

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANANDA DA SILVA ANTONIO

DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO PARA O ESTUDO QUÍMIOSISTEMÁTICO DO GÊNERO
Ocotea (LAURACEAE) NA AMAZÔNIA

MANAUS
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANANDA DA SILVA ANTONIO

DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO PARA O ESTUDO QUIMIOSSISTEMÁTICO DO
GÊNERO *Ocotea* (LAURACEAE) NA AMAZÔNIA

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para
obtenção do Título de Doutora em
Química na área de concentração de
Métodos Analíticos e Estudos
Ambientais.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Larissa Silveira Moreira Wiedemann

Co-orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

MANAUS
2020

Dedico esta Tese à minha família
pelo apoio, paciência e por não
deixarem que eu parasse de acreditar
em mim mesma.

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A635q Antonio, Ananda da Silva
Desenvolvimento, otimização e validação de método analítico
para o estudo quimiossistemático do gênero *Ocotea* (Lauraceae) na
Amazônia / Ananda da Silva Antonio . 2020
191 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Larissa Silveira Moreira Wiedemann
Coorientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior
Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal
do Amazonas.

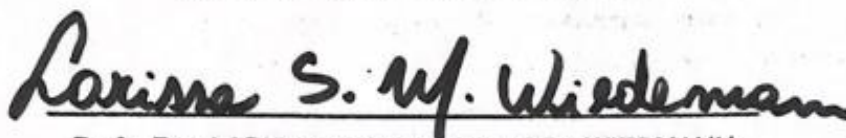
1. *Ocotea*. 2. método de extração. 3. metabolômica. 4.
quimiofenética. 5. cromatografia. I. Wiedemann, Larissa Silveira
Moreira. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Desenvolvimento, otimização e validação de
método analítico para o estudo quimiossistemático
do gênero *Ocotea* (Lauraceae) na Amazônia

ANANDA DA SILVA ANTONIO

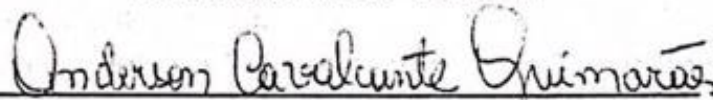
Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do
Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor(a) em
Química.

Aprovada em 11 de maio de 2020.



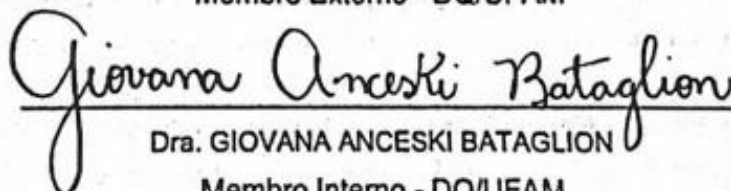
Profa. Dra. LARISSA SILVEIRA MOREIRA WIEDMANN

Presidente/Orientador - DQ/UFAM



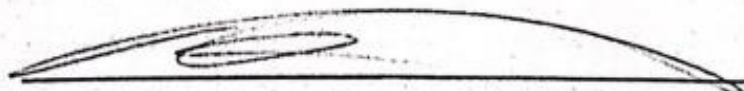
Prof. Dr. ANDERSON CAVALCANTE GUIMARÃES

Membro Externo - DQ/UFAM



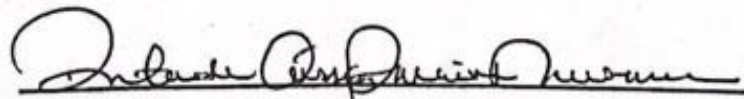
Dra. GIOVANA ANCESKI BATAGLIONI

Membro Interno - DQ/UFAM



Prof. Dr. HENRIQUE MARCELO GUALBERTO PEREIRA

Membro Externo - IQ/UFRJ



Dra. RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA

Membro Interno - DQ/UFAM

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 11 de maio 2020.

AGRADECIMENTOS

Eu tenho muitas pessoas para agradecer, mas vamos começar pelos médicos que me atenderam na última etapa desse doutorado...sem eles eu definitivamente não teria conseguido terminar. Um agradecimento especial à dra. Nilce Biasi.

Queria agradecer e dedicar esse trabalho à minha família, meus irmãos Nirvana Antonio e Carlos Magno, e minha mãe Regina Antonio que sempre me apoiaram e encorajaram a continuar. Além do que, se teve alguém que teve que aturar minha loucura foram eles.

Se eu tivesse bolsa, eu agradecia a Glaucia Bolson também, mas como eu não tenho mais só posso expressar minha hashtag gratidão para ela e os 40 dias que nós ficamos se aturando pra nenhuma das duas surtar no Rio de Janeiro. As minhas amigas Laise Pimentel, Emilly Cruz e Larissa Cristina também que sempre estiveram ali para me ouvir reclamar ao vento.

Depois de 10 anos estudando na UFAM, quero sempre relembrar e manter os amigos valiosos que esse lugar me permitiu conhecer...Chris Leal e Flávio Moura, essa é pra vocês!

Aos professores Larissa Wiedemann e Valdir Veiga por terem sido fundamentais no meu crescimento profissional e pela ótima orientação. Além de todos os demais professores do DQ/UFAM com os quais tive o prazer de ter aulas.

À Elizanne Porto, Carol Biasi e Cookie, muito obrigada por me receberem no Rio de Janeiro e me acolheram na casa de vocês, foi ótimo a companhia.

Ao grupo de pesquisa Q-BIOMA, em especial a Isadora Moita, Emily Marcela, Simone Braga, Larissa Pudim, Thaís (ih não sei o sobrenome de todo mundo), Yasmin Cunha, Leon Manickhand (deve ser assim que escreve?). Mesmo sem saber os sobrenomes de todos agradeço pelos muitos momentos de companheirismo, amizade, café e estresse juntos.

Às equipes técnicas do PDBFF/INPA, LADETEC/UFRJ e CAM/UFAM, em especial aos doutores Alberto Vicentini, Felipe Silva, Gustavo Ramalho e Henrique Marcelo, cuja colaboração foi fundamental para a execução desta pesquisa.

The journey is more important than the
end or the start

RESUMO

O gênero *Ocotea* é um dos mais biodiversos e de maior interesse econômico da família Lauraceae. Entretanto, sua exploração comercial e científica é escassa devido à grande dificuldade na identificação de suas espécies por métodos convencionais. Deste modo, esta pesquisa desenvolveu, otimizou e validou um método para o estudo metabolômico do gênero *Ocotea* a partir de suas folhas, de forma a desenvolver a quimiosistemática do gênero. Para o desenvolvimento e otimização do método de extração foi realizado um planejamento fatorial de níveis mistos, avaliando os efeitos da composição do solvente extrator, temperatura de extração, tamanho de partícula da amostra e proporção entre amostra e solvente extrator na qualidade dos perfis químicos obtidos, considerando características qualitativas e quantitativas. O método de extração otimizado foi aplicado em 14 espécies distintas de *Ocotea* para realização do estudo metabolômico destas através de ferramentas quimiométricas e da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas. Por fim, o método foi validado para os fins de metabolômica global, empregando o estudo de linearidade, precisão e reprodutibilidade com auxílio de uma amostra de controle de qualidade. Durante a otimização do método, as condições experimentais com melhor desempenho no que diz respeito o rendimento da extração e qualidade do perfil cromatográfico foi pelo uso de 70% etanol, temperatura de extração de 40°C, tamanho de partícula de 0,595 mm e a proporção entre amostra e solvente extrator de 1:12 g:mL, sendo a composição do solvente extrator e a temperatura de extração os fatores que mais influenciaram a qualidade dos dados para metabolômica global. O emprego do método otimizado possibilitou a avaliação metabolômica das 14 espécies de *Ocotea*, sendo possível definir marcadores químicos capazes de distinguir as espécies *O. splendens* e *O. canaliculata* e classificar as demais dentro de 3 grupos distintos. Ainda, através da validação analítica o método de análise demonstrou desempenho satisfatório para a produção de perfis químicos holísticos, com elevada precisão e reprodutibilidade. Desta forma, o método desenvolvido pode ser satisfatoriamente aplicado no estudo metabolômico global do gênero *Ocotea*, podendo contribuir na identificação e circunscrição de espécies.

Palavras-chave: *Ocotea*, método de extração, metabolômica, quimiofenética, cromatografia, espectrometria

ABSTRACT

The *Ocotea* genus is one of the most biodiverse and economically interesting in the Lauraceae family. However, its commercial and scientific exploitation is scarce due to the great difficulty on the species identification by taxonomy features. Thus, this Thesis propose to develop, optimize and validate a method for the metabolic study of *Ocotea* , using species leaves samples, to develop the genus chemosystematic. The development and optimization of the extraction method was performed by a factorial design which evaluated the effects of the extractor solvent composition, extraction temperature, particle size and the proportion between sample and solvent, on the quality extractor chemical profile, considering qualitative and quantitative features. The optimized extraction method was applied on 13 different species of *Ocotea*. The metabolomic study used chemometric tools and high performance liquid chromatography techniques combined with mass spectrometry. At last, the method was validated for untargeted metabolomics goals, by the study of linearity, precision and reproducibility with a quality control sample. The experimental conditions with best performance, regarding extraction yield and the quality of the chemical profile applied 70% ethanol, extraction temperature of 40°C, particle size of 0.595 mm and the proportion between sample and solvent of 1:12 g:mL. The composition of the extracting solvent and the extraction temperature were the factors that most influence the data quality for untargeted metabolomics. The use of the optimized method enabled a metabolic evaluation of the 14 *Ocotea* species, enabling to define chemical markers capable to specifically distinguishing *O. splendens* and *O. canaliculata* species and classifying the others within 3 distinct groups. Still, through analytical validation, the analytical method demonstrated satisfactory performance for the production of holistic chemical fingerprints, presenting precise and reproduceable data. In conclusion, the developed method can be satisfactorily applied in the untargeted metabolic study of the genus *Ocotea*, being able to contribute on species identification and circumscription.

Keywords: *Ocotea*, method development, analytical validation, metabolomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ramo florido da <i>Ocotea guianensis</i> (Fonte: Acervo Pessoal)	26
Figura 2. Resumo da história do gênero <i>Ocotea</i> entre 1775 e 1986. Adaptado de Quinet; Andreatta (2002) e Burger (1988).	26
Figura 3. Principais estruturas morfológicas utilizadas na identificação de <i>Ocotea</i> . A) representação lateral da flor; B) visão superior da flor com estruturas florais; C) estames de série I; D) estames de série IV; E) estames de série IV; F) locelo presente no estame; G) filete na visão lateral da flor; H) glândula na visão lateral da flor. Adaptado de BROTTTO; CERVI; SANTOS (2013).....	27
Figura 4. Exemplos das classes estruturais de alcaloides encontradas no gênero <i>Ocotea</i> (Fonte: Acervo pessoal).....	31
Figura 5. Exemplos de lignoides encontrados na <i>Ocotea</i> (Fonte: acervo pessoal)	32
Figura 6. Estrutura molecular básica dos flavonoides (Fonte: acervo pessoal)	33
Figura 7. Tipos de flavonoides encontrados no gênero <i>Ocotea</i> (Fonte: acervo pessoal)	36
Figura 8. Representação gráfica do (A) planejamento fatorial completo 2 ² , (B) planejamento composto central e (C) planejamento de Box-Benhken. (Fonte: acervo pessoal)	43
Figura 9. Exemplo de dendrograma (Fonte: acervo pessoal).....	51
Figura 10. Etapas principais no desenvolvimento e validação de métodos analíticos (Fonte: acervo pessoal).....	53
Figura 11. Fluxograma da pesquisa realizada. CCD = cromatografia em camada delgada; CLAE-DAD = cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos; EM-ID = espectrometria de massas por infusão direta; CLAE-EM = cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.	63

Figura 12. Mapa do Área de Proteção Ambiental do PDBFF	72
Figura 13. Análise por HCPC do número de ocorrência das classes estruturais de alcaloides no gênero <i>Ocotea</i> . Onde = (1) <i>O. acutangula</i> ; (2) <i>O. acutifolia</i> ; (3) <i>O. atirrensis</i> ; (4) <i>O. boldridgeiana</i> ; (5) <i>O. brachybotra</i> ; (6) <i>O. brenesii</i> ; (7) <i>O. bucherii</i> ; (8) <i>O. caesia</i> ; (11) <i>O. duckei</i> ; (13) <i>O. glaziovii</i> ; (14) <i>O. gomezii</i> ; (15) <i>O. haldrigiana</i> ; (16) <i>O. insularis</i> ; (17) <i>O. lancifolia</i> ; (18) <i>O. leucoxylon</i> ; (19) <i>O. macrophylla</i> ; (20) <i>O. macropoda</i> ; (22) <i>O. minarum</i> ; (23) <i>O. puberula</i> ; (24) <i>O. pulchella</i> ; (26) <i>O. teleiandra</i> ; (27) <i>O. variabilis</i> ; (28) <i>O. velloziana</i> ; (29) <i>O. venenosa</i> ; (30) <i>O. sp</i> ; pontos pretos sobrepostos sem numeração: <i>O. caparari</i> , <i>O. caudata</i> , <i>O. formosa</i> , <i>O. meiziana</i> e <i>O. insinuata</i> . (Fonte: Acervo pessoal).....	87
Figura 14. Alcaloides de maior relevância como marcadores químicos no gênero <i>Ocotea</i>	89
Figura 15. Análise de HCPC do número de ocorrência dos lignoides presentes no gênero <i>Ocotea</i> . Onde: (1) <i>O. bullata</i> ; (2) <i>O. macrophylla</i> ; (3) <i>O. cymbarum</i> ; (4) <i>O. elegans</i> ; (5) <i>O. aciphylla</i> ; (6) <i>O. costulatum</i> Mez; (7) <i>O. cymosa</i> ; (8) <i>O. duckei</i> ; (9) <i>O. foetens</i> ; (10) <i>O. heterochroma</i> ; (11) <i>O. minarum</i> ; (12) <i>O. odorifera</i> ; (13) <i>O. porosa</i> ; (14) <i>O. simulans</i> ; (15) <i>O. veraguensis</i>	91
Figura 16. Gráfico de Pareto dos efeitos principais dos fatores no rendimento da extração	98
Figura 17. Exemplo dos perfis químicos obtidos pela técnica de CCD, onde, 1 = amostra 1B-2A-3C-4A e 2 = 1B-2A-3C-4C. A) Reativo NP-PEG, B) UV 254 nm, C) UV 366 nm, D) vanilina sulfúrica, E) cloreto férrico.....	100
Figura 18. Resultados de HCA e PCA dos perfis cromatográficos obtidos por CCD. Para nomenclatura das amostras vide Tabela 4 , onde: temperatura de extração (1) a 40°C (A), 50°C (B) e 60°C (C); tamanho de partícula (2) em 0,595 nm (A) e 0,841 nm (B);	

proporção entre amostra e solvente extrator (3) a 1:8 g:mL (A) e 1:12 g:mL (C); e % de etanol no solvente extrator em 70% (A) ou 99,8% (C).	101
Figura 19. Comparação da área total do cromatograma em amostras selecionadas durante a otimização do método de extração.....	103
Figura 20. Tempo de retenção das 20 variáveis selecionadas para análise multivariada dos perfis cromatográficos (HPLC-DAD).....	104
Figura 21. Análise de HCA (A) e PCA (B) dos perfis cromatográficos por HPLC-DAD empregando 20 variáveis pré-selecionadas.	105
Figura 22. Análise de PCA de amostras extraídas na proporção 1:12 (g:mL) entre material botânico e solvente extrator	106
Figura 23. Análise de HCA (A) e PCA (B) dos espectros de massas no modo negativo de ionização. Números azuis representam os <i>loadings</i> na análise de PCA.....	109
Figura 24. Perfis cromatográficos obtidos nas espécies de <i>O. percurrans</i>	113
Figura 25. Perfis cromatográficos distintos encontrados na espécie <i>O. splendens</i>	114
Figura 26. Perfil cromatográfico das espécies <i>O. guianensis</i> (196), <i>O. splendens</i> (113889 e 103056), <i>O. percurrans</i> (83216 e 83018) e <i>O. minor</i> (83521)	114
Figura 27. Perfil cromatográfico das espécies <i>O. guianensis</i> (196), <i>O. matogrossensis</i> (123078), <i>O. delicata</i> (40608), <i>O. scrabrella</i> (75733), <i>O. rhynchophylla</i> (143511) e <i>O. douradensis</i> (74438).....	115
Figura 28. Perfil cromatográfico das espécies <i>O. guianensis</i> (196), <i>O. cujumarum</i> (30009), <i>O. boisseriana</i> (93045), <i>O. nigrescens</i> (52587) e <i>O. matogrossensis</i> (122528)	115
Figura 29. Espectro de absorvância das espécies avaliadas na região 1	116
Figura 30. Espectro de absorvância na região 2 do perfil cromatográfico	117

Figura 31. Espectro de absorbância característicos nas regiões 3, 4 e 5 do perfil cromatográfico e lista das espécies que apresentam picos cromatográficos em cada região.	117
Figura 32. Dendrograma para a HCA contendo todas as espécies avaliadas de <i>Ocotea</i>	120
Figura 33. Gráfico de (A) scores e (B) loadings para a PCA empregando todas as amostras de <i>Ocotea</i> avaliadas	121
Figura 34. Cromatograma do pico base da espécie <i>Ocotea splendens</i> obtido por CLAE-EM	122
Figura 35. Dendrograma para análise de 13 espécies de <i>Ocotea</i>	125
Figura 36. Gráfico de scores para análise de PCA de 13 espécies de <i>Ocotea</i>	126
Figura 37. Gráfico de loadings para o PCA de 13 espécies de <i>Ocotea</i>	128
Figura 38. Padrão de fragmentação do m/z 281 da <i>O. canaliculata</i>	128
Figura 39. Análise de dispersão por (A) gráfico de resíduos e (B) gráfico de probabilidade normal dos resíduos	136
Figura 40. Análise das amostras de controle de qualidade por (A) PCA, com (B) ampliação dos detalhes acerca da elipse de confiança das amostras de controle de qualidade	137
Figura 41. Cromatograma do pico base a amostra de controle de qualidade sem diluição em modo de ionização negativo	138

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Número de ocorrência das classes estruturais de lignoides na <i>Ocotea</i>	93
Tabela 2. Transformação dos fatores de 3 níveis em fatores de 2 níveis	67
Tabela 3. Número de ocorrência de alcaloides nas espécies de <i>Ocotea</i> utilizado para análise quimiométrica da literatura. Adaptado de Silva Teles <i>et al.</i> (2009).....	84
Tabela 4. Rendimentos de extração obtidos durante a otimização do método	96
Tabela 5. Sinais <i>m/z</i> que atuaram como marcadores químicos na análise multivariada	129
Tabela 6. Identidade sugerida para os metabólitos detectados	131
Tabela 7. Coeficiente de correlação linear (r^2) e tempo de retenção (RT) dos metabólitos que apresentaram linearidade ótima	139
Quadro 1. Flavonoides encontrados no gênero <i>Ocotea</i>	34
Quadro 2. Fatores e níveis avaliados durante o planejamento fatorial.....	65
Quadro 3. Parâmetros operacionais empregados na análise por EM-ID.....	69
Quadro 4. Dados dos espécimes de <i>Ocotea</i> coletados no Sítio Amostral Km 37.....	73
Quadro 5. Parâmetros operacionais empregados nas análises realizadas no espectrometro de massas modelo Q-Exactive	75
Quadro 6. Programação utilizada no software MZmine para a extração de dados dos cromatogramas obtidos pela técnica de CLAE-EM.	76
Quadro 7. Parâmetros utilizados na integração dos dados cromatográficos obtidos por CLAE-EM para identificação dos metabólitos presentes.....	77
Quadro 8. Ordem de injeção das amostras durante a validação do método por CLAE-EM.	79
Quadro 9. Descrição das espécies de <i>Ocotea</i> que possuem descrição filogenética ou química	130

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

O.	Ocotea
HCPC	Agrupamento Hierárquico em Componentes Principais, do inglês Hierarchical Clustering on Principal Components
Da	Dalton
k	Fatores
n	Níveis
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
EM	Espectrometria de massas
RMN	Ressonância magnética nuclear
ESI	Ionização por <i>eletrospray</i> , do inglês Electrospray ionization
<i>m/z</i>	Razão massa carga
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
DDA	Aquisição dependente de dados, do inglês Data Dependent Acquisition
DIA	Aquisição independente de dados, do inglês Data Independent Acquisition
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos, do inglês Hierarchical Clustering Analysis
PCA	Análise de componentes principais, do inglês Principal Components Analysis
QC	Amostras de controle de qualidade, do inglês Quality Control
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
EM-ID	Espectrometria de massas por infusão direta
EEB	Extrato etanólico bruto
R_f	Fator de retenção
NP/PEG	Difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol
PDBFF	Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
EAFM	Herbário do Instituto Federal De Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas
LADETEC	Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico

FWHM	Largura a meia altura do pico cromatográfico, do inglês Full Width at Half-Maximum
kV	kilovolt
arb	arbitrário
°C	graus Celsius
eV	eletrovolt
L	Litros
Min.	minutos
Nm	nanômetro
ppm	partes por milhão
QC	amostra de controle de qualidade

SUMÁRIO

Sumário.....	18
1. Introdução	20
2. Objetivos.....	23
2.1. Geral	23
2.2. Específicos.....	23
3. Revisão bibliográfica	24
3.1. O gênero <i>Ocotea</i>	25
3.2. Perfil químico do gênero <i>Ocotea</i>	29
3.3. Quimiossistemática.....	36
3.4. Otimização de métodos	40
3.5. Métodos analíticos empregados na quimiossistemática	43
3.6. Métodos quimiométricos	48
3.7. Validação de métodos.....	52
3.7.1. Validação de métodos em metabolômica global	58
4. MATERIAIS E MÉTODOS	62
4.1. Avaliação do perfil metabolômico conhecido do gênero <i>Ocotea</i>	64
4.2. Desenvolvimento e otimização do método de extração	64
4.2.1. Preparo das amostras para obtenção dos perfis químicos	67
4.2.2. Obtenção do perfil químico por métodos cromatográficos	68
4.2.3. Obtenção do perfil químico por espectrometria de massas	69
4.2.4. Tratamento quimiométrico	70
4.3. Obtenção do perfil químico de espécies de <i>Ocotea</i>	70
4.3.1. Coleta e extração do material botânico.....	71
4.3.2. Estudo quimiossistemático do gênero <i>Ocotea</i>	74

4.3.3.	Tratamento dos dados	75
4.4.	Validação do método analítico	77
5.	Resultados e discussão.....	82
5.1.	Análise bibliográfica do gênero <i>Ocotea</i>	83
5.1.1.	Composição alcaloidica.....	83
5.1.2.	Lignoides	89
5.1.3.	Flavonoides.....	94
5.1.4.	Considerações gerais	94
5.2.	Otimização do método de extração	95
5.2.1.	Avaliação do rendimento da extração	95
5.2.2.	Efeito qualitativo do método de extração em perfis cromatográficos	99
5.2.3.	Efeito da extração no perfil cromatográfico por CLAE-DAD	102
5.2.4.	Avaliação do perfil químico por espectrometria de massas	107
5.2.5.	Considerações gerais	110
5.3.	Estudo metabolômico das espécies de <i>Ocotea</i>	111
5.3.1.	Caracterização das espécies de <i>Ocotea</i> por CLAE-DAD.....	111
5.3.2.	Perfil metabolômico por CLAE-EM	118
5.3.3.	Considerações gerais	134
5.4.	Validação do método	135
5.4.1.	Considerações gerais	141
6.	Conclusões	142
7.	Referencias bibliográficas.....	144
8.	Apêndices.....	155
8.1.	Apêndice 1.....	155

8.2.	Apêndice 2.....	164
8.3.	Apêndice 3.....	165
8.4.	Apêndice 4.....	170
8.4.1.	Publicação de artigo na Revista Virtual de Química.....	170
8.4.2.	Publicação na revista RSC Advances.....	171
8.4.3.	Publicação na Revista Food Analytical Methods.....	172
8.4.4.	Publicação na Revista Journal of the Brazilian Chemical Society.....	173
8.4.5.	Publicação na Revista Química Nova	174
8.4.6.	Publicação na Revista RSC Advances	175
8.4.7.	Publicação na Revista Phytochemistry.....	176
8.4.8.	Artigo submetido para avaliação na Acta Amazonica.....	177
8.4.9.	Artigo submetido para avaliação na Phytochemical Analysis.....	178
8.4.10.	Artigo submetido para avaliação na Natural Product Research ..	179
8.4.11.	Publicação de capítulo de livro.....	180
8.4.12.	Produção de capítulo de livro	181
8.4.13.	Participação em Congresso em 2018 (apresentação de poster) ...	182
8.4.14.	Participação em Congresso em 2019 (apresentação de poster) ...	183
8.4.15.	Participação em congresso (equipe organizadora).....	184
8.4.16.	Participação em congresso (apresentação de miniconferência)...	185
8.5.	Apêndice 5.....	186

1. INTRODUÇÃO

A família Lauraceae é uma das mais primitivas da flora mundial, com fósseis datados no período do médio Cretáceo (CHANDERBALI; VAN DER WERFF; RENNER, 2001). Dentro desta, o gênero *Ocotea* está entre os de maior valor econômico e científico, possuindo espécies com notória bioatividade, quimiodiversidade e ancestralidade (CHANDERBALI; VAN DER WERFF; RENNER, 2001; SALLEH; AHMAD, 2017). Diversas espécies do gênero *Ocotea* demonstraram possuir atividade biológica como antioxidante, anti-inflamatória, antilarvicida, antibactericida, antiviral e antileishmaniose (SALLEH; AHMAD, 2017). Estas características evidenciam o gênero *Ocotea* não somente uma notória fonte de novos produtos bioativos, mas também como uma ferramenta capaz de auxiliar na compreensão da biodiversidade (GOTTLIEB; BORIN, 2012; SALLEH; AHMAD, 2017).

Entretanto, sua exploração é escassa devido à dificuldade de identificação de suas espécies. (TROFIMOV; ROHWER, 2018; TROFIMOV; DE MORAES; ROHWER, 2019). A criação do gênero *Ocotea* teve como objetivo principal acomodar em um único grupo espécies botânicas que não se encaixavam perfeitamente nas delimitações taxonômicas de outros gêneros, como a *Aniba* e *Licaria* (QUINET; ANDREATA, 2002). Desse modo, a *Ocotea* passou a incluir espécies com uma ampla variedade de características morfológicas, as quais correspondem parcialmente as características que delimitam os demais gêneros da família Lauraceae. Devido essa sobreposição parcial entre os delimitadores morfológicos, a *Ocotea* se tornou o gênero de mais difícil identificação dentro da família Lauraceae (TROFIMOV; ROHWER, 2018; WERFF, 2018a, 2018b).

Para que este gênero possa ser explorado de forma benéfica tanto para indústria quanto para o conhecimento da biodiversidade, sua correta delimitação e avaliação

sistemática deve ser obtida (GOTTLIEB; BORIN, 2012; CANUTO *et al.*, 2018; TROFIMOV; DE MORAES; ROHWER, 2019). O estudo sistemático de gêneros botânicos é realizado principalmente por meio da taxonomia e filogenia. Apesar de a filogenia ser uma técnica eficaz em vários estudos sistemáticos e de circunscrição de gêneros, essa abordagem não tem sido promissora no estudo da *Ocotea*, dividindo o gênero em vários grupos pouco resolvidos. Deste modo, a resolução sistemática da *Ocotea* depende da definição de um conjunto maior de atributos para delimitar cada espécie, tais como características florais, químicas ou diferentes sequências de DNA (CHANDERBALI; VAN DER WERFF; RENNER, 2001; TROFIMOV; DE MORAES; ROHWER, 2019).

O uso de perfis químicos no estudo sistemático de espécies botânicas é denominado de quimiosistemática. Resumidamente, esta área de pesquisa visa caracterizar organismos em função de sua composição de metabólitos especializados, podendo este perfil químico ser utilizado para diferenciar e identificar espécies distintas, realizar prospecção de espécies e compostos bioativos, elucidar as linhas evolutivas e os processos de adaptação botânica. O grande potencial desta linha de pesquisa está na variedade de metabólitos distintos que podem ser encontrados na flora, podendo assim fornecer uma gama de novas características para cada espécie (EMERENCIANO *et al.*, 1987; GONZÁLEZ-ZAMORA *et al.*, 2013; SINGH, 2016; CANUTO *et al.*, 2018).

Apesar do potencial da quimiosistemática, seu uso deve ser feito de forma criteriosa para permitir a comparação de diferentes espécies. Assim, se torna fundamental a determinação de um método padronizado e confiável que possa ser utilizado no estudo quimiosistemáticos de grupos botânicos (NAZ *et al.*, 2014; BEGOL *et al.*, 2018). Neste contexto, esta pesquisa teve como objetivo desenvolver, otimizar e validar um método

analítico de obtenção do perfil metabolômico de extratos de folhas do gênero *Ocotea* de forma a contribuir com o estudo quimiosistemático do gênero.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Realizar o estudo quimiossistemático do gênero *Ocotea* por metabolômica global.

2.2. Específicos

- 1) Desenvolver um método de extração assistido de ultrassom para metabolômica global do gênero *Ocotea*
- 2) Otimizar as condições experimentais para extração baseado na espécie-tipo, *Ocotea guianensis*;
- 3) Avaliar o perfil químico de 14 espécies de *Ocotea* por métodos cromatográficos e espectrométricos;
- 4) Identificar marcadores químicos de média polaridade para espécies de *Ocotea*;
- 5) Validar um método para análise metabolômica global do gênero *Ocotea* por métodos cromatográficos e espectrométricos;
- 6) Avaliar a quimiossistemática de diferentes espécies de *Ocotea*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A família Lauraceae compreende a uma das famílias botânicas mais primitivas e biodiversas da flora mundial. De ocorrência pantropical, suas aproximadamente 3.000 espécies ocorrem predominantemente na Ásia tropical, Brasil, Austrália e Madagascar (QUINET, 2005; SILVA TELES *et al.*, 2019). Entre estas, 346 podem ser encontradas na Amazônia brasileira, classificando a Lauraceae como a quinta família de maior ocorrência no bioma amazônico (TER STEEGE *et al.*, 2016). Esta família apresenta grande importância científica e econômica, visto que devido sua ancestralidade, geodistribuição, biodiversidade e quimiodiversidade seus espécimes podem ser utilizados tanto no estudo do processo de evolução botânica como na confecção de diferentes bioprodutos para a indústria farmacêutica e alimentícia (CHANDERBALI; VAN DER WERFF; RENNER, 2001; MARQUES, 2001; SALLEH; AHMAD, 2017).

Entre os 50 gêneros que compõem a Lauraceae, o gênero *Ocotea* se destaca como um dos mais amplos, sendo constituído por aproximadamente 400 espécies de ocorrência predominante na América Central, América do Sul e África (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013; WERFF, 2018b, 2018a). No que tange a Amazônia brasileira, já foram identificadas 181 espécies distintas do gênero *Ocotea*, sendo o terceiro gênero mais representativo da flora amazônica (TER STEEGE *et al.*, 2016).

O gênero *Ocotea* apresenta grande relevância econômica, visto que é constituído por diversas espécies medicinais com ampla atividade biológica (OLIVEIRA FILHO; FERNANDES; ASSIS, 2015; SALLEH; AHMAD, 2017). Apesar da importância dos possíveis bioprodutos derivados da *Ocotea*, a exploração deste gênero apresenta um grande empecilho relacionado a correta identificação de suas espécies. A *Ocotea* compreende a um dos gêneros de angiospermas considerados de mais difícil identificação, devido à baixa resolução no que tange as características morfológicas que

o delimitam, sendo inclusive conhecido como “gênero de descarte”. Historicamente, o gênero *Ocotea* tem sido utilizado para abrigar espécies que não apresentavam características perfeitamente concordantes com as delimitações dos demais gêneros da Lauraceae, o que ocasionou tanto o aumento da biodiversidade deste gênero como a redução na resolução de suas características (BURGER, 1988; ASSIS; DE MELLO-SILVA, 2010; TROFIMOV; ROHWER, 2018; WERFF, 2018b).

Assim, diversas estratégias tem sido empregadas para aprimorar a resolução do gênero *Ocotea*, de forma a melhorar a identificação e avaliar as possíveis relações sistemáticas entre suas espécies. Entre as pesquisas realizadas existem tanto revisões das características morfológicas (ASSIS; DE MELLO-SILVA, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2018; TROFIMOV; ROHWER, 2018), como pelo uso das ciências ômicas (CHANDERBALI; VAN DER WERFF; RENNER, 2001; MARASCHIN *et al.*, 2009). Entretanto, ainda não existe uma concordância sobre como aperfeiçoar e definir a sistemática do gênero (TROFIMOV; ROHWER, 2018; WERFF, 2018b).

3.1. O gênero *Ocotea*

O gênero *Ocotea* foi definido em 1775, 22 anos após a descrição do primeiro gênero da família Lauraceae (gênero *Laurus*), utilizando como sua espécie-tipo a *Ocotea guianensis* (Figura 1). Como um dos 5 primeiros gêneros descritos para a Lauraceae, a *Ocotea* foi afetada pela maioria das circunscrições da família até 1986, o que compreende a 9 reestruturações das características morfológicas que definem o gênero (Figura 2) (BURGER, 1988; QUINET; ANDREATA, 2002; BROTTTO; CERVI; SANTOS, 2013).



Figura 1. Ramo florido da *Ocotea guianensis* (Fonte: Acervo Pessoal)

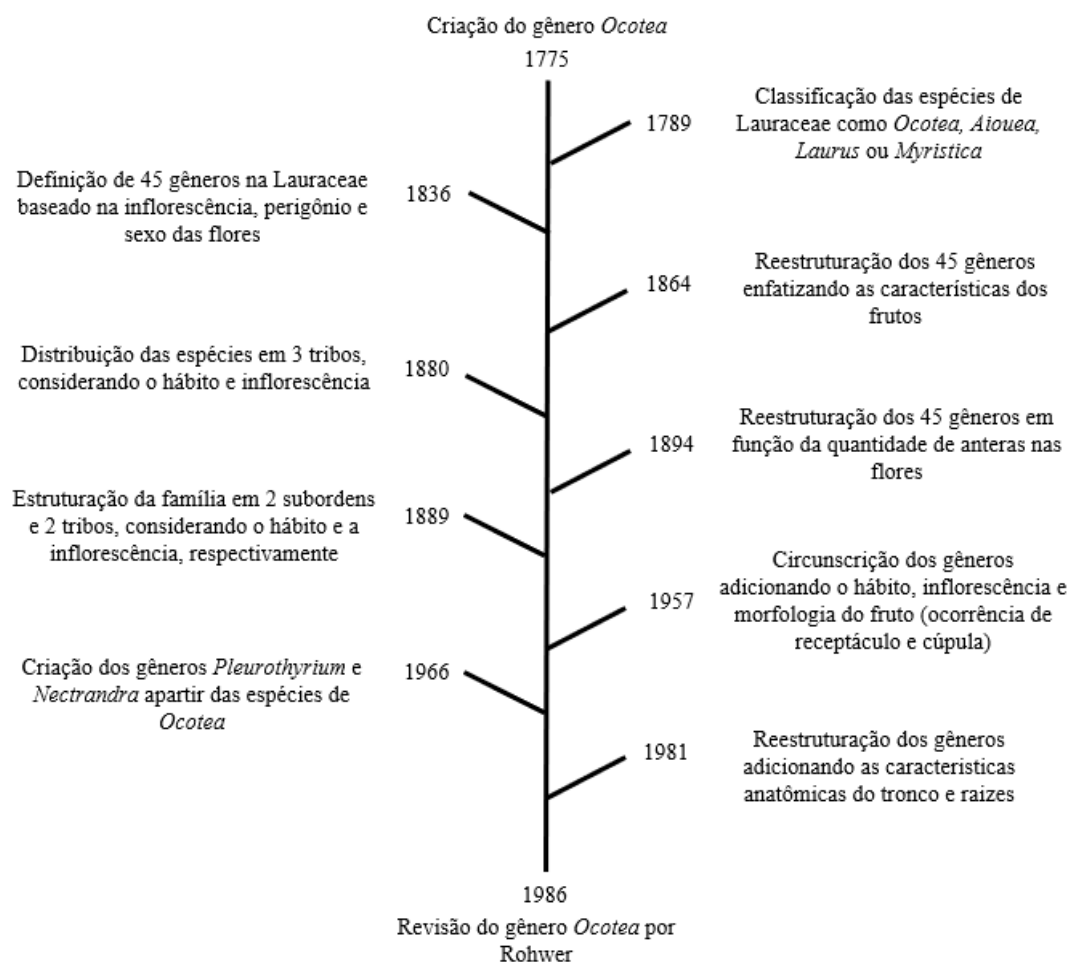


Figura 2. Resumo da história do gênero *Ocotea* entre 1775 e 1986. Adaptado de Quinet; Andreata (2002) e Burger (1988).

Atualmente, as delimitações e chaves de identificação do gênero *Ocotea* permanecem conforme revisado por Rohwer (1986), sendo o gênero morfologicamente caracterizado pela presença de flores unissexuadas ou hermafroditas estaminadas, com 6 tépalas, 9 estames e locelos dispostos em pares sobrepostos, além de frutos bacáceos parcialmente encobertos pela cúpula (Figura 3) (QUINET; ANDREATA, 2002; WERFF, 2018b). Após 1986, o gênero *Ocotea* ainda acomodou novas espécies, que apresentavam tanto características similares aos de seus delimitadores morfológicos, como espécies que simplesmente não se encaixavam perfeitamente nos demais gêneros de Lauraceae. Como principal consequência, o gênero teve um grande aumento na sua diversidade morfológica, tornando as chaves de identificação morfológica ainda menos específicas para o gênero (BURGER, 1988; QUINET; ANDREATA, 2002; BROTTTO; CERVI; SANTOS, 2013; WERFF, 2018a, 2018b).

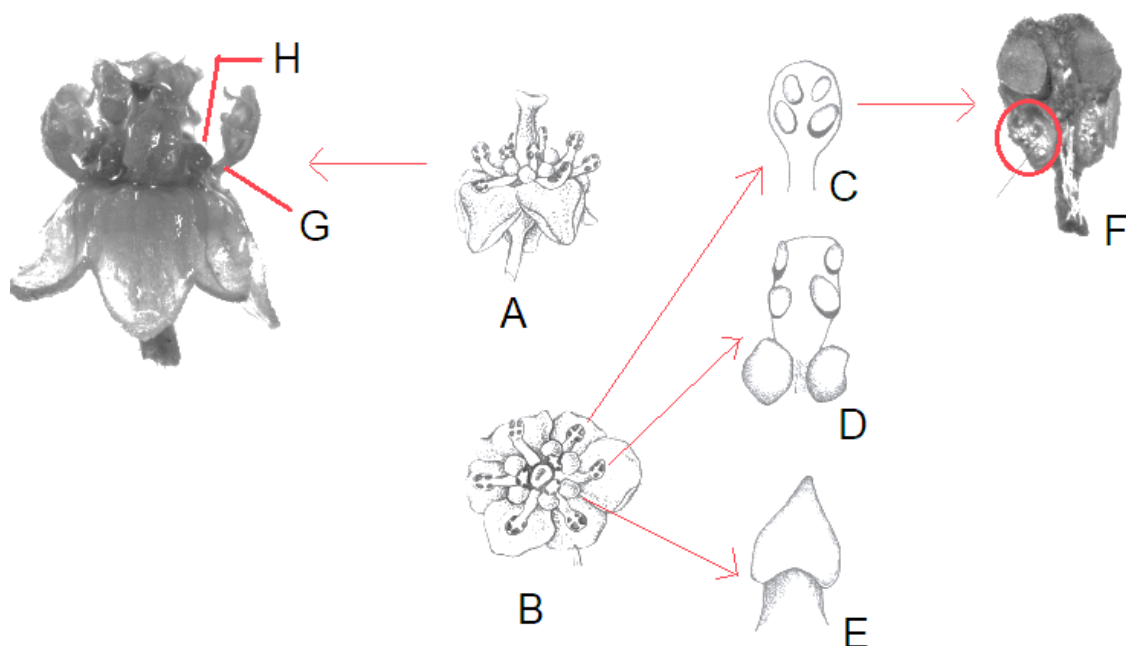


Figura 3. Principais estruturas morfológicas utilizadas na identificação de *Ocotea*. A) representação lateral da flor; B) visão superior da flor com estruturas florais; C) estames de série I; D) estames de série IV; E) estames de série IV; F) locelo presente no estame; G) filete na visão lateral da flor; H) glândula na visão lateral da flor. Adaptado de BROTTTO; CERVI; SANTOS (2013).

As primeiras aplicações comerciais do gênero *Ocotea* remetem o uso de sua madeira na confecção de móveis, imóveis, itens de decoração e produção de papel (QUINET; ANDREATA, 2002; MARIA *et al.*, 2007; BROTTTO; CERVI; SANTOS, 2013). Sua utilização pela indústria farmacêutica também é extensa, apresentando espécies com atividades biológicas promissoras para a confecção de fármacos, como por exemplo, atividade citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória, antibactericida, antifúngica, anti-*leishmaniose*, anti-larvicida, antiplasmódica e antimalárica (SALLEH; AHMAD, 2017).

Apesar deste potencial, a diversidade morfológica dentro da *Ocotea* atua como um agente limitante em sua exploração consciente, visto a dificuldade em obter identificações inequívocas das espécies apenas com características morfológicas, como é usualmente realizado (GOTTSLIEBT; BORIN, 2012; CANUTO *et al.*, 2018).

Conforme as características morfológicas não possibilitam uma identificação inequívoca das espécies de *Ocotea* foi proposto o uso de caracteres alternativos para estudar sistematicamente, tanto o gênero *Ocotea*, como a família Lauraceae. Nesse contexto, Chanderbali e colaboradores (2001) realizaram um estudo filogenético abrangente da família Lauraceae, visando estabelecer a sistemática de 122 de suas espécies a partir da análise de diferentes sequências do DNA ribossômico e do cloroplasto. Nesta pesquisa, a *Ocotea* foi definida como parte de um complexo de espécies denominado de “Complexo *Ocotea*”, o qual é constituído por espécies de diferentes gêneros como *Aniba*, *Licaria*, *Endlicheria* e *Rhodostemonodaphne*. Ainda, esta pesquisa definiu a *Ocotea* como um gênero polifilético, originado em 7 pontos distintos dentro da linha evolutiva da Lauraceae e dividido em 5 grupos com características similares na morfologia floral (CHANDERBALI; VAN DER WERFF; RENNER, 2001; ASSIS; DE MELLO-SILVA, 2010; WERFF, 2018b).

Apesar desse estudo abrangente, a delimitação polifilética da *Ocotea* e a formação do Complexo *Ocotea* ainda indica a baixa resolução no estudo sistemático do gênero através apenas das características genéticas. O estudo filogenético mais recente do gênero *Ocotea*, realizado por Trofimov e colaboradores em 2019, também resultou na formação de grupos de espécies pouco resolvidos, enfatizando a necessidade de incluir a sistemática do gênero características de diferentes níveis organizacionais simultaneamente, como composição química, morfologia epidermal e diferentes sequências de DNA.

A aplicação de características químicas no estudo sistemático, denominado de quimiosistemática ou metabolômica, é raro no que tange o estudo da *Ocotea*. Até o presente, o estudo fitoquímico do gênero visando este objetivo basicamente dividiu as espécies apenas pela sua habilidade de biossintetizar alcaloides ou lignoides, assumindo que as espécies que acumulam alcaloides são incapazes de produzir lignoides, e vice-versa (GOTTLIEB; KUBITZKI, 1981; MARIA *et al.*, 2007). Essa abordagem simplória ignora completamente a quimiodiversidade do gênero, baseando-se somente em compostos previamente isolados. Desde estabelecimento desta classificação quimiosistemática por Gottlieb e Kubitzki em 1981, nenhuma atualização ou verificação foi realizada utilizando o conhecimento moderno acerca da composição química da *Ocotea*.

3.2. Perfil químico do gênero *Ocotea*

O conhecimento fitoquímico atual da *Ocotea* é fundamentado principalmente em estudos de isolamento de compostos bioativos, com dados escassos acerca da definição de marcadores químicos de ocorrência específica nas espécies deste gênero. Entre os anos de 1906 e 2019, foram publicados 544 artigos e catalogados na plataforma *Chemical*

Abstract Platform (CAS) descrevendo a composição química de diferentes espécies de *Ocotea*. Entre estes foram reportados 366 metabólitos especializados para o gênero, sendo estes principalmente classificados como alcaloides, bicicloneolignanas, lignoides e flavonoides. De fato, estas classes compreendem os metabólitos com aplicações farmacêuticas mais difundidas da *Ocotea*, como é o caso da iangambina (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2008; SALLEH; AHMAD, 2017).

Dentre estes, os alcaloides são atualmente classificados como a principal classe química biossintetizada pela *Ocotea* (MARIA *et al.*, 2007; SALLEH; AHMAD, 2017; SILVA TELES *et al.*, 2019), com 195 tipos distintos de alcaloides descritos entre suas espécies. Os lignoides compreendem a segunda classe química de maior ocorrência, sendo registrados 124 metabólitos diferentes, enquanto na classe de flavonoides apenas 37 compostos foram descritos.

Os alcaloides compreendem uma das classes químicas mais diversificadas, sendo composta por aproximadamente 27.000 substâncias distintas. Com relação a sua estrutura molecular, estes podem ser definidos como um grupo de compostos cíclicos nitrogenados, com um ou mais átomos de nitrogênio na forma de aminas primárias, secundárias ou terciárias, biossintetizados principalmente a partir de aminoácidos, como a fenilalanina, tirosina, triptofano, ornitina e lisina. Em organismos vivos, os alcaloides se apresentam associados a ácidos orgânicos, ésteres, taninos ou glicosídeos (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008; SILVA TELES *et al.*, 2019).

Apesar de grande parte do conhecimento fitoquímico sobre *Ocotea* ser focado na sua composição alcaloídica, vale ressaltar que apenas 8% das espécies do gênero possuem algum nível de descrição química acerca desta classe de metabólitos. Ainda assim, a *Ocotea* é considerada o maior produtor de alcaloides dentro da família Lauraceae (SILVA TELES *et al.*, 2019). Em suma, as classes estruturais biossintetizadas pela *Ocotea* são os

bisbenzilisoquinolínicos, benzilisoquinolínicos, aporfínicos, proaporfínicos, morfinanas e fenantrenos (Figura 4) (SILVA TELES *et al.*, 2019).

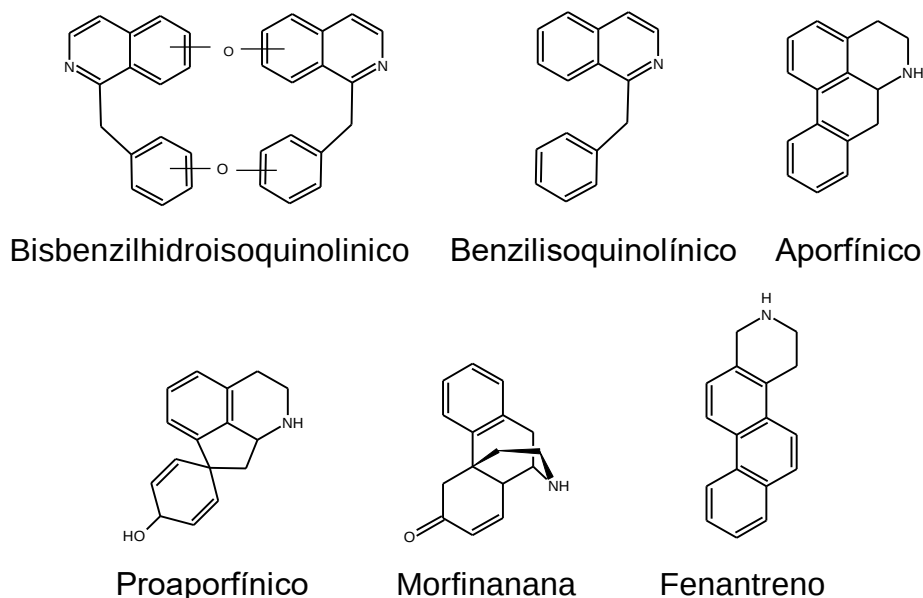


Figura 4. Exemplos das classes estruturais de alcaloides encontradas no gênero *Ocotea* (Fonte: Acervo pessoal)

Os lignoides compõem uma classe de compostos fenólicos derivados da via do ácido chiquímico de ampla ocorrência na flora. Sua estrutura molecular básica é composta por dímeros do fenilpropano podendo apresentar substituintes em suas porções fenílicas. A classificação destes compostos também ocorre baseada em diferenças observadas na estrutura molecular básica, sendo as principais classes as lignanas, neolignanas e oxineolignanas (TEPONNO; KUSARI; SPITELLER, 2016; LI *et al.*, 2018).

Os lignoides correspondem a segunda classe química mais encontrada na *Ocotea*, sendo o terceiro gênero com maior ocorrência dessa classe na Lauraceae (LI *et al.*, 2018). Apesar disso, a maior parte dos estudos fitoquímicos com *Ocotea* relacionados a lignoides ocorreram entre os anos de 1983 e 2000. Até o momento foram identificados 125

lignoides distintos na *Ocotea* (Apêndice 1), classificados como lignanas, epoxilignanas, diepoxilignanas, neolignanas, cicloneolignanas e oxineolignanas (LI *et al.*, 2018).

Essa classe química é encontrada principalmente nos galhos, sendo que a *O. duckei* e a *O. catharinensis* receberam destaque dentro do gênero no que diz respeito à biossíntese de lignoides. A *O. duckei* é reconhecida como uma das principais fontes de iangambina (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2008; MONTE NETO *et al.*, 2008), uma diepoxilignana de notória bioatividade que por muitos anos foi considerada um marcador químico para identificação da *O. duckei*.

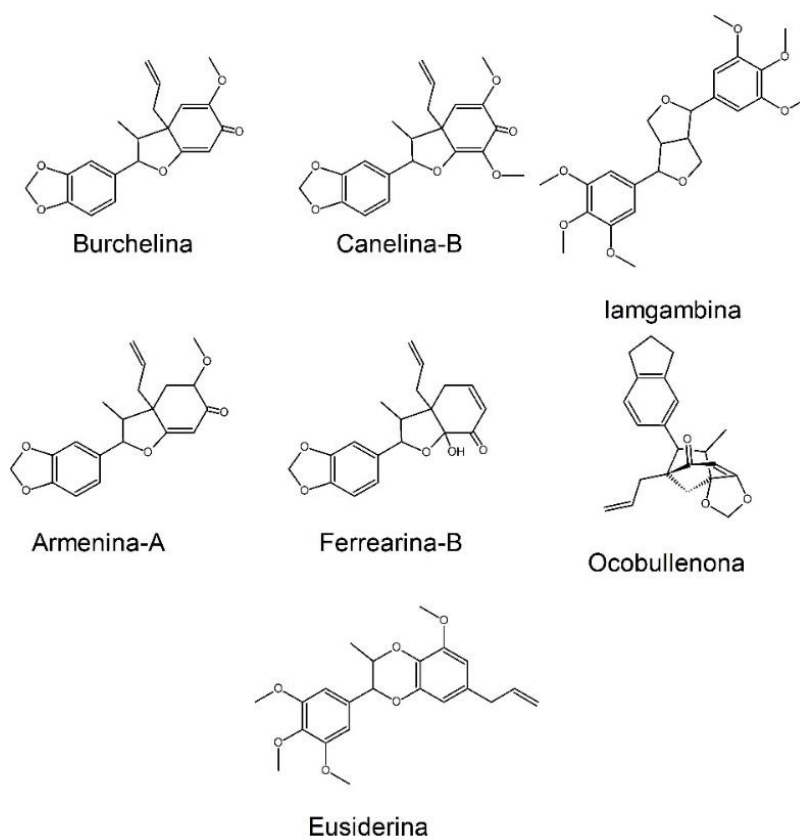


Figura 5. Exemplos de lignoides encontrados na *Ocotea* (Fonte: acervo pessoal)

Os flavonoides correspondem a uma classe química de compostos fenólicos constituídos por 2 ou mais anéis aromáticos, com no mínimo um grupo hidroxila e conectados por uma ponte de carbonos (Figura 6). Os flavonoides ocorrem em grande parte das angiospermas, sendo seus compostos responsáveis parcialmente pela coloração

de frutos e flores. Além disso, apresentam notável atividade biológica como antioxidantes, anti-inflamatórios, antimutagênicos e anticancerígenos, sendo atualmente indispensáveis na dieta humana (BEECHER, 2003; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2014).

