação e desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas a cada caso, nas quais a quimiometria focada no *design* experimental e na análise de variáveis é uma ferramenta fundamental.

#### **4.4 – Ensaios biológicos**

Nesta seção serão apresentados os resultados dos diversos ensaios biológicos realizados com os extratos otimizados com ambas as técnicas de extração, assistida por homogeneização (EAH 1) e assistida por micro-ondas (EAM 7). Os ensaios biológicos foram efetuados com linhagens celulares tumorais e não-tumoral para avaliar a citotoxicidade dos extratos.

#### **4.4.1 – Ensaio de viabilidade celular (IC<sub>50</sub>)**

O extrato-teste EAH foi direcionado ao ensaio de viabilidade celular no intuito de avaliar sua citotoxicidade nas seguintes linhagens celulares humanas: não-tumoral de pulmão (MRC-5), tumoral de ovário (A2780), tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis), tumoral de próstata (DU145), tumoral de mama (MCF-7), tumoral de mama triplo-negativo (MDA-MB-231) e tumoral de pulmão (A549) – resultado já apresentado na subseção 4.1.3, mas será retomado.

A determinação da atividade citotóxica das amostras se deu pelo método colorimétrico utilizando brometo de 3-(4,5- dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) como reagente de viabilidade, no qual ocorre a redução do sal de MTT de coloração amarela em cristais de Formazan de coloração roxa, por meio da ação de enzimas presentes apenas em células viáveis. Assim, o número de células vivas é proporcional ao número de cristais formados, permitindo quantificá-las. A partir disso, foram calculados os valores de IC<sub>50</sub>, concentração mínima necessária para inibir em 50% o crescimento celular, e os índices de seletividade (IS) dos extratos quanto às células tumorais. Os resultados podem ser vistos na TABELA 4.9.

TABELA 4.9 – Valores de IC<sub>50</sub> e IS do extrato-teste EAH em diversas linhagens celulares a partir do ensaio de viabilidade com MTT realizado em 48 h.

<b>Linhagens</b>	<b>IC<sub>50</sub> µg.mL<sup>-1</sup> (± DP)</b>	<b>IS</b>
MRC-5	50.81 ± 1.80	-
A549	18.86 ± 1.41	2,69
A2780	6.70 ± 0.79	7,58
A2780cis	11.69 ± 3.76	4,35
DU145	41.45 ± 0.62	1,23
MCF-7	38.92 ± 0.52	1,31
MDA-MB-231	10.48 ± 0.22	4,85

Pode-se observar, ao comparar os valores de IC<sub>50</sub>, que o extrato EAH foi mais ativo nas linhagens tumoral de ovário (A2780), tumoral de mama triplo-negativo (MDA-MB-231), tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis) e tumoral de pulmão (A549), nesta ordem. O extrato apresentou os menores valores de IC<sub>50</sub> nestas linhagens, isto é, uma menor concentração foi necessária para inibir o crescimento celular. As linhagens tumorais de próstata (DU145) e mama (MCF-7) apresentaram valores de IC<sub>50</sub> ligeiramente maiores.

De acordo com a revisão bibliográfica realizada na base *Web of Science*, que abrangeu estudos dos últimos 10 anos sobre a aplicação de extratos de manga em ensaios biológicos com células cancerígenas de pulmão, ovário, próstata e mama, observou-se uma predominância de pesquisas envolvendo as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, alguns estudos com a linhagem A549 e nenhuma referência para as demais linhagens consultadas<sup>17,25,90,93,113-122</sup>. Diante disso, a seleção das linhagens celulares para este estudo considerou três critérios principais: (1) os valores de IC<sub>50</sub> mais promissores obtidos, (2) a disponibilidade de estudos prévios e (3) o grau de mortalidade dos tipos de câncer analisados. Assim, foram escolhidas as seguintes linhagens como foco desta pesquisa: tumoral de ovário (A2780), tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis) e

tumoral de pulmão (A549). A não-tumoral de pulmão (MRC-5) também foi selecionada por ser uma linhagem saudável, importante para comparações e cálculos de IS.

A partir desta definição, foram conduzidos ensaios de viabilidade utilizando os padrões comerciais de ácido gálico e metil galato nas linhagens selecionadas, uma vez que estes compostos foram estabelecidos como analitos de interesse por meio dos ensaios bioguiados e das análises espectrométricas descritas na subseção 4.1.3 e subseção 4.1.4. Além disso, os ensaios foram realizados com os fármacos cisplatina e doxorrubicina, cujos valores de IC<sub>50</sub> e IS foram utilizados como referência. Os resultados podem ser vistos na TABELA 4.10.

TABELA 4.10 – Comparação dos valores de IC<sub>50</sub> dos padrões de ácido gálico e metil galato com os dos fármacos cisplatina e doxorrubicina obtidos a partir do ensaio de viabilidade com MTT realizado em 48 h.

		IC <sub>50</sub> µg.mL <sup>-1</sup> (± DP)				IS		
		MRC5 (saudável)	A549 (pulmão)	A2780 (ovário)	A2780cis (ovário resistente)	A549	A2780	A2780cis
<b>Padrões analíticos</b>	ácido gálico	32.29 ± 0.62	8.82 ± 0.34	2.16 ± 0.82	1.73 ± 0.18	3,66	14,95	18,66
	metil galato	22.31 ± 1.85	9.28 ± 0.45	4.96 ± 1.47	9.88 ± 0.61	2,40	4,50	2,26
<b>Fármacos comerciais</b>	cisplatina	5.72 ± 0.57	4.32 ± 1.40	3.51 ± 0.30	7.68 ± 0.29	1,32	1,63	0,74
	doxorrubicina	13.19 ± 1.21	2.21 ± 0.15	0.43 ± 0.10	1.29 ± 0.92	5,97	30,67	10,22

Os valores de IC<sub>50</sub> dos analitos nas células tumorais são comparáveis aos dos fármacos comerciais, sendo até menores em alguns casos quando tratadas com ácido gálico, como para as linhagens A2780 (IC<sub>50</sub> = 2,16 µg.mL<sup>-1</sup>) e A2780cis (IC<sub>50</sub> = 1,73 µg.mL<sup>-1</sup>), principalmente em relação à cisplatina. Este resultado evidencia a alta atividade biológica dos analitos, com grande potencial antitumoral, uma vez que são necessárias baixas concentrações para inibir o crescimento celular. Estes valores concordam com valores de IC<sub>50</sub> dos analitos nas mesmas linhagens reportados na literatura, embora possam apresentar pequenas variações em função da metodologia empregada<sup>90,123,124</sup>. Em contrapartida, na linhagem saudável MRC-5, os valores de IC<sub>50</sub> dos padrões

analíticos são ligeiramente superiores aos dos fármacos, o que resulta em elevados índices de seletividade para a maioria das linhagens tumorais quando tratadas com os analitos. Destacam-se os valores obtidos para o ácido gálico, que apresentou IS de 14,95 na A2780 e de 18,66 na A2780cis.

Após a definição dos extratos otimizados por meio das análises quimiométricas, estes foram submetidos aos ensaios de viabilidade celular. Para possibilitar a comparação entre os extratos-teste (subseção 4.1.1) e os extratos otimizados (subseção 4.3.3) obtidos a partir das duas técnicas de extração, também foram realizados ensaios de viabilidade celular com os extratos-teste provenientes da extração assistida por micro-ondas (EAM). Os valores de IC<sub>50</sub> e IS dos extratos-teste EAH e EAM, bem como dos extratos otimizados EAH 1 e EAM 7, estão apresentados na TABELA 4.11.

TABELA 4.11 – Comparação dos valores de IC<sub>50</sub> dos extratos-teste e otimizados a partir do ensaio de viabilidade com MTT realizado em 48 h, obtidos com as técnicas de extrações assistida por homogeneização (EAH) e por micro-ondas (EAM).

Extratos	IC <sub>50</sub> µg.mL <sup>-1</sup> (± DP)				IS		
	MRC5 (saudável)	A549 (pulmão)	A2780 (ovário)	A2780cis (ovário resistente)	A549	A2780	A2780cis
EAH	50.81 ± 1.80	18.86 ± 1.41	6.70 ± 0.79	11.69 ± 3.76	2,69	7,58	4,35
EAH 1	52.86 ± 0.26	14.25 ± 1.94	0.70 ± 0.09	1.33 ± 0.14	3,71	75,51	39,74
EAM	36.90 ± 0.49	12.71 ± 0.81	0.50 ± 0.09	7.96 ± 0.85	2,90	73,80	4,64
EAM 7	72.85 ± 2.00	6.09 ± 0.63	0.21 ± 0.09	2.82 ± 0.95	11,96	346,90	25,83

Comparando os extratos obtidos a partir da mesma técnica de extração, é possível notar que, em ambas, os extratos otimizados apresentaram valores de IC<sub>50</sub> menores para as células tumorais comparados aos seus respectivos extratos-teste. Destacam-se as concentrações obtidas com o extrato otimizado EAH 1, que apresentou IC<sub>50</sub> de 0,70 µg.mL<sup>-1</sup> para a linhagem A2780, valor quase 10 vezes inferior ao observado para o extrato-teste EAH (IC<sub>50</sub> = 6,70 µg.mL<sup>-1</sup>). Da mesma forma, para a linhagem A2780cis, o IC<sub>50</sub> do EAH 1 de 1,33 µg.mL<sup>-1</sup> foi aproximadamente 9 vezes menor em comparação ao obtido com o extrato-

teste EAH ( $IC_{50} = 11,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Estes resultados indicam que os extratos otimizados potencializaram a atividade antitumoral.

Em contrapartida, os valores de  $IC_{50}$  dos extratos otimizados foram ligeiramente superiores aos de seus respectivos extratos-teste na linhagem não-tumoral, resultando em elevados índices de seletividade para as células tumorais. Destacam-se os valores de IS para os extratos obtidos por micro-ondas, especialmente o otimizado, com IS de 346,90 para a A2780 e 25,83 para a A2780cis – valores muito promissores, uma vez que IS superiores a 2 para compostos orgânicos já são considerados interessantes<sup>125,126</sup>.

Comparando os extratos otimizados obtidos com cada um dos métodos, observa-se que o extrato produzido por micro-ondas (EAM 7) foi mais ativo para a maioria das linhagens tumorais, com exceção da A2780cis, apresentando valor de  $IC_{50}$  um pouco inferior ao EAH 1, porém comparável. Ademais, o extrato EAM 7 foi mais seletivo também para a grande maioria das linhagens tumorais. Embora uma comparação direta não seja viável devido às particularidades da matriz e aos métodos de extração e caracterização desenvolvidos nesta pesquisa, resultados similares foram relatados no estudo conduzido por Dorta, Lobo e González (2013)<sup>100</sup>, o qual identificou que a atividade antioxidante e o teor de fitoquímicos foram superiores nos extratos produzidos por micro-ondas do que naqueles obtidos por extração convencional, tendo como hipótese as particularidades de seu mecanismo de extração, como o aquecimento seletivo e localizado, liberando mais facilmente os analitos bioativos do material vegetal.

Considerando estudos que investigam extratos de manga obtidos a partir de diferentes partes da fruta (polpa, casca, caroço, semente e folha) em linhagens celulares tumorais variadas, a atividade antitumoral destes extratos tem se destacado na literatura e concordam com os resultados obtidos. O estudo conduzido por Abdullah et al. (2014)<sup>113</sup> avaliou os efeitos citotóxicos do extrato etanólico do caroço de manga nas linhagens humanas de câncer de mama MDA-

MB-231 e MCF-7, obtendo valores de  $IC_{50}$  de  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Em contraste, o  $IC_{50}$  foi significativamente maior para as células normais MCF-10A,  $149 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sugerindo seletividade do extrato para células tumorais. O estudo conduzido por Ahmad et al. (2015)<sup>93</sup> investigou a atividade citotóxica de extratos de manga obtidos com diferentes solventes. O extrato do caroço de manga, obtido com acetato de etila e metanol, apresentou valores de  $IC_{50}$  inferiores a  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  nas linhagens tumorais de mama (MCF-7) e do colo do útero (HeLa). Além disso, extratos da casca do caule, extraídos com éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila, demonstraram valores de  $IC_{50}$  variando de 5 a  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  nas mesmas linhagens e na linhagem tumoral de cólon (HT-29).

Estudos mais recentes e alinhados a esta pesquisa, como o conduzido por Mirza et al. (2021)<sup>118</sup>, investigaram, a partir de uma revisão da literatura, o potencial preventivo e terapêutico anticancerígeno de extratos da polpa de manga. Os extratos enriquecidos com polifenóis demonstraram uma supressão do crescimento celular de maneira dependente da concentração para a linhagem celular de câncer de pulmão (A549), com valores de  $IC_{50}$  de  $8,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $13,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , de acordo com a variedade de manga testada. O estudo desenvolvido por Alshwyeha et al. (2024)<sup>25</sup> avaliou a viabilidade celular utilizando extrato etanólico do caroço de manga em células tumorais de pulmão (A549) e células saudáveis (MRC-5) por meio do ensaio colorimétrico com MTT. Após 24 h de tratamento, os valores calculados de  $IC_{50}$  foram de  $9,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para A549 e  $63,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para MRC-5, sugerindo seletividade do extrato para células tumorais, em concordância com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Ao comparar os valores de  $IC_{50}$  dos extratos otimizados obtidos por cada método de extração com os dos fármacos (TABELA 4.11), observa-se que os extratos otimizados apresentaram valores comparáveis e, em alguns casos, inferiores. Destacam-se os resultados para a linhagem A2780, em que tanto o EAH 1 ( $IC_{50} = 0,70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) quanto o EAM 7 ( $IC_{50} = 0,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) exibiram

grande potência inibitória com concentrações inferiores. De maneira semelhante, para a linhagem A2780cis, o extrato EAH 1 ( $IC_{50} = 1,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) também apresentou um valor inferior de concentração comparado ao do fármaco para a mesma linhagem, enquanto o extrato EAM 7 ( $IC_{50} = 2,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) exibiu concentração bastante próxima.

Além disso, nota-se que os IS dos extratos otimizados são consideravelmente superiores aos dos fármacos em todas as linhagens analisadas (TABELA 4.12). Ou seja, os extratos se mostraram muito mais seletivos para as linhagens tumorais do que os medicamentos que já são utilizados no tratamento dos mais diversos tipos de câncer, como os de pulmão e ovário. Ressalta-se que, para compostos orgânicos, são considerados promissores valores de IS superiores a  $2^{125,126}$ , sendo que os extratos EAH 1 e EAM 7 apresentaram para a linhagem A2780 valores de 75,51 e 346,90, respectivamente. Em contraste, a cisplatina e a doxorrubicina, também avaliadas para essa linhagem, registraram IS de 1,63 e 30,67, respectivamente, valores significativamente inferiores aos obtidos pelos extratos.

TABELA 4.12 – Comparação dos valores de  $IC_{50}$  dos extratos otimizados EAH 1 e EAM 7 com os dos fármacos cisplatina e doxorrubicina obtidos no ensaio de viabilidade celular com MTT realizado em 48 h.

		$IC_{50} \mu\text{g.mL}^{-1} (\pm DP)$				IS		
		MRC5 (saudável)	A549 (pulmão)	A2780 (ovário)	A2780cis (ovário resistente)	A549	A2780	A2780cis
<b>Extratos otimizados</b>	EAH 1	52.86 ± 0.26	14.25 ± 1.94	0.70 ± 0.08	1.33 ± 0.14	3,71	75,51	39,74
	EAM 7	72.85 ± 2.00	6.09 ± 0.63	0.21 ± 0.09	2.82 ± 0.95	11,96	346,90	25,83
<b>Fármacos comerciais</b>	cisplatina	5.72 ± 0.57	4.32 ± 1.40	3.51 ± 0.30	7.68 ± 0.29	1,32	1,63	0,74
	doxorrubicina	13.19 ± 1.21	2.21 ± 0.15	0.43 ± 0.10	1.29 ± 0.92	5,97	30,67	10,22

De fato, a baixa seletividade de quimioterápicos convencionais representa um desafio contínuo no tratamento oncológico, impulsionando pesquisas voltadas tanto para o aprimoramento da seletividade dos fármacos cisplatina e doxorrubicina<sup>127</sup> – devido aos seus efeitos colaterais adversos e à resistência adquirida – quanto para o desenvolvimento de novos agentes

quimioterápicos que sejam simultaneamente mais eficazes e menos tóxicos, como no caso deste estudo.

#### 4.4.1.1 – Concentração dos analitos nos extratos otimizados

Com base nos valores de  $IC_{50}$  dos extratos e nas concentrações de ácido gálico (AG) e metil galato (MG) obtidas a partir das quantificações realizadas nos extratos, foi determinada a concentração destes analitos nos extratos otimizados, visando compreender, por exemplo, qual a concentração de AG e MG no extrato EAM7 a partir do seu  $IC_{50}$  de  $0,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$  obtido na linhagem A2780. O intuito foi comparar a concentração destes analitos nos extratos otimizados com as concentrações inibitórias obtidas com os respectivos padrões analíticos, ou seja, comparar a concentração de AG e MG nos extratos otimizados utilizados nos ensaios biológicos com os valores de  $IC_{50}$  dos compostos isolados. Os dados podem ser vistos na TABELA 4.13.

TABELA 4.13 – Comparação das concentrações de ácido gálico e metil galato nos extratos otimizados a partir de seus valores de  $IC_{50}$  com os valores de  $IC_{50}$  dos padrões analíticos, ambos obtidos nos ensaios de viabilidade celular.

Linhagens tumorais	Analitos	Extratos otimizados $\mu\text{g.mL}^{-1}$		Padrões analíticos	$IC_{50} \mu\text{g.mL}^{-1}$
		EAH 1	EAM 7		
A549 (pulmão)	AG	0,413	0,185	AG	8,82
	MG	0,213	0,002	MG	9,28
A2780 (ovário)	AG	0,020	0,006	AG	2,16
	MG	0,010	0,002	MG	4,96
A2780cis (ovário resistente à cisplatina)	AG	0,039	0,086	AG	1,73
	MG	0,020	0,029	MG	9,88

Nota-se que a concentração dos analitos AG e MG nos extratos otimizados é consideravelmente inferior à concentração inibitória obtida com os analitos isolados (padrões analíticos). Por exemplo, as concentrações de ácido gálico nos extratos EAH 1 ( $0,020 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e EAM 7 ( $0,006 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) na linhagem tumoral de ovário (A2780) foram, respectivamente, 108 e 360 vezes inferiores ao valor de  $IC_{50}$  do padrão analítico de AG ( $2,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Esta diferença

significativa nas concentrações indica que o extrato apresenta um expressivo efeito sinérgico entre os compostos presentes na matriz, os quais atuam em conjunto na inibição do crescimento celular, potencializando a atividade antitumoral do extrato mesmo com concentrações reduzidas de AG e MG em comparação aos ensaios de viabilidade celular com estes compostos isolados.

Com base nestes dados, foi realizado um novo ensaio de viabilidade celular na linhagem A2780, mas utilizando ambos os padrões analíticos de AG e MG simultaneamente, nas concentrações correspondentes aos seus valores de  $IC_{50}$ , com o objetivo de avaliar possíveis efeitos sinérgicos entre eles. O  $IC_{50}$  obtido a partir dessa combinação foi de  $7,36 \pm 0,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , valor próximo à soma dos  $IC_{50}$  individuais de cada analito ( $IC_{50}$  AG =  $2,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $IC_{50}$  MG =  $4,96 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), indicando a ausência de efeitos aditivos ou sinérgicos entre os dois compostos. Isto sugere que outros compostos não quantificados, presentes no extrato, desempenham um papel relevante na potencialização da atividade antitumoral observada.

Comparando as concentrações de AG e MG nos extratos otimizados em cada uma das linhagens tumorais apresentadas na TABELA 4.13, pode-se observar que em ambos os extratos na linhagem A2780 – em que tanto EAH 1 quanto EAM 7 demonstraram maior potencial antitumoral nos ensaios de viabilidade celular – as concentrações de AG e MG foram as menores. É interessante notar também que, ao comparar a concentração de AG e MG entre os extratos nas linhagens mais promissoras A2780 e A549, observa-se que o extrato EAM 7 apresenta menor concentração destes analitos em relação ao extrato EAH 1, apesar de ter demonstrado maior atividade biológica. Isso reforça a hipótese de que, embora o ácido gálico e o metil galato sejam reconhecidos por sua atividade antitumoral<sup>128</sup>, outros analitos também contribuem para a atividade biológica observada. Além disso, a maior atividade antitumoral não parece estar exclusivamente relacionada às concentrações elevadas desses analitos, mas sim à composição da matriz e às interações sinérgicas entre seus constituintes.

