



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)  
INSTITUTO DE QUÍMICA (IQ)  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (PPGQ)

VINÍCIUS GALVÃO WAKUI

**Estudo fitoquímico de *Lomatozona artemisiifolia* Baker (Asteraceae), uma espécie endêmica do Cerrado, através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e quimiometria**

GOIÂNIA  
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

[ ] Dissertação      [ X ] Tese

#### 2. Nome completo do autor

Vinícius Galvão Wakui

#### 3. Título do trabalho

Estudo fitoquímico de *Lomatozona artemisiifolia* Baker (Asteraceae), uma espécie endêmica do Cerrado, através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e quimiometria

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [ X ] SIM      [ ] NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Lucilia Kato, Professor do**



**Magistério Superior**, em 14/12/2021, às 19:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **VINÍCIUS GALVÃO WAKUI, Discente**, em 20/12/2021, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2574836** e o código CRC **68131598**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.045715/2021-04

SEI nº 2574836

VINÍCIUS GALVÃO WAKUI

**Estudo fitoquímico de *Lomatozona artemisiifolia* Baker (Asteraceae), uma espécie endêmica do Cerrado, através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e quimiometria**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Goiás (UFG) como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química

Orientadora: Professora Doutora Lucilia Kato

GOIÂNIA  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Wakui, Vinícius Galvão

Estudo fitoquímico de *Lomatozona artemisiifolia* Baker (Asteraceae), uma espécie endêmica do Cerrado, através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e quimiometria [manuscrito] / Vinícius Galvão Wakui. - 2021.

x, 273 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lucilia Kato.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Lomatozona artemisiifolia. 2. flavonas polimetoxiladas. 3. diterpenos labdanos. 4. molecular networking. 5. Global Natural Products Social Molecular Networking. I. Kato, Lucilia, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

## ATA DE DEFESA DE TESE

Ata nº **129-A** da sessão da Defesa de Doutorado de **Vinícius Galvão Wakui**, que confere o título de **Doutor em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **6 (seis) dias do mês de outubro de 2021 (dois mil e vinte e um)**, a partir das **14h00m, via videoconferência**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Doutorado intitulada "**Estudo fitoquímico de *Lomatozona artemisiifolia* Baker (Asteraceae), uma espécie endêmica do Cerrado, através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e quimiometria**". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucília Kato (UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Luiz Henrique Keng Queiroz Júnior (UFG)**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecilia Maria Alves de Oliveira (UFG)**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glaucia Braz Alcantara (UFMS)** e **Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago (UNIFESP)**. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Doutorado, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucília Kato, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 6 (seis) dias do mês de outubro de 2021 (dois mil e vinte e um).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Lucilia Kato, Professor do Magistério Superior**, em 14/12/2021, às 19:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Glaucia Braz Alcantara, Usuário Externo**, em 20/12/2021, às 10:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Henrique Keng Queiroz Junior, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2021, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joao Henrique Ghilardi Lago, Usuário Externo**, em 21/12/2021, às 10:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **CECILIA MARIA ALVES DE OLIVEIRA, Usuário Externo**, em 07/01/2022, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2574829** e o código CRC **609889BD**.

---

Referência: Processo nº 23070.045715/2021-04

SEI nº 2574829

Aos meus pais Jorge e Maria Imaculada, a quem sempre serei grato pela  
minha educação e companhia

## Agradecimentos

Agradeço à Deus pelo dom da vida e por me dar forças para sempre seguir em frente. E à minha família e amigos por sempre torcerem por mim.

Agradeço a professora Lucilia Kato, pela orientação neste projeto e contribuir para minha formação como pesquisador na área de produtos naturais. Serei sempre grato pelo aprendizado ao seu lado.

Às professoras Cecília Maria de Oliveira e Vanessa Giselle Paqualotto Severino por também contribuírem para minha formação com seu exemplo e conselhos.

Aos meus companheiros Marcos, Eurídes, Gustavo, Jorge, Márcia, Gerso, Diego Armando, Diego Melo, Gabriela, Ana Paula Terezan e todos os integrantes do Laboratório de Produtos Naturais pela companhia, momentos de descontração e amizade.

A Marlene e a Livia pela ajuda e participação neste projeto.

Aos alunos de iniciação científica Amanda, Bruna, Ana Géssika e Lorrant, pela participação e ajuda neste e em outros projetos.

Ao professor Sérgio Tadeu Sibov pela parceria no projeto, nas coletas e por fornecer o material vegetal *in vitro*.

Ao professor Luiz Henrique Keng Queiroz Júnior pela colaboração no projeto através das análises de quimiometria.

A Ana Paula pela colaboração nas análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

À professora Mara Rubia pela colaboração nos ensaios nematocidas. Agradeço ao Heriksen por me acompanhar nos experimentos e aos alunos do Laboratório de Nematologia pelo acolhimento.

Aos meus colegas de trabalho do Instituto de Ciências Biológicas, pelo apoio durante este curso.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa, no início do doutorado. Por fim agradeço ao Instituto de Química e à Universidade Federal de Goiás pela minha formação e por possibilitar a realização do doutorado.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	vii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	2
1.2 O Cerrado e suas espécies .....	4
1.3 Revisão bibliográfica de <i>Lomatozona artemisiifolia</i> Baker (Asteraceae).....	6
1.4 Produtos naturais encontrados em espécies da tribo Eupatorieae .....	9
1.5 Análises por redes moleculares no <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i> .....	11
1.6 Uso de extratos vegetais no controle de fitonematoides .....	15
2. OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivos específicos .....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
3.1 Equipamento e solventes.....	20
3.2 Procedimentos cromatográficos .....	20
3.3 Análises de ressonância magnética nuclear .....	20
3.4 Análises de espectrometria de massas de alta resolução por ionização <i>eletrospray</i> .....	21
3.5 Análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas .....	21
3.6 Análises dos extratos de <i>L. artemisiifolia</i> por CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares ...	22
3.6.1 Pré-processamento dos dados de CLAE-IES-EM/EM no <i>software</i> MZmine 2 .....	22
3.6.2 Análises do <i>Network Annotated Propagation</i> (NAP) .....	23
3.7 Coleta do material vegetal .....	24
3.8 Preparação dos extratos.....	24
3.8.1 Isolamento de diterpenos labdanos .....	26
3.8.2 Isolamento de flavonas polimetoxiladas .....	27
3.9 Atividade nematicida dos extratos de <i>L. artemisiifolia</i> .....	28
3.10 Análise quimiométrica dos dados de CLAE-IES-EM.....	30

3.11 Análise estatística do ensaio nematocida.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
4.1.1 – Acetato labdan-8-ol-15-il (1) .....	34
4.1.2 – Labdan-8,15-diol (2) .....	40
4.1.3 – Ácido 8-hidroxilabdan-15-óico (3).....	46
4.1.4 – 4',5-dihidroxi-3,3',6,7-tetrametoxiflavona (crisopenetina) (4).....	49
4.1.5 – 4'-5-dihidroxi-3,3',7-trimetoxiflavona (paquipodol) (5) .....	54
4.1.6 – Quercetagetina-3,5,6,3',4'-pentametil éter (6).....	57
4.1.7 – 5,6,3'-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (oxianina B) (7) .....	63
5. Análises dos extratos de <i>L. artemisiifolia</i> através de CLAE-IES-EM/EM .....	66
6. Identificação de metabólitos secundários de <i>L. artemisiifolia</i> através de análises por redes moleculares e espectrometria de massas .....	88
6.1 Análise por redes moleculares no modo <i>feature-based molecular networking</i> .....	92
7. Análise quimiométrica dos dados de CLAE-IES-EM .....	117
8. Comparação entre as espécies de <i>L. artemisiifolia</i> nativas do Cerrado e <i>in vitro</i> .....	122
9. Avaliação dos extratos de <i>L. artemisiifolia</i> na atividade nematocida <i>in vitro</i> de <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	128
10. CONCLUSÃO .....	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	135
APÊNDICES.....	150
Apêndice A – Espectros de IES-EM e RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, NOE 1D, HSQC e HMBC dos compostos isolados.....	151
Apêndice B – Espectros de fragmentação EM/EM dos compostos e classes anotadas através das análises de CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares .....	189
Apêndice C – Dados da análise de quimiometria.....	228
Apêndice D – Manuscrito do artigo.....	230

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>L. artemisiifolia</i> Baker no Parque Estadual da Serra Dourada e sua classificação taxonômica (SiBBR, 2021). Fonte: autoria própria.....	7
Figura 2. Metabólitos secundários identificados em espécies da tribo Eupatorieae presentes no Parque Estadual da Serra Dourada. ....	10
Figura 3. Esquema simplificado mostrando como ocorre a análise por redes moleculares usando o GNPS (Wang et al, 2016). Fonte: autoria própria, criada no aplicativo BioRender. ....	12
Figura 4. Esquema de preparação dos extratos a partir das partes aéreas de <i>L. artemisiifolia</i> das estações seco e chuvoso. ....	25
Figura 5. Esquema de isolamento dos compostos 15-acetil-8-hidroxi-labdanol (1) e 8,15-labdanodiol (2) a partir do extrato AcOEt 1. ....	26
Figura 6. Esquema de isolamento do ácido 8-hidroxi-15-labdanóico (3) a partir do extrato hexânico. ....	27
Figura 7. Esquema de isolamento dos compostos 4 – 7 a partir do extrato AcOEt 1. ....	27
Figura 8. Etapas realizadas no ensaio nematocida: I – Cultivo do inóculo de <i>P. brachyurus</i> em soja; II – Extração dos nematoides das raízes pelo método de Cooler & D’Herde (1972); III – Contagem dos nematoides utilizando câmara de Peters e microscópio; IV – Soluções dos extratos de <i>L. artemisiifolia</i> ; V – Aplicação das soluções em tubos de ensaio contendo <i>P. brachyurus</i> (100 juvenis.mL <sup>-1</sup> ) e VI – Contagem dos nematoides usando-se solução de KMnO <sub>4</sub> (0,5%) para identificação dos nematoides mortos (Jatala, 1975). Fonte: autoria própria .....	29
Figura 9. CCD dos compostos isolados de <i>L. artemisiifolia</i> no sistema eluente CHCl <sub>3</sub> /MeOH (96:4), destacados em amarelo: a) Compostos 2, 1 e 3 revelados com anisaldeído; b) Compostos 4, 5, 6 e 7 na luz UV em 254 nm.....	32
Figura 10. Estrutura química dos compostos isolados das partes aéreas de <i>L. artemisiifolia</i> ..	33
Figura 11. Espectro de IES-EM do composto 1.....	35
Figura 12. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto 1 com expansão das regiões entre 4,20 - 4,00 ppm e 2,10 - 0,70 ppm. ....	36
Figura 13. Experimento de HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) do composto 1 com expansão de 10,0 – 70,0 ppm em F1 e 0,70 – 1,90 ppm em F2. ....	37
Figura 14. Correlações observadas no experimento de HMBC do composto 1.....	38
Figura 15. Espectro de IES-EM do composto 2.....	41
Figura 16. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto 2 com expansão das regiões entre 3,75 - 3,60 ppm e 2,00 - 0,70 ppm. ....	42
Figura 17. Experimento de HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) do composto 2 com expansão da região de 10,0 – 70,0 ppm em F1 e 0,60 – 2,00 ppm em F2.....	43
Figura 18. Correlações observadas no experimento de HMBC do composto 2.....	44
Figura 19. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto 3 com expansão das regiões entre 2,40-2,10 ppm e 2,00-0,70 ppm. ....	47
Figura 20. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do composto 5, com expansões das regiões entre a) 13-12 ppm, b) 7,75- 7,60 ppm, c) 7,0-6,0 ppm e d) 4,00-3,85 ppm. ....	50

Figura 21. Experimento de HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>5</b> com expansão da região de 80,0 – 180,0 ppm em F1 e 4,00 – 8,00 ppm em F2.....	51
Figura 22. Estrutura química da crisopenetina isolada de <i>L. artemisiifolia</i> , com as principais correlações observadas no experimento de HMBC.....	52
Figura 23. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do composto <b>5</b> , com expansões das regiões entre a) 14-12 ppm, b) 8,0-6,0 ppm e c) 4,0-3,0 ppm. ....	55
Figura 24. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do composto <b>6</b> , com expansões das regiões em a) 7,75-7,60 ppm e b) 7,00-6,00 e c) 4,0-3,8 ppm. ....	58
Figura 25. Espectro de NOE 1D (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do composto <b>6</b> , irradiado em δ <sub>H</sub> 7,72 ppm. ....	59
Figura 26. Espectro de NOE 1D (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do composto <b>6</b> , irradiado em δ <sub>H</sub> 7,63 ppm. ....	60
Figura 27. Espectro de NOE 1D (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do composto <b>6</b> , irradiado em δ <sub>H</sub> 7,04 ppm. ....	61
Figura 28. Correlações observadas no experimento de NOE 1D para confirmação dos grupos metoxilas em C-3 e C-4'. ....	62
Figura 29. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>7</b> com expansões das regiões entre a) 14,0-12,0 ppm, b) 7,80-6,50 ppm e c) 4,00-3,80 ppm. ....	64
Figura 30. Cromatograma de íons extraídos no modo negativo de ionização, do extrato EA1 (estação seca, chuvosa e planta <i>in vitro</i> ). Legendas de cores: verde (estação seca), vermelho (estação chuvosa) e azul (planta <i>in vitro</i> ). Os cromatogramas foram processados no software MZmine 2.....	67
Figura 31. Cromatogramas de íons extraídos no modo negativo de ionização, do extrato EA2 (estação seca, chuvosa e planta <i>in vitro</i> ). Legendas de cores: verde (estação seca), vermelho (estação chuvosa) e azul (planta <i>in vitro</i> ). Os cromatogramas foram processados no software MZmine 2.....	68
Figura 32. Cromatogramas de íons extraídos no modo negativo de ionização, dos extratos EE (estação seca, chuvosa e planta <i>in vitro</i> ). Legendas de cores: verde (estação seca), vermelho (estação chuvosa) e azul (planta <i>in vitro</i> ). Os cromatogramas foram processados no software MZmine 2.....	69
Figura 33. Cromatogramas de íons extraídos no modo positivo de ionização, dos extratos EA1 (planta <i>in vitro</i> ; cor azul) e EE (estação chuvosa; cor vermelha). Os cromatogramas foram processados no software MZmine 2. ....	70
Figura 34. Espectro de massas da oxianina B, destacando a presença de íons produtos formados pelas perdas do radical metila.....	71
Figura 35. Cromatogramas e espectros de massas (EM/EM) dos isômeros dos íons precursores (a) <i>m/z</i> 343,0825 (Tr. 8,48,10,73, 11,86, 12,53, 13,08 e 15,93 min) e (b) <i>m/z</i> 359,0776 (Tr. 8,67, 10,29 e 11,70 min). ....	73
Figura 36. Cromatogramas e espectros de massas (EM/EM) dos isômeros dos íons precursores (a) <i>m/z</i> 373,0932 (Tr. 8,56, 10,86 e 12,37 min) e (b) <i>m/z</i> 387,1091 (Tr. 10,02, e 10,89 min). ...	74
Figura 37. Rota de biossíntese das subclasses de flavonoides. (Retirado de Jiang et al 2016 e Dewick, 2009, com modificações).....	75

Figura 38. Comparação do extrato acetato 2 da estação chuvosa (EA2) com os padrões (a) naringenina e (b) luteolina por CLAE-IES-EM/EM. ....	76
Figura 39. Comparação do extrato acetato 2 da estação chuvosa (EA2) com os padrões kaempferol, catequina e epicatequina por CLAE-IES-EM/EM. ....	77
Figura 40. Nomenclatura dos íons de produtos diagnósticos da fragmentação via reação RDA. (Adaptado de Cuykens et al 2004). ....	78
Figura 41. Espectro de massas de alta resolução no modo de íon negativo (35 eV) de (a) naringenina e (b) luteolina, com íons de produtos diagnósticos gerados pela reação RDA. ....	79
Figura 42. Cromatogramas e espectros de massas dos íons atribuídos aos compostos isolados (a) acetato labdan-8-ol-15-il ( <b>1</b> ) ( $m/z$ 335,2821 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> ) e (b) 8,15-labdanodiol ( <b>2</b> ) ( $m/z$ 293,2837 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> ). ....	80
Figura 43. Cromatogramas e espectros de massas do íon precursor atribuído ao composto isolado ácido 8-hidroxi-15-labdanóico ( <b>3</b> ) ( $m/z$ 323,25922 [M-H] <sup>-</sup> ). ....	81
Figura 44. Espectro de fragmentação do íon precursor $m/z$ 323,25922 [M-H] <sup>-</sup> com as fórmulas atribuídas a cada íon fragmento. ....	82
Figura 45. Proposta de fragmentação para o íon precursor $m/z$ 323,25922 [M-H] <sup>-</sup> , com base nos trabalhos de Aguiar et al (2018) e Amaral (2009). ....	83
Figura 46. Espectros de fragmentação EM/EM dos íons precursores $m/z$ 335,29413 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> e $m/z$ 293,28360 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> . ....	85
Figura 47. Proposta de mecanismo de formação dos íons precursores $m/z$ 335,29434 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> e $m/z$ 293,28360 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> com base nos trabalhos de Aguiar et al (2018) e Amaral (2009). ....	86
Figura 48. Espectro de fragmentação EM/EM dos íons precursores a) $m/z$ 359,11237 e b) $m/z$ 357,09827 nos modos positivo e negativo de ionização em 35 eV. ....	89
Figura 49. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor $m/z$ 359,07751 [M-H] <sup>-</sup> no modo negativo de ionização em 70 eV. ....	90
Figura 50. Espectro de fragmentação EM/EM dos íons precursores a) $m/z$ 335,2821 no modo positivo de ionização em 35 eV, b) $m/z$ 323,2595 no modo negativo em 35 eV e c) $m/z$ 323,2593 no modo negativo em 70 eV. ....	91
Figura 51. Rede molecular clássica com os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo negativo. ( <a href="https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=b5db3c1063214e708e4441dcf3eadd7d">https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=b5db3c1063214e708e4441dcf3eadd7d</a> ). ....	92
Figura 52. Rede molecular com os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo negativo através do feature-based molecular networking. ....	94
Figura 53. Rede molecular com os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo positivo através do feature-based molecular network. ....	95
Figura 54. Rede molecular com os dados no modo negativo de ionização, com as subclasses de flavonoides anotadas em <i>L. artemisiifolia</i> . ....	96
Figura 55. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor $m/z$ 313,07172 [M-H] <sup>-</sup> em 16,05 min, mostrando os íon produtos [M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> (-15,0235 Da) e [M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> (-30,0470 Da). ....	98

Figura 56. Expansão da rede molecular no modo positivo, mostrando o cluster em que foram anotados os nós $m/z$ 343,1178, $m/z$ 373,1283 e $m/z$ 403,1388. Ao lado a comparação do espectro de fragmentação da FPM anotada como quercetagetina hexametil éter ( $m/z$ 403,1388) com o espectro de referência da biblioteca do GNPS. Legenda: espectro superior (íon precursor da amostra) e espectro inferior (referência da biblioteca do GNPS). .....	100
Figura 57. Comparação dos espectros de fragmentação das FPMs anotadas como 3,7,3',4',5'-pentametóxilflavona ( $m/z$ 373,1283) e quercetagetina hexametil éter ( $m/z$ 403,1388) com o espectro de referência da biblioteca do GNPS. Legenda: espectro superior (íon precursor da amostra) e espectro inferior (referência da biblioteca do GNPS). .....	101
Figura 58. Cluster de FPMs anotada através do Network Annotated Propagation (NAP). As cores dos nós indicam as anotações pela biblioteca espectral do GNPS (amarelo) e através dos algoritmos Fusion (azul) e Consensus (laranja).....	102
Figura 59. Clusters de flavanonas, flavonas e flavonas metoxiladas através do Network Annotated Propagation (NAP). As cores dos nós indicam as anotações pela biblioteca espectral do GNPS (amarelo) e através dos algoritmos Fusion (azul) e Consensus (laranja). .....	103
Figura 60. Espectro de fragmentação EM/EM dos íons (a) $m/z$ 287,0563 [M-H] <sup>-</sup> e (b) $m/z$ 317,0667 [M-H] <sup>-</sup> . .....	105
Figura 61. Espectro de fragmentação do íon precursor $m/z$ 331,0461 [M-H] <sup>-</sup> (Tr. 8,00 min). ..	106
Figura 62. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor $m/z$ 593,15173 [M-H] <sup>-</sup> . .....	107
Figura 63. Proposta de fragmentação da vicenina-2 com base nos íons fragmentos observados no espectro de fragmentação EM/EM. (Retirado de Silva et al, 2017, com modificações. ....	108
Figura 64. Anotação do íon precursor $m/z$ 323,25922 [M-H] <sup>-</sup> como o ácido 8-hidroxiabdan-15-óico ( <b>3</b> ), na rede molecular no modo negativo. ....	109
Figura 65. Comparação do espectro de fragmentação do diterpeno anotado como ácido 8-hidroxiabdan-15-óico ( <b>3</b> ) com a biblioteca de referência. Legenda: espectro da amostra na porção superior (preto) e o espectro de referência da biblioteca do GNPS na parte inferior (verde). .....	110
Figura 66. Anotação dos íons $m/z$ 335,29413 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> e $m/z$ 293,28360 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> como os acetato labdan-8-ol-15-il ( <b>1</b> ) e labdan-8,15-diol ( <b>2</b> ). .....	110
Figura 67. Comparação dos espectros de fragmentação dos diterpenos anotados (a) acetato labdan-8-ol-15-il ( <b>1</b> ) e (b) labdan-8,15-diol ( <b>2</b> ) com a biblioteca de referência. Legenda: espectro da amostra na porção superior (preto) e o espectro de referência da biblioteca do GNPS na parte inferior (verde). .....	111
Figura 68. Dendograma obtido na análise hierárquica de clusters (HCA) e gráfico de escores da análise de componentes principais (PCA). Legenda: EC – estação chuvosa; ES – estação seca; IV – <i>in vitro</i> . .....	118
Figura 69. Gráfico de escores e de pesos da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Legenda: EC – estação chuvosa; ES – estação seca; IV – <i>in vitro</i> . .....	120
Figura 70. Variáveis importantes na projeção (VIP) geradas pela análise de PLS-DA. ....	121