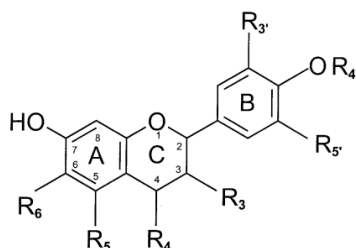


Figura 6. Estrutura molecular básica dos flavonoides (Fonte: acervo pessoal)

Essa classe é biossintetizada a partir da via do ácido chiquímico e do ácido acético, sendo a diversidade de compostos encontrados nela derivados de modificações nos níveis de oxidação de seu esqueleto e ocorrência de reações de alquilação, glicosilação e oligomerização. As modificações que ocorrem nos anéis B e C são também utilizadas na classificação dos flavonoides, tais como flavonas e flavonóis (BEECHER, 2003; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2014). Apesar de sua ampla ocorrência na família Lauraceae, o perfil químico de flavonoides e antocianinas já foi empregado para diferenciar duas espécies de *Cassytha* (Lauraceae) e estabelecer similaridades entre diferentes variedades de *Cassytha filiformis* (Cipó-chumbo) (MURAI *et al.*, 2008).

No gênero *Ocotea* foram descritos 37 flavonoides distintos (Quadro 1), divididos em 6 classes (Figura 7), e correspondendo principalmente a derivados glicosilados da quercetina e kaempferol, os quais apresentaram o maior número de ocorrência dentro do gênero (SALLEH; AHMAD, 2017).

Quadro 1. Flavonoides encontrados no gênero *Ocotea*

Espécie	Composto	Classe	Referência
<i>O. aciphylla</i>	(epi) afzelina-(epi) galocateína-7-O-glucosídeo	Flavonol	(CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2016)
<i>O. odorifera</i>	(Epi) catequina	Flavanol	(GONTIJO <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. odorifera</i>	(Epi) catequina-(4,8/2,7)-(epi) catequina-(4,8)-(epi) catequina		
<i>O. odorifera</i>	(Epi) catequina-(4,8/2,7)-(epi) catequina-(4,8)-(epi) catequina-(4,8)-(epi) catequina		
<i>O. aciphylla</i>	(epi) catequina-(epi) afzelina-7-O-hexose-deoxihexosida	Procianidina	
<i>O. aciphylla</i>	(epi) catequina-(epi) afzelina-7-O-glucosídeo		(CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2016)
<i>O. foetens</i>	(epi) catequina-(epi) catequina (Tipo B)		(LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017a)
<i>O. foetens</i>	(epi) catequina-(epi) catequina-(epi) catequina (Tipo A)		
<i>O. acutifolia</i>	3-O- α -L-kaempferol ramnopiranosil	Flavonol	(GARCEZ <i>et al.</i> , 2011)
<i>O. caudata</i>	Afzelina (kaempferol 3 ramnosídeo)	Flavona	(GIL ARCHILA; CUCA SUÁREZ, 2018)
<i>O. caudata</i>			(COSTA <i>et al.</i> , 2015)
<i>O. notata</i>			(GARRETT <i>et al.</i> , 2012)
<i>O. notata</i>		Flavonol	(CANDIDO <i>et al.</i> , 2016)
<i>O. pulchella</i>			(GARCEZ; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1995)
<i>O. vellosiana</i>			(GONTIJO <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. odorifera</i>			(LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017a)
<i>O. foetens</i>	Apigenina 6,8-di-C-glucosídeo		(LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017a)
<i>O. aciphylla</i>	Apigenina 6,8-di-C-glucosídeo -O-ramnosídeo	Flavona	(CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2016)
<i>O. odorifera</i>	Apigenina 6-C-pentosídeo-8-C-hexosídeo		(GONTIJO <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. odorifera</i>	Apigenina-7-O-rutinosídeo		
<i>O. foetens</i>	Apigenina-C-hexosídeo-C-pentosídeo		(LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017a)
<i>O. corymbosa</i> / <i>O. elegans</i>	Astilbina	Flavanonol	(BATISTA <i>et al.</i> , 2010)
<i>O. caudata</i>	Astragalina (kaempferol 3-glucosídeo)	Flavonol	(GIL ARCHILA; CUCA SUÁREZ, 2018)
<i>O. vellosiana</i>			(GARCEZ; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1995)
<i>O. lancifolia</i>	Catequina	Flavanol	(DA SILVA <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. notata</i>			(GARRETT <i>et al.</i> , 2012)

Espécie	Composto	Classe	Referência
<i>O. lancifolia</i>	Epicatequina	Flavanol	(DA SILVA <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. notata</i>			(GARRETT <i>et al.</i> , 2012)
<i>O. porosa</i>			
<i>O. porosa</i>	Epicatequina-(7,8-bc)-4α-(4-hidroxifenil)-desidro-2(3H)-pirona		(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
<i>O. minarum</i>	Eriodictiol-3'-O-β-D-glicopiranosídeo	Flavanona	(GARCEZ <i>et al.</i> , 2005)
<i>O. vellosiana</i>	Hirsutrina (miricetina 3-glucosídeo)		(GARCEZ; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1995)
<i>O. lancifolia</i>	Isoramnetina-3-O-flucosídeo-7-O-ramnosídeo	Flavonol	(DA SILVA <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. lacifolia</i>	Isoramnetina-3-O-glucosídeo-7-O-ramnosídeo		
<i>O. acutifolia</i>	Kaempferol		(GARCEZ <i>et al.</i> , 2011)
<i>O. notata</i>			(GARRETT <i>et al.</i> , 2012)
<i>O. lancifolia</i>	Kaempferol-3-O-glucosídeo		(DA SILVA <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. lancifolia</i>	Kaempferol-3-O-pentospídeo		
<i>O. pulchella</i>	Kaempferol-4'-O-ramnopiranosídeo		(CANDIDO <i>et al.</i> , 2016)
<i>O. notata</i>	Miquelianina		(GARRETT <i>et al.</i> , 2012)
<i>O. minarum</i>	Naringenina-7-O-β-D-glicopiranosídeo		Flavanona
<i>O. aciphylla</i>	Dímero de procianidina-7-O-glucosídeo	Procianidina	(CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2016)
<i>O. aciphylla</i>	Dímero de procianidina-7-O-hexose-deoxihexosídeo		
<i>O. caudata</i>	Quercetina	Flavonol	(GIL ARCHILA; CUCA SUÁREZ, 2018)
<i>O. notata</i>			(GARRETT <i>et al.</i> , 2012)
<i>O. corymbosa</i> / <i>O. elegans</i>	Quercetina-3-D-xilosídeo		(BATISTA <i>et al.</i> , 2010)
<i>O. notata</i>			(GARRETT <i>et al.</i> , 2012)
<i>O. lancifolia</i>	Quercetina-3-O-arabinosídeo		(DA SILVA <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. caudata</i>	Quercetina-3-O-glucosídeo (isoquecitrina)		(GIL ARCHILA; CUCA SUÁREZ, 2018)
<i>O. corymbosa</i> / <i>O. elegans</i>			(BATISTA <i>et al.</i> , 2010)
<i>O. lancifolia</i>			(DA SILVA <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. notata</i>			(GARRETT <i>et al.</i> , 2012)
<i>O. notata</i>			(COSTA <i>et al.</i> , 2015)
<i>O. notata</i>			(GARRETT <i>et al.</i> , 2012)
<i>O. lancifolia</i>			(DA SILVA <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. corymbosa</i> / <i>O. elegans</i>	Quercetina-3-O-β-D-galactosídeo		(BATISTA <i>et al.</i> , 2010)
<i>O. minarum</i>	Quercetina-7-O-β-D-glicopiranosídeo	Flavonol	(GARCEZ <i>et al.</i> , 2005)
<i>O. elegans</i>		Flavonol	(BATISTA <i>et al.</i> , 2010)

Espécie	Composto	Classe	Referência
<i>O. lancifolia</i>	Quercitrina (quercetina 3-ramnosídeo)		(DA SILVA <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. notata</i>			(GARRETT <i>et al.</i> , 2012)
<i>O. notata</i>			
<i>O. vellosiana</i>			(GARCEZ; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1995)
<i>O. minarum</i>	Taxifolina	Flavanonol	(GARCEZ <i>et al.</i> , 2005)

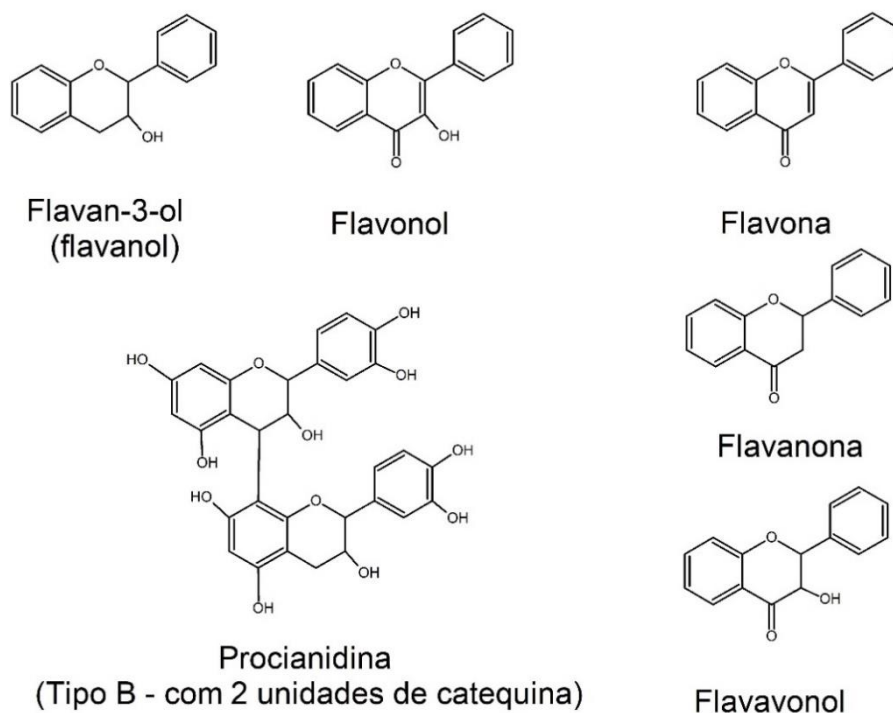


Figura 7. Tipos de flavonoides encontrados no gênero *Ocotea* (Fonte: acervo pessoal)

Apesar de ser uma classe química comum na Lauraceae, apenas 3,4% das espécies de *Ocotea* possuem alguma descrição de sua composição de flavonoides. Este fato se deve ao grande interesse nas frações alcalóidicas do gênero, negligenciando as demais classes químicas.

3.3. Quimiosistemática

O uso do gênero *Ocotea* como um “gênero de descarte”, incorporando espécies com diferentes características morfológicas, dificultou a delimitação dos caracteres que definem o gênero. Deste modo, se tornou difícil definir e identificar quais espécies são do gênero *Ocotea* ou não. Para melhorar os métodos de identificação de espécie podem ser definidas características diferentes para definir cada espécie e o próprio gênero *Ocotea*. Entre as estratégias propostas para aprimorar a identificação de espécies botânicas está a utilização de características não relacionadas a atributos morfológicos das espécies, tais como a filogenia ou a quimiosistemática (GOTTLIEB; BORIN, 2012).

A quimiosistemática é uma área de pesquisa que objetiva definir características químicas capazes de discernir e caracterizar espécies, subtribos e gêneros botânicos. A partir da quimiosistemática também é possível avaliar os processos de evolução e adaptação botânica em diferentes condições ambientais (SCHRIPEMA *et al.*, 2014; WOLFENDER *et al.*, 2015; SCHRIMPE-RUTLEDGE *et al.*, 2017; CANUTO *et al.*, 2018).

A caracterização química de espécies botânicas utilizando metabólitos especializados é denominada de metabolômica, sendo uma área de estudo que tem recebido grandes avanços na última década (CANUTO *et al.*, 2018). Os metabólitos secundários estudados por esta área de pesquisa apresentam massa molecular menor que 1.000 Dalton (Da) e atuam principalmente na manutenção da vida do organismo, auxiliando sua sobrevivência, defesa e adaptação a um dado bioma, aumentar sua resistência, entre outras. Entre as classes químicas que compõem os metabólitos especializados estão os alcaloides, terpenos, flavonoides, lignoides, esteroides e polifenóis (COMMISSO *et al.*, 2013; FUNARI *et al.*, 2013; WOLFENDER *et al.*, 2015).

O perfil químico de metabólitos especializados se apresenta como uma característica única de cada espécie botânica, visto que a habilidade de produzir

determinados compostos é adquirida durante os processos de evolução e especialização, os quais também originam as diferentes espécies, gêneros e famílias botânicas (FUNARI *et al.*, 2013; MOHANTY; VISHNU; SAHU, 2014; SCHRIPSEMA *et al.*, 2014).

A metabolômica aplicada a quimiosistemática pode ser dividida em duas vertentes principais: a metabolômica alvo (do inglês: *targeted metabolomics*) e a metabolômica global (do inglês: *untargeted metabolomics*) (GORROCHATEGUI *et al.*, 2016; CANUTO *et al.*, 2018). A metabolômica alvo tem como objetivo avaliar as espécies em função de um pequeno grupo de metabólitos previamente selecionados, geralmente pertencentes a uma classe química específica ou classificados como constituintes majoritários na amostra. Por outro lado, a metabolômica global visa a determinação do maior número possível de metabólitos presentes na amostra de forma simultânea, englobando várias classes químicas e usualmente se limitando apenas pelo tipo de amostra (extrato ou óleo essencial, por exemplo) ou grau de polaridade desta (análise de frações de baixa, média ou alta polaridade) (DE VOS *et al.*, 2007; ROBERTS *et al.*, 2013; GORROCHATEGUI *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2017; CANUTO *et al.*, 2018).

Para realização de estudos por metabolômica alvo é necessário que a espécie em estudo tenha composição química previamente conhecida, possibilitando a determinação de quais compostos serão utilizados durante o estudo quimiosistemático. Por analisar uma quantidade menor de analitos esta metodologia pode empregar técnicas analíticas mais seletivas, tanto no processo de extração quanto de detecção, tornando o procedimento de análise mais preciso. Na metabolômica alvo, os analitos devem ser isolados e caracterizados quimicamente de forma individual, o que confere ao fluxograma de trabalho um caráter quantitativo que não existe na metabolômica global. Entretanto, se forem selecionadas muitas espécies ou muitos analitos para compor o perfil químico, a metabolômica alvo pode demandar grande quantidade de insumos e tempo,

tornando-se impraticável (COMMISSO *et al.*, 2013; GORROCHATEGUI *et al.*, 2016; CANUTO *et al.*, 2018).

Na metabolômica global o analista não precisa ter nenhum tipo de conhecimento prévio sobre a composição química do espécime botânico, entretanto, a visão holística da amostra impede que se utilize técnicas de extração e análise com alta seletividade. Assim, a metabolômica global apresenta um perfil de dados mais qualitativos, quando comparada a metabolômica alvo. Deste modo, a quantificação dos metabólitos ocorre de forma semiquantitativa, ou seja, apenas pela concentração relativa entre os constituintes do perfil químico. Ainda, por não apresentar um analito alvo, esta metodologia gera uma grande quantidade de dados, os quais somente podem ser avaliados com o uso de ferramentas estatísticas (COMMISSO *et al.*, 2013; GORROCHATEGUI *et al.*, 2016; CANUTO *et al.*, 2018).

Os modelos quimiosistemáticos que empregam a metabolômica alvo são tipicamente baseados na ausência/presença de um determinado metabólito previamente isolado. Essa abordagem pode ocasionar a geração de dados equivocados ou que precisem ser periodicamente redefinidos, visto que nela não é considerado a existência de um marcador químicos como composto minoritário em uma espécie que o modelo classifique como ausente desta substância (DE VOS *et al.*, 2007; ERPENBECK; SOEST, 2007; COMMISSO *et al.*, 2013; ANTONIO; WIEDEMANN; VEIGA JUNIOR, 2018). Neste contexto a metabolômica global emergiu como uma estratégia alternativa, menos afetada por pressuposições relacionadas a composição de constituintes majoritários e minoritários de uma espécie (COMMISSO *et al.*, 2013; SINGH, 2016).

O desafio no uso da metabolômica global está relacionado justamente a produção de um perfil químico abrangente. Devido à complexidade das matrizes botânicas e a sua alta quimiodiversidade, não existe um único método de extração e análise que seja

aplicável a todos os grupos botânicos. Assim, se torna fundamental realizar o desenvolvimento e otimização de métodos voltados especificamente para cada grupo botânico e tipo de matriz que será avaliada (DE VOS *et al.*, 2007; CANUTO *et al.*, 2018).

3.4. Otimização de métodos

Otimização de métodos corresponde ao processo de avaliação empírica para estabelecer quais condições experimentais satisfazem melhor a obtenção de um determinado dado, preservando a confiabilidade da análise. A forma como este processo será realizado depende do objetivo do método em questão, que pode ser tanto o aumento da recuperação de um ou mais analitos de interesse, redução do sinal de um interferente ou mesmo redução do tempo e custos de execução (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; PAULA *et al.*, 2017).

Para realizar a otimização de métodos devem ser estabelecidos os fatores (k), níveis (n) e variáveis-resposta que serão avaliadas. Os fatores representam as variáveis controladas pelo analista que serão estudadas durante o processo, estando assim relacionadas as condições experimentais, como por exemplo a temperatura de extração e composição da fase móvel utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência. A escolha dos fatores que serão estudados depende do conhecimento prévio tanto da amostra quanto do método a qual ela será submetida. Idealmente os fatores devem ser variáveis do processo que tenham capacidade de alterar a resposta pretendida, e assim, sua escolha depende de uma extensa revisão bibliográfica (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; FERREIRA *et al.*, 2018).

Os níveis correspondem aos valores numéricos que os fatores poderão assumir durante o procedimento de otimização, sendo sua escolha também intimamente ligada a

revisão bibliográfica. Vale ressaltar que, todas as aferições realizadas a partir das respostas obtidas durante a otimização do método serão feitas dentro do universo delimitado por estes níveis. A variável-resposta selecionada para o procedimento de otimização corresponde a resposta analítica que se deseja aprimorar, como por exemplo, o rendimento da extração ou aumento da bioatividade da amostra (FERREIRA *et al.*, 2019).

Dentre as formas de se interpretar os resultados obtidos durante a otimização de métodos está a avaliação dos efeitos dos fatores. Os efeitos são medidas quantitativas de quanto e como cada fator influência na variável-resposta, sendo possível assim interpretar e compreender os mecanismos que ocorrem durante a realização do método (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; FERREIRA *et al.*, 2018).

As metodologias utilizadas durante a otimização de métodos envolvem a realização de experimentos que modificam os fatores em todos os seus níveis, de forma a obter uma resposta analítica para cada combinação possível entre estas. Assim, quanto maior quantidade de fatores ou de níveis, maior será a quantidade de experimentos realizados. Uma das formas de representar a quantidade de fatores e níveis de um experimento é pela notação n^k , a qual também pode ser utilizada para calcular o número de ensaios que serão realizados. Dentre as técnicas de planejamento fatorial que podem ser usadas para realizar uma otimização podem ser destacadas o planejamento fatorial completo, planejamento composto central e o experimento de Box-Behnken (FERREIRA *et al.*, 2018).

O planejamento fatorial completo empregando dois níveis corresponde ao método mais empregado em química analítica devido a menor quantidade de experimentos necessários para sua execução e a maior simplicidade no tratamento e interpretação dos dados. Neste tipo de delineamento todas as possíveis combinações dos níveis de cada

fator são realizadas (Figura 8A), assim, experimentos com dois fatores e dois níveis, do tipo 2^2 , irão requerer um mínimo de 4 experimentos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; PAULA *et al.*, 2017).

No delineamento composto central do tipo 2^k , além dos pontos já existentes no planejamento fatorial completo, serão avaliados um ou mais pontos centrais correspondentes a valores intermediários ao que se encontraria no planejamento fatorial completo (Figura 8B). Adicionalmente, este delineamento também inclui pontos axiais que permitem a elaboração de superfícies de resposta. Assim, o planejamento de composto central pode assumir mais de 3 níveis mantendo um número razoável de ensaios, apesar de dificilmente serem utilizados delineamento com um número de níveis maior que 3 (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; PAULA *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2018).

O delineamento de Box-Behnken também é empregado na construção de superfícies de resposta, entretanto ele pode ser utilizado apenas com fatores que possuam três níveis. Ele apresenta uma alternativa com menor número de ensaios que o planejamento composto central, entretanto, não avalia as combinações de pontos extremos dos seus fatores (Figura 8) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; PAULA *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2018).

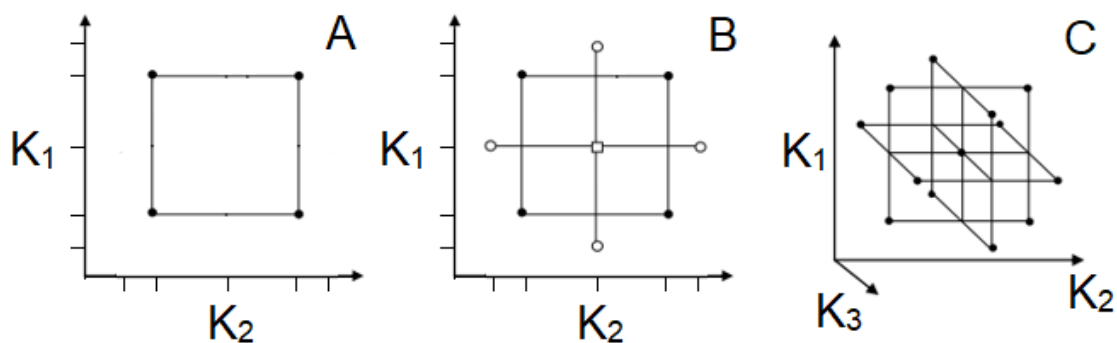


Figura 8. Representação gráfica do (A) planejamento fatorial completo 2^2 , (B) planejamento composto central e (C) planejamento de Box-Behnken. (Fonte: acervo pessoal)

3.5. Métodos analíticos empregados na quimiossistemática

A obtenção do perfil metabolômico global pode ser realizada pelo emprego de diferentes métodos cromatográficos e espectrométricos (DUNN *et al.*, 2013; DELGADO; SUÁREZ, 2016; CANUTO *et al.*, 2018). Devido à alta complexidade química das matrizes botânicas, as quais apresentam uma ampla variedade de metabólitos com diferentes características físico-químicas, não existe uma única técnica que seja satisfatória para estudos de metabolômica global, assim geralmente é preferível o uso de técnicas multiplataforma (DUNN *et al.*, 2013; NAZ *et al.*, 2014).

As principais técnicas aplicadas atualmente são a cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acopladas a espectrometria de massas (EM) ou a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) (CANUTO *et al.*, 2018). O uso da espectrometria de massas e da RMN como principais técnicas de detecção na metabolômica global se deve ao fato destes métodos fornecerem informações sobre a estrutura molecular de forma a possibilitar sua identificação, em alguns casos, sem a necessidade de técnicas complementares. Apesar da maior parte de seu uso ser realizado acoplado as técnicas cromatográficas, estas podem ser utilizadas de forma independente

uma vez que também pode gerar um perfil químico da amostra (NAZ *et al.*, 2014; WOLFENDER *et al.*, 2015; CANUTO *et al.*, 2018).

A RMN tem como vantagens sobre a EM uma maior robustez, reprodutibilidade e necessidade de poucas etapas de preparo de amostra, sendo em alguns casos possível realizar a análise em amostras não tratadas, como os extratos brutos de plantas, sem causar a destruição da amostra. Entre suas desvantagens pode se destacar o alto custo associado, possibilidade de sobreposição do sinal durante a análise de misturas complexas, complexidade no tratamento estatístico dos dados e a sua baixa sensibilidade quando comparada a EM (WOLFENDER *et al.*, 2015; CANUTO *et al.*, 2018).

Apesar das vantagens da RMN, a espectrometria de massas é a técnica de detecção mais empregada atualmente (DUNN *et al.*, 2017; BEGOL *et al.*, 2018; CANUTO *et al.*, 2018; GU *et al.*, 2019). O uso da EM tem ocorrido tanto hifenada à métodos cromatográficos quanto via injeção direta, sendo que esta última apresenta uma aquisição de dados mais rápida que os métodos hifenados, apesar da perda da sensibilidade. Devido à ausência de um método de separação, o uso da EM via injeção direta gera uma quantidade menor de dados quando comparado a CLAE-EM, visto sua maior susceptibilidade a efeitos de matriz, sobreposição ou ambiguidade de sinais m/z (NAZ *et al.*, 2014; WOLFENDER *et al.*, 2015).

A diversidade de fontes ionizantes e analisadores de massa confere a esta técnica uma ampla gama de aplicações na metabolômica global com alta sensibilidade (CANUTO *et al.*, 2018). A fonte de íons mais utilizada em estudos metabolômicos é a ionização por *eletrospray* (do inglês *electrospray ionization* ou ESI), a qual promove a formação de íons através da nebulização da amostra sob um campo magnético. Esta técnica é capaz de realizar uma ionização branda de moléculas de média e alta polaridade com massas moleculares de 100 a 100.000 Da (ZHOU *et al.*, 2012).

Visto a abrangência de metabólitos que podem ser detectados utilizando a EM e a complexidade inerente de matrizes vegetais, o uso da cromatografia em análises metabolômicas é essencial para reduzir a complexidade dos dados e dos efeitos da matriz no processo de ionização (ZHOU *et al.*, 2012; WOLFENDER *et al.*, 2015).

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) é aplicada no estudo metabolômico global de constituintes voláteis, sendo popular devido sua robustez, sensibilidade e reprodutibilidade. (CANUTO *et al.*, 2018). A técnica de cromatografia gasosa tem como pré-requisitos para a análise dos constituintes da amostra que estes sejam voláteis e termicamente estáveis, visto que a injeção e análise nesse tipo de sistema cromatográfico envolve o uso de altas temperaturas (acima de 150°C) e a fase móvel é constituída por um gás inerte. Assim, para possibilitar a análise de amostras complexas pela técnica de CG-EM, pode ser necessário que estas sejam submetidas ao processo de derivatização, onde é promovida uma modificação estrutural dos analitos de interesse, através de reações de alquilação, acetilação ou sililação, por exemplo, para que estes adquiram funções orgânicas que os confirmem os pré-requisitos necessários para a análise (T'KINDT *et al.*, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) tem ganhando mais espaço na metabolômica global devido sua robustez, sensibilidade, seletividade e diversificação de combinações entre as fases móveis e estacionária. Na técnica de CLAE a fase móvel e fase estacionaria podem ser modificadas em função de diferentes características químicas e físicas, com maior facilidade do que nos métodos de CG, onde a fase móvel é constituída por um gás inerte. A variedade de combinações entre fase móvel e estacionária, assim como o avanço tecnológico para produção de colunas cromatográficas, tem permitido que a CLAE seja empregada tanto compostos polares quanto apolares, independentemente de sua volatilidade ou

estabilidade térmica, incluindo a detecção de diversas classes químicas em um único sistema cromatográfico. (FEKETE *et al.*, 2014; NAZ *et al.*, 2014; CANUTO *et al.*, 2018).

O uso da CLAE em estudos metabolômicos globais é geralmente realizada com o uso de colunas cromatográficas de fase reversa, como a C18, a qual pode realizar a separação de compostos de média polaridade como ácidos fenólicos, flavonoides, esteroides, alcaloides e seus derivados glicosilados. Outra opção emergente são as colunas hidrofílicas (HILIC) para a análise de frações polares, contendo principalmente metabólitos primários, as quais apresentam como vantagem a compatibilidade com a fonte de ionização tipo ESI (ZHOU *et al.*, 2012; WOLFENDER *et al.*, 2015).

Apesar da técnica de CLAE-EM ser relativamente demorada quando comparada aos métodos de espectrometria de massas por injeção direta, há um aumento significativo na seletividade e sensibilidade da análise, o que permite a sugestão de marcadores químicos mesmo que estes estejam em baixas concentrações na matriz. O uso da CLAE-EM em metabolômica é geralmente realizada com o uso das técnicas de ionização em eletrospray ou a pressão atmosférica, sendo capaz de efetivamente separar e detectar as principais classes químicas presentes em plantas como alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos, fenilpropanoides, entre outros. Assim, até mesmo misturas isoméricas podem ser devidamente identificadas pelo uso do CLAE-EM (DE VOS *et al.*, 2007; FUNARI *et al.*, 2013; SINGH, 2016; CANUTO *et al.*, 2018).

Vale ressaltar que a metabolômica global é uma área de pesquisa relativamente nova, a qual ainda não possui nenhum procedimento operacional padrão, visto que a complexidade e diversidade química de amostras botânicas impede que se utilize um único método analítico para obter uma informação exata de toda a composição de metabólitos especializados da amostra. Assim, as pesquisas nesta área geralmente focam na produção de um perfil químico específico. Por exemplo, no estudo de DE VOS *et al.*

(2007) foi proposto um procedimento operacional padrão, aplicável a família Brassicaceae, no qual foi realizada a extração de metabólitos especializados com auxílio de ultrassom utilizando como solvente extrator metanol acidificado. No procedimento proposto, a análise metabolômica foi realizada por CLAE-EM empregando um sistema de eluição em gradiente exploratório de ácido fórmico e acetonitrila. No estudo de DE VOS *et al.* (2007), o EM foi configurado tanto em modo de aquisição dependente de dados (DDA, do inglês Data Dependent Acquisition) quanto independente (DIA, do inglês Data Independent Acquisition). (SCHRIMPE-RUTLEDGE *et al.*, 2017).

No método de DDA, os sinais m/z de maior intensidade detectados pelo espectrômetro de massas serão submetidos a fragmentação, do tipo MS^2 , sendo recomendada para análises exploratórias, quando não se conhece a composição da matriz ou seus possíveis biomarcadores. Por outro lado, o método DIA depende do conhecimento prévio da amostra e permite que o equipamento realize experimentos do tipo monitoramento de reações múltiplas, onde cada sinal m/z , ou íon precursor, selecionado pelo analista será monitorado e a fragmentação pode ser realizada em mais níveis MS^n . (LIIGAND *et al.*, 2017; SCHRIMPE-RUTLEDGE *et al.*, 2017).

Na pesquisa realizada por LIU *et al.* (2016) foi utilizada uma metodologia similar a descrita por DE VOS *et al.* (2007), apresentando alterações nas taxas de variação do gradiente de eluição durante a corrida cromatográfica. Nessa pesquisa foi realizada a análise metabolômica global de amostras comerciais e material botânico da *Rheum palmatum* L., para possibilitar a diferenciação de extratos obtidos destas para uso medicinal. A partir do perfil químico obtido foram estabelecidos 73 biomarcadores para realizar a construção de um modelo matemático classificatório pelo método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), o qual apresentou alto poder de previsão na diferenciação dos tipos de extrato.

3.6. Métodos quimiométricos

A utilização dos métodos analíticos, seja de forma independente como em multiplataforma, ocasionam a geração de uma grande quantidade de dados quando se emprega a metabolômica global. Com isso, o uso de ferramentas estatísticas se torna essencial no desenvolvimento da pesquisa e na interpretação dos dados (GORROCHATEGUI *et al.*, 2016; CANUTO *et al.*, 2018).

A quimiometria compreende a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos, possibilitando sua análise exploratória, comparação de métodos e amostras e o fornecimento do máximo de informação relevante ao estudo químico presente nos dados (FERREIRA, 2015). Nos estudos envolvendo metabolômica global, os principais métodos quimiométricos empregados compreendem o teste de hipóteses Anova e os testes de reconhecimento de padrão não supervisionados (GORROCHATEGUI *et al.*, 2016; CANUTO *et al.*, 2018).

O teste Anova compreende um método que tem por objetivo testar a igualdade de três ou mais populações de dados baseado na análise de variância das amostras que a compõem. Caracterizado como um teste de hipóteses, a Anova usa o pressuposto da hipótese nula e hipótese alternativa para definir a igualdade ou não das populações. O objetivo neste tipo de análise é rejeitar uma das hipóteses formuladas, onde a hipótese nula define que as populações comparadas são iguais, enquanto a hipótese alternativa define as populações como diferentes (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A rejeição ou não da hipótese nula pode ser realizada através da comparação do nível de significância (α) da análise com o p -valor amostral. O nível de significância

representa a probabilidade máxima de se rejeitar a hipótese nula incorretamente, sendo geralmente utilizado o valor de 5% ou 0,05. Por outro lado, o p -valor amostral representa o menor valor de α para se rejeitar a hipótese nula com base nos resultados de variância da população. Assim, a hipótese nula é rejeitada e as populações são consideradas significativamente diferentes quando o p -valor foi menor ou igual que α (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; TEÓFILO; FERREIRA, 2006)..

Os métodos de reconhecimento de padrão são ferramentas utilizadas para identificar semelhanças e diferenças entre diversas amostras, de forma a possibilitar sua classificação dentro de um conjunto de grupos criados de acordo com a similaridade de suas múltiplas características. Estes métodos podem ser classificados como supervisionados e não supervisionados, cuja principal diferença está no conhecimento prévio das amostras. Nos métodos supervisionados, as amostras pertencem à classes pré-estabelecidas pelo analista, as quais são utilizadas na construção do modelo de classificação (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; FERREIRA, 2015). Por outro lado, nos métodos não-supervisionados não é necessário o conhecimento prévio sobre a existência de classes no conjunto amostral, sendo assim, este tipo de método é mais empregado na metabolômica global, principalmente envolvendo o estudo de espécies novas ou pouco exploradas (COMMISSO *et al.*, 2013; GORROCHATEGUI *et al.*, 2016; CANUTO *et al.*, 2018).

Os principais métodos não supervisionados utilizados em estudos de metabolômica global e quimiossistemática são a análise hierárquica de agrupamentos (HCA, do inglês Hierarchical Clustering Analysis) e a análise de componentes principais (PCA, do inglês Principal Components Analysis). A técnica de HCA tem como objetivo organizar as amostras em função de suas similaridades, reduzindo a dimensionalidade das variáveis que descrevem cada amostra e criando grupos com o máximo de

homogeneidade interna (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; FERREIRA, 2015).

A análise de HCA avalia a similaridade das amostras dentro de um universo multidimensional composto pelas variáveis que descrevem as amostras. Nesse universo, as amostras são classificadas como similares e pertencentes a um determinado grupo de acordo com sua proximidade, a qual pode ser medida através de diferentes métodos, sendo o principal deles a distância Euclidiana. Nesta métrica, a distância entre as amostras é calculada de acordo com a Equação 1, derivada do Teorema de Pitágoras (FERREIRA, 2015).

$$d_{AB} = \sqrt{(x_{a1} - x_{b1})^2 + \dots (x_{aj} - x_{bj})^2}$$

Equação 1. Cálculo da distância Euclidiana entre dois pontos em um universo multidimensional. Onde, d_{AB} = distância entre amostras A e B; x_{aj} = valores numéricos da j-ésima coordenada de A e B.

Os agrupamentos descritos pelo HCA são representados na forma de um gráfico bidimensional conhecido como dendrograma (Figura 9), onde as amostras são representadas em chaves, conhecidas como agrupamentos ou *clusters*, do inglês, em função da distância entre as amostras. Conforme as chaves se conectam mais longe do valor de zero no eixo que representa a distância, menor é a similaridade entre as amostras e grupos (FERREIRA, 2015).

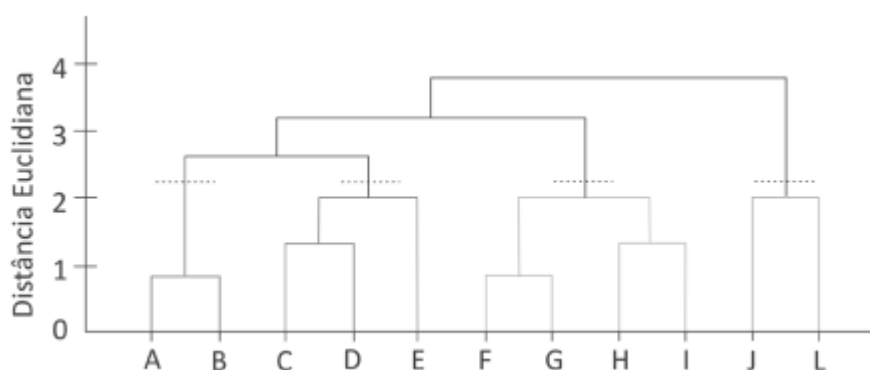


Figura 9. Exemplo de dendrograma (Fonte: acervo pessoal)

A análise de PCA também tem como objetivo reduzir a dimensionalidade do universo multifatorial composto pelas características que descrevem as amostras. Nessa técnica a redução da dimensionalidade ocorre pela transformação das variáveis originais, resumindo a informação contida nestas, em uma quantidade menor de variáveis, denominada de componentes principais (CP). Esse método permite avaliar similaridades e correlações entre as variáveis e entre as amostras, tornando possível identificar amostras ou variáveis de comportamento atípico e identificar quais principais características relacionadas à similaridade e dissimilaridade entre as amostras (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; FERREIRA, 2015; CANUTO *et al.*, 2018).

O agrupamento das variáveis em CP é realizado de acordo com a existência de correlações significativas entre o comportamento de seus dados, assim, variáveis que apresentam correlações lineares entre si e alta variabilidade no universo amostral, serão agrupadas dentro de uma única componente principal. As CP são calculadas de tal forma a manter a maior representatividade possível acerca da variância nas características originais, sendo assim, geralmente apresentadas com um valor de porcentagem associado, o qual indica o quanto cada CP representa os dados originais (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; FERREIRA, 2015).

O resultado da análise de PCA é expresso na forma dos gráficos de pesos (popularmente conhecido como gráfico de *loadings*) e gráficos de escores (popularmente conhecido como gráfico de *scores*), os quais são representações bi ou tridimensionais que utilizam como eixos as PCs produzidas durante a análise. No gráfico de *loadings* é apresentado as variáveis originais que compunham o universo multidimensional das amostras, e assim, este gráfico apresenta a composição das CPs em função das variáveis originais. No gráfico de *scores*, as amostras são representadas, o que permite avaliar os agrupamentos e comportamento destas em relação um a outra e sua correlação com as componentes principais. Assim, as análises de HCA e PCA são importantes ferramentas no reconhecimento de marcadores taxonômicos e similaridade de espécies botânicas quando aplicado na quimiosistemática (FERREIRA, 2015).

3.7. Validação de métodos

A otimização de métodos geralmente é aplicada no desenvolvimento de metodologias novas ou na adaptação das existentes para um novo objetivo. Em ambos os casos, além de alcançar as condições que irão gerar os melhores resultados analíticos é preciso garantir que o método desenvolvido seja confiável na obtenção da resposta analítica. Para isso devem ser aplicadas as metodologias de validação de método (ANVISA, 2003; LEITE, 2008; KRUIVE *et al.*, 2015).

O processo de validação consiste de um meio de avaliar se um método analítico apresenta o desempenho necessário para gerar uma resposta analítica confiável, no que diz respeito principalmente a precisão e exatidão desta resposta independente de qual analista ou em qual local esse método seja realizado (LEITE, 2008; KRUIVE *et al.*, 2015). A validação de um método ocorre pela análise dos parâmetros de validação, ou figuras de

mérito, que são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. Vale ressaltar que, dependendo das características do método (qualitativo ou quantitativo) e seu objetivo (detecção de componente majoritários ou minoritários na amostra) poderá ou não ser necessária a avaliação de todos os parâmetros de validação. Assim, a validação de métodos segue etapas específicas (Figura 10) que dependerão da determinação inicial do objetivo do método. A determinação dos parâmetros de validação é uma forma de garantir e documentar que o método apresenta os requisitos necessários para produzir uma resposta analítica confiável, sem ser significativamente afetado por fatores externos ou internos a sua execução, e de forma reprodutível (ANVISA, 2003; LEITE, 2008).

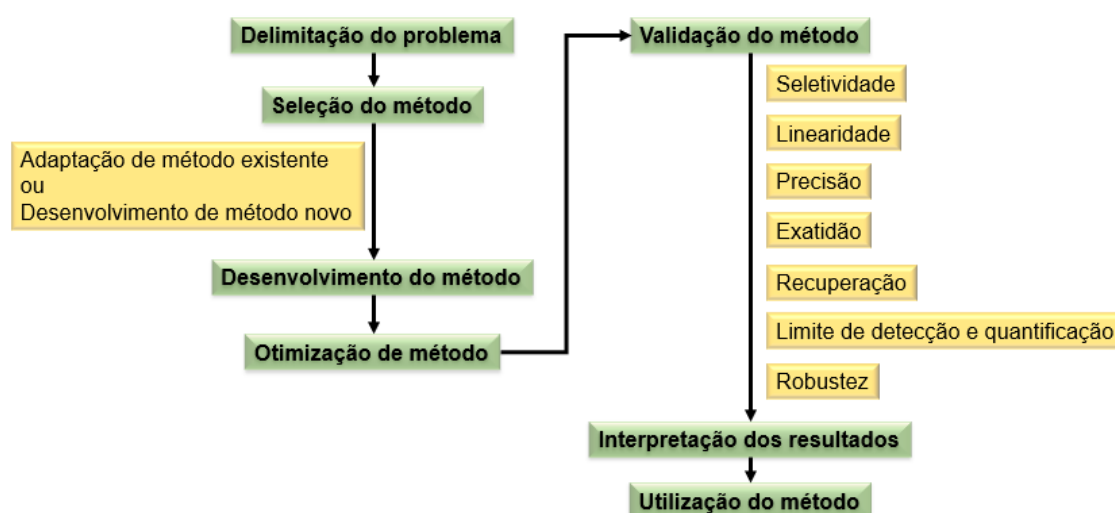


Figura 10. Etapas principais no desenvolvimento e validação de métodos analíticos (Fonte: acervo pessoal)

A seletividade do método se refere a habilidade de distinguir um analito na presença dos demais componentes da amostra. Assim, este parâmetro assegura que a medida realizada pelo método para identificação ou quantificação deste analito não sofre interferências significativas na presença de outras substâncias que compõem a matriz,

impurezas ou ainda que o analito não é confundido com outros compostos da amostra (ANVISA, 2003; LEITE, 2008).

O estudo da seletividade é inicialmente realizado pela análise da matriz, buscando verificar possíveis interferentes presentes na amostra que apresentem sinais similares ou sobrepostos ao do analito de interesse (LEITE, 2008; KRUIVE *et al.*, 2015). A seletividade também está relacionada ao tipo de detector, de forma que os métodos capazes de gerar dados estruturais específicos sobre a natureza do analito, como os métodos de EM e RMN, são considerados mais específicos que aqueles onde a resposta gerada é correlacionada a grupos funcionais contidos no analito, como nos métodos espectrofotométricos com uso de radiação ultravioleta, visível ou infravermelho (LEITE, 2008; VAN DER KOOY *et al.*, 2009; KRUIVE *et al.*, 2015).

A determinação da seletividade pode ser realizada pela análise de quatro tipos de amostra em no mínimo hexaplicata. Os tipos de amostra a serem analisados são amostras branco (sem os analitos de interesse) e amostras de controle (em concentrações baixa, média e alta do analito) com e sem a fortificação de possíveis interferentes. Dessa forma se torna possível avaliar o efeito dos interferentes tanto na ausência quanto presença do analito de interesse (LEITE, 2008; KRUIVE *et al.*, 2015).

A linearidade corresponde a capacidade do método de gerar resultados proporcionais conforme a concentração do analito de interesse se modifica, dentro de uma determinada faixa de trabalho. Com isso, o método demonstra sua capacidade de quantificação e construção de modelos matemáticos para o estudo do analito. A faixa de trabalho neste caso se refere a faixa de concentrações do analito no qual a resposta analítica gerada pelo método apresentará linearidade (LEITE, 2008).

A determinação deste parâmetro é geralmente realizada através da análise de curvas analíticas produzidas por padronizações internas ou externas, com pelo menos 5

pontos de concentração distintos. Os dados assim obtidos são submetidos a tratamento matemático (como regressão linear pelo método dos mínimos quadrados) para avaliar a relação entre a concentração do analito e a resposta gerada pelo método. Com isso é obtida uma equação que relaciona ambos os fatores, geralmente na forma de $y = a + bx$, onde y é a resposta gerada pelo método, x é a concentração do analito, a é a intersecção da reta com o eixo y , quando x é igual a zero e b é a inclinação da reta (ANVISA, 2003; LEITE, 2008; YILMAZ *et al.*, 2018).

Além da equação da reta também é obtido o coeficiente de correlação linear (r) desta, o qual indicará se a reta representada pela equação é capaz de efetivamente descrever os dados empíricos e se estes apresentam um comportamento proporcional. Assim, o método poderá ser definido como linear, se o coeficiente de correlação linear foi igual ou maior que 0,99 (LEITE, 2008).

Vale ressaltar que o parâmetro “ b ” referente a inclinação da curva também representa uma medida de sensibilidade do método, ou seja, o quanto a resposta analítica varia em função de alterações na concentração da amostra, sendo que, uma variação maior nesta resposta com pequenas variações na concentração indicam uma maior sensibilidade do método e um valor maior do parâmetro “ b ” (ANVISA, 2003; LEITE, 2008).

A precisão é um dos parâmetros que define a confiabilidade do método. Esse parâmetro determina se a resposta analítica se repete conforme a análise é repetida em uma mesma amostra. Assim, a precisão pode ser avaliada tanto em termos de repetibilidade quanto de reprodutibilidade, ao avaliar a concordância dos dados em casos específicos. A repetibilidade se refere a similaridade dos dados obtidos durante a análise da mesma amostra em diferentes momentos de um curto intervalo de tempo (menos de 24 horas) e ao longo de grande intervalo de tempo (igual ou superior a 72 horas). Na realização deste parâmetro, a obtenção dos dados deve ser realizada pelo mesmo analista,

equipamento e condições de análise, de forma a garantir que qualquer variação observada nos dados seja referente ao método (ANVISA, 2003; LEITE, 2008; KRUIVE *et al.*, 2015).

De forma análoga, a reprodutibilidade determina a concordância dos dados obtidos em relação a uma mesma amostra quando analisada por equipamentos, analistas ou laboratórios diferentes. Em ambos os casos a obtenção dos dados deve preferencialmente ser obtida em heptaplicata de três níveis de concentração diferentes (baixo, médio e alto dentro da curva analítica), sendo os dados analisados em função do coeficiente de variação destas réplicas e pelo emprego do Teste *F* (LEITE, 2008; KRUIVE *et al.*, 2015).

A exatidão é o parâmetro relacionado a capacidade do método em gerar a resposta analítica considerada como correta ou verdadeira, se relacionando com a existência de erros sistemáticos na medida. Sua análise pode ser realizada de diferentes formas, dependendo da existência de amostras certificadas de controle de qualidade. Entre as formas de determinação estão: análise de amostras certificadas; comparação de dados obtidos pela adição de padrão na matriz em 3 níveis de concentração diferentes; e comparação dos dados obtidos de uma amostra específica quando avaliada por outro método que já tenha sido validado e cuja exatidão seja conhecida (LEITE, 2008; KRUIVE *et al.*, 2015)

A recuperação está relacionada a exatidão do método analítico. Assim, em uma de suas definições mais empregadas, a recuperação do método deve mostrar a proximidade do resultado obtido com o “valor real”. Como este valor real geralmente não é conhecido em amostras biológicas, este pode ser definido também por uma amostra de padrão de calibração, contendo uma concentração conhecida e que seja submetido ao método de análise. Este parâmetro pode indicar erros de origem sistemática como medidas volumétricas imprecisas, erros durante a extração ou presença de interferentes

na amostra, que possam ocasionar a perda do analito durante a análise ou um ganho no sinal analítico deste acima do previsto (LEITE, 2008).

A determinação da recuperação pode ser realizada pelo método de adição de padrão em matrizes sem o analito de interesse ou pela análise comparativa de amostras fortificadas e não fortificadas em três níveis de concentração diferente do analito, quando não for possível obter uma matriz branca (LEITE, 2008; KRUIVE *et al.*, 2015).

O limite de detecção consiste na menor concentração de analito a qual é possível ser detectada sem que ocorra sua quantificação, sendo assim relacionada a sensibilidade do método a concentrações ínfimas. Vale ressaltar que o limite de detecção além de variar em relação a matriz em estudo também é afetado pelo tipo de equipamentos utilizados. O limite de quantificação, por outro lado, corresponde a menor concentração do analito que o método consegue quantificar com um nível de precisão e exatidão aceitáveis (LEITE, 2008; KRUIVE *et al.*, 2015)

O parâmetro de robustez diz respeito a capacidade do método em fornecer uma resposta analítica confiável e constante mesmo quando submetido a pequenas alterações nas condições analíticas de análise, tais como troca do grau de pureza dos reagentes, alterações na temperatura de análise, alterações no pH da amostra, composição da fase móvel, comprimento de onda selecionado para detecção do analito, entre outros. Sendo assim este parâmetro estaria relacionado a sensibilidade e precisão da metodologia (LEITE, 2008; KRUIVE *et al.*, 2015).

A robustez pode ser avaliada em três níveis diferentes: fatores externos (ex.: umidade do ar e corrente elétrica), fatores internos (mudanças nos parâmetros de funcionamento do método) e efeito da matriz (mudanças na composição da matriz). Uma tendência recente na análise da robustez é sua determinação por meio de planejamentos fatoriais como o de composto central para avaliar o efeito de cada fator na resposta.

Apesar deste método ser capaz de gerar modelos matemáticos mais específicos para o estudo da robustez, grande parte das pesquisas ainda utilizam o método tradicional de análise, onde cada fator que será estudado é variado individualmente durante a análise em três níveis de concentração diferentes e os resultados são avaliados em função do coeficiente de variação e emprego dos testes Anova e Teste *F* (LEITE, 2008; KRUIVE *et al.*, 2015).

3.7.1. Validação de métodos em metabolômica global

Como o objetivo da metabolômica global consiste principalmente na identificação do maior número possível de metabólitos de forma simultânea, é comum que a maioria das substâncias discriminadas durante a análise não sejam identificadas. De fato, a metabolômica global não tem entre seus principais objetivos a identificação de todos os constituintes, o que seria inviável e geralmente é realizado de forma tardia (DUNN *et al.*, 2012, 2017; NAZ *et al.*, 2014; BEGOL *et al.*, 2018). Assim, um dos maiores desafios envolvendo a validação de métodos voltados para a metabolômica global está na ausência de amostras brancas e soluções padrão, durante a pesquisa.

Visto que muitos dos metabólitos evidenciados durante a análise não são identificados com exatidão, a execução dos procedimentos padrões de validação se torna impraticável (BIJTTEBIER *et al.*, 2016; BEGOL *et al.*, 2018). Ainda, a ausência na identificação de todos os metabólitos discriminados durante a análise, assim como a variabilidade dos mesmos dentro do universo amostral nesse tipo de estudo, torna o uso de substâncias padrão inviável (GIKA *et al.*, 2019). Mesmo o uso de pequenos conjuntos de padrões para realizar a validação não é possível, uma vez que, com a produção de um perfil químico holístico não há como garantir que o conjunto de padrões selecionados serão capazes de representar o comportamento de todos os analitos que podem ser

encontrados no universo amostral (DUNN *et al.*, 2012; BIJTTEBIER *et al.*, 2016; BEGOL *et al.*, 2018).

Com a inviabilidade de se utilizar soluções padrão, a quantificação dos metabólitos detectados somente pode ser realizada de forma relativa pela comparação entre os constituintes presentes na amostra. Consequentemente, a determinação da linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação deve ser realizada de uma forma distinta ao que é preconizado pelas agências regulamentadoras (BEGOL *et al.*, 2018; GIKA *et al.*, 2019).

A estratégia definida atualmente para validar métodos em metabolômica global, consiste no uso de amostras de controle de qualidade (QC, do inglês Quality Control). Este tipo de amostra na metabolômica global tem como objetivo representar simultaneamente todo o universo amostral, sendo assim necessário que ela possua todos os metabólitos diferentes presentes nas amostras estudadas. A produção da QC para metabolômica global pode ser realizada pelo próprio analista na forma de uma amostra composta, constituída por alíquotas de mesmo volume e concentração de todas as amostras do universo amostral. Deste modo, uma amostra representativa com concentrações médias de todos os constituintes presentes no universo amostral é produzida (DUNN *et al.*, 2012; BEGOL *et al.*, 2018). Vale ressaltar que o uso de todas as amostras do universo amostral na confecção da QC é recomendado apenas quando a pesquisa avaliará até 200 amostras. No caso de uma quantidade maior de amostras é recomendado a escolha aleatória de uma parcela das amostras para compor a QC (DUNN *et al.*, 2012; BEGOL *et al.*, 2018).

Assim, as QC são utilizadas para fornecer dados de precisão e performance analítica do método (DUNN *et al.*, 2012; GIBSON *et al.*, 2018; GIKA *et al.*, 2019). Entretanto, vale ressaltar que ainda não existem guias regulamentadoras para a validação

de métodos em metabolômica global (DUNN *et al.*, 2017; DE PAEPE *et al.*, 2018; GONZALEZ-RIANO *et al.*, 2018; ROMBOUTS *et al.*, 2019).

Na validação de métodos analíticos por CLAE-EM em metabolômica global, a análise das amostras de controle de qualidade também é utilizada para averiguar a aplicabilidade de marcadores previamente selecionados. Recomenda-se que as QC sejam analisadas exaustivamente, de forma a possibilitar a análise de seus resultados via coeficiente de variação do sinal analítico e porcentagem de detecção dos metabólitos selecionados. A porcentagem de variação se refere a quantidade de vezes que o metabólito é detectado em análises independentes da amostra de QC, visto que a supressão iônica pode ocorrer durante a análise por EM. Caso o coeficiente de variação do sinal seja maior que 30% ou sua porcentagem de detecção menor que 50%, este metabólito deve ser removido da análise por comprometer a reprodutibilidade (DUNN *et al.*, 2013; NAZ *et al.*, 2014; CANUTO *et al.*, 2018).

As amostras de QC são empregadas tanto no estudo de linearidade como de precisão do método. No caso da linearidade a amostra deve ser sequencialmente diluída, verificando o decréscimo do sinal analítico em função do fator de diluição. Apesar desta técnica representar melhor o comportamento da matriz quando comparada ao estudo de soluções padrão, ela apresenta uma menor confiabilidade quando empregada em métodos que utilizem o EM como detector. A perda de confiabilidade se deve a rápida redução na concentração dos analitos na amostra quando é necessário realizar sua diluição, visto a complexidade da amostra de controle de qualidade. Metabólitos de baixa concentração são rapidamente suprimidos quando a amostra de controle de qualidade é diluída. Como a concentração destes metabólitos se torna ínfima, a ionização deles é suprimida causando a não detecção (DUNN *et al.*, 2012, 2013; NAZ *et al.*, 2014). Ainda, visto a inviabilidade de uso de misturas de soluções padrão, ausência de amostras brancas em fitoquímica e a

baixa representatividade de amostras fortificadas com padrões para validação de métodos em metabolômica global, o uso das QC é o mais recomendado (DE VOS *et al.*, 2007; DUNN *et al.*, 2012; NAZ *et al.*, 2014).

Na determinação da precisão do método, a modificação existente na metodologia em comparação aos preconizado pelas agências regulamentadoras está no fato que se utiliza apenas a amostra de controle de qualidade sem diluições. Durante esta análise, apenas os metabólitos presentes nas QC com comportamento linear e porcentagem de detecção dentro do aceitável serão avaliados. Neste caso, o sinal analítico destes metabólitos deve apresentar um coeficiente de variação menor que 15%, quando forem substância majoritárias, e menor que 30%, quando se tratar de substâncias minoritárias (BEGOL *et al.*, 2018; ROMBOUTS *et al.*, 2019).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em 4 etapas (Figura 11), que compreenderam uma análise quimiossistemática da literatura disponível do gênero *Ocotea*; o desenvolvimento e otimização do método de extração; estudo preliminar do perfil químico de espécies de *Ocotea*; e a validação da metodologia. Deste modo, foi possível realizar o estudo quimiossistemático das folhas das espécies de *Ocotea* avaliadas.

As folhas foram escolhidas como matriz de análise nesta pesquisa visto a ampla aplicação deste órgão na etnobotânica, assim como nas avaliações fitoquímicas da família Lauraceae (MARQUES, 2001; SALLEH; AHMAD, 2016; GONTIJO *et al.*, 2017; SILVA TELES *et al.*, 2019). Ainda, diversos metabólitos bioativos e de interesse como marcadores químicos da família Lauraceae são encontrados nas folhas (SALLEH; AHMAD, 2016, 2017; GONTIJO *et al.*, 2017; SILVA TELES *et al.*, 2019).

Para a execução desta pesquisa, também foram selecionadas apenas as frações de média polaridade. Essa escolha foi baseada na literatura existente acerca da *Ocotea* e da família Lauraceae. Os metabólitos de maior destaque no gênero, mencionados na seção 3.2, são prontamente extraídos em solventes de média polaridade. Adicionalmente, os estudos existentes atualmente indicam essa fração como detentora de vários metabólitos considerados relevantes na quimiossistemática da Lauraceae (GOTTLIEB; KUBITZKI, 1981; BARRERA *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2017; GIL ARCHILA; CUCA SUÁREZ, 2018; LIU *et al.*, 2018)

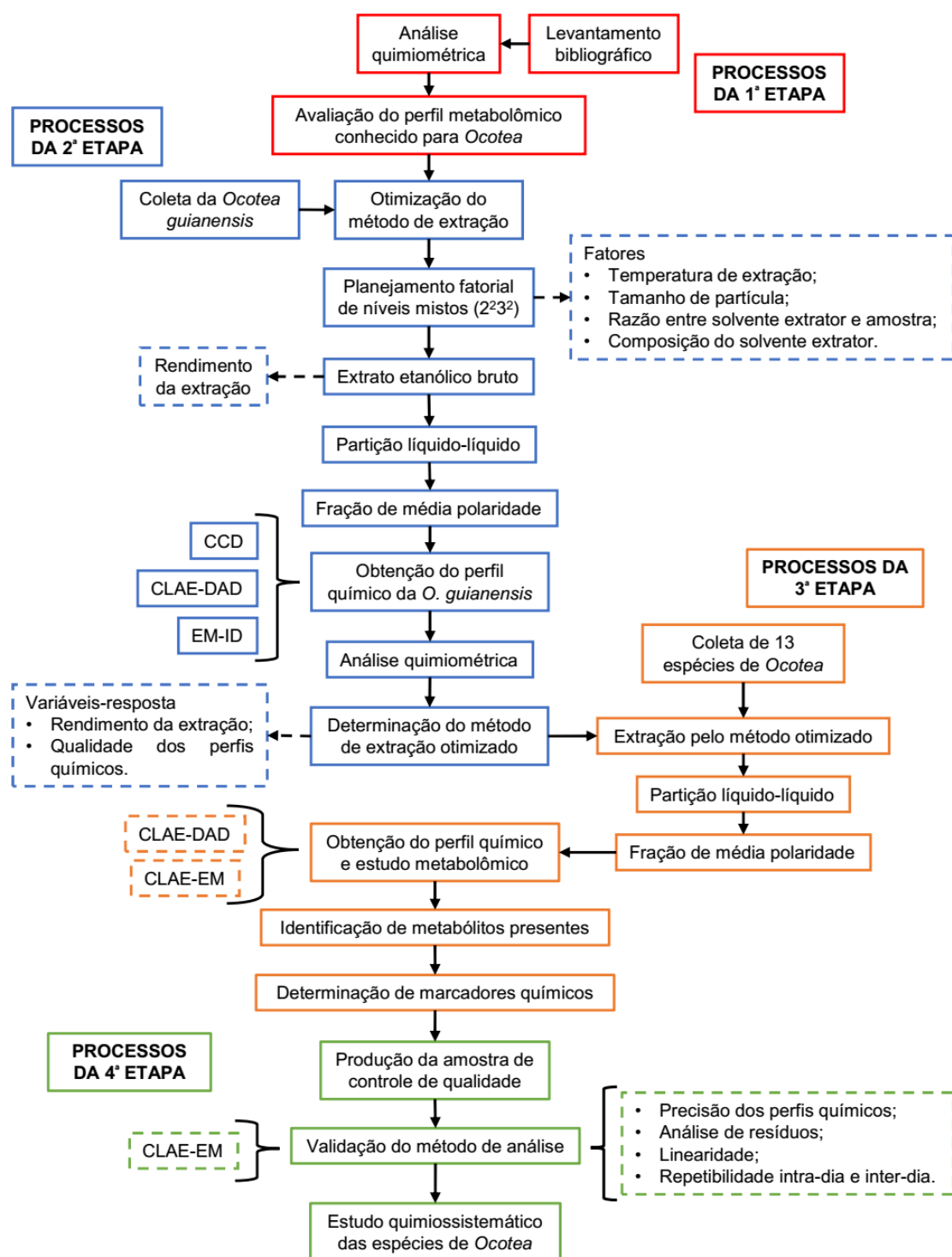


Figura 11. Fluxograma da pesquisa realizada. CCD = cromatografia em camada delgada; CLAE-DAD = cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos; EM-ID = espectrometria de massas por infusão direta; CLAE-EM = cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.

4.1. Avaliação do perfil metabolômico conhecido do gênero *Ocotea*

O conhecimento prévio da composição química do gênero é essencial para o desenvolvimento do método de estudo quimiosistemático. Deste modo, foi realizado um levantamento bibliográfico extensivo da composição química de espécies pertencentes ao gênero. Esse levantamento foi analisado por meio da técnica de Agrupamento Hierárquico em Componentes Principais (HCPC, do inglês Hierarchical Clustering on Principal Components) com auxílio do software RStudio 1.2 e o pacote FactorMineR (LÊ; HUSSON, 2008). Nesta técnica o número de ocorrência de classes estruturais de alcaloides e lignoides foi utilizado para caracterizar as espécies descritas.

4.2. Desenvolvimento e otimização do método de extração

Para o desenvolvimento e otimização do método de extração foram coletadas folhas de um espécime de *Ocotea guianensis*, localizada Área de Proteção Ambiental da Universidade Federal do Amazonas, campus Norte (S03°05'395'', W059°57'958''). Uma exsicata do espécime foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas (HUAM) sob número de depósito 11417.

A coleta foi realizada em diferentes alturas da copa do espécime, sendo as folhas limpas com papel toalha úmido e secas a temperatura ambiente. Todas as folhas coletadas foram combinadas para formar uma amostra composta. As folhas secas foram divididas em três porções iguais antes de serem submetidas a maceração em moinho de facas tipo Willey (SP-32, SPLabor). Cada porção foi triturada em um tamanho de partícula distinto (0,595, 0,841 e 2,000 mm) e posteriormente armazenadas sob refrigeração (-4°C) até o momento da extração.

Para a otimização do método de extração foi empregado um planejamento fatorial completo de níveis mistos 2^23^2 (MONTGOMERY, 2001), para avaliar o efeito da temperatura do banho ultrassônico, composição do solvente extrator em função da concentração de etanol, tamanho de partícula do material botânico e proporção entre a quantidade de amostra e solvente extrator na produção de um perfil químico viável para análises de metabolômica global (**Quadro 2**).

Quadro 2. Fatores e níveis avaliados durante o planejamento fatorial

Fatores		Níveis		
		Código para identificação das amostras		
		A (-1)	B (0)	C (1)
1	Temperatura de extração (°C)	40	50	60
2	Tamanho de partícula da amostra (mm)	0,595	0,841	2,000
3	Proporção amostra: solvente extrator (g:mL)	1:8	-	1:12
4	% de álcool etílico no solvente extrator	70	-	99,8

Todas as amostras foram codificadas de acordo com o número de identificação dos fatores seguido pela letra (A, B ou C, conforme apresentado no Quadro 2) que representa o nível utilizado em cada fator na produção da amostra. Deste modo, cada amostra produzida durante a otimização do método foi identificada por uma sequência de 4 números seguidos por letras.

A escolha dos fatores e níveis utilizados na otimização do método foi realizada com base no levantamento bibliográfico sobre a fitoquímica da Lauraceae. Entretanto, vale ressaltar que apenas o solvente extrator e a temperatura de extração são parâmetros comumente detalhados nas pesquisas fitoquímicas, e desta forma foram escolhidos com base na quantidade de vezes com que são utilizados neste tipo de estudo. Os parâmetros de tamanho de partícula da amostra e razão entre o solvente extrator e a amostra geralmente não são discriminados em artigos tratando da Lauraceae (ANDREI; BRAZ-

FILHO; GOTTLIEB, 1988; CUCA; LEON; COY, 2009; CAMARGO *et al.*, 2013; ALBARRACIN *et al.*, 2017), e por este motivo, foram selecionados com base na experiência com experimentos anteriores do Grupo de Pesquisa Q-Bioma.

Todas as extrações foram realizadas com auxílio de ondas ultrassônicas empregando equipamento de banho ultrassônico (*Unique Ultrasonic Cleaner*) na frequência de 40 kHz. Todos os procedimentos de extração foram realizados em triplicata utilizando 2,00 g de material botânico com exposição ao banho ultrassônico por 30 minutos. Após realizadas as extrações, o solvente extrator foi removido através de destilação a vácuo para a obtenção do extrato etanólicos bruto (EEB).

As variáveis resposta utilizadas para avaliação da otimização do método foram o rendimento da extração e a qualidade dos perfis químicos obtidos por métodos cromatográficos e espectroscópicos, conforme metodologia descrita por Klein-Júnior *et al.* 2016. O rendimento das extrações foi calculado através de método gravimétrico empregando a massa de material vegetal utilizada durante a extração e a massa de EEB obtido. O resultado dos rendimentos foi utilizado para obter o efeito principal (do inglês, *main effects*) dos fatores na eficácia do método, visto que idealmente, este deve consumir o mínimo de material botânico necessário, de forma a evitar impactos ambientais.

O cálculo dos efeitos principais dos fatores no rendimento da extração foi realizado através do método de confundimento dos fatores de 3 níveis em fatores de dois níveis (Tabela 1) seguindo a metodologia de MONTGOMERY (2001). Após a transformação das variáveis, o cálculo do efeito pode ser realizado como em um planejamento fatorial completo simétrico do tipo 2^6 (6 fatores e 2 níveis) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; MONTGOMERY, 2001).

Tabela 1. Transformação dos fatores de 3 níveis em fatores de 2 níveis

Novos fatores de dois níveis		Fator original de 3 níveis
X1	X2	Fator 1
-	-	nível A
+	-	nível B
-	+	nível B
+	+	nível C
X3	X4	Fator 2
-	-	nível A
+	-	nível B
-	+	nível B
+	+	nível C

O efeito dos fatores na qualidade do perfil cromatográfico foi avaliado em função das modificações na resolução cromatográfica, número total de picos detectados, área total e individual dos picos no cromatograma. O efeito dos fatores na qualidade do perfil espectrométrico foi avaliado em função da quantidade total de sinais m/z detectados (com intensidade relativa superior a 5%) e a intensidade relativa de cada sinal em função do pico base.

Os dados obtidos por cromatografia e espectrometria foram analisados via teste Anova e técnicas de HCA e PCA, para determinar a combinação de condições experimentais capazes de gerar a melhor resposta em função das variáveis citadas.

4.2.1. Preparo das amostras para obtenção dos perfis químicos

Para a obtenção dos perfis químicos os EEBs foram inicialmente submetidos a partição líquido-líquido, sendo individualmente pesados (0,20 g) e solubilizados em metanol:água destilada 4:1 V:V (4 mL). A partição foi realizada com solventes em ordem crescente de polaridade, empregando hexano, acetato de etila e metanol, para obtenção das frações de baixa, média e alta polaridade, respectivamente. Todas as frações foram

secas utilizando destilação à vácuo e armazenadas sob refrigeração (-4°C) até o momento de análise. A obtenção dos perfis químicos foi realizada empregando apenas a fração de média polaridade.

4.2.2. Obtenção do perfil químico por métodos cromatográficos

A fração de média polaridade foi analisada pelas técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise por CCD foi realizada em fase normal empregando como fase estacionária sílica gel (Merck Alugram® Xtra SIL G/UV254). A fase móvel foi adaptada a partir de eluentes descritos na literatura, objetivando a melhor resolução cromatográfica distinção de maior quantitativo de manchas.(WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008; DELGADO; SUÁREZ, 2016) A fase móvel selecionada consistia em uma mistura de clorofórmio: acetato de etila: metanol: ácido fórmico (5:3:2:0,5). A visualização da cromatoplaça foi realizada pelo uso dos seguintes reveladores: luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, vanilina sulfúrica, reativo NP/PEG (solução de difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol), reativo de Dragendorff e cloreto férrico 5% massa: volume. Cada mancha observada durante as análises de CCD foram tabeladas de acordo com seu fator de retenção (R_f) para posterior tratamento estatístico dos dados.

Para análise por CLAE, as amostras foram diluídas a 1 mg mL⁻¹ em metanol e filtradas em membrana de 0,45 µm de PTFE w/GMF (WHATMAN). A obtenção dos perfis químicos por CLAE foi realizada em sistema de fase reversa, utilizando equipamento analítico Dionex - Ultimate 3000 (Thermo Scientific) equipado com coluna Shim-pack ODS(H) Shimadzu® 5 µm C18 (4,6 mm x 25 cm, 100 Å), amostrador automático e detector de arranjo de diodos (DAD). A coluna e o sistema de injeção foram mantidos a 40°C sendo empregado um volume de injeção de 20 µL. A eluição foi

realizada em modo gradiente, com vazão de 1,0 mL min⁻¹, utilizando solução de ácido fórmico 0,5% (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B). O gradiente de eluição variou de 5 a 70% do solvente B, com uma taxa de variação de 2% min⁻¹ do solvente B. O DAD realizou o registro de absorbância na faixa de comprimentos de onda de 200 a 700 nm, dentre as quais o comprimento de onda 300 nm foi selecionado para a avaliação da qualidade do perfil químico, visto que neste comprimento de onda mais de 70% dos picos cromatográficos apresentaram resolução igual ou superior a 1,5.

Os cromatogramas obtidos foram integrados utilizando o programa Chromeleon versão 7 com algoritmo Cobra[®] (Thermo Fisher Scientific). Através deste pré-tratamento foram obtidos a resolução cromatográfica, área de pico total e individual, sendo estes dados utilizados para avaliação da qualidade do perfil químico.

4.2.3. Obtenção do perfil químico por espectrometria de massas

Para esta etapa as frações de média polaridade foram preparadas na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ em metanol. A análise por espectrometria de massas (EM) foi realizada por infusão direta da amostra em um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access (Thermo Scientific), operando com fonte de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês Electrospray Ionization) em modo positivo e negativo. Cada amostra foi analisada em modo *full scan*, sendo o espectro obtido resultado da soma de 10 análises individuais na faixa de 100 a 1000 razão massa: carga (*m/z*). Os parâmetros operacionais utilizados nesta análise podem ser observados no **Quadro 3**.

Quadro 3. Parâmetros operacionais empregados na análise por EM-ID

Parâmetro operacional	Valor definido
Voltagem do <i>spray</i>	3,0 kV (modo negativo) 4,5 kV (modo positivo)

Parâmetro operacional	Valor definido
Vazão do gás de bainha	35 arb
Vazão do gás secante	0,0 arb
Vazão do gás auxiliar	15 arb
Temperatura do capilar do <i>electrospray</i>	350°C
Temperatura da fonte de ionização	250°C
Energia de colisão	30 eV
Fluxo do gás nebulizador (N ₂)	2,5 L min ⁻¹

Para análise quimiométrica dos espectros cada sinal m/z foi considerado como uma variável discreta, sendo empregada suas intensidades relativas como a resposta quantitativa das variáveis. Adicionalmente, o número total de sinais discriminados também foi empregado na avaliação da qualidade do perfil químico.

4.2.4. Tratamento quimiométrico

O tratamento estatístico foi realizado por meio dos softwares OriginPro 2017 e Microsoft Office Excel 365. Foram realizadas as análises: teste Anova *one way*; análise hierárquica de agrupamentos (HCA) utilizando o método de Ward com distância euclidiana e nível de confiança em 95%; e análise de componentes principais (PCA) com nível de confiança em 95%. Vale ressaltar que para a análise dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, a absorbância (mAU) de cada pico foi utilizada como variável resposta, sendo cada um destes picos considerados variáveis discretas. Para a análise multivariada dos dados obtidos por EM-ID, os sinais m/z foram normalizados por norma suprema em função do sinal m/z de maior intensidade (considerado como 100%) para converter os valores de intensidade absoluta de cada sinal em abundância relativa.

4.3. Obtenção do perfil químico de espécies de *Ocotea*

4.3.1. Coleta e extração do material botânico

A obtenção de material botânico de diferentes espécies de *Ocotea* foi realizada através de parceria estabelecida com o Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais (PDBFF), desenvolvido pela parceria entre o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e o Instituto Smithsonian. O PDBFF gerencia 1.000 km² de área de proteção ambiental no Amazonas, composta por 11 fragmentos florestais de floresta primária. A autorização para realização de coletas nesta área está no Apêndice 2.

A coleta foi realizada no fragmento florestal denominado “Sítio amostral Km 37” (marcado com quadro vermelho na Figura 12) da Reserva Florestal ZF-3, localizada no km 62 da BR-174. Nesta localidade foram coletadas folhas das espécies *O. boisseriana*, *O. canaliculata*, *O. cinerea*, *O. cujumarum*, *O. delicata*, *O. douradenses*, *O. matogrossensis*, *O. minor*, *O. nigrescens*, *O. percurrentis*, *O. rhynchophylla*, *O. scrabrella* e *O. splendens* (Quadro 4). Cada espécime coletado teve uma exsicata depositada no Herbário do Instituto Federal De Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (EAFM).

As folhas coletadas foram limpas com papel toalha úmido e secas em temperatura ambiente, sendo posteriormente maceradas de acordo com os resultados obtidos durante a otimização do método (Seção 4.1). O material botânico assim preparado foi armazenado sob refrigeração (-4°C) até o momento de análise. A extração das amostras também foi realizada de acordo com os resultados obtidos com os experimentos descritos na Seção 4.1, sendo assim empregado apenas as condições experimentais de extração otimizadas. Após obtenção dos EEBs, cada amostra foi submetida a partição líquido-líquido, conforme descrito na Seção 4.2.1, para a obtenção da fração de média polaridade em acetato de etila.

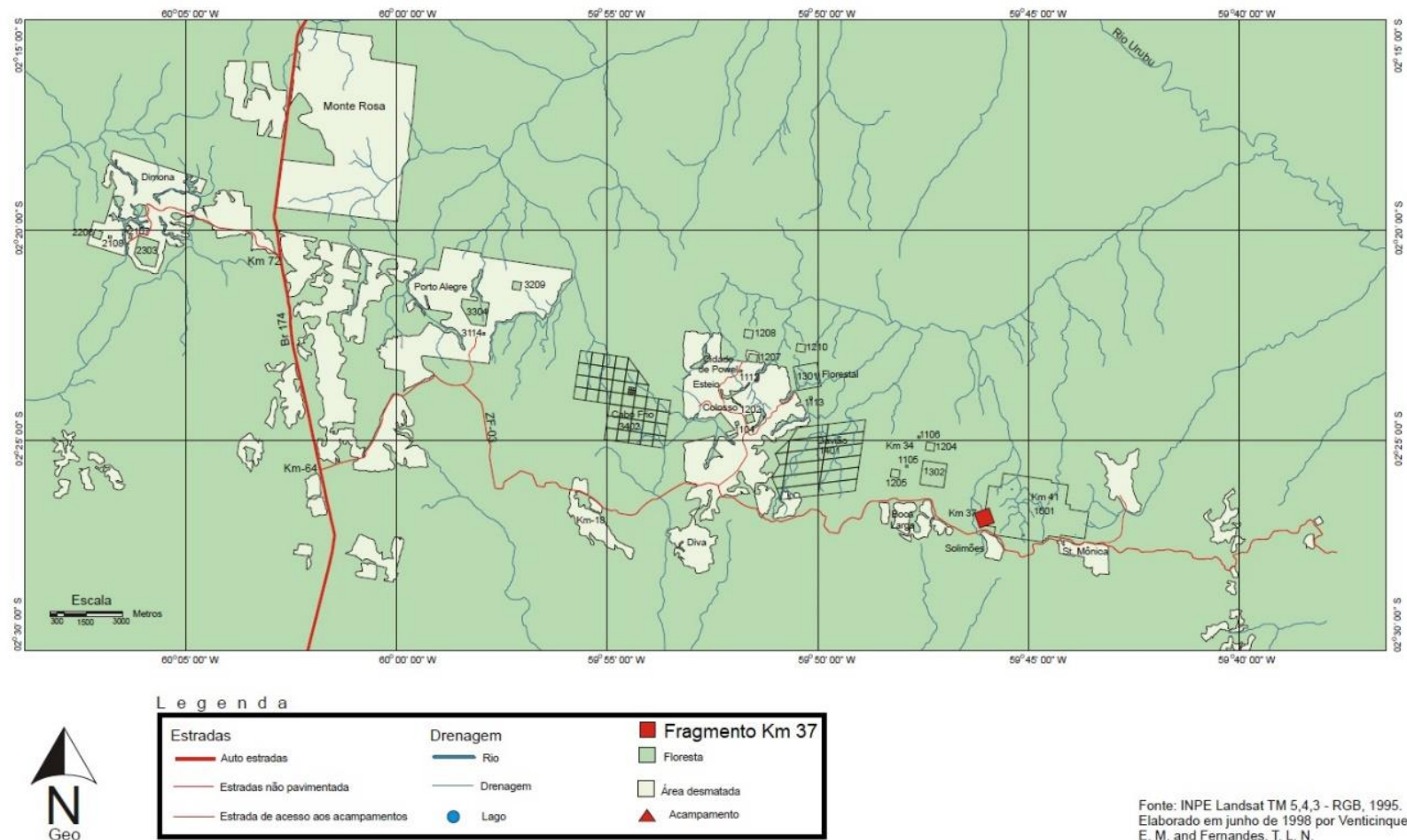


Figura 12. Mapa do Área de Proteção Ambiental do PDBFF

Quadro 4. Dados dos espécimes de *Ocotea* coletados no Sítio Amostral Km 37

Espécie	Identificação do espécime	Localização do espécime		Data de coleta	Número de depósito no EAFM
		S	O		
<i>O. boisseriana</i>	93045	02°26.510'	059°47.216'	06/06/2017	16661
<i>O. boisseriana</i>	84583	02°26.452'	059°47.246'	07/06/2017	16671
<i>O. boisseriana</i>	84270	02°26.463'	059°47.249'	07/06/2017	16673
<i>O. boisseriana</i>	75198	02°26.467'	059°47.247'	07/06/2017	16674
<i>O. canaliculata</i>	64429	02°26.456'	059°47.265'	08/06/2017	16676
<i>O. canaliculata</i>	52994	02°26.499'	059°47.642'	08/06/2017	16677
<i>O. canaliculata</i>	63170	02°26.498'	059°47.258'	08/06/2017	16682
<i>O. cinerea</i>	41131	02°26.577'	059°47.256'	24/05/2017	16644
<i>O. cinerea</i>	83165	02°26.497'	059°47.241'	06/06/2017	16657
<i>O. cinerea</i>	123078	02°26.490'	059°47.204'	06/06/2017	16664
<i>O. cujumary</i>	30009	02°26.634'	059°47.260'	24/05/2017	16639
<i>O. cujumary</i>	62469	02°26.555'	059°47.248'	25/05/2017	16647
<i>O. cujumary</i>	62843	02°26.519'	059°47.250'	25/05/2017	16649
<i>O. cujumary</i>	62987	02°26.502'	059°47.266'	25/05/2017	16652
<i>O. delicata</i>	50573	02°26.613'	059°47.245'	24/05/2017	16640
<i>O. delicata</i>	40608	02°26.616'	059°47.249'	24/05/2017	16642
<i>O. delicata</i>	74168	02°26.506'	059°47.246'	08/06/2017	16680
<i>O. douradensis</i>	74438	02°26.493'	059°47.243'	06/06/2017	16659
<i>O. douradensis</i>	60897	02°26.591'	059°47.244'	08/06/2017	16678
<i>O. douradensis</i>	60762	02°26.600'	059°47.232'	08/06/2017	16679
<i>O. matogrossensis</i>	50312	02°26.621'	059°47.245'	24/05/2017	16641
<i>O. matogrossensis</i>	122528	02°26.506'	059°47.189'	06/06/2017	16663
<i>O. matogrossensis</i>	143653	02°26.458'	059°47.174'	07/06/2017	16669
<i>O. minor</i>	83521	02°26.495'	059°47.231'	06/06/2017	16660
<i>O. minor</i>	94251	02°26.446'	059°47.238'	07/06/2017	16670
<i>O. minor</i>	84680	02°26.452'	059°47.174'	07/06/2017	16672
<i>O. minor</i>	74945	02°26.473'	059°47.246'	07/06/2017	16675
<i>O. nigrescens</i>	40384	02°26.626'	059°47.253'	24/05/2017	16643
<i>O. nigrescens</i>	62608	02°26.541'	059°47.238'	25/05/2017	16648
<i>O. nigrescens</i>	62624	02°26.516'	059°47.257'	25/05/2017	16651
<i>O. nigrescens</i>	52587	02°26.514'	059°47.261'	25/05/2017	16653
<i>O. percurrans</i>	83044	02°26.519'	059°47.232'	25/05/2017	16655
<i>O. percurrans</i>	83018	02°26.518'	059°47.234'	06/06/2017	16656
<i>O. percurrans</i>	83216	02°26.504'	059°47.224'	06/06/2017	16658
<i>O. rhynchophylla</i>	133545	02°26.463'	059°47.191'	07/06/2017	16667
<i>O. rhynchophylla</i>	143511	02°26.457'	059°47.176'	07/06/2017	16668
<i>O. scrabrella</i>	113066	02°26.520'	059°47.196'	07/06/2017	16665
<i>O. scrabrella</i>	75733	02°26.440'	059°47.262'	08/06/2017	16681
<i>O. scrabrella</i>	64566	02°26.449'	059°47.272'	08/06/2017	16683
<i>O. splendens</i>	62846	02°26.524'	059°47.256'	25/05/2017	16650

Espécie	Identificação do espécime	Localização do espécime		Data de coleta	Número de depósito no EAFM
		S	O		
<i>O. splendens</i>	103056	02°26.496'	059°47.214'	06/06/2017	16662
<i>O. splendens</i>	113889	02°26.490'	059°47.197'	07/06/2017	16666

4.3.2. Estudo quimiosistemático do gênero *Ocotea*

Para o estudo do perfil químico das diferentes espécies de *Ocotea* coletadas (13 coletadas na reserva florestal do PDBFF – Quadro 4 - e a *O. guianensis*, coletada na UFAM), as frações de média polaridade obtidas foram submetidas as análises de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM). As análises em CLAE-DAD foram realizadas conforme descrito na seção 4.2.2. A amostra foi preparada para estas análises também de acordo com a seção 4.2.1.

A análise das amostras por CLAE-EM foi realizada no *Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico* (LADETEC) na Universidade Federal do Rio de Janeiro empregando em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo Dionex Ultimate 3000 UHPLC acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive (Thermo Scientific, USA), com detector de massas híbrido do tipo Quadrupolo-Orbitrap. O volume de injeção das amostras foi de 8,0 µL em uma coluna cromatográfica Synchronis C18 (2,1 x 50 mm, 100 Å) mantida na temperatura de 40 °C. A análise foi realizada em modo gradiente com fase móvel composta por uma solução de ácido fórmico 0,1%: formiato de amônio 5 mM (Solvente A) e metanol (solvente B), na vazão de 0,400 mL min⁻¹. O gradiente foi realizado de 0 a 100% do solvente B com tempo total de corrida cromatográfica de 11 minutos.

O espectrômetro de massas foi utilizado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) nos modos positivo e negativo e faixa de full scan de *m/z* 100 a 900. O

espectrômetro de massas operou em modo de aquisição dependente de dados para realizar a análise de fragmentação (MS^2) dos sinais de maior intensidade. Os demais parâmetros operacionais do espectrômetro de massas podem ser observados no Quadro 5. Vale ressaltar que cada amostra foi analisada em triplicata.

Quadro 5. Parâmetros operacionais empregados nas análises realizadas no espectrometro de massas modelo Q-Exactive

Parâmetro operacional	Valor definido
Voltagem do <i>spray</i>	2,9 kV (modo negativo) 3,9 kV (modo positivo)
Fluxo do gás de bainha	60 arb
Fluxo do gás secante	0,0 arb
Fluxo do gás auxiliar	20 arb
Temperatura do capilar do <i>electrospray</i>	380°C
Temperatura da fonte de ionização	250°C
Energia de colisão	30 eV
Fluxo do gás nebulizador (N_2)	2,5 L min ⁻¹
Resolução	70.000 FWHM
Erro	5,0 ppm
Janela de isolamento	m/z 4,0
Algoritmo de aquisição dos dados de MS^2 por DDA	<i>TopN</i>
Configuração de busca do algoritmo <i>TopN</i>	5 precursores para isolar um metabólito
Calibração do equipamento para obtenção de medidas precisas via software XCalibur 3.0.1	Algoritmo <i>Lock mass</i> configurado em <i>best</i> para fragmentos de polidimetilciclosiloxano

4.3.3. Tratamento dos dados

Os perfis cromatográficos obtidos pela técnica de CLAE-EM foram utilizados processados através do software MZmine versão 2.37 com a correção 17.7. Neste procedimento foi realizado a correção da linha de base; detecção dos sinais m/z de metabólitos com tempos de retenção distintos; redução do ruído (pela técnica de *smoothing*); deconvolução dos sinais utilizando o algoritmo ADAP (MYERS *et al.*,

2017); e alinhamento dos sinais. Os parâmetros aplicados no software MZmine são evidenciados no **Quadro 6**.

Quadro 6. Programação utilizada no software MZmine para a extração de dados dos cromatogramas obtidos pela técnica de CLAE-EM.

Correção da linha de base	
Parâmetro do software	Valor
Método de correção	<i>Assymetric baseline corrector</i>
<i>Smoothing</i>	800000
<i>Asymetry</i>	0,005
Deteccção de sinais m/z	
Método de deteccção	<i>Wavelet transform</i>
<i>Noise level</i>	$1,0 \times 10^3$
<i>Scale level</i>	50
<i>Wavelet window size (%)</i>	10,0
Redução de ruído	
<i>Filter width</i>	5
Deconvolução	
<i>m/z center calculation</i>	média
<i>S/N threshold</i>	10
S/N estimator	<i>Intensity window SN</i>
<i>Min. feature height</i>	10
<i>Coeficiente/area threshold</i>	110
<i>Peak durantion range</i>	0,00 – 10,00
<i>RT wavelet range</i>	0,00 – 0,10
Alinhamento	
Diferença máxima entre os sinais m/z	5,0 ppm
Peso do sinal m/z	20
Diferença máxima entre os tempos de retenção	20%
Peso do tempo de retenção	10

Após a deteccção dos metabólitos presentes foi produzido um perfil químico médio para cada amostra (Quadro 4) através de suas triplicatas técnicas. O perfil químico médio foi então avaliado pelas técnicas de HCA e PCA, empregando o software OriginPro 2017, conforme mencionado na seção 4.2.4.

Para realizar a identificação dos metabólitos presentes nas amostras foi realizada a integração dos perfis cromatográficos obtidos pela técnica de CLAE-EM utilizando o software XCalibur 3.0.1 e o algoritmo INCOS. Os parâmetros de integração podem ser observados no **Quadro 7**. Com base nos sinais cromatográficos integrados, os dados de

fragmentação (MS^2) foram listados e comparados com os perfis de fragmentação dos metabólitos já descritos no gênero *Ocotea* e para família Lauraceae. Adicionalmente, os dados de fragmentação dos sinais m/z detectados nas amostras analisadas também foram comparados com as informações contidas em bancos de dados de domínio público, como o *MassBank of North America* (MoNA - <http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>), o *The Human Metabolome Database* (HMDB - <http://www.hmdb.ca/>) e o *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Quadro 7. Parâmetros utilizados na integração dos dados cromatográficos obtidos por CLAE-EM para identificação dos metabólitos presentes

Parâmetros de integração	Valor utilizado
<i>Baseline window</i>	10
<i>Area noise factor</i>	3
<i>Peak noise factor</i>	3
<i>Noise region</i>	1,00 a 2,00 minutos
<i>Minimum peak width</i>	1
<i>Multiplet resolution</i>	2
<i>Area tail extension</i>	5

4.4. Validação do método analítico

O procedimento de validação foi realizado utilizando a metodologia recomendada por Begol *et al.* (2018) para metabolômica global em métodos envolvendo a técnica de CLAE-EM, a qual tem sido aplicada por outros pesquisadores na validação de estudos metabolômicos em fluidos biológicos. (BEGOL *et al.*, 2018; DE PAEPE *et al.*, 2018; ROMBOUTS *et al.*, 2019). Assim, foi realizada a avaliação da qualidade do registro de dados, determinação da linearidade, reprodutibilidade inter-dia e intra-dia.

Para todos os experimentos foi preparada uma amostra de controle de qualidade (QC). Essa amostra foi produzida a partir da mistura de alíquotas de 100 μ L das frações de média polaridade de todas as 14 espécies e 45 amostras (amostras do Quadro 4 e da

Ocotea guianensis mencionada na seção 4.1) preparadas na concentração de 1 mg mL⁻¹ em metanol grau HPLC. Após a reunião das alíquotas, a QC foi homogeneizada em banho ultrassônico por 10 segundos e posteriormente filtrada em membrana de 0,45 µm de PTFE w/GMF (WHATMAN).

A avaliação da qualidade do registro de dados diz respeito a performance analítica do método instrumental, sendo avaliada para garantir que o método apresente dados fidedignos. Essa análise é utilizada para evidenciar a precisão e exatidão associada a aquisição de dados visto a ausência de soluções padrão. Nesta análise, deve se garantir que os metabólitos são registrados com o mínimo de variação em sua resposta analítica. Para definir a qualidade do registro de dados, a amostra de QC foi analisada repetidamente em triplicata após a análise de 5 amostras individuais até que as 45 amostras de *Ocotea* fossem analisadas. Deste modo foi utilizado a ordem de injeção discriminada no **Quadro 8**.

Quadro 8. Ordem de injeção das amostras durante a validação do método por CLAE-EM.

Ordem de injeção	Tipo de amostra	Ordem de injeção	Tipo de amostra	Ordem de injeção	Tipo de amostra	Ordem de injeção	Tipo de amostra	Ordem de injeção	Tipo de amostra	Ordem de injeção	Tipo de amostra
1	QC	22	QC	43	AO	64	QC	85	AO	106	QC
2	QC	23	QC	44	AO	65	QC	86	AO	107	AO
3	QC	24	QC	45	AO	66	QC	87	AO	108	AO
4	QC 20x	25	QC	46	AO	67	AO	88	QC	109	AO
5	QC 20x	26	QC	47	AO	68	AO	89	QC	110	AO
6	QC 20x	27	QC	48	QC	69	AO	90	QC	111	AO
7	QC 17,5x	28	QC	49	QC	70	AO	91	QC	112	QC
8	QC 17,5x	29	QC	50	QC	71	AO	92	QC	113	QC
9	QC 17,5x	30	QC	51	AO	72	QC	93	QC	114	QC
10	QC 15x	31	QC	52	AO	73	QC	94	QC	115	AO
11	QC 15x	32	BR	53	AO	74	QC	95	QC	116	AO
12	QC 15x	33	BR	54	AO	75	AO	96	QC	117	AO
13	QC 10x	34	BR	55	AO	76	AO	97	QC	118	AO
14	QC 10x	35	AO	56	QC	77	AO	98	QC	119	AO
15	QC 10x	36	AO	57	QC	78	AO	99	AO	120	QC
16	QC 5x	37	AO	58	QC	79	AO	100	AO	121	QC
17	QC 5x	38	AO	59	QC	80	QC	101	AO	122	QC
18	QC 5x	39	AO	60	QC	81	QC	102	AO		
19	QC 2x	40	QC	61	QC	82	QC	103	AO	128	QC
20	QC 2x	41	QC	62	QC	83	AO	104	QC	129	QC
21	QC 2x	42	QC	63	QC	84	AO	105	QC	130	QC

QC = amostra de controle de qualidade; QC 20x = amostra de controle de qualidade diluída em fator de 20 vezes; QC 17,5x = amostra de controle de qualidade diluída em fator de 17,5 vezes; QC 15x = amostra de controle de qualidade diluída em fator de 15 vezes; QC 10x = amostra de controle de qualidade diluída em fator de 10 vezes; QC 5x = amostra de controle de qualidade diluída em fator de 5 vezes; QC 2x = amostra de controle de qualidade diluída em fator de 2 vezes; BR = branco da injeção apenas com o solvente de diluição; AO = amostra de *Ocotea*.

A verificação da qualidade do registro foi realizada pela soma total da intensidade do sinal nos cromatogramas da corrente iônica total de todas as amostras de QC não diluídas individualmente. Esses dados foram avaliados em função do coeficiente de variação e dispersão em função da ordem de injeção (Quadro 8). Em seguida, os metabólitos detectados durante a análise de CLAE-EM nas amostras de QC foram extraídos com o auxílio do software MZmine empregando a mesma metodologia utilizada na seção 4.3.3

A tolerância de 20% de variação aplicada no tratamento dos dados (**Quadro 6**) foi selecionada para garantir que apenas dados reprodutíveis sejam extraídos dos cromatogramas (NAZ *et al.*, 2014; BEGOL *et al.*, 2018). Após o tratamento dos dados, as amostras de QC e as amostras de todas as espécies de *Ocotea* estudadas foram submetidas a análise de PCA, empregando como variável-resposta a área dos sinais detectados, para averiguar a variabilidade das amostras de QC (DUNN *et al.*, 2012).

A linearidade foi estudada a partir da diluição sequenciada da QC empregando os seguintes fatores de diluição: 0; 2; 5; 10; 15; 17,5; e 20 vezes. Cada diluição foi analisada em triplicata (Quadro 8). Para extração dos dados referentes aos metabólitos que constituem as amostras de QC foi realizado o tratamento de dados descrito no Quadro 8, sendo que após as etapas descritas nesse, a lista de metabólitos gerada foi filtrada para eliminar dados que não tenham apresentado reprodutibilidade entre as réplicas de um mesmo ponto de eluição. Deste modo apenas sinais detectados simultaneamente nas 3 réplicas de pelo menos um dos pontos de eluição foram avaliadas para determinação da linearidade via cálculo do coeficiente de linearidade (r^2) de cada sinal.

Para determinação da reprodutibilidade as amostras de QC foram analisadas em decuplicata de forma consecutiva. No caso da repetibilidade intra-dia, as análises foram

realizadas no mesmo dia, enquanto para o ensaio inter-dia as análises foram realizadas em 3 dias distintos. Para que o método seja considerado reprodutível, estes metabólitos devem ser detectáveis em no mínimo 70% das análises de amostras de QC e apresentar coeficientes de variação entre as réplicas menor que 15% quando corresponderem a constituintes majoritários ou menor que 30% quando corresponderem a constituintes minoritários (BEGOL *et al.*, 2018; ROMBOOTS *et al.*, 2019).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa podem ser segmentados nas 4 etapas descritas na seção 4. As etapas de análise bibliográfica, desenvolvimento e otimização do método de extração foram realizadas na Universidade Federal do Amazonas e tinham como objetivo estabelecer o perfil metabolômico conhecido do gênero para auxiliar a interpretação de dados posteriores; e determinar o método de extração capaz de gerar o perfil químico de melhor qualidade para a metabolômica global, considerando a quimiodiversidade dos extratos (NAZ *et al.*, 2014; KLEIN-JÚNIOR *et al.*, 2016; BEGOL *et al.*, 2018).

Na etapa 3, apenas o método de extração otimizado foi aplicado para obter o perfil metabolômico global das frações de média polaridade de 13 espécies distintas de *Ocotea*. Esta etapa teve como objetivo principal elucidar a composição química destas espécies, aplicando ferramentas quimiométricas para evidenciar possíveis marcadores químicos que auxiliem na identificação de espécies ou distinção de pequenos grupos destas. Por fim, estes marcadores químicos auxiliaram na avaliação quimiosistemática das espécies.

A quarta etapa da pesquisa teve como objetivo validar o método para seu uso na metabolômica global da *Ocotea*, atestando sua capacidade analítica para gerar perfis químicos holísticos aplicáveis à quimiosistemática do gênero. A segunda e terceira etapas foram realizadas nos laboratórios do Instituto Militar de Engenharia e no Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Vale ressaltar que durante o período do Doutorado (2016 – 2020) foram realizadas as atividades extracurriculares de pesquisa (Apêndice 4): publicação de 7 artigos científicos; submissão de 3 manuscritos para o ano de 2020; publicação de 2 capítulos

dentro do livro “Práticas de laboratório em química de produtos naturais”; confecção de 6 capítulos do livro “*Chemistry and Nutritional effects of Capsicum*” para o ano de 2020; apresentação do trabalho na forma de poster em dois congressos (19º Encontro Nacional de Química Analítica – 2018 – e 7th *Brazilian Conference on Natural Products* – 2019); apresentação de trabalho na forma de miniconferência no 19º Encontro Nacional de Química Analítica – 2018; e participação na equipe organizadora do 7th *Brazilian Conference on Natural Products* – 2019.

5.1. Análise bibliográfica do gênero *Ocotea*

5.1.1. Composição alcaloidica

A análise da composição alcaloídica do gênero foi realizada com base na descrição de alcaloides da família Lauraceae da revisão “Alkaloids of the Lauraceae” de Silva Teles e colaboradores (2019). Deste modo, o número de ocorrência de cada classe estrutural de alcaloides (**Tabela 2**) foi utilizada como variável para analisar a correlação das espécies já estudadas do gênero.

Tabela 2. Número de ocorrência de alcaloides nas espécies de *Ocotea* utilizado para análise quimiométrica da literatura. Adaptado de Silva Teles *et al.* (2019)

HCPC ID	Cluster na análise de HCPC	Espécie de <i>Ocotea</i>	Benzilisoquinolínico	bisbenzilisoquinolínico	Proaporfínico	Aporfínico	Fenantreno	Morfinana
1	1	<i>O. acutangula</i>	0	0	0	0	0	4
2	3	<i>O. acutifolia</i>	0	0	0	15	0	0
3	1	<i>O. atirrensis</i>	1	0	0	0	0	0
4	2	<i>O. boldridgeiana</i>	0	0	0	4	0	0
5	2	<i>O. brachybotra</i>	0	0	2	5	0	5
6	2	<i>O. brenesii</i>	0	0	0	5	0	0
7	1	<i>O. bucherii</i>	0	0	0	2	0	0
8	2	<i>O. caesia</i>	0	0	0	6	0	0
9	1	<i>O. caparrari</i>	1	0	0	0	0	0
10	1	<i>O. caudata</i>	0	0	0	1	0	0
11	1	<i>O. duckei</i>	3	0	0	2	0	0
12	1	<i>O. formosana</i>	0	0	0	1	0	0
13	2	<i>O. glaziovii</i>	0	0	7	6	0	0
14	1	<i>O. gomezii</i>	0	0	0	2	0	0
15	2	<i>O. haldrigiana</i>	0	0	1	5	0	0
16	1	<i>O. insularis</i>	1	0	0	1	2	0
17	2	<i>O. lancifolia</i>	4	0	1	8	0	1
18	2	<i>O. leucoxylon</i>	0	0	0	5	1	0

HCPC ID	Cluster na análise de HCPC	Espécie de <i>Ocotea</i>	Benzilisoquinolínico	bisbenzilisoquinolínico	Proaporfínico	Aporfínico	Fenantreno	Morfinana
19	3	<i>O. macrophylla</i>	2	0	0	14	0	0
20	2	<i>O. macropoda</i>	0	0	0	6	0	0
21	1	<i>O. meiziana</i>	0	0	0	1	0	0
22	3	<i>O. minarum</i>	0	0	0	14	0	0
23	3	<i>O. puberula</i>	0	0	0	17	0	0
24	1	<i>O. pulchella</i>	5	0	0	0	0	0
25	1	<i>O. insinuata</i>	0	0	0	1	0	0
26	2	<i>O. teleiandra</i>	1	0	0	5	0	0
27	2	<i>O. variabilis</i>	0	0	2	4	0	0
28	3	<i>O. vellosiana</i>	1	0	0	11	0	0
29	1	<i>O. venenosa</i>	0	1	0	0	0	0
30	1	<i>O. sp</i>	2	0	0	0	0	0

HCPC ID = número de identificação da espécie na análise de HCPC;

Em um ponto de vista quimiosistemático, a ocorrência de alcaloides bisbenzilisquinolinicos pode ser empregado como um marcador químico, visto que segundo o levantamento bibliográfico de Silva Teles e colaboradores (2019), apenas 3 espécies de *Ocotea* (*O. rodiaei*, *O. rodiei* e *O. venenosa*) apresentam essa classe estrutural e entre os 13 alcaloides bisbenzilisquinolonicos distintos já reportados apenas dois (ocoteína e rodiasina) foram encontrados em outro gênero da família Lauraceae (*Nectandra*).

Os alcaloides tipo aporfínicos constituem a principal classe biossintetizada pelo gênero *Ocotea*, representando aproximadamente 72% do número de ocorrência. Além disso, dentro da família Lauraceae, o gênero *Ocotea* é o segundo com maior ocorrência desta classe química (SILVA TELES *et al.*, 2019). Dentre os metabólitos de maior com maiores registros destacam-se a glaziovina, dicentrina, isoboldina, isocoridina, nantenina, glaucina, leucoxina, ocoteína e predicentrina (SILVA TELES *et al.*, 2019).

A análise quimiométrica resultou na reunião das espécies em 3 agrupamentos (também conhecidos como *cluster*) (Figura 13). No *cluster* 1 foi composto por 14 espécies (Tabela 2), o *cluster* 2 foi composto por 11 espécies (Tabela 2) e o *cluster* 3 por 5 espécies (Tabela 2). O *cluster* 1 foi composto principalmente por espécies com baixa ocorrência de alcaloides aporfínicos e ampla presença do tipo benzilisquinolinico. Os alcaloides benzilisquinolinicos resultam de uma rota biossintética mais especializada do que os alcaloides aporfínicos (SILVA TELES *et al.*, 2019). Essa especialização dos metabólitos está relacionado a evolução botânica em angiospermas (GOTTLIEB, 1972; GOTTLIEB; KUBITZKI, 1981; BRANT *et al.*, 2001; GUYER *et al.*, 2014; RAMOS; SOUSA, 2017; RAMOS *et al.*, 2019). Assim, podemos estabelecer que as espécies deste *cluster* correspondem aquelas mais novas com maior índice evolutivo.

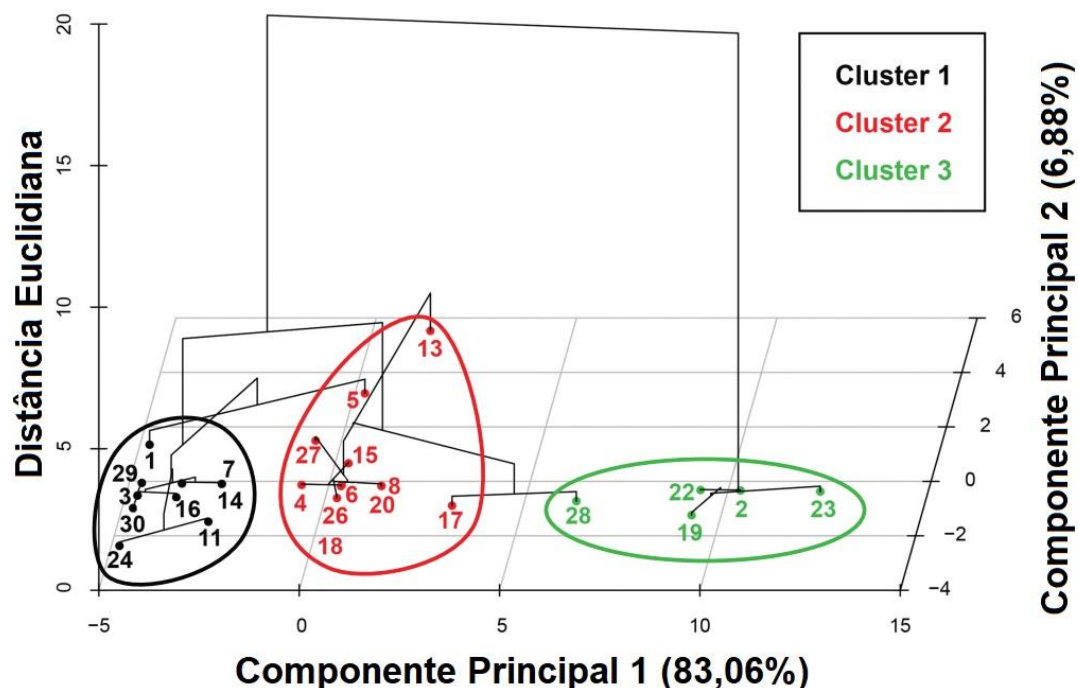


Figura 13. Análise por HCPC do número de ocorrência das classes estruturais de alcaloides no gênero *Ocotea*. Para identificação das espécies consultar a Tabela 2 na página 83. (Fonte: Acervo pessoal).

Vale ressaltar que os alcaloides bisbenzilisquinolinicos os do tipo morfina não se apresentaram em apenas um *cluster* (Tabela 2). Vale ressaltar que as morfina, ocorreram em apenas 3 espécies de *Ocotea* (*O. acutangula* - 1; *O. lancifolia* - 17 e a *O. brachybotra* - 5), podendo classificar essa classe estrutural como um possível marcadores químico dentro do gênero *Ocotea* para este subconjunto de espécies.

No *Cluster 2* (Figura 13) foram alocadas majoritariamente espécies capazes de produzir alcaloides proaporfínicos, dentre as quais a *O. glaziovii* (espécie 13, **Figura 13 e Tabela 3**) apresentou o maior número de ocorrência desta classe estrutural (**Tabela 2**). No que diz respeito os alcaloides proaporfínicos, se pode destacar a crostparina como um possível marcador químico específico para a espécie *O. glaziovii*, visto que dentro do gênero *Ocotea* esta é a única espécie até o momento a apresentar este metabólito.

Na avaliação dos dados foi observado a baixa ocorrência dos alcaloides bisbenzilisoquinolínicos, benzilisoquinolínicos e morfínicos no gênero *Ocotea* (Tabela 3). A diversificação e especialização destas estruturas na *Ocotea*, quando comparado aos demais gêneros da Lauraceae (SILVA TELES *et al.*, 2019), indica que estas classes podem ser relevantes no estudo quimiosistemático do gênero *Ocotea*. Essas classes poderiam ser sugeridas como possíveis marcadores químicos específicos as espécies capazes de biossintetizá-las.

O *Cluster* 3 foi composto principalmente por espécies com ampla ocorrência de alcaloides aporfínicos (Figura 13, Tabela 3). Esta classe estrutural possui menor nível de especialização que as demais (GOTTLIEB; KUBITZKI, 1981; SILVA TELES *et al.*, 2019). Assim, as espécies deste *cluster* podem ser associadas a um período mais antigo na história evolutiva do gênero *Ocotea*, ou seja, serem classificadas como espécies basais. Vale ressaltar que vários alcaloides aporfínicos já foram reportados em outros gêneros da família Lauraceae (SILVA TELES *et al.*, 2019). Com isso, apesar de proporcionar a formação de um cluster os alcaloides aporfínicos não podem ser eficientemente utilizados no estudo sistemático da *Ocotea*, visto que apresentam pouca especificidade para o gênero.

Dentre os alcaloides de *Ocotea* apenas 5 compostos (Figura 14), poderiam ser aplicados como possíveis marcadores químicos, visto que possuem um alto grau de especialização. Estes compostos são a ocominarona, dehidroocopodina, talictuberina, 3-hidroxicentrina e a dehidroocoteína.

Assim, não são facilmente encontrados em espécies botânicas que não possuam uma alta especialização ou estejam adaptadas a um determinado bioma (GOTTLIEB, 1972; RAMOS; SOUSA, 2017; RAMOS *et al.*, 2019). Portanto esses marcadores com

alto grau de oxidação encontrados neste trabalho reforçam a teoria proposta pela literatura sobre evolução botânica e especialização de rotas biossintéticas

O fato do perfil alcaloídico resultante da análise bibliográfica do gênero *Ocotea* ser capaz de produzir *clusters* correlacionáveis com os índices de especialização e evolução demonstra a viabilidade e capacidade deste tipo de dado em auxiliar outras ciências ômicas na elucidação sistemática do gênero.

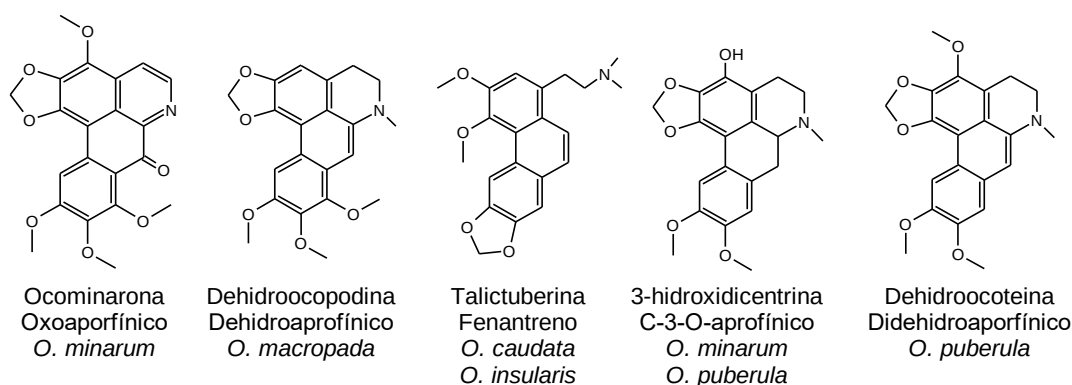


Figura 14. Alcaloides de maior relevância como marcadores químicos no gênero *Ocotea*

5.1.2. Lignoides

Vale ressaltar a este ponto que, o único modelo quimiosistemático para a *Ocotea* foi proposto por Otto Gottlieb (1971) e classificava as espécies em dois grandes grupos, os acumuladores de alcaloides e os de lignoides (GOTTLIEB, 1972). Esse modelo se baseou no processo de evolução fitoquímica da rota biossintética do chiquimato, cuja especialização torna possível a produção de alcaloides ao passo que lignoides não seriam mais biossintetizados. Assim, espécies biossintetizadoras de alcaloides não acumulariam lignoides, e vice versa. O grande defeito deste modelo foi considerar que ambas as classes químicas não poderiam ser biossintetizadas simultaneamente. Apesar de atualmente ser claro para a fitoquímica que a conclusão de Otto Gottlieb está ficando devassada (MARIA *et al.*, 2007; SALLEH; AHMAD, 2017), esse postulado continuou sendo

aplicado e nunca foi submetido a revisão, mesmo com vários registros de espécies de *Ocotea* apresentando ambas classes químicas simultaneamente (Barbosa-Filho *et al.*, 2008; Coy-Barrera *et al.*, 2009; Garcez *et al.*, 2005).

De forma análoga ao procedimento realizado com os dados sobre alcaloides na *Ocotea*, o número de ocorrência dos lignoides (Tabela 3) também foi avaliado de forma quimiossistemática pela técnica de HCPC. Pela análise no número de ocorrência de lignoides, a espécie *O. catharinensis* se destaca por corresponder a espécie com maior número de ocorrência de cicloneolignanas (Tabela 3). Entre os lignoides, os compostos que apresentam maior ocorrência no gênero *Ocotea* são a ferrearina, burchelina, armenina e canelina (Figura 5) (Apêndice 1) (SALLEH; AHMAD, 2017; LI *et al.*, 2018)

Nesta análise houve a formação de 5 *clusters* (Figura 15), dentre os quais o *Cluster* 1 foi composto apenas pela *O. duckei*. A distinção desta espécie se deve a ocorrência das diepoxilignanas, as quais até o momento são de ocorrência quase exclusiva apenas nesta espécie de *Ocotea* (Tabela 3). Deste modo, não somente a iangambina pode ser considerada um marcador químico da *O. duckei* mas todo seu perfil de diepoxilignanas.

Os *clusters* 2 e 3 são caracterizados por espécies com maior número de ocorrência de neolignanas. A diferenciação do *Cluster* 3 se deve a ocorrência de cicloneolignanas na *O. porosa* (Tabela 3), indicando a possibilidade de se utilizar essa classe estrutural como marcador químico no perfil de lignanas da *O. porosa* dentro do gênero *Ocotea*. Assim como o *Cluster* 1, no *Cluster* 4 também houve o agrupamento de espécies produtoras de cicloneolignanas, entretanto com um menor número de ocorrência em relação ao *Cluster* 1. Por fim, o *Cluster* 5 agrupou um maior conjunto de espécies cujo número de ocorrência de lignoides foi baixo, sendo assim o *cluster* de menor resolução.

Em suma, essa análise contemporânea do conhecimento químico de lignoides no gênero *Ocotea* também ocasionou a separação de espécies em função da especialização

das estruturas dos lignoides em neolignanas, diepoxilignanas e cicloneolignanas. O padrão de agrupamento demonstrou que as espécies *O. duckei*, *O. aciphylla*, *O. porosa* e *O. cymosa* podem ser espécies mais recentes na linha evolutiva do gênero, visto que apresentaram os tipos de lignoides com maior nível de oxidação.

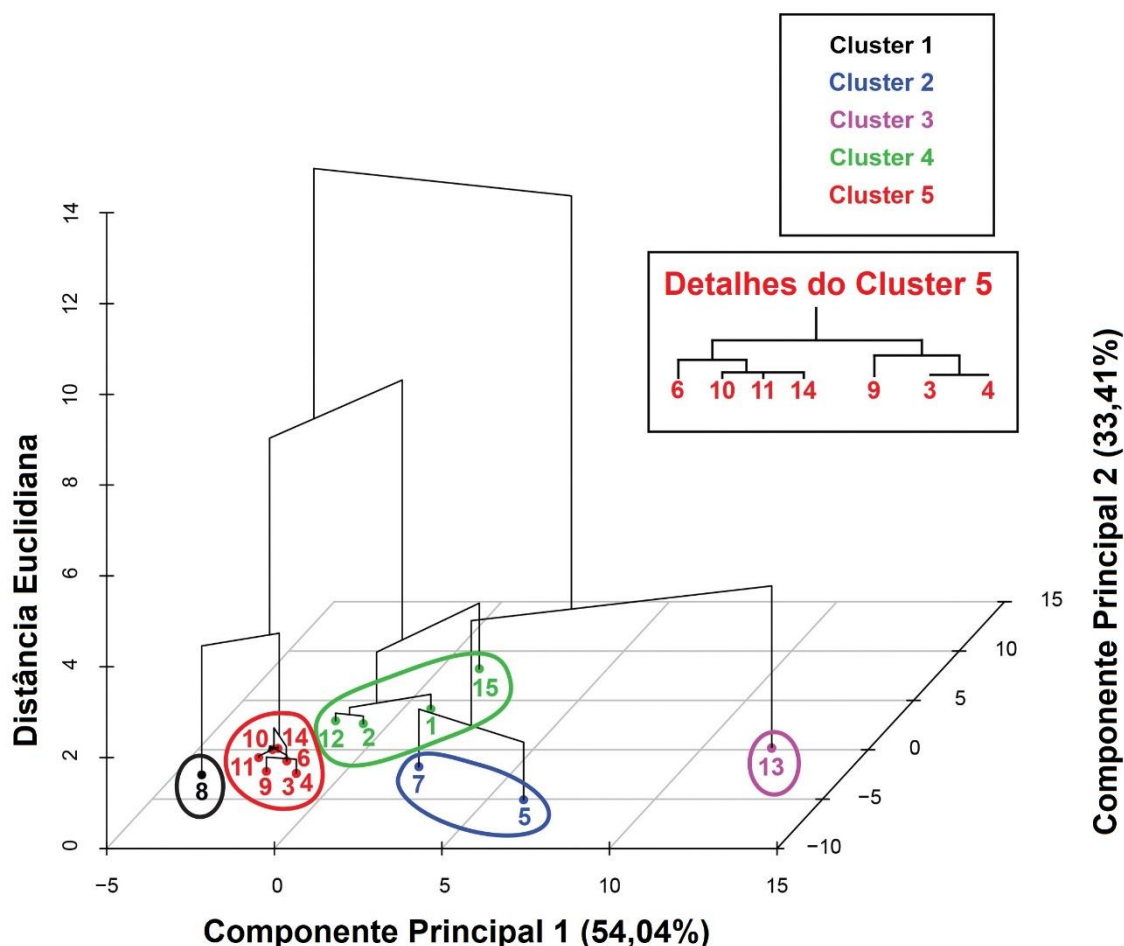


Figura 15. Análise de HCPC do número de ocorrência dos lignoides presentes no gênero *Ocotea*. Onde: (1) *O. bullata*; (2) *O. macrophylla*; (3) *O. cymbarum*; (4) *O. elegans*; (5) *O. aciphylla*; (6) *O. costulatum* Mez; (7) *O. cymosa*; (8) *O. duckei*; (9) *O. foetens*; (10) *O. heterochroma*; (11) *O. minarum*; (12) *O. odorifera*; (13) *O. porosa*; (14) *O. simulans*; (15) *O. veraguensis*.

Vale ressaltar que, apenas 3,7% das espécies de *Ocotea* apresentam algum nível de descrição de seus lignoides, além de que grande parte dos metabólitos descritos no gênero (Apêndice 1) já foram reportados em outras espécies de Lauraceae (LI *et al.*, 2018). Deste modo, a aplicação inequívoca dos lignoides no estudo sistemático da *Ocotea*

ainda depende da avaliação de uma maior variedade de espécies, assim como a utilização simultânea de outras características químicas, tais como o perfil alcaloídico.

Tabela 3. Número de ocorrência das classes estruturais de lignoides na *Ocotea*

	Espécie	Cicloneolignana	Diepoxilignana	Dioxineolignana	Epoxilignana	Epoxineolignana	Lignana	Neolignana
1	<i>O. bullata</i>	7	0	0	0	0	0	2
2	<i>O. macrophylla</i>	5	0	0	0	0	2	1
3	<i>O. cymbarum</i>	0	0	0	0	0	0	2
4	<i>O. elegans</i>	0	0	0	0	0	0	2
5	<i>O. aciphylla</i>	0	0	0	0	0	0	10
6	<i>O. costatum</i>	1	0	1	0	0	0	1
7	<i>O. cymosa</i>	2	0	0	3	0	0	5
8	<i>O. duckei</i>	0	7	0	0	0	0	0
9	<i>O. foetens</i>	0	0	0	2	1	1	1
10	<i>O. heterochroma</i>	2	1	0	0	0	0	0
11	<i>O. minarum</i>	1	0	0	0	0	0	0
12	<i>O. odorifera</i>	5	0	0	0	0	0	0
13	<i>O. porosa</i>	7	0	0	0	0	0	14
14	<i>O. simulans</i>	2	0	0	0	0	0	0
15	<i>O. veraquensis</i>	11	0	0	0	0	0	1
16	<i>O. catharinensis</i>	44	0	0	0	0	0	7

5.1.3. Flavonoides

Visto a escassez de dados sobre a ocorrência dessa classe química na *Ocotea*, a análise por HCPC se torna inviável, podendo ser realizada apenas uma análise aproximada dos índices evolutivos no gênero.

Entre os flavonoides descritos para o gênero (**Quadro 1**), 45,5% eram estruturas *O*-glicosiladas e apenas 1 flavonoide era *O*-alquilado. Esse padrão indica que a *Ocotea* pode ser um gênero basal ou intermediário na linhagem evolutiva da Lauraceae, visto que a *O*-alquilação dos flavonoides está relacionada a especialização da rota biossintética e consequentemente se relaciona a espécies mais evoluídas ou novas (SANTOS; SALATINO, 2000; SOARES; KAPLAN, 2001). Ainda, a razão entre flavona: flavonol no gênero *Ocotea* foi de 0,05, fato que também confirma o possível ancestralismo do gênero dentro da família Lauraceae (SANTOS; SALATINO, 2000; BRANT *et al.*, 2001; MURAI *et al.*, 2008). A biossintetização preferencial de flavonas em frente aos flavonóis foi relacionada por diferentes pesquisadores com a evolução de caracteres morfológicos mais especializados e redução na produção de lignóides, cuja rota biossintética inibiria a produção de flavonas (SANTOS; SALATINO, 2000; BRANT *et al.*, 2001; SOARES; KAPLAN, 2001; MURAI *et al.*, 2008).

5.1.4. Considerações gerais

Os dados da análise bibliográfica foram publicados na forma de artigo de pesquisa na revista *Phytochemistry*, com o título *Ocotea* complex: A metabolomic analysis of a Lauraceae genus (Apêndice 4, item 8.4.7). Os agrupamentos formados indicam a capacidade do estudo metabolômico na resolução do gênero *Ocotea*. As informações fitoquímicas permitem classificar as espécies em pequenos subagrupamentos, fornecendo

informações sobre correlações existentes sobre estas. Ainda, os metabólitos responsáveis pelos agrupamentos das espécies permitem avaliar a linha evolutiva das espécies através da especialização das estruturas moleculares.

As ideias propostas por Gottlieb sobre a quimiosistemática do gênero *Ocotea* na década de 90 foram reavaliadas. Apesar do gênero poder ser caracterizado pela alta produção de alcaloides, ainda foi possível evidenciar marcadores químicos específicos dentro desta classe. A especialização das estruturas moleculares com maior ocorrência dentro das classes de alcaloides e lignoides observadas evidenciam a posição basal do gênero *Ocotea* dentro da família Lauraceae. O perfil de ocorrência de flavonoides dentro do gênero *Ocotea* também evidencia uma possível basalidade do gênero.

5.2. Otimização do método de extração

5.2.1. Avaliação do rendimento da extração

O rendimento da extração (R%) foi a primeira variável resposta avaliada durante a otimização do método de extração assistido por ultrassom. Isso se deve ao importante papel que esta variável possui no que diz respeito a preservação do espécime em estudo. Durante a pesquisa com produtos naturais é esperado que o espécime avaliado possa ser acessado futuramente, assim, durante a coleta é recomendável ocasionar o mínimo de estresse possível ao indivíduo, evitando alterações bruscas no seu metabolismo ou mesmo a morte da planta. Desta forma, assegura-se a reprodutibilidade ou continuidade do estudo com aquele espécime. Assim, obter um rendimento de extração alto reduz a necessidade de retirar grandes quantidades de material botânico para a execução do experimento,

reduzindo assim o estresse causado ao indivíduo coletado (STEEGE; JANSEN-JACOBS; DATADIN, 2000; GOTTLIEBT; BORIN, 2012).

Durante a otimização do método de extração os rendimentos variaram entre 1,97 e 10,76%, com coeficientes de variação (CV) abaixo de 10% entre as triplicatas técnicas (Tabela 4). Os valores de CV evidenciam a repetibilidade do procedimento de extração assistido de ultrassom. O maior rendimento de extração obtido (10,76%) demonstra ainda que a extração assistida de ultrassom é um método promissor para o estudo fitoquímico de angiospermas, visto que, em um período de 30 min. foi possível obter rendimentos similares aos obtidos pela técnica de maceração exaustiva empregada por um período de 5 dias em amostras da família Lauraceae (ZSCHOCKE *et al.*, 2000a; BATISTA *et al.*, 2015; ALBARRACIN *et al.*, 2017). Representando assim, uma redução substancial no tempo de extração comumente empregado.

Tabela 4. Rendimentos de extração obtidos durante a otimização do método

Código da condição de análise	T (°C)	Tamanho de partícula (mm)	Proporção entre amostra e solvente extrator (g:mL)	% etanol no solvente extrator	R % (n = 3)	CV (%)
1B-2A-3C-4A	50	0,595	1:12	70	10,76	8,88
1A-2A-3C-4A	40	0,595	1:12	70	9,96	8,74
1A-2B-3C-4A	40	0,841	1:12	70	9,76	5,61
1C-2A-3C-4A	60	0,595	1:12	70	9,29	6,75
1B-2B-3C-4A	50	0,841	1:12	70	9,25	2,05
1C-2B-3C-4A	60	0,841	1:12	70	8,43	2,99
1C-2A-3A-4A	60	0,595	1:8	70	7,84	5,08
1A-2A-3A-4A	40	0,595	1:8	70	7,39	6,34
1B-2A-3A-4A	50	0,595	1:8	70	7,08	2,85
1B-2B-3A-4A	50	0,841	1:8	70	7,07	3,83
1A-2C-3C-4A	40	2,000	1:12	70	7,03	6,04
1A-2B-3A-4A	40	0,841	1:8	70	6,95	4,38
1B-2A-3C-4C	50	0,595	1:12	99,8	6,53	6,26
1C-2B-3A-4A	60	0,841	1:8	70	6,40	3,34
1C-2C-3C-4A	60	2,000	1:12	70	6,39	5,46
1C-2A-3C-4C	60	0,595	1:12	99,8	6,23	8,60
1B-2C-3C-4A	50	2,000	1:12	70	5,87	4,09

Código da condição de análise	T (°C)	Tamanho de partícula (mm)	Proporção entre amostra e solvente extrator (g:mL)	% etanol no solvente extrator	R % (n = 3)	CV (%)
1A-2A-3C-4C	40	0,595	1:12	99,8	5,75	2,10
1A-2B-3C-4C	40	0,841	1:12	99,8	5,70	6,80
1C-2C-3A-4A	60	2,000	1:8	70	5,28	1,65
1B-2C-3A-4A	50	2,000	1:8	70	5,04	3,71
1C-2A-3A-4C	60	0,595	1:8	99,8	4,72	5,81
1C-2B-3C-4C	60	0,841	1:12	99,8	4,50	2,56
1A-2C-3A-4A	40	2,000	1:8	70	4,45	9,47
1B-2B-3C-4C	50	0,841	1:12	99,8	4,40	3,13
1B-2B-3A-4C	50	0,841	1:8	99,8	4,25	5,39
1A-2A-3A-4C	40	0,595	1:8	99,8	4,17	2,61
1A-2B-3A-4C	40	0,841	1:8	99,8	3,84	7,62
1B-2A-3A-4C	50	0,595	1:8	99,8	3,53	5,24
1C-2C-3C-4C	60	2,000	1:12	99,8	3,51	3,29
1C-2B-3A-4C	60	0,841	1:8	99,8	2,93	5,14
1A-2C-3C-4C	40	2,000	1:12	99,8	2,39	9,37
1B-2C-3A-4C	50	2,000	1:8	99,8	2,29	2,95
1A-2C-3A-4C	40	2,000	1:8	99,8	2,29	7,38
1B-2C-3C-4C	50	2,000	1:12	99,8	2,17	1,85
1C-2C-3A-4C	60	2,000	1:8	99,8	1,97	7,70

T = temperatura da extração; R % = rendimento médio da extração; CV = coeficiente de variação.

Cada um dos fatores experimentais avaliados durante a otimização apresentaram um efeito distinto no rendimento da extração (Figura 16), visto que cada parâmetro está envolvido em fenômenos químicos e físico-químicos distintos no que tange a sonoquímica. Entre os fatores estudados, a composição do solvente extrator foi o que apresentou o maior efeito no rendimento da extração, enquanto a temperatura foi o único fator que não causou modificações significativas no rendimento (Figura 16).

O efeito significativo e mais agudo da composição do solvente extrator no rendimento pode ser principalmente atribuído a sua polaridade. Como o gênero *Ocotea* é atualmente conhecido como uma fonte rica de alcaloides, lignoides e flavonoides, uma redução na polaridade do extrator (pela redução no teor de água do solvente) pode reduzir a interação e solubilidade destas classes químicas com o solvente, reduzindo a eficácia da

extração (MARIA *et al.*, 2007; CUSTÓDIO; VEIGA JUNIOR, 2014; XU *et al.*, 2017). Assim, o etanol 70% pode interagir de forma mais eficaz com os constituintes das amostras, aumentando o rendimento da extração quando comparado ao etanol 99,8%.

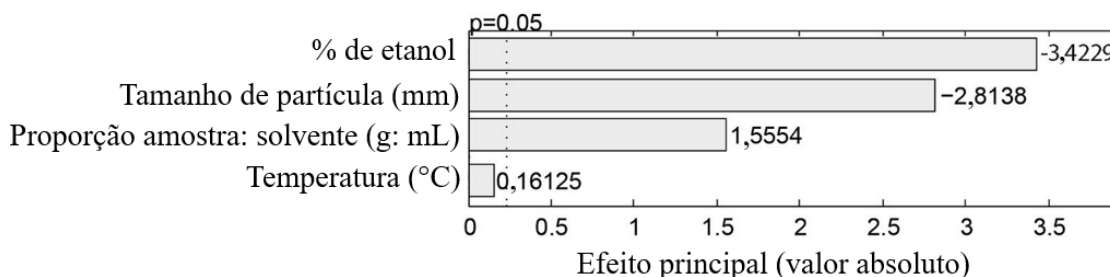


Figura 16. Gráfico de Pareto dos efeitos principais dos fatores no rendimento da extração

O efeito significativo do tamanho de partícula e da proporção entre a amostra e solvente extrator no rendimento da extração (Figura 16) estão relacionados ao aumento da superfície de contato total e formação de gradiente de concentração no solvente extrator, respectivamente. O aumento da superfície de contato total ocasionada pela redução do tamanho de partícula aumenta os sítios de interação entre o solvente extrator e a amostra, enquanto que a adição de volumes maiores de solvente intensifica o gradiente de concentração formado durante a extração, induzindo o processo de difusão dos metabólitos presentes na amostra para o solvente. Ainda, um aumento no volume de solvente extrator utilizado também possibilita uma extração mais eficaz, visto que o extrator terá capacidade para solubilizar uma concentração maior de metabólitos antes de se tornar saturado (AZMIR *et al.*, 2013; TIWARI, 2015).

Apesar da temperatura não apresentar um efeito significativo no rendimento da extração, ainda é possível observar pequenas reduções nos seus valores em amostras extraídas a 60°C (Tabela 4, por exemplos as 1C-2A-3C-4A e 1A-2A-3C-4A). A utilização de temperaturas elevadas pode afetar a extração assistida de ultrassom dos metabólitos de espécimes botânicos através de dois mecanismos principais. O primeiro

diz respeito a degradação térmica dos constituintes, o que afetaria principalmente os dados qualitativos no que diz respeito a produção de um perfil químico global.

O segundo mecanismo está relacionado ao processo de cavitação ocasionado pelas ondas ultrassônicas, onde, elevações na temperatura reduzem a intensidade da cavitação devido à elevação da pressão de vapor do solvente extrator e preenchimento dos vácuos existente neste por seus próprios vapores. Com isso, o colapso das bolhas geradas pelo ultrassom se torna menos frequente, reduzindo a efetividade destas na ruptura de membranas celulares e posterior solubilização dos metabólitos especializados (AZMIR *et al.*, 2013; TIWARI, 2015; CHEMAT *et al.*, 2017).

Considerando o rendimento da extração, as condições experimentais que obtiveram o resultado ótimo foi pelo uso da temperatura de 50°C, tamanho de partícula de 0,595 mm, proporção entre amostra e solvente extrator de 1:12 (g:mL) e etanol 70% como solvente extrator (amostra 1B-2A-3C-4A). Por se tratar de uma variável-resposta quantitativa relacionada a composição total dos extratos (todos os compostos extraídos com etanol 70%), não é possível estipular se a temperatura de 40 ou 50°C seriam mais adequadas qualitativamente para a construção do perfil químico, visto que estas temperaturas apresentaram resultados estatisticamente similares em relação ao rendimento (Tabela 4, amostras 1B-2A-3C-4A e 1A-2A-3C-4A).

5.2.2. Efeito qualitativo do método de extração em perfis cromatográficos

Visto que o objetivo do método de extração é a análise metabolômica global, ou seja, aquela que não se limita à apenas uma classe ou um conjunto de constituintes, o efeito do método de extração no caráter qualitativo dos perfis químicos que podem ser obtidos também deve ser avaliado (NAZ *et al.*, 2014; KLEIN-JÚNIOR *et al.*, 2016;

ANTONIO *et al.*, 2020). Para isso foram analisados os perfis cromatográficos obtidos pelas técnicas de CCD e CLAE-DAD.

A análise das frações de média polaridade da *O. guianensis* por CCD demonstraram um perfil complexo (Figura 17), cuja coloração das manchas sugere a presença de compostos fenólicos nas amostras (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). Este indicativo corrobora o conhecimento fitoquímico do gênero *Ocotea*, o qual também descreve a presença destas classes químicas em várias amostras (MARIA *et al.*, 2007; SALLEH; AHMAD, 2017).

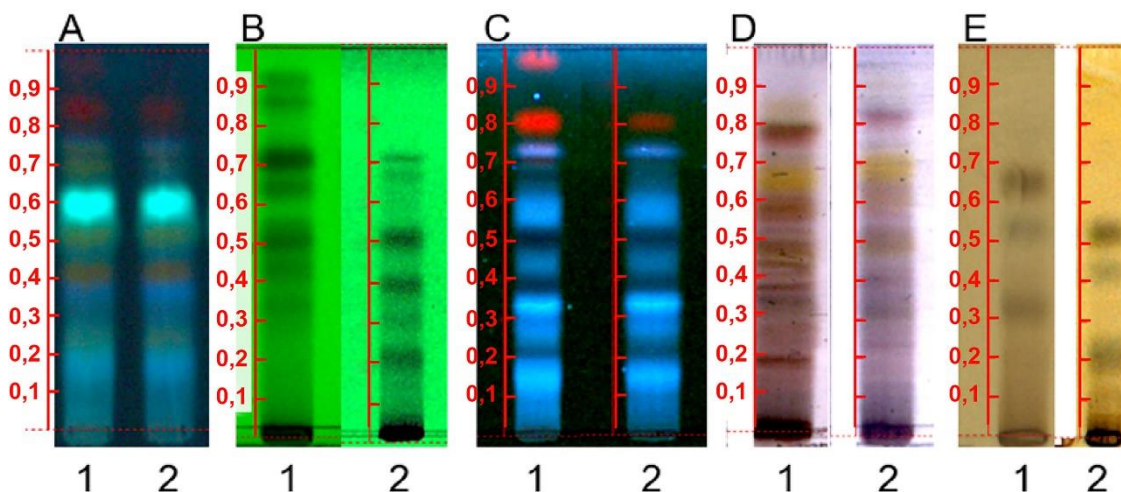


Figura 17. Exemplo dos perfis químicos obtidos pela técnica de CCD, onde, 1 = amostra 1B-2A-3C-4A e 2 = 1B-2A-3C-4C. A) Reativo NP-PEG, B) UV 254 nm, C) UV 366 nm, D) vanilina sulfúrica, E) cloreto férrico

Essas indicações estão de acordo com o descrito para o gênero *Ocotea* (MARIA *et al.*, 2007; SALLEH; AHMAD, 2017) e corroboram a possibilidade destes compostos se degradarem durante a extração assistida de ultrassom com uso de temperatura elevada, visto a sensibilidade destas estruturas moleculares sob estas condições (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008; LI *et al.*, 2016). Vale ressaltar que nenhuma das amostras analisadas apresentaram formação de manchas na cromatoplaça quando reveladas com o reativo de Dragendorff.

Para avaliar o efeito qualitativo dos parâmetros estudados durante a otimização no perfil cromatográfico gerado pela técnica de CCD, cada mancha discriminada na cromatoplaça foi considerada como uma variável, sendo a resposta analítica a presença ou ausência destas em cada um dos reveladores empregados. A análise por HCA e PCA evidenciou a formação de três grupos distintos (Figura 18) em função da temperatura de extração e da composição do solvente extrator. Deste modo, apesar da temperatura não ter afetado o rendimento da extração esta afeta significativamente o perfil químico de forma qualitativa causando alterações no perfil cromatográfico.

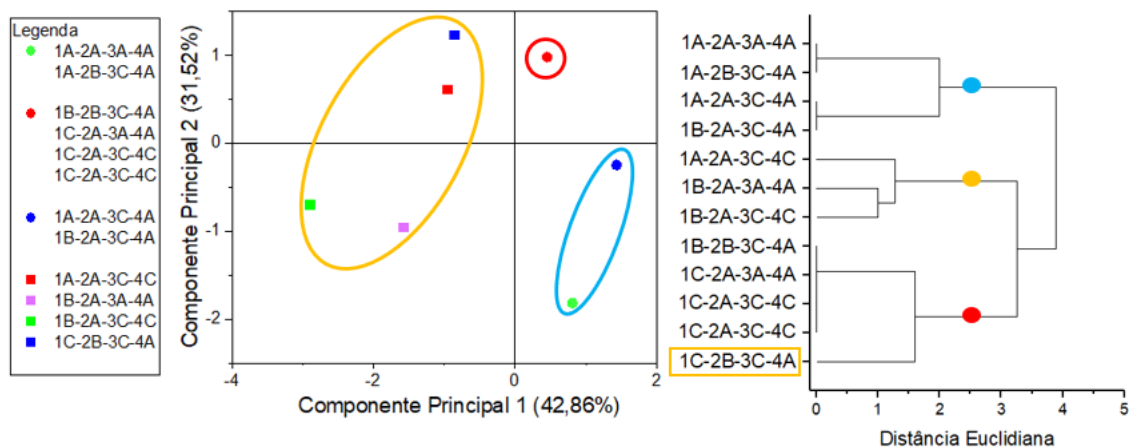


Figura 18. Resultados de HCA e PCA dos perfis cromatográficos obtidos por CCD. Para nomenclatura das amostras vide **Tabela 4**, onde: temperatura de extração (1) a 40°C (A), 50°C (B) e 60°C (C); tamanho de partícula (2) em 0,595 nm (A) e 0,841 nm (B); proporção entre amostra e solvente extrator (3) a 1:8 g:mL (A) e 1:12 g:mL (C); e % de etanol no solvente extrator em 70% (A) ou 99,8% (C).

O grupo azul (Figura 18) foi composto majoritariamente por amostras extraídas com 70% etanol em temperaturas amenas (40 e 50°C), enquanto o grupo amarelo e vermelho contem as condições de extração que envolveram o uso da temperatura de 60°C e 99,8% etanol como solvente extrator. As amostras extraídas em diferentes condições de tamanho de partícula e proporção entre amostra e solvente não formaram grupos específicos, demonstrando que ambos fatores não ocasionam efeitos significativos de caráter qualitativo no perfil cromatográfico.

Apesar da temperatura de extração não ter afetado significativamente o rendimento de extração, seu efeito no perfil cromatográfico foi substancial como pode ser observado pelo padrão de agrupamento formado durante a análise multivariada, com a separação das amostras envolvendo o uso da temperatura de 60°C. Esse comportamento pode ser associado a possível degradação térmica dos metabólitos presentes. A degradação de parte dos metabólitos da amostra com o aumento da temperatura, impossibilitaria que estes reagissem com os reveladores utilizados na CCD, ocasionando assim a redução na quantidade de manchas observadas nas cromatoplasas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

Com isso, apenas a temperatura de extração e o tipo de solvente seriam indicados pela técnica de CCD como fatores influentes mais influentes na qualidade do perfil cromatográfico voltado para metabolômica global. Considerando a quimiodiversidade observável pelas cromatoplasas, as condições envolvendo o uso de etanol 70% e 40 ou 50°C seriam ótimas para o objetivo da pesquisa, visto que discriminaram maior quantidade de constituintes aliado aos maiores rendimentos de extração.

5.2.3. Efeito da extração no perfil cromatográfico por CLAE-DAD

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD (Figura 19) apresentaram modificações qualitativas (quantidade de sinais) e quantitativas (área dos picos) significativas em função das modificações entre os níveis dos fatores avaliados, principalmente no intervalo de 18 a 30 minutos. As alterações mais significativas ocorreram frente alterações na temperatura e na % de etanol no solvente extrator, corroborando os dados obtidos pela CCD.

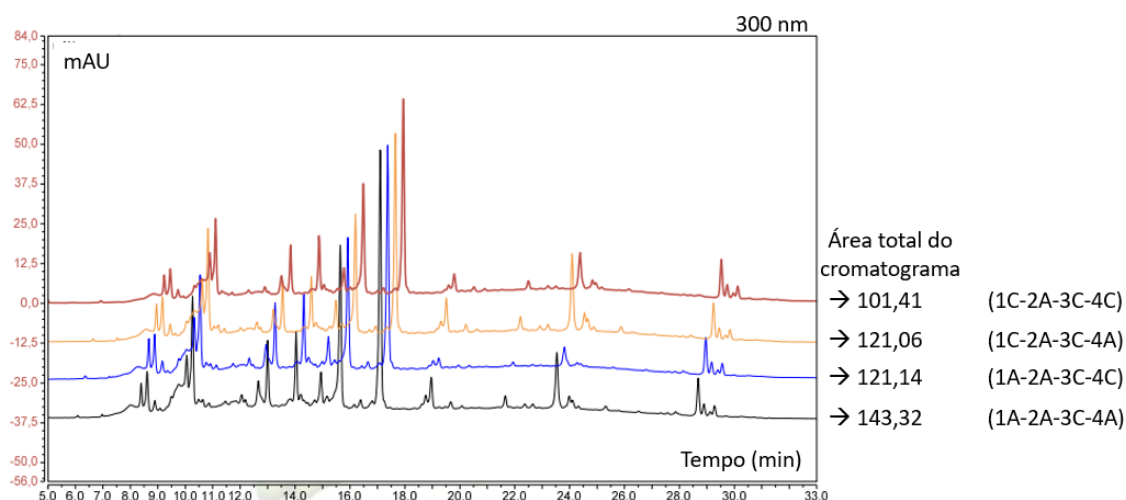


Figura 19. Comparação da área total do cromatograma em amostras selecionadas durante a otimização do método de extração

O uso de temperaturas de extração amenas e 70% de etanol resultaram em um aumento da área total do cromatograma (Figura 19, 1A-2A-3C-4A E 1C-2A-3C-4A) corroborando que ocorra a degradação de metabólitos perante o uso de temperaturas altas durante a extração. Como a metabolômica global usa uma abordagem com dados quantitativos relativos, como comparação da área entre diferentes picos ou área total do cromatograma (NAZ *et al.*, 2014; BEGOL *et al.*, 2018), reduções nestas características como cromatograma diminuem a qualidade do perfil holístico e das interpretações quimiossistemáticas que podem ser aferidas a partir da amostra. Assim, nossos dados demonstram que uma matriz rica em compostos de média polaridade pode ter sua representatividade afetada significativamente por uso de temperatura elevadas.

A temperatura de extração é um parâmetro que deve ser cuidadosamente otimizado durante o uso de métodos assistidos por ultrassom na metabolômica, visto que a temperatura pode influenciar o processo de cavitação e consequentemente alterar a eficácia da transferência de massas (TIWARI, 2015).

A avaliação da área total dos cromatogramas (Figura 19) indica que a temperatura de extração e a composição do solvente extrator afetaram de forma qualitativa e

quantitativa os perfis químicos gerados, causando diferenças significativas (teste Anova, $\alpha = 0,05$) entre as condições experimentais avaliadas. Assim, o uso de temperaturas mais brandas e de etanol 70% promoveram o aumento da área total do cromatograma (Figura 19). Assim como discutido anterior, a redução da área dos picos pode ser relacionada a menor compatibilidade do etanol 99,8% com os constituintes da amostra e possível degradação térmica pelo uso de temperaturas mais elevadas (TIWARI, 2015).

A análise multivariada dos perfis químicos foi realizada utilizando cada pico discriminado (57 picos distintos) como uma variável discreta, com a resposta analítica sendo suas respectivas áreas. Através da análise de PCA aplicando as 57 variáveis, não foi possível encontrar diferenciações entre as amostras, assim, foi realizado o estudo dos valores de *loading* das 3 primeiras componentes principais para selecionar as variáveis mais significativas para a análise. Com isso foram selecionadas 20 variáveis para análise (Figura 20), as quais eram significativamente afetadas por alterações no método de extração.

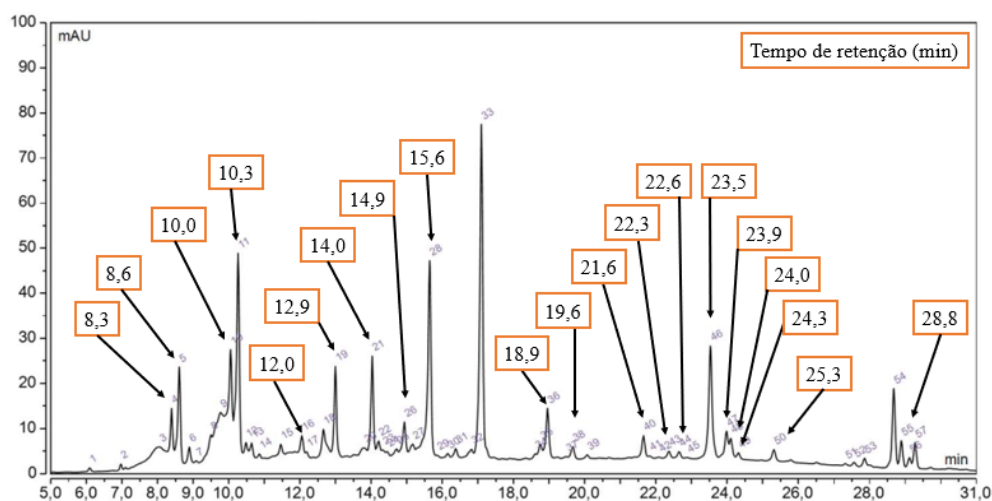


Figura 20. Tempo de retenção das 20 variáveis selecionadas para análise multivariada dos perfis cromatográficos (HPLC-DAD)

A análise multivariada dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD evidenciou a formação de 3 agrupamentos distintos, principalmente correlacionados a composição do

solvente extrator (fator 4) e a proporção entre amostra e solvente extrator (fator 3). Esse padrão de agrupamento é consistente com o efeito dos fatores no rendimento da extração, onde a temperatura foi o fator com menor influência quantitativa.

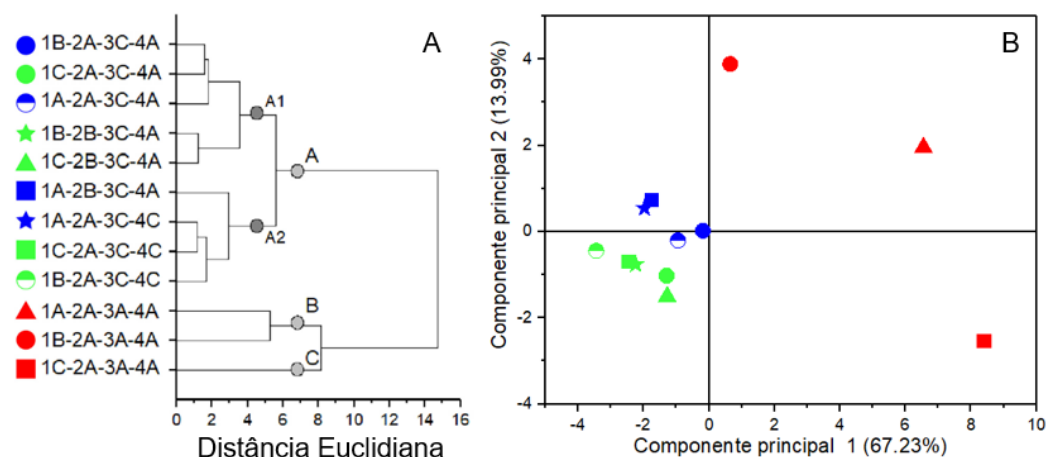


Figura 21. Análise de HCA (A) e PCA (B) dos perfis cromatográficos por HPLC-DAD empregando 20 variáveis pré-selecionadas.

Nesta análise (Figura 21) a distinção dos *clusters* está relacionada ao decréscimo na proporção entre a amostra e o solvente extrator, conforme pode ser observado pelo distanciamento do grupo vermelho em relação as demais amostras. A segregação do grupo vermelho pode ser atribuída a redução no volume de solvente extrator, como mencionado anterior, o qual reduz a magnitude do fenômeno de transferência de massa, diminuindo de forma qualitativa e quantitativa a eficácia da extração. Apesar da importância desse parâmetro na construção do perfil químico, essa informação raramente é fornecida em artigos relatando a fitoquímica de angiospermas, mesmo naqueles destinados ao estudo quimiossistemático (GARRETT *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2017; GIL ARCHILA; CUCA SUÁREZ, 2018).

Adicionalmente, os grupos azul e verde foram analisados isoladamente do grupo vermelho pelas técnicas de HCA e PCA. Deste modo, foi possível observar que as

amostras são segregadas de acordo com a temperatura de extração e composição do solvente extrator (Figura 22). O padrão de agrupamento das amostras está fortemente correlacionado a presença e ausência de sinais cromatográficos na faixa de 18 a 30 min do cromatograma, além do decréscimo da área dos picos cromatográficos contidos entre 12 e 17 min.

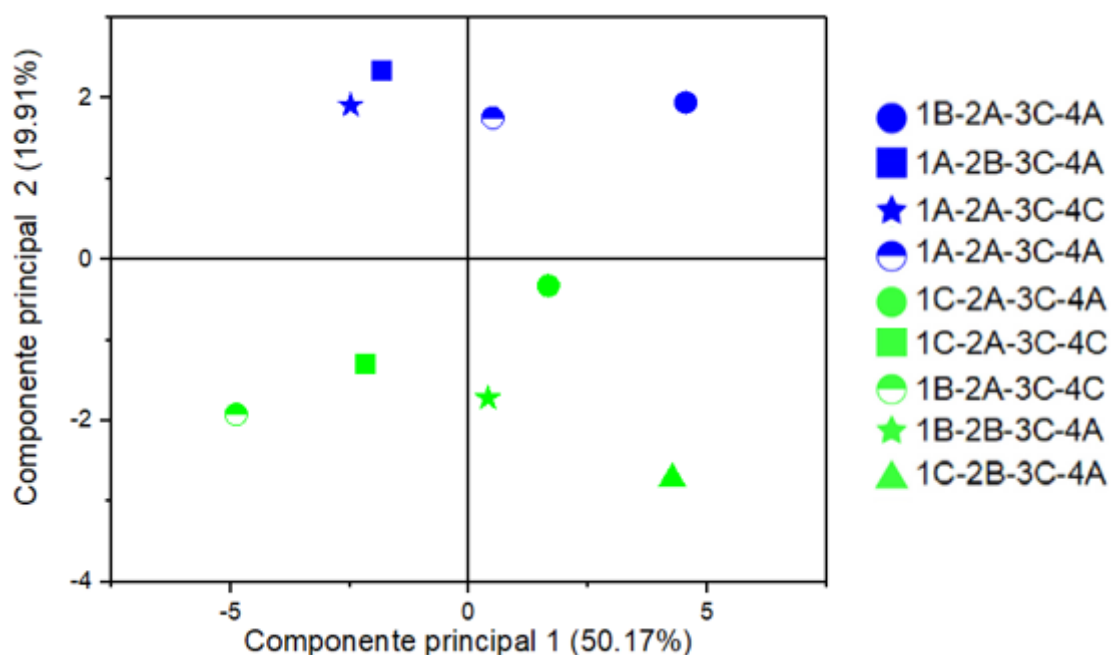


Figura 22. Análise de PCA de amostras extraídas na proporção 1:12 (g:mL) entre material botânico e solvente extrator

A formação do grupo azul com as amostras que apresentam os maiores valores de área em seus picos evidência que o uso de temperaturas brandas, com solvente extrator 70% e a proporção de 1:12 é capaz de aumentar a eficácia da extração de metabólitos especializados, demonstrando assim, que o uso destas condições é mais adequada para o estudo quimiossistemático do gênero.

De modo geral, a análise de multivariada dos dados obtidos por CLAE-DAD corrobora aqueles obtidos com a CCD, onde a separação das amostras indica uma

diferença qualitativa no perfil químico entre as amostras extraídas com solvente extrator composto por 99,8% e 70% de etanol. As amostras extraídas com solvente constituído por 99,8% de etanol apresentam, em geral, uma intensidade de absorbância menor e ausência de parte dos picos quando comparadas as suas análogas, extraídas com 70% de etanol.

Essa distinção quantitativa entre os tipos de solventes extratores, pode ser atribuída à capacidade de hidratação do solvente empregado durante a extração, visto que a presença de água no meio auxilia a hidratação da amostra de forma a aumentar sua permeabilidade e a solubilidade de determinados metabólitos. Com isso, o processo de difusão é favorecido, permitindo que o solvente com maior teor de água extraia maiores concentrações dos mesmos metabólitos extraídos com etanol 99,8% (TIWARI, 2015; CHEMAT *et al.*, 2017).

Assim, os perfis químicos obtidos por cromatografia em camada delgada e CLAE-DAD indicam que, ao considerar a representatividade qualitativa e quantitativa do perfil químico o melhor método de extração seria pelo emprego da temperatura de 40°C, tamanho de partícula de 0,595 mm, proporção entre amostra e solvente extrator de 1:12 (g:mL) e etanol 70% como solvente extrator. Apesar da similaridade entre os dados obtidos a 40 e 50°C, o uso da temperatura mais baixa ocasiona um incremento na intensidade dos picos, possivelmente reduzindo a degradação térmica dos constituintes da amostra e aumentando a potência do ultrassom.

5.2.4. Avaliação do perfil químico por espectrometria de massas

Uma análise multivariada preliminar dos perfis químicos obtidos por espectrometria de massas em modo de varredura entre 100 a 1000 Da evidenciou que apenas os sinais entre os m/z 100 e 600 eram significativamente afetados durante as

modificações do método de extração. Dentro desta faixa, no modo negativo, foram encontrados 214 sinais com intensidade relativa superior a 10%, dentre os quais apenas 16 apresentaram efeitos significativos na análise multivariada, visto que suas intensidades relativas se modificaram drasticamente em função das alterações na forma de extração.

No modo positivo foram detectados apenas 25 sinais com intensidade relativa maior que 10% na faixa de m/z 100 a 600. Esse dado demonstra que a detecção de metabólitos no modo positivo é menos sensível às modificações no método de extração e suas interferências no perfil químico. Ainda, a quantidade baixa de dados indica que este método de ionização gera uma quantidade relativamente baixa de dados na construção de um perfil químico global. Assim, a avaliação prosseguiu considerando apenas o modo negativo de ionização e empregando apenas os 16 sinais de m/z mais afetados com as alterações no método de extração.

Deste modo, a análise multivariada demonstrou a formação de 3 agrupamentos (Figura 23) relacionados principalmente a diferenças na composição do solvente extrator e no tamanho de partícula, corroborando a análise multivariada dos cromatogramas por HPLC-DAD. O *cluster* A foi formado apenas por amostras extraídas com 70% de etanol, enquanto os *clusters* B e C foram compostos por aquelas extraídas com etanol 99,8%. Ainda, as amostras extraídas com os maiores tamanhos de partícula também são apresentadas no *cluster* C.

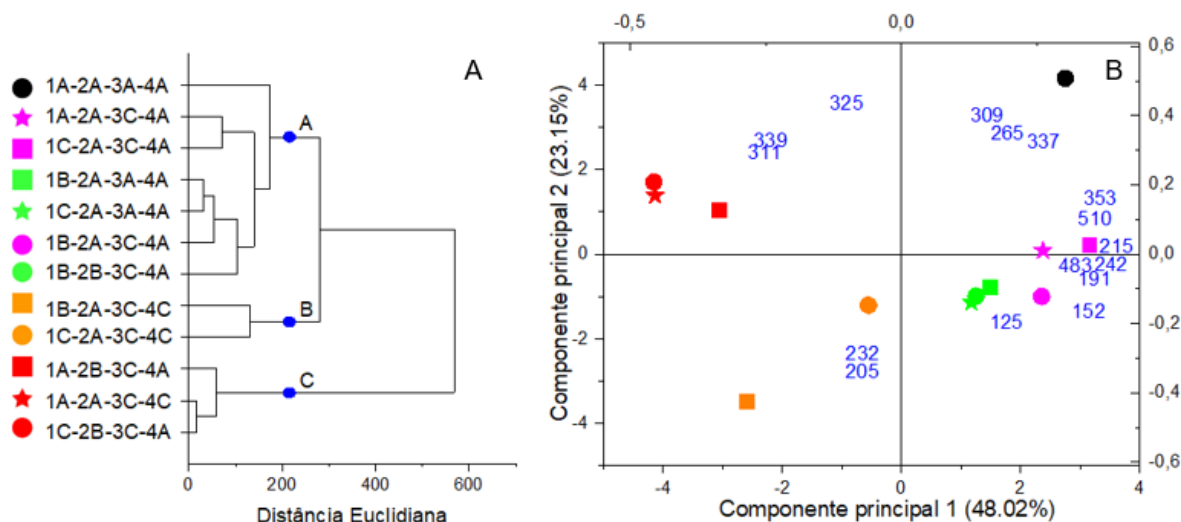


Figura 23. Análise de HCA (A) e PCA (B) dos espectros de massas no modo negativo de ionização. Números azuis representam os *loadings* na análise de PCA

Pela análise dos *loadings* (Figura 23) é possível observar que o grupo vermelho (*cluster C*) é caracterizado por altas intensidade relativas dos sinais m/z 311, 325 e 339 e baixos valores nos demais sinais (variando de 10 a 80% de intensidade relativa). Isso indica que as condições de extração representadas no grupo vermelho não favorecem a solubilização da maior parte dos metabólitos presentes na amostra ou apresentam grande especificidade para apenas um conjunto específico de substâncias. Desse modo, estas condições de extração não seriam adequadas para geração de perfis químicos em metabolômica global.