Estes resultados ressaltam a importância de estudos que investigam extratos vegetais para além de compostos isolados, uma vez que matrizes complexas, como resíduos de manga, contêm diversos metabólitos capazes de exercer atividade antitumoral individualmente, mas que, em conjunto, podem gerar interações que potencializam esse efeito. É amplamente reconhecido que extratos de plantas com propriedades medicinais frequentemente exibem maior atividade biológica do que seus constituintes isolados, devido às interações aditivas ou sinérgicas entre os compostos – com destaque para os compostos fenólicos<sup>129-131</sup>. O estudo desses efeitos sinérgicos tem ganhado crescente atenção, inclusive na área farmacêutica, em que a combinação de substâncias ativas tem se mostrado promissora no tratamento de doenças complexas como o câncer<sup>132</sup>. Essa abordagem possibilita uma ação simultânea sobre diferentes alvos moleculares, aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo a probabilidade de resistência aos fármacos, além de reduzir as doses necessárias e evitar efeitos colaterais provenientes de altas concentrações de medicamentos<sup>133,134</sup>.

#### **4.4.2 – Ensaio morfológico**

Os extratos otimizados foram então direcionados ao ensaio morfológico utilizando as seguintes linhagens celulares humanas: não-tumoral de pulmão (MRC-5), tumoral de pulmão (A549), tumoral de ovário (A2780) e tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis). Este ensaio foi conduzido com o objetivo de avaliar os danos celulares, considerando que alterações no ambiente celular podem desencadear diversos efeitos na viabilidade das células, incluindo a interrupção do ciclo celular, a redução da taxa de proliferação e, em última instância, a indução da morte celular<sup>135</sup>.

Tendo como referência o controle composto apenas por água purificada, usada para solubilizar os extratos, foram analisadas as alterações morfológicas em células saudáveis e tumorais utilizando concentrações correspondentes a  $\frac{1}{2}$ .IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e 2.IC<sub>50</sub>, determinadas a partir dos valores de IC<sub>50</sub>

obtidos para os extratos EAH 1 e EAM 7. A fim de identificar morte celular, foi adicionado às células iodeto de propídeo (PI), um corante fluorescente vermelho que é impermeável às membranas celulares intactas, mas se intercala às bases do DNA em células com membranas danificadas, permitindo, assim, a marcação de células mortas ou em processo de morte celular<sup>136</sup>.

As micrografias em campo claro e por fluorescência das células descritas anteriormente tratadas com o extrato EAH 1 no intervalo de 0, 24 e 48 h de ensaio podem ser visualizadas nas FIGURAS 4.22 a 4.25.

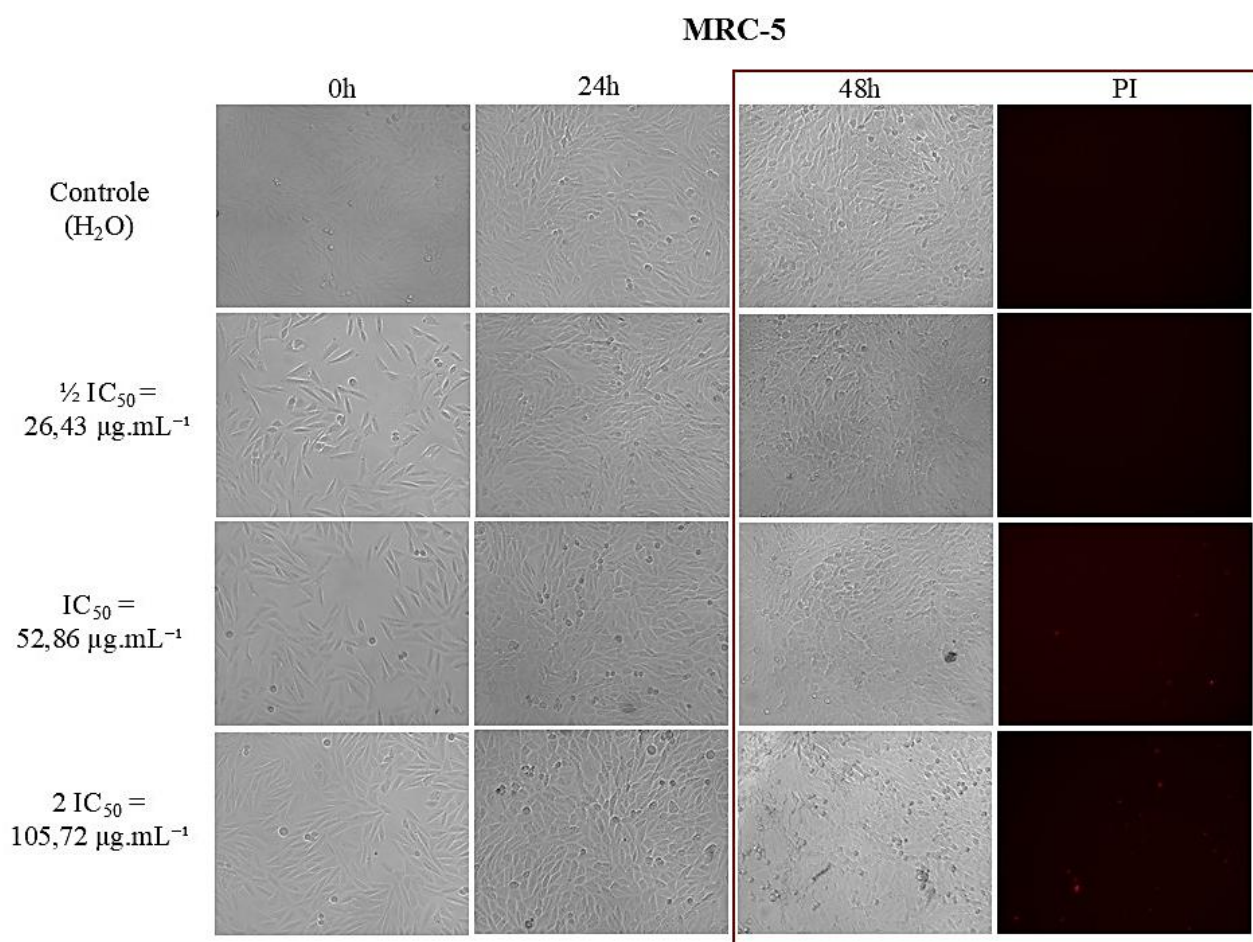


FIGURA 4.22 – Ensaio morfológico com o extrato otimizado EAH 1 na linhagem celular não-tumoral MRC-5. Micrografias obtidas com microscópio CELENA<sup>®</sup> S (zoom de 10x).

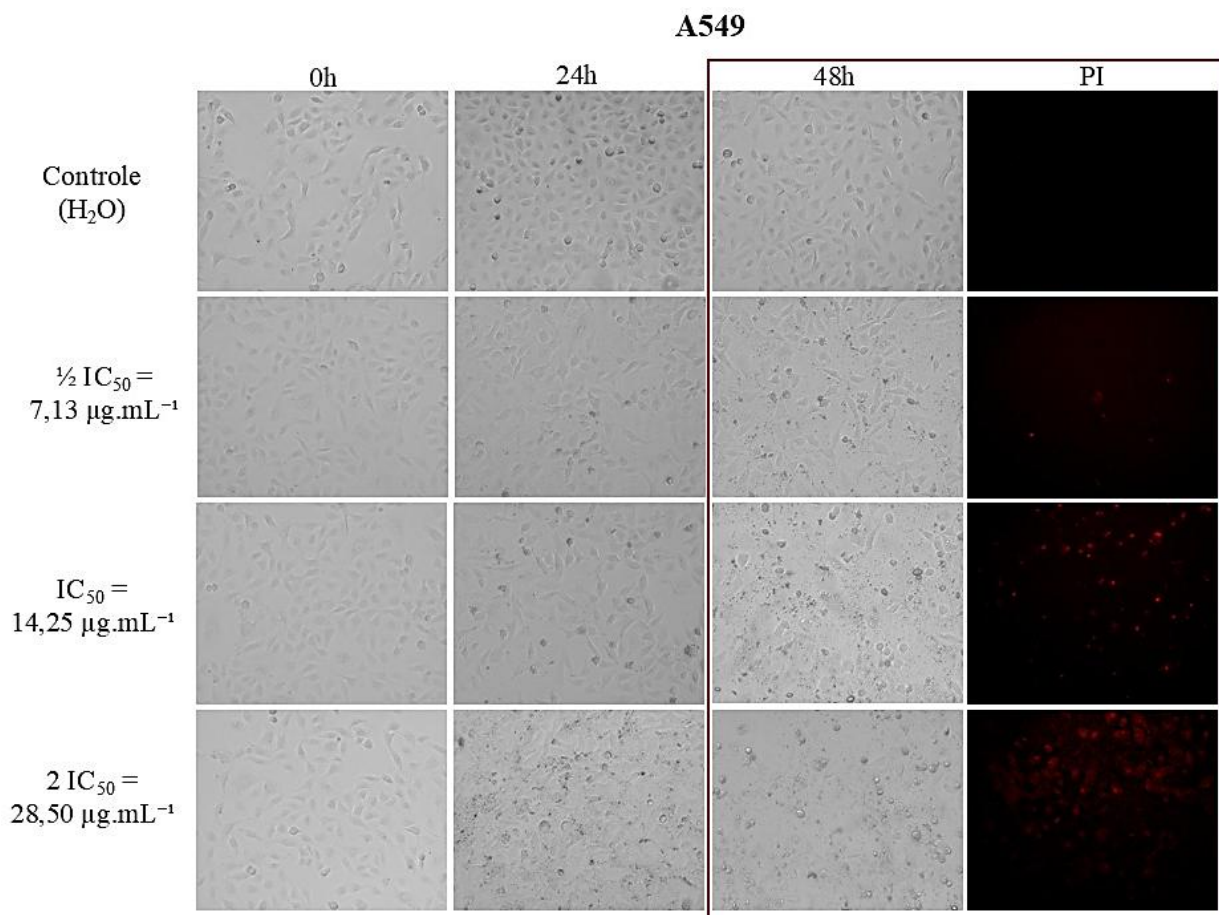


FIGURA 4.23 – Ensaio morfológico com o extrato otimizado EAH 1 na linhagem celular tumoral de pulmão A549. Micrografias obtidas com microscópio CELENA<sup>®</sup> S (zoom de 10x).

### A2780

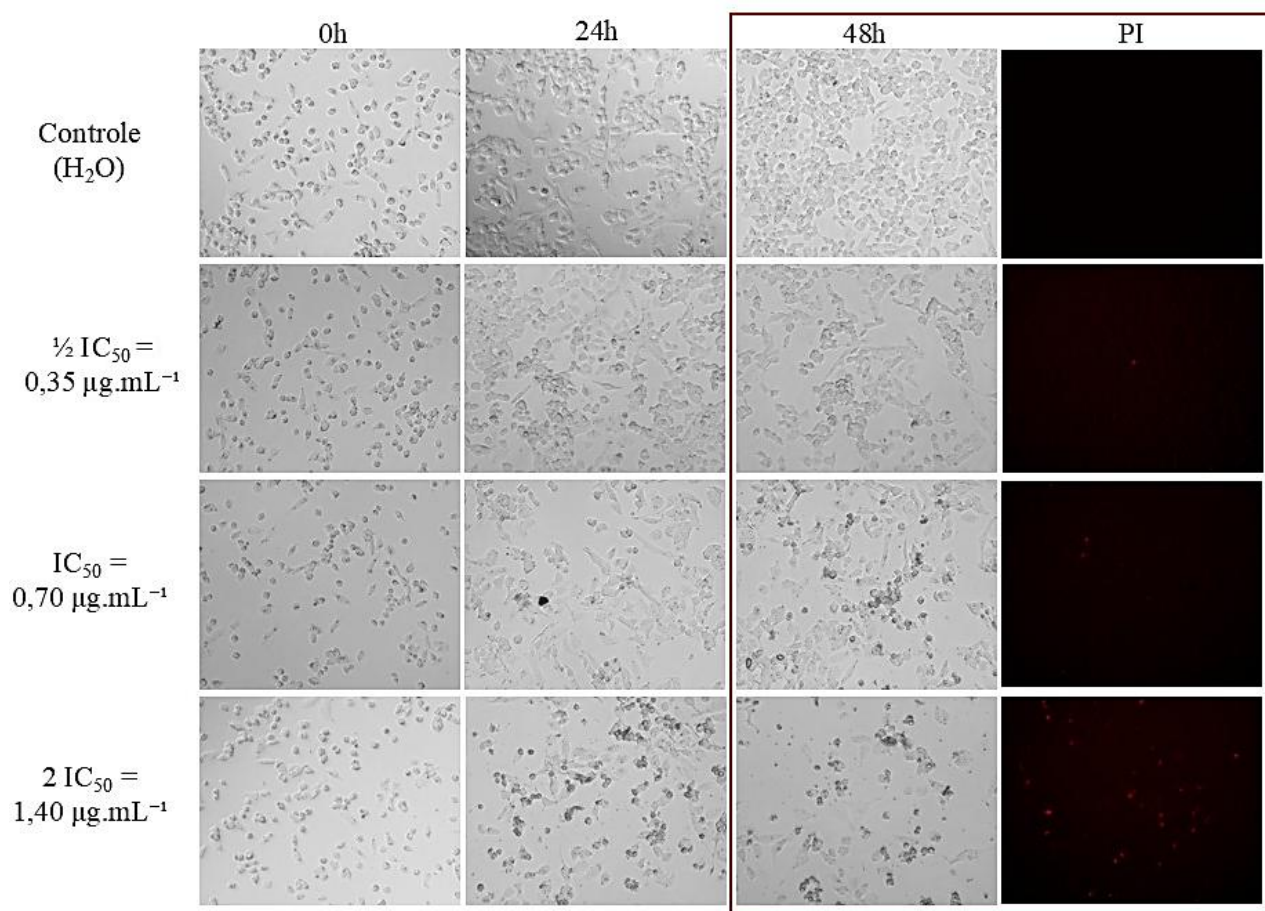


FIGURA 4.24 – Ensaio morfológico com o extrato otimizado EAH 1 na linhagem celular tumoral de ovário A2780. Micrografias obtidas com microscópio CELENA<sup>®</sup> S (zoom de 10x).

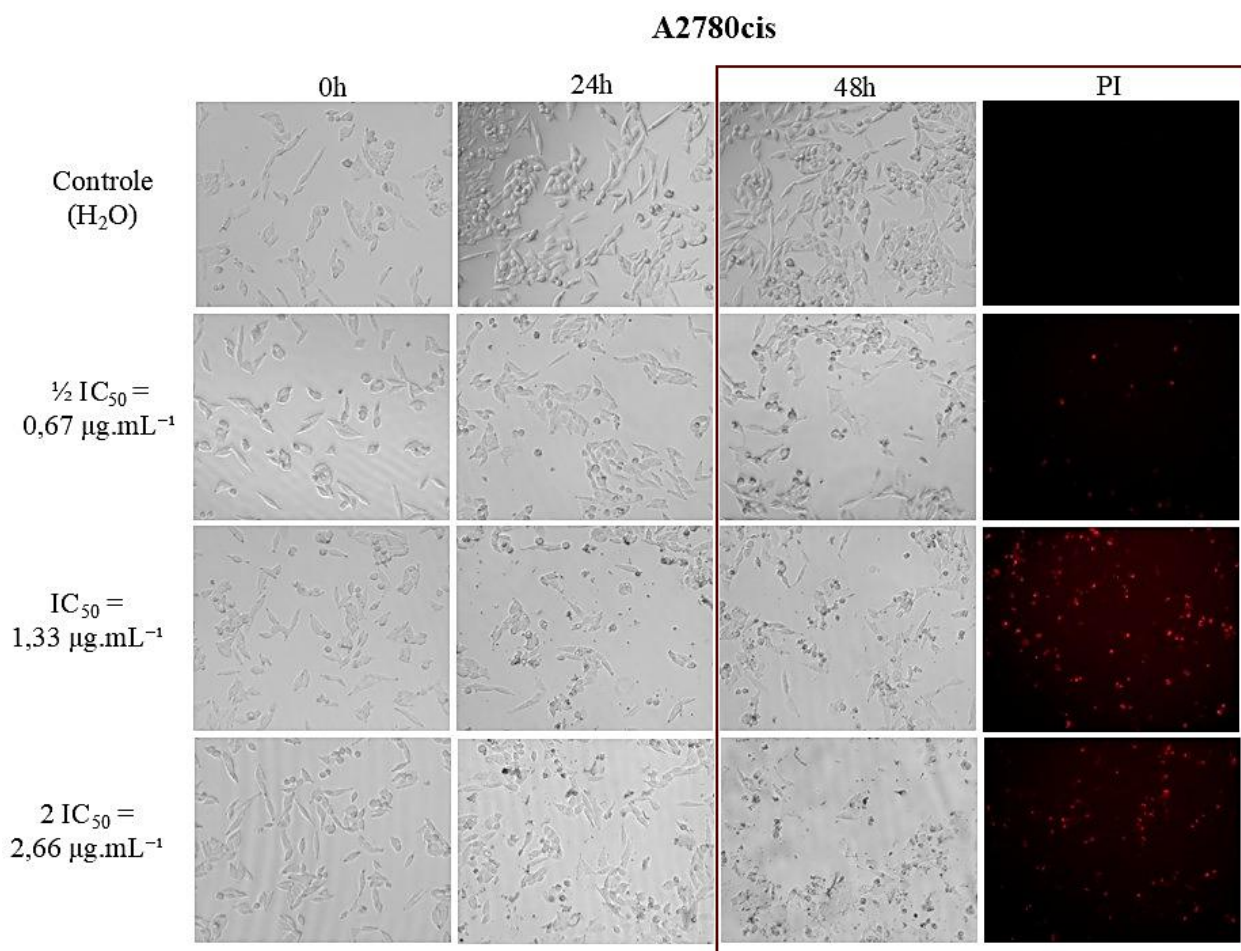


FIGURA 4.25 – Ensaio morfológico com o extrato otimizado EAH 1 na linhagem celular tumoral de ovário resistente à cisplatina A2780cis. Micrografias obtidas com microscópio CELENA<sup>®</sup> S (zoom de 10x).

Ao comparar as linhagens de células tumorais com a não-tumoral MRC-5, nota-se que a célula saudável mantém sua morfologia semelhante ao controle após 48 h de tratamento com as concentrações de  $\frac{1}{2}.IC_{50}$  e  $IC_{50}$ , apresentando poucas alterações em sua estrutura e somente alguns pontos de morte celular (marcado em vermelho) nas concentrações de  $IC_{50}$  e  $2.IC_{50}$ . Em contraste, as células tumorais apresentam estruturas celulares bastante alteradas, reafirmando a preferência de atuação do extrato EAH 1 pelas células tumorais, como visto no ensaio de viabilidade celular – com valores de  $IC_{50}$  inferiores para as células tumorais em comparação com as saudáveis.

Ao analisarmos as micrografias, as alterações morfológicas observadas nas três linhagens tumorais apresentam características similares. Os efeitos mais pronunciados são vistos em 48 h de tratamento com o extrato nas micrografias em campo claro e com a marcação com PI, destacados com contorno. No tratamento com a concentração de  $\frac{1}{2}.IC_{50}$ , é possível observar uma redução na densidade celular em comparação com o controle, especialmente nas linhagens A2780 e A2780cis, indicando uma ação citostática do extrato EAH 1 nestas concentrações.

No tratamento com a concentração do  $IC_{50}$ , observa-se uma significativa alteração morfológica em todas as linhagens tumorais, com as células apresentando um aspecto enrugado e formação de detritos. Além disso, observam-se vários pontos de morte celular marcados com PI, especialmente nas linhagens A549 e A2780cis. Estas características indicam um efeito citotóxico do extrato EAH 1 nestas concentrações.