Figura 71. Rede molecular no modo FBMN com os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo negativo, destacando os íons que apresentaram maior abundância nos extratos de <i>L. artemisiifolia in vitro</i> . .....	122
Figura 72. Cromatogramas de íons extraídos dos íons precursores a) $m/z$ 593,1519 [M-H] <sup>-</sup> nos extratos etanólicos e b) $m/z$ 313,0720 [M-H] <sup>-</sup> (Tr 16,02 min) nos extratos acetato de etila 1, selecionados na análise de VIP. Legendas de cores: verde (estação seca), vermelho (estação chuvosa) e azul (planta in vitro). .....	124
Figura 73. Cromatogramas de íons extraídos dos íons precursores a) $m/z$ 339,2543 [M-H] <sup>-</sup> (Tr. 12,15 min) no extratos acetato 1 e b) $m/z$ 501,3073 [M-H] <sup>-</sup> (Tr 8,90 min), selecionados na análise de VIP. Legendas de cores: verde (estação seca), vermelho (estação chuvosa) e azul (planta in vitro).....	125
Figura 74. Contagem dos juvenis (J2) de <i>P. brachyurus</i> na câmara de Peters com uso da solução de KMnO <sub>4</sub> (0,05%) para a distinção dos nematoides (a) vivos e (b) mortos. Fonte: autoria própria .....	128
Figura 75. Resultado do ensaio nematicida com os extratos de <i>L. artemisiifolia</i> nas concentrações de 0,0%, 0,025%, 0,05%, 0,1% e 0,2%. .....	130
Figura 76. Resultado do ensaio nematicida do extrato etanólico da estação chuvosa. ....	131

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa e rendimento dos extratos das partes aéreas de <i>L. artemisiifolia</i> .....	25
Tabela 2. Dados espectrais de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz), <sup>13</sup> C (125 MHz) e HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>1</b> e comparação com a literatura.....	39
Tabela 3. Dados espectrais de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (via HSQC) e HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>2</b> e comparação com a literatura.....	45
Tabela 4. Dados espectrais de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do composto <b>3</b> e comparação com a literatura.....	48
Tabela 5. Dados espectrais de RMN de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (via HSQC) e HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) do composto <b>4</b> e comparação com a literatura.....	53
Tabela 6. Dados espectrais de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do composto <b>5</b> e comparação com a literatura.....	56
Tabela 7. Dados espectrais de RMN de <sup>1</sup> H e NOE 1D (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do composto <b>6</b> e comparação com a literatura.....	62
Tabela 8. Dados espectrais de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) do composto <b>7</b> e comparação com a literatura.....	65
Tabela 9. Compostos anotados através das análises de CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares (GNPS e NAP).....	113
Tabela 10. Compostos anotados através das análises de CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares (GNPS e NAP) no modo positivo de ionização.....	116
Tabela 11. Anotação dos compostos selecionados pela análise de variáveis importantes na projeção (VIP) da PLS-DA através da plataforma GNPS.....	127

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\Phi$	diâmetro da coluna
$\delta$	deslocamento químico
AcOEt	acetato de etila
CLAE-IES-EM/EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas com ionização por <i>eletrospray</i>
CC	coluna cromatográfica
CCD	cromatografia em camada delgada
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo duplete
DDA	Data-dependent Acquisition
EM/EM	espectrometria de massas/ espectrometria de massas
EtOH	etanol
EA1	extrato acetato de etila 1
EA2	extrato acetato de etila 2
EE	extrato etanólico
FBMN	<i>feature-based molecular networking</i>
FPM	flavona polimetoxilada
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
H	altura da coluna
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IES	ionização por <i>eletrospray</i>
<i>J</i>	constante de acoplamento
[M+H] <sup>+</sup>	molécula protonada
[M-H] <sup>-</sup>	molécula desprotonada
[M+Na] <sup>+</sup>	molécula cationizada
[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	molécula protonada com perda de água
<i>m</i>	multipleto
<i>m/z</i>	relação massa-carga
MeOH	metanol

min	minutos
NAP	<i>Network Annotated Propagation</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Square Discriminant Analysis</i>
ppm	partes por milhão
PRM	<i>Parallel Reaction Monitoring</i>
RDA	retro Diels-Alder
RMN	ressonância magnética nuclear
s	simpleto
s/	simpleto largo
SisGen	Sistema Nacional de Gestão Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado
Tr	tempo de retenção
TMS	tetrametilsilano
UV	ultravioleta
VIP	<i>Variable Importance in Projection</i>

## RESUMO

O Cerrado brasileiro é reconhecido pela sua biodiversidade, com a presença de várias espécies endêmicas com um grande potencial de atividades biológicas. A espécie *Lomatozona artemisiifolia* Baker é endêmica do Cerrado da região Centro-Oeste e atualmente encontra-se em extinção. Visando sua conservação neste bioma, foram conduzidos, em trabalhos anteriores, estudos de micropropagação *in vitro*, uma técnica que permite sua produção em laboratório. Dessa forma, baseado nas atividades biológicas já relatadas na literatura para outras espécies da família Asteraceae endêmicas do Cerrado, neste trabalho é relatado o estudo fitoquímico de *L. artemisiifolia* e a comparação entre as espécies nativas deste bioma e *in vitro*. Considerando-se a falta de estudos químicos com espécies do gênero *Lomatozona*, inicialmente foram isolados os compostos acetato labdan-8-ol-15-il (1), labdan-8,15-diol (2), ácido 8-hidroxiabdan-15-óico (3), crisoplenetina (4), paquipodol (5), quercetagetina-3,5,6,3',4'-pentametil éter (6) e oxianina B (7). Em seguida, os extratos de *L. artemisiifolia* das espécies nativa e *in vitro* foram analisados por CLAE-IES-EM/EM e comparados através de análise quimiométrica, permitindo-se observar diferenças significativas entre os extratos acetato de etila, relacionados ao conteúdo da superfície foliar desta espécie. As análises por redes moleculares foram conduzidas com o objetivo de anotar os demais compostos presentes nesta espécie, levando a desreplicação de várias subclasses de flavonoides. As análises quimiométricas em conjunto com as análises por redes moleculares permitiram identificar as subclasses de compostos cuja produção é influenciada pelas condições de crescimento do campo e micropropagação *in vitro*. Observou-se que as espécies nativas e *in vitro*, se diferenciam sobretudo pelo conteúdo químico secretado pelos tricomas glandulares, distribuídos sobre a superfície foliar desta espécie, indicando assim possíveis anormalidades no desenvolvimento destas estruturas vegetais na planta obtida por micropropagação. Baseado nas classes de compostos identificadas nos extratos de *L. artemisiifolia*, foi realizada uma avaliação de seus extratos no controle do fitonematóide *Pratylenchus brachyurus*. Os resultados, entretanto, indicaram um baixo potencial para a atividade nematicida.

Palavras-chaves: 1. *Lomatozona artemisiifolia*. 2. flavonas polimetoxiladas. 3. diterpenos labdanos. 4. molecular networking. 5. Global Natural Products Social Molecular Networking.

## ABSTRACT

The Brazilian Cerrado is recognized for its biodiversity and the presence of several endemic species with a great potential for biological activities. The specie *Lomatozoma artemisiifolia* Baker is endemic from Cerrado of the Brazilian Midwest region and it is currently endangered. The *in vitro* micropropagation studies were conducted in previous works, a technique that allows its production in the laboratory looking for conservation on this biome. Thus, based on the biological activities already reported in the literature for other species of Asteraceae endemic to the Cerrado, this work reports the phytochemical study of *L. artemisiifolia* and a comparison between *in vitro* and the native species of this biome. The observation of missing chemical study with species of the genus *Lomatozoma*, the major compounds labdan-8-ol-15-il (1), labdan-8,15-diol (2), 8-hydroxylabdan-15-oic acid (3), chrysosplenetin (4), paquipodol (5), quercetagenin-3,5,6,3',4'-pentamethyl ether (6) and oxyanin B (7), were isolated. Then, the extracts of *L. artemisiifolia* from native and *in vitro* species were studied by LC-ESI-MS/MS and they have been compared by the chemometric analysis, that allow to observe significant differences between the ethyl acetate extracts, that was related to its foliar surface content. The molecular network analyzes were conducted in order to annotate the other compounds present in this species, leading to dereplication of several subclasses of flavonoids. The chemometric analysis together with the molecular network analysis allowed us to identify the metabolite subclasses whose production is influenced by the conditions of field growth and *in vitro* micropropagation. It was observed that native and *in vitro* species are mainly differentiated by the chemical content secreted by glandular trichomes, distributed over the foliar surface of this species, thus indicating possible abnormalities in the development of vegetal structures in the plant obtained by micropropagation. The extracts from *Lomatozoma* were evaluated on the control of the phytonematode *Pratylenchus brachyurus* based on the metabolite classes identified in *L. artemisiifolia*. However, the results indicated a low potential for the nematicide activity.

Keywords: 1. *Lomatozoma artemisiifolia*. 2. polymethoxylated flavones. 3. labdane diterpenes. 4. molecular networking. 5. Global Natural Products Social Molecular Networking.

# Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais tem papel fundamental na manutenção da vida moderna, atuando em várias áreas importantes para a sociedade, para citar algumas, agricultura, medicina, cosméticos, corantes e tintas (Lopes & Vieira, 2017).

Também conhecidos como metabólitos especializados, assumem importantes funções relacionadas à interação com o meio ambiente em que vivem, tais como a proteção ao estresse ambiental e à predadores, sendo, portanto, imprescindíveis para a sobrevivência dos organismos vivos de onde provém (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004).

Assim pode-se dizer que os metabólitos especializados contribuem e participam dos processos de adaptação das espécies de plantas e microrganismos em um ecossistema, evoluindo em conjunto com estes (Wolfender et al, 2019). Isso se reflete em uma grande diversidade de estruturas químicas, compondo variadas classes de compostos, com funções especializadas. Esses compostos são capazes de interagir com diversos sítios ativos de proteínas, enzimas e células, exibindo um amplo espectro de atividades biológicas, que vem a ser de grande interesse para os seres humanos (Venegas-Molina et al, 2021).

Não por acaso, as plantas e outros organismos vivos são uma das principais fontes de princípios ativos usados no desenvolvimento de medicamentos, seja em sua forma intacta, sintética ou semi-sintética, correspondendo à 49,2% das novas drogas aprovadas nos últimos 38 anos (Cragg & Newman, 2020; Sukmarine, 2021). Vários exemplos ilustram isso, como o trabalho de Youyou Tu e colaboradores com a espécie *Artemisia annua*, utilizando a abordagem de ensaios bioguiados no isolamento da artemisina, uma lactona sesquiterpênica com atividade antimalarial, cujo uso no tratamento da malária nas últimas décadas lhe rendeu o prêmio nobel em 2015 (Tu, 2011; Tu, 2016).

Sem dúvida o ensaio bioguiado constitui uma estratégia muito eficiente na obtenção de compostos bioativos, contudo o processo de obtenção destes na sua forma pura a partir de extratos vegetais leva um longo tempo, além de um

consumo elevado de insumos químicos (Michel et al, 2013). A desvantagem deste método é a possibilidade de reisolamento de compostos já descritos na literatura (Wolfender et al, 2019).

Assim, nos últimos anos, muitos trabalhos estiveram focados na desreplicação, que é processo de identificação prévia dos metabólitos especializados majoritários presentes em extratos ou frações bioativas, priorizando o isolamento de compostos novos (Hubert et al, 2017). Esta abordagem somente foi possível com uso de técnicas analíticas como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ressonância magnética nuclear ou à espectrometria de massas (Abrol et al, 2021; Dantas et al, 2021; Egan et al, 2021). Isso requer o uso de padrões ou base de dados especializadas para comparação, especialmente no caso da espectrometria de massas que necessita dos dados de fragmentação (EM/EM) dos compostos. O desenvolvimento de bases de dados, contendo dados de EM/EM como Metlin, MassBank, ReSpect, mzCloud, é com certeza uma contribuição inestimável para estes estudos (Guijas et al, 2018; Sawada et al, 2012; Horai et al, 2010; mzCloud, 2021). Estes bancos de dados possuem ferramentas de busca integrada com o espectro de massas de referência, retornando possíveis candidatos para um dado íon precursor, mas ainda assim, considerando que as informações de massa exata ( $m/z$ ), devem ser buscadas de forma manual, esta tarefa torna-se difícil, principalmente quando o número de amostras é muito grande.

Contudo, os recentes avanços tecnológicos no aprimoramento de técnicas espectrométricas e espectroscópicas, principalmente no tratamento dos dados com uso de ferramentas de bioinformática, hoje permitem que centenas de amostras possam ser analisadas e os dados sejam interpretados em um espaço de tempo menor, acelerando a descoberta de novos compostos na pesquisa de produtos naturais (Medema, 2021).

Neste contexto o desenvolvimento da plataforma de dados *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) tem contribuído efetivamente para a consolidação desse cenário, ao permitir a análise simultânea de centenas de amostras e comparação de seus dados de espectrometria de massas com bibliotecas espectrais, levando a anotações para os compostos. Dentre as possibilidades de análise nesta plataforma, destaca-se o *molecular networking*,

uma forma de observar as similaridades estruturais dos compostos detectados nas análises e juntamente com as anotações verificar a presença de metabólitos ainda não descritos, otimizando a desreplicação de extratos vegetais (Wang et al, 2016).

## 1.2 O Cerrado e suas espécies

O Cerrado brasileiro é considerado o segundo maior bioma da América Latina, cobrindo a área central do Brasil em uma extensão de cerca de 204 milhões de hectares (Bezerra, 2018; Sano et al, 2019). Neste bioma são encontradas um total de 12.337 espécies de plantas catalogadas, com uma estimativa de que 44% destas sejam endêmicas (Flora do Brasil, 2021; Simon et al, 2009). Abrigando um terço da biodiversidade brasileira e apresentando uma alta taxa de endemismo de espécies de plantas e animais, sob alta pressão antrópica, o Cerrado é considerado um dos 35 *hotspots* mundiais de conservação da biodiversidade (Myers et al, 2000; Mittermeier et al, 2011).

Recentemente, vários estudos tem sido realizados com espécies nativas do bioma Cerrado, algumas delas ameaçadas de extinção. Estes trabalhos têm demonstrado o potencial biológico dessas espécies, tais como atividades inseticida, citotóxica, anticolinesterase e antioxidante (Pereira et al, 2020; Silva et al, 2020; Silva et al, 2020; Oliveira et al, 2018). Espécies bem conhecidas como o pequi (*Caryocar brasiliense*), utilizada pela população na alimentação, se fazem presentes neste bioma, o qual se caracteriza também pela presença de outras utilizadas na medicina popular, como é o caso das espécies *Lychnophora ericoides* e *Vernonia scorpioides*, conhecidas popularmente como “arnica” e “assa-peixe”, respectivamente. O uso popular da *L. ericoides* envolve o uso do extrato alcoólico no tratamento de feridas e dores, enquanto que a *V. scorpioides* é usada topicamente no tratamento de alergias e irritações da pele (Godinho et al, 2015).

Dentre as várias famílias de plantas utilizadas na medicina popular e que estão presentes no Cerrado destacam-se as famílias Euphorbiaceae, Bignoniaceae, Fabaceae e Asteraceae (Neto et al, 2020). A família Asteraceae possui cerca 375 espécies nativas neste bioma e estima-se que 56,9% delas

sejam endêmicas (Rivera et al, 2016). Os estudos com espécies de Asteraceae endêmicas do Cerrado tem relatado importantes propriedades farmacológicas, tais como atividades antiprotozoária, antitumoral, antipirética e antimalárica, os quais podem ser atribuídos à presença de metabólitos secundários já identificados nessas espécies, pertencentes às classes de flavonoides, lactonas sesquiterpênicas, diterpenos e ácidos clorogênicos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Nogueira et al, 2016; Neto et al, 2020). Além disso, do ponto de vista comercial, algumas espécies também tem atraído o interesse de pesquisadores como é o caso da *Bidens graveolens*, cujo estudo químico do óleo essencial associado à análise de odores, demonstra um potencial uso deste pela indústria de química fina (Silva et al, 2020).

Por outro lado, o Cerrado também se caracteriza pela presença de espécies em extinção. Apesar da extinção de espécies ser considerado um processo natural nos ecossistemas, a intensa atividade antrópica, dentre elas o fogo, a mineração, bem como a expansão das fronteiras agrícolas e pecuárias tem acelerado este processo e levado à perda ou degradação do habitat de espécies somente encontradas neste bioma (Martinelli et al, 2014; Ressel & Guilherme, 2020).

Neste contexto são necessárias ações que visem a conservação destas espécies, que além do seu potencial uso na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos, possuem também importante papel ecológico na manutenção do ecossistema ou comunidade em que estão inseridas (Martinelli et al, 2014; Lopes & Vieira, 2017).

Uma das estratégias mais promissoras de conservação de espécies raras e em extinção é a cultura de tecidos vegetais, a qual pode ser definida como o cultivo asséptico de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições químicas e físicas definidas (Thorpe, 2007). A micropropagação *in vitro*, é uma das técnicas utilizadas para esta finalidade e se baseia no princípio de totipotência celular, que estabelece que toda célula vegetal possui geneticamente a capacidade de regenerar uma planta inteira (Chagas et al, 2006). No bioma Cerrado, a micropropagação *in vitro* tem sido utilizada com bastante eficácia para a conservação de espécies de plantas endêmicas que

estão ameaçadas de extinção, principalmente as que possuem uso popular no tratamento de doenças, por exemplo, *Lychnophora pinaster* (Asteraceae), *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) e *Zeyheria montana* (Bignoniaceae) (de Souza et al, 2007; Souza et al, 2011; Cardoso & da Silva, 2013).

Além disso outros estudos têm estendido esta ação de conservação para espécies desconhecidas permitindo a sua investigação sob o ponto de vista químico ou biológico. A espécie *Lomatozona artemisiifolia*, pertencente à família Asteraceae, se enquadra nessa situação, sendo classificada como endêmica e em risco de extinção, apresentando poucos estudos na literatura.

### **1.3 Revisão bibliográfica de *Lomatozona artemisiifolia* Baker (Asteraceae)**

A família Asteraceae possui ocorrência em todos os continentes, com exceção da Antártida, sendo composta por cerca de 24.000 espécies e possuindo entre 1.600 e 1.700 gêneros, o que representa aproximadamente 10% da flora mundial (Funk et al, 2009). No Brasil, esta família é considerada a terceira maior das angiospermas e destaca-se pela sua alta especificidade por habitats, que se reflete em um número expressivo de 1.298 espécies endêmicas de um total de 2.028 espécies (Nakajima et al, 2013).

Na taxonomia atual a espécie *Lomatozona artemisiifolia* Baker pertence ao gênero *Lomatozona*, à tribo Eupatorieae e à família Asteraceae (figura 1). É uma espécie endêmica do Cerrado e sua ocorrência é restrita na Serra Dourada, nos municípios de Serranópolis, Mossâmedes e Jataí, no Estado de Goiás (CNCFlora, 2021). É classificada como uma espécie em perigo de extinção em função de sua distribuição restrita e deficiência de dados (Nakajima et al, 2012; Martinelli et al, 2014).

A *L. artemisiifolia* é um subarbusto de folhas opostas com altura que varia de 30 à 60 cm, ocorrendo em fendas de rochas (Ribeiro & Teles, 2015). Apresenta lâmina foliar glandulosa em ambas as faces, caracterizada pela presença de tricomas glandulares densamente distribuídos sobre o caule e as folhas, nos quais foram identificados oito tipos diferentes dessas estruturas vegetais (Trindade, 2013; Ribeiro & Teles, 2015). Os tricomas glandulares são

responsáveis pela produção e secreção de metabólitos secundários sobre a superfície da planta, formando uma camada contínua conhecida como exsudado, o qual está relacionado à proteção da planta contra herbívoros, reflexão da luz e redução da temperatura foliar (Wagner, 1991; Morimoto, 2019).



Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Asterales

Família: Asteraceae

Tribo: Eupatorieae

Gênero: *Lomatozona*

Espécie: *Lomatozona artemisiifolia*

Figura 1. *L. artemisiifolia* Baker no Parque Estadual da Serra Dourada e sua classificação taxonômica (SiBBR, 2021). Fonte: autoria própria.

Com o objetivo de contribuir para a conservação desta espécie endêmica no seu habitat natural, o Cerrado goiano, foram conduzidos estudos de micropropagação *in vitro* a partir das sementes coletadas *L. artemisiifolia* no Parque Estadual da Serra Dourada. As condições adequadas de pH, temperatura e concentração de hormônios de crescimento para o cultivo *in vitro* de *L. artemisiifolia* foram estabelecidas em meio Murashige-Skoog (Moreira, 2018). Isso permitiu que os indivíduos obtidos de *L. artemisiifolia* pela micropropagação *in vitro* fossem utilizados para um estudo de reforço populacional desta espécie na Serra Dourada, onde apresentaram uma taxa de sobrevivência de 50% (Silva, 2019).

Contudo, nem sempre as plantas *in vitro* introduzidas no ambiente natural conseguem se adaptar por um longo período e estes estudos requerem um tempo maior de avaliação da sua efetividade (Ressel & Guilherme, 2020).

Além disso os extratos de *L. artemisiifolia* foram avaliados frente à *Bemisia tabaci*, conhecida como mosca-branca, e aos nematóides *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne javanica*, os quais tem causado severos prejuízos em culturas de soja e café (Márquez et al, 2021; Bell et al, 2018). Moreira (2018)

avaliou a atividade inseticida do extrato acetato de etila desta espécie frente a ninfas de *Bemisia tabaci* em feijoeiro, apresentando uma taxa de mortalidade superior 92%. O mesmo extrato foi capaz de atuar no controle *in vitro* de *P. brachyurus* e *M. javanica*, alcançando taxas de mortalidade de 90,55% e 49,50%, respectivamente. Já no experimento de campo em culturas de milho e tomate, o uso do extrato acetato de etila permitiu a redução da densidade populacional de *P. brachyurus* e *M. javanica* em taxas de 54,40% e 66,59%, respectivamente.

Estes resultados de atividade biológica mostram a importância do estudo dos constituintes químicos de *L. artemisiifolia*. Nos trabalhos publicados até o momento com esta espécie foram realizadas análises qualitativas através de reações colorimétricas e de cromatografia em camada delgada, nos quais é relatado a presença de compostos das classes químicas de terpenos, flavonoides, cumarinas, taninos e alcaloides (Trindade, 2013; Moreira, 2018). Trindade (2013) realizou a análise dos compostos voláteis presentes no óleo essencial através de CG-EM, identificando 21 compostos, dentre eles majoritariamente os sesquiterpenos  $\gamma$ -muuroleno,  $\beta$ -germacreno,  $\delta$ -elemeno,  $\delta$ -careno,  $\beta$ -ocimeno e cariofileno. No trabalho de Moreira (2018) também é descrita a análise de uma fração por espectrometria de massas de alta resolução, a qual permitiu a anotação de um flavonoide polimetoxilado através da comparação com o banco de dados Metlin (Guijas et al, 2018).