Os dados obtidos pela técnica de PCA também corroboram as conclusões obtidas pela análise de CLAE-DAD, onde o uso de etanol 70% a 40°C e com aplicações de tamanhos de partículas menores favorecem a extração dos metabólitos especializados da matriz. Durante a análise multivariada dos espectros de massas (Figura 23), as amostras deslocadas para a direita no gráfico de score e que compõem o cluster A, apresentaram a maior quantidade de picos com intensidade relativa acima de 50%. A composição dos grupos também indica que perfil químico obtido por espectrometria de massas obtido é

mais sensível a variações de temperatura do que as demais técnicas já avaliadas. Assim, esta técnica evidencia a importância de se utilizar a menor temperatura de extração estudada.

5.2.5. Considerações gerais

Os resultados do desenvolvimento e otimização do método foram publicados na forma de artigo de pesquisa completo na revista RSC Advances com o título “Phytochemistry by design: a case study of the chemical composition of *Ocotea guianensis* optimized extracts focused on untargeted metabolomics analysis” (Apêndice 4, item 8.4.6). Tendo em vista o rendimento da extração, as informações qualitativas e quantitativas obtidas durante a análise por CCD, CLAE-DAD e EM-ID e a análise multivariada dos dados obtidos por estas técnicas, as condições de extração que apresentaram maior eficácia na produção de um perfil metabolômico global da fração de média polaridade de *Ocotea* envolveu o uso de 70% etanol, temperatura de extração de 40°C, tamanho de partícula de 0,595 mm e a proporção entre amostra e solvente extrator de 1:12 g:mL (amostra 1A-2A-3C-4A, Tabela 4). Nestas condições a amostra apresentou perfis cromatográficos e espectroscópicos de melhor qualidade considerado o objetivo holístico da análise. Apesar destas condições de análise produzirem o segundo maior rendimento de extração, os valores desta variável-resposta são estatisticamente similares às condições que obtiveram o maior rendimento (amostra 1B-2A-3C-4A, Tabela 4). Deste modo, as condições de extração codificadas como 1A-2A-3C-4A, foram empregadas na continuidade do estudo com diferentes espécies de *Ocotea*

5.3. Estudo metabolômico das espécies de *Ocotea*

5.3.1. Caracterização das espécies de *Ocotea* por CLAE-DAD

A extração das espécies de *Ocotea* avaliadas nesta etapa obteve um rendimento médio por espécie de 6,98 a 18,37% com coeficientes de variação (CV) entre 5,59 e 43,79% (Tabela 5). Os altos valores de CV podem ser associados a diferentes características inerentes a cada espécime específico, como idade e presença de espécies parasitas em suas proximidades.

A análise por CLAE-DAD destas espécies foi inicialmente avaliada em função da resolução cromatográfica e comportamento das linhas de base em cada comprimento de onda detectado pelo equipamento. Assim, foi selecionado o cromatograma gerado a 366 nm, visto que neste a maior parte dos picos cromatográficos, considerando todas as amostras avaliadas, apresentavam resolução superior a 1,5 com poucos desvios na linha de base (KRUIVE *et al.*, 2015; KLEIN-JÚNIOR *et al.*, 2016).

Tabela 5. Rendimento das extrações de diferentes espécies de *Ocotea*

Espécie	Identificação da amostra	Rendimento (%)	Rendimento médio (%)	C.V (%)	Elevação do relevo (m)
<i>O. boisseriana</i>	93045	8,46	6,98	11,72	136
	84583	7,00			128
	84270	6,62			123
	75198	6,97			124
<i>O. canaliculata</i>	64429	9,94	8,27	33,20	123
	52994	4,58			120
	63170	8,27			144
<i>O. cinerea</i>	41131	10,75	9,85	5,59	126
	83165	9,75			133
	123078	9,85			147
<i>O. cujumar</i>	30009	11,95	7,68	32,66	129

Espécie	Identificação da amostra	Rendimento (%)	Rendimento médio (%)	C.V (%)	Elevação do relevo (m)
	62469	6,94			107
	62843	8,42			107
	62987	6,37			109
<i>O. delicata</i>	50573	9,40			120
	40608	13,74	9,40	31,68	124
	74168	8,04			120
<i>O. douradensis</i>	74438	7,96			129
	60897	10,81	10,81	35,27	128
	60762	15,50			125
<i>O. matogrossensis</i>	50312	8,74			117
	122528	10,41	8,74	22,27	144
	143653	6,53			140
<i>O. minor</i>	83521	15,01			128
	94251	13,62			135
	84680	16,32	14,31	9,60	129
	74945	13,35			122
<i>O. nigrescens</i>	40384	7,86			130
	62608	10,03			109
	62624	9,78	9,90	22,18	107
	52587	13,16			111
<i>O. percurrrens</i>	83044	18,34			147
	83018	4,70	18,34	43,79	135
	83216	18,87			136
<i>O. rhynchophylla</i>	51513	10,67			112
	52706	14,62			113
	133545	18,34	15,89	21,36	139
	143511	17,15			139
<i>O. scrabrella</i>	113066	9,60			143
	75733	6,81	9,60	30,21	130
	64566	12,61			123
<i>O. splendens</i>	62846	18,45			108
	103056	16,97	18,45	6,05	141
	113889	19,16			140

Inicialmente os espécimes foram caracterizados pela técnica de CLAE-DAD, onde, apesar dos altos valores de CV observados durante a extração, apenas duas espécies apresentaram perfis cromatográficos distintos entre seus espécimes coletados, sendo estas a *O. percurrrens* e *O. splendens*. A distinção qualitativa observada nos espécimes de *O. percurrrens*, ocorreu na amostra de número 83018 entre o tempo de corrida cromatográfica

de 9 a 16,5 min e de 28 a 30 min. (Figura 24). No caso da *O. splendens* a diferenciação ocorreu na amostra 113889, com modificações em relação aos demais espécimes no tempo de retenção de 14 a 14,7 min, 16 a 17 min e 17,5 a 20,5 min. (Figura 25). Esse fenômeno pode ser inicialmente atribuído a modificações no ciclo de vida e idade dos indivíduos, o que poderia ocasionar distinções na composição química.

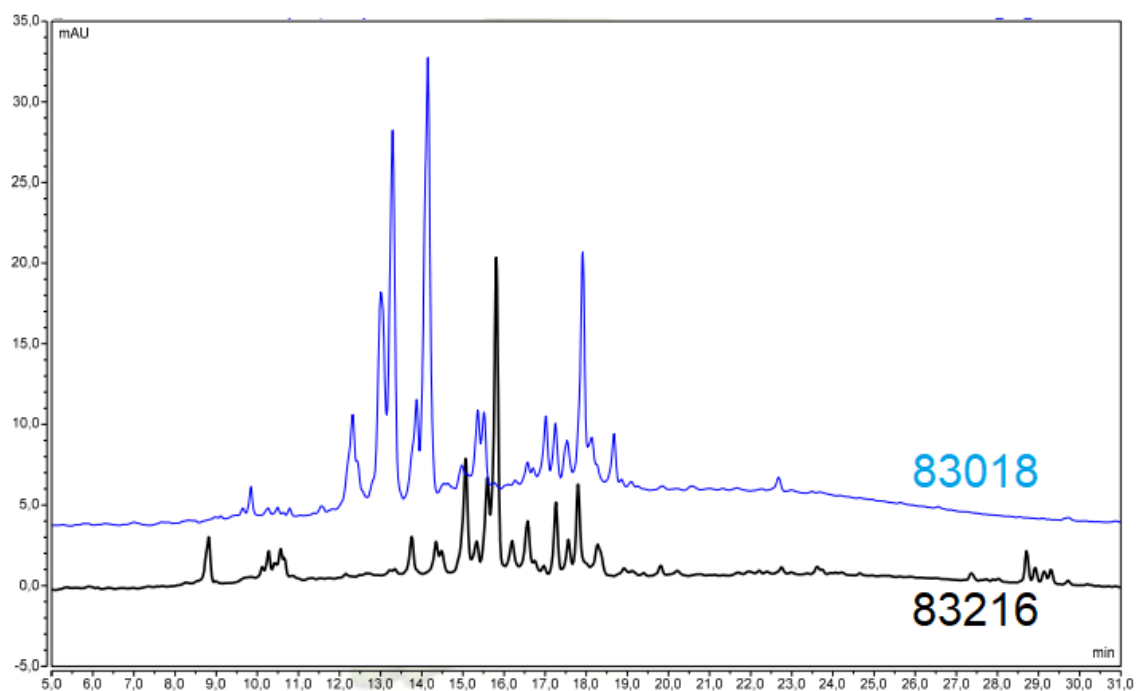


Figura 24. Perfis cromatográficos obtidos nas espécies de *O. percurrents*.

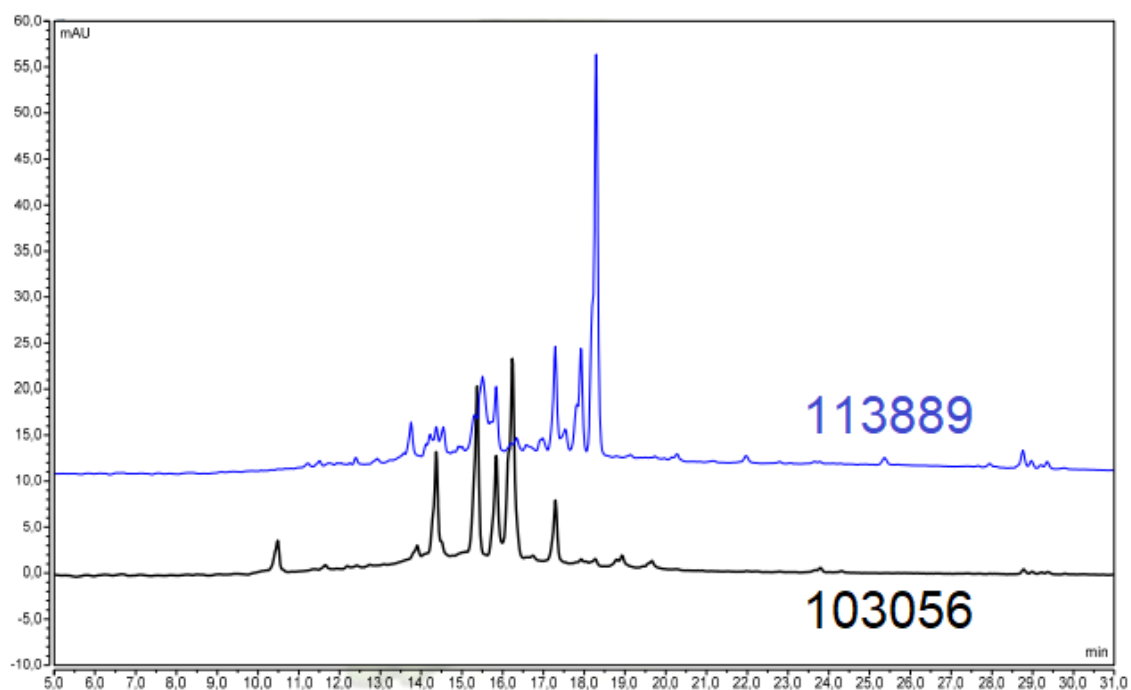


Figura 25. Perfis cromatográficos distintos encontrados na espécie *O. splendens*

O perfil cromatográfico por CLAE-DAD das espécies avaliadas (Figura 26, Figura 27 e Figura 28) demonstra que os constituintes discriminados pelo método ocorrem principalmente entre 12 a 19 min de corrida cromatográfica. As amostras apresentaram seus picos majoritários aproximadamente nos tempos de retenção de 13,1, 14,2, 15,7 e 17,2 minutos. Também foi observado até 5 picos cromatográficos no tempo de retenção compreendido entre 28,6 e 29,6 minutos (Figura 26).

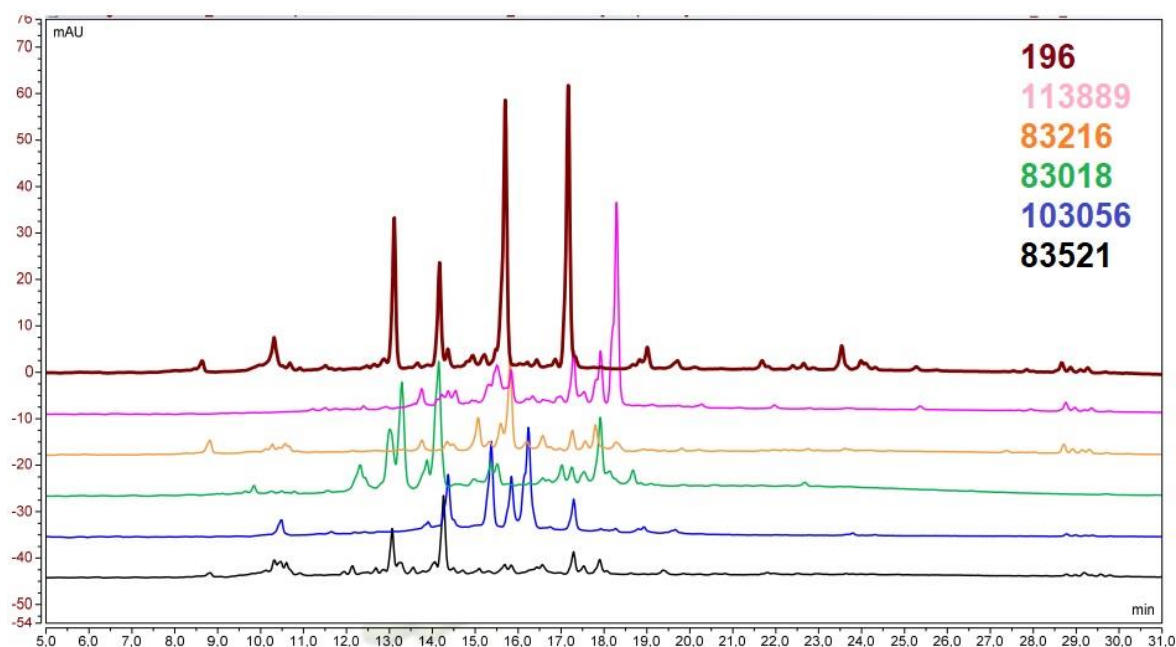


Figura 26. Perfil cromatográfico das espécies *O. guianensis* (196), *O. splendens* (113889 e 103056), *O. percurrans* (83216 e 83018) e *O. minor* (83521)

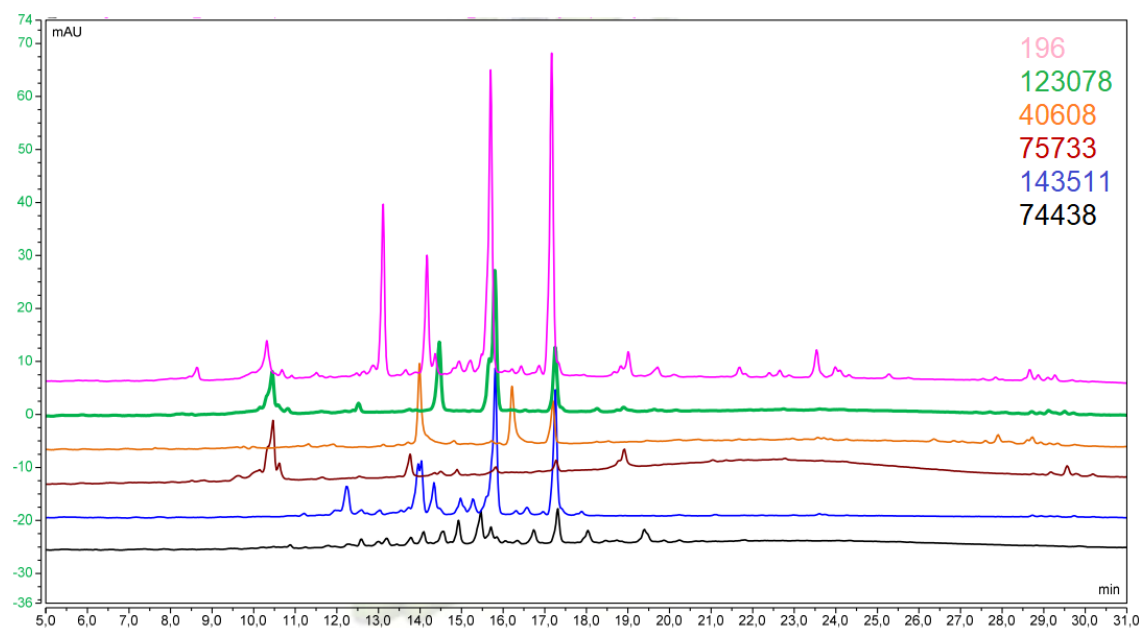


Figura 27. Perfil cromatográfico das espécies *O. guianensis* (196), *O. matrogrossensis* (123078), *O. delicata* (40608), *O. scrabrella* (75733), *O. rhynchophylla* (143511) e *O. douradensis* (74438)

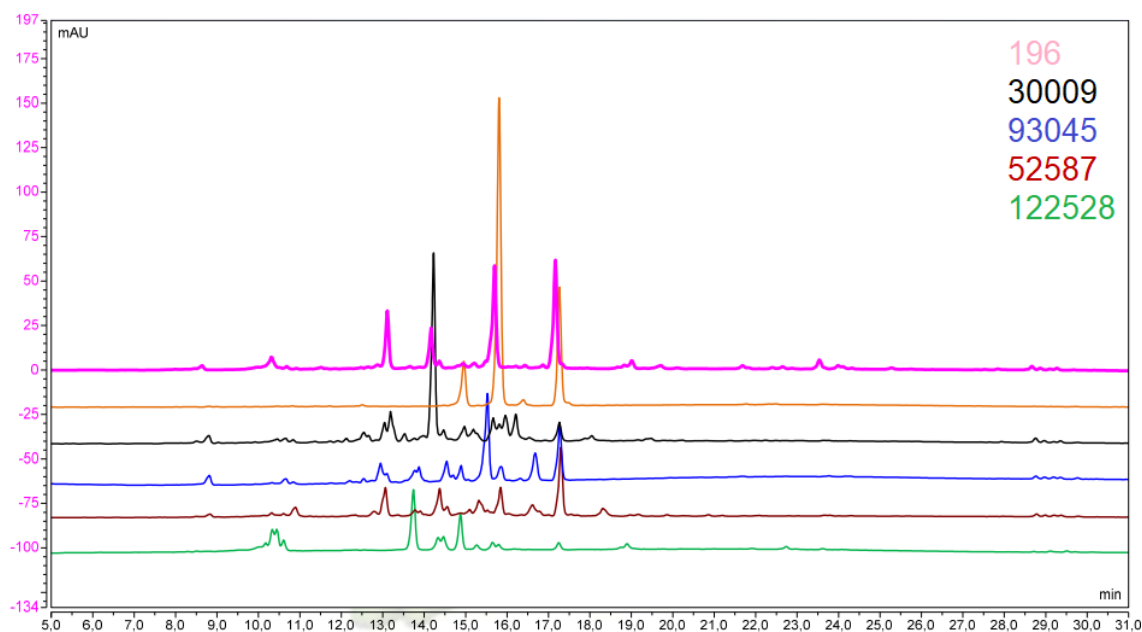


Figura 28. Perfil cromatográfico das espécies *O. guianensis* (196), *O. canaliculata*, *O. cujumar* (30009), *O. boisseriana* (93045), *O. nigrescens* (52587) e *O. matrogrossensis* (122528)

No tempo de retenção de aproximadamente 13,1 min. no CLAE-DAD as espécies avaliadas apresentaram 3 tipos de espectros de absorvância (Figura 29). Neste tempo de retenção, o pico cromatográfico observado na espécie *O. guianensis* (196) apresentou um espectro de absorvância sugestivo de compostos fenólicos (Figura 29A) com duas bandas de absorção entre 240 e 280 nm e 300 e 350 nm.

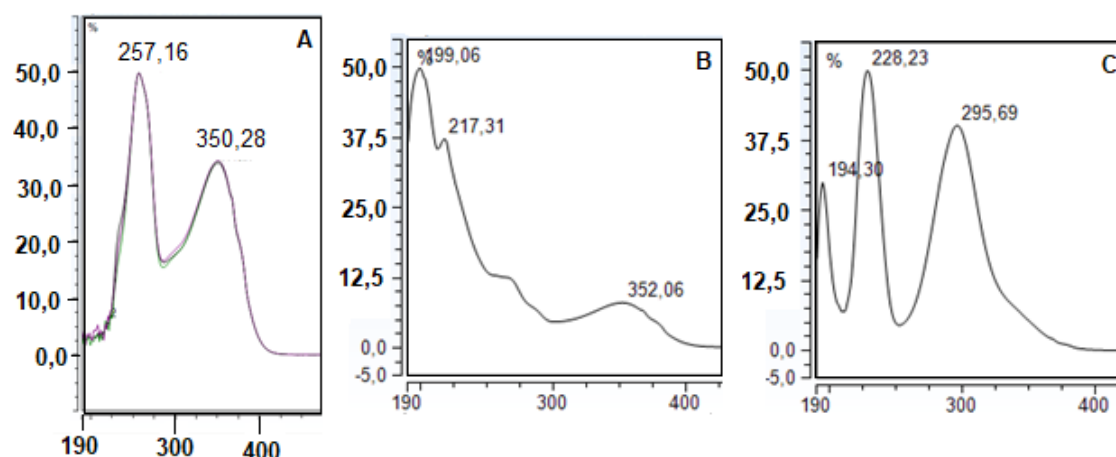


Figura 29. Espectro de absorvância das espécies avaliadas na região com tempo de retenção em aproximadamente 13,1 minutos. (A) espectro de absorvância na espécie *O. guianensis*; (B) espectro de absorvância nas espécies *O. cujumar*, *O. nigrescens* e *O. percurrans*; (C) espectro de absorvância na espécie *O. boisseriana*.

No tempo de retenção de aproximadamente 14,2 min.($\pm 0,05$), apenas as espécies *O. guianensis* (196), *O. matogrossensis* (122528), *O. cujumar* (30009), *O. minor* (83521) e *O. percurrans* (83018) apresentaram picos cromatográficos. Em todas as espécies os espectros de absorvância nesta região foram iguais (Figura 30). As bandas de absorvância observadas (Figura 30), também sugerem a presença de compostos fenólicos, tais como o ácido clorogênico ou flavonoides. O espectro de absorvância observado nas amostras com tempo de retenção em aproximadamente 15,7 e 17,2 min. também apresentaram bandas de absorvância indicativas para a presença de compostos fenólicos (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

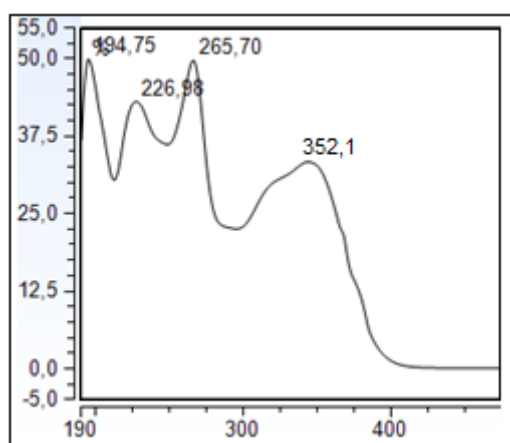


Figura 30. Espectro de absorvância na região 2 do perfil cromatográfico

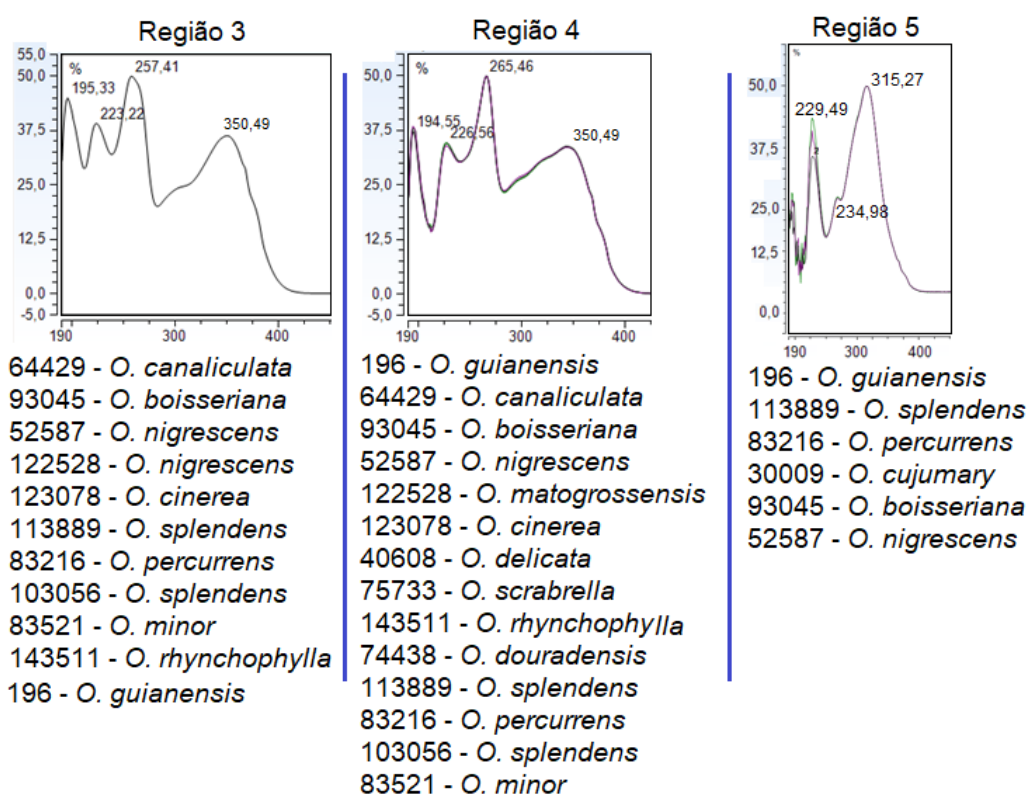


Figura 31. Espectro de absorvância característicos nas regiões 3, 4 e 5 do perfil cromatográfico e lista das espécies que apresentam picos cromatográficos em cada região.

Deste modo, os espectros de absorvância obtidos nos picos majoritários discriminados pelo CLAE-DAD evidenciam a presença de compostos cromogênicos nas

espécies. Apesar de corresponderem a uma mistura, os espectros de absorbância sugerem a presença de alcaloides, flavonóis, flavonas e derivados do ácido clorogênico, sendo necessário a realização do fracionamento das amostras para averiguar a identidade destes compostos majoritários. Vale ressaltar ainda que, considerando a concentração relativa dos sinais cromatográficos entre as amostras (área do pico), as espécies *O. boisseriana*, *O. nigrescens*, *O. matogrossensis*, *O. douradensis* e *O. scrabrella* apresentariam as menores concentrações destes compostos.

5.3.2. Perfil metabolômico por CLAE-EM

Para estabelecer a similaridade entre as espécies e reconhecer possíveis sinais cromatográficos que possam ser utilizados como marcadores químicos específicos ou que contribuam significativamente na metabolômica global do gênero *Ocotea* foi realizada a análise multivariada dos dados.

Entre as 14 espécies de *Ocotea* avaliadas foram detectados 5,715 sinais *m/z* distintos, sendo os mesmos empregados para o estudo quimiossistemático destas por análise multivariada. As técnicas de HCA (Figura 32) e PCA (Figura 33) evidenciaram a formação de 2 grandes agrupamentos, dentre os quais a *O. splendens* se apresentou como a de composição química distinta das demais, compondo sozinha um dos agrupamentos. Ainda, no segundo grupo as réplicas biológicas de 9 das 14 espécies avaliadas apresentaram elevada similaridade, formando subagrupamentos concisos entre si.

De modo geral, espécimes diferentes da mesma espécie botânica podem apresentar alta variabilidade em sua composição química, visto a ocorrência de vários fenômenos bióticos e abióticos capazes de alterar o metabolismo de cada indivíduo (NEHME *et al.*, 2008; DUBEY *et al.*, 2015; BAKHA *et al.*, 2018). Assim, a formação dos subagrupamentos contendo indivíduos da mesma espécie (Figura 32) evidencia que

o método aplicado é adequado para a obtenção de características inerentes a espécie, sendo pouco afetado por fenômenos como alteração do relevo no local de coleta, idade dos indivíduos coletados e tratamento das amostras coletadas.

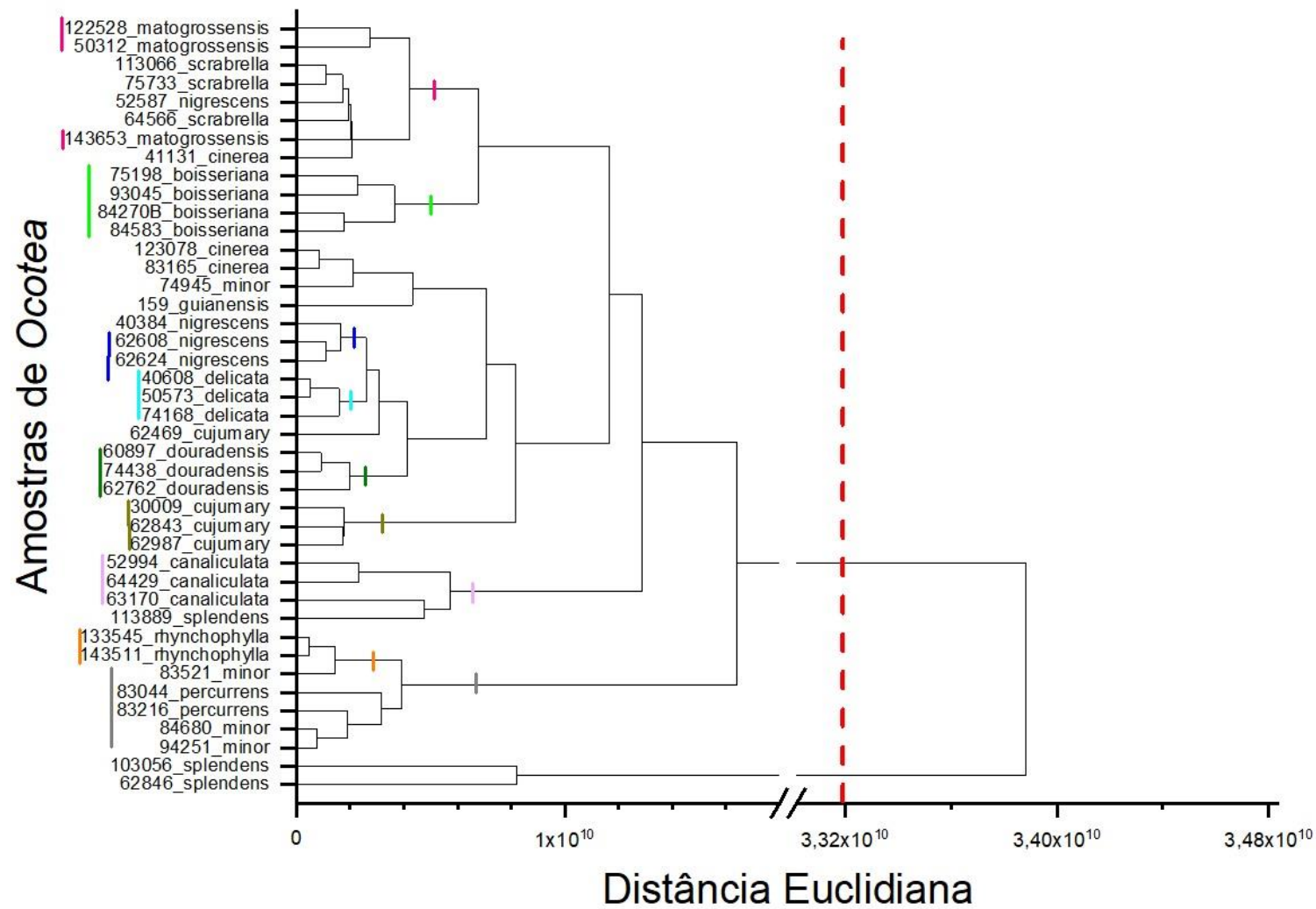


Figura 32. Dendrograma para a HCA contendo todas as espécies avaliadas de *Ocotea*

base das réplicas biológicas desta espécie como um de seus constituintes majoritários (Figura 34).

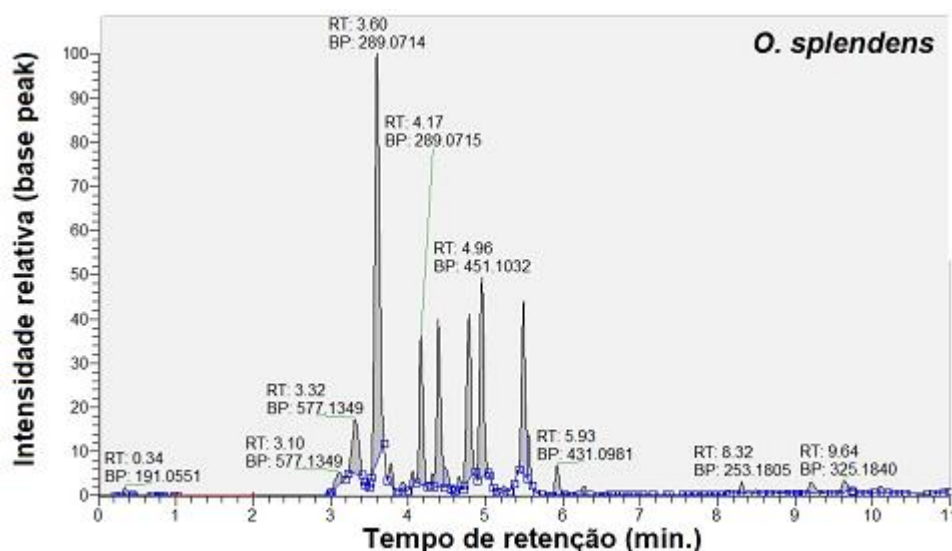


Figura 34. Cromatograma do pico base da espécie *Ocotia splendens* obtido por CLAE-EM

A área do pico observada para este sinal m/z na *O. splendens* corresponde ao dobro do valor observado para as demais espécies, com exceção da *O. guianensis*, onde este não se apresenta como um dos metabólitos de maior concentração (Apêndice 3). Adicionalmente, o m/z 289,07167 não foi detectado em duas das três réplicas das espécies *O. nigrescens*, *O. delicata* e *O. boissieriana*, o que indica uma baixa metabolização deste composto por estas espécies. O padrão de fragmentação deste sinal m/z , caracterizado pela presença dos sinais 245,0816, 125,0229, 137,0230, 203,0708 e 205,0500 permite sugerir sua identidade como o flavonoide catequina.

Apesar da ampla ocorrência deste metabólito em espécies botânicas, inclusive na família Lauraceae, devido a elevada concentração relativa, capaz de distingui-la de outras espécies do gênero, este pode ser utilizado para compor um grupo de marcadores químicos para a *O. splendens* dentro do gênero ou de um subgrupo de amostras (como foi o caso nesta pesquisa).

Assim como o m/z 289,07167, o sinal 451,10557 foi um dos metabólitos capazes de distinguir a *O. splendens* das demais (Figura 33), com a área de seu pico cromatográfico apresentando um valor pelo menos 5 vezes maior que o observado nas demais espécies, com exceção da *O. guianensis*. Deste modo, ambos os metabólitos podem ser considerados marcadores químicos para a *O. splendens* e *O. guianensis* dentro do conjunto de espécies avaliados. Apesar da similaridade destas espécies através destes metabólitos, considerando o perfil químico global gerado a *O. guianensis* apresenta maior similaridade com as demais espécies, conforme pode ser observado na análise multivariada (Figura 32 e Figura 33).

Adicionalmente o gráfico de *loadings* (Figura 33) revela o m/z 577,13479 como um possível marcador químico para a *O. guianensis*. Este metabólito não foi detectado na *O. nigrescens*, assim como em dois dos três espécimes de *O. canaliculata*. Visto que a *O. guianensis* apresenta similaridade química com espécies do gênero pertencentes ao “Velho mundo” (ANTONIO *et al.*, 2020) (ou seja, espécies de alta ancestralidade na linha cronológica do gênero), e pelo fato que as rotas metabolizadoras se alteram com a evolução botânica (RAMOS; SOUSA, 2017), pode ser estimado que as espécies *O. nigrescens* e *O. canaliculata* pertençam a história recente da *Ocotea*.

O m/z 863,18497 caracteriza as espécies *O. rhynchophylla* e *O. minor* de acordo com a técnica de PCA (Figura 33). Visto o perfil de fragmentação deste sinal m/z , contendo os fragmentos 411,0720, 289,0717, 245,0816, 125,0231 e 109,0282 pode ser sugerido que este corresponda a um derivado glicosilado da catequina. Ainda, o m/z 863,18497 não foi detectado nas espécies *O. matogrossensis*, *O. canaliculata*, *O. boisseriana* e *O. delicata*. Essas espécies juntamente com a *O. nigrescens*, que não apresentou a catequina (m/z 289) em sua composição, podem compor um subgrupo de espécies caracterizado pela baixa metabolização deste flavonol. A ampla metabolização

de flavonóis, quando comparado a flavonas, é associado com a basalidade de espécies botânicas (SANTOS; SALATINO, 2000), deste modo, espécies com baixa metabolização de flavonóis podem ser associadas a maiores índices de evolução botânica, conforme abordado na Seção 5.1.3. A formação deste grupo de espécies com baixa produção de flavonóis tem relevância na quimiosistemática, visto que, a maioria das espécies de *Ocotea* quimicamente descritas até o momento se apresentam como acumuladoras de flavonóis (Quadro 1).

As espécies *O. matogrossensis* e *O. boisseriana*, localizadas na porção inferior do gráfico de *scores* (Figura 33), são caracterizadas pela alta intensidade relativa do *m/z* 191,0526, apresentando no mínimo o dobro da área de pico cromatográfico detectado nas demais espécies. Vale ressaltar que todas as espécies avaliadas apresentaram este sinal *m/z* em sua composição.

O sinal *m/z* 191,05 pode ser relacionado a ocorrência do ácido quínico e de um derivado do ácido clorogênico (Tabela 6), compostos já reportados em outras espécies de Lauraceae e angiospermas (FANG; YU; PRIOR, 2002; LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017; DA TRINDADE; DA SILVA; SETZER, 2018). Apesar de comum em espécies botânicas, a concentração alta destes metabólitos sugerido pela alta intensidade do *m/z* 191,05 em parte das espécies avaliadas, pode ser utilizada como um marcador químico relevante para a metabolômica global da *O. matogrossensis* e *O. boisseriana*.

Para melhorar a resolução na separação das espécies, a análise multivariada foi refeita excluindo as réplicas biológicas da *O. splendens*, as quais atuaram como um *outlier* na HCA e PCA (Figura 32 e Figura 33). Pela as técnicas de HCA (Figura 35) e PCA (Figura 36) as espécies foram divididas em 4 agrupamentos distintos, dentre os quais o grupo azul foi compostos apenas pela *O. canaliculata*.

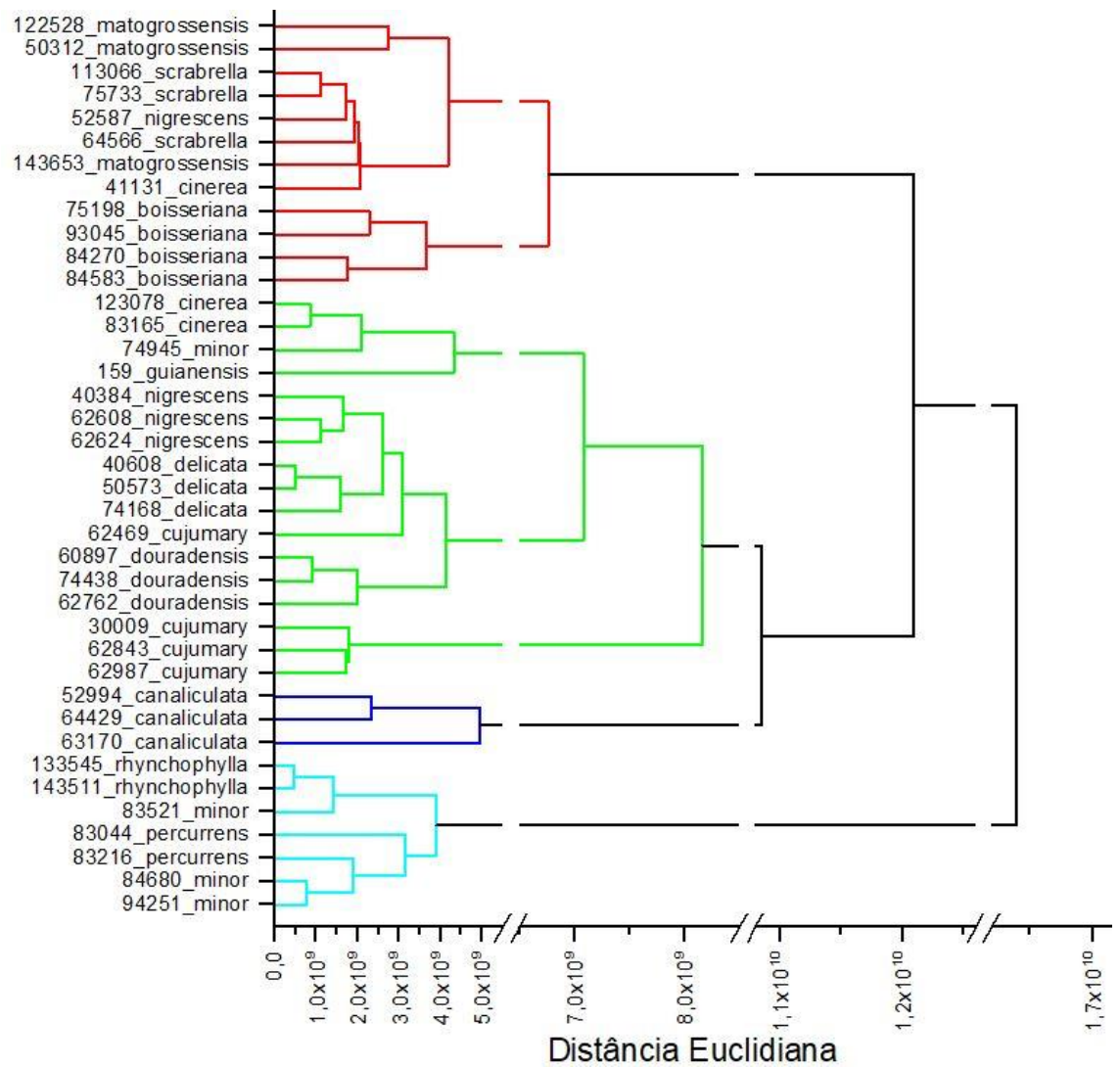


Figura 35. Dendrograma para análise de 13 espécies de *Ocotea*

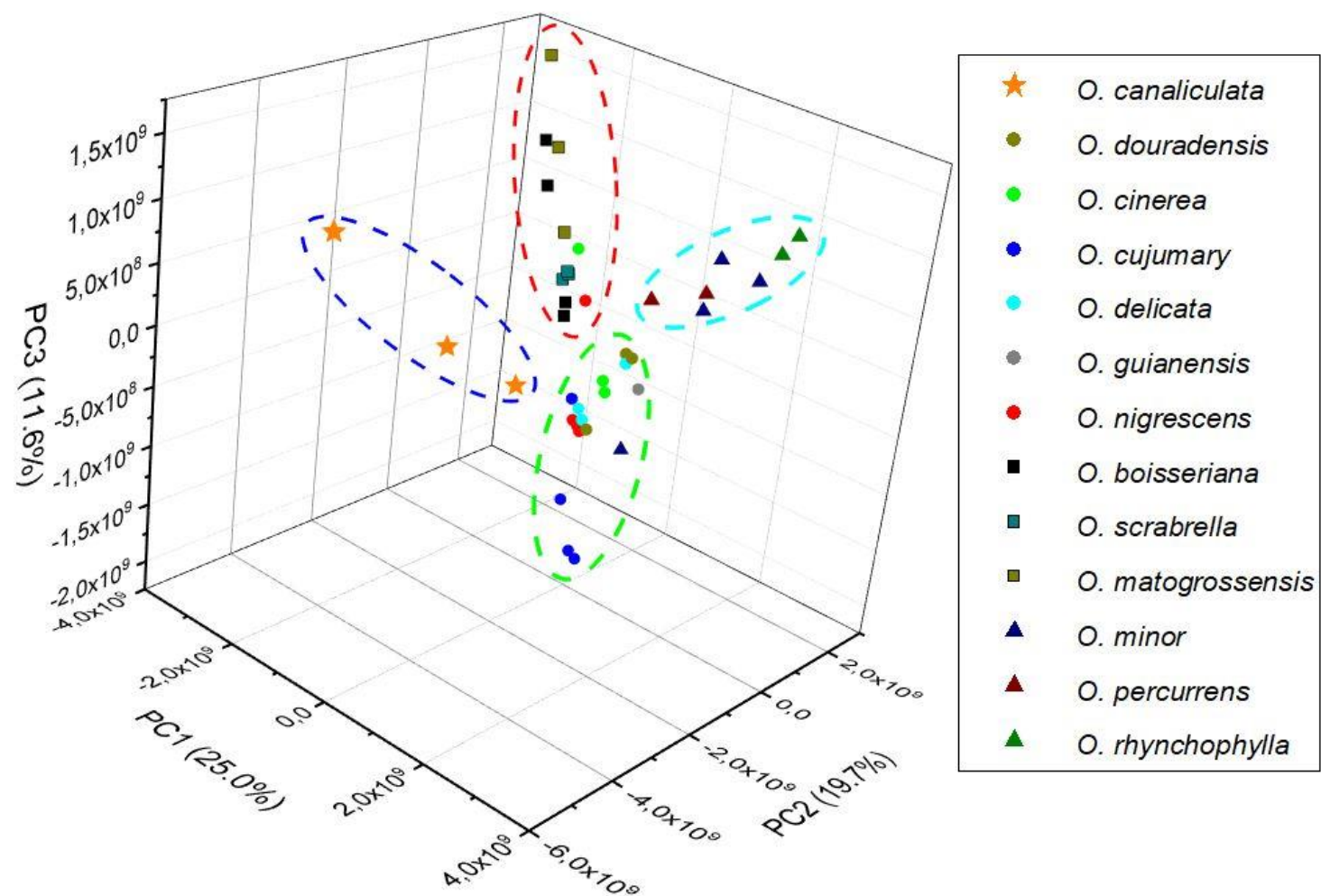


Figura 36. Gráfico de scores para análise de PCA de 13 espécies de *Ocotea*.

Através do gráfico de *loadings* (Figura 37), a *O. canaliculata* pode ser caracterizada e distinguida das demais principalmente pela presença dos sinais *m/z* 281,13944, 450,11061 e 449,10816 com os valores mais elevados de área do pico cromatográfico. Dentre estes o *m/z* 281,13944 ocorreu apenas nas réplicas biológicas de *O. canaliculata* podendo ser considerada como um marcador químico específico para a espécie dentro deste subconjunto de amostras.

A fragmentação do *m/z* 281,13944 apresentou uma perda neutra de -44 u e -142 u (Figura 38), podendo indicar a presença de metabólito alquilado, como o malonil que possui perda neutra característica de -44 u (CUYCKENS; CLAEYS, 2004). A perda neutra de -142 u também sugere que este sinal corresponda a uma substância glicosilada (LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017).

O grupo ciano (Figura 36), constituído majoritariamente pelas espécies *O. minor*, *O. percurrans* e *O. rhychophylla* pode ser caracterizado pelos altos valores de área do sinal *m/z* 836,18497 (Figura 37), corroborando o padrão observado anteriormente (**Figura 32**). Vale ressaltar que a área detectada deste sinal *m/z* para o grupo ciano manteve uma média de $2,8 \times 10^9$, enquanto nas demais espécies a média da área foi de $4,49 \times 10^7$.

A remoção da *O. splendens* da análise multivariada ainda permitiu evidenciar a correlação entre as espécies *O. matogrossensis*, *O. boisseriana* e *O. scrabrella* através da ocorrência do *m/z* 191, conforme mencionado anteriormente para as duas primeiras espécies citadas.

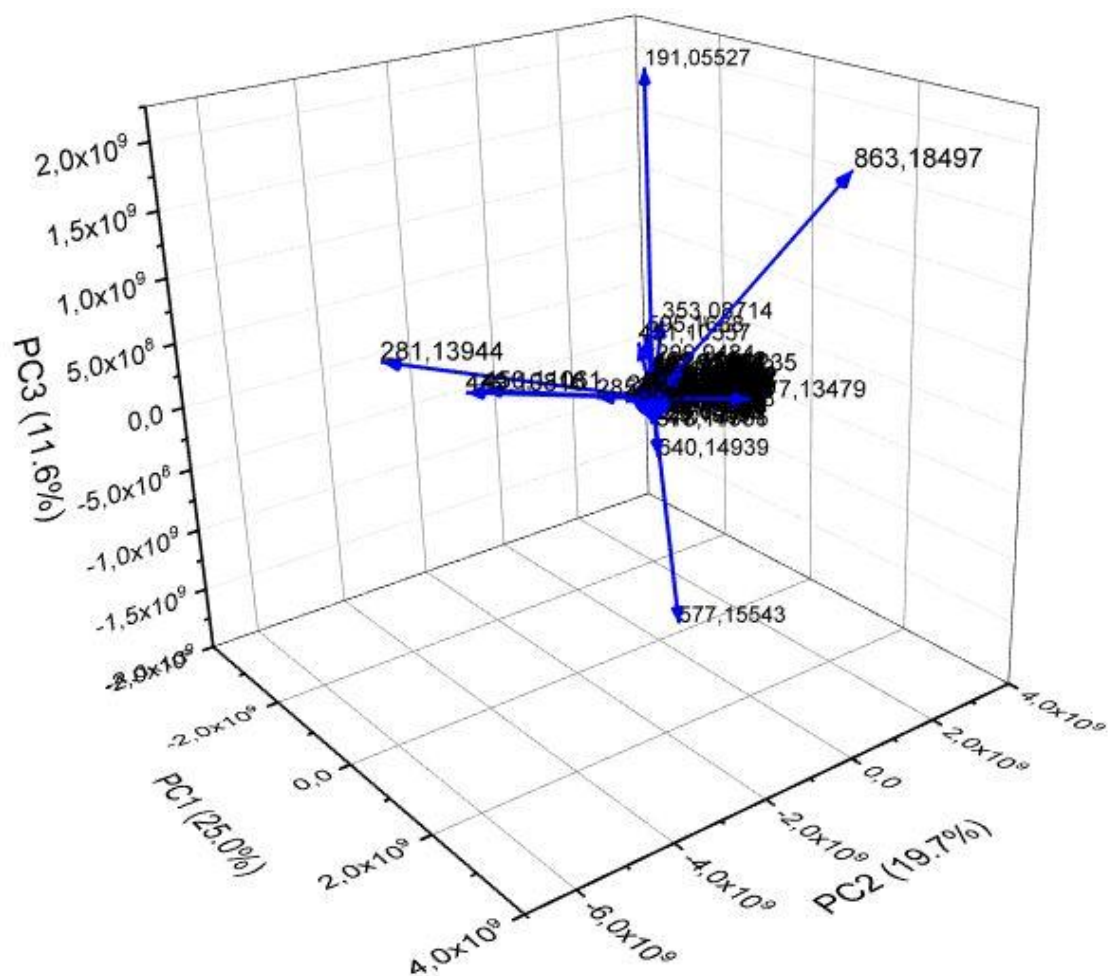


Figura 37. Gráfico de loadings para o PCA de 13 espécies de *Ocotea*

64429 #1329 RT: 4.40 AV: 1 NL: 1.29E5
T: FTMS - p ESI d Full ms2 281.1393@hcd30.00 [5]

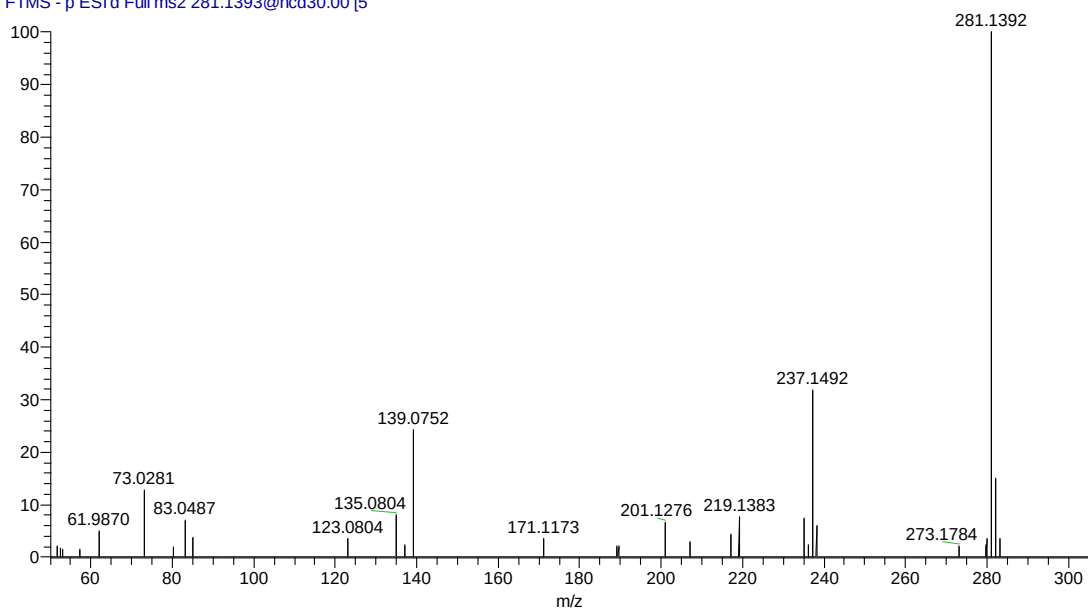


Figura 38. Padrão de fragmentação do m/z 281 da *O. canaliculata*.

Similarmente, o grupo verde (Figura 36) composto majoritariamente pelas espécies *O. douradensis*, *O. cinerea*, *O. cujumar*, *O. delicata*, *O. guianensis* e *O. nigrescens* correlacionou estas de acordo com a área do sinal m/z 191,05527, previamente discutido com relação a *O. guianensis*. De modo geral, os sinais m/z que apresentaram maior relevância no agrupamento das amostras podem ser resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Sinais m/z que atuaram como marcadores químicos na análise multivariada

m/z	Espécie(s) caracterizada	Ausente nas espécies
289,07167	<i>O. splendens</i>	<i>O. nigrescens</i> , <i>O. delicata</i> , <i>O. boissieriana</i>
451,105557	<i>O. splendens</i> , <i>O. guianensis</i>	-
577,13479	<i>O. guianensis</i> , <i>O. douradensis</i> , <i>O. cinerea</i> , <i>O. cujumar</i> , <i>O. delicata</i> , <i>O. nigrescens</i>	<i>O. nigrescens</i> , <i>O. canaliculata</i>
863,18497	<i>O. rhynchophylla</i> , <i>O. minor</i> , <i>O. percurrans</i>	<i>O. matogrossensis</i> , <i>O. canaliculata</i> , <i>O. boissieriana</i> , <i>O. delicata</i>]
191,05526	<i>O. matogrossensis</i> , <i>O. boissieriana</i> , <i>O. scrabrella</i>	-
281,13944	<i>O. canaliculata</i>	Todas as demais
450,11061	<i>O. canaliculata</i>	<i>O. matogrossensis</i> , <i>O. minor</i> , <i>O. douradensis</i>
449,10816	<i>O. canaliculata</i>	<i>O. matogrossensis</i> , <i>O. minor</i> , <i>O. douradensis</i>

Visto que grande parte das espécies estudadas nunca foi descrita quimicamente (Quadro 9) foi realizada a triagem (do inglês, *screening*) dos constituintes ou classes químicas presentes nas amostras de *Ocotea*. Através dos perfis de fragmentação e comparação com a literatura existente foi possível sugerir a identidade de 24 substâncias (Tabela 6). As substâncias identificadas condizem com os estudos fitoquímicos já existentes para o gênero *Ocotea*, onde é destacada a ampla metabolização de alcaloides e flavonoides (MARIA *et al.*, 2007; SALLEH; AHMAD, 2017).

Quadro 9. Descrição das espécies de *Ocotea* que possuem descrição filogenética ou química

Espécie	Possui descrição filogenética	Possui descrição química
<i>O. splendens</i>	Sim	Apenas de óleos essenciais
<i>O. canaliculata</i>	Sim	Apenas de óleos essenciais
<i>O. cujumarum</i>	Sim	Apenas de óleos essenciais
<i>O. minor</i>	Não	Apenas de óleos essenciais
<i>O. nigrescens</i>	Não	Apenas de óleos essenciais
<i>O. percurrans</i>	Não	Apenas de óleos essenciais
<i>O. rhynchophylla</i>	Sim	Não
<i>O. matogrossensis</i>	Não	Não
<i>O. guianensis</i>	Sim	Sim, apenas a publicação oriunda desta Tese (ANTONIO <i>et al.</i> , 2020)
<i>O. boisseriana</i>	Não	Não
<i>O. cinerea</i>	Não	Não
<i>O. delicata</i>	Não	Não
<i>O. douradensis</i>	Não	Não
<i>O. scrabrella</i>	Não	Não

Tabela 6. Identidade sugerida para os metabólitos detectados

Identidade sugerida	m/z observado	Padrão de fragmentação observado*	Tempo de retenção (min.)	Erro (ppm)	Referência**
Modo positivo de ionização					
Coclaurina	286,143	269,1170; 237,0908; 178,0856; 175,0752; 143,0491; 107,0494	3,88	-0,6889	(SCHMIDT <i>et al.</i> , 2005)
Predicentrina	342,169	311,1268; 296,1039; 279,1012; 265,0846	4,1	-0,8767	(SHIM <i>et al.</i> , 2013) ^A
Corituberina	328,1543	297,1119; 282,0887; 265,0857; 237,0907	4,16	-1,8284	(SHIM <i>et al.</i> , 2013) ^B
Boldina	328,1544	311,1542; 297,1107; 282,0887; 279,1016; 265,0858	4,28	0,198	(SHIM <i>et al.</i> , 2013) ^C
Coridina	342,1705	311,1275; 296,1041; 280,1092; 265,0856	4,5	-0,8767	(STÉVIGNY <i>et al.</i> , 2004)
Isoboldina	328,1543	311,1260; 296,1043; 280,1096; 265,0863	4,56	-1,8284	(SHIM <i>et al.</i> , 2013) ^D
Reticulina	330,1696	299,1271; 192,1014; 175,0751; 137,0595	4,1	-0,9086	(SCHMIDT <i>et al.</i> , 2005)
Modo negativo de ionização					
Kaempferol-3-O-rhamnosideo	431,098	285,0396; 255,0297; 227,0340	5,93	-0,8582	(MARCH; MIAO, 2004)
Ácido quínico	191,0552	173,0448; 127,0389	0,37	0,5234	(LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017)
Kaempferol	285,0402	255,0296; 229,0500	5,91	2,4558	(MARCH; MIAO, 2004)
Kaempferol-3-O-pentosideo	417,0809	284,0326; 255,0300; 227,0341	5,67	2,6373	(MARCH; MIAO, 2004)
Kaempferol-3-O-glicosideo	447,0927	285,0402; 257,0453; 241,0484; 151,0025	5,36	-1,3084	(MARCH; MIAO, 2004) ^E

Identidade sugerida	m/z observado	Padrão de fragmentação observado*	Tempo de retenção (min.)	Erro (ppm)	Referência**
Quercetina-3-O-rhamonsideo	447,093	301,0343; 273,0239; 257,0455; 229,0497; 151,0024; 121,0283	5,54	-2,2031	MassBank of North America ^F
Isosakuranetina-5-O-rhamonisideo	431,134	285,0375; 269,0803; 163,0389; 255,0314	5,55	-1,7535	Human Metabolome Database ^G
Derivado da catequina	879,1775	719,1513; 593,1299; 583,1166; 575,1194; 352,0672; 289,0716; 245,0815	3,52	-	(LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017; MAAZOUN <i>et al.</i> , 2017)
Derivado da catequina	863,1848	719,1515; 593,1299; 466,1199; 352,0672; 289,0716; 245,0815	3,78	-	(LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017; MAAZOUN <i>et al.</i> , 2017)
Derivado do Kaempferol	449,1087	341,0689; 285,0422; 241,0519; 151,0032	5,06	-	(MARCH; MIAO, 2004; LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017)
Ácido clorogênico	353,0887	191,0552; 179,0340; 173,0449; 135,0439	3,01	5,6643	MassBank of North America ^H
Derivado da catequina	483,1295	341,0662; 289,0717; 245,0816; 205,0500; 203,0704; 109,0282	4,56	-	(LLORENT-MARTÍNEZ; SPÍNOLA; CASTILHO, 2017; MAAZOUN <i>et al.</i> , 2017)
Catequina	289,0714	245,0816; 137,0230; 203,0708; 205,0500	3,23	2,4215	(MAAZOUN <i>et al.</i> , 2017) ^I

*Padrões de fragmentação demonstrados no Apêndice 5

**referência utilizada para sugerir a identidade do metabólito baseado no padrão de fragmentação.

^A<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00005436122>

^B<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/PM010812>

^C<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/PB001521>
^D<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB000005436060>
^E<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00000845312>
^F<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00000846668>
^Ghttps://hmdb.ca/spectra/ms_ms/13529
^H<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00000579204>
^I<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/FiehnHILIC002631>

Os estudos quimiosistemáticos existentes acerca do gênero *Ocotea* caracterizam as espécies em apenas dois tipos de grupos, aquelas que acumulam alcaloides e aquelas que acumulam lignoides. Entretanto, essa classificação é atualmente defasada visto que espécies como a *O. duckei* e *O. macrophylla* já foram reportadas por conterem compostos de ambas as classes. Assim, mesmo que até o momento não tenham sido encontrados lignoides no perfil químico das espécies estudadas não descartamos a possibilidade de estes estarem presentes em pequenas concentrações.

5.3.3. Considerações gerais

O método empregado para a avaliação metabolômica das 14 espécies de *Ocotea* foi capaz de evidenciar marcadores químicos específicos para duas destas, a *O. splendens* e *O. canaliculata*. Adicionalmente, as espécies foram classificadas em 4 grupos relacionados principalmente as concentrações relativas de flavonoides presentes nestas. A caracterização de cada grupo ocorreu perante um subconjunto de sinais m/z específicos observados no perfil químico destas, os quais compõem um total de 8 sinais m/z de elevada significância na classificação das espécies.

A separação das espécies em subagrupamentos evidencia a eficácia da metabolômica global em prover meios de distinguir e caracterizar espécies de alta complexidade, como as do gênero *Ocotea*. Com a associação de dados morfológicos ou taxonômicos pode ser possível a consolidação destes agrupamentos como uma ferramenta sistemática na identificação, classificação e estudo evolutivo destas espécies.

Ainda, foi possível realizar a sugestão de identidade de 24 metabólitos distintos dentro do universo amostral, o qual era composto por espécies nunca antes avaliadas no que tange sua composição química de média polaridade. Como um primeiro registro

químico destas espécies, a identificação destes metabólitos se torna um passo importante na compreensão da composição química do gênero.

5.4. Validação do método

A validação de métodos analíticos garante que uma metodologia seja adequada para a sua função, sendo assim capaz de produzir dados confiáveis e exatos. No caso da metabolômica global, onde o objetivo da análise requer que sejam avaliados centenas de metabólitos (DE PAEPE *et al.*, 2018), o procedimento de validação ainda não é registrado por órgãos regulamentadores. Entretanto, os fluxogramas de trabalho sugeridos até o momento (DUNN *et al.*, 2012; NAZ *et al.*, 2014; BEGOL *et al.*, 2018; DE PAEPE *et al.*, 2018; ROMBOUTS *et al.*, 2019) têm sido eficientemente aplicado na demonstração e garantia da precisão analítica dos métodos usados em metabolômica global.

Durante a avaliação da qualidade do registro a soma das intensidades dos sinais nos cromatogramas de corrente iônica total das amostras de QC apresentaram repetibilidade aceitável em um intervalo de 130 injeções (Figura 39), com um coeficiente de variação de 5,40% (n=55). A distribuição normal dos resíduos dentro deste intervalo de injeções demonstra que o método analítico empregado não apresenta desvios sistemáticos no sinal analítico, sendo assim a variação observada entre as análises de amostras reais referente apenas a variabilidade biológica (DUNN *et al.*, 2012; NAZ *et al.*, 2014).

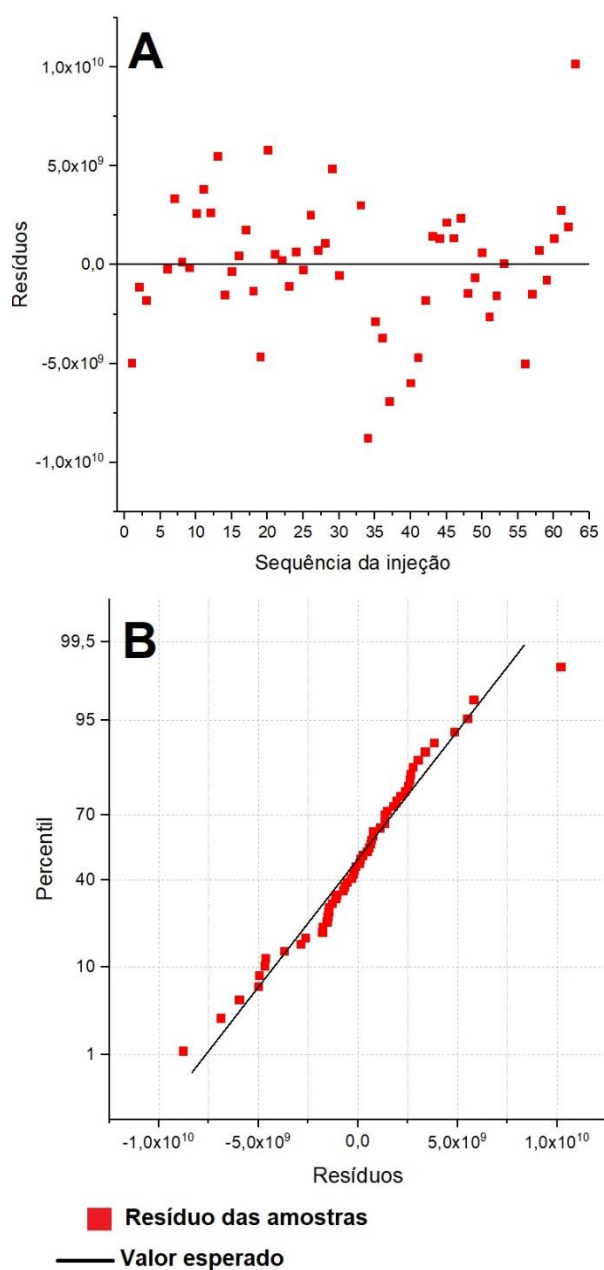


Figura 39. Análise de dispersão por (A) gráfico de resíduos e (B) gráfico de probabilidade normal dos resíduos

A PCA realizada com as amostras de QC e de *Ocotea* corroboram a repetibilidade do método (Figura 40). Nesta análise, as amostras de QC apresentaram-se na forma de um grupo compacto, com distância Euclidiana menor que o observado entre as réplicas biológicas das espécies avaliadas. Esse comportamento evidencia a qualidade da obtenção dos dados metabolômicos, visto que as amostras de controle de qualidade foram

produzidas em laboratório e assim não devem apresentar variação biológica (DUNN *et al.*, 2012). Desta forma, o método empregado para obtenção dos perfis químicos por CLAE-EM demonstrou ter repetibilidade e qualidade na obtenção de sinal adequada para o objetivo da metabolômica global (DUNN *et al.*, 2012; NAZ *et al.*, 2014; BEGOL *et al.*, 2018; DE PAEPE *et al.*, 2018; ROMBOUTS *et al.*, 2019).

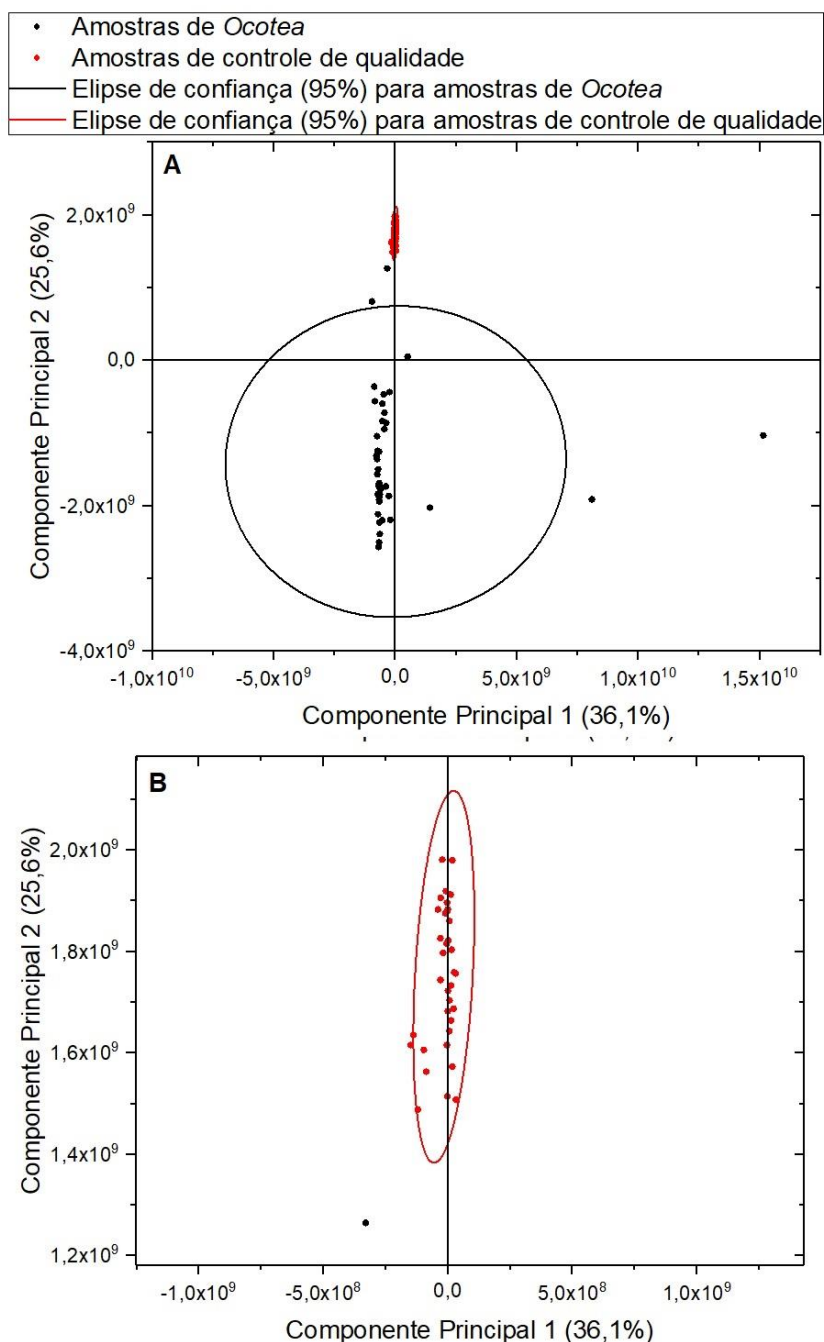


Figura 40. Análise das amostras de controle de qualidade por (A) PCA, com (B) ampliação dos detalhes acerca da elipse de confiança das amostras de controle de qualidade

A amostra de controle de qualidade apresentou um cromatograma (Figura 41) com 184 sinais de m/z recorrentes nas amostras de QC utilizadas no estudo de linearidade. Dentre estes, 49,45% dos metabólitos apresentaram linearidade ótima (Tabela 7) (BEGOL *et al.*, 2018; ROMBOUTS *et al.*, 2019), com coeficientes de correlação (r^2) maior que 0,900. Enquanto isso, 11,41% dos sinais m/z apresentaram linearidade regular com r^2 variando entre 0,899 e 0,800. Durante a validação de método para metabolômica global realizado por De Paepe *et al.* (2018) também foram encontradas porcentagens similares de metabólitos com lineares ótima, durante a avaliação de amostras de fezes (42,9% de sinais lineares) e plasma (41,5% de sinais lineares).

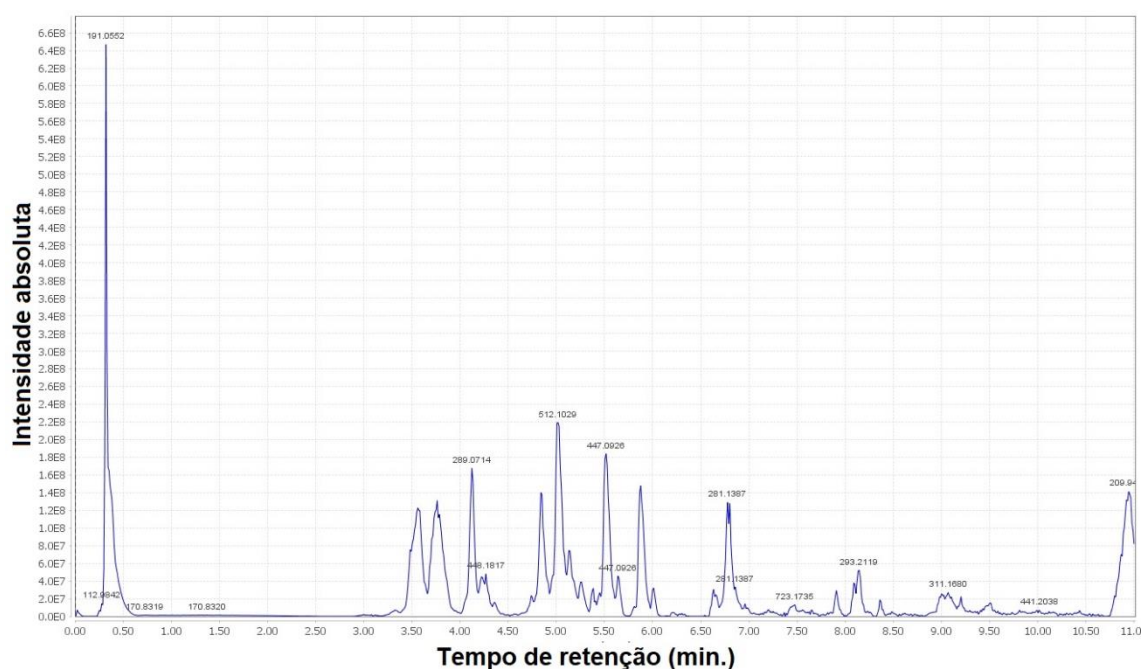


Figura 41. Cromatograma do pico base a amostra de controle de qualidade sem diluição em modo de ionização negativo

Tabela 7. Coeficiente de correlação linear (r^2) e tempo de retenção (RT) dos metabólitos que apresentaram linearidade ótima no modo negativo de ionização.

<i>m/z</i>	RT (min.)	r^2	<i>m/z</i>	RT (min.)	r^2	<i>m/z</i>	RT (min.)	r^2	<i>m/z</i>	RT (min.)	r^2
427,1879	7,799	0,9991	337,0926	3,955	0,9723	864,1857	3,780	0,9438	577,1353	3,302	0,8784
323,0784	0,336	0,9990	364,1919	8,064	0,9722	295,2276	8,705	0,9425	293,1850	6,958	0,8706
433,2075	4,235	0,9989	578,1387	6,897	0,9716	451,2030	4,755	0,9338	448,1823	4,279	0,8668
195,0500	0,324	0,9988	191,0550	4,058	0,9710	179,0551	0,320	0,9322	371,1196	0,328	0,8575
321,0629	0,383	0,9985	451,1025	4,738	0,9707	191,0551	0,332	0,9274	707,1836	3,632	0,8507
563,1409	5,202	0,9983	863,1821	3,874	0,9703	451,2043	5,119	0,9243	165,0377	4,300	0,8439
189,0393	0,377	0,9982	152,0700	0,332	0,9698	441,2025	10,449	0,9234	433,1045	5,914	0,8350
452,1074	4,738	0,9980	450,1120	4,696	0,9673	416,0831	3,849	0,9233	115,9194	0,008	0,8324
144,0654	0,320	0,9976	191,0189	0,408	0,9661	434,2102	4,470	0,9225	723,1708	4,905	0,8228
640,1522	5,771	0,9963	165,0397	10,160	0,9651	490,1924	4,638	0,9208	215,0321	0,322	0,8170
391,1047	0,340	0,9959	512,1039	3,883	0,9647	293,2122	8,665	0,9158	293,2005	8,355	0,8151
487,0803	4,825	0,9957	383,1192	0,330	0,9636	135,0284	0,325	0,9146	367,1045	0,321	0,8139
417,2130	5,144	0,9941	593,1505	5,883	0,9633	387,1143	0,320	0,9146	510,0889	5,238	0,8060
281,1392	6,751	0,9940	448,1744	7,562	0,9596	352,0670	4,152	0,9127	165,0397	9,018	0,8057
434,2029	5,462	0,9939	225,0610	0,311	0,9583	149,0444	0,342	0,9075	353,0874	2,947	0,7889
325,0482	4,119	0,9928	431,1843	7,561	0,9579	146,9648	0,072	0,9060	723,1714	7,665	0,7875
453,1936	5,118	0,9925	577,1352	6,912	0,9566	192,0587	0,333	0,9048	112,9843	0,034	0,7866
379,1049	0,336	0,9920	341,1091	0,323	0,9555	321,0616	3,375	0,9021	577,1555	5,746	0,7765
593,1500	4,985	0,9916	367,1032	4,334	0,9532	377,0853	0,319	0,9018	463,0883	4,878	0,7700
453,1973	5,026	0,9896	579,1498	4,059	0,9522	190,9275	0,034	0,8987	421,2264	9,195	0,7664
112,9842	0,298	0,9894	144,0443	4,716	0,9522	327,2538	9,855	0,8987	432,1939	7,963	0,7664
450,1981	4,785	0,9893	165,0393	0,323	0,9516	516,1888	5,175	0,8963	421,1553	7,567	0,7664
365,0892	0,358	0,9884	205,0346	0,336	0,9484	514,1001	4,940	0,8929	327,2174	6,765	0,7664
223,0453	0,334	0,9879	431,0979	5,689	0,9474	181,0708	0,308	0,8916	415,1970	6,085	0,7664
473,2023	4,882	0,9878	431,0979	4,948	0,9474	485,0850	5,095	0,8856	475,2155	5,963	0,7664

<i>m/z</i>	RT (min.)	r ²	<i>m/z</i>	RT (min.)	r ²	<i>m/z</i>	RT (min.)	r ²	<i>m/z</i>	RT (min.)	r ²
245,0437	0,319	0,9870	295,2195	8,136	0,9450	595,1668	4,251	0,8787	575,1192	5,805	0,7664
352,1032	0,337	0,9848	337,0926	3,955	0,9723	864,1857	3,780	0,9438	577,1353	3,302	0,8784
206,0662	0,341	0,9843	364,1919	8,064	0,9722	295,2276	8,705	0,9425	293,1850	6,958	0,8706
289,0717	4,323	0,9839	578,1387	6,897	0,9716	451,2030	4,755	0,9338	448,1823	4,279	0,8668
337,0941	0,349	0,9837	191,0550	4,058	0,9710	179,0551	0,320	0,9322	371,1196	0,328	0,8575
433,1140	5,640	0,9828	451,1025	4,738	0,9707	191,0551	0,332	0,9274	707,1836	3,632	0,8507
656,1464	5,543	0,9822	863,1821	3,874	0,9703	451,2043	5,119	0,9243	165,0377	4,300	0,8439
428,2072	7,438	0,9808	152,0700	0,332	0,9698	441,2025	10,449	0,9234	433,1045	5,914	0,8350
474,1982	5,871	0,9806	450,1120	4,696	0,9673	416,0831	3,849	0,9233	115,9194	0,008	0,8324
133,0130	0,349	0,9804	191,0189	0,408	0,9661	434,2102	4,470	0,9225	723,1708	4,905	0,8228
431,1922	4,260	0,9792	165,0397	10,160	0,9651	490,1924	4,638	0,9208	215,0321	0,322	0,8170
533,1718	0,330	0,9790	512,1039	3,883	0,9647	293,2122	8,665	0,9158	293,2005	8,355	0,8151
441,1981	5,332	0,9790	383,1192	0,330	0,9636	135,0284	0,325	0,9146	367,1045	0,321	0,8139
192,0586	3,749	0,9785	593,1505	5,883	0,9633	387,1143	0,320	0,9146	510,0889	5,238	0,8060
325,2385	10,556	0,9783	448,1744	7,562	0,9596	352,0670	4,152	0,9127	165,0397	9,018	0,8057
879,1776	3,578	0,9758	225,0610	0,311	0,9583	149,0444	0,342	0,9075	353,0874	2,947	0,7889
289,0723	0,406	0,9753	431,1843	7,561	0,9579	146,9648	0,072	0,9060	723,1714	7,665	0,7875
144,0442	3,603	0,9753	577,1352	6,912	0,9566	192,0587	0,333	0,9048	112,9843	0,034	0,7866
353,0885	0,333	0,9734	341,1091	0,323	0,9555	321,0616	3,375	0,9021	577,1555	5,746	0,7765
295,0836	0,333	0,9728	367,1032	4,334	0,9532	377,0853	0,319	0,9018	463,0883	4,878	0,7700
353,0697	3,557	0,9726	579,1498	4,059	0,9522	190,9275	0,034	0,8987	421,2264	9,195	0,7664

Para o estudo da reprodutibilidade intra e inter-dia a área dos metabólitos detectados foi inicialmente avaliada quanto a sua estabilidade para a detecção por espectrometria de massas. De acordo com a literatura (BEGOL *et al.*, 2018), apenas metabólitos presentes em 70% das amostras de controle de qualidade devem ser utilizados no estudo da reprodutibilidade. Entre as 43 amostras de QC empregadas no estudo da reprodutibilidade foram detectados 1011 sinais m/z distintos, dos quais 382 demonstraram estabilidade mínima para a análise, ou sejam, foram detectados em pelo menos 30 das amostras de QC.

No que diz respeito a reprodutibilidade intra-dia, os coeficientes de variação (CV) apresentam valores entre 3,10 e 0,02%. Por outro lado, o ensaio inter-dia apresentou CV variando entre 5,12 e 0,03%. Estes resultados corroboram que os perfis químicos obtidos pelo método aplicado apresentam ótima precisão instrumental, repetibilidade e reprodutibilidade, atestando que a variação observada nas amostras reais de espécies de *Ocotea* corresponde as distinções biológicas entre estas.

5.4.1. Considerações gerais

Até o momento, não há na literatura registro de métodos validados para o estudo metabolômico da família Lauraceae, ou mesmo de apenas algum de seus gêneros. Ainda, o método empregado por CLAE-EM nesta pesquisa demonstrou possuir ótima performance para a obtenção de perfis químicos globais de *Ocotea*. A validação do método atestou que o mesmo é capaz de apresentar reprodutibilidade e precisão para mais de 100 metabólitos de forma simultânea, distribuídos ao longo da corrida cromatográfica, o que indica sua adequabilidade para o objetivo de metabolômica global.

6. CONCLUSÕES

A avaliação metabolômica da espécie-tipo *O. guianensis* possibilitou a obtenção de um método de extração e análise otimizado para o estudo quimiossistemático da *Ocotea*. Durante a otimização do método, as condições que possibilitaram a obtenção de perfis químicos representativos em metabolômica global envolveram o uso do solvente extrator constituído por 70% etanol, proporção de 1:12 (g:mL) entre amostra e solvente extrator, temperatura de extração de 40°C e tamanho de partícula de 0,595 mm da amostra.

Pelo método otimizado foi possível obter rendimento de 9,96%, o que é um valor elevado quando comparado as técnicas de extração por Soxhlet e por maceração exaustiva. Durante a otimização do método as modificações na composição do solvente extrator e na temperatura de extração apresentam os maiores efeitos na composição qualitativa e quantitativa dos perfis químicos, evidenciando sua correlação com os mecanismos de extração por solvatação assistida de ultrassom. O estudo metabolômico da *O. guianensis* demonstrou que o método desenvolvido é eficaz para a extração de alcaloides aporfínicos e flavonoides glicosilados derivados da quercetina e kaempferol.

A avaliação quimiométrica das demais espécies de *Ocotea* possibilitou sua distinção em 4 agrupamentos, além da caracterização específica dos espécimes de *O. splendens* e *O. canaliculata*. Apesar de amostras botânicas apresentarem alta variabilidade química entre espécimes, o método empregado apresentou boa precisão na caracterização de cada espécie, de modo que suas réplicas biológicas apresentaram perfil químico similar.

O estudo quimiométrico realizado com mais de 5.000 sinais *m/z* detectados entre as 14 espécies de *Ocotea*, no modo negativo de ionização, permitiu a elucidação de 8 metabólitos de maior significância na diferenciação das espécies, sendo estes compostos

fenólicos. Apesar de corresponderem a sinais m/z de ocorrência em mais de uma espécie, a intensidade relativa destes ainda permitiu sua discriminação como marcadores químicos, visto que o método aplicado compreende a metabolômica global. Adicionalmente, a análise do perfil de fragmentação dos sinais m/z detectáveis no modo positivo e negativo possibilitou sugerir a identidade de 24 metabólitos, incluindo ácidos fenólicos, alcaloides e flavonoides.

Além destas classes químicas serem comumente descritas na família Lauraceae, a identificação majoritária dos flavonoides como formas glicosiladas de flavonóis, evidencia a basalidade do gênero *Ocotea*, uma vez que a metabolização deste tipo de estrutura pode ser associada a rotas biossintéticas de baixa especialização. Vale ressaltar, que este estudo foi pioneiro no que diz respeito tanto a caracterização química de média polaridade das espécies avaliadas como na avaliação quimiosistemática moderna do gênero *Ocotea*. Sendo assim, um passo importante na compreensão deste “complexo” de espécies.

O método aplicado foi validado com sucesso, demonstrando ser adequado para o objetivo da metaboloma global. Pelo uso de uma amostra controle de qualidade, o método demonstrou alta linearidade, o qual permitirá a quantificação de 91 metabólitos simultaneamente com o uso de padrões internos. A precisão e reprodutibilidade do método apresentaram resultados dentro do desejado, com coeficientes de variação entre as áreas dos picos cromatográficos menor que 10%. Deste modo, a validação atestou que os resultados obtidos durante o estudo metabolômico da *Ocotea* são representativos da variação biológica observada nas espécies. Por fim, o método desenvolvido pode ser aplicado de forma confiável no estudo quimiosistemático do gênero *Ocotea*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARRACIN, L. T.; DELGADO, W. A.; CUCA, L. E.; ÁVILA, M. C. Chemical constituents of the bark of *Endlicheria oreocola* (Lauraceae) from Colombia. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 74, p. 60–62, 2017.
- ANDREI, C. C.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. Allylphenols from *Ocotea cymbarum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 12, p. 3992–3993, 1988.
- ANTONIO, A. S.; WIEDEMANN, L. S. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. **RSC Advances**, v. 8, n. 45, p. 25767–25784, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C8RA02067A>>.
- ANTONIO, S.; AGUIAR, C.; SILVEIRA, L.; WIEDEMANN, M. Phytochemistry by design: a case study of the chemical composition of *Ocotea guianensis* optimized extracts focused on untargeted metabolomics analysis. **RSC Advances**, v. 10, p. 3459–3471, 2020.
- ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003**, p. 1–15, 2003.
- ASSIS, L. C. S.; DE MELLO-SILVA, R. Taxonomic and Nomenclatural Changes in the *Ocotea indecora* Group (Lauraceae). **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 20, n. 4, p. 377–380, 2010. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.3417/2009009>>.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>>.
- BAKHA, M.; EL MTILI, N.; MACHON, N.; ABOUKHALID, K.; AMCHRA, F. Z.; KHIRAOUI, A.; GIBERNAU, M.; TOMI, F.; AL FAIZ, C. Intraspecific chemical variability of the essential oils of Moroccan endemic *Origanum elongatum* L. (Lamiaceae) from its whole natural habitats. **Arabian Journal of Chemistry**, 2018.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; VARGAS, M. R. W.; SILVA, I. G.; FRANÇA, L. S.; MORAIS, L. C. S. F.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; CHAVES, M. C. O.; ALMEIDA, R. N.; AGRA, M. F. *Ocotea duckei*: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 2, p. 144–147, 2008. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032748949&partnerID=40&md5=a47e57623d646400e70a27f77092fa6d>>.
- BARRERA, E. D. C.; SUÁREZ, L. E. C.; SUA, C.; DAVID, E.; BARRERA, C. Aporphine alkaloids from leaves of *Ocotea macrophylla* (Kunth) (Lauraceae) from Colombia. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 522–524, 2009.
- BARROS NETO, B. .; SCARMINIO, I. S. .; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2001.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401–1406, 2006.
- BATISTA, A. L.; YOSHIDA, N. C.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. Chemical constituents from *Nectandra cuspidata* nees - Lauraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 61, p. 229–231, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2015.06.007>>.
- BATISTA, A. N. de L.; BATISTA JUNIOR, J. M.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.;

CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. da S.; NUNOMURA, S. M.; YOSHIDA, M. Aromatic compounds from three brazilian Lauraceae species. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 321–323, 2010.

BEECHER, G. R. Overview of Dietary Flavonoids : Nomenclature , Occurrence and Intake. In: Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet, February, **Anais...**2003.

BEGOL, O.; GIKA, H. G.; THEODORIDIS, G. A.; WILSON, I. D. Quality control and validation issues in LC-MS metabolomics. In: THEODORIDIS, G.; GIKA, H.; WILSON, I. (Ed.). **Metabolomic Profiling: Methods in Molecular Biology**. 1. ed. New York: Humana Press, 2018. 1738.

BIJTTEBIER, S.; VAN DER AUWERA, A.; FOUBERT, K.; VOORSPOELS, S.; PIETERS, L.; APERS, S. Bridging the gap between comprehensive extraction protocols in plant metabolomics studies and method validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 935, p. 136–150, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.047>>.

BRANT, A. J. C.; CAMPOS, C. C.; ZAMBON, M.; MILITÃO, J. S. L. T.; EMERENCIANO, V. P.; ROMOFF, P.; KAPLAN, M. A. C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 947–957, 2001.

BROTTO, M. L.; CERVI, A. C.; SANTOS, E. P. O gênero Ocotea (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 64, n. 3, p. 495–525, 2013.

BURGER, W. C. A New Genus of Lauraceae From Costa Rica, With Comments on Problems of Generic and Specific Delimitation Within the Family. **Brittonia**, v. 40, n. 3, p. 275–282, 1988.

CABRAL, M. M. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, G. L. A.; CHAVES, M. C. O.; BRAGA, M. V.; DE SOUZA, W.; SOARES, R. O. A. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against Trypanosoma cruzi. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 319–324, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.11.007>>.

CAMARGO, M. J. De; LAZARO, M.; MIRANDA, D.; KAGAMIDA, C. M.; RODRIGUES, E. D.; RODRIGUES, F.; SILVA, W.; OF, S.; SIX, L. sesquiterpenos de ocotea lancifolia. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1008–1013, 2013.

CANDIDO, L. P.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M. G.; GUALTIERI, S. C. J.; MACÍAS, F. A. Evaluation of the Allelopathic Potential of Leaf, Stem, and Root Extracts of Ocotea pulchella Nees et Mart. **Chemistry and Biodiversity**, p. 1058–1067, 2016.

CANUTO, G. A. B.; DA COSTA, J. L.; DA CRUZ, PEDRO, L. R.; DE SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolomics: definitions, state-of-art and representative applications. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CHANDERBALI, A. S.; VAN DER WERFF, H.; RENNER, S. S. Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 88, n. 1, p. 104–134, 2001.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>>.

COMMISSO, M.; STRAZZER, P.; TOFFALI, K.; STOCCHERO, M.; GUZZO, F. Untargeted metabolomics : an emerging approach to determine the composition of herbal products. **Computational and Structural Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 1–7, 2013.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201301007>>.

CONCEIÇÃO, R. S.; CARNEIRO, M. M. A. de A.; REIS, I. M. A.; BRANCO, A.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; BOTURA, M. B. In vitro acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 2, p. 275–282, 2016.

COSTA, I. F. B.; CALIXTO, S. D.; HEGGDORNE DE ARAUJO, M.; KONNO, T. U. P.; TINOCO, L. W.; GUIMARÃES, D. O.; LASUNSKAIA, E. B.; LEAL, I. R. C.; MUZITANO, M. F. Antimycobacterial and nitric oxide production inhibitory activities of *ocotea notata* from Brazilian restinga. **Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2014.

COY-BARRERA, E. D.; CUCA-SUÁREZ, L. E. In vitro anti-inflammatory effects of naturally-occurring compounds from two lauraceae plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 83, n. 4, p. 1397–1402, 2011.

COY-BARRERA, E. D.; CUCA-SUÁREZ, L. E.; SEFKOW, M. PAF-antagonistic bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from leaves of *Ocotea macrophylla* Kunth. (Lauraceae). **Phytochemistry**, v. 70, n. 10, p. 1309–1314, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.010>>.

COY BARRERA, E. D.; CUCA SUÁREZ, L. E. Aporphine alkaloids from leaves of *Ocotea macrophylla* (Kunth) (Lauraceae) from Colombia. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 4, p. 522–524, 2009.

CUCA, L. E.; LEON, P.; COY, E. D. A bicyclo[3.2.1]octanoid neolignan and toxicity of the ethanol extract from the fruit of *Ocotea heterochroma*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 2, p. 179–181, 2009.

CUSTÓDIO, D. L.; VEIGA JUNIOR, V. F. da. Lauraceae alkaloids. **RSC Advances**, v. 4, n. 42, p. 21864, 2014. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/ra/c4ra01904k>>.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

DA SILVA, D. T.; HERRERA, R.; BATISTA, B. F.; HEINZMANN, B. M.; LABIDI, J. Physicochemical characterization of leaf extracts from *Ocotea lancifolia* and its effect against wood-rot fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 117, p. 158–170, 2017.

DA SILVA, W. D.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. Bicyclooctanoid neolignans from *Ocotea costulatum*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 661–662, 1989.

DA TRINDADE, R.; DA SILVA, J. K.; SETZER, W. N. Copaifera of the neotropics: A review of the phytochemistry and pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, 2018.

DAVID, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Phenylpropanoid-catechins from bark of *Ocotea porosa*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 2, p. 545–546, 1994.

DE PAEPE, E.; VAN MEULEBROEK, L.; ROMBOUTS, C.; HUYSMAN, S.; VERPLANKEN, K.; LAPAUW, B.; WAUTERS, J.; HEMERYCK, L. Y.; VANHAECKE, L. A validated multi-matrix platform for metabolomic fingerprinting of human urine, feces and plasma using ultra-high performance liquid-chromatography coupled to hybrid orbitrap high-resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1033, p. 108–118, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.065>>.

DE VOS, R. C. H.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J. J. B.; BINO, R. J.; HALL, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 778–791,

2007.

DELGADO, W. A.; SUÁREZ, L. E. C. Classification of ethanolic extracts from Lauraceae species by two-dimensional thin layer chromatography and multivariate statistical analyses 2D-TLC/PCA-cluster. **Revista Colombiana de Química**, v. 45, n. 1, p. 10–14, 2016.

DIAS, D. A.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Further neolignans from ocotea porosa. **Phytochemistry**, v. 25, n. 11, p. 2613–2616, 1986.

DIAZ, P. A. M. Bisnorneolignano de la madera de ocotea simulans. **Revista Colombiana de Química**, v. 25, n. 1, 1996. Disponível em: <<http://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/16237>>.

DODSON, C. D.; STERMITZ, F. R.; CASTRO, O.; JANZEN, D. H. Neolignans From Fruits Of Ocotea veraguensis. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 2037–2040, 1987.

DREWES, S. E.; HORN, M. H.; MAVI, S. Cryptocarya liebertiana and Ocotea bullata - Their phytochemical relationship. **Phytochemistry**, v. 44, n. 3, p. 437–440, 1997.

DUBEY, R. K.; SINGH, V.; UPADHYAY, G.; PANDEY, A. K.; PRAKASH, D. Assessment of phytochemical composition and antioxidant potential in some indigenous chilli genotypes from North East India. **Food Chemistry**, v. 188, p. 119–125, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.088>>.

DUNN, W. B.; BROADHURST, D. I.; EDISON, A.; GUILLOU, C.; VIANT, M. R.; BEARDEN, D. W.; BEGER, R. D. Quality assurance and quality control processes: summary of a metabolomics community questionnaire. **Metabolomics**, v. 13, n. 5, p. 1–6, 2017.

DUNN, W. B.; ERBAN, A.; WEBER, R. J. M.; CREEK, D. J.; NEUMANN, S.; KOPKA, J.; VIANT, M. R. Mass appeal : metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. p. 44–66, 2013.

DUNN, W. B.; WILSON, I. D.; NICHOLLS, A. W.; BROADHURST, D. The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans. **Bioanalysis**, v. 4, n. 18, p. 2249–2264, 2012.

EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, Z. S.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R. A chemosystematic analysis of tribes of Asteraceae involving sesquiterpene lactones and flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 12, p. 3103–3115, 1987.

ERPENBECK, D.; SOEST, R. W. M. Van. Review Status and Perspective of Sponge Chemosystematics. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 2–19, 2007.

FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3579–3585, 2002.

FEKETE, S.; SCHAPPLER, J.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. Current and future trends in UHPLC. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2–13, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.007>>.

FELÍCIO, J. D.; MOTIDOME, M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Further neolignans from Ocotea aciphylla. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1707–1710, 1986.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria, Conceitos, Métodos e aplicações**. 1. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2015.

FERREIRA, S. L. C.; JUNIOR, M. M. S.; FELIX, C. S. A.; SILVA, D. L. F.; SANTOS, A. S.; SANTOS, J. H.; SOUZA, C. T. De; CRUZ, R. A.; SOUZA, A. S. Multivariate optimization techniques in food analysis – A review. **Food Chemistry**, v. 273, n. September 2017, p. 3–8, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.114>>.

FERREIRA, S. L. C.; LEMOS, V. A.; CARVALHO, V. S. De; ERIK, G. P.;

QUEIROZ, A. F. S.; FELIX, C. S. A.; DANIEL, L. F.; DOURADO, G. B.; OLIVEIRA, R. V. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 176–182, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.002>>.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; JOSÉ, A.; BOLZANI, S. METABOLÔMICA, UMA ABORDAGEM OTIMIZADA PARA EXPLORAÇÃO DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: ESTADO DA ARTE, PERSPECTIVAS E DESAFIOS. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

GARCEZ, F. R.; DA SILVA, A. F. G.; GARCEZ, W. S.; LINCK, G.; MATOS, M. D. F. C.; SANTOS, E. C. S.; QUEIROZ, L. M. M. Cytotoxic aporphine alkaloids from *ocotea acutifolia*. **Planta Medica**, v. 77, n. 4, p. 383–387, 2011.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; DA SILVA, L. M. G. E.; SHIMABUKURO, A. A. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 B, p. 1382–1386, 2005.

GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Benzylisoquinoline Alkaloids and Flavonols From *Ocotea Velloziana*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 815–816, 1995.

GARRETT, R.; ROMANOS, M. T. V.; RICARDO, M.; SANTOS, M. G.; ROCHA, L.; JORGE, A. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 306–313, 2012.

GIBSON, C. L.; CODREANU, S. G.; SCHRIMPE-RUTLEDGE, A. C.; RETZLAFF, C. L.; WRIGHT, J.; MORTLOCK, D. P.; SHERROD, S. D.; MCLEAN, J. A.; BLAKELY, R. D. Global untargeted serum metabolomic analyses nominate metabolic pathways responsive to loss of expression of the orphan metallo β -lactamase, MBLAC1. **Molecular Omics**, v. 14, n. 3, p. 142–155, 2018.

GIKA, H.; VIRGILIOU, C.; THEODORIDIS, G.; PLUMB, R. S.; WILSON, I. D. Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping (metabonomics/metabolomics): The state of the art. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1117, n. January, p. 136–147, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.009>>.

GIL ARCHILA, E.; CUCA SUÁREZ, L. E. Phytochemical study of leaves of *Ocotea caudata* from Colombia. **Natural Product Research**, v. 32, n. 2, p. 195–201, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1344663>>.

GOMES, M. C. C. P.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, R. Bicyclo(3.2.1)octane neolignans from an *ocotea* species. **Phytochemistry**, v. 22, n. I, 1983.

GONÇALVES, R. D. A.; PINHEIRO, A. B.; DE OLIVEIRA, M. A.; DO NASCIMENTO, R. T.; ROSALEM, P. F.; GARCIA, V. L.; MARTINS, A. R. Anatomical characters and chemical profile of leaves of three species in lauraceae family. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 1, p. 1–8, 2018.

GONTIJO, D. C.; BRANDÃO, G. C.; GONTIJO, P. C.; DE OLIVEIRA, A. B.; DIAZ, M. A. N.; FIETTO, L. G.; LEITE, J. P. V. Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves. **Food Chemistry**, v. 230, p. 618–626, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.087>>.

GONZALEZ-RIANO, C.; SANZ-RODRÍGUEZ, M.; ESCUDERO-RAMIREZ, J.; LORENZO, M. P.; BARBAS, C.; CUBELOS, B.; GARCIA, A. Target and untargeted GC–MS based metabolomic study of mouse optic nerve and its potential in the study of neurological visual diseases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 153, p. 44–56, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.015>>.

GONZÁLEZ-ZAMORA, A.; SIERRA-CAMPOS, E.; LUNA-ORTEGA, J. G.;

PÉREZ-MORALES, R.; ORTIZ, J. C. R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J. L. Characterization of different capsicum varieties by evaluation of their capsaicinoids content by high performance liquid chromatography, determination of pungency and effect of high temperature. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13471–13486, 2013.

GORROCHATEGUI, E.; JAUMOT, J.; LACORTE, S.; TAULER, R. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 425–442, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.004>>.

GOTTLIEB, O. R.; KUBITZKI, K. Chemosystematics of Aniba. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 9, n. 1, p. 5–12, 1981.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v. 11, n. 5, p. 1537–1570, 1972.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. de M. B. Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma? **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2105–2114, 2012.

GU, R.; RYBALOV, L.; NEGRIN, A.; MORCOL, T.; LONG, W.; MYERS, A. K.; ISAAC, G.; YUK, J.; KENNELLY, E. J.; LONG, C. Metabolic Profiling of Different Parts of *Acer truncatum* from the Mongolian Plateau Using UPLC-QTOF-MS with Comparative Bioactivity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 1585–1597, 2019.

GUYER, L.; HOFSTETTER, S. S.; CHRIST, B.; LIRA, B. S.; ROSSI, M.; HÖRTENSTEINER, S. Different Mechanisms Are Responsible for Chlorophyll Dephytylation during Fruit Ripening and Leaf Senescence in Tomato. **Plant Physiology**, v. 166, n. 1, p. 44–56, 2014. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.114.239541>>.

HAN, T.-L.; YANG, Y.; ZHANG, H.; LAW, K. P. Analytical challenges of untargeted GC-MS-based metabolomics and the critical issues in selecting the data processing strategy. **F1000Research**, v. 6, p. 967, 2017. Disponível em: <<https://f1000research.com/articles/6-967/v1>>.

HARAGUCHI, M.; MOTIDOME, M.; YOSHIDA, M. Neolignans from *Ocotea catharinensis*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 561–563, 1983.

ISHIGE, M.; MOTIDOME, M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from *Ocotea catharinensis*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 9, p. 2101–2104, 1991.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; VIAENE, J.; SALTON, J.; KOETZ, M.; GASPER, A. L.; HENRIQUES, A. T.; VANDER HEYDEN, Y. The use of chemometrics to study multifunctional indole alkaloids from *Psychotria nemorosa* (Palicourea comb. nov.). Part I: Extraction and fractionation optimization based on metabolic profiling. **Journal of Chromatography A**, v. 1463, p. 60–70, 2016.

KRUVÉ, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography – mass spectrometry methods : Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 8–28, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016>>.

LÊ, S. J.; HUSSON, F. FactorMineR: An R package for multivariate analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25, n. 1, p. 1–18, 2008.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5. ed. Campinas: Editora Átomo, 2008.

LI, H.-Z.; ZHANG, Z.-J.; XUE, J.; CUI, L.-X.; HOU, T.; LI, X.-J.; CHEN, T. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and rosmarinic acid from perilla leaves using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 36 (4), n. 4, p. 686–693, 2016.

LI, Y.; XIE, S.; YING, J.; WEI, W.; GAO, K. Chemical structures of lignans and

neolignans isolated from Lauraceae. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018.

LIIGAND, P.; KAUPMEES, K.; HAAV, K.; LIIGAND, J.; LEITO, I.; GIROD, M.; ANTOINE, R.; KRUBE, A.; LIIGAND, P.; KAUPMEES, K.; HAAV, K.; LIIGAND, J.; LEITO, I.; GIROD, M. Think Negative : Finding the best ESI / MS mode for your analyte Think Negative : Finding the best ESI / MS mode for your analyte. **Analytical chemistry**, v. 10, 2017.

LIU, X.; YANG, J.; FU, J.; XIE, T. G.; JIANG, P. C.; JIANG, Z. H.; ZHU, G. Y. Phytochemical and chemotaxonomic studies on the twigs of *Cinnamomum cassia* (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 81, n. June, p. 45–48, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.09.004>>.

LIU, Y.; LI, L.; XIAO, Y.; YAO, J.; LI, P.; YU, D.; MA, Y. Global metabolite profiling and diagnostic ion filtering strategy by LC – QTOF MS for rapid identification of raw and processed pieces of *Rheum palmatum* L. **Food Chemistry**, v. 192, p. 531–540, 2016.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; SPÍNOLA, V.; CASTILHO, P. C. Phenolic profiles of Lauraceae plant species endemic to Laurisilva forest: A chemotaxonomic survey. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 1–12, 2017a.

LÓPEZ, H.; VALERA, A.; TRUJILLO, J. Lignans from *Ocotea foetens*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 5, p. 782–785, 1995.

LORDELLO, A. L. L.; YOSHIDA, M. Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 6–9, 1997.

MAAZOUN, A. M.; HLEL, T. Ben; HAMDY, S. H.; BELHADJ, F.; JEMÂA, J. M. Ben; MARZOUKI, M. N. Screening for insecticidal potential and acetylcholinesterase activity inhibition of *Urginea maritima* bulbs extract for the control of *Sitophilus oryzae* (L.). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, n. 3, p. 752–760, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2017.04.004>>.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. 1. ed. New York: Springer-Verlag, 1970.

MARASCHIN, M.; DIAS, P. F.; PEDROTTI, Ê. L.; MORAIS, H. N. F.; VIANA, A. M.; WOOD, K. V. Metabolomic Analysis of *Ocotea odorifera* Cell Cultures: A model protocol for acquiring metabolite data. In: **Methods in molecular biology, Protocols for in vitro cultures and Secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants**. [s.l.] Humana Press, 2009. 547p. 347–358.

MARCH, R. E.; MIAO, X. S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 231, n. 2–3, p. 157–167, 2004.

MARIA, S.; ZANIN, W.; LUÍSA, A.; LORDELLO, L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 92–98, 2007.

MARQUES, C. A. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA FAMÍLIA LAURACEAE Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195–206, 2001.

MOHANTY, I. C.; VISHNU, K. S.; SAHU, G. R. Development of phytochemical fingerprint of an Indian medicinal plant *Chitrak* (*Plumbago zeylanica* L.) using high performance thin layer chromatography (HPTLC). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 18, p. 669–685, 2014. Disponível em: <<http://academicjournals.org/journal/JMPR/article-abstract/3F7257D44609>>.

MONTE NETO, R. L.; SOUSA, L. M. A.; DIAS, C. S.; FILHO BARBOSA, J. M.; OLIVEIRA, M. R. Yangambin cytotoxicity: A pharmacologically active lignan obtained from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, 2008.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 5. ed. New York:

Jonh Wiley & Sons, 2001.

MORAIS, L. C. S. L.; ALMEIDA, R. N.; DA-CUNHA, E. V. L.; DA SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GRAY, A. I. Further Lignans from *Ocotea duckei*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 2, p. 144–147, 1999.

MURAI, Y.; KOKUBUGATA, G.; YOKOTA, M.; KITAJIMA, J.; IWASHINA, T. Flavonoids and anthocyanins from six *Cassytha* taxa (Lauraceae) as taxonomic markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 9, p. 745–748, 2008.

MYERS, O.; SUMMER, S.; LI, S.; BARNES, S.; DU, X. One step forward for reducing false positive and false negative compound identification from mass spectrometry metabolomics data: New algorithms for constructing extracted ion chromatograms and detecting chromatographic peaks. **Analytical Chemistry**, 2017.

NAZ, S.; VALLEJO, M.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 99–105, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.071>>.

NEHME, C. J.; DE MORAES, P. L. R.; TININIS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Intraspecific variability of flavonoid glycosides and styrylpyrones from leaves of *Cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 8, p. 602–611, 2008.

OLIVEIRA FILHO, A. A.; FERNANDES, H. M. B.; ASSIS, T. J. C. F. Lauraceae 's Family: A Brief Review of Cardiovascular Effects. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 7, n. 1, p. 22–26, 2015.

PAULA, D.; JÚNIOR, N.; NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; PAULA, V. F. De; JÚNIOR, B. N.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo Optimization of Analytical Methods Methodology – Part I: Process Variables Using Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Super. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, 2017.

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 563–572, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062005000300017&lng=pt&tlng=pt>.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 53, n. 82, p. 59–121, 2002.

RAKOTONDRAIBE, L. H.; GRAUPNER, P. R.; XIONG, Q.; OLSON, M.; WILEY, J. D.; KRAI, P.; BRODIE, P. J.; CALLMANDER, M. W.; RAKOTOBÉ, E.; RATOVOSON, F.; RASAMISON, V. E.; CASSERA, M. B.; HAHN, D. R.; KINGSTON, D. G. I.; FOTSO, S. Neolignans and other metabolites from *ocotea cymosa* from the madagascar rain forest and their biological activities1. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 3, p. 431–440, 2015.

RAMOS, C. C.; DE SOUSA, A. L.; DE ALMEIDA, C. M. S.; DE OLIVEIRA, R. R. Chemosystematic Analysis of *Solanum* Steroidal Alkaloids. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1467–1479, 2019.

RAMOS, C. C.; SOUSA, A. L. De. *Solanum* Chemosystematic Aspects : Analysis of Mixed Pathway (Acetate / Shikimate) Special Metabolites. **International Journal of Plant Research**, v. 7, n. 3, p. 75–82, 2017.

ROBERTS, L. D.; SOUZA, A. L.; GERSZTEN, R. E.; CLISH, C. B. Targeted Metabolomic. In: **Curr. Protoc. Mol. Biol.** [s.l.] John Wiley & Sons, 2013. p. 1–34.

ROHWER, J. G. *Prodromus einer Monographie der Gattung Ocotea* Aubl.

(Lauraceae), sensu lato. . 1986.

ROMBOUTS, C.; DE SPIEGELEER, M.; VAN MEULEBROEK, L.; DE VOS, W. H.; VANHAECKE, L. Validated comprehensive metabolomics and lipidomics analysis of colon tissue and cell lines. **Analytica Chimica Acta**, v. 1066, p. 79–92, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.020>>.

ROMOFF, P.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from *Ocotea aciphylla*. **Phytochemistry**, v. 76, n. 27, p. 2101–2104, 1982.

SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F. Review on Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Licaria* (Lauraceae). **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 20, n. 3, p. 390, 2016.

SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F. Phytochemistry and biological activities of the genus *Ocotea* (Lauraceae): A review on recent research results (2000–2016). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 5, p. 204–218, 2017.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 567–573, 2000.

SCHMIDT, J.; RATH, K.; BOETTCHER, C.; ZENK, M. H. Analysis of Benzylisoquinoline-Type Alkaloids by Electrospray Tandem Mass Spectrometry and Atmospheric Pressure Photoionization. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 11, n. 3, p. 325–333, 2005.

SCHRIMPE-RUTLEDGE, A. C.; CODREANU, S. G.; SHERROD, S. D.; MCLEAN, J. A. Untargeted Metabolomics Strategies- Challenges and Emerging Directions. **Journal of american society of mass spectrometry**, v. 27, n. 12, p. 1897–1905, 2017.

SCHRIPSEMA, J.; LEMOS, M. A.; DIANIN, M. F. V.; VIANNA, D. S.; DAGNINO, D. S. New Approaches in Metabolic Fingerprinting: Improved Extraction Method and Automatic Reduction of NMR Spectra to Essential Data. In: **Instrumental Methods for the Analysis and Identification of Bioactive Molecules**. [s.l: s.n.]p. 361–373.

SHIM, H. J.; LEE, J. Y.; KIM, B.; HONG, J. General fragmentations of alkaloids in electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Mass Spectrometry Letters**, v. 4, n. 4, p. 79–82, 2013.

SILVA TELES, M. M. R.; VIEIRA PINHEIRO, A. A.; DA SILVA DIAS, C.; FECHINE TAVARES, J.; BARBOSA FILHO, J. M.; LEITÃO DA CUNHA, E. V. Alkaloids of the Lauraceae. In: **Alkaloids: Chemistry and Biology**. [s.l: s.n.]p. 147–304.

SINGH, R. Chemotaxonomy: A Tool for Plant Classification. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 4, n. 2, p. 90–93, 2016.

SOARES, G. I. G.; KAPLAN, M. A. Analysis of flavone-flavonol ratio in Dicotyledoneae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 135, n. 1, p. 61–66, 2001.

STEEGE, H. Ter; JANSEN-JACOBS, M. J.; DATADIN, V. K. Can botanical collections assist in a National Protected Area Strategy in Guyana? **Biodiversity and Conservation**, v. 9, n. 2, p. 215–240, 2000.

STÉVIGNY, C.; JIWAN, J. L. H.; ROZENBERG, R.; DE HOFFMANN, E.; QUETIN-LECLERCQ, J. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 5, p. 523–528, 2004.

T'KINDT, R.; MORREEL, K.; DEFORCE, D.; BOERJAN, W.; VAN BOCXLAER, J. Joint GC-MS and LC-MS platforms for comprehensive plant metabolomics: Repeatability and sample pre-treatment. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 29, p. 3572–3580, 2009.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas Para Cálculos De Planejamentos Experimentais, Um Tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. **Recent advances in research on lignans and neolignans**. [s.l: s.n.]v. 33

TER STEEGE, H.; VAESSEN, R. W.; CÁRDENAS-LÓPEZ, D.; SABATIER, D.; ANTONELLI, A.; DE OLIVEIRA, S. M.; PITMAN, N. C. A. A.; JØRGENSEN, P. M.; SALOMÃO, R. P. The discovery of the Amazonian tree flora with an updated checklist of all known tree taxa. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29549, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep29549>>.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100–109, 2015.

TROFIMOV, D.; DE MORAES, P. L. R.; ROHWER, J. G. Towards a phylogenetic classification of the Ocotea complex (Lauraceae): classification principles and reinstatement of Mespilodaphne. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 190, n. 1, p. 25–50, 2019.

TROFIMOV, D.; ROHWER, J. G. Epidermal features allowing identification of evolutionary lineages in the Ocotea complex (Lauraceae). **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 31, n. July 2017, p. 17–35, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1433831917301294>>.

VAN DER KOOY, F.; MALTESE, F.; YOUNG, H. C.; HYE, K. K.; VERPOORTE, R. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 763–775, 2009.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2008.

WANG, Y. S.; WEN, Z. Q.; LI, B. T.; ZHANG, H. Bin; YANG, J. H. Ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology of the genus Litsea: An update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 181, p. 66–107, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.032>>.

WEI, X.; LI, G. H.; WANG, X. L.; HE, J. X.; WANG, X. N.; REN, D. M.; LOU, H. X.; SHEN, T. Chemical constituents from the leaves of Cinnamomum parthenoxylon (Jack) Meisn. (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 70, p. 95–98, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2016.11.004>>.

WERFF, H. van der. Two New Species of Ocotea (Lauraceae) from the Andes in Ecuador and Peru. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 26, n. 3, p. 257–261, 2018a.

WERFF, H. van der. A New Species of Ocotea (Lauraceae) from the Eastern Lowlands of Ecuador. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 26, n. 2, p. 150–153, 2018b.

WOLFENDER, J.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136–164, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.091>>.

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

YILMAZ, M. A.; ÇAKIR, O.; ARICA, E.; YENER, İ.; OTLUĐİL, B. An LC-MS / MS Method Validation for the Phytochemical Quantification of Four Edible Plants Yenilebilir Dört Bitki Türünün Fitokimyasal İçeriğinin Miktaral Tayini için LC-MS / MS Metot Validasyonu. v. 8, n. 1, p. 179–187, 2018.

ZHOU, B.; XIAO, J. F.; TULI, L.; RESSOM, H. W. LC-MS-based metabolomics. **Molecular BioSystems**, p. 470–481, 2012.

ZSCHOCKE, S.; DREWES, S. E.; PAULUS, K.; BAUER, R.; VAN STADEN, J. Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1–2, p. 219–230, 2000a.

ZSCHOCKE, S.; VAN STADEN, J.; PAULUS, K.; BAUER, R.; HORN, M. M.; MUNRO, O. Q.; BROWN, N. J.; DREWES, S. E. Stereostructure and anti-inflammatory activity of three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea bullata*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 591–595, 2000b.

8. APÊNDICES

8.1. Apêndice 1

Quadro 1. Lignoides encontrados no gênero *Ocotea*

Espécie	Composto	Classe	Referência
<i>O. catharinensis</i>	(7R,8R,1'R,3'R,4'S)-4'-hidroxi-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxo-2'-oxo- $\Delta^{1,3,5,5',8'}$ -8.1',7.3'-neolignana	Neolignana	(LORDELLO; YOSHIDA, 1997)
<i>O. cymosa</i>	(7R,8R,1'R,3'R)- $\Delta 8'$ -3,4,5-Trimetoxi-3',4'-metilenodioxo-1',2',3',6'-tetraidro-6'-oxo-7.1'-8.3'-neolignana		(RAKOTONDRAIBE <i>et al.</i> , 2015)
<i>O. catharinensis</i>	(7R,8R,1'R,3'R)-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxo-4'-oxo- $\Delta^{1,3,5,8}$ -8.1',7.0.6'-neolignana		(LORDELLO; YOSHIDA, 1997)
<i>O. macrophylla</i>	(7R,8R,3'S,4'S,5'R)- $\Delta 8$ -4'-hidroxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-2',3',4',5'-tetraidro-2'-oxo-7.3',8.5'-neolignana (ocofilol C)		(COY-BARRERA; CUCA-SUÁREZ; SEFKOW, 2009)
	(7R,8R,3'S,4'S,5'R)- $\Delta 8$ -4'-hidroxi-3,4,5'-trimetoxi-2',3',4',5'-tetraidro-2'-oxo-7.3',8.5'-neolignana (ocofilol B)		
	(7R,8R,3'S,4'S,5'R)- $\Delta 8$ -4'-hidroxi-5'-metoxi-3,4-metilenodioxo-2',3',4',5'-tetraidro-2'-oxo-7.3',8.5'-neolignana (ocofilol A)		
<i>O. cymosa</i>	(7R,8S,1'S,3'S)- $\Delta 8'$ -3,4,5-Trimetoxi-3',4'-metilenodioxo-1',2',3',6'-tetraidro-6'-oxo-7.1'-8.3'-neolignana		(RAKOTONDRAIBE <i>et al.</i> , 2015)
<i>O. catharinensis</i>	(7R,8S,1'R)- $\Delta 8'$ -1',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxo-1',6'-diidro-6'-oxo-7.0.2',8.3'-neolignana		(HARAGUCHI; MOTIDOME; YOSHIDA, 1983)

	(7R,8S,1'R,3'R)- $\Delta^{5',8'}$ -3,4,3'5'-tetrametoxi-4'-oxo-8.1',7.O.6'-neolignana		(ISHIGE <i>et al.</i> , 1991)
	(7R,8S,1'R,5'R)-7,2'-epoxi-5',6'-diidro-3,4,3',5'-tetrametoxi-8,1'-neoligna-8'-ene-4'(1'H)-ona		
	(7R,8S,1'R,5'R)-7,2'-epoxi-5',6'-diidro-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxi-8,1'-neoligna-8'-ene-4'(1'H)-ona		(LORDELLO; YOSHIDA, 1997)
Espécie	Composto	Classe	Referência
<i>O. aciphylla</i>	(7R,8S,1'S)-7,2'-epoxi-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxi-8,1'-neoligna-8'-ene-4'(1'H)-ona		(FELÍCIO <i>et al.</i> , 1986)
<i>O. catharinensis</i>			(HARAGUCHI; MOTIDOME; YOSHIDA, 1983)
<i>O. catharinensis</i>	(7S,8R,1'R,4'S,5'R,6'S)- $\Delta^{8'}$ -4'6'-diidroxi-5,5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxi-3'-oxo-8.1',7.5'-neolignana	Neolignana	(ISHIGE <i>et al.</i> , 1991)
	(7S,8R,1'R,4'S,5'R,6'S)- $\Delta^{8'}$ -4'6'-diidroxi-5'-metoxi-3,4-metilenodioxi-3'-oxo-8.1',7.5'-neolignana		
	(7S,8R,1'S)- $\Delta^{2',5',8'}$ -3'5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxi-4'-oxo-8.1',7.O.6'-neolignana		
	(7S,8R,1'S,4'R,5'R,6'S)- $\Delta^{2',8'}$ -4'6'-diidroxi-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxi-8.1',7.5'-neolignana		
	(7S,8R,1'S,4'S,5'R,6'S)- $\Delta^{2',8'}$ -4'6'-diidroxi-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxi-8.1',7.5'-neolignana		
<i>O. veraguensis</i>	(7S,8R,1'R)--1',6'-diidro-1',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxi-6'-oxo-7.O.4',8.3'-neolignana		(DODSON <i>et al.</i> , 1987)
<i>O. costulatum</i>	(7S,8R,1'R,3'S,4'R,5'S)-4'-hidroxi-3,3',5'-trimetoxi-4,5-metilenodioxi-6'-oxo- Δ -1,3,5',8'-8.',7.5'-neolignana		(DA SILVA; BRAZ-FILHO; GOTTLIEB, 1989)
<i>O. catharinensis</i>	(7S,8R,1'S,2'S,3'R)-1',2'-diidro-2',5'-diidroxi-3'-metoxi-3,4-metilenodioxi-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene-4'(3'H)-ona		(ISHIGE <i>et al.</i> , 1991)
	(7S,8R,3'R)- $\Delta^{1',5',8'}$ -3'5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxi-4'-oxo-8.1',7.O.6',3'.7'-neolignana		

	(7S,8S)-7,5'-epoxi-2',6'-dimetoxi-4,5-metilenodioxo-1',7'-seco-8,4'-neoligna-8'-ene-1',7'-eter		
	(7S,8S)-7,5'-epoxi-3,2',6'-trimetoxi-4,5-metilenodioxo-1',7'-seco-8,4'-neoligna-8'-ene-1',7'-eter		
Espécie	Composto	Classe	Referência
O. catharinensis	(7S,8S,1'R,3'R)- $\Delta^{5',8'}$ -3'5'-Dimetoxi-3,4-metilenodioxo-4'-oxo-8.1',7.O.6'-neolignana	Neolignana	(ISHIGE <i>et al.</i> , 1991)
O. veraguensis	(7S,8R,1'R,2'R,3'S)- Δ 8-2'-acetoxi-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxo-1',2',3',4'-tetraidro-4'-oxo-7.3',8.1'-neolignana		(DODSON <i>et al.</i> , 1987)
	(7S,8R,1'S,2'S,3'R)- Δ 8--3',5'-dimetoxi-2'-hidroxi-3,4-metilenodioxo-1',2',3',4'-tetraidro-4'-oxo-7.3',8.1'-neolignana		
O. macrophylla	2'-epi-guianina		(COY-BARRERA; CUCA-SUÁREZ; SEFKOW, 2009)
O. foetens	3',4'-ácido dimetoxi-benzóico-(3'',4''-dimetoxifenil)-2-ester metil-3-oxobutil	Lignana	(LÓPEZ; VALERA; TRUJILLO, 1995)
O. cymosa	3',4'-metilenodioxo-3,4,5-trimetoxi- Δ 8'-8.O.6'-neolignana	Neolignana	(RAKOTONDRAIBE <i>et al.</i> , 2015)
O. duckei Vattimo	4'-O-dimetil-epi-iangambina	Lignana	(BARBOSA-FILHO <i>et al.</i> , 2008)
	4''-O-dimetilepimagnolina A		
O. aciphylla	5-metoxiguianina	Neolignana	(FELÍCIO <i>et al.</i> , 1986)
			(ROMOFF; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1982)
O. porosa	7,2'-epoxi-5'-hidroxi-3,4-dimetoxi-8,3'-neoligna-7,8'-dieno		(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
O. aciphylla	Armenina-B		(FELÍCIO <i>et al.</i> , 1986)
O. cymbarum	burchelina		(CABRAL <i>et al.</i> , 2010)
O. aciphylla	canelina A		(FELÍCIO <i>et al.</i> , 1986)

O. catharinensis	canelina C		(HARAGUCHI; MOTIDOME; YOSHIDA, 1983)
O. cymosa	cimosalignana A	Lignana	(RAKOTONDRAIBE <i>et al.</i> , 2015)
Espécie	Composto	Classe	Referência
O. cymosa	cimosalignana B	Lignana	(RAKOTONDRAIBE <i>et al.</i> , 2015)
	cimosalignana C		
	Demetilsibilenona	Neolignana	
	Demetoxisibilenona		
	didimochlaenona C		
O. duckei Vattimo	epi-iangambina	Lignana	(BARBOSA-FILHO <i>et al.</i> , 2008)
	episesartemina		(MORAIS <i>et al.</i> , 1999)
O. simulans	eugenol	Neolignana	(DIAZ, 1996)
O. costulatum	eusiderina		(DA SILVA; BRAZ-FILHO; GOTTLIEB, 1989)
O. aciphylla	ferrearina B		(ROMOFF; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1982)
	ferrearina C		(FELÍCIO <i>et al.</i> , 1986)
	ferrearina D		
O. foetens	galgravina		(LÓPEZ; VALERA; TRUJILLO, 1995)
O. heterochroma	iangambina	Lignana	(CUCA; LEON; COY, 2009)
O. bullata	iso-ocobulenona	Neolignana	(DREWES; HORN; MAVI, 1997)
O. bullata	iso-ocobulenona		(ZSCHOCKE <i>et al.</i> , 2000a)
O. macrophylla	licarina B		(COY BARRERA; CUCA SUÁREZ, 2009)
O. porosa	licarina B		(DIAS; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1986)

O. minarum	lioniresinol	Lignana	(GARCEZ <i>et al.</i> , 2005)
O. macrophylla	meso-3,4,5,3',4',5'-hexametoxilignana		(COY-BARRERA; CUCA-SUÁREZ, 2011)
Espécie	Composto	Classe	Referência
O. bullata	ocobulenona	Neolignana	(DREWES; HORN; MAVI, 1997)
O. cymosa	ococimosina		(RAKOTONDRAIBE <i>et al.</i> , 2015)
O. porosa	porosina		(DIAS; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1986)
	porosina B		
	rel-(7R,8R,1'R,5'R)-7,2'-epoxi-5',6'-diidro-5'-metoxi-3,4-metilenodioxo-8,1'-neoligna-8'-ene-4'(1'H)-ona		
	rel-(7R,8R,1'S,2'R,3'S,4'R)-1',2',3',4'-tetraidro-2',4'-diidroxi-5'-metoxi-3,4-metilenodioxo-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene		(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
	rel-(7R,8R,1'S,3'R,4'R)-3',4'-diidro-4'-hidroxi-5'-metoxi-3,4-metilenodioxo-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene-2'(1'H)-ona		
O. catharinensis	rel-(7R,8S,1'R,2'R,3'S)- Δ^8 -2',5'-Diidroxi-3'-metoxi-3,4-metilenodioxo-1',2',3',4'-tetraidro-4'-oxo-7.3',8.1' neolignana		(HARAGUCHI; MOTIDOME; YOSHIDA, 1983)
	rel-(7R,8S,1'R,2'R,3'S,4'R)- Δ^8 -2',4'-Diidroxi-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxo-1',2',3',4'-tetraidro-7.3',8.1' neolignana		
	rel(7R,8S,1'R,2'S)-2'-Hidroxi-3,4,5-trimetoxi-3'-oxo- $\Delta^{1,3,5,4',8'}$ -8.1',7.O.2'-neolignana		(LORDELLO; YOSHIDA, 1997)
	rel(7R,8S,1'R,2'S)-2'-Hidroxi-3,4,-dimetoxi-3'-oxo- $\Delta^{1,3,5,4',8'}$ -8.1',7.O2'-neolignana		
	rel(7R,8S,1'R,2'S)-2'-Hidroxi-3,4,-metilenodioxo-3'-oxo- $\Delta^{1,3,5,4',8'}$ -8.1',7.O2'-neolignana		

	rel(7R,8S,1'R,2'S)-2'-metoxi-3,4-metilenodioxo-3'-oxo- $\Delta^{1,3,5,4',8'}$ -8.1',7.O.2'-neolignana		
O. porosa	rel-(7R,8S,1'R,2'R,3'R,4'R,5'R)-7.2',3'.4'-diepoxi-1',2',3',4',5',6'-hexaidro-2'-hidoxi-3,4,5'-trimetoxi-8,1'-neoligna-8'-ene		(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
Espécie	Composto	Classe	Referência
O. porosa	rel-(7R,8S,1'R,2'R,3'S,4'R,5'R)-7,2'-epoxi-2',3',4'-triidoxi-1',2',3',4',5',6'-hexaidro-3,4,5'-trimetoxi-8,1'-neoligna-8'-ene	Neolignana	(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
O. catharinensis	rel-(7R,8S,1'R,2'S)- $\Delta^{4',8'}$ -2'-hidroxi-3,4-dimetoxi-3'-oxo-8.1',7.O.6'-neolignana		(ISHIGE <i>et al.</i> , 1991)
O. porosa	rel-(7R,8S,1'R,2'S,4'R,5'R)-7,2'-epoxi-4'-hidoxi-1',2',3',4',5',6'-hexaidro-3,4,2',5'-tetrametoxi-8,1'-neoligna-8'-ene		(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
	rel-(7R,8S,1'R,2'S,4'R,5'R)- Δ^8 -2',4'-Diidroxi-3,4,5'-trimetoxi-1',2',4',5',6'-tetraidro-2'-oxo-8.1'-neolignana		(DIAS; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1986)
	rel-(7R,8S,1'R,2'S,5'R)-1',2',5',6'-tetraidro-3,4,2',5'-tetrametoxi-8,1'-neoligna-8'-ene		(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
	rel-(7R,8S,1'R,5'R)-5',6'-diidro-7-hidoxi-3,4,5'-trimetoxi-8,1'-neoligna-8'-ene-2'(1'H)-ona		(DIAS; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1986)
	rel-(7R,8S,1'R,5'S)- Δ^8 -5'-metoxi-3,4-metilenodioxo-1',4',5',6'-tetraidro-4'-oxo-7.O.2',8.1'-neolignana		
O. catharinensis	rel(7S,8R,1'R,3'R,4'R)-4'-hidroxi-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxo-2'-oxo- $\Delta^{1,3,5,5',8'}$ -8.1',7.3'-neolignana		(LORDELLO; YOSHIDA, 1997)
	rel-(7S,8R,1'R,4'S,5'R,6'R)- Δ^8 -4'6'-diidroxi-5'-metoxi-3,4-metilenodioxo-3'-oxo-8.1',7.5'-neolignana		(ISHIGE <i>et al.</i> , 1991)
O. heterochroma	rel-(7S,8R,1'S,2'R,3'S)- Δ^8 -2'-Acetoxi-5,1',3'-trimetoxi-3,4-metilenodioxo-7,3',8,1'-neolignana		(CUCA; LEON; COY, 2009)
	rel-(7S,8R,1'S,2'R,3'S)- Δ^8 -2'-hidroxi-5,1',3'-trimetoxi-3,4-methylenedioxy-7,3',8,1'-neolignan		

O. odorifera	rel-(7S,8R,1'R,2'R,3'S,4'S)- Δ^8 -4'-acetoxi-2'-hidroxi-3,3',5'-trimetoxi-4,5-metilenodioxo-1',2',3',4'-tetraidro-7 3',8 1'-neolignana		(GOMES; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1983)
	rel-(7S,8R,1'R,2'R,3'S,4'S)- Δ^8 -4'-acetoxi-2'-hidroxi-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxo-1',2',3',4'-tetraidro-7 3',8 1'-neolignana		
Espécie	Composto	Classe	Referência
O. odorifera	rel-(7S,8R,1'R,3'R,4'S)- Δ^8 -4'-acetoxi-3,4,5,3',5'-pentametoxi-1',2',3',4'-tetraidro-5'-oxo-7 3',8 1'-neolignana	Neolignana	(GOMES; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1983)
O. veraguensis	rel-(7S,8R,1'S,2'R,3'S)-1',2',5',6'-tetraidro-2'-hidroxi-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxo-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene-4'(3'H)-ona		(DODSON <i>et al.</i> , 1987)
	rel-(7S,8R,1'S,2'R,3'S)-1',2',5',6'-tetraidro-4,2'-diidroxi-3,3',5'-trimetoxi-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene-4'(3'H)-ona		
	rel-(7S,8R,1'S,2'R,3'S)-2'-acetoxi-1',2',5',6'-tetraidro-3,4,3',5'-tetrametoxi-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene-4'(3'H)-ona		
	rel-(7S,8R,1'S,2'R,3'S)-2'-acetoxi-1',2',5',6'-tetraidro-3',5'-dimetoxi-3,4-metilenodioxo-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene-4'(3'H)-ona		
O. odorifera	rel-(7S,8R,1'S,2'R,3'S,4'R)- Δ^8 -4'-acetoxi-2'-hidroxi-3,3'-dimetoxi-4,5-metilenodioxo-1',2',3',4',5',6'-hexaidro-5'-oxo-7 3',8 1'-neolignana		(GOMES; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1983)
	rel-(7S,8R,1'S,2'R,3'S,4'R)- Δ^8 -4'-acetoxi-2'-hidroxi-3'-metoxi-3,4-metilenodioxo-1',2',3',4',5',6'-tetraidro-5'-oxo-7 3',8 1'-neolignana		
O. veraguensis	rel-(7S,8R,1'S,2'S,3'R)-2'-acetoxi-1',2'-diidro-3,3',5'-trimetoxi-4,5-metilenedioxo-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene-4'(3'H)-ona		(DODSON <i>et al.</i> , 1987)
	rel-(7S,8R,1'S,2'S,3'R)-2'-acetoxi-1',2'-diidro-3,4,3',5'-tetrametoxi-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene-4'(3'H)-ona		
	rel-(7S,8R,1'S,2'S,3'R)-2'-acetoxi-1',2'-diidro-3,4,5,3',5'-pentametoxi-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene-4'(3'H)-ona		

	rel-(7S,8R,1'S,2'S,3'R,4'R)-2'-acetoxi-1',2',3',4'-tetraidro-4'-hidroxi-3,4,3',5'-tetrametoxi-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene		
	rel-(7S,8R,1'S,2'S,3'R,4'R)-2'-acetoxi-1',2',3',4'-tetraidro-4'-hidroxi-3',5'-drimetoxi-3,4-metilenedioxi-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene		
Espécie	Composto	Classe	Referência
O. costulatum	rel-(7S,8R,1'S,3'S,4'S)-3',4'-diidro-4'-hidroxi-3,3',5'-trimetoxi-4,5-metilenodioxi-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene-2'(1'H)-ona	Neolignana	(DA SILVA; BRAZ-FILHO; GOTTLIEB, 1989)
O. porosa	rel-(7S,8S)-3'-metoxi-3,4-metilenodioxi-7'-oxo-8.5',7.O.4'-8',9'-bisnorneolignana		(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
O. simulans	rel-(7S,8S)-4'-hidroxi-7'-oxo-8.3',7.O.4'-8',9' bisnorneolignana		(DIAZ, 1996)
O. porosa	rel-(7S,8S)-7,4'-epoxi-4'-hidroxi-3,5'-dimetoxi-8',9'-bisnor-8,3'-neoligna-7'-ona		(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
O. catharinensis	rel(7S,8S,1'R,2'S)-2'-hidroxi-3,4-dimetoxi-3'-oxo- $\Delta^{1,3,5,4';8'}$ -8.1',7.O.2'-neolignana		(LORDELLO; YOSHIDA, 1997)
	rel-(7S,8S,1'R,2'S)- $\Delta^{4',8'}$ -2'-hidroxi-3,4-metilenodioxi-3'-oxo-8.1',7.O.6'-neolignana		(ISHIGE <i>et al.</i> , 1991)
O. porosa	rel-(7S,8S,1'R,5'R,6'S)- $\Delta^{2',8'}$ -6'-acetoxi-3'-metoxi-3,4-metilenodioxi-4'-oxo-8.1'-neolignana		(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
	rel-(7S,8S,1'S,2'S)-7,2'-epoxi-3'-hidroxi-1',2',3',6'-tetraidro-2'-metoxi-3,4-metilenodioxi-8,1'-neoligna-8'-ene		(DIAS; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1986)
	rel-(7S,8S,1'S,3'R,4'S,5'S)- $\Delta^{8'}$ -4'-hidroxi-3'-metoxi-3,4-metilenodioxi-6'-oxo-8.1',7.5'-neolignana		(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)

	rel-(7S,8S,1'S,3'R,4'S,5'S,6'S)- Δ^8 -4',6'-diidroxi-3'-metoxi-3,4-metilenodioxi-8.1',7.5'-neolignana		
O. foetens	rel-(7S,8S,7'S,8'R)-7,7'-epoxi-2,5,3',4',5'-pentametoxilignana	Lignana	(LÓPEZ; VALERA; TRUJILLO, 1995)
Espécie	Composto	Classe	Referência
O. porosa	rel-(7S,8S,1'R,2'S,3'R)-2'-acetoxi-1',2'-diidro-5'-metoxi-3,4-metilenodioxi-7.3',8.1'-cicloneoligna-8'-ene-4'(3'H)-ona	Neolignana	(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
O. bullata	rel-(8R,1'R,3'R)-2',3'-Diidro-3,4,5-trimetoxi-3',4'-metilenodioxi-8,3'-neoligna-7-ene-6'(1H)-ona		(DREWES; HORN; MAVI, 1997)
O. porosa	rel-2'-metoxi-3,4-metilenodioxi-1',7'-seco-8,4'-neoligna-8'-ene-1',7'-éter		(DAVID; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1994)
O. duckei Vattimo	sesartemina	Lignana	(BARBOSA-FILHO <i>et al.</i> , 2008)
O. bullata	sibilenona	Neolignana	(ZSCHOCKE <i>et al.</i> , 2000b)
O. duckei Vattimo	siringaresinol	Lignana	(BARBOSA-FILHO <i>et al.</i> , 2008)
O. macrophylla	threo-3,4,5,3',4',5'-hexametoxilignana		(COY-BARRERA; CUCA-SUÁREZ, 2011)
O. foetens	veraguensina		lópez e valera 1995
O. macrophylla	Δ^7 -3,4,5,3'-tetrametoxi-8',9'-dinor-4',7'-epoxi-8.3'-neolignana-7'-aldeido (ocofilal B)		(COY-BARRERA; CUCA-SUÁREZ; SEFKOW, 2009)
	Δ^7 -3,4-metilenodioxi-3'-metoxi-8',9'-dinor-4',7'-epoxi-8.3'-neolignana-7'-aldeido (ocofilal A)		
O. bullata	Δ^8 -3 ¹ ,6 ¹ -diidro-3,4,3 ¹ ,4 ¹ -bis-metilenodioxo-6 ¹ -oxo-8,3 ¹ neolignana		(DREWES; HORN; MAVI, 1997)

8.2. Apêndice 2

Autorização para atividade com finalidade científica em área de proteção florestal



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57502-1	Data da Emissão: 16/02/2017 20:49	Data para Revalidação*: 18/03/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA JUNIOR	CPF: 018.728.677-90
Título do Projeto: Estudos fitoquímicos de espécies oleaginosas Amazônicas	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - FUA	CNPJ: 04.378.626/0001-97

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coletas de material biológico	03/2017	02/2021
2	Estudos químicos	03/2017	02/2021

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	O pesquisador deverá entrar em contato com a coordenação do Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais PDBFF/INPA para confirmar datas das expedições, infraestrutura e outros procedimentos existentes para realizar as coletas nas áreas dos fragmentos florestais. Cópias das publicações resultantes da pesquisa realizadas no interior da ARIE PDBFF deverão ser enviadas por e-mail à coordenação do PDBFF/INPA.
2	Cópias de todos os relatórios e publicações resultantes da atividade de pesquisa na REBIO Uatumã devem ser encaminhadas a gestão da UC.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Ananda da Silva Antonio	Doutoranda	937.828.372-15	2203347-5 SESEG-AM	Brasileira
2	ALBERTO VICENTINI	Botânico	110.673.438-65	1246771-5 SESEG-AM	Brasileira
3	Yasmin Cunha da Silva	Química - Mestranda	014.946.702-83	18308821 SSP-AM	Brasileira
4	Charles Eugene Zartman	Botânico	534.316.852-34	V4325130 DPMF-AM	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

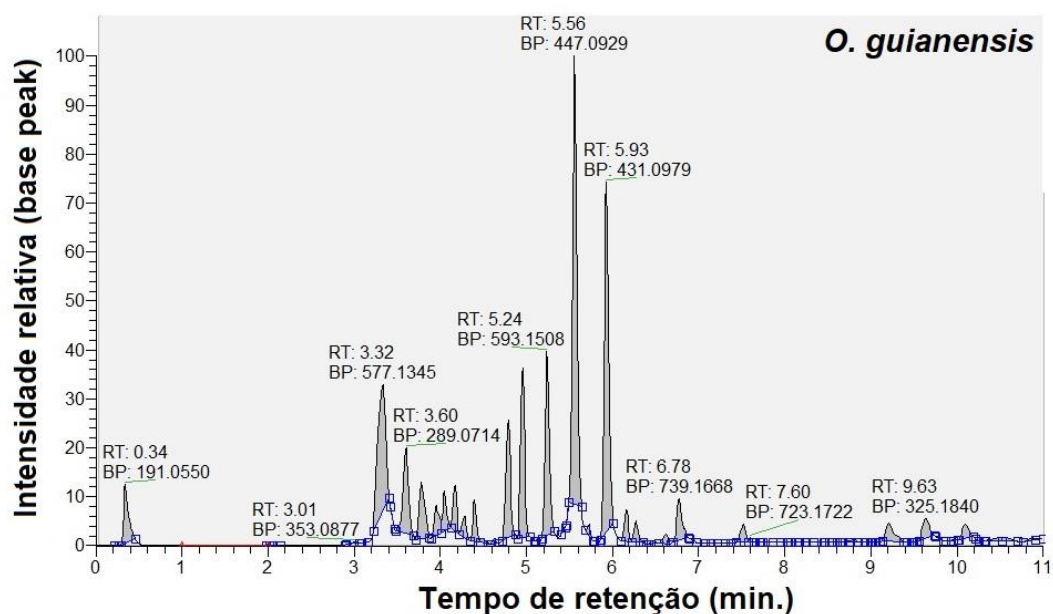
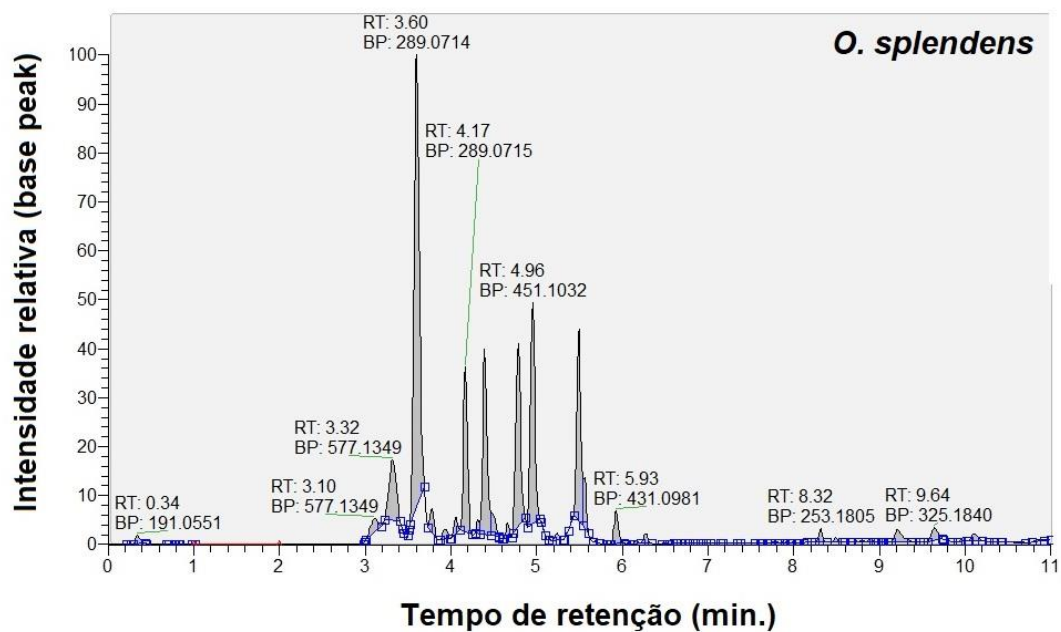
Código de autenticação: 38234161

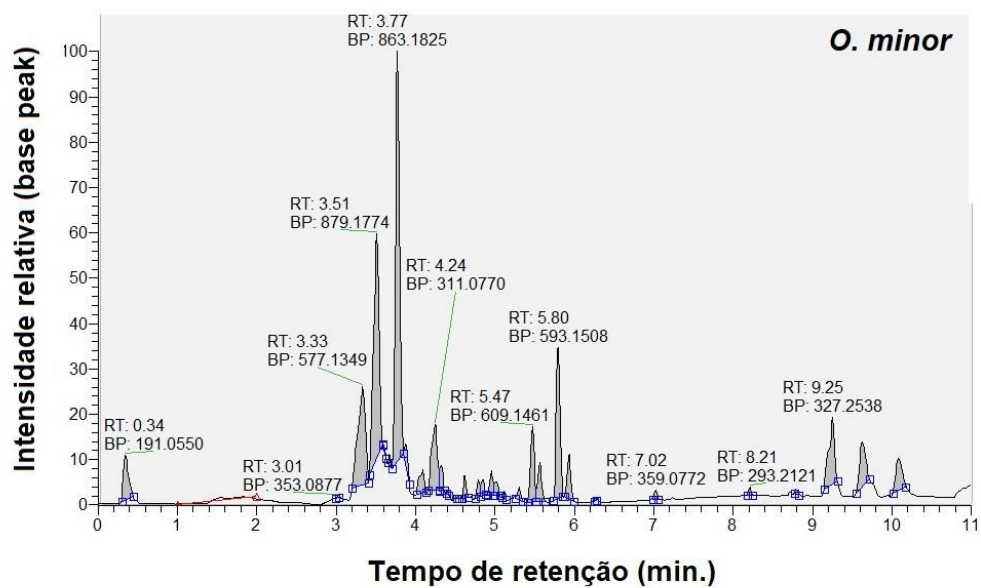
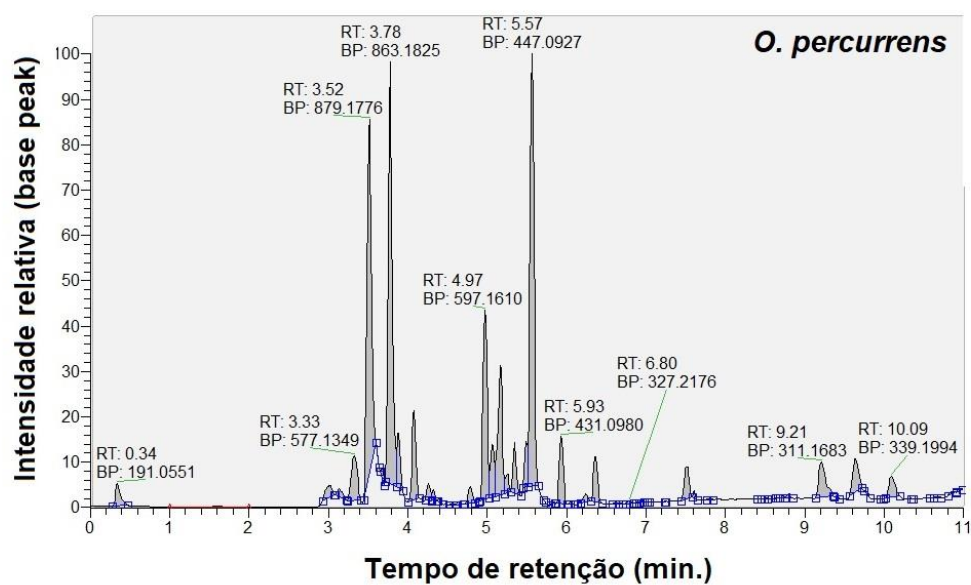
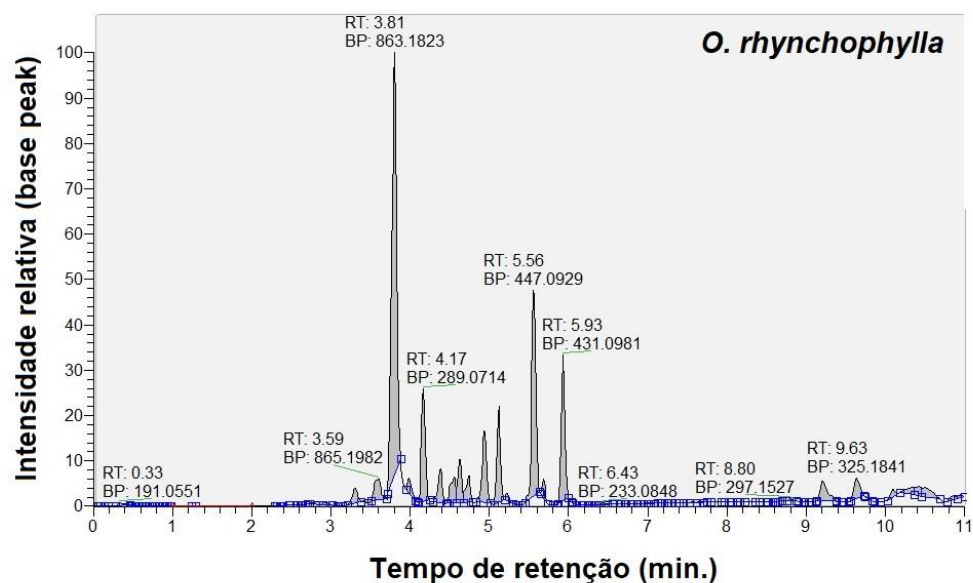


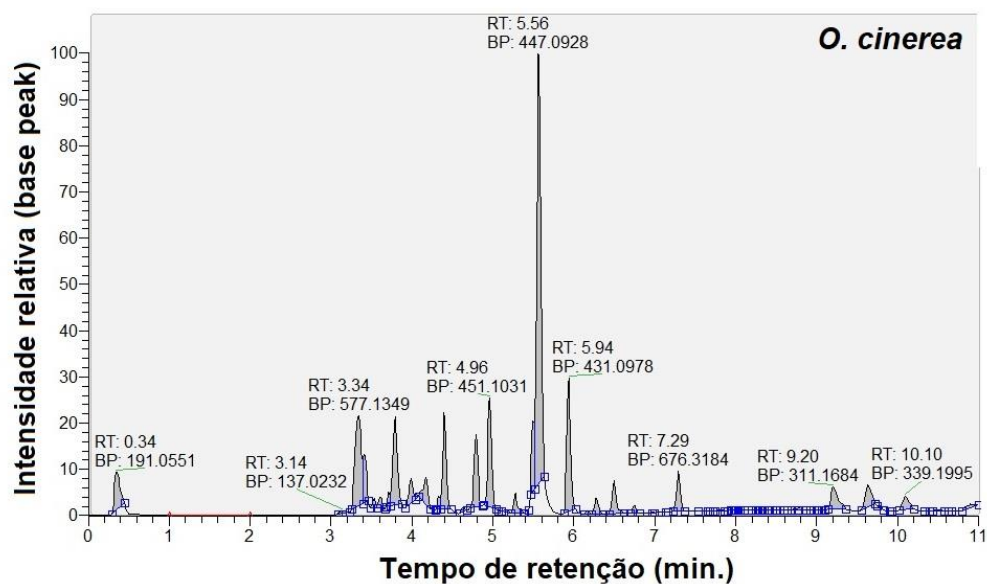
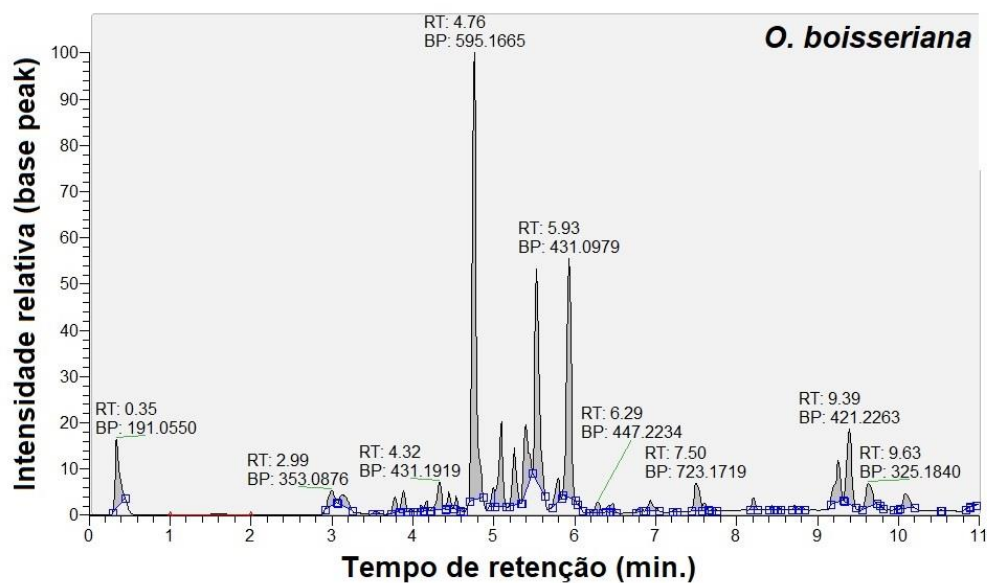
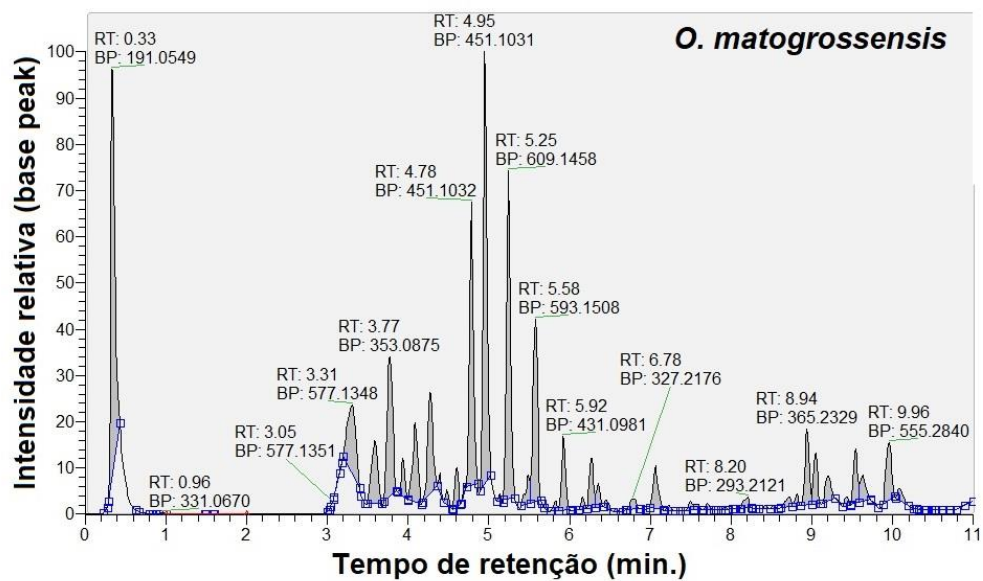
Página 1/3

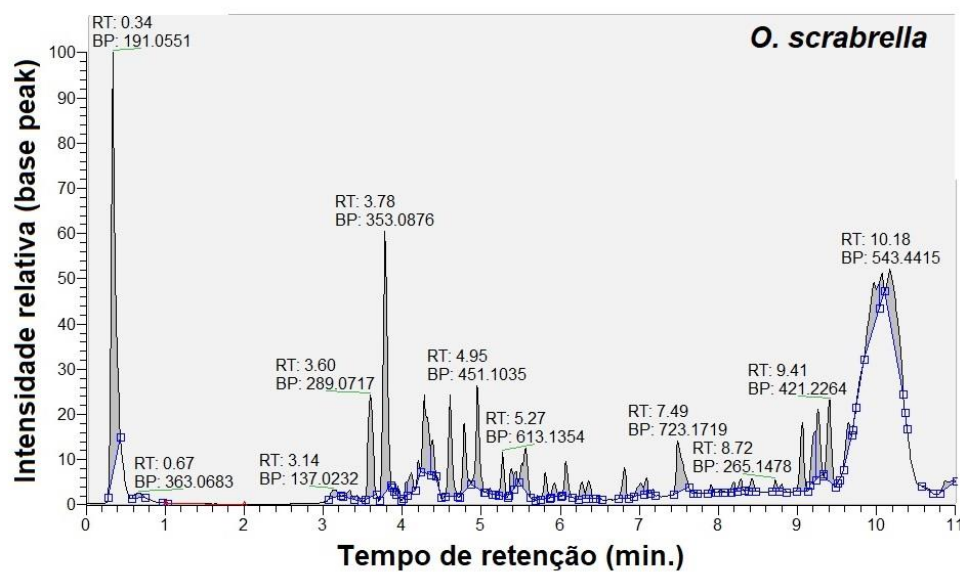
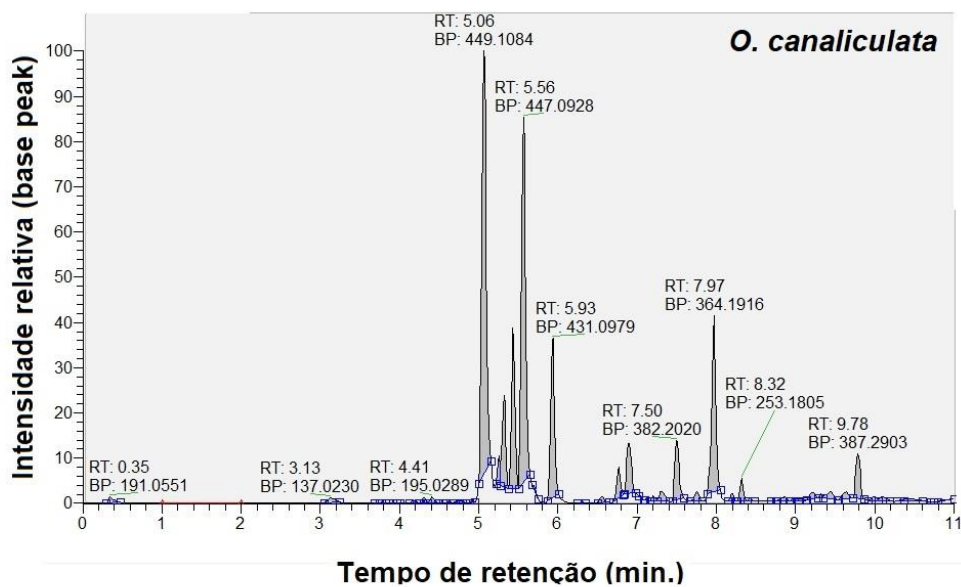
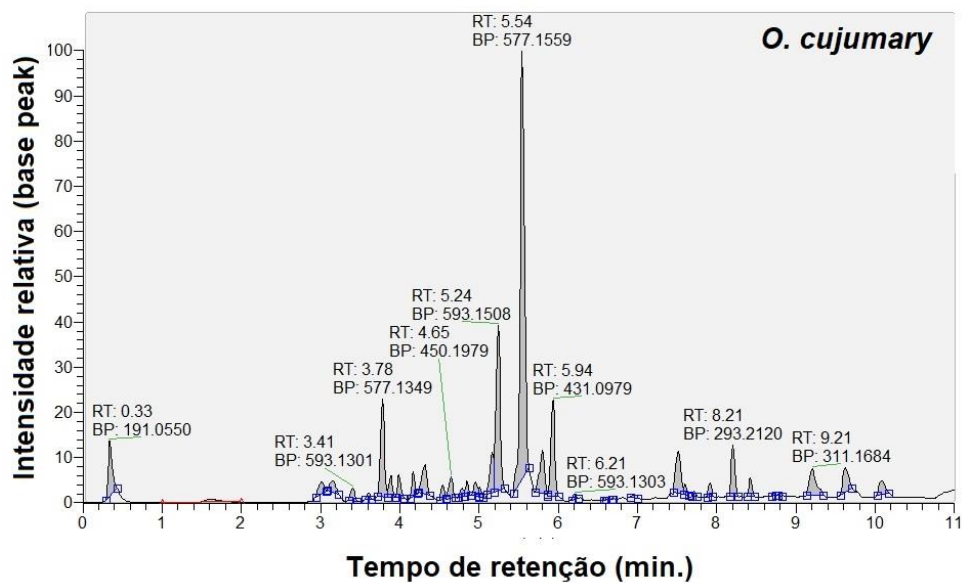
8.3. Apêndice 3

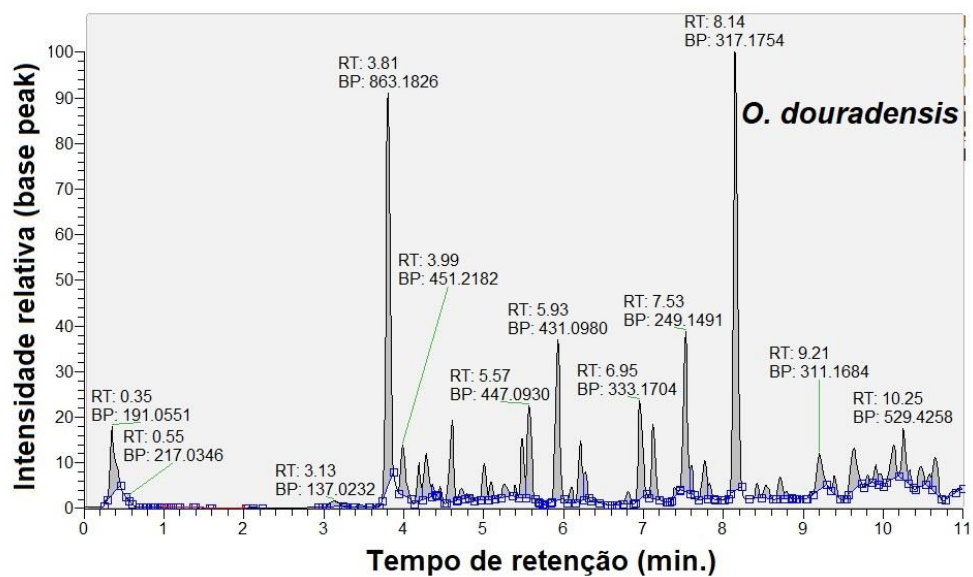
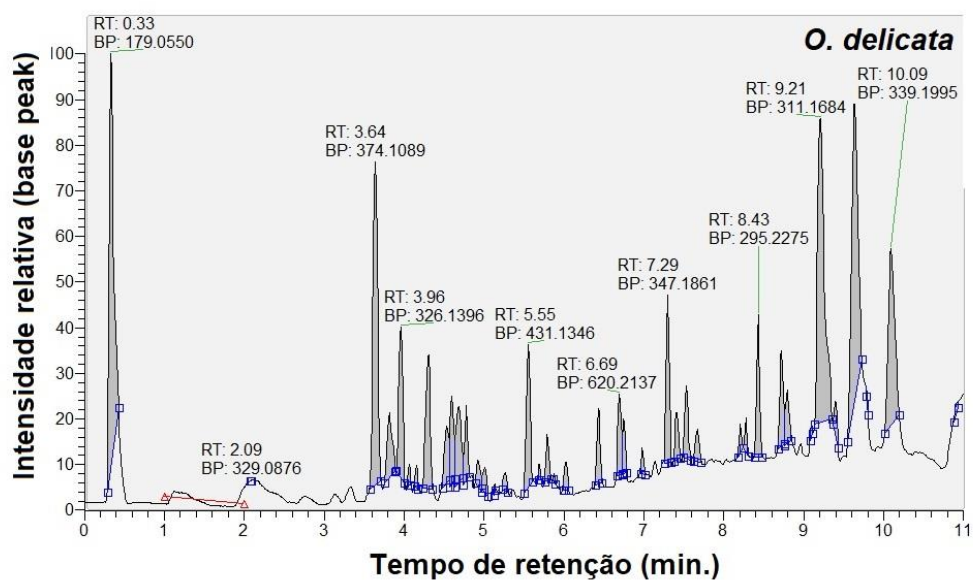
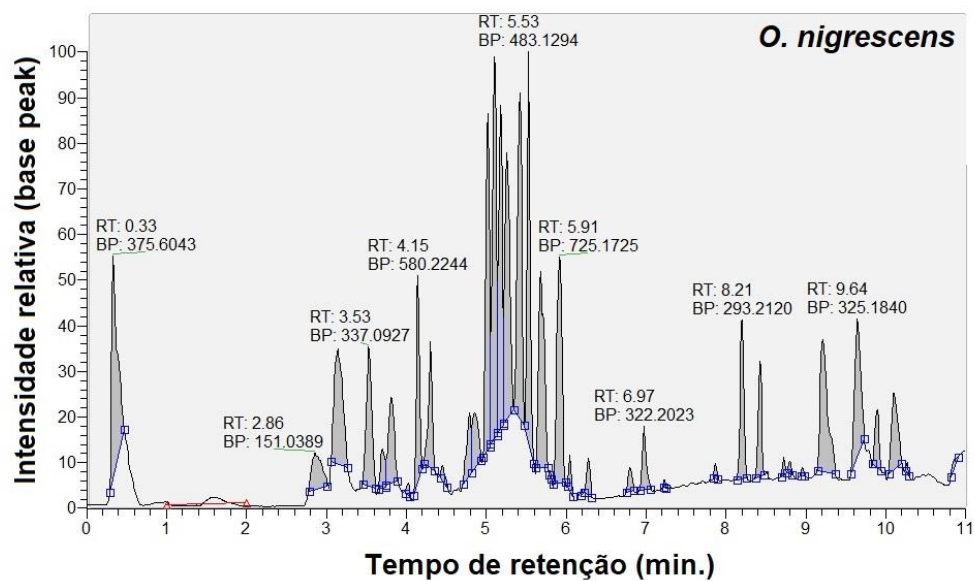
Cromatogramas *base peak* obtidos pela técnica de CLAE-EM em modo de ionização negativo das 14 espécies de *Ocotea* estudadas.











8.4. Apêndice 4

Atividades extracurriculares realizadas durante o curso de doutorado (2016 – 2020).

8.4.1. Publicação de artigo na Revista Virtual de Química



Artigo

Avaliação de Características Químicas do Solo Durante a Decomposição Cadavérica e suas Aplicações à Química Forense

**Antonio, A. S.;* de Paula, A. R. U.; Aguiar, A. T. C.; da Costa, L. C. A.;
Keppler, R. L. F.; Bentes, K. R. S.; Wiedemann, L. S. M.**

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (3), 574-599. Data de publicação na Web: 1 de junho de 2018

<http://rvq.sbg.org.br>

Evaluation of Soil Chemical Properties During Cadaveric Decomposition and its Applications to Forensic Chemistry

Abstract: The estimation of the Post-Mortem Interval (PMI) is a primordial parameter in the investigation of crimes against life. In tropical climate areas, the cadaveric decomposition occurs in an accelerated form, preventing the PMI estimation by usual methods. Understanding how different circumstances affect the cadaveric composition is very important to develop methods that enable the PMI estimation in several climatic conditions. One of the alternatives, however not much explored in Brazil, refers to the use of soil chemistry for the determination of longstanding PMIs. In this research, variations in soil chemical properties were monitored during swine carcasses cadaverous decomposition in a tropical forest area in order to recognize patterns and evaluate the applicability of these by the criminal expertise. Among the evaluated characteristics are the levels of pH, inorganic nitrogen (ammonia and nitrate), total nitrogen, carbon nitrogen proportion (C: N), exchangeable aluminum, available phosphorus and macro and micronutrients. The results showed distinct variations according to the decomposition phases observed and also to the way the carcasses were deposited in the study environment (above or below the soil), evidencing the possibility of using these variations in the development of models for the prediction of post-mortem intervals lasting up to 67 days.

Keywords: Post-mortem interval; soil chemistry; necrochorume; cadaveric soil.

8.4.2. Publicação na revista RSC Advances

RSC Advances



REVIEW

[View Article Online](#)

[View Journal](#) | [View Issue](#)



Cite this: *RSC Adv.*, 2018, 8, 25767

The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites†

A. S. Antonio,^a L. S. M. Wiedemann^a and V. F. Veiga Junior ^{ab}

The *Capsicum* genus is one of the most popular plants consumed and cultivated worldwide, containing approximately 50 000 varieties of pepper. Due to its wide biodiversity, the chemical composition within the genus also presents a great variability. Its major applications are in food and pharmacological industry, as pepper presents a chemical composition rich in capsaicinoids, carotenoids, flavonoids and volatile compounds which is attributed to the ability of the fruit to remove insipidity, produce aromas and act against oxidative diseases. Due the existence of several cultivars there is a huge intraspecific chemical variability within each species, which can be considered as an obstacle when selecting and cultivating a species to be applied as a natural product source for a specific objective. The usage of pepper-based products in different industrial areas requires pre-established ranges of chemical compounds, such as capsaicinoids, which in high concentration are toxic when consumed by humans. Applying a pepper with a chemical profile closely related to the concentration that is required after industrial processing can improve efficacy and effectiveness of the process. An insight into the chemical characteristics of major secondary bioactive compounds within *Capsicum*, the factors that affect their concentration and their chemosystematic implication are reported and discussed.

Received 8th March 2018
Accepted 3rd July 2018

DOI: 10.1039/c8ra02067a
rsc.li/rsc-advances

8.4.3. Publicação na Revista Food Analytical Methods

Food Analytical Methods
<https://doi.org/10.1007/s12161-019-01470-2>



Food Pungency: the Evolution of Methods for Capsaicinoid Analysis

Ananda da Silva Antonio¹ · Larissa Silveira Moreira Wiedemann¹ · Valdir Florêncio da Veiga Junior^{1,2}

Received: 14 December 2018 / Accepted: 11 February 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Capsicum species are very famous natural products used and consumed as spices, fruits, and powder preparations. Their popularity is due to the presence of an exclusive alkaloid class known as capsaicinoid, responsible for the pungency of peppers and part of their biological activities. Since the beginning of their commercial exploration, several analytical methods have been developed to identify and quantify capsaicinoids. In large concentrations, capsaicinoids are toxic to mammalian; therefore, it is mandatory to establish their levels in pepper products and ensure if they can be consumed. The first method developed to determine pungency in pepper products was organoleptic, but with the technological development of these products, it became necessary to develop more accurate methods not susceptible to human errors. Currently, the methods applied for capsaicinoid analysis vary from fast and inexpensive methods, such as electrochemical methods, to those most costly with high performance, such as the chromatographic methods. In this paper, the major analytical methods developed until now, for the determination of capsaicinoids, have been reviewed and discussed.

Keywords Capsaicinoid analysis · Capsaicin · Pepper · Pungency · Analytical methods

8.4.4. Publicação na Revista Journal of the Brazilian Chemical Society



<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190028>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 30, No. 6, 1115-1129, 2019
Printed in Brazil - ©2019 Sociedade Brasileira de Química

Review

Perspectives and Applications of Natural Products as Civilian Defense Devices

Ananda S. Antonio,^a Gabriel D. Fonseca,^b Álvaro J. B. Mendes,^b
Larissa S. M. Wiedemann^a and Valdir F. Veiga-Junior^{a,*}

^aDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas,
Avenida Rodrigo Octávio, 6200, Coroado, 69077-000 Manaus-AM, Brazil

^bDepartamento de Engenharia Química, Instituto Militar de Engenharia,
Praça General Tibúrcio, 80, Praia Vermelha, Urca, 22290-270 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

Civilian defense devices are physical and chemical artefacts used to incapacitate an aggressor without causing death or injury. As city violence increases, safety feelings became worst and a growing commercial demand for these materials supply faces technologically challenges not only to riot control but also to self-protection. Controversies on the use of these devices have been discussed, especially on their toxicity when synthetic chemical agents are used. Natural metabolites are a less explored alternative to meet this demand. They have the capacity to generate a temporary disabling effect due to their pungency. Those metabolites, which include capsaicinoids, gingerols and piperine, can be used as deterrent agents in civilian defense devices due to their low toxicity to humans. Although they are a viable alternative, there are few studies focused on their quality control, efficiency and toxicity. This review aimed to present relevant aspects about the development and use of natural products as deterrent agents in self-defense devices against aggressors and animals, and as non-lethal weapons for riot control in order to help the scientific development of this type of bioproduct.

Keywords: disabling agents, *Capsicum*, *Piper*, *Zingiber*, self-defense devices

8.4.5. Publicação na Revista Química Nova

<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170418>

Quim. Nova, Vol. 43, No. 1, 72-77, 2020

Artigo

PERFIL METABÓLICO DOS EXTRATOS POLARES DAS FOLHAS, GALHOS E CASCAS DE *Copaifera multijuga* HAYNE (COPAÍBA MARI-MARI DA AMAZÔNIA) POR ESI-EM

Davi S. Oliveira^a, Leandro S. Lima^a, Ananda S. Antonio^a, Larissa S. M. Wiedemann^a e Valdir F. Veiga-Junior^{a,b,*} 

^aDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio, 6200, 69079-00 Manaus – AM, Brasil

^bDepartamento de Engenharia Química, Instituto Militar de Engenharia, Praça General Tibúrcio, 80, Praia Vermelha, Urca, 22290-270 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 03/06/2019; aceito em 23/09/2019; publicado em 02/10/2019

METABOLIC PROFILE OF THE POLAR EXTRACTS OF THE LEAVES, BRANCHES AND BARKS OF *Copaifera multijuga* HAYNE (COPAÍBA mari-mari AMAZÔNIA) BY ESI-MS. *Copaifera multijuga* Hayne is the main species of the genus in the Amazon region, being exploited for copaiba oil production mainly because of its therapeutic properties. The plant parts (leaves, branches, and barks) are widely used in folk medicine. However, they are little explored in terms of chemical composition. In this study, the polar extracts of leaves, branches, and barks of the species were analysed by direct infusion in ESI-MS with the aid of reference standards and MS² fragmentation experiments. Twenty-six substances (carboxylic acids, flavonoids, condensed tannins, a diterpene and fifteen isomers of galloylquinic acids) were detected. Metabolic profiles were similar between extracts of leaves and branches, especially with the detection of galloylquinic acids and carboxylic acids. In bark extract, condensed tannins epicatechin-(4 β -8)-epiafzelechin (dimer) and epicatechin-(4 β -8)-epiafzelechin-(4 β -8)-epiafzelechin (trimer) were detected. The PCA showed differences and similarities in the chemical composition of the copaiba mari-mari extracts. Thus, galloylquinic acids and flavonoids kaempferol, 7-O-methyl-kaempferol, quercetin-3-O-L-pentoside, and quercetin-3-O-L-rhamnoside are described for the first time in *C. multijuga*. The phytotherapeutic properties of teas of the plant parts of the species may be associated with the suggested polyphenols.

Keywords: *Copaifera multijuga*, Copafba, Metabolomic, Amazonia, Mass Spectrometry.

Cite this: *RSC Adv.*, 2020, 10, 3459

Phytochemistry by design: a case study of the chemical composition of *Ocotea guianensis* optimized extracts focused on untargeted metabolomics analysis†

Ananda da Silva Antonio,^a Ana Tayná Chaves Aguiar,^a
Gustavo Ramalho Cardoso dos Santos,^b Henrique Marcelo Gualberto Pereira,^b
Valdir Florêncio da Veiga-Junior^{*,ac} and Larissa Silveira Moreira Wiedemann^a

Untargeted metabolomics aim to provide a global chemical fingerprint of biological matrices. This research field can be used in phytochemical screenings for bioactive species or in the identification of species. Despite its importance in providing a global chemical profile, little research has focused on the optimization of the extraction methods, as each type of matrix requires a specific procedure. Therefore, we propose to evaluate the effect of different extraction features in an ultrasound-assisted extraction for the untargeted metabolomic study of an *Ocotea* species, a genus of great economical interest but little chemical exploitation. Method optimization was performed in a full factorial $2^{2 \times 3^2}$ design, evaluating the solvent composition, extraction temperature, sample particle size and sample : solvent ratio effects in the metabolomic response. The effect of these parameters on the quality of the untargeted metabolomic profiles was studied by analysis of the extraction yield as well as the chromatographic and spectrometric profiles. Most substances identified were glycosylated flavonoids and aporphinic alkaloids. The application of 70% ethanol enhanced the extraction of several specialized metabolites. Statistical analysis of extraction yield and chemical profiles indicates that high temperatures and low proportion between sample and extracting solvent reduce the quality and modify the chemical profile, both qualitatively and quantitatively. The use of 70% ethanol as the extracting solvent, 1 : 12 sample : solvent ratio, 40 °C as the extraction temperature and particle size of 0.595 mm were the optimized conditions to produce a comprehensive chemical profile for *Ocotea guianensis*.

Received 12th December 2019
Accepted 15th January 2020

DOI: 10.1039/c9ra10436d

rsc.li/rsc-advances

8.4.7. Publicação na Revista Phytochemistry



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochem



Ocotea complex: A metabolomic analysis of a lauraceae genus

Ananda S. Antonio^a, Valdir F. Veiga-Junior^{a,b,*}, Larissa Silveira Moreira Wiedemann^a

^a Chemistry Department, Institute of Exact Sciences, Federal University of Amazonas, Avenida Rodrigo Octávio, 6200, Coroado, CEP: 69.077-000, Manaus, AM, Brazil

^b Chemical Engineering Section, Military Institute of Engineering, Praça General Tibúrcio, 80, Praia Vermelha, Urca, CEP: 22.290-270, Rio de Janeiro, RJ, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

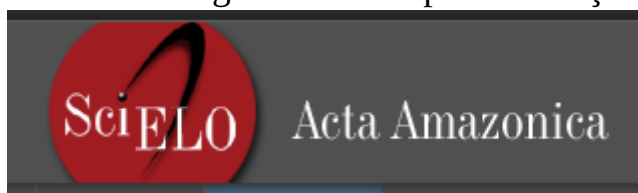
Ocotea
Lauraceae
Metabolomic
Alkaloids
Flavonoids
Lignans

ABSTRACT

The genus *Ocotea* is one of the largest and most economically explored in the Lauraceae family. However, its current industrial use is limited by the difficult identification of *Ocotea* species. At present, the genus is botanically considered a complex since accurate classification is very difficult to achieve based on taxonomic characteristics. As chemophenetics can aid in *Ocotea* species identification processes, we propose to evaluate the chemical data in several studies of Lauraceae species published between 1906 and 2019 in order to provide insights of the identification issue of matrix which DNA material or full morphological characteristics may not be readily available. Several alkaloids and lignoids have been found to be specifically synthesized by *Ocotea* species, enabling their usage in species identification by targeted and untargeted metabolomic approaches. The multivariate analysis of alkaloid, lignoid and flavonoid profiles allowed the characterization of subsets of species, the differentiation of chemical profile based on plant parts (leaves and branches), and to elucidate specific biomarkers for species. The previous chemophenetic model was contradicted by our data using statistical tools, such as HCPC, which allowed clustering adjustments based not only in the presence or absence of two single chemical classes. Chemophenetic study has proved to be a reliable tool in the enhancement of the identification and comprehension of this genus and the family. Here, the current status, pitfalls and future perspectives in *Ocotea* species metabolomic characterization will be presented.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112314>

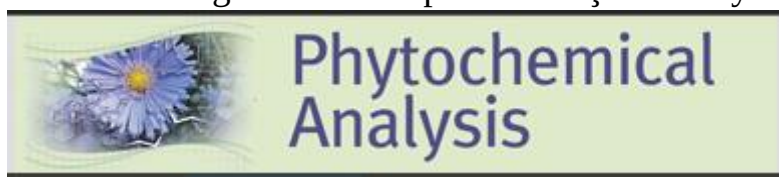
8.4.8. Artigo submetido para avaliação na Acta Amazonica



Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM: Online, ActAmaz	AA-2020-0005	Discovery of Ocotea delicata metabolomic fingerprint: An Amazon basin endemic species View Submission Cover Letter	06-Jan-2020	06-Jan-2020
• Awaiting EIC Decision • Awaiting Reviewer Invitation				

8.4.9. Artigo submetido para avaliação na Phytochemical Analysis



Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
Evaluating Reviews	PCA-19-0465	Flavonoids and galloyquinic acids role as chemosystematic markers for Copaifera species identification View Submission Cover Letter	04-Dec-2019	04-Dec-2019

8.4.10. Artigo submetido para avaliação na Natural Product Research

Chemosystematic evaluation of Amazonian freshwater sponges

Journal:	<i>Natural Product Research</i>
Manuscript ID	GNPL-2020-0147
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	16-Jan-2020
Complete List of Authors:	Manço da Costa Bolson, Glaucia Cristina; Universidade Federal do Amazonas, Department of Chemistry Antonio, Ananda; Federal University of Amazonas, Chemistry Department de Barros, Iuri; Universidade Federal do Amazonas, Department of Chemistry dos Santos, Gustavo; Federal University of Rio de Janeiro, Chemistry Institute, Brazilian Doping Control Laboratory Pereira, Henrique; Federal University of Rio de Janeiro, Chemistry Institute, Brazilian Doping Control Laboratory Wiedemann, Larissa; Federal University of Amazonas, Chemistry Department Veiga Junior, Valdir; Military Institute of Engineering, Chemical Engineering Department

8.4.11. Publicação de capítulo de livro

Foi realizada a publicação de dois capítulos no livro *Práticas de laboratório em química de produtos naturais* (Editora Interciência Ltda, ISBN 978-85-7193-432-0)

1. **ANTONIO, A. S.**; Aguiar, A. T. C.
A obtenção da amostra In: *Práticas de laboratório em química de produtos naturais*. 1 ed. Rio de Janeiro: editora interciência ltda, 2019, v.1, p. 119-.
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso, ISBN: 9788571934320
2. SARAIVA, S.; **ANTONIO, A. S.**
Procedimentos de campo para coleta botânica In: *Práticas de laboratório em química de produtos naturais*. 1 ed. Rio de Janeiro: editora interciência ltda, 2019, v.1, p. 103-.
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso, ISBN: 9788571934320

8.4.12. Produção de capítulo de livro

Está sendo realizada a confecção de seis capítulos para compor o livro *Chemistry and Nutritional effects of Capsicum* (Royal Society of Chemistry) previsto para o ano de 2020

Food Chemistry, Function and Analysis

Chemistry and Nutritional Effects of *Capsicum*

Valdir Florêncio da Veiga Jr, Larissa Silveira Moreira Wiedemann,
Cláudio Pereira de Araújo Jr and Ananda da Silva Antonio



8.4.13. Participação em Congresso em 2018 (apresentação de poster)



8.4.14. Participação em Congresso em 2019 (apresentação de poster)



8.4.15. Participação em congresso (equipe organizadora)



8.4.16. Participação em congresso (apresentação de miniconferência)

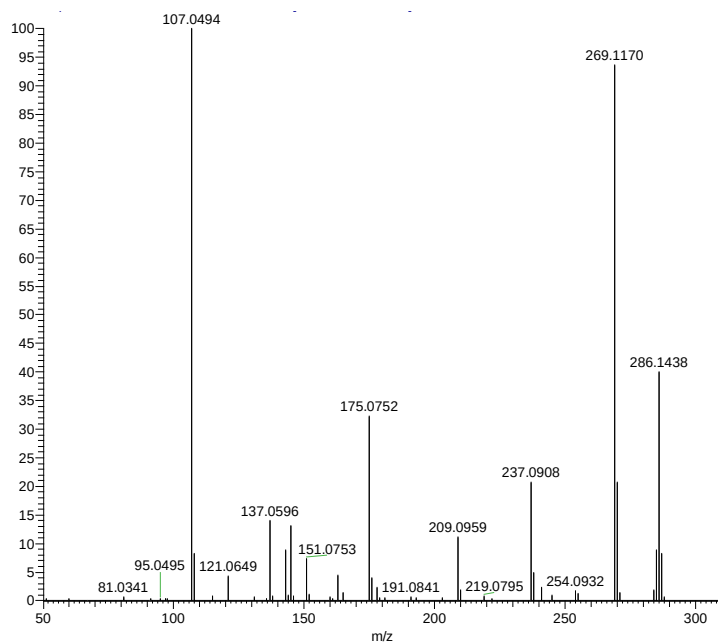


8.5. Apêndice 5

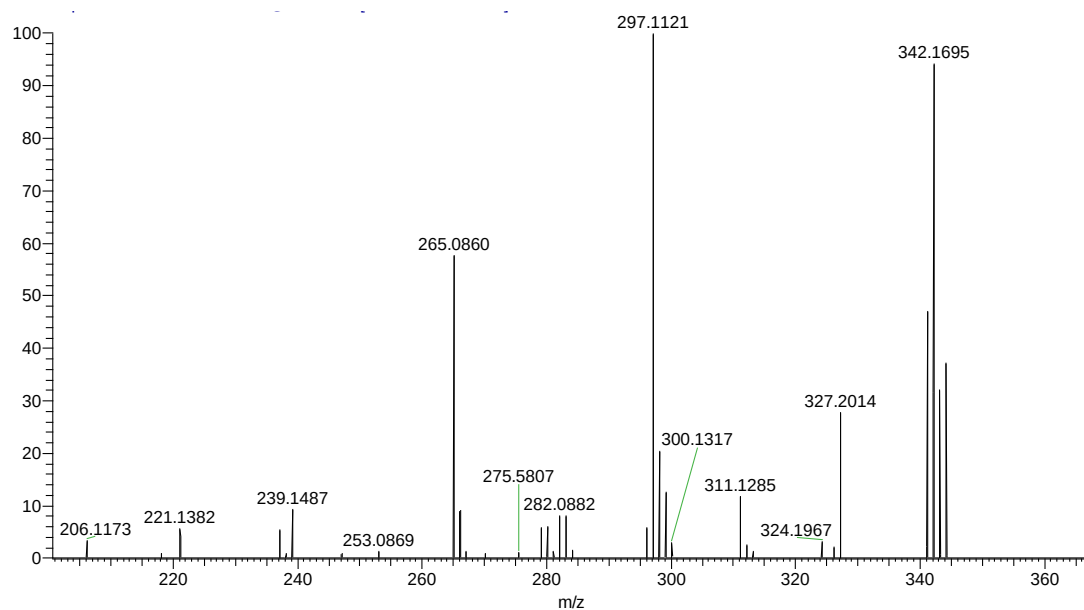
Demonstração dos padrões de fragmentação (MS^2) observados para a identificação putativa de metabólitos (Tabela 6).

Modo positivo de ionização

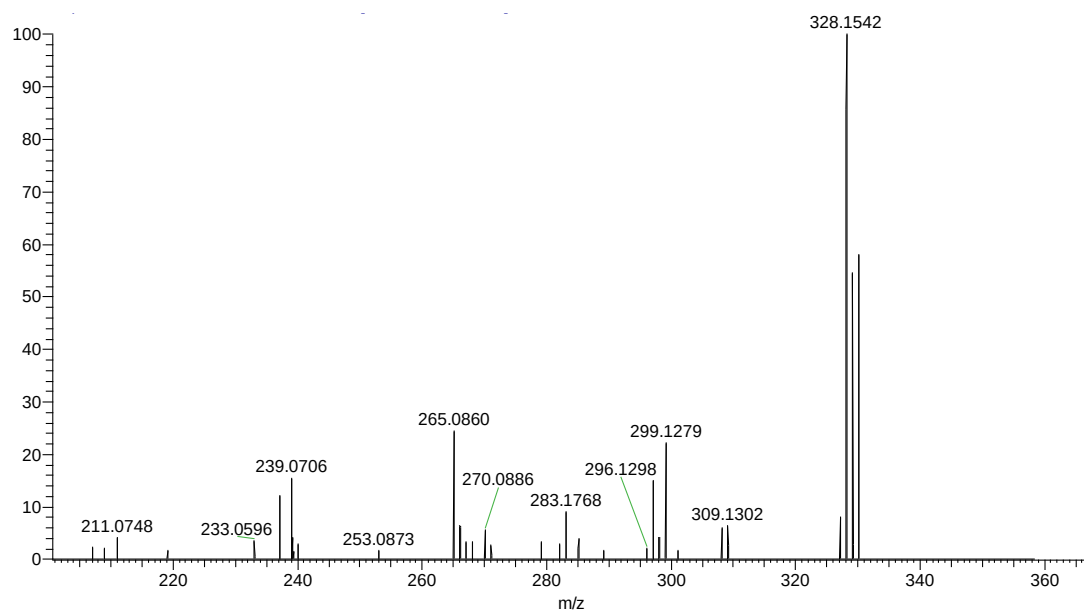
Coclorina



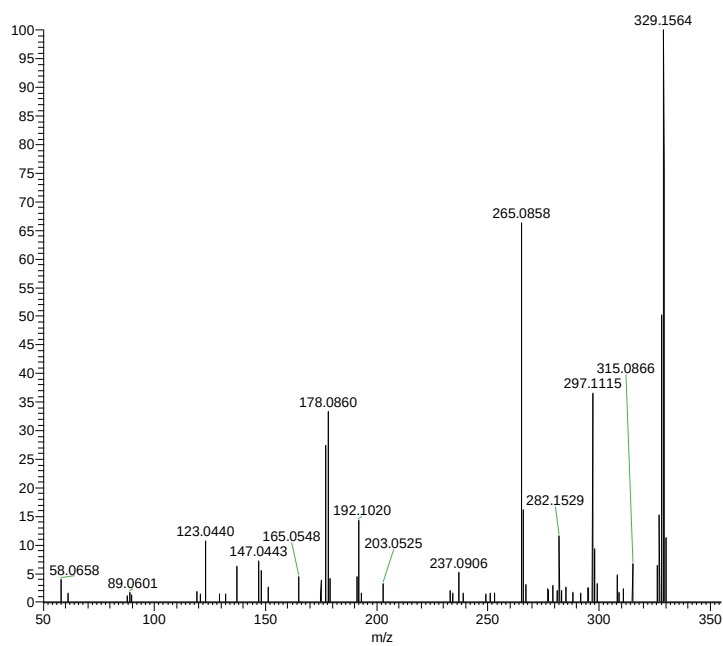
Predicentrina/ Coridina



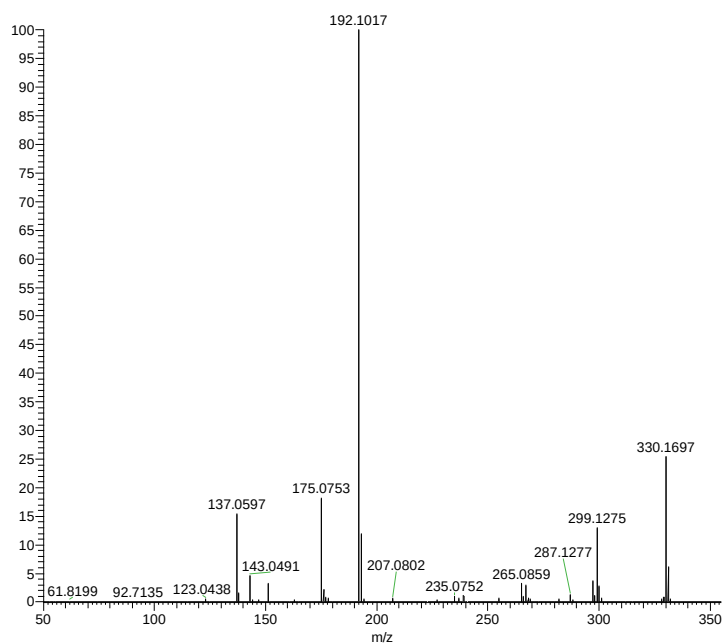
Corituberina



Boldina/ Isoboldina

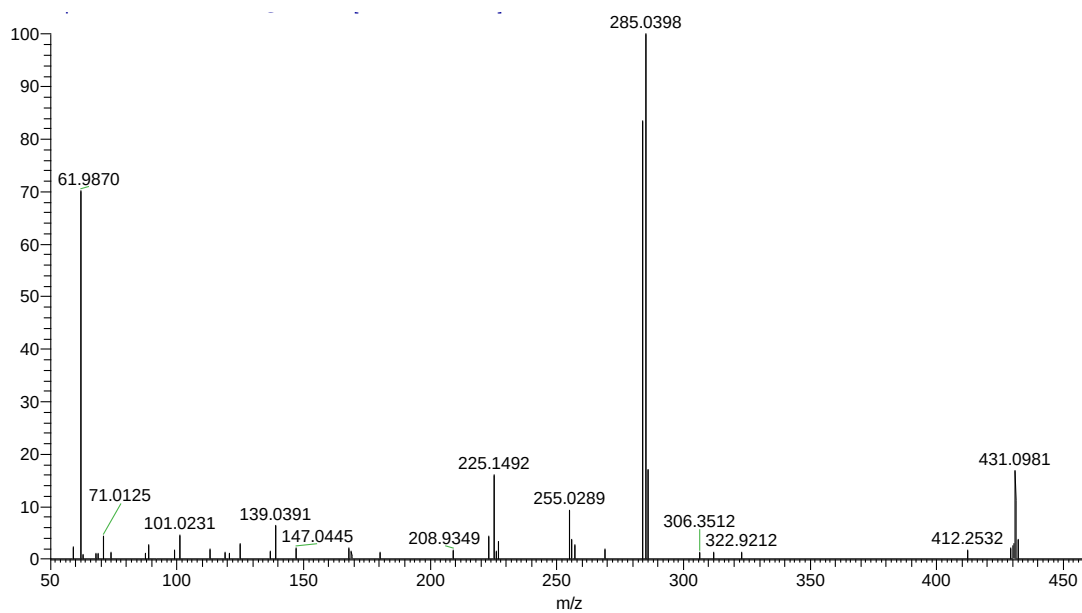


Reticulina

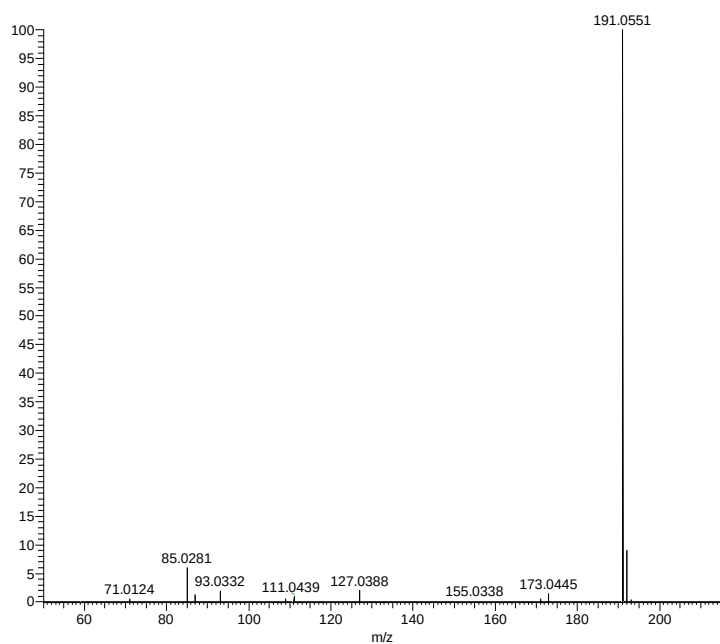


Modo negativo de ionização

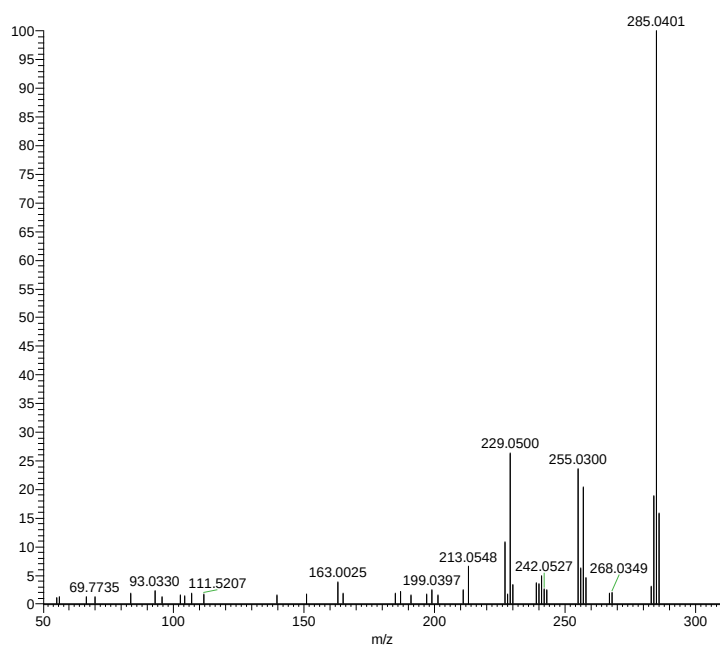
Kaempferol-3-O-rhamnosideo



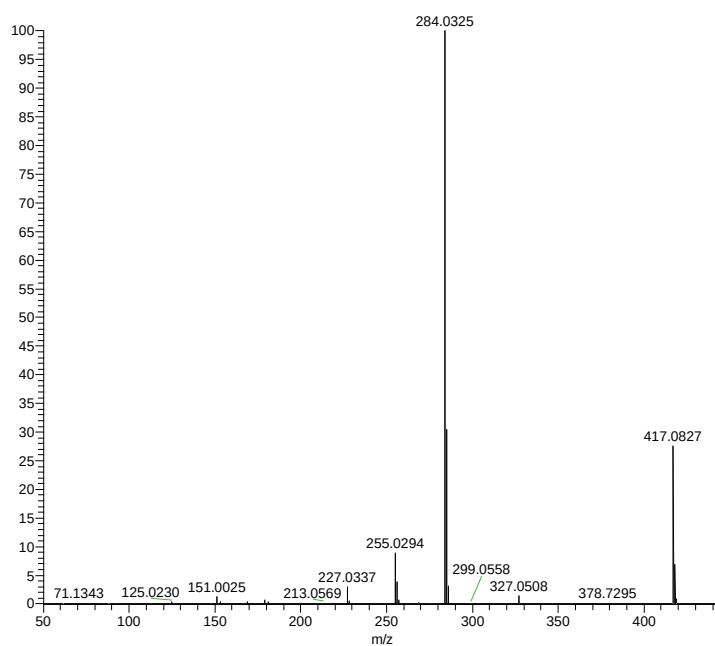
Ácido quínico



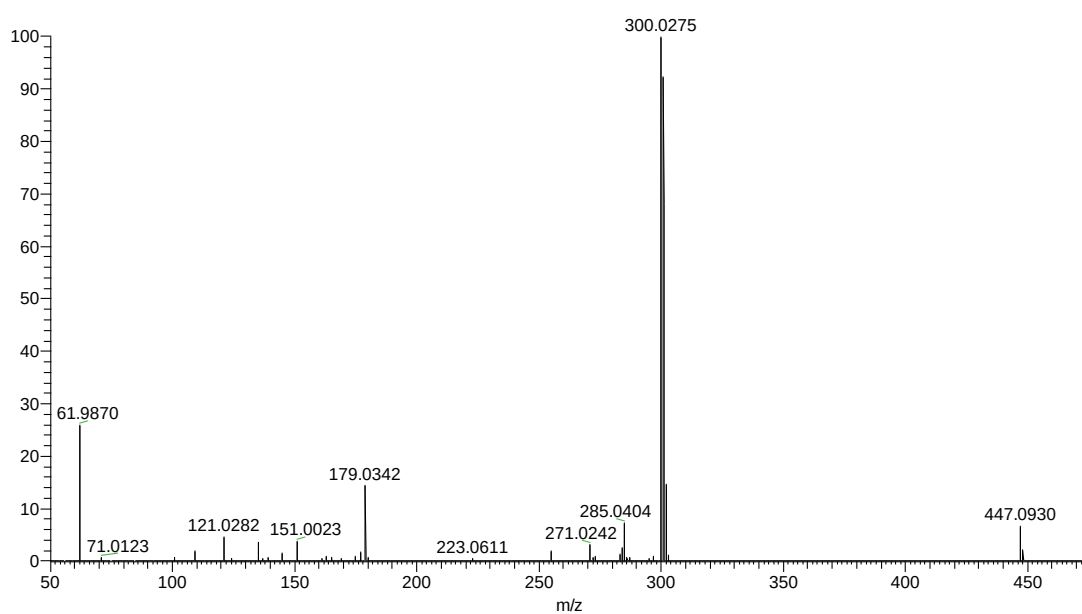
Kaempferol



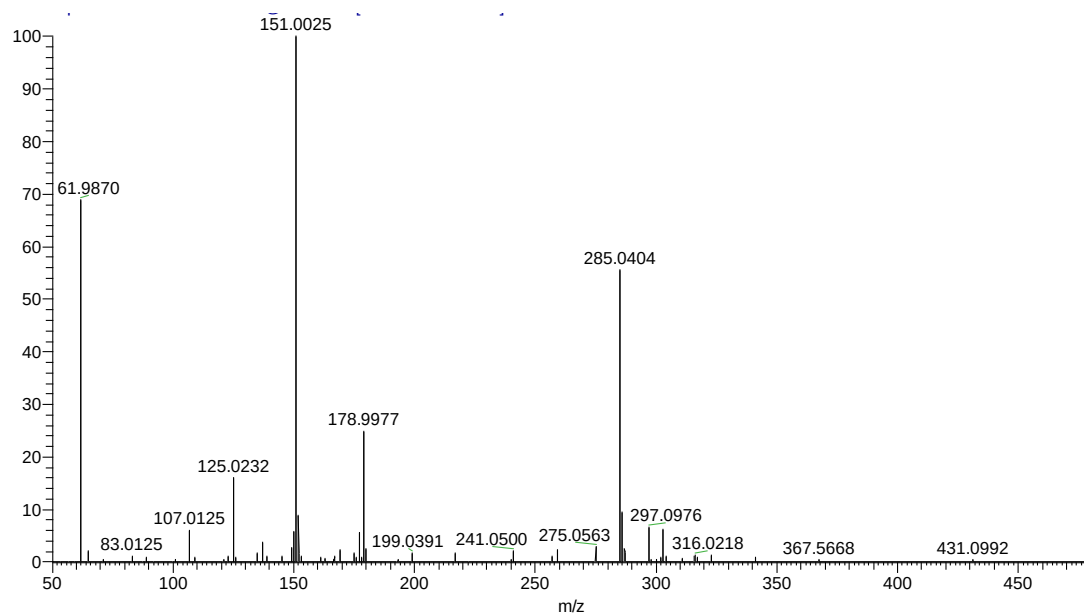
Kaempferol-3-O-pentosideo



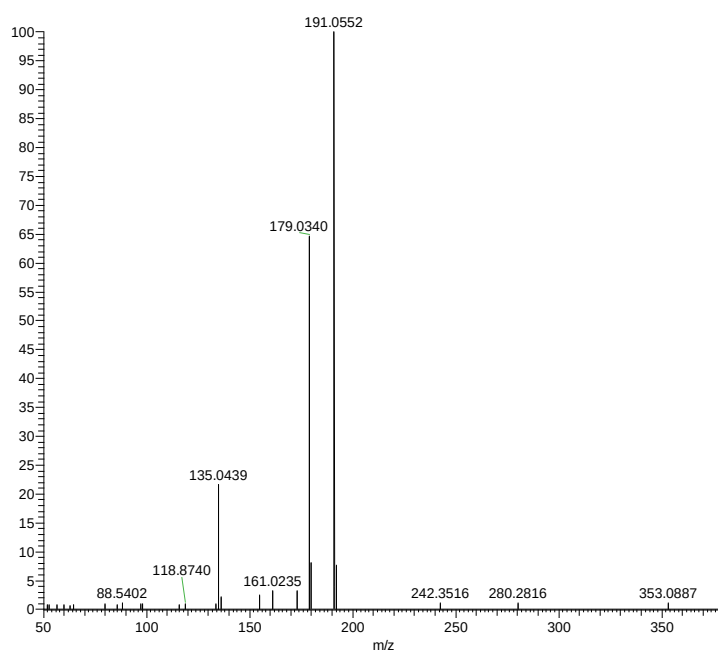
Quercetina-3-O-rhamonsideo



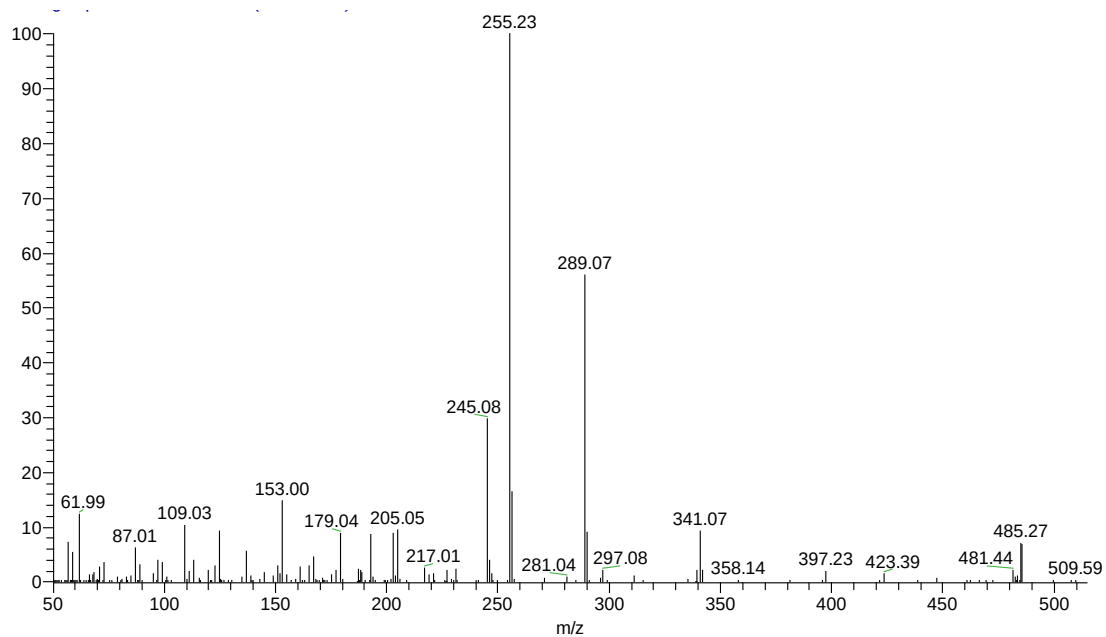
Derivado do Kaempferol



Ácido clorogênico



Derivado da catequina (m/z = 483,1295; RT = 4,56 min.)



Catequina