Pode-se observar, portanto, efeitos citostáticos e citotóxicos a depender da concentração de extrato utilizada no tratamento. Substâncias com ação citostática modulam o crescimento celular de maneira proporcional à concentração ou ao tempo de tratamento, pois atuam inibindo a divisão celular. No entanto, ao término do tratamento, as células podem sair desse estado de dormência e retomar seu crescimento. Em contraste, agentes citotóxicos impedem o crescimento celular induzindo a morte celular. Nesse mecanismo de ação, a divisão celular das células sobreviventes não é diretamente reduzida, mas a população total de células vivas diminui, impactando conseqüentemente o crescimento celular<sup>137</sup>.

No tratamento com a concentração de  $2.IC_{50}$ , a redução da densidade celular e as alterações morfológicas são intensificadas, acompanhadas pela ocorrência de morte celular. Nas linhagens A549 e A2780, essa maior concentração resulta em um aumento nas marcações de morte celular. Por outro lado, na linhagem A2780cis, a morte celular é mais proeminente na concentração

do  $IC_{50}$ , enquanto a elevação para  $2 \cdot IC_{50}$  também leva à morte celular, mas em menor grau (menos marcações) possivelmente devido à extensiva redução da densidade celular e à conseqüente menor disponibilidade de células para marcação.

As micrografias em campo claro e por fluorescência das células descritas anteriormente tratadas com o extrato EAM 7 no intervalo de 0, 24 e 48 h de ensaio podem ser visualizadas nas FIGURAS 4.26 a 4.29.

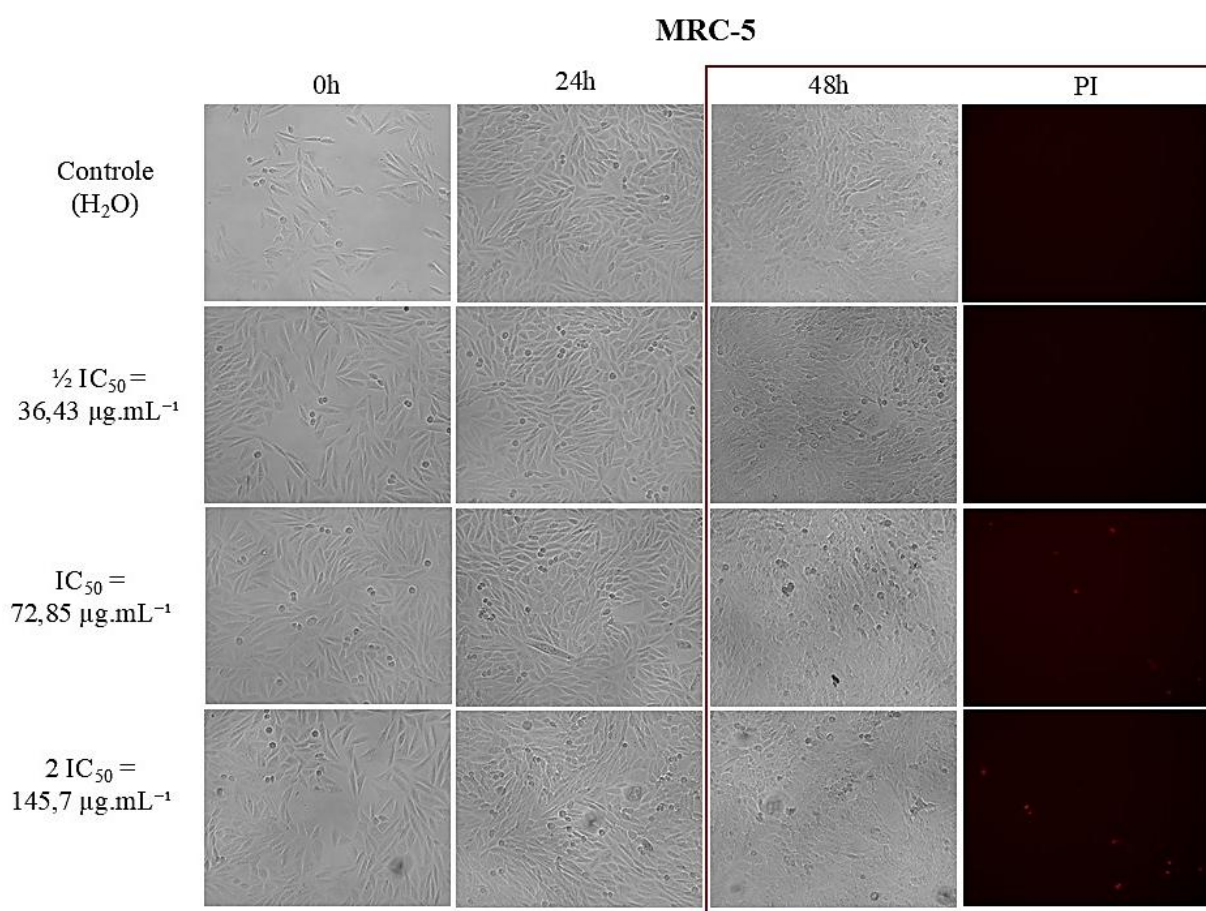


FIGURA 4.26 – Ensaio morfológico com o extrato otimizado EAM 7 na linhagem celular não-tumoral MRC-5. Micrografias obtidas com microscópio CELENA<sup>®</sup> S (zoom de 10x).

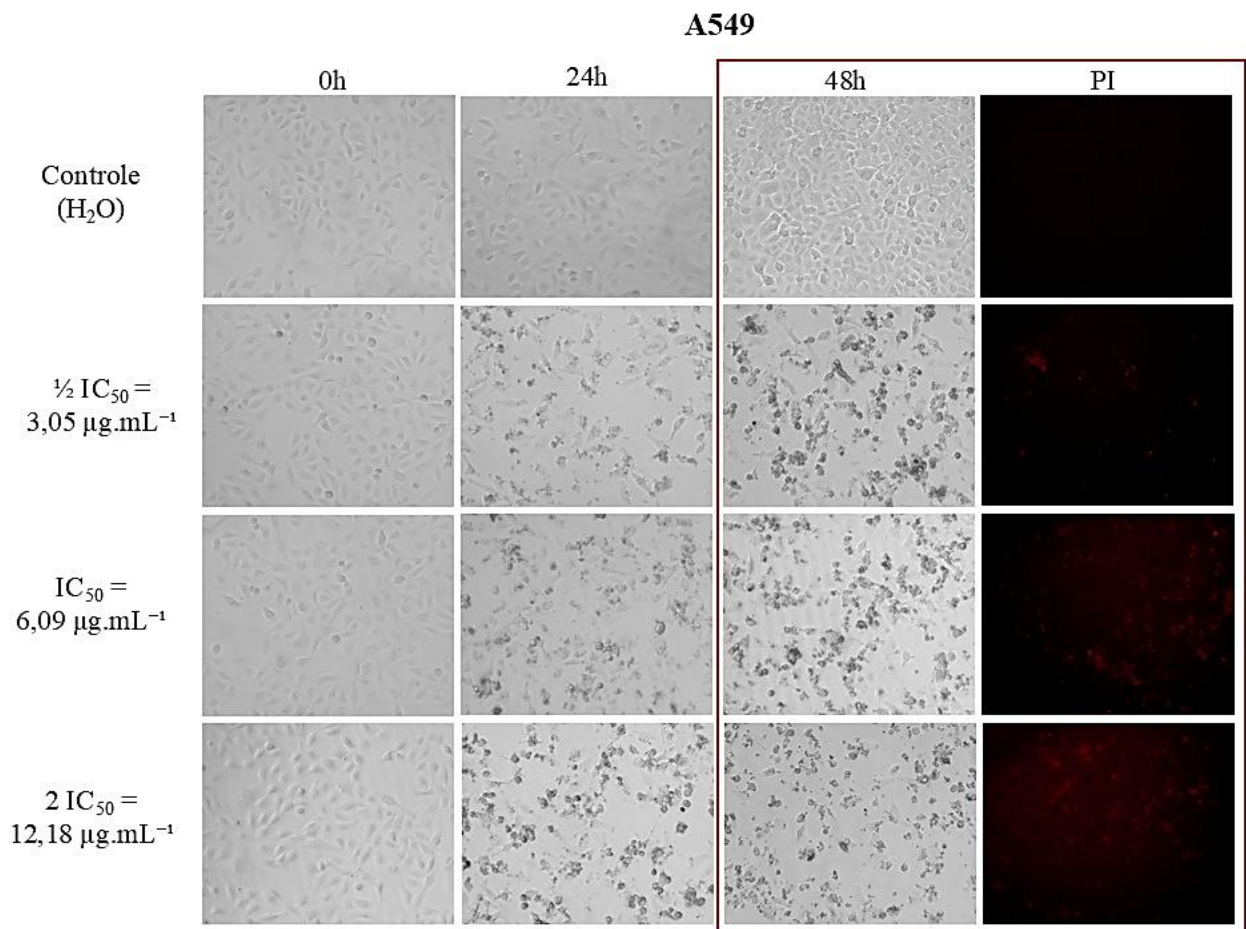


FIGURA 4.27 – Ensaio morfológico com o extrato EAM 7 na linhagem celular tumoral de pulmão A549. Micrografias obtidas com microscópio CELENA<sup>®</sup> S (zoom de 10x).

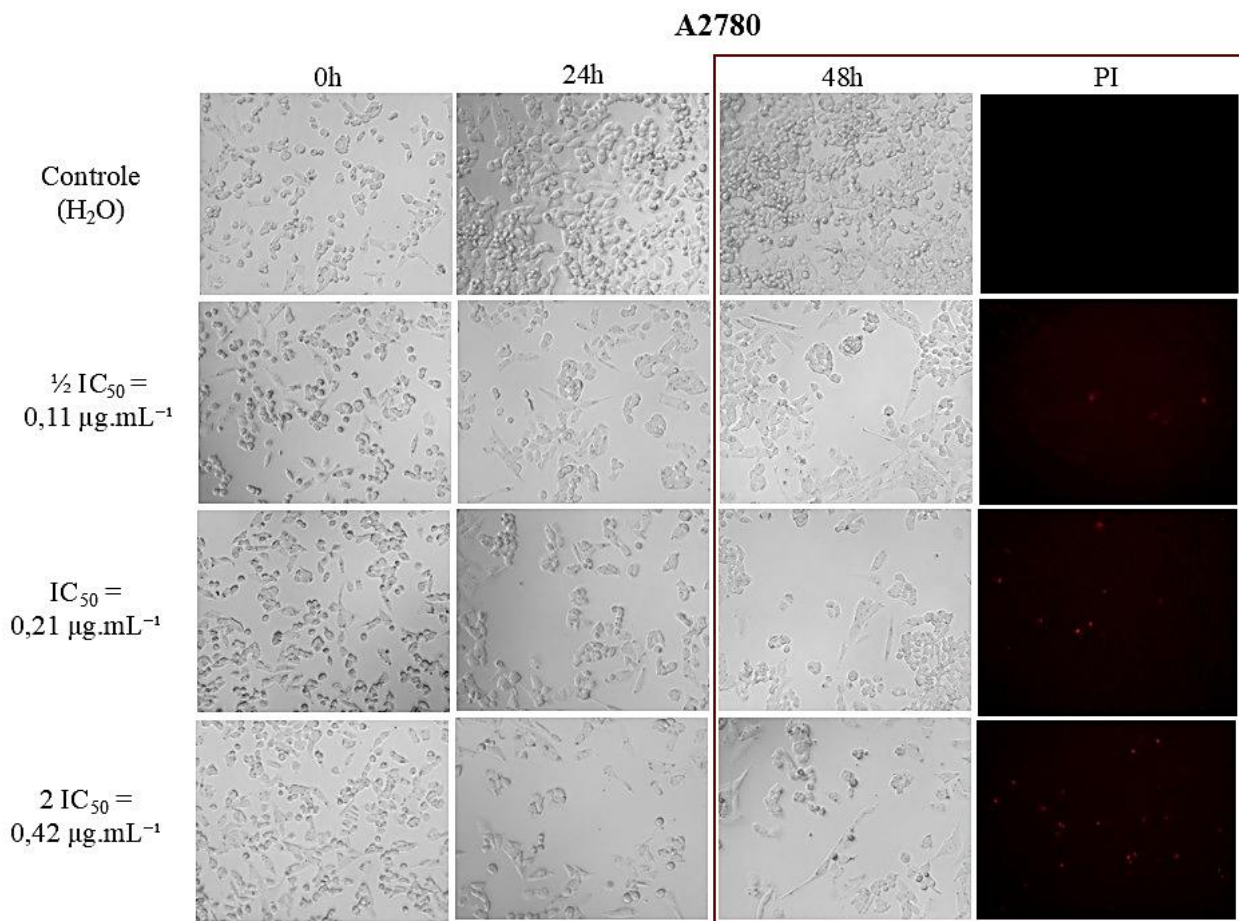


FIGURA 4.28 – Ensaio morfológico com o extrato EAM 7 na linhagem celular tumoral de ovário A2780. Micrografias obtidas com microscópio CELENA<sup>®</sup> S (zoom de 10x).

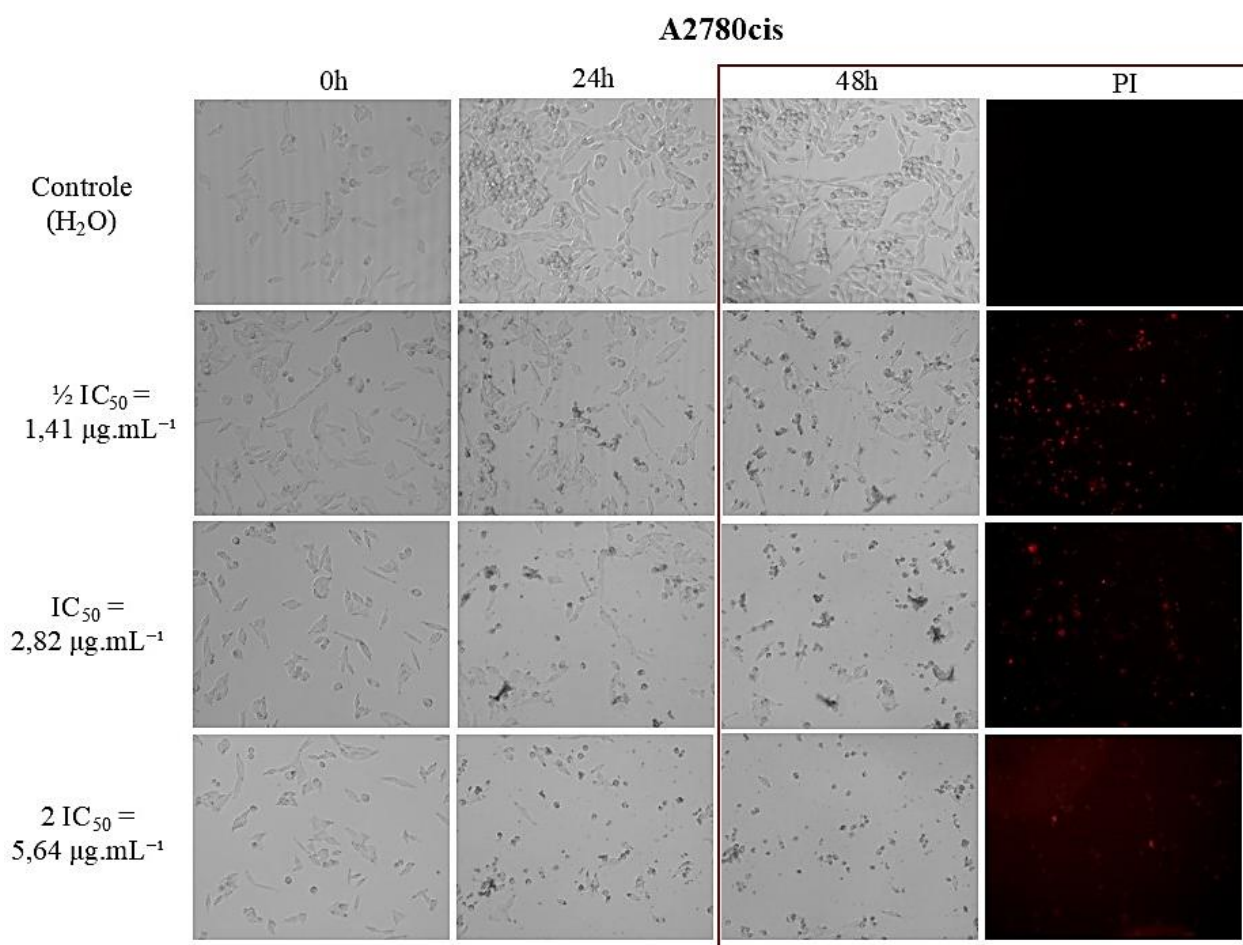


FIGURA 4.29 – Ensaio morfológico com o extrato EAM 7 na linhagem celular tumoral de ovário resistente à cisplatina A2780cis. Micrografias obtidas com microscópio CELENA<sup>®</sup> S (zoom de 10x).

De maneira semelhante ao observado com o extrato EAH 1, ao comparar as linhagens de células tumorais com a não-tumoral MRC-5 tratadas com o extrato EAM 7, nota-se que a célula saudável mantém sua morfologia semelhante ao controle até mesmo após 48 h de tratamento em todas as concentrações testadas, apresentando poucas alterações em sua estrutura e alguns pontos de morte celular, especialmente na concentração de  $2 \cdot IC_{50}$ . Por outro lado, linhagens tumorais apresentam morfologias completamente alteradas mesmo com a menor concentração de  $\frac{1}{2} \cdot IC_{50}$ , o que confirma a preferência do extrato EAM 7 pelas células tumorais, como visto no ensaio de viabilidade celular.

Ao analisarmos as micrografias, as alterações morfológicas observadas nas três linhagens tumorais apresentam características similares. Os efeitos mais proeminentes registrados em 48 h de tratamento estão destacados com contorno, mas é possível notar drásticas alterações nas estruturas celulares já em 24 h de ensaio e com as menores concentrações de extrato. No tratamento com a concentração de  $\frac{1}{2}.IC_{50}$ , há uma redução na densidade celular em comparação com o controle, além de significativas alterações morfológicas e algumas marcações de morte celular em todas as linhagens. A redução da densidade celular indica um efeito citostático do extrato, especialmente nas células A2780 e A2780cis. No entanto, pode-se observar muitos pontos de morte celular na linhagem A2780cis, indicando que também há uma ação citotóxica do extrato nesta concentração.

No tratamento com a concentração do  $IC_{50}$ , as alterações morfológicas se mantêm em todas as linhagens. As células A549 apresentam uma aparente ruptura da membrana celular com exposição do meio intracelular, levando a um aumento em seu tamanho e evaginações superficiais. Diferentemente, as células A2780cis apresentam um aspecto enrugado, formação de detritos e uma diminuição do tamanho. Estas diferenças morfológicas sugerem a ativação de distintos mecanismos de morte celular, como necrose (aumento das células devido à formação de bolhas de membrana<sup>138</sup>) e apoptose (arredondamento e encolhimento das células<sup>136,138,139</sup>), ambas observadas em estudos com extratos de manga em linhagens celulares semelhantes<sup>140,141</sup>, embora o mecanismo apoptótico seja o mais relatado. No entanto, a complexidade das alterações celulares observadas nesta pesquisa dificulta a determinação precisa destes mecanismos, tornando necessária a realização de ensaios adicionais para sua confirmação. Ainda, observam-se diversos pontos de morte celular marcados com PI em todas as linhagens.

No tratamento com a concentração de  $2.IC_{50}$ , a redução da densidade celular e as alterações morfológicas são intensificadas. A marcação de morte

celular se mantém nas células A549 e A2780, enquanto na linhagem A2780cis há uma diminuição de morte celular devido à extensiva redução da densidade celular e à conseqüente menor disponibilidade de células para marcação – característica similar observada com o extrato EAH 1.

#### **4.4.3 – Ensaio clonogênico**

Os extratos otimizados foram então direcionados ao ensaio clonogênico, também conhecido como ensaio de formação de colônias, utilizando as seguintes linhagens celulares humanas: não-tumoral de pulmão (MRC-5), tumoral de pulmão (A549), tumoral de ovário (A2780) e tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis).

