



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

KALINE RODRIGUES CARVALHO

**ESTUDO METABOLÔMICO E ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE MACELA-
DA-TERRA (*Egletes viscosa* L.-ASTERACEAE)**

FORTALEZA

2021

KALINE RODRIGUES CARVALHO

ESTUDO METABOLÔMICO E ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE MACELA-DA-TERRA (*Egletes viscosa* L.-ASTERACEAE)

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Edilberto Rocha Silveira
Coorientador: Dr. Kirley Marques Canuto

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C324e Carvalho, Kaline Rodrigues.
Estudo metabolômico e atividade gastroprotetora de macela-da-terra (*Egletes viscosa* L.-Asteraceae) /
Kaline Rodrigues Carvalho. – 2021.
291 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em
Química, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira.
Coorientação: Prof. Dr. Kirley Marques Canuto.
1. *Egletes viscosa*. 2. Quimiotipos. 3. Metabolômica. 4. Asteraceae. 5. Macela-da-terra. I. Título.
CDD 540
-

KALINE RODRIGUES CARVALHO

ESTUDO METABOLÔMICO E ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE MACELA-DA-TERRA (*Egletes viscosa* L.-ASTERACEAE)

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Kirley Marques Canuto (Coorientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Prof. Dr. Fernando Batista da Costa
Universidade de São Paulo (USP)

Dra. Deborah dos Santos Garruti
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Profa. Dra. Dávila de Souza Zampieri
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Gisele Simone Lopes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Ao encerrar mais uma etapa de minha vida como acadêmica, gostaria de agradecer a todos que contribuíram para que, de uma forma ou de outra, esta se concretizasse. Foram muitos amigos e amigas que compartilharam comigo momentos de tristeza, dúvidas, alegrias e entusiasmo. Chegado o momento, quero dizer muito obrigada:

À minha família, sobretudo minha mãe, por todo amor, compreensão e apoio em minhas decisões.

Ao meu orientador Prof. Edilberto Rocha Silveira, pela orientação, e apoio que sempre pude contar, além da amizade que contribuíram bastante para minha formação acadêmica.

Ao meu coorientador Dr. Kirley Marques Canuto, pela acolhida, dedicação, atenção e conhecimento transmitido para o desenvolvimento deste trabalho e principalmente, por todas as críticas e sugestões que foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional, e para o aprimoramento desta tese.

Aos pesquisadores da Embrapa Dr. Edy Sousa de Brito, Dra Rita de Cássia Alves Pereira, Dr. Guilherme Julião Zocolo e Dr. Ebenézer de Oliveira Silva pela contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Elenilson Godoy Alves Filho pela grande colaboração no tocante a realização das análises quimiométricas, imprescindíveis para o aprimoramento e a conclusão deste trabalho.

Ao apoio técnico do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa: Dra Lorena Mara Alexandre e Silva, Dra Tigressa Helena Soares Rodrigues e Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro sempre solícitos quando precisei de auxílio material ou teórico para a viabilização de algum experimento.

À Ana Sheila Queiroz de Souza por ter contribuído na realização deste trabalho, sempre realizando as identificações químicas no CG-EM com total dedicação e esmero.

Às professoras Dra Dávila de Souza Zampieri, Dra Gisele Simone Lopes e Dra Mary Anne Souza Lima por aceitarem o convite para participar da banca de qualificação, possibilitando o aprimoramento e o enriquecimento deste trabalho.

À Profa. Dra Flávia Almeida Santos, sua pós-doutoranda Dra Ana Flávia Seraine Custódio Viana e o doutorando Ms. Paulo Iury Gomes Nunes pela realização dos testes farmacológicos, cujos resultados foram de extrema importância para o desenvolvimento do trabalho.

À diretoria da Embrapa por ter, durante esse período, oferecido todo o apoio, além de condições técnicas e logísticas para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço de forma particular, ao Sr. Newton sempre acolhedor, cordial e solícito.

À Ms. Alexandra Elbakyan fundadora do *Sci-hub*, por tornar possível o aprofundamento bibliográfico.

Aos amigos técnicos de laboratório do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, pelo apoio constante e convivência sempre alegre e divertida no trabalho.

Aos amigos do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa, dos quais guardo boas lembranças.

Aos amigos do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais - UFC, pelo apoio constante e convivência.

Aos funcionários, Célia, Orlando, Lana e Lorryne pelos serviços prestados.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado no período de dois anos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Embrapa pelo apoio financeiro (SEG 03.14.01.012.00.00).

“Ao fim do dia, podemos aguentar muito mais do que pensamos que podemos”.

Frida Khalo.

RESUMO

Egletes viscosa Less (Asteraceae) é uma erva conhecida popularmente no Nordeste brasileiro por “macela-da-terra”, onde seus capítulos florais (CF) são usados na forma de chá/infusão para distúrbios gastrointestinais. Suas propriedades gastroprotetoras têm sido atribuídas ao flavonoide ternatina, e aos diterpenos tanabalina e ácido centipédico. Esta planta possui duas variedades químicas com base na composição química do óleo essencial: quimiotipo A, rico em acetato de *trans*-pinocarveíla, e quimiotipo B, rico em acetato de *cis*-isopinocarveíla. Em razão disso, o presente trabalho visou realizar um estudo metabolômico e avaliar a atividade gastroprotetora dos CF e das folhas dos dois quimiotipos de *E. viscosa*. Os materiais botânicos investigados foram de origem silvestre, cultivados por semeadura ou adquiridos comercialmente, sendo posteriormente preparados em diferentes formas e analisados por técnicas cromatográficas e/ou espectrométricas: cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM), espectroscopia de infravermelho próximo (IVp), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplado a espectrometria de massas (CLUE-EM). Em seguida, os dados gerados foram combinados com quimiometria para a discriminação de quimiotipos. A análise de CG-EM foi aplicada a CF extraídos por hidrodestilação e por microextração em fase sólida (MEFS), a qual foi precedida pela otimização das condições de extração através de delineamento composto central rotacional. As melhores condições foram obtidas com CF extraídos com fibra DVB/CAR/PDMS por 6,6 min a 40 °C. O método de MEFS tem como vantagens não ser não-destrutivo e requerer uma quantidade de CF 300x menor do que a hidrodestilação. O método de IVp também discriminou os quimiotipos de maneira não-destrutiva utilizando um dispositivo portátil, o qual pode ser aplicado in situ (ex.: fazendas). Além disso, métodos de CLUE-EM e RMN ¹H foram desenvolvidos e validados para a quantificação dos compostos, revelando que os CF do quimiotipo A possuem maiores teores dos três princípios ativos. Todos os métodos analíticos mostraram ser simples, rápidos, confiáveis e complementares para autenticidade e/ou controle de qualidade de matérias-primas e produtos comercializados de *E. viscosa*. Adicionalmente, a análise de CLUE-EM de alta resolução permitiu a identificação de 36 compostos nas infusões (CF: 25, folhas: 20), sendo 20 deles relatados pela primeira vez na espécie, entre os quais derivados do ácido cafeico, flavonoides e diterpenos. Análise quimométrica dos dados de CLUE-EM indicou que os quimiotipos A e B mostravam também diferenças nas concentrações de vários destes constituintes não-voláteis. A atividade gastroprotetora dos CF e folhas foi avaliada através de ensaios de lesões gástricas induzidas por

etanol em camundongos. Todas as amostras exibiram efeito gastroprotetor (50 - 400 mg.kg⁻¹) e foram desprovidas de toxicidade. Os CF foram mais potentes do que as folhas, exibindo gastroproteção com doses de 50 mg.kg⁻¹. Não foi observada diferença significativa entre amostras de chá e de tintura. Os quimiotipos apresentaram apenas algumas pequenas diferenças no mecanismo de ação, o qual envolve ação antioxidante, NO, prostaglandinas, canais de K⁺ e receptores TRPV1. Nosso estudo é o primeiro relato comprovando o efeito gastroprotetor de *E. viscosa* nas formas farmacêuticas consumidas pela população.

Palavras-chave: *Egletes viscosa*. Quimiotipos. Metabolômica. Asteraceae. Macela-da-terra. Atividade gastroprotetora.

ABSTRACT

Egletes viscosa Less (Asteraceae) is an herb popularly known as “macela-da-terra” in the Northeast of Brazil, where its flower buds (FB) are used in the form of tea/infusion for gastrointestinal disorders. Indeed, its gastroprotective properties have been attributed to the flavonoid ternatine, and to the diterpenes tanabalin and centipedic acid. Such plant has two chemical varieties based on the chemical composition of the essential oil: chemotype A, which is rich in *trans*-pinocarveyl acetate and *cis*-isopinocarveyl acetate-rich chemotype B. As a result, the present study aimed to perform a metabolomic study and evaluate the gastroprotective activity of FB and leaves of the two chemotypes of *E. viscosa*. The plant materials investigated were of wild origin, cultivated by sowing or purchased commercially, then they were prepared in different forms and analyzed by chromatographic and/or spectrometric techniques: gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), near infrared spectroscopy (NIR), hydrogen nuclear magnetic resonance (¹H NMR) and ultra-efficiency liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS). Next, the generated data were combined with chemometrics for the discrimination of chemotypes. The GC-MS analyses were applied to FB extracted by hydrodistillation and by solid phase microextraction (SPME), which had its extraction conditions previously optimized through a central rotational composite design. The best conditions were achieved with FB extracted with DVB/CAR/PDMS fiber for 6.6 min at 40 °C. The SPME method has the advantages of being non-destructive and requiring an amount of FB 300x lesser than the hydrodistillation. The NIR method also discriminated the chemotypes in a non-destructive way using a portable device, which can be applied *in situ* (eg. farms). In addition, UPLC-MS and ¹H NMR methods were developed and validated for the quantification of the compounds, revealing that the FB from the chemotype A presents higher contents of the three active principles. All analytical methods showed to be simple, fast, reliable and complementary for authenticity and / or quality control of *E. viscosa* raw materials and products. In addition, the UPLC-MS analysis allowed the identification of 36 compounds in the infusions (FB: 25, leaves: 20), 20 of them have been reported for the first time in the species, including derivatives of caffeic acid, flavonoids and diterpenes. Chemometric analysis of the UPLC-MS data indicated that chemotypes A and B also showed differences in the concentrations of many non-volatile constituents. The gastroprotective activity of FB and leaves was evaluated through ethanol-induced gastric lesions in mice. All samples exhibited a gastroprotective effect (50 - 400 mg.kg⁻¹) and were devoid of toxicity. FB were more potent than leaves, showing gastroprotection at doses of 50 mg.kg⁻¹. There was no significant

difference between tea and tincture samples. The chemotypes showed only small differences in the mechanism of action, which involves antioxidant, NO, prostaglandins, K⁺ channels and TRPV1 receptors. Our study is the first report proving the gastroprotective effect of *E. viscosa* in the pharmaceutical forms consumed by the population.

Keyword: *Egletes viscosa*. Chemotypes. Metabolomics. Asteraceae. Macela-da-terra. Gastroprotective activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Capítulos florais de <i>E. viscosa</i> comercializados em supermercados e ervanários	36
Figura 2	– Detalhes das folhas de <i>E. viscosa</i> : (A) quimiotipo "A", rico em acetato de <i>trans</i> -pinocarveíla; (B) quimiotipo "B" rico em acetato de <i>cis</i> -isopinocarveíla	37
Figura 3	– Prancha revelando características da família Asteraceae	41
Figura 4	– Distribuição geográfica das subfamílias de Asteraceae	42
Figura 5	– Estruturas dos compostos isolados de <i>E. viscosa</i>	46
Figura 6	– Etapas envolvidas nas análises metabólicas	68
Figura 7	– Estrutura dos compostos bioativos de <i>E. viscosa</i> : ternatina (1); tanabalina (2) e ácido centipédico (3)	79
Figura 8	– Cromatogramas CLUE-EMAR dos padrões (C = 100 ppm) em modo negativo: (A) ternatina, (B) tanabalina e (C) ácido centipédico e em modo positivo (D) ternatina, (E) tanabalina e (F) ácido centipédico	80
Figura 9	– Espectros ESI no modo positivo dos padrões analíticos de (A) ternatina, (B) tanabalina e (C) ácido centipédico	80
Figura 10	– Cromatograma CLUE-QDa em modo de varredura completa (210-400 nm) dos padrões analíticos: (A) ternatina, (B) tanabalina e (C) ácido centipédico	81
Figura 11	– Cromatogramas CLUE-QDa MIS da infusão de capítulos florais (Ev017): (a) ternatina; (b) tanabalina e (c) ácido centipédico	82
Figura 12	– Gráficos típicos de desvios residuais	84
Figura 13	– Gráfico de resíduo das respostas em cada nível de concentração em função das concentrações das soluções padrão de calibração: Desvio d_y versus Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) para os compostos: (a) ternatina; (b) tanabalina e (c) ácido centipédico	86

Figura 14	– Gráfico mostrando o efeito matriz para os compostos bioativos: (a) ternatina, (b) tanabalina e (c) ácido centipédico de <i>E. viscosa</i>	90
Figura 15	– Teor de ternatina, tanabalina e ácido centipédico (mg.kg^{-1}) da infusão dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i> , determinados por análise de CLUE-QDa MIS	94
Figura 16	– Teores de ternatina, tanabalina e ácido centipédico (mg.kg^{-1}) da infusão das partes aéreas de <i>E. viscosa</i> , determinados por análise de CLUE-QDa MIS	94
Figura 17	– Espectros de IVp das amostras dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i> do quimiotipo A (espectros de cima) e quimiotipo B (espectros de baixo)	97
Figura 18	– Espectro de IVp dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i>	98
Figura 19	– Média dos espectros IVp de capítulos florais de <i>E. viscosa</i> (linha preta), com a área espectral selecionada por iPLS (faixa verde); b) Variância capturada (%) em função do número de VL; c) Predição de pontuação do modelo de validação cruzada para classificação binária de capítulos florais de <i>E. viscosa</i> com maiores quantidades de acetato de <i>trans</i> -pinocarveíla (quimiotipo A como bolas azuis) e maiores quantidades de acetato de <i>cis</i> -isopinocarveíla (quimiotipo B como bolas vermelhas)	98
Figura 20	– Cromatogramas dos óleos essenciais obtidos em CG-DIC dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i> . A: quimiotipo A (Ev024) e B: quimiotipo B (Ev017) ..	101
Figura 21	– Teste de validação cruzada para a quantidade predita \times medida de acetato de <i>trans</i> -pinocarveíla (a) e acetato de <i>cis</i> -isopinocarveíla (b) (expresso como área absoluta no cromatograma CG-DIC). A curva de regressão verde é a correlação perfeita entre o valor real e o predito pelo modelo, e a curva vermelha representa a correlação real	102
Figura 22	– Cromatogramas dos óleos essenciais obtidos em CG-EM dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i> . A: quimiotipo A (Ev024) e B: quimiotipo B (Ev017)	103

Figura 23	– Variabilidade dos quimiotipos de <i>E. viscosa</i> com base no conjunto de dados CG-EM de seus óleos essenciais: escores VL1 × VL2 (a), gráfico de pesos para a discriminação de quimiotipos (b), de acordo com o gráfico de importância das variáveis na projeção (c)	103
Figura 24	– Principais constituintes dos óleos essenciais de capítulos florais dos quimiotipos A e B de <i>E. viscosa</i>	104
Figura 25	– Espectro RMN ¹ H (600 MHz) de capítulos florais de <i>E. viscosa</i> (25,0 mg): amostras do quimiotipo A (Ev024) extraídas com CDCl ₃ (a) e CD ₃ OD (b); amostras do quimiotipo B (Ev017) extraídas com CDCl ₃ (c) e CD ₃ OD (d); expansões da região entre 3,3 – 4,7 (a1 e b1); Sinais dos compostos: Te: ternatina; T: tanabalina e Ac: ácido centipédico	107
Figura 26	– Espectros de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) de capítulos florais pulverizados de <i>E. viscosa</i> do quimiotipo B (Ev034): (a) 100,0 mg; (b) 50,0 mg e (c) 25,0 mg e expansões da região entre 3,3 a 4,1 (a1, b1 e c1) ...	108
Figura 27	– Variabilidade dos quimiotipos de <i>E. viscosa</i> com base no conjunto de dados de RMN de ¹ H: gráfico de escores VL1 × VL2 (a) e pesos (b) para discriminação dos quimiotipos: A em bolas azuis e B em bolas vermelhas	109
Figura 28	– Expansões do espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) do extrato metanólico dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i> . A: expansão da região (δ_H 7,05-7,70); B: expansão da região (δ_H 3,77-3,92)	111
Figura 29	– Teor de ternatina, tanabalina e ácido centipédico (mg.kg ⁻¹) em capítulos florais de <i>E. viscosa</i> , determinados por análise de RMNq ¹ H	111
Figura 30	– Cromatogramas MEFS-CG-EM das fibras DVB/CAR/PDMS (à esquerda) e PA (à direita) e óleo essencial do quimiotipo A (Ev024) de <i>E. viscosa</i> : (a) capítulos florais; (b) capítulos florais e água; (c) capítulos florais, água e sal; (d) hidrodestilação	115
Figura 31	– Cromatogramas de MEFS-CG-EM das fibras DVB/CAR/PDMS (à esquerda) e PA (à direita) e óleo essencial do quimiotipo B (Ev017) de <i>E. viscosa</i> : (a) capítulos florais; (b) capítulos florais e água; (c) capítulos florais, água e sal; (d) hidrodestilação	116

Figura 32	– Efeitos estimados pelo gráfico de Pareto para a soma das áreas dos picos de CG-EM dos compostos acetato <i>trans</i> -pinocarveíla e acetato <i>cis</i> -isopinocarveíla extraídos dos capítulos florais do quimiotipo A de <i>E. viscosa</i> (a); gráficos da superfície em 2D (b); gráfico da superfície resposta em 3D (c)	121
Figura 33	– Efeitos estimados pelo gráfico de Pareto para a soma das áreas dos picos de CG-EM dos compostos acetato <i>trans</i> -pinocarveíla e acetato <i>cis</i> -isopinocarveíla extraídos dos capítulos florais do o quimiotipo B de <i>E. viscosa</i> (a); gráficos da superfície em 2D (b); gráfico da superfície resposta em 3D (c)	122
Figura 34	– Cromatogramas de CLUE-EMAR para infusão de capítulos florais de <i>E. viscosa</i> silvestre (Ev017): (a) modo de ionização negativo e (b) modo positivo	131
Figura 35	– Estruturas dos compostos tentativamente identificados das partes aéreas de <i>E. viscosa</i>	134
Figura 36	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do ácido cítrico (2)	136
Figura 37	– Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido cítrico (2)	136
Figura 38	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do ácido 3,4-dihidroxibenzoico hexosídeo (4)	137
Figura 39	– Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido 3,4-dihidroxibenzoico hexosídeo (4)	137
Figura 40	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do ácido neoclorogênico (A) e ácido clorogênico (B)	138
Figura 41	– Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido neoclorogênico (5)	138
Figura 42	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do ácido cafeico (7)	139
Figura 43	– Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido cafeico (7)	139
Figura 44	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do ácido criptoclorogênico (A) e ácido 1-cafeoilquínico (B)	140

Figura 45	– Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido criptoclorogênico (8)	140
Figura 46	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo da rutina (8)	141
Figura 47	– Esquema mostrando as principais fragmentações da rutina (8)	141
Figura 48	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo de kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo (9)	141
Figura 49	– Esquema mostrando as principais fragmentações de kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo (9)	142
Figura 50	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo dos ácidos dicafeoilquínico: (a) 1,4-diCaQ; (b) 3,4-diCaQ; (c) 3,5di-CaQ e (d) 4,5di-CaQ	143
Figura 51	– Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido dicafeoilquínico	144
Figura 52	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo da quercetina (20)	144
Figura 53	– Esquema mostrando as principais fragmentações da quercetina (20)	145
Figura 54	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do 12-acetoxi-7-hidroxi-3,13(14)-clerodandieno-18,19:15,16-diolídeo (22)	145
Figura 55	– Esquema mostrando as principais fragmentações de 12-acetoxi-7-hidroxi-3,13(14)-clerodandieno-18,19:15,16-diolídeo (22)	146
Figura 56	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo de lactona isociliolida (A) e seu isômero (B)	146
Figura 57	– Esquema mostrando a principal fragmentação da lactona isociliolida (24) e seu isômero (30)	147
Figura 58	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo da kerlinolida (25)	147
Figura 59	– Esquema mostrando as principais fragmentações da kerlinolida (25)	148
Figura 60	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do 7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diol (A) e seu isômero (B)	148

Figura 61	– Esquema mostrando as principais fragmentações do 7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diol	149
Figura 62	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do bacchariol (29)	149
Figura 63	– Esquema mostrando as principais fragmentações de bacchariol (29)	150
Figura 64	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo de 12- <i>epi</i> -bacchotricuneatina (31)	150
Figura 65	– Esquema mostrando as principais fragmentações de 12- <i>epi</i> -bacchotricuneatina (31)	151
Figura 66	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo de 12-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diolida (32)	151
Figura 67	– Esquema mostrando a principal fragmentação de 12-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diolida (32)	152
Figura 68	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo da ternatina (33)	152
Figura 69	– Esquema mostrando a principal fragmentação da ternatina (33)	153
Figura 70	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo da salvisplendina C (34) ...	153
Figura 71	– Esquema mostrando as principais fragmentações de salvisplendina C (34) .	154
Figura 72	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo de 15,16-epoxi-12-hidroxineocleroda-13 (16), 14-dieno-18,19-hemiacetal (35)	154
Figura 73	– Esquema mostrando as principais fragmentações de 15,16-epóxi-12-hidroxineocleroda-13(16),14-dieno-18,19-hemiacetal (35)	155
Figura 74	– Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo de 12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida (A) e seu isômero (B)	155
Figura 75	– Esquema mostrando as principais fragmentações dos diastereoisômeros 12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida (36) e seu isômero (39)	156
Figura 76	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo do 8 α -hidroxilabd-13(S)- <i>O</i> -D-ribopiranosídeo (37)	156
Figura 77	– Esquema mostrando as principais fragmentações do 8 α -hidroxilabd-13(S)- <i>O</i> -D-ribopiranosídeo (37)	157

Figura 78	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo do 3-etóxi-12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida (38)	157
Figura 79	– Esquema mostrando as principais fragmentações de 3-etóxi-12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida (38)	158
Figura 80	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo da tanabalina (40)	158
Figura 81	– Esquema mostrando as principais fragmentações de tanabalina (40)	158
Figura 82	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo (IES) do 9,10-seco-4,9(10),13(14)-labdatrien-18-ol (A) e seu isômero (B)	159
Figura 83	– Esquema mostrando as principais fragmentações do 9,10-seco-4,9(10),13(14)-labdatrien-18-ol (41) e seu isômero (43)	159
Figura 84	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo do tarapacol (45)	160
Figura 85	– Esquema mostrando as principais fragmentações do tarapacol (45)	160
Figura 86	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo do ácido centipédico (46) .	161
Figura 87	– Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido centipédico (46)	161
Figura 88	– Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo do 13-hidroxilabda-7,14-dieno13(<i>R</i>)- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosídeo (47)	162
Figura 89	– Esquema mostrando as principais fragmentações do 13-hidroxilabda-7,14-dieno13(<i>R</i>)- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosídeo (47)	162
Figura 90	– Cromatogramas CLUE da infusão dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i> comerciais (Ev024) do quimiotipo A: (a) modo de ionização negativo e (b) modo positivo	163
Figura 91	– Cromatogramas de CLUE da infusão de capítulos florais cultivados de <i>E. viscosa</i> (Ev034-01) do quimiotipo B: (a) modo de ionização negativo e (b) modo positivo	167
Figura 92	– Cromatogramas CLUE da tintura dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i> silvestre (Aiuaba - Ev017-03) do quimiotipo B: (a) modo de ionização negativo e (b) modo positivo	171

Figura 93	– Cromatograma CLUE das folhas cultivadas do quimiotipo A de <i>E. viscosa</i> (Ev047): (a) modo de ionização negativo e (b) modo positivo	176
Figura 94	– Cromatograma de CLUE-EMAR das folhas (Ev048) de <i>E. viscosa</i> do quimiotipo B no modo de ionização: (a) negativo e (b) positivo	179
Figura 95	– Resultados da classificação multivariada da modelagem OPLS-DA das amostras de <i>E. viscosa</i> de acordo com o quimiotipo: a) Escores VL1 x VL2; b) Resíduos de Hotelling T2 x Q; c) Cargas VL1 relevantes; d) Pontuações VIP no eixo VL1 rutina (10); kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosídeo (11); ácido 1,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (12); ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (13); ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (15); composto desconhecido (16); lactona isociliolida (24); kerlinolida (25); isômero 7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diolida (28); bacchariol (29) e 15,16-epóxi-12-hidroxineocleroda-13(16),14-dieno18,19-hemiacetal (35)	190
Figura 96	– Estrutura dos compostos responsáveis pela discriminação dos quimiotipos no conjunto de dados de CLUE-EMAR	191
Figura 97	– Atividade gastroprotetora de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A), Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B), Ev017-01 (Chá dos capítulos florais de material silvestre (Aiuaba) - Quimiotipo B) e Ev017-03 (Tintura dos capítulos florais de material silvestre (Aiuaba) - Quimiotipo B), Ev047 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo A), Ev048 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo B) e N-acetilcisteína (NAC) em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos	195
Figura 98	– Efeito dos chás (Ev024 e Ev034-01) e tintura (Ev017-03) de <i>Egletes viscosa</i> sobre o estresse oxidativo gástrico no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos	197

Figura 99 – Avaliação da toxicidade aguda de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A), Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B), Tintura Ev017-03 (Tintura dos capítulos florais de material silvestre (Aiuaba) - Quimiotipo B), Ev047 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo A) e Ev048 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo B) em camundongos	199
Figura 100 – Avaliação do envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A) e Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B)	200
Figura 101 – Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito gastroprotetor de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A) e Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B)	200
Figura 102 – Avaliação do envolvimento dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) no efeito gastroprotetor de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A) e Ev034-01 (Chá de capítulos florais - Quimiotipo B)	201
Figura 103 – Avaliação do envolvimento dos receptores TRPV-1 no efeito gastroprotetor de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A) e Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B)	202
Figura 104 – Microfotografias representativas de cortes estomacais de camundongos observados em ensaio <i>in vivo</i> para avaliação atividade gastroprotetora de amostras de <i>E. viscosa</i>	203

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Estruturas dos compostos atribuídos a atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae	51
Tabela 2	– Resultados obtidos para as curvas analíticas dos compostos construídas sem superposição de matriz (solvente) por CLUE-QDa-MIS	83
Tabela 3	– Resultados obtidos para as curvas analíticas dos compostos construídas com superposição de matriz (extrato) por CLUE-QDa-MIS	83
Tabela 4	– Resultados obtidos para o teste <i>F</i> de avaliação de homogeneidade de variâncias, sendo <i>k</i> o número de grupos (pontos de calibração)	87
Tabela 5	– Análise estatística de significância dos parâmetros das curvas analíticas sem superposição de matriz	88
Tabela 6	– Análise estatística de significância dos parâmetros das curvas analíticas com superposição de matriz	88
Tabela 7	– Resultados dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) estimados para os compostos	91
Tabela 8	– Dados de precisão (repetibilidade e inter-corrída)	92
Tabela 9	– Resultados obtidos para os ensaios de recuperação no estudo de exatidão do método	92
Tabela 10	– Parâmetros de validação cruzada para a acurácia de classificação derivados da matriz de confusão com base nas análises de IVp para os capítulos florais dos quimiotipos A e B de <i>E. viscosa</i> , usando três variáveis latentes (3 VL)	100
Tabela 11	– Parâmetros estatísticos de modelos de regressão multivariada usando três variáveis latentes (3 VL) para os quimiotipos A e B de acordo com as respectivas quantidades de acetato <i>trans</i> -pinocarveíla e acetato <i>cis</i> -isopinocarveíla (área absoluta no cromatograma CG-DIC)	101

Tabela 12	– Parâmetros de validação cruzada avaliados na acurácia da classificação do modelo PLS-DA para discriminação dos dois quimiotipos de <i>E. viscosa</i> usando o conjunto de dados CG-EM de seus óleos essenciais	105
Tabela 13	– Parâmetros de validação cruzada avaliados na acurácia da classificação do modelo PLS-DA para discriminação dos dois quimiotipos de <i>E. viscosa</i> usando o conjunto de dados RMN	110
Tabela 14	– Condições experimentais e valores de resposta para extração de compostos voláteis dos capítulos florais dos dois quimiotipos de <i>E. viscosa</i> usando MEFS-CG-EM	118
Tabela 15	– Análise de variância (ANOVA) para os modelos quadráticos desenvolvidos para descrever a influência da massa de capítulos florais (X_1), temperatura de extração (X_2) e tempo de extração (X_3) na área total dos picos no cromatograma de CG-EM dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i>	119
Tabela 16	– Comparação dos componentes voláteis identificados nos capítulos florais de <i>E. viscosa</i> pelo método de MEFS e hidrodestilação (HD) do quimiotipo A (Ev024) e quimiotipo (Ev024)	126
Tabela 17	– Resultados das análises de CG-EM para compostos voláteis de capítulos florais de <i>E. viscosa</i> extraídos por hidrodestilação (óleo essencial) e por MEFS	129
Tabela 18	– Identificação química da infusão dos capítulos florais silvestre (Ev017) por CLUE-EMAR	132
Tabela 19	– Abundância relativa dos íons-produtos (EM/EM) no modo negativo dos ácidos dicafeoilquínicos (diCaQ)	143
Tabela 20	– Identificação química da infusão dos capítulos florais comerciais (Ev024) do quimiotipo A por CLUE-EMAR	164
Tabela 21	– Identificação química da infusão dos capítulos florais cultivados (Ev034-01) do quimiotipo B por CLUE-EMAR	168
Tabela 22	– Identificação química da tintura dos capítulos florais silvestre (Aiuaba - Ev017-03) do quimiotipo B por CLUE-EMAR	172

Tabela 23	– Identificação química do chá das folhas cultivadas (Ev047) do quimiotipo A por CLUE-EMAR	177
Tabela 24	– Identificação química da infusão das folhas cultivadas (Ev048) do quimiotipo B por CLUE-EMAR	180
Tabela 25	– Comparação do perfil químico dos extratos de <i>E. viscosa</i>	185
Tabela 26	– Parâmetros estatísticos da acurácia da classificação do modelo PLS-DA para discriminação dos dois quimiotipos de <i>E. viscosa</i> usando o sistema CLUE-EMAR sob 2 VL	190
Tabela 27	– Análise geral da avaliação do efeito antioxidante	198
Tabela 28	– Efeitos dos tratamentos com Ev024, Ev034-01 e N-acetilcisteína (NAC) nas alterações histopatológicas gástricas em modelo de úlcera gástrica induzidas por etanol em camundongos	204
Tabela 29	– Parâmetros de CLUE-EMAR e CLUE-QDa-MIS	208
Tabela 30	– Amostras utilizadas neste trabalho e seus rendimentos dos óleos essenciais	218
Tabela 31	– Níveis de variáveis empregados na triagem de uma otimização do método de extração dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i> por MEFS-CG-EM, usando <i>DCCR</i>	223

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
COW	<i>Correlation Optimized Warping</i> (Alinhamento por Correlação Otimizada)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> (Espectroscopia de correlação)
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DIC	Detector de Ionização de Chama
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzeno/Carbowax/Polidimetilsiloxano
EM	Espectrometria de Massas
EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i> (Análise hierárquica de agrupamentos)
HD	Hidrodestilação
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Correlação Heteronuclear de Ligações Múltiplas)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> (Espectroscopia Heteronuclear de Coerência Quântica Simples)
i.p	Intraperitoneal
IVp	Infravermelho próximo
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCC	<i>Matthews Correlation Coefficient</i> (Coeficiente de correlação de Matthews)
MEFS	Microextração em Fase Sólida
MSR	Metodologia de Superfície Resposta
MMQO	Métodos dos Mínimos Quadrados Ordinários

MIS	Monitoramento de Íons Seleccionados
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
NAC	N-acetilcisteína
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia)
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Squares discriminant analysis</i> (Análise discriminante de mínimos quadrados parciais ortogonais)
PA	Poliacrilato
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de componentes principais)
PDA	Detector de Arranjo de diodo
ppb	Parte por bilhão
ppm	Parte por milhão
PLS-DA	<i>Partial Least Square Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais)
PRESS	<i>Predictive Residual Error Sum of Squares</i> (Soma dos Quadrados dos Erros Residuais de Previsão)
QDa	Detector quadrupolo
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Prótio
RMNq	Ressonância Magnética Nuclear – modo quantitativo
s.c	Subcutânea
<i>t</i>	Teste <i>t</i> de Student
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1</i> (Membro transitório 1 da subfamília V do canal de cátions do potencial transitório)
TOF	<i>Time of flight</i> (Tempo de voo)
UV-vis	Ultravioleta - visível
VIP	Variáveis Importantes da Progressão
v.o	via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

λ_{max} Comprimento de onda de máxima absorção

J Constante de acoplamento

δ Deslocamento químico

δ_{C} Deslocamento químico de carbono

δ_{H} Deslocamento químico de hidrogênio

Δ Diferença ou variação

m/z Relação massa/carga

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	36
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo Geral	39
2.2	Objetivos específicos	39
3	CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	40
3.1	Breve histórico sobre a família Asteraceae e o gênero <i>Egletes</i>	40
3.2	Considerações botânicas de <i>Egletes viscosa Less</i>	43
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	44
4.1	Agronomia	44
4.2	Biologia	44
4.3	Química	44
4.4	Farmacologia	47
4.5	Metabolômica	68
4.6	Técnicas analíticas utilizadas em estudos metabolômicos	69
4.6.1	<i>Métodos de validação</i>	69
4.6.2	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho Próximo (IVp)</i>	70
4.6.3	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	71
4.6.4	<i>Espectrometria de massa (EM)</i>	73
4.6.5	<i>Cromatografia gasosa (CG-EM)</i>	73
4.6.6	<i>Microextração em Fase Sólida (MEFS)</i>	74
4.6.7	<i>Análise estatística</i>	75
4.6.8	<i>Métodos não supervisionados de análises de dados</i>	75
4.6.9	<i>Métodos supervisionados de análises de dados</i>	77
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1	Validação do Método Analítico	79
5.1.1	<i>Otimização das condições de separação CLUE-EMAR e CLUE-QDa</i>	79
5.1.2	<i>Seletividade</i>	81
5.1.3	<i>Linearidade</i>	83
5.1.4	<i>Teste de homocedasticidade</i>	84
5.1.5	<i>Efeito matriz</i>	89
5.1.6	<i>Precisão</i>	91

5.1.7	<i>Exatidão</i>	92
5.2	Quantificação dos compostos bioativos de <i>E. viscosa</i>	93
5.3	Espectroscopia no infravermelho próximo (IVp)	94
5.3.1	<i>Discriminação de quimiotipos de <i>E. viscosa</i> nos capítulos florais com base no conjunto de dados IVp</i>	94
5.3.2	<i>Correlação entre o conjunto de dados IVp e o conteúdo de acetato de trans-pinocarveila e acetato de cis-isopinocarveila</i>	100
5.3.3	<i>Identificação de marcadores voláteis para o conjunto de dados CG-EM</i>	102
5.4	Discriminação de quimiotipos de <i>E. viscosa</i> usando o conjunto de dados de espectroscopia de RMN	105
5.4.1	<i>Quantificação dos compostos bioativos em capítulos florais de <i>E. viscosa</i> por RMNq de ¹H</i>	110
5.5	Otimização da técnica de Microextração em Fase Sólida (MEFS-CG-EM) para análise de compostos voláteis de <i>E. viscosa</i>	112
5.5.1	<i>Planejamento experimental para otimização dos parâmetros de MEFS</i>	117
5.5.2	<i>Análise dos compostos voláteis em <i>E. viscosa</i> por MEFS</i>	123
5.6	Determinação do perfil químico dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i> usando dados de CLUE-EMAR	130
5.6.1	<i>Caracterização química de amostras de <i>E. viscosa</i> por CLUE-EMAR</i>	130
5.6.2	<i>Identificação química da infusão dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i> comerciais (Ev024) do quimiotipo A</i>	163
5.6.3	<i>Identificação química da infusão dos capítulos florais cultivados do quimiotipo B de <i>E. viscosa</i> (Ev034-01)</i>	167
5.6.4	<i>Análise do perfil químico da tintura dos capítulos florais do quimiotipo B de <i>E. viscosa</i> (Aiuaba-Ev017-03)</i>	171
5.6.5	<i>Análise do perfil químico da infusão das folhas cultivada (Ev047) do quimiotipo A de <i>E. viscosa</i></i>	176
5.6.6	<i>Análise do perfil químico do chá das folhas cultivadas (Ev048) do quimiotipo B de <i>E. viscosa</i></i>	179
5.6.7	<i>Comparação do perfil químico dos extratos de <i>E. viscosa</i> analisados por CLUE-EMAR</i>	183
5.7	Discriminação dos quimiotipos de <i>E. viscosa</i> usando o conjunto de dados de CLUE-EMAR	188

5.7.1	<i>Variabilidade do conjunto de dados de CLUE-EMAR</i>	188
5.8	Estudos farmacológicos	192
5.8.1	<i>Resultados da avaliação gastroprotetora dos extratos de E. viscosa</i>	192
5.8.2	<i>Efeito de Egletes viscosa sobre o estresse oxidativo gástrico no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos</i>	196
5.8.3	<i>Efeito de Egletes viscosa sobre a toxicidade aguda em camundongos</i>	198
5.8.4	<i>Avaliação do envolvimento das Prostaglandinas, do Óxido Nítrico (ON), dos Canais de Potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) e dos receptores TRPV-1 no efeito gastroprotetor das amostras Ev024 e Ev034-01 de Egletes viscosa</i>	199
5.8.5	<i>Avaliação histológica do tecido gástrico das amostras de E. viscosa em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos</i>	202
6	MATERIAL E MÉTODOS	205
6.1	Planejamento de estudo	205
6.2	Reagentes e padrões	205
6.3	Material Vegetal	206
6.4	Experimento agrônômico de E. viscosa	206
6.5	Preparo das soluções padrão dos analitos e amostras	207
6.6	Condições analíticas de CLUE-EMAR	207
6.7	Análise CLUE-QDa	208
6.8	Validação do método analítico	209
6.8.1	<i>Seletividade</i>	209
6.8.2	<i>Linearidade</i>	209
6.8.3	<i>Curvas de calibração</i>	209
6.8.4	<i>Teste de Homocedasticidade</i>	210
6.8.5	<i>Teste tr para ajuste linear</i>	211
6.8.6	<i>Teste de Significância dos parâmetros de calibração</i>	212
6.8.7	<i>Efeito matriz</i>	212
6.8.8	<i>Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ)</i>	213
6.8.9	<i>Exatidão</i>	213
6.8.10	<i>Precisão</i>	213
6.8.11	<i>Repetitividade</i>	214
6.8.12	<i>Precisão Intermediária</i>	214
6.9	Análise de IV próximo (portátil)	215

6.9.1	<i>Análise quimiométrica para o conjunto de dados IV</i>	215
6.9.2	<i>Análise quimiométrica para o conjunto de dados de CLUE-EMAR</i>	217
6.10	Hidrodestilação de voláteis de <i>E. viscosa</i>	218
6.11	Análise CG-EM	219
6.11.1	<i>Análise quimiométrica do conjunto de dados CG-EM</i>	219
6.11.2	<i>Análise CG-DIC</i>	220
6.12	Análise de RMN	220
6.12.1	<i>Análise quimiométrica do conjunto de dados RMN de ¹H</i>	221
6.12.2	<i>Análise quimiométrica do conjunto de dados CLUE-EMAR</i>	221
6.12.3	<i>Análise RMNq de ¹H</i>	222
6.13	Otimização da Análise por MEFS-CG-EM	222
6.13.1	<i>Microextração em fase sólida - (MEFS)</i>	222
6.13.2	<i>Planejamento Experimental para Microextração em Fase Sólida (MEFS)</i>	222
6.13.3	<i>Projeto Experimental e Análise de Dados</i>	223
6.13.4	<i>Resolução máxima dos picos cromatográficos</i>	224
6.14	Avaliação farmacológica	224
6.14.1	<i>Lesões gástricas induzidas por etanol</i>	224
6.14.2	<i>Avaliação da atividade antioxidante de <i>E. viscosa</i> frente às lesões gástricas induzidas por etanol</i>	225
6.14.3	<i>Avaliação da toxicidade aguda</i>	225
6.14.4	<i>Avaliação do envolvimento das Prostaglandinas, do Óxido Nítrico (ON), dos Canais de Potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) e dos receptores TRPV-1 no efeito gastroprotetor do chá dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i>: quimiotipo A (Ev024) e quimiotipo B (Ev034-01)</i>	226
6.14.5	<i>Avaliação histológica gástrica do efeito do chá dos capítulos florais de <i>E. viscosa</i>: quimiotipo A (Ev024) e quimiotipo B (Ev034-1) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol</i>	227
6.14.6	<i>Análise dos dados (ANOVA)</i>	228
7	CONCLUSÃO	229
	REFERÊNCIAS	231

APENDICE A - TEOR DE TERNATINA, TANABALINA E ÁCIDO CENTIPÉDICO (mg.kg ⁻¹) DOS EXTRATOS DAS PARTES AÉREAS DE MATERIAIS SILVESTRE/COMERCIAIS/CULTIVADOS DE <i>E. viscosa</i> , DETERMINADOS POR ANÁLISE DE CLUE-QDa-MIS	248
APÊNDICE B - AMOSTRAS DE CAPÍTULOS FLORAIS DE <i>E. viscosa</i> CLASSIFICADAS DE ACORDO COM A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE SEUS ÓLEOS ESSENCIAIS	250
APÊNDICE C - OS RESULTADOS DA MATRIZ DE CONFUSÃO DA CLASSIFICAÇÃO BINÁRIA DE <i>E. viscosa</i> DE ACORDO COM OS QUIMIOTIPOS A E B USANDO RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DE 80 ESPECTROS IVp	251
APÊNDICE D - ANÁLISE POR CG-EM DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>E. viscosa</i> DE CAPÍTULOS FLORAIS: QUIMIOTIPOS A	252
APÊNDICE E - ANÁLISE POR CG-EM DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>E. viscosa</i> DE CAPÍTULOS FLORAIS: QUIMIOTIPOS B	253
APÊNDICE F - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS ANALISADOS POR CG-EM DOS CAPÍTULOS FLORAIS DE <i>E. viscosa</i>	255
APÊNDICE G - ESPECTROS DE RMN ¹ H, ¹ H-COSY (600 x 600 MHz, CD ₃ OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE <i>E. viscosa</i> : A: QUIMIOTIPO A (Ev024); B: QUIMIOTIPO B (Ev017)	258
APÊNDICE H - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹ H, ¹ H COSY (600 x 600 MHz, CD ₃ OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE <i>E. viscosa</i> : A: (δ _H 0,5-2,7 x δ _H 0,5 - 2,7); B: (δ _H 0,6-3,2 x δ _H 3,6-7,2)	259
APÊNDICE I - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ¹ H, ¹ H COSY (600 x 600 MHz, CD ₃ OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE <i>E. viscosa</i> : A: (δ _H 3,5-7,5 x δ _H 0,9-2,9); B: (δ _H 3,5-8,0 x δ _H 3,8-7,8)	260
APÊNDICE J - ESPECTROS DE RMN ¹ H, ¹³ C-HSQC (600 x 150 MHz, CD ₃ OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE <i>E. viscosa</i> : QUIMIOTIPO B (a); QUIMIOTIPO A (b)	261

APÊNDICE K - ESPECTROS DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE <i>E. viscosa</i> : QUIMIOTIPO B (Ev017) (a); QUIMIOTIPO A (Ev024) (b)	262
APÊNDICE L - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HSQC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE <i>E. viscosa</i> : A: (δ_{H} 1,5-2,8 x δ_{C} 10-55); B: (δ_{H} 0,5-1,4 x δ_{C} 05-45)	263
APÊNDICE M - ESPECTROS DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE <i>E. viscosa</i> : QUIMIOTIPO B (Ev017) (a); QUIMIOTIPO A (Ev024) (b)	264
APÊNDICE N - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE <i>E. viscosa</i> : A: (δ_{H} 3,2-7,4 x δ_{C} 10-80); B: (δ_{H} 3,6-8,0 x δ_{C} 105-180)	265
APÊNDICE O - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE <i>E. viscosa</i> : A: (δ_{H} 1,4-2,6 x δ_{C} 15-75); B: (δ_{H} 0,5-1,5 x δ_{C} 15-90)	266
APÊNDICE P - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE <i>E. viscosa</i> : A: (δ_{H} 1,2-3,0 x δ_{C} 110-185); B: ESTRUTURA DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO METANÓLICO DOS CAPÍTULOS FLORAIS DE <i>E. viscosa</i>	267
APÊNDICE Q - MATRIZ DE CONFUSÃO RESULTANTE DA CLASSIFICAÇÃO BINÁRIA DO CONJUNTO DE DADOS CG-EM DE ACORDO COM OS QUIMIOTIPOS "A" e "B" de <i>E. viscosa</i>	268
APÊNDICE R - RESULTADOS DA MATRIZ DE CONFUSÃO DA CLASSIFICAÇÃO BINÁRIA DE <i>E. viscosa</i> DE ACORDO COM OS QUIMIOTIPOS A E B, UTILIZANDO OS RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO PELOS ESPECTROS DE RMN ^1H	268

APÊNDICE S - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DOS DIFERENTES QUIMIOTIPOS DE <i>E. viscosa</i> COM BASE NOS SEGUINTE PARÂMETROS DE RMN E COMPARAÇÃO COM REFERÊNCIAS ANTERIORES: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ em ppm), MULTIPLICIDADE, CONSTANTE DE ACOPLAMENTO (J em Hz), CORRELAÇÕES ^1H-^{13}C HSQC e HMBC	269
APÊNDICE T - TEOR DE TERNATINA, TANABALINA E ÁCIDO CENTIPÉDICO ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE <i>E. viscosa</i>, DETERMINADOS POR ANÁLISE DE RMNq ^1H	273
APÊNDICE U - CROMATOGRAMA CLUE DA INFUSÃO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE <i>E. viscosa</i> DE AIUABA SILVESTRE (Ev017): (a) MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVA e (b) MODO POSITIVO	274
APÊNDICE V - ESPECTRO DE RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz) DA TERNATINA	275
APÊNDICE W – ESPECTRO DE RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz) DA TANABALINA	276
APÊNDICE X - ESPECTRO DE RMN ^1H (CD_3OD, 600 MHz) DO ÁCIDO CENTIPÉDICO	277
APÊNDICE Y - COMPARAÇÃO DOS DADOS DE CG-EM PARA OS COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE <i>E. viscosa</i> USANDO 2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO: (1) MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE DESSORÇÃO TÉRMICA DA FIBRA (MEFS) E (2) HIDRODESTILAÇÃO SEGUIDA POR INJEÇÃO DIRETA DO ÓLEO ESSENCIAL (OE).....	278

APÊNDICE Z - COMPARAÇÃO DOS DADOS DE CG-EM PARA OS COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO B DE <i>E. viscosa</i> USANDO 2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO: (1) MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE DESSORÇÃO TÉRMICA DA FIBRA (MEFS) E (2) HIDRODESTILAÇÃO SEGUIDA POR INJEÇÃO DIRETA DO ÓLEO ESSENCIAL (OE).....	279
APÊNDICE AA - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS COMPOSTOS ACETATO DE <i>TRANS</i> -PINOCARVEÍLA E ACETATO DE <i>CIS</i> -ISOPINOCARVEÍLA PARA O QUIMIOTIPO A	280
APÊNDICE BB - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS COMPOSTOS ACETATO DE <i>TRANS</i> -PINOCARVEÍLA E ACETATO DE <i>CIS</i> -ISOPINOCARVEÍLA PARA O QUIMIOTIPO B	280
APÊNDICE CC - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS ANÁLISE DE MEFS DOS CAPÍTULOS FLORAIS DE <i>E. viscosa</i>	281
APÊNDICE DD - CROMATOGRAMAS MEFS DOS CAPÍTULOS FLORAIS ANALISADOS NAS FIBRAS DVB/CAR/PDMS E PA DO QUIMIOTIPO A (Ev024) E QUIMIOTIPO B (Ev017)	283
APÊNDICE EE - DADOS DE RMN 1D DE ¹ H E ¹³ C (600 E 150 MHz, CDCl ₃) PARA A SALVISPLENDINA C, E COMPARAÇÃO COM DADOS DE RMN ¹ H E ¹³ C DA LITERATURA	284
APÊNDICE FF - ESPECTRO DE RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) DE SALVISPLENDINA C	285
APÊNDICE GG - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) DE SALVISPLENDINA C	286
APÊNDICE HH - ESPECTRO DE RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 150MHz) DE SALVISPLENDINA C	287
APÊNDICE II - A: EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN ¹ H, ¹³ C HSQC (600 x 150 MHz, CDCl ₃) DE SALVISPLENDINA C: A: (δ_H 3,7-7,7 x δ_C 60-150); B: (δ_H 0,5-2,7 x δ_C 0-65)	288
APÊNDICE JJ - A: EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN ¹ H, ¹³ C HMBC (600 x 150 MHz, CDCl ₃) DE SALVISPLENDINA C (δ_H 3,3-7,6 x δ_C 15-85), B: (δ_H 3,4-7,6 x δ_C 100-175)	289

APÊNDICE KK - A: EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN ^1H, ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CDCl_3) DE SALVISPLENDINA C (δ_{H} 1,5-2,4 x δ_{C} 10-80), B: (δ_{H} 0,75-1,4 x δ_{C} 15-78)	290
APÊNDICE LL - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN ^1H, ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CDCl_3) DE SALVISPLENDINA C (δ_{H} 1,8-2,4 x δ_{C} 120-178), B: ALGUMAS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO ESPECTRO DE ^1H, ^{13}C HMBC (600 MHz, CD_3OD) DE SALVISPLENDINA C	291
ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS	292
ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO NA FOOD RESEARCH INTERNATIONAL	293

1 INTRODUÇÃO

Egletes viscosa (L.) Less (Asteraceae) é uma erva aromática anual das regiões tropicais da América, que cresce ao longo das margens dos rios, lagos e represas. No Nordeste do Brasil, *E. viscosa* é popularmente conhecida como ‘macela’ ou ‘macela-da-terra’ e seus capítulos florais secos são comercializados a granel e em embalagens comerciais (por exemplo, sachês) em supermercados e ervanários (Figura 1) (MATOS, 2007). A infusão dos capítulos florais de *E. viscosa* tem sido tradicionalmente utilizada para o tratamento de distúrbios gastrointestinais como dor de estômago, diarreia e dispepsia (SILVEIRA; PESSOA, 2006). *E. viscosa* é freqüentemente identificada erroneamente com duas outras espécies de Asteraceae devido à mesma designação popular de ‘macela’, *Achyrocline satureioides* (Lam) DC e *Tanacetum parthenium* L.

Figura 1 - Capítulos florais de *E. viscosa* comercializados em supermercados e ervanários.



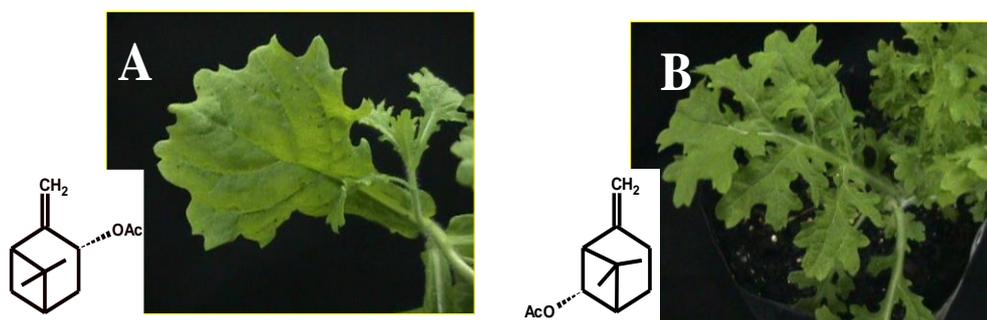
Fonte: Kirley M. Canuto, 2019.

Estudos fitoquímicos anteriores revelaram três compostos: ternatina, tanabalina e ácido centipédico, apontados como bioativos, devido às suas propriedades gastroprotetoras e hepatoprotetoras. Esses efeitos foram previamente corroborados por estudos pré-clínicos usando extratos e seus constituintes puros (GUEDES *et al.*, 2002, 2008; RAO *et al.*, 1994, 1997; MELO *et al.*, 2013; SOUZA, 1998).

Estudos da composição química volátil dos capítulos florais revelaram dois quimiotipos diferentes para *E. viscosa* com base nos principais componentes do óleo essencial: quimiotipo A, caracterizado por acetato de *trans*-pinocarveíla; e quimiotipo B, com o acetato de *cis*-isopinocarveíla como compostos majoritários. Além disso, uma investigação fitoquímica anterior mostrou diferenças entre o número de compostos isolados de chás preparados a partir dos dois quimiotipos. Embora a discriminação morfológica entre as amostras seja relativamente

fácil, é impossível identificar visualmente o quimiotipo dos capítulos florais (CUNHA, 2003) (Figura 2). Desta maneira, o método capaz de discriminar os quimiotipos de *E. viscosa* é extrair e analisar seu óleo essencial por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Este método de extração do óleo essencial é demorado e destrutivo (FREITAS *et al.*, 2018).

Figura 2 - Detalhes das folhas de *E. viscosa*: (A) quimiotipo "A", rico em acetato de *trans*-pinocarveíla; (B) quimiotipo "B" rico em acetato de *cis*-isopinocarveíla.



Fonte: SILVEIRA; PESSOA, 2005.

Tendo em vista a necessidade de se desenvolver métodos rápidos para a discriminação dos quimiotipos de *E. viscosa*, nós desenvolvemos métodos espectroscópicos de infravermelho próximo e de ressonância magnética nuclear aliados a métodos quimiométricos supervisionados (iPLS, PLS-DA e OPLS-DA). Ambas as técnicas se mostraram reprodutíveis e confiáveis para a autenticação e qualidade desses materiais. Além disso, observou-se que os quimiotipos também apresentavam composição não volátil distinta. Adicionalmente, os teores dos compostos bioativos foram quantificados por dois métodos analíticos: RMNq ^1H e cromatografia líquida de ultra-eficiência com espectrometria de massas (CLUE-EM), viabilizando uma quantificação rápida, sensível e precisa.

Apesar da alta eficiência dos referidos métodos, eles não fornecem a composição química do óleo essencial, que também apresenta potencial econômico para a indústria de aromas e fragrâncias devido ao bom rendimento de extração (ca. 1% p / p), odor agradável e constituição química única. Por isso, nós desenvolvemos um método de microextração em fase sólida (MEFS) combinada com CG-EM para se obter o perfil químico volátil de uma maneira mais rápida, não destrutiva e utilizando apenas uma quantidade ínfima de capítulos florais.

Posteriormente, nós avaliamos as atividades gastroprotetora de preparações farmacêuticas (chá e tintura) de capítulos florais e de folhas de *E. viscosa* através de ensaios farmacológico in vivo com camundongos. Todas as amostras mostraram efeito gastroprotetor e

foram isentos de toxicidade, em doses terapêuticas, garantindo eficácia e segurança. Paralelamente, todas as diferentes preparações farmacêuticas foram quimicamente caracterizadas por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à ionização por *electrospray* e espectrometria de massas (CLUE-EMAR), que revelou que estes produtos continham basicamente derivados do ácido cafeico, flavonoides e diterpenos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo metabolômico e avaliar a atividade gastroprotetora dos capítulos florais e das folhas dos dois quimiotipos de *Egletes viscosa*, visando determinar a composição química e discriminar os materiais com maior efeito farmacológico.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método de quantificação de ternatina, tanabalina e ácido centipédico de capítulos florais e folhas de *E. viscosa* por CLUE-qDa e RMNq de ^1H ;
- Desenvolver métodos de autenticação botânica para a discriminação dos quimiotipos de *E. viscosa* por técnicas espectrométricas (IVp, RMN ^1H , MEFS e CLUE-EMAR) combinadas com métodos quimiométricos;
- Determinar a composição química volátil dos capítulos florais por CG-EM e CG-DIC;
- Determinar e comparar a composição química dos extratos dos capítulos florais e das folhas dos diferentes quimiotipos usando CLUE-EM;
- Avaliar a atividade gastroprotetora de infusões dos capítulos e das folhas de *E. viscosa* através de ensaios in vivo em camundongos;
- Correlacionar teores de ternatina, tanabalina e ácido centipédico de capítulos florais com a atividade gastroprotetora.

3 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

3.1 Breve histórico sobre a família Asteraceae e o gênero *Egletes*

As plantas da família Asteraceae (Compositae) têm uma distribuição cosmopolita e uma característica morfológica muito variada. É a terceira maior família do grupo das Angiospermas, possui cerca de 32.000 espécies, pertencentes a 1.900 gêneros (RETTA *et al.*, 2012; ROQUE; TELES; NAKAJIMA, 2017).

A família Asteraceae foi descrita por Teofrasto 300 anos a.C. e posteriormente denominada de Compositae por Giseke, em 1792, porém o Código Internacional de Nomenclatura Botânica autorizou novamente a denominação Asteraceae em 1822 (KATINAS *et al.*, 2007).

Estudos filogenéticos moleculares em Asteraceae têm fornecido importantes resultados na evolução da família. Jansen e Palmer 1987 identificaram uma inversão de cloroplastos de todos os membros de Asteraceae, exceto na subtribo Barnadesiinae (BREMER; JANSEN, 1992). Em função de sua origem monofilética e por ser apontada como o grupo-irmão para o restante das Asteraceae, Bremer e Jansen 1992 elevaram esta subtribo à categoria de subfamília, Barnadesioideae.

Dessa forma, o tradicional sistema de classificação das Asteraceae, consistindo das subfamílias Asteroideae e Cichorioideae foi, então, expandido para incluir a Barnadesioideae. Posteriormente uma classificação subfamiliar foi feita por Kim e Jansen 1995, e teve algumas revisões introduzidas por Bremer (1996), Panero e Funk (2002) e Fu *et al.* (2016), sendo esta última realizada na tentativa de elucidar as relações filogenéticas, bem como para avaliar vários marcadores moleculares, resultando na publicação de novos nomes e o reconhecimento de quatro subfamílias e 35 tribos em Asteraceae (FU *et al.*, 2016).

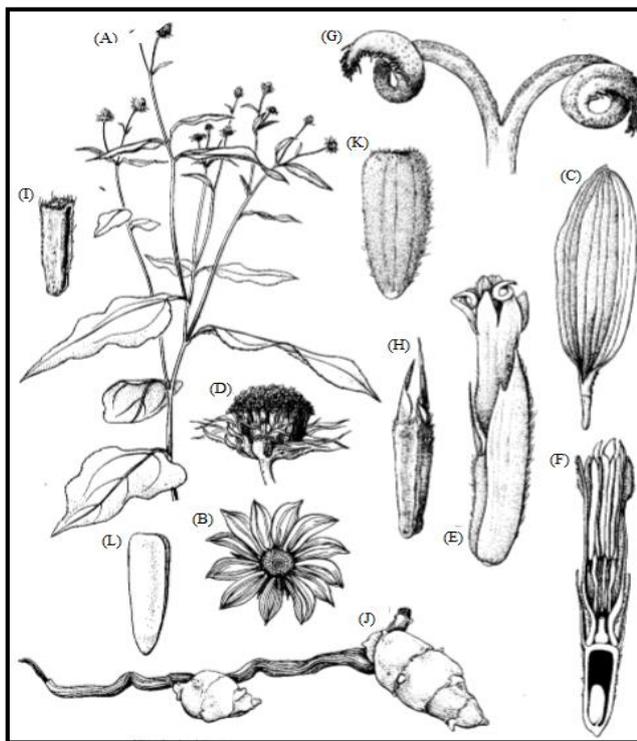
Para os autores, essas mudanças representam a maior revisão para a classificação da família, e embora os resultados se baseiem em uma grande matriz de dados e na combinação de múltiplos marcadores genéticos, sua aceitação tem sido parcimoniosa entre os estudiosos da família.

Estima-se que ocorram cerca de 250 gêneros e 2.000 espécies de Asteraceae no Brasil, distribuídas em todo o território nacional, de acordo com Silva, Barbosa e Barros (2014):

Possui representantes perenes ou anuais, às vezes lactescentes. Folhas alternas, ocasionalmente opostas, raramente verticiladas, simples, sem estípulas, margens inteiras, denteadas, lobadas ou fendidas. Inflorescências em capítulos (característica marcante da família), formadas por pequenas flores, assentadas em um receptáculo comum, plano, côncavo ou convexo, cercado por brácteas distribuídas em séries; flores dispostas em raios (externos), geralmente estéreis e flores do disco (interno)

bissexuadas ou raramente unissexuadas, comumente actinomorfas, diclamídeas ou sem cálice (Figura 3).

Figura 3 - Prancha revelando características da família Asteraceae.



(A-J) *Heliantus tuberosus*: (A) planta florida; (B) capítulo; (C) flor do raio, estéril; (D) capítulo com flores do raio removidas, mostrando o involucre de brácteas (filárias); (E) flor do disco e bráctea; (F) flor dos disco em secção longitudinal, observe as anteras, escamas do pappus e óvulo basal; (G) ramos do estilete com suas linhas estigmáticas; (H) aquênio maduro com escamas do pappus; (I) aquênio sem pappus; (J) rizoma com túberas invernais; (K-L) *H. annuus*: (K) aquênio; (L) embrião.

Fonte: JUDD *et al.*, 2009.

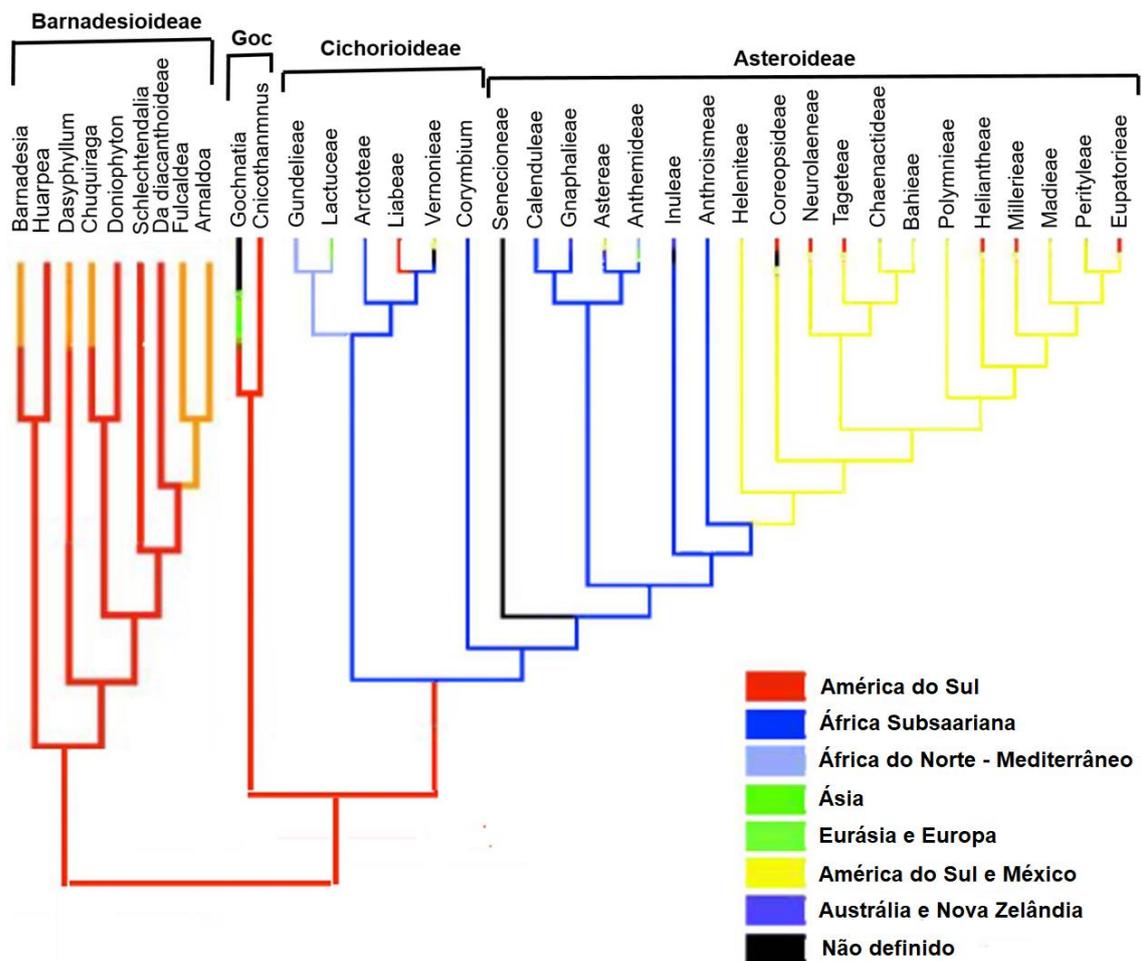
Há quatro subfamílias reconhecidas atualmente, as quais ocorrem todas na América do Sul: Asteroideae, Cichorioideae, Barnadesioideae e Gochnatioideae. A subfamília Barnadesioideae é a mais restrita e limitada à América Tropical, e apresenta-se sob a forma de arbustos ou ervas. Essa subfamília pode ser encontrada mais comumente em regiões mais abertas, como em campos, mas também pode se desenvolver e se adaptar bem em ambientes de floresta. A subfamília Asteroideae é a maior das quatro subfamílias dentro de Asteraceae contendo cerca de metade dos gêneros e espécies dessa planta (Figura 4, p. 42).

Dentro de Asteroideae, as tribos que compreendem os maiores gêneros e espécie são Gnaphalieae, Astereae, Heliantheae e Eupatorieae. A tribo Astereae, formalmente estabelecida por Cassini em 1819, foi dividida em quatro subtribos. Posteriormente, uma nova classificação feita por Bentham em 1873, teve algumas revisões por Hoffmann em 1890 e Nesom em 1994, sendo essa última classificação adotada hoje para tribos, o qual divide as Astereae em 14 subtribos (Asterinae, Baccharidinae, Bellidinae, Brachycominae,

Chrysopsidinae, Conyzinae, Feliciinae, Grangeinae, Hinterhuberinae, Lageniferinae, Machaerantherinae, Podocominae, Solidagininae e Symphyotrichinae) (JUDD *et al.*, 2009).

As espécies da tribo Astereae possuem ampla distribuição mundial, porém estão marcadamente concentradas na África do Sul, América do Sul ao longo dos Andes, Austrália, Nova Zelândia e sudoeste da América do Norte (JUDD *et al.*, 2009; ROQUE, 2008).

Figura 4 - Distribuição geográfica das subfamílias de Asteraceae.



Fonte: Adaptado de FUNK *et al.*, 2005.

O gênero mais representativo no Brasil é *Baccharis* com 1441 espécies, seguido de *Conyza* com 915. *Egletes* pertence à subtribo Grangeinae e compreende 10 espécies, ambas de ampla distribuição geográfica, sendo a maioria das espécies concentradas na América do Sul (HEIDEN; PIRANI, 2016; MINTEGUIAGA *et al.*, 2019).

Conforme JUDD *et al* 2009, o gênero *Egletes* possui:

Capítulos radiados, flores radiais femininas férteis e as do disco hermafroditas férteis;

invólucro campanulado; brácteas lanceoladas agudas, subseriadas ao receptáculo. Corola com flores marginais lanceoladas ou filiformes, disco regularmente tubuloso, limbo campanulado, dentes 4-5, antena base inteira obtusa, ramo do estilete brevemente achatado, apêndices breves. Aquênio subquadrangular e ápice cupulado. Sem pappus. Erva anual decubente ou suberecta, folhas alternas secéis, obovais dentadas ou binatifidas, capítulos pequenos pensuculatus.

3.2 Considerações botânicas de *Egletes viscosa* Less

Egletes viscosa Less., ocorre abundantemente no Nordeste do Brasil, inclusive no Estado do Ceará, onde é facilmente encontrada no sertão. Segundo Cunha (2003) a espécie *E. viscosa* é descrita como:

Egletes viscosa Less. É herbácea, anual, caule cespitoso toda pilosa glandulosa, folha profunda pinatifida de 2-5 cm de comprimento, subpeciolada, dilatada, capítulos solitários, laterais curtos pensuculatos ou ápice dos ramos quase carimbosos, invólucro largo campanulado, bráctens pilosos, lanceoladas e agudas, corola alvaligulada, lanceolada aguda, aquênio quadrangular de ápice denteado. Habita toda a América Tropical – é planta amarga estomáquica e antidiarreica.

O táxon *Egletes* é formado por 10 espécies: *E. dominingensis*, *E. floribunda*, *E. florida*, *E. humifusa*, *E. liebmannii*, *E. obovata*, *E. prostrata*, *E. repens*, *E. tenuifolia*, *E. viscosa*, das quais apenas *E. viscosa* e *E. prostrata* apresentam relatos de estudos científicos, a última com um único artigo relacionando à parte botânica (ALARCÓN; CUENCA, 2005). A pesquisa foi realizada colocando o nome de cada espécie no *Scifinder*. Portanto, a espécie *E. viscosa* é a mais estudada no gênero *Egletes*.

O primeiro relato etnofarmacológico de *E. viscosa* foi feito pelo botânico escocês George Gardner (1812-1849). *E. viscosa* é considerada uma das espécies de uso mais difundido na medicina popular nordestina. O registro de aplicação medicinal de macela-da-terra é conhecido pelo menos desde 1846, quando relatou seu uso contra dispepsia no manuscrito “*Catalogue of Brazilian Plants*”, durante uma expedição ao sertão nordestino (Icó e Crato-CE) (FAGG *et al.*, 2015).

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os trabalhos encontrados na literatura para *E. viscosa* são pertencentes a quatro grandes áreas: Agronomia, Biologia, Química e Farmacologia.

4.1 Agronomia

Os trabalhos agronômicos abordam, em sua maioria, meios de multiplicação de *E. viscosa* por semeadura. De acordo com Bezerra *et al.* (2008) a produção de biomassa e de capítulos florais cresce linearmente com o avanço das épocas de colheita e que caule, folhas e capítulos exibem maiores rendimentos de extratos etanólico e clorofórmico do que as raízes. O maior rendimento de óleo essencial das inflorescências e o maior índice de colheita foram registrados 125 dias após o transplântio.

4.2 Biologia

Estudos citogenéticos e de variabilidade genética, baseados no sequenciamento do DNA ribossomal das folhas, determinaram duas sequências distintas para cada tipo químico, sugerindo que os quimiotipos de macela possam ser na verdade duas variedades ou espécies distintas (BATISTA *et al.*, 2012).

4.3 Química

A prospecção fitoquímica de *E. viscosa* conduziu ao isolamento de cerca de vinte e três compostos de diferentes classes químicas tais como cumarina, flavonoides e diterpenos (VIANA *et al.*, 2013). Os primeiros relatos da composição química dos capítulos florais de *E. viscosa* foram realizados por Lima *et al.* (1996) a partir do extrato hexânico isolaram o ácido centipédico e um novo diterpeno clerodânico, tanabalina. Do extrato etanólico, foi isolada o flavonoide ternatina. Embora a tanabalina tenha sido relatada apenas em *E. viscosa*, os compostos ternatina e ácido centipédico são encontrados em outras plantas: ternatina em *Ecoysanthera rosea* Miq. - Apocynaceae (ZHU *et al.*, 2011) e *Murraya paniculata* (Linn.) Jack - Rutaceae (FERRACIN *et al.*, 1998), ácido centipédico em *Achillea biebersteinii* Afan. - Asteraceae (MAHMOUD; AL-SHIHRY, 2006) e *Laennecia schiedeana* (Less.) G. L. Nesom - Asteraceae (ARCINIEGAS *et al.*, 2011). Além disso, ambos ocorrem em *Zanthoxylum syncarpum* Tull. - Rutaceae (FACUNDO *et al.*, 1997).

Dando continuidade à investigação fitoquímica desta espécie, foram identificados e isolados do extrato clorofórmico dos capítulos florais cinco metabólitos, todos caracterizados como diterpenos. Três são diterpenos, 12-*epi*-bacchotricuneatina (**8**), barbatol (**13**) e tarapacol (**14**). Outros dois são diterpenos furânicos com esqueleto 10,15-ciclofitano denominados de 9,10-seco-4,9(10),13(14)-labdatrien-15-20-olid-18-ol (**15**), e o 15,20-epóxi-9,10-seco-4,9(10),13(20),14-labdatetraen-18-ol (**16**). Nesse estudo também foram isolados ternatina (**1**), tanabalina (**2**) e ácido centipédico (**3**). Além de diterpenos labdânicos, foram encontrados em *E. viscosa* diterpenos do tipo clerodano, tais como tanabalina e 12-*epi*-bacchotricuneatina. Os compostos diterpênicos clerodânicos (**4-7**) foram também encontrados em *E. viscosa* (SILVEIRA; PESSOA, 2006).

Mais tarde, um estudo realizado com o extrato aquoso de capítulos florais colhidos de espécimens cultivados apontou que *E. viscosa* também poderia ser diferenciada pela composição química não volátil. Vieira *et al.* (2006) constataram que alguns constituintes estavam presentes apenas em um dos quimiotipos ou quantitativamente diferentes nos extratos aquosos preparados com capítulos florais dos dois quimiotipos cultivados. Esse estudo resultou no isolamento e identificação de um novo diterpeno do tipo clerodano: 12-acetoxi-7-hidroxi-3,13(14)-clerodandieno-18,19:15,16-diolídeo (**18**), como também compostos já encontrados em *E. viscosa*.

Das partes aéreas cultivadas foram isolados ternatina (**1**), barbatol (**13**), tarapacol (**14**), 13-*epi*-esclareol (**17**), espinasterol (**19**), triacontano (**20**) e 8 α -hidroxilabd-14(15)-eno-13(S)-O- β -D-ribopiranosídeo (**21**) (SILVA-FILHO *et al.*, 2007). Em estudo feito com uma planta inteira coletada no Peru, foram identificados diterpenos labdânicos glicosilados (LEE *et al.*, 2005). Na Figura 5, p. 46, são mostradas as estruturas químicas de todos os compostos isolados de *E. viscosa*.

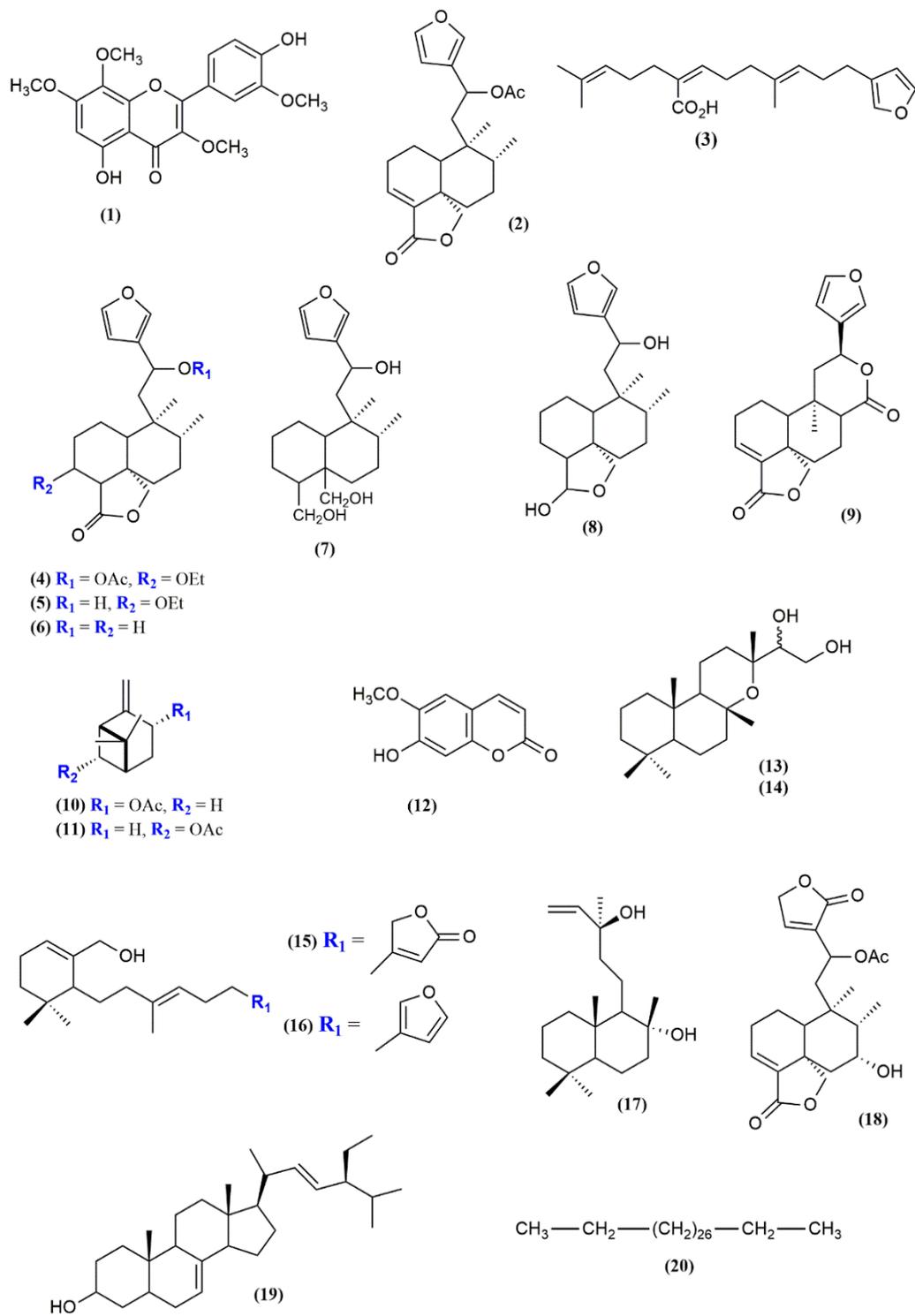
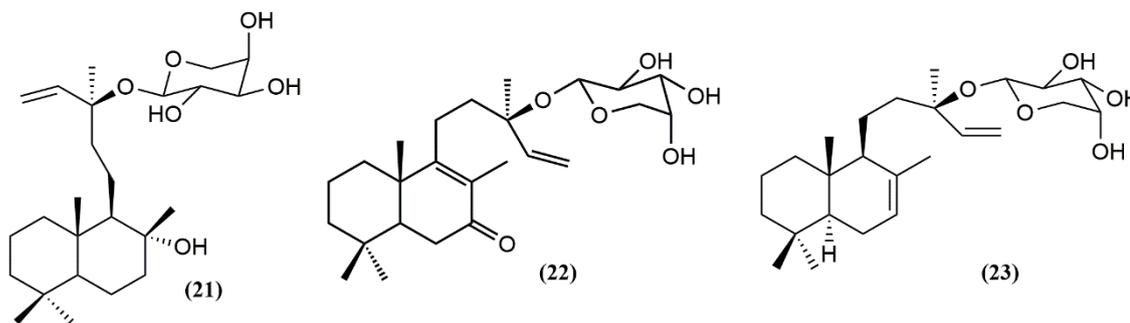
Figura 5 - Estruturas químicas dos compostos isolados de *E. viscosa* (continua).

Figura 5 - Estruturas dos compostos isolados de *E. viscosa* (conclusão).



Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Farmacologia

Em geral, a pesquisa mostrou que a família Asteraceae possui uma ampla diversidade de atividades farmacológicas. Espécies pertencentes a esta família são bastante utilizadas na medicina popular, como condimento em culinárias regionais e agente de controle de pestes. As indicações tradicionais na medicina popular incluem problemas digestivos, hepáticos, renais, inflamatórios e infecção bacteriana, entre outros. Várias espécies possuem em sua constituição química muitos compostos fenólicos, sesquiterpênicos, diterpenos e uma grande abundância de flavonoides (SHAFIQ, *et al.*, 2020; BESSADA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2015; ACHIKA *et al.*, 2014).

A grande maioria dos trabalhos publicados de *E. viscosa* relatam estudos farmacológicos ratificando as propriedades terapêuticas da planta através de ensaios pré-clínicos realizados com extratos e óleos essenciais dos capítulos florais, bem como de alguns de seus constituintes químicos: o flavonoide ternatina e os diterpenos tanabalina e ácido centipédico, que são apontados como os princípios ativos.

Estudos farmacológicos dos extratos hexânico e metanólico dos capítulos florais de *E. viscosa* indicam atividades antibacteriana e potencializadora de antibióticos quando combinadas com aminoglicosídeos. Portanto, podem ser utilizados como uma alternativa para o combate à resistência bacteriana (AQUINO *et al.*, 2015). A respeito do extrato aquoso obtido da maceração dos capítulos florais apresentou propriedades antinociceptivas utilizados no tratamento de distúrbios inflamatórios da dor. Nos testes de toxicidade aguda e subcrônica, não foi observada mortalidade em roedores (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais dos capítulos florais apresentam atividade antinociceptiva, anticonvulsivante e antibacteriana (SOUZA *et al.*, 1998). Nesse trabalho os autores

demonstraram eficácia antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* e atividade anticonvulsivante e antibacteriana em camundongos.

Na literatura encontram-se vários trabalhos com estes três constituintes químicos isolados considerados como os princípios ativos de *E. viscosa*. Por exemplo, a ternatina foi sujeito de vários ensaios farmacológicos, tendo sua atividade hepatoprotetora comprovada em dois tipos diferentes testes: hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno e induzida por tetracloreto de carbono (MELO *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 1999; 1998; RAO, *et al.*, 1994). Além disso, a ternatina mostrou ser eficaz na inibição da peroxidação lipídica induzida pela aflatoxina B1 (SOUZA *et al.*, 1999).

De acordo com Melo *et al.* (2013) a administração de ternatina induziu um efeito inibitório sobre o estresse oxidativo após hepatectomia parcial a 70%, mas sem alterar a evolução da regeneração hepática. Nesse estudo concluiu-se que a ternatina promoveu uma diminuição significativa dos níveis de glicose no sangue 168 h após hepatectomia parcial em comparação com os controles (MELO *et al.*, 2013; 2006). Demonstrou ainda inibição a quimiotaxia de leucócitos e a formação de radicais livres de oxigênio (SOUZA *et al.*, 1992; RAO *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 1994; RAO *et al.*, 1997). Guimarães *et al.* (2011) mostraram evidências das propriedades antioxidantes e antiperoxidativas na torsão/destorsão testicular em ratos. Além disso, mostrou atividade antianafilática, antiinflamatória na supressão da produção de mediadores inflamatórios e a inibição das enzimas ciclo-oxigenase e síntese de óxido nítrico (VIEIRA, 2004; RAO, 2003; SOUZA *et al.*, 1992).

O efeito gastroprotetor da ternatina foi avaliado em ratos contra os danos da mucosa gástrica induzida por estresse de restrição hipotérmica, etanol absoluto e indometacina, enquanto a atividade antidiarreica foi investigada pelo estudo de sua influência no trânsito gastrointestinal, medido por um marcador de carvão e por óleo de mamona. Tomados em conjunto, os resultados apontam um possível efeito da ternatina, uma vez que a sua utilização potencializou a inibição e o controle das atividades (RAO, *et al.*, 1997).

Os compostos diterpenos tanabalina e ácido centipédico isolados foram avaliados na ação antiinflamatória em modelos agudos e crônicos de dermatite na orelha de camundongo. Os resultados mostraram uma inibição significativa relacionada ao edema inflamatório da orelha e fluxo de células polimorfonucleares (CALOU *et al.*, 2008). Além disso, esses compostos foram analisados quanto atividade antinoceptiva e gastroprotetora em ratos por nocicepção e úlcera gástrica. Os autores concluíram que houve redução na gravidade das lesões gástricas absolutas induzidas por etanol (GUEDES *et al.*, 2002; 2008).

Ao passo que se avançavam as pesquisas farmacológicas, desde o início dos anos

90, surgiu a necessidade de se conhecer melhor os diferentes níveis de ação gastroprotetora dos constituintes não-voláteis, sendo apontados na literatura três constituintes químicos responsáveis (ternatina, tanabalina e ácido centipédico) pelas propriedades biológicas descritas (RAO *et al* 1994; SOUZA *et al* 1998).

Neste trabalho foi realizado um levantamento bibliográfico das espécies pertencentes à família Asteraceae, utilizando o site de buscas *Scifinder* e sites científicos como: <http://www.sciencedirect.com.br> e <http://www.google.com.br>.

A pesquisa foi realizada colocando as palavras “Asteraceae”, “Compositae” e “gastroprotective” no *Scifinder*, obtendo-se 25 artigos, os quais relatavam os estudos fitoquímicos e/ou farmacológico de 13 gêneros de Asteraceae. *Achillea*, *Achyroclines*, *Artemisia*, *Baccharis*, *Acmella*, *Arctium*, *Camellia*, *Chamomilla*, *Cynaras*, *Parastrephia*, *Praxelis*, *Solidago* e *Vernonia*. Dos 25 artigos, 6 são reviews, utilizados como importante fonte de referência, que proporcionaram uma avaliação geral dos constituintes químicos de espécies responsáveis pela atividade gastroprotetora.

A Tabela 1, p. 51, mostra uma compilação das referências que contêm várias espécies de Asteraceae com atividade gastroprotetora em diferentes modelos avaliados de gastroproteção (*in vivo*). As espécies mais citadas na literatura referentes a atividade gastroprotetora foram *Achillea millefolium*, *Artemisia campestris* L, *Baccharis trimera*, *Baccharis illinita*, *Solidago chilensis* e *Vernonia anthelmintica*. Entre essas espécies destacam-se flavonoides e ácidos fenólicos. Na espécie *Solidago chilensis* foram encontrados diterpenos clerodânicos com relatos de atividade gastroprotetora.

Em relação às formas de uso e preparação dos extratos foi verificado o predomínio das partes aéreas das plantas e a utilização de extratos aquosos na forma de chá. Em geral, as doses utilizadas variaram de 3-2000 mg kg⁻¹ com inibições de até 95%. Dentre os compostos identificados, dezoito são da classe dos flavonoides, sendo oito do tipo flavonois hidroxilados (quercetina, kaempferol, kaempferol-ramnosídeo, rutina, hiperósido, mircetina, eupatilina, hesperidina), quatro do tipo flavonois metoxilados (3',4',5'-*O*-trimetiltricetina, santina, éter quercetagetina-3,6-dimetílico e ternatina), seis flavonas (luteolina, apigenina, crisina, naringenina, nobiletina e tangeretina), oitos ácidos, sendo cinco derivados do ácido cafeico (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico), ácido gálico, ácido *p*-cumárico, duas tremetonas, três lactonas sesquiterpênicas (micratina, sintenina e 4 β ,10 α -dihidroxi-5 β ,7 β ,8 β H-guaia-1,11(13)dien-12,8 α -olida), treze diterpenos clerodânicos (solidagenona, 3 α -hidroxisolidagenona, 3 β -hidroxisolidagenona, solidagolactona, solidagen-6 α -ol, solidagen-6 β -ol, 6 α -

acetoxisolidagenona, bacchalineol, ácido 18-O-malônico, éster metílico de 18-*O*-malonato, éster etílico de 18-*O*-malonato, tanabalina e ácido centipédico) e uma cumarina (2H-1-benzopirano-2-ona), totalizando quarenta e quatro constituintes apontados como responsáveis pela ação gastroprotetora de espécies de Asteraceae.

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

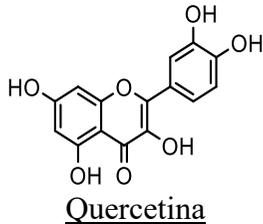
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
Flavonoides					
 <p>Quercetina</p>	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas-EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100 - 300	90%-aéreas- H ₂ O	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2006
	<i>Acmella oleracea</i>	Induzido por ácido acético em ratos	100	88% aéreas-EtOH	MOTILVA; LASTRA; CALERO, 1992
	<i>Arctium lappa</i>	Lesões gástricas induzidas por etanol	50 - 400	75%-folhas-EtOH	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2012
	<i>Artemisia rupestris</i>	Úlceras induzidas por estresse em ratos	200	80% aéreas- H ₂ O	KAHRAMAN; SERTESER, 2003
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas - H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019
	<i>Achyroclines saturoides</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100 - 500	86%-aéreas- H ₂ O	SANTIN <i>et al.</i> , 2010
	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Úlceras induzidas por etanol em ratos	50 - 500	95%-aéreas-EtOH	LEMOS <i>et al.</i> , 2007
	<i>Baccharis illinita</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	3 - 100	50%-aéreas-CHCl ₃	FREITAS <i>et al.</i> , 2008
	<i>Baccharis trimera</i>	Úlceras induzidas por etanol / intragástricas	100	77%-aéreas-EtOH	RAO <i>et al.</i> , 2003
<i>Camellia sinensis</i>	Úlceras induzidas por ácido etanol	25 - 50	74% aéreas-EtOH	IZZO <i>et al.</i> , 1994	

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

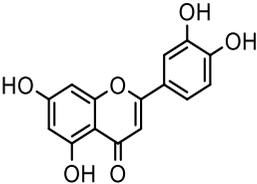
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta- Extratos	Referências
 <p><u>Quercetina</u></p>	<i>Camellia sinensis</i>	Úlceras induzidas por ligação do piloro	100	50%-aéreas-MeOH	MARTIN, MOTILVA E LASTRA <i>et al.</i> , 1993
	<i>Chamomilla recutita</i>	Úlceras induzidas por etanol em ratos	250 - 800	56%-Aéreas-H ₂ O	AL-HASHEM <i>et al.</i> , 2010
	<i>Cynaras colymus</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	50	83%-aéreas-MeOH	KOTOB <i>et al.</i> , 2018
	<i>Praxelis clematidea</i>	Úlceras induzidas por etanol em ratos	125 - 500	88%-aéreas-CHCl ₃	FALCÃO <i>et al.</i> , 2013
	<i>Solidago chilensis</i>	Úlceras induzidas por ácido etanol em ratos	100 - 300	50%-aéreas-MeOH	BARROS <i>et al.</i> , 2016
	<i>Solidago chilensis</i>	Úlceras induzidas por etanol em ratos	125 - 2000	92%-aéreas-H ₂ O	BUCCIARELLI <i>et al.</i> , 2010
	<i>Vernonia anthelmintica</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	88%-sementes-DCM	DOGRA, KUMAR E KUMAR <i>et al.</i> , 2020
 <p><u>Luteolina</u></p>	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas-H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019
	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas-EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100 - 300	90%-aéreas-H ₂ O	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2006
	<i>Achyroclines satureoides</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100 - 500	86%-aéreas-H ₂ O	SANTIN <i>et al.</i> , 2010

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <p><u>Luteolina</u></p>	<i>Baccharis illinita</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	300-1000	80%-raízes- H ₂ O	BAGGIO <i>et al.</i> , 2003
	<i>Baccharis illinita</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	3 - 100	50%-aéreas-CHCl ₃	FREITAS <i>et al.</i> , 2008
	<i>Baccharis trimera</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100 - 500	86%-aéreas-H ₂ O	DIAS <i>et al.</i> , 2009
	<i>Camellia sinensis</i>	Gástrico induzido por ligação do piloro	100	50%-aéreas-MeOH	MARTIN, MOTILVA E LASTRA <i>et al.</i> , 1993
	<i>Chamomilla recutita</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	250 - 800	56%-Aéreas-H ₂ O	AL-HASHEM <i>et al.</i> , 2010
	<i>Praxelis clematidea</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	125 - 500	88%-aéreas- CHCl ₃	FALCÃO <i>et al.</i> , 2013
	<i>Solidago chilensis</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100 - 300	50%-aéreas-MeOH	BARROS <i>et al.</i> , 2016
	<i>Vernonia condensata</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	30-300	80%-folhas-EtOH	BOEING <i>et al.</i> , 2016
<i>Vernonia anthelmintica</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	88%-sementes-DCM	DOGRA, KUMAR E KUMAR <i>et al.</i> , 2020	

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

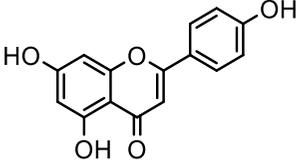
Compostos	Espécies	Ensaio experimentais	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <u>Apigenina</u>	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas-H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por aspirina e estresse oxidativo em ratos	100 - 400	85%-aéreas-H ₂ O	SEBAI <i>et al.</i> , 2014
	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas-EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100 - 300	90%-aéreas- H ₂ O	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2006
	<i>Baccharis illinita</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	3 - 100	50%-aéreas-CHCl ₃	FREITAS <i>et al.</i> , 2008
	<i>Chamomilla recutita</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	250 - 800	56%-Aéreas-H ₂ O	AL-HASHEM <i>et al.</i> , 2010
	<i>Praxelis clematidea</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	125 - 500	88%-aéreas-CHCl ₃	FALCÃO <i>et al.</i> , 2013
 <u>Kaempferol</u>	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas – H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019
	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas- EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Baccharis illinita</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	3 - 100	50%-aéreas-CHCl ₃	FREITAS <i>et al.</i> , 2008
	<i>Solidago chilensis</i>	Gástrico induzido por ácido etanol em ratos	100 - 300	50%-aéreas-MeOH	BARROS <i>et al.</i> , 2016
	<i>Vernonia anthelmintica</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	88%-sementes-DCM	DOGRA, KUMAR E KUMAR <i>et al.</i> , 2020

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

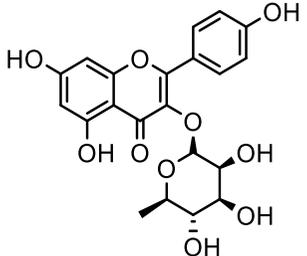
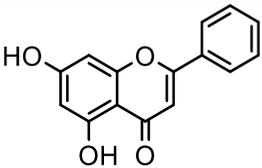
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <u>Kaempferol</u> <u>ramnosídeo</u>	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas- EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Achyroclines saturooides</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100 - 500	86%-aéreas- H ₂ O	SANTIN <i>et al.</i> , 2010
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas – H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019
	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	50 - 500	95%-aéreas-EtOH	LEMOS <i>et al.</i> , 2007
	<i>Vernonia anthelmintica</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	88%-sementes-DCM	DOGRA, KUMAR E KUMAR <i>et al.</i> , 2020
 <u>Crisina</u>	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas-EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por aspirina e estresse oxidativo em ratos	100 - 400	85%-aéreas-H ₂ O	SEBAI <i>et al.</i> , 2014

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

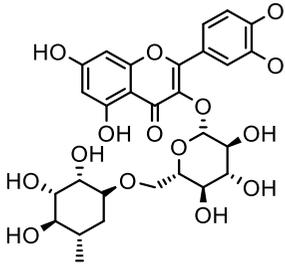
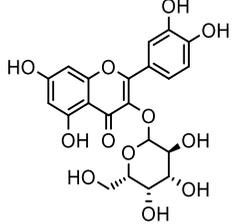
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <p><u>Rutina</u></p>	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas-EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Achyroclines saturooides</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100 - 500	86%-aéreas- H ₂ O	SANTIN <i>et al.</i> , 2010
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas-H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019
	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	50 - 500	95%-aéreas-EtOH	LEMOS <i>et al.</i> , 2007
	<i>Baccharis illinita</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	3 - 100	50%-aéreas-CHCl ₃	FREITAS <i>et al.</i> , 2008
	<i>Camellia sinensis</i>	Gástrico induzido por ácido etanol	25 - 50	74% aéreas-EtOH	IZZO <i>et al.</i> , 1994
	<i>Vernonia anthelmintica</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	88%-sementes-DCM	DOGRA, KUMAR E KUMAR <i>et al.</i> , 2020
 <p><u>Hiperósido</u></p>	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas-H ₂ O	DIB E ALAOUI-FARISB <i>et al.</i> , 2019
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por aspirina e estresse oxidativo em ratos	100 - 400	85%-aéreas-H ₂ O	SEBAI <i>et al.</i> , 2014

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

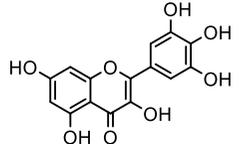
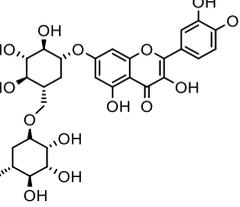
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <p><u>Mircetina</u></p>	<i>Achillea millefolium</i> <i>Artemisia campestris</i> <i>Vernonia anthelmintica</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos Gástrico induzido por aspirina e estresse oxidativo em ratos Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300 100 - 400 100	81%-aéreas-EtOH 85%-aéreas-H ₂ O 88%-sementes-DCM	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010 SEBAI <i>et al.</i> , 2014 DOGRA, KUMAR E KUMAR <i>et al.</i> , 2020
 <p><u>Eupatilina</u></p>	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas-H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019
 <p><u>Hesperidina</u></p>	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas - H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

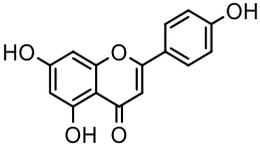
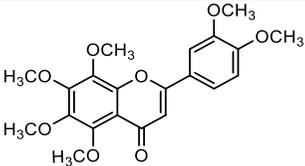
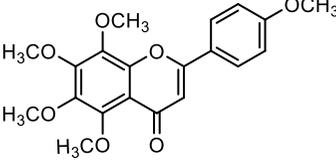
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <p><u>Naringenina</u></p>	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas- EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por aspirina e estresse oxidativo em ratos	100	85%-aéreas-H ₂ O	SEBAI <i>et al.</i> , 2014
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas-H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019
	<i>Baccharis illinita</i>	Inibição da secreção gástrica	3 - 100	80%-aéreas-CHCl ₃	FREITAS <i>et al.</i> , 2008
 <p><u>Nobiletina</u></p>	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas-EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Baccharis illinita</i>	Inibição da secreção gástrica	3 - 100	80%-aéreas-CHCl ₃	FREITAS <i>et al.</i> , 2008
 <p><u>Tangeretina</u></p>	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas-EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Baccharis illinita</i>	Inibição da secreção gástrica	3 - 100	80%-aéreas-CHCl ₃	FREITAS <i>et al.</i> , 2008

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

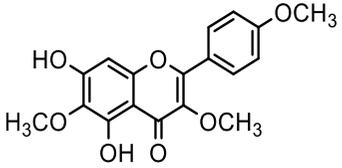
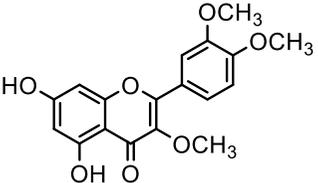
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <p><u>3',4',5'-O-trimetiltricetina</u></p>	<i>Achillea biebersteinii</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	45%-aéreas-AcOEt	ABD-ALLA <i>et al.</i> , 2016
 <p><u>Santina</u></p>	<i>Baccharis illinita</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos Inibição da secreção gástrica	100 3 - 100	45%-aéreas-AcOEt 80%-aéreas-CHCl ₃	ABD-ALLA <i>et al.</i> , 2016 FREITAS <i>et al.</i> , 2008

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

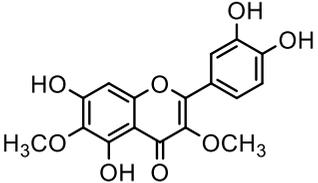
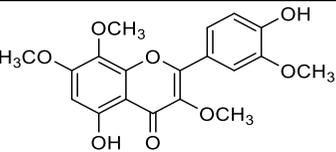
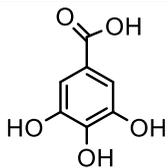
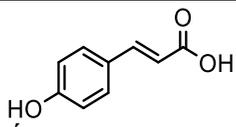
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <p><u>Éter quercetagina-3,6-dimetílico</u></p>	<i>Achillea biebersteinii</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	45%-aéreas-AcOEt	ABD-ALLA <i>et al.</i> , 2016
	<i>Baccharis illinita</i>	Inibição da secreção gástrica	3 - 100	80%-aéreas-CHCl ₃	FREITAS <i>et al.</i> , 2008
 <p><u>Ternatina</u></p>	<i>Egletes viscosa</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 50	60%-capítulos florais	RAO <i>et al.</i> , 1997
Ácidos fenólicos					
 <p><u>Ácido gálico</u></p>	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por aspirina e estresse oxidativo em ratos	100 - 400	85%-aéreas-H ₂ O	SEBAI <i>et al.</i> , 2014
 <p><u>Ácido p-cumárico</u></p>	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por aspirina e estresse oxidativo em ratos	100 - 400	85%-aéreas-H ₂ O	SEBAI <i>et al.</i> , 2014

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

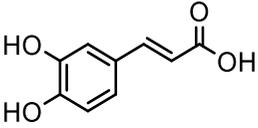
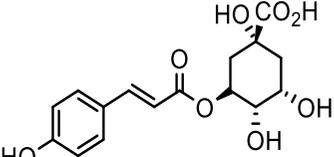
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <p>Ácido cafeico</p>	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas-EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas-H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por aspirina e estresse oxidativo em ratos	100 - 400	85%-aéreas-H ₂ O	SEBAI <i>et al.</i> , 2014
	<i>Solidago chilensis</i>	Gástrico induzido por HCl / EtOH em ratos	100 - 300	50%-aéreas-MeOH	BARROS <i>et al.</i> , 2016
	<i>Vernonia anthelmintica</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	88%-sementes-DCM	DOGRA, KUMAR E KUMAR <i>et al.</i> , 2020
 <p>Ácido clorogênico</p>	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas-EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas-H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por aspirina e estresse oxidativo em ratos	100 - 400	85%-aéreas-H ₂ O	SEBAI <i>et al.</i> , 2014
	<i>Solidago chilensis</i>	Gástrico induzido por HCl / EtOH em ratos	100 - 300	50%-aéreas-MeOH	BARROS <i>et al.</i> , 2016
	<i>Vernonia anthelmintica</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	88%-sementes-DCM	DOGRA, KUMAR E KUMAR <i>et al.</i> , 2020

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

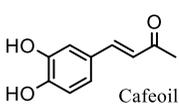
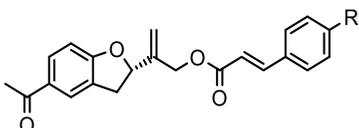
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extrato	Referências
 <p>Cafeoil</p> <p>R₁=R₂ = H; R₃=R₄ = Cafeoil R₂=R₄ = H; R₁=R₃ = Cafeoil R₁=R₄ = H; R₂=R₃ = Cafeoil</p> <p><u>Ác. 3,4-di-cafeoilquínico</u> <u>Ác. 3,5-di-cafeoilquínico</u> <u>Ác. 4,5-di-cafeoilquínico</u></p>	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 300	81%-aéreas-EtOH	BITTENCOURT <i>et al.</i> , 2010
	<i>Achillea millefolium</i>	Gástrico induzido por etanol	100 - 300	90%-aéreas-H ₂ O	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2006
	<i>Achyroclines saturoides</i>	Gástrico induzido por etanol	100 - 500	86%-aéreas-H ₂ O	SANTIN <i>et al.</i> , 2010
	<i>Artemisia campestris</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	90%-aéreas-H ₂ O	DIB; EZZAHRA; ALAOUI-FARIS <i>et al.</i> , 2019
	<i>Baccharis illinita</i>	Inibição da secreção gástrica	3 - 100	80%-aéreas-CHCl ₃	FREITAS <i>et al.</i> , 2008
	<i>Vernonia anthelmintica</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	88%-sementes-DCM	DOGRA, KUMAR E KUMAR <i>et al.</i> , 2020
 <p>R= H R= OH</p> <p><u>Tremetonas</u></p>	<i>Parastrephia quadrangulares</i>	Gástrico induzido por HCl / EtOH em ratos	20	76%-aéreas-EtOH	ARDILES <i>et al.</i> , 2018

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

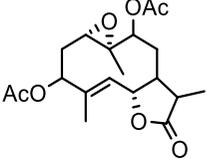
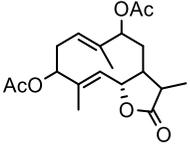
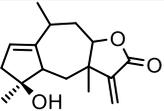
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extrato	Referências
Lactonas sesquiterpênicas					
 <u>Micrantina</u>	<i>Achillea biebersteinii</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	100	45%-aéreas-AcOEt	ABD-ALLA <i>et al.</i> , 2016
 <u>Sintenina</u>					
 <u>4β,10α-dihidroxi-5β,7β,8βH-guaia-1,11(13)dien-12,8α-olida</u>					

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

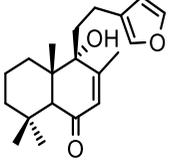
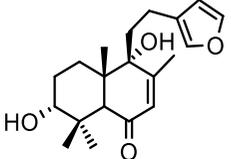
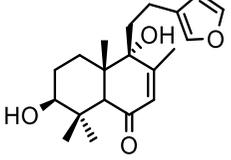
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
Diterpenos					
 <u>Solidagenona</u>	<i>Solidago chilensis</i>	Gástrico induzido por HCl / etanol em ratos	50 - 200	75%-rizoma-CHCl ₃	SCHMEDA-HIRSCHMANN <i>et al.</i> , 2002
 <u>3α-Hidroxisolidagenona</u>					
 <u>3β-Hidroxisolidagenona</u>					

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

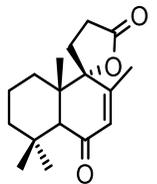
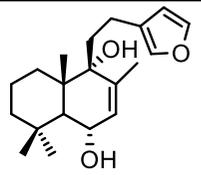
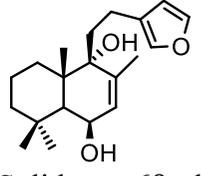
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <p><u>Solidagolactona</u></p>	<i>Solidago chilensis</i>	Gástrico induzido por HCl / etanol em ratos	50 - 200	75%-rizoma-CHCl ₃	SCHMEDA-HIRSCHMANN <i>et al.</i> , 2002
 <p><u>Solidagen-6α-ol</u></p>					
 <p><u>Solidagen-6β-ol</u></p>					

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (continua).

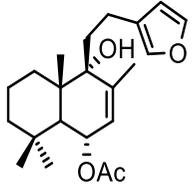
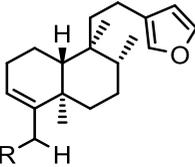
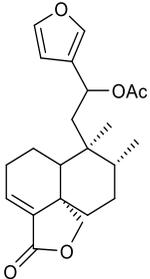
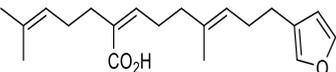
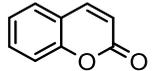
Compostos	Espécies	Ensaio experimental	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <p><u>6α-Acetoxyolidagenona</u></p>	<i>Solidago chilensis</i>	Gástrico induzido por HCl / EtOH em ratos	50 - 200	75%-rizoma-CHCl ₃	SCHMEDA-HIRSCHMANN <i>et al.</i> , 2002
 <p><u>Bacchalineol</u></p> <p>R= OH R= Ác. 18-O-malônico R= Éster metílico de 18-O-malonato R= Éster etílico de 18-O-malonato</p>	<i>Parastrephia quadrangularis</i>	Gástrico induzido por HCl / EtOH em ratos	20	19%-aérea-EtOH	ARDILES <i>et al.</i> , 2018
 <p><u>Tanabalina</u></p>	<i>Egletes viscosa</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 50	63%-capítulos florais	GUEDES <i>et al.</i> , 2002

Tabela 1-Estruturas dos compostos apontados como responsáveis pela atividade gastroprotetora das espécies de Asteraceae (conclusão).

Compostos	Espécies	Ensaio experimentais	Doses (mg.kg ⁻¹)	Inibições-Partes da planta-Extratos	Referências
 <u>Ácido centipédico</u>	<i>Egletes viscosa</i>	Gástrico induzido por etanol em ratos	25 - 100 25 - 50	79%-capítulos florais 49%-capítulos florais	GUEDES <i>et al.</i> , 2008 GUEDES <i>et al.</i> , 2002
Cumarinas  <u>Cumarina (2H-1- benzopirano-2-ona)</u>	<i>Hertia cheirifolia</i>	Gástrico induzido por HCl / EtOH em ratos	50 - 100	88%-raízes-MeOH	MAJOULI <i>et al.</i> , 2018

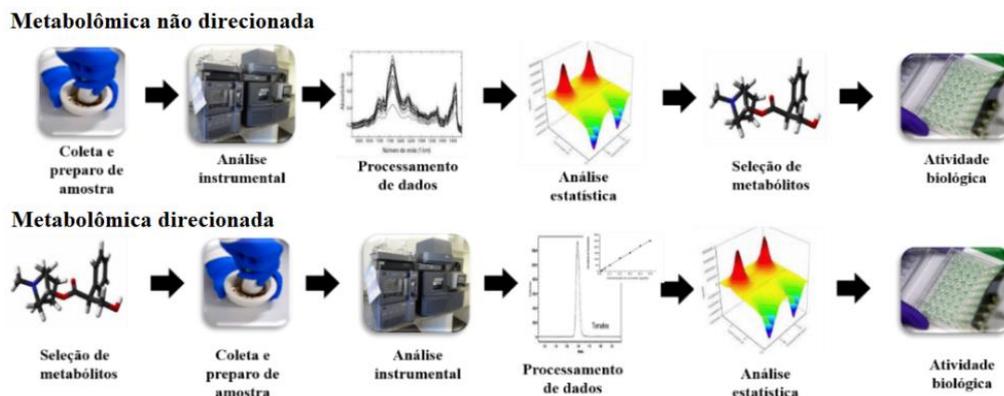
4.5 Metabolômica

A metabolômica compreende a análise abrangente e quantitativa do metaboloma de um sistema biológico. Poderosos métodos analíticos eficientes, como cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas de alta resolução, e programas computacionais capazes de processar grandes conjuntos de dados analíticos gerados viabilizaram o rápido desenvolvimento da metabolômica. Os metabólitos são produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica. O conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular (até 1500 Da), presentes ou alterados em um sistema biológico é chamado de metaboloma. Muitos desses compostos também são chamados de produtos naturais (PNs) e historicamente têm sido uma fonte importante de moléculas na descoberta de medicamentos, aromatizantes, alimentação, devido à sua ação em muitos alvos farmacológicos (FIEHN, 2001; WOLFENDER *et al.*, 2013).

Existem duas abordagens analíticas utilizadas para a análise dos metabólitos: metabolômica não direcionada (do inglês, *untargeted metabolomics*) e metabolômica direcionada (do inglês, *targeted metabolomics*) (LOPES *et al.*, 2020; NAUSHAD; KHAN, 2014).

A abordagem mais tradicional da metabolômica direcionada (*targeted metabolomics*) consiste na análise de um grupo de metabólitos de interesse previamente definidos. Por outro lado, na metabolômica não direcionada (*untarget metabolomics*) permite avaliar todo o conjunto de substâncias de modo indiscriminado. A Figura 6 demonstra, através de um fluxo de informações, os requerimentos básicos para o desenvolvimento de um experimento em metabolômica (CANUTO *et al.*, 2018).

Figura 6 - Etapas envolvidas nas análises metabolômicas.



Fonte: Adaptado de CANUTO *et al.*, 2018.

A quantidade de dados adquiridos impõe um grande desafio analítico no mapeamento completo da constituição metabólica de um organismo biológico, uma vez que existe uma grande diversidade química de metabólitos, com diferentes funções biológicas e com níveis de concentrações diferentes. Sendo assim, é importante enfatizar que atualmente não é possível encontrar uma única técnica analítica capaz de promover a identificação e quantificação de todo o metaboloma de um determinado sistema biológico (CANUTO *et al.*, 2018; FUNARI *et al.*, 2013; SUSSULINI, 2017). A maioria dos experimentos em metabolômica combina ferramentas analíticas de detecção e separação, com o objetivo de minimizar as deficiências individuais das ferramentas analíticas. Dentre as combinações mais comuns estão as técnicas de separação cromatográfica (cromatografia líquida e gasosa) acopladas a detectores de ultravioleta ou espectrometria de massas. Além disso, a ressonância magnética nuclear (RMN) também vem sendo empregada para a elucidação estrutural, bem como nos estudos de extratos brutos de alta complexidade (LOPES *et al.*, 2020).

Neste trabalho, as duas abordagens metabolômicas, direcionada e não direcionada, foram aplicadas na investigação dos metabólitos de *E. viscosa*. Em todos os casos, as abordagens contemplaram uma visão global da composição química visando a discriminação, quantificação e identificação dos seus constituintes no material vegetal.

4.6 Técnicas analíticas utilizadas em estudos metabolômicos

4.6.1 Métodos de validação

A necessidade de se mostrar a qualidade das medições dos analitos, através de sua eficiência, reprodutibilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros e acadêmicos irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil, e de outros países, exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (CASSIANO, 2009; RIBANI, 2004).

Neste trabalho foi desenvolvido um método de quantificação dos princípios ativos correspondentes às classes: flavonoide e diterpenos. Geralmente, a quantificação de flavonoides

é realizada por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE), acoplada à detecção por Ultravioleta/Arranjo de diodo (UV/Vis / UV/DAD) e, mais recentemente, à espectrometria de massas (EM). A detecção por UV/DAD é eficiente e seletiva para flavonoides. Devido ao seu caráter aromático conjugado, os flavonoides absorvem fortemente a luz ultravioleta em comprimentos de onda longos (faixas de 240-550 nm) (RIJKE *et al.*, 2006; VILLIERS; VENTER; PASCH *et al.*, 2016). Por outro lado, a análise de diterpenos é realizada em comprimentos de onda mais curtos (205-230 nm) devido à ausência de grupos cromóforos, resultando em baixa sensibilidade (JOSHI, 2012). Dessa maneira a espectrometria mostra-se uma técnica apropriada, uma vez que fornece informações estruturais sobre a fórmula molecular e/ou padrão de fragmentação, além de alta sensibilidade. Além disso, essa técnica tem sido reforçada pela sua hibridização com cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE-EMAR), que é atualmente a técnica de separação mais eficiente (VILLIERS; VENTER; PASCH *et al.*, 2016).

4.6.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho Próximo (IVp)

Algumas técnicas espectroscópicas possuem o diferencial de realizar medidas analíticas de maneira não destrutiva, e dentre elas se destaca a espectrometria no infravermelho próximo (do inglês, *Near Infrared* – IVp). Essa técnica permite o desenvolvimento de métodos não invasivos, rápidos, com baixo impacto ambiental (com o mínimo de reagentes/solventes) e baixo custo (ALVES-FILHO *et al.*, 2019; SHAWKY; EL-KHAIR; SELIM, 2020).

A região do infravermelho compreende a radiação eletromagnética com comprimento de onda de 780 a 1.000.000 nm, sendo dividida em três sub-regiões: Infravermelho próximo IVp (780-2.500 nm), infravermelho médio (2.500-50.000 nm) e infravermelho distante (50.000-1.000.000 nm) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2009).

A análise IVp produz um espectro eletromagnético (reflectância ou transmitância), em que o comprimento de onda depende dos processos de espalhamento e de absorção de acordo com as composições químicas: grupos funcionais moleculares e ligações C-H, N-H, S-H ou O-H (ALVES-FILHO *et al.*, 2019b; QUINTELAS *et al.*, 2019; BLANCO, 2005).

Devido as bandas espectrais no IVp serem largas e na maioria das vezes sobrepostas torna-se necessária a aplicação de técnicas matemáticas e estatísticas de análise e calibração multivariada que extraiam as informações contidas nesses dados espectrais (ALVES-FILHO *et al.*, 2019b; TAHIR *et al.*, 2019; TSUCHIKAWA *et al.*, 2007; DING *et al.*, 2017).

As primeiras aplicações analíticas desta técnica ocorreram no final da década de 50 e a primeira aplicação importante foi na década de 60, quando Karl Norris iniciou o seu

emprego no estudo de matrizes complexas de origem natural, como os de produtos agroindustriais. A partir deste momento, o interesse pela espectrometria IVp cresceu notavelmente e esta técnica foi reconhecida como uma poderosa ferramenta para análises quanti e qualitativas de parâmetros químicos e físicos (TSUCHIKAW, 2007; KAROUI; BAERDEMAEKER, 2007; SHAWKY; EL-KHAIR, SELIM, 2020). Sua propagação nas mais variadas áreas de atuação pode ser atribuída principalmente à sua habilidade para processar amostras sólidas com mínima, ou nenhuma, manipulação analítica e a sua compatibilidade com sondas de fibra óptica como transmissores de sinais, os quais permitem análises *in situ* e *online*. Além dessas características, as metodologias baseadas na espectroscopia IVp possuem as seguintes propriedades inerentes: análise simultânea de vários parâmetros; não invasivas; possuem alta velocidade de processamento das informações e rápido fornecimento de resultados quantitativos; não consomem reagentes químicos nocivos ao meio ambiente; são menos laboriosas e de baixo custo (ALVES-FILHO *et al.*, 2019; JINTAO e al., 2018).

Portanto, nos últimos anos esta técnica vem se consolidando como um método alternativo, não-invasivo e de fácil operação, devido sua utilização na identificação de espécies vegetais (WANG *et al.* 2018), análise de origem geográfica (YANG *et al.* 2018), análise quantitativa (CHEN *et al.* 2018; SUN *et al.* 2019), detecção rápida (JINTAO *et al.* 2018), detecção de adulteração e monitoramento *online* (XU *et al.* 2012).

4.6.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A RMN é um fenômeno, que pode ser observado para qualquer átomo que contenha spin nuclear diferente de zero ($I \neq 0$). Esses átomos possuem propriedades giromagnéticas intrínsecas, devido a seus momentos angulares e magnéticos, que os fazem detectáveis por RMN. Todos os metabólitos podem apresentar em suas estruturas átomos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio e/ou fósforo. Esses elementos têm alguns isótopos com $I \neq 0$, sendo os isótopos ^1H , ^{13}C , ^{15}N e ^{19}P os mais importantes. O isótopo de hidrogênio de massa atômica igual a 1, o ^1H , é o mais utilizado, devido a sua sensibilidade e sua elevada abundância natural (99,98 %) (PAIVA, 2010).

A RMN é uma técnica qualitativa e quantitativa altamente reprodutível e não seletiva, ou seja, não depende das características químicas dos compostos observados, como polaridade e acidez. Em metabolômica, experimentos de RMN uni- e bidimensionais vem sendo extensamente empregados devido a sua alta reprodutibilidade e fácil preparo de amostras,

fornecendo informações a respeito da estrutura de diferentes compostos.

Em geral, a análise por RMN tem uma grande vantagem em relação a outras técnicas, pois é não destrutiva e não requer o uso de substâncias de referências de alto grau de pureza para obtenção de concentração dos compostos, as quais são necessárias para EM ou condições cromatográficas (fase estacionária, fase móvel, temperatura) (FREITAS *et al.*, 2018).

A primeira análise quantitativa de uma mistura por RMN de ^1H foi relatada em 1963 por Hollis (HOLLIS *et al.*, 1963; GIRAUDEAU, 2017). Desde então, vários desenvolvimentos metodológicos aumentaram a faixa de aplicação do RMN quantitativo, que tem sido cada vez mais utilizado em uma variedade de aplicações como produtos farmacêuticos, produtos naturais, metabolômica, ciência de alimentos, etc.

Nas últimas décadas, a RMN tem sido aplicada majoritariamente a estudos metabolômicos ao possibilitar a análise simultânea de diversos grupos de metabólitos secundários. Dentre as inúmeras aplicações destaca-se a discriminação, autenticação e avaliação da qualidade de fitoterápicos e alimentos (ALVES-FILHO *et al.*, 2019; DIEHL *et al.*, 2020).

Além disso, a poderosa combinação de RMN e quimiometria permite a avaliação qualitativa e quantitativa de produtos orgânicos como um todo ou, em outras palavras, sem processos de separação química prévia (MONAKHOVA *et al.*, 2015). Geralmente, visam abordar três objetivos principais diferentes: simplificação de conjuntos de dados complexos, por exemplo, análise de componentes principais (PCA); classificação de objetos para definir suas características qualitativas (análise discriminante); ou predição quantitativa da concentração de analitos usando técnicas de regressão multivariada (DIEHL *et al.*, 2020).

Portanto, alguns requisitos importantes relacionados à análise de RMN (parâmetros de aquisição e processamento) devem ser levados em consideração para reduzir o erro analítico e produzir resultados confiáveis o ajuste preciso do transmissor na sonda de RMN; calibração do pulso rígido a 90° para fornecer a intensidade máxima do sinal a uma temperatura estável; relaxamento total da rotação após o pulso de 90° , o tempo de aquisição somado ao intervalo de relaxação deve ser mais de sete vezes o tempo de relaxamento longitudinal mais longo (T_1) do núcleo de prótons (^1H), que para uma molécula orgânica de tamanho médio (massa de um algumas centenas) é de 0,5-5,0s, dependendo da concentração da amostra, viscosidade, temperatura e solvente (RIGGER *et al.*, 2017); e, por fim, o perfil de saturação para supressão de água deve ser avaliado para aumentar o ganho (*gain*) permitindo, conseqüentemente, maior e melhor detecção e análise de metabólitos. Esses requisitos devem ser considerados em todos os estágios do desenvolvimento metodológico no RMNq ^1H (ALVES-FILHO; ALEXANDRE;

FERREIRA, 2015).

4.6.4 Espectrometria de massas (EM)

A combinação da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (EMAR), é a técnica analítica de separação mais eficiente para aquisição de perfis cromatográficos atualmente, podendo ser acoplada a diferentes analisadores e detectores. Em metabolômica, essa técnica se tornou especialmente importante a partir do início dos anos 90 após o seu acoplamento a fontes de ionização em pressão atmosférica (*electrospray* - ESI). A ESI é o método de escolha para a maioria dos estudos metabolômicos, permitindo a formação de espécies protonadas, desprotonadas e adutos. Com o desenvolvimento dos analisadores do tipo tempo de voo e Orbitrap, por exemplo, foi possível obter espectros em alta resolução e a determinação de fórmulas elementares a partir dos valores de massa/carga (m/z) dos íons detectados, auxiliando o processo de identificação e quantificação de metabólitos (ESTEKI; SHAHSAVARI, 2020; AYDO, 2020; FORCISI *et al.*, 2013; FUNARI *et al.*, 2013; MOCO *et al.*, 2007).

Na literatura encontram-se diversos estudos com extratos de plantas a partir de métodos desenvolvidos para obter o perfil metabólico levando à identificação de substâncias. Além disso, o uso de análise multivariada de dados permite, ainda, o agrupamento de amostras por semelhanças na produção de metabólitos especiais selecionados (PEERAPATTANA, OTSUKA 2013; DING *et al.*, 2015; NIKAM *et al.*, 2012; SMILLIE E KHAN, 2009).

4.6.5 Cromatografia gasosa (CG-EM)

A CG-EM é uma das técnicas de análise mais empregadas em estudos metabolômicos, apresentando alta robustez e reprodutibilidade. Essa técnica requer que os analitos sejam voláteis e termicamente estáveis, condições que excluem muitos metabólitos secundários importantes das plantas. Entretanto, grande parte dos metabólitos que compõem o metaboloma podem ser derivatizados, para que se tornem voláteis a baixas temperaturas (CANUTO *et al.*, 2018; DETTMER-WILDE; ENGEWALD, 2014; SUSSULINI, 2017; YULIANA *et al.*, 2013). Todavia, o uso da CG-EM em metabolômica apresenta uma grande vantagem, resultante da construção de espectrotecas, conferindo alta credibilidade na identificação dos metabólitos, que combina a informação de tempo de retenção e o padrão de

fragmentação obtido, em decorrência da ionização por impacto de elétrons sob uma energia padronizada de ionização (usualmente 70 eV) (CANUTO *et al.*, 2018; DETTMER-WILDE; ENGEWALD, 2014; SUSSULINI, 2017).

4.6.6 Microextração em Fase Sólida (MEFS)

A MEFS baseia-se no equilíbrio de analitos entre uma fibra de sílica fundida, ou uma fibra recoberta com um polímero não-volátil (equilíbrio de adsorção e partição, respectivamente), e a matriz amostral. A fibra, responsável pela extração, fica protegida no interior de uma agulha, adaptada em um dispositivo chamado *holder*, sendo exposta pela movimentação de um êmbolo. A altura (comprimento) da agulha pode ser de acordo com a finalidade ou local onde se deseja inseri-la (BHAVYA; RAVI; NAIDU, 2019; BELLIARDO *et al.*, 2006).

Caso seja necessário, as fibras podem ser substituídas, por motivos de desgaste, ou para que se empregue outro tipo de polímero, de acordo com as características físico-químicas do(s) analito(s).

A hidrodestilação é uma das técnicas mais comuns usadas para o isolamento de óleos essenciais de plantas. No entanto, é uma abordagem destrutiva e demorada, exigindo grandes quantidades de amostra. Além disso, longos períodos de tempo em aquecimento levam à destruição de compostos sensíveis, formação de artefatos e oxidação dos compostos. Neste sentido, a microextração em fase sólida pode ser uma alternativa valiosa, pois são necessárias pequenas quantidades de amostra e evita-se a degradação térmica e a contaminação por solvente dos componentes químicos voláteis (BELLIARDO *et al.*, 2006; MESQUITA *et al.*, 2017).

A MEFS difere das outras técnicas de extração para amostras aquosas pelo menor tempo de análise e pela não utilização de solventes. Em relação às outras, é uma técnica simples, rápida e de fácil manuseio, além da vantagem da utilização de pequenas quantidades de amostra, podendo ser aplicada para a extração de voláteis de plantas medicinais, alimentos, amostras biológicas e culturas de fungos. Entretanto, embora seja uma técnica versátil, as condições de extração devem ser otimizadas para cada tipo de amostra. Neste caso, os principais parâmetros a serem avaliados são modo de extração (“headspace” ou imersão direta na amostra líquida), tipo de fibra, tempo de exposição da fibra, tempo de equilíbrio, pH, velocidade de agitação, concentração iônica, temperatura e volume da amostra (BHAVYA; RAVI; NAIDU, 2019; RAFIEIOLHOSSAINIA, 2012).

4.6.7 Análise estatística

O grande volume e alta complexidade de dados produzidos em estudos metabolômicos tornaram impossível tratar as informações manualmente, por isso várias ferramentas e softwares de informática foram desenvolvidos para ajudar no processamento de dados, de modo a evitar erros e manter a integridade das variações biológicas investigadas (BOUFRIDI; QUINN, 2016; HU; XU, 2013; MOCO *et al.*, 2007). Nesse contexto, as ferramentas quimiométricas são utilizadas com o objetivo de reduzir o dimensionamento do conjunto de dados, sem perder a qualidade das informações geradas nas análises metabolômicas.

A análise estatística é utilizada para extrair informações relevantes dos dados, através de métodos de análise multivariada, e univariada. As análises estatísticas multivariadas, também denominadas de métodos de reconhecimento de padrões, são recomendadas para a classificação e discriminação de entidades ou metabólitos responsáveis por diferenciar os grupos de amostras, além disso, também são utilizadas para correlacionar um perfil metabólico a uma determinada atividade biológica (CANUTO *et al.*, 2018; FUNARI *et al.*, 2013). Nas análises univariadas, as variáveis de estudo (metabólitos) são avaliadas separadamente e, ao contrário dos métodos multivariados, são desprezadas as relações entre elas. Testes estatísticos como ANOVA e teste *t* de *Student* são frequentemente utilizados. Por outro lado, as ferramentas de análises estatísticas multivariadas empregadas para a análise de dados de perfis dos metabólitos podem ser classificadas como abordagens não supervisionadas e supervisionadas (FUNARI *et al.*, 2013; THEODORIDIS *et al.*, 2012).

Nos métodos supervisionados, cada amostra analisada provém de uma classe pré-estabelecida, e essa informação é utilizada durante a análise dos dados e na construção dos modelos de classificação. Em contrapartida, os métodos não supervisionados não fazem uso dessa informação e, portanto, não requerem nenhum conhecimento prévio a respeito da classificação das amostras. De modo que as mesmas são naturalmente agrupadas com base nas informações contidas nos dados experimentais (FERREIRA, 2015).

4.6.8 Métodos não supervisionados de análises de dados

De um modo geral, inicialmente são utilizados os métodos não supervisionados, também designados de métodos exploratórios, com a finalidade de reduzir a dimensionalidade dos dados e fornecer uma visão geral da separação, formação de conglomerados de dados (*clusters*) e/ou detectar amostras anômalas (*outliers*) (FUNARI *et al.*, 2013; THEODORIDIS

et al., 2012). A finalidade principal é reunir as amostras de tal modo que aquelas pertencentes a um mesmo grupo sejam mais semelhantes entre si. A ideia é maximizar a homogeneidade interna, dentro dos grupos, e maximizar a heterogeneidade entre grupos. Sendo assim, alguns algoritmos foram desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos (CORREIA; FERREIRA, 2007). Dentre os métodos não supervisionados mais utilizados, tem-se a análise de componentes principais (PCA, do inglês, *principal component analysis*) e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA, do inglês, *hierarchical cluster analysis*) (CANUTO *et al.*, 2018; SOUZA; POPPI, 2012; FUNARI *et al.*, 2013; THEODORIDIS *et al.*, 2012).

PCA é o método não supervisionado mais empregado nos estudos metabolômicos. Sua utilização visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informações (variância) possíveis. Essa redução é obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (PCs). Organizadas em ordem decrescente de importância, as PCs são combinações lineares das variáveis originais. Os gráficos obtidos representam as amostras em um sistema cartesiano onde os eixos são as PCs (BOUFRIDI; QUINN, 2016). Através da interpretação dos gráficos é possível verificar quais dos parâmetros analisados (variáveis) são os principais responsáveis pela formação dos grupos de amostras. A avaliação das PCs pode auxiliar no estabelecimento de uma assinatura química particular para cada grupo de amostras segregado após a PCA. Esse é o objetivo principal dos estudos de reconhecimento de padrões, que busca encontrar uma maneira de relacionar a identidade de uma amostra com suas características químicas (SOUZA; POPPI, 2012).

A análise de componentes principais tem sido utilizada em dados espectroscópicos ou espectrométricos, como CLAE-DAD, CLAE-DAD-EM ou RMN ¹H, sendo aplicado principalmente para discriminação de amostras submetidas a diferentes condições genéticas e ambientais (SOUZA; POPPI, 2012).

A análise hierárquica é útil para reduzir a dimensionalidade de conjunto de dados de grande porte, principalmente quando se tem muitos conjuntos de amostras e/ou variáveis, permitindo um grande número de amostras que possam ser agrupadas por suas semelhanças (FERREIRA, 2015). HCA busca agrupar as amostras em classes, baseando-se na similaridade dos participantes de uma mesma classe e nas diferenças entre os membros de classes distintas. A representação gráfica obtida é denominada de dendrograma, um gráfico bidimensional independentemente do número de variáveis do conjunto de dados (PILON *et al.*, 2020).

A análise hierárquica tem sido extensamente empregada na química de produtos

naturais para a quimiotaxonomia de amostras, permitindo a classificação genética de espécies de plantas e microorganismos baseados no perfil químico de cada espécie (CANUTO *et al.*, 2018; SOUZA; POPPI, 2012; PILON *et al.*, 2020).

Tanto HCA quanto PCA permitem a interpretação multivariada de conjuntos de dados, grandes e complexos, por meio de gráficos bi ou tridimensionais. Estes gráficos apresentam informações que expressam as inter-relações que podem existir entre as variáveis, facilitando a interpretação multivariada do comportamento das amostras (CANUTO *et al.*, 2018; SOUZA; POPPI, 2012; PILON *et al.*, 2020).

4.6.9 Métodos supervisionados de análises de dados

Nas análises supervisionadas, selecionam-se uma série de amostras representativas de cada grupo para as quais as medidas experimentais são coletadas e o padrão de cada um deles é definido. Nesses métodos, as informações à respeito das amostras é que supervisionam o desenvolvimento dos critérios de discriminação que serão utilizados para fazer o reconhecimento e a consequente distinção de novas amostras (CORREIA; FERREIRA, 2007). Normalmente, os métodos supervisionados de análises são executados posteriormente aos métodos não supervisionados. Esses métodos são concebidos com o objetivo de melhorar a separação entre os grupos obtidas nas análises exploratórias. Em suma, o uso dos métodos supervisionados tem por objetivo obter a máxima distinção dos grupos de amostras e entender quais variáveis são responsáveis por esta distinção (THEODORIDIS *et al.*, 2012). Os métodos supervisionados de análises mais utilizados em estudo metabolômicos são análise discriminante por mínimos quadrados parciais ou projeção para estruturas latentes (PLS-DA, do inglês, *projection to latent structures ou partial least squares discriminant analysis*) e mínimos quadrados parciais ortogonais ou projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês, *orthogonal projection to latent structures ou orthogonal partial least squares discriminant analysis*) (CANUTO *et al.*, 2018; CORREIA; FERREIRA, 2007; THEODORIDIS *et al.*, 2012).

O método consiste em um vetor Y que representa os valores das classes em relação ao vetor X (conjunto de dados). O modelo gerado tem como parâmetros o R^2 , que mede a adequação do modelo para o conjunto de dados, enquanto Q^2 e PRESS (Soma dos Quadrados dos Erros Residuais de Previsão) são utilizados para avaliar a capacidade de predição do modelo (validação), sendo recomendado o uso de dupla validação cruzada.

O OPLS-DA foi introduzido como uma melhoria do método PLS-DA para

discriminar dois ou mais grupos de amostras. O algoritmo OPLS-DA melhora a capacidade preditiva, devido à correção de sinal ortogonal para distinguir as variações nos dados que são úteis para a predição de uma resposta (THEODORIDIS *et al.*, 2012; WESTERHUIS *et al.*, 2010).

A literatura relata trabalhos com os métodos (PLS-DA e OPLS-DA) para classificar e discriminar espécies, autenticar materiais vegetais e na identificação de marcadores químicos (SUD *et al.*, 2016; WISHART, 2016; ZHANG *et al.*, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do Método Analítico

5.1.1 Otimização das condições de separação CLUE-EMAR e CLUE-QDa

No primeiro passo para o desenvolvimento do método, os padrões (ternatina, tanabalina e ácido centipédico), conforme apresentados na Figura 7, foram analisados no sistema CLUE-EMAR para estabelecer parâmetros de ionização e identificação molecular, conforme apresentado nas Figuras 8 e 9, p. 80. A melhor ionização foi alcançada no modo positivo $[M+H]^+$. No modo negativo, esses compostos foram detectados em baixa intensidade, juntamente com picos adicionais de compostos interferentes. Posteriormente, o método foi transposto para o sistema CLUE-QDa para análise em modo de varredura completa como observado na Figura 10, p. 81. Em seguida, o método CLUE-QDa foi otimizado ajustando-o ao modo de monitoramento de íons selecionados (MIS), que abreviou o tempo de corrida de 19 para 10 min. Assim, apenas as m/z dos íons mais abundantes dos analitos foram selecionadas para serem detectadas nos intervalos de tempo específicos, resultando em maior sensibilidade e seletividade.

Figura 7 - Estrutura dos compostos bioativos de *E. viscosa*: ternatina (1); tanabalina (2) e ácido centipédico (3).

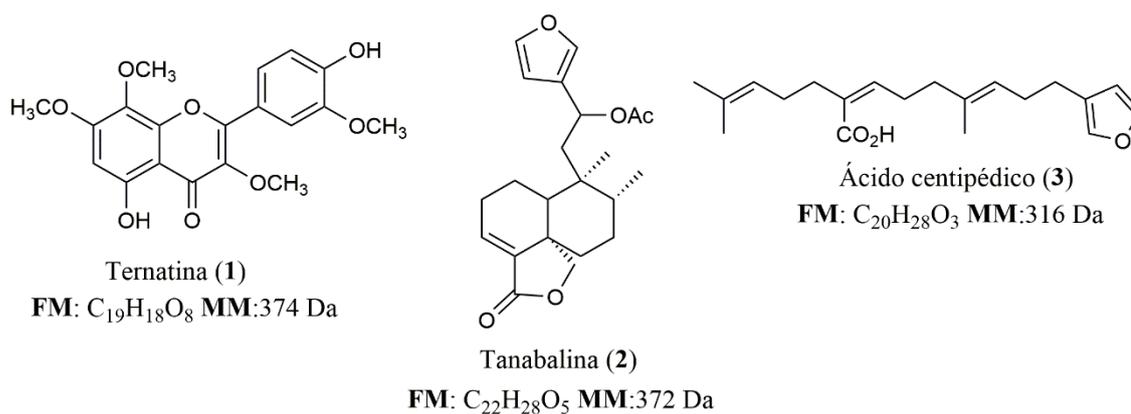
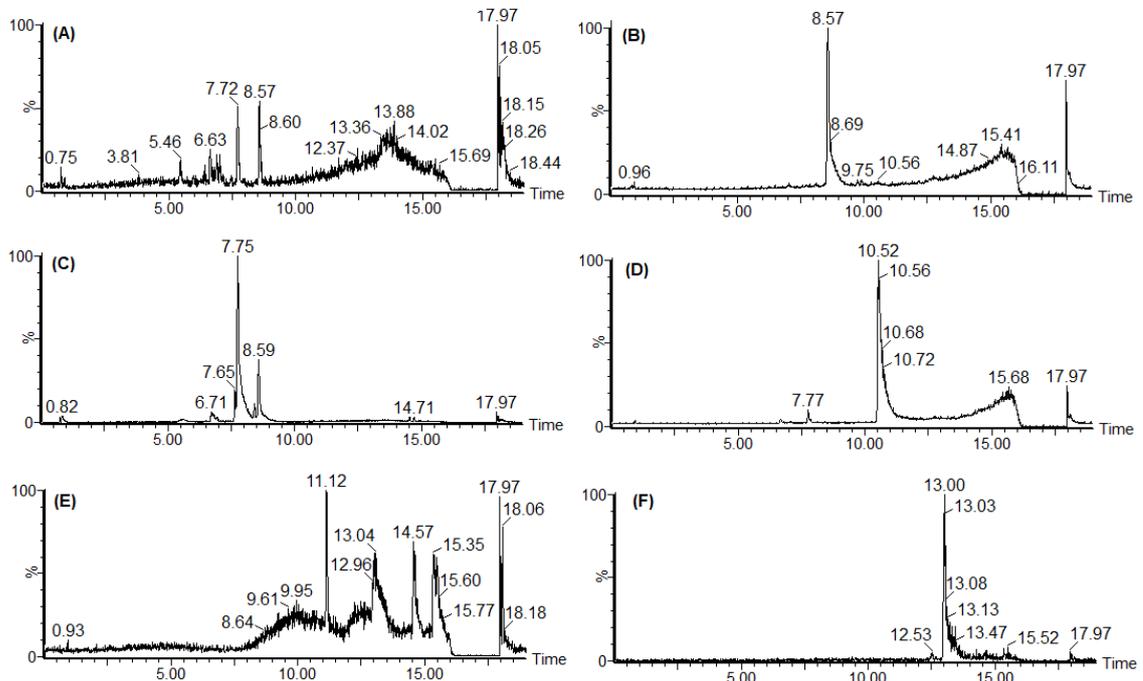
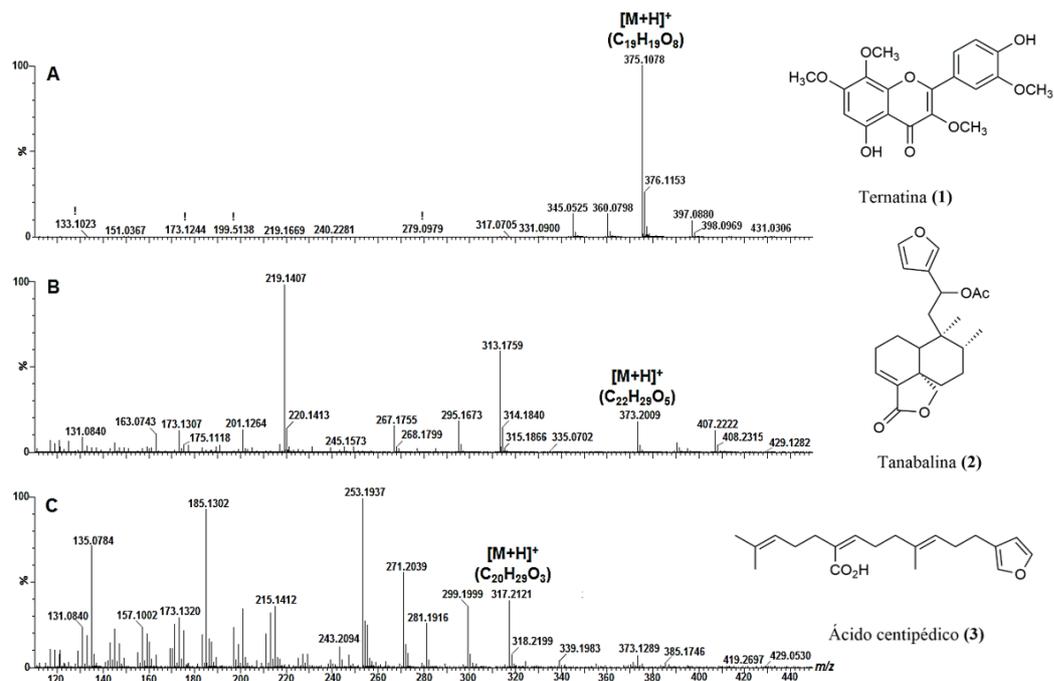


Figura 8 - Cromatogramas CLUE-EMAR dos padrões (C = 100 ppm) em modo negativo: (A) ternatina, (B) tanabalina e (C) ácido centipédico e em modo positivo (D) ternatina, (E) tanabalina e (F) ácido centipédico.



Fonte: Elaborada pela autora.

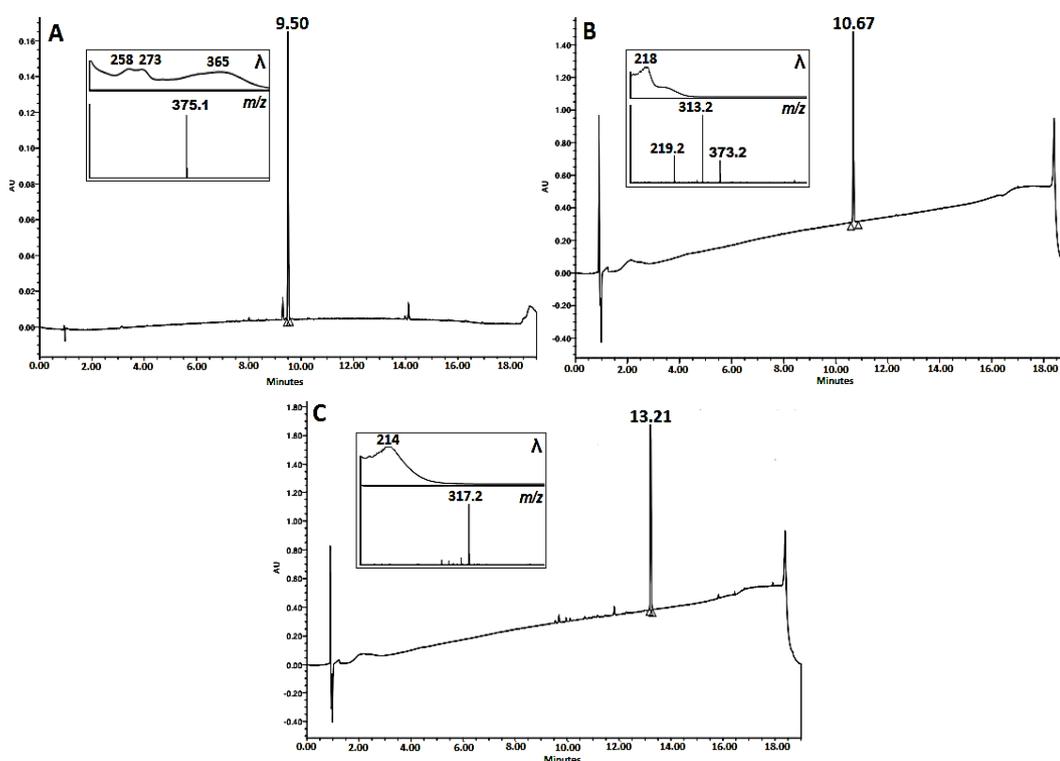
Figura 9 - Espectros ESI no modo positivo dos padrões analíticos de (A) ternatina, (B) tanabalina e (C) ácido centipédico.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os íons quantitativos de ternatina e ácido centipédico foram os seus íons precursores com m/z 375,1 ($t_r = 0,76 - 2,76$ min) e m/z 317,2 ($t_r = 5,00 - 7,00$ min). Por outro lado, quantificou-se a tanabalina a partir de seu íon-fragmento de m/z 313,2 ($t_r = 2,10 - 4,10$) correspondendo à perda de ácido acético $[M+H-60]^+$, o qual mostrou-se mais abundante que seu respectivo íon precursor, por isso foi adotado como íon de quantificação. Conforme apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Cromatogramas CLUE-QDa em modo de varredura completa (210-400 nm) dos padrões analíticos: (A) ternatina, (B) tanabalina e (C) ácido centipédico.



Fonte: Elaborada pela autora.

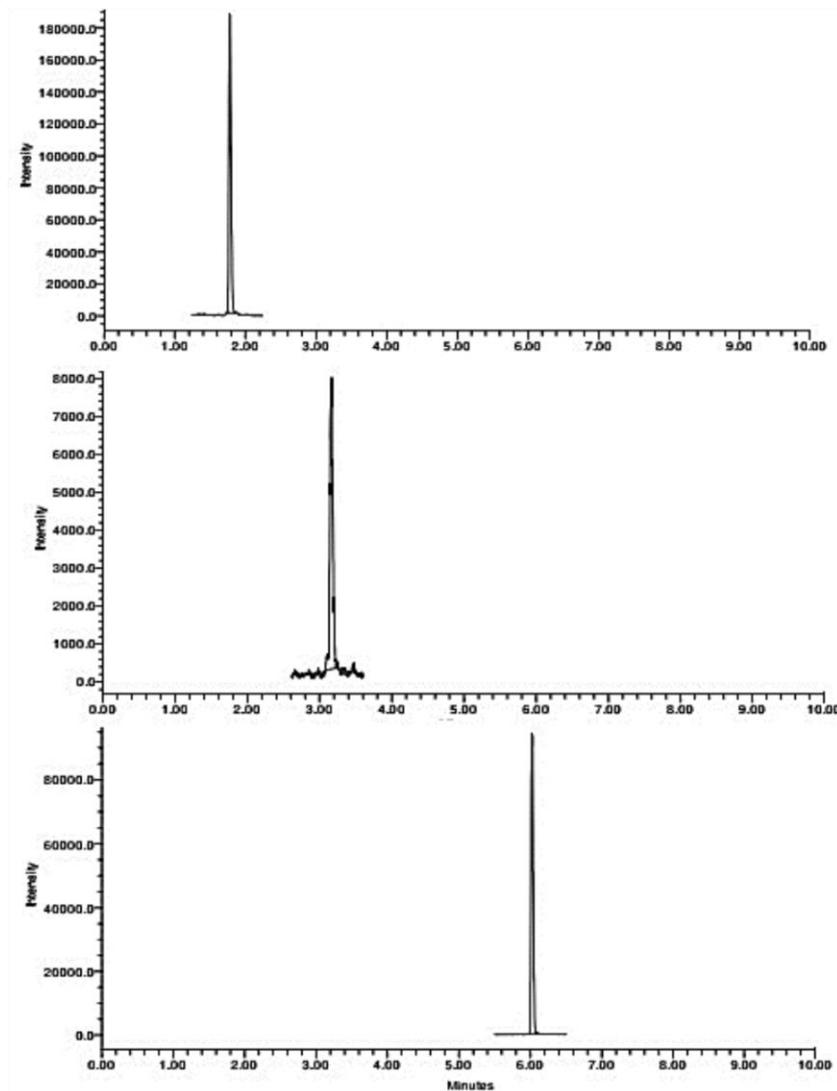
5.1.2 Seletividade

O método CLUE-QDa-MIS mostrou uma boa seletividade para os íons monitorados uma vez que os sinais cromatográficos dos padrões foram bem resolvidos em seus respectivos intervalos e avaliados através da análise de amostras em branco e amostras fortificadas. O Monitoramento de Íons Seleccionados (MIS) permite que o espectrômetro de massas detecte compostos específicos com alta sensibilidade. No modo MIS, o instrumento é configurado para reunir dados em massa de interesse, na qual o sinal cromatográfico é atribuído a um só analito.

Dessa maneira, tem-se uma maior seletividade e sensibilidade nas análises dos compostos, onde a presença do analito na amostra é constatada pela análise do espectro de massas do mesmo em seu respectivo intervalo de monitoramento. Devido a essa elevada seletividade, os efeitos de possíveis interferentes provenientes de componentes presentes na matriz são minimizados. A Figura 11 mostra os cromatogramas no modo MIS da infusão dos capítulos florais.

Figura 11 - Cromatogramas CLUE-QDa MIS da infusão de capítulos florais (Ev017): (a) ternatina; (b) tanabalina e (c) ácido centipédico.

(a)



(b)

(c)

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.3 Linearidade

No estudo inicial de avaliação da linearidade do método foram obtidos os valores dos parâmetros “a” (coeficiente angular), “b” (coeficiente linear), e o coeficiente de correlação linear (R), por meio do método dos mínimos quadrados proveniente das injeções cromatográficas das soluções padrão dos analitos no solvente e na matriz, plotou-se as concentrações conhecidas (x_i), contra as respostas do sistema cromatográfico (y_i). Desse modo, a curva de calibração que melhor representa o conjunto de pontos obtidos (x_i, y_i), mediante o uso do método dos mínimos quadrados, fornece a equação com a melhor linha reta entre o conjunto de pontos (x_i, y_i) (SKOOG, WEST, HOLLER, 2005).

Os valores dos coeficientes de correlação (R) das curvas analíticas construídas com, ou sem superposição de matriz revelaram-se adequados para os compostos estudados, conforme Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos compostos construídas sem superposição de matriz (solvente) por CLUE-QDa-MIS.

Composto	Equação ($y = ax \pm b$)	R	Intervalo Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ternatina	$y = 274,39x - 1886$	0,9997	25 - 500
Tanabalina	$y = 29,127x - 158,5$	0,9981	75 - 1000
Ácido centipédico	$y = 7,0681x + 372,53$	0,9973	75 - 1000

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos compostos construídas com superposição de matriz (extrato) por CLUE-QDa-MIS.

Composto	Equação ($y = ax \pm b$)	R	Intervalo Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ternatina	$y = 175,05x - 558,61$	0,9991	25 - 500
Tanabalina	$y = 8,56x + 1728$	0,9953	75 - 1000
Ácido centipédico	$y = 2,35x + 367,35$	0,9976	75 - 1000

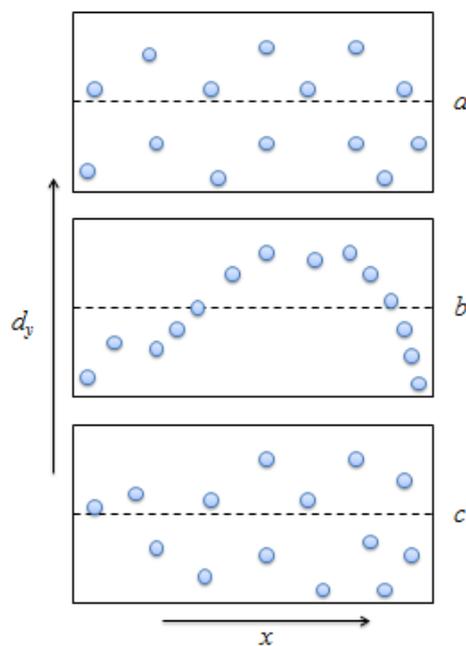
Fonte: Elaborada pela autora.

No que diz respeito à faixa linear, ou seja, intervalo que melhor compreende a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, observa-se que o intervalo linear adequado para boa parte dos compostos tanto na matriz quanto no solvente está compreendido de 25 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

5.1.4 Teste de homocedasticidade

A homocedasticidade é uma característica da calibração que está relacionada com a homogeneidade das variâncias dos resíduos em cada nível de concentração. A distribuição dos resíduos ao longo dos valores de x pode ser verificada pelos gráficos de resíduos d_y em função de x (valores dos níveis de concentração p da calibração). A representação gráfica desses valores pode ser verificada na Figura 12.

Figura 12 - Gráficos típicos de desvios residuais.



Fonte: MARTINS, 2015.

em que:

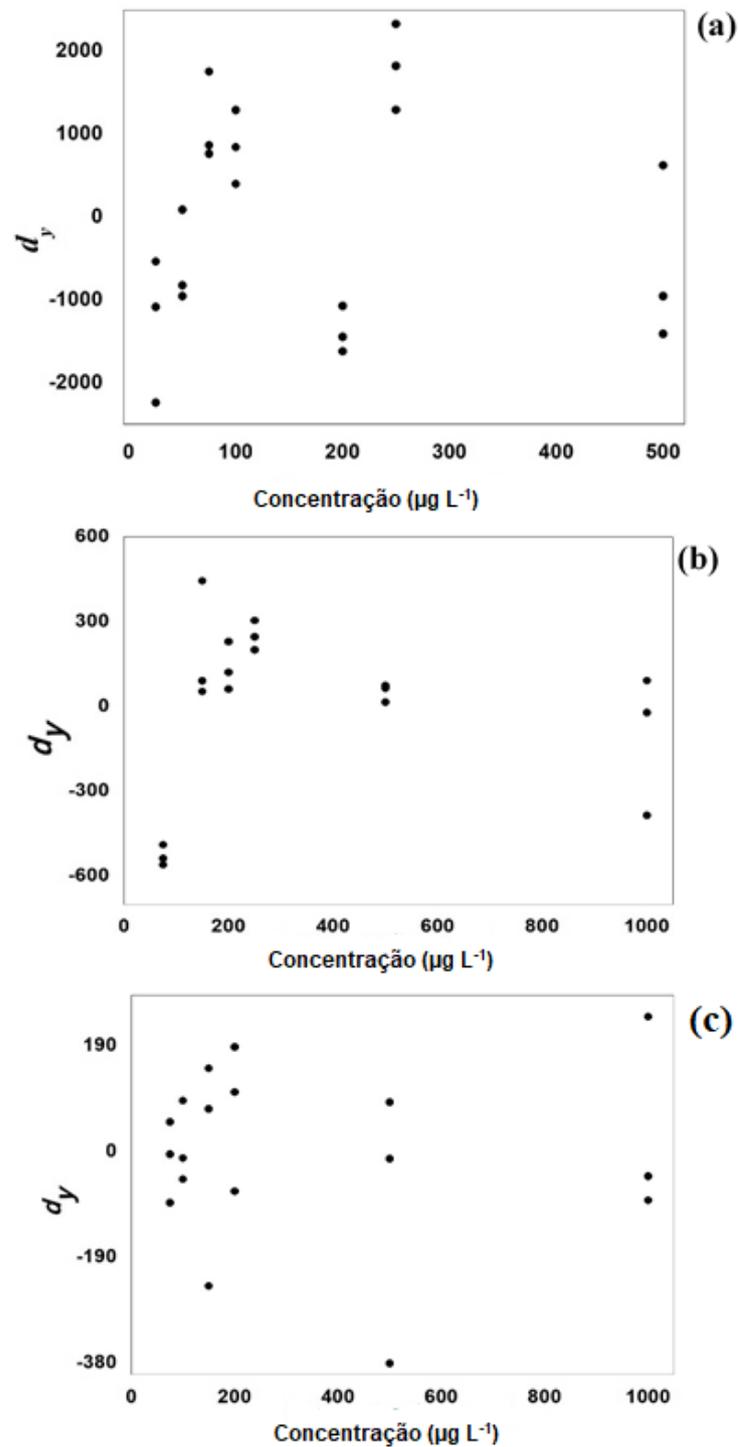
(a) Resíduos aleatoriamente dispersos em torno da linha zero, indicando um ajuste satisfatório (modelo linear adequado).

(b) Resíduos apresentando desvios sistemáticos, desvios em forma de U ou de U invertido, indicando falta de ajuste ou de linearidade (modelo inadequado) na faixa de calibração. Nesses casos, a curva de calibração pode ser ajustada por um polinômio de ordem superior a um, ou alternativamente reduz-se a faixa de concentração da calibração.

(c) Resíduos crescentes (ou decrescentes) com a concentração, em formato afunilado ou de cone, indicando heterocedasticidade da resposta instrumental e exigindo o ajuste pelo MMQP (métodos dos mínimos quadrados ponderados).

Na Figura 13, p. 86, são apresentados gráficos de resíduos para a calibração dos compostos, nos quais podemos verificar que os erros se distribuem de forma aleatória, indicando o caráter homocedástico da calibração (*variâncias constantes dos resíduos*) e, portanto, a possibilidade de estimativa dos parâmetros de regressão via método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Por fim, deve-se avaliar estatisticamente o ajuste do modelo, empregando teste t_r para qualidade do ajuste, pois só assim pode-se concluir, com confiabilidade, que o modelo linear está ajustado. A constatação de homocedasticidade pode ser também um indicativo de ajuste do modelo linear para a curva de calibração (DANZER; CURRIE, 1998).

Figura 13 - Gráfico de resíduo das respostas em cada nível de concentração em função das concentrações das soluções padrão de calibração: Desvio d_y versus Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) para os compostos: (a) ternatina; (b) tanabalina e (c) ácido centipédico.



Fonte: Elaborada pela autora.

O ajuste do modelo linear para a calibração pode ser verificado pelo teste F de Hartley, calculado segundo a Equação 4 na subseção 6.8.4. Ao mesmo tempo, obteve-se o valor crítico tabelado de F disponível na literatura correspondente ao respectivo grau de liberdade ($f = m - 1$) no numerador e no denominador, para um nível de confiança de 95%, sendo m o número de réplicas por ponto de calibração e k é o número de pontos da curva. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados obtidos para o teste F de avaliação de homogeneidade de variâncias, sendo k o número de grupos (pontos de calibração).

Composto	$F_{calculado}$		Teste $F_{critico}$	k	m
	Solvente	Matriz			
Ternatina	39,0	14,6	333	7	3
Tanabalina	28,4	62,3	266	6	3
Ácido centipédico	7,3	11,4	266	6	3

Fonte: Elaborada pela autora.

Pela análise da Tabela 4, ao comparar os valores de F_{cal} com os $F_{critico}$ obtido na literatura, que todos os compostos apresentaram perfil homocedástico ($F_{calc} < F_{crit}$), isso significa que a análise de regressão pode ser conduzida através do método MMQO.

Embora os valores de F ($F_{calc} < F_{crit}$) mostrem homogeneidade das variâncias, esse resultado não comprova a não existência de efeito matriz, que tem como objetivo averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a amostra. Para isso, foi necessária a aplicação do teste t de *Student*, o qual avalia os parâmetros de inclinação e intercepto a fim de definir se as curvas analíticas possuem perfis que diferem estatisticamente entre si.

O valor do parâmetro t_{crit} obtido para cada composto nas curvas de calibração em solvente puro (sem superposição de matriz) e no extrato (com superposição de matriz), foi avaliado com base no número de pontos de calibração, que auxiliou no cálculo do número de graus de liberdade, para um nível de confiança de 95%. Como pode ser observado nas Tabelas 5 e 6, p. 88, os valores do teste t mostraram que todos os coeficientes angulares das curvas de calibração são significativos, uma vez que $t_{calc,a} > t_{crit}$. Contudo, os coeficientes lineares das curvas de calibração não foram significativos ($t_{calc,b} < t_{crit}$), podendo ser retirados da curva para a quantificação dos analitos.

Tabela 5 - Análise estatística de significância dos parâmetros das curvas analíticas sem superposição de matriz.

Composto	* <i>a</i>	<i>S_a</i>	<i>t_{calc,a}</i>	** <i>b</i>	<i>S_b</i>	<i>t_{calc,b}</i>	<i>t_{crit}</i>	Teste <i>t</i>	Curva ajustada
Ternatina	274,39	2,82	96,69	-1886,0	651,13	-2,90	2,57	$t_{cal} > t_{crit}$ $t_{cal} < t_{crit}$	$y = 274,39x$
Tanabalina	29,12	0,85	32,69	-109,05	411,8	-0,26	2,78	$t_{cal} > t_{crit}$ $t_{cal} < t_{crit}$	$y = 29,12x$
Ácido centipédico	7,06	0,26	23,28	372,53	122,61	3,04	2,78	$t_{cal} > t_{crit}$ $t_{cal} > t_{crit}$	$y = 7,06x + 72,53$

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear;

S_a e *S_b* = desvio padrão de cada coeficiente;

t_{crit} = valor obtido na literatura;

t_{calc,a} e *t_{calc,b}* = valor de *t* calculado e curva ajustada.

Tabela 6 - Análise estatística de significância dos parâmetros das curvas analíticas com superposição de matriz.

Composto	* <i>a</i>	<i>S_a</i>	<i>t_{calc,a}</i>	** <i>b</i>	<i>S_b</i>	<i>t_{calc,b}</i>	<i>t_{crit}</i>	Teste <i>t</i>	Curva ajustada
Ternatina	175,05	3,38	51,36	558,61	780,37	-0,72	2,57	$t_{cal} > t_{crit}$ $t_{cal} < t_{crit}$	$y = 175,05x$
Tanabalina	8,56	0,41	18,10	1728,00	200,38	8,62	2,78	$t_{cal} > t_{crit}$ $t_{cal} > t_{crit}$	$y = 8,56x + 1728$
Ácido centipédico	2,35	0,08	16,45	367,35	38,79	9,47	2,78	$t_{cal} > t_{crit}$ $t_{cal} > t_{crit}$	$y = 2,35x + 367,35$

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear;

S_a e *S_b* = desvio padrão de cada coeficiente;

t_{crit} = valor obtido na literatura;

t_{calc,a} e *t_{calc,b}* = valor de *t* calculado e curva ajustada.

No teste *t* de *Student* para a comparação dos valores absolutos dos parâmetros de regressão, observamos os valores dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas, que todos os analitos sofreram influência significativa da matriz sobre sua quantificação, visto que houve decréscimo nos coeficientes angulares nas curvas analíticas do solvente e da matriz.

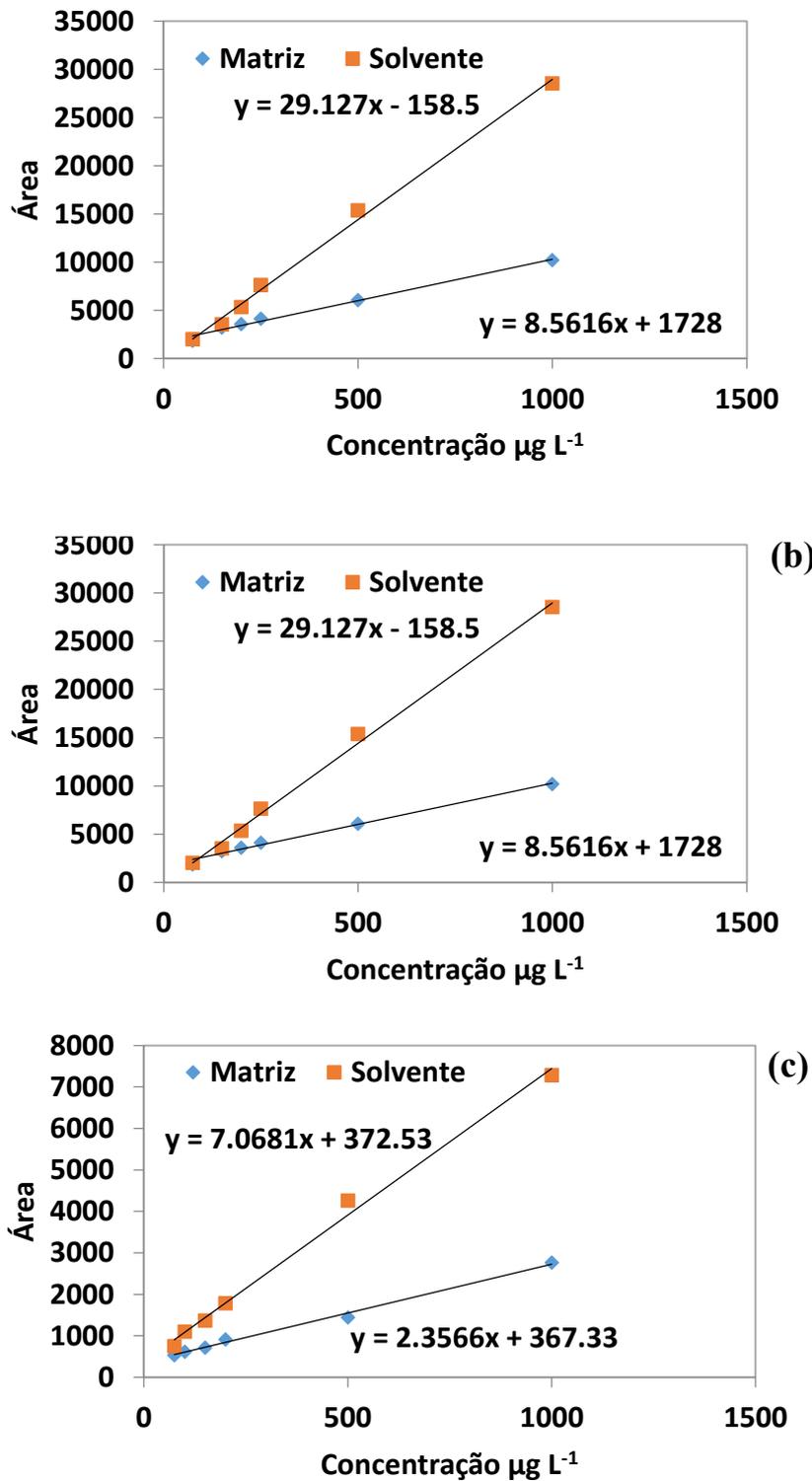
Essa constatação mostra que a matriz tem significativa influência sobre a exatidão na quantificação dos compostos, indicando que a curva de calibração analítica seja construída considerando a superposição de matriz (RIBANI *et al.*, 2004).

5.1.5 Efeito matriz

Em análises empregando fontes de ionização do tipo *electrospray* é muito comum a presença do efeito matriz, pois a presença de componentes coeluídos pode influenciar a intensidade do sinal do composto através de uma competição por cargas disponíveis e pelo acesso à superfície de gotas para emissão de fase gasosa, criando assim o chamado efeito matriz (WILM, 2011). Assim, pode-se considerar que a significativa diminuição, ou aumento, da sensibilidade dos compostos está associada ao efeito matriz, pois ocorre uma competição entre os co-extrativos (substâncias que podem interferir na resposta analítica) e os analitos, que suprime ou potencializa o sinal do analito.

A avaliação do efeito matriz foi conduzida com base na comparação estatística das inclinações (a) e interceptos (b) das curvas de calibração ajustadas obtidas no solvente puro e na matriz, preparadas conforme descrito na subseção 6.8.7 nos estudos de linearidade. Em cada analito, foram expressos como porcentagens das inclinações das curvas analíticas, ternatina (- 36,2 %), tanabalina (- 70,6%) e ácido centipédico (- 66,6%), caracterizando significativo efeito matriz para todos os compostos, onde o efeito se pronunciou de forma negativa. Esse efeito pode ser visualizado na Figura 14, p. 90, que exhibe as curvas analíticas no solvente e na matriz. Na literatura o efeito matriz não é considerado significativo, isto é, não influencia a análise quantitativa quando valores $< 20\%$ ou $> - 20\%$ são observados (WALORCZYK, 2014). Assim, para a infusão de *E. viscosa* os componentes da matriz influenciam diretamente na quantificação. Portanto, a quantificação dos compostos foi baseada na curva da matriz.

Figura 14 - Gráfico mostrando o efeito matriz para os compostos bioativos: (a) ternatina, (b) tanabalina e (c) ácido centipédico de *E. viscosa*.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os limites de detecção e quantificação descritos na Tabela 7 foram estimados pelo método da relação sinal / ruído. Os valores satisfatoriamente estimados para limites de detecção (LD) variaram entre 5 mg.kg⁻¹ e 12,5 mg.kg⁻¹ enquanto os valores de limite de quantificação (LQ) enquadraram-se entre 25 mg.kg⁻¹ e 37,5 mg.kg⁻¹.

Tabela 7 - Resultados dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) estimados para os compostos.

Composto	LD (mg.kg ⁻¹)	LQ (mg.kg ⁻¹)
Ternatina	5	25
Tanabalina	12,5	37,5
Ácido centipédico	12,5	37,5

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores estabelecidos para LD e LQ foram baseados na razão sinal/ruído entre a altura do sinal e do ruído, estabelecendo uma relação de aproximadamente 3 e 10, respectivamente. Os valores estabelecidos para os compostos mostraram-se confiáveis na quantificação, tendo em vista que estes analitos estão presentes na amostra em quantidades majoritárias, ou seja, não estão presentes em níveis traços, os limites de detecção e quantificação que foram determinados são aceitáveis para o escopo do método.

5.1.6 Precisão

A Tabela 8, p. 92, são relatados os resultados obtidos para a precisão, associados à repetitividade. Os ensaios foram conduzidos sob as mesmas condições de medição, mesmo dia, mesmo analista, mesmo equipamento. A precisão inter-corrída foi conduzida sob as mesmas condições citadas anteriormente, contudo, as análises foram realizadas em dias diferentes. Em seguida, foi calculado o desvio padrão correspondente às concentrações obtidas para cada analito (MAPA, 2011).

Tabela 8 - Dados de precisão (repetitividade e inter-corrida).

Composto	Precisão intra-dia *DP (%)				Precisão inter-dia *DP (%)			
	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	150 $\mu\text{g L}^{-1}$	250 $\mu\text{g L}^{-1}$	500 $\mu\text{g L}^{-1}$	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	150 $\mu\text{g L}^{-1}$	250 $\mu\text{g L}^{-1}$	500 $\mu\text{g L}^{-1}$
Ternatina	4,22	NI	3,81	1,49	4,24	NI	4,63	0,89
Tanabalina	NI	0,92	0,35	1,11	NI	0,89	1,17	0,88
Ácido centipédico	NI	6,04	3,41	1,00	NI	8,78	3,38	0,87

desvio padrão; NI, não informado.

Os valores para precisões intra-dia e inter-dia para ternatina, tanabalina e ácido centipédico foram expressos em percentual de desvio padrão, mostrando-se inferiores a 4,63, 1,17 e 8,78%, respectivamente. Esses valores foram satisfatórios, tendo como critério de aceitabilidade para a precisão valores máximos de 15% para critério de aceitação do parâmetro (MAPA, 2011).

5.1.7 Exatidão

Os ensaios de recuperação foram conduzidos de acordo com o procedimento descrito na subseção 6.8.9. Os resultados estimados a partir dos percentuais médios de recuperação e seus respectivos desvios padrão estão discriminados na Tabela 9, apresentando valores entre 85 a 115 %. O critério de aceitabilidade para a exatidão baseada no percentual de recuperação é dependente dos níveis de concentração considerados nos ensaios. Para resultados de recuperação de soluções com concentrações entre 1 ppb e 100 ppm, considera-se como aceitáveis valores entre 70 % e 120 % (RIBANI *et al.*, 2004).

Tabela 9 - Resultados obtidos para os ensaios de recuperação no estudo de exatidão do método.

	Recuperação (%)			
	25 $\mu\text{g L}^{-1}$	150 $\mu\text{g L}^{-1}$	250 $\mu\text{g L}^{-1}$	500 $\mu\text{g L}^{-1}$
Ternatina	86 ± 3,7	NI	99 ± 7,7	106 ± 5,7
Tanabalina	NI	81 ± 8,0	107 ± 10,9	86 ± 2,4
Ácido centipédico	NI	115 ± 2,9	108 ± 3,1	85 ± 9,1

NI, não informado, Fonte: Elaborada pela autora.

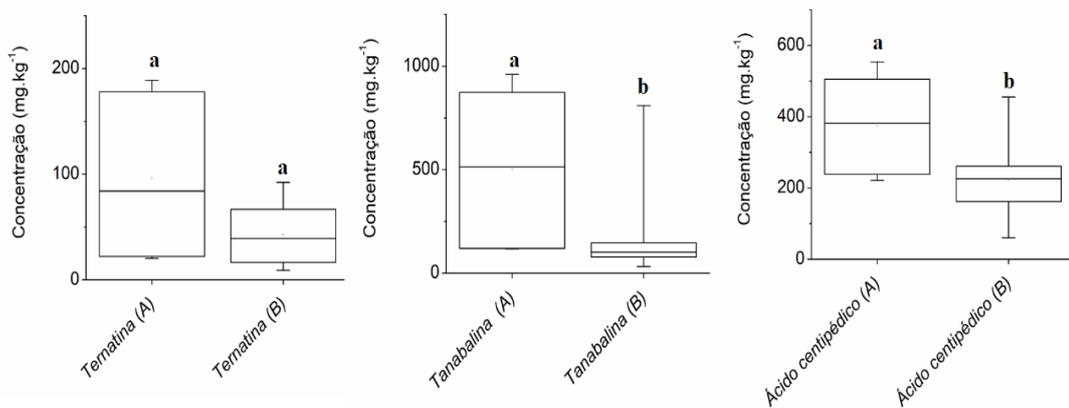
5.2 Quantificação dos compostos bioativos de *E. viscosa*

O método desenvolvido e validado foi aplicado a dezesseis amostras de capítulos florais de *E. viscosa*: infusões preparadas com materiais comerciais adquiridos entre março/2019 e novembro/2017 e materiais silvestre (Aiuaba e Tauá/Serrote de boi). As amostras foram classificadas quanto ao quimiotipo baseadas na extração e identificação química do óleo essencial. O objetivo foi estabelecer um método robusto que simultaneamente incorporasse os analitos em uma única ampla faixa linear aplicável à espécie.

Os resultados da quantificação dos analitos mostraram que a composição química das amostras de infusões de *E. viscosa* variou significativamente dependendo da origem e da época dos capítulos florais. A partir do perfil químico foi possível verificar a existência dos dois quimiotipos, como mostrado em um estudo anterior por Vieira *et al.* (2006) através de análise da composição volátil dos capítulos florais, ratificado nesse trabalho através da quantificação e identificação de seus constituintes. Portanto, os capítulos florais podem apresentar constituintes comuns a ambos os quimiotipos, ou diferentes e específicos para cada um deles. Os teores de ternatina, tanabalina e ácido centipédico variaram de 9,00 a 189,00 mg.kg⁻¹, 33,00 a 960,00 mg.kg⁻¹ e 60,00 a 553,00 mg.kg⁻¹, respectivamente (dados disponíveis no Apêndice A). De acordo com a análise ANOVA, o quimiotipo A contém mais tanabalina e ácido centipédico do que o quimiotipo B. No entanto, o teor da ternatina não é estatisticamente diferente para os dois quimiotipos (Figura 15, p. 94).

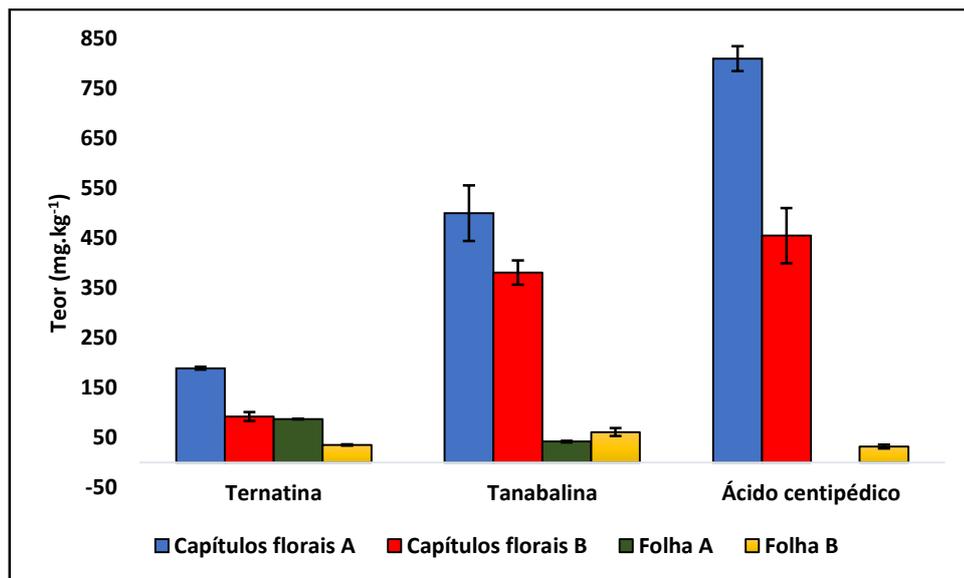
As infusões das folhas cultivadas dos dois quimiotipos (baseado na morfologia das folhas) foram submetidas a análise por CLUE-QDa-MIS. Curiosamente, a presença dos compostos bioativos foi confirmada. Numa análise comparativa entre os extratos das partes aéreas, pôde-se observar que os teores dos constituintes bioativos nas folhas foram inferiores à encontrada nos capítulos florais (Figura 16, p. 94). Nas amostras investigadas, a ocorrência desses compostos foi detectada em maiores concentrações no quimiotipo A.

Figura 15 - Teores de ternatina, tanabalina e ácido centipédico (mg.kg^{-1}) da infusão dos capítulos florais de *E. viscosa*, determinados por análise de CLUE-QDa MIS.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16 - Teores de ternatina, tanabalina e ácido centipédico (mg.kg^{-1}) da infusão das partes aéreas de *E. viscosa*, determinados por análise de CLUE-QDa MIS.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 Espectroscopia no infravermelho próximo (IVp)

5.3.1 Discriminação de quimiotipos de *E. viscosa* nos capítulos florais com base no conjunto de dados IVp

Vários métodos analíticos têm sido empregados para determinar a autenticidade de materiais vegetais. As técnicas mais comumente usadas para a autenticidade incluem cromatografia líquida e gasosa e técnicas espectroscópicas (infravermelho e ressonância magnética nuclear). A espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada como um método

para determinar a autenticidade de amostras de plantas através do uso do infravermelho próximo. O IVp, (do inglês, NIR - *Near Infrared Spectroscopy*) fornece facilidade para uma avaliação rápida e não destrutiva de matérias-primas. Esse método acoplado com ferramentas quimiométricas permitiu discriminar os dois quimiotipos de *E. viscosa*.

A maioria das bandas de absorção na região do infravermelho próximo são bandas harmônicas ou de combinação das bandas de absorção fundamentais na região do infravermelho do espectro eletromagnético, que são decorrentes de transições vibracionais e rotacionais. A Figura 17, p. 97 mostra os espectros de IVp de algumas amostras de capítulos florais de *E. viscosa*. Os espectros das amostras na figura evidenciam a variabilidade dos dados de IVp como uma função da composição química entre as amostras. Os espectros são claramente muito semelhantes e são dominados pelos grupamentos funcionais O-H, C-H e uma banda de combinação em 1930 nm (Figura 18, p. 98). Observa-se no espectro uma banda de absorção em 1185 nm, que pode ser atribuída ao segundo sobretom do estiramento das ligações C-H de grupos CH₃ e CH₂. As absorções em 1432, 1930 e 2155 nm são devidas aos primeiros sobretoms do estiramento da ligação e combinações de alongamento de O-H e deformação. O aparecimento destas bandas nas amostras é justificado pela presença de álcoois monoterpênicos encontrados no óleo essencial dos capítulos florais de *E. viscosa*. Além disso, as bandas em 1696 e 1815 nm podem ser atribuídas ao primeiro sobretom do estiramento da ligação C-H associado a uma ligação dupla de carbono C=C, provavelmente de compostos monoterpênicos (NG; WEHLING; CUPPETT, 2011).

Em virtude da alta similaridade dos espectros, o uso de métodos estatísticos multivariados sofisticados foi essencial para se extrair informações úteis dos espectros de IVp. Então, um método de análise discriminante por mínimos quadrados ordinários (PLS-DA) foi desenvolvido para discriminar os dois quimiotipos de capítulos florais de *E. viscosa*: o quimiotipo A, rico em acetato *trans*-pinocarveila, o quimiotipo B, formado principalmente por seu isômero acetato de *cis*-isopinocarveila. Inicialmente, essa modelagem de classificação binária foi obtida usando todo o conjunto de dados do espectro IVp.

Posteriormente, o uso de um método por mínimos quadrados parciais de intervalo (iPLS) permitiu selecionar a região espectral mais relevante para a classificação dos quimiotipos (Figura 19a, p. 98). O método iPLS é baseado na divisão do espectro em intervalos menores seguido pela obtenção dos modelos de regressão PLS para cada intervalo usando o mesmo número de variáveis latentes (VL). Essa etapa é de fundamental importância nos resultados a serem obtidos. Um modelo contendo um número de VLs inferior ao ideal resultará em subajuste, pois não irá considerar na totalidade a informação contida no conjunto de dados.

Por outro lado, um número elevado de VLs aumentará o ruído e os erros de modelagem, resultando em um sobreajuste. Desse modo, foram selecionadas 3 VLs, pois 96,49% das amostras de todas as classes são classificadas corretamente com este número de variáveis (Figura 19b, p. 98).

A eficiência dos modelos de calibração multivariada pode ser avaliada pelo cálculo dos valores da raiz quadrada do erro quadrático médio (RMSE – do inglês, *root mean square error*), os quais expressam a exatidão do modelo, ou seja, a proximidade entre o valor calculado pelo modelo e o valor verdadeiro ou obtido por um método de referência. Tais valores podem ser calculados através da equação 16 na subseção 6.9.1. De acordo com os valores de RMSECV (erro médio quadrático da validação cruzada) do iPLS, o modelo usando a região espectral entre 1647-1680, 1810-1884, 1933-1965 e 2014-2169 nm apresentou a melhor capacidade de classificação para os quimiotipos de *E. viscosa*.

A Figura 19c, p. 98, apresenta as pontuações para a classificação binária de 80 espectros IVp obtidos em quintuplicatas de *E. viscosa* com base no quimiotipo.

Figura 17 - Espectros de IVp das amostras dos capítulos florais de *E. viscosa* do quimiotipo A (espectros de cima) e quimiotipo B (espectros de baixo).

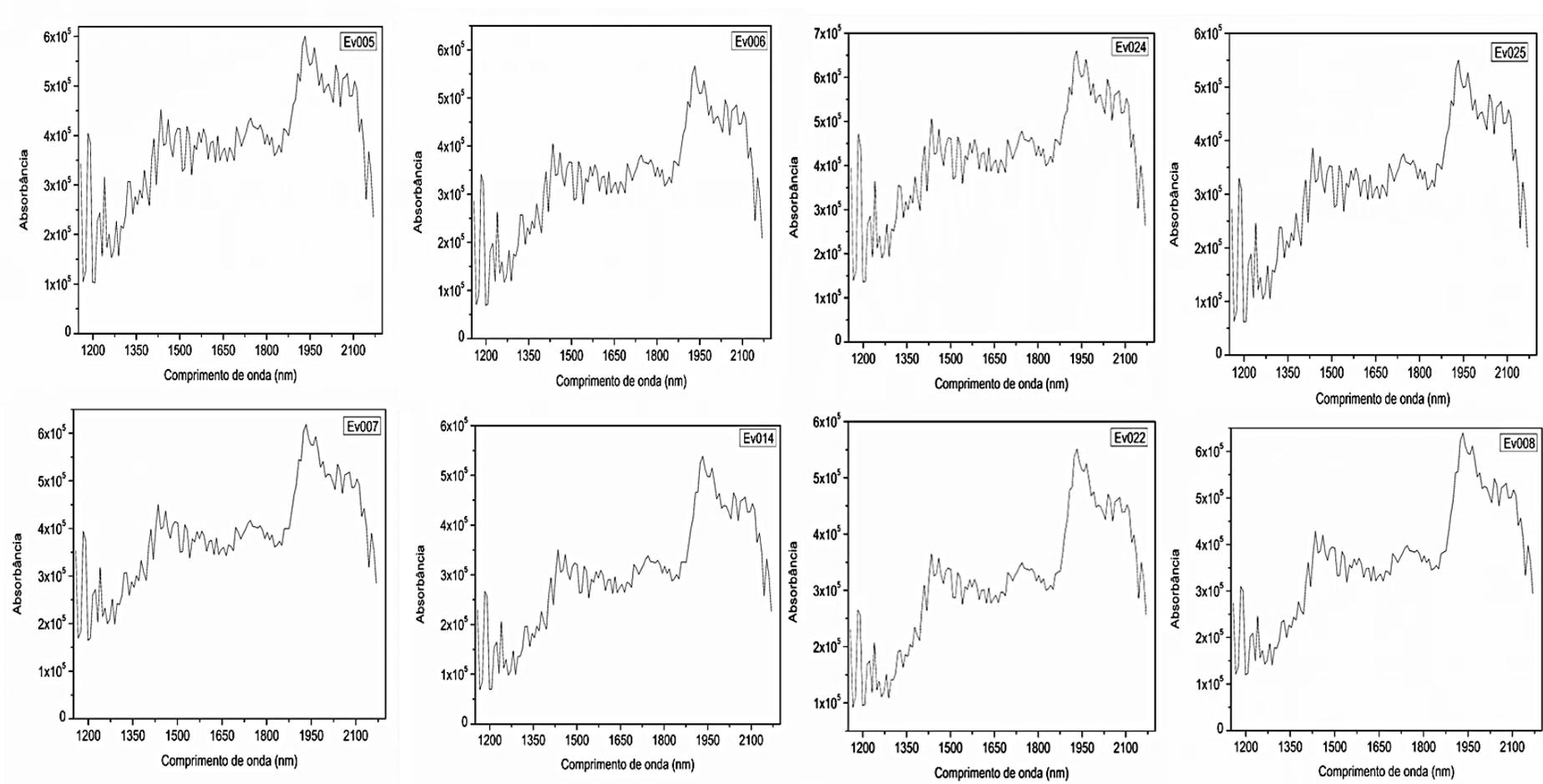


Figura 18 - Espectro de IVp dos capítulos florais de *E. viscosa*.

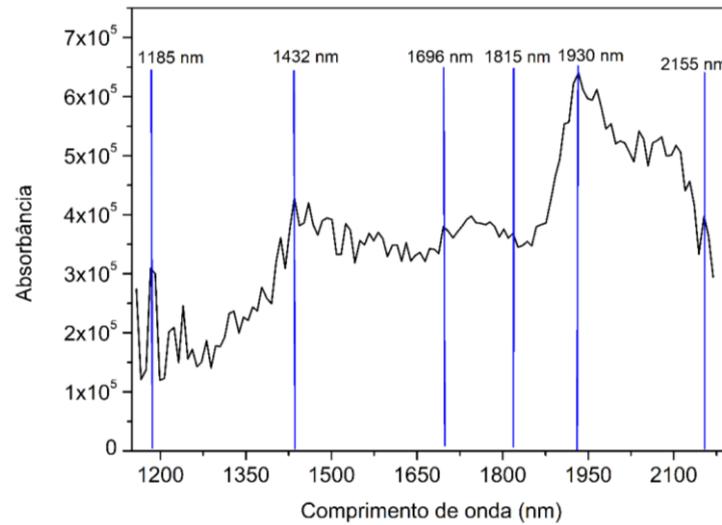
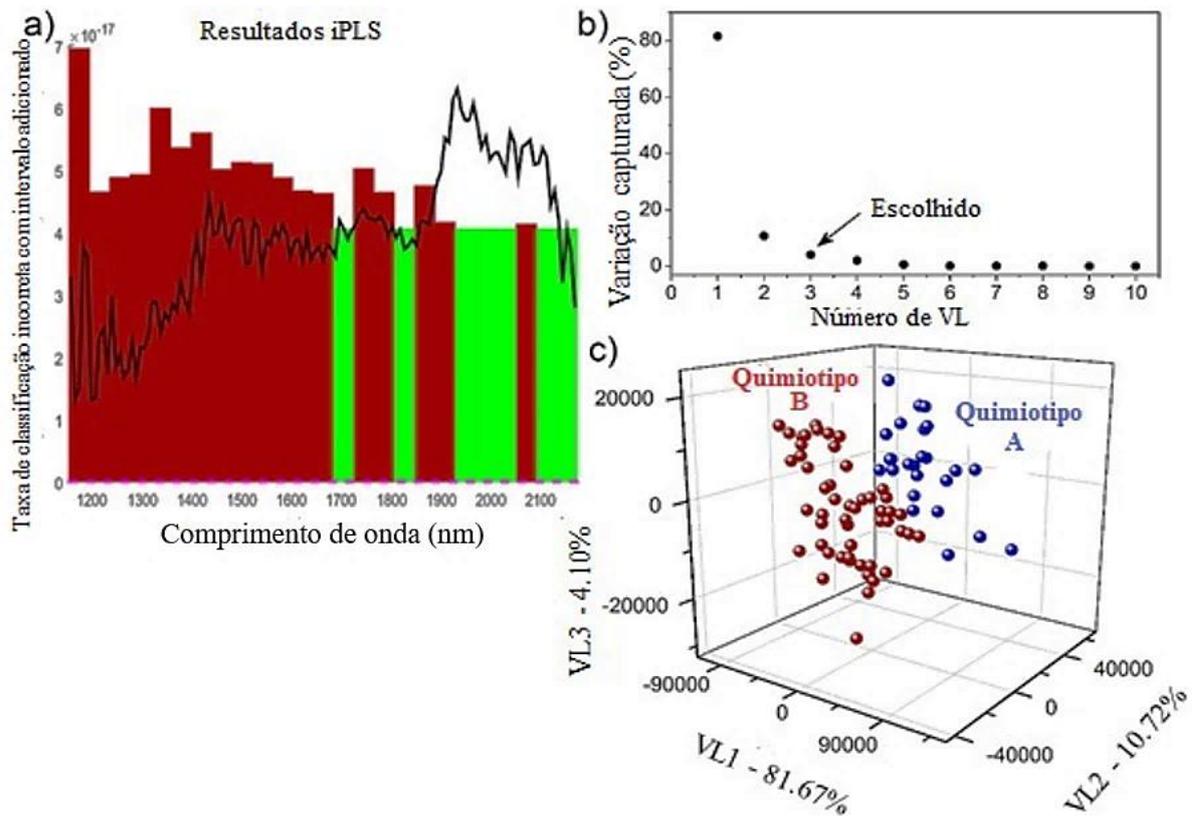


Figura 19 - Média dos espectros IVp de capítulos florais de *E. viscosa* (linha preta), com a área espectral selecionada por iPLS (faixa verde); b) Variância capturada (%) em função do número de VL; c) Predição de pontuação do modelo de validação cruzada para classificação binária de capítulos florais de *E. viscosa* com maiores quantidades de acetato de *trans*-pinocarveila (quimiotipo A como bolas azuis) e maiores quantidades de acetato de *cis*-isopinocarveila (quimiotipo B como bolas vermelhas).



As absorvâncias entre 1647 e 1884 nm estão relacionadas ao estiramento C-H, enquanto as bandas entre 1933 e 2169 nm podem ser atribuídas ao grupamento funcional O-H (MAGWAZA *et al.*, 2012). De fato, essas bandas são amplamente encontradas em muitos compostos orgânicos, incluindo os monoterpenos que compõem o óleo essencial de *E. viscosa*, através dos quais os quimiotipos de seus capítulos florais tradicionalmente se distinguem entre si.

A acurácia da classificação do modelo PLS-DA para a discriminação dos quimiotipos de *E. viscosa* foi determinada pela análise da matriz de confusão, como pode ser visto no Apêndice C, utilizando a capacidade de predição do agrupamento de quimiotipos sob a “regra mais provável”. A Tabela 10, p. 100, descreve os respectivos parâmetros estatísticos utilizados para avaliar a qualidade da modelagem. Os valores de positivo verdadeiro (PV); falso positivo (FP); verdadeiro negativo (VN); falso negativo (FN) foram determinados através da análise da matriz de confusão. A partir desses dados foram obtidos os valores de sensibilidade, especificidade, precisão e coeficiente de correlação de Matthews (MCC), de acordo com as fórmulas aplicadas para cada parâmetro, conforme mostrados na subseção 6.9.1 (STEDMON; BRO 2008; BALLABIO; CONSONNI, 2013). O modelo mostrou-se bem ajustado, uma vez que os valores encontrados para esses parâmetros estavam próximos a 1. O parâmetro sensibilidade foi capaz de distinguir duas amostras, com uma certa confiança. A especificidade denota a capacidade de se detectar uma amostra na presença de outros componentes. Além disso, a alta precisão na discriminação dos quimiotipos foi evidenciada através do coeficiente de correlação de Matthews (MCC), que indica a perfeita separação entre os dois quimiotipos. Os baixos erros de calibração e validação cruzada (RMSEC e RMSECV), bem como o alto índice de similaridade (RMSEC / RMSECV), além dos altos coeficientes de correlação de calibração (r^2 cal) e validação cruzada (r^2 VC) corroboraram a grande capacidade de classificação da modelagem (FREITAS *et al.*, 2018). Por fim, os valores baixos de *bias* mostraram uma excelente capacidade preditiva para o modelo.

Tabela 10 - Parâmetros de validação cruzada para a acurácia de classificação derivados da matriz de confusão com base nas análises de IVp para os capítulos florais dos quimiotipos A e B de *E. viscosa*, usando três variáveis latentes (3 VL).

<i>Parâmetros</i>	<i>Quimiotipo A</i>	<i>Quimiotipo B</i>
<i>Sensibilidade</i>	0,96	0,94
<i>Falso Positivo</i>	0,06	0,04
<i>Especificidade</i>	0,94	0,96
<i>Falso Negativo</i>	0,04	0,06
<i>Erro</i>	0,05	0,05
<i>Precisão</i>	0,89	0,98
<i>MCC</i>	0,89	0,89
<i>RMSEC^a</i>	0,24	0,24
<i>RMSECV^b</i>	0,26	0,26
<i>RMSEC / RMSECV^c</i>	0,92	0,92
<i>Bias</i>	$-1,9 \times 10^{-15}$	$-2,0 \times 10^{-15}$
<i>CV Bias</i>	0,0001	0,0001

^a erro quadrático médio de calibração da raiz;

^b Erro quadrático médio da raiz da validação cruzada;

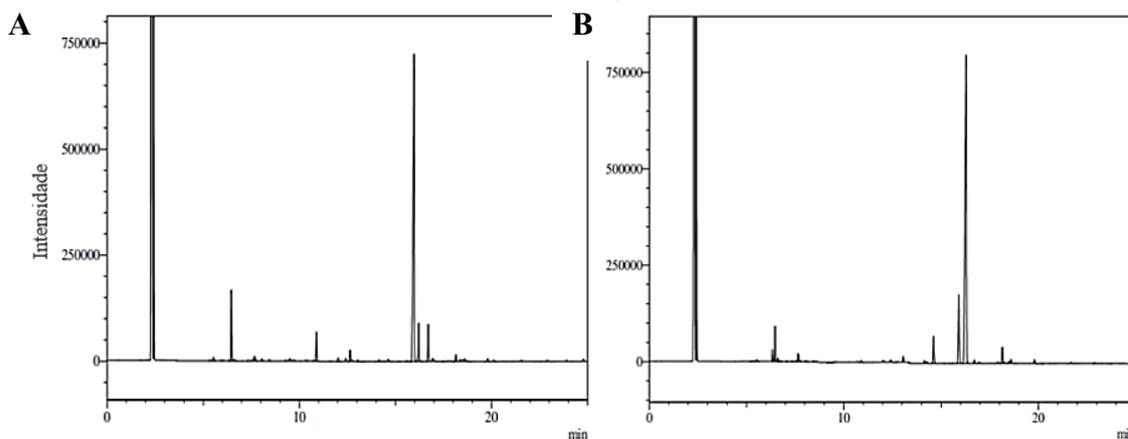
^c Índice de similaridade.

5.3.2 *Correlação entre o conjunto de dados IVp e o conteúdo de acetato de trans-pinocarveíla e acetato de cis-isopinocarveíla*

Devido à grande exatidão e capacidade de classificação do modelo, como pode ser observado os valores dos parâmetros estatísticos, para discriminar quimiotipos de *E. viscosa* através do conjunto de dados IVp, hipotetizamos que a resposta IVp estaria correlacionada com o conteúdo de seus respectivos compostos principais. Assim, a princípio poderíamos quantificá-los usando a análise de IVp em vez da análise demorada e destrutiva realizada por cromatografia gasosa. Nesse sentido, aplicamos um modelo de predição multivariada baseado em PLS ao conjunto de dados IVp associado apenas às áreas absolutas de acetato de *trans*-pinocarveíla e acetato de *cis*-isopinocarveíla no cromatograma CG-DIC (Apêndice B). Os cromatogramas de CG-DIC podem ser visualizados na Figura 20, p. 101. No entanto, essa suposta correlação não foi confirmada, como pode ser verificado pelos baixos coeficientes de correlação e altos erros (Tabela 11, p. 101). Além disso, as curvas de regressão evidenciam a baixa capacidade de predição do modelo, comparando as concentrações previstas e reais (Figura 21, p. 102). O fato dos compostos *trans*-pinocarveíla e *cis*-isopinocarveíla serem isômeros justifica os resultados obtidos por IVp. Os resultados obtidos do conjunto de dados de IVp associado às áreas absolutas

dos isômeros no CG-DIC sugere que outros constituintes contribuem para a discriminação dos quimiotipos de *E. viscosa*.

Figura 20 - Cromatogramas dos óleos essenciais obtidos em CG-DIC dos capítulos florais de *E. viscosa*. A: quimiotipo A (Ev024) e B: quimiotipo B (Ev017).



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 11 - Parâmetros estatísticos de modelos de regressão multivariada usando três variáveis latentes (3 VL) para os quimiotipos A e B de acordo com as respectivas quantidades de acetato *trans*-pinocarveíla e acetato *cis*-isopinocarveíla (área absoluta no cromatograma CG-DIC).

Parâmetros	Quimiotipo A	Quimiotipo B
$RMSEC^a$	$1,8 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
$RMSECV^b$	$1,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
$r^2 \text{ cal.}^c$	0,38	0,69
$r^2 \text{ CV.}^d$	0,31	0,62

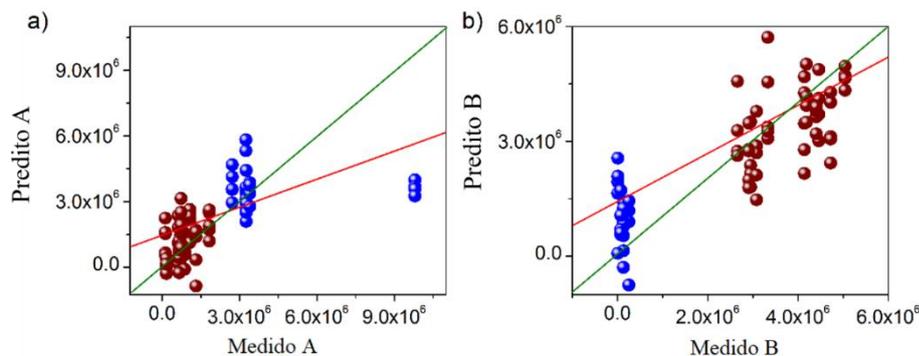
^a erro quadrático médio de calibração da raiz;

^b Erro quadrático médio da raiz da validação cruzada;

^c Coeficiente de correlação entre o quimiotipo real e o previsto durante a calibração.

^d Coeficiente de correlação entre o quimiotipo real e o previsto durante a validação cruzada.

Figura 21 - Teste de validação cruzada para a quantidade predita \times medida de acetato de *trans*-pinocarveíla (a) e acetato de *cis*-isopinocarveíla (b) (expresso como área absoluta no cromatograma CG-DIC). A curva de regressão verde é a correlação perfeita entre o valor real e o predito pelo modelo, e a curva vermelha representa a correlação real.

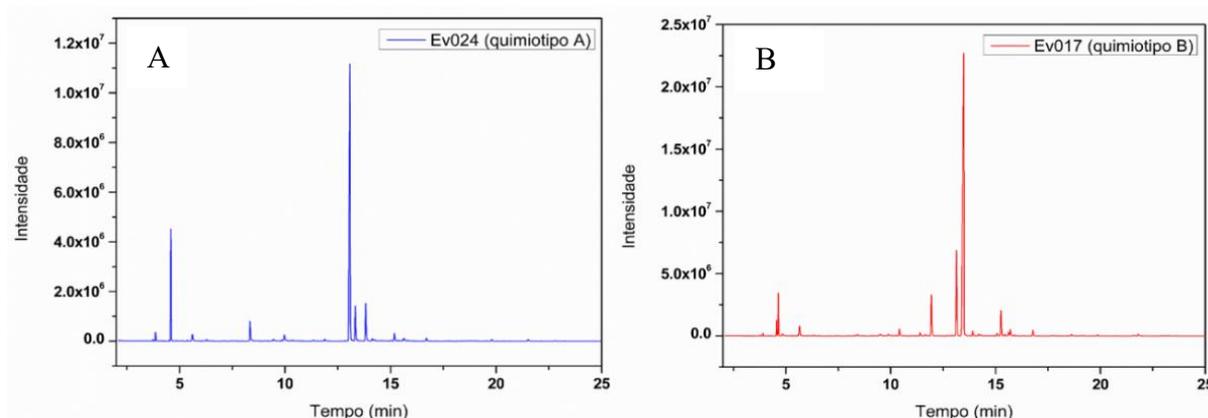


5.3.3 Identificação de marcadores voláteis para o conjunto de dados CG-EM.

Como a resposta IVp mostrou uma baixa correlação com o conteúdo de acetato de *trans*-pinocarveíla e de *cis*-isopinocarveíla de acordo com o modelo PLS anterior, buscamos outros compostos discriminantes para os quimiotipos de *E. viscosa*. A Figura 22, p. 103, apresenta os cromatogramas dos óleos essenciais dos capítulos florais analisados por CG-EM (do inglês, *CG-MS Gas Chromatography Mass Spectrometry*). Assim, um método de análise discriminante por mínimos quadrados ordinários (PLS-DA) foi desenvolvido para o conjunto de dados de CG-EM dos óleos essenciais de 16 variedades de *E. viscosa* (Figura 23, p. 103). De acordo com os resultados do PLS-DA, as amostras do quimiotipo A agruparam-se em escores positivos de VL1 de acordo com o conteúdo de acetato de *trans*-pinocarveíla (quimiotipo A, azuis). Por outro lado, as amostras do quimiotipo B foram agrupadas em escores negativos de VL1, com base na quantidade de acetato de *cis*-isopinocarveíla (quimiotipo B, vermelhas) (Figura 23a, p. 103). No gráfico de pesos (Figura 23b, p. 103), observou-se a presença abundante no quimiotipo A dos compostos: β -pineno ($t_r = 4,68$ min; 1,52-25,60%), *trans*-pinocarveol ($t_r = 8,46$ min; 0,29-11,33%); acetato de *trans*-pinocarveíla ($t_r = 13,22$ min; 2,09-64,73%) e acetato de mirtenila ($t_r = 13,98$ min; 0,97-6,00%). Para o quimiotipo B, os compostos: *trans*-carveol ($t_r = 10,47$ min; 0,70-8,01%), acetato de *cis*-crisantenila ($t_r = 12,01$ min; 0,10-4,85%) e acetato de *cis*-isopinocarveíla ($t_r = 13,54$ min; 1,25-82,49%). Além disso, a importância da variável no gráfico de projeção (VIP) foi então usada para identificar quais compostos voláteis mais contribuíram para o agrupamento ou tendências observadas nos dados (Figura 23c, p. 103) revelando que esses compostos são responsáveis pela separação das amostras. A Figura 24, p. 104, apresenta as estruturas dos constituintes químicos voláteis

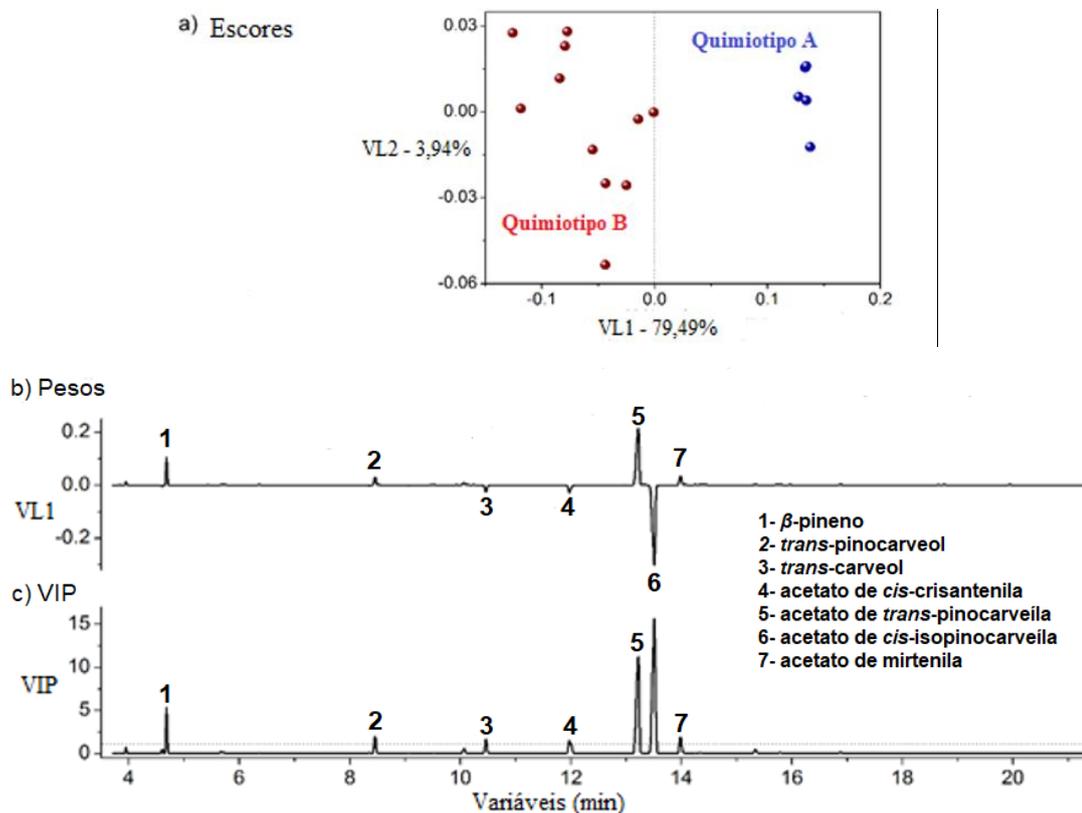
responsáveis pela separação das amostras. A composição química global e estruturas de todos os compostos voláteis identificados estão disponíveis no Apêndice D-F.

Figura 22 - Cromatogramas dos óleos essenciais obtidos em CG-EM dos capítulos florais de *E. viscosa*. A: quimiotipo A (Ev024) e B: quimiotipo B (Ev017).



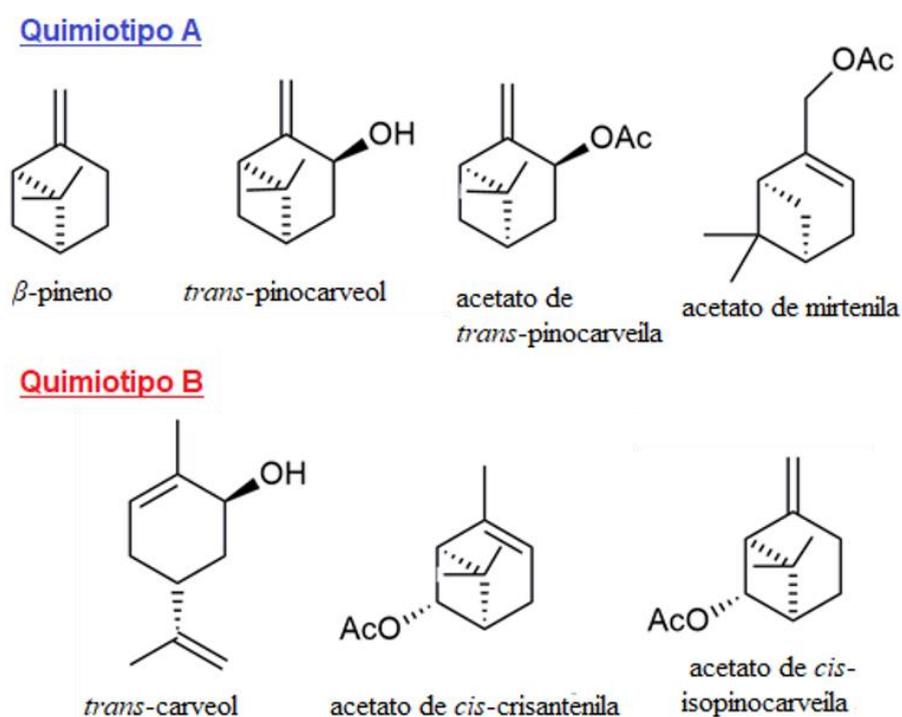
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 23 - Variabilidade dos quimiotipos de *E. viscosa* com base no conjunto de dados CG-EM de seus óleos essenciais: escores VL1 \times VL2 (a), gráfico de pesos para a discriminação de quimiotipos (b), de acordo com o gráfico de importância das variáveis na projeção (c).



Além disso, a elevada exatidão de classificação do modelo PLS-DA pode ser verificada com erros de classificação zero, além de valores máximos de sensibilidade, especificidade, precisão e coeficiente de correlação de Matthews (MCC) (Tabela 12, p. 105) (STEDMON; BRO, 2008; BALLABIO; CONSONNI, 2013; BALLABIO *et al.*, 2015; JENSEN *et al.*, 2005). Esses valores foram determinados pela análise da matriz de confusão (Apêndice Q), bem como empregando as fórmulas conforme pode ser visualizado na subseção 6.9.1. Os valores obtidos foram iguais a 1 para sensibilidade, especificidade, precisão e MCC o que permitiu uma maior capacidade de classificação do modelo. Baixos erros de calibração e validação cruzada (RMSEC e RMSECV), bem como o alto índice de similaridade (RMSEC / RMSECV), além dos baixos valores de *bias* mostraram a capacidade de predição do modelo.

Figura 24 - Principais constituintes dos óleos essenciais de capítulos florais dos quimiotipos A e B de *E. viscosa*.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 12 - Parâmetros de validação cruzada avaliados na acurácia da classificação do modelo PLS-DA para discriminação dos dois quimiotipos de *E. viscosa* usando o conjunto de dados CG-EM de seus óleos essenciais.

<i>Parâmetros</i>	<i>Quimiotipo A</i>	<i>Quimiotipo B</i>
<i>Sensibilidade</i>	1,00	1,00
<i>Falso Positivo</i>	0,00	0,00
<i>Especificidade</i>	1,00	1,00
<i>Falso Negativo</i>	0,00	0,00
<i>Erro</i>	0,00	0,00
<i>Precisão</i>	1,00	1,00
<i>MCC</i>	1,00	1,00
<i>RMSEC^a</i>	0,13	0,13
<i>RMSECV^b</i>	0,21	0,21
<i>RMSEC / RMSECV^c</i>	0,62	0,62
<i>Bias</i>	$-1,1 \times 10^{-16}$	$5,5 \times 10^{-17}$
<i>Bias VC</i>	-0,02	0,02

^a Erro quadrático médio de calibração da raiz;

^b Erro quadrático médio da raiz da validação cruzada;

^c Índice de similaridade.

A acurácia da classificação do modelo PLS-DA para a discriminação dos quimiotipos de *E. viscosa* foi determinada pela análise da Matriz de Confusão como pode ser visto no Apêndice Q.

5.4 Discriminação de quimiotipos de *E. viscosa* usando o conjunto de dados de espectroscopia de RMN.

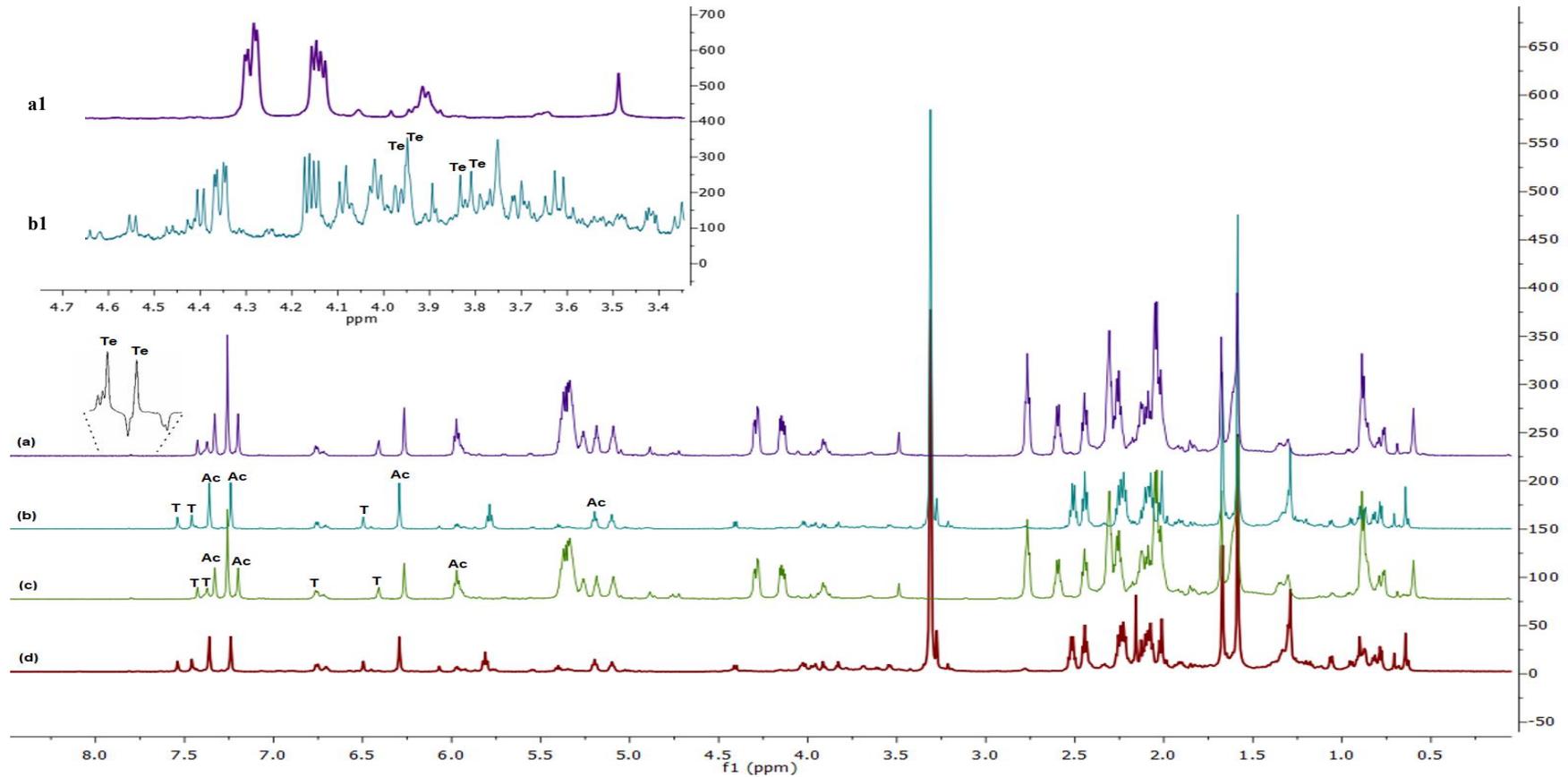
Buscando outros métodos analíticos rápidos que pudessem revelar compostos discriminantes não voláteis, mas também quantificá-los, desenvolveu-se um método RMNq ¹H acoplado a ferramentas quimiométricas para discriminação de quimiotipos de *E. viscosa*, como foi realizado no conjunto de dados IVp. No entanto, em primeiro lugar, a preparação da amostra foi otimizada para garantir níveis detectáveis e quantificáveis dos metabólitos secundários não voláteis. Nesse sentido, os melhores resultados foram alcançados solubilizando os capítulos florais em pó (25 mg) em CD₃OD (600 µL), uma vez que os sinais de RMN ¹H associados à ternatina (em menor quantidade) foram atribuídos e mais intensos do que nos espectros

registrados em CDCl_3 (Figura 25, p. 107). Com relação à quantidade de amostra, a massa mínima investigada (25 mg) mostrou-se suficiente para a detecção e quantificação dos compostos bioativos (Figura 26, p. 108).

Os espectros de RMN de ^1H exibiram sinais em δ 7,35 (s, H-17), 7,23 (s, H-16) e 6,28 (s, H-15), que eram consistentes com os esperados para hidrogênios do anel furânico do ácido centipédico. Os sinais em δ 7,54 (s, H-15), 7,45 (s, H-16) e 6,74 (dd, $J = 7,2$ Hz, H-15) foram atribuídos aos hidrogênios do anel furânico e olefinicos da tanabalina, enquanto aqueles em δ 7,80 (s, H-6') 7,75 (d, $J = 8,1$ Hz, H-2') foram compatíveis com hidrogênios aromáticos da ternatina. Além disso, a trilinoleína foi caracterizada pelos sinais em δ 5,34 (m, H-9, H-10, H-12 e H-13), 2,77 (t, $J = 6,8$ Hz) e 2,34 (t, $J = 7,4$, H-2). Através de comparação com dados na literatura, os sinais dos triglicerídeos foram reconhecidos (ALEMANY, 2002; NIEVA-ECHEVARRIA, *et al.*, 2014). Os sinais em δ 4,15 (dd, $J = 12,1$; 6,3 Hz, CH_2 glicerol) e δ 4,35 (dd, $J = 12,1$; 3,7 Hz, CH_2 glicerol) foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos do glicerol. O sinal em δ 5,21(m) foi compatível ao hidrogênio metínico da unidade glicerol. De fato, esses compostos foram atribuídos de maneira inequívoca através de experimentos de RMN 2D (Apêndice G-P) e por comparação com os dados da literatura. As atribuições estão descritas no Apêndice S.

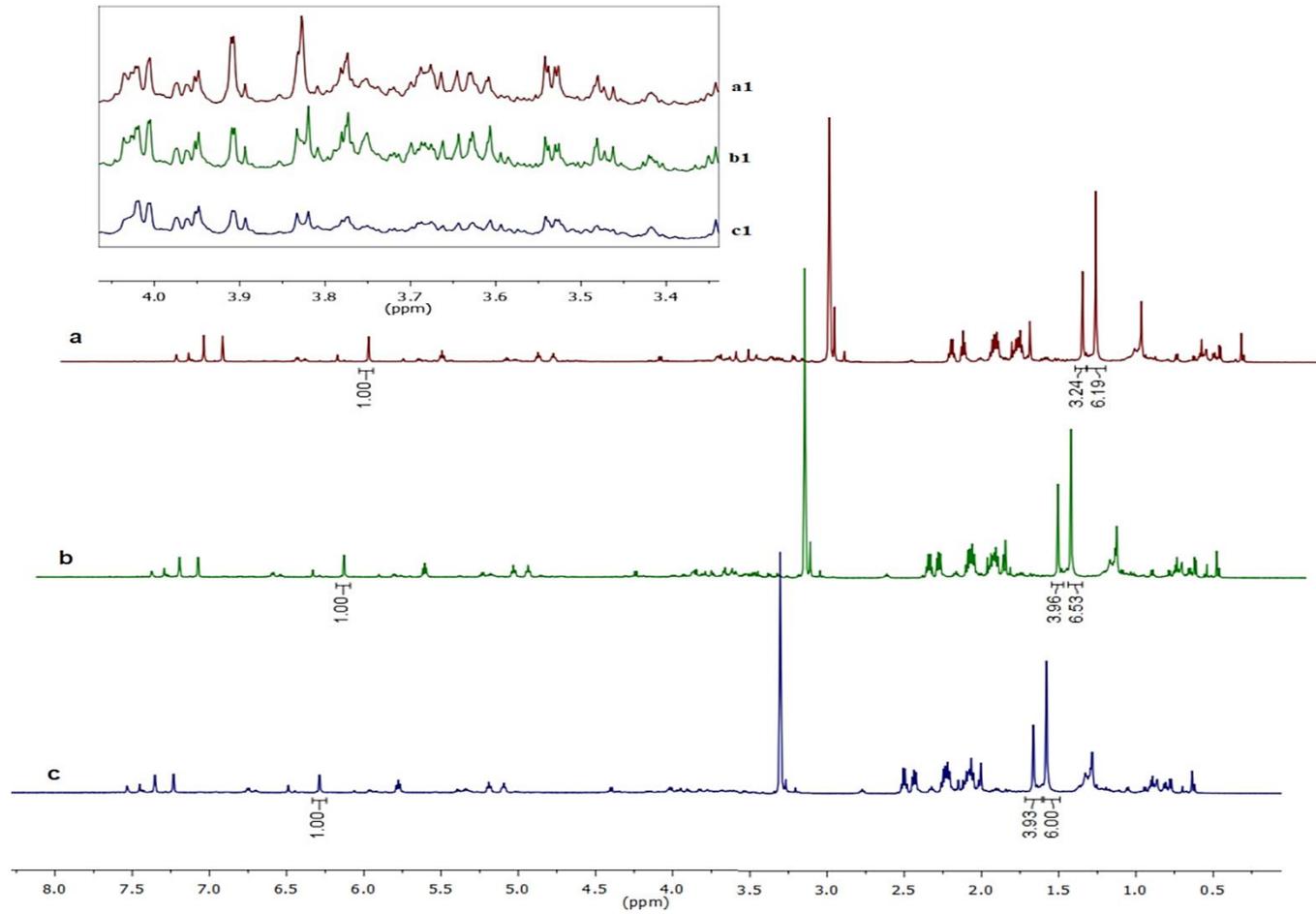
Assim, um método PLS-DA foi aplicado ao conjunto de dados de RMN para classificação dos quimiotipos de *E. viscosa*, usando as condições de amostragem mencionadas acima. A Figura 27, p. 109, ilustra os escores (a) e os pesos relevantes (b) da análise multivariada para a atribuição de amostras, apresentando tendências de agrupamento e *outliers* com nível de confiança de 95%. Uma clara tendência de separação dependente do quimiotipo foi observada principalmente no eixo VL1. As amostras de *E. viscosa* localizadas em escores negativos de VL1 foram basicamente aquelas previamente classificadas como quimiotipo A, as quais continham maiores teores de ternatina, tanabalina e ácido centipédico. Por outro lado, amostras de *E. viscosa* com escores positivos pertenciam ao quimiotipo B e apresentaram maiores teores de trilinoleína.

Figura 25 - Espectro RMN ^1H (600 MHz) de capítulos florais de *E. viscosa* (25,0 mg): amostras do quimiotipo A (Ev024) extraídas com CDCl_3 (a) e CD_3OD (b); amostras do quimiotipo B (Ev017) extraídas com CDCl_3 (c) e CD_3OD (d); expansões da região entre 3,3 – 4,7 (a1 e b1); Sinais dos compostos: Te: ternatina; T: tanabalina e Ac: ácido centipédico.



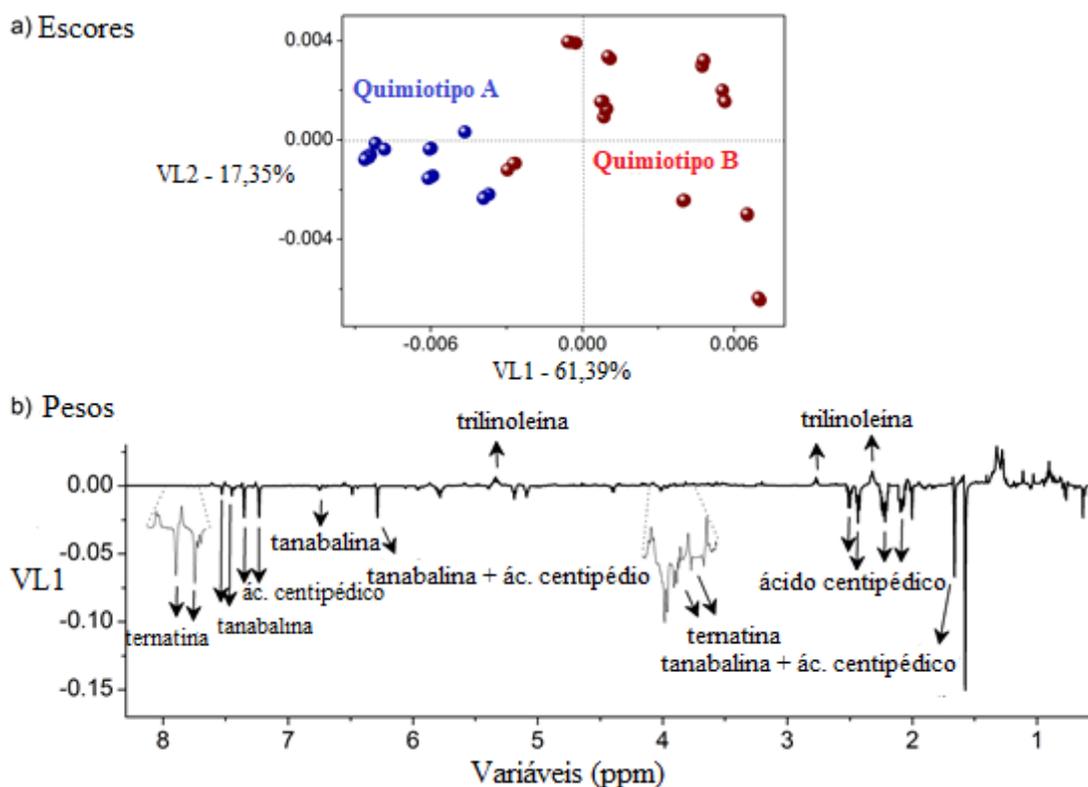
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 26 - Espectros de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) de capítulos florais pulverizados de *E. viscosa* do quimiotipo B (Ev034): (a) 100,0 mg; (b) 50,0 mg e (c) 25,0 mg e expansões da região entre 3,3 a 4,1 (a1, b1 e c1).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 27 - Variabilidade dos quimiotipos de *E. viscosa* com base no conjunto de dados de RMN de ^1H : gráfico de escores VL1 \times VL2 (a) e pesos (b) para discriminação dos quimiotipos: A em bolas azuis e B em bolas vermelhas.



Conforme desenvolvido para as análises IVp e CG, a acurácia da classificação do modelo PLS-DA para a discriminação dos quimiotipos de *E. viscosa* foi determinada pela análise da matriz de confusão seguida pela avaliação dos seus parâmetros estatísticos (Apêndice R). Da mesma forma que os outros dois métodos, o modelo para dados de RMN demonstrou alta sensibilidade, especificidade, precisão e coeficiente de correlação de Matthews (MCC), portanto, é capaz de fornecer uma discriminação confiável dos quimiotipos resultante das diferenças entre seus constituintes não voláteis (Tabela 13, p. 110).

De fato, um estudo fitoquímico anterior apontou que os quimiotipos de *E. viscosa* também eram diferentes em relação à composição química não volátil. Vieira *et al.* (2006) constataram que alguns constituintes estavam presentes apenas em um de seus quimiotipos ou quantitativamente divergentes nos extratos aquosos preparados com capítulos florais dos dois quimiotipos cultivados. Além disso, estudos citogenéticos e de variabilidade genética revelaram duas seqüências distintas para cada tipo químico com base no seqüenciamento do DNA ribossômico de suas folhas, sugerindo que os quimiotipos de *E. viscosa* poderiam realmente ser

duas variedades ou espécies distintas (BATISTA *et al.*, 2012).

Tabela 13 - Parâmetros de validação cruzada avaliados na acurácia da classificação do modelo PLS-DA para discriminação dos dois quimiotipos de *E. viscosa* usando o conjunto de dados RMN.

<i>Parâmetros</i>	<i>Quimiotipo A</i>	<i>Quimiotipo B</i>
<i>Sensibilidade</i>	1,0	1,0
<i>Falso Positivo</i>	0,0	0,0
<i>Especificidade</i>	1,0	1,0
<i>Falso Negativo</i>	0,0	0,0
<i>Erro</i>	0,0	0,0
<i>Precisão</i>	1,0	1,0
<i>MCC</i>	1,0	1,0
<i>RMSEC^a</i>	0,15	0,15
<i>RMSECV^b</i>	0,17	0,17
<i>RMSEC / RMSECV^c</i>	0,88	0,88
<i>Bias</i>	$-5,5 \times 10^{-17}$	$-1,1 \times 10^{-16}$
<i>CV Bias</i>	0,007	-0,007

^a Erro quadrático médio de calibração da raiz;

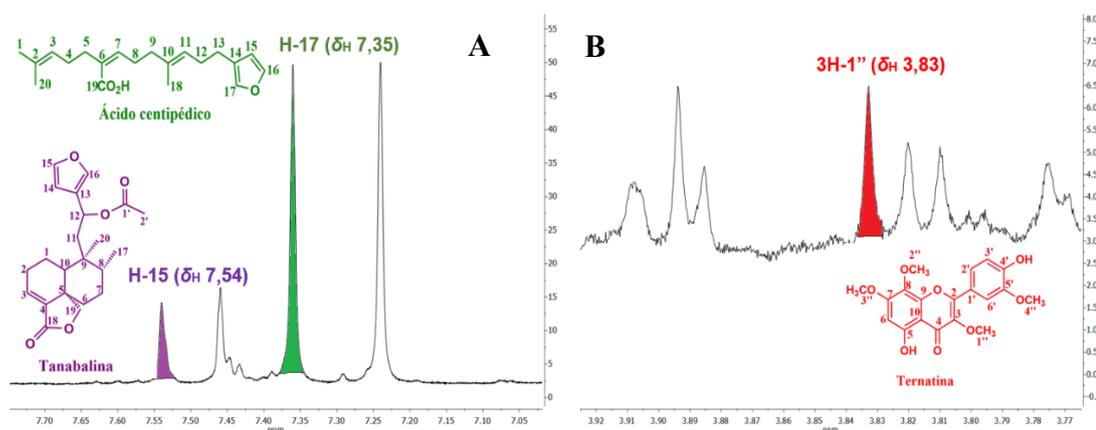
^b Erro quadrático médio da raiz da validação cruzada;

^c Índice de similaridade.

5.4.1 *Quantificação dos compostos bioativos em capítulos florais de E. viscosa por RMNq de ¹H.*

A Figura 28, p. 111, mostra as expansões do espectro e seus respectivos sinais integrados na quantificação dos compostos por RMNq ¹H. A Figura 29, p. 111, mostra o conteúdo dos compostos discriminantes (em mg.kg⁻¹) quantificados por análise de RMNq ¹H. De acordo com a análise ANOVA, o quimiotipo A contém mais tanabalina e ácido centipédico que o quimiotipo B, corroborando a tendência observada na análise quimiométrica. No entanto, o conteúdo da ternatina não é estatisticamente diferente para os dois quimiotipos.

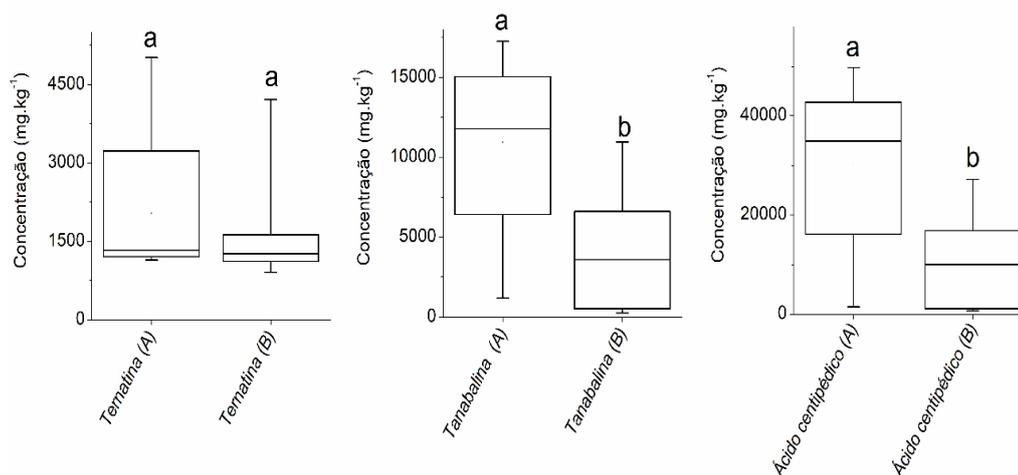
Figura 28 - A: Expansões do espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) do extrato matanólico dos capítulos florais de *E. viscosa*. A: expansão da região (δ_{H} 7,05-7,70); B: expansão da região (δ_{H} 3,77-3,92).



Fonte: Elaborada pela autora.

Além de permitir discriminar o quimiotipo de *E. viscosa*, o método RMNq de ^1H pode ser útil para o controle de qualidade de matérias-primas e produtos à base de plantas derivados desta planta, uma vez que os três compostos quantificados são seus componentes bioativos (Apêndice T).

Figura 29 - Teor de ternatina, tanabalina e ácido centipédico ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) em capítulos florais de *E. viscosa*, determinados por análise de RMNq ^1H .



Fonte: Elaborada pela autora.

5.5 Otimização da técnica de Microextração em Fase Sólida (MEFS-CG-EM) para análise de compostos voláteis de *E. viscosa*.

Investigações farmacológicas revelaram que o óleo essencial de *E. viscosa* possui atividades antinociceptivas, anticonvulsivantes e antibacterianas (SOUZA *et al.*, 1998). A destilação a vapor e a hidrodestilação são basicamente os métodos mais antigos conhecidos para se obter compostos voláteis das plantas. Para o estudo químico dos constituintes dos óleos essenciais de *E. viscosa*, a hidrodestilação tem sido o método de extração convencionalmente usado para identificação dos seus quimiotipos. No entanto, esse método tem algumas desvantagens, como a grande quantidade de amostra e o longo tempo de extração.

MEFS, (do inglês *SPME Solid-Phase Microextraction*), combinado com CG-EM foi aplicado pela primeira vez para analisar os capítulos florais de *E. viscosa*. Dessa forma, foi necessário otimizar a etapa de preparo da amostra e a condição de extração para ambos os quimiotipos, visto que sua composição química poderia gerar diferentes respostas analíticas. Primeiramente, a fim de garantir uma classificação inequívoca para os quimiotipos, realizamos a quimiotipagem convencional das amostras de capítulos florais com base na quantificação dos compostos principais [acetato de *trans*-pinocarveíla (**26**) e acetato de *cis*-isopinocarveíla (**27**)] em seus óleos essenciais, que inicialmente se destinavam a ser materiais de referência para as análises de MEFS. Cinco das 16 amostras de óleo essencial foram classificadas como quimiotipo A (**26**: 54-64%; **27**: 0-5%), enquanto onze corresponderam ao quimiotipo B (**27**: 2-27%; **26**: 43-82%). Curiosamente, os rendimentos de óleo para as amostras do quimiotipo B (0,43-1,80%) foram superiores aos obtidos das amostras do quimiotipo A (0,3-0,5%). Posteriormente, escolhemos uma amostra de cada quimiotipo para os experimentos de otimização. Os perfis cromatográficos de MEFS não coincidiram completamente com os de seus respectivos óleos essenciais, nem em relação à quantidade total do pico nem às áreas dos picos dos compostos principais. Este resultado indesejado foi encontrado porque as duas abordagens de extração possuem diferentes formas de amostragem e injeção CG-EM (*headspace* x injeção direta), implicando também em uma ligeira variação no tempo de retenção de seus constituintes. Além disso, uma vez que os compostos **26** e **27** estavam geralmente presentes em ambos os quimiotipos, eles não conseguiram discriminar as amostras individualmente. Portanto, propusemos a relação da área do pico entre eles como o critério-chave para selecionar a melhor condição analítica.

Belliardo *et al.* (2006) relataram previamente o efeito do revestimento da fibra de MEFS para várias plantas aromáticas e medicinais. Como cada analito possui características

físico-químicas particulares, se comportando de maneira específica em relação ao equilíbrio de partição existente entre a fibra e matriz da amostra, buscou-se as condições de extração cujo equilíbrio favorecesse a pré-concentração dos compostos de interesse no revestimento das fibras.

Neste estudo, dois revestimentos poliméricos com afinidade de adsorção distinta foram avaliados: DVB/CAR/PDMS (revestimento apolar) e Poliacrilato (revestimento moderadamente polar). A fibra DVB/CAR/PDMS extraiu muito mais compostos (pelo menos duas vezes) e picos geralmente maiores do que o poliacrilato, incluindo os compostos principais, independentemente da preparação da amostra e do quimiotipo. Além disso, a fibra ternária mostrou alta eficiência para extração de voláteis, por isso foi selecionada para este estudo. Essa fibra contém uma estrutura meso-macroporosa e, portanto, contém uma variedade de tamanhos de poros aumentando a distribuição da porosidade e a polaridade da fibra, melhorando a retenção dos analitos (PAWLISZYN *et al.*, 2006).

ANOVA e teste *F* a 95% do nível de confiança revelaram que as áreas de picos de **26** e **27** foram significativamente maiores nas extrações realizadas com fibra DVB/CAR/PDMS para quase todas as amostras, conforme resumido nos Apêndices AA e BB. Surpreendentemente, a fibra de poliacrilato não foi capaz de capturar o composto **27** das amostras do quimiotipo A adicionadas com água ou solução salina. Por fim, mas não menos importante, a fibra DVB/CAR/PDMS forneceu perfis cromatográficos com razão **26/27** semelhantes aos obtidos para o óleo essencial de ambos os quimiotipos, embora este último tenha sido bem menos rico, não apresentando mais de 10 picos.

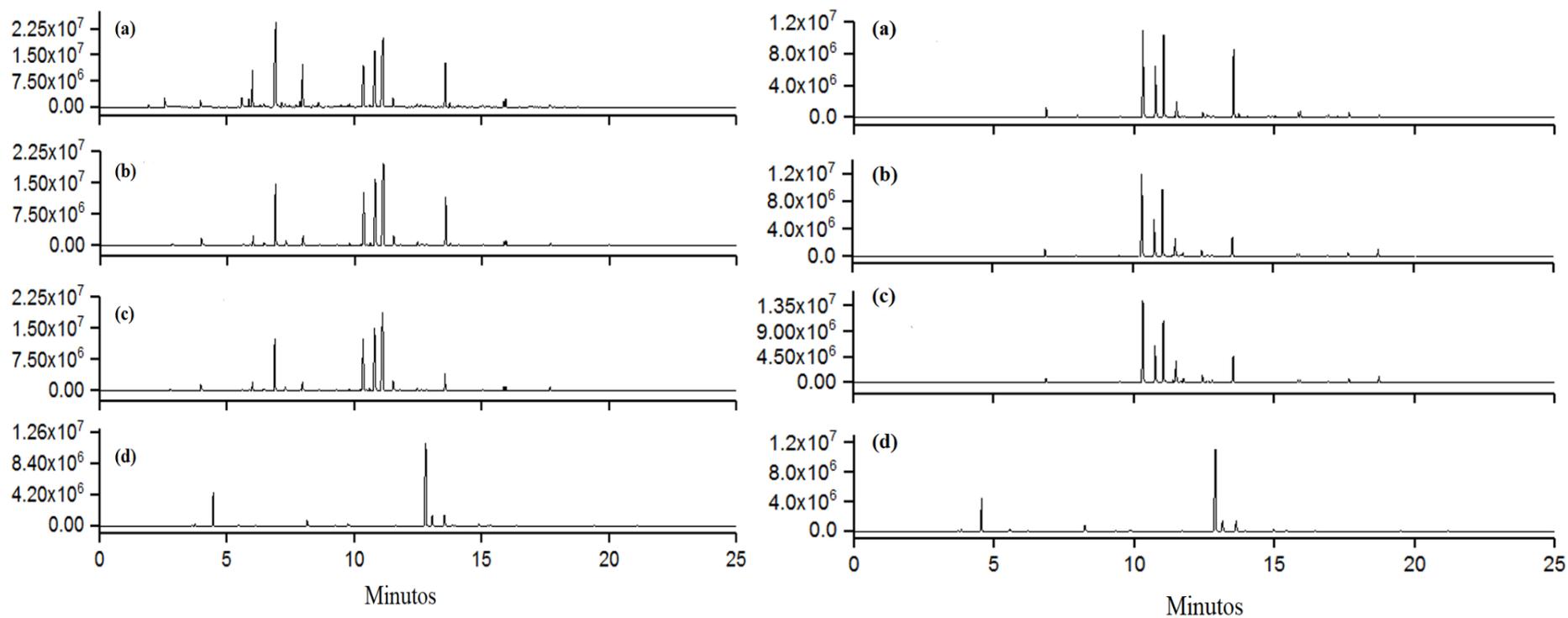
Outros parâmetros, como adição de água e sal na amostra durante o tempo de equilíbrio, também foram avaliados. Os Apêndices Y e Z apresentam os dados de CG-EM para o efeito da adição de NaCl e água às amostras na extração dos compostos voláteis: número e área total dos picos detectados; área e razão entre os picos dos compostos majoritários (*trans/cis*), além dos resultados das fibras testadas. A adição de sal na amostra aquosa antes do processo de extração aumenta a força iônica da solução (BELLIARDO *et al.*, 2019). No entanto, o aumento das áreas dos picos foi observado apenas para amostras de capítulos florais do quimiotipo B imersas em solução aquosa salina e extraídas com fibra PA.

Observa-se um caso de efeito de *salting-in*, fenômeno onde ocorre o aumento de solubilidade do composto orgânico na matriz aquosa. Por outro lado, efeito *salting-out*, ocorre quando há diminuição de solubilidade do analito. Assim, o efeito *salting* aumenta ou diminui a quantidade de analito extraída dependendo do composto e da concentração de sal (LORENZO, 2014; RUBIOLO *et al.*, 2006). O efeito negativo da resposta com a adição de sal é evidente na

Figura 30, p. 115, e Figura 31, p. 116, pois percebe-se que o máximo de resposta é obtido quando não há a adição de sal. O efeito *salting* não pode ser determinado teoricamente, embora teorias tenham sido desenvolvidas para explicar esse efeito em extrações (PAWLISZYN *et al.*, 2012).

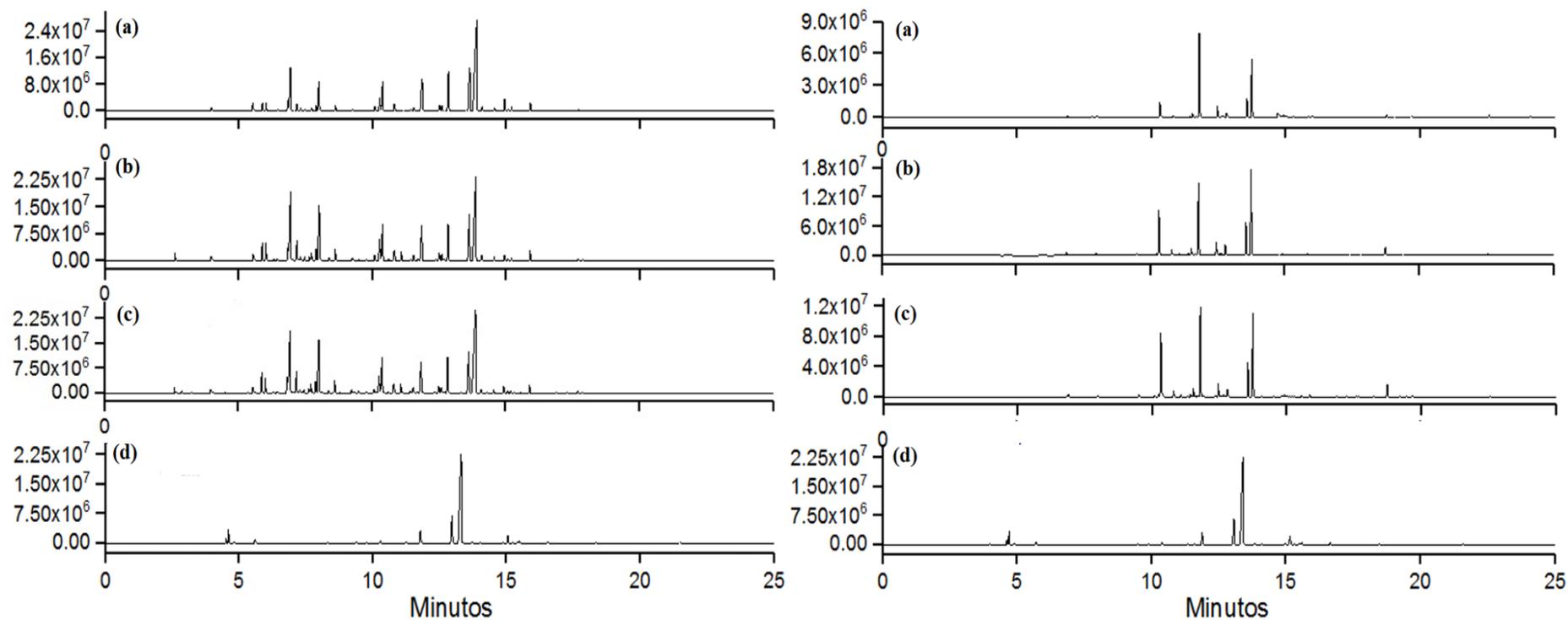
Dessa forma, optou-se por utilizar no procedimento experimental amostras de capítulos florais desprovidas de aditivos, a fim de se desenvolver método não-destrutível, mais rápido, mais sensível e que fornecesse maiores informações e teores dos analitos.

Figura 30 - Cromatogramas MEFS-CG-EM das fibras DVB/CAR/PDMS (à esquerda) e PA (à direita) e óleo essencial do quimiotipo A (Ev024) de *E. viscosa*: (a) capítulos florais; (b) capítulos florais e água; (c) capítulos florais, água e sal; (d) hidrodestilação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 31 - Cromatogramas de MEFS-CG-EM das fibras DVB/CAR/PDMS (à esquerda) e PA (à direita) e óleo essencial do quimiotipo B (Ev017) de *E. viscosa*: (a) capítulos florais; (b) capítulos florais e água; (c) capítulos florais, água e sal; (d) hidrodestilação.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.5.1 Planejamento experimental para otimização dos parâmetros de MEFS

O peso da amostra, o tempo de extração e a temperatura são os principais fatores que afetam a eficiência do MEFS na análise de compostos voláteis (BELLIARDO *et al.*, 2019). O efeito dessas variáveis independentes e suas interações foram avaliados. O projeto experimental e os respectivos valores de resposta Y_1 (soma das áreas de pico dos compostos de acetato de *trans*-pinocarveíla (26) e acetato de *cis*-isopinocarveíla (27) no cromatograma CG-EM) e Y_2 (resolução de pico) são mostrados na Tabela 14, p. 118.

Assim, os dados experimentais foram analisados por meio de regressão de superfície de resposta ajustada a um modelo polinomial de segunda ordem. Os valores previstos (Y) foram avaliados em função dos efeitos lineares, quadráticos e de interação significativos ($p < 0,05$) de acordo com a ANOVA, conforme mostrado na Tabela 15, p. 119. Os modelos calculados para cada resposta foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) enquanto a falta de ajuste dos modelos foi desprezível ($p > 0,05$). Modelos quadráticos com $R^2 > 0,90$ foram obtidos para compostos voláteis, área total e número de compostos voláteis. Além disso, valores elevados foram observados para R^2 e R^2 ajustado, variando de 0,9632 a 0,9861 e 0,9995 a 1,0000, respectivamente. Os modelos de superfície de resposta para quimiotipos de *E. viscosa* ($p < 0,05$) podem ser expressos usando as equações (1) e (2), que são baseadas na área total do pico dos isômeros acetato de *trans*-pinocarveíla (26) e acetato de *cis*-isopinocarveíla acetato (27) registrado no cromatograma CG-EM dos capítulos florais, respectivamente:

$$Y_{\text{Área Total}} = 5,30 + 0,71X_1 + 0,09X_3 + 0,60X_1^2 + 0,0011X_2^2 + 0,00074X_3^2 - 0,025X_1 \cdot X_2 - 0,014X_1 \cdot X_3 - 0,0015X_2 \cdot X_3 \quad (1)$$

$$Y_{\text{Área Total}} = 7,52 - 0,0012X_2 \cdot X_3 + 0,00094X_2^2 \quad (2)$$

Tabela 14 - Condições experimentais e valores de resposta para extração de compostos voláteis dos capítulos florais dos dois quimiotipos de *E. viscosa* usando MEFS-CG-EM.

Nº Exp.	Massa (g)	Temperatura	Tempo de	Quimiotipo A		Quimiotipo B	
		de extração,	extração, t	(Ev024)		(Ev017)	
		T (°C)	(min)	Y ₁ (log Y ₁) ^a	Y ₂ ^b	Y ₁ (log Y ₁) ^a	Y ₂ ^b
1	0,5	40	10	6,96	1,91	7,98	1,95
2	0,5	40	20	7,46	1,59	8,21	1,79
3	0,5	60	10	8,61	0,00 ^c	9,04	0,00 ^c
4	0,5	60	20	8,68	0,00 ^c	8,96	0,00 ^c
5	1,0	40	10	7,32	1,66	8,06	1,95
6	1,0	40	20	7,63	1,60	8,37	1,78
7	1,0	60	10	8,60	0,00 ^c	8,93	0,00 ^c
8	1,0	60	20	8,72	0,00 ^c	9,05	0,00 ^c
9	0,33	50	15	7,80	1,27	8,39	1,67
10	1,0	50	15	7,81	1,29	8,43	1,65
11	0,75	33,2	15	7,20	1,92	7,96	2,15
12	0,75	66,8	15	8,80	0,00 ^c	9,30	0,00 ^c
13	0,75	50	6,6	7,55	1,65	8,23	1,75
14	0,75	50	23,4	7,95	1,17	8,55	1,56
15	0,75	50	15	7,79	1,38	8,42	1,95
16	0,75	50	15	7,79	1,38	8,45	1,79
17	0,75	50	15	7,78	1,33	8,40	1,84

^a Soma das áreas dos picos dos compostos acetato *trans*-pinocarveíla e acetato *cis*-isopinocarveíla nos cromatogramas de CG-EM;

^b Resolução dos picos cromatográficos;

^c alargamento dos sinais, com a consequente sobreposição de compostos adjacentes.

A resolução dos sinais também foi avaliada, fornecendo uma medida quantitativa da capacidade da coluna para separar os dois compostos usados na discriminação dos quimiotipos: acetato *trans*-pinocarveíla e acetato *cis*-isopinocarveíla. Em geral, os valores de resolução foram superiores a 1,5, indicando uma separação completa dos analitos, exceto na temperatura de 60 °C, na qual os sinais coeluíram devido à elevada concentração desses compostos na amostra.

Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) para os modelos quadráticos desenvolvidos para descrever a influência da massa de capítulos florais (X_1), temperatura de extração (X_2) e tempo de extração (X_3) na área total dos picos no cromatograma de CG-EM dos capítulos florais de *E. viscosa*.

	Quimiotipo A ¹		Quimiotipo B ²	
	Área dos picos ^a		Área dos picos ^a	
	Coefficiente	<i>p</i>	Coefficiente	<i>p</i>
Constante	5,30	1,86E-4	7,52	0,018
X_1	0,71	7,7E-3	-0,07	0,800
X_2	-6,9E-3	0,070	-0,02	0,100
X_3	0,09	1,2E-3	0,04	0,077
X_1^2	0,60	2,0E-3	0,26	0,160
X_2^2	1,1E-3	2,5E-4	9,4E-4	0,006
X_3^2	7,4E-4	8,5E-3	3,7E-4	0,339
$X_1 \cdot X_2$	-2,5E-2	1,1E-3	-0,01	0,067
$X_1 \cdot X_3$	-1,4E-2	0,013	0,02	0,059
$X_2 \cdot X_3$	-1,5E-3	6,9E-4	-1,2E-3	0,019
Falta de ajuste	8,63E-4	-	0,085	-
R^2	0,9632	-	0,9861	-
R^2 ajustado	1,0000	-	0,9995	-

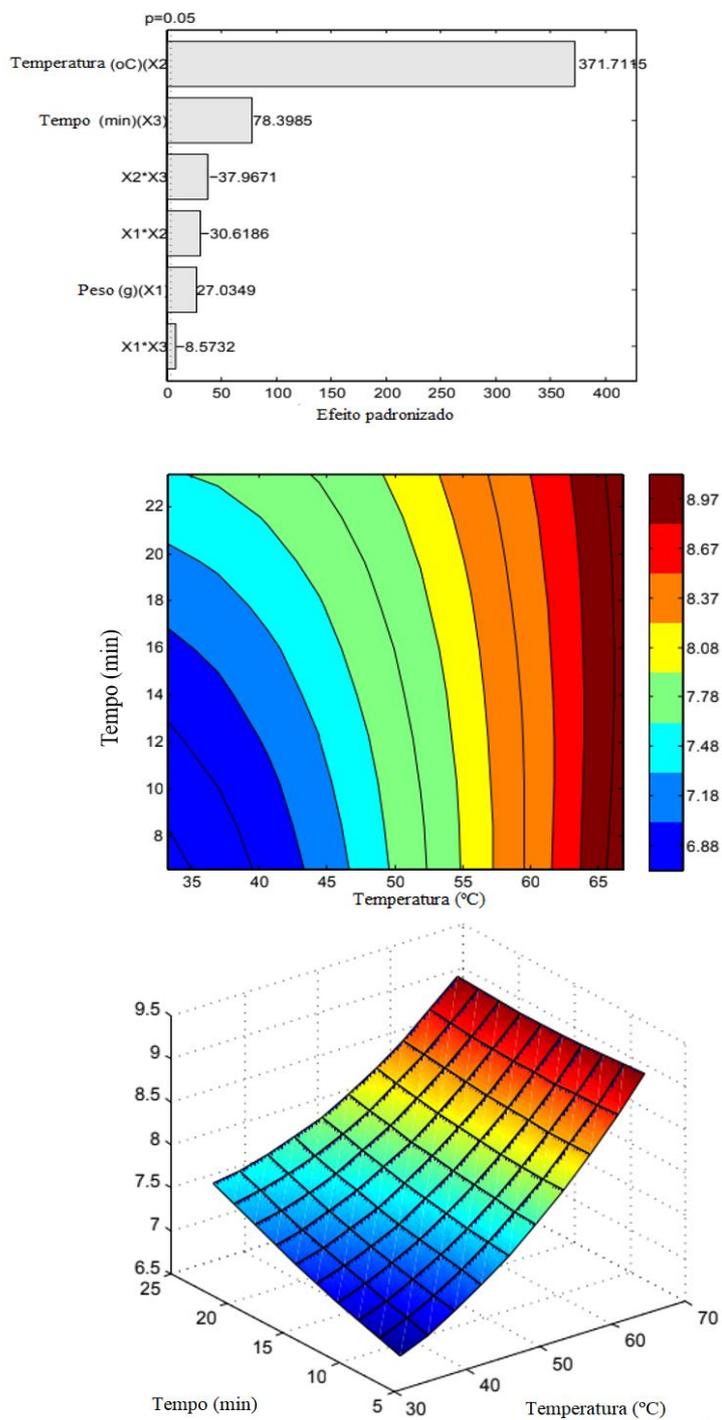
^a Soma da área dos picos de CG-EM para os compostos acetato de *trans*-pinocarveíla e acetato de *cis*-isopinocarveíla; ¹Ev024; ²Ev017.

De acordo com gráfico de Pareto (Figuras 32, p. 121 e 33, p. 122), a temperatura de extração teve um papel significativo nas variáveis de respostas estudadas. Dessa forma, verificou-se um aumento na resposta à medida que a temperatura foi elevada a 60 °C, visto que temperaturas mais altas favorecem a volatilização de compostos menos voláteis, resultando em maior extração. O gráfico de Pareto mostra também interações significativas entre a massa de amostra, temperatura e tempo de extração. O valor negativo para essas interações indica um efeito oposto na resposta analítica. Portanto, a temperatura de 40 °C foi adotado como ideal na detecção e identificação dos compostos.

No tocante à variável tempo, percebeu-se uma pequena variação significativa na eficiência da MEFS, indicando que um tempo mínimo de extração é suficiente para detecção e identificação dos compostos, como é observado pelo gráfico de superfície resposta para o quimiotipo A (Figura 32, p. 121) e para o quimiotipo B (Figura 33, p. 122). Dessa forma, foi

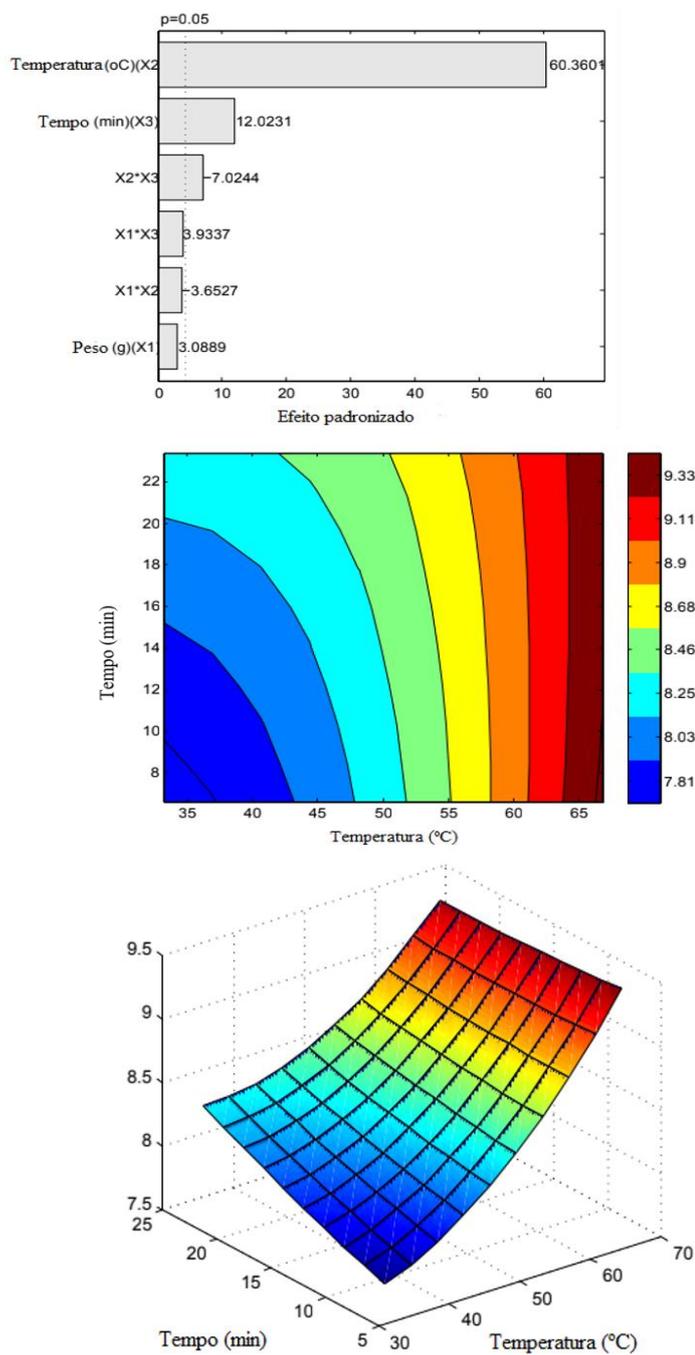
adotado um tempo de 6,6 minutos para extração dos compostos. Esse efeito também foi observado para variável peso da amostra, cuja contribuição foi quase insignificante na resposta dos analitos. Portanto, para a variável peso foi estabelecida a quantidade mínima de 0,33 g como suficiente para se obter uma extração eficiente.

Figura 32 - Efeitos estimados pelo gráfico de Pareto para a soma das áreas dos picos de CG-EM dos compostos acetato *trans*-pinocarveíla e acetato *cis*-isopinocarveíla extraídos dos capítulos florais do quimiotipo A de *E. viscosa* (a); gráficos da superfície em 2D (b); gráfico da superfície resposta em 3D (c).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 33 - Efeitos estimados pelo gráfico de Pareto para a soma das áreas dos picos de CG-EM dos compostos acetato *trans*-pinocarveíla e acetato *cis*-isopinocarveíla extraídos dos capítulos florais do quimiotipo B de *E. viscosa* (a); gráficos da superfície em 2D (b); gráfico da superfície resposta em 3D (c).



Fonte: Elaborada pela autora.

5.5.2 Análise dos compostos voláteis em *E. viscosa* por MEFS.

Análise de CG-EM dos compostos voláteis dos capítulos florais de *E. viscosa* extraídos por hidrodestilação (óleo essencial) revelou 24 constituintes, como mostrado na Tabela 16, p. 126. Os óleos essenciais consistiram basicamente de estéres de monoterpreno, com predominância de acetato *trans*-pinocarveíla e acetato *cis*-isopinocarveíla. Além disso, os monoterprenos α -pineno, β -pineno e limoneno foram abundantes.

A análise MEFS dos capítulos florais de *E. viscosa* permitiu a identificação de 33 compostos. Para o quimiotipo A, a extração com a fibra DVB/CAR/PDMS rendeu 11 monoterprenoides (5 álcoois-11,48%; 2 cetonas-32,75% e 4 ésteres- 8,30%) (monoterpenóides), além de 10 monoterprenos (37,53%) e 9 sesquiterprenos (4,30%), representando 94,36%. A fibra PA extraiu também 11 monoterprenoides (4 álcoois- 32,26%; 3 cetonas-34,99% e 4 ésteres- 24,89%), 2 monoterprenos (3,38%) e 6 sesquiterprenos (4,17%), representando quase 99,69%. Na análise do quimiotipo B, a fibra DVB/CAR/PDMS extraiu 11 monoterprenoides (5 álcoois- 16,42%; 2 cetonas (0,61% e 4 ésteres- 53,25%, 8 monoterprenos (12,63%) e 3 sesquiterprenos (2,01%), representando quase 90,92%; A fibra PA extraiu 12 monoterprenoides (6 álcoois - 52,27%; 3 cetonas- 3,55% e 3 ésteres- 34,70%), 2 monoterprenos (3,51%) e 2 sesquiterprenos (1,46%), representando quase 95,49% (Tabela 16, p. 126).

De modo geral, a fibra DVB/CAR/PDMS possibilitou extrair compostos de polaridade intermediária e baixa. Já para fibra PA, as proporções de compostos polares tiveram aumento significativo. A influência do revestimento da fibra na extração de HS-SPME de compostos voláteis foi estudada por Carasek e Pawliszyn (2006), e concluíram que os dois tipos de fibras em conjunto (PDMS e DVB/CAR) atuam de forma complementar para filtrar compostos voláteis, sugerindo que DVB/CAR/PDMS era o revestimento mais eficiente para a extração de compostos de menor peso molecular e de polaridades intermediárias. Além disso, essa combinação aumenta a distribuição de porosidade, por conseguinte, ocorre o aumento da polaridade, melhorando a retenção (adsorção) dos analitos na fibra. Por fim, a fibra PA, que apresenta um revestimento polar, observou-se que ela exibiu melhor eficiência para os compostos menos voláteis, quando comparada à fibra DVB/CAR/PDMS (SILVA *et al.*, 2018; REYES-GARCÉS *et al.*, 2018).

Esses resultados mostram claramente que a análise por MEFS pode ser utilizado com sucesso para discriminar os quimiotipos de *E. viscosa*. As análises do OE são caracterizadas por apresentarem frações ricas em ésteres terpênicos embora com composições completamente diferentes. O óleo essencial do quimiotipo A é caracterizado pelo acetato de

trans-pinocarveíla (60,46%) como componente principal e β -pineno (8,21%). Por outro lado, o óleo essencial do quimiotipo B é caracterizado pelo acetato de *cis*-isopinocarveíla (64,68%) como componente principal e acetato de *cis*-crisantenila (5,55%). Foram investigados a composição do óleo essencial e por MEFS dos capítulos florais de ambos os quimiotipos de *E. viscosa*, adequados para discriminar os dois quimiotipos. Este é o primeiro relato de comparação da composição química das frações voláteis obtidas pelos dois métodos de extração. Nesse sentido, observou-se que alguns compostos estavam presentes exclusivamente no OE: sabineno, *trans*-carveol e acetato de geranila. Por outro lado, vários constituintes foram detectados apenas por MEFS, canfeno (3), α -felandreno (7), α -terpineno (8), *o*-cimeno (9), *trans*-p-menth-2-en-7-ol (22), *cis*-mirtanol (23), *trans*-3-pinanona (13), *trans*-3-pinocarvona (14), *cis*-3-pinocarvona (15), acetato de verbenila (25), α -cubebeno (29), α -copaeno (32), α -curcumeno (37), α -muuroleno (38), óxido de cariofileno (41) e benzofenona (42). Alguns deles eram abundantes, como *trans*-3-pinanona (13) (11,82-13,75%) e *cis*-3-pinocarvona (15) (20,93% -21,24%) no quimiotipo A, bem como *trans*-3(10)-caren-2-ol (19) (32,20%) e acetato de verbenila (25) (7,09%) no quimiotipo B, destacando-se a presença abundante de *trans*-3-pinanona (11,82-13,75%) e de *cis*-3-pinocarvona (20,93%-21,24%) no quimiotipo A, bem como de *trans*-3(10)-caren-2-ol (32,20%) e acetato de verbenila (7,09%) no quimiotipo B. Além disso, o composto *trans*-pinocarveol foi encontrado em ambos os quimiotipos com percentuais acima de 5%. A ausência desses compostos nas análises de hidrodestilação (HD) nas amostras investigadas pode ser justificada pelo método de extração utilizado para obtenção dos óleos essenciais: hidrodestilação. Esse processo, embora versátil e bastante utilizado para obtenção dos óleos essenciais de plantas aromáticas, pode proporcionar a degradação de alguns compostos presentes no óleo essencial, visto que o material botânico permanece em contato direto com a água quente por longos períodos de tempo. Como consequência da alta temperatura, alguns compostos de baixo peso molecular (menor coeficiente de efusão) encontrados na análise por MEFS, podem ter sido degradados ou volatilizados durante o processo de extração. A MEFS baseia-se no equilíbrio de analitos e a fibra recoberta por um polímero e a matriz amostral. No ato da exposição da fibra na matriz da amostra, tende-se a estabelecer um equilíbrio dos analitos entre a matriz e a fibra. Durante o equilíbrio, os compostos com menor massa molecular tende a permanecer na fase gasosa, favorecendo o processo de adsorção na fibra. Isso justificaria a existência de outros constituintes de menor peso molecular (inexistentes no OE), majoritários nas análises por MEFS. Entretanto, com o aumento da temperatura, pôde-se observar que os compostos acetato de *trans*-pinocarveíla e

acetato de *cis*-isopinocarveíla tiveram concentrações elevadas, uma vez que foram coeluídos na temperatura de 60 °C.

Tabela 16 - Comparação dos componentes voláteis identificados nos capítulos florais de *E. viscosa* pelo método de MEFS e hidrodestilação (HD) do quimiotipo A (Ev024) e quimiotipo B (Ev017) (continua).

Compostos voláteis ^a	IK ^b	IK ^c	Quimiotipo A (Ev024)			Quimiotipo B (Ev017)			
			DVB/CAR/PDMS	PA	HD	DVB/CAR/PDMS	PA	HD	
Monoterpenos hidrocarbonetos									
1	α -Tujeno	933	930	1,10	-	0,52	1,05	-	-
2	α -Pineno	947	939	4,42	-	-	1,89	-	0,21
3	Canfeno	950	954	0,54	-	-	-	-	-
4	Sabineno	984	975	-	-	-	-	-	1,34
5	β -Pineno	990	979	22,23	2,74	8,21	7,44	1,07	3,73
6	β -Mirceno	996	990	0,72	-	-	1,04	-	0,21
7	α -Felandreno	1007	1004	0,33	-	-	-	-	-
8	α -Terpineno	1027	1017	0,41	-	-	0,53	-	-
9	<i>O</i> -Cimeno	1036	1026	0,72	-	-	0,75	-	-
10	Limoneno	1039	1029	6,49	0,88	1,20	5,20	2,44	1,80
11	γ -Terpineno	1068	1059	0,60	-	0,25	0,73	-	-
Monoterpenos álcoois									
12	<i>trans</i> -Pinocarveol	1150	1139	8,77	22,56	3,91	5,77	6,78	0,25
16	Terpinen-4-ol	1183	1177	-	0,76	0,73	-	-	0,41
17	α -Terpineol	1194	1188	-	0,54	-	0,25	0,47	0,32
18	Mirtenol	1200	1195	1,61	5,1	2,15	0,71	1,75	-
19	<i>trans</i> -3(10)-Caren-2-ol	1206	1204	0,25	0,60	-	7,80	32,2 0	-
20	Dihidro-isocarveol	1207	1214	-	-	0,54	-	-	-
21	<i>trans</i> -Carveol	1211	1216	-	-	-	-	-	1,06
22	<i>trans-p</i> -Ment-2-en-7-ol	1235	1230	0,62	1,70	-	1,28	5,41	-
23	<i>cis</i> -Mirtanol	1253	1253	0,23	1,00	-	-	3,72	-
Monoterpenos cetonas									
13	<i>trans</i> -Pinnanona	1156	1158	11,82	13,75	-	0,21	1,13	-

Tabela 16 - Comparação dos componentes voláteis identificados nos capítulos florais de *E. viscosa* pelo método de MEFS e hidrodestilação (HD) do quimiotipo A (Ev024) e quimiotipo B (Ev017) (continua).

Compostos voláteis ^a	IK ^b	IK ^c	Quimiotipo A (Ev024)			Quimiotipo B (Ev017)		
			DVB/CAR/PDMS	PA	HD	DVB/CAR/PDMS	PA	HD
14 <i>trans</i> -Pinocarvona	1164	1160	-	-	-	0,40	-	-
15 <i>cis</i> -Pinocarvona	1170	1172	20,93	21,24	-	-	0,81	-
Monoterpenos acetoxilados								
24 Acetato de <i>cis</i> -crisantenila	1265	1268	-	-	0,56	-	-	5,55
25 Acetato de verbenila	1275	1280	0,60	6,26	-	6,44	7,09	-
26 Acetato de <i>trans</i> -pinocarveila	1310	1298	6,72	16,71	60,46	10,47	6,76	6,47
27 Acetato de <i>cis</i> -isopinocarveila	1321	1305	0,68	1,18	8,08	35,56	20,85	64,68
28 Acetato de mirtenila	1325	1326	0,30	0,74	7,83	0,78	-	-
30 Acetato de dihidri- <i>neo</i> -isocarveol	1356	1359	-	-	0,17	-	-	-
31 Isobutanoato de linalila	1381	1375	-	-	1,76	-	-	3,70
33 Acetato de geranila	1387	1381	-	-	-	-	-	0,47
34 Acetato de mirtanila	1385	1386	-	-	1,05	-	-	1,03
Sesquiterpenos								
29 α -Cubebeno	1355	1345	0,18	-	-	0,41	-	-
32 α -Copaeno	1370	1374	0,39	-	-	0,45	-	-
35 <i>E</i> -Cariofileno	1417	1419	0,86	0,99	0,68	-	-	0,86
36 γ -Muuroleno	1475	1479	1,24	0,50	-	-	-	0,25
37 α -Curcumeno	1480	1480	0,17	0,74	-	-	-	-
38 α -Muuroleno	1499	1500	0,22	0,44	-	-	0,15	-
39 <i>cis</i> -Calameneno	1520	1520	0,75	1,00	-	-	-	-
40 δ -Cadineno	1536	1523	-	-	0,41	-	-	0,17
41 Óxido de cariofileno	1599	1583	0,49	0,50	-	1,15	1,31	-

Tabela 16 - Comparação dos componentes voláteis identificados nos capítulos florais de *E. viscosa* pelo método de MEFS e hidrodestilação (HD) do quimiotipo A (Ev024) e quimiotipo B (Ev017) (conclusão).

Compostos voláteis ^a	IK ^b	IK ^c	Quimiotipo A (Ev024)			Quimiotipo B (Ev017)		
			DVB/CAR/PDMS	PA	HD	DVB/CAR/PDMS	PA	HD
42 Benzofenona	1622	1626	-	0,82	-	-	1,61	-
Total identificado (%)			94,36	99,69	98,77	90,92	95,49	99,56
(%) Classes								
Monoterpenos hidrocarbonetos			37,53	3,38	10,18	18,63	3,51	7,29
Monoterpenos álcoois			11,48	32,26	7,33	16,42	52,27	7,59
Monoterpenos cetonas			32,75	34,99	0,82	0,61	3,55	-
Monoterpenos acetoxilados			8,30	24,89	78,30	53,25	34,70	81,90
Sesquiterpenos			4,30	4,17	2,14	2,01	1,46	2,78

^a Os compostos são listados na ordem de eluição em HP-5MS. ^b índice de Kovats obtido em HP-5MS. ^c índice de Kovats obtido da literatura (ADAMS, 2017; NIST, 2011). DVB/CAR/PDMS: Divinilbenzeno/Carbowax/Polidimetilsiloxano; PA: Poliacrilato.

A Tabela 17 apresenta a distribuição quantitativa dos dois componentes característicos dos quimiotipos de *E. viscosa*. A análise por MEFS das amostras investigadas forneceu perfis confiáveis que podem ser facilmente distinguidos, proporcionando assim uma discriminação inequívoca entre os dois quimiotipos. O número de picos detectados por MEFS foi sempre maior do que os encontrados no OE, ou seja, a composição volátil dos capítulos é mais rica e diversificada do que a do OE. Os percentuais dos constituintes majoritários foram maiores quando extraídos por hidrodestilação. As condições cromatográficas aplicadas às amostras foram descritas na subsecção 6.11. As estruturas dos compostos identificados na análise de MEFS e os cromatogramas podem ser encontrados no Apêndice CC e DD, respectivamente.

Tabela 17 - Resultados das análises de CG-EM para compostos voláteis de capítulos florais de *E. viscosa* extraídos por hidrodestilação (óleo essencial) e por MEFS.

Código	Quimiotipo	Hidrodestilação			MEFS		
		<i>trans</i> ^a (%)	<i>cis</i> ^b (%)	nº picos	<i>trans</i> ^a (%)	<i>cis</i> ^b (%)	nº picos
Ev005	A	54,45	-	23	25,76	4,04	43
Ev006	A	55,08	1,25	23	27,15	4,91	40
Ev007	B	10,46	69,21	20	10,30	44,33	29
Ev008	B	2,77	82,49	22	5,74	62,26	35
Ev009	B	13,13	66,99	19	14,43	46,16	36
Ev013	B	18,94	52,03	21	17,43	29,09	34
Ev014	B	2,09	77,86	16	3,88	59,96	27
Ev016	B	11,27	70,28	19	12,27	44,82	32
Ev017	B	11,82	68,78	18	10,18	31,18	35
Ev020	B	27,44	43,40	25	19,81	27,48	32
Ev021	B	22,58	56,99	29	14,20	34,16	31
Ev022	B	14,98	55,76	15	17,88	45,83	25
Ev024	A	64,73	5,04	17	34,30	1,75	31
Ev025	A	56,11	-	17	30,23	1,80	27
Ev027	A	59,53	2,92	20	30,56	4,44	35
Ev030	B	13,49	56,05	19	14,29	41,81	33

^a Acetato de *trans*-pinocarveíla. ^b Acetato de *cis*-isopinocarveíla.

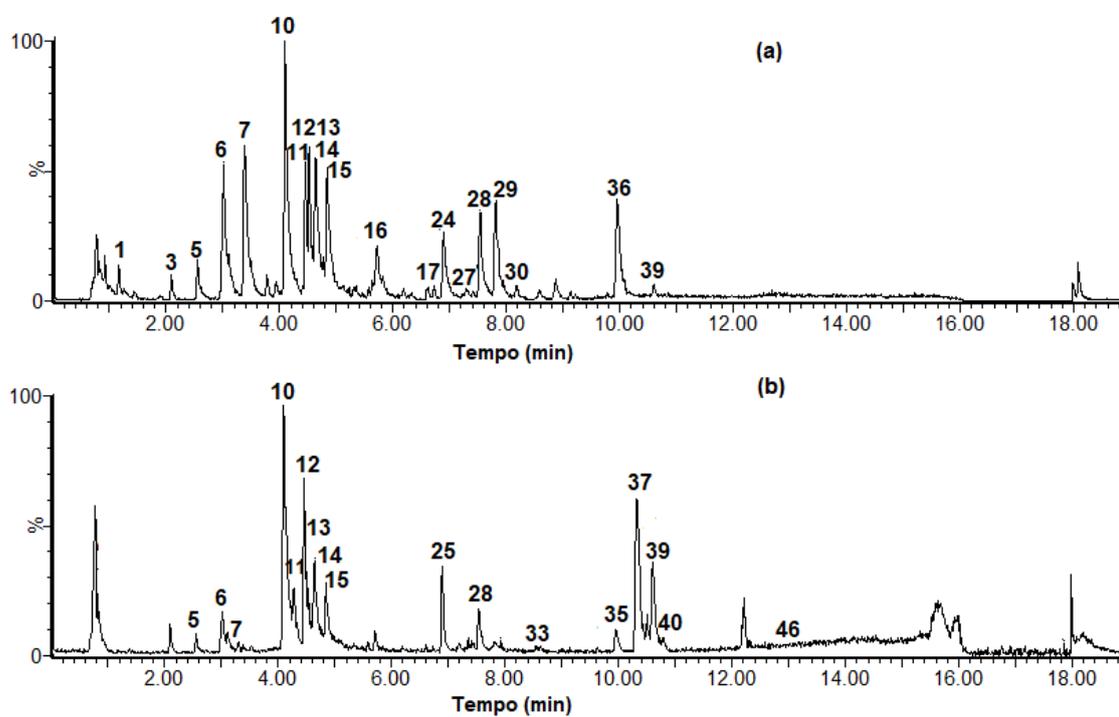
5.6 Determinação do perfil químico dos capítulos florais de *E. viscosa* usando dados de CLUE-EMAR.

5.6.1 Caracterização química de amostras de *E. viscosa* por CLUE-EMAR

Seguindo a metodologia de extração descrita na subseção 6.5, amostras dos capítulos florais de *E. viscosa* foram analisadas por CLUE-EMAR de acordo com os parâmetros descritos na subseção 6.6. Os cromatogramas foram obtidos nos modos de ionização por eletronebulização negativo ESI(-) e positivo ESI(+).

Análise por CLUE-EMAR, (do inglês UPLC-HRMS - *Ultra Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry*) da infusão de capítulos florais silvestres (Ev017) do quimiotipo B permitiu a identificação de vinte e dois compostos: sete derivados do ácido cafeico (**5**, **6**, **7** e **12-15**), três flavonoides (**10**, **11** e **33**) e doze diterpenos (**24**, **25**, **27-30**, **35-37**, **39**, **40** e **46**) (Tabela 18, p. 132). A numeração das estruturas foi baseada na ordem de eluição desses compostos (picos) nos cromatogramas CLUE (Figura 34, p. 131), onde compostos fenólicos foram primeiramente eluídos seguidos por diterpenos como esperado para coluna de fase reversa, em que componentes não-polares como os terpenos são mais fortemente retidos pelo adsorvente do que pelos componentes hidrofílicos. Embora o cromatograma em modo negativo tenha mostrado mais sinais, a maioria dos compostos foi detectada em ambos os modos de ionização como íons protonados / desprotonados além de alguns adutos de sódio observados no ESI(+). A escolha do método cromatográfico baseou-se em um método descrito anteriormente para *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn (Phyllanthaceae) que também proporcionou uma boa separação para metabólitos secundários de *E. viscosa* (SOUSA *et al.*, 2016). Foram analisados seis extratos das partes aéreas de *E. viscosa* e identificados trinta e seis compostos, dos quais vinte são relatados pela primeira vez na espécie (**2**, **4-15**, **20**, **24**, **29**, **30**, **32**, **34** e **35**). As estruturas destes metabólitos podem ser visualizadas na Figura 35, p. 134.

Figura 34 - Cromatogramas de CLUE-EMAR para infusão de capítulos florais de *E. viscosa* silvestre (Ev017) do quimiotipo B: (a) modo de ionização por eletronebulização negativo e (b) modo positivo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 18 - Identificação química da infusão dos capítulos florais silvestre (Ev017) por CLUE-EMAR (continua).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Modo Negativo		Fragmentos de íons m/z	Modo Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)		$[M+H]^+$ m/z	Erro (ppm)		
1	1,16	não identificado	C ₇ H ₈ O ₇	203,0227	4,5	167,0249; 124,0240; 96,9695	-	-	-	-
3	2,09	não identificado	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₀	497,1440	- 2,4	-	-	-	-	-
5	2,55	ácido neoclorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0876	- 0,6	191,0549; 179,0378	355,1038	2,5	163,0396	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
6	3,01	ácido clorogênico*	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0858	0,0	191,0437; 179,0366	355,1038	2,5	163,0392	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
7	3,38	ácido cafeico*	C ₉ H ₉ O ₄	179,0464	0,5	135,0451; 133,0334	-	-	-	(WANG <i>et al.</i> , 2017)
10	4,10	rutina*	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1501	0,1	301,0347	611,1625	2,1	303,0479	(SOUSA <i>et al.</i> , 2016)
11	4,45	kaempferol 3- <i>O</i> - rutinosideo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	593,1503	0,2	285,0340	595,1649	-2,4	303,0485; 287,0535	(ENGELS <i>et al.</i> , 2012)
12	4,52	ácido 1,4-di- <i>O</i> - cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1201	1,2	353,0782; 191,0425; 179,0329; 173,0366	517,1331	-2,9	287,0570; 163,0381	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
13	4,63	ácido 3,4-di- <i>O</i> - cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1110	0,1	353,0821; 191,0504; 179,0356; 173,0415	517,1354	1,5	287,0564; 163,0358	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
14	4,76	ácido 3,5-di- <i>O</i> - cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1243	1,6	353,0845; 191,0535; 179,0535; 173,0439	517,1371	4,8	287,0533; 163,0368	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
15	4,84	ácido 4,5-di- <i>O</i> - cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1106	0,2	353,0953; 191,0500; 179,0351; 173,0432	517,1350	0,8	287,0555; 163,0377	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
16	5,72	não identificado	C ₃₈ H ₄₄ O ₃	547,3201	- 1,1	483,1365; 331,1617	-	-	-	-
17	6,72	não identificado	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361,1655	1,1	345,1749; 191,0567;	-	-	-	-
24	6,90	lactona isociliolida	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	343,1489	-4,1	299,1629	-	-	-	(ZDERO <i>et al.</i> , 1990)

Tabela 18 - Identificação química da infusão dos capítulos florais silvestre (Ev017) por CLUE-EMAR (conclusão).

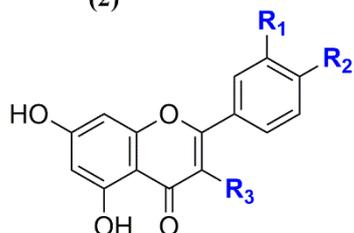
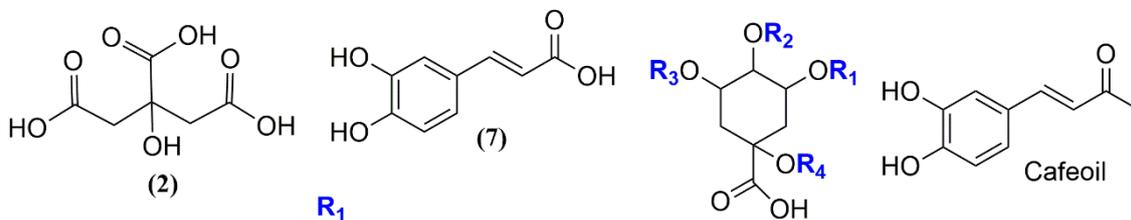
Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Modo Negativo		Fragmentos de íons m/z	Modo Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)		$[M+H]^+$ m/z	Erro (ppm)		
25	6,90	kerlinolida	C ₂₂ H ₂₈ O ₇	-	-	-	405,1884	1,7	387,1718; 327,1571; 217,1222	(VIEIRA <i>et al.</i> , 2006)
27	7,28	7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347,1822	-0,4	329,2519; 205,1733	-	-	-	(JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004)
28	7,53	isômero 7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347,1798	0,0	329,2392; 205,1672	349,1981	2,0	219,1367; 173,1290; 95,0868	(JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004)
29	7,81	bacchariol	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	359,1532	-1,1	315,1714; 297,1733	-	-	-	(AKAIKE <i>et al.</i> , 2003)
30	7,93	isômero lactona isociliolida	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	343,1499	0,5	299,0195	-	-	-	(ZDERO <i>et al.</i> , 1990)
33	8,60	ternatina** 15,16-epóxi-12-	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	-	-	-	375,1049	-2,2	345,0577	(LIMA <i>et al.</i> , 1996)
35	10,01	hidroxineocleroda-13(16),14-dieno-18,19-hemiacetal	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	-	-	-	357,2051	3,9	317,1991; 223,1064	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)
36	10,05	12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331,1887	-0,3	313,0215; 303,1934; 269,1918; 219,1366	-	-	-	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)
37	10,33	8 α -hidroxilabda-13(S)-O- β -D-ribopiranosideo	C ₂₅ H ₄₃ O ₆	-	-	-	463,3053 [M+Na] ⁺	0,6	273,2593	(SILVA-FILHO <i>et al.</i> , 2007)
39	10,60	isômero 12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331,1747	1,1	313,0287; 303,1960; 269,1940; 219,1659	355,1883 [M+Na] ⁺	-0,6	315,0516; 271,0284	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)
40	10,65	tanabalina**	C ₂₂ H ₂₈ O ₅	-	-	-	373,2020	1,9	313,1795; 219,1366	(LIMA <i>et al.</i> , 1996)
46	13,01	ácido centipédico**	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	-	-	-	317,2116	0,5	299,1991; 271,2125	(LIMA <i>et al.</i> , 1996)

*Comparado com padrão autêntico

** Identificado pelo íon extraído

Fonte: Elaborada pela autora.

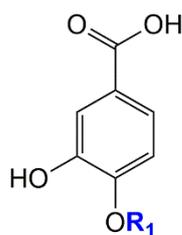
Figura 35 - Estruturas dos compostos tentativamente identificados das partes aéreas de *E. viscosa*.



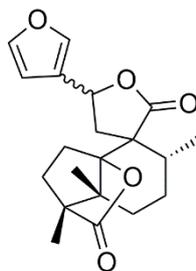
(10) $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{Rhamnosil-glicosil}$

(11) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{Rhamnosil-glicosil}$

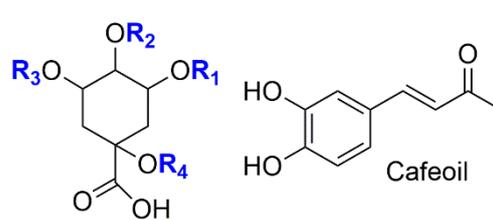
(20) $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$



(4) $R_1 = \text{Hexosídeo (glicosil)}$



(24)
(30)



	R_1	R_2	R_3	R_4
(5) Cafeoil	H	H	H	H
(6)	H	H	Cafeoil	H
(8)	H	Cafeoil	H	H
(9)	H	H	H	Cafeoil
(12)	H	Cafeoil	H	Cafeoil
(13)	Cafeoil	Cafeoil	H	H
(14)	Cafeoil	H	Cafeoil	H
(15)	H	Cafeoil	Cafeoil	H

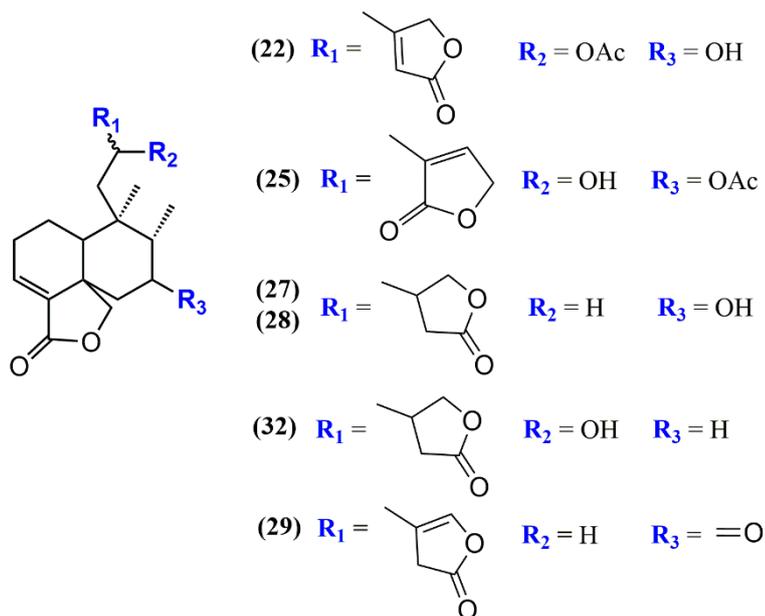
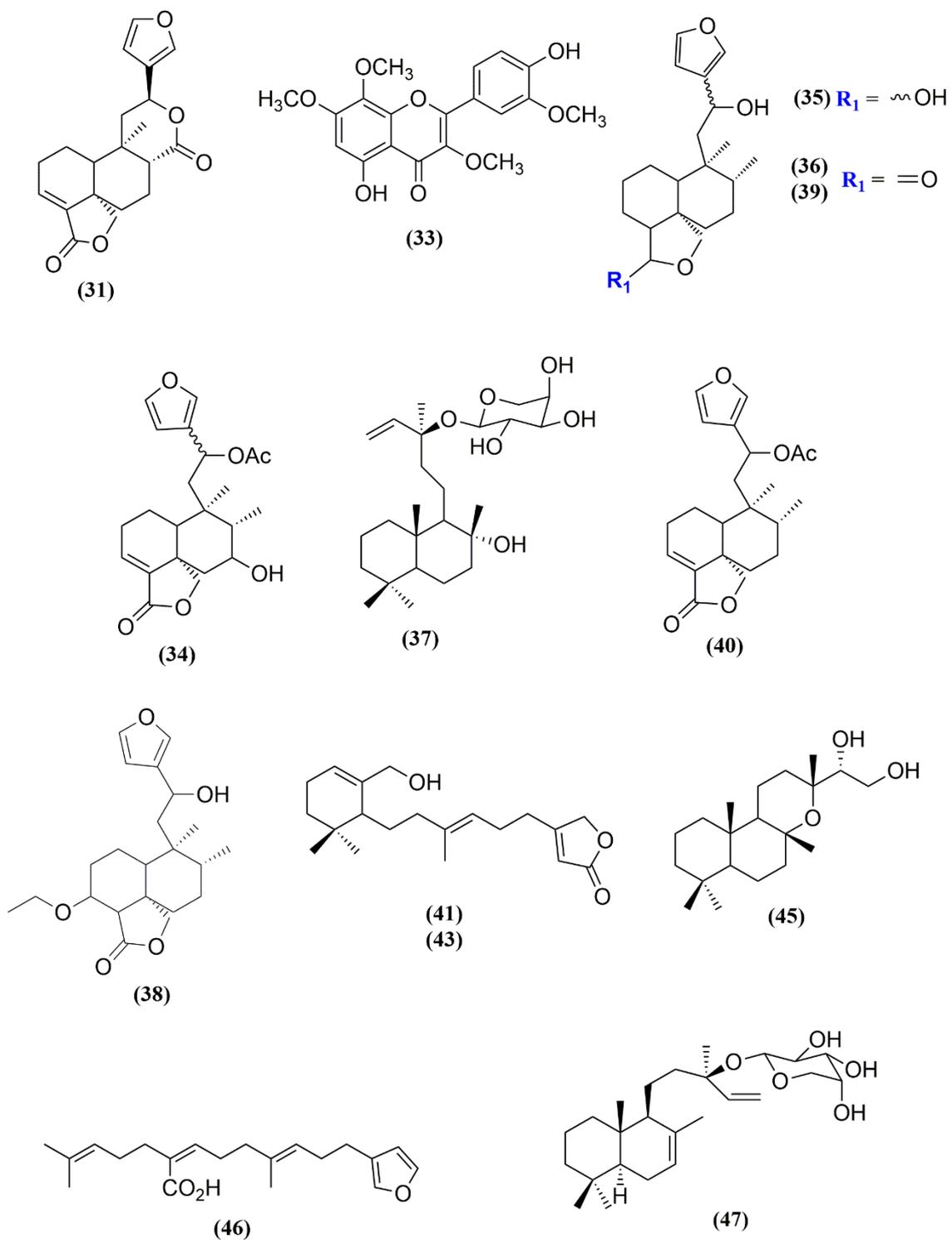
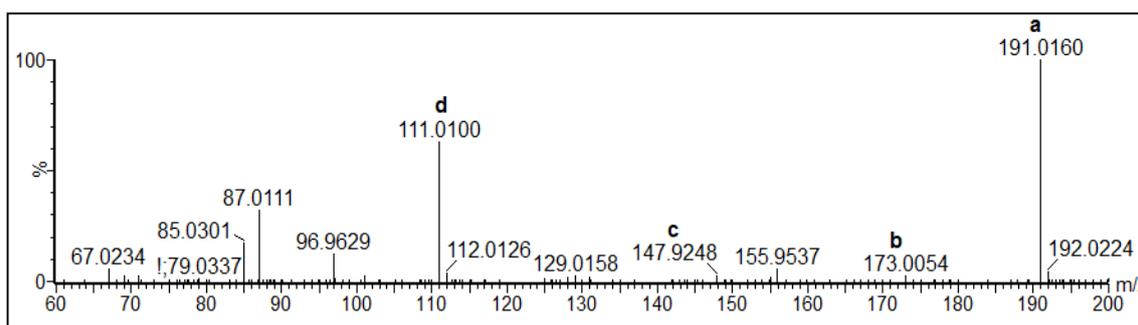


Figura 35 - Estruturas dos compostos tentativamente identificados das partes aéreas de *E. viscosa*.



O pico 2 ($t_r = 1,36$ min) exibiu um íon molecular desprotonado com m/z 191,0160 (**a**), consistente com a fórmula molecular $C_6H_7O_7$. Seu espectro de EM/EM (Figura 36) mostrou íons correspondentes a perda de água com m/z 173,0054 (**b**), dióxido de carbono com m/z 147,9248 (**c**), seguido de desidratação com m/z 111,0100 (**d**), conforme sumarizados na Figura 37. De acordo com a literatura, esse composto trata-se do ácido cítrico (**2**), o qual está sendo descrito pela primeira vez no gênero em estudo (SÁNCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2016).

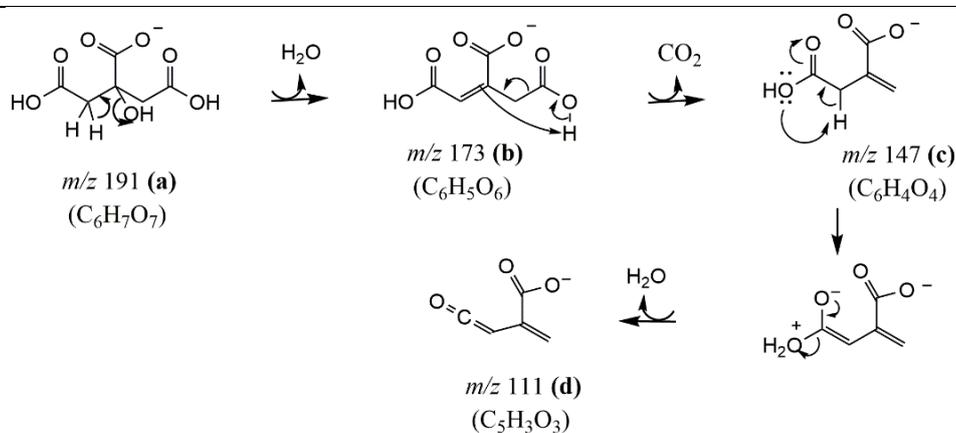
Figura 36 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do ácido cítrico (**2**).



Fonte:

Elaborada pela autora.

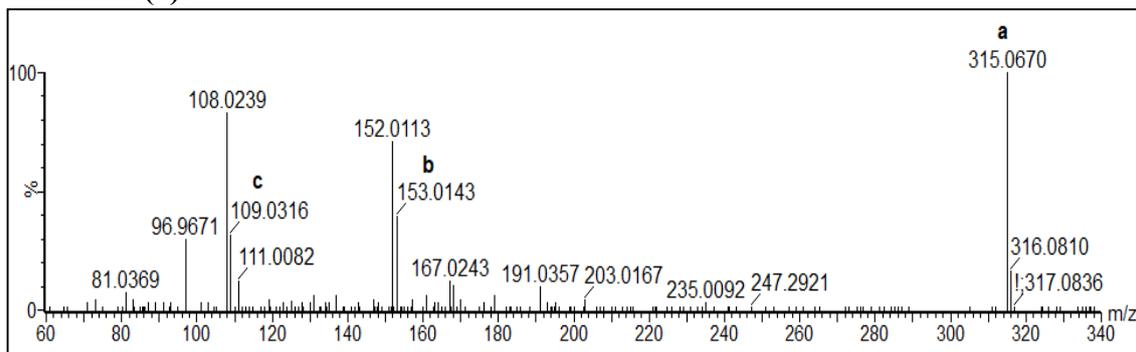
Figura 37 - Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido cítrico (**2**).



Fonte: Elaborada pela autora.

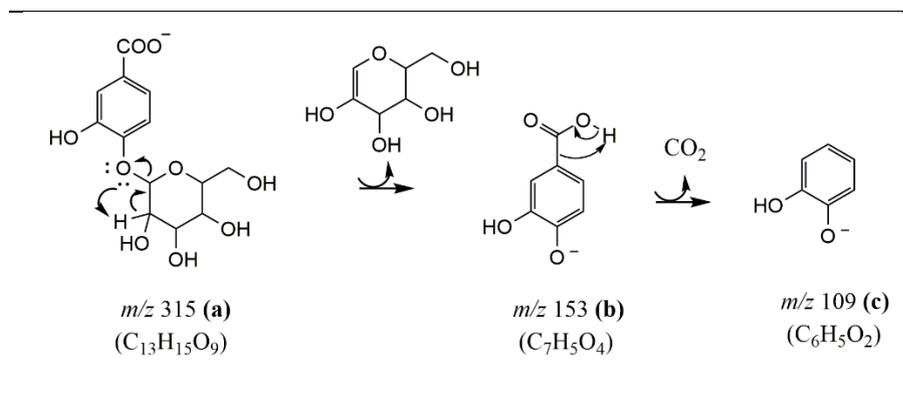
O pico 4 ($t_r = 2,31$ min) mostrou íon molecular desprotonado com m/z 315,0670 (**a**), compatível com a fórmula molecular $C_{13}H_{15}O_9$ (Figura 38, p. 137). Além da presença dos fragmentos com m/z 153,0143 (**b**) consistente com a perda neutra de uma unidade hexosídeo e descarboxilação com m/z 109,0316 (**c**), conforme mostrado na Figura 39, p. 137. Este composto foi identificado como ácido 3,4-dihidroxibenzoico hexosídeo (**4**), o qual está sendo descrito pela primeira vez no gênero em estudo (SANCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2016).

Figura 38 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do ácido 3,4-dihidroxibenzoico hexosídeo (4).



Fonte: Elaborada pela autora.

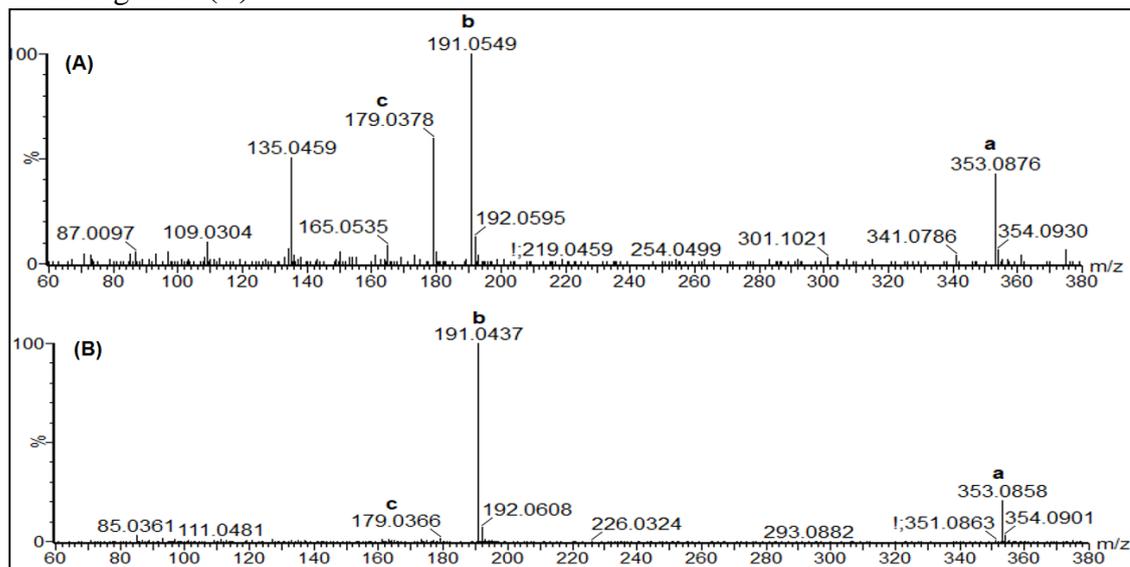
Figura 39 - Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido 3,4-dihidroxibenzoico hexosídeo (4).



Fonte: Elaborada pela autora.

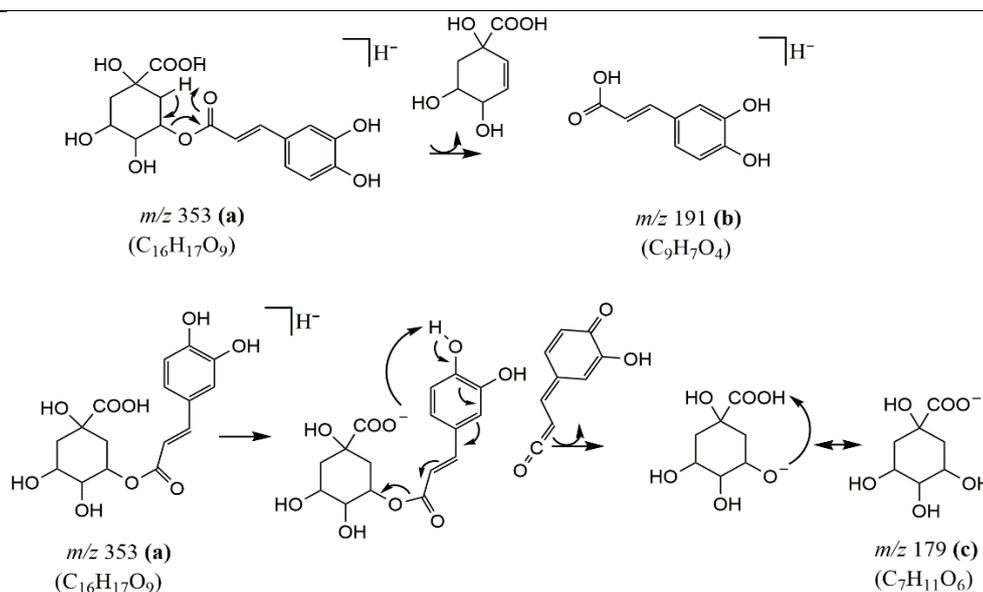
Os picos 5 e 6 ($t_r = 2,55$ e $3,01$ min) apresentaram íons desprotonados com m/z 353,0876 / 353,0858 (a) consistentes com a fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_9$ (Figura 40, p. 138). Seus espectros EM/EM mostraram o mesmo perfil de fragmentação consistindo na perda de ácido quínico com m/z 191,0549 / 191,0437 (b) e ácido cafeico 179,0378 / 179,0366 (c) (Figura 41, p. 138). Com base na intensidade dos íons fragmentos e tempo de retenção descrito na literatura, foi possível identificar os compostos como sendo ácido 3-cafeoilquínico (ácido neoclorogênico) (5) e ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico) (6). Além disso, o ácido clorogênico foi confirmado pelo padrão autêntico nas mesmas condições cromatográficas, ambos estão sendo descritos pela primeira vez no gênero em estudo (SANCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2016).

Figura 40 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do ácido neoclorogênico (A) e ácido clorogênico (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 41 - Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido neoclorogênico (5).

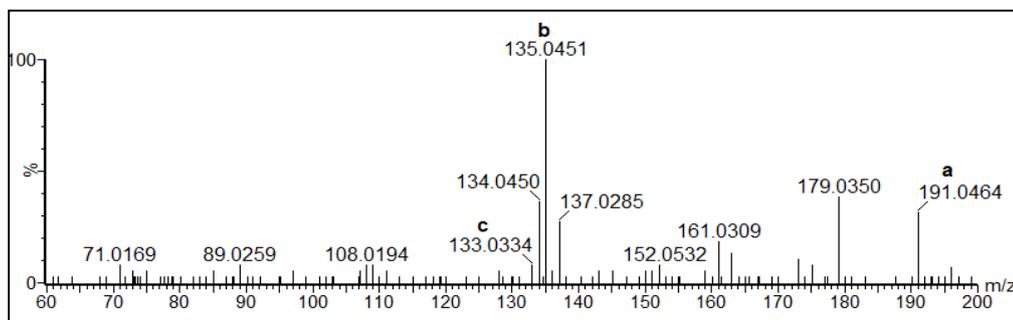


Fonte: Elaborada pela autora.

O pico 7 ($t_r = 3,38$ min) apresentou um íon molecular desprotonado com m/z 179,0464 (a) compatível com a fórmula molecular $C_9H_8O_4$ (Figura 42, p. 139), bem como os íons fragmentos m/z 135,0451 (b) decorrente da perda de dióxido de carbono e eliminação de ácido fórmico com m/z 133,0334 (c), conforme sumarizados na Figura 43, p. 139 (WANG *et al.*, 2017). Assim, o composto 7 foi identificado como ácido cafeico por comparação com

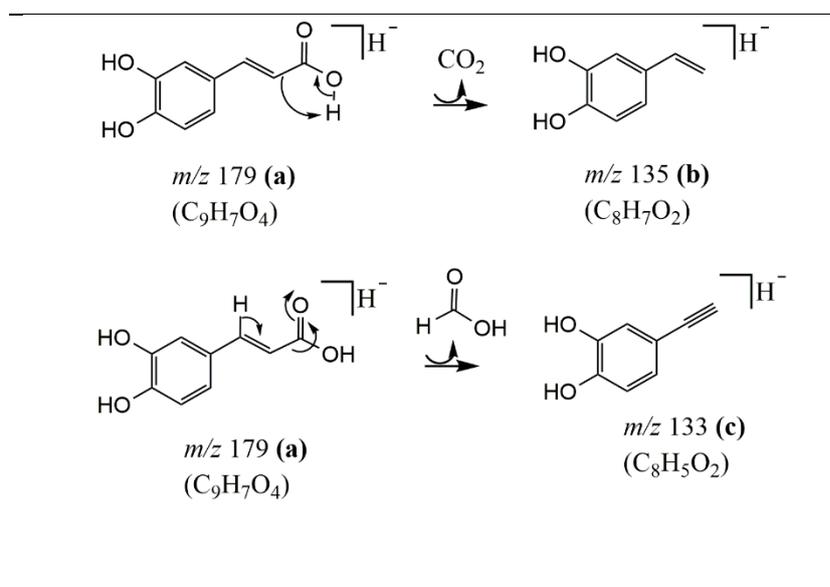
padrão autêntico nas mesmas condições cromatográficas, o qual está sendo descrito pela primeira vez no gênero estudado (SANCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2016).

Figura 42 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do ácido cafeico (7).



Fonte: Elaborada pela autora.

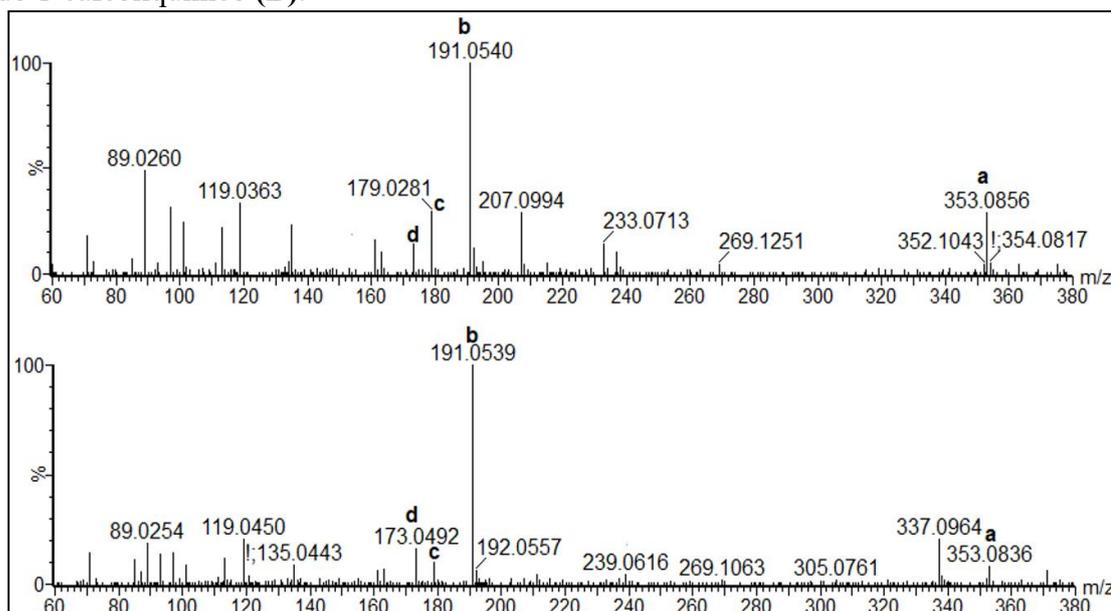
Figura 43 - Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido cafeico (7).



Fonte: Elaborada pela autora.

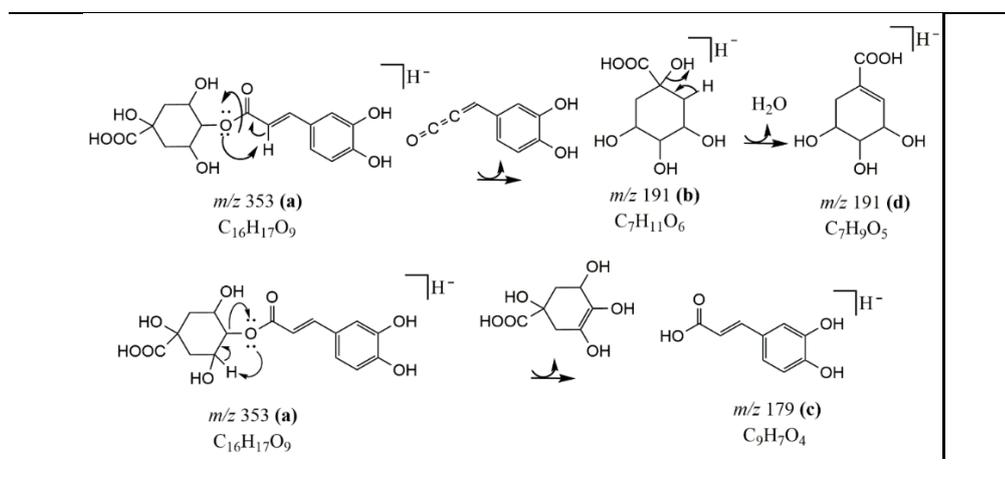
Os picos 8 e 9 ($t_r = 3,52$ e $t_r = 3,73$) exibiram íon molecular desprotonados com m/z 353,0856 e 353,0836, respectivamente, consistentes com a fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_9$. Seus espectros EM/EM (Figura 44, p. 140) mostraram íons referentes a perda de quinona ceteno com m/z 191,05140, 191,0539 (b), ácido quínico com m/z 179,0281, 179,0338 (c) e água com m/z 173,0405, 173,0492 (d), conforme mostrado na Figura 45, p. 140. Com base nos dados de fragmentação e por comparação com dados da literatura (tempo de retenção) foi possível identificar os compostos como ácido criptoclorogênico (8) e ácido 1-cafeoilquínico (9) (SANCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2016).

Figura 44 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do ácido criptoclorogênico (A) e ácido 1-cafeoilquínico (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 45 - Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido criptoclorogênico (8).

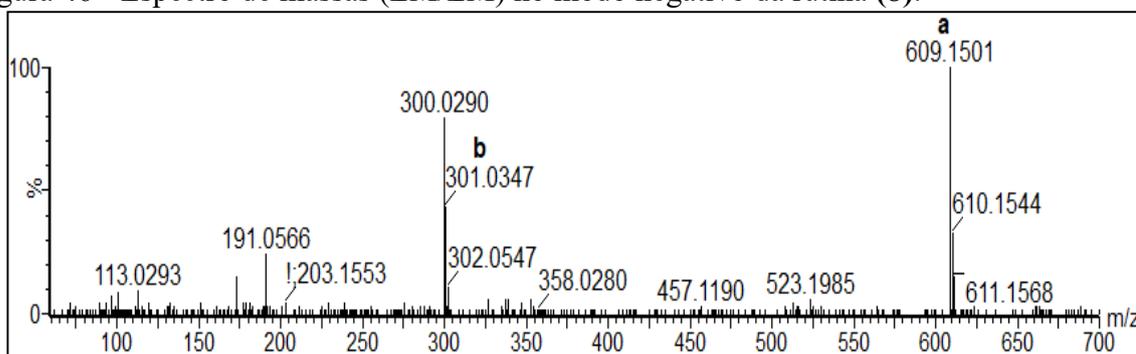


Fonte: Elaborada pela autora.

Os picos 10 e 11 ($t_r = 4,10$ e $4,45$ min) foram caracterizados como glicosídeos flavonóidicos baseados em seus íons precursores desprotonados com m/z 609,1501 (a), Figura 46, p. 141, compatível com a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{16}$ e m/z 593,1503 (a), Figura 47, p. 141, consistente com a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{15}$, além da presença dos fragmentos com m/z 301,0347 (b) e m/z 285,0340 (b), respectivamente (Figura 48, p. 141 e Figura 49, p. 142), característico para quercetina e kaempferol, decorrentes da perda de uma unidade rutinosídeo. Assim, estes compostos foram propostos a serem rutina (quercetina-3-*O*-rutinosídeo) (10) e kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (11), respectivamente. O composto rutina foi autenticado por um

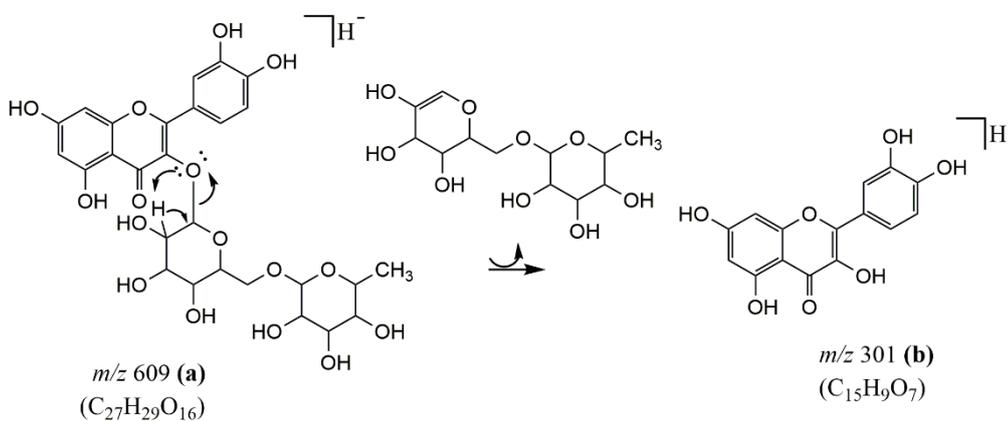
composto padrão, nas mesmas condições cromatográficas. Ambos estão sendo relatados pela primeira vez no gênero, os quais foram relatados anteriormente em Asteraceae (SOUSA *et al.*, 2016; ENGELS *et al.*, 2012).

Figura 46 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo da rutina (8).



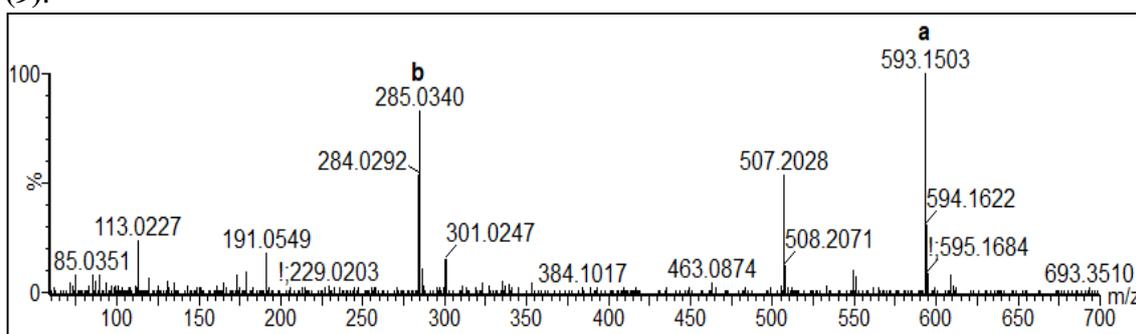
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 47 - Esquema mostrando as principais fragmentações da rutina (8).



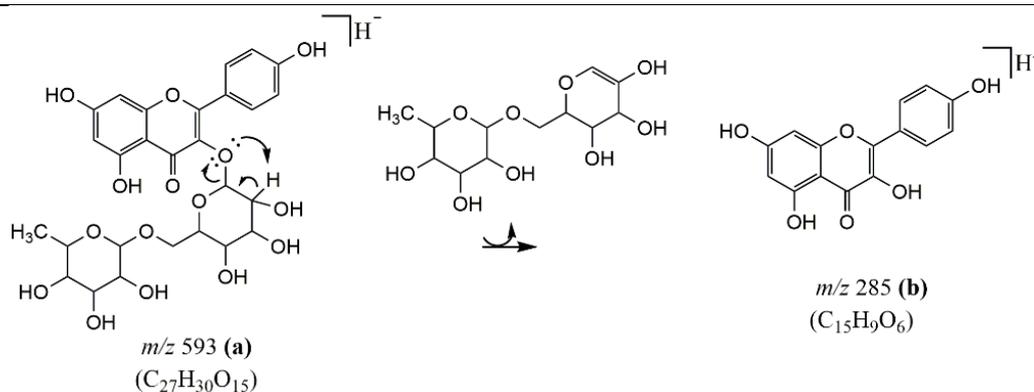
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 48 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo de kaempferol-3-O-rutinosídeo (9).



Fonte: Elaborada pela autora.

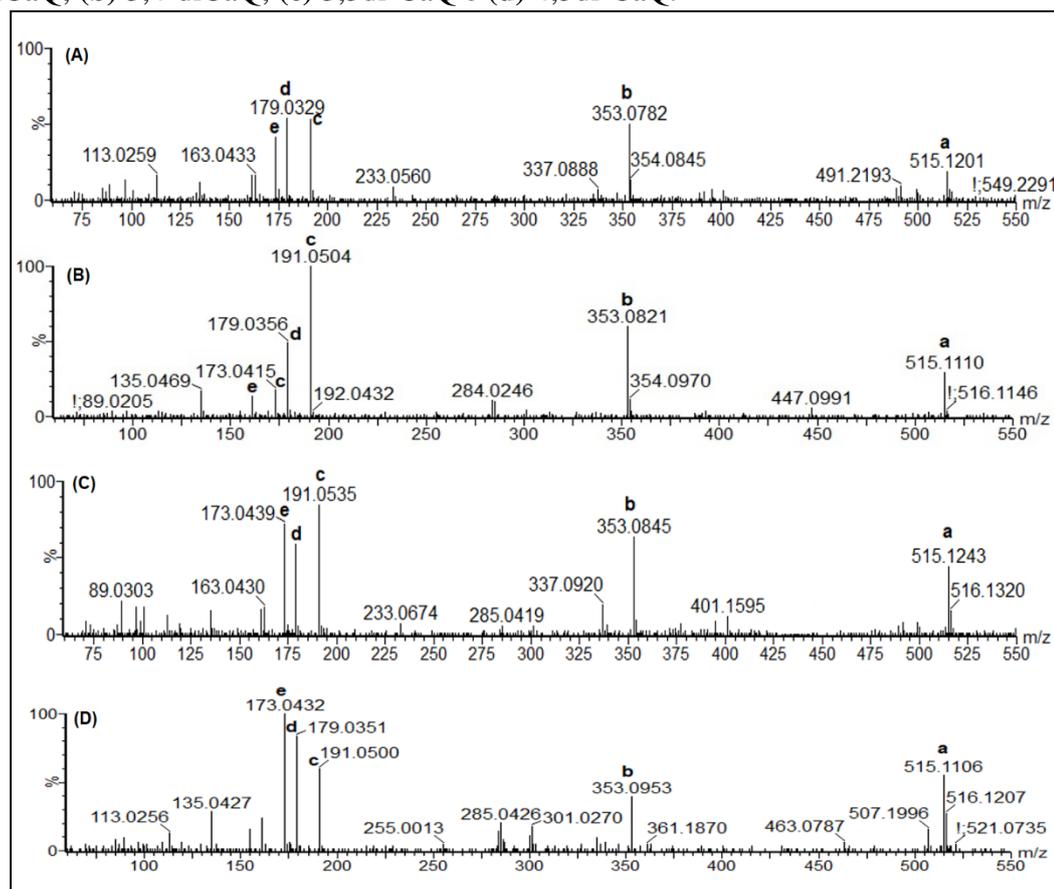
Figura 49 - Esquema mostrando as principais fragmentações de kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (**9**).



Fonte: Elaborada pela autora.

Os picos 12-15 (**12**, $t_r = 4,52$ min; **13**, 4,63 min; **14**, 4,76 min e **15**, 4,84 min) exibiram íons moleculares desprotonados com m/z 515,1201, 515,1110, 515,1243 e 515,1106 (**a**), respectivamente, exibiram fórmula molecular $C_{25}H_{24}O_{12}$ (Figura 50, p. 143) Estes compostos foram atribuídos aos ácidos dicafeoilquínicos (diCaQ) devido aos íons-produtos referentes a perda neutra de quinona ceteno com m/z 353,0782 / 353,0821 / 353,0845 / 353,0953 (**b**), a saída de duas unidades de cafeoil com m/z 191,0425 / 191,0504 / 191,0535 / 191,0500 (**c**), eliminação de clorogenato com m/z 179,0329 / 179,0356 / 179,0535 / 179,0351 (**d**) e perda de água com m/z 173,0366 / 173,0415 / 173,0439 / 173,0432 (**e**), conforme sumarizados na Figura 51, p. 144. Como os padrões de fragmentação eram idênticos aos anteriormente relatados por Clifford *et al.* (2005), esses isômeros foram distinguidos pela proporção relativa de seus fragmentos, bem como pela ordem de eluição (Tabela 19, p. 143). Assim, com base na análise dos dados de fragmentação e por comparação com os dados propostos por Clifford *et al.* (2005) foi possível caracterizar estes compostos como ácidos dicafeoilquínicos: 1,4-diCaQ (**12**); 3,4-diCaQ (**13**); 3,5-diCaQ (**14**) e 4,5-diCaQ (**15**), os quais estão sendo relatados pela primeira vez no gênero.

Figura 50 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo dos ácidos dicafeoilquínico: (a) 1,4-diCaQ; (b) 3,4-diCaQ; (c) 3,5-di-CaQ e (d) 4,5-di-CaQ.



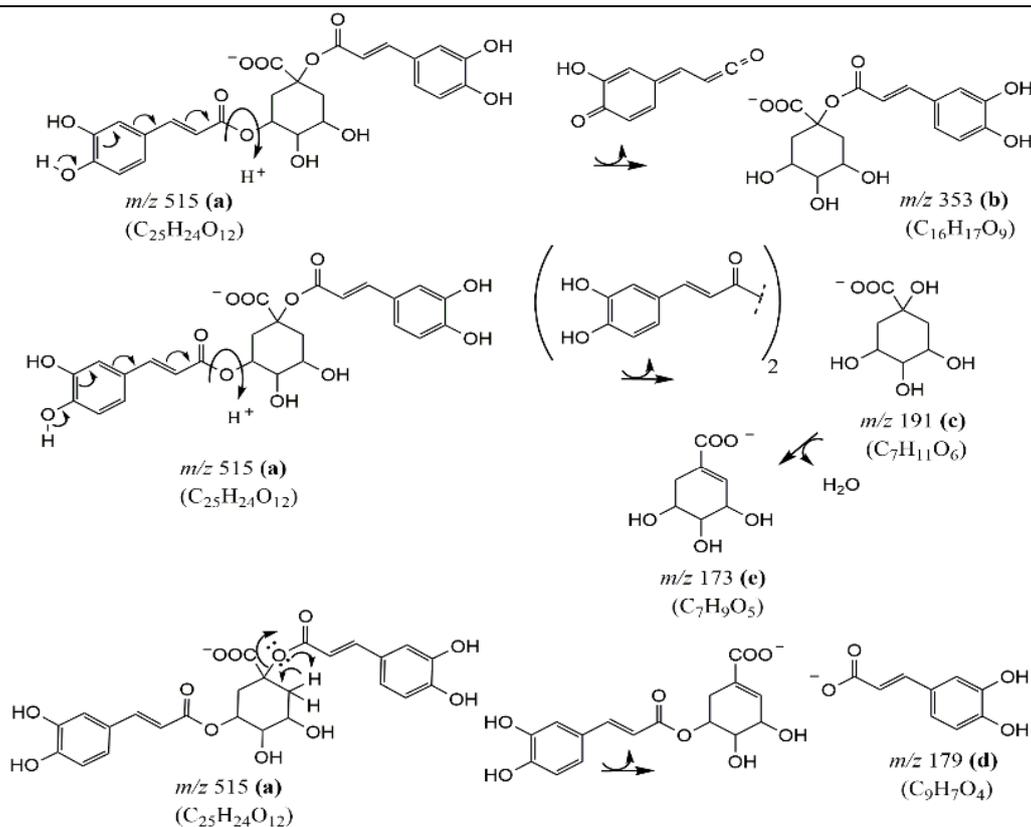
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 19 - Abundância relativa dos íons-produtos (EM/EM) no modo negativo dos ácidos dicafeoilquínicos (diCaQ).

Compostos	Íons-produtos (EM/EM)			
	m/z	Abundância (%)	m/z	Abundância (%)
1,4-diCaQ	191	30	179	45
3,4-diCaQ	191	90	179	60
3,5-diCaQ	191	40	179	30
4,5-diCaQ	191	25	179	65

Fonte: Clifford *et al.*, (2005).

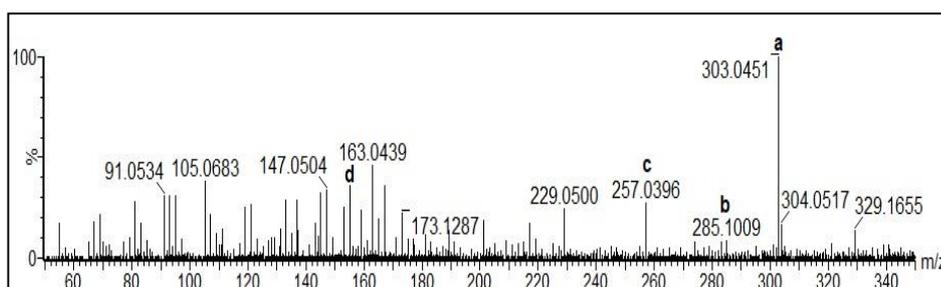
Figura 51 - Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido dicafeoilquínico.



Fonte: Elaborada pela autora.

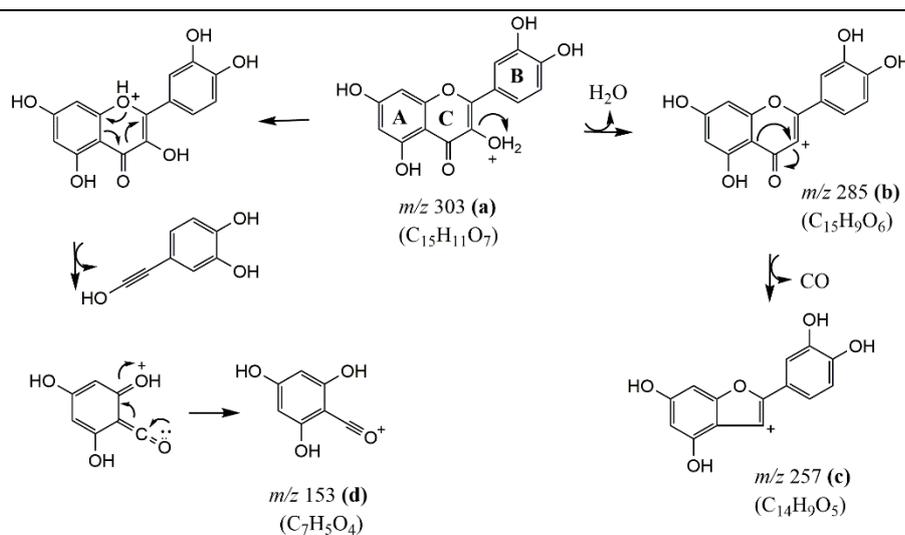
O íon protonado com m/z 303,0451 (a) ($t_r = 5,94$ min) foi consistente com a fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$. Seu espectro EM/EM (Figura 52) mostrou íons com m/z 285,1009 (b) consistente com a perda de água, e posterior eliminação de monóxido de carbono com m/z 257,0396 (c). Além disso, foi observado íon com m/z 153,0287 (d) decorrente da fragmentação Retro Diels Alder (RDA) no anel C (Figura 53, p. 145). Esse composto foi identificado como flavonoide quercetina (20) após ser comparado com o padrão autêntico nas mesmas condições cromatográficas, o qual está sendo relatado pela primeira vez no gênero (ENGELS *et al.*, 2012).

Figura 52 - Espectro de massa (EM/EM) no modo positivo da quercetina (20).



Fonte: Elaborada pela autora.

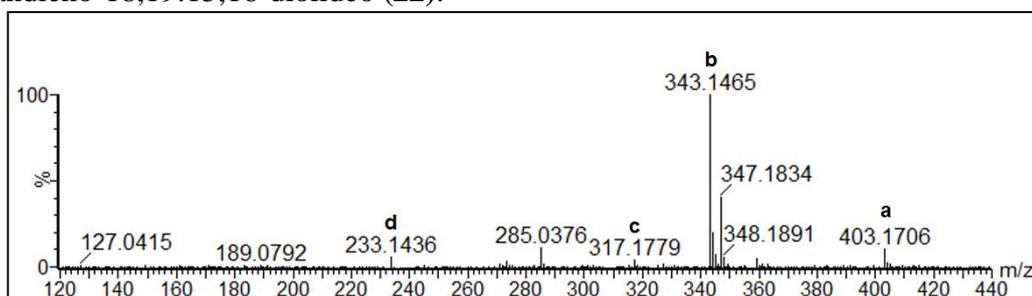
Figura 53 - Esquema mostrando as principais fragmentações da quercetina (**20**).



Fonte: Elaborada pela autora.

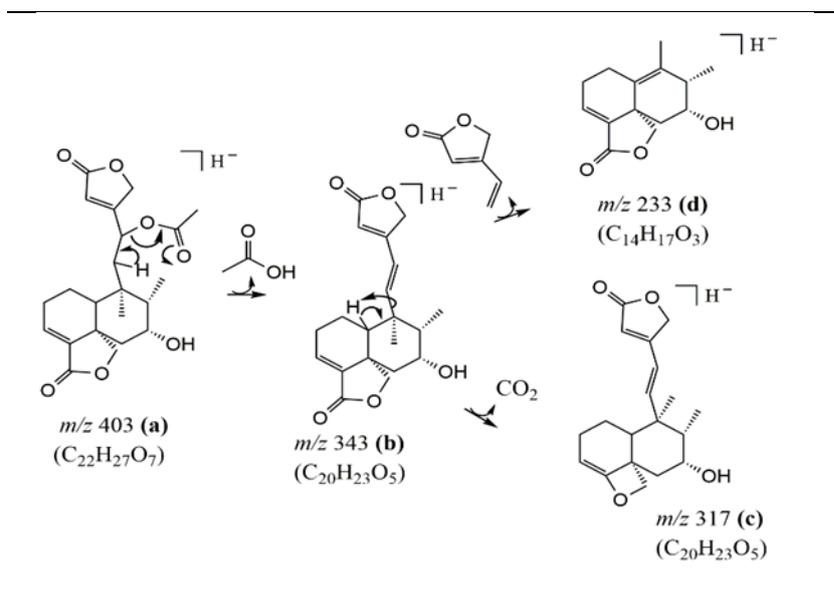
O pico 22 ($t_r = 6,65$ min) exibiu um íon molecular desprotonado com m/z 403,1706 (**a**), consistente com a fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_4$. Seu espectro EM/EM (Figura 54) mostrou íons-produtos compatíveis com a perda de ácido acético com m/z 343,1465 (**b**), perda de monóxido de carbono com m/z 317,1779 (**c**) e perda neutra de vinil-butenil-lactona com m/z 233,1436 (**d**) (Figura 55, p. 146). Este composto foi caracterizado como 12-acetoxi-7-hidroxi-3,13(14)-clerodandieno-18,19:15,16-diolídeo (**22**). Esse composto foi previamente encontrado em *E. viscosa* (VIEIRA *et al.*, 2006).

Figura 54 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do 12-acetoxi-7-hidroxi-3,13(14)-clerodandieno-18,19:15,16-diolídeo (**22**).



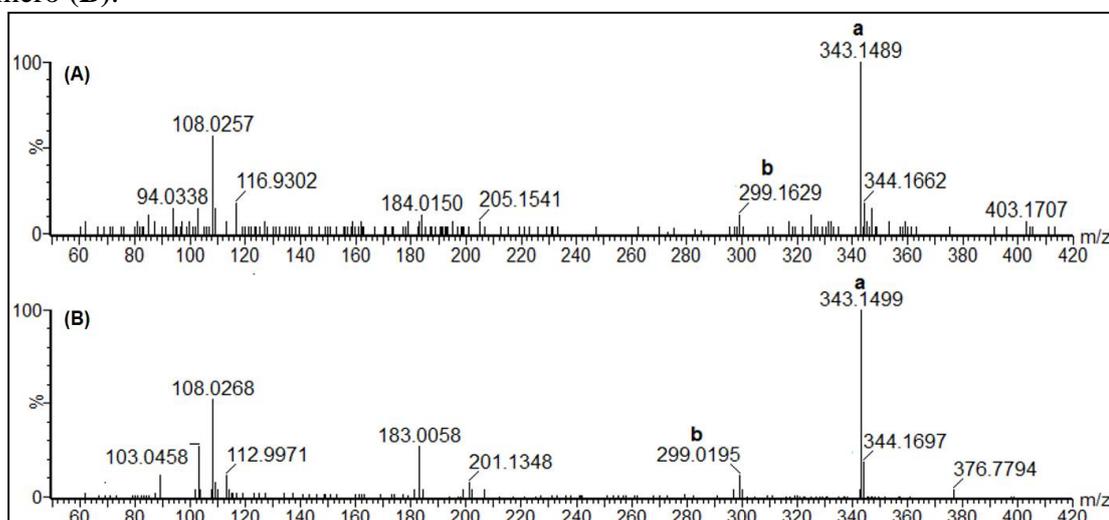
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 55 - Esquema mostrando as principais fragmentações de 12-acetoxi-7-hidroxi-3,13(14)-clerodandieno-18,19:15,16-diolídeo (**22**).



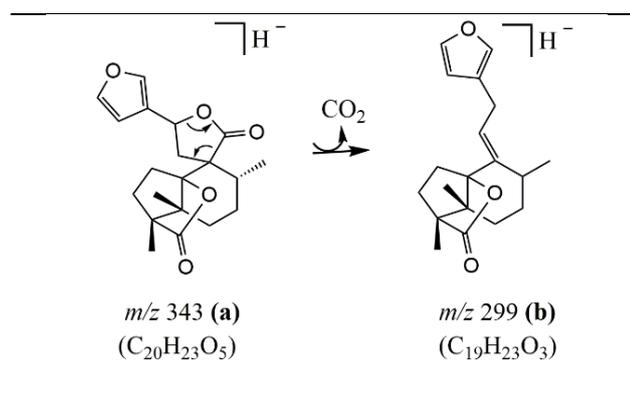
Os íons desprotonados com m/z 343,1489 (**a**) ($t_r = 6,90$ min) e 343,1499 ($t_r = 7,93$ min) foram consistentes com a fórmula molecular $C_{20}H_{25}O_5$ (Figura 56). Ambos mostraram íons-produtos com m/z 299,1629 / 299,0195 (**b**) sugerindo uma ruptura do anel lactônico atribuída a perda de dióxido de carbono, conforme mostrado na Figura 57, p. 147. Estes compostos foram identificados como o diterpeno clerodânico lactona isociliolida (**24**) e seu epímero (**30**), que foram encontrados anteriormente em *Conyza schimperi* (Asteraceae) (ZDERO *et al.*, 1990).

Figura 56 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo de lactona isociliolida (**A**) e seu isômero (**B**).



Fonte: Elaborada pela autora.

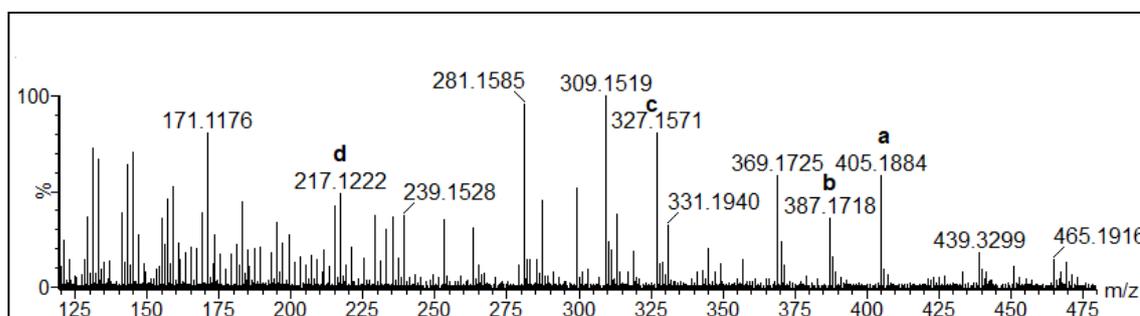
Figura 57 - Esquema mostrando a principal fragmentação da lactona isociliolida (**24**) e seu isômero (**30**).



Fonte: Elaborada pela autora.

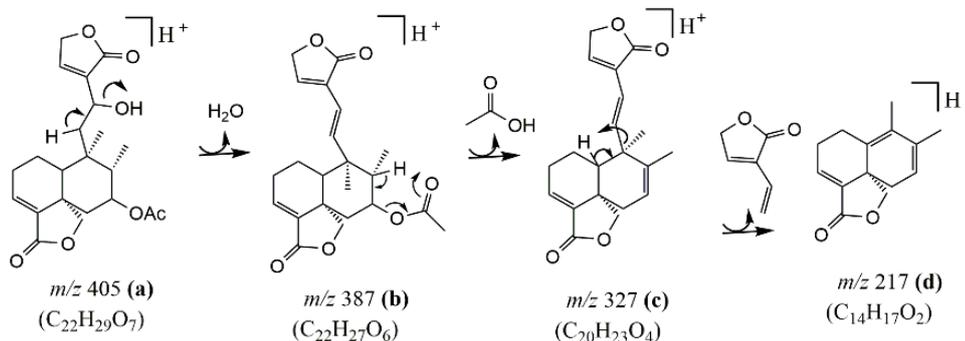
O pico 25 ($t_r = 6,90$ min) foi determinado como diterpeno clerodânico kerlinolida (**25**) cuja fórmula molecular $C_{22}H_{28}O_7$ foi deduzida do íon protonado com m/z 405,1884, Figura 58. A estrutura proposta foi confirmada com base na observação dos íons-produtos com m/z 387,1718 (**b**) sugerindo uma perda de água, seguida de perda de ácido acético com m/z 327,1571 (**c**) e perda neutra de vinil-butenil-lactona com m/z 217,1222 (**d**), conforme sumarizados na Figura 59, p. 148. Kerlinolida foi previamente isolada de *E. viscosa* (VIEIRA *et al.*, 2006).

Figura 58 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo da kerlinolida (**25**).



Fonte: Elaborada pela autora.

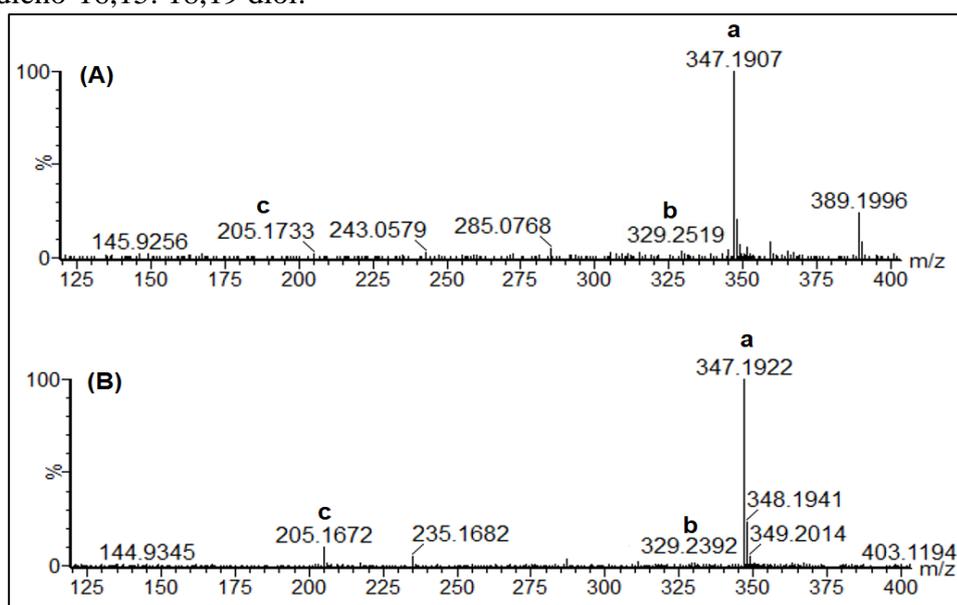
Figura 59 - Esquema mostrando as principais fragmentações da kerlinolida (**25**).



Fonte: Elaborada pela autora.

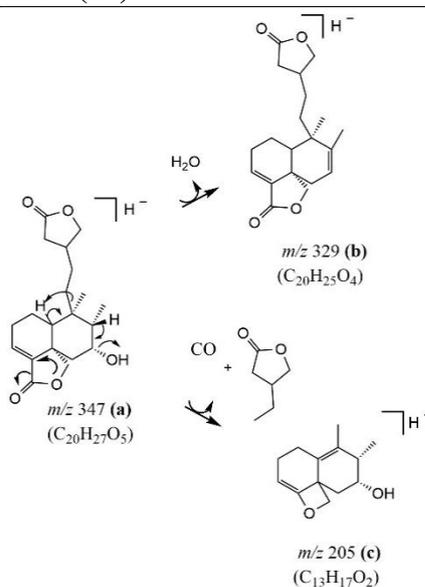
Os íons moleculares desprotonados com m/z 347,1907 / 347,1922 / 347,1877 (**a**) observados para os picos 27 ($t_r = 7,28$ min), 28 ($t_r = 7,53$ min) 32 ($t_r = 8,57$ min), respectivamente, foram atribuídos à fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_5$, (Figura 60). Fragmentos de íons com m/z 329,2519 / 329,2392 / 329,2495 (**b**) referente a perda de água, bem como a perda neutra de vinil-butirolactona seguida de monóxido de carbono m/z 205,1733 / 205,1672 / 205,1671 (**c**), conforme mostrado na Figura 61, p. 149. Assim, estes compostos (**27**) e (**28**) foram identificados como 7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19 diol, um diterpeno clerodânico relatado em *Baccharis trimera* (Asteraceae) (AKAIKE *et al.*, 2003).

Figura 60 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo dos isômeros 7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15: 18,19 diol.



Fonte: Elaborada pela autora.

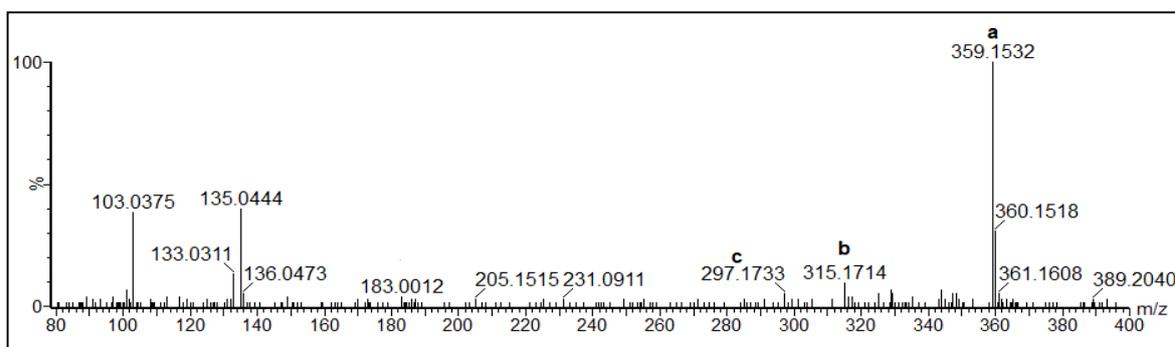
Figura 61 - Esquema mostrando as principais fragmentações do 7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diol (**27**) e seu isômero (**28**).



Fonte: Elaborada pela autora.

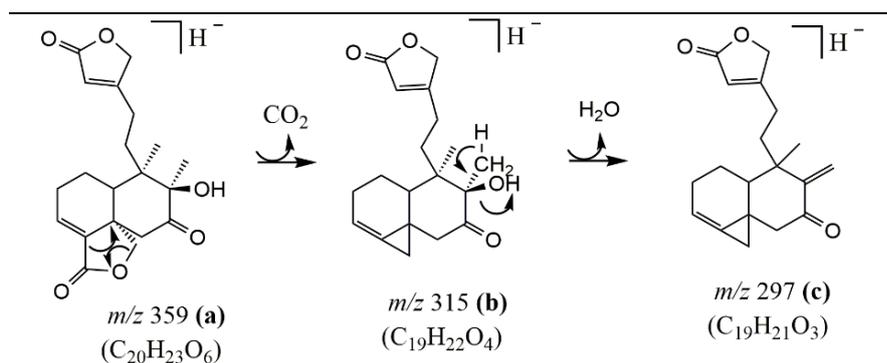
O pico 29 ($t_r = 7,81$ min) foi caracterizado como diterpeno clerodano bacchariol (**29**) devido ao seu íon molecular desprotonado com m/z 359,1324 (**a**), atribuído a fórmula molecular de $C_{20}H_{24}O_6$, conforme mostra a Figura 62, juntamente com íons-produtos com m/z 315,1714 (**b**) gerado pela descarboxilação e seguido de desidratação com m/z 297,1733 (**c**) (Figura 63, p. 150) (JANUÁRIO *et al.*, 2004). Esse composto foi encontrado anteriormente em *B. gaudichaudiana* (AKAIKE *et al.*, 2003).

Figura 62 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo do bacchariol (**29**).



Fonte: Elaborada pela autora.

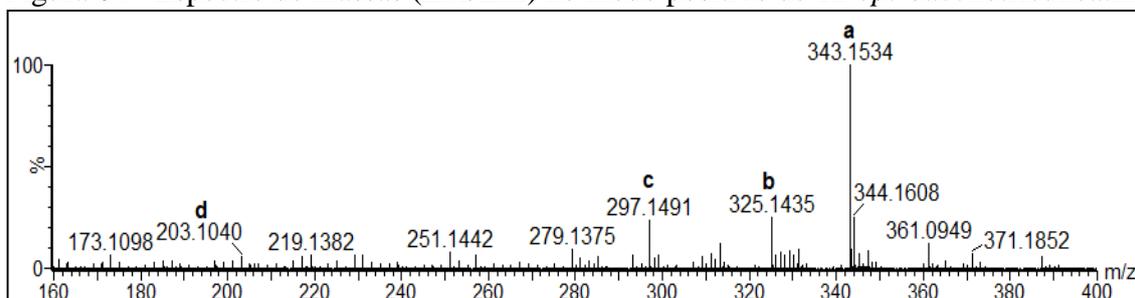
Figura 63 - Esquema mostrando as principais fragmentações de bacchariol (**29**).



Fonte: Elaborada pela autora.

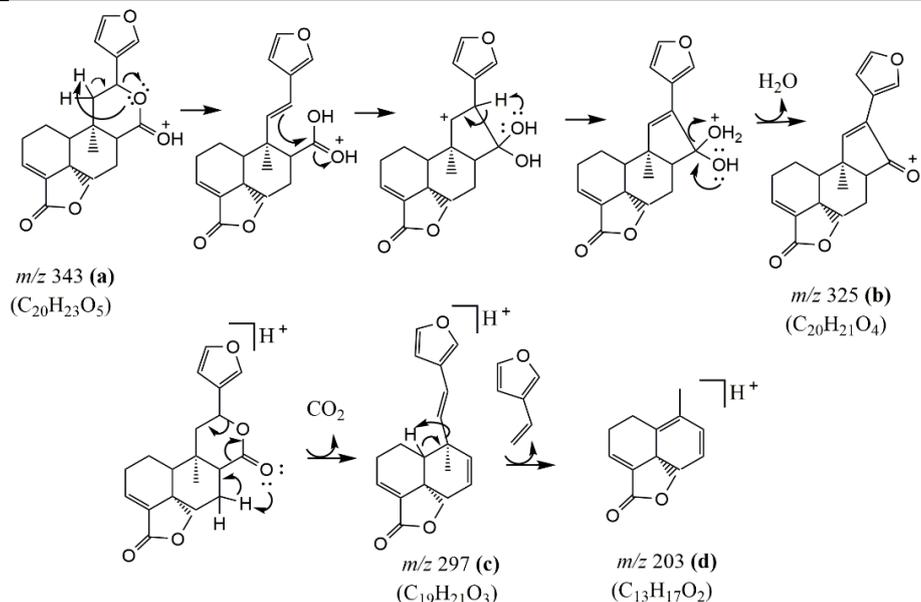
O pico 31 ($t_r = 8,15$ min) exibiu um íon molecular protonado com m/z 343,1534 (**a**), cuja fórmula molecular deduzida da massa monoisotópica, $C_{20}H_{22}O_5$ (Figura 64). Além disso, o seu espectro de EM/EM mostrou íons fragmentos referentes a perda de água com m/z 325,1435 (**b**), perda de dióxido de carbono com m/z 297,1491 (**c**) e posterior eliminação neutra de vinil-butirolactona com m/z 203,1040 (**d**) (Figura 65, p. 151). Este composto foi identificado como 12-*epi*-bacchotricuneatina (**31**), um diterpeno clerodano relatado em *E. viscosa* (VIEIRA *et al.*, 2004).

Figura 64 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo de 12-*epi*-bacchotricuneatina (**31**).



Fonte: Elaborada pela autora.

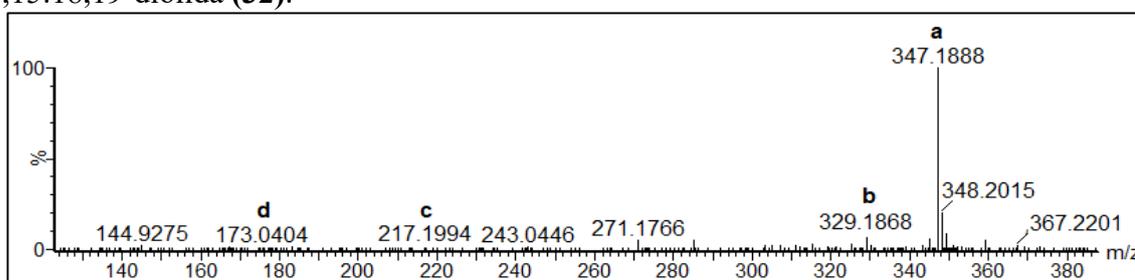
Figura 65 - Esquema mostrando as principais fragmentações de 12-*epi*-bacchotricuneatina (**31**).



Fonte: Elaborada pela autora.

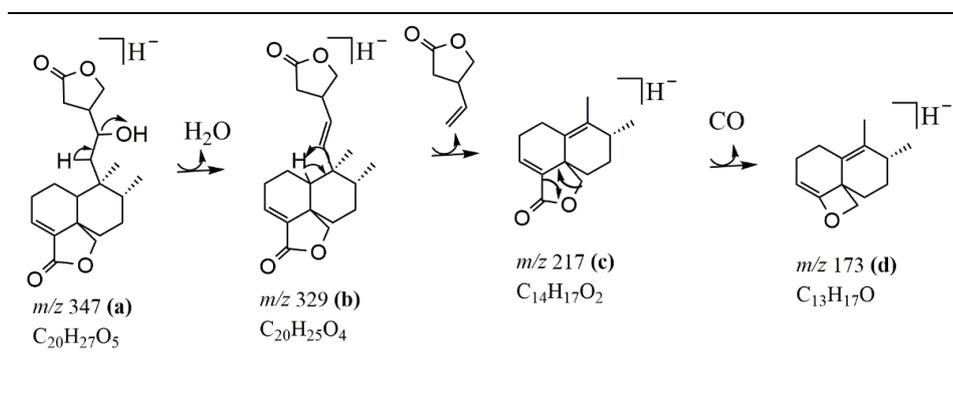
O pico 32 ($t_r = 8,57$ min) mostrou um íon molecular desprotonado com m/z 347,1888 (**a**), compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{27}O_5$. Seu espectro de EM/EM, conforme observado na Figura 66, mostrou íons fragmentos correspondentes a perda de água com m/z 329,1868 (**b**), a saída de vinil-butirilactona resultando no íon com m/z 217,1766 (**c**), bem como, a eliminação de monóxido de carbono a partir do íon com m/z 173,0404 (**d**) (Figura 67, p. 152). Este composto foi identificado como diterpeno clerodânico 12-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diolida, o qual está sendo descrito pela primeira vez na espécie (JANUÁRIO *et al.*, 2004).

Figura 66 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo de 12-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diolida (**32**).



Fonte: Elaborada pela autora.

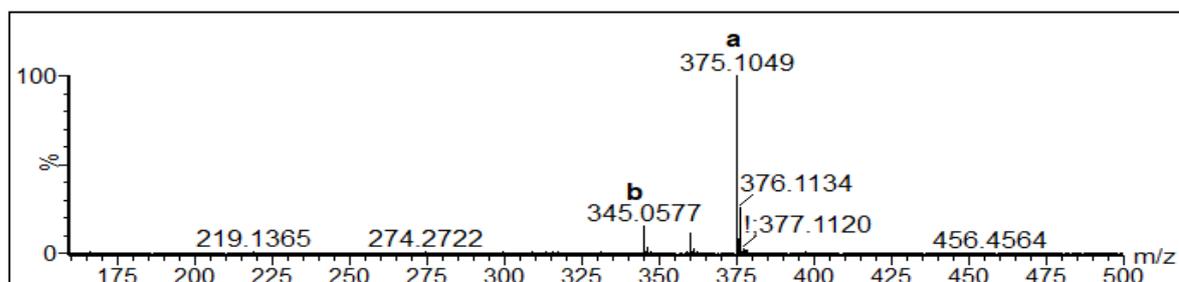
Figura 67 - Esquema mostrando as principais fragmentações de 12-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diolida (**32**).



Fonte: Elaborada pela autora.

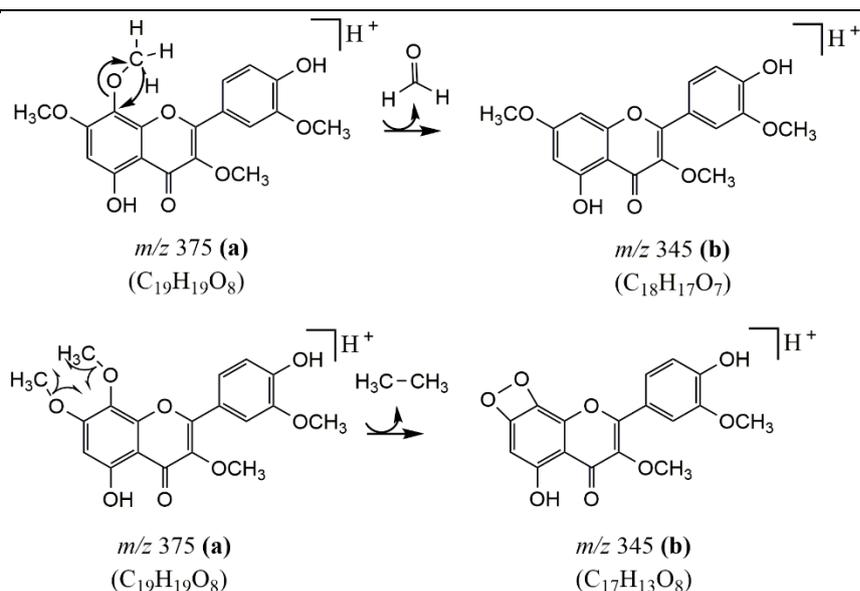
O pico 33 ($t_r = 8,60$ min) exibiu um íon molecular protonado com m/z 375,1049 (**a**) compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_8$, cujo espectro de massas (EM/EM) (Figura 68) mostrou íon fragmento referente a perda de 30 Da com m/z 345,0577 (**b**), consistente com perda de formaldeído ou etano, conforme sumarizados na Figura 69, p. 153. Assim, este composto foi identificado como flavonoide ternatina (**33**) por comparação com padrão autêntico nas mesmas condições cromatográficas (LIMA *et al.*, 1996).

Figura 68 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo da ternatina (**33**).



Fonte: Elaborada pela autora.

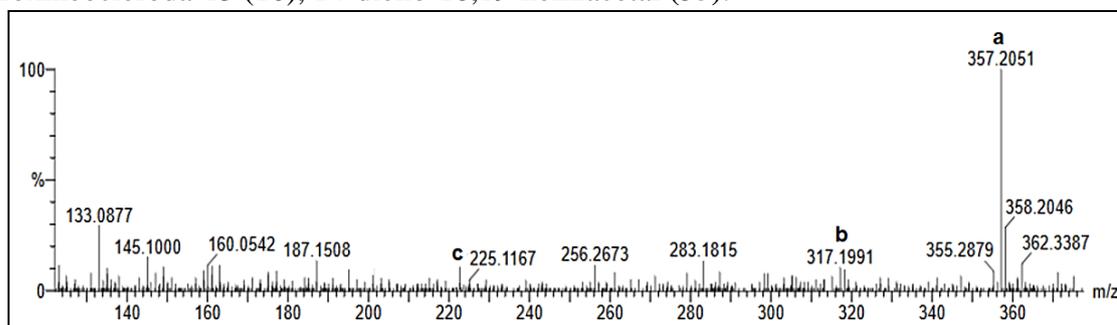
Figura 69 - Esquema mostrando a principal fragmentação da ternatina (**33**).



Fonte: Elaborada pela autora.

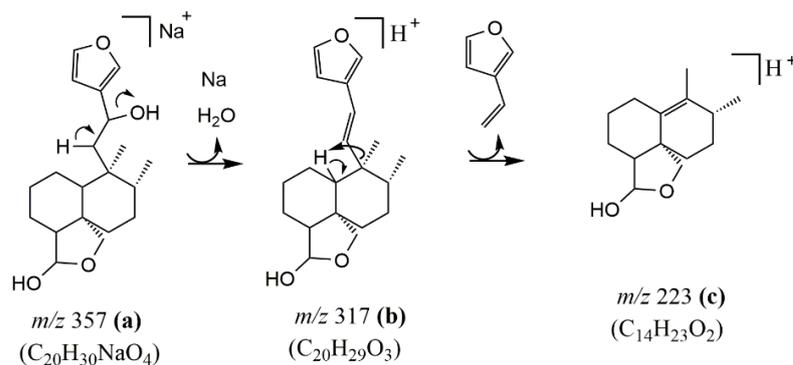
O pico 35 ($t_r = 10,01$ min) mostrou um íon de aduto de sódio com m/z 357,2051 (**a**) consistente com a fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_4$. Seu espectro EM/EM (Figura 70) mostrou íons-produtos referentes a perda de água com m/z 317,1991 (**b**) e posterior eliminação neutra de vinil-furano com m/z 223,1064 (**c**), conforme mostrado na Figura 71, p. 154. Esse composto (**35**) foi caracterizado como 15,16-epóxi-12-hidroxieneocleroda-13(16),14-dieno-18,19-hemiacetal, um diterpeno já relatado em *E. viscosa* (SILVEIRA; PESSOA, 2005).

Figura 70 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo de 15,16-epóxi-12-hidroxieneocleroda-13 (16), 14-dieno-18,19-hemiacetal (**35**).



Fonte: Elaborada pela autora.

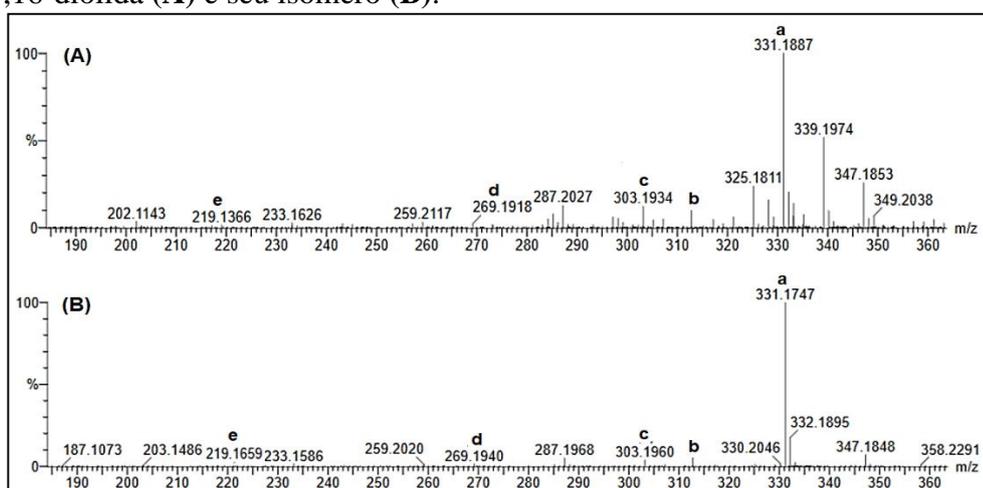
Figura 71 - Esquema mostrando as principais fragmentações de 15,16-epóxi-12-hidroxieneocleroda-13(16),14-dieno-18,19-hemiacetal (**35**).



Fonte: Elaborada pela autora.

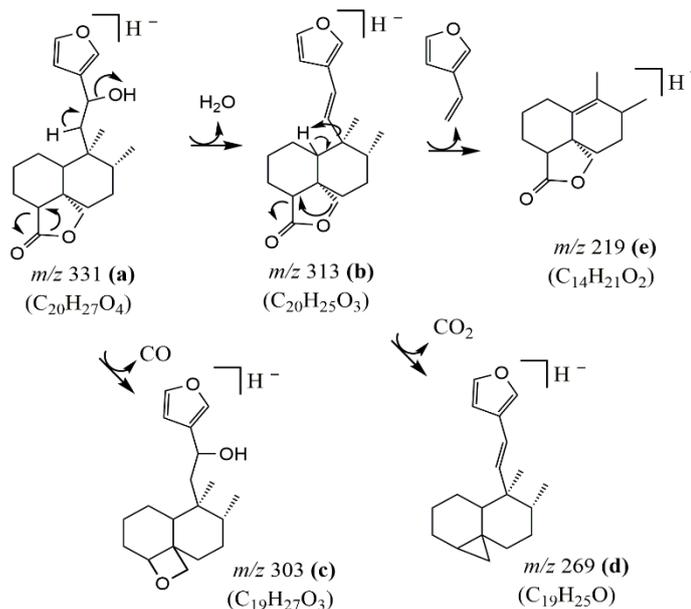
Os íons desprotonados com m/z 331,1887 e 331,1747 (**a**) encontrados nos picos 36 ($t_r = 10,05$ min) e 39 ($t_r = 10,60$ min), foram compatíveis com a fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_4$. Seus espectros de EM/EM (Figura 72) mostraram fragmentos referentes a perda de água com m/z 313,0215 / 313,0287 (**b**), monóxido de carbono com m/z 303,1934 / 303,1960 (**c**), dióxido de carbono com m/z 269,1918 / 269,1940 (**d**) e vinil-furano com m/z 219,1366 / 219,1659 (**e**), conforme sumarizados na Figura 73, p. 155. Portanto, esses diterpenos foram propostos como diastereoisômero de 12-hidroxi-clerodandien-18,19: 15,16-diolida, os quais foram relatados para *E. viscosa* (SILVEIRA; PESSOA, 2005).

Figura 72 - Espectro de massas (EM/EM) no modo negativo de 12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida (**A**) e seu isômero (**B**).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 73 - Esquema mostrando as principais fragmentações dos diastereoisômeros 12-hidroxi-clerodandien-18,19: 15,16-diólida (**36**) e seu isômero (**39**).



Fonte: Elaborada pela autora.

O íon molecular protonado com m/z 389,1940 ($t_r = 9,17$ min), foi atribuído à fórmula molecular $C_{22}H_{28}O_6$ (Figura 74). Fragmentos de íons referentes a perda de ácido acético com m/z 329,1722 (**b**), água com m/z 311,1630 (**c**), vinil-furano com m/z 235,1340 (**d**) e posterior perda de água com m/z 217,1202 (**e**), conforme mostrado na Figura 75, p. 156. Com base no perfil de fragmentação e dados da literatura, este composto foi atribuído a salvisplendina C (**34**), um diterpeno clerodânico relatados em *Heteropappus altaicus* (Asteraceae), o qual está sendo relatado pela primeira vez no gênero (FONTANA; SAVONA; RODRÍGUEZ, 2006). Estudos fitoquímicos de *E. viscosa* realizados nesse trabalho possibilitou o isolamento e elucidação estrutural do constituinte denominado salvisplendina C. Os dados de RMN 1H e bidimensionais estão disponíveis nos Apêndices EE-LL.

Figura 74 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo da salvisplendina C (**34**).

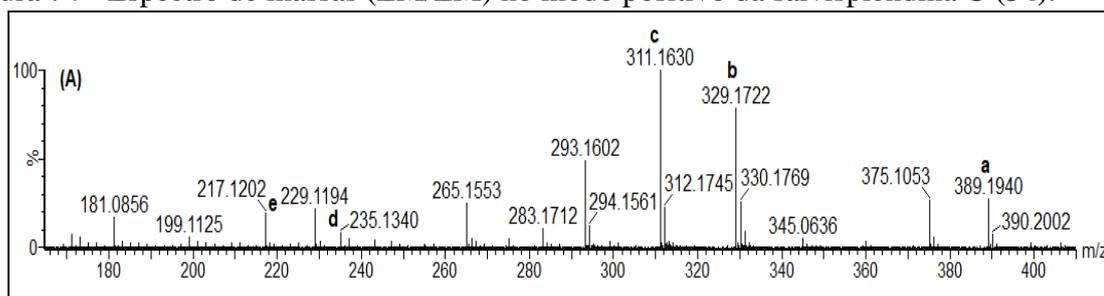
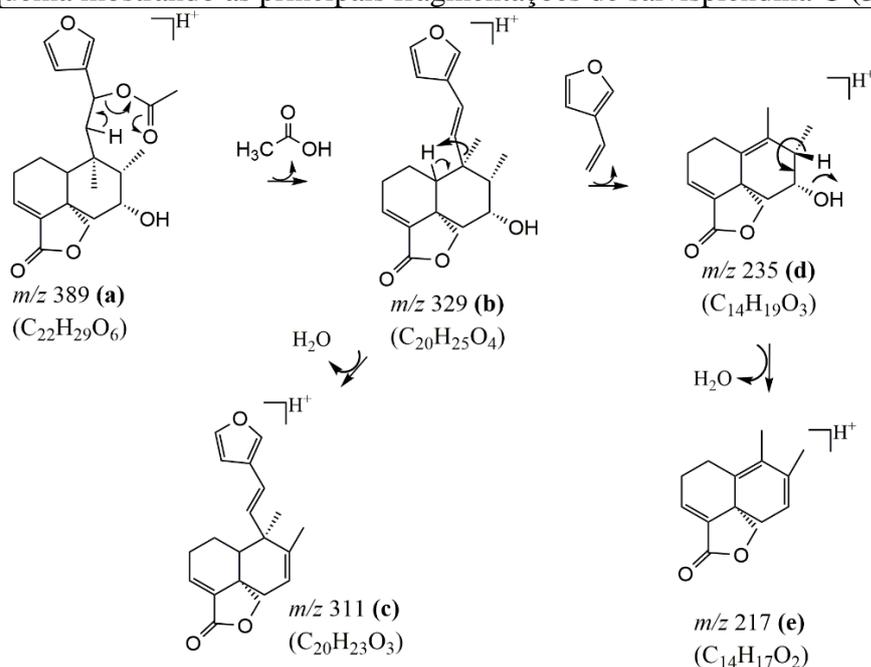


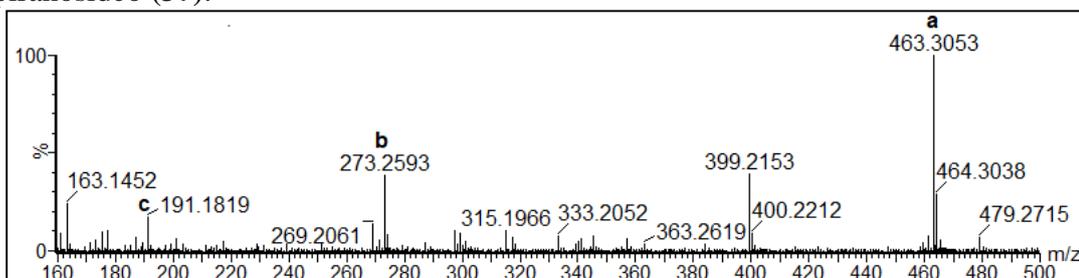
Figura 75 - Esquema mostrando as principais fragmentações de salvisplendina C (**34**).



Fonte: Elaborada pela autora.

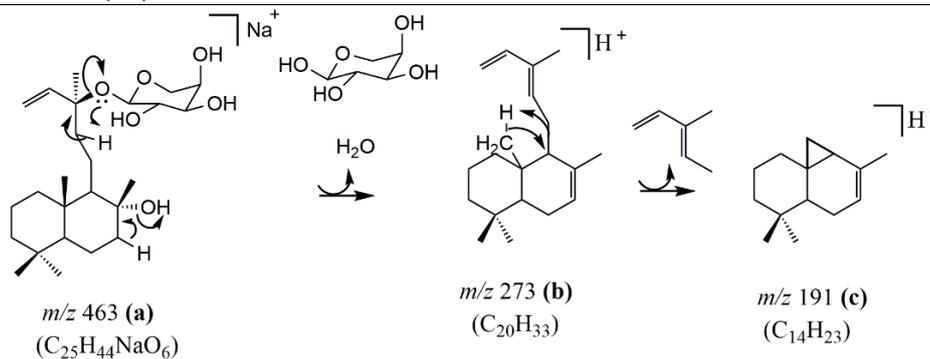
O composto (**37**) ($t_r = 10,33$ min) teve a sua fórmula molecular estabelecida como $C_{25}H_{43}O_6$ a partir do íon de aduto de sódio com m/z 463,3053 (**a**). Foram observados no espectro de massas EM/EM, conforme mostra a Figura 76, fragmentos referentes a perda de uma unidade glicosídica seguido de desidratação com m/z 273,2593 (**b**) e posterior eliminação de 3-metilpent-1,3-dieno com m/z 191,1819 (**c**) (Figura 77, p. 157). Este composto foi identificado como 8 α -hidroxilabd-13(S)-*O*-D-ribopiranosídeo (**39**), um glicosídeo diterpênico previamente encontrado em *E. viscosa* (SILVA-FILHO *et al.*, 2007).

Figura 76 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo do 8 α -hidroxilabd-13(S)-*O*-D-ribopiranosídeo (**37**).



Fonte: Elaborada pela autora.

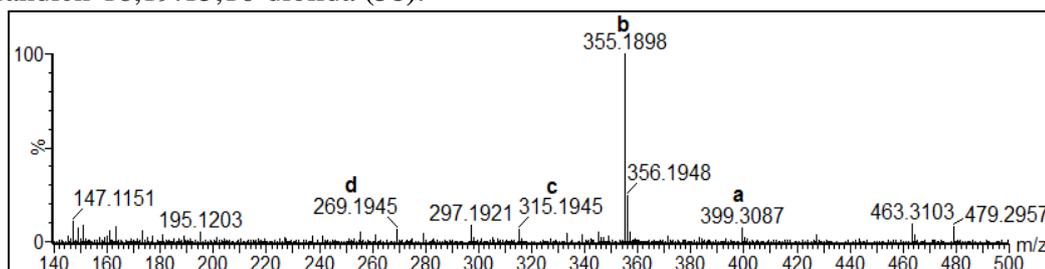
Figura 77 - Esquema mostrando as principais fragmentações do 8 α -hidroxilabd-13(S)-O-D-ribopiranosídeo (**37**).



Fonte: Elaborada pela autora.

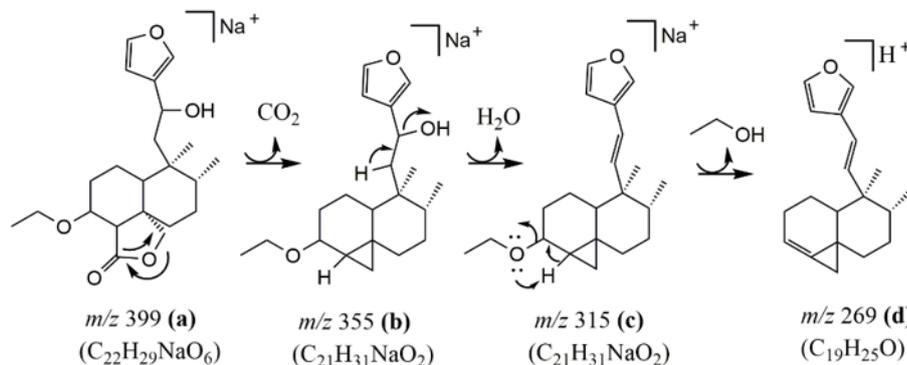
O pico 38 ($t_r = 10,59$ min) exibiu íon aduto de sódio com m/z 399,3087 (**a**) correspondendo à fórmula molecular $C_{22}H_{32}O_5$. Seu espectro (EM/EM), conforme mostra a Figura 78, mostrou íons fragmentos com m/z 355,1898 (**b**), m/z 315,1945 (**c**), m/z 269,1945 (**d**), compatíveis com perdas de dióxido de carbono, água e etanol, respectivamente (Figura 79, p. 158). Este composto foi identificado de 3-etóxi-12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida (**38**), um composto na classe dos diterpenos clerodânicos previamente encontrado em *E. viscosa* (SILVEIRA; PESSOA, 2006).

Figura 78 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo do 3-etóxi-12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida (**38**).



Fonte: Elaborada pela autora.

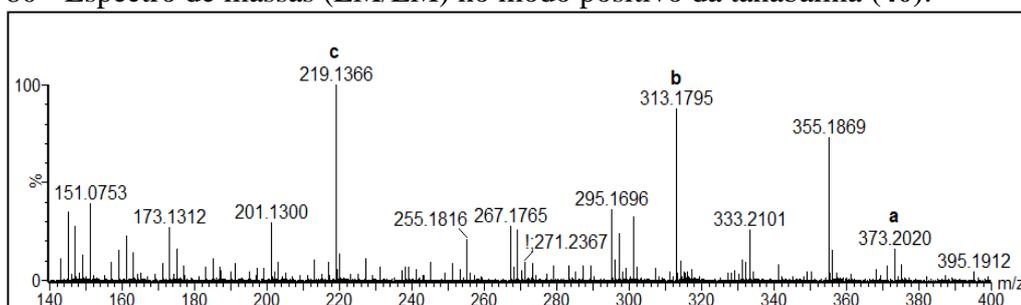
Figura 79 - Esquema mostrando as principais fragmentações de 3-etóxi-12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida (**38**).



Fonte: Elaborada pela autora.

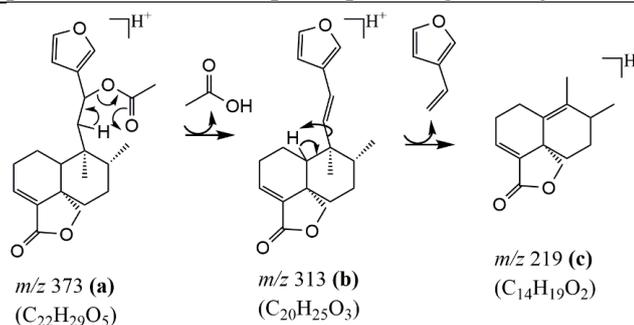
O pico 40 ($t_r = 10,65$ min) exibiu um íon molecular protonado com m/z 373,2020 (**a**), compatível com a fórmula molecular $C_{22}H_{28}O_5$. Seu espectro EM/EM (Figura 80) apresentou íons referentes a perda de ácido acético com m/z 313,1795 (**b**) e fragmento neutro de vinil-furano com m/z 219,1366 (**c**) (Figura 81). Com base nos dados de fragmentação e comparação com padrão autêntico foi inferida como sendo o diterpeno clerodano tanabalina (**40**) (LIMA *et al.*, 1996).

Figura 80 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo da tanabalina (**40**).



Fonte: Elaborada pela autora.

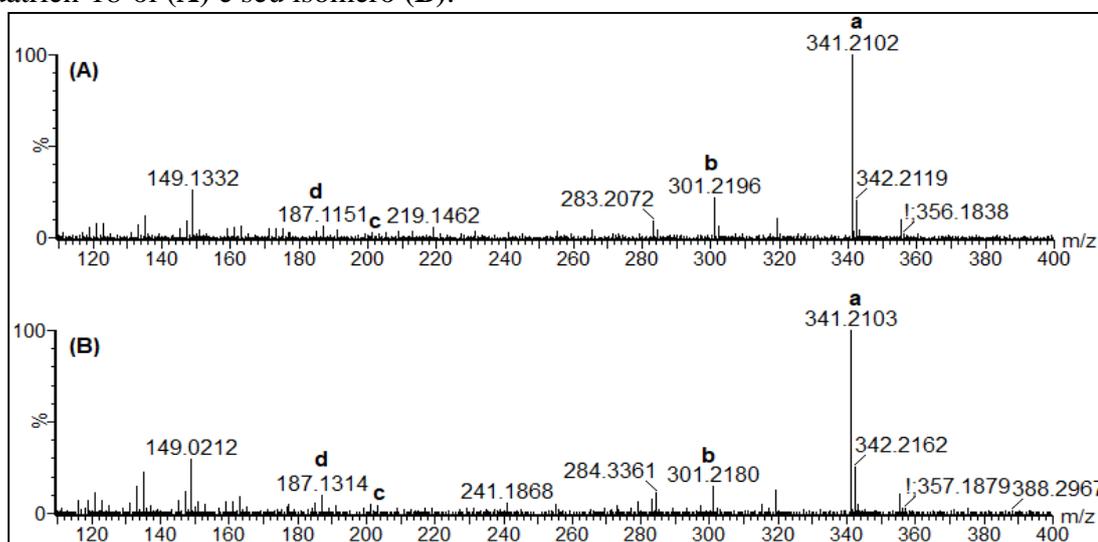
Figura 81 - Esquema mostrando as principais fragmentações de tanabalina (**40**).



Fonte: Elaborada pela autora.

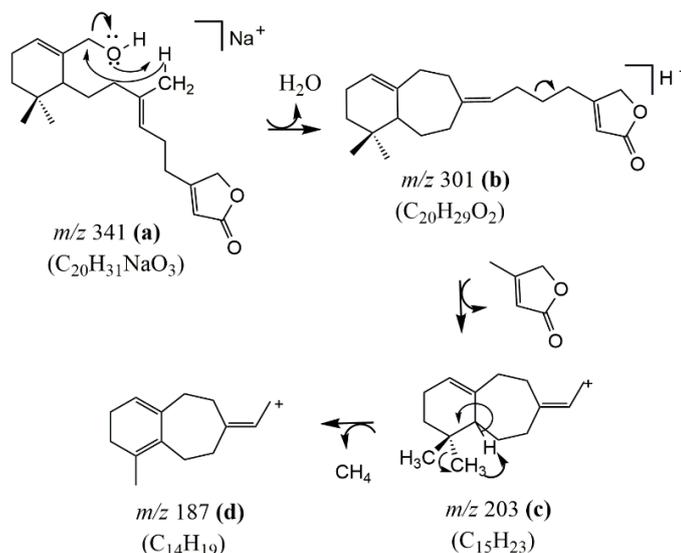
Os compostos diastereoisômeros de 9,10-seco-4,9(10),13(14)-labdatrien-18-ol mostraram íons de aduto de sódio com m/z 341,2102 (**a**) (**41**, $t_r = 11,07$ min) e 341,2103 (**a**) (**43**, $t_r = 12,04$ min) compatíveis com a fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_3$. No espectro de massas (Figura 82), eles mostraram íons fragmentos com m/z 301,2196 / 301,2180 (**b**), m/z 173,0154 / 173,0251 (**c**), e m/z 187,1151 / 187,1314 (**d**), consistentes com a perda de água, vinilbutirolactona e metano, respectivamente (Figura 83). Estes compostos foram previamente encontrados em *E.viscosa* (SILVEIRA; PESSOA, 2006).

Figura 82 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo do 9,10-seco-4,9(10),13(14)-labdatrien-18-ol (**A**) e seu isômero (**B**).



Fonte: Elaborada pela autora.

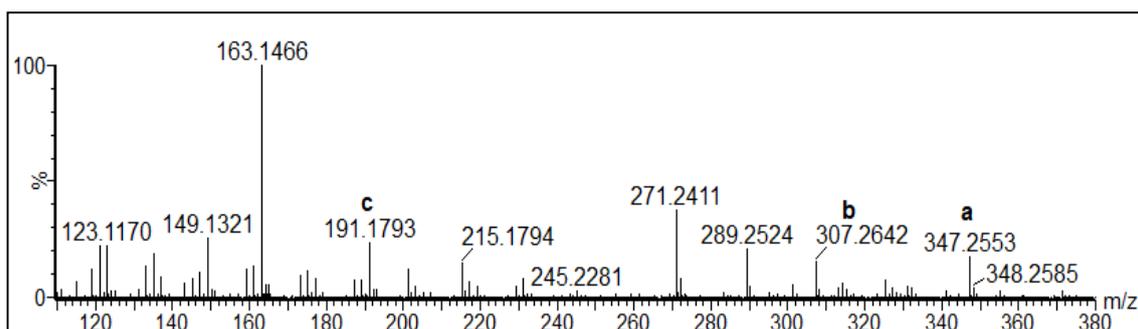
Figura 83 - Esquema mostrando as principais fragmentações do 9,10-seco-4,9(10),13(14)-labdatrien-18-ol (**41**) e seu isômero (**43**).



Fonte: Elaborada pela autora.

O pico 45 ($t_r = 12,81$ min) mostrou um íon de aduto de sódio com m/z 347,2553 consistente com a fórmula molecular $C_{20}H_{36}O_3$ (Figura 84). Os íons fragmentos com m/z 307,2642 (**b**) e m/z 191,1793 (**c**) foram compatíveis com a perda de água e 3-metilpentan-1,2,3-triol, respectivamente (Figura 85). Esse composto foi identificado como sendo tarapacol (**45**) que foi previamente encontrado em *E. viscosa* (SILVA-FILHO *et al.*, 2007).

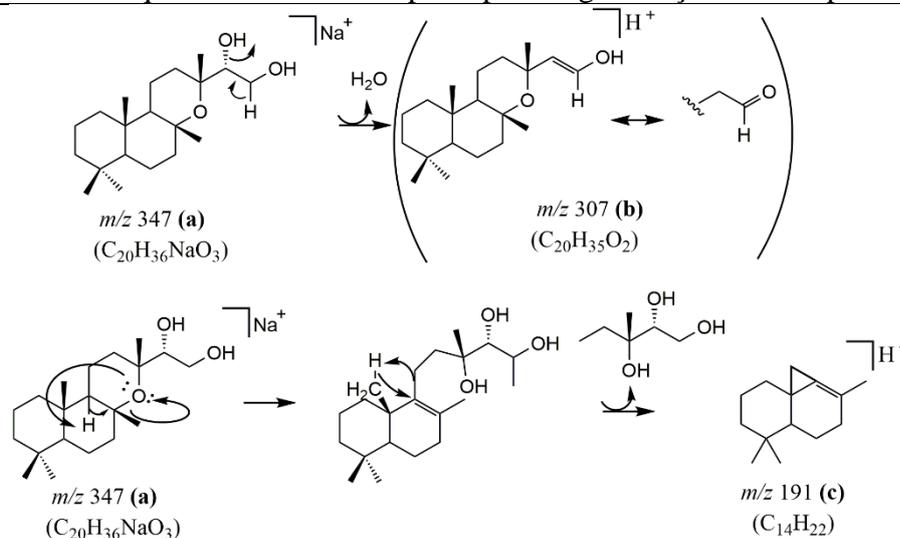
Figura 84 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo do tarapacol (**45**).



Fonte:

Elaborada pela autora.

Figura 85 - Esquema mostrando as principais fragmentações do tarapacol (**45**).

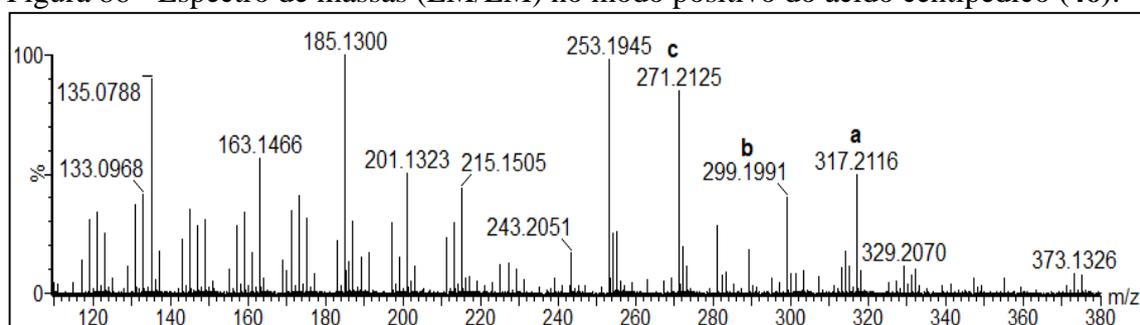


Fonte: Elaborada pela autora.

O pico 46 ($t_r = 13,01$ min) exibiu íon molecular protonado com m/z 317,2116 compatível com a fórmula molecular de $C_{20}H_{28}O_3$ (Figura 86) onde verificou-se a presença dos íons fragmentos com m/z 299,1991 (**b**) e m/z 271,2125 (**c**) referentes a perda de água e ácido fórmico, Figura 87, p. 161. A partir desses dados e por comparação com padrão autêntico foi

possível identificá-lo como sendo um diterpeno denominado ácido centipédico (**46**) (LIMA *et al.*, 1996).

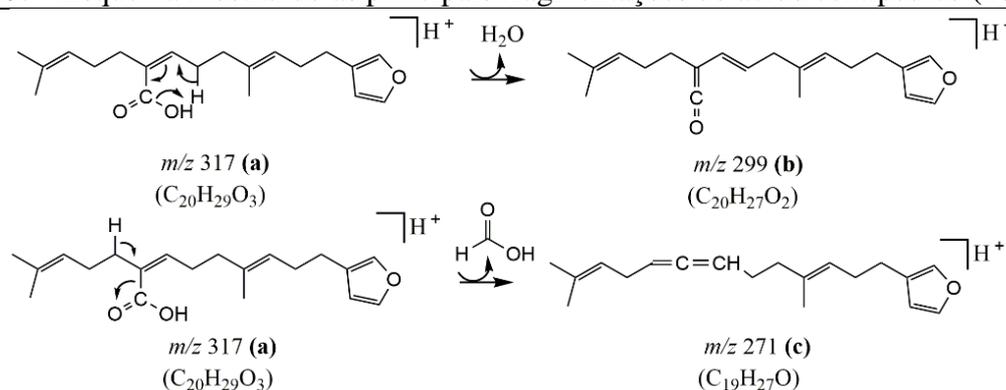
Figura 86 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo do ácido centipédico (**46**).



Fonte:

Elaborada pela autora.

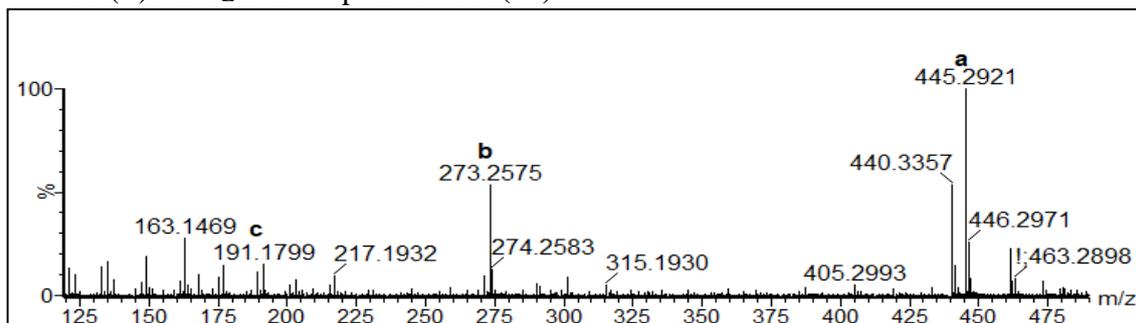
Figura 87 - Esquema mostrando as principais fragmentações do ácido centipédico (**46**).



Fonte: Elaborada pela autora.

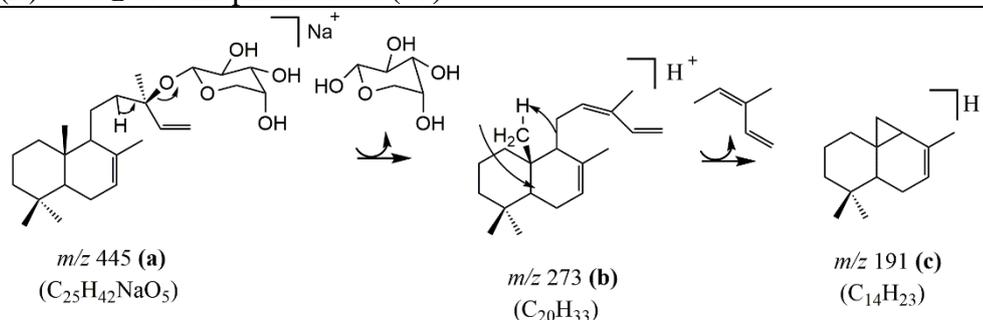
O pico 47 ($t_r = 13,07$ min) mostrou um íon de aduto de sódio com m/z 445,2921 (**a**), consistente com a fórmula molecular $C_{25}H_{42}O_5$ (Figura 88, p. 162). Os íons fragmentos com m/z 273,2575 (**b**) e m/z 191,1799 (**c**) foram consistentes com a perda de uma unidade glicosídica e 3-metilpentan-1,3-dieno, respectivamente, conforme mostrado na Figura 89, p. 162. Esse composto foi caracterizado como 13-hidroxiabda-7,14-dieno-13(*R*)-*O*- α -L-arabinopiranosídeo (**47**), que foi previamente descrito em *E. viscosa* (LEE *et al.*, 2005).

Figura 88 - Espectro de massas (EM/EM) no modo positivo do 13-hidroxiabda-7,14-dieno13(R)-O- α -L-arabinopiranosídeo (**47**).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 89 - Esquema mostrando as principais fragmentações do 13-hidroxiabda-7,14-dieno13(R)-O- α -L-arabinopiranosídeo (**47**).



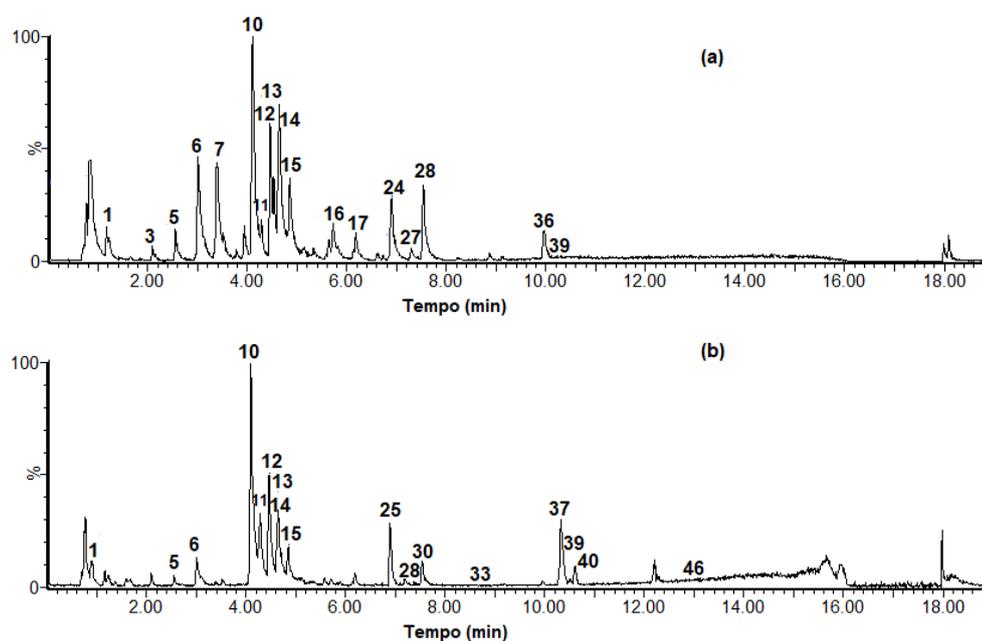
Fonte: Elaborada pela autora.

Além dos constituintes descritos acima nas amostras de infusão, os constituintes bioativos ternatina, tanabalina e ácido centipédico também foram observados, porém somente quando seus respectivos m/z foram extraídos do cromatograma de íons totais (TIC). Verificou-se a identificação através dos seus íons protonados $[M+H]^+$, exibindo m/z 375,1081 ($C_{19}H_{18}O_8$, $\Delta m/z = 0,3$ ppm), 373,2022 ($C_{22}H_{28}O_5$, $\Delta m/z = -1,6$ ppm) e 317,2022 ($C_{20}H_{28}O_3$, $\Delta m/z = 1,9$ ppm). Embora esses compostos sejam abundantes nos capítulos florais de *E. viscosa*, eles são pouco extraídos pela água quente, uma vez que a ternatina, o ácido centipédico e a tanabalina são compostos lipofílicos. Nos extratos analisados, tintura e o extrato otimizado, por exemplo, foi possível observar sinais desses compostos nos cromatogramas, essa diferença pode ser atribuída ao tipo de extração utilizada na obtenção desses extratos e na utilização do solvente etanol na extração e solubilização dos compostos.

5.6.2 Identificação química da infusão dos capítulos florais comerciais do quimiotipo A de *E. viscosa* (Ev024).

Análise por CLUE-EMAR da infusão de capítulos florais comerciais, adquiridos no mercado de Fortaleza-CE (Figura 90), possibilitou a identificação de vinte compostos, dos quais sete foram derivados do ácido cafeico (**5-7** e **12-15**), três flavonoides (**10**, **11**, **33**) e dez diterpenos (**24**, **25**, **27**, **28**, **30**, **36**, **37**, **39**, **40** e **46**) (Tabela 20, p. 164).

Figura 90 - Cromatogramas CLUE da infusão dos capítulos florais de *E. viscosa* comerciais (Ev024) do quimiotipo A: (a) modo de ionização negativo e (b) modo positivo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 20 - Identificação química da infusão dos capítulos florais comerciais (Ev024) do quimiotipo A por CLUE-EMAR (continua).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Modo Negativo		Modo Positivo			Fragmentos de íons m/z	Referências
				[M-H] ⁻ m/z	Erro (ppm)	Fragmentos de íons m/z	[M+H] ⁺ m/z	Erro (ppm)		
1	1,16	não identificado	C ₇ H ₈ O ₇	203,0227	4,5	167,0249; 124,0240; 96,9695	-	-	-	-
3	2,09	não identificado	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₀	497,1440	- 2,4	-	-	-	-	-
5	2,55	ácido neoclorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0929	- 0,6	191,0596; 179,0425	355,1038	2,5	163,0396	(SÁNCHEZ- SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
6	3,01	ácido clorogênico*	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0872	0,0	191,0580; 179,0402	355,1038	2,5	163,0392	(SÁNCHEZ- SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
7	3,38	ácido cafeico*	C ₉ H ₉ O ₄	179,0344	0,0	135,0492; 133,0397	-	-	-	(WANG <i>et al.</i> , 2017)
10	4,10	rutina*	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1456	0,1	301,0393	611,1625	2,1	303,0479	(SOUSA <i>et al.</i> , 2016)
11	4,45	kaempferol 3- <i>O</i> - rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	593,1501	0,2	285,0385	595,1649	-2,4	303,0485; 287,0535	(ENGELS <i>et al.</i> , 2012)
12	4,52	ácido 1,4-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1184	1,2	353,0911;191,0611 ; 179,0385; 173,0498	517,1331	-2,9	287,0570; 163,0381	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
13	4,63	ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1190	0,1	353,0878;191,0589 ; 179,0384; 173,0502	517,1354	1,5	287,0564; 163,0358	CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
14	4,76	ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1172	1,0	353,0930;191,0595 ; 179,0415; 173,0519	517,1371	4,8	287,0533; 163,0368	CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
15	4,84	ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1186	0,2	353,0913; 91,0607; 179,0395; 173,0492	517,1350	0,8	287,0555; 163,0377	CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
16	5,72	não identificado	C ₃₈ H ₄₄ O ₃	547,3201	- 1,1	483,1365; 331,1617	-	-	-	-

Tabela 20 - Identificação química da infusão dos capítulos florais comerciais (Ev024) do quimiotipo A por CLUE-EMAR (continua).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Modo Negativo		Fragmentos de íons m/z	Modo Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)		$[M+H]^+$ m/z	Erro (ppm)		
17	6,72	não identificado	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361,1655	1,1	345,1749; 191,0567	-	-	-	-
24	6,90	lactona isociliolida	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	343,1559	-2,1	299,1790	-	-	-	(ZDERO <i>et al.</i> , 1990)
25	6,90	kerlinolida	C ₂₂ H ₂₈ O ₇	-	-	-	405,1920	1,7	387,1824; 327,1492; 217,1197	(VIEIRA <i>et al.</i> , 2006)
27	7,28	7-hidroxi-3,13- clerodandien- 16,15:18,19diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347,1824	-0,9	329,2465; 205,1456	-	-	-	(JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004)
28	7,53	isômero 7-hidroxi-3,13- clerodandien-16,15:18,19 diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347,1858	0,0	329,2486; 205,1520	349,1981		219,1367; 173,1290; 95,0868	(JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004)
30	7,93	isômero lactona isociliolida	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	343,1499	0,5	299,0195	345,0287	-0,9	301,5874	(ZDERO <i>et al.</i> , 1990)
33	8,60	ternatina **	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	-	-	-	375,1080	0,0	345,0498	(LIMA <i>et al.</i> , 1996)
36	10,05	12-hidroxi-clerodandien- 18,19:15,16-diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331,1907	-0,3	313,2258; 303,1877; 269,1820; 219,1299	-	-	-	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)

Tabela 20 - Identificação química da infusão dos capítulos florais comerciais (Ev024) do quimiotipo A por CLUE-EMAR (conclusão).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Modo Negativo		Fragmentos de íons m/z	Modo Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				[M-H] ⁻ m/z	Erro (ppm)		[M+H] ⁺ m/z	Erro (ppm)		
37	10,33	8 α -hidroxilabd-13(S)-O- β -D-ribopiranosídeo	C ₂₅ H ₄₃ O ₆	-	-	-	463,3044 [M+Na] ⁺	0,6	273,2539	(SILVA-FILHO <i>et al.</i> , 2007)
39	10,60	isômero 12-hidroxi- clerodandien- 18,19:15,16-diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331,1976	- 2,3	313,2054; 303,1850; 269,1899; 219,1300	355,1883 [M+Na] ⁺	- 0,6	184,0769; 133,0869	SILVEIRA; PESSOA, 2005)
40	10,65	tanabalina**	C ₂₂ H ₂₈ O ₅	-	-	-	373,2020	1,9	313,1795; 219,1366	(LIMA <i>et al.</i> , 1996)
46	13,01	ácido centipédico**	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	-	-	-	317,2028	1,9	299,1570; 271,2125	(LIMA <i>et al.</i> , 1996)

*Comparado com padrão autêntico

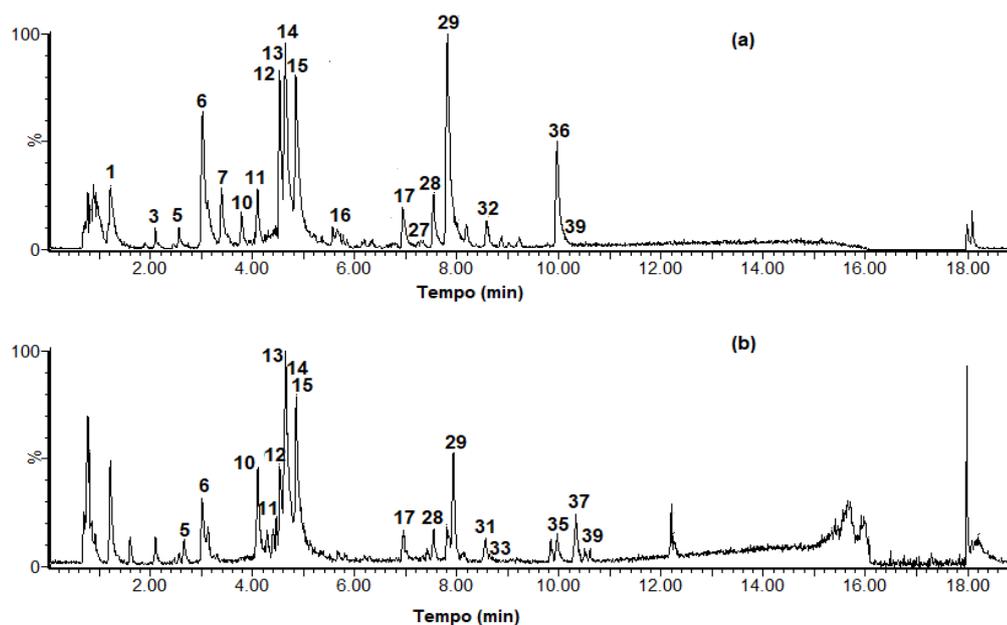
** Identificado pelo íon extraído

Fonte: Elaborada pela autora.

5.6.3 Identificação química da infusão dos capítulos florais cultivados do quimiotipo B de *E. viscosa* (Ev034-01).

O perfil químico da infusão dos capítulos florais cultivados foi estabelecido mediante a análise do cromatograma em modo negativo ESI(-) e positivo ESI(+), conforme ilustrado na Figura 91. Análise por CLUE-EMAR permitiu a identificação de dezessete compostos: sete derivativos do ácido cafeico (5-7 e 12-15), três flavonoides (10, 11, 32) e nove diterpenos (27-29, 31, 32, 35-37 e 39) (Tabela 21, p. 178).

Figura 91 - Cromatogramas de CLUE da infusão de capítulos florais cultivados de *E. viscosa* (Ev034-01) do quimiotipo B: (a) modo de ionização negativo e (b) modo positivo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 21 - Identificação química da infusão dos capítulos florais cultivados (Ev034-01) do quimiotipo B por CLUE-EMAR (continua).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Modo Negativo		Modo Positivo			Fragmentos de íons m/z	Referências
				[M-H] ⁻ m/z	Erro (ppm)	Fragmentos de íons m/z	[M+H] ⁺ m/z	Erro (ppm)		
1	1,22	não identificado	C ₇ H ₈ O ₇	203,0230	4,2	167,0255; 124,0210; 96,9607	-	-	-	-
3	2,09	não identificado	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₀	497,1455	-2,0	-	-	-	-	-
5	2,55	ácido neoclorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0942	-0,9	191,0585; 179,0414	355,1038	2,5	163,0396	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
6	3,01	ácido clorogênico*	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0865	0,5	191,0580; 179,0402	355,1038	2,5	163,0392	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
7	3,38	ácido cafeico*	C ₉ H ₉ O ₄	179,0362	0,8	135,0492; 133,0397	-	-	-	(WANG <i>et al.</i> , 2017)
10	4,10	rutina*	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1490	-1,4	301,0393	611,1625	2,1	303,0479	(SOUSA <i>et al.</i> , 2016)
11	4,45	kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	593,1501	0,8	285,0385	595,1649	-2,4	303,0485; 287,0535	(ENGELS <i>et al.</i> , 2012)
12	4,52	ácido 1,4-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1174	2,5	353,0911;191,0611 ; 179,0385; 173,0498	517,1331	-2,9	287,0570; 163,0381	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNER, 2005)
13	4,63	ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1185	0,5	353,0878;191,0589 ; 179,0384; 173,0502	517,1354	1,5	287,0564; 163,0358	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNER, 2005)
14	4,76	ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1149	0,4	353,0930;191,0595 ; 179,0415; 173,0519	517,1371	4,8	287,0533; 163,0368	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNER, 2005)
15	4,84	ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1190	0,5	353,0913; 91,0607; 179,0395; 173,0492	517,1350	0,8	287,0555; 163,0377	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNER, 2005)
16	5,72	não identificado	C ₃₈ H ₄₄ O ₃	547,3201	-1,1	483,1365; 331,1617	-	-	-	-

Tabela 21 - Identificação química da infusão dos capítulos florais cultivados (Ev034-01) por CLUE-EMAR (continua).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Modo Negativo		Fragmentos de íons m/z	Modo Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)		$[M+H]^+$ m/z	Erro (ppm)		
17	6,72	não identificado	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361,1655	1,1	345,1749; 191,0567	363,2018	0,4	193,2593	-
27	7,53	7-hidroxi-3,13-clerodadien-16,15:18,19diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347,1801	-1,2	329,2465; 205,1542	-	-	-	(JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004)
28	7,55	isômero 7-hidroxi-3,13-clerodadien-16,15:18,19-dioida	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347,1858	0,0	329,2486; 205,1591	349,1981	-	219,1367; 173,1290; 95,0868	(JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004)
29	7,81	bacchariol	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	359,1499	-1,1	315,1479; 297,1524	361,0157	-1,7	317,1247; 299,2298	(AKAIKE <i>et al.</i> , 2003)
31	8,15	12- <i>epi</i> -bachotricuneatina	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	-	-	-	343,1540	0,5	325,1451; 297,1488; 203,1078	(VIEIRA <i>et al.</i> , 2006)
32	8,57	12-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-dioida	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347,1888	1,5	329,1868; 217,1994; 173,0404	-	-	-	(JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004)
33	8,60	ternatina**	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	-	-	-	375,1080	0,0	345,0496	(LIMA <i>et al.</i> , 1996)
35	10,01	15,16-epoxi-12-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-dioida	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	-	-	-	357,2051	3,9	317,1991; 223,1064	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)

Tabela 21 - Identificação química da infusão dos capítulos florais cultivados (Ev034-01) por CLUE-EMAR (conclusão).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Modo Negativo		Fragmentos de íons m/z	Modo Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)		$[M+H]^+$ m/z	Erro (ppm)		
36	10,05	12-hidroxi-clerodadien- 18,19:15,16-diolida	$C_{20}H_{28}O_4$	331,1907	-0,3	313,2258; 303,1900; 269,1923; 219,0632	-	-	-	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)
37	10,33	8 α -hidroxilabd-13(S)- <i>O</i> - β -D-ribopranosídeo	$C_{25}H_{43}O_6$	-	-	-	463,3044[M+Na] ⁺	0,6	273,2539	(SILVA- FILHO <i>et al.</i> , 2007)
39	10,60	isômero 12-hidroxi- clerodadien-18,19:15,16- diolida	$C_{20}H_{28}O_4$	331,1976	-2,3	313,2054; 303,1905; 269,1950; 216,0132	355,1883[M+Na] ⁺	-0,6	184,0769; 133,0869	SILVEIRA; PESSOA, 2005)

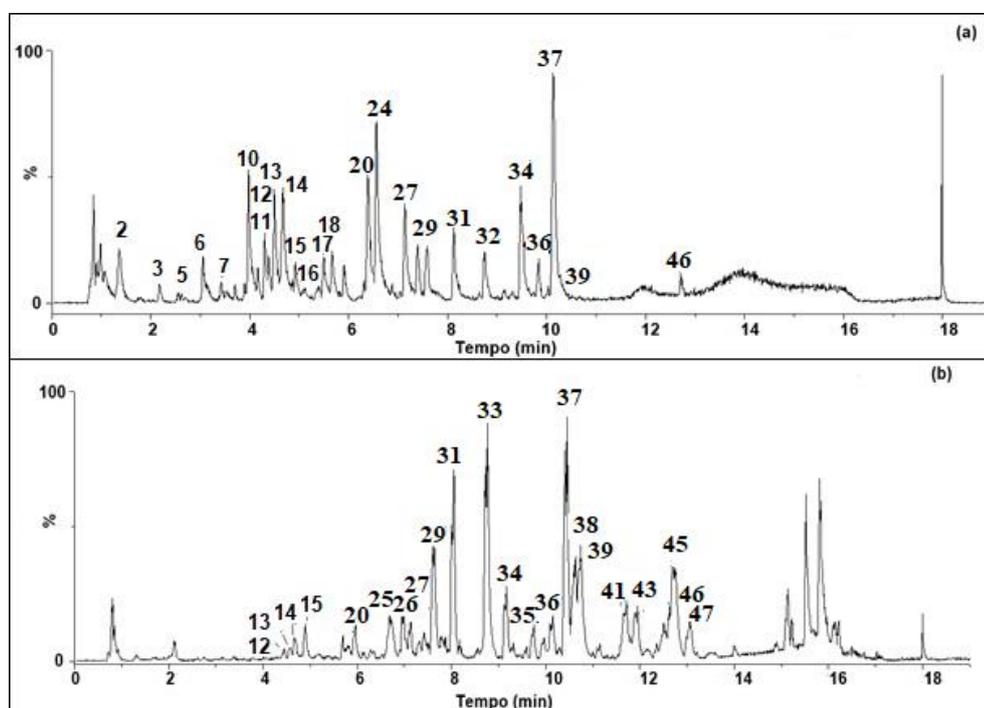
*comparado com padrão autêntico nas mesmas condições cromatográficas. ** íon extraído.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.6.4 Análise do perfil químico da tintura dos capítulos florais do quimiotipo B de *E. viscosa* (Aiuaba-Ev017-03).

O perfil químico da tintura foi estabelecido mediante a análise do cromatograma em modo negativo ESI(-) e positivo ESI(+), como ilustrado na Figura 92. Análise por CLUE-EMAR permitiu a identificação de vinte e sete compostos: um ácido orgânico (2), sete derivados do ácido cafeico (5-7 e 12-15), quatro flavonoides (10, 11, 20 e 33) e quinze diterpenos (24, 25, 27, 29, 31, 34, 35-39, 41, 43, 45-47) (Tabela 22, p. 172).

Figura 92 - Cromatogramas CLUE da tintura dos capítulos florais de *E. viscosa* silvestre (Aiuaba - Ev017-03) do quimiotipo B: (a) modo de ionização negativo e (b) modo positivo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 22 - Identificação química da tintura dos capítulos florais silvestres (Aiuaba - Ev017-03) do quimiotipo B por CLUE-EMAR (continua).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Negativo		Fragmentos de íons m/z	Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)		$[M+H]^+$ m/z	Erro (ppm)		
2	1,36	ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	191,0160	-3,1	173,0054; 147,9248; 111,0100	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
3	2,17	não identificado	$C_{26}H_{26}O_{10}$	497,1440	-2,4	315,0794	-	-	-	
5	2,62	ácido neoclorogênico	$C_{16}H_{18}O_9$	353,0871	-0,6	191,0561; 179,0329	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
6	3,12	ácido clorogênico*	$C_{16}H_{18}O_9$	353,0872	-0,3	191,0537; 179,0384	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
7	3,41	ácido cafeico*	$C_9H_8O_4$	179,0339	-2,8	135,0389; 133,0397	-	-	-	(WANG <i>et al.</i> , 2017)
10	4,03	rutina*	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,1465	1,5	301,0364	-	-	-	(SOUSA <i>et al.</i> , 2016)
11	4,30	kaempferol 3-O- rutinosídeo	$C_{27}H_{30}O_{16}$	593,1496	-1,7	285,0410	-	-	-	(ENGELS <i>et al.</i> , 2012)
12	4,37	ácido 1,4-di-O- cafeoil quínico	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515,1175	-2,9	353,0795; 191,0528; 179,0302; 173,0435	517,1331	-2,9	287,0570; 163,0381;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
13	4,51	ácido 3,4-di-O- cafeoil quínico	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515,1177	-2,5	353,0832; 91,0522; 179,0295; 173,0441	517,1354	1,5	287,0564; 163,0358;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
14	4,56	ácido 3,5-di-O- cafeoil quínico	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515,1194	0,8	353,0853; 91,0533; 179,0305; 173,0443	517,1371	4,8	287,0533; 163,0368;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
15	4,68	ácido 4,5-di-O- cafeoil quínico	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515,1188	-0,4	353,0823; 91,0531; 179,0305; 173,0406	517,1350	0,8	287,0555; 163,0377;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
16	5,38	não identificado	$C_{27}H_{48}O_{11}$	547,3097	-3,8	191,0437; 173,0437	-	-	-	-
17	5,50	não identificado	$C_{20}H_{26}O_6$	361,1651	0,0	317,1709; 173,0414; 163,0428	-	-	-	-

Tabela 22 - Identificação química da tintura dos capítulos florais silvestres (Aiuaba - Ev017-03) do quimiotipo B por CLUE-EMAR (continua).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Negativo		Fragmentos de íons m/z	Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				[M-H] ⁻ m/z	Erro (ppm)		[M+H] ⁺ m/z	Erro (ppm)		
18	5,67	não identificado	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361,1663	3,3	317,1657; 173,0384; 163,0601	-	-	-	-
20	5,94	quercetina*	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,0499	1,8	151,0467	303,0513	2,6	285,1036; 257,0355; 153,0271	-
24	6,90	lactona isociliolida	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	343,1559	4,1	299,1698				(ZDERO <i>et al.</i> , 1990)
25	6,90	kerlinolida	C ₂₂ H ₂₈ O ₇	-	-	-	405,1906	-1,7	387,1871; 327,1520; 217,1540	(VIEIRA <i>et al.</i> , 2006)
26	6,71	não identificado	C ₂₀ H ₂₂ O ₃	-	-	-	311,1641	-0,6	217,1160;	-
27	7,28	7-hidroxi-3,13-clerodandien- 16,15:18,19diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347,1862	1,2	329,0307; 205,1780	349,1129	-2,9	331,2403; 251,0134	(JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004)
29	7,81	bachariol	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	359,1500	1,4	315,1940; 297,1549	361,1587	0,8	317,0187	(AKAIKE <i>et al.</i> , 2003)
31	8,15	12- <i>epi</i> -bachotricuneatina	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	341,1387	1,0	323,7852; 295,1587	343,1540	0,5	325,1451; 297,1488; 203,1078	(VIEIRA <i>et al.</i> , 2006)
32	8,57	12-hidroxi-3,13- clerodandieno-16,15:18,19- diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347,1878	1,2	329,1008; 217,1554; 173,1104	-	-	-	(JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004)
33	8,60	ternatina	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	-	-	-	375,1071	-0,3	345,0704	(LIMA <i>et al.</i> , 1996)
34	9,17	salvisplendina C	C ₂₂ H ₂₈ O ₆	396,1899	-0,5	327,0026; 309,1127; 215,3397	398,1971	1,8	329,1753; 311,1693; 235,1537; 217,1236	(FONTANA; SAVONA; RODRÍGUEZ, 2006)

Tabela 22 - Identificação química da tintura dos capítulos florais silvestre (Aiuaba - Ev017-03) do quimiotipo B por CLUE-EMAR (continua).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Negativo		Fragmentos de íons m/z	Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)		$[M+H]^+$ m/z	Erro (ppm)		
35	10,01	15,16-epoxi-12-hidroxi-13(16),14-dien-18,19-hemiacetal	$C_{20}H_{30}O_4$	-	-	-	357,2045	3,1	317,1981; 223,1078	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)
36	10,05	12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida	$C_{20}H_{28}O_4$	331,1907	-0,3	313,1652; 303,0214; 269,2010; 219,1398	-	-	-	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)
36	10,10	12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida	$C_{20}H_{28}O_4$	-	-	-	355,1871 $[M+Na]^+$	-3,9	313,8567; 221,1444	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)
37	9,81	8 α -hidroxilabda-13(S)-O- β -D-ribopiranosídeo	$C_{25}H_{44}O_6$	439,3058	-0,5	273,0215	-	-	-	(SILVA-FILHO <i>et al.</i> , 2007)
37	10,33	8 α -hidroxilabda-13(S)-O- β -D-ribopiranosídeo	$C_{25}H_{44}O_6$	-	-	-	463,3045 $[M+Na]^+$	1,9	273,2539; 191,1793	(SILVA-FILHO <i>et al.</i> , 2007)
38	10,59	3-etóxi-12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida	$C_{22}H_{32}O_5$	-	-	-	399,2137 $[M+Na]^+$	-2,5	355,2350; 315,2025; 269,1956	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)
39	10,60	isômero 12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida	$C_{20}H_{28}O_4$	331,1921	3,6	313,1025; 313,0257; 269,1960; 219,2014	355,1871 $[M+Na]^+$	-1,7	313,1967; 221,2091	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)
41	11,68	9,10-seco-4,9(10),13(14)-labdatrien-18-ol	$C_{20}H_{30}O_3$	-	-	-	341,2069 $[M+Na]^+$	-3,2	329,0254; 205,3214	(SILVEIRA; PESSOA, 2006)
43	11,76	isômero 9,10-seco-4,9(10),13(14)-labdatrien-18-ol	$C_{20}H_{30}O_3$	-	-	-	341,2082 $[M+Na]^+$	-3,2	329,0200; 205,1216	(SILVEIRA; PESSOA, 2006)
45	12,81	tarapacol	$C_{20}H_{36}O_3$	-	-	-	347,2553 $[M+Na]^+$	1,2	307,2642; 191,1793	(SILVA-FILHO <i>et al.</i> , 2007)

Tabela 22 - Identificação química da tintura dos capítulos florais silvestre (Aiuaba - Ev017-03) do quimiotipo B por CLUE-EMAR (conclusão).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Negativo		Fragmentos de íons m/z	Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)		$[M+H]^+$ m/z	Erro (ppm)		
46	12,99	ácido centipédico	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	315,1974	4,4	299,1570; 271,0109	-	-	-	(LIMA <i>et al.</i> , 1996)
47	13,07	13-hidroxiabda-7,14- dieno 13(R)-O- α -L- arabinopiranosídeo	C ₂₅ H ₄₂ O ₅	-	-	-	445,2921 $[M+Na]^+$	-2,0	273,2575; 191,1799	(LEE <i>et al.</i> , 2005)

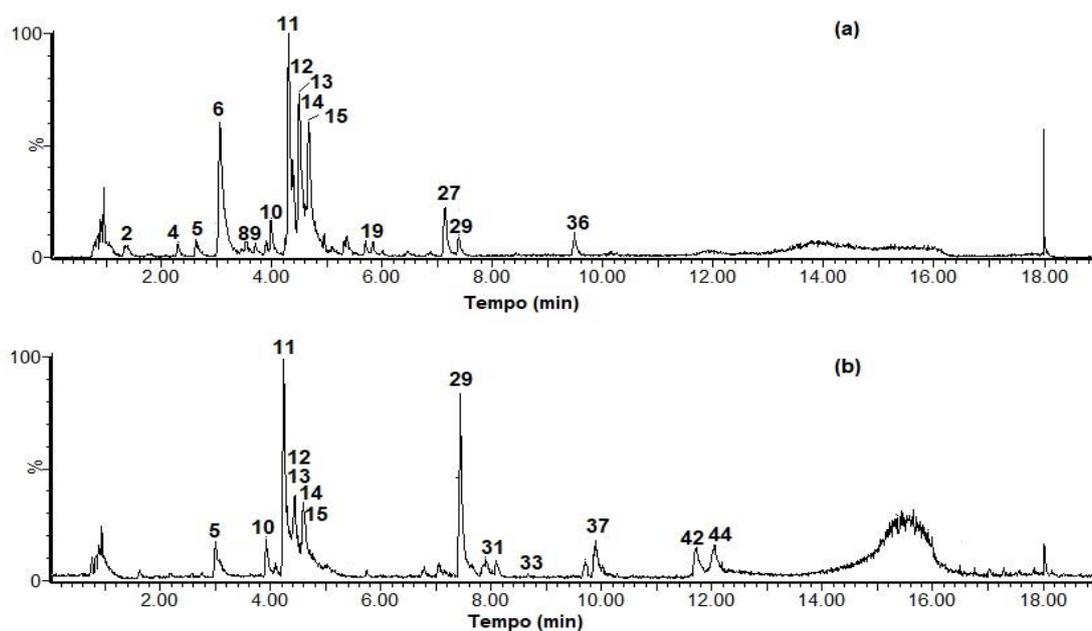
*comparado com padrão autêntico.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.6.5 Análise do perfil químico da infusão das folhas (Ev047) do quimiotipo A de *E. viscosa* cultivada.

O perfil químico do chá das folhas do quimiotipo A foi estabelecido mediante a análise do cromatograma em modo negativo ESI(-) e positivo ESI(+), como ilustrado na Figura 93. A análise por CLUE-EMAR permitiu a identificação de dezenove compostos: dois ácidos orgânicos (2 e 4); nove derivados de ácido cafeico (4-6, 8, 9 e 12-15), três flavonoides (10, 11 e 33) e cinco diterpenos (27, 29, 31, 36 e 37) (Tabela 23, p. 177).

Figura 93 - Cromatograma CLUE das folhas cultivadas do quimiotipo A de *E. viscosa* (Ev047): (a) modo de ionização negativo e (b) modo positivo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 23 - Identificação química do chá das folhas cultivadas (Ev047) do quimiotipo A por CLUE-EMAR (continua).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Negativo		Fragmentos de íons m/z	Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)		$[M+H]^+$ m/z	Erro (ppm)		
2	1,35	ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	191,0190	-1,0	111,0087	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
4	2,31	ácido dihidroxibenzoico hexosídeo	C ₂₀ H ₁₂ O ₄	315,0672	4,8	153,0073; 109,0218	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
5	2,62	ácido neoclorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	1,4	191,0513; 179,0336	355,1031	0,6	163,0392	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
6	3,10	ácido clorogênico*	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0886	2,0	191,0437; 179,0356	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
8	3,52	ácido criptoclorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0875	0,6	191,0528; 179,0376	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
9	3,73	ácido 1-cafeoilquínico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0860	-3,7	191,0547; 179,0343	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
10	3,99	rutina*	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1453	-0,5	301,0305	611,1613	0,2	303,0514	(SOUSA <i>et al.</i> , 2016)
11	4,30	kaempferol 3- <i>O</i> -rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	593,1498	-1,3	285,0304	595,1660	-0,5	303,0506; 287,0534;	(ENGELS <i>et al.</i> , 2012)
12	4,38	ácido 1,4-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1165	-4,9	353,0839; 191,0544; 179,0310; 173,0407	517,1357	2,1	287,0543; 163,0369;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
13	4,49	ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1177	-2,5	353,0804; 191,0469; 179,0286; 173,0417	517,1357	2,1	287,0564; 163,0358;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
14	4,67	ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1179	-2,1	353,0847; 191,0557; 179,0269; 173,0403	517,1364	3,5	287,0539; 163,0384;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
15	4,94	ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1189	-0,2	353,0825; 191,0568; 179,0311; 173,0442	517,1321	-4,8	287,0544; 163,0374;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)

Tabela 23 - Identificação química do chá das folhas cultivadas (Ev047) do quimiotipo A por CLUE-EMAR (conclusão).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Negativo		Fragmentos de íons m/z	Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				[M-H] ⁻ m/z	Erro (ppm)		[M+H] ⁺ m/z	Erro (ppm)		
19	5,82	não identificado	C ₂₈ H ₄₇ O ₁₀	543,3173	0,7	353,0796; 191,0585; 179,0800; 173,0472	-	-	-	-
27	7,28	7-hidroxi-3,13- clerodandien- 16,15:18,19diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347,1863	1,4	329,0171; 205,1598	-	-	-	(JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004)
29	7,81	bacchariol	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	359,1493	-0,6	315,1129; 297,1293	361,1587	0,8	317,0187	(AKAIKE <i>et al.</i> , 2003)
31	8,15	12- <i>epi</i> - bacchotricuneatina	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	-	-	-	343,1540	0,5	325,1451; 297,1488; 203,1078	(VIEIRA <i>et al.</i> , 2006)
33	8,60	ternatina	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	-	-	-	375,1073	-1,9	345,0521	(LIMA <i>et al.</i> , 1996)
36	10,05	12-hidroxi- clerodandien- 18,19:15,16-dioida	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331,1913	1,2	313,0254; 303,2145; 269,1988; 219,1655	-	-	-	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)
37	10,33	8 α -hidroxilabd-13(S)- O- β -D-ribopiranosídeo	C ₂₅ H ₄₃ O ₆	-	-	-	463,3050 [M+Na] ⁺	3,5	273,2598	(SILVA-FILHO <i>et al.</i> , 2007)
42	11,71	não identificado	C ₂₀ H ₃₅ O ₃	-	-	-	347,2574 [M+Na] ⁺	3,5	271,2433; 163,1478	-
44	12,03	não identificado	C ₂₀ H ₃₅ O ₃	-	-	-	347,2571 [M+Na] ⁺	2,6	271,2433; 163,1475	-

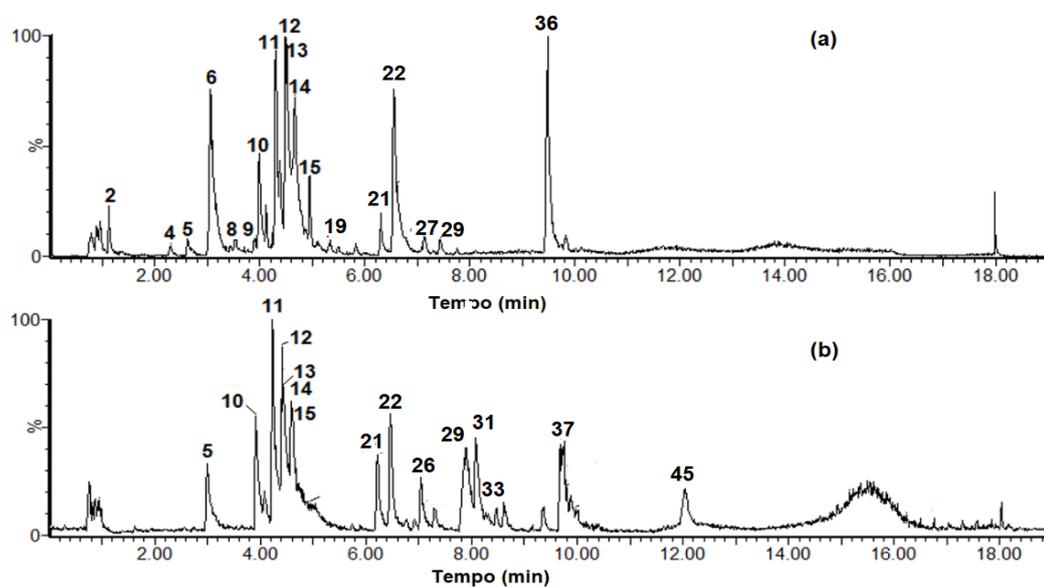
*comparado com padrão autêntico.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.6.6 Análise do perfil químico do chá das folhas cultivadas (Ev048) do quimiotipo B de *E. viscosa*.

A análise por CLUE-EMAR da infusão das folhas do quimiotipo B permitiu identificar dezenove compostos: dois ácidos orgânicos (**2** e **4**); dez derivados do ácido cafeico (**5**, **6**, **8**, **9** e **12-15**), três flavonoides (**10**, **11** e **33**) e sete diterpenos (**22**, **27**, **29**, **31**, **36**, **37** e **45**) (Figura 94). Os compostos foram detectados e tentativamente identificados no modo negativo e positivo, como ilustrado na Tabela 24, p. 180.

Figura 94 - Cromatograma de CLUE-EMAR das folhas (Ev048) de *E. viscosa* do quimiotipo B no modo de ionização: (a) negativo e (b) positivo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 24 - Identificação química da infusão das folhas cultivadas (Ev048) do quimiotipo B por CLUE-EMAR (continua).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Negativo		Fragmentos de íons m/z	Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)		$[M+H]^+$ m/z	Erro (ppm)		
2	1,35	ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	191,0190	-1,0	111,0087	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
4	2,31	ácido 3,4-dihidroxibenzoico hexosídeo	C ₂₀ H ₁₂ O ₄	315,0672	4,8	153,0073; 109,0218	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
5	2,62	ácido neoclorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	1,4	191,0513; 179,0336	355,1031	0,6	163,0392	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
6	3,10	ácido clorogênico*	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0886	2,0	191,0437; 179,0356	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
8	3,52	ácido criptoclorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0875	0,6	191,0528; 179,0376	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
9	3,73	ácido 1-cafeoilquínico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0836	-2,7	191,0539; 179,0338; 173,0492	-	-	-	(SÁNCHEZ-SALCEDO <i>et al.</i> , 2016)
10	3,99	rutina*	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1453	-0,5	301,0305	611,1613	0,2	303,0514	(SOUSA <i>et al.</i> , 2016)
11	4,30	kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	593,1498	-1,3	285,0304	595,1660	-0,5	303,0506; 287,0534;	(ENGELS <i>et al.</i> , 2012)
12	4,38	ácido 1,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1165	-4,9	353,0839; 191,0544; 179,0310; 173,0407	517,1357	2,1	287,0543; 163,0369;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)
13	4,49	ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1177	-2,5	353,0804; 191,0469; 179,0286; 173,0417	517,1357	2,1	287,0564; 163,0358;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005)

Tabela 24 - Identificação química da infusão das folhas cultivadas (Ev048) do quimiotipo B por CLUE-EMAR (continua).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Negativo			Positivo			Referências
				[M-H] ⁻ <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Fragmentos de íons <i>m/z</i>	[M+H] ⁺ <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Fragmentos de íons <i>m/z</i>	
14	4,67	ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1179	-2,1	353,0847; 191,0557; 179,0269; 173,0403	517,1364	3,5	287,0539; 163,0384;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNER, 2005)
15	4,94	ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoil quínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515,1189	-0,2	353,0825; 191,0568; 179,0311; 173,0442	517,1321	-4,8	287,0544; 163,0374;	(CLIFFORD; KNIGHT; KUHNER, 2005)
19	5,82	não identificado	C ₂₈ H ₄₇ O ₁₀	543,3173	0,7	353,0796; 191,0585; 179,0800; 173,0472	-	-	-	-
21	6,21	não identificado	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	345,1666	-3,8	327,1692; 217,1222	347,1855	-0,9	329,1764; 311,1660	-
22	6,65	12-acetoxi-7-hidroxi-3,13(14)-clerodandien-18,19:15,16-diolídeo	C ₂₂ H ₂₈ O ₇	403,1736	-2,1	343,1423; 317,1782; 233,1452	405,1912	-0,2	387,1754; 327,1604; 309,1471; 217,1216 313,1829; 219,1398; 163,0735	(VIEIRA <i>et al.</i> , 2006)
26	7,05	não identificado	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	-	-	-	331,1919	3,0	-	-
27	7,13	7-hidroxi-3,13-clerodandien-16,15:18,19diolida	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347,1863	1,4	329,0171; 205,1598	-	-	-	(JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004)
29	7,81	bacchariol	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	359,1493	-0,6	315,1129; 297,1293	361,1587	0,8	317,0187	(AKAIKE <i>et al.</i> , 2003)
31	8,15	12- <i>epi</i> -bacchotricuneatina	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	-	-	-	343,1536[M+Na] ⁺	0,5	325,1451; 297,1488; 203,1054	(VIEIRA <i>et al.</i> , 2006)
33	8,60	ternatina	C ₁₉ H ₁₉ O ₈	-	-	-	375,1073	-1,9	345,0587	(LIMA <i>et al.</i> , 1996)

Tabela 24 - Identificação química da infusão das folhas cultivadas (Ev048) do quimiotipo B por CLUE-EMAR (conclusão).

Pico	t_r (min)	Compostos	Fórmula molecular	Negativo		Fragmentos de íons m/z	Positivo		Fragmentos de íons m/z	Referências
				$[M-H]^-$ m/z	Erro (ppm)		$[M+H]^+$ m/z	Erro (ppm)		
36	10,05	12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida	$C_{20}H_{28}O_4$	331,1913	1,2	313,0287;303,1965; 269,1940; 219,2145	-	-	-	(SILVEIRA; PESSOA, 2005)
37	10,33	8 α -hidroxilabd-13(S)-O- β -D-ribopiranosídeo	$C_{25}H_{43}O_6$	-	-	-	463,3050[M+Na] ⁺	3,5	273,2598	(SILVA-FILHO <i>et al.</i> , 2007)
45	12,02	tarapacol	$C_{20}H_{36}O_3$	-	-	-	347,2566[M+Na] ⁺	1,2	307,2626; 191,1790	(SILVA-FILHO <i>et al.</i> , 2007)

*comparado com padrão autêntico.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.6.7 Comparação do perfil químico dos extratos de *E. viscosa* analisados por CLUE-EMAR.

O perfil químico dos extratos de capítulos florais de *E. viscosa* foi estabelecido mediante a análise dos cromatogramas de CLUE-EMAR nos modos de ionização negativo ESI(-) e positivo ESI(+). Este estudo possibilitou a identificação de compostos já relatados na espécie *E. viscosa*, como também forneceu dados inéditos quanto a presença de compostos tentativamente identificados. No conjunto de compostos considerados, há a presença de classes químicas tais como: derivados do ácido cafeico, flavonoides e diterpenos, observando-se que a literatura relata a presença majoritária de diterpenos e a presença do flavonoide ternatina. Não há relatos na literatura reportando a presença dos compostos derivados do ácido cafeico em *E. viscosa*.

Na Tabela 25, p. 185, é possível visualizar melhor os compostos semelhantes e diferentes presentes nos extratos. A tintura apresentou a maior quantidade de compostos identificados. O uso do etanol favoreceu a solubilização de compostos mais lipofílicos.

Na análise química dos extratos, os derivados do ácido cafeico e flavonoides, tais como rutina e kaempferol 3-*O*-rutinosídeo, estavam presentes em todas amostras, independentemente da condição de preparo da amostra, exibindo picos cromatográficos intensos. Todos estão sendo relatados pela primeira vez em *E. viscosa*.

A infusão dos capítulos florais apresentou diferenças entres os quimiotipos, sendo encontrado exclusivamente no quimiotipo B os compostos: 15,16-epóxi-12-hidroxi-13(14)-clerodandien-18,19:15,16-diolida e bacchariol.

Os compostos ácido dihidroxibenzoico, ácido criptoclorogênico e ácido 1-cafeoilquínico foram encontrados apenas nas infusão das folhas. Em relação aos quimiotipos, as folhas também mostraram diferenças, sendo os compostos 12-acetoxi-7-hidroxi-3,13(14)-clerodandien-18,19:15,16-diolídeo e tarapacol identificado apenas nas folhas do quimiotipo B.

Na tintura, foram observados compostos diterpênicos denominados: 9,10-seco-4,9(10),13(14)-labdatrien-18-ol e seu isômero, salvisplendina C, 12-*epi*-bachotricuneatina, 13-hidroxi-13(14)-clerodandien-18,19:15,16-diolídeo e tarapacol. Adicionalmente, quercetina e ácido cítrico foram encontrados na tintura, sendo relatados pela primeira vez na espécie. Alguns diterpenos foram comuns a todas amostras, tais como, lactona isociliolida, kerlinolida, 8 α -hidroxilabda-7,14-dieno-13(*R*)-*O*- α -L-arabinopiranosídeo. Além dos compostos 7-hidroxi-3,13-clerodandien-18,19:15,16-diolida e seus

respectivos isômeros, dentre esses, apenas lactona isociliolida e 7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diolida não foram previamente relatados em *E. viscosa*.

Tabela 25 - Comparação do perfil químico dos extratos de *E. viscosa* (continua).

Compostos	Capítulos Florais				Folhas	
	Infusão ^a Quimiotipo B	Infusão ^b Quimiotipo A	Infusão ^c Quimiotipo B	Tintura ^e Quimiotipo B	Infusão ^f Quimiotipo A	Infusão ^g Quimiotipo B
Ácido						
Ácido cítrico (2)	-	-	-	X	X	X
TOTAL DE COMPOSTOS	-	-	-	1	1	1
Ácidos Fenólicos						
Ácido dihidroxibenzoico hexosídeo (4)	-	-	-	-	X	X
Ácido neoclorogênico (5)	X	X	X	X	X	X
Ácido clorogênico (6)	X	X	X	X	X	X
Ác. cafeico (7)	X	X	X	X	-	-
Ácido criptoclorogênico (8)	-	-	-	-	X	X
Ácido 1-cafeoilquínico (9)	-	-	-	-	X	X
Ácido 1,4-di-O-cafeoil quínico (12)	X	X	X	X	X	X
Ácido 3,4-di-O-cafeoil quínico (13)	X	X	X	X	X	X
Ácido 3,5-di-O-cafeoil quínico (14)	X	X	X	X	X	X
Ácido 4,5-di-O-cafeoil quínico (15)	X	X	X	X	X	X
TOTAL DE COMPOSTOS	7	7	7	7	9	9
Flavonoides						
Rutina (10)	X	X	X	X	X	X
Kaempferol 3-O-rutinosídeo (11)	X	X	X	X	X	X
Quercetina (20)	-	-	-	X	-	-
Ternatina (33)	X	X	X	X	X	X

Tabela 25 - Comparação do perfil químico dos extratos de *E. viscosa* (continua).

Compostos	Capítulos Florais				Folhas	
	Infusão ^a Quimiotipo B	Infusão ^b Quimiotipo A	Infusão ^c Quimiotipo B	Tintura ^c Quimiotipo B	Infusão ^f Quimiotipo A	Infusão ^g Quimiotipo B
TOTAL DE COMPOSTOS	3	3	3	4	3	3
Diterpenos						
12-Acetoxi-7-hidroxi-3,13(14)-clerodandien-18,19:15,16-diolídeo (22)	-	-	-	-	-	X
Lactona isociliolida (24)	X	X	-	X	-	-
Kerlinolida (25)	X	X	-	X	-	-
7-Hidroxi-3,13-clerodandien-16,15:18,19-diolida (27)	X	X	X	X	X	X
Isômero 7-hidroxi-3,13-clerodandien-16,15:18,19-diolida (28)	X	X	X	-	-	-
Bacchariol (29)	X	-	X	X	X	X
Isômero lactona isociliolida (30)	X	X	-	-	-	-
12- <i>epi</i> -Bachotricuneatina (31)	-	-	X	X	X	X
12-hidroxi-3,13-clerodandien-16,15:18,19-diolida (32)	X	-	X	X	-	-
Salvisplendina C (34)	-	-	-	X	-	-
15,16-Epóxi-12-hidroxineocleroda13(16),14-dieno-18,19-hemiacetal (35)	X	-	X	X	-	-
12-Hidroxi-clerodandieno-18,19:15,16diolida (36)	X	X	X	X	X	X
8 α -Hidroxi-13(S)- <i>O</i> - β -D-ribopiranosídeo (37)	X	X	X	X	X	X
3-Etóxi-12-hidroxi-clerodandien-18,19: 15,16-diolida (38)	-	-	-	X	-	-

Tabela 25 - Comparação do perfil químico dos extratos de *E. viscosa* (conclusão).

Compostos	Infusão ^a	Infusão ^b	Infusão ^c	Tintura ^e	Infusão folhas ^f	Infusão folhas ^g
Isômero 12-hidroxi-clerodandien-18,19:15,16-diolida (39)	X	X	X	X	-	-
Tanabalina (40)	X	X	-	-	-	-
9,10-Seco-4,9(10),13(14)-labdatrien-18-ol (41)	-	-	-	X	-	-
Isômero 9,10-seco-4,9(10),13(14)-labdatrien-18-ol (43)	-	-	-	X	-	-
Tarapacol (45)	-	-	-	X	-	X
Ácido centipédico (46)	X	X	-	X	-	-
13-hidroxilabda-7,14-dieno13(R)-O- α -L-arabinopiranosídeo (47)	-	-	-	X	-	-
TOTAL DE COMPOSTOS	13	10	9	17	5	7

^a Chá dos capítulos florais de *E. viscosa* silvestre (Aiuaba-Ce); ^b Chá dos capítulo florais de *E. viscosa* adquiridos comercialmente no mercado central de Fortaleza; ^c Chá dos capítulos florais cultivados no canteiro da Embrapa (Cascavel-Ce); ^d Tintura do capítulos florais de *E. viscosa* silvestre (Aiuaba-Ce); ^e Chá das folhas de plantas cultivadas no canteiro da Embrapa morfologicamente atribuídas ao quimiotipo A; ^f Chá das folhas de plantas cultivadas no Canteiro da Embrapa morfologicamente atribuídas ao quimiotipo B.

Os compostos considerados bioativos ternatina, tanabalina e ácido centipédico foram identificados, na maioria das vezes, através da obtenção de seus íons extraídos do cromatograma de íons totais (TIC). Embora esses compostos sejam abundantes nos capítulos florais de *E. viscosa*, eles são poucos extraídos pela água quente, uma vez que a ternatina, tanabalina e o ácido centipédico são compostos lipofílicos.

5.7 Discriminação dos quimiotipos de *E. viscosa* usando o conjunto de dados de CLUE-EMAR.

Um método de impressão digital metabólica por CLUE-EMAR juntamente com um método de reconhecimento de padrões supervisionado baseado em OPLS-DA foi utilizado para discriminar e classificar amostras comerciais e silvestres de capítulos florais. Essa abordagem teve como objetivo identificar compostos não voláteis presentes na infusão dos capítulos florais responsáveis pela discriminação dos quimiotipos. Utilizou-se o perfil CLUE-EMAR para a identificação de compostos marcadores. A técnica é considerada abrangente no que se refere à classe de compostos a serem analisadas, devido a grande variedade de fases estacionárias disponíveis, além dos diferentes modos de separação, como a eluição em fase reversa, com ou sem pareamento iônico, interação hidrofílica, e troca iônica. Além disso, vem sendo cada vez mais aplicada nos estudos envolvendo análises metabolômicas devido à alta robustez, sensibilidade e seletividade (CANUTO *et al.*, 2018).

Inicialmente, a fonte ESI foi operada nos dois modos de ionização, positivo e negativo. No entanto, por fornecer mais informações, o modo de ionização adotado foi o negativo, como pode ser visualizado no Apêndice U. Os espectros de massas foram adquiridos de m/z 110-1180, que é uma faixa abrangendo as massas da maioria dos metabólitos secundários (compostos fenólicos, diterpenos e derivados de metabólitos) presentes nos capítulos florais de *E. viscosa*.

5.7.1 Variabilidade do conjunto de dados de CLUE-EMAR

A análise por CLUE-EMAR acoplada à quimiometria foi desenvolvida para classificar as amostras de acordo com a variabilidade dos metabólitos secundários e o respectivo quimiotipo: maiores quantidades de acetato de *trans*-pinocarveíla ("A" como azul); quantidades maiores de acetato de *cis*-isopinocarveíla ("B" como vermelho). A fim de identificar a variação dos quimiotipos e encontrar marcadores químicos em potencial, os dados de CLUE-EMAR

foram analisados através de projeção ortogonal para análise discriminante de estruturas latentes (OPLS-DA). Os resultados da classificação multivariada obtidos por OPLS-DA revelaram a separação clara das amostras de *E. viscosa* com base em seu quimiotipo (Figura 95a, pág. 190). As pontuações na classificação das amostras (Fig. 95c, pág. 190) revelou que o quimiotipo A agrupou em escores negativos de VL1 pelas altas quantidades concomitantes de rutina (**10**), kaempferol 3-*O*-rutinosídeo (**11**), ácido 1,4-di-*O*-cafeoilquínico (**12**), isômero 7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diolida (**28**), bacchariol (**29**) e 15,16-epóxi-12-hidroxineocleroda-13(16),14-dieno18,19-hemiacetal (**35**). Por outro lado, o quimiotipo B, agrupou em pontuações positivas de VL1 por maiores quantidades de ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico (**13**), ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (**15**), composto desconhecido (**16**), lactona isociliolida (**24**) e kerlinolida (**25**), as estruturas podem ser visualizadas na Figura 96, p. 191. Esses compostos citados apresentaram significância relevante na classificação de *E. viscosa* de acordo com os resultados do VIP (importância variável na projeção), uma vez que suas intensidades de sinais foram superiores ao valor limite em 1 (Figura 95d, pág 180).

A Tabela 26, p. 190, descreve os parâmetros estatísticos de OPLS-DA usando 2 variáveis latentes (2 VL), que foram escolhidas de acordo com os erros de modelagem, variância capturada e classificação das amostras com base nos resultados da Matriz de Confusão. Além disso, apesar de algumas amostras apresentarem alta influência (*Hotelling T2*) ou erro (Q residual) na modelagem (valores maiores que 1), não influenciaram negativamente no modelo de classificação. Além disso, os parâmetros estatísticos revelaram a elevada robustez da classificação do modelo por baixo erro na calibração (RMSEC) e validação cruzada (RMSECV), baixo *bias* e valores de *bias* VC, bem como sensibilidade máxima (sem amostras classificadas erroneamente, taxa de verdadeiro positivo igual a 1) capacidade de validação cruzada e alta especificidade, uma vez que apenas 1 das 45 amostras do quimiotipo A foi classificada incorretamente (taxa de verdadeiro negativo igual a 0,98).

Figura 95 - Resultados da classificação multivariada da modelagem OPLS-DA das amostras de *E. viscosa* de acordo com o quimiotipo: a) Escores VL1 \times VL2; b) Resíduos de Hotelling T2 \times Q; c) Cargas VL1 relevantes; d) Pontuações VIP no eixo VL1: rutina (10); kaempferol 3-*O*-rutinosídeo (11); ácido 1,4-di-*O*-cafeoilquínico (12); ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico (13); ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (15); composto desconhecido (16); lactona isociliolida (24); kerlinolida (25); isômero 7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diolida (28); bacchariol (29) e 15,16-epóxi-12-hidroxineocleroda-13(16),14-dieno18,19-hemiacetal (35).

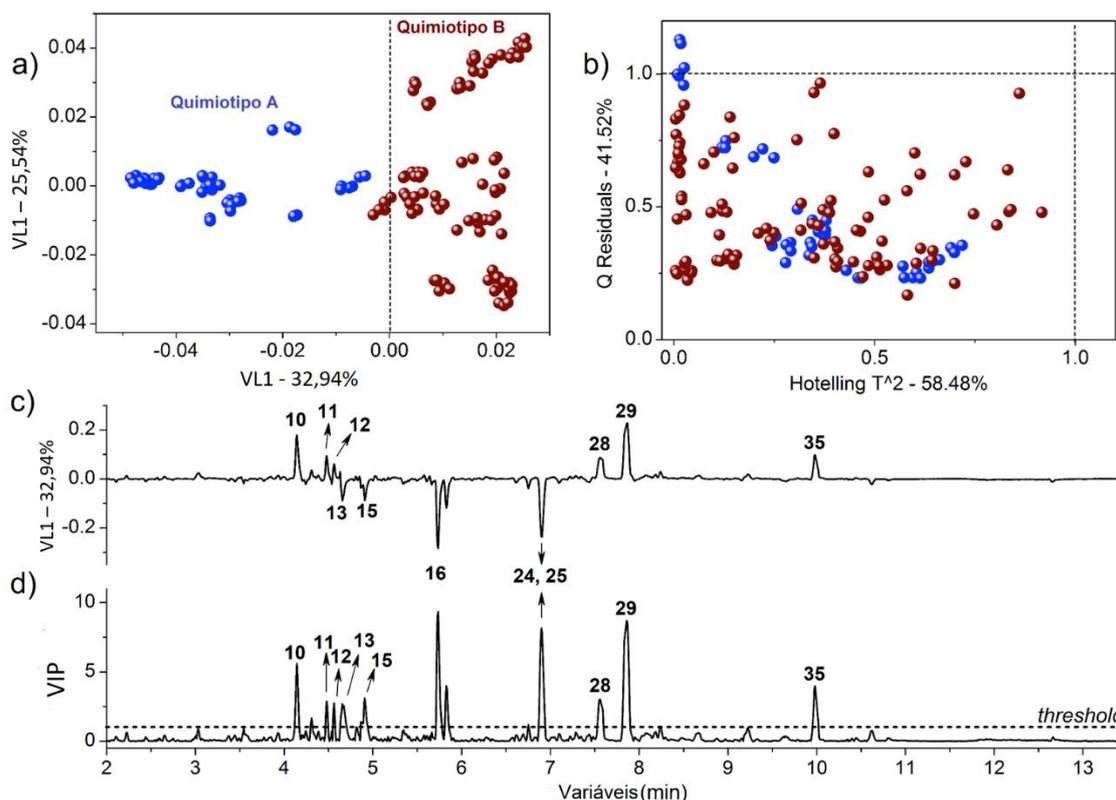
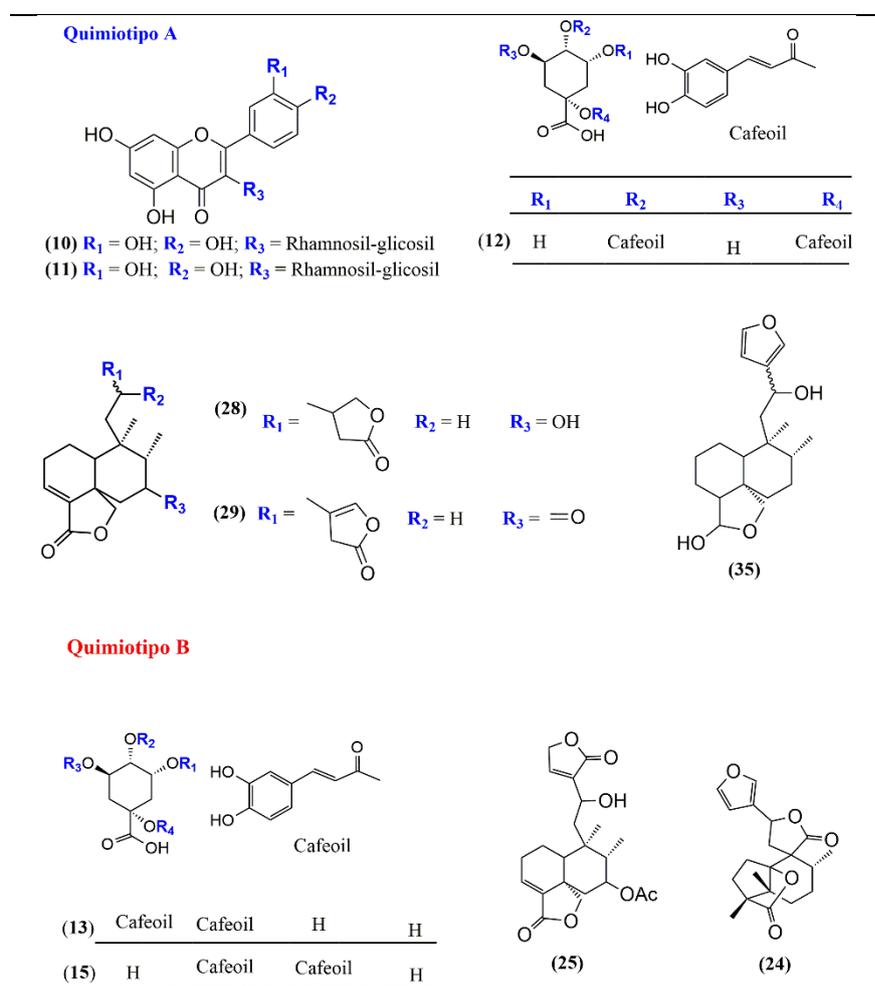


Tabela 26 - Parâmetros estatísticos da acurácia da classificação do modelo PLS-DA para discriminação dos dois quimiotipos de *E. viscosa* usando o sistema CLUE-EMAR sob 2 VL.

Parâmetros	Quimiotipo A	Quimiotipo B
Sensitividade e TVP ^a	0,98	1,00
Especificidade e TVN ^b	1,00	0,98
RMSEC ^c	0,19	0,19
RMSECV ^d	0,20	0,20
MCC	0,98	0,98
RMSEC/RMSECV ^e	0,95	0,95
Bias	0,00	$-2,2 \times 10^{-16}$
Bias VC	$-6,0 \times 10^{-5}$	$-6,0 \times 10^{-5}$

^a Taxa de verdadeiro positivo; ^b Taxa de verdadeiro negativo; ^c Erro quadrático médio de calibração; ^d Erro quadrático médio da validação cruzada; ^e Índice de similaridade

Figura 96 - Estruturas dos compostos responsáveis pela discriminação dos quimiotipos no conjunto de dados de CLUE-EMAR.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.8 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

5.8.1 Resultados da avaliação gastroprotetora dos extratos de *E. viscosa*.

Foram realizados ensaios pré-clínicos (camundongos) para avaliação do efeito gastroprotetor de amostras (chás e tintura) preparadas a partir dos capítulos florais silvestres, comerciais e cultivados, e das folhas de planta cultivada, visando avaliar se as folhas também possuem atividade gastroprotetora e se há diferença no efeito gastroprotetor entre os quimiotipos. Inicialmente, foram testadas seis amostras de *E. viscosa*: Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A), Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B), Ev017-01 (Chá dos capítulos florais de material silvestre (Aiuaba) - Quimiotipo B), e Ev017-03 (Tintura dos capítulos florais de material silvestre (Aiuaba) - Quimiotipo B), Ev047 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo A) e Ev048 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo B).

Todas as amostras demonstraram atividade gastroprotetora, por via oral, com doses que variaram de 50 – 400 mg.kg⁻¹ (Figura 97, p. 195). As preparações feitas com capítulo florais exibiram maior efeito gastroprotetor, exibindo gastroproteção com doses de 50 mg.kg⁻¹ e percentual de inibição da lesão gástrica de mais de 80% em doses de 200 mg.kg⁻¹. Não foi observada diferença significativa entre amostras de chá e de tintura.

Estudos fitoquímicos prévios dos capítulos florais de *E. viscosa* revelaram a presença do flavonoide, ternatina e compostos diterpenos, tanabalina e ácido centipédico. As investigações farmacológicas anteriores demonstraram as propriedades antiinflamatórias, hepatoprotetoras, gastroprotetora e antinociceptiva da ternatina. Os efeitos gastroprotetores da tanabalina e ácido centipédico foram demonstrados em ensaios *in vivo* de lesões gástricas induzidas por indometacina e etanol (GUEDES *et al.*, 2008).

Estudos realizados por Araújo *et al.* (2008) avaliaram o efeito antinociceptivo do extrato aquoso de capítulos florais, em contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados mostraram ação antinociceptiva do extrato, apresentando inibição de 63%.

Os resultados encontrados nos chás de capítulos florais de *E. viscosa* testados neste trabalho, reforçaram de que o chá é eficiente no tratamento de doenças gastrointestinais, evidenciado, pelo efeito na lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. Essa constatação corrobora a forte inibição encontrada (valores entre de 60-80% de inibição), compatíveis com extratos de capítulos florais de *E. viscosa* relatos na literatura.

Investigações farmacológicas dos compostos bioativos isolados de *E. viscosa*

comprovam ação gastroprotetora dos extratos. Estudos fitoquímicos do chá através da identificação e quantificação neste trabalho, possibilitou identificar além dos três constituintes, a presença de compostos fenólicos, flavonoides e diterpenos já relatados em *E. viscosa*, bem como na família Asteraceae CAMPOS *et al.*, 2016; GÁLVEZ; MEDINA; JIMENEZ *et al.*, 2001). Na literatura, a atividade gastroprotetora de espécies de Asteráceas é atribuída a compostos fenólicos, flavonoides e diterpenos do tipo clerodânico (LAKSHMI *et al.*, 2011; MARTÍN *et al.*, 1998; MOTA *et al.*, 2009; WACHTER; MONTENEGRO; TIMMERMANN, 1999). Em especial os compostos: ácido cafeico, ácido clorogênico, os ácidos dicafeoilquínico, rutina e kaempferol ramnosídeo, que, de acordo com a literatura e baseado no levantamento deste trabalho encontrado na subseção 4.4, pode-se concluir que esses compostos possuem atividade gastroprotetora. Além disso, é possível que estes compostos necessitem atuar combinado aos demais presentes (diterpenos) na planta para desempenhar determinadas ações biológicas.

Os chás das folhas apresentaram gastroproteção apenas nas doses mais elevadas (200 e 400 mg.kg⁻¹), não havendo diferença na resposta entre os quimiotipos. Entretanto, o efeito gastroprotetor das folhas foi inferior ao dos capítulos florais em todas as doses testadas. Este achado pode ser justificado pelos teores dos compostos bioativos, revelando uma menor concentração de ternatina, tanabalina e ácido centipédico nas folhas. A identificação química das folhas cultivadas por CLUE-EMAR revelou diferenças com relação aos capítulos florais. Os compostos ácido cítrico, ácido dihidroxibenzoico e tarapacol foram identificados exclusivamente nas folhas. As folhas cultivadas também mostraram diferenças, sendo os compostos 12-acetoxi-7-hidroxi-3,13(14)-clerodandien-18,19:15,16-diolídeo e tarapacol identificado apenas nas folhas do quimiotipo B.

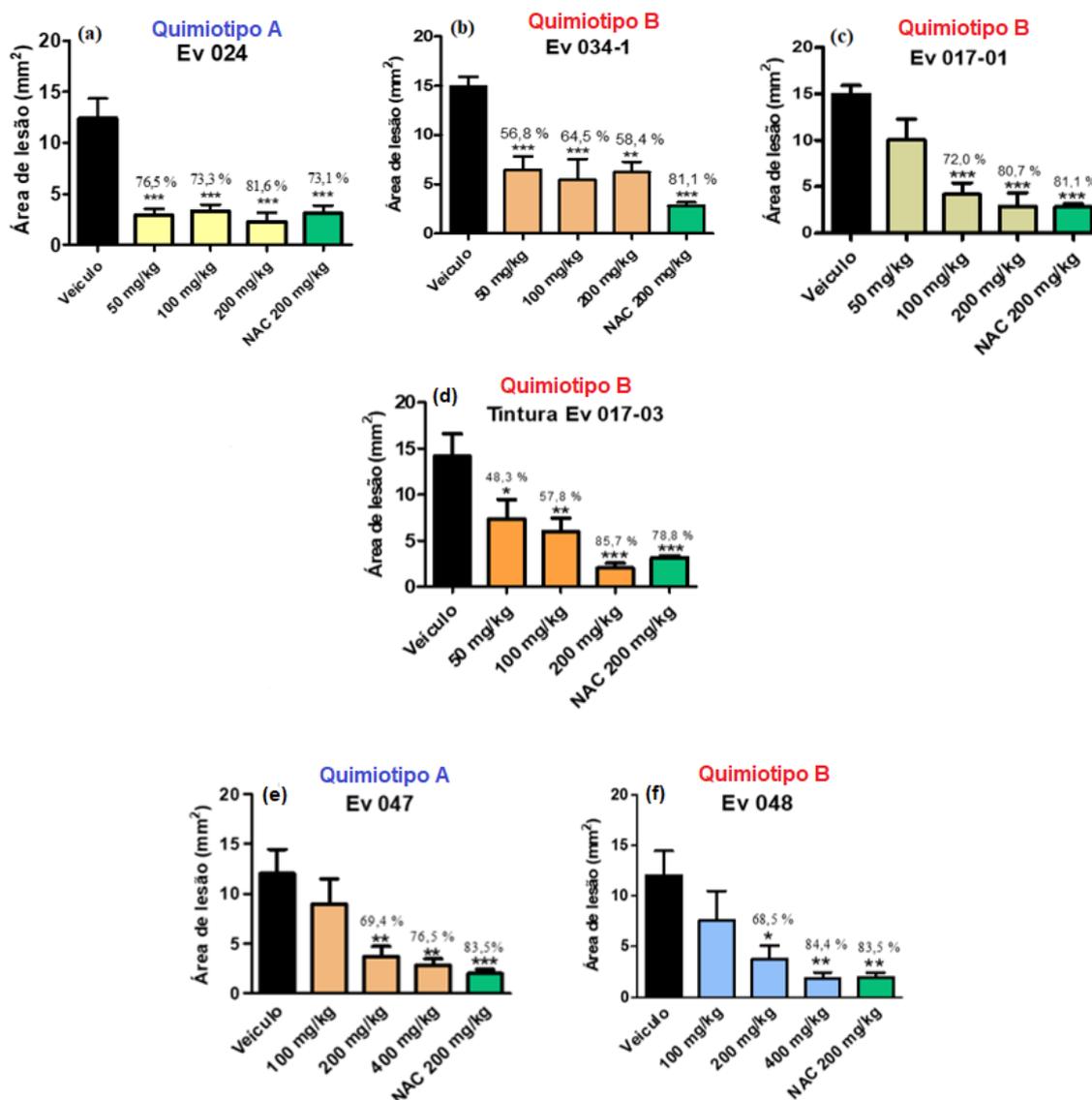
Ardiles *et al.* 2018 avaliaram os diterpenos clerodanos isolados de *Parastrephi quadrangulares*, os quais mostraram efeito gastroprotetor. Além disso, dois compostos (*p*-coumaroiloxitremetona e *p*-cinamoiloxitremetona) foram também avaliados quanto à sua ação gastroprotetora a qual mostrou melhor capacidade gastroprotetora, superior à do fármaco controle lansoprazol (76%). Esses resultados revelaram que vários constituintes desta planta têm atividade gastroprotetora, sendo esses dois compostos citados anteriormente, podendo ser considerados moléculas líderes na exploração de novos agentes gastroprotetores.

A partir dessa avaliação inicial, procedeu-se a escolha daquelas com melhor atividade gastroprotetora (Ev024, Ev034-01 e Ev017-03) para seguirem para a avaliação da possível participação de uma atividade antioxidante como parte de sua ação gastroprotetora. As amostras Ev024 e Ev034-01 mostraram atividade antioxidante como parte de sua ação

gastroprotetora.

Para investigação do mecanismo de ação gastroprotetora, apenas as amostras Ev024 e Ev034-01 foram avaliadas, em virtude de serem chás, a forma medicinal mais comumente utilizada pela população. Os resultados mostraram que o mecanismo de ação de Ev024 envolve a participação de prostaglandinas, de canais de potássio dependentes de ATP e de receptores TRPV1, sem a participação do óxido nítrico. Por outro lado, o mecanismo de ação de Ev034-01 também conta com a participação de canais de potássio dependentes de ATP e de receptores TRPV1, além de óxido nítrico, contudo sem a participação das prostaglandinas. Essa diferença no mecanismo da ação gastroprotetora deve-se possivelmente à diferença de composição química entre os quimiotipos A e B. As análises quantitativa e qualitativa dos extratos realizados neste trabalho, revelou que os quimiotipos possuem composição química não-volátil distinta. Uma vez que os teores dos compostos bioativos nos capítulos florais apresentaram diferenças, sendo os compostos tanabalina e ácido centipédico com maiores teores no quimiotipo A. Em relação à identificação química por CLUE-EMAR da infusão dos capítulos florais, observa-se diferenças entres os quimiotipos, sendo encontrado exclusivamente no quimiotipo B os compostos: 15,16-epóxi-12-hidroxi-13(16),14-dieno-18,19-hemiacetal 12-hidroxi-3,13-clerodandieno-18,19:15,16-diolida e bacchariol.

Figura 97 - Atividade gastroprotetora de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A), Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B), Ev017-01 (Chá dos capítulos florais de material silvestre (Aiuaba) - Quimiotipo B) e Ev017-03 (Tintura dos capítulos florais de material silvestre (Aiuaba) - Quimiotipo B), Ev047 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo A), Ev048 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo B) e N-acetilcisteína (NAC) em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.



- Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. da área de lesão gástrica (mm^2). Percentual (%) de redução da área de lesão gástrica. NAC, N-acetilcisteína.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao veículo (animais que receberam apenas etanol absoluto) (ANOVA e Teste de Tukey).

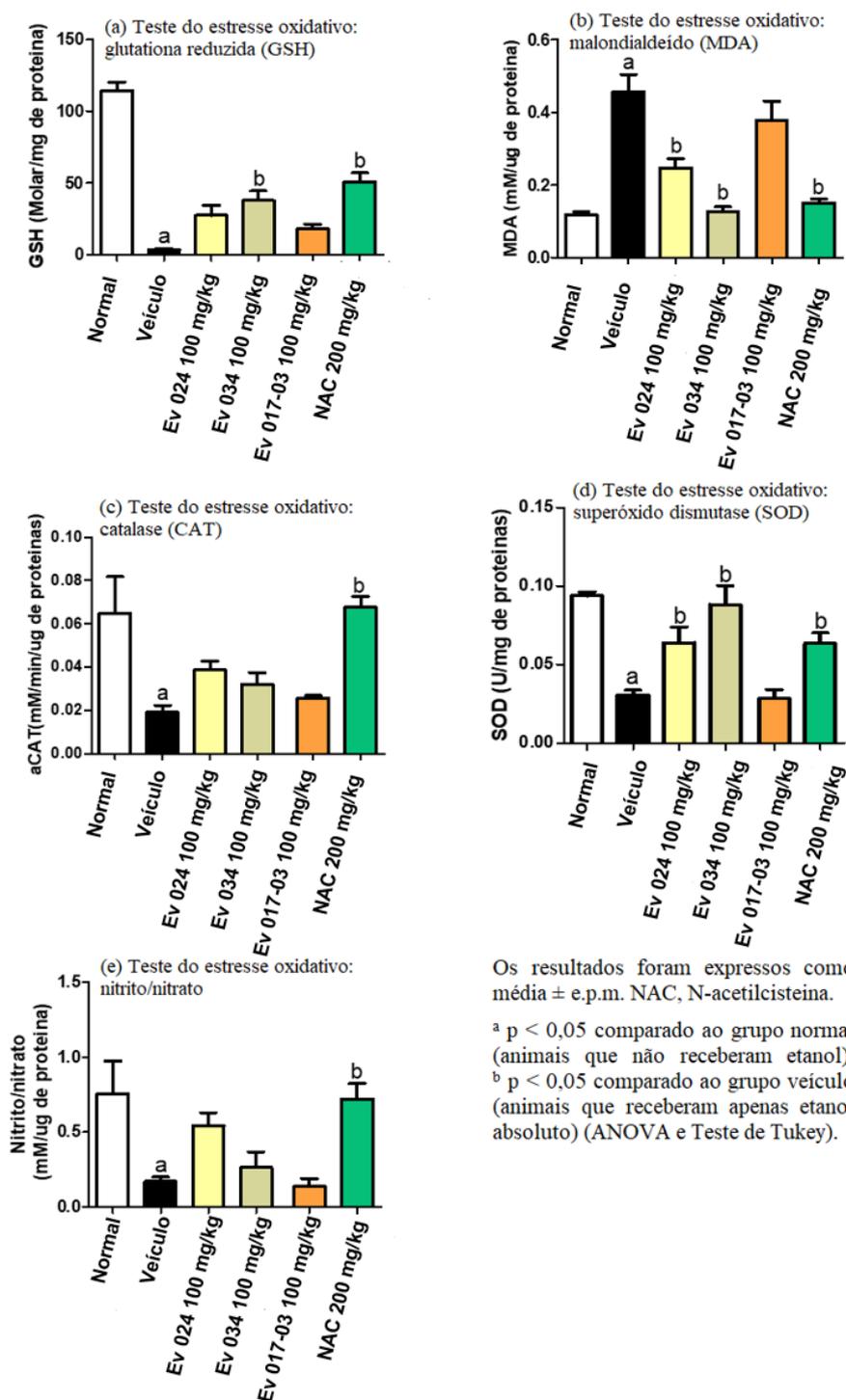
Nota-se visualmente que as porcentagens de inibição da lesão gástrica, o chá do quimiotipo A é melhor que o chá do quimiotipo B. Contudo, quando é realizada a análise estatística não há diferença entre os dois. As comparações foram feitas com relação aos controles (não tratados) e os dados considerados significativos com $p < 0,05$.

5.8.2 Efeito dos chás e tintura de *Egletes viscosa* sobre o estresse oxidativo gástrico no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.

Os extratos que mostraram maiores atividades gastroprotetora (Ev024, Ev034-01 e Ev017-03) foram selecionados para os ensaios de atividade antioxidante. As amostras foram avaliadas quanto aos seus efeitos em marcadores gástricos de estresse oxidativo: Glutathiona reduzida (GSH), quantificada pelo teor dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) (SEDLAK e LINDSAY, 1968); Malondialdeído (MDA) (AGAR, BOS E DEMÕ, 1999); Catalase (aCAT) (AEBI, 1974); Superóxido dismutase (SOD) (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971) e Nitrito/nitrato (GREEN *et al.*, 1982; BRADFORD, 1976).

Os resultados da avaliação do estresse oxidativo (Figura 98, p. 197) mostram que Ev034-01 e Ev017-03 apresentaram a melhor atividade antioxidante. Segue-se então o Ev024 que também possui atividade antioxidante com exceção do GSH comparado a Ev034-01. Para a tintura Ev017-03 sua ação gastroprotetora não está relacionada a atividade antioxidante (Tabela 27, p. 198).

Figura 98 - Efeito dos chás (Ev024 e Ev034-01) e tintura (Ev017-03) de *Egletes viscosa* sobre o estresse oxidativo gástrico no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.



Fonte: Flávia A. Santos, 2020.

Tabela 27 - Análise geral da avaliação do efeito antioxidante.

Amostras	GSH	MDA	aCAT	SOD	Nitrato /Nitrito
Ev024	NA	↓	NA	↑	NA
Ev034-01	↑	↓	NA	↑	NA
Ev017-03	NA	NA	NA	NA	NA

↑: Aumentou em relação ao grupo controle referente ao teste do efeito antioxidante (Figura 98); ↓: Diminuiu em relação ao grupo controle referente ao teste do efeito antioxidante (Figura 98); NA: Não alterou em relação ao grupo controle referente ao teste do efeito antioxidante (Figura 98).

GSH (glutathiona reduzida), MDA (malondialdeído), aCAT (catalase), SOD (superóxido dismutase).

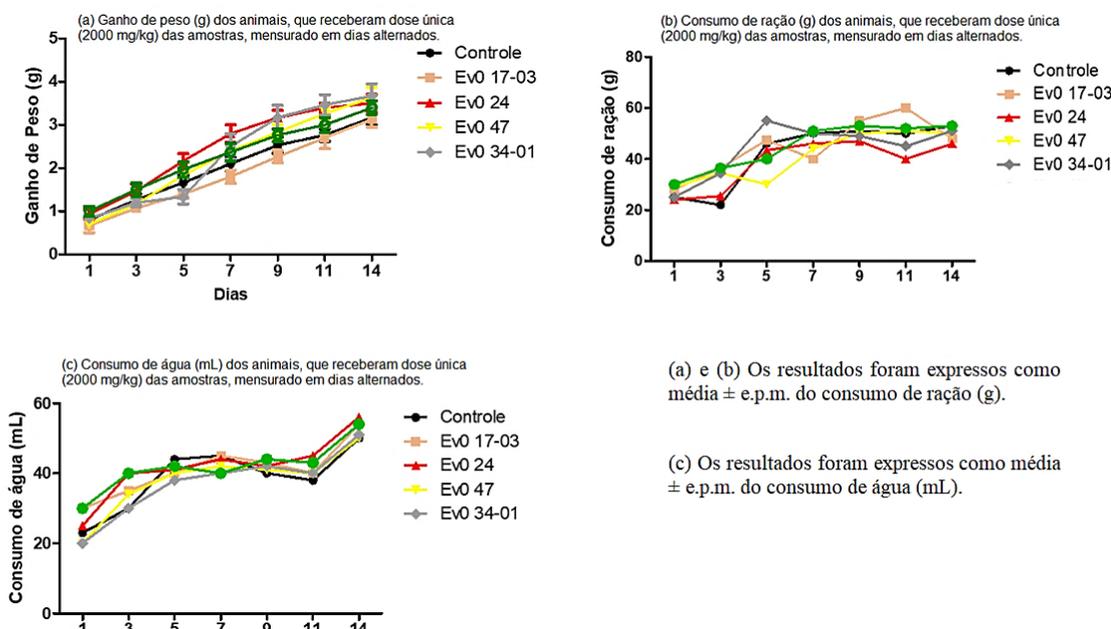
Fonte: Flávia A. Santos, 2020.

5.8.3 Efeito de *Egletes viscosa* sobre a toxicidade aguda em camundongos

Avaliação da toxicidade aguda evidenciam que a administração oral única de 2000 mg.kg⁻¹ das amostras testes não produziu alterações no peso dos camundongos, nem no consumo de ração e água quando comparadas com o grupo controle, durante os 14 dias seguintes à sua administração. Nenhuma morte foi observada e após os 14 dias a inspeção, apenas visual, não mostrou alterações significativas ou lesões nos órgãos internos dos grupos tratados quando comparados com os do grupo controle (Figura 99, p. 199). Esses dados certificam a seguridade das doses utilizadas para estudar o efeito farmacológico das amostras.

As amostras Ev024, Ev034-01, Ev047 e Ev017-03 foram avaliadas em um ensaio de toxicidade aguda, por via oral, com administração única de uma dose de 2 g.kg⁻¹. O ensaio revelou a total ausência de toxicidade aguda das amostras, confirmando a segurança de uso das preparações de *E. viscosa* nas doses escolhidas nesse projeto.

Figura 99 - Avaliação da toxicidade aguda de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A), Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B), Tintura Ev017-03 (Tintura dos capítulos florais de material silvestre (Aiuaba) - Quimiotipo B), Ev047 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo A) e Ev048 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo B) em camundongos.

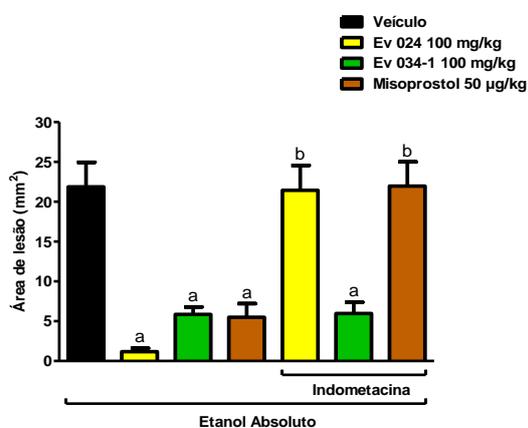


Fonte: Flávia A. Santos, 2020.

5.8.4 Avaliação do envolvimento das Prostaglandinas, do Óxido Nítrico (NO), dos Canais de Potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) e dos receptores TRPV-1 no efeito gastroprotetor das amostras Ev024 e Ev034-01 de *Egletes viscosa*.

O pré-tratamento dos animais com indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas, reverteu totalmente a ação gastroprotetora de Ev024, mas não inibiu a atividade gastroprotetora de Ev034-01, demonstrando que a ação gastroprotetora de Ev024 envolve a participação das prostaglandinas, enquanto a ação gastroprotetora de Ev034-01 não envolve a participação das prostaglandinas (Figura 100, p. 200).

Figura 100 - Avaliação do envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A) e Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B).

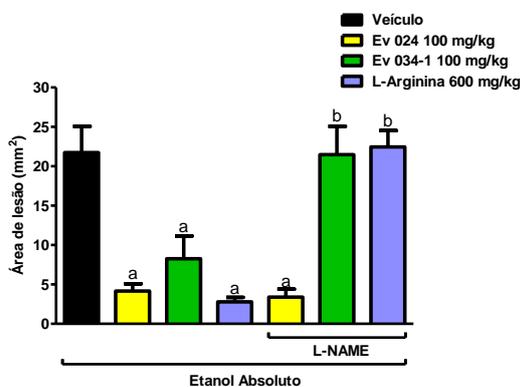


Fonte: Flávia A. Santos, 2020.

Os resultados são expressos como média \pm e.p.m da área de lesão grátrica (mm²). ^a $p < 0,05$ comparado com o veículo, ^b $p < 0,05$ comparado com Ev024, Ev034-01 ou Misoprostol (n = 8 animais/grupo) (ANOVA e teste de Tukey).

O pré-tratamento dos animais com L-NAME, um inibidor da atividade da enzima óxido nítrico sintase, não inibiu a atividade gastroprotetora de Ev024, mas reverteu totalmente a atividade de Ev034-01, demonstrando que a ação gastroprotetora de Ev024 não envolve a participação do óxido nítrico, enquanto a de Ev034-01 envolve a participação do óxido nítrico (Figura 101).

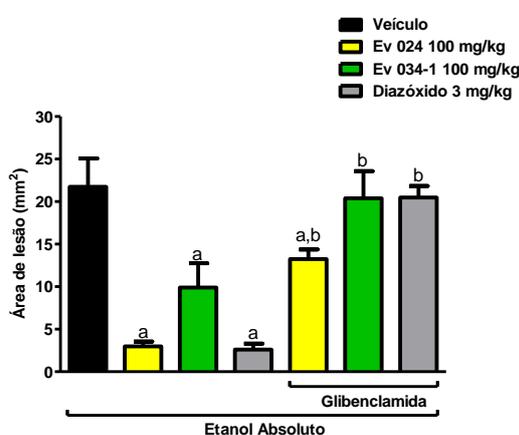
Figura 101 - Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito gastroprotetor de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A) e Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B).



Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. da área de lesão grátrica (mm^2). ^a $p < 0,05$ comparado com o veículo, ^b $p < 0,05$ comparado com Ev024, Ev034-01 ou L-arginina sozinho ($n = 8$ animais/grupo) (ANOVA e teste de Tukey).

O pré-tratamento dos animais com glibenclamida, um bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), reverteu parcialmente a ação gastroprotetora de Ev024, mas reverteu totalmente a ação gastroprotetora de Ev034-01, demonstrando a participação da abertura dos canais de potássio na ação gastroprotetora de ambas as amostras (Figura 102).

Figura 102 - Avaliação do envolvimento dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) no efeito gastroprotetor de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A) e Ev034-01 (Chá de capítulos florais - Quimiotipo B).

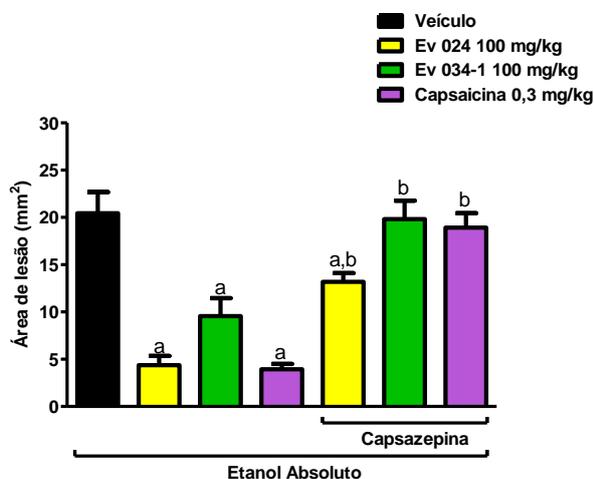


Fonte: Flávia A. Santos, 2020.

Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. da área de lesão grátrica (mm^2). ^a $p < 0,05$ comparado com o veículo, ^b $p < 0,05$ comparado com Ev024, Ev034-01 ou Diazóxido sozinho ($n = 8$ animais/grupo) (ANOVA e teste de Tukey).

O pré-tratamento dos animais com capsazepina, um antagonista específico dos receptores TRPV1, reverteu parcialmente a ação gastroprotetora de Ev024, porém reverteu totalmente a ação de Ev034-01, demonstrando a participação dos receptores TRPV1 na ação gastroprotetora dos compostos, evidenciando a possível participação das fibras sensoriais aferentes em seus mecanismos de gastroproteção (Figura 103, p. 202).

Figura 103 - Avaliação do envolvimento dos receptores TRPV-1 no efeito gastroprotetor de Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A) e Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B).



Fonte: Flávia A. Santos, 2020.

Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. da área de lesão gástrica (mm^2). ^a $p < 0,05$ comparado com o veículo, ^b $p < 0,05$ comparado com Ev024, Ev034-01 ou Capsaicina sozinha ($n = 8$ animais/grupo (ANOVA e teste de Tukey)).

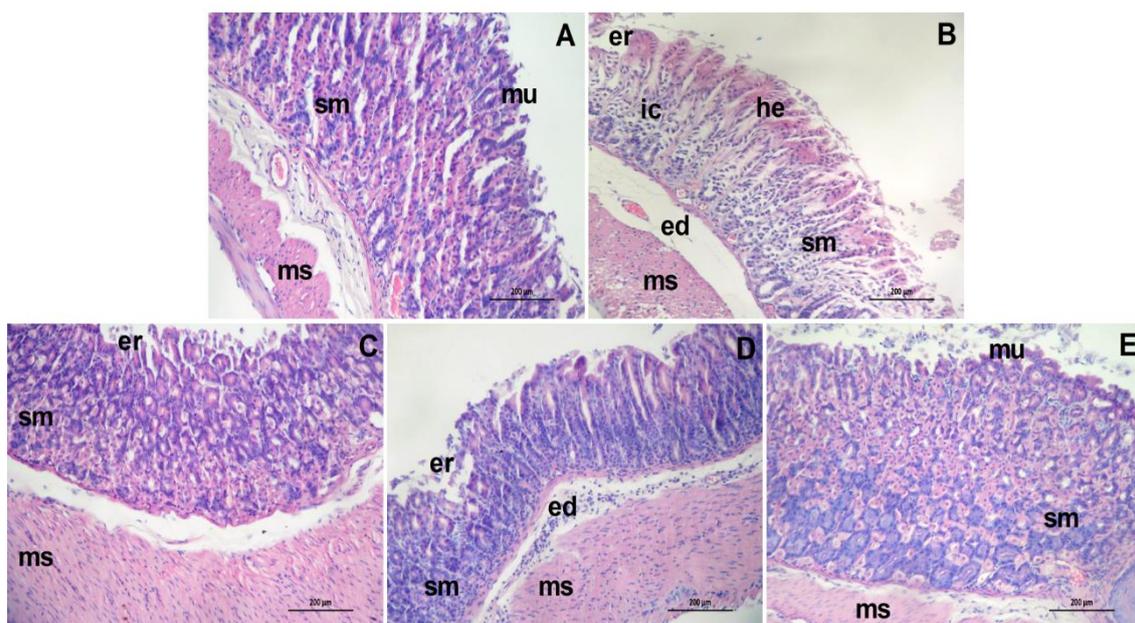
5.8.5 Avaliação histológica do tecido gástrico das amostras de *E. viscosa* em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos

Após exame histopatológico, temos que no grupo Normal (*sham*) a maioria das amostras não demonstraram alterações significativas; no grupo Veículo (etanol absoluto) ocorreu uma lesão gástrica intensa apresentando erosão, hemorragia, edema e infiltrado inflamatório diversificado; para o grupo Ev024 temos que as amostras ficaram subdivididas: lesão gástrica moderada com presença de erosão leve e amostras com a não ocorrência de alterações histológicas significativas, apresentando uma leve ocorrência de erosões e de infiltrado polimorfonuclear; já o grupo Ev034-01 apresentou lesão gástrica moderada associada à erosão moderada na maioria dos estômagos examinados apresentando edema leve e infiltrado polimorfonuclear moderado; no grupo N- acetilcisteína a maioria das amostras não demonstraram alterações significativas (Figura 104, p. 203).

A análise microscópica das amostras de estômagos dos respectivos tratamentos, a fim de verificar o que estava acontecendo a nível tecidual, e observou-se que tanto Ev024 e

Ev034-01 reduziram as lesões teciduais (edema, hemorragia, erosão), em maior ou menor grau, assim como o infiltrado antiinflamatório tecidual induzidos pelo etanol absoluto (Tabela 28, p. 204).

Figura 104 - Microfotografias representativas de cortes estomacais de camundongos observados em ensaio *in vivo* para avaliação atividade gastroprotetora de amostras de *E. viscosa*.



Microfotografias representativas de cortes estomacais.

(A), controle normal (sham) mostrando aparência histológica normal da mucosa (mu), submucosa (sm) e da região muscular (ms);

(B) grupo etanol absoluto, mostrando erosão (er) e hemorragia (he) na camada mucosa, infiltração de células inflamatórias (ic) na área submucosa e edema (ed);

(C) grupo Ev024 (100 mg/kg) mostrando erosão (er) leve;

(D) grupo Ev034-1 (100 mg/kg) mostrando erosão (er) na região de mucosa, infiltração de células inflamatórias (ic) na área submucosa e edema (ed);

(E) grupo N-acetilcisteína (200 mg/kg) mostrando histologia normal da mucosa e submucosa (H&E, 200x; n = 8 animais/grupo).

Fonte: Flávia A. Santos, 2020.

Tabela 28 - Efeitos dos tratamentos com Ev024, Ev034-01 e N-acetilcisteína (NAC) nas alterações histopatológicas gástricas em modelo de úlcera gástrica induzidas por etanol em camundongos.

Alteração histopatológica	Controle (Normal)	Veículo (Etanol)	Ev024	Ev034-01	NAC
Erosão na área da mucosa	0 (0-0)	3 (2-3) a	2 (0-2) b	2 (0-2) b	0 (0-2) b
Hemorragia na área da mucosa	0 (0-0)	2 (0-2) a	0 (0-1) b	0 (0-0) b	0 (0-0) b
Edema na área da submucosa	0 (0-0)	2 (0-2) a	0 (0-0)b	0 (0-1) b	0 (0-0) b
Infiltração de células inflamatórias na área da submucosa	0 (0-0)	3 (2-3)a	0 (0-2) b	0 (0-2)	0 (0-1) b

Parâmetros de pontuação: nulo (0), leve (1), moderado (2) e grave (3). Escores expressos como mediana (mínima - máxima). ^a $p < 0,05$ comparado ao Controle (Normal) e ^b $p < 0,05$ comparado ao Veículo (Etanol) (Kruskal-wallis e teste de Dunn).

Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A), Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B).

Fonte: Flávia A. Santos, 2020.

6 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e análises químicas foram conduzidos no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN), localizado na Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE).

6.1 Planejamento de estudo

O planejamento de estudo permitiu utilizar e associar as técnicas analíticas para obtenção do perfil químico dos capítulos florais e das folhas de *E. viscosa*. Dessa forma, foi possível identificar e caracterizar quimicamente os seus dois quimiotipos. Os materiais foram submetidos a diversos tipos de preparo de amostra e de análises cromatográfica e espectrométricas. Os capítulos florais foram investigados *in natura* e nas formas de óleo essencial, chá, tintura e de extrato com solventes deuterados, sendo posteriormente analisados por IVp, CG-EM, CG-DIC, RMN, CLUE-EMAR, CLUE-QDa-MIS. As folhas foram avaliadas apenas na forma de chá e analisada por CLUE-EMAR. Por fim, os chás e tintura dos capítulos florais e das folhas foram submetidos a ensaios para avaliação da atividade gastroprotetora.

6.2 Reagentes e padrões

A água ultrapura foi obtida usando um sistema de purificação de água Milli-Q (Billerica, MA, EUA). Metanol e acetonitrila foram adquiridos da Tedia (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e ácido fórmico da Fluka (Buchs, ZU, Suíça). Os padrões analíticos de ternatina, tanabalina e ácido centipédico, foram isolados a partir de um extrato de diclorometano dos capítulos florais de *E. viscosa*, utilizando cromatografia em coluna de sílica gel e CLAE de acordo com o método descrito por Vieira *et al.* (2006). A pureza variou de 95-98% de acordo com as análises CLUE-DAD e RMN. Os padrões autênticos de ácido clorogênico (> 95%), ácido cafeico (> 98%) e rutina (> 94%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

6.3 Material Vegetal

Os capítulos florais de *E. viscosa* foram adquiridos em supermercados e ervanários no Estado do Ceará, conforme descrito no apêndice A. A determinação do quimiotipo das amostras foi baseada na área relativa dos picos dos principais compostos voláteis: acetato de *trans*-pinocarveíla e acetato de *cis*-isopinocarveíla, que foram determinados por análises dos seus óleos essenciais através de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM) e com detector de ionização de chama (CG-DIC). O procedimento de extração e as condições cromatográficas, conforme descrito na subseção 6.10 e 6.11, estavam de acordo com o método relatado anteriormente por Castro *et al.* (2019). Um espécimen coletado no município de Aiuaba-CE foi depositado no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, sob o código identificador: # 38254.

6.4 Experimento agrônômico de *E. viscosa*

O experimento agrônômico foi conduzido pela pesquisadora Dra. Rita de Cássia Alves Pereira, na sede da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE, Latitude 03°45' 04,7" e Longitude 38°34' 38,1"), no período de dezembro/2016 a junho/2017. A produção das mudas foi realizada em viveiros cobertos com sombrite 50% de iluminação durante 90 dias. As mudas foram plantadas em vasos plásticos com capacidade de 1 L preenchidos com uma mistura constituída de substrato comercial e vermiculita na proporção 3: 1.

O transplântio foi realizado no início de abril/2017, em canteiros de alvenaria com dimensões de 8 m de comprimento por 1m de largura, protegidos com tela sombrite 50% de iluminação, previamente adubados com 20 L de húmus de minhoca/metro linear. O espaçamento utilizado foi de 40 cm entre plantas e 40 cm entre fileiras. As covas de plantio possuíam 10 cm de largura x 10 cm de altura e 10 cm de profundidade. A irrigação realizada nas plantas foi por gotejamento. Durante todo o período de cultivo, foram feitas capinas em número suficiente para o controle de ervas-daninhas. As coletas das plantas iniciaram 90 dias após o plantio das mudas de *E. viscosa* nos canteiros.

O experimento consistiu em blocos ao acaso com cinco replicatas, cada uma contendo quatro indivíduos. Após cada colheita, as plantas foram separadas por folhas e capítulos e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar forçado a 40 °C até obter peso constante. Após a secagem, os quatro indivíduos de cada replicata foram pesados separadamente.

6.5 Preparo das soluções padrão dos analitos e amostras

Na condução dos estudos de desenvolvimento e validação do método analítico foram preparados soluções-padrões individuais dissolvendo cada composto em metanol para proporcionar uma solução com uma concentração de 100 mg L^{-1} . As massas foram pesadas e transferidas a 10,0 mL em balão volumétrico.

Após a preparação das soluções-padrões de estoque, por diluição, foi preparada uma solução-padrão multicomponente diluída dos três analitos preparada a partir de alíquotas de cada solução-estoque, com solvente metanol para perfazer uma solução única com concentração 10 mg L^{-1} .

Os preparos das infusões e a tinturas foram feitas de acordo com o modo de preparação tradicional (MATOS, 2007). Um balão de fundo redondo de 1 L foi mantido sob aquecimento em manta aquecedora com 150 mL de água destilada até 100°C . Após o aquecimento, o balão foi retirado da manta e foram transferidos dois gramas de capítulos florais por 10 minutos, resfriada, filtrada através de uma membrana de filtro com tamanho de poro de $0,22 \mu\text{m}$ (PTFE, Millex, Milipore) e liofilizada. Depois de liofilização, foi obtido 175 mg (rendimento: 8,75 %) de extrato aquoso. O extrato foi analisado por CLUE-EMAR e CLUE-QDa-MIS. Para a preparação da tintura, 20g de capítulos florais de *E. viscosa* silvestre (Aiuaba-CE) foram transferidos para um erlenmeyer de 500 mL com 300 mL de solução hidroalcoólica (EtOH : H₂O 1:2, v/v) à temperatura ambiente ($24^\circ\text{C} \pm 2$) por dois dias. Após esse período a solução hidroalcoólica foi liofilizada fornecendo 1,56 g (rendimento: 7,8%) do extrato. Em seguida uma alíquota do extrato foi submetida à análise por CLUE-EMAR e CLUE-QDa-MIS. Todas as amostras foram diluídas em água (extrato: água 3,5 : 6,5, v/v) para se ajustar à faixa linear da curva de calibração CLUE-EMAR.

6.6 Condições analíticas de CLUE-EMAR

A identificação química foi realizada em um sistema Acquity CLUE (Waters, Milford, MA, EUA) acoplada ao espectrômetro de massa de quadrupolo e tempo de voo (QTOF) (Waters, Milford, MA, EUA) de acordo com o método descrito por (SOUSA *et al.*, 2016), conforme Figura 47. A separação foi realizada em uma coluna Acquity BEH C18 ($1,7 \mu\text{m}$, $2,1 \times 150 \text{ mm}$, Waters, Milford, MA, EUA) mantida a 40°C , injetando-se $5 \mu\text{L}$ de amostra. A fase móvel foi uma combinação de A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (0,1% de ácido fórmico

em acetonitrila) a uma vazão de 0,4 mL/min. O gradiente variou linearmente de 5% a 95% de B (v/v) ao longo de 15 min, e depois a coluna foi lavada durante 2 min e condicionada durante 2 min. Os espectros de massas foram registrados no modo positivo e no modo negativo, em uma faixa de massa entre 110-1180 Da. A temperatura da fonte foi de 120 °C, a temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L / h e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como *lock mass*. O modo de aquisição foi MS^E. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

6.7 Análise CLUE-QDa

As análises de quantificação foram realizadas em um cromatógrafo Acquity UPLC acoplado com detectores de quadrupolo e fotodiodos. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 150 mm), mantida a 40 °C, utilizando uma fase móvel composta dos solventes A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila). O gradiente de eluição partiu de 56% de B, aumentou para 62% de B (1 min), depois 71% de B (2,71 min), 86% de B (4,41 min), e para 100% de B (6,10 min), retornando a 56% de B (7,80 min) e, finalmente, equilibrando por 10,00 min. A vazão foi de 0,4 mL.min⁻¹ e o volume de injeção de 2 µL. A ionização foi realizada através de uma fonte de eletropulverização positiva (IES +). Os parâmetros da EM foram ajustados para varredura completa, tensão capilar de 0,8 kV, temperatura de dessolvatação de 600 °C e faixa de massa entre 70 e 1250 Da. Posteriormente, as soluções padrões e amostras foram analisadas pelo modo Monitoramento de Íons Seleccionados (MIS), monitorando os íons para quantificação dos analitos (*m/z*) previamente seleccionados, como observados na Tabela 29.

Tabela 29 - Parâmetros de CLUE-EMAR e CLUE-QDa-MIS.

Compostos	Fórmula	CLUE-EMAR			CLUE-QDa-MIS			
		T _r	<i>m/z</i>	Erro	Íon			
					T _r	UV (nm)	<i>m/z</i>	Janela de aquisição
Ternatina	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	8,60	375,1032	-2,9	9,50	258; 365	375,1	0,76 – 2,76
Tanabalina	C ₂₂ H ₂₈ O ₅	10,52	373,2009	- 1,6	10,67	218	313,2	2,10 – 4,10
Ácido centipédico	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	13,02	317,2121	1,3	13,21	214	317,2	5,00 – 7,00

Fonte: Elaborada pela autora.

6.8 Validação do método analítico por CLUE-QDa-MIS

6.8.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de componentes que possam interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Nos métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos sinais cromatográficos. Sendo assim, a utilização de testes de pureza de sinal (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massa) são interessantes para demonstrar que o sinal cromatográfico é atribuído a uma só substância (MAPA, 2011; RIBANI *et al.*, 2004).

A seletividade do método CLUE-QDa-MIS foi avaliada através da análise de amostras não fortificadas, e amostras fortificadas com soluções padrões de ternatina, tanabalina e ácido centipédico. Foi analisada a avaliação da pureza dos picos cromatográficos relativos a cada um dos compostos, avaliando-se também a possível coeluição de componentes da matriz com os analitos de interesse.

6.8.2 Linearidade

O estudo da linearidade do método para os analitos seguiu as seguintes etapas: (1) obtenção das equações para as curvas de calibração primárias no solvente através da regressão linear por método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO); (2) Teste de homocedasticidade através da avaliação visual dos gráficos de resíduo (d_y) da resposta analítica (y_i) em função da concentração (x_i) e adicionalmente por teste F de Hartley; (3) Teste t_r para falta de ajuste para verificação do ajuste das equações de calibração (MAPA, 2011).

6.8.3 Curvas de calibração

No estudo de linearidade foi definida a faixa de concentração correspondente a 25 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ na amostra. Foram preparadas soluções padrões de calibração multicomponente dos analitos em solvente metanol. As soluções de calibração foram obtidas por diluição de uma solução padrão 10 mg L^{-1} multicomponente dos analitos em metanol em balão volumétrico de 10,0 mL. Foram definidos nove pontos dentro da faixa 5 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Cada solução padrão de calibração foi injetada no CLUE-QDa em triplicatas.

Após todas as injeções foram obtidas as respostas instrumentais na forma de área do pico cromatográfico (A_P) relativas a cada concentração (x_i) para todos os analitos, para estimativa das curvas de calibração via regressão linear por mínimos quadrados ordinários (MMQO) através do software Microsoft Excel 2013.

As curvas de calibração também foram preparadas através de calibração por superposição de matriz (curvas de calibração matrizadas), ou seja, com os mesmos pontos de concentração que foram preparados em solvente puro, sendo também preparados no próprio extrato aquoso (infusão). Este experimento visou avaliar a linearidade do método na ausência e na presença dos componentes da matriz, como também avaliar o efeito de matriz que será descrito na subseção 6.8.7 (MAPA, 2011; RIBANI *et al.*, 2004). A análise dos padrões de calibração na matriz foi obtida nas mesmas condições aplicadas para os padrões de calibração no solvente.

6.8.4 Teste de Homocedasticidade

Após estimativa das equações de calibração obtendo-se os parâmetros de regressão, inclinação (a) e intercepto (b) primários MMQO para cada analito, foram calculados os resíduos (d_y) das respostas instrumentais conforme Equação 3 e plotados os gráficos de resíduo em função da concentração (x_i) para avaliação da hipótese de homocedasticidade.

$$d_y = (y_i - \hat{y}_i) \quad (3)$$

Em que:

y_i = Resposta instrumental experimental ($A_{P,i}/A_{PI}$);

\hat{y}_i = Resposta instrumental prevista pela equação de calibração obtida via MMQO.

Nos casos onde houve dispersão aleatória do resíduo na faixa de concentração considerada a hipótese de homocedasticidade foi aceita. Quando o perfil de distribuição dos resíduos apresentou aparência afunilada considerou-se a hipótese de heterocedasticidade, sendo de qualquer forma conduzido o teste $F_{m\acute{a}x}$ de Hartley para nível de confiança de 95 %, conforme Equação 4 (MAPA, 2011).

$$F_{m\acute{a}x} = \frac{s_{m\acute{a}x}^2}{s_{m\acute{i}n}^2} \quad (4)$$

Em que:

$F_{máx}$ = Parâmetro F de Hartley calculado;

$s_{máx}^2$ = Maior variância do conjunto de dados da calibração;

s_{min}^2 = Menor variância do conjunto de dados da calibração.

Se $F_{máx} < F_{crítico}$ considerando $f = m-1$ graus de liberdade, sendo m o número de replicatas de cada conjunto de dados e k o número grupos de dados comparados admite-se homocedasticidade para um dado nível de confiança.

Se $F_{máx} > F_{crítico}$ considerando $f = m-1$ graus de liberdade e k o número grupos de dados comparados admite-se heterocedasticidade para um dado nível de confiança.

Para os testes desenvolvidos neste trabalho temos $m = 3$ ($f = 2$) k igual ao número de pontos de calibração definidos para cada composto e nível de confiança de 95 %.

6.8.5 Teste t_r para ajuste linear

O teste t_r possibilita a verificação do ajuste dos modelos lineares para as equações de calibração, sendo conduzido tanto para as equações de calibração obtidas via MMQO, quanto para as obtidas via MMQP (MAPA, 2011). Este teste baseou-se no cálculo do parâmetro t_r para os modelos das equações de curva de calibração definidas para as respectivas faixas de calibração estabelecidas, conforme Equação 5.

$$t_r = |r| \cdot \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}} \quad (5)$$

Em que:

r = Coeficiente de correlação;

n = Número de pontos de calibração considerados.

Se $t_{r,calc} < t_{crítico}$ para $(n - 2)$ graus de liberdade e nível de confiança de 95 % é considerada a hipótese de falta de ajuste linear para o modelo da equação de calibração;

Se $t_{r,calc} > t_{crítico}$ para $(n - 2)$ graus de liberdade e nível de confiança de 95 % é considerada a hipótese de ajuste linear para o modelo da equação de calibração.

6.8.6 Teste de Significância dos parâmetros de calibração

A avaliação da significância dos parâmetros estatísticos (coeficiente angular (a) e linear (b)) nas curvas analíticas foi realizada mediante uso do teste t de *Student*. De modo que para que o parâmetro seja estatisticamente significativo, a razão entre o valor do parâmetro e o desvio (Equações 6 e 7) deve ser maior que o valor tabelado para o t de *Student* (DANZER; CURRIE, 1998).

$$t_{\text{calculado}} = \frac{a}{S_a} \quad (6)$$

$$t_{\text{calculado}} = \frac{b}{S_b} \quad (7)$$

Em que:

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear;

S_a = desvio do coeficiente angular;

S_b = desvio do coeficiente linear.

6.8.7 Efeito matriz

A avaliação da possível existência de efeito matriz causado pelo extrato foi executada mediante comparações entre as inclinações das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz. O cálculo da magnitude do efeito matriz foi executado por meio da Equação 8 (SALVIA; CREN-OLIVÉ; VULLIET, 2013).

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (8)$$

Em que:

X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas preparadas na matriz;

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas preparadas em solvente.

6.8.8 Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ)

Usando o método sinal-ruído, foram estimados os valores de LD e LQ baseando-se na razão entre altura do sinal pela altura do ruído, estabelecendo uma relação entre sinal/ruído de aproximadamente 3 e 10, respectivamente.

6.8.9 Exatidão

Os estudos de exatidão foram baseados em ensaios de recuperação seguindo dois passos, foram realizados em três níveis de concentração, um nível baixo, um intermediário e um nível alto: ternatina (25, 150 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$), tanabalina e ácido centipédico (150, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$), dentro da faixa de linearidade estabelecida para os analitos, sendo conduzidos em 6 repetições em cada nível de concentração (MAPA, 2011).

Os ensaios de recuperação foram conduzidos através da fortificação das amostras adicionando-se às infusões diluídas (3,5:10 v/v) alíquotas de 25, 150, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ da solução-padrão multicomponente de 10 mg L^{-1} segundo os respectivos níveis de concentração avaliados. Juntamente com as amostras fortificadas foram analisadas amostra não fortificadas (branco da amostra). As amostras fortificadas foram analisadas por CLUE-QDa-MIS nas condições do método selecionado.

Os percentuais de recuperação foram calculados conforme Equação 9 expressa abaixo:

$$Rec (\%) = \frac{C_f - C_b}{C_{ad}} \cdot 100 \quad (9)$$

Em que:

C_f = Concentração quantificada após análise.

C_b = Concentração quantificada na amostra branco.

C_{ad} = Concentração adicionada na fortificação.

6.8.10 Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos estudos de repetitividade (precisão

intra-corrída) e de precisão intermediária (precisão intralaboratorial), conforme detalhado nas subseções abaixo.

6.8.11 Repetitividade

Para os estudos de repetitividade foram feitas seis injeções de uma solução contendo todos os analitos na matriz, nos níveis de concentração 25, 150, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo as corridas cromatográficas realizadas sob condições de repetitividade: mesmo analista, mesmo equipamento e num mesmo dia. Finalmente a concentração de cada analito foi determinada para cada uma das seis replicatas, sendo obtido o desvio padrão relativo (Equação 10) para cada composto como estimativa da repetitividade do método (MAPA, 2011; RIBANI *et al.*, 2004).

6.8.12 Precisão Intermediária

Para a determinação da reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária), os procedimentos acima foram repetidos em mais duas ocasiões (em condições de reprodutibilidade: dias diferentes de análise). Por fim, o desvio padrão relativo das replicatas por nível de concentração foram avaliadas, conforme as Equações 10 e 11 (MAPA, 2011).

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (10)$$

$$CV (\%) = \frac{s_r}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (11)$$

Em que:

x_i = Valores quantificados para concentração em cada replicata para o nível i de concentração

\bar{x} = Valor médio da concentração em um dado nível i

n = Número de replicatas em cada nível ($n = 6$)

s_r = Desvio padrão da repetitividade

6.9 Análise de IV próximo (portátil)

Os experimentos de infravermelho próximo (IVp) foram realizados em um espectrômetro portátil microNIR 1700 Viavi (Milpitas, CA, EUA) (45 mm de diâmetro × 42 mm de altura) equipado com duas fontes de radiação de tungstênio para medições de reflectância, operando na faixa de 1150 a 2170 nm e resolução espectral de 10 nm, além de um monocromador contínuo baseado em um filtro variável linear. A análise de IVp foi realizada diretamente nos capítulos florais. Os dados espectrais foram adquiridos com 100 varreduras / amostra e um tempo de integração de 50 ms. Os espectros de referência para medição da absorbância foram obtidos de amostra feita de Spectralon™ e o sinal escuro, apontando o instrumento para o ambiente.

6.9.1 Análise quimiométrica para o conjunto de dados IV.

A análise quimiométrica foi realizada em uma matriz numérica de 80 espectros gerados a partir da aquisição de dezesseis amostras de *E. viscosa* em quintuplicata. A região espectral entre 1150 e 2170 nm foi utilizada para a análise, resultando em uma matriz numérica com dimensionalidade de 10000 pontos de dados (80 espectros × 125 variáveis). As amostras foram classificadas de acordo com o composto majoritário do óleo essencial (quimiotipo). Os dados espectrais foram convertidos em arquivos ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*) para construção de matriz através do programa Origin™ 9.4, que foi exportado para análise quimiométrica usando o pacote PLS-Toolbox (versão 8.7 - Eigenvector Research Inc., Wenatchee, EUA).

Para avaliar a variabilidade química entre as amostras de *E. viscosa*, um método supervisionado por PLS-DA (Análise Discriminante dos Mínimos Quadrados Parciais) foi aplicado ao conjunto de dados IVp de capítulos florais usando o quimiotipo como variáveis categóricas (coluna Y). Além disso, uma modelagem baseada em intervalo quadrático parcial de intervalo (iPLS) foi desenvolvida para definir as regiões espectrais IVp mais importantes para discriminação dos quimiotipos, usando o tamanho do intervalo de 5 nm e o número automático subsequente de intervalos nos espectros.

Foram aplicados o pré-processamento da Correção de dispersão multiplicativa (MSC) sobre os espectros e o processamento centrado na média sobre as amostras, uma vez que melhoram os resultados da modelagem. Os espectros foram ajustados para apresentar o mesmo

nível de dispersão estimado por um espectro médio após a aplicação do algoritmo MSC. O algoritmo PLS simplificado (SIMPLS) foi aplicado para construir o modelo e o número de variáveis latentes (VL) foi selecionado de acordo com a matriz de confusão e os seguintes parâmetros estatísticos: RMSEC (erro quadrático médio de calibração); RMSEV (erro quadrático médio da validação cruzada); coeficientes de correlação (r^2) de calibração e validação cruzada; valor de *bias*; e modelo seletividade (taxa positiva verdadeira) e especificidade (taxa negativa verdadeira). A validação cruzada do modelo foi desenvolvida pelo método das venezianas com menos de 10 splits e espessura igual a 1.

Para se obter os valores desses parâmetros de validação foi utilizada as seguintes fórmulas a partir dos resultados das classificações da classe atual *versus* a classe predita (matriz de confusão):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{PV}{PV + FN} \quad (12)$$

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP} \quad (13)$$

$$\text{Precisão} = \frac{VP}{VP + FP} \quad (14)$$

$$\text{MCC} = \frac{(PV \times VN) - (FP \times FN)}{\sqrt{(PV + FP) \times (PV + VN) \times (VN + FP) \times (VN + FN)}} \quad (15)$$

Onde: positivo verdadeiro (PV); falso positivo (FP); verdadeiro negativo (VN); falso negativo (FN) e coeficiente de correlação de Mathews (MCC).

A eficiência dos modelos de calibração multivariada foi avaliada pelo cálculo dos valores da raiz quadrada do erro quadrático médio (RMSE – do inglês, *root mean square error*), conforme equação 16:

$$\text{RMS} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Y_{prev} - Y_{real})^2}{n}} \quad (16)$$

Onde: n o número de amostras, (Y_{prev}) o valor calculado pelo modelo e (Y_{real}) o

valor verdadeiro ou obtido por um método de referência (Y_{real}).

Esses erros podem ser calculados a partir da auto-predição das amostras de calibração (raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração - RMSEC), da validação cruzada das mesmas (raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada - RMSECV).

Além disso, uma análise de regressão multivariada por PLS (*Partial Least Squares*) foi empregada para prever a concentração de acetato de *trans*-pinocarveíla (quimiotipo A) e acetato de *cis*-isopinocarveíla (quimiotipo B), correlacionando suas quantidades (CG-Áreas absolutas do DIC, Tabela 2A) com os espectros do IVp. Os mesmos pré-tratamentos e algoritmos aplicados aos espectros e amostras no modelo PLS-DA foram utilizados para essa modelagem de regressão.

6.9.2 Análise quimiométrica para o conjunto de dados CLUE-EMAR.

Os dados brutos do sistema CLUE-EMAR controlado pelo software MassLynx (versão 4.1, Waters Corporation) foram processados usando o software Markerlynx XS sob os seguintes parâmetros: tempo de retenção entre 2,0 e 13,0 min; faixa de massas entre 120 e 1180 Da no modo de ionização negativa; e o valor de eliminação de ruído em 5. Portanto, um método quimiométrico supervisionado por PLS-DA (Análise Discriminante dos Mínimos Quadrados Parciais) foi aplicado a fim de destacar a variabilidade das amostras de *E. viscosa* com base no quimiotipo. A análise quimiométrica foi desenvolvida pelo pacote PLS-Toolbox (versão 8.7 - Eigenvector Research Inc., Wenatchee, EUA), utilizando o algoritmo SIMPLS (*Simplified PLS*) para modelagem. Antes da modelagem quimiométrica, algoritmos para correção de linha de base, suavização para melhorar a forma dos sinais, alinhamento de sinais por COW (alinhamento por correlação otimizada) e normalização de sinais para área foram aplicados sobre as variáveis; e as amostras foram centradas na média para enfatizar as variáveis para a discriminação do agrupamento das amostras. Após a classificação das amostras por PLS-DA com base no quimiotipo, os dados foram avaliados por PLS-DA ortogonal (OPLS-DA) destacando as variáveis retidas na primeira variável latente (VL). O número total de VL para classificação da amostra de acordo com o quimiotipo (A ou B) foi selecionado de acordo com os resultados da Matriz de Confusão e os seguintes parâmetros estatísticos foram avaliados: RMSEC (erro quadrático médio de calibração); RMSECV (erro quadrático médio da validação cruzada); coeficientes de correlação de calibração (r^2_{cal}) e validação cruzada (r^2_{VC}); *bias* e valores de *bias* VC; seletividade do modelo (taxa de verdadeiro positivo) e especificidade (taxa

de verdadeiro negativo). A modelagem de classificação foi validada usando o método *Venetian Blind* em 10 divisões e espessura de *blind* igual a 1.

6.10 Hidrodestilação dos capítulos florais de *E. viscosa*.

A obtenção dos óleos essenciais de *E. viscosa* foi realizada através do processo de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger para identificar e discriminar os quimiotipos pela análise por cromatografia gasosa (CG). O processo consistiu em colocar os capítulos florais (300 g) em um balão fundo redondo com 1,0 L de água destilada mantendo-se em ebulição por um período de quatro horas. Após este período o óleo, contido no doseador, foi separado da água, seco com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), pesado e armazenados a -18 °C no *freezer* antes da análise. As amostras de óleo essencial foram preparadas diluindo 10 µL em 990 µL de hexano e injetadas em alíquotas de 1 µL. As informações dos rendimentos dos óleos essenciais das amostras encontram-se descritas na Tabela 30.

Tabela 30 - Amostras utilizadas neste trabalho e seus rendimentos dos óleos essenciais.

Código	Origem / Data	Quimiotipo	Rendimento (%)
Ev005	Fortaleza-Ceará / Março 2016	A	0,45
Ev006	Fortaleza-Ceará / Março 2016	A	0,47
Ev007	Fortaleza-Ceará / Março 2016	B	1,2
Ev008	Cascavel-Ceará / Março 2016	B	1,3
Ev009	Fortaleza-Ceará / Abril 2016	B	0,96
Ev013	Pacajus-Ceará / Junho 2016	B	0,73
Ev014	Fortaleza-Ceará / Julho 2016	B	0,91
Ev016	Fortaleza-Ceará / Julho 2016	B	0,88
Ev017	Aiuaba-Ceará / Dezembro 2016	B	1,8
Ev020	Juazeiro-Ceará / Dezembro 2016	B	0,81
Ev021	Tauá-Ceará / Dezembro 2016	B	1,4
Ev022	Fortaleza-Ceará / Março 2017	B	0,6
Ev024	Fortaleza-Ceará / Março 2017	A	0,5
Ev025	Fortaleza-Ceará / Março 2017	A	0,47
Ev027	Cascavel-Ceará / Março 2017	A	0,30
Ev030	Fortaleza-Ceará / Novembro 2016	B	0,43

6.11 Análise CG-EM

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo CG-EM Agilent 5977A equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP 5MS (Agilent) (30 m × 0,25 mm id, espessura de filme de 0,25 µm) conectada a um detector quadrupolo operando no modo impacto de elétrons a 70 eV com uma faixa de massa de varredura de m/z 50-600 e taxa de amostragem de 2,7 varreduras.s⁻¹. O hélio foi utilizado como gás carreador a 1 mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor e da interface foram de 240 °C e 280 °C, respectivamente. A rampa de temperatura foi de: 40 °C por 4 min, aumentada para 80 °C a 2,5 °C min⁻¹, para 110 °C a 5 °C min⁻¹ e a 220 °C a 10 °C min⁻¹. A temperatura final (220 °C) foi mantida por 23 min. Os espectros de massa foram obtidos no modo de ionização de elétrons (IE) a 70 eV e na faixa de massa de 50 a 600 Da, usando o software Massa Hunter Workstation - análise qualitativa, versão B.06.00 Agilent Technologies. A identificação dos compostos foi realizada comparando os espectros de massas adquiridos com os espectros da Biblioteca NIST 2.0, 2012 (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, Gaithersburg, Maryland, EUA).

6.11.1 Análise quimiométrica do conjunto de dados CG-EM.

Um método PLS-DA supervisionado foi empregado para os dados de CG-EM dos óleos essenciais de *E. viscosa* obtidos como descrito anteriormente (seção 6.10), com o objetivo de identificar outros constituintes responsáveis pela discriminação dos quimiotipos. A região entre 3,7 e 21,5 min dos cromatogramas CG-EM foi selecionada, resultando em uma matriz com dimensionalidade de 44.768 (16 amostras × 2798 variáveis), que foi exportada pelo software PLS-Toolbox (descrito na subseção 6.9.1). Algoritmos para correção da linha de base, alinhamento de variáveis usando COW (*Correlation Optimized Warping*) com segmento de 50 pontos de dados e uma folga de 5 pontos de dados e normalização foram aplicados sobre as variáveis (FREITAS *et al.*, 2018). A composição química completa dos óleos essenciais foi determinada pela comparação dos padrões de fragmentação e índices de tempo de retenção linear de cada constituinte com os fornecidos pelo banco de dados do espectrômetro e relatórios anteriores (CRAVEIRO *et al.*, 1992).

6.11.2 Análise CG-DIC

A análise por CG-DIC foi realizada em um instrumento Shimadzu modelo CG-2010 Plus, coluna RTX-5 metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), modo de injeção com divisão de fluxo 1:30, gás carreador nitrogênio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹ (84,1 kPa) e velocidade linear constante de cm.s⁻¹, temperatura do injetor 250°C, temperatura do detector de 280°C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70°C com rampa de aquecimento de 4°C.min⁻¹ até 180°C por 27,5 min, seguida por rampa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ até 250°C, ao término da corrida (34,5min). A identificação dos compostos foi realizada através da comparação dos seus índices de retenção com os de compostos conhecidos, obtidos por injeção de uma mistura de padrões contendo uma série homóloga de alcanos C7-C30, e de dados da literatura.

6.12 Análise de RMN

As experiências de RMN foram realizadas em um espectrômetro Agilent de 600 MHz equipado com uma sonda de detecção inversa de 5 mm (H-F/¹⁵N-³¹P) One Probe™. Primeiramente, a preparação da amostra foi otimizada em relação ao solvente deuterado (clorofórmio, CDCl₃ e metanol, CD₃OD-Sigma-Aldrich 99,8%) e quantidade de capítulos florais (25, 50 e 100 mg), que foram moídos antes da análise. As amostras foram suspensas em 600 μL de solvente deuterado e sonicadas por 2 min. Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 5 mm RMN.

Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos sob parâmetros quantitativos em triplicata usando a sequência de pulsos PRESAT para supressão do pico da água não deuterada, dados espectrais com 32 varreduras usando 48.000 pontos de domínio de tempo para uma janela espectral de 16,0 ppm, pulso calibrado para 90° (7,78 μs de comprimento de pulso a 58 dB de potência), tempo de aquisição de 5,0 s, com intervalos de reciclagem (*recycling delay*) de 35,0 s (determinado pela seqüência de pulsos de inversão-recuperação), sob temperatura controlada a 298 K. O processamento espectral foi realizado aplicando-se alargamento exponencial Lorentziano de 0,3 Hz e “*zero filling*” até 16 k pontos de dados antes da transformação de Fourier. A correção de fase foi efetuada manualmente e a correção automática da linha de base foi aplicada em toda a faixa espectral. Os espectros foram referenciados ao sinal TMS-*d*₄ em

δ 0,0.

A fim de garantir uma atribuição inequívoca às ressonâncias observadas nos espectros de RMN de ^1H , experimentos bidimensionais (2D) de RMN foram adquiridos usando sequências de pulso padrões do de espectrômetro. Os experimentos ^1H - ^1H gCOSY foram obtidos com largura espectral de 9.615,4 Hz em ambas as dimensões; Matriz de dados 1442×200 ; 16 varreduras por incremento de t_1 , e intervalo de relaxação (*relaxation delay*) de 1,0 s. Os experimentos ^1H - ^{13}C gHSQC foram adquiridos com intervalo de evolução de 3,425 ms (intervalo de transferência, *transfer delay*) para uma constante de acoplamento $^1J(\text{C}, \text{H})$ de 146 Hz; Matriz de dados 1442×200 ; 48 varreduras por incremento t_1 ; larguras espectrais de 9.615,4 Hz em f_2 e 30.154,5 Hz em f_1 e tempo de relaxação de 1,0 s. Os experimentos de ^1H - ^{13}C -gHMBC foram registrados com um intervalo de evolução de 62,5 ms para uma constante de acoplamento $J^{2-3}(\text{C}, \text{H})$ de 8 Hz; Matriz de dados 1442×200 ; 96 varreduras por incremento t_1 ; larguras espectrais de 9.615,4 Hz em f_2 e 36.182,7 Hz em f_1 e tempo de relaxação de 1,0 s. Para análises quimiométricas e RMN quantitativa de ^1H , as amostras foram preparadas com 25 mg de capítulos florais pulverizados e submetidos a extração em CD_3OD .

6.12.1 Análise quimiométrica do conjunto de dados RMN ^1H .

Para avaliação quimiométrica, uma matriz numérica foi construída pela conversão de cada espectro de RMN de ^1H em arquivos ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*) e importada pelo programa Origin TM 9.4. Algoritmos para correção da linha de base, alinhamento de variáveis usando COW com segmento de 50 pontos de dados e uma folga de 5 pontos de dados e normalização foram aplicados sobre as variáveis (FREITAS *et al.*, 2018). Conforme realizado para o conjunto de dados IVp, foi estabelecido um método PLS-DA usando os dois quimiotipos como variáveis categóricas (coluna Y).

6.12.2 Análise RMNq ^1H .

Os compostos bioativos foram quantificados usando um método de referência externo. Uma solução padrão de sacarose ($5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foi usada para calibrar o espectrômetro e o arquivo da sonda foi atualizado com os parâmetros de determinação de concentração necessários. (SUCUPIRA *et al.*, 2017). Os sinais em δ 3,83 (ternatina), δ 7,54 (tanabalina) e δ 7,35 (ácido centipédico) foram escolhidos para quantificação devido as suas intensidades e resolução.

A incerteza combinada do método foi estimada com base nos erros analíticos e

desvios padrões das três repetições amostrais. Os resultados foram submetidos à análise de variâncias (ANOVA) unidirecional ao nível de significância de 0,05, comparação de médias pelo teste de Tukey para testar a homogeneidade da variância e avaliar estatisticamente as diferenças entre as concentrações.

6.13 Otimização da Análise por MEFS-CG-EM

6.13.1 Microextração em fase sólida - (MEFS)

As extrações foram realizadas utilizando duas fibras com revestimento de divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) com 30 µm de espessura, e poliacrilato (PA) com 85 µm de espessura, sendo todas com 1 cm de altura. As fibras são revestidas de um polímero, de características polares (PA) e polaridade intermediária (DVB/CAR/PDMS), sendo largamente usado em análises de voláteis de plantas e demonstrando resultados satisfatórios (BELLIARDO *et al.*, 2019). As fibras de MEFS foram adquiridas na Supelco (Bellefonte, EUA). Todas as fibras foram condicionadas antes da análise de acordo com as instruções do fabricante por inserção na porta do injetor do CG.

O procedimento de MEFS foi realizado automaticamente por meio do amostrador automático Agilent Combipal acoplado ao instrumento CG-EM, consistindo nas seguintes operações sequenciais: acondicionamento da amostra sob agitação por 30 min a 30 °C, extração da amostra por 15 min e injeção por dessorção térmica da fibra.

As extrações foram realizadas por *headspsace*, em *vials* de 20 mL com três tipos de preparo de amostras sendo: (1) 1 g de capítulos florais; (2) 1 g de capítulos florais imersos em 6 mL de água e (3) 1 g de capítulos florais imersos em uma solução salina de 6 mL de água e 3 g de NaCl. Após o equilíbrio estabelecido, a fibra foi exposta, em seguida levado ao injetor do cromatógrafo.

6.13.2 Planejamento Experimental para Microextração em Fase Sólida (MEFS)

Após estudos preliminares de amostragem e escolha da fibra a ser utilizada no experimento, as variáveis independentes: como peso (p), temperatura de extração (T), tempo de extração (t), selecionadas para a análise por MEFS, foram avaliadas usando a metodologia de superfície resposta (MSR). A otimização das condições da MEFS para voláteis de *E. viscosa* foi implementada usando o software Chemoface versão 1.61 (NUNES *et al.*, 2012). Como

planejamento experimental, realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 17 ensaios, tendo como variáveis independentes: peso (g); temperatura de extração (°C); tempo de extração (min), conforme Tabela 31.

Tabela 31 - Níveis de variáveis empregados na triagem de uma otimização do método de extração dos capítulos florais de *E. viscosa* por MEFS-CG-EM, usando DCCR.

Variáveis independentes	Símbolo	Intervalo e níveis				
		- 1.682	- 1	0	1	+ 1.682
Massa, m (g)	X_1	0,33	0,5	0,75	1	1
Temperatura de extração, T (°C)	X_2	33,2	40	50	60	66,8
Tempo de extração, t (min)	X_3	6,6	10	15	20	23,4

Fonte: Elaborada pela autora.

6.13.3 Projeto Experimental e Análise de Dados

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi utilizada para determinar as melhores condições de extração dos compostos voláteis majoritários dos capítulos florais de dois quimiotipos de *E. viscosa*. As variáveis de resposta foram as áreas totais dos picos, a saber, as de acetato *trans*-pinocarveíla e acetato *cis*-isopinocarveíla. Planejamento rotativo composto central ($\alpha = 1.682$) com três fatores independentes: massa de capítulos florais (X_1), temperatura de extração (X_2) e tempo de extração (X_3).

Os dados experimentais do DCCR foram analisados por meio de regressão da superfície de resposta e ajustados a um modelo polinomial de segunda ordem, conforme indicado na Equação (17):

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ii} X_i^2 + \beta_{ij} X_i X_j \quad (17)$$

Onde Y é a variável dependente prevista, β_0 é a constante do modelo que fixa a resposta no ponto central do experimento (interceptação), β_i é o coeficiente de regressão para os termos de efeito linear, β_{ii} é o termo de efeito quadrático, β_{ij} é o termo de efeito da interação das variáveis i e j , e X_i e X_j são as variáveis independentes. A adequação do modelo foi prevista através da análise de variância (ANOVA), que estabeleceu a falta de ajuste do modelo e o coeficiente de determinação (R^2). Além disso, os valores experimentais e previstos para cada variável dependente foram comparados.

6.13.4 Resolução máxima dos picos cromatográficos

Também foi avaliada uma resolução dos picos cromatográficos, que forneceu uma medida quantitativa da capacidade da coluna para separar os dois compostos majoritários: acetato de *trans*-pinocarveíla e acetato de *cis*-isopinocarveíla. A resolução dos picos foi calculada de acordo com a equação (18) (SKOOG, WEST, HOLLER, 2006):

$$R_p = 2 (d_{R2} - d_{R1}) / (W_{b2} - W_{b1}) \quad (18)$$

Onde R_p é a resolução do pico, d_R é o tempo de retenção e W_b é a largura do pico.

6.14 Avaliação farmacológica

6.14.1 Lesões gástricas induzidas por etanol

Os testes farmacológicos foram realizados pela Dra. Ana Flávia Seraine Custódio Viana e Ms. Paulo Iury Gomes Nunes sob a supervisão da Profa. Flávia Almeida Santos, no Laboratório de Produtos Naturais (LPN), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Nesse estudo, foram realizados ensaios pré-clínicos (camundongos) para avaliação do efeito gastroprotetor dos extratos de capítulos florais de dois quimiotipos de *E. viscosa*. Foram utilizados camundongos albinos Swiss, machos, pesando entre 25-30g. Os animais foram adquiridos do Biotério da Universidade de Fortaleza e mantidos em caixas de polipropileno, T = 24 °C, com ciclos de claro / escuro de 12 / 12 h, recebendo ração padrão e água à vontade e em jejum de sólidos (ração) por 12 hs antes do início dos experimentos. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFC (protocolo 81/2017).

Para avaliar a atividade gastroprotetora dos extratos de *E. viscosa*, foi utilizado o modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto segundo método de Robert *et al.* 1979. Para isso, os camundongos foram tratados, via oral, com veículo (1% Tween 80 em salina, 10 mL.kg⁻¹, v.o.), Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A), Ev034-01 (Chá de capítulos florais cultivados - Quimiotipo B), Ev017-01 (Chá dos capítulos florais de material

silvestre (Aiuaba) - Quimiotipo B), e Ev017-03 (Tintura dos capítulos florais de material silvestre (Aiuaba) - Quimiotipo B), Ev047 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo A) ou Ev048 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo B), 50 – 400 mg.kg⁻¹, 60 min da administração oral de etanol absoluto (96%; 0,2 mL/animal). N - acetilcisteína (NAC, 200 mg.kg⁻¹, v.o.) foi utilizada como fármaco de referência, e administrada 60 min antes do etanol absoluto (Figura 51). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico (Cetamina 300 mg.kg⁻¹ e Xilazina 30 mg.kg⁻¹, i.p.), os estômagos foram retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre dois vidros de relógio para uma melhor visualização. O percentual da face glandular gástrica lesionada foi determinado com o auxílio de um programa de planimetria computadorizado (ImageJ®). A área ulcerada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico.

6.14.2 Avaliação da atividade antioxidante de E. viscosa frente às lesões gástricas induzidas por etanol.

As amostras com maiores atividades gastroprotetora (Ev024, Ev034-01 Ev017-03) foram submetidas a análise dos marcadores gástricos de estresse oxidativo: Glutathiona reduzida (GSH), quantificada pelo teor dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (NP-SH) (SEDLAK e LINDSAY, 1968); Malondialdeído (MDA) (AGAR, BOS E DEMÕ, 1999); Catalase (aCAT) (AEBI, 1974); Superóxido dismutase (SOD) (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971) e Nitrito/nitrato (GREEN *et al.*, 1982; BRADFORD, 1976).

6.14.3 Avaliação da toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada seguindo as diretrizes da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD 425) (OECD GUIDELINE, 2001). Para isso, camundongos *Swiss* machos foram divididos em cinco grupos de 3 animais em cada grupo, o grupo veículo recebeu por via oral água destilada (10 ml.kg⁻¹), e os grupos testes Ev024 (Chá de capítulos florais comerciais - Quimiotipo A), Ev034-01 (Chá de capítulos florais - Quimiotipo B) Ev017-03 (Tintura dos capítulos florais de material silvestre (Aiuaba) - Quimiotipo B), Ev047 (Chá das folhas cultivadas- Quimiotipo A), receberam por via oral, a dose única de 2000 mg.kg⁻¹ das respectivas amostras. Os animais foram observados 1, 2, 4, 6 e 8 h após a administração, e a partir de então, diariamente, até o 14º. dia, para verificar a ocorrência e o número de mortes. Além disso, o peso

dos animais e o consumo de ração e água foram mensurados, em dias alternados, durante 14 dias.

6.14.4 Avaliação do envolvimento das Prostaglandinas, do Óxido Nítrico (NO), dos Canais de Potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) e dos receptores TRPV-1 no efeito gastroprotetor do chá dos capítulos florais de *E. viscosa*: quimiotipo A (Ev024) e quimiotipo B (Ev034-01).

Para avaliar a participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor de Ev024 e de Ev034-01, os animais ($n = 8$ animais/grupo) foram pré-tratados com indometacina (10 mg.kg^{-1} , s.c.) 30 minutos antes da administração do veículo (1% Tween 80 em salina, 10 mL.kg^{-1} , v.o.), Ev024 (100 mg.kg^{-1} , v.o.), Ev034-01 (100 mg.kg^{-1} , v.o.) ou misoprostol ($50 \text{ }\mu\text{g/kg}$, v.o.). Após 60 min dos tratamentos, todos os animais receberam etanol absoluto ($0,2 \text{ mL/animal}$, v.o.) para a indução das lesões, de acordo com protocolo descrito por Matsuda e Yoshikawa 1999, com modificações. Depois de 30 min, os animais foram eutanasiados e as lesões gástricas mensuradas por planimetria com o auxílio de um programa computadorizado (ImageJ®) (ROBERT *et al.*, 1979).

Para se determinar o papel do óxido nítrico no efeito gastroprotetor de Ev024 e de Ev034-01, os animais ($n = 8$ animais/grupo) foram pré-tratados com N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 20 mg.kg^{-1} , i.p.), um inibidor da sintase de óxido nítrico. Depois de 30 min os animais receberam veículo, Ev024 (100 mg.kg^{-1} , v.o.), Ev034-01 (100 mg.kg^{-1} , v.o.) ou L-arginina (600 mg.kg^{-1} , i.p.) (HANCHAR, 1979). Após 60 min da administração do veículo, Ev024 ou Ev034-1 (100 mg.kg^{-1} , v.o.), e 30 min após a administração de L-arginina, todos os animais receberam etanol absoluto ($0,2 \text{ mL/animal}$). Depois de 30 min da administração do etanol os animais foram eutanasiados e as lesões gástricas mensuradas por planimetria com o auxílio de um programa computadorizado (ImageJ®) (ROBERT *et al.*, 1979).

A participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) no efeito gastroprotetor de Ev024 e de Ev034-01 foi investigada em animais ($n = 8$ animais/grupo) pré-tratados com glibenclamida (3 mg.kg^{-1} , i.p.), um bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), 30 min antes da administração do veículo, Ev024 (100 mg.kg^{-1} , v.o.), Ev034-01 (100 mg.kg^{-1} , v.o.) ou diazóxido (3 mg.kg^{-1} , i.p.), seguindo o protocolo descrito por Peskar *et al.* (2002). Após 45 min da administração do veículo, Ev024 ou Ev034-01, e 30 min após a administração de diazóxido, todos os animais receberam etanol absoluto ($0,2 \text{ mL/animal}$). Trinta minutos depois os animais foram eutanasiados e as lesões gástricas mensuradas por planimetria com o auxílio de um programa computadorizado (ImageJ®) (ROBERT *et al.*, 1979).

Para se verificar a participação dos receptores TRPV1 no efeito gastroprotetor de Ev024 e de Ev034-01, os animais ($n = 8$ animais/grupo) foram pré-tratados com capsazepina (5 mg.kg^{-1} , i.p.), um antagonista específico dos receptores TRPV1, 30 min antes da administração do veículo, Ev024 (100 mg.kg^{-1} , v.o.), Ev034-1 (100 mg.kg^{-1} , v.o.) ou capsaicina ($0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$, v.o.). Após 60 min dos tratamentos, todos os animais receberam etanol absoluto ($0,2 \text{ mL/animal}$, v.o.) para a indução das lesões, de acordo com protocolo descrito por Moraes *et al.* 2010, com modificações. Depois de 30 min, os animais foram eutanasiados e as lesões gástricas mensuradas por planimetria com o auxílio de um programa computadorizado (ImageJ®) (ROBERT *et al.*, 1979).

6.14.5 Avaliação histológica gástrica do efeito do chá dos capítulos florais de E. viscosa: quimiotipo A (Ev024) e quimiotipo B (Ev34-01) no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.

Camundongos Swiss, machos, foram tratados, via oral, com veículo (1% Tween 80 em salina, 10 mL.kg^{-1}), Ev024 (100 mg.kg^{-1}), Ev034-01 (100 mg.kg^{-1}) ou N-acetilcisteína (NAC, 200 mg.kg^{-1}) 60 min antes da administração oral de etanol absoluto (96%; $0,2 \text{ mL/animal}$). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico (Cetamina 300 mg.kg^{-1} e Xilazina 30 mg.kg^{-1} , i.p.), os estômagos foram retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e fixados em formalina tamponada (10%, pH 6,8-7,4) e emblocados em parafina. Adicionou-se um grupo normal (*Sham*), com animais que não receberam nenhum tipo de tratamento. Os blocos de parafina foram cortados ($5 \mu\text{m}$), fixados em lâminas histológicas e em seguida corados com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação microscópica. As lâminas foram examinadas com auxílio de um microscópio óptico, com câmera acoplada, para obtenção das fotomicrografias, sendo as aferições histomorfológicas analisadas por patologista habilitado sem conhecimento prévio dos grupos. As alterações histológicas foram avaliadas quanto ao infiltrado inflamatório, hemorragia, edema e erosão (VIANA *et al.*, 2016).

6.14.6 Análise dos dados (ANOVA)

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (epm). Para comparação múltipla dos dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Para os dados não-paramétricos, os resultados foram expressos como mediana (min - máx) e analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

7 CONCLUSÃO

O estudo metabolômico de *Egletes viscosa* mostrou a composição química dos capítulos florais e das folhas de dois quimiotipos (A- rico em acetato de *trans*-pinocarveíla e B- rico em acetato de *cis*-isopinocarveíla) e viabilizou o desenvolvimento de métodos analíticos para discriminação desses materiais e quantificação dos seus princípios ativos, através da combinação de um conjunto de técnicas cromatográficas e espectrométricas (CG-EM; IVp; RMN ¹H e CLUE-EM) com as ferramentas quimométricas (iPLS, PLS-DA e OPLS-DA).

Todos os métodos analíticos mostraram ser simples, rápidos, confiáveis e complementares para autenticidade e/ou controle de qualidade de matérias-primas e produtos comercializados de *E. viscosa*. O novo método de MEFS-CG-EM mostrou ser eficiente na discriminação dos quimiotipos, de uma maneira não-destrutiva, mais rápida e utilizando uma quantidade de capítulos florais pelos menos 300x menor do que o método convencional de hidrodestilação e análise do óleo essencial. Adicionalmente, novos constituintes voláteis foram identificados como discriminantes para os quimiotipos. O método de IVp também discriminou os quimiotipos de maneira não-destrutiva utilizando um dispositivo portátil, o qual pode ser aplicado *in natura* (fazendas, ervanários). O método de RMN ¹H tem a vantagem de ser muito prático (poucos minutos) e quantitativo.

A análise de CLUE-EM de alta resolução permitiu a identificação de 36 compostos nas infusões, sendo 20 relatados pela primeira vez na espécie, entre os quais derivados do ácido cafeico, flavonoides e diterpenos. As infusões dos capítulos florais são compostas por 25 constituintes, enquanto as folhas são constituídas por 20 compostos. Análise quimométrica dos dados de CLUE-EMAR indicou que os quimiotipos A e B mostravam diferenças nas concentrações da rutina, kaempferol 3-*O*-rutinosídeo, ácido 1,4-di-*O*-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico, composto desconhecido, lactona isociliolida, kerlinolida, isômero 7-hidroxi-3,13-clerodandieno-16,15:18,19-diolida, bacchariol e 15,16-epóxi-12-hidroxineocleroda-13(16),14-dieno18,19-hemiacetal. Além disso, de acordo com as quantificações realizadas pelos métodos de CLUE-EM-MIS e RMNq ¹H, as infusões dos capítulos florais do quimiotipo A contém os maiores teores dos três princípios ativos foram observados.

As infusões dos capítulos florais e das folhas exibiram efeito gastroprotetor em doses que variaram de 50 - 400 mg.kg⁻¹ nos ensaios de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Todas as amostras foram desprovidas de toxicidade em doses terapêuticas. Os capítulos florais foram mais potentes do que as folhas, exibindo gastroproteção com doses de

50 mg.kg⁻¹ e percentual de inibição da lesão gástrica de mais de 80% em doses de 200 mg.kg⁻¹. Não foi observada diferença significativa entre amostras de chá e de tintura. Os quimiotipos apresentaram apenas algumas pequenas diferenças no mecanismo de ação, o qual envolve ação antioxidante, óxido nítrico, prostaglandinas, canais de K⁺ e receptores TRPV1. Nosso estudo é o primeiro relato comprovando o efeito gastroprotetor de *E. viscosa* nas formas farmacêuticas consumidas pela população.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, H. I.; SHALABY, N. M. M.; HAMED, M. A.; EL-RIGAL, N. S.; AL-GHAMDI, S. N.; BOUAJILA, J. Phytochemical composition, protective and therapeutic effect on gastric ulcer and α -amylase inhibitory activity of *Achillea biebersteinii* Afan. **Archives of Pharmacal Research**, Gizé, v. 39, p. 10–20, 2016.
- ACHIKA, J. I.; ARTHUR, D. E.; GERALD, I.; ADEDAYO, A. A review on the phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the Asteraceae family. **Journal of Applied Chemistry**, Zaria, v. 7 p. 1-8, 2014.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Stockton, 4th ed. (Allured Publ., Carol Stream, IL, 2017).
- AEBI, H. Catalase, in vitro: **Methods of Enzymatic Analysis**, Nova Iorque, Academic Press, H.U. Bergmeyer (Ed.) NY, v. 2, p. 673-684, 1974.
- AGAR, E.; BOS, C. A. M.; DEMÖ, E. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. **Neuropharmacology**, Samsun, v. 10, n. 8, p. 1799-1801, 1999.
- AKAIKE, S.; SUMINO, M.; SEKINE, T.; SEO, S.; KIMURA, N.; IKEGAMI, F. A new *ent*-Clerodane diterpene from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Chiba, v. 51, p. 197-199, 2003.
- ALARCÓN, C.; CUENCA G. Arbuscular mycorrhizas in coastal sand dunes of the Paraguaná Peninsula, Venezuela. **Mycorrhiza**, Caracas, v. 16, p. 1-9, 2005.
- AL-HASHEM, F. H. Gastroprotective effects of aqueous extract of *Chamomilla recutita* against ethanol-induced gastric ulcers. **Saudi Medical Journal**, Abha, v. 31, p. 1211-1216, 2010.
- ALEMANY, L. B. Using simple ^{13}C NMR linewidth and relaxation measurements to make detailed chemical shift assignments in triacylglycerols and related compounds. **Chemistry and Physics of Lipids**, Houston, v. 120, p. 33–44, 2002.
- ALMEIDA, A. B. A. DE; LUIZ-FERREIRA, A.; COLA, M.; MAGRI, L. D. P.; BATISTA, L. M.; PAIVA, J. A.; TRIGO, J. R.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Anti-ulcerogenic mechanisms of the sesquiterpene lactone onopordopicrin-enriched fraction from *Arctium lappa* L. (Asteraceae): role of somatostatin, gastrin, and endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **Journal of Medicinal Food**, Campinas, v. 15, p. 378–383, 2012.
- ALVES- FILHO, E. G. A.; SILVA, L. M. A.; WURLITZER, N. J.; FERNANDES, F. A. N.; FONTELES, T. V.; RODRIGUES, S.; DE BRITO, E. S. An integrated analytical approach based on NMR, LC-MS and GC-MS to evaluate thermal and non-thermal processing of cashew apple juice. **Food Chemistry**, Fortaleza, v. 309, p. 125761, 2019a.

- ALVES-FILHO, E. G. A.; ALEXANDRE, L. M.; FERREIRA, A. G. Advancements in waste water characterization through NMR spectroscopy : review. **Magnetic Resonance in Chemistry**, São Carlos, v. 53, p. 648–657, 2015.
- ALVES-FILHO, E. A.; SILVA, L. M.; LIMA, Y.; RIBEIRO, P.; SILVA, E.; ZOCCOLO, G.; CANUTO, K.; MORAIS, S.; CASTRO, A. C.; DE BRITO, E. Metabolomic variability of different genotypes of cashew by LC-MS and correlation with near-infrared spectroscopy as a tool for fast phenotyping. **Metabolites**, Fortaleza, v. 9, p. 1–19, 2019b.
- AQUINO, P. E. A.; PEREIRA, N. L. F.; FIGUEIREDO, F. G.; FERREIRA, S. S.; LEANDRO, G. L. M.; SOUZA, J. C. C. O.; OLIVEIRA, C. D. M.; SANTANA, J. K. L.; TORRES, C. M. G.; SILVA, M. R.; COUTINHO, H. D. M.; MATIAS, E. F. F. The association between drugs and herbal products: In vitro enhancement of the antibiotic activity by extracts of dry floral buttons of *Egletes viscosa* L. (macela). **European Journal of Integrative Medicine**, Juazeiro do Norte, v. 7, p. 258–262, 2015.
- ARAÚJO, A. A. S.; BONJARDIM, L. R.; MOTA, E. M.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; ESTEVAM, C. S.; CORDEIRO, L.; Sérgio Ricardo S. SEIXAS, S. R. S.; BATISTA, J. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antinociceptive activity and toxicological study of aqueous extract of *Egletes viscosa* Less (Asteraceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Cristóvão, v. 44, p. 707–715, 2008.
- ARCINIEGAS, A.; POLINDARA, L. A.; PÉREZ-CASTORENA, A. L.; GARCÍA, A. M.; AVILA, G.; VILLASENOR, J. L.; VIVAR, A. R. Chemical composition and biological activity of *Laennecia schiedeana*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Cidade do México, v. 66, p. 115-122, 2011.
- ARDILES, A.; BARRIENTOS, R.; SIMIRGIOTIS, M. J.; BÓRQUEZ, J.; SEPÚLVEDA, B.; ARECHE, C. Gastroprotective activity of the atacama desert. **Molecules**, [S.I.]v. 23, p. 1–13, 2018.
- AYDO, C. Recent advances and applications in LC-HRMS for food and plant natural products: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Bingol, v. 412, p. 1973–1991, 2020.
- BAGGIO, C. H. Cristina Setim FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, Curitiba, v. 47, p. 93–98, 2003.
- BALLABIO, D.; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. **Analytical Methods**, Milão, v. 16, p. 3790–3798, 2013.
- BALLABIO, D. Chemometrics and intelligent laboratory systems a MATLAB toolbox for principal component analysis and unsupervised exploration of data structure. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Milão, v. 149, p. 1–9, 2015.
- BARROS, M.; SILVA, L. M.; BOEING, T.; SOMENSI, L. B.; CURY, B. J.; BURCI, L. M.; SANTIN, J. R.; ANDRADE, S. F.; MONACHE, F. D.; CECHINEL-FILHO, V. Pharmacological reports about gastroprotective effects of methanolic extract from leaves of

Solidago chilensis (Brazilian arnica) and its components quercitrin and afzelin in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacol**, Itajaí, v. 389, p. 403–417, 2016.

BATISTA, J. M. M.; TORRES, D. C.; JORGEL, D. M. M.; SOARES, C. E. A.; BEZERRA, W. M.; SILVEIRA, E. R.; GRANGEIRO, T. B. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Egletes viscosa* (L.) Less., a traditional medicinal plant from northeastern Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Fortaleza, v. 23, n. 5, p. 818–824, 2012.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. **Analytical Bio Chemistry**, Durham, v. 287, p. 276–287, 1971.

BELLIARDO, F.; BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; RUBIOLO, P.; SGORBINI, B. Headspace–solid-phase microextraction in the analysis of the volatile fraction of aromatic and medicinal plants. **Journal of Chromatographic Science**, Torino, v. 44, p. 416–429, 2006.

BENTHAM, G. Compositae. In: Bentham, G. & Hooker, J.D. *Genera Plantarum*, London: Lovell Reeve & Co, Londres, v. 2, p. 163-533, 1873.

BESSADA, S. M. F.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. **Industrial Crops and Products**, Porto, v. 76, p. 604-6015, 2015.

BEZERRA, A. M. E.; MEDEIROS, S. F.; OLIVEIRA, L. D. M.; SILVEIRA, E. R. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, Fortaleza, v. 26, n. 1, p. 26–29, 2008.

BHAVYA, M. L.; RAVI, R.; NAIDU, M. M. Development and validation of headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography (HS-SPME-GC) method for the analysis of *Zingiber zerumbet* L. **Natural Product Research**, Mysore, v. 22, p. 1–5, 2019.

BITTENCOURT, F.; ALLEMAND, A.; SILVA, L. M.; SANTOS, A. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MENDES, D. A. G. B.; ANDRE, E.; WERNER, M. F. P.; MARQUES, M. C. A. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. **Journal of Ethnopharmacology**, Curitiba, v. 130, n. 1, p. 85–92, 2010.

BLANCO, M. Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation : development and validation of a near infrared spectroscopic method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Barcelona, v. 27, p. 280–286, 2005.

BOEING, T.; SILVA, L. M.; SOMENSI, L. B.; CURY, B. J.; COSTA, A. P. M.; PETREANU, M.; NIERO, R.; ANDRADE, S. F. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker : a medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, Itajaí, v. 184, p. 196–207, 2016.

BOUFRIDI, A.; QUINN, R. J. Turning metabolomics into drug discovery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brisban, v. 27, n. 8, p. 1334–1338, 2016.

- BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Athens, v. 254, p. 248–254, 1976.
- BREMER, K.; JANSEN, K. A New subfamily of the Asteraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Uppsala, v. 79, n. 2, p. 414–415, 1992.
- BREMER, K. Major clades and grades of the Asteraceae. In D.J.N. Hind & H.J. Beentje, [S.I.], v. 1, p. 1-7, 1996.
- BUCCIARELLI, A.; MINETTI, A.; MILCZAKOWSKY, C.; SKLIAR, M. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, Bahía Blanca, v. 48, p. 1025–1030, 2010.
- CALOU, I. B. F.; SOUSA, D. I. M.; CUNHA, G. M.A.; BRITO, G. A. C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Topically applied diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate and oxazolone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Fortaleza, v. 31, p. 1511–6, 2008.
- CAMPOS, R.; BRESSAN, J.; JASINSKI, V. C. G.; ZUCCOLOTTO, T.; SILVA, L. E.; CERQUEIRA, L. B. *Baccharis* (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. **Chemistry Biodiversity**, Curitiba, v. 13, p. 1–17, 2016.
- CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIOL, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, São Paulo, v. 41, p. 75–91, 2018.
- CARVALHO, K. R.; ZOCCOLO, G. J.; PEREIRA, R. C. A.; MARTINS, F. I. C. C.; RIBEIRO, P. R. V.; DE BRITO, E. S.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M. Development of a UPLC-ESI-MS method for simultaneous determination of flavonoids and diterpenes in *Egletes viscosa* (L.) Less herbal products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Fortaleza, v. 166, p. 155-163, 2019.
- CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, São Carlos, v. 32, p. 1021–1030, 2009.
- CASSINI, A. H. G. Suite du sixième mémoire sur la famille des synanthérées, contenant les caractères des tribus. **Journal de Physique, de Chimie, d'histoire Naturelle**, [S.I.], v. 334, p. 189–204, 1819.
- CASTRO, K. N. C. COSTA-JÚNIOR, L. M.; LIMA, D. F.; CANUTO, K. M.; BRITO, E. S.; ANDRADE, I. M.; TEODORO, M. S.; OIRAM-FILHO, F. O.; SANTOS, R. C.; MAYO, S. J. Acaricidal activity of cashew nut shell liquid associated with essential oils from *Cordia verbenacea* and *Psidium guajava* on *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Essential Oil Research**, Parnaíba, v. 31, p. 1–8, 2019.
- CAVALCANTI, A. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; SOUSA, R. S.; SILVA-SANTOS, J. E.; MESIA-VELA, S.; MARQUES, M. C. A. Safety and antiulcer

efficacy studies of *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Curitiba, v. 107, p. 277–284, 2006.

CHEN, Y.; ZHONG, Y.; QI, Y.; QIU, Y.; YANG, L.; LIANG, S. Near-infrared spectroscopy for rapid evaluation of different processing products of *Sophora japonica*. **Spectroscopy Letters**, Guangzhou, v. 51, n. 1, p. 37–44, 2018.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Guildford, v. 53, p. 3821–3832, 2005.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 481–487, 2007.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L. Essential oil from flower heads of *Egletes viscosa* Less. **Journal of Essential Oil Research**, Fortaleza, v. 4, p. 11–14, 1992.

CUNHA, Adriano Nunes. **Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (químico, farmacológico, botânico e agrônômico) de *Egletes viscosa* Less.** 2003. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, Jena, v. 70, n. 4, p. 993–1014, 1998.

DETTMER-WILDE, K.; ENGEWALD, W. Practical gas chromatography: **A Comprehensive Reference**. London: Springer, v. 1, 2014.

DIAS, L. F. T.; MELO, E. S.; HERNANDES, L. S.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 19, p. 309–314, 2009.

DIB, I.; EZZAHRA, F.; ALAOUI-FARIS, E. *Artemisia campestris* L.: review on taxonomical aspects, cytogeography, biological activities and bioactive compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Oujda, v. 109, p. 1884–1906, 2019.

DIEHLA, B.; HOLZGRABEB, U.; MONAKHOVA, Y.; SCHONBERGER, T. Quo Vadis qNMR?. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Cologne, v. 177, p. 112847, 2020.

DING, G.; NIE, Y.; HOU, Y.; LIU, Z.; LIU, A.; PENG, J.; JIANG, M.; BAI, G. An integrated strategy of marker ingredients searching and near infrared spectroscopy rapid evaluation for the quality control of chinese eaglewood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Tianjin, v. 114, p. 462–470, 2015.

DING, G.; WANG, Y.; LIU, A.; HOU, Y.; ZHANG, T.; BAI, G.; LIU, C. From chemical markers to quality markers: an integrated approach of UPLC/Q-TOF, NIRS, and chemometrics

for the quality assessment of honeysuckle buds. **Royal Society of Chemistry**, Tianjin, v. 36, p. 22034-22044, 2017.

DOGRA, N. K.; KUMAR, S.; KUMAR, D. *Vernonia anthelmintica* (L.) Willd.: An ethnomedicinal, phytochemical, pharmacological and toxicological review. **Journal of Ethnopharmacology**, Palampur, v. 256, p. 112777, 2020.

ENGELS, C.; GRATER, D. ESQUIVELB, P.; JIMÉNEZ, V. M.; GANZLEA, M. G.; SCHIEBER, A. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, Edmonton, v. 46, n. 2, p. 557-562, 2012.

ESTEKI, M.; SHAHSAVARI, Z. Gas chromatographic fingerprinting coupled to chemometrics for food authentication. **Food Reviews International**, Zanzan, v. 36, n. 4, p. 384-427, 2020.

ESTEKI, M.; SHAHSAVARI, Z.; SIMAL-GANDARA, J. Use of spectroscopic methods in combination with linear discriminant analysis for authentication of food products. **Food Control**, Zanzan, v. 91, p. 100–112, 2018.

FACUNDO, V.; SILVEIRA, A. S. P.; FILHO, R. B.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. Chemical study of potentially bioactive plants from northeastern Brazil: *Zanthoxylum syncarpum* Tull. **Revista Brasileira de Farmácia**, Fortaleza, v. 78, p. 57–59, 1997.

FAGG, C. W.; LUGHADHA, E. N.; MILLIKEN, W.; HIND, D. J. N.; BRANDÃO, M. G. L. Useful Brazilian plants listed in the manuscripts and publications of the Scottish medic and naturalist George Gardner (1812–1849). **Journal of Ethnopharmacology**, Brasília, v. 161, p. 18-29, 2015.

FALCÃO H. S.; MAIA, G. L. A.; BONAMIN, F.; KUSHIMA, H.; MORAES, T. M.; LIMA, C. A. H.; TAKAYAMA, C.; FERREIRA, A. L.; BRITO, A. R. M. S.; AGRA, M. F.; FILHO, J. M. B.; BATISTA, L. M. Gastroprotective mechanisms of the chloroform and ethyl acetate phases of *Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M.King & H.Robinson (Asteraceae). **Journal of Natural Medicines**, João Pessoa, v. 67, p. 480-491, 2013.

FERRACIN, R.; SILVA, F. G. F.; VIEIRA, J. B. F. P. C. Flavonoids from the fruits of *Murraya paniculata*. **Phytochemistry**, São Carlos, v. 47, n. 3, p. 393–396, 1998.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Campinas: Editora Unicamp, v. 1, 2015.

FILHO, E. G. A.; ALEXANDRE, L. M.; FERREIRA, A. G. Advancements in waste water characterization through NMR spectroscopy: review. **Magnetic Resonance in Chemistry**, São Carlos, v. 53, p. 648–657, 2015.

FIEHN O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**, Potsdam, v. 2, p. 155-168, 2001.

FONTANA, G.; SAVONA, G.; RODRÍGUEZ, B. Clerodane diterpenoids from *Salvia splendens*. **Journal of Natural Products**, Palermo, v. 69, n. 12, p. 1734–1738, 2006.

FORCISI, S.; MORITZ, F.; KANAWATI, B.; TZIOTIS, D.; LEHMANN, R.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. **Journal of Chromatography A**, Neuherberg, v. 1292, p. 51–65, 2013.

FREITAS, J. V. B.; FILHO, E. G. A.; SILVA, L. M. A.; ZOCCOLO, G. J.; BRITO, E. S.; GRAMOSA, N. V. Chemometric analysis of NMR and GC datasets for chemotype characterization of essential oils from different species of *Ocimum*. **Talanta**, Fortaleza, v. 180, p. 329–336, 2018.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; FINAU, J.; ANGINONI, M., PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R.; MARQUES, M. C. Inhibition of H⁺/K⁺ ATPase in the gastroprotective effect of *Baccharis illinita* DC. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Curitiba, v. 60, p. 1105–1110, 2008.

FU, Z.; BO-HAN, J.; NIE, B.; ZHANG, G. J.; GAO, T. G.; CONSORTIUM, C. P. A comprehensive generic-level phylogeny of the sun flower family: Implications for the systematics of chinese Asteraceae. **Journal of Systematics and Evolution**, Beijing, v. 54, n. 4, p. 416–437, 2016.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, Araraquara, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

FUNK, V. A.; BAYER, R. J.; KEELEY, S.; CHAN, R.; WATSON, L.; GEMEINHOLZER, B.; SCHILLING, E.; PANERO, J. L.; BALDWIN, B. G.; GARCIA JACAS, N.; SUSANNA, A.; JANSEN, R. K. Every where but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biologiske Skrifter**, Austin, v. 55 p. 343-374, 2005.

GALVEZ, J.; MEDINA, F. S. D. E.; JIMENEZ, J. Effects of flavonoids on gastrointestinal disorders. **Studies in Natural Products Chemistry**, Granada, v. 25, 2001.

GIRAUDEAU, P. Challenges and perspectives in quantitative NMR. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Nantes, v. 55, p. 61–69, 2017.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids automated. **Analytical Biochemistry**, Cambridge, v. 126, p. 131-138, 1982.

GUEDES, M. M.; CUNHA, A. N.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Antinociceptive and gastroprotective effects of diterpenes from the flower buds of *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, Fortaleza, v. 68, p. 1044–1046, 2002.

GUEDES, M. M.; CARVALHO, A. C.S.; LIMA, A. F.; LIRA, S. R. S.; QUEIROZ, S. S.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective mechanisms of centipedic

acid, a natural diterpene from *Egletes viscosa* Less. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Fortaleza, v. 31, p. 1351–1355, 2008.

HEIDEN, G.; PIRANI, J. R. Taxonomy of *Baccharis* subgen. *Tarchonanthoides* (Asteraceae: Astereae: Baccharidinae), a group from the southeastern South American grasslands and savannas. *Phytotaxa*, Auckland, v. 241, n. 1, p. 1-70, 2016

HOFFMANN, O. Compositae. In: A. Engler & K. Prantl. **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**, Leipzig, v. 4, p. 87-387, 1890.

HOLLIS, D. P.; BHACCA, N. S.; JOHNSON, L. F.; PIER, E. A. NMR spectra catalog. Baltimore, v. 2, p. 117-120, 1963.

HU, C.; XU, G. Mass-spectrometry-based metabolomics analysis for foodomics. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Dalian, v. 52, p. 36–46, 2013.

IZZO, A. A.; CARLO, G. D.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; AUTORE, G. Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. **Phytotherapy Research**, Nápoles, v. 8, p. 179–181, 1994.

JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. L.R.; SATO, D. N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, Ribeirão Preto, v. 150, n. 3, p. 243–251, 2004.

JENSEN, B. F.; HANNE, H. F. REFSGAARD, H. H. F.; BRO, R.; BROCKHOFF, P. B. Classification of membrane permeability of drug candidates: a methodological investigation. **QSAR & Combinatorial Science**, Kongens Lyngby, v. 24, p. 449–457, 2005.

JINTAO, X.; YUFEI, L.; LIMING, Y.; CHUNYAN, L.; QUANWEI, Y.; WEIYING, W.; YUN, J.; MINXIANG, Z.; PENG, L. Rapid and simultaneous analysis of five alkaloids in four parts of coptidis rhizoma by near-infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Xinxiang, v. 188, p. 611–618, 2018.

JOSHI, D. D. Herbal drugs and fingerprints: evidence based herbal drugs, Springer, London, 2012.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KAHRAMAN, A.; SERTESER, M. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, Afyon, v. 183, p. 133–142, 2003.

KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**, Lovaina, v. 102, p. 621–640, 2007.

KATINAS, L.; GUTIÉRREZ, D. G.; GROSSI, M. A.; CRISCI, J. V. Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la republica Argentina. **Sociedad Argentina de Botánica**, La Plata, v. 42, p. 113–130, 2007.

KIM, K.; JANSANT, R. K. ndhF Sequence evolution and the major clades in the sunflower family. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, Austin, v. 92, p. 10379–10383, 1995.

KOTOB, S. E.; SAYED, A. H.; MOHAMED, S. H.; AHMED, H. H. Quercetin and ellagic acid in gastric ulcer prevention : an integrated scheme of the potential mechanisms of action from in vivo study. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, Gizé, v. 11, n. 1, 2018.

LAKSHMI, T.; GEETHA R. V.; ROY, A.; KUMAR, A. S. Yarrow (*Achillea millefolium* Linn.) a herbal medicinal plant with broad therapeutic use - a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Chennai, v. 9, n. 2, p. 136-141, 2011.

LAN, D.; LIU, J.; GUO, X.; ZHU, G.; TIAN, S. Determining the contents of rupestonic acid, vitexicarpin, apigenin, and luteolin in *Artemisia rupestris* L. in different growth stages by thin-layer chromatographic scanning. **Journal of Planar Chromatography**, Xinjiang, v. 31, p. 190–196, 2018.

LEE, D.; LI, C.; GRAF, T. N.; VIGO, J. S.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; KINGHORN, A. D.; KROLL, D. J.; WANI, M. C.; OBERLIES, N. H. Diterpene glycosides from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, Research Triangle Park, v. 71, n. 8, p. 792–794, 2005.

LEMOES, M.; de BARROS, M. P.; SOUSA, J. P.; SILVA A. F. A.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Videira, v. 59, p. 603–608, 2007.

LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R.; MARQUES, M. S. L.; SANTOS, R. H. A.; GAMBARDELA, M. T. Biologically active flavonoids and terpenoids from *Egletes viscosa*. **Phytochemistry**, Fortaleza, v. 41, n. 1, p. 217–223, 1996.

LINDSAY, H. R.; SEDLAK, J. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, Birmingham, v. 205, p. 192–205, 1968.

LORENZO, J. M. Influence of the type of fiber coating and extraction time on foal dry-cured loin volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). **Meat Science**, Ourense, v. 96, n. 1, p. 179–186, 2014.

MAGWAZA, L. S.; OPARA, U. L.; NIEUWOUDT, H.; CRONJE, P. J. R.; SAEYS, W.; NICOLAI, B. NIR spectroscopy applications for internal and external quality analysis of citrus fruit - a review. **Food and Bioprocess Technology**, Stellenbosch, v. 5, p. 425–444, 2012.

- MAHMOUD, A.; AL-SHIHRY, S. A new ionone glucoside and terpenoid constituents from *Achillea biebersteinii* and their antifungal activity. **Natural Product Communications**, Al-Hofuf, v. 1, p. 697–703, 2006.
- MAJOULI K.; HAMDIB, A.; ABDELHAMIDB, A.; BOURAOUIB, A.; KENANIA, A. Anti-inflammatory activity and gastroprotective effect of *Hertia cheirifolia* L. roots extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Monastir, v. 217, p. 7-10, 2018.
- MARTÍN, M. J.; LA-CASA, C.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C.; CABEZA, J.; VILLEGAS, I.; MOTILVA, V. Anti-Oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. **Zeitschrift für Naturforschung**, Seville, v. 53, p. 82–88, 1998.
- MARTIN, M. J.; MOTILVA, V.; LASTRA, C. A. DE. Quercetin and naringenin; effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. **Phytotherapy Reserch**, Seville, v. 7, p. 150–153, 1993.
- MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. **Pharmacology Letters**, Kyoto, v. 65, n. 2, p. 27–32, 1999.
- MAPA. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-garantia-qualidade-analitica.pdf>. Acesso em: 18 de Abril 2018.
- MARTINS, Fátima Itana Chaves Custódio. **Desenvolvimento e validação de método para a determinação multirresíduo de pesticida em manga (*Mangifera indica* L.) empregando *Quechers* e CG-EM**. 2015. Mestrado (Mestrado em Química) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. In: Universidade Federal do Ceará (Ed.). 3. ed. Fortaleza-CE: UFC, p. 394, 2007.
- MEDINA, S.; PEREIRA, J. A.; SILVA, P.; PERESTRELO, R.; CÂMARA, J. S. Food fingerprints - a valuable tool to monitor food authenticity and safety. **Food Chemistry**, Funchal, v. 278, p. 144-162, 2019.
- MELO, C. M.; MAIA, J. L.; CAVALCANTE, I. J.; LIMA, M. A.; VIEIRA, G. A.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. 12-Acetoxyhawtriwaic acid lactone, a diterpene from *Egletes viscosa*, attenuates capsaicin-induced ear edema and hindpaw nociception in mice: possible mechanisms. **Planta Medica**, Fortaleza, v. 72, n. 7, p. 584–589, 2006.
- MELO, J. U. S.; MELO, R. B.; SANTOS, J. M. V.; JÚNIOR, M. M. C.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. L. Effects of bioflavonoid ternatin on liver regeneration and oxidative stress in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, Fortaleza, v. 28, n. 6, p. 435–440, 2013.
- MESQUITA, P. R. R.; NUNES, E. C.; SANTOS, F. N.; BASTOS, L. P.; COSTA, M. A. P. C.; RODRIGUES, F. M.; ANDRADE, J. B. Discrimination of *Eugenia uniflora* L. biotypes based

on volatile compounds in leaves using HS-SPME/GC-MS and chemometric analysis. **Microchemical Journal**, Salvador, v. 130, p. 79–87, 2017.

MINTEGUIAGA, M.; DELLACASSA, E.; IRAMAINC, M. A.; CATALÁNA, C. A. N.; BRANDÁN, S. A. FT-IR, FT-Raman , UV e Vis , NMR and structural studies of carquejyl acetate , a distinctive component of the essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC (Asteraceae). **Journal of Molecular Structure**, São Miguel de Tucumã, v. 1177, p. 419–510, 2019.

MOCO, S.; VERVOORT, J.; MOCO, S.; BINO, R. J.; DE VOS, R. C.; BINO, R. Metabolomics technologies and metabolite identification. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Wageningen, v. 26, n. 9, 2007.

MONAKHOVA, Y. B.; GODELMANN, R.; KUBALLAC, T.; MUSHTAKOVA, S. P.; RUTLEDGE, D. Independent components analysis to increase efficiency of discriminant analysis methods (FDA and LDA): application to NMR fingerprinting of wine. **Talanta**, Cologne, v. 141, p. 60–65, 2015.

MOTA, K. S. L.; DIAS, G. E. N.; PINTO, M. E. F.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, João Pessoa, v. 14, p. 979–1012, 2009.

MOTILVA, V.; LASTRA, C. A. DE; CALERO, M. J. M. Effects of naringenin and quercetin on experimental chronic gastric ulcer in rat. Studies on the histological findings. **Phytotherapy Research**, Seville, v. 6, p. 168–170, 1992.

NAUSHAD, M.; KHAN, M. R. **Ultra performance liquid chromatography mass spectrometry**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, [S.I.], 2014.

NESOM, G. L. Review of the taxonomy of aster sensu lato (Asteraceae: Astereae), emphasizing the new world species. **Phytologia**, Austin, v. 77, p. 141–297, 1994.

NIEVA-ECHEVARRÍA, B.; GOICOECHEA, E.; MANZANOS, M. J.; GUILLÉN, M. D. A method based on ¹H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures. **Food Research International**, Vitoria, v. 66, p. 379–387, 2014.

NIKAM, P. H.; KAREPARAMBAN, J.; JADHAV, A.; KADAM, V. Future trends in standardization of herbal drugs. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Navi Mumbai, v. 02, p. 38–44, 2012.

NUNES, C. A.; FREITAS, M. P.; PINHEIRO, A. C. M.; BASTOS, S. C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Lavras, v. 23, n. 11, p. 2003–2010, 2012.

OECD GUIDANCE. The working party on chemicals , pesticides and biotechnology. **Guidance document on acute oral toxicity testing**, Paris, 2001. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd24.pdf>. Acesso em: 10 Abril 2020.

PALMER, J. D. A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, Ann Arbor, v. 84, p. 5818–5822, 1987.

PANERO, J. L.; FUNK, V. A. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, Austin, v. 115, p. 909–922, 2002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. 4ed. (tradução), São Paulo: Ed. Cengage Learning, 2010.

PAWLISZYN, J. Handbook of solid phase microextraction. Oxford: Elsevier, 2012.

PAWLISZYN, J. Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Waterloo, v. 54, p. 8688–8696, 2006.

PEERAPATTANA, J.; OTSUKA, K. Application of NIR spectroscopy for the quality control of mangosteen pericarp powder: quantitative analysis of alpha-mangostin in mangosteen pericarp powder and capsule. **Journal of Natural Medicines**, Khon Kaen, v. 67, p. 452–459, 2013.

PESKAR, B. M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B. A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bochum, v. 301, p. 969–974, 2002.

PILON, A. C.; SELEGATO, D. M.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C. P.; PINHO, D. R.; NETO, F. C.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. Metabolômica de plantas: métodos e desafios. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 3, p. 329–354, 2020.

QUINTELAS, C.; MESQUITA, D. P.; FERREIRA, E. C.; AMARAL, A. L. Quantification of pharmaceutical compounds in wastewater samples by near infrared spectroscopy (NIR). **Talanta**, Braga, v. 194, p. 507–513, 2019.

RAFIEIOLHOSSAINIA, M.; ADAMS, A.; SODAEIZADEH, H.; DAMME, P. V.; DE KIMPE, N. Fast quality assessment of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) by headspace solid-phase microextraction: influence of flower development stage. **Natural Product Communications**, Ghent, v. 7, p. 97–100, 2012.

RAO, V.; SANTOS, F. A.; SOBREIRA, T. T.; SOUZA, M. F.; MELO, C. L.; SILVEIRA, E. R. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, Fortaleza, v. 63, p. 146–149, 1997.

RAO, V. S. N.; FIGUEIREDO, E. G.; MELO, C. L.; VIANA, G. S. B.; MENEZES, D. B.; MATOS, M. S. F.; SILVEIRA, E. R. Protective effect of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less., in experimental liver injury. **Pharmacology**, Fortaleza, v. 48, p. 392–397, 1994.

- RAO, V. S. N.; PAIVA, L. A. F.; SOUZA, M. F.; CAMPOS, A. R.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C.; TEIXEIRA, M. J.; SILVEIRA, E. R. Ternatin, an anti-inflammatory flavonoid, inhibits thioglycolate-elicited rat peritoneal neutrophil accumulation and LPS-activated nitric oxide production in murine macrophages. **Planta Medica**, Fortaleza, v. 69, p. 851–853, 2003.
- RAO, C. V.; OJHA, S. K.; GOVINDARAJAN, R.; RAWAT, A. K. S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. Quercetin, a bioflavonoid, protects against oxidative stress-related gastric mucosal damage in rats. **Natural Product Science**, Lucknow, v. 9, p. 68-72, 2003.
- RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S. A.; BANDONI, A. L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from latin America: a review. **Industrial Crops and Products**, Junín, v. 38, p. 27–38, 2012.
- REYES-GARCÉS, N.; GIONFRIDDO, E.; GÓMEZ-RÍOZ, G. A.; ALAM, M. N.; BOYACI, E.; BOJKO, B.; SINGH, V.; GRANDY, J.; PAWLISZYN, J. Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions. **Analytical Chemistry**, Ontario, v. 90, p. 302-360, 2018.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Curitiba, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- RIGGER, R.; RUCK, A.; HELLRIEGEL, C.; SAUERMOSER, R.; MORF, F.; BREITRUCK, K. B.; OBKIRCHER, M. Certified reference material for use in ^1H , ^{31}P , and ^{19}F quantitative NMR, ensuring traceability to the international system of units. **Journal of AOAC International**, Buchs, v. 100, p. 1365–1375, 2017.
- RIJKE, E.; WILFRIED, P. O.; NIESSEN, M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, Naarden, v. 1112, n. 2, p. 31–63, 2006.
- ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANGASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, Kalamazoo, v. 77, p. 433–443, 1979.
- ROQUE, N. Asteraceae: caracterização e morfologia floral. Salvador: EDUFBA, 2008.
- ROQUE, N. TELES, A.M., NAKAJIMA, J.N. A família Asteraceae no Brasil: classificação e diversidade. Salvador: EDUFBA, 2017.
- RUBIOLO, P.; BELLIARDO, F.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; SGOBINI, B.; BICCHI, C. Headspace–solid-phase microextraction fast GC in combination with principal component analysis as a tool to classify different chemotypes of chamomile flower-heads (*Matricaria recutita* L.). **Phytochemical Analysis**, Turim, v. 225, p. 217–225, 2006.
- SALVIA, M. V.; CREN-OLIVÉ, C.; VULLIET, E. Statistical evaluation of the influence of soil properties on recoveries and matrix effects during the analysis of pharmaceutical compounds and steroids by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed

by liquid chromatography-tandem . **Journal of Chromatography A**, Villeurbanne, v. 1315, p. 53–60, 2013.

SÁNCHEZ-SALCEDO, E. M.; TASSOTTIB, M.; RIOB, D. D.; HERNÁNDEZ, F.; MARTÍNEZ, J. J.; MENA, P. (Poly)phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC-MS approach. **Food Chemistry**, Alicante, v. 212, p. 250–255, 2016.

SANTIN J. R.; LEMOS, M.; JÚNIOR, L. C. K.; NIERO, R.; ANDRADE, S. F. Antiulcer effects of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, Itajaí, v. 130, p. 334–339, 2010.

SANTOS, S. B. G. J. M. V.; SANTOS, J. M. V.; ARAGÃO, A. A.; KIMURA, O. S.; SILVIRA, E. R.; VASCONCELOS, P. R. L. Ternatin pretreatment attenuates testicular injury induced by torsion/detorsion in wistar rats; pré-tratamento com ternatina atenua a lesão testicular induzida por torção/destorção em ratos Wistar. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Fortaleza, v. 26, n. 4, p. 325–328, 2011.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.; ASTUDILLO, L. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Casilla, v. 81, p. 111–115, 2002.

SEBAI, H.; JABRI, M. A.; SOULI, A.; HOSNI, K.; SELMI, S.; TOUNSI, H.; TEBOURBI, O.; BOUBAKER, S.; EL-BENNAE, J.; SAKLY, M. Protective effect of *Artemisia campestris* extract against aspirin-induced gastric lesions and oxidative stress in rat. **Royal Society of Chemistry**, Zarzouna, v. 4, p. 49831–49841, 2014.

SHAFIQ, N.; SHAFIQ, S.; RAFIQ, N.; PARVEEN, S.; JAVED, I.; MAJEED, H. N.; MAHMOOD, A.; NOOR, N.; ANJUM, A. Review: Phytochemicals of the Seriphidium, Economically and Pharmaceu-tically Important Genus of Asteraceae Family. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 17, p. 158–168, 2020.

SHAWKY, E.; EL-KHAIR, R. A. A.; SELIM, D. A. NIR spectroscopy-multivariate analysis for rapid authentication, detection and quantification of common plant adulterants in saffron (*Crocus sativus* L.) stigmas. **Food Science and Technology**, Faisalabad, v. 122, p. 109032, 2020.

SILVA-FILHO, F. A. E; LIMA, M. A. S.; BEZERRA, A. M.; FILHO, R. B.; SILVEIRA, E. R. A labdane diterpene from the aerial parts of *Egletes viscosa* Less. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Fortaleza, v. 18, n. 7, p. 1374–1378, 2007.

SILVA, M. P. DA; BARBOSA, F. S. Q.; DE BARROS, R. F. M. Estudo taxonômico e etnobotânico sobre a família Asteraceae (Dumortier) em uma comunidade rural no Nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, Campo Maior, v. 110–123, n. 1981–1268, p. 110–123, 2014.

SILVEIRA E. R.; PESSOA O. D. L. **Constituintes Micromoleculares de Plantas do Nordeste com Potencial Farmacológico: Com Dados de RNM ¹³C**. Fortaleza-CE, Expressão Gráfica. Brasil, 2005.

SMILLIE, T. J.; KHAN, I. A. A comprehensive approach to identifying and authenticating botanical products. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 87, n. 2, p. 175–186, 2009.

SKOOG, WEST, HOLLER, C. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: 2009.

SOUSA, A. D.; MAIA, A. I. V.; RODRIGUES, T. H. S.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; PEREIRA, R. C. A.; VIEIRA, R. F.; BRITO, E. S. Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF. **Industrial Crops and Products**, Fortaleza, v. 79, p. 91–103, jan. 2016.

SOUZA, M.; RAO, V.; SILVEIRA, E. Anti-anaphylactic and anti-inflammatory effects of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Fortaleza, v. 25, p. 1029–32, 1992

SOUZA, M. F.; CUNHA, G. M. A.; FONTENELE, J. B.; VIANA, G. S. B.; RAO, V. S. N.; SILVEIRA, E. R. Antithrombotic activity of ternatin, a tetramethoxy flavone from *Egletes viscosa* Less. **Phytotherapy Research**, Fortaleza, v. 8, n. 8, p. 478–481, 1994.

SOUZA, M. F.; RAO, V. S. N.; SILVEIRA, E. R. Prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by ternatin, a bioflavonoid from *Egletes viscosa* Less. **Phytotherapy Research**, Fortaleza, v. 12, n. 8, p. 557–561, 1998.

STEDMON, C. A.; BRO, R. Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. **Limnology Oceanography Methods**, Roskilde, v. 6, p. 572-579, 2008.

SUCUPIRA, N. R.; ALVES-FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; DE BRITO, E. S.; WURLITZER, N. J.; SOUSA, P. H. M. NMR Spectroscopy and chemometrics to evaluate different processing of coconut water. **Food Chemistry**, Fortaleza, v. 216, p. 217-224, 2016.

SUD, M.; FAHY, E.; COTTER, D.; AZAM, K.; VADILEU, I.; BURANT, C.; EDISON, A.; FIEHN, O.; HIGASHI, R.; NAIR, K. S.; SUMMER, S.; SUBRAMANIAM, S. Metabolomics Workbench: An international repository for metabolomics data and metadata, metabolite standards, protocols, tutorials and training, and analysis tools. **Nucleic Acids Research**, San Diego, v. 44, p. 463-470, 2016.

SUN, F.; ZHAO, W.; WANG, K.; WANG, S.; LIANG, S. Near-infrared spectroscopy to assess typhaneoside and isorhamnetin-3-*O*-glucoside in different processed products of pollen *typhae*. **Spectroscopy Letters**, Guangzhou, v. 52, n. 7, p. 423–430, 2019.

SUSSULINI, A. **Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications**. Cham: Springer, Campinas, v. 965, 2017.

TAHIR, H. E.; ARSLAN, M.; MAHUNU, G. K.; SHI, J.; ZOU, X.; GASMALLA, M. A. A.; MARIOD, A. A. Data fusion approach improves the prediction of single phenolic compounds in honey: a study of NIR and raman spectroscopies. **eFood**, Zhenjiang, v. 1, p. 173-180, 2019.

THEODORIDIS, G. A.; GIKA, H. G.; WANT, E. J.; WILSON, I. D. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. **Analytica Chimica Acta**, Thessaloniki, v. 711, p. 7–16, 2012.

TSUCHIKAWA, S. A review of recent near infrared research for wood and paper a review of recent near infrared research. **Applied Spectroscopy Reviews**, Furo-cho, v. 42, p. 43-71, 2007.

VIANA, G. S. B.; LEAL, L. K. A. M.; VASCONCELOS, S. M. M. Plantas medicinais da caatinga: atividades biológicas e potencial terapêutico. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2013.

VIANA, A. F. S. C.; SILVA, F. V.; FERNANDES, H. B.; OLIVEIRA, I. S.; BRAGA, M. A.; NUNES, P. I. G.; VIANA, D. A.; SOUSA, D. P.; RAO, V. S.; OLIVEIRA, R. C. M.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of (-)-myrtenol against ethanol-induced acute gastric lesions: possible mechanisms. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Fortaleza, v. 68, p. 1–8, 2016.

VIEIRA, G. A. B.; LIMA, M. A. S.; BEZERRA, A. M. E.; SILVEIRA, E. R. Chemical composition of teas from two cultivated chemotypes of *Egletes viscosa* (“Macela-da-terra”). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Fortaleza, v. 17, n. 1, p. 43–47, 2006.

VIEIRA, M. M.; MACÊDO, F. Y. B.; FILHO, J. N. B.; COSTA, A. C. L. V.; CUNHA, A. N.; SILVEIRA, E. R.; BRITO, G. A. C., RIBEIRO, R. A. Ternatin, a flavonoid, prevents cyclophosphamide and Ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Phytotherapy Research**, Fortaleza, v. 18, n. 2, p. 135–141, 2004.

VILLIERS, A. DE; VENTER, P.; PASCH, H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, Stellenbosch, v. 1430, p. 16–78, 2016.

WACHTER, G. A.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMANN, B. N. Diterpenoids from *Baccharis pingraea*. **Journal of Natural Products**, Tucson, v. 62, p. 307–308, 1999.

WADOOD, S. A.; BOLI, G.; XIAOWEN, Z.; HUSSAIN, I.; YIMIN, W. Recent development in the application of analytical techniques for the traceability and authenticity of food of plant origin. **Microchemical Journal**, Beijing, v. 152, p. 104295, 2020.

WALORCZYK, S. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. **Talanta**, Poznan, v. 120, p. 106–113, 2014.

WANG, C.; ZHANG, N.; WANG, Z.; QI, Z.; ZHENG, B.; LI, P.; LIU, J. Rapid characterization of chemical constituents of *Platycodon grandiflorum* and its adulterant *Adenophora stricta* by UPLC-QTOF-MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, Changchun, v. 52, p. 643–656, 2017.

WANG, L.; HUI, Y.; JIANG, K.; YIN, G.; WANG, J.; YAN, Y.; WANG, Y.; LI, J.; WANG, P.; BI, K.; WANG, T. Potential of near infrared spectroscopy and pattern recognition for

rapid discrimination and quantification of *Gleditsia sinensis* thorn powder with adulterants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Shenzhen, v. 160, p. 64–72, 2018.

WILM, M. Principles of electrospray ionization. **Molecular & Cellular Proteomics**, Dublin, 2011.

WISHART, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. **Nature Reviews Drug Discovery**, Edmonton, v. 15, p. 473–484, 2016.

WOLFENDER, J.; RUDAZ, S.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, Geneva, v. 20, p. 1056–1090, 2013.

XU, B.; WU, Z.; LIN, Z.; SUI, C.; SHI, X.; QIAO, Y.; NIR analysis for batch process of ethanol precipitation coupled with a new calibration model updating strategy. **Analytica Chimica Acta**, Beijing, v. 720, p. 22–28, 2012.

YANG, Y.; WU, Y.; LI, W.; LIU, X.; ZHENG, J.; ZHANG, W.; CHEN, Y. Determination of geographical origin and icariin content of herba epimedii using near infrared spectroscopy and chemometrics. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Hangzhou, v. 191, p. 233–240, 2018.

YULIANA, N. D.; JAHANGIR, M.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry Reviews**, Bogor, v. 12, p. 293–304, 2013.

ZDERO, C.; AHMED, A. A.; BOHLMANN, F.; MUNGAI, G. M. Diterpenes and sesquiterpene xylosides from east african *Conyza* species. **Phytochemistry**, Berlin, v. 29, n. 10, p. 3167–3172, 1990.

ZHANG, N.; JING, T.; ZHAO, M.; JIN, J.; XU, M.; CHEN, Y.; ZHANG, S.; WAN, X.; SCHWAB, W.; SONG, C. Untargeted metabolomics coupled with chemometrics analysis reveals potential non-volatile markers during oolong tea shaking. **Food Research International**, Hefei, v. 123, p. 125–134, 2019.

ZHU, X. D.; ZHANG, Q. H.; WANG, F.; YE, Y. J. Chemical constituents in *Ecdysanthera rosea*. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, Yaoundé, v. 42, n. 2, p. 237–240, 2011.

**APENDICE A -TEOR DE TERNATINA, TANABALINA E ÁCIDO CENTIPÉDICO (mg.kg⁻¹) DOS EXTRATOS DAS PARTES
AÉREAS DE MATERIAIS SILVESTRE/COMERCIAIS/CULTIVADOS DE *E. viscosa*, DETERMINADOS POR ANÁLISE DE CLUE-
QDa-MIS (CONTINUA).**

Código	Nome	Origem/Data	Quimiotipo	Quantificação qDa (mg.kg ⁻¹ ± DP)		
				ternatina	tanabalina	ác. centipédico
Ev005	Spirro 1 ^{a,*}	Fortaleza-Ceará / Março 2016	A	84,00 ± 2,70	787,50 ± 0,36	221,25 ± 7,50
Ev006	Spirro 2 ^{a,*}	Fortaleza-Ceará / Março 2016	A	189,00 ± 2,85	123,75 ± 0,09	381,75 ± 5,50
Ev007	CRC Cascavel ^{a,*}	Fortaleza-Ceará / Março 2016	B	30,75 ± 9,00	33,00 ± 0,21	174,75 ± 4,40
Ev008	Macela Beberibe ^{a,*}	Cascavel-Ceará / Março 2016	B	44,25 ± 0,16	147,00 ± 0,32	135,75 ± 2,29
Ev009	Alagoas a granel ^{a,*}	Fortaleza-Ceará / Abril 2016	B	16,50 ± 0,62	108,75 ± 0,51	225,75 ± 2,66
Ev013	Horizonte 1 ^{a,*}	Pacajus-Ceará / Junho 2016	B	9,00 ± 0,27	60,00 ± 3,00	174,75 ± 13,58
Ev014	Baldarate 3 ^{a,*}	Fortaleza-Ceará / Julho 2016	B	39,00 ± 2,85	102,00 ± 0,14	243,75 ± 1,50
Ev016	CRC Russas ^{a,*}	Fortaleza-Ceará / Julho 2016	B	92,25 ± 4,28	84,00 ± 0,31	261,00 ± 2,12
Ev017	Aiuaba ^{b,*}	Aiuaba-Ceará / Dezembro 2016	B	66,75 ± 2,48	78,00 ± 4,80	255,75 ± 4,28
Ev017-03	Tintura ^{b,**}	Aiuaba-Ceará / Dezembro 2016	B	120,50 ± 2,53	251,50 ± 24,15	281,00 ± 44,93
Ev020	Flora ^{a,*}	Juazeiro-Ceará / Dezembro 2016	B	48,00 ± 2,70	810,00 ± 0,26	455,25 ± 55,5
Ev021	Tauá (Serrote de boi) ^{b,*}	Tauá-Ceará / Dezembro 2016	B	34,50 ± 1,05	210,00 ± 0,25	60,00 ± 4,80
Ev022	Macela baldarate 4 ^{a,*}	Fortaleza-Ceará / Março 2017	B	78,00 ± 0,12	81,00 ± 5,55	162,00 ± 3,08
Ev024	Casa do alho 1 ^{a,*}	Fortaleza-Ceará / Março 2017	A	167,25 ± 4,28	117,25 ± 3,33	255,00 ± 1,58
Ev025	Casa do alho roxo 2 ^{a,*}	Fortaleza-Ceará / Março 2017	A	20,25 ± 4,65	514,50 ± 0,66	553,50 ± 24,8
Ev027	Juazeiro Ce 1 ^{a,*}	Cascavel-Ceará / Março 2017	A	24,00 ± 0,12	960,00 ± 0,42	456,75 ± 2,33
Ev030	Spirro 2 mundo verde ^{a,*}	Fortaleza-Ceará / Novembro 2016	B	14,25 ± 0,72	143,25 ± 0,58	282,00 ± 1,35

APENDICE A -TEOR DE TERNATINA, TANABALINA E ÁCIDO CENTIPÉDICO (mg.kg⁻¹) EM CAPÍTULOS FLORAIS E FOLHAS DE MATERIAL CULTIVADOS DE *E. viscosa*, DETERMINADOS POR ANÁLISE DE CLUE-QDa-MIS (CONCLUSÃO).

Código	Nome	Origem/Data	Quimiotipo	Quantificação qDa (mg.kg ⁻¹ ± DP)		
				ternatina	tanabalina	ác. centipédico
Ev034-1	Cascavel ^{a,*}	Canteiro Embrapa/Março2018	B	79,90 ± 1,11	63,10 ± 0,30	240,00 ± 2,00
Ev047	Folhas “Quimiotipo A” ^{b,c,*}	Canteiro Embrapa/Março2018	Folha A ¹	86,90 ± 0,73	42,62 ± 1,67	ND
Ev048	Folhas “Quimiotipo B” ^{b,c,*}	Canteiro Embrapa/Março2018	Folha B ²	35,51 ± 1,15	61,50 ± 7,77	32,90 ± 3,80

DP, desvio padrão. ND, não determinado; ¹ Folha A: morfologia das folhas do quimiotipo A; ² Folha B: morfologia das folhas do quimiotipo B. ^acomercial; ^bsilvestre; ^ccultivado;

*Extrato aquoso (infusão); ** Tinturação (EtOH : H₂O 1:2, v/v).

Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE B - AMOSTRAS DE CAPÍTULOS FLORAIS DE *E. viscosa* CLASSIFICADAS DE ACORDO COM A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE SEUS ÓLEOS ESSENCIAIS.

Códigos	Origem / Data	Quimiotipo	CG-EM (%)		CG-DIC (%)		Área absoluta (CG-DIC) ^c	
			<i>trans</i> ^a	<i>cis</i> ^b	<i>trans</i> ^a	<i>cis</i> ^b	<i>trans</i> ^a	<i>cis</i> ^b
Ev005	Fortaleza-Ceará / Março 2016	A	54,45	-	55,00	-	2697674.00	-
Ev006	Fortaleza-Ceará / Março 2016	A	55,08	1,25	55,95	1,66	2878905.67	65521.67
Ev007	Fortaleza-Ceará / Março 2016	B	10,46	69,21	11,49	67,72	619900.33	4052889.00
Ev008	Cascavel-Ceará / Março 2016	B	2,77	82,49	2,81	81,37	135098.00	4118277.33
Ev009	Fortaleza-Ceará / Abril 2016	B	13,13	66,99	13,86	65,76	685614.00	3528408.67
Ev013	Pacajus-Ceará / Junho 2016	B	18,94	52,03	19,40	51,70	1170492.67	3162515.33
Ev014	Fortaleza-Ceará / Julho 2016	B	2,09	77,86	2,36	77,22	120809.33	4588829.00
Ev016	Fortaleza-Ceará / Julho 2016	B	11,27	70,28	12,07	69,01	624397.67	3912231.67
Ev017	Aiuaba-Ceará / Dezembro 2016	B	11,82	68,78	12,47	64,68	666526.00	3918433.33
Ev020	Juazeiro-Ceará / Dezembro 2016	B	27,44	43,40	26,65	44,54	1766417.67	2719014.00
Ev021	Tauá-Ceará / Dezembro 2016	B	22,58	56,99	22,44	53,26	1489214.00	3479890.00
Ev022	Fortaleza-Ceará / Março 2017	B	14,98	55,76	15,43	56,27	871794.00	2924782.33
Ev024	Fortaleza-Ceará / Março 2017	A	64,73	5,04	60,46	8,08	3310851.67	300342.33
Ev025	Fortaleza-Ceará / Março 2017	A	56,11	-	53,32	-	3219166.67	-
Ev027	Cascavel-Ceará / Março 2017	A	59,53	2,92	57,66	4,33	3159839.67	227148.67
Ev030	Fortaleza-Ceará / Novembro 2016	B	13,49	56,05	14,35	55,33	793815.33	3259193.67

^a *trans*: Acetato de *trans*-pinocarveíla; ^b *cis*: Acetato de *cis*-isopinocarveíla; ^c Áreas absolutas determinadas no CG-DIC.

APÊNDICE C-OS RESULTADOS DA MATRIZ DE CONFUSÃO DA CLASSIFICAÇÃO BINÁRIA DE *E. viscosa* DE ACORDO COM OS QUIMIOTIPOS A E B USANDO RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DE 80 ESPECTROS IVp.

		Classe atual	
		<i>Modelo</i>	
Classe predita	<i>A</i>	24 (VP)	3 (FP)
	<i>B</i>	1 (FN)	52 (VN)
	Não atribuído	0	0
	Σ	25	55

VP: verdadeiro positivo; FP: falso positivo; FN: falso negativo; VN: verdadeiro negativo.
 Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE D- ANÁLISE POR CG-EM DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. viscosa* DE CAPÍTULOS FLORAIS: QUIMIOTIPOS A.

Quimiotipo A

Compostos ^a	IK ^b	IK ^c	Ev005	Ev006	Ev024	Ev025	Ev027	Compostos ^a	IK ^b	RI ^c	Ev005	Ev006	Ev024	Ev025	Ev027
<i>α</i> -Tujeno (1)	933	930	0,25	0,27	0,16	0,39	0,25	<i>cis</i> -Mirtanol (23)	1253	1253	0,50	0,42	-	-	-
<i>α</i> -Pinenos (2)	947	939	1,71	1,89	-	2,02	1,20	Acetato de <i>cis</i> -crisantenila (26)	1268	1265	0,16	0,12	0,10	-	0,11
<i>β</i> -Pinenos (4)	990	979	17,17	18,05	12,76	25,60	18,44	Acetato de <i>trans</i>-pinocarveila (27)	1310	1298	54,45	55,08	64,73	56,11	59,53
<i>α</i> -Terpineno (6)	1027	1017	-	0,19	-	-	-	Acetato de <i>cis</i> -isopinocarveila (28)	1321	1305	-	1,25	5,04	-	2,92
<i>O</i> -Cimeno (7)	1036	1026	-	-	-	-	-	Acetato de mirtenila (29)	1336	1326	5,11	5,02	5,92	5,76	6,00
Limoneno (8)	1039	1029	0,64	0,59	0,76	1,05	0,83	<i>δ</i> -Elemeno (30)	1343	1338	0,44	0,33	-	0,12	0,46
<i>E-β</i> -Ocimeno (9)	1054	1050	-	-	-	-	-	Acetato de <i>trans</i> -carveila (31)	1346	1342	0,11	-	-	-	-
<i>γ</i> -Terpineno (10)	1068	1059	0,34	0,36	0,28	0,40	0,37	Acetato de <i>α</i> -terpenila (32)	1359	1349	-	-	-	0,12	0,06
Linalol (11)	1104	1096	0,35	-	-	-	-	Acetato de di-hidro-neo-isocarveila (33)	1374	1359	-	-	0,09	-	-
<i>trans</i> -Pinocarveol (13)	1150	1139	11,33	9,56	4,39	2,99	2,97	Isobutanoato de linalila (34)	1381	1375	0,93	0,94	1,11	1,00	1,13
<i>cis</i> -Pinocanfona (15)	1172	1175	0,10	0,88	-	-	-	Acetato de <i>trans</i> -mirtanila (37)	1394	1386	0,18	0,20	0,42	0,38	0,31
Terpinen-4-ol (16)	1183	1177	0,99	0,51	0,54	0,55	0,52	<i>β</i> -Cubebeno (38)	1394	1388	-	0,34	-	-	-
<i>α</i> -Terpineol (17)	1194	1188	0,54	-	-	-	-	<i>β</i> -Elemeno (39)	1394	1390	0,34	0,16	-	-	-
Mirtenol (18)	1200	1195	3,39	2,81	1,81	1,26	1,27	<i>E</i> -Cariofileno (41)	1394	1419	0,52	0,71	0,45	0,93	1,03
4- <i>cis</i> -Caranona (19)	1205	1200	0,23	0,20	-	-	-	<i>α</i> -Curcumina (42)	1491	1480	0,22	0,12	-	-	-
Di-hidro-carveol (20)	1220	1214	-	-	0,16	-	-	<i>δ</i> -Cadineno (44)	1536	1523	-	-	0,18	0,18	0,24

^a Os compostos são listados na ordem de eluição em HP-5MS. ^b índice de Kovats obtido em HP-5MS. ^c índice de Kovats obtido da literatura ADAMS, 2017; NIST, 2011).

**APÊNDICE E- ANÁLISE POR CG-EM DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. viscosa* DE CAPÍTULOS FLORAIS: QUIMIOTIPOS B.
(CONTINUA)**

Compostos ^a	IK ^b	RI _{Lit} ^a	Quimiotipo B										
			Ev007	Ev008	Ev009	Ev013	Ev014	Ev016	Ev017	Ev020	Ev021	Ev022	Ev030
<i>α</i> -Tujeno (1)	933	930	0,18	0,14	-	0,21	-	-	-	0,15	0,05	-	0,20
<i>α</i> -Pineno (2)	947	939	0,37	0,11	-	0,89	-	0,29	0,18	0,71	0,13	0,55	0,89
Sabineno (3)	984	975	0,66	0,52	0,47	0,69	0,64	0,35	1,37	0,61	0,83	0,35	0,94
<i>β</i> -Pineno (4)	990	979	5,22	1,52	3,12	14,35	3,38	3,63	3,92	14,15	2,40	6,52	16,45
Mirceno (5)	996	990	0,36	0,26	-	-	-	-	0,48	-	0,30	-	-
<i>α</i> -Terpineno (6)	1027	1017	0,12	0,11	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-
<i>O</i> -Cimeno (7)	1036	1026	0,12	0,11	-	-	-	-	-	-	0,06	-	-
Limoneno (8)	1039	1029	0,68	0,50	0,28	0,90	0,37	0,46	1,00	0,96	0,66	0,38	0,73
<i>E-β</i> -Ocimeno (9)	1054	1050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>γ</i> -terpineno (10)	1068	1059	0,22	0,19	-	0,27	-	0,22	-	0,25	0,09	-	-
1-Terpineol (12)	1145	1133	0,41	0,26	0,39	-	0,31	0,55	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Pinocarveol (13)	1150	1139	0,55	-	1,86	1,25	0,26	0,89	0,29	0,72	0,58	2,10	0,59
<i>cis</i> -Crisantenol (14)	1168	1164	0,14	-	0,25	-	0,29	-	-	-	0,05	-	-
<i>cis</i> -Pinocanfona (15)	1172	1175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,44
Terpinen-4-ol (16)	1183	1177	0,48	0,43	0,34	0,54	0,35	0,45	0,30	0,41	0,04	0,30	0,28
<i>α</i> -Terpineol (17)	1194	1188	0,42	0,36	0,44	0,48	0,29	0,38	0,05	0,37	0,33	-	-
Mirtenol (18)	1200	1195	0,20	-	0,52	0,41	-	0,32	-	0,34	0,27	-	0,19
Di-hidro- <i>trans</i> -carvona (20)	1207	1200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,21	-
<i>trans</i> -Carveol (21)	1215	1216	2,74	3,15	5,43	1,35	8,01	4,11	1,06	0,70	1,16	7,06	2,22
Car-3-en-2-one (22)	1253	1248	0,19	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cis</i> -Mirtanol (23)	1253	1253	-	-	0,09	-	0,23	0,21	-	-	-	-	-
Acetato de linalol (24)	1257	1257	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Mirtanol (25)	1268	1261	-	-	4,23	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de <i>cis</i> -crisantenila (26)	1268	1265	4,27	4,79	-	3,66	4,85	4,35	4,43	3,10	3,61	3,55	3,91
Acetato de <i>trans</i> -pinocarveila (27)	1310	1298	10,46	2,77	13,13	18,94	2,09	11,27	11,82	27,44	22,58	14,98	13,49

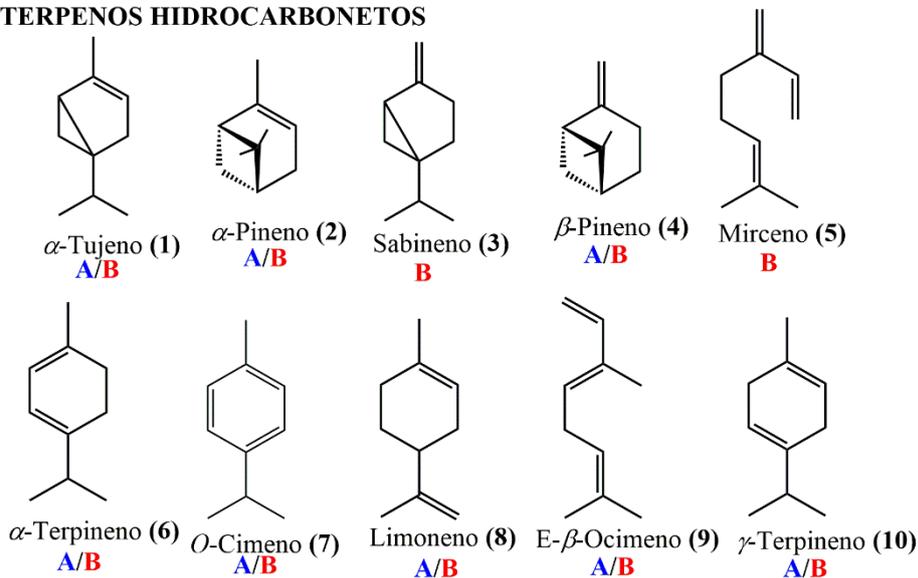
**APÊNDICE E - ANÁLISE POR CG-EM DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. viscosa* DE CAPÍTULOS FLORAIS:
QUIMIOTIPOS B. (CONCLUSÃO)**

Compostos ^a	IK ^b	IK _{Lit} ^a	Quimiotipo B										
			Ev007	Ev008	Ev009	Ev013	Ev014	Ev016	Ev017	Ev020	Ev021	Ev022	Ev030
Acetato de <i>cis</i>-isopinocarveila (28)	1321	1305	69,21	82,49	66,99	52,03	77,86	70,28	68,78	43,40	56,99	55,76	56,05
Acetato de mirtenila (29)	1336	1326	1,02	-	0,97	1,99	-	0,99	-	2,93	1,20	1,34	1,31
δ-Elemeno (30)	1343	1338	0,06	-	-	0,13	-	-	-	0,19	0,15	-	-
Acetato de di-hidro-neoisocarveila (33)	1374	1359	0,07	0,07	-	-	-	-	-	0,09	0,24	-	-
Isobutanoato de linalila (34)	1381	1375	0,56	0,52	0,59	0,78	0,41	0,57	2,72	0,88	2,56	0,60	0,34
Acetato de geranila (35)	1387	1381	-	0,12	-	-	-	-	0,35	-	-	-	-
Propanoato de isobornila (36)	1391	1384	0,12	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de <i>trans</i> -mirtanila (37)	1394	1386	0,21	0,18	0,22	0,11	-	-	0,74	0,17	0,40	0,23	0,21
β-Cubebeno (38)	1394	1388	-	-	-	-	-	-	-	0,31	0,64	-	-
β-Elemeno (39)	1394	1390	-	-	-	0,28	-	0,22	-	-	-	-	-
α-Barbateno (40)	1417	1407	-	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E</i> -Cariofileno (41)	1434	1419	0,48	0,38	0,33	0,54	0,32	0,45	0,71	0,67	0,88	0,47	0,16
Germacreno D (43)	1494	1481	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-	-
δ-Cadineno (44)	1536	1523	-	0,14	-	-	-	-	0,13	0,14	0,13	-	-
Óxido de cariofileno (45)	1599	1583	0,27	0,39	-	0,21	0,32	-	-	-	0,78	-	-

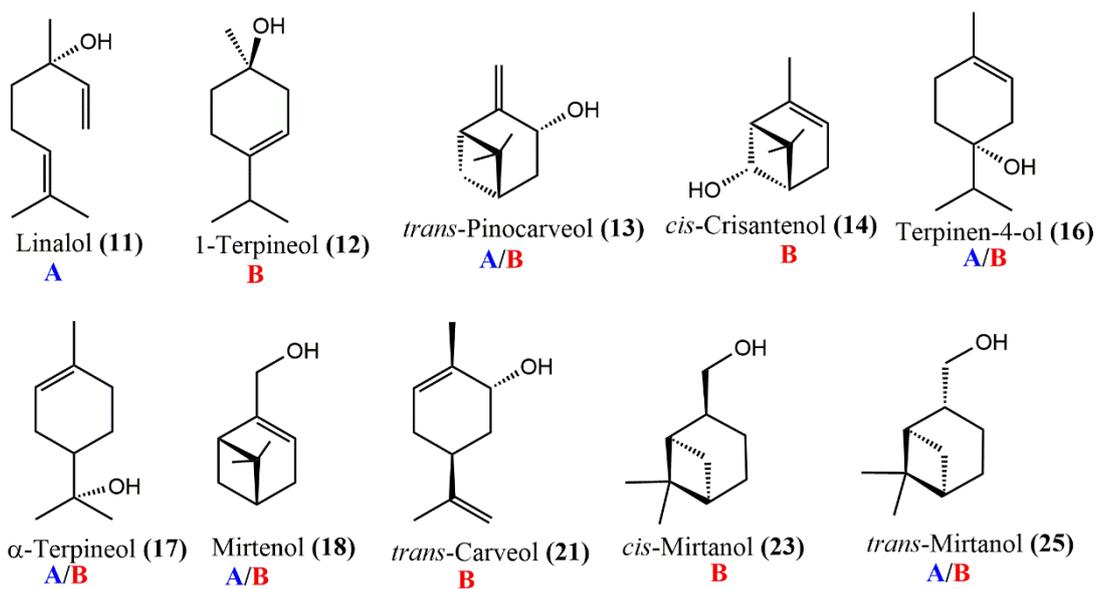
^a Os compostos são listados na ordem de eluição em HP-5MS. ^b índice de Kovats obtido em HP-5MS. ^c índice de Kovats obtido da literatura ADAMS, 2017; NIST, 2011).
Fonte: Elaborada pela autora.

**APÊNDICE F - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS
ÓLEOS ESSENCIAIS ANALISADOS POR CG-EM DOS CAPÍTULOS
FLORAIS DE *E. viscosa* (CONTINUA).**

MONOTERPENOS HIDROCARBONETOS



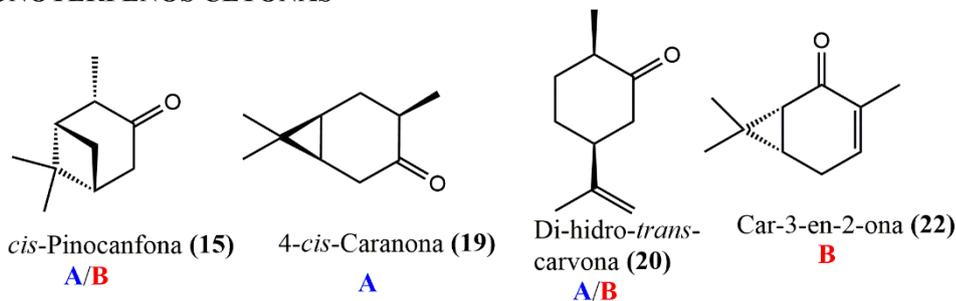
MONOTERPENOS ÁLCOOIS



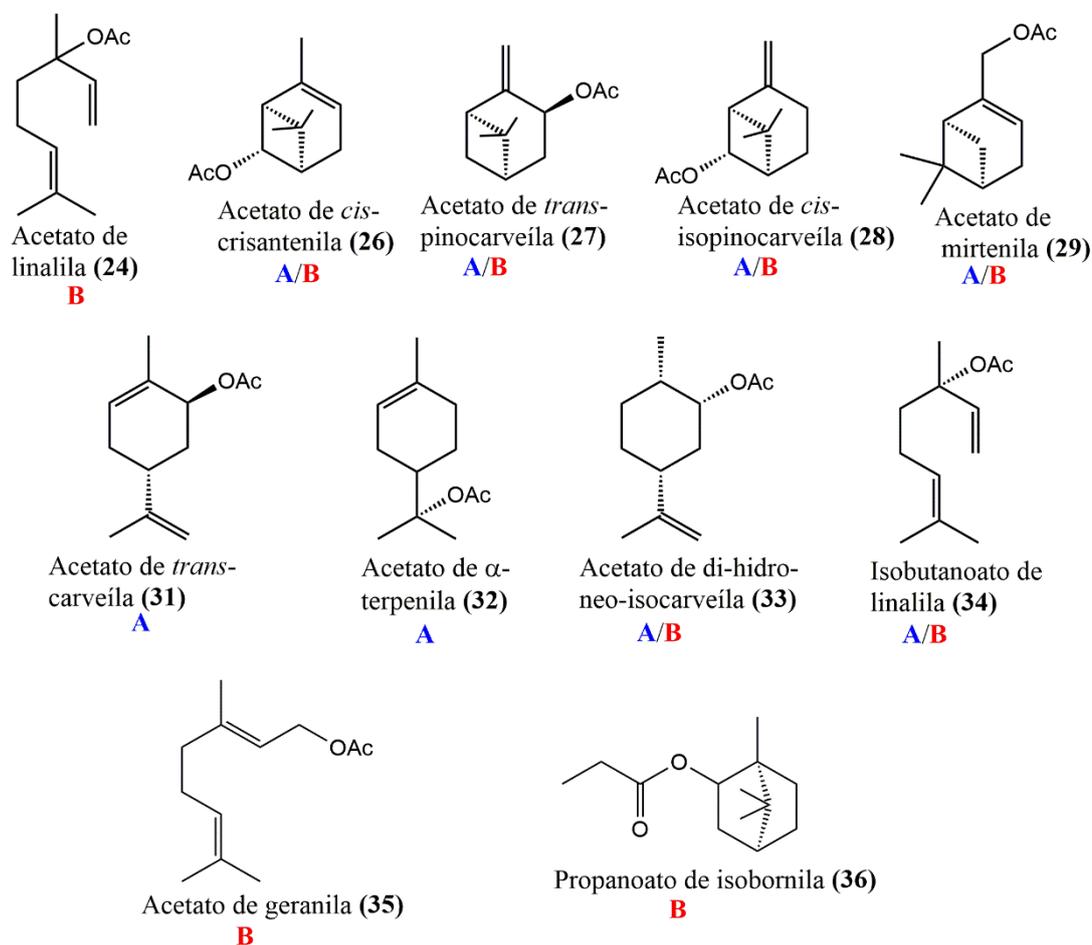
A: Encontrado no quimiotipo A; B: Encontrado no quimiotipo B; A/B: Encontrado no quimiotipo A e B.

**APÊNDICE F - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS
ÓLEOS ESSENCIAIS ANALISADOS POR CG-EM DOS CAPÍTULOS
FLORAIS DE *E. viscosa* (CONTINUA).**

MONOTERPENOS CETONAS



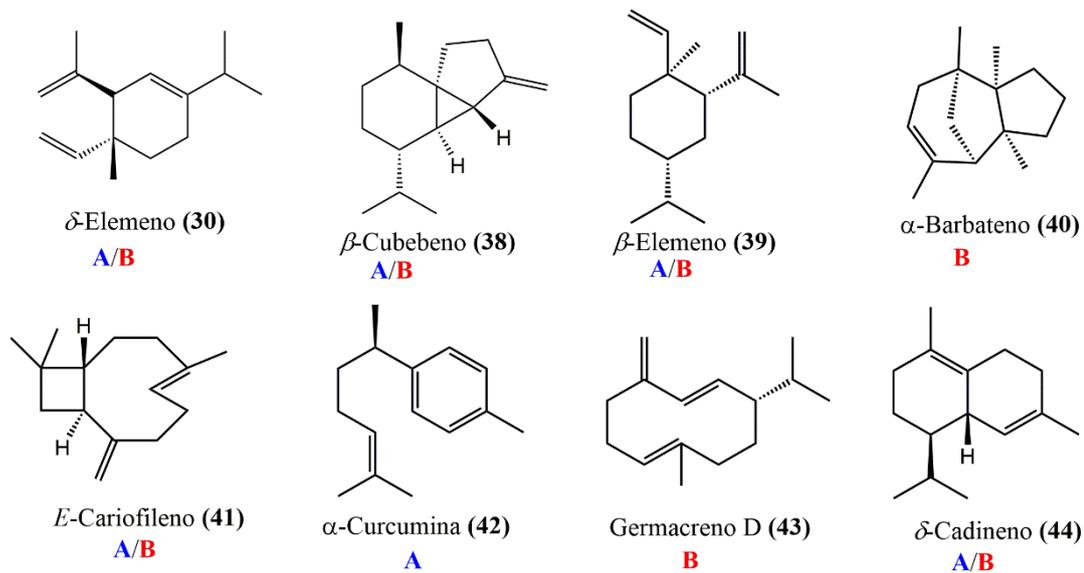
MONOTERPENOS ACETOXILADOS



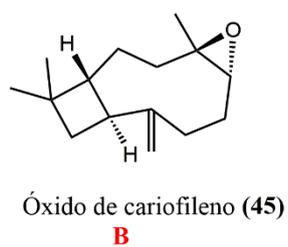
A: Encontrado no quimiotipo A; **B:** Encontrado no quimiotipo B; **A / B:** Encontrado no quimiotipo A e B.

**APÊNDICE F - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NOS
ÓLEOS ESSENCIAIS ANALISADOS POR CG-EM DOS CAPÍTULOS
FLORAIS DE *E. viscosa* (CONCLUSÃO).**

SESQUITERPENOS HIDROCARBONETOS



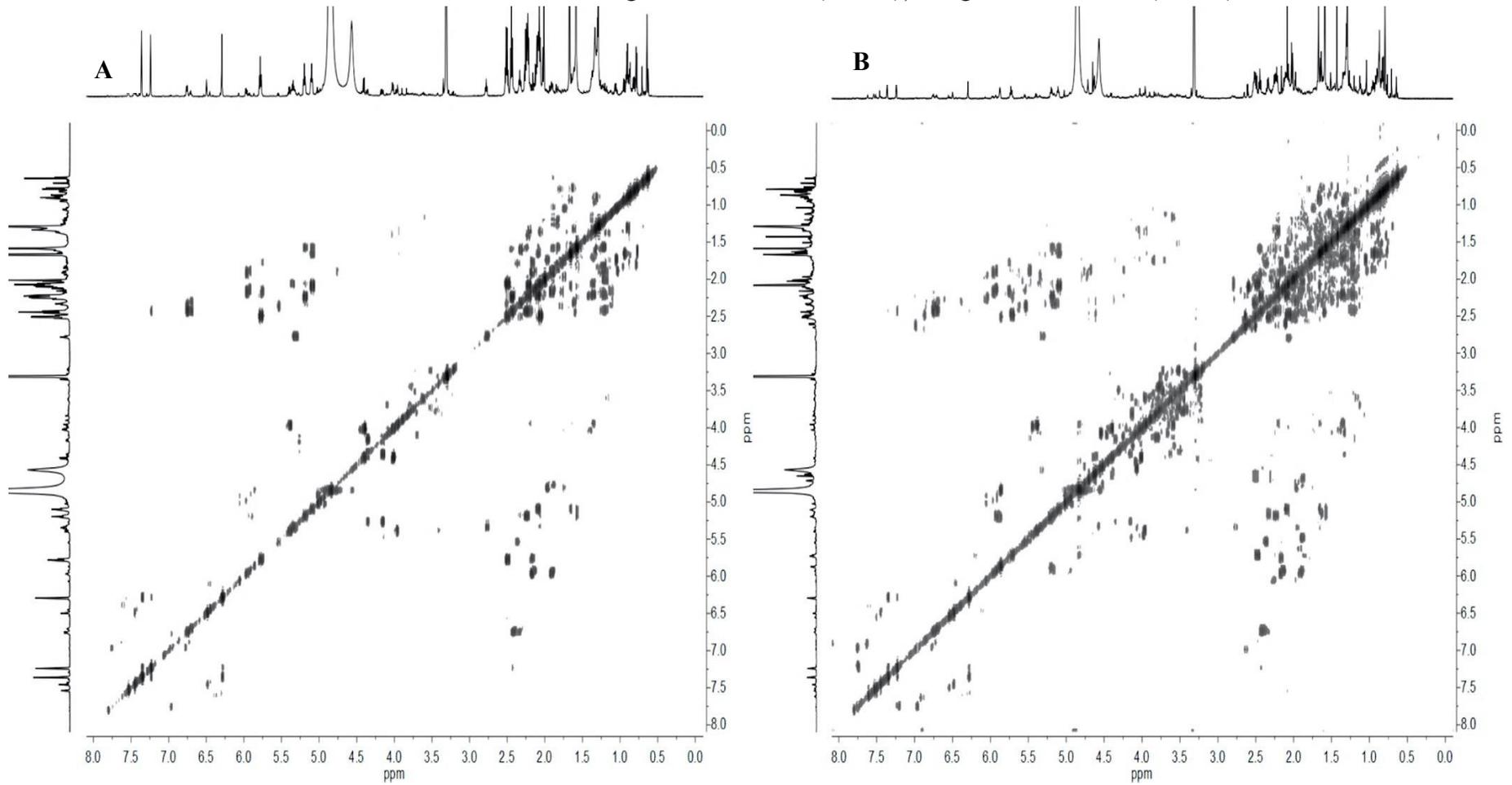
SESQUITERPENOS OXIGENADOS



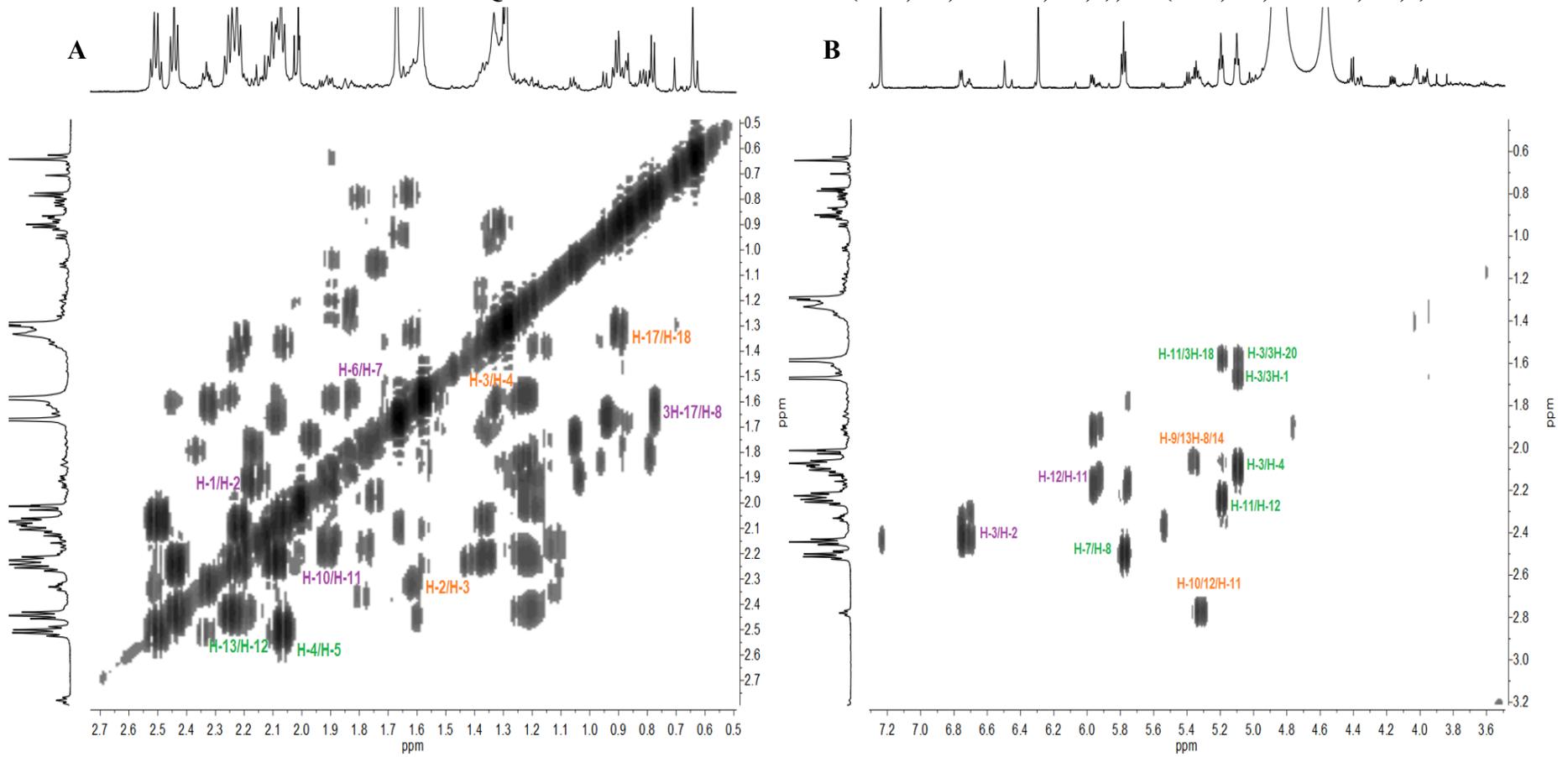
A: Encontrado no quimiotipo A; **B:** Encontrado no quimiotipo B; **A / B:** Encontrado no quimiotipo A e B.

Fonte: Elaborada pela autora.

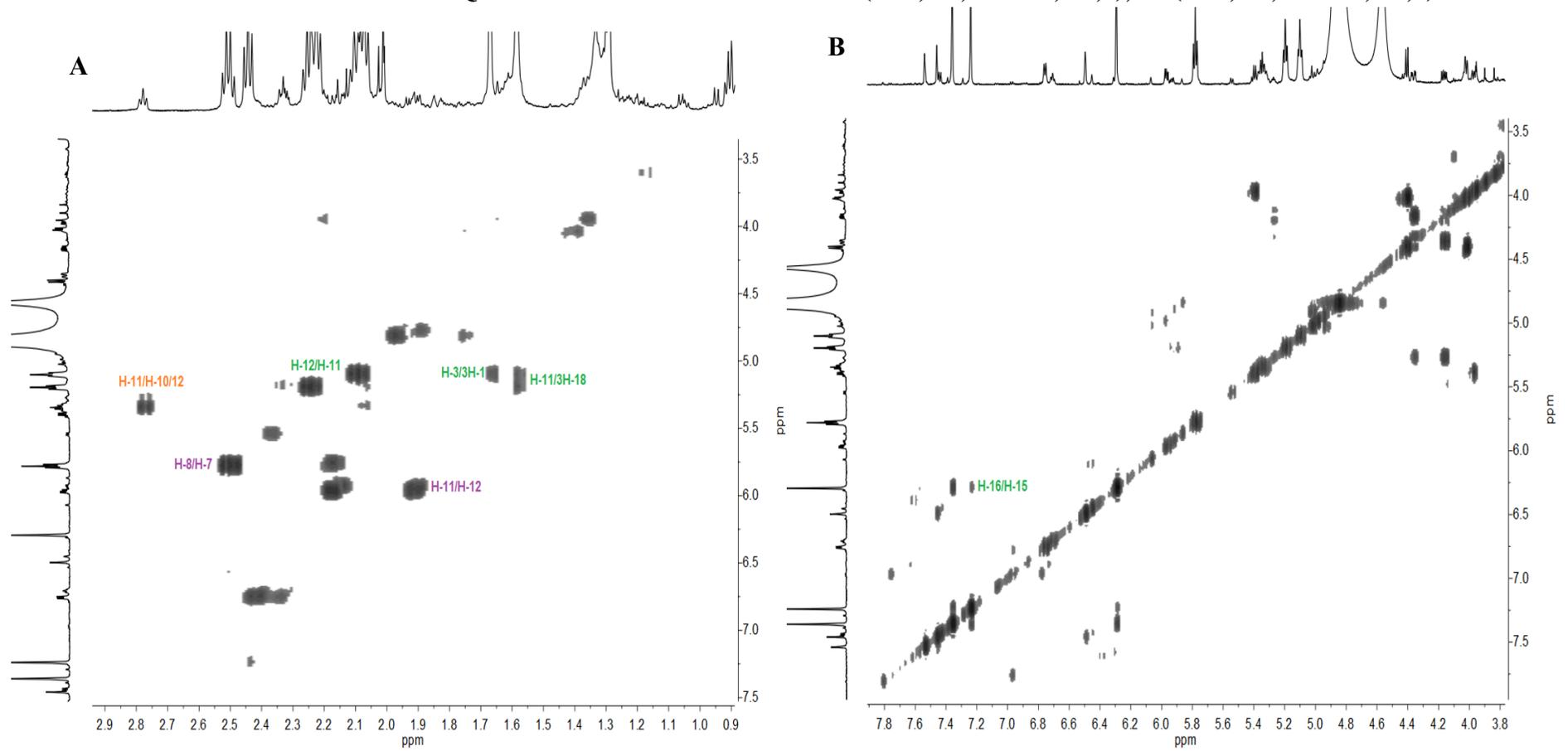
APÊNDICE G - ESPECTROS DE RMN ^1H , ^1H -COSY (600 x 600 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE *E. viscosa*: A: QUIMIOTIPO A (Ev024); B: QUIMIOTIPO B (Ev017).



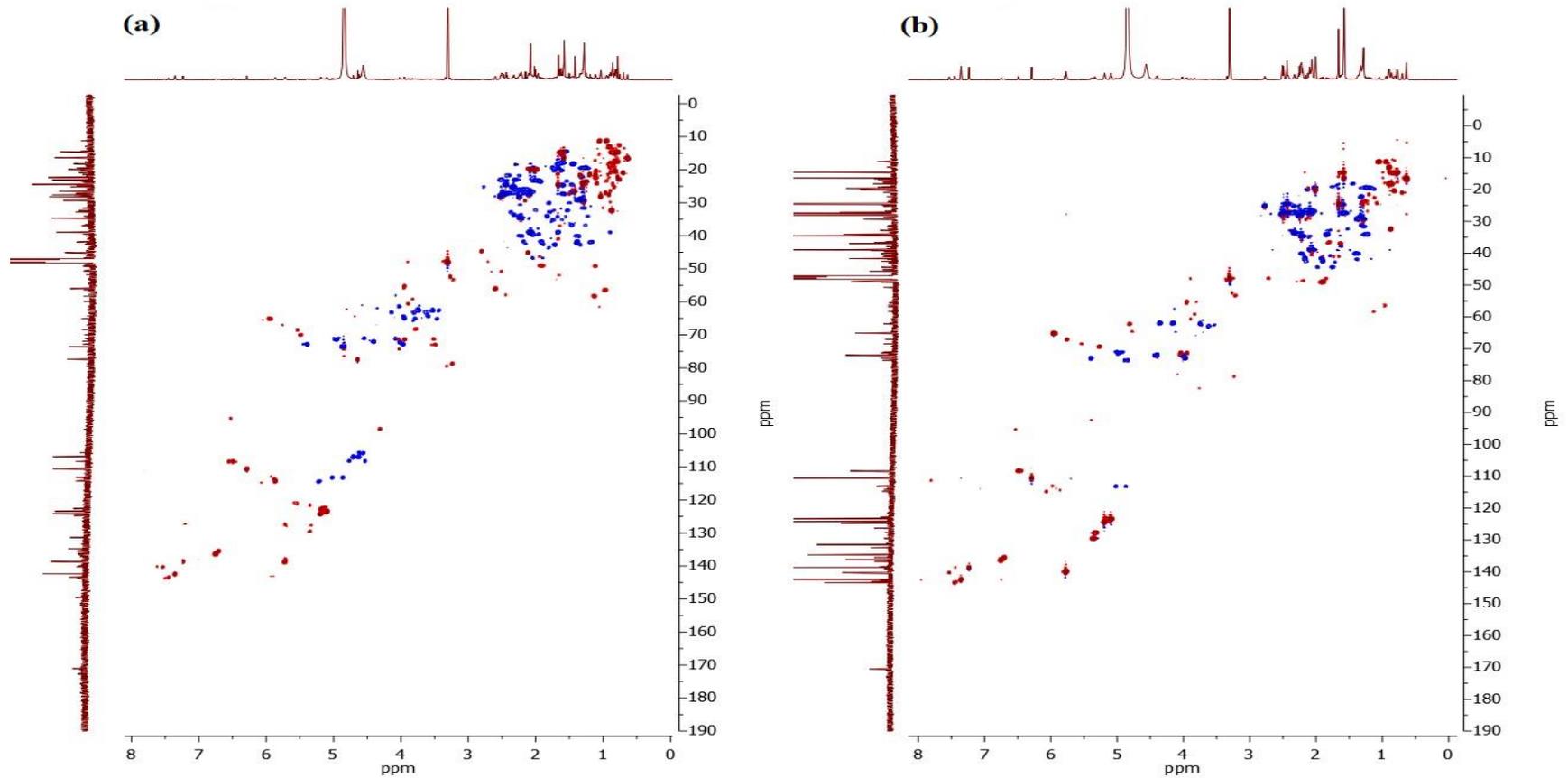
APÊNDICE H - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^1H COSY (600 x 600 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE *E. viscosa* (δ_{H} 0,5-2,7 x δ_{H} 0,5-2,7); B: (δ_{H} 0,6-3,2 x δ_{H} 3,6-7,2).



APÊNDICE I - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^1H COSY (600 x 600 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE *E. viscosa*: A: (δ_{H} 3,5-7,5 x δ_{H} 0,9-2,9); B: (δ_{H} 3,5-8,0 x δ_{H} 3,8-7,8).

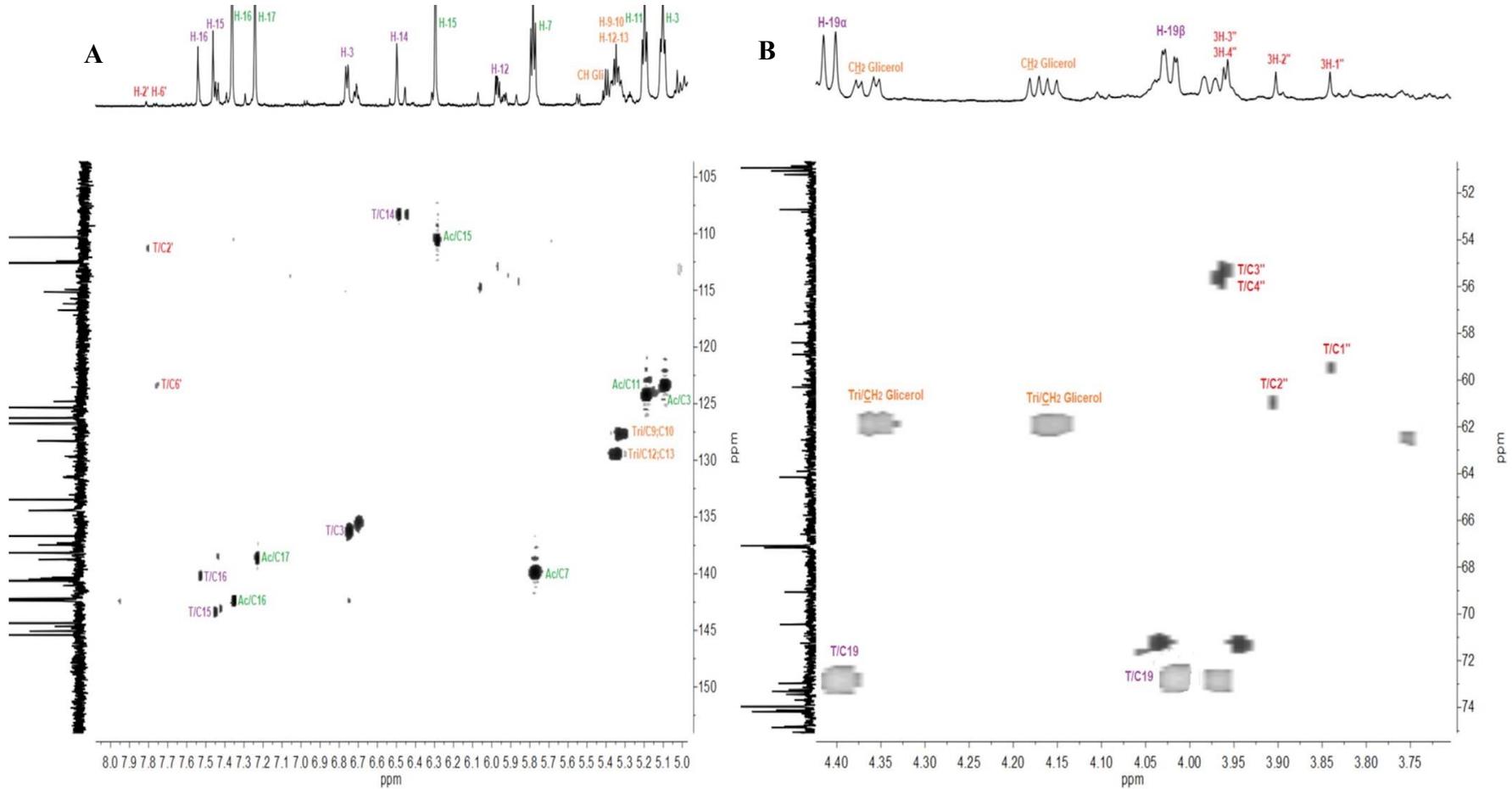


APÊNDICE J - ESPECTROS DE RMN ^1H , ^{13}C -HSQC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE *E. viscosa*: QUIMIOTIPO B (a); QUIMIOTIPO A (b).



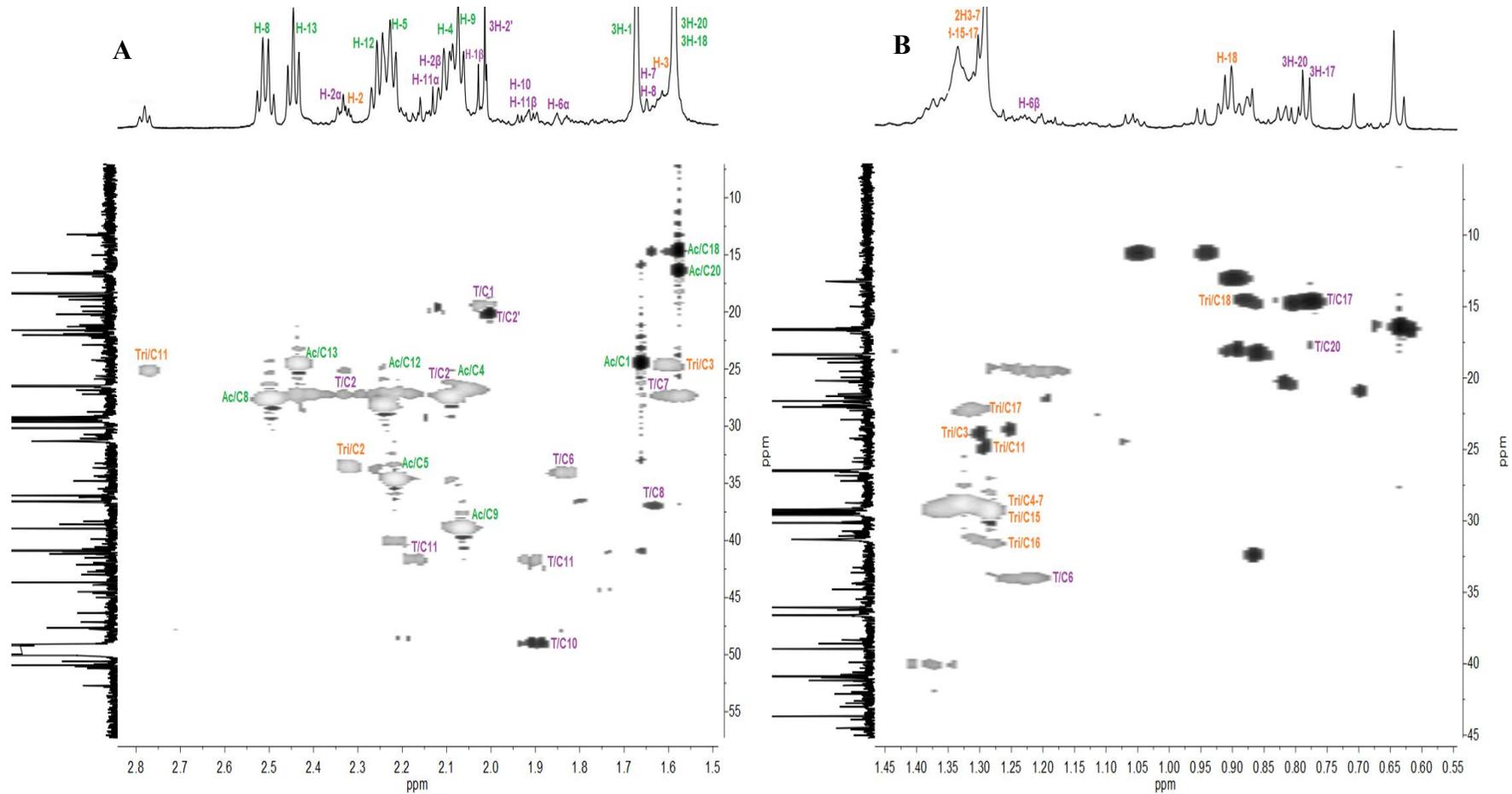
Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE K - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HSQC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE *E. viscosa*: A: (δ_{H} 5,0-8,0 x δ_{C} 105-155); B: (δ_{H} 3,7-4,4 x δ_{C} 52-74).



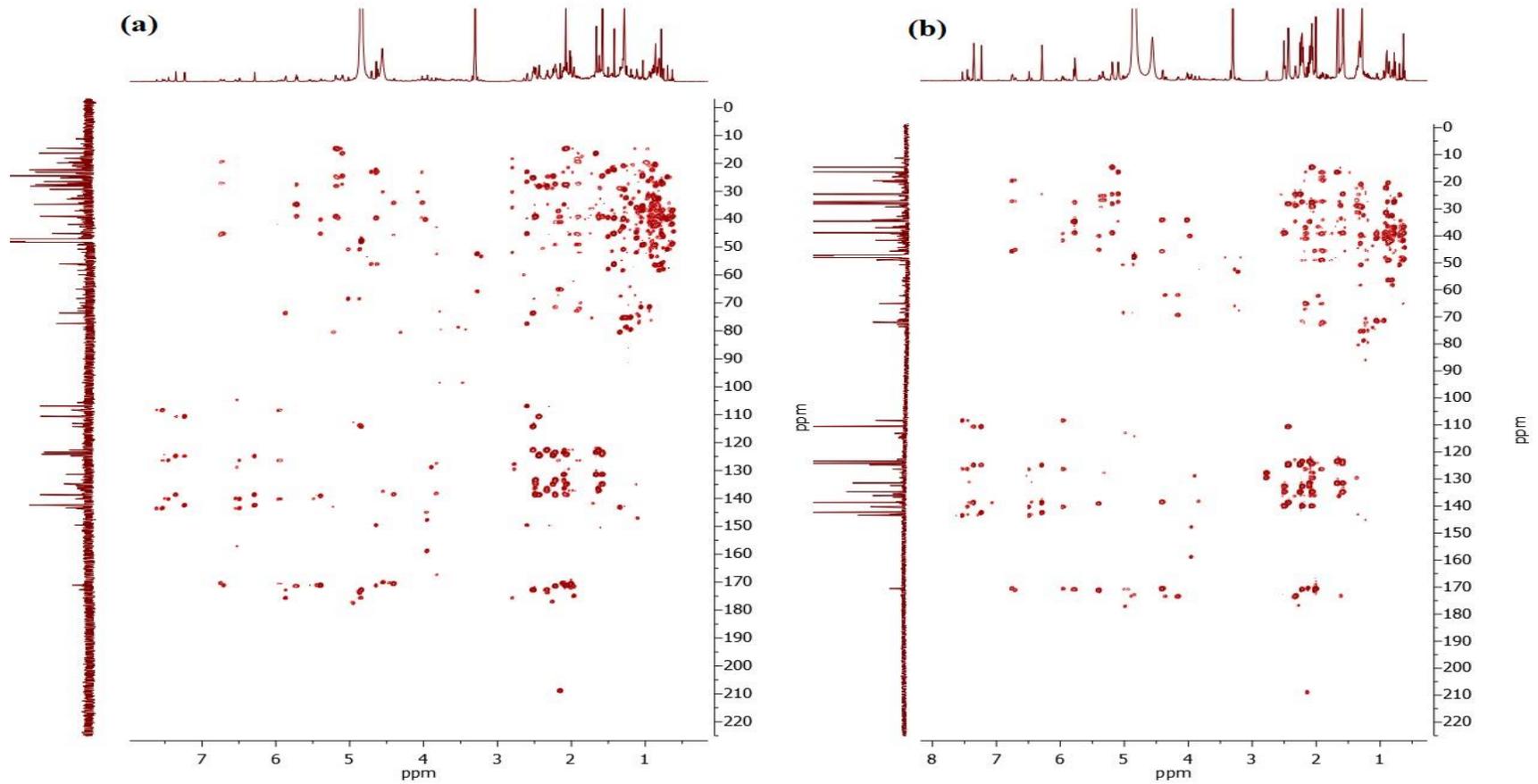
Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE L - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HSQC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE *E. viscosa*: A: (δ_{H} 1,5-2,8 x δ_{C} 10-55); B: (δ_{H} 0,5-1,4 x δ_{C} 05-45).



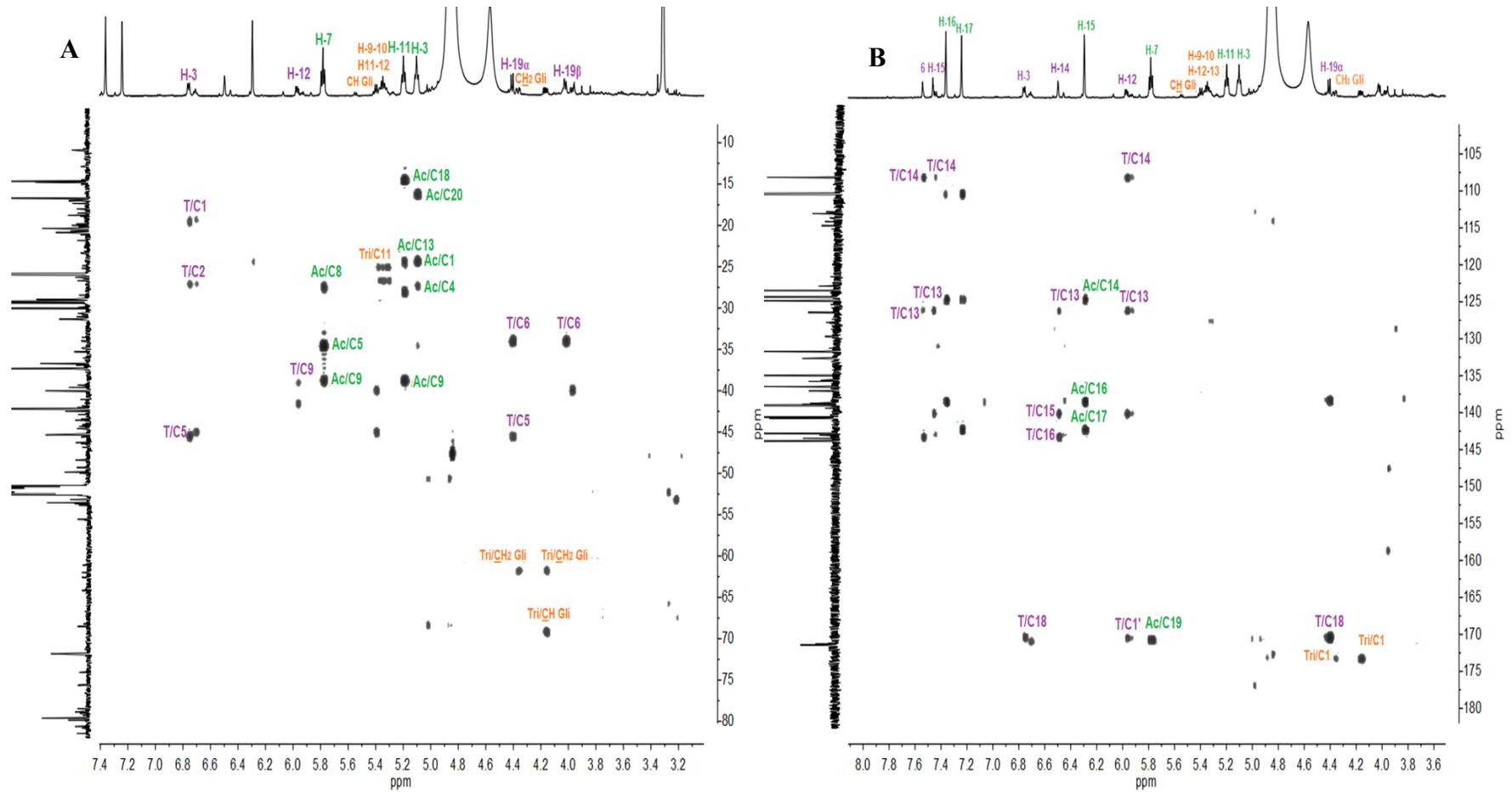
Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE M - ESPECTROS DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE *E. viscosa*: QUIMIOTIPO B (Ev017) (a); QUIMIOTIPO A (Ev024) (b).



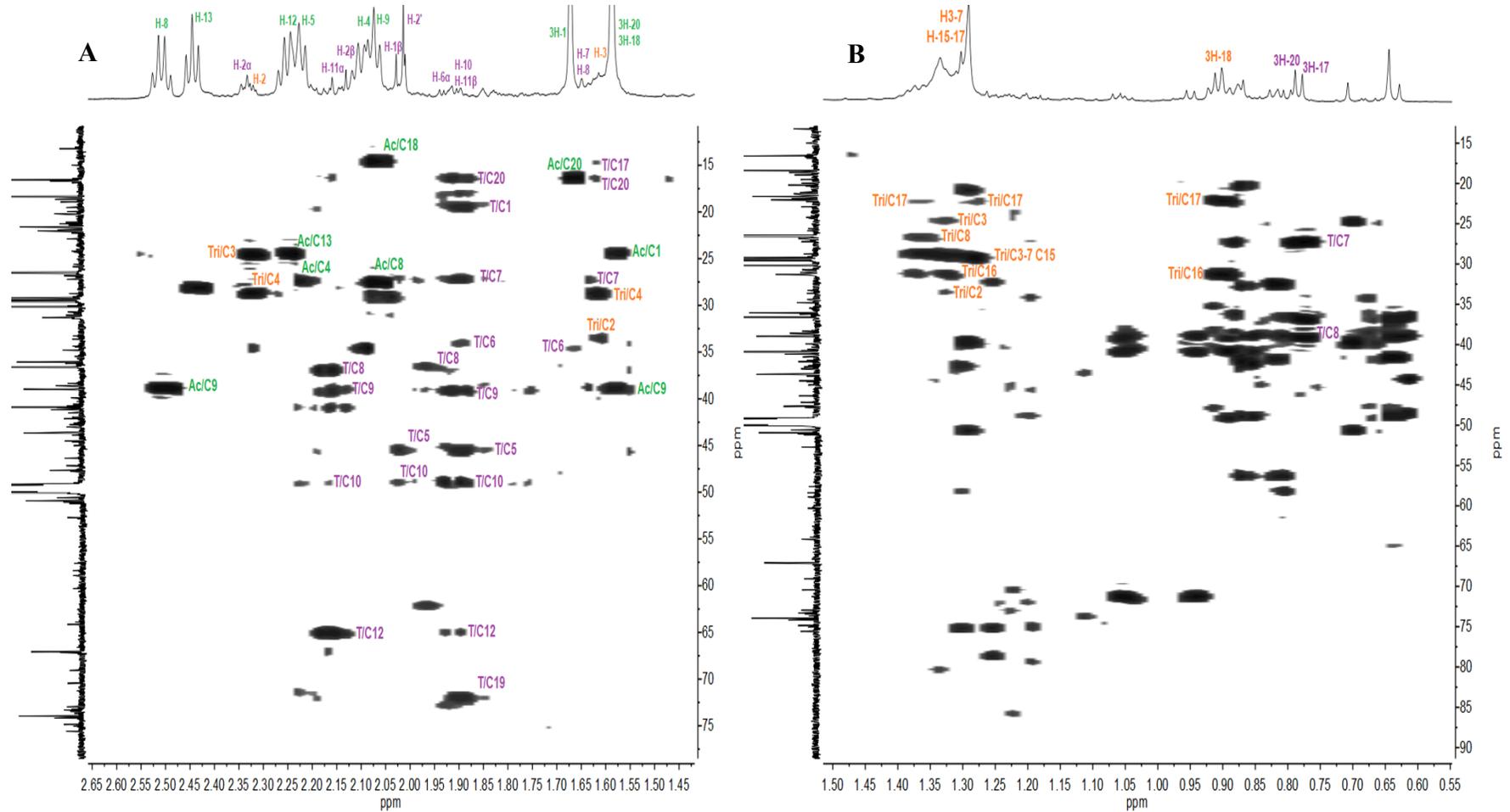
Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE N - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE *E. viscosa*: A: (δ_{H} 3,2-7,4 x δ_{C} 10-80); B: (δ_{H} 3,6-8,0 x δ_{C} 105-180).



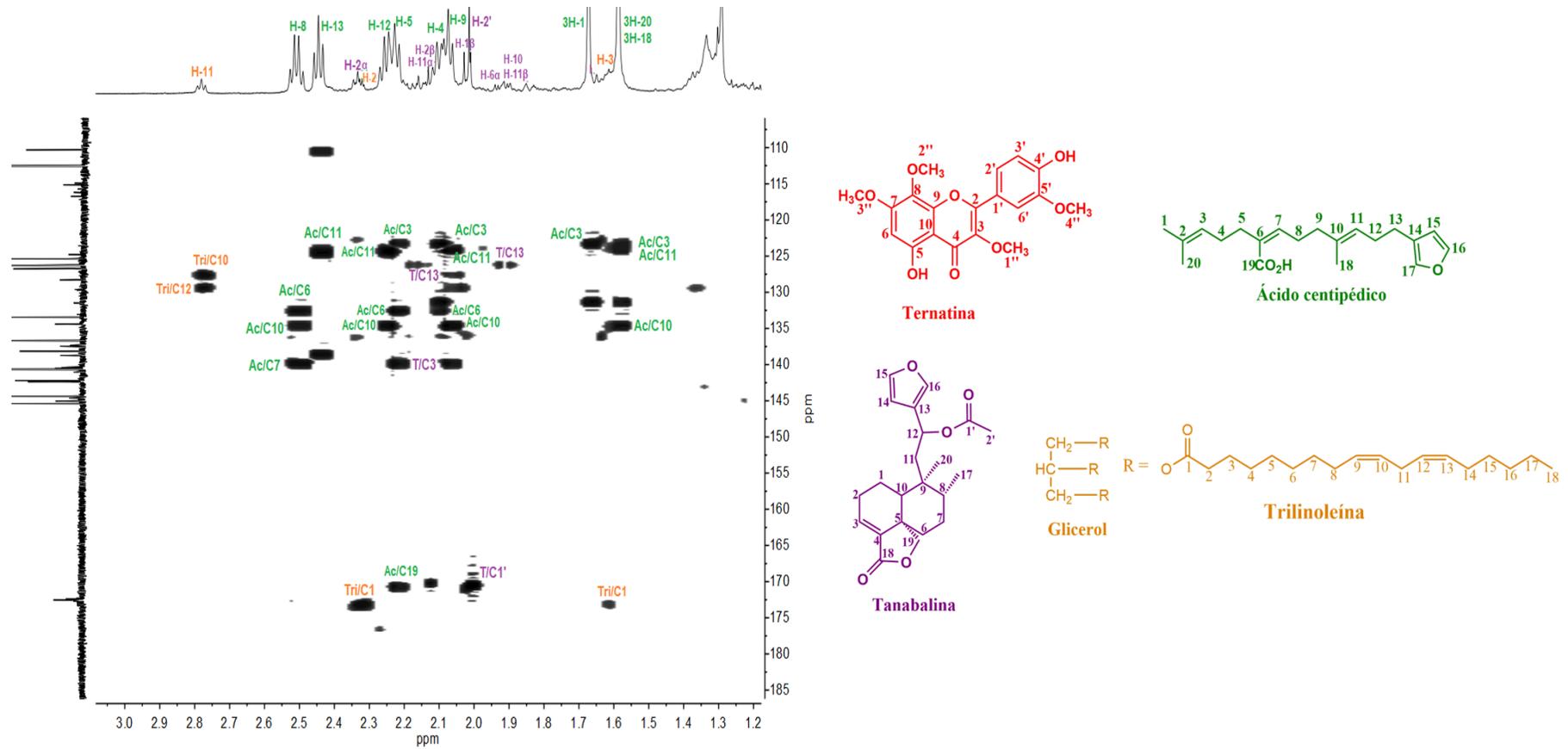
Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE O - A: EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE *E. viscosa*: A: (δ_{H} 1,4-2,6 x δ_{C} 15-75); B: (δ_{H} 0,5-1,5 x δ_{C} 15-90).



Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE P - A: EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CD_3OD) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE *E. viscosa* (δ_{H} 1,2-3,0 x δ_{C} 110-185), B: ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO METANÓLICO DOS CAPÍTULOS FLORAIS DE *E. viscosa*.



Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE Q - MATRIZ DE CONFUSÃO RESULTANTE DA CLASSIFICAÇÃO BINÁRIA DO CONJUNTO DE DADOS CG-EM DE ACORDO COM OS QUIMIOTIPOS "A" e "B" de *E. viscosa*.

		Classe atual	
		<i>Modelo</i>	
Classe predita	<i>A</i>	11 (VP)	0 (FP)
	<i>B</i>	0 (FN)	5 (VN)
	Não atribuído	0	0
	Σ	11	5

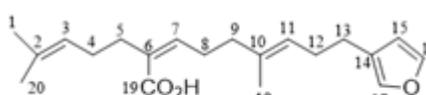
VP: verdadeiro positivo; FP: falso positivo; FN: falso negativo; VN: verdadeiro negativo.
 Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE R - RESULTADOS DA MATRIZ DE CONFUSÃO DA CLASSIFICAÇÃO BINÁRIA DE *E. viscosa* DE ACORDO COM OS QUIMIOTIPOS A E B, UTILIZANDO OS RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO PELOS ESPECTROS DE RMN ¹H.

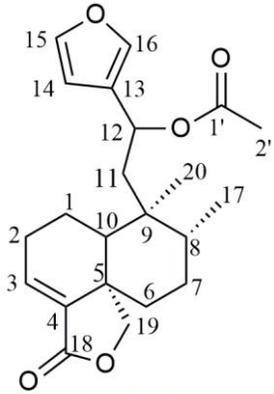
		Classe atual	
		<i>Modelo</i>	
Classe predita	<i>A</i>	15 (VP)	0 (FP)
	<i>B</i>	0 (FN)	33 (VN)
	Não atribuído	0	0
	Σ	15	33

VP: verdadeiro positivo; FP: falso positivo; FN: falso negativo; VN: verdadeiro negativo.
 Fonte: Elaborada pela autora.

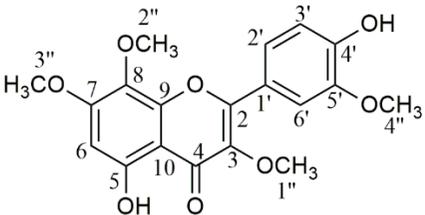
APÊNDICE S - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DOS DIFERENTES QUIMIOTIPOS DE *E. viscosa* COM BASE NOS SEGUINTES PARÂMETROS DE RMN E COMPARAÇÃO COM REFERÊNCIAS ANTERIORES: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ em ppm), MULTIPLICIDADE, CONSTANTE DE ACOPLAMENTO (J em Hz), CORRELAÇÕES ^1H - ^{13}C HSQC e HMBC (Continua).

<i>Estruturas</i>	# C	$\delta^{13}\text{C}$ (CD_3OD)	$\delta^1\text{H HSQC}$ (multip.:J) (CD_3OD)	$\delta^1\text{H HMBC}$ (CD_3OD)	$\delta^{13}\text{C}$ (CDCl_3)	$\delta^1\text{H}$ (CDCl_3)	Ref.
 <p>Ácido centipédico</p>	1	24,7	1,66 (3H, s)	5,09; 2,06	25,6	1,69	*
	2	130,1	-	-	130,7	-	
	3	123,5	5,09 (t, $J = 6,6; 1,2$)	2,06; 1,57	123,5	5,11	
	4	27,1	2,06	5,09	27,9	2,12	
	5	33,4	2,32	2,06	34,5	2,27	
	6	132,4	-	-	132,2	-	
	7	140,4	5,77 (t, $J = 7,2$)	2,49; 2,06	145,7	6,01	
	8	27,6	2,49 (q, $J = 7,2$)	2,06	28,1	2,64	
	9	39,2	2,06 (m)	2,49; 1,57	39,0	2,12	
	10	134,0	-	-	134,8	-	
	11	123,5	5,18 (t, $J = 7,8$)	2,32; 1,57	124,5	5,20	
	12	25,1	2,32 (m)	5,18; 2,43	28,4	2,27	
	13	24,4	2,43 (t, $J = 7,2$)	2,32; 5,18	25,0	2,46	
	14	125,4	-	-	124,9	-	
	15	110,7	6,28	7,23; 2,43	111,0	6,28	
	16	138,5	7,23	6,28; 7,35	138,8	7,21	
	17	143,2	7,35	6,28; 2,43	142,5	7,34	
	18	14,4	1,57	2,06	15,9	1,60	
	19	171,2	-	-	173,8	-	
	20	16,4	1,57	5,09; 1,66	17,7	1,60	

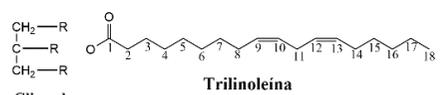
APÊNDICE S - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DOS DIFERENTES QUIMIOTIPOS DE *E. viscosa* COM BASE NOS SEGUINTE PARÂMETROS DE RMN E COMPARAÇÃO COM REFERÊNCIAS ANTERIORES: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ em ppm), MULTIPLICIDADE, CONSTANTE DE ACOPLAMENTO (J em Hz), CORRELAÇÕES ^1H - ^{13}C HSQC e HMBC (Continua).

Estruturas	# C	$\delta^{13}\text{C}$ (CD_3OD)	$\delta^1\text{H}$ HSQC (multip.;J) (CD_3OD)	$\delta^1\text{H}$ HMBC (CD_3OD)	$\delta^{13}\text{C}$ (CDCl_3)	$\delta^1\text{H}$ (CDCl_3)	Ref.
 <p>Tanabalina</p>	1	19,3	2,01; 1,19	2,34; 2,15; 6,74	20,2	1,99; 1,10	*
	2	27,5	2,34; 2,15	6,74; 2,34; 1,86	27,5	2,40; 2,18	
	3	136,3	6,74 (dd, $J = 7,2$)	2,34; 2,15; 2,01	140,0	6,76	
	4	141,7	-	-	135,6	-	
	5	45,3	-	-	45,6	-	
	6	34,3	1,86; 1,20	1,58; 1,51	34,2	1,86	
	7	27,7	1,58; 1,51	1,60; 1,86; 1,20	27,7	1,61; 1,44	
	8	37,2	1,60	1,58; 1,51	37,1	1,57	
	9	39,0	-	-	39,4	-	
	10	49,1	1,90	2,01; 1,19; 2,34;	49,0	1,86	
	11	42,3	2,15; 1,90	2,15	41,9	2,15; 1,80	
	12	65,5	5,96	5,96	64,8	5,93	
	13	126,5	-	2,15; 1,90	126,2	-	
	14	108,5	6,48	-	108,6	6,39	
	15	140,2	7,54	7,54; 5,96	139,5	7,36	
	16	143,4	7,45	6,48; 7,45	143,3	7,41	
	17	15,2	0,76 (s)	6,48; 7,54	15,7	0,75	
	18	170,2	-	1,60	169,1	-	
	19	71,8	4,40; 4,01 (d, $J = 8,4$)	-	71,7	4,26	
	20	17,8	0,77 (s)	1,90	17,5	0,59	
1'	170,1	-	1,90; 1,60	170,0	-		
2'	20,8	2,00	-	21,5	2,00		

APÊNDICE S - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DOS DIFERENTES QUIMIOTIPOS DE *E. viscosa* COM BASE NOS SEGUINTE PARÂMETROS DE RMN E COMPARAÇÃO COM REFERÊNCIAS ANTERIORES: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ em ppm), MULTIPLICIDADE, CONSTANTE DE ACOPLAMENTO (J em Hz), CORRELAÇÕES ^1H - ^{13}C HSQC e HMBC (Continua).

<i>Estruturas</i>	# C	$\delta^{13}\text{C}$ (CD_3OD)	$\delta^1\text{H HSQC}$ (<i>multip.;</i> J) (CD_3OD)	$\delta^1\text{H HMBC}$ (CD_3OD)	$\delta^{13}\text{C}$ (CDCl_3)	$\delta^1\text{H}$ (CDCl_3)	<i>Ref.</i>
 <p>Ternatina</p>	2	-	-	-	155,7	-	
	3	-	-	-	138,6	-	
	4	-	-	-	179,0	-	
	5	-	-	-	157,4	-	
	6	95,7	6,52 (s)	-	95,4	6,42 (s)	
	7	-	-	-	158,4	-	
	8	-	-	-	128,8	-	
	9	-	-	-	148,4	-	
	10	-	-	-	105,3	-	
	1'	-	-	-	122,9	-	
	2'	111,2	7,80 (d, $J = 1,8$)	-	110,8	7,78 (dd, $J = 8,7; 2,0$)	*
	3'	-	6,97 (d, $J = 8,4$)	-	114,7	7,06 (d, $J = 8,7$)	
	4'	-	-	-	148,3	-	
	5'	-	-	-	146,4	-	
	6'	122,3	7,75 (dd, $J = 8,4; 1,8$)	-	122,7	-	
1''	60,5	3,83 (s)	-	61,5	-		
2''	59,2	3,89 (s)	-	60,1	7,80 (s)		
3''	55,5	3,95 (s)	-	56,3	3,88 (s)		
4''	55,5	3,95 (s)	-	56,0	3,92 (s)		
					3,95 (s)		
					3,98 (s)		

APÊNDICE S - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DOS DIFERENTES QUIMIOTIPOS DE *E. viscosa* COM BASE NOS SEGUINTE PARÂMETROS DE RMN E COMPARAÇÃO COM REFERÊNCIAS ANTERIORES: DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ em ppm), MULTIPLICIDADE, CONSTANTE DE ACOPLAMENTO (J em Hz), CORRELAÇÕES ^1H - ^{13}C HSQC e HMBC (Conclusão).

<i>Estruturas</i>	# C	$\delta^{13}\text{C}$ (CD_3OD)	$\delta^1\text{H}$ HSQC (<i>multip.; J</i>) (CD_3OD)	$\delta^1\text{H}$ HMBC (CD_3OD)	$\delta^{13}\text{C}$ (CDCl_3)	$\delta^1\text{H}$ (CDCl_3)	<i>Ref.</i>
 <p>Trilinoleína</p>	1	173,5	-	-	172,8; 173,2	-	**
	2	33,9	2,34 (t, $J = 7,4$)	29,3; 173,5	34,1	2,38	
	3	23,8	1,38 – 1,25 (sl)	33,9; 173,5	24,8	1,19 – 1,42	
	4-7	29,3	1,38 – 1,25 (sl)	29,3	29,0	1,19 – 1,42	
	8	27,4	2,10 (m)	29,3; 129,5	27,2	2,03	
	9	129,5	5,34 (m)	25,3; 27,4	128,1; 129,9	5,28 – 5,46	
	10	129,5	5,34 (m)	25,3	128,1; 129,9	5,28 – 5,46	
	11	25,3	2,77 (t, $J = 6,8$)	129,5	25,6	2,90 – 2,77	
	12	129,5	5,34 (m)	25,3; 27,4	128,1; 129,9	5,28 – 5,46	
	13	129,5	5,34 (m)	25,3; 27,4	128,1; 129,9	5,28 – 5,46	
	14	27,4	2,10 (m)	129,5	27,2	2,03	
	15	29,3	1,38 – 1,25 (sl)	27,4; 129,5	29,0	1,19 – 1,42	
	16	31,2	1,38 – 1,25 (sl)	27,4; 29,3	29,0	1,19 – 1,42	
	17	22,1	1,38 – 1,25 (sl)	14,0; 29,3	29,0	1,19 – 1,42	
	18	14,0	0,88 (t, sobreposto)	22,1; 31,2	14,0	0,97 – 0,88	
	Glicerol CH ₂	61,8	4,35 (dd, $J = 12,1$; 3,7)	173,5	62,1	4,15; 4,30	
	Glicerol CH ₂	61,8		173,5	62,1	4,15; 4,30	
	Glicerol CH	69,3	4,15 (dd, $J = 12,1$; 6,3)	173,5	68,9	5,25	
			5,21 (m)				

* (LIMA, *et al.*, 1996); ** (NIEVA-ECHEVARRÍA, *et al.*, 2014; ALEMANY, 2002).

Fonte: Elaborada pela autora.

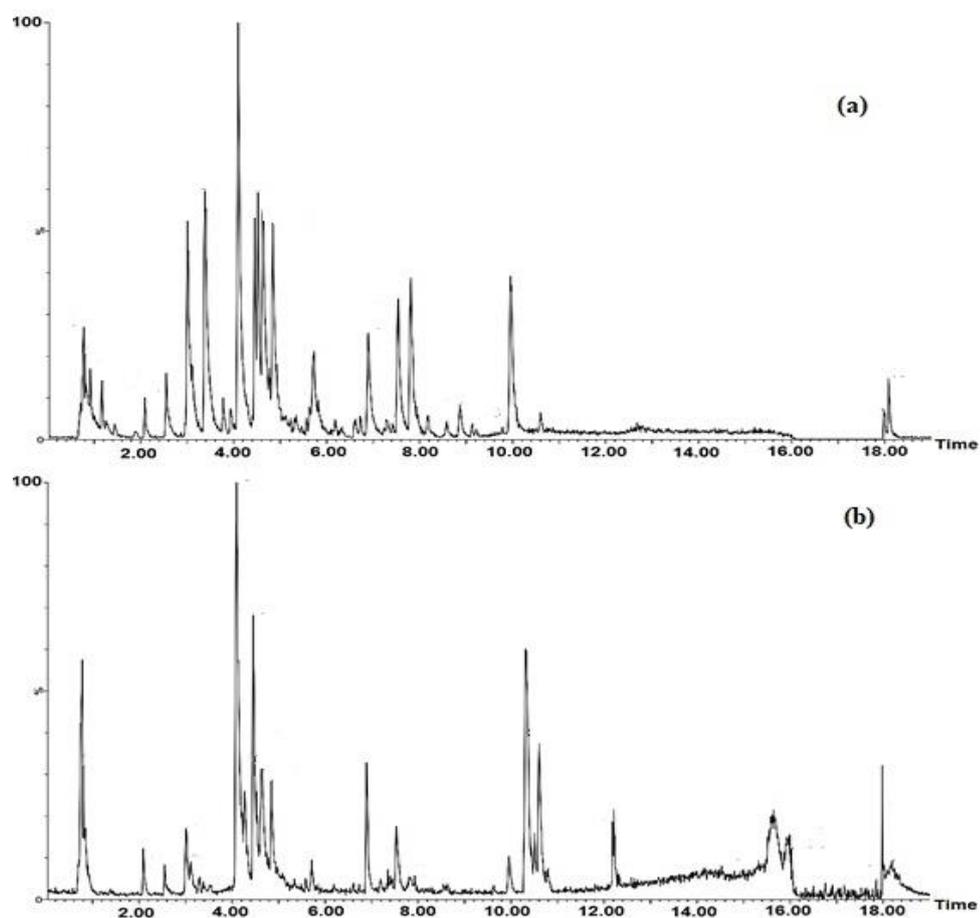
APÊNDICE T - TEOR DE TERNATINA, TANABALINA E ÁCIDO CENTIPÉDICO (mg.kg⁻¹) DO EXTRATO METANÓLICO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE *E. viscosa*, DETERMINADOS POR ANÁLISE DE RMNq ¹H.

Código	Nome	Origem/Data	Quimiotipo	Quantificação RMNq (mg.kg ⁻¹ ± DP)		
				ternatina	tanabalina	ác. centipédico
Ev005	Spirro 1	Fortaleza-Ceará / Março 2016	A	1140,26 ± 54,94	12848,30 ± 93,82	34893,30 ± 369,00
Ev006	Spirro 2	Fortaleza-Ceará / Março 2016	A	1325,81 ± 72,63	11779,40 ± 183,57	356669,90 ± 91,80
Ev007	CRC Cascavel	Fortaleza-Ceará / Março 2016	B	1117,31 ± 83,06	3635,65 ± 47,26	9984,33 ± 56,95
Ev008	Macela Beberibe	Cascavel-Ceará / Março 2016	B	4211,87 ± 138,74	1521,55 ± 150,09	5656,19 ± 162,28
Ev009	Alagoas a granel	Fortaleza-Ceará / Abril 2016	B	1237,02 ± 89,65	6599,12 ± 64,68	1072,55 ± 141,02
Ev013	Horizonte 1	Pacajus-Ceará / Junho 2016	B	1020,54 ± 80,36	3528,45 ± 35,73	10631,90 ± 171,54
Ev014	Baldarate 3	Fortaleza-Ceará / Julho 2016	B	1385,67 ± 346,14	506,19 ± 67,04	1075,08 ± 116,17
Ev016	CRC Russas	Fortaleza-Ceará / Julho 2016	B	1259,97 ± 125,69	5457,94 ± 58,57	16862,30 ± 289,57
Ev017	Aiuaba	Aiuaba-Ceará / Dezembro 2016	B	1623,10 ± 170,25	10957,00 ± 54,58	27162,80 ± 8,76
Ev020	Flora	Juazeiro-Ceará / Dezembro 2016	B	1657,01 ± 172,86	8069,29 ± 101,58	21033,60 ± 223,10
Ev021	Tauá (Serrote de boi)	Tauá-Ceará / Dezembro 2016	B	1551,27 ± 86,60	244,16 ± 63,37	703,22 ± 30,66
Ev022	Macela baldarate 4	Fortaleza-Ceará / Março 2017	B	909,81 ± 16,66	3576,09 ± 22,48	13576,40 ± 111,79
Ev024	Casa do alho 1	Fortaleza-Ceará / Março 2017	A	5015,93 ± 287,79	1173,17 ± 33,81	1426,69 ± 66,15
Ev025	Casa do alho roxo 2	Fortaleza-Ceará / Março 2017	A	1440,53 ± 50,64	17255,19 ± 483,47	49671,20 ± 541,11
Ev027	Juazeiro Ce 1	Cascavel-Ceará / Março 2017	A	1267,95 ± 105,44	11633,48 ± 100,40	30727,10 ± 171,54
Ev030	Spirro 2 mundo verde	Fortaleza-Ceará / Novembro 2016	B	1187,14 ± 57,12	512,14 ± 10,31	1798,55 ± 20,07

DP, desvio padrão.

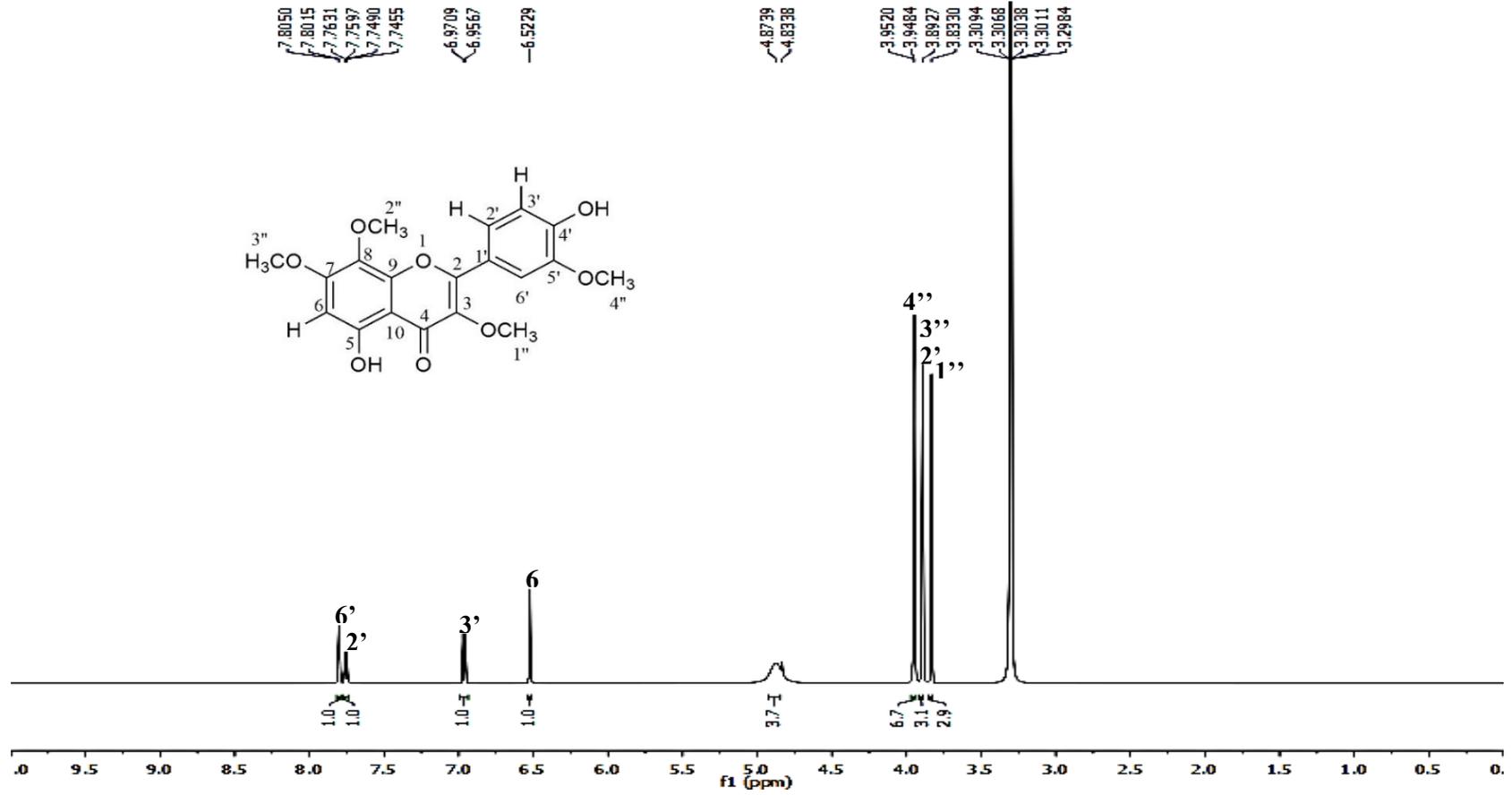
Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE U - CROMATOGRAMA CLUE-EMAR DA INFUSÃO DE CAPÍTULOS FLORAIS DE *E. viscosa* DE AIUABA SILVESTRE (Ev017): (a) MODO DE IONIZAÇÃO NEGATIVA e (b) MODO POSITIVO.



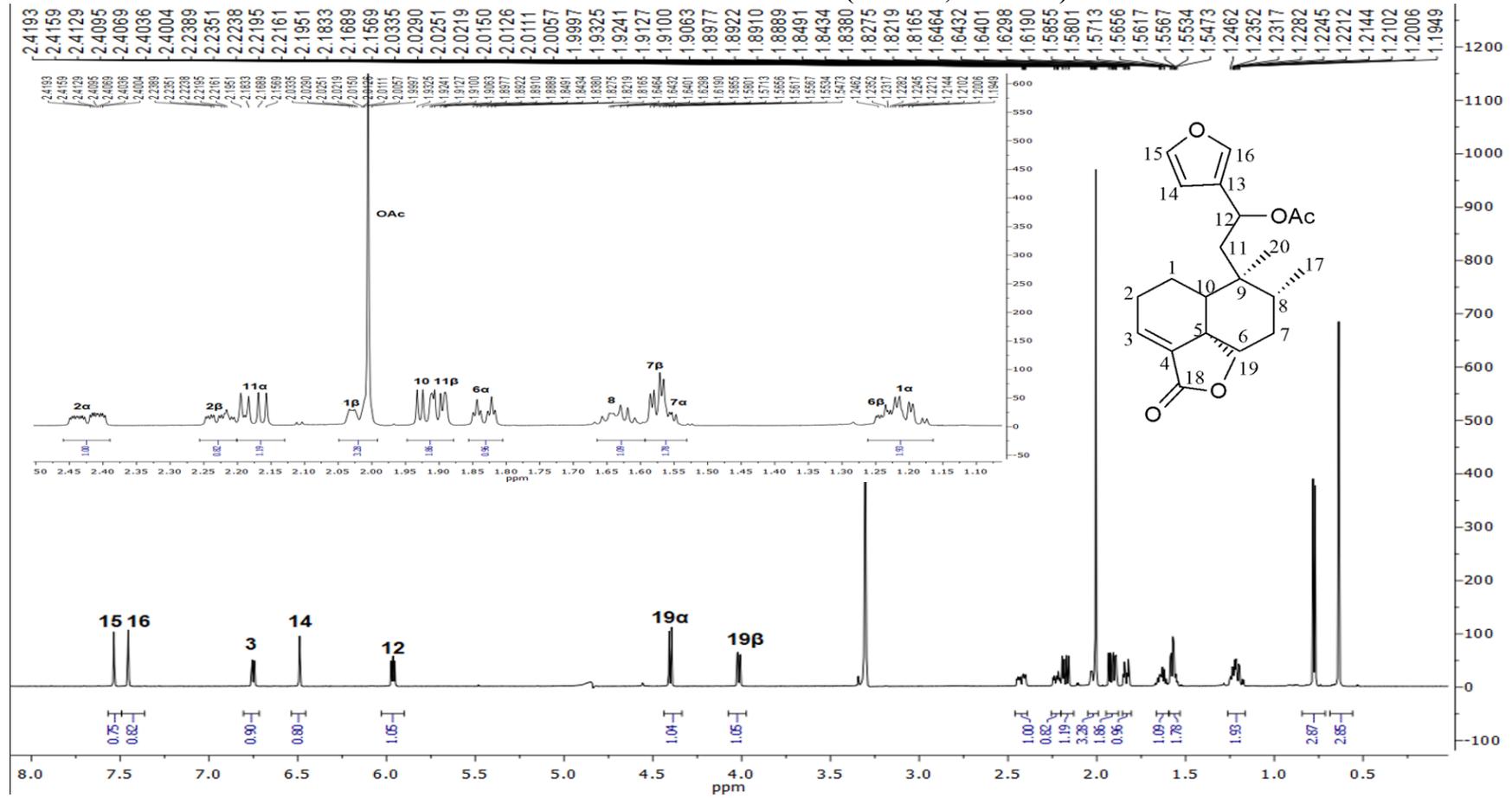
Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE V - ESPECTRO DE RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) DA TERNATINA.



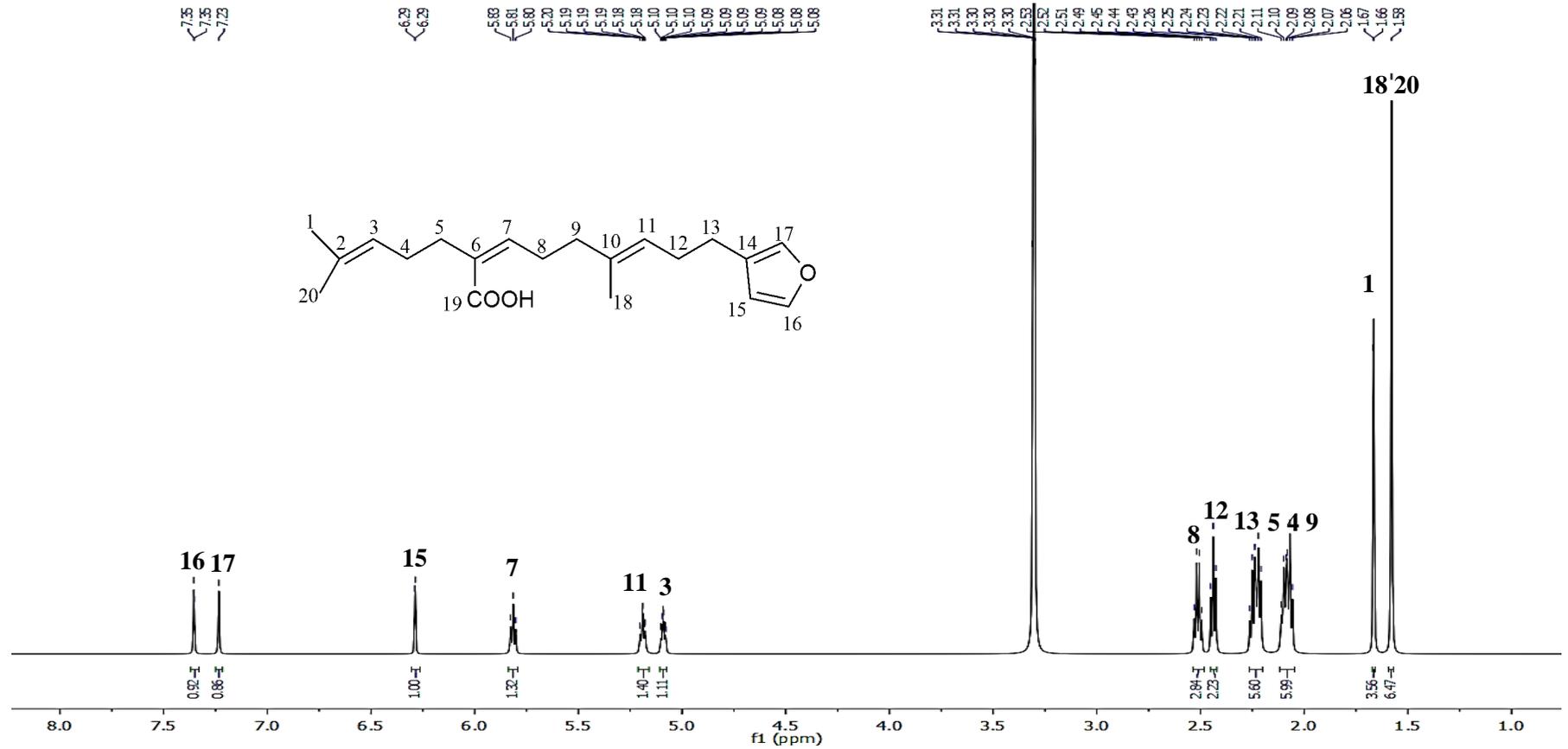
Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE W - ESPECTRO DE RMN ^1H (CD_3OD , 600MHz) DA TANABALINA.



Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE X - ESPECTRO DE RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) DO ÁCIDO CENTIPÉDICO.



Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE Y - COMPARAÇÃO DOS DADOS DE CG-EM PARA OS COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO A DE *E. viscosa* USANDO 2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO: (1) MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE DESSORÇÃO TÉRMICA DA FIBRA (MEFS) E (2) HIDRODESTILAÇÃO SEGUIDA POR INJEÇÃO DIRETA DO ÓLEO ESSENCIAL (OE).

Extração	Amostra	t_r (<i>trans</i>) 26	t_r (<i>cis</i>) 27	Área absoluta 26 e 27	Razão área dos picos 26/27	Nº de picos	Área total dos picos
MEFS-Fibra DVB/CAR/PDM S	Cap. florais	13,573	13,742	29674261 ± 4,7E+11 3131455 ± 1,29E+10	9,5	40	460103172.70 ± 23219294.81
	Cap. florais + água	13,567	13,748	14323966.7 ± 4,25E+13 8475969.09 ± 1,8E+6	1,7	33	293340926.55 ± 20278452.00
	Cap. florais + solução salina	13,554	13,737	10389588.7 ± 4,95E+12 1974885.59 ± 3,8E+5	5,2	28	246331036.06 ± 22280508.68
MEFS- Fibra PA	Cap. florais	13,542	13,723	17598974 ± 8,18E+10 1215349 ± 5,32E+09	14,5	14	99454572.24 ± 8644907.48
	Cap. florais + água	13,536	15,844	1689009.02 ± 8,02E+08 0	-	13	89181996.54 ± 8586888.11
	Cap. florais + solução salina	13,536	15,844	10805768 ± 1,2E+13 0	-	14	109571445.55 ± 9127738.12
Hidrodestilação- injeção direta	Óleo essencial	12,960	13,208	36209954,14 4071998,71	8,9	7	56789643.87 ± 12609119.00

trans: Acetato de *trans*-pinocarveíla; *cis*: Acetato de *cis*-isopinocarveíla, Razão *trans/cis*: razão da área absoluta obtida dos compostos acetato de *trans*-pinocarveíla e acetato de *cis*-isopinocarveíla. Nº de picos: número de picos observados no cromatograma CG-EM.

Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE Z - COMPARAÇÃO DOS DADOS DE CG-EM PARA OS COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS CAPÍTULOS FLORAIS DO QUIMIOTIPO B DE *E. viscosa* USANDO 2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO: (1) MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE DESSORÇÃO TÉRMICA DA FIBRA (MEFS) E (2) HIDRODESTILAÇÃO SEGUIDA POR INJEÇÃO DIRETA DO ÓLEO ESSENCIAL (OE).

Extração	Amostra	t_r (<i>trans</i>) 26	t_r (<i>cis</i>) 27	Área absoluta 26 e 27	Razão área 26/27	Nº de picos	Área total dos picos
MEFS- Fibra DVB/CAR/PDMS	Cap. florais	13,623	13,892	49279840 ± 1,41E+12 1,58E+08 ± 6,28E+12	0,033	41	472700139.67 ± 8231866.10
	Cap. florais + Água	13,598	13,848	33289258 ± 2,95E+13 1.19E+08 ± 2,41E+14	0,028	49	514052421.4 ± 6398574.56
	Cap. florais + solução salina	13,604	13,867	36327632 ± 1,30E+13 1,33E+08 ± 1,68E+13	0,27	48	554035860.18 ± 9511683.98
MEFS- Fibra PA	Cap. Florais	13,536	13,717	3420441 ± 6,14E+10 10487042 ± 2,12E+10	2,3	12	48936189.55 ± 8025483.48
	Cap. Florais + Água	13,542	13,736	16407052 ± 1,15E+12 46952065 ± 4,37E+12	1,57	20	162420435.75 ± 6931622.80
	Cap. Florais + solução salina	13,535	13,723	12069958 ± 6,01E+12 35715780 ± 4,37E+12	0,33	23	167874145.75 ± 9563037.70
Hidrodestilação- injeção direta	Óleo essencial	13,138	13,488	19855542,3 103007131,55	0,19	10	151596475.02 ± 26120646.00

trans: Acetato de *trans*-pinocarveíla; *cis*: Acetato de *cis*-isopinocarveíla, Razão *trans/cis*: razão da área absoluta obtida dos compostos acetato de *trans*-pinocarveíla e acetato de *cis*-isopinocarveíla. Nº de picos: número de picos observados no cromatograma CG-EM.

Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE AA - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS COMPOSTOS ACETATO DE *TRANS*-PINOCARVEÍLA E ACETATO DE *CIS*-ISOPINOCARVEÍLA PARA O QUIMIOTIPO A.

Amostra	Composto	$F_{(calculado)}$	$F_{(crítico)}$	Valor- <i>p</i>
Capítulos florais	26	528,09 ^a	18,51	0,00188 ^c
Capítulos florais	27	402,02 ^a	18,51	0,00247 ^c
Capítulos florais + água	26	7,50 ^b	18,51	0,11138 ^d
Capítulos florais + água	27	-	-	-
Capítulos florais + solução salina	26	0,020 ^b	18,51	0,89947 ^d
Capítulos florais + solução salina	27	-	-	-

$F_{crítico}$: valor obtido na literatura para um nível de confiança de 95%. ^a $F_{calculado} > F_{crítico}$ é significativo; ^b $F_{calculado} < F_{crítico}$ é não significativo; ^c $p < 0,05$ é significativo; ^d $p > 0,05$ é não significativo. **26**: Áreas absolutas obtidas no cromatograma CG-EM do composto acetato de *trans*-pinocarveíla. **27**: Áreas absolutas obtidas no cromatograma CG-EM do composto acetato de *cis*-isopinocarveíla.

Fonte: Elaborada pela autora.

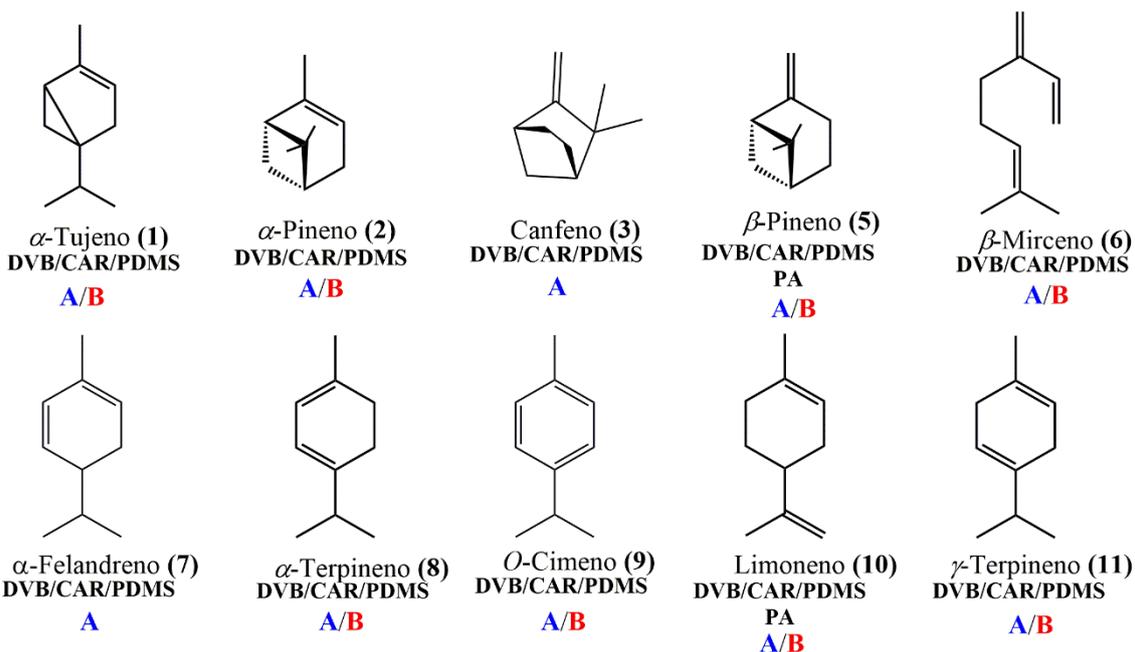
APÊNDICE BB - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA OS COMPOSTOS ACETATO DE *TRANS*-PINOCARVEÍLA E ACETATO DE *CIS*-ISOPINOCARVEÍLA PARA O QUIMIOTIPO B.

Amostra	MEFS	$F_{(calculado)}$	$F_{(crítico)}$	Valor- <i>p</i>
Capítulos florais	26	2858,24 ^a	18,51	0,00034 ^a
Capítulos florais	27	6865,11 ^a	18,51	0,00014 ^a
Capítulos florais + água	26	18,59 ^a	18,51	0,04979 ^a
Capítulos florais + água	27	42,55 ^a	18,51	0,02270 ^a
Capítulos florais + solução salina	26	61,56 ^a	18,51	0,01585 ^a
Capítulos florais + solução salina	27	887,12 ^a	18,51	0,00112 ^a

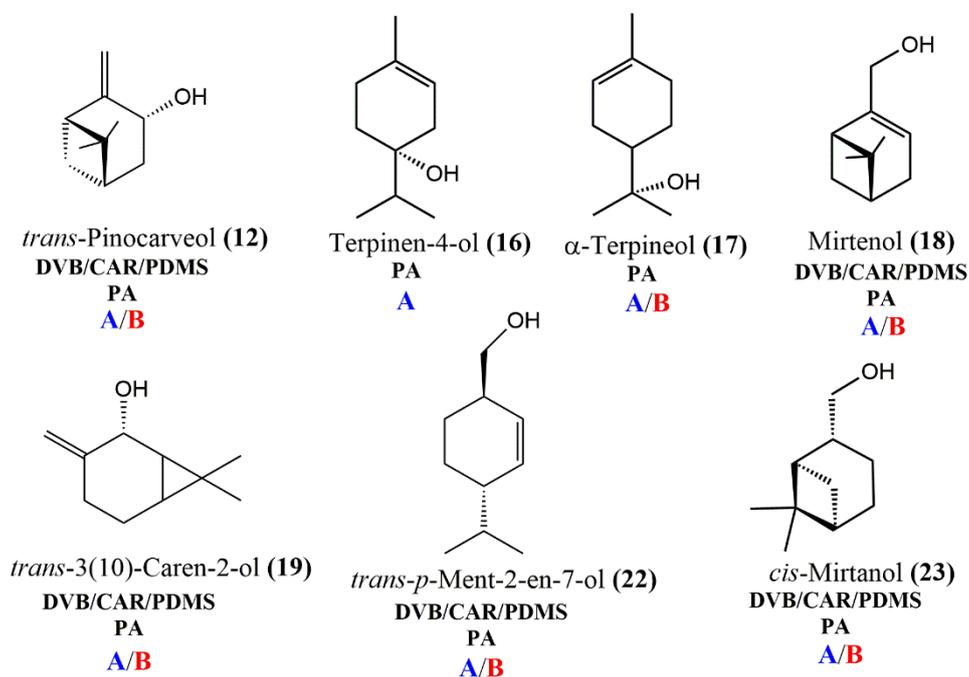
$F_{crítico}$: valor obtido na literatura para um nível de confiança de 95%. ^a $F_{calculado} > F_{crítico}$ é significativo; ^b $F_{calculado} < F_{crítico}$ é não significativo; ^c $p < 0,05$ é significativo; ^d $p > 0,05$ é não significativo. **26**: áreas absolutas obtidas no cromatograma CG-EM do composto acetato de *trans*-pinocarveíla; **27**: áreas absolutas obtidas no cromatograma CG-EM do composto acetato de *cis*-isopinocarveíla.

Fonte: Elaborada pela autora.

**APÊNDICE CC - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS ANÁLISES POR MEFS NOS CAPÍTULOS FLORAIS DE *E. viscosa* (CONTINUA).
MONOTERPENOS HIDROCARBONETOS**



MONOTERPENOS HIDROXILADOS



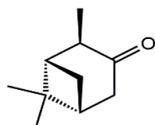
MEFS: Microextração em Fase Sólida;

DVB/CAR/PDMS: Divinilbenzeno/Carbowax/Polidimetilsiloxano;

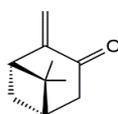
PA: Poliacrilato.

APÊNDICE CC - ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS ANÁLISE DE MEFS NOS CAPÍTULOS FLORAIS DE *E. viscosa* (CONCLUSÃO).

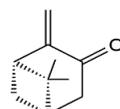
MONOTERPENOS CETONAS



trans-Pinanona (13)
DVB/CAR/PDMS
PA
A/B

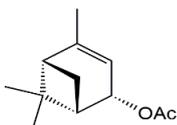


trans-Pinocarvona (14)
DVB/CAR/PDMS
PA
A

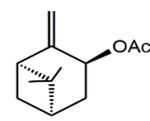


cis-Pinocarvona (15)
DVB/CAR/PDMS
PA
A

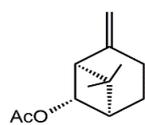
MONOTERPENOS ACETOXILADOS



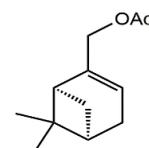
Acetato de verbenila (25)
DVB/CAR/PDMS
PA
A/B



Acetato de *trans*-pinocarveila (26)
DVB/CAR/PDMS
PA
A/B

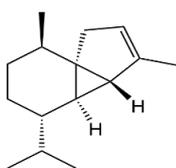


Acetato de *cis*-isopinocarveila (27)
DVB/CAR/PDMS
PA
A/B

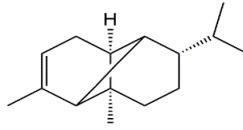


Acetato de mirtenila (28)
DVB/CAR/PDMS
PA
A/B

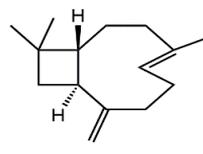
SESQUITERPENOS HIDROCARBONETOS E OXIGENADOS



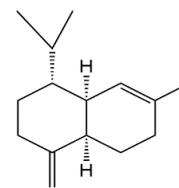
α -Cubebeno (29)
DVB/CAR/PDMS
A/B



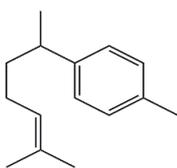
α -Copaeno (32)
DVB/CAR/PDMS
A/B



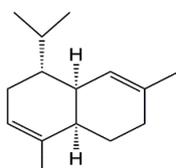
E-Cariofileno (35)
DVB/CAR/PDMS
PA
A



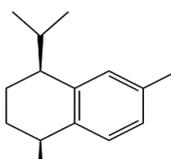
γ -Muuroлено (36)
DVB/CAR/PDMS
PA
A



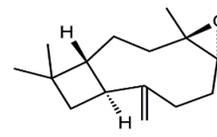
α -Curcumeno (37)
DVB/CAR/PDMS
PA
A



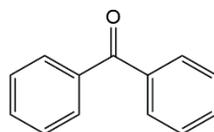
α -Muuroлено (38)
DVB/CAR/PDMS
PA
A/B



cis-Calameneno (39)
DVB/CAR/PDMS
PA
A



Óxido de cariofileno (41)
DVB/CAR/PDMS
PA
A/B



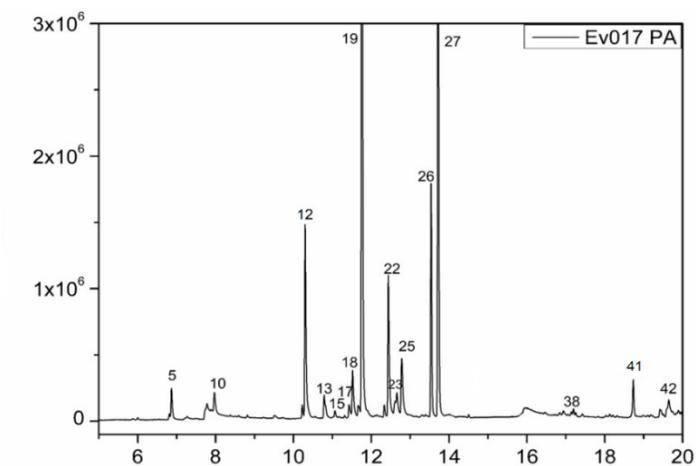
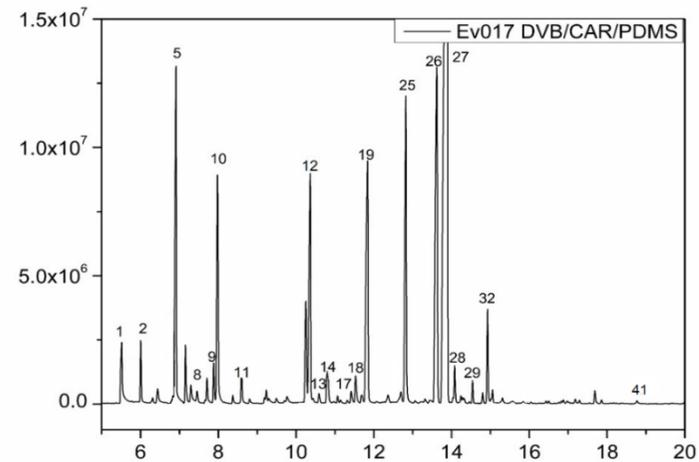
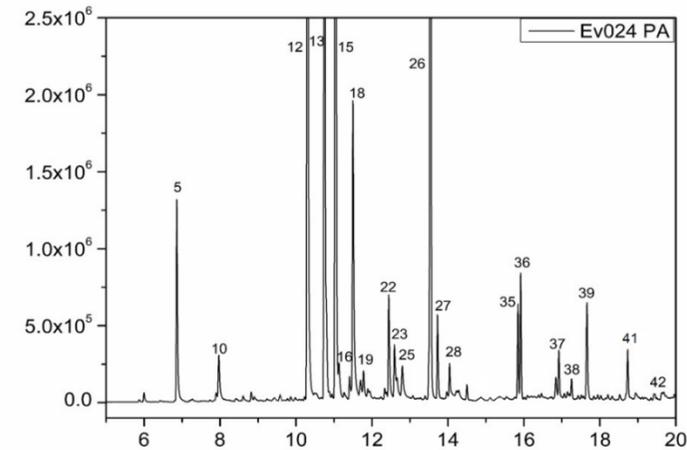
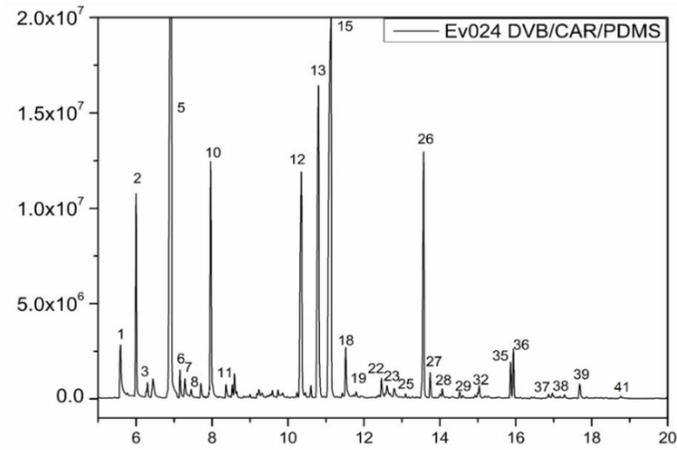
Benzofenona (42)
PA
A/B

MEFS: Microextração em Fase Sólida;

DVB/CAR/PDMS: Divinilbenzeno/Carbowax/Polidimetilsiloxano;

PA: Poliacrilato.

APÊNDICE DD - CROMATOGRAMAS MEFS DOS CAPÍTULOS FLORAIS ANALISADOS NAS FIBRAS DVB/CAR/PDMS E PA DO QUIMIOTIPO A (Ev024) E QUIMIOTIPO B (Ev017).

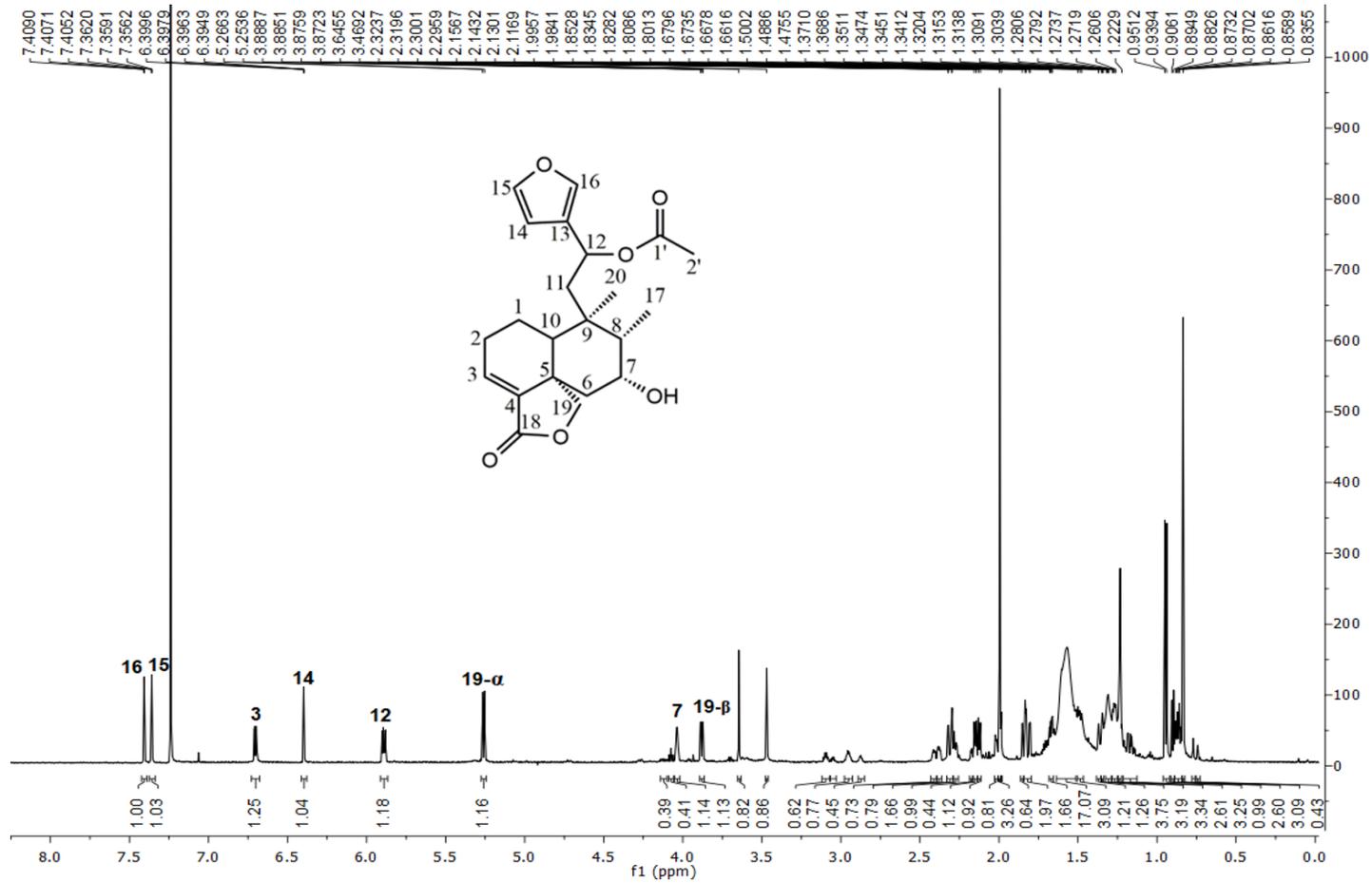


APÊNDICE EE - DADOS DE RMN 1D DE ¹H E ¹³C (600 E 150 MHz, CDCl₃) PARA A SALVISPLENDINA C, E COMPARAÇÃO COM DADOS DE RMN ¹H E ¹³C DA LITERATURA.

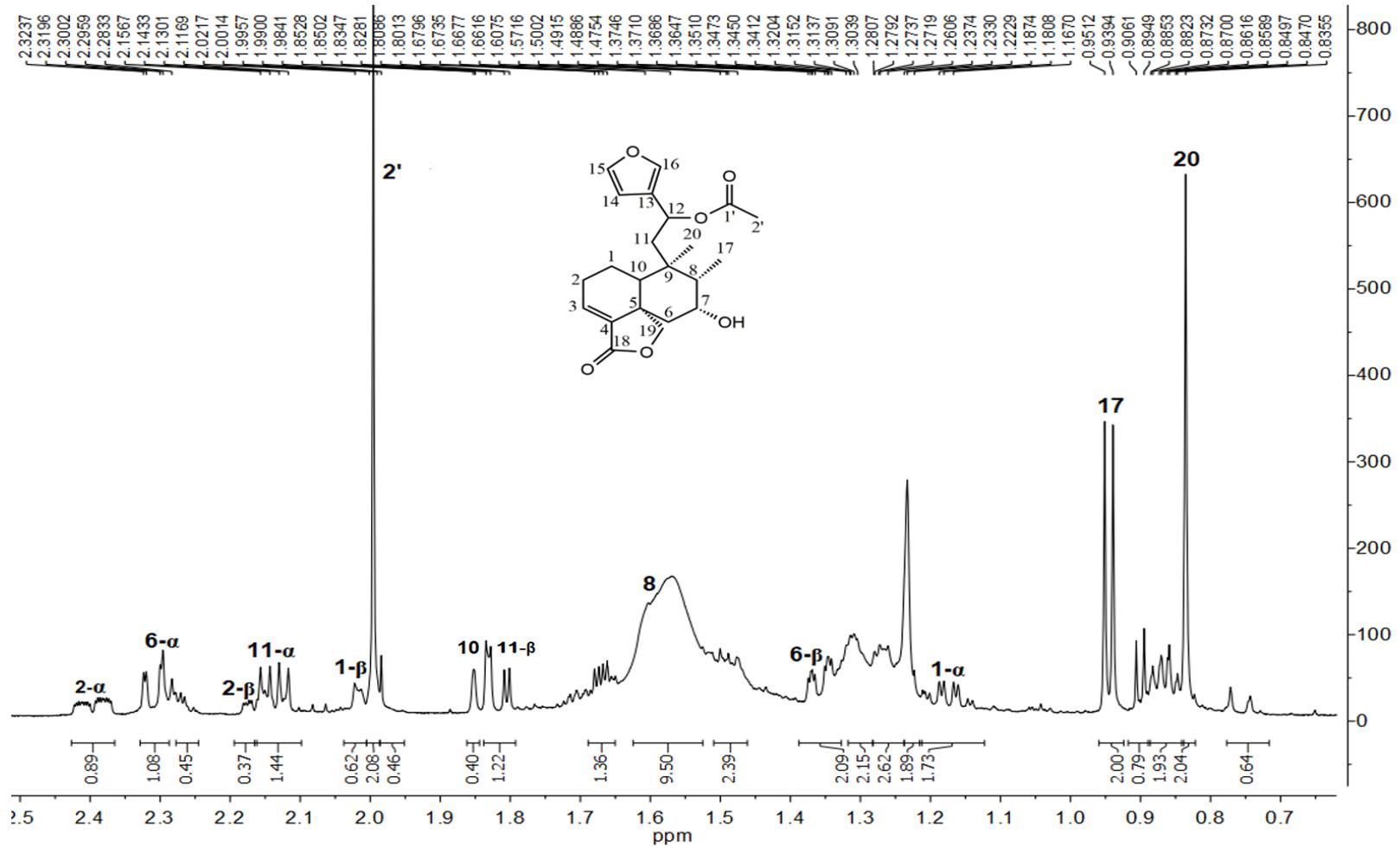
C	δ_H	δ_C	Lit* δ_C	Lit* δ_H
1	1,17 qd (<i>J</i> = 12,5; 4,0) 2,00 **	20,0	19,6	1,08 qd (<i>J</i> = 12,5; 4,0) 1,50 dddd (<i>J</i> = 12,5; 4,8; 2,0; 0,6)
2	2,35 dddd (<i>J</i> = 18,0; 7,5; 3,8; 2,0) 2,16 dddd (<i>J</i> = 18,0; 7,5; 3,8; 2,0)	27,7	27,2	2,28 dddd (<i>J</i> = 18,1; 7,4; 4,0; 2,2) 2,02 dddd (<i>J</i> = 18,1; 12,5; 4,8; 2,2)
3	6,7 dd (<i>J</i> = 7,5; 2,2)	135,1	135,2	6,68 dd (<i>J</i> = 7,4; 2,2)
4	-	139,3	138,8	-
5	-	45,2	44,9	-
6	2,31 dd (<i>J</i> = 14,1; 2,4) 1,39 ddd (<i>J</i> = 14,0; 3,6; 2,2)	40,3	40,2	2,31 dd (<i>J</i> = 14,1; 2,4); 1,39 ddd (<i>J</i> = 14,1; 3,6; 2,2)
7	4,05 ddd (<i>J</i> = 3,7; 3,6; 2,4)	72,6	72,5	4,08 ddd (<i>J</i> = 3,7; 3,6; 2,4)
8	1,62**	41,1	41,5	1,69 qd (<i>J</i> = 7,1; 3,7)
9	-	39,3	39,3	-
10	1,84 dd (<i>J</i> = 12,5; 0,8)	49,3	48,5	1,84 dd (<i>J</i> = 12,5; 0,6)
11	2,17 dd (<i>J</i> = 16,0; 8,2) 1,81 dd (<i>J</i> = 16,0; 3,6)	42,8	42,7	2,20 dd (<i>J</i> = 16,0; 8,2) 1,77 dd (<i>J</i> = 16,0; 3,2)
12	5,9 dd (<i>J</i> = 8,2; 3,2)	65,0	64,5	5,8 dd (<i>J</i> = 8,2; 3,2)
13	-	126,3	126,0	-
14	6,41 dd (<i>J</i> = 1,8; 0,8)	108,7	108,6	6,40 dd (<i>J</i> = 1,8; 0,9)
15	7,37 t (<i>J</i> = 1,8)	143,6	143,6	7,38 t (<i>J</i> = 1,8)
16	7,42 dd (<i>J</i> = 1,8; 0,9)	140,2	139,9	7,41 dd (<i>J</i> = 1,8; 0,9)
17	0,93 d (<i>J</i> = 7,1)	12,2	12,1	1,15 d (<i>J</i> = 7,1)
18	-	169,8	169,8	-
19	3,89 dd (<i>J</i> = 7,6; 2,2) 5,27 d (<i>J</i> = 7,5)	72,8	72,6	3,86 dd (<i>J</i> = 7,6; 2,2) 5,27 d (<i>J</i> = 7,6)
20	0,85 s	19,3	19,2	0,85 s
1'	-	170,2	170,2	-
2'	2,01 s	21,7	21,3	1,99 s

*Dados de RMN ¹H e ¹³C (300 e 100 MHz) CDCl₃ (FONTANA; SAVONA; RODRÍGUEZ, 2006); ** Sinal sobreposto.

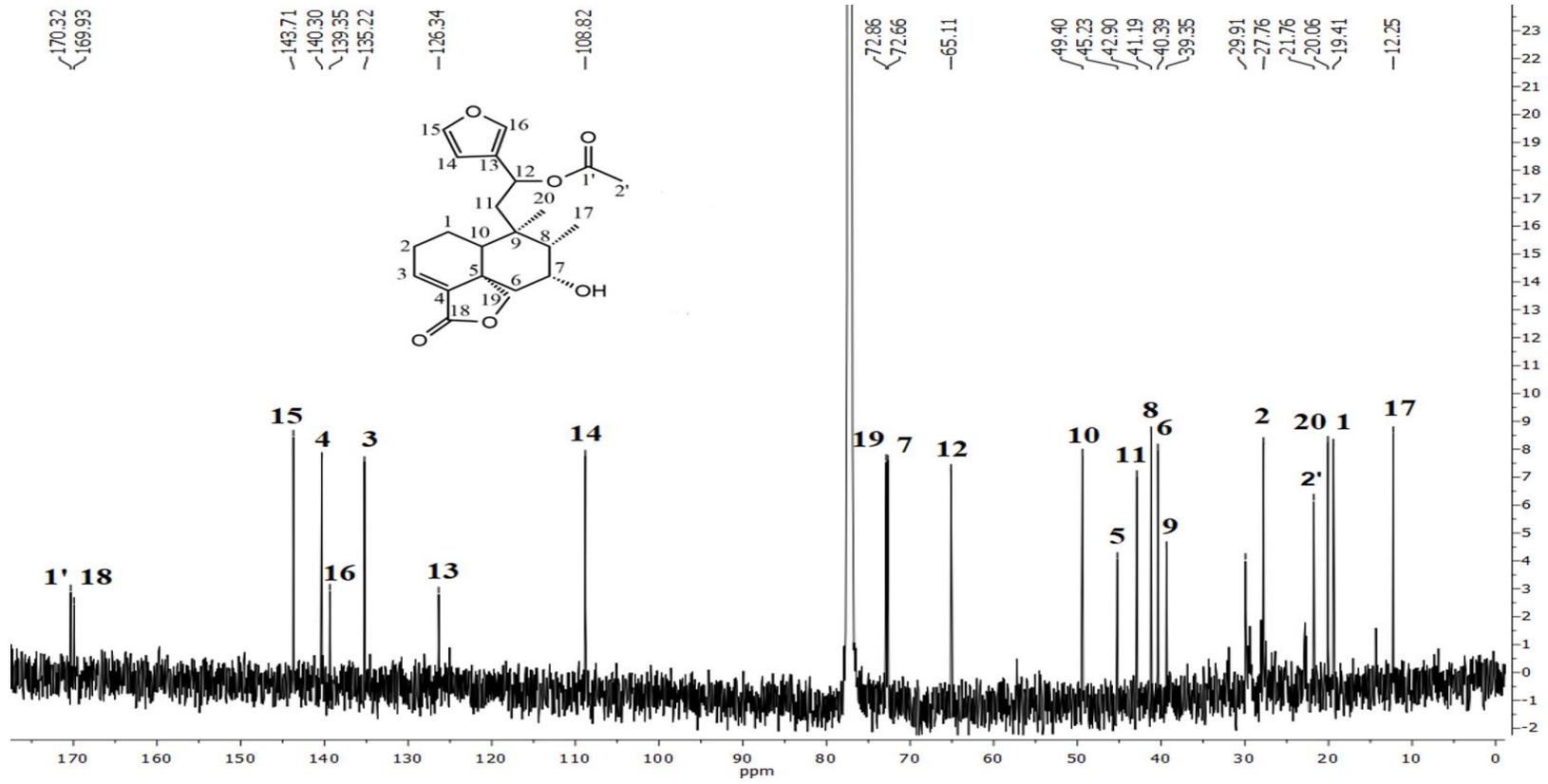
APÊNDICE FF - ESPECTRO DE RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) DE SALVISPLENDINA C.



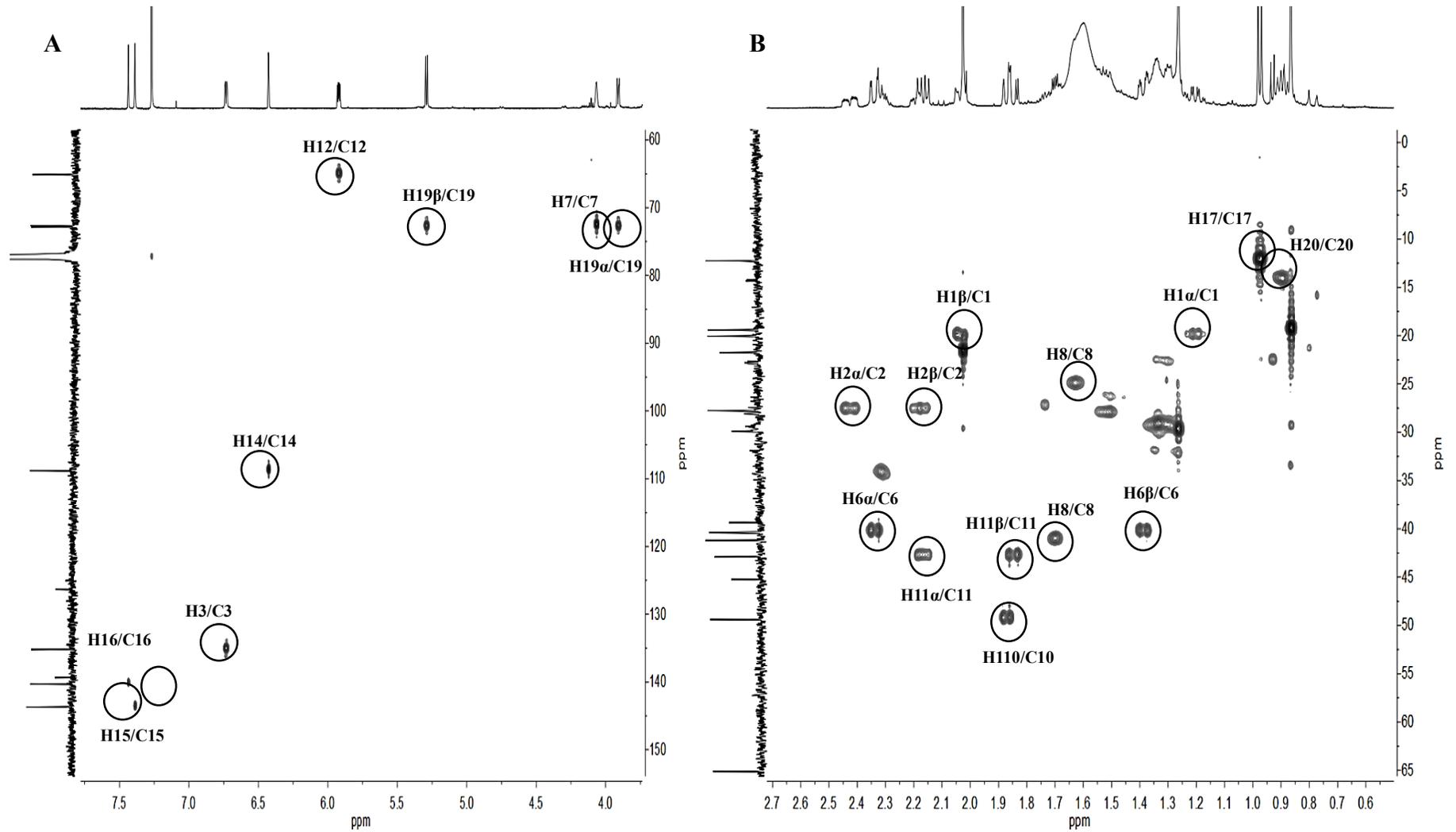
APÊNDICE GG - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) DE SALVISPLENDINA C.



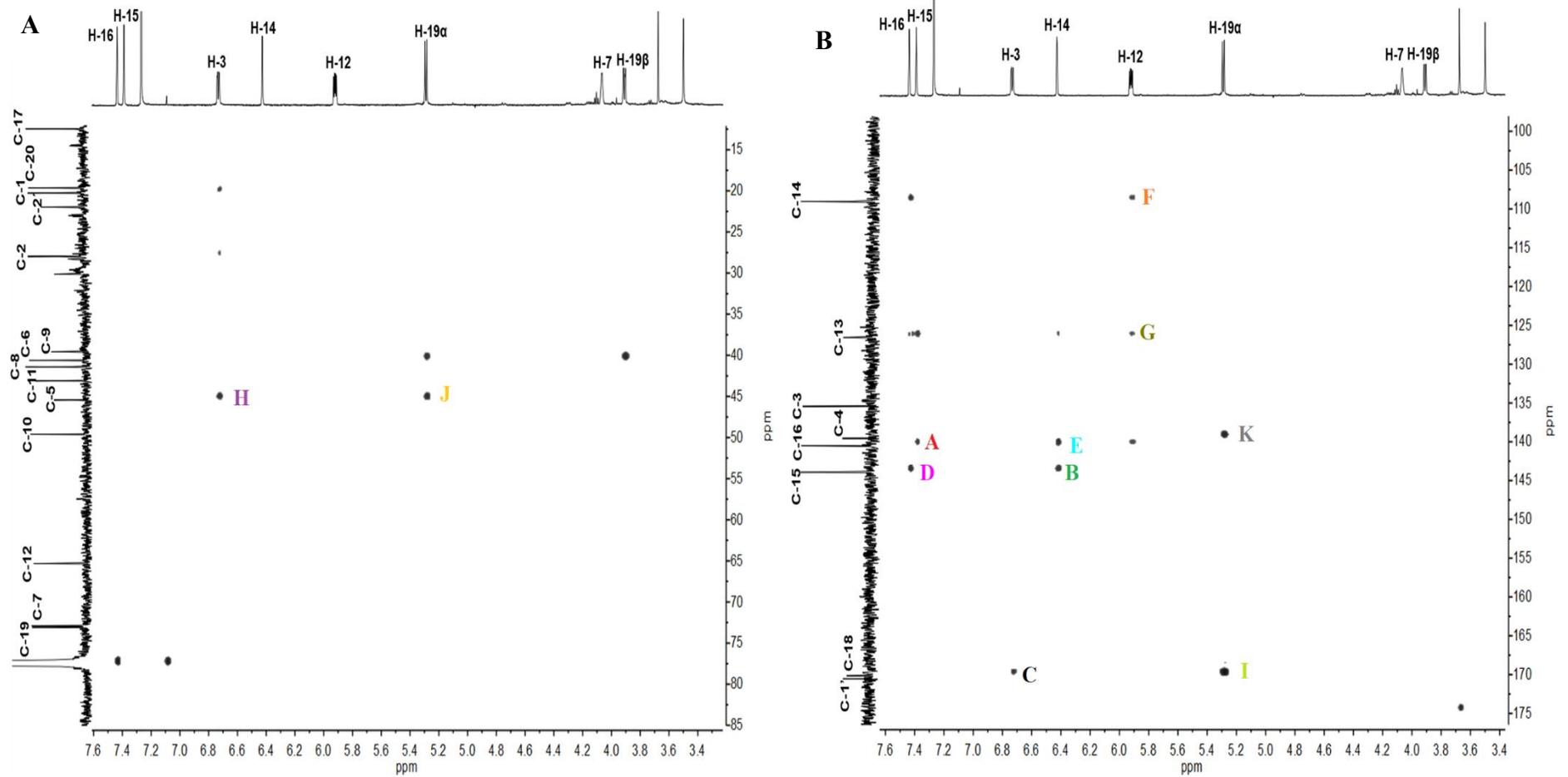
APÊNDICE HH -ESPECTRO DE RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150MHz) DE SALVISPLENDINA C.



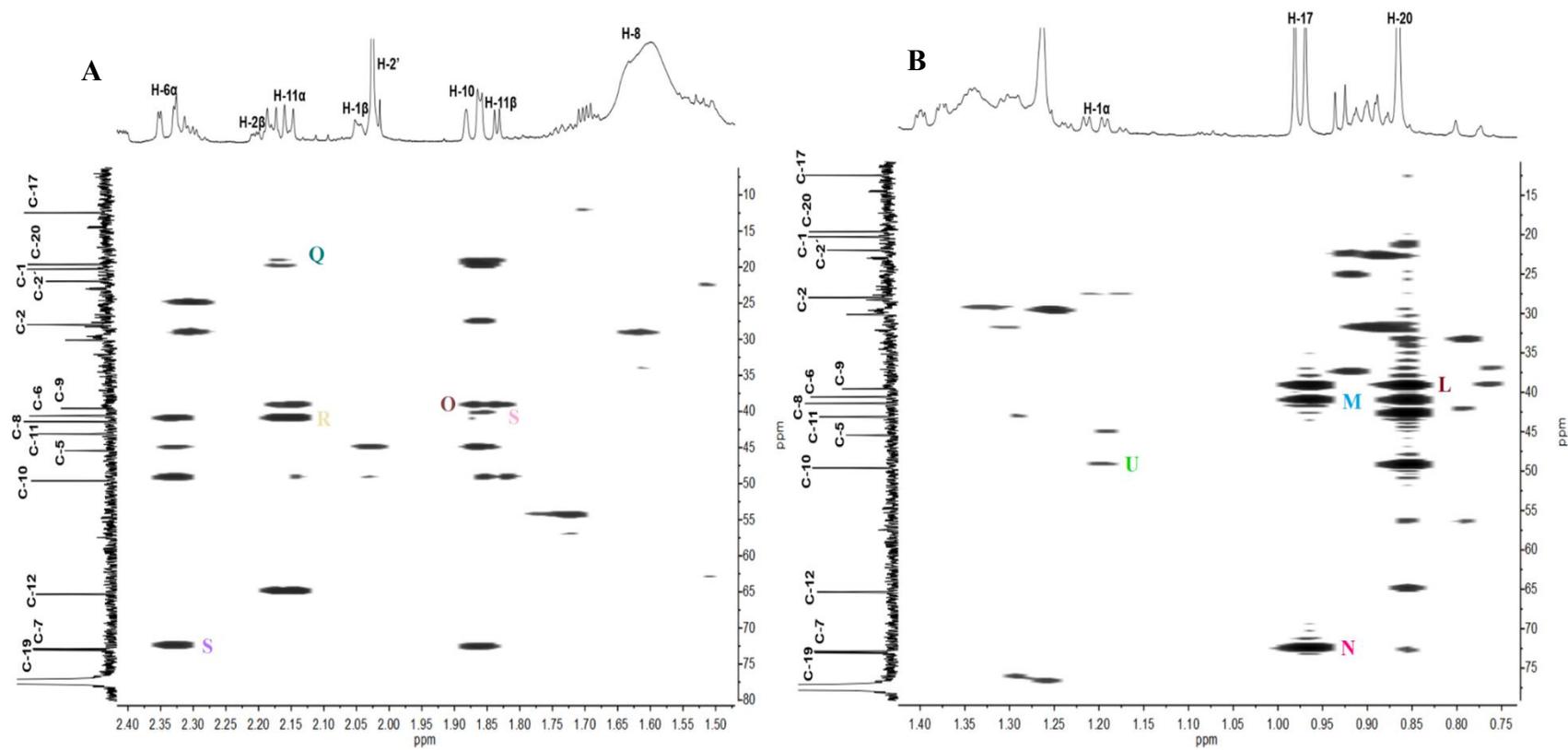
APÊNDICE II - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HSQC (600 x 150 MHz, CDCl_3) DE SALVISPLENDINA C: A: (δ_{H} 3,7-7,7 x δ_{C} 60-150); B: (δ_{H} 0,5-2,7 x δ_{C} 0-65).



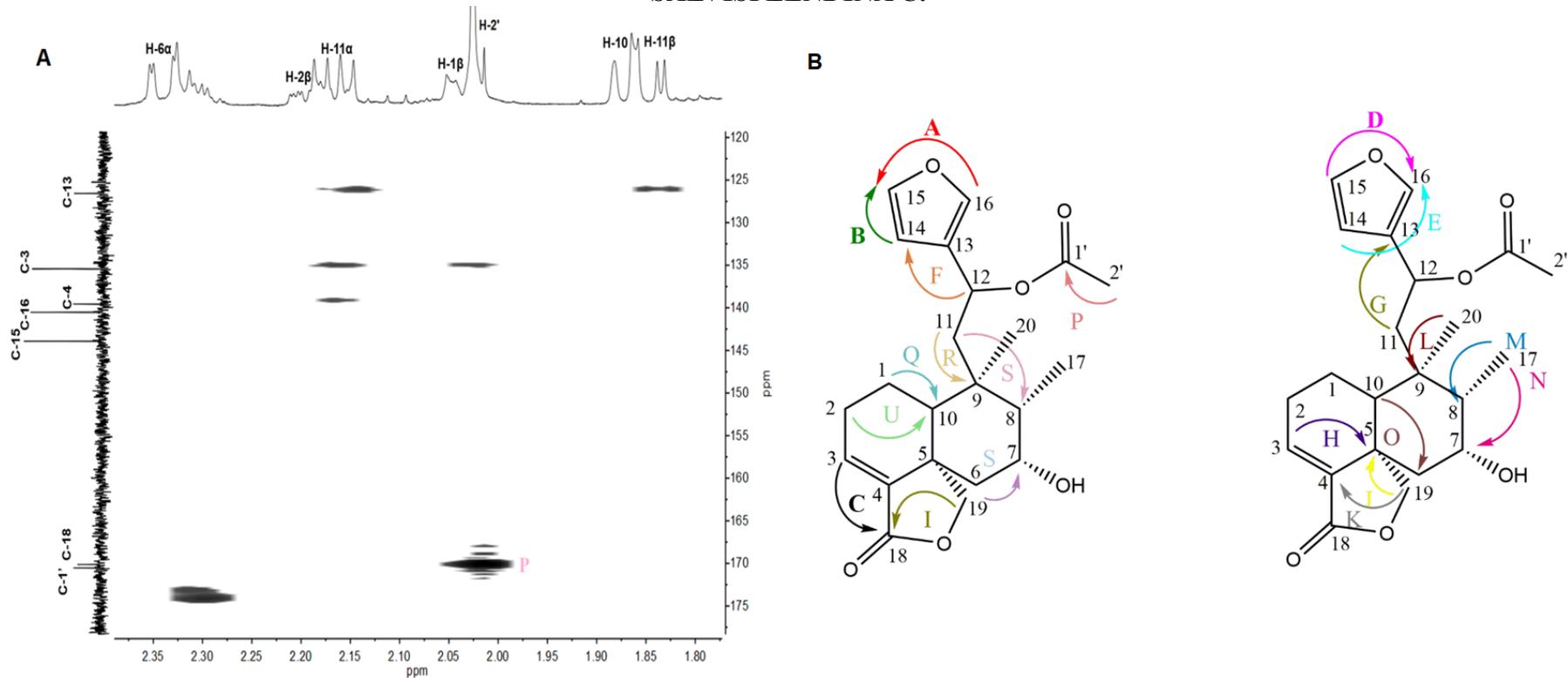
APÊNDICE JJ - EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CDCl_3) DE SALVISPLENDINA C: A: (δ_{H} 3,3-7,6 x δ_{C} 15-85); B: (δ_{H} 3,4-7,6 x δ_{C} 100-175).



APÊNDICE KK - A: EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CDCl_3) DE SALVISPLENDINA C: A: (δ_{H} 1,5-2,4 x δ_{C} 10-80); B: (δ_{H} 0,75-1,4 x δ_{C} 15-78).



APÊNDICE LL - A: EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN ^1H , ^{13}C HMBC (600 x 150 MHz, CDCl_3) DE SALVISPLENDINA C (δ_{H} 1,8-2,4 x δ_{C} 120-178), B: ALGUMAS CORRELAÇÕES OBSERVADAS NO ESPECTRO DE ^1H , ^{13}C HMBC (600 X 150 MHz, CDCl_3) DE SALVISPLENDINA C.



ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 166 (2019) 155–163



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

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



Development of a UPLC-ESI-MS method for simultaneous determination of flavonoids and diterpenes in *Egletes viscosa* (L.) Less herbal products

Kaline Rodrigues Carvalho^{a,b}, Guilherme Julião Zocolo^a, Rita de Cássia Alves Pereira^a, Fátima Itana Chaves Custódio Martins^{a,b}, Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro^a, Edy Sousa de Brito^a, Edilberto Rocha Silveira^a, Kirley Marques Canuto^{a,*}

^a Embrapa Agroindústria Tropical, 60511-110, Fortaleza, CE, Brazil

^b Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Cx Postal 12.200, 60021-940, Fortaleza, CE, Brazil

Abstract

Egletes viscosa (L.) Less (Asteraceae) is a tropical aromatic herb whose flower buds are used for gastrointestinal disorders. Its gastroprotective properties have been attributed to the flavonoid ternatin and the furan diterpenes tanabalin and centipedic acid. The aim of this study was to develop a method of ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization and mass spectrometry (UPLC-ESI-MS) for identifying the constituents from *E. viscosa* flower buds as well as quantifying its bioactive compounds in herbal products. Infusions and tincture from wild and commercial *E. viscosa* materials were directly injected on a UPLC-quadrupole-time-of-flight system (UPLC-q-TOF). Afterwards, reference standards were used to quantify ternatin, tanabalin and centipedic acid in these samples, employing a UPLC-single quadrupole system set up for positive mode and Selected Ion Monitoring (SIM). Seventeen compounds were identified, including caffeic acid derivatives, flavonoids and diterpenes, from which seven have been reported for the first time in this specie. The quantification method showed good linearity ($R > 0.99$), accuracy, precision and sensitivity. The intra-day and inter-day precisions presented relative standard deviations inferior to 6.04 and 8.78%, respectively. The recoveries of all the analytes varied 82.25–117.87%. The limits of detection and quantification ranged between 10–25 g/L and 25–75 g/L, respectively. For the samples, the contents of ternatin, tanabalin and centipedic acid ranged from 0.89 to 8.03 mg/L, 0.84–16.8 mg/L and 3.21–16.8 mg/L, respectively. The method demonstrated to be rapid, sensitive and reliable for the quality control of *E. viscosa*-based products, besides being applicable to other plant extracts containing flavonoids and diterpenes.

ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO NA FOOD RESEARCH INTERNATIONAL

Food Research International 138 (2020) 109759

**NIR and ^1H qNMR methods coupled to chemometrics discriminate the chemotypes of the gastroprotective herb *Egletes viscosa***

Kaline R. Carvalho^{a,c}, Ana Sheila Q. Souza^a, Elenilson G. Alves Filho^b, Lorena Mara A. Silva^a, Ebenézer O. Silva^a, Rita de Cássia A. Pereira^a, Guilherme J. Zocolo^a, Edy S. de Brito^a, Edilberto R. Silveira^c, Kirley M. Canuto^{a,*}

^a Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Brazil

^b Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bloco 858, 60440-900 Fortaleza, CE, Brazil

^c Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bloco 935, 60021-940 Fortaleza, CE, Brazil

Abstract

Egletes viscosa is a Brazilian medicinal herb consumed as flower bud tea due to its gastroprotective properties. This plant possesses two essential oil-based chemical varieties: *trans*-pinocarveyl acetate-rich chemotype A and *cis*-isopinocarveyl acetate-rich chemotype B. Therefore, we developed two simple, fast and reliable methods for discrimination of *E. viscosa* chemotypes using NIR and ^1H qNMR spectroscopies combined with the chemometrics tools (iPLS and PLS-DA). Both methods showed high sensitivity, precision and specificity in the cross-validation tests. The NIR method has the advantages of being non-destructive and analyzable by portable devices, enabling its application for field and industrial evaluations. Meanwhile, the ^1H qNMR method allows the quantification of the bioactive components.