Assim este trabalho buscou ampliar o conhecimento químico da espécie *Lomatozona artemisiifolia*, através da identificação de compostos ainda não relatados no gênero *Lomatozona*. Também foram investigados os constituintes químicos presentes no exsudado secretado pelos tricomas glandulares e os presentes em extratos de média e alta polaridade, não descritos nos estudos anteriores. Além disso, foi realizada uma comparação entre os conteúdos químicos das espécies nativas e *in vitro*, mostrando as diferenças e similaridades que surgem do ambiente de desenvolvimento dessas plantas.

#### 1.4 Produtos naturais encontrados em espécies da tribo Eupatorieae

A *L. artemisiifolia* pertence a tribo Eupatorieae e é uma espécie endêmica do Cerrado goiano, encontrada principalmente no Parque Estadual da Serra Dourada onde está localizada a Reserva Biológica Prof. José Ângelo Rizzo. Neste local são também encontrados outros gêneros que compõem a tribo Eupatorieae presente no estado de Goiás. O Parque Estadual da Serra Dourada é uma unidade de conservação que corresponde a uma área de proteção ambiental de 30.000 hectares, abrigando 23 espécies e 12 gêneros desta tribo (Ribeiro & Teles, 2015). Atualmente os estudos realizados sobre a composição química e as atividades biológicas dessas espécies abrangem somente 7 espécies e 5 gêneros.

A composição química das espécies que compõem os gêneros pertencentes à tribo Eupatorieae é representada por metabólitos secundários das classes de flavonoides, chalconas, cumarinas, ácidos hidroxicinâmicos, cadinenos, terpenos, diterpenos, lactonas sesquiterpênicas e esteróides (figura 2) (Taleb-Contini et al, 2007; Wollenweber et al, 1997; Emerenciano et al, 2001; Vieira et al, 2020; Feitosa et al, 2021; Ríos et al, 2014; de Amorim et al, 2016; Chahal et al, 2021; Bohnmann et al, 1979). Uma variedade de subclasses de flavonoides é relatada em vários gêneros, como flavonoides O-heterosídeos, flavonoides agliconas, flavanonas e flavonoides metoxilados encontrados, por exemplo, no gênero *Mikania* e nas espécies *Chromolaena laevigata* e *Chromolaena squalida*, que estão presentes no Parque Estadual da Serra Dourada (Feitosa et al, 2021; Taleb-Contini et al, 2003; de Oliveira et al, 2020). Na literatura existem trabalhos que associam as atividades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e anticarcinogênica à presença desses compostos (Machado et al, 2021; Kilit et al 2021). Uma outra classe que merece ser mencionada são as lactonas sesquiterpênicas, encontradas em abundância em toda a família Asteraceae (Scotti et al, 2012).

As atividades biológicas das espécies da tribo Eupatorieae relatadas na literatura, incluindo as encontradas no Parque Estadual da Serra Dourada, mostram a relevância do estudo químico do gênero e espécies ainda não investigadas presentes nesta unidade de conservação, dentre elas o gênero

*Lomatozona*. Este gênero, é composto pelas espécies *L. huntii*, *L. inaequale*, *L. andersoni* e *L. artemisiifolia* que, com exceção desta última, não possuem relatos na literatura (*speciesLink network*, 2021). Assim, o presente estudo com a espécie *L. artemisiifolia* busca contribuir para o conhecimento químico deste gênero ainda pouco conhecido.

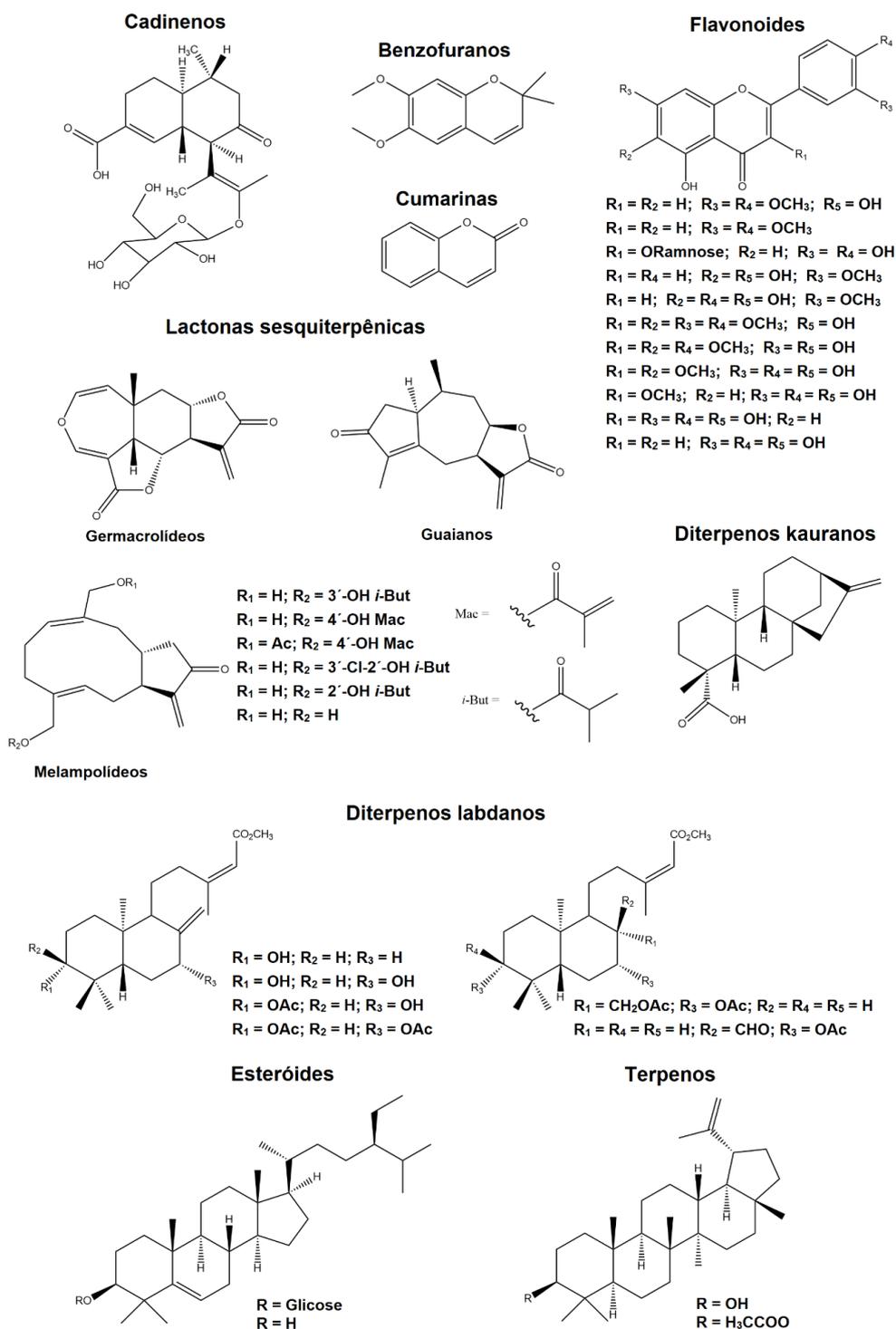


Figura 2. Metabólitos secundários identificados em espécies da tribo Eupatorieae presentes no Parque Estadual da Serra Dourada.

## 1.5 Análises por redes moleculares no Global Natural Products Social Molecular Networking

O *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) é uma plataforma *online* de curadoria de dados de EM/EM públicos que fornece uma infraestrutura para a análise de dados. Estes dados correspondem atualmente à 221.083 espectros alocados em um repositório de dados chamado MassIVE (*Mass spectrometry Virtual Interactive Environment*) (Aron et al, 2020). O MassIVE é composto pelos espectros fornecidos pela comunidade de usuários e bibliotecas de compostos já existentes como MassBank (<http://massbank.jp>), EU MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>), North America MassBank (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>), ReSpect, entre outras (Sawada et al, 2012; Horai et al, 2010).

Uma das principais características é a possibilidade de inserção de dados pelos usuários, criando um banco de “dados vivos”, que tende a aumentar com o passar do tempo (Wang et al, 2016). Como controle de qualidade, os dados inseridos pela comunidade são cruzados com bibliotecas espectrais de referência como o NIST 2017 (Aron et al, 2020). Assim estes dados são categorizados de acordo com o nível de informação fornecido com os espectros, sendo que para aqueles que provém de substâncias puras isoladas ou sintetizadas, contendo análises complementares (RMN uni- e bidimensional), é atribuído uma classificação Ouro (*Gold*); vinculados a publicações científicas, Prata (*Silver*); e sem publicação ou com elucidação estrutural incompleta, Bronze (*Bronze*) (Wang et al, 2016).

Dentre as ferramentas de análise presentes no GNPS o *molecular networking* ou análise por redes moleculares é a mais utilizada. A análise por redes moleculares se baseia na premissa de que moléculas com estrutura química similares tendem a se fragmentar em fase gasosa produzindo fragmentos em comum (Perruchon et al, 2021). Baseado na sua fragmentação os compostos das amostras são comparados entre si e também com a biblioteca de referência do GNPS. Os espectros de massas de cada um dos íons precursores são representados por *nós* e baseado na sua similaridade podem ou não ser conectados entre si, formando a rede molecular (Wang et al, 2016).

Na rede molecular o grau de similaridade espectral é determinado pelo cosseno, o qual varia de 0 à 1, sendo que valores mais próximos de 1 indicam uma similaridade maior, enquanto que 0 indica pouca ou nenhuma semelhança (Pilon et al, 2021). O cosseno se aplica as anotações obtidas por comparação com a biblioteca espectral do GNPS, indicando o quanto os espectros das amostras são similares a estes. Além disso, pode ser usado para verificar possíveis similaridades espectrais entre os compostos de uma amostra, sendo uma forma de visualizar semelhanças estruturais entre os mesmos (figura 3).

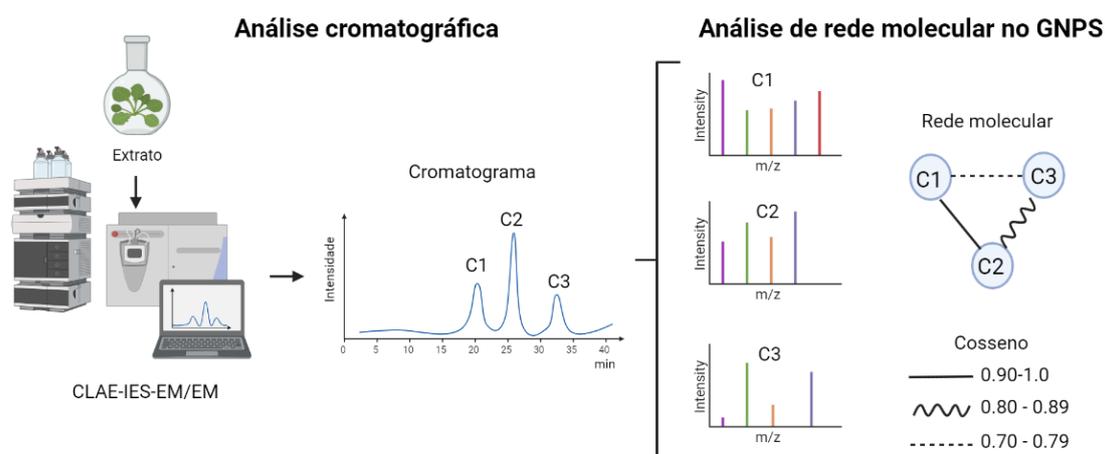


Figura 3. Esquema simplificado mostrando a análise por redes moleculares usando o GNPS (Wang et al, 2016). Fonte: autoria própria, criada no aplicativo BioRender.

A comparação com bibliotecas de referência presentes no GNPS, fornece por sua vez anotações para os compostos das amostras, as quais podem ser visualizadas na rede molecular e permitem observar compostos possivelmente ainda não descritos na literatura, facilitando a descoberta de novos compostos (Remy et al, 2019). Além disso a possibilidade de análise de centenas de amostras tem permitido ampliar o número de espécies de plantas e microrganismos estudadas, correlacionando as anotações obtidas com dados de atividades biológicas, posição geográfica, taxonomia, entre outros, variando conforme o objetivo de trabalho (Crüsemann et al, 2017; Nothias et al, 2018; Maniei et al, 2020; Olivon et al, 2020; Cortelo et al, 2021).

Inicialmente uma das dificuldades encontradas na análise por redes moleculares foi a diferenciação de isômeros, os quais apresentam a mesma massa exata ( $m/z$ ) quando detectados nas análises de CLAE-IES-EM/EM. Nestas análises um mesmo íon precursor costuma ser fragmentado múltiplas

vezes durante a eluição cromatográfica. A análise por redes moleculares no modo clássico utiliza o algoritmo *MS-Cluster*, o qual detecta espectros de EM/EM com alto grau de similaridade (quase idênticos), agrupando-os em um mesmo nó, de forma que os tempos de retenção não são considerados (Olivon et al, 2017). Nesse processo, podem ocorrer falhas no agrupamento espectral decorrentes da presença de íons precursores em baixa intensidade ou de íons isóbaros que coeluem e são fragmentados juntamente com o íon precursor selecionado, levando a formação de nós múltiplos referentes ao mesmo composto na rede molecular (Nothias et al, 2020).

Para contornar estas dificuldades foi desenvolvido o modo de análise *feature-based molecular networking* (FBMN), que adotando etapas de pré-processamento dos dados permitiu que informações contidas no EM1 (tempo de retenção, área e intensidade dos picos) e EM/EM (fragmentação) fossem reunidas e incorporadas na análise por redes moleculares (Pilon et al, 2021). No FBMN um único espectro de EM/EM representativo de cada íon precursor é selecionado, onde a área ou altura do pico cromatográfico pode ser utilizada para estimar a intensidade relativa desse íon nos cromatogramas (Nothias et al, 2020). Isso evita a perda ou redundância dos dados dos íons precursores, como pode ocorrer na análise por redes moleculares clássica, simplificando a descoberta de compostos estruturalmente relacionados.

Entretanto, as etapas de pré-processamento do FBMN requerem condições iguais para as análises cromatográficas das amostras, tornando inviável esta abordagem para estudos com um grande número de amostras (Nothias et al, 2020). Neste sentido, a análise por redes moleculares no modo clássico é a mais indicada para estudos com conjunto de amostras na ordem de centenas a milhares (Aron et al, 2020).

É importante ressaltar que o GNPS e outras plataformas computacionais similares não fornecem uma identificação estrutural para os metabólitos secundários, mas sim uma anotação (Pilon et al, 2021). Este termo significa a atribuição de possíveis estruturas químicas de forma automática, através da correspondência com os dados de EM/EM presentes nessas plataformas de análises de dados. Tratam-se, portanto, de possibilidades que devem ser

verificadas com cautela (Wolfender et al, 2019). Em função disso, os pesquisadores da área de metabolômica sugerem a adoção de níveis de anotação: (i) nível 1 para identificações inequívocas realizadas pela comparação com padrões e com uso de dois tipos de informações ortogonais para esta confirmação; (ii) nível 2, para compostos possivelmente anotados sem o uso de padrões autenticados e através da comparação com espectros de massas presentes em bibliotecas espectrais; (iii) nível 3, para anotações à nível de classe de compostos, obtidas pela predição *in silico* da estrutura química ou elucidação parcial desta; (iv) nível 4, quando não se tem uma correspondência com as bibliotecas espectrais e somente os dados de espectros de massas, os quais podem futuramente serem verificados para a correta atribuição (Sansone et al, 2007; Wolfender et al, 2019).

A anotação dos compostos é um dos maiores desafios nos estudos de bioinformática. Desde o lançamento do GNPS em 2016, a taxa de anotação nesta plataforma variou de 2% para entre 5-6%, onde uma grande parcela de compostos se mantém desconhecidos (Pilon et al, 2021). Para contornar esta situação ferramentas *in silico* foram incorporadas dentro da estrutura de análises do GNPS, com o objetivo de estender a anotação quando não há correspondência com a sua biblioteca espectral (Lee et al, 2019). O *Network Annotated Propagation* (NAP) é uma delas e a baseia-se no algoritmo MetFrag, o qual prediz prováveis estruturas químicas com base na análise de seus fragmentos (Ruttkies et al, 2019). O NAP permite que as informações de conectividade observadas na rede molecular sejam usadas para o ranqueamento das prováveis estruturas previstas pelo algoritmo MetFrag (da Silva et al, 2018; Ernst et al, 2019). Para isso foram desenvolvidos os algoritmos *Fusion* e *Consensus*. O algoritmo *Fusion* utiliza os nós que já possuem anotações como referência para a predição de estruturas químicas similares aos nós conectados a estes. Para os casos em que não há uma anotação com as bibliotecas espectrais do GNPS é usado o algoritmo *Consensus*, sendo que ambos os casos levam a anotações em nível de classe e subclasses (nível 3) (da Silva et al, 2018; Ottavio et al, 2020).

## 1.6 Uso de extratos vegetais no controle de fitonematoides

Os fitonematoides são vermes que se encontram no solo, cuja manutenção de vida baseia-se em parasitar as raízes de plantas, de onde obtém nutrientes para seu sustento e reprodução. Em contrapartida, causam sérios danos aos organismos vegetais que parasitam levando à sua morte (Santana, 2021).

As infestações causadas por nematoides que parasitam plantas estão entre as que mais causam danos econômicos em plantas cultivadas em todo o mundo (Leiva et al, 2020). No Brasil, as principais espécies de fitonematoides pertencem aos gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Pratylenchus* e *Rotylenchulus*, os quais afetam culturas de soja, milho, feijão, tomate, banana, entre outras (de Oliveira et al, 2021). A forma mais comum de controle populacional dos fitonematoides é o uso de nematicidas sintéticos (Chen et al, 2020). Apesar de serem efetivos, seu uso excessivo tem levado a seleção de indivíduos mais resistentes, demandando o aumento de doses de aplicação, o que tem causado danos ao meio ambiente além de prejudicar a saúde de aplicadores e consumidores (Baldisera et al, 2021).

Neste contexto os extratos vegetais ou oriundos de microrganismos apresentam o potencial de tornarem-se um nematicida ecologicamente sustentável, cuja ação baseia na presença de metabólitos secundários com atividade nematicida. Estudos mostram que várias classes de metabólitos secundários como isotiocianatos, ácidos orgânicos, terpenoides, furanocumarinas, canabinoides, alcaloides e flavonoides possuem atividade nematicida (Ntalli & Caboni, 2012; Bano et al, 2020). A maioria dos relatos da atividade nematicida de terpenoides envolvem o uso do óleo essencial, onde verificou-se que ação sinérgica de terpenos contribui para o aumento da toxicidade, onde mais promissores foram os pares de trans-anetol/geraniol, trans-anetol/eugenol, carvacrol/eugenol e geraniol/carvacrol (Caboni & Ntalli, 2014).

Os terpenoides das classes de monoterpenos derivados do necrodano, diterpenos tetracíclicos e triterpenos isolados das espécies *Lavandula lusiere* (Laminaceae), *Piliostigma thonningi* (Leguminosae) e *Lantana camara* (Verbanaceae), também apresentaram alta atividade nematicida (Julio et al,

2016; Dzomba et al, 2020; Begum et al, 2000). Os ácidos fenólicos são outra classe que apresenta nematoxicidade, cujos estudos de estrutura-atividade apontam que o maior número de grupos hidroxila (-OH), assim como a presença de grupos metoxila, está associado a um aumento na atividade (Faizi et al, 2011).

De forma similar, Bano e colaboradores (2020) avaliaram atividade nematicida *in vitro* de vinte flavonoides, pertencentes as subclasses de flavonas, flavonóis e derivados O-heterosídeos, ao nematoide *Meloidogyne incognita*, apresentando atividade nematicida que variaram de 60-100% em concentrações abaixo de 1%. Neste estudo observaram relações de estrutura-atividade para a classe de flavonoides, de forma que os mais ativos apresentaram um grupo metoxila e ao menos três grupos hidroxilas, sendo que as flavonas apresentaram maior atividade que os flavonóis (Bano et al, 2020).

Uma outra forma de controle populacional de fitonematoides, ainda pouco estudada, é a indução de resistência, onde metabólitos secundários como os ácidos  $\beta$ -aminobutírico e salicílico são capazes de ativar o mecanismo de defesa da planta os quais inibem o desenvolvimento e reprodução dos nematoides (Caboni & Ntalli, 2014).

Estes resultados corroboram com as atividades nematicidas apresentadas por extratos e óleos essenciais de espécies como *Achillea millefolium*, *Tagetes patula*, *Triumfetta grandidens*, que se apresentam, portanto, como uma alternativa ao uso de nematicidas sintéticos (Baldisera et al, 2021; Faizi et al, 2011; Jang et al, 2015). A principal vantagem está na possibilidade de defensivos ecologicamente viáveis e possivelmente menos nocivos à saúde humana (Santana et al, 2021).

# Objetivos

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo químico da espécie *Lomatozona artemisiifolia* Baker (Asteraceae) e através de ferramentas de quimioinformática comparar a espécie nativa do Cerrado goiano com a obtida por micropropagação *in vitro*. Com base na sua composição química, avaliar a atividade nematicida dos extratos.

### 2.1 Objetivos específicos

- Realizar o isolamento de metabólitos secundários das partes aéreas de *L. artemisiifolia* através de técnicas de cromatografia e identificá-los por ressonância magnética nuclear uni- e bidimensional e espectrometria de massas;
- Caracterizar o perfil químico dos extratos de *L. artemisiifolia* por CLAE-IES-EM/EM;
- Comparar os extratos das espécies de *L. artemisiifolia* nativas do Cerrado e *in vitro* através de uma análise quimiométrica dos dados de CLAE-IES-EM;
- Realizar a desreplcação dos extratos de *L. artemisiifolia* através da análise dos dados de CLAE-IES-EM/EM pela plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS);
- Avaliar a atividade nematicida dos extratos de *L. artemisiifolia*;

# **Materiais e métodos**

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Equipamento e solventes**

O material vegetal coletado foi seco em estufa de ventilação e pulverizado em moinho de facas (marca Marconi). Os extratos foram concentrados utilizando o evaporador rotativo da marca IKA® RV10 para a eliminação do solvente.

Na preparação dos extratos vegetais e nos procedimentos cromatográficos foram utilizados solvente grau P.A. das marcas Synth, Neon, Biograde e Anidrol. As análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas com solventes grau HPLC da J.T. Baker. Nas análises de ressonância magnética nuclear foram usados solventes deuterados ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da Cambridge Isotopes Laboratories Inc. (CIL).

Nos ensaios nematocidas, os extratos foram solubilizados em água destilada utilizando-se ultra-turrax (IKA T10 Basic). A quantificação dos nematoides foi feita com auxílio de microscópio.

#### **3.2 Procedimentos cromatográficos**

As análises de cromatografia em camada delgada analítica e preparativa foram realizadas em placas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> suportadas em alumínio. Os reveladores usados nestas análises foram a luz ultravioleta ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) e anisaldeído para a identificação de compostos das classes de flavonoides e terpenoides, respectivamente.

O fracionamento dos extratos e isolamento de compostos foi feito com sílica gel 60 (70 – 230 mesh) em colunas de vidro que variaram o diâmetro e altura conforme a massa da amostra.

#### **3.3 Análises de ressonância magnética nuclear**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e os experimentos de NOE 1D, HSQC e HMBC foram adquiridos no espectrômetro Bruker Avance III (500,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 125,03 MHz para o  $^{13}\text{C}$ , com campo aplicado de 11,76 Teslas) no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do IQ/UFG e preparadas em  $\text{CDCl}_3$  com padrão interno de TMS (0,05% v/v).

### **3.4 Análises de espectrometria de massas de alta resolução por ionização *eletrospray***

As análises de espectrometria de massas de alta resolução por infusão direta por ionização *eletrospray* foram realizadas no espectrômetro de massas Thermo Scientific Q Exactive, utilizando-se fonte de ionização HESI, voltagem de 3500 V e temperatura do capilar de 320°C. Os espectros foram adquiridos nos modos positivo e negativo de ionização em uma faixa de 50 – 520 *m/z*.

### **3.5 Análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas**

As análises de espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas em um espectrômetro de massas Thermo Scientific Q Exactive Focus CLUE-EM/EM acoplado a um sistema de UHPLC Dionex UltiMate 3000 no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da UFG (CRTI – UFG). Os perfis cromatográficos foram obtidos usando-se uma coluna ACE de fase reversa C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm – 3,0 µm) e como fase móvel foi usada uma mistura de metanol e água deionizada, ambos acidificados com ácido fórmico (0,1% v/v), mantendo-se um fluxo de 1,0 mL/min. O gradiente iniciou-se com MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30). Aos 13 min atingiu-se 100% de MeOH, voltando às condições iniciais em 18 min, sendo mantido nessa proporção até o final da corrida cromatográfica em 23 min. A temperatura da coluna foi mantida em 40 °C e os dados de EM foram adquiridos na faixa de 150 - 750 *m/z* no modo negativo, pelo monitoramento de reações paralelas (PRM), enquanto que no modo positivo os dados foram adquiridos na faixa de 150 - 750 *m/z* no modo de aquisição dependente de dados (DDA).

As amostras foram preparadas em uma concentração de 1,0 mg/mL, dissolvidas em metanol e filtradas em filtros PVDF 0,45 µm, com volume de injeção de 10 µL para cada amostra.

### 3.6 Análises dos extratos de *L. artemisiifolia* por CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares

Os extratos EA1, EA2 e EE, das estações seca, chuvosa e da planta *in vitro*, foram analisados através de CLAE-IES-EM/EM. A rede molecular foi criada na plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Network*), situado no sítio <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>, utilizando-se os dados de CLAE-IES-EM/EM de todos os extratos (EA1, EA2 e EE) adquiridos no modo positivo e negativo de ionização, usando-se o modo clássico e o *feature-based molecular networking* (FBMN).

As redes moleculares no modo clássico foram construídas usando-se valores de tolerância de 1,0 para as massas do íon precursor e 0,2 para o íon fragmento. A pontuação de cosseno foi mantida em 0,7 e no mínimo 4 íons fragmentos em comum.

No modo FBMN, os valores de tolerância foram fixados em 0,02 para as massas dos íons precursor e fragmento (EM/EM). A rede molecular foi criada apresentando pontuação de cosseno acima de 0,65 e no mínimo 4 íons fragmentos em comum. Os espectros da rede foram pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS, onde os compostos correspondentes foram obtidos com limiar de pontuação acima de 0,65 e somente se um mínimo de 4 íons correspondentes foram alcançados. As redes moleculares foram visualizadas no *software* Cytoscape versão 3.8.2, layout “organic”, onde os espectros de massa dos íons precursores são representados por nós e as arestas (conexões) indicam o grau de similaridade entre os mesmos, dado pelo valor de cosseno.

#### 3.6.1 Pré-processamento dos dados de CLAE-IES-EM/EM no *software* MZmine 2

Inicialmente os arquivos foram convertidos de RAW para .mzXML usando-se o *software* MSconvert parte do pacote ProteoWizard versão 3.0. Os arquivos .mzXML foram processados no *software* MZmine 2 versão 2.53. A detecção das massas foram realizadas com nível de ruído de 1000000 e 0 para o EM1 e EM2, respectivamente. Os cromatogramas foram construídos através do algoritmo ADAP com tamanho de grupo de no mínimo 5 varreduras, com um limiar de intensidade de 3000000, um mínimo de intensidade dos picos de 1000000 e tolerância de  $m/z$  de 0,01 (ou 5 ppm). Os cromatogramas foram

deconvoluídos usando-se uma altura do pico de no mínimo 3000000, duração dos picos na faixa de 0,09 à 10,00 min e nível da linha de base de 1000000. As varreduras de EM2 foram pareadas usando-se uma tolerância de  $m/z$  0,025 Da e tolerância de tempo de retenção de 0,15 min. Os isótopos foram agrupados usando-se uma tolerância de  $m/z$  0,0 ou 5,0 ppm, tolerância de tempo de retenção de 0,1 e carga máxima de 1. O alinhamento dos picos cromatográficos  $m/z$  de  $m/z$  0,0 ou 5,0 ppm, tolerância de tempo de retenção de 0,2, pesos de  $m/z$  e tempo de retenção de 75 e 25, respectivamente. Em seguida, a lista de picos foi filtrada mantendo-se somente as varreduras dos picos com EM/EM. Os picos foram buscados entre as amostras através do “Gap-filling”, com tolerância de intensidade de 10%, tolerância de  $m/z$  de 0,0 ou 5,0 ppm e tolerância de tempo de retenção de 0,1. As áreas quantificadas dos picos e os dados espectrais foram exportados para arquivos .csv e .mgf, respectivamente. Esses arquivos foram carregados no GNPS, juntamente com um arquivo de metadados contendo informações das amostras, como identificação das amostras das plantas e do branco, estação de coleta ou planta *in vitro*, solvente de extração e código das amostras.

### **3.6.2 Análises do *Network Annotated Propagation* (NAP)**

As redes moleculares foram analisadas usando-se o *Network Annotated Propagation* (NAP). Foram selecionadas as 10 primeiras estruturas dos candidatos para a anotação dos nós vizinhos com uso dos algoritmos de ranqueamento *Fusion* e *Consensus*. As estruturas selecionadas apresentaram acurácia de 5 ppm e os valores de cosseno foram definidos acima 0,65. Os bancos de dados selecionados foram: GNPS, SUPNAT, NPAtlas, KEGG, CHEBI. As classes de compostos foram selecionadas para “Flavonoids” na redes moleculares do modo negativo. Os resultados do NAP foram mapeados nas redes moleculares e visualizadas no *software* Cytoscape versão 3.8.2 através do *plugin* Chem Viz 2.

### 3.7 Coleta do material vegetal

As partes aéreas de *L. artemisiifolia* foram coletadas na Reserva Biológica “Prof, José Angelo Rizzo” da Universidade Federal de Goiás, situada no Parque Estadual da Serra Dourada (PESD), que se localiza nos Municípios de Mossâmedes, Cidade de Goiás e Buritis de Goiás. Foram realizadas duas coletas, uma na estação seca que ocorre entre os meses de abril e setembro; e outra na estação chuvosa, entre outubro e março, sendo que ambas as coletas foram no ano de 2016. A espécie foi identificada pelo prof. Dr. Aristônio Magalhães Teles do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás, Unidade de Conservação, PRPPG, sob o número de registro 4253. O projeto de pesquisa foi cadastrado no Sistema Nacional do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen), com o número de cadastro AFCEC88.

### 3.8 Preparação dos extratos

O estudo botânico da espécie *L. artemisiifolia* relata a presença de tricomas glandulares distribuídos no caule e nas folhas, os quais produzem e secretam metabólitos secundários sobre a superfície destes, formando uma camada contínua chamada de exsudado (Trindade, 2013). Para acessar a composição química do exsudado de *L. artemisiifolia*, suas partes aéreas frescas foram submetidas a uma extração rápida com acetato de etila, após a coleta, fornecendo o extrato acetato de etila 1 (EA1), um extrato contendo o conteúdo químico presente na superfície da planta.

Em seguida, para a extração dos metabólitos secundários intracelulares, o material vegetal foi seco em estufa por 24 horas, triturado em moinho de facas e novamente extraído com acetato de etila, fornecendo o extrato acetato de etila 2 (EA2). Depois de seco, à temperatura ambiente, o material foi extraído com etanol 92,8° INPM obtendo-se o extrato etanólico (EE) (figura 4).

Este procedimento foi aplicado às plantas coletadas no período seco (abril-setembro) e chuvoso (outubro-março), e à planta obtida por micropropagação *in vitro*. A massa dos extratos e os rendimentos encontram-se na tabela 1. A *L. artemisiifolia in vitro* foi produzida por Moreira (2018), através

de experimentos de micropropagação a partir de sementes de *L. artemisiifolia* coletadas na Serra Dourada, em meio Murashige-Skoog no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFG, sob supervisão do prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov, que forneceu o material vegetal para o estudo químico.

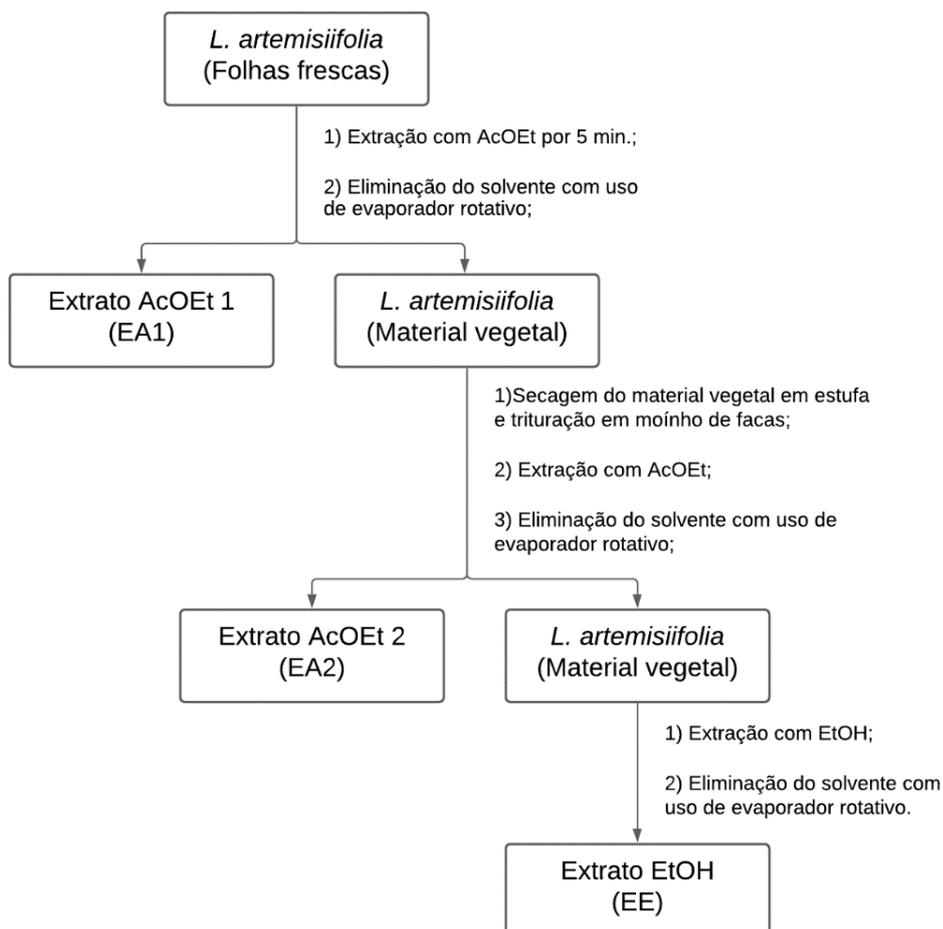


Figura 4. Esquema de preparação dos extratos a partir das partes aéreas de *L. artemisiifolia* das estações seco e chuvoso.

Tabela 1. Massa e rendimento dos extratos das partes aéreas de *L. artemisiifolia*.

Período	Massa de material vegetal fresco	EA1 (Rendimento)	EA2 (Rendimento)	EE (Rendimento)
Seco	200 g	9,02 g (4,51%)	1,44 g (0,72%)	1,13 g (0,56%)
Chuvoso	120 g	12,65 g (10,54%)	1,85 g (1,54%)	1,10 g (0,92%)
<i>In vitro</i>	3,03 g	286,8 mg (9,46%)	61,4 mg (2,03%)	129,1 mg (4,26%)

### 3.8.1 Isolamento de diterpenos labdanos

Uma alíquota do EA1 (período seco) foi submetida a uma coluna cromatográfica de sílica gel 60, usando-se como eluente hexano com um gradiente de acetato de etila (100:0 para 0:100), fornecendo 50 frações. As frações 21 e 25 foram submetidas a outra coluna cromatográfica levando ao isolamento dos compostos acetil-8,15-labdanodiol (**1**) (13,6 mg) e 8,15-labdanodiol (**2**) (3,2 mg) (figura 5).

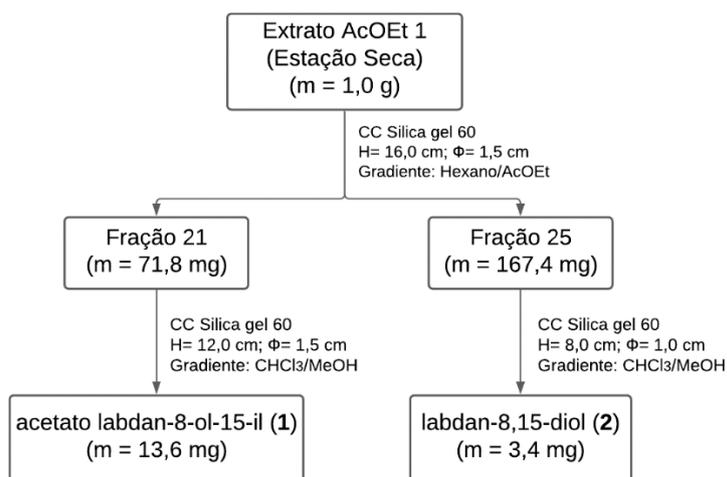


Figura 5. Esquema de isolamento dos compostos 15-acetil-8-hidroxi-labdano (**1**) e 8,15-labdanodiol (**2**) a partir do extrato AcOEt 1.

Uma alíquota do extrato AcOEt 1 da estação chuvosa foi separada e submetida a uma extração com hexano, fornecendo o extrato hexânico. Este foi fracionado por cromatografia em coluna em sílica gel 60 (Hexano/AcOEt, 100:0 a 60:30; CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 100:0 a 50:50). Dentre as frações obtidas, a fração 247-250 (10,03 mg) foi selecionada para uma CCD preparativa (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 90:10), a qual permitiu o isolamento do ácido 8-hidroxi-15-labdanóico (**3**) (1,4 mg) (figura 6).

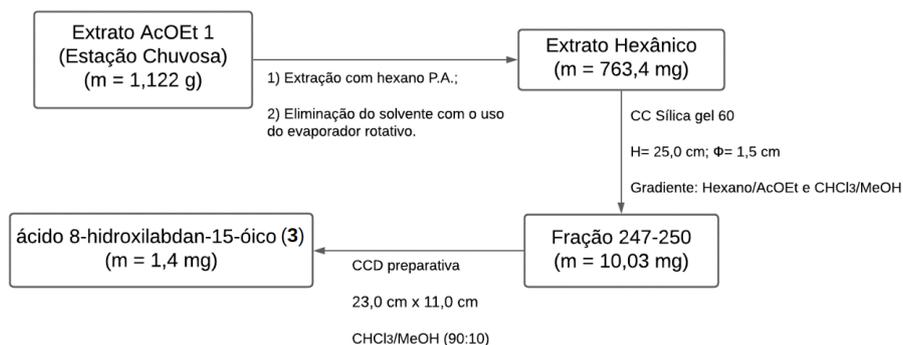


Figura 6. Esquema de isolamento do ácido 8-hidroxi-15-labdanóico (3) a partir do extrato hexânico.

### 3.8.2 Isolamento de flavonas polimetoxiladas

As frações 25 e 27, obtida do fracionamento do extrato AcOEt 1 (estação seca) foram submetidas a outra coluna cromatográfica de sílica gel 60 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 100:0 a 90:10). A partir da fração 25, as subfrações reunidas de 12-25, foram purificadas através cromatografia em camada delgada preparativa, usando-se como eluente CHCl<sub>3</sub>/MeOH (98:2), permitindo o isolamento da crisoplenetina (4) (1,3 mg) e paquipodol (5) (1,3 mg). A purificação da fração 27 levou ao isolamento dos compostos quercetagetina-3,5,6,3',4'-pentametil éter (6) (4,8 mg) e oxianina B (7) (2,7 mg) (figura 5).

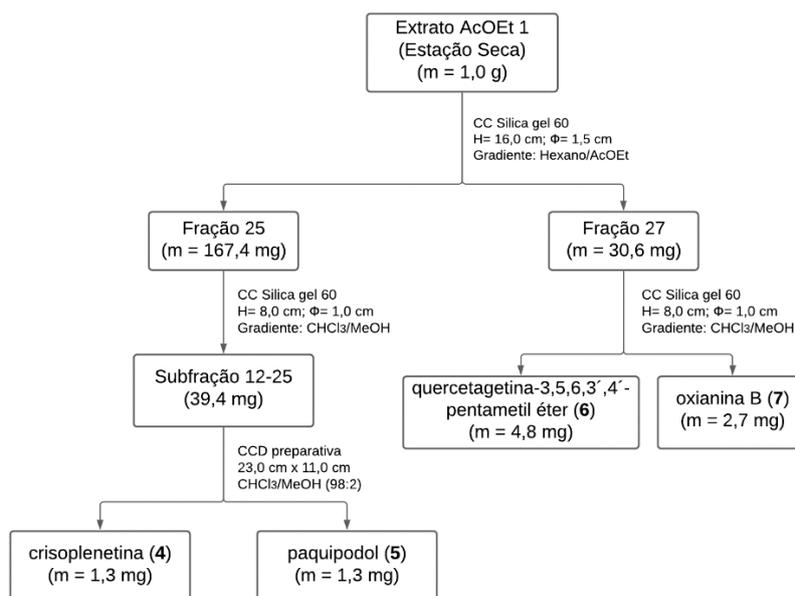


Figura 7. Esquema de isolamento dos compostos 4 – 7 a partir do extrato AcOEt 1.

### 3.9 Atividade nematicida dos extratos de *L. artemisiifolia*

A população de *Pratylenchus brachyurus* foi obtida das raízes de soja, cultivadas em casa de vegetação. A extração do inóculo a partir das raízes seguiu o método de Cooler & D'Herde (1972). As raízes de soja foram picadas em pedaços de aproximadamente 4,0 cm e lavadas em água. Em seguida, foram trituradas em um liquidificador em velocidade média por 30 segundos. A suspensão obtida foi filtrada em peneiras de 100 mesh (0,177 cm) sobre a de 500 mesh (0,025 cm). Adicionou-se caulim ao filtrado, o qual foi centrifugado à 1800 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se uma solução de sacarose 45%, agitou-se e a solução resultante foi centrifugada à 1800 rpm. O sobrenadante foi então vertido em peneira de 500 mesh (0,025 cm) para a retenção de juvenis (J2), que foram coletados em um tubo tipo Falcon. Por fim, o inóculo foi quantificado em câmara de Peters e a solução calibrada para aproximadamente 500 juvenis.mL<sup>-1</sup>, a qual foi usada para o ensaio nematicida *in vitro*.

Os extratos de *L. artemisiifolia* foram submetidos a dois ensaios nematicidas. No primeiro foram testados os extratos acetato 1 (EA1), acetato 2 (EA2) e etanólicos (EE) das estações seca e chuvosa, nas concentrações de 0,0%, 0,025%, 0,05%, 0,1% e 0,2%. No segundo somente foi testado o extrato etanólico da estação chuvosa, nas concentrações de 0,0%, 0,1%, 0,2%, 0,4% e 0,8%. Para uma melhor solubilização adicionou-se 400 µL de uma solução alcóolica (1,25%) aos extratos, que foram submetidos a sonicação em banho de ultrassom por 5 min e agitados com o ultra-turrax (IKA T10 Basic). A solução dos extratos foi adicionada em tubos contendo uma solução de juvenis de *P. brachyurus*, com totalizando 5,0 mL de solução (inóculo e extrato) contendo aproximadamente 100 juvenis.mL<sup>-1</sup>. O ensaio nematicida foi feito em delineamento casualizado com cinco tratamentos e oito repetições. Os nematoides ficaram em contato com os extratos de *L. artemisiifolia* por 24 horas e em seguida fez-se a quantificação de nematoides vivos e mortos usando-se o microscópio óptico (aumento de 40 x) e câmara de Peters.

A distinção dos nematoides mortos e vivos foi feita seguindo-se a metodologia de Jatala (1975). Esta metodologia utiliza uma solução de KMnO<sub>4</sub>

(0,25%) que penetra nos nematoides mortos, colorindo o seu interior, diferenciando-os dos vivos nos quais a solução não atravessa a sua cutícula e se mantém transparentes. A figura 8 mostra as etapas descritas acima.

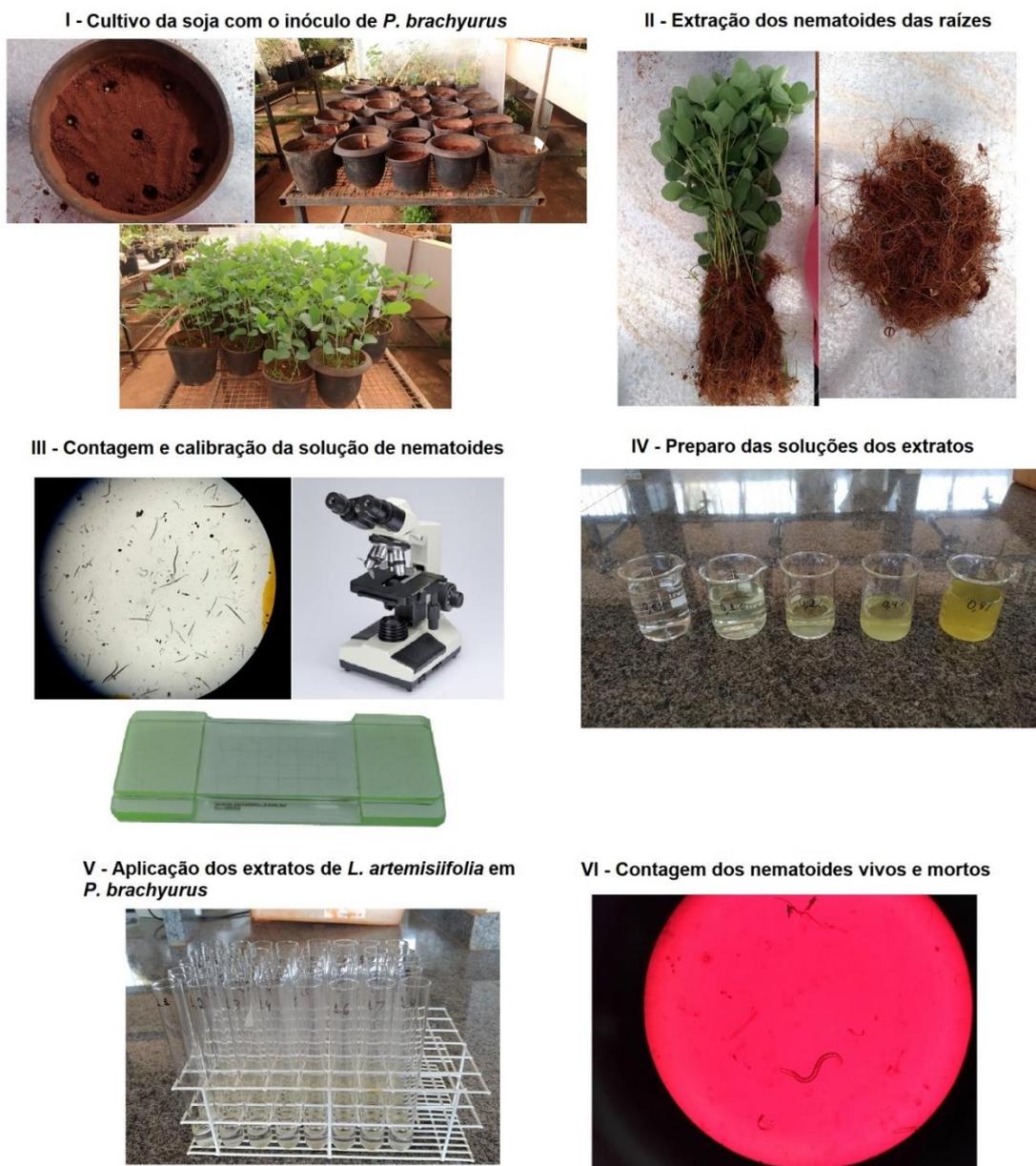


Figura 8. Etapas realizadas no ensaio nematocida: I – Cultivo do inóculo de *P. brachyurus* em soja; II – Extração dos nematoides das raízes pelo método de Cooler & D’Herde (1972); III – Contagem dos nematoides utilizando câmara de Peters e microscópio; IV – Soluções dos extratos de *L. artemisiifolia*; V – Aplicação das soluções em tubos de ensaio contendo *P. brachyurus* ( $100 \text{ juvenis.mL}^{-1}$ ) e VI – Contagem dos nematoides usando-se solução de  $\text{KMnO}_4$  (0,5%) para identificação dos nematoides mortos (Jatala, 1975). Fonte: autoria própria.

### 3.10 Análise quimiométrica dos dados de CLAE-IES-EM

Os dados de CLAE-IES-EM de todos os extratos foram analisados estatisticamente de forma a observar o agrupamento dos extratos com o perfil químico similar. As análises quimiométricas foram realizadas em colaboração com o prof. Dr. Luiz Henrique Keng Queiroz Júnior do Laboratório de Ciências de Dados e Quimioinformática (LaCiQ) da UFG. Inicialmente foi feita a conversão dos dados de CLAE-IES-EM para o formato .mzXML e em seguida os dados foram inseridos no programa RStudio Versão 1.1.456 (R Core Team, 2020), onde foi desenvolvido um algoritmo computacional para o tratamento dos dados de CLAE-IES-EM. Nesta rotina, os dados da amostra foram cruzados com o branco, removendo-se os sinais de relação massa-carga ( $m/z$ ) em comum. A tabela resultante contendo as informações íons precursores (tipo de extrato, estação de coleta ou planta *in vitro*,  $m/z$  e intensidade do sinal), foi exportada como uma matriz de dados em um arquivo .csv e carregada na plataforma MetaboAnalyst versão 4.0 (Chong et al, 2018). Os dados foram escalonados pelo centramento na média (figura 155 do apêndice C). Em seguida a matriz de dados foi analisada por agrupamento hierárquico de clusters (HCA), usando o método Ward, análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Nesta última, foram gerados os escores das variáveis importantes na projeção (VIP).

### 3.11 Análise estatística do ensaio nematocida

Nos ensaios de atividade nematocida os dados foram tratados estatisticamente buscando-se alcançar uma distribuição normal e homogeneidade das variâncias. Quando isso não foi possível, os dados foram transformados usando-se o método de Box & Cox (1964) através do *software* Past 4.01 (Hammer et al, 2001). Em seguida, foi feita a análise de variância (ANOVA), em que as médias foram submetidas ao teste de regressão ao nível de 5% de probabilidade, com uso do *software* Sisvar 5.7 (Ferreira, 2011). Os gráficos de mortalidade média dos nematoides em função da concentração do extrato, ambos em porcentagem, foram construídos no *software* Microsoft Excel 2019.

# **Resultados e discussão**

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos isolados foram analisados por cromatografia em camada delgada analítica, usando-se como reveladores a luz UV (254 nm) e o revelador anisaldeído para verificação de sua pureza e indicação das classes de metabólitos especializados. Os compostos **1 – 3** foram isolados na forma de um óleo incolor apresentando coloração roxa na análise de CCD com revelador anisaldeído, característico da classe de terpenoides (Thomas & Paris, 2010; Buffon, 2005). Já os compostos **4 – 7**, quando analisados por CCD apresentaram absorção na luz UV em 254 nm, característico da classe de flavonoides (Mabry et al, 1970; Ferreira, 2018) (figura 9).

A elucidação estrutural foi realizada por análises de RMN de  $^1\text{H}$  e experimentos de NOE 1D, HSQC, HMBC e também espectrometria de massas por ionização de *eletrospray* (IES-EM), além da comparação destes dados com a literatura. O estudo químico das partes aéreas de *L. artemisiifolia* levou ao isolamento e elucidação estrutural de sete compostos: acetato labdan-8-ol-15-il (**1**), labdan-8,15-diol (**2**), ácido 8-hidroxiabdan-15-óico (**3**), crisoplenetina (**4**), paquipodol (**5**), quercetagetina-3,5,6,3',4'-pentametil éter (**6**) e oxianina B (**7**) (figura 10). Estes compostos são descritos pela primeira vez nesta espécie e no gênero *Lomatozona*.

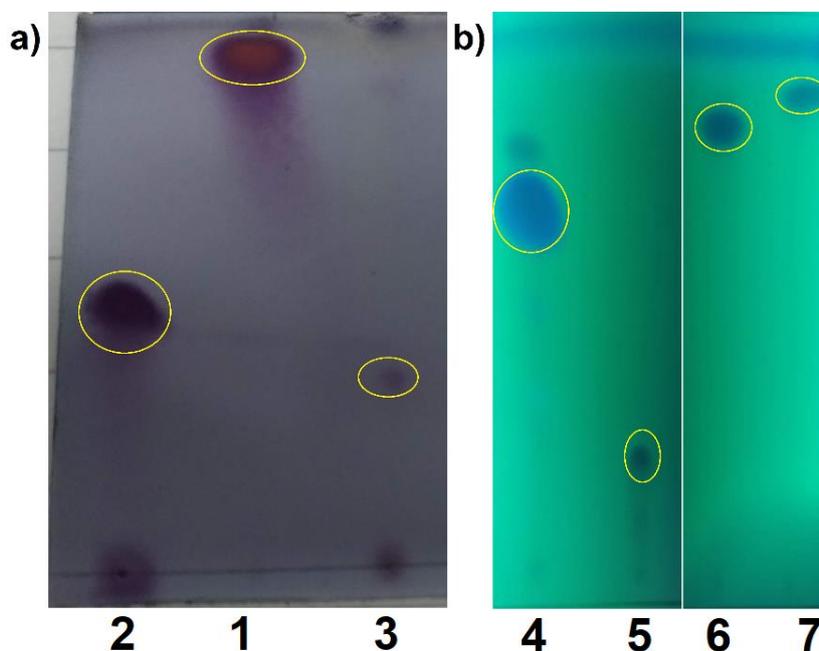


Figura 9. CCD dos compostos isolados de *L. artemisiifolia* no sistema eluente  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (96:4), destacados em amarelo: a) Compostos **2**, **1** e **3** revelados com anisaldeído; b) Compostos **4**, **5**, **6** e **7** na luz UV em 254 nm.

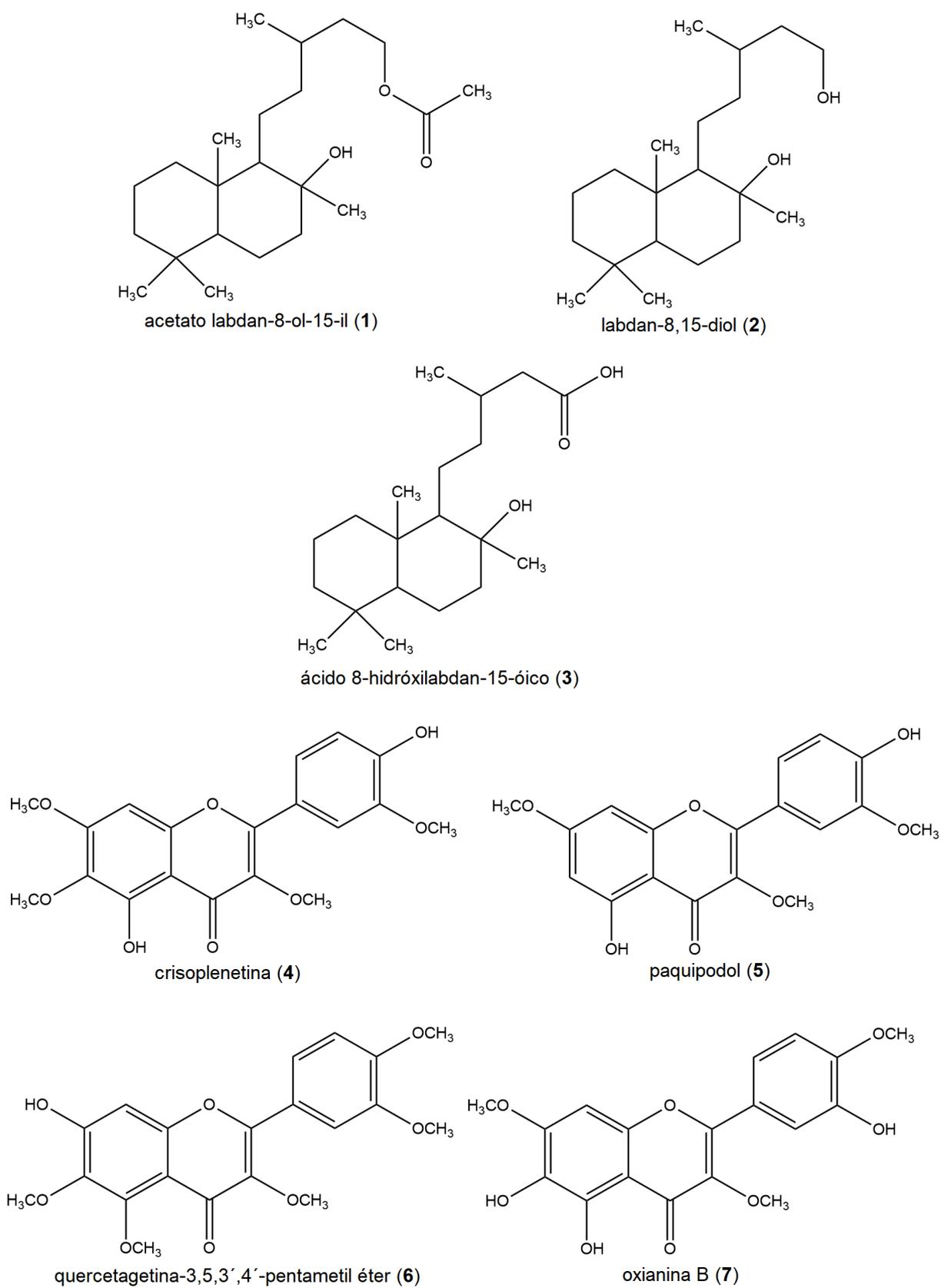
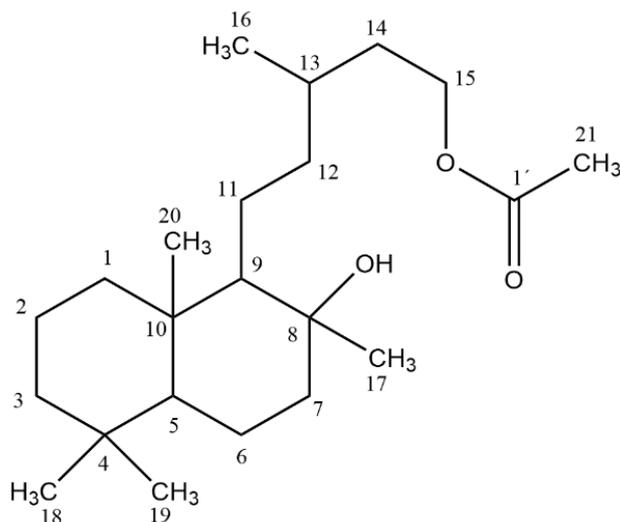


Figura 10. Estrutura química dos compostos isolados das partes aéreas de *L. artemisiifolia*.

#### 4.1.1 – Acetato labdan-8-ol-15-il (1)



O composto **1** foi isolado na forma de óleo incolor da fração 21 do extrato acetato 1, solúvel em clorofórmio. A análise de IES-EM mostrou o íon molecular com aduto de sódio  $m/z$  375,28650  $[M + Na]^+$  com erro de -1,24, compatível com a fórmula molecular  $C_{22}H_{40}O_3Na^+$  (figura 11).

No espectro de RMN de  $^{13}C$  observou-se um total de 22 carbonos, os quais em conjunto com os experimentos de HSQC e HMBC permitiram a sua atribuição à seis carbonos metílicos, nove carbonos metilenos, três carbonos metínicos e três carbonos não hidrogenados. Observou-se que três deles são carbonos oxigenados (C-8, C-15 e C-1').

O espectro de RMN de  $^1H$  do composto **1** indicou a presença de três grupos metilas angulares com sinais em  $\delta_H$  0,78 (s, 6H, H-19 e H-20) e 0,86 (s, 3H, H-18), um grupo metila ligado a um carbono terciário oxigenado com deslocamento químico em  $\delta_H$  1,13 (s, 3H, H-17), um grupo metila ligado a uma cadeia alifática em  $\delta_H$  0,89 (d,  $J = 6,50$  Hz, 3H, H-13) e um grupo metila característico do grupo acetato em  $\delta_H$  2,03 (s, 3H, H-21)(figura 12).

LKVLA09\_pos\_frag375\_55nce #35 RT: 0.16 AV: 1 NL: 2.75E5  
T: FTMS + p ESI Full ms2 375.3000@hcd55.00 [50.0000-385.0000]

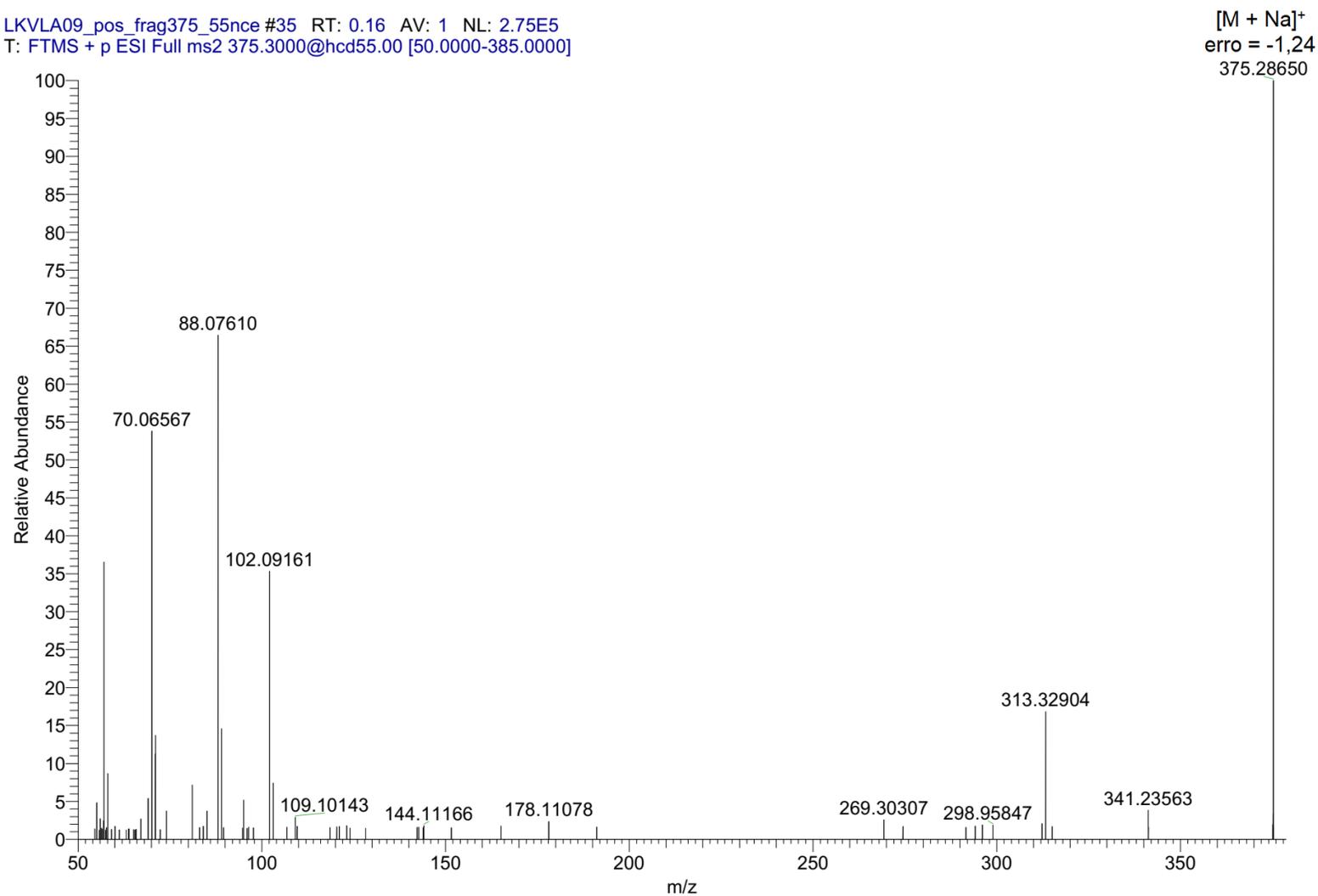


Figura 11. Espectro de IES-EM do composto 1.

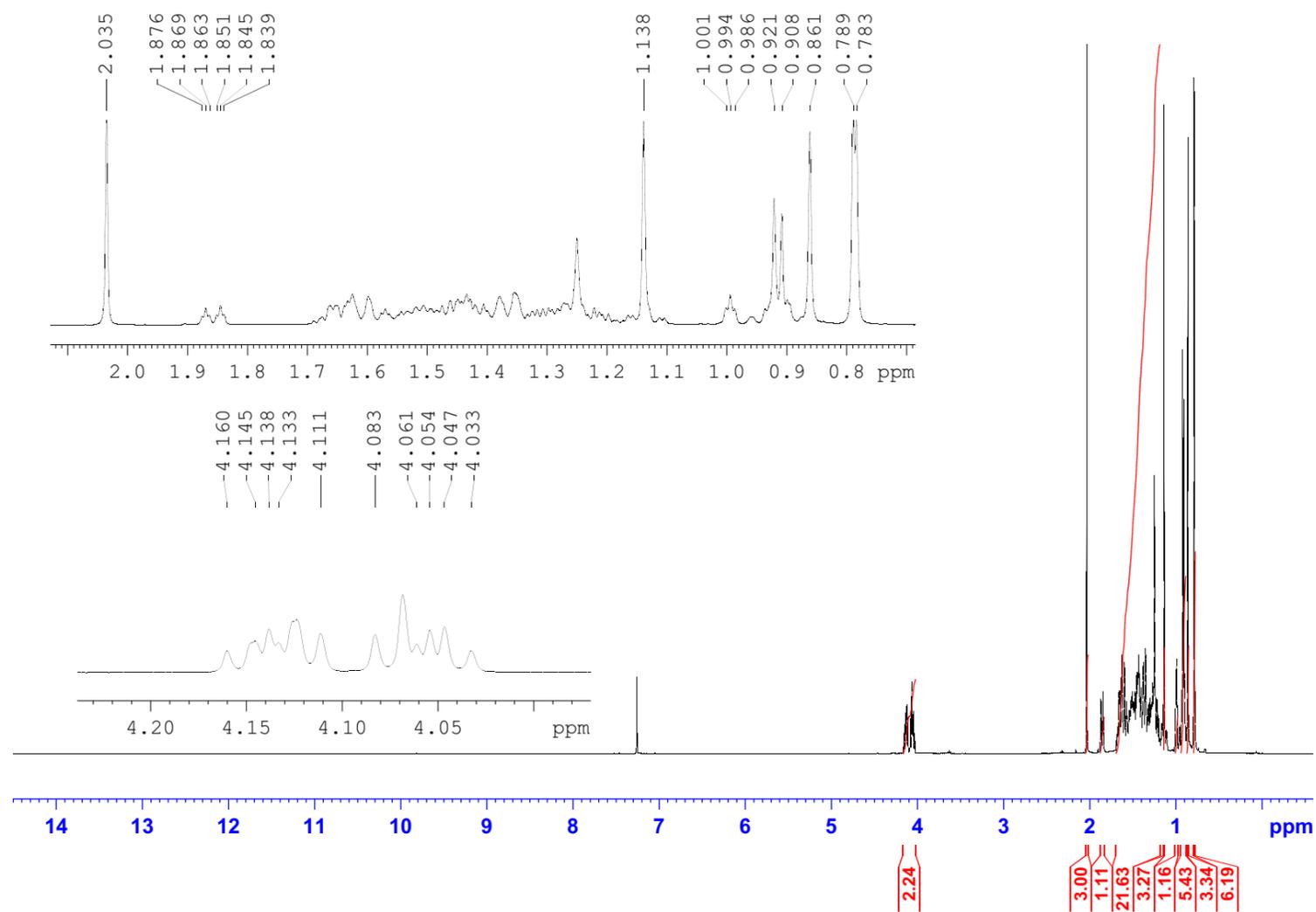


Figura 12. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **1** com expansão das regiões entre 4,20 - 4,00 ppm e 2,10 - 0,70 ppm.

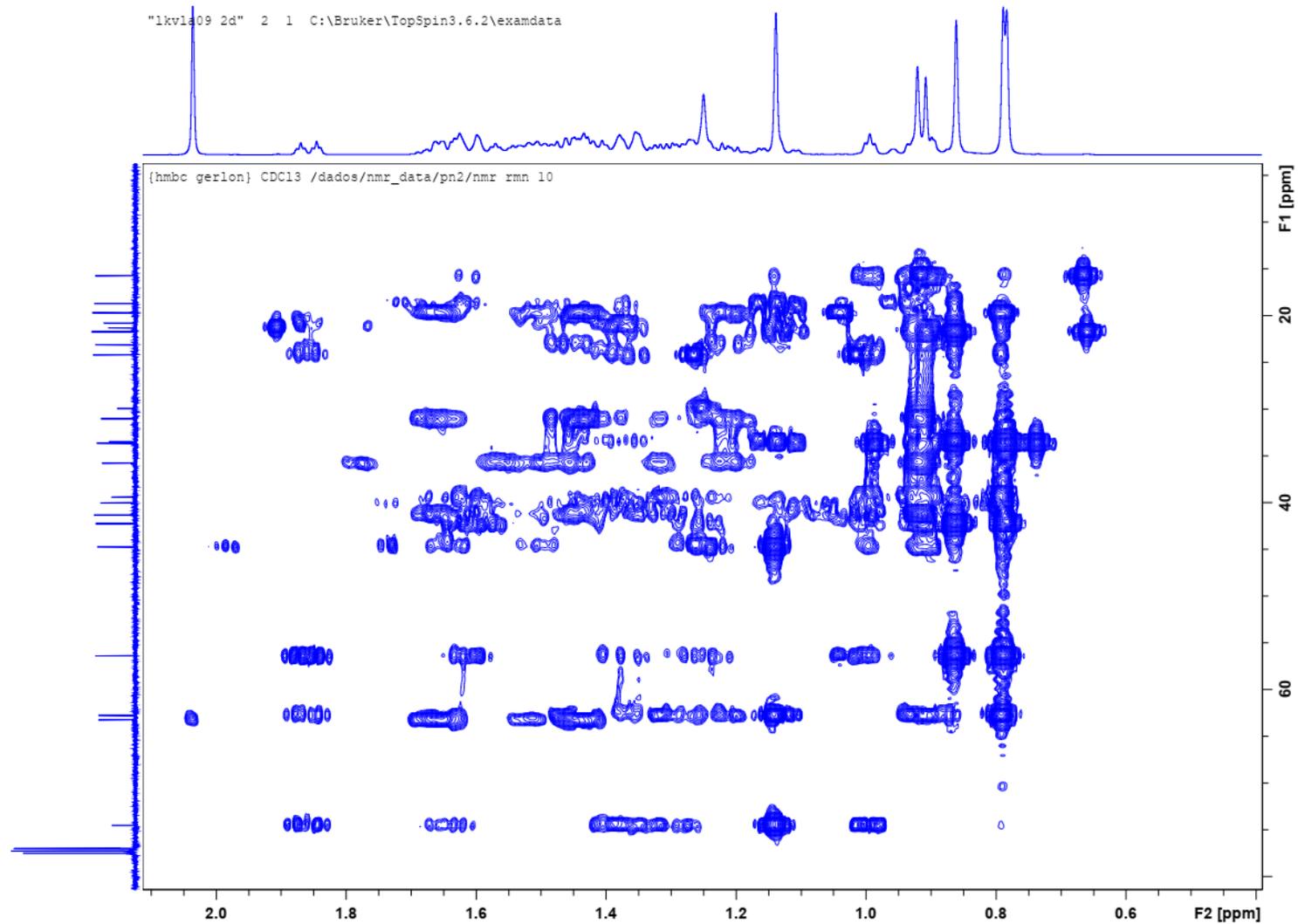


Figura 13. Experimento de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) do composto **1** com expansão de 10,0 – 70,0 ppm em F1 e 0,70 – 1,90 ppm em F2.

Foram observadas correlações no experimento de HMBC das metilas em  $\delta_H$  0,78 (s, 6H, H-19) e  $\delta_H$  0,86 (s, 3H, H-18) com os carbonos C-3 ( $\delta_C$  42,2) e C-5 ( $\delta_C$  56,3), e também da metila em  $\delta_H$  0,78 (s, 6H, H-20) com os carbonos em  $\delta_C$  56,3 (C-5) e  $\delta_C$  62,7 (C-9), caracterizando o sistema de um anel decalino, comum à estrutura de diterpenos labdanos. O composto **1** também apresenta vários multipletos em  $\delta_H$  1,33 (m, 2H, H-11),  $\delta_H$  1,43 -1,19 (m, 2H, H-12),  $\delta_H$  1,64 - 1,43 (m, 2H, H-14) e  $\delta_H$  4,09 (m, 2H, H-15), atribuídos a uma cadeia lateral alifática ligada ao anel decalino. Isso pode ser confirmado através da correlação dos hidrogênios em  $\delta_H$  0,99 (m, 1H, H-9) e  $\delta_H$  1,33 (m, 2H, H-11) com os carbonos C-11 ( $\delta_C$  23,0) e C-9 ( $\delta_C$  62,7), respectivamente. Além disso observou-se a correlação dos hidrogênios metilênicos  $\delta_H$  4,09 (m, 2H, H-15) e da metila em  $\delta_H$  2,03 (s, 3H, H-21) com a carbonila em  $\delta_C$  171,5 (C-1'), indicando a presença de um grupamento acetato na extremidade da cadeia alifática (figura 13).

Os dados espectroscópicos são compatíveis com a estrutura química do diterpeno labdano acetato labdan-8-ol-15-il (figura 14; tabela 2) (Urones et al, 1992). Os espectros das análises de RMN uni- e bidimensionais deste composto se encontram nas figuras 77 – 84 do apêndice A.

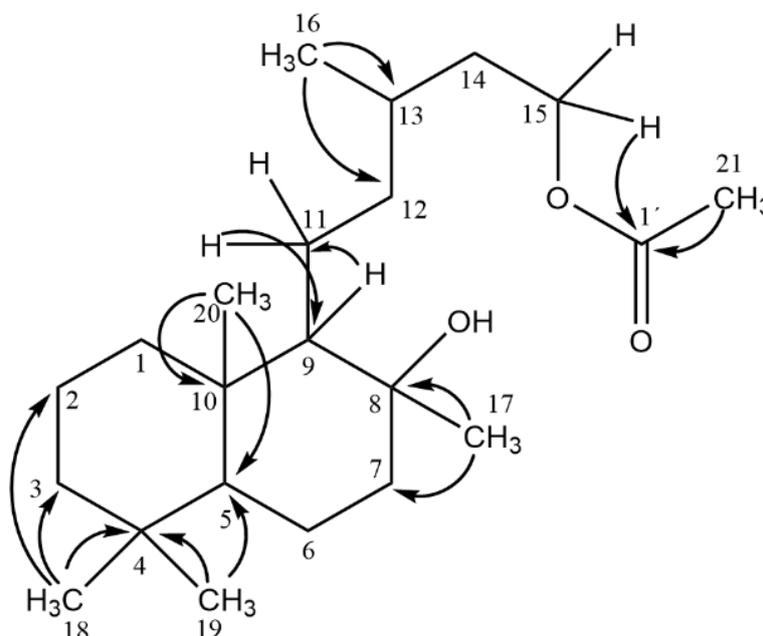
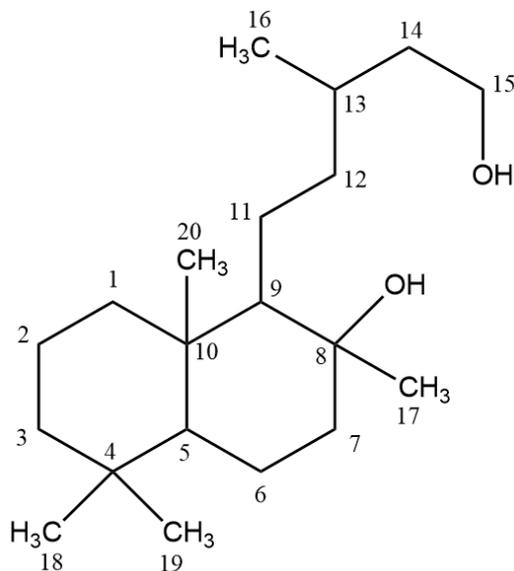


Figura 14. Correlações observadas no experimento de HMBC do composto **1**.

Tabela 2. Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz),  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) e HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) do composto **1** e comparação com a literatura.

Composto <b>1</b>				Referência (Urones et al, 1992) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)	
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HMBC	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	1,59 – 0,93 ( <i>m</i> , 2H)	39,4		-	39,93
2	1,57 – 1,41 ( <i>m</i> , 2H)	18,7		-	18,53
3	1,35 – 1,11 ( <i>m</i> , 2H)	42,2		-	42,12
4	-	33,4		-	33,29
5	0,89 ( <i>m</i> , 1H)	56,3		-	56,27
6	1,62 – 1,43 ( <i>m</i> , 2H)	20,7		-	20,63
7	1,85 – 1,36 ( <i>dt</i> , 12,3 e 3,2 Hz, 2H)	44,7		-	39,33
8	-	74,5		-	74,20
9	0,99 ( <i>tl</i> , $J = 3,8$ Hz, 1H)	62,7	C-11	-	62,54
10	-	39,4		-	39,24
11	1,33 ( <i>m</i> , 2H)	23,0	C-9	-	22,89
12	1,43 – 1,19 ( <i>m</i> , 2H)	41,3	C-11; C-13	-	44,85
13	1,48 ( <i>m</i> , 1H)	30,9	C-14; C-16	-	30,90
14	1,64 – 1,43 ( <i>m</i> , 2H)	35,7		-	35,62
15	4,09 ( <i>m</i> , 2H)	63,2	C-13; C-14; C-1'	4,08 ( <i>m</i> , 2H)	62,99
16	0,91 ( <i>d</i> , 6,5 Hz, 3H)	19,7	C-12	0,89 ( <i>d</i> , 6,5 Hz, 3H)	19,54
17	1,13 ( <i>s</i> , 3H)	24,2	C-7; C-8	1,09 ( <i>s</i> , 3H)	24,07
18	0,86 ( <i>s</i> , 3H)	33,4	C-3; C-4; C-5	0,82 ( <i>s</i> , 3H)	33,45
19	0,78 ( <i>s</i> , 6H)	21,7	C-3; C-4; C-5	0,75 ( <i>s</i> , 6H)	21,53
20		15,7	C-5; C-9; C-10		15,50
21	2,03 ( <i>s</i> , 3H)	21,7	C-15; C-1'	2,00 ( <i>s</i> , 3H)	20,98
1'	-	171,5		-	171,08

#### 4.1.2 – Labdan-8,15-diol (2)



O composto **2** foi isolado como um óleo incolor com solubilidade em clorofórmio. O espectro de massas obtido por IES-EM no modo negativo mostrou o íon desprotonado  $m/z$  309,28030  $[M - H]^-$  com erro de +1,28 compatível com a fórmula molecular  $C_{20}H_{37}O_2^-$  (figura 15).

O espectro de RMN de  $^1H$  do composto **2** mostrou sinais muito similares ao do composto **1**, com exceção do sinal da metila do grupo acetato. Foram observados sinais referentes aos grupos metílicos em  $\delta_H$  1,14 (s, 3H, H-17),  $\delta_H$  0,86 (s, 3H, H-18),  $\delta_H$  0,79 (s, 6H, H-19 e H-20) típico do anel decalino observado no composto **1**. Além disso notou-se o sinal de uma metila em  $\delta_H$  0,91 (*d*,  $J = 6,4$  Hz, 3H, H-16) ligada a cadeia alifática. O deslocamento químico dos hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  3,62 – 3,72 (*m*, 2H, H-15) indica a presença de grupo hidroxila ligado a esta cadeia (figura 16).

O experimento de HMBC permitiu confirmar a estrutura de um diterpeno labdano, através das correlações dos hidrogênios em  $\delta_H$  1,40 (*m*, 2H, H-12) com o carbono C-9 ( $\delta_C$  62,3) e dos hidrogênios em  $\delta_H$  1,00 (*t*,  $J = 3,7$  Hz, 1H, H-9) com os carbonos, C-7 ( $\delta_C$  44,2), C-8 ( $\delta_C$  74,3), C-12 ( $\delta_C$  40,9) e C-17 ( $\delta_C$  24,0) (figuras 17 e 18).

VLAO3\_NCE55\_020819 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 3.38E6  
T: FTMS - p ESI Full ms2 309.30@hcd55.00 [50.00-320.00]

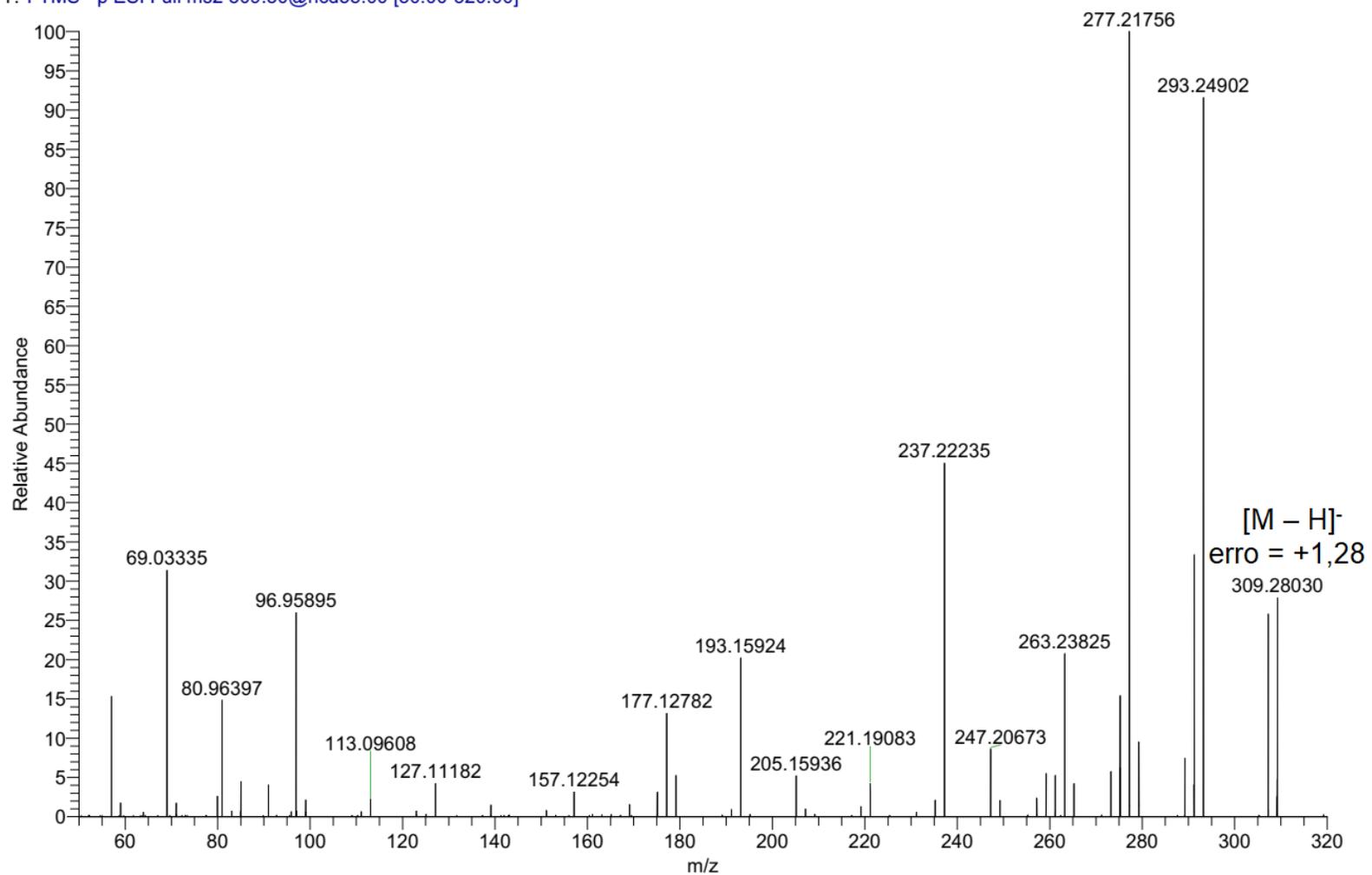


Figura 15. Espectro de IES-EM do composto 2.

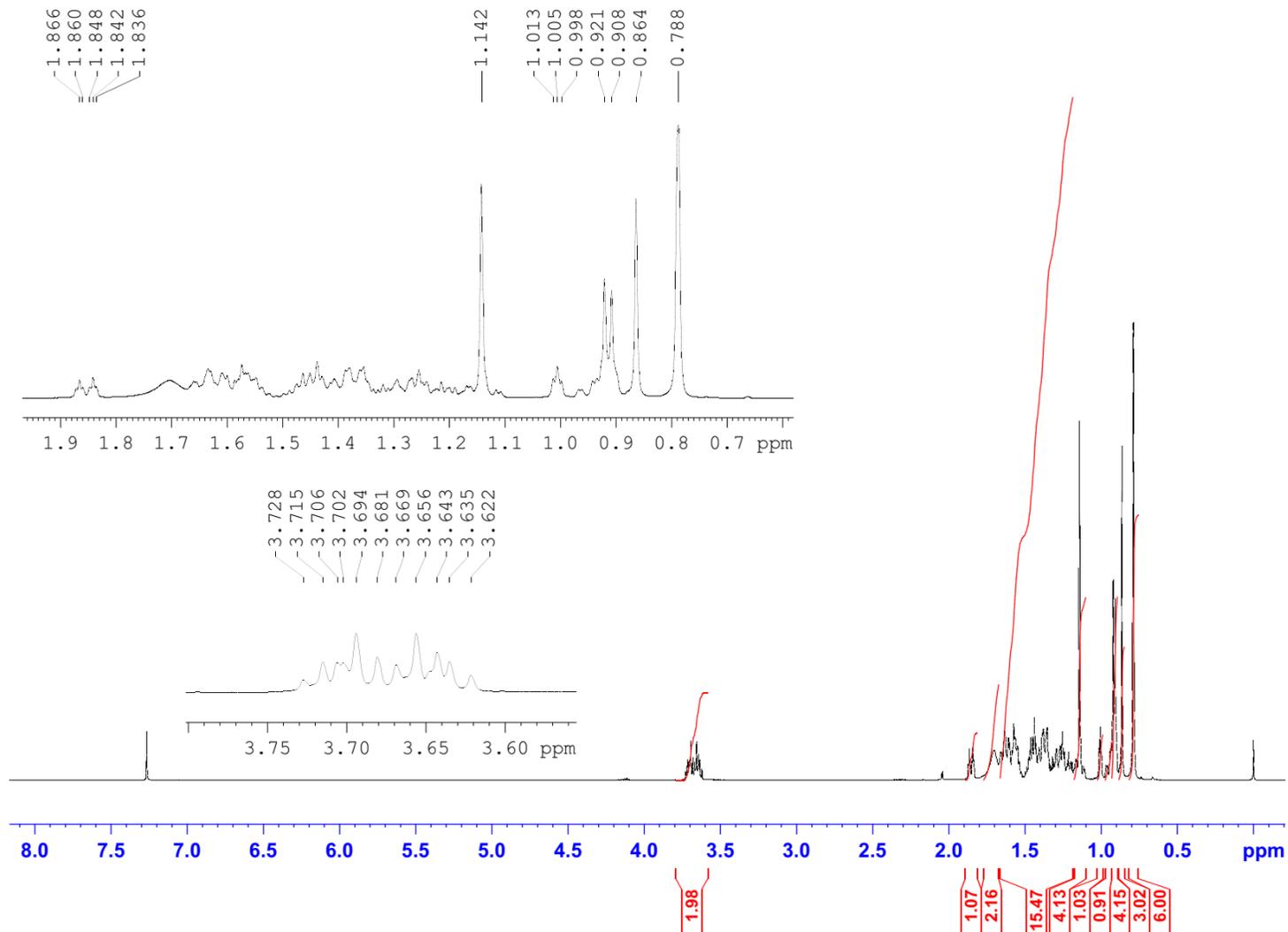


Figura 16. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2** com expansão das regiões entre 3,75 - 3,60 ppm e 2,00 - 0,70 ppm.

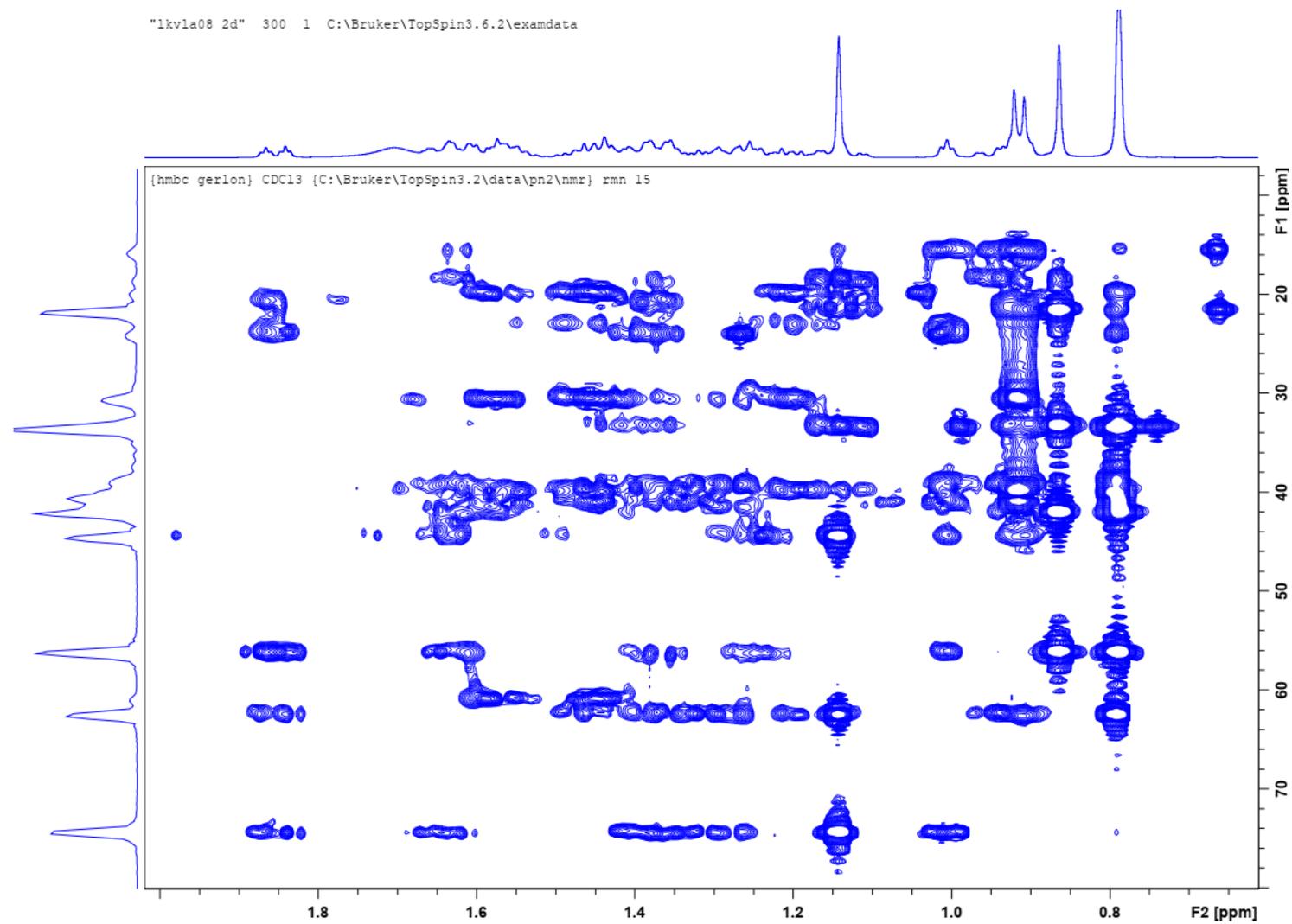


Figura 17. Experimento de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) do composto **2** com expansão da região de 10,0 – 70,0 ppm em F1 e 0,60 – 2,00 ppm em F2.

Através da comparação com a literatura observou-se que os dados espectroscópicos são compatíveis com a estrutura química do diterpeno labdan-8,15-diol (figura 18; tabela 3) (Chacon-Morales et al 2019). Todos os espectros das análises de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC encontram-se nas figuras 85 - 90 do apêndice A.

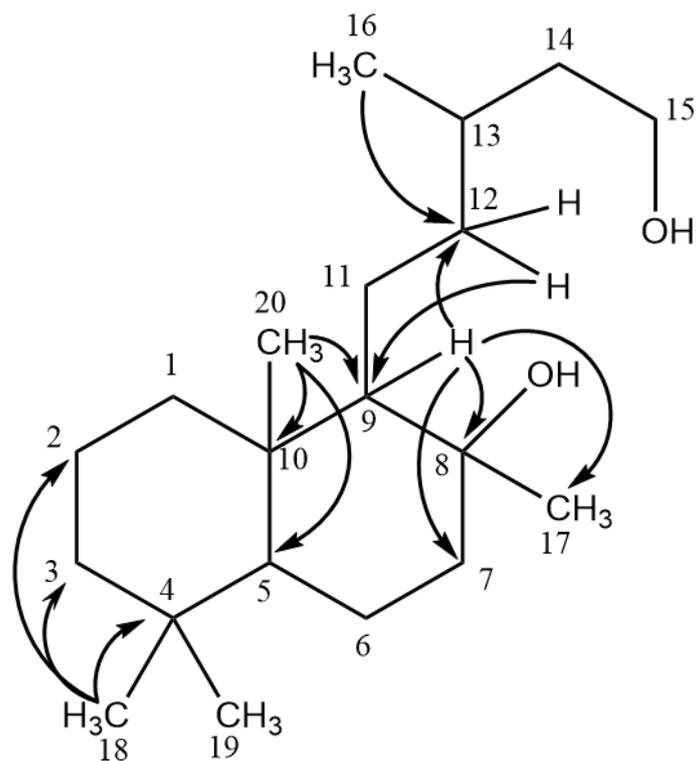
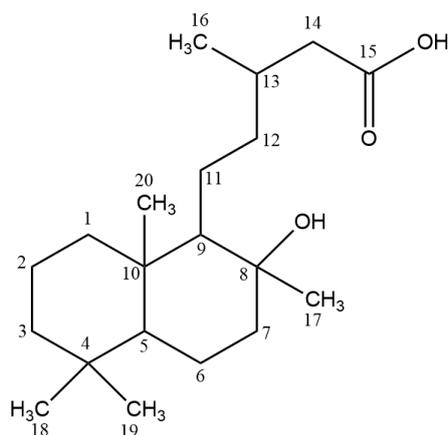


Figura 18. Correlações observadas no experimento de HMBC do composto **2**.

Tabela 3. Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (via HSQC) e HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) do composto **2** e comparação com a literatura.

Composto <b>2</b>				Referência (Chacon-Morales et al 2019) ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)	
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HMBC	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	1,60 – 0,93 ( <i>m</i> , 2H)	39,7		-	39,8
2	1,58 – 1,42 ( <i>m</i> , 2H)	18,3		-	18,5
3	1,37 – 1,14 ( <i>m</i> , 2H)	42,1		-	42,1
4	-	33,5		-	33,4
5	0,91 ( <i>m</i> , 1H)	56,3	C-10; C-20	-	56,2
6	1,64 – 1,25 ( <i>m</i> , 2H)	20,3		-	20,6
7	1,85 – 1,38 ( <i>dt</i> , $J = 3,0$ Hz, 2H)	44,2	C-6; C-8; C-9; C-17	1,84 ( <i>dt</i> , $J = 12,0$ e 3,1 Hz, 2H)	44,7
8	-	74,3		-	74,6
9	1,00 ( <i>t</i> , $J = 3,7$ Hz, 1H)	62,3	C-6; C-7; C-8; C-12	0,99 ( <i>t</i> , $J = 3,1$ Hz, 1H)	62,5
10	-	39,4		-	39,2
11	1,38 – 1,29 ( <i>m</i> , 2H)	20,6		-	23,1
12	1,40 ( <i>m</i> , 2H)	40,9	C-9	-	41,1
13	1,55 ( <i>m</i> , 1H)	30,5		-	30,6
14	1,60 ( <i>m</i> , 2H)	39,7	C-15	-	39,8
15	3,62 – 3,72 ( <i>m</i> , 2H)	60,8	C-13; C-14	3,65 ( <i>m</i> , 2H)	60,8
16	0,91 ( <i>d</i> , $J = 6,4$ Hz, 3H)	20,0	C-12	0,89 ( <i>d</i> , $J = 6,3$ Hz, 3H)	20,0
17	1,14 ( <i>s</i> , 3H)	24,0		1,12 ( <i>s</i> , 3H)	24,0
18	0,86 ( <i>s</i> , 3H)	33,6	C-2; C-3; C-4	0,85 ( <i>s</i> , 3H)	33,5
19	0,78 ( <i>s</i> , 6H)	21,3		0,77 ( <i>s</i> , 6H)	21,6
20		15,5	C-5; C-9; C-10		15,5

#### 4.1.3 – Ácido 8-hidroxilabdan-15-óico (3)



O composto **3** foi isolado da fração 247-250 do extrato hexânico na forma de óleo incolor solúvel em clorofórmio. Na análise de CCD apresentou coloração roxa com o revelador anisaldeído, característico de terpenoides (Thomas & Paris, 2010; Buffon, 2005).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **3** apresentou sinais de grupos metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  0,99 (*d*,  $J = 6,6$  Hz, 3H, H-16),  $\delta_{\text{H}}$  1,15 (*s*, 3H, H-17),  $\delta_{\text{H}}$  0,86 (*s*, 3H, H-18) e  $\delta_{\text{H}}$  0,78 (*s*, 6H, H-19 e H-20). Estes, em conjunto com os sinais de multipletos, característicos de hidrogênios metilênicos, verificados em  $\delta_{\text{H}}$  1,60 – 0,93 (*m*, 2H),  $\delta_{\text{H}}$  1,36 – 1,00 (*m*, 2H),  $\delta_{\text{H}}$  0,89 (*m*, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  1,02 (*m*, 1H), caracterizam o mesmo anel decalino observado nos compostos **1** e **2**. Ao contrário destes, não foi observado a presença dos hidrogênios metilênicos H-15 com deslocamento químico entre  $\delta_{\text{H}}$  4,00 – 3,00 ppm, mas sim dois duplos dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,35 (*dd*,  $J = 14,7$  e 6,1 Hz, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  2,21 (*dd*,  $J = 14,7$  e 7,6 Hz, 1H), referentes aos hidrogênios H-14. A constante de  $J = 14,7$  Hz indica o acoplamento geminal dos hidrogênios H-14 entre si, enquanto as de  $J = 7,6$  e 6,1 Hz indicam o acoplamento com o hidrogênio H-13. Também foram observados sinais que indicam a presença da cadeia alifática de diterpenos labdanos em  $\delta_{\text{H}}$  1,41 – 1,25 (*m*, 2H, H-11),  $\delta_{\text{H}}$  1,39 (*m*, 2H, H-12) e  $\delta_{\text{H}}$  1,93 (*m*, 1H, H-13) (figura 19).

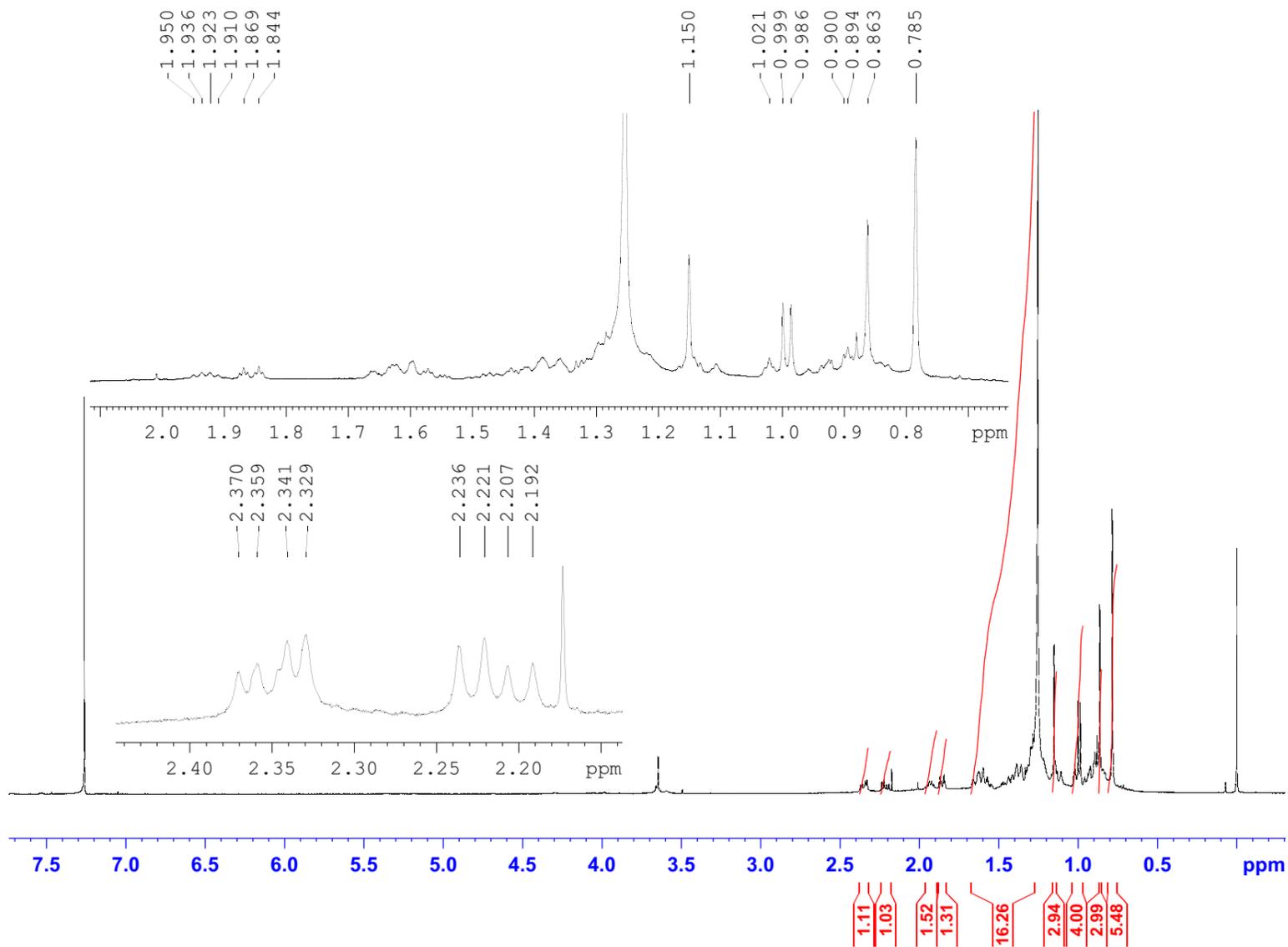


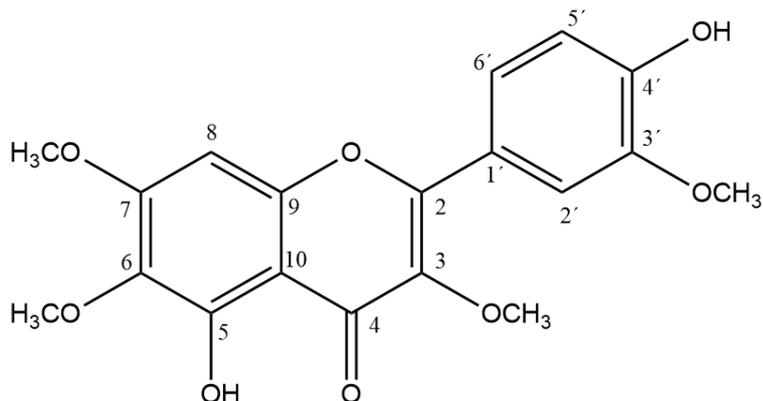
Figura 19. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **3** com expansão das regiões entre 2,40-2,10 ppm e 2,00-0,70 ppm.

O conjunto dos dados espectroscópicos em comparação com a literatura são compatíveis com a estrutura do ácido 8-hidroxiabdan-15-óico (tabela 4) (García-Sánchez et al, 2014). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  deste composto e suas expansões estão nas figuras 91 - 93 do apêndice A.

Tabela 4. Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **3** e comparação com a literatura.

Composto <b>3</b>		Referência (García-Sánchez et al, 2014) ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)
1	1,60 – 0,93 ( <i>m</i> , 2H)	1,60 – 0,93 ( <i>m</i> , 2H)
2	1,57 – 1,41 ( <i>m</i> , 2H)	1,58 – 1,42 ( <i>m</i> , 2H)
3	1,36 – 1,00 ( <i>m</i> , 2H)	1,35 – 1,13 ( <i>m</i> , 2H)
4	-	-
5	0,89 ( <i>m</i> , 1H)	0,91 ( <i>m</i> , 1H)
6	1,64 – 1,26 ( <i>m</i> , 2H)	1,64 – 1,25 ( <i>m</i> , 2H)
7	1,85 ( <i>dt</i> , $J = 12,3$ e $3,0$ Hz, 1H); 1,36 ( <i>m</i> , 1H)	1,85 ( <i>dt</i> , $J = 12,2$ e $2,9$ Hz); 1,35 ( <i>m</i> , 1H)
8	-	-
9	1,02 ( <i>m</i> , 1H)	1,03 ( <i>m</i> , 1H)
10	-	-
11	1,41 – 1,25 ( <i>m</i> , 2H)	1,42 – 1,24 ( <i>m</i> , 2H)
12	1,39 ( <i>m</i> , 2H)	1,40 ( <i>m</i> , 2H)
13	1,93 ( <i>m</i> , 1H)	1,97 ( <i>m</i> , 1H)
14	2,35 ( <i>dd</i> , $J = 14,7$ e $6,1$ Hz, 1H); 2,21 ( <i>dd</i> , $J = 14,7$ e $7,6$ Hz, 1H)	2,39 ( <i>m</i> , $J = 14,7$ e $6,4$ Hz, 1H); 2,13 ( <i>m</i> , $J = 14,7$ e $7,6$ Hz, 1H)
15	-	-
16	0,99 ( <i>d</i> , $J = 6,6$ Hz, 3H)	0,98 ( <i>d</i> , $J = 6,5$ Hz, 3H)
17	1,15 ( <i>s</i> , 3H)	1,15 ( <i>s</i> , 3H)
18	0,86 ( <i>s</i> , 3H)	0,86 ( <i>s</i> , 3H)
19	0,78 ( <i>s</i> , 6H)	0,78 ( <i>s</i> , 3H)
20		0,76 ( <i>s</i> , 3H)

#### 4.1.4 – 4',5-dihidroxi-3,3',6,7-tetrametoxiflavona (crisoplenetina) (4)



O composto **4** foi isolado na forma de um sólido de cor amarela com solubilidade em clorofórmio.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **4**, foram observados sinais que caracterizam a estrutura química de um flavonoide, semelhante à quercetagina-3,5,6,3',4'-pentametil éter, com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{H}}$  7,71 (*d*,  $J = 2,0$  Hz, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  7,66 (*dd*,  $J = 8,4$  e 2,0 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  7,04 (*d*,  $J = 8,4$  Hz, 1H), os quais caracterizam o anel aromático B como sendo trissubstituído. Também foi observado um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,50 (*s*, 1H), característico da posição 8 do anel aromático A, o qual apresenta três grupos substituintes. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  12,60 (*s*, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  5,98 (*s*, 1H), foram atribuídos às duas hidroxilas, sendo a primeira ligada ao anel aromático B na posição 5, como observado para o composto **3** (figura 20). A posição das metoxilas foi atribuída com base nas correlações observadas no mapa de correlação HMBC.

A análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC do composto **4** permitiu a identificação de 16 átomos de carbono, os quais foram atribuídos a doze carbonos de anel aromático com sinais em  $\delta_{\text{C}}$  153,2,  $\delta_{\text{C}}$  133,1,  $\delta_{\text{C}}$  159,5,  $\delta_{\text{C}}$  90,3,  $\delta_{\text{C}}$  152,6,  $\delta_{\text{C}}$  107,1,  $\delta_{\text{C}}$  123,2,  $\delta_{\text{C}}$  111,0,  $\delta_{\text{C}}$  146,5,  $\delta_{\text{C}}$  148,3,  $\delta_{\text{C}}$  114,6,  $\delta_{\text{C}}$  122,8; e quatro carbonos com sinais característicos de metoxila em  $\delta_{\text{C}}$  56,6,  $\delta_{\text{C}}$  60,3,  $\delta_{\text{C}}$  61,2,  $\delta_{\text{C}}$  56,6 (figura 21).

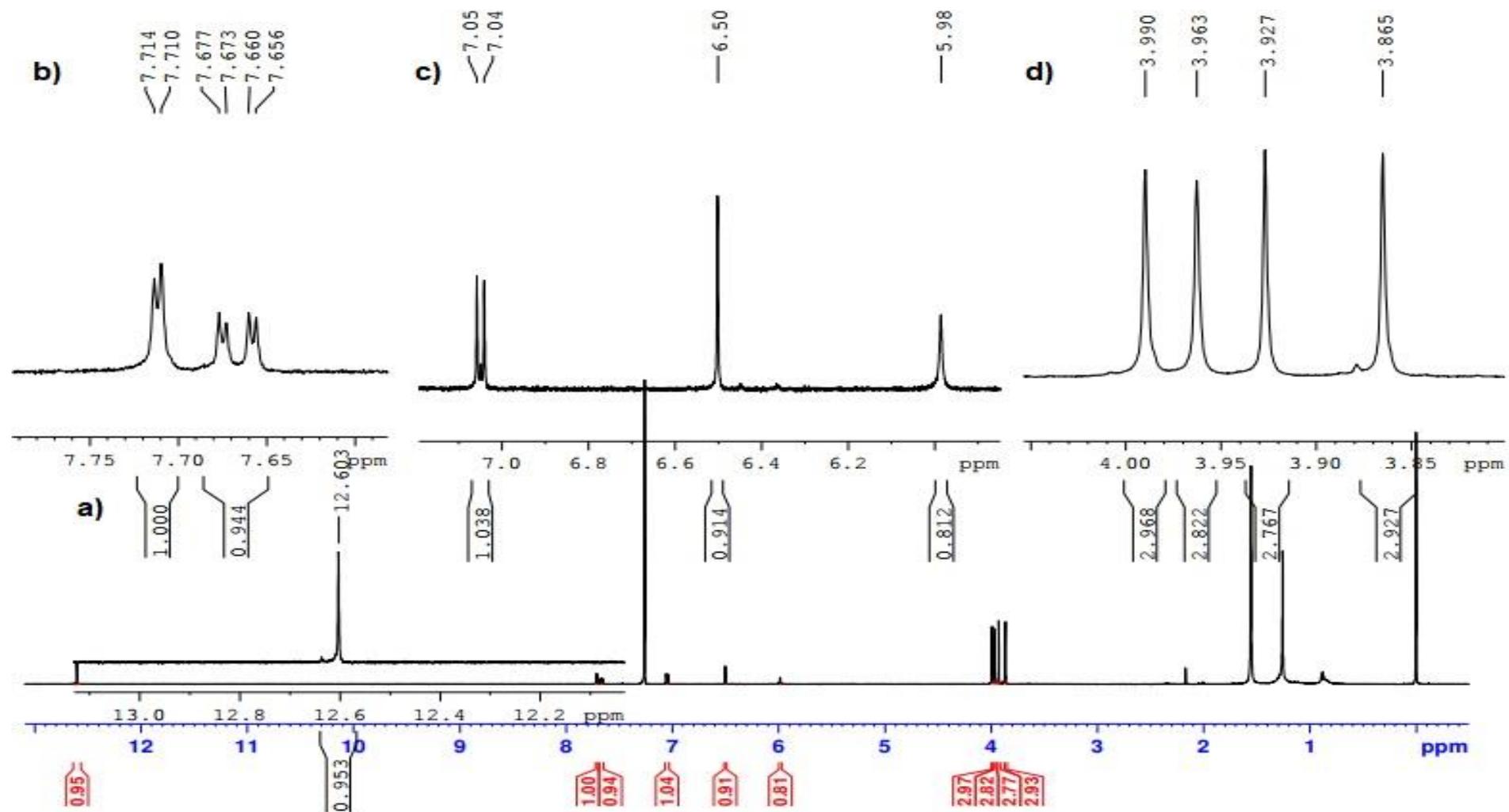


Figura 20. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **4**, com expansões das regiões entre a) 13-12 ppm, b) 7,75- 7,60 ppm, c) 7,0-6,0 ppm e d) 4,00-3,85 ppm.

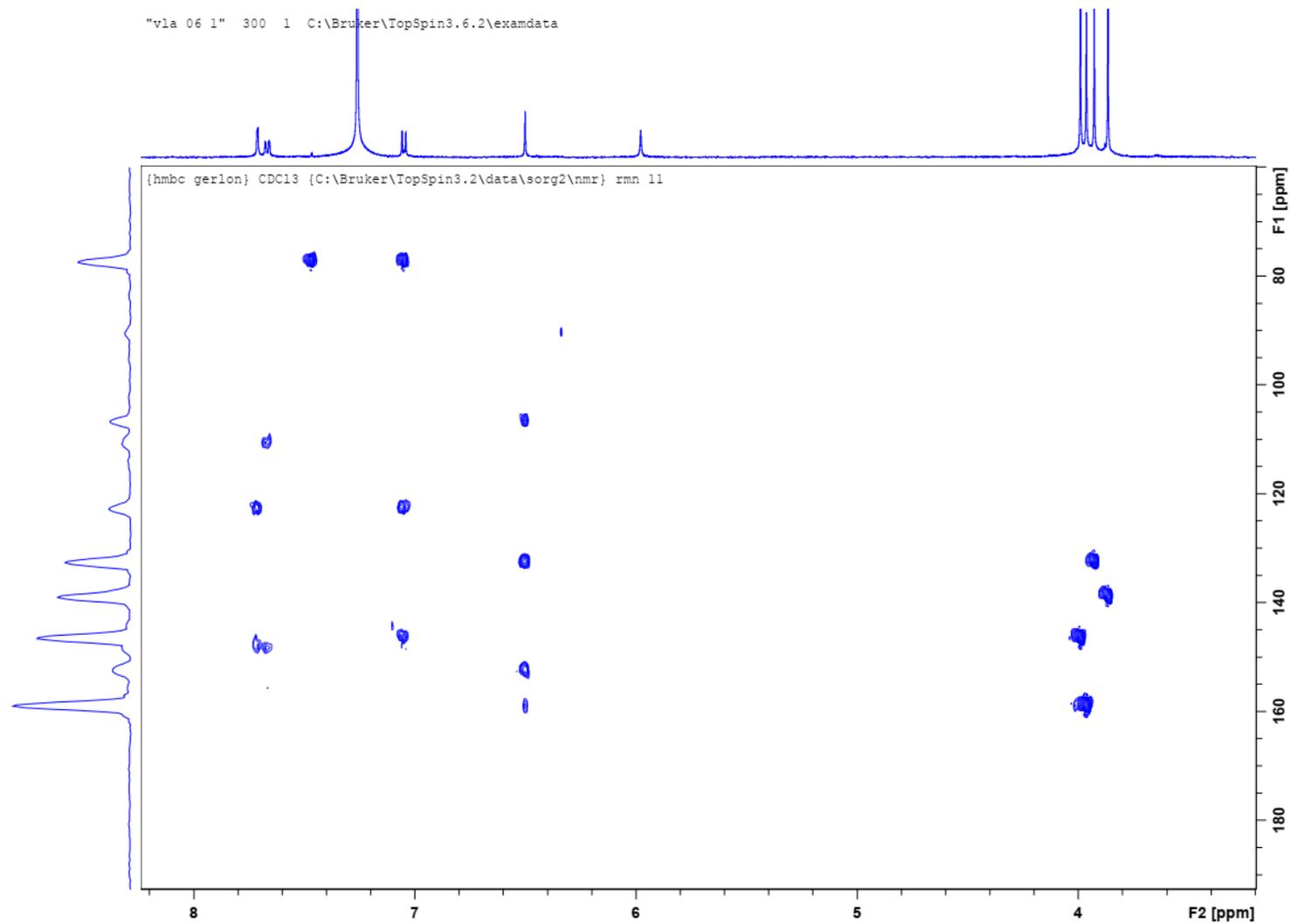


Figura 21. Experimento de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) do composto **4** com expansão da região de 80,0 – 180,0 ppm em F1 e 4,00 – 8,00 ppm em F2.

A correlação dos hidrogênios da metoxila em  $\delta_H$  3,96 (s, 3H) com o carbono em  $\delta_C$  159,5, permitiu observar a ligação com o carbono C-7. Os hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  7,71 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H) e  $\delta_H$  7,66 (dd,  $J = 8,0$  e  $2,0$  Hz, 1H) possuem correlação com o carbono quaternário em  $\delta_C$  148,3, o qual foi atribuído ao carbono C-4' do anel B. Por sua vez o hidrogênio aromático em  $\delta_H$  7,04 (d, 8,0 Hz, 1H) apresenta correlação com o carbono em  $\delta_C$  146,5, atribuído ao carbono C-3'. Os hidrogênios da metoxila em  $\delta_H$  3,98 (s, 3H) apresentam correlação com este carbono, e sendo assim encontram-se ligados ao carbono C-3'. Os hidrogênios da metoxila em  $\delta_H$  3,86 (s, 3H) se correlacionam com o carbono  $\delta_C$  139,6, atribuído ao carbono C-3, sendo esta posição desta metoxila. Por fim a hidroxila com deslocamento químico em  $\delta_H$  5,98 (s, 1H) teve a sua posição atribuída ao carbono C-4' (figuras 21 e 22).

Os dados espectroscópicos obtidos através das análises de RMN de  $^1H$  e dos mapas de correlação HSQC e HMBC foram comparados com a literatura e são compatíveis com a estrutura química da flavona metoxilada 4',5-dihidroxi-3,3',6,7-tetrametoxiflavona, também conhecido como crisoplenetina (**4**) (figura 22; tabela 5) (Sy & Brown, 1998). Os espectros das análises de RMN uni- e bidimensionais encontram-se nas figuras 94 - 99 do apêndice A.

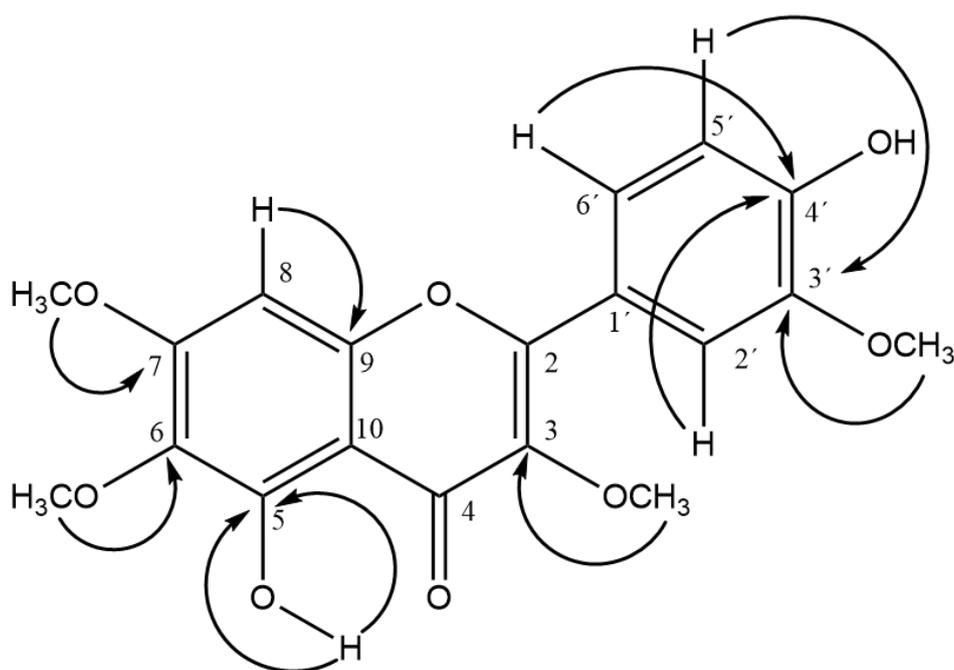
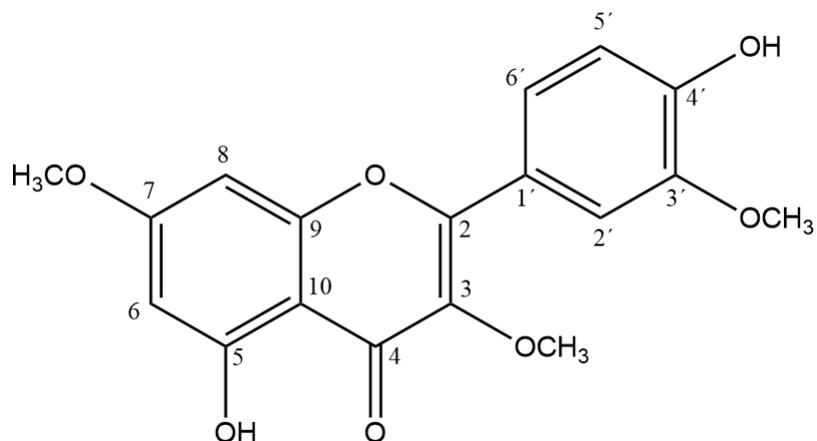


Figura 22. Estrutura química da crisoplenetina isolada de *L. artemisiifolia*, com as principais correlações observadas no experimento de HMBC.

Tabela 5. Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (via HSQC) e HMBC ( $\text{CDCl}_3$ ) do composto **4** e comparação com a literatura.

Composto <b>4</b>				Referência (Sy & Brown, 1997) ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	HMBC	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	-	-		-	156,0
3	-	139,6		-	138,7
4	-	-		-	178,6
5	-	153,2		-	152,8
6	-	133,1		-	132,4
7	-	159,5		-	158,8
8	6,50 (s, 1H)	90,3	C-6; C-7; C-8; C-9	6,51 (s, 1H)	90,4
9	-	152,6		-	152,3
10	-	107,1		-	106,6
1'	-	123,2		-	122,5
2'	7,71 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	111,0	C-1'; C-3'	7,70 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	111,0
3'	-	146,5		-	146,4
4'	-	148,3		-	148,4
5'	7,04 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)	114,6	C-3'	7,05 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	114,6
6'	7,66 (dd, $J = 8,4$ e $2,0$ Hz, 1H)	122,8	C-2'; C-4'	7,66 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)	122,6
5-OH	12,60 (s, 1H)	-	C-5; C-6; C-10	-	-
7-OCH <sub>3</sub>	3,96 (s, 3H)	56,6	C-7	3,97 (s, 3H)	56,3
3-OCH <sub>3</sub>	3,86 (s, 3H)	60,3	C-3	3,86 (s, 3H)	60,2
6-OCH <sub>3</sub>	3,92 (s, 3H)	61,2	C-6	3,93 (s, 3H)	60,9
4'-OH	5,98 (s, 1H)	-		-	-
3'-OCH <sub>3</sub>	3,98 (s, 3H)	56,6	C-3'	3,99 (s, 3H)	56,1

#### 4.1.5 – 4'-5-dihidroxi-3,3',7-trimetoxiflavona (paquipodol) (5)



O composto **5** foi isolado da fração 25 do extrato acetato 1, na forma de um sólido amarelo solúvel em clorofórmio.

De forma similar às flavonas **4**, o composto **5** apresenta no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sinais de hidrogênios de um anel aromático trissubstituído, e atribuídos ao anel B da estrutura deste flavonoide. Foram observados também sinais de hidrogênios aromáticos característicos do anel A desta classe de compostos, com sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,45 (*d*,  $J = 2,0$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,36 (*d*,  $J = 2,0$  Hz), mostrando um acoplamento meta entre estes hidrogênios. Semelhante aos compostos **3** e **5** observou-se que o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  12,63 (*s*, 1H) é característico de hidroxila em C-5. Isso permite a atribuição dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,45 (*d*,  $J = 2,0$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,36 (*d*,  $J = 2,0$  Hz) nas posições 8 e 6, respectivamente. Além disso os três simpletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,98 (*s*, 3H),  $\delta_{\text{H}}$  3,87 (*s*, 3H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,86 (*s*, 3H), foram atribuídos à três metoxilas, caracterizando este composto como uma trimetoxiflavona (figura 23).

Com base nos dados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  e a comparação destes com a literatura, o composto **6** foi identificado como a 4'-5-dihidroxi-3,3',7-trimetoxiflavona, também conhecido como paquipodol (**6**) (tabela 6) (Arbain *et al*, 2018). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e suas expansões encontram-se nas figuras 100 – 103 do apêndice A.

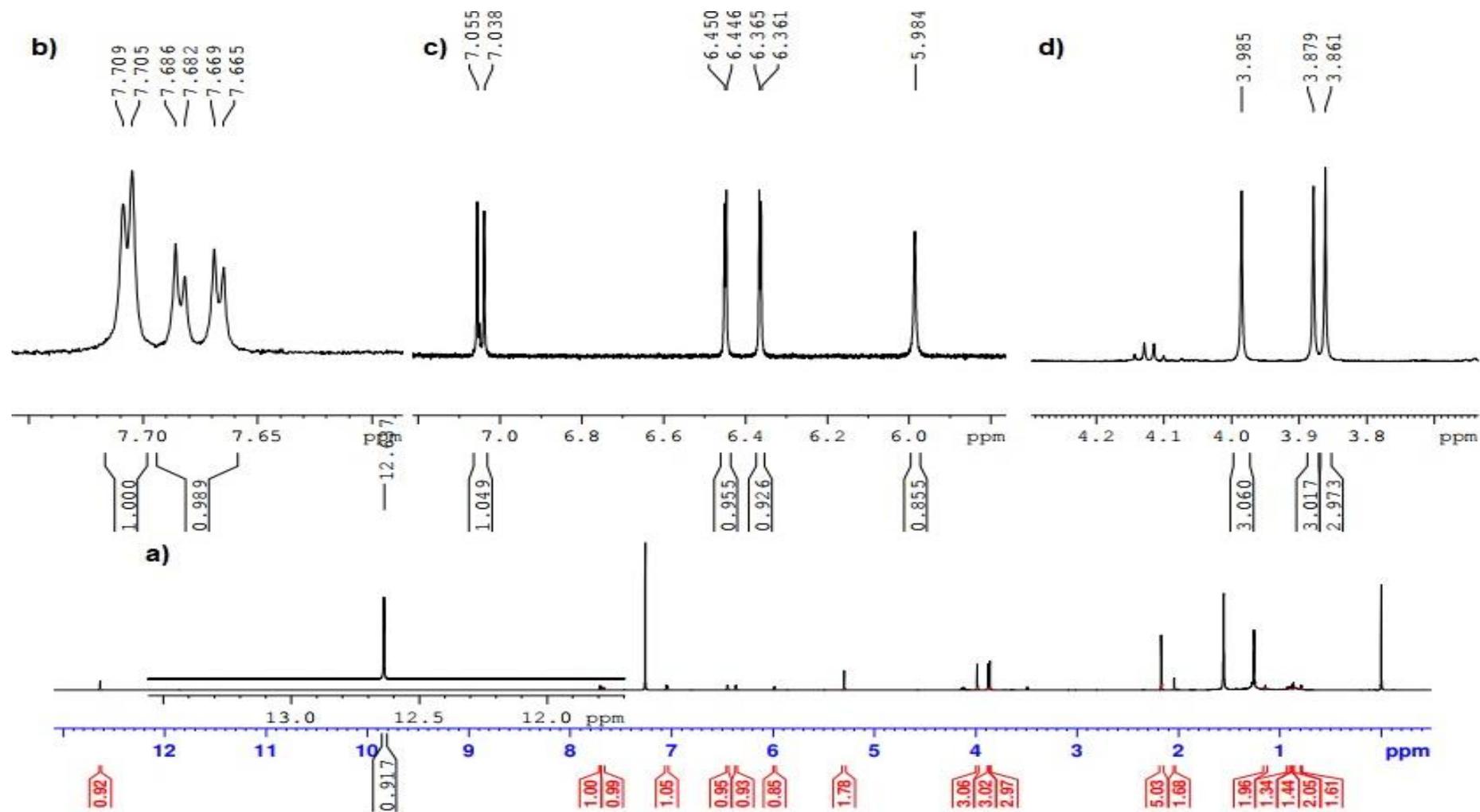
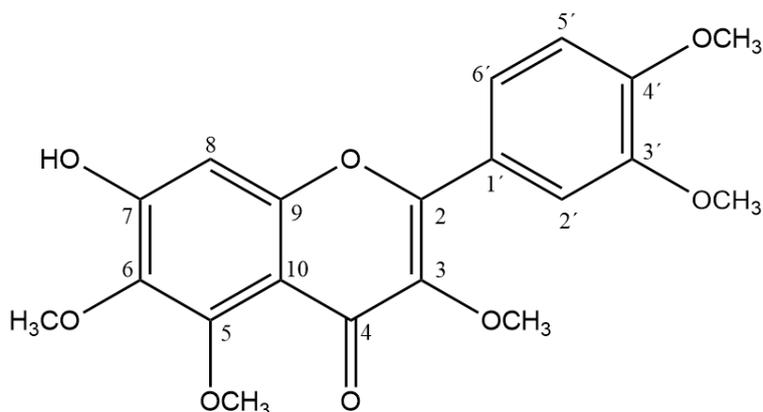


Figura 23. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **5**, com expansões das regiões entre a) 14-12 ppm, b) 8,0-6,0 ppm e c) 4,0-3,0 ppm.

Tabela 6. Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **5** e comparação com a literatura.

Composto <b>5</b>		Referência (Arbain et al, 2018) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)
6	6,36 ( $d$ , $J = 2,0$ Hz, 1H)	6,34 ( $d$ , $J = 2,0$ Hz, 1H)
8	6,45 ( $d$ , $J = 2,0$ Hz, 1H)	6,65 ( $d$ , $J = 2,0$ Hz, 1H)
2'	7,70 ( $d$ , $J = 2,0$ Hz, 1H)	7,74 ( $d$ , $J = 2,0$ Hz, 1H)
5'	7,04 ( $d$ , $J = 8,5$ Hz, 1H)	6,94 ( $d$ , $J = 8,0$ Hz, 1H)
6'	7,67 ( $dd$ , $J = 8,5$ e 2,0 Hz, 1H)	7,68 ( $dd$ , $J = 8,0$ e 2,0 Hz, 1H)
3-OCH <sub>3</sub>	3,86 (s, 3H)	3,81 (s, 3H)
5-OH	12,63 (s, 1H)	-
7-OCH <sub>3</sub>	3,87 (s, 3H)	3,89 (s, 3H)
3'-OCH <sub>3</sub>	3,98 (s, 3H)	3,94 (s, 3H)
4'-OH	5,98 (s, 1H)	-

#### 4.1.6 – Quercetagetina-3,5,6,3',4'-pentametil éter (6)



O composto **6** foi isolado na forma de sólido amarelo da fração 27 do extrato acetato 1, solúvel em clorofórmio.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **6** apresenta sinais característicos de um anel aromático cujas multiplicidades dos sinais indicam um anel aromático trissubstituído com deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{H}}$  7,72 (*d*,  $J = 2,0$  Hz, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  7,63 (*dd*,  $J = 8,0$  e 2,0 Hz, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  7,04 (*d*,  $J = 8,0$  Hz, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  6,73 (*s*, 3H). Também são observados sinais de metoxilas na região de 4,0 - 3,8 ppm, com deslocamentos em  $\delta_{\text{H}}$  4,01 (*s*, 3H),  $\delta_{\text{H}}$  3,97 (*s*, 3H),  $\delta_{\text{H}}$  3,96 (*s*, 3H),  $\delta_{\text{H}}$  3,91 (*s*, 3H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,86 (*s*, 3H) (figura 24).

O experimento de RMN de NOE 1D foi usado para a confirmação da posição das metoxilas. Neste experimento foram irradiados os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,72,  $\delta_{\text{H}}$  7,63 e  $\delta_{\text{H}}$  7,04 (figuras 25, 26 e 27). Observou-se as correlações do hidrogênio aromático em  $\delta_{\text{H}}$  7,63 com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,04 e a metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  3,91 (figura 26). Ao irradiar o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  7,72 observou-se a correlação deste hidrogênio com a metoxila em  $\delta_{\text{H}}$  3,97 (figura 25).

O conjunto de dados obtidos pela análise de RMN, permitiu a identificação deste composto como a flavona metoxilada quercetagetina-3,5,6,3',4'-pentametil éter (figura 28; tabela 7) (Chen *et al*, 1997). Todos os dados espectroscópicos obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  e NOE 1D encontram-se nas figuras 104 - 111 do apêndice A.