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar, a longo prazo, indicativos de efeitos citostáticos e citotóxicos dos extratos nas células, sendo adequado para a análise de diferentes tipos de morte celular. Também chamado de ensaio de sobrevivência celular, o ensaio clonogênico determina a capacidade de células individuais proliferarem indefinidamente. Dessa forma, ele é amplamente empregado para avaliar os efeitos relacionados à paralisação e retardo do crescimento celular<sup>142-144</sup>. A partir dele, pode-se visualizar as colônias de células que proliferaram e quantificá-las após o tratamento. A quantificação das células é realizada com o auxílio do cristal violeta, um corante roxo intenso que se liga ao DNA e proteínas celulares, marcando as colônias de células que sobreviveram.

Tendo como referência o controle, composto apenas por água purificada, foram analisadas as formações de colônias em células saudáveis e tumorais utilizando concentrações correspondentes a  $\frac{1}{2}$ .IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e 2.IC<sub>50</sub>, determinadas a partir dos valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os extratos EAH 1 e EAM 7. A FIGURA 4.30 retrata as fotografias das colônias formadas a partir do tratamento das células com o extrato EAH 1 no período de 10 dias. O número de colônias resultante dos tratamentos pode ser visualizado nos gráficos

apresentados na FIGURA 4.31. Os resultados dos testes de *Dunnett*, com os *p*-valores ajustados para significância, estão representados nos gráficos.

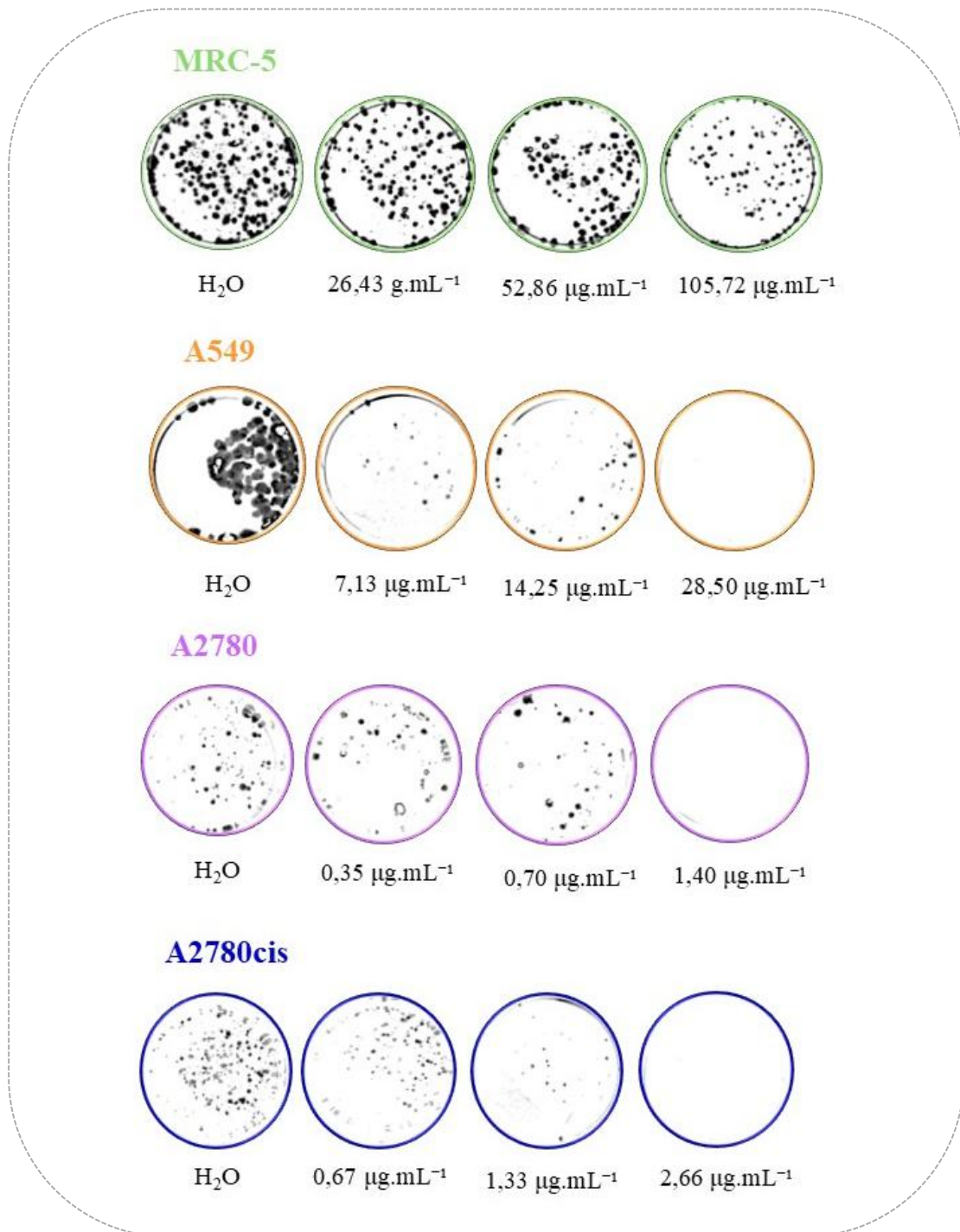


FIGURA 4.30 – Imagens das colônias MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações do extrato otimizado EAH 1.

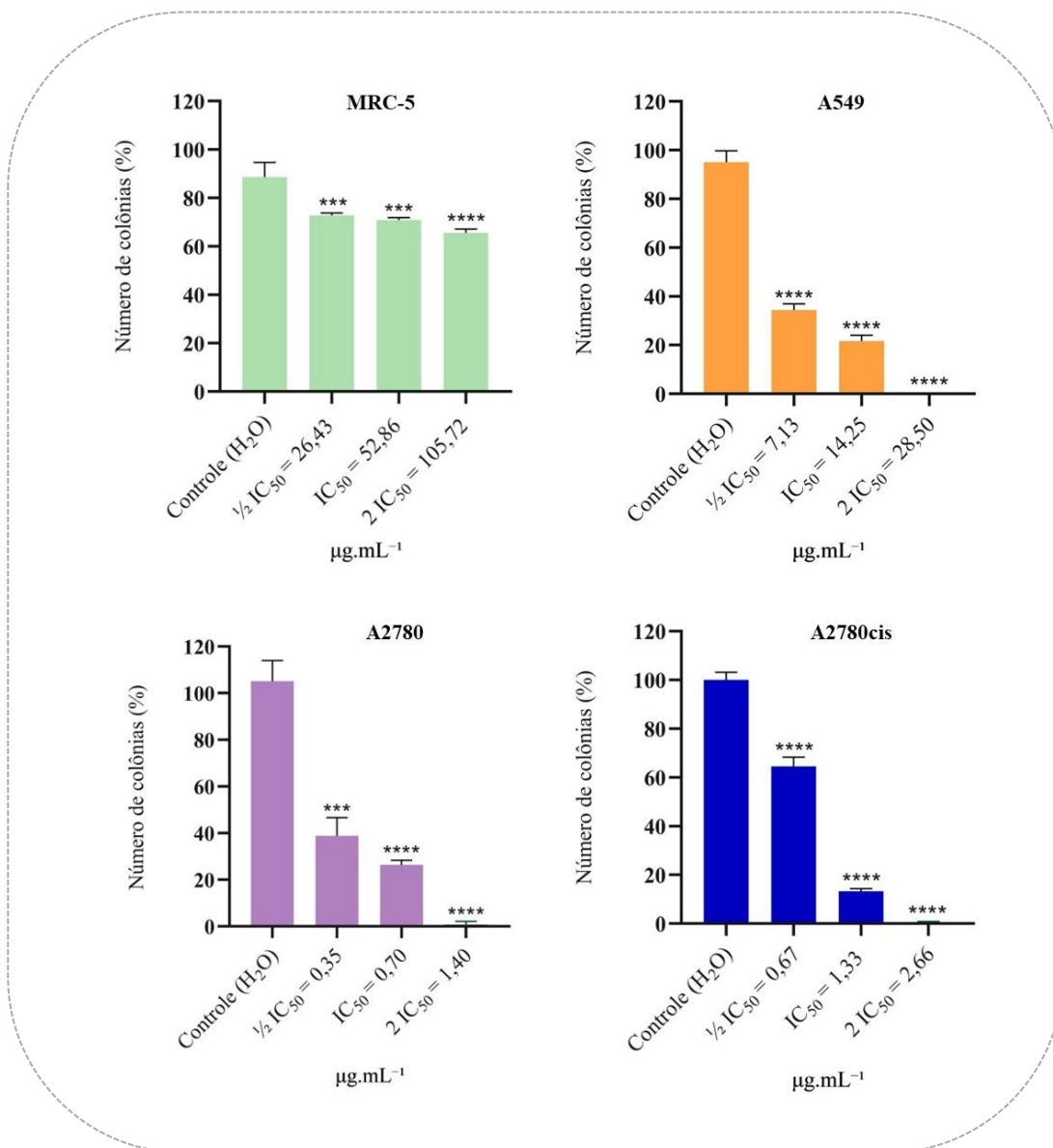


FIGURA 4.31 – Distribuição do número de colônias (%) para cada concentração do extrato otimizado EAH 1. Valores de significância: \* $p = 0,01$  \*\* $p = 0,004$  \*\*\* $p = 0,0003$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Ao analisar os resultados, pode-se observar que o extrato EAH 1 apresenta um maior potencial citotóxico e/ou citostático frente às células tumorais. Observa-se um padrão semelhante nas linhagens tumorais, com uma redução drástica no número de colônias, evidenciando os efeitos pronunciados do extrato exclusivamente nestas células.

Na linhagem não-tumoral MRC-5, observa-se uma baixa redução no número de colônias, passando de 100% no controle para 66% quando tratada com a concentração máxima de 2.IC<sub>50</sub> (105,72 µg.mL<sup>-1</sup>, a maior concentração testada).

Este resultado indica que o extrato atua de forma sutil nas células saudáveis, o que está em concordância com os maiores valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios de viabilidade celular e com as poucas alterações morfológicas observadas na linhagem não-tumoral.

Nas células tumorais de pulmão A549, observa-se uma redução abrupta no número de colônias, passando de aproximadamente 100% no controle (composto apenas por água purificada) para 34% quando tratadas com ½.IC<sub>50</sub>. Esse decréscimo se mantém com o aumento da concentração do extrato, atingindo 0% com 2.IC<sub>50</sub>, o que indica um efeito citotóxico. Um comportamento semelhante é observado na linhagem tumoral de ovário A2780, que apresenta 39% de colônias com ½.IC<sub>50</sub> e redução total a 0% com 2.IC<sub>50</sub>, reforçando a ação citotóxica do extrato. Este resultado indica que o extrato atua de forma mais pronunciada nas células tumorais, o que também está em concordância com as alterações morfológicas mais intensas observadas nestas células tumorais, com diversas marcações de morte celular na concentração de 2.IC<sub>50</sub> com ambas as linhagens.

Na linhagem tumoral de ovário resistente à cisplatina A2780cis, a redução é mais gradual, passando de 100% no controle para 65% com ½.IC<sub>50</sub>, o que sugere um efeito citostático nessa concentração. No entanto, na concentração do IC<sub>50</sub>, há uma redução abrupta no número de colônias para 13% – a menor porcentagem de colônias em comparação com as outras linhagens –, atingindo 0% com 2.IC<sub>50</sub>. Esse resultado evidencia o potencial citotóxico do extrato em concentrações mais elevadas. Estes dados estão em concordância com os resultados do ensaio morfológico, no qual a linhagem A2780cis apresentou grande redução na densidade celular e poucas células mortas com ½.IC<sub>50</sub> (perfil citostático), enquanto a concentração do IC<sub>50</sub> resultou em um aumento expressivo na morte celular (perfil citotóxico).

A FIGURA 4.32 retrata as fotografias das colônias formadas a partir do tratamento das células com o extrato EAM 7 no período de 10 dias. O número de colônias resultante dos tratamentos pode ser visualizado no gráfico apresentado

na FIGURA 4.33. Os resultados dos testes de *Dunnnett*, com os *p*-valores ajustados para significância, estão representados nos gráficos.

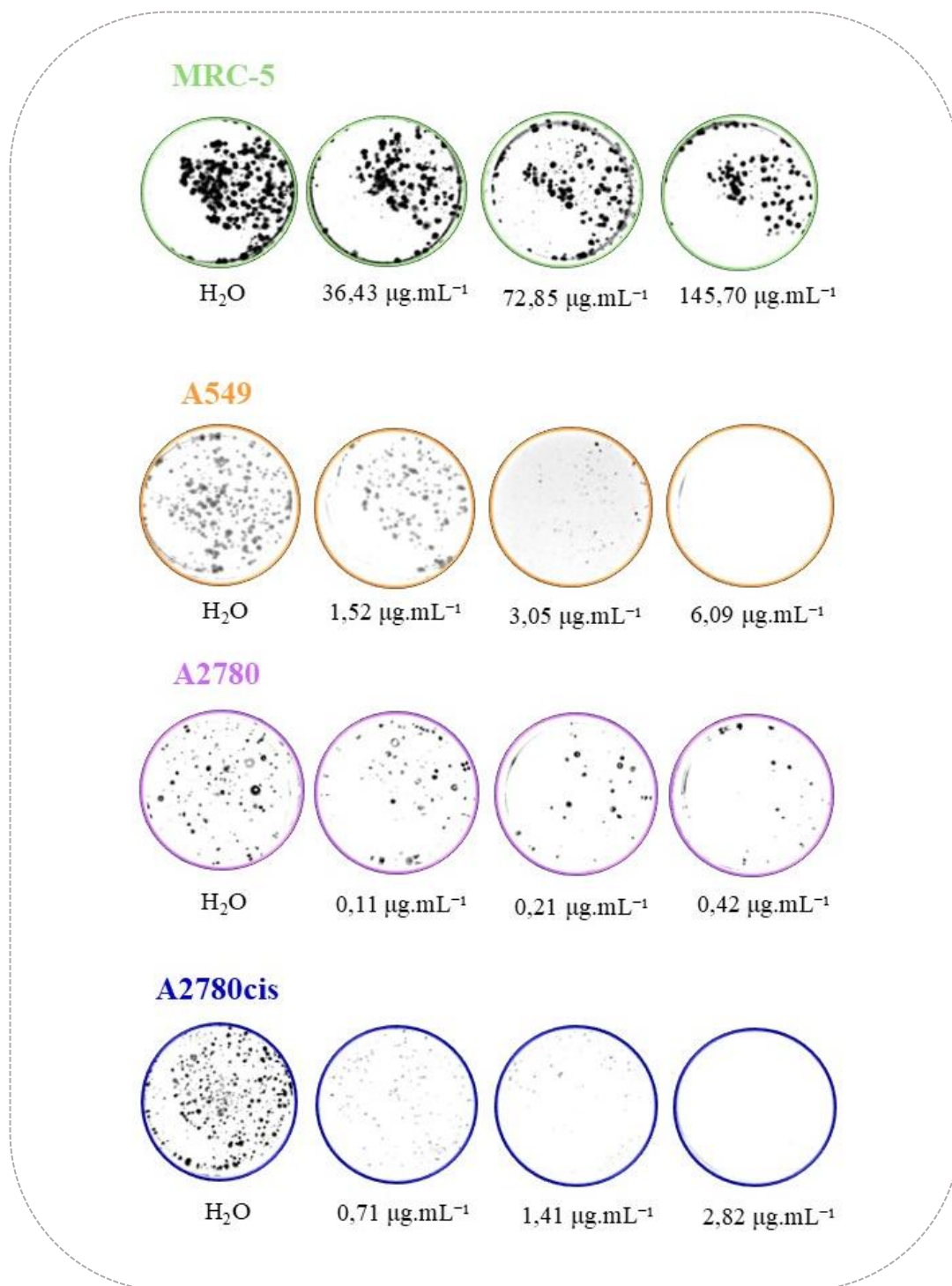


FIGURA 4.32 – Imagens das colônias MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações do extrato otimizado EAH 1.

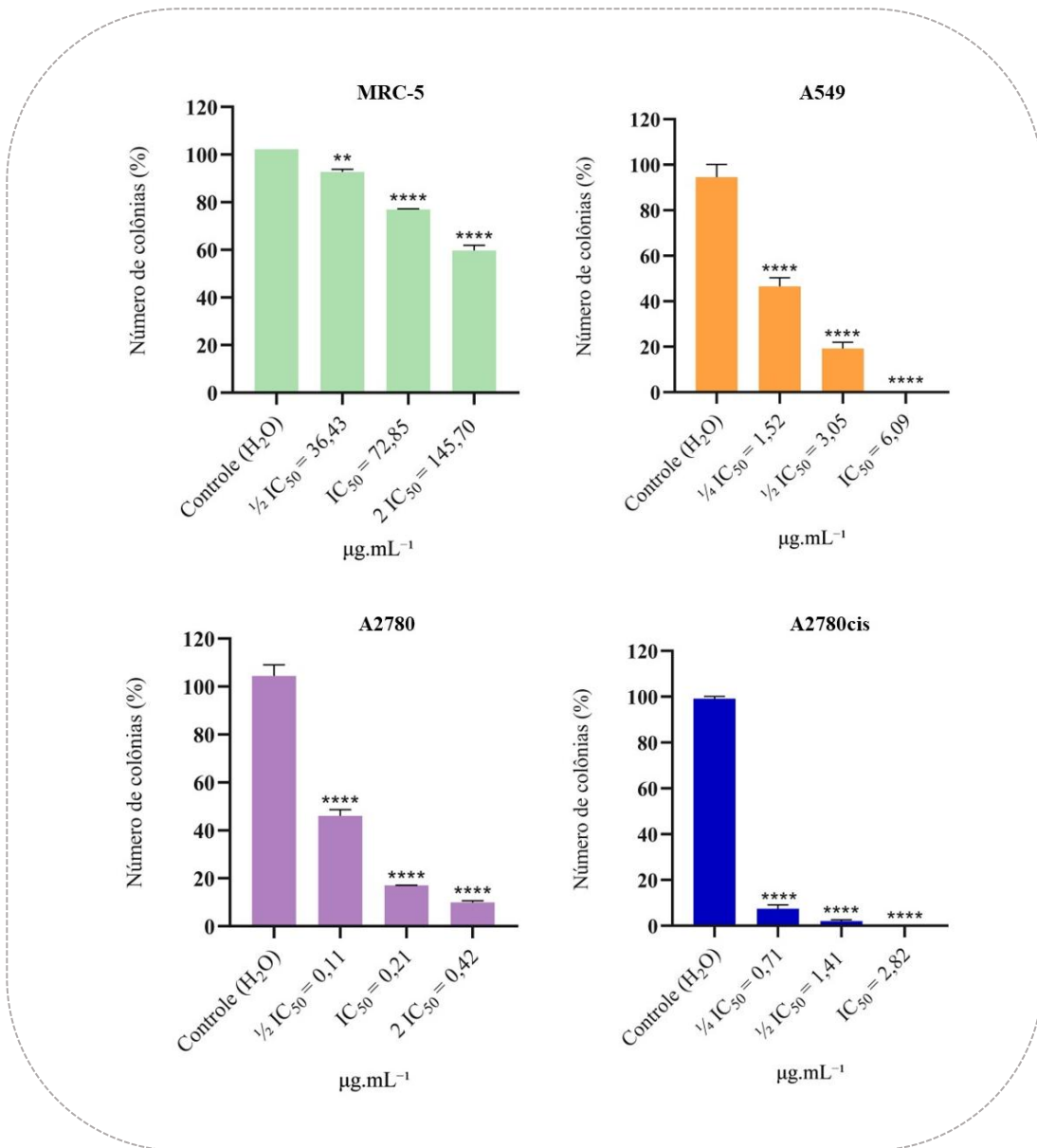


FIGURA 4.33 – Distribuição do número de colônias (%) para cada concentração do extrato otimizado EAM 7. Valores de significância: \* $p = 0,01$  \*\* $p = 0,004$  \*\*\* $p = 0,0003$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Os resultados obtidos com o extrato EAM 7 são semelhantes aos observados para o extrato EAH 1, indicando um potencial citotóxico e/ou citostático sobre as células tumorais, porém ainda mais pronunciado em comparação ao EAH 1. A formação de colônias em células tumorais foi analisada utilizando concentrações ainda menores para as linhagens A549 e A2780cis, iniciando a partir de  $1/4$  IC<sub>50</sub>.

