



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

ESTUDO METABOLÔMICO DO GÊNERO *Copaifera* - FABACEAE

DAVI SANTOS OLIVEIRA

MANAUS

2019

DAVI SANTOS OLIVEIRA

ESTUDO METABOLÔMICO DO GÊNERO *Copaifera* - FABACEAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química, na linha de Pesquisa de Produtos Naturais e Biomoléculas.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

Coorientadora: Profa. Dra. Larissa Silveira Moreira Wiedemann

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

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

Oliveira, Davi Santos
O48e Estudo metabolômico do gênero Copaifera - Fabaceae / Davi Santos Oliveira. 2019
130 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Coorientadora: Larissa Silveira Moreira Wiedemann
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Copaiibeiras. 2. Metaboloma. 3. Espectrometria de massas. 4. Órgãos vegetais. 5. Metabólitos. I. Veiga Júnior, Valdir Florêncio da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico esse trabalho a toda a minha família, em especial a minha mãe Maria Cristina de Sousa e o meu falecido pai Joaquim dos Santos Oliveira por todo o apoio e educação prestados em vida. Tudo o que sou e todas as minhas conquistas, devo a eles, que me ensinaram e lutar e conquistar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Nesse pequeno espaço tentarei demonstrar um pouco da minha gratidão por esses dois anos, repleto de ensinamentos, força, contribuição, companheirismos e parcerias. É muito difícil agradecer a todos sem esquecer ninguém. Agradeço:

Agradeço a Deus, por toda luz e sabedoria nessa trajetória, pela saúde e força de vontade para chegar ao fim de mais essa jornada.

À minha família, em especial aos meus pais, minha mãe Maria Cristina de Sousa e ao meu falecido pai Joaquim dos Santos Oliveira, por todos os ensinamentos, apoio e educação dados em vida.

À vida que me ensinou a navegar por águas prósperas e tranquilas.

Ao meu orientador de PIBITI, PIBIC e Dissertação, Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior por ser meu “segundo pai” e “pai científico” durante esses quase quatro anos. Obrigado pelos desafios, que não foram poucos, pela confiança, ensinamentos e por acreditar no meu potencial. Obrigado por toda orientação e apoio nessa caminhada.

À doutoranda Ananda Antônio, sua amiga Laise Pimentel e a minha coorientadora Profa. Dra. Larissa Silveira por toda a paciência e companheirismo, além de todos os ensinamentos e o acompanhamento na elucidação dos dados multivariados. Obrigado por sempre estarem por perto.

Ao melhor grupo do mundo, embora poucos restaram, mas ainda somos o Q-Bioma, a todos os membros. Aos membros atuais Isadora, Glaucia, Emily, Ananda, Milena, Simone, Maurício, Steve, Larissa Brito. Aos antigos, como a Larissa Sousa, Leandro Lima e Yasmin Cunha. Obrigado por todos os momentos de alegrias e desesperos desde a iniciação científica até o mestrado.

Agradeço em especial as “abigas” Glaucia, Milena, Isadora pela viagem mais inesperada da minha vida, foram 20 dias de muitas risadas, sacrifícios, trabalho duro, brigas e muita aprendizagem, sem vocês, acredito que jamais seria da mesma forma, a viagem ao Rio de Janeiro vai ficar pra sempre em minha memória. Agradeço especialmente as abigas Glaucia e a Milena, sem vossos apoios e ajudas nada aconteceria, sou muito grato por tudo, fiquei com o paladar mal-acostumado, mas com vocês, aprendi a não estragar um carbonara e a ser paciente com certeza. A todas, agradeço por tornarem aqueles cafés das tardes mais alegres e informativos, sobre artigos não discutíamos, mas a fofoca midiática estava sempre em dia, e também nas dificuldades e dramas na vida acadêmica, sempre aconselhando e mostrando o melhor caminho.

Aos amigos de graduação na UFAM, a Priscila Duarte, Priscila Brasil, Jean Michel, Nilton Ortiz, Rosane Binda e Gian Pessoa.

Agradeço em especial a Priscila Duarte, irmã e companheira de graduação que a UFAM me deu com tanto amor e carinho, obrigado pelos diversos momentos de alegria e o apoio nos momentos difíceis, aos quais crescemos juntos e nos fizeram viver como

indivíduos protagonistas de nossas próprias histórias, nunca ninguém me levou pra tantos almoços na vida, e nem me aturou tanto, obrigado pela incrível amizade.

Agradeço em especial também a Priscila Brasil, os nossos destinos se cruzaram ao final da graduação e logo se tornou companheira de mestrado, inclusive da mesma linha de pesquisa, a qual se mostrou indispensável nos estudos acadêmicos e uma fiel amiga escudeira e pau pra toda obra, agradeço por todos os ensinamentos e conselhos nos intermináveis telefonemas, que não foram poucos, e nas angústias e alegrias da vida acadêmica, obrigado pela incrível amizade.

Aos amigos que a vida me deu Adriel Ramos, Chiara Glebova e Daniel Renne. Obrigado por sempre estarem presentes, apoiando, sorrindo e encorajando durante todo esse processo de crescimento profissional.

Aos meus companheiros de mestrado, que de alguma forma contribuíram nessa caminhada desde as disciplinas até a finalização desse projeto.

À Central Analítica da UFAM pela contribuição com os experimentos espectrométricos preliminares.

Ao Instituto Militar de Engenharia do Rio de Janeiro que me acolheu e recepcionou durante os trabalhos de intercâmbio.

Ao Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico do Instituto de Química da UFRJ, em especial ao coordenador Prof. Dr. Henrique Marcelo e ao técnico responsável Dr. Gustavo Ramalho pela parceria e contribuição com os experimentos espectrométricos de alta resolução.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e o Jardim Botânico do Rio de Janeiro pela prestação de serviços.

Aos professores, que são verdadeiros heróis e que de alguma forma contribuíram para meu desenvolvimento intelectual. Muito obrigado pela dedicação e por todos os ensinamentos.

A CAPES pela bolsa concedida, e as outras agências (CNPq e FAPEAM) de fomento, que contribuíram para a manutenção dos laboratórios de pesquisa.

“Existe uma força mais poderosa que a eletricidade
o vapor e a energia atômica: à vontade.”

Albert Einstein

RESUMO

As copaiibeiras como são conhecidas às espécies do gênero *Copaifera* (Fabaceae) são muito apreciadas na medicina popular e na fitoterapia, principalmente, pela utilização do óleo-resina de copaíba que possui propriedades terapêuticas, bem como os chás das folhas e cascas de copaíba são apreciados pelas populações tradicionais da Amazônia e do cerrado brasileiro. Embora o gênero *Copaifera* seja bastante estudado fitoquimicamente e farmacologicamente, principalmente pelo óleo-resina, a pesquisa de novos recursos farmacológicos ainda se limitam a poucas espécies, como a espécie endêmica do cerrado *Copaifera langsdorffii*, seus estudos se direcionam, principalmente nas folhas, assim outras partes vegetais (cascas, galhos, sementes e flores) são objetos de pouca ou nenhuma pesquisa. Logo, a metabolômica não direcionada buscou, pela técnica de UHPLC-HRMS, analisar qualitativamente o maior quantidade de metabólitos detectáveis no material de estudo e estabelecer similaridades e diferenças por Análise de Componentes Principais (PCA). O objetivo do trabalho foi explorar e descrever as características do metaboloma das principais espécies (*C. langsdorffii* Desf., *C. multijuga* Hayne, *C. trapezifolia* Hayne, *C. lucens* Dwyer e *C. venezuelana* Harms & Pittier) do gênero *Copaifera*. Por meio de padrões de referência, dados espectrométricos de MS², dados da literatura científica e bancos de dados virtuais HMDB e MoNA, os perfis metabólicos das espécies foram investigados. Foram detectados 47 metabólitos, entre diversas classes metabólicas, como derivados de ácido benzoico e ácido cinâmico, ácidos graxos, ácidos diterpenos, flavonoides agliconas, flavonoides glicosilados, um glicosídeo fenólico, ácidos galoilquínicos e taninos condensados. A PCA observou-se uma forte distinção no perfil metabólico das folhas e cascas das espécies. As folhas distinguiram-se, principalmente, pela presença dos ácidos galoilquínicos di- e tri-substituídos e flavonoides glicosilados (derivados de quercetina e canferol) e nas cascas foram detectados principalmente, taninos condensados (derivados de catequina) nas formas de dímero e trímero. Os galhos apresentaram composição química intermediária entre as folhas e as cascas, principalmente devido à proximidade e extensão entre os órgãos vegetais. As sementes e flores de *C. langsdorffii* apresentaram composições químicas divergentes em relação aos demais órgãos vegetais, trata-se de composições com características únicas dos órgãos e necessitam de maior atenção fitoquímica. Concluiu-se que a abordagem metabolômica não direcionada por UHPLC-HRMS é uma excelente ferramenta de exploração metabólica que possibilitou o perfilamento metabólico e a detecção de 47 metabólitos nos órgãos vegetais (folhas, cascas, galhos, sementes e flores) das espécies e por meio da PCA os metabólitos foram mapeados e os ácidos galoilquínicos (di-, tri-substituídos) foram indicadas como biomarcadoras das folhas e os taninos condensados (dímero e trímero) das cascas.

Palavras-chave: Copaiibeiras, metaboloma, espectrometria de massas, órgãos vegetais, metabólitos.

ABSTRACT

The copaibeiras, as they are known to the species of the genus *Copaifera* (Fabaceae, Caesalpinioideae), are much appreciated in folk medicine and phytotherapy, especially for the use of copaiba oil-resin, which has therapeutic properties, as well as the leaves teas and barks of copaiba. by the traditional populations of the Amazon and the Brazilian savannah.. Although the genus *Copaifera* is widely studied phytochemically and pharmacologically, mainly due to oil-resin, the search for new pharmacological resources is still limited to a few species, such as the endemic savannah *Copaifera langsdorffii*, studies are mainly directed to the leaves, as well as others. Vegetable parts (barks, branches, seeds and flowers) are the subject of little or no research. Therefore, the non-directed metabolomics sought, through the UHPLC-HRMS technique, to qualitatively analyze the largest number of detectable metabolites in the study material and to establish similarities and differences by Principal Component Analysis (PCA). The objective of this work was to explore and describe the characteristics of the metabolome of the main species (*C. langsdorffii* Desf., *C. multijuga* Hayne, *C. trapezifolia* Hayne, *C. lucens* Dwyer e *C. venezuelana* Harms & Pittier) of the *Copaifera* genus. With the help of reference standards, MS² spectrometric data, data from the scientific literature and virtual databases HMDB and MoNA, the metabolic profiles of species were investigated. 47 metabolites were detected among various metabolic classes, such as benzoic acid and cinnamic acid derivatives, fatty acids, diterpene acids, aglycone flavonoids, glycosylated flavonoids, a phenolic glycoside, galloylquinic acids and condensed tannins. PCA observed a strong distinction in the metabolic profile between the leaves and bark extracts of *Copaifera* species. The leaves were distinguished mainly due to the presence of di- and tri-substituted galloylquinic acids and glycosylated flavonoids (quercetin and canferol derivatives) and in the barks were detected mainly condensed tannins (catechin derivatives) in the dimer and trimer forms. . The branches showed intermediate chemical composition between the leaves and bark, mainly due to the proximity and extension between the plant organs. The seeds and flowers of *C. langsdorffii* presented different chemical compositions in relation to the other vegetal organs, they are compositions with unique organ characteristics and need more phytochemical attention. It was concluded that the UHPLC-HRMS non-directed metabolomic approach is an excellent metabolic exploration tool that enabled the metabolic profiling and the detection of 47 metabolites in the plant organs (leaves, barks, branches, seeds and flowers) of species and by PCA the metabolites were mapped and the galloylquinic (di-, tri-substituted) acids were indicated as leaves biomarkers and the condensed tannins (dimer and trimer) of the barks of species.

Keywords: Copaibeiras, metabolome, mass spectrometric, plant organs, metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma geral da metodologia empregada.	34
Figura 2. Cromatogramas dos padrões de referência analisados.....	46
Figura 3. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 137,023.....	48
Figura 4. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 153,018.....	48
Figura 5. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 163,039.....	49
Figura 6. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 179,034.....	49
Figura 7. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 181,050.....	50
Figura 8. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 165,055.....	51
Figura 9. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 201,112.....	51
Figura 10. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 261,135.....	52
Figura 11. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 263,129.....	52
Figura 12. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 303,196.....	53
Figura 13. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 317,212.....	53
Figura 14. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 319,228.....	54
Figura 15. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 345,149.....	55
Figura 16. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 347,186.....	55
Figura 17. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 269,045.....	56
Figura 18. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 269,045.....	57
Figura 19. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 271,061.....	58
Figura 20. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 285,040.....	58
Figura 21. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 301,035.....	59
Figura 22. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 431,098.....	60
Figura 23. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 433,079.....	60
Figura 24. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 447,093.....	61
Figura 25. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 447,094.....	62
Figura 26. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 461,109.....	62
Figura 27. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 463,087.....	63
Figura 28. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 473,109.....	64
Figura 29. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 473,167.....	65
Figura 30. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 343,066.....	66
Figura 31. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 357,155.....	67
Figura 32. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 495,078.....	67

Figura 33. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 523,110.....	68
Figura 34. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 509,093.....	69
Figura 35. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 661,104.....	70
Figura 36. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 675,120.....	70
Figura 37. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 647,089.....	71
Figura 38. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 689,136.....	72
Figura 39. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 561,148.....	73
Figura 40. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 833,208.....	73
Figura 41. Regiões de detecção das classes metabólicas nos extratos de <i>Copaifera</i>	80
Figura 42. Cromatograma (3-5,70 min) do extrato em MeOH das folhas de <i>C. trapezifolia</i> . .	81
Figura 43. Gráfico <i>score plot</i> 3D ilustrando a combinação das PC 1, 2 e 3: A-Agrupamentos por órgãos vegetais; B-Agrupamentos por espécies.....	90
Figura 44. Cromatogramas em <i>Base Peak</i> de 1-GCM e 2-GCM (TR: 7,5-8,6 min).....	91
Figura 45. Cromatogramas em <i>Base Peak</i> de 5-CCV e 3-CCM (TR: 3-6 min).....	91
Figura 46. Cromatograma em <i>Base Peak</i> de 6-SCLS (TR: 4,5-9 min).	92
Figura 47. Gráfico <i>score plot</i> 2D ilustrando a combinação das PC4 x PC2.....	92
Figura 48. Cromatogramas em <i>Base Peak</i> de 2-FCM, 9-FCLS, 10-FCT e 11-FCL.....	93
Figura 49. Gráficos de <i>score plot</i> 2D ilustrando as combinações A (PC 6 x PC 1) e B (PC 5 x PC1).....	94
Figura 50. Cromatogramas em <i>Base Peak</i> do Grupo 1 (7-CCLS; 12-CCL) e Grupo 2 (3-CCM; 5-CCV) (TR: 3-8,8 min).....	95
Figura 51. Cromatograma em <i>Base Peak</i> de 8-FICLS (TR: 2-9 min).....	96
Figura 52. Gráficos <i>score plot</i> 3D ilustrando a combinação das PC's 1, 2 e 3: A-Agrupamentos por órgãos vegetais; B-Agrupamentos por espécies.	97
Figura 53. Cromatograma em <i>Base Peak</i> de 1-GCM e 2-FCM (TR: 7,6-9 min).....	98
Figura 54. Cromatogramas em <i>Base Peak</i> de 5-CCV e 3-CCM (TR: 2,9-7 min).....	99
Figura 55. Gráfico 2D ilustrando a combinação das PC 4 x PC 2.	99
Figura 56. Cromatogramas em <i>Base Peak</i> de 4-GCV, 3-CCM, 5-CCV e 7-CCLS (TR: 3,5-5,25 min).....	100
Figura 57. Cromatogramas em <i>Base Peak</i> de 2-FCM, 10-FCT e 11-FCL (TR: 2,5-8,8 min).	101
Figura 58. Gráficos 2D ilustrando as combinações A (PC 6 e PC 2) e B (PC 5 e PC 2).	102
Figura 59. Cromatogramas em <i>Base Peak</i> de 6-SCLS (TR: 7,6-9 min).	102
Figura 60. Cromatogramas em <i>Base Peak</i> de 8-FICLS e 12-CCL (TR: 6,8-9 min).	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formula molecular (FM), metabólitos detectados, tempos retenção (TR's) médio e variação, íons precursores (m/z) e íons fragmentos MS ²	75
Tabela 2. Relação dos metabólitos detectados nos extratos dos órgãos vegetais das espécies de <i>Copaifera</i> , tempos retenção (TR's) médio e variação (triplicata), íons precursores (m/z).....	83
Tabela 3. Relação das PCs em acordo com a variância explicada.	90
Tabela 4. Relação dos picos cromatográficos mais influentes nas amostras 2-FCM, 9-FCLS, 10-FCT, 11-FCL.	93
Tabela 5. Relação dos picos cromatográficos mais influentes nas amostras 7-CCLS e 12-CCL.	95
Tabela 6. Relação dos picos cromatográficos mais influentes na amostra 8-FICLS.....	95
Tabela 7. Relação das PCs em acordo com a variância explicada.	97
Tabela 8. Relação dos picos cromatográficos mais influentes nas amostras 2-FCM, 10-FCT, 11-FCL.	100
Tabela 9. Relação dos picos cromatográficos exclusivos da 6-SCLS com tempos de retenção, áreas relativas e metabólitos sugeridos.....	103
Tabela 10. Relação dos picos cromatográficos exclusivos da 8-FICLS com tempos de retenção, áreas relativas e íons-base.	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Relação das espécies, regiões coletadas e datas das coletas.....	35
Quadro 2. Partes vegetais adquiridas para o estudo.	35
Quadro 3. Relação de padrões utilizados como referência para as análises em UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS.....	35
Quadro 4. Banco de Dados dos metabólitos levantados no gênero <i>Copaifera</i>	39

LISTA DE ABREVIACÕES

MPa – MegaPascal

MS – *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

MS² – *Tandem Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas em Tandem)

UV – Radiação ultravioleta

min – Minutos

mLmin⁻¹ – Mililitro por minuto

% - Porcentagem

≥ - Maior igual

csv. - *Comma-Separated Values* (Valores Separados por Vírgula)

TR – Tempo de Retenção

AR – Área relativa

PCA – *Principal Component Analysis* (Análise de Componentes Principais)

CP – Componentes principais

u – Unidade de massa atômica

NI – Não identificado

Ga – Grupo galoil

MGa – Grupo 3-*O*-metil-galoil

HMDA - *Human Metabolome Database* (Banco de Dados Metaboloma Humano)

MoNA – *MassBank of North America* (Banco de Massas da América do Norte)

Q-BiomA – Química de Biomoléculas da Amazônia

INPA - Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas

JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

CL – Cromatografia líquida

UHPLC-*Ultra High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance)

Q-Orbitrap – *Quadrupole – Orbitrap*

HRMS – *High Resolution Spectrometry* (Espectrometria de Massas de Alta Resolução)

m/z - Razão massa e carga

ESI – *Eletrospray* (Electropulverização)

$[M-H]^-$ - Ionização negativa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Fabaceae: Biodiversidade e Sustentabilidade	21
2.2 Importância do Gênero <i>Copaifera</i>	22
2.3 Metabolômica e Cromatografia Líquida de Alta Pressão acoplada a Espectrometria de Massas Alta Resolução (UHPLC-HRMS).....	26
2.4 Análise dos Componentes Principais (PCA)	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. METODOLOGIA	34
4.1 Material Vegetal e Padrões de referência	34
4.2 Extrações em Acetato de etila e Metanol.....	35
4.3 Cromatografia de filtração em microescala em gel de Sílica flash.....	36
4.4 Cromatografia de ultra performance acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS).....	36
4.5 Pré-tratamento dos dados multivariados.....	37
4.6 Análises estatísticas multivariadas (PCA)	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Banco de metabólitos do gênero <i>Copaifera</i>	39
5.2 Perfis de fragmentação dos metabólitos detectados nos extratos dos órgãos vegetais	46
5.2.1 Derivados de ácido benzoico e ácido cinâmico.....	47
5.2.2 Derivados de ácidos graxos e ácidos diterpenos	51
5.2.3 Flavonoides agliconas	56
5.2.4 Flavonoides glicosilados	59

5.2.5	Glicosídeo fenólico e os Ácidos galoilquínicos	64
5.2.6	Taninos condensados	72
5.3	Perfil cromatográfico UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS	80
5.4	Metabolômica não direcionada do Gênero <i>Copaifera</i>	88
5.4.1	Análise de Componentes Principais (PCA) – Extratos em AcOEt	89
5.4.2	Análise de Componentes Principais (PCA) – Extratos em MeOH	97
6.	CONCLUSÕES.....	106
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
8.	ANEXOS.....	120

1. INTRODUÇÃO

A família Fabaceae é considerada a terceira maior família de angiospermas do mundo, com cerca de 750 gêneros e mais de 19.500 espécies catalogadas. A família está subdividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilinoideae (LEWIS et al., 2005; CHRISRTENHUSZ & BYNG, 2016). No Brasil, ocorrem 222 gêneros e 2.845 espécies, são tradicionalmente conhecidas como leguminosas e estão distribuídas por diversos ecossistemas do bioma brasileiro (COSTA, 2017). A família possui importância econômica e ecológica tanto na sustentabilidade das florestas nativas quanto na alta produção alimentícia (grãos, legumes e raízes), correspondendo, aproximadamente, a 30% do consumo da proteína vegetal no mundo (FERNANDES et al., 2014). Quanto ao uso medicinal, diversos gêneros botânicos se destacam como os gêneros *Acacia* (cascas) e *Cicer* (sementes) apreciados pelas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (AHMAD et al., 2016).

O gênero *Copaifera* conta com 72 espécies descritas, das quais 52 são reconhecidas e 16 delas são encontradas no Brasil (COSTA, 2017; VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002). As espécies são encontradas na América do Sul entre as regiões que se estendem pela Amazônia Internacional e na costa litorânea da África Ocidental (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002; TRINDADE et al., 2018). São reconhecidas popularmente como “copaibeiras” e por meio dos conhecimentos tradicionais e indígenas são empregadas na medicina popular e fitoterapia (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002). O óleo-resina de copaíba é um valioso fitoterápico natural de alto valor agregado devido às propriedades anti-inflamatória e cicatrizante, com a composição química rica em sesquiterpenos e ácidos diterpenos (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002; TRINDADE et al., 2018). O chá das cascas do caule ou folhas das copaibeiras são bastante apreciados na medicina popular e são aprontados por decocção ou infusão para tratar doenças respiratórias, estomacais e digestivas (VÁSQUEZ et al., 2014; TRINDADE et al., 2018). O chá das sementes também é usado como um purgativo e para tratar distúrbios respiratórios como a asma (TRINDADE et al., 2018); já para as flores das copaibeiras não há relatos da utilização medicinal.

Os estudos fitoquímicos e farmacológicos do gênero *Copaifera* concentram-se na *Copaifera langsdorffii* Desf., especificamente, nos extratos polares das folhas com composição abundante em ácidos galoilquínicos mono-, di- e tri-substituídos e os

flavonoides quercetina-3-*O*-ramnosídeo e canferol-3-*O*-ramnosídeo como principais componentes, com excelentes atividades farmacológicas e biológicas relacionadas as propriedades antioxidantes (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002; TRINDADE et al., 2018; LEMOS et al., 2015; MOTTA^a et al., 2017; MOTTA^b et al., 2017; COSTA et al., 2015; FURTADO et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2015). Nas cascas da *C. langsdorffii* foram relatados ácidos graxos, diterpenos (ácidos caurenóico, hardwickiico e copálico) esteróis e triterpenos (lupeol e ácido betulínico) (VEIGA JÚNIOR et al., 2006). Nas cascas de *Copaifera multijuga* Hayne foi verificado a presença de taninos condensados (derivados de epicatequina e epiafzelequina) (PEREIRA et al., 2018) e nos frutos de *C. langsdorffii* (BATISTA e tal., 2016). Nas sementes de *C. langsdorffii* e *C. officinalis* foram relatados ácidos graxos, esteróis, ácidos diterpenos e fenólicos, flavonoides e derivados de cumarina (BATISTA e tal., 2016; VEIGA JÚNIOR et al., 2007; NETO et al., 2008).

O grupo de pesquisa Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-BiomA) da Universidade Federal do Amazonas há mais de 10 anos vem estudando e desenvolvendo pesquisas com o óleo-resina e mais recentemente com extratos das folhas e cascas de *C. multijuga*. Embora o gênero *Copaifera* seja conhecido popularmente pelos conhecimentos tradicionais, a maior parte dos estudos concentra-se em poucas espécies. Desta forma, outras espécies de *Copaifera* continuam inexploradas. O estudo metabolômico não direcionado caracteriza-se como um imenso potencial de investigação dos metabólitos característicos no gênero *Copaifera*.

Entre as técnicas hifenadas utilizadas em metabolômica está a cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS). A técnica hifenada é uma ferramenta poderosa em termos de separação e detecção de substâncias com alta versatilidade, precisão e seletividade para o monitoramento e rastreamento de metabólitos em extratos complexos de origem vegetal (XI, 2015). Desta forma, propõe-se o estudo metabolômico do gênero *Copaifera*, visando explorar o metaboloma dos extratos de média e alta polaridade dos órgãos vegetais das espécies *C. langsdorffii* Desf., *C. multijuga* Hayne, *C. trapezifolia* Hayne, *C. lucens* Dwyer e *C. venezuelana* Harms & Pittier, visando o enriquecimento de informações do perfil metabólico do gênero.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fabaceae: Biodiversidade e Sustentabilidade

A família Fabaceae (também conhecida como Leguminosae) é considerada a 3º maior família de angiospermas do mundo (AHMAD et al., 2016). Leguminosas como são conhecidas às espécies da família que apresentam diversidade entre árvores e arbustos, como plantas perenes e herbáceas e estão distribuídas entre diversos ecossistemas ao redor do mundo, principalmente entre as zonas tropicais e subtropicais (SOUZA, 2012).

É a família botânica de maior relevância na evolução humana por meio do aprimoramento das práticas agrícolas e produção alimentícia. Atualmente, é considerada a 2º maior família com potencial econômico, principalmente devido à alta produção alimentos (vagens, grãos e legumes), correspondendo a cerca de 30% do consumo de proteína vegetal no mundo (GRAHAN & VANCE, 2003; FERNANDES et al., 2014). Entre outras aplicações, destacam-se a exploração madeireira, óleos-resinas, óleos essenciais, extratos vegetais e etc; sendo usado pelas indústrias de perfumaria, farmacêutica, cosmética, tintas e vernizes, e a fitoterapia. Entretanto, grande parte da biodiversidade vegetal é fitoquimicamente e farmacologicamente desconhecida, estima-se que apenas 15% sejam devidamente explorados (JOLY et al., 2011).

A família Fabaceae possui uma riqueza metabólica quimicamente diversificada, onde classes metabólicas de polifenóis como antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, procianidinas e terpenos já foram detectados (DETTENBORN, 2009; LIMA, 2018; IGNOATO, 2012; GOMES, 2015). Muitas plantas angiospermas presentes na família possuem altos teores de fenólicos e estão biossinteticamente relacionadas à via do ácido chiquímico (SANTOS-SÁNCHEZ, 2019).

As propriedades farmacológicas das plantas medicinais utilizadas no uso fitoterápico estão relacionadas às características antioxidantes, as quais desempenham nos vegetais proteção contra a radiação UV, funções biológicas de antioxidantes, proteção contra microrganismos, vírus, bactérias, entre outros (VEITCH, 2013; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; HAVSTEEN, et al., 2002; NIVELDT, et al., 2001). Quanto ao uso medicinal, diversos gêneros botânicos se destacam como o gênero *Acacia*, as cascas das

espécies são aproveitadas para fins medicinais com propriedades anti-inflamatória, anti-hipertensivo, antiespasmódico, antibacteriana, antipirético entre outras, do gênero *Cicer* são apreciadas as sementes utilizadas para intuito medicinal com propriedades antioxidantes e efeitos benéficos (AHMAD et al., 2016).

O gênero *Copaifera*, muito presente no bioma brasileiro desde a Amazônia ao Cerrado, possui grande importância farmacológica e fitoterápica na medicina popular brasileira devido aos conhecimentos tradicionais repassados de geração em geração (TRINDADE et al., 2018). Historicamente, as copaibeiras são conhecidas por produzirem o óleo-resina de copaíba, sendo amplamente utilizado como fitoterápico natural devido a suas propriedades; cicatrizante, antifúngica e bactericida (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002). Entretanto, atualmente os extratos dos órgãos vegetais das espécies vêm despertando interesse farmacológico quanto à descoberta e altos teores de substâncias fenólicas bioativas.

2.2 Importância do Gênero *Copaifera*

O gênero *Copaifera* tem sua importância medicinal registrada desde a vinda dos portugueses ao Brasil, por volta de 1500, pelos jesuítas que aqui observavam as práticas curativas dos nativos (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002). As propriedades curativas do óleo de copaíba eram de conhecimento dos nativos e foram repassados de geração em geração até o advento da sociedade moderna e a fitoterapia como tratamento alternativo (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002).

As espécies do gênero são nativas da América do Sul e são encontradas na região que se estende do México ao norte da Argentina, e na costa da África (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002). No Brasil, as espécies distribuem-se entre todas as regiões do país (COSTA, 2017). As copaibeiras são árvores de grande porte, crescem até 40 m de altura e 4 m de diâmetro e podem viver até 400 anos. Estas são altamente adaptadas aos mais diversos ambientes, desde florestas de terra firme, margens inundáveis dos rios e córregos características da região Amazônica até as margens arenosas de lagos e matas de cerrado da região central do Brasil (ALENCAR, 1982; VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002; TRINDADE et al., 2018).

As espécies do gênero *Copaifera* possuem uma grande contribuição socioeconômica, devido ao comércio e extração sustentável do óleo de copaíba, um fitoterápico natural com intensa aplicação na medicina popular, especialmente pelo efeito anti-inflamatório, antitumoral, anticancerígeno, antisséptico (HECK et al., 2012; VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002). As folhas e as cascas do caule das Copaiibeiras são amplamente utilizadas na medicina popular especialmente pelas populações tradicionais na Amazônia, os chás das folhas ou cascas podem ser preparados por infusão ou por decocção para tratar doenças respiratórias, estomacais e digestivas (VÁSQUEZ et al., 2014). O chá das sementes também é usado como um purgativo e para o tratamento da asma (TRINDADE et al., 2018). Nos últimos anos estudos fitoquímicos e farmacológicos, principalmente com as folhas, cascas do tronco e frutos veem conciliando o conhecimento popular ao conhecimento científico (TRINDADE et al., 2018).

O extrato polar das folhas de *C. langsdorffii* tem despertado interesse farmacológico apresentando efeito antilítiasico em testes *in vivo* induzidos em ratos e o efeito profilático para tratar a recorrência de cálculos renais induzidos em ratos (BRANCALION et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Lemos e colaboradores (2015) avaliaram a eficácia das propriedades gastroprotetoras dos extratos hidroalcoólicos das folhas contra úlceras gástricas induzidas por estresse oxidativo utilizando etanol/ HCl em testes *in vivo*, com ratos (LEMOS et al., 2015). Os extratos das folhas também apresentaram atividade antiparasitária e antimalárica contra o protozoário parasita *Plasmodium falciparum* (SOUSA^a et al., 2012).

Motta e colaboradores (2017) conseguiram caracterizar e validar dezesseis estruturas de 16 ácidos galoilquínicos mono-, di- e tri-substituídos e os flavonoides quercetina-3-*O*-ramnosídeo e canferol-3-*O*-ramnosídeo partir dos extratos polares das folhas de *C. langsdorffii*, (MOTTA^a et al., 2017; MOTTA^b et al., 2017). Recentemente, um estudo com os óleo-resinas e extratos polares das folhas de outras cinco espécies (*Copaifera duckei* Dwyer, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* Dwyer, *C. pubiflora* Benth, *C. reticulata* Ducke e *C. trapezifolia*) apresentaram ausência do efeito citotóxico em testes em *in vivo* e genotóxico em testes *in vitro* e *in vivo*, nos extratos foram detectados a presença de 16 ácidos galoilquínicos e os flavonoides quercetin-3-*O*-ramnosídeo e canferol-3-*O*-ramnosídeo bem como detectados na *C. langsdorffii* (FURTADO et al., 2018). As substâncias fenólicas detectadas apresentaram ação gastroprotetora (MOTTA^a et al., 2017).

Os flavonoides são metabólitos secundários encontrados nas plantas, e desempenham papéis fundamentais de manutenção e proteção dos mesmos, são encontrados na forma de

glicosídeos ou agliconas, sendo as pentoses, hexoses e desoxihexoses os principais açúcares substituintes nas hidroxilas das agliconas, resultando em uma diversidade estrutural (HUBER & RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Tais substâncias fenólicas podem apresentar propriedades farmacológicas, como ação antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, além de agir no sistema imunológico, cardiovascular, circulatório e nervoso (OLIVEIRA et al., 2002; HEIM et al., 2002; SHASHANK et al., 2013; GEORGIEV et al., 2014). Os flavonoides quercetina-3-*O*-*L*-ramnosídeo (quercitrina) e canferol-3-*O*-*L*-ramnosídeo (afzelina) foram identificados como os constituintes majoritários nos extratos polares folhas de *C. langsdorffii* por três pesquisadores diferentes (BRANCALION, 2010; FURTADO et al., 2015; SOUSA^b et al., 2012).

Em investigações fitoquímicas dos extratos das cascas do tronco de *C. langsdorffii*, foram identificados dois importantes triterpenos, o lupeol e o ácido betulínico (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2006). Os triterpenos detectados (e seus derivados) apresentam diversas atividades farmacológicas como antimalárica (KARAGOZ et al., 2018) e antitumoral (ZHANG et al., 2015), especialmente sua ação anti-HIV contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (HUANG et al., 2018).

Estudos a partir da polpa dos frutos de *C. langsdorffii* revelaram excelentes atividades antioxidantes para os extratos em etanol e presença de diversas substâncias fenólicas como os ácidos *p*-cumárico, *o*-cumárico, cinâmico, benzoico e gálico, além da (-)-epicatequina galato, (+)-catequina, (-)-epicatequina, e dos flavonoides quercetina-3-*O*-*L*-glucosídeo, quercetina, quercetina-3-*O*-rutinosídeo e os taninos condensados epicatequina-(4 β -8)-catequina (procianidina B1) e epicatequina-(4 β -8)-epicatequina (procianidina B2) (BATISTA et al., 2016). Neto e colaboradores (2008) em investigação fitoquímica do extrato apolar das cascas dos frutos da espécie isolaram e caracterizaram três diterpenos os ácidos caurenóico, poliáltico, nivenolídeo e o sesquiterpeno óxido de cariofileno (NETO et al., 2008). De forma que, tais resultados revelaram grandes potenciais para os frutos da espécie.

Estudos com os extratos das cascas de *C. multijuga* apresentaram excelentes resultados relacionados às propriedades antioxidantes frente aos testes *in vitro* e *in vivo* com redução do estresse oxidativo, além do potencial efeito antineoplásico em células tumorais de Ehrlich e ao estresse oxidativo induzido por paracetamol; sendo ambos os testes em camundongos (ALBIERO et al., 2016; CUNHA et al., 2018; PEREIRA et al., 2018). As atividades antioxidantes podem estar relacionadas à presença dos polifenóis detectados

como taninos condensados nas formas de dímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina, trímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina, e estruturas bem maiores como tetrâmero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina e o pentâmero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina, bem como os teores significativos de fenólicos e flavonoides (PEREIRA et al., 2018).

Em estudos com extratos hidroalcoólicos das folhas de *C. trapezifolia* Hayne foi possível observar a atividade antibacteriana contra *Porphyromonas gingivalis* e *Peptostreptococcus micros* (LEANDRO et al., 2016). O óleo essencial das folhas de *C. trapezifolia* já apresentou uma rica composição em terpenóides, como sesquiterpenos (hidrocarbonetos e hidroxilados) e diterpenos, bem como a presença de hidrocarbonetos simples (VEIGA JÚNIOR^b et al., 2006). Esses são os principais registros das atividades biológicas e da composição química extratos das folhas, registrados para a espécie presente, principalmente na mata atlântica (TRINDADE et al., 2018).

A *C. lucens* Dwyer possui apenas estudos biológicos relacionados à atividade antimicrobiana e antileishmanial do óleo-resina da espécie (LEANDRO et al., 2012). Não existem estudos fitoquímicos e/ou biológicos secundários com os extratos das partes vegetais da espécie endêmica da mata atlântica. E sobre a *C. venezuelana* Harms & Pittier não há relatos sobre a composição química e nem atividades biológicas do óleo-resina, ao dos extratos vegetais, um estudo sobre a caracterização ambiental realizada no município de Miranda, estado da Zulia, na Venezuela, descreveu que os povos tradicionais utilizam o óleo-resina na espécie na medicina popular (FERRER-PARIS et al., 2015).

2.2.1 Considerações fitogeográficas sobre as espécies de interesse

As espécies adquiridas foram: *C. langsdorffii* Desf., *C. multijuga* Hayne, *C. trapezifolia* Hayne, *C. lucens* Dwyer e *C. venezuelana* Harms & Pittier. As informações fitogeográficas e tipos de vegetação foram levantados do portal Flora do Brasil 2020 (floradobrasil.jbrj.gov.br) e de algumas informações etnobotânicas disponíveis na literatura.

C. langsdorffii Desf. é nativa do cerrado brasileiro e podem ser encontrados traços da espécie em regiões do sul da Bolívia ao nordeste da Argentina. No Brasil, especialmente nas

regiões Sudeste e Centro-Oeste, os espécimes desenvolvem-se naturalmente em solos férteis e bem drenados até terrenos úmidos de florestas ripárias característicos do cerrado brasileiro, sendo uma das espécies mais populares do gênero. Os nomes populares variam de acordo com as regiões encontradas como copaúba, copaúva, copaíba vermelha, entre outros (CARVALHO, 2003; COSTA, 2017).

C. multijuga Hayne é nativa da região Amazônica que engloba os países do Peru e a Bolívia. Os espécimes desenvolvem-se solos arenosos e argilosos, em florestas de terra firme e/ou florestas de várzea típica da Amazônia, sendo a principal espécie na região. A espécie é conhecida na Amazônia por vários nomes, os mais comuns são copaíba mari-mari, copaíba angelim, copaíba-roxa, entre outros; sendo que a ascensão e o reconhecimento da espécie se deve aos conhecimentos indígenas dos povos da região (BRUM et al., 2009; COSTA, 2017).

C. trapezifolia Hayne é nativa da mata atlântica e ocorre entre os estados de Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e São Paulo. Os espécimes podem ser encontrados desde matas serranas até em terras baixas, nos quais se desenvolvem em solos bem drenados e de textura que varia de arenosa a franca-argilosa em florestas ciliares e ombrófila (floresta pluvial). A espécie é reconhecida pelos nomes populares de capuva, copuva, óleo branco, entre outros (CARVALHO, 2006; COSTA, 2017).

C. lucens Dwyer é nativa da mata atlântica e ocorre entre os estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Os espécimes são encontrados desde matas serranas do tipo florestas ombrófila até terras baixas e arenosas, características de restinga que são depósitos arenosos paralelos à linha costeira. A espécie é reconhecida como pau-óleo, pau-óleo-copaíba entre outros (COSTA, 2017).

C. venezuelana Harms & Pittier é nativa da Venezuela, com vestígios em matas ciliares na Amazônia brasileira. A espécie se desenvolve, principalmente, em selvas da bacia do lago Maracaibo na Venezuelana e é intimamente reconhecida como cabimo (nome popular dado pelos venezuelanos) (COSTA, 2007; FERRER-PARIS et al., 2015).

2.3 Metabolômica e Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada a Espectrometria de Massas Alta Resolução (UHPLC-HRMS)

Metabolômica é um marco entre o desenvolvimento das ciências “ômicas” e foi introduzido há 18 anos por Oliver Fiehn por volta de 2001, sendo uma análise abrangente e quantitativa do metaboloma de uma amostra biológica (FIEHN, 2001), onde o metaboloma se refere à composição geral de todos os metabólitos que constituem a amostra biológica (HALL, 2006). Os metabólitos são representados por variados conjuntos de arranjos moleculares que compreendem diversas classes metabólicas resultantes de processos celulares e biossintéticos (CANUTO et al., 2018). Logo, o metaboloma é composto por uma grande variedade de substâncias de baixa massa molar (< 1000 U), as quais possuem propriedades químicas diversas, compreendendo a múltiplas classes metabólicas e uma enorme variedade de biomoléculas complexas (VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2006).

Entre os estudos metabolômicos observam-se grandes divergências em relação às terminologias aplicadas às análises, entretanto, as definições levam a conclusões semelhantes, no qual a resposta medida ao nível molecular é obtida a partir da integração entre a bioquímica e os organismos vivos (NICHOLSON, 2008). Seguindo as definições mais recentes de Canuto e colaboradores (2018), as análises metabolômicas podem ser classificadas em duas abordagens: metabolômica direcionada (do inglês, *targeted metabolomics*), é a análise quantitativa de um e/ou mais metabólitos pré-selecionados e relacionados a rotas metabólicas similares; e a metabolômica não direcionada (do inglês, *untargeted metabolomics*) é análise qualitativa abrangente do maior quantidade de metabólitos detectáveis entre diversas classes metabólicas contidas em uma amostra biológica (CANUTO et. al., 2018).

Os estudos metabolômicos são realizados fundamentalmente a partir de análises comparativas sobre os perfis metabólicos individuais obtidos para diferentes amostras. Um perfil metabólico pode ser obtido através de técnicas analíticas cromatográficas e/ou espectrométricas, definindo um conjunto de sinais cromatográficos e/ou espectrais adquiridos para uma amostra complexa de extratos vegetais, animais, microrganismos ou fluidos biológicos (WOLFENDER, 2009; JIANG et al., 2010; CIEŚLA, 2012).

Na atualidade, o estudo metabolômico possui grande potencial de aplicação e expansão em diversos setores produtivos e de aperfeiçoamento de processos, devido à importância e aplicabilidade e respostas obtidas nos experimentos (HALL, 2006; CANUTO et al., 2018). Segundo Canudo e colaboradores (2018), entre os principais estudos de metabolômica, as aplicações são diversas, como ambiental, em estudo das colheitas e produção em resposta aos fatores abióticos; e na área da medicina, revelando distúrbios

ocultos no organismo humano, além de configura como uma ferramenta alternativa no diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças (CANUTO et. al., 2018). No Reino Plantae, estes estudos se configuram como excelentes abordagens para a exploração e mapeamento metabólico, resultando no entendimento do metabolismo secundário das espécies, gêneros e famílias botânicas (HALL, 2006). Como exemplo, temos o gênero *Baccharis*, o estudo investigou 211 espécies distintas, nas quais resultaram descobertas importantes para a quimiotaxonomia e a triagem de espécies com atividade anti-inflamatória, o que possibilitou a realização de estudos bioguiados na descoberta de potenciais fármacos (CASOTI, 2017).

Logo, a separação e a detecção dos metabólitos precisam de uma instrumentação altamente sensível. Logo, temos a cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-Q-Orbitrap-MS).

De forma geral, a cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC), do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, vem sendo considerada um componente determinante na separação dos metabólitos em estudos da metabolômica global e/ou alvo (GIKA et al., 2019; CANUTO et. al., 2018). E hifenizada com espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) com analisador híbrido (Q-Orbitrap) oferecem excelentes combinações de separação, análise e detecção dos íons precursores e íons fragmentos derivados dos metabólitos secundários (GIKA et al., 2019; CANUTO et. al., 2018).

A cromatografia líquida (CL) é um processo físico-químico de separação das substâncias presentes em uma mistura pela interação diferencial entre uma fase estacionária (sólida) e uma fase móvel (líquida) (MALDANER & JARDIM, 2009). A CL desde suas primeiras aplicações, por volta de 1950, até os dias atuais com a cromatografia líquida de ultra alta performance (UHPLC), acumula diversos avanços em termo de eficiência das análises cromatográficas, impulsionadas pelo desenvolvimento contínuo de novas partículas de fases estacionárias e um aumento significativo no número de pratos teóricos (coeficiente de distribuição da mistura entre a fase móvel e a estacionária); gerando assim, análises cromatográficas com melhor desempenho, reprodutibilidade e mais rápidas sem a perda de eficiência e resolução (MALDANER & JARDIM, 2009).

A cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC) é o avanço mais recente das técnicas de separação, operando em pressões acima de 100 MPa com altas velocidades lineares da fase móvel e utilização de fases estacionárias com partículas menores que 2 µm, bem como a atual tecnologia de instrumentação (bombas, injetores e detectores),

proporcionam análises cromatográficas de alta resolução e maior detectabilidade em menor tempo de análise, na ordem de poucos minutos e menor consumo de solventes na fase móvel (MALDANER & JARDIM, 2009; GIKA et al., 2019). Hifenizada para a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), as técnicas combinam o melhor dos processos de separação cromatográfica e detecção espectrométrica para fins de avaliação de misturas complexas.

A HRMS tem como princípio básico gerar íons por meio de moléculas neutras e/ou carregadas por meio de um método de ionização apropriado (ESI-*Electrospray*), desta forma, os íons são analisados e separados quantitativamente em função da razão massa/carga (m/z) em um analisador de massas e suas abundâncias são registradas pelo detector que correlaciona os íons com um sinal de corrente elétrica. A magnitude do sinal elétrico em função da relação m/z é convertida por um processador de dados, que gera o espectro de massas correspondente (GROSS, 2004). A técnica possui aplicação variada em acordo com o método de ionização, sendo muito bem empregada na determinação de metabólitos por meio da massa molar e o perfil de fragmentação, além da obtenção do perfil metabólico sem a identificação prévia dos metabólitos (VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2006).

A MS exhibe excelentes vantagens, como a análise rápida dos metabólitos; a preparação das amostras exige passos simples e pouca quantidade de amostra; alta sensibilidade; uma extensa faixa de detecção metabólica e etc (VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2006). Entretanto, a técnica também apresenta desvantagens, como a limitação da caracterização dos metabólitos aos dados espectrométricos de MS/MS; podem ocorrer interferências da matriz da amostral quanto à natureza química dos metabólitos; incompatibilidade com solventes fortemente iônicos ou tampões (VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2006).

