

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos metabolômicos do gênero *Mikania* (Asteraceae) por
UHPLC-MS, GC-MS e RMN ¹H**

AMANDA GUIRALDELLI MAHR

Ribeirão Preto

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos metabolômicos do gênero *Mikania* (Asteraceae) por
UHPLC-MS, GC-MS e RMN ¹H**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Amanda Guiraldelli Mahr

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto em 15/03/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Guiraldelli Mahr, Amanda

Estudos Metabolômicos do gênero *Mikania* (Asteraceae) por UHPLC-MS, GC-MS e RMN ¹H. Ribeirão Preto, 2019.
239 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Costa, Fernando Batista.

1. Metabolômica. 2. Espectrometria de massas. 3. Quimiotaxônomia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Amanda Guiraldelli Mahr

Título: Estudos metabolômicos do gênero *Mikania* (Asteraceae) por UHPLC-MS, GC-MS e RMN ¹H

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Fernando Batista da Costa

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a essa força divina que sempre encheu meu coração de luz e garra para seguir os caminhos que meu coração pediu. Caminhos (sonhos) estes que muitas vezes são cheios de obstáculos, inseguranças e desafios mas que sempre me levaram e continuarão a levar ao conhecimento, evolução, simplicidade e felicidade.

Agradeço imensamente a minha família pelo apoio incondicional a minha jornada neste doutorado e em tantas outras na vida. Em especial ao meu marido Frederik que com carinho me apoiou e cuidou de tudo na minha ausência rotineira nessa reta final da tese. A minha filha Giugiu, o meu muito obrigada pelo carinho, amor, incentivo e compreensão pelas inúmeras ausências. Obrigada por me achar a melhor mãe do mundo mesmo trabalhando tanto! Ao meu irmão, sou grata pelo incentivo e por ser um exemplo de pessoa apaixonada pela ciência. A minha mãe e avó que sempre estiveram ao meu lado, o meu muito obrigada!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Batista da Costa primeiramente por ter aceito orientar uma aluna com vínculo empregatício a 400 Km de distância a qual já se esperava que não teria tempo integral para a pesquisa científica. A gratidão é grande pela confiança de que um bom trabalho também poderia ser feito. Além disso, o orgulho é grande de saber que um orientador incentiva e reconhece a importância em criar elos entre academia e indústria e que os dois lados podem se completar de forma única, trazendo novas abordagens, idéias e visão de ângulos diferentes para ambos os campos.

Agradeço também ao meu coorientador Prof. Dr. Massuo Jorge Kato do IQ/USP-SP pela parceria na execução das análises de RMN e por me mostrar que além de um grande professor é um grande cientista que ama o que faz.

Agradeço ao programa FCFRP-USP pela oportunidade e infraestrutura e FAPESP pelo suporte em infraestrutura oferecido.

Além disso, sou grata ao Prof. Dr. José Rubens Pirani e Dr. Caetano Oliveira do IB/USP-SP pelas amostras de *Mikania* cedidas a este doutorado, assim como ao Prof. Dr. Ricardo Vessecchi do IQ/USP-RP pelas dicas e sugestões valiosas na área de caracterização por espectrometria de massas.

Agradeço aos técnicos de Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-RP Mário e Angélica por serem pessoas tão dedicadas com quem pude contar inúmeras vezes.

Agradeço ao colegas, atuais e ex-integrantes do AsterBiochem da FCFRP-RP Bruno, Federico, Tiago, Rosana, Dani, Gari, Felipe, Anny, Marcelo, Ricardo, Lucas e Jolindo pela amizade, risadas, trocas de idéia e compreensão, apesar da distância que sempre existiu entre nós. Sempre me senti muito acolhida e isso não tem preço! Um muito obrigada especial a Rosana que sempre soma algo de positivo em cada conversa que temos sobre a vida e discussão científica, sempre com palavras de incentivo ao longo de todos esses anos de doutorado!

Agradeço de coração a Farmacopéia Americana por me oferecer a oportunidade de continuar me qualificando profissionalmente e ceder sua infraestrutura. Em especial agradeço ao meu supervisor Wanderson Guimarães que continuamente me incentivou a seguir o meu espírito cientista e ao gerente do laboratório Bruno Rondon. Aos queridos cientistas do laboratório de caracterização de padrões USP, o meu agradecimento sincero pelo incentivo contínuo e compreensão em dias de cansaço. Em especial agradeço a cientista Ana Cristina que sempre me presenteou com palavras de incentivo e de carinho. Agradeço ao Marcelo, Ronaldo, Juliana, Bruno Horta e Patrícia pelo apoio e ao André pela confiança que depositou sempre em mim e que me tornou forte e confiante para seguir meus sonhos.

Também sou imensamente grata ao meu amigo Rafael Maranhão pela sua dedicação em me apoiar e incentivar nesta jornada desafiadora de conciliar uma vida de cientista na Farmacopéia Americana em São Paulo e de aluna de doutorado em Ribeirão Preto. Agradeço pelas inúmeras discussões científicas sobre os projetos sensacionais que fizemos juntos, por colocar “a mão na massa” nos projetos ao meu lado e por me ajudar a construir essa bagagem de conhecimento tão sólida que levarei pro resto da vida, assim como sua parceria.

A todos demais amigos que participaram desse momento na minha vida, direta ou indiretamente, agradeço pela amizade e carinho que me fortaleceu para seguir em frente rumo a essa conquista.

“Wherever you go, go with all your heart.”

Confucius

RESUMO

GUIRALDELLI AMANDA, M. **Estudos metabolômicos do gênero *Mikania* (Asteraceae) por UHPLC-MS, GC-MS e RMN ^1H** . 2019. 239f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O gênero *Mikania* é um dos mais representativos da família *Asteraceae* com cerca de 450 espécies, sendo este contemplado recentemente com estudos filogenéticos porém um estudo quimiotaxonômico abrangente ainda não foi reportado para o gênero. Além disso algumas espécies são usadas indistintamente na medicina popular, sendo conhecidas como guaco, sendo as mais comuns *M. glomerata* e *M. laevigata*. Devido a grande semelhança morfológica dessas duas espécies estas têm sido usadas com frequência uma em substituição da outra, além do fitoterápico a base de guaco estar envolvido em um cenário com divergências regulatórias e apresentar falta de parâmetros adequados para seu controle de qualidade. O estudo metabolômico não direcionado de cerca de cem espécies de *Mikania* foi realizado usando-se LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H como técnicas analíticas ortogonais para oferecer uma proposta de classificação quimiotaxonômica para o gênero e um suporte ao controle de qualidade de fitoterápicos a base de guaco e das matérias-primas vegetais. Um método analítico seletivo foi desenvolvido por LC-UV-MS usando ferramentas de *Quality-by-Design* (QbD) e validado para quantificação por LC-UV dos ácidos cinamoilgrandiflórico, benzoilgrandiflórico e caurenóico (ACIN, ACAU, ABEN), cumarina (CUM), siringaldeído (SIR) e ácido 2-hidroxicinâmico (AHC) em *M. glomerata* e *M. laevigata*. Este método foi usado para a aquisição da impressão digital metabólica nos estudos metabolômicos não direcionados por LC-MS assim como nos estudos direcionados por LC-UV o qual contribuiu para validação dos estudos metabolômico não direcionados. O protocolo para os estudos metabolômicos foi desenhado avaliando-se os riscos envolvidos em cada uma das etapas sendo estabelecidos critérios de aceitação e protocolos para validação de cada uma delas, sendo de extrema importância para garantir a confiabilidade e robustez dos resultados. Planejamento fatorial foi usado como estratégia para otimização da extração de metabólitos para a análise por LC-MS e otimização da extração e derivatização dos metabólitos para a análise por GC-MS. O pré-processamento dos dados brutos foi validado usando-se amostras controle de qualidade associado a análises por PCA e HCA, sendo a matriz validada de dados obtida pela fusão dos dados de LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H submetida a análise estatística multivariada como HCA e OPLS-DA resultando em uma proposta de classificação quimiotaxonômica para o gênero *Mikania*. Quatro grupos foram observados refletindo em partes os estudos filogenéticos, sendo 12 metabólitos evidenciados como discriminantes, revelando a importância dos diterpenos e lactonas sesquiterpênicas como possíveis classificadores quimiotaxonômicos do gênero. A estratégia de combinar diferentes técnicas analíticas nos estudos metabolômicos do gênero *Mikania* demonstrou ser uma ferramenta muito poderosa e valiosa para fornecer informação complementar e ortogonal entre as técnicas, podendo uma técnica cobrir as limitações da outra contribuindo para o acesso de uma visão abrangente do conteúdo metabólico das espécies de *Mikania* e aplicação na classificação quimiotaxonômica, assim como evidenciar possíveis parâmetros de controle de qualidade alternativos para as matérias-primas vegetais e fitoterápicos que contêm espécies medicinais do gênero *Mikania*.

Palavras-chave: Estudos metabolômicos e classificação quimiotaxonômica.

ABSTRACT

GUIRALDELLI AMANDA, M. A. **Metabolomics Studies on the Genera *Mikania* (Asteraceae) by UHPLC-MS, GC-MS and NMR ¹H**. 2019. 239f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The genus *Mikania* is one of the most representative from Asteraceae family comprising about 450 species. Phylogenetic studies on the genera have been recently reported however a broad chemotaxonomic studies have not been reported so far. Many *Mikania* species are used in the popular medicine known as guaco, being the most common *M. glomerata* and *M. laevigata* and due to their high morphological similarity, they have been very often mislabeled becoming an issue on herbal medicines production and safe plant-based raw material intake. Moreover there are regulatory divergences related to the guaco herbal medicine production and lack of suitable parameters for its quality control. Untargeted metabolomics studies based on orthogonal techniques UHPLC-MS, GC-MS and NMR ¹H were conducted on about one hundred *Mikania* species in order to provide a chemotaxonomic classification proposal for the genus and supporting information for the quality control of guaco herbal medicines. A selective analytical method was developed based on Analytical Quality-by-design (AQbD) approach and validated for the quantitation of six substances: cinnamoylgrandifloric acid (ACIN) bezoylgrandifloric acid (ABEN), kaurenoic acid (ACAU), coumarin (CUM), syringaldehyde (SIR) and 2-hydroxycinnamic acid (AHC) in *M. glomerata* and *M. laevigata*. This method was used to carry out the untargeted metabolomics studies by LC-MS as well as targeted metabolomics studies by LC-UV, which successfully contributed for the untargeted metabolomics studies validation. An overall protocol for the metabolomics studies was designed based on a risk-assessment approach contributing for the acceptance criteria establishment in order to validate each step involved in the metabolomics pipeline, representing an essential strategy in order to assure the trustability and robustness of the outcomes. Factorial design was used as strategy for metabolites extraction optimization for the LC-MS analysis and metabolites extraction and derivatization optimization for GC-MS analysis. The raw data preprocessing was validated using quality control samples in addition to PCA and HCA, being the validated matrix of fused LC-MS, GC-MS and NMR ¹H data further analyzed by HCA and OPLS-DA, resulting in a chemotaxonomic classification proposal for the *Mikania* genus. Four main groups were observed reflecting the phylogenetic studies in some extent, being 12 metabolites highlighted as discriminants demonstrating the importance of diterpenes and sesquiterpene lactones as possible chemotaxonomic classifiers for *Mikania* genus. The strategy of combining different analytical techniques in the metabolomic studies showed to be a powerful and valuable tool in order to provide complementary and orthogonal information. In order words, analytical limitation presented by one of the techniques could be covered by another orthogonal technique contributing to the access of a global overview of the metabolic content of *Mikania* species. Thus, metabolomics studies could be applied on the chemotaxonomic classification and reveal alternative methods for guaco herbal medicine and botanical materials quality control.

Keywords: Metabolomics studies and chemotaxonomic classification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da tese e conteúdo abordado em cada capítulo.	4
Figura 2. Metabólitos alvo para desenvolvimento e validação de método quantitativo em <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i> e estudos metabolômicos direcionados por LC-UV..	6
Figura 3. Cromatograma da fração DCM-1 avaliada pelo método em escala analítica.	10
Figura 4. Sobreposição dos cromatogramas obtidos em escala analítica e semi-preparativa para isolamento dos diterpenos.....	11
Figura 5. Cromatogramas obtidos com a injeção de concentrações crescente de amostras de DCM-1 em escala semi-preparativa.	11
Figura 6. Frações coletadas do extrato DCM-1 em acetato de etila para isolamento dos diterpenos, usando método por HPLC-UV em escala semi-preparativa.....	12
Figura 7. Espectro de infravermelho obtido da fração F.1.2 caracterizada como ACAU.	13
Figura 8. Espectro de infravermelho obtido da fração F.2 caracterizada como ACIN.	13
Figura 9. Espectro de RMN de ¹ H obtidos para Fração F.1.2 (400 MHz, CDCl ₃) proposta como ácido caurenóico.....	15
Figura 10. Espectro de RMN de ¹³ C obtido para Fração F.1.2 (125 MHz, CDCl ₃) proposta como ácido caurenóico.....	15
Figura 11. Espectro de RMN de ¹ H obtidos para Fração F.2 (400 MHz, CDCl ₃) proposta como ácido cinamoilgrandiflórico.....	16
Figura 12. Espectro de RMN de ¹³ C obtido para Fração F.2 (125 MHz, CDCl ₃) proposta como ácido cinamoilgrandiflórico.....	16
Figura 13. Espectros Full MS obtido para Fração F.1.2 (ACAU).	17
Figura 14. Espectros (A) <i>Full MS</i> e (B) <i>MS/MS</i> com respectivas sugestões de fragmentos para Fração F.2 (ACIN).	17
Figura 15. Cromatograma obtido por UHPLC (210 nm) para a fração F.1.2 (<i>DES36</i>).	18
Figura 16. Cromatograma obtido por UHPLC (210 nm) para a fração F.2 (<i>DES36</i>).	19
Figura 17. Experimentos da matriz construída pelo software Fusion™ (S-Matrix) usando <i>G-optimal design</i>	22

Figura 18. Gráfico dos fatores pH da fase móvel <i>versus</i> gradiente com projeções das respostas monitoradas e seus critérios de aceitação geradas no estudo de triagem para as colunas e solvente orgânicos estudados para o desenvolvimento do método analítico por UHPLC-UV usando planejamento fatorial.....	25
Figura 19. Perfil cromatográfico apresentando alto fator de cauda com coluna <i>Phenyl</i>	26
Figura 20. Superfície de reposta para número de picos totais para os fatores gradiente e pH número de picos usando acetonitrila e coluna <i>Water HSS T3</i>	27
Figura 21. Eluição dos diterpenos com as colunas HSS T3 e <i>Shield RP18</i> (210nm).	28
Figura 22. Efeito diluente usando etanol 85% como solvente final.....	29
Figura 23. Espectros de absorção no UV dos padrões validados para avaliação λ . 29	
Figura 24. (A) Cromatograma adquirido em 210 nm do extrato fortificado de <i>M. glomerata</i> (DES36), (B) Cromatograma expandido em 210 nm dos diterpenos.	30
Figura 25. Cromatograma do extrato fortificado de <i>M. glomerata</i> – 270 nm.....	31
Figura 26. Cromatograma do extrato fortificado de <i>M. glomerata</i> – 240 nm.....	31
Figura 27. Cromatograma do extrato fortificado de <i>M. laevigata</i> – 210 nm.	31
Figura 28. Cromatograma do extrato fortificado de <i>M. laevigata</i> - 240 nm.....	32
Figura 29. Cromatograma do extrato fortificado de <i>M. laevigata</i> – 270 nm.	32
Figura 30. TIC no modo negativo (ESI-) adquirido da amostra <i>M. laevigata</i>	32
Figura 31. TIC no modo positivo (ESI+) adquirido da amostra <i>M. laevigata</i>	33
Figura 32. Sobreposição do TIC (ESI-) e cromatograma obtido em 210 nm de <i>M. laevigata</i> em alta escala.	33
Figura 33. TIC no modo negativo e positivo (B) para a amostra <i>M. glomerata</i>	33
Figura 34. TIC no modo positivo adquirido da amostra <i>M. glomerata</i>	34
Figura 35. Fluxograma de critérios e parâmetros para processamento de dados no software Mzmine 2.11 para o estudo de otimização de extração de metabólitos.....	35
Figura 36. Gráfico contrastes <i>versus</i> valor de z para as respostas y_1, y_2, y_3 e y_4	42
Figura 37. Gráfico dos coeficientes de regressão gerados no estudo de otimização por PCC e seus intervalos de confiança.....	44
Figura 38. (A) Resíduos <i>versus</i> resíduo do modelo e (B) Resposta experimental <i>versus</i> resposta prevista pelo modelo ($R^2:0,975$ e $Q^2:0,981$).	45

Figura 39. Superfície de resposta gerada da otimização das condições de extração.	45
Figura 40. Diagrama de causa e efeito para estudos metabolômicos por LC-MS....	74
Figura 41. Sequência de injeções para os estudos metabolômicos não direcionados por LC-MS incluindo amostras CQF e CQTQ em intervalos entre as amostras das espécies de <i>Mikania</i>	75
Figura 42. Escores da LV1 e LV2 obtidos com após análise por PLS-DA com CQF e CQTQ.	76
Figura 43. Fluxo de validação da matriz de dados para estudos metabolômicos por LC-MS.	77
Figura 44. Fluxograma de critérios e parâmetros para processamento de dados no software Mzmine 2.11.	78
Figura 45. Variáveis da amostra CQTQ <i>versus</i> desvio padrão antes (A) e depois (B) transformação com Log10.	81
Figura 46. Escores obtidos nos estudos dos pré-processamentos com a matriz A (<i>Noise Level</i> 1.10^6).	82
Figura 47. Escores obtidos nos estudos dos pré-processamentos com a matriz B (<i>Noise Level</i> 1.10^5).	83
Figura 48. Dendogramas gerados por HCA a partir das matrizes (A) E#06B e (B) E#07B e (C) E#08B.	85
Figura 49. Dendogramas gerados por HCA a partir das matrizes (D) E#09B e (E) E#10B e (F) E#33B.	86
Figura 50. Pontos críticos para validação dos estudos metabolômicos por GC-MS	92
Figura 51. Silanização do colesterol usando MSTFA.	93
Figura 52. Metoximação do megestrol acetato usando alcóxilamina e piridina.	94
Figura 53. Sequência de pré-processamentos da matriz de dados obtida por GC-MS, usando Mzmine e MSCLUST.	97
Figura 54. Gráfico contrastes <i>versus</i> valor de z para as respostas y_1 e y_2	100
Figura 55. Gráfico dos coeficientes de regressão gerados e seus intervalos de confiança.	103
Figura 56. Gráfico dos coeficientes de regressão e seus intervalos de confiança após recálculo do modelo sem o coeficiente b_{22}	103

Figura 57. Superfície de contorno gerada usando-se a função de desejabilidade para otimização das condições de extração e derivatização para análise por GC-MS. ...	104
Figura 58. Sequência de injeções para os estudos metabolômicos não direcionados por GC-MS.	107
Figura 59. Fases estacionárias estudadas no desenvolvimento de método para aquisição da impressão digital metabólica das espécies de <i>Mikania</i> por GC-EI-MS.	109
Figura 60. Perfil cromatográfico (TIC) da amostra controle de qualidade fortificada derivatizada (CQF_GC) adquirida por GC-EI-MS.	110
Figura 61. Reação de silanização (A) sem presença de metanol e (B) com presença de metanol residual no vial de preparo da amostra do estudo de otimização (4.1.1.1.G).	111
Figura 62. Cromatogramas da amostra controle de qualidade (vermelho) e brancos (preto) adquiridos por GC-MS para os estudo de periodicidade de troca do liner. ...	112
Figura 63. Plot de escores PC1, PC2 e PC3 obtido por PCA com CQF_GC e STD_GC.	113
Figura 64. Sobreposição do primeiro preparo da amostra 59 (preto) excluída do estudo e novo preparo (vermelho).	113
Figura 65. Fluxograma de critérios e parâmetros para processamento de dados de GC-MS no software Mzmine 2.11 e MSClust.	114
Figura 66. Escores obtido nos estudos dos pré-processamentos com matriz A_GC-MS (Noise Level 1.10^5).....	117
Figura 67. Escores obtido nos estudos dos pré-processamentos com matriz B_GC-MS (Noise Level 1.10^4).....	118
Figura 68. Dendogramas gerados por HCA a partir das matrizes (A) E#06B, (B) E#07B e (C) E#08B.....	120
Figura 69. Dendogramas gerados por HCA a partir das matrizes (D) E#09B e (E) E#10B.....	121
Figura 70. Espectros de RMN de ^1H das amostras de duas espécies do subgênero <i>Cylindrolepis</i> e <i>Mikania</i> evidenciando algumas regiões referentes a algumas classes de metabólitos. ^{94,95, 96,97}	128
Figura 71. Fluxograma de critérios e parâmetros usados no pré-processamento dos espectros de RMN de ^1H usando o software MestReNova.	129

Figura 72. Escores PC1, PC2 e PC 3 obtidos dos estudos dos pré-processamentos dos dados de RMN de ^1H	131
Figura 73. Dendograma gerado por HCA a partir da matriz fusão dos dados de LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H	137
Figura 74. Gráfico dos escores de (A) T1 versus T2 (B) T1 versus T3 e (C) T2 versus T3 gerado por OPLS-DA a partir da fusão das matrizes de dados adquiridos LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H	140
Figura 75. Espectro de massa <i>Full Scan</i> (+ESI) ácido cinamoilgrandiflórico.....	151
Figura 76. Espectro de massa amostra 20 (<i>M.salvifolia</i>) tempo retenção 11,9 min.	152
Figura 77. EICs dos sinais m/z referente a 2 metabólitos (M e M') presentes na amostra de <i>M. salvifolia</i> (amostra 20).	153
Figura 78. Espectros MS/MS (A) da espécie iônica $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 317,06 e (B) da molécula desprotonada $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 315,05 identificado como eupatifolin.	155
Figura 79. Proposta de via de fragmentação e íons diagnósticos para o suporte da proposta de identificação da flavona eupatifolin.....	156
Figura 80. Média dos espectros MS/MS adquiridos com 10, 25 e 45 eV no ESI(-) para (A) $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 609,14, (B) $[\text{M}-\text{H}-\text{Glucosil}]^-$ com m/z 463,08 (<i>in-source</i> fragmento) (C) expansão do espectro evidenciando a abundância isotópica do íon fragmento com m/z 300,02 formado a partir do íon precursor m/z 463,08 $[\text{M}-\text{H}-\text{glucosil}]^-$	157
Figura 81. Proposta de via de fragmentação da molécula protonada com m/z 609,11 (TR: 10,23 min) na amostra <i>M. cordifolia</i> (ID 72).	158
Figura 82. (A) Espectro MSMS ESI(-) do íon precursor com m/z 439,03 e (B) Espectro de MS ESI(-) expandido evidenciando o cluster isotópico relacionado ao íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 439,03.....	159
Figura 83. Proposta de via de fragmentação para o flavonol sulfonado a partir do íon precursor $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 439,03 proposto como 3',4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavonol,3-O-sulfona.....	160
Figura 84. Espectros MS/MS ESI(-) do íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 483,13 (ácido dicumaroilquínico).	161
Figura 85. Lactonas sesquiterpênicas detectadas e propostas de íons fragmentos no modo ESI+: (A) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ m/z 606,4321 e (B) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ m/z 644,4115.....	162

Figura 86. Espectro MS/MS do íon precursor m/z 606,43 (ESI+) referente a lactona sesquiterpênica palmitoil-metacriloil-hidroxil germacradienolido.	162
Figura 87. Espectro MS (GC-EI-MS) para o pico com TR:38,6 min. (estigmasterol).	163
Figura 88. Proposta de via de fragmentação para o íon molecular m/z 484 referente ao stigmasterol TMS.....	164
Figura 89. Proposta de via de fragmentação para α -amirin (m/z 498).	164
Figura 90. Espectro adquirido por GC-EI-MS extraído do pico com tempo de retenção 41,2 minutos identificado como α -amirin.	165
Figura 91. Espectros MS Scan e MS/MS ESI(+) da íon aduto com amônio $[M+NH_4]^+$ m/z 382,21 (TR: 10,7 min) referente a variável P2485.	166
Figura 92. Propostas de identidade para o metabólito P2485.	167
Figura 93. Proposta de via de fragmentação para molécula protonada $[M+H]^+$ referente a lactona sesquiterpênica P2485.	167
Figura 94. Espectros de RMN de 1H de espécie <i>M. cordifolia</i> (ID 72 e 45).	168
Figura 95. Propostas de identidade para o metabólito 5130.	169
Figura 96. Espectros MS Scan e MS/MS ESI(+) da espécie iônica aduto com amônio $[M+NH_4]^+$ m/z 366,18 (TR: 10,5 min) referente a variável P5130.	170
Figura 97. Proposta de via de fragmentação para a lactona sesquiterpênica P5130.	171
Figura 98. Espectros MS Scan e MS/MS ESI(+) do íon aduto com amônio $[M+NH_4]^+$ m/z 408,20 (TR: 11,4 min) referente a variável P1200.	171
Figura 99. Propostas de vias fragmentação e candidatos para a lactona sesquiterpênica P1200 sendo (a) guaianolido funcionalizado com um ácido orgânico e (b) germacrolido funcionalizado com acetato e derivado de ácido metacrílico.....	172
Figura 100. Esquema com possibilidade da formação da dupla a partir do cátion guaianolido.	173
Figura 101. Propostas 1 e 2 de identidade para o metabólito P1200.	174
Figura 102. Candidatos para a identidade da variável P2417.	174
Figura 103. Espectros MS Scan e MS/MS do íon fragmento <i>in-source</i> m/z 301,2 ESI(+) e $[M-H]^-$ m/z 317,21 no modo ESI(-) (TR: 12,6 min) referente a variável P2417.	176

Figura 104. Proposta de via de fragmentação no modo ESI(+) para o diterpeno referente e variável P2417.	177
Figura 105. Proposta de via de fragmentação no modo ESI(-) para o diterpeno referente e variável P2417.	177
Figura 106. Candidato para a identidade da variável P5483.	178
Figura 107. Espectros MS Scan e MS/MS da íon fragmento m/z 301,2 no modo ESI(+) e íon $[M-H]^-$ m/z 447,25 no modo ESI(-) (TR: 18,7 min) referente a variável P5483.	179
Figura 108. Proposta para a via de fragmentação e eliminação do ácido cinâmico a partir do íon precursor $[M-H]^-$ com m/z 447,2559, referente a variável P5483.	180
Figura 109. Proposta para a via de fragmentação para formação dos íons com m/z 147,04 e 103,05 partir do íon precursor $[M-H]^-$ com m/z 447,2559.	180
Figura 110. Espectro de MS adquirido por GC-EI-MS da variável GC2294.	181
Figura 111. Proposta de via de fragmentação para o derivado TMS de ácido diterpênico referente a variável GC2294.	181
Figura 112. Candidato para a identidade da variável N74.	182
Figura 113. Espectros MS e MS/MS ESI(-) da espécie desprotonada m/z 301,21 (TR: 17,2 min) referente a variável N74.	182
Figura 114. Espectro adquirido por GC-MS evidenciando a presença de ácido caurenóico em espécies de <i>Mikania</i>	183
Figura 115. Candidatos para a identidade da variável N100.	183
Figura 116. Espectros MS Scan e MS/MS da espécie iônica deprotonada m/z 335,22 ESI(-) e íon fragmento m/z 301,21 ESI(+) (TR: 11,2 min) referente a variável N100.	184
Figura 117. Proposta de via de fragmentação no modo ESI(+) para o diterpeno referente e variável N100.	185
Figura 118. Espectros MS Scan e MS/MS ESI(-) do íon desprotonado com m/z 515,12 (TR: 10,9 min) referente a variável N4356.	186
Figura 119. Candidato para a identidade da variável N4356.	187
Figura 120. Proposta de via de fragmentação para o ácido dicafeoilquínico N4356.	187
Figura 121. Candidato para a identidade das variáveis GC64 e GC247.	189
Figura 122. Espectro de MS adquirido por GC-EI-MS da variável GC64.	189

Figura 123. Espectro de MS adquirido por GC-EI-MS da variável GC237.	189
Figura 124. Reações de fragmentação possivelmente envolvidas na formação dos íons fragmentos do derivado MTOX-TMS relacionados as variáveis GC64 e GC237.	190
Figura 125. Reação de fragmentação envolvendo clivagem α e eliminação do grupo TMS-OH (GC64 e GC237).	191
Figura 126. Candidato para a identidade das variáveis GC373 e GC1048.	192
Figura 127. Espectro de MS adquirido por GC-EI-MS da (a) variável GC373 e (b) GC1048.	192
Figura 128. Reações de fragmentação possivelmente envolvidas na formação dos íons fragmentos dos dissacarídeos derivado de TMS das variáveis GC373 e GC1048.	193
Figura 129. Estudos metabolômicos LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H - Plote dos escores (T1 x T2) e loadings (P1 x P2) (OPLS-DA).....	206
Figura 130. Estudos metabolômicos LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H - Plote dos escores (T2 x T3) e loadings (P2 x P3) (OPLS-DA).....	207
Figura 131. <i>Heatmap</i> dos metabólitos discriminantes e espécies de <i>Mikania</i> separadas por grupo.	209
Figura 132. Dendograma gerado por HCA a partir da matriz de dados adquiridos por LC-MS.	212

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades biológicas relatadas de alguns compostos identificados em <i>Mikania</i>	6
Tabela 2. Método em escala analítica desenvolvido para separação dos diterpenos nos extratos obtidos por CLV.	8
Tabela 3. Condições de MS - Método <i>MetMS1</i>	8
Tabela 4. Método em escala semi-preparativa desenvolvido para separação dos diterpenos nos extratos obtidos por CLV.	9
Tabela 5. Frações obtidas por CLV do extrato etanólico de <i>M. glomerata</i>	10
Tabela 6. Sinais dos espectros de RMN de ¹ H e de ¹³ C para F 1.2 e F.2 (CDCl ₃). .	14
Tabela 7. Fatores selecionados para o desenvolvimento de método por UHPLC-UV.	20
Tabela 8. Método seletivo (<i>DES36</i>) desenvolvido para quantificação dos metabólitos alvos em <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i>	21
Tabela 9. ANOVA para os modelos gerados para as respostas monitoradas no estudo de triagem por DoE no desenvolvimento do método analítico por UHPLC-UV.	24
Tabela 10. Fator de assimetria e resolução dos padrões com picos adjacentes.....	30
Tabela 11. Condições das variáveis independentes com nível superior (+), inferior (1) para o estudo de triagem baseado em planejamento fatorial fracionário.	36
Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2 ⁵⁻¹ para estudo de triagem das condições de extração de metabólitos para análise por LC-UV-MS.	36
Tabela 13. Condições das variáveis independentes com nível superior (+), inferior (1), intermediário (0) e axial (1,414) para otimização usando PCC.	38
Tabela 14. Matriz do planejamento do composto central para duas variáveis.....	38
Tabela 15. Análise de Variância para regressão múltipla.	40
Tabela 16. Respostas obtidas nos estudos de triagem por UHPLC-MS.....	41
Tabela 17. Cálculo do erro de um contraste após reorganização do planejamento.	43
Tabela 18. Análise de variância para regressão múltipla usando-se a resposta y ₃	43
Tabela 19. Avaliação dos coeficientes de regressão gerados pelo modelo no estudo de otimização por PCC.....	44
Tabela 20. Análise de variância para regressão múltipla após recálculo do modelo no estudo de otimização por PCC.....	44
Tabela 21. Preparo das amostras fortificadas nos níveis de 50% a 150%.	47

Tabela 22. Exatidão e linearidade dos padrão em solbvente.....	54
Tabela 23. Exatidão e linearidade da matéria prima vegetal fortificada.	55
Tabela 24. Estimativa dos coeficientes e avaliação da significância - <i>M. glomerata</i>	56
Tabela 25. Estimativa dos coeficientes e avaliação da significância - <i>M. laevigata</i>	57
Tabela 26. Análise de Variância - <i>M.glomerata</i> e <i>M. laevigata</i>	57
Tabela 27. Valores da estatística de Anderson-Darling e Breusch-Pagan para validação das susbtâncias em <i>M. glomerata</i>	58
Tabela 28. Valores da estatística de Anderson-Darling e Breusch-Pagan para validação das susbtâncias em <i>M. laevigata</i>	58
Tabela 29. Valores da estatística de Durbin-Watson para validação das substâncias em <i>M. glomerata</i>	59
Tabela 30. Valores da estatística de Durbin-Watson para validação das susbtâncias em <i>M. laevigata</i>	59
Tabela 31. Valores de F calculados e p-valor obtido nos testes de paralelismo, intercepto e retas coincidentes na matriz <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i>	60
Tabela 32. Estabilidade das amostras preparadas com <i>M. laevigata</i> e <i>M. glomerata</i>	61
Tabela 33. Precisão 1 e 2 realizada para <i>M. glomerata</i> e <i>M. laevigata</i>	62
Tabela 34. Intercepto, inclinação, limite de quantificação e de detecção.	62
Tabela 35. Recuperação obtida no estudo de robustez para <i>M. glomerata</i>	63
Tabela 36. Recuperação obtida no estudo de robustez para <i>M. laevigata</i>	63
Tabela 37. Quantificação (%m/m) das substâncias alvo nas espécies disponíveis de <i>Mikania</i> usando método <i>DES36</i>	64
Tabela 38. Estudos para validação do pré-processamento dos dados brutos obtidos por LC-MS.	79
Tabela 39. Fórmulas dos diferentes métodos usados no tratamento dos dados brutos obtidos por LC-MS. ⁶³	79
Tabela 40. Método <i>DES_GCMS_00</i> usado nos estudos de triagem e otimização das condições de extração dos metabólitos e derivatização por GC-MS.	96
Tabela 41. Condições das variáveis independentes com nível superior (+), inferior (1) para o estudo de triagem usando planejamento factorial fracionário para otimização da extração e deriviatização de metabólitos para análise por GC-MS	96

Tabela 42. Condições das variáveis independentes para cada nível estudado para o estudo de refinamento usando planejamento do tipo Doehlert para otimização da extração e derivatização de metabólitos para análise por GC-MS.	98
Tabela 43. Matriz de experimentos para duas variáveis usada no estudo de refinamento usando planejamento do tipo Doehlert para otimização da extração e derivatização de metabólitos para análise por GC-MS.	98
Tabela 44. Respostas obtidas nos estudos de triagem por GC-MS.	100
Tabela 45. Cálculo do erro de um contraste após reorganização do planejamento.	101
Tabela 46. Respostas obtidas no planejamento do tipo Doehlert e desejabilidade individuais e global.	102
Tabela 47. Análise de variância para regressão usando-se como resposta os valores de desejabilidade calculados.	102
Tabela 48. Avaliação dos coeficientes de regressão gerados pelo modelo.	103
Tabela 49. Análise de variância para regressão após recálculo do modelo.	104
Tabela 50. Método desenvolvido para estudos metabolômicos por GC-MS.	106
Tabela 51. Desvio padrão relativo das injeções de amostras STD para verificação da adequabilidade do sistema durante estudos metabolômicos por GC-MS.	112
Tabela 52. Estudos para validação do pré-processamento dos dados brutos obtidos por RMN de ¹ H.	130
Tabela 53. ANOVA do modelo gerado por OPLS-DA na validação cruzada.	141
Tabela 54. Seleção das variáveis significativas para o agrupamento dos grupos quimiotaxonômicos do gênero <i>Mikania</i> observado no plote de escores obtido por OPLS-DA.	143
Tabela 55. Condições de MS (<i>MetMS3</i>) usadas na caracterização dos metabólitos.	150
Tabela 56. Proposta de identidade dos metabólitos discriminantes adquiridos por LC-MS para o agrupamento das espécies de <i>Mikania</i>	204
Tabela 57. Proposta de identidade dos metabólitos discriminantes adquiridos por GC-MS para o agrupamento das espécies de <i>Mikania</i>	205
Tabela 58. Atribuições aos deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ¹ H evidenciados como discriminates.	205

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEN	Ácido benzoilgrandiflórico
ACAU	Ácido caurenóico
ACAU22	Condições do método em escala analítica - isolamento diterpenos
ACAU23	Condições do método em escala semi-preparativa - isolamento
ACIN	Ácido cinamoilgrandiflórico
ACN	Acetonitrila
AHC	Ácido hidroxicinamico
AQ	Tempos de aquisição - RMN 1H
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AsterDB	<i>Library of Natural Products from Asteraceae</i>
BSA	bis(trimetil)acetamida
BSTFA	bis(trimetil)trifluoroacetamida
C	Centragem na média
C1	Componente 1
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
CL	Cadeia lateral
COSY	Correlation spectroscopy
CQF	Controle de qualidade fortificado
CQF_GC	Controle de qualidade fortificado para análises por GC-MS
CQF_GC2	Controle de qualidade fortificado - GC-MS - Segundo preparo
CQTQ	Controle de qualidade tal qual
CUM	Cumarina
di	Desejabilidades individuais
D	Desejabilidade global
d1	Tempo de recuperação - RMN 1H
DCM	Diclorometano
DES36	Condições do método desenvolvido/validado para estudos metabolômicos por LC-UV-MS
DES_GCMS_00	Método usado nos estudos de triagem e otimização das condições de extração dos metabólitos e derivatização por GC
DES_GCMS_01	Método desenvolvido para estudos metabolômicos por GC-MS
DHC	Desidrocumarina
Dist. Isot.	Distribuição Isotópica
DPR	Desvio Padrão Relativo
DS	<i>Dummy Scan</i> (RMN ¹ H)
E	Escalonamento
EI	Electron Impact (Ionização por Impacto de elétrons)
EIC	<i>Extracted ion Chromatogram</i>
EP	Erro Puro

Erro Contr.	Erro do Contraste
Erro exp.	Erro experimental
EtOH	Etanol
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
F.C.	Fator de Cauda
FAJ	Falta de Ajuste
Fcalc	Valor de F calculado
F.M.	Fórmula Molecular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
Fragm.	Fragmento
F _{tab}	Valor de F tabelado
GC2294	Variável discriminante adquirida por GC-EI-MS
GC64	Variável discriminante adquirida por GC-EI-MS
GC247	Variável discriminante adquirida por GC-EI-MS
GC1048	Variável discriminante adquirida por GC-EI-MS
GC373	Variável discriminante adquirida por GC-EI-MS
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
g.L.	Graus de liberdade
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
HCD	<i>High Energy Collisional Dissociation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IN	Instrução normativa
<i>In-source</i>	Fragmentação na fonte de ionização em MS
IV	Infravermelho
IDA	<i>Independent-Data Analysis</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LV	<i>Latent Variable</i>
MeOH	Metanol
Média Rec.	Média da Recuperação
MetMS1	Parâmetros usados no espectrômetro de massa - método 1
MetMS2	Parâmetros usados no espectrômetro de massa - método 2
MetMS3	Parâmetros usados no espectrômetro de massa - método 3
MikBD	Banco de Dados com informações do gênero <i>Mikania</i>
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
MQ	Média Quadrática
MQreg	Média Quadrática da regressão
MQres	Média Quadrática dos resíduos
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MSI	<i>Metabolomics Standards Initiative</i>

MSTFA	N-metil trimetilsililfluoroacetamida
MTOX-TMS	Metiloximamia-trimetilsilil
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
N	Normalização
N74	Variável discriminate adquirida por LC-MS ESI(-)
N100	Variável discriminate adquirida por LC-MS ESI(-)
NA	Espectro de MS/MS não adquirido
NC	Nível de confiança para identificação (MSI)
NS	Não sugerido
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis</i>
P	<i>loadings</i>
P2485	Variável discriminate adquirida por LC-MS ESI(+)
P5130	Variável discriminate adquirida por LC-MS ESI(+)
P5483	Variável discriminate adquirida por LC-MS ESI(+)
P2417	Variável discriminate adquirida por LC-MS ESI(+)
PC	<i>Principal Component</i> (Componente Principal)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCC	Planejamento do Composto Central
PLS-DA	<i>Partial Least Squares - Discriminant Analysis</i>
P/N	<i>Part Number</i>
PTFE	<i>Polytetrafluoroethylene</i>
PT	<i>Power Transformation</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
Q ²	Coeficiente de predição
QbD	<i>Quality by Design</i>
QToF	<i>Quadrupole-Time of Flight</i>
RDA	<i>retro-Diels-Alder</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
r ²	Coeficiente de determinação
R ² X	Coeficiente de explicação
REG	Regressão
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RES	Resíduo
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RMN162	Variável discriminate adquirida por RMN de ¹ H
RMN162	Variável discriminate adquirida por RMN de ¹ H
RMN202	Variável discriminate adquirida por RMN de ¹ H
RMN206	Variável discriminate adquirida por RMN de ¹ H
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear 1D de próton
Rs	Resolução
RT	<i>Retention Time</i>
S _{coef}	Desvio padrão dos coeficientes da regressão
s	Desvio Padrão do Intercepto
S	Inclinação (<i>slope</i>) da curva analítica
SN2	Substituição nucleofílica 2
s/r	Razão sinal ruído

SIR	Siringaldeído
SQ	Soma quadrática
STD	Solução Padrão
T	Escores
TAG	Triacilglicerol
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TMCS	Trimetilsilimidazol
TMS	Trimetilsilil
TMSI	bistrimetilsililacetamida
TR	Tempo de retenção
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UHPLC-UV-MS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet-Mass spectrometry</i>
USP RSL	<i>United States Pharmacopeia - Reference Standard Laboratory</i>
Variância Cont.	Variância do Contraste
Variância Exp.	Variância Experimental
Var. Sign.	Variável Significativa
Vcap	Diferença de Potencial aplicado ao capilar em MS
VIP	Método de Seleção de variáveis - <i>Variable in the Projection</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	nível de significância
λ	comprimento de Onda
\hat{y}	vetor das respostas estimadas pelo modelo
b	o vetor de regressão.
X^t	matriz transposta de X.
$(X^t X)^{-1}$	matriz inversa do produto da transposta da matriz X com ela
p	número de coeficientes de regressão
n	número de experimentos
m	número de experimentos
\hat{y}_i	resposta prevista para observação i
\bar{y}_i	média das respostas experimentais
$y_i(+)$	médias das observações no nível alto para cálculo dos efeitos
$y_i(-)$	médias das observações no nível baixo para cálculo dos efeitos
x_{ij}	variáveis explicativas do modelo
ε_{ij}	variável aleatória que representa o erro experimental
β	coeficiente da regressão
Y_{ij}	variável aleatória e representa o valor da variável resposta
σ^2	variância
n_i	número de réplicas no nível i de concentração
k	número de níveis
$R\Delta m$	defeito de massa relativo (<i>relative mass defect</i>)

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA E ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XII
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XVII
CAPÍTULO 1.	
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivos.....	3
1.2. Estrutura da tese	4
CAPÍTULO 2.	
ESTUDOS METABOLÔMICOS DIRECIONADOS POR LC-UV-MS.....	5
2.1. Extração e isolamento dos diterpenos.....	7
2.2. Caracterização das frações isoladas	12
2.3. Desenvolvimento do método analítico por UHPLC-UV-MS.....	19
2.4. Planejamento fatorial aplicado à otimização das condições de extração	34
2.5. Validação do método analítico.....	46
2.6. Quantificação das substâncias alvos para estudos metabolômicos	63
2.7. Discussão	66
CAPÍTULO 3.	
ESTUDOS METABOLÔMICOS NÃO DIRECIONADOS POR LC-MS.....	73
3.1. Aquisição dos dados por UHPLC-MS e validação do método de análise.....	74
3.2. Validação do método de processamento dos dados	77
3.3. Discussão	87
CAPÍTULO 4.	
ESTUDOS METABOLÔMICOS NÃO DIRECIONADOS POR GC-MS.....	91
4.1. Otimização das condições de extração e derivatização dos metabólitos	94
4.2. Análise por GC-MS e validação da aquisição de dados.....	105
4.3. Validação do método de processamento e análise de dados para estudos metabolômicos por GC-MS	114

4.4. Discussão	122
CAPÍTULO 5.	
ESTUDOS METABOLÔMICOS NÃO DIRECIONADOS POR RMN de ¹H	127
5.1. Análises por RMN de ¹ H.....	127
5.2. Validação dos métodos de pré-processamento dos dados de RMN de ¹ H	129
5.3. Discussão	132
CAPÍTULO 6.	
FUSÃO DOS DADOS DE LC-MS, GC-MS E RMN de ¹H	135
6.1. Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) do perfil químico das espécies de <i>Mikania</i> e correlação com com árvore filogenética.....	136
6.2. Análise supervisionada por OPLS-DA do perfil químico das espécies de <i>Mikania</i> e validação do modelo de predição obtido	138
6.3. Seleção das variáveis discriminantes dos grupos quimiotaxonômicos.....	142
6.4. Discussão	143
CAPÍTULO 7.	
CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS EM ESPÉCIES DE <i>Mikania</i>	148
7.1. Caracterização dos metabólitos nas espécies medicinais de <i>Mikania</i>	149
7.2. Proposta de identificação das substâncias discriminantes nos estudos metabolômicos por LC-MS, GC-MS e RMN de ¹ H	165
7.3. Discussão	194
CAPÍTULO 8.	
QUIMIOTAXONOMIA DO GÊNERO <i>Mikania</i>	201
8.1. Análise dos grupos quimiotaxonômicos obtidos nos estudos metabolômicos baseado na fusão de dados de LC-MS, GC-MS e RMN de ¹ H	202
8.2. Aspectos relacionados a função biológica de alguns metabólitos em plantas e presente classificação quimiotaxonômica	213
8.3. Aspectos relacionados ao controle de qualidade da matéria-prima vegetal usada na produção do Guaco.....	216
8.4. Discussão	219
CONCLUSÕES	224
REFERÊNCIAS.....	226

APÊNDICE A. Espécies de <i>Mikania</i> coletadas	242
APÊNDICE B. Estudos de seletividade do método desenvolvido para abordagem metabolômica direcionada por UHPLC-UV	246
APÊNDICE C. Validação do método para quantificação por UHPLC-UV: Linearidade - Análise de resíduos	249
APÊNDICE D. Caracterização de metabólitos em espécies medicinais de <i>Mikania</i> por LC-MS e GC-MS	255

1. Introdução e objetivos

Metabolômica é uma ciência que tem como foco a análise de metabólitos em matrizes biológicas (humana, plantas e microorganismos)³, empregando abordagens analíticas direcionadas assim como abordagens não direcionadas.^{2,3,4,25} Dentre as diversas aplicabilidades dos estudos metabolômicos, podem ser destacadas a descoberta de novos compostos bioativos, identificação de biomarcadores, predição de toxicidade e atividade farmacológica de metabólitos, estudos quimiotaxonômicos, modificação genética de organismos específicos e controle de qualidade de fitoterápicos, dentre outras.^{1,4,11,16,21,24,25} Os estudos metabolômicos devem incluir o estabelecimento de uma estratégia multifacetada e totalmente integrada de melhores condições de extração das amostras; separação, detecção e identificação de metabólitos; coleta, manipulação e análise de dados e, em última instância, quantificação. Esta abordagem holística da análise metabolômica é direcionada principalmente pelos recentes avanços em tecnologias de separação (e.g. CG, HPLC, UPLC) e técnicas de detecção (e.g.: MS, RMN, DAD, FID) e no desenvolvimento de novos métodos de análise multivariada.^{12,22,23,26} As técnicas utilizadas em estudos metabolômicos geram uma enorme quantidade de dados, sendo exigido um significativo pré-processamento antes de poderem ser analisados estatisticamente. Esta etapa apresenta um grande impacto sobre a extensão e qualidade na identificação e quantificação dos metabólitos e, conseqüentemente, na interpretação biológica dos resultados.¹⁴ A etapa de processamento dos dados geralmente é realizada com auxílio de métodos estatísticos multivariados adequados para o estudo de correlação entre as variáveis e, normalmente, inclui análises multivariadas não

supervisionadas ou supervisionadas, tais como *Principal Component Analysis* (PCA), *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA), *Partial Least Squares* (PLS), *Orthogonal Partial Least Squares* (OPLS) e outros.¹⁴

O gênero *Mikania* pertence à família Asteraceae, a qual compreende cerca de 1.500 gêneros e 23.000 espécies.⁵ Eupatorieae é uma grande tribo da família Asteraceae⁸, sendo *Mikania* o maior gênero da tribo com cerca de 450 espécies, as quais possuem distribuição pantropical, com maior diversidade na América do Sul.^{8,28} No Brasil, estão distribuídas 198 espécies, das quais 140 são endêmicas.⁹ *Mikania* é um dos gêneros com circunscrição mais estável da tribo, porém é encontrada uma dificuldade na delimitação entre as espécies devido ao grande número de variantes taxonômicas e à existência de espécies que exibem um complexo polimorfismo.¹⁰ Várias propostas de classificação existem para as espécies deste gênero baseado em aspectos morfológicos, sendo os tipos de capitulescência usados tradicionalmente para a distinção das espécies na maioria dos sistemas seccionais, porém a evolução desse caráter ainda não foi analisada no contexto filogenético e químico, questionando-se sua utilidade na classificação infragenérica.⁵⁸ O gênero foi contemplado recentemente com estudos filogenéticos,⁸⁸ porém um estudo quimiotaxonômico abrangente ainda não foi reportado.

Algumas espécies do gênero *Mikania* são usadas indistintamente na medicina popular, sendo conhecidas como guaco.²⁹ As espécies mais comumente utilizadas são *M. glomerata* e *M. laevigata* e, devido à grande similaridade morfológica entre elas, estas têm sido empregadas com regularidade uma em substituição da outra. Estas espécies são geralmente utilizadas no tratamento de doenças respiratórias^{5,28} mas vários estudos relatam outras propriedades do guaco, incluindo ação tônica, depurativa, antipirética e broncodilatadora, além de estimulante do apetite e antigripal.²⁸ É ainda empregada no tratamento da asma, bronquite e adjuvante no combate à tosse.¹⁷ Somente a ação broncodilatadora, antitussígena, expectorante e edematogênica sobre as vias respiratórias foram comprovadas.¹⁸

Em relação à situação regulatória do guaco no Brasil, a lista de registro simplificado de fitoterápicos (IN 05/2008) apresenta registro para guaco sendo a cumarina considerada o marcador químico e *M. glomerata* como espécie a qual deve fornecer a matéria-prima vegetal para a produção do fitoterápico.⁷⁵ O guaco se encontra envolvido em algumas divergências quanto a sua situação regulatória e

algumas metodologias publicadas na monografia da Farmacopéia Brasileira para seu controle de qualidade não representam estratégias para se evitar adulterações de artigos botânicos e garantir autenticidade das espécies usadas, representando então um desafio no âmbito da saúde pública e medicina tradicional.⁵

A classe mais característica encontrada nas espécies de *Mikania* são as cumarinas e seus derivados, aos quais diversos autores atribuem o efeito farmacológico do guaco.^{19,28} Entre as classes de substâncias mais comumente encontradas em *Mikania* estão também os sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e as lactonas sesquiterpênicas.²⁸ Lactonas sesquiterpênicas do tipo germacrolido funcionalizadas em C-14 ou C-15 ou em ambos são os metabólitos secundários típicos de um significativo número de espécies de *Mikania*. Diterpenos com esqueleto do tipo *ent*-caurano também são comumente encontrados como, por exemplo, os ácidos *ent*-caurenóico, *ent*-grandiflórico, *ent*-cinamoilgrandiflórico e o *ent*-caurenol.^{5,17,28,29} Dentre os esteróis mais comumente encontrados nas espécies do gênero, têm-se o estigmasterol, lupeol e β -sitosterol, todos eles bastante comuns em Asteraceae.^{28,39} Triterpenóides como a friedelina e β -amirina são amplamente encontrados entre as espécies do gênero. Outros metabólitos secundários como flavonóides, fenilpropanóides e derivados também são identificados.²⁸

1.1. Objetivos

O principal objetivo do plano de pesquisa é o estudo metabolômico de 94 amostras do gênero *Mikania*, usando a abordagem não direcionada por UHPLC-MS, CG-MS e RMN de ¹H e direcionada por UHPLC-UV, para se propor uma classificação quimiotaxonômica para o gênero. Também é objetivo a proposta de identidade dos metabólitos discriminantes das classes quimiotaxonômicas observadas e proposta de validação da metodologia desenvolvida para os estudos metabolômicos. Para os estudos metabolômicos com abordagem direcionada, será desenvolvido e validado um método seletivo e quantitativo para seis substâncias (ácido cinamoilgrandiflórico (ACIN), ácido benzoilgrandiflórico (ABEN), ácido caurenóico (ACAU), cumarina (CUM), siringaldeído (SIR) e ácido hidroxicinâmico (AHC)) em duas espécies medicinais de *Mikania* (*M. glomerata* e *M. laevigata*), o qual contribuirá para validação do estudo de abordagem não direcionada e para proposta de metodologias de controle de qualidade mais adequadas para fitoterápicos a base de guaco.

1.2. Estrutura da tese

Esta tese é constituída de 8 capítulos, além da conclusão e apêndices.

Figura 1. Estrutura da tese e conteúdo abordado em cada capítulo.

<p>CAPÍTULO 2. ESTUDOS METABOLÔMICOS DIRECIONADOS POR LC-UV-MS</p>	<p>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</p> <p>Introdução breve geral sobre estudos metabolômicos, e sobre as espécies do gênero <i>Mikania</i>.</p>
<p>Aborda o desenvolvimento do método analítico usado nos estudos metabolômicos direcionados e não direcionados assim como a validação do método quantitativo de três diterpenos caurânicos, cumarina e fenilpropanóide em duas espécies medicinais de <i>Mikania</i>. O capítulo também discute a otimização da extração de metabólitos em matriz complexa vegetal usando-se planejamento fatorial. O capítulo é finalizado com a quantificação dos metabólitos alvos em todas as espécies disponíveis de <i>Mikania</i>.</p>	<p>CAPÍTULO 3. ESTUDOS METABOLÔMICOS NÃO DIRECIONADOS POR LC-MS</p> <p>Aborda o desenvolvimento de um protocolo de análise para estudos metabolômicos não direcionados por UHPLC-MS focando no estabelecimento de critérios de aceitação para a validação do método analítico e de processamento de dados.</p>
<p>CAPÍTULO 5. ESTUDOS METABOLÔMICOS NÃO DIRECIONADOS POR RMN ¹H</p> <p>Aborda a validação do processamento de dados adquiridos nos estudos metabolômicos não direcionados por RMN ¹H.</p>	<p>CAPÍTULO 4. ESTUDOS METABOLÔMICOS NÃO DIRECIONADOS POR GC-MS</p> <p>Aborda o desenvolvimento de um protocolo de análise para estudos metabolômicos não direcionados por GC-MS focando no estabelecimento de critérios de aceitação para a validação do método analítico e de processamento de dados. Este capítulo também detalha estratégias de derivatização de metabólitos para análises por GC-MS usando-se planejamento fatorial.</p>
<p>CAPÍTULO 7. CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS EM <i>Mikania</i></p> <p>Aborda as estratégias usadas na caracterização dos metabólitos detectados em três espécies medicinais de <i>Mikania</i> por LC-MS e GC-MS. A caracterização dos metabólitos discriminantes evidenciados por OPLS a partir da matriz de fusão de dados obtidos nos estudos metabolômicos por LC-MS, GC-MS e RMN ¹H finaliza o capítulo 7 o qual propõe a identidade de possíveis classificadores quimiotaxonômicos do gênero <i>Mikania</i>.</p>	<p>CAPÍTULO 6. FUSÃO DE DADOS DE LC-MS, GC-MS E RMN ¹H</p> <p>Discute os métodos envolvidos na fusão das matrizes validadas de dados adquiridos por LC-MS, GC-MS e RMN ¹H. A matriz de dados resultante é usada nas análises multivariadas como HCA e OPLS-DA evidenciando o perfil de semelhança das diferentes espécies de <i>Mikania</i> e grupos quimiotaxonômicos. Os metabólitos discriminantes também são evidenciado neste capítulo.</p> <p>CAPÍTULO 8. QUIMIOTAXONOMIA DO GÊNERO <i>Mikania</i></p> <p>Este capítulo reúne os resultados obtidos nos capítulos 2 e 3 capítulo 4, capítulo 5, capítulo 6 e capítulo 7 seção 7.2 direcionando para uma discussão sobre quimiotaxonomia do gênero <i>Mikania</i> e classificadores quimiotaxonômicos. Além disso, aborda a aplicação dos estudos metabolômicos como suporte para discussões sobre parâmetros de controle de qualidade adequados para as matérias-primas vegetais e fitoterápicos a base de guaco</p>

2. Estudos metabolômicos direcionados por LC-UV-MS

Divergências existem em relação a situação regulatória do guaco no Brasil, mesmo sendo este o fitoterápico com o maior número de registros no país.²⁹ As espécies comumente usadas na produção guaco são a *M. glomerata* e *M. laevigata*, sendo um desafio a confirmação da autenticidade dessas espécies, devido à grande similaridade morfológica entre elas e ausência de metodologias e parâmetros adequados de controle de qualidade para esses materiais botânicos. Além disso, um estudo abrangente sobre o conteúdo metabólico de diversas espécies de *Mikania*, correlacionando a classificação quimiotaxonômica com a classificação filogenética ainda não existe. Devido a este cenário, além do comprometimento para obtenção de um método que forneça um perfil cromatográfico por LC-UV com melhor resolução possível para a aquisição da impressão digital metabólica para os estudos metabolômicos não direcionados por LC-MS (capítulo 3), também busca-se um método para os estudos metabolômicos direcionados que seja seletivo e robusto para a quantificação por LC-UV de seis substâncias em *M. glomerata* e *M. laevigata*. As seis substâncias foram determinadas como alvo por apresentarem atividades biológicas (Tabela 1) em estudos prévios, sendo elas: ácido o-hidroxicinâmico (AHC), cumarina (CUM), siringaldeído (SIR), ácido caurenóico (ACAU), ácido cinamoilgrandiflórico (ACIN) e ácido benzoilgrandiflórico (ABEN) os quais foram ilustrados na Figura 2.

Figura 2. Metabólitos alvo para desenvolvimento e validação de método quantitativo em *M. glomerata* e *M. laevigata* e estudos metabolômicos direcionados por LC-UV

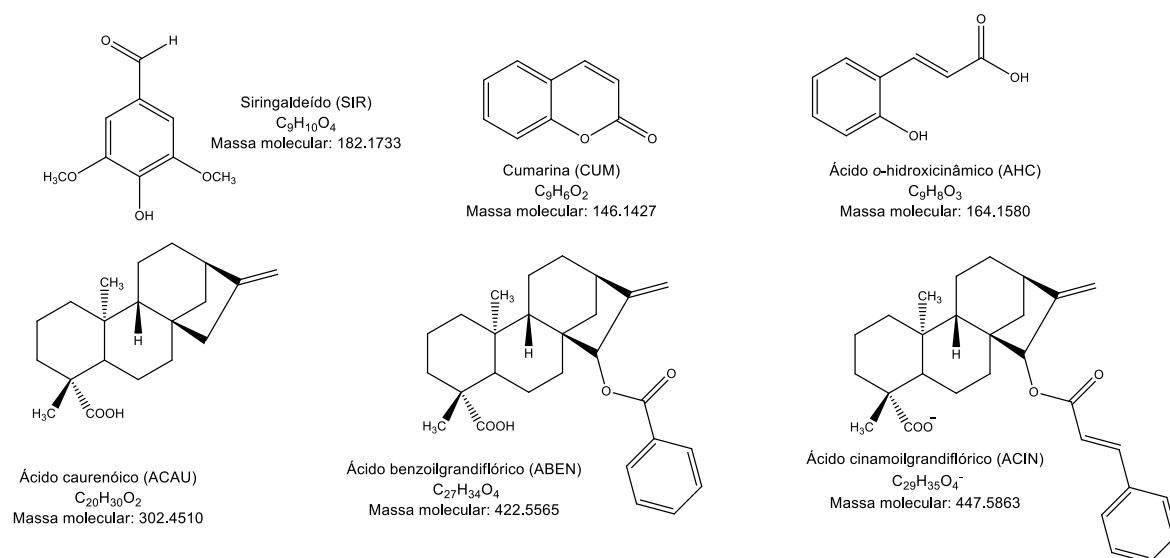


Tabela 1. Atividades biológicas relacionadas de alguns compostos identificados em *Mikania*

Metabólitos	Atividade Biológica
Cumarina	Atividade broncodilatadora Atividade anticoagulante e antitrombótica Ativação de macrófagos e células do sistema imunológico Atividade anti-inflamatória ^{43,50,59,60}
Ácido Caurenóico	Atividade anti-inflamatória Inibição da contratilidade, relaxante musculatura lisa ⁴⁴
Siringaldeído	Atividade antioxidante propriedade anti-inflamatória ^{45,46}
Ácido o-cumárico	Redução do total de leucócitos e eosinófilos em ratos com alérgia induzida ⁴⁷
Ácido cinamoilgrandiflórico e benzoilgrandiflórico	Inibição da contratilidade, relaxante musculatura lisa ^{48,49}

Este capítulo descreve o desenvolvimento do método de análise para os estudos metabolômicos direcionado por LC-UV e não direcionados por LC-MS (a ser discutido no capítulo 3). Também são reunidos os resultados obtidos na validação do método analítico por LC-UV e resultados da quantificação das substâncias CUM,

AHC, ACAU, ABEN e ACIN em todas as amostras de espécies de *Mikania* disponíveis contribuindo para o melhor entendimento da classificação quimiotaxonômica das espécies de *Mikania*, como informação complementar aos estudos metabolômicos de abordagem não direcionada. O estudo metabolômico direcionado desenvolvido neste capítulo também resultou em evidências para uma discussão sobre o controle de qualidade das matérias-primas vegetais e fitoterápicos que contêm as espécies medicinais do gênero *Mikania* (a ser discutidos no capítulo 8).

2.1. Extração e isolamento dos diterpenos

Os diterpenos ACIN, ACAU e ABEN foram isolados com as seguintes finalidades: (1) uso no desenvolvimento e na validação do método para os estudos metabolômicos direcionados por LC-UV e (2) uso no preparo de soluções para avaliação da adequabilidade do sistema e amostras controles de qualidade nos estudos metabolômicos não direcionados por LC-MS e GC-MS.

2.1.1. Materiais e Métodos

2.1.1.1. Aquisição e processamento das folhas *M. glomerata*

Foram adquiridos 4 kg de partes aéreas secas de *M. glomerata* (São Paulo - Capital, R. Benjamin Constant, 23 - Centro). A autenticidade do material foi conferida pela farmacêutica Ligia Pinho (CRF 59680). O material foi pulverizado em moinho de facas e tamisado em telas *Mesh* 10, sendo 2 kg submetido a percolação com EtOH 96% por 24 h.³¹ O extrato foi concentrado em rotaevaporador e mantido em dessecador, resultando em 180 g de extrato seco.

2.1.1.2. Fracionamento do extrato bruto

O extrato etanólico foi submetido a cromatografia líquida a vácuo (CLV), sendo 85 g desse extrato incorporados a 70 g de sílica gel e aplicados no topo da coluna (CLV 1 - 500 g de sílica gel, malha 0,063-0,200 mm, 6 cm diâmetro) e eluídos sequencialmente com 1 L de hexano, diclorometano (DCM) e acetato de etila. Em seguida, 80 g de extrato foi novamente incorporados a 70 g de sílica gel e submetidos a CLV2 usando-se a mesma sequência de eluição usada na CLV 1.

2.1.1.3. Desenvolvimento do método em escala analítica

As diferentes frações obtidas por CLV (DCM-1/2 e AcEtOH-1/2) foram concentradas em rotaevaporador e armazenadas em dessecador. A fração DCM-1 foi

analisada por HPLC-DAD-MS (UHPLC Agilent Infinity 1290, Q-ToF Agilent 6530) pelo método descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Método em escala analítica desenvolvido para separação dos diterpenos nos extratos obtidos por CLV.

Método HPLC-UV	
Coluna	Agilent Zorbax C8 (150mm x 4,5mm x 3,5µm)
Fluxo	1 mL/min
Vol. Inj.	10 µL
Solução A	Ácido Fórmico 0.1% em água - Gradiente
Solução B	Acetonitrila - Gradiente
Temp. Coluna	40°C
Detector	210, 240 e 270 nm
Equipamento	UHPLC Agilent Infinity 1290
Gradiente	55% de ACN em 39 min 55% - 100% de ACN até 41 min 100% de ACN até 46 min 100% - 55% e ACN até 47 min 55% de ACN em 50 min

A pureza dos picos dos diterpenos foi avaliada por UHPLC-MS, através dos métodos descritos na Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 3. Condições de MS - Método *MetMS1*.

Condições de MS			
Mode	ESI(-)(+)	Fragmentor	90 V
Gas Temp.	300°C	Skimmer	90 V
Gas Flow	10 L/min	Octapole RF	750 V
Nebulizer	40 psi	Acquisition mode	<i>Target Analysis</i>
Sheat Gas Temp. (N ₂)	325°C	<i>m/z</i> Acquisition Range (MS)	20 - 1500
Sheat Gas Flow (N ₂)	10 L/min	<i>m/z</i> Acquisition Range (MS/MS)	50 - 800
Vcap	3000 V	Energia de Colisão (CID) (N ₂)	10, 25 e 45 eV
Nozzle Voltage	600 V		

Os íons precursores selecionados para estudos de fragmentação no modo positivo ESI(+) foram: 183,06 (SIR), 147,04 (CUM) e 301,22 (ABEN, ACIN) referente ao íon protonado de cada metabólito alvo e íon fragmento formado *in-source* para os diterpenos. No modo negativo ESI(-) os íons precursores selecionados foram: 163,04

(ACIN), 301,22 (ACAU), 421,24 (ABEN) e 447,26 (ACIN) referente ao íon desprotonado de cada metabólito alvo.

2.1.1.4. Escalonamento para escala semi-preparativa

O método desenvolvido em escala analítica (Tabela 2) foi escalonado para escala semi-preparativa (Tabela 4).

Tabela 4. Método em escala semi-preparativa desenvolvido para separação dos diterpenos nos extratos obtidos por CLV.

Escala Semi-preparativa	
Coluna	<i>Waters Bondapack C18 (300mm x 7,8mm x 15µm)</i>
Fluxo	9 mL/min
Vol. Inj.	100 µL
Solução A	Ácido Fórmico 0.1% em água - <i>Gradiente</i>
Solução B	Acetonitrila - <i>Gradiente</i>
Temp. Coluna	40°C
Detector	210, 240 e 270 nm
Equipamento	HPLC Waters Alliance 2695
Gradiente	55% de ACN em 40,96 mins 55% - 100% de ACN até 43,06 min 100% de ACN até 48,31 min 100% - 55% de ACN até 49,36 min 55% de ACN em 57,76 min

Um estudo de carregamento da coluna foi realizado para maximizar a quantidade dos diterpenos a serem isolados em cada corrida analítica, sendo o extrato DCM a 1000 mg/mL em acetato de etila injetados. Duas frações foram coletadas manualmente (F.1.2 e F.2) conforme Figura 6 sendo concentradas em rotaevaporador à 45°C para a retirada da acetonitrila. Para retirada da fase aquosa, uma partição líquido-líquido foi realizada com a fase aquosa contendo os diterpenos e 200 mL de diclorometano. A mistura foi agitada com auxílio de agitador magnético por 1 hora e separada usando-se funil de separação. A fase orgânica foi separada para recuperação dos diterpenos e a fase aquosa descartada. A partição foi repetida mais uma vez com o mais 100 mL de diclorometano. O solvente foi evaporado resultando nas substâncias de interesse isoladas.

2.1.2. Resultados

2.1.2.1. Fracionamento do extrato bruto

O extrato etanólico resultado da percolação com etanol 96% (item 2.1.1.1) foi submetido a CLV conforme item 2.1.1.2. As frações obtidas se encontram resumidas na Tabela 5.

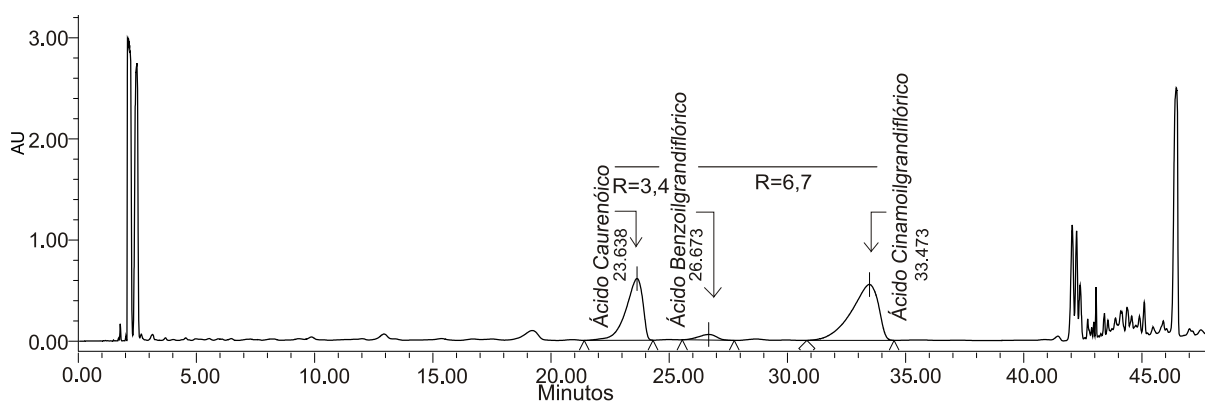
Tabela 5. Frações obtidas por CLV do extrato etanólico de *M. glomerata*.

			CLV 1		CLV 2	
Fração	Eluente	Volume	Nome	Massa (g)	Nome	Massa (g)
1	Hexano	1L	HX	descartado	HX	descartado
2	DCM	1L	DCM-1	4,0 g	DCM-2	3,5 g
3	AcEtOH	1L	AcEtOH-1	30,5g	AcEtOH-2	29,2g

2.1.2.2. Desenvolvimento do método em escala analítica

As frações concentradas em rotaevaporador (Tabela 5) foram analisadas pelo método desenvolvido descrito na Tabela 2. A presença dos diterpenos foi observada somente nas frações DCM e AcEtOH, portanto a fração HX foi descartada. A separação do ABEN e ACAU com resolução de 3,4 (Figura 3) foi obtida, usando-se o método desenvolvido descrito na Tabela 2.

Figura 3. Cromatograma da fração DCM-1 avaliada pelo método em escala analítica.

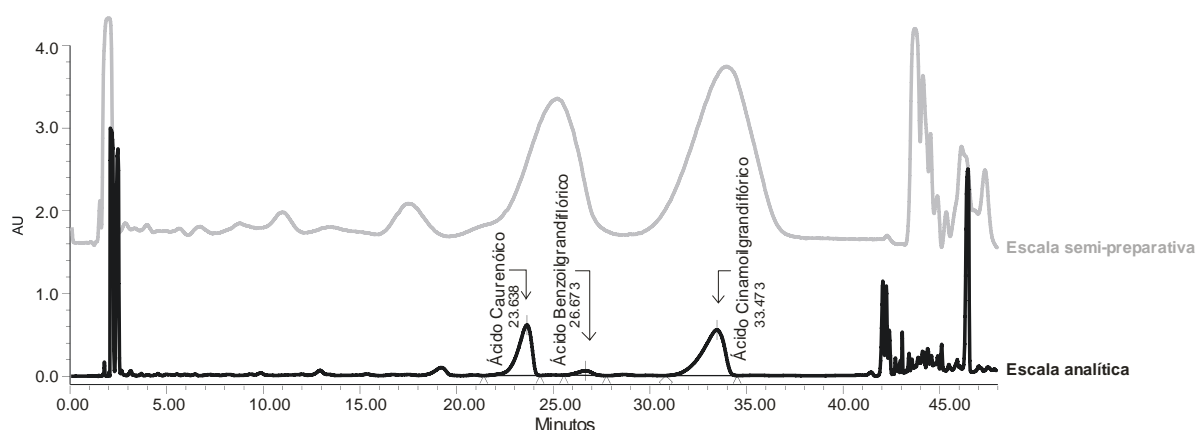


O método descrito na Tabela 2 foi selecionado para o escalonamento para escala semi-preparativa e subsequente isolamento dos diterpenos. Anteriormente ao escalonamento do método, a pureza dos picos dos diterpenos foi avaliada por LC-MS, não havendo nenhuma co-eluição com os diterpenos de interesse.

2.1.2.3. Escalonamento para escala semi-preparativa

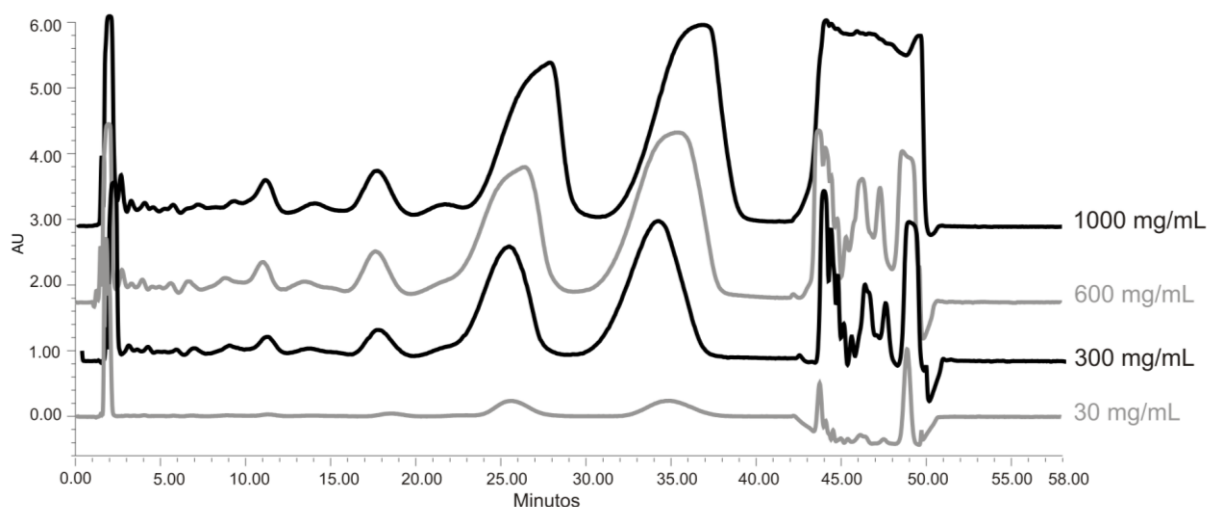
Após escalonamento para escala semi-preparativa (Tabela 4), o perfil cromatográfico (Figura 4) apresentou uma boa resolução entre os picos de ACAU (tempo de retenção (TR): 25min) e ACIN (TR: 34min). No entanto houve a co-eluição de ACAU e ABEN.

Figura 4. Sobreposição dos cromatogramas obtidos em escala analítica e semi-preparativa para isolamento dos diterpenos.



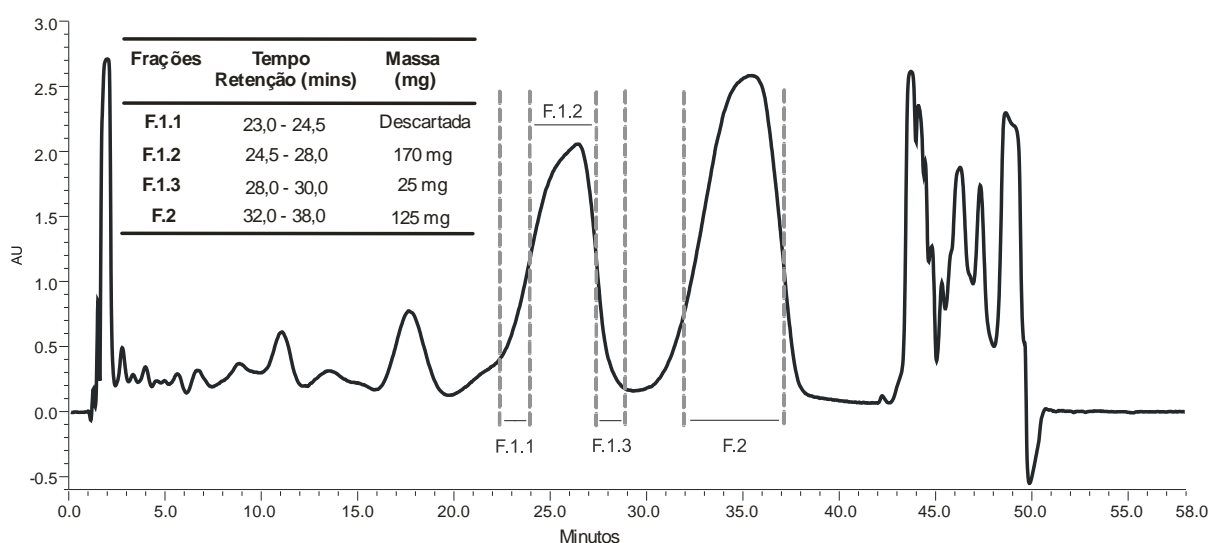
A quantidade de amostra preparada para injeção no HPLC e isolamento dos diterpenos foi concentrada sucessivamente para avaliação da concentração máxima que resultaria em resolução maior que 1,5 entre os picos de ACAU e ACIN (Figura 5).

Figura 5. Cromatogramas obtidos com a injeção de concentrações crescente de amostras de DCM-1 em escala semi-preparativa.



Amostras de 1 g/mL do extrato DCM-1 e DCM-2 em acetato de etila foram injetadas e as frações coletadas manualmente conforme Figura 6. Após partição líquido-líquido (conforme seção 2.1.1.4) a fase orgânica foi coletada e solvente evaporado resultando nas frações F.1.1, F.1.2, F.1.3 e F.2. A fração F.1.1 e F.1.3 foram descartadas e as demais (F.1.2 e F.2) foram submetidas à caracterização e avaliação de pureza por diferentes técnicas analíticas a ser discutida na seção 2.2.

Figura 6. Frações coletadas do extrato DCM-1 em acetato de etila para isolamento dos diterpenos, usando método por HPLC-UV em escala semi-preparativa.



2.2. Caracterização das frações isoladas

As frações F.1.2 e F.2 foram caracterizadas através de diferentes técnicas analíticas. A fração F.1.2. foi considerada padrão para ACAU e ABEN e a fração F.2 foi considerada padrão de ACIN.

2.2.1. Materiais e Métodos

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (DRX 400, Bruker) foram obtidos no Departamento de Química na FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, utilizando-se CDCl_3 como solvente. A análise de IV⁵⁶ (FT-IR Spectrum 100, PerkinElmer) foi realizada no Laboratório de Estudos Colaborativos de Padrões de Referência da Farmacopéia Americana (USP RSL), assim como a pureza cromatográfica⁵¹ das frações isoladas, analisadas por UHPLC-UV-MS (UHPLC 1290 acoplado com QToF 6540 Agilent) usando o método DES36 - Tabela 8 e MetS1 - Tabela 3, incluindo experimentos MS/MS para fração F.2 usando-se energia de colisão de 35 eV.

2.2.2. Resultados

2.2.2.1. Análise por infravermelho

Os espectros das frações F.1.2 (Figura 7) e F.2 (Figura 8) evidenciam a presença da função ácido carboxílico devido à presença de uma banda de absorção larga na região de 3300-2500 cm^{-1} , característica de vibrações de estiramento de O-H; banda de média intensidade em 903 cm^{-1} (F.2) e 869 cm^{-1} (F.1.2) atribuída à deformação angular fora do plano (O-H); banda intensa em 1691 cm^{-1} (F.2) e 1693 cm^{-1} (F.1.2), característica de estiramento C=O de ácido carboxílico e uma banda de intensidade média em 1278 cm^{-1} (F.2) e 1264 cm^{-1} (F.1.2), atribuída ao estiramento a ligação C-O em ácidos carboxílicos.

Figura 7. Espectro de infravermelho obtido da fração F.1.2 caracterizada como ACAU.

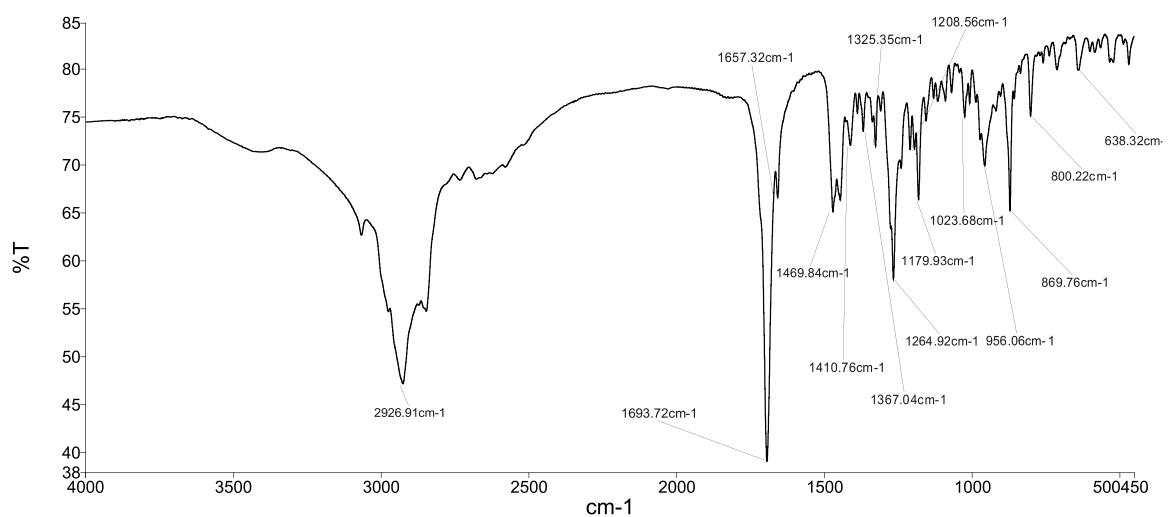
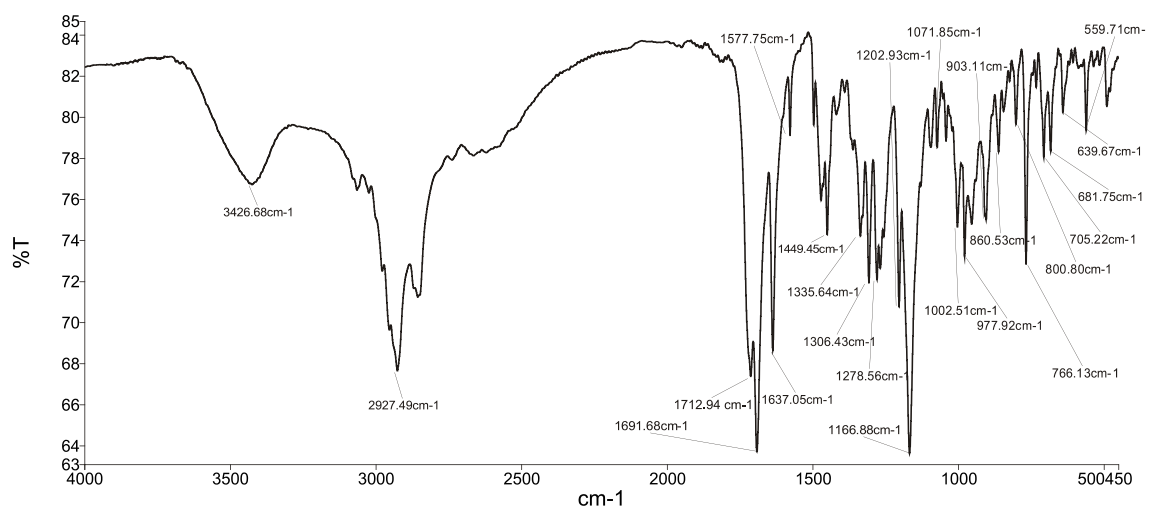


Figura 8. Espectro de infravermelho obtido da fração F.2 caracterizada como ACIN.



A análise do espectro obtido da fração F.2 evidenciou presença de anel aromático, pela banda intensa em 766 cm^{-1} , característica de deformação angular fora do plano ($=\text{C-H}$) e bandas de absorções em 1637 cm^{-1} e 1449 cm^{-1} , características de estiramentos das ligações $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático:⁵³ A banda em 1712 cm^{-1} , parcialmente sobreposta à da carbonila do ácido carboxílico (1691 cm^{-1}), pode ser atribuída à ligação $\text{C}=\text{O}$ do grupamento éster.⁷⁹ A presença de éster pode ser também confirmada pela presença da banda intensa em 1166 cm^{-1} , característica de estiramento da ligação C-O de éster.⁵³

Os espectros de IV em conjunto com os dados obtidos com as outras técnicas analíticas dão suporte para a proposta de identificação da F.1.2 como ácido caurenóico e F.2 como ácido cinamoilgrandiflórico.

2.2.2.2. Análise por RMN de ^1H e ^{13}C

Os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN para cada fração F.1.2 e F.2 (Figura 9, Figura 10, Figura 11 e Figura 12) se encontram resumidos na Tabela 6 e estão de acordo com deslocamentos químicos obtidos na análise de ácido caurenóico e cinamoilgrandiflórico observados na literatura^{61,62}

Tabela 6. Sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para F 1.2 e F.2 (CDCl_3).

H	δ_{H} (ppm)		C	δ_{C} (ppm)						
	F 1.2.	F 2.		F 1.2.	F 2.	C	F 1.2.	F 2.	C	F 2.
13	2,66 (sl,1H)	2,77(sl,1H)	1	40,7	40,7	11	18,5	18,4	1'	167,1
15	5,33 (s)	5,34(s)	2	19,1	19,1	12	33,1	33,1	2'	118,4
17a	4.76/4,82	5,09/5,06(sl)	3	37,8	37,8	13	43,8	42,6	3'	144,9
17b	4.76/4,82	5,09/5,06(sl)	4	43,7	43,7	14	39,7	37,4	4'	134,5
18	1,26 (s,3H)	1,18(s,3H)	5	57,0	57,0	15	48,9	83,1	5'	129,7
20	1,10 (s,3H)	0,90(s,3H)	6	21,8	21,8	16	155,96	155,95	6'	128,1
2'	-	6,42(d,J16)	7	41,3	34,9	17	103,01	103,02	7'	130,3
3'	-	7,64(d,J16)	8	43,7	47,8	18	30,0	29,7		
5'	-	7,46(m,2H)	9	55,0	55,1	19	184,43	184,14		
6',7'	-	7,31(m,3H)	10	40,5	39,9	20	15,81	15,81		

Legenda: (s) simpleto, (sl) simpleto largo, (d) dupleto e (m) mutipleto.

Figura 9. Espectro de RMN de ^1H obtidos para Fração F.1.2 (400 MHz, CDCl_3) proposta como ácido caurenóico.

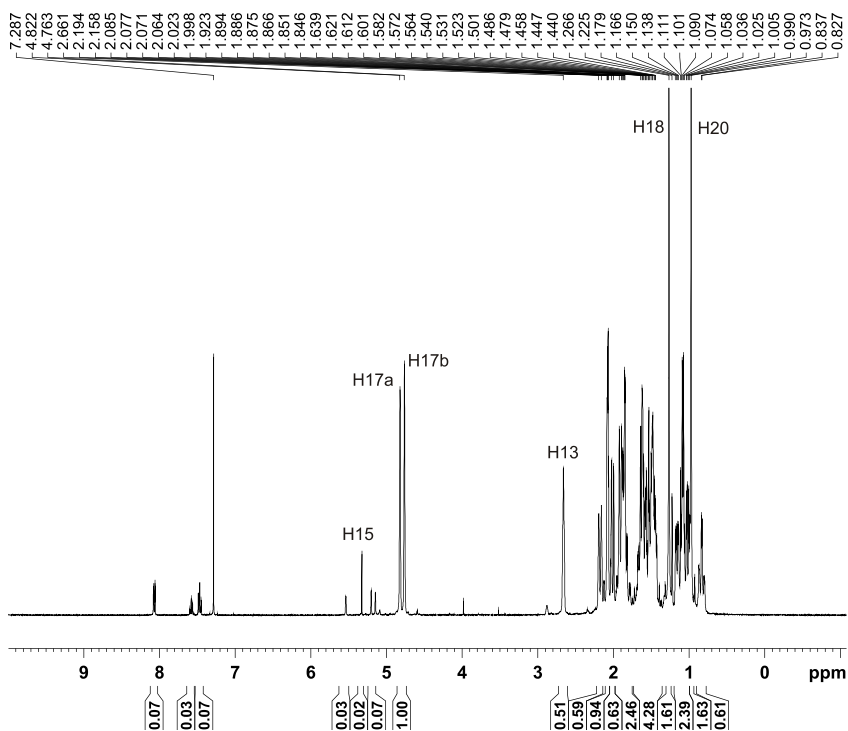


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para Fração F.1.2 (125 MHz, CDCl_3) proposta como ácido caurenóico.

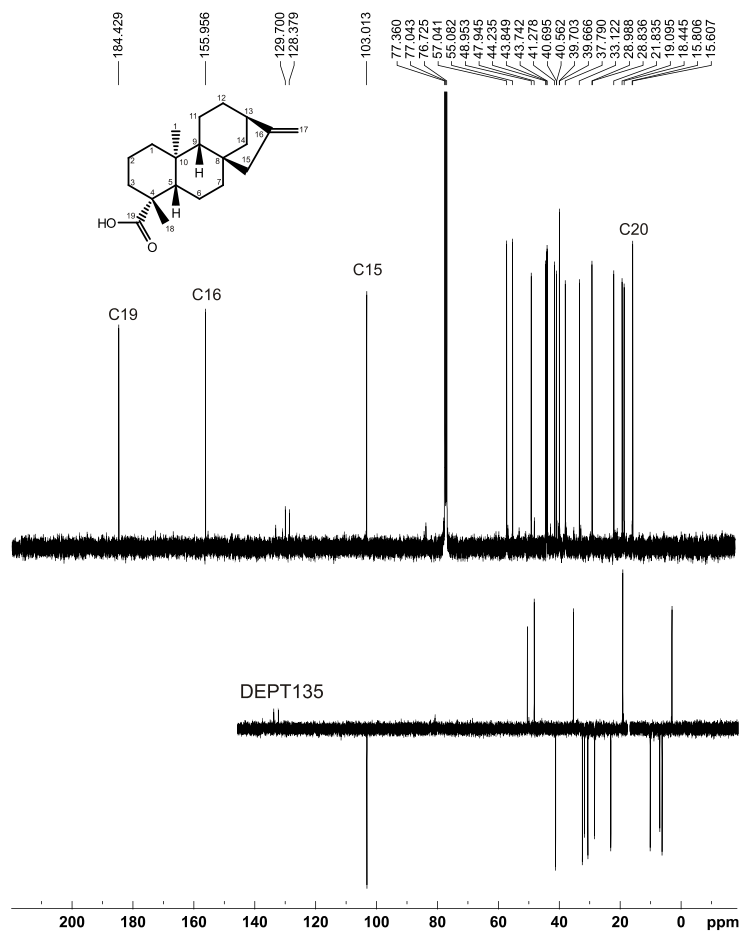


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H obtidos para Fração F.2 (400 MHz, CDCl_3) proposta como ácido cinamoilgrandiflórico.

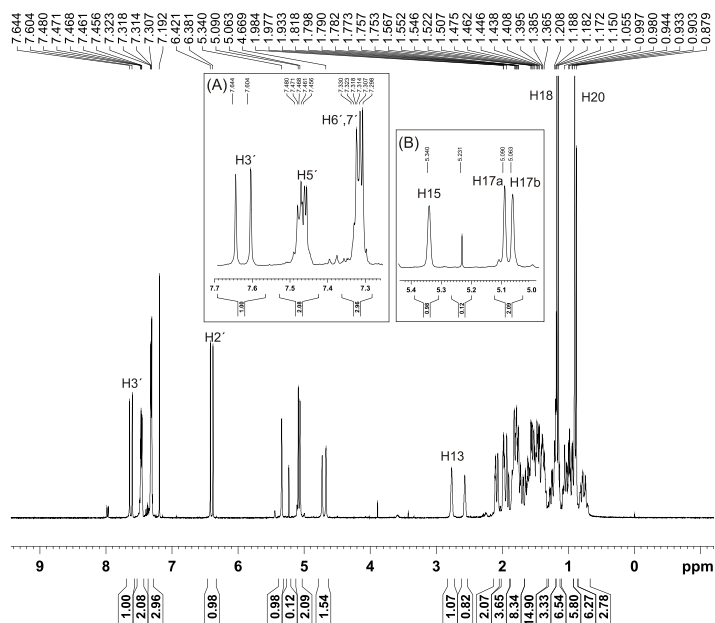
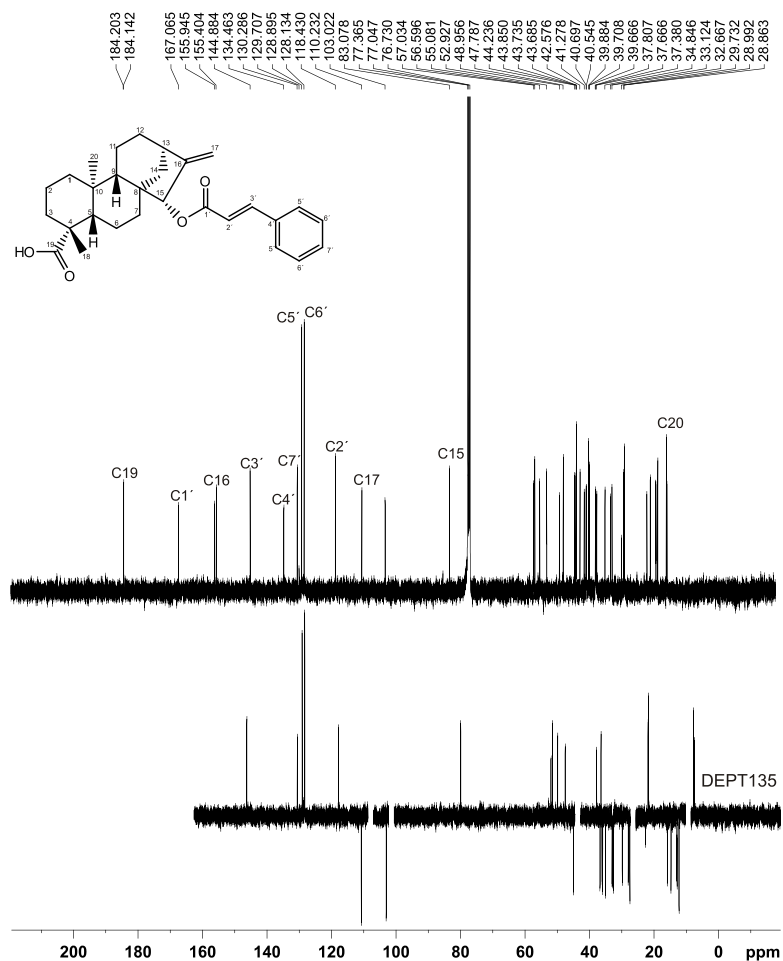


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para Fração F.2 (125 MHz, CDCl_3) proposta como ácido cinamoilgrandiflórico.



2.2.2.3. Caracterização por LC-MS

As frações foram analisadas por LC-MS e as espécies iônicas observadas nos espectros de MS e MS/MS forneceram um suporte para a proposta de identificação da F.1.2 como ácido caurenóico (Figura 13) e F.2 como ácido cinamoilgrandiflórico (Figura 14).

Figura 13. Espectros Full MS obtido para Fração F.1.2 (ACAU).

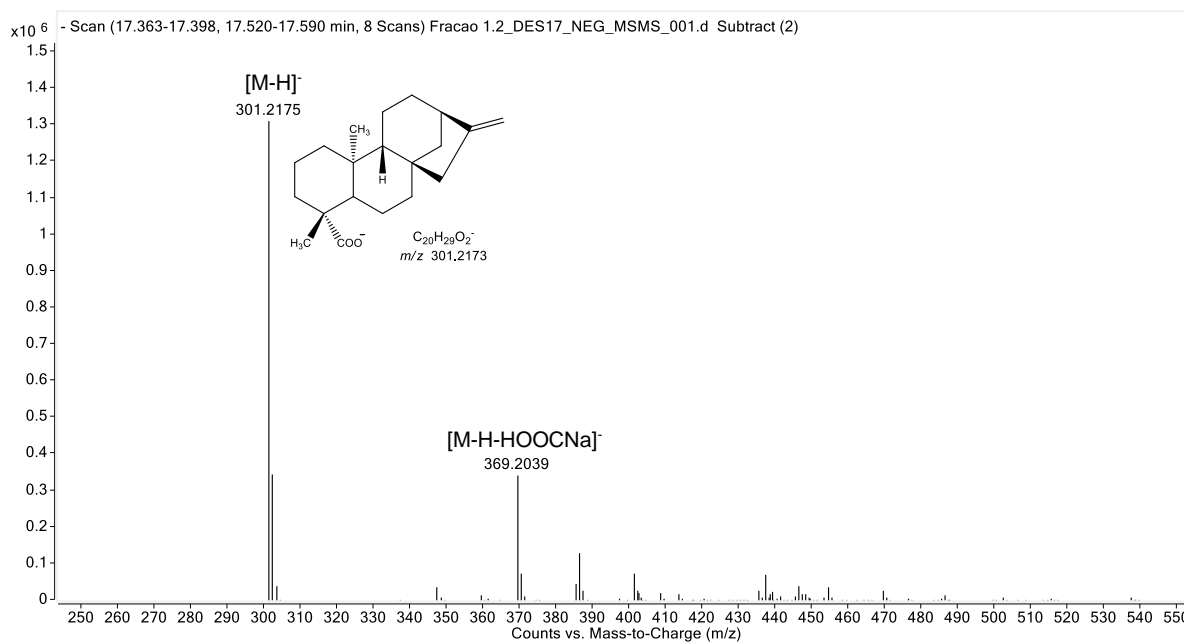
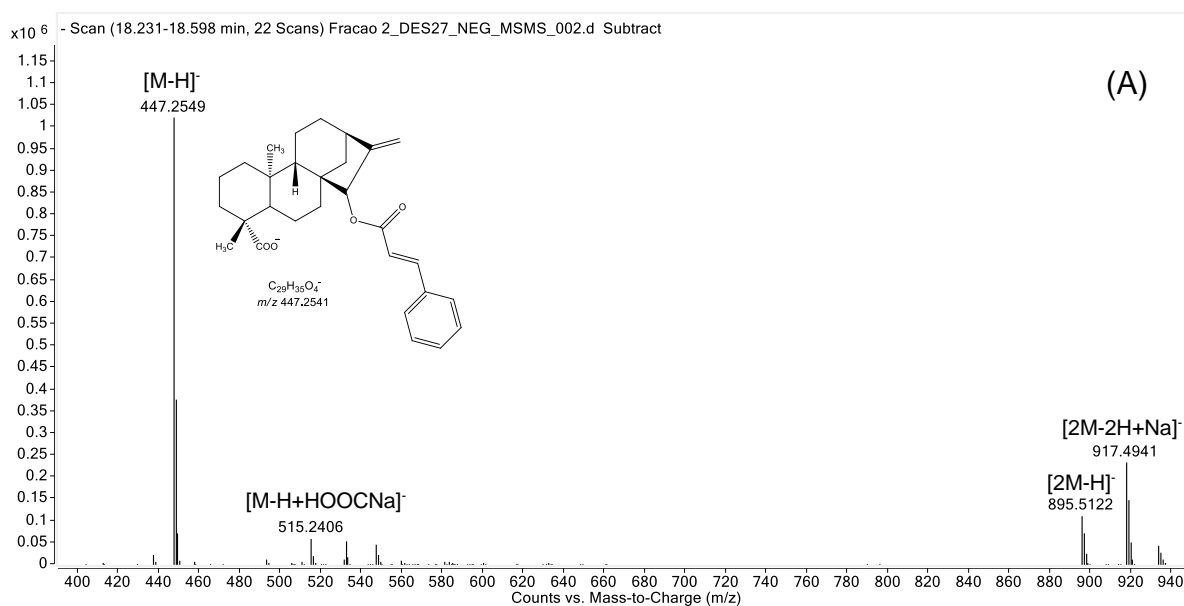
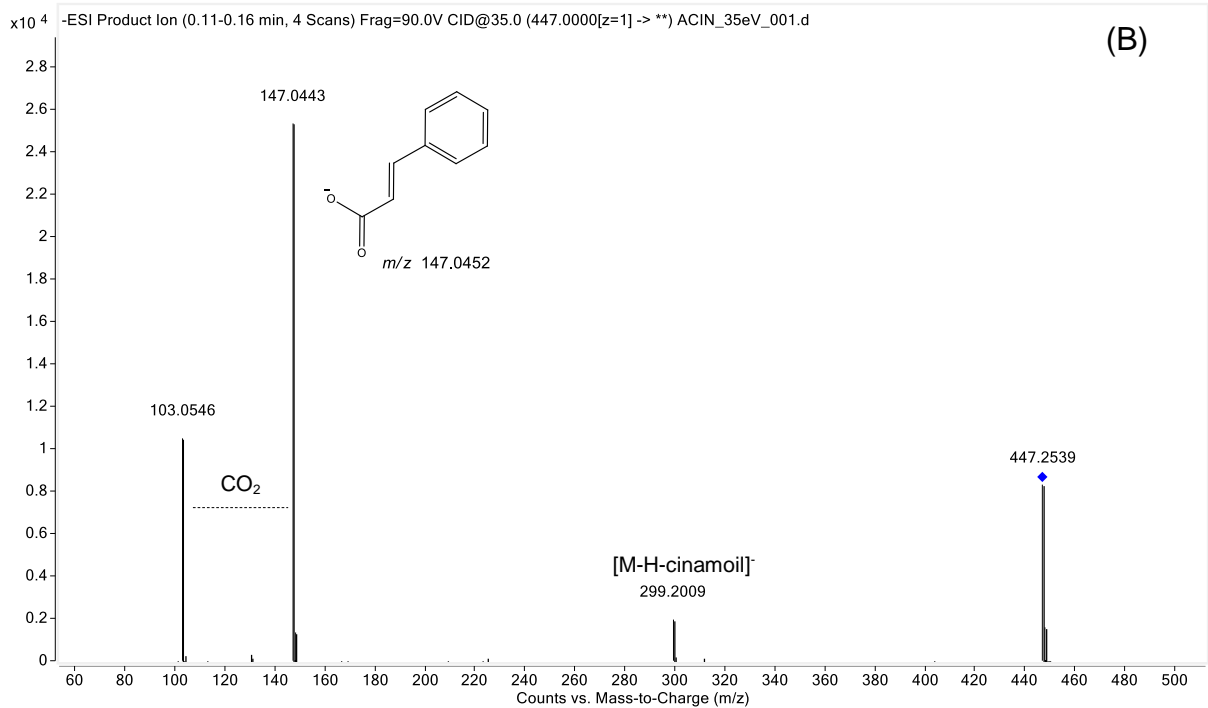


Figura 14. Espectros (A) Full MS e (B) MS/MS com respectivas sugestões de fragmentos para Fração F.2 (ACIN).





2.2.2.4. Pureza cromatográfica

O cromatograma obtido por UHPLC (Tabela 8) da fração F.1.2 aponta um total de 88,00% de pureza do ACAU e 10,55% de ABEN, e para fração F.2 98,68% de ACIN. O total de impurezas presentes nas frações foi calculado pela subtração de 100 pela porcentagem do pico principal encontrada em cada fração após integração de todas as impurezas presentes. O ABEN foi validado a partir do padrão de ACAU (F.1.2), visto que este apresenta 10,55% de ABEN.

Figura 15. Cromatograma obtido por UHPLC (210 nm) para a fração F.1.2 (DES36).

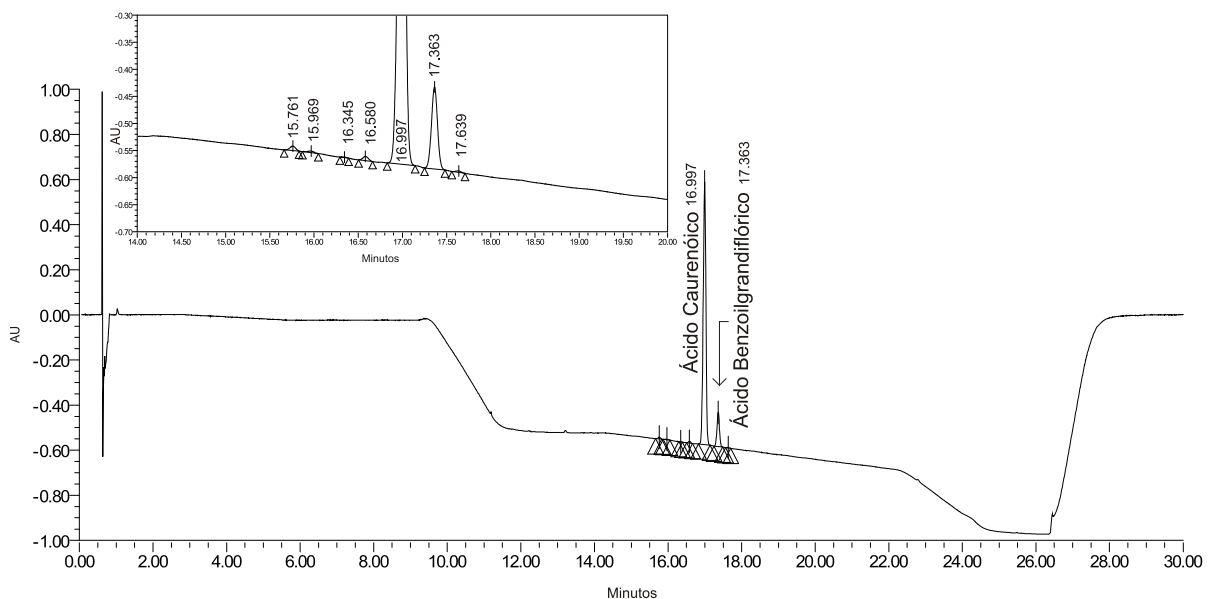
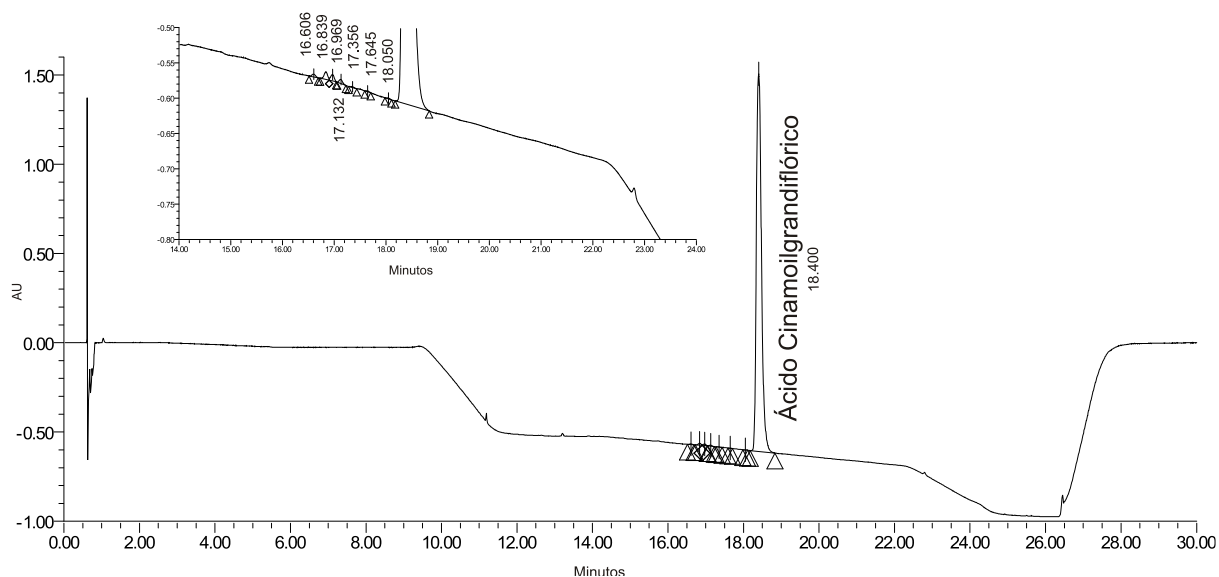


Figura 16. Cromatograma obtido por UHPLC (210 nm) para a fração F.2 (DES36).

2.3. Desenvolvimento do método analítico por UHPLC-UV-MS

2.3.1. Materiais e Métodos

2.3.1.1. Preparo das amostras e padrões

Os metabólitos alvo para o desenvolvimento do método foram adquiridos da Sigma-Aldrich: CUM (99%, Lote: SLBF4096V), SIR (98%, Lote: S26323V) e AHC (97%, Lote: STBD3151V). Os padrões dos diterpenos ACIN, ABEN e ACAU foram isolados conforme descrito no item 2.1.1.2 para serem usados no desenvolvimento e validação do método analítico por UHPLC-UV. A princípio, uma condição de extração foi padronizada baseada nos estudos das melhores condições para análise de diferentes tipos de amostras de Asteraceae realizada pelo grupo de pesquisa AsterBioChem⁵⁴ e em protocolos para análise metabolômica de plantas.²⁷ Aproximadamente 10 mg do pó das folhas de *M. glomerata* foram transferidos para um tubo Eppendorf e fortificados com os seis padrões para uma concentração final de 0,1 mg/mL. Em seguida, 2 mL de etanol 70% foram adicionados⁵⁴ e a amostra foi agitada por 1 min, sonicada por 20 min e centrifugada a 3600 rpm por 5 min. A fase etanólica foi filtrada usando um filtro de PTFE de 0,22 µm e 1 mL foi transferido para balão de 2 mL e completado com água.

2.3.1.2. Planejamento experimental

O método foi desenvolvido por UHPLC-DAD (Waters Acquity H-Class) e os dados processados pelo software *Waters Empower 3*. Um desenho experimental foi

construído para a avaliação dos melhores parâmetros de análise usando-se o software *Fusion Method Development™* (*S-Matrix*). Uma triagem foi realizada variando-se quatro fatores cromatográficos (Tabela 7). As respostas monitoradas foram Resposta 1: Número de picos totais, Resposta 2: número de picos com resolução $R_s < 1,5$ e Resposta 3: fator de assimetria (Experimentos com fator de assimetria acima de 1,6 tiveram valor da resposta 1, e experimentos com fator de assimetria abaixo de 1,6, valor da resposta 0). As respostas foram processadas manualmente usando o software Empower 3 (Waters).

Tabela 7. Fatores selecionados para o desenvolvimento de método por UHPLC-UV.

Fatores	Descrição
Colunas	Agilent Zorbax SB Phenyl (100mm x 2,1mm x 1,8 μ m) Waters ACQUITY BEH Shield RP18 (100mm x 2,1mm x 1,7 μ m) Waters ACQUITY BEH C8 (100mm x 2,1mm x 1,7 μ m) Waters ACQUITY HSS T3 (100mm x 2,1mm x 1,7 μ m)
Solvente Orgânico	Acetonitrila e Metanol
Tempo de gradiente	Mínimo de 15 minutos de gradiente Máximo de 30 minutos de gradiente
pH da fase móvel	Formiato de Amônio 10mM pH 4,0 Ácido fórmico 0,1% pH 2,7

Outros fatores foram mantidos constantes no estudo de triagem como volume de injeção de 5 μ L, vazão de 0,4 mL/min e temperatura da coluna de 40 °C.

As melhores condições foram avaliadas a partir dos gráficos com projeções das respostas as quais estão de acordo com critérios de aceitação selecionados para os parâmetros cromatográficos e função de desejabilidade, usando o software *Fusion Method Development™* (*S-Matrix*). Para o cálculo da desejabilidade individual (d_i) de cada resposta a ser monitorada os seguintes critérios foram considerados:

- Resposta 1 (número de picos totais): O objetivo foi maximizar a resposta sendo o valor mínimo (*lower bound - L*) 20 picos e valor máximo (*upper bound - U*) 40 picos. Peso da resposta (*Relative Rank - r*) foi 1.
- Resposta 2 (número de picos com $R_s < 1,5$): O objetivo foi minimizar a resposta sendo o valor mínimo (*L*) 0 picos e valor máximo (*U*) 10 picos. Peso da resposta (*r*) foi 1.
- Resposta 3 (fator de assimetria menor que 1,6): O objetivo foi minimizar a resposta sendo o valor mínimo (*L*) 0 e valor máximo (*U*) 1. Peso da resposta (*r*) foi 0,5.

A qualidade do ajuste e capacidade preditiva do modelo foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) usando-se o software *Fusion Method Development™* (*S-Matrix*).

2.3.1.3. Otimização do método de análise e estudo de seletividade

Após o estudo de triagem das variáveis primárias foi conduzido um estudo para otimização do método analítico, avaliando-se variáveis secundárias como temperatura, volume de injeção e fluxo, resultando no método *DES36* (Tabela 8). A resposta analítica monitorada foi $R_s \leq 1,5$ entre os metabólitos alvos e fator de assimetria não mais que 2,0.^{55,57}

Tabela 8. Método seletivo (*DES36*) desenvolvido para quantificação dos metabólitos alvos em *M. glomerata* e *M. laevigata*.

Condições UHPLC-UV		
Coluna	Waters, Acquity BEH Shield RP18 (100mm x 2,1mm x 1,7µm)	
Fluxo	0,4 mL/min	
Solução A	Ácido Fórmico 0,1% em água (pH: 2,65 ± 0,01) - Gradiente	
Solução B	Acetonitrila - Gradiente	
Temp. Coluna	40°C ± 2°C	
Vol. Inj.	5 µL	
Detector UV	210, 240 e 270 nm	
Gradiente		
Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	90	10
1,5	90	10
5	87	13
8	87	13
10	40	60
13	40	60
21	35	75
23	0	100
25	0	100
26	90	10
30	90	10

O método *DES36* foi usado para aquisição de dados para os estudos metabolômicos por UHPLC-UV abordagem direcionada e não direcionada por LC-MS.

A seletividade do método foi estudada para os extratos de *Mikania laevigata* e *M. glomerata* por UHPLC-MS (UHPLC Agilent 1290 acoplado ao QToF 6540 Agilent) através dos métodos *DES36* (Tabela 8) e *MetMS1* (Tabela 3).

2.3.2. Resultados

2.3.2.1. Planejamento fatorial para o desenvolvimento do método de análise

Um desenho experimental foi construído para uma primeira triagem das melhores condições de análise (Figura 17) a fim de se obter melhor resolução possível entre as substâncias da matriz e principalmente entre as substâncias alvo para quantificação.

Figura 17. Experimentos da matriz construída pelo software Fusion™ (S-Matrix) usando *G-optimal design*.

Experiment Design Matrix

Run No.	Sample Set No.	Strong Solvent Type (*)	Gradient Time (min)	pH (*)	Column Type (*)
Condition Column - 1	1	Acetonitrila	0,20	2,7	Waters Acquity BEH C18 Shield
Condition Column - 2	1	Acetonitrila	0,20	2,7	Waters Acquity HSS T3
Condition Column - 3	1	Acetonitrila	0,20	2,7	Agilent Zorbax SB Phenyl
Condition Column - 4	1	Acetonitrila	0,20	2,7	Waters Acquity BEH C8
1.a	1	Acetonitrila	22,50	2,7	Waters Acquity BEH C18 Shield
1.b	1	Acetonitrila	22,50	2,7	Waters Acquity BEH C18 Shield
2.a	1	Acetonitrila	22,50	2,7	Waters Acquity HSS T3
2.b	1	Acetonitrila	22,50	2,7	Waters Acquity HSS T3
3.a	1	Acetonitrila	22,50	2,7	Agilent Zorbax SB Phenyl
3.b	1	Acetonitrila	22,50	2,7	Agilent Zorbax SB Phenyl
4.a	1	Acetonitrila	22,50	2,7	Waters Acquity BEH C8
4.b	1	Acetonitrila	22,50	2,7	Waters Acquity BEH C8
5.a	1	Acetonitrila	30,00	2,7	Waters Acquity HSS T3
5.b	1	Acetonitrila	30,00	2,7	Waters Acquity HSS T3
6.a	1	Acetonitrila	15,00	2,7	Waters Acquity HSS T3
6.b	1	Acetonitrila	15,00	2,7	Waters Acquity HSS T3
7.a	1	Acetonitrila	30,00	2,7	Agilent Zorbax SB Phenyl
7.b	1	Acetonitrila	30,00	2,7	Agilent Zorbax SB Phenyl
8.a	1	Acetonitrila	15,00	2,7	Agilent Zorbax SB Phenyl
8.b	1	Acetonitrila	15,00	2,7	Agilent Zorbax SB Phenyl

A resolução pode ser descrita baseada em três parâmetros⁵⁷ (Eq. 1), os quais estão relacionados a seletividade ($\alpha-1$), eficiência (N) e retenção ($k/(1+k)$) do método analítico.

$$Rs = \frac{1}{4} . (\alpha - 1) . N^{0.5} . \frac{K}{(1+k)} \quad \text{Eq. 1}$$

Para o estudo de triagem de condições iniciais foram selecionados fatores primários os quais pequenas variações podem representar um grande impacto na resolução. Visto que pequenas variações nos parâmetros fator de retenção (k) e fator de separação (α) impactam significativamente na resolução,¹⁵² os fatores escolhidos para triagem foram: composição da fase estacionária, avaliando-se diferentes empacotamentos de colunas cromatográficas (fenil, C18, C8); diferentes solventes orgânicos (MeOH e ACN); inclinação do programa de gradiente (gradiente: 5%-100% solvente orgânico com inclinação de 15 a 30 min) e pH da fase móvel (ácido fórmico 0.1% pH 2,7 e formiato de amônio 10 mM pH 4,0).

Para os estudos metabolômicos abordagem não direcionada, focou-se na obtenção do menor número possível de co-eluições facilitando a determinação das variáveis para as análises estatísticas multivariadas e caracterização das substâncias discriminantes dos grupos de espécies de *Mikania* por LC-MS, diminuindo a chance de supressão iônica, complexidade dos espectros de massa entre outros fatores.

A temperatura também pode afetar a retenção das substâncias e equilíbrio de distribuição das substâncias entre fase móvel e fase estacionária⁵⁷ podendo alterar a seletividade do método. No entanto, a temperatura foi otimizada após estudo de triagem, sendo mantida à 40°C durante o estudo inicial das condições primárias citadas anteriormente. Os parâmetros volume de injeção (5 μ L) e fluxo (0,4 mL/min) também foram mantidos constantes durante a triagem e avaliados posteriormente para refinamento do método buscando-se uma melhoria na eficiência do método (aumento do número de pratos teórico) e resolução entre os metabólitos alvo

A capacidade de predição e ajuste dos modelos foram avaliados através da ANOVA e resumidos na Tabela 9. O valor de F resultante da razão entre a média quadrática (MQ) da regressão pela MQ do resíduo, foi maior que o valor de F_{tab} com 5% de significância ($\alpha=0,05$) e graus de liberdade da regressão e resíduos, respectivamente. Portanto, este resultado caracteriza uma boa capacidade de predição do modelo para as respostas monitoradas. O valor de F resultante da razão entre a média quadrática (MQ) da falta de ajuste pela MQ do erro puro foi menor que o valor de F_{tab} com 5% de significância ($\alpha=0,05$) e graus de liberdade da falta de ajuste e erro puro, respectivamente. Portanto este resultado caracteriza a ausência de falta de ajuste dos modelos de predição das respostas monitoradas.

Tabela 9. ANOVA para os modelos gerados para as respostas monitoradas no estudo de triagem por DoE no desenvolvimento do método analítico por UHPLC-UV.

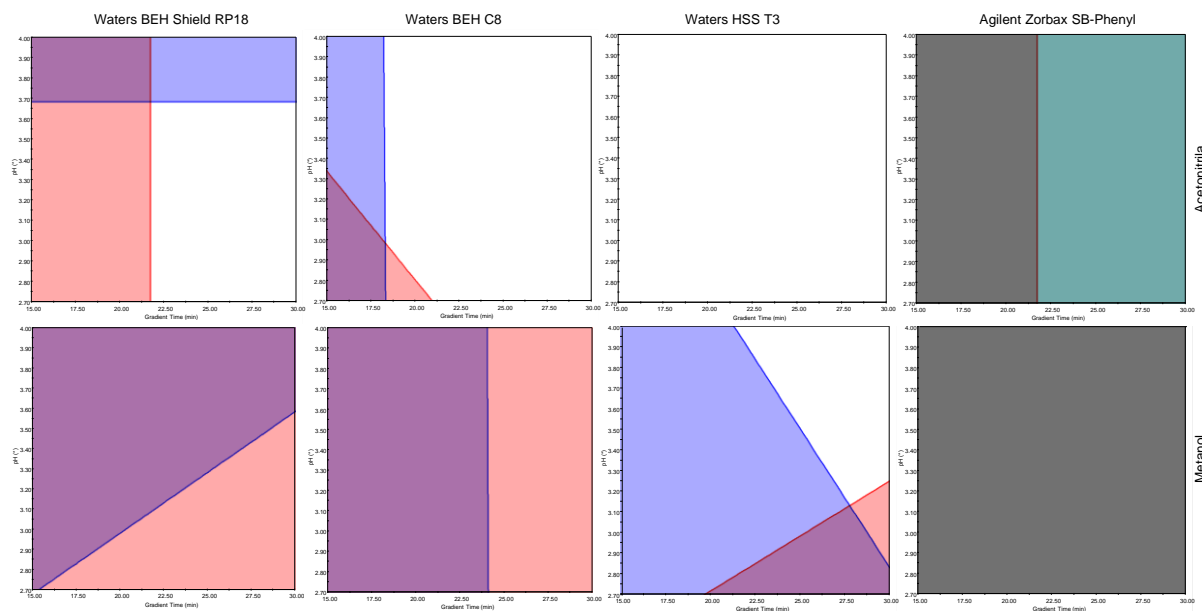
Resposta 1: Número de picos totais					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F _{calc.}	F _{tabelado}
Regressão	1062,7972	7	151,8282	13,9475	2,29 (7 e 34 g.L)
Resíduos	370,1135	4	10,8857		
F. Ajuste	159,8635	23	6,9506	0,3636	2,23 (11 e 23 g.L)
Erro Puro	210,2500	11	19,1136		
Total	1432,9107	41	151,8282	13,9475	
Resposta 2: Número de picos com resolução abaixo 1,5					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F _{calc.}	F _{tabelado}
Regressão	25,7239	73	3,6748	5,4572	2,50 (4 e 73 g.L)
Resíduos	22,8952	4	0,6734		
F. Ajuste	15,8952	23	0,6911	1,0860	2,62 (23 e 11 g.L)
Erro Puro	7,0000	11	0,6364		
Total	48,6190	41	3,6748		

As respostas analíticas monitoradas foram projetadas em gráficos que relacionam as variáveis gradiente e pH da fase móvel (Figura 18). Critérios de aceitação estudados como número de picos com $R_s > 1,5$, número de picos totais e fator de assimetria abaixo de 1,6 foram avaliados a partir desses gráficos (Figura 18).

Avaliando os gráficos ilustrados na Figura 18, foi observado que a acetonitrila apresenta uma maior seletividade em comparação ao metanol para os metabólitos detectados em *Mikania*, visto que menos que 28 metabólitos foram detectados (área sombreada de vermelho) nos gráficos com uso de metanol para as quatro colunas, refletindo um maior número de co-eluições e menor seletividade. A área sombreada em azul nos gráficos do metanol, relacionada com a resposta número de picos com $R_s < 1,5$, cobre uma maior área quando comparada com o uso da acetonitrila evidenciando um menor número de picos com resolução de linha de base com o uso do metanol. Desta forma a acetonitrila foi selecionada como solvente orgânico para o próximo passo de refinamento do método analítico.

Ainda avaliando os gráficos das respostas monitoradas, observou-se que a coluna *Zorbax SB Phenyl* apresenta picos com alto valor de fator de assimetria sendo que o gráfico desta coluna com acetonitrila apresenta uma grande área sombreada de verde referente a resposta fator de assimetria menor que 1,6, portanto evidenciando formato de pico alargado e não desejado.

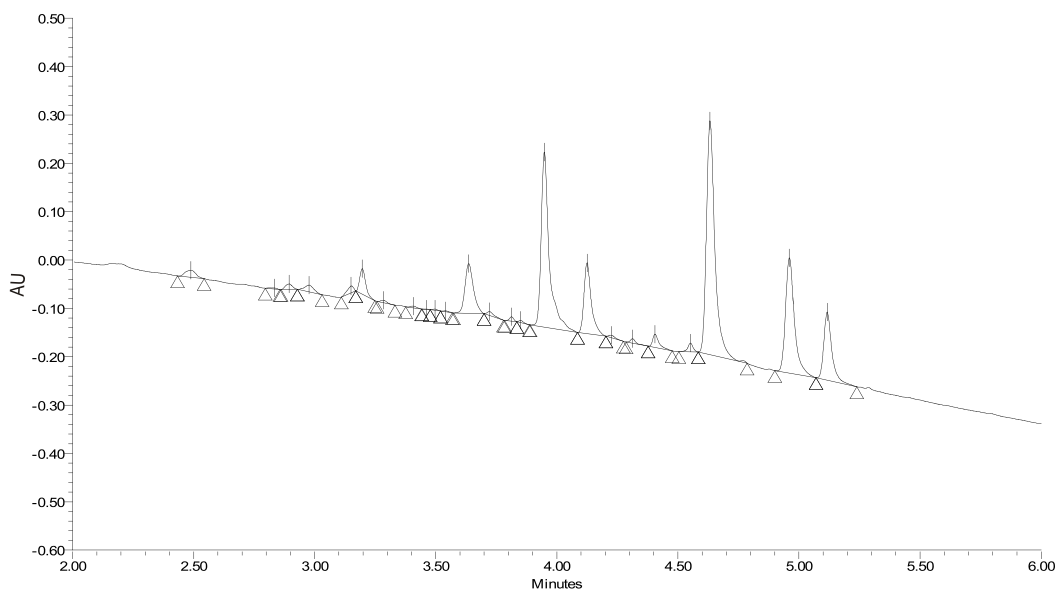
Figura 18. Gráfico dos fatores pH da fase móvel *versus* gradiente com projeções das respostas monitoradas e seus critérios de aceitação geradas no estudo de triagem para as colunas e solvente orgânicos estudados para o desenvolvimento do método analítico por UHPLC-UV usando planejamento fatorial.



Legenda: (A) área sombreada de vermelho: condições em que o critério de aceitação (CA) para a resposta 1 não for atingido (número de picos igual ou maior 28), (B) área sombreada de azul: condições em que o CA para a resposta 2 não for atingido (número de picos com $R_s < 1,5$ abaixo de 4), (C) área sombreada de verde: condições em que o CA para a resposta 3 não for atingido (fator de assimetria $< 1,6$) e (D) área branca: condições em que as as respostas monitoradas estão dentro dos critérios de aceitação.

Devido a coluna *Zorbax SB Phenyl* não apresentar nenhuma tecnologia de capeamento dos silanóis residuais (*non-encapped*), foi verificado um alto valor de fator de assimetria (Figura 19). Desta forma essa coluna foi excluída da etapa de refinamento do método analítico.

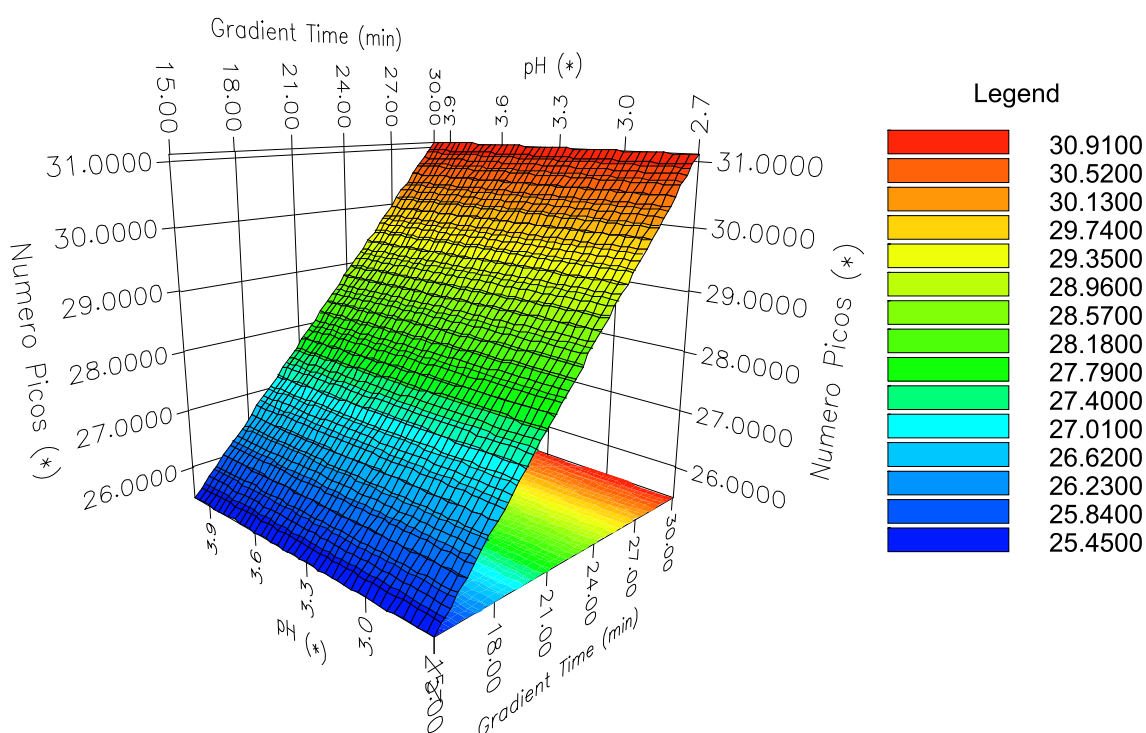
A partir da Figura 18 foi observado uma boa performance da coluna C8 (*Waters Acquity BEH C8*) e das duas colunas C18 (*Waters ACQUITY BEH Shield RP18* e *Waters Acquity HSS T3*), com maiores áreas brancas. Isto se deve ao fato de as colunas apresentarem uma maior flexibilidade frente as condições estudadas em relação as respostas monitoradas, com o uso da acetonitrila. Ou seja, encontram-se dentro dos critérios mínimos de aceitação.

Figura 19. Perfil cromatográfico apresentando alto fator de cauda com coluna *Phenyl*.

As espécies *Mikania glomerata* e *M. laevigata* são ricas em ácidos diterpênicos, derivados do ácido benzóico, derivados de fenilpropanóides e outros compostos fenólicos.²⁸ O cenário teórico ideal para a cromatografia de fase reversa para separação desses compostos ácidos seria o uso de fase móvel com pH abaixo do valor de pKa desses metabólitos para que estes estejam presentes na forma não-ionizada e tenham maior afinidade com a coluna estacionária de fase-reversa, podendo resultar em maior seletividade e separação desses metabólitos. A triagem do pH da fase móvel evidenciou um maior número de picos com o uso de pH mais baixo (pH entre 3,7 até 2,7) e coluna *Waters BEH Shield RP18*, provavelmente devido a presença de metabólitos não-ionizados em maior extensão e conseqüentemente maior capacidade de retenção impactando na seletividade (Figura 18). Para as colunas *Waters C18 HSS T3* e coluna *Waters BEH C8* o pH mostrou ser não significativo em relação a resposta 1 e 2 apresentando maior área branca (Figura 18). Esta observação foi correlacionada a uma menor porcentagem de recobrimento com cadeia alquílica (*carbon load*)¹⁵³ dessas colunas comparadas com o *BEH Shield RP18*. Esta observação também pode ser observada pela superfície de resposta da coluna *Waters HSS T3* para a resposta 1 número de picos relacionando os fatores pH da fase móvel e gradiente (Figura 20), o qual evidencia que o pH não impacta significativamente na resposta monitorada. No entanto, gradiente mais longos e com inclinação mais branda apresentam maior número de picos, portanto menor co-eluições.

As três colunas (C8, HSS T3 e BEH Shield RP18) não apresentaram nenhum problema relacionado ao fator de cauda apresentando gráficos sem nenhuma área sombreada de verde, o que pode refletir as tecnologias de recobrimento de silanóis residuais como capeamento com grupos não polares e formação de camada aquosa pela coluna BEH Shield RP18 pela presença de um grupo polar embebido na cadeia alquílica.¹⁵³

Figura 20. Superfície de reposta para número de picos totais para os fatores gradiente e pH número de picos usando acetonitrila e coluna *Water HSS T3*.

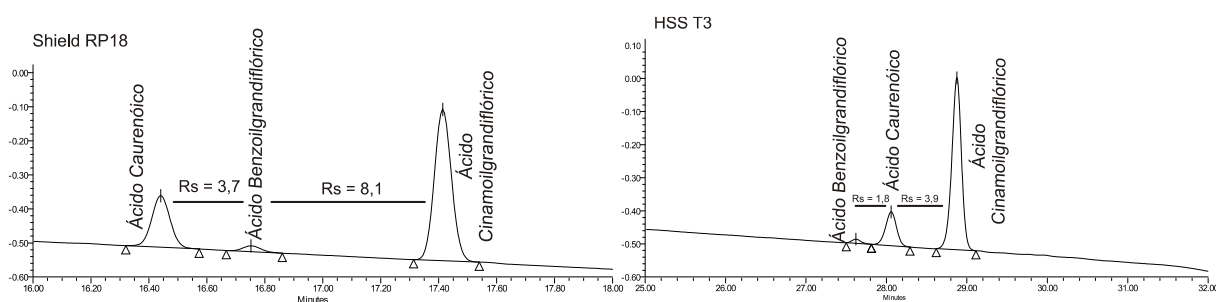


Através da função de desejabilidade, as melhores condições cromatográficas também foram evidenciadas, comparando-se o valor de desejabilidade global (D) de diversas condições, sendo os critérios considerados para o cálculo da desejabilidade individual de cada condição descritos na seção 2.3.1.2. As três melhores respostas obtidas pela função de desejabilidade foram: (1) coluna *Waters HSS T3* e pH 4,0 com desejabilidade global de 0,89, (2): coluna *Waters BEH C8* e pH 4.0 com D:0,87 e (3) coluna *Waters BEH Shield RP18* e pH 2,7 com D:0,81, refletindo as observações e conclusões tiradas da avaliação dos gráficos com as regiões de aceitação discutidas nesta seção.

As colunas selecionadas (*Waters BEH C8*, *BEH Shield RP18* e *HSS T3*) no estudo de triagem foram selecionadas para serem estudadas na etapa de otimização do método usando-se a abordagem “*One factor at a time*” (OFAT), usando acetonitrila como solvente orgânico, porém sendo incluídas variáveis secundárias como temperatura da coluna, volume de injeção e fluxo.

Na etapa de refinamento, a resposta usada para monitorar a qualidade da separação cromatográfica foi a resolução entre os pares críticos dos diterpenos alvo. A coluna *Waters BEH C8* não apresentou separação satisfatória para os diterpenos (resolução abaixo de 1,5). Ambas colunas *Waters Acquity HSS T3* e *Acquity BEH Shield RP18* apresentaram resolução entre os diterpenos de interesse dentro do critério de aceitação ($R_s > 1,5$). No entanto, foi observado a troca da ordem de eluição do ACAU e ABEN quando comparado os perfis cromatográficos obtidos com as duas colunas, o que pode ter sido causado pela menor taxa de recobrimento da fase ligada (*carbon load*) na coluna *HSS T3* a qual apresenta 11% de *carbon load* comparada a *Shield RP18* o qual apresenta 17%.¹⁵³ Uma menor taxa de recobrimento representa um maior espaçamento entre as cadeias ligantes consequentemente apresentando um menor efeito estérico para “entrada” do ACAU (menor tamanho) em comparação ao ABEN (maior tamanho) aumentando o tempo de retenção do ABEN e invertendo a ordem de eluição. Com a inversão da ordem de eluição do ACAU e ABEN na coluna *Waters HSS T3* a resolução entre o par crítico ACAU-ABEN foi de 1,8, enquanto que com o uso da coluna *Waters BEH Shield RP18* foi observado R_s de 3,7 (Figura 21). Desta forma a coluna escolhida para o método final foi a *Waters BEH Shield RP18* a qual apresentou maiores R_s entre os diterpenos.

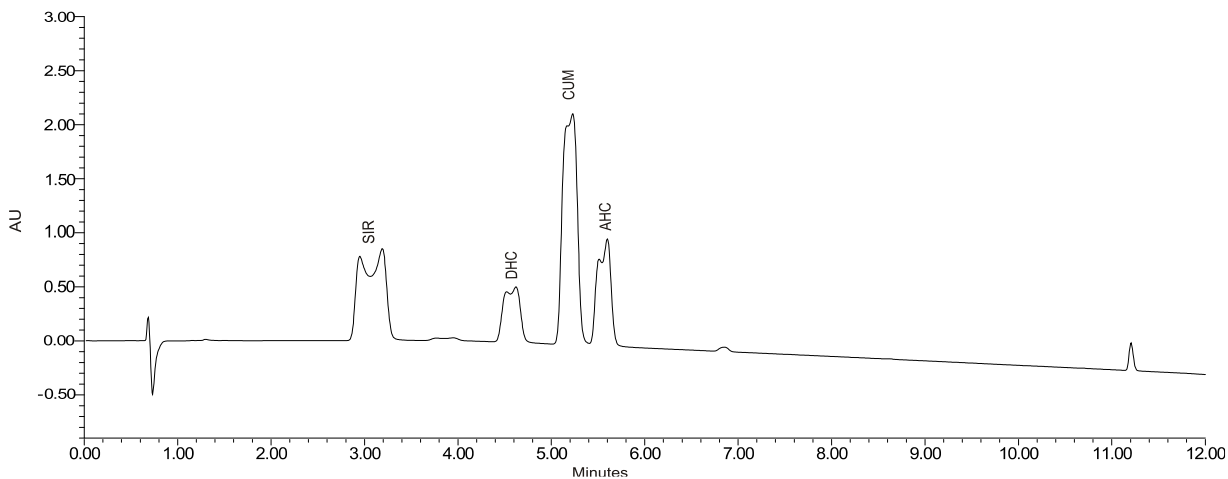
Figura 21. Eluição dos diterpenos com as colunas HSS T3 e *Shield RP18* (210nm).



Efeito diluente foi observado (Figura 22) usando etanol 85% como diluente final, sendo observado a quebra dos picos devido à alta porcentagem de solvente orgânico no diluente final (85% etanol) comparando-se à concentração baixa de solvente

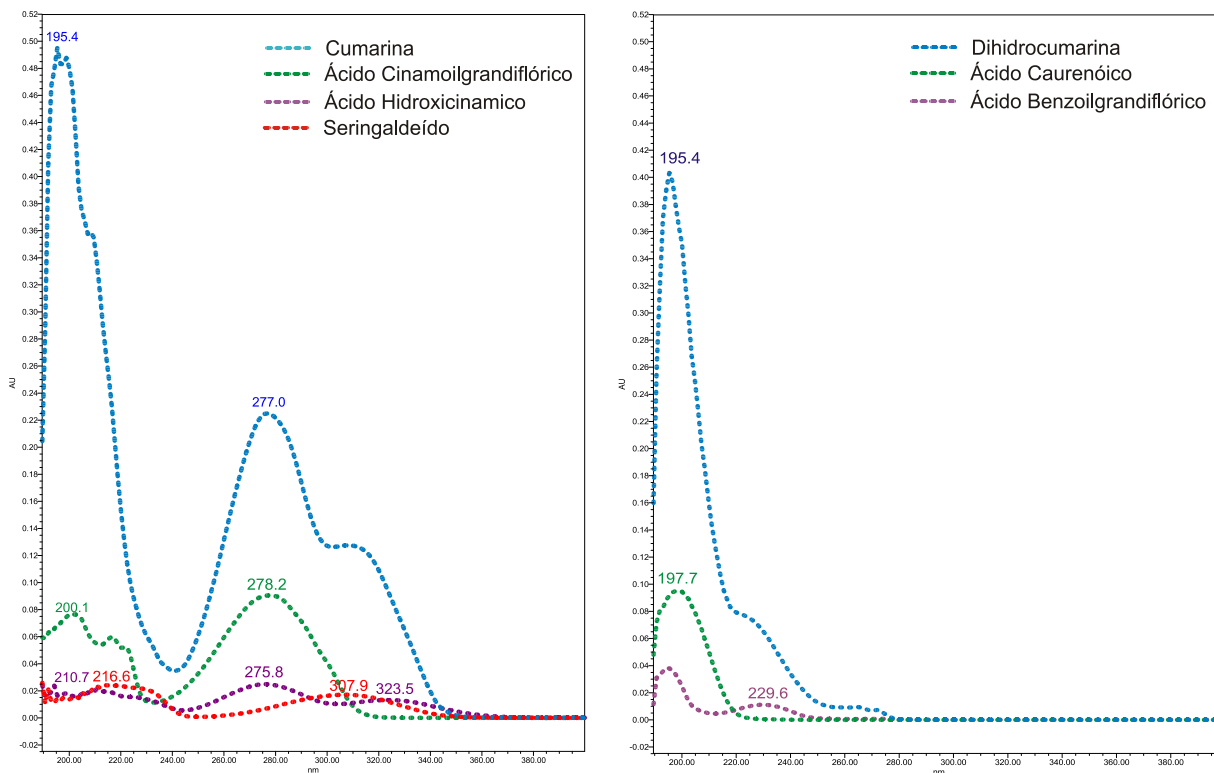
orgânico no início do gradiente.¹⁰⁶ Diluente final usado foi etanol 30% para evitar esse efeito.

Figura 22. Efeito diluente usando etanol 85% como solvente final.



A seleção dos comprimentos de onda foi feita baseada no comprimento de onda onde cada composto teria máxima absorção no UV (Figura 23).

Figura 23. Espectros de absorção no UV dos padrões validados para avaliação λ .



CUM, SIR, AHC e ACIN serão quantificados em 270 nm, ABEN em 240 nm e ACAU em 210 nm.

Para o método final foi selecionado a coluna *Waters BEH Shield RP18*, acetonitrila como solvente orgânico, pH da fase móvel 2,7 (ácido fórmico 0,1%) e temperatura da coluna de 40°C sendo o método chamado de *DES36* (Tabela 8).

A resolução entre os picos das substâncias alvo para quantificação foram todos maiores de 1,5 e fator de assimetria menor que 2,0 (Tabela 10) método *DES36*.

Tabela 10. Fator de assimetria e resolução dos padrões com picos adjacentes.

Substâncias	Fator de assimetria	Resolução (<i>M. glomerata</i>)	Resolução (<i>M. laevigata</i>)
SIR (270nm)	1.0	SIR - Pico 1: 1,84	SIR - Pico 1: 1,81
CUM (270nm)	1.1		
AHC (270nm)	1.1	DHC - AHC: 2,50	DHC - AHC: 2,5
ACAU (210nm)	1.0	ACAU – ABEN: 2,39	ACAU – ABEN: 2,31
ABEN (240nm)	1.1	ABEN-ACIN: 8,29	ABEN-ACIN: 7,84
ACIN (270nm)	1.0		

Critério de aceitação: Fator de assimetria $\leq 2,0^{57}$, Resolução $\geq 1,5^{55}$, DHC: dihidrocoumarina

Abaixo encontram-se os cromatogramas (210, 240 e 270 nm) das amostras fortificadas de *M. glomerata* (Figura 24, Figura 25 e Figura 26) e *M. laevigata* (Figura 26, Figura 27e Figura 28), obtidos pelo método *DES36*

Figura 24. (A) Cromatograma adquirido em 210 nm do extrato fortificado de *M. glomerata* (DES36), (B) Cromatograma expandido em 210 nm dos diterpenos.

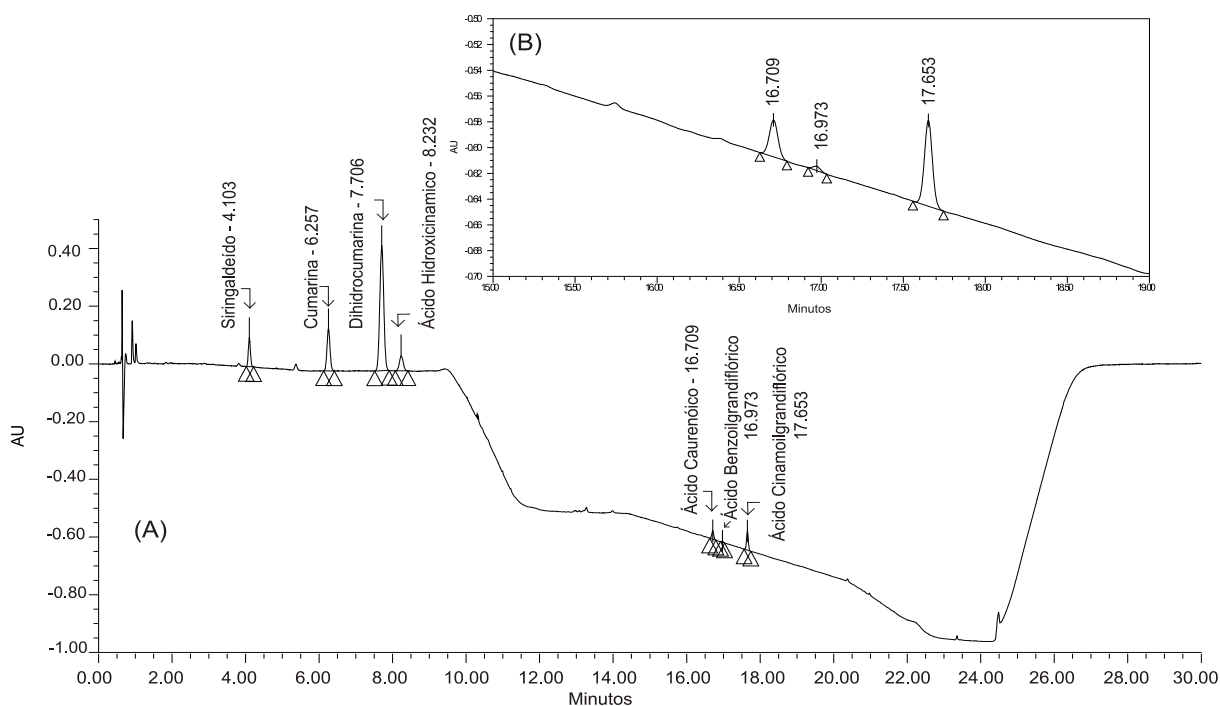


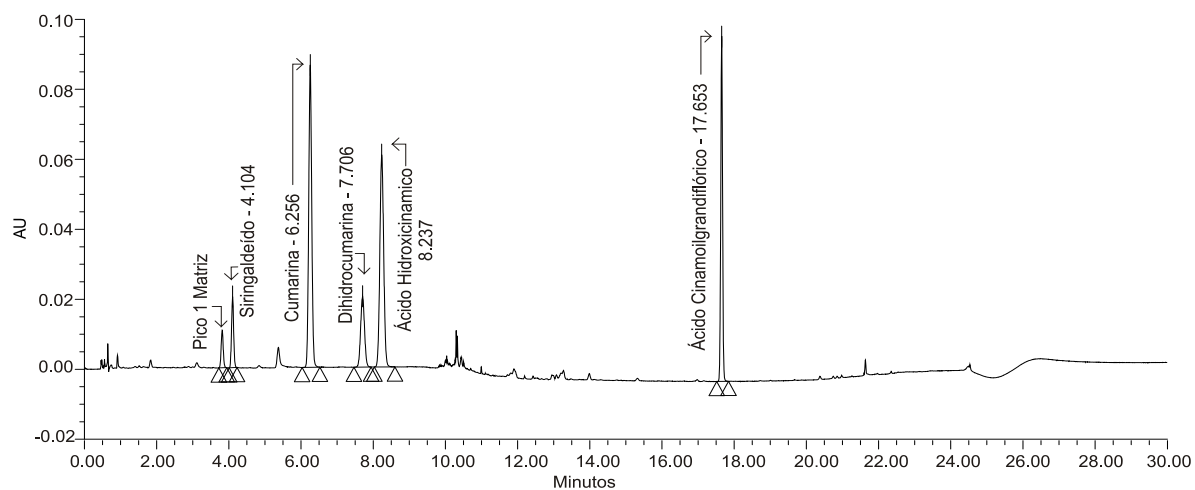
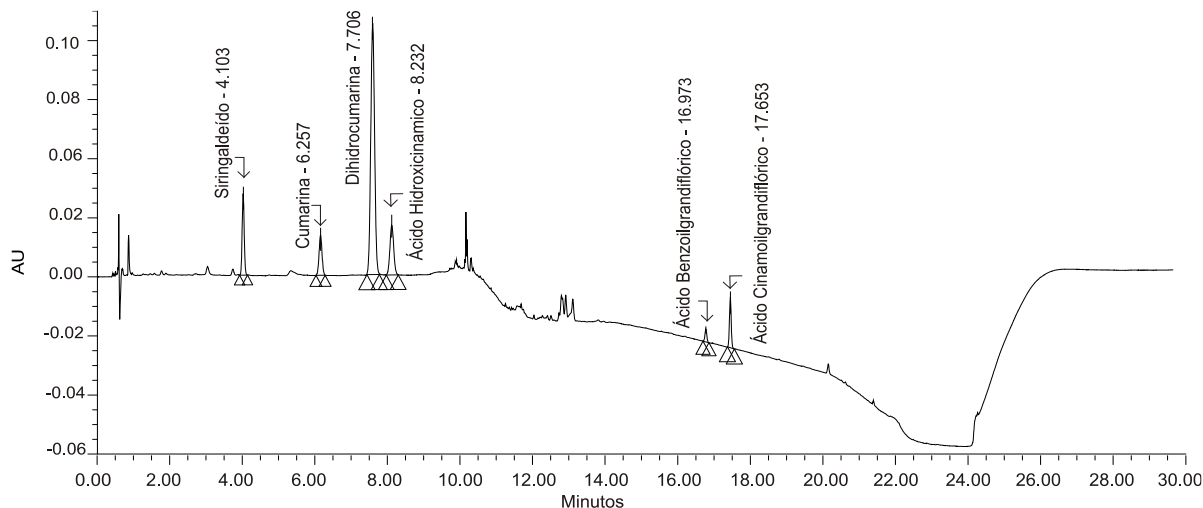
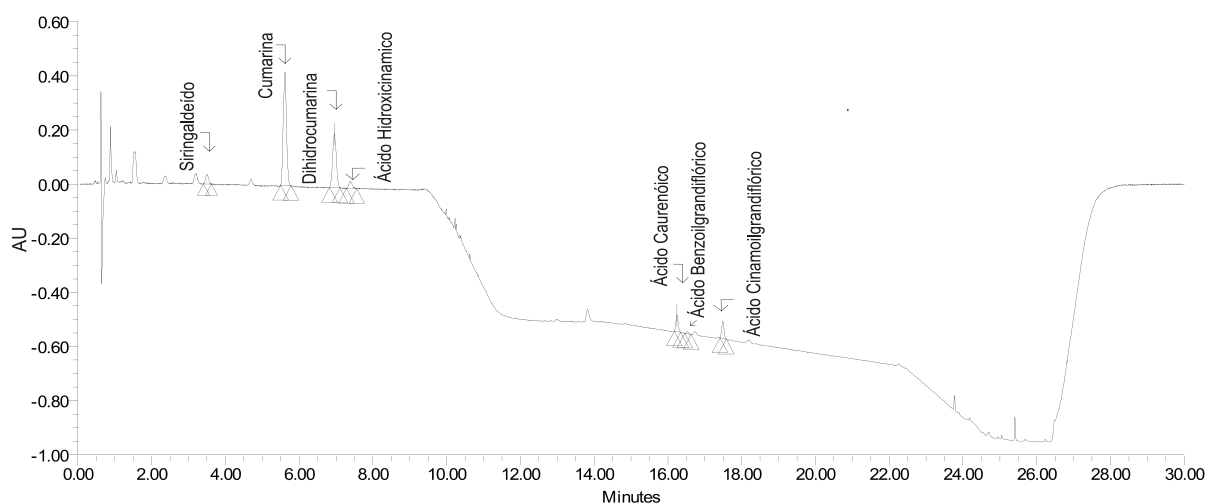
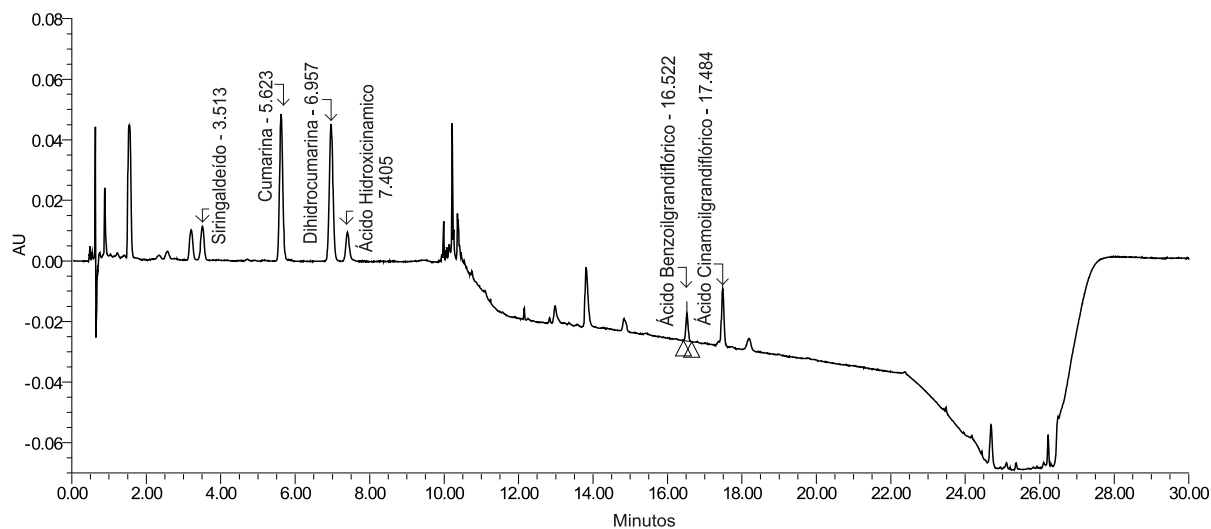
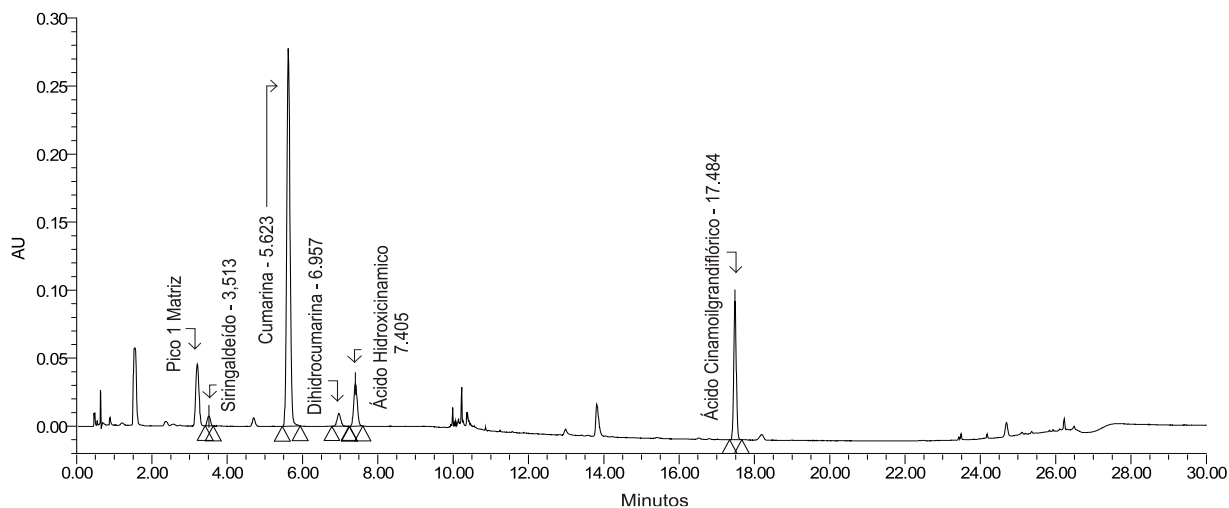
Figura 25. Cromatograma do extrato fortificado de *M. glomerata* – 270 nm.**Figura 26.** Cromatograma do extrato fortificado de *M. glomerata* – 240 nm.**Figura 27.** Cromatograma do extrato fortificado de *M. laevigata* – 210 nm.

Figura 28. Cromatograma do extrato fortificado de *M. laevigata* - 240 nm.**Figura 29.** Cromatograma do extrato fortificado de *M. laevigata* - 270 nm.

2.3.2.2. Estudos de seletividade do método analítico

Nenhuma co-eluição foi observada nos extratos de *M. laevigata* e *M. glomerata* para as substâncias de interesse e outras substâncias adjacentes por LC-MS.

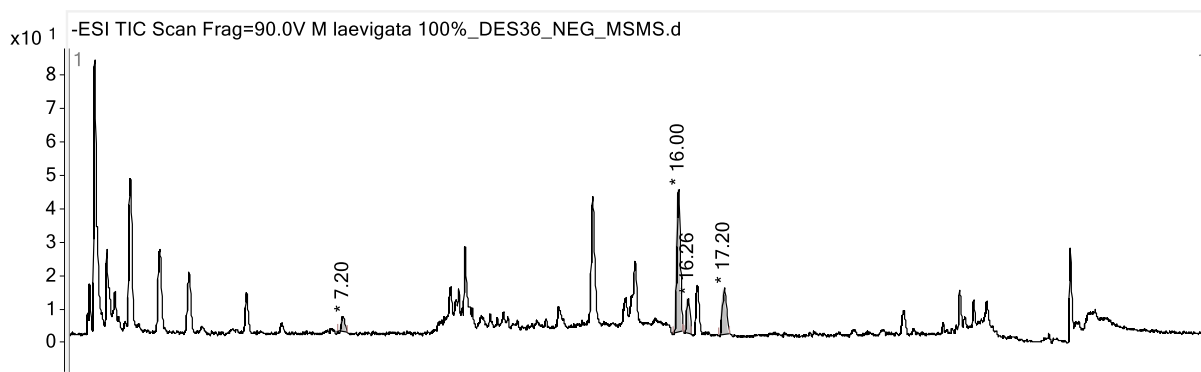
Figura 30. TIC no modo negativo (ESI-) adquirido da amostra *M. laevigata*.

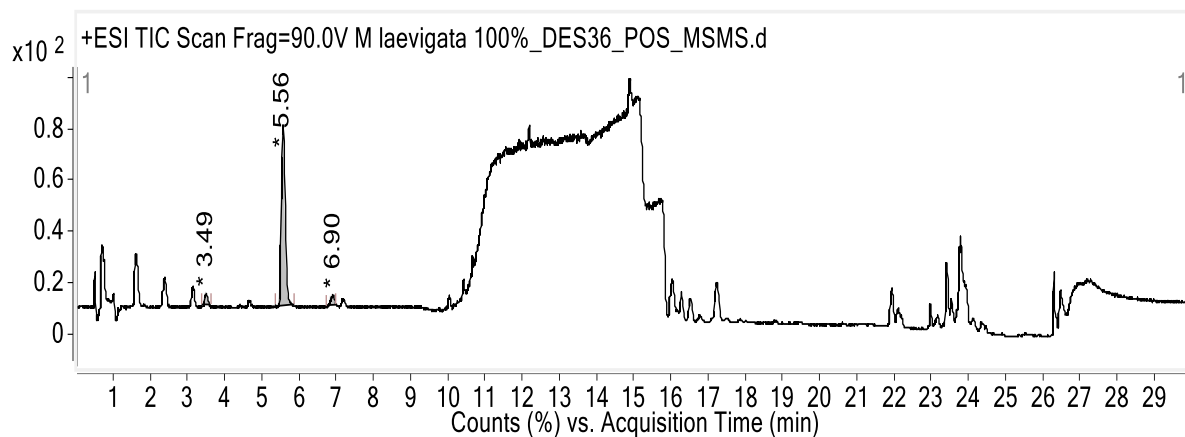
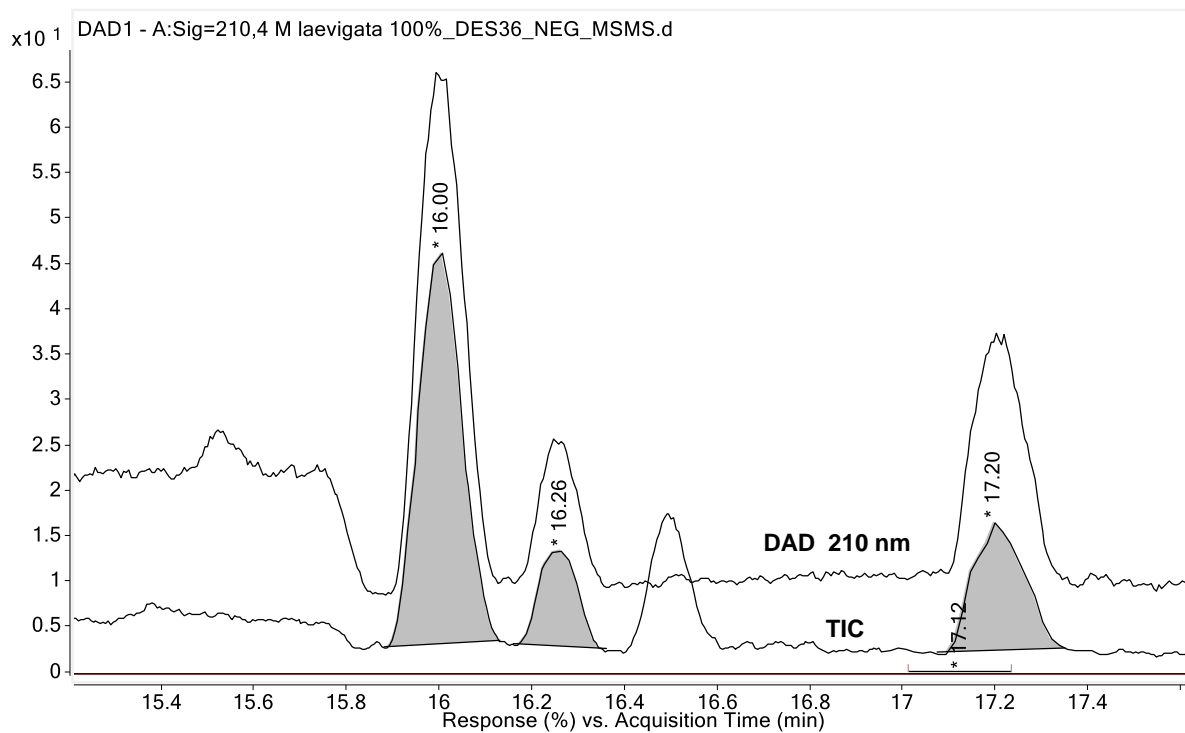
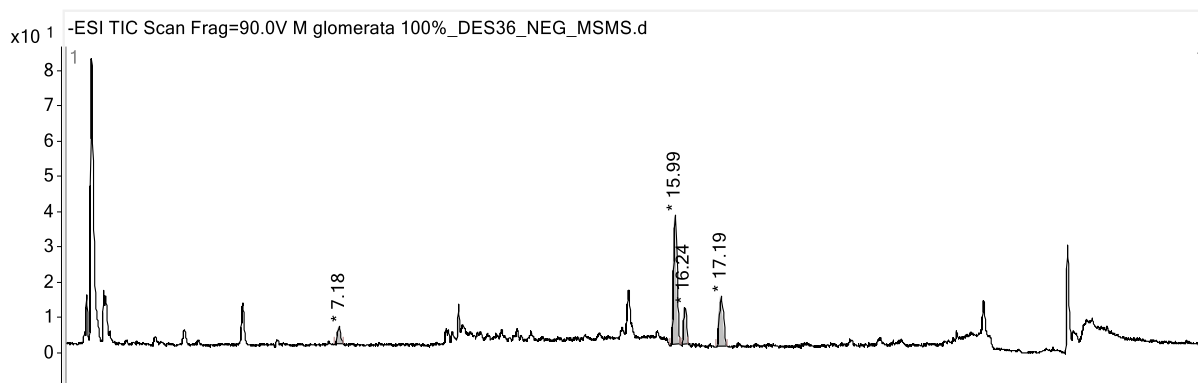
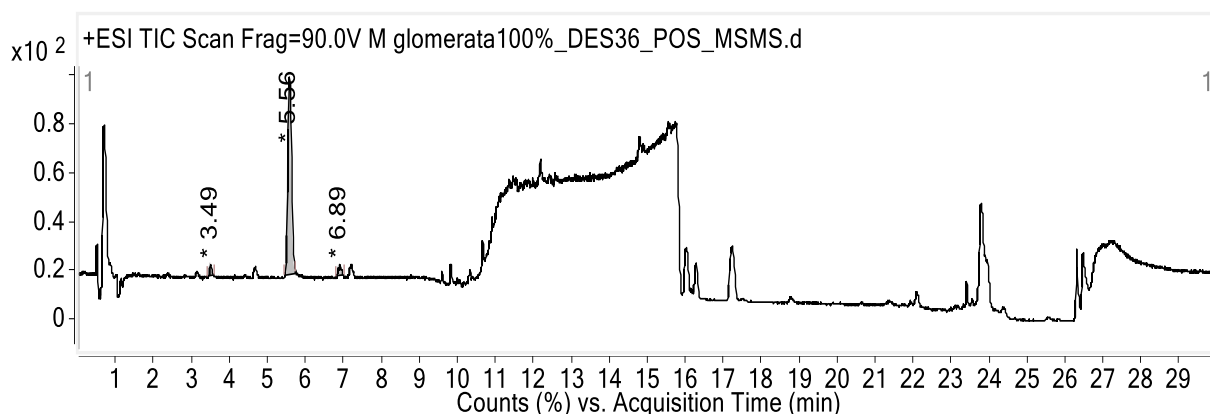
Figura 31. TIC no modo positivo (ESI+) adquirido da amostra *M. laevigata*.**Figura 32.** Sobreposição do TIC (ESI-) e cromatograma obtido em 210 nm de *M. laevigata* em alta escala.**Figura 33.** TIC no modo negativo e positivo (B) para a amostra *M. glomerata*.

Figura 34. TIC no modo positivo adquirido da amostra *M. glomerata*.

Espectros de MS adquiridos para os estudos de seletividade das duas matrizes vegetais (*M. glomerata* e *M. laevigata*) se encontram no Apêndice B.

2.4. Planejamento fatorial aplicado à otimização das condições de extração

Com a finalidade de avaliar as melhores condições de extração das substâncias das espécies de *Mikania* para os estudos metabolômicos não direcionados e direcionados (quantificação dos compostos ACAU, ABEN, ACIN, AHC, SIR e CUM em *Mikania*), diferentes variáveis foram estudadas as quais pudessem impactar na extração dos metabólitos e substâncias de interesse, por meio de um estudo inicial de triagem baseado em planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} seguido de estudos para otimização das condições de extração.

2.4.1. Materiais e Métodos

2.4.1.1. Material vegetal e tratamento das amostras

O total de 91 amostras das folhas de espécies de *Mikania* foram coletadas no Brasil e em países da América do Sul (Apêndice A) e identificadas pelo doutorando Caetano Troncoso Oliveira, sob orientação do Professor Dr. José Rubens Pirani, do Instituto de Biociências da USP. As amostras foram armazenadas em dessecador, (ao abrigo de luz), pulverizadas através de maceração com nitrogênio líquido usando grau e pistilo, homogeneizadas, armazenadas em dessecador e refrigeradas.

2.4.1.2. Preparo das amostras

Para o estudo de triagem usando planejamento fatorial fracionário, 5 mg das folhas previamente pulverizadas de todas as espécies disponíveis de *Mikania* foram misturadas e 10 mg da mistura foi submetida a extração em ultrassom com 2

mL do solvente extrator conforme Tabela 11 e Tabela 12. Para os estudos de otimização usando planejamento do composto central (PCC) o mesmo procedimento foi realizado porém condições de extração se encontram nas Tabela 13 e Tabela 14.

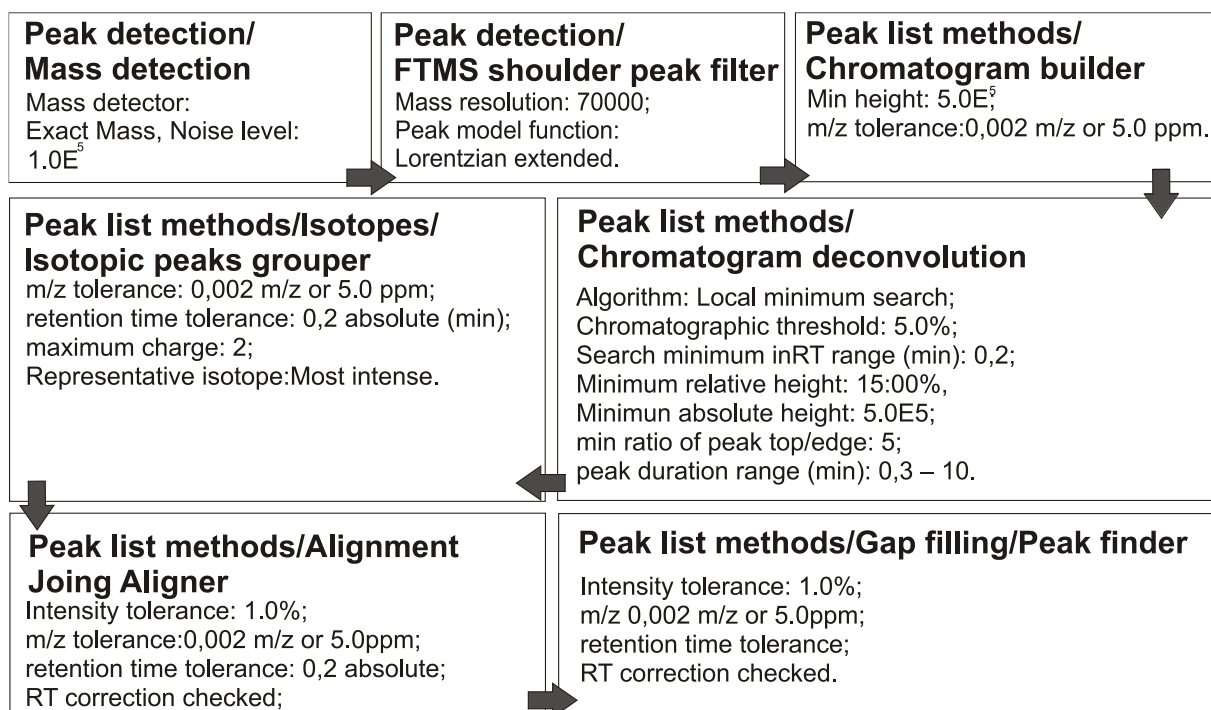
2.4.1.3. Análise por UHPLC-MS

Os dados foram obtidos por UHPLC-MS (*Thermo Scientific UltiMate 3000 XRS* - *Exactive Plus Orbitrap™*), usando os métodos *DES36* (Tabela 8) e *MetMS2*: Modo: ESI(+) e ESI(-) (*polarity switching*), faixa: 50-1500 *m/z*, *Spray Voltage*: 3600V (ESI+) e 3200 V (ESI-); temperatura do capilar: 320 °C; faixa para MS²: 50-1500 *m/z*, energia de colisão (HCD): 35 eV. Software de aquisição usado foi *Xcalibur 2.2* (Thermo Scientific).

2.4.1.4. Pré-processamento dos dados para os estudos de triagem

Os dados brutos de LC-MS obtidos com *Orbitrap* em formato *.raw* foram separados nos modos positivo e negativo usando-se *ProteoWizard MSconvert* (EUA) e convertidos para o formato *.mzXML*. Em seguida os dados foram exportados para o software *MZmine 2.11* (*MZmine Development Team*) e submetidos a uma série de pré-processamentos conforme fluxograma representado na Figura 35.

Figura 35. Fluxograma de critérios e parâmetros para processamento de dados no software *Mzmine 2.11* para o estudo de otimização de extração de metabólitos.



Os dados processados foram exportados em formato .csv em *Excel (Microsoft 2013)*, possibilitando o cálculo do total de área e número de picos obtidos no cromatograma de íons totais (TIC) nos modos ESI+/ESI-. Estes resultados foram usados para o cálculo dos contrastes e coeficientes usando *Excel 2013* e *Matlab R2013b (Mathworks)*.

2.4.1.5. Estudos de triagem baseado em planejamento fatorial fracionário

Cinco variáveis foram estudadas, sendo estabelecido o uso do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para este estudo (Tabela 11 e Tabela 12).

Tabela 11. Condições das variáveis independentes com nível superior (+), inferior (1) para o estudo de triagem baseado em planejamento fatorial fracionário.

Variáveis	Domínio Experimental (Níveis)	
	-1	+1
(x_1) Tipo de solvente	MeOH:H ₂ O	EtOH:H ₂ O
(x_2) Proporção de álcool (%)	20%	80%
(x_3) % Ácido fórmico	0	0,1%
(x_4) Ciclos de extração (repetições)	1x	3x
(x_5) Tempo de extração (min)	5 min	30 min

Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para estudo de triagem das condições de extração de metabólitos para análise por LC-UV-MS.

Exp.	Tipo de solvente x_1	Proporção de álcool x_2	% Ácido fórmico x_3	Ciclos de extração x_4	Tempo de extração (min) x_5
1	MeOH:H ₂ O	2:8	-	1X	30 min
2	EtOH:H ₂ O	2:8	-	1X	5 min
3	MeOH:H ₂ O	8:2	-	1X	5 min
4	EtOH:H ₂ O	8:2	-	1X	30 min
5	MeOH:H ₂ O	2:8	0,1%	1X	5 min
6	EtOH:H ₂ O	2:8	0,1%	1X	30 min
7	MeOH:H ₂ O	8:2	0,1%	1X	30 min
8	EtOH:H ₂ O	8:2	0,1%	1X	5 min
9	MeOH:H ₂ O	2:8	-	3X	5 min
10	EtOH:H ₂ O	2:8	-	3X	30 min
11	MeOH:H ₂ O	8:2	-	3X	30 min
12	EtOH:H ₂ O	8:2	-	3X	5 min
13	MeOH:H ₂ O	2:8	0,1%	3X	30 min
14	EtOH:H ₂ O	2:8	0,1%	3X	5 min
15	MeOH:H ₂ O	8:2	0,1%	3X	5 min
16	EtOH:H ₂ O	8:2	0,1%	3X	30 min

As respostas desejadas e monitoradas foram: maximizar (y1) número picos ESI(+), (y2) número de picos ESI(-), (y3) área total dos picos ESI(-) e (y4) área total dos picos ESI(+) monitorados no TIC obtido por UHPLC-MS.

2.4.1.6. Cálculo dos efeitos e estimativa de erros

O cálculo dos efeitos foi feito conforme descrito nas equações Eq.2 e Eq.3.

$$\text{Efeito}_{\text{médio}} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Efeito} = \frac{\sum_{i=1}^{n/2} y_{i(+)} - \sum_{i=1}^{n/2} y_{i(-)}}{n/2} \quad \text{Eq. 3}$$

A Eq. 2 descreve o efeito para a média de todas as observações, enquanto a Eq. 3 descreve o cálculo do efeito para as variáveis e interações usando a diferença entre as médias das observações no nível mais ($y_i(+)$) e as médias das observações no nível menos ($y_i(-)$).^{32,33}

A princípio, a estimativa do erro foi avaliada em um gráfico dos contrastes (efeitos) *versus* valores de z .³² Contrastes possivelmente não significativos, foram excluídos do modelo gerando réplicas, possibilitando o cálculo da variância (s^2 - Eq. 4), graus de liberdade (v) e erro experimental (s). A variância do efeito (s_{ef}^2) foi calculada conforme Eq. 5 (n =número de experimentos) e para avaliação da significância do efeito, o valor crítico (erro crítico) foi calculado conforme Eq 6.

$$\text{Variância}_{\text{experimental}} = \frac{\sum_{i=1}^n v \cdot s^2}{\sum_{i=1}^n v} \quad \text{Eq. 4}$$

$$\text{Variância}_{\text{efeito}} = \sum_{i=1}^n a_i^2 s_i^2, \quad \text{sendo } a = \frac{1}{n/2} \quad \text{Eq. 5}$$

$$\text{Erro}_{\text{crítico}} = \sqrt{s_{ef}^2} \cdot t_{(g,l,0,05)} \quad \text{Eq. 6}$$

Os contrastes (efeitos) com valor superior, em módulo, ao valor crítico, foram considerados significativos ($\alpha=0,05$), e os com valores inferiores, não significativos.

2.4.1.7. Otimização das condições de extração de metabólitos

O planejamento do composto central (PCC) foi realizado para otimização do experimento, permitindo encontrar a região ótima na superfície^{32,33,34} para obtenção das condições que fornecem como resposta um maior número de picos e área total no modo positivo ESI(+) e negativo ESI(-). As duas variáveis significativas observadas

no estudo de triagem (proporção de etanol e % de ácido fórmico) foram consideradas para o estudo de otimização do modelo. Valores de cada variável e seus respectivos níveis se encontram descritos na Tabela 13 e matriz de experimentos na Tabela 14.

Tabela 13. Condições das variáveis independentes com nível superior (+), inferior (1), intermediário (0) e axial (1,414) para otimização usando PCC.

Variáveis	Domínio Experimental (Níveis)				
	-1,414	-1	0	+1	+1,14
(x ₁) Proporção de EtOH (%)	7,58%	30%	50%	70%	98,98%
(x ₂) % Ácido Fórmico	0%	0,03%	0,05%	0,07%	0,1%

Tabela 14. Matriz do planejamento do composto central para duas variáveis.

Exp.	Matriz codificada		Matriz com condições experimentais	
	%EtOH (x ₁)	% ácido fórmico (x ₂)	%EtOH (x ₁)	% ácido fórmico (x ₂)
1	-1	-1	30	0,03%
2	1	-1	70	0,03%
3	-1	1	30	0,07%
4	1	1	70	0,07%
5	0	0	50	0,05%
6	0	0	50	0,05%
7	0	0	50	0,05%
8	-1,414	0	7,58	0,05%
9	0	-1,414	50	0
10	1,414	0	98,98	0,05%
11	0	1,414	50	0,00

As respostas desejadas e monitoradas foram: maximizar (y₁) número picos ESI(+), (y₂) número de picos ESI(-), (y₃) área total dos picos ESI(-) e (y₄) área total dos picos ESI(+) monitorados no TIC obtido por UHPLC-MS. Além disso, as condições devem estar de acordo com o critério de aceitação para os estudos de recuperação dos seis padrões ACAU, ABEN, ACIN, AHC, SIR e CUM na matriz vegetal (seção 2.4.1.13).

2.4.1.8. Cálculo dos coeficientes de regressão do modelo

Os coeficientes de regressão foram calculados conforme Eq. 3, a qual representa o modelo matricialmente, sendo o vetor de regressão b determinado através do método dos mínimos quadrados^{12,13}, definido pela Eq. 7.

$$\hat{y} = Xb \quad (\text{Eq. 7})$$

Sendo:

\hat{y} = vetor das respostas estimadas pelo modelo.

b = o vetor de regressão.

$$b = (X^tX)^{-1}X^ty \quad (\text{Eq. 8})$$

Sendo:

X^t = matriz transposta de X .

$(X^tX)^{-1}$ = matriz inversa do produto da transposta da matriz X com ela mesma.

2.4.1.9. Identificação dos coeficientes significantes

As avaliações de significância para os coeficientes do modelo foram realizadas usando o teste t , com nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$).^{15,16,33} Nesta avaliação foi considerada hipótese nula (H_0) que o valor do coeficiente é não significativo, sendo a decisão tomada da seguinte forma: A hipótese nula será rejeitada quando o valor de $|t_{calc}| \geq t_{tab}$ com 5% de significância ($\alpha=0,05$) ou p-valor $< \alpha$, caso contrário a hipótese não será rejeitada.

2.4.1.10. Estimativa dos erros para os coeficientes

A estimativa dos erros para os coeficientes foi realizada a partir das repetições no ponto central, sendo possível obter a média e a variância das replicatas. A matriz $(X^tX)^{-1}$ apresenta grande influência na variância dos parâmetros de regressão, sendo que o produto desta matriz com o valor da variância obtida através das repetições no ponto central fornece a matriz $V(b)$ (matriz de variância-covariância (Eq. 9)).³³ Os elementos da diagonal da matriz $V(b)$ representam as variâncias dos parâmetros de regressão, na mesma ordem em que elas aparecem na equação de regressão. A raiz quadrada dos elementos da diagonal principal da matriz $V(b)$ determina os valores correspondentes dos erros padrão (s_{coef}) dos coeficientes calculados (Eq. 10).³³ Os cálculos foram feitos usando-se Matlab R2013b (*Mathworks*).

$$V(b) = (X^tX)^{-1} \cdot s^2 \quad (\text{Eq. 10}) \quad s_{coef} = \pm \sqrt{V(b)_{ii}}, \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (\text{Eq. 9})$$

2.4.1.11. Avaliação da capacidade preditiva do modelo

A qualidade do ajuste e capacidade preditiva do modelo foi avaliada através da análise de variância (ANOVA)³³ usando-se o Matlab R2013b (*Mathworks*) e Excel.

A razão entre a média quadrática da regressão (MQreg) pela média quadrática dos resíduos (MQres), foi usada para comparar tais fontes de variação através do teste *F*, levando em consideração seus respectivos números de graus de liberdade (Tabela 15). O mesmo pode ser feito para a razão entre a média quadrática da falta de ajuste (MQfaj) pela média quadrática do erro puro (MQep).⁴⁶ Nesta avaliação foi considerada hipótese nula (H_0) a não diferença entre as fontes de variação comparadas, sendo a decisão tomada da seguinte forma: (a) rejeição da hipótese nula com 5% de significância ($\alpha=0,05$), quando ($|F_{calc}| \geq F_{tab}$). Desta forma o valor estatístico amostral observado é significativo e as fontes de variação comparadas são diferentes e (b) Aceitação da hipótese nula, caso contrário ($|F_{calc}| < F_{tab}$).

Tabela 15. Análise de Variância para regressão múltipla.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MQ)	F_{v_1, v_2}
Regressão	$\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{p - 1}$	$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}}$
Resíduo	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_{res} = \frac{SQ_{res}}{n - p}$	
Total	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$	$n - 1$	$MQ_{tot} = \frac{SQ_{tot}}{n - 1}$	$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$
Erro Puro	$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$	
Falta de ajuste	$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (\hat{y}_{ij} - \bar{y})^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$	

Legenda: p =número de coeficientes, n =número de experimentos m =número de experimentos independentes, \hat{y}_i = resposta prevista, \bar{y}_i = média das respostas experimentais. F = valor para o test f . v_1, v_2 = respectivos graus de liberdade.

2.4.1.12. Superfície de resposta

A superfície de resposta foi plotada usando-se o software Matlab R2013b baseada no seguinte modelo matemático:

$$y = 0,61080 + 0,23414x_1 - 0,21475x_1^2 \quad (\text{Eq. 11})$$

2.4.1.13. Recuperação de substâncias alvos

As condições de extração também foram avaliadas pelo teste de recuperação dos padrões adicionados à matriz vegetal conforme seção 2.5.1.6.

2.4.2. Resultados

2.4.2.1. Estudos de triagem baseado em planejamento fatorial fracionário

Após o preparo e injeção dos 16 experimentos estabelecidos pelo planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} (Tabela 12) seguido do tratamento dos dados brutos as seguintes respostas (y_1 , y_2 , y_3 e y_4) foram obtidas (Tabela 16).

Tabela 16. Respostas obtidas nos estudos de triagem por UHPLC-MS.

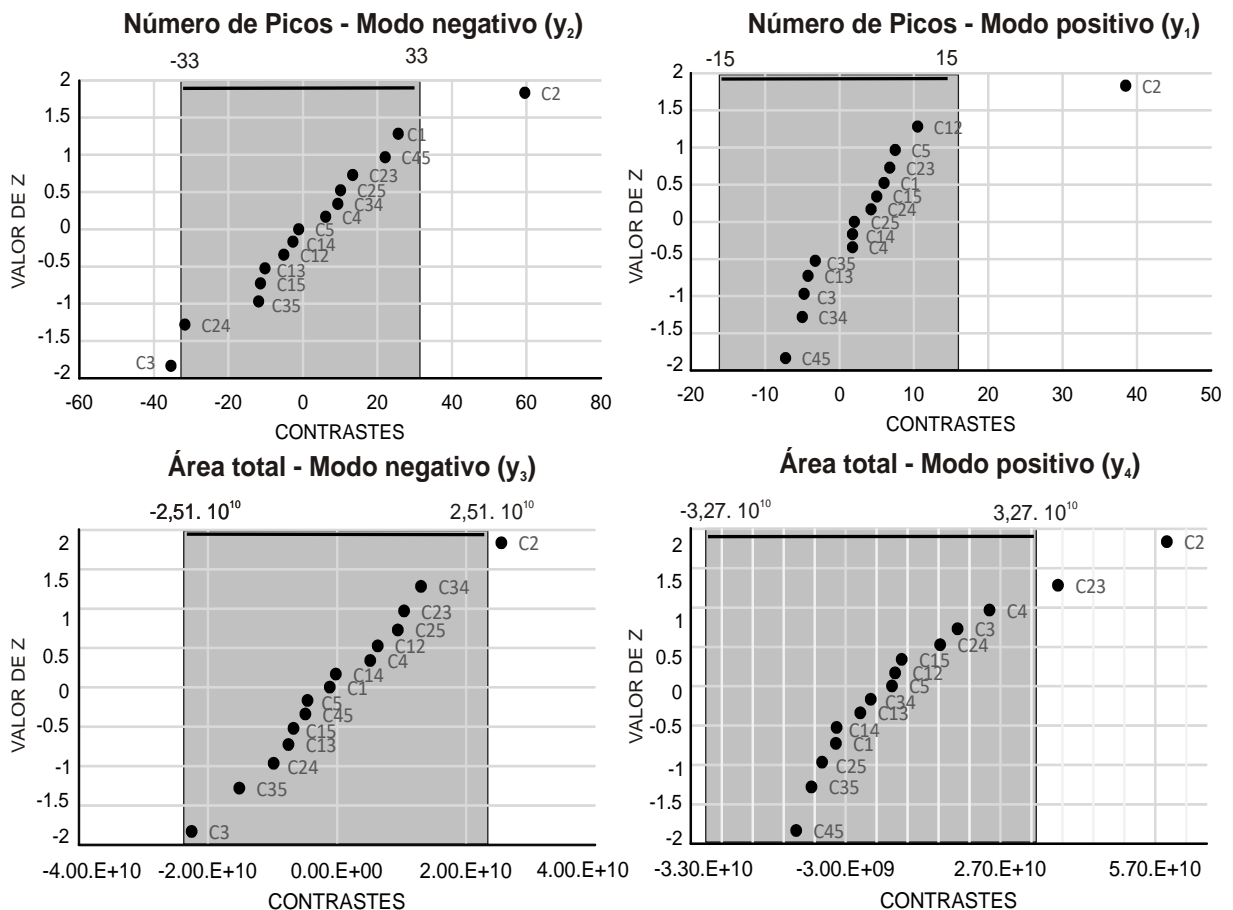
Exp.	Número de picos POS (y_1)	Número de picos NEG (y_2)	Área POS (y_3)	Área NEG (y_4)
1	121	544	192822013252	102456708261
2	103	659	150550938099	136610728631
3	125	612	171692873570	105494595229
4	164	624	198896465269	92844136498
5	111	609	153405266159	92127367550
6	110	556	163002128323	72191607003
7	148	575	229894080511	91095815734
8	145	627	234842577589	108029689938
9	118	582	189984622313	109784964512
10	121	609	184486970788	96718388379
11	142	496	214925803181	27429959364
12	159	563	216564763430	96678983234
13	99	518	165594358875	66388932244
14	97	627	157908092444	98844726333
15	146	642	295776545228	100952194514
16	159	604	269061867352	97687890082

2.4.2.2. Cálculos dos efeitos e estimativa dos erros do estudo de triagem

A princípio, a estimativa do erro foi avaliada em um gráfico dos contrastes *versus* valores de z^{32} (Figura 36). Os contrastes com valor superior, em módulo, ao valor

crítico, foram considerados significativos ($\alpha = 0,05\%$), e os com valor inferior, não significativos. Todos os valores críticos obtidos para as respostas condizem com a identificação dos contrastes mais importantes usando-se os gráficos de probabilidade (Figura 36), com exceção da resposta y_1 (n° picos - POS). Inicialmente, os contrastes C2 e C1 foram considerados significativos para y_1 , mas após a reorganização do planejamento excluindo-se x_3 , x_4 e x_5 , observou-se C1 era inferior ao valor crítico, portanto demonstrando que essa variável pode ser considerada não significativa. Assim as variáveis x_2 (proporção de álcool) e x_3 (% de ácido fórmico) foram mantidas para o refinamento do modelo para se propor um modelo no qual correlacione as variáveis analisadas com as quatro respostas escolhidas.

Figura 36. Gráfico contrastes *versus* valor de z para as respostas y_1, y_2, y_3 e y_4 .



Portanto à partir da triagem, as variáveis (x_1 , x_4 e x_5) consideradas não significativas foram excluídas para a reorganização do planejamento, gerando novas réplicas, possibilitando o cálculo do erro ($\alpha=0,05$) e variância experimental (Tabela 17), sendo estes usados no cálculo do erro dos contrastes e erro crítico.

Tabela 17. Cálculo do erro de um contraste após reorganização do planejamento.

Y	Var. Sign.	N° réplicas	g.L	Variância Exp.	Erro Exp.	Variância Contr.	Erro Contr.	Valor Crítico
y ₂	x ₂ , x ₃	4	12	927,2	30	231,8	15	33
y ₃	x ₂ , x ₃	4	12	2,7.10 ²⁰	1,6.10 ¹⁰	1,3.10 ²⁰	1,1.10 ¹⁰	2,5.10 ¹⁰
y ₁	x ₁ , x ₂	4	12	94,6	10	47,3	7	15
y ₄	x ₂ , x ₃	4	12	4,5.10 ²⁰	2,2.10 ²⁰	2,2.10 ²⁰	1,5.10 ¹⁰	3,3.10 ¹⁰

2.4.2.3. PCC aplicado à otimização das condições de extração

O PCC foi realizado para otimização do experimento, permitindo encontrar a região ótima na superfície^{32,33,34} para obtenção das condições que fornecem como resposta um maior número de picos e área total no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-). Para as respostas y₁, y₂ e y₄ foi observado que as diferentes variáveis eram não significativas. Portanto, a criação da superfície de resposta foi baseada somente na resposta y₃ (área dos picos em ESI-).

Tabela 18. Análise de variância para regressão múltipla usando-se a resposta y₃.

Fonte de Variação	SQ	g.L	MQ	F _{calc.}	F _{tabelado}
Regressão (REG)	2,64.10 ¹⁵	5	5,27.10 ¹⁴	(F ₁) 46,61	F ₁ : 5,05 (5 e 5 g.l.)
Resíduos (RES)	5,65.10 ¹³	5	1,13.10 ¹³		
F. Ajuste (FAJ)	5,00.10 ¹³	3	1,67.10 ¹³	(F ₂) 5,10	F ₂ : 19,16 (3 e 2 g.l.)
Erro Puro (EP)	6,53.10 ¹²	2	3,27.10 ¹²		
Total	2,69.10 ¹⁵	10	2,69.10 ¹⁴		

Nota-se que $F_{1\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ ($\alpha = 0,05$), evidenciando que as fontes de variação REG e RES são estatisticamente diferentes. Sendo assim, o modelo é capaz de prever de forma adequada a resposta monitorada. Sendo $F_{2\text{calc}} < F_{\text{tab}}$, pode-se dizer que as fontes de variação FAJ e EP são estatisticamente iguais, não havendo discrepância entre a resposta do modelo de previsão e a média das replicatas realizadas. A partir do primeiro modelo gerado, foi avaliado quais coeficientes gerados eram significantes, empregando-se o teste t ($\alpha = 0,05$) (Tabela 19). Como não houve falta de ajuste, a MQres pôde ser usada como estimativa da variância dos coeficientes, as quais foram ponderadas para cada coeficiente. O erro crítico pôde ser obtido pela multiplicação do erro de cada coeficiente pelo valor de t_{tab} (com 4 g.L. e $\alpha = 0,05$). Analisando a Tabela 19 e o gráfico dos coeficientes (Figura 37), verifica-se que b₂ se confunde com seu erro ($t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ e $p < \alpha$), portanto este pôde ser eliminado para o recálculo.

Figura 37. Gráfico dos coeficientes de regressão gerados no estudo de otimização por PCC e seus intervalos de confiança.

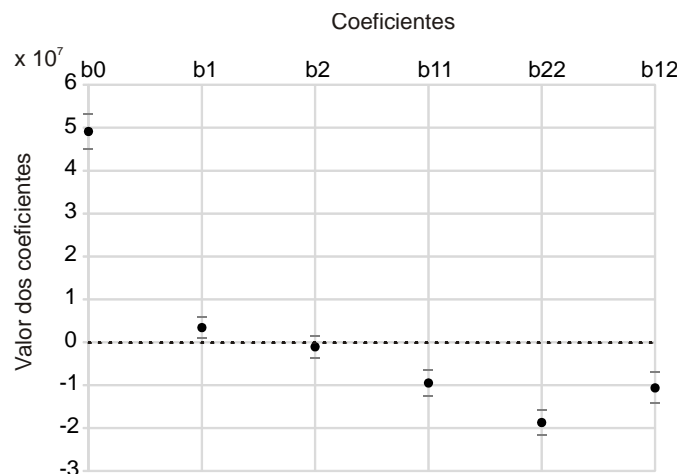


Tabela 19. Avaliação dos coeficientes de regressão gerados pelo modelo no estudo de otimização por PCC.

	Coeficientes	Erro crítico	t_{calc}	p	*t_{tab}	
b ₀	49066666,67	1043823,59	47,01	0,00		<i>Significativo</i>
b ₁	3391902,794	639208,795	5,31	0,03		<i>Significativo</i>
b ₂	-1106233,737	639208,795	1,73	0,23	2,13	Não Significativo
b ₁₁	-9527708,333	760810,644	12,53	0,01		<i>Significativo</i>
b ₂₂	-18717708,33	760810,644	24,61	0,00		<i>Significativo</i>
b ₁₂	-10667500	903977,748	11,80	0,01		<i>Significativo</i>

* t_{tab} com 95% confiança e 4 g.L.

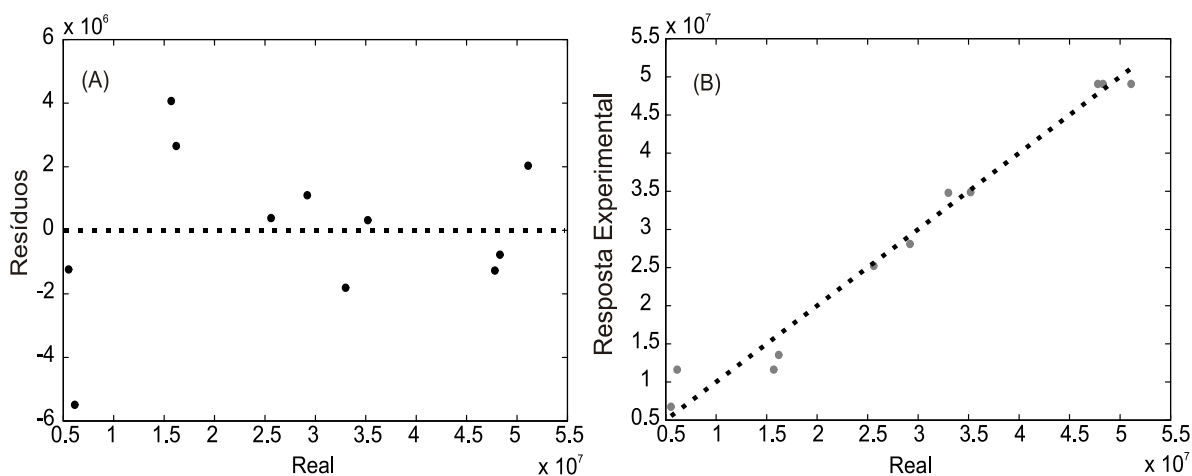
Com o recálculo, observa-se o aumento da razão MQ_{reg}/MQ_r (59,37), evidenciando uma melhor capacidade preditiva do modelo (Tabela 20).

Tabela 20. Análise de variância para regressão múltipla após recálculo do modelo no estudo de otimização por PCC.

Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc.}	F_{tabelado}
Regressão	2,63.10 ¹⁵	4	6,56.10 ¹⁴	59,37	4,53 (4 e 6 g.L)
Resíduos	6,63.10 ¹³	6	1,11.10 ¹³		
F. Ajuste	1,14.10 ¹³	3	4,81.10 ¹²	0,27	9,27 (3 e 3 g.L)
Erro Puro	5,19.10 ¹³	3	1,73.10 ¹³		
Total	2,69.10 ¹⁵	10	2,69.10 ¹⁴		

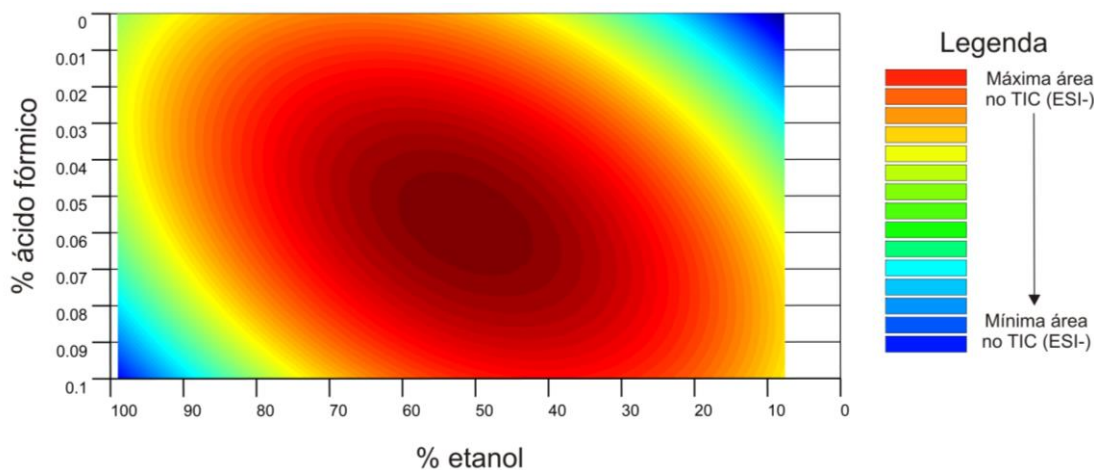
Para se observar se toda variação em torno da média foi explicada pela regressão pode-se também, além do teste F, avaliar o valor do coeficiente R²:0,975, Q²:0,981 e o gráfico dos resíduos³⁴ (Figura 38).

Figura 38. (A) Resíduos *versus* resíduo do modelo e (B) Resposta experimental *versus* resposta prevista pelo modelo ($R^2:0,975$ e $Q^2:0,981$).



Após recalculado, os coeficientes gerados foram usados para a criação de uma superfície de resposta a qual correlaciona as variáveis x_1 (proporção de etanol) e x_2 (% de ácido fórmico) e resposta y_3 (área total no ESI-) (Figura 39).

Figura 39. Superfície de resposta gerada da otimização das condições de extração.



A escolha da condição ideal foi feita a partir da região de máximo da superfície (região vermelha) em conjunto com estudos de recuperação (item 2.4.2.4) dos seis metabólitos alvo escolhidos para serem validados.

2.4.2.4. Recuperação de metabólitos alvos

Inicialmente, a extração das substâncias da matriz de *Mikania* foi feita com etanol 70%, baseado na superfície de resposta na região vermelho mais acentuada (Figura 39). No entanto, foi observado nos estudos de recuperação que as substâncias mais apolares (ACAU, ABEN e ACIN) nas amostras preparadas nos

níveis de 50% a 150%, não apresentavam recuperações dentro dos critérios de aceitação com o uso de etanol 70% como solvente extrator. Visto que a análise de diferentes preparos de amostras tal qual (sem fortificação) apresentam áreas de ACAU, ABEN e ACIN com $DPR < 1,0\%$ concluiu-se que uma outra fonte de variação existia comprometendo a recuperação das substâncias.

A possível saturação do solvente de extração etanol 70% com a concentração final dessas substâncias mais apolares foi considerada relacionada à solubilidade limitada desses metabólitos nessa porcentagem de etanol em presença de outros constituintes da matriz.

Por esse motivo, estudos de recuperação foram conduzidos usando-se como solvente extrator etanol 85%, resultando em recuperação satisfatória para todas as substâncias. Detalhes do estudo de recuperação se encontram descritos na seção 2.5.1.6. A condição de extração para os estudos metabolômicos não direcionados e direcionados mais adequada foi etanol 85% como solvente extrator e extração assistida por ultrassom por 30 min à temperatura de 40°C.

2.5. Validação do método analítico

A validação do método desenvolvido *DES36* (Tabela 8) foi realizada conforme guia do FDA para validação de métodos bioanalíticos³⁷ e RDC N°166 da Anvisa⁴⁰ e Guia N°10 da Anvisa para tratamento estatístico da validação analítica⁸⁵. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão, exatidão, estudos de estabilidade e robustez.

2.5.1. Materiais e Métodos

2.5.1.1. Aquisição e processamento do material vegetal

Cerca de 500 g de folhas de *M. laevigata* foram coletadas, dia 17/12/2014, na USP *campus* de São Paulo, pelo botânico Caetano Troncoso, o qual conferiu a autenticidade do material. O material foi seco em estufa a 50°C por dois dias e pulverizado em moinho de facas. Amostra da espécie *M. glomerata* foi processada conforme seção 2.1.1.1.

2.5.1.2. Método de análise e equipamento

O método desenvolvido (Tabela 8) foi validado usando-se UHPLC-DAD-MS (UHPLC Agilent 1290 - QToF 6540 Agilent) e software Waters Empower 3.

2.5.1.3. Preparo das amostras

2.5.1.3.A. Solução estoque A: Concentração final de 0,0714 mg/mL de SIR e AHC; 0,714 mg/mL de CUM e ACAU (Fração F1.2: 88% ACAU e 10,55% ABEN) e 0,357 mg/mL de ACIN (Fração F2: 98,68%), em Etanol.

2.5.1.3.B. Amostra fortificada: 35,7 mg do pó das folhas de *M. glomerata* e *M. laevigata* foi transferido para balão de 5 mL e fortificado com solução estoque A conforme concentração final de interesse (Tabela 21).

Tabela 21. Preparo das amostras fortificadas nos níveis de 50% a 150%.

Nível	Volume Sol. Estoque A (µL)	Concentração Final (µg/mL)	Concentração Final (%)
150%	750 µL	ABEN,AHC,SIR: 3,75 µg/mL ACAU,CUM: 37,5 µg/mL ACIN: 18,75 µg/mL	ABEN,AHC,SIR: 0,150% ACAU,CUM: 1,50% ACIN: 0,750%
125%	625 µL	ABEN,AHC,SIR: 3,125 µg/mL ACAU,CUM: 31,3 µg/mL ACIN: 15,625 µg/mL	ABEN,AHC,SIR: 0,125% ACAU,CUM: 1,25% ACIN: 0,625%
100%	500 µL	ABEN,AHC,SIR: 2,5 µg/mL ACAU,CUM: 25,0 µg/mL ACIN: 12,5 µg/mL	ABEN,AHC,SIR: 0,1% ACAU,CUM: 1,0% ACIN: 0,5%
75%	375 µL	ABEN,AHC,SIR: 1,875 µg/mL ACAU,CUM: 18,8 µg/mL ACIN: 9,375 µg/mL	ABEN,AHC,SIR: 0,075% ACAU,CUM: 0,75% ACIN: 0,375%
50%	250 µL	ABEN,AHC,SIR: 1,25 µg/mL ACAU,CUM: 12,5 µg/mL ACIN: 6,25 µg/mL	ABEN,AHC,SIR: 0,050% ACAU,CUM: 0,50% ACIN: 0,250%

O volume foi completado para proporção final de etanol 85% e a amostra agitada por 1 min, sonicada por 30 minutos a 40°C. Em seguida, 700 µL do sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 2 mL e o volume completado com água (solvente final foi etanol 30%). A solução final foi filtrada por membrana PTFE de 0,22 µm.

2.5.1.3.C. Amostra tal qual: Conforme item 2.5.1.3.B com exceção da adição dos padrões.

2.5.1.3.D. Solução padrão STD: Solução estoque A foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL conforme concentração final de interesse (Tabela 21). O volume foi completado para proporção final de etanol 85% e a amostra agitada por 1 min,

sonicada por 30 min a 40 °C. Em seguida, 700 µL do sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 2 mL e o volume completado com água (solvente final foi etanol 30%).

2.5.1.4. Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi avaliada através de cinco injeções de uma solução contendo os padrões na concentração do nível 100% (2.5.1.3.B) em etanol 30% como diluente final sendo avaliado: resolução entre pares críticos, fator de cauda e repetibilidade da resposta dos picos, avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) da área de cada pico de interesse. Os critérios para cada requerimento foram determinados conforme guia de validação de métodos bioanalíticos do FDA³⁷ e RDC N°166 da Anvisa⁴⁰.

2.5.1.5. Seletividade

Para a análise da seletividade do método uma amostra da matriz vegetal de *M. laevigata* e *M. glomerata* foram fortificadas ao nível de 100% das substâncias alvo para quantificação (seção 2.5.1.3.B). A não co-eluição das substâncias alvo com outra substância da matriz foi avaliada por espectrometria de massa (Agilent QToF 6530).

2.5.1.6. Linearidade e Exatidão

O intervalo de aplicação representa a faixa avaliada que demonstra resultados precisos, lineares e exatos, sendo que essa faixa deve abranger a especificação da matéria-prima vegetal. Desta forma para a determinação de qual faixa de concentração deve ser contemplada com estudo de linearidade, inicialmente foi estimado a faixa de concentrações dos marcadores químicos nas drogas vegetais de *M. glomerata* e *M. laevigata*. Esses dados foram obtidos a partir dos materiais vegetais trabalhados e de dados de teores previamente relatados na literatura⁵.

A linearidade foi determinada através da fortificação da matriz vegetal com as substâncias (SIR, CUM, AHC, ACAU, ABEN, ACIN) sendo utilizado cinco concentrações na faixa de 50% a 150% (em 2,5 mg/mL do extrato) de cada metabólito alvo. Para a análise da linearidade e exatidão foram injetadas em duplicata três amostras fortificadas nos níveis 50%, 75%, 100%, 125% e 150% preparadas conforme seção 2.5.1.3.B e uma amostra tal qual preparada conforme seção 2.5.1.3.C. Os cálculos de recuperação dos compostos foram feitos através da razão da

concentração do composto obtido na análise para cada nível pela concentração conhecida adicionada, sendo:

$$\text{Concentração obtida (mg/mL)} = \frac{(A_{am} - A_{tq})}{A_{pd}} \times C_{pd} \quad \text{Eq.12}$$

Legenda:

A_{am} = Área média composto na amostra fortificada.

A_{tq} = Área média composto na amostra tal qual.

A_{pd} = Área média padrão à 100%.

C_{pd} = Concentração do Padrão à 100%.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Conc. composto adicionada}}{\text{Conc. obtida}} \times 100 \quad \text{Eq.13}$$

A linearidade das substâncias em solvente (sem o uso da matriz vegetal) também foi avaliada na faixa de 50% a 150%. Para a linearidade dos padrões sem a matriz vegetal, as soluções foram preparadas conforme 2.5.1.3.D.

A exatidão do método analítico foi avaliada em cada nível (150%, 125%, 100%, 75% e 50%) sendo os critérios de aceitação: desvio padrão relativo da triplicata em cada nível deve ser não mais que 5% e a recuperação de cada composto deve estar entre 85% a 115%³⁷.

A linearidade foi avaliada baseada nos critérios da RDC N°166 da Anvisa⁴⁰ e Guia N°10 da Anvisa para tratamento estatístico da validação analítica⁸⁵ publicados em 2017. O modelo matemático que descreve a relação da resposta analítica (área) em função da variável concentração foi estimado através da análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_{1ij} + \varepsilon_{ij} \quad \text{para } j = 1, \dots, n_i \text{ e } i = 1, \dots, k \quad \text{Eq. 14}$$

Sendo:

Y_{ij} : variável aleatória e representa o valor da variável resposta;

x_{ij} : são as variáveis explicativas;

ε_{ij} : variável aleatória que representa o erro experimental;

β_0 e β_1 : parâmetros do modelo estimados, e que definem a reta de regressão;

n_i : número de réplicas no nível i de concentração e k é o número de níveis.

$n = \sum_{i=1}^k n_i$ é o tamanho da amostra

Desta forma o coeficiente linear (β_0) e angular (β_1) foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, considerando as seguintes hipóteses:

(I) A relação matemática entre y e x é linear;

(II) Resíduos têm distribuição normal e a média do erro é nula, ou seja, $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$;

(III) Para qualquer valor de x , a variância de ε_{ij} é sempre σ^2 , portanto os resíduos são homocedástico $Var(\varepsilon_{ij}) = Var(Y_{ij}) = \sigma^2$. O erro de uma observação deve ser independente do erro de outra observação (não estar correlacionados), sendo, $Cov(\varepsilon_{ij}, \varepsilon_{i'j'}) = 0$, para $i \neq i'$ ou $j \neq j'$.

Para avaliação se realmente existe uma relação linear entre a área e concentração de cada composto alguns parâmetros foram avaliados como:

(I) Avaliação da significância do coeficiente linear (β_0) e angular (β_1): Teste t.

$$\text{Hipóteses } \begin{cases} H_0: \beta_0 = 0 \\ H_1: \beta_0 \neq 0 \end{cases} \quad \text{e} \quad \begin{cases} H_0: \beta_1 = 0 \\ H_1: \beta_1 \neq 0 \end{cases}$$

Tomada de decisão: Não rejeita H_0 quando $|t_{calc}| \geq t_{tab}$ com 5% de significância ($\alpha=0,05$), caso contrário H_0 é rejeitado.

Nos casos que o coeficiente do intercepto foi considerado estatisticamente significativo, a significância da magnitude na resposta analítica foi avaliada $Magnitude = (\hat{\beta}_0 / Resposta\ analítica) * 100$. Foi considerado não significativo magnitude de até 2%.¹⁴⁹

(II) Avaliação capacidade preditiva do modelo de regressão: Análise de Variância (ANOVA) e avaliação do coeficiente de determinação (r^2).

Tomada de decisão: Boa capacidade preditiva do modelo $|F_{calc}| \geq F_{tab}$ com 5% de significância ($\alpha=0,05$) e g.L da regressão e resíduo (sendo $F_{calc} = MQ_{regressão} / MQ_{resíduo}$). Coeficiente de determinação r^2 deve estar acima de 0,99.

(III) Análise dos Resíduos - Teste de Normalidade: Teste de Anderson-Darling.

$$\begin{cases} H_0: \text{resíduos apresentam distribuição normal} \\ H_1: \text{resíduos não apresentam distribuição normal} \end{cases}$$

Tomada de decisão: Não rejeita H_0 quando $p\text{-valor} > 0,05$ ($\alpha=0,05$), caso contrário H_0 é rejeitado.

(IV) Análise dos Resíduos: Diagnóstico de Homoscedasticidade: Breusch-Pagan.

$$\begin{cases} H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_n^2 \\ H_1: \text{pelo menos um dos } \sigma_i^2 \text{ é diferente} \end{cases}$$

Tomada de decisão: Não rejeita H_0 quando $p\text{-valor} > 0,05$ ($\alpha=0,05$), caso contrário H_0 é rejeitado.

(V) Análise dos Resíduos - Teste de Independência: Gráfico de Resíduos padronizados versus ordem de coleta das observações e Teste de Durbin-Watson.

A partir da tabela de significância de durbin-watson¹⁵⁴ os valores de dU e dL para um regressor e nível de significância de 5% são: dU=1,36 e dL=1,07. Portanto os critérios de avaliação são:

$0 < DW < L$ / $(1 < DW < 1,07)$: Correlação Positiva

$L < DW < U$ / $(1,07 < DW < 1,36)$: Inconclusivo

$U < DW < (4-U)$ / $(1,36 < DW < 2,64)$: Sem correlação

$(4-U) < DW < (4-L)$ / $(2,64 < DW < 2,93)$: Inconclusivo

$(4-L) < DW < 4$ / $(2,93 < DW < 4)$: Correlação Negativa

(VI) Análise Pontos Influentes - Distância de Cook¹⁵⁵

Tomada de decisão: Distância de Cook menor que 1 evidencia a não presença de pontos influentes no modelo.

2.5.1.7. Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação das curvas de calibração preparadas com os seis analitos de interesse em solvente (2.5.1.3.D) e com a amostra fortificada com os seis analitos (2.5.1.3.B) preparadas para a avaliação da linearidade. As curvas foram preparadas em cinco níveis de concentração e em triplicata.

Considerando o modelo de regressão linear (Eq. 17) e uma variável *dummy* (X_{i2}), as curvas foram comparadas.

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \beta_3 X_{i1} X_{i2} + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, \dots, n \quad \text{Eq. 15}$$

Sendo:

Y_{ij} : variável resposta (Área)

β_0 : intercepto, β_1 é o coeficiente referente à concentração, β_2 : é o coeficiente referente ao efeito matriz;

β_3 : é o coeficiente referente a interação das variáveis X_{i1} e X_{i2} ; X_{i1} variável concentração, X_{i2} variável ref. ao efeito matriz

ε_{ij} é o erro experimental

$$\text{Efeito Matriz} = \begin{cases} X_{i2} = 0, & \text{sem efeito} \\ X_{i2} = 1, & \text{com efeito} \end{cases}$$

As curvas na matriz vegetal e em solvente foram comparadas para todos os compostos através dos testes: Teste de Paralelismo⁸⁶, Teste de Igualdade de Intercepto⁸⁶ e Teste de Retas Coincidentes⁸⁶. As hipóteses usadas foram:

Paralelismo (coeficiente angular)	Igualdade do intercepto (coeficiente linear)
$\{ H_0: \beta_3 = 0, \text{ Retas paralelas} \}$ $\{ H_1: \beta_3 \neq 0, \text{ Há efeito matriz} \}$	$\{ H_0: \beta_2 = 0, \text{ curvas com mesmo intercepto} \}$ $\{ H_1: \beta_2 \neq 0, \text{ Há efeito matriz} \}$

Retas Coincidentes
 (coeficiente angular e linear)

$$\begin{cases} H_0: \beta_2 = \beta_3 = 0, \text{ Retas coincidentes (mesmo } \beta_0 \text{ e } \beta_1) \\ H_1: \text{ pelo menos um } \beta_i \neq 0, \text{ efeito matriz} \end{cases}$$

Tomada de decisão: Não rejeita H_0 caso $p\text{-valor} > 0,05$ (α) e $|F_{\text{calc}}| < F_{\text{tab}}$, sendo $F_{\text{calc}} = \text{MQ}_{\text{regressão}} / \text{MQ}_{\text{resíduo}}$.

2.5.1.8. Estabilidade

A estabilidade das substâncias alvo em solução foi avaliada injetando uma amostra fortificada no nível 100% e uma tal qual em duplicata, nos seguintes tempos: 0, 14, 26, 33, 39 e 50 horas. A análise foi feita à temperatura ambiente (25°C). A recuperação de cada composto não deve variar mais do que 2,0% da recuperação obtida no tempo 0h.

2.5.1.9. Precisão

A precisão foi avaliada intra-dia (Precisão 1) e inter-dia (Precisão 2). A precisão intra-dia foi verificada por meio de seis preparos individuais de amostras fortificadas a 100% (2.5.1.3.B) da concentração dos marcadores químicos no material vegetal e uma amostra tal qual (2.5.1.3.C). Da mesma maneira, a precisão inter-dia foi determinada no segundo dia consecutivo. A concentração de cada composto no material vegetal foi determinada (Eq.12) e a recuperação calculada conforme Eq. 13.

2.5.1.10. Limite de Quantificação e Limite de Detecção

O limite de quantificação (LQ) e detecção (LD) foi calculado através da extrapolação da curva analítica obtida no teste de linearidade, sendo o LQ expresso pela Eq. 16 e LD pela Eq. 17:

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad \text{Eq. 17}$$

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad \text{Eq. 16}$$

Sendo “s” o desvio padrão do intercepto da curva analítica e “S” a inclinação da curva. Uma amostra de cada padrão foi preparada na concentração de LQ e LD para confirmar se no LQ teríamos razão sinal/ruído (s/r) ≥ 10 e no LD, s/r ≥ 3.

2.5.1.11. Robustez

A robustez do método foi avaliada pela análise comparativa de amostras analisadas nas condições estabelecidas com algumas variações: temperatura da coluna (36°C e 42°C), porcentagem de ácido fórmico na solução A (0.09% e 0.11%) e vazão (0,36 mL/min e 0,44 mL/min). Uma amostra tal qual e uma amostra fortificada a 100% de *M. glomerata* e *M. laevigata* foram avaliadas. Critérios de aceitação foram recuperação entre 85% a 115% e $R_s \geq 1,5$ entre todos os pares críticos.

2.5.2. Resultados

2.5.2.1. Seletividade

A seletividade foi estudada após o desenvolvimento do método analítico conforme item 2.3.2.2.

2.5.2.2. Linearidade e Exatidão

O intervalo de aplicação representa a faixa avaliada que demonstra resultados precisos, lineares e exatos, sendo que essa faixa deve abranger a especificação da

matéria-prima vegetal. Desta forma, para a determinação da faixa de concentração a qual deve ser contemplada no estudo de linearidade, a princípio foi estimado a faixa de concentrações das substâncias alvos nas drogas vegetais de *M. glomerata* e *M. laevigata*. Esses dados foram obtidos a partir dos materiais vegetais trabalhados e de dados de teores previamente relatados na literaturas⁵.

Tabela 22. Exatidão e linearidade dos padrão em solbvente.

	Nível	Média Rec. (%)	DPR (%)	R ²	Critério de aceitação
SIR	50%	99,59	0,60	0,9999	Desvio do valor nominal: 105,7% a 94,3% ⁵⁵ %DPR ≤ 2.8%;
	75%	100,79	0,38		
	100%	99,47	0,38		
	125%	100,08	0,19		
	150%	100,03	0,31		
CUM	50%	99,74	0,66	1,0000	Desvio do valor nominal: 104% a 96% ⁵⁵ %DPR ≤ 2.0%;
	75%	100,25	0,50		
	100%	99,89	0,32		
	125%	100,16	0,18		
	150%	99,91	0,32		
AHC	50%	99,98	0,49	1,0000	Desvio do valor nominal: 105,7% a 94,3% ⁵⁵ %DPR ≤ 2.8%;
	75%	99,99	0,28		
	100%	99,98	0,58		
	125%	100,10	0,25		
	150%	99,95	0,35		
ACAU	50%	100,22	0,77	0,9999	Desvio do valor nominal: 104% a 96% ⁵⁵ %DPR ≤ 2.0%;
	75%	99,45	0,50		
	100%	100,09	0,54		
	125%	100,49	0,46		
	150%	99,73	0,57		
ABEN	50%	99,53	0,67	1,0000	Desvio do valor nominal: 105,7% a 94,3% ⁵⁵ %DPR ≤ 2.8%;
	75%	100,61	0,98		
	100%	99,68	0,33		
	125%	100,17	0,30		
	150%	99,93	0,57		
ACIN	50%	99,51	0,56	1,0000	Desvio do valor nominal: 104% a 96% ⁵⁵ %DPR ≤ 2.0%;
	75%	100,10	0,39		
	100%	100,26	0,31		
	125%	100,20	0,69		
	150%	99,78	0,79		

Tabela 23. Exatidão e linearidade da matéria prima vegetal fortificada.

	Nível	<i>M. glomerata</i>			<i>M. laevigata</i>		
		Média Rec. (%)	DPR (%)	R ²	Média Rec. (%)	DPR (%)	R ²
SIR	50%	99,23	0,73	0,9999	101,82	0,40	0,9998
	75%	99,31	0,55		100,48	0,54	
	100%	99,62	0,58		100,77	0,17	
	125%	100,78	0,83		101,90	0,39	
	150%	100,47	0,32		100,94	0,32	
CUM	50%	101,02	0,54	0,9993	99,92	0,67	0,9984
	75%	99,33	0,90		101,43	0,66	
	100%	99,09	0,73		102,13	0,66	
	125%	100,99	0,86		103,32	0,77	
	150%	99,03	0,49		100,15	0,89	
AHC	50%	100,69	1,08	0,9996	100,62	1,24	0,9991
	75%	100,48	0,63		101,91	0,94	
	100%	99,55	0,97		102,24	0,27	
	125%	101,21	0,94		102,00	0,48	
	150%	99,80	0,43		99,91	0,77	
ACAU	50%	100,95	0,99	1,0000	100,02	0,35	0,9999
	75%	100,98	0,79		101,15	1,02	
	100%	101,36	0,47		100,45	1,57	
	125%	100,65	0,51		101,42	0,69	
	150%	100,86	0,71		101,81	0,35	
ABEN	50%	99,50	3,30	0,9999	99,33	0,39	0,9997
	75%	98,18	1,90		101,21	1,04	
	100%	99,45	1,58		99,02	1,16	
	125%	99,31	3,03		99,98	0,14	
	150%	99,44	1,62		100,05	1,16	
ACIN	50%	100,66	4,01	0,9993	101,42	2,39	0,9981
	75%	101,75	4,76		104,16	4,12	
	100%	103,85	4,03		101,84	4,26	
	125%	101,40	4,57		104,65	0,67	
	150%	102,68	3,23		101,29	2,77	

Critério de aceitação: %DPR ≤ 15,0%; Recuperação: 115% a 85%.

(I) Avaliação da significância do coeficiente linear (β_0) e angular (β_1)

Na matriz *M. glomerata* para todas as substâncias observou-se que o coeficiente angular (β_1) é significativo sendo $|t_{calc}| \geq t_{tab}$ com 5% de significância. Para todas substâncias, com exceção do SIR, observou-se que o coeficiente do intercepto (β_0) é não significativo (Tabela 24).

Tabela 24. Estimativa dos coeficientes e avaliação da significância - *M. glomerata*.

Cumarina - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	4454,067	61147288,716	7820	0,6	1,77	Não significativo
β_1	50318,306	90753,710	301	167,0		Significativo
Ácido o-cumárico - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	648,867	1055714,589	1027	0,6	1,77	Não significativo
β_1	68895,097	126328,028	355	193,8		Significativo
Siringaldeído - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	-481,367	25933,117	161	-3,0	1,77	Significativo
β_1	13510,245	3037,152	55	245,1		Significativo
Ácido caurenóico - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	1100,100	768156,288	876	1,3	1,77	Não Significativo
β_1	10196,116	1521,675	39	261,4		Significativo
Ácido benzoilgrandifílico - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	-209,667	71111,341	266	-0,8	1,77	Não Significativo
β_1	11063,676	9801,025	99	111,8		Significativo
Ácido cinamoilgrandiflorico - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	-5973,433	23366689,701	4833	-1,2	1,77	Não Significativo
β_1	32598,180	163557,096	404	80,6		Significativo

* $\alpha=0.05$, g.L. 13

Na matriz *M. laevigata*, observou-se que o coeficiente angular (β_1) é significativo para todas as substâncias, sendo $|t_{calc}| \geq t_{tab}$ com 5% de significância. Para todas substâncias, com exceção do AHC e SIR, observou-se que o coeficiente do intercepto (β_0) é significativo ($|t_{calc}| > t_{tab}$) (Tabela 25).

Para as substâncias que apresentaram coeficiente do intercepto estatisticamente diferente de zero observou-se a significância da magnitude na resposta analítica. A magnitude para os compostos ABEN, ACAU e ACIN em *M. laevigata* foi entre 2%-0.01% sendo considerado não significativo. Para o composto SIR em *M. glomerata* a magnitude foi 2,6% - 0,9% e para CUM em *M. laevigata* foi de 9% a 3%. Portanto, fica evidenciado a importância de se levar a curva de calibração com no mínimo três pontos para rotina e não usar ponto único para quantificação.

Tabela 25. Estimativa dos coeficientes e avaliação da significância - *M. laevigata*.

Cumarina - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	66264,633	62785061,604	7924	8,4	1,77	Significativo
β_1	51987,805	93184,463	305	170,3		Significativo
Ácido o-cumárico - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	9,300	474733,496	689,00	0,01	1,77	Não Significativo
β_1	70452,043	56807,159	238,34	295,6		Significativo
Siringaldeído - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	105,767	40261,749	200,65	0,5	1,77	Não Significativo
β_1	13446,506	4715,247	68,668	195,8		Significativo
Ácido caurenóico - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	-2250,467	83903,443	289,66	-7,8	1,77	Significativo
β_1	10374,913	166,208	12,892	804,7		Significativo
Ácido benzoilgrandifílico - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	-141,467	2077,159	45,576	-3,1	1,77	Significativo
β_1	11072,601	286,287	16,920	654,4		Significativo
Ácido cinamoilgrandiflorico - <i>M. glomerata</i>						
	Coeficientes	Variância	DP	t_{calc}	$*t_{tab}$	Conclusão
β_0	-8305,267	9645257,926	3105,6	-2,7	1,77	Significativo
β_1	33726,136	67512,788	259,83	129,8		Significativo

* $\alpha=0.05$, g.L. 13**(II) Avaliação capacidade preditiva do modelo de regressão**

Para todas as substâncias verificou-se uma boa capacidade preditiva do modelo sendo $|F_{calc}| \geq F_{tab}$ e p-valor < 0.05 (Figura 36).

Tabela 26. Análise de Variância - *M. glomerata* e *M. laevigata*

	<i>M. glomerata</i>		<i>M. laevigata</i>	
	$F_{calc.}$	p-valor	$F_{calc.}$	p-valor
SIR	52098	8,26E-25	33246	1,53E-23
CUM	24192	1,21E-22	25150	9,38E-23
AHC	32576	1,74E-23	75737	7,26E-26
ACAU	59224	3,59E-25	561279	1,61E-31
ABEN	10837	2,22E-20	371163	2,37E-30
ACIN	5644	1,53E-18	14615	3,19E-21

 $F_{tab}(\alpha=0.05, g.L.: 1, 13): 4,7$

(III) Análise dos Resíduos: Teste da normalidade e diagnóstico de homoscedasticidade

Verificou-se que para as seis substâncias não houve evidências para rejeitar a hipótese nula no teste de normalidade usando o teste de Anderson-Darling, uma vez que o p-valor calculado foi superior 0,05. Portanto, conclui-se que os resíduos apresentem distribuição normal (Tabela 27 e Tabela 28).

Tabela 27. Valores da estatística de Anderson-Darling e Breusch-Pagan para validação das substâncias em *M. glomerata*.

	Teste Normalidade		Teste Homoscedasticidade	
	Estatística Anderson-Darling	p-valor	Estatística Breusch-Pagan	p-valor
SIR	0,34	0,46	0,057	0,81
CUM	0,27	0,69	0,37	0,54
AHC	0,27	0,79	0,19	0,66
ACAU	0,41	0,33	0,13	0,72
ABEN	0,59	0,12	0,05	0,81
ACIN	0,60	0,12	0,009	0,92

Tabela 28. Valores da estatística de Anderson-Darling e Breusch-Pagan para validação das substâncias em *M. laevigata*.

	Teste Normalidade		Teste Homoscedasticidade	
	Estatística Anderson-Darling	p-valor	Estatística Breusch-Pagan	p-valor
SIR	0,54	0,16	1,00	0,32
CUM	0,30	0,60	1,37	0,24
AHC	0,63	0,10	1,24	0,27
ACAU	0,45	0,28	0,05	0,81
ABEN	0,73	0,06	0,67	0,41
ACIN	0,54	0,16	1,00	0,32

Critério: p-valor > 0.05

Também não houveram evidências para rejeitar a hipótese nula no teste de homoscedasticidade dos resíduos usando o teste de Breusch-Pagan, uma vez que o p-valor calculado ficou acima de 0,05. Portanto, conclui-se que os resíduos são homoscedásticos (Tabela 27 e Tabela 28).

(IV) Análise dos Resíduos: Teste de Independência

Verificou-se que não houve correlação entre as observações para nenhuma substância em ambas matrizes *M. glomerata* e *M. laevigata*. Porém para algumas

delas, o teste de Durbin-Watson resultou como inconclusivo, estando o valor DW entre: $L < DW < U$ ou $(4-U) < DW < (4-L)$ (Tabela 29 e Tabela 30).

Para as substâncias que a correlação das observações foi classificada como inconclusiva pelo teste de Durbin-Watson, os gráficos dos resíduos padronizados *versus* ordem de coleta foram avaliados. O gráfico com essa informação e gráfico dos resíduos padronizados *versus* respostas previstas pelo modelo para todas as substâncias estudadas se encontram no Apêndice B. Concluiu-se que não há correlação entre as observações para todas as substâncias.

Tabela 29. Valores da estatística de Durbin-Watson para validação das substâncias em *M. glomerata*.

	Estatística Durbin-Watson (dw)	Conclusão
SIR	1,39	Resíduos Independentes
CUM	1,25	Inconclusivo
AHC	1,90	Resíduos Independentes
ACAU	2,86	Inconclusivo
ABEN	1,09	Inconclusivo
ACIN	2,36	Resíduos Independentes

Tabela 30. Valores da estatística de Durbin-Watson para validação das substâncias em *M. laevigata*.

	Estatística Durbin-Watson (dw)	Conclusão
SIR	1,17	Inconclusivo
CUM	1,06	Inconclusivo
AHC	2,06	Resíduos independentes
ACAU	1,89	Resíduos independentes
ABEN	2,33	Resíduos independentes
ACIN	1,17	Inconclusivo

(V) Análise dos Resíduos: Pontos influentes (Distância de Cook)

Todos valores D-Cook calculados para todas observações estão abaixo de 1, para as seis substâncias nas matrizes *M. glomerata* e *M. laevigata*. Sendo assim, não foi destacada nenhuma observação que possa influenciar o modelo matemático. O gráfico com valores D-Cook calculados *versus* observações para todas as substâncias estudadas se encontram no Apêndice C.

2.5.2.3. Efeito Matriz

O efeito matriz foi observado para as substâncias SER, CUM, AHC, ACAU e ABEN na matriz *M.glomerata* e SER, CUM, AHC e ABEN na matriz *M. laevigata* (Tabela 31). Desta forma a curva de calibração pra quantificação das substâncias deve ser feita adicionando-se os padrões na matriz vegetal.

Tabela 31. Valores de F calculados e p-valor obtido nos testes de paralelismo, intercepto e retas coincidentes na matriz *M. glomerata* e *M. laevigata*.

<i>M. glomerata</i>							
Paralelismo		Intercepto		Retas coincidentes		Conclusão	
F _{calc.}	p-valor	F _{calc.}	p-valor	F _{calc.}	p-valor		
SIR	34,13	3,5 10 ⁻⁶	-	-	-	-	efeito matriz
CUM	3,60	0,07	0,04	0,84	13,12	1,1 10 ⁻⁴	efeito matriz
AHC	0,016	0,90	0,097	0,80	0,17	0,84	não apresentou efeito matriz
ACAU	72,46	5,4 10 ⁻⁹	-	-	-	-	efeito matriz
ABEN	41,42	8,1 10 ⁻⁷	-	-	-	-	efeito matriz
ACIN	0,52	0,46	1,92	0,18	2,45	0,11	não apresentou efeito matriz
<i>M. laevigata</i>							
Paralelismo		Intercepto		Retas coincidentes		Conclusão	
F _{calc.}	p-valor	F _{calc.}	p-valor	F _{calc.}	p-valor		
SIR	19,84	1,4 10 ⁻⁴	-	-	-	-	efeito matriz
CUM	5,59	0,026	-	-	-	-	efeito matriz
AHC	22,8	6,1 10 ⁻⁵	-	-	-	-	efeito matriz
ACAU	51,86	1,2 10 ⁻⁷	-	-	-	-	efeito matriz
ABEN	195,8	1,3 10 ⁻¹³	-	-	-	-	efeito matriz
ACIN	0,56	0,46	1,8	0,19	2,1	0,15	não apresentou efeito matriz

Critério de aceitação: $F_{calc} < F_{tab}$ e $p\text{-valor} > 0,05$

F_{tab} ($\alpha=0,05$ e gl.: 1 e 26) = 4,22

2.5.2.4. Estabilidade

As substâncias apresentaram valores de recuperação (%p/p) com variação de não mais que 2,0% em relação à amostra 0h dentro de 50 h.

Tabela 32. Estabilidade das amostras preparadas com *M. laevigata* e *M. glomerata*.

<i>M. laevigata</i>						
Recuperação (%p/p)						
	0h	14h	26h	33h	39h	50h
SIR	101,25	100,89	99,46	99,84	100,57	99,53
CUM	100,35	101,24	100,26	100,50	99,94	100,43
AHC	101,37	101,27	102,12	102,07	102,09	101,47
ACAU	100,57	99,81	99,52	99,93	99,46	100,00
ABEN	100,50	100,08	99,88	100,12	100,12	99,98
ACIN	95,68	95,46	95,52	95,20	95,53	96,30
Diferença com o tempo 0h						
	0h	14h	26h	33h	39h	50h
SIR	-	-0,36	-1,79	-1,41	-0,68	-1,72
CUM	-	0,89	-0,09	0,15	-0,41	0,08
AHC	-	-0,10	0,75	0,70	0,72	0,10
ACAU	-	-0,76	-1,05	-0,64	-1,11	-0,57
ABEN	-	-0,42	-0,62	-0,38	-0,38	-0,52
ACIN	-	-0,22	-0,16	-0,48	-0,15	0,62
<i>M. glomerata</i>						
Recuperação (%p/p)						
	0h	14h	26h	33h	39h	50h
SIR	100,52	100,18	99,33	99,75	99,57	99,89
CUM	97,98	99,43	99,24	98,67	98,72	98,56
AHC	100,47	101,00	101,47	101,36	101,27	101,13
ACAU	98,13	98,34	98,34	99,64	98,54	98,32
ABEN	99,51	99,21	100,51	99,44	99,87	99,59
ACIN	95,50	95,71	96,47	95,89	96,01	95,91
Diferença com o tempo 0h						
	0h	14h	26h	33h	39h	50h
SIR	-	-0,34	-1,19	-0,77	-0,95	-0,63
CUM	-	1,45	1,26	0,69	0,74	0,58
AHC	-	0,53	1,00	0,89	0,80	0,66
ACAU	-	0,21	0,21	1,51	0,41	0,19
ABEN	-	-0,30	1,00	-0,07	0,36	0,08
ACIN	-	0,21	0,97	0,39	0,51	0,41

Critério de aceitação: Recuperação (%p/p) em relação ao tempo 0h: $\pm 2.0\%$.

2.5.2.5. Precisão

O método demonstrou ser preciso para as seis substâncias avaliadas nas duas matrizes vegetais.

Tabela 33. Precisão 1 e 2 realizada para *M. glomerata* e *M. laevigata*.

<i>M. glomerata</i>						
	Precisão 1		Precisão 2		Combinatória	
	Média Rec. %	DPR %	Média Rec. %	DPR %	Média Rec. %	DPR %
SIR	101,09	0,28	99,62	0,58	100,35	0,88
CUM	100,13	0,26	99,09	0,74	99,61	0,76
ABEN	99,45	1,58	99,45	1,58	98,89	1,45
AHC	99,00	0,36	99,55	0,97	99,28	0,76
ACAU	99,53	0,89	101,36	0,47	100,44	1,17
ACIN	100,35	0,60	98,92	0,43	99,64	0,90
DHC	100,70	1,65	103,85	4,03	102,27	3,38
<i>M. laevigata</i>						
	Precisão 1		Precisão 2		Combinatória	
	Média Rec. %	DPR %	Média Rec. %	DPR %	Média Rec. %	DPR %
SIR	101,15	0,20	100,77	0,17	100,96	0,26
CUM	100,27	0,14	102,13	0,66	101,20	1,07
AHC	99,45	1,58	99,02	1,17	99,99	1,29
ACAU	99,53	0,89	100,45	1,57	100,76	1,24
ABEN	99,33	0,60	101,57	0,67	100,45	1,29
ACIN	104,09	0,73	101,84	4,26	102,96	3,10

Critério de aceitação: %DPR \leq 15,0%; Recuperação do valor nominal: 115% a 85%.

2.5.2.6. Limite de Quantificação e de Detecção

Os valores de LQ e LD calculados se encontram na Tabela 34.

Tabela 34. Intercepto, inclinação, limite de quantificação e de detecção.

Compostos	Intercepto	(S) Inclinação	(s) DP Intercepto	LQ calc. ($\mu\text{g/mL}$)	s/r (LQ)	LD calc. ($\mu\text{g/mL}$)	s/r (LD)
SIR	127,53	13034675	153,73	0,1179	19	0,03892	9
CUM	3128,93	51154273,19	2417,76	0,4726	276	0,15597	27
AHC	491,68	69119508,4	148,10	0,0214	15	0,00707	30
ACAU	1124,54	18667414,2	148,82	0,6024	10	0,02631	3
ABEN	53,2	11818659,75	105,27	0,0891	34	0,02939	9
ACIN	2449,67	32205254,88	1276,75	0,3964	175	0,13083	6

Critério aceitação: s/r LQ \geq 10, s/r LD \geq 3.

2.5.2.7. Robustez

O estudo baseado na variação da temperatura mostra uma grande influência com o aumento da temperatura da coluna, pois à 44°C o par crítico DHC-AHC apresenta $R_s \leq 1,5$. Com o uso de ácido fórmico 0,09% tem-se $R_s: 1,4$ entre SIR-Pico Matriz 1. Desta forma, variou-se 4°C abaixo da temperatura original e 2 °C acima e o método contará com restrição no pH da fase móvel e temperatura da coluna. No estudo de robustez, sob todas as variações, obteve-se recuperação dentro do critério de aceitação (115% a 85%) e $R_s \geq 1,5$ entre os pares críticos.

Tabela 35. Recuperação obtida no estudo de robustez para *M. glomerata*.

	Fluxo		Temperatura		% ácido fórmico	
	0,36 mL/min	0,44 mL/min	36°C	42°C	0,09%	0,11%
SIR	101,84	101,69	100,08	101,59	101,46	100,09
CUM	102,39	101,59	100,52	102,84	103,42	96,68
AHC	102,13	100,94	99,84	101,73	102,07	102,53
ACA	99,93	100,82	101,56	101,81	101,23	102,53
ABE	99,65	100,35	99,39	99,88	101,23	102,32
ACIN	99,99	97,27	99,35	101,35	101,31	103,33

Tabela 36. Recuperação obtida no estudo de robustez para *M. laevigata*.

	Fluxo		Temperatura coluna		% ácido fórmico	
	0,36 mL/min	0,44 mL/min	36°C	42°C	0,09%	0,11%
SIR	100,86	100,99	101,55	100,52	101,21	100,37
CUM	102,98	100,97	100,76	102,52	103,27	103,22
AHC	102,10	101,72	100,72	101,26	102,28	101,78
ACA	105,50	103,81	103,54	99,85	103,40	102,53
ABE	101,35	100,57	100,62	103,47	102,67	100,03
ACIN	105,52	102,15	104,25	106,30	106,51	107,41

2.6. Quantificação das substâncias alvos para estudos metabolômicos

2.6.1. Materiais e Métodos

O estudo focou na quantificação de ACAU, ACIN, ABEN, CUM e AHC nas amostras de *Mikania* preparadas conforme seção 2.5.1.3.A, usando o método DES36 (Tabela 8), contra curva de calibração preparada na matriz vegetal (seção 2.5.1.3).

Os dados foram adquiridos por UHPLC-DAD (Waters Acquity H-Class) e processados pelo software Empower 3 (Waters).

2.6.2. Resultados

Os diterpenos caurânicos, cumarina e ácido o-hidroxicinâmico foram quantificados nas amostras das espécies de *Mikania* sendo a %m/m listada na Tabela 37.

Tabela 37. Quantificação (%m/m) das substâncias alvo nas espécies disponíveis de *Mikania* usando método DES36.

Cód.	Espécie	CUM (%)	AHC (%)	ACIN (%)	ACAU (%)	ABEN (%)
2	<i>M. cf. trinervis</i>	0,000	0,008	0,493	0,042	<LD
3	<i>M. nummularia</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
4	<i>M. trachypleura</i>	0,006	<LD	<LD	<LD	<LD
5	<i>M. decumbens</i>	0,244	0,401	<LD	<LD	<LD
6	<i>M. pinnatiloba</i>	NA	NA	NA	NA	NA
7	<i>M. capricorni</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
8	<i>M. paranensis</i>	<LD	<LD	<LD	1,597	0,544
9	<i>M. cordifolia</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
10	<i>M. smaragdina</i>	NA	NA	NA	NA	NA
11	<i>M. lanuginosa</i>	<LD	<LD	0,425	3,846	0,115
12	<i>M. lasiandrae</i>	0,007	<LD	0,791	2,646	0,026
13	<i>M. vitifolia</i>	0,005	<LD	0,002	<LD	<LD
14	<i>M. rufecens</i>	0,003	<LD	0,224	0,808	0,218
15	<i>M. ternata</i>	0,008	<LD	<LD	<LD	<LD
16	<i>M. sp1</i>	0,003	<LD	<LD	<LD	<LD
17	<i>M. sessilifolia</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	0,035
18	<i>M. obtusata</i>	0,005	<LD	0,922	5,245	0,151
19	<i>M. pseudogracilis</i>	0,002	<LD	<LD	<LD	<LD
20	<i>M. salviifolia</i>	NA	NA	NA	NA	NA
21	<i>M. lindbergii</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
22	<i>M. glauca</i>	<LD	<LD	0,133	0,554	<LD
23	<i>M. hirsutissima</i>	0,002	<LD	0,776	4,071	0,263
24	<i>M. lasiandrae</i>	0,007	<LD	0,633	1,670	0,095
25	<i>M. additicia</i>	<LD	<LD	<LD	0,307	0,021
26	<i>M. camporum</i>	<LD	<LD	<LD	1,161	<LD
27	<i>M. chlorolepis</i>	<LD	<LD	<LD	0,068	<LD
28	<i>M. cordifolia</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
29	<i>M. trinervis</i>	<LD	<LD	0,002	3,648	1,613
30	<i>M. sericea</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
31	<i>M. firmula</i>	<LD	<LD	0,176	2,154	1,315
32	<i>M. callineura</i>	<LD	<LD	0,095	<LD	<LD
33	<i>M. salzmaniifolia</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
34	<i>M. sp. nov.</i>	0,008	<LD	0,063	0,268	<LD
36	<i>M. biformis</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	0,119

Cód.	Espécie	CUM (%)	AHC (%)	ACIN (%)	ACAU (%)	ABEN (%)
37	<i>M. grazielae</i>	0,003	<LD	<LD	<LD	<LD
38	<i>M. elliptica</i>	0,006	<LD	<LD	<LD	<LD
39	<i>M. sp2</i>	<LD	<LD	<LD	3,315	0,240
40	<i>M. lutzburgii</i>	<LD	<LD	0,003	0,000	<LD
41	<i>M. alvimii</i>	<LD	<LD	<LD	0,282	<LD
42	<i>M. jeffreyi</i>	NA	NA	NA	NA	NA
43	<i>M. sp. nov.</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
44	<i>M. hemiphaerica</i>	0,005	<LD	<LD	<LD	<LD
45	<i>M. cordifolia</i>	0,003	<LD	<LD	<LD	0,009
47	<i>M. smilacina</i>	0,825	0,180	<LD	<LD	<LD
48	<i>M. hirsutissima</i>	0,023	<LD	0,308	2,861	0,081
49	<i>M. populifolia</i>	0,007	<LD	<LD	0,381	0,034
50	<i>M. pohliana</i>	<LD	<LD	0,084	0,942	0,077
51	<i>M. laurifolia</i>	0,016	<LD	0,371	2,570	0,000
52	<i>M. psilostachya</i>	0,006	<LD	<LD	<LD	<LD
53	<i>M. vitifolia</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
54	<i>M. guaco</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
55	<i>M. aristei</i>	<LD	<LD	0,525	6,236	0,043
56	<i>M. lehmanii</i>	<LD	<LD	0,272	2,936	0,026
57	<i>M. banisteriae</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
58	<i>M. aquaria</i>	0,004	<LD	<LD	<LD	<LD
59	<i>M. haenkeana</i>	0,004	<LD	<LD	<LD	0,908
60	<i>M. incasina</i>	0,006	<LD	0,030	0,451	0,238
61	<i>M. angularis</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
62	<i>M. marinii</i>	0,002	<LD	<LD	<LD	0,037
63	<i>M. cuzcoensis</i>	0,013	<LD	0,040	0,096	0,027
64	<i>M. triangularis</i>	<LD	<LD	<LD	0,029	0,116
65	<i>M. glomerata</i>	0,003	<LD	<LD	4,060	<LD
66	<i>M. eriostrepta</i>	0,004	<LD	<LD	<LD	<LD
67	<i>M. laevigata</i>	0,564	0,204	0,135	1,044	0,155
68	<i>M. alvimii</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
69	<i>M. officinalis</i>	0,009	<LD	<LD	<LD	0,017
70	<i>M. officinalis</i> var. <i>brachypoda</i>	0,364	0,372	<LD	<LD	0,053
71	<i>M. pohlii</i>	0,003	<LD	<LD	<LD	0,069
72	<i>M. cordifolia</i>	0,141	0,064	<LD	<LD	0,052
73	<i>M. hassleriana</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
73A	<i>M. triangularis</i>	<LD	0,007	<LD	0,303	<LD
74	<i>M. paranensis</i>	<LD	<LD	<LD	1,374	<LD
75	<i>M. lanuginosa</i>	<LD	<LD	<LD	2,947	0,099
76	<i>M. pinnatiloba</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	0,048
77	<i>M. fulva</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
78	<i>M. thapsoides</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
79	<i>M. anethifolia</i>	<LD	<LD	0,033	5,103	1,222
80	<i>M. periplocifolia</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
81	<i>M. periplocifolia</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
82	<i>M. oreophila</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Cód.	Espécie	CUM (%)	AHC (%)	ACIN (%)	ACAU (%)	ABEN (%)
83	<i>M. orleansensis</i>	<LD	<LD	0,230	<LD	<LD
84	<i>M. oblongifolia</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
85	<i>M. warmingii</i>	NA	NA	NA	NA	NA
86	<i>M. monsenii</i>	<LD	0,007	<LD	0,126	<LD
87	<i>M. sessilifolia</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	0,053
88	<i>M. purpurescens</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
89	<i>M. fasciculata</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
90	<i>M. aff. burchelli</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
91	<i>M. psilostachya</i>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
102	<i>M. glomerata</i>	0,221	0,008	0,099	0,642	0,241
101	<i>M. laevigata</i>	0,013	0,000	<LD	0,275	0,167
100	<i>M. glomerata</i>	0,225	0,058	0,353	1,316	3,074

Legenda: LD: Limite de detecção. NA: Não analisado.

2.7. Discussão

O gênero *Mikania* é um dos mais representativos da família *Asteraceae* com cerca de 450 espécies. Recentemente o gênero foi contemplado com estudos filogenéticos,⁸⁸ no entanto um estudo quimiotaxonômico abrangente ainda não foi reportado. A abordagem metabolômica representa uma estratégia para entendimento do conteúdo metabolômico abrangente das espécie estudadas, portanto se torna uma ferramenta importante a ser aplicada nos estudos de classificação quimiotaxonômica do gênero. Além da ausência de estudos recentes e abrangentes sobre a classificação desse importante gênero, algumas espécies são medicinais sendo utilizadas na produção de fitoterápicos no Brasil.^{5,28,135} Algumas espécies conhecidas como guaco são consumidas pela população principalmente para o tratamento de doenças respiratórias devido a propriedades expectorantes e broncodilatadoras das folhas de guaco⁵ geralmente sob a forma de infusão, extrato fluido, tintura e xarope.¹³⁵ O uso da abordagem metabolômica também representa uma ferramenta valiosa para uma discussão mais abrangente sobre o controle de qualidade de fitoterápicos que contêm extratos de espécies medicinais do gênero *Mikania* e autenticação da matéria-prima vegetal, visto que essa abordagem analítica possibilita o acesso amplo do conteúdo metabólico das espécies de *Mikania*, facilitando identificar metabólitos relevantes a serem monitorados durante o controle de qualidade

A cumarina foi considerada marcador químico da espécie *M. glomerata* pela Anvisa⁷⁵, sendo considerada o composto responsável pela atividade broncodilatadora do guaco.⁴¹ Dados da literatura mostram que diterpenos do tipo caurano têm

demonstrado também atividade inibitória de contratibilidade e relaxamento muscular.^{28,41,61} Baseado em estudos quantitativos usando extratos hidroalcoólicos, os metabólitos mais prevalentes também estão associados ao efeito terapêutico do guaco, como por exemplo cumarina, ácido *o*-cumárico, dihidrocumarina, siringaldeído e ácido caurenóico.^{28,41} Alguns métodos foram publicados para análise quantitativa simultânea dos compostos ativos do guaco, como a determinação de cumarina e ácido caurenóico por CG⁵⁹, e análise de cumarina e ácido *o*-cumárico por HPLC-UV⁶⁰. Bertolucci *et al* desenvolveram um método para análise de cinco compostos (cumarina, ácido caurenóico, ácido benzoilgrandiflórico, ácido cinamoilgrandiflórico e ácido *o*-cumárico) por HPLC-UV.²⁹ No entanto, nenhum método desenvolvido considerou estudos de efeito matriz e estudos de seletividade por LC-MS.

Visto que tanto cumarinas e diterpenos possam ser responsáveis pelas atividades farmacológicas atribuídas ao guaco,²⁹ foi desenvolvido e validado um método seletivo para quantificação de seis substâncias (ACIN, ACAU, ABEN, SIR e AHC e CUM) nas matrizes de *M. glomerata* e *M. laevigata* por UHPLC-UV. As substâncias a serem quantificadas foram escolhidas por serem citadas em inúmeros trabalhos como responsáveis por desencadear atividades farmacológicas^{41-50,59,60} presente em extratos de espécies de *Mikania*, como o guaco. O desenvolvimento deste método apresentou três objetivos, sendo o primeiro dar suporte ao controle de qualidade dos fitoterápicos que contêm extratos de espécies medicinais do gênero *Mikania* e as matérias-primas vegetais para quantificação de cumarina e ácidos diterpênicos. O segundo objetivo foi fornecer uma metodologia para os estudos metabolômicos com abordagem direcionada por LC-UV sendo as substâncias CUM, AHC, ACAU, ABEN e ACIN quantificadas em todas as amostras das espécies de *Mikania* disponíveis, representando informação biológica adicional aos estudos metabolômicos não direcionados, além de ser usado na validação dos metabólitos discriminantes dos grupos quimiotaxonômicos a ser discutido no capítulo 8. O terceiro objetivo foi oferecer um perfil cromatográfico com melhor resolução possível para obtenção da impressão digital metabólica de várias espécies de *Mikania* para os estudos metabolômicos não direcionados por LC-MS (capítulo 3).

Visto que a matriz vegetal é complexa e contém inúmeros metabólitos com diferentes propriedades físico-química, o desenvolvimento de um protocolo de extração de metabólitos representa um desafio em estudos metabolômicos. O uso do

planejamento experimental, para o desenvolvimento de protocolos de extração de metabólitos, foi usado como estratégia para se estudar o impacto de diferentes fatores envolvidos na extração na resposta analítica.

No estudo de triagem, usando-se planejamento fatorial fracionário, os fatores que impactaram de forma significativa na resposta analítica (x_2 :proporção álcool e x_3 :% ácido fórmico no solvente extrator) foram otimizados através do uso do planejamento do composto central. Através da superfície de resposta, pode-se observar que as melhores condições de extração, e conseqüentemente detecção, seria o uso de etanol 60% como solvente extrator adicionado de 0,05% de ácido fórmico.

No entanto, o objetivo do protocolo de extração de metabólitos é também o de oferecer um método que atenda os critérios dos estudos de recuperação para todos metabólitos alvos e estabilidade das soluções.

A princípio, a extração dos metabólitos foi feita com menor proporção de etanol (como previsto como condição que fornece maior área da superfície de resposta), porém houveram problemas de recuperação das substâncias mais apolares (ACAU, ABEN e ACIN). Essa observação foi correlacionada a problemas de solubilidade do ACAU, ACIN e ABEN e problemas de extração de substâncias mais apolares da matriz vegetal com uso de etanol 70%, sendo necessário aumentar a sua concentração para 85%.

A superfície de resposta representa uma ferramenta de acesso à região de conhecimento experimental quanto ao comportamento da extração dos metabólitos e a condição final escolhida se encontra dentro dessa região de máximo. No entanto, evidencia-se o balanço da boa recuperação e estabilidade das soluções e uma maior quantidade de metabólitos extraídos.

Durante o desenvolvimento foi observado o efeito diluente quando usado etanol 85% como solvente final e proporção inicial da fase móvel de 5% de fase aquosa. Foi observada a quebra do pico das substâncias que eluem no começo da corrida e por esse motivo a concentração de etanol foi reduzida sendo o solvente final etanol:água (3:7). Nota-se também, a importância de se evitar o efeito diluente em estudos metabolômicos não direcionados por LC-MS, pois devido ao arrastamento das bandas de algumas substâncias ou quebra de picos, metabólitos que eluem adjacentes a essas substâncias podem ter sua detectabilidade prejudicada por LC-MS devido a

possível supressão iônica impactando na qualidade dos espectros de massa adquiridos e na etapa de deconvolução.

O método para quantificação por LC-UV foi desenvolvido usando-se ferramentas de “Quality by Design” (QbD), sendo estudadas alguns fatores como pH da fase móvel, diferentes seletividades de colunas, proporção de solventes orgânicos, oferecendo condições iniciais para posterior refinamento do método.

Visto que os estudos metabolômicos não direcionados não focam a princípio em compostos alvos pré-determinados, o planejamento fatorial para avaliação do impacto do pH da fase móvel no perfil de eluição é uma ferramenta valiosa visto que a matriz de estudo é complexa e com inúmeros metabólitos com diferentes propriedades dificultando escolha do valor de pH ótimo para análise.

Colunas com empacotamento C18, C8 e fenil foram estudadas, sendo observado maior alargamento de picos com o uso da coluna *Agilent Zorbax SB Phenyl* não capeada. Esta característica também impactou na resolução cromatográfica, possivelmente devido a um menor efeito estérico das cadeias de fase reversa e a um maior acesso dos metabólitos na base da coluna, que conseqüentemente, veio a possibilitar uma interação secundária com grupos não funcionalizados na base da coluna como grupos silanóis/silanóxidos.

As colunas *Waters Acquity BEH C8*, *Waters Acquity HSS T3*, *Waters Acquity BEH Shield RP18* apresentam diferentes tecnologias para recobrimento de silanóis residuais além de diferentes porcentagem de recobrimento da fase ligada (*carbon load*) o que pode impactar significativamente na retenção e seletividade de separação dos metabólitos. A coluna da *waters BEH C8* e *HSS T3* são capeadas com grupos apolares o que reduz significativamente interações secundárias de metabólitos com grupos residuais silanóis. Já a coluna *Waters BEH Shield RP18* apresenta grupo polar carbamato embebido na cadeia alquílica ligada ao suporte da coluna, o que leva à formação de uma camada de fase aquosa devido a interação de hidrogênio entre esse grupo polar e moléculas de água da fase móvel.¹⁵³ Esta camada de água age como proteção evitando que metabólitos alcancem a base da coluna e conseqüentemente contribuindo de forma significativa para evitar a interação secundária com outros possíveis sites de retenção.

Para as colunas *BEH C8*, *HSS T3* e *Shield RP18*, observou-se picos com fator de assimetria baixos. Para a coluna *BEH C8* houve uma menor seletividade para os compostos mais apolares como os diterpenos, sendo esta observação correlacionada a um menor fator de retenção desses compostos quando comparado a coluna *C18*, o que resultou em resolução baixa entre os diterpenos. No entanto, deve-se atentar que maior retenção de compostos apolares possa ocorrer em colunas *C8* comparadas a colunas *C18* com o uso de colunas *C8* com maiores taxas de recobrimento da fase ligada. A coluna *BEH C8* apresenta 12%¹⁵³ de recobrimento (*carbon load*), a *HSS T3* apresenta 11%¹⁵³ e a *Shield RP18* apresenta 17%.¹⁵³ Entre as duas colunas *C18* escolhidas para o refinamento do método, observou-se que a coluna *BEH Shield RP18* ofereceu maior resolução entre os três diterpenos alvos quando comparada a coluna *HSS T3*.

Foi observado também a troca da ordem de eluição do ácido caurenóico e ácido benzoilgrandiflórico quando comparadas as duas colunas *C18*. Esta troca pode estar relacionada à taxa de recobrimento da fase ligada na coluna *HSS T3*, onde uma menor taxa representa um maior espaçamento entre as cadeias ligantes. Conseqüentemente, existe um menor efeito estérico para “entrada” do ácido caurenóico (menor tamanho) em comparação ao ácido benzoilgrandiflórico (maior tamanho). Dessa forma, verificou-se o aumento do tempo de retenção do ácido caurenóico no colun Waters *HSS T3* e a inversão da ordem de eluição. Esta observação evidencia de forma clara a importância de se avaliar a seletividade das colunas não somente quanto ao tipo de fase ligada (*C18*, *C8*, Fenil, Ciano etc), mas também quanto a diferentes taxas de recobrimento da fase ligante (*carbon load*), diferentes tecnologias de capeamento e proteção/exposição da interação com sites secundários de retenção (capeamento com grupos apolares, grupos polares, grupos polares embebidos na cadeia e etc) e acidez da sílica, o que podem impactar na seletividade da coluna.

Para os estudos metabolômicos de abordagem direcionada por LC-UV, a seletividade do método foi avaliada por LC-MS, sendo nenhuma co-eluição observada para as substâncias a serem quantificadas. O método mostrou ser seletivo para as seis substâncias nas matrizes de *M.laevigata* e *M.glomerata*.

O guia de orientação para registro de medicamento fitoterápico, registro e notificação de produto tradicional fitoterápico publicado pela Anvisa em 2014, traz

orientações para validação de fitoterápicos, através da Instrução normativa Nº 4¹⁴⁶. Este guia referencia a RDC 899/2003 como guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos a ser usados na validação de fitoterápicos. No entanto, recentemente a RDC 899/2003 da Anvisa foi revogada pela RDC 166/2017,⁴⁰ a qual esta vigente desde de 24 de Julho de 2017 e requer o reporte dos estudos de linearidade em conjunto com avaliação estatística para avaliação da qualidade do modelo de regressão usado. Este guia reflete o guia publicado pelo FDA para validação de métodos analíticos o qual é harmonizado com os requerimentos publicados pelo ICH no guia Q2(R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*.¹⁴⁶

Desta forma a metodologia desenvolvida foi validada conforme RDC 166/2017 da Anvisa sendo os cálculos estatísticos da linearidade reportados. A linearidade foi avaliada com os padrões e matriz fortificada, atendendo os critérios de aceitação para recuperação^{39,37}, sendo linear na faixa de 50% a 150% com $R^2 > 0.99$ para todas as substâncias. Nenhum método publicado na literatura avaliou possível efeito matriz e estudou se há linearidade dentro da faixa de concentração de trabalho fortificando a matriz com as substâncias conhecidas. Efeito matriz pode levar à não recuperação da concentração inicial dos padrões adicionadas na matriz e caso exista deve ser levada em consideração preparando-se a curva de calibração na própria matriz e não somente no solvente final.

Ainda nos estudos de linearidade, foi observado uma boa capacidade preditiva dos modelos gerados por regressão linear, usando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Na avaliação dos resíduos foi observado que os resíduos são homoscedásticos para todas as substâncias nas duas matrizes de matéria-prima vegetal, não sendo necessário a ponderação dos dados. Além disso, os resíduos foram considerados como tendo distribuição normal e mostram não estar correlacionados, respeitando as premissas para o uso do MMQO como estimativa adequada dos coeficientes de regressão.

Neste estudo foi observado o efeito matriz para algumas substâncias, portanto a curva de calibração para a quantificação das substâncias foi preparada adicionando-se quantidades conhecidas dos padrões na matriz vegetal dentro da faixa de linearidade validada. Além disso, o método mostrou boa precisão inter e intra-dia com $\%DPR \leq 15,0\%$ e recuperação do valor nominal entre 115% e 85%.

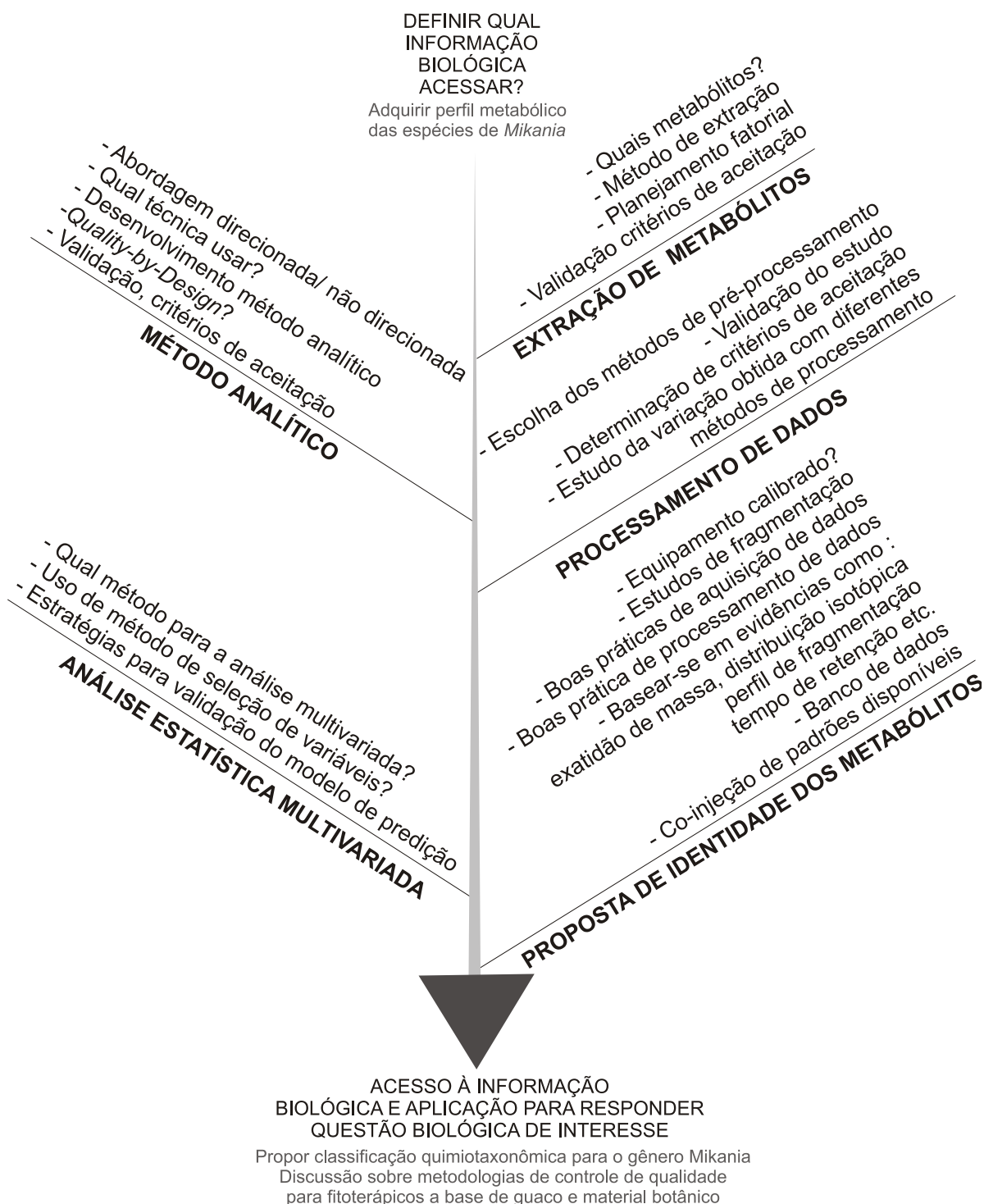
Nos estudos metabolômicos direcionados por LC-MS as substâncias CUM, AHC, ACAU, ABEN e ACIN foram quantificadas em todas as amostras de espécies de *Mikania* disponíveis, usando-se o método desenvolvido e validado deste capítulo.

Visto a divergência de inúmeros estudos quanto ao teor dessas substâncias nas espécies medicinais de *Mikania*, este estudo visou mostrar de forma abrangente a produção desses metabólitos dentre as espécies de *Mikania* disponíveis. Desta forma, este estudo poderá ser aplicado como ferramenta de controle de qualidade para produção de extratos vegetais padronizados e fitoterápicos à base de guaco, além de contribuir para melhor entendimento da classificação quimiotaxonômica de *Mikania*, haja vista que fornecerá informação complementar aos estudos metabolômicos de abordagem não direcionada a ser discutido no capítulo 8.

3. Estudos metabolômicos não direcionados por LC-MS

Diversas etapas foram envolvidas no fluxo dos estudos metabolômicos não direcionados, como: otimização do protocolo de extração de metabólitos, desenvolvimento do método de análise, pré-processamento dos dados brutos obtidos, análise estatística multivariada e proposta de identificação dos metabólitos discriminantes. O capítulo 3 descreve como os critérios de validação para algumas etapas foram determinados e como essas etapas foram desenvolvidas e validadas focando principalmente na validação do método de pré-processamento dos dados brutos e análises por LC-MS. Os resultados obtidos na etapa de extração de metabólitos e desenvolvimento da metodologia analítica para os estudos metabolômicos não direcionados foram discutidos com detalhes no capítulo 2.

Com o intuito de identificar as etapas críticas que possam impactar na qualidade e confiabilidade dos resultados assim como dispersões nos estudos metabolômicos por LC-MS, um diagrama de causa e efeito (Figura 40) foi usado como ferramenta para a análise de possíveis dispersões nos estudos metabólomicos. Parâmetros foram identificados para validação sendo critérios de aceitação determinados. A informação biológica de interesse deste projeto é o conhecimento do conteúdo metabólico das diferentes espécies de *Mikania* para se propor uma classificação quimiotaxonomica do gênero e dar suporte para uma discussão sobre metodologias mais adequadas de controle de qualidade de fitoterápicos a base de guaco.

Figura 40. Diagrama de causa e efeito para estudos metabolômicos por LC-MS.

3.1. Aquisição dos dados por UHPLC-MS e validação do método de análise

3.1.1. Materiais e Métodos

3.1.1.1. Preparo das amostras e controle de qualidade

3.1.1.1.A. Amostras (1,75 mg/mL): preparo conforme 2.5.1.3.B usando-se 10 mg do pó das folhas de cada espécie de *Mikania*, com exceção da fortificação com padrões.

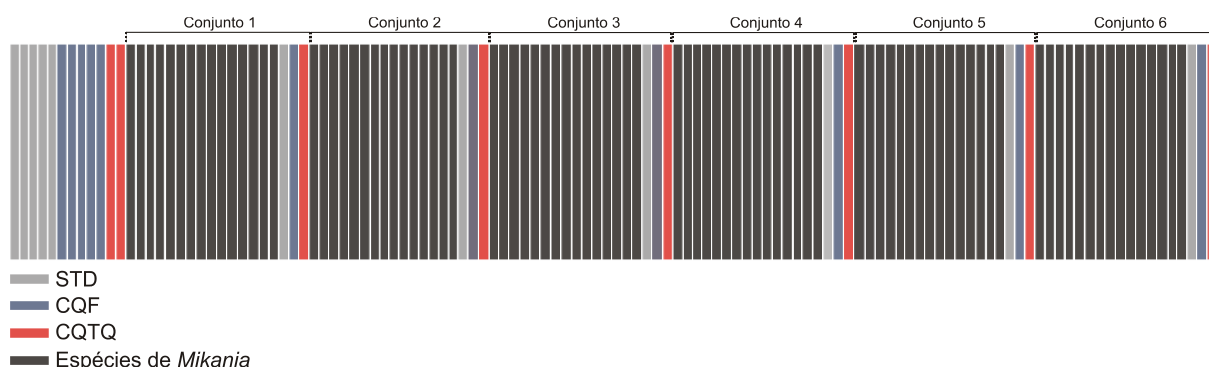
3.1.1.1.B. Controle de Qualidade Fortificado (CQF): 5 mg do pó das folhas de todas as espécies disponíveis de *Mikania* foi misturada e cerca de 12 mg dessa mistura foram transferidos para balão de 2 mL e fortificados para uma concentração final de 25 µg/mL de CUM e 2,5 µg /mL de AHC. Em seguida, a amostra foi tratada conforme item 2.5.1.3.C.

3.1.1.1.C. Controle de Qualidade Tal Qual (CQTQ): conforme item 3.1.1.1.B. com exceção da fortificação.

3.1.1.2. Análises por UHPLC-UV-MS

As amostras de espécies de *Mikania* disponíveis (item 2.4.1.1) foram analisadas por UHPLC-UV-MS (*Termo Scientific UltiMate 3000 XRS - Exactive Plus Orbitrap™*, método *DES36 - Tabela 8 e MetS2* – item 2.4.1.3) para obtenção da impressão digital metabólica. Para avaliação da repetibilidade entre as corridas, uma amostra CQF foi injetada cinco vezes antes das análises e a amostra CQTQ³⁷ em duplicata seguido de uma injeção de CQF e CQTQ após 15 amostras das diferentes espécies (Figura 41). A amostra STD (2.5.1.3.D) foi injetada em quintuplicata antes das análises.

Figura 41. Sequência de injeções para os estudos metabolômicos não direcionados por LC-MS incluindo amostras CQF e CQTQ em intervalos entre as amostras das espécies de *Mikania*.



3.1.1.3. Validação do método de análise por UHPLC-MS

A estratégia de validação do método de análise por UHPLC-MS se deu pela avaliação de diferentes parâmetros como:

(I) Avaliação da adequabilidade do sistema: O desvio padrão relativo (DPR) das áreas das substâncias cumarina e ácido *o*-hidroxicinâmico detectadas na replicata de injeção das amostras CQF no início da sequência de análise deve \leq a 5 %.

(II) Agrupamento das amostras controle de qualidade (CQF e CQTQ) no gráfico de escores do modelo obtido por PLS-DA: após aquisição dos dados por LC-MS e pré-processamento (seção 2.4.1.4), a matriz foi normalizada pela área máxima, escalonada usando como fator a área máxima menos a área mínima e transformada por log 10. Em seguida, foi analisada por HCA e PLS-DA (SIMCA 13.0.3 Unmetrics).

(III) Avaliação da sensibilidade e exatidão de massa: O DPR das áreas das substâncias cumarina e ácido *o*-hidroxicinâmico detectadas nas CQF e CQTQ injetadas ao longo de toda a sequência devem ser menor ou igual a 5 %.

3.1.2. Resultados

3.1.2.1. Validação do método de análise por UHPLC-MS

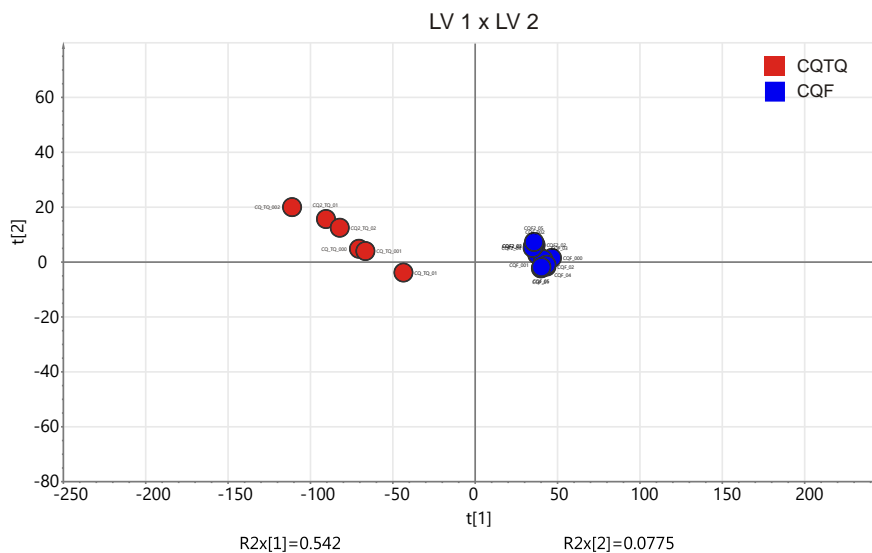
(I) Avaliação da adequabilidade do sistema

O desvio padrão relativo (DPR) das áreas das substâncias cumarina e ácido *o*-hidroxicinâmico detectadas nas amostras CQF foram respectivamente: 0,2% e 0,7%, estando dentro do critério de aceitação estabelecido de $DPR \leq 5\%$.

(II) Agrupamento das amostras controle de qualidade

Foi observado o agrupamento bem delimitado das amostras CQTQ e CQF e com um baixo desvio, nos gráfico dos escores da LV1 e LV2 obtido por PLS-DA, evidenciando uma alta similaridade dos perfis metabólicos adquiridos para essas amostras (Figura 42).

Figura 42. Escores da LV1 e LV2 obtidos com após análise por PLS-DA com CQF e CQTQ.



Desta forma, foi evidenciado que não houveram desvios significantes durante as análises descartando possíveis problemas de repetibilidade entre as corridas de toda a sequência de análises, não sendo necessário descartar ou reinjetar nenhuma amostra. Este parâmetro foi usado como ferramenta para detecção de possíveis problemas de variações não biológicas nas análises das espécies de *Mikania*.

(III) Avaliação da sensibilidade e exatidão de massa

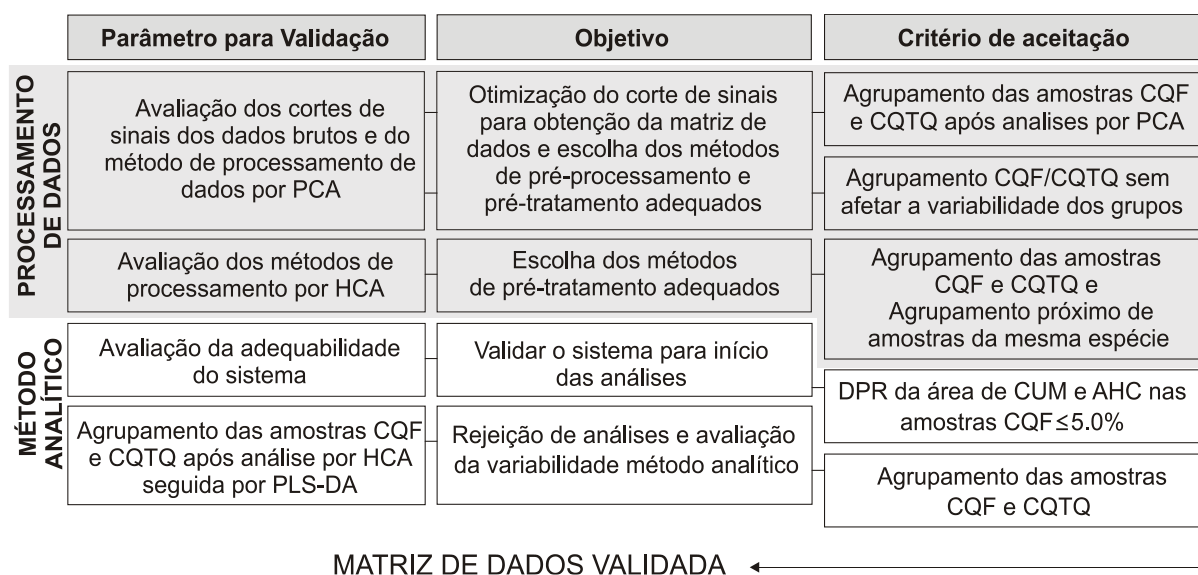
O DPR das áreas das substâncias cumarina e ácido *o*-hidroxicinâmico detectadas nas CQF e CQTQ injetadas ao logo de toda a sequência foram menor que 5 %, evidenciando que nenhum problema relacionado a sensibilidade ocorreu. Desta forma nenhuma ação preventiva de limpeza da fonte de ionização precisou ser tomada validando o perfil metabólico adquirido das espécies relacionadas a todos conjuntos de injeções nas análises por LC-MS.

3.2. Validação do método de processamento dos dados

3.2.1. Materiais e Métodos

Os parâmetros e critério de aceitação avaliados na validação dos estudos se encontram resumidos na Figura 43.

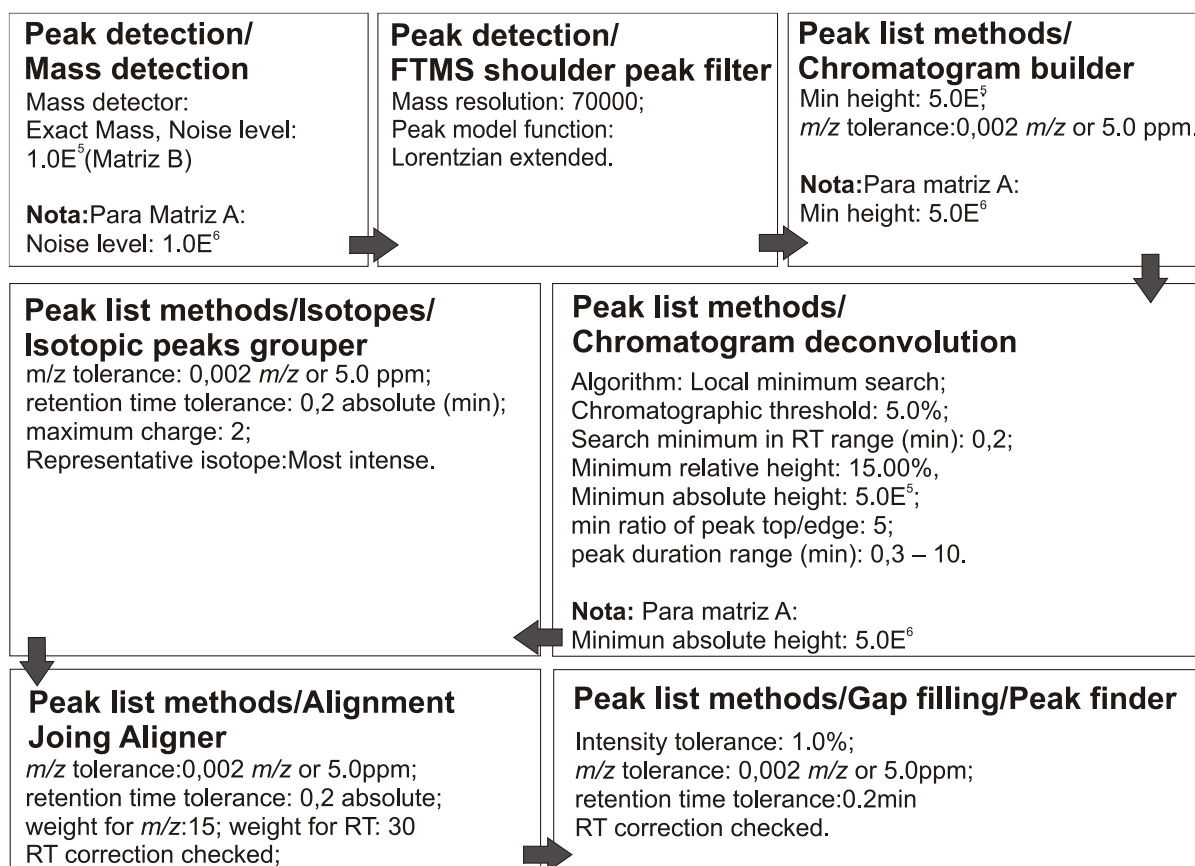
Figura 43. Fluxo de validação da matriz de dados para estudos metabolômicos por LC-MS.



Os dados brutos de LC-MS obtidos com o *Orbitrap* (seção 3.1.1.2) em formato *.raw* foram separados em modo positivo e negativo usando-se *ProteoWizard MSconvert* (EUA). Em seguida, estes foram convertidos para formato *.mzXML* e

importados para o software *MZmine 2.11* (*MZmine Development Team*). Esses dados foram submetidos a uma série de pré-processamentos (Figura 44), sendo em princípio duas grandezas de ruído usadas para obter os sinais de m/z para gerar as matrizes A (corte de sinais: 1.10^6) e B (corte de sinais: 1.10^5) no software *MZmine 2.11* (*MZmine Development Team*).

Figura 44. Fluxograma de critérios e parâmetros para processamento de dados no software Mzmine 2.11.



Em seguida os dados pré-processados foram exportados em formato .csv para uma planilha de Excel (Microsoft 2013), com os seguintes dados: m/z (espectros de MS), tempo de retenção e área das substâncias detectadas nas amostras de *Mikania* observadas no cromatograma TIC nos modos positivo (ESI+) e negativo (ESI-). As matrizes A e B foram submetidas à diferentes pré-tratamentos usando o software *Matlab R2013b* (*Mathworks*) conforme Tabela 38.

Foram também avaliados a matriz E#33 de presença e ausência e matriz E#34 das áreas sem nenhum pré-processamento.

Tabela 38. Estudos para validação do pré-processamento dos dados brutos obtidos por LC-MS.

#	Sequência Métodos				#	Sequência Métodos			
#1	N	-	Range Scaling	-	#17	N	C	Range Scaling	-
#2	N	-	Auto Scaling	-	#18	N	C	Auto Scaling	-
#3	N	-	Pareto Scaling	-	#19	N	C	Pareto Scaling	-
#4	N	-	Vast Scaling	-	#20	N	C	Vast Scaling	-
#5	N	-	Level Scaling	-	#21	N	C	Level Scaling	-
#6	N	-	Range Scaling	Log10	#22	N	C	Range Scaling	Log10
#7	N	-	Auto Scaling	Log10	#23	N	C	Auto Scaling	Log10
#8	N	-	Pareto Scaling	Log10	#24	N	C	Pareto Scaling	Log10
#9	N	-	Vast Scaling	Log10	#25	N	C	Vast Scaling	Log10
#10	N	-	Level Scaling	Log10	#26	N	C	Level Scaling	Log10
#11	N	-	Range Scaling	PT	#27	N	C	Range Scaling	PT
#12	N	-	Auto Scaling	PT	#28	N	C	Auto Scaling	PT
#13	N	-	Pareto Scaling	PT	#29	N	C	Pareto Scaling	PT
#14	N	-	Vast Scaling	PT	#30	N	C	Vast Scaling	PT
#15	N	-	Level Scaling	PT	#31	N	C	Level Scaling	PT
#16	N	-	-	-	#32	N	C	-	-

N= Normalização, C=Centragem na média, PT=power transformation.

Tabela 39. Fórmulas dos diferentes métodos usados no tratamento dos dados brutos obtidos por LC-MS.⁶³

Métodos	Fórmulas
Normalização	$\tilde{x}_{ij} = x_{ij} / x_{i \max}$
Centering	$\tilde{x}_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_i$
Autoscaling	$\tilde{x}_{ij} = (x_{ij} - \bar{x}_i) / s_i$
Range Scaling	$\tilde{x}_{ij} = (x_{ij} - \bar{x}_i) / (x_{i \max} - x_{i \min})$
Pareto Scaling	$\tilde{x}_{ij} = (x_{ij} - \bar{x}_i) / \sqrt{s_i}$
Vast Scaling	$\tilde{x}_{ij} = ((x_{ij} - \bar{x}_i) / s_i), \bar{x}_i / s_i$
Level Scaling	$\tilde{x}_{ij} = (x_{ij} - \bar{x}_i) / \bar{x}_i$
Log Transformation	$\tilde{x}_{ij} = {}^{10} \text{Log} (x_{ij})$
Power transformation	$\tilde{x}_{ij} = \sqrt{x_{ij}}$

Legenda: \tilde{x} : valor área final, \bar{x}_i : média da área de cada coluna da matriz de dados, i :linhas da matriz de dados e j :colunas da matriz de dados .

Conforme os estudos propostos, pode-se observar a variabilidade dos agrupamentos das espécies de *Mikania* avaliando-se os plotes dos escores da PC1

e PC2 após análise por PCA (*Matlab R2013b - Mathworks*). O agrupamento das amostras CQF e CQTQ foi também considerado como um dos critérios de aceitação para validação do estudo.

3.2.1.1. Avaliação dos cortes de sinais dos dados brutos e processamento de dados por PCA

Este parâmetro foi avaliado através da avaliação dos plots dos escores da PC1 e PC2 após análise por PCA (*Matlab R2013b - Mathworks*) das matrizes E#B1 até E#B34 e E#A1 até A#A34. O critério de aceitação foi o agrupamento das amostras de CQF e CQTQ com baixa dispersão sem afetar a evidência da variabilidade dos possíveis grupos das espécies de *Mikania*.

3.2.1.2. Avaliação dos métodos de processamento por HCA

Este parâmetro foi avaliado através da avaliação do dendograma gerado após análise por HCA (software R) das matrizes E#B6, E#B7, E#B8, E#B9, E#B10 e E#B33 usando o algoritmo '*hclust*', sendo a similaridade calculada pela distância euclidiana e as amostras conectadas pela conexão tipo Ward.d Os critérios de aceitação para validação foram o agrupamento das amostras CQF e CQTQ separadamente das amostras de *Mikania* e na sequência foi avaliado o agrupamento próximo de amostras das mesmas espécies: amostras 9/28/72/45: *M. cordifolia*, 41/68: *M. alvimmi*, 23/48: *M. hirsutissima*, 80/81: *M. periplocifolia* e 8/74: *M. paranensis*, 69/70 *M. officinalis*.

3.2.2. Resultados

3.2.2.1. Avaliação dos cortes de sinais dos dados brutos e métodos de processamento de dados por PCA

Após o pré-processamento da matriz A (corte de sinais da ordem de 1.10^6) usando o *Mzmine*, foram observados no total 1050 variáveis deconvoluídas. Depois do processamento dos dados conforme Tabela 38, no geral foi observado o não agrupamento das amostras CQF e CQTQ (Figura 46). Devido ao fato que as amostras CQF e CQTQ foram preparadas de um pool homogêneo das diferentes espécies de *Mikania* e injetadas durante as análises, é esperado que estas se agrupem umas próximas as outras sendo esta avaliação uma ferramenta para indicar a soma da variabilidade de origem não biológica. As matrizes E#22-E#26 (N, C, Escalonamento, Log10) e E#27 (N, C, *Range Scaling*, *Power Transformation*) evidenciaram o

agrupamento das amostras CQF e CQTQ porém com alta dispersão. A princípio sugere-se que o corte feito nos dados obtidos por LC-MS ao transferir os dados para o *MZmine* tenha sido um valor alto podendo ter excluído sinais de metabólitos significantes para o agrupamento das amostras CQF e CQTQ e conseqüentemente podendo afetar o agrupamento das espécies de *Mikania*. Após o pré-processamento da matriz B (corte de sinais da ordem de 1.10^5) usando o *MZmine* foram observados no total 3000 variáveis deconvoluídas. Em geral, houve o agrupamento das amostras CQF e CQTQ com dispersão baixa em todos tratamentos seguidos das transformações *Log10* e *Power Transformation* (E06#B até E15#B) e matriz presença e ausência (E33#B) (Figura 47). Esta observação sugere que o corte usado na matriz B possa ser mais adequado não excluindo tantos sinais de metabólitos que estejam presentes em baixa concentração na amostra e que também possam ser significativos para o agrupamento mais delimitado das amostras CQF e CQTQ. Conseqüentemente, o uso da matriz B afeta em menor extensão os agrupamentos das espécies de *Mikania* em comparação com o uso da matriz A, sendo a matriz B (corte 1.10^5) mais adequada para ser usada nas análises multivariadas.

As matrizes transformadas com *Log10* e *Power Transformation*, em geral resultaram no melhor agrupamento das amostras CQF e CQTQ sendo a heteroscedasticidade dos dados reduzida (Figura 45). *Power transformation* não proporcionou a separação entre as amostras de *Mikania* e amostras CQF e CQTQ de forma evidente como o *Log10*, portanto esta transformação não foi validada.

Figura 45. Variáveis da amostra CQTQ versus desvio padrão antes (A) e depois (B) transformação com *Log10*.

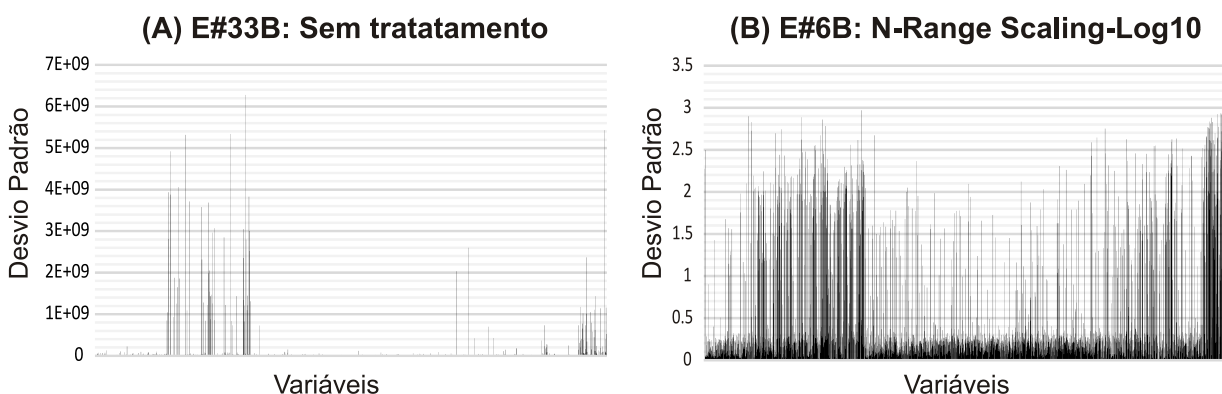
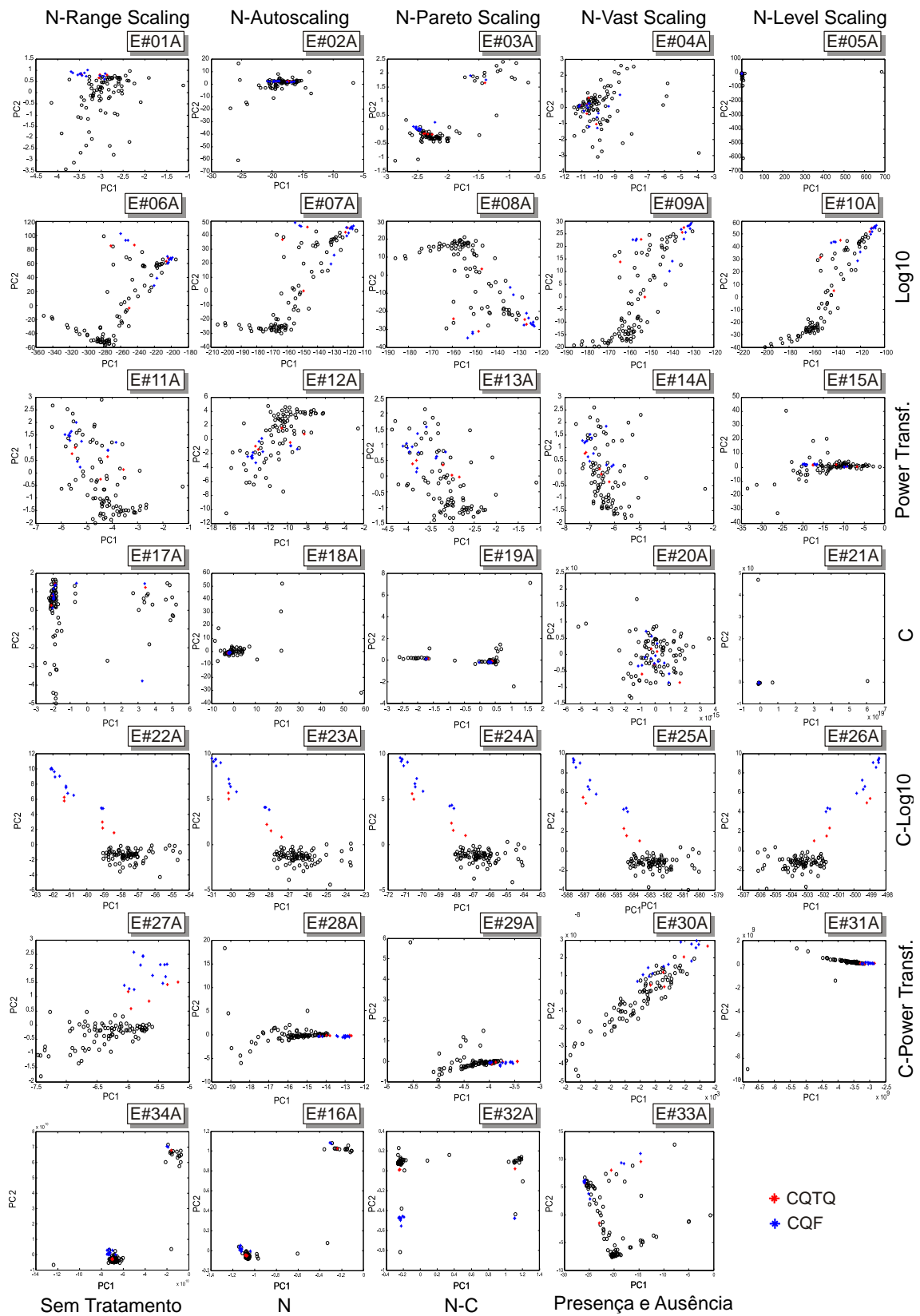
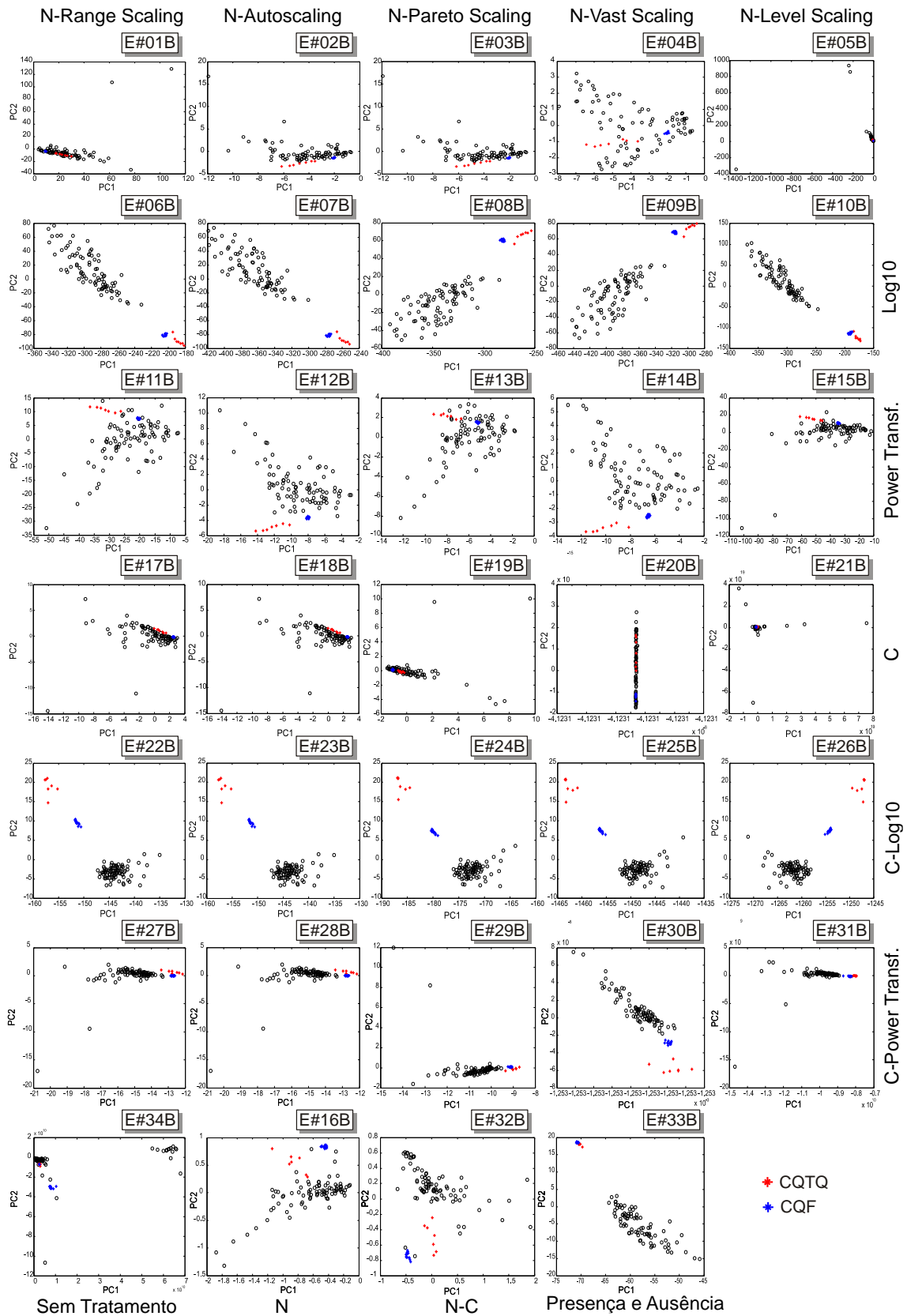


Figura 46. Escores obtidos nos estudos dos pré-processamentos com a matriz A (*Noise Level* 1.10^6).



Legenda: N=Normalizado, C=Centrado na média.

Figura 47. Escores obtidos nos estudos dos pré-processamentos com a matriz B (*Noise Level* 1.10^5).



Legenda: N=Normalizado, C=Centrado na média.

Com o uso da matriz presença e ausência (E#33B) informações importantes para o agrupamento podem ser perdidas reduzindo a exatidão do agrupamento, já que diferença de concentração de metabólitos não são levadas em consideração. No entanto, esta é uma forma de minimizar variações não biológicas e problemas relacionados a heteroscedasticidade e concentração das variáveis. Quando usada a centragem na média seguida de algum método de escalonamento, não houve evidência da variabilidade entre as amostras de *Mikania*, resultando em um grupo denso apesar de um bom agrupamento das amostras CQF e CQTQ, portanto o uso da centragem foi descartada (E#22B até E#26B e E#27B até E#31B)

Com bases nas observações acima, conclui-se que as matrizes E#6B, E#7B, E#8B, E#9B, E#10B e E#33B possibilitaram a visualização de diferentes grupos entre as amostras de *Mikania* e agrupamento dos CQFs e CQTQs com baixa dispersão, portanto estas serão avaliadas na próxima etapa de validação dos métodos de processamento da matriz de dados.

3.2.2.2. Avaliação dos métodos de processamento de dados por HCA

Os dendogramas gerados através da análise por HCA das planilhas pré-processadas que passaram nos critérios de aceitação na seção 3.2.1.1 (E#06B, E#07B, E#08B, E#09B, E#10B e E#33B) foram comparados (Figura 48 e Figura 49).

Todas as matrizes resultaram no agrupamento das amostras CQF e CQTQ em uma grande chave diferente e agrupamento próximo das espécies: 9/28/72/45: *M. cordifolia*, 41/68: *M. alvimmi*, 8/74: *M. paranensis*, 69/70 *M. officinalis*. Alguns pré-tratamentos os quais usam o desvio padrão como fator de escalonamento (*pareto scaling*, *vast scaling* e *autoscaling*) não resultaram no agrupamento próximo das duas amostras de *M. hirsutissima* (23/48) e *M. paranensis* (8/74). As duas amostras de *M. hirsutissima* usando as matrizes E#07B (*autoscaling_Log10*) e E#08B (*Pareto scaling_Log10*) não se agruparam, localizando-se em chaves completamente diferentes (grupo A e grupo B), assim como as duas espécies de *M. paranensis* se agruparam em subchaves diferentes. O mesmo perfil foi observado usando a matriz E#33B (presença e ausência), porém as duas amostras da espécie de *M. paranensis* se agruparam na mesma subchave. A matriz E#09B (*Vast scaling_Log10*) resultou em um agrupamento mais disperso das espécies de *M. paranensis*, porém as espécies de *M. hirsutissima* agruparam-se na mesma subchave dentro do grupo B.

Figura 48. Dendogramas gerados por HCA a partir das matrizes (A) E#06B e (B) E#07B e (C) E#08B.

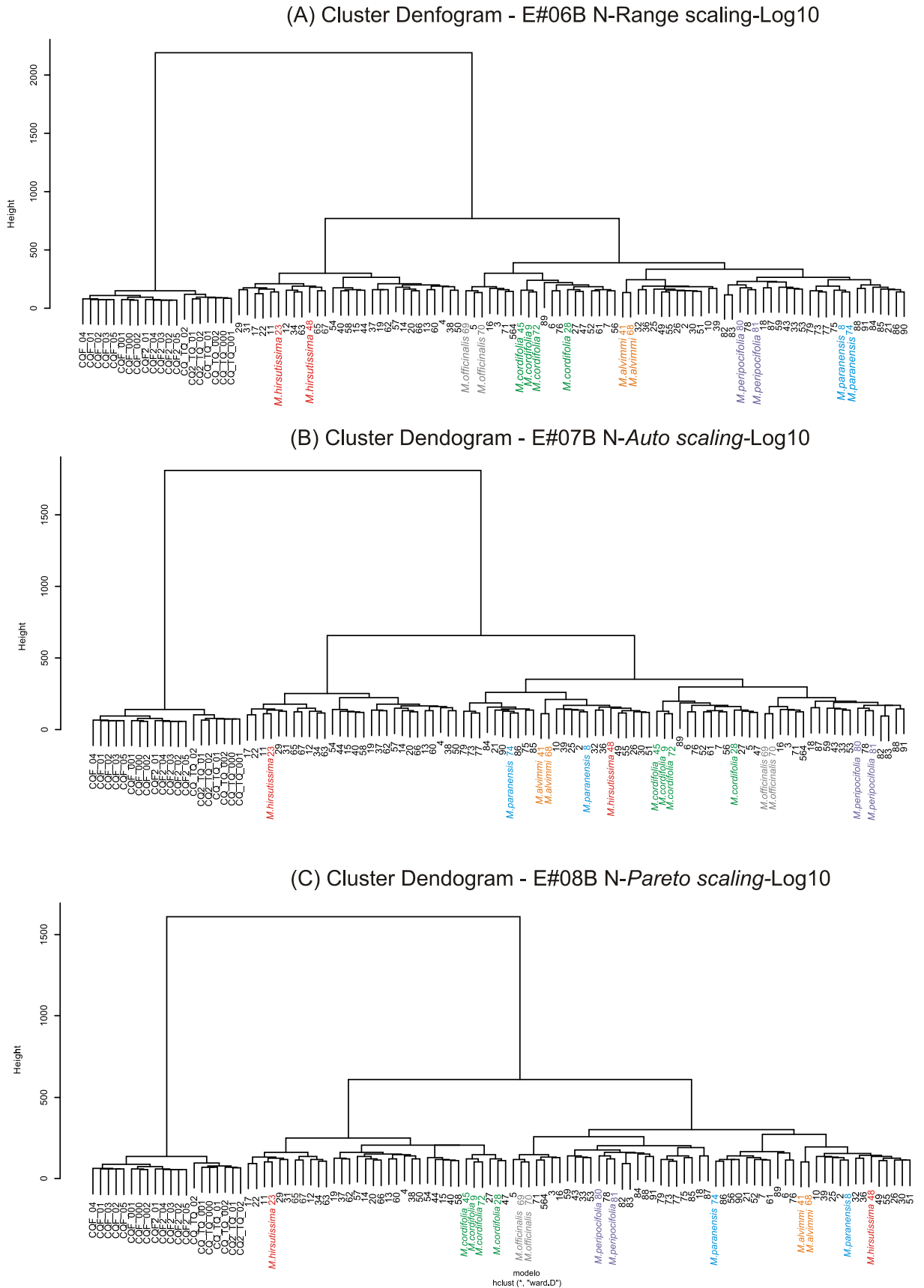
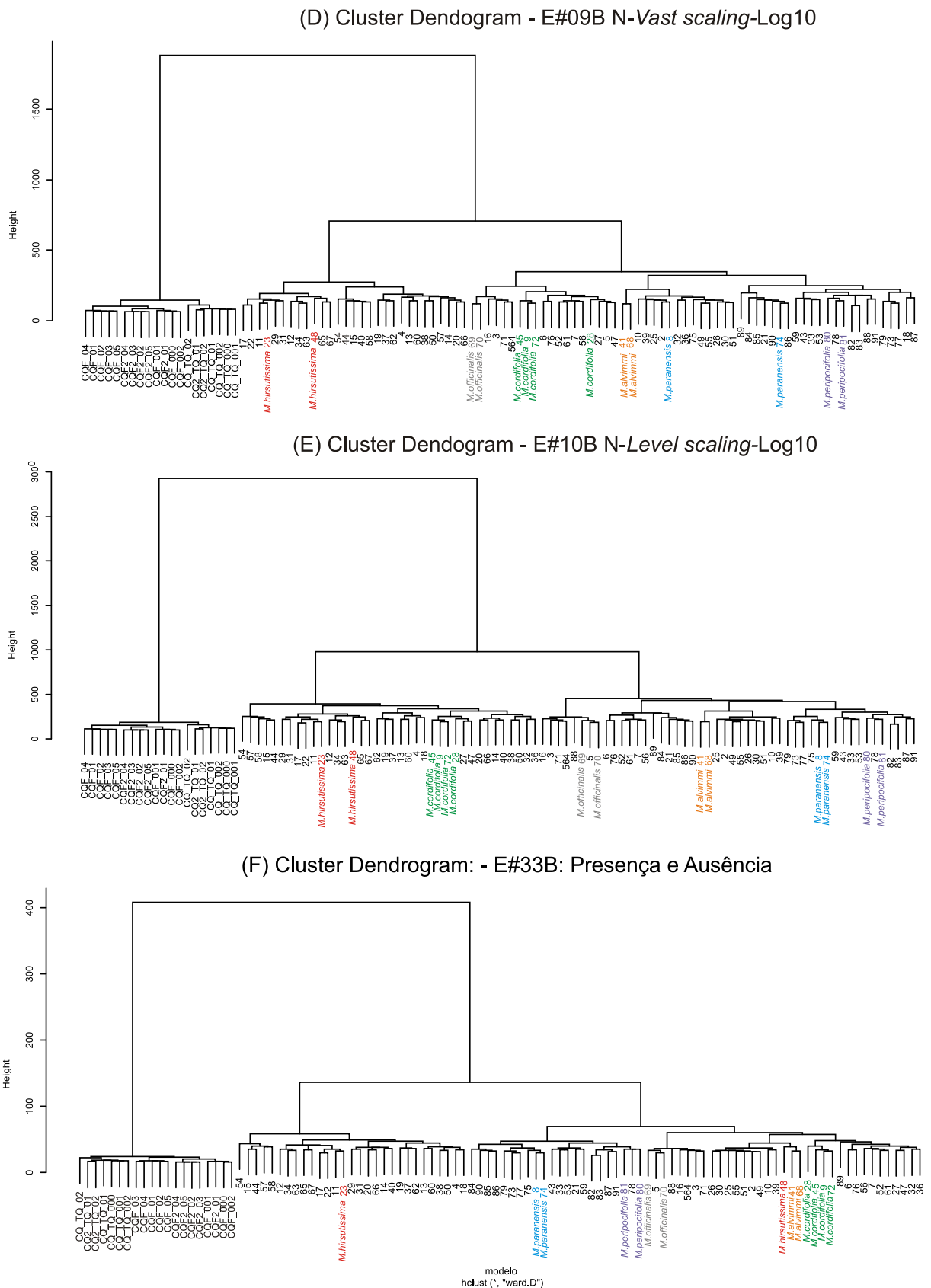


Figura 49. Dendogramas gerados por HCA a partir das matrizes (D) E#09B e (E) E#10B e (F) E#33B.



As matrizes E#06B (*range scaling*_Log10) e E#10B (*level scaling*_Log10) resultaram no agrupamento de todas as amostras de mesma espécie dentro das mesmas subchaves. O uso do *level scaling* resultou no agrupamento mais próximo das amostras de *M. cordifolia* no mesmo grupo A onde se localiza as espécies de *M. hirsutissima*. Com o uso do *range scaling*, as amostras *M. cordifolia* se localizaram no grupo B, exemplificando claramente o impacto da escolha dos métodos de pré-tratamento no agrupamento das amostras após análise multivariada. Devido ao fato que a espécie *M. hirsutissima* pertence ao grande subgênero *Cylindroleps* e a espécie *M. cordifolia*, ao subgênero *Mikania*,⁸⁸ a matriz E#06B foi validada e usada nos estudos metabolômicos por LC-MS e conseqüentemente na fusão de dados no capítulo 6.

3.3. Discussão

O acesso ao conteúdo metabólico completo de uma dada matriz de estudo ainda representa um grande desafio para se alcançar de fato o objetivo legítimo dos estudos metabolômicos não direcionados. Devido a grande diversidade da natureza dos metabólitos presentes em plantas, busca-se alcançar a extração e detecção do maior número possível de metabólitos com o objetivo de ser obter uma visão abrangente do metaboloma em estudo. Desta forma diferentes desafios são encontrados nas etapas de determinação do protocolo de extração de metabólitos da matriz em estudo e uso de diferentes técnicas analíticas.

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tem sido frequentemente usada como técnica analítica em diversos estudos metabolômicos^{108,109} com diferentes finalidades e aplicações. Além da escolha da técnica analítica adequada para a aplicação do estudo metabolômico, uma avaliação de risco de cada etapa envolvida no fluxo do estudo dever ser feita, levantando-se pontos críticos os quais possam impactar na qualidade dos resultados obtidos no final do estudo metabolômico. Toda etapa crítica identificada deve ser validada através da determinação de parâmetros de validação e critérios de aceitação, os quais devem ser embasados pelos objetivos da metodologia proposta.

Em metabolômica não existe um protocolo referência único o qual descreve quais etapas devem ser validadas e como determinar critérios de aceitação, visto que estes estudos possam apresentar diversos objetivos e finalidade de uso. No estudo

metabolômico não direcionado do gênero *Mikania* o protocolo de análise foi primeiramente desenhado e o risco envolvido em cada uma dessas etapas foi avaliada através de um diagrama de causa e efeito evidenciando os seguintes pontos a serem validados e monitorados: procedimento de extração de metabólitos, desenvolvimento da metodologia analítica e escolha da técnica analítica mais adequada, métodos de pré-processamento de dados, escolha do método de análise multivariada para avaliação do agrupamento das amostras e seleção de variáveis e proposta de identidade dos metabólitos discriminantes nos estudos metabolômicos.

A etapa de extração dos metabólitos é muito crítica dentro do fluxo dos estudos metabolômicos, assim como discutido no capítulo 2, sendo usado o planejamento experimental para otimizar e maximizar a extração de metabólitos envolvendo estudos de recuperação. O desenvolvimento do método analítico também foi baseado em planejamento fatorial para obtenção de um maior conhecimento sobre o processo de separação dos metabólitos presentes nas espécies de *Mikania* e quais fatores cromatográficos influenciam no perfil cromatográfico contribuindo para otimização do método para que este atenda o objetivo dos estudos metabolômicos direcionados e não direcionados por LC-UV-MS.

A escolha dos métodos para pré-processamento de dados também pode impactar diretamente na conclusão e na interpretação dos dados em estudos metabolômicos. A escolha dos métodos de pré-processamento de dados não adequados pode resultar em uma interpretação dos dados equivocada ou até mesmo a uma visão distante do verdadeiro conjunto de informações que o metaboloma em estudo contém e representa. Diferentes métodos que possam ser usados serão somente adequados para um determinado estudo metabolômico, se estes todos resultarem em um mesmo conjunto de informações que podem ser interpretados igualmente, devendo os métodos ser limitados, estudados e discutidos. Desta forma, um estudo da variação entre os resultados obtidos após aplicação de diferentes pré-processamentos foi realizado considerando critérios de aceitação para validação da matriz de dados e contribuir na tomada de decisão de quais métodos são mais adequados.

Na avaliação dos cortes de sinais dos dados brutos (ordem de grandeza de sinais considerados como ruído) por PCA, foi evidenciado que o corte de dados mais alto (ordem de 1.10^6) poderia excluir metabólitos discriminantes para o agrupamento das

amostras das espécies de *Mikania*, visto que as amostras CQF e CQTQ conhecidas não se agruparam. Essa etapa geralmente não é muito bem justificada em diversos estudos metabolômicos, e critérios de aceitação que contribuem na tomada de decisão não são empregados, portanto o impacto da variação desse parâmetro não é entendido.

Em estudos metabolômicos aplicados a proposta de classificação quimiotaxonômica, o comportamento das diferentes espécies em estudo não é inicialmente conhecido sendo um desafio o julgamento se os métodos envolvidos no pré-processamento são adequados e se evidenciam de forma correta a real informação biológica contida nos dados adquiridos, caso parâmetros de validação não sejam considerados para guiar a tomada de decisão. Foi observado também nesta etapa, que após análise por HCA as amostras das mesmas espécies tinham a tendência em se agrupar mesmo usando-se diferentes métodos de pré-processamentos, porém para alguns métodos, amostras da mesma espécie não se agruparam. Desta forma, o agrupamento próximo das amostras da mesma espécie foi considerado como um critério de aceitação para guiar a tomada de decisão para a escolha do método de pré-processamento mais adequado.

O método de escalonamento do tipo Pareto é usado com frequência em estudos metabolômicos, no entanto para a matriz de dados obtida por LC-MS, foi observado que esse tipo de escalonamento localizou as duas amostras da espécie *M. hirsutissima* em diferentes grupos (grupo A e B) os quais apresentam uma grande diferença do conteúdo metabólico. Outros métodos de escalonamento os quais usam o desvio padrão (DP) como fator de escalonamento (*autoscaling* - DP e *Vast Scaling* - DPR), apresentaram comportamentos parecidos e não foram validados. Com o uso do método *Level Scaling* as amostras da espécie *M. hirsutissima* localizaram-se no mesmo grande grupo da espécie *M. cordifolia*. Em conjunto com os dados filogenéticos do gênero *Mikania*, o uso do *level scaling* foi considerado inválido devido ao fato que a espécie *M. hirsutissima* pertence ao subgênero *Cylindrolepis* e a espécie *M. cordifolia* ao outro grande subgênero *Mikania*⁸⁸.

Para a validação do método de análise, diferentes critérios de aceitação foram determinados e parâmetros monitorados para a identificação de possíveis variabilidades não biológicas que pudessem ocorrer durante a aquisição dos dados. O agrupamento das amostras CQF e CQTQ após análise por HCA seguido por PLS-

DA foi usado como ferramenta para detecção de possíveis problemas de variações não biológicas durante as análises das espécies de *Mikania* e também para identificar a necessidade de reparos e/ou reinjeções de amostras. Além disso, as amostras CQF e CQTQ também serviram como critério para avaliação da adequabilidade do sistema e avaliação da sensibilidade ao longo das análises.

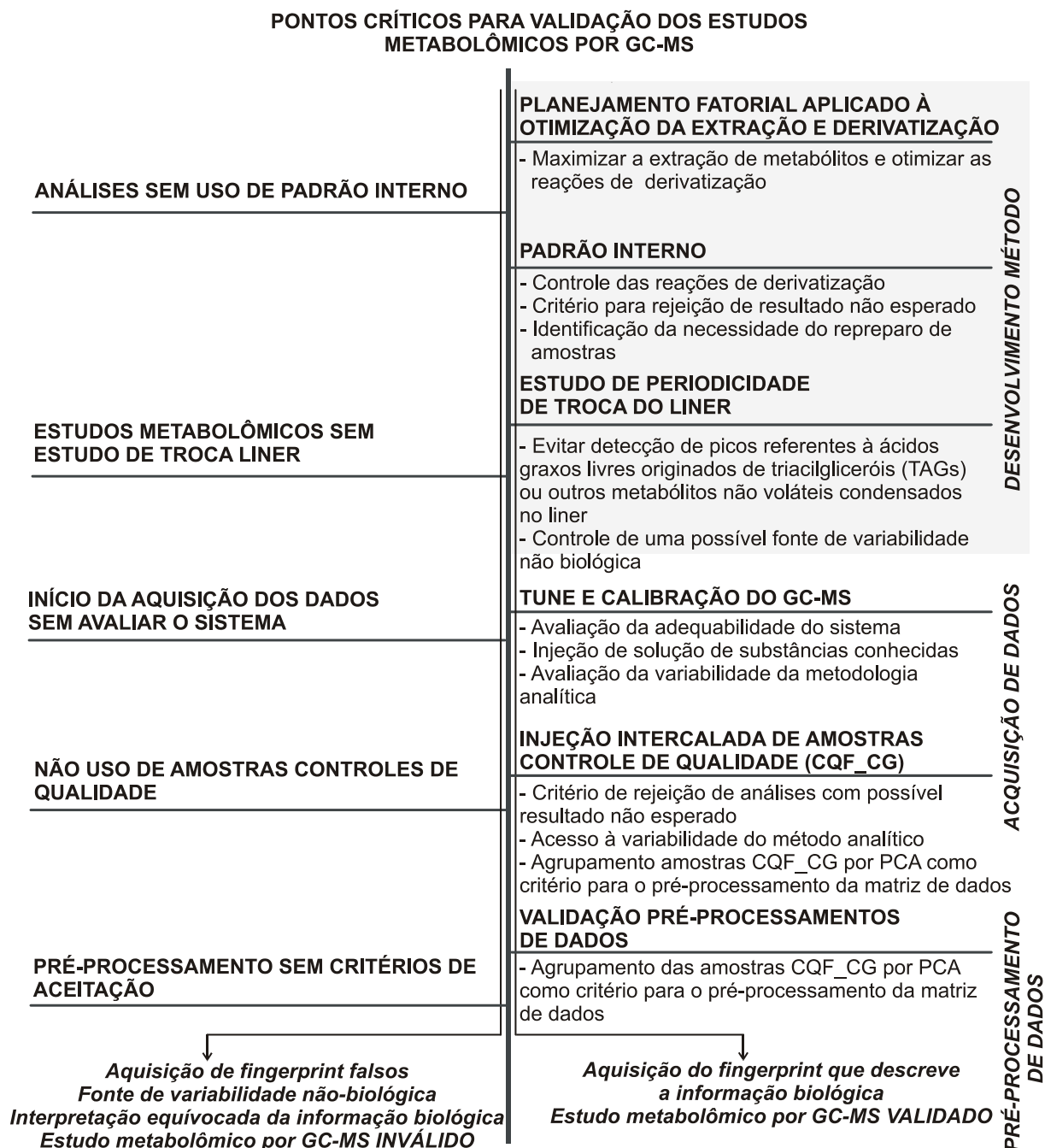
Após a aquisição dos dados por LC-MS (ESI+ e ESI-) e validação da aquisição destes e do método de pré-processamento, a matriz de dados validada foi concatenada com as matrizes validadas obtidas por GC-MS (capítulo 4) e RMN de ^1H (capítulo 5). A fusão das matrizes será discutido mais adiante no capítulo 6.

4. Estudos metabolômicos não direcionados por GC-MS

Para as análises por GC-MS os metabólitos devem apresentar propriedades as quais possibilitam sua volatilização e eluição pelo sistema de GC. Reações de derivatização possibilitam que compostos polares se tornem suficientemente voláteis podendo ser eluídos em temperaturas razoáveis evitando decomposição térmica.^{82,78} O processo de derivatização portanto poderá aumentar a volatilidade de compostos de interesse, até mesmo reduzir a adsorção no sistema de GC otimizando a resposta, separação cromatográfica e simetria do pico.^{82,78} Os metabólitos que apresentam grupos funcionais com hidrogênio ativo como -OH, -SH, ou -NH e -COOH representam um desafio para serem analisados por GC pois devido à interações intermoleculares mais fortes apresentam volatilidade reduzida. A derivatização basicamente será usada como estratégia para: melhora da resolução e simetria de pico de compostos mais polares; análise de compostos relativamente não voláteis;

otimização da eficiência da análise e aumento da detectabilidade.⁸² Este capítulo aborda estratégias de derivatização dos metabólitos, assim como outras etapas identificadas como críticas nas análises por GC-MS e estabelecimento de parâmetros de validação conforme descritas na Figura 50.

Figura 50. Pontos críticos para validação dos estudos metabolômicos por GC-MS



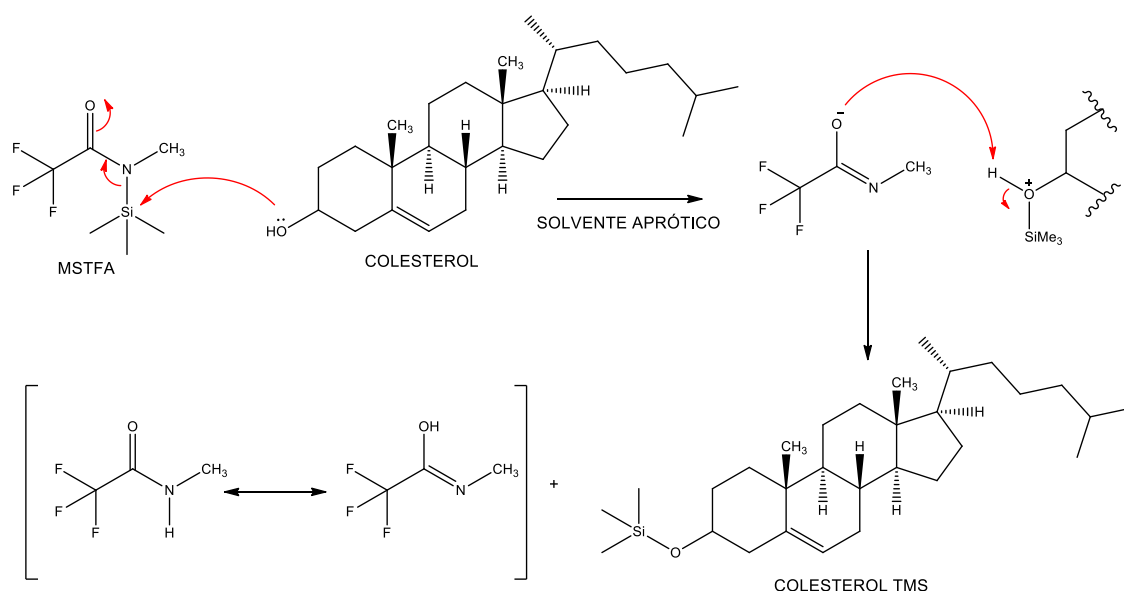
Três tipos básicos de derivatização são geralmente usados para análises por GC: silanização, acilação e alquilação, sendo a silanização a forma mais comum de derivatizar compostos contendo grupos funcionais como: -OH, -SH, ou -NH,^{80,82}

reduzindo a polaridade dos compostos e evitando interações por ligação de hidrogênio intermolecular e aumentando a volatilidade dos metabólitos (Figura 51).⁸²

Diferentes tipos de reagentes podem ser usados para silanização como: trimetilclorosilano (TMCS), trimetilsililimidazol (TMSI), bistrimetilsililacetamida (BSA), bistrimetiltrifluoroacetamida (BSTFA), N-metil trimetilsililfluoroacetamida (MSTFA) entre outros.⁸² Derivatização com mais de um reagente pode ser necessário para compostos que contêm diferentes grupos funcionais.⁸¹ Para o estudo de otimização das condições de extração e derivatização dos metabólitos, diferentes fatores que possam impactar na aquisição do perfil metabólico por GC-MS e extração foram estudados através de planejamento fatorial para detecção de um maior número de e intensidade de picos no TIC. A estratégia para estabelecimento dos fatores a serem estudados por planejamento fatorial foi baseada nas seguintes observações:

- Melhores grupos abandonadores (reagentes organosilanos) possibilitarão reações de silanização mais rápidas, dando suporte para a escolha do uso do MSTFA como reagente organosilano.

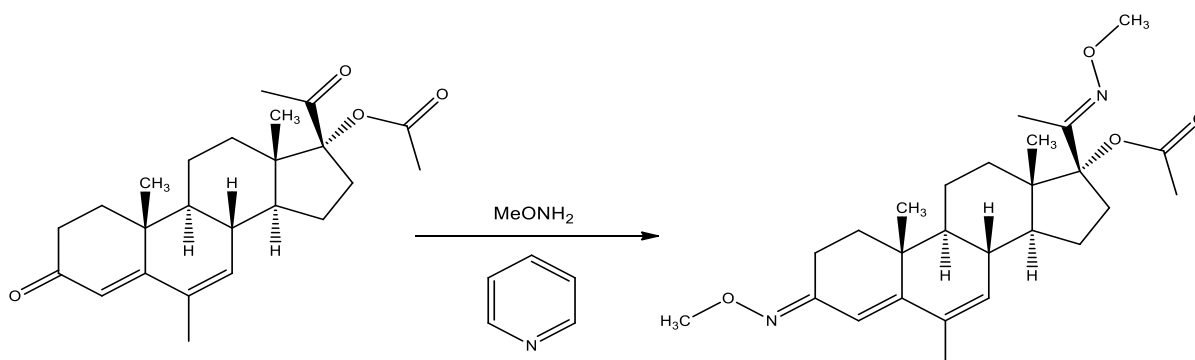
Figura 51. Silanização do colesterol usando MSTFA.



- A eficiência da reação de silanização (substituição nucleofílica S_N2) (Figura 51) é fortemente influenciada pelo solvente usado, o qual deve facilitar a saída do grupo abandonador e não solvatar o nucleófilo, como por exemplo uso de solventes apróticos. No estudo foi usado a piridina como solvente.

- Metabólitos que contêm grupo cetona podem formar entre 15-20% de enol trimetilsilil ésteres após silanização. Reações de metoximação formando metoxiaminas podem ser realizadas antes da silanização para otimizar a eficiência cromatográfica para tais compostos⁸², ex. Progesterona (Figura 52). Desta forma, a oximação será realizada e uma dos fatores a serem avaliados no estudo de triagem será a temperatura para a reação de oximação.

Figura 52. Metoximação do megestrol acetato usando alcóxilamina e piridina.



4.1. Otimização das condições de extração e derivatização dos metabólitos

4.1.1. Materiais e métodos

Para a avaliação das melhores condições de extração e derivatização dos metabólitos presentes nas espécies de *Mikania* para análise por GC-MS, usando planejamento fatorial diferentes fatores foram selecionados, os quais possam impactar na extração e detecção dos metabólitos por GC-MS. Padrões internos foram adicionados em todas as amostras para controle de qualidade do preparo de amostra tanto nos estudos de triagem quanto otimização. A não detecção dos padrões derivatizados na amostra resultou no reparo das amostras (seção 4.1.1.1) e reanálise.

4.1.1.1. Preparo das amostras

4.1.1.1.A. Solução referência A: 0,2 mg/mL de ACIN e ACAU em clorofórmio.

4.1.1.1.B. Solução referência B: 0,2 mg/mL de megestrol acetato em clorofórmio.

4.1.1.1.C. Solução referência C: 0,2 mg/mL de estigmasterol em clorofórmio.

4.1.1.1.D. Solução referência D: 0,2 mg/mL de USP (+)-catequina RS (Lote:F0H389) em uma mistura de clorofórmio:metanol (9:1).

4.1.1.1.E. Cloridrato de metoxilamina: 20 mg/mL de cloridrato de metoxilamina (Sigma-Aldrich Lote: BCBQ9028V) em piridina (Sigma-Aldrich Lote: STBH0036).

4.1.1.1.F. Amostras para experimento de triagem (10mg/mL): 10 mg da mistura das folhas pulverizadas das espécies de *Mikania* foram submetidas à extração com 1 mL do solvente extrator conforme Tabela 41. A extração foi realizada em ultrassom, conforme período de duração descrito na seção 4.1.1.3. Após a extração, as amostras foram filtradas por uma membrana de PVDF 0.22 μ m e 500 μ L do filtrado foi transferido para um vial de 2 mL. Em seguida 100 μ L das soluções referências A, B, C e D foi adicionado ao vial contendo a amostra. Após o solvente ser evaporado, 200 μ L da solução 20 mg/mL de cloridrato de metoxilamina em piridina foi adicionada ao vial e as amostras foram sonicado à 40°C ou 60°C durante 1 hora conforme o desenho experimental. Em seguida, 100 μ L ou 50 μ L de MSTFA (Sigma-Aldrich Lote: BCP2381V) foram adicionados ao vial adicionalmente à 200 μ L de piridina e as amostras foram sonicadas à temperatura ambiente por 30 minutos conforme desenho experimental. Após a silanização, o volume foi completado para um volume final de 500 μ L com clorofórmio e analisadas por GC-MS.

4.1.1.1.G. Amostras para planejamento Doehlert (10 mg/mL): 10 mg da mistura das folhas pulverizadas das espécies de *Mikania* foram submetidas à extração com 1 mL do solvente extrator conforme Tabela 42 e Tabela 43. A extração foi realizada em ultrassom durante 30 minutos. Após a extração, as amostras foram filtradas por uma membrana de PVDF 0,22 μ m e 500 μ L do filtrado foi transferidos para um vial de 2 mL. Em seguida, 100 μ L das soluções referências A, B, C e D foi adicionado ao vial e por fim o solvente foi evaporado. Para a metoximação, 200 μ L da solução 20 mg/mL de cloridrato de metoxilamina em piridina foi adicionada ao vial após evaporação do solvente e sonicada à 40°C durante 1 hora. Em seguida, 50 μ L de MSTFA foram adicionados ao vial adicionalmente à 200 μ L de piridina e as amostras foram sonicadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a silanização o volume foi completado para um volume final de 500 μ L com clorofórmio e analisadas por GC-MS.

4.1.1.2. Método de Análise por GC-MS

Os experimentos para o estudo de triagem e otimização das condições de extração dos metabólitos e derivatização foram obtidos por GC-EI-MS (Agilent Series 5975) conforme método de análise DES_GCMS_00 (Tabela 40).

Tabela 40. Método DES_GCMS_00 usado nos estudos de triagem e otimização das condições de extração dos metabólitos e derivatização por GC-MS.

Condições GC-MS (DES_GCMS_00)
Coluna: Agilent DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)
Gás arraste: Hélio
Inj. Vol: 2,5 µL
Temperatura Injetor: 250°C
Temperatura do Forno: 210°C - 5 min. 210°C até 320°C em 2°C/min. 320°C em 7 min.
Split: 2:1
Liner: Split Vidro deativado com lã de vidro deativada (Agilent P/N:5183-4647)
Temperatura MS transfer: 330°C
Fonte de Ionização: EI (<i>m/z</i> range: 10 – 950)
Temperatura da Fonte de Ionização: 230°C
Temperatura do Quadrupolo: 150°C

4.1.1.3. Estudos de triagem baseado em planejamento fatorial fracionário

Foram consideradas inicialmente cinco fatores importantes para a extração e derivatização dos metabólitos para as análises por GC-MS, sendo estabelecido o uso do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para este estudo (Tabela 41), envolvendo no total 16 experimentos. As respostas desejadas e monitoradas foram: maior valor de y_1 (número de picos no TIC) e y_2 (área dos picos no TIC).

Tabela 41. Condições das variáveis independentes com nível superior (+), inferior (1) para o estudo de triagem usando planejamento factorial fracionário para otimização da extração e derivatização de metabólitos para análise por GC-MS

Variáveis	Domínio Experimental (Níveis)	
	-1	+1
(x_1) Proporção CHCl_3 em metanol	20%	80%
(x_2) Tempo de extração	30 min	60 min
(x_3) Temperatura de extração	40°C	60°C
(x_4) Temperatura de oximação	40°C	60°C
(x_5) Volume de MSTFA	50µL	100µL

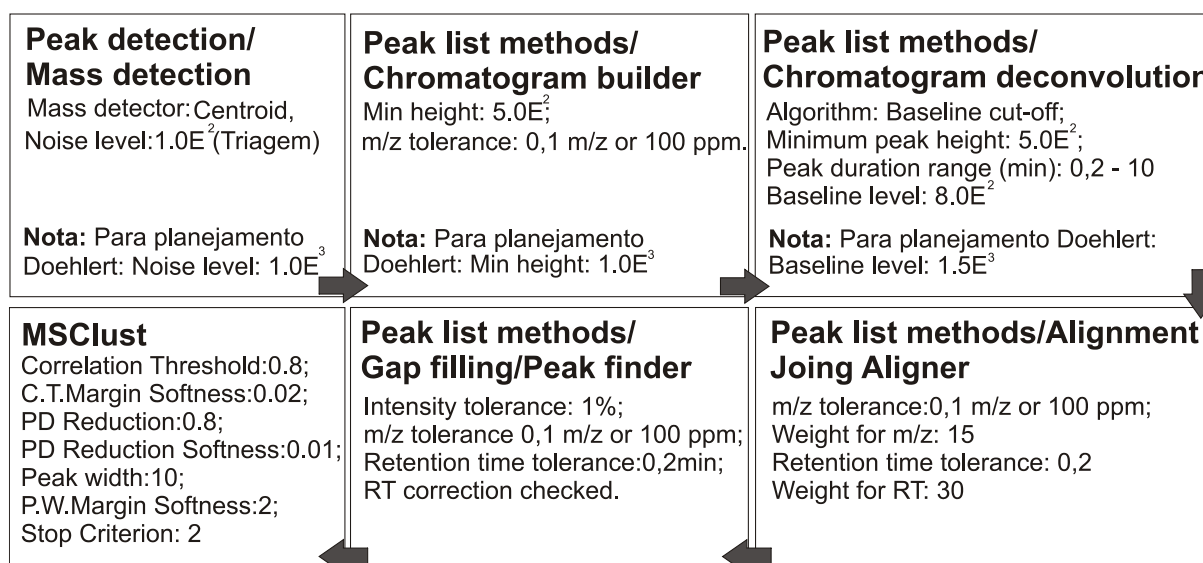
Respostas (Y) : (y_1) N° picos e (y_2) Área TIC - EI.

4.1.1.4. Pré-processamento e pré-tratamento dos dados de GC-MS

Os dados brutos obtidos na triagem por GC-MS em formato *.d* foram convertidos para o formato *.mzXML*, usando o *ProteoWizard MSconvert* (EUA) e em

seguida exportados para o software *MZmine 2.11* (MZmine Development Team). Esses dados foram submetidos a uma série de pré-processamentos como: *Peak detection*, deconvolução, deisotoping, alinhamento, gap filling entre outros (Figura 53), sendo os dados processados exportados em formato .csv para uma planilha de Excel (Microsoft 2013).

Figura 53. Sequência de pré-processamentos da matriz de dados obtida por GC-MS, usando Mzimine e MSCLUST.



Em seguida, a matriz de dados obtida foi submetida à redução dos sinais de *m/z* detectados por GC-MS usando-se o algoritmo *MSClust*.⁸⁷ A finalidade do uso desse algoritmo é a de agrupar os diversos sinais de *m/z* associados a um único metabólito, diminuindo o número de sinais correlacionados entre si para as análises multivariadas. A matriz de dados pré-processada através do *MZmine* e *MSClust* foi usada para cálculo do total de área de cada metabólito extraído e detectado e número de picos obtidos. Estes resultados foram utilizados para o cálculo dos contrastes e coeficientes usando-se do Excel 2013 e Matlab R2013b (Mathworks).

4.1.1.5. Cálculo dos contrastes e estimativa de erros no estudo de triagem

Cálculo dos efeitos e estimativa dos erros foram feitos conforme item 2.4.1.6.

4.1.1.6. Doehlert aplicado à otimização do preparo de amostras

Os fatores significativos avaliados no estudo de triagem foram selecionados para o planejamento do estudo de otimização do modelo, sendo elas a proporção de

clorofórmio no solvente extrator e temperatura de extração. Valores de cada fator e seus respectivos níveis se encontram descritos na Tabela 42.

Tabela 42. Condições das variáveis independentes para cada nível estudado para o estudo de refinamento usando planejamento do tipo Doehlert para otimização da extração e derivatização de metabólitos para análise por GC-MS.

Variáveis	Domínio Experimental (Níveis)						
	-1	-0,866	-0,5	0	+0,5	+0,866	+1
(x₁) %CHCl₃ em MeOH	0%	-	25%	50%	75%	-	100%
(x₂) Temperatura extração	-	25°C	-	40°C	-	55°C	-

O design do tipo Doehlert foi realizado para o refinamento do estudo, avaliando-se duas variáveis através de 7 experimentos (Tabela 43). No planejamento dos experimentos dois pontos adicionais (experimentos 8 e 9) foram considerados com o objetivo de se ter ao menos 3 réplicas (experimentos 1, 8 e 9) para avaliação do erro intrínscio dos ensaios realizados e para o cálculo da soma quadrática do erro puro.

Tabela 43. Matriz de experimentos para duas variáveis usada no estudo de refinamento usando planejamento do tipo Doehlert para otimização da extração e derivatização de metabólitos para análise por GC-MS.

Exp.	Matriz codificada		Matriz com condições experimentais	
	%CHCl ₃ em MeOH (x ₁)	Temperatura extração (x ₂)	%CHCl ₃ em MeOH (x ₁)	Temperatura extração (x ₂)
1	0	0	0,5 mL MeOH + 0,5mL CHCl ₃	40°C
2	-1	0	1mL MeOH	40°C
3	-0,5	-0,866	0,75 mL MeOH + 0,25 mL CHCl ₃	25°C
4	1	0	1mL CHCl ₃	40°C
5	0,5	0,866	0,25 mL MeOH + 0,75 mL CHCl ₃	55°C
6	-0,5	0,866	0,75 mL MeOH + 0,25 mL CHCl ₃	55°C
7	0,5	-0,866	0,25 mL MeOH + 0,75 mL CHCl ₃	25°C
8	0	0	0,5 mL MeOH + 0,5 mL CHCl ₃	40°C
9	0	0	0,5 mL MeOH + 0,5 mL CHCl ₃	40°C

As respostas monitoradas foram: (y_1) número de picos e (y_2) área total dos picos monitorados no TIC obtido por GC-EI-MS (método DES_GCMS_00 - Tabela 40). As respostas desejadas foram: maior valor de y_1 e y_2 .

4.1.1.7. Função de Desejabilidade e Superfície de Resposta

A escolha das melhores condições de extração e derivatização dos metabólitos foi realizada avaliando-se a região na superfície de resposta a qual resultaria em um maior número de picos (y_1) e área total (y_2) no TIC. Com intuito de identificar uma condição a qual tenha compromisso em maximizar mais de uma resposta monitorada, as respostas do planejamento fatorial foram convertidas em desejabilidades individuais (d_i) (Eq. 18) e em seguida foi calculada a desejabilidade global (D) (Eq. 19), usando-se o excel.

$$d_i = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ 1 & \text{se } y > T \end{cases} \quad \text{Eq. 18}$$

$$D = \sqrt[m]{d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m} \quad \text{Eq. 19}$$

Sendo:

L: Valor Mínimo, T: Valor Alvo, U: Valor Máximo e s: peso da resposta e M: número de respostas monitoradas.

O cálculo dos coeficientes de regressão e identificação dos coeficientes significantes para o modelo foram feitos respectivamente conforme os itens 2.4.1.8 e 2.4.1.9. A estimativa dos erros para os coeficientes e avaliação da capacidade preditiva e ajuste do modelo foram feitos conforme itens 2.4.1.10 e 2.4.1.11. A superfície de resposta foi plotada usando-se o software Matlab R2013b baseado no seguinte modelo matemático:

$$y = 0,15072 - 0,50825x_1 - 0,15145x_2 + 0,36009x_1^2 + 0,302898x_1x_2 \quad \text{Eq. 20}$$

4.1.2. Resultados

4.1.2.1. Estudos de triagem baseado em planejamento fatorial fracionário

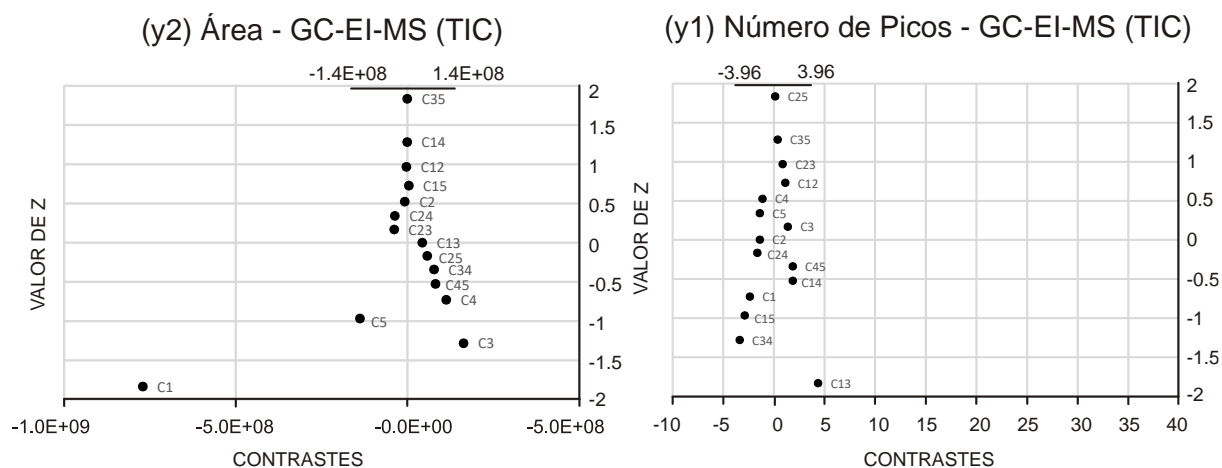
Após o preparo e injeção dos 16 experimentos estabelecidos pelo planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} (Tabela 41), seguido do tratamento dos dados brutos conforme Figura 53, as respostas y_1 (Número de picos) e y_2 (Área picos) foram obtidas (Tabela 44).

Tabela 44. Respostas obtidas nos estudos de triagem por GC-MS.

Exp.	Número de picos (y_1)	Área picos (y_2)
1	981	2457007450
2	975	1924662718
3	980	2752377918
4	969	1773413373
5	981	2821281725
6	977	1818690920
7	981	2589786283
8	985	2022579880
9	982	2730113525
10	976	1804829215
11	980	2667222261
12	976	1847949301
13	978	2848404095
14	980	2238187383
15	971	2829713761
16	977	2099773370

A princípio, a estimativa do erro foi avaliada em um gráfico dos contrastes *versus* valores de z^{32} (Figura 54).

Figura 54. Gráfico contrastes *versus* valor de z para as respostas y_1 e y_2 .



A partir do gráfico de probabilidade, as variáveis x_2 , x_4 e x_5 foram consideradas não significativas para as respostas número de picos (y_1) e área dos picos (y_2). Estas variáveis foram excluídas para a reorganização do planejamento, gerando novas réplicas, possibilitando o cálculo do erro ($\alpha=0,05$) e da variância experimental, sendo estes usados no cálculo do erro dos contrastes e erro crítico. Os contrastes com valor superior, em módulo, ao valor crítico, foram considerados significativos ($\alpha=0,05\%$), e os com valor inferior, não significativos (Tabela 45).

Tabela 45. Cálculo do erro de um contraste após reorganização do planejamento.

Y	Var. Sign.	Nº réplicas	g.L	Variância Exp.	Erro Exp.	Variância Contr.	Erro Contr.	Valor Crítico
y_1	x_1, x_3	2	8	11.81	3,44	2,95	1.72	3.96
y_2	x_1, x_3	2	8	$1,5 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^{15}$	$6,2 \cdot 10^{10}$	$1,4 \cdot 10^8$

Considerando a resposta área dos picos (y_2) detectados no TIC, observou-se que somente o efeito dos contrastes primários C_1 e C_3 apresentaram valor acima do erro crítico (erro crítico: $1,4 \cdot 10^8$), sendo as variáveis proporção de metanol e clorofórmio no solvente extrator (x_1) e temperatura de extração (x_3) consideradas significativas para a resposta y_2 monitorada. Somente o efeito da interação entre as variáveis x_1 e x_3 (C_{13}) impactou de forma significativa na resposta número de picos (y_1). Desta forma, as variáveis proporção de metanol e clorofórmio no solvente extrator (x_1) e temperatura de extração (x_3) foram selecionadas para o refinamento do modelo através do planejamento do tipo Doehlert.

4.1.2.2. Planejamento do tipo Doehlert aplicado à otimização das condições de extração e derivatização dos metabólitos

O planejamento do tipo Doehlert foi realizado para otimização do experimento, permitindo encontrar a região ótima na superfície de resposta³² para obtenção das condições que fornecem como resposta um maior número de picos e área total no TIC adquiridos por GC-EI-MS. Para a construção da superfície de resposta, considerando as duas respostas escolhidas (x_1 : proporção de metanol e clorofórmio no solvente extrator e x_2 : temperatura de extração), as respostas do planejamento fatorial foram convertidas em valores entre 0 e 1 de desejabilidade individual (d_i), sendo que estes valores representam respostas desejáveis (1) e não desejáveis (0) (Tabela 46).

Tabela 46. Respostas obtidas no planejamento do tipo Doehlert e desejabilidade individuais e global.

Exp.	Número de picos (y_1)	Área picos (y_2)	d_1	d_2	D
1	87	163793468	0,05	0,40	0,139
2	93	297828027	1,00	1,00	1,000
3	91	261234833	0,62	1,00	0,787
4	81	125978846	0,00	0,00	0,000
5	85	158481661	0,04	0,00	0,000
6	91	171079494	0,07	1,00	0,262
7	85	141838348	0,01	0,00	0,000
8	86	154203720	0,03	0,20	0,073
9	90	155995167	0,03	1,00	0,175

d: desejabilidade individual, *D*: Desejabilidade global. $L_1:85$, $T_1:90$, $s_1:1$, $L_2: 125978846$, $T_2: 297828027$, $s_2:2$.

A qualidade do ajuste do modelo foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) conforme Tabela 47. Nota-se que $F_{1\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ ($\alpha = 0,05$), evidenciando que as fontes de variação da regressão e do resíduo são estatisticamente diferentes, concluindo-se que o modelo é capaz de prever de forma adequada a resposta monitorada. Sendo $F_{2\text{calc}} < F_{\text{tab}}$, pode-se dizer que as fontes de variação falta de ajuste e erro puro são estatisticamente iguais, não havendo discrepância entre a resposta do modelo de previsão e a média das replicatas realizadas.

Tabela 47. Análise de variância para regressão usando-se como resposta os valores de desejabilidade calculados.

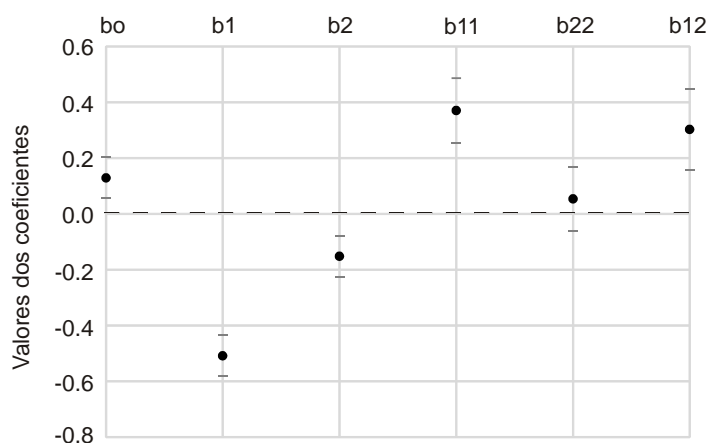
Fonte de Variação	SQ	g.L	MQ	$F_{\text{calc.}}$	F_{tabelado}
Regressão (REG)	1,078	5	0,216	(F_1) 113,83	$F_1 : 9,01$
Resíduos (RES)	0,006	3	0,002		(5 e 3 g.l.)
Erro Puro (EP)	0,005	2	0,003	(F_2) 0,1549	$F_2 : 18,51$
F. Ajuste (FAJ)	0,000	1	0,000		(1 e 2 g.l.)
Total	1,084	8	0,135		

A partir do primeiro modelo gerado, foi avaliado quais coeficientes gerados eram significantes, através do teste t ($\alpha = 0,05$) (Tabela 48). Como não há falta de ajuste, a MQ_{res} foi usada como estimativa da variância dos coeficientes, as quais devem ser ponderadas para cada coeficiente. Os intervalos de confiança foram obtidos pela multiplicação do erro de cada coeficiente pelo valor de t_{tab} (com 2 g.L. e $\alpha = 0,05$). Analisando a Tabela 48 e o gráfico dos coeficientes (Figura 55), verifica-se que b_{22} se confunde com seu erro ($t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ e $p\text{-valor} < 0,05$), portanto sendo não significativas podendo ser eliminado para o recálculo do modelo.

Tabela 48. Avaliação dos coeficientes de regressão gerados pelo modelo.

	Coeficientes	Erro crítico	t_{calc}	p	*t_{tab}
b₀	0,129096	0,00088	4,35	0,02	<i>Significativo</i>
b₁	-0,508251	0,00088	-17,14	0,00	<i>Significativo</i>
b₂	-0,151449	0,00088	-5,11	0,02	<i>Significativo</i>
b₁₁	0,370904	0,00220	7,91	0,01	2,92 <i>Significativo</i>
b₂₂	0,054076	0,00220	1,15	0,18	Não Significativo
b₁₂	0,302898	0,00352	5,11	0,02	<i>Significativo</i>

* t_{tab} com 95% confiança e 2 g.L

Figura 55. Gráfico dos coeficientes de regressão gerados e seus intervalos de confiança.

Após o recálculo nenhum coeficiente foi não significativo (Figura 56) e pela análise de variância observou-se uma ótima capacidade preditiva do modelo sendo $F_{1calc} > F_{tab}$ e $F_{2calc} < F_{tab}$ considerando 95% de confiança (Tabela 49 e Figura 56).

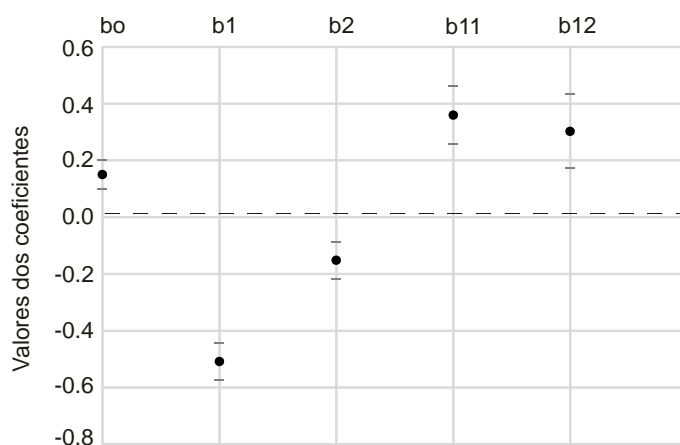
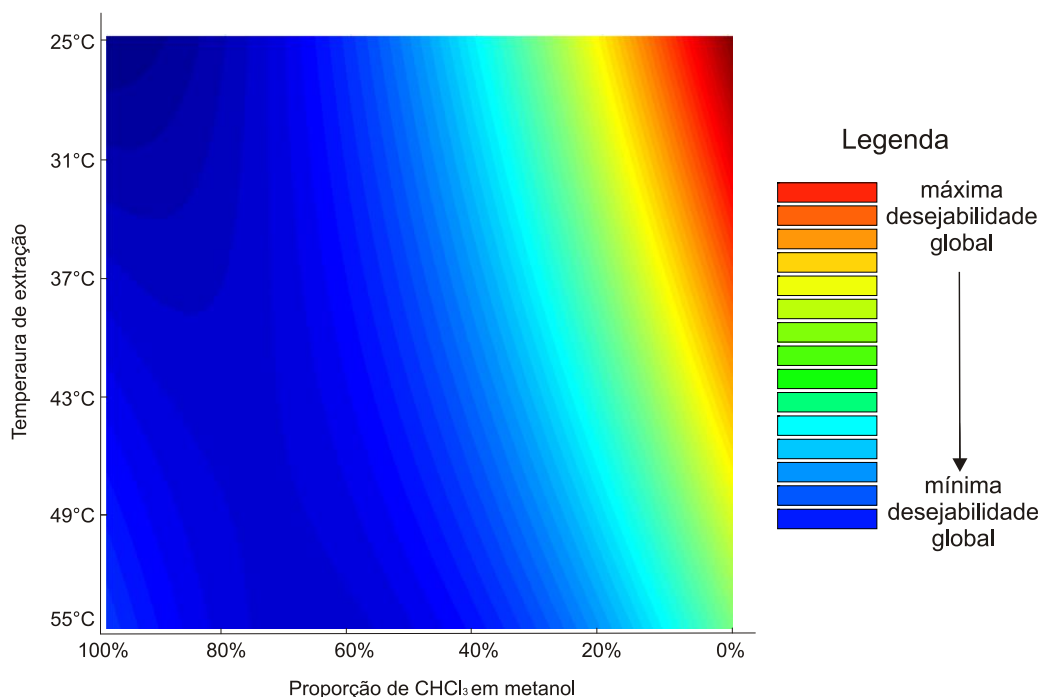
Figura 56. Gráfico dos coeficientes de regressão e seus intervalos de confiança após recálculo do modelo sem o coeficiente b22.

Tabela 49. Análise de variância para regressão após recálculo do modelo.

Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F _{calc.}	F _{tabelado}
Regressão	1,075	4	0,269	(F ₁) 116,92	F ₁ : 6,39
Resíduos	0,009	4	0,002		(4 e 4 g.L)
Erro Puro	0,005	2	0,003	(F ₂) 0,74	F ₂ : 19,0
F. Ajuste	0,004	2	0,002		(2 e 2 g.L)
Total	2,69.10¹⁵	10	2,69.10¹⁴		

Para se observar se toda variação em torno da média foi explicada pela regressão, além do teste F, foi avaliado o valor do coeficiente $R^2:0,996$ e $Q^2:0,998$.

Após o recálculo do modelo sem o coeficiente b22, os coeficientes gerados foram usados para a criação de uma superfície de resposta a qual mostra a relação das variáveis x_1 e x_2 com as respostas y_1 e y_2 (Figura 57). A escala de cor evidenciada na superfície de contorno descreve o aumento da desejabilidade calculada partindo da menor desejabilidade representada pela cor azul até a maior desejabilidade representada pela cor vermelha. Desta forma a extração dos metabólitos para os estudos metabolômicos por GC-MS será realizada à 25°C usando-se somente metanol como solvente extrator, refletindo a região da superfície de resposta com maior valor de desejabilidade de resposta (Figura 57).

Figura 57. Superfície de contorno gerada usando-se a função de desejabilidade para otimização das condições de extração e derivatização para análise por GC-MS.

4.2. Análise por GC-MS e validação da aquisição de dados

4.2.1. Materiais e Métodos

4.2.1.1. Preparo das amostras e controles de qualidade

4.2.1.1.A. Solução Padrão: 0,2 mg/mL megestrol acetato e catequina em clorofórmio.

4.2.1.1.B. Amostras de *Mikania* derivatizadas (10 mg/mL): 10 mg do pó de cada espécie de *Mikania* foi submetido à extração com 1 mL de metanol em ultrassom à 40°C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas por uma membrana de PVDF 0.22 µm e 500 µL do filtrado foi transferido para um vial de 2 mL. Em seguida 100 µL da Solução Padrão (4.1.1.1.A) foi adicionada ao vial e o solvente completamente evaporado. Para a metoximação, 200 µL da solução 20 mg/mL de cloridrato de metoxilamina (4.1.1.1.E) foi adicionada ao vial e as amostras foram sonicadas à 40°C durante 1 hora. Em seguida, 50 µL de MSTFA e 200 µL de piridina foram adicionados ao vial e as amostras sonicadas à 25°C por 30 minutos. Após a silanização, 50 µL de clorofórmio foi adicionado ao vial e agitado.

4.2.1.1.C. Solução de Substâncias Referência (STD): 100 µL das soluções referências A, B, C e D (4.1.1.1.A, 4.1.1.1.B, 4.1.1.1.C e 4.1.1.1.D) foi transferido para um vial de 2 mL. Após o solvente ser evaporado, 200 µL da solução 20 mg/mL de cloridrato de metoxilamina em piridina (4.1.1.1.E) foi adicionada ao vial e amostras foram sonicado à 40°C durante 1 hora. Em seguida, 50 µL de MSTFA foram adicionados ao vial adicionalmente à 200 µL de piridina e as amostras foram sonicadas à 25°C por 30 minutos. Após a silanização, 50 µL de clorofórmio foi adicionado ao vial e agitado.

4.2.1.1.D. Controle de Qualidade Fortificado (CQF GC e CQF GC2): 10 mg da mistura das folhas pulverizadas de todas espécies de *Mikania* foi transferida para um vial de 2 mL e adicionado 1 mL de metanol. Em seguida, a amostra foi tratada conforme item 4.2.1.1.B.

4.2.1.1.E. Branco: conforme seção 4.2.1.1.C com exceção da adição das soluções referências.

4.2.1.2. Desenvolvimento do método de análise por GC-MS

O método DES_GCMS_01 foi desenvolvido por GC-MS Agilent Série 5975C injetando-se uma amostra controle de qualidade fortificado (CQF_GC 4.2.1.1.D), resultando nas condições descritas na Tabela 50.

Tabela 50. Método desenvolvido para estudos metabolômicos por GC-MS.

Condições GC-MS (DES_GCMS_01)
Coluna: Agilent DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)
Gás arraste: Hélio
Inj. Vol: 10 µL
Temperatura Injetor: 250°C
Temperatura do Forno: 210°C - 5 min. 210°C até 320°C em 2°C/min.
Split: 2:1
Liner: <i>Split</i> vidro deativado com lã de vidro deativada (Agilent P/N:5183-4647)
Temperatura MS transfer: 330°C
Fonte de Ionização: EI (<i>m/z</i> range: 10 – 950)
Temperatura da Fonte de Ionização: 230°C
Temperatura do Quadrupolo: 150°C

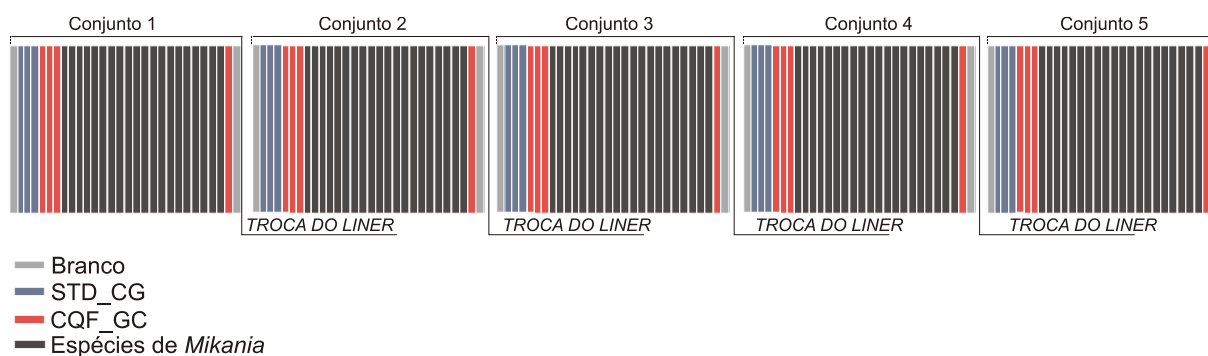
A presença dos padrões derivatizados de catequina e acetato de megestrol acetato foi monitorada em todas as amostras das espécies de *Mikania* como ferramenta de controle de qualidade para as reações de derivatização. Estudos de periodicidade de troca liner também foi estudado no desenvolvimento do método para avaliação de *carry-over* para o estabelecimento do número máximo de injeções de amostras de *Mikania* e periodicidade adequada de troca do liner nos estudos metabolômicos por GC-MS. A estratégia utilizada foi a análise de vinte amostras branco (4.2.1.1.E) após a injeção da seguinte sequência de análise: uma amostra CQF_GC (4.2.1.1.D) em triplicata, vinte amostras de espécies de *Mikania* (4.2.1.1.B) em seguida de mais uma amostra CQF_GC.

4.2.1.3. Aquisição de dados por GC-MS para os estudos metabolômicos

Todas as amostras das espécies de *Mikania* disponíveis foram analisadas por GC-MS (Agilent 5975C - EI), usando-se o método DES_GCMS_01 (Tabela 50) para aquisição da impressão digital metabólica. No início das análises por GC-MS uma amostra branco foi injetada, seguido de uma amostra solução de substâncias referência (STD_CG) em triplicata para avaliação da adequabilidade dos sistema. Em seguida uma amostra CQF_GC foi injetada em triplicata. Na sequência vinte amostras das espécies de *Mikania* derivatizadas (item 4.2.1.1.B) foram injetadas finalizando com uma injeção de CQF_GC e branco. Em seguida o liner foi trocado e a sequência injetada novamente para um novo conjunto de amostras de *Mikania* (Figura 58). As

soluções foram injetadas todas dentro de 24 horas após o preparo, devido a estabilidade dos metabólitos derivatizados em solução. A solução CQF_GC foi injetada com o conjunto de amostras 1, 2 e 3. Um segundo preparo fresco da amostra controle de qualidade (CQF_GC2) foi injetado junto com os conjuntos de amostra 4 e 5.

Figura 58. Sequência de injeções para os estudos metabolômicos não direcionados por GC-MS.



No total cinco conjunto de amostras foram injetados em diferentes dias (conjunto 1, 2, 3, 4 e 5). O primeiro preparo da amostra CQF_GC foi injetado fresco com as primeiras 15 amostras de *Mikania* (Set 01) e armazenada em geladeira. A amostra CQF também foi injetada no início e fim dos conjuntos de amostra 2 e 3 e devido a estabilidade da solução a amostra CQF_GC2 foi novamente preparada para ser injetada com o conjunto 4 e 5 de amostras.

4.2.1.4. Validação do método de análise por GC-MS

A estratégia de validação do método por GC-MS se deu pela avaliação de diferentes parâmetros:

(I) A adequabilidade do sistema foi avaliada para todos os conjuntos de injeções baseada nos seguinte critério de aceitação: desvio padrão relativo (DPR) menor ou igual a 5.0% para as áreas das substâncias derivatizadas Catequina 5TMS e estigmasterol TMS na solução de substâncias referências STD.

(II) Agrupamento das amostras controle de qualidade CQF e STD injetadas ao longo de toda a sequência no plote de escores da PC1, PC2 e PC3 após análise por PCA da matriz normalizada, escalonada por pareto e transformada usando log 10 (*Matlab R2013b - Mathworks*). O não agrupamento de alguma amostra CQF_GC e CQF_GC

injetada ao longo das análises foi usado como parâmetro para rejeitar o conjunto de análises das diferentes espécies de *Mikania*.

(IV) Detecção do padrão interno megestrol acetato metoxima e catequina 5TMS em todas as amostras: A não detecção dos padrões internos derivatizados foi usado como controle de qualidade do preparo de amostra e reações de derivatização.

(III) Presença de ácidos graxos livres ou qualquer outro sinal nas amostras brancas injetadas durante o estudo.

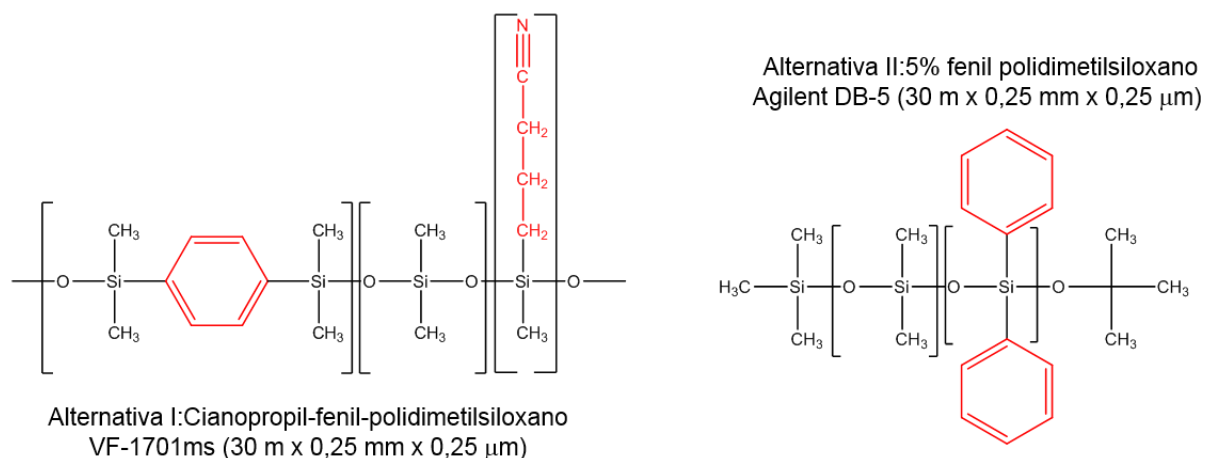
4.2.2. Resultados

4.2.2.1. Desenvolvimento do método de análise por GC-MS

Baseado no estudo de otimização da extração de metabólitos para os estudos metabolômicos por GC-MS, foi observado que metabólitos de diferentes classes de compostos foram extraídos e detectados usando-se o método inicial DES_GCMS_00, dentre eles: monossacarídeos, dissacarídeos, ácidos graxos, cumarina, fenilpropanóides, diterpenos, triterpenos e esteróis. As amostras a serem analisadas apresentam um range amplo de metabólitos com diferentes propriedades físico-químicas, sendo que muito destes apresentam grupos que após serem silanizados (grupos funcionais derivatizados: -OTMS, -NTMS, =N-OCH₃) ainda podem interagir com a fase estacionária por interação dipolo-dipolo se a coluna oferecer essa possibilidade. Desta forma, um tipo de fase estacionária que é capaz de interagir por interações dipolo-dipolo com o analito, apresenta uma seletividade diferenciada para separar compostos como no caso de colunas de polisiloxano substituído com grupos cianopropil, trifluoropropil e solunas polietilenoglicol (PEG). Com os metabólitos derivatizados, é esperado que os potenciais grupos que poderiam interagir por interações de hidrogênio estarão derivatizados, sendo assim, fases que contêm grupos polietilenoglicol não foram estudadas. Fases estacionárias que contêm grupo fenil podem ter seletividade diferenciada para analitos com grupos aromáticos ou que possuem ligações π , sendo interessante avaliar essas colunas no desenvolvimento.

A estratégia inicial de desenvolvimento foi a escolha de duas colunas: (I) Agilent VF-1701ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) a qual apresenta fase estacionária de polidimetilsiloxano substituída com 14% de grupo cianopropil e fenil e (II) Agilent DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) a qual apresenta fase estacionária de polisiloxano funcionalizada com 5% de fenil (Figura 59).

Figura 59. Fases estacionárias estudadas no desenvolvimento de método para aquisição da impressão digital metabólica das espécies de *Mikania* por GC-EI-MS.

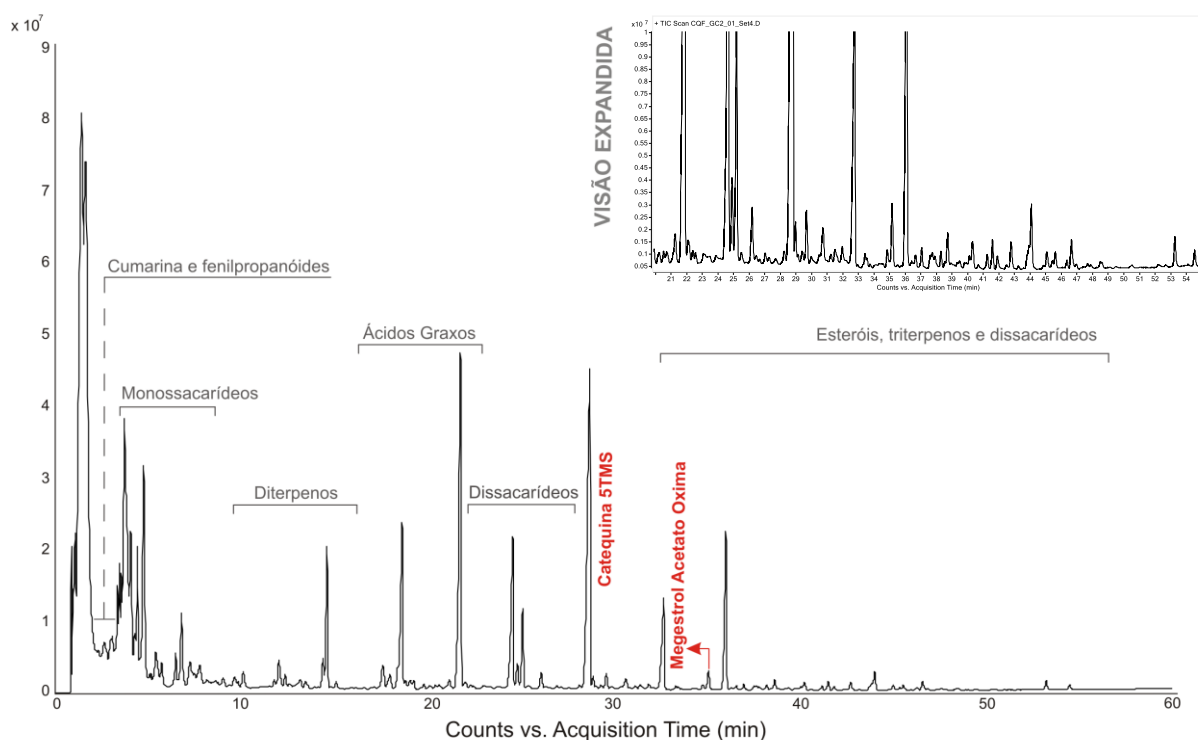


O melhor perfil cromatográfico observado foi com a coluna Agilent DB-5, a qual demonstrou uma melhor separação dos compostos mais apolares os quais eluem entre 25 até 60 minutos. Apesar da seletividade diferenciada da coluna VF-1701ms para compostos mais polares, foi observada uma redução significativa da resolução entre os compostos apolares. Desta forma, o ganho em capacidade de retenção dos compostos mais polares no início da corrida usando-se a VF-1701ms não foi considerado mais vantajoso do que melhor resolução dos compostos mais apolares usando-se a coluna DB-5. Além disso, as análises por GC-MS foi considerada uma técnica ortogonal para a avaliação principalmente de esteróis e triterpenos mais apolares os quais podem ter sua ionização dificultada nas análises por LC-ESI-MS.

Liner do tipo *splitless* de vidro deativado com lã de vidro foi testado resultando em um perfil cromatográfico mais pobre com alto valor de fator de assimetria. Devido a alta concentração da amostra (10 mg/mL) o liner tipo *split* foi estudado e resultou em perfis de picos ótimos com baixo fator de assimetria e conseqüentemente maior número de compostos bem resolvidos.

A partir dessas observações, o método para os estudos metabolômicos foi otimizado usando-se a coluna DB-5, usando liner de vidro deativado tipo *split* contendo lã de vidro deativada. Injeção de 10 μL de amostra e razão de split de 1:2 foi usada. O método “DES_GCMS_01” foi desenvolvido para os estudos metabolômicos das espécies de *Mikania* por GC-MS (Figura 60) resultando no perfil cromatográfico como ilustrado na Figura 60.

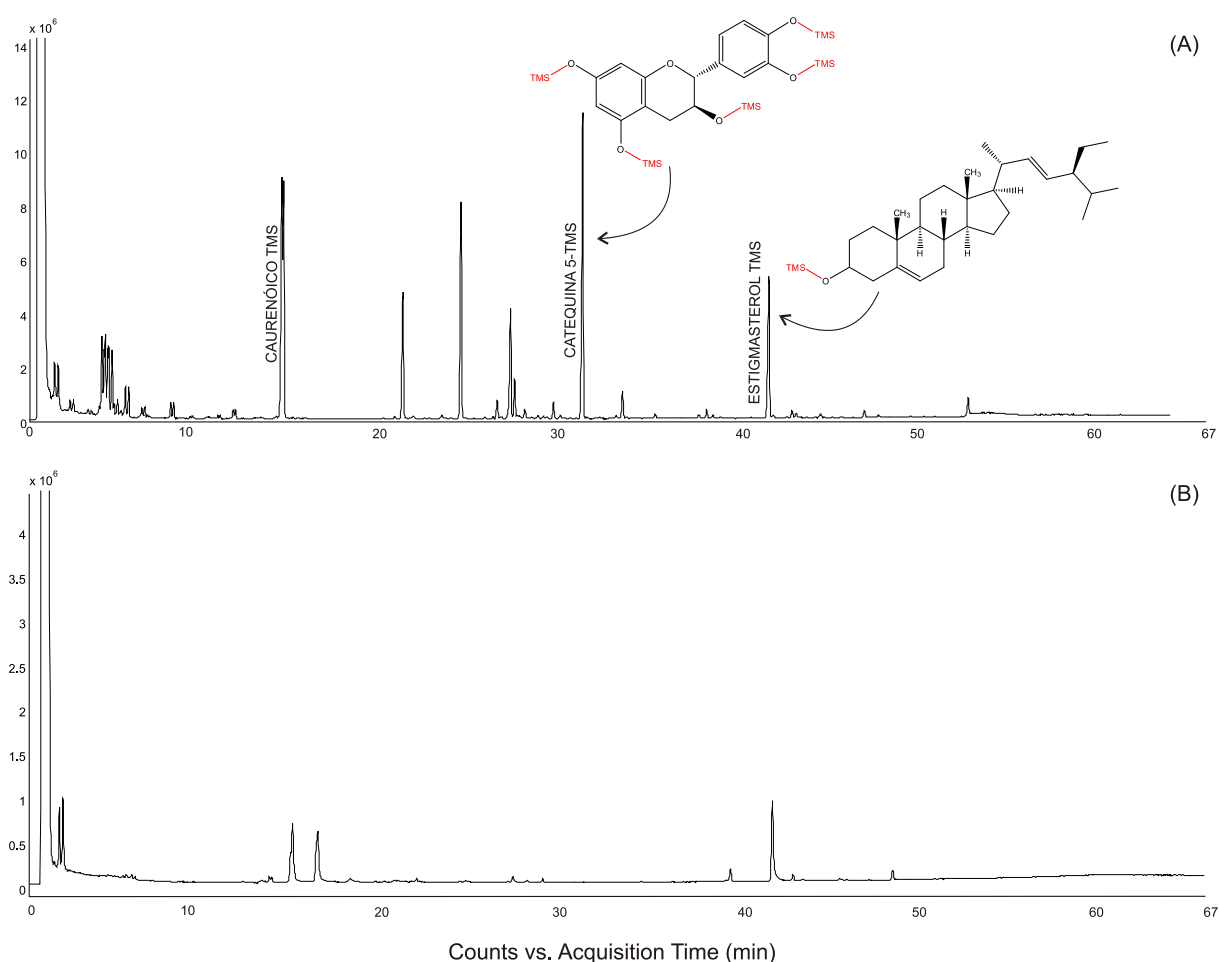
Figura 60. Perfil cromatográfico (TIC) da amostra controle de qualidade fortificada derivatizada (CQF_GC) adquirida por GC-EI-MS.



Somente o planejamento de um estudo de otimização das condições de derivatização e extração não é suficiente para garantir que os metabólitos sejam derivatizados e conseqüentemente detectados no perfil metabólico adquirido por GC-EI-MS. Uma das etapas críticas do preparo das amostras para injeção no GC-MS é a evaporação do solvente logo após a extração dos metabólitos. Como brevemente apresentado na introdução do capítulo 5, se o solvente extrator metanol (solvente prótico) não for totalmente evaporado do vial antes de adicionar os reagentes para silanização, este pode drasticamente reduzir a nucleofilicidade dos metabólitos que apresentam caráter nucleofílico (aqueles com grupos funcionais como -OH, -SH, ou -NH e -COOH) levando a um baixo rendimento da reação de silanização ou até mesmo a sua não ocorrência, conseqüentemente muitos dos metabólitos não serão detectados, como ilustrado na Figura 61. Visto que a impressão digital metabólica adquirida por GC-MS de cada espécie de *Mikania* não é previamente conhecida, vê-se a importância em adicionar substâncias conhecidas no preparo de todas as amostras como requisito de controle qualidade das reações de derivatização. Desta forma, o preparo de amostra pode ser validado no momento da aquisição dos dados

por GC-MS e amostras em que os padrões internos derivatizados não foram detectados, podem ser descartadas evitando que perfis metabólicos falsos sejam incluídos no estudo metabolômico resultando em uma interpretação das informações biológicas equivocadas.

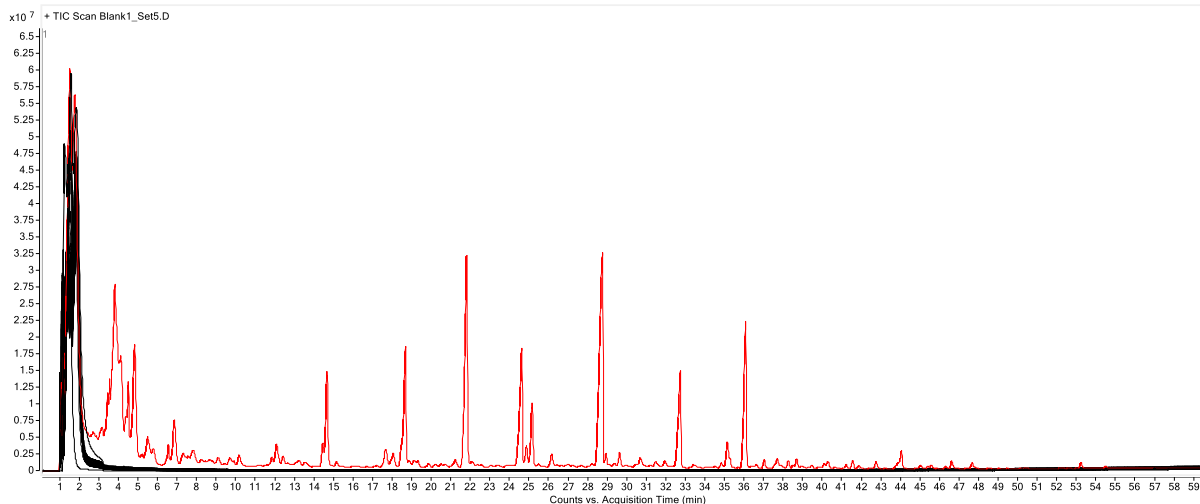
Figura 61. Reação de silanização (A) sem presença de metanol e (B) com presença de metanol residual no vial de preparo da amostra do estudo de otimização (4.1.1.1.G).



Um estudo para avaliação de possível *carry-over* entre injeções também foi considerado no desenvolvimento do método com intuito de estabelecer o número adequado de injeções de amostras de *Mikania* para se evitar possível *carry-over* entre injeções sequenciais. Avaliando-se a sequência de injeção estabelecida para este estudo, nenhum metabólito foi detectado nas trinta amostras branco injetadas após a seguinte sequência: uma amostra CQF_GC em triplicata, vinte amostras de espécies de *Mikania* e uma amostra CQF_GC (Figura 62). Baseado nesta observação, foi

validada a troca do liner a cada vinte injeções de amostras derivatizadas de *Mikania* e quatro amostras controle de qualidade (CQF_GC).

Figura 62. Cromatogramas da amostra controle de qualidade (vermelho) e brancos (preto) adquiridos por GC-MS para os estudo de periodicidade de troca do liner.



4.2.2.2. Validação do método de análise por GC-MS

A estratégia de validação do método por GC-MS se deu pela avaliação de diferentes parâmetros como: (I) avaliação da adequabilidade do sistema, (II) Agrupamento das amostras CQF e STD, (III) Detecção do padrão interno megestrol acetato metoxima e catequina 5TMS e (IV) Presença de ácidos graxos livres nas amostras branco.

(I) Avaliação da adequabilidade do sistema

O desvio padrão relativo (DPR) para as áreas das substâncias derivatizadas catequina 5TMS e estigmasterol TMS nas amostras STD foi baixo de 5.0%.

Tabela 51. Desvio padrão relativo das injeções de amostras STD para verificação da adequabilidade do sistema durante estudos metabolômicos por GC-MS.

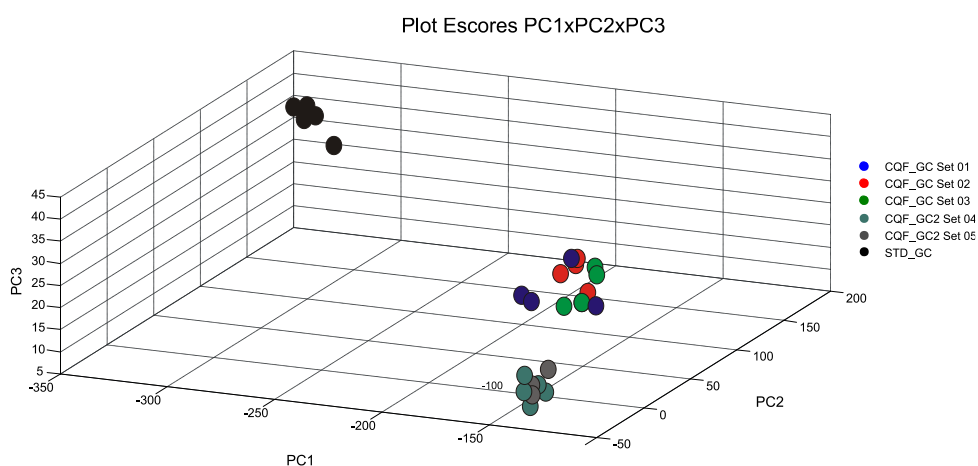
Análise	Catequina 5TMS (DPR%)	Estigmasterol TMS (DPR%)
Set 01	1.5%	0.7%
Set 02	1.2%	0.0%
Set 03	0.6%	1.0%
Set 04	2.1%	1.1%
Set 05	3.8%	2.0%

Critério de aceitação $DPR \leq 5.0\%$

(II) Agrupamento das amostras controle de qualidade CQF e STD

O agrupamento das amostras CQF e STD dos cinco conjuntos de análises foi observado no plot dos escores da PC1, PC2 e PC3, portanto nenhum conjunto de amostras foi rejeitado e reanalisado. Foi observado uma certa dispersão entre as amostras controle de qualidade CQF_GC (set 01, 02 e 03) e CQF_GC2 (Set 04 e 05) por serem preparos diferentes.

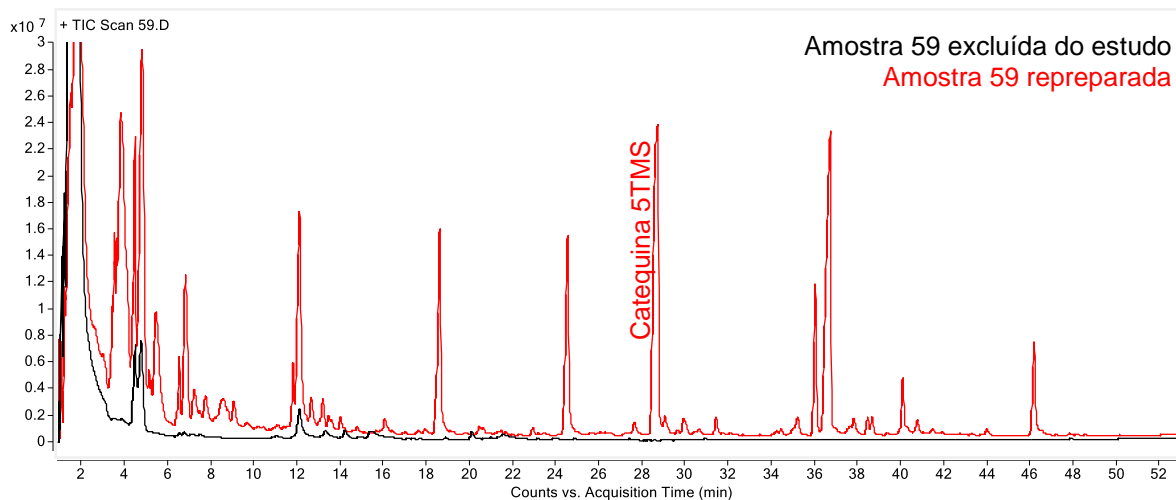
Figura 63. Plot de escores PC1, PC2 e PC3 obtido por PCA com CQF_GC e STD_GC.



(III) Detecção do padrão interno megestrol acetato metoxima e catequina 5TMS

Em todas as amostras das espécies de *Mikania* foram detectados os padrões internos megestrol acetato metoxima e catequina 5TMS com exceção na amostra 59 *M. haenkeana* (Figura 64).

Figura 64. Sobreposição do primeiro preparo da amostra 59 (preto) excluída do estudo e novo preparo (vermelho).



Com essa ferramenta, a necessidade de reparo e reanálise pode ser identificada, resultando no reparo da amostra 59 considerando um tempo maior na etapa de evaporação do solvente extrator antes do início das reações de derivatização.

(IV) Presença de ácidos graxos livres nas amostras brancas

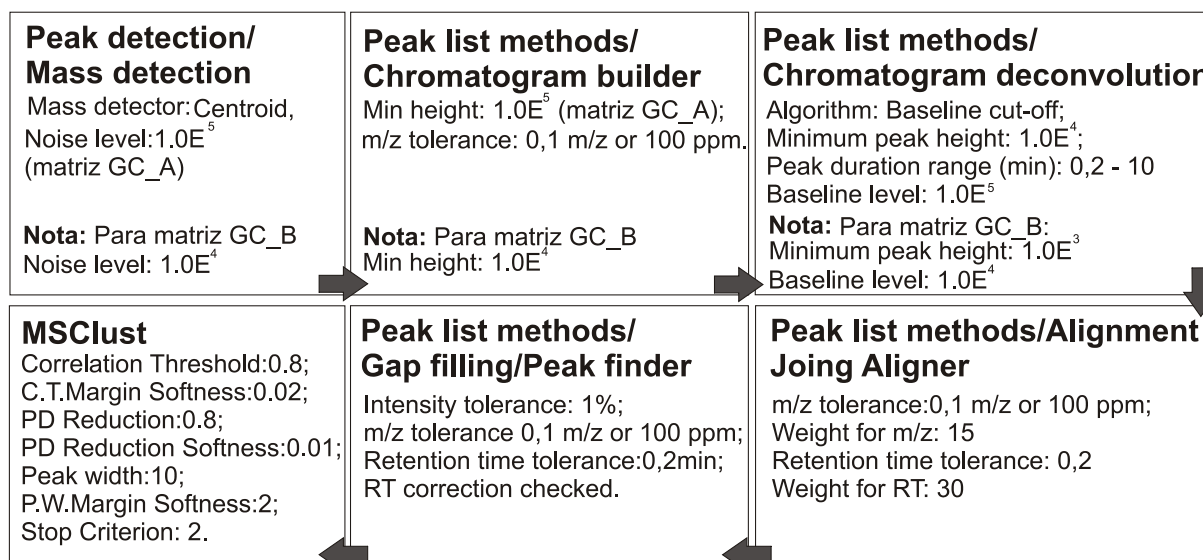
Nenhum sinal foi detectado nas amostras branco injetadas após a injeção as amostras de *Mikania*.

4.3. Validação do método de processamento e análise de dados para estudos metabolômicos por GC-MS

4.3.1. Materiais e métodos

Os dados brutos obtidos nos estudos metabolômicos por GC-MS em formato *.d* foram convertidos para o formato *.mzXML* usando-se o *ProteoWizard MSconvert* (EUA) e em seguida exportados para o software *MZmine 2.11* (MZmine Development Team). Esses dados foram submetidos a uma série de pré-processamentos conforme Figura 65.

Figura 65. Fluxograma de critérios e parâmetros para processamento de dados de GC-MS no software Mzmine 2.11 e MSClust.



A princípio duas grandezas de ruído foram usadas para obter os sinais de *m/z* para gerar as matrizes A (corte de sinais: $1 \cdot 10^5$) e B (corte de sinais: $1 \cdot 10^4$) no software *Mzmine 2.11* (*Mzmine Development Team*). Em seguida os dados pré-processados foram exportados em formato *.csv* para uma planilha de Excel (Microsoft 2013), com

os seguintes dados: m/z , tempo de retenção e área das substâncias detectadas nas amostras de *Mikania* observadas no cromatograma TIC obtidos por GC-MS. Em seguida foi aplicado um algoritmo para agrupamento dos sinais de m/z usando o MSClust⁸⁷. As matrizes A e B foram submetidas à diferentes processamentos de dados, usando o software Matlab R2013b (Mathworks) conforme Tabela 38. Foram também avaliados a matriz E#33 de presença e ausência e matriz E#34 das áreas sem nenhum pré-tratamento.

4.3.1.1. Avaliação dos cortes de sinais dos dados brutos e processamento de dados por PCA

Este parâmetro foi validado através da avaliação dos plots dos escores da PC1, PC2 após análise por PCA (*Matlab R2013b - Mathworks*) das matrizes E#1B até E#34B e E#1A até E#34A. O critério de aceitação foi o agrupamento das amostras de CQF e STD com baixa dispersão sem afetar a evidência da variabilidade dos possíveis grupos das espécies de *Mikania*.

4.3.1.2. Avaliação dos métodos de processamento por HCA

Este parâmetro foi validado através da avaliação do dendograma gerado após análise por HCA (software R) das matrizes E#06B, E#07B, E#08B, E#09B e E#10B usando o algoritmo '*hclust*', sendo a similaridade calculada pela distância euclidiana e as amostras conectadas pela conexão tipo Ward.d. Os critérios de aceitação para validação foram: agrupamento das amostras CQF e STD separadamente das amostra de *Mikania* e o agrupamento próximo de amostras das mesmas espécies: amostras 9/28/72/45: *M. cordifolia*, 41/68: *M. alvimmi*, 23/48: *M. hirsutissima*, 80/81: *M. periplocifolia* e 8/74: *M. paranensis*, 69/70 *M. officinalis*.

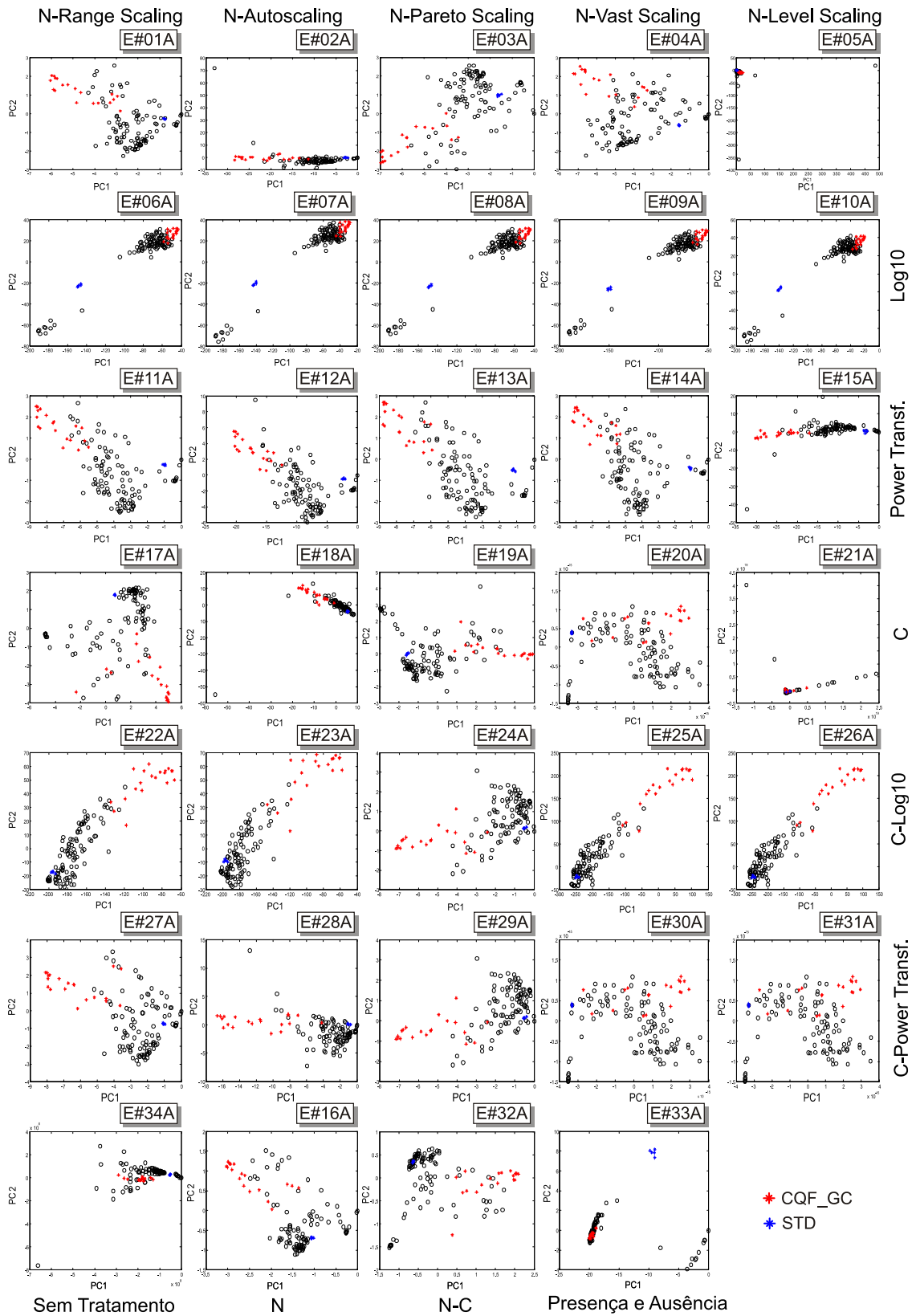
4.3.2. Resultados

A variabilidade dos agrupamentos das espécies de *Mikania* e agrupamento das amostras controle de qualidade foram avaliadas através da análise dos plots dos escores da PC1 e PC2 após análise da matriz de dados por PCA (Figura 66 e Figura 67), sendo a grandeza dos sinais dos dados brutos validados seguidos de um estudo da adequabilidade do uso de métodos de pré-processamentos através da comparação do dendograma gerado por HCA.

4.3.2.1. Avaliação dos cortes de sinais dos dados brutos e dos métodos de processamento de dados por PCA

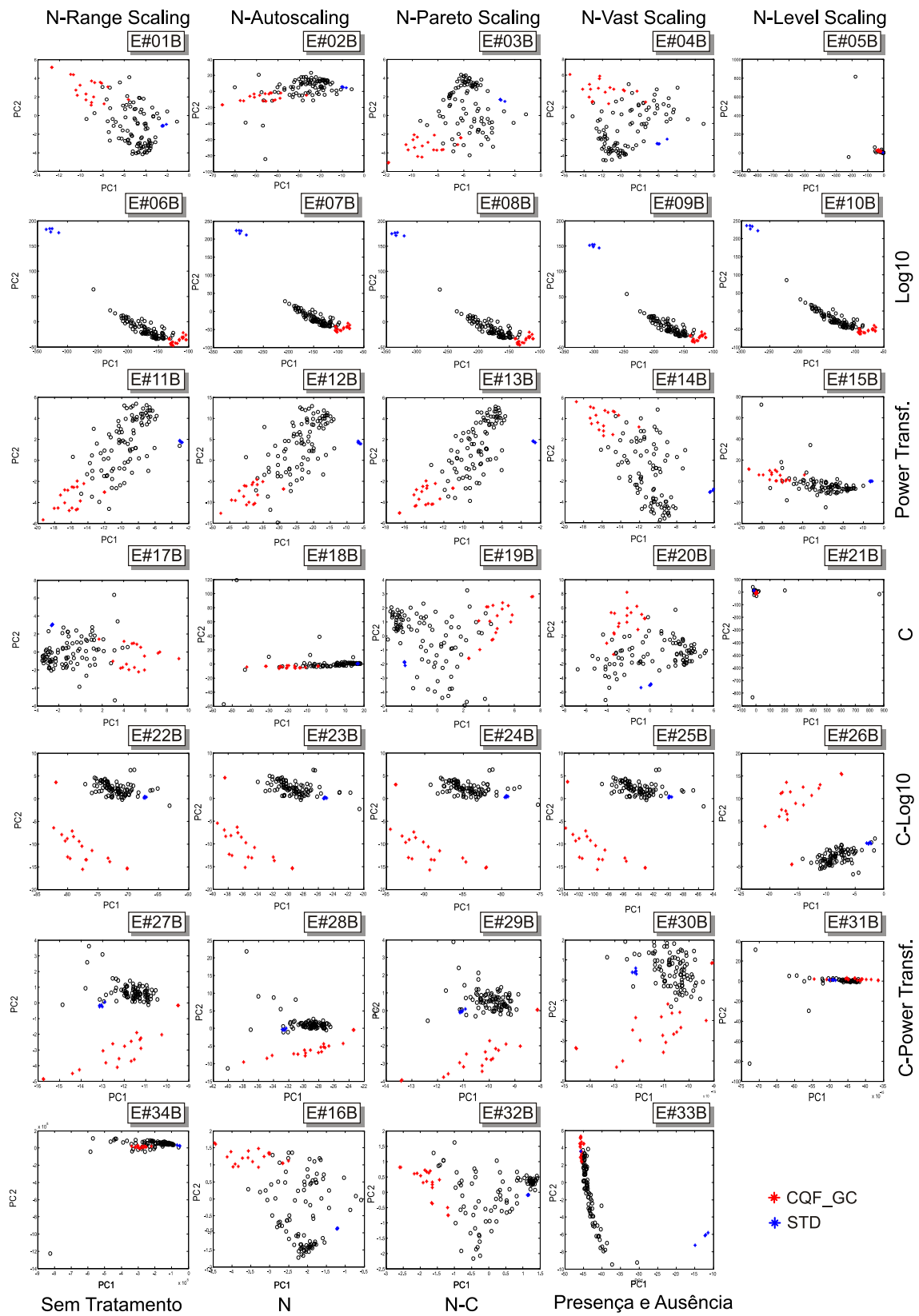
As amostras CQF_GC e STD não se agruparam de forma delimitada após normalização seguida dos métodos de escalonamento (Figura 66 e Figura 67-E#01A/B até E#05A/B). A transformação dos dados usando Log10 e a raiz quadrada das observações (*power transformation*) reduz a variabilidade das variâncias para cada metabólito entre as diferentes observações (amostras), sendo uma ferramenta utilizada para reduzir a heteroscedasticidade dos dados. A matriz normalizada, escalonada e transformada usando *Log10* e *power transformation* no geral resultou no agrupamento das amostras CQF_GC e STD separadamente. A normalização seguida de escalonamento e *Log10* resultou em uma delimitação melhor das amostras CQF_GC quando comparadas com *power transformation* (Figura 66 E#06A - E#15A e Figura 67-E#06B - E#15B). A sequência de tratamento de normalização, escalonamento e *Log10* (E#06A até E#10A) usando a matriz A com corte de sinais maior (1.10^5), resultou no agrupamento bem delimitado das amostras STD e CQF_GC. No entanto, o grupo de GCF_GC se apresenta não tão bem evidenciado das amostras das diferentes espécies de *Mikania*. A mesma sequência de tratamento (Figura 67- E#06B até E#10B) usando a matriz B com corte de sinais menor (1.10^4), resultou em um perfil de separação das amostras CQF_GC, STD e espécies de *Mikania* parecido com o da matriz A, porém o grupo das amostras CQF_GC se apresenta mais bem delimitado e separado das amostras de *Mikania*. A sequência de tratamento: normalização, escalonamento e *power transformation* (Figura 66. E#011A até E#15A) usando a matriz A com corte de sinais maior (1.10^5) resultou no agrupamento dos CQF_GC mais disperso e em as amostras STD se encontram entre as espécies de *Mikania* apesar da grande diferença do conteúdo metabólico destas. A mesma sequência de tratamento usando *power transformation* (Figura 67.E#11B até E#15B) para a matriz B com corte de sinais menor (1.10^4), conseguiu de forma mais delimitada agrupar as amostras STD, com exceção do estudo E#12B usando-se o *Level Scaling*. Usando-se a matriz B com corte de sinais menor (1.10^4) existe uma maior chance de que metabólitos menos concentrados sejam significativos para a delimitação mais definida dos grupos presentes na matriz de dados, podendo resultar no agrupamento mais bem definido das amostras STD quando comparadas com a matriz A de corte mais alto (1.10^5). Desta forma o corte na ordem de 1.10^4 foi validado.

Figura 66. Escores obtido nos estudos dos pré-processamentos com matriz A_GC-MS (Noise Level 1.10^5).



Legenda: N=Normalizado, C=Centrado na média.

Figura 67. Escores obtido nos estudos dos pré-processamentos com matriz B_GC-MS (Noise Level 1.10^4).



Legenda: N=Normalizado, C=Centrado na média.

A matriz presença e ausência (Figura 66 e Figura 67 - E#33A/B) resultou no agrupamento das amostras STD porém não evidenciou o agrupamento das amostras CQF_GC e das espécies de *Mikania*, portanto não foram validadas. O perfil de agrupamento após o PCA usando a matriz E#33A/B, evidencia que foram perdidas informações biológicas importantes para o agrupamento das diferentes espécies de *Mikania* e amostras CQF_GC, visto que as amostras CQF_GC não se agruparam de forma satisfatória. A concentração de alguns metabólitos pode ter um papel fundamental para a melhor delimitação dos grupos, e neste caso a área dos picos deve ser considerada.

A matriz A normalizada, centrada na média e escalonada (Figura 66: E#17A - E#21A) no geral não resultou no agrupamento das amostras CQF_GC, porém a matriz B (Figura 67: E#17B - E#21B) agrupou com maior dispersão, e as amostras STD não ficaram bem evidenciadas em relação aos outros grupos. As matrizes normalizadas, centradas na média, escalonadas e transformadas (Log10 ou *power transformation*) resultaram em um agrupamento disperso das amostras CQF_GC porém mais bem delimitados. Com esse processamento, não houve um agrupamento satisfatório das amostras STD, portanto a centragem não foi validada. Após o uso de diferentes métodos de escalonamento seguido da transformação log 10, as amostras CQF_GC e STD agruparam-se respectivamente e separadamente das amostras das diferentes espécies de *Mikania* portanto sendo essa sequência de processamento selecionada.

Com bases nas observações acima foi validado o corte dos sinais na ordem de 1.10^4 sendo as matrizes a serem estudadas na próxima etapa de validação: E#06B: *N_Range Scaling_Log10*, E#07B: *N_Autoscaling_Log10*, E#08B: *N_Pareto Scaling_Log10* e E#09B: *N_Vast Scaling_Log10* e E#10B: *N_Level scaling_Log10*.

4.3.2.2. Avaliação dos métodos de processamento de dados por HCA

A partir da comparação dos dendogramas gerados por HCA das matrizes E#06B, E#07B, E#08B, E#09B e E#10B (Figura 68 e Figura 69), foi observado que somente o uso do escalonamento de Pareto (*Pareto Scaling*) seguido da transformação *Log10* resultou no agrupamento de todas as amostras CQF_GC injetadas ao longo das análises de GC-MS em uma mesma chave (Figura 68 e Figura 69). Além disso, as amostras STD também se agruparam em uma única chave, preenchendo as expectativas iniciais.

Figura 68. Dendogramas gerados por HCA a partir das matrizes (A) E#06B, (B) E#07B e (C) E#08B.

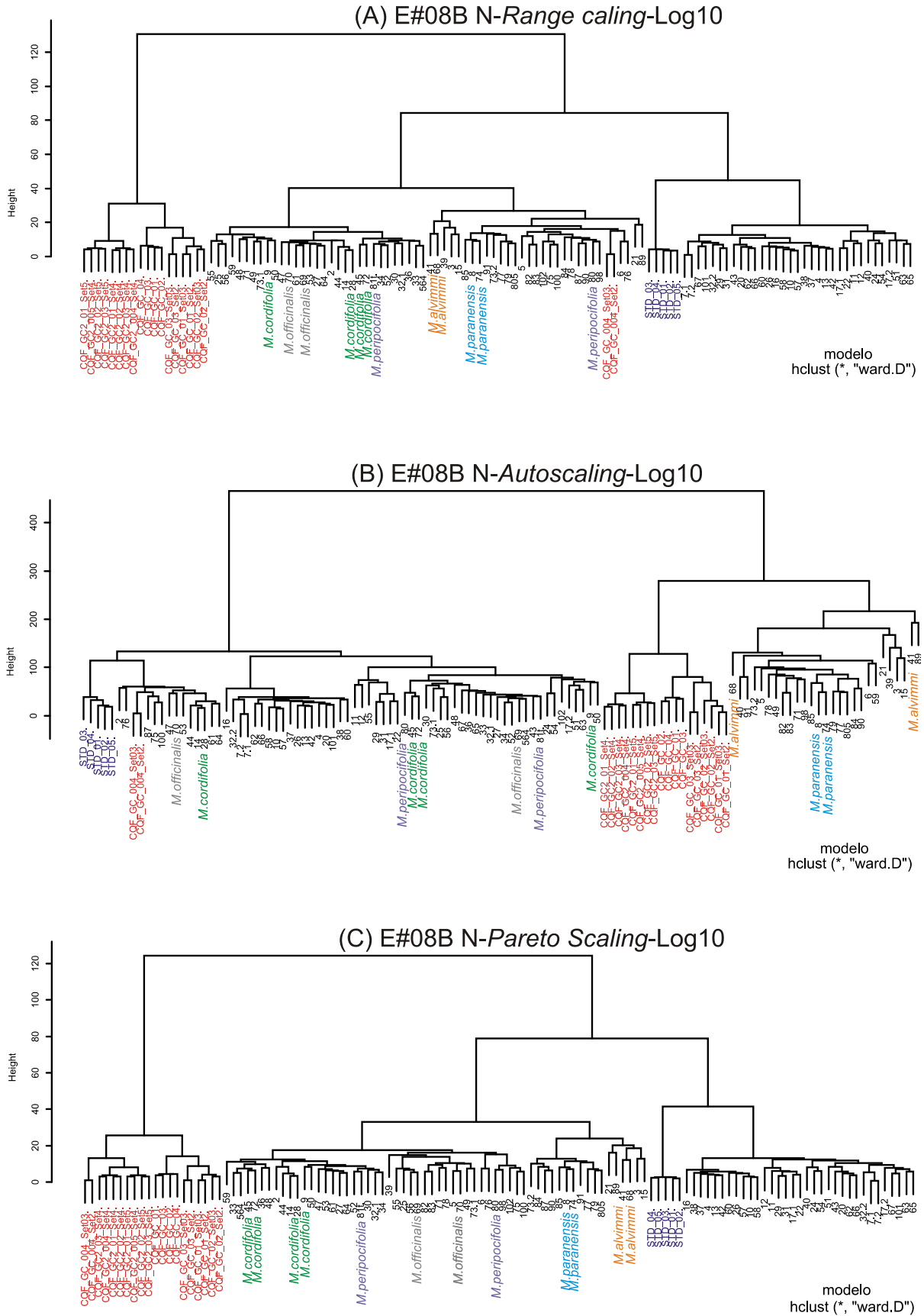
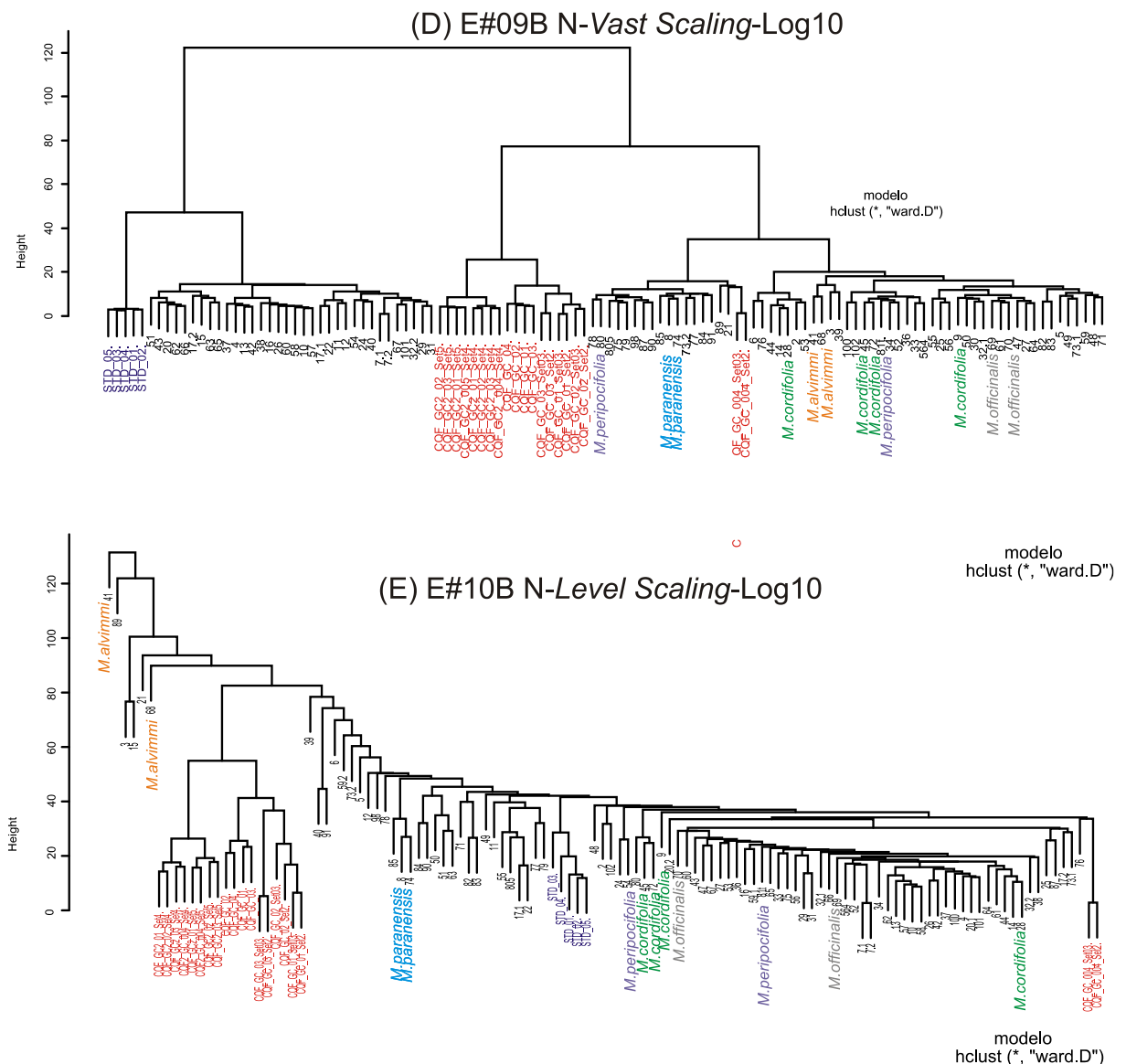


Figura 69. Dendogramas gerados por HCA a partir das matrizes (D) E#09B e (E) E#10B.



A partir das análises de LC-MS, pode-se observar que diferentes amostras da mesma espécie se agruparam bem perto uma das outras. Desta forma, para finalizar a validação da matriz de dados, o dendrograma gerado pela matriz E#08B foi analisado para observar se as diferentes amostras da mesma espécie se agrupariam também baseado no perfil metabólico obtido por GC-MS. O dendrograma obtido com a matriz E#08B agrupou as quatro diferentes amostras de *M. cordifolia* (9/28/72/45), *M. alvimmi* (41/68), *M. paranensis* (8/74) e *M. officinalis* (69/70). As duas amostras da espécie *M. periplocifolia* (80/81) não se agruparam lado a lado, porém se encontram dentro da

mesma chave. Desta forma a planilha validada para os estudos metabolômicos por GC-MS foi a E#08B (*N-Pareto Scaling-Log10*).

4.4. Discussão

Como discutido no capítulo 3, técnicas de separação como a cromatografia acoplada a espectrometria de massas têm sido usadas com frequência em estudos metabolômicos.¹⁰⁸ Esta estratégia analítica viabiliza a aquisição de dados com alta seletividade e sensibilidade além de fornecer diversas evidências que contribuem na etapa de proposta de identidade dos metabólitos discriminantes nos estudos metabolômicos.¹⁰⁸ Este trabalho reuniu dados adquiridos por LC-ESI-MS e GC-EI-MS paralelamente para se alcançar uma visão mais completa do conteúdo metabólico das espécies de *Mikania*.

Substâncias com baixa volatilidade e estabilidade térmica, ou até mesmo substâncias que podem ser adsorvidas no injetor/liner, geralmente podem apresentar baixa detectabilidade por GC e área de pico não reprodutíveis,^{81,82} representando um grupo de metabólitos com certas limitações de análise por GC. A escolha adequada do procedimento de derivatização pode otimizar significativamente a separação cromatográfica dos metabólitos presentes na matriz, assim como possibilita a análise de compostos não voláteis por GC-MS, aumentando a chance de análise do maior número possível de metabólitos. A escolha dos reagentes e solventes a serem usados nas reações de derivatização, envolve um compromisso entre maximizar a eficiência da derivatização, para que o maior número de metabólitos possíveis seja derivatizado. Existem diversos procedimentos publicados na literatura sobre extração e derivatização para análise por GC, porém, devido a complexidade das matrizes de estudo (plantas) não há procedimentos ideais publicados e sim procedimentos que possam ser mais apropriados para um dado conjunto de metabólitos⁸³.

O uso de planejamento fatorial pode fornecer informações significativas quanto ao preparo da amostra e detectabilidade dos metabólitos, fornecendo muita informação de como os metabólitos são extraídos e derivatizados frente a variação de fatores que possam impactar na aquisição da impressão digital metabólica por GC-MS. Desta forma, limitações específicas da matriz de estudo podem ser entendidas em relação ao preparo de amostra e derivatização. Cinco fatores foram estudados para o desenvolvimento do protocolo de extração e derivatização dos metabólitos para

análise por GC-EI-MS, através do planejamento fatorial fracionário. Baseado no conhecimento prévio e dados da literatura sobre possíveis metabólitos presentes nas espécies de *Mikania*, o estudo focou na extração usando como solvente extrator diferentes proporções de metanol e clorofórmio.

Muitos protocolos usam também proporções de água no solvente extrator o que poderia aumentar a extração de compostos mais polares como ácidos fenólicos, ácidos fenilpropanóides, flavonóides glicosilados e etc. No entanto, esta tese foi delineada para três técnicas analíticas (LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H) as quais podem fornecer informações complementares uma a outra. Dentro dos estudos metabolômicos por LC-MS (capítulo 2 e 3) a extração foi realizada com mistura de etanol e água favorecendo a extração de compostos mais polares os quais não apresentam tantas limitações de ionização e detectabilidade nas análises por LC-ESI-MS.

Para o estudo por GC-MS, um solvente extrator mais apolar (ex.:clorofórmio) poderia representar informação complementar ao perfil metabólico obtido por LC-MS. Outro ponto importante referente a derivatização dos metabólitos, é a necessidade do uso de solventes adequados para fornecer condições ideais para que as reações possam acontecer. O uso de água no solvente extrator, por mais que pequena, diminuiria substancialmente a volatilidade do solvente extrator impactando na etapa crítica de evaporação do solvente após extração. A presença residual de solvente prótico no vial da amostra antes da adição do reagente organosilano para a reação de silanização pode levar à não ocorrência da reação consequentemente os metabólitos de polaridade alta e média não derivatizados iriam condensar no liner ou até mesmo no início da coluna, afetando drasticamente a aquisição do conteúdo metabólico por GC-MS. Além disso, os reagentes organosilanos podem sofrer facilmente hidrólise⁷⁸, e até mesmo os solventes apróticos usados devem ser o mais puro possível e anidro.

Dentro da região experimental de conhecimento adquirida com o planejamento fatorial, o uso de metanol como solvente extrator resultou em um maior número de metabólitos extraídos e detectados por GC-EI-MS. Diferentes proporções do reagente MSTFA adicionado para a reação de silanização e temperatura durante a reação de oximação não mostraram ser significativas neste estudo dentro da região de estudo escolhida. Os fatores temperatura de extração e proporção de clorofórmio no solvente

extrator apresentaram impacto significativo na resposta e foram otimizados através de um estudo de otimização usando planejamento do tipo Doehlert.

Durante os estudos de melhores condições de extração e derivatização, a etapa de evaporação do solvente antes da adição de MSTFA para silanização representou um dos maiores desafios. Dois padrões internos foram adicionados em todas as amostras como ferramenta de controle de qualidade do preparo de amostras e essa estratégia contribuiu para identificar problemas de preparo da amostra (ex.: casos em que o metanol não evaporou completamente do vial). Durante a aquisição dos dados para os estudos metabolômicos por GC-MS, essa ferramenta também foi utilizada com sucesso como um dos parâmetros de validação do método analítico. Este parâmetro de validação evidencia a importância da determinação de ferramentas de controle de qualidade do preparo e reações de derivatização para análise por GC-MS. A falta de estratégias de controle de qualidade pode resultar em uma interpretação equivocada do conteúdo metabólico e invalidar o estudo.

Durante o desenvolvimento do método analítico, o liner do tipo *splitless* foi estudado para avaliar se um maior número de picos seria detectado, visto que a amostra reside por mais tempo dentro deste, podendo auxiliar na volatilização de metabólitos com ponto de ebulição maior. No entanto, a aquisição de dados com o liner do tipo *split* com razão de *split* de 1:2 forneceu um perfil cromatográfico com fator de assimetria mais baixo e melhor resolução entre os metabólitos. Devido ao fato que a matriz de estudo é complexa e contém também metabólitos com baixa volatilidade, liners com lã de vidro deativada foram usados para impedir que metabólitos não voláteis não alcancem a coluna e condensem no início da coluna, além de auxiliar na vaporização mais uniforme dos metabólitos com menor ponto de ebulição dentro do liner. O estudo com uma coluna mais apolar como a Agilent DB-5 (polidimetilsiloxano substituída com 5% de fenil) apresentou um perfil cromatográfico com menor número de co-eluições dos metabólitos mais apolares em comparação com uma coluna mais polar como a Agilent VF-1701ms (polidimetilsiloxano substituída com 14% de grupo cianopropil e fenil) e foi escolhida para o método final.

Com o uso de metanol como solvente extrator, muitos lipídios como os triacilglicerídeos (TAGs) podem ser extraídos, se presentes na matriz, assim como outras substâncias não voláteis. TAGs são não-voláteis e podem condensar no injetor,

no *liner* e até mesmo nos primeiros centímetros da coluna de GC.⁸⁴ Ao longo das injeções os TAGs condensados no *liner* podem ser pirolizados devido a alta temperatura do injetor e as cadeias de ácidos graxos livres podem ser volatilizadas e eluídas nas injeções subsequentes caracterizando o *carry-over*.^{83,84} Este fenômeno pode levar a identificação falso-positiva de ácidos graxos nas amostras além de poder aumentar o sinal de *background* sujando o equipamento e comprometendo a qualidade dos resultados a serem usados nos estudos metabolômicos. Desta forma, um estudo de periodicidade de troca do *liner* foi realizado para validar o número máximo de injeção de amostras. Além disso, ao longo das análises das amostras, metabólitos não voláteis condensados e acumulados no *liner* podem levar à exposição de sítios ativos na lâ de vidro, podendo causar a adsorção de compostos mais polares e conseqüentemente à aquisição de perfis metabólicos não coerentes com a informação biológica da amostra estudada.

Uma avaliação crítica de quais etapas podem afetar diretamente a qualidade e repetibilidade foi realizada resultando na determinação de parâmetros de validação e critérios de aceitação para auxiliar a validação da metodologia. O uso de injeções de amostras controle de qualidade (CQ) ao longo da sequência das amostras em estudo foi de extrema importância no auxílio ao acesso à variabilidade não biológica e como controle de qualidade das análises e procedimento de processamento de dados. O agrupamento dessas amostras CQ foi estabelecido como critério de aceitação auxiliando de forma eficiente a tomada de decisão quanto a rejeição de amostras que possam ter sofrido uma variação significativa na aquisição de dados e na validação dos métodos de pré-processamento de dados.

Diferentes matrizes com diferentes tipos e concentrações de metabólitos podem requerir diferentes pré-processamentos para redução da variabilidade de origem não biológica. Durante a validação dos métodos de pré-processamento, diferentes métodos foram estudados para validação da matriz de dados processada. Foi evidenciando a importância do uso de corte de sinais mais baixo e inclusão de sinais de *m/z* com abundância abaixo de 1.10^5 e acima de 1.10^4 .

O uso do *Level scaling* resultou na diferenciação pobre das espécies e amostras CQF e STD, mesmo após a transformação dos dados. *Level scaling* converte as mudanças relacionadas a concentração dos metabólitos em mudanças

relativas a média das concentrações e pode inflar metabólitos que tenham uma diferença acentuada de concentração entre as diferentes observações⁶³, porém esses podem não ser necessariamente os metabólitos discriminantes nos estudos metabolômicos.

Pareto scaling usa como fator de escalonamento a raiz quadrada do desvio padrão podendo impactar com maior intensidade nos metabólitos menos concentrados, os quais podem estar mais sujeitos a uma maior influência da variabilidade não biológica (apresentando maior desvio padrão) em relação a metabólitos mais concentrados.⁶³ Desta forma, métodos que usam o desvio padrão como fator de escalonamento podem conseguir evidenciar metabólitos presentes em menores concentrações e caso estes sejam metabólitos discriminantes a variabilidade interclasse pode ser evidenciada usando métodos de análise estatística multivariada.

O *autoscaling* usa como fator de escalonamento o próprio desvio padrão podendo afetar mais intensamente os metabólitos que apresentam maior desvio padrão, sendo o método de pareto mais moderado. Neste estudo *pareto scaling* seguido de *Log 10* mostrou ser mais adequado para o conjunto de dados e foi validado.

A matriz de dados adquirida por GC-EI-MS geralmente é complexa devido a uma excessiva fragmentação dos metabólitos na fonte de impacto de elétrons. Desta forma, após o pré-processamento no Mzmine, ainda é necessário o uso de algoritmos para agrupamento de sinais de *m/z* relacionados ao metabólito precursor. O algoritmo usado foi o MSClust o qual reduziu de forma significativa o número de variáveis presentes na matriz de dados, ainda mantendo o agrupamento das amostras conhecidas CQF e STD, critério este que auxiliou na determinação dos parâmetros a serem usados no MSClust.

Após a aquisição dos dados por GC-EI-MS e validação da metodologia, a matriz validada foi concatenada com as matrizes obtidas por LC-MS e RMN de ¹H no capítulo 6.

5. Estudos metabolômicos não direcionados por RMN de ^1H

Este capítulo apresenta brevemente a impressão digital metabólica adquirida por RMN de ^1H para algumas amostras das espécies de *Mikania*. O capítulo também discute os resultados obtidos na validação dos métodos de pré-processamento dos dados de RMN de ^1H e critérios de validação usados apresentando a matriz validada a ser concatenada com os dados de LC-MS e GC-MS no capítulo 6.

5.1. Análises por RMN de ^1H

5.1.1. Materiais e Métodos

5.1.1.1. Preparo das amostras e controle de qualidade

5.1.1.1.A. Amostras (5 mg/mL): 15 mg do pó de cada espécie de *Mikania* foi submetido à extração com 1 mL de metanol em ultrassom á 40°C por 30 minutos. Em seguida as amostras foram filtradas por uma membrana de PVDF 0,22 μm e o solvente evaporado. Na sequência a amostra foi dissolvida em MeOD para concentração final de 5 mg/mL.

5.1.1.1.B. Controle de Qualidade (CQ): 5 mg do pó obtido das folhas pulverizadas de todas as espécies disponíveis de *Mikania* foi misturado e preparado conforme item 5.1.1.1.A.

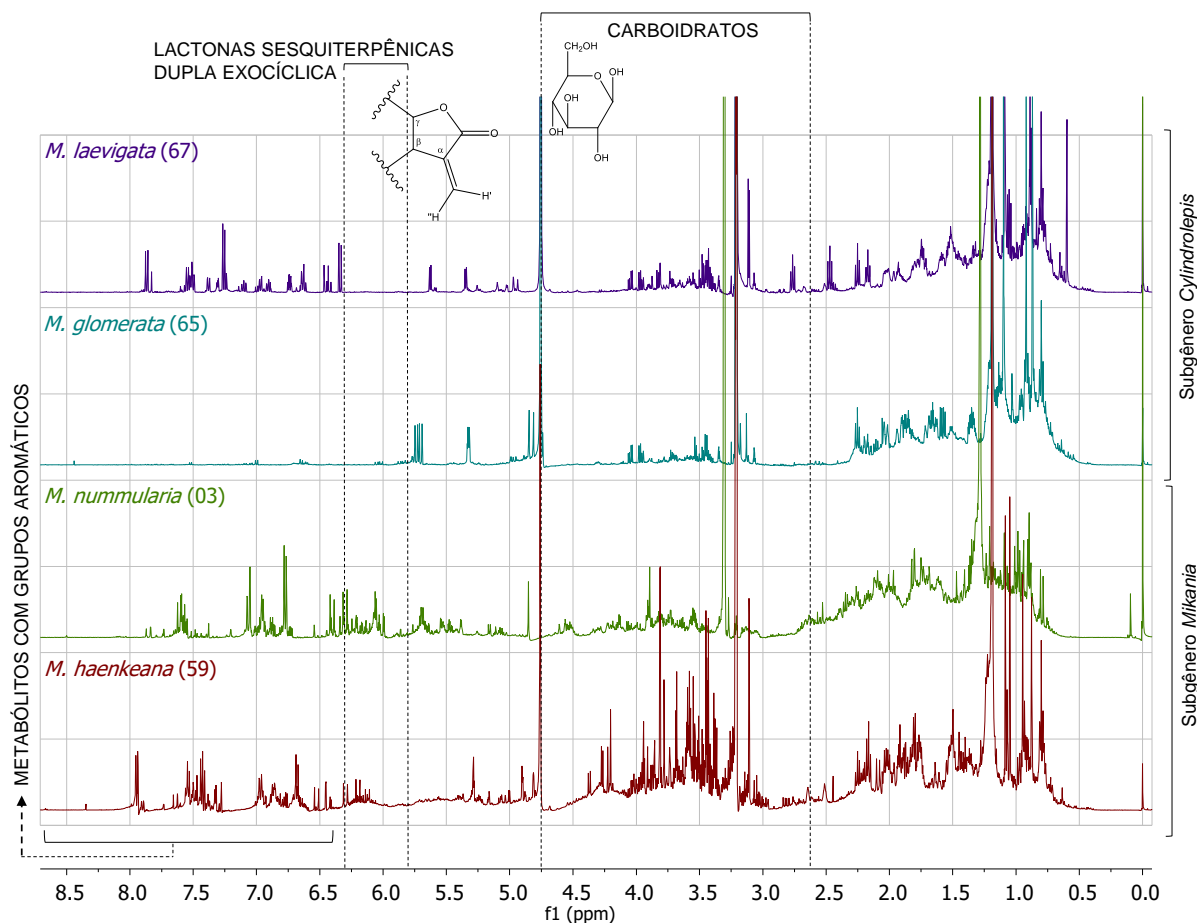
5.1.1.2. Aquisição dos espectros de RMN de ^1H

Espectros de RMN de ^1H foram adquiridos para as amostras disponíveis de *Mikania* (item 5.1.1.1.A) usando equipamento da Bruker AIII 500 MHz equipado com sonda de 5 mm TXI, com gradiente de campo no eixo z (software TopSpin 3.5 pl 7). Tubos Norell 5mm, 7' *standard series* 500 MHz foram usados na análise. Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos a 298 K, com janela espectral de 20 ppm, com pré-saturação do sinal de água (presat), 256 scans (DS:4), tempos de aquisição (AQ) e recuperação (d1) de 3,28 s e 2,0 s, respectivamente e tempo de pré-scan 10 μseg . Todos os espectros foram obtidos utilizando-se a sequência de pulsos *zgpr*.

5.1.2. Resultados

Espectros de quatro espécies de *Mikania* (Figura 70) ilustram a impressão digital metabólica adquirida por RMN de ^1H .

Figura 70. Espectros de RMN de ^1H das amostras de duas espécies do subgênero *Cylindrolepis* e *Mikania* evidenciando algumas regiões referentes a algumas classes de metabólitos.^{94,95, 96,97}

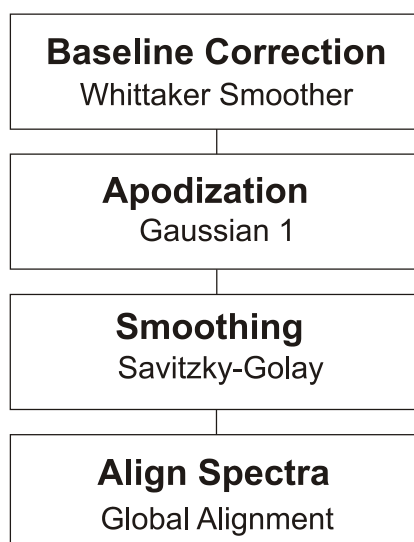


5.2. Validação dos métodos de pré-processamento dos dados de RMN de ¹H

5.2.1. Materiais e Métodos

Os dados brutos adquiridos por RMN de ¹H foram processados no software *MestReNova 9.0.1* (2014 Mestrelab Research S.L). Os espectros foram submetidos a uma série de pré-processamentos conforme Figura 71.

Figura 71. Fluxograma de critérios e parâmetros usados no pré-processamento dos espectros de RMN de ¹H usando o software MestReNova.



Em seguida, os dados pré-processados foram escalonados usando diferentes tipos de fatores de escalonamento (Tabela 52) e exportados em formato .csv para uma planilha de Excel (Microsoft 2013), com os seguintes dados: deslocamento químico (δ) e intensidade dos sinais. Picos referentes ao solvente metanol-d4 foram deletados manualmente na planilha de excel. As matrizes resultantes dos diferentes pré-tratamentos usados foram analisadas por PCA usando o software Matlab R2013b (Mathworks).

Para validação do método de processamento dos espectros de RMN de ¹H foi realizada a avaliação dos plots dos escores da PC1, PC2 e PC3 após análise por PCA (*Matlab R2013b - Mathworks*) das matrizes RMN#1 até RMN#7 (Tabela 52). O critério de aceitação foi a avaliação e comparação do perfil de agrupamento das amostras de *Mikania*. Para as matrizes validadas através da avaliação dos escores da PC1, PC2 e PC3 (RMN#2, RMN#3, RMN#4 e RMN#5) dendogramas foram obtidos por HCA (software R) usando o algoritmo 'hclust', sendo a similaridade calculada pela distância euclidiana e as amostras conectadas pela conexão tipo Ward.d. A ordem de

agrupamento das amostras nos dendogramas foi comparada para validação da matriz a ser usada na fusão dos dados de todas técnicas analíticas

Tabela 52. Estudos para validação do pré-processamento dos dados brutos obtidos por RMN de ¹H.

#	Sequência dos métodos		
RMN#1	<i>Smoothing</i>	<i>Auto Scaling</i>	Log10
RMN#2	<i>Smoothing</i>	<i>Range Scaling</i>	Log10
RMN#3	<i>Smoothing</i>	<i>Level Scaling</i>	Log10
RMN#4	<i>Smoothing</i>	<i>Vast Scaling</i>	Log10
RMN#5	<i>Smoothing</i>	<i>Pareto Scaling</i>	Log10
RMN#6	<i>Smoothing</i>	<i>Pareto Scaling</i>	<i>Power Transformation</i>
RMN#7	-	<i>Pareto Scaling</i>	Log10

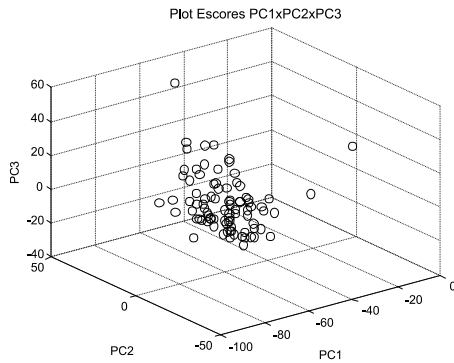
5.2.2. Resultados

Nos estudos de validação do pré-processamento de dados propostos, a variabilidade dos agrupamentos das espécies de *Mikania* foram avaliadas através da análise dos plots dos escores da PC1, PC2 e PC3 após análise da matriz de dados por PCA (Figura 72).

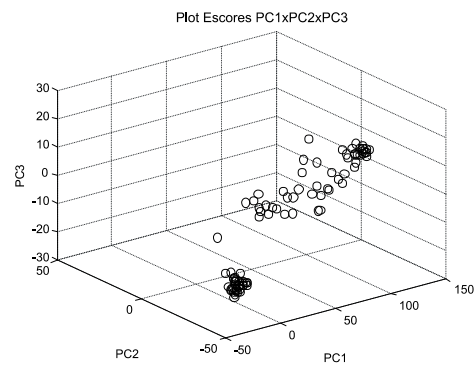
Dois grandes grupos relativamente bem definidos foram observados após análise por PCA das matrizes RMN#2, RMN#3, RMN#4 e RMN#5. O escalonamento dos dados antes da análise estatística multivariada (PCA) contribui para a redução do efeito da variação da quantidade dos metabólitos extraídos minimizando problemas devido a diferentes concentrações das amostras analisadas.⁹⁶ O tipo de método usado pode ou não impactar de forma significativa no agrupamento das amostras dependendo da natureza dos dados. O *Autoscaling* (RMN#1) foi o único método de escalonamento que não evidenciou o agrupamento em dois grandes grupos, portanto essa matriz não foi validada. Dois tipos de métodos para transformação de dados foram avaliados: raiz quadrada de cada valor (*power transformation*) e Log10. Comparando as matrizes RMN#5 (log 10) e RMN#6 (*power transformation*), foi observado que usando *power transformation* houve o agrupamento em dois grupos com maior dispersão quando comparado ao uso do log 10. Essa observação deu suporte para validação do uso do log 10 como método de transformação de dados e invalidou o *power transformation*.

Figura 72. Escores PC1, PC2 e PC 3 obtidos dos estudos dos pré-processamentos dos dados de RMN de ^1H .

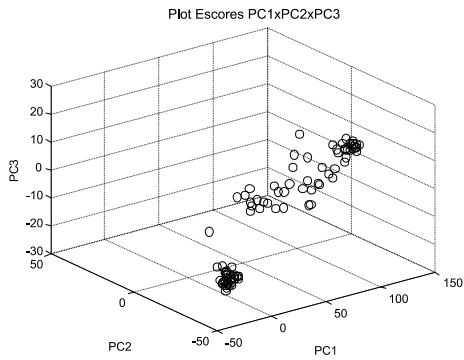
RMN#1: Smoothing-Auto Scaling-Log 10



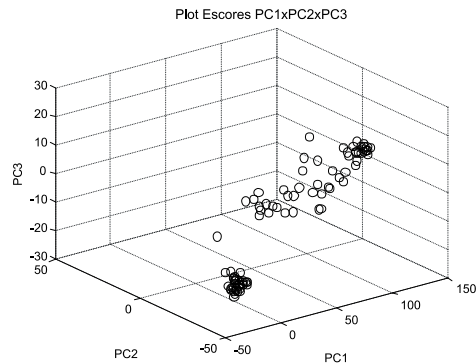
RMN#2: Smoothing-Range Scaling-Log 10



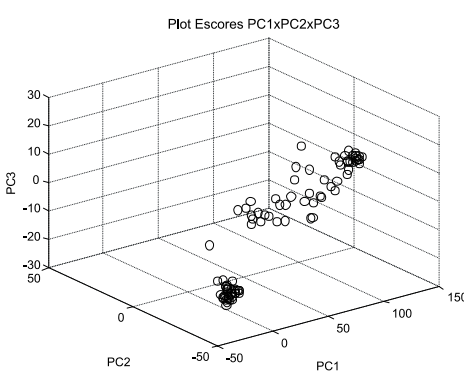
RMN#3: Smoothing-Level Scaling-Log 10



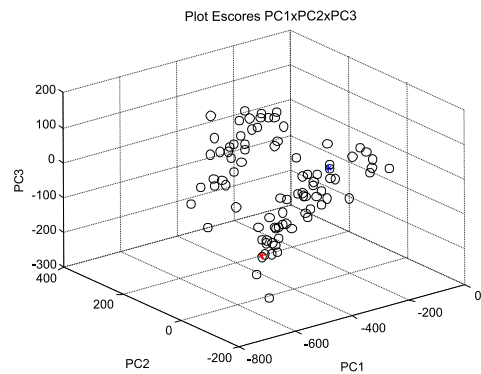
RMN#4: Smoothing-Vast Scaling-Log 10



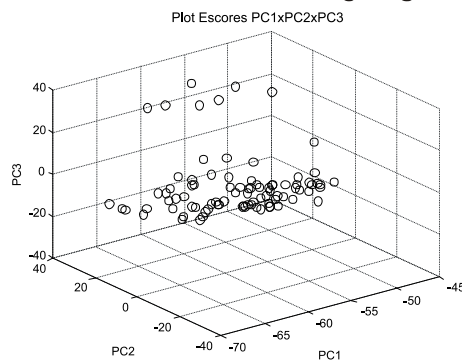
RMN#5: Smoothing-Pareto Scaling-Log 10



RMN#6: Smoothing-Pareto Scaling-PT



RMN#7: Pareto Scaling-Log10



O uso de alisamento de dados pode resultar em processamento extensivo dos dados e perda de informação biológica relevante. Foi avaliado o impacto do uso do alisamento (*smoothing*) antes do escalonamento da matriz de dados, sendo as matrizes RMN#5 e RMN#7 comparadas. O processamento sem alisamento seguido de um método de escalonamento evidenciou a importância do alisamento para o conjunto de dados estudado para obter um agrupamento mais bem definido das amostras de *Mikania*. Desta forma somente as matrizes RMN#2, RMN#3, RMN#4 e RMN#5 foram validadas.

Para as quatro planilhas validadas nenhuma diferença foi observada na ordem de agrupamento das diferentes amostras de *Mikania* através da comparação dos dendogramas obtidos por HCA. Portanto, todos os tipos de escalonamento *Range Scaling*, *Level Scaling*, *Vast Scaling* e *Pareto Scaling* foram considerados válidos neste estudo. Para a fusão dos dados de RMN de ¹H aos dados obtidos com as outras técnicas analíticas, a matriz RMN#5 (*smoothing*, *Pareto Scaling* e Log10) foi escolhida.

5.3. Discussão

A técnica de RMN tem sido usado com frequência em estudos metabolômicos para detectar uma ampla faixa de metabólitos entre eles metabólitos secundários (flavonóides, terpenóides, fenilpropanóides e etc) assim como metabólitos primários abundantes (carboidratos, aminoácidos, lipídeos e etc).^{96,137} A análise por RMN representa uma estratégia valiosa para a análise quantitativa de metabólitos além de uma estratégia poderosa na etapa de proposta de identidade dos metabólitos discriminantes nos estudos metabolômicos.¹³⁷

Estudos metabolômicos de diferentes matrizes (plantas, microorganismos etc) embasados pelo perfil metabólito adquirido por RMN e espectrometria de massas têm cada vez mais sido realizados por serem abordagens analíticas complementares.^{136,137} A técnica de aquisição de espectros de RMN, no entanto apresenta no geral baixa sensibilidade quando comparada a espectrometria de massas sendo necessário o uso significativamente maior de quantidade de amostra o que em muitos casos pode inviabilizar o uso da técnica. No presente trabalho, algumas amostras com baixa quantidade disponível não puderam ser incluídas no estudo por este motivo. Em relação a limitação da técnica no que tange a sensibilidade, o avanço do

desenvolvimento da técnica de RMN deve ser evidenciado para otimização da sensibilidade de medida como sondas com resfriamento (ex.: *CryoProbe* da Bruker e *ColdProbe* da Varian) além da disponibilidade de micro sondas para o uso reduzido de volume (*microprobe*).⁹⁶ No entanto, a disponibilidade do equipamento de RMN, além do custo de se aplicar essas diversas estratégias, impactam significativamente no uso da técnica em estudos metabolômicos como no caso do presente estudo.

A técnica de RMN de ^1H 1D é uma das abordagens mais comumente utilizadas em estudos metabolômicos.¹³⁷ Os espectros de RMN de ^1H 1D adquiridos de misturas complexas como os extratos vegetais resultam em espectros de alta complexidade havendo a sobreposição de muitos sinais consequentemente dificultando a identificação acurada e integração dos sinais. O estudo metabolômico do gênero *Mikania* se apoiou na aquisição de espectros de RMN de ^1H 1D, porém vale ressaltar o uso de técnicas de aquisição de espectros 2D (^1H - ^1H J-resolved, COSY, HMBC)⁹⁶ com intuito de superar em parte a limitação da complexidade dos espectros com sinais sobrepostos, facilitando a identificação de metabólitos em misturas complexas analisadas por RMN.⁹⁶ No entanto, técnicas 2D requerem tempo de máquina ainda maiores impactando novamente em custo das análises e viabilidade de serem usados nos estudos metabolômicos, sendo o motivo de não ter sido usado neste estudo. A proposta de identificação dos metabólitos discriminantes avaliados nos estudos metabolômicos se apoiou em diferentes evidências adquiridas especialmente por LC-MS e GC-MS com suporte dos deslocamentos químicos característicos de algumas classes de metabólitos observados nos espectros de RMN de ^1H assim como será discutido no capítulo 7.

A etapa de processamento de dados representa uma etapa crítica na qualidade dos resultados finais. Para validação da matriz dos dados adquiridos por RMN de ^1H , diferentes métodos de escalonamento foram estudados assim como o impacto do uso de dois métodos de transformação (log 10 e *power transformation*). Além disso, o uso de alisamento também foi estudado para avaliação de um possível processamento extensivo dos dados, o que poderia mascarar com certa extensão a informação biológica.

Para a validação dos métodos de processamento foi determinado como critério de aceitação a comparação do perfil de agrupamento das amostras de *Mikania* o qual deveria se dar em dois grandes grupos devido ao fato de ter sido essa a tendência de

agrupamento observada. No entanto, vê-se a importância da determinação de critérios de aceitação que não sejam dependentes dos resultados. Estes critérios devem ser robustos e determinados antes das análises assim como foi a validação da matriz de dados adquiridos por LC-MS e GC-MS, direcionada pelo agrupamento das amostras controle de qualidade. Neste estudo houve uma dificuldade para a determinação do critério de aceitação para validação da planilha com dados de RMN, os quais fossem independentes do resultado observado, sendo este um ponto a ser desenvolvido e otimizado em protocolos de análise por RMN.

Após a aquisição dos dados por RMN de ^1H e validação do método de pré-processamento os dados foram concatenados com os dados adquiridos por LC-MS e GC-MS no capítulo 6.

6. Fusão dos dados de LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H

Este capítulo aborda as estratégias usadas na fusão dos dados obtidos nas análises das espécies de *Mikania* por LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H . Além disso, o capítulo também apresenta o método para análise estatística multivariada usado, resultando na obtenção de um dendograma por HCA, sendo o agrupamento correlacionado com o agrupamento obtido nos estudos filogenéticos das espécies de *Mikania* em uma breve discussão. Este capítulo também aborda métodos de seleção de variáveis e de pré-processamento e é finalizado com a descrição das estratégias de validação do modelo de predição obtido por OPLS-DA usado nos estudos metabolômicos. Os resultados discutidos nesse capítulo darão o direcionamento para o entendimento de quais são os metabólitos chave na separação dos grupos das espécies de *Mikania* e compreensão mais detalhada da classificação quimiotaxonômica a ser discutido com detalhes no capítulo 8.

6.1. Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) do perfil químico das espécies de *Mikania* e correlação com árvore filogenética

6.1.1. Materiais e Métodos

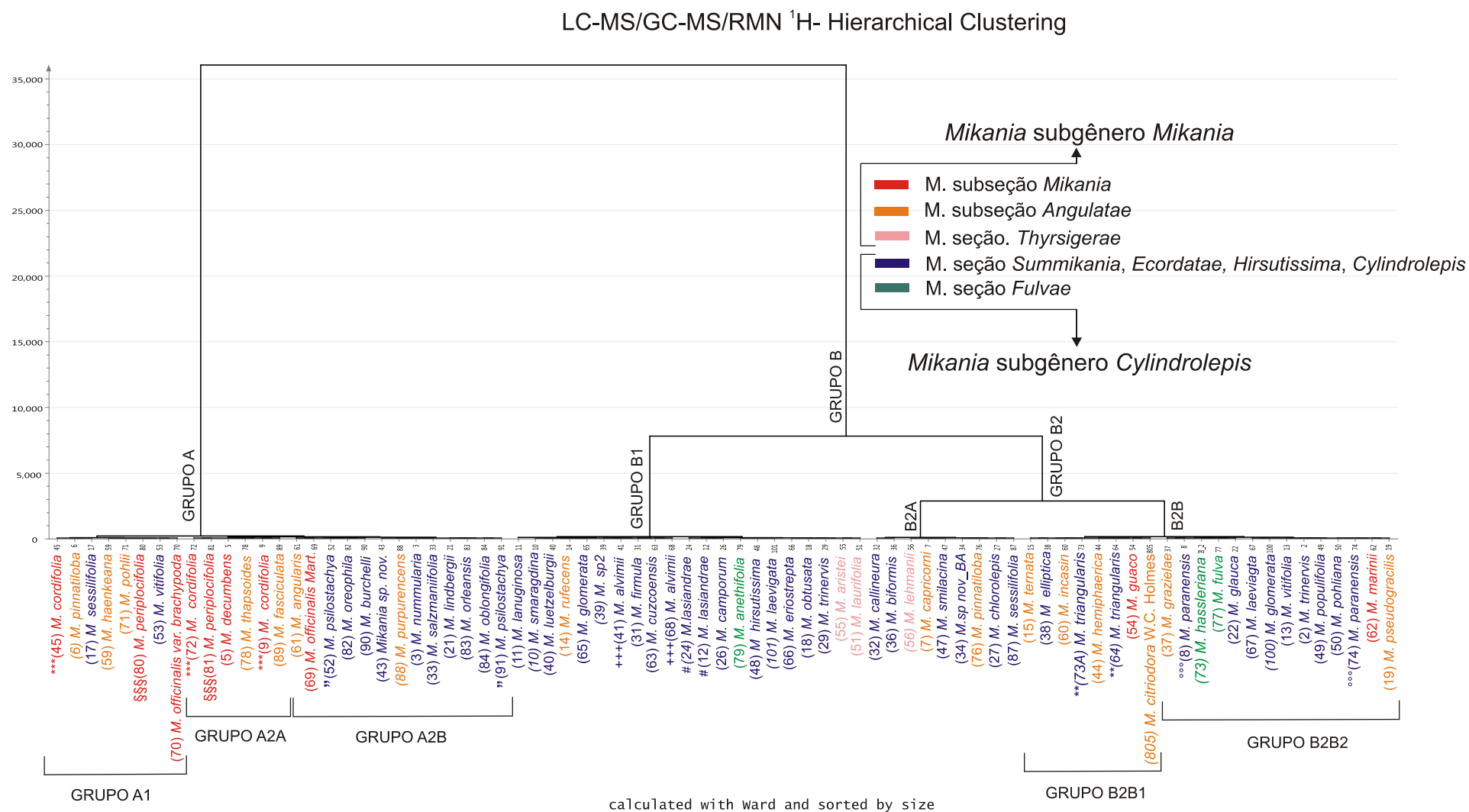
Uma matriz de dados foi obtida pela fusão dos dados adquiridos por LC-MS, GC-MS, RMN de ¹H. As matrizes concatenadas foram inicialmente processadas em blocos e validadas, sendo elas: matriz E6#B obtida por LC-MS (*N-range scaling-Log10*), matriz E#8B obtida por GC-MS (*N-Pareto scaling-Log10*) (Tabela 38) e matriz E#5 obtido por RMN de ¹H (*smoothing-pareto scaling-log10*) (Tabela 52).

Para avaliação da quimiotaonomia do gênero *Mikania*, a matriz validada com os dados de LC-MS, GC-MS, RMN de ¹H (LC-MS#6B / GC-MS#8B / RMN#5) foi submetida a análise por HCA usando o software SIMCA 13.0.3 (Umetrics). A similaridade foi calculada pela distância euclidiana e as amostras conectadas pela conexão tipo Ward. O dendograma obtido por HCA, baseado no perfil químico, foi comparado com a árvore filogenética das espécies de *Mikania*.⁸⁸

6.1.2. Resultados

A fusão das matrizes de dados processadas e validadas de cada técnica analítica (LC-MS#6B / GC-MS#8B / RMN#5) resultou inicialmente em uma planilha complexa com 7456 variáveis adquiridas por LC-ESI-MS em modo positivo ESI(+), 4381 variáveis adquiridas por LC-ESI-MS em modo negativo ESI(-), 2328 variáveis adquiridas por GC-MS e 313 variáveis adquiridas por RMN de ¹H, com um total de 14487 variáveis iniciais. Após obtenção do modelo por OPLS-DA (baseado no agrupamento observado após HCA) e exclusão de variáveis com valores de VIP abaixo de 0,8 houve a redução do número de variáveis para 7581, e com essa matriz foi obtido o dendograma gerado por HCA (Figura 73). No dendograma foi observado a formação de quatro grupos, além do agrupamento bem delimitado do grupo controle de qualidade (amostras CQ não foram ilustradas no dendograma) (Figura 73). No dendograma obtido por HCA a cor do nome das espécies estudadas está relacionada à seção/subgênero propostas pelos estudos filogenéticos, para facilitar a comparação com a classificação quimiotaonomica proposta.

Baseado no HCA obtido pela fusão das matrizes de LC-MS, GC-MS e RMN de ¹H (Figura 73), foi observado a formação de dois grandes grupos A e B. O grupo A se ramificou nos grupos secundários A1 e A2, sendo dois subgrupos observados dentro da subchave A2: A2A e A2B.

Figura 73. Dendrograma gerado por HCA a partir da matriz fusão dos dados de LC-MS, GC-MS e RMN de ¹H.

As amostras dentro do subgrupo A1 e A2A pertencem predominantemente ao subgênero *Mikania* (espécies em laranja e vermelho). Dentro do subgrupo A2B, foi observado predominantemente espécies do outro grande subgênero *Cylindrolepis* (espécies em azul).

O grupo B se ramificou em dois grupos secundários o B1 e B2, sendo dois subgrupos observados dentro da subchave B2B: B2B1 e B2B2. Os subgrupos secundários B1, B2A e B2B2 apresentam predominantemente espécies do subgênero *Cylindrolepis* (espécies em azul). Grupo B2B1 apresenta espécies tanto do subgênero *Mikania* e *Cylindrolepis*.

As espécies *M. hassleriana* (73), *M. fulva* (77) e *M. anethifolia* (79) (espécies evidenciadas em verde) se localizaram no grupo B, sendo estas espécies da seção *Fulvae* e subgênero *Cylindrolepis*, evidenciando a similaridade do perfil químico dessas espécies. Ainda dentro do grupo B, foi observado a presença de três espécies *M. laurifolia* (51), *M. aristei* (55) e *M. lehmanii* (56) (espécies evidenciadas em rosa) classificadas pela filogenia como do subgênero *Mikania* seção *Thyrsigerae*, no entanto foi observado baseado no perfil químico uma maior semelhança destas com as espécies do subgênero *Cylindrolepis*.

6.2. Análise supervisionada por OPLS-DA do perfil químico das espécies de *Mikania* e validação do modelo de predição obtido

6.2.1. Materiais e Métodos

Baseado no agrupamento por HCA, um modelo de predição de classes foi estimado por OPLS-DA usando o software SIMCA 13.0.3 (Unmetrics). O método *VIP* (*Variable Importance in the Projection*) foi usado inicialmente como seleção de variáveis, sendo o critério para rejeição das variáveis $VIP < 0,8$.

A estratégia de validação do modelo estatístico usado nos estudos metabolômicos se deu pela avaliação de diferentes parâmetros:

(I) Agrupamento das amostras controle de qualidade (CQ): Análise do agrupamento bem delimitado das amostras CQ no plote de escores obtido por OPLS-DA.

(II) Avaliação da capacidade de predição do modelo: A qualidade de predição do modelo foi avaliada através do coeficiente de predição Q^2 e de explicação (R^2X e R^2Y) calculados através da validação do modelo (Validação cruzada *K-fold*), além do teste F calculados pelo software SIMCA 13.0.3 (Unmetrics).¹³¹

O teste F foi realizado pela comparação do F calculado (F_{calc} : razão da média quadrática da regressão (MQ_{reg}) e média quadrática dos resíduos (MQ_{res})) e F tabelado (F_{tab}), sendo F_{tab} estabelecido com 5% de significância e graus de liberdade da regressão e resíduos, respectivamente. O modelo foi considerado com boa capacidade preditiva se $|F_{calc}| \geq F_{tab}$ e $p\text{-valor} < 0,05$.

A estimativa da variabilidade e qualidade do coeficiente de predição foi realizada através da permutação da ordem das observações da matriz de dados. No total, 10 modelos foram construídos através da permutação aleatória das observações, usando o mesmo conjunto de dados para a comparação do valor de Q^2 .¹³²

(III) Avaliação do ranqueamento dos metabólitos discriminantes: Avaliação da autenticidade dos metabólitos discriminantes usando como método para análise de regressão PLS-DA e OPLS-DA, através do software SIMCA.

6.2.2. Resultados

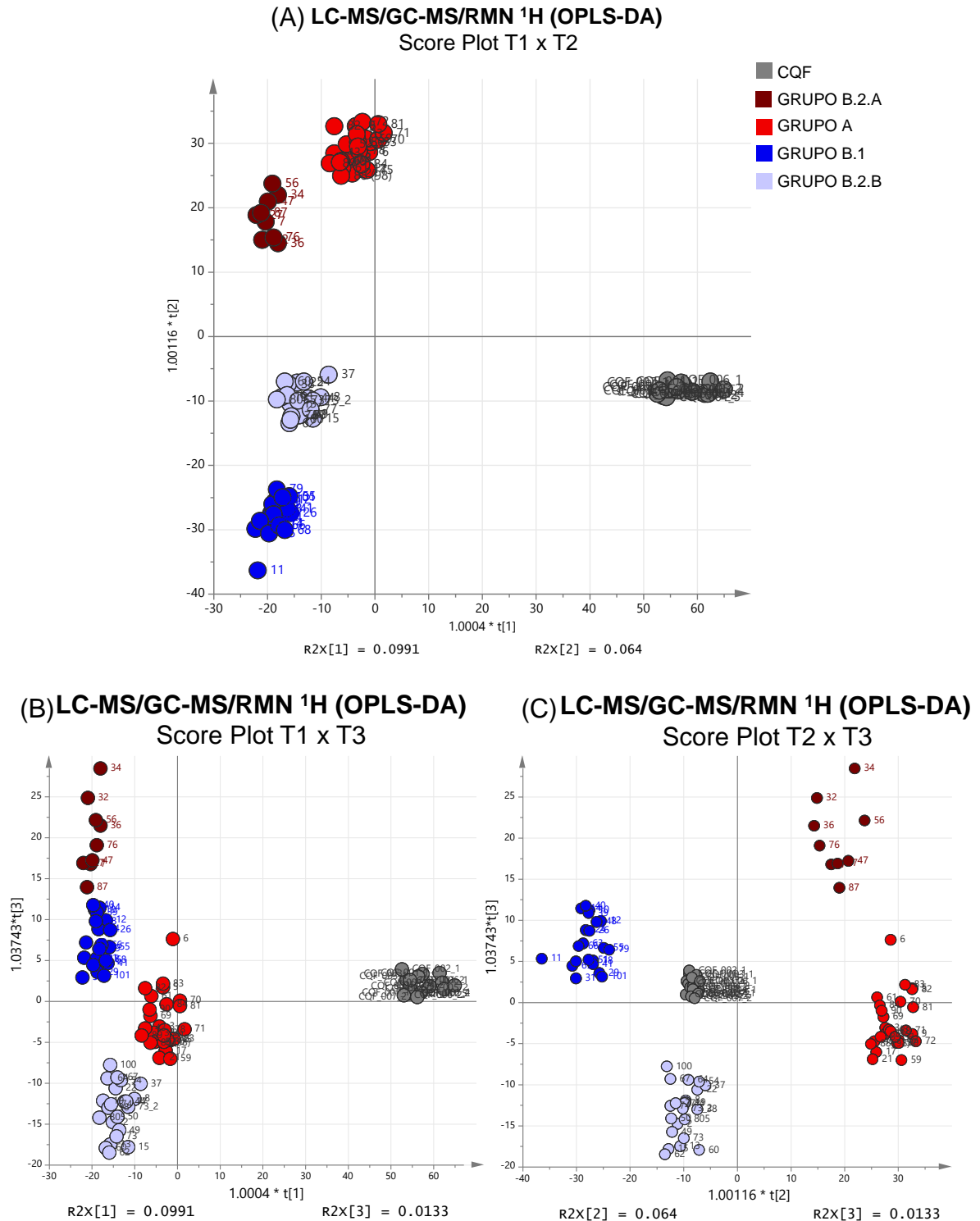
Baseado nos agrupamentos observados no dendograma obtido por HCA, foi gerado um modelo de predição de classes por OPLS-DA. Avaliando os plotes dos escores T1 *versus* T2, T1 *versus* T3 e T2 *versus* T3 obtidos por OPLS-DA (Figura 74), pode-se visualizar também o agrupamento bem delimitado de dois grandes grupos A e B e os subgrupos B1, B2A e B2B, assim como evidenciado no dendograma obtido por HCA.

O modelo de predição de classes obtido por OPLS-DA foi validado baseado nos seguintes parâmetros:

(I) Agrupamento das amostras controle de qualidade (CQF)

Analisando o plote de escores (Figura 74) foi observado o agrupamento bem delimitado das amostras CQF. Esse agrupamento foi considerado evidência do uso adequado dos métodos de processamentos das matrizes de dados e escolha do método de regressão usado para a predição do modelo para análise quimiotaconômica do gênero *Mikania*.

Figura 74. Gráfico dos escores de (A) T1 versus T2 (B) T1 versus T3 e (C) T2 versus T3 gerado por OPLS-DA a partir da fusão das matrizes de dados adquiridos LC-MS, GC-MS e RMN de ¹H.



(II) Avaliação da capacidade de predição do modelo

A qualidade de predição do modelo foi avaliada através do coeficiente de predição (Q^2) e de explicação (R^2X e R^2Y) estimados através da validação do modelo (validação cruzada *K-fold*), além do teste F calculados pelo software SIMCA.¹³¹ O modelo de predição gerado por OPLS-DA apresentou coeficientes de explicação $R^2X = 0,418$ e $R^2Y = 0,968$; e coeficiente de predição $Q^2 = 0,415$, usando-se 4 componentes para gerar o modelo.

Comparando as fontes de variação da regressão e do resíduo através do teste *F*, foi observado que fontes de variação comparadas são diferentes estatisticamente sendo $|F_{calc}| \geq F_{tab}$ e p-valor $< 0,05$, portanto sendo uma evidência que o modelo apresenta uma boa capacidade de predição (Tabela 53).

Tabela 53. ANOVA do modelo gerado por OPLS-DA na validação cruzada.

Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	$F_{calc.}$	$*F_{tab.}$	p-valor
Regressão	189,523	88	2,15368	3,3	1,3	$1,7 \cdot 10^{-14}$
Resíduos	190,477	292	0,652317			

$*F_{tab}$ ($\alpha=0,05$ e g.L. 88 e 292)

A partir da validação cruzada, foi obtido o valor do coeficiente de predição Q^2 de 0,415, o qual fornece também um parâmetro para avaliação da habilidade de predição e ajuste do modelo. Baseado na discussão de Triba *et al* sobre o impacto da permutação da ordem das observações da matriz de dados na estimativa do coeficiente de predição¹³², a permutação da ordem das observações foi simulada de forma aleatória gerando no total 10 modelos com o mesmo conjunto de dados para comparação do valor de Q^2 desses modelos.¹³²

Esta estratégia, em conjunto com teste *F*, foi usada como critério de validação do modelo, visto que a capacidade preditiva se apresentou abaixo de 0,5. Na validação da estimativa da habilidade de predição foi observado uma baixa dispersão Q^2 , o qual se apresentou entre 0,405 e 0,445, portanto sendo consistente com o $Q^2 = 0,415$ estimado para o modelo final usado nos estudos metabolômicos. Desta forma é evidenciado que a permutação não impacta na habilidade da estimativa de predição do modelo usado, portanto mostrando que há robustez na determinação da significância da diferença dos metabólitos para a discriminação dos grupos quimiotaxonômicos do gênero *Mikania*.

O número de componentes necessárias para gerar o modelo também foi comparado sendo observado o uso de 2 a 4 componentes e o método final considerou 4 componentes.

(III) Avaliação do ranqueamento dos metabólitos discriminantes

Nesta etapa dois métodos de regressão foram avaliados, sendo eles: PLS-DA e OPLS-DA. O agrupamento gerado usando PLS-DA como método de escolha para regressão resultou num agrupamento semelhante ao resultado obtido por OPLS-DA, porém muito mais disperso e com dificuldades para evidenciar as diferenças entre os grupos.

Além disso, o ranqueamento dos metabólitos mais significativos para o agrupamento obtido pelo modelo de predição gerado por PLS-DA evidenciou alguns metabólitos fantasmas como discriminantes o que pode direcionar para interpretações equivocadas sobre a informação biológica.

Desta forma outra etapa de validação é necessária para se propor os candidatos de metabólitos significativos nos agrupamentos observados gerando resultados confiáveis. Com o uso do OPLS-DA como método de regressão dos dados, foi observado que a lista de metabólitos considerados significativos consistia de metabólitos realmente presentes nas amostras de *Mikania*, além de apresentar um agrupamento bem definido dos quatro grupos quimiotaxonômicos das espécies de *Mikania* e amostras CQF (Figura 74).

6.3. Seleção das variáveis discriminantes dos grupos quimiotaxonômicos.

6.3.1. Materiais e Métodos

A partir do modelo gerado por OPLS-DA (6.2.1), as variáveis significativas para os agrupamentos observados foram avaliadas usando o método para seleção de variáveis *Best First* no software WEKA (*Waikato Environment for Knowledge Analysis*).

6.3.2. Resultados

A estratégia para determinar quais são as variáveis significativas para o agrupamento das amostras de *Mikania*, considerou o método de seleção de variáveis *BestFirst*, resultando no total de 312 variáveis.

Após avaliação de quais variáveis apresentavam-se somente em um dos grupos ou em dois grupos, as 17 variáveis apresentadas na Tabela 54 foram

consideradas para a caracterização (capítulo 7 seção 7.2) para um entendimento do perfil metabólico das espécies de *Mikania*.

Tabela 54. Seleção das variáveis significativas para o agrupamento dos grupos quimiotaxonômicos do gênero *Mikania* observado no plote de escores obtido por OPLS-DA.

Código da variável	Técnica analítica	m/z observado	Tempo retenção (TR) (min)	δ (ppm)	Grupo
N74	LC-MS / ESI(-)	301,21	17,2	-	B
P2417	LC-MS / ESI(+)	301,21	12,4	-	B
P5483	LC-MS / ESI(+)	301,21	18,7	-	B
N100	LC-MS / ESI(-)	335,22	11,2	-	B
P1200	LC-MS / ESI(+)	183,12	11,4	-	A/B2B
P2485	LC-MS / ESI(+)	183,11	10,6	-	A/B2B
P5130	LC-MS / ESI(+)	229,12	10,4	-	A/B2B
N4356	LC-MS / ESI(-)	353,08	10,6	-	B2B/B1A
GC2294	GC-EI-MS	257	12,1	-	B
GC64	GC-EI-MS	307	3,7	-	B2A/A
GC247	GC-EI-MS	307	3,8	-	B2A/A
GC373	GC-EI-MS	204	32,8	-	B2A/A
GC1048	GC-EI-MS	204	47,5	-	B2A/A
RMN162	RMN de ¹ H	-	-	6,21	A
RMN163	RMN de ¹ H	-	-	6,04	A
RMN202	RMN de ¹ H	-	-	4,44	A
RMN206	RMN de ¹ H	-	-	4,28	B2A/A

6.4. Discussão

A fusão dos dados adquiridos por técnicas analíticas ortogonais como LC-MS, GC-MS e RMN de ¹H resultou em uma matriz complexa que reflete a informação biológica das espécies de *Mikania* de forma abrangente, contribuindo para o alcance do objetivo desafiador dos estudos metabolômicos de abordagem não direcionada da forma mais genuína possível. A fusão dos dados complementares obtidos pelas diferentes técnicas analíticas representa uma estratégia interessante para o acesso do conteúdo metabólico de cada amostra de *Mikania*, visto que a limitação de detectabilidade de uma técnica pode ser compensada por outra técnica como será discutido no capítulo 7.

A classificação das espécies de *Mikania* e diferenças do perfil metabólico de cada espécie foram consideradas não conhecidas sendo primeiramente usado um

método não supervisionado como o HCA para análise exploratória e avaliação da similaridade do perfil metabólico das espécies de *Mikania*. A partir do dendograma gerado por HCA, foi observado o agrupamento de alguns grupos os quais refletiram com certa extensão, o agrupamento obtido baseado nos estudos filogenéticos das espécies de *Mikania*. A princípio, foi observado que amostras do subgênero *Mikania* e *Cylindrolepis* apresentaram a tendência em se agrupar separadamente nos dois grandes grupos quimiotaxonômicos nomeados de A e B. No entanto, houveram espécies do subgênero *Mikania* que se localizaram no grande grupo B, onde um maior número de espécies do subgênero *Cylindrolepis* se localizam. Algumas espécies do subgênero *Cylindrolepis* também se agruparam no grupo A, onde um maior número de espécies do subgênero *Mikania* se localizam. A classificação quimiotaxonômica será discutida em detalhes no capítulo 8, reunindo a proposta de identidade dos metabólitos discriminantes para o agrupamento e hipóteses serão levantadas baseado no conteúdo metabólico de cada espécie clarificando a possível razão da divergência de amostras de subgêneros diferentes terem se agrupado separadamente.

Após obter uma hipótese inicial baseado nos agrupamentos evidenciados por HCA, OPLS-DA foi usado para verificar essa hipótese de agrupamento e inferir com mais clareza os metabólitos que maximizam a discriminação dos grupos quimiotaxonômicos. Esta estratégia direcionou para uma proposta de classificação quimiotaxonômica a ser discutida no capítulo 8, evidenciando informações que resultou na correlação de forma integrativa do conhecimento sobre vias biosintéticas, funções dos metabólitos, possíveis classificadores quimiotaxonômicos com o conteúdo metabólico de cada classe quimiotaxonômica e agrupamento das espécies.

Uma etapa muito importante após a construção do modelo gerado por OPLS-DA para seleção de metabólitos discriminantes e entendimento dos agrupamentos é a avaliação de parâmetros que refletem a qualidade de predição e ajuste do modelo como o coeficiente de predição (Q^2) e de explicação (R^2X e R^2Y) estimados na validação cruzada.

A etapa da aplicação das análises estatísticas dentro do fluxo dos estudos metabolômicos é crítica e deve ser validada, portanto diferentes estratégias foram usadas para a validação da análise estatística usada para acessar os diferentes grupos quimiotaxonômicos do gênero *Mikania* e o modelo de predição. Primeiramente o agrupamento das amostras controle de qualidade (CQ) foi utilizado com sucesso

como critério para: validação da matriz fusão dos dados das três técnicas analíticas envolvidas no estudo e validação do uso do método de OPLS-DA. O guia do SIMCA discute que modelos de predição com valor do coeficiente de predição acima de 0,5 é importante para garantir uma adequada habilidade de predição do modelo¹³¹, porém, no geral não existem critérios de aceitação para este parâmetro de qualidade visto que este pode ser afetado por alguns fatores¹³² como o número reduzido de amostras disponíveis. Além disso, amostras que apresentam conteúdo metabólico com alta variabilidade dentro de uma mesma classe pode dificultar a descrição dos agrupamentos pelos modelos de predição, visto que somente parte das informações contidas na matriz de dados serão levadas em consideração. Isto pode ocorrer devido a complexidade do conjunto de metabólitos presentes em plantas e devido á exposição da planta a diferentes tipos de estresses abióticos e bióticos impactando na dinâmica dos processos celulares e nas vias biosintéticas que podem causar flutuações na concentração de alguns metabólitos ou impactar na produção de um novo metabólito como resposta ao estresse.

Sendo assim, existe um desafio na escolha de modelos de regressão para a construção de modelos que descrevam de forma genuína a relação das variáveis (tipos de metabólitos e concentração destes) com a resposta estudada (agrupamento das amostras), podendo resultar em coeficientes de predição mais pobres, porém não necessariamente representando uma baixa qualidade do modelo a ser usado em uma determinada aplicação, como no caso da classificação quimiotaxonômica. Para a avaliação da capacidade preditiva do modelo, além da avaliação dos coeficientes de predição e de explicação, a estratégia de permutação da ordem das observações foi usada para validar a robustez da estimativa da variabilidade e qualidade do coeficiente de predição. Esta estratégia foi usada baseada na discussão de Triba *et. al*¹³² sobre o impacto da permutação da ordem das observações na matriz de dados no coeficiente de predição do modelo estimado na validação cruzada e em conjunto com o teste F evidenciou que o modelo gerado por OPLS-DA apresenta uma boa capacidade de predição para ser usado nos estudos metabolômico do gênero *Mikania*.

Outro ponto muito importante dentro dos estudos metabolômicos é a estratégia usada para regressão e gerar o modelo de predição de clases e seleção dos metabólitos mais significativos para o agrupamento das amostras. O uso do método estatístico OPLS-DA também representou uma ferramenta de pré-processamento

neste estudo e contribuiu para evidenciar variações preditivas da resposta e filtrar variações não-biológicas não-correlacionadas a resposta do modelo de forma mais efetiva^{133,134} do que com o uso do PLS-DA.

O uso do método de regressão PLS-DA neste estudo levou ao ranqueamento de vários metabólitos relacionados a *background*, provavelmente devido a limitações desse método para filtrar variações que não estão diretamente correlacionadas com a resposta, portanto estando presentes nos escores, dificultando a interpretação dos plots de escores e *loading*.^{133,134} Com o uso do OPLS-DA, foi observado que a lista de metabólitos considerados significativos consistia de metabólitos realmente presentes nas amostras das espécies de *Mikania*, contribuindo para a exatidão da seleção de metabólitos discriminantes do agrupamento observado, consequentemente revelando a informação biológica de forma mais acurada e evitando o uso de falsos discriminantes no acesso ao entendimento do perfil quimiotaxonômico do gênero. Apesar dessa observação, vê-se a importância ainda da determinação de outros parâmetros de validação para a etapa ranqueamento de metabólitos discriminantes para garantir que metabólitos realmente discriminantes sejam evidenciados como responsáveis pelo agrupamento das amostras em estudo.

Observa-se também, que a etapa de avaliação e ranqueamento dos metabólitos discriminantes também pode ser impactada de forma significativa pela etapa de deconvolução dos dados e método de escalonamento, sendo importante incluir critérios para validação do algoritmo de deconvolução nos estudos metabolômicos.

Algoritmos de deconvolução os quais consideram muitos sinais de “*background*” como metabólitos, podem facilitar a seleção de metabólitos não reais ou fantasmas como discriminantes. Outra etapa dos estudos metabolômicos que se conecta com a problemática da seleção de metabólitos discriminantes é a etapa de proposta da identidade desses metabólitos. A proposta de identificação feita baseada em evidências mínimas (assunto a ser discutido no capítulo 7) contribui para a determinação de sinais relacionados ao *background*, ou seja, aparentes metabólitos não reais, contribuindo para validar a etapa de seleção de discriminantes.

A lista de metabólitos discriminantes evidenciados pelos modelos de regressão não deve ser considerada como discriminantes, antes que os atributos relacionados a essas variáveis sejam avaliados nos dados brutos na etapa de identificação dos metabólitos. Desta forma, vê-se necessário reunir outras evidências coletadas para a

proposta de identificação do metabólito e avaliação se o sinal evidenciado é realmente um metabólito, sinal de *background* ou fragmento desse metabólito, nos estudos que envolvem espectrometria de massas. Diversas etapas incluídas nos estudos metabolômicos como métodos de pré-processamentos, método estatístico usado e proposta de identidade de metabólitos responsáveis pelo agrupamento das amostras em estudo se interconectam e podem impactar de forma significativa na robustez e exatidão da conclusão direcionada por cada uma dessas etapas.

Os metabólitos evidenciados neste capítulo como discriminantes dos grupos pelo modelo de predição de classes gerado por OPLS-DA tiveram suas identidades propostas e discutidas no capítulo 7. Em seguida, as classes das espécies de *Mikania* evidenciadas no dendograma obtido por HCA e modelo de predição obtido por OPLS-DA, foram discutidas no capítulo 8, evidenciando a proposta de classificação quimiotaxonômica do gênero *Mikania* e classificadores quimiotaxonômicos baseado na abordagem metabolômica.

7. Caracterização de metabólitos em espécies de *Mikania*

Este capítulo aborda na seção 7.1, as estratégias usadas na caracterização dos metabólitos detectados por LC-MS em três espécies de *Mikania* consideradas medicinais (*M.cordifolia*, *M. glomerata* e *M. laevigata*). Também é discutido brevemente a otimização dos parâmetros de análise por MS e boas práticas para processamento de dados e caracterização dos principais metabólitos por espectrometria de massas com foco nas principais classes encontradas nas espécies *M.cordifolia*, *M. glomerata* e *M. laevigata*. Este capítulo também aborda na seção 7.2, as estratégias usadas na proposta de identificação dos metabólitos discriminantes evidenciados no capítulo 6 a partir dos estudos metabolômicos, sendo estes

metabólitos de grande importância para o agrupamento das espécies de *Mikania* e entendimento da semelhança baseada no conteúdo metabólico de cada amostra. Nesta segunda seção do capítulo, dados adquiridos por LC-MS e GC-MS serão usados como evidências para a determinação da proposta de identidade desses metabólitos discriminantes com o suporte dos deslocamentos químicos obtidos nos espectros de RMN de ^1H .

Um aspecto essencial para proposta de identificação de metabólitos por espectrometria de massas é a qualidade da aquisição dos dados. A otimização dos parâmetros da fonte de ionização deve ser considerada, visto que pode impactar de forma significativa na detecção de algumas substâncias de determinadas classes químicas, acentuando a fragmentação de substâncias na fonte e podendo direcionar a uma falsa interpretação dos dados e identificação incorreta de discriminantes para os estudos metabolômicos. Além disso, outros parâmetros analíticos devem ser otimizados para minimizar problemas relacionados a supressão iônica, como: pH da fase móvel, tipos de aditivos usados na fase móvel, uso de cromatografia antes da infusão das substâncias no espectômetro de massas, efeito diluente entre outros.

Em estudos metabolômicos substâncias com diferentes propriedades físico-químicas podem estar presentes na matriz de estudo. Portanto, este cenário torna um desafio a otimização das condições da fonte de ionização para que todas as substâncias sejam ionizadas e detectadas. As condições determinadas para este estudo visaram a ionização do maior número possível de classes de substâncias químicas, levando em consideração a possibilidade de fragmentação *in-source* de algumas delas, além de boas práticas para identificação das substâncias de interesse.

7.1. Caracterização dos metabólitos nas espécies medicinais de *Mikania*

7.1.1. Materiais e Métodos

7.1.1.1. Material vegetal

Material vegetal usado foi coletado e tratado conforme seção 2.4.1.1.

7.1.1.2. Análises dos metabólitos por LC-MS

A princípio uma amostra da espécie *M. salvifolia* (ID 20) foi preparada conforme seção 3.1.1.1.A e analisada por LC-MS (UPLC Agilent 1290 acoplado ao QToF 6540 Agilent) para otimização das condições de análises de MS, usando o método cromatográfico descrito na Tabela 8 e resultando no método descrito na Tabela 55.

Tabela 55. Condições de MS (*MetMS3*) usadas na caracterização dos metabólitos.

Condições de MS (<i>MetMS3</i>)			
Mode	ESI+ e ESI-	Fragmentor	110 V
Gas Temp.	325°C	Skimmer	65 V
Gas Flow	8 L/min	Octapole RF	750 V
Nebulizer	60 psig	Acquisition mode	Auto MS/MS
Sheat Gas Temp.	350°C	<i>m/z</i> Acquisition Range (Full Scan)	100 - 1500
Sheat Gas Flow	11 L/min	<i>m/z</i> Acquisition Range (MS/MS)	50 - 1500
Vcap	3200 V	CID - Collisional Energy	10, 25 e 45 eV
Nozzle Voltage	700 V		

Em seguida as amostras das três espécies medicinais (*M. glomerata* - ID 65, *M. laevigata* – ID 67 e *M. cordifolia* - ID 72) foram preparadas conforme seção 3.1.1.1.A e analisadas por UHPLC-MS (UHPLC Agilent 1290 acoplado ao QToF 6540 Agilent), usando-se o Método *DES36* (Tabela 8) e *MetMS3* (Tabela 55).

Experimentos de aquisição dependente de dados (*dependent Data Analysis - DDA*) foram realizados, usando o modo de aquisição de dados “*Auto MS/MS*”. Os critérios de seleção de íons para fragmentação foram: três íons mais abundantes e acima de 1000 *counts* em uma janela de tempo de 0,2 minutos. Experimentos de fragmentação dos íons selecionados foram realizados aplicando-se energias de colisão de 10, 25 e 45 eV. O tune do equipamento foi feito antes da sequência de análises. Entre todas as injeções de amostra o equipamento foi calibrado automaticamente usando solução para calibração com substâncias conhecidas com valores de *m/z* entre 118,0862 até 1521,9414.

A proposta de identificação foi feita com base nos dados adquiridos por LC-ESI-QToF e GC-EI-MS (dados adquiridos para os estudos metabolômicos por GC-MS (Tabela 50). As principais classes de metabólitos foram identificadas e apresentadas.

7.1.1.3. Processamento dos dados adquiridos por LC-MS

As análises foram processadas com o software Agilent *MassHunter B.05.00*, usando-se o algoritmo *Find Compounds by Auto MS/MS* para deconvolução dos sinais e extração dos EICs (*Extracted Ion Chromatograms*), espectros de massa *Scan* e *MS/MS*.

7.1.1.4. Interpretação dos dados adquiridos por LC-MS

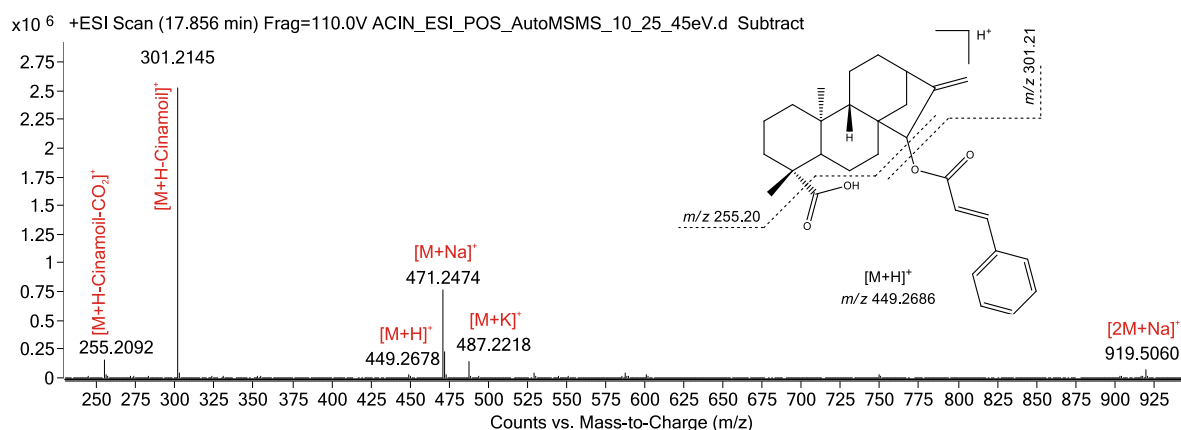
As caracterizações foram embasadas na exatidão de massa das espécies iônicas observadas, abundância dos isótopos, perfil de fragmentação e tempo de

retenção em conjunto com dados da literatura. As massas exatas para as propostas de identidade foram acessadas usando o software Chemdraw Ultra versão 12.0.2.1076 (CambridgeSoft). Um banco de dados (MiKBD) foi construído com as informações que suportam a proposta de identificação.

7.1.2. Resultados

Uma amostra da espécie *M. cordifolia* preparada conforme seção 3.1.1.1.A foi analisada por LC-ESI-QToF para otimização das condições de análises de MS com o objetivo de caracterizar as substâncias presentes em três espécies de *Mikania* e avaliação do comportamento de alguns metabólitos com os parâmetros de análise escolhidos. Foi observado a fragmentação relativamente extensiva na fonte de alguns metabólitos esterificados com diferentes ácidos orgânicos, como no caso de ácidos diterpênicos esterificados com derivados do ácido benzóico e fenilpropanóides (Figura 75).

Figura 75. Espectro de massa *Full Scan* (+ESI) ácido cinamoilgrandiflórico.



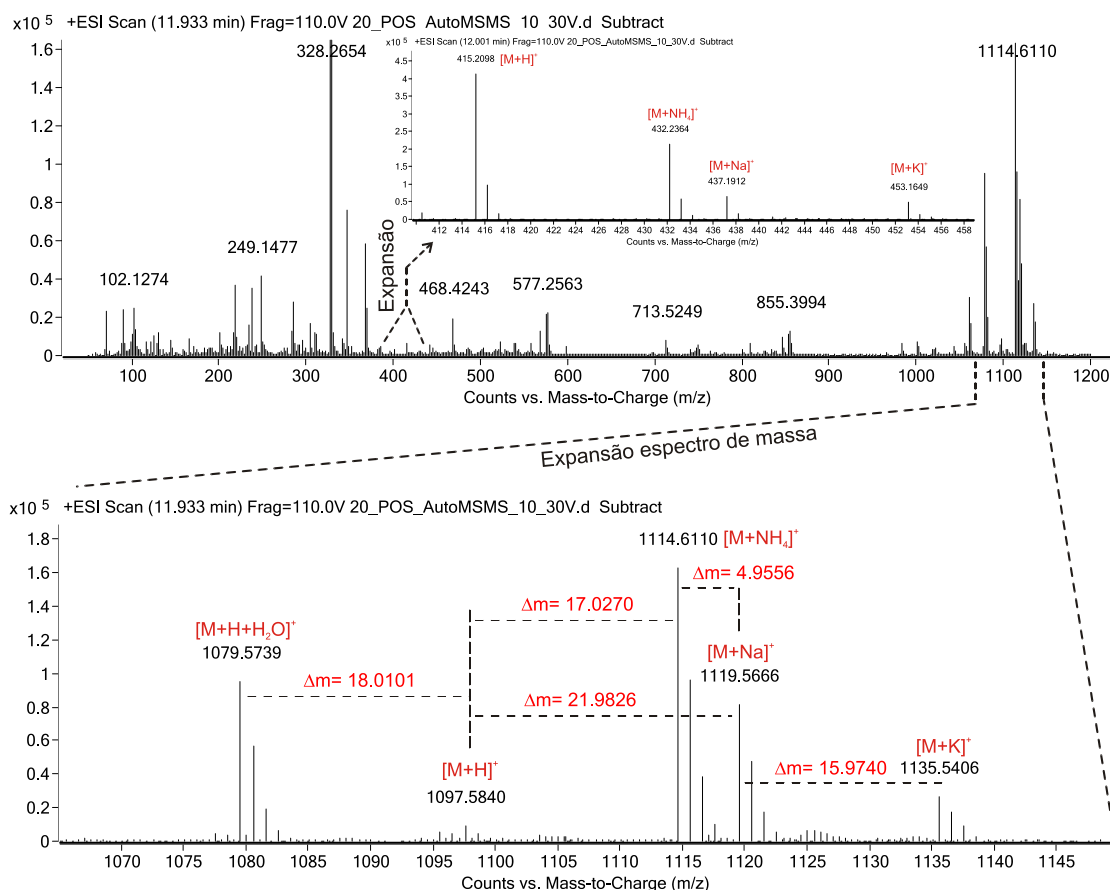
A diferença de potencial aplicada ao capilar é muito dependente das propriedades das substâncias a serem analisadas, e altos valores podem resultar na fragmentação extensiva na fonte (fragmentação *in-source*) de metabólitos esterificados com fenilpropanóides, ácidos graxos ou outros ácidos orgânicos e metabólitos glicosilados. A fragmentação excessiva na fonte pode dificultar a interpretação dos dados e direcionar a uma falsa interpretação dos dados obtidos caso boas práticas para interpretação de dados não sejam levadas em consideração.

A temperatura do gás para desolvatação e da própria fonte também devem ser otimizada evitando que compostos mais termolábeis sofram fragmentação excessiva na fonte de ionização. Por outro lado, diminuído muito a temperatura do gás para

dessolvatação, pode haver redução da sensibilidade para algumas espécies iônicas devido a formação aumentada de clusters iônicos, maior formação de adutos e não dessolvatação adequada dos íons. Outro aspecto importante é a co-injeção de solução referência ao longo da injeção das amostras, especialmente em estudos metabolômicos os quais geralmente apresentam uma série de análises longas, possibilitando a avaliação da acurácia da estimativa da medida de m/z e recalibração pós-análise se necessário (usado ponderadamente), não comprometendo de forma tão drástica a exatidão de massa da medida.

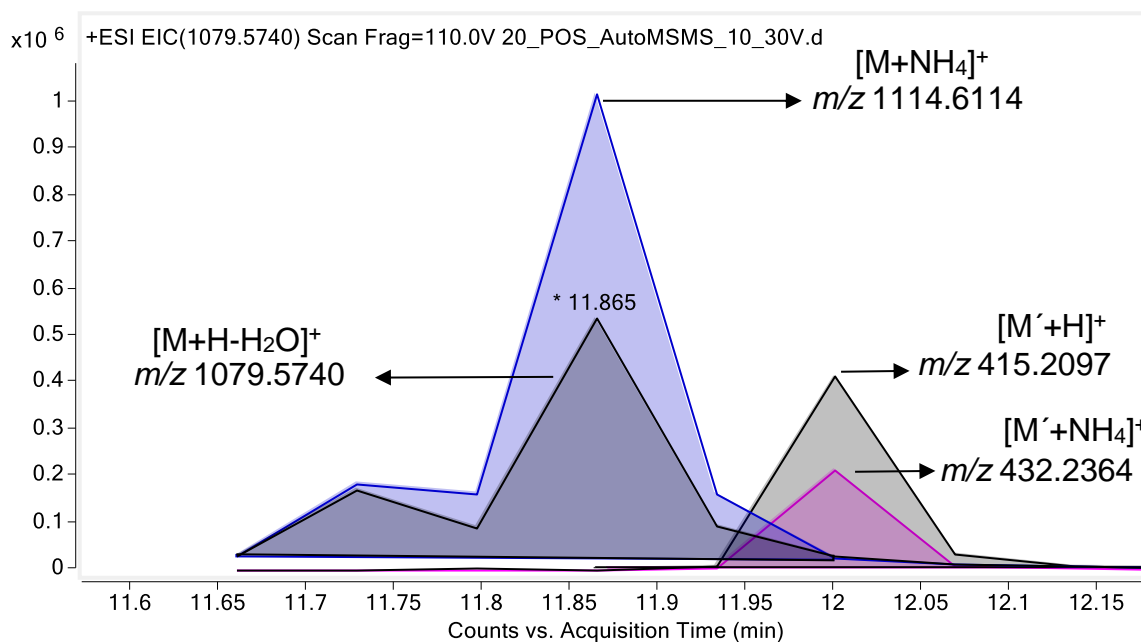
Em estudos metabolômicos é comum a aquisição de espectros de massa muito complexos onde diferentes sinais de diferentes substâncias ionizadas podem estar presentes em um mesmo tempo de retenção (Figura 76), como: molécula protonada $[M+H]^+$ e desprotonada $[M-H]^-$, possíveis íons fragmentos *in-source*, espécies iônicas cationizadas $[M+\text{cátion}]^+$ e anionizadas $[M+\hat{\text{Anion}}]^-$ (adutos), espécies iônicas diméricas de diferentes substâncias, espécies iônicas dimérica $[2M+H]^+$ em coordenação com cátions $[2M+\text{cátion}]^+$ ou ânions $[2M+\hat{\text{Anion}}]^-$, além de sinais relacionado ao *background* de análise entre outras possibilidades (Figura 76).

Figura 76. Espectro de massa amostra 20 (*M.salvifolia*) tempo retenção 11,9 min.



Visto a complexidade dos espectros de massa e a dificuldade de atribuição dos sinais de m/z corretamente, a deconvolução dos diferentes sinais de m/z representa uma ferramenta valiosa em estudos metabolômicos, sendo possível obter de forma rápida cromatogramas de íons extraídos (*Extracted Ion Chromatograms* - EICs), espectros MS Scan e MS/MS (para cada energia de colisão estudada) para cada substância encontrada. Este estudo envolveu a aquisição de espectros de MS e MS/MS usando análise dependente de dados (*dependent-data analysis* DDA) e três valores de energia de colisão. Em paralelo, é de grande importância a avaliação crítica do número de substâncias obtidas pelo algoritmo após deconvolução. Uma estratégia simples usada neste estudo para determinar quais sinais m/z podem estar correlacionados foi a avaliação do EIC referente a cada sinal deconvoluído (Figura 77) assim como diferença de massa entre os sinais de m/z . Sinais de m/z deconvoluídos que apresentam formato dos picos no EIC iguais, geralmente tratam-se de sinais correlacionados os quais variam com o decorrer do tempo da mesma forma. Sendo assim, é possível visualmente evidenciar a presença de diferentes espécies iônicas relacionadas a uma único metabólito sem considerá-los substâncias diferentes facilitando a caracterização dos metabólitos.

Figura 77. EICs dos sinais m/z referente a 2 metabólitos (M e M') presentes na amostra de *M. salvifolia* (amostra 20).



Tentativas de padronização e harmonização das etapas envolvidas em estudos metabolômicos têm sido discutidas com frequência, sendo um importante guia

publicado com discussões da Iniciativa de Padronização em Metabolômica (*Metabolomics Standards Initiative* - MSI).⁶⁸ Para a etapa de identificação de metabólitos, níveis de confiabilidade de identificação foram propostos: Nível 1 - *Identified Compound*: substância identificada com no mínimo duas evidências ortogonais comparadas com padrão de referência ou substância caracterizada analisada nas mesmas condições de análise do estudo proposto; Nível 2 – *Putatively annotated compound*: substância identificada baseada em evidências obtidas por técnicas analíticas e semelhanças comparadas a dados da literatura/banco de dados porém sem a co-avaliação do padrão de referência ou substância caracterizada; Nível 3 – *Putatively characterized compound classes*: evidências que suportam somente a identificação da classe química a que a substância pertence e Nível 4 - *Unknown Compounds*: Substância ou classe não identificada.

As interpretações dos dados neste capítulo foram feitas baseada em evidências como: exatidão de massa (íons desprotonados/protonados, espécies iônicas diméricas/adutos, íons fragmentos), determinação de adutos ou possíveis fragmentações *in-source*, distribuição isotópica (abundância isotópica, exatidão de massa dos íons isotópicos) e estudos de fragmentação (MS/MS). Além das evidências discutidas anteriormente, as propostas de identificação também se apoiaram no tempo de retenção e banco de dados publicados na literatura e/ou referências, além de fundamentos de biosíntese. Vias de fragmentação foram propostas com o intuito de fornecer um suporte adicional às propostas de identificação, além de ter sido reportado o nível de confiança para identificação.⁶⁸

Baseado nas estratégias discutidas nos itens anteriores desse capítulo, algumas substâncias detectadas por UHPLC-MS (QToF) e GC-EI-MS das espécies *M. glomerata*, *M. laevigata* e *M. cordifolia* foram caracterizadas.

Diversas classes de metabólitos foram identificadas como flavonóides, fenilpropanóides, lactonas sesquiterpências, triterpenos, esteróis entre outros. Um banco de dados foi construído com as informações que dão suporte a proposta de identificação dessas substâncias por LC-MS e um breve resumo com as evidências para caracterização desses metabólitos se encontra no Apêndice C.

7.1.2.1. Flavonóides

Diversos flavonóides tiveram sua identidade propostas, dentre eles: 5,3',4',5'-hidroxi-isoflavona 7-O-ramnoglucosil, flavonol polimetoxilado 3-O-sulfona, eupatifolin,

luteolina, apigenina, hispidulin entre outros. Experimentos de fragmentação por MS resultam em espectros muito ricos quanto a informações sobre o perfil de substituição do anel A e C em flavonóides. Eupatifolin foi identificado com suporte do perfil de fragmentação (CID) no modo ESI(+) e ESI(-) o qual evidencia íons fragmentos os quais podem ser usados como diagnósticos característicos de flavonóides com hidroxilas vicinais sendo uma delas metoxilada no anel A assim como ilustrado na proposta de fragmentação (

Figura 79) e evidenciado no espectros de MS/MS (Figura 78). Sem a análise detalhada do perfil de fragmentação desse metabólito a sua identificação poderia ter sido facilmente equivocada mesmo estando dentro dos requerimentos de evidências mínimas publicadas⁶⁸ para nível de confiança 2 (*putatively annotated compound*).

Figura 78. Espectros MS/MS (A) da espécie iônica $[M+H]^+$ com m/z 317,06 e (B) da molécula desprotonada $[M-H]^-$ com m/z 315,05 identificado como eupatifolin.

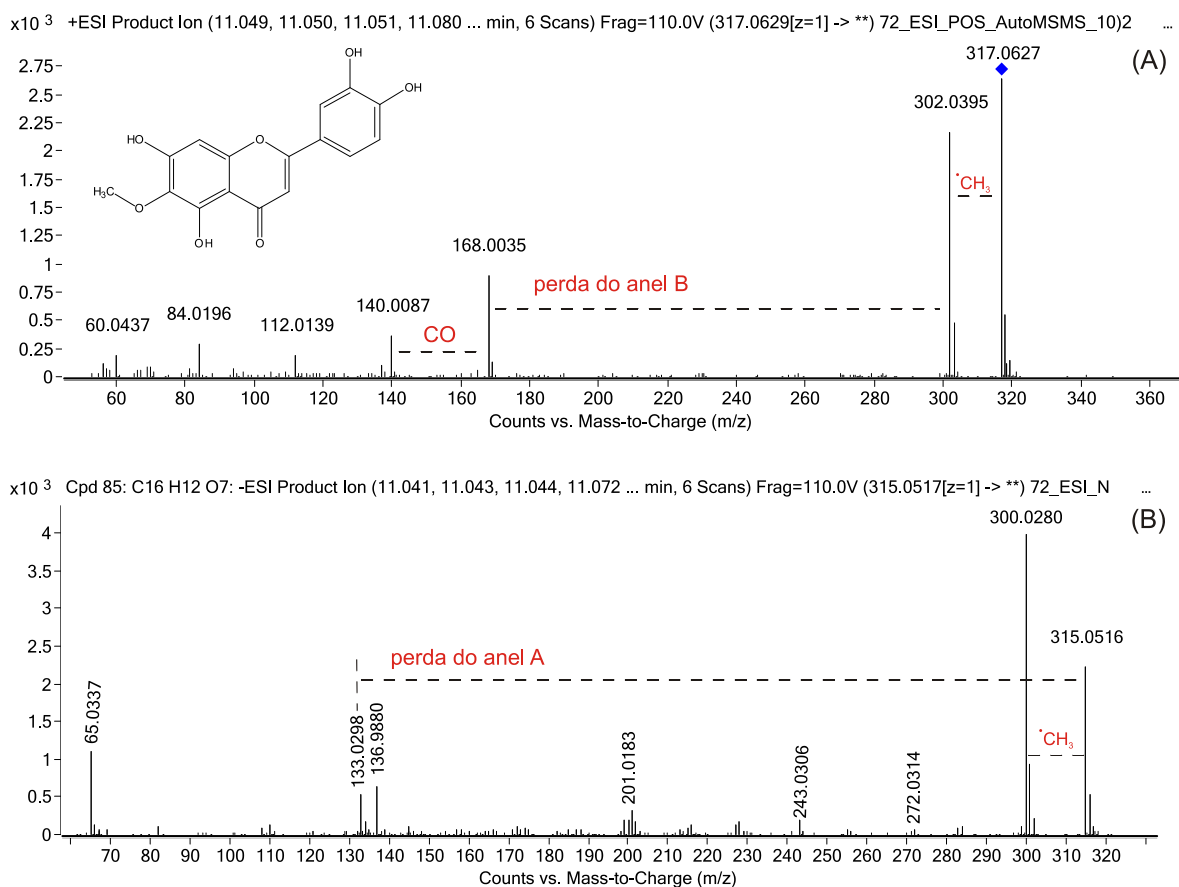
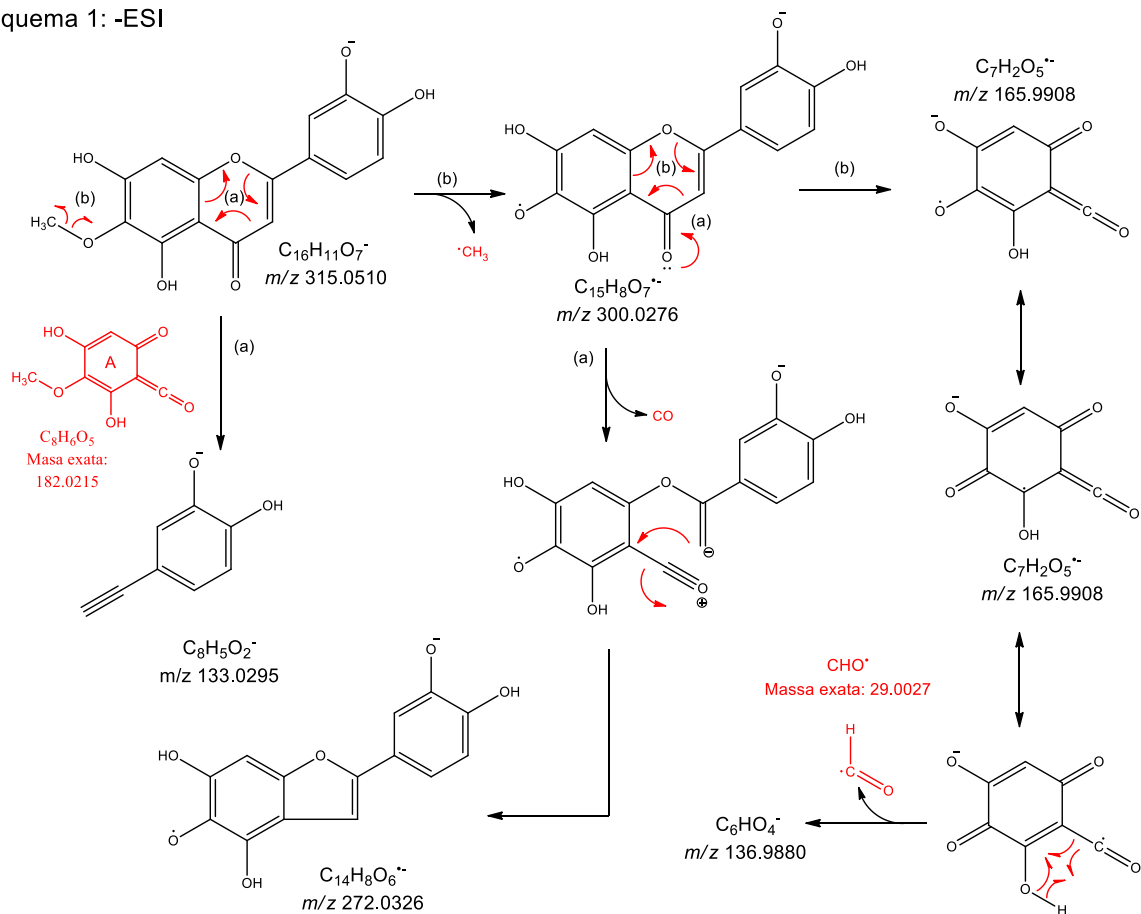
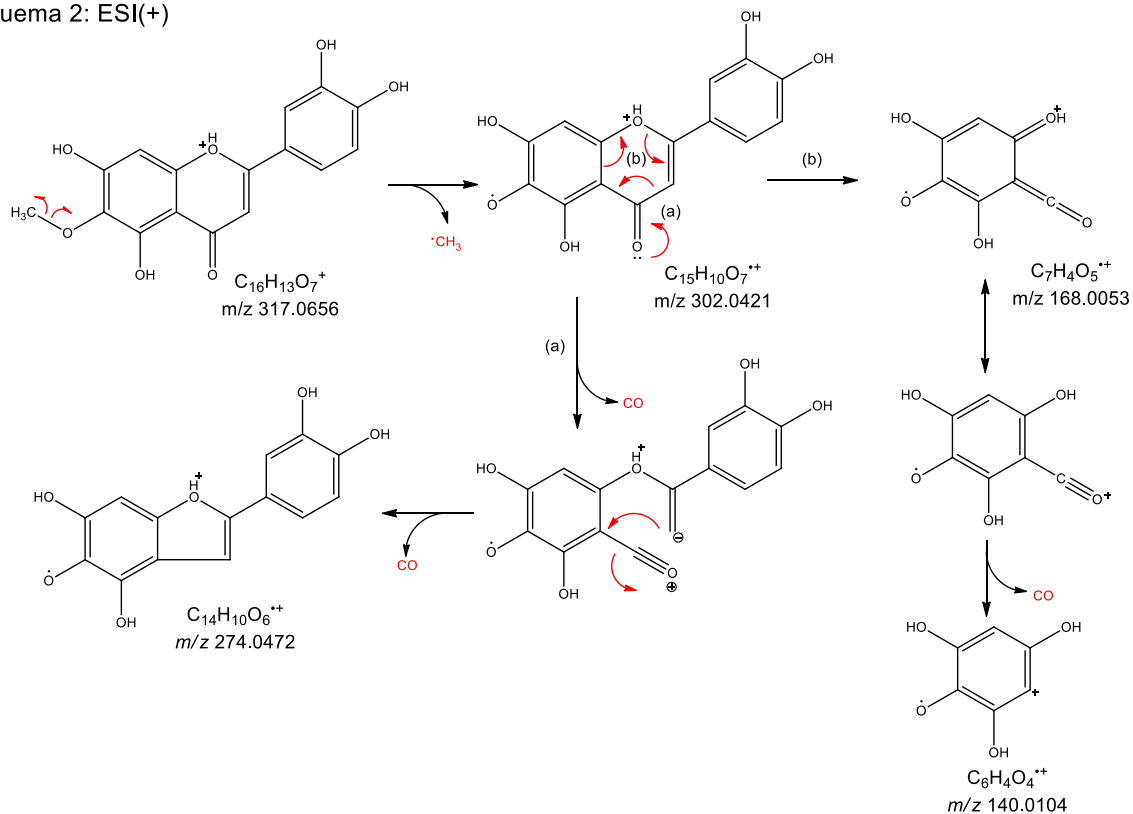


Figura 79. Proposta de via de fragmentação e íons diagnósticos para o suporte da proposta de identificação da flavona eupatifolin.

Esquema 1: -ESI

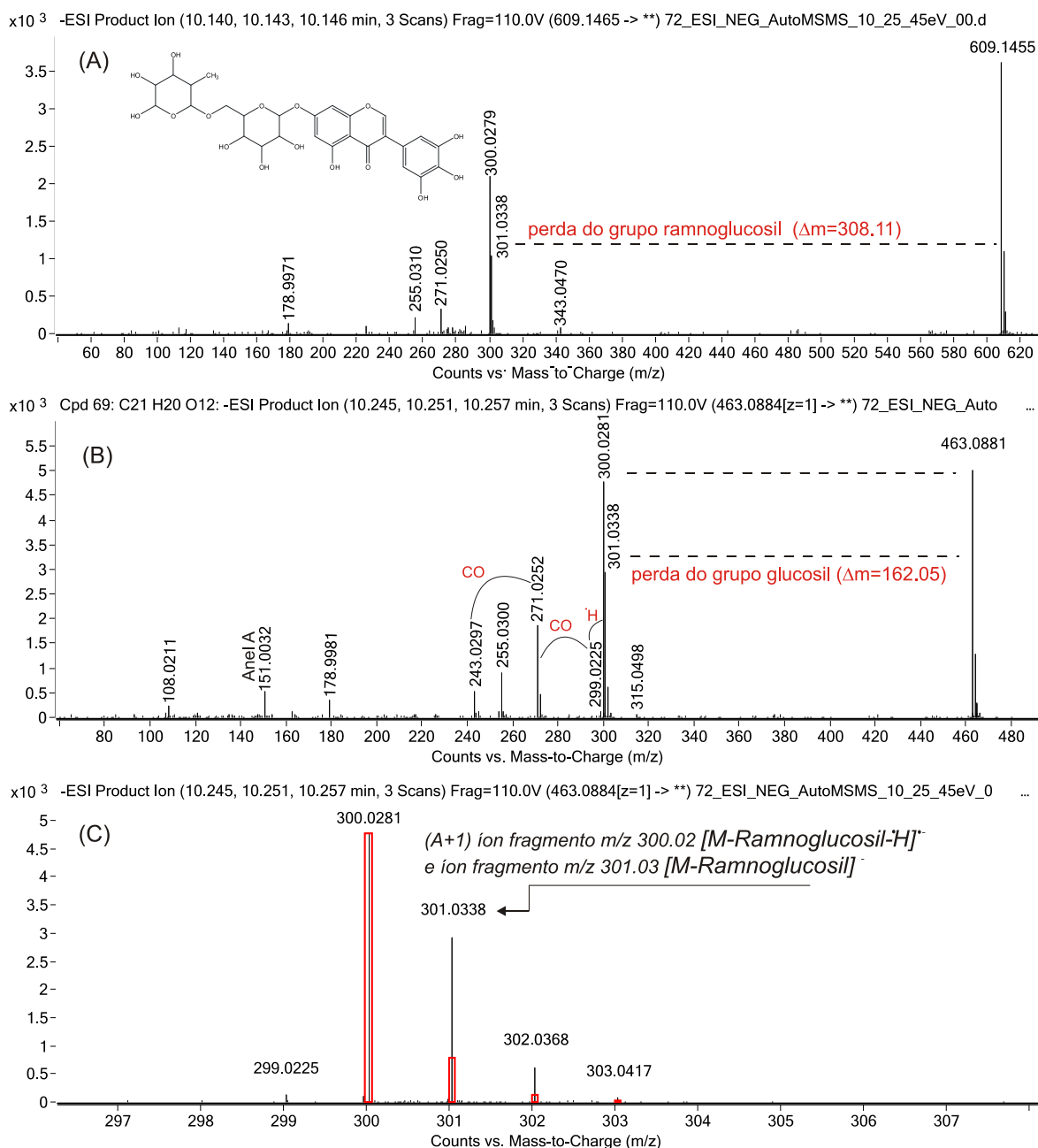


Esquema 2: ESI(+)



Flavonóides glicosilados também foram detectados sendo a proposta de identidade de um deles 5,3',4',5'-hidroxi-isoflavone 7-O-ramnoglicosil (Figura 80).

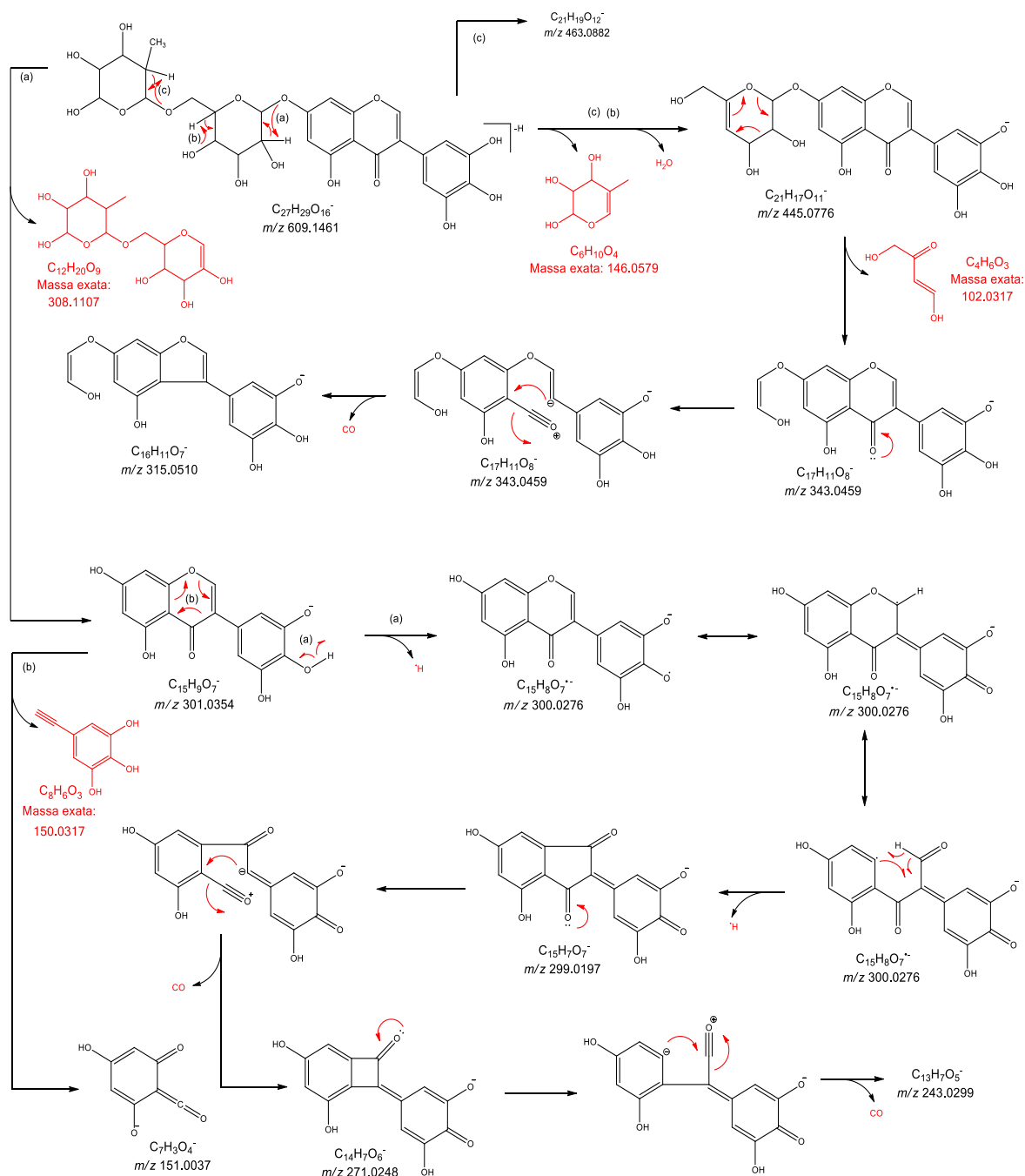
Figura 80. Média dos espectros MS/MS adquiridos com 10, 25 e 45 eV no ESI(-) para (A) $[M-H]^-$ com m/z 609,14, (B) $[M-H-Glucosil]^-$ com m/z 463,08 (*in-source* fragmento) (C) expansão do espectro evidenciando a abundância isotópica do íon fragmento com m/z 300,02 formado a partir do íon precursor m/z 463,08 $[M-H-glucosil]^-$.



Este caso ilustra a importância da avaliação da distribuição isotópica de alguns íons fragmentos, a qual evidenciou a formação do íon fragmento com m/z 300,0281 e também do íon com m/z 301,0338. Conforme ilustrado na figura Figura 80 - C foi

observado uma abundância muito maior do íon isotópico A+1 referente ao íon monoisotópico com m/z 300,02 devido a contribuição de um íon fragmento diferente também com m/z 301,03. O íon com m/z 301,03 [M-H-ramnoglucosil]⁻ foi proposto ser formado a partir da perda neutra do grupo ramnoglucosil (308,11 Da) a partir da molécula protonada com m/z 609,14 seguido da perda de hidrogênio radical formando o íon fragmento com m/z 300,02 [M-H-ramnoglucosil-•H]⁻ (Figura 81).

Figura 81. Proposta de via de fragmentação da molécula protonada com m/z 609,11 (TR: 10,23 min) na amostra *M. cordifolia* (ID 72).

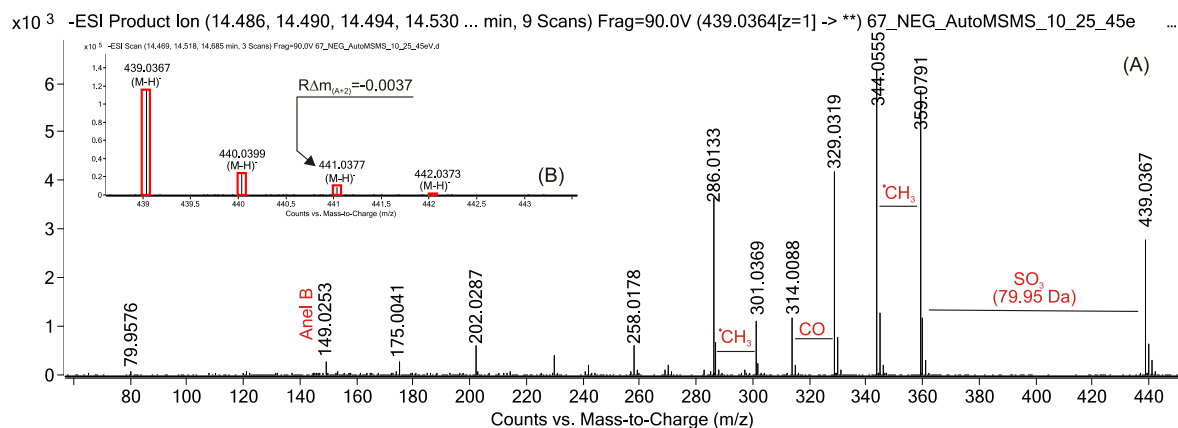


Estudos realizados demonstraram que fragmentações de isoflavonas metoxiladas através da reação retro-Diels-Alder (RDA) não seria a via mais característica como ocorre para os derivados de flavonóides (flavonol, flavona etc).¹⁴² Além disso, discussões já publicadas sobre a observação da formação de íon fragmentos $[M-H\cdot H]^{\cdot-}$ a partir de isoflavonas não metoxiladas como genisteína e daidzeína, corroboram com a proposta de formação do íon m/z 300,02 pela perda do hidrogênio radical devido a presença de uma isoflavona (Figura 81) em experimentos fornecendo energias de colisões mais altas (45 eV).¹⁴² Além disso foi observado perdas sequenciais de CO, as quais originam os íons com m/z 271,0252 e m/z 243,0297. A segunda perda de CO foi proposta ter ocorrido como consequência da formação de um intermediário com quatro membros (m/z 271,02) devido a perda de um segundo hidrogênio radical seguida de perda do CO (Figura 81).

Fragmentações RDA também foram observadas formando íon menos abundantes como o íon diagnóstico do anel A com m/z 151,0032. Reação RDA também foi observada após a perda do grupo ramnosil e água, formando o íon com m/z 343,0470 com baixa abundância, seguida da perda de CO, sendo observado o íon com m/z 315,0498.

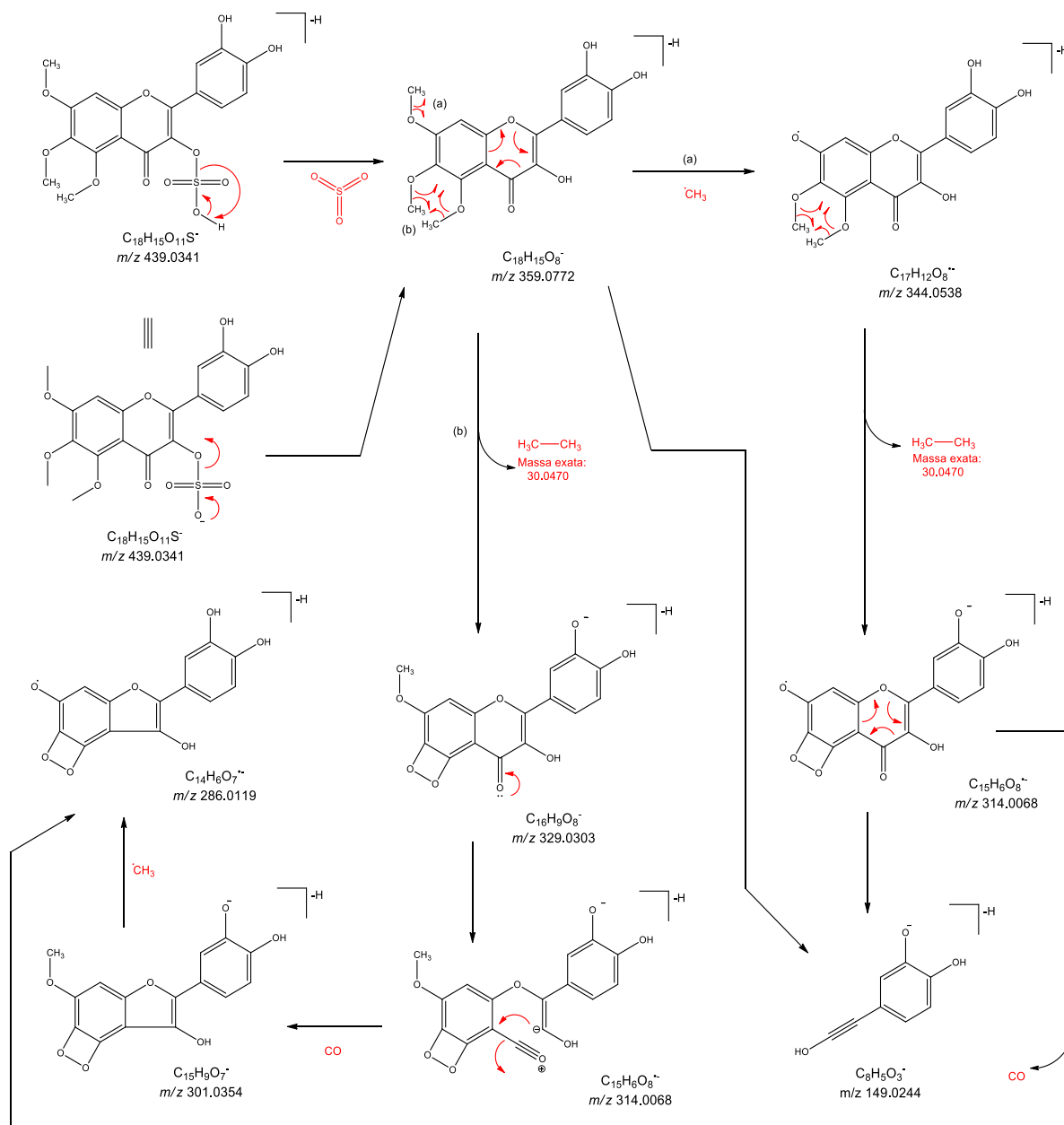
Alguns flavonóis sulfonados também foram detectados em *M. laevigata* e em menor concentração em *M. glomerata*. Flavonóis 3-O-sulfonados já foram reportados em algumas espécies de *Mikania* como mikanin 3-O-sulfona e eupalitin 3-O-sulfona.²⁸ Nas espécies estudadas neste trabalho foi proposta a identidade da 3',4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavonol,3-O-sulfona (TR:14,6 min) (Figura 82).

Figura 82. (A) Espectro MSMS ESI(-) do íon precursor com m/z 439,03 e (B) Espectro de MS ESI(-) expandido evidenciando o cluster isotópico relacionado ao íon $[M-H]^{-}$ de m/z 439,03.



Este caso também mostra a importância do uso da informação sobre o defeito de massa relativo (*relative mass defect* - $R\Delta m$) isotópico e exatidão de massa dos íons isotópicos para se propor candidatos de fórmula molecular para os metabólitos detectados, além da abundância isotópica. Devido a presença do elemento enxofre, foi observado um defeito de massa relativo do cluster isotópico A+2 ($R\Delta m_{(A+2)}$) negativo sendo uma evidência muito importante para filtrar candidatos de fórmula molecular na etapa de proposta de identidade de metabólitos.¹⁴⁸

Figura 83. Proposta de via de fragmentação para o flavonol sulfonado a partir do íon precursor $[M-H]^-$ de m/z 439,03 proposto como 3',4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavonol,3-O-sulfona.

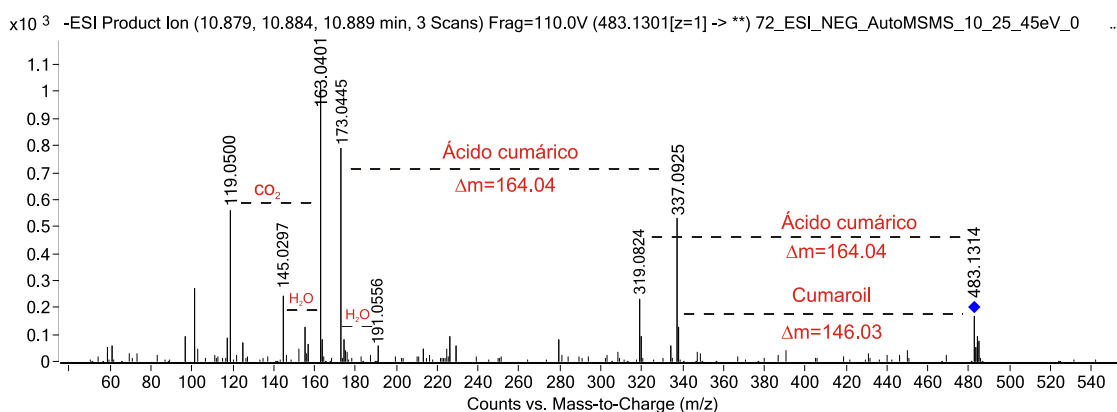


O anel A do flavonol 3-O-sulfonado foi proposto ser polimetoxilado favorecendo a ocorrência de reações de fragmentação radicalar resultando na perda de C₂H₆ como ocorre na formação dos íons [M+H-SO₃-C₂H₆]⁺ de *m/z* 329,0303 e [M+H-SO₃-•CH₃-C₂H₆]^{+•} de *m/z* 314,0068 (Figura 83). As típicas fragmentação envolvendo reações retro-Diels-Alder (RDA) em flavonóides polimetoxilados acabam não sendo a via mais característica o que pode dificultar a detecção de íons diagnósticos do perfil de substituição do anel A e B. No entanto, foi possível detectar com baixa abundância o íon com *m/z* 149,0253 sendo este considerado como íon diagnóstico do anel B evidenciando a localização das três metoxilas no anel A, sendo o anel B dihidroxilado, descartando a possibilidade de se tratar do mikanin 3-O-sulfona ou eupalitin 3-O sulfona, já previamente descritos. Outro derivado de flavonol sulfonado foi detectado (4'-hidroxi-5,6,7-trimetoxiflavonol,3-O-sulfona) (Espectro de MS íon [M-H]⁻ com *m/z* 423,0416 e TR:16,5 min) e também devido a presença do íon diagnóstico do anel B no espectro de MS/MS ESI(+) (*m/z* 135,0441) e ESI(-) (*m/z* 133,0309) pode-se sugerir o padrão de substituição do anel B com uma hidroxila e anel A polimetoxilado.

7.1.2.2. Fenilpropanóides, ácidos fenólicos e cumarina

Alguns fenilpropanóides tiveram suas estruturas propostas como o ácido dicumaroilquínico (Figura 84). A posição da esterificação das cadeias dos fenilpropanóides não foram identificadas devido a ausência de evidências nos espectros de MS. Outros fenilpropanóides e derivados do ácido benzóicos também se destacaram dentre as espécies de *Mikania* estudadas como ácido dicafeoilquínico, ácido cafeoil-feruloilquínico, ácido hidroxicinâmico, ácido o-hidroxicinâmico, ácido protocatecuíco e cumarina.

Figura 84. Espectros MS/MS ESI(-) do íon [M-H]⁻ com *m/z* 483,13 (ácido dicumaroilquínico).



7.1.2.3. Lactonas Sesquiterpênicas

Várias lactonas sesquiterpênicas (LS) foram detectadas em *M. cordifolia* porém não foram detectadas em *M. glomerata* e *M. laevigata*. Dentre elas se destacaram: 3-hidroxi-metacriloil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido, miristoil-hidroxi-metacriloil germacradienolido, palmitoil-hidroxi-metacriloil germacradienolido, linolenil-hidroxi-hidroximetacriloil entre outros.

Figura 85. Lactonas sesquiterpênicas detectadas e propostas de íons fragmentos no modo ESI+: (A) $[M+NH_4]^+$ m/z 606,4321 e (B) $[M+NH_4]^+$ m/z 644,4115.

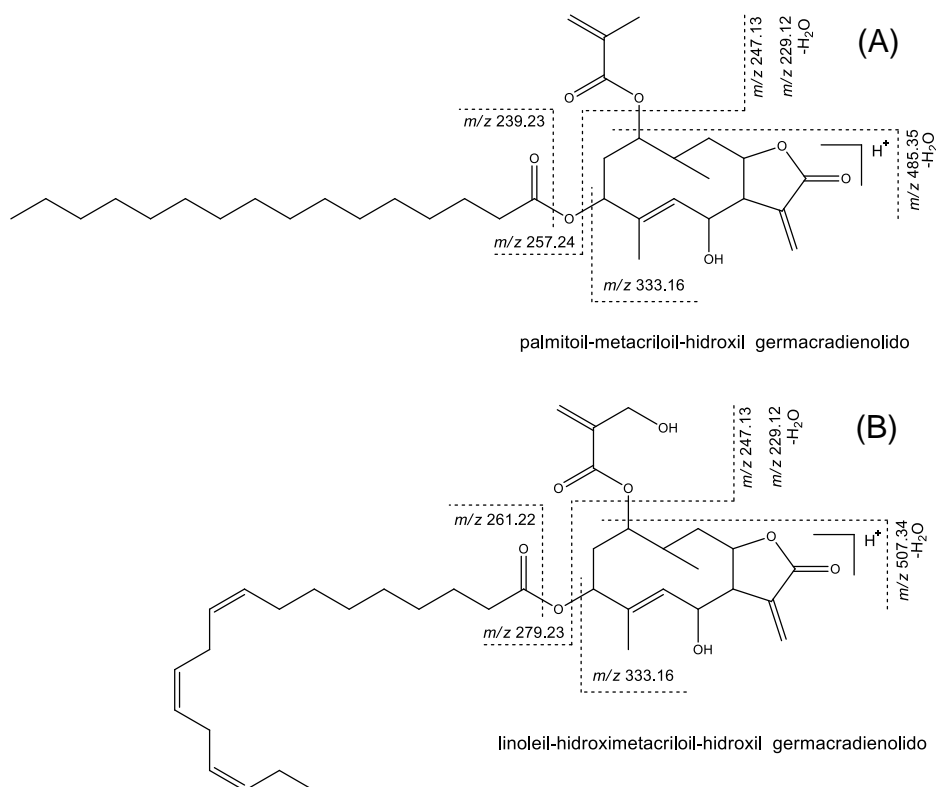
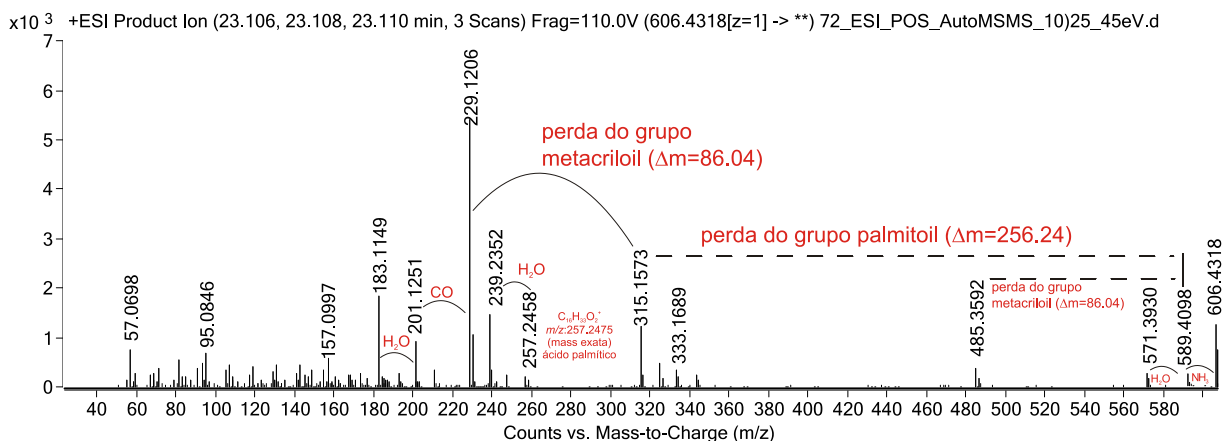


Figura 86. Espectro MS/MS do íon precursor m/z 606,43 (ESI+) referente a lactona sesquiterpênic palmitoil-metacriloil-hidroxiil germacradienolido.



Pela limitação das evidências obtidas nos estudos por MS, não foi possível localizar as posições em que a LS estão esterificadas com os ácidos orgânicos, sem co-injeção de padrões. Além disso há falta de evidências para localização das duplas dos ácidos graxos insaturados observados sendo estes propostos baseado em ácidos graxos naturais mais comuns. Detalhes quanto aos espectros de MS/MS, proposta de via fragmentação para LS e limitações serão discutidos na seção 8.2.

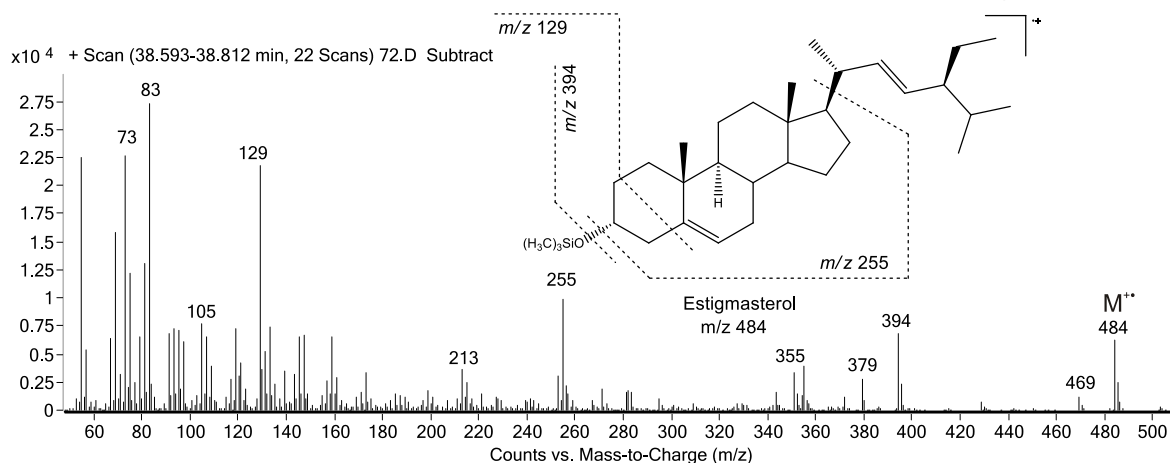
7.1.2.4. Diterpenos

Diversos diterpenos foram detectados especialmente nas espécies *M. glomerata* e *M. laevigata*. Na amostra de *M. cordifolia* baixa concentração de diterpenos foram detectados. Dentre eles se destacaram: ácido ent-15-metacriloil caur-16(17)en-19-óico, ácido entcaur-16(17)en-19-óico (ácido caurenóico), ácido ent-15-benzoil caur-16(17)en-19-óico (ácido benzoilgrandiflórico), ácido ent-15-cinamoil caur-16(17)en-19-óico (ácido cinamoilgrandiflórico) e ácido grandiflórico. Detalhes quanto aos espectros de MS/MS e proposta de via fragmentação serão discutidos na seção 8.2.

7.1.2.5. Esteróides e triterpenos

Alguns esteróides foram detectados nas três espécies de *Mikania* avaliadas com maior concentração na espécie *M. cordifolia*. A proposta de caracterização se deu pela análise dos espectros adquiridos por GC-EI-MS e auxílio da biblioteca NIST, a qual foi usada com cautela. Vários esteróides foram detectados como o estigmasterol TMS no tempo de retenção 38,6 minutos (Figura 87).

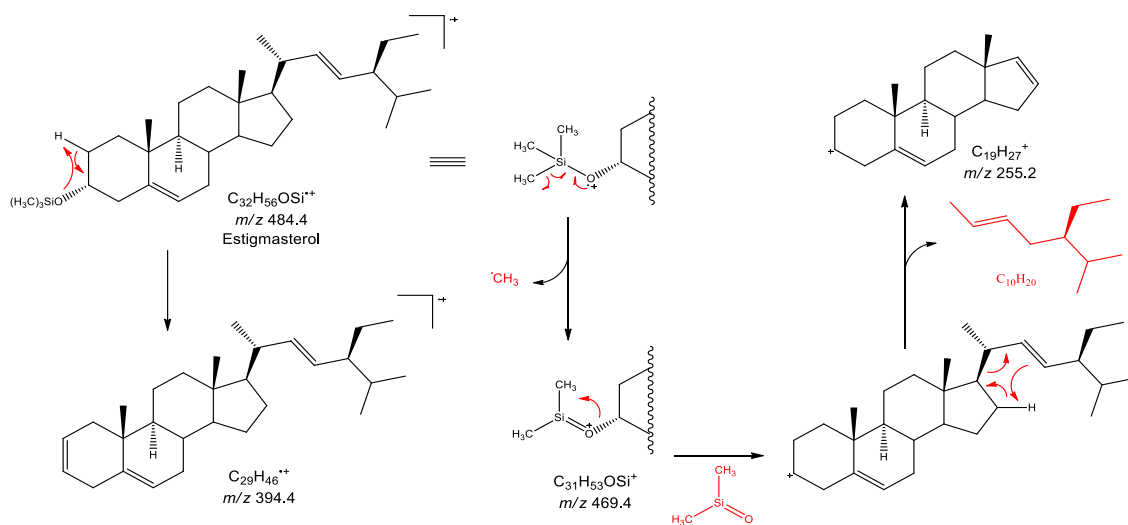
Figura 87. Espectro MS (GC-EI-MS) para o pico com TR:38,6 min. (estigmasterol).



A proposta para a via de fragmentação para alguns íon fragmentos foi reportada (Figura 88) como um suporte para a proposta de identificação.¹⁴³ Padrão de estigmasterol também foi co-injectado.

Sitosterol, campesterol e outros esteróis com C29 e C28 foram detectados.

Figura 88. Proposta de via de fragmentação para o íon molecular m/z 484 referente ao estigmasterol TMS.



Alguns triterpenos também foram detectados como o α -amirin (Figura 90). O íon de maior abundância com m/z 218 evidencia possível presença da dupla entre carbono 12 e 13 em triterpenos¹⁴⁴ (Figura 89). Vários triterpenos acetilados (lupeol acetato, α -amirin acetato, β -amirin acetato) e oxo-amirin foram detectados.

Figura 89. Proposta de via de fragmentação para α -amirin (m/z 498).

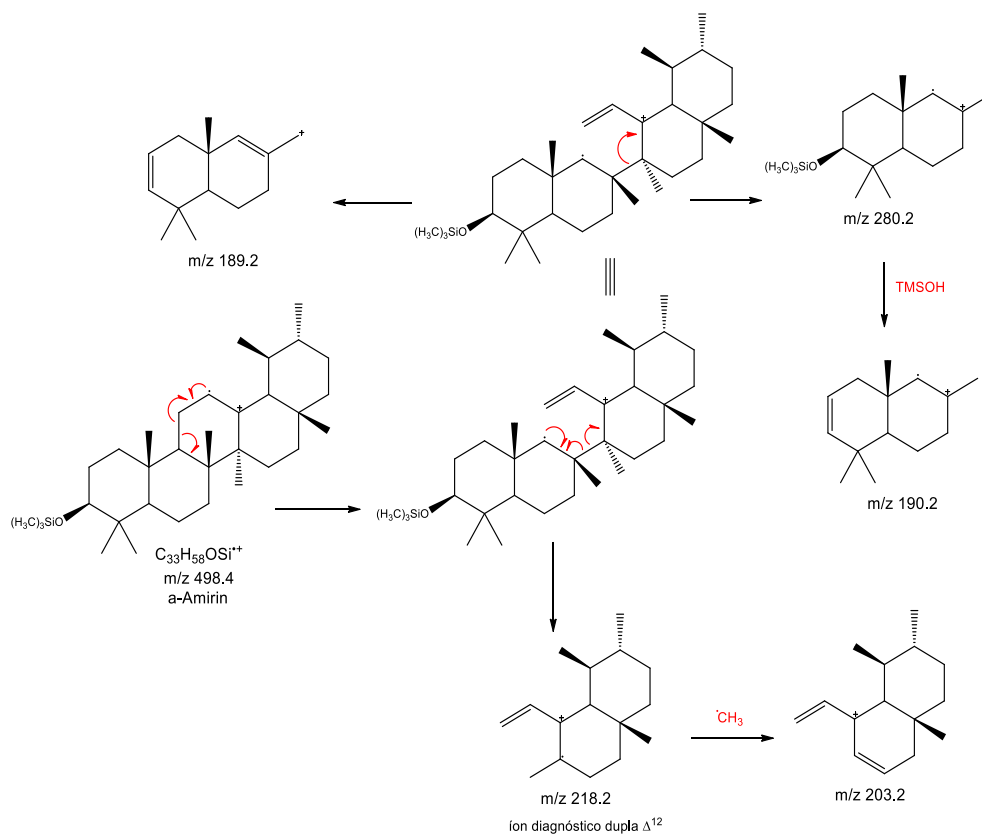
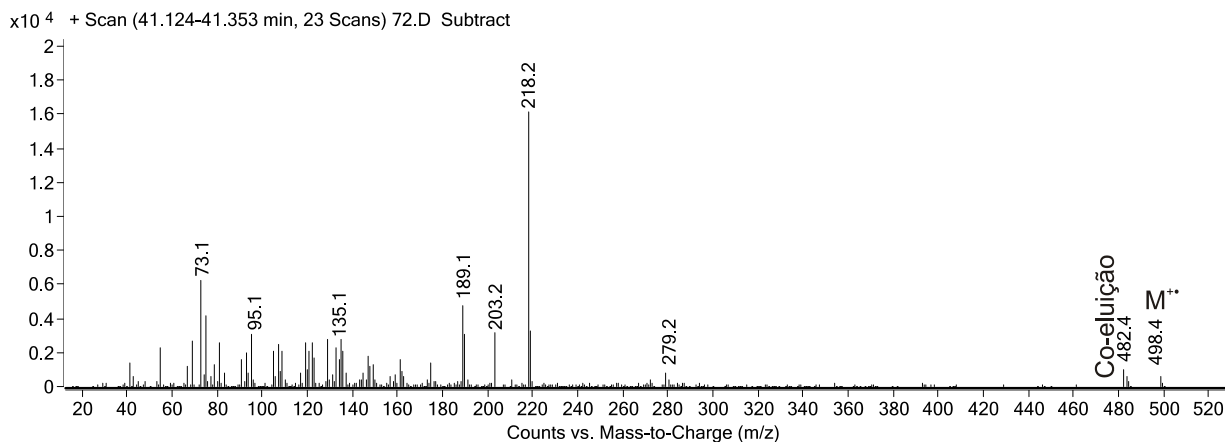


Figura 90. Espectro adquirido por GC-EI-MS extraído do pico com tempo de retenção 41,2 minutos identificado como α -amirin.



7.2. Proposta de identificação das substâncias discriminantes nos estudos metabolômicos por LC-MS, GC-MS e RMN de ¹H

7.2.1. Materiais e Métodos

Os metabólitos considerados significativos nos estudos metabolômicos (P2485, P5130, P1200, P5483, N74, P2417, N100, GC2294, GC64, GC247, GC1048 e GC373) a partir da fusão dos dados de LC-MS, GC-MS e RMN de ¹H foram caracterizados baseado nos espectros de MS e MS/MS adquiridos por LC-ESI-QToF (Tabela 8 e Tabela 55) e espectros de MS adquiridos por GC-EI-MS (Tabela 50), com suporte de dados adquiridos por RMN de ¹H. Padrão de ácido caurenóico (F1.2) e de ácido cinamoilgrandiflórico (F2) (seção 2.1) foram co-injetados por LC-MS e GC-MS para contribuir para a confirmação da proposta de identificação.

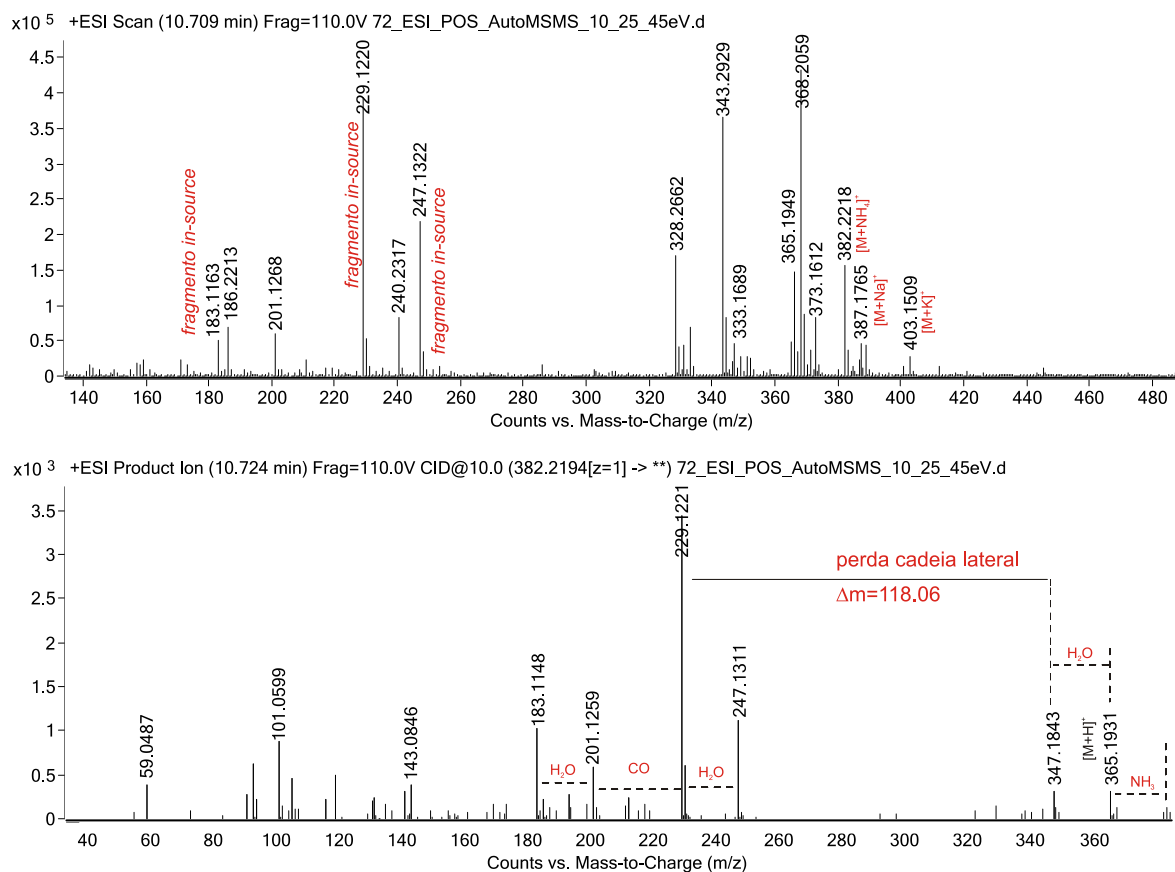
7.2.2. Resultados

Conforme os resultados obtidos após análise estatística multivariada da matriz resultante da fusão dos dados de LC-MS, GC-MS e RMN de ¹H alguns metabólitos (Tabela 54) foram evidenciados no capítulo 6 como possíveis responsáveis pelo agrupamento das amostras de *Mikania* baseado em seus perfis químico. Esta seção se dedica a fornecer as evidências usadas para o suporte da proposta de identificação de cada um dos metabólitos considerados significativos nos estudos metabolômicos. Para cada proposta, o nível de confiança para identificação foi reportado conforme classificação dos níveis de confiabilidade publicados pela Iniciativa de Padronização em Metabolômica (MSI)⁶⁸, conforme descrito no início do capítulo.

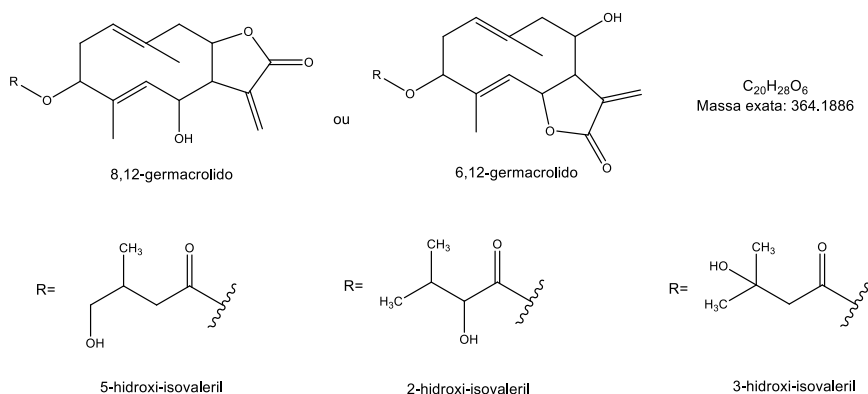
7.2.2.1. Metabólitos discriminantes da classe lactona sesquiterpênica

O metabólito com código P2485 destacou o íon com m/z 183,1160 e tempo de retenção em 10,6 minutos. Esta espécie iônica foi considerada um fragmento formado na fonte de ionização (fragmento *in-source*) tendo como precursor o íon aduto com amônio cujo m/z 382,2218 (Figura 91). Foi observado a formação de diferentes espécies iônicas relacionadas a este metabólito havendo a formação de adutos com diferentes cátions, além de uma extensiva fragmentação na fonte. O metabólito foi proposto ser uma lactona sesquiterpênica (LST) com fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_6$ (exatidão de massa: 1,57 ppm) e identidade proposta sendo hidroxil-isovaleril-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido ou hidroxil-valeril-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido (Figura 92).

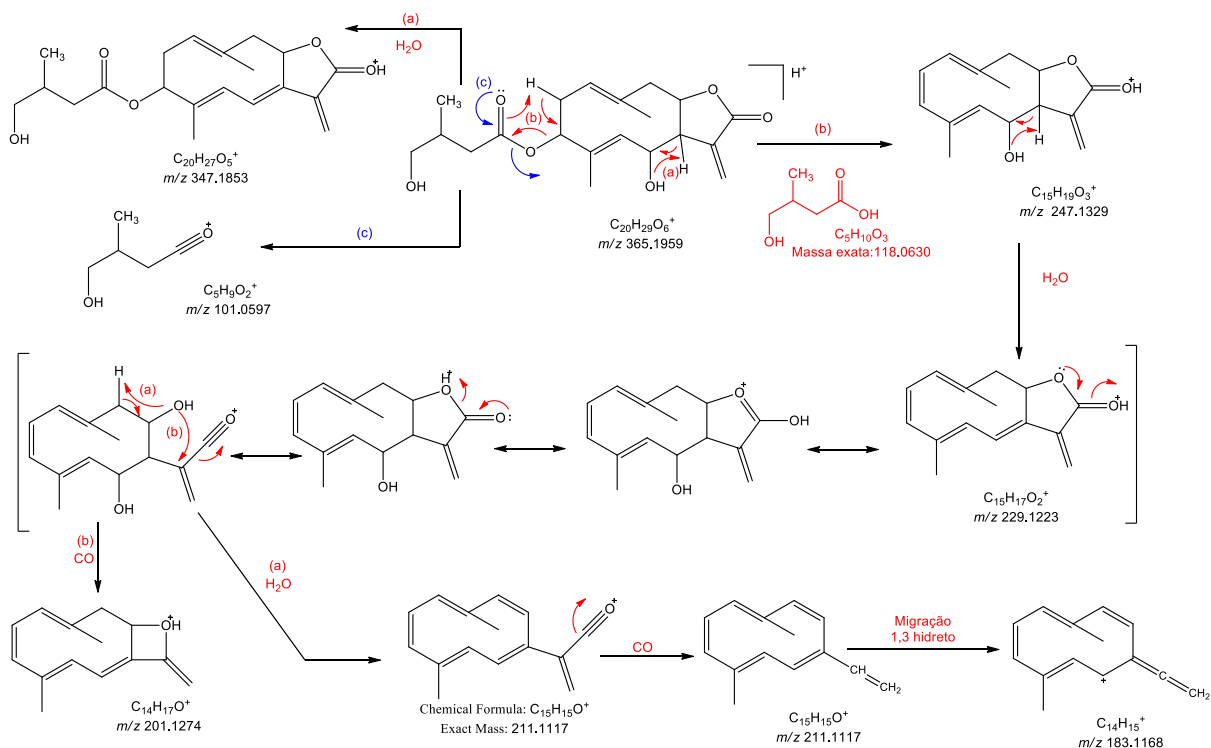
Figura 91. Espectros MS Scan e MS/MS ESI(+) da íon aduto com amônio $[M+NH_4]^+$ m/z 382.21 (TR: 10,7 min) referente a variável P2485.



No espectro de MS/MS para $[M+NH_4]^+$ m/z 382,22 (Figura 91) a perda da cadeia lateral pode ser observada através da perda neutra de 118,06 Da e da formação do íon acílio ($RC\equiv O^+$) diagnóstico para a confirmação do tipo de grupo o qual funcionaliza o germacrolido.

Figura 92. Propostas de identidade para o metabólito P2485.

No entanto, somente baseado nos estudos de fragmentação por MS não existem evidências suficientes que suportam a identificação correta da identidade da cadeia lateral, sendo propostas: 5-hidroxi-isovaleril, 3-hidroxi-isovaleril ou 2-hidroxi-isovaleril.

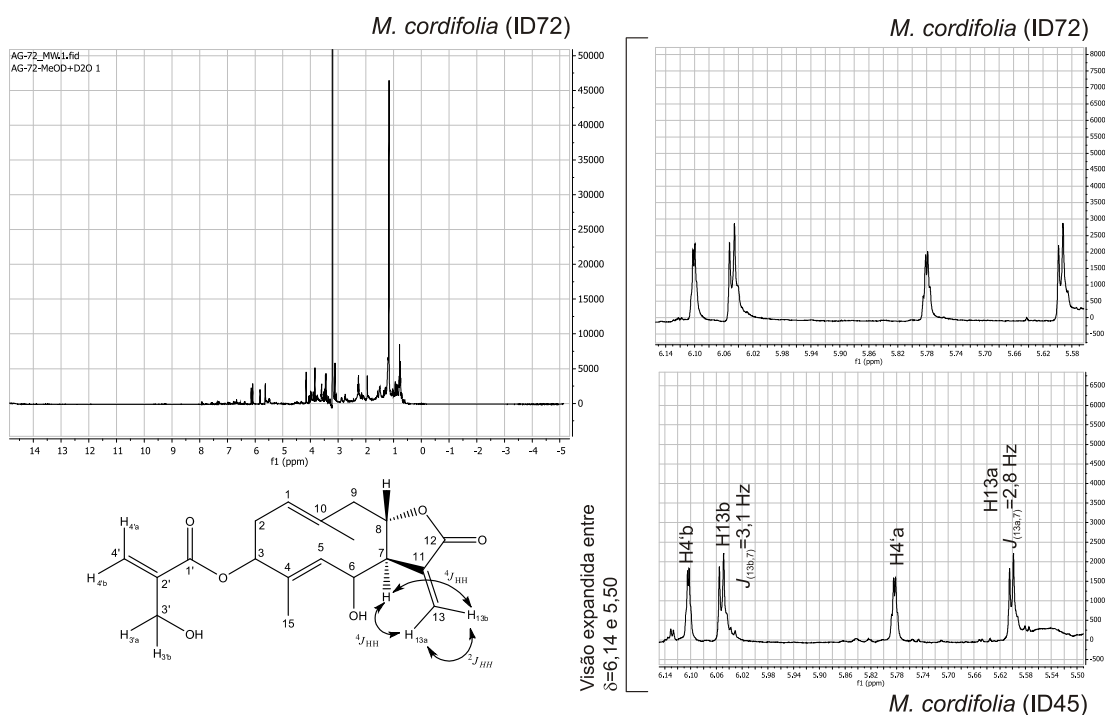
Figura 93. Proposta de via de fragmentação para molécula protonada $[M+H]^+$ referente a lactona sesquiterpênica P2485.

O principal íon fragmento $[M+H-H_2O-C_5H_{10}O_3]^+$ com m/z 229,12 foi sugerido ser formado a partir da perda da cadeia lateral através de rearranjo do tipo McLafferty seguido de eliminação de H_2O da espécie iônica protonada $[M+H]^+$ m/z 365,19, conforme ilustrado na proposta de via de fragmentação na Figura 93. Consecutivas

perdas neutras de 18,01 e 27,99 Da, referentes a eliminação de H₂O e CO¹⁴⁵ respectivamente, resultaram no aparecimento dos íons fragmentos com *m/z* 201,1239 e 183,1148, sendo estes também formados em menor extensão *in-source*.

A informação fornecida pelo espectro de MS/MS não suporta a identificação do tipo de esqueleto da lactona sesquiterpênica nem se a posição do anel lactônico estaria entre o C7-C8 ou C6-C7. LST do tipo germacrolido com anel lactônico α,β -insaturado na posição 7 e 8 ou 6 e 7 e dupla exocíclica (entre C11 e C13) já foram identificadas nas espécies de *Mikania*,^{89,90,91} porém uma recorrência de identificação de LST 6,12-germacrolido na tribo Eupatoriae é observada.¹⁵⁰ Além disso, a proposta da presença de LST com dupla exocíclica no anel lactônico é suportada por duas variáveis adquiridas por RMN de ¹H, as quais também foram evidenciadas como discriminante, com deslocamentos químicos $\delta=6,04$ (variável RMN163) ppm e $\delta=6,21$ (variável RMN 162) ppm. Estes deslocamentos foram relacionados como característico do H13b, devido a possível presença de lactonas sesquiterpênicas com anel lactônico insaturado e dupla exocíclica.^{94,95,97} Avaliando os espectros de RMN de ¹H de duas amostras da espécie *M. cordifolia* (ID 72 e 45) (Figura 94), foi observada a presença de dois dupletos com $\delta=6,04$ e com $\delta=5,60$ os quais foram relacionados ao acoplamento alílico entre os hidrogênios em C13 exometilênicos com H7 ($^4J_{13b,7}=3,1\text{Hz}$ e $^4J_{13a,7}=2,8\text{Hz}$) em C6 ou C8 γ -lactonas.¹⁵¹

Figura 94. Espectros de RMN de ¹H de espécie *M. cordifolia* (ID 72 e 45).

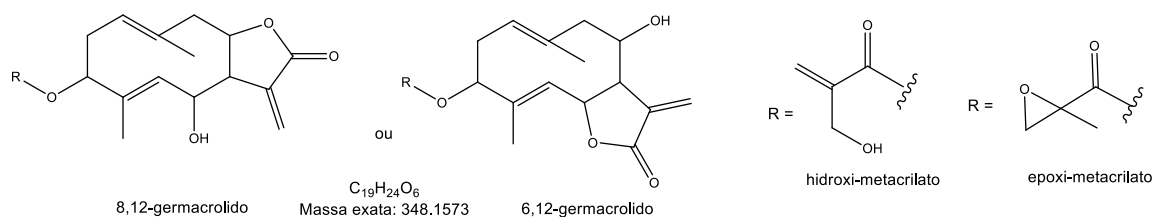


Para 6,12-germacrolidos com C8 α -OH o acoplamento geminal entre os dois hidrogênios metilênicos resulta em um quarteto¹⁵¹, o que não foi observado. Portanto essa observação poderia ser uma evidência de que C8-OH em C6 γ -lactonas (ou C6-OH em C8 γ -lactonas) esteja esterificado com o ácido orgânico proposto baseado no perfil de fragmentação obtido por MS.

Uma terceira variável com $\delta=4,44$ ppm (variável RMN202) foi relacionada com deslocamento característico para hidrogênio localizado no carbono adjacente ao oxigênio do anel lactônico^{94,95,97}. Lactonas sesquiterpênicas com H-7 com configuração trans são encontradas com mais frequência⁹⁸ em plantas, podendo o anel lactônico apresentar fusão-trans ou cis. No entanto, esses detalhes não puderam ser propostos devido a falta de evidências.

O metabólito com código P5130 destacou o íon fragmento *in-source* com m/z 229,1222 e tempo de retenção em 10,5 minutos como um dos metabólitos discriminantes nos estudos metabolômicos. Esta espécie iônica também foi relacionada a uma LST com fórmula molecular $C_{19}H_{24}O_6$ sendo os candidatos para identidade: 3-hidroxi-metacriloil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolideo, 3-epoxi-metacriloil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolideo, 3-hidroxi-metacriloil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-6,7-germacrolideo, 3-epoxi-metacriloil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-6,7-germacrolideo (Figura 95).

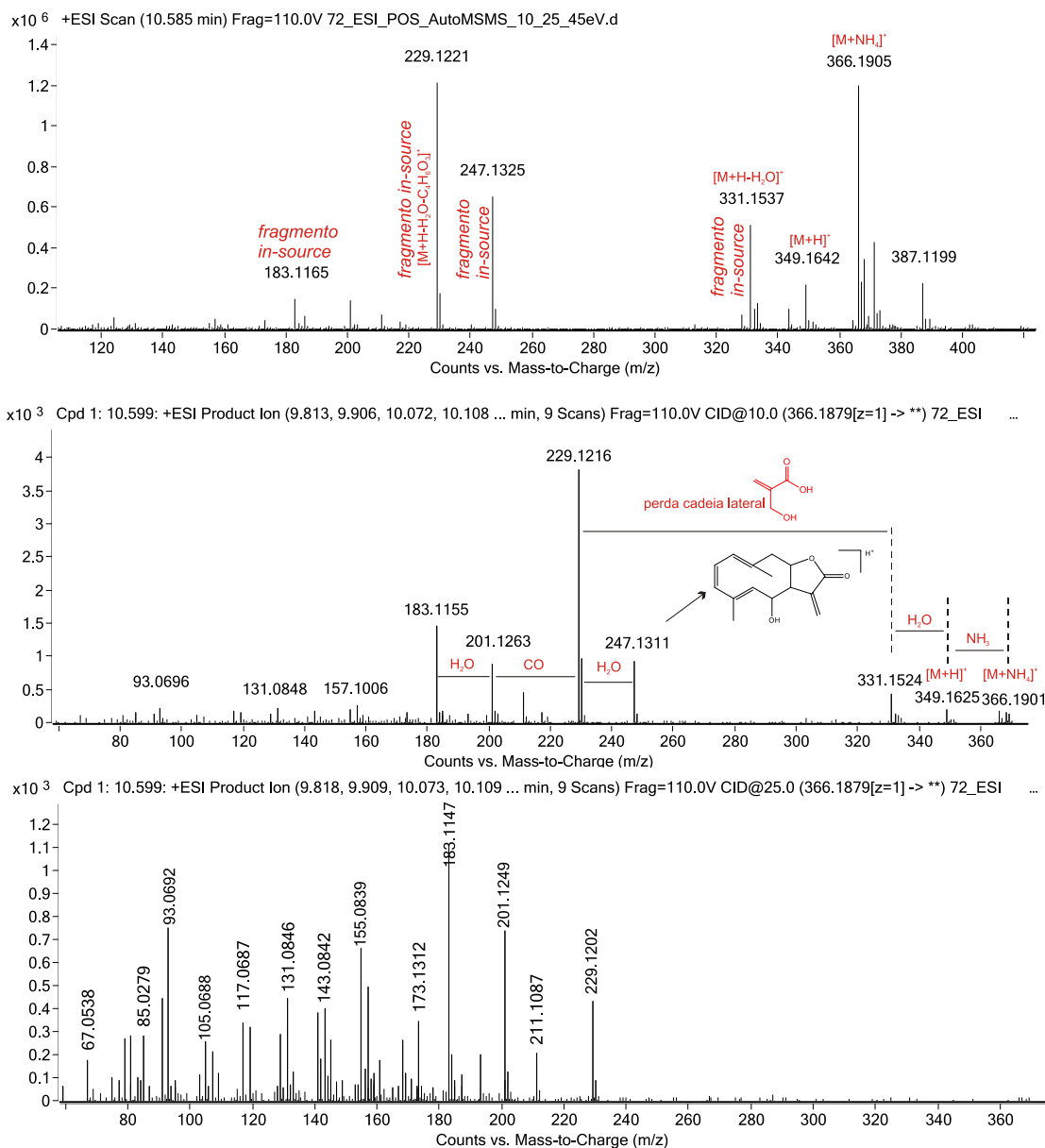
Figura 95. Propostas de identidade para o metabólito 5130.



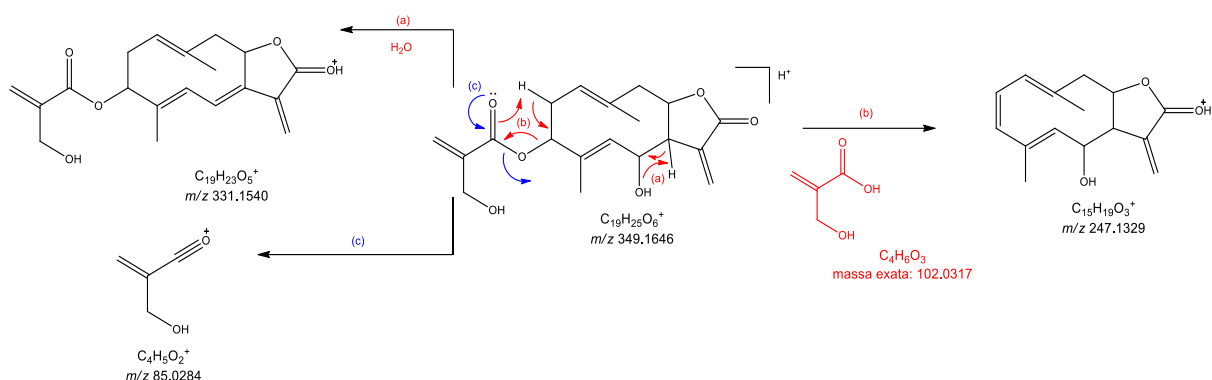
No espectro de MS/MS da espécie $[M+NH_4]^+$ m/z 366,18 (exatidão de massa: 1,64 ppm) (Figura 96), foi observado a perda do grupo hidroxi-metacriloil (ou epoxi-metacriloil) através da perda neutra de 102,03 Da, adicionalmente a detecção do íon acílio ($RC\equiv O^+$) com m/z 85,0279, sendo este íon diagnóstico para a cadeia lateral, conforme ilustrado na proposta de via de fragmentação na Figura 96. Foi observado a ocorrência de rearranjo de hidrogênio envolvendo a desidratação da lactona a partir da espécie iônica protonada (Figura 96 - Via a) formando o íon fragmento com m/z

331,1124 e reação retro-heteroene⁹⁹ resultando na perda da cadeia lateral formando o íon fragmento com m/z 247,1311.

Figura 96. Espectros MS Scan e MS/MS ESI(+) da espécie iônica aduto com amônio $[M+NH_4]^+$ m/z 366,18 (TR: 10,5 min) referente a variável P5130.

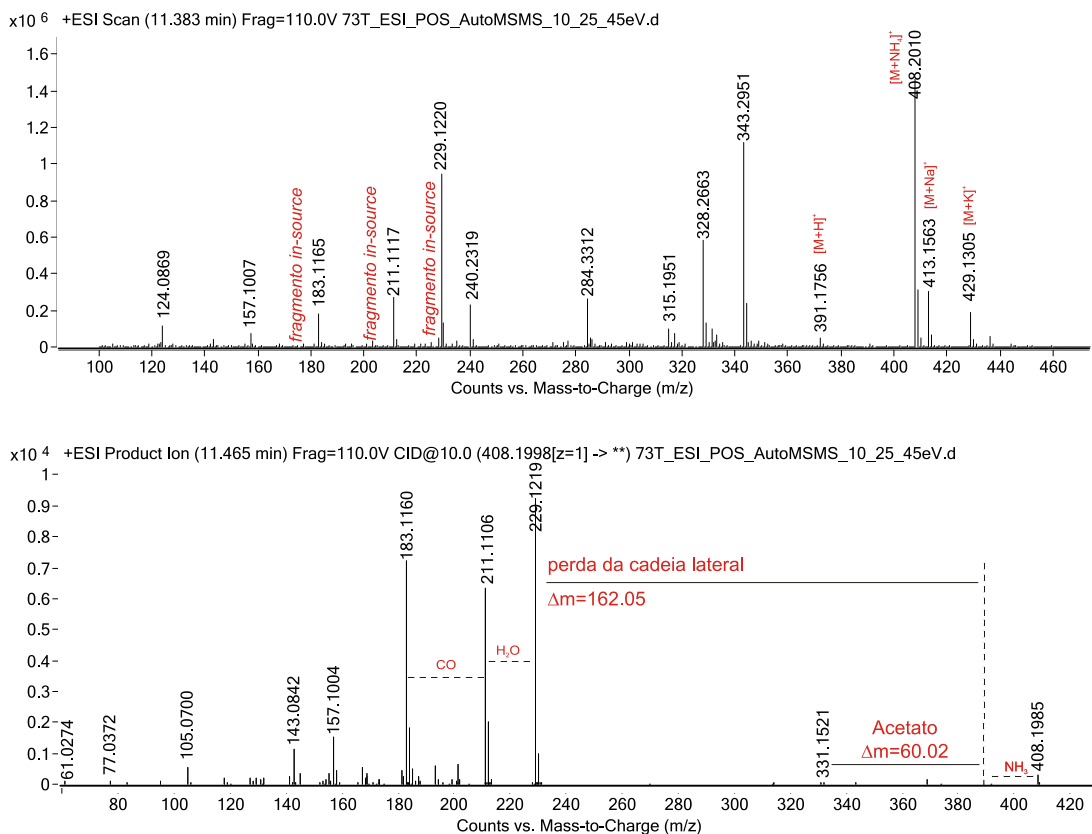


O íon fragmento principal $[M+H-H_2O-C_4H_6O_3]^+$ com m/z 229,12 e consecutivas perdas neutras de 18,01 e 27,99 Da referentes a eliminação de H₂O e CO,¹⁴⁵ resultaram na formação dos íons fragmentos com m/z 201,1239 e 183,1148 nos experimentos de fragmentação, conforme ilustrado na proposta de via de fragmentação da variável P2485 na Figura 93.

Figura 97. Proposta de via de fragmentação para a lactona sesquiterpênica P5130.

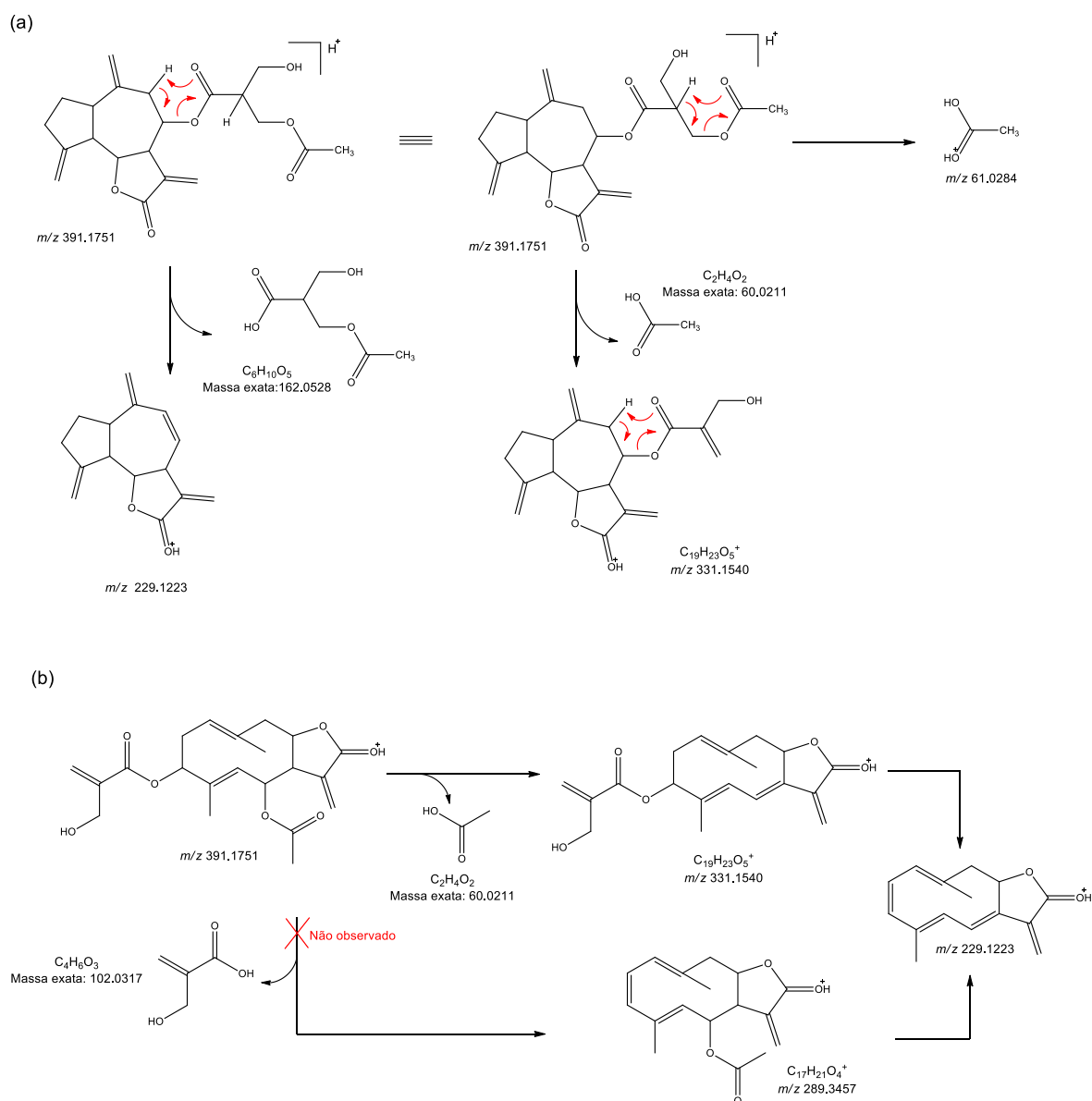
Para as variáveis P2485 e P5130, a proposta de identificação foi considerada com nível de confiabilidade de 2 (*putatively annotated compound*), reunindo evidências analíticas de técnicas ortogonais (MS e RMN de 1H) sendo fornecido os espectros usados e evidências para a proposta da identidade das LST.

O metabólito P1200 destacou o íon fragmento *in-source* com m/z 183,17 e tempo de retenção em 11,4 minutos como um dos discriminantes nos estudos metabolômicos (Figura 98). Esta espécie iônica foi proposta ser um fragmento formado na fonte a partir do íon precursor $[M+NH_4]^+$ com m/z 408,2010 (1,71 ppm).

Figura 98. Espectros MS Scan e MS/MS ESI(+) do íon aduto com amônio $[M+NH_4]^+$ m/z 408,20 (TR: 11,4 min) referente a variável P1200.

A espécie iônica $[M+NH_4]^+$ com m/z foi proposta ser uma LST com fórmula molecular $C_{21}H_{26}O_7$. No espectro de MS/MS do íon $[M+NH_4]^+$ m/z 408,20 (Figura 98), foi observado a perda de cadeia lateral através da perda neutra de 162,05 Da a partir da molécula protonada (m/z 391,17), formando o íon fragmento mais abundante com m/z 229,1211.

Figura 99. Propostas de vias fragmentação e candidatos para a lactona sesquiterpênica P1200 sendo (a) guaianolido funcionalizado com um ácido orgânico e (b) germacrolido funcionalizado com acetato e derivado de ácido metacrílico.

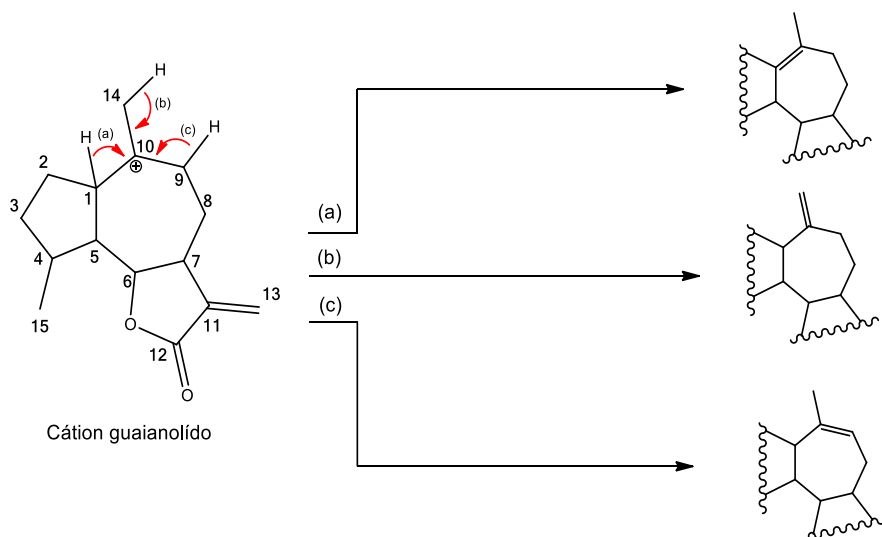


Há evidências também para a presença de um grupo acetato na cadeia lateral ou substituído em outra posição no esqueleto da LS como o íon fragmento com m/z 331,1494 com diferença de massa de 60.02 Da relativo a LS protonada além do íon

fragmento $\text{CH}_3\text{COO}_2\text{H}^+$ (m/z 61,0274) sendo este considerado íon diagnóstico para a confirmação da presença de um grupo acetato. Conforme ilustrado na proposta de via de fragmentação para essa LST (Figura 98), a perda da cadeia lateral e grupo acetato ocorreria através de um rearranjo tipo McLafferty. A princípio as evidências sugerem a presença de uma LS tipo guaianolido ou eudesmanolido funcionalizada no carbono 3 ou 8 com grupo 3-hidroxi-4-acetato-isobutiril (Figura 98 - esquema a) ou uma LST tipo germacrolido funcionalizada com grupo acetato e com um derivado do ácido metacrílico (4-hidroxi-metacriloil ou epoxi-metacriloil) (Figura 98 - esquema b). Observando o esquema b na Figura 98 e espectro de MS/MS, nota-se a ausência do íon fragmento m/z 289,14, o qual esperaria ser observado no espectro caso a LST fosse a ilustrada no esquema b da Figura 98. Além disso, foi observado uma baixa abundância do íon m/z 331,15 o que não seria esperado caso houvesse a esterificação com ácidos orgânicos em dois pontos do esqueleto da LST. Portanto essa observação sugere a saída de uma única cadeia lateral, dando evidências para excluir LST do tipo germacrolido da lista de candidatos. Portanto, propõe-se LST do tipo guaianolido ou eudesmanolido esterificado com 3-hidroxi-4-acetato-isobutiril.

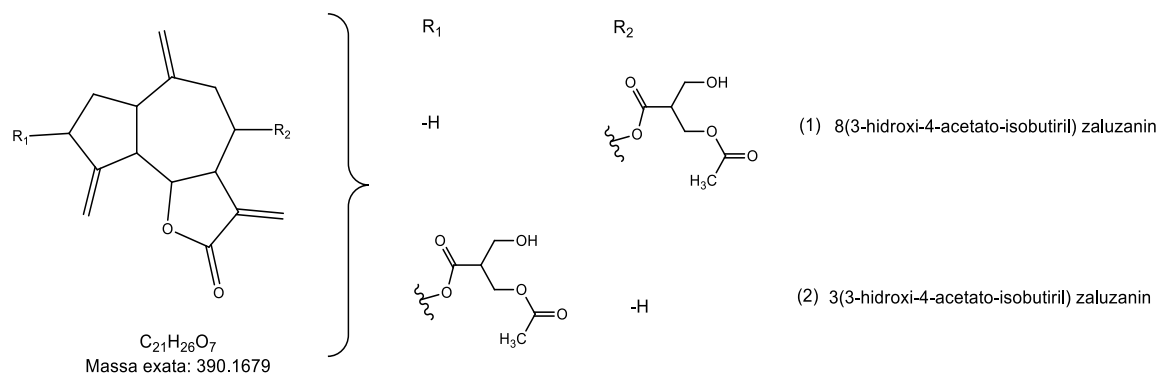
Consecutivas perdas neutras de 18,01 e 27,99 Da, referentes a eliminação de H_2O e CO^{145} também foram observadas sugerindo a presença de um anel lactônico como observado para os metabólitos P2485 e P5130. Essa proposta também apresenta limitações para a localização da dupla no esqueleto germacrolido, podendo esta estar localizada no anel de 7-membros entre os carbonos 1(10), 14(10) e 10(9) (Figura 100).¹³⁸

Figura 100. Esquema com possibilidade da formação da dupla a partir do cátion guaianolido.



Várias LST já foram identificadas em espécies de *Mikania* sendo estas basicamente do tipo germacrolídeo, guaianolido e eudesmanolido.²⁸

Figura 101. Propostas 1 e 2 de identidade para o metabólito P1200.



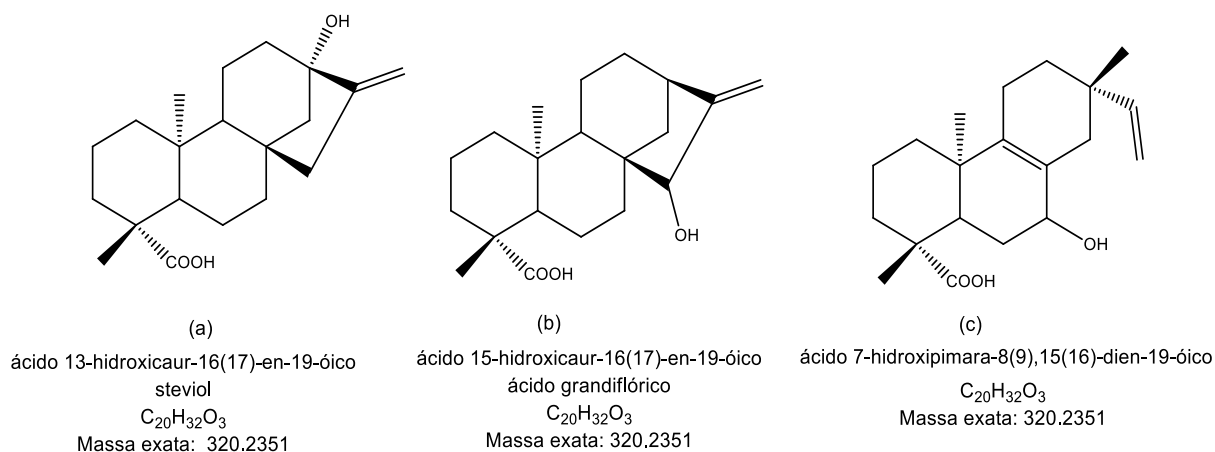
Esta proposta de identificação foi considerada apresentar nível de confiabilidade 3 devido a limitação para se afirmar o tipo de esqueleto da LS. Ressalta-se a importância de estudos com padrão autêntico para validar as evidências e hipóteses aqui levantadas.

7.2.2.2. Metabólitos discriminantes da classe diterpenos

Outros quatro metabólitos foram considerados discriminantes nos estudos metabolômicos (P5483, P2417, N74, GC2294 e N100), os quais foram caracterizados como ácidos diterpênicos.

O metabólito com código P2417 destacou o íon fragmento *in-source* com m/z 301,21 e tempo de retenção 12,6 min. Este metabólito foi proposto ser um derivado de ácido diterpênico hidroxilado com fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_3$ (Figura 102).

Figura 102. Candidatos para a identidade da variável P2417.



Derivados de ácidos diterpênicos hidroxilados, acetilados, esterificados com fenilpropanoídes/derivados de ácido benzóico e glicosilados são comumente encontrados nas espécies de *Mikania* sendo vários já referenciados na literatura.^{28,31,49,61} Nota-se que entre os diterpenos já relatados em *Mikania* um grande número deles apresentam esqueleto do tipo *ent*-caurano seguido do esqueleto tipo pimarano.²⁸ Baseado no perfil de fragmentação da substância P2417, não há evidências suficientes para a confirmação do tipo de esqueleto que essa substância apresenta, porém devido ao fato de vários diterpenos do tipo caurano esterificados com diferentes ácidos orgânicos na posição 15 estarem presentes em espécies de *Mikania*, a identidade desse metabólito foi proposta ser ácido grandiflórico ou steviol.

No espectro MS modo ESI(-) referente a variável P2417 (Figura 103) foi observado o íon deprotonado $[M-H]^-$ com m/z 317,2122 (exatidão de massa: 1,64 ppm) e no espectro de MS/MS dessa espécie iônica (ESI-) foi observado a sua descaboxilação (m/z 273,2230). Esta reação foi considerada resultado provável da eliminação α ocorrendo simultaneamente a remoção do hidrogênio do grupo hidroxil e conseqüentemente migração da carga negativa para o átomo de oxigênio do grupo hidroxil (Figura 105) de forma semelhante já descrita e observada em ácidos graxos.⁹⁹ No modo positivo (ESI+), notou-se a fragilidade dos diterpenos funcionalizados os quais geralmente sofrem fragmentação na fonte perdendo suas cadeias laterais. Geralmente os ácidos diterpênicos esterificados com ácidos orgânicos se fragmentam extensivamente *in-source* resultando somente no aparecimento do íon fragmento com m/z 301,21 o que também pode representar uma estratégia interessante para a identificação desses ácidos diterpênicos funcionalizados de forma rápida numa mistura complexa de produtos naturais porém com suporte dos dados adquiridos no modo negativo, para obtenção de informação adicional sobre a cadeia lateral.

No espectro MS modo ESI(+) (Figura 103) foi observado somente o íon fragmento *in-source* $[M+H-H_2O]^+$ com m/z 301,21 e pelo seu perfil de fragmentação no espectro MS/MS foi observado a perda de água, devido a clivagem indutiva assistida pelo oxigênio da carbonila⁹⁹ formando o íon $[M+H-2H_2O]^+$ com m/z 283,2087 seguida da perda de CO (clivagem indutiva)⁹⁹ resultando no íon $[M+H-2H_2O-CO]^+$ com m/z 255,2099 (Figura 104). Dependendo dos parâmetros usados na fonte de ionização também é observado a formação do fragmento com m/z 255,21 em baixa abundância na própria fonte de ionização como no caso deste estudo.

Figura 103. Espectros MS Scan e MS/MS do íon fragmento *in-source* m/z 301,2 ESI(+) e $[M-H]^-$ m/z 317,21 no modo ESI(-) (TR: 12,6 min) referente a variável P2417.

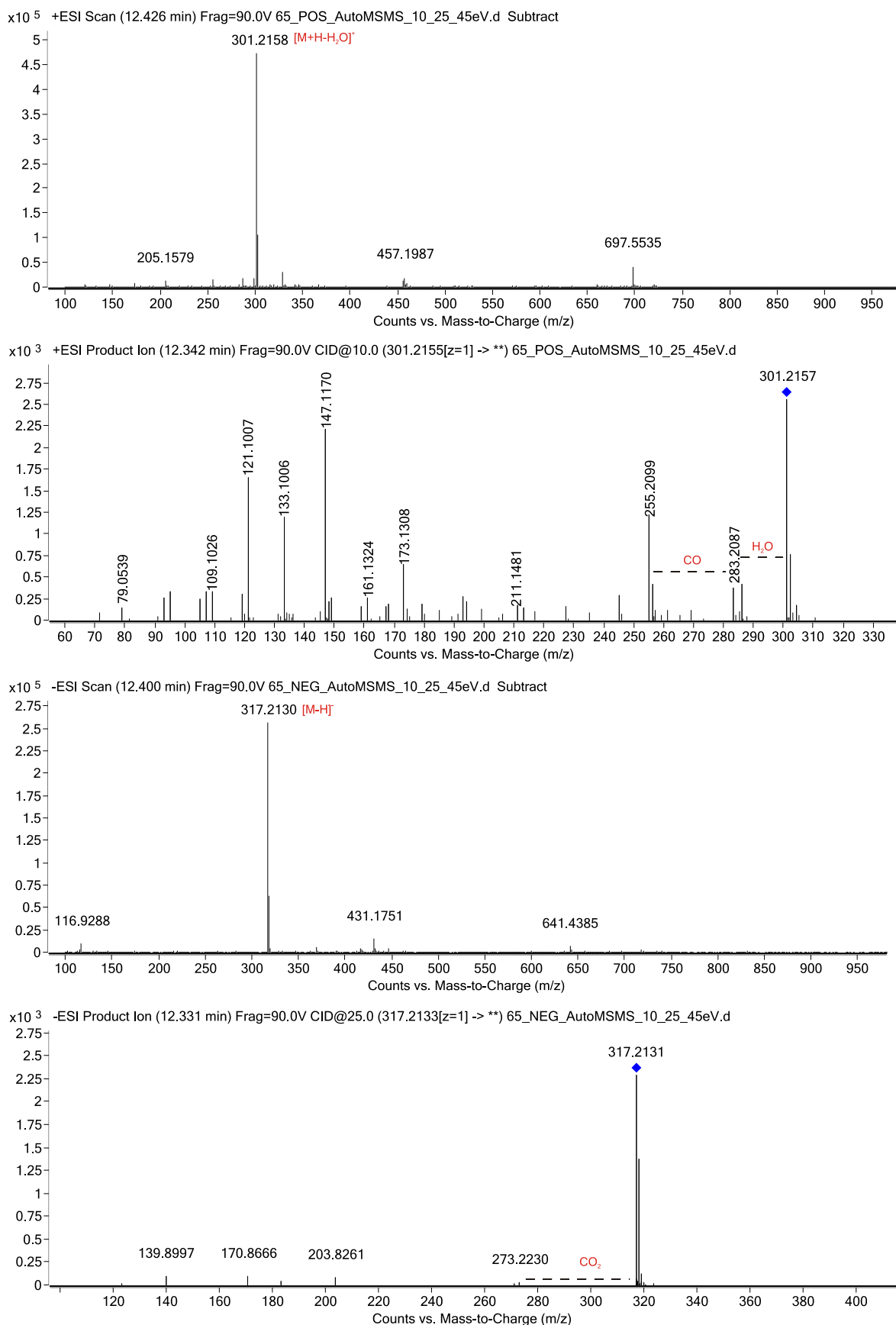


Figura 104. Proposta de via de fragmentação no modo ESI(+) para o diterpeno referente e variável P2417.

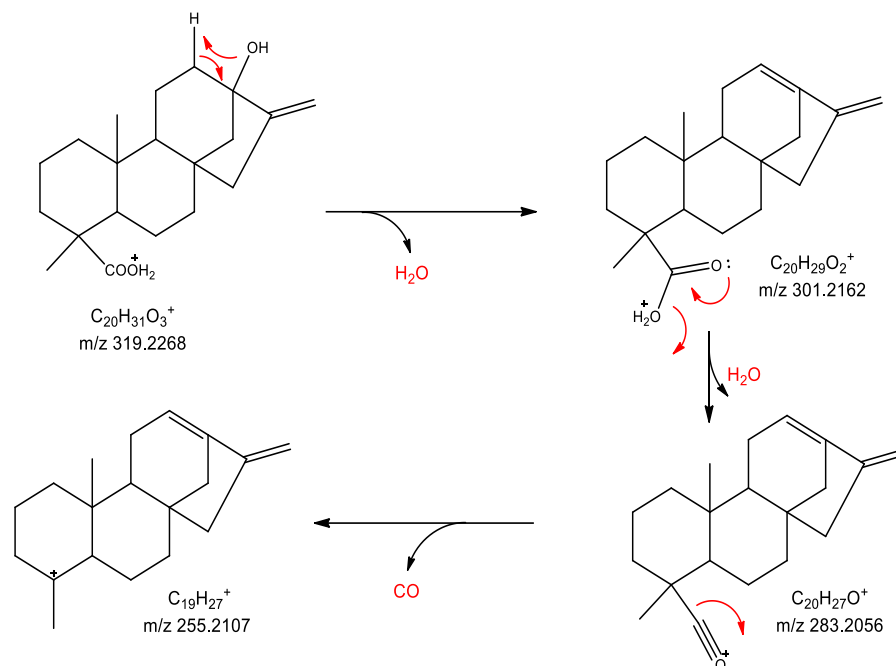
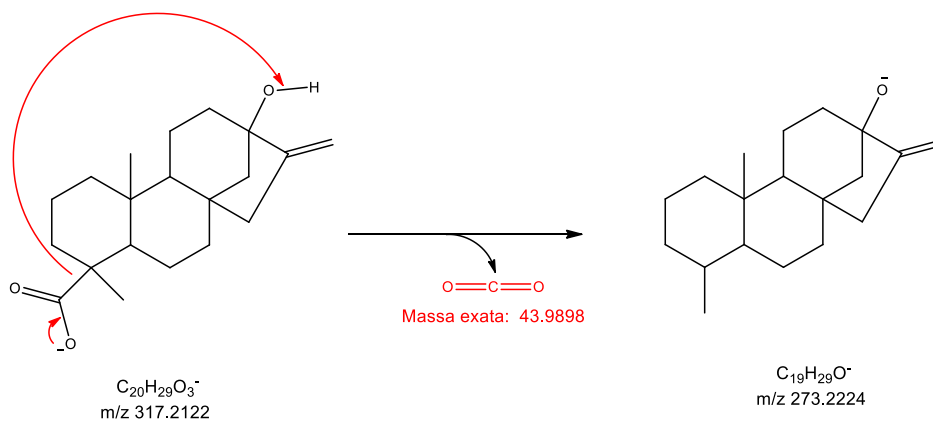
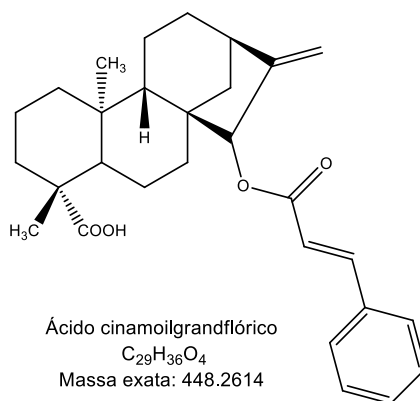


Figura 105. Proposta de via de fragmentação no modo ESI(-) para o diterpeno referente e variável P2417.



A perda de água observada no espectro MS/MS (ESI+), a partir do íon $[M+H-H_2O]^+$ com m/z 301,21, foi considerada evidência importante para descartar o possível candidato ácido 8,9-epoxi-pimar-15-en-19-óico. Para a proposta de identificação da variável P2417, considerou-se nível de confiabilidade 3 (*putative annotated compound*).

O metabólito discriminante com código P5483 destacou o íon fragmento com m/z 301,21 e tempo de retenção em 18,7 min. Este metabólito foi proposto ser o ácido cinamoilgrandiflorico com fórmula molecular $C_{29}H_{36}O_4$ (Figura 106).

Figura 106. Candidato para a identidade da variável P5483.

No espectro ESI-MS em modo positivo, referente a variável P5483 (Figura 107), foi observado somente o íon fragmento $[M+H\text{-ácido cinâmico}]^+$ com m/z 301,21. Pelo perfil de fragmentação no espectro MS/MS foi observada a perda de água seguida da perda de CO (clivagem indutiva)⁹⁹ resultando no íon $[M+H-H_2O-CO]^+$ com m/z 255,2093. No espectro MS modo ESI(-) (Figura 107) foi observado o íon deprotonado $[M-H]^-$ com m/z 447,2559 (exatidão de massa: 1,64 ppm). No espectro de MS/MS dessa espécie iônica foi observada a perda da cadeia lateral (ácido cinâmico) resultando no fragmento $[M-H\text{-ácido cinâmico}]^-$ com m/z 299,2056. Visto que o ácido cinamoilgrandiflorico não apresenta hidrogênio adjacente à posição esterificada no carbono 15, a perda da cadeia lateral através do típico rearranjo do tipo McLaferty aparentemente não ocorre, evidenciando outra possível via de fragmentação para perda do ácido cinâmico. Como uma proposta para o suporte da perda do ácido cinâmico é sugerido a ocorrência de um rearranjo a partir da reação heteroene assistida pela remoção do hidrogênio do carbono 9 conforme esquema na Figura 108, porém a proposta de estrutura para o fragmento apresentaria sistema muito rígido sendo importante futuros estudos de fragmentação envolvendo outras estratégias para a confirmação desse tipo de rearranjo. Da mesma forma, foi observado que a fragmentação da cadeia lateral dirigida pela transferência de carga não ocorre através da eliminação assistida pela remoção do hidrogênio adjacente ao ácido cinâmico, por este diterpeno não apresentá-lo. A proposta apresentada na Figura 109 evidencia rearranjo parecido com o apresentado na Figura 108, porém sendo iniciado pela remoção do hidrogênio do carbono 14 pelo grupo carregado negativamente, resultando na transferência da carga e resultando no fragmento com m/z 147,0458. O íon com m/z 103,0553 foi proposto ser formado a partir da descarboxilação do íon fragmento com m/z 147,04.

Figura 107. Espectros MS Scan e MS/MS da íon fragmento m/z 301,2 no modo ESI(+) e íon $[M-H]^-$ m/z 447,25 no modo ESI(-) (TR: 18,7 min) referente a variável P5483.

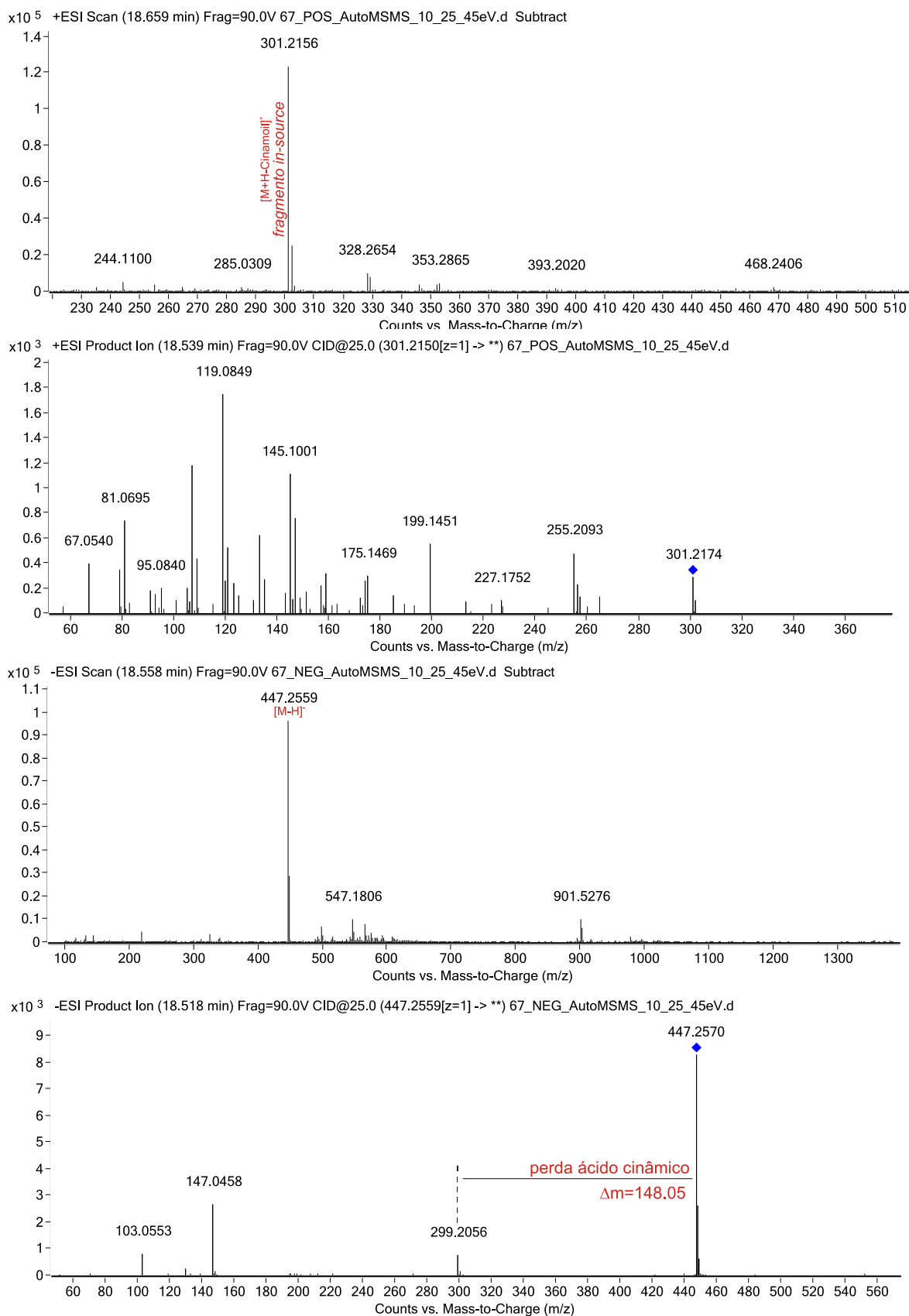


Figura 108. Proposta para a via de fragmentação e eliminação do ácido cinâmico a partir do íon precursor $[M-H]^-$ com m/z 447,2559, referente a variável P5483.

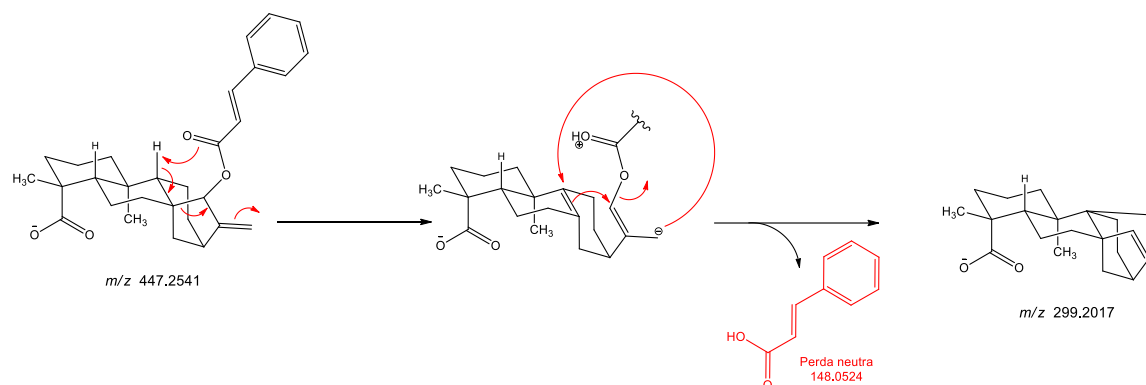
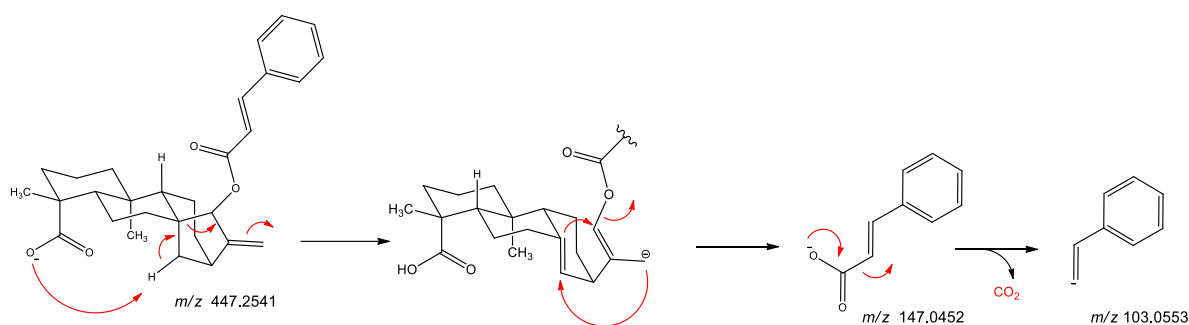
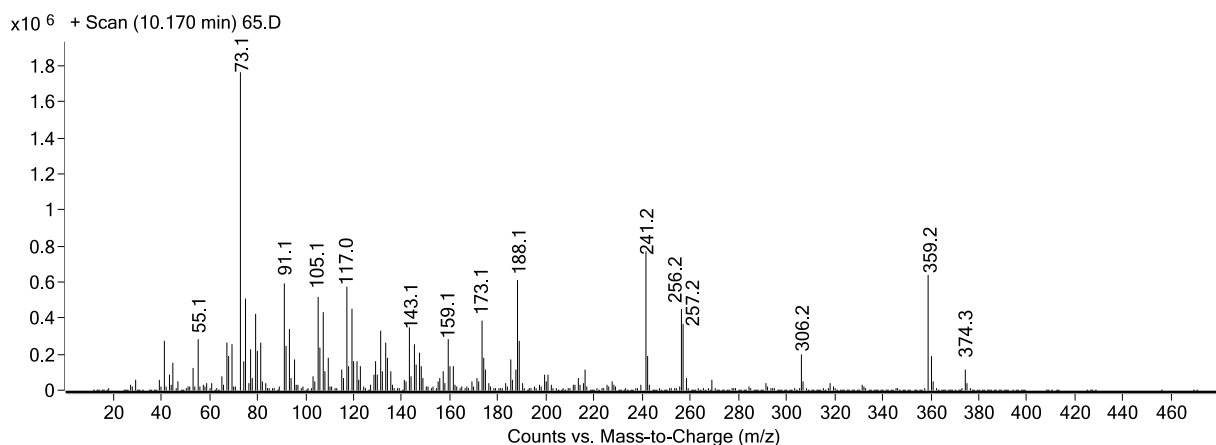
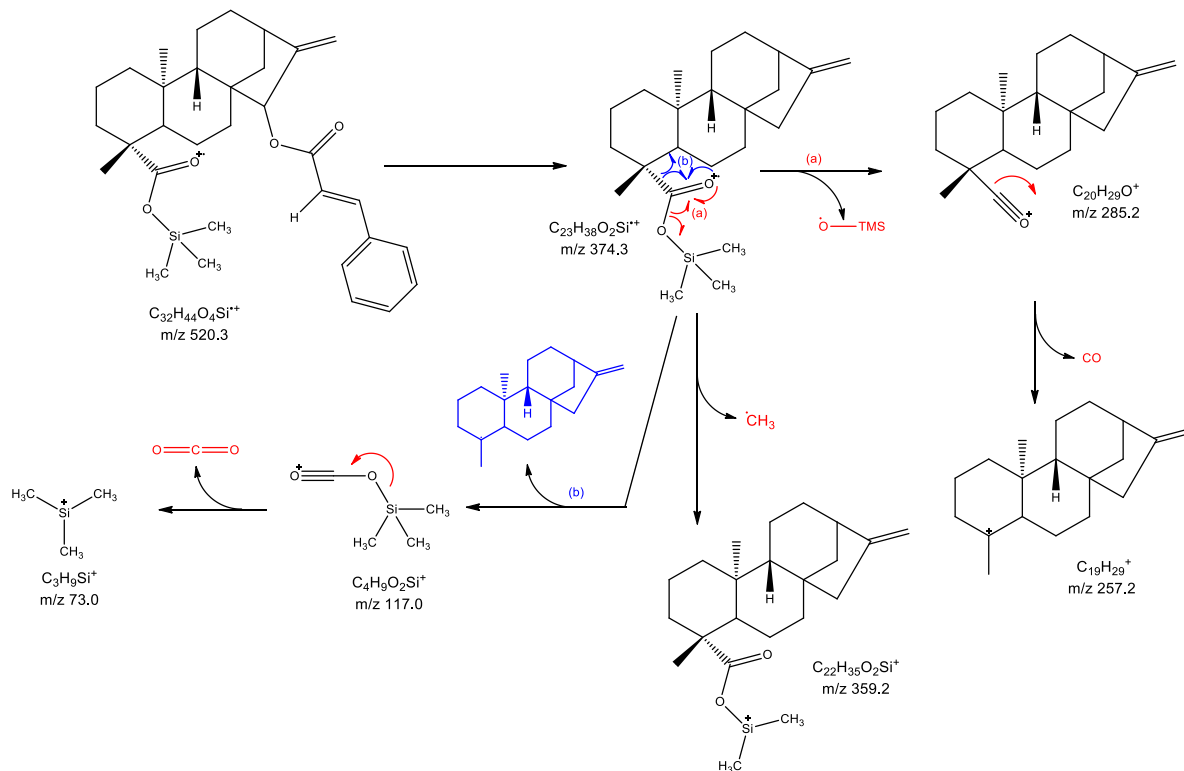


Figura 109. Proposta para a via de fragmentação para formação dos íons com m/z 147,04 e 103,05 a partir do íon precursor $[M-H]^-$ com m/z 447,2559.



Padrão de ácido cinamoilgrandiflórico (fração F2 isolada e caracterizada no capítulo 2) foi também injetado e analisado por LC-MS apresentando o mesmo perfil de fragmentação e tempo de retenção do metabólito P5483, evidenciando também a perda da cadeia lateral nos estudos de fragmentação apesar de não apresentar hidrogênio adjacente ao carbono 15.

Outra evidência da presença do ácido cinamoilgrandiflórico é o metabólito com código GC2294 também discriminante nos estudos metabolômicos. A variável destacou o íon fragmento com m/z 257 adquirido por GC-EI-MS com tempo de retenção 10,2 minutos. Este se refere ao derivado trimetilsilil (TMS) do ácido cinamoilgrandiflórico conforme o espectro de MS (Figura 110) e proposta de via de fragmentação (Figura 111), enfatizando a importância desse ácido diterpênico no agrupamento das amostras de *Mikania* e como possível classificador quimiotaxonômico.

Figura 110. Espectro de MS adquirido por GC-EI-MS da variável GC2294.**Figura 111.** Proposta de via de fragmentação para o derivado TMS de ácido diterpênico referente a variável GC2294.

Clivagem α envolvendo o heteroátomo⁹² insaturado foi observada em duas vias possíveis de fragmentação (Figura 111 - via a e b). A via (a) resultou na perda do radical $\cdot\text{O-TMS}$ formando o íon fragmento intermediário com m/z 285, o qual logo em seguida perde CO através da clivagem indutiva⁹² resultando no íon fragmento abundante com m/z 257. A via (b) resultou na formação do íon com m/z 117 seguida de clivagem indutiva resultando na perda de CO₂ e formação do íon característico de compostos silanizados com m/z 73. Padrão de ácido cinamoilgrandiflórico derivatizado

também foi injetado para confirmar a identidade desse diterpeno sendo tempo de retenção e perfil de fragmentação comparado ao obtido na amostra de *Mikania*. O padrão de ácido cinamoilgrandiflórico foi também analisado por LC-MS sendo o perfil de fragmentação e tempo de retenção similares ao da substância detectada em algumas espécies de *Mikania*. Portanto para a proposta de identificação das variáveis P5483 e GC2294 considerou-se nível de confiabilidade 1 (*identified compound*).

O metabólito com código N74 destacou o íon fragmento com m/z 301,21 e tempo de retenção 17,2 minutos adquirido por LC-MS (ESI-) caracterizando um outro derivado de ácido diterpênico. A proposta de identidade foi que a variável N74 se trata do ácido caurenóico.

Figura 112. Candidato para a identidade da variável N74.

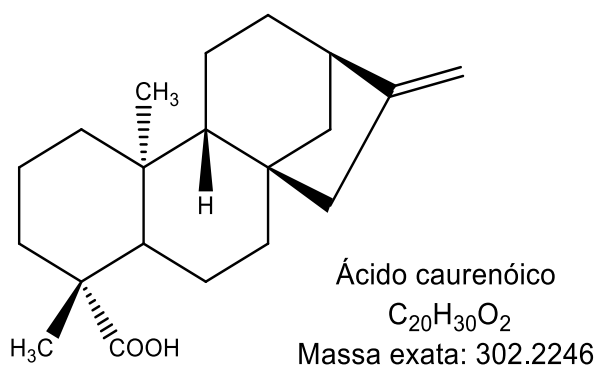
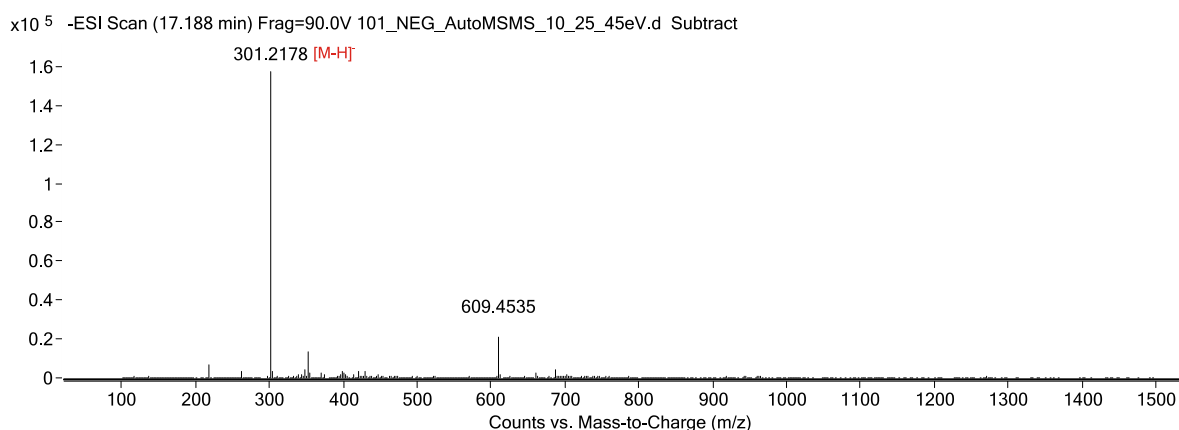
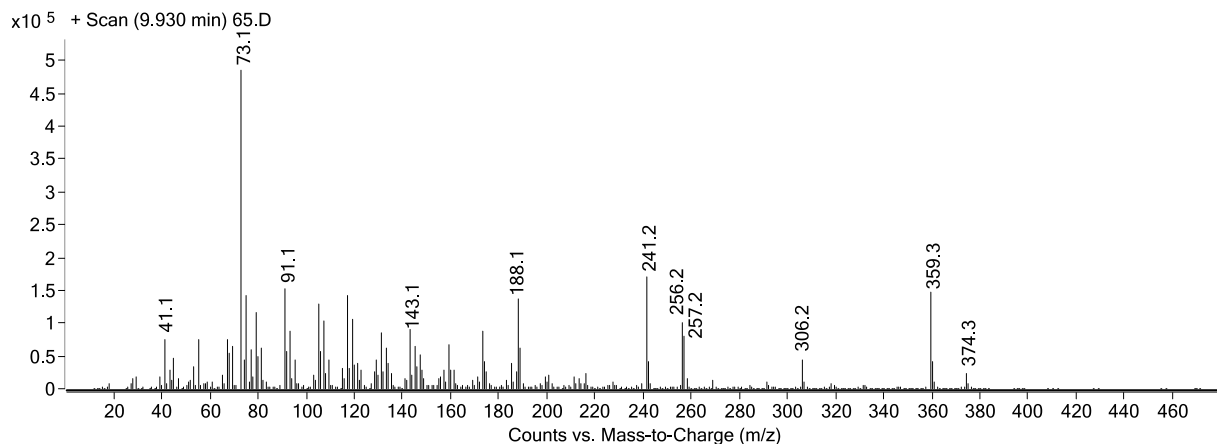


Figura 113. Espectros MS e MS/MS ESI(-) da espécie desprotonada m/z 301,21 (TR: 17,2 min) referente a variável N74.



Ácido caurenóico também foi detectado nas análises por GC-MS (Figura 114) sendo o padrão também injetado por GC-MS.

Figura 114. Espectro adquirido por GC-MS evidenciando a presença de ácido caurenóico em espécies de *Mikania*.

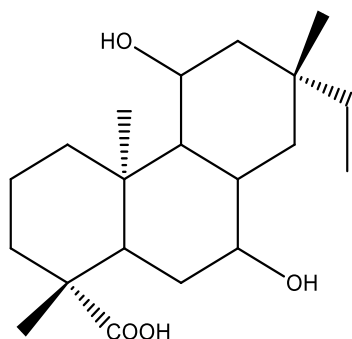


Padrão de ácido caurenóico foi injetado tanto por LC-MS quanto por GC-MS sendo perfil de fragmentação e tempo de retenção comparáveis ao da substância detectada em algumas espécies de *Mikania*. Portanto para a proposta de identificação da variável N74 considerou-se nível de confiabilidade 1 (*identified compound*).

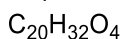
O metabólito N100 destacou o íon fragmento com m/z 335,22 e tempo de retenção 11,2 minutos (ESI-). Este metabólito também foi proposto ser um derivado de ácido diterpênico hidroxilado com fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_4$ (Figura 115).

No espectro MS modo ESI(+) referente a variável N100 (Figura 116) foi observado o íon fragmento *in-source* $[M+H-H_2O]^+$ com m/z 319,2252. Seu perfil de fragmentação evidenciou duas vias de fragmentação competitivas para formação do íon fragmento com m/z 255,20 (Figura 117).

Figura 115. Candidatos para a identidade da variável N100.

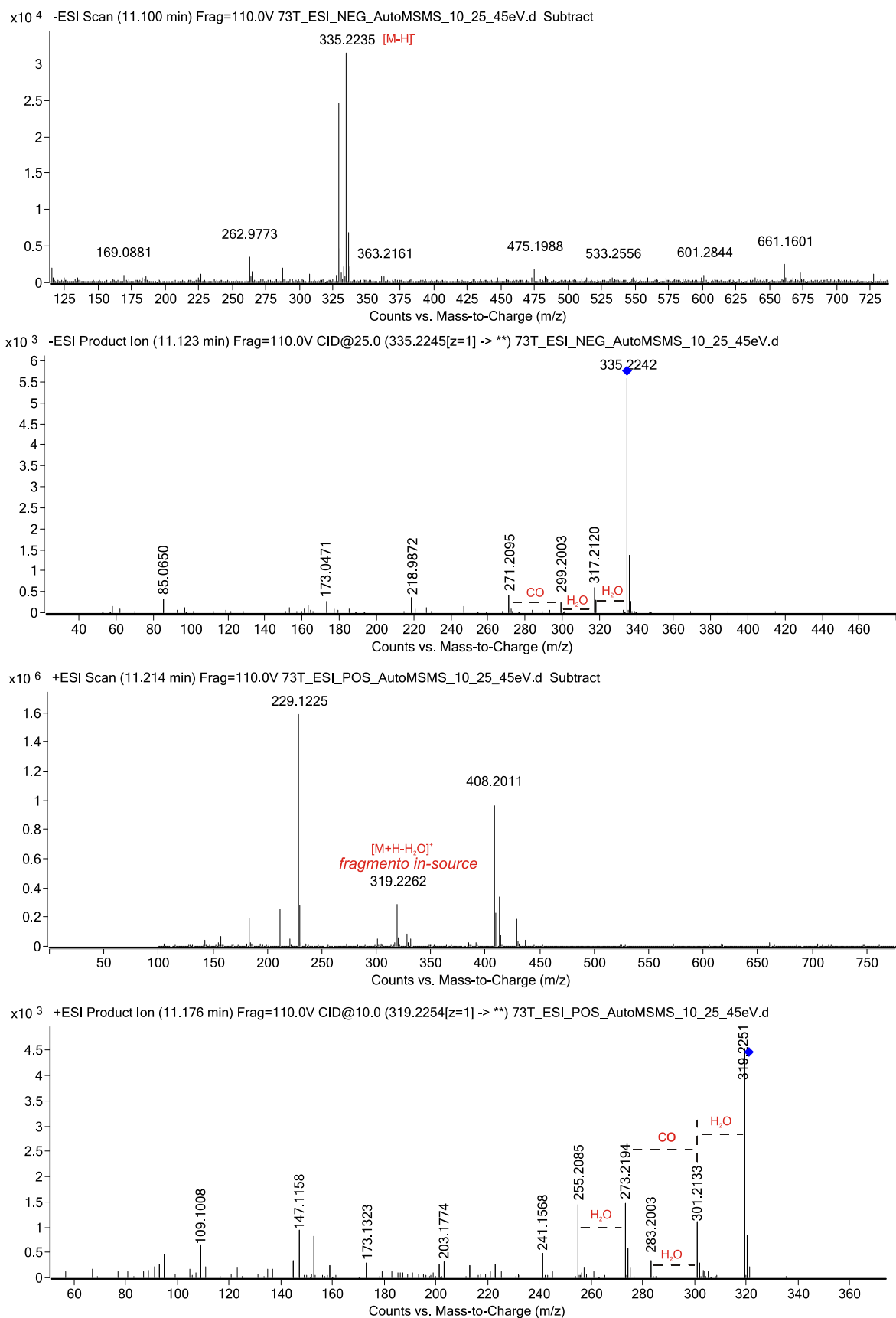


ácido 7,11-dihidroxipimar-15(16)-en-19-óico



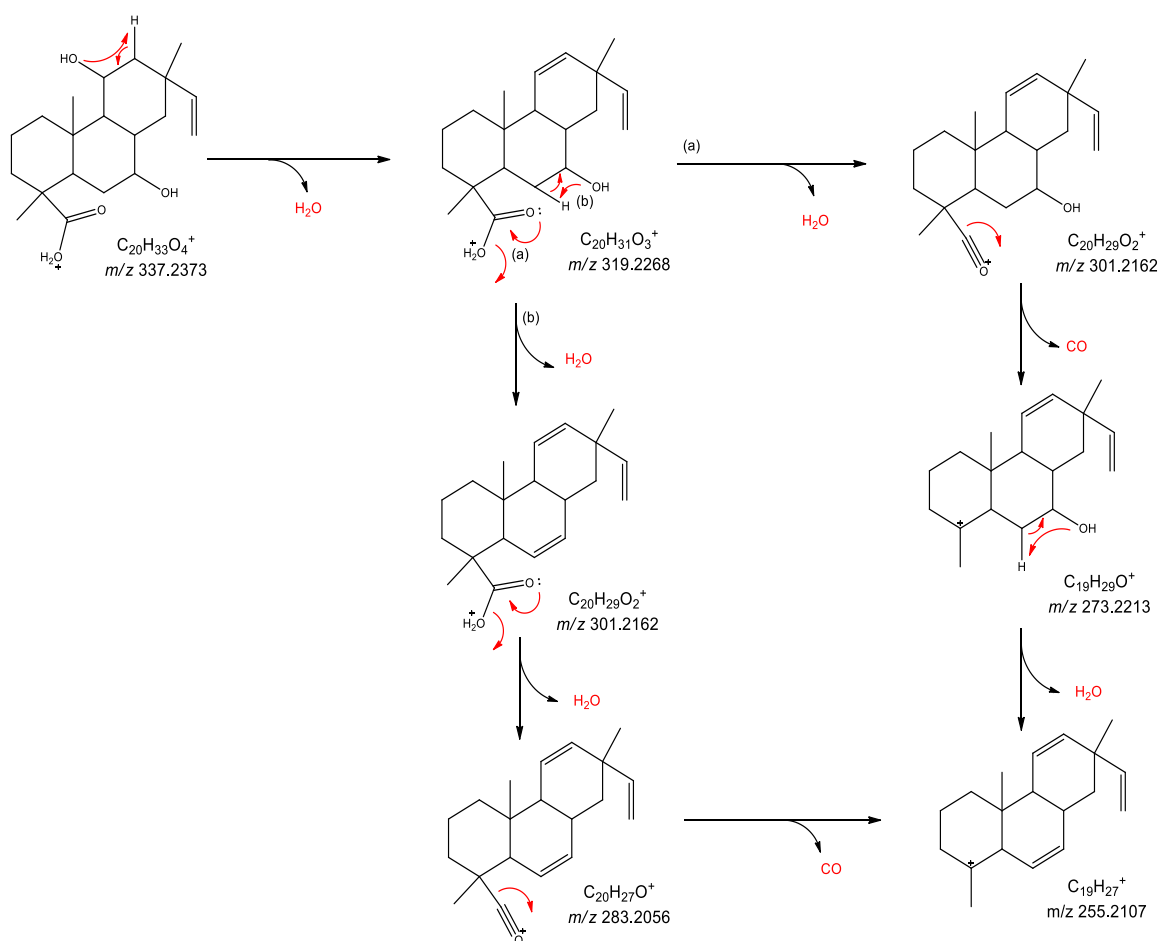
Massa exata: 336.2301

Figura 116. Espectros MS Scan e MS/MS da espécie iônica deprotonada m/z 335,22 ESI(-) e íon fragmento m/z 301,21 ESI(+) (TR: 11,2 min) referente a variável N100.



A desidratação do íon precursor (m/z 319,2252) pode ocorrer tanto a partir da clivagem indutiva no site carregado (Figura 117 - via a) quanto por rearranjo de hidrogênio no carbono 7 distante a carga, havendo eliminação de H_2O e formação de uma dupla ligação (Figura 117 - via b) resultando na formação do íon $[M+H-2H_2O]^+$ com m/z 301,2133. Pela via (a), foi observada a perda de CO havendo a formação do íon $[M+H-2H_2O-CO]^+$ com m/z 273,2194 o qual somente se forma devido a presença de duas hidroxilas funcionalizadas no anel do diterpeno. No espectro MS modo ESI(-) referente a variável N100 (Figura 116), foi observado o íon desprotonado $[M-H]^-$ com m/z 335,2243 (exatidão de massa: 2,08 ppm). No espectro de MS/MS dessa espécie iônica (ESI-) foram observadas duas desidratações consecutivas formando os íons $[M-H-H_2O]^-$ com m/z 317,2120 e $[M-H-2H_2O]^-$ com m/z 299,2003.

Figura 117. Proposta de via de fragmentação no modo ESI(+) para o diterpeno referente e variável N100.



Para a proposta de identificação da variável 100 considerou-se nível de confiabilidade 2 (*putative annotated compound*).

7.2.2.3. Metabólitos discriminantes da classe fenilpropanóide

O metabólito com código N4356 evidenciou o íon fragmento *in-source* com m/z 353,08 e tempo de retenção 10,6 minutos na análise por LC-MS modo ESI(-) (Figura 118). Este metabólito foi proposto ser um ácido dicafeoilquínico com fórmula molecular $C_{25}H_{24}O_{12}$ (Figura 119).

Figura 118. Espectros MS Scan e MS/MS ESI(-) do íon desprotonado com m/z 515,12 (TR: 10,9 min) referente a variável N4356.

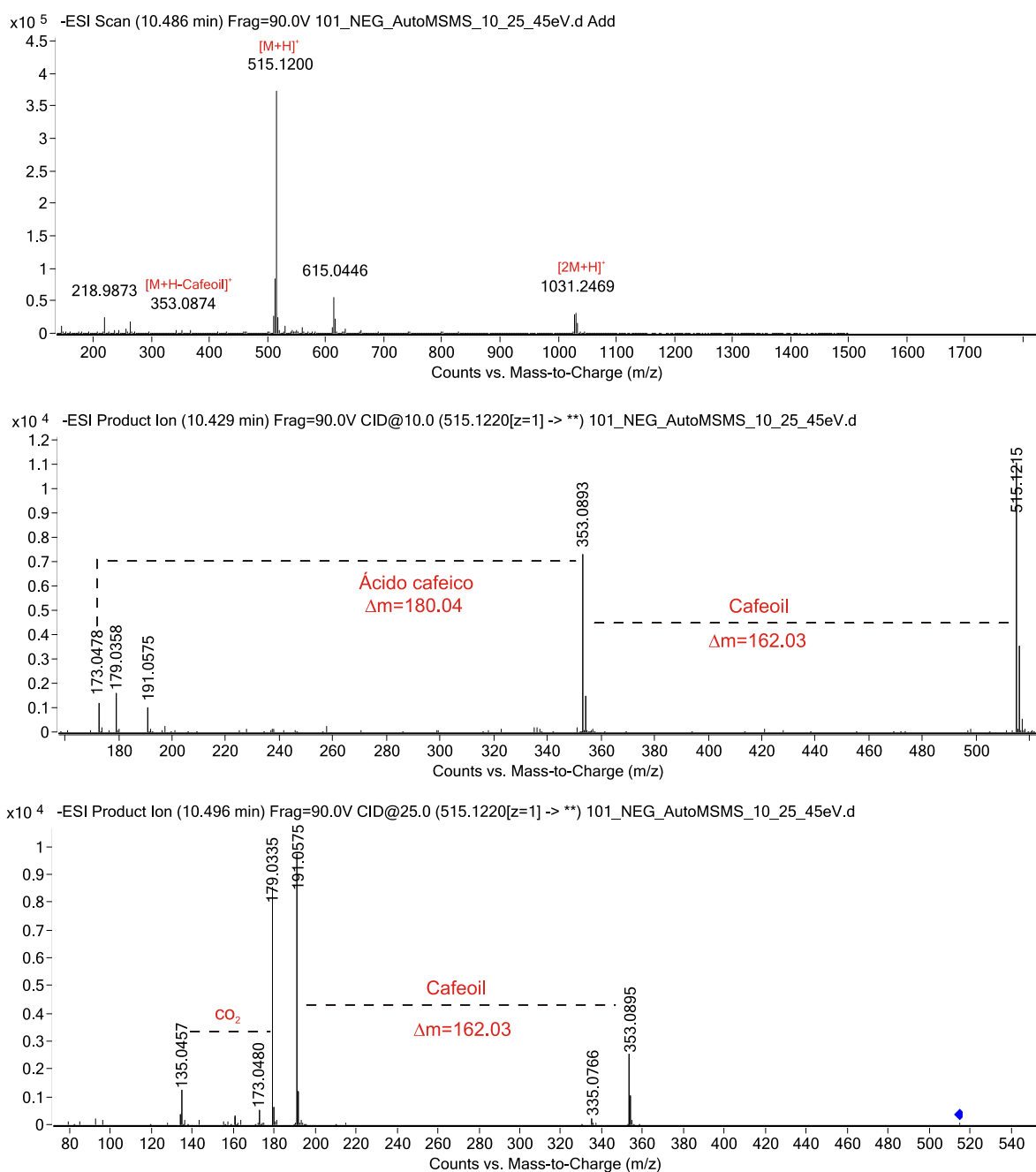
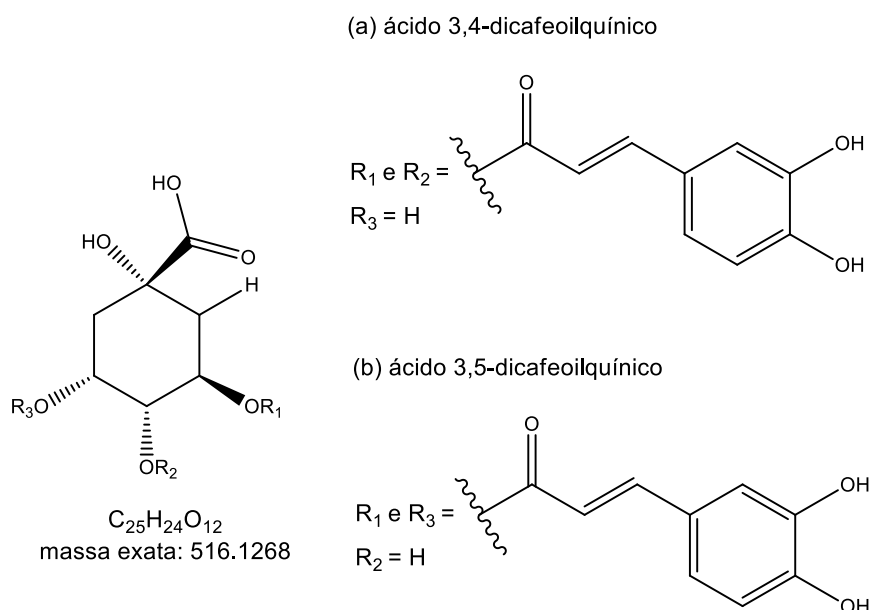


Figura 119. Candidato para a identidade da variável N4356.

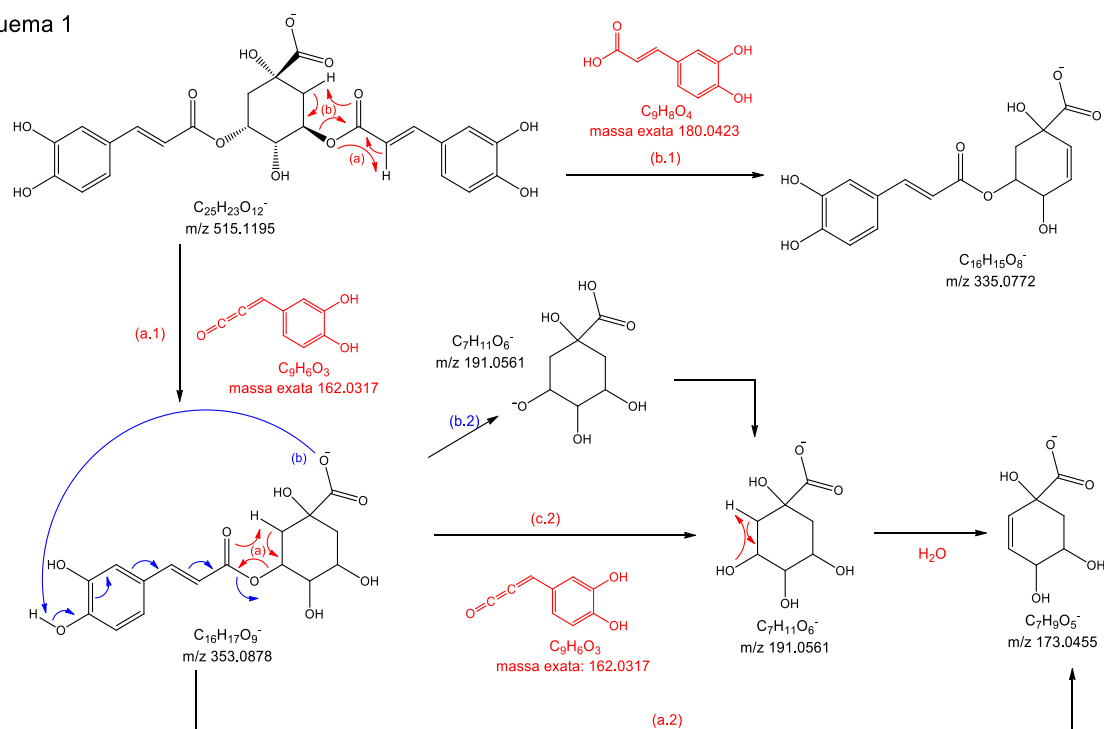
No espectro MS (Figura 118) observou-se o íon desprotonado $[M-H]^-$ com m/z 515,1200 (exatidão de massa: -0,97 ppm) e espécie iônica dimérica $[2M-H]^-$ com m/z 1031,2469. No espectro de MS/MS (íon precursor m/z 515,12) (Figura 120), foi observada a perda do ácido cafeico resultando no íon com m/z 335,0766 em menor abundância e a perda do grupo cafeoil resultando no sinal de maior abundância com m/z 353,0766, o qual também se formou na fonte de ionização de forma não extensiva.

O íon fragmento com m/z 191,0575 se refere ao ácido quínico podendo este ser formado por duas vias de fragmentação competitivas resultando na perda do segundo grupo cafeoil. Essas duas vias propostas são: via c.2 (Figura 120 - Esquema 1) se refere ao rearranjo havendo remoção de hidrogênio e via b.2 (Figura 120 - Esquema 1) se refere a eliminação assistida pela remoção do hidrogênio do grupo cafeoil⁹⁹. O mesmo ocorre na formação do íon com m/z 173,0480, o qual pode ser formado através da reação retro-heteroene (via a.2) e rearranjo havendo remoção de hidrogênio havendo a perda do cafeoil seguida da eliminação de água⁹⁹.

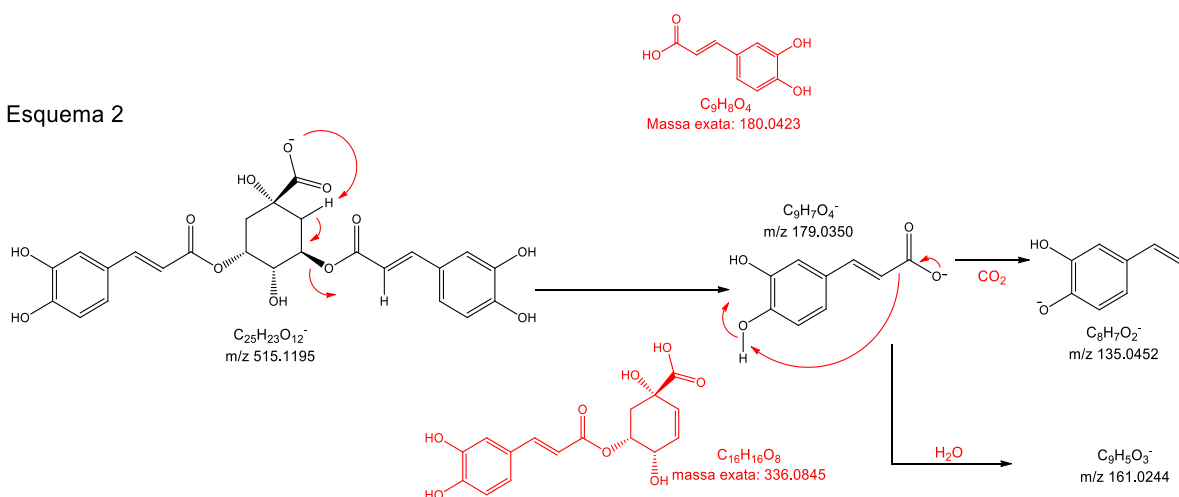
Também foi observada a formação do íon com m/z 179,0335 referente ao ácido cafeico, sendo este formado a partir da eliminação assistida pela remoção de hidrogênio (Figura 120 - Esquema 2) gerando na sequência o íon fragmento com m/z 135,0457 após descarboxilação.

Figura 120. Proposta de via de fragmentação para o ácido dicafeoilquínico N4356.

(a) Esquema 1



(b) Esquema 2



Para a proposta de identificação da variável N4356, foi considerada nível de confiabilidade 2 (*putative annotated compound*).

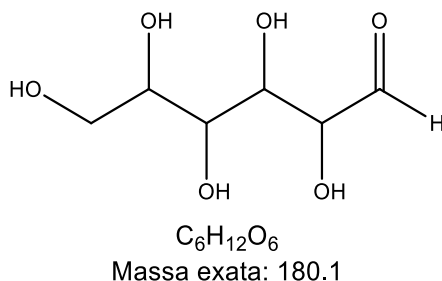
7.2.2.4. Metabólitos discriminantes da classe carboidratos

Quatro variáveis adquiridas por GC-EI-MS foram evidenciadas como significativas para o agrupamento de alguns grupos de espécies de *Mikania*, sendo elas as variáveis GC64, GC247, GC1048 e GC373. Todas elas foram propostas serem carboidratos sendo dois monossacarídeos e dois dissacarídeos.

Os metabólitos com código GC64 e GC247 evidenciaram o íon fragmento com m/z 307 e tempo de retenção 3,74 e 3,81 minutos, respectivamente. A proposta de

identidade para as duas variáveis é de uma aldohexose (Figura 121), sendo o espectro referente ao seu derivado de metiloxima-trimetilsilil (MTOX-TMS).

Figura 121. Candidato para a identidade das variáveis GC64 e GC247.



Em ambos espectros de MS referentes as variáveis CG64 (Figura 122) e GC237 (Figura 123) foi possível observar o íon molecular M^+ com m/z 569.

Figura 122. Espectro de MS adquirido por GC-EI-MS da variável GC64.

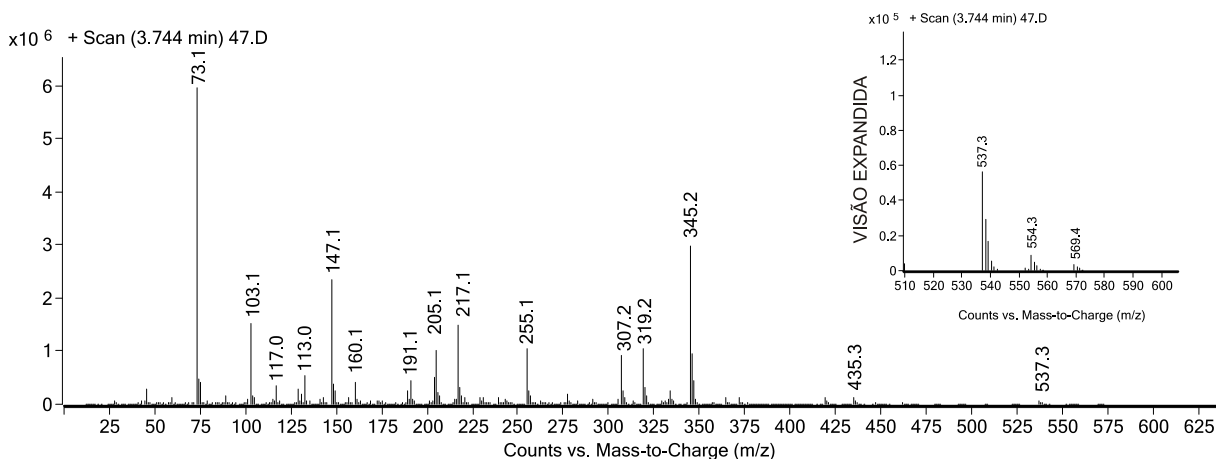
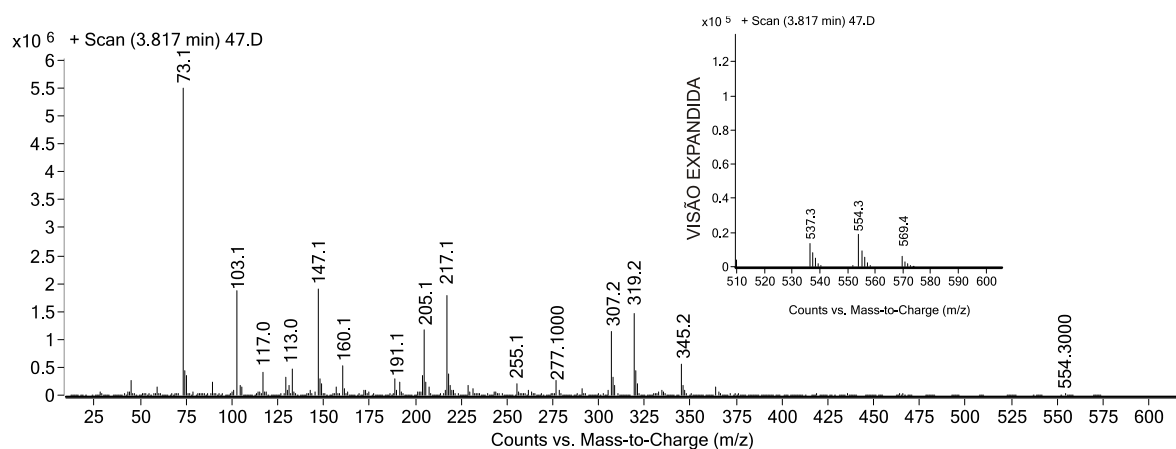


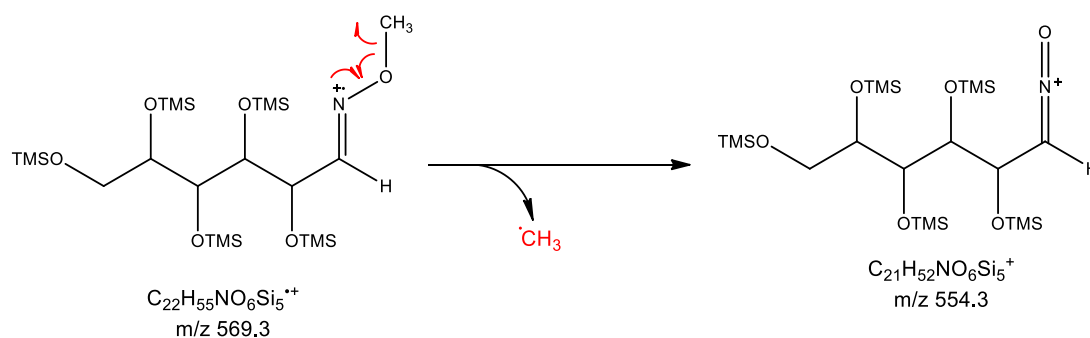
Figura 123. Espectro de MS adquirido por GC-EI-MS da variável GC237.



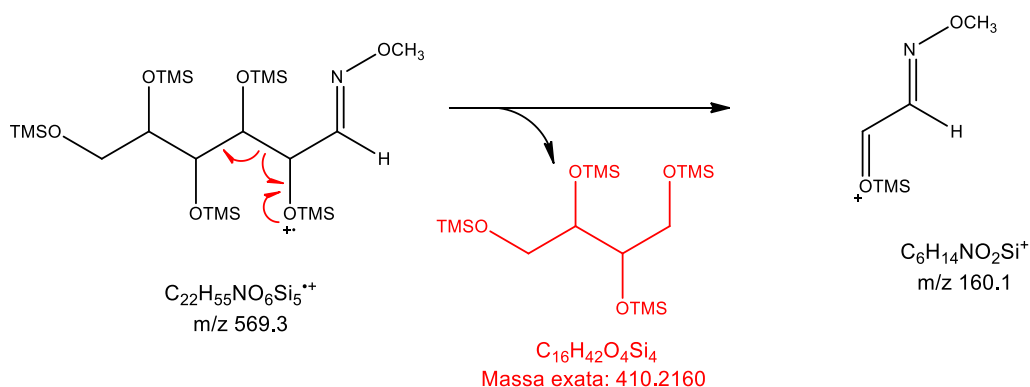
O íon fragmento com m/z 554 foi proposto ser formado pela possível perda do grupo metil radical da metoxima devido a clivagem α iniciada pelo site radicalar⁹¹ (Figura 124 - esquema a) e o íon com m/z 537 a partir de reação envolvendo a saída de metanol (Figura 124 - esquema c).

Figura 124. Reações de fragmentação possivelmente envolvidas na formação dos íons fragmentos do derivado MTOX-TMS relacionados as variáveis GC64 e GC237.

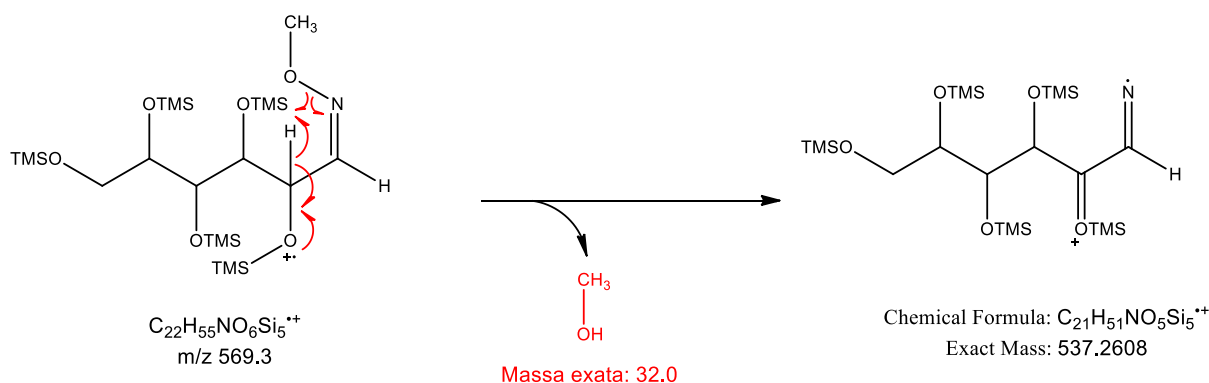
(a) Clivagem α iniciada pelo site radicalar: Formação do íon fragmento com m/z 554



(b) Clivagem α iniciada pelo site radicalar: Formação do íon fragmento com m/z 160

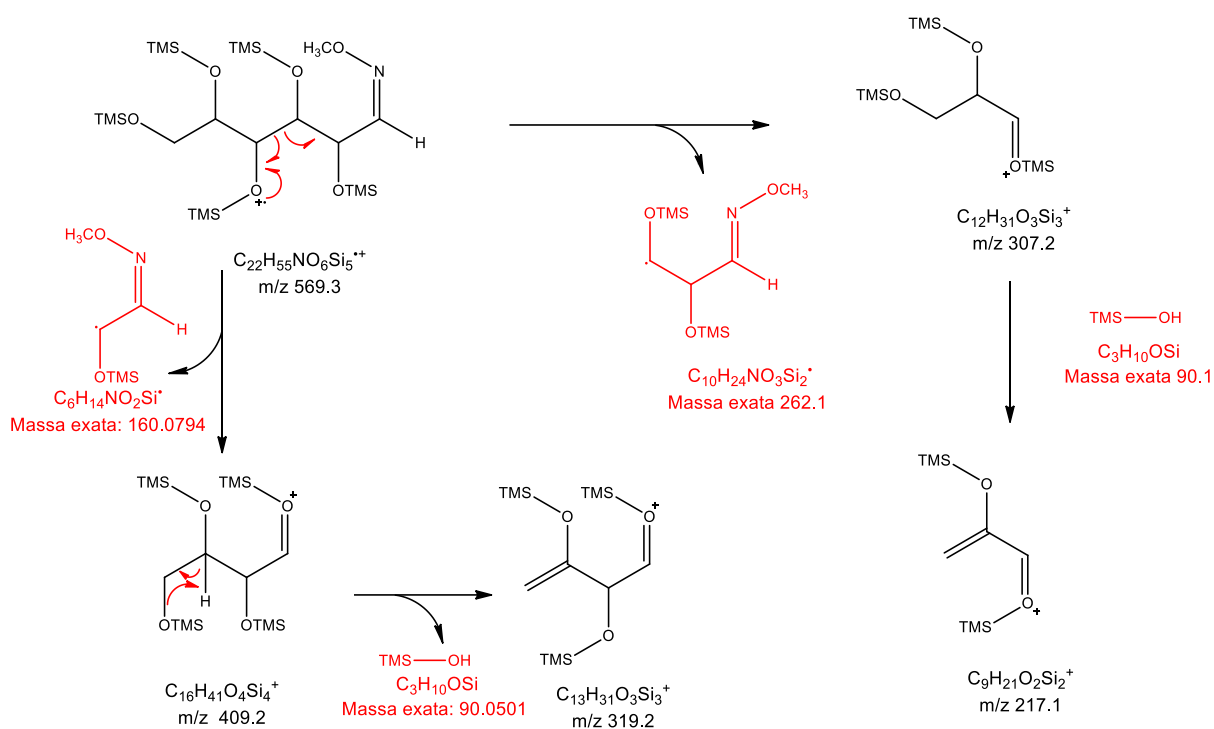


(c) Rearranjo envolvendo eliminação de CH_3OH



Foi também observado o íon fragmento com m/z 160 sendo sugerido a sua formação a partir da clivagem $\alpha^{91,92}$ (Figura 124 - esquema b). Uma série iônica (série iônica 1) foi observada, a qual conta com íons formados a partir da clivagem α em diferentes posições com a presença do grupo $-\text{OTMS}$: m/z 307, 205 e 103 (Figura 125). Uma segunda série iônica foi também observada sendo esta possivelmente gerada a partir da eliminação do grupo TMS-OH (rearranjo de hidrogênio), a partir dos íon fragmentos da série iônica 1 formando íons fragmentos com m/z 217 e 319 respectivamente. A espécie iônica observada em maior abundância com m/z 73 foi relacionada a formação do íon de elétron par SiC_3H_9^+ .

Figura 125. Reação de fragmentação envolvendo clivagem α e eliminação do grupo TMS-OH (GC64 e GC237).



Íons fragmentos com m/z 345 e 255 referentes a outro metabólito aparecem no espectro de MS das variáveis GC64 e GC237 (Figura 122 e Figura 123), exemplificando a complexidade de se interpretar corretamente as informações contidas no espectro de MS adquirido por GC-EI-MS e conseqüentemente sendo um desafio na etapa de determinação do metabólito discriminante correto envolvido nos estudos metabolômicos. A avaliação dos cromatogramas dos íons extraídos (EICs) contribuem muito para avaliação da co-eluição de metabólitos diferentes sendo observado neste caso a co-eluição de um outro metabólito com a hexose derivatizada.

Este metabólito elue junto com o pico relacionado a variável G64 (TR: 3,71 min) sendo possível observar no espectro de MS da variável GC237 a diminuição acentuada dos íons relacionados a esse metabólito desconhecido (m/z 345 e 255).

Os metabólitos com código GC373 e GC1048 evidenciaram o íon fragmento com m/z 204 e tempo de retenção 32,77 e 47,53 minutos, respectivamente. A proposta de identidade é de um dissacarídeo com duas unidades de piranose (Figura 126), sendo o espectro referente ao seu derivado de trimetilsilil (TMS).

Figura 126. Candidato para a identidade das variáveis GC373 e GC1048.

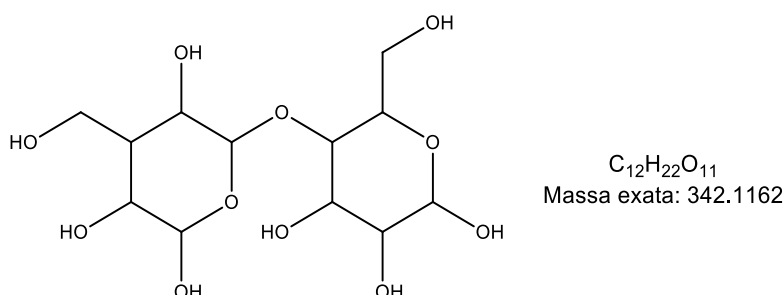
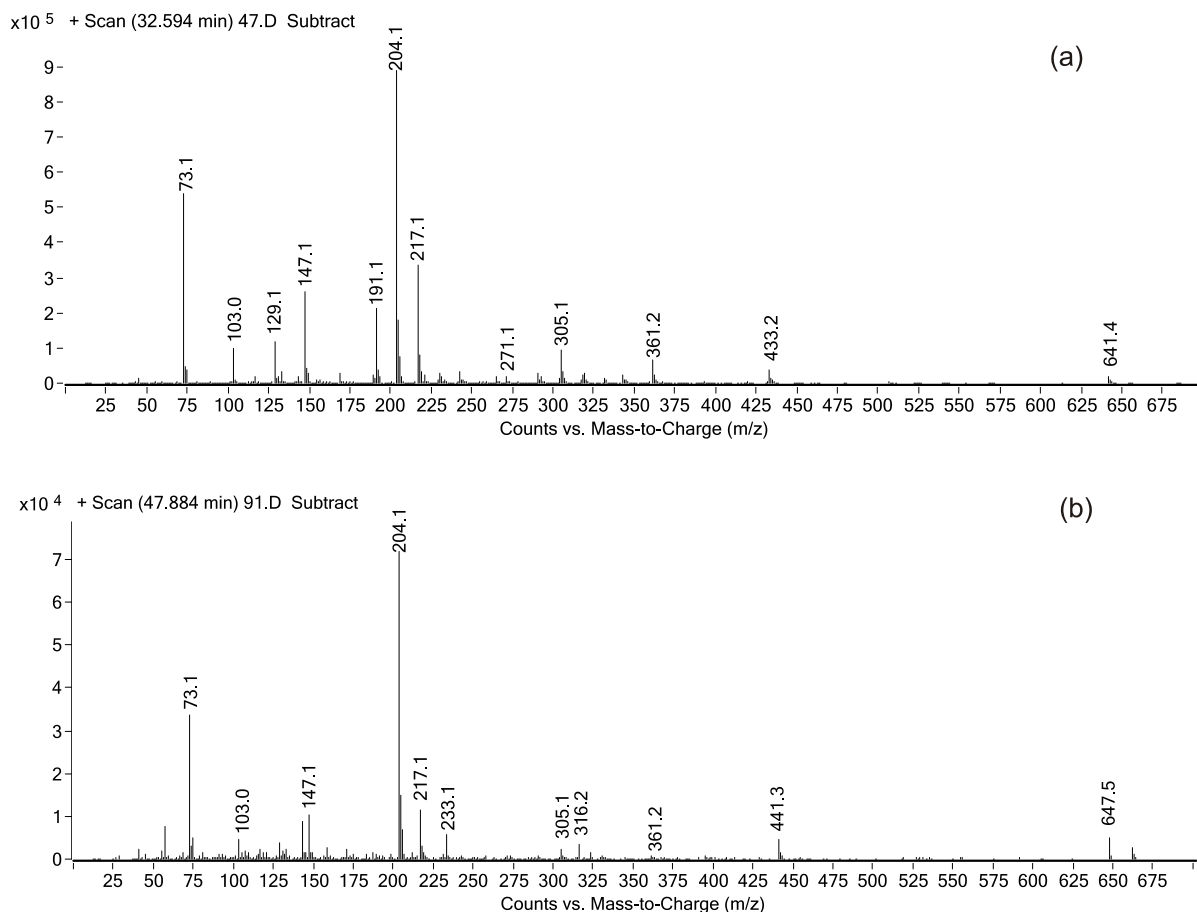


Figura 127. Espectro de MS adquirido por GC-EI-MS da (a) variável GC373 e (b) GC1048.

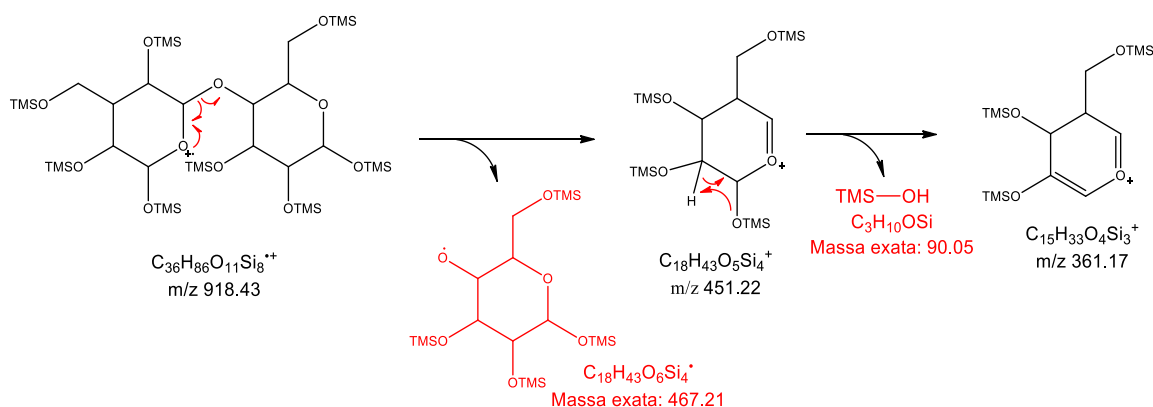


Baseado nos espectros de MS apresentados não é possível afirmar a posição da ligação glicosídica e a estereoquímica dos grupos hidroxil da hexose.

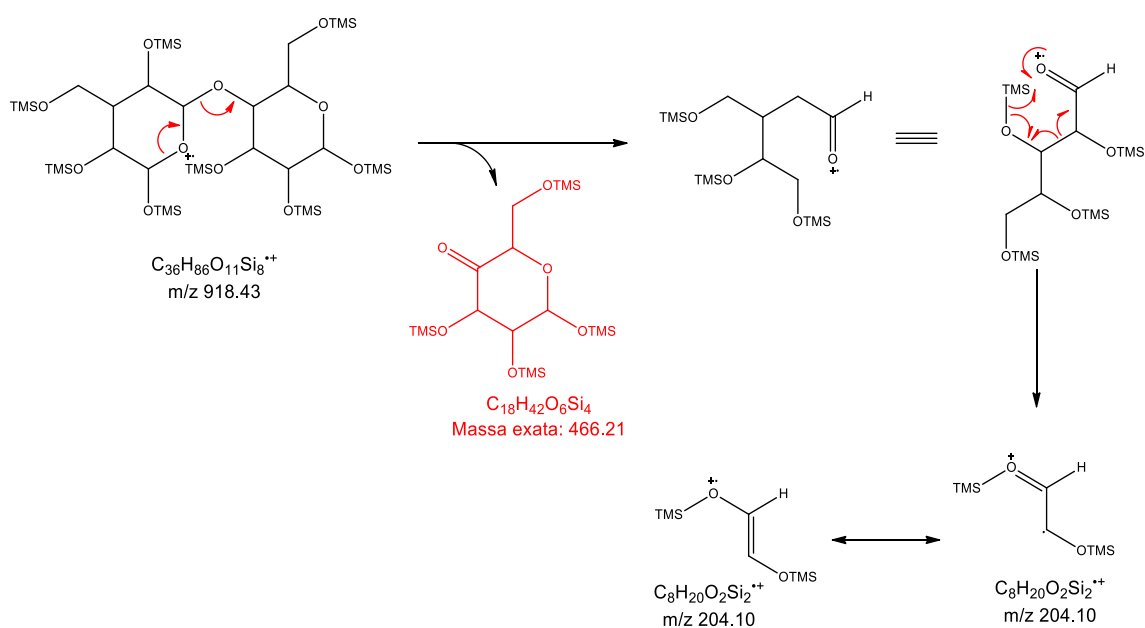
Em ambos espectros de MS referentes as variáveis GC373 e GC 1048 (Figura 127) não foi possível observar o íon molecular $M^{+\bullet}$ com m/z 918. O íon fragmento mais abundante com m/z 204 foi observado sendo proposto a sua formação a partir da clivagem indutiva resultando na perda de um monossacarídeo seguido de rearranjo de McLafferty^{92,100} formando íon radical (Figura 128 – Esquema b).

Figura 128. Reações de fragmentação possivelmente envolvidas na formação dos íons fragmentos dos dissacarídeos derivado de TMS das variáveis GC373 e GC1048.

(a) Clivagem α iniciada pelo site radical seguido da eliminação de TMS-OH



(b) Clivagem indutiva seguida de rearranjo de McLafferty



O íon fragmento m/z 204 é um dos íons que podem ser utilizados como diagnóstico para a identificação de dissacarídeos derivados de TMS. O íon de elétron

par com m/z 361 aparece no espectro de MS sendo formado a partir da clivagem α iniciada pelo radical seguido da eliminação de TMS-OH (Figura 128 – Esquema a).

Uma das variáveis adquiridas por RMN de ^1H , evidenciada também como discriminante, foi a variável RMN 206 com deslocamento químico $\delta=4,28$ ppm sendo este considerado como deslocamento característico do hidrogênio ligado ao grupo hidroxil devido a presença de carboidratos em algumas espécies de *Mikania*,⁹⁶ dando suporte para a identificação de carboidratos por GC-MS. Para as espécies com maior concentração de carboidratos, foi também observado nos espectros de RMN de ^1H , deslocamento químico com valores próximos a 5,25 ppm o qual pode ser relacionado ao hidrogênio hemiacetal em carboidratos.⁹⁶

Para a proposta de identificação das variáveis GC64, GC237, GC373 e GC1048, foi considerado nível de confiabilidade 3 (*putatively characterized compound class*). Apesar de várias evidências fornecidas como perfil de fragmentação, tempo de retenção e dados de RMN de ^1H não é possível propor o tipo de carboidrato e estereoquímica dos carbonos hidroxilados, portanto os dados dão suporte para a identificação somente da classe.

7.3. Discussão

Uma das etapas mais desafiadoras e críticas dentro do fluxo dos estudos metabolômicos é a identificação dos metabólitos, para evitar identificações falso-positivas. Produtos naturais apresentam uma ampla diversidade química tornando desafiadora a identificação correta desses baseado somente na exatidão de massa nas análises por espectrometria de massas.¹⁰⁵ Mesmo espectrômetros de massas de altíssima resolução capazes de estimar o valor de m/z dos íons com exatidão de 0,1 - 1 ppm não podem oferecer evidências suficientes para a determinação única da fórmula molecular de metabólitos com peso molecular mais altos (considerando elementos como C,H, O, S, N e P), somente contando com a exatidão de massa da medida.^{105,101,66}

Visto que a abundância dos isótopos (A+1, A+2, etc) é dependente da composição elementar do metabólito esta informação representa uma ferramenta importantíssima na determinação da proposta da formula molecular podendo diminuir significativamente a chance de identificações falso-positivas^{101,105}, porém ainda não fornece informação estrutural sobre os metabólitos¹⁰⁵.

Espectrômetros de massas com alto poder de resolução têm a habilidade de estimar o valor de m/z com maior exatidão e distinguir entre dois sinais que apresentam uma pequena diferença de massa,¹⁰⁴ porém para garantirmos a qualidade da estimativa com alta exatidão uma etapa muito importante é a realização do *tune* e calibração do equipamento usando solução de compostos conhecidos, sendo importante reportar evidências da calibração como boas práticas.⁶⁸ A infusão de substâncias referência concomitante com as análises possibilita monitorar a exatidão de massa e acessar a qualidade da estimativa da exatidão de massa pelo analisador de MS e avaliar alguma descalibração que possa ter ocorrido durante as análises sendo de extrema importância para identificação dos metabólitos.

Técnicas hífenadas como cromatografia líquida/gasosa acoplada ao espectrômetro de massas representam uma estratégia valiosa para diminuir a complexidade da matriz em estudo, sendo os diversos metabólitos separados antes de entrarem na fonte de ionização do espectrômetro de massas em estudos metabolômicos. Esta estratégia contribui para a redução de forma significativa de possível supressão iônica que possa acontecer devido ao efeito matriz, melhor detectabilidade de metabólitos menos concentrados e além de oferecer a chance de separação de metabólitos isobáricos os quais não seriam resolvidos usando somente um espectrometro de massas, incluindo diastereoisômeros e enantiômeros.¹⁰³ Além disso a cromatografia oferece um informação ortogonal aos dados obtidos por MS como o tempo de retenção, a qual apresenta um papel muito importante na proposta de identificação de metabólitos, sendo complementar as informações obtidas por MS.¹⁰² O uso de UHPLC tem sido uma estratégia de separação cada vez mais usada afim de se reduzir o tempo de análise muitas vezes longas devido ao grande número de amostras analisadas em estudos metabolômicos.

A condução de experimentos de fragmentação representa aquisição de informações estruturais adicionais, podendo fornecer um suporte mais concreto para as propostas de caracterização de substâncias por LC-MS em estudos metabolômicos aliado à boas práticas de processamento e interpretação de espectros de massa. Os dados usados nos estudos metabolômicos por LC-ESI-MS do gênero *Mikania* foram adquiridos usando um Orbitrap *Exactive* o qual não é um equipamento híbrido e não apresenta um quadrupolo (ou outro analisador adequado) para selecionar íons para os eventos de fragmentação. Desta forma para a caracterização dos metabólitos

presentes em algumas espécies medicinais de *Mikania* e dos metabólitos discriminantes para o agrupamento das espécies nos estudos metabolômicos, os dados de LC-MS foram adquiridos usando UHPLC acoplado a um QToF para a realização dos experimentos de fragmentação. Análise dependente de dados (*Dependent Data Analysis* - DDA) no modo ESI(+) e ESI(-) foi usada como estratégia de aquisição de dados, usando 3 intensidades de energias de colisão, fornecendo bastante informação para o suporte da proposta de identificação dos metabólitos.

O processamento dos espectros de massa obtidos por LC-MS foi feito com cautela com auxílio de algoritmo para deconvolução de sinais, avaliação da correlação de cromatogramas de íons extraídos (EIC) e as interpretações feitas baseada em evidências como: exatidão de massa (íons desprotonados/protonados, espécies iônicas diméricas/adutos, íons fragmentos), determinação de adutos ou possíveis fragmentações *in-source*, distribuição isotópica (abundância isotópica, exatidão de massa dos íons isotópicos) e estudos de fragmentação (MS/MS) usando-se 3 energias de colisão. Neste estudo, além das evidências discutidas anteriormente algumas substâncias foram caracterizadas com suporte de dados publicados na literatura, além do tempo de retenção e propostas de vias de fragmentação para acesso da viabilidade de formação dos íons fragmentos detectados a partir da identidade proposta para os metabólitos. Outra fonte muito importante na identificação dos metabólitos é se apoiar em fundamentos e conhecimento da biosíntese de produtos naturais e um prévio conhecimento sobre os metabólitos já identificados nas espécies em estudo.

Os dados usados nos estudos metabolômicos por GC-EI-MS do gênero *Mikania* foram adquiridos usando um GC acoplado a um quadrupolo, sendo estes os mesmo dados usados na caracterização dos metabólitos das espécies medicinais de *Mikania* e dos metabólitos discriminantes no estudo metabolômico. O processamento dos dados contou também com o uso de algoritmos de deconvolução de sinais (software *MassHunter*), algoritmos para subtração de sinais de linha de base para obtenção de espectros de melhor qualidade e correlação dos cromatogramas de íon extraídos de alguns íons fragmentos. A biblioteca NIST foi usada como auxílio na identificação dos metabólitos de interesse adicionalmente a proposta de vias possíveis de fragmentação para a identidade proposta dos metabólitos de interesse, valendo ressaltar inúmeras identificações falso-positivas baseada somente na comparação

com espectros de MS e biblioteca NIST a qual deve ser usada com cautela. Outras evidências como já discutidas devem ser usadas para validar a proposta de identificação.

As variáveis significativas adquiridas por RMN de ^1H também foram avaliadas neste capítulo dando suporte as propostas de identificação de alguns metabólitos discriminantes das classes quimiotaxonômicas oferecendo informação adicional para confirmação da presença de duas classes de metabólitos como as lactonas sesquiterpênicas e carboidratos.

Visto a complexidade e fragilidade da etapa de proposta de identificação em estudos metabolômicos diversas publicações têm trazido guias e evidências mínimas que devem ser reportadas para assegurar a confiabilidade das identificações.^{68,139,140} Como apresentado nesse capítulo, uma publicação muito importante para a área metabolômica aborda a classificação de níveis de confiabilidade para identificação proposta pela MSI listando evidências mínimas para assegurar o suporte adequado e robusto das identificações em estudos metabolômicos.⁶⁸ O nível de confiabilidade conforme sugerido pela MSI (Nível 1, 2, 3 e 4) foi reportado para todas as propostas de identificações ilustradas no capítulo 8, porém vale ressaltar que critérios mínimos sugeridos ainda são muito limitados e podem ainda não dar o suporte necessário para identificações de forma adequada. Somente basear as identificações nos níveis de confiabilidade publicados por Sumner *et. al*⁶⁸ podem não assegurar a confiabilidade das identificações visto que os critérios sugeridos não refletem as boas práticas de aquisição de dados, processamento e interpretação de dados.

A partir da caracterização dos metabólitos presentes nas três espécies medicinais de *Mikania* foi observada a presença de metabólitos da classe lactonas sesquiterpênicas somente na espécie *M. cordifolia*, dentre eles germacrolidos e guaianolidos esterificados com ácidos orgânicos como ácido epoxi-metacrílico. No geral nas três espécies foi observado flavonóides (eupatifolin, luteolina, e alguns flavonoides glicosilados), diterpenos do tipo caurano (ácido cinamoilgrandiflorico, steviol, ácido caurenóico, ácido benzoilgrandiflorico etc), diterpenos do tipo pimarano, fenilpropanóides como o ácido *o*-cumárico, derivados do ácido benzóico como o ácido protocatecuíco e cumarina. Os espectros adquiridos por GC-MS representaram um papel muito importante especialmente no auxílio da identificação de triterpenos não glicosilados, esteróis, monossacarídeos e dissacarídeos nas espécies de *Mikania*.

A partir dos estudos metabolômicos 17 variáveis foram evidenciadas como discriminantes para o agrupamentos de 1 ou 2 grupos, sendo oito variáveis adquiridas por LC-MS, quatro por RMN de ^1H e quatro por GC-MS. Diversas evidências obtidas por MS, GC-MS e RMN de ^1H foram disponibilizadas para o suporte da proposta de identificação das variáveis.

A estratégia de combinar diferentes técnicas analíticas para o estudo do conteúdo metabólico das espécies de *Mikania* demonstrou ser uma ferramenta muito poderosa e valiosa para fornecer informação complementar e ortogonal entre as técnicas podendo uma técnica cobrir as limitação de análise da outra. No geral, a análise por LC-ESI-MS forneceu informação muito rica para metabólitos mais polares os quais tem maior facilidade de se ionizar em solução como flavonóides, lactonas sesquiterpênicas, ácidos diterpênicos, fenilpropanóides, cumarinas etc.

Compostos com energia de ionização mais altos como carboidratos em algumas situações podem não ser detectados por MS, porém geralmente podem formar adutos com cátions sendo uma estratégia de ionização para essa classe. No entanto, a análise de uma matriz complexa como a do extrato da folha de *Mikania* onde diversos compostos mais polares estão presentes pode levar a uma supressão iônica mais acentuada dessa classe. Compostos mais apolares com baixo potencial de oxidação como tetraterpenos e carotenóides também apresentam uma certa limitação de ionização por ESI porém estudos também mostram a ionização desses compostos através da oxidação destes formando espécies iônicas radicalares ou até mesmo redução formando espécies iônicas radicalares negativas.¹⁴¹

No entanto, como discutido para os carboidratos, essas substâncias podem ter sua ionização suprimida devido a competição de ionização dos compostos mais polares e uso de condições na fonte que não favoreçam reações redox, sendo interessante para essa classe investir em métodos de preparo de amostras mais seletivos antes das análises.

Devido a limitação da ionização de compostos mais apolares por ESI possível não ionização ou supressão iônica de alguns compostos importantes e presentes nas espécies de *Mikania* podem ocorrer sendo estes não detectados. Usando GC-MS como técnica de escolha, substâncias voláteis e semi-voláteis podem ser analisadas e aliado a técnicas de derivatização compostos mais polares têm sua volatilidade aumentada e também podem ser analisados por GC-MS caso apresentem

estabilidade térmica. Portanto o uso do GC-MS representa uma ótima estratégia para análise ortogonal de produtos naturais.

No caso das amostras de *Mikania*, monossacarídeos e dissacarídeos derivados de TMS puderam ser detectados cobrindo uma limitação analítica da técnica de LC-ESI-MS na análise de uma matriz complexa com alto conteúdo de metabólitos polares e de fácil ionização em solução. Além disso triterpenos e esteróis puderam ser muito bem detectados por GC-MS os quais podem também ter sua sensibilidade prejudicada por LC-ESI-MS devido a possível supressão iônica em uma matriz complexa e maior dificuldade de ionização em solução as vezes requerendo a adição de aditivos como estratégia de ionização. Além disso, a disponibilidade da biblioteca NIST para espectros adquiridos por GC-EI-MS auxilia na tentativa de proposta de identificação de alguns triterpenos mais comuns. Por LC-ESI-MS diversos sinais foram relacionados a presença de triterpenos porém é um desafio identificá-los somente baseado nos espectros de MS/MS, sem auxílio da co-injeção de padrões.

Além disso, é comum nas análises por LC-MS que alguns metabólitos geralmente esterificados com diversos ácidos orgânicos e glicosilados se fragmentem na própria fonte no modo positivo, às vezes sendo a espécie iônica protonada/desprotonada nem mesmo detectada ou detectada com baixíssima abundância como ocorreu com os ácidos diterpênicos esterificados. Nestes casos espectros de MS apresentam uma maior complexidade para atribuição das espécies iônicas observadas, portanto cautela deve ser tomada na interpretação dos dados.

Parâmetros da fonte de ionização em alguns casos podem ser otimizados com o intuito de diminuir a fragmentação extensiva de alguns metabólitos mais sensíveis na fonte, porém para muitos devido a sua natureza não é possível evitar totalmente a fragmentação *in-source*, devendo-se conviver com esse possível cenário o qual deve ser levado em consideração na etapa de identificação dos metabólitos. Este tipo de fenômeno representa outra limitação para atribuição de fórmula molecular correta usando-se a atribuição automática da fórmula molecular para valores de m/z de íons detectados e deconvoluídos diretamente do software de pré-processamento de dados como o MzMine, visto que ainda não existem algoritmos os quais possam levar todos esses fatores particulares de cada natureza de produto natural em consideração, levando a identificação equivocada de discriminantes e marcadores em estudos

metabolômicos podendo até mesmo invalidar o estudo e as conclusões tiradas a partir deste.

Com maior conhecimento quanto ao conteúdo metabólico das espécies de *Mikania* e proposta de identidade dos metabólitos discriminantes para o agrupamento das espécies discutida neste capítulo, um suporte sólido é apresentado para se propor a classificação quimiotaxonômica do gênero *Mikania* a ser discutida no capítulo 9.

8. Quimiotaxonomia do gênero *Mikania*

Este capítulo reúne os resultados obtidos nos capítulos 2, 3, 4, 5, 6 e capítulo 7 seção 7.2 direcionando para uma discussão sobre a quimiotaxonomia do gênero *Mikania* baseado em estudos metabolômicos. O capítulo 6 abordou a estratégia usada para a fusão de dados obtidos por LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H e detalhes sobre a análise estatística multivariada dos dados resultando na obtenção do dendograma por HCA e plote de escores e *loading* por OPLS-DA onde pode-se observar o agrupamento das diferentes amostras de espécies de *Mikania*. Em sequência, o capítulo 7 descreveu detalhadamente a estratégia usada para propor a identidade dos metabólitos discriminantes. Após as várias etapas contidas no fluxo do estudo metabolômico o capítulo 8 propõe uma classificação quimiotaxonômica para o gênero *Mikania* baseado nas várias evidências discutidas nos capítulos anteriores. Este capítulo também descreve aspectos relacionados a função biológica de alguns metabólitos em plantas e estabelece um paralelo com a classificação quimiotaxonômica proposta. O capítulo finaliza com uma discussão sobre o controle de qualidade de matérias-primas vegetais usadas na produção do Guaco, levantando pontos importantes observados nos estudos metabolômicos.

8.1. Análise dos grupos quimiotaconômicos obtidos nos estudos metabolômicos baseado na fusão de dados de LC-MS, GC-MS e RMN de ¹H

8.1.1. Materiais e Métodos

A classificação quimiotaconômica do gênero *Mikania* foi proposta baseado no modelo de predição obtido por OPLS-DA, baseado no agrupamento obtido por HCA (seção **Error! Reference source not found.** e 6.2), a partir da matriz fusão de dados de LC-MS, GC-MS e RMN de ¹H, conforme discutido no capítulo 6. Um *heatmap* também foi construído usando as variáveis discriminantes evidenciadas nos estudos metabolômicos e amostras das espécies de *Mikania* com auxílio do software Matlab R2013b (Mathworks). A matriz usada para construção do *heatmap* foi normalizada normalizada pela área máxima de cada variável, representando a concentração como porcentagem relativa.

Um dendograma adicional foi gerado por HCA através do software R usando a matriz validada com os dados adquiridos por LC-MS e processada conforme E#B6 (Tabela 38), Parâmetros usados no HCA foi: algoritmo '*hclust*', sendo a similaridade calculada pela distância euclidiana e as amostras conectadas pela conexão tipo Ward.d.

8.1.2. Resultados

Como já discutido no capítulo 6, foram observadas algumas semelhança do agrupamento das espécies de *Mikania*, baseado no perfil metabólico obtido por LC-MS, GC-MS e RMN de ¹H, com o agrupamento baseado no estudo filogenético.⁸⁸ Com o acesso a identidade dos metabólitos discriminantes propostos no capítulo 7, foi possível compreender quais classes químicas de produtos naturais evidenciam a separação dos grupos em *Mikania* e contribuem para a classificação quimiotaconômica. Além disso foi possível entender a razão de algumas espécies de diferentes subgêneros terem se agrupado separadamente em alguns casos.

Os metabólitos considerados discriminantes para classificação quimiotaconômica se encontram descritos resumidamente na Tabela 56, Tabela 57 e Tabela 58. A partir do dendograma obtido por HCA (capítulo 6 Figura 73), foi observado a formação de quatro grupos os quais podem ser visualizados no plote de escores das componentes (C) 1 e 2 (Figura 129) e componentes 2 e 3 (Figura 130) obtidos por OPLS-DA. Através da análise do plote dos *loadings* (Figura 129 e Figura

130), foi observada a predominância de alguns tipos de metabólitos que ocorrem mais em alguns grupos ou até mesmo não são detectados em alguns grupos.

A partir da comparação do plote de escores e *loadings* das componentes 1 e 2 (Figura 129), foi observado que sinais dos metabólitos P1200, P2485 e P5130 adquiridos por LC-MS, identificados como lactonas sesquiterpênicas, se apresentam como discriminantes do grupo A. As variáveis adquiridas por RMN de ^1H também se apresentaram agrupadas perto dos sinais das lactonas sesquiterpênicas sendo os deslocamentos químicos $\delta=6,04$ ppm (RMN163) e $\delta=6,21$ ppm (RMN162) relacionados a dupla exocíclica do anel γ -lactônico devido a presença de lactonas sesquiterpênicas em várias espécies do grupo A. A variável com deslocamento químico $\delta=4,44$ ppm (RMN202) também foi relacionada as lactonas sesquiterpênicas sendo deslocamento característico para hidrogênio localizado no carbono adjacente ao oxigênio do anel lactônico^{94,95,97}. Conforme dendograma obtido por HCA (Figura 73), várias espécies consideradas do subgênero *Mikania* agruparam-se no grupo A. Ainda analisando o plote de *loadings* das componentes 1 e 2, foi observado que o grupo A apresentou variáveis adquiridas por GC-MS identificadas como monossacarídeos (GC64 e GC247) e dissacarídeos (GC373 e GC1048).

A variável obtida por RMN de ^1H com deslocamento químico $\delta=4,28$ ppm (RMN206) foi relacionada a presença de carboidratos em maior concentração no grupo A sendo este deslocamento característico para o hidrogênio do grupo hidroxil⁹⁶. Foi observado também, que ácidos diterpênicos e ácido dicafeoilquínico não foram detectados nas espécies do grupo A em geral. Para melhor visualização dos metabólitos discriminantes dentro de cada grupo quimiotaxonômico, um *heatmap* foi contruído relacionando o nome das espécies de *Mikania* versus a concentração relativa dos metabólitos discriminantes (Figura 131). Baseado no *heatmap* foi observado claramente que as amostras do grupo A apresentam maior concentração de lactonas sesquiterpênicas e carboidratos e praticamente nenhuma espécie contém ácidos diterpênicos e ácido dicafeoilquínico em seu perfil metabólico. Ainda analisando as amostras localizadas no grupo A, também foi observado que para as espécies pertencentes ao grande subgênero *Cylindrolepis*, as lactonas sesquiterpênicas foram detectadas em baixíssimas quantidades ou até mesmo não detectadas, sendo elas: (90) *M.burchelli*, (83) *M.orleansis*, (52) *M.psilostachya*, (91) *M.psilostachya*, (84) *M.oblongifolia*, (43) *M.sp. nov*, (21) *M.lindbergii*, (17) *M. sessifolia*

Tabela 56. Proposta de identidade dos metabólitos discriminantes adquiridos por LC-MS para o agrupamento das espécies de *Mikania*.

VAR.	TR (min)	Espectro MS Scan			Espectro MS/MS +ESI			Espectro MS/MS -ESI			Proposta de identidade	Classe química
		m/z obs.	Espécie iônica	Fórmula molecular	Erro massa (ppm)	m/z obs. íons fragm.	Espécies iônicas íons fragmentos	m/z obs. íons fragm.	Espécies iônicas íons fragmentos			
N74	17,2	301,2178	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	1,7	-	-	-	-	-	Ácido ent-caur-16(17)en-19-óico (ácido caurenóico)	diterpeno caurânico
P2417	12,6	301,2158 317,2130	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	1,3 -2,5	283,2087 255,2099	[M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺	273,2230	[M-H-CO ₂] ⁻	Ácido grandiflórico / steviol	diterpeno caurânico	
P5483	18,7	301,2156 447,2559	[M+H-CL] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₉ H ₃₆ O ₄	2,0 1,6	255,2093	[M+H-CL-H ₂ O-CO] ⁺	299,2056 147,0458 103,0553	[M-H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁻ C ₉ H ₇ O ₂ ⁻ [C ₉ H ₇ O ₂ -CO ₂] ⁻	Ácido ent-15-cinamoil-caur-16(17)en-19-óico Ácido cinamoilgrandiflórico	diterpeno caurânico	
N100	11,2	319,2262 335,2235	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	-1,2 -2,1	301,2133 283,2003 273,2194 255,2085	[M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-3H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-3H ₂ O-CO] ⁺	317,2120 299,2003 271,2095	[M-H-H ₂ O] ⁻ [M-H-2H ₂ O] ⁻ [M-H-2H ₂ O-CO] ⁻	Ácido dihidroxipimar-15(16)en-óico	diterpeno pimarano	
P5130	10,4	349,1642 366,1905	[M+H] ⁺ [M+NH ₄] ⁺	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	1,1 1,6	331,1524 247,1311 229,1216 201,1263 183,1155 85,0279	[M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O] ⁺ [M+H-C ₄ H ₆ O ₃] ⁺ [M+H-H ₂ O-C ₄ H ₆ O ₃] ⁺ [M+H-H ₂ O-C ₄ H ₆ O ₃ -CO] ⁺ [M+H-2H ₂ O-C ₄ H ₆ O ₃ -CO] ⁺ C ₄ H ₅ O ₂ ⁺	-	-	3-hidroxi-metacrilóil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido / epoxi-metacrilóil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido	lactona sesquiterp.	
P2485	10,6	365,1874 382,2218	[M+H] ⁺ [M+NH ₄] ⁺	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	-2,7 1,6	347,1843 247,1311 229,1211 201,1274 183,1168 101,0599	[M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O] ⁺ [M+H-C ₅ H ₁₀ O ₃] ⁺ [M+H-H ₂ O-C ₅ H ₁₀ O ₃] ⁺ [M+H-H ₂ O-C ₅ H ₁₀ O ₃ -CO] ⁺ [M+H-2H ₂ O-C ₅ H ₁₀ O ₃ -CO] ⁺ C ₅ H ₉ O ₂ ⁺	-	-	hidroxi-isovaleril-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido	lactona sesquiterp.	
P1200	11,4	391,1756 408,2010	[M+H] ⁺ [M+NH ₄] ⁺	C ₂₁ H ₂₆ O ₇	-1,3 1,7	331,1521 229,1216 201,1274 183,1168 61,0274	[M+NH ₄ -NH ₃ -CH ₃ COO ₂ H] ⁺ [M+H-H ₂ O-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ [M+H-H ₂ O-C ₆ H ₁₀ O ₅ -CO] ⁺ [M+H-2H ₂ O-C ₆ H ₁₀ O ₅ -CO] ⁺ C ₂ H ₅ O ₂ ⁺	-	-	8(3-hidroxi-4acetato-isobutiril)zalanin / 3(3-hidroxi-4acetato-isobutiril)zalanin	lactona sesquiterp.	
N4356	10,6	515,1200 1031,2469	[M+H] ⁺ [2M+H] ⁺	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	-1,0 -0,6	-	-	353,0893 191,0575 179,0335 173,0480 135,0457	[M-H-Cafeoil] ⁻ [M-H-2Cafeoil] ⁻ C ₉ H ₇ O ₄ ⁻ [M-H-ácido cafeico] ⁻ [C ₉ H ₇ O ₄ -CO ₂] ⁻	Ácido dicafeoilquínico	ácido dicafeoilquínico	

Legenda: CL: Cadeia lateral; VAR.: Variável; obs.: observado; fragm.: fragmento

Tabela 57. Proposta de identidade dos metabólitos discriminantes adquiridos por GC-MS para o agrupamento das espécies de *Mikania*.

N°	RT (min)	m/z obs. Íons fragmentos	Espécies iônicas íons fragmentos	Proposta de identidade	Classe química
-	9,9	374 359 257 117 73	M ⁺⁺ [M ⁺⁺ -H ₃ C] ⁺ [M ⁺⁺ -OTMS-CO] ⁺ C ₄ H ₉ O ₂ Si ⁺ [C ₄ H ₉ O ₂ Si-CO ₂] ⁺	Ácido caurenóico TMS	diterpeno
GC2294	10,2	374 359 257 117 73	[M ⁺⁺ -CL] ⁺ [M ⁺⁺ -CL-H ₃ C] ⁺ [M ⁺⁺ -OTMS-CO] ⁺ C ₄ H ₉ O ₂ Si ⁺ [C ₄ H ₉ O ₂ Si-CO ₂] ⁺	Ácido cinamoilgrandiflorico TMS	diterpeno
GC64	3,7	569 554 537 307 217 319	M ⁺⁺ [M ⁺⁺ -H ₃ C] ⁺ [M ⁺⁺ -CH ₃ OH] ⁺⁺ [M ⁺⁺ -C ₁₀ H ₂₄ NO ₃ Si ₂] ⁺ [M ⁺⁺ -C ₁₀ H ₂₄ NO ₃ Si ₂ -TMSOH] ⁺ [M ⁺⁺ -C ₆ H ₁₄ NO ₂ Si ₂ -TMSOH] ⁺	Aldohexose derivado de metiloxima-trimetilsilil	carboidrato
GC247	3,8	569 554 537 307 217 319	M ⁺⁺ [M ⁺⁺ -H ₃ C] ⁺ [M ⁺⁺ -CH ₃ OH] ⁺⁺ [M ⁺⁺ -C ₁₀ H ₂₄ NO ₃ Si ₂] ⁺ [M ⁺⁺ -C ₁₀ H ₂₄ NO ₃ Si ₂ -TMSOH] ⁺ [M ⁺⁺ -C ₆ H ₁₄ NO ₂ Si ₂ -TMSOH] ⁺	Aldohexose derivado de metiloxima-trimetilsilil	carboidrato
GC373	32,8	361 204	[M ⁺⁺ -C ₁₈ H ₄₃ O ₆ Si ₄ -TMSOH] ⁺ C ₈ H ₂₀ O ₂ Si ₂ ⁺⁺	Dissacarídeo 8TMS	carboidrato
GC1048	47,5	361 204	[M ⁺⁺ -C ₁₈ H ₄₃ O ₆ Si ₄ -TMSOH] ⁺ C ₈ H ₂₀ O ₂ Si ₂ ⁺⁺	Dissacarídeo 8TMS	carboidrato

CL: Cadeia lateral, TMS: Trimetilsilil

Tabela 58. Atribuições aos deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ¹H evidenciados como discriminantes.

N°	δ (ppm)	Atribuição	Classe química
RMN162	6,21	acoplamento alílico entre os hidrogênios em C13 exometilênicos com H7 em C6 ou C8 γ-lactonas. ¹⁵¹	Lactona sesquiterpênica
RMN163	6,04	acoplamento alílico entre os hidrogênios em C13 exometilênicos com H7 em C6 ou C8 γ-lactonas. ¹⁵¹	Lactona sesquiterpênica
RMN202	4,44	hidrogênio localizado no carbono adjacente ao oxigênio do anel lactônico em LST ^{94,95,97}	Lactona sesquiterpênica
RMN166	4,28	hidrogênio ligado ao grupo hidroxil em carboidratos ⁹⁶	Carboidrato

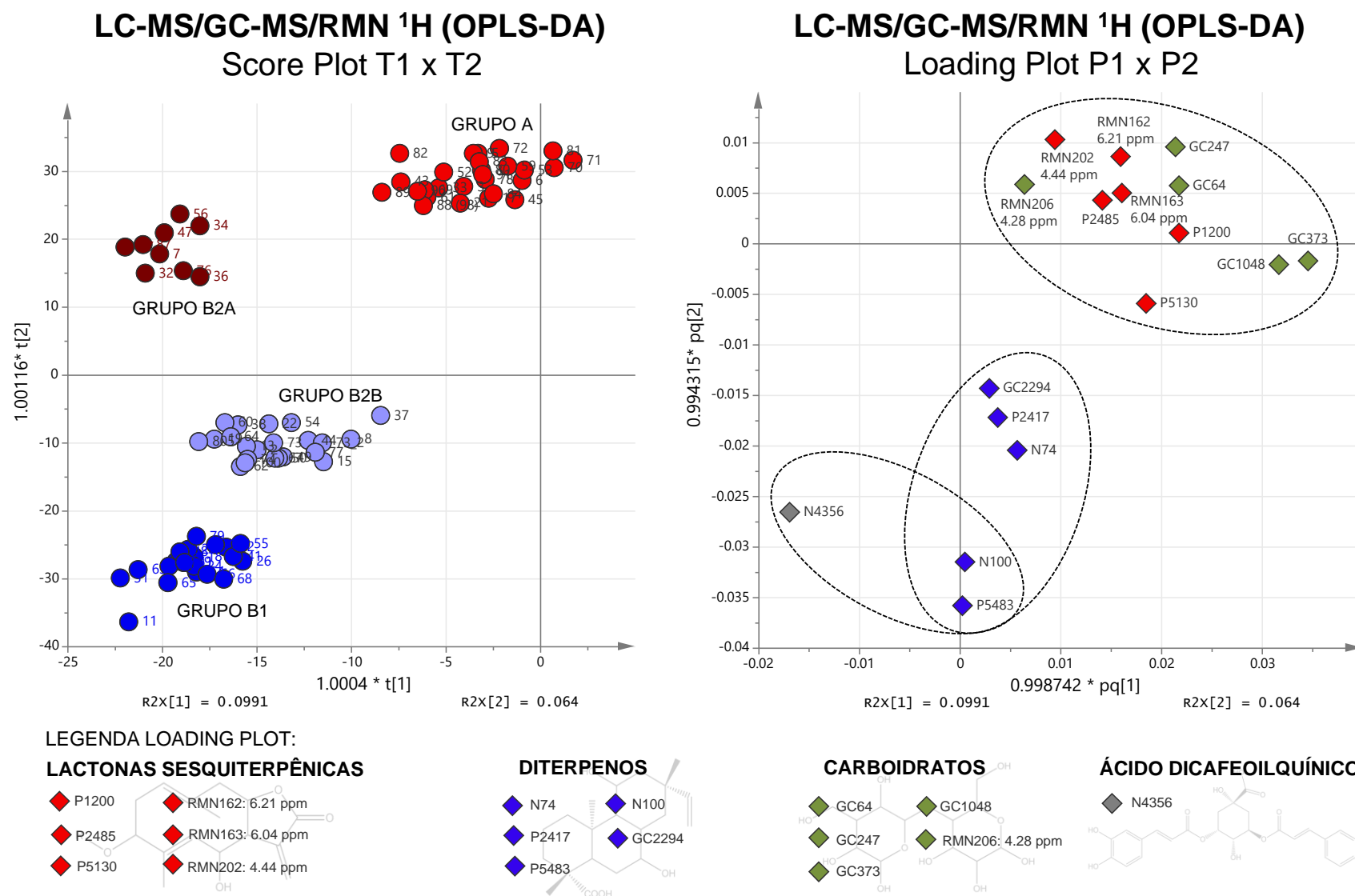
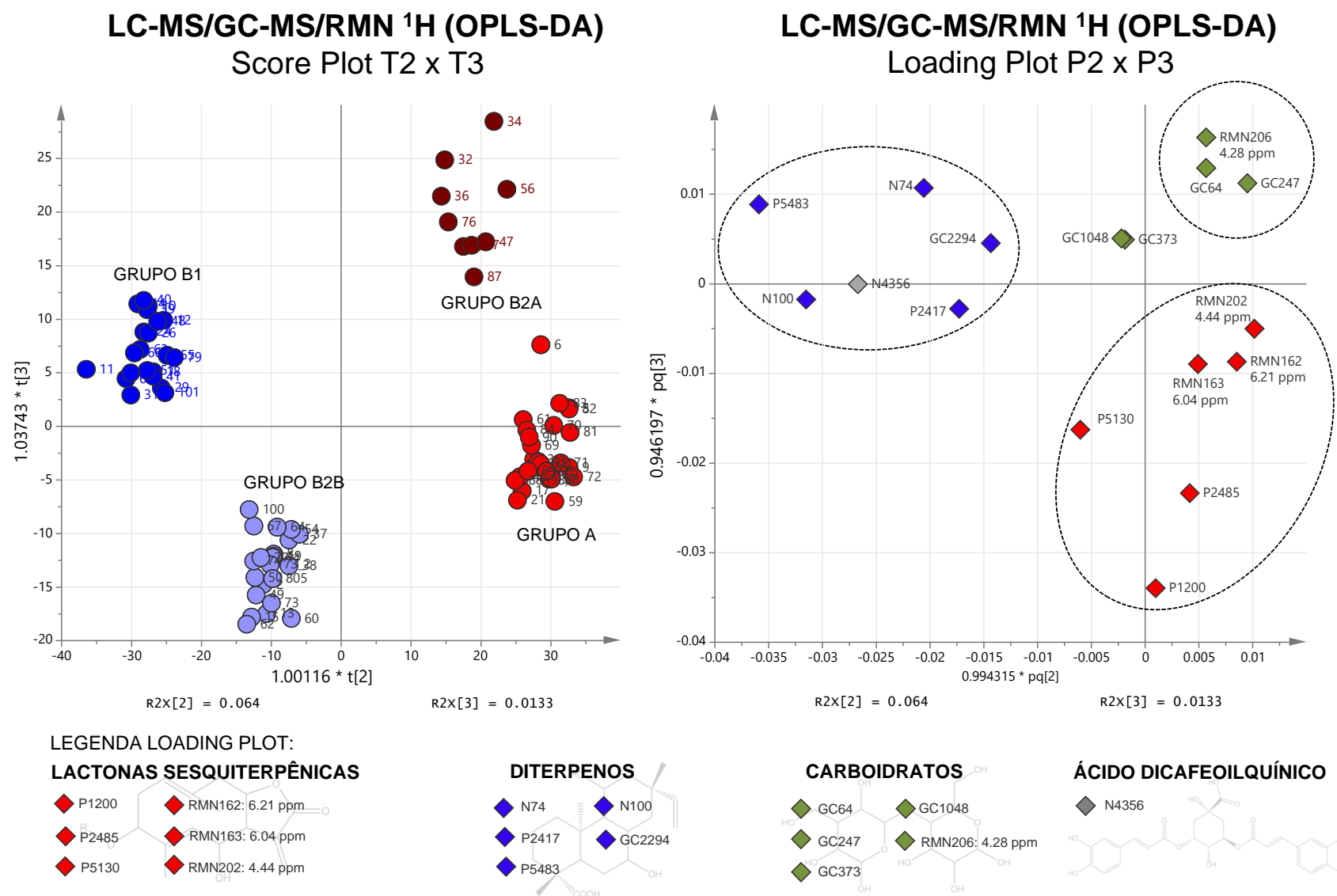
Figura 129. Estudos metabolômicos LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H - Plote dos escores (T1 x T2) e loadings (P1 x P2) (OPLS-DA).

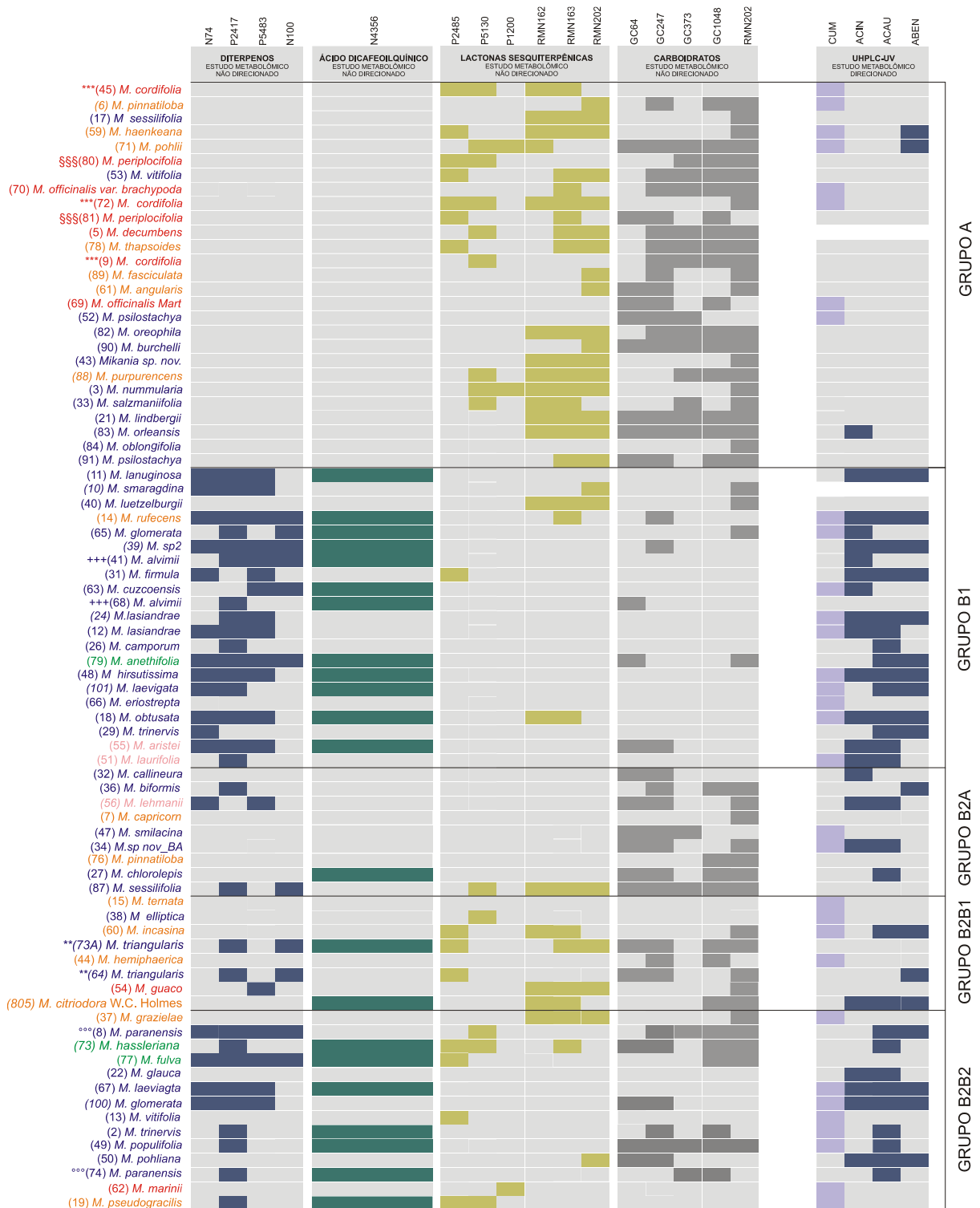
Figura 130. Estudos metabolômicos LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H - Plote dos escores (T2 x T3) e loadings (P2 x P3) (OPLS-DA).

e (82) *M. oreophila*. Baseado no dendograma obtido por HCA é clara a separação das amostras do subgênero *Cylindrolepis* dentro do subgrupo A2B, as quais possivelmente se agruparam no grupo A devido a não detecção de diterpenos e não detecção de ácido dicafeoilquínico, porém não sendo detectada LST.

Foi observado no plotes de *loading* (Figura 129 e Figura 130) e *heatmap* (Figura 131), que os diterpenos e ácido dicafeoilquínico são discriminantes e somente algumas espécies agrupadas no grupo B apresentam, podendo estes metabólitos serem considerados marcadores quimiotaxonômicos para diferenciar os grupos A e B. Os resultados dos estudos metabolômicos direcionados através da quantificação dos diterpenos ácido cinamoilgrandiflórico, ácido bezoilgrandiflórico e ácido caurenóico por LC-UV foram também considerados no *heatmap* (a direita) e foram usados para validar a hipótese de que os diterpenos possam ser considerados marcadores quimiotaxonômicos do grupo B, visto que foram praticamente detectados somente neste grupo, não sendo detectado nas amostra do grupo A, assim como os estudos metabolômicos não direcionados sugeriram. Além disso, o estudo direcionado por LC-UV em conjunto com análise da variável N74 obtida por LC-MS no estudo direcionado traz a evidência de que o ácido caurenóico não foi detectado em nenhuma amostra de *Mikania* do grupo A nem em baixas concentrações.

Avaliando os metabólitos discriminantes do grupo B através do plote de *loading* das C1 e C2 (Figura 129), foi observado que os ácidos diterpênicos e ácido dicafeoilquínico são detectados em maiores concentrações nos grupos B1 e B2B. Pelo gráfico de *loading* das C1 e C2, amostras do grupo B2A aparentam não conter os diterpenos discriminantes, porém pelo *heatmap*, foi observado que algumas espécies apresentam em menor concentração, sendo o ácido dicafeoilquínico detectado somente em uma amostra do grupo B2A. O grupo B2A apresenta espécies do subgênero *Mikania* e *Cylindrolepis* e também uma característica semelhante as amostras do grupo A, detecção de carboidratos. Esta observação pode ser feita avaliando-se o plote de *loading* das C2 e C3 (Figura 130), onde as variáveis adquiridas por GC-MS (GC64, GC247) e o deslocamento químico $\delta=4,28$ ppm (RMN206) relacionados aos carboidratos aparecem exatamente na região onde o grupo B2A se localiza no plote de escores das C2 e C3. A provável razão pela separação do grupo A e B2A é a não presença de lactonas sesquiterpênicas e a concentrações de baixa a média de alguns ácidos diterpênicos discriminantes no grupo B2A.

Figura 131. Heatmap dos metabólitos discriminantes e espécies de *Mikania* separadas por grupo.



LEGENDA COR DAS ESPÉCIES

- *Mikania* Subgênero *Mikania*
- M. subseção *Mikania*
- M. subseção *Angulatae*
- M. seção. *Thyrsigerae*
- M. seção *Summikania, Ecordatae, Hirsutissima, Cylindrolepis*
- M. seção *Fulvae*
- *Mikania* Subgênero *Cylindrolepis*

LEGENDA CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS

- ESTUDO METABOLÓMICO NÃO DIRECIONADO
- ESTUDO METABOLÓMICO DIRECIONADO
- Acima de 5%*
- Acima de 2,5%*
- Acima de 1%*
- Acima de 5%*
- Acima de 0,070% p/p**
- Acima de 0,001% p/p**

* Relativo ao maior valor de cada metabólito

** Quantificado com curva de calibração usando método validado

O grupo B1 e B2B dividem algumas semelhanças como alta concentração dos diterpenos discriminantes e ácido dicafeoilquínico. As amostras agrupadas no grupo B1 pertencem basicamente somente ao gênero *Cylindrolepis* e baseado no plote de *loading* da C2 e C3 (Figura 130) foi observada a presença das variáveis relacionadas aos diterpenos discriminantes e ácido dicafeoilquínico neste grupo. Avaliando-se o plote de *loading* da C1 e C2 (Figura 129), foi observado que a variável N4356 referente ao ácido dicafeoilquínico, apresenta-se mais a esquerda em direção da localização do grupo B1 no plote de escores, evidenciando esse metabólito como discriminante deste grupo. Fazendo uma correlação das evidências do plote de *loading* com as informações do *heatmap* foi observado claramente que a maioria das amostras do grupo B1 apresentam maiores concentrações dos diterpenos e ácido dicafeoilquínico em relação ao grupo B2B. Estas duas observações em conjunto com a quase nenhum sinal relacionado aos carboidratos no grupo B1 foram relacionadas como possíveis discriminantes para a separação dos grupos B2B e B1. Ainda avaliando o conteúdo metabólico do grupo B1 foi observada uma informação muito interessante pelo *heatmap* de que somente uma espécie do grupo B1 apresenta baixa concentração da lactona sesquiterpênica (LS) P1200, sendo que para todas as outras espécies, LST não foram detectadas por LC-MS, contribuindo para a distinção do grupo B1 do grupo B2B, o qual apresenta algumas amostras com concentrações médias de lactonas sesquiterpênicas.

Avaliando o agrupamento das espécies baseado somente nos dados de LC-MS, dois grandes grupos foram observados sendo que as espécies agrupadas no grupo A (Figura 132) são basicamente do subgênero *Cylindrolepis*. O agrupamento baseado somente nos dados de LC-MS basicamente evidenciou somente os diterpenos e ácido dicafeoilquínico como classificadores quimitaxonômicos evidenciando de forma mais enfática a semelhança das espécies do subgênero *Cylindrolepis* e *Mikania*. Baseado nos resultados obtidos pelo estudo metabolômico usando a fusão de dados de LC-MS, CG-MS e RMN de ^1H , foi observado que as amostras do subgênero *Cylindrolepis* apresentam maiores concentrações de diterpenos (Figura 131),

sendo esta classe de metabólitos bem detectadas por LC-MS. Pelas análises de LC-MS as LST também foram detectadas porém os resultados de RMN de ^1H foram decisivos para evidenciá-las como classificadores quimitaxonômicos, portanto a

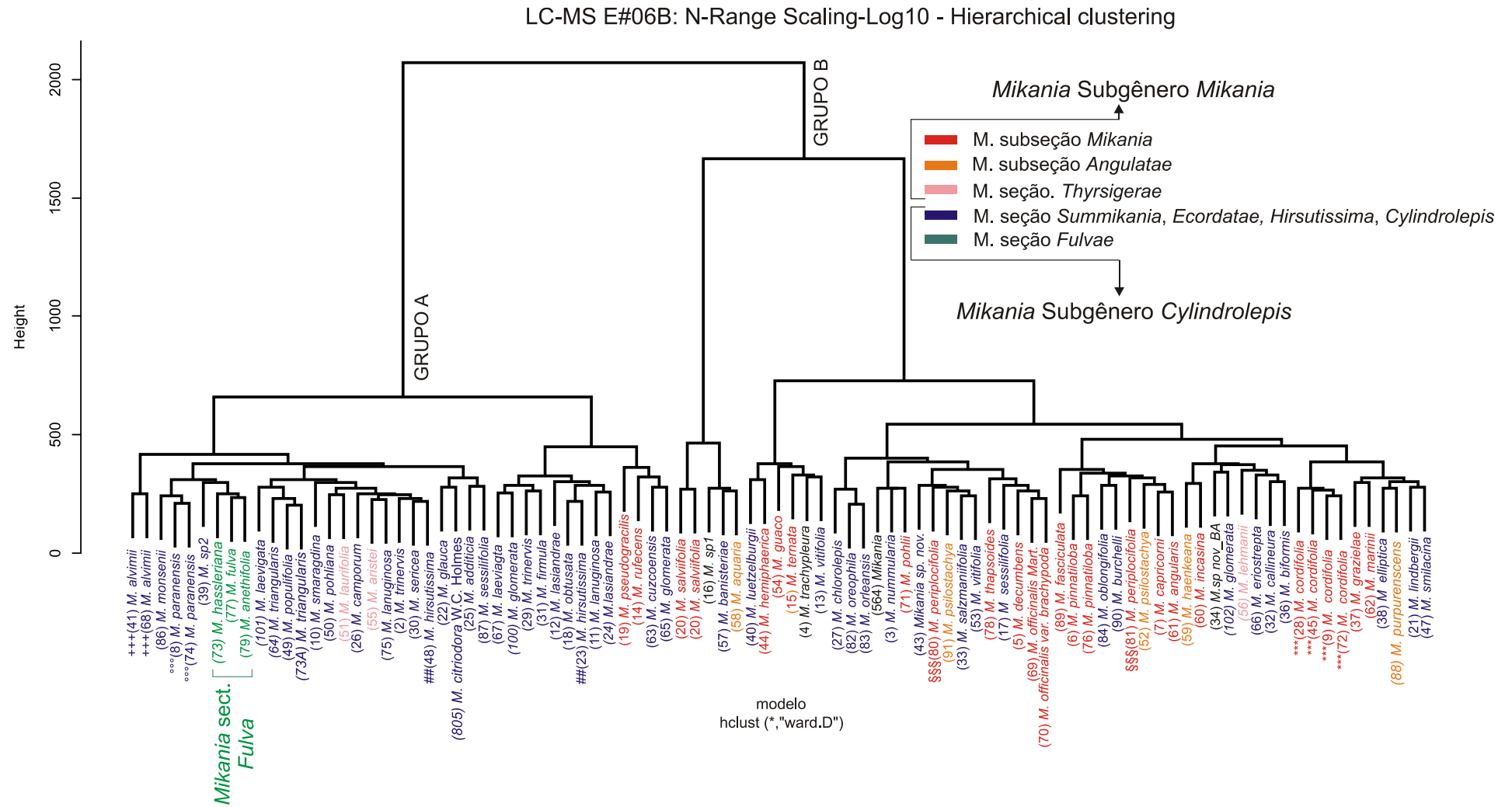
classificação quimiotaxômica resultante do estudo metabolômico usando-se LC-MS, CG-MS e RMN de ^1H contribuiu para evidenciar diferenças entre espécies que pelos estudos filogenéticos são da mesma seção. Um exemplo disso foi a semelhança metabólica observada para as três espécies consideradas da seção *Fulvae* pelos estudos filogenéticos (*M. anethifolia* - 79, *M. hasslerina* - 77 e *M. fulva* - 79) e que baseado no agrupamento observado somente com os dados de LC-MS (Figura 132) essas espécies se agruparam uma ao lado da outra pelo fato que somente os diterpenos e ácido dicafeoilquínico foram considerados metabólitos discriminantes. Baseado no agrupamento observado usando as três técnicas analíticas essas mesmas três espécies se localizaram todas no grupo B (assim como esperado pela filogenia) porém em subgrupos quimiotaxonômicos diferentes (Figura 131).

Para essas três espécies diterpenos foram detectados acima de 5% e ácido dicafeoilquínico acima de 2,5% porém somente para a espécie *M. anethifolia* (amostra 79) nenhuma LST foi detectada localizando-a no subgrupo B1 o qual tem como característica a não presença de LST. Já as amostras 73 – *M. hassleriana* e 77 – *M. fulva* apresentaram LST acima de 1% localizando-as no subgrupo B2B, separando as espécies para as quais se esperava um agrupamento baseado nos estudos filogenéticos.

Além de todas as observações quanto as diferenças do perfil metabólico para cada grupo quimiotaxonômico do gênero *Mikania*, foi observado o agrupamento de todas amostras que são da mesma espécie mesmo tendo sido coletadas em estados e/ou países diferentes e diferentes condições ambientais/estações do ano, com exceção de duas espécies (*M. laevigata* e *M. glomerata*). As amostras das seguintes espécies se agruparam dentro do mesmo subgrupo: 9/72/45: *M. cordifolia*, 41/68: *M. alvimmi*, 80/81: *M. periplocifolia*, 8/74: *M. paranensis*, 69/70 *M. officinalis*, 52/91 *M. psilostachya*, 73A/63 *M. triangularis*, 24/12 *M. lasiandrae*.

Pode-se inferir em princípio, que as substâncias significativas para o agrupamento dessas espécies estariam presentes independente do local e do período de coleta do estudo, sendo a concentração e ou produção desses metabólitos discriminantes não sendo afetado de forma significativa em resposta a diferentes estresses abiótico e bióticos que essas amostras possam ter sido expostas.

Figura 132. Dendrograma gerado por HCA a partir da matriz de dados adquiridos por LC-MS.



8.2. Aspectos relacionados a função biológica de alguns metabólitos em plantas e presente classificação quimiotaxonômica

Plantas produzem uma variedade de metabólitos os quais podem apresentar uma ampla diversidade de propriedades-físico química e funções biológicas. Muitos deles apresentam função biológica envolvida nos processos de crescimento e desenvolvimento da planta, fotossíntese, assimilação de nutrientes, respiração e diversos mecanismos de defesa.¹¹¹ Diversos metabólitos secundários estão envolvidos em diversos mecanismos de defesa contra patógenos e contra danos que possam ser causados devido a exposição a diferentes condições de estresses abióticos como radiação solar, temperatura, estresse hídrico entre outros.¹¹¹ Desta forma a classificação taxonômica baseado no conteúdo metabólico é um desafio e pode estar correlacionada a condições que a planta esteve exposta previamente a sua coleta para os estudos metabolômicos. Sendo assim, viu-se a importância em se delinear um paralelo entre os metabólitos discriminantes evidenciados nos estudos metabolômicos com as suas funções biológicas e possíveis impactos que estes podem sofrer em plantas expostas em diferentes condições ambientais, para acessar a robustez destes metabólitos como classificadores quimiotaxonômicos e dar o suporte para uma discussão quanto ao controle de qualidade de materiais botânicos dentro do gênero *Mikania*.

As lactonas sesquiterpênicas apresentam diversos papéis biológicos, sendo reguladores do crescimento da planta, podendo atuar na defesa contra ataque de herbívoros e microorganismos e como metabólitos alelopáticos.^{116,126} Além de apresentarem diversas atividades biológicas, as LST podem apresentar alta toxicidade geralmente associada a alquilação de glutatona e proteínas contendo resíduos de cisteína resultando em aumento do estresse oxidativo e distúrbio nas funções de proteínas, alquilação de DNA, indução ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) os quais desencadeiam danos oxidativos ao DNA, oxidação de lipídeos, proteínas etc.¹¹⁰ Lactonas sesquiterpênicas “alquilantes” apresentam sistema α,β -insaturado agindo como aceptores de Michael (eletrófilos), podendo ocorrer adição nucleofílica 1,4 (adição de Michael) na presença de nucleófilos como grupos sulfidril presente em várias proteínas.^{110,116} Lactonas sesquiterpênicas com a dupla exocíclica estão mais sujeitas ao ataque do nucleófilo devido a um menor impedimento estérico comparado a lactonas sesquiterpênicas com

a dupla endocíclica o que a princípio poderia apresentar uma toxicidade maior. Além disso, LST que não apresentam sistema α,β -insaturado podem também ser tóxicas através da inibição de enzimas transportadores de cálcio havendo o aumento da concentração desse cátion no citosol causando danos a mitocôndria e aumento da liberação de ROS.¹¹⁰ Algumas LST também foram consideradas antagonistas alostéricas do receptor GABA sendo neurotóxicas.¹¹⁰ Os estudos metabolômicos evidenciaram alguns metabólitos da classe das LST como discriminantes do agrupamento de duas classes quimiotaxonômicas: grupo A e grupo B2B, sendo que no grupo A os diterpenos não foram detectados ou estão em concentrações muito baixas e no grupo B2B a concentração de diterpenos é mais baixa comparada ao grupo B1. Esta observação pode evidenciar que para as amostras desses grupos a biosíntese de terpenóides esteja direcionada para a produção de LS podendo estas representarem metabólitos constitutivos de defesa das espécies destes grupo, porém a questão se mantém quanto a possibilidade de serem fitoalexinas e estarem sendo produzidas devido a um estímulo externo.

Diterpenos, assim com LS também apresentam papel importante na interação entre plantas e insetos apresentando propriedades inseticidas, anti-herbivoria, atuando também como reguladores do crescimento da planta (fitohormônios) e ação aleopática.^{125,127} Estudos do impacto da variação sazonal na produção de diterpenos do tipo caurano em espécies de *M. laevigata* e *M. glomerata* feito por Bertolucci *et al.* (2013) evidenciam uma variabilidade pequena na concentração de alguns ácidos diterpênicos (ácido cinamoilgrandiflórico, ácido benzoilgrandiflórico e ácido caurenóico) quando comparados com o impacto da variação sazonal na produção da cumarina.¹²² Nas espécies de *M. glomerata* foi observado variação de 0,75% a 1,2% do ácido caurenóico avaliando-se exicatas coletadas durante outono, inverno, primavera e verão, havendo maior concentração do diterpeno nas amostras coletadas no inverno e cultivadas em luz plena (sem sombra), sugerindo um ligeiro aumento na produção desse diterpeno nesta estação do ano. Nas espécies de *M. laevigata* o mesmo foi observado.¹²² Em contrapartida, estudos feito por Almeida, C. L. (2015) não evidenciaram variação significativa desses diterpenos nos estudos com plantas cultivadas em diferentes luminosidades impactando somente no aumento da concentração de derivados do ácido cafeoilquínico em luz plena.¹²¹ Estudos realizados por Almeida, C. L. (2015) expondo amostras das espécies de *M. glomerata* e *M. laevigata* a danos mecânicos e temperatura também não evidenciaram alteração

significativa na concentração de diterpenos.¹²¹ Devido ao fato de que muitos dos discriminantes quimiotaxonômicos evidenciados nos estudos metabolômicos são diterpenos, em conjunto com evidências de que possa não haver um impacto significativo na concentração de diterpenos em amostras de *Mikania* coletadas sob diferentes condições de estresse abiótico, pode-se inferir que há uma menor chance de que os agrupamentos das espécies de *Mikania* estejam correlacionados com condições ambientais e algum tipo de estresse. Além disso, evidência a robustez de se determinar os ácidos diterpênicos como discriminantes quimiotaxonômicos dos grupos A e B no gênero *Mikania*.

Compostos fenólicos como os ácidos clorogênicos (ex.: ácido dicafeoilquínico) e flavonóides apresentam um papel importante em diversos mecanismos de defesa em plantas, como por exemplo atuando na proteção solar.^{111,123} A radiação UV-B entre outras condições de estresse podem catalizar a geração de espécies reativas de oxigênio¹¹⁷ e estas podem causar diversos danos nos tecidos das plantas como oxidação de lipídeos polinsaturados da membrana celular, inativação de enzimas antioxidantes e danos oxidativos a proteínas e ácidos nucleicos, consequentemente danos ao DNA,¹¹⁷ prejudicando o crescimento da planta. Além disso, outros distúrbios metabólicos podem ser observados.^{113,112} Estudos apontam que plantas expostas em maior extensão à radiação solar apresentam um aumento significativo da síntese de compostos fenólicos como mecanismos de defesa pelo fato de agirem como “*radical-scavenger*”.^{117,112,119} Além do importante papel na proteção contra radiação UV, estudos apontam papel importante dos ácidos clorogênicos na defesa contra patógenos (ex.: fungos e bactérias) e herbívoros estando esses compostos envolvidos em diferentes mecanismos contra danos causados por estresses abióticos e bióticos.^{114,115 115,119} Estudos do impacto de diferentes condições de estresse abióticos na concentração de ácidos clorogênicos em espécies de *M. glomerata* e *M. laevigata* evidenciaram o aumento significativo na concentração de ácido dicafeoilquínico.¹²¹ Nos estudos metabolômicos do gênero *Mikania* vários compostos fenólicos como os flavonóides foram detectados em várias espécies de *Mikania* porém nenhum foi considerado como metabólito discriminante. O ácido decafeoilquínico foi evidenciado nos estudos metabolômicos como discriminante do grupo B1 e B2B, porém vê-se a importância de estudos com um maior número de réplicas biológicas e amostras expostas à diferentes tipos de estresses abióticos antes de se considerar este metabólito como classificador quimiotaxonômico. O mesmo questionamento seria

levantado caso flavonóides tivessem sido evidenciados como discriminantes: estaria o agrupamento observado correlacionado a alguma condição de estresse em que a planta possa ter sido exposta (ex: maior ou menor exposição a luz solar, variação da temperatura etc)?

Monossacarídeos e dissacarídeos também foram evidenciados como discriminantes nos estudos metabolômicos do gênero *Mikania*. Os carboidratos produzidos pela fotossíntese em plantas são bem conhecidos pelo seu papel essencial como fonte de produção energética e armazenamento energético¹²⁰, porém também são considerados autores de um complexo sistema de comunicação e sinalização, sistema este que coordena o metabolismo com o crescimento, desenvolvimento, senescência e resposta a mudanças ambientais e diferentes tipos de estresses que a planta possa estar exposta.^{118,120} Diversas condições de exposição da planta podem levar a depleção de açúcar, impactando nas rotas biosintéticas relacionadas ao crescimento e redirecionando vias para o metabolismo básico e respiração baseada no catabolismo de proteínas e lipídeos ao invés da glicólise, sendo vias biosintéticas que consomem muita energia inibidas.¹¹⁸ Carboidratos são essenciais quando as plantas estão expostas a estresses abióticos ou bióticos visto que são fonte energética necessária para a produção de metabólitos secundários envolvidos na defesa da planta como algumas fitoalexinas.¹²⁰ Estudos mostram que carboidratos também podem estar envolvidos no sistema de sinalização relacionado a imunidade das plantas^{118,120} Desta forma a presença de carboidratos em alguns grupos quimiotaconômicos como o grupo A e B2B pode refletir diversas situações em que as plantas coletadas estiveram expostas, porém uma observação interessante é a maior concentração de carboidratos nos grupos onde há maior concentração de LS e uma redução significativa nos grupos com maior concentração de diterpenos como o grupo B1.

8.3. Aspectos relacionados ao controle de qualidade da matéria-prima vegetal usada na produção do Guaco

Algumas espécies do gênero *Mikania* são usadas indistintamente na medicina popular, sendo conhecidas como guaco.²⁹ As espécies mais comumente utilizadas são *M. glomerata* e *M. laevigata* e devido à grande similaridade morfológica entre elas, estas têm sido empregadas com regularidade uma em substituição da outra. Em relação à situação regulatória do guaco no Brasil, a lista de registro simplificado de

fitoterápicos (IN 05/2008) apresenta registro para guaco sendo a cumarina considerada o marcador químico e *M. glomerata* como espécie a qual deve fornecer a matéria-prima vegetal para a produção do fitoterápico.⁷⁵ Em 2014, *M. laevigata* também foi considerada na lista de registro simplificado de fitoterápicos publicada pela IN 04/2014, trazendo a classificação do guaco como produto tradicional fitoterápico. Baseado na classificação filogenética realizado por Oliveira, C. (2015)⁸⁸ foi observado que as amostras das espécies *M. laevigata* e *M. glomerata* são muito semelhantes quanto aos marcadores plastidiais usados no estudo, sendo agrupadas uma ao lado da outra e pertencendo ao subgênero *Cylindrolepis* seção *Cylindrolepis*, além da alta semelhança morfológica. Baseado nos estudos quimiotaconômicos foi observado que as espécies *M. glomerata* e *M. laevigata* pertencem ao mesmo grupo B onde evidencia-se maior produção de diterpenos e ácido dicafeoilquinico. No entanto, as amostras 65 *M. glomerata* e 101 *M. laevigata* se agruparam no subgrupo B1 e as amostras (100) *M. glomerata* e (67) *M. laevigata* se agruparam uma ao lado da outra no subgrupo B2B2.

Como apresentado anteriormente a cumarina foi considerada marcador químico da *M. glomerata* pela Anvisa⁷⁵, sendo considerada o composto responsável pela atividade broncodilatadora do guaco.⁴¹ Baseado nos estudos metabólicos foi observado que a cumarina não é um metabólito discriminante para diferenciar as classes quimiotaconômicas em *Mikania*, no entanto alguns diterpenos foram evidenciados como discriminantes.

Estudos do impacto da variação sazonal na produção de diterpenos do tipo caurano e cumarina em espécies de *M. laevigata* e *M. glomerata* feito por Bertolucci *et al.* (2013) evidenciaram uma grande variabilidade na concentração de cumarina em amostras coletadas durante as quatro estações do ano.¹²² Nas amostras de *M. glomerata* a cumarina não foi detectada, no entanto nas amostras de *M. laevigata* foi observada a presença de cumarina variando de 0,04%, em amostras coletadas no inverno e cultivadas com 80% de sombrite, chegando a 0,94%, em amostras coletadas no verão cultivadas com 80% de sombrite.¹²² Baseado no estudos metabólicos, foi observado 0,56% de cumarina na espécie *M. laevigata* 67 (coletada em Ubatuba Outubro de 2013) e a amostra número 101 (coletada em São Paulo em Março de 2014) com 0,013% de cumarina, sendo que estas não se agruparam no mesmo subgrupo. A amostra da espécie *M. glomerata* número 65 apresentou 0,003% de

cumarina e amostra número 100 apresentou 0,23%. Baseado nos estudos metabólicos foi observada uma grande semelhança no conteúdo metabólico das espécies *M. glomerata* e *M. laevigata* porém diferenças na concentração de diterpenos e cumarina foram observados. Também não foi possível evidenciar nenhum possível marcador químico para diferenciar as duas espécies. Portanto este estudo dá o suporte para uma flexibilidade regulatória em relação ao uso de *M. gomerata* e *M. laevigata* na produção do guaco.

As metodologias de controle de qualidade sugeridas na monografia publicada na quarta edição da Farmacoéia Brasileira somente monitora a quantidade de cumarina porém não pode não garantir de fato a qualidade de forma abrangente do produto fitoterápico vendido no mercado, visto que a cumarina não é um marcador para autenticidade da *M. glomerata* e *M. laevigata* (espécies regulamentadas para uso na produção de guaco pela Anvisa) e nem mesmo é um classificador quimiotaxonômico, podendo inclusive não ser o único metabólito responsável pela atividade farmacológica do guaco o qual pode atuar de forma sinérgica com diterpenos do tipo caurano assim como brevemente discutido no capítulo 2. Baseado neste panorama, vê-se a importância de também incluir métodos analíticos para a quantificação de diterpenos do tipo caurano e determinar especificações adequadas para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal usada na produção do fitoterápico guaco. Também é de grande importância a inclusão de especificações e métodos analíticos limites para LS no controle de qualidade da matéria-prima vegetal. As LST podem ser tóxicas em determinadas concentrações e diversas espécies de *Mikania* mostraram conter LST em concentrações relativamente altas. Além disso, várias espécies são muito semelhantes morfológicamente dificultando sua autenticação. Outras espécies do gênero *Mikania* também são popularmente conhecidas como guaco e são usadas no tratamento de doenças respiratórias como *M. cordifolia* e *M. triangularis*²⁸, porém essas duas espécies apresentaram concentrações de lactonas sesquiterpênicas relativamente altas, o que evidencia ainda mais a importância da inclusão da avaliação da presença de LST no controle de qualidade do guaco para garantir a segurança da administração do fitoterápico em paralelo a condução de estudos toxicológicos para esses metabólitos. A avaliação de LST também poderia ser usada para evitar adulterações da matéria prima vegetal com espécies de *M. cordifolia* e *M. triangularis* ou qualquer outra espécie que tenha maior concentração de cumarina, porém apresenta LST.

A quinta edição da Farmacopéia Brasileira, que entrou em vigência no ano de 2011, suprimiu a monografia de guaco publicada na quarta edição. Desta forma, atualmente não existe especificações e metodologias oficiais para avaliação da qualidade do guaco vendido no mercado, mesmo sendo este um fitoterápico muito usado pela população e com o maior número de registros no país.

8.4. Discussão

O gênero *Mikania* representa um dos mais facilmente reconhecidos e uniformes gêneros da tribo Eupatorieae, pertencendo a família Asteraceae. No entanto, dificuldades na delimitação das espécies são observadas, devido à existência de vários complexos de espécies altamente polimórficas.¹⁰ Devido a este fato, várias propostas de classificação para as espécies deste gênero existem, como: Candolle (1836): sete seções³⁰, Baker (1876) três seções e quatro séries⁷²; Robinson (1922): cinco séries baseadas apenas nas sinflorescência⁷³; Barroso (1958): divisão em cinco seções utilizando como caracteres a forma da folha, hábito das espécies e o tipo de inflorescência⁷¹; Holmes (1996): duas seções baseando-se no padrão de maturação do capítulo e na localização das brácteas subinvolucrais.⁵⁸ As espécies do gênero *Mikania* apresentam estabilidade morfológica do capítulo, sendo esta característica usada na identificação morfológica das espécies, porém é observado grande variedade nos padrões de distribuição dos capítulos (sinflorescência), na forma das folhas, no formato das flores e na posição das brácteas subinvolucrais. Estas características foram utilizadas durante mais de dois séculos de estudos para a definição de grupos infragenéricos em *Mikania*.⁸⁸ O gênero foi contemplado recentemente com estudos filogenéticos,⁸⁸ porém um estudo quimiotaxonômico abrangente ainda não foi reportado.

O estudo metabolômico de 91 amostras de espécies de *Mikania* através de três técnicas analíticas ortogonais como LC-MS, GC-MS e RMN de ¹H, evidenciou claramente o agrupamento das espécies em dois grandes grupos baseado nas diferenças e semelhanças do conteúdo metabólico, refletindo em partes a filogenia. Os diterpenos foram considerados classificadores quimiotaxonômicos importantes para o entendimento da semelhança das espécies sendo a principal classe química responsável pela diferenciação do grupo A e grupo B. Nenhuma espécie presente no grupo A apresentou concentrações significativas dos diterpenos discriminantes (geralmente nem mesmo detectadas) sendo que esta observação, obtida a partir dos

estudos metabolômicos não direcionados, foi validada com o resultado dos estudos metabolômicos direcionados pela quantificação de três diterpenos caurânicos por LC-UV. Além disso, as LST também apresentaram papel muito importante na classificação quimiotaxonômica do gênero e em muitas espécies consideradas do subgênero *Mikania*, as LST foram detectadas.

Seaman, F. (1982) discute o uso das LST como marcadores taxonômicos na diferenciação de diversas tribos em Asteraceae, baseado na revisão do conteúdo de LST de várias espécies das tribos de Asteraceae,¹²⁸ podendo estas serem metabólitos chave na diferenciação infragenérica da família, no entanto ainda muito poucos dados estão disponíveis.¹²⁸ Outras revisões citam que aparentemente a diversidade química de LST possa estar interconectada com a especiação em Asteraceae e que essa classe química e seus diferentes tipos de esqueleto, têm sido usados como marcadores quimiosistemáticos em Asteraceae,^{116,126,128} sendo que a distribuição de LST pode ser explicada em termos de papel adaptativo na história evolutiva das espécies da família Asteraceae.^{116,126} Baseado na presente classificação quimiotaxonômica, algumas LST foram evidenciadas como discriminantes para a diferenciação dos grupos A e B, além de grupos B1/B2A do B2B. Basicamente espécies do grupo A apresentam concentrações relativas altas de LST, sendo elas espécies do subgênero *Mikania*, com exceção das espécies do subgênero *Cylindrolepis* que não apresentaram LST. Comparando o conteúdo metabólico adquirido por LC-MS com o conteúdo revelado pela fusão dos dados, foi observado que com a fusão dos dados das 3 técnicas, a presença dos sinais obtidos por RMN de ¹H direcionou as LST como classificadores, evidenciando melhor as espécies do subgênero *Mikania* no grupo A e um grupo misto de espécies com concentrações mais altas de LST e diterpenos no grupo B2B, além do grupo B1 e B2A o qual praticamente não apresentou LST. Desta forma, foi observado a importância do uso de dados obtidos por diferentes técnicas para se oferecer um suporte a classificação quimiotaxonômica e acesso a variabilidade do conteúdo metabólico das espécies estudadas. Usando somente os dados adquiridos por LC-MS basicamente somente os diterpenos e ácido dicafeoilquínico foram evidenciados como discriminantes.

Como brevemente discutido as LST foram evidenciadas como metabólitos característicos de diversas tribos na família Asteraceae, com ênfase nos esqueletos do tipo germacranolidos, eudesmanolidos e guaianolidos, porém em algumas tribos

esses metabólitos ocorrem raramente, como: *Astereae*, *Calenduleae*, *Senecioneae* e *Tageteae*.¹²⁸ No entanto, há tribos em que a classe de terpenóides em ênfase são diterpenos e triterpenos, como no caso da tribo *Astereae* a qual sintetiza um leque amplo de diterpenos biologicamente ativos ao invés de LST.¹²⁸ Estas observações corroboram com os resultados observados a partir do estudo metabolômico das espécies de *Mikania* discutido acima, havendo a formação clara de dois grande grupos A e B, um com ausência de diterpenos e outro com presença.

O ácido dicafeoilquínico também foi evidenciado como metabólito discriminante e somente as espécies do grupo B1 e B2B apresentaram este metabólitos em maiores concentrações, além de maiores concentrações de carboidratos no grupo A e B2. Tanto a abordagem não direcionada quanto direcionada evidenciou que a cumarina não é uma classificador taxonômico e nem mesmo um metabólito discriminante para a classificação quimiotaxonômica do gênero *Mikania*.

Algumas espécies consideradas pela filogenia como do subgênero *Cylindrolepis* se agruparam com espécies do subgênero *Mikania* no grupo A, provavelmente devido ao fato de não apresentarem os diterpenos discriminantes, porém não havendo a produção de LST. Um terceiro grupo (B2B) mostrou um perfil metabólico interessante havendo a produção tanto de diterpenos quanto de LST sendo agrupados tanto espécies do subgênero *Cylindrolepis* quanto *Mikania*.

A influência de diversos fatores suscetíveis de modular a resposta das plantas (consequentemente seu conteúdo metabólico), como diferentes estágios de desenvolvimento, interações com patógenos, alelopatia, estresses abiótico e fatores de nutrição, dificulta em partes os estudos da classificação quimiotaxonômica baseada em poucas réplicas biológicas de cada espécie.¹²⁰ Desta forma, o agrupamento das espécies pode estar correlacionado a alguma condição de estresse em que a planta possa ter sido exposta. Os diterpenos foram considerados a princípio classificadores quimiotaxonômicos robustos, pelo fato de estudos mostrarem uma baixa variação do seu conteúdo em espécies de *Mikania* expostas a diversos tipos de estresses abiótico e biótico. Esta observação também pode ter evidenciado uma maior consistência do agrupamento das espécies do subgênero *Cylindrolepis*, refletindo os estudos filogenéticos, porém não a nível de seção. Além disso, foi observado amostras diferentes da mesma espécie coletadas em locais diferentes, agrupando-se dentro do mesmo subgrupo evidenciando que os metabólitos discriminantes possam

não sofrer uma variação significativa baseada em diferentes condições de exposição da planta.

Além da aplicação dos estudos metabolômicos nos estudos de classificação quimiotaxonômica do gênero *Mikania*, o entendimento do conteúdo metabólico de várias espécies do gênero também reflete a possibilidade de melhor delineamento de estratégias de controle de qualidade para as espécies medicinais de *Mikania* usadas popularmente no tratamento de diversas afecções. Como já mencionado, algumas espécies do gênero *Mikania* são usadas indistintamente na medicina popular, porém existem divergências em relação a situação regulatória do guaco no Brasil. A lista de registro simplificado de fitoterápicos (IN 05/2008) apresenta registro para guaco (marcador: cumarina, espécie *M. glomerata*)⁷⁵; em 2010, o guaco entrou na lista de Assistência Farmacêutica na Atenção Básica à Saúde e em 2011 foram incluídas as preparações xarope e tintura usando-se *M. laevigata* e *M. glomerata* no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira.⁷⁴ Em seguida, o guaco foi incluído na relação de medicamentos essenciais (RENAME)⁷⁶ em 2012, usando-se *M. glomerata*, sendo distribuído gratuitamente nas unidades básicas de saúde. Estudos apontam ausência de cumarina em *M. glomerata*, sendo esta substância tida como uma das responsáveis pela atividade farmacológica do guaco.²⁹ Com base na proposta de classificação quimiotaxonômica apresentada neste trabalho, foi observado a grande semelhança do conteúdo metabólico das espécies *M. glomerata* e *M. laevigata*. Além disso foi observado que a cumarina não é um marcador quimiotaxonômico e nem mesmo um metabólito discriminante, evidenciando uma necessidade de se encontrar outras metodologias para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal em paralelo a quantificação somente da cumarina. Esse trabalho sugere a avaliação do conteúdo de diterpenos do tipo caurano, além de inclusão de método limite para a avaliação da presença de LST em matérias-prima vegetais usadas na produção do guaco. Baseado neste trabalho, LST não foram detectadas nas amostras de *M. laevigata* e *M. glomerata* porém foram encontradas em concentrações relativamente alta nas espécies *M. triangularis* e *M. cordifolia* as quais também são espécies com relatos de uso na medicina popular. A inclusão de metodologia para avaliação da presença de LST também poderia ser uma estratégia de avaliação de adulterações de matérias-prima vegetais com outras espécies de plantas, visto que somente a *M. glomerata* e *M. laevigata* são consideradas para a produção do guaco pela Anvisa. Além disso, a presença de LST pode representar risco a segurança da administração

de extratos vegetais visto que LST podem apresentar certa toxicidade devendo ser especificados critérios de aceitação máximos para a presença de LST e estudos toxicológicos realizados para garantir a segurança do uso das matéria-prima vegetal de origem das folhas de espécies de *Mikania* para a produção do fitoterápico.

9. Conclusões

A classificação quimiotaxonômica do gênero *Mikania* foi proposta com sucesso usando-se a abordagem metabolômica não direcionada por LC-MS, GC-MS e RMN de ^1H . A estratégia de combinar diferentes técnicas analíticas ortogonais para o estudo do conteúdo metabólico das espécies de *Mikania* demonstrou ser uma ferramenta muito poderosa e valiosa para fornecer informação complementar e ortogonal entre as técnicas. A fusão dos dados adquiridos pelas três técnicas refletiu a informação biológica das espécies de *Mikania* de forma abrangente, contribuindo de fato para o alcance do objetivo desafiador dos estudos metabolômicos de abordagem não direcionada de forma mais genuína possível.

Foi proposto quatro classes quimiotaxonômica para o gênero *Mikania*, os quais refletiram em partes os estudos filogenéticos. Doze metabólitos foram evidenciados como discriminantes, revelando a importância dos diterpenos e lactonas sesquiterpênicas como possíveis classificadores quimiotaxonômicos do gênero. Em paralelo, foi realizada uma avaliação crítica de quais etapas envolvidas no fluxo dos estudos metabolômicos poderiam afetar a qualidade e confiabilidade do estudo, resultando na determinação de parâmetros de validação e critérios de aceitação os quais auxiliaram na validação da metodologia empregada e da classificação quimiotaxonômica. Cinco etapas foram identificadas como críticas as quais foram validadas, sendo elas: preparo de amostra, metodologia analítica, processamento de dados brutos, análises multivariadas e proposta de identificação dos metabólitos.

A validação dos métodos de processamento dos dados brutos foi validada evidenciando o impacto do uso de diferentes métodos de pré-processamento, sendo esta etapa identificada como uma das mais críticas em estudos metabolômicos. Concluiu-se que a sequência de métodos de pré-processamentos deve ser feita caso-a-caso para cada matriz de dados em particular e a variabilidade do uso de diferentes métodos deve ser entendida para direcionar a escolha do método mais adequado. Além disso, a etapa de proposta de identificação dos metabólitos discriminantes também foi evidenciada como etapa crítica e como uma das mais desafiadoras dentro do fluxo dos estudos metabolômicos para evitar identificações falso-positivas. Esta etapa foi validada baseada em evidências que suportam a proposta de identificação dos metabólitos discriminantes e com a discussão sobre as limitações de identificação e boas práticas de aquisição e processamento de dados espectrais.

Este trabalho também abordou o uso do estudo metabolômico direcionado para a quantificação por LC-UV de cinco substâncias que apresentam papel importante relacionado as atividades farmacológicas de algumas espécies medicinais do gênero *Mikania* (ACAU, ACIN, ABEN, CUM e AHC), contribuindo para a compreensão em maior extensão do conteúdo metabólico das espécies do gênero, além de servir como ferramenta de validação e suporte para o estudo quimiotaxonômico do gênero. Este estudo também forneceu um suporte para uma proposta mais robusta de controle de qualidade da matéria-prima vegetal usado na produção do guaco, discutindo sobre a autenticação de matérias-prima vegetais, identificação de adulterações de material botânico e possibilidade de presença de metabólitos possivelmente tóxicos.

Desta forma conclui-se que o fluxo de metodologia apresentada neste trabalho foi validada e conduzida com sucesso fornecendo resultados robustos e confiáveis para dar o suporte adequado a proposta de classificação quimiotaxonômica do gênero *Mikania* e evidenciar a aplicação da abordagem metabolômica para se propor metodologias de controle de qualidade mais adequadas para materiais botânicos.

Referências

1. VERPOORTE, R., CHOI Y.H., KIM H.K. 2005. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. *J. Ethnopharmacol.* 100:53.
2. Villas-Bôas, S.G., Gombert, A.K. 2006. Análise do metaboloma: Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* ano IX - nº36. p. 58-69.
3. Krastanov, A. 2010. Metabolomics: The state of art. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 24(1), 1537-1543.
4. Shyur, L.F., Yang, N.S. 2008. Metabolomics for phytomedicine research and drug development. *Current Opinion in Chemical Biology.* 12:66–71.
5. GASPARETTO, J. C. et al. *Mikania glomerata Spreng e M. Laevigata Sch Bip. Ex Baker*, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos. Químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 4, p. 627–640, 2010.
6. Judd, W.S., Stevens, P.F., Campbell, C.S., Kellogg E.A. 1999. *Plant systematic: a phylogenetic approach*. 3rd Edition.
7. Nakajima, J. et al. 2013. Asteraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB101581>>. Acesso em: 4 Dez. 2013.
8. Robinson, H., E. Schilling, J. L. Panero. 2009. Eupatorieae in Systematics, evolution and biogeography of Compositae, eds. V.A. Funk, A. Susanna, T. F. Stuessy, and R. J. Bayer. Vienna: IAPT. p. 731–744.
9. Ritter, M.R. et al. 2013. *Mikania* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5344>>. Acesso em: 4 Dez. 2013.
10. King, R. M.; Robinson, H. 1987. The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). In: *Monographs in Systematic Botany*. Missouri Botanical Garden, v.22, p.419.

-
11. Fiehn, O. et al. 2002. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* 18, 1157-1161.
 12. Hall, R., Beale, M., Fiehn, O., Hardy, N., Sumner, L., Bino, R. 2002. Plant Metabolomics: The Missing Link in Functional Genomics Strategies. *The Plant Cell*, Vol. 14, 1437.
 13. Frank, R., Hargreaves, R. 2003. Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 566–580.
 14. Katajamaa, M., Orešič, M. 2007. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J. Chromatogr. A*, 1158, 318-328.
 15. Trygg, J., Holmes, E., Lundstedt, T. 2007. Chemometrics in metabolomics. *J. Proteome Res.* 6:469.
 16. Villas-Bôas, S.G., Mas, S., Åkesson, J.S., Nielsen, J. 2005. Mass spectrometry in metaboloma analysis. *Mass Spectrom. Rev.* 24:613.
 17. Czelusniak, K.E., Brocco, A., Pereira, D.F., Freitas, G.B.L. 2012. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata Sprengel* e *Mikania laevigata Schulyz Bip. ex Baker*. *Rev. bras. plantas med.* vol.14, n.2, pp. 400-409.
 18. Oliveira, F., Alisue, G., Akisue, M.K. 1998. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, 1998. p.412.
 19. Pedroso, A.P.D., Santos, S.C., Steil, A.A., Deschamps, F., Barison, A., Campos, F., Biavatti, M.W. 2008. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. *Rev Bras Farmacogn* 18: 63-69.
 20. Santos, S.C., Krueger, C.L., Steil, A.A., Krueger, M.R., Biavati, M.W., Wisniewski-Junior, A. 2006. LC characterization of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. *Planta Med* 72:679-684.
 21. Fiehn, O. 2002. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48: 155-171.
-

-
22. Kooke, R., Keurentjes, J.J.B. 2012. Multi-dimensional regulation of metabolic networks shaping plant development and performance. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 63, No. 9, pp. 3353–3365.
 23. Glauser, G., et al. 2013. Ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry for plant metabolomics: A systematic comparison of high-resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers., *J. Chromatogr. A*. 1292: 151– 159.
 24. Xue, S.Y., et al. 2012. Metabolic fingerprinting investigation of *Tussilago farfara* L. by GC-MS and multivariate data analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*. 41, 6-12.
 25. Cevallos-Cevallos, J.M., et al. 2009. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20, 557 - 566.
 26. Khakimov B., et al. 2012. Plant metabolomics: Resolution and quantification of elusive peaks in liquid chromatography-mass spectrometry profiles of complex plant extracts using multi-way decomposition methods. *J. Chromatogr. A*. 1266, 84-94.
 27. Ric CH De Vos, Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J.J.B., Bino, R.J., Hall R.D. 2007. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*. Vol.2. N.4: 778-791.
 28. Rufatto, L.C., et al. 2012. Genus *Mikania*: chemical composition and phytotherapeutical activity. *Rev Bras. de Farmacogn.* vol.22, n.6, PP. 1384-1403.
 29. Bertolucci, S.K.V., et al. 2009. Development and validation of an RP-HPLC Method for quantification of Cinnamic Acid Derivatives and Kaurane-Type Diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. *Planta Med.* 75:280-285.
 30. Candolle, A.P. 1836. *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*. Paris: Treuttel et Wurtz. vol.5, p. 103-211.
 31. Bertolucci, S.K.V., et al. 2013. Isolation and HPLC quantitation of kaurane-type diterpenes and cinnamic acid derivatives of long-term stored leaves of *Mikania*

-
- laevigata* and *Mikania glomerata*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, vol.85, n. 2, ISSN 0001-3765.
32. Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, A., Pettersen, J., Bergman, R. 1998. Experimental design and optimization, *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* 42:3–40.
33. Teófilo, R.F., Ferreira, M.M.C. 2006. Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para cálculos de planejamentos. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 2, 338-350.
34. Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. 2001. Como fazer experimentos : pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, SP : Editora da Unicamp. 251-286.
35. Naz, S., et al. 2014. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Chromatogr. A*, in press.
36. Ribani, et al. 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, 771-780.
37. US FDA, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001.
38. Gráfico de seletividade de colunas de fase reversa. Waters. Disponível em:http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10048475&locale=de_DE. Acesso em: 11 Jul. 2014.
39. Christensen, R. 1996. *Analysis of Variance, Design, and Regression: Applied Statistical Methods*. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, FL.
40. observ. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017 . Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.
41. Hoult, J.R.S., Paya, M. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *Gen.Pharmacol.* 27:713-722.
42. Ramanitrahambola, D., Rakotondramanana, D.A., Rasoanaivo, P., Randriantsoa, A., Ratsimamanga, S., Palazzino, G., Galeffi, C., Nicoletti, M. 2005. Bronchodilator activity of *Phymatodes scolopendria* (Burm.)ching and its bioactive constituent. *J. Ethnopharmacol.* 102:400-407.
-

-
43. Alves, C.F., Alves, V.B.F., de Assis, I.P., Clemente-Napimoga, J.T., Uber-Bucek, E., Dal-Secco, D., Cunha, F.Q., Rehder, V.L.G., Napimoga, M.H. 2009. Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. *J. Pharm. Pharmacol.* 61:1097-1104.
 44. Choi, R.J., Shin, E.M., Jung, H.A., Choi, J.S., Kim, Y.S. 2011. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Phytomedicine* 18:677-682.
 45. Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., Pizzariello, A. 2007. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential *Food Chem.* 100:1481-1489.
 46. Stanikunaite, R., Khan, S.I., Trappe, J.M., Ross, S.A. 2009. Cyclooxygenase-2 inhibitory and antioxidant compounds from the truffle *Elaphomyces granulatus*. *Phytother. Res.* 23:575-578.
 47. Santos, S.C., Krueger, C.L., Steil, A.A., Krueger, M.R., Biavatti, M.W., Wisniewski A.J. 2006. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. *Planta Med.* 72:679-684.
 48. MOURA, R.S., et al. 2002. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. *J Pharm Pharmacol.* 54: 249–56
 49. AMBROSIO, S.R., TIRAPELLI, C.R., COSTA, F.B., OLIVEIRA, A.M. 2006. Kaurane and pimarane-type diterpenes from *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. *Life Sci.* 79: 925–33
 50. LEITE, M.G.R., et al. 1993. Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (anador) e *Torresea cearensis* (cumaru). *Rev Bras Farm* 74: 12-15.
 51. United States Pharmacopeia. 2014. USP37-NF32 Rockville: United States Pharmacopeial Convention. General Chapter USP37 <621> Chromatography.
-

-
52. MILMAN, B. L. 2005. Identification of chemical compounds. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 24, No. 6.
 53. SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. 1991. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
 54. CASOTI, R., et al. 2013. Experimental design to optimize Baccharis sample extraction in metabolomic studies, in: 4th Brazilian Conference on Natural Products (4th BCNP) and the XXX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXX RESEM). SBQ, Natal, Brazil, p. PS-0216.
 55. United States Pharmacopeia. Medicines Compendium: United States Pharmacopeial Convention, 2014. General Chapter <10> Assessing Validation Parameters for Reference and Linearity and Range Acceptable Procedures-Guideline for Donors/Instructions for Staff.
 56. United States Pharmacopeia. 2014. USP37-NF32 Rockville: United States Pharmacopeial Convention. General Chapter USP37 <197K> Spectrometric identification.
 57. SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH J.L. 1997. Practical HPLC method development, 2nd edition, Wiley, pp.210-211.
 58. HOLMES, W.C. 1996. A Proposed sectional classification for Mikania (Eupatoriae). In D.J. Hind, H.J Beentjee (eds): Compositae: Systematics. Proceedings of the international Compositae Conference, Kew (1994), Vol.1, Royal Botanic Gardens, Kew, London, 621-6.
 59. GASPARETTO, J.C., FRANCISCO, T.M.G., PONTAROLO, R. 2013. Chemical constituents of *Mikania glomerata* Spreng and *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 7(13), pp.753-765:
 60. LACY, A., O'KENNEDY, R. 2004. Studies on coumarins and coumarin related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. Curr. Pharm. Des. 10:3797-3811.

-
61. NASCIMENTO, A.M., OLIVEIRA, D.C.R. 2001. Kaurane diterpenes and other chemical constituents from *Mikania stipulaceae* (M. Vahl) Willd. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 12, n. 4, p. 552-555.
 62. PAVIA, D.L., LAMPMAN, G. M., Kriz, G. S. 2010. *Introduction to spectroscopy*. 4. ed. Washington: Brooks/Cole.
 63. VAN DER BERG, R. et al. 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*.7:142
 64. WESTAD, F., MARINI, F. 2015. Validation of chemometric models e A tutorial. *Analytica Chimica Acta* 893:14-24.
 65. KIND, T., FIEHN, O. 2010. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal Rev.* 2:23-60.
 66. KIND, T., FIEHN, O. 2007. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*. 8:105.
 67. FIEHN, O. et al. 2008. Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. *The Plant Journal*. 53, 691–704.
 68. SUMNER, L.W. et al. 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3, 211–221.
 69. HERZ, W. 1986. Constituents of *Mikania* Species. *New Trends in Natural Products Chemistry*, v.26, p.143-154.
 70. HERZ, W. 1998. Terpenoid chemistry of *Mikania* Species. *Journal of the Chemical Society*, v.75, n. 10 - 12, p. 559-564.
 71. BARROSO, G. M. 1958. *Mikaniae do Brasil*. Rio de Janeiro, *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, v.16.
 72. BAKER, J.G. 1876. *Mikania*. In C.F.P. MARTIUS (ed.) *Flora brasiliensis*. Frid. Fleischer, Leipzig, vol. 6,pars 2, p. 217–271.
 73. ROBINSON, B.L. 1922. The *Mikania* of Northern and Western South America. *Contr. Gray Herb.* 64: 21-116.
-

-
74. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. p. 43-44.
 75. IN 05/2008. Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado. 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. p. 43-44.
 76. RENAME 2012. Portaria Portaria MS/GM nº 533. Ministério da Saúde.
 77. NETO, A.J.S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica* Vol.2, N.1, 71-81, 2010. Instituto Nacional de Cromatografia.
 78. Derivatization Reagents For Selective Response and Detection in Complex Matrices. Sigma-Aldrich.
 79. KOPKA, J. Current Challenges and developments in GC-MS based metabolite profiling technology. *Journal of Biotechnology* 124 (2006) 312-322.
 80. GULLBERG, J. et al. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization fo *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomics studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 331 (2004) 283-295.
 81. Why Derivatize? Improve GC Separations with Derivatization By Kristi Sellers, Innovations Chemist. RESTEK.
 82. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis Francis Orata, Masinde Muliro University of Science and Technology, Kenya.
 83. FIEHN, O. Metabolomics by Gas Chromatography – Mass Spectrometry: Combined Targeted and Intareted Profiling. 2016. *Curr. Protocol Mol. Biol.* 114:30.4.1-30.4.32. 2016.
 84. FIEHN, O. et.al. Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. *Plant J.*, 53(4):691-704. 2008.
 85. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. GUIA nº 10, versão 1, de 30 de agosto de 2017. GUIA PARA TRATAMENTO ESTATÍSTICO DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA. 2017.

-
86. GUJARATI, D. "Use of dummy variables in testing for equality between sets of coefficients in linear regressions: a generalization." *The American Statistician*. Washington, v. 24, n. 5, p. 18-22, Dec. 1970a.
87. TIKUNOV, Y.M., et al. MSCLust: a tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data . *Metabolomics*, 8:714-718, 2012.
88. Caetano Troncoso Oliveira. Sistemática de *Mikania* Willd. (Eupatorieae - Asteraceae). Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Biociências São Paulo. 2015.
89. BARRERO, A.F., et al. Preparation, stereochemistry and cytotoxic activity of the melampolides from *Mikania minima*. *J Nat Prod* 63: 305-307, 2000.
90. CATALÁN, C.A.N. et al. Cis, cis-germacranolides and melampolides from *Mikania thapsoides*. *J Nat Prod* 66: 949-953, 2003.
91. BARDÓN, A., et al. 15-Norguaianolides and germacranolides from *Mikania mendocina*. *Phytochemistry* 41: 845-849, 1996.
92. MCLAFFERTY, F.W., TURECEK, F. Interpretation of mass spectra. 4th edition University Science Books, Mill Valley, California, 1993.
93. FURUHASHI, T. et al. Fragmentation patterns of methyloxime-trimethylsilyl derivatives of constitutive mono- and disaccharide isomers analyzed by chromatography/field ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29, 238-246, 2015.
94. STANEVA, J. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Quantitative analysis of sesquiterpene lactones in extract of *Arnica montana* L . by H NMR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 54, n. 1, p. 94–99, 2011.
95. CHAVES, J. S., DE OLIVEIRA, D. C. R. Sesquiterpene Lactones and other Chemical Constituents of *Mikania hoehnei* R. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 5, p. 734–737, 2003.
96. KIM, H.K., CHOI, Y.H., VERPOORTE R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*. Vol.5 N.3. 2010.
-

-
97. CASTRO, V.; JAKUPOVIC, J.; F., B. Sesquiterpene lactones from *Mikania* species. *Phytochemistry*, v. 25, n. 7, p. 1750–1752, 1986.
 98. SÜLSEN, V.P.; MARZINO V.S. Sesquiterpene Lactones: Advances in their Chemistry and Biological Aspects. Springer 2018. Chapter 1: Page 5-9. 2018.
 99. DEMARQUE, D. P. et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.*, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.
 100. DAN, G. et al. Identification of sugars from *Silene Albae* heba using GC-MS technique. 2011. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, Vol. 73, Iss. 2.
 101. KIND, T.; FIEHN, O. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions : Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. v. 10, p. 1–10, 2006.
 102. KIND, T.; FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical Reviews*, v. 2, n. 1, p. 23–60, 2010.
 103. KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New advances in separation science for metabolomics: Resolving chemical diversity in a post-genomic era. *Chemical Reviews*, v. 113, n. 4, p. 2437–2468, 2013.
 104. MURRAY, K. K. et al. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)*. v. 85, n. 7, p. 1515–1609, 2013.
 105. XIAO, J. F.; ZHOU, B.; RESSOM, H. W. Metabolite identification and quantitation in LC-MS / MS-based metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 32, p. 1–14, 2012.
 106. Dolan J.W. Injection Problems. *LC Troubleshooting, LC–GC Volume 14*. 1996.
 107. Yi-Zeng Lianga*, Peishan Xieb, Kelvin Chanc, Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, 812 (2004) 53–70.
 108. DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 26, n. 1, p. 51–78, 2007.
 109. GLAUSER, G. et al. Ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry for plant metabolomics: A systematic comparison of high-
-

-
- resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers. *Journal of Chromatography A*, v. 1292, p. 151–159, 2013.
110. AMORIM, M. H. R. et al. Sesquiterpene lactones : Adverse health effects and toxicity mechanisms. v. 8444, n. 7, p. 559–579, 2013.
111. MAZID, R. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. v. 3, n. 2, p. 232–249, 2011.
112. DENG, Y.; LU, S. *Critical Reviews in Plant Sciences Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants*. v. 2689, 2017.
113. FROHNMEYER, H.; STAIGER, D. Update on Ultraviolet-B Light Responses Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants . Balancing Damage and Protection 1. v. 133, n. December, p. 1420–1428, 2003.
114. LALLEMAND, L. A. et al. A Structural Basis for the Biosynthesis of the Major Chlorogenic Acids Found in Coffee 1 [W][OA]. v. 160, n. September, p. 249–260, 2012.
115. LOZOVAYA, V. V et al. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani* >. v. 42, p. 671–679, 2004.
116. PADILLA-GONZALEZ, G. F.; ANTUNES, F. *Critical Reviews in Plant Sciences Sesquiterpene Lactones : More Than Protective Plant Compounds With High Toxicity Sesquiterpene Lactones : More Than Protective Plant Compounds With High*. v. 2689, n. February, 2016.
117. POSMYK, M. M.; KONTEK, R.; JANAS, K. M. Ecotoxicology and Environmental Safety Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress \$. v. 72, p. 596–602, 2009.
118. ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar Sensing and Signaling in Plants : Conserved and Novel Mechanisms. p. 675–712, 2006.
119. SAVIRANTA, N. M. M. et al. Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium pratense* L .) induced by exposure to moderately elevated ozone. *Environmental Pollution*, v. 158, n. 2, p. 440–446, 2010.
120. TROUVELOT, S. et al. Carbohydrates in plant immunity and plant protection : roles and potential application as foliar sprays. v. 5, n. November, p. 1–14, 2014.
-

-
121. ALMEIDA, C. L. Metabólitos secundários de duas espécies de Guaco (*Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz) cultivadas sob condições variadas. 2015. Tese de mestrado - Universidade estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia.
 122. BERTOLUCCI, S. K. V et al. Seasonal variation on the contents of coumarin and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *M. glomerata* Leaves under different shade levels. *Chemistry and Biodiversity*, v. 10, n. 2, p. 288–295, 2013.
 123. GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS Leonardo Gobbo-Neto e Norberto P. Lopes*. v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
 124. TOTTE, N. et al. Biosynthesis of the diterpenoid steviol , an ent -kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni , via the methylerythritol phosphate pathway. v. 41, p. 6407–6410, 2000.
 125. MULLIN, C. A. et al. Feeding and Toxic Effects of Floral Sesquiterpene Lactones, Diterpenes, and Phenolics from Sunflower. p. 2293–2299, 1991.
 126. NGUYEN, D. T. et al. Biochemical Conservation and Evolution of Germacrene A Oxidase in Asteraceae. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 285, N. 22, pp. 16588–16598. 2010
 127. COOPER-DRIVER G.A.; QUESNE, P. W. L. Diterpenoids as Insect Antifeedants and Growth Inhibitors : Role in *Solidago* Species. n. 16, 1987.
 128. SEAMAN, F. C. Sesquiterpene Lactones as Taxonomic as characters in Asteraceae. v. 48, n. 2, p. 121–592, 1982.
 129. SKORUPINSKA-TUDEK, K. et al. Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Dolichols. v. 283, n. 30, p. 21024–21035, 2008.
 130. WÖLWER-RIECK, U. et al. Methylerythritol and Mevalonate Pathway Contributions to Biosynthesis of Mono - , Sesqui - , and Diterpenes in Glandular Trichomes and Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. 2014.
 131. UMETRICS, User Guide SIMCA. Version 13, Umetrics, 2016.
-

-
132. TRIBA, M. N. et al. Molecular BioSystems PLS / OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold. *Molecular BioSystems*, v. 11, p. 13–19, 2014.
 133. SADEGHI-BAZARGANI, H.; BANANI, A.; MOHAMMADI, S. Using SIMCA statistical software package to apply orthogonal projections to latent structures modeling. *World Automation Congress (WAC)*, 2010, p. 1–9, 2010.
 134. WORLEY, B.; POWERS, R. *Multivariate Analysis in Metabolomics* *Curr Metabolomics*, 2013.
 135. LUBI, N.C., SATO, M.E.O., GAENSLY, F. Desenvolvimento de forma farmacêutica líquida de uso oral , isenta de substâncias glicogênicas , com extrato fluido de *Mikania glomerata Sprengel - Asteraceae (guaco)*. p. 43–46, 2003.
 136. BINGOL, K. et al. Emerging new strategies for successful metabolite identification in metabolomics. 2016.
 137. EDISON, A. S. et al. *ScienceDirect* The future of NMR-based metabolomics. p. 34–40, 2017.
 138. DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: 3rd Edition* Wiley, John & Sons. 2010.
 139. DONA, A. C. et al. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics / metabolomics experiments. *CSBJ*, v. 14, p. 135–153, 2016.
 140. SALEK, R. M. et al. The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. v. 2, n. 1, p. 1, 2013.
 141. VESSECCHI, R. *et al.* Radical Ion Generation Processes of Organic Compounds in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *ChemInform*, 38(35). 2007.
 142. VESSECCHI, R. et al. Re-examination of the anion derivatives of isoflavones by radical fragmentation in negative electrospray ionization tandem mass spectrometry : experimental and computational studies. n. April, 2011.
 143. ANDRÁSI, N. et al. Derivatization and fragmentation pattern analysis of natural and synthetic steroids , as their trimethylsilyl (oxime) ether derivatives by gas

-
- chromatography mass spectrometry: Analysis of dissolved steroids in wastewater samples. v. 1218, p. 1878–1890, 2011.
144. VILEGAS, J. H. Y. et al. Further Triterpenes , Steroids and Furocoumarins from Brazilian Medicinal Plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). v. 8, n. 5, p. 529–535, 1997.
145. CROTTI, A. E. M. et al. The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 232, n. 3, p. 271–276, 2004.
146. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 4. Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico - Junho, 2014.
147. ICH International Conference on Harmonization - Q2(R1) Validation of Analytical Procedures, 2005.
148. THURMAN, E. M.; FERRER, I. The isotopic mass defect: a tool for limiting molecular formulas by accurate mass. p. 2807–2816, 2010.
149. ERMER, J., MILLER, J.H. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005
150. C. Zdero, F. Bohlmann, Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist, P1. *Syst. Evol.* 171 (1990) 1–14.
151. Samek K. et.al, The geminal coupling and paramagnetic shift of exomethylene protons in the -unsaturated -lactone group of sesquiterpene lactones containing C8- -hydroxyl groups, *Tetrahedron*. 27 (1971) 3317 to 3322.
152. Phenomenex, *The Ultimate Guide to HPLC/UHPLC Reversed Phase Selectivity*, (2013).
<https://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/reversedguide.pdf>.
153. Waters Corporation, *Acquity UPLC Columns, Exceed Expectations*, (2012) 1–42. www.waters.com/acquitycolumns.
154. Durbin, J., Watson, G.S. *Testing for serial correlation in least squares regression II*. *Biometrika*, (1951). 38(1/2) p. 159-177.
-

155. Cook, R. D., Weisberg, S.; *Residuals and influence in regression*, (1982) New York, NY: Chapman & Hall

Apêndice A - Espécies de *Mikania* coletadas.Tabela A 1. Espécies de *Mikania* coletadas para estudos metabólicos.

Espécie	Código	Voucher	País	Estado/Província	Cidade	Data da Coleta	Localização
<i>Mikania cf. trinervis</i>	2	Oliveira 598	Brasil	São Paulo	Campos do Jordão	3/4/2012	22°42'16.7"S 45°28'16.4"W
<i>Mikania nummularia</i>	3	Oliveira 601	Brasil	São Paulo	Campos do Jordão	3/4/2012	22°42'16.7"S 45°28'16.4"W
<i>Mikania trachypleura</i>	4	Oliveira 776	Brasil	Paraná	Castro	17/03/2013	24°45'54.75"S 50°9'31.47"W
<i>Mikania decumbens</i>	5	Oliveira 783	Brasil	Paraná	Palmas	20/03/2013	26°33'1.19"S 51°57'2.03"W
<i>Mikania pinnatiloba</i>	6	Oliveira 785	Brasil	Paraná	Palmas	20/03/2013	26°33'1.19"S 51°57'2.03"W
<i>Mikania capricorni</i>	7	Oliveira 786	Brasil	Paraná	Palmas	20/03/2013	26°35'46.95"S 51°51'37.56"W
<i>Mikania paranensis</i>	8	Oliveira 787	Brasil	Paraná	Palmas	20/03/2013	26°34'51.36"S 51°42'7.78"W
<i>Mikania cordifolia</i>	9	Oliveira 795	Brasil	Paraná	Porto União	21/03/2013	26°21'48.73"S 51°15'36.41"W
<i>Mikania smaragdina</i>	10	Oliveira 798	Brasil	Paraná	Guaratuba	22/03/2013	25°51'19.43"S 48°58'13.44"W
<i>Mikania lanuginosa</i>	11	Oliveira 799	Brasil	Paraná	Guaratuba	22/03/2013	25°51'19.43"S 48°58'13.44"W
<i>Mikania lasiandrae</i>	12	Oliveira 800	Brasil	Paraná	Guaratuba	22/03/2013	25°51'19.43"S 48°58'13.44"W
<i>Mikania vitifolia</i>	13	Oliveira 801	Brasil	Paraná	Guaratuba	22/03/2013	25°51'19.43"S 48°58'13.44"W
<i>Mikania rufecens</i>	14	Oliveira 803	Brasil	Paraná	Morretes	23/03/2013	25°19'56.86"S 48°54'2.37"W
<i>Mikania ternata</i>	15	Oliveira 806	Brasil	Paraná	Morretes	24/03/2013	25°19'56.86"S 48°54'2.37"W
<i>Mikania sp1</i>	16	Oliveira 807	Brasil	Paraná	Quatro Barras	25/03/2013	25°24'5.26"S 49°0'49.28"W
<i>Mikania sessilifolia</i>	17	Oliveira 808	Brasil	Minas Gerais	Moeda	13/04/2013	20°16'58.83"S 43°57'23.87"W
<i>Mikania obtusata</i>	18	Oliveira 809	Brasil	Minas Gerais	Moeda	13/04/2013	20°16'58.83"S 43°57'23.87"W
<i>Mikania pseudogracilis</i>	19	Oliveira 811	Brasil	Minas Gerais	Moeda	13/04/2013	20°16'58.83"S 43°57'23.87"W
<i>Mikania salviifolia</i>	20	Oliveira 813	Brasil	Minas Gerais	Entre Rios	13/04/2013	20°42'4.39"S 44°3'20.33"W
<i>Mikania lindbergii</i>	21	Oliveira 815	Brasil	Minas Gerais	Lima Duarte	14/04/2013	21°40'55.27"S 43°52'31.9"W
<i>Mikania glauca</i>	22	Oliveira 819	Brasil	Minas Gerais	Liberdade	14/04/2013	21°56'12.02"S 44°22'51.77"W
<i>Mikania hirsutissima</i>	23	Oliveira 820	Brasil	Minas Gerais	Itamonte	15/04/2013	22°22'14.56"S 44°44'46.27"W
<i>Mikania lasiandrae</i>	24	Oliveira 821	Brasil	Minas Gerais	Itamonte	15/04/2013	22°22'14.56"S 44°44'46.27"W
<i>Mikania additicia</i>	25	Oliveira 822	Brasil	Minas Gerais	Itamonte	15/04/2013	22°22'14.56"S 44°44'46.27"W

Espécie	Código	Voucher	País	Estado/Província	Cidade	Data da Coleta	Localização
<i>Mikania camporum</i>	26	Oliveira 823	Brasil	Minas Gerais	Itamonte	15/04/2013	22°22'14.56"S 44°44'46.27"W
<i>Mikania chlorolepis</i>	27	Oliveira 824	Brasil	Minas Gerais	Itamonte	15/04/2013	22°22'14.56"S 44°44'46.27"W
<i>Mikania cordifolia</i>	28	Oliveira 826	Brasil	São Paulo	Ubatuba	16/04/2013	23°21'41.83"S 45°8'7.03"W
<i>Mikania trinervis</i>	29	Oliveira 827	Brasil	São Paulo	Ubatuba	16/04/2013	23°21'41.83"S 45°8'7.03"W
<i>Mikania sericea</i>	30	Oliveira 828	Brasil	São Paulo	Ubatuba	16/04/2013	23°21'41.83"S 45°8'7.03"W
<i>Mikania firmula</i>	31	Oliveira 830	Brasil	Bahia	Camamu	25/04/2013	14°4'12.03"S 39°5'19.89"W
<i>Mikania callineura</i>	32	Oliveira 834	Brasil	Bahia	Una	26/04/2013	15°14'19.46"S 39°15'32.26"W
<i>Mikania salzmaniifolia</i>	33	Oliveira 836	Brasil	Bahia	Una	26/04/2013	15°14'19.46"S 39°15'32.26"W
<i>Mikania sp. nov.</i>	34	Oliveira 837	Brasil	Bahia	Camacán	27/04/2013	15°23'24.52"S 39°34'0.88"W
<i>Mikania biformis</i>	36	Oliveira 839	Brasil	Bahia	Camacán	27/04/2013	15°23'24.52"S 39°34'0.88"W
<i>Mikania grazielae</i>	37	Oliveira 840	Brasil	Bahia	Rio de Contas	2/5/2013	13°31'23.31"S 41°57'28.12"W
<i>Mikania elliptica</i>	38	Oliveira 841	Brasil	Bahia	Rio de Contas	2/5/2013	13°31'23.31"S 41°57'28.12"W
<i>Mikania sp2</i>	39	Oliveira 842	Brasil	Bahia	Rio de Contas	2/5/2013	13°31'23.31"S 41°57'28.12"W
<i>Mikania lutzelburgii</i>	40	Oliveira 843	Brasil	Bahia	Rio de Contas	2/5/2013	13°31'23.31"S 41°57'28.12"W
<i>Mikania alvimii</i>	41	Oliveira 844	Brasil	Bahia	Rio de Contas	2/5/2013	13°31'23.31"S 41°57'28.12"W
<i>Mikania jeffreyi</i>	42	Oliveira 845	Brasil	Bahia	Rio de Contas	2/5/2013	13°36'7.03"S 41°48'48.12"W
<i>Mikania sp. nov.</i>	43	Oliveira 848	Brasil	Bahia	Una	16/06/2013	15°7'52.34"S 39°19'15.12"W
<i>Mikania hemiphaerica</i>	44	Oliveira 850	Brasil	Bahia	Una	16/06/2013	15°7'52.34"S 39°19'15.12"W
<i>Mikania cordifolia</i>	45	Oliveira 855	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás	30/06/2013	14°10'16.3"S 47°46'37.77"W
<i>Mikania smilacina</i>	47	Oliveira 857	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás	30/06/2013	14°10'16.3"S 47°46'37.77"W
<i>Mikania hirsutissima</i>	48	Oliveira 858	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás	30/06/2013	14°10'16.3"S 47°46'37.77"W
<i>Mikania populifolia</i>	49	Oliveira 859	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás	30/06/2013	14°10'16.3"S 47°46'37.77"W
<i>Mikania pohliana</i>	50	Oliveira 862	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás	30/06/2013	14°11'10.85"S 47°36'12.83"W
<i>Mikania laurifolia</i>	51	Oliveira 864	Colômbia	Cundinamarca	Fute	6/8/2013	4°36'23.12"N 74°18'16.83"W
<i>Mikania psilostachya</i>	52	Oliveira 869	Colômbia	Cundinamarca	Fute	11/8/2013	4°36'23.12"N 74°18'16.83"W
<i>Mikania vitifolia</i>	53	Oliveira 871	Colômbia	Cundinamarca	Fute	11/8/2013	4°36'23.12"N 74°18'16.83"W
<i>Mikania guaco</i>	54	Oliveira 873	Colômbia	Cundinamarca	Chuachi	11/8/2013	4°36'23.12"N 74°18'16.83"W

Espécie	Código	Voucher	País	Estado/Provincia	Cidade	Data da Coleta	Localização
<i>Mikania aristei</i>	55	Oliveira 878	Colômbia	Cundinamarca		17/08/2013	4°43'23.12"N 73°53'17.54"W
<i>Mikania lehmanii</i>	56	Oliveira 891	Colômbia	Cundinamarca	Facatativa	17/08/2013	4°48'17.14"N 74°24'45.52"W
<i>Mikania banisteriae</i>	57	Oliveira 895	Colômbia	Cundinamarca	Junin	18/08/2013	4°42'32.24"N 73°40'3.78"W
<i>Mikania aquaria</i>	58	Oliveira 896	Peru	Junin	La Merced	7/9/2013	11°10'59.45"S 75°27'30.55"W
<i>Mikania haenkeana</i>	59	Oliveira 897	Peru	Junin	La Merced	7/9/2013	11°10'59.45"S 75°27'30.55"W
<i>Mikania incasina</i>	60	Oliveira 898	Peru	Junin	La Merced	7/9/2013	11°10'59.45"S 75°27'30.55"W
<i>Mikania angularis</i>	61	Oliveira 900	Peru	Cusco	Cusco	10/9/2013	13°9'45"S 72°32'34"W
<i>Mikania marinii</i>	62	Oliveira 902	Peru	Cusco	Calca	12/9/2013	12°58'44.22S 72°3'52.78"W
<i>Mikania cuzcoensis</i>	63	Oliveira 914	Peru	Cusco	Quince Mil	14/09/2013	13°22'27.79"S 70°53'59.96"W
<i>Mikania triangularis</i>	64	Oliveira 916	Brasil	São Paulo	São Paulo	30/09/2013	23°34'3.14"S 46°43'48.99"W
<i>Mikania glomerata</i>	65	Oliveira 917	Brasil	São Paulo	São Paulo	30/09/2013	23°34'3.14"S 46°43'48.99"W
<i>Mikania eriostrepta</i>	66	Oliveira 918	Brasil	São Paulo	Ubatuba	5/10/2013	23°19'8.38"S 45°9'10"W
<i>Mikania laevigata</i>	67	Oliveira 919	Brasil	São Paulo	Ubatuba	5/10/2013	23°34'20.51"S 46°43'30.46"W
<i>Mikania alvimii</i>	68	Oliveira 929	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás	1/12/2013	14°0'0.86"S 47°31'7.3"W
<i>Mikania officinalis</i>	69	Oliveira 930	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás	1/12/2013	14°0'0.86"S 47°31'7.3"W
<i>Mikania officinalis</i> var. <i>brachypoda</i>	70	Oliveira 932	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás	1/12/2013	14°9'13.23"S 47°32'15.65"W
<i>Mikania pohlii</i>	71	Oliveira 933	Brasil	Goiás	Alto Paraíso de Goiás	1/12/2013	14°8'9.24"S 47°43'23.38"W
<i>Mikania cordifolia</i>	72	Guiraldelli000	Brasil	São Paulo	São Paulo	1/3/2014	23°33'55"S 46°43'51"W
<i>Mikania hassleriana</i>	73	Oliveira 938	Brasil	Paraná	Sengés	3/9/2014	25°25'46"S 50°0'23"W
<i>Mikania triangularis</i>	73A	Guiraldelli001	Brasil	São Paulo	São Paulo	03/2014	23°33'55"S 46°43'51"W
<i>Mikania paranensis</i>	74	Oliveira 943	Brasil	Paraná	Palmeira	3/10/2014	25°25'46"S 50°0'23"W
<i>Mikania lanuginosa</i>	75	Oliveira 944	Brasil	Santa Catarina	Santa Cecília	3/10/2014	26°57'39"S 50°25'37"W
<i>Mikania pinnatiloba</i>	76	Oliveira 945	Brasil	Santa Catarina	Capão Alto	3/11/2014	27°56'13"S 50°30'42"W
<i>Mikania fulva</i>	77	Oliveira 948	Brasil	Santa Catarina	Capão Alto	3/11/2014	27°56'13"S 50°30'42"W
<i>Mikania thapsoides</i>	78	Oliveira 951	Brasil	Rio Grande do Sul	São Sepé	3/12/2014	30°9'39"S 55°33'54"W
<i>Mikania anethifolia</i>	79	Oliveira 952	Brasil	Rio Grande do Sul	Santana do Livramento	3/12/2014	30°53'27"S 55°31'58"W
<i>Mikania periplocifolia</i>	80	Oliveira 956	Brasil	Rio Grande do Sul	Santana do Livramento	3/13/2014	30°53'27"S 55°31'58"W
<i>Mikania periplocifolia</i>	81	Oliveira 960	Brasil	Rio Grande do Sul	São Lourenço do Sul	3/15/2014	31°21'56"S 51°58'41"W
<i>Mikania oreophila</i>	82	Oliveira 961	Brasil	Rio Grande do Sul	São José dos Ausentes	3/16/2014	28°44'54"S 50°3'57"W

Espécie	Código	Voucher	País	Estado/Província	Cidade	Data da Coleta	Localização
<i>Mikania orleansensis</i>	83	Oliveira 962	Brasil	Rio Grande do Sul	São José dos Ausentes	3/16/2014	28°44'54"S 50°3'57"W
<i>Mikania oblongifolia</i>	84	Oliveira 966	Brasil	Minas Gerais	São Roque de Minas	3/27/2014	20°15'29"S 46°24'54"W
<i>Mikania warmingii</i>	85	Oliveira 969	Brasil	Minas Gerais	São Roque de Minas	3/27/2014	20°15'29"S 46°24'54"W
<i>Mikania monsenii</i>	86	Oliveira 972	Brasil	Minas Gerais	São Roque de Minas	3/27/2014	20°13'14"S 46°29'4"W
<i>Mikania sessilifolia</i>	87	Oliveira 973	Brasil	Minas Gerais	São Roque de Minas	3/27/2014	20°13'14"S 46°29'4"W
<i>Mikania purpurescens</i>	88	Oliveira 974	Brasil	Minas Gerais	São Roque de Minas	3/27/2014	20°13'14"S 46°29'4"W
<i>Mikania fasciculata</i>	89	Oliveira 977	Brasil	Minas Gerais	São Roque de Minas	3/28/2014	20°11'31"S 46°39'39"W
<i>Mikania aff. burchelli</i>	90	Oliveira 978	Brasil	Minas Gerais	São Roque de Minas	3/29/2014	20°11'31"S 46°39'39"W
<i>Mikania psilostachya</i>	91	Oliveira 979	Brasil	Minas Gerais	São Roque de Minas	3/29/2014	20°11'31"S 46°39'39"W
<i>Mikania glomerata*</i>	100	-	Brasil	São Paulo	São Paulo	-	-
<i>Mikania laevigata</i>	101	Guiraldelli003	Brasil	São Paulo	São Paulo	03/2014	23°33'55"S 46°43'51"W
<i>Mikania citriodora W.C. Holmes</i>	805	Fernandes805	Brasil	Minas Gerais	São Roque de Minas	3/29/2014	20°11'31"S 46°39'39"W

*comercial

Apêndice B – Estudos de seletividade do método desenvolvido para abordagem metabolômica direcionada por UHPLC-UV.

Figura B.1. Espectros de MS extraídos do cromatograma TIC obtido da amostra *M. laevigata* no modo negativo ESI (-): AHC, ACAU, ABEN.

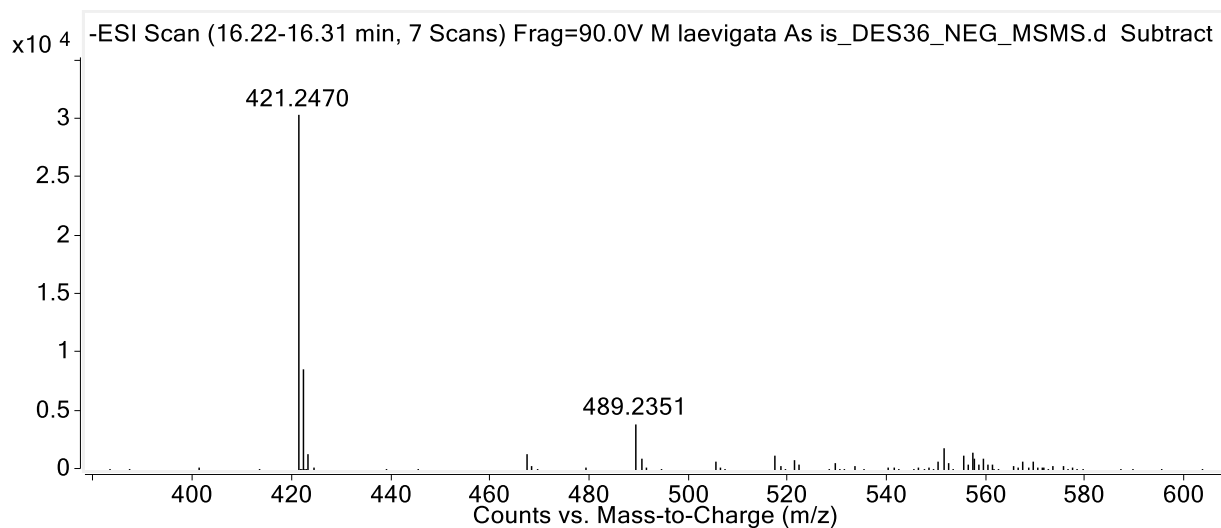
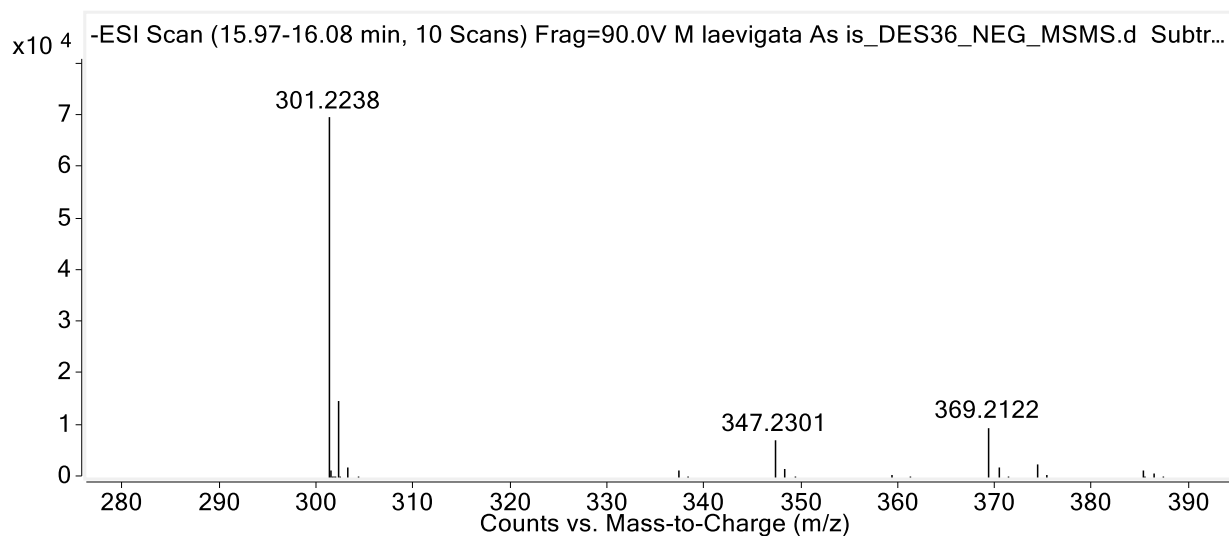
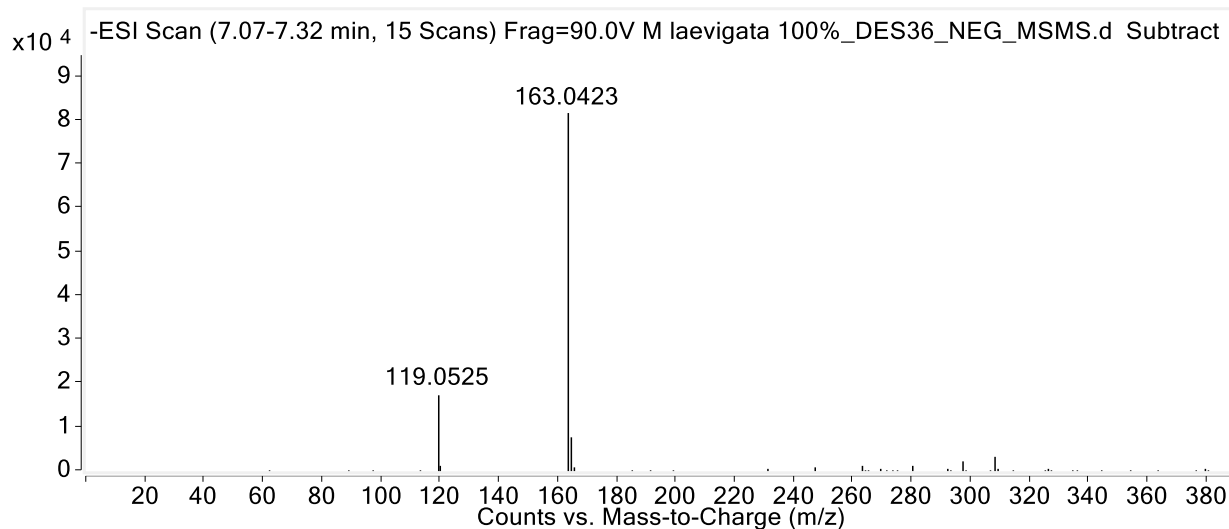


Figura B.2. Espectros de MS extraídos do cromatograma TIC obtido da amostra *M. laevigata* no modo negativo ESI (-) - ACIN.

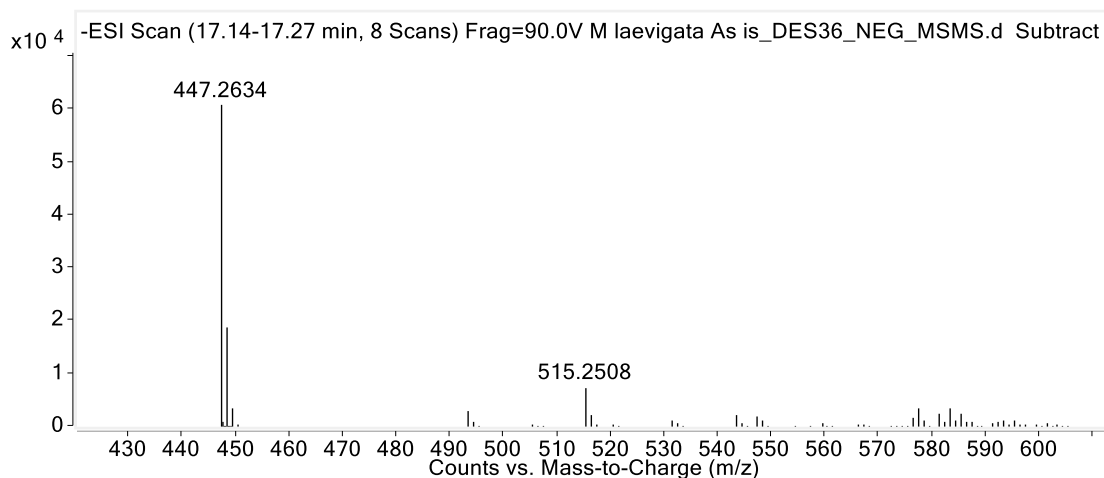


Figura B.3. Espectros de MS extraídos do cromatograma TIC obtido da amostra *M. laevigata* no modo negativo ESI (+): CUM, SIR.

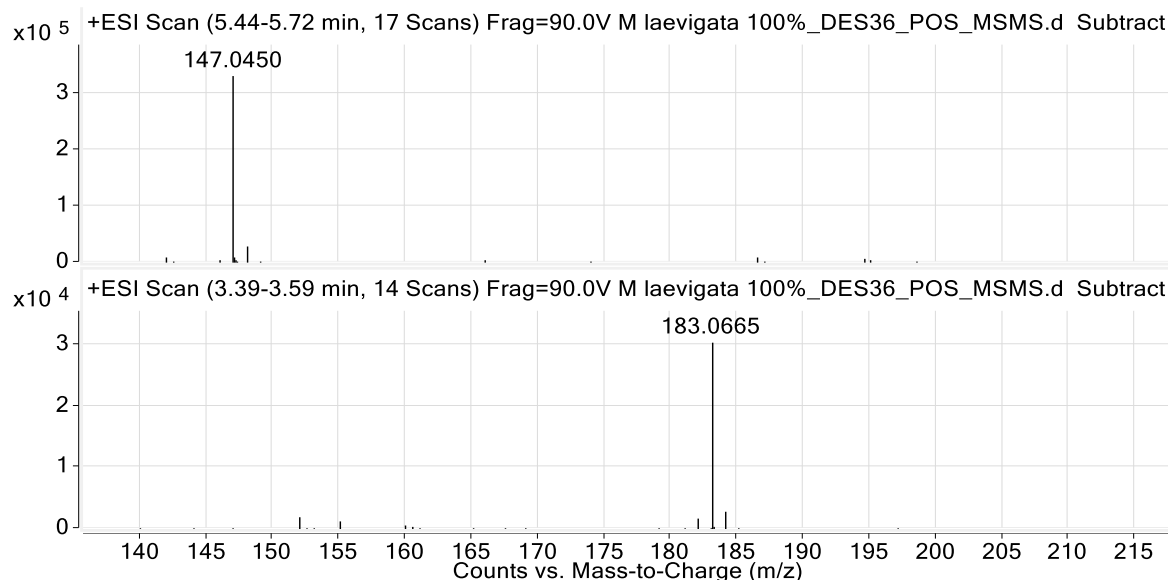


Figura B.4. Espectros de MS extraídos do cromatograma TIC obtido da amostra *M. glomerata* no modo negativo ESI (-): AHC.

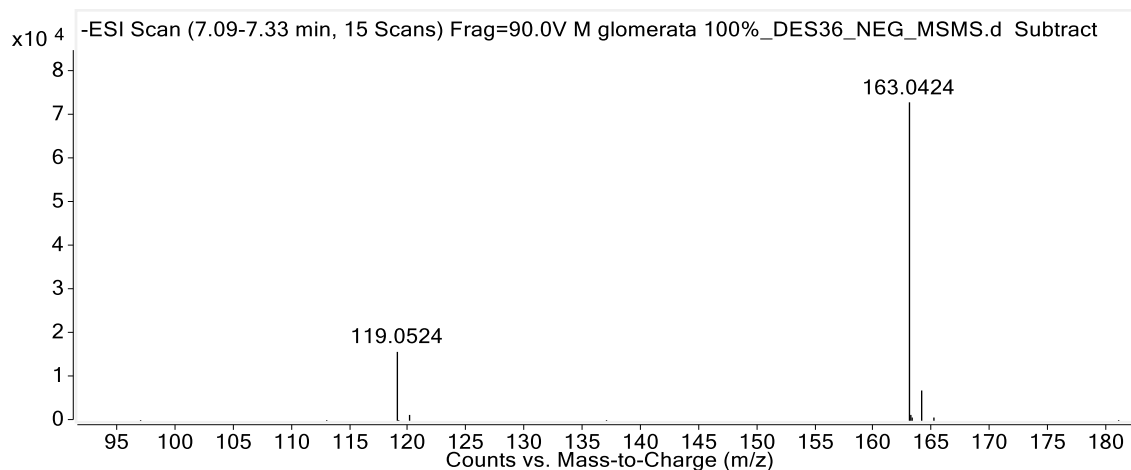
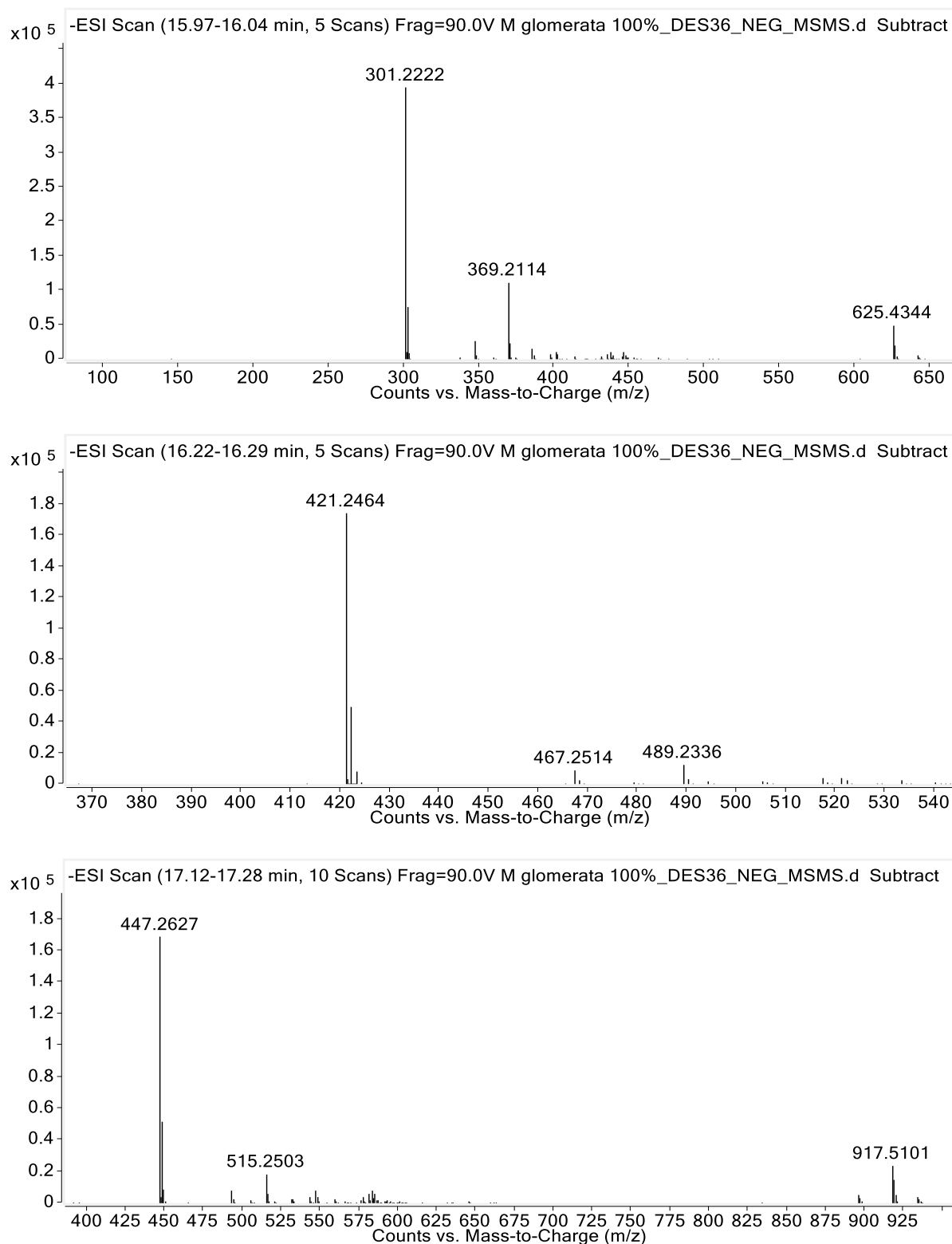
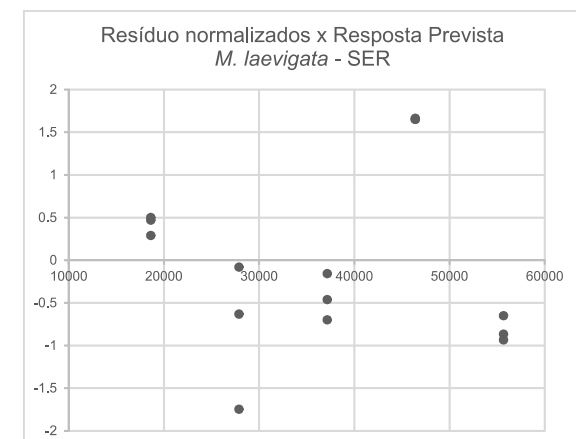
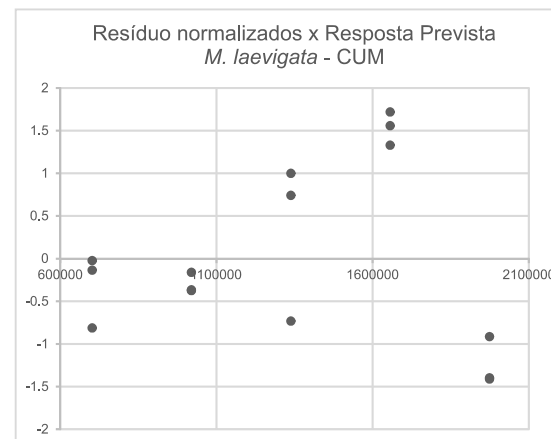
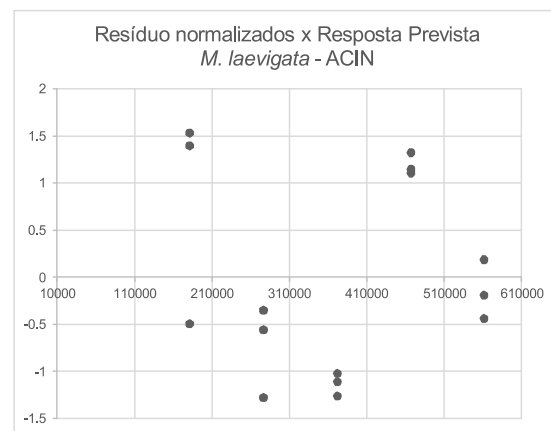
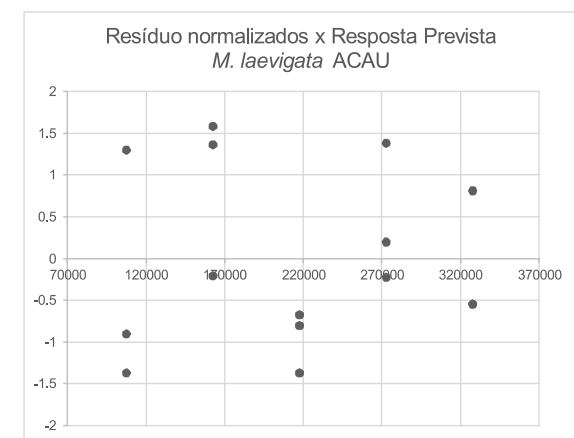
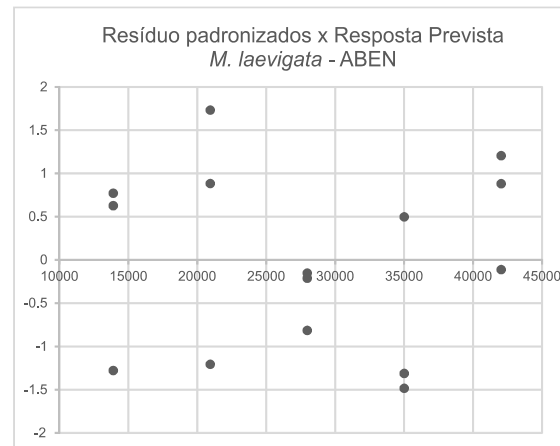
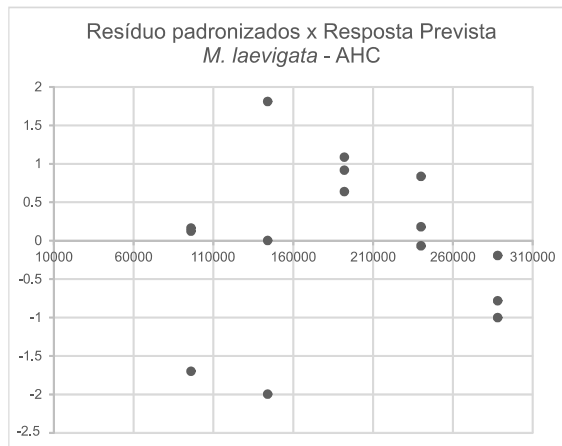


Figura B.5. Espectros de MS extraídos do cromatograma TIC obtido da amostra *M. glomerata* no modo negativo ESI (-): ACAU, ABEN e ACIN.



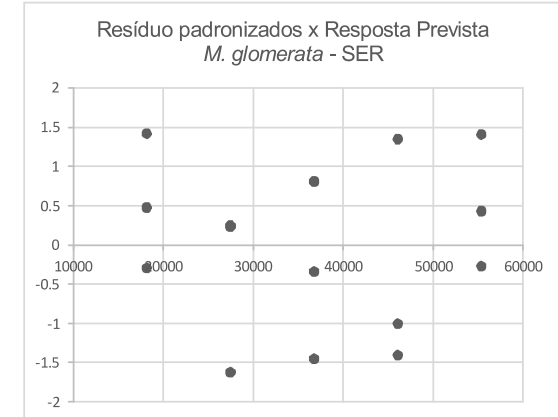
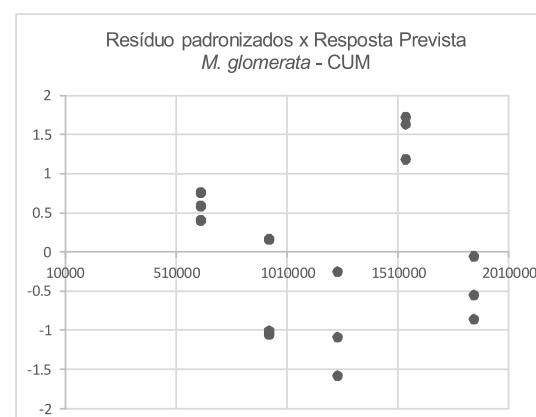
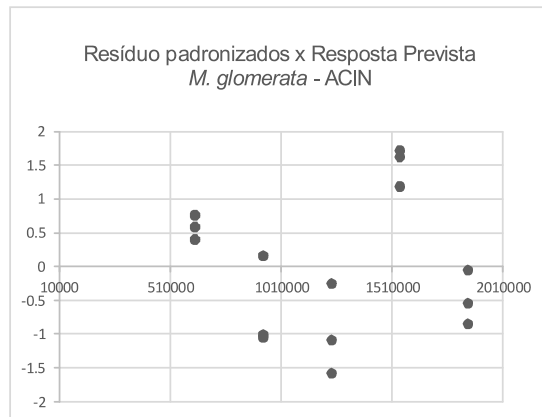
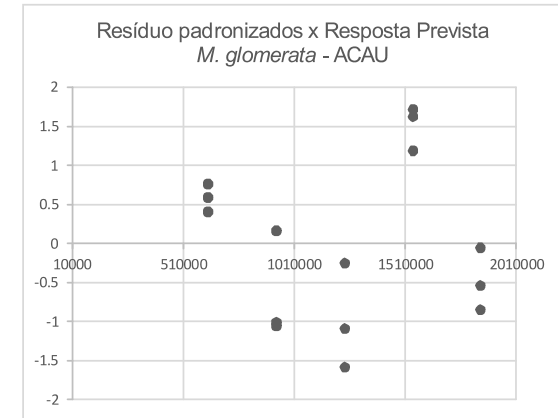
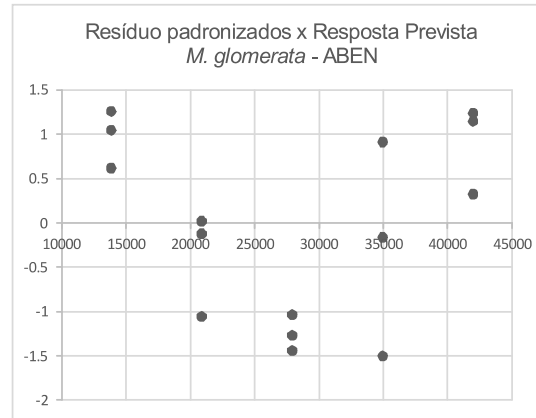
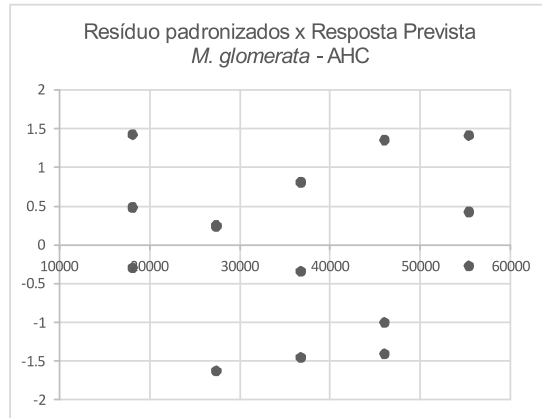
Apêndice C – Validação do método para quantificação por UHPLC-UV: Linearidade - Análise de resíduos.

Tabela C.1. Gráficos dos resíduos padronizados *versus* Resposta prevista pelo modelo - *M. laevigata*.



Avaliação: -2 < Resíduos padronizados < 2

Tabela C.2. Gráficos dos resíduos padronizados *versus* Resposta prevista pelo modelo - *M. glomerata*.



Avaliação: $-2 < \text{Resíduos padronizados} < 2$

Tabela C.3. Gráficos dos resíduos padronizados *versus* ordem de coleta - *M. laevigata*.

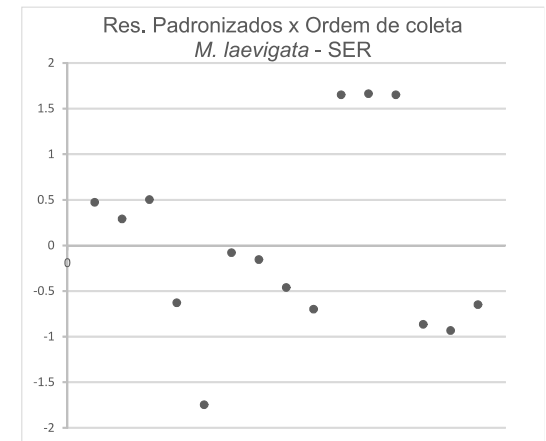
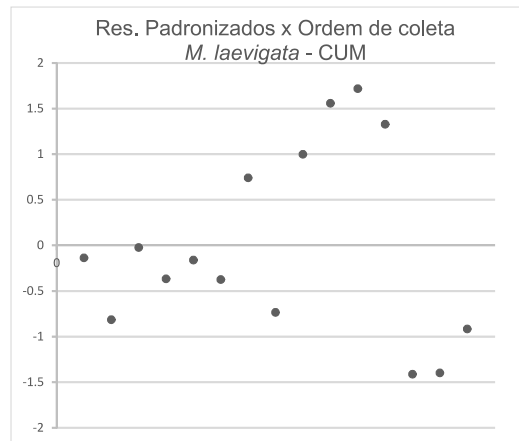
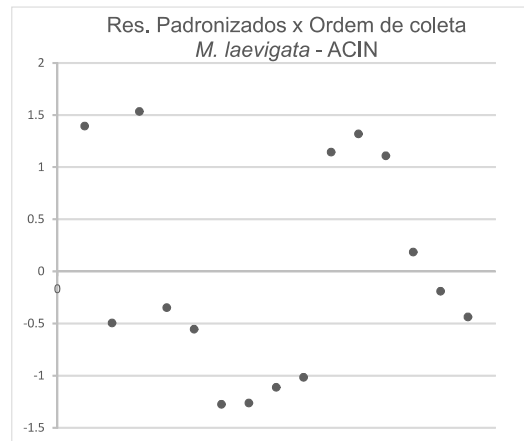
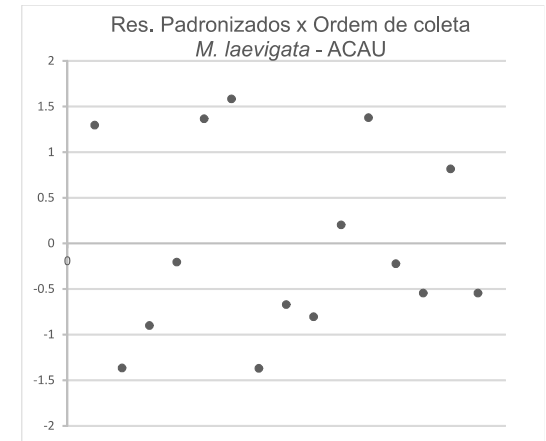
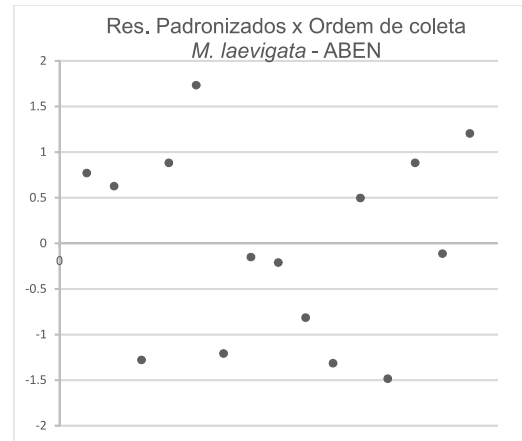
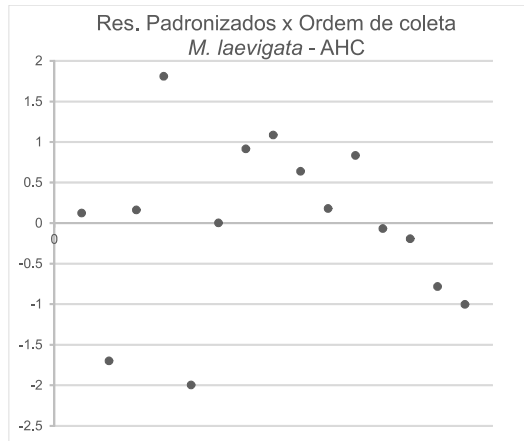


Tabela C.4. Gráficos dos resíduos padronizados *versus* ordem de coleta - *M. glomerata*.

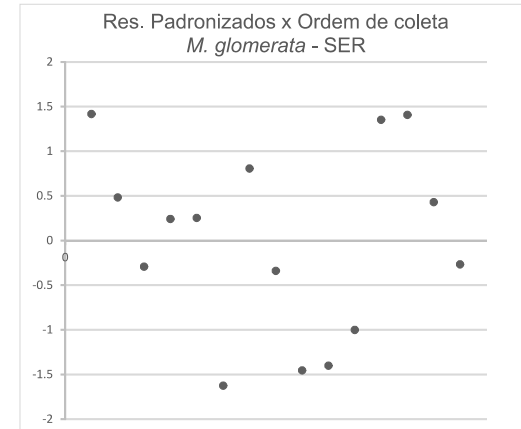
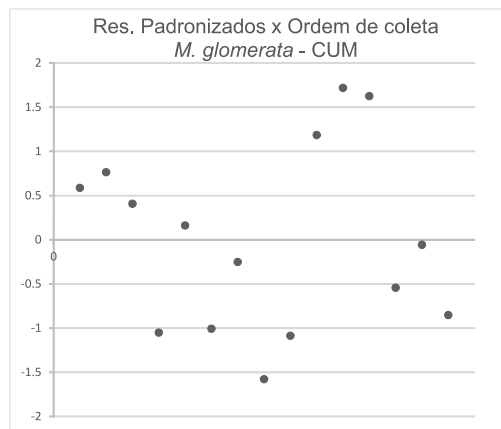
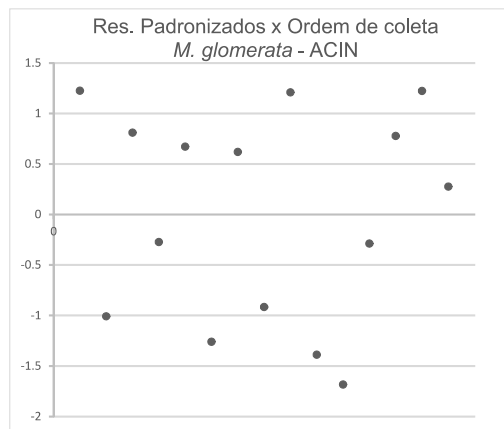
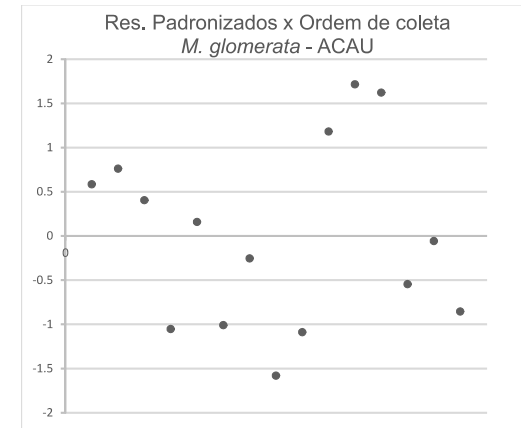
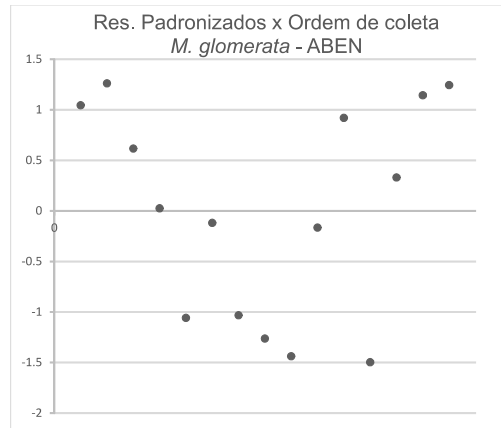
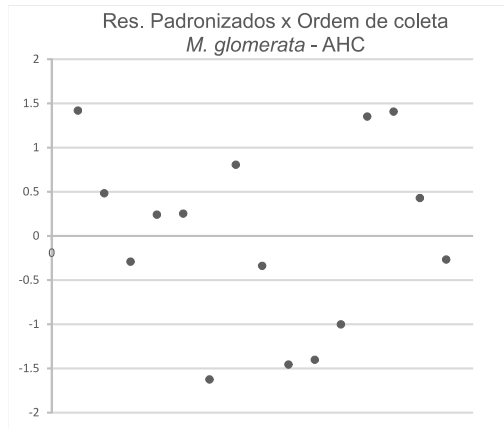
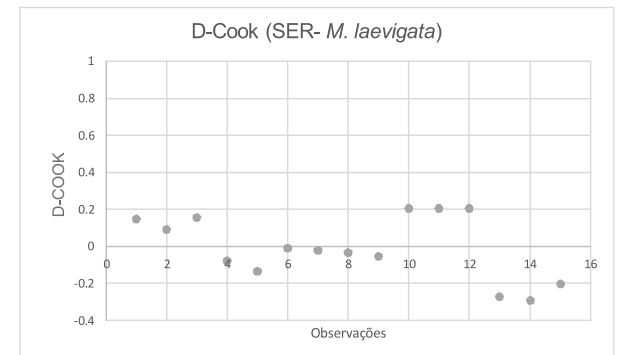
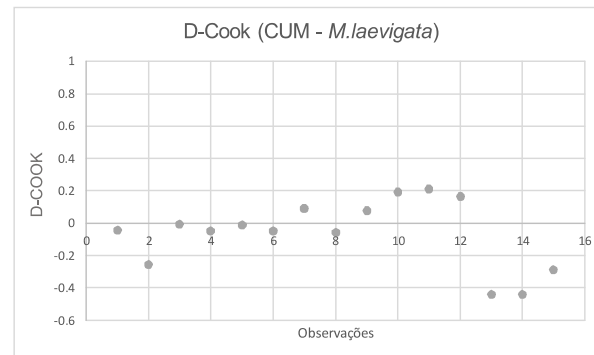
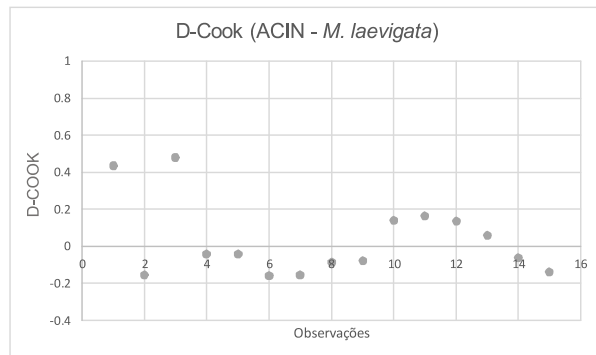
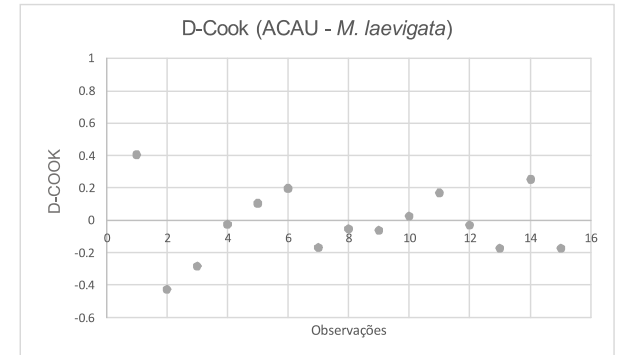
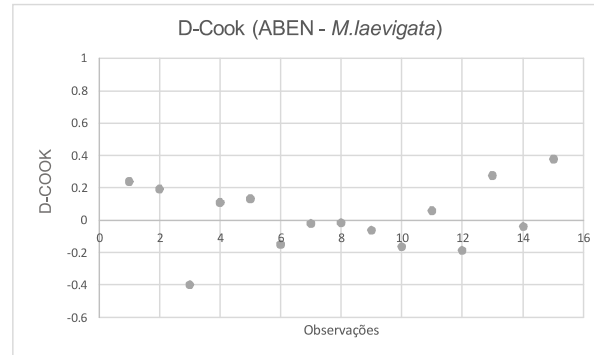
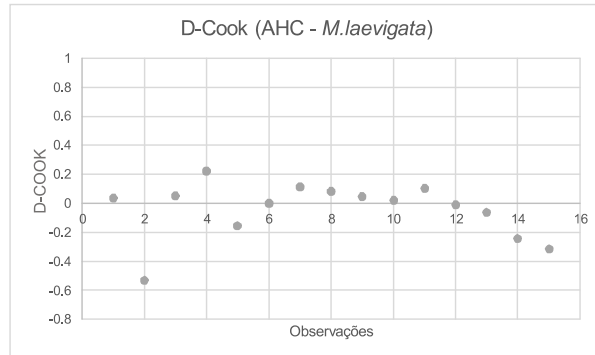
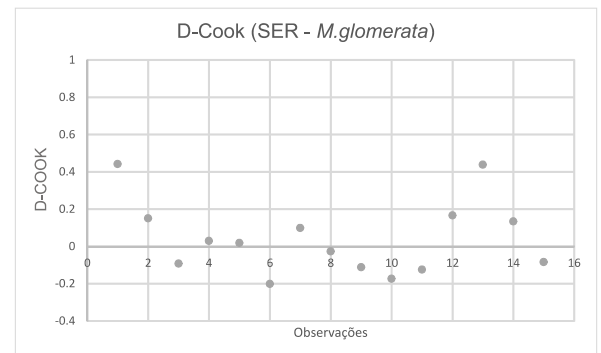
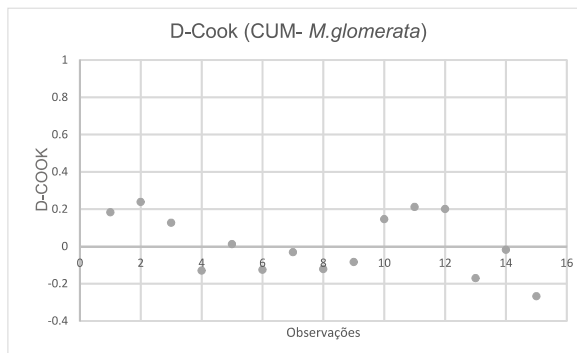
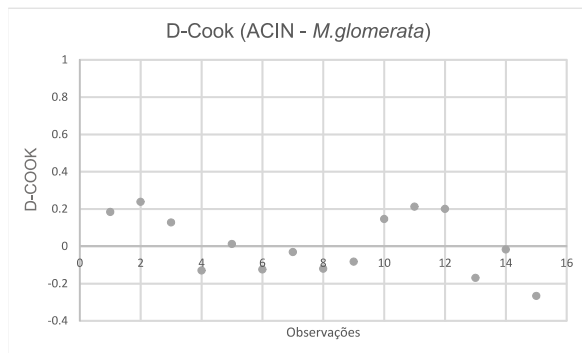
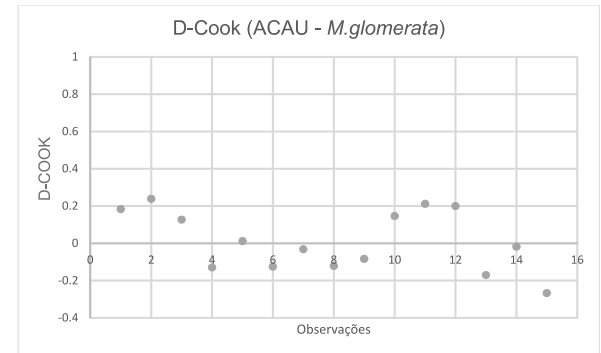
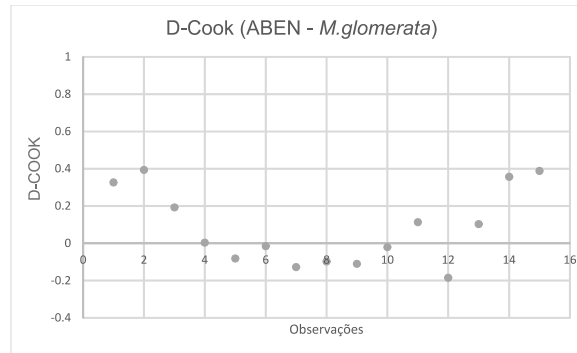
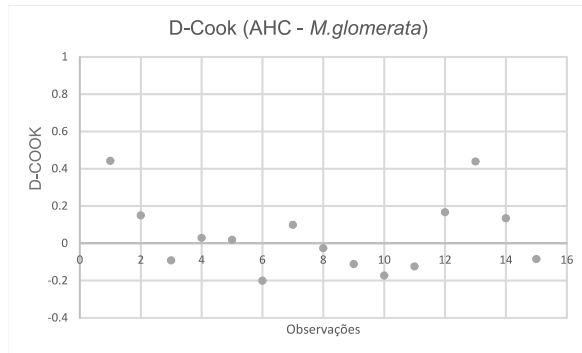


Tabela C.5. Gráficos com valor de D-COOK versus observações - *M. laevigata*.



Avaliação: $D-COOK < 1$

Tabela C.6. Gráficos com valore de D-COOK versus observações - *M. glomerata*.



Avaliação: $D-COOK < 1$

Apêndice D - Caracterização de metabólitos em espécies medicinais de *Mikania*
Tabela D.1. Evidências para proposta da identidade de alguns metabólitos detectados por LC-MS em *M. cordifolia*.

ID	TR (min)	Espectro MS Scan				Espectro MS/MS +ESI		Espectro MS/MS -ESI		Proposta de identidade	NC
		m/z obs.	Espécie iônica	Fórmula molecular	Erro massa (ppm)	m/z íons fragm.	Espécies iônicas íos fragmentos	m/z íons fragm.	Espécies iônicas		
1	1,5	153,0197	[M-H]	C ₇ H ₆ O ₄	-2,3	-	-	109,0300 108,0216	[M-H-CO ₂] ⁻ C ₆ H ₄ O ₂ ⁻	Ácido protocatecuico	2
2	5,3	165,0562	[M-H]	C ₉ H ₁₀ O ₃	-2,9	-	-	147,0453 121,0663 106,0430	[M-H-H ₂ O] ⁻ [M-H-CO ₂] ⁻ NS	Não identificado	4
3	6,3	147,0429	[M+H] ⁺				129,0119 103,0531 91,0532 77,0381 65,0388	-	-	cumarina	1
4	8,0	163,0404 165,0542	[M-H] [M+H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₃	-2,3		147,0437 103,0524 91,0542 77,0376	119,0503	[M-H-CO ₂] ⁻	Ácido hidróxicinâmico	1
5	10,1	609,1464 463,0885* 611,1558 465,0994* 303,0474*	[M-H] [M-H-Rhm] [M+H] ⁺ [M+H-Rhm] ⁺ [M+H-Dissac.] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-0,6 2,8	-		343,0470 301,0339 300,0279 271,0250 243,0297 151,0032	[M-H-C ₅ H ₁₀ O ₄ -H ₂ O-C ₄ H ₆ O ₃] ⁻ [M-H-Dissaccharide] ⁻ [M-H-Dissaccharide-H] ⁻ [M-H-Dissaccharide-2H ⁻ -CO] ⁻ [M-H-Hexose-2H ⁻ -2CO] ⁻ [M-H-Hexose-Ring B] ⁻	5,3',4',5'-hydroxy-isoflavone 7-O-rhamnoglucoside	2
6	10,5	515,1202	[M-H]	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	-1,3	-		353,0885 191,0559 179,0351 173,0351	[M-H-Cafeoil] ⁻ [M-H-2Cafeoil] ⁻ [Cafeoil] ⁻ [M-H-2Cafeoil-H ₂ O] ⁻	Ácido dicafeoilquinico	2
7	10,4	349,1642 366,1905	[M+H] ⁺ [M+NH ₄] ⁺	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	1,1 1,6		331,1524 247,1311 229,1216 201,1263 183,1155 85,0279	-	-	3-hidroxi-metacrilóil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido / epoxi-metacrilóil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido	2
8	10,6	529,1358	[M-H]	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂	-1,3	-		367,1033 353,0887 191,0554 193,0500 179,0359 173,0351	[M-H-Cafeoil] ⁻ [M-H-Feruloil] ⁻ [M-H-Cafeoil-Feruloil] ⁻ [Feruloil] ⁻ [Cafeoil] ⁻ [M-H-Cafeoil-Feruloil-H ₂ O] ⁻	Ácido 3-5-cafeoil-feruloilquinico	2
9	10,6	365,1874 382,2218	[M+H] ⁺ [M+NH ₄] ⁺	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	-2,7 1,6		347,1843 247,1311 229,1211 201,1274 183,1168 101,0599	-	-	3-hidroxi-metacrilóil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido / epoxi-metacrilóil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido	2
10	10,8	529,1358	[M-H]	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂	-1,3	-		367,1035 353,0892 191,0562 193,0507 179,0362 173,0344	[M-H-Cafeoil] ⁻ [M-H-Feruloil] ⁻ [M-H-Cafeoil-Feruloil] ⁻ [Feruloil] ⁻ [Cafeoil] ⁻ [M-H-Cafeoil-Feruloil-H ₂ O] ⁻	Ácido 4-5-cafeoil-feruloilquinico	2

APÊNDICE D. CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS EM ESPÉCIES MEDICINAIS DE *Mikania*

11	10,9	483,1307	[M-H]	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₀	-0,7	-	-	337,0925 173,0445 163,0401 119,0500	[M-H-(p-cumaroil)] ⁻ [M-H-2(p-cumaroil)-H ₂ O] ⁻ [Cumaroil] ⁻ [Cumaroil-CO ₂] ⁻	Ácido 3-5-dicumaroilquínico	2
12	11,0	349,1635 366,1879	[M+H] ⁺ [M+NH ₄] ⁺	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	-	331,1524 247,1311 229,1216 201,1263 183,147	[M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O] ⁺ [M+H-C ₄ H ₆ O ₃] ⁺ [M+H-H ₂ O-C ₄ H ₆ O ₃] ⁺ [M+H-H ₂ O-C ₄ H ₆ O ₃ -CO] ⁺ [M+H-2H ₂ O-C ₄ H ₆ O ₃ -CO] ⁺	-	-	3-hidroxi-metacriloil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido / epoxi-metacriloil-6-hidroxi-1(10),4(5),11(13)-trien-7,8-germacrolido	2
13	11,1	483,1311	[M-H]	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₀	-0,7	-	-	337,0928 173,0441 163,0398 119,0509	[M-H-(p-cumaroil)] ⁻ [M-H-2(p-cumaroil)-H ₂ O] ⁻ [Cumaroil] ⁻ [Cumaroil-CO ₂] ⁻	Ácido 4-5-dicumaroilquínico	2
14	11,1	315,0517 317,0650	[M-H] [M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	-2,2 1,7	302,0395 168,0035 140,0087	[M+H-CH ₃] ⁺ [M+H-CH ₃ -Anel B] ⁺ [M+H-CH ₃ -Anel B-CO] ⁺	300,0280 133,0298 272,0314 136,9880	[M-H-CH ₃] ⁻ [M-H-A ring] ⁻ [M-H-CO] ⁻ [M-H-B ring-CHO] ⁻	Eupatifolin	2
15	11,1	285,0411	[M-H]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-2,4	NA	NA	257,0433 151,0037 133,0299	[M-H-CO] ⁻ [M-H-B ring] ⁻ [M-H-A ring] ⁻	3',4',5',7-tetrahydroxy-flavone (Luteolin)	2
16	11,5	269,0451	[M-H]	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	1,77	NA	NA	117,0341 151,0032	[M-H-A ring] ⁻ [M-H-B ring] ⁻	4',5',7-trihydroxy-flavone (Apigenin)	2
17	11,5	299,0566 599,1201 301,0702	[M-H] [2M-H]	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	-1,6 - 1,6	286,0450 258,0503 168,0062 140,0093	[M+H-CH ₃] ⁺ [M+H-CH ₃ -CO] ⁺ [M+H-CH ₃ -Anel B] ⁺ [M+H-CH ₃ -Anel B-CO] ⁺	284,0328 256,0376 151,0035 117,0352 136,9888 107,0131	[M-H-CH ₃] ⁻ [M-H-CH ₃ -CO] ⁻ [M-H-B ring] ⁻ [M-H-A ring] ⁻ [M-H-B ring-CHO] ⁻ [M-H-B ring-C ring] ⁻	4',5',7-trihydroxy-6-methoxyflavone (Hispidulin)	2
18	11,6	299,0563	[M-H]	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	-1,5	NA	NA	284,0329 256,0379 151,0028 133,0295 107,0136	[M-H-CH ₃] ⁻ [M-H-CH ₃ -CO] ⁻ [M-H-B ring] ⁻ [M-H-A ring] ⁻ [M-H-B ring-C ring] ⁻	4',5',7-trihydroxy-7-methoxyflavone (Sorbifolin)	2
19	11,8	696,3318 701,2874 679,3046	[M+NH ₄] ⁺ [M+Na] ⁺ [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	-	679,3065 661,2953 433,1823 415,1703 352,2821 331,2821 247,1300 229,1203 211,1092 201,1253 183,1149	NS	-	-	Lactona sesquiterpênica	3
20	11,9	415,2081	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	-	281,1366 225,0963 135,0794 119,0843 107,0868 91,0527	134,07 loss NS CO loss C ₇ H ₇ ⁺	-	-	Não identificado	4
21	12,0	649,2222	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	-	631,2116 547,1937 403,0971 357,0926 300,0594 229,1197 211,1088 201,1239 183,1146	NS	-	-	Lactona sesquiterpênica	3

APÊNDICE D. CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS EM ESPÉCIES MEDICINAIS DE *Mikania*

22	12,4	147,0793 349,1325	in-source frag [M+H] ⁺	-	-	147,0790 119,0850 91,0539	NS CO loss C ₇ H ₇ ⁺	-	-	Não identificado	4
23	12,6	293,2124	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	-0,8	-	-	-	-	ácido linolenico hidroxilado	2
24	13,1	295,2281	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	-0,8	-	-	-	-	ácido linoleico hidroxilado	2
25	15,9	385,2387	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	-0,6	-	-	299,1984 85,0297	[M-H-Metacryloyl] ⁻ C ₄ H ₅ O ₂ ⁻	ent-15-metacryloyl kaur-16(17)en-19 oic acid	2
26	17,0	301,2178	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	-1,6	-	-	-	-	entkaur-16(17)en-19 oic acid (Kaurenoic acid)	1
27	17,4	421,239 301,21*	[M-H] ⁻ [M+H-ác, benzóico] ⁺	C ₂₇ H ₃₄ O ₄	-1,4 -	255,2093	[M+H-ác,benzóico-H ₂ O-CO] ⁺	299,2015 121,0295 77,0399	[M-H-benzoyl] ⁻ C ₇ H ₅ O ₂ ⁻ [Benzoyl-CO ₂] ⁻	ent-15-benzoyl kaur-16(17)en-19 oic acid ácido benzoilgrandiflorico	1
28	17,6	644,4115 627,3875 649,3661 665,3385	[M+NH ₄] ⁺ [M+H] ⁺ [M+Na] ⁺ [M+K] ⁺	C ₃₇ H ₅₄ O ₈	- 2,5 - -	627,3877 609,3763 507,3434 261,2201 247,1318 229,1212 201,1257 183,1144	[M+NH ₄ -NH ₃] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O-hidroxiacetilolil] ⁺ R=O ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -linolenil-hidroxiacetilolil] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -linolenil-hidroxiacetilolil-H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -linolenil-hidroxiacetilolil-2H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -linolenil-hidroxiacetilolil-H ₂ O-CO] ⁺	-	-	hidroxil-hidroxiacetilolil-linolenil germacradienolido / hidroxil-epoximetacrilolilmetacrilolil-linolenil germacradienolido	2
29	18,4	447,2546 301,21*	[M-H] ⁻ [M+H-ác, cinamoil] ⁺	C ₂₉ H ₃₆ O ₄	-1,0 -	255,2093	[M+H-ác,cinamoil-H ₂ O-CO] ⁺	299,2034 147,0454 103,0554	[M-H-cinamoil] ⁻ C ₉ H ₇ O ₂ ⁻ [Cinamoil-CO ₂] ⁻	Ácido ent-15-cinamoil caur-16(17)-en-19-óico (ácido cinamoilgrandiflorico)	1
30	20,0	622,4300 627,3861	[M+NH ₄] ⁺ [M+Na] ⁺	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	2,1 -	605,4023 587,3921 485,3601 257,2458 239,2356 247,1305 229,1218 201,1237 183,1150	[M+NH ₄ -NH ₃] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O-hidroxiacetilolil] ⁺ C ₁₆ H ₃₃ O ₂ ⁺ [C ₁₆ H ₃₃ O ₂ -CO] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -palmitoil-hidroxiacetilolil] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -palmitoil -hidroxiacetilolil-H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ - palmitoil-hidroxiacetilolil-2H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ - palmitoil-hidroxiacetilolil-H ₂ O-CO] ⁺	-	-	hidroxil-hidroxiacetilolil-palmitoil germacradienolido	2
31	20,6	578,4043	[M+NH ₄] ⁺	C ₃₃ H ₅₂ O ₇	1,4	561,3755 543,3659 457,3299 333,1676 315,1562 247,1317 229,1212 201,1244 183,1154	[M+NH ₄ -NH ₃] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O-metacrilolil] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -miristoil] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O-miristoil] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -miristoil-metacrilolil] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -miristoil-metacrilolil-H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -miristoil-metacrilolil-2H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -miristoil-metacrilolil-H ₂ O-CO] ⁺	-	-	hidroxil-metacrilolil-miristoil germacradienolido	2
32	20,6	441,3711	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	3,6	423,3578 287,2358 233,1888 149,0934 135,1153	[M+H-H ₂ O] ⁺ - - - -	-	-	Oxo-triterpeno	3

APÊNDICE D. CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS EM ESPÉCIES MEDICINAIS DE *Mikania*

33	20.9	425.3759	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O	-2,3	407.3619	[M+H-H ₂ O] ⁺			triterpeno	3
34	21.6	429.3693	[M+H] ⁺	C ₂₉ H ₄₆ O ₂	-	411.3584 401.3345 351.1265 219.1346 205.1198 191.1055 177.0892 165.0894	NS	-	-	Esterol C29	3
35	22.6	397.3798	[M+H] ⁺	-	-	243.2085 215.1789 175.1449 161.1316 147.1156 135.1165 119.0845	NS	-	-	Não identificado	4
36	23.1	606,4351 611,3901	[M+NH ₄] ⁺ [M+Na] ⁺	C ₃₅ H ₅₆ O ₇	2,1 -	589.4075 571.3973 485.3618 333.1689 315.1558 257.2458 247.133 229.1192 201.1254 183.1152	[M+NH ₄ -NH ₃] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O-metacriloil] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -palmitoil] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -H ₂ O-palmitoil] ⁺ C ₁₆ H ₃₃ O ₂ ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -palmitoil-metacriloil] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -palmitoil-metacriloil-H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -palmitoil-metacriloil-2H ₂ O] ⁺ [M+NH ₄ -NH ₃ -palmitoil-metacriloil-H ₂ O-CO] ⁺	-	-	hidroxil-metacriloil-palmitoil germacradienolido	2
37	23.7	483,3816	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₅₀ O ₃	3,5	432,3577 287,2347 233,1876 189,1615	[M+H-HAc] ⁺ NS NS NS			Oxo triterpeno acetato	3

NA: MS/MS espectro não adquirido (baixa abundância),

NS: Não sugerido

*Fragmento formado "in-source".

- Não detectado ou não ioniza

NC: Nível de confiança

Tabela D.2. Evidências para proposta da identidade de alguns metabólitos detectados por LC-MS em *M. glomerata*.

ID	TR (min)	Espectro MS Scan			Erro massa (ppm)	Espectro MS/MS +ESI		Espectro MS/MS -ESI		Proposta de identidade	NC
		m/z obs.	Espécie iônica	Fórmula molecular		m/z obs. Íons fragm.	Íons fragmentos Espécies iônicas	m/z obs. Íons fragm.	Íons fragmentos Espécies iônicas		
1	10,5	515,1212	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	-3,3	-	-	NA	NA	Ácido dicafeoilquinico	3
2	10,9	483,1310	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₀	-2,7	-	-	NA	NA	Ácido 4-5-dicumaroilquinico	3
3	10,9	335,2208	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	0,9	317,2108 299,2019 289,2153 271,2039	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-2H ₂ O] ⁺	-	-	Ácido dihidroxi caur-16(17)en-19-óico	3
4	11,0	335,2205	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	0,8	317,2090 299,1975 271,2051 253,1603	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-3H ₂ O-CO] ⁺	-	-	Ácido dihidroxi caur-16(17)en-19-óico	3
5	11,1	483,1309	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₀	-2,5	-	-	NA	NA	Ácido 4-5-dicumaroilquinico	3
6	11,2	319,2262* 335,2235	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	-1,2 -2,1	301,2133 283,2003 273,2194 255,2085	[M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-3H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-3H ₂ O-CO] ⁺	317,2120 299,2003 271,2095	[M-H-H ₂ O] ⁻ [M-H-2H ₂ O] ⁻ [M-H-2H ₂ O-CO] ⁻	Ácido dihidroxipimar-15(16)-en-óico	3
7	11,4	317,2108* 333,2080	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	-2,7	299,2005 271,2052 253,1944	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺	289,2179	[M-H-CO ₂] ⁻	Ácido dihidroxi caur-16(17)en-19-óico	3
8	11,9	335,2213 333,2082	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	1,2 -	317,2096 299,2023 289,2023 271,2060 253,1939 193,1212	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-3H ₂ O-CO] ⁺ NS	289,2179	[M-H-CO ₂] ⁻	Ácido dihidroxi caur-16(17)en-19-óico	3
9	12,0	335,2222 333,2087	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	-1,5 -	317,2107 299,1984 271,2042	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺	289,2170	[M-H-CO ₂] ⁻	Ácido dihidroxi caur-16(17)en-19-óico	3
10	12,3	317,2105 315,1977	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	1,2 -	299,1991 289,2144 271,2051 253,1942	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-3H ₂ O-CO] ⁺	271,2076	[M-H-CO ₂] ⁻	Ácido hidroxi caura-dien-19-óico	3
11	12,5	301,2158* 317,2130	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	1,3 -2,5	283,2087 255,2099	[M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺	273,2230	[M-H-CO ₂] ⁻	Ácido grandiflorico / steviol	2
12	12,6	317,2109 315,1977	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	0,6 -	299,1980 271,2045 253,1936	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-3H ₂ O-CO] ⁺	271,2072	[M-H-CO ₂] ⁻	Ácido hidroxi-caura-dien-19-óico	3
13	12,8	301,2158* 317,2129	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	- -2,2	255,2093	[M+H-H ₂ O-CO] ⁺	299,2049 273,2198	[M-H-H ₂ O] ⁻ [M-H-CO ₂] ⁻	Ácido dihidroxi-caur-16(17)en-19-óico	3

APÊNDICE D. CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS EM ESPÉCIES MEDICINAIS DE *Mikania*

14	13,2	317,2101 315,1979	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	0,7 -	299,2000 271,2049 253,2049	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-3H ₂ O-CO] ⁺	271,2032	[M-H-CO ₂] ⁻	Ácido hidroxi-caura-dien-19-óico	3
15	14,6	441,0478 439,0352	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₆ O ₁₁ S	2,0 -2,4	-	-	359,0779 344,0538 329,0311 314,0088 301,0358 286,0127 149,0251	[M+H-SO ₃] ⁺ [M+H-SO ₃ -CH ₃] ⁺⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆] ⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆] ⁺⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆ -CO] ⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆ -CO-CH ₃] ⁺⁺ C ₈ H ₆ O ₂ ⁻ (Anel B)	3',4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavonol,3-sulfona	2
16	16,5	425,0523 423,0406	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₄ O ₁₀ S	-	-	-	343,0828 328,0597 313,0364 298,0147 285,0406 270,0190 133,0276	[M+H-SO ₃] ⁺ [M+H-SO ₃ -CH ₃] ⁺⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆] ⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆] ⁺⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆ -CO] ⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆ -CO-CH ₃] ⁺⁺ C ₈ H ₆ O ₂ ⁻ (Anel B)	4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavonol,3-sulfona	2
17	17,3	301,2181	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	1,0	-	-	-	-	Ácido ent-caur-16(17)en-19-óico (ácido caurenóico)	1
18	18,7	301,2156 447,2559	[M+H-CL] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₉ H ₃₆ O ₄	2,0 1,6	255,2093	[M+H-CL-H ₂ O-CO] ⁺	299,2056 147,0458 103,0553	[M-H-C ₉ H ₆ O ₂] ⁻ C ₉ H ₇ O ₂ ⁻ [C ₉ H ₇ O ₂ -CO ₂] ⁻	Ácido hidroxi-caura-dien-19-óico Ácido cinamoilgrandiflorico	1

NA: MS/MS espectro não adquirido (baixa abundância),

NS: Não sugerido

*Fragmento formado "in-source".

- Não detectado ou não ioniza

NC: Nível de confiança

CL: cadeia lateral

Tabela D.3. Evidências para proposta da identidade de alguns metabólitos detectados por LC-MS em *M. laevigata*.

ID	TR (min)	Espectro MS Scan			Erro massa (ppm)	Espectro MS/MS +ESI		Espectro MS/MS -ESI		Proposta de identidade	NC
		m/z obs.	Espécie iônica	Fórmula molecular		m/z obs. íons fragm.	Íons fragmentos Espécies iônicas	m/z obs. íons fragm.	Íons fragmentos Espécies iônicas		
1	4,9	167,0691 165,0565	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₃	-0,8	149,0590 121,0642 107,0489 77,0385		147,0458 121,0661 106,0426	[M-H-H ₂ O] ⁻ [M-H-CO ₂] ⁻ NS	Não identificado	4
2	6,2	147,0458	[M+H] ⁺	C ₉ H ₆ O ₂		103,0538 91,0543 77,0386 65,0385	[M+H-H ₂ O-CO ₂] ⁺ C ₇ H ₇ ⁺ C ₆ H ₅ ⁺ C ₅ H ₅ ⁺	-	-	Cumarina	1
3	8,0	165,05371 63,0403	[M-H] ⁻ [M+H] ⁺	C ₉ H ₆ O ₃	0,9 -0,2	147,0432 103,0539 91,0541 77,0385	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-H ₂ O-CO ₂] ⁺ C ₇ H ₇ ⁺ C ₆ H ₅ ⁺	119,0503	[M-H-CO ₂] ⁻	Ácido hidróxicinâmico	1
4	10,8	917,3852	NS	NS		-	-	873,3949 855,3848 767,3520 725,3520 725,3425 685,3086 643,2995 625,2882 479,2294 335,1874 165,0579 147,0456	NS	Não identificado	4
5	10,9	919,4018	NS	NS		-	-	875,4110 857,3995 769,3683 727,3692 685,3119 643,3002 625,2882 335,1878 317,1774 163,0618 147,0449	NS	Não identificado	4
6	11,1	961,4098	NS	NS		-	-	917,4225 899,4121 811,3781 667,2999 165,0560 147,0455	NS	Não identificado	4
7	11,1	875,4113	NS	NS		-	-	857,3992 769,3688 727,3570 335,1871 317,1764 163,0614 147,0448 191,0614	NS	Não identificado	4
8	11,3	903,406	NS	NS		-	-	753,3737 711,3614 669,3143 627,3017	NS	Não identificado	4

APÊNDICE D. CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS EM ESPÉCIES MEDICINAIS DE *Mikania*

									609,294331 9,1938 165,0562 147,0454 101,0611				
9	10,5	515,1222	[M-H] ⁻	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	-	-	NA	NA	Ácido dicafeoilquinico	3		
10	11,4	337,2543 335,2240	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	- -1,25	NA	NA			Ácido dihidroxi caur-16(17)en-19-óico	3		
11	11,5	317,2094* 333,2086	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	- -1,54	299,1984 271,2048 253,1954	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺	-	-	Ácido dihidroxi caur-16(17)en-19-óico	3		
12	11,6	309,2047 307,1925	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	- -1,07	291,1943 273,1824	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O] ⁺	NA	NA	Não identificado	4		
13	11,673	361,0898 359,0788	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	- 1,99	346,0663 328,0543 300,0610	[M+H-CH ₃] ⁺ [M+H-CH ₃ -H ₂ O] ⁺ [M+H-CH ₃ -H ₂ O-CO] ⁺	-	-	3',4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavonol	2		
14	12,3	301,2154* 317,2135	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	- -1,28	283,2055 255,2092	[M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺	-	-	Ácido hidroxi caur-16(17)en-19-óico	3		
15	12,3	317,2102 333,2084	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	- -1,27	NA	NA			Ácido dihidroxi caur-16(17)en-19-óico	3		
16	12,4	301,2147 317,2135	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	- -1,28	283,2055 271,1826 255,2088	[M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺	-	-	Ácido hidroxi-caura-dien-19-óico	3		
17	12,6	277,2152 293,2135	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	- -1,24	231,2085	-HAc	275,2026 235,1708 183,1389 171,1030	NS	Ácido graxo	3		
18	12,7	317,2104 315,1981	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	0,6 -	299,1985 271,2047 253,2047	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺ [M+H-3H ₂ O-CO] ⁺	271,2037	[M-H-CO ₂] ⁻	Ácido hidroxi-caura-dien-19-óico	3		
19	13,1	295,2289	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	-1,06	-	-	277,2181 195,1394 183,1389 171,1029	NS	Ácido graxo	3		
20	13,4	301,2158* 317,2139	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	-1,69	283,2051 255,2090	[M+H-2H ₂ O] ⁺ [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺	-	-	Ácido hidroxi caur-16(17)en-19-óico	3		
21	16,1	301,2165* 387,2566	[M+H-CL] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₄ H ₃₆ O ₄	-2,5	255,2093	[M+H-ácido isobutírico-H ₂ O-CO] ⁺	317,2138 299,2021 87,0453	[M-H-isobutiril] ⁻ [M-H-ácido isobutírico] ⁻ C ₄ H ₇ O ₂ ⁻	Ácido isobutiril-caur-16(17)en-19-óico	2		
22	14,6	441,0477 439,0351	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₆ O ₁₁ S	2,0 -2,4	361,0894 346,0660 328,0557 317,0623 299,0541	[M+H-SO ₃] ⁺ [M+H-SO ₃ -CH ₃] ⁺ [M+H-SO ₃ -CH ₃ -H ₂ O] ⁺ [M+H-SO ₃ -CH ₄ -CO] ⁺ [M+H-SO ₃ -CH ₄ -CO-H ₂ O] ⁺	359,0791 344,0555 329,0319 314,0088 301,0369 286,0133 149,0253	[M+H-SO ₃] ⁺ [M+H-SO ₃ -CH ₃] ⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆] ⁺ [M+H-SO ₃ -CH ₃ -C ₂ H ₆] ⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆ -CO] ⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆ -CO-CH ₃] ⁺ C ₈ H ₅ O ₃ ⁻ (Anel B)	3',4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavonol,3-O-sulfona	2		

APÊNDICE D. CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS EM ESPÉCIES MEDICINAIS DE *Mikania*

23	16,5	425,0520 423,0415	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₄ O ₁₀ S		345,0943 326,0762 135,0441	[M+H-SO ₃] ⁺ [M+H-SO ₃ -CH ₃] ⁺ C ₈ H ₇ O ₂ ⁺ (Anel B)	343,0841 328,0602 313,0372 298,0136 285,0422 270,0188 133,0309	[M+H-SO ₃] ⁺ [M+H-SO ₃ -CH ₃] ⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆] ⁺ [M+H-SO ₃ -CH ₃ -C ₂ H ₆] ⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆ -CO] ⁺ [M+H-SO ₃ -C ₂ H ₆ -CO-CH ₃] ⁺ C ₈ H ₅ O ₂ ⁻ (Anel B)	4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavanol,3-O-sulfona	2
24	16,6	271,2291	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	-1,27	-	-	225,2231	-HAc	Não identificado	4
25	17,2	303,2299 301,2188	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	1,0	-	-	-	-	Ácido caur-16(17)en-19-óico (ácido caurenóico)	1
26	17,3	301,2152* 401,2718	[M+H-CL] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₅ H ₃₈ O ₄	-2,02	255,2090	[M+H-ác, hidroximetacrilóil-H ₂ O-CO] ⁺	299,2020 101,0612	[M-H-ácido hidroximetacrilóil] C ₄ H ₅ O ₃ ⁻ (hidroximetacrilóil)	Ácido hidroximetacrilóil-caur-16(17)en-19-óico /Ácido epoximetacrilóil-caur-16(17)en-19-óico	2
27	17,6	301,2149* 421,2406	[M+H-CL] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₄ O ₄	-2,2	283,2022 255,2091	[M+H-ácido benzóico-H ₂ O] ⁺ [M+H-ácido benzóico-H ₂ O-CO] ⁺	299,2030 121,0302 77,0398	[M-H-ácido hidroximetacrilóil] C ₇ H ₅ O ₂ ⁻ (benzoil) [C ₇ H ₅ O ₂ -CO ₂] ⁻	Ácido ent-15-benzoil caur-16(17)en-19-óico acid ácido benzoilgrandiflórico	2
28	17,7	303,2304 301,2189	[M-H] ⁻ [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	-1,57	-	-	-	-	Ácido ent-15-caur-16(17)en-19-óico Ácido caurenóico	1
29	17,9	301,2150* 447,2558	[M+H-CL] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₉ H ₃₆ O ₄	-1,74	-	-	299,2019 147,0454 193,0555	[M-H-C ₉ H ₈ O ₂] C ₉ H ₇ O ₂ ⁻ [C ₉ H ₇ O ₂ -CO ₂] ⁻	Ácido diterpênico esterificado com ácido cinâmico	4
30	18,0	301,2188	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	-1,47	-	-	-	-	Ácido diterpênico	4
31	18,5	301,2150* 447,2558	[M+H-CL] ⁺ [M-H] ⁻	C ₂₉ H ₃₆ O ₄	-1,95	283,2027 255,2088	[M+H-ácido cinâmico-H ₂ O] ⁺ [M+H-ácido cinâmico-H ₂ O-CO] ⁺	299,2056 147,0458 103,0553	[M-H-C ₉ H ₈ O ₂] C ₉ H ₇ O ₂ ⁻ [C ₉ H ₇ O ₂ -CO ₂] ⁻	Ácido ent-15-cinamoil caur-16(17)en-19-óico ácido cinamoilgrandiflórico	1

NA: MS/MS espectro não adquirido (baixa abundância),

NS: Não sugerido

*Fragmento formado "in-source".

- Não detectado ou não ioniza

NC: Nível de confiança

CL: cadeia lateral

Tabela D.4. Evidências para proposta da identidade dos metabólitos detectados por GC-MS em espécies *M. cordifolia*, *M. glomerata* e *M. laevigata*.

N°	RT (min)	m/z obs. Íons fragmentos	Espécies iônicas íos fragmentos	Proposta de identidade	Classe química
1	37,4	482	M ⁺⁺	11-oxo-amirin acetato	triterpeno
2	37,7	472 382 255 129* 73	M ⁺⁺ [M ⁺⁺ -TMSOH] ⁺ [M ⁺⁺ -TMSOH-CL] ⁺ C ₆ H ₁₃ OSi ⁺ C ₃ H ₉ Si ⁺	campesterol TMS derivado	esterol
2	38,7	484 469 394 255 129* 73	M ⁺⁺ [M ⁺⁺ -H ₃ C] ⁺ [M ⁺⁺ -TMSOH] ⁺ [M ⁺⁺ -TMSOH-CL] ⁺ C ₆ H ₁₃ OSi ⁺ C ₃ H ₉ Si ⁺	estigmasterol TMS	esterol
3	39,4	484 469 394 255 129* 73	M ⁺⁺ [M ⁺⁺ -H ₃ C] ⁺ [M ⁺⁺ -TMSOH] ⁺ [M ⁺⁺ -TMSOH-CL] ⁺ C ₆ H ₁₃ OSi ⁺ C ₃ H ₉ Si ⁺	esterol C29 TMS	esterol
4	40,3	498 279 218* 203 189 190 73	M ⁺⁺ C ₁₇ H ₃₁ Si ⁺ [M ⁺⁺ -C ₁₆ H ₂₆] ⁺⁺ [M ⁺⁺ -C ₁₆ H ₂₆ -H ₃ C] ⁺ C ₁₄ H ₂₁ ⁺ [M ⁺⁺ -C ₁₆ H ₂₆ -TMSOH] ⁺⁺ C ₃ H ₉ Si ⁺	β-Amyrin TMS derivado	triterpeno
5	40,3	486 471 396 155 129* 73	M ⁺⁺ [M ⁺⁺ -H ₃ C] ⁺ [M ⁺⁺ -TMSOH] ⁺ [M ⁺⁺ -TMSOH-CL] ⁺ C ₆ H ₁₃ OSi ⁺ C ₃ H ₉ Si ⁺	Sitosterol TMS derivado	esterol
6	40,4	472 382 255 129* 73	M ⁺⁺ [M ⁺⁺ -TMSOH] ⁺ [M ⁺⁺ -TMSOH-CL] ⁺ C ₆ H ₁₃ OSi ⁺ C ₃ H ₉ Si ⁺	esterol C28 TMS derivado	esterol

N°	RT (min)	m/z obs. Íons fragmentos	Espécies iônicas íons fragmentos	Proposta de identidade	Classe química
7	41,1	482	M ⁺	11-oxo-amirin acetato	triterpeno
8	41,2	498 279 218* 203 189 190 73	M ⁺ C ₁₇ H ₃₁ Si ⁺ [M ⁺ -C ₁₆ H ₂₆] ⁺ [M ⁺ -C ₁₆ H ₂₆ -H ₃ C] ⁺ C ₁₄ H ₂₁ ⁺ [M ⁺ -C ₁₆ H ₂₆ -TMSOH] ⁺ C ₃ H ₉ Si ⁺	α-Amyrin TMS derivado	triterpeno
9	41,6	498 279 218 203 189* 190 191 73	M ⁺ C ₁₇ H ₃₁ Si ⁺ [M ⁺ -C ₁₆ H ₂₆] ⁺ [M ⁺ -C ₁₆ H ₂₆ -H ₃ C] ⁺ C ₁₄ H ₂₁ ⁺ [M ⁺ -C ₁₆ H ₂₆ -TMSOH] ⁺ C ₁₄ H ₂₃ ⁺ C ₃ H ₉ Si ⁺	lupeol TMS	triterpeno
10	42,45	468 453 189*	M ⁺ [M ⁺ -H ₃ C] ⁺ C ₁₄ H ₂₁ ⁺	Triterpeno acetato	triterpeno
11	42,8	468 453 218* 203 189	M ⁺ [M ⁺ -H ₃ C] ⁺ [M ⁺ -C ₁₆ H ₂₆] ⁺ [M ⁺ -C ₁₆ H ₂₆ -H ₃ C] ⁺ C ₁₄ H ₂₁ ⁺	β-Amyrin acetato	triterpeno
12	43,0	484 217 255 129* 73	M ⁺ - [M ⁺ -TMSOH-CL] ⁺ C ₆ H ₁₃ OSi ⁺ C ₃ H ₉ Si ⁺	esterol C29 TMS	esterol
13	43,9	468 453 218* 203 189	M ⁺ [M ⁺ -H ₃ C] ⁺ [M ⁺ -C ₁₆ H ₂₆] ⁺ [M ⁺ -C ₁₆ H ₂₆ -H ₃ C] ⁺ C ₁₄ H ₂₁ ⁺	triterpeno acetato	triterpeno
14	44,1	468 453 408 393 189*	M ⁺ [M ⁺ -H ₃ C] ⁺ [M ⁺ -HOAc] ⁺ [M ⁺ -HOAc-CH ₃] ⁺ C ₁₄ H ₂₁ ⁺	lupeol acetato	triterpeno

N°	RT (min)	m/z obs. Íons fragmentos	Espécies iônicas íons fragmentos	Proposta de identidade	Classe química
15	44,1	498	M ⁺⁺	triterpeno TMS	triterpeno
		218	[M ⁺⁺ -C ₁₆ H ₂₆] ^{**}		
		203	[M ⁺⁺ -C ₁₆ H ₂₆ -H ₃ C] ⁺		
		189*	C ₁₄ H ₂₁ ⁺		
		73	C ₃ H ₉ Si ⁺		
16	46,3	468	M ⁺⁺	triterpeno acetato	triterpeno
		453	[M ⁺⁺ -H ₃ C] ⁺		
		408	[M ⁺⁺ -HOAc] ^{**}		
		393	[M ⁺⁺ -HOAc-CH ₃] ⁺		
		189*	C ₁₄ H ₂₁ ⁺		
17	46,7	468	M ⁺⁺	triterpeno acetato	triterpeno
		453	[M ⁺⁺ -H ₃ C] ⁺		
		408	[M ⁺⁺ -HOAc] ^{**}		
		393	[M ⁺⁺ -HOAc-CH ₃] ⁺		
		189*	C ₁₄ H ₂₁ ⁺		
		191	C ₁₄ H ₂₃ ⁺		

Legenda: CL: Cadeia lateral, * Pico Base, TMS: trimetilsilil