Na linhagem não-tumoral MRC-5, observa-se uma redução mínima no número de colônias, passando de 100% no controle para 60% quando tratada com a concentração máxima de  $2.IC_{50}$  ( $145,70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , a maior concentração testada). Este resultado indica que o extrato atua de forma sutil nas células saudáveis, o que está em concordância com os maiores valores de  $IC_{50}$  obtidos nos ensaios de viabilidade celular e com as poucas alterações morfológicas observadas na linhagem não-tumoral.

Nas células tumorais de pulmão A549, observa-se uma redução abrupta no número de colônias, passando de aproximadamente 100% no controle para 47% quando tratadas com  $\frac{1}{4}.IC_{50}$ . Esse decréscimo se mantém e atinge 0% com a concentração do  $IC_{50}$ , o que indica um efeito citotóxico. Um comportamento semelhante e ainda mais pronunciado é observado com o extrato na linhagem tumoral de ovário resistente à cisplatina A2780cis, que apresenta somente 7% de colônias com  $\frac{1}{4}.IC_{50}$  e praticamente 0% com  $\frac{1}{2}.IC_{50}$ , sugerindo uma forte ação citotóxica do extrato. Estes dados concordam com os resultados do ensaio morfológico, pois observa-se na linhagem A2780cis muitas marcações de morte celular já na menor concentração testada de  $\frac{1}{2}.IC_{50}$ .

Na linhagem tumoral de ovário A2780, observa-se uma redução abrupta de 100% de colônias no controle para 46% com  $\frac{1}{2}.IC_{50}$ , indicando um efeito citotóxico do extrato. Na concentração de  $IC_{50}$ , ainda se observa uma redução no número de colônias, atingindo 17%. No entanto, na concentração máxima de  $2.IC_{50}$ , a redução se mantém em 10%, sugerindo que, em concentrações mais elevadas, o extrato exerce predominantemente um efeito citostático. Estes resultados estão em concordância com os resultados do ensaio morfológico, no qual a linhagem A2780 apresentou uma grande redução na densidade celular, mas poucas células em morte celular, mesmo nas concentrações mais altas, reforçando seu perfil citostático.

## **4.5 – Comparação dos metabólitos presentes nos extratos otimizados**

Esta etapa da pesquisa teve como objetivo investigar a relação entre a composição química da matriz e a atividade biológica do extrato mais ativo. Para isso, foi realizada uma análise comparativa dos extratos com base na anotação de metabólitos, visando obter informações sobre quais compostos podem estar contribuindo para a potencialização da atividade antitumoral observada.

Ao comparar os extratos através dos ensaios biológicos realizados, nota-se um maior potencial antitumoral do extrato otimizado obtido por micro-ondas (EAM 7). Este extrato apresentou menores concentrações de  $IC_{50}$  nos ensaios de viabilidade celular com as diferentes linhagens tumorais, grandes danos morfológicos às células tumorais e uma redução significativa no número de colônias formadas ao longo do tempo.

Conforme discutido na subseção 4.4.1.1, tal atividade biológica pronunciada provavelmente resulta da interação sinérgica entre diversos metabólitos presentes no extrato. Vale lembrar que as concentrações de ácido gálico e metil galato foram significativamente menores em ambos os extratos otimizados na linhagem mais promissora, tumoral de ovário. Além disso, apesar de apresentar menor concentração destes analitos em comparação ao extrato EAH 1, o extrato EAM 7 demonstrou maior atividade biológica nas linhagens tumorais mais promissoras, tumoral de ovário e de pulmão. Esses resultados indicam que a atividade antitumoral observada não está exclusivamente relacionada às concentrações dos compostos bioativos, mas sim à composição da matriz e às interações sinérgicas entre seus constituintes. Dessa forma, no intuito de compreender as diferenças na resposta biológica entre os extratos otimizados, foi realizada uma análise por espectrometria de massas de alta resolução. Essa abordagem permitiu detectar e anotar os metabólitos exclusivos extraídos com cada técnica, ou seja, os analitos presentes especificamente no extrato EAM 7 e

no extrato EAH 1, na tentativa de correlacionar a composição química e a atividade biológica observada.

Conforme descrito na subseção 3.9, a avaliação dos metabólitos presentes nos extratos otimizados foi feita por meio das análises das quintuplicatas dos extratos EAM 7 e EAH 1, processados pelo *software* MassHunter Qualitative Analysis 10.0 (Agilent Technologies). A partir do grande volume de dados gerados, a normalização foi empregada para harmonizar os dados provenientes das diversas amostras, eliminando variações indesejadas e aprimorando a comparabilidade entre o conjunto de dados. Esse processo envolve a aplicação de correções matemáticas nos dados para reduzir os efeitos de variações técnicas sistemáticas. O tratamento de dados neste estudo foi conduzido usando o *software* Mass Profiler Professional<sup>®</sup> B.08.00 (MPP, Agilent Technologies), identificando apenas os dados significativamente representativos, diminuindo o impacto de valores discrepantes entre as amostras.

A partir da comparação dos espectros de massa obtidos com dados disponíveis na biblioteca espectral de MS/MS do METLIN *Personal Compound Database and Library* (PCDL), considerando um índice de similaridade (score)  $\geq 70\%$  e erro  $< 5$  ppm, foi gerado um Diagrama de Venn para comparar os metabólitos presentes em cada extrato. No total, foram detectadas 103 entidades químicas no extrato EAH 1 e 82 no extrato EAM 7, sendo 47 entidades químicas em comum, extraídas em ambos os métodos, como pode ser visto na FIGURA 4.34.

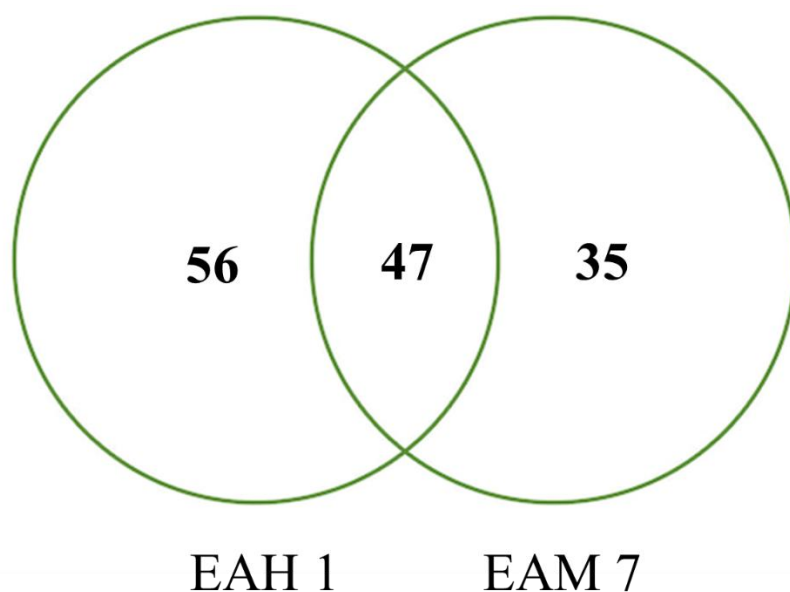


FIGURA 4.34 – Diagrama de Venn comparando a quantidade de entidades químicas detectadas em cada um dos extratos otimizados.

Assim, observa-se que foram detectadas 56 entidades metabólicas exclusivas no extrato EAH 1, das quais 36 foram anotadas com a sugestão do composto, enquanto para o extrato EAM 7 foram detectadas 35 entidades metabólicas exclusivas, das quais 12 foram anotadas. Essas informações podem ser visualizadas no Apêndice B. Em relação aos metabólitos anotados no extrato EAH 1, observa-se uma maior variedade de classes químicas, composta por fenólicos, carboidratos, compostos nitrogenados e lipídios. Alguns exemplos destes metabólitos podem ser vistos na FIGURA 4.35. Em relação ao extrato EAM 7, observa-se a predominância de metabólitos pertencentes à classe dos carboidratos, seguida de compostos fenólicos. Alguns exemplos podem ser visualizados na FIGURA 4.36.

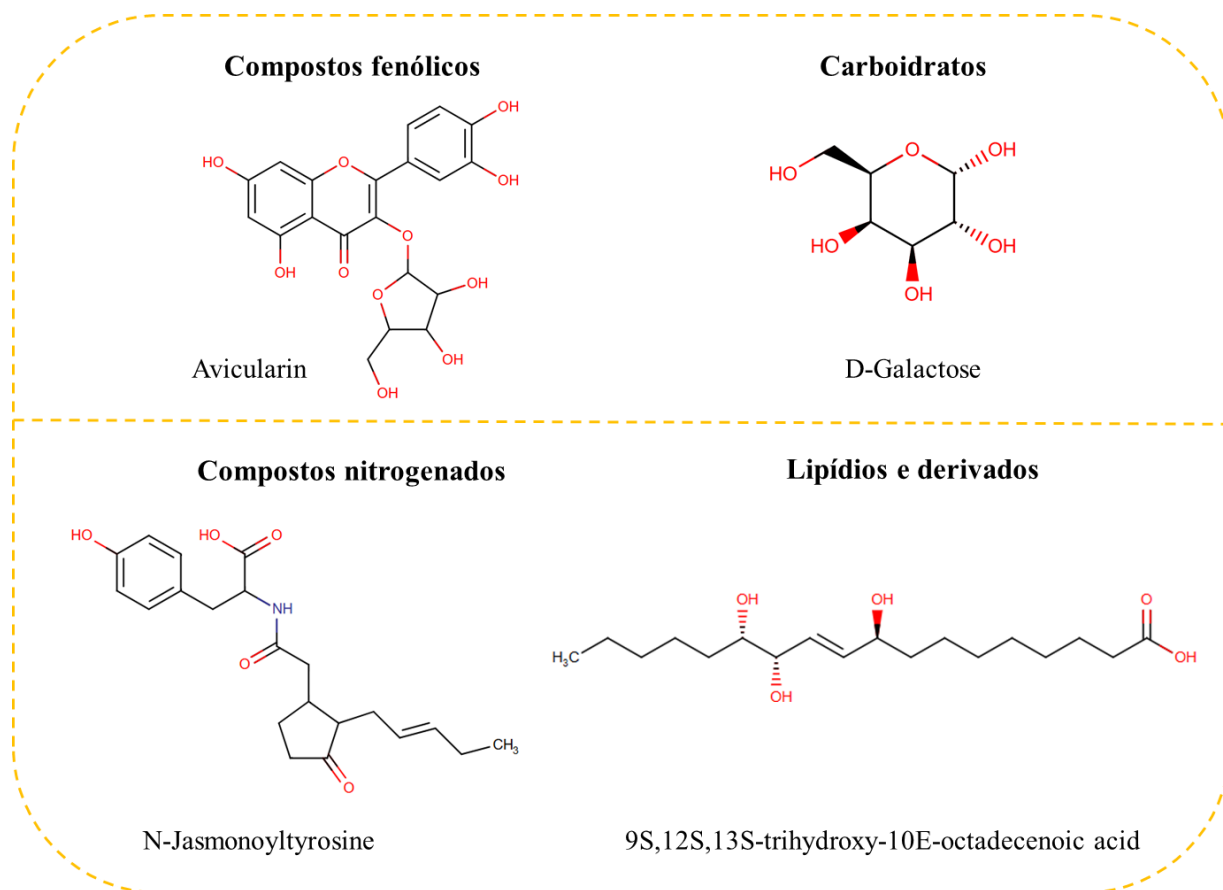


FIGURA 4.35 – Metabólitos anotados exclusivamente no extrato EAH 1.

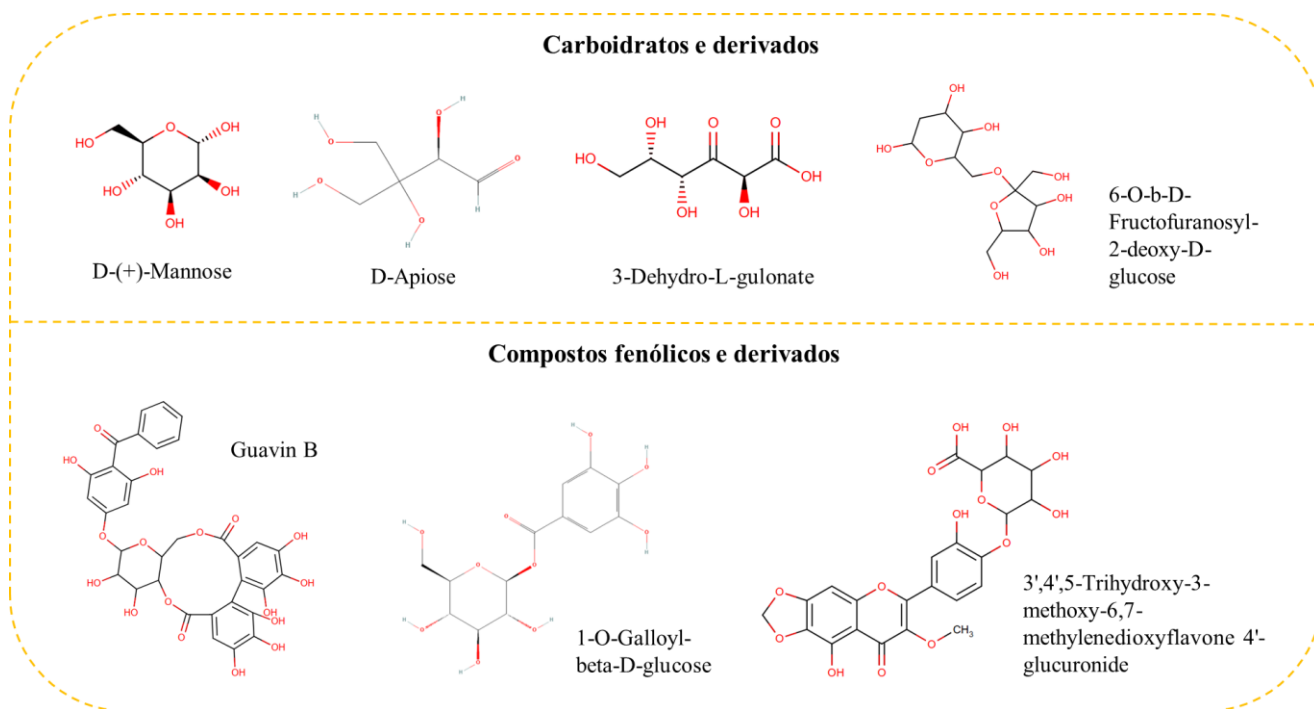


FIGURA 4.36 – Metabólitos anotados exclusivamente no extrato EAM 7.

Esta análise sugere que o extrato EAM 7 proporciona uma extração mais seletiva de determinadas classes químicas, com destaque para os carboidratos. Embora os métodos tradicionais para extração de carboidratos sejam baseados principalmente na extração sólido-líquido convencional, esses procedimentos não são seletivos para carboidratos bioativos específicos, apresentando baixa eficiência, degradação de polissacarídeos termolábeis e coextração de compostos interferentes. Para superar esses desafios, a extração assistida por micro-ondas tem se destacado como uma técnica verde para a obtenção de carboidratos bioativos<sup>60</sup>. Nessa abordagem, a água é frequentemente utilizada na mistura do solvente extrator, não apenas devido à sua solubilidade para carboidratos, mas também porque a interação das micro-ondas com as moléculas de água intracelular gera calor de forma rápida e eficiente por meio de rotações dipolares, levando ao rompimento celular<sup>145</sup>. Ademais, o calor gerado pode fragmentar carboidratos complexos em unidades menores a partir de processos de hidrólise de cadeias moleculares e clivagem de ligações de hidrogênio intermoleculares, nas quais frações de alto peso molecular são convertidas em baixo peso molecular, alterando sua estrutura inicial, mas não a estrutura primária dos polissacarídeos<sup>146</sup>. Portanto, a extração destes metabólitos e seus derivados é facilitada ao empregar o método assistido por micro-ondas.

Os carboidratos são classificados como metabólitos primários, substâncias que são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos. Eles representam a maior fração da biomassa vegetal, sendo componentes estruturais e fontes de energia fundamentais para as plantas<sup>147</sup>. A natureza hidrofílica dos carboidratos, aliada à sua capacidade de interagir seletivamente com receptores biológicos na superfície celular, tem possibilitado o desenvolvimento de novas abordagens promissoras para o tratamento do câncer e de outras doenças. Entre 2000 e 2021, 54 medicamentos à base de carboidratos foram aprovados para uso clínico, tanto como fármacos quanto como agentes de diagnóstico, sendo os tratamentos contra o câncer uma das quatro principais

categorias<sup>148</sup>. No contexto da terapia antitumoral, essas abordagens incluem desde o uso de carboidratos como portadores de pró-fármacos, possibilitando um direcionamento mais eficiente aos alvos terapêuticos<sup>149</sup>, até sua aplicação direta como alternativas aos quimioterápicos convencionais<sup>150</sup>. Estudos têm demonstrado que esses compostos exibem significativa atividade anticâncer em diferentes linhagens celulares, com alta seletividade e menores efeitos colaterais<sup>150,151</sup>. Esse potencial terapêutico está associado à atuação dos carboidratos, os quais promovem danos ao DNA, induzem a parada do ciclo celular e causam ruptura da membrana mitocondrial. Esses mecanismos resultam na indução de apoptose em células cancerígenas e podem também inibir processos de metástase, evidenciando seu papel promissor no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer<sup>149-151</sup>.

Dentre os metabólitos pertencentes à classe de carboidratos anotados no extrato EAM 7, o composto anotado como D-(+)-Mannose, um monossacarídeo extraído de plantas, especialmente de frutas<sup>152</sup>, vem sendo estudado recentemente para aplicação em terapias do câncer, uma vez que pode desestabilizar a proteína de morte programada (PD-1). Muitos tumores desenvolvem mecanismos para escapar da resposta imune, incluindo a ativação de pontos de verificação imunológicos, como a PD-1. Assim, o composto pode aumentar a eficácia do bloqueio do ponto de verificação imunológico e das terapias baseadas na inibição da quinase MEK (MEKi), frequentemente ativada em cânceres. Com isso, contribui na redução do crescimento tumoral, tornando-se um potencial adjuvante no tratamento do câncer<sup>152-154</sup>.

O composto anotado como D-Apiose é um monossacarídeo raro que ocorre como um constituinte de polissacarídeos vegetais encontrados amplamente em frutas, como a pectina<sup>155</sup> – composta por D-Xilose, D-Apiose, D-Galactose e ácido galacturônico<sup>156</sup>. Processos de extração que envolvem ondas de calor ou vibrações mecânicas podem promover a liberação de porções constituintes de monossacarídeos da pectina. Embora não tenham sido identificados estudos

relatando atividade biológica antitumoral deste composto em específico, a pectina e seus derivados apresentam efeitos inibitórios na supressão de determinadas respostas inflamatórias e efeito preventivo no crescimento e metástase do câncer<sup>157</sup>.

Além destes metabólitos, destaca-se, entre os compostos anotados na classe de carboidratos no extrato EAM 7, a presença de carboidratos simples e possíveis intermediários metabólicos, como 6-O-b-D-Fructofuranosyl-2-deoxy-D-glucose e 3-Dehydro-L-gulonate. Esses achados reforçam a hipótese de que o mecanismo térmico da extração assistida por micro-ondas pode favorecer a fragmentação de carboidratos complexos presentes na manga em estruturas menores e mais simples, como as detectadas.

Dentre os metabólitos pertencentes à classe dos fenólicos anotados no extrato EAM 7, alguns se destacam por seu potencial antitumoral já amplamente relatados na literatura. Dentre eles está o composto anotado como Guavin B, pertencente à classe dos taninos hidrolisáveis. Entre suas atividades biológicas, destacam-se a inibição da peroxidação lipídica, a redução da mutagenicidade de carcinógenos e da proliferação de células tumorais, além de estimular respostas imunológicas pelo sistema do hospedeiro<sup>158</sup>. O interesse nos taninos como agentes anticancerígenos está relacionado à sua capacidade de modular vias celulares associadas à carcinogênese, tornando-os potenciais candidatos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas<sup>159</sup>.

O composto anotado como 3',4',5-Trihydroxy-3-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone 4'-glucuronide pertence à classe dos flavonoides glicuronídeos. Esses compostos têm sido investigados como potenciais candidatos na descoberta de novos fármacos<sup>160</sup>, pois atuam na melhoria da biodisponibilidade de medicamentos administrados por via oral e na quimioprevenção da resistência múltipla a drogas<sup>161</sup>, um dos principais desafios no tratamento do câncer.