Um marco na evolução e expansão da espectrometria de massas foi o aprimoramento de novas técnicas de ionização, como a ESI (*Electrospray Ionization*) ou electropulverização (CROTTI, 2006). Um dos primeiros usos da ionização por electropulverização com espectrometria de massas foi em 1968, relatado por Malcolm Dole, e em 2002, o Prêmio Nobel de Química foi para John Bennett Fenn pelo desenvolvimento da espectrometria de massas por ionização por electropulverização ao final de 1980 (Banerjee & Mazumdar, 2012). Até antes do desenvolvimento dessa técnica, apenas moléculas pequenas e termolábeis eram analisados por espectrometria de massas; após o advento das técnicas incorporando conceitos simples, mas revolucionários com a formação de íons moleculares

em solução, moléculas termolábeis, complexos organometálicos, polímeros e moléculas de elevadas massas moleculares (até 1000 u), apresentaram respostas espectrométricas características por meio da ionização em ESI-MS (STEWART, 1999; CROTTI, 2006).

Um dos grandes diferenciais entre o processo de ionização e a detecção dos íons é o analisador de massas, nos últimos 15 anos desde o lançamento do primeiro espectrômetro de massas baseado em Orbitrap em 2005, necessidades crescentes da comunidade científica, desafiaram e contribuíram continuamente para o desenvolvimento de tecnologias de HRMS baseadas em Orbitrap (ELIUK & MAKAROV, 2015). O analisador híbrido Q-Orbitrap (*Q Exactive*) combina o melhor do quadrupolo (Q) para a filtragem e isolamento de íons precursores e o analisador Orbitrap empregado para a detecção de varreduras completas e íons precursores e análises de MS/MS, sendo a plataforma ideal para a triagem não direcionada ou direcionada com seletividade extremamente alta de substâncias conhecidas e desconhecidas em aplicações qualitativas e quantitativas com especificidade que excede em níveis de resolução dos outros analisadores, como triplo quadrupolo (2,000), Q-Trap (2,000) ou Q-TOF (40,000) em comparação com o Q-Orbitrap (140.000) (ELUIK & MAKAROV, 2015; MCLEISH et al., 2013).

Na prática, as abordagens metabolômicas por meio UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS nos fornecem resultados amplos e representativos em relação aos materiais de estudo, bem como a estratégia de metabolômica direcionada estabelecida por Castaldo e colaboradores (2019) que combinaram um método quantitativo para 28 micotoxinas e uma triagem pós-alvo para outros 245 metabólitos fúngicos e bacterianos em amostras de alimentos secos para animais (CASTALDO et al., 2019). Em estudos realizados por Rombouts e colaboradores (2017) sob uma abordagem metabolômica não direcionada com os subprodutos da digestão de carne vermelha e carne branca que podem vim a contribuir para o desenvolvimento do câncer colorretal, foram detectados vinte dois metabólitos inequivocamente associados à digestão colônica simulada de carne vermelha em correlação com o desenvolvimento do câncer (ROMBOUTS et al., 2017).

Apesar do grande desenvolvimento nos métodos instrumentais de separação e detecção, é amplamente reconhecido que as diferentes metodologias de abordagem metabolômica não resolvem completamente os problemas enfrentados pelos pesquisadores que tentam realizar fenotipagem metabólica abrangente (GIKA et al., 2019). Portanto, a exploração e mineração das informações presentes nos conjuntos de dados espectrais e

cromatográficos derivados das análises metabolômicas podem ser lapidadas pelas análises estatísticas multivariadas (CANUTO et al., 2017).

2.4 Análise dos Componentes Principais (PCA)

As análises estatísticas multivariadas estão cada vez mais presentes nos tratamentos e refinamentos de dados multivariados de metabolômica. Os conjuntos de dados multivariados resultantes de análises instrumentais podem ser considerados aleatórios a primeira vista, entretanto por meio das análises estatísticas multivariadas os conjuntos de dados podem ser interpretados por representações gráficas reconhecendo padrões e tendências ocultas nos dados multivariados (ABDI & WILLIAMS, 2010). Tais representações gráficas podem ser obtidas por meio de algoritmos específicos desenvolvidos para representar graficamente a maior quantidade de informação presente no conjunto de dados multivariados, como a análise de componentes principais (PCA) (NETO & MOITA, 1998; FERREIRA et al., 1999; ABDI & WILLIAMS, 2010)

A análise de componentes principais (PCA), do inglês, *Principal Component Analysis* é uma ferramenta algorítmica de grande aplicação na análise de um grande volume de dados variáveis, sendo muito empregada nas análises do metaboloma (VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2006). A PCA foi criada em 1901 por Karl Pearson, é um método algorítmico que tende diminuir a dimensionalidade do conjunto de dados originais, conservando e representando graficamente a maior quantidade de informação (variância acumulada) (JOLLIFFE & CADIMA, 2016). A diminuição da dimensionalidade é obtida pela seleção de variáveis ortogonais significativas entre si, chamadas componentes principais (CP's). Os gráficos obtidos em duas (2D) ou três (3D) dimensões projetam as amostras em um sistema coordenadas cartesianas 2D ou 3D onde os eixos são as CP's (JOLLIFFE & CADIMA, 2016). A primeira componente principal explica o máximo de variância na série de dados, e as componentes subsequentes descrevem o restante da variância não explicada (ABDI & WILLIAMS, 2010).

Na prática, o algoritmo é extremamente útil em áreas de estudos da metabolômica, como a ambiental, climática, esportes de alto rendimento, entre outros (CANUTO et al., 2017). Xu e colaboradores (2016) em uma abordagem metabolômica multidimensional sobre uma aplicação quimiosistemática utilizando técnicas de cromatografia líquida de alta

pressão e espectrometria de massas de alta resolução desenvolveu um método multidimensional de mobilidade de íons e juntamente com a análise multivariada de PCA, delimitaram espécies de táxons de líquen (*Cetraria*) e suas fortes correlações com a filogenia (XU et al., 2016). Em estudos quimiométricos, utilizando os algorítmicos de PCA e a análise de componentes hierárquicos (HCA), com amostras do óleo-resina de *C. multijuga* Hayne, sendo a espécie endêmica da Amazônia, foram observadas variações na composição química das amostras em função do conteúdo de β -cariofileno e de óxido de cariofileno, confirmando a possibilidade de variação da composição química do óleo-resina proveniente de uma mesma espécie, além da detecção dos diterpenos marcadores de ácido copálico e pinifólico, e quanto as origens geográficas das amostras coletadas foram observadas variações qualitativas quanto ao tipo de solo e os metabólitos presentes nos óleos-resinas (BARBOSA et al., 2012; BARBOSA et al., 2013).

Portanto, os estudos metabolômico dos gêneros botânicos contribuem para a exploração da biodiversidade em prol das potencialidades e novas descobertas. Inúmeras espécies presentes na nossa biodiversidade ainda não foram estudadas química e/ou farmacologicamente. O gênero *Copaifera*, em especial, possui importantes aplicações farmacológicas na medicina popular, aplicações derivadas tanto do óleo-resina quanto dos seus extratos vegetais, entretanto apesar da importância farmacológica e medicinal, diversas espécies ainda não foram estudadas em seus aspectos metabólicos, tão pouco suas possíveis relações frente aos seus extratos vegetais. Portanto, uma abordagem metabolômica não direcionada com o auxílio da técnica hifenada de UHPLC-HRMS, configura-se como uma excelente estratégia instrumental e metodológica para alcançar informações da composição química e dos extratos, órgãos vegetais e espécies do gênero por meio da quimiometria, especificamente com a PCA, verificando a distribuição e a composição química dos metabólitos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Explorar e descrever as características do metaboloma das cinco principais espécies (*C. langsdorffii*, *C. multijuga*, *C. venezuelana*, *C. trapezifolia*, *C. lucens*) do gênero *Copaifera* (Fabaceae).

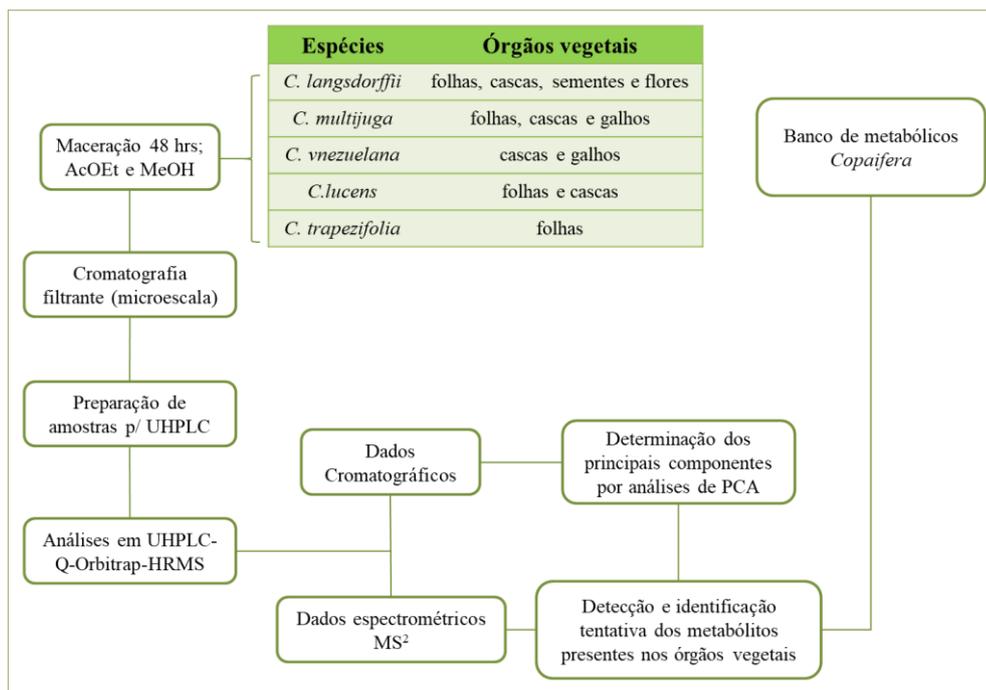
3.2 Objetivos específicos

- i. Obter os perfis metabólicos por UHPLC-HRMS dos extratos de média e alta polaridade de diferentes órgãos vegetais de espécies do gênero *Copaifera*;
- ii. Caracterizar os metabólitos presentes na composição química por meio dos perfis de fragmentação MS²;
- iii. Analisar os dados multivariados das análises cromatográficas por PCA;
- iv. Analisar e descrever a metabolômica não direcionada permitindo a identificação de características e similaridades por órgão vegetal, extrato e espécie botânica.

4. METODOLOGIA

A metodologia empregada foi organizada de acordo com o fluxograma da figura 1.

Figura 1. Fluxograma geral da metodologia empregada.



4.1 Material Vegetal e Padrões de referência

Os materiais vegetais foram obtidos a partir de cinco espécies do gênero *Copaifera* provenientes das regiões norte e sudeste do Brasil. As espécies adquiridas foram *C. multijuga* Hayne, *C. venezuelana* Harms & Pittier, *C. langsdorffii* Desf., *C. trapezifolia* Hayne e *C. lucens* Dwyer. No quadro 1, temos a disposição das espécies adquiridas e seus respectivos locais de origem do material vegetal registrados nos Herbários do INPA e no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. O quadro 2 dispõe os órgãos vegetais e espécies obtidas para o estudo metabolômico.

Quadro 1. Relação das espécies, regiões coletadas e datas das coletas.

Espécies	Locais de Coleta	Nº do projeto (SisGen)	Nº de exsicata	Data da coleta
<i>C. multijuga</i> Hayne	Manaus/ AM	A09F694	INPA82418	03/2011
<i>C. venezuelana</i> Harms & Pittier	Coari/ AM	A9CDF0F	INPA229668	04/2009
<i>C. langsdorffii</i> Desf.	Campinas/SP	A3AE56C	RB344931	12/1999
<i>C. trapezifolia</i> Hayne	São Miguel Arcanjo /SP	A10C77E	RB142240	04/2000
<i>C. lucens</i> Dwyer	JBRJ - Rio de Janeiro/ RJ	ADCD561	RB301745	10/2005

Quadro 2. Partes vegetais adquiridas para o estudo.

Espécies	Partes Vegetais				
	Folhas	Cascas	Galhos	Sementes	Flores
<i>C. langsdorffii</i>	X	X	X	X	X
<i>C. multijuga</i>	X	X	X	-	-
<i>C. lucens</i>	X	X	-	-	-
<i>C. venezuelana</i>	-	X	X	-	-
<i>C. trapezifolia</i>	X	-	-	-	-

No quadro 3, temos a relação dos padrões de referência obtidos da marca *Sigma Aldrich*, utilizados como suporte nas detecções e identificações dos metabólitos presentes nos extratos.

Quadro 3. Relação de padrões utilizados como referência para as análises em UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS.

Lista de Padrões Analíticos
Ácido gálico
(-) epicatequina
Quercetina
Quercetina-3- <i>O</i> - <i>L</i> -glucosídeo
Canferol
Apigenina

4.2 Extrações em Acetato de etila e Metanol

Os materiais vegetais foram secos e triturados em moinho e submetidos a extrações sucessivas por maceração em temperatura ambiente (25°C) por 48 horas nos solventes acetato de etila (AcOEt) e posteriormente em metanol (MeOH) na razão de 1 g de material

vegetal para 10 mL de solvente, e por fim, concentradas em evaporador rotativo. Os extratos brutos resultantes foram mantidos sobre refrigeração até as respectivas análises cromatográficas e espectrométricas.

A conservação dos extratos em baixas temperaturas possibilitou melhor estabilidade evitando possíveis oxidações com o risco da formação de artefatos ou contaminações, assim como conservando a integridade dos metabólitos presentes nos extratos.

4.3 Cromatografia de filtração em microescala em gel de sílica flash

A cromatografia de filtração visou à exclusão dos constituintes apolares presentes nos extratos brutos que poderiam vir a interferir negativamente nas análises. Os extratos brutos (15 mg) foram submetidos à cromatografia de filtração em microescala adaptadas em pipetas de Pasteur (150 mm de comprimento e 5,5 mm de diâmetro interno). Estas foram recheadas com 1g sílica 70-230 *mesh* (*SilicaFlash*® G60 e F60 de marca SILICYCLE), utilizando os eluentes hexano 100 % (3x 3mL) e o solvente extrator 100% (3x 3mL) (AcOEt ou MeOH), ambos os solventes utilizados foram adquiridos da marca TEDIA. Depois de filtrados, os extratos foram secos.

4.4 Cromatografia de ultra performance acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS)

As análises cromatográficas e espectrométricas foram realizadas no Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As amostras foram preparadas na concentração de 1mg/mL em metanol (grau HPLC TEDIA) e 20 µL foram retirados e diluídos em 980 µL de metanol. Após a preparação das amostras, as mesmas foram filtradas novamente em uma membrana de 0,45 µm de PTFE w/GMF da marca WHATMAN como norma padrão para uma análise de alto rendimento livre de possíveis impurezas e interferências. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alto desempenho (*Dionix Ultimate 3000*) acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (*Q Exectuve* híbrido Quadrupolo-Orbitrap), ambos da THERMO SCIENTIFIC. Foi utilizada a coluna *Synchronis C18* (2,1 x 50 mm, partícula de 1,7 µm) da

THERMO FISHER SCIENTIFIC. As fases móveis foram à solução aquosa de ácido fórmico 0,1%: formiato de amônio 5mM (A) e metanol (B). A programação de gradiente foi: 0% a 30% de solvente B (5,45% min⁻¹), tempo da corrida de 0-9 min e 2 min de fluxo constante para limpeza da coluna entre amostras. A taxa de fluxo foi de 1 mL min⁻¹ e o volume de injeção de 10 µL.

O espectrômetro de massas foi operado no modo de íons positivo e negativo usando a comutação rápida de polaridade, definindo dois eventos de varredura (MS de íons e fragmentação MS²) com uma resolução de 140000 a m/z 200 e <1 ppm de precisão em massa. As condições do modo de ionização positiva (ESI +) foram: voltagem do spray 3,9 kV; temperatura do capilar 380 °C. As condições do modo de ionização negativo foram: voltagem de spray 2,9 kV; temperatura do capilar 380°C. O intervalo de varredura foi de m/z 100-900. Os cromatogramas e os espectros gerados foram processados no programa *Xcalibur* 3.0. As análises de MS¹ ocorreram no quadrupolo (q) e MS² no orbitrap. Os perfis de fragmentação MS² dos íons precursores foram avaliados e comparados com dados espectrais disponíveis na literatura científica com procedimentos experimentais similares (ESI-MSⁿ) e os dados espectrais disponíveis nos banco de dados virtuais MoNA – *MassBank of North America* (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/>) e a HMDB – *The Human Metabolome Database* (<http://www.hmdb.ca/>).

4.5 Pré-tratamento dos dados multivariados

As dados multivariados obtidos em análises em triplicata tiveram como parâmetros os coeficientes de variação estipulados por Rombouts e colaboradores (2019) para estudos metabolômicos, para o TR é aceitável coeficiente de variação de <2%, e para os constituintes minoritários <30% de variação, e para os majoritários <20% em termos da AR% (ROMBOUTS et al., 2019).

Os dados multivariados foram obtidos a partir da integração manual dos picos cromatográficos estabelecendo um limite de detecção $\geq 0,10\%$ de área relativa média (AR), abaixo desse limite os dados foram considerados como ruídos operacionais, portanto não foram considerados nas análises multivariadas. Para as análises estatísticas multivariadas foram construídas duas tabelas mestras, uma para os dados derivados das amostras extraídas em AcOEt e outra para os dados derivados das amostras em MeOH. Para as análises

multivariadas dos dados em AcOEt foi utilizada uma tabela composta de 12 amostras x 147 variáveis (TR min) e para os dados em MeOH foi utilizada uma tabela composta de 12 amostras x 161 variáveis (TR min). Os íons detectados foram introduzidos na discussão dos dados multivariados analisados a fim de mesclar as informações obtendo uma visão geral.

4.6 Análises estatísticas multivariadas (PCA)

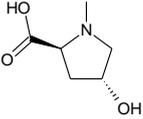
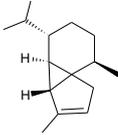
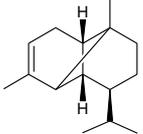
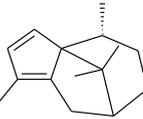
As análises estatísticas multivariadas são usadas para extrair a informação relevante dos dados, a avaliação dos dados extraídos possibilitam a classificação e discriminação das entidades ou metabólitos responsáveis por diferenciar as amostras. A análise de componentes principais (PCA, do inglês, *principal component analysis*) foi realizada utilizando o *software Origin 2017, graphing & analysis*, versão 94E. O alinhamento dos dados cromatográficos foi feito manualmente observando os tempos de retenção e o íon-base de todas as análises. Este software permitiu a análise de dados multivariados exportados de tabelas padronizadas no formato csv. A série de dados obtidos por UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS foram submetidos às análises de PCA com extração de seis componentes principais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Banco de metabólitos do gênero *Copaifera*

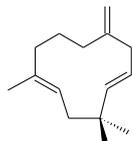
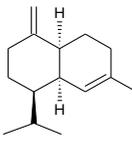
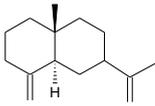
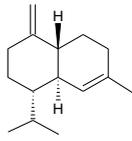
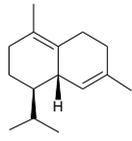
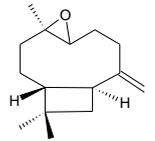
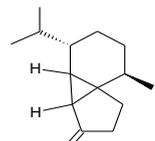
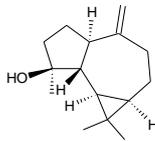
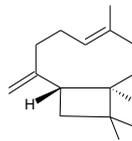
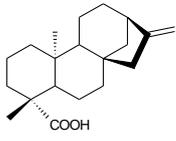
O banco de metabólitos construído a partir do levantamento de mais de 25 trabalhos de caráter fitoquímico exploratório com extratos de baixa a alta polaridade das folhas, cascas e frutos das espécies do gênero *Copaifera*. Um total de quatro espécies (*C. langsdorffii*, *C. officinalis*, *C. Trapezifolia* e *C. multijuga*) apresentaram estudos na literatura científica entre 1986 a 2019. A relação dos 81 metabólitos encontrados nas espécies de *Copaifera* se encontram dispostos no quadro 4 e contribuirão juntamente com o estudo metabolômico em questão para a compreensão do metaboloma do gênero e seus metabólitos secundários. Os dados auxiliaram nas identificações dos perfis de fragmentação MS² dos metabólitos detectados nos órgãos vegetais das espécies do gênero *Copaifera*.

Quadro 4. Banco de dados dos metabólitos levantados no Gênero *Copaifera*

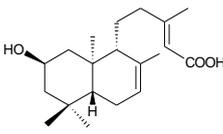
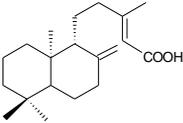
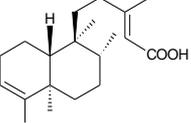
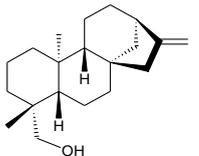
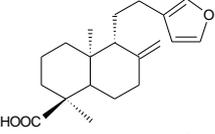
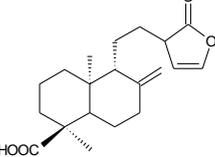
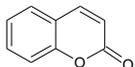
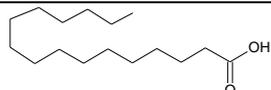
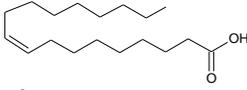
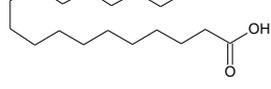
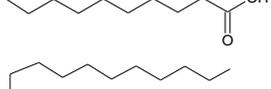
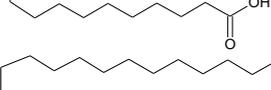
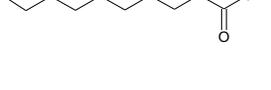
Aminoácido			
Estruturas	Nomes	Espécie e Material Vegetal	Fontes
	<i>N</i> -metil- <i>trans</i> -4-hidróxi- <i>L</i> -prolina (1)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	LANGNHEIM et. al., 1986; MACEDO et. al., 1989; VEIGA JÚNIOR et. al., 2006
Sesquiterpenos			
	α -Cubebeno (2)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	LANGNHEIM et. al., 1986; MACEDO et. al., 1989; VEIGA JÚNIOR et. al., 2006
	α -Copaeno (3)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	LANGNHEIM et. al., 1986; MACEDO et. al., 1989; VEIGA JÚNIOR et. al., 2006
	Cipereno (4)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	LANGNHEIM et. al., 1986; MACEDO et. al., 1989

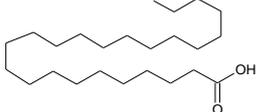
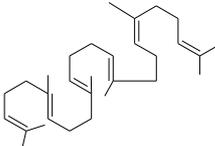
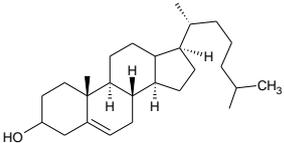
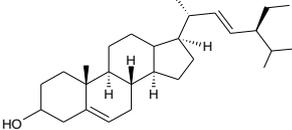
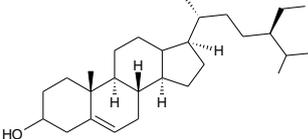
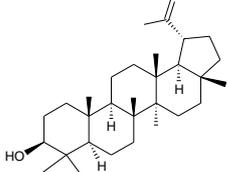
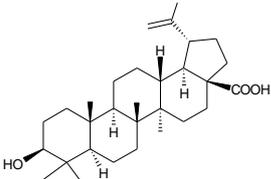
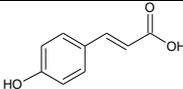
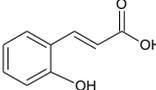
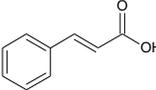
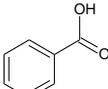
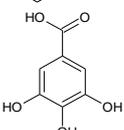
Continua

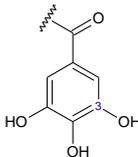
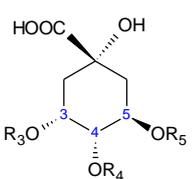
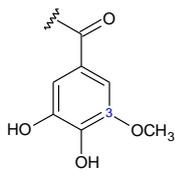
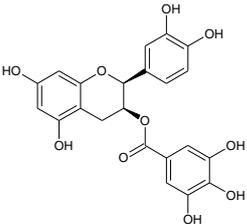
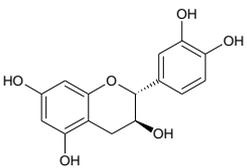
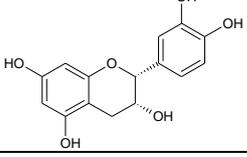
Continuação

	β -Humuleno (5)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	LANGNHEIM et. al., 1986; MACEDO et. al., 1989
	Muuroleno (6)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	LANGNHEIM et. al., 1986; MACEDO et. al., 1989
	β -Selineno (7)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	LANGNHEIM et. al., 1986; MACEDO et. al., 1989
	δ -Cadineno (8)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	LANGNHEIM et. al., 1986; MACEDO et. al., 1989
	γ -Cadineno (9)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	LANGNHEIM et. al., 1986; MACEDO et. al., 1989
	Óxido de cariofileno (10)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	LANGNHEIM et. al., 1986; MACEDO et. al., 1989; VEIGA JÚNIOR et. al., 2006; LEMOS et. al., 2015
	β -Cubebeno (11)	<i>C. langsdorffii</i> (Cascas)	VEIGA JÚNIOR et. al., 2006
	Espatuleno (12)	<i>C. trapezifolia</i> (Folhas) <i>C. langsdorffii</i> (Cascas)	VEIGA JÚNIOR ^a et. al., 2006; VEIGA JÚNIOR ^b et al., 2006
	β -Cariofileno (13)	<i>C. trapezifolia</i> ; <i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	LEMOS et. al., 2015; VEIGA JÚNIOR et. al., 2006 ^b
Diterpenos			
	Ácido <i>ent</i> -caurenóico (14)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas; Cascas)	SOUSA et. al., 2012; COSTA et. al., 2015; VEIGA JÚNIOR et. al., 2006 ^a

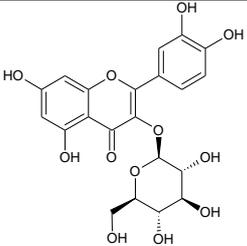
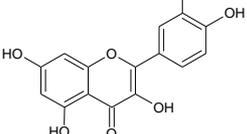
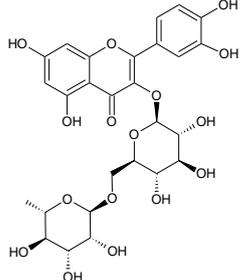
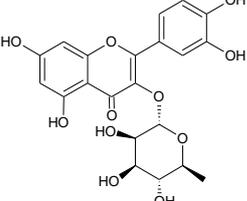
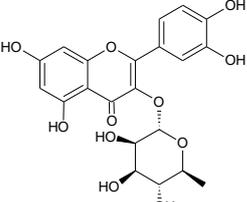
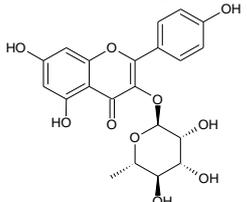
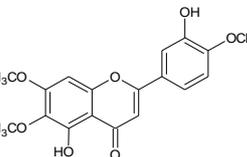
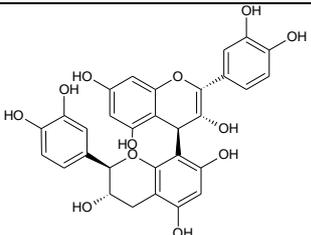
Continuação

	Ácido 2-hidróxi-labda-7,13-dien-15-óico (15)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	SOUSA et. al., 2012
	Ácido copálico (16)	<i>C. langsdorffii</i> (Casca)	VEIGA JÚNIOR ^a et. al., 2006
	Ácido colavênico (17)	<i>C. langsdorffii</i> (Casca)	VEIGA JÚNIOR ^a et. al., 2006
	Kaurenol (18)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	SOUSA et. al., 2012
	Ácido poliáltico (19)	<i>C. langsdorffii</i> (Frutos)	NETO et. al., 2008
	Ácido nivenolídeo (20)	<i>C. langsdorffii</i> (Frutos)	NETO et. al., 2008
Cumarina			
	Cumarina (21)	<i>C. langsdorffii</i> ; <i>C. officinalis</i> (Sementes; Frutos)	VEIGA JÚNIOR, 2007; NETO et. al., 2008
Ácidos Graxos			
	Ácido hexadecanóico (22)	<i>C. officinalis</i> (Sementes)	VEIGA JÚNIOR, 2007
	Ácido octadec-9-enóico (23)	<i>C. officinalis</i> (Sementes)	VEIGA JÚNIOR, 2007
	Ácido octadecanóico (24)	<i>C. officinalis</i> (Sementes; Frutos)	VEIGA JÚNIOR, 2007; NETO et. al., 2008
	Ácido decanóico (25)	<i>C. officinalis</i> (Sementes)	VEIGA JÚNIOR, 2007
	Ácido eicosanóico (26)	<i>C. officinalis</i> (Sementes)	VEIGA JÚNIOR, 2007
	Ácido docosanóico (27)	<i>C. officinalis</i> (Sementes)	VEIGA JÚNIOR, 2007

Continuação			
	Ácido tetracosanóico (28)	<i>C. officinalis</i> (Sementes)	VEIGA JÚNIOR, 2007
Esqualeno			
	Esqualeno (29)	<i>C. officinalis</i> (Sementes)	VEIGA JÚNIOR, 2007
Triterpenos			
	Campesterol (30)	<i>C. langsdorffii</i> (Cascas)	VEIGA JÚNIOR ^a et. al., 2006
	Estigmasterol (31)	<i>C. langsdorffii</i> (Cascas)	VEIGA JÚNIOR ^a et. al., 2006
	β -Sitosterol (32)	<i>C. langsdorffii</i> (Cascas)	VEIGA JÚNIOR ^a et. al., 2006
	Lupeol (33)	<i>C. langsdorffii</i> (Cascas)	VEIGA JÚNIOR ^a et. al., 2006
	Ácido betulínico (34)	<i>C. langsdorffii</i> (Cascas)	VEIGA JÚNIOR ^a et. al., 2006
Ácidos fenólicos			
	Ácido <i>p</i> -cumárico (35)	<i>C. langsdorffii</i> (Frutos)	BATISTA et. al., 2016
	Ácido <i>o</i> -cumárico (36)	<i>C. langsdorffii</i> (Frutos)	BATISTA et. al., 2016
	Ácido cinâmico (37)	<i>C. langsdorffii</i> (Frutos)	BATISTA et. al., 2016
	Ácido benzoico (38)	<i>C. langsdorffii</i> (Frutos)	BATISTA et. al., 2016
	Ácido gálico (39)	<i>C. langsdorffii</i> (Frutos)	BATISTA et. al., 2016

Ácidos galoilquínicos			
 <p>G1: galoil</p>	 <p>Ácido quínico</p>	 <p>G2: 3-O-metil galoil</p>	
<p>(16): R₃=G1;R₄=H;R₅=H (17): R₃=H; R₄=G1; R₅=G1 (18): R₃=H; R₄=H; R₅=G1 (19): R₃=G2; R₄=H; R₅=H (20): R₃=H; R₄=G2; R₅=H (21): R₃=H; R₄=H; R₅=G2 (22): R₃=G1;R₄=G1;R₅=H (23): R₃=G2; R₄=G1; R₅=H (24): R₃=G1; R₄=G2; R₅=H (25): R₃=G2; R₄=G2; R₅=H (26): R₃=G1; R₄=H; R₅=G1 (27): R₃=G2; R₄=H;R₅=G1 (28): R₃=G1; R₄=H;R₅=G1 (29): R₃=G2;R₄=H;R₅=G2 (30): R₃=H;R₄=G1;R₅=G1 (31): R₃=H; R₄=G2; R₅=G1 (32): R₃=H; R₄=G1; R₅=G2 (33): R₃=H; R₄=G2; R₅=G2 (34): R₃=G1; R₄=G1; R₅=G1 (35): R₃=G2; R₄=G1; R₅=G1 (36): R₃=G1;R₄=G2;R₅=G1 (37): R₃=G1; R₄=G1; R₅=G2 (38): R₃=G2; R₄=G2; R₅=G1 (39): R₃=G2; R₄=G1; R₅=G2 (40): R₃=G1; R₄=G2; R₅=G2 (41): R₃=G2; R₄=G2;R₅=G2</p>	<p>Ác. 3-<i>O</i>-(galoil) quínico (40) Ác. 4-<i>O</i>-(galoil) quínico (41) Ác. 5-<i>O</i>-(galoil) quínico (42) Ác. 3-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil) quínico (43) Ác. 4-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil) quínico (44) Ác. 5-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil) quínico (45) Ác. 3,4-di-<i>O</i>-(galoil) quínico (46) Ác. 3-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil)-4-<i>O</i>-(galoil) quínico (47) Ác. 3-<i>O</i>-(galoil)-4-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil) quínico (48) Ác. 3,4-di-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil) quínico (49) Ác. 3,5-di-<i>O</i>-(galoil) quínico (50) Ác. 3-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil)-5-<i>O</i>-(galoil) quínico (51) Ác. 3-<i>O</i>-(galoil)-5-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil) quínico (52) Ác. 3,5-di-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil) quínico (53) Ác. 4,5-di-<i>O</i>-(galoil) quínico (54) Ác. 4-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil)-5-<i>O</i>-(galoil) quínico (55) Ác. 4-<i>O</i>-(galoil)-5-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil) quínico (56) Ác. 4,5-di-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil) quínico (57) Ác. 3,4,5-tri-<i>O</i>-(galoil) quínico (58) Ác. 3-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil)-4,5-di-<i>O</i>-(galoil) quínico (59) Ác. 4-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil)-3,5-di-<i>O</i>-(galoil) quínico (60) Ác. 5-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil)-3,4-di-<i>O</i>-(galoil) quínico (61) Ác. 3,4-di-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil)-5-<i>O</i>-(galoil) quínico (62) Ác. 3,5-di-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil)-4-<i>O</i>-(galoil) quínico (63) Ác. 4,5-di-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil)-3-<i>O</i>-(galoil) quínico (64) Ác. 3,4,5-tri-<i>O</i>-(3-<i>O</i>-metil galoil) quínico (65)</p>	<p><i>C. langsdorffii</i> (Folhas)</p> <p>MOTTA, 2014; MOTTA^a et al., 2017; MOTTA^b et al., 2017</p>	
Derivados de catequina			
	<p>(-)-Epicatequina galato (66)</p>	<p><i>C. langsdorffii</i> (Frutos)</p>	<p>BATISTA et. al., 2016</p>
	<p>(+)-Catequina (67)</p>	<p><i>C. langsdorffii</i> (Frutos)</p>	<p>BATISTA et. al., 2016</p>
	<p>(-)-Epicatequina (68)</p>	<p><i>C. langsdorffii</i> (Frutos)</p>	<p>BATISTA et. al., 2016</p>
Flavonoides			

Continuação

	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo (69)	<i>C. langsdorffii</i> (Frutos)	BATISTA et. al., 2016
	Quercetina (70)	<i>C. langsdorffii</i> (Frutos)	BATISTA et. al., 2016
	Quercetina-3- <i>O</i> -rutosídeo (71)	<i>C. langsdorffii</i> (Frutos)	BATISTA et. al., 2016
	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (72)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	SOUSA et. al., 2012; BRANCALION, 2010; FURTADO et. al., 2015; COSTA et. al., 2015
	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (73)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	SOUSA et. al., 2012; BRANCALION, 2010; FURTADO et. al., 2015; COSTA et. al., 2015
	Canferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo (74)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	SOUSA et. al., 2012; BRANCALION, 2010; FURTADO et. al., 2015; COSTA et. al., 2015
	3',5-di-hidróxi-4',5,6-tri- metóxi-flavona (75)	<i>C. langsdorffii</i> (Folhas)	COSTA et. al., 2015
Taninos condensados			
	Epicatequina-(4β-8)-catequina (76)	<i>C. langsdorffii</i> (Frutos)	BATISTA et. al., 2016

Conclusão

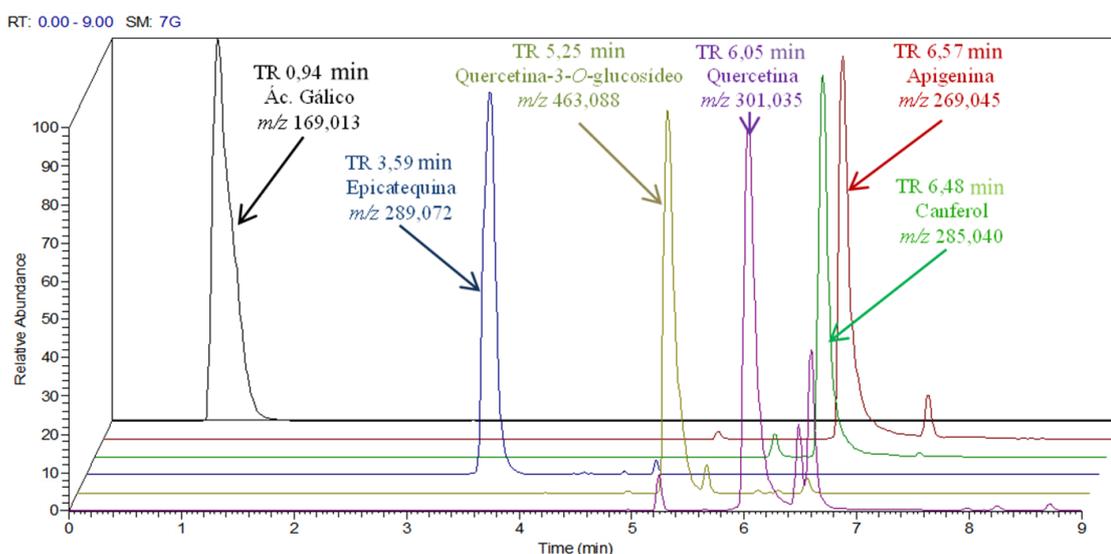
	Epicatequina-(4 β -8)-epicatequina (77)	<i>C.langsdorffii</i> (Frutos)	BATISTA et al., 2016
	Epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina (78)	<i>C.multijuga</i> (cascas)	PEREIRA et al., 2018
	Epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina- (4 β -8)-epiafzelequina (79)	<i>C.multijuga</i> (cascas)	PEREIRA et al., 2018
	Epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina- (4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)- epiafzelequina (80)	<i>C.multijuga</i> (cascas)	PEREIRA et al., 2018
	Epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina- (4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)- epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina (81)	<i>C.multijuga</i> (cascas)	PEREIRA et al., 2018

5.2 Perfis de fragmentação dos metabólitos detectados nos extratos dos órgãos vegetais

O estudo do perfil metabolômico dos extratos dos órgãos vegetais seguiu o modo não seletivo visando à observação simultânea do maior número de metabólitos detectáveis de acordo com a faixa de m/z 100-900 e os perfis de fragmentação MS^2 para os íons precursores em varredura completa. Foram analisados seis padrões de referência: ácido gálico; epicatequina; quercetina-3-*O*-glucosídeo; quercetina; canferol e a apigenina. Os padrões de referência delimitaram regiões específicas do cromatograma entre 0-9 min com uma taxa de variação média no tempo de retenção (TR) de $\pm 0,05$ min, como ilustrado na figura 2 e auxiliaram na detecção dos metabólitos. Os espectros MS^2 dos padrões de referência encontram-se nos anexos 1-6.

Em comparação, o modo de ionização negativa revelou uma melhor sensibilidade e picos mais observáveis que no modo positivo, especialmente na gama de eluição dos polifenóis, como os ácidos galoilquínicos, flavonoides e os taninos condensados. Os polifenóis são substâncias relativamente polares com grupos carboxílicos ou fenóis nas moléculas, e assim podem ser facilmente ionizados no modo de íons negativos. Além disso, as características espectrais de íons negativos mostraram íons $[M-H]^-$ fortes e ruído químico mais baixo, resultando em maiores relações sinal-ruído para os metabólitos detectáveis, portanto, maior sensibilidade (FARAG et al., 2013). Assim, todas as amostras e identificações dos metabólitos foram realizadas no modo de ionização negativa.

Figura 2. Cromatogramas dos padrões de referência analisados.



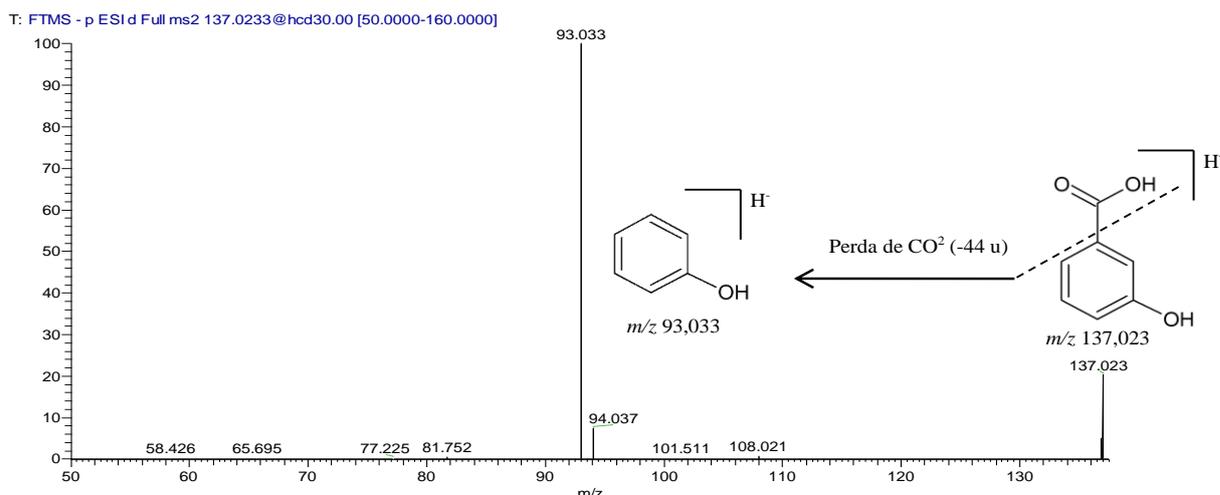
Foram detectados 47 metabólitos, dos quais quatro substâncias foram identificadas com o auxílio dos padrões de referência (TR min e perfil de fragmentação MS²): apigenina, canferol, quercetina e quercetina-3-*O*-glucosídeo. As estruturas dos metabólitos detectados foram estabelecidas por meio da análise comparativa entre os dados espectrométricos dos padrões de referência e vias de fragmentação similares, os dados da literatura científica com procedimentos experimentais similares (ESI-MSⁿ) e os dados espectrais disponíveis nos banco de dados virtuais MoNA – *MassBank of North America* (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/>) e a HMDB – *The Human Metabolome Database* (<http://www.hmdb.ca/>).

5.2.1 Derivados de ácido benzoico e ácido cinâmico

Foram detectados derivados de ácido benzoico e ácido cinâmico, ambos produzidos a partir da via metabólica do ácido chiquímico, uma importante via biosintética na produção das substâncias aromáticas (SHASHANK et al., 2013). As substâncias que possuem o grupo carboxila como principal função na estrutura, apresentam padrões análogos de fragmentação, como a perda de CO₂ (-44 u) e H₂O (-18 u) (KANG e tal., 2016). Por meio dos experimentos de MS² foi possível observar os principais íons fragmentos presentes nessas substâncias ácidas.

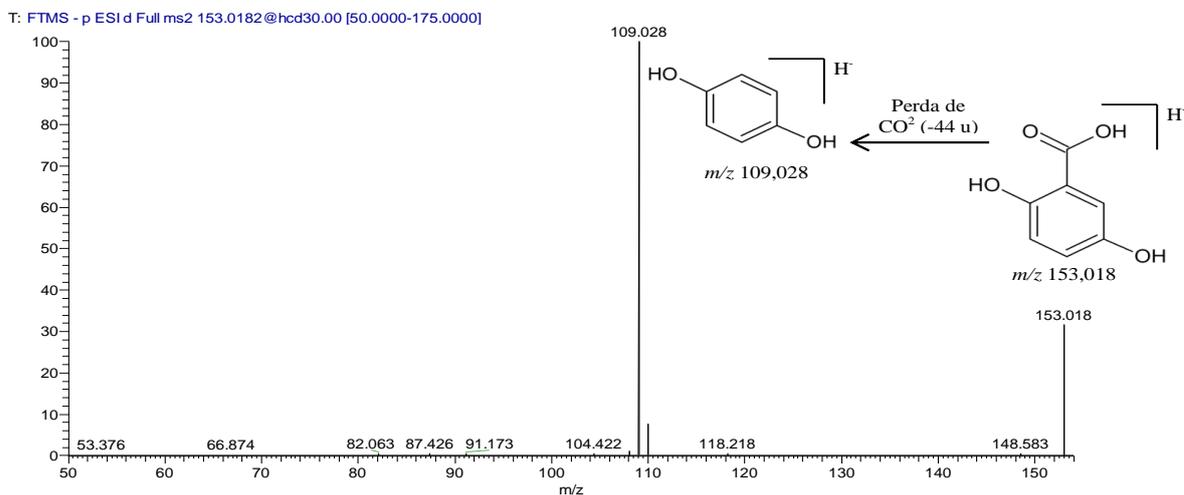
O ácido 3-hidróxi-benzoico foi detectado a partir do íon precursor m/z 137,023 [M-H]⁻ no TR 3,46±0,06 min e o perfil de fragmentação MS² apresentou uma perda característica de CO₂ (-44 u) resultado da descarboxilação e formação do íon fragmento m/z 93,033 [M-CO₂-H]⁻ característico do fenol de acordo com o espectro de MS² na figura 3. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual HMDB e resultados similares foram alcançados por GRUZ et al., 2008.

Figura 3. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 137,023.



O ácido 2,5-di-hidróxi-benzoico também conhecido como ácido gentísico, foi detectado a partir do íon precursor m/z 153,018 [M-H]⁻ no TR 2,21±0,12 min e o perfil de fragmentação MS² apresentou uma perda característica de CO₂ (-44 u), resultado da descarboxilação e formação do íon fragmento m/z 109,028 [M-CO₂-H]⁻ de acordo com o espectro de MS² na figura 4. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual HMDB e resultados similares foram alcançados por CHANDRASEKARA & SHAHIDI, 2011.

