UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Metabolômica como ferramenta na análise quimiotaxonômica
do gênero *Catasetum* (ORCHIDACEAE)**

Karen Dayane de Oliveira Bandeira

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Metabolômica como ferramenta na análise quimiotaxonômica
do gênero *Catasetum* (ORCHIDACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientada: Karen Dayane de Oliveira
Bandeira

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto

**Versão Corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 31/03/2017. A versão
original encontra-se disponível na faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Ribeirão Preto/USP.**

Ribeirão Preto
2017

LOMBADA

BANDEIRA, K.D.O.	Metabolômica como ferramenta na análise quimiotaxonômica do gênero <i>Catasetum</i> (ORCHIDACEAE)	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCFRPUSP 2017
-----------------------------	--	--	---------------------------------------

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.

Bandeira, Karen Dayane de Oliveira

Metabolômica como ferramenta na análise quimiotaxonômica do gênero *Catasetum* (ORCHIDACEAE). Ribeirão Preto, 2017. 122p.; 30cm.

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

Orientador: Gobbo Neto, Leonardo.

1. Orchidaceae. 2. *Catasetum*. 3. Metabolômica. 4. GC-MS 5. UHPLC-MS. 6. Espectrometria de massas. 7. Quimiotaxonomia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karen Dayane de Oliveira Bandeira

Metabolômica como ferramenta na análise quimiotaxonômica do gênero *Catasetum* (ORCHIDACEAE).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

À minha família, meus melhores amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus de infinita bondade, beleza e misericórdia que me guia e me protege todos os dias, que me ama mais do que tudo e que tudo faz por mim. Obrigada Senhor por concluir mais essa etapa comigo, por nunca me abandonar e nunca desistir de mim, obrigada por me mostrar seus caminhos e me capacitar a seguir em frente.

Ao Prof. Dr Leonardo Gobbo Neto, por quem guardo imenso respeito e admiração, pela atenção, paciência, disponibilidade, compreensão e essencial orientação na realização desse estudo, além de sua contribuição no meu crescimento pessoal.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais e Sintéticos, importantes parceiros ao longo deste período, por todo apoio e por todas as trocas de experiências.

Às amigas Camila e Marília pelo auxílio, pelo companheirismo, pela alegria do convívio diário, pela disposição e pela contribuição direta no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Emerson Ricardo Pansarin pelos conhecimentos compartilhados, pela colaboração nesse estudo no fornecimento das amostras de orquídeas e à aluna Evelyn Franken pelo auxílio nas amostragens e pelos cuidados e identificação dos indivíduos utilizados.

À FAPESP pela bolsa concedida (Processo nº 2014/20436-0) e pelo financiamento deste projeto.

À CAPES, pela bolsa concedida no início do mestrado.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), pela oportunidade e apoio durante todo o processo.

Aos meus amigos, que em todo momento, perto ou distante, fizeram a diferença ao longo de toda a minha vida, através da confiança e do amor mútuo entre nós.

Aos companheiros do Ministério Universidades Renovadas, que se tornaram a cada dia mais importantes na minha vida. Pâmela, Pedro, Raony, Douglas, Michelle, Aline, Letícia e Raul obrigada por serem tão cheios de Deus e compartilharem tanto amor por onde estão.

Aos irmãos da paróquia Santa Tereza D'ávila, aos ministérios de música e intercessão e ao Padre Josirlei por todas as alegrias, pelos momentos de oração, por serem meus companheiros de caminhada em busca incessante pela santidade e por fazerem parte da minha formação espiritual.

À minha família, que esteve sempre ao meu lado durante minha formação acadêmica, que me compreenderam e me incentivaram sempre a buscar a realização dos meus sonhos, sem vocês eu nada seria.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu realizasse esse estudo, o meu mais sincero muito obrigada.

*“A natureza é o único livro que oferece um
conteúdo valioso em todas as suas folhas”.*

Johann Goethe

RESUMO

BANDEIRA, K. D. O. **Metabolômica como ferramenta na análise quimiotaixonômica do gênero *Catasetum* (ORCHIDACEAE)**. 2017.122f Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A família Orchidaceae é a maior família entre as monocotiledôneas e representa uma das maiores famílias de plantas floríferas com um número estimado de cerca de 30 mil espécies. A complexidade taxonômica de um dos gêneros dentro dessa família, o *Catasetum*, tem despertado muito interesse por parte dos cultivadores e pesquisadores em Orchidaceae, especialmente devido aos novos táxons que estão sendo descobertos no gênero. Visando aprimorar a classificação de espécies do gênero, uma ferramenta a ser utilizada é a análise dos constituintes químicos do metabolismo dessas plantas, onde fica evidenciada a necessidade de estudos utilizando métodos analíticos mais sensíveis, rápidas e seletivas, como a análise metabolômica. A obtenção da impressão digital metabólica é a obtenção detalhada dos metabólitos do organismo sob determinada condição, produzindo um cromatograma que é característico daquela planta, como uma impressão digital. Através disso, é possível determinar diferenças metabólicas em amostras, por meio de ferramentas estatísticas. Para o refinamento dos dados, é necessário o uso de softwares específicos que extraem as informações úteis para as análises. Foram analisadas 42 espécies distintas do gênero *Catasetum* e algumas duplicatas, totalizando 51 amostras por GC-MS e UHPLC-MS(ESI-Orbitrap). As “impressões digitais” metabólicas foram processadas nos softwares *MetAlign*TM e *MSClust*, e as matrizes geradas foram analisadas por análise de componentes principais (PCA), análise de cluster hierárquico (HCA) e análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA). Os métodos utilizados para as análises tanto por GC-MS quanto por UHPLC-MS resultaram em dados satisfatórios para análise metabolômica, gerando 57 substâncias voláteis identificadas a partir da fragrância das flores, sendo acetato de nerila, sabineno, β -mirceno, α -pineno e β -pineno as mais frequentes. Os resultados das análises metabolômicas apresentaram proximidade com a filogenia, principalmente em níveis mais específicos. Os grupos gerados pelas análises, de modo geral, foram coerentes quanto à semelhança metabólica entre as espécies que os compõem, sugerindo a possibilidade do uso de impressões digitais metabólicas como uma boa ferramenta para análise quimiotaixonômica.

Palavras-chave: Orchidaceae. *Catasetum*. Metabolômica. GC-MS. UHPLC-MS. Espectrometria de massas. Quimiotaixonomia.

ABSTRACT

BANDEIRA, K. D.O. **Metabolomics as a tool for chemotaxonomic analysis of the genus *Catasetum* (Orchidaceae)**.2017.122f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The Orchidaceae family is the largest family among monocotyledons and represents one of the largest families of flowering plants with an estimated 30,000 species. The taxonomic complexity of one of the genera within this family, the *Catasetum*, has aroused much interest from growers and researchers in Orchidaceae, especially due to the new taxa being discovered in the genus. Aiming to improve the classification of species of the genus, a tool to be used is the analysis of the chemical constituents of the metabolism of these plants, where it is evidenced the need for studies using analytical methodologies more sensitive, fast and effective, such as the metabolomics analysis. Obtaining the metabolic fingerprint is the detailed obtaining of the metabolites of the organism under certain condition, producing a chromatogram that is characteristic of that plant, like a fingerprint. Through this, it is possible to determine metabolic differences in samples, through statistical tools. For the refinement of the data, it is necessary to use specific softwares that extract the useful information from analyzes data. The information generated can be used with different applications. A total of 51 samples were analyzed by GC-MS and UHPLC-MS (ESI-Orbitrap), 42 different species of the genus *Catasetum* and some duplicates. Metabolic "fingerprints" were processed in the MetAlignTM and MScIust softwares, and the generated matrices were analyzed by Principal Component Analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA) and partial least squares orthogonal discriminant analysis (OPLS-DA). The methods used for analysis by both GC-MS and UHPLC-MS resulted in satisfactory data for metabolomics analysis, generating 57 volatile substances identified from the flower fragrance, being neryl acetate, sabinene, β -myrcene, α -pinene and β -pinene the most frequent. The results of the metabolic analyzes showed proximity to the phylogeny, mainly in more specific levels. The groups generated by the analyzes, in general, were coherent regarding the metabolic similarity between the species that compose them, suggesting the possibility of the use of metabolic fingerprints as a good tool for chemotaxonomic analysis.

Keywords: Orchidaceae. *Catasetum*. Metabolomics. GC-MS. UHPLC-MS. Mass Spectrometer. Chemotaxonomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	13
Método desenvolvido para extração de voláteis.	
Figura 2	18
Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir de <i>Catasetum fimbriatum</i> utilizando tubos de Porapak TM Q (em azul) e SPME (em cor-de-rosa).	
Figura 3	22
Gráfico de <i>Scores Scatter Plot</i> por PCA (Análise de Componentes Principais) das espécies de <i>Catasetum</i> analisadas por GC-MS.. $R^2X(\text{acum})$: 0.419. Q^2 : -0.0662.	
Figura 4	23
Gráfico de <i>Scores Scatter Plot</i> por PCA (Análise de Componentes Principais) das análises por GC-MS, após a retirada da espécie <i>Catasetum expansum</i> (outlier). $R^2X(\text{acum})$: 0.37. Q^2 : -0.0713.	
Figura 5	25
A. Gráfico de <i>Scores Scatter Plot</i> em 3D por PCA (Análise de Componentes Principais) com <i>C. luridum</i> . $R^2X(\text{acum})$: 0.37. Q^2 : -0.0713. B. Gráfico de <i>Scores Scatter Plot</i> em 3D por PCA (Análise de Componentes Principais) sem <i>C. luridum</i> . $R^2X(\text{acum})$: 0,539. Q^2 : 0.011.	
Figura 6	26
Gráfico de <i>Scores Scatter Plot</i> por PCA (Análise de Componentes Principais) das análises por GC-MS após a retirada da espécie <i>Catasetum expansum</i> e <i>Catasetum luridum</i> (outliers). $R^2X(\text{acum})$: 0,539. Q^2 : 0.011.	
Figura 7	27
Análise de cluster hierárquico (HCA) das impressões digitais metabólicas obtidas por GC-MS das espécies de <i>Catasetum</i> , após a retirada dos outliers.	
Figura 8	28
Análise de cluster hierárquico (HCA) das impressões digitais metabólicas obtidas por GC-MS das espécies de <i>Catasetum</i> , após a retirada dos outliers; separado em cinco grupos.	
Figura 9	29
Gráfico de <i>Scores Scatter Plot</i> por PCA (Análise de Componentes Principais) das análises por GC-MS, após a retirada dos outliers, coloridos de acordo com os grupos encontrados no HCA, demonstrando os padrões de agrupamento. $R^2X(\text{acum})$: 0,539. Q^2 : 0.011.	
Figura 10	32
Gráfico de <i>Scores Scatter Plot</i> da análise por OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) das análises por GC-MS. $R^2X(\text{acum})$: 0.534. $R^2Y(\text{acum})$: 0.901. Q^2 : 0.589.	
Figura 11	33
Gráfico de VIP (Importância das Variáveis para a Projeção) das análises por GC-MS. B. Gráfico de <i>Loadings Scatter Plot</i> do OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) das análises por GC-MS. Em vermelho estão as variáveis que possuem valores de $VIP > 1$.	
Figura 12	34
Exemplos de gráfico de Coeficientes, relacionados ao grupo A (amarelo) e grupo B (azul) das análises por GC-MS. Em vermelho estão as variáveis que possuem valores positivos, utilizadas nas análises.	

Figura 13	37
Gráfico <i>Scores Scatter Plot</i> por PCA (Análise de Componentes Principais) das espécies de <i>Catasetum</i> analisadas por UHPLC-MS(Orbitrap TM). $R^2X(\text{acum})$: 0,479. Q^2 : -0,077.	
Figura 14	38
Gráfico de <i>Scores Scatter Plot</i> por PCA (Análise de Componentes Principais) da análise por UHPLC-MS(Orbitrap TM) após a retirada da espécie <i>Catasetum expansum</i> (outlier). $R^2X(\text{acum})$: 0.864. Q^2 : 0.822.	
Figura 15	40
Análise de cluster hierárquico (HCA) das impressões digitais metabólicas obtidas por UHPLC-MS(Orbitrap TM) das espécies de <i>Catasetum</i> , após a retirada dos outliers.	
Figura 16	41
Análise de cluster hierárquico (HCA) das impressões digitais metabólicas obtidas por UHPLC-MS(Orbitrap TM) das espécies de <i>Catasetum</i> , havendo padrão de separação em três grandes grupos.	
Figura 17	43
Gráfico de <i>Scores Scatter Plot</i> da análise por OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) das análises por UHPLC-MS(Orbitrap TM). $R^2X(\text{acum})$: 0.848. $R^2Y(\text{acum})$: 0.801. Q^2 : 0.608.	
Figura 18	44
A. Gráfico de VIP (Importância das Variáveis para a Projeção) das análises por GC-MS. B. Gráfico de <i>Loadings Scatter Plot</i> do OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) das análises por GC-MS. Em vermelho estão as variáveis que possuem valores de $VIP > 1$.	
Figura 19	45
Exemplos de gráfico de Coeficientes, relacionados ao grupo A (verde) e grupo B (azul) das análises por UHPLC-MS(Orbitrap TM). Em vermelho estão as variáveis que possuem valores positivos, utilizadas nas análises.	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	8
Classificação do gênero <i>Catasetum</i>	
Tabela 2	35
Dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos por GC-MS das substâncias discriminantes apontadas nas análises de correlação.	
Tabela 3	48
Dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos por UHPLC-MS(Orbitrap TM) das substâncias discriminantes apontadas nas análises de correlação.	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AIF	<i>All Ion Fragmentation</i> (Fragmentação Total de Íons)
DA	<i>Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminatória)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNP	<i>Dictionary of Natural Products</i> ©
EI	<i>Electron Ionization</i> (Ionização por Elétrons)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por Electrospray)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FFCLRP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia Gasosa)
HCA	<i>Hierarchical Clustering Analysis</i> (Análise de Cluster Hierárquico)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
KI	<i>Kovats Index</i> (Índice de Kóvats)
<i>m/z</i>	massa/carga
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
OPLS	<i>Orthogonal Partial Least Squares</i> (Análise por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PLS	<i>Partial Least Squares</i> (Análise por Mínimos Quadrados Parciais)
PTFE	Politetrafluoretileno
Q^2	Poder de predição
R^2	Coeficiente de correlação múltipla
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPME	<i>Solid Phase Micro Extration</i> (Microextração em Fase Sólida)
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Total de íons ocorrentes)
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)
UV	Ultra-violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
μ	Micro
TM	Trademark
®	Marca Registrada
©	Copyright

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1. Introdução	1
1.1 Metabolômica	1
1.2 Quimiotaxonomia	5
1.3 Família Orchidaceae	6
1.4 Gênero Catasetum	7
2. Objetivos	9
3. Material e Métodos	10
3.1. Material Vegetal	10
3.2. Método de Extração – Substâncias Voláteis das flores.....	12
3.3. Método de Extração – Folhas	14
3.4. Equipamentos Utilizados	14
3.5 Método Analítico em GC-MS	15
3.6 Método Analítico em UHPLC-MS	15
3.7 Pré-tratamento dos Dados Cromatográficos	16
3.8 Análises de Correlação	17
3.9 Identificação das substâncias discriminantes	17
3.10 Correlação entre Análise multivariada e a filogenia do gênero Catasetum	18
4. Resultados e Discussão	18
4.1 Método de Extração	18
4.2 Obtenção das Impressões Digitais Metabólicas	19
4.3 Pré-tratamento dos Dados Cromatográficos	20
4.4 Análises Metabolômicas	21
4.4.1 Análises Metabolômicas por GC-MS	21

4.4.2	Substâncias Discriminantes da Análise Metabolômica por GC-MS	35
4.4.3	Análise Metabolômica por UHPLC-MS	36
4.4.4	Substâncias Discriminantes da Análise Metabolômica por UHPLC-MS	45
4.4.5	Correlação com Filogenia	48
5.	Conclusão	52
6.	Referências	53
	Apêndice I	57
	Apêndice II	58
	Apêndice III	59
	Apêndice IV	60
	Apêndice V	67
	Apêndice VI	69
	Apêndice VII	86
	Apêndice VIII	102
	Anexo A	104

1. Introdução

1.1 Metabolômica

Metabolômica é a identificação quantitativa e qualitativa de todos os metabólitos presentes em um organismo simultaneamente, em um determinado momento e sobre determinadas condições (YULIANA *et al.*, 2011b).

A análise metabolômica visa o metaboloma, que é constituído por todos os produtos biossintetizados por um determinado organismo em um momento específico, porém o grande número de metabólitos (muitas vezes desconhecidos) em suas diferentes concentrações torna a análise do metaboloma por completo impraticável (KELL, 2006; SUMNER, 2003; VERPOORTE, 2005; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005).

O processo de isolamento e identificação de metabólitos presentes em extratos vegetais é dificultado pela baixa concentração desses metabólitos, além do tempo necessário para a realização desse processo. Sabe-se ainda, que os métodos fitoquímicos utilizados tradicionalmente no processo de identificação são pouco sensíveis e limitados, mostrando-se muitas vezes eficazes apenas para identificação de compostos majoritários na espécie vegetal. Portanto, é importante a identificação diretamente no extrato, por uma técnica analítica sensível e eficaz, capaz de identificar compostos presentes em baixas quantidades no extrato em questão como, por exemplo, a abordagem metabolômica. Assim, a análise metabolômica é uma importante ferramenta quando se tem em vista a análise do metabolismo secundário vegetal (JANSEN *et al.*, 2009; LANG, 2008; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005; WOLFENDER, 2010).

A abordagem metabolômica permite um estudo sistemático de uma mistura complexa sem a necessidade do isolamento das substâncias. Os métodos que

atualmente têm sido usados em análises metabolômicas podem ser classificados basicamente em 3 grupos: I. Métodos cromatográficos (GC, HPLC); II. Métodos baseados em massa molecular (espectrometria de massas) e III. Métodos baseados em características físicas (espectroscopia de RMN). Cada método possui vantagens e desvantagens, e nenhum é capaz de isoladamente gerar o resultado final da análise (VERPOORTE, 2005; YULIANA, 2011).

São utilizadas técnicas analíticas hífenadas com a finalidade de detectar as mínimas diferenças químicas entre as amostras, pois tais técnicas analíticas possuem grande sensibilidade, eficiência e rapidez, sendo capazes de demonstrar a diversidade química dos extratos proporcionando uma maior representatividade do metaboloma. As duas tecnologias analíticas mais utilizadas em estudos qualitativos de metabolômica de plantas são a espectrometria de massa (MS) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). No entanto, devido à sua elevada sensibilidade em relação à RMN, MS é, de longe, a tecnologia de escolha na maioria dos estudos de metabolômica de plantas e, quando acoplado a poderosas técnicas cromatográficas (por exemplo, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)) permite a separação e caracterização da extrema diversidade de compostos presentes no metaboloma de plantas (JORGE, *et al.* 2016; CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015c; YULIANA *et al.*, 2011a; WECKWERTH e MORGENTHAL, 2005).

Estudos abrangendo partes específicas do metaboloma de plantas têm sido realizados por meio de preparo de amostras e extrações eficientes, em conjunto com diferentes técnicas analíticas, e compreendendo diversas etapas, entre as quais destacam-se: (1) obtenção das impressões digitais metabólicas (metabolite

fingerprinting), que visa a determinar diferenças metabólicas entre as amostras, por meio de métodos analíticos seguidos do uso de ferramentas estatísticas que estabelecem as diferenças existentes entre as amostras; e, (2) com base nos resultados da primeira etapa, pode-se partir para a obtenção de perfis metabólicos (metabolite profiling), que tem como objetivo a identificação e, em alguns casos, quando necessário, a quantificação dos metabólitos responsáveis pelas diferenças entre as amostras (ALLWOOD *et al.* 2009; JANSEN *et al.*, 2009; MORITZ e JOHANSSON, 2008; NORDSTRÖM, 2008; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005).

A infinidade de informações geradas pelas abordagens metabolômicas pode ser utilizada para diversas aplicabilidades, mas para que isso seja possível deve-se analisar e manejar adequadamente os dados (TIKUNOV *et al.*, 2012). Durante as análises metabolômicas, são geradas grandes quantidades de dados pela obtenção da impressão digital metabólica, tais como tempo de retenção e espectros de massas (modos positivo e negativo), para cada pico cromatográfico, e em meio à esses dados, devido a complexidade do metaboloma das plantas, pode ocorrer coeluição de substâncias, sobreposição de perfis de fragmentação e possíveis fragmentações na fonte durante o processo em analisadores de massas. Devido a esses fatores, é necessária a utilização de softwares específicos que extraiam as informações úteis para as análises. (BAMBA e FUKUSAKI, 2006; TIKUNOV *et al.*, 2012).

Um dos softwares empregados para análises metabolômicas é o MetAlignTM, utilizado no processamento dos dados brutos dos cromatogramas e nas análises metabolômicas comparativas de misturas complexas através do alinhamento quantitativo de sinais de massas das amostras analisadas (LOMMEN, 2009; LOMMEN *et al.* 2012).

A infinidade de informações geradas pelas abordagens metabolômicas podem ser utilizadas para diversas aplicabilidades, mas para que isso seja possível deve-se analisar e manejar adequadamente os dados. As matrizes de dados resultantes podem ser submetidas diretamente às análises comparativas usando diversas ferramentas estatísticas (TIKUNOV *et al.* 2012). Diversos softwares estatísticos podem ser usados para a realização da chamada mineração de dados (data mining), tais como The Unscrambler X (CAMO Software, Noruega), SIMCA (Umetrics) ou R (R Project for Statistical Computing). Esses softwares fazem a comparação entre as amostras e obtêm as informações relevantes sobre as semelhanças e diferenças entre elas.

As análises podem facilitar a visualização de pequenas diferenças químicas nos extratos que estão correlacionadas com substâncias minoritárias. Para as análises multivariadas mais comumente usadas em metabolômica, softwares são utilizados para construir análises de componentes principais (PCA), análises de cluster hierárquico (HCA), análises por mínimos quadrados parciais (PLS) e análises discriminantes por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS), permitindo a categorização das amostras em grupos. Esses modelos são apresentados para superar problemas dimensionais e utilizar a co-linearidade dos dados abrangendo componentes únicos na forma de combinações lineares dos dados originais (TRIVEDI e ILES, 2012).

A identificação dos metabólitos indicados na mineração de dados é preferencialmente feita, dentro da abordagem metabolômica, através da desreplicação, a qual é definida como rápida caracterização das substâncias discriminantes da amostra baseando-se em relatos na literatura e que constam em bancos de dados como o SciFinder Scholar® (©American Chemical Society),

Dictionary of Natural Products© (DNP) (©Taylor & Francis Group) ou PubChem (©National Center for Biotechnology Information), sem necessidade de seu isolamento. Somente os metabólitos não identificados na desreplicação precisam ser isolados para identificação estrutural (CROTTI *et al.*, 2006; GOBBO-NETO e LOPES, 2008; HOSTETTMANN *et al.*, 2001).

1.2 Quimiotaxonomia

MARTUCCI *et al.* (2014) reportaram que perfis metabólicos e análises multivariadas podem ser uma ferramenta rápida e mais abrangente para fins quimiotaxonômicos que a investigação fitoquímica clássica.

Um número relativamente pequeno de espécies da família Orchidaceae tem sido investigado quanto à sua composição química, com cerca de 300 metabólitos secundários reportados até o momento (COTA *et al.* 2008; GUTIÉRREZ, 2010; RAMOS *et al.*, 2012; SILVA, 2003; XOCHITL, 2011). Esse número inclui, entre outros metabólitos, flavonoides, terpenos, quinonas e fenantrenos. Uma base de dados online, www.pherobase.com (EL-SAYED AM, 2014), relata compostos como α -felandreno, α -pineno, acetato de benzila, β -pineno, eucaliptol, limoneno, óxido de *trans*-limoneno, óxido de *cis*-limoneno e *trans*- β -ocimeno como substâncias características de todo o gênero *Catasetum*. O banco descreve ainda substâncias para somente 20 das 73 espécies mantidas no orquidário da FFCLRP (fornecedor das espécies utilizadas no presente estudo), sendo α e β -pineno, carvona, linalol, mirceno e nerol as substâncias mais comuns entre elas, além da presença de algumas das substâncias descritas como características do gênero. As demais orquídeas contidas no presente estudo não possuem relatos satisfatórios na literatura.

Além disso, até mesmo as subfamílias em Orchidaceae foram descritas de maneira controversa por autores distintos. Muitas descrições de novos gêneros incluem análises moleculares (DNA) enquanto em décadas anteriores, a descrição de novos táxons era baseada apenas em morfologia (CHASE *et al.* 2015).

Desta forma, fica evidente a proporção da contribuição que a análise metabolômica pode oferecer à melhor compreensão da filogenia e das relações taxonômicas entre espécies do gênero *Catasetum*, cujos estudos envolvendo perfis metabólicos são raros na literatura.

1.3 Família Orchidaceae

Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas floríferas (The Plant List, 2014) e uma das maiores famílias de angiospermas, com 880 gêneros e 27.800 espécies. Orquídeas compreendem cerca de 8% das plantas vasculares, ocorrendo em praticamente todos os habitat terrestres exceto desertos e são nativas em todos os continentes exceto a Antártida (GIVNISH *et al.* 2016) Porém esses dados são considerados prematuros até que sejam realizados estudos filogenéticos complementares (CHASE *et al.* 2015).

As orquídeas são cultivadas como ornamentais e são valorizadas não só por causa de sua beleza exótica, mas também pela sua longa vida. A multiplicação em larga escala de orquídeas, especialmente os híbridos e espécies ameaçadas, utilizando técnicas de cultura de tecidos, tem ajudado a família a ocupar uma posição como uma das dez mais cultivadas entre flores ornamentais. A propagação por sementes leva à produção de plantas heterozigóticas tornando assim, a proliferação *in vitro* um procedimento alternativo cômodo para a propagação de orquídeas (BAKER *et al.*, 2014).

A família fornece questões desafiadoras para estudos evolutivos e continua a apresentar novidades taxonômicas. No entanto, a aplicação de estratégias de conservação para este grupo é por vezes dificultada por problemas taxonômicos. Determinar a classificação mais adequada para cada táxon, que é sempre uma tarefa difícil, é especialmente controverso dentro de Orchidaceae; problemas como a descrição excessiva de novas espécies, ou inflação taxonômica, são graves em todo o mundo. Esta situação deve-se principalmente à aplicação de um conceito de espécie muito amplo ou muito limitado e à escassez de informação genética e filogenética, o que coloca grandes dificuldades na delimitação de espécies ou limites dos gêneros (PILLON e CHASE, 2007 e HOPPER, 2009).

A classificação da família Orchidaceae ainda não bem definida. O sistema de classificação foi desenvolvido há séculos e estabelecido principalmente por taxonomistas. Inclui divisões e subdivisões baseadas nas similaridades na estrutura das flores (OLIVEIRA *et al.* 2010), porém estudos de classificação têm incorporado em suas classificações principalmente informações filogenéticas em adição aos dados morfológicos (CHASE *et al.* 2003).

1.4 Gênero *Catasetum*

Cerca de 850 gêneros fazem parte da família Orchidaceae, arranjados em 70 subtribos, 22 tribos e 5 subfamílias baseadas principalmente no número e posição das anteras sendo estas: Apostasioideae, Cyripedioideae, Orchidoideae, Spiranthoideae e Epidendroideae. Essa última subfamília é, de longe, a mais vasta, contendo cerca de 580 gêneros e 15.000 espécies, possuindo número de gêneros e espécies superior à soma de todas as outras subfamílias (BASTOS e VANDERBERG, 2012).

A subtribo *Catasetinae* (*Epidendroideae*) compreende sete gêneros (PRIDGEON *et al.* 2009). Dentre eles se encontra o gênero *Catasetum*, descrito por L. C. Richard Kunth em 1822 (SILVA *et al.* 2015).

Tabela 1. Classificação do gênero *Catasetum*

família	ORCHIDACEAE				
tribos	Apostasioideae	Cypripedioideae	Epidendroideae	Orchidoideae	Spiranthoideae
subtribo	Catasetinae				
gênero	<i>Catasetum</i>				

O gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth tem um número crescente de espécies descrito nos últimos anos. O gênero possui um total de 130 espécies de acordo com Romero (2009), já Petini-Benelli (2012) descreve a existência de um total de 160 espécies. São 166 espécies segundo Silva *et al.* (2015) enquanto Govaerts (2016) relata a existência de cerca de 200 espécies ao todo. Elas tem ocorrência distribuída entre o México e o Paraguai e Argentina. No Brasil, são conhecidas 105 espécies, distribuídas por todo o país, sendo a maior parte encontrada no bioma amazônico (ENGELS *et al.* 2016).

Catasetum inclui algumas das espécies mais belas e raras dentro de Orchidaceae (OLIVEIRA *et al.* 2010).

A complexidade taxonômica de *Catasetum* tem despertado muito interesse por parte dos cultivadores e pesquisadores em Orchidaceae, especialmente devido aos novos táxons que estão sendo descobertos no gênero (CAMERON *et al.* 1999; STERN e JUDD, 2001; SILVA, 1998).

As orquídeas devem ser um dos principais grupos de plantas floríferas a ser estudado quanto a aspectos evolutivos, pois representa a evolução em seu aspecto

mais dinâmico, a rápida produção de uma variedade incrivelmente diversa de espécies. O desafio é entender como isso aconteceu (CHASE *et al.* 2003).

2. Objetivos

O objetivo do estudo foi obter as impressões digitais metabólicas (metabolite fingerprinting) em GC-MS e UHPLC-MS de espécies do gênero *Catasetum* e correlacioná-las, separadamente, com sua filogenia baseada em DNA, visando auxiliar na elucidação das relações taxonômicas e evolutivas do gênero.

Os objetivos específicos se constituíram em:

- a) amostrar, separadamente, folhas e voláteis florais das plantas selecionadas, processar e extrair o material vegetal;
- b) otimizar a metodologia analítica utilizada atualmente pelo grupo em GC-MS;
- c) otimizar a metodologia de extração e análise utilizada atualmente pelo grupo em UHPLC-MS (Orbitrap);
- d) obtenção das impressões digitais metabólicas por GC-MS e UHPLC-MS(Orbitrap);
- e) promover as análises estatísticas multivariadas não supervisionadas e supervisionadas utilizando as impressões digitais metabólicas; f) comparar resultados obtidos pelas análises estatísticas multivariadas com a filogenia baseada em DNA.

3. Material e Métodos

3.1. Material Vegetal

Todos os indivíduos utilizados neste estudo estão alojados no orquidário da FFCLRP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Emerson Ricardo Pansarin, colaborador do estudo.

As flores foram amostradas após a abertura total, quando emitem voláteis com maior intensidade; no período entre o final da manhã e o início da tarde. No momento da amostragem de voláteis das flores, uma folha saudável e completamente desenvolvida do mesmo indivíduo também foi amostrada. O material amostrado de flores foi processado e analisado via GC-MS enquanto folhas foram armazenadas sob temperatura constante de -80°C até coleta do número total de amostras para análise em processo contínuo via UHPLC-MS.

As espécies analisadas neste estudo, tanto em GC-MS quanto em UHPLC-MS foram *Catasetum albovirens* Barb. Rodr., *Catasetum arietinum* Miranda & Lacerda, *Catasetum ariquemense* Miranda & Lacerda, *Catasetum barbatum*(Lindl.) Lindl., *Catasetum bicolor* Klotzsch, *Catasetum carolinianum* Miranda & Lacerda, *Catasetum cernuum* (Lindl.) Rchb.f., *Catasetum ciliatum* Barb. Rodr., *Catasetum cirrhaeoides* Hoehne, *Catasetum complanatum* Miranda & Lacerda, *Catasetum confusum* Romero, *Catasetum cristatum* Lindl, *Catasetum denticulatum* Miranda, *Catasetum discolor* (Lindl.) Lindl., *Catasetum expansum* Rchb.f, *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl., *Catasetum gardneri* Schltr, *Catasetum juruenensis* Hoehne, *Catasetum lanciferum* Lindl, *Catasetum luridum* Lindl, *Catasetum macrocarpum* L. C. Rich., *Catasetum macroglossum* Rchb.f, *Catasetum maranhense* Lacerda & Silva, *Catasetum mattsosianum* Bicalho, *Catasetum multifidum* Miranda, *Catasetum multifissum* Senghas, *Catasetum osakadianum* Silva & Oliveira,

Catasetum osculatum Lacerda & Castro, *Catasetum parguazense* Romero & Carnevali, *Catasetum pileatum* Rchb.f, *Catasetum planiceps* Lindl, *Catasetum purum* Nees & Sining, *Catasetum rooseveltianum* Hoehne, *Catasetum saccatum* Lindl, *Catasetum sanguineum* Lindl. & Paxton, *Catasetum sacco* (Vell.) Hoehne, *Catasetum vinaceum* Hoehne e os híbridos *Catasetum* sp x *altaflorestense* Benelli & Grade e *Catasetum boyi* x *barbatum*, com duplicatas de *Catasetum ariqueense*, *Catasetum lanciferum*, *Catasetum macrocarpum*, *Catasetum maranhense*, *Catasetum mattosianum*, *Catasetum multifidum* e *Catasetum rooseveltianum*. A partir dos exemplares de *Catasetum hopkinsonianum* Carr & Castro, *Catasetum pulchrum* N. E. Brown e de *Catasetum semicirculatum* Miranda foram coletadas somente fragrâncias devido ausência de amostras foliares nos indivíduos durante a floração.

Além disso, foram analisadas amostras da mesma espécie porém de indivíduos de origem diferente de coleta. Foi o caso das espécies *C. macrocarpum*, *C. maranhense* e *C. mattosianum*. Amostras de *C. ariqueense*, *C. lanciferum*, *C. multifidum* e *C. rooseveltianum* foram coletadas de um mesmo indivíduo em diferentes florescências. Entre as demais espécies do gênero disponíveis no orquidário, porém não analisadas, estão os indivíduos com perda da florescência devido à incidência de herbívoros e em sua maioria os indivíduos que não floresceram durante o período do estudo, por se encontrarem ainda em adaptação ao ambiente onde estão sendo mantidas.

Os dados de coleta referente às espécies de *Catasetum* utilizadas no estudo se encontram no Apêndice VIII.

3.2. Método de Extração – Substâncias Voláteis das Flores

Para a amostragem dos compostos voláteis, buscou-se desenvolver um método que permitisse maior controle sobre as amostras por possibilitar o armazenamento e assim o controle do momento da injeção no aparelho de cromatografia gasosa além da viabilidade econômica do método.

A captura de voláteis obtida por microextração em fase sólida (SPME), utilizou duas flores num recipiente fechado à temperatura ambiente por 60 minutos onde foi inserida uma fibra revestida de polidimetilsiloxano com 100 µm de espessura (Supelco Inc., Bellefont, PA), aparato para injeção manual em cromatografia gasosa. O cromatograma obtido a partir do método foi utilizado como referência para comparação da eficiência do método a ser desenvolvido.

O método padrão para análise de voláteis envolve a injeção imediata dos voláteis adsorvidos à fibra ao cromatógrafo de fase gasosa, o que dificultaria o processo de captura dos voláteis das espécie do presente estudo e sua análise devido à disponibilidade do cromatógrafo de fase gasosa para injeção dos voláteis o momento da captura de cada amostra.

Foi testada, portanto, a injeção da solução resultante da eluição dos voláteis adsorvidos à fibra de polidimetilsiloxano com diferentes solventes, porém o método apresentou sensibilidade muito inferior, tendo a amostra apresentado somente os picos de substâncias majoritárias, não havendo a presença de diversos picos encontrados na análise envolvendo a injeção direta da fibra ao cromatógrafo.

Para a amostragem utilizando tubos de Porapak™ Q, foram testadas a utilização de uma ou duas flores para captura, tempo de captura de 30 ou 60 minutos, e testou-se também o melhor solvente para a eluição dos compostos do polímero, utilizando-se *n*-hexano, éter etílico, acetato de etila e clorofórmio. Na

entrada de ar no sistema foi conectado um filtro com carvão ativado, na saída de ar uma bomba à vácuo faz a sucção do ar através do tubo empacotado com o polímero.

Para avaliar a eficiência do processo de filtração do ar por carvão ativado e a ausência de contaminantes nas amostras, foram realizadas análises do sistema anterior e posteriormente à captura dos voláteis das flores, a fim de obter cromatogramas do sistema limpo, sem a presença de compostos provenientes do ambiente externo ao sistema.

Por fim, o método escolhido como o mais eficiente para o desenvolvimento do estudo, empregou o uso de duas flores submetidas a um aprisionamento num sistema de captação onde o ar de entrada foi filtrado por um tubo contendo 0,5 g de carvão ativado e utilizou-se uma bomba à vácuo para aspirar o ar em torno das amostras através de um tubo empacotado com o polímero Porapak™ (Figura 1). O fluxo de ar atravessou o sistema durante 60 minutos e em seguida o tubo contendo o polímero onde estavam adsorvidos os compostos voláteis foi eluído com 700 µL de acetato de etila para recolher o extrato. Esse extrato foi então armazenado a -80°C até a análise via GC-MS.

Figura 1 – Método desenvolvido para extração de voláteis

3.3. Método de Extração - Folhas

Uma folha de cada indivíduo foi pulverizada em gral de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado à 10 mg de material vegetal pulverizado 1,0 mL de solução metanol-água 7:3, e foi procedido de extração em banho de ultrassom (UltraSonic Cleaner 1400, 40kHz, UNIQUE) por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos à 15000 rpm a 10°C (M-240R, Boeco Germany), filtradas com filtro de seringa com membrana filtrante de PTFE (0,22 µm) e acondicionada em frascos vials de 2 mL.

Para verificar o surgimento de erros nas análises cromatográficas, como erros de tempos de retenção, foi adicionado 100 µL de padrão interno hidrocortisona à 10 mg/mL a 100 mL do solvente posteriormente utilizado nos extratos resultando em uma concentração final de 10 µg/mL. Em todos os cromatogramas, o pico cromatográfico referente ao padrão interno pode ser observado, tanto no modo positivo quanto no negativo, em 12,93 minutos, em média, referente ao pico de m/z 363 no modo positivo e de m/z 407 no modo negativo.

3.4. Equipamentos Utilizados

As análises por GC-EI-MS foram feitas em cromatógrafo de fase gasosa (GC) acoplado a um espectrômetro de massas (MS) com fonte de ionização por elétrons (EI) e analisador do tipo quadrupolo QP2010 Shimadzu. Os dados obtidos por GC-MS foram analisados utilizando o software GC Solution.

As análises metabolômicas por UHPLC-MS foram realizadas em UHPLC-MS(Orbitrap™) (Thermo Scientific Exactive™, Thermo Scientific®), que consiste em cromatógrafo de fase líquida de ultra eficiência (UHPLC *Accele* 1250) acoplado a um

espectrômetro de massas (MS) com fonte de ionização por electrospray (ESI) e analisador tipo Orbitrap, utilizando simultaneamente o modo de ionização positivo e negativo.

3.5. Método Analítico em GC-MS

As análises por GC-MS foram feitas no modo de injeção *splitless* sob temperatura de 250 °C na fonte com um fluxo de emissão de 60 uA e energia de ionização de 70 eV. Foi utilizado volume de injeção de 1,0 µL em coluna de fase estacionária DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com He como gás de arraste, fluxo de 1,3 mL/min e aquecimento com programação de temperatura de 100 – 300 °C a 3 °C/min durante 60 min. Os espectros de massas foram adquiridos no intervalo de 50 - 500 *m/z*.

3.6. Método Analítico em UHPLC-MS

O método escolhido foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa, variando-se alguns parâmetros da análise como gradientes e proporção dos solventes, tempos de análise e fluxo, para obter um método mais abrangente possível para que se conseguisse detectar as substâncias mais diversas.

As análises por UHPLC-MS foram feitas utilizando acetonitrila (B) e ácido fórmico (0,1%) (v/v) (A) como fase móvel a um fluxo de 400 µl/min, e o seguinte gradiente de eluição: 0 – 2 min, 5% B; 2 – 30 min, 5 - 100% B ; 30 – 34 min, 100% B; 34 – 37 min, 100 - 5% B; 37 – 40 min, 5% B. Foi utilizada uma coluna KinetexTM Core-Shell 1,7 µm XB-C18 (100 Å; 150 x 2,1 mm; Phenomenex), protegida por uma pré-coluna de material equivalente.

As análises foram realizadas por ESI-MS e ESI-AIF nos modos positivo e negativo concomitantemente. Os cromatogramas de íon total (TIC) foram registrados na faixa de varredura de 100 a 1000 m/z e os seguintes parâmetros do espectrômetro de massas foram mantidos em todas as análises: 1,0 microscans/s; resolução de 70.000 no modo MS e de 35.000 no modo AIF; e *maximum injection time* de 100 ms. Os parâmetros da fonte de ionização foram: fluxo do *sheath gas*, 30u; fluxo do *auxiliary gas*, 10u; fluxo de *sweep gas* de 11; voltagem do spray no modo de ionização positivo, 3,6 kV; voltagem do spray no modo de ionização negativo, 3,2 kV; corrente no spray de 1,4 MA; temperatura do capilar de 320 °C; voltagem no capilar de + e - 30 V; voltagem na lente de + e - 90 V; voltagem no cone de + e - 20 V; S-lens RF, 50; HCD, energia de colisão (NDE) 35 eV.. N₂ foi utilizado como gás de secagem e colisão.

Foi realizada a calibração do aparelho para cada polaridade antes das análises, utilizando substâncias de baixa massa molecular e a solução Thermo calmix (Sigma-Aldrich®). Os dados foram registrados utilizando-se o software Xcalibur 2.1.0 (Thermo Fisher Scientific®). Foi analisado 1,0 mL de solução metanol-água 7:3 e um padrão interno de hidrocortisona era analisado para verificação das linhas de base e surgimento de picos relacionados ao solvente, picos fantasmas.

3.7. Pré-tratamento dos Dados Cromatográficos

Após a aquisição das impressões digitais metabólicas, foi realizado o pré-tratamento e refinamento dos dados, utilizando-se os softwares *MetAlign*TM (RIKILT, Holanda) e *MSClust*TM (Plant Research International, Holanda), com os parâmetros listados no Apêndice I e II. Os cromatogramas foram alinhados, centralizados e normalizados. Foi realizada a remoção de ruídos e fixação de linha de base

apropriada, extração e exportação dos dados através do software *MetAlign*TM. Os sinais de massas derivados da mesma substância, localizados dentro de um intervalo de tempo de retenção correspondente ao intervalo coberto pelo pico de eluição da substância, foram agrupados havendo a reconstrução mais próxima do espectro real da substância íntegra. Esse agrupamento foi realizado pelo software *MSClust*TM

3.8. Análises de Correlação

As análises multivariadas foram realizadas no software SIMCA (versão 13.0.3) utilizando a matriz de dados, gerada pelo *MetAlign*TM, e utilizando a transformação por logaritmo. Foram realizadas as análises de componentes principais (PCA), análise de cluster hierárquico (HCA) e análises discriminantes por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA). Na análise de cluster hierárquico (HCA), as distâncias do agrupamento hierárquico foram calculadas por divisão e o dendograma classificado por tamanho. Os valores de cada componente do modelo para a análise do PCA e OPLS estão relacionados no Apêndice III.

3.9. Identificação das substâncias discriminantes

Os compostos foram identificados por meio de busca dos espectros de massas nas bibliotecas NIST 8, WILEY 7 e FFNSC 1.3. Além disso, os índices de Kóvats (KI) de cada composto foram calculados por meio da fórmula de Kóvats após a injeção de uma série homóloga de *n*-alcanos (C9-C22). A similaridade dos espectros de massas com os compostos presentes na biblioteca e os índices de Kóvats (KI) foram usados para a identificação dos compostos.

3.10. Correlação entre análise multivariada e a filogenia do gênero *Catasetum*

Os resultados obtidos nas análises de cluster hierárquico (HCA) foram comparados com os resultados obtidos na análise filogenética baseada em DNA de espécies de *Catasetum* realizada sob supervisão do Prof. Dr. Emerson R. Pansarin (FFCLRP-USP) pela aluna de doutorado Evelyn P. Franken, com projeto vinculado à FAPESP (Processo nº 2014/14969-6).

4. Resultados e Discussão

4.1. Método de Extração

O método desenvolvido para a captura das substâncias utilizando o polímero Porapak™ Q (50-80 mesh, Supelco), conforme esquema representado anteriormente na Figura 1, foi considerado satisfatório para a finalidade que foi desenvolvido quando comparadas as intensidade dos picos cromatográficos aos obtidos através do método de adsorção por microextração em fase sólida no modo “headspace” (HS-SPME). A Figura 2 mostra a sobreposição dos cromatogramas obtidos pelos dois métodos a partir de flores de um mesmo indivíduo utilizando o software GCMS Solution Postrun Analysis.

Figura 2: Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir de *Catasetum fimbriatum* utilizando tubos de Porapak™ Q (em azul) e SPME (em cor-de-rosa).

4.2 Obtenção das Impressões Digitais Metabólicas

Os voláteis de 40 espécies foram capturados e analisados por GC-MS resultando nas impressões digitais metabólicas da fração volátil destas espécies, no modo de ionização por elétron (EI). As impressões digitais metabólicas resultantes das análises são mostradas no Apêndice VI.

Foram reconhecidos 1062 picos cromatográficos durante o processamento dos dados gerados. As análises realizadas por GC-MS apontam a presença das substâncias descritas como características do gênero *Catasetum*, sendo possível notar pequena variação entre as substâncias produzidas pelas espécies dentro do gênero, sendo comum a presença principalmente de acetato de nerila, α e β -pineno e β -mirceno. Foram identificadas 57 substâncias como constituintes das 40 diferentes espécies de *Catasetum*. Dentre esses compostos, a maioria são terpenóides em sua natureza biossintética.

Durante o processo de captura dos voláteis das espécies utilizadas no estudo, a fragrância de algumas espécies era imperceptível ao olfato e ao analisá-las os cromatogramas revelaram apenas a presença de alguns hidrocarbonetos, estando ausentes os compostos terpenóides identificados até então nas demais espécies do gênero.

A relação completa com as substâncias identificadas a partir das espécies amostradas se encontra no Apêndice 4.

As impressões digitais metabólicas resultantes das análises por UHPLC-MS (OrbitrapTM) estão mostradas no Apêndice VII. Em cada Figura, A corresponde à análise no modo positivo e B à análise no modo negativo. Em todos os cromatogramas, por volta de 12,9 minutos, é possível verificar o pico cromatográfico referente ao padrão interno hidrocortisona.

O método utilizado nas análises por UHPLC-MS mostrou-se capaz de detectar uma grande diversidade de substâncias químicas presentes no extrato, sendo possível observar a eluição de substâncias em ordem decrescente de polaridade. Por possuir grande sensibilidade, a utilização da espectrometria de massas utilizando a fonte de ionização por ESI e analisador do tipo Orbitrap possibilitou a detecção de diversas substâncias, mesmo se estivessem em baixas concentrações, que podem ser importantes para as análises de correlação.

4.3 Pré-tratamento dos Dados Cromatográficos

Após a obtenção das impressões digitais metabólicas, essas foram alinhadas, centralizadas e normalizadas, submetidas à remoção de ruídos e fixação de linhas de base apropriadas gerando uma planilha em formato *.xml*.

Os parâmetros a serem selecionados no tratamento dos dados foram escolhidos através da análise de diversos cromatogramas, observando de base, ruído, largura e altura do pico, o tempo de análise, dentre outros. Os parâmetros utilizados no software *MetAlign*TM para as análises de GC-MS e LC-MS estão, respectivamente, no apêndice IA e B. A partir desses pré-tratamentos foram observados 1062 picos a partir das análises de GC-MS e 7432 a partir das análises de UHPLC-MS.

Após o tratamento, gerou-se uma planilha com os dados das impressões digitais de todas as espécies, a qual foi utilizada para a reconstrução dos espectros originais através do agrupamento de íons possivelmente derivados da mesma substância pelo software *Msclust*, havendo uma diminuição do número de sinais derivados de um mesmo analito e diminuição da redundância nas análises de

correlação (TIKUNOV, 2012). O tratamento realizado resultou em 433 metabólitos reconstruídos.

4.4 Análises Metabolômicas

4.4.1 Análise Metabolômica por GC-MS

A análise estatística multivariada por Componentes Principais (PCA) permitiu observar que a impressão digital da espécie *C. expansum* apresentou resultado que a classifica como um *outlier* forte, uma vez que está posicionada muito além da região de tolerância (Figura 3), e a presença desse *outlier* estaria tendenciando o modelo e afetando o agrupamento e a separação das demais espécies. Os valores do coeficiente de correlação múltipla e poder de predição são, respectivamente, $R^2X(\text{acum})$ 0.419 e Q^2 0.-0662 (Figura 3). Ao remover-se o *outlier* da análise, os valores desses são alterados para $R^2X(\text{acum})$ 0.37 e Q^2 de -0.0713 e o modelo apresenta uma melhora significativa, além de uma modificação no padrão de similaridade entre as observações no espaço amostral (Figura 4).

Figura 3. Gráfico de *Scores Scatter Plot* por PCA (Análise de Componentes Principais) das espécies de *Catasetum* analisadas por GC-MS.. $R^2X(\text{acum})$: 0.419. Q^2 : -0.0662.

Figura 4. Gráfico de *Scores Scatter Plot* por PCA (Análise de Componentes Principais) das análises por GC-MS, após a retirada da espécie *Catasetum expansum* (outlier). $R^2X(\text{acum})$: 0.37. Q^2 : -0.0713.

Através da visualização do gráfico de *Scores Scatter Plot* por PCA em três dimensões é possível observar mais um *outlier*, a espécie de *C. luridum* (Figura 5.A.). Através da Figura 5 podemos observar as comparações entre PCA's com e sem esse *outlier* (A e B respectivamente), evidenciando uma melhora nos valores de coeficiente de correlação múltipla e poder de predição, e uma modificação no padrão de similaridade entre as observações no espaço amostral, o que pode indicar que esse *outlier* também está tendenciando a projeção do modelo.

Após a retirada dos dois *outliers*, o modelo de PCA obteve os valores de $R^2X(\text{acum})$ 0.539 e Q^2 0.011 (Figura 6). A partir desse modelo foi realizada a análise de cluster hierárquico (HCA) (Figura 7), o qual demonstrou diversos pontos em comum com análise filogenética baseada em DNA de espécies de *Catasetum* realizada sob supervisão do Prof. Dr. Emerson Pansarin (FFCLRP-USP)

Figura 5 – A. Gráfico de *Scores Scatter Plot* em 3D por PCA (Análise de Componentes Principais) com *C. luriidum*. $R^2X(\text{acum})$: 0.37. Q^2 : -0.0713. **B.** Gráfico de *Scores Scatter Plot* em 3D por PCA (Análise de Componentes Principais) sem *C. luriidum*. $R^2X(\text{acum})$: 0,539. Q^2 : 0.011.

Figura 6. Gráfico de *Scores Scatter Plot* por PCA (Análise de Componentes Principais) das análises por GC-MS após a retirada da espécie *Catasetum expansum* e *Catasetum luridum* (outliers). **R²X(acum): 0,539. Q²: 0.011.**

Figura 7 - Análise de cluster hierárquico (HCA) das impressões digitais metabólicas obtidas por GC-MS das espécies de *Catasetum*, após a retirada dos outliers.

Figura 8 - Análise de cluster hierárquico (HCA) das impressões digitais metabólicas obtidas por GC-MS das espécies de *Catasetum*, após a retirada dos outliers; separado em cinco grupos.

Figura 9. Gráfico de *Scores Scatter Plot* por PCA (Análise de Componentes Principais) das análises por GC-MS, após a retirada dos *outliers*, coloridos de acordo com os grupos encontrados no HCA, demonstrando os padrões de agrupamento. $R^2X(\text{acum})$: 0,539. Q^2 : 0,011.

Com base nos cinco grupos formados a partir do HCA (Figura 8), foi possível observar que esses estão de acordo com a tendência de agrupamento por similaridade química que ocorre no PCA (Figura 6). Com isso, esses cinco grupos foram utilizados na realização da análise multivariada por OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais), a qual possibilita, através da discriminação em grupos, determinar quais variáveis que são importantes para a projeção desses grupos e a separação entre eles.

O Gráfico de Scores do OPLS-DA (Figura 10) mostrou uma boa separação dos cinco grupos indicados pelo HCA, indicada pelo R^2 0,901, e um valor de Q^2 0.589. Esses valores são satisfatórios para as análises metabolômicas com intuito de propor as substâncias discriminantes a cada grupo de espécies formado na análise de cluster hierárquico.

Nas análises estatísticas multivariadas, como a análise supervisionada por OPLS-DA, será melhor a separação entre os grupos discriminados quanto mais próximo de 1,0 for o valor do coeficiente de correlação múltipla (R^2), indicando uma melhor correlação entre as amostras e a resposta fornecida. Nas análises metabolômicas, devido à alta complexidade das amostras utilizadas nos estudos, são considerados aceitáveis valores acima de 0,5 para coeficiente de correlação múltipla (R^2) e poder de predição (Q^2) (BAILEY, *et al.*, 2004; BYLESJÖ *et al.*, 2006.; ERIKSSON *et al.*, 2008; TROPSHA e GOLBRAIKH, 2007; YULIANA *et al.*, 2011a).

O OPLS-DA é um método introduzido como uma melhoria ao PLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais), o qual aumenta a covariância entre as variáveis explicativas (x) e a variável resposta (y) e forma vetores de pontuação (*score vectors*) e vetores de carga (*loading vectors*),

sendo que a maximização é realizada com a finalidade de estimar a matriz de covariância entre as classes. (LILAND et al., 2011; TRIVEDI; ILES, 2012). Através disso, é utilizado para discriminar duas ou mais classes com o objetivo de determinar como as variáveis afetam a separação entre as classes (WESTERHUIS et al., 2010). Devido à utilização de componentes ortogonais no modelo, há um aumento nas correlações entre variáveis.

A partir do modelo de OPLS-DA, foi obtido o gráfico de VIP (Importância das Variáveis para a Projeção) (Figura 11.A), o qual indica quais são as variáveis (substâncias) mais importantes para a projeção dos grupos no OPLS-DA (Figura 10) e é usado para determinar as variáveis que diferenciam os grupos nas análises metabolômicas (TRIVEDI e ILES, 2012). Na Figura 11, as variáveis em vermelho são as que possuem valores de $VIP > 1$, sendo essas as que são significantes para a separação dos grupos.

Além disso, também foi obtido o gráfico de Coeficientes (Figura 12) para cada grupo, o qual mostra os coeficientes de regressão relacionados às variáveis presentes em cada grupo, e é utilizado para interpretar a influência das variáveis X (substâncias) na matriz resposta (Y). Na Figura 12, as variáveis em vermelho são as que possuem valores positivos, sendo essas as que influenciam os grupamentos. Utilizando esses dois gráficos, foi possível selecionar as substâncias discriminantes.

As substâncias discriminantes selecionadas para a desreplicação estão na

Tabela

2.

Figura 10. Gráfico de *Scores Scatter Plot* da análise por OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) das análises por GC-MS. $R^2X(\text{acum})$: 0.534. $R^2Y(\text{acum})$: 0.901. Q^2 : 0.589.

Figura 11. A. Gráfico de VIP (Importância das Variáveis para a Projeção) das análises por GC-MS. **B.** Gráfico de *Loadings Scatter Plot* do OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) das análises por GC-MS. Em vermelho estão as variáveis que possuem valores de $VIP > 1$.

Figura 12. Exemplos de gráfico de Coeficientes, relacionados ao grupo A (amarelo) e grupo B (azul) das análises por GC-MS. Em vermelho estão as variáveis que possuem valores positivos, utilizadas nas análises.

4.4.2. Substâncias Discriminantes da Análise Metabolômica por GC-MS

A separação em grupos na análise por HCA ocorre através da correlação entre as observações (extratos) utilizando como chave a semelhança química ou semelhança entre as variáveis (substâncias) que cada observação possui. Assim, o que caracteriza cada grupo formado é um conjunto de substâncias, chamadas de discriminantes nas análises de correlação *in silico*. A presença e/ou ausência de determinado grupo de variáveis é o que caracteriza o agrupamento, podendo chama-los de conjunto de marcadores químicos. Para os grupos do HCA, observou-se que a separação entre grupos está não somente relacionada à presença de certo conjunto de marcadores, mas também à ausência de outros.

As substâncias discriminantes selecionadas, referente aos cinco grupos observados no HCA, estão listadas na Tabela 1. As substâncias foram identificados por meio de busca dos espectros de massas nas bibliotecas NIST 8, WILEY 7 e FFNSC 1.3.

Tabela 2. Dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos por GC-MS das substâncias discriminantes apontadas nas análises de correlação.

IDc	Grupo	TR (min)	KI** literatura	KI** calculado	Substância
216	A	19,7	1246	1236	carvona
3414	A	28,375	1448	1437	(E) acetato de cinamila
504	B	10,77	1032	1030	eucaliptol
921	B	9,17	991	990	β -mirceno
1526	C	21,085	1278	1271	decanol
4715	C	11,17	1046	1044	(E) β -ocimeno
6082	D	13,72	1101	1100	linalol
4052	E	13,72	1101	1100	linalol

Os grupos D e E, não apresentam substâncias singulares que sejam significativamente responsáveis pela separação dos grupos, mostrando que a

composição dos agrupamentos não está relacionada apenas com a presença ou ausência de uma substância apenas, mas sim com o conjunto de substâncias voláteis que as espécies produzem. A composição dos voláteis produzidos pelas amostras, em geral apresenta diversas semelhanças, mostrando a grande proximidade química entre as espécies do gênero *Catasetum*. A relação completa com as substâncias identificadas em cada amostra se encontra no Apêndice IV. No Apêndice V estão relacionadas às estruturas químicas das substâncias identificadas análise por GC-MS das espécies em estudo.

4.4.3. Análise Metabolômica por UHPLC-MS

A análise por componentes principais (PCA) permitiu observar que a espécie *C. expansum* possui um comportamento de *outlier* forte, assim como observado nas análises por GC-MS, uma vez que está posicionada muito além da região de tolerância e sua presença estaria tendenciando o modelo. Os valores do coeficiente de correlação múltipla e poder de predição são, respectivamente, $R^2X(\text{acum})$ 0,479 e Q^2 -0,077 (Figura 14). Ao remover o *outlier*, o modelo resultou nos valores de $R^2X(\text{acum})$ 0,864 e Q^2 0,822, mostrando uma melhora no modelo quanto aos valores de coeficiente e quanto à disposição espacial das observações no espaço (Figura 15).

A partir das informações fornecidas pelo PCA, foi realizada a análise de cluster hierárquico (HCA) (Figura 16), o qual demonstrou grandes semelhanças com a análise filogenética baseada em DNA de espécies de *Catasetum* realizada sob supervisão do Prof. Dr. Emerson Pansarin (FFCLRP-USP).

Figura 13. Gráfico *Scores Scatter Plot* por PCA (Análise de Componentes Principais) das espécies de *Catasetum* analisadas por UHPLC-MS(Orbitrap™). $R^2X(\text{acum})$: 0,479. Q^2 : -0,077.

Figura 14. Gráfico de *Scores Scatter Plot* por PCA (Análise de Componentes Principais) da análise por UHPLC-MS(Orbitrap™) após a remoção da espécie *Catasetum expansum* (outlier). $R^2X(\text{acum})$: 0.864. Q^2 : 0.822.

Figura 15. Análise de cluster hierárquico (HCA) das impressões digitais metabólicas obtidas por UHPLC-MS(Orbitrap™) das espécies de *Catasetum*, após a retirada do outlier.

Figura 16. Análise de cluster hierárquico (HCA) das impressões digitais metabólicas obtidas por UHPLC-MS(Orbitrap™) das espécies de *Catasetum*, havendo padrão de separação em três grandes grupos.

Baseando-se nos três grupos formados a partir do HCA (Figura 17), foi realizada a análise multivariada por OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) (Figura 18).

O Gráfico de *Scores* do OPLS-DA mostrou uma boa separação dos três grupos indicados pelo HCA, indicada pelo R^2 de 0,848 e Q^2 de 0.608. Esses são bons valores para as análises metabolômicas, permitindo que o modelo proponha as substâncias responsáveis pela separação dos grupos, sendo discriminantes a cada grupo de espécies formado na análise de cluster hierárquico.

A partir do modelo de OPLS-DA, foi obtido o gráfico de VIP (Importância das Variáveis para a Projeção) e Coeficientes. Na Figura 19, as variáveis em vermelho são as que possuem valores de $VIP > 1$, e na Figura 20 são as que possuem valores de Coeficiente positivos. A partir desses gráficos foram indicadas as substâncias importantes e mais influentes para a projeção dos grupos. As substâncias discriminantes selecionadas para a desreplicação estão na Tabela 3.

Figura 17. Gráfico de *Scores Scatter Plot* da análise por OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) das análises por UHPLC-MS(Orbitrap™). $R^2X(\text{acum})$: 0.848. $R^2Y(\text{acum})$: 0.801. Q^2 : 0.608.

Figura 18. A. Gráfico de VIP (Importância das Variáveis para a Projeção) das análises por UHPLC-MS(Orbitrap™). **B.** Gráfico de *Loadings Scatter Plot* do OPLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) das análises por UHPLC-MS(Orbitrap™). Em vermelho estão as variáveis que possuem valores de VIP>1.

Grupo A **Grupo B** **Grupo C**

Figura 19. Exemplos de gráfico de Coeficientes, relacionados ao grupo A (verde) e grupo B (azul) das análises por UHPLC-MS(Orbitrap™). Em vermelho estão as variáveis que possuem valores positivos, utilizadas nas análises.

4.4.4. Substâncias Discriminantes da Análise Metabolômica por UHPLC-MS

A partir das matrizes geradas pelo software *MSClust*, identificou-se as espécies que possuem as substâncias indicadas nas análises de correlação (Tabela 3).

Nas análises metabolômicas por LC-MS, cada variável representa um centrotipo, o agrupamento ocorrido para a reconstituição de metabólitos formado pelo algoritmo do software *MSClust*. Os centrotipos selecionados para desreplicação foram avaliados quanto aos íons que formam cada agrupamento, para ter certeza de que está relacionado a somente uma substância. Com isso, todos os centrotipos possuem somente uma substância detectada no respectivo modo de ionização.

O grupo B (azul no HCA) possui conjunto de marcadores formado pelas substâncias 269NEG, 498NEG, 396NEG e 371NEG. Esse grupo de marcadores está localizado principalmente em espécies do grupo B, sendo pouco frequentes em espécies de outros grupos. Assim, esse conjunto de substâncias proporciona uma boa caracterização do grupo.

O grupo C (vermelho no HCA) possui um padrão semelhante ao B (azul), o qual possui presença quase restrita das substâncias discriminantes ao grupo, sendo pouco frequentes em espécies dos outros grupos. As substâncias que caracterizam esse grupo são 202NEG, 317NEG, 666POS, 150NEG e 415NEG.

Também deve-se levar em consideração na caracterização de um grupo, além da presença das substâncias discriminantes, a ausência das substâncias discriminantes referentes aos outros grupos.

O grupo A (verde no HCA) possui um conjunto de marcadores formado pelas substâncias discriminantes 411NEG, 403NEGM 353NEG, 369NEG. Essas substâncias, estão presentes em muitas outras espécies analisadas, principalmente

do grupo B. Portanto, o que caracteriza o grupo A, além da presença das substâncias citadas acima, é também a ausência das substâncias discriminantes dos grupos B e C.

Com isso, cada conjunto de marcadores que foi indicado pelas análises de correlação, explicam coerentemente o agrupamento formado nas análises de cluster hierárquico (HCA).

As substâncias selecionadas como discriminantes, referentes aos três grupos observados no HCA, estão relatadas na tabela 3.

Tabela 3. Dados espectrométricos obtidos por UHPLC-UV(DAD)-MS(Orbitrap™) das substâncias discriminantes apontadas nas análises de correlação in silico e a fórmula molecular calculada.

IDc	Grupo	TR (min)	* Massa Monoisotópica	Modo de Ionização Negativo	Modo de Ionização Positivo	Fórmula Molecular
				Íons Precursores (m/z)	Íons Precursores (m/z)	
411NEG	A	6,33212	405,15818	[M-H] ⁻ 404,1503	[M+H] ⁺ 406,1655	C ₂₄ H ₂₃ NO ₅
403NEG		5,63722	388,13816	[M-H] ⁻ 387,1303	-	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀
353NEG		12,2522	388,17448	[M-H] ⁻ 387,1666	-	C ₁₈ H ₂₈ O ₉
369NEG		18,3073	308,19947	[M-H] ⁻ 307,1916	[M+H] ⁺ 309,2068	C ₁₈ H ₂₈ O ₄
269NEG	B	10,2637	546,10004	[M-H] ⁻ 545,0922	[M+H] ⁺ 547,2191	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₄
498NEG		8,92883	464,09666	[M-H] ⁻ 463,0888	[M+H] ⁺ 465,1044	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
396NEG		13,1793	314,0798746	[M-H] ⁻ 313,07205	[M+H] ⁺ 315,0856	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
371NEG		12,0485	522,1385046	[M-H] ⁻ 521,13068	[M+H] ⁺ 523,34924	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃
202NEG	C	15,0453	660,1498546	[M-H] ⁻ 659,14203	-	C ₃₄ H ₂₈ O ₁₄
317NEG		14,2702	398,0623596	[M-H] ⁻ 397,054535	-	C ₂₀ H ₁₄ O ₉
666POS		20,613	322,1548034	-	[M+H] ⁺ 323,162628	C ₁₉ H ₂₀ N ₃ O ₂
150NEG		12,3333	578,12882	[M-H] ⁻ 577,12079	[M+H] ⁺ 579,1359	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₅
415NEG		18,0215	312,1948	[M-H] ⁻ 311,1870	-	C ₁₇ H ₂₈ O ₅

IDc. Código da substância.

*Corresponde à massa do íon acrescida ou subtraída, dependendo do modo de ionização, da massa do Hidrogênio (1.0078246 u).

pb. Pico base.

(-). Não detectado.

4.4.5 Comparação com análise filogenética

O dendograma obtido a partir do OPLS nas análises metabolômicas por GC-MS (Figura 8, a partir de agora, chamado de dendograma 1), gerou cinco grupos, sendo o primeiro grupo composto por *C. discolor* e dois indivíduos de *C. macrocarpum*; o segundo grupo formado por *C. mattosianum* e duplicatas da espécie *C. maranhense*. O terceiro grupo constituído por *C. denticulatum* e *C. vinaceum*. O quarto grupo apresenta *C. semicirculatum*, *C. confusum*, *C. sanguineum*, *C. juruenensis*, *C. barbatum*, *C. multifidum* e dois exemplares de *C. rooseveltianum* formando dois grupamentos menores.

O quinto e maior grupo consiste nas amostras de *C. complanatum*, *C. pulchrum*, *C. xaltaflorestense*, *C. gardneri*, *C. saccatum*, uma das duplicatas de *C. multifidum*, as duas amostras de *C. ariquemense*, *C. cristatum*, *C. purum*, *C. lanciferum*, *C. planiceps*, *C. pileatum*, *C. macrocarpum*, *C. fimbriatum*, *C. carolinianum*, *C. hopkinsonianum*, *C. bicolor*, *C. albovirens*, *C. cirrhaeoides*, *C. mattosianum*, *C. multifissum*, *C. cernuum*, *C. arietinum*, *C. socco*, *C. boyixbarbatum*, *C. osakadianum*, *C. osculatum* e *C. parguazense*.

Foi possível observar a coerência no agrupamento das espécies, principalmente baseando-se nos indivíduos de uma mesma espécie, como a presença das amostras de *C. maranhense* no mesmo grupo, bem como *C. macrocarpum* e *C. rooseveltianum*. Houve maior distância entre as amostras de *C. ariquemense*, porém ainda dentro do mesmo grupo, além da separação das amostras de *C. multifidum* e *C. mattosianum* em grupos diferentes.

É possível observar ainda no HCA gerado pelas análises metabolômicas por GC-MS, a formação de grupos relacionados com a região de origem das amostras. No grupo A é formado por (30) *C. macrocarpum*, (16) *C. discolor* e (20) *C.*

macrocarpum, todas as amostras são provenientes do município de Paraubepas (PA). Enquanto no grupo B estão (24) *C. mattosianum* e (32) *C. maranhense* e (33) *C. maranhense*, todas as amostras originárias do estado do Espírito Santo, sugerindo portanto, a proximidade química de espécies de acordo com a região de origem.

No dendograma obtido a partir do OPLS nas análises metabolômicas por UHPLC-MS (Figura 16, a partir de agora chamado de dendograma 2), as espécies foram agrupadas em três grandes grupos e suas subdivisões bem definidas, sendo o primeiro grupo formado por *C. parguazense*, *C. macroglossum*, *C. juruenensis*, *C. purum* e *C. vinaceum*. O segundo grupo é formado por *C. pileatum*, *C. xaltaflorestense*, *C. multifissum*, *C. osakadianum*, *C. complanatum*, *C. ariquemense*, *C. cirrhaeoides*, *C. albovirens*, *C. cristatum*, *C. boyixbarbatum*, *C. carolinianum*, *C. gardneri*, *C. socco*, *C. luridum* e (34) *C. mattosianum*.

O terceiro grupo é composto por *C. ciliatum*, *C. barbatum*, *C. ariquemense*, *C. denticulatum*, duas duplicatas de *C. rooseveltianum*, *C. arietinum*, duas duplicatas de *C. lanciferum*, *C. bicolor*, *C. fimbriatum*, *C. cernuum*, *C. planiceps*, *C. confusum*, *C. saccatum*, *C. osculatum*, *C. discolor*, *C. mattosianum*, *C. multifidum*, *C. sanguineum*, três amostras de *C. macrocarpum* e duas amostras de *C. maranhense*.

O dendograma apresentou as duplicatas das espécies *C. maranhense*, *C. rooseveltianum*, *C. macrocarpum* e *C. lanciferum* agrupadas entre si, sendo encontradas nos mesmos grupamentos, indicando a similaridade química entre os indivíduos de mesma espécie.

São várias as semelhanças entre os grupos formados como resultado das análises realizadas, como a proximidade das duas amostras de *C. rooseveltianum* e de *C. maranhense* dentro de um mesmo grupo tanto no dendograma 1 quanto no dendograma 2. Além disso, todas as espécies contidas no segundo grupo do

dendograma 2 foram agrupadas em um mesmo grupo no dendograma 1. O segundo grupo do formado por *C. mattosianum* e duas amostras de *C. maranhense* no dendograma 1 se encontra agrupado na primeira subdivisão do terceiro grupo do dendograma 2. As amostras de *C. confusum*, *C. barbatum* que se encontram no quarto grupo do dendograma 1 se encontram juntas também no terceiro subgrupo do terceiro grupo do dendograma 2.

A análise filogenética baseada em DNA feita por colaboradores (Anexo A), utilizando os mesmos espécimens utilizados no presente estudo, obteve resultados próximos aos obtidos pelas análises de cluster hierárquico realizada neste estudo. As amostras de *C. saccatum* e *C. osculatum* e de *C. planiceps* e *C. multifidum* se encontram no mesmo grupo em todas as análises, tanto nos HCAs obtidos por UHPLC-MS e GC-MS quanto na análise filogenética. As amostras de *C. maranhenses* e *C. mattosianum* também são encontradas em posições próximas em todas as análises.

As amostras de *C. cernuum* e *C. arietinum*, se encontram muito próximas em todas as análises, estando no quinto grupo do dendograma 1 e no segundo subgrupo do terceiro grupo no dendograma 2.

As amostras de *C. barbatum* e *C. juruenensis* se encontram num mesmo grupo tanto na análise filogenética quanto no dendograma 1, assim como *C. pulchrum* e *C. cristatum*; *C. carolinianum*, *C. lanciferum* e *C. albovirens*; *C. paraguayense* e *C. bicolor*; *C. macrocarpum*, *C. gardneri* e *C. osakadianum*. A análise filogenética mostra ainda a proximidade das espécies de *C. confusum*, *C. lanciferum*, *C. ariqueense* e *C. denticulatum*, espécies que se encontram no terceiro grupo do dendograma 2.

5. Conclusão

Foram analisadas 42 espécies distintas do gênero *Catasetum* e algumas duplicatas, totalizando 51 amostras.

Os métodos utilizados para as análises tanto por GC-MS quanto por UHPLC-MS resultaram em dados satisfatórios para análise metabolômica, gerando 57 substâncias voláteis identificadas a partir da fragrância das flores, sendo acetato de nerila, sabineno, β -mirceno, α -pineno e β -pineno as mais frequentes, além de uma grande quantidade de substâncias detectadas por UHPLC-MS a partir das amostras foliares.

A partir do estudo da composição química das espécies do gênero *Catasetum* e das separações em grupos obtidas nas análises metabolômicas realizadas, é possível observar a proximidade nas amostras de acordo com suas respectivas origens, semelhante ao que ocorre na análise filogenética realizada para esses mesmos indivíduos.

Os grupos gerados pelas análises metabolômicas possuem, de modo geral, são coerentes no que diz respeito às espécies que os compõem, gerando confiabilidade no método utilizado como ferramenta para análise quimiotaxonômica.

6. Referências

- ALLWOOD, J. W.; GOODACRE, R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 33-47, 2010.
- BAKER, A.; KAVIANI, B. NEMATZADEH, G.; NEGAHDAR, N. Micropropagation Of *Orchis Catasetum* – A Rare And Endangered Orchid. **Acta Scientiarum Polonorumci, Hortorum Cultus** v. 13 n. 2 p. 197-205. 2014.
- BAMBA, T.; FUKUSAKI, E. Technical problems and practical operations in plant metabolomics. **Journal of Pesticide Science**, v. 31, p. 300-304, 2006.
- BAILEY, N. J. C.; WANG, Y.; SAMPSON, J.; DAVIS, W.; WHITCOMBE, I.; HYLANDS, P. J.; CROFT, S. L.; HOLMES, E. Prediction of anti-plasmodial activity of *Artemisia annua* extracts: application of ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 35, p.117–26, 2004.
- BASTOS e VANDERBERG, 2012 BASTOS, C. A.; VAN DEN BERG, C. *Catasetum* (Orchidaceae) da Bahia. **Sitientibus série Ciências Biológicas** v.12 n.1. p.83–89. 2012.
- BYLESJÖ, M.; RANTALAINEN, M.; CLOAREC, O.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; TRYGG, J. OPLS Discriminant Analysis: Combining The Strengths of PLSDA and SIMCA Classification. **Journal of Chemometrics**. v. 20,p- 341-351, 2006.
- CAMERON, K. M.; CHASE, W.; WHITTEN, W.M.; KORES, P. J.; JARRELL, D. C.; ALBERT, V. A.; YUKAW, T.; HILLS, H. G.; GOLDMAN, D. H. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: Evidence from *rbcL* nucleotide sequences. **American Journal of Botany**. v.86 n.2 p. 208–224. 1999.
- CHAGAS-PAULA, D.; ZHANG, T.; DA COSTA, F.; EDRADA-EBEL, R.; A Metabolomic Approach to Target Compounds from the Asteraceae Family for Dual COX and LOX Inhibition. **Metabolites**. v.5, p.404-430, 2015
- CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; BARRETT, R. L.; FREUDENSTEIN, J. V.; DIXON, K.W.; KELL, S.P.; BARRETT, R.L.; CRIBB, P.J. DNA Data and Orchidaceae Systematics: A New Phylogenetic Classification. **Orchid Conservation**. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah. Chapter 5. 69–89. 2003.
- CHASE M.W., CAMERON K.M., FREUDENSTEIN J. V., PRIDGEON A.M., SALAZAR G., VAN DEN BERG C., SCHUITEMAN A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** n. 177, 151–174. 2015
- COTA, B. B.; MAGALHÃES, A.; PIMENTA, A. M. C.; SIQUEIRA, E. P. ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L. Chemical Constituents of *Habenaria petalodes* Lindl. (Orchidaceae). **Journal of the Brazilian Chemistry Society** v. 19. n.6. 1098-1104. 2008.

CROTTI, A.E.M.; CAROLLO, C.A.; GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M.D.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular weight compounds. *In*: TAFT, C.A. (Ed.), **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. Research Signpost: Kerala, India, pp. 99-141, 2006. EL-SAYED AM, 2014),

DODSON, C. H. Pollination and Variation in the Subtribe Catasetinae (Orchidaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**. Vol. 49, No. 1/2. pp. 35-56. 1962.

EL-SAYED AM . The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <http://www.pherobase.com> Acesso em: dezembro 2016.

ENGELS M. E.; ROCHA, L. C. F.; PETINI-BENELLI, A. A New Species Of *Catasetum* (Orchidaceae, Epidendroideae, Cymbidieae) From The Southern Brazilian Amazon. **Lankesteriana** n. 16 v.3. 329-333. 2016.

ERIKSSON, L., TRYGG, J.; WOLD, S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models. **Journal of Chemometrics**. v.22, o.594–600, 2008.

GIVNISH T.J., SPALINK D., AMES M., LYON S.P., HUNTER S.J., ZULUAGA A., ILES W.J.D., CLEMENTS M. A, ARROYO M.T.K., LEEBENS-MACK J., ENDARA L., KRIEBEL R., NEUBIG K.M., WHITTEN W.M., WILLIAMS N.H., CAMERON K.M. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. n. 282. 2015

GIVNISH, T. J.; SPALINK, D.; MERCEDES, A.; LYON, S. P.; HUNTER, S. J.; ZULUAGA, A.; DOUCETTE, A.; CARO, G. G.; MCDANIEL, J. CLEMENTS, M. A.; ARROYO, M. T. K.; ENDARA, L.; KRIEBEL, R.; WILLIAMS, N. H.; CAMERON, K. M. Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. **Journal of Biogeography**. 2016

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N, P. Online Identification of Chlorogenic Acids, Sesquiterpene Lactones, and Flavonoids in the Brazilian Arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) Leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a Validated HPLC-DAD Method for Their Simultaneous Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 1193–1204, 2008.

Govaerts, R. World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Available in: <www.kew.org/wcsp/monocots> Acesso em dezembro 2016.

GUTIÉRREZ, R. M. P. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. **Journal of Medicinal Plants Research** v. 4 n.8 p 592-638. 2010.

HOPPER, S.D. Taxonomic turmoil down-under: recent developments in Australian orchid systematics. **Annals of Botany**. 104, 447–455. 2009

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L.; TERREAUX, C. Modern screening techniques for plant extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 18-32, 2001.

JANSEN, J.J.; SMIT, S.; HOEFSLOOT, H.C.J.; SMILDE, A.K. The photographer and the greenhouse: how to analyze plant metabolomics data. **Phytochemical Analysis**, v. 21. p. 48-60, 2009.

JORGE, T. F.; MATA, A. T.; ANTÓNIO, C. Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. **Philosophy Transactions**. Real Society A. 374. 2016

KELL, D. B.; Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v.11. n. 23/24. p.1085-1092. 2006.

LANG, G. , MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.ELLIS, G.; LAATSCH, H.;MUNRO, H. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v.71. p.1595–1599. 2008.

LILAND, K. H.. Multivariate methods in metabolomics – from preprocessing to dimensions reduction and statistical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. v.30, p.827-841, 2011.

LIN, C. Y.; WU, H.; TJEERDEMA, R. S.; VIANI, M. R. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. **Metabolomics**, v. 3, p.55–67, 2007.

MARTUCCI, M. E. P.; DE VOS, R. C. H.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L. Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool: Application in the Genus *Vernonia* Schreb. **PLoS ONE**. v. 9 n.4. 2014.

MILET-PINHEIRO, P.; NAVARRO, D. M. A. F.; DOTTERL, S.; CARVALHO, A. T.; PINTO, C. E.; AYASSE, M.; SCHLINDWEIN, C. Pollination biology in the dioecious orchid *Catasetum uncatum*: How does floral scent influence the behaviour of pollinators? **Phytochemistry**. v.116. p.149–161. 2015.

MOORE, L. Orchid Fragrance Complexity as a Mechanism for Euglossine Bee Pollinator Specialization. **Writing Excellence Award Winners**. Paper 4. 2009.

MORITZ, T.; JOHANSSON, A.I. Plant metabolomics. In: Griffiths, W.J. (Ed.) Metabolomics, metabolomics and metabolite profiling. **Reino Unido: The Royal Society of Chemistry: Cambridge**. 303p., 2008.

NORDSTRÖM, A. Data mining for metabolomics. In: Griffiths, W.J. (Ed.) Metabolomics, metabolomics and metabolite profiling. 2008. **Reino Unido: The Royal Society of Chemistry: Cambridge**. 303p., 2008.

OLIVEIRA, L. V. R.; FARIA, R. T.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; SANTOS, M. O.; CARVALHO, V. P. Genetic Analysis of Species in the Genus *Catasetum*

(ORCHIDACEAE). **Brazilian Archeologic and Biologic Technology**. v.53 n.2: p. 375-387, 2010.

PETINI-BENELLI, A. **Orquídeas de Mato Grosso – Genus *Catasetum* L.C. Rich ex Kunth**. Rio de Janeiro, Pod, p. 130. 2012.

PILLON, Y., CHASE, M.W., Taxonomic exaggeration and its effects on orchid conservation. **Conservation Biology**. v 21 p. 263–265. 2007.

RAMOS, P.; COLAREDA, G. A.; ROSELLA, M. A.; DEBENEDETTI, S. L.; SPEGAZZINI, E. D.; CONSOLINI, A. E. Phytochemical Profile and Anti-Inflammatory Effect of the Orchid *Catasetum macroglossum*. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 31 n.1 p 62-67. 2012.

ROMERO, G.A. Distribution [of *Catasetum*]. In: Pridgeon, A.M., Cribb, P.J. & Chase, M.W. (Eds.) *Genera orchidacearum* 5, Epidendroideae (part two) (pp. 1–14). **Oxford: Oxford University Press**. 2009.

SILVA, I. V.; OLIVEIRA, R. M.; ROSSI, A. B.; SILVA, A. B.; OLIVEIRA, D. M. Use of anatomical root markers for species identification in *Catasetum* (Orchidaceae) at the Portal da Amazônia region, MT, Brazil. **Acta Amazonica**. v. 45 n. 1. 2015

SILVA, J. A. T. Orchids: Advances in Tissue Culture, Genetics, Phytochemistry and Transgenic Biotechnology. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**. v. 7 n.1 p. 1-52. 2003.

SILVA, M. F. F., OLIVEIRA, A. T. *Catasetum Cucullatum*, uma nova espécie de Orchidaceae para o Estado do Amazonas, Brasil. **Boletim Museu Paraense de História Natural e Ethnographia Emílio Goeldi**, v. 14 n. 1. p. 63-67. 1998.

STERN, W.L.; JUDD, W.S. Comparative anatomy and systematic of Catasetinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** v.136 p. 153-178. 2001.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817–836, 2003

The Plant List. Disponível em: www.theplantlist.org. [acesso em dezembro de 2016]

TIKUNOV, Y.M.; LAPTENOK, S.; HALL, R.D.; BOVY, A.; DE VOS, R.C.H. MScIust: a tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data. **Metabolomics**, v. 8, p. 714–718, 2012.

TRIVEDI, D.K.; ILES, R.K. The application of SIMCA P+ in shotgun metabolomics analysis of ZIC®HILIC-MS spectra of human urine – experience with the Shimadzu IT-TOF and profiling solutions data extraction software. **Journal of Chromatography Separation Techniques**. v.3,p.1-5, 2012.

TROPSHA, A.; GOLBRAOKH, A. Predictive QSAR modeling workflow, model applicability domains, and virtual screening. **Current Pharmaceutical Design**. v. 13, p.3494–504, 2007.

T'KINDT, R.; MORREEL, K.; DEFORCE, D.; BOERJAN, W.; VAN BOCXLAIE, J. Joint GC-MS and LC-MS platforms for comprehensive plant metabolomics: repeatability and sample pre-treatment. **Journal of chromatography**, v. B877, p.3572, 2009.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100. p.53–56. 2005.

VILLAS-BÔAS, S.; MAS, S.; ÅKESSON, J.S.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metaboloma analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 613-646, 2005.

WECKWERTH, W. e MORGENTHAL, K. Metabolomics : from pattern recognition to biological interpretation. **Drug Discovery Today**. v. 10, p.1551–1558, 2005.

WESTERHUIS, J. A; VAN VELZEN, E. J. J; HOEFSLOOT, H. C. J. SMILDE, A. K. Multivariate paired analysis: multilevel PLS-DA versus OPLS-DA. **Metabolomics**. v.6, p.119-128, 2010.

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

XOCHITL, P. B. Análisis Químico de Las Fragancias Producidas por Las Orquídeas *Prosthechea Varicosa* y *Prosthechea Karwinskii* para La Identificación de Compuestos Volátiles. **Maestría en Ciencias em Conservación y Aprovechamiento de los Recursos Naturales (Ingeniería)**. 2011.

YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. **Analytical Chemistry**, v.83, p.6902–6906, 2011a.

YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; Metabolomics for Bioactivity Assessment of Natural Products. **Phytotherapy Research**. v.25, p.157-169, 2011b.

ZHENG, L. WATSON, D. G.; JOHNSTON, B. F.; CLARK, R. L.; EDRADA-EBEL, R.; ELSEHERI, W. A chemometric study of chromatograms of tea extracts by correlation optimization warping in conjunction with PCA, support vector machines and random forest data modeling. **Analytica Chimica Acta**, v.642, p.257, 2009.

Apêndice I - Parâmetros utilizados nos softwares MetAlign™ para os dados obtidos a partir de GC-MS (A) e UHPLC-MS (B)

(A) Parâmetros GC-MS			(B) Parâmetros UHPLC-MS				
Part A: Program ConFiguRation, Data Set Selection and Baseline Correction			Part A: Program ConFiguRation, Data Set Selection and Baseline Correction				
1A. Program conFiguRation:			1A. Program conFiguRation:				
Input format		netCDF	Input format		mzxmL		
Scan filter of 1st data set		Use filter of Scan 2	Scan filter of 1st data set		Use filter of Scan 2		
Number of processors to use		1	Number of processors to use		1		
2B. Mass resolution		Nominal mass	2B. Mass resolution (Accurate Mass)		70000		
Mass bin		0.65	Amplitude range		100 to 1000		
Baseline and noise elimination parameters			Baseline and noise elimination parameters				
4. Retention begin (scan)		1	4. Retention begin (scan)		1		
5. Retention end (scan)		7100	5. Retention end (scan)		3900		
6. Maximum amplitude		1000000000	6. Maximum amplitude		1000000000		
7. Peak slope factor (X noise)		1	7. Peak slope factor (X noise)		1		
8A. Peak threshold factor (X noise)		2	8A. Peak threshold factor (X noise)		2		
8B. Peak threshold		5000	8B. Peak threshold		999999		
9. Average peak width at half height (scans)		5	9. Average peak width at half height (scans)		10		
Part B: Scaling and Aligning Data Sets			Part B: Scaling and Aligning Data Sets				
12. Scaling Options		No Scaling		12. Scaling Options		No Scaling	
13. Initian peak search criteria				13. Initian peak search criteria			
Begin of 1st region		scan nr 1	max. Shift 20	Begin of 1st region		scan nr 1	max. Shift 20
End of 1st region		scan nr 7100	max. Shift 20	End of 1st region		scan nr 3900	max. Shift 20
14. Tuning Aligment options and criteria		No Pre-align Processing (Rough)		14. Tuning Aligment options and criteria		No Pre-align Processing (Rough)	
21. Detailed Ascii Output / Excel Compatible Output / Differential Retention Display			21. Detailed Ascii Output / Excel Compatible Output / Differential Retention Display				
Output options		Multivariate compatible output		Output options		Multivariate compatible output	
Mass		low 100	high 300	Mass		low 2	high 1000
Retention		low 5	high 40	Retention		low 2	high 40
Peak thershold factor (X noise)		3		Peak thershold factor (X noise)		2	

Apêndice II - Parâmetros utilizados no softwares MSClust

Effective peaks	100
Peak width, scans ou r. time	10
P.W. margin softness	2
Correlation threshold (0.0 - 1.0)	0,8
C.T. margin softness	0,02
PD reduction (0.0 - 1.0)	0,8
PD reduction softness	0,01
Stop criterion	8

Apêndice III - Valores de cada componente do modelo para a análise de PCA e OPLS para os dados obtidos a partir de GC-MS (A) e UHPLC-MS (B)

(A)

Type	A	R2X(cum)	R2Y(cum)	Q2(cum)
PCA-X	5	0.539		0.011
PLS-DA	6	0.536	0.901	0.593
OPLS-DA	4+2+0	0.534	0.901	0.589

(B)

Type	A	R2X(cum)	R2Y(cum)	Q2(cum)
PCA-X	4	0.864		0.822
OPLS-DA	2+1+0	0.848	0.801	0.608

Apêndice IV – Compostos voláteis identificados a partir das flores de *Catasetum*

Espécie	Substância	TR*	KI** literatura	KI** calculado
1 <i>C albovirens</i>	Linalol	13345	1101	1096.7
	(E)-8-hidroxilinalol	28650	1325	1347.7
	β-mirceno	8970	991	989.9
	eucaliptol	10515	1032	1028.8
	(E)-β-ocimeno	11175	1046	1044.6
	2,4-dimetil-acetofenona	20300	1252	1253.0
	indol	21725	1297	1285.1
	antranilato de metila	23740	1343	1331.4
	acetato de geranila	25560	1380	1373.6
	(E,E)-α-farneseno	30880	1504	1502.2
2 <i>C arietinum</i>	(E)-cariofileno	27340	1424	1409.6
	(E)-α-bergamoteno	27970	1432	1424.9
	α-humuleno	28770	1454	1444.3
	(E,E)-α-farneseno	30855	1504	1495.0
	β-bisaboleno	30980	1508	1498.0
	óxido de cariofileno	33720	1587	1568.0
	β-elemeno	26140	1390	1381.4
	2,4-dimetil-acetofenona	21200	1252	1268.1
3 <i>C ariquemense</i>	limoneno	11010	1030	1041.1
	2,4-dimetil-acetofenona	20990	1252	1269.2
	(E,E)-α-farneseno	31585	1504	1521.4
4 <i>C ariquemense</i>	2,4-dimetil-acetofenona	20300	1252	1253.8
	acetato de nerila	28445	1428	1443.7
	(E,E)-α-farneseno	30870	1504	1502.9
5 <i>C barbatum</i>	(E)-β-farneseno	29105	1452	1452.5
	acetato de nerila	28770	1428	1444.3
	(Z)-α-bergamoteno	28310	1416	1433.2
6 <i>C bicolor</i>	acetato de nerila	28445	1428	1443.7
	β-mirceno	8655	991	979.6
7 <i>C boyixbarbatum</i>	(E)-α-bergamoteno	27990	1432	1432.6
	α-copaeno	25540	1375	1374.2
8 <i>C carolinianum</i>	decanol	21085	1278	1271.3
9 <i>C cernuum</i>	(E)-β-ocimeno	11115	1046	1045.8
	(Z)-β-ocimeno	10670	1035	1035.1

11 <i>C cirrhaeoides</i>	<i>trans</i> sabinol	15250	1140	1140.2
	álcool benzílico	10600	1040	1030.5
12 <i>C complanatum</i>	α -terpineol	17565	1195	1188.8
	(E)- β -ocimeno	11265	1046	1044.7
	eucaliptol	10620	1032	1029.3
	β -mirceno	9065	991	990.4
	sabineno	8460	972	972.8
	β -pineno	8635	978	977.9
	α -pineno	7200	933	936.3
	α -tujeno	6960	927	929.3
13 <i>C confusum</i>	indol	22315	1297	1293.1
	acetato de nerila	28755	1428	1444.0
14 <i>C cristatum</i>	(E,E)- α -farneseno	30870	1504	1503.1
	acetato de para-anisila	27040	1418	1409.5
	α -terpineol	17430	1195	1189.2
	(E)- β -ocimeno	11180	1046	1044.6
	eucaliptol	10520	1032	1028.6
	β -mirceno	8940	991	988.1
	sabineno	8334	972	970.3
	α -pineno	7050	933	931.9
15 <i>C denticulatum</i>	linalol	13645	1101	1099.4
	acetato de nerila	28765	1428	1444.2
16 <i>C discolor</i>	acetato de cinamila	28320	1448	1435.8
	acetato de geranila	25725	1380	1374.0
	isoascaridol	23315	1306	1318.1
	nerol	20235	1229	1248.5
	carvona	19695	1246	1236.5
	eucaliptol	10620	1032	1029.3
	para-cimeno	10325	1025	1022.2
	α -felandreno	9650	1007	1006.1
	β -pineno	8630	978	977.8
	sabineno	8465	972	973.0
	α -pineno	7225	933	937.0
	α -tujeno	6965	927	929.5
17 <i>C expansum</i>	indol	22335	1297	1293.5
	carvona	20000	1246	1241.3
	<i>trans</i> -dihidro carvona	18130	1215	1199.4
	<i>cis</i> -dihidro carvona	17880	1198	1193.9
	óxido de <i>trans</i> -limoneno	15260	1146	1135.4
	β -felandreno	10745	1031	1030.1

	para cimeno	10475	1025	1023.6
	α felandreno	9775	1007	1006.9
	β -pineno	8730	978	978.1
	sabineno	8560	972	973.1
	α -pineno	7255	933	935.2
	α -tujeno	7020	927	928.3
18 <i>C sanguineum</i>	α -pineno	7265	933	935.5
	β -pineno	8725	978	977.9
	metil heptenona	8885	986	982.6
	limoneno	10710	1030	1029.3
	acetato de nerila	28760	1428	1444.2
19 <i>C fimbriatum</i>	acetato de geranila	25570	1380	1373.9
	(<i>E</i>)-geranato de metila	23090	1320	1316.3
	indol	21795	1297	1286.6
	geranial	20695	1268	1261.9
	geraniol	20195	1255	1250.7
	citronelol	19005	1232	1223.9
	linalol	13340	1101	1096.6
	(<i>E</i>)- β -ocimeno	11170	1046	1044.5
	β -mirceno	8985	991	990.4
20 <i>C macrocarpum</i>	acetato de cinamila	28310	1448	1435.6
	acetato de geranila	25705	1380	1373.5
	geranial	20845	1268	1262.2
	nerol	20365	1229	1251.5
	geraniol	20195	1255	1247.7
	oxido de <i>trans</i> -limoneno	15045	1146	1132.7
	eucaliptol	10620	1032	1029.3
	para-cimeno	10325	1025	1022.2
	α -felandreno	9650	1007	1006.1
	β - mirceno	9045	991	989.8
	β -pineno	8635	978	977.9
	sabineno	8470	972	973.1
	α -pineno	7215	933	936.7
	α -tujeno	6965	927	929.5
21 <i>C gardneri</i>	decanol	21080	1278	1271.2
	carvona	19560	1246	1237.1
	<i>cis</i> -dihidro carvona	17525	1198	1191.4
	óxido de <i>trans</i> -limoneno	14935	1146	1133.2
	eucaliptol	10535	1032	1029.6
	α -pineno	7100	933	935.1
22 <i>C hopkinsonianum</i>	linalol	15675	1101	1104.7

	α -pineno	7190	933	936.0
23 <i>C juruenensis</i>	linalol	13660	1101	1099.8
	(E)- β -ocimeno	11395	1046	1045.6
24 <i>C mattosianum</i>	carvona	20815	1246	1261.5
	cis-dihidro carvona	17630	1198	1190.3
	oxido de <i>trans</i> -limoneno	15065	1146	1133.1
	limoneno	10630	1030	1029.5
	para cimeno	10330	1025	1022.3
	α -felandreno	9655	1007	1006.2
	β -mirceno	9070	991	990.6
	β -pineno	8630	978	977.8
	sabineno	8480	972	973.4
	α -pineno	7220	933	936.9
	α -tujeno	6970	927	929.6
25 <i>C lanciferum</i>	limoneno	10405	1030	1026.2
26 <i>C lanciferum</i>	cinamato de metila	25605	1384	1374.7
	limoneno	10475	1030	1027.8
27 <i>C luridum</i>	eucaliptol	10515	1032	1029.2
	β -mirceno	8960	991	989.9
	α -pineno	7075	933	934.4
28 <i>C macrocarpum</i>	acetato de nerila	28775	1428	1444.5
	eucaliptol	10740	1032	1030.0
	α -pineno	7260	933	935.3
29 <i>C macrocarpum</i>	eucaliptol	10595	1032	1028.7
	(E)- β -ocimeno	7190	1046	936.0
30 <i>C macrocarpum</i>	acetato de cinamila	28365	1448	1436.9
	acetato de para-anisila	27175	1418	1408.0
	metil eugenol	26640	1403	1395.2
	eugenol	24620	1357	1348.4
	álcool cinâmico	22470	1309	1298.5
	timol	22070	1293	1289.6
	oxido de <i>trans</i> -limoneno	15045	1146	1132.7
	eucaliptol	10630	1032	1029.6
	para-cimeno	10320	1025	1022.1
	α - felandreno	9640	1007	1005.9
	β -pineno	8620	978	977.5
	sabineno	8465	972	973.0
	α -pineno	7200	933	936.3

	α -tujeno	6955	927	929.2
31 <i>C macroglossum</i>	isoascaridol	23165	1306	1318.8
	indol	21695	1297	1285.1
	oxido de <i>cis</i> -limoneno	20390	1160	1155.7
	β -felandreno	10480	1031	1028.3
	β -pineno	8515	978	976.8
	sabineno	8365	972	972.4
	α -pineno	7065	933	934.1
32 <i>C maranhense</i>	(<i>E,E</i>)- α -farneseno	31185	1504	1503.2
	acetato de nerila	28785	1428	1444.7
	cinamato de metila	26070	1384	1379.7
	para-anisato de metila	25645	1375	1369.9
	indol	22340	1297	1293.6
	eucaliptol	10765	1032	1030.6
	β -mirceno	9165	991	990.7
	β -pineno	8730	978	978.1
	sabineno	8560	972	973.1
	α -pineno	7255	933	935.2
33 <i>C maranhense</i>	(<i>E,E</i>)- α -farneseno	31195	1504	1503.5
	acetato de nerila	28760	1428	1444.1
	cinamato de metila	26040	1384	1379.1
	para-anisato de metila	25630	1375	1369.6
	indol	22380	1297	1294.5
	α -terpineol	17820	1195	1192.5
	eucaliptol	10740	1032	1030.0
	β -mirceno	9155	991	990.4
	β -pineno	8720	978	977.8
	sabineno	8560	972	973.1
34 <i>C mattosianum</i>	para-cimeno	12510	1025	1076.8
	α -pineno	7065	933	932.4
35 <i>C multifidum</i>	acetato de cinamila	28630	1448	1440.9
36 <i>C multifidum</i>	acetato de nerila	28765	1428	1444.2
37 <i>C multifissum</i>	(<i>E,E</i>)- α -farneseno	31055	1504	1502.3
	(<i>E</i>)- β -farneseno	28935	1452	1450.7
	(<i>E</i>)- β -ocimeno	11250	1046	1044.3
38 <i>C osakadianum</i>	2.4 dimetil acetofenona	20295	1252	1252.9

39 <i>C osculatum</i>	2.4 dimetil acetofenona	21315	1252	1272
40 <i>C parguazense</i>	vanilina	20675	1394	1364
41 <i>C pileatum</i>	δ- cadineno	31440	1518	1517.5
	(Z)-β-farneseno	27330	1439	1416.6
	eucaliptol	10515	1032	1028.5
	α-pineno	7065	933	932.4
	sabineno	8340	972	970.3
	β-pineno	8505	978	975.2
42 <i>C planiceps</i>	carvona	19710	1246	1242.8
	cis-dihidro carvona	17590	1198	1195.2
	oxido de trans limoneno	14910	1146	1134.9
	eucaliptol	10450	1032	1029.7
	para-cimeno	10165	1025	1022.9
	α-felandreno	9455	1007	1005.7
	β-pineno	8430	978	976.6
	sabineno	8280	972	972.1
	α-pineno	7005	933	934.3
43 <i>C purum</i>	β-bisaboleno	30965	1508	1505.5
	(E)-α-bergamoteno	27975	1432	1432.3
	eucaliptol	10545	1032	1029.9
	β-mirceno	8980	991	990.4
	sabineno	8365	972	972.4
	α-pineno	7075	933	934.4
44 <i>C rooseveltianum</i>	(E,E)-α-farneseno	31195	1504	1503.5
	(E)-β-cariofileno	27680	1424	1417.9
	acetato de nerila	28780	1428	1444.6
45 <i>C rooseveltianum</i>	(E,E)-α-farneseno	31185	1504	1503.2
	acetato de nerila	28765	1428	1444.2
	(E)-β-cariofileno	27685	1424	1417.9
	eugenol	24850	1357	1351.5
	indol	22345	1297	1293.7
	β-mirceno	9155	991	990.4
46 <i>C saccatum</i>	eucaliptol	10600	1032	1028.8
	β-pineno	8635	978	977.9
	sabineno	8470	972	973.1
	α-pineno	7200	933	936.3
47 <i>C socco</i>	decanol	21020	1278	1269.9

48 <i>C vinaceum</i>	acetato de nerila	28760	1428	1444.1
	linalol	13705	1101	1100.8
	(E)- β -ocimeno	11390	1046	1045.5
49 x <i>altaflorestense</i>	acetato de cinamila	28150	1448	1435.5
	acetato de hidrocinamila	24980	1375	1360.2
	isoascaridol	23210	1306	1319.0
	alcool cinamico	22350	1309	1299.1
	cis-dihidro carvona	17515	1198	1196.9
	óxido de <i>trans</i> limoneno	14940	1146	1132.7
	(Z)- β -ocimeno	10500	1035	1028.5
	para-cimeno	10240	1025	1022.2
	α -felandreno	9565	1007	1006.0
	β -mirceno	8990	991	990.5
	β -pineno	8555	978	977.8
	sabineno	8390	972	973.0
	α -pineno	7125	933	936.0
	α -tujeno	6890	927	929.1
50 <i>C pulchrum</i>	(E)- β -ocimeno	10755	1046	1043.5
	limoneno	10055	1030	1026.4
	β -mirceno	8565	991	987.8
	sabineno	7965	972	969.8
	α -pineno	6695	933	931.6
	α -tujeno	6465	927	924.7
51 <i>C semicirculatum</i>	β -mirceno	9160	991	990.5
	bergamoteno	28300	1432	1432.9
	(E)- β -farneseno	29110	1452	1452.6
	(E,E) - α - farneseno	31190	1504	1503.3

*TR Tempo de Retenção

**KI. Índice de Kovats

Apêndice V : Estruturas químicas das substâncias identificadas a partir dos voláteis das flores do gênero
Catasetum

alfa-copaeno

alfa-felandreno

alfa-humuleno

alfa-pineno

alfa-terpineol

alfa-tujeno

acetato de cinamila

acetato de geranila

acetato de hidroxicinamila

acetato de nerila

acetato de anisila

álcool cinâmico

antranilato de metila

beta-bisaboleno

beta-elemeno

beta-felandreno

beta-mirceno

beta-pineno

carvona

cinamato de metila

cis dihidrocarvona

citrônol

decanol

delta-cadineno

eucaliptol

eugenol

(E)-alfa-bergamoteno

(E)-beta-cariofileno

(E)-beta-farneseno

(E,E)-alfa-farneseno

(E)-geranato de metila

(E)-8-hidroksilinalol

(E)-beta-ocimeno

geranial

geraniol

indol

isoascaridol

limoneno

linalol

metil eugenol

metil heptenona

nerol

óxido de cariofileno

óxido de cis limoneno

óxido de trans limoneno

para-anisato de metila

para-cimeno

sabineno

timol

trans sabinol

vanilina

(Z)-alfa-bergamoteno

(Z)-beta-farneseno

(Z)-beta-ocimeno

Apêndice VI – Impressões digitais metabólicas obtidas a partir das análises por GC-MS

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (3) *C. ariquemense*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (4) *C. ariquemense*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. albovirens*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. xaltaflorestense*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. arietinum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. boyixbarbatum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. barbatum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. bicolor*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. carolinianum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. cernuum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. cirrhaeoides*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. complanatum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. confusum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. cristatum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. denticulatum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. discolor*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. expansum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. fimbriatum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. gardneri*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. hopkinsonianum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. juruenensis*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. luridum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. macroglossum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. multifissum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C osakadianum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C osculatum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C paraguayense*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. pileatum*

Figura 32 : Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. planiceps*

Figura 33 : Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. pulchrum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. purum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. saccatum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. semicirculatum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. socco*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. vinaceum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de *C. sanguineum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (20) *C. macrocarpum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (24) *C. mattosianum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (25) *C. lanciferum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (26) *C. lanciferum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (28) *C. macrocarpum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (29) *C. macrocarpum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (30) *C macrocarpum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (32) *C maranhense*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (33) *C maranhense*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (34) *C. mattosianum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (35) *C. multifidum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (36) *C. multifidum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (44) *C. rooseveltianum*

Impressão digital metabólica obtida por GC-MS a partir dos compostos voláteis das flores de (45) *C. rooseveltianum*

Apêndice VII – Impressões digitais metabólicas obtidas nas análises via UHPLC-MS

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. albovirens* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. arietinum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (3) *C. ariquemense* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (4) *C. ariquezensis* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. barbatum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. bicolor* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C boyixbarbatum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C carolinianum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C cernuum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. ciliatum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. cirrhaeoides* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. complanatum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. confusum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. cristatum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. denticulatum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C discolor* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C expansum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C sanguineum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. fimbriatum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. gardneri* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. juruenensis* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (24) *C. mattosianum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (25) *C. lanciferum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (26) *C. lanciferum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. luridum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (28) *C. macrocarpum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (29) *C. macrocarpum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (30) *C. macrocarpum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. macroglossum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (32) *C. maranhense* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (33) *C. maranhense* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (34) *C. mattosianum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. multifidum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. multifissum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. osakadianum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. osculatum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. parguazense* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. pileatum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. planiceps* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. purum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (44) *C. rooseveltianum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de (45) *C. rooseveltianum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. saccatum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. socco* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. vinaceum* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Impressão digital metabólica do extrato hidrometanólico foliar de *C. xaltaflorestense* **A.** Modo de ionização positivo. **B.** Modo de ionização negativo

Apêndice VIII – Dados de coleta das amostras de *Catasetum*

<i>Vaso</i>	<i>espécie</i>	<i>Origem</i>	<i>Data da captura de voláteis e folha</i>
960	<i>albovirens</i>	Irituí PA	04/dez/15
844	<i>arietinum</i>	Limoeiro PE	18/abr/16
924	<i>ariquemense</i>	Urupá RO	jan/15
924	<i>ariquemense</i>	Urupá RO	05/fev/16
952	<i>barbatum</i>	Manaus AM	23/mar/15
971	<i>bicolor</i>	*	10/fev/16
957	<i>boyixbarbatum</i>	Irlanduba AM	15/abr/2016
946	<i>carolinianum</i>	*	05/jan/16
810	<i>cernuum</i>	Jundiá SP	03/nov/15
	<i>ciliatum</i>	AM	09/mar/15
935	<i>cirrhaeoides</i>	*	22/abr/16
947	<i>complanatum</i>	Ariquemes RO	14/mai/15
836	<i>confusum</i>	Palmas TO	22/abr/15
990	<i>cristatum</i>	Jaguaquara BA	25/abr/16
	<i>denticulatum</i>	RO	22/abr/15
814	<i>discolor</i>	Paraupébas PA	17/jun/15
823	<i>expansum</i>	*	22/abr/15
821	<i>sanguineum</i>	*	29/abr/15
303	<i>fimbriatum</i>	São Simão SP	16/dez/15
819	<i>macrocarpum</i>	Paraupébas PA	06/jul/15
845	<i>gardneri</i>	Gravatá PE	11/jan/16
922	<i>hopkinsonianum</i>	S Fco do Guaporé RO	14/mai/15
921	<i>juruenensis</i>	Alvorada do Oeste - RO	07/abr/15
901	<i>mattosianum</i>	Serra ES	14/mai/15
943	<i>lanciferum</i>	Padre Leopoldo MG	jan/15
943	<i>lanciferum</i>	Padre Leopoldo MG	dez/15
898	<i>luridum</i>	Niterói RJ	21/jan/16
834	<i>macrocarpum fem</i>	Palmas TO	30/abr/15
849	<i>macrocarpum</i>	São Luiz MA	15/mai/15
819	<i>macrocarpum2</i>	Paraupébas PA	17/jun/15
822	<i>macroglossum</i>	*	02/fev/16
951	<i>maranhense</i>	São Matheus ES	22/abr/15
951	<i>maranhense</i>	São Matheus ES	23/fev/16
305	<i>mattosianum</i>	Santa Tereza ES	05/fev/16
814	<i>multifidum</i>	Paraupébas PA	07/abr/15
815	<i>multifidum</i>	Paraupébas PA	13/abr/2015
916	<i>multifissum</i>	Porto Velho RO	19/mai/15

918	<i>osakadianum</i>	Porto Velho RO	15/dez/15
911	<i>osculatum</i>	Sinop - MT	06/jul/15
919	<i>parguazense</i>	Porto Velho RO	27/out/15
860	<i>pileatum</i>	*	22/mar/16
850	<i>planiceps</i>	*	19/out/15
847	<i>purum</i>	Jaguaquara BA	11/jan/16
929	<i>rooseveltianum</i>	Tangará da Serra MT	23/mar/15
929	<i>rooseveltianum 1</i>	Tangará da Serra MT	22/abr/15
932	<i>saccatum</i>	Sena Madureira AC	15/mai/15
936	<i>socco</i>	Itanhaém SP	14/jan/16
861	<i>vinaceum</i>	*	11/jan/16
903	<i>x altaflorestense</i>	Nova Canaã do Norte MT	10/dez/15
817	<i>pulchrum</i>	Paraupabas -PA	29/jun/2016
959	<i>semicirculatum</i>	Sena Madureira AC	07/05/2015

**espécies adquiridas em orquidário comercial*

Anexo A – *Análise filogenética baseada em DNA do gênero de Catasetum realizada por colaboradores*