O composto anotado como 1-O-Galloyl-beta-D-glucose é um éster fenólico pertencente à classe dos taninos hidrolisáveis. Estudos recentes indicam que esse composto interage com o receptor de andrógeno (AR), sugerindo um potencial mecanismo multifacetado para o tratamento do câncer de próstata<sup>162</sup>. Além disso, outros ésteres fenólicos estruturalmente similares demonstraram, em estudos *in vitro* e *in vivo*, uma ampla gama de atividades biológicas, evidenciando seu potencial terapêutico e preventivo para doenças como o câncer. Estudos pré-clínicos utilizando modelos *in vivo* sustentam sua eficácia promissora na inibição seletiva da progressão tumoral, sem induzir toxicidade significativa ao organismo hospedeiro<sup>163</sup>.

Os resultados obtidos indicam que os extratos otimizados apresentam composições distintas, tanto em relação à quantidade de metabólitos quanto à diversidade de classes químicas extraídas. Na técnica de micro-ondas, observa-se uma predominância na extração de carboidratos (seguida de fenólicos), o que pode estar relacionado à sua atividade antitumoral mais pronunciada nos ensaios biológicos. Embora essa hipótese necessite de estudos mais aprofundados com uma caracterização detalhada do perfil químico de cada extrato, conclui-se que a técnica de extração e seu mecanismo influenciam diretamente na obtenção de compostos específicos, mesmo quando se utiliza a mesma matriz e condições experimentais similares, como composição do solvente extrator e tempo de extração. Dessa forma, diferentes interações sinérgicas podem emergir, modulando a atividade biológica dos extratos e impactando seu potencial antitumoral.

## 5 – Conclusões

Os resultados deste estudo demonstram que a extração verde e sustentável de compostos fenólicos a partir de resíduos de processamento de manga é uma abordagem viável e promissora, estando alinhada aos princípios da Química Verde e Química Sustentável. A aplicação de ferramentas quimiométricas e espectrométricas foi essencial neste processo, contribuindo para o desenvolvimento de metodologias mais eficientes, direcionadas e otimizadas, essenciais no campo da Química Analítica Verde.

A combinação de técnicas espectrométricas com ensaios bioguiados permitiu a detecção de metabólitos secundários com atividade antitumoral nos extratos, evidenciando a ação biológica dos analitos ácido gálico e metil galato, adotados como marcadores de referência. Os métodos analíticos desenvolvidos e otimizados para os analitos de interesse se mostraram adequados, apresentando seletividade, linearidade ( $R^2 > 0,999$ ), limites de detecção e quantificação compatíveis com a faixa linear de trabalho, bem como precisão ( $CV < 2\%$ ) e exatidão ( $> 96\%$ ). Os ensaios de recuperação também apresentaram resultados satisfatórios ( $> 94\%$ ).

Por meio da aplicação da quimiometria no planejamento e análise dos resultados das extrações, identificou-se que as variáveis mais influentes na extração dos analitos de interesse nos extratos otimizados utilizando a técnica assistida por homogeneização foram a composição de etanol a 40% (v.v<sup>-1</sup>) em água e a realização de uma única extração. Já para a extração assistida por micro-ondas, a composição de etanol a 80% (v.v<sup>-1</sup>) em água e a temperatura de 70°C foram determinantes para a obtenção de extratos otimizados com ácido gálico e metil galato. As diferenças nas melhores condições obtidas em cada técnica são justificadas pelos distintos mecanismos de extração envolvidos, que incluem processos mecânicos e térmicos, os quais influenciam diretamente as interações entre a matriz e o solvente, afetando, conseqüentemente, a eficiência na extração dos analitos.

Os extratos otimizados com ácido gálico e metil galato apresentaram maior atividade e seletividade contra células tumorais em comparação aos extratos-teste, sendo o extrato obtido por micro-ondas (EAM 7) o mais promissor. Este extrato apresentou valores de IC<sub>50</sub> inferiores aos dos fármacos cisplatina e doxorrubicina na linhagem tumoral de ovário (A2780) e valores próximos ou inferiores na linhagem tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis), além de uma seletividade superior, indicando que a extração por micro-ondas foi mais eficaz na obtenção de extratos bioativos com ação antitumoral. Além disso, observou-se uma forte interação sinérgica entre os compostos da matriz, reforçando o potencial do uso de extratos com marcadores de referência como agentes quimioterápicos, podendo aumentar a eficácia terapêutica e reduzir as chances de resistência à fármacos. Os ensaios biológicos demonstraram, ainda, que os extratos otimizados possuem um perfil citotóxico a longo prazo, resultando na indução de morte celular.

A análise comparativa dos metabólitos específicos extraídos por cada técnica revelou que os extratos otimizados obtidos possuem composições distintas, tanto em quantidade de metabólitos extraídos quanto na diversidade de classes químicas. Dentre os metabólitos anotados, observou-se uma predominância da classe de carboidratos na extração assistida por micro-ondas, o que pode estar associado à maior atividade antitumoral do extrato EAM 7. Estes resultados reforçam que o método de extração e seu mecanismo influenciam diretamente na obtenção de compostos específicos, possibilitando diferentes interações sinérgicas que modulam a atividade biológica dos extratos e impactam seu potencial antitumoral.

Em suma, este estudo evidencia o potencial de reaproveitamento de resíduos de manga para a obtenção de agentes antitumorais, utilizando metodologias analíticas verdes e sustentáveis, destacando a relevância dos métodos de extração e suas variáveis na obtenção de extratos bioativos. Esses achados contribuem para o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado a

partir de soluções baseadas na natureza, ampliando as possibilidades de aplicação da Química Verde e da Química Sustentável na busca por novas estratégias terapêuticas.



## 6 – Referências bibliográficas

1. CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. PIB do Agronegócio Brasileiro. 2025. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 10 fev. 2025.
2. ABIA - Associação Brasileira da Indústria de Alimentos. Números do setor. 2024. Disponível em: <https://www.abia.org.br/numeros-setor>. Acesso em: 10 fev. 2025.
3. PNUMA - Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente. Relatório do Índice de Desperdício de Alimentos. 2024. Disponível em: <https://www.unep.org/resources/publication/food-waste-index-report-2024>. Acesso em: 10 fev. 2025.
4. PEREIRA, B. S., DE FREITAS, C., VIEIRA, R. M. & BRIENZO, M. Brazilian banana, guava, and orange fruit and waste production as a potential biorefinery feedstock. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* **24**, 2126–2140 (2022).
5. UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. Emissions Gap Report. 2024. Disponível em: <https://www.unep.org/resources/emissions-gap-report-2024>. Acesso em: 10 fev. 2025.
6. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agropecuária no Brasil. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/br>. Acesso em: 10 fev. 2025.

7. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de Manga em São Paulo. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/manga/sp>. Acesso em: 10 fev. 2025.
8. CARVALHO, C. R. L., ROSSETTO, C. J., MANTOVANI, D. M. B., MORGANO, M. A., CASTRO, J. V. D., & BORTOLETTO, N. Avaliação de cultivares de mangueira selecionadas pelo Instituto Agronômico de Campinas comparadas a outras de importância comercial. *Rev. Bras. Frutic.* **26**, 264–271 (2004).
9. CLARK, J. H. & MATHARU, A. S. Waste to Wealth using Green Chemistry. *Waste as a Resource.* 66–82 (2013).
10. TWAIJ, B. M. & HASAN, M. N. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *Int. J. Plant Biol.* **13**, 4–14 (2022).
11. SAYAGO-AYERDI, S., GARCÍA-MARTÍNEZ, D. L., RAMÍREZ-CASTILLO, A. C., RAMÍREZ-CONCEPCIÓN, H. R. & VIUDA-MARTOS, M. Tropical Fruits and Their Co-Products as Bioactive Compounds and Their Health Effects: A Review. *Foods* **10**, 1952 (2021).
12. PARRA-PACHECO, B., CRUZ-MORENO, B. A., AGUIRRE-BECERRA, H., GARCÍA-TREJO, J. F. & FEREGRINO-PÉREZ, A. A. Bioactive Compounds from Organic Waste. *Molecules* **29**, 2243 (2024).
13. SHUKLA, S., SONDHI, A., TRIPATHI, A. D., LEE, J. K., PATEL, S. K., & AGARWAL, A. Valorisation of fruit waste for harnessing the bioactive

- compounds and its therapeutic application. *Trends Food Sci. Technol.* **144**, 104302 (2024).
14. DHAKAL, M., GHIMIRE, S., KARKI, G., DEOKAR, G. S., AL-ASMARI, F., & NIRMAL, N. P. Fruit Waste: Potential Bio-Resource for Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds. in *Bioactive Extraction and Application in Food and Nutraceutical Industries* (eds. Sarkar, T. & Pati, S.) 299–332 (Springer US, New York, NY, 2024).
  15. GÓMEZ-MALDONADO, D., LOBATO-CALLEROS, C., AGUIRRE-MANDUJANO, E., LEYVA-MIR, S. G., ROBLES-YERENA, L., & VERNON-CARTER, E. J. Antifungal activity of mango kernel polyphenols on mango fruit infected by anthracnose. *LWT* **126**, 109337 (2020).
  16. EMAM, M., ABDEL-HALEEM, D. R., FARAG, S. M., EL-ANSARI, M. A. & SOBEH, M. Larvicidal Activity of Pentagalloyl Glucose and Mangiferin Isolated from the Waste of Mango Kernel Against *Culex pipiens* L. *Waste Biomass Valorization* **13**, 83–93 (2022).
  17. QUIZON, C., ALVAREZ, M. R., MORENO, P., DELICA, K., BASINGAN JR, M., DENIEGA, F. & NACARIO, R. Effect of drying method on the anticancer activity and metabolite profile of mango (*Mangifera indica*) leaf extracts as revealed using LC-MS/MS metabolomics. *Vietnam J. Chem.* **60**, 490–501 (2022).
  18. PEREIRA, R., VELASCO, C., GÓMEZ-GARCIA, R., DIAS, J., PINTADO, M. & VALENTE, L. M. Unravelling the effects of extrusion and

- drying temperatures on the radical scavenging capacity of aquafeeds supplemented with mango and pineapple by-products. *Anim. Feed Sci. Technol.* **316**, 116061 (2024).
19. GARCÍA-MAHECHA, M., SOTO-VALDEZ, H., CARVAJAL-MILLAN, E., MADERA-SANTANA, T. J., LOMELÍ-RAMÍREZ, M. G., & COLÍN-CHÁVEZ, C. Bioactive Compounds in Extracts from the Agro-Industrial Waste of Mango. *Molecules* **28**, 458 (2023).
  20. TACIAS-PASCACIO, V. G., CASTAÑEDA-VALBUENA, D., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., BERENGUER-MURCIA, Á., MEZA-GORDILLO, R., GUTIÉRREZ, L. F. & AYORA-TALAVERA, T. Phenolic compounds in mango fruit: a review. *J. Food Meas. Charact.* **16**, 619–636 (2022).
  21. ZUIN, V. G., SEGATTO, M. L. & ZANOTTI, K. Towards a green and sustainable fruit waste valorisation model in Brazil: optimisation of homogenizer-assisted extraction of bioactive compounds from mango waste using a response surface methodology. *Pure Appl. Chem.* **92**, 617–629 (2020).
  22. MANHONGO, T. T., CHIMPHANGO, A., THORNLEY, P. & RÖDER, M. Techno-economic and environmental evaluation of integrated mango waste biorefineries. *J. Clean. Prod.* **325**, 129335 (2021).
  23. MANHONGO, T. T., CHIMPHANGO, A., THORNLEY, P. & RÖDER, M. An economic viability and environmental impact assessment of mango

- processing waste-based biorefineries for co-producing bioenergy and bioactive compounds. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **148**, 111216 (2021).
24. CHAHAR, M. K., SHARMA, N., DOBHAL, M. P. & JOSHI, Y. C. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn. Rev.* **5**, 1–12 (2011).
25. ALSHWYEH, H. A., AL-SHEIKH, W. M. S., RASEDEE, A., ALNASSER, S. M., AL-QUBAISI, M. S., & IBRAHIM, W. N. *Mangifera indica* L. kernel ethanol extract inhibits cell viability and proliferation with induction of cell cycle arrest and apoptosis in lung cancer cells. *Mol. Cell. Oncol.* **11**, 2299046 (2024).
26. SANTOS, M. D. O., LIMA, F., MARTINS, L. F. L., OLIVEIRA, J. F. P., ALMEIDA, L., & CANCELA, M. D. C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Rev. Bras. Cancerol.* **69**, e-213700 (2023).
27. WHO - World Health Organization. Global Cancer Observatory, Brazil. 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today/en>. Acesso em: 11 fev. 2025.
28. STRATTON, M. R., CAMPBELL, P. J. & FUTREAL, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–724 (2009).
29. URRUTICOECHEA, A., ALEMANY, R., BALART, J., VILLANUEVA, A., VINALS, F., & CAPELLA, G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3–10 (2010).

30. GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chem.* **88**, 102925 (2019).
31. DUAN, M., LENG, S. & MAO, P. Cisplatin in the era of PARP inhibitors and immunotherapy. *Pharmacol. Ther.* **258**, 108642 (2024).
32. ZHANG, C., XU, C., GAO, X. & YAO, Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics* **12**, 2115–2132 (2022).
33. NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **83**, 770–803 (2020).
34. HUANG, M., LU, J.-J. & DING, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Nat. Prod. Bioprospecting* **11**, 5–13 (2021).
35. BISHT, A., AVINASH, D., SAHU, K. K., PATEL, P., DAS GUPTA, G., & KURMI, B. D. A comprehensive review on doxorubicin: mechanisms, toxicity, clinical trials, combination therapies and nanoformulations in breast cancer. *Drug Deliv. Transl. Res.* **15**, 102–133 (2025).
36. LINDERS, A. N., DIAS, I. B., LÓPEZ FERNÁNDEZ, T., TOCCHETTI, C. G., BOMER, N. & VAN DER MEER, P. A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging. *Npj Aging* **10**, 1–9 (2024).
37. WHO - World Health Organization. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines: report of a WHO global survey. 2005.

Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9241593237>. Acesso em: 11 fev. 2025.

38. CARVALHO, A. C. B., PERFEITO, J. P. S., COSTA E SILVA, L. V., RAMALHO, L. S., MARQUES, R. F. D. O. & SILVEIRA, D. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. *Braz. J. Pharm. Sci.* **47**, 467–473 (2011).
39. THOMFORD, N. E., SENTHEBANE, D. A., ROWE, A., MUNRO, D., SEELE, P., MAROYI, A., & DZOBO, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1578 (2018).
40. OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Carga global de câncer aumenta em meio à crescente necessidade de serviços. 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/1-2-2024-carga-global-cancer-aumenta-em-meio-crescente-necessidade-servicos>. Acesso em: 12 fev. 2025.
41. WARNER, J. C., CANNON, A. S. & DYE, K. M. Green chemistry. *Environ. Impact Assess. Rev.* **24**, 775–799 (2004).
42. ANASTAS, P. & EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301–312 (2009).
43. GAŁUSZKA, A., MIGASZEWSKI, Z. & NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal. Chem.* **50**, 78–84 (2013).

44. KÜMMERER, K. Sustainable Chemistry: A Future Guiding Principle. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 16420–16421 (2017).
45. ONU - Organização das Nações Unidas. Nações Unidas no Brasil - Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. 2025. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 12 fev. 2025.
46. CLARK, J. H. Green and Sustainable Chemistry: An Introduction. (2016).
47. KÜMMERER, K., CLARK, J. H., & ZUIN, V. G. Rethinking chemistry for a circular economy. *Science*. 367(6476), 369–370 (2020).
48. ZUIN, V. G. Circularity in green chemical products, processes and services: Innovative routes based on integrated eco-design and solution systems. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2**, 40–44 (2016).
49. FORSTER-CARNEIRO, T., BERNI, M. D., DORILEO, I. L. & ROSTAGNO, M. A. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. *Resour. Conserv. Recycl.* **77**, 78–88 (2013).
50. ALDER, C. M., HAYLER, J. D., HENDERSON, R. K., REDMAN, A. M., SHUKLA, L., SHUSTER, L. E., & SNEDDON, H. F. Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide. *Green Chem.* **18**, 3879–3890 (2016).
51. ZUIN, V. G. & RAMIN, L. Z. Green and Sustainable Separation of Natural Products from Agro-Industrial Waste: Challenges, Potentialities, and Perspectives on Emerging Approaches. in *Chemistry and Chemical*

- Technologies in Waste Valorization* (ed. Lin, C. S. K.) 229–282 (Springer International Publishing, Cham, 2018).
52. ZUIN, V. G., RAMIN, L. Z., SEGATTO, M. L., STAHL, A. M., ZANOTTI, K., FORIM, M. R., DA SILVA, M. F. G. F. & FERNANDES, J. B. To separate or not to separate: what is necessary and enough for a green and sustainable extraction of bioactive compounds from Brazilian citrus waste. *Pure Appl. Chem.* **93**, 13–27 (2021).
53. SEGATTO, M. L., ZANOTTI, K. & ZUIN, V. G. Microwave-assisted extraction and matrix solid-phase dispersion as green analytical chemistry sample preparation techniques for the valorisation of mango processing waste. *Curr. Res. Chem. Biol.* **1**, 100007 (2021).
54. PEREIRA, G. A., MOLINA, G., ARRUDA, H. S. & PASTORE, G. M. Optimizing the Homogenizer-Assisted Extraction (HAE) of Total Phenolic Compounds from Banana Peel. *J. Food Process Eng.* **40**, e12438 (2017).
55. DA SILVA FRANCISCHINI, D., LOPES, A. P., SEGATTO, M. L., STAHL, A. M. & ZUIN, V. G. Development and application of green and sustainable analytical methods for flavonoid extraction from Passiflora waste. *BMC Chem.* **14**, 56 (2020).
56. ŞAHİN, S. & BILGIN, M. Valorization of peach (*Prunus persica* L.) waste into speciality products via green methods. *Biomass Convers. Biorefinery* **12**, 123–132 (2022).

57. MÁRQUEZ, K., MÁRQUEZ, N., ÁVILA, F., CRUZ, N., BURGOS-EDWARDS, A., PARDO, X. & CARRASCO, B. Oleuropein-Enriched Extract From Olive Mill Leaves by Homogenizer-Assisted Extraction and Its Antioxidant and Antiglycating Activities. *Front. Nutr.* **9**, (2022).
58. BEILANKOUHI, S., POURFARZAD, A., GHANBARZADEH, B., RASOULI, M. & HAMISHEKAR, H. Identification of polyphenol composition in grape (*Vitis vinifera* cv. Bidaneh Sefid) stem using green extraction methods and LC–MS/MS analysis. *Food Sci. Nutr.* **12**, 6789–6798 (2024).
59. PATRA, A., ABDULLAH, S. & PRADHAN, R. C. Review on the extraction of bioactive compounds and characterization of fruit industry by-products. *Bioresour. Bioprocess.* **9**, 14 (2022).
60. MENA-GARCÍA, A., RUIZ-MATUTE, A. I., SORIA, A. C. & SANZ, M. L. Green techniques for extraction of bioactive carbohydrates. *TrAC Trends Anal. Chem.* **119**, 115612 (2019).
61. LI, Y., FABIANO-TIXIER, A.-S., ABERT-VIAN, M. & CHEMAT, F. Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants and Food Colors. in *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice* (eds. Chemat, F. & Cravotto, G.) 103–125 (Springer US, Boston, MA, 2013).
62. ZUIN, V. G. & PEREIRA, C. A. M. Green Sample Preparation Focusing on Organic Analytes in Complex Matrices. in *Green Chromatographic Techniques: Separation and Purification of Organic and Inorganic Analytes*

- (eds. Inamuddin, Dr. & Mohammad, A.) 141–166 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2014).
63. SAVELIEV, M., PANCHUK, V. & KIRSANOV, D. Math is greener than chemistry: Assessing green chemistry impact of chemometrics. *TrAC Trends Anal. Chem.* **172**, 117556 (2024).
64. GEMPERLINE, P. Practical guide to chemometrics. (CRC Press, Boca Raton, 2006).
65. KALINOWSKA, K., BYSTRZANOWSKA, M. & TOBISZEWSKI, M. Chemometrics approaches to green analytical chemistry procedure development. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **30**, 100498 (2021).
66. PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. DA S., LOPES, N. P. & EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova* **25**, 45–61 (2002).
67. ACQUAVIA, M. A., PASCALE, R., FOTI, L., CARLUCCI, G., SCRANO, L., MARTELLI, G. & LELARIO, F. Analytical Methods for Extraction and Identification of Primary and Secondary Metabolites of Apple (*Malus domestica*) Fruits: A Review. *Separations* **8**, 91 (2021).
68. LUCCI, P., SAURINA, J. & NÚÑEZ, O. Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *TrAC Trends Anal. Chem.* **88**, 1–24 (2017).
69. ROCCHETTI, G., BLASI, F., MONTESANO, D., GHISONI, S., MARCOTULLIO, M. C., SABATINI, S. & LUCINI, L. Impact of

- conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves. *Food Res. Int.* **115**, 319–327 (2019).
70. TSUGAWA, H., IKEDA, K., TAKAHASHI, M., SATOH, A., MORI, Y., UCHINO, H. & ARITA, M. A lipidome atlas in MS-DIAL 4. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1159–1163 (2020).
71. PEREIRA FILHO, E. R. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. EdUFSCar, São Carlos (2015).
72. CASS, Q. B., & DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação. EdUFSCar, São Carlos (2001).
73. KRUIVE, A., REBANE, R., KIPPER, K., OLDEKOP, M. L., EVARD, H., HERODES, K. & LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Anal. Chim. Acta* **870**, 29–44 (2015).
74. KRUIVE, A., REBANE, R., KIPPER, K., OLDEKOP, M. L., EVARD, H., HERODES, K. & LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Anal. Chim. Acta* **870**, 8–28 (2015).
75. CASSIANO, N. M., BARREIRO, J. C., MARTINS, L. R. R., OLIVEIRA, R. V. & CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quím. Nova* **32**, 1021–1030 (2009).

76. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS (2011).
77. ABRAHAM, J. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. in *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes* (eds. Tietje, C. & Brouder, A.) 1041–1053 (Brill | Nijhoff, 2010).
78. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS (2011).
79. BORGES, R. M., RESENDE, J. V. M., MORAES, A. O. D., PEREIRA, A. K., GARRETT, R., BAUERMEISTER, A. & SILVA, A. J. R. D. Guia Para Processamento De Dados De Cromatografia Acoplada A Espectrometria De Massas. *Quím. Nova* **45**, 608–620 (2022).
80. STAUFFER, M. Calibration and Validation of Analytical Methods: A Sampling of Current Approaches. (BoD – Books on Demand, 2018).
81. MATUSZEWSKI, B. K., CONSTANZER, M. L. & CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Anal. Chem.* **75**, 3019–3030 (2003).
82. GEIGER, M., DESANGLOIS, G., HOGEVEEN, K., FESSARD, V., LEPRÊTRE, T., MONDEGUER, F. & HESS, P. Cytotoxicity, Fractionation

- and Dereplication of Extracts of the Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*, a Producer of Pinnatoxin G. *Mar. Drugs* **11**, 3350–3371 (2013).
83. GUAN TIANYE, G. T., LIANG YAN, L. Y., LI CHUNZHU, L. C., XIE LIN, X. L., WANG GUANGJI, W. G., & SHENG LONGSHENG, S. L. Recent Development in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Allied Topics for Traditional Chinese Medicine Research. *Chin. J. Nat. Med.* **9**, 385–400 (2011).
84. ALSEEKH, S., AHARONI, A., BROTMAN, Y., CONTREPOIS, K., D'AURIA, J., EWALD, J. & FERNIE, A. R. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nat. Methods* **18**, 747–756 (2021).
85. AGILENT. Captiva EMR–Lipid and Captiva EMR–Lipid HF: Method Guide. Disponível em: <https://www.agilent.com/en/product/sample-preparation/filtration/captiva-emr-lipid>. Acesso em: 17 fev. 2025.
86. AGILENT. Bond Elut PSA. Disponível em: <https://www.agilent.com/en/product/sample-preparation/solid-phase-extraction-spe/bond-elut-psa#productdetails>. Acesso em: 17 fev. 2025.
87. CROTTI, A. E. M., VESSECCHI, R., LOPES, J. L. C. & LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por ‘electrospray’: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quím. Nova* **29**, 287–292 (2006).

88. HONG, Y., WANG, Z., BARROW, C. J., DUNSHEA, F. R. & SULERIA, H. A. R. High-Throughput Screening and Characterization of Phenolic Compounds in Stone Fruits Waste by LC-ESI-QTOF-MS/MS and Their Potential Antioxidant Activities. *Antioxidants* **10**, 234 (2021).
89. ALI, A., WU, H., PONNAMPALAM, E. N., COTTRELL, J. J., DUNSHEA, F. R., & SULERIA, H. A. Comprehensive Profiling of Most Widely Used Spices for Their Phenolic Compounds through LC-ESI-QTOF-MS2 and Their Antioxidant Potential. *Antioxidants* **10**, 721 (2021).
90. YAP, K. M., SEKAR, M., SEOW, L. J., GAN, S. H., BONAM, S. R., MAT RANI, N. N. I. & FULORIA, S. *Mangifera indica* (Mango): A Promising Medicinal Plant for Breast Cancer Therapy and Understanding Its Potential Mechanisms of Action. *Breast Cancer Targets Ther.* **13**, 471–503 (2021).
91. WIANOWSKA, D., & OLSZOWY-TOMCZYK, M. A concise profile of gallic acid—From its natural sources through biological properties and chemical methods of determination. *Molecules*, 28(3), 1186 (2023).
92. KEYVANI-GHAMSARI, S., RAHIMI, M. & KHORSANDI, K. An update on the potential mechanism of gallic acid as an antibacterial and anticancer agent. *Food Sci. Nutr.* **11**, 5856–5872 (2023).
93. AHMAD, S., SUKARI, M. A., ISMAIL, N., ISMAIL, I. S., ABDUL, A. B., ABU BAKAR, M. F. & EE, G. C. Phytochemicals from *Mangifera pajang* Kosterm and their biological activities. *BMC Complement. Altern. Med.* **15**, 83 (2015).

94. LIANG, H., HUANG, Q., ZOU, L., WEI, P., LU, J., & ZHANG, Y. Methyl gallate: Review of pharmacological activity. *Pharmacol. Res.* **194**, 106849 (2023).
95. MERCOSUL. Farmacopeia Mercosul: Cromatografia. Disponível em: [https://www.anmat.gob.ar/webanmat/mercosur/acta\\_1-15/P\\_Res\\_xx\\_15\\_Cromatografia\\_PT.pdf](https://www.anmat.gob.ar/webanmat/mercosur/acta_1-15/P_Res_xx_15_Cromatografia_PT.pdf). Acesso em: 18 fev. 2025.
96. RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova* **27**, 771–780 (2004).
97. PUBCHEM. Gallic Acid. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/370>. Acesso em: 18 fev. 2025.
98. PUBCHEM. Methyl gallate. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7428>. Acesso em: 18 fev. 2025.
99. DORTA, E., LOBO, M. G. & GONZALEZ, M. Reutilization of Mango Byproducts: Study of the Effect of Extraction Solvent and Temperature on Their Antioxidant Properties. *J. Food Sci.* **77**, C80–C88 (2012).
100. DORTA, E., LOBO, M. G. & GONZÁLEZ, M. Improving the Efficiency of Antioxidant Extraction from Mango Peel by Using Microwave-assisted Extraction. *Plant Foods Hum. Nutr.* **68**, 190–199 (2013).
101. LIM, K. J. A., CABAJAR, A. A., LOBARBIO, C. F. Y., TABOADA, E. B. & LACKS, D. J. Extraction of bioactive compounds from mango (*Mangifera*

- indica L. var. Carabao) seed kernel with ethanol–water binary solvent systems. *J. Food Sci. Technol.* **56**, 2536–2544 (2019).
102. SIACOR, F. D., LOBARBIO, C. F., & TABOADA, E. B. Optimizing the extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from mango seed kernel wastes using response surface methodology. *Applied Environmental Research*, 42(3), 60-76 (2020).
103. MARTÍNEZ-OLIVO, A. O., CARLOS-MURILLO, M. U., SÁYAGO-AYERDI, S. G., SÁNCHEZ-BURGOS, J. A. & ZAMORA-GASGA, V. M. Optimization of ultrasonic extraction for enhanced polyphenol profile and antioxidant capacity in mango seeds: A comparative study with thermal extraction. *Food Chem. Adv.* **3**, 100480 (2023).
104. TORRES-LEÓN, C., ROJAS, R., SERNA-COCK, L., BELMARES-CERDA, R. & AGUILAR, C. N. Extraction of antioxidants from mango seed kernel: Optimization assisted by microwave. *Food Bioprod. Process.* **105**, 188–196 (2017).
105. RAMÍREZ-BREWER, D., QUINTANA, S. E. & GARCÍA-ZAPATEIRO, L. A. Modeling and optimization of microwave-assisted extraction of total phenolics content from mango (*Mangifera indica*) peel using response surface methodology (RSM) and artificial neural networks (ANN). *Food Chem. X* **22**, 101420 (2024).

106. ZOU, T., WU, H., LI, H., JIA, Q. & SONG, G. Comparison of microwave-assisted and conventional extraction of mangiferin from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *J. Sep. Sci.* **36**, 3457–3462 (2013).
107. VÉLEZ-ERAZO, E. M., PASQUEL-REÁTEGUI, J. L., Dorronsoro-Guerrero, O. H. & Martínez-Correa, H. A. Phenolics and carotenoids recovery from agroindustrial mango waste using microwave-assisted extraction: Extraction and modeling. *J. Food Process Eng.* **44**, e13774 (2021).
108. NOUBIGH, A., JERIBI, C., MGAIDI, A. & ABDERRABBA, M. Solubility of gallic acid in liquid mixtures of (ethanol + water) from (293.15 to 318.15) K. *J. Chem. Thermodyn.* **55**, 75–78 (2012).
109. VAN DER HOEVEN, PH. C. & LYKLEMA, J. Electrostatic stabilization in non-aqueous media. *Adv. Colloid Interface Sci.* **42**, 205–277 (1992).
110. LI, Z., WANG, Z., LI, M., GAO, Z. & WANG, B. Measurement and correlation of solubility of methyl gallate in nine pure and ethanol + n-propanol mixed solvents at temperatures within 293.15–333.15 K. *J. Mol. Liq.* **293**, 111531 (2019).
111. ZUIN, V. G., SEGATTO, M. L. & RAMIN, L. Z. Green Chemistry in Analytical Chemistry. in *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology* (ed. Meyers, R. A.) 1–24 (Springer, New York, NY, 2018).
112. AGUILERA, J. M. Solid-Liquid Extraction. in *Extraction Optimization in Food Engineering* (CRC Press, 2003).

113. ABDULLAH, A.-S. H., MOHAMMED, A. S., ABDULLAH, R., MIRGHANI, M. E. S. & AL-QUBAISI, M. Cytotoxic effects of *Mangifera indica* L. kernel extract on human breast cancer (MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines) and bioactive constituents in the crude extract. *BMC Complement. Altern. Med.* **14**, 199 (2014).
114. HOANG, V. L. T., PIERSON, J. T., CURRY, M. C., SHAW, P. N., DIETZGEN, R. G., GIDLEY, M. J. & MONTEITH, G. R. Polyphenolic contents and the effects of methanol extracts from mango varieties on breast cancer cells. *Food Sci. Biotechnol.* **24**, 265–271 (2015).
115. EDIRIWEERA, M. K., TENNEKOON, K. H., SAMARAKOON, S. R., THABREW, I. & DE SILVA, E. D. Induction of Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells by Sri Lankan Endemic Mango (*Mangifera zeylanica*) Fruit Peel through Oxidative Stress and Analysis of its Phytochemical Constituents. *J. Food Biochem.* **41**, e12294 (2017).
116. BAI, X., LAI, T., ZHOU, T., LI, Y., LI, X., & ZHANG, H. In Vitro Antioxidant Activities of Phenols and Oleanolic Acid from Mango Peel and Their Cytotoxic Effect on A549 Cell Line. *Molecules* **23**, 1395 (2018).
117. NAVARRO, M., ARNAEZ, E., MOREIRA, I., QUESADA, S., AZOFEIFA, G., WILHELM, K. & CHEN, P. Polyphenolic Characterization, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of *Mangifera indica* Cultivars from Costa Rica. *Foods* **8**, 384 (2019).

118. MIRZA, B., CROLEY, C. R., AHMAD, M., PUMAROL, J., DAS, N., SETHI, G., & BISHAYEE, A. Mango (*Mangifera indica* L.): a magnificent plant with cancer preventive and anticancer therapeutic potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **61**, 2125–2151 (2021).
119. PERERA, N., EDIRIWEERA, M. K., SAMARAKOON, S. R., SELVAKUMAR, I., NAGARAJAN, D., VELLINGIRI, V., & TENNEKOON, K. H. *Mangifera zeylanica* and *Mangifera indica* Leaf Extracts Exert Anticancer Effects Possibly by Inhibiting Histone Deacetylases. *J. Herbs Spices Med. Plants* **29**, 98–113 (2023).
120. NEMEC, M. J., KIM, H., MARCIANTE, A. B., BARNES, R. C., HENDRICK, E. D., BISSON, W. H. & MERTENS-TALCOTT, S. U. Polyphenolics from mango (*Mangifera indica* L.) suppress breast cancer ductal carcinoma in situ proliferation through activation of AMPK pathway and suppression of mTOR in athymic nude mice. *J. Nutr. Biochem.* **41**, 12–19 (2017).
121. JOHN, J., KINRA, M., RANADIVE, N., KENI, R., NAYAK, P. G., JAGDALE, R. N. & NANDAKUMAR, K. Neuroprotective effect of Mulmina Mango against chemotherapy-induced cognitive decline in mouse model of mammary carcinoma. *Sci. Rep.* **12**, 3072 (2022).
122. SHABAN, N. Z., EL-RASHIDY, F. H., ADAM, A. H., BELTAGY, D. M., ALI, A. E., ABDE-ALAZIZ, A. A., & TALAAT, I. M. Anticancer role of mango (*Mangifera indica* L.) peel and seed kernel extracts against 7,12-

- dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in female rats. *Sci. Rep.* **13**, 7703 (2023).
123. GARCÍA-RIVERA, D., DELGADO, R., BOUGARNE, N., HAEGEMAN, G. & VANDEN BERGHE, W. Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of *Mangifera indica* L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells. *Cancer Lett.* **305**, 21–31 (2011).
124. YOU, B. R. & PARK, W. H. Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicol. In Vitro* **24**, 1356–1362 (2010).
125. CALDERÓN-MONTAÑO, J. M., MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, S. M., JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, V., BURGOS-MORÓN, E., GUILLÉN-MANCINA, E., JIMÉNEZ-ALONSO, J. J. & LÓPEZ-LÁZARO, M. Screening for Selective Anticancer Activity of 65 Extracts of Plants Collected in Western Andalusia, Spain. *Plants* **10**, 2193 (2021).
126. SEGUN, P. A., OGBOLE, O. O., ISMAIL, F. M., NAHAR, L., EVANS, A. R., AJAIYEGBA, E. O., & SARKER, S. D. Resveratrol derivatives from *COMMIPHORA AFRICANA* ( A. RICH. ) Endl. display cytotoxicity and selectivity against several human cancer cell lines. *Phytother. Res.* **33**, 159–166 (2019).
127. ZLOTNIKOV, I. D., DOBRYAKOVA, N. V., EZHOV, A. A. & KUDRYASHOVA, E. V. Achievement of the Selectivity of Cytotoxic Agents against Cancer Cells by Creation of Combined Formulation with Terpenoid

- Adjuvants as Prospects to Overcome Multidrug Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 8023 (2023).
128. LO GALBO, V., LAURICELLA, M., GIULIANO, M., EMANUELE, S., CARLISI, D., CALVARUSO, G. & D'ANNEO, A. Redox Imbalance and Mitochondrial Release of Apoptogenic Factors at the Forefront of the Antitumor Action of Mango Peel Extract. *Molecules* **26**, 4328 (2021).
129. WRÓŃSKA, N., SZLAUR, M., ZAWADZKA, K. & LISOWSKA, K. The Synergistic Effect of Triterpenoids and Flavonoids—New Approaches for Treating Bacterial Infections? *Molecules* **27**, 847 (2022).
130. NG, C. X., AFFENDI, M. M., CHONG, P. P. & LEE, S. H. The Potential of Plant-Derived Extracts and Compounds to Augment Anticancer Effects of Chemotherapeutic Drugs. *Nutr. Cancer* **74**, 3058–3076 (2022).
131. MITRA, S., TAREQ, A. M., DAS, R., EMRAN, T. B., NAINU, F., CHAKRABORTY, A. J. & SIMAL-GANDARA, J. Polyphenols: A first evidence in the synergism and bioactivities. *Food Rev. Int.* **39**, 4419–4441 (2023).
132. CHEON, C. & KO, S. G. Synergistic effects of natural products in combination with anticancer agents in prostate cancer: A scoping review. *Front. Pharmacol.* **13**, (2022).
133. CASANOVA, L. M. & COSTA, S. S. Synergistic Interactions in Natural Products: Therapeutic Potential and Challenges. *Rev. Virtual Quím.* 575–595 (2017).

134. EL-READI, M. Z., AL-ABD, A. M., ALTHUBITI, M. A., ALMAIMANI, R. A., AL-AMOODI, H. S., ASHOUR, M. L. & EID, S. Y. Multiple Molecular Mechanisms to Overcome Multidrug Resistance in Cancer by Natural Secondary Metabolites. *Front. Pharmacol.* **12**, (2021).
135. WAY, G. P., KOST-ALIMOVA, M., SHIBUE, T., HARRINGTON, W. F., GILL, S., PICCIONI, F. & SINGH, S. Predicting cell health phenotypes using image-based morphology profiling. *Molecular biology of the cell*, *32*(9), 995-1005 (2021).
136. BANFALVI, G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis* **22**, 306–323 (2017).
137. VILLASANA, M., OCHOA, G. & AGUILAR, S. Modeling and optimization of combined cytostatic and cytotoxic cancer chemotherapy. *Artif. Intell. Med.* **50**, 163–173 (2010).
138. RELLO, S., STOCKERT, J. C., MORENO, V. L., GAMEZ, A., PACHECO, M., JUARRANZ, A. & VILLANUEVA, A. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* **10**, 201–208 (2005).
139. DOONAN, F. & COTTER, T. G. Morphological assessment of apoptosis. *Methods* **44**, 200–204 (2008).
140. LOZANO-CASABIANCA, G. A., ARANGO-VARELA, S. S. & MALDONADO-CELIS, M. E. Induction of Apoptosis and Decrease of

- Autophagy in Colon Cancer Cells by an Extract of Lyophilized Mango Pulp.  
*Int. J. Environ. Res. Public. Health* **20**, 4165 (2023).
141. KUMKOON, T., CHUNHAVACHARATORN, P., MANOHONG, P., NIRMAL, N., BENJAKUL, S., & KATEWONGSA, K. Anti-Cancer Activity of Ethanolic Extract from ‘Bao’ Mango (*Mangifera indica*) Peel and Its Nanoencapsulation Against Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines. *ChemNanoMat* **10**, e202300530 (2024).
142. MIRZAYANS, R., ANDRAIS, B., SCOTT, A., TESSIER, A. & MURRAY, D. A sensitive assay for the evaluation of cytotoxicity and its pharmacologic modulation in human solid tumor-derived cell lines exposed to cancertherapeutic agents. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Société Can. Sci. Pharm.* **10**, 298s–311s (2007).
143. BRIX, N., SAMAGA, D., BELKA, C., ZITZELSBERGER, H. & LAUBER, K. Analysis of clonogenic growth in vitro. *Nat. Protoc.* **16**, 4963–4991 (2021).
144. MUNSHI, A., HOBBS, M. & MEYN, R. E. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol. Med.* **110**, 21–28 (2005).
145. TSUBAKI, S., ONDA, A., HIRAOKA, M., FUJII, S., AZUMA, J. I., & WADA, Y. Chapter 7 - Microwave-Assisted Water Extraction of Carbohydrates From Unutilized Biomass. in *Water Extraction of Bioactive Compounds* (eds. Dominguez González, H. & González Muñoz, M. J.) 199–219 (Elsevier, 2017).