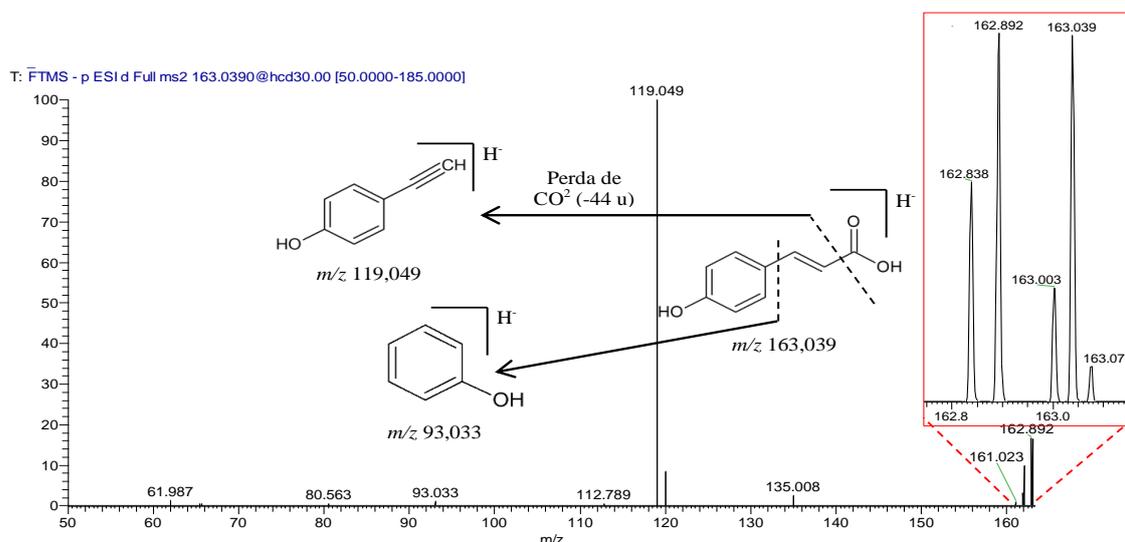
Figura 4. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 153,018.



O ácido cumárico foi detectado a partir do íon precursor m/z 163,039 [M-H]⁻ no TR 3,51 ±0,12 min e o perfil de fragmentação MS² apresentou uma perda característica de CO₂ (-44 u) resultado da descarboxilação e formação do íon fragmento m/z 119,049 [M-CO₂-H]⁻ e o íon fragmento m/z 93,033 [M-C₃H₃O₂-H]⁻ foi característico do fenol de acordo com o espectro de MS² na figura 5. A região aglomerada de íons próximos ao íon precursor deve-se

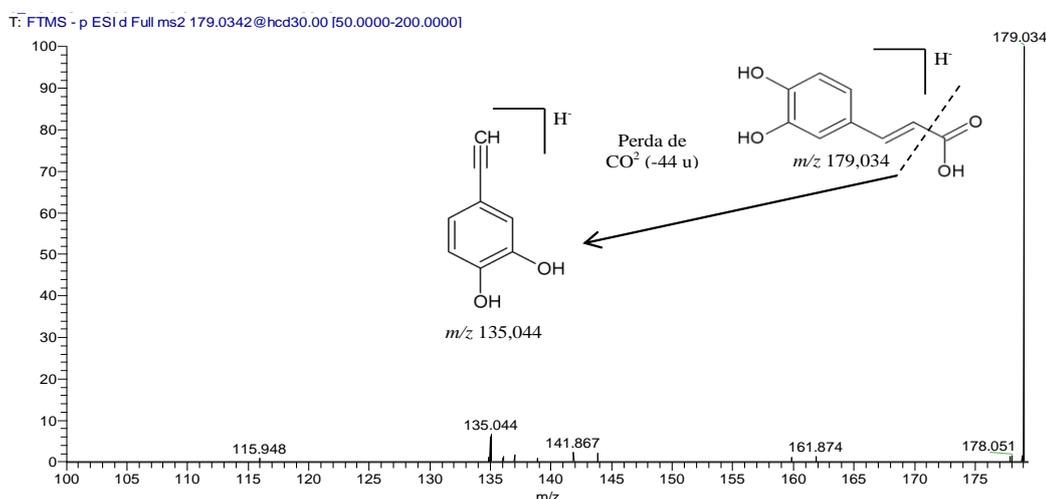
a ionização simultânea de pelo menos outros quatro íons na mesma faixa da massa do íon precursor, pois se trata de uma amostra complexa de extrato vegetal com milhares de metabólitos presentes. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual HMDB e resultados similares foram alcançados por HERAS et al., 2016.

Figura 5. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 163,039.



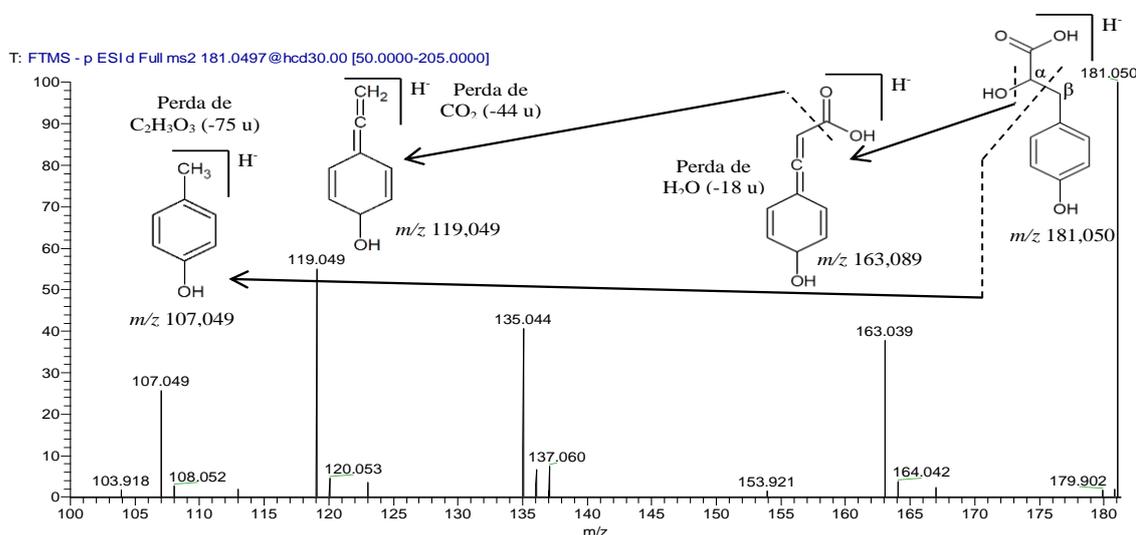
O ácido caféico foi detectado do íon precursor m/z 179,034 $[M-H]^-$ no TR $3,62 \pm 0,02$ min e o perfil de fragmentação MS^2 apresentou perda característica de CO_2 (-44 u) resultado da descarboxilação e formação do íon fragmento m/z 135,044 $[M-CO_2-H]^-$ de acordo com o espectro de MS^2 na figura 6. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual HMDB e resultados similares foram alcançados por HERAS et al., 2016.

Figura 6. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 179,034.



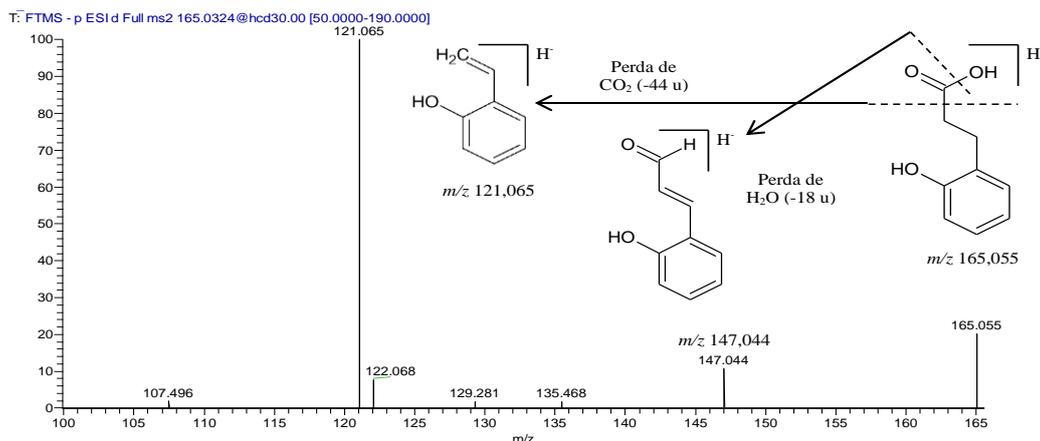
O ácido 4-hidróxi-feniláctico também conhecido como ácido 2-hidróxi-3-(4-hidroxi-fenil)-propanoico foi detectado a partir do íon precursor m/z 181,050 $[M-H]^-$ no TR $3,72 \pm 0,04$ min e no perfil de fragmentação MS^2 apresentaram-se perdas características de H_2O (-18 u) e CO_2 (-44 u) resultando desde a desidratação na formação do íon fragmento m/z 163,039 $[M-H_2O-H]^-$ e a consequente descarboxilação resultando na formação do íon fragmento m/z 119,049 $[M-CO_2-H]^-$ de acordo com o espectro de MS^2 na figura 7. O íon fragmento m/z 107,049 foi resultante da dissociação da ligação entre os carbonos α e β próximos ao grupo carboxílico. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis nos bancos de dados virtuais HMDB e MoNA. Resultados similares foram obtidos por SANTOS et al., 2010.

Figura 7. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 181,050.



O ácido 3-*O*-(2-hidróxi-fenil) propanoico foi detectado a partir do íon precursor m/z 165,055 $[M-H]^-$ no TR $4,82 \pm 0,05$ min e no perfil de fragmentação MS^2 apresentaram-se perdas características de H_2O (-18 u) e CO_2 (-44 u) resultando nos íons fragmentos m/z 147,044 $[M-H_2O-H]^-$ e 121,065 $[M-CO_2-H]^-$ decorrentes dos processos de desidratação e descarboxilação do íon precursor m/z 165,055 de acordo com o espectro MS^2 na figura 8. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtuais HMDB e resultados similares foram alcançados por JAGANATH et al., 2009.

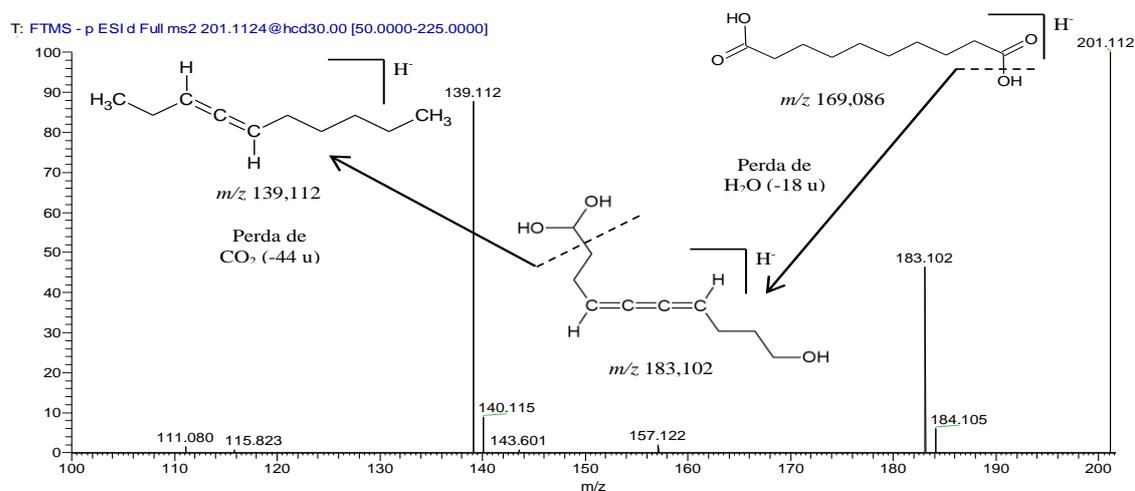
Figura 8. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 165,055.



5.2.2 Derivados de ácidos graxos e ácidos diterpenos

O ácido sebáico foi detectado a partir do íon precursor m/z 201,112 $[M-H]^-$ no TR $6,11 \pm 0,04$ min e no perfil de fragmentação MS^2 apresentaram-se perdas características de H_2O (-18 u) e CO_2 (-44 u) resultando nos íons fragmentos m/z 183,102 $[M-H_2O-H]^-$ e 139,112 $[M-CO_2-H]^-$ decorrentes dos processos de desidratação e descarboxilação subsequentes da fragmentação do íon precursor m/z 201,112 de acordo com o espectro MS^2 na figura 9, a seguir. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtuais HMDB e MoNA e resultados similares foram alcançados por KUMAR et al., 2004.

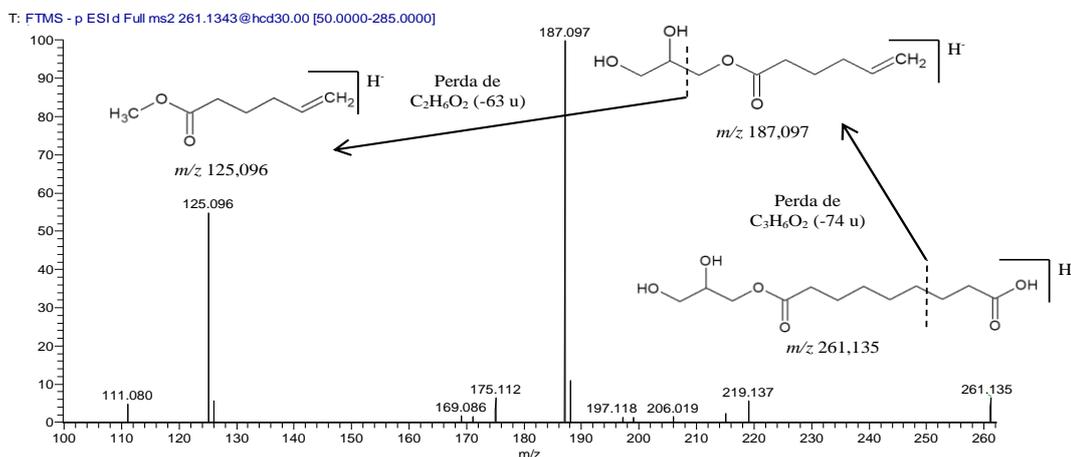
Figura 9. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 201,112.



O ácido 9-(2,3-di-hidroxiopropoxi)-9-oxononânico foi detectado a partir do íon precursor m/z 261,135 $[M-H]^-$ no TR $5,31 \pm 0,08$ min e o perfil de fragmentação MS^2

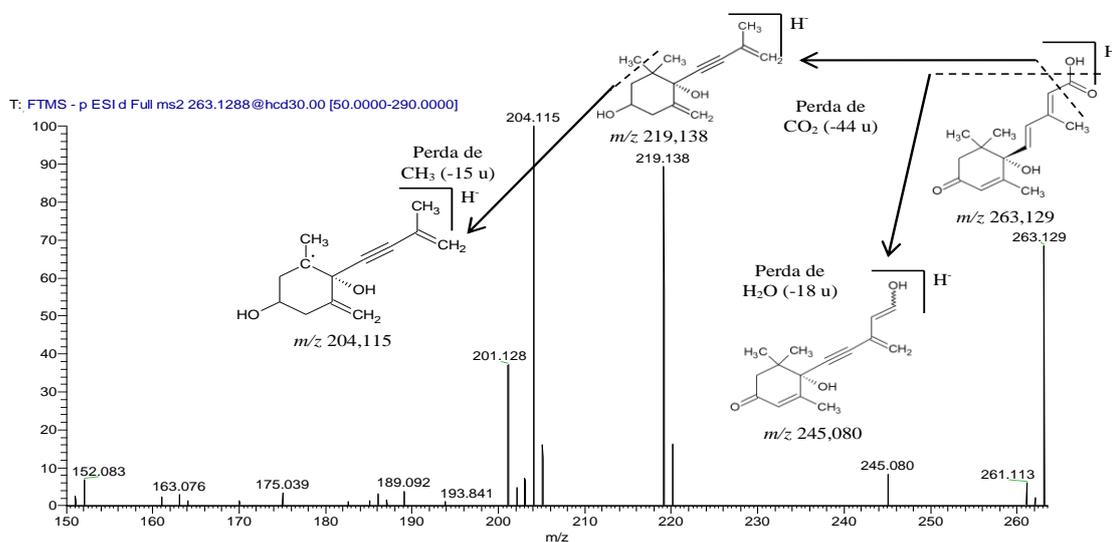
apresentaram-se perdas características de $C_3H_6O_2$ (-74 u) e C_2H_6O (-63 u) resultando nos íons fragmentos m/z 187,097 $[M - C_3H_6O_2 - H]^-$ e 125,096 $[M - C_3H_6O_2 - C_2H_6O - H]^-$ de acordo com o espectro MS^2 na figura 10. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual MoNA.

Figura 10. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 261,135.



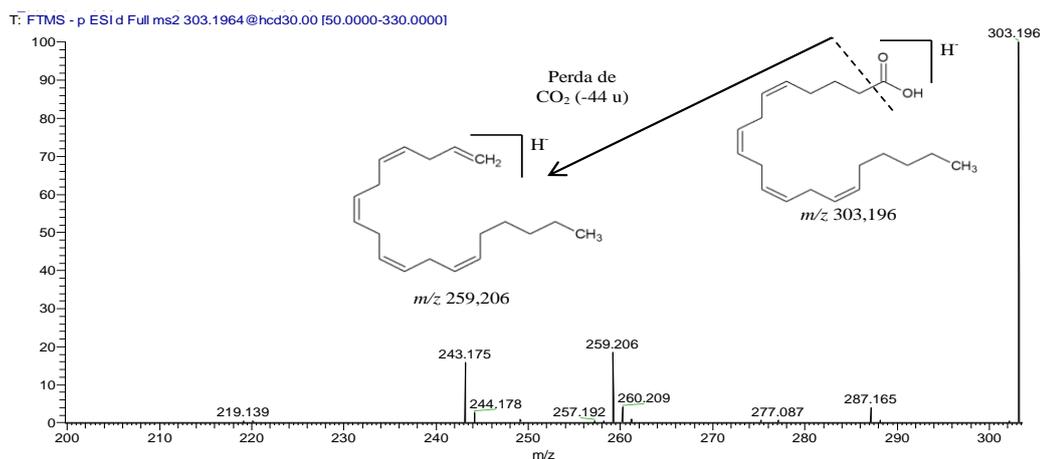
O ácido abscísico foi detectado a partir do íon precursor m/z 263,129 $[M - H]^-$ no TR $5,31 \pm 0,08$ min e o perfil de fragmentação MS^2 apresentaram-se perdas características de H_2O (-18 u) e CO_2 (-44 u) resultando nos íons fragmentos m/z 245,080 $[M - H_2O - H]^-$ e 219,138 $[M - CO_2 - H]^-$. A partir do íon fragmento m/z 219,138 inferiu-se uma perda de radical $\bullet CH_3$ (-15 u) resultando no íon fragmento m/z 204,115 $[M - CO_2 - CH_3 - H]^-$ de acordo com o espectro MS^2 na figura 11. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtuais HMDB e MoNA. Resultados similares foram alcançados por ROSS et al., 2004.

Figura 11. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 263,129.



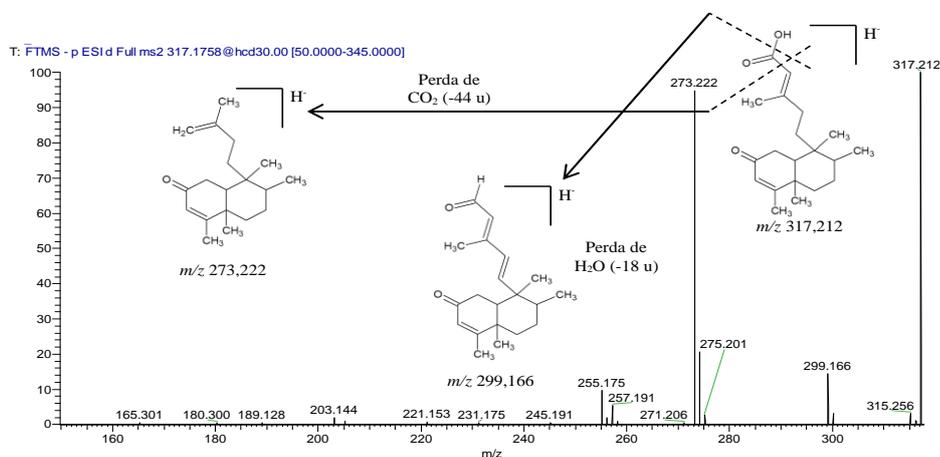
O ácido araquidônico foi detectado a partir do íon precursor m/z 303,196 $[M-H]^-$ no TR $7,31 \pm 0,08$ min e o perfil de fragmentação MS^2 apresentou uma perda característica de CO_2 (-44 u) resultando no íon fragmento m/z 259,206 $[M-CO_2-H]^-$ decorrente do processo de descarboxilação de acordo com o espectro MS^2 na figura 12. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtuais HMDB e MoNA. Resultados similares foram alcançados por BOLLINGER et al., 2013.

Figura 12. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 303,196.



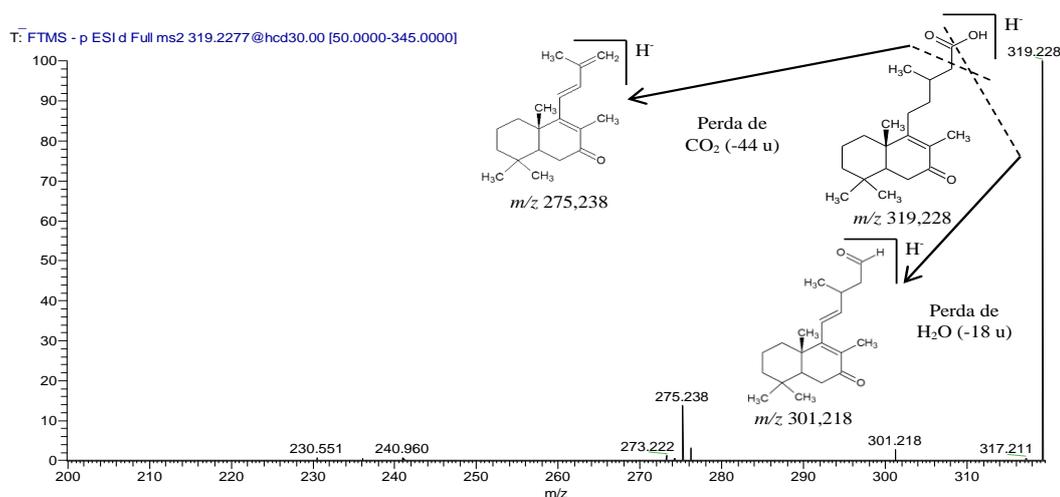
O ácido (*E*)-5-(1,2,4a,5-tetrametil-7-oxo-3,4,8,8a-tetra-hidro-2*H*-naftalen-1-il) -3-metilpent-2-enóico foi detectado a partir do íon precursor m/z 317,212 $[M-H]^-$ no TR $8,08 \pm 0,05$ min e o perfil de fragmentação MS^2 apresentaram-se perdas características de H_2O (-18 u) e CO_2 (-44 u) resultando nos íons fragmentos m/z 299,166 $[M-H_2O-H]^-$ e 273,222 $[M-CO_2-H]^-$ decorrentes dos processos de desidratação e descarboxilação de acordo com o espectro MS^2 na figura 13. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtuais MoNA.

Figura 13. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 317,212.



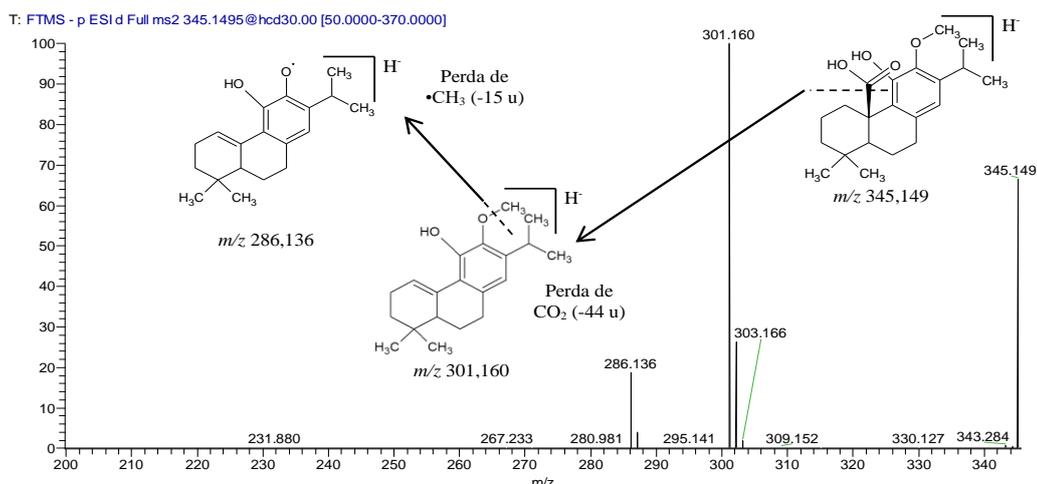
O ácido 5-[(8a *S*)-2,5,5,8a-tetrametil-3-oxo-4a,6,7,8-tetrahydro-4*H*-naftalen-1-il]-3-metilpentanóico foi detectado a partir do íon precursor m/z 319,228 $[M-H]^-$ no TR $8,20 \pm 0,10$ min e no perfil de fragmentação MS^2 apresentaram-se perdas características de H_2O (-18 u) e CO_2 (-44 u) resultando nos íons fragmentos m/z 301,218 $[M-H_2O-H]^-$ e 275,238 $[M-CO_2-H]^-$ decorrentes dos processos de desidratação e descarboxilação de acordo com o espectro MS^2 na figura 14. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual MoNA.

Figura 14. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 319,228.



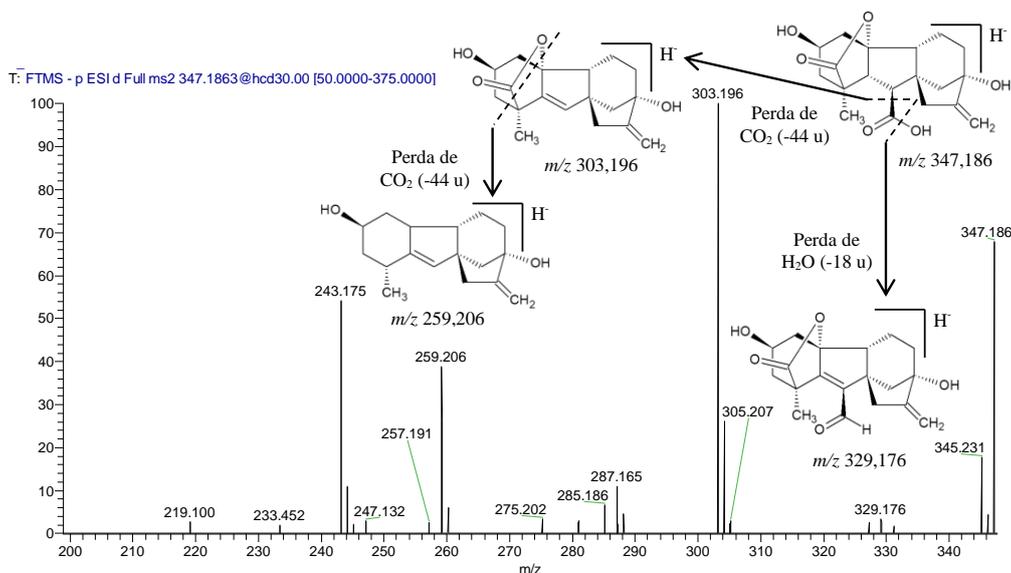
O ácido 1,3,4,9,10,10a-hexahidro-5-hidróxi-6-metóxi-1,1-dimetil-7-(1-metiletil)-, (4a*R*)-4a(2*H*)-fenantranocarboxílico foi detectado a partir do íon precursor m/z 345,145 $[M-H]^-$ no TR $8,77 \pm 0,02$ min e no perfil de fragmentação MS^2 apresentaram-se perdas características de CO_2 (-44 u) e radical $\bullet CH_3$ (-15 u) e resultando nos íons fragmentos m/z 301,160 $[M-CO_2-H]^-$ e 286,136 $[M-CO_2-CH_3-H]^-$ decorrentes dos processos de descarboxilação e dissociação homolítica subsequente do íon precursor m/z 301,160 de acordo com o espectro MS^2 na figura 15. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual MoNA.

Figura 15. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 345,149.



A giberelina A29 foi detectada a partir do íon precursor m/z 347,186 $[M-H]^-$ no TR $7,30 \pm 0,03$ min e o perfil de fragmentação MS^2 apresentaram-se perdas características de H_2O (-18 u) e duas perdas subsequentes de CO_2 (-44 u) que resultaram nos íons fragmentos m/z 329,176 $[M-H_2O-H]^-$, 303,196 $[M-CO_2-H]^-$ e 259,206 $[M-2CO_2-H]^-$ decorrentes dos processos de desidratação e descarboxilações subsequentes do íon precursor m/z 347,186 de acordo com o espectro MS^2 na figura 16. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual MoNA e resultados similares foram alcançados por SHARMA et al., 2004.

Figura 16. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 347,186.

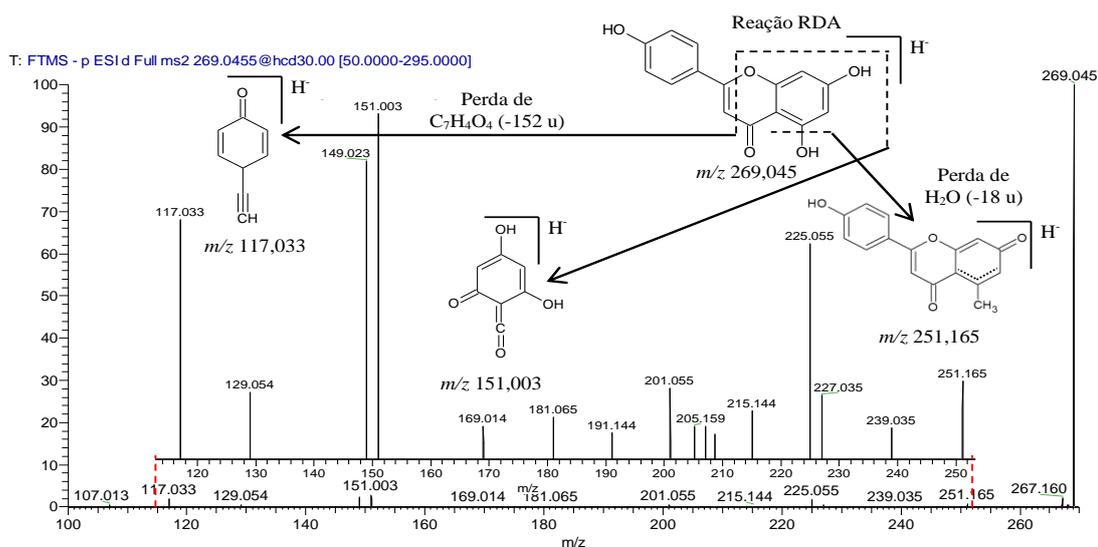


5.2.3 Flavonoides Agliconas

Os flavonoides ao fragmentarem revelam vários íons fragmentos, alguns íons fragmentos de suma importância para a determinação do flavonoide. Geralmente, no modo negativo, a perda de grupos como H₂O (-18 u), CO (-28 u), C₂H₂O (-42 u) e CO₂ (-44 u) e suas perdas sucessivas são comuns. Os flavonoides metilados ou metoxilados são caracterizados pela perda de CH₃ (-15 u) no modo negativo (RIJKE et al., 2006). Ainda sim, os fragmentos estruturalmente mais informativos são os produzidos na reação retro-Diels-Alder (RDA). A reação de RDA é a principal reação de fragmentação de flavonoides, particularmente importante para a caracterização estrutural de agliconas.

A apigenina foi detectado a partir do íon precursor m/z 269,045 [M-H]⁻ no TR 6,56±0,03 min e o perfil de fragmentação MS² apresentou uma perda característica de H₂O (-18 u) e a reação RDA resultou em dois íons fragmentos específicos m/z 151,003 [M-C₈H₆O-H]⁻ e 117,033 [M-C₇H₄O₄-H]⁻ decorrentes das perdas de C₈H₆O (-118 u) e C₇H₄O₄ (-152 u), respectivamente, de acordo com o espectro MS² na figura 17. O perfil de fragmentação foi similar ao padrão de referência apigenina (anexo 6) e foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual HMDA, e resultados similares foram alcançados por KECKES et al., 2013.

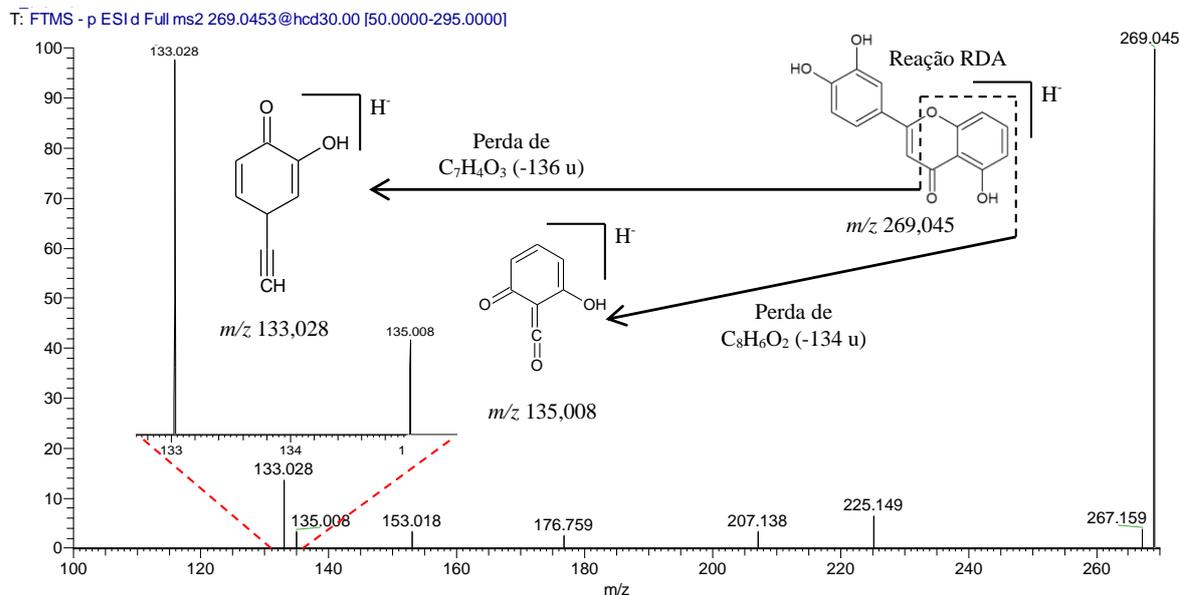
Figura 17. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 269,045.



A 5,3',4'-tri-hidroxiavona foi detectado a partir do íon precursor m/z 269,045 [M-H]⁻ no TR 5,72±0,06 min e o perfil de fragmentação MS² apresentaram perdas características da reação RDA com a detecção de dois íons fragmentos específicos m/z

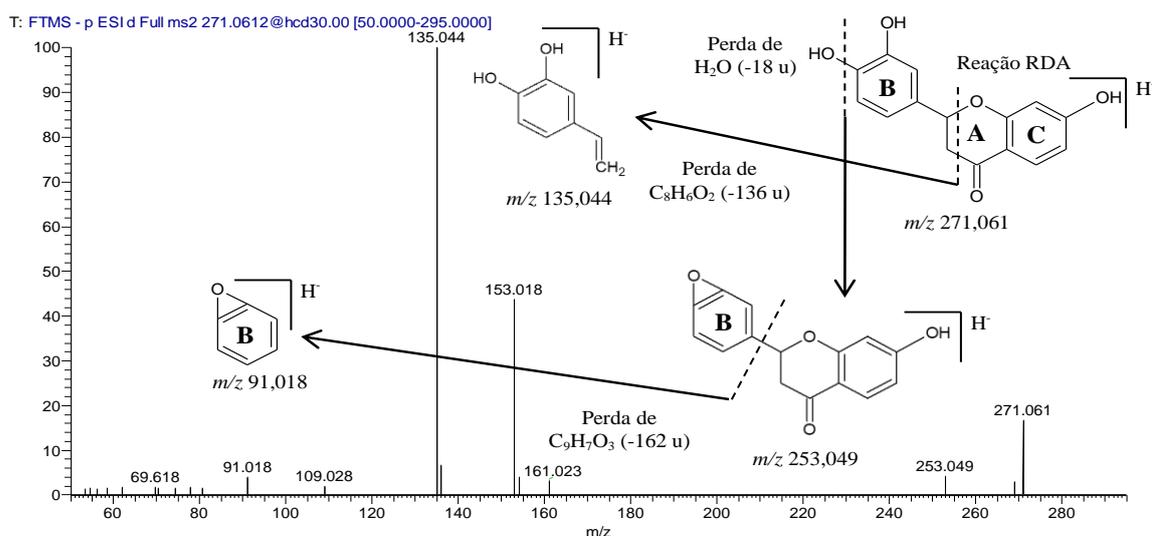
135,008 [M-C₈H₆O₂-H]⁻ e 133,028 [M-C₇H₄O₃-H]⁻ resultados das perdas de C₈H₆O₂ (-134 u) e C₇H₄O₃ (-136 u), respectivamente, de acordo com o espectro MS² na figura 18. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual MoNA e resultados similares foram alcançados por KECKES et al., 2013.

Figura 18. Perfil de fragmentação do íon precursor *m/z* 269,045.



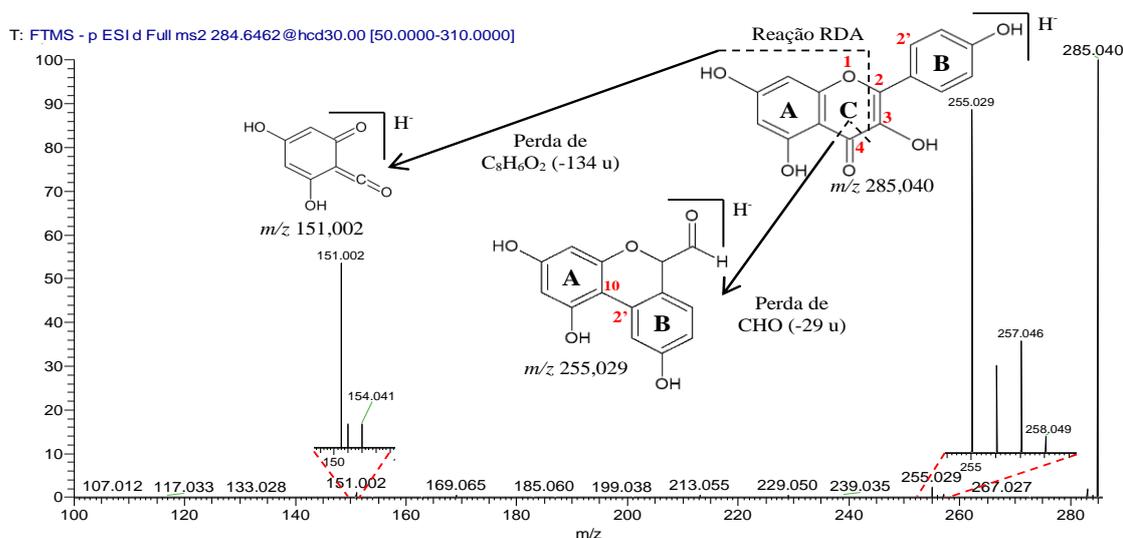
A 2-(3,4-di-hidroxifenil)-7-hidroxi-2,3-di-hidrocrome-4-ona foi detectado a partir do íon precursor *m/z* 271,061 [M-H]⁻ no TR 5,17±0,02 min e o perfil de fragmentação MS² apresentou perda característica de H₂O (-18 u) com a formação do íon fragmento *m/z* 253,049 [M-H₂O-H]⁻ e a partir da reação RDA foi possível detectar um íon fragmento específico *m/z* 135,044 [M-C₈H₆O₂-H]⁻ que resultou da perda de C₈H₆O₂ (-136 u), ainda sim, foi detectado o íon fragmento em *m/z* 91,018 como resultado da dissociação do anel B de acordo com o espectro MS² na figura 19. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual MoNA e resultados similares foram alcançados por KECKES et al., 2013.

Figura 19. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 271,061.



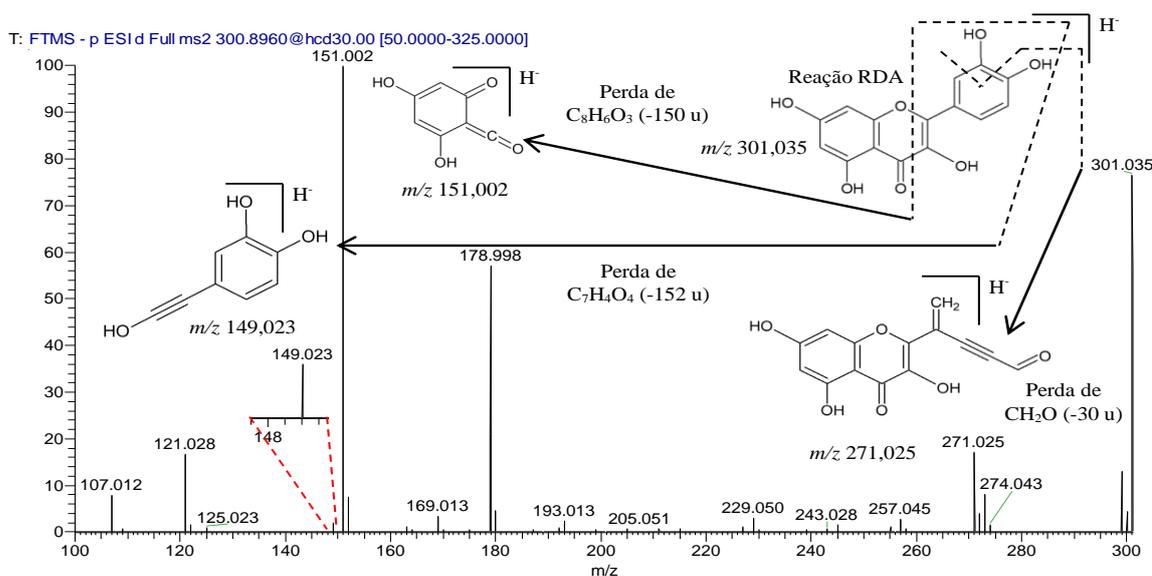
O canferol foi detectado a partir do íon precursor no m/z 285,040 $[M-H]^-$ no TR $6,47 \pm 0,10$ min e o perfil de fragmentação MS^2 apresentou perda característica de CHO (-29 u) seguida da dissociação da ligação entre os carbonos C-3 e C-4 no anel C e rotação em 180° da ligação entre o O-1 e C-2 do anel C, resultando na rotação do anel B e a ligação do C-2' do anel C com o C-10 do anel A formando uma estrutura do anel fundido resultando na formação do íon fragmento m/z 255,029 $[M-CHO-H]^-$ e a partir da reação RDA foi possível detectar um íon fragmento específico m/z 151,002 $[M-C_8H_6O_2-H]^-$ que resultou da perda de $C_8H_6O_2$ (-134 u) de acordo com o espectro MS^2 na figura 20. O perfil de fragmentação foi similar ao padrão de referência canferol (anexo 5). Resultados similares foram alcançados por JUSTESEN, 2001.

Figura 20. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 285,040.



A quercetina foi detectada a partir do íon precursor m/z 301,035 $[M-H]^-$ no TR $6,06 \pm 0,05$ min e o perfil de fragmentação MS^2 apresentou perda característica de CH_2O (-30 u) resultando no íon fragmento m/z 271,025 $[M-CH_2O-H]^-$ e a partir da reação RDA foi possível detectar dois íons fragmentos específicos m/z 151,002 e 149,023 que resultou da perda de $C_8H_6O_3$ (-150 u) e $C_7H_4O_4$ (-152 u) de acordo com o espectro MS^2 na figura 21. O perfil de fragmentação foi similar padrão de referência quercetina (anexo 4). Resultados similares foram alcançados por KECKES et al., 2013.

Figura 21. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 301,035.



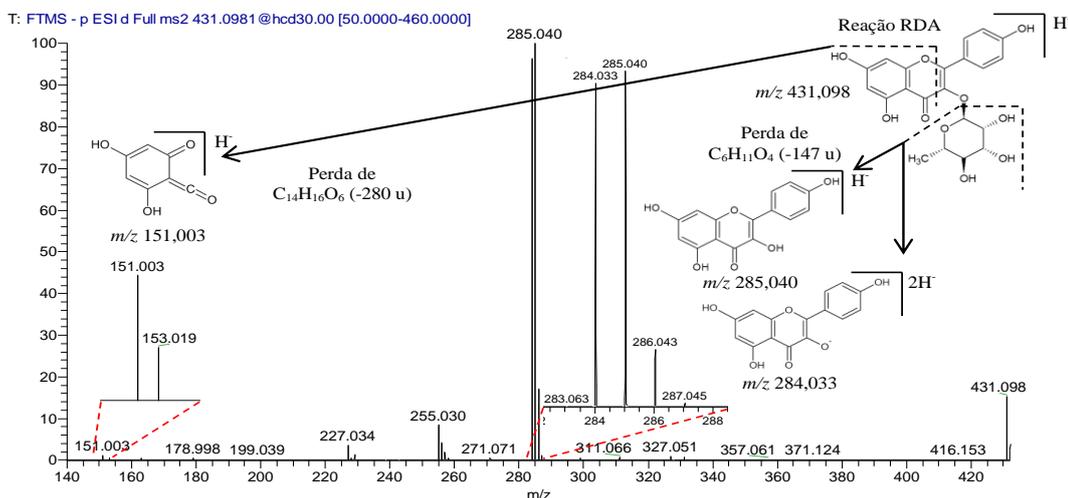
5.2.4 Flavonoides Glicosilados

Os flavonoides glicosilados ou também conhecidos como glicosídeos são formados pela aglicona – glicídios, gliconas ou “oses” (geralmente monossacarídeos). As fragmentações em MS^2 fornecem informações estruturais sobre a aglicona presente no glicosídeo e o número e o tamanho dos açúcares (hexose, desoxihexose ou pentose) substituídos na aglicona de acordo com a dissociação das ligações *O*-glicosídicas (NICOLAU et al., 2016).

O canferol-3-*O*-ramnosídeo foi detectado a partir do íon precursor m/z 431,098 $[M-H]^-$ no TR $5,91 \pm 0,11$ min e o perfil de fragmentação MS^2 apresentou perda característica do grupo ramnosídeo $C_6H_{11}O_4$ (-147 u) resultando nos íons fragmentos m/z 284,033 $[M-ramnosídeo-2H]^-$ e 285,040 $[M-ramnosídeo-H]^-$ característicos de canferol desprotonados e a partir da reação RDA foi possível detectar um íon fragmento específico em m/z 151,003 $[M-$

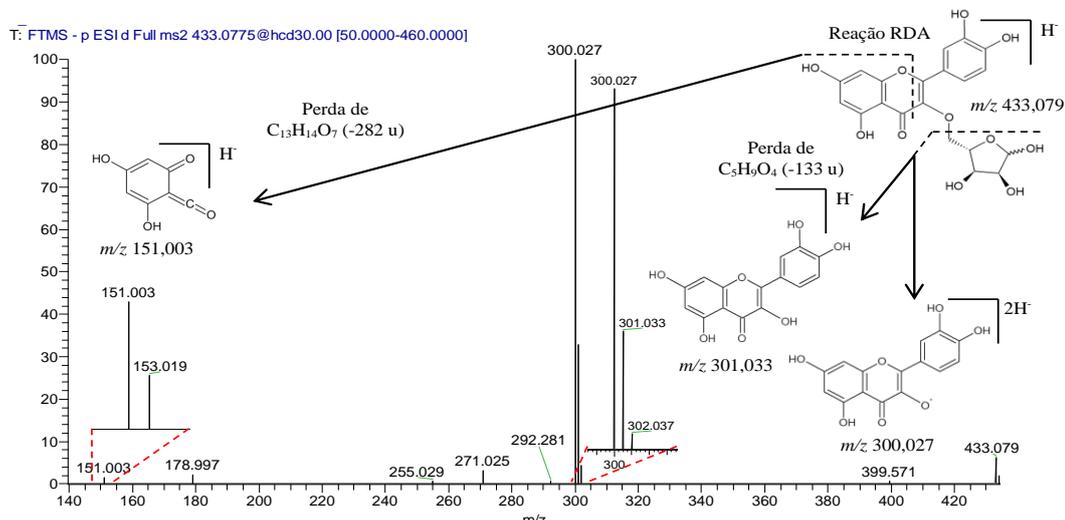
$C_{14}H_{16}O_6-H]^-$ que resultou da perda de $C_{14}H_{16}O_6$ (-280 u) de acordo com o espectro MS^2 na figura 22. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual MoNA. Resultados similares foram alcançados por MOTTA^a et al., 2017.

Figura 22. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 431,098.



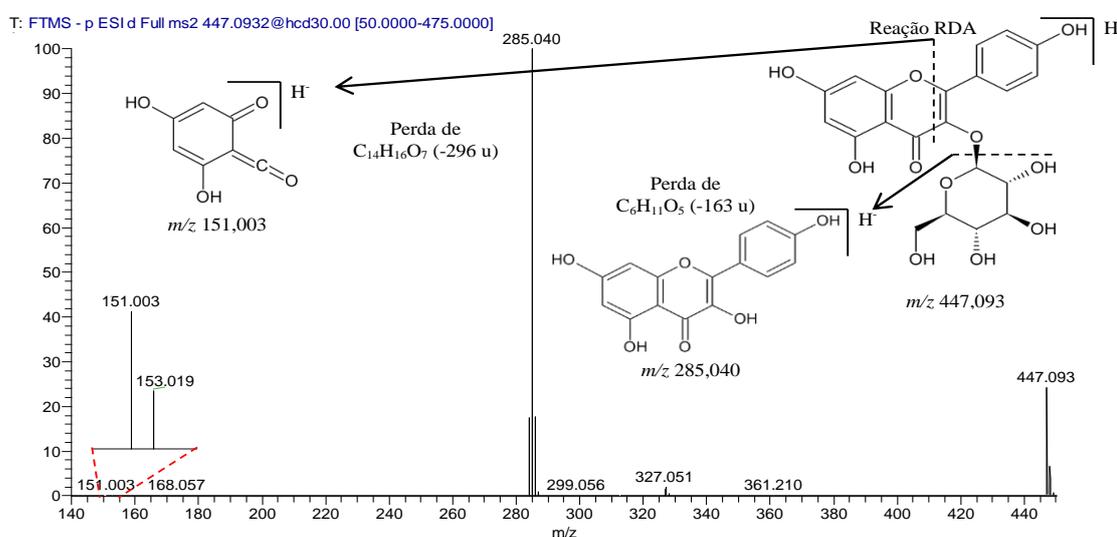
A quercetina-3-*O*-pentosídeo foi detectada a partir do íon precursor m/z 433,079 $[M-H]^-$ no TR $5,40 \pm 0,05$ min e o perfil de fragmentação MS^2 apresentou perda característica do grupo pentosídeo $C_5H_9O_4$ (-133 u) resultando nos íons fragmentos m/z 301,033 $[M\text{-pentosídeo-}H]^-$ e 300,027 $[M\text{-pentosídeo-}2H]^-$ característicos da quercetina desprotonada e a partir da reação RDA foi possível detectar um íon fragmento específico em m/z 151,003 $[M\text{-}C_{15}H_{14}O_7-H]^-$ que resultou da perda de $C_{15}H_{14}O_7$ (-282 u) de acordo com o espectro MS^2 na figura 23. Resultados similares para o perfil de fragmentação da quercetina-3-*O*-pentosídeo foram alcançados por CELLI et al., 2011; TIBERTI et al., 2007.

Figura 23. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 433,079.



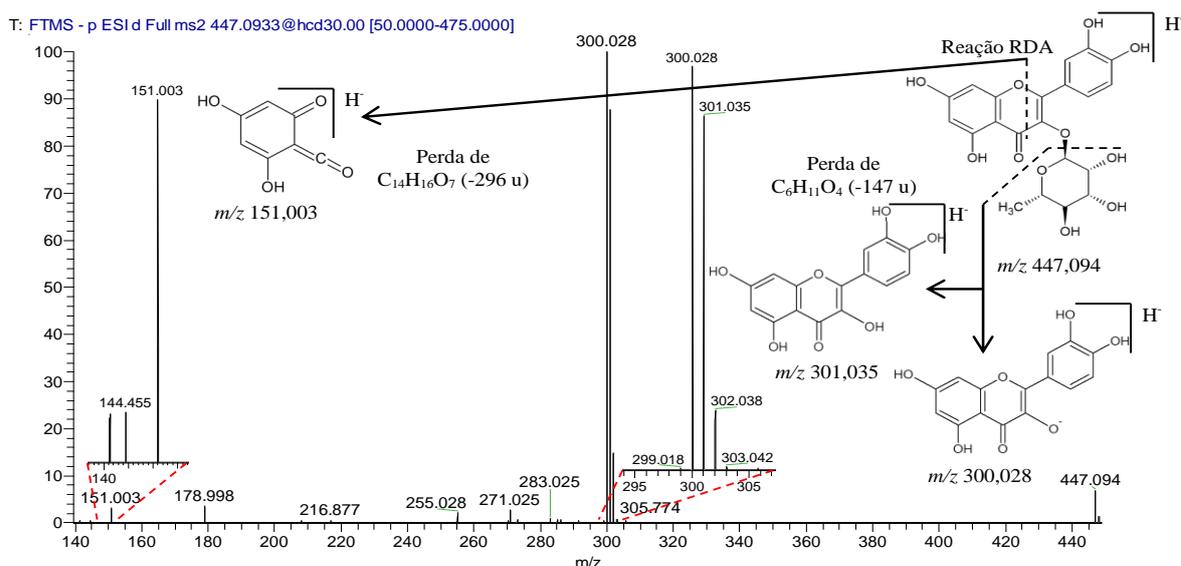
O canferol-3-*O*-glucosídeo foi detectado a partir do íon precursor m/z 447,093 [M-H]⁻ no TR 5,14±0,05 min e o perfil de fragmentação MS² apresentou perda característica do grupo glucosídeo C₆H₁₁O₅ (-163 u) por meio da dissociação da ligação 3-*O*-glicosídica resultando no íon fragmento m/z 285,040 [M-glucosídeo-H]⁻ característico da canferol desprotonado e a partir da reação RDA foi possível detectar um íon fragmento específico em m/z 151,003 [M-C₁₄H₁₆O₇-H]⁻ que resultou da perda de C₁₄H₁₆O₇ (-296 u) de acordo com o espectro MS² na figura 24. Resultados similares para o perfil de fragmentação do canferol-3-*O*-glucosídeo foram alcançados por HERAS et al., 2016; CORREIA et al., 2006.

Figura 24. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 447,093.



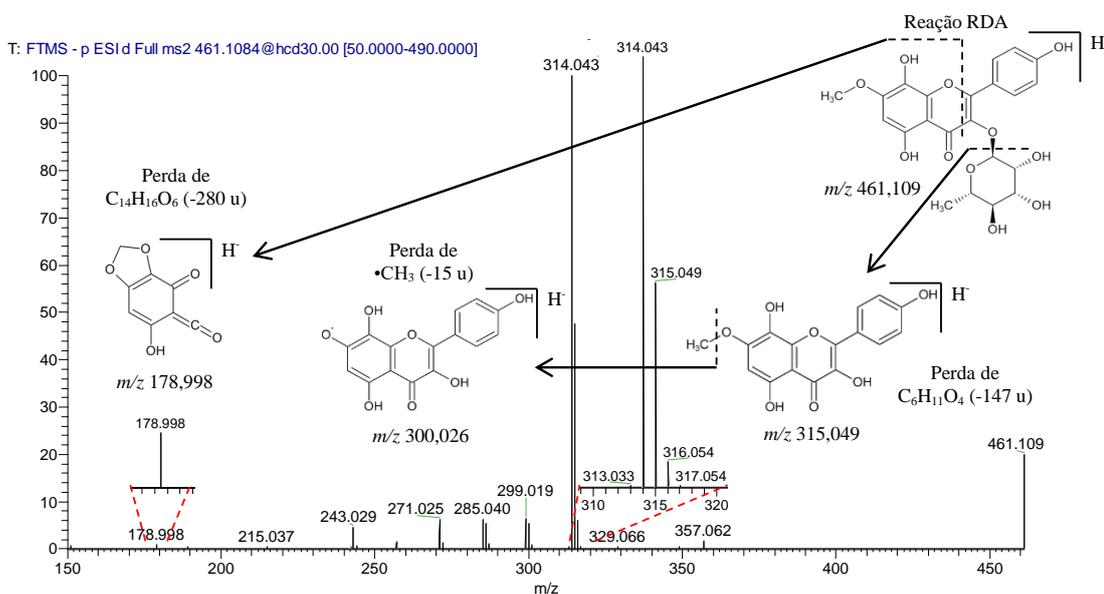
A quercetina-3-*O*-ramnosídeo foi detectada a partir do íon precursor m/z 447,093 [M-H]⁻ no TR 5,65±0,15 min e o perfil de fragmentação MS² apresentou perda característica do grupo ramnosídeo C₆H₁₁O₄ (-147 u) por meio da dissociação da ligação 3-*O*-glicosídica resultando nos íons fragmentos m/z 300,028 [M-ramnosídeo-2H]⁻ e 301,035 [M-ramnosídeo-H]⁻ característicos de quercetina desprotonada e a partir da reação RDA foi possível detectar um íon fragmento específico em m/z 151,003 [M-C₁₄H₁₆O₇-H]⁻ que resultou da perda de C₁₄H₁₆O₇ (-296 u) de acordo com o espectro MS² na figura 25. Resultados similares para o perfil de fragmentação do canferol-3-*O*-glucosídeo foram alcançados por LEMOS et al., 2015; COSTA et al., 2015; FURTADO et al., 2015.

Figura 25. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 447,094.



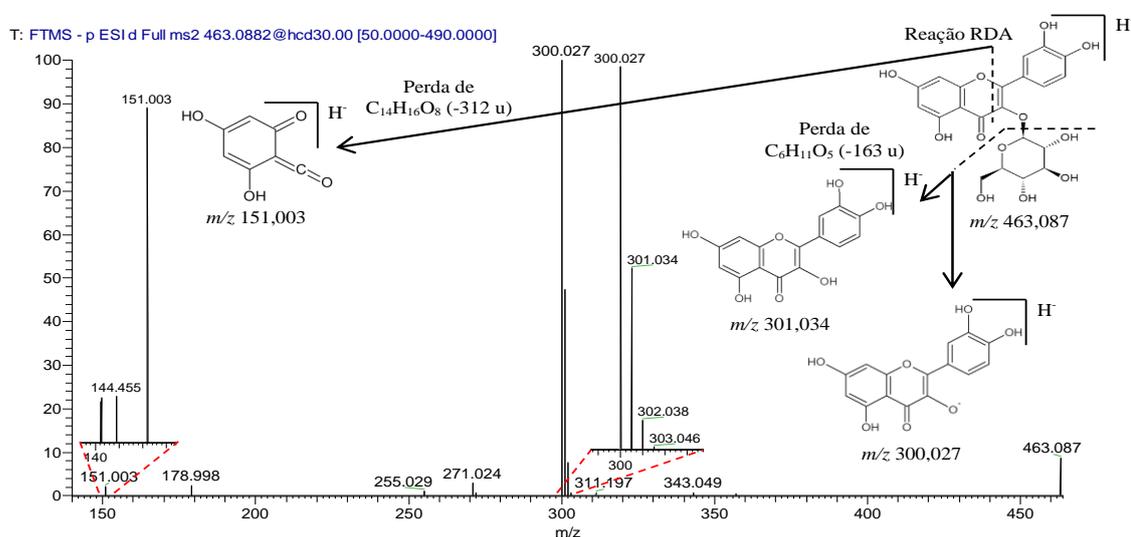
O 5,8-di-hidróxi-2-(4-hidroxifenil)-7-metóxi-cromen-4-ona-3-*O*-ramnosídeo foi detectado a partir do íon precursor m/z 461,109 $[M-H]^-$ no TR $5,79 \pm 0,10$ min e o perfil de fragmentação MS^2 apresentou perda característica do grupo ramnosídeo $C_6H_{11}O_4$ (-147 u) por meio da dissociação da ligação 3-*O*-glicosídica resultando no íon fragmento m/z 315,049 $[M\text{-ramnosídeo-H}]^-$. Já a perda subsequente do radical $\bullet CH_3$ resultou no íon fragmento m/z 300,026 $[M\text{-ramnosídeo-}CH_3\text{-H}]^-$ e a partir da reação RDA foi possível detectar um íon fragmento específico em m/z 178,998 que resultou da perda de $C_{14}H_{16}O_6$ (-280 u) de acordo com o espectro MS^2 na figura 26. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual MoNA.

Figura 26. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 461,109.



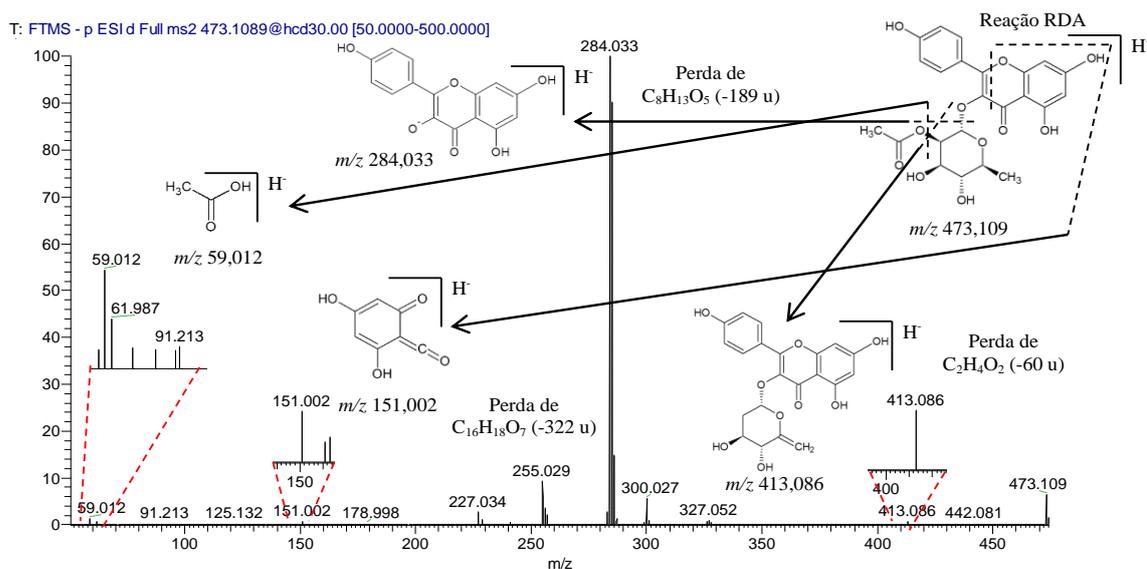
A quercetina-3-*O*-glucosídeo também conhecida como isoquercitrina foi detectada a partir do íon precursor m/z 463,102 $[M-H]^-$ no TR 6,30±0,09 min e o perfil de fragmentação MS² apresentou perda característica do grupo glucosídeo C₆H₁₁O₅ (-163 u) por meio da dissociação da ligação 3-*O*-glicosídica resultando nos íons fragmentos m/z 301,034 $[M\text{-glucosídeo-H}]^-$ e 300,027 $[M\text{-glucosídeo-2H}]^-$ característicos da quercetina desprotonada. A partir da reação RDA foi possível detectar um íon fragmento específico em m/z 151,003 que resultou da perda de C₁₄H₁₆O₈ (-312 u) de acordo com o espectro MS² na figura 27. Resultados para o perfil de fragmentação foram similares ao padrão de referência quercetina-3-*O*-glucosídeo (anexo 3). Resultados similares foram alcançados por HERAS et al., 2016; KELEBEK, 2006.

Figura 27. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 463,087.



A canferol-3-*O*-(2-acetil-ramnosídeo) foi detectada a partir do íon fragmento m/z 473,109 $[M-H]^-$ no TR 6,25±0,05 min e o perfil de fragmentação MS² apresentou perda característica do grupo 2-acetil-ramnosídeo C₈H₁₃O₅ (-189 u) por meio da dissociação da ligação 3-*O*-glicosídica resultando nos íons fragmentos m/z 284,033 $[M\text{-(2-acetil-ramnosídeo)-2H}]^-$ característico do canferol desprotonado. Alguns íons fragmentos específicos foram detectados, como o íon m/z 413,086 que resultou da perda do grupo acetil C₂H₄O₂ (-60 u), o íon m/z 151,002 resultou da reação RDA e o íon m/z 59,012 caracterizou o grupo acetil de acordo com o espectro MS² na figura 28. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual HMDB. Resultados similares para o perfil de fragmentação do canferol-3-*O*-(2-acetil-ramnosídeo) foram alcançados por YIN et al., 2015.

Figura 28. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 473,109.

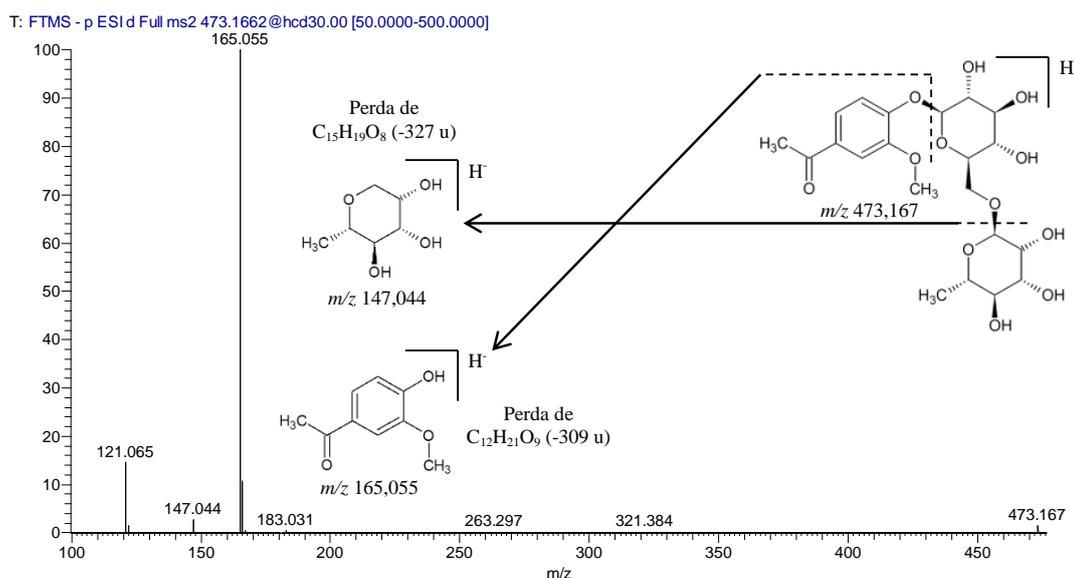


5.2.5 Glicosídeo fenólico e os Ácidos galoilquínicos

Os ácidos fenólicos possuem como núcleo principal composto por derivados de ácido hidroxibenzoicos e/ou ácidos hidroxicinâmicos, os quais podem ser esterificados por uma ou mais unidades de ácido fenólico e/ou glicosídeos (REZENDE et al., 2016). A estrutura química dos ácidos fenólicos pode ser avaliada e confirmada a partir de experiências MS2 os quais fornecem informações estruturais sobre o núcleo principal e os grupos substituintes presentes (LI & SEERAM, 2018). Quimicamente, essas substâncias possuem no mínimo um anel aromático no qual pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila.

O 4-acetil-2-metoxifenil-1-*O*-beta-*D*-glucopiranosídeo-6-*O*-(6-desoxi-alfa-*L*-manopiranosil) foi detectada a partir do íon precursor m/z 473,167 $[M-H]^-$ no TR $4,49 \pm 0,09$ min e o perfil de fragmentação MS² apresentou perda característica do grupo glucopiranosídeo-6-desoxi-manopiranosil $C_{12}H_{21}O_9$ (-309 u) por meio da dissociação da ligação 1-*O*-glicosídica resultando no íon fragmento m/z 165,055 $[M-C_{12}H_{21}O_9-H]^-$ característico da 4-acetil-2-metoxifenil e a dissociação da ligação 6-*O*-glicosídica levou a detecção do íon fragmento m/z 147,044 $[M-C_{15}H_{19}O_8-H]^-$ que resultou da perda de $C_{15}H_{19}O_8$ (-327 u) de acordo com o espectro MS² na figura 29. O perfil de fragmentação foi comparado com os dados espectrométricos disponíveis no banco de dados virtual MoNA.

Figura 29. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 473,167.



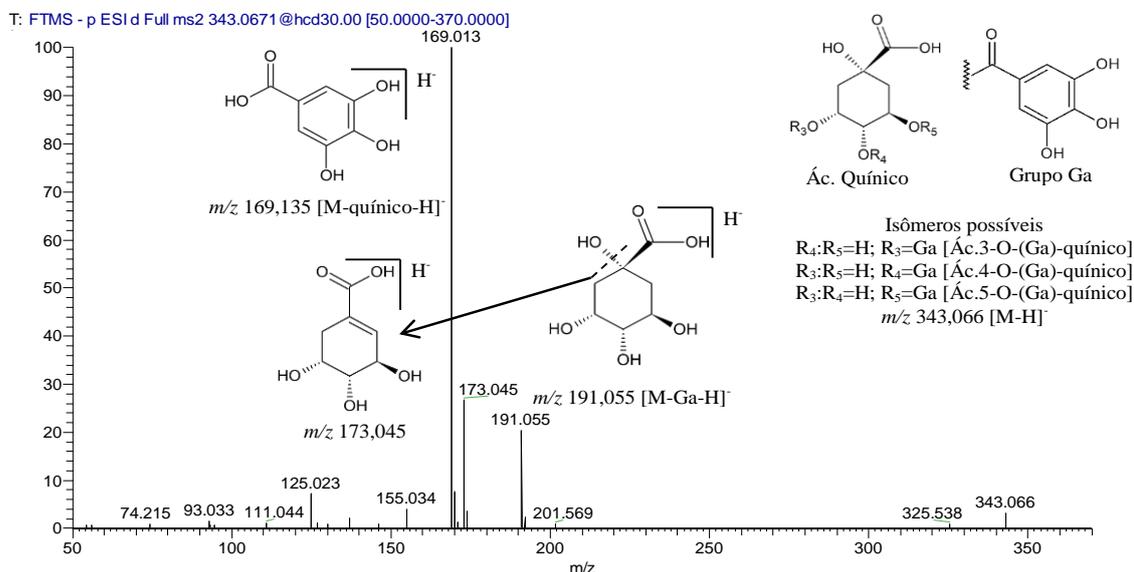
Os ácidos galoilquínicos possuem como núcleo principal o ácido quínico, que pode ser esterificado por uma ou mais unidades de ácido gálico e/ou ácido 3-*O*-metil-gálico nas posições 3, 4 e 5 do ácido quínico. Logo, estas substâncias fenólicas exibem como principais características a dissociação limitada e padrões análogos de fragmentação com perdas pontuais dos grupos galoil (Ga) (-152 u) e 3-*O*-metil-galoil (MGa) (-166 u) segundo MOTTA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2015.

As diferenças observadas nos perfis de fragmentação dos ácidos galoilquínicos foram causadas pelo número de substituições dos grupos Ga e/ou MGa ligados ao ácido quínico. Alguns perfis de fragmentação detectados podem estar relacionados a diferentes séries de ácidos galoilquínicos mono-, di- e tri-substituídos. A partir dos experimentos de MS² não foi possível estabelecer a caracterização completa de alguns ácidos galoilquínicos detectados, pois as mesmas estão sujeitas a isomeria de posição visto que os grupos substituintes (Ga e MGa) podem alternar entre as posições 3, 4 e 5 na cadeia do ácido quínico. Ainda sim, foi possível estabelecer a caracterização completa do ácido 3,4,5-tri-*O*-(galoil)-quínico (m/z 647,089) e o ácido 3,4,5-tri-*O*-(3-*O*-metil-galoil)-quínico (m/z 689,136).

O ácido (galoil) quínico foi detectado a partir do íon precursor m/z 343,066 [M-H]⁻ nos TR's 4,49±0,09 min (a) e 1,15±0,15 min (b) e em ambos os TR's foi verificado o mesmo perfil de fragmentação MS², o qual a partir do íon precursor m/z 343,066 apresentou perda do grupo Ga $C_7H_5O_4$ (-153 u) permitindo a detecção do íon fragmento m/z 191,055 [M-Ga-H]⁻ característico do ácido quínico e o m/z 173,045 do ácido quínico desidratado (-18 u), já o íon fragmento m/z 169,013 [M-quínico-H]⁻ correspondeu ao ácido gálico

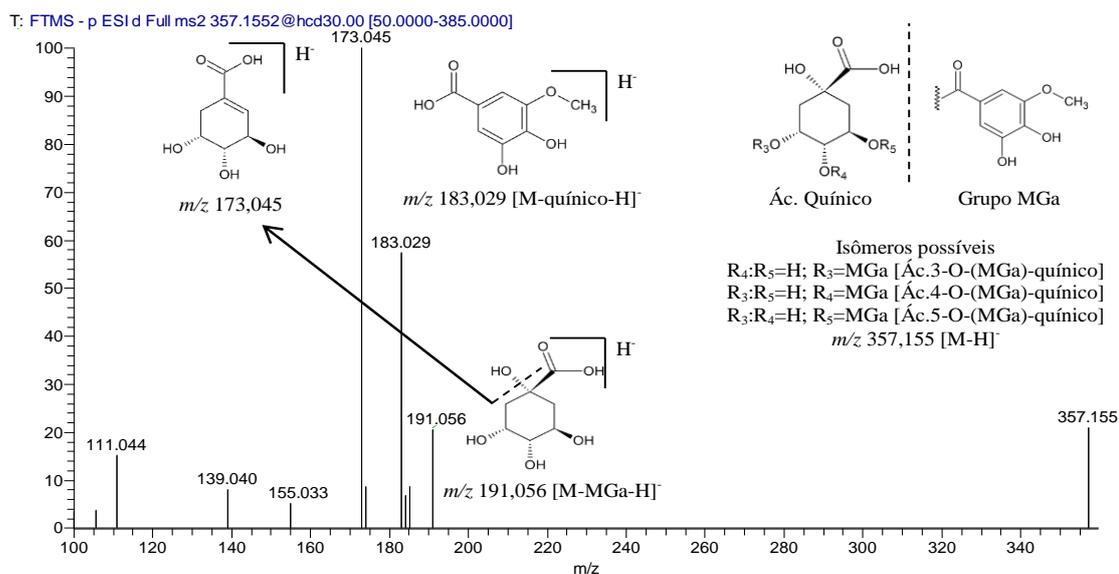
desprotonado decorrente da perda do grupo quínico $C_7H_{11}O_5$ (-175 u) de acordo com o espectro MS^2 na figura 30. Resultados similares foram detectados por MOTTA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2015.

Figura 30. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 343,066.



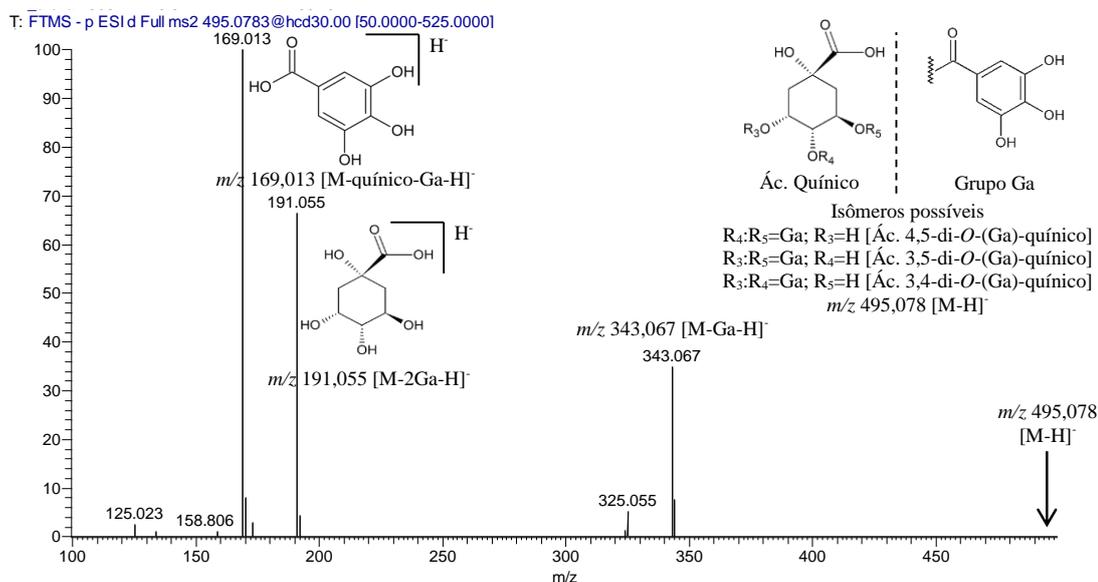
O ácido (3-*O*-metil-galoil) quínico foi detectada partir do íon precursor m/z 357,144 [M-H]⁻ nos TR's $3,08 \pm 0,02$ min (a), $3,35 \pm 0,02$ min (b) e $5,21 \pm 0,08$ min (c) em ambos os TR's foi verificado o mesmo perfil de fragmentação MS^2 , o qual a partir do íon precursor m/z 357,144 apresentou perda do grupo MGa $C_8H_7O_4$ (-167 u) permitindo a detecção do íon fragmento m/z 191,055 [M-MGa-H]⁻ característico do ácido quínico desprotonado e o m/z 173,045 do ácido quínico desidratado (-18 u), já o íon fragmento m/z 183,029 [M-quínico-H]⁻ correspondeu ao ácido 3-*O*-metil-gálico desprotonado decorrente da perda do grupo quínico $C_7H_{11}O_5$ (-175 u) de acordo com o espectro MS^2 na figura 31. Resultados similares foram detectados por MOTTA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2015.

Figura 31. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 357,155.



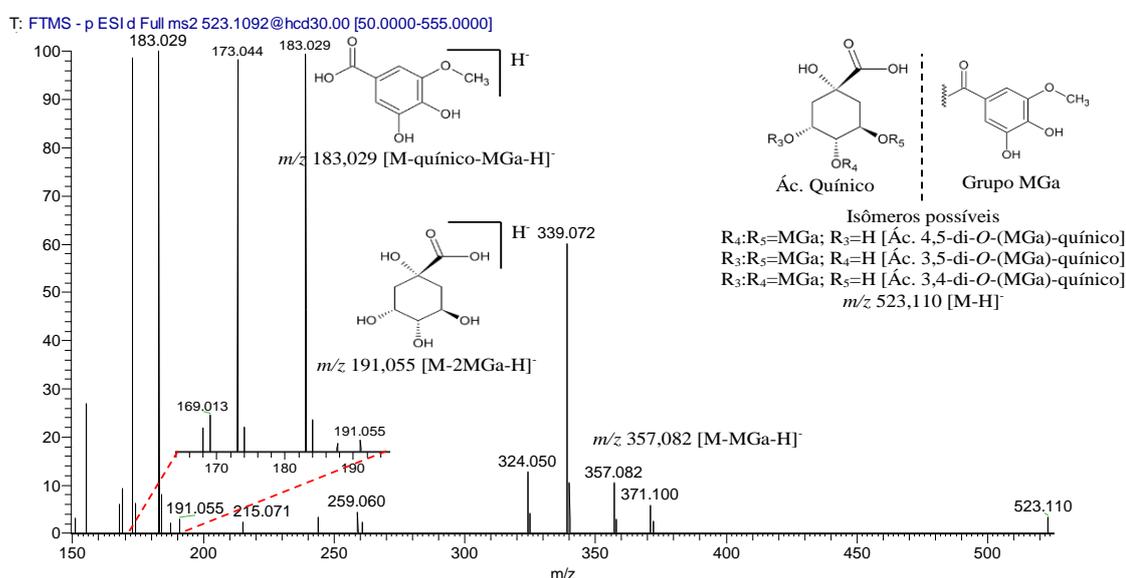
O ácido di-(galoil) quínico foi detectada a partir do íon precursor m/z 495,078 [M-H]⁻ nos TR's $3,54 \pm 0,02$ min (a) e $3,66 \pm 0,05$ min (b) em ambos os TR's foi verificado o mesmo perfil de fragmentação MS², o qual a partir do íon precursor m/z 495,078 apresentou duas perdas subsequentes do grupo Ga C₇H₅O₄ (-153 u) permitindo a detecção dos íons fragmentos m/z 343,066 [M-Ga-H]⁻ e m/z 191,055 [M-2Ga-H]⁻ característico do ácido quínico desprotonado e o íon fragmento m/z 169,013 [M-quínico-Ga-H]⁻ correspondeu ao ácido gálico desprotonado decorrente da perda do grupo quínico mais o grupo Ga C₁₄H₁₅O₉ (-327 u) de acordo com o espectro MS² na figura 32. Resultados similares foram detectados por MOTTA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2015.

Figura 32. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 495,078.



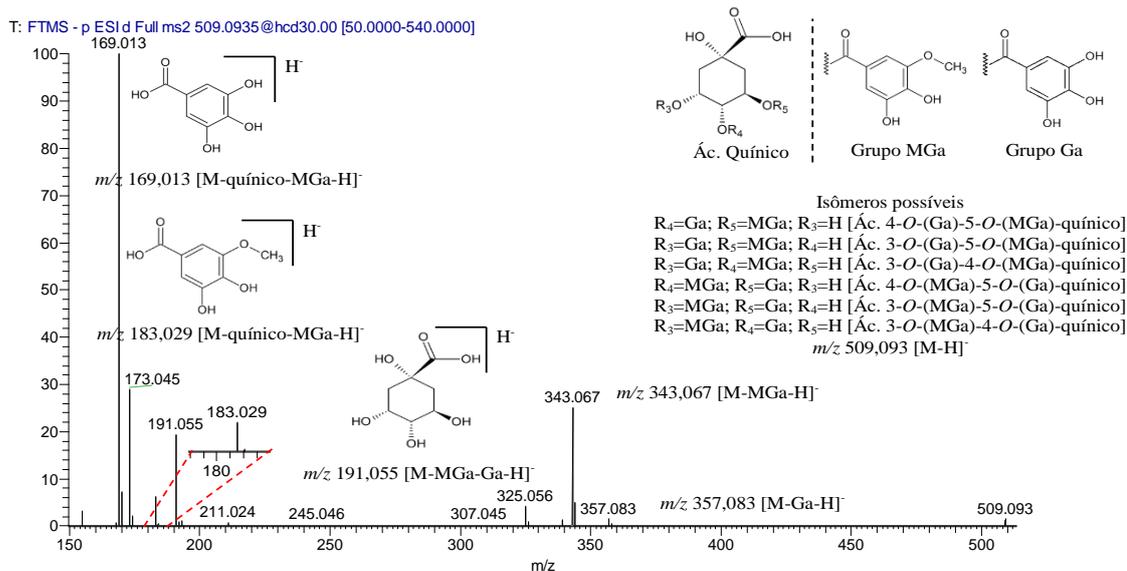
O ácido di-(3-*O*-metilgaloil) quínico foi detectada partir do íon precursor m/z 523,110 $[M-H]^-$ nos TR's 4,17±0,03 min (a), 4,43±0,02 min (b) e 4,57±0,02 min (c) em ambos os TR's foi verificado o mesmo perfil de fragmentação MS², o qual a partir do íon precursor m/z 523,110 apresentou duas perdas subsequentes do grupo MGa C₈H₇O₄ (-167 u) permitindo a detecção dos íons fragmentos m/z 357,144 $[M-MGa-H]^-$ e m/z 191,055 $[M-2MGa-H]^-$ característico do ácido quínico desprotonado e o m/z 173,045 do ácido quínico desidratado (-18 u), já o íon fragmento m/z 183,029 $[M\text{-quínico-MGa-H}]^-$ correspondeu ao ácido 3-*O*-metil-gálico desprotonado decorrente da perda do grupo quínico mais o grupo MGa C₁₅H₁₇O₉ (-341 u) de acordo com o espectro MS² na figura 33. Resultados similares foram detectados por MOTTA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2015.

Figura 33. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 523,110.



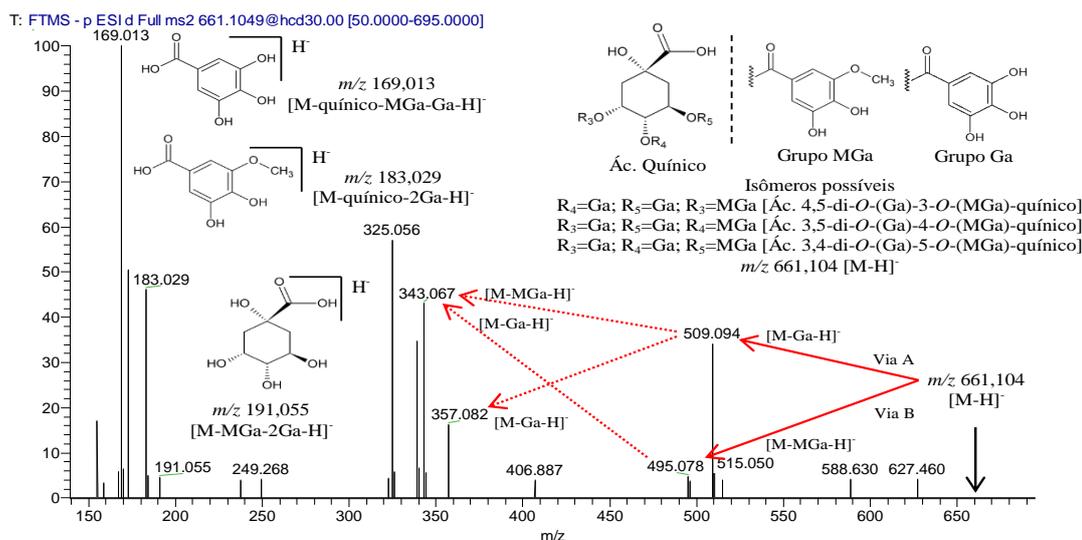
O ácido (galoil)-(3-*O*-metilgaloil) quínico m/z 509,094 foi detectada a partir do íon precursor m/z 509,094 $[M-H]^-$ nos TR's 3,64±0,02 min (a) e 4,13±0,02 min (b) em ambos os TR's foi verificado o mesmo perfil de fragmentação MS², o qual a partir do íon precursor m/z 509,094 apresentou duas perdas subsequentes, uma do grupo MGa C₈H₇O₄ (-167 u) e outra do grupo Ga C₇H₅O₄ (-153 u) os quais permitiram a detecção dos íons fragmentos m/z 357,144 $[M-Ga-H]^-$ e m/z 343,067 $[M-MGa-H]^-$. O íon fragmento m/z 191,055 $[M-MGa-Ga-H]^-$ foi característico do ácido quínico desprotonado e o m/z 169,013 $[M\text{-quínico-MGa-H}]^-$ do ácido gálico desprotonado, já o íon fragmento m/z 183,029 $[M\text{-quínico-Ga-H}]^-$ correspondeu ao ácido 3-*O*-metil-gálico desprotonado de acordo com o espectro MS² na figura 34. Resultados similares foram detectados por MOTTA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2015.

Figura 34. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 509,093.



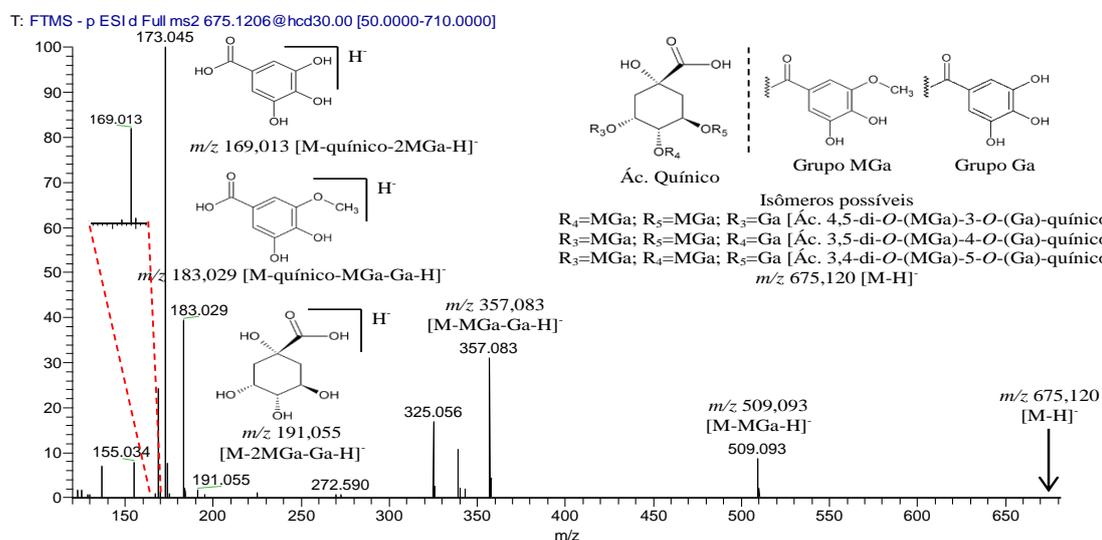
O ácido di-(galoil)-(3-*O*-metilgaloil) quínico foi detectado a partir do íon precursor m/z 661,105 [M-H]⁻ nos TR's 4,27±0,02 min (a) e 4,41±0,02 min (b) em ambos os TR's foi verificado o mesmo perfil de fragmentação MS², o qual a partir do íon precursor m/z 661,105 apresentaram-se perdas subsequentes do grupo MGa C₈H₇O₄ (-167 u) e do grupo Ga C₇H₅O₄ (-153 u), os quais permitiram a detecção das vias A e B de fragmentação a partir do íon precursor m/z 661,105[M-H]⁻ conforme a figura 35. A via A, a partir do íon precursor é possível observar uma perda do grupo Ga C₇H₅O₄ (-153 u) formando íon fragmento m/z 509,064 seguida de outra perda do grupo MGa C₈H₇O₄ (-167 u) ou grupo Ga C₇H₅O₄ (-153 u) formando os íons fragmentos m/z 343,067 e 357,082, respectivamente. A via B, a partir do íon precursor é possível observar uma perda do grupo MGa C₈H₇O₄ (-167 u) formando íon fragmento m/z 495,078 seguida da perda do grupo Ga C₇H₅O₄ (-153 u) formando o íon fragmento m/z 343,067. O íon fragmento m/z 191,055 [M-MGa-2Ga-H]⁻ foi característico do ácido quínico desprotonado e o m/z 169,013 [M-quínico-MGa-Ga-H]⁻ do ácido gálico desprotonado, já o íon fragmento m/z 183,029 [M-quínico-2Ga-H]⁻ correspondeu ao ácido 3-*O*-metil-gálico desprotonado de acordo com o espectro MS² na figura 35. Resultados similares foram detectados por MOTTA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2015.

Figura 35. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 661,104.



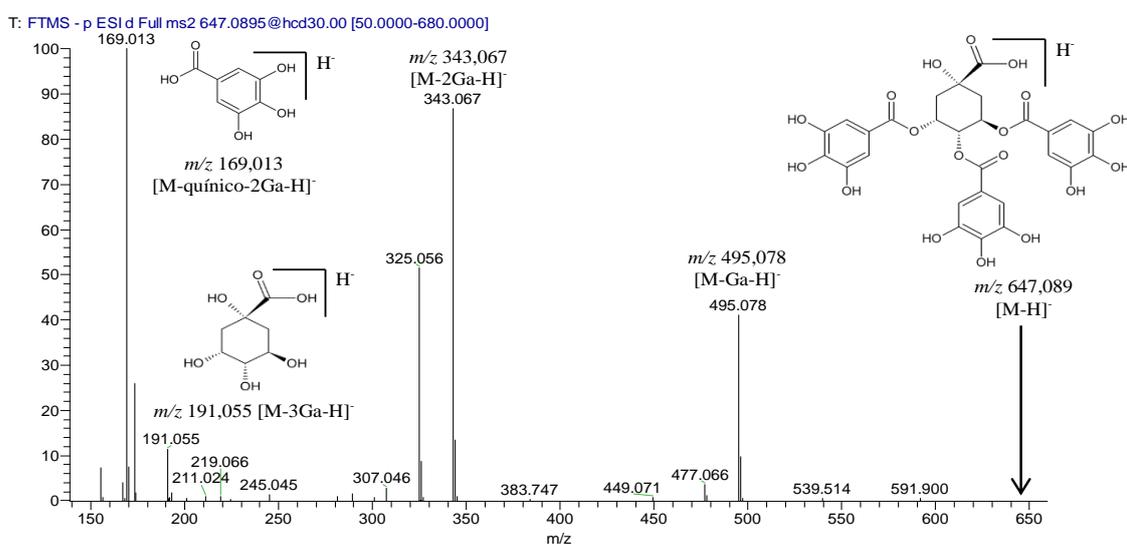
O ácido di-(3-*O*-metilgaloil)-(galoil) quínico foi detectado a partir do íon precursor m/z 675,120 [M-H]⁻ nos TR's 4,69±0,05 min (a) e 4,82±0,02 min (b) em ambos os TR's foi verificado o mesmo perfil de fragmentação MS², o qual a partir do íon precursor m/z 675,120 apresentaram-se duas perdas subsequentes, uma do grupo MGa C₈H₇O₄ (-167 u) e outra do grupo Ga C₇H₅O₄ (-153 u) que resultaram na detecção dos íons fragmentos m/z 509,093 [M-MGa-H]⁻ e 357,083 [M-MGa-Ga-H]⁻. O íon fragmento m/z 191,055 [M-2MGa-Ga-H]⁻ foi característico do ácido quínico desprotonado e o m/z 169,013 [M-quínico-2MGa-H]⁻ do ácido gálico desprotonado, já o íon fragmento m/z 183,029 [M-quínico-MGa-Ga-H]⁻ correspondeu ao ácido 3-*O*-metil-gálico desprotonado de acordo com o espectro MS² na figura 36. Resultados similares foram detectados por MOTTA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2015.

Figura 36. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 675,120.



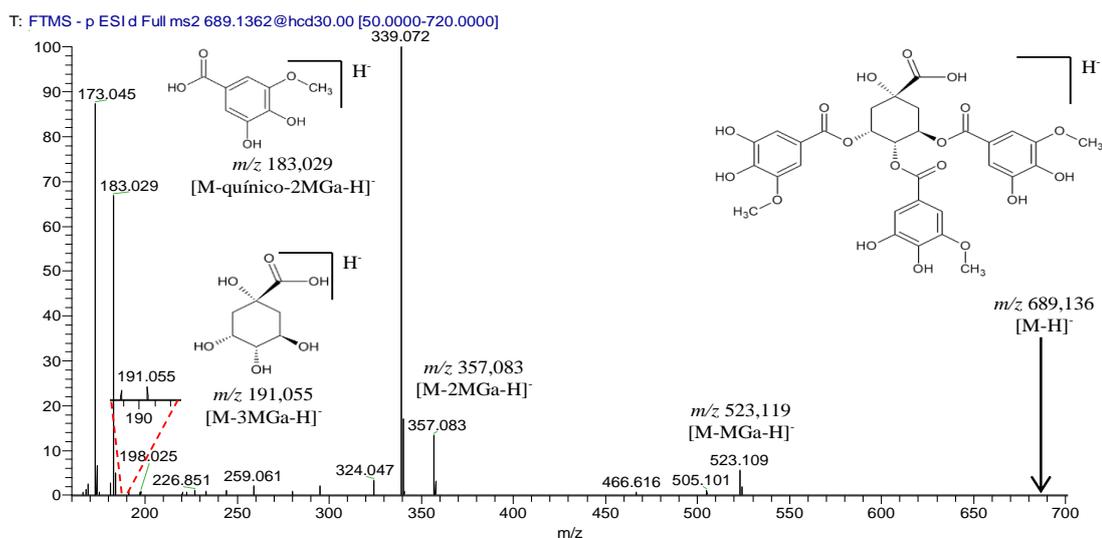
O ácido 3,4,5-tri-*O*-(galoil) quínico foi detectado a partir do íon precursor m/z 647,089 [M-H]⁻ no TR 3,99±0,02 min o perfil de fragmentação MS², a partir do íon precursor m/z 647,089, apresentou três perdas subsequentes do grupo Ga C₇H₅O₄ (-153 u) permitindo a detecção dos íons fragmentos m/z 495,078 [M-Ga-H]⁻, m/z 343,067 [M-2Ga-H]⁻, m/z 191,055 [M-3Ga-H]⁻ característico do ácido quínico desprotonado e o m/z 169,013 [M-quínico-2Ga-H]⁻ característico do ácido gálico desprotonado de acordo com o espectro MS² na figura 37. Resultados similares foram detectados por MOTTA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2015.

Figura 37. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 647,089.



O ácido 3,4,5-tri-*O*-(3-*O*-metilgaloil) quínico foi detectado a partir do íon precursor m/z 689,136 [M-H]⁻ no TR 5,05±0,10 min o perfil de fragmentação MS², a partir do íon precursor m/z 689,136, apresentaram-se três perdas subsequentes do grupo MGa C₇H₅O₄ (-153 u) permitindo a detecção dos íons fragmentos m/z 523,119 [M-MGa-H]⁻, m/z 357,083 [M-2MGa-H]⁻, m/z 191,055 [M-3MGa-H]⁻ característico do ácido quínico desprotonado e o m/z 183,029 [M-quínico-2MGa-H]⁻ característico do ácido 3-*O*-metil-gálico desprotonado de acordo com o espectro MS² na figura 38. Resultados similares foram detectados por MOTTA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2015; COSTA et al., 2015.

Figura 38. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 689,136.

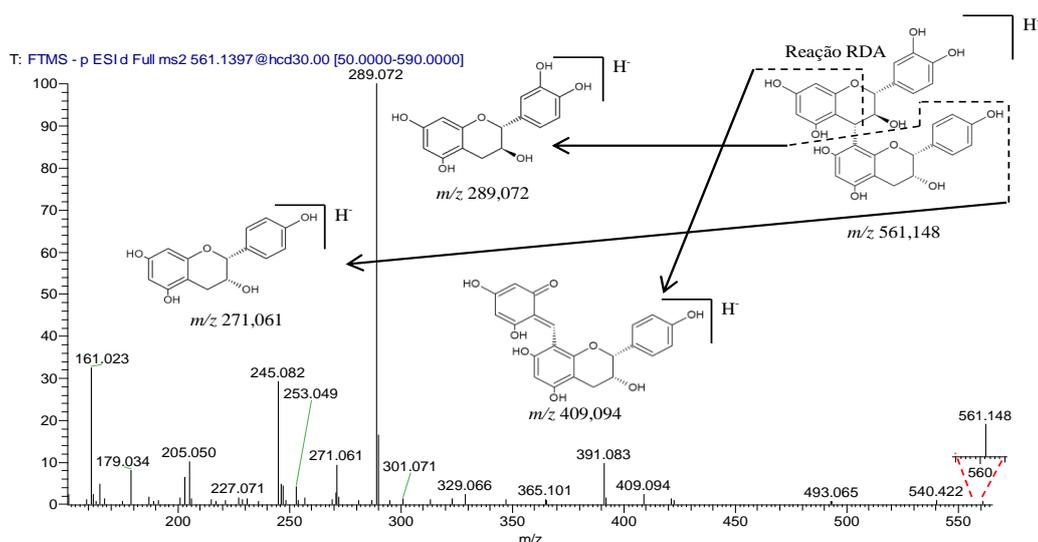


5.2.6 Taninos condensados

Os taninos condensados são biopolímeros formados pela condensação de epicatequinas e seus derivados. Também são conhecidos como polifenóis de grande massa molar e variam estruturalmente pela quantidade de monômeros interligados pelas ligações entre os carbonos C-4 de um monômero com C-8 de outro (RUBERT-NASON & LINDROTH, 2018). A estrutura dos taninos pode ser avaliada e a partir das experiências MS^2 os quais fornecem informações estruturais sobre os monômeros condensados.

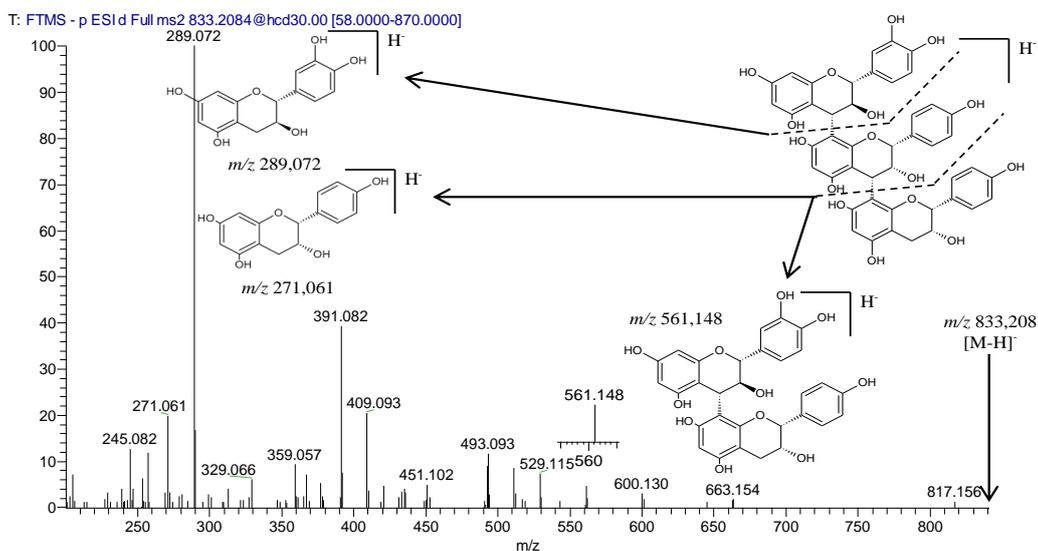
O dímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina foi detectado partir do íon precursor m/z 561,148 $[M - \text{H}]^-$ no TR $4,31 \pm 0,08$ min e o perfil de fragmentação MS^2 , a partir do íon precursor m/z 561,148 foi possível detectar dois íons fragmentos característicos das unidades dos monômeros, o m/z 289,072 $[M - \text{epiafzelequina} - \text{H}]^-$ da epicatequina desprotonada e o m/z 271,061 $[M - \text{epicatequina} - \text{H}]^-$ da epiafzelequina desprotonada. O íon fragmento m/z 409,093 $[M - \text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3 - \text{H}]^-$ foi reconhecido como um produto da reação retro Diels-Alder (RDA) que pode vim a ocorre na estrutura conforme o espectro MS^2 na figura 39. Resultados similares foram detectados por SOUZA et al., 2008, PEREIRA et al., 2018.

Figura 39. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 561,148.



O trímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina foi detectado a partir do íon precursor m/z 833,208 [M-H]⁻ no TR 4,65 \pm 0,10 min e o perfil de fragmentação MS², a partir do íon precursor m/z 833,208, revelou íon fragmentos similares ao dímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina (m/z 561,148) com o acréscimo de uma unidade de monômero de epiafzelequina por meio da ligação 4 β -8. Desta forma, foram conhecidas duas perdas dos monômeros de afzelequina por meio da detecção do íon fragmento m/z 289,072 [M-2epiafzelequina-H]⁻ característico da epicatequina desprotonada e o m/z 271,061 [M-epicatequina-epiafzelequina-H]⁻ da epiafzelequina desprotonada conforme o espectro MS² na figura 40. Resultados similares foram detectados por SOUZA et al., 2008, PEREIRA et al., 2018.

Figura 40. Perfil de fragmentação do íon precursor m/z 833,208.



Na ausência de padrões de referência, a identificação das substâncias correspondentes foi baseada na busca da molécula desprotonada $[M-H]^-$ juntamente com a interpretação dos seus íons fragmentações. A busca exata em massa e o estudo das vias de fragmentação descritas na literatura nos permitiram obter o máximo de informação estrutural possível. Dessa maneira, foi possível detectar diferentes ácidos fenólicos, flavonoides aglicona, flavonoides glicosilados, ácidos galoilquínicos e taninos condensados. A tabela 1, a seguir, resume os dados espectrométricos e os TR's obtidos para cada uma das substâncias detectadas entre as 24 amostras.

Tabela 1. Formula molecular (FM), metabólitos detectados, tempos retenção (TR's) médio e variação, íons precursores (m/z) e íons fragmentos MS².

FM	Metabólitos detectados	TR, $\pm\Delta$ (min)	Íons precursores (m/z) [M-H] ⁻	Íons fragmentos MS ² (m/z)
Derivados de ácido benzoico				
C ₇ H ₆ O ₃	Ác. 3-hidróxi-benzóico	3,46 \pm 0,06	137,023	93,033
C ₇ H ₆ O ₄	Ác. 2,5-di-hidróxi-benzóico	2,21 \pm 0,12	153,018	109,028
Derivados de ácido cinâmico				
C ₉ H ₈ O ₃	Ác. cumárico	3,51 \pm 0,12	163,039	119,049; 93,033
C ₉ H ₈ O ₄	Ác. caféico	3,62 \pm 0,02	179,034	135,044
C ₉ H ₁₀ O ₄	Ác. 4-hidróxifeniláctico	3,72 \pm 0,04	181,050	163,039; 135,044; 119,049; 107,049
C ₉ H ₁₀ O ₃	Ác. 3- <i>O</i> -(2-hidróxi-fenil) propanoico	4,82 \pm 0,05	165,055	147,044; 121,065
Ácidos graxos				
C ₁₀ H ₁₈ O ₄	Ác. sebáico	6,11 \pm 0,04	201,112	183,102; 139,112
C ₁₂ H ₂₂ O ₆	Ác. 9-(2,3-di-hidroxi-propoxi)-9-oxononanoico	5,31 \pm 0,08	261,135	187,097; 125,096
C ₁₅ H ₂₀ O ₄	Ác. abscísico	5,31 \pm 0,08	263,129	245,080; 219,138; 204,115; 201,128
C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Ác. araquidônico	7,31 \pm 0,08	303,196	259,206; 243,175
Ácidos diterpenos				
C ₂₀ H ₃₀ O ₃	Ác. (<i>E</i>)-5-(1,2,4a,5-tetrametil-7-oxo-3,4,8,8a-tetra-hidro-	8,08 \pm 0,05	317,212	299,166; 273,222; 255,175

	<i>2H</i> -naftalen-1-il) -3-metilpent-2-enóico			
C ₂₀ H ₃₂ O ₃	Ác. 5-[(8a <i>S</i>)-2,5,5,8a-tetrametil-3-oxo-4a,6,7,8-tetrahidro-4 <i>H</i> -naftalen-1-il]-3-metilpentanóico	8,20±0,10	319,228	301,218; 275,238
C ₂₁ H ₃₀ O ₄	Ác. 1,3,4,9,10,10a-hexahidro-5-hidróxi-6-metóxi-1,1-dimetil-7-(1-metiletil)-,(4a <i>R</i>)-4a(2 <i>H</i>)-fenantranocarboxílico	8,77±0,02	345,145	301,160; 286,136
C ₁₉ H ₂₄ O ₆	Giberelina A29	7,30±0,03	347,186	329,176; 303,196; 259,206; 243,175
Flavonoides agliconas				
C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Apigenina	6,56±0,03	269,045	251,165; 225,055; 151,003; 117,033
C ₁₅ H ₁₀ O ₅	5,3',4'-tri-hidroxi flavona	5,72±0,06	269,045	225,149; 135,008; 133,028
C ₁₅ H ₁₂ O ₅	2-(3,4-di-hidroxifenil)-7-hidroxil-2,3-di-hidrocromen-4-ona	5,17±0,02	271,061	253,049; 153,018; 135,044; 91,018
C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Canferol	6,47±0,10	285,040	255,029; 151,002
C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina	6,06±0,05	301,035	271,025; 178,998; 151,002; 149,023; 121,028; 107,012
Flavonoides glicosilados				
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Canferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo	5,91±0,11	431,098	285,040; 284,033; 255,030; 227,034; 151,003
C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	Quercetina-3- <i>O</i> -pentosídeo	5,40±0,05	433,079	301,033; 300,027; 271,025; 151,003
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Canferol-3- <i>O</i> -glucosídeo	5,14±0,05	447,093	285,040; 151,003

C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo	5,55±0,15	447,093	301,035; 300,028; 271,025; 255,028; 151,003
C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	5,8-di-hidróxi-2-(4-hidroxifenil)-7-metóxi-cromen-4-ona-3- <i>O</i> -ramnosídeo	5,79±0,10	461,109	315,049; 314,043; 300,026; 178, 998
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	6,30±0,09	463,102	301,034; 300,027; 151,003
C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	Canferol-3- <i>O</i> -(2-acetil ramnosídeo)	6,25±0,05	473,110	413,086; 284,033; 255,029; 227,034; 151,002; 59,012
Glicosídeo fenólico				
C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	4-acetil-2-metoxifenil-1- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -glucopiranosídeo-6- <i>O</i> -(6-desoxi-alfa- <i>L</i> -manopiranosil)	4,49±0,09	473,167	165,055; 147,044; 121,065
Ácidos galoilquínicos				
C ₁₅ H ₁₈ O ₉	Ác. (galoil) quínico (a)	4,49±0,09	343,066	191,055; 173,045; 169,013; 155,034; 125,023
C ₁₅ H ₁₈ O ₉	Ác. (galoil) quínico (b)	1,15±0,15	343,066	191,055; 173,045; 169,013; 155,034; 125,023
C ₁₆ H ₂₀ O ₉	Ác. (3- <i>O</i> -metil-galoil) quínico (a)	3,08±0,02	357,144	191,056; 183,029; 173,045; 155,033; 139,040
C ₁₆ H ₂₀ O ₉	Ác. (3- <i>O</i> -metil-galoil) quínico (b)	3,35±0,02	357,144	191,056; 183,029; 173,045; 155,033; 139,040
C ₁₆ H ₂₀ O ₉	Ác. (3- <i>O</i> -metil-galoil) quínico (c)	5,21±0,08	357,144	191,056; 183,029; 173,045; 155,033; 139,040
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄	Ác. di-(galoil) quínico (a)	3,54±0,02	495,078	343,067; 325,055; 191,055; 169,013

$C_{21}H_{20}O_{14}$	Ác. di-(galoil) quínico (b)	3,66±0,05	495,078	343,067; 325,055; 191,055; 169,013
$C_{23}H_{24}O_{14}$	Ác. di-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (a)	4,17±0,03	523,110	357,082; 339,072; 324,050; 191,055; 183,029; 173,044
$C_{23}H_{24}O_{14}$	Ác. di-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (b)	4,43±0,02	523,110	357,082; 339,072; 324,050; 191,055; 183,029; 173,044
$C_{23}H_{24}O_{14}$	Ác. di-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (c)	4,57±0,02	523,110	357,082; 339,072; 324,050; 191,055; 183,029; 173,044
$C_{22}H_{22}O_{14}$	Ác. (galoil)-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (a)	3,64±0,02	509,094	357,083; 343,067; 325,056; 191,055; 183,029; 173,045; 169,013
$C_{22}H_{22}O_{14}$	Ác. (galoil)-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (b)	4,13±0,02	509,094	357,083; 343,067; 325,056; 191,055; 183,029; 173,045; 169,013
$C_{29}H_{26}O_{18}$	Ác. di-(Galoil)-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (a)	4,27±0,02	661,105	509,094; 495,078; 357,082; 343,067; 339,072; 325,056; 191,055; 183,029; 169,013
$C_{29}H_{26}O_{18}$	Ác. di-(Galoil)-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (b)	4,41±0,02	661,105	509,094; 495,078; 357,082; 343,067; 339,072; 325,056; 191,055; 183,029; 169,013
$C_{30}H_{28}O_{18}$	Ác. di-(3- <i>O</i> -metilgaloil)-(Galoil) quínico (a)	4,69±0,05	675,120	509,093; 357,083; 339,072; 325,056; 191,055; 183,029; 173,045; 169,013; 155,034
$C_{30}H_{28}O_{18}$	Ác. di-(3- <i>O</i> -metilgaloil)-(Galoil) quínico (b)	4,82±0,02	675,120	509,093; 357,083; 339,072; 325,056; 191,055; 183,029;

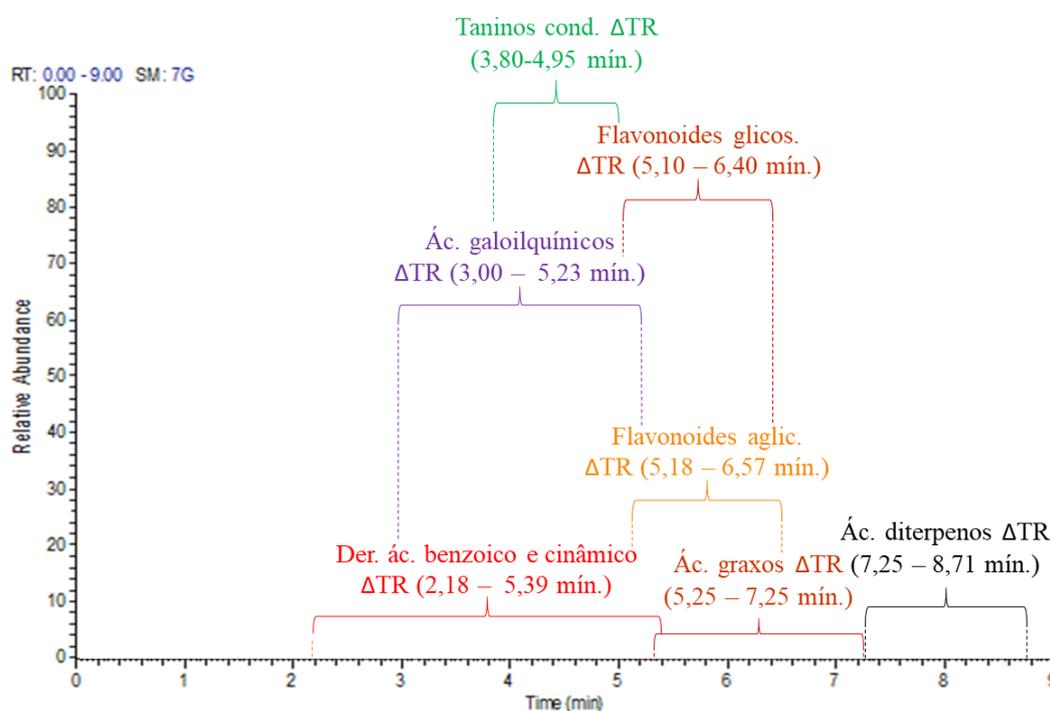
				173,045; 169,013; 155,034
$C_{28}H_{24}O_{18}$	Ác. 3,4,5-tri- <i>O</i> -(galoil) quínico	3,99±0,02	647,089	495,078; 343,067; 325,056; 191,055; 173,045; 169,013
$C_{31}H_{30}O_{18}$	Ác. 3,4,5-tri- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico	5,05±0,10	689,136	523,119; 357,083; 339,072; 191,055; 183,029; 173,045
Taninos condensados				
$C_{30}H_{26}O_{11}$	Epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina	4,31±0,08	561,148	409,094; 391,083; 289,072; 271,061; 245,082; 205,050; 179,034; 161,023
$C_{45}H_{38}O_{16}$	Epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina	4,65±0,10	833,208	600,130; 561,148; 529,115; 493,093; 409,093; 391,082; 359,057; 289,072; 271,061; 245,061

5.3 Perfil cromatográfico UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS

Os extratos em AcOEt e MeOH dos órgãos vegetais das espécies de *Copaifera* foram analisados por cromatografia líquida de ultra rápida performance em fase normal UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS, usando uma fase móvel consistindo em ácido fórmico (0,1%): formiato de amônia 5 mM e metanol que permitiu a eluição abrangente dos analitos vegetais, isto é, derivados de ácido benzoico e cinâmico, derivados de ácidos graxos, ácidos diterpenos, flavonoides agliconas, flavonoides glicosilados, ácidos galoilquínicos e taninos condensados em 9 minutos de corrida cromatográfica (cerca de 540 segundos) em comparação com o tempo de análise de 30 min (1800 segundos) relatado anteriormente para o estudo de validação e descrição da composição química dos extratos polares das folhas de *C. langsdorffii* Desf. (MOTTA^a et al., 2017; MOTTA^b et al., 2017).

Foi possível descrever regiões características das classes metabólicas presentes de acordo com o TR (min) e AR média (%) dos picos observados nos cromatogramas por UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS. A figura 41, a seguir, apresenta a faixa de detecção das classes metabólicas de acordo com as médias do TR (min) e AR (%) para todas as análises.

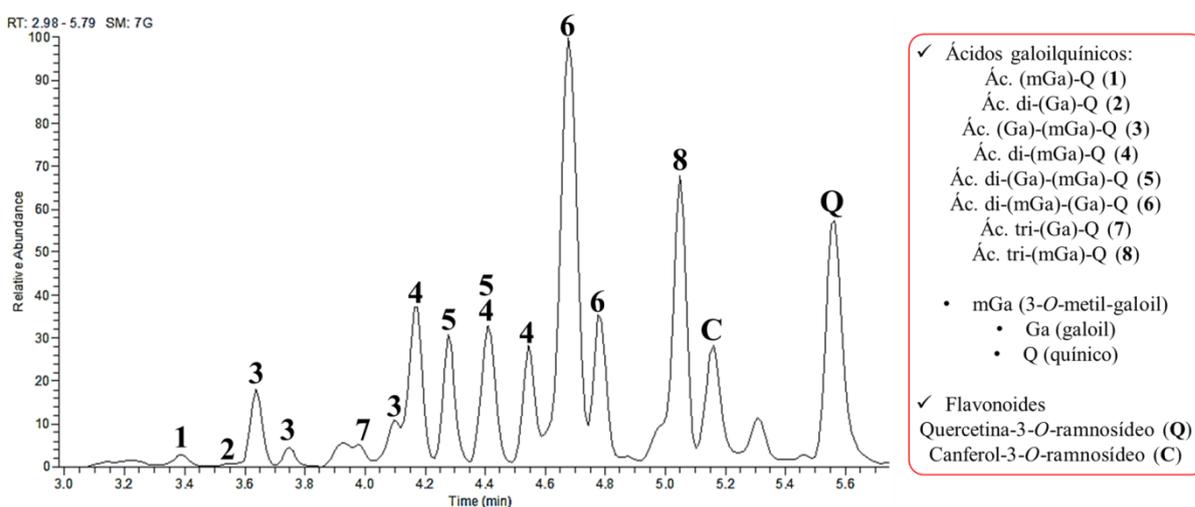
Figura 41. Regiões de detecção das classes metabólicas nos extratos de *Copaifera*.



A região dos cromatogramas com TR entre 3,00-5,23 min foi caracterizada pela detecção dos ácidos galoilquínicos mono-, di- e tri-substituídos nos extratos das folhas de

Copaifera (tabela 2). Os picos cromatográficos característicos dos ácidos galoilquínicos apresentaram perfis de fragmentação similares em diferentes TR's, o que se caracteriza a presença de isômeros estruturais já relatados em extratos de polares das folhas de *Copaifera* (MOTTA^a et al., 2017; MOTTA^b et al., 2017; FURTADO et al., 2018). A exemplo, na figura 42, temos o destaque de uma pequena região (3-5,70 min) do cromatograma da amostra do extrato em MeOH das folhas de *C. trapezifolia* que se evidenciou uma boa separação dos ácidos galoilquínicos mono-, di-, tri- substituídos, bem como seus isômeros detectados em diferentes TR's em um pequeno intervalo de 2,70 min (162 segundos) de uma corrida total de 9 min.

Figura 42. Cromatograma (3-5,70 min) do extrato em MeOH das folhas de *C. trapezifolia*.



A região destacada na figura 42 para o perfil cromatográfico obtido foi semelhante ao perfil caracterizado e validado por Mota e colaboradores (2017) em condições cromatográficas diferentes para os extratos polares das folhas de *C. langsdorffii*. Os ácidos galoilquínicos e os flavonoides quercetina-3-O-ramnosídeo e canferol-3-O-ramnosídeo apresentaram série eluotrópica similar à metodologia adotada na corrida cromatográfica de 30 min (MOTTA^b et al., 2017).

A região de detecção dos flavonoides glicosilados ocorreu com TR entre 5,10-6,40 com a presença de derivados glicosilados de canferol e quercetina. As regiões dos ácidos galoilquínicos e flavonoides glicosilados foram características nos extratos (AcOEt e MeOH) das folhas das espécies de *Copaifera*. A região de detecção dos taninos condensados com o TR entre 4,25-4,35 min foi característica da presença do dímero e trímero dos derivados de epicatequina condensados. A região dos taninos condensados foi característica dos extratos (AcOEt e MeOH) das cascas das espécies de *Copaifera*. Todos os cromatogramas (incluindo

as réplicas das análises em triplicata) das 12 amostras obtidas em AcOEt e 12 amostras obtidas em MeOH encontram-se nos anexos 7-30.

As substâncias detectadas, os tempos de retenção e os íons moleculares discutidos na sessão anterior, estão relacionados na tabela 2 de acordo com a detecção nos extratos (AcOEt e MeOH) para as espécies de *Copaifera*. Um total de 47 metabólitos foi detectado, dos quais quatro substâncias foram identificadas com o auxílio dos padrões de referência (TR min e MS/MS): apigenina, canferol, quercetina e quercetina-3-*O*-glucosídeo. Vale ressaltar que este é o primeiro perfil metabólico abrangente dos órgãos vegetais de *C. multijuga* (folhas, cascas e galhos), *C. lucens* (folhas e cascas), *C. trapezifolia* (folhas) e *C. venezuelana* (galhos e cascas) em vista o grande número de metabólitos detectados. A profundidade e sensibilidade na identificação e detecção dos metabólitos deve-se, em parte, a uma maior sensibilidade do UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS, em especial ao analisador híbrido Q-Orbitrap que combina os pontos fortes de cada analisador ampliando o limite de detecção.

Os metabólitos identificados e detectados pertencem a várias classes metabólicas incluindo derivados de ácido cinâmico (ex: ác. cumárico, ác. caféico) e ácido benzoico (ex: ác. 3-hidróxi-benzoico, ác. 2,5-di-hidróxi-benzoico), ácidos graxos (ex: ác. sebácico, ác. abscísico), ácidos diterpenos [ex: ác. (*E*)-5-(1,2,4a,5-tetrametil-7-oxo-3,4,8,8a-tetra-hidro-2*H*-naftalen-1-il)-3-metilpent-2-enóico, giberelina A29], e uma rica variedade de polifenóis, como flavonoides agliconas (ex: quercetina, canferol), flavonoides glicosilados (ex: quercetina-3-*O*-glucosídeo, canferol-3-*O*-ramnosídeo), ácidos fenólicos galoilquínicos mono-, di- e tri-substituídos e taninos condensados nas formas de dímero e trímero.

Tabela 2. Relação dos metabólitos detectados nos extratos dos órgãos vegetais das espécies de *Copaifera*, tempos retenção (TR's) médio e variação (triplicata), íons precursores (*m/z*).

Metabólitos detectados	TR, ±Δ(min)	Íons precursores (<i>m/z</i>) [M-H]	Extratos das espécies de <i>Copaifera</i> (AcOEt/ MeOH)											
			<i>C. langsdorffii</i>				<i>C. multijuga</i>			<i>C. lucens</i>		<i>C. venezuelana</i>		<i>C. trapezifolia</i>
			Folhas	Cascas	Flores	Sementes	Folhas	Galhos	Cascas	Folhas	Cascas	Galhos	Cascas	Folhas
Ác. 3-hidróxi-benzóico	3,46±0,06	137,023	S/ N	S/ S	S/ N	S/ N	S/ S	S/ S	-	S/ S	N/ S	S/ S	-	S/ S
Ác. 2,5-di-hidróxi-benzóico	2,21±0,12	153,018	S/ N	S/ S	S/ N	S/ N	N/ S	S/ S	S/ S	S/ S	S/ S	S/ S	S/ S	S/ S
Ác. cumárico	3,51±0,12	163,093	S/ N	-	-	-	-	-	-	-	-	N/ S	-	N/ S
Ác. caféico	3,62±0,02	179,034	-	-	-	S/ N	-	N/ S	-	-	-	-	-	N/ S
Ác. 4-hidróxifeniláctico	3,72±0,04	181,050	N/ S	-	-	-	-	-	-	-	-	S/ S	-	-
Ác. 3- <i>O</i> -(2-hidróxi-fenil)propanoico	4,82±0,05	165,055	N/ S	N/ S	N/ S	S/ N	-	S/ S	-	S/ N	S/ S	S/ S	S/ S	S/ N
Ác. sebácico	6,11±0,04	201,112	S/ S	S/ S	S/ S	S/ S	S/ S	S/ S	S/ N	S/ S	N/ S	S/ S	S/ N	S/ S
Ác. 9-(2,3-di-hidroxi-propoxi)-9-oxononanoico	5,31±0,08	261,135	S/ S	S/ N	S/ S	S/ S	N/ S	N/ S	-	S/ N	N/ S	S/ N	-	S/ N
Ác. abscísico	5,31±0,08	261,135	-	-	S/ N	S/ N	N/ S	N/ S	-	-	-	-	-	N/ S
Ác. araquidônico	7,31±0,08	303,196	-	S/ S	-	-	S/ N	N/ S	-	-	S/ S	S/ S	S/ N	S/ N
Ác. (<i>E</i>)-5-(1,2,4a,5-tetrametil-7-oxo-3,4,8,8a-tetra-hidro-2 <i>H</i> -naftalen-1-il)-3-metilpent-2-enóico	8,08±0,05	317,212	S/ N	-	-	N/ S	-	S/ S	-	-	-	N/ S	S/ N	S/ N
Ác. 5-[(8a <i>S</i>)-2,5,5,8a-tetrametil-3-oxo-4a,6,7,8-tetrahydro-4 <i>H</i> -naftalen-1-il]-3-metilpentanoico	8,20±0,10	319,228	-	-	S/ N	N/ S	S/ N	-	-	S/ N	-	S/ S	S/ S	S/ N

Continua

Continuação

Ác. 1,3,4,9,10,10a-hexahidro-5-hidróxi-6-metóxi-1,1-dimetil-7-(1-metiletil)-, (4aR)-4a(2H)-fenantranocarboxílico	8,77±0,02	345,145	N/ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Giberelina A29	7,30±0,03	347,186	S/ N	S/ S	S/ N	S/ S	S/ S	S/ S	S/ S	-	S/ S	S/ S	S/ S	S/ S
Apigenina	6,56±0,03	269,045	S/ N	S/ S	N/ S	S/ S	N/ S	N/ S	-	S/ N	S/ S	-	-	S/ S
5,3',4'-tri-hidroxi flavona	5,72±0,06	269,045	S/ N	S/ S	-	-	S/ N	S/ S	S/ S	-	N/ S	S/ S	S/ S	S/ S
2-(3,4-di-hidroxifenil)-7-hidroxi-2,3-di-hidrocrome-4-ona	5,17±0,02	271,061	-	S/ N	-	-	-	N/ S	-	-	S/ S	S/ S	N/ S	-
Canferol	6,47±0,10	285,040	S/ N	S/ S	-	S/ N	S/ N	S/ S	N/ S	S/ S	S/ S	S/ S	N/ S	S/ S
Quercetina	6,06±0,05	301,035	S/ S	S/ S	N/ S	N/ S	S/ S							
Canferol-3-O-ramnosídeo	5,91±0,11	431,098	S/ N	-	-	-	S/ N	N/ S	-	S/ N	N/ S	-	-	S/ S
Quercetina-3-O-pentosídeo	5,40±0,05	433,079	S/ N	-	-	-	S/ S	S/ S	-	S/ S	N/ S	-	-	S/ S
Canferol-3-O-glucosídeo	5,14±0,05	447,093	S/ N	S/ N	-	-	S/ S	S/ S	N/ S	S/ S	N/ S	N/ S	S/ S	S/ S
Quercetina-3-O-ramnosídeo	5,55±0,15	447,093	S/ N	S/ N	S/ N	-	S/ S	N/ S	-	S/ S				
5,8-di-hidróxi-2-(4-hidroxifenil)-7-metóxi-cromen-4-ona-3-O-ramnosídeo	5,79±0,10	461,109	S/ N	-	S/ N	-	-	-	-	S/ N	-	-	-	S/ N
Quercetina-3-O-glucosídeo	6,30±0,09	463,102	S/ N	-	-	-	S/ S	S/ S	-	S/ S	-	N/ S	-	S/ S
Canferol-3-O-(2-acetil ramnosídeo)	6,25±0,05	473,110	S/ N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S/ N
4-acetil-2-metoxifenil-1-O-beta-D-glucopiranosídeo-6-O-(6-desoxi-alfa-L-manopiranosil)	4,49±0,09	473,167	-	-	-	N/ S	N/ S	N/ S	S/ S	-	N/ S	S/ S	S/ S	-

Continuação

Ác. (galoil) quínico (a)	0,82±0,09	343,066	-	-	-	-	-	-	-	S/ S	-	-	-	N/ S
Ác. (galoil) quínico (b)	1,15±0,15	343,066	-	-	-	-	-	-	-	S/ S	-	-	-	N/ S
Ác. (3- <i>O</i> -metil-galoil) quínico (a)	3,08±0,02	357,144	S/ N	S/ N	-	-	N/ S	-	-	-	-	-	-	-
Ác. (3- <i>O</i> -metil-galoil) quínico (b)	3,35±0,02	357,144	S/ N	S/ N	-	-	S/ S	N/ S	-	S/ S	N/ S	-	-	S/ S
Ác. (3- <i>O</i> -metil-galoil) quínico (c)	5,21±0,08	357,144	S/ N	-	S/ N	-	N/ S	N/ S	-	-	-	-	-	N/ S
Ác. di-(galoil) quínico (a)	3,54±0,02	495,078	-	-	-	-	-	-	-	N/ S	N/ S	N/ S	-	S/ S
Ác. di-(galoil) quínico (b)	3,66±0,05	495,078	S/ N	-	-	-	-	-	-	S/ S	N/ S	-	-	-
Ác. di-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (a)	4,17±0,03	523,110	S/ N	S/ S	-	-	S/ S	S/ S	-	S/ S	S/ S	N/ S	-	S/ S
Ác. di-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (b)	4,43±0,02	523,110	S/ N	S/ S	-	-	S/ S	N/ S	-	S/ S	S/ S	S/ S	-	S/ S
Ác. di-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (c)	4,57±0,02	523,110	S/ N	S/ N	-	-	S/ S	S/ S	-	S/ S	N/ S	N/ S	-	S/ S
Ác. (galoil)-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (a)	3,64±0,02	509,094	S/ N	S/ N	-	-	N/ S	-	-	S/ S	N/ S	N/ S	-	S/ S
Ác. (galoil)-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (b)	4,13±0,02	509,094	S/ N	S/ N	-	-	N/ S	-	-	S/ S	N/ S	N/ S	-	S/ S
Ác. di-(Galoil)-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (a)	4,27±0,02	661,105	S/ N	-	-	-	-	-	-	S/ S	-	-	-	S/ S
Ác. di-(Galoil)-(3- <i>O</i> -metilgaloil) quínico (b)	4,41±0,02	661,105	S/ N	-	-	-	-	-	-	S/ S	N/ S	N/ S	-	S/ S
Ác. di-(3- <i>O</i> -metilgaloil)-(Galoil) quínico (a)	4,69±0,05	675,120	S/ N	S/ N	-	-	N/ S	N/ S	-	S/ S	N/ S	S/ S	-	S/ S

Conclusão

Ác. di-(3-O-metilgaloil)- (Galoil) quínico (b)	4,82±0,02	675,120	S/ N	-	-	-	-	-	-	-	N/ S	N/ S	S/ N	-	N/ S
Ác. 3,4,5-tri-O-(galoil) quínico	3,99±0,02	647,089	-	-	-	-	-	-	-	-	S/ S	N/ S	N/ S	-	S/ S
Ác. 3,4,5-tri-O-(3-O- metilgaloil) quínico	5,05±0,10	689,136	S/ N	S/ S	-	-	S/ S	S/ S	-	S/ S	S/ S	S/ N	-	S/ S	
epicatequina-(4β-8)- epiafzelequina	4,31±0,08	561,148	-	S/ S	-	S/ N	-	-	S/ S	-	S/ S	S/ S	S/ S	-	
epicatequina-(4β-8)- epiafzelequina-(4β-8)- epiafzelequina	4,65±0,10	833,208	-	S/ S	-	-	-	N/ S	S/ S	-	S/ S	S/ S	S/ S	-	

Detectado (S), Não detectado (N), ausência em ambos os extratos AcOEt e MeOH (-).

As substâncias fenólicas são produtos metabolizados a partir do metabolismo secundário das plantas. Estes compostos são produzidos para a proteção contra a luz UV, insetos, vírus e bactérias (REZENDE et al., 2016). Tais substâncias fenólicas, incluindo os ácidos fenólicos, possuem propriedades bioativas, como antioxidantes (SOUSA et al., 2007), antitumorais (NOLDIN et al., 2003), antimicrobianas (FERNANDES et al., 2006), entre outras. Os ácidos fenólicos dos derivados de ácido cinâmico e ácido benzoico foram detectados na maioria dos extratos dos órgãos vegetais das espécies de *Copaifera*. Os ácidos fenólicos, bem como outros polifenóis, são sintetizados a partir da via do chiquimato através da *L*-fenilamina ou *L*-tirosina, uma vez que estes aminoácidos são os precursores comuns para a maioria dos produtos fenólicos naturais (REZENDE et al., 2016).

Os ácidos galoilquínicos e os flavonoides quercetina-3-*O*-ramnosídeo e o canferol-3-*O*-ramnosídeo sugeridos já foram identificados e validados nos extratos polares das folhas de *C. langsdorffii* (MOTTA^b et al., 2017), bem como nos extratos polares das folhas de *Copaifera duckei*, *C. multijuga*, *C. paupera*, *C. pubiflora*, *C. reticulata* (FURTADO et al., 2018), sendo que tais substâncias exibem excelente atividade antioxidante (MOTTA, 2014). Por conseguinte, resultados promissores de gastroproteção foram encontrados em extratos polares das folhas de *C. langsdorffii*, em modelos de úlceras induzidas por etanol-HCl em camundongos (LEMOS et al., 2015). Os ácidos galoilquínicos também foram testados em um ensaio de gastroproteção no mesmo modelo de úlcera induzida, os quais reduziram significativamente a área total da lesão e aumentaram a taxa de cura em comparação com o pantoprazol, além dos compostos testados exibem citotoxicidade contra células de adenocarcinoma gástrico (MOTTA^a, et al., 2017). De modo que, tais substâncias bioativas também foram detectadas nos extratos polares das folhas da *C. langsdorffii*, *C. multijuga*, *C. trapezifolia* e *C. lucens*, neste trabalho. Logo, tais descobertas indicam os ácidos galoilquínicos como substâncias marcadoras dos extratos das folhas de *Copaifera* e abrem novas perspectivas sobre o potencial fitoquímico e farmacológico do gênero.

Doze flavonoides nas formas de aglicona e glicosídeos, principalmente derivados de quercetina e canferol foram detectados. Estas substâncias formam um importante grupo de metabólitos secundários, os quais desempenham nas plantas a função de proteger contra raios UV, insetos, fungos, vírus, bactérias e agentes oxidantes (OLIVEIRA et al., 2002; HEIM et al., 2002; SHASHANK et al., 2013). Os produtos naturais ricos em flavonoides são apontados como potenciais agentes terapêuticos, devido às diversas propriedades farmacológicas; estes compostos demonstram ter ação antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, além

de agir no sistema imunológico, circulatório, cardiovascular e nervoso (OLIVEIRA et al., 2002; HEIM et al., 2002; SHASHANK & ABHAY., 2013; GEORGIEV et al., 2014). Os flavonoides relacionados na tabela 2 foram observados, principalmente, nos extratos das folhas das espécies de *Copaifera*. Tais flavonoides detectados, juntamente com os ácidos galoilquínicos formam importantes classes metabólicas presentes nas folhas das espécies de *Copaifera*.

Os extratos das cascas de *C. langsdorffii*, *C. multijuga*, *C. lucens* e *C. venezuelana* revelaram a presença de uma classe metabólica ainda pouco explorada entre as espécies do gênero *Copaifera*, os taninos condensados, os quais foram primeiramente detectados em estudos preliminares dos extratos polares das cascas de *C. multijuga* (PEREIRA et al., 2018). Tais substâncias fenólicas são classificadas como biopolímeros e possuem propriedades antioxidantes, que foram avaliadas frente aos testes *in vitro* e *in vivo* com redução do estresse oxidativo induzido por paracetamol, além do potencial efeito antineoplásico em células tumorais de Ehrlich (ALBIERO et al., 2016; CUNHA et al., 2018; PEREIRA et al., 2018). Ressalta-se ainda que as cascas de *Copaifera* sp. são muito utilizadas na medicina popular como ingrediente no preparo de chás para o tratamento de enfermidades, no qual os taninos condensados pode estar relacionados.

5.4 Metabolômica não direcionada do Gênero *Copaifera*

A Metabolômica não direcionada está baseada na análise qualitativa do maior número de metabólitos possíveis e pertencentes às diversas classes químicas contidas em um sistema biológico de estudo (CANUTO et al., 2018). Desta forma, a técnica de UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS é uma excelente abordagem para exploração dos metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais, entretanto são gerados grandes volumes de dados multivariados complexos que necessitam de tratamento estatístico.

As análises estatísticas multivariadas buscam sintetizar informações e tendências na composição química dos extratos vegetais por meio dos algoritmos de covariância (VILLAS BÔAS & GOMBERT, 2006). A análise dos componentes principais (PCA) distribuiu as amostras em um plano bi e/ou tridimensional de acordo com a importância dos picos cromatográficos integrados, mapeando as substâncias e revelando padrões na composição química dos órgãos vegetais.

Os dados derivados das amostras extraídas em AcOEt e das amostras extraídas em MeOH foram analisados separadamente como conjuntos de dados diferentes. Ambos os conjuntos apresentaram tendências e comportamentos diferentes, principalmente, relacionados ao solvente utilizado na extração das amostras.

Foram considerados os extratos em órgãos vegetais de cinco espécies em quantidades e proporções variadas; folhas (seis sp), cascas (quatro sp), galhos (duas sp), sementes e flores (uma sp).

Os dados cromatográficos de TR (min) e AR (%) foram utilizados para estas análises de PCA e seguiram a regra algorítmica de covariância com a utilização das componentes principais (CP's) 1-6. Para as análises de PCA com os dados das amostras em AcOEt foi utilizado uma tabela mestra composta de 12 (amostras) x 147 variáveis (TR min). Para as análises de PCA das amostras em MeOH foi utilizado uma tabela mestra composta de 12 (amostras) x 161 variáveis (TR min).

Como consequência da análise de PCA são gerados dois tipos de representações gráficas, que devem sempre ser analisados em conjunto, o gráfico de *score plot* e o gráfico de *loadings*. O gráfico de *score plot* mostra as coordenadas das amostras de acordo com o sistema de eixos/variáveis formados pelas componentes principais. Já o gráfico de *loadings* mostra o quanto cada variável original contribuiu na construção de cada componente principal; bem como explica o porquê dos agrupamentos observados no gráfico de *score plot*. Os gráficos dos *loadings* das seis componentes principais analisadas para cada conjunto de dados multivariados (AcOEt e MeOH) encontram-se nos anexos 31 e 32.

Os gráficos de *score plot* foram subdivididos em combinações entre as PC's 1-6 com ilustrações bi e tridimensionais, dos quais foi possível observar agrupamentos e distinções características de acordo com as coordenadas observadas para os órgãos vegetais analisados. Foram utilizados seis componentes principais em vista a explorar o máximo de informações relevantes sobre os conjuntos de dados.

5.4.1 Análise de Componentes Principais (PCA) – Extratos em AcOEt

A PCA revelou a similaridade e distinção metabólica entre os órgãos vegetais (folhas, cascas, galhos, sementes e flores) extraídos por maceração em AcOEt das cinco espécies de *Copaifera*. A extração em AcOEt objetivou detectar metabólitos de média polaridade.

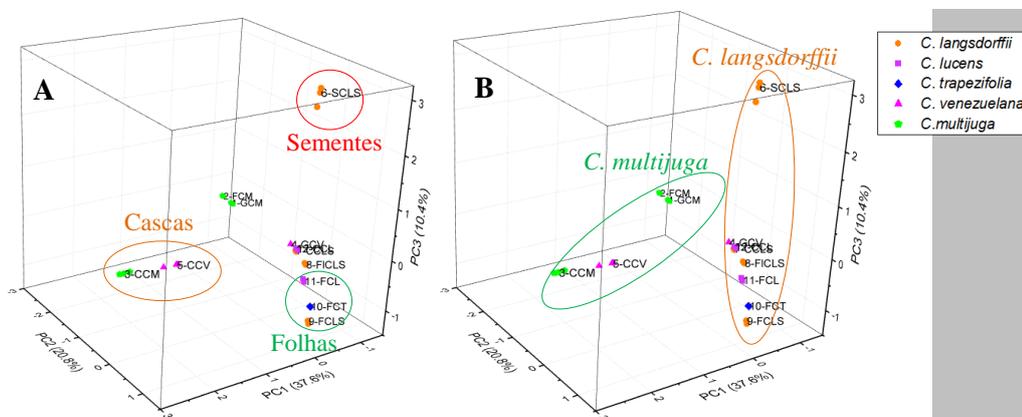
Às duas primeiras componentes PC1 e 2 possuem juntas uma variância explicada superior a 55% (tabela 3, abaixo), o que é muito bom, pois tem boa representatividade dos dados contidos nas variáveis originais (ROUMBOUTS et al., 2019). Às seis primeiras componentes (PC's 1-6) representam um total de 90% da variância explicada.

Tabela 3. Relação das PCs em acordo com a variância explicada.

Nº Componentes Principais	Autovalor	Porcentagem de Variação (%)	Cumulativo (%)
1	428,492	37,611	37,611
2	237,200	20,820	58,431
3	118,001	10,357	68,789
4	98,059	8,607	77,396
5	97,470	8,116	85,513
6	69,296	6,082	91,596

De acordo com a análise e inspeção visual do gráfico tridimensional *score plot* (figura 43, A e B) com as combinações entre as PC's 1, 2 e 3, são possíveis observar que as réplicas das análises em triplicata se sobrepuseram demonstrando um bom desempenho instrumental. Sendo observados agrupamentos em função das espécies e o dos órgãos vegetais.

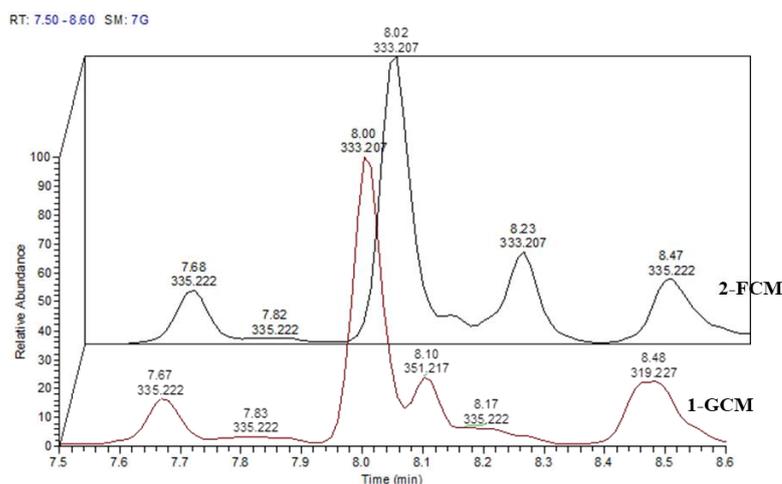
Figura 43. Gráfico *score plot* 3D ilustrando a combinação das PC 1, 2 e 3: A-Agrupamentos por órgãos vegetais; B-Agrupamentos por espécies.



Os extratos dos órgãos vegetais (folhas, galhos e cascas) de *C. multijuga* destacam-se, principalmente, em função de PC1 e PC2 de acordo com a figura 43 B.

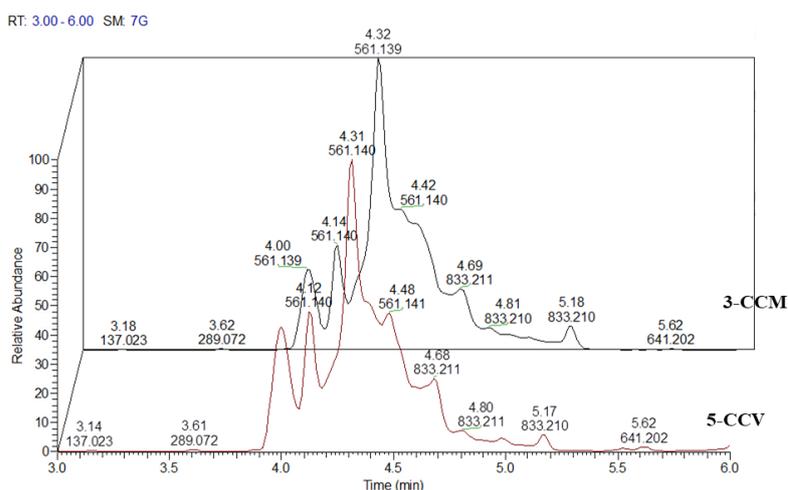
As réplicas dos extratos das folhas (2-FCM) e dos galhos (1-GCM) de *C. multijuga* apresentaram grande similaridade (figura 44), as amostras assemelharam-se principalmente pela presença de um pico cromatográfico com TR 8,02±0,04 min com área relativa (AR) média de ±38,40% para o 2-FCM e ±32,18% para o 1-GCM, ambos relacionados ao íon-base não identificado (NI) *m/z* 333,207.

Figura 44. Cromatogramas em *Base Peak* de 1-GCM e 2-GCM (TR: 7,5-8,6 min).



Os extratos das cascas de *C. multijuga* (3-CCM) assemelharam-se as cascas de *C. venezuelana* (5-CCV), principalmente em função da PC1 como observado na figura 43 A, as amostras apresentaram perfis cromatográficos similares, o pico cromatográfico determinante no agrupamento foi detectado no TR $4,31 \pm 0,08$ min com AR média de $\pm 67,49\%$ para 3-CCM e $\pm 49,71\%$ para o 5-CCV, respectivamente (figura 45). O pico cromatográfico no TR 4,31 min está relacionado ao dímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina (m/z 561,140) detectado por MS², um tanino condensado, até então somente identificado nas cascas de *C. multijuga* entre as espécies do gênero *Copaifera*.

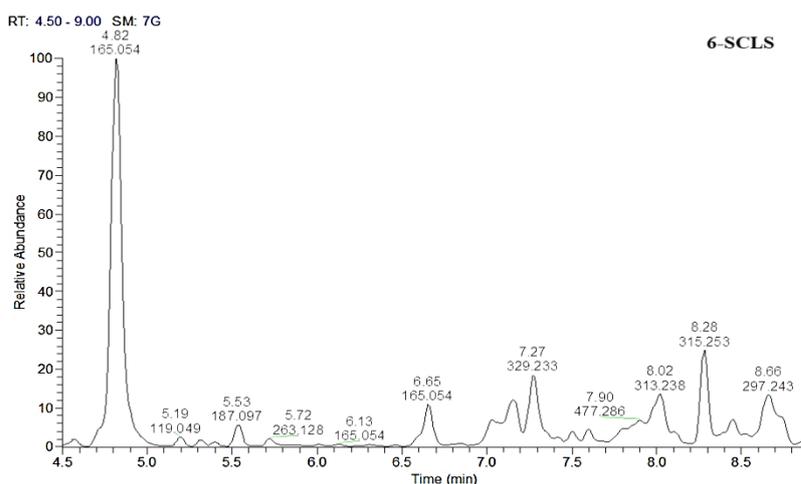
Figura 45. Cromatogramas em *Base Peak* de 5-CCV e 3-CCM (TR: 3-6 min).



Ainda de acordo com a figura 43 B é possível observar uma forte distinção das réplicas do extrato das sementes de *C. langsdorffii* (6-SCLS) em função de PC3, o 6-SCLS diferenciou-se das demais espécies e órgãos vegetais e apresentaram picos cromatográficos exclusivos com TR $4,81 \pm 0,03$ min, $6,65 \pm 0,02$ min, $7,27 \pm 0,03$ min, $8,28 \pm 0,02$ min e

8,65±0,02 min com as AR's médias de ±33,33%, ±4,12%, ±5,73%, ±5,82% e ±6,64%, respectivamente. Picos cromatográficos foram relacionados aos íons-base NI com m/z 165,054 nos TR's 4,81 e 6,65 min, m/z 329,233 no TR 7,27 min, m/z 315,253 no TR 8,28 min e m/z 297,243 no TR de 8,65 min. Tais picos detectados foram característicos no extrato das sementes de *C. langsdorffii* (figura 46).

Figura 46. Cromatograma em *Base Peak* de 6-SCLS (TR: 4,5-9 min).



O gráfico de *score plot* com a combinação entre a PC 4 e 2 na figura 47, revelou a distinção entre os extratos das folhas de quatro espécies, a *C. multijuga* (2-FCM), *C. langsdorffii* (9-FCLS), *C. trapezifolia* (10-FCT) e *C. lucens* (11-FCL) às duas últimas citadas apresentaram relativa semelhança em função de PC 4 e PC2. A tabela 4 apresenta os picos cromatográficos mais influentes na distinção entre os extratos das folhas das espécies.

Figura 47. Gráfico *score plot* 2D ilustrando a combinação das PC4 x PC2.

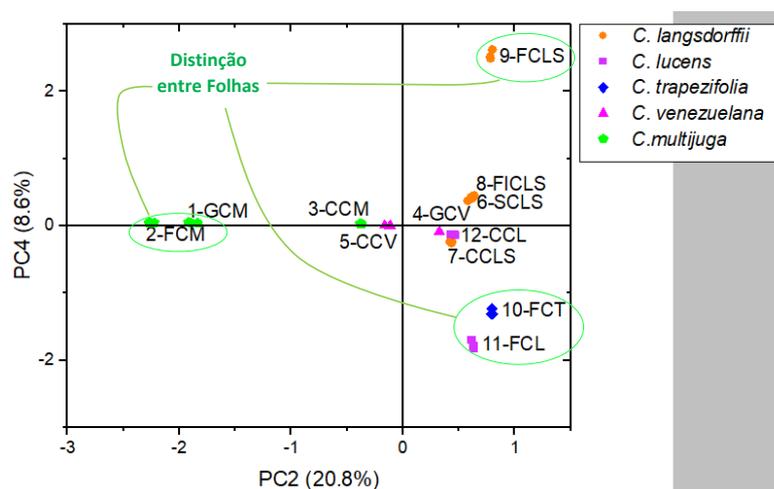


Figura 48. Cromatogramas em *Base Peak* de 2-FCM, 9-FCLS, 10-FCT e 11-FCL.

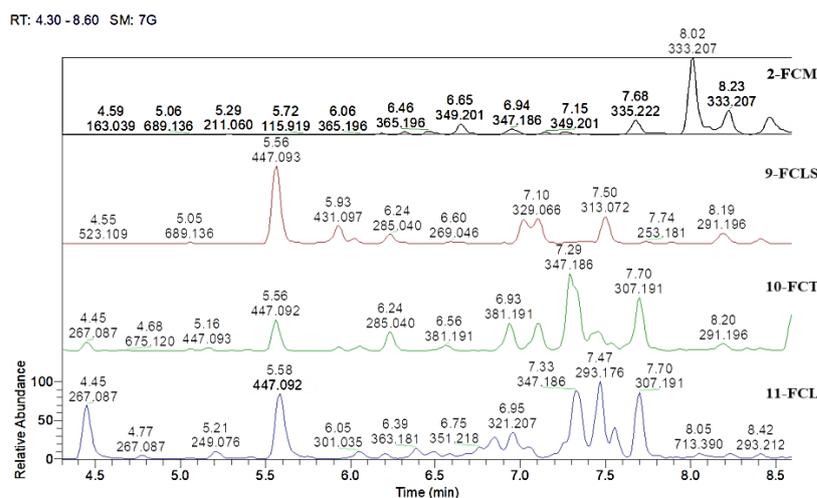


Tabela 4. Relação dos picos cromatográficos mais influentes nas amostras 2-FCM, 9-FCLS, 10-FCT, 11-FCL.

TR (min)	2-FCM (AR%)	9-FCLS (AR%)	10-FCT (AR%)	11-FCL (AR%)	METABOLITOS
8,47±0,03	±12,39	-	-	-	<i>m/z</i> 335,223
8,23±0,04	±11,88	-	-	-	<i>m/z</i> 333,207
8,02±0,02	±32,18	-	-	-	<i>m/z</i> 333,207
7,70±0,10	-	-	±11,28	±9,38	<i>m/z</i> 307,191
7,67±0,02	±7,67	-	-	-	<i>m/z</i> 335,222
7,49±0,04	-	±10,59	-	-	<i>m/z</i> 313,071
7,47±0,02	-	-	-	±11,21	<i>m/z</i> 293,176
7,29±0,09	-	-	±22,87	±13,59	<i>m/z</i> 347,186
7,10±0,02	-	-	±6,97	-	<i>m/z</i> 307,191
7,01±0,03	-	±6,97	-	-	<i>m/z</i> 343,082
5,93±0,08	-	±7,30	±1,05	-	<i>m/z</i> 431,083
5,55±0,15	-	±29,90	±6,98	±12,05	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (<i>m/z</i> 447,092)
4,45±0,11	-	-	±2,52	±11,34	<i>m/z</i> 267,087

Portanto, de acordo com a análise do gráfico bidimensional na figura 47, os cromatogramas na figura 48 e os dados da tabela 4, foi possível observar uma forte distinção entre os extratos das folhas de *C. multijuga* (2-FCM), *C. langsdorffii* (9-FCLS), *C. trapezifolia* (10-FCT) e *C. lucens* (11-FCL) e a presença de picos cromatográficos característicos. As réplicas das análises de 2-FCM concentraram-se à direita do gráfico, a distinção foi influenciada pela presença dos picos cromatográficos com TR 8,02 min (AR ±32,18% e *m/z* 333,207), 8,23 min (AR ±11,88% e *m/z* 333,207) e 8,47 min (AR ±12,39% e *m/z* 335,223) e seus respectivos íons-base NI. As réplicas das análises de 9-FCLS concentraram-se na parte superior esquerda do gráfico (figura 47), a presença de quercetina-3-*O*-ramnosídeo (*m/z* 447,092), detectada por MS² no pico cromatográfico com TR de 5,55 min com AR de ±29,90% contribuiu significativamente para a distinção, bem como os picos com TR 7,01 min (AR ±6,97% e *m/z* 343,082) e 7,49 min (AR ±10,59% e *m/z* 313,072) e seus

respectivos íons-base NI. As réplicas das análises do 10-FCT e 11-FCL apresentaram relativa similaridade e concentraram-se na parte inferior esquerda do gráfico, a similaridade entre as amostras foi influenciado para presença de três picos cromatográficos característicos entre as amostras, o pico com TR de 7,70 min (m/z 307,191) com AR média de $\pm 11,28\%$ para o 10-FCT e $\pm 9,38\%$ para 11-FCL, no TR de 7,29 min (m/z 347,186) com AR média de $\pm 22,87\%$ para o 10-FCT e $\pm 13,59\%$ para 11-FCL e no TR de 4,45 min (m/z 267,087) com AR média de $\pm 2,52\%$ para o 10-FCT e $\pm 11,34\%$ para 11-FCL. A detecção de quercetina-3-*O*-ramnosídeo (m/z 447,092) no 9-FCLS, 10-FCT e 11-FCL indica o flavonoide como um biomarcado nas folhas do gênero *Copaifera*.

A análise do gráfico bidimensional na figura 49 **A** com as combinações de (PC 6 x PC 1) e os cromatogramas dispostos na figura 50 evidenciam uma discrepância entre os extratos das cascas das espécies, é possível observar dois agrupamentos, o Grupo 1 está localizado na parte inferior do gráfico composto pelas réplicas das análises dos extratos das cascas de *C. lucens* (12-CCL) e *C. langsdorffii* (7-CCLS) e o Grupo 2 localizado à esquerda do gráfico composto pelas réplicas das análises dos extratos das cascas de *C. multijuga* (3-CCM) e *C. venezuelana* (5-CCV). O Grupo 1, composto por 12-CCL e 7-CCLS as quais apresentaram cinco picos cromatográficos similares listados na tabela 5. O Grupo 2, composto por 3-CCM e 5-CCV distinguem-se, principalmente, por apresentarem os picos cromatográficos com TR de $4,31 \pm 0,08$ min e $4,65 \pm 0,10$ min característicos dos taninos condensados nas formas de dímero epiafzelequina-(4 β -8)-epicatequina (m/z 561,140) com AR's de $\pm 57,56\%$ (3-CCM) e $\pm 41,71\%$ (5-CCV) e o trímero epiafzelequina-(4 β -8)-epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina (m/z 833,209) com AR's de $\pm 14,93\%$ (3-CCM) e $\pm 8\%$ (5-CCV).

Figura 49. Gráficos de *score plot* 2D ilustrando as combinações A (PC 6 x PC 1) e B (PC 5 x PC 1).

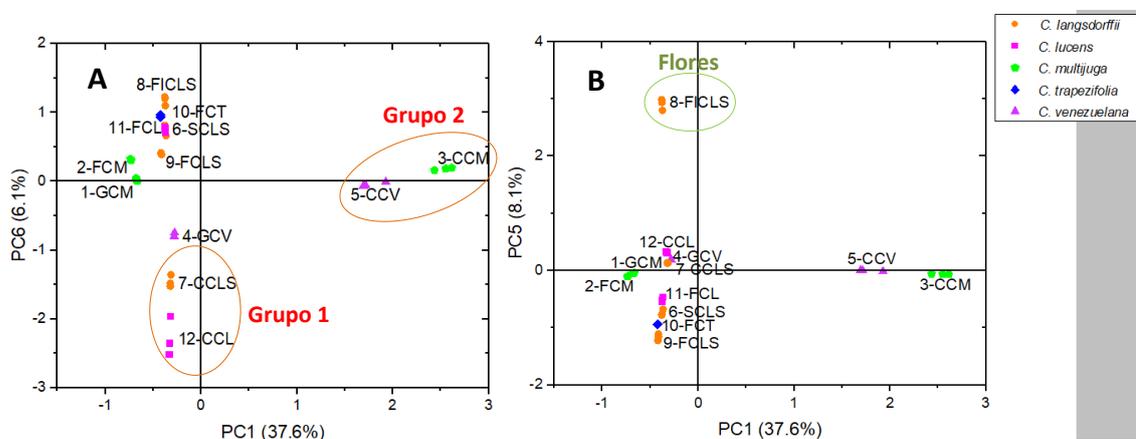


Figura 50. Cromatogramas em *Base Peak* do Grupo 1 (7-CCLS; 12-CCL) e Grupo 2 (3-CCM; 5-CCV) (TR: 3-8,8 min).

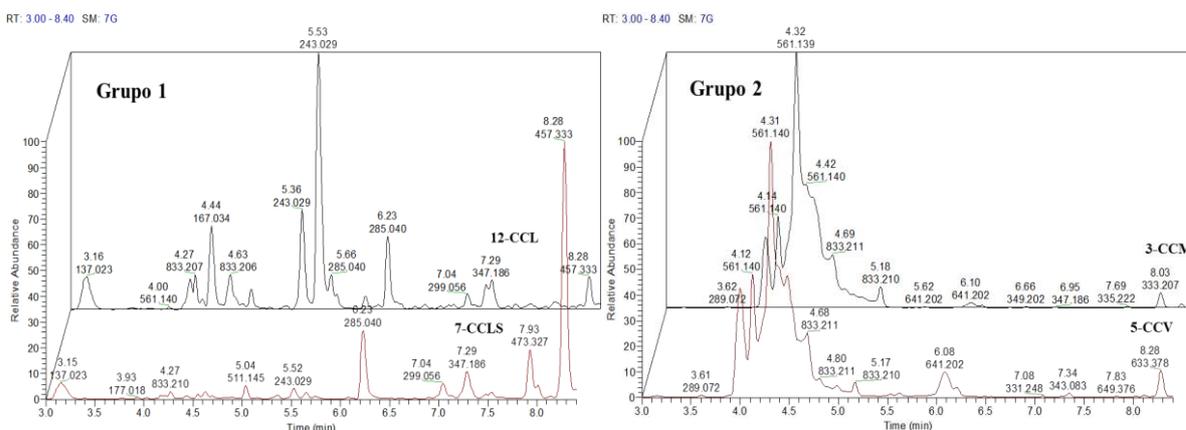


Tabela 5. Relação dos picos cromatográficos mais influentes nas amostras 7-CCLS e 12-CCL.

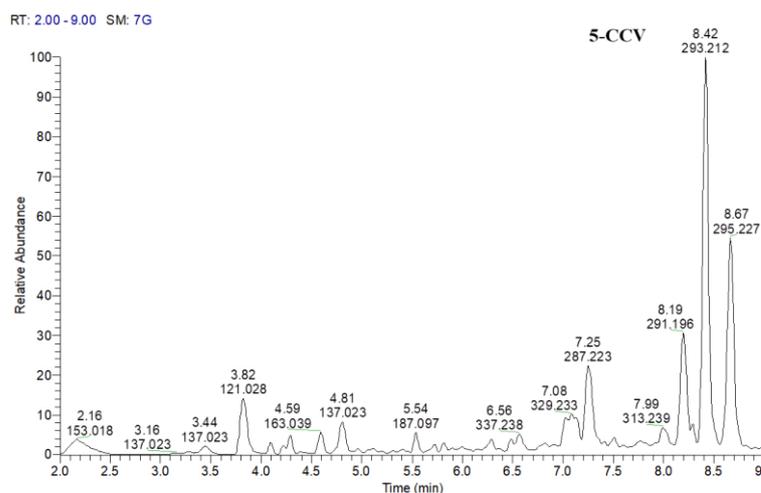
TR (min)	7-CCLS (AR%)	12-CCL (AR%)	METABOLITOS
8,27±0,05	±14,70	±2,05	<i>m/z</i> 457,333
6,23±0,10	±6,58	±8,06	<i>m/z</i> 285,040
5,51±0,06	±0,99	±16,03	<i>m/z</i> 243,029
5,35±0,02	±0,45	±8,15	<i>m/z</i> 243,029
3,17±0,04	±6,97	±8,83	<i>m/z</i> 137,023

De acordo com a análise do gráfico bidimensional na figura 49 **B**, é possível observar uma distinção das réplicas das análises do extrato das flores de *C. langsdorffii* (8-FICLS) na parte superior do gráfico em função de PC 5. Logo, percebeu-se que seis picos cromatográficos destacam-se para o 8-FICLS, os picos estão listados na tabela 6 abaixo de acordo com o cromatograma na figura 51. Destaque para a detecção do ácido 2,5-di-hidróxi-benzoico (*m/z* 153,018) no TR de 2,21 min com AR de ±9,13%.

Tabela 6. Relação dos picos cromatográficos mais influentes na amostra 8-FICLS.

TR (min)	8-FICLS (AR%)	METABOLITOS
8,64±0,03	±13,50	<i>m/z</i> 295,228
8,40±0,04	±21,05	<i>m/z</i> 293,212
7,24±0,05	±6,70	<i>m/z</i> 287,223
3,83±0,08	±12,83	<i>m/z</i> 121,028
2,21±0,12	±9,13	Ácido 2,5-di-hidróxi-benzóico (<i>m/z</i> 153,018)

Figura 51. Cromatograma em *Base Peak* de 8-FICLS (TR: 2-9 min).



Sintetizando as tendências e informações gerais observadas na análise multivariada dos compostos principais das amostras extraídas em AcOEt. As réplicas das análises dos extratos das folhas de *C. multijuga* (2-FCM), *C. langsdorffii* (9-FCLS), *C. trapezifolia* (10-FCT) e *C. lucens* (11-FCL) apresentaram significativa distinção. A quercetina-3-*O*-ramnosídeo foi detectada nos extratos das folhas *C. langsdorffii* (9-FCLS), *C. trapezifolia* (10-FCT) e *C. lucens* (11-FCL) indicando o flavonoide como um possível biomarcador das folhas das espécies de *Copaifera*. As réplicas dos extratos em AcOEt das cascas de *C. multijuga* (3-CCM) e *C. venezuelana* (5-CCV), demonstraram a presença dos taninos condensados nas formas de dímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina e trímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina como a classe metabólica marcadora das cascas das espécies de *Copaifera*. As réplicas do extrato dos galhos de *C. multijuga* (1-GCM) assemelharam-se as réplicas do extrato das folhas da espécie (2-FCM), já as réplicas do extrato dos galhos de *C. venezuelana* (4-GCV) se assemelham as réplicas do extrato das cascas da espécie (5-CCV), tais delimitações podem está relacionada à proximidade entre os órgãos vegetais e suas extensões. As réplicas dos extratos das flores (8-FICLS) de *C. langsdorffii* apresentaram composição química distinta dos demais órgãos vegetais, pois apresentaram seis picos cromatográficos característicos no TR entre 2,21-8,64 min entre os quais foi detectado o ácido 2,5-di-hidróxi-benzoico.

5.4.2 Análise de Componentes Principais (PCA) – Extratos em MeOH

A PCA revelou a similaridade e distinção metabólica entre os órgãos vegetais (folhas, cascas, galhos, sementes e flores) extraídos por maceração em MeOH das cinco espécies de *Copaifera*. A extração em MeOH objetivou detectar os metabólitos de alta polaridade.

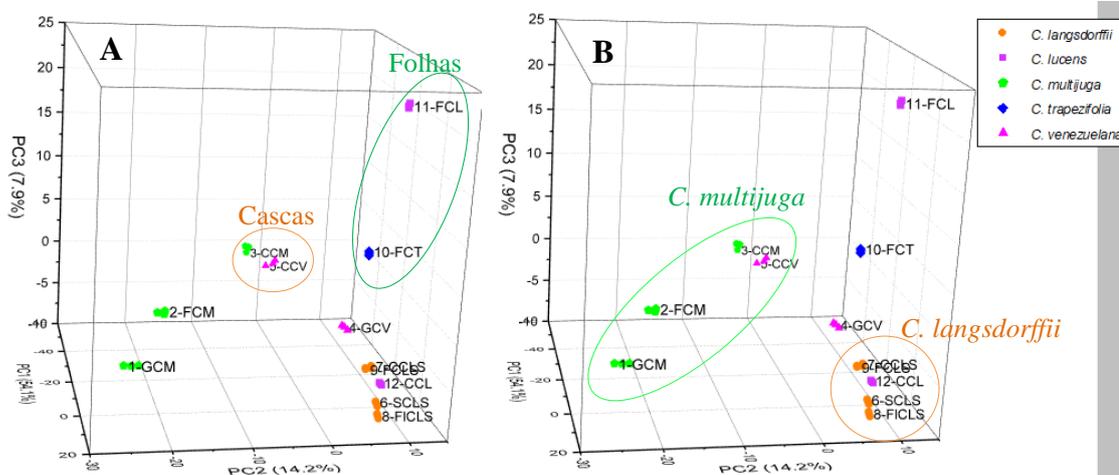
Às duas primeiras componentes PC 1 e 2 possuem juntas uma variância explicada superior a 65% (tabela 7, a abaixo), o que é muito bom, pois tem boa representatividade dos dados contidos nas variáveis originais (ROUMBOUTS et al., 2019). Às seis componentes (PC's 1-6) representam um total de 90% da variância explicada.

Tabela 7. Relação das PCs em acordo com a variância explicada.

Nº de Componentes Principais	Autovalor	Porcentagem de Variação (%)	Cumulativo (%)
1	464,303	54,119	54,119
2	121,619	14,176	68,295
3	68,096	7,937	76,233
4	50,130	5,843	82,076
5	42,860	4,995	87,072
6	33,544	3,909	90,9823

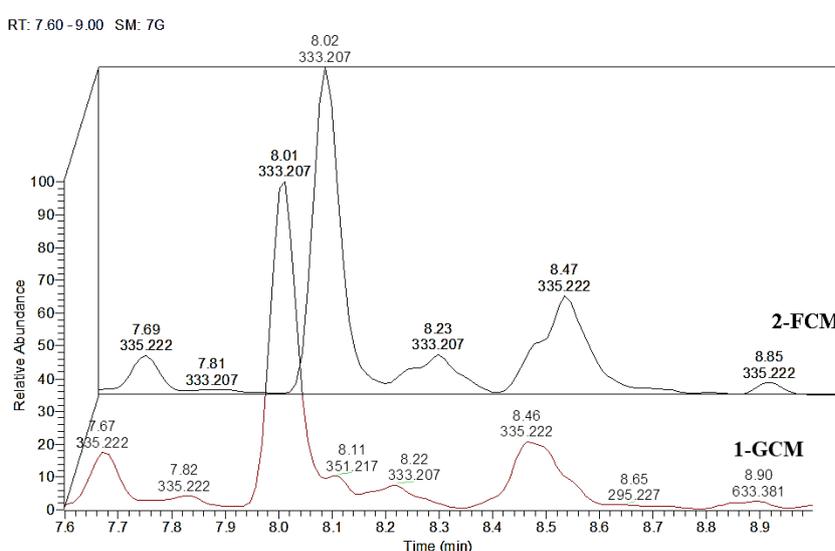
De acordo com a análise e inspeção visual do gráfico tridimensional de *score plot* (figura 52 A e B) com as combinações entre as PC's 1, 2 e 3, são possíveis observar que as réplicas das análises em triplicata se sobrepuseram demonstrando um bom desempenho instrumental. Sendo possível observar agrupamentos em função das espécies e dos órgãos vegetais.

Figura 52. Gráficos *score plot* 3D ilustrando a combinação das PC's 1, 2 e 3: A-Agrupamentos por órgãos vegetais; B-Agrupamentos por espécies.



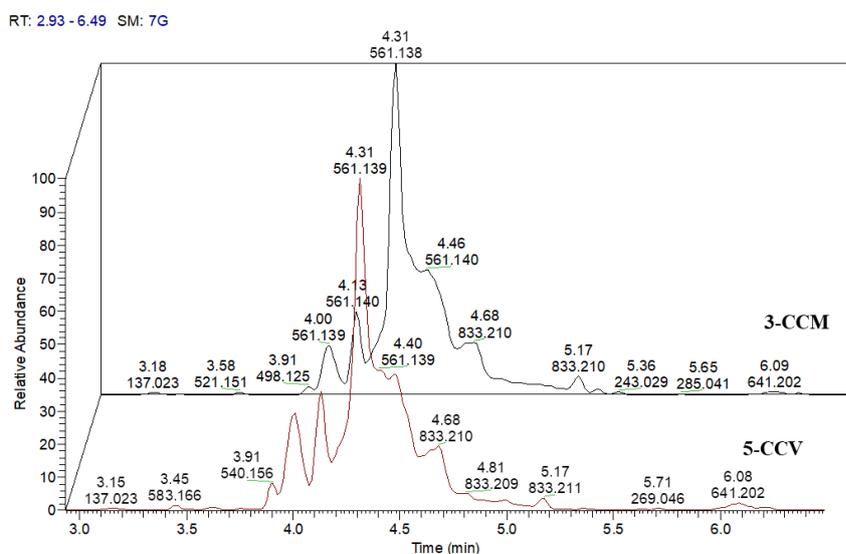
A *C. multijuga* e seus extratos dos órgãos vegetais (folhas, galhos e cascas) destacaram-se em relação às demais espécies, principalmente em função de PC 1 e PC 2 como destacado na figura 52 B. As réplicas dos extratos das folhas (2-FCM) e dos galhos (1-GCM) de *C. multijuga* apresentaram grande similaridade, as amostras assemelharam-se devido à presença dos picos cromatográficos com TR de $8,02 \pm 0,05$ min e $8,46 \pm 0,05$ min com AR média de $\pm 26,61\%$ e $\pm 9,77\%$ para o 1-GCM e $\pm 22,96\%$ e $\pm 8,59\%$ para o 2-FCM, ambos os sinais estão relacionados aos íons-base não identificados (NI's) m/z 333,207 e 335,222, respectivamente, de acordo com os cromatogramas na figura 53.

Figura 53. Cromatograma em *Base Peak* de 1-GCM e 2-FCM (TR: 7,6-9 min).



Os extratos das cascas de *C. multijuga* (3-CCM) assemelham-se as cascas de *C. venezuelana* (5-CCV), principalmente em função da PC 1 como observado na figura 52 A, pois ambos os extratos apresentaram perfis cromatográficos similares e revelaram a presença de um pico cromatográfico característico com TR de $4,31 \pm 0,08$ min com AR de $\pm 61,81\%$ para o 3-CCM e $\pm 47,53\%$ para o 5-CCV conforme a figura 54, o pico cromatográfico detectado em 4,31 min está relacionado ao dímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina (m/z 561,140) detectado por MS². O tanino condensado foi relatado, anteriormente, nas cascas de *C. multijuga* (PEREIRA et al., 2018).

Figura 54. Cromatogramas em *Base Peak* de 5-CCV e 3-CCM (TR: 2,9-7 min).



O gráfico de *score plot* com a combinação entre a PC 4 e 2 na figura 55, revelou a presença de um agrupamento composto, principalmente, por amostras de cascas, os extratos dos galhos de *C. venezuelana* (4-GCV) e das cascas de *C. multijuga* (3-CCM), *C. venezuelana* (5-CCV) e *C. langsdorffii* (7-CCLS) apresentaram proximidade ao centro do gráfico, principalmente devido à presença de dois picos cromatográficos com TR's de $4,31 \pm 0,08$ e $4,65 \pm 0,10$ min com AR's médias de $\pm 61,81\%$ e $\pm 10,23\%$ para a 3-CCM, $\pm 14,33\%$ e $\pm 2,34\%$ para a 4-GCV, $\pm 47,53\%$ e $\pm 9,18\%$ para a 5-CCV e $\pm 1,74\%$ (7-CCLS), conforme os cromatogramas dispostos na figura 56. Os picos cromatográficos foram detectados por MS² como o dímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina (m/z 561,140) e o trímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina (m/z 833,209). Os taninos condensados foram relatados, anteriormente, nas cascas de *C. multijuga* (PEREIRA et al., 2018).

Figura 55. Gráfico 2D ilustrando a combinação das PC 4 x PC 2.

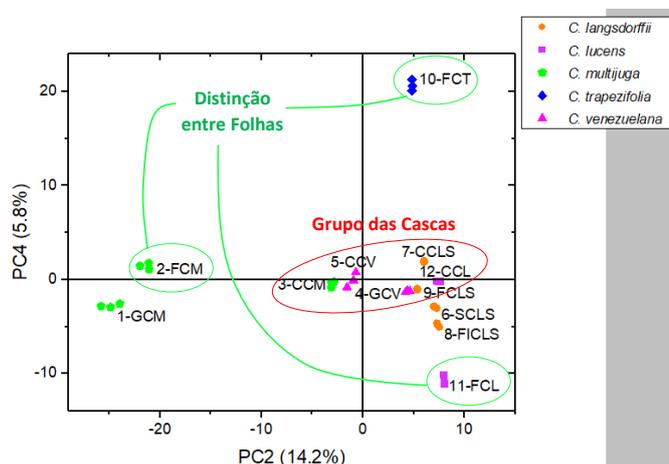
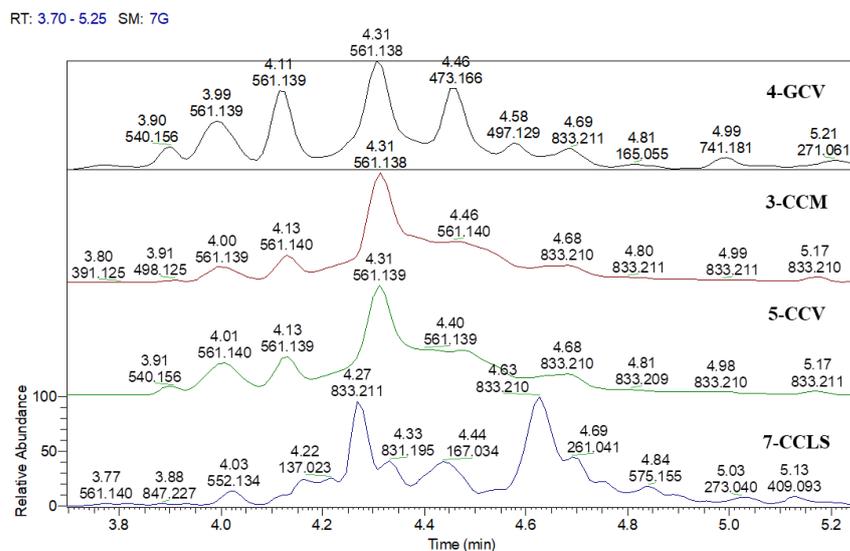


Figura 56. Cromatogramas em *Base Peak* de 4-GCV, 3-CCM, 5-CCV e 7-CCLS (TR: 3,5-5,25 min).

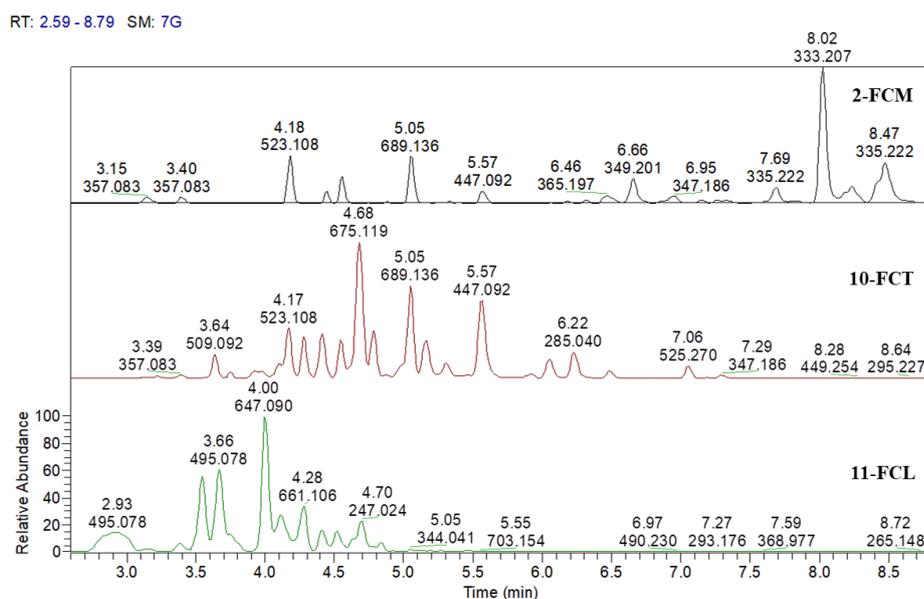


Ainda de acordo com o gráfico de *score plot* da figura 55, foi possível observar a distinção dos extratos das folhas de *C. multijuga* (2-FCM), *C. langsdorffii* (10-FCT) e *C. lucens* (11-FCL) em relação às demais espécies e órgãos vegetais em função de PC4 e PC2, as diferenças também podem ser observadas nos cromatogramas disposto na figura 57. A tabela 8 a seguir, apresenta os picos cromatográficos mais influentes na distinção entre os extratos das folhas das espécies.

Tabela 8. Relação dos picos cromatográficos mais influentes nas amostras 2-FCM, 10-FCT, 11-FCL.

TR (min)	2-FCM (AR%)	10-FCT (AR%)	11-FCL (AR%)	METABÓLITOS
8,46±0,02	±22,96	-	-	<i>m/z</i> 335,223
8,02±0,03	±8,59	-	-	<i>m/z</i> 333,207
5,55±0,15	±2,65	±10,99	-	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (<i>m/z</i> 447,093)
5,05±0,10	±6,62	±8,87	-	Ác. tri-3,4,5-(3- <i>O</i> -metil-galoil)-quínico (<i>m/z</i> 689,136)
4,69±0,05	-	±16,18	-	Ác. di-(3- <i>O</i> -metil-galoil)-(galoil)-quínico (a) (<i>m/z</i> 675,120)
4,17±0,03	-	±5,32	-	Ác. di-(3- <i>O</i> -metil-galoil)-quínico (a) (<i>m/z</i> 523,109)
3,99±0,02	-	-	±14,15	Ác. tri-(galoil)-quínico (<i>m/z</i> 647,089)
3,66±0,05	-	-	±11,06	Ác. di-(galoil)-quínico (<i>m/z</i> 495,078)
2,87±0,06	-	-	±12,31	<i>m/z</i> 495,078

Figura 57. Cromatogramas em *Base Peak* de 2-FCM, 10-FCT e 11-FCL (TR: 2,5-8,8 min).



Portanto, de acordo com a análise do gráfico bidimensional da figura 55 e os dados da tabela 8 foi possível observar uma forte distinção entre os extratos das folhas de *C. multijuga* (2-FCM), *C. trapezifolia* (10-FCT) e *C. lucens* (11-FCL) e a presença de picos cromatográficos característicos (figura 57). As réplicas das análises do 2-FCM localizadas na parte direita do gráfico, distinguiram-se das demais devido à influência da PC 2 e a detecção dos picos cromatográficos com TR de 8,02 min (AR $\pm 8,59\%$ e m/z 333,207) e 8,46 min (AR $\pm 22,96\%$ e m/z 335,222), ainda sim, no TR de 5,05 min (AR $\pm 6,62\%$) foi detectado a presença do ácido tri-3,4,5-(3-*O*-metil-galoil)-quínico (m/z 689,136) e no TR de 5,57 min (AR $\pm 2,65\%$) foi detectado o flavonoide quercetina-3-*O*-ramnosídeo (m/z 447,092). As réplicas das análises do 10-FCT localizadas na parte superior esquerda do gráfico são influenciadas pela PC 4 e distinguiram-se das demais devido à presença dos picos cromatográficos correspondentes aos ácidos galoilquínicos com TR de 4,69 min (AR $\pm 16,18\%$) que correspondeu ao ácido di-(3-*O*-metil-galoil)-(galoil)-quínico (**a**) (m/z 675,120), no TR de 4,17 min (AR de $\pm 5,32\%$) relacionado ao ácido di-(3-*O*-metil-galoil)-quínico (**a**) (m/z 523,109) e no TR de 5,57 min (AR $\pm 10,99\%$) foi detectado o flavonoide quercetina-3-*O*-ramnosídeo (m/z 447,093). As réplicas das análises do 11-FCL localizadas na parte inferior esquerda do gráfico, as quais foram influenciadas pela detecção no TR de 3,99 min (AR $\pm 14,15\%$) do ácido 3,4,5-tri-*O*-(galoil)-quínico (m/z 647,089) e no TR de 2,87 min (AR de $\pm 12,31\%$) o íon NI com m/z 495,078.

Bem como relatado na literatura, a presença de polifenóis como os ácidos galoilquínicos e flavonoides no gênero *Copaifera* foi primeiramente relatada nos extratos polares das folhas de *C. langsdorffii* (MOTTA, 2014; MOTTA^a et al., 2017). Logo, por meio do estudo em questão, verificou-se que outras espécies do gênero *Copaifera* também produzem esses metabólitos secundários com potencial antioxidante, tal tendência foi observada com a detecção dos ácidos galoilquínicos (m/z 495,078; 523,109; 647,089; 675,120; 689,136) e do flavonoide quercetina-3-*O*-ramnosídeo (m/z 447,093) o que indicam a presença de classes metabólicas marcadoras das folhas do gênero *Copaifera*.

O gráfico bidimensional de *score plot* na figura 58 A ilustrando as combinações da PC 6 e 2 evidenciou-se uma distinção discreta das réplicas das análises do extrato das sementes de *C. langsdorffii* (6-SCLS) em função de PC 5, tal distinção foi influenciada por cinco picos cromatográficos detectados somente no extrato das sementes e estão relacionados na tabela 9 e conforme o cromatograma na figura 59 abaixo.

Figura 58. Gráficos 2D ilustrando as combinações A (PC 6 e PC 2) e B (PC 5 e PC 2).

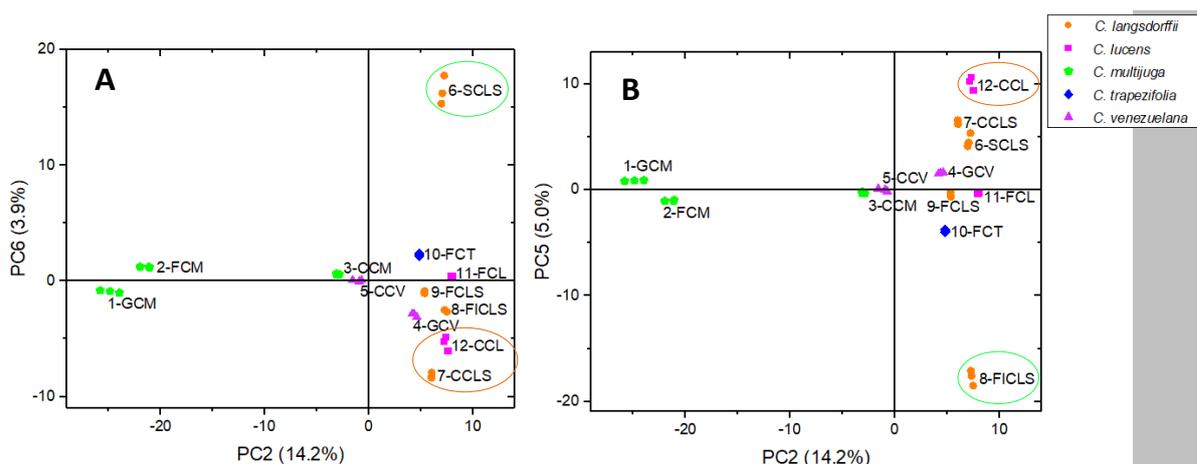


Figura 59. Cromatogramas em *Base Peak* de 6-SCLS (TR: 7,6-9 min).

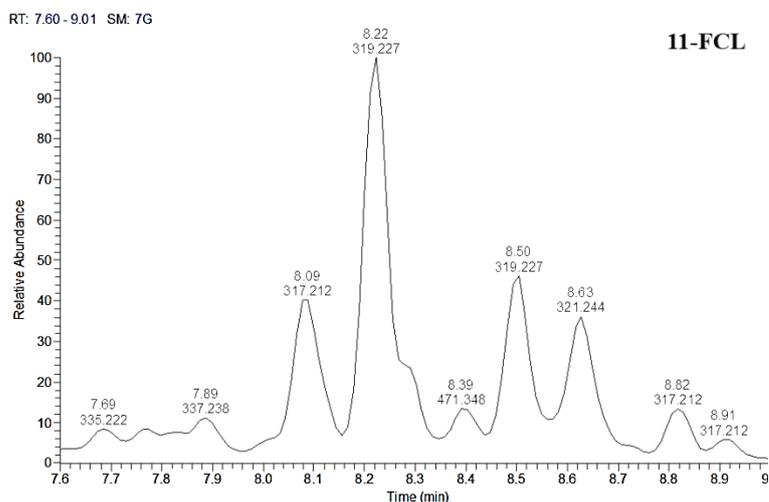


Tabela 9. Relação dos picos cromatográficos exclusivos da 6-SCLS com tempos de retenção, áreas relativas e metabólitos sugeridos.

TR (min)	6-SCLS (AR%)	METABOLITOS
8,60±0,03	±5,80	<i>m/z</i> 317,212
8,48±0,03	±6,62	<i>m/z</i> 319,228
8,20±0,10	±15,92	Ácido 5-[(8a <i>S</i>)-tetra-2,5,5,8a-tetrametil-3-oxo-4a,6,7,8-tetrahydro-4 <i>H</i> -naftalen-1-il]-3-metilpentanóico (<i>m/z</i> 319,228)
8,08±0,05	±6,36	Ácido (<i>E</i>)-5-(1,2,4a,5-tetrametil-7-oxo-3,4,8,8a-tetrahydro-2 <i>H</i> -naftalen-1-il)-3-metilpent-2-enóico (<i>m/z</i> 317,212)
7,88±0,04	±5,75	<i>m/z</i> 337,238

De acordo com a análise do gráfico bidimensional na figura 58 **A** com as combinações da PC 6 e PC 2 foi possível observar uma distinção discreta das réplicas das análises do extrato das sementes de *C. langsdorffii* (6-SCLS) em função da PC 6, pelo menos cinco picos cromatográficos (Figura 59) foram característicos com destaque para os diterpenos detectados no TR de 8,08 min (AR ±6,36%) correspondendo ao ácido (*E*)-5-(1,2,4a,5-tetrametil-7-oxo-3,4,8,8a-tetrahydro-2*H*-naftalen-1-il)-3-metilpent-2-enóico (*m/z* 317,212) e no TR de 8,20 min (AR ±15,92%) relacionado ao ácido 5-[(8a *S*)-tetra-2,5,5,8a-tetrametil-3-oxo-4a,6,7,8-tetrahydro-4*H*-naftalen-1-il]-3-metilpentanóico (*m/z* 319,228) ambos detectados por MS².

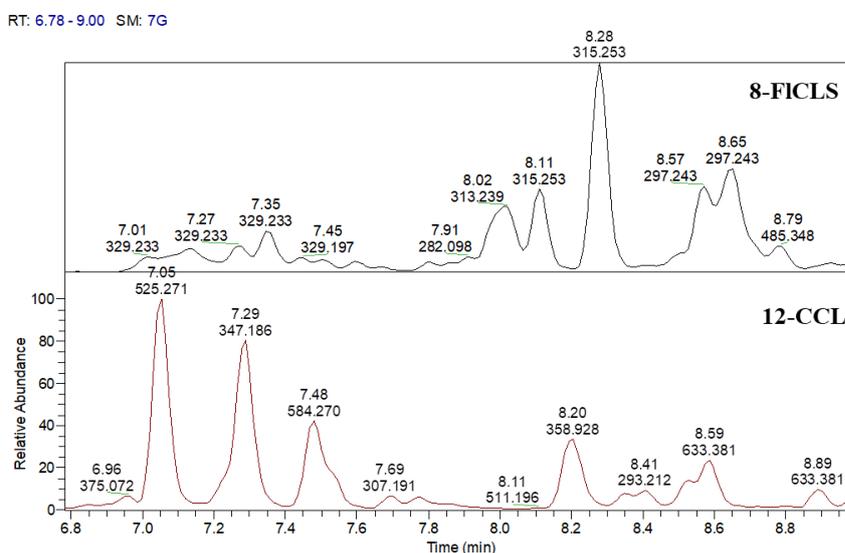
Ainda de acordo com a análise do gráfico bidimensional na figura 58 **A** foi possível observar uma aproximação entre as réplicas das análises dos extratos das cascas de *C. langsdorffii* (7-CCLS) e *C. lucens* (12-CCL) em função da PC 6 na parte inferior esquerda do gráfico, tal relação foi influenciada principalmente pela presença do pico cromatográfico com TR de 7,30±0,03 min relacionado ao metabólito diterpeno giberelina A29 (*m/z* 347,186) com AR média de ±4,87% para a 7-CCLS e ±10,09% para a 12-CCL.

Analisando o gráfico bidimensional na figura 58 **B** com as combinações das PC's 5 e 2, foi possível observar uma forte distinção das réplicas das análises do extrato das flores de *C. langsdorffii* (8-FICLS) e uma discreta distinção do extrato das cascas de *C. lucens* (12-CCL) em relação aos demais extratos dos órgãos vegetais em função de PC5. A distinção das réplicas do 8-FICLS foram influenciadas por um conjunto de cinco picos cromatográficos característicos relacionados na tabela 10 e podem ser observados no cromatograma na figura 60. A discreta distinção observada nas réplicas do 12-CCL foi influenciada pela detecção exclusiva do pico cromatográfico no TR de 7,05 min (AR ±10,69%) o qual correspondeu ao íon-base NI com *m/z* 525,270.

Tabela 10. Relação dos picos cromatográficos exclusivos da 8-FICLS com tempos de retenção, áreas relativas e íons-base.

TR (min)	8-FICLS (AR%)	Íons-base e Metabolitos
8,65±0,05	±8,22	m/z 297,243
8,57±0,06	±6,63	m/z 297,243
8,27±0,08	±13,25	m/z 315,254
8,01±0,04	±6,73	m/z 313,238
7,05±0,05	±10,69	m/z 525,270

Figura 60. Cromatogramas em *Base Peak* de 8-FICLS e 12-CCL (TR: 6,8-9 min).



Sintetizando as tendências e informações gerais observadas na análise multivariada dos componentes principais das amostras extraídas em metanol, foi possível indicar classes metabólicas biomarcadoras para os extratos das folhas e das cascas das espécies do gênero *Copaifera*. Os ácidos galoilquínicos e o flavonoide quercetina-3-*O*-ramnosídeo foram detectados em grande parte das réplicas dos extratos das folhas de *C. trapezifolia* (10-FCT), *C. lucens* (11-FCL) e *C. multijuga* (2-FCM). Os taninos condensados nas formas de dímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina e trímero epicatequina-(4 β -8)-epiafzelequina-(4 β -8)-epiafzelequina foram detectados nas réplicas dos extratos das cascas de *C. multijuga* (3-CCM), *C. venezuelana* (5-CCV), *C. lucens* (12-CCL) e *C. langsdorffii* (7-CCLS) indicando a classe metabólica marcadora das cascas das espécies de *Copaifera*. As réplicas do extrato dos galhos de *C. multijuga* (1-GCM) assemelharam-se as réplicas do extrato das folhas da espécie (2-FCM), já as réplicas do extrato dos galhos de *C. venezuelana* (4-GCV) se assemelham as

réplicas do extrato das cascas (5-CCV) da espécie, tais aproximações podem está relacionada à proximidade entre os órgãos vegetais e suas extensões. As réplicas dos extratos das sementes (6-SCLS) e flores (8-FICLS) de *C. langsdorffii* apresentaram composição química distinta dos demais órgãos vegetais, as sementes (6-SCLS) destacaram-se com a presença de cinco picos cromatográficos característicos no TR entre 7,88-8,60 min entre os quais foram detectados dois ácidos diterpenos pelo perfil de fragmentação, as flores (8-FICLS) apresentaram seis picos cromatográficos característicos no TR entre 5,53-8,65 min.

6. CONCLUSÕES

O estudo metabolômico das espécies de *Copaifera* revelou-se extremamente satisfatório para a caracterização e mapeamento dos metabólitos presentes nos extratos dos órgãos vegetais.

A técnica hifenada de UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS foi aplicada com sucesso e se mostrou extremamente eficiente no perfilamento metabólico dos extratos dos órgãos vegetais e na detecção dos metabólitos por meio da fragmentação MS² dos metabólitos presentes.

A técnica mostrou-se extremamente eficiente em termos de reprodutibilidade, seletividade, versatilidade e precisão espectrométrica, além de proporcionar análises rápidas e maior economia no consumo de solventes orgânicos.

Foram detectados um total de 47 metabólitos, dos quais 4 foram identificados por comparação com padrões de referência. Diversas classes metabólicas foram detectadas como ácidos fenólicos (derivados de ác. cinâmico e ác. benzoico), ácidos graxos (ác. sebácico, ác. abscísico etc.), ácidos diterpenos (Giberelina A29, Ác. 5-[(8a S)-2,5,5,8a-tetrametil-3-oxo-4a,6,7,8-tetrahydro-4H-naftalen-1-il]-3-metilpentanóico etc.), uma rica variedade de polifenóis, como flavonoides agliconas (quercetina, canferol, etc.), flavonoides glicosilados (derivados de quercetina e canferol), um glicosídeo fenólico, ácidos galoilquínicos mono-, di- e tri-substituídos e suas variedades isoméricas detectadas em diferentes tempos de retenção, e taninos condensados nas formas de dímero e trímero.

As análises estatísticas de PCA proporcionaram um excelente suporte técnico para o mapeamento dos metabólitos presentes nos extratos dos órgãos vegetais extraídos em AcOEt e MeOH. Os dados cromatográficos (acima do limite de AR $\geq 0,10\%$) foram analisados em dois lotes (dados AcOEt e MeOH) em virtude na natureza química do solvente extrator, os quais revelaram tendências metabólicas diferentes, principalmente para as folhas, em virtude da afinidade e interação solvente-amostra no processo de maceração.

Os extratos das folhas apresentaram tendências diferentes em ambos os solventes extratores. Nas amostras em AcOEt, foi possível detectar a presença do flavonoide quercetina-3-O-ramnosídeo em 3/4 amostras dos extratos das folhas de *Copaifera* analisadas. Já nas amostras em MeOH, foi possível detectar, além da quercetina-3-O-ramnosídeo, os ácidos galoilquínicos di- e tri-substituídos em 3/4 amostras dos extratos das folhas de

Copaifera analisadas. Desta forma os ácidos galoilquínicos e o flavonoide quercetina-3-O-ramnosídeo podem ser considerados marcadores das folhas de *Copaifera*.

Nos extratos das cascas foram observadas tendências similares em ambos os solventes extratores. Nas amostras foram detectadas a presença comum de taninos condensados (derivados de catequina) nas formas de dímero e trímero entre os extratos dos galhos e cascas de *Copaifera* estudadas. Indicando assim, os taninos condensados como possíveis marcadores das cascas de *Copaifera*.

Nos extratos dos galhos apresentaram tendências divergentes e semelhantes em ambos os solventes extratores. As amostras dos galhos de *C. multijuga* apresentaram composição similar às folhas, tal relação pode estar diretamente relacionada à proximidade entre os órgãos vegetais. Bem como as amostras dos galhos de *C. venezuelana* que apresentaram composição semelhante às cascas.

As sementes e flores de *C. langsdorffii* apresentaram perfis metabólicos diferenciados e distantes da composição dos demais órgãos vegetais. Diversos picos cromatográficos presentes nos órgãos não foram passíveis de identificação por meio dos dados espectrais MS², logo recomendam-se estudos fitoquímicos mais direcionados e o acompanhamento por outras técnicas espectrométricas e espectroscópicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, F.; ANWAR, F.; HIRA, S. Review on medicinal importance of fabaceae family. *Pharmacologyonline*, v. 3, p. 151–156, 2016.
- ALBIERO, L. R.; NERY, E. F.; DALAZEN, J. C.; KELLY, T. O.; PEREIRA, D. L.; SINHORIN, V. D. G.; KAMENO, R.; CASTOLDI, L. Ethanolic extracts of *Copaifera multijuga* inhibits the subcutaneous growth of Ehrlich carcinoma in Swiss mice. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* v. 11, p. 30-38, 2016.
- ALENCAR, J.C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne-Leguminosae, na Amazônia Central. 2 - Produção de óleo-resina. *Acta Amazônica*. v. 12, n.1, p.75-89, 1982.
- BANERJEE, S. & MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*. v. 2012, p. 1-40, 2012.
- BARBOSA, P. C. S.; MEDEIROS, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, G.; WIEDEMANN, L. S. M.; VEIGA-JÚNIOR, V. F. Influence of Abiotic Factors on the Chemical Composition of Copaiba Oil (*Copaifera multijuga* Hayne): Soil Composition, Seasonality and Diameter at Breast Height. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. 10, p. 1823-1833, 2012.
- BARBOSA, P. C. S.; WIEDEMANN, L. S. M.; MEDEIROS, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, G.; VEIGA-JÚNIOR, V. F. Phytochemical Fingerprints of Copaiba Oils (*Copaifera multijuga* Hayne) Determined by Multivariate Analysis. *Chemistry & Biodiversity*, v. 10, p. 1350-1361, 2013.
- BATISTA, Â. G.; FERRARI, A. S.; CUNHA, D. C.; SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; CORREA, L. C.; PRADO, M. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; ESTEVES, E. A.; JÚNIOR, M. R. M. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chemistry*. v. 197, p. 1153-1159, 2016.
- BOLLINGER, J. G.; ROHAN, G.; SADILEK, M.; GELB, M. H. LC/ESI-MS/MS detection of FAs by charge reversal derivatization with more than four orders of magnitude improvement in sensitivity. *Journal of Lipid Research*, v. 54, n. 12, p. 3523–3530, 2013.

- Brum, H. D.; Camargo, J. L. C; Ferraz, I. D. K. 2009. Copaíba-roxa, *Copaifera mutlijuga* Hayne in: I. D. K. Ferraz & J. L. C. Camargo (Eds) Manual de Sementes da Amazônia. Fascículo 9, 12p. INPA, Manaus/AM, Brasil.
- CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L. DA; CRUZ, P. L. R. SOUZA, A. R. DE; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Quimica Nova*, v. 41, p. 75-91, 2018.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies Florestas Brasileiras: recomendações, silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo-PR: EMBRAPA/ CNPF, 2003.
- CARVALHO, P. E. R. Pau-Óleo. Colombo-PR: EMBRAPA/ CNPF, 2006.
- CASOTI, R. Estudos metabolômicos do gênero *Baccharis* (Asteraceae), avaliação do potencial anti-inflamatório in vitro e suas correlações através de métodos in silico. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2017.
- CASTALDO, L.; GRAZIANI, G.; GASPARI, A.; IZZO, L.; TOLOSA, J.; RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y.; RITIENI, A. Target Analysis and Retrospective Screening of Multiple Mycotoxins in Pet Food Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Toxins*, v. 11, n. 8, p. 434, 2019.
- CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Research International*, v. 44, n. 8, p. 2442–2451, 2011.
- CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Functional Foods*, v. 3, n. 3, p. 144–158, 2011.
- CHRISRTENHUSZ, M. J. M.; JAMES, W. B. The Number of known Plants Species in the Word and its Annual Increase. *Phytotaxa*, v. 261, n. 3, p. 201–217, 2016.
- CIEŚLA, Ł. Biological Fingerprinting of Herbal Samples by Means of Liquid Chromatography. *Chromatography Research International*, v. 2012, 2012.
- CORREIA, H.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A.; AMARAL, M. T.; SANTOS-BUELGA, C.; BATISTA, M. T. Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices. *Biomedical Chromatography*, v. 20, n. 1, p. 88–94, 2006.

COSTA, A. R. M.; FREITAS, L. A. P.; MENDIOLA, J.; IBÁÑEZ, E. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and in vitro assays, *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 86, p. 86-96, 2015.

COSTA, J. A. S. Estudos Taxonômicos, Biosistemáticos e Filogenéticos em *Copaifera L.* (Leguminosae-Detarieae) com Ênfase nas Espécies do Brasil Extra-Amazônico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS. Feira de Santana, Bahia, 2007.

COSTA, J.A.S (2017). *Copaifera* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/>>. Acesso em: 02 Set. 2019

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”: Processus químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

CUNHA, A. P. S.; BALDISSERA, L.; PEREIRA, D. L.; ALBIERO, L. R.; CASTOLDI, L.; SINHORIN, A. P.; SINHORIN, V. D. G. Avaliação do potencial antioxidante de *Copaifera multijuga* em camundongos com tumor de Ehrlich, *Acta Amazonica*, v. 48, p. 347-353, 2018.

DETTENBORN, G. R. Investigação de Isoflavonas em Espécies de Leguminosas Nativas do Sul do Brasil, com ênfase em *Trifolium riograndense* Burkart. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

ELIUK, S.; MAKAROV, A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annual Review of Analytical Chemistry*, v. 8, n. 1, p. 61–80, 2015.

FARAG, M. A.; EL-AHMADY, S. H.; ELIAN, F. S.; WESSJOHANN, L. A. Metabolomics driven analysis of artichoke leaf and its commercial products via UHPLC-q-TOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry*, v. 95, p. 177–187, 2013.

FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural*, p. 294-297, 2006.

FERNANDES, J. M.; GARCIA, F. C. P.; AMOROZO, M. C. M.; SIQUEIRA, L. C.; MAROTTA, C. P. B.; CARDOSO, I. M. Etnobotânica de Leguminosae entre agricultores

agroecológicos na Floresta Atlântica, Araponga, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, v. 65, n. 2, p. 539-554, 2014.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria 1: calibração multivariada, um tutorial. *Quimica Nova*, v.22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FERRER-PARIS, J. R.; STACHOWICZ, I.; MORÁN, L.; GANZÁLEZ, L.; SÁNCHEZ-MERCADO, A. Y.; LOZANO, C.; SOTO, J.; CARDOZO-URDANETA, A.; VARGAS, T. Caracterización ambiental del Ecoparque “Ojo de Agua El Cardón ”, municipio Miranda , estado Zulia, (January), Figshare, 2015.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *International Journal of Genomics*, v. 2, n. 3, p. 155-168, 2001.

FURTADO, R. A.; BERNADES, C. T. V.; SILVA, M. N.; ZOCCAL, K.F.; FACCIOLI, L. H.; BASTOS, J. K. Antiedematogenic Evaluation of *Copaifera langsdorffii* Leaves Hydroethanolic Extract and Its Major Compounds, *BioMed Research International*, v. 2015, 2015.

FURTADO, R. A.; OLIVEIRA, P. F. de; SENEDESE, J. M.; OZELIN, S. D.; SOUZA, L. D. R. de; LEANDRO, L. F.; OLIVEIRA, W. L. de; SILVA, J. M. da; OLIVEIRA, L. C.; ROGEZ, H.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, C. S.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Assessment of toxicogenetic activity of oleoresins and leaves extracts of six *Copaifera* species for prediction of potential human risks, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 221, p. 119-125, 2018.

GEORGIEV V.; ANANGA A.; TSOLOVA V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals, *Nutrients*, v. 6, p. 391-415, 2014.

GIKA, H.; VIRGILIOU, C.; THEODORIDIS, G.; ROBERT, S.; WILSON, I. D. Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping (metabonomics/metabolomics): The state of the art PT CR. *Journal of Chromatography B*. 2019.

GOMES, R. F. Avaliação dos constituintes químicos em resíduos madeireiros de *Inga alba* Willd. E *Inga paraensis* Ducke. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus/ AM, 2015.

GRAHAM, P.H.; VANCE, C.P. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, v. 131, n. 3, p. 872-877, 2003.

- GROSS, J. H. Mass Spectrometry: a textbook. Berlin: Springer, 2004.
- GRUZ, J.; NOVÁK, O.; STRNAD, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. Food Chemistry, v. 111, n. 3, p. 789–794, 2008.
- HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. New Phytologist, v. 169, p. 453-468, 2006.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.
- HECK, M. C.; VIANA, L. Á.; VICENTINI, V. E. P.; Importância do óleo de *Copaifera* sp. (Copaíba). Rev. Saúde e Biol. v.7, n. 1, p. 82, 2012.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, The Journal of nutritional biochemistry, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.
- HERAS, R. M. LAS, QUIFER-RADA, P., ANDRÉS, A., & LAMUELA-RAVENTÓS, R. Polyphenolic profile of persimmon leaves by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). Journal of Functional Foods, v. 23, p. 370–377, 2016.
- HUANG, Q.; CHEN, H.; LUO, X.; ZHANG, Y.; YAO, X.; ZHENG, X. Structure and Anti-HIV Activity of Betulinic Acid Analogues. Current medical Science, v. 38, n. 3, p. 11–12, 2018.
- HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. Alimentos e Nutrição, v.19, n. 1, p. 97-108, 2008.
- IGNOATO, M. C. Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Aeschynomene fluminensis* e de *Machaerium hirtum* (Fabaceae) de Porto Rico – Paraná. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/ Paraná, 2012.
- JAGANATH, I. B.; MULLEN, W.; LEAN, M. E. J.; EDWARDS, C. A.; CROZIER, A. In vitro catabolism of rutin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. Free Radical Biology and Medicine, v. 47, n. 8, p. 1180–1189, 2009.

- JIANG, Y.; DAVID, B.; TU, P.; BARBIN, Y. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines: a review. *Analytica chimica acta*, v. 657, n. 1, p. 9-18, 2010.
- JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 374, n. 2065, p. 1-16, 2016.
- JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; OLIVEIRA, M. C. de; BOLZANI, V. D. S.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. *Revista USP*, n. 89, p. 114-133, 2011.
- JUSTESEN, U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 36, n. 2, p. 169–178, 2001.
- KANG, J.; PRICE, W. E.; ASHTON, J.; TAPSELL, L. C.; JOHNSON, S. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of *Sorghum wholegrains* by LC-ESI-MSn. *Food Chemistry*, v. 211, p. 215–226, 2016.
- KARAGÖZ, A. Ç.; LEIDENBERGER, M.; HAHN, F.; HAMPEL, F.; FRIEDRICH, O.; MARSCHALL, M.; TSOGOEVA, S. B. Synthesis of new betulinic acid/betulin-derived dimers and hybrids with potent antimalarial and antiviral activities. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 27, n. 1, p. 110-115, 2018.
- KEČKEŠ, S.; GAŠIĆ, U.; VELIČKOVIĆ, T. Ć.; MILOJKOVIĆ-OPSENICA, D.; NATIĆ, M.; TEŠIĆ, Ž. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 138, n. 1, p. 32–40, 2013.
- KELEBEK, H. LC-DAD – ESI-MS / MS characterization of phenolic constituents in *Turkish black tea*: Effect of infusion time and temperature. *Food Chemistry*, v. 204, p. 227–238, 2016.
- KUMAR, M. R.; PRABHAKAR, S.; KUMAR, M. K.; REDDY, T. J.; VAIRAMANI, M. Negative ion electrospray ionization mass spectral study of dicarboxylic acids in the presence of halide ions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 18, n.10, p. 1109–1115, 2004.

- LANGNHEIM, J. H.; CONVIS, C. L.; MACEDO, C. A.; STUBBLEBINE W. H., *Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in south-eastern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 14, p. 41-49, 1986.
- LEANDRO, L. F.; MORAES, T. da S.; OLIVEIRA, P. F. de; ALVES, J. M.; SENEDESE, J. M.; GRANDIS, R. A. D.; VARANDA, E. A.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. G. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and mutagenic potential of the phenolic-rich hydroalcoholic extract from *Copaifera trapezifolia* Hayne leaves. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, p. 937-950, 2016.
- LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. de S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A. da; VEIGA-JÚNIOR, V. F. da. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. *Molecules*, v. 17, p. 3866-3889, 2012.
- LEMONS, M.; SANTIN, J. R.; MIZUNO, C. S.; BOCING, T.; SOUSA, J. P. B.; NANAAKKARA, D.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, n. 3, p. 238-245, 2015.
- LEWIS, G.; SCHRINE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew, p.577, 2005.
- LI, C.; SEERAM, N. P. Ultra-fast liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid phenolic profiling of red maple (*Acer rubrum*) leaves. *Journal of Separation Science*, v. 41, n.11, p. 2331–2346, 2018.
- LIMA, N. M.; SANTOS, V. N. C.; LA PORTA, F. A. Quimiodiversidade, Bioatividade e Quimiosistemática do Gênero *Inga* (FABACEAE): Uma Breve Revisão. *Revista Virtual de Química*, v. 10, p. 459-473, 2018.
- MACEDO, C.A.; LANGENHEIM, J.H. A further investigation of leaf sesquiterpene variation in relation to herbivory in 2 Brazilian populations of *Copaifera langsdorffii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 17, p. 207-216, 1989.
- MALDANER, L., JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.
- MCLEISH, K. R.; MERCHANT, M. L.; KLEIN, J. B.; WARD, R. A. Technical note: proteomic approaches to fundamental questions about neutrophil biology. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 94, p. 683-693, 2013.

MOTTA, E. V. DA S. Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas de *Copaifera langsdorffii*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2014.

MOTTA^a, E. V.S.; LEMOS, M.; COSTA, J. C.; BANDERO-FILHO, V. C.; SASSE, A.; SHERIDAN H.; BASTOS, J. K. Galloylquinic acid derivatives from *Copaifera langsdorffii* leaves display gastroprotective activity. *Chemico-biological interactions*, v.261, p.145-155, 2017.

MOTTA^b, E. V. da S.; COSTA, J. de C. da; BASTOS, J. K. A validated HPLC-UV method for the analysis of galloylquinic acid derivatives and flavonoids in *Copaifera langsdorffii* leaves. *Journal of Chromatography B*, v. 1061, p. 240-247, 2017.

NETO, J. M. M., MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química Nova*, v.21, p. 467-469, 1998.

NETO, J. S. L.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. *Química Nova*, v. 31, p. 1078-1080, 2008.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: Metabonomics. *Nature*, v. 455, n. 7216, p.1054, 2008.

NIVELDT, R. J.; NOOD, E. V.; HOORN, D. V.; BOELEN, P. G.; NORREN, K. V.; LEEUWEN, P. V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal Clinical of Nutrition*, v. 74, p. 418-425, 2001.

NOGUEIRA, M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K. Flavonoids and Methoxy-galloylquinic Acid Derivatives from the Leaf Extract of *Copaifera langsdorffii* Desf. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 63, n. 31, p. 6939-6945, 2015.

NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L.(artichoke) cultivated in Brazil. *Química Nova*, v. 26, n.3, p. 331-334, 2003.

OLIVEIRA, R.B.; COELHO, E.B.; RODRIGUES, M.R.; COSTA-MACHADO, A.R.M.; SOUSA, J.P.B.; BERRETTA, A.A.; BASTOS, J.K. Effect of the *Copaifera langsdorffii* Desf. leaf extract on the ethylene glycol-induced nephrolithiasis in rats. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* v. 2013, 2013.

OLIVEIRA, T. T. D.; GOMES, S. M.; NAGEM, T. J.; COSTA, N. M. B.; SECOM, P. R. Efeito de diferentes doses de flavonoides em ratos hiperlipidêmicos. *Revista de Nutrição*, v. 15, p.45, 2002.

PEREIRA, D. L.; CUNHA, A. P. S.; CARDOSO, C. R. P.; ROCHA, C. Q.; VILEGAS, W.; SINHORIN, A. P.; SINHORIN, V. D. G. Antioxidant and hepatoprotective effects of ethanolic and ethyl acetate stem bark extracts of *Copaifera multijuga* (Fabaceae) in mice. *Acta Amazonica*, v. 48, p. 347-357, 2018.

REZENDE, F. M. de; ROSADO, D.; MOREIRA, F. A.; de CARVALHO, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. *Laboratório de Ensino de Botânica*, p. 93, 2016.

RIJKE, E. de; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C., BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, v. 1112, n.1-2, p. 31–63, 2006.

ROMBOUTS, C.; de SPIEGELEER, M.; VAN MEULEBROEK, L.; de VOS, W. H.; VANHAECKE, L. Validated comprehensive metabolomics and lipidomics analysis of colon tissue and cell lines. *Analytica Chimica Acta*, v. 1066, p. 79–92, 2019.

ROSS, A. R. S.; AMBROSE, S. J.; CUTLER, A. J.; FEURTADO, J. A.; KERMODE, A. R.; NELSON, K.; ABRAMS, S. R. Determination of endogenous and supplied deuterated abscisic acid in plant tissues by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Analytical Biochemistry*, v. 329, n. 2, p. 324–333, 2004.

RUBERT-NASON, K. F.; LINDROTH, R. L. Analysis of condensed tannins in *Populus* spp. using reversed phase UPLC-PDA(-)-ESI-MS following thiolytic depolymerisation. *Phytochemical Analysis*, v. 30, n. 3, p. 257–267, 2019.

SANTOS, S. A. O.; PINTO, P. C. R. O.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products*, v. 31, n. 3, p. 521–526, 2010.

SANTOS-SÁNCHEZ, Norma francenia et al. Via do ácido shiquímico na biossíntese de compostos fenólicos. In: *Aspectos Fisiológicos das Plantas dos Compostos Fenólicos*. IntechOpen, 2019.

- SHARMA, R.; IYER, J. P.; CHAKRABORTI, A. K.; BANERJEE, U. C. Determination of gibberellins in fermentation broth produced by *Fusarium verticillioides* MTCC 156 by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 39, n. 1, p. 83-88, 2004.
- SHASHANK, K.; ABHAY, K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview, *The Scientific World Journal*, v. 4, p.32, 2013.
- SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.; ARAÚJO, D. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SOUSA^a, J. P. B.; NANAYAKKARA, D.; SILVA, A. A. B.; BASTOS, J. K. Leishmanicidal and antimalarial activities of crude extracts from aerial parts of *Copaifera langsdorffii* and isolation of secondary metabolites. *Journal of Pharmacy Research*, v. 8, p. 4103-4107, 2012.
- SOUSA^b, J.P.B.; BRANCALIO, A.P.S.; JÚNIOR, M.G.; BASTOS, J.K., A validated chromatographic method for the determination of flavonoids in *Copaifera langsdorffii* by HPLC, *Natural Product Communications*, v. 7, p. 25, 2012.
- SOUZA, L. M. de; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A.; SASSAKI, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 47, n. 1, p. 59-67, 2008.
- SOUZA, L. A. G. de. Guia da biodiversidade de Fabaceae do Alto Rio Negro. Manaus: FINEP, p.118, 2012.
- STEWART, I. I. Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 54, n. 12, p. 1649-1695, 1999.
- TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line LC/UV/MS analysis of flavonols in the three apple varieties most widely cultivated in Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n.1, p. 100-105, 2007.
- TRINDADE, R. da; SILVA, J. K. da; SETZER, W. N. *Copaifera* of the neotropics: A review of the phytochemistry and pharmacology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 5, p. 1511, 2018.

- VÁSQUEZ, S. P. F.; MEDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.
- VEIGA JÚNIOR, V. F.; ANDRADE JÚNIOR M. A.; FERRAZ, I. D. K.; CHRISTO, H. B.; PINTO A. C. Constituents from *Copaifera officinalis* L. seeds. *Acta amazônica*, v. 37, p. 123-126, 2007.
- VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. *Química Nova*, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.
- VEIGA JÚNIOR^a, V. F.; PINTO, A. C. Constituintes químicos das cascas de *Copaifera langsdorffii* Desf. *Revista Fitos*, v. 2, p. 59, 2006.
- VEIGA JÚNIOR^b, V.F.; PINTO, A.C.; DE LIMA, H.C. The essential oil composition of *Copaifera trapezifolia* Hayne leaves. *Journal of Essential Oil Research*, v. 18, n. 4, p. 430-431, 2006.
- VEITCH, N. C. Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural product reports*, v. 30, p. 988-1027, 2013.
- VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 36, p. 58-69, 2006.
- WOLFENDER, J. L. MS-based plant metabolomic approaches for biomarker Discovery, *Natural product communications*, v. 4, n. 10, p. 1417, 2009.
- XI, J. Ultrahigh pressure extraction of bioactive compounds from plants: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 57, n. 6, p. 1097–1106, 2017.
- XU, M.; EIRIKSSON, F. F.; OLAFSDOTTIR, E. S.; HEIDMARSSON, S.; THORSTEINSDOTTIR, M.; OMARSDOTTIR, S. Abordagem metabolômica multidimensional usando espectrometria de massa de alta resolução e mobilidade UPLC-ion para a caracterização de metabólitos secundários de líquen: uma aplicação à quimiosistemática. *Planta Medica*, v. 82, n. 1, p. 45, 2016.
- YIN, D. D.; YUAN, R. Y.; WU, Q.; LI, S. S.; SHAO, S.; XU, Y. J.; WANG, L. S. Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, v. 187, p. 20-28, 2015.

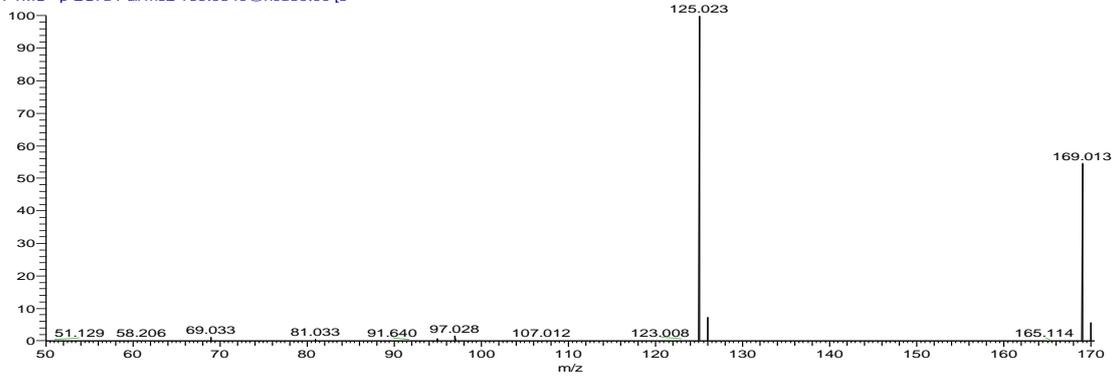
ZHANG, D.; XU, H.; WANG, L.; LI, Y.; SUN, P.; WU, X.; YE, W. Betulinic Acid and its Derivatives as Potential Antitumor Agents, V. 35, n. 6, p. 1127–1155, 2015.

8. ANEXOS

Seção 5.1 Perfis de fragmentação dos metabólitos detectados nos extratos dos órgãos vegetais
(Espectros MS² dos padrões de referência)

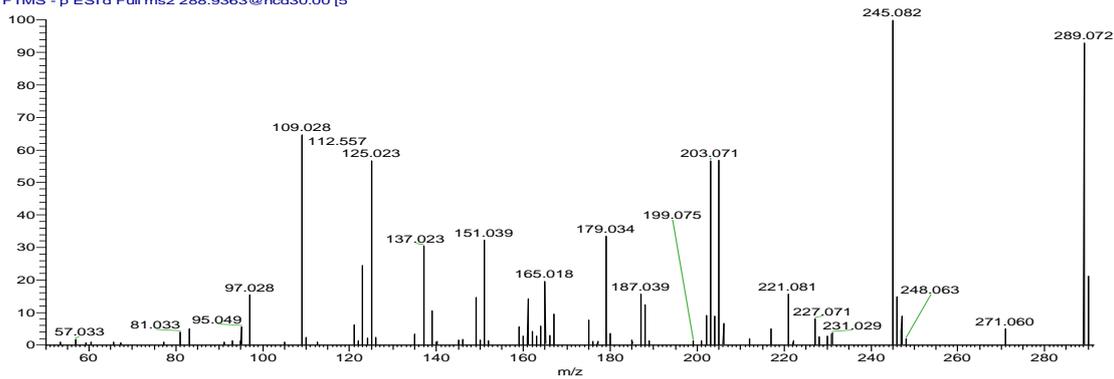
Anexo 1. Espectro MS² do ácido gálico.

Acido gálico #306 RT: 0.93 AV: 1 NL: 6.01E8
T: FTMS - p ESI d Full ms2 169.0340@hcd30.00 [5]



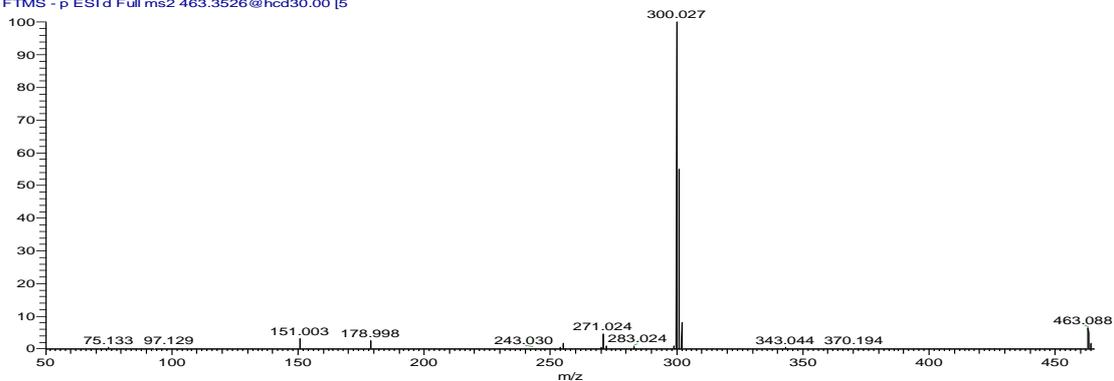
Anexo 2. Espectro MS² da epicatequina.

epicatequina #939 RT: 3.61 AV: 1 NL: 3.65E8
T: FTMS - p ESI d Full ms2 288.9363@hcd30.00 [5]



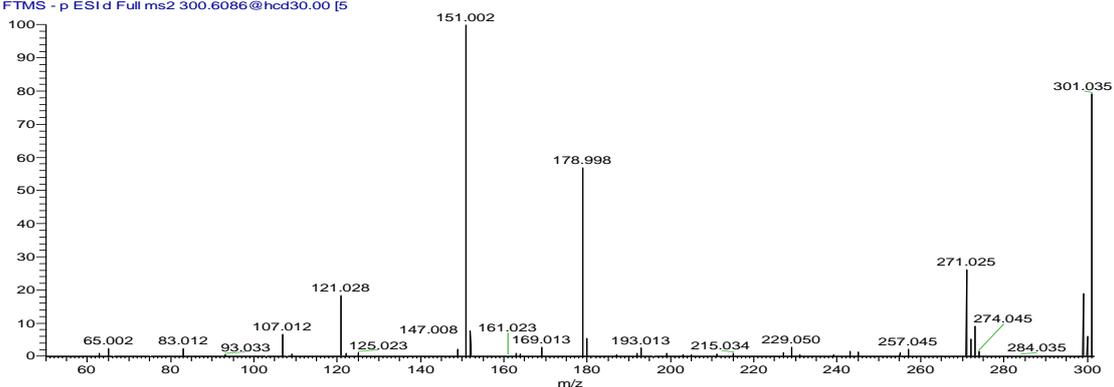
Anexo 3. Espectro MS² quercetina-3-O-glucosídeo.

quercetina-3-o-glucosídeo #1372 RT: 5.24 AV: 1 NL: 2.64E9
T: FTMS - p ESI d Full ms2 463.3526@hcd30.00 [5]



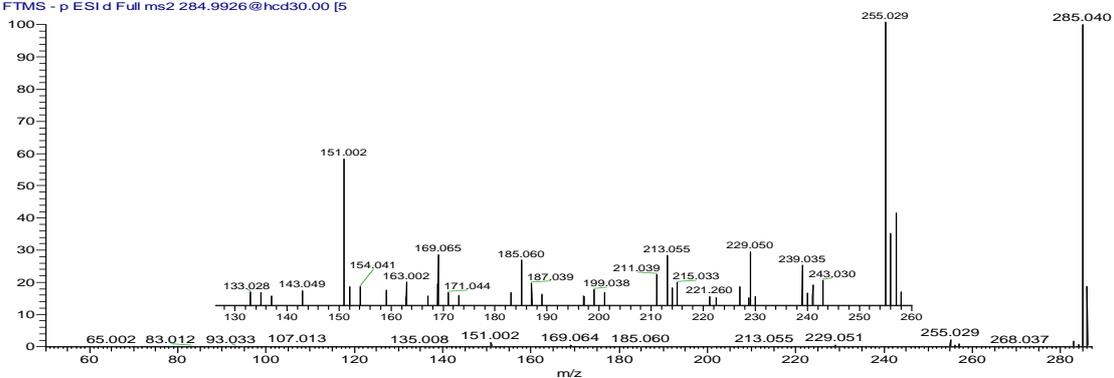
Anexo 4. Espectro MS² quercetina.

quercetina #1697 RT: 6.05 AV: 1 NL: 2.05E9
T: FTMS - p ESI d Full ms2 300.6086@hcd30.00 [5]



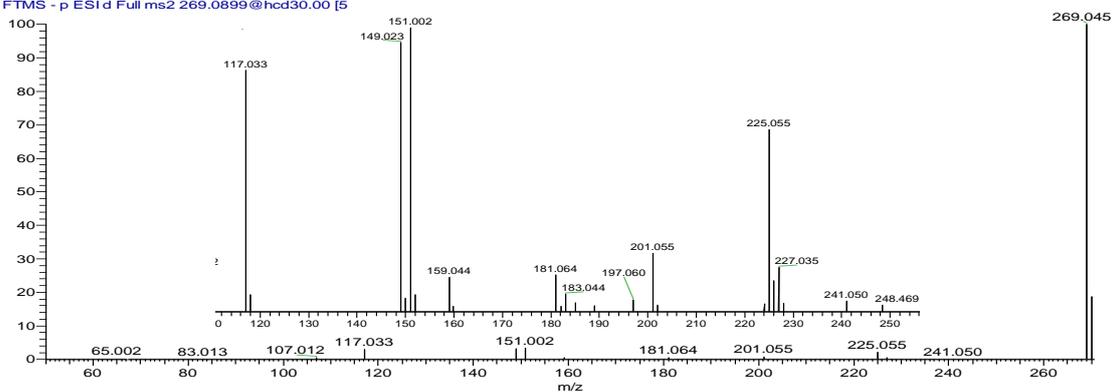
Anexo 5. Espectro MS² canferol.

canferol #1842 RT: 6.47 AV: 1 NL: 1.03E10
T: FTMS - p ESI d Full ms2 284.9926@hcd30.00 [5]



Anexo 6. Espectro MS² apigenina.

apigenina #1770 RT: 6.56 AV: 1 NL: 7.98E9
T: FTMS - p ESI d Full ms2 269.0899@hcd30.00 [5]



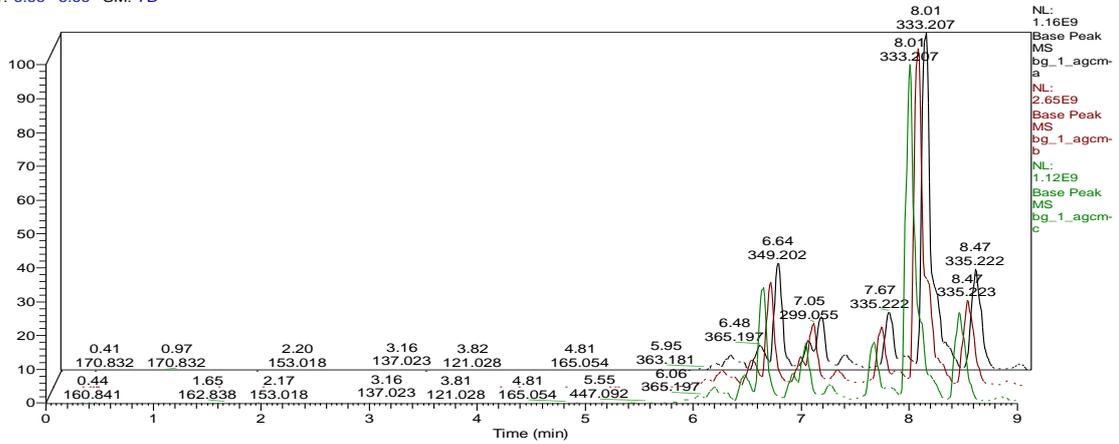
Seção 5.2 Perfil cromatográfico UHPLC-Q-Orbitrap-MS

Cromatogramas obtidos em análises em triplicata por UHPLC-Q-Orbitrap-MS

(Amostras obtidas em AcOEt)

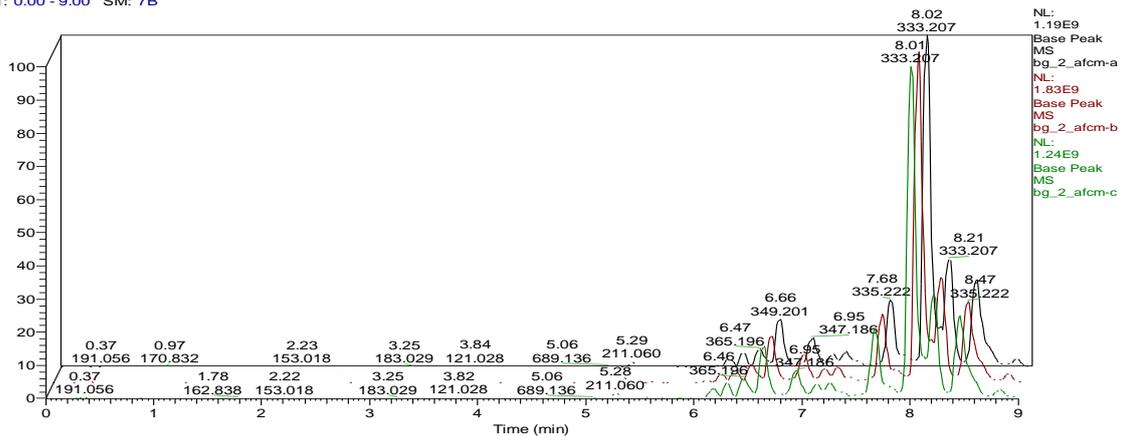
Anexo 7. 1-AGCM (a, b e c)-Extrato dos Galhos de *C. multijuga*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7B



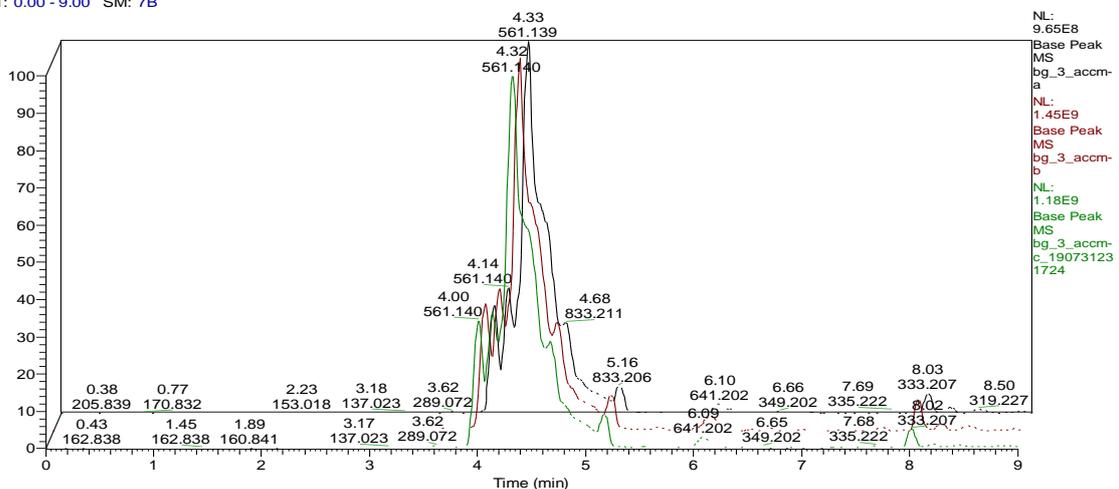
Anexo 8. 2-AFCM (a, b e c)-Extrato dos Folhas de *C. multijuga*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7B



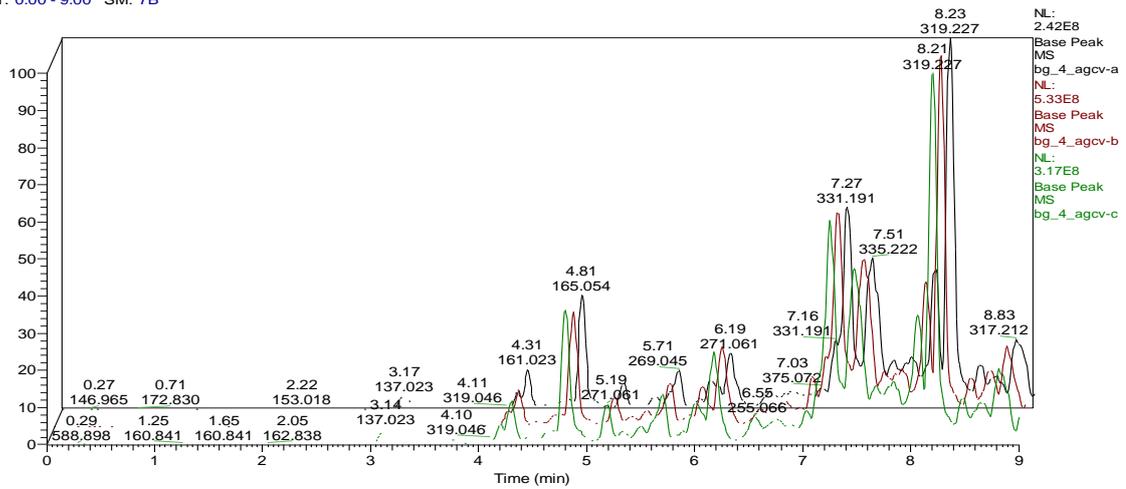
Anexo 9. 3-ACCM (a, b e c)-Extrato dos Cascas de *C. multijuga*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7B



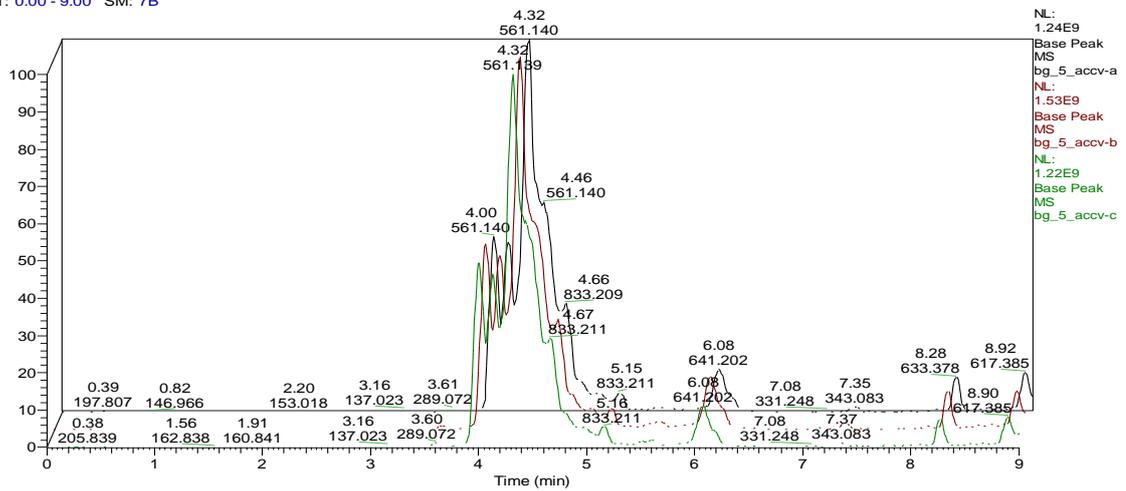
Anexo 10. 4-AGCV (a, b e c)-Extrato dos Galhos de *C. venezuelana*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7B



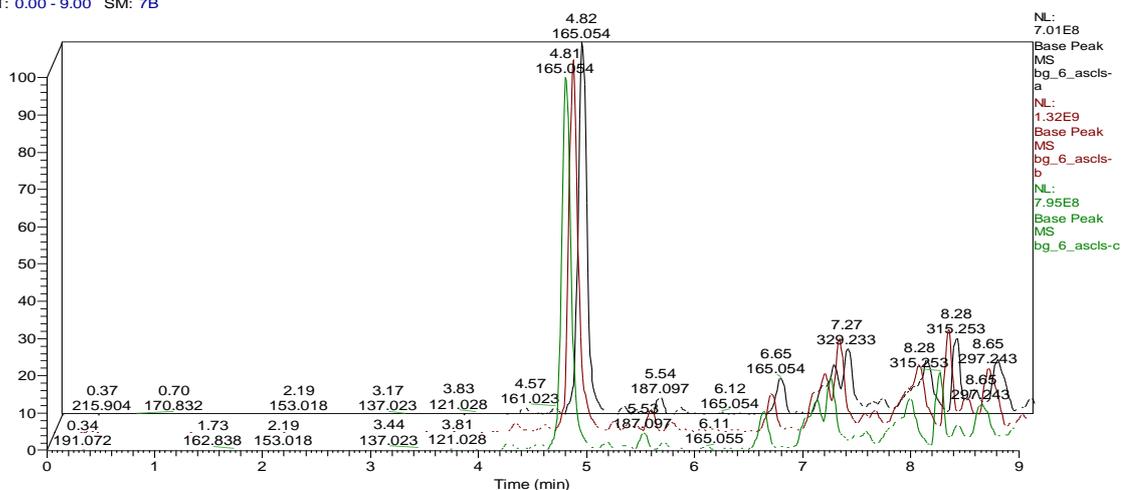
Anexo 11. 5-ACCV (a, b e c)-Extrato dos Cascas de *C. venezuelana*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7B



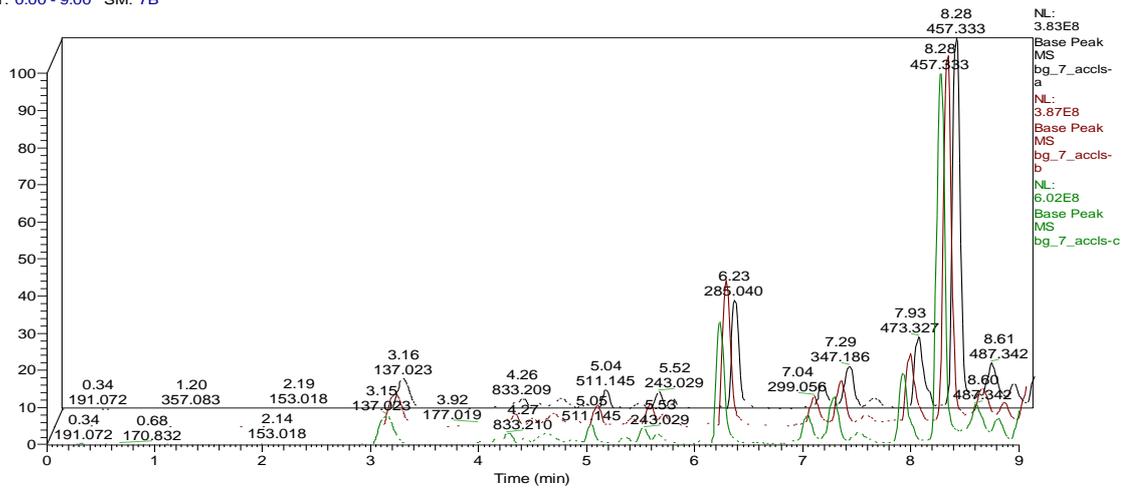
Anexo 12. 6-ASCLS (a, b e c)-Extrato dos Sementes de *C. langsdorffii*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7B



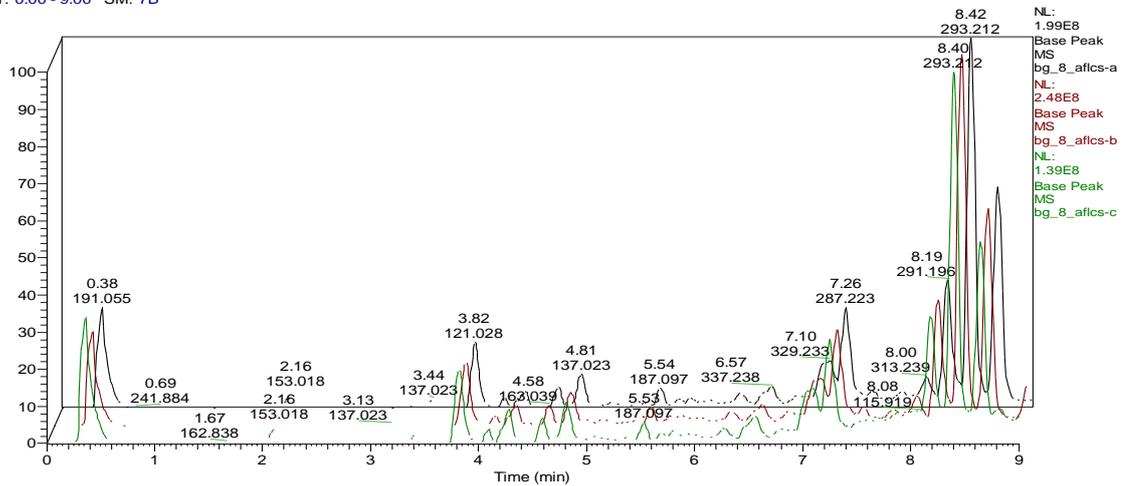
Anexo 13. 7-ACCLS (a, b e c)-Extrato dos Cascas de *C. langsdorffii*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7B



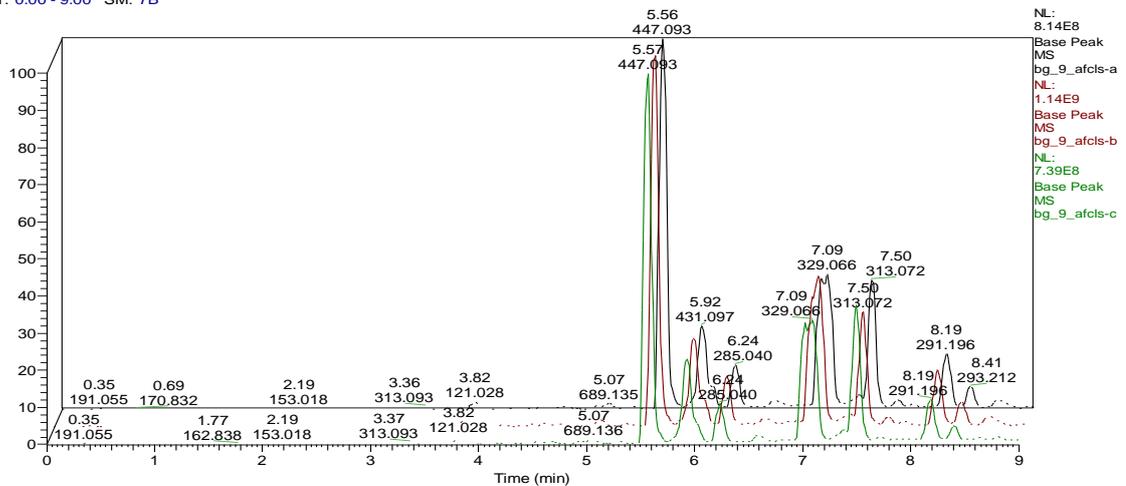
Anexo 14. 8-AFCLS (a, b e c)-Extrato dos Flores de *C. langsdorffii*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7B



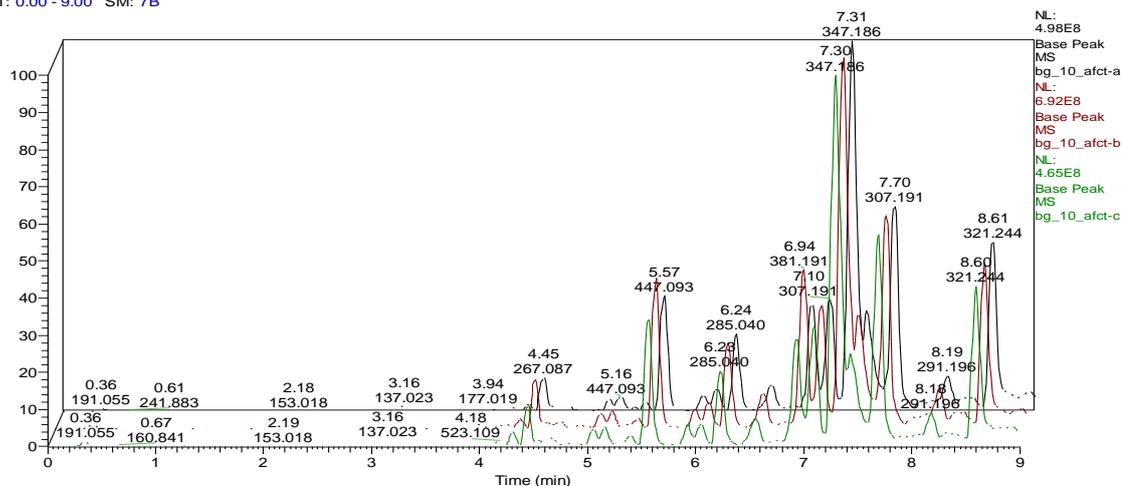
Anexo 15. 9-AFCLS (a, b e c)-Extrato dos Folhas de *C. langsdorffii*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7B



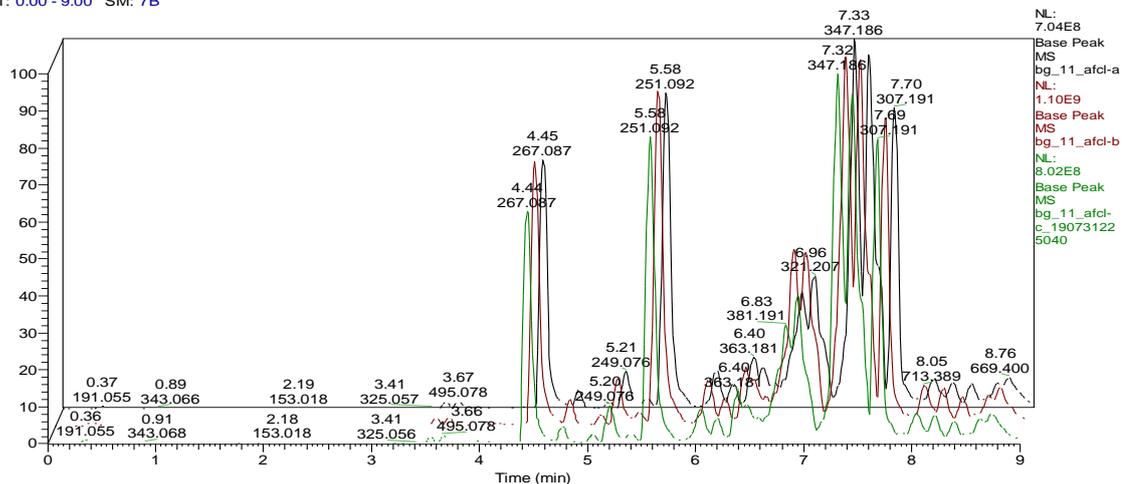
Anexo 16. 10-AFCT (a, b e c)-Extrato das Folhas de *C. trapezifolia*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7B



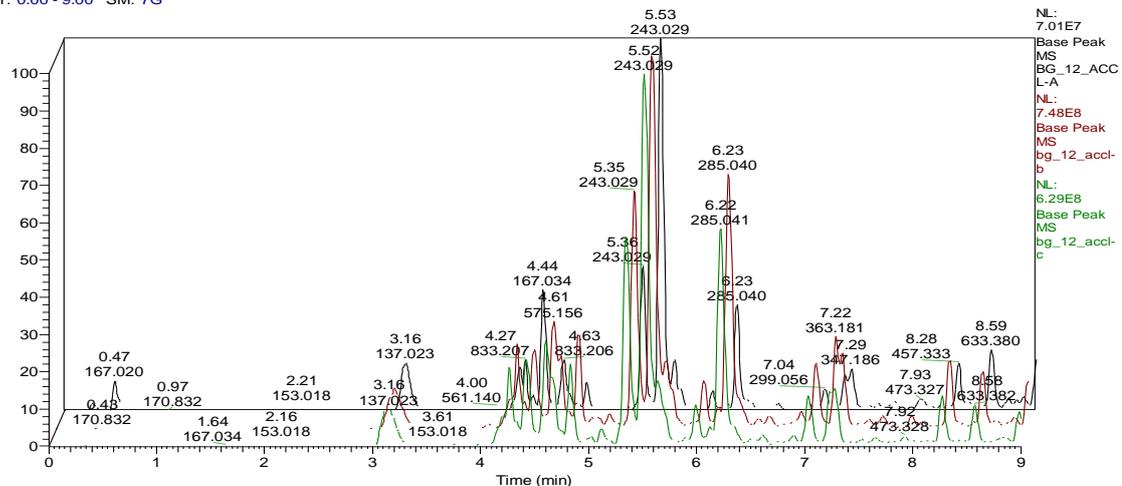
Anexo 17. 11- AFCL (a, b e c)-Extrato dos Folhas de *C. lucens*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7B



Anexo 18. 12- ACCL (a, b e c)-Extrato dos Cascas de *C. lucens*.

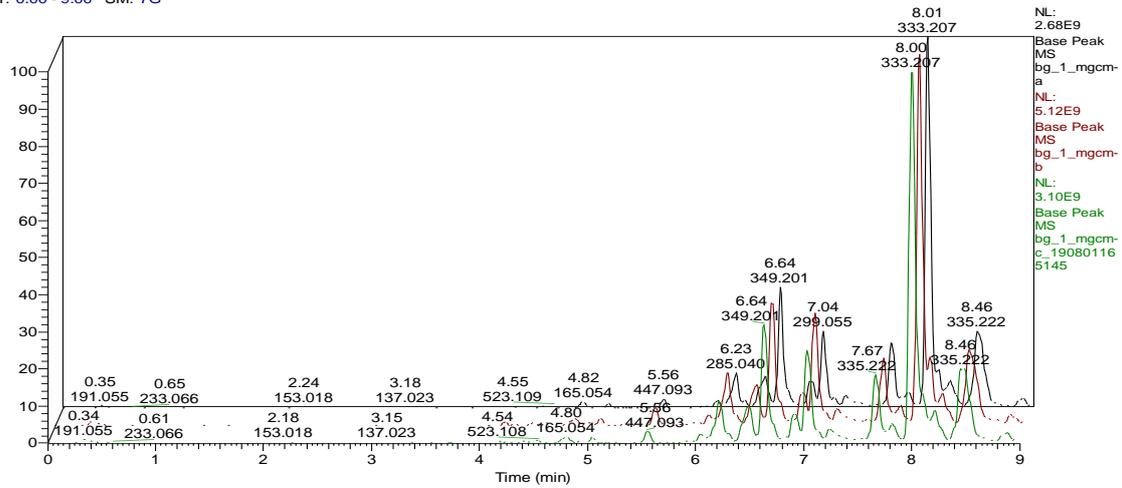
RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



(Amostras obtidas em MeOH)

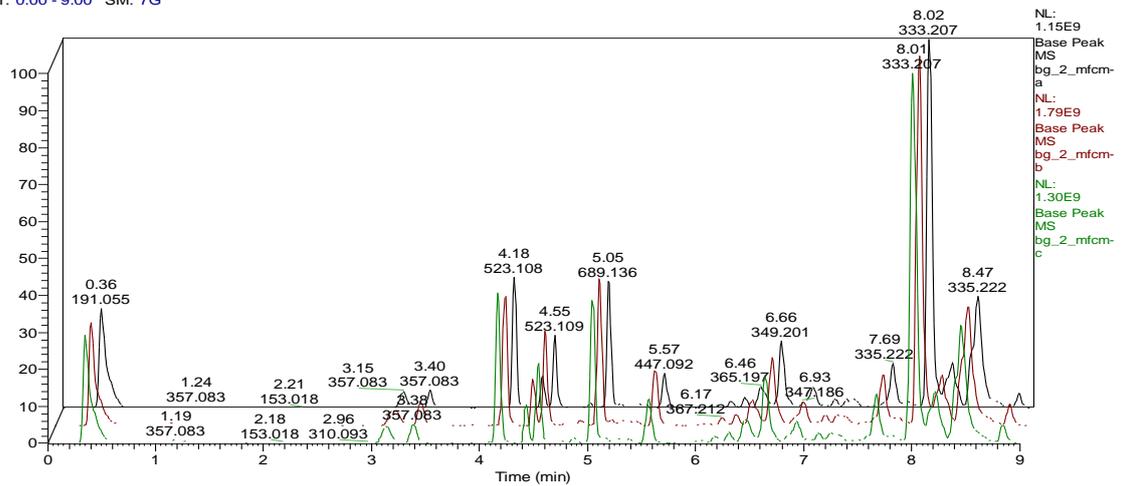
Anexo 19. 1-MGCM (a, b e c)-Extrato dos Galhos s de *C. multijuga*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



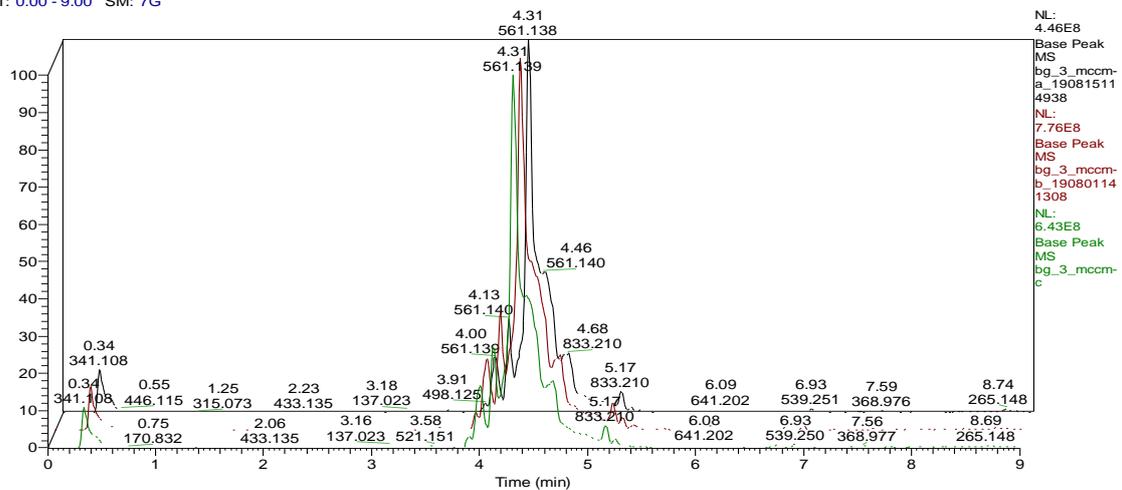
Anexo 20. 2-MFCM (a, b e c)-Extrato das Folhas de *C. multijuga*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



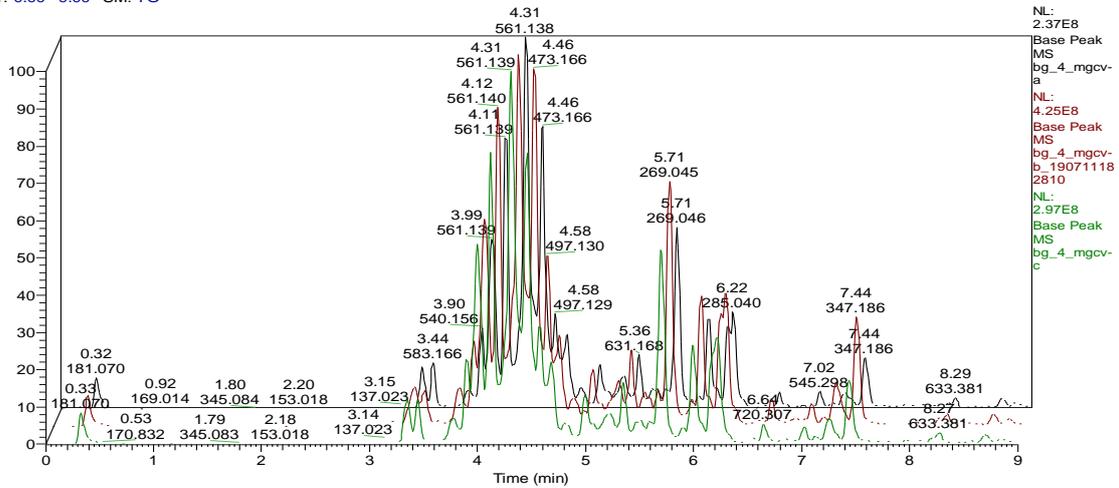
Anexo 21. 3-MCCM (a, b e c)-Extrato das Cascas de *C. multijuga*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



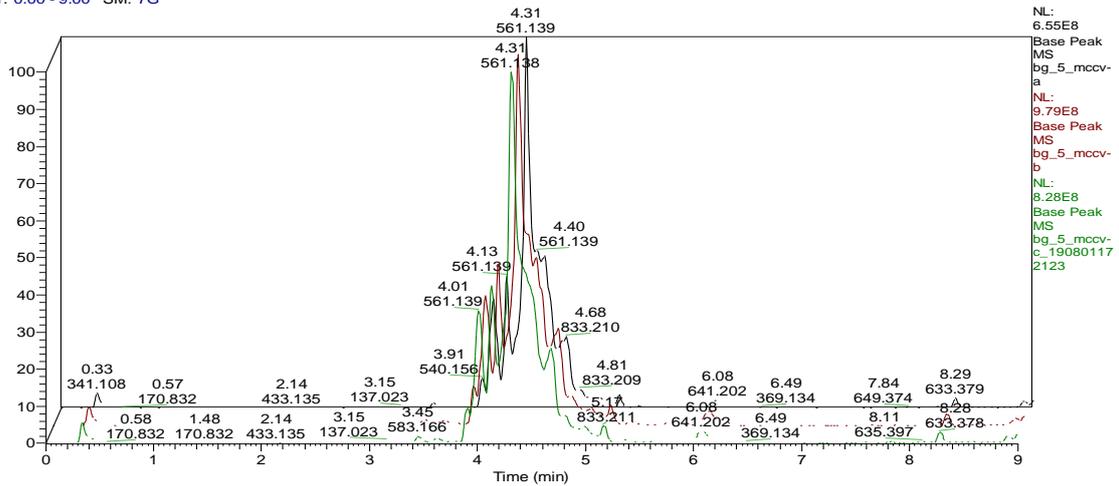
Anexo 22. 4-MGCV (a, b e c)-Extrato das Galhos de *C. venezuelana*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



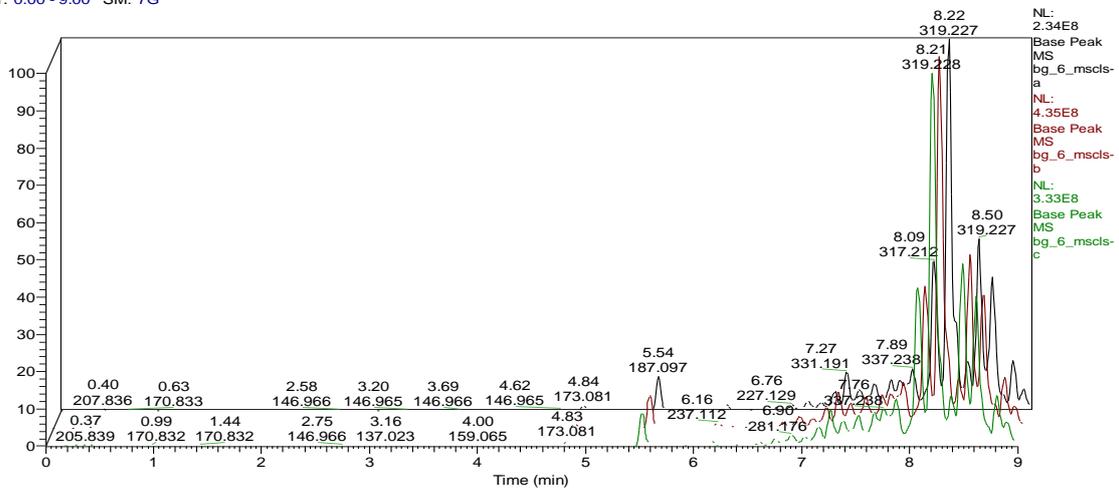
Anexo 23. 5-MCCV (a, b e c)-Extrato das Cascas de *C. venezuelana*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



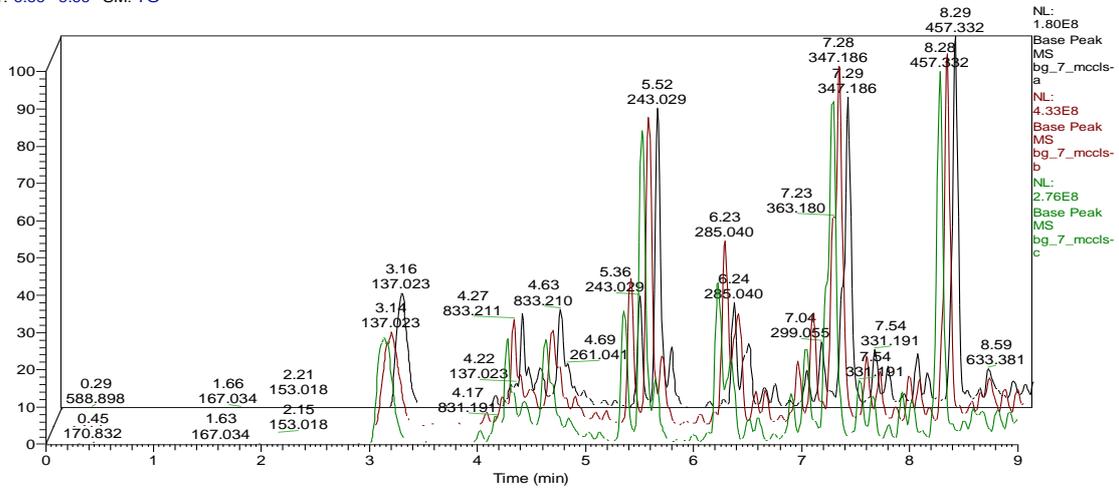
Anexo 24. 6-MSCLS (a, b e c)-Extrato das Sementes de *C. langsdorffii*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



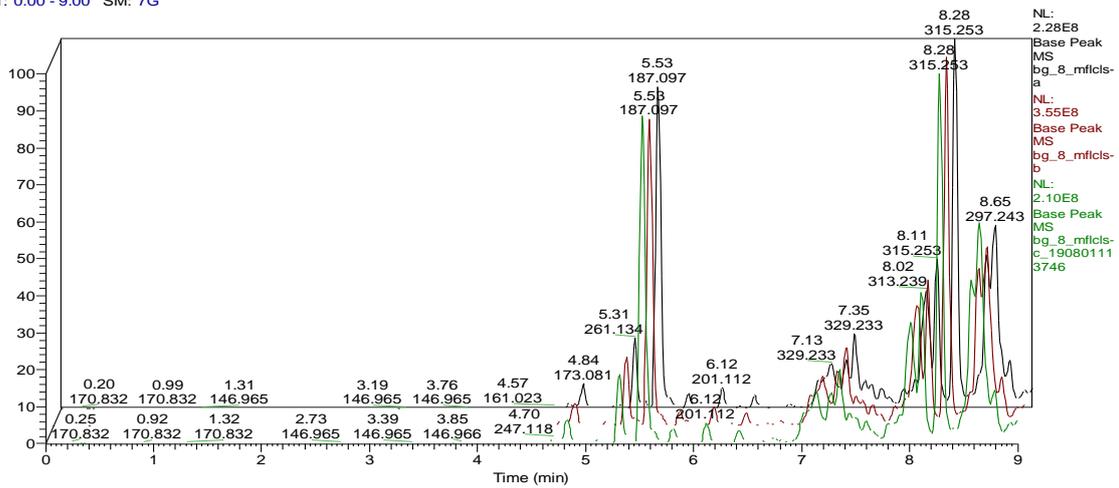
Anexo 25. 7-MCCLS (a, b e c)-Extrato das Cascas de *C. langsdorffii*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



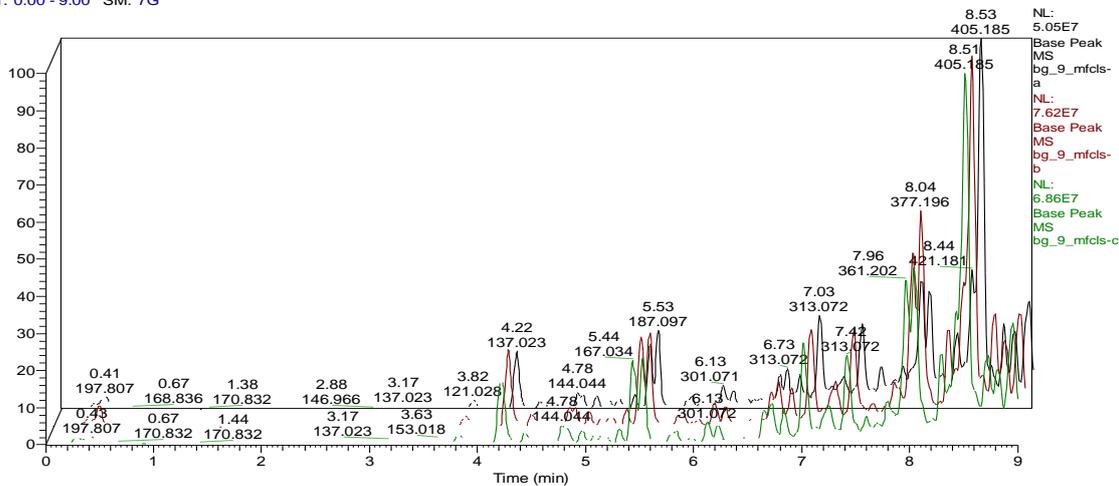
Anexo 26. 8-MFICLS (a, b e c)-Extrato das Flores de *C. langsdorffii*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



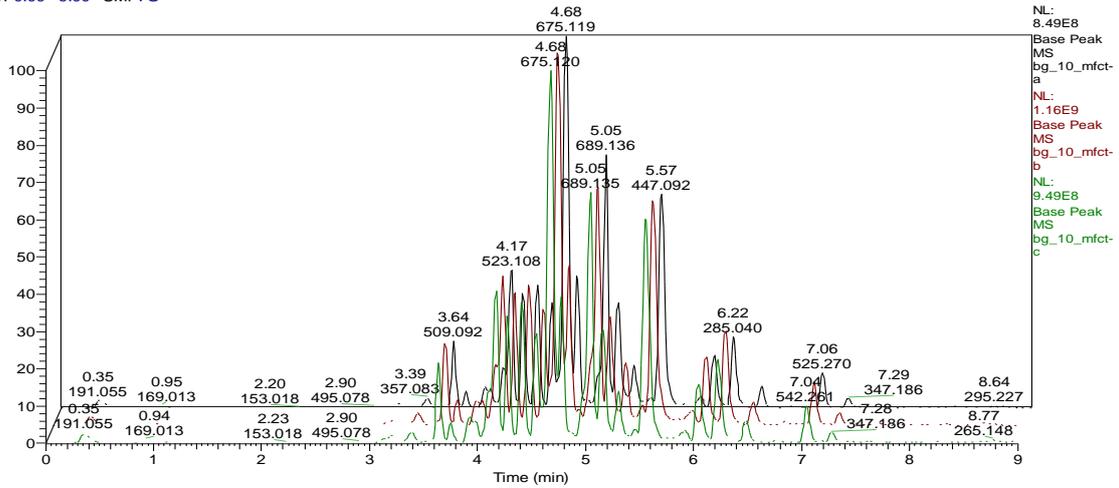
Anexo 27. 9-MFCLS (a, b e c)-Extrato das Folhas de *C. langsdorffii*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



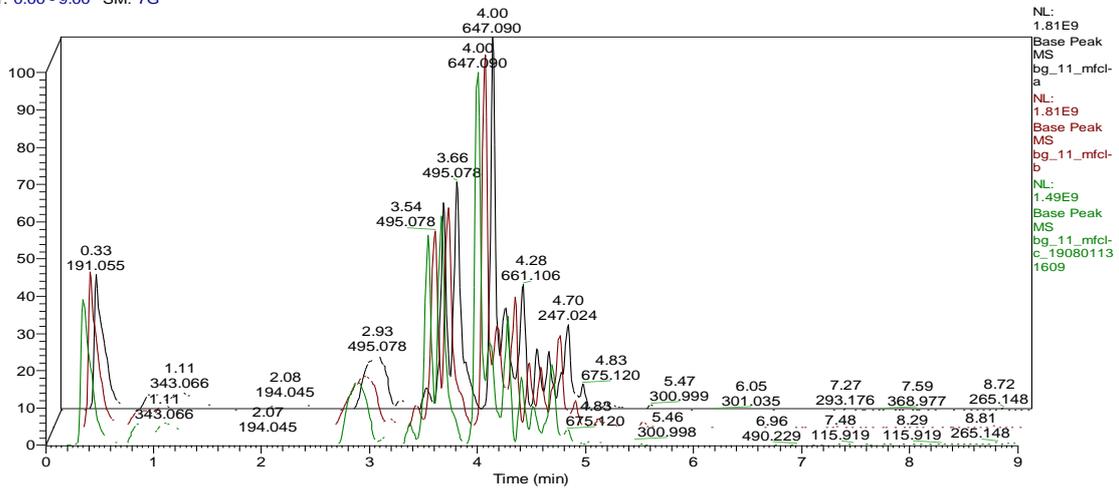
Anexo 28. 10-MFCT (a, b e c)-Extrato das Folhas de *C. trapezifolia*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



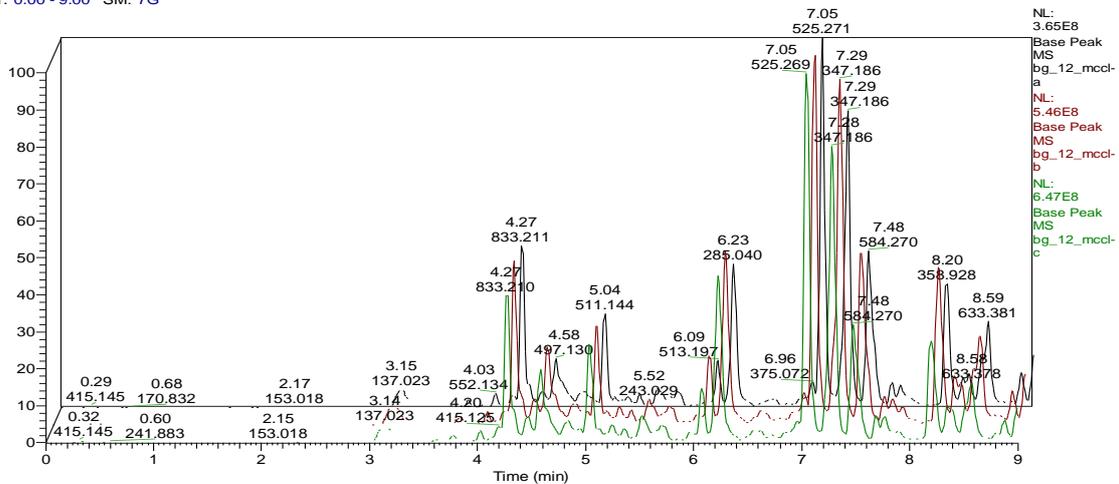
Anexo 29. 11-MFCL (a, b e c)-Extrato das Folhas de *C. lucens*.

RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



Anexo 30. 12-MCCL (a, b e c)-Extrato das Cascas de *C. lucens*.

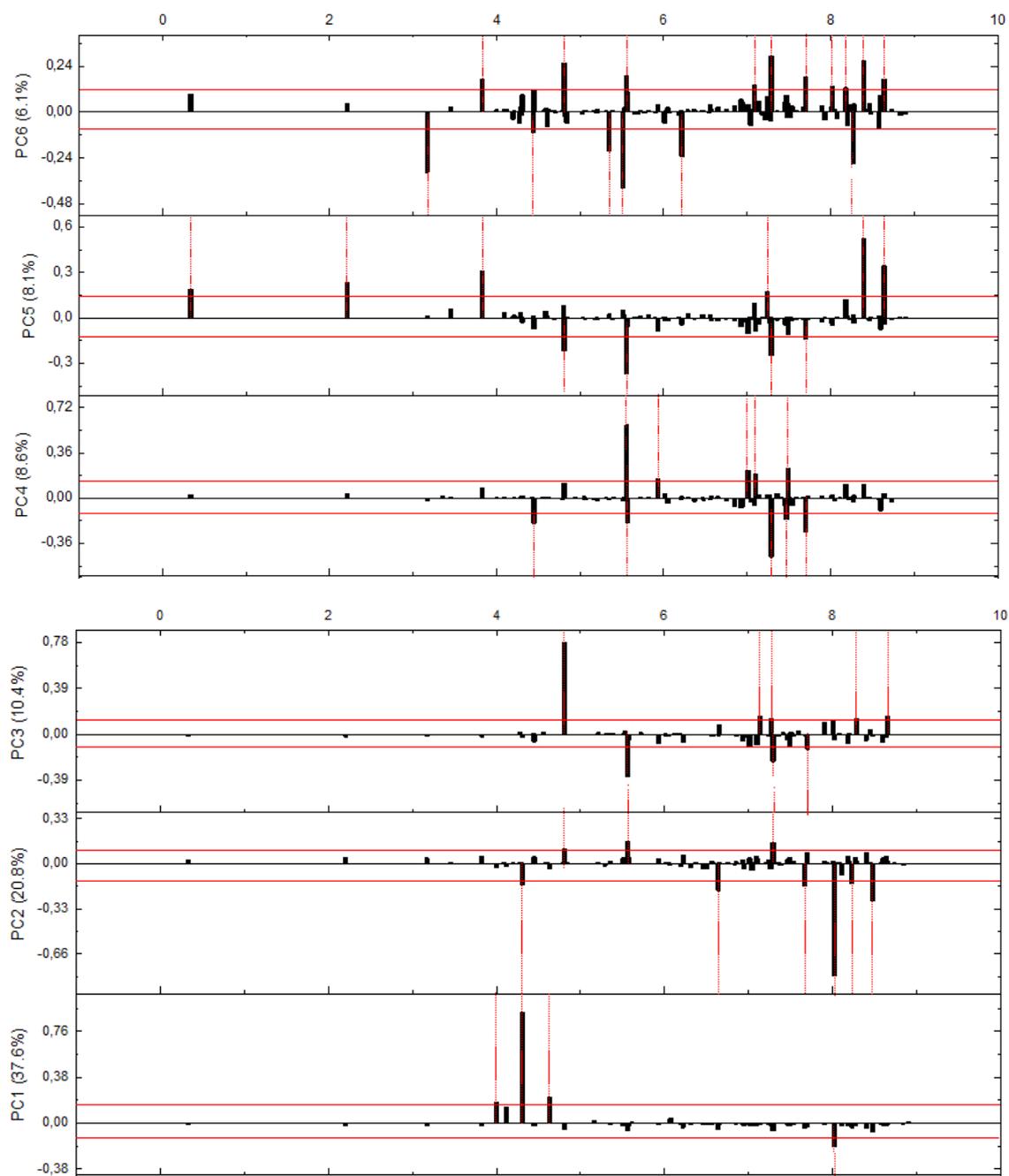
RT: 0.00 - 9.00 SM: 7G



Seção 5.3 Metabolômica Global do Gênero *Copaifera*

Gráficos de *Loadings* dos dados cromatográficos obtidos através das análises das amostras em AcOEt e amostras em MeOH.

Anexo 31. Gráficos de *loadings* das seis componentes principais abordadas na interpretação dos dados cromatográficos derivados das amostras em AcOEt.



Anexo 32. Gráficos de *loadings* das seis componentes principais abordadas na interpretação dos dados cromatográficos derivados das amostras em MeOH.