146. LU, X. Changes in the structure of polysaccharides under different extraction methods. *eFood* **4**, e82 (2023).
147. ZANOTTI, K., STAHL, A. M., SEGATTO, M. L. & ZUIN, V. G. Green and Sustainable Extraction of High-Value Compounds. in *Sustainable Separation Engineering* 63–104 (John Wiley & Sons, Ltd, 2022).
148. CAO, X., DU, X., JIAO, H., AN, Q., CHEN, R., FANG, P. & YU, B. Carbohydrate-based drugs launched during 2000–2021. *Acta Pharm. Sin. B* **12**, 3783–3821 (2022).
149. FRANCONETTI, A., LÓPEZ, Ó. & FERNANDEZ-BOLANOS, J. G. Carbohydrates: Potential Sweet Tools Against Cancer. *Curr. Med. Chem.* **27**, 1206–1242 (2020).
150. KHAN, T., DATE, A., CHAWDA, H. & PATEL, K. Polysaccharides as potential anticancer agents—A review of their progress. *Carbohydr. Polym.* **210**, 412–428 (2019).
151. WANG, J., ZHANG, Y., LU, Q., XING, D. & ZHANG, R. Exploring Carbohydrates for Therapeutics: A Review on Future Directions. *Front. Pharmacol.* **12**, (2021).
152. HU, X., SHI, Y., ZHANG, P., MIAO, M., ZHANG, T. & JIANG, B. D-Mannose: Properties, Production, and Applications: An Overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15**, 773–785 (2016).

153. DONG, W., LIN, M., ZHANG, R., SUN, X., LI, H., LIU, T. & LV, L. D-mannose targets PD-1 to lysosomal degradation and enhances T cell-mediated anti-tumor immunity. *Cancer Lett.* **591**, 216883 (2024).
154. ZHANG, R., YANG, Y., DONG, W., LIN, M., HE, J., ZHANG, X. & LV, L. D-mannose facilitates immunotherapy and radiotherapy of triple-negative breast cancer via degradation of PD-L1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**, e2114851119 (2022).
155. JEEVITHA, G. C., RAMAMOORTHY, S., AHMAD, F., SARAVANAN, R., HAQUE, S., & CAPANOGLU, E. Recent advances in extraction methodologies for the valorization of mango peel wastes. *Int. J. Food Prop.* **26**, 3492–3511 (2023).
156. ANTENUCCI, S., ORTENZI, M. A., FARINA, H., SMANIOTTO, F. & VEROTTA, L. Potential Edible Pectin-based film for high water soluble Ellagic Acid salt release. (2017).
157. GHAI, K., GUPTA, A. K. & GUPTA, P. K. Pectin: A Versatile Biopolymer with Numerous Health Benefits and Medical Uses. *J. Biol. Act. Prod. Nat.* **2**, 250–255 (2012).
158. ROJAS-GARBANZO, C. Psidium Fruits: Endemic Fruits of Latin America with a Wide Variety of Phytochemicals. *Food Sci.* **2**, (2018).
159. OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* **66**, 2012–2031 (2005).

160. CHEN, M., REN, X., SUN, S., WANG, X., XU, X., LI, X. & SHE, G. Structure, Biological Activities and Metabolism of Flavonoid Glucuronides. *Mini Rev. Med. Chem.* **22**, 322–354 (2022).
161. MIRON, A., APROTOSOAIE, A. C., TRIFAN, A. & XIAO, J. Flavonoids as modulators of metabolic enzymes and drug transporters. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1398**, 152–167 (2017).
162. ABDUL-HAMMED, M., ADEDOTUN, I. O., ISMAIL, U. T., AYANKOSO, S. A., ABDUL-RAZAQ, R., OLAJIDE, M., & LAWAL, T. A. Investigating the bioactive compounds from *Capsicum annum* as a probable alternative therapy for prostate cancer treatment: a structure-based drug design approach. *Pure Appl. Chem.* **96**, 719–742 (2024).
163. ZHANG, J., LI, L., KIM, S.-H., HAGERMAN, A. E. & LÜ, J. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *Pharm. Res.* **26**, 2066 (2009).



## Apêndice A

Tabelas ANOVA para as regressões calculadas na construção das curvas analíticas no solvente e na matriz (extratos obtidos com ambas as técnicas).

<b>Curva no solvente com ácido gálico</b>						
<b>Fonte da variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F calculado</b>	<b>F crítico</b>	<b>p-valor</b>
Entre grupos	1,09783E+13	1	1,09783E+13	9,95448	4,74723	0,00830
Dentro dos grupos	1,32342E+13	12	1,10285E+12			
Total	2,42124E+13	13				

<b>Curva no solvente com metil galato</b>						
<b>Fonte da variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F calculado</b>	<b>F crítico</b>	<b>p-valor</b>
Entre grupos	1,30007E+15	1	1,30007E+15	10,19964	4,74723	0,00772
Dentro dos grupos	1,52954E+15	12	1,27462E+14			
Total	2,82961E+15	13				

<b>Curva na matriz com ácido gálico (EAH)</b>						
<b>Fonte da variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F calculado</b>	<b>F crítico</b>	<b>p-valor</b>
Entre grupos	1,10221E+13	1	1,10221E+13	9,93964	4,74723	0,00833
Dentro dos grupos	1,33068E+13	12	1,1089E+12			
Total	2,43289E+13	13				

<b>Curva na matriz com metil galato (EAH)</b>						
<b>Fonte da variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F calculado</b>	<b>F crítico</b>	<b>p-valor</b>
Entre grupos	1,30726E+15	1	1,30726E+15	10,1498	4,74723	0,00784
Dentro dos grupos	1,54556E+15	12	1,28797E+14			
Total	2,85282E+15	13				

<b>Curva na matriz com ácido gálico (EAM)</b>						
<b>Fonte da variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F calculado</b>	<b>F crítico</b>	<b>p-valor</b>
Entre grupos	1,10553E+13	1	1,10553E+13	10,01086	4,74723	0,00816
Dentro dos grupos	1,3252E+13	12	1,10433E+12			
Total	2,43073E+13	13				

<b>Curva na matriz com metil galato (EAM)</b>						
<b>Fonte da variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F calculado</b>	<b>F crítico</b>	<b>p-valor</b>
Entre grupos	1,30563E+15	1	1,30563E+15	10,13491	4,74723	0,00787
Dentro dos grupos	1,5459E+15	12	1,28825E+14			
Total	2,85153E+15	13				

## Apêndice B

Metabólitos detectados e anotados exclusivamente no extrato otimizado EAH 1 (obtido por homogeneização) e no extrato otimizado EAM 7 (obtido por micro-ondas).

### Metabólitos exclusivos do extrato EAH 1

N°	Compostos propostos	Fórmula molecular	RT (min)	Massa exata	m/z teórico	Score	Erro (ppm)	Bases de dados			Espécies
								HMP	KEGG	LMP	
1	(2S)-2-hydroxyphytanic acid	C20 H40 O3	7,753	328,2984	327,2911	82,75	1,91		C02982	LMPR0104010015	(M-H)-
2	11S-HpODE	C18 H32 O4	7,042	312,2301	293,2123	83,94	0,10		C07338	LMFA02000115	(M-H)-[-H2O]
3	16-Hydroxy hexadecanoic acid	C16 H32 O3	8,349	272,235	271,2278	83,75	-0,50	HMDB06294	C18218	LMFA01050051	(M-H)-
4	1-Octadec-9-enyl glycerol	C21 H42 O3	8,622	342,3135	341,3062	80,81	0,29		C13860		(M-H)-
5	2,3-Diketo-L-gulonate	C6 H8 O7	1,089	192,0273	173,0095	90,00	1,76	HMDB06511	C04575		(M-H)-[-H2O]
6	2'',4''-Diacetylfazelin	C25 H24 O12	1,016	516,1283	497,1115	100,00	2,91	HMDB40138			(M-H)-[-H2O]
7	3'-Demethylstaurosporine	C27 H24 N4 O3	8,123	452,1835	451,1763	71,86	-2,96		C07349		(M-H)-
8	3-O-a-L-Fucopyranosyl-D-glucose	C12 H22 O10	1,011	326,1212	353,1084	84,94	-0,16	HMDB06701			(M+HCOO)-[-H2O]
9	4-Methyl-3-oxoadipate-enol-lactone	C7 H8 O4	6,315	156,0425	183,0301	97,80	1,30		C18311		(M+HCOO)-[-H2O]
10	4-O-beta-D-Glucosyl-sinapate	C17 H22 O10	0,925	386,1232	367,1053	76,77	4,81		C02919		(M-H)-[-H2O]
11	5-O-p-Coumaroylnigrumin	C20 H23 N O9	1,183	421,1353	456,1047	100,00	-4,71	HMDB38730			(M+Cl)-
12	9(S)-HODE	C18 H32 O3	7,344	296,2347	277,2168	80,91	-1,45		C14767		(M-H)-[-H2O]
13	9S,12S,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid	C18 H34 O5	6,333	330,241	329,2337	81,70	1,15	HMDB04708	C14833	LMFA02000014	(M-H)-
14	Avicularin	C20 H18 O11	5,996	434,0861	433,0784	73,56	2,80	HMDB30860		LMPK12112167	(M-H)-
15	Camelliatannin G	C49 H34 O29	5,958	1086,1137	1113,1014	91,06	-4,47	HMDB41118			(M+HCOO)-[-H2O]
16	Cis-Caffeoyl tartaric acid	C13 H12 O9	6,069	312,0463	311,039	77,31	-5,91	HMDB29276			(M-H)-
17	D-Galactonic acid	C6 H12 O7	0,939	196,0582	195,0509	99,57	-0,62	HMDB00565	C00880		(M-H)-
18	D-Galactose	C6 H12 O6	0,913	180,063	161,0452	84,96	-1,97	HMDB00143	C00124		(M-H)-[-H2O]
19	D-Glucarate	C6 H10 O8	1,083	210,0378	191,02	84,90	1,30	HMDB29881	C00818	LMFA01170108	(M-H)-[-H2O]
20	Dihydromyricetin	C15 H12 O8	6,219	320,053	301,0351	78,78	-0,75		C02906		(M-H)-[-H2O]
21	Ethyl aconitate	C8 H10 O6	4,020	202,0476	183,0298	84,98	-0,48	HMDB40275			(M-H)-[-H2O]
22	Galactotriose	C18 H32 O16	0,931	504,1685	503,1613	97,78	-0,97	HMDB29922			(M-H)-

continua

**Metabólitos exclusivos do extrato EAH 1**

N°	Compostos propostos	Fórmula molecular	RT (min)	Massa exata	m/z teórico	Score	Erro (ppm)	Bases de dados			Espécies
								HMP	KEGG	LMP	
23	Hydrocortisone phosphate	C21 H31 O8 P	0,953	442,1761	477,1453	100,00	1,06		D00977		(M+Cl)-
24	Irilone 4'-glucoside	C22 H20 O11	5,986	460,0998	441,0820	78,48	-1,72	HMDB33818			(M-H)-[-H2O]
25	L-Galactonate	C6 H12 O7	0,938	196,0587	195,0514	99,43	1,95		C15930		(M-H)-
26	L-Xylonate	C5 H10 O6	1,090	166,0470	193,0346	86,60	-4,67		C05411		(M+HCOO)-[-H2O]
27	Mallotochromene	C24 H26 O8	7,766	442,1647	423,1473	80,84	4,27		C09013		(M-H)-[-H2O]
28	Melibiose	C12 H22 O11	0,928	342,1160	387,1142	99,86	-0,69	HMDB00048	C05402		(M+HCOO)-
29	Mesaconic acid	C5 H6 O4	1,085	130,0264	111,0086	96,10	-1,29	HMDB00749	C01732	LMFA01170116	(M-H)-[-H2O]
30	Methyl (3x,4E,10R)-3,10-dihydroxy-4,11-dodecadiene-6,8-diyanoate 10-glucoside	C19 H24 O9	6,265	396,1435	377,1247	100,00	3,74	HMDB40897			(M-H)-[-H2O]
31	N-Acetyl-9-O-lactoylneuraminic acid	C14 H23 N O11	1,213	381,1266	426,1248	75,81	-1,44	HMDB00768			(M+HCOO)-
32	N-Jasmonoyltyrosine	C21 H27 N O5	6,707	373,1873	400,1748	74,59	-4,23	HMDB39503			(M+HCOO)-[-H2O]
33	Oroxindin	C22 H20 O11	5,983	460,1013	441,0834	75,53	1,57			LMPK12111323	(M-H)-[-H2O]
34	Piperaduncin B	C29 H30 O8	0,918	506,1963	487,1793	88,01	4,41		C09829	LMPK12120468	(M-H)-[-H2O]
35	Protoverine	C27 H43 N O9	7,346	525,2933	524,2859	97,60	-0,97		C10817		(M-H)-
36	Stearic acid	C18 H36 O2	8,091	284,2709	283,2637	92,99	-2,09	HMDB00827	C01530	LMFA01010018	(M-H)-
37		C2 H8 N O3 P	5,879	125,0239	124,0165	97,90	-2,06		C03782		(M-H)-
38		C8 H10 N4 O4	1,004	226,0693	207,0513	80,83	-4,03		C16365		(M-H)-[-H2O]
39		C12 H20 O5	6,166	244,1309	225,1130	84,72	-0,91				(M-H)-[-H2O]
40		C16 H16 N4	6,258	264,1363	263,1291	81,88	-4,43		C15389		(M-H)-
41		C22 H14	7,077	278,1089	313,0786	70,80	-2,25		C14325		(M+Cl)-
42		C19 H24 N4 O2	8,088	340,1914	381,1946	79,39	4,29		C07420		(M+CH3COO)-[-H2O]
43		C14 H14 N6 O7	1,141	378,0928	377,0855	99,41	1,00				(M-H)-
44		C19 H17 N3 O7	1,100	399,1047	380,0873	74,56	-4,80		C17354		(M-H)-[-H2O]
45		C25 H43 N O7	8,134	469,3033	528,3171	86,36	-1,36		C11996	LMPK04000037	(M+CH3COO)-
46		C23 H16 N3 O9	0,898	478,0896	477,0824	75,64	2,05				(M-H)- (M+HCOO)-
47		C23 H12 N4 O9	6,076	488,0602	487,0529	99,17	-0,55				(M-H)-
48		C27 H23 N8 O2	8,081	491,1944	490,1872	77,57	0,00				(M-H)-
49		C16 H26 N7 O11	0,983	492,1690	491,1615	78,99	-0,09				(M-H)- (M+CH3COO)-
50		C25 H45 N O9	8,036	503,3089	502,3015	98,83	-1,15		C15760		(M-H)-
51		C17 H22 N14 O8	0,953	550,1742	549,1666	79,12	-0,59				(M-H)- (M+CH3COO)-
52		C27 H12 N9 O10	5,978	622,0719	621,0646	70,92	1,86				(M-H)-
53		C21 H20 N14 O10	1,038	628,1482	627,1406	75,88	-0,71				(M-H)- (M+CH3COO)-
54		C21 H30 N3 O19	1,040	628,1482	627,1412	92,31	1,30				(M-H)- (M+CH3COO)-
55		C23 H32 O20	1,042	628,1488	627,1415	96,02	0,19				(M-H)- (M+CH3COO)-
56		C26 H30 N O17	1,040	628,1505	627,1425	89,43	-1,45				(M-H)- (M+CH3COO)-

**Metabólitos exclusivos do extrato EAM 7**

Nº	Compostos propostos	Fórmula molecular	RT (min)	Massa exata	m/z teórico	Score	Erro (ppm)	Bases de dados			Espécies
								HMP	KEGG	LMP	
1	D-Apiose	C5 H10 O5	0,997	150,0529	149,0456	100,00	0,44		C01488		(M-H)-
2	Guavin B	C33 H26 O17	6,115	694,1144	721,1021	79,20	-3,78	HMDB33274			(M+HCOO)-[-H2O]
3	1-O-Galloyl-beta-D-glucose ou Beta-Glucogallin	C13 H16 O10	1,076	332,0746	331,0673	100,00	0,71		C01158		(M-H)-
4	1-Phosphatidyl-D-myo-inositol	C11 H19 O13 P	6,120	390,0561	371,0383	100,00	-0,53	HMDB06953	C01194		(M-H)-[-H2O]
5	3',4',5-Trihydroxy-3-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone 4'-glucuronide	C23 H20 O14	6,133	520,0854	501,0676	100,00	0,09	HMDB37757			(M-H)-[-H2O]
6	3-Dehydro-L-gulonate	C6 H10 O7	0,949	194,0432	193,0360	100,00	3,01	HMDB06334	C00618		(M-H)-
7	6-O-b-D-Fructofuranosyl-2-deoxy-D-glucose	C12 H22 O10	1,011	326,1213	353,1087	93,15	-0,12	HMDB40154			(M+HCOO)-[-H2O]
8	Citbismine C	C37 H36 N2 O11	1,160	684,2325	683,2252	87,00	0,85	HMDB41435			(M-H)-
9	D-(+)-Mannose	C6 H12 O6	0,910	180,0633	179,0633	91,15	-0,49	HMDB00169	C00159		(M-H)-
10	L-Galactonate	C6 H12 O7	0,931	196,0584	195,0511	99,60	0,39		C15930		(M-H)-
11	Ribonic acid	C5 H10 O6	1,134	166,0476	225,0615	100,00	-0,55	HMDB00867	C01685	LMFA01050411	(M+CH3COO)-
12	UDP-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-alpha-D-glucuronate	C19 H28 N4 O18 P2	6,112	662,0875	721,1014	81,20	0,11		C19725		(M+CH3COO)-
13		C5 H9 N O4	1,072	147,0531	128,0353	92,70	-0,69	HMDB02931			(M-H)-[-H2O]
14		C7 H8 O6	1,196	188,0318	169,0139	83,92	-1,80		C11515		(M-H)-[-H2O]
15		C7 H14 O7	0,982	210,0736	209,0663	100,00	-1,69		C08236		(M-H)-
16		C10 H14 N2 O6	7,281	258,0853	239,0674	100,00	0,56	HMDB04813			(M-H)-[-H2O]
17		C8 H22 N6 O6	6,356	298,1602	297,1532	73,09	0,55				(M-H)-
18		C14 H6 N6 O7	6,215	370,0300	369,0217	100,00	0,68				(M-H)-
19		C18 H8 N8 O4	1,087	400,0662	399,0589	80,80	1,66				(M-H)-
20		C16 H27 N O12	1,067	425,1530	470,1518	100,00	-0,73	HMDB02061	C00518		(M+HCOO)-
21		C11 H20 N4 O10 P2	1,187	430,0661	471,0694	94,30	1,39		C05673		(M+CH3COO)-[-H2O]
22		C13 H16 N6 O11	0,899	432,0861	431,0793	87,60	-3,79				(M-H)-
23		C23 H29 N3 O6	0,905	443,2041	460,1667	96,10	-3,53		C02203		(M+Cl)-[-H2O]
24		C28 H14 O9	0,891	494,0639	493,0574	72,00	0,23				(M-H)-
25		C15 H12 N9 O11	0,897	494,0643	493,0569	78,86	-2,73				(M-H)-
26		C19 H4 N4 O13	7,565	495,9779	494,9705	100,00	0,83				(M-H)-
27		C19 H32 O16	1,007	516,1698	515,1624	96,84	1,43				(M-H)-
28		C17 H4 N6 O15	6,942	531,9737	530,9663	80,00	0,45				(M-H)-
29		C16 H8 N3 O19	8,601	545,9733	544,9660	100,00	-3,53				(M-H)-
30		C22 H32 O18	1,007	584,1588	643,1727	100,00	-0,15				(M+CH3COO)-
31		C21 H16 N18 O4	1,007	584,1593	643,1728	75,54	-1,50				(M+CH3COO)-
32		C26 H30 O19	1,082	646,1381	645,1309	99,21	-0,07				(M-H)-
33		C24 H18 N14 O9	1,081	646,1389	645,1314	100,00	1,22				(M-H)-
34		C30 H16 N7 O14	5,991	698,0768	697,0696	100,00	1,80				(M-H)-
35		C35 H12 N13 O10	6,004	774,0828	773,0754	100,00	-0,28				(M-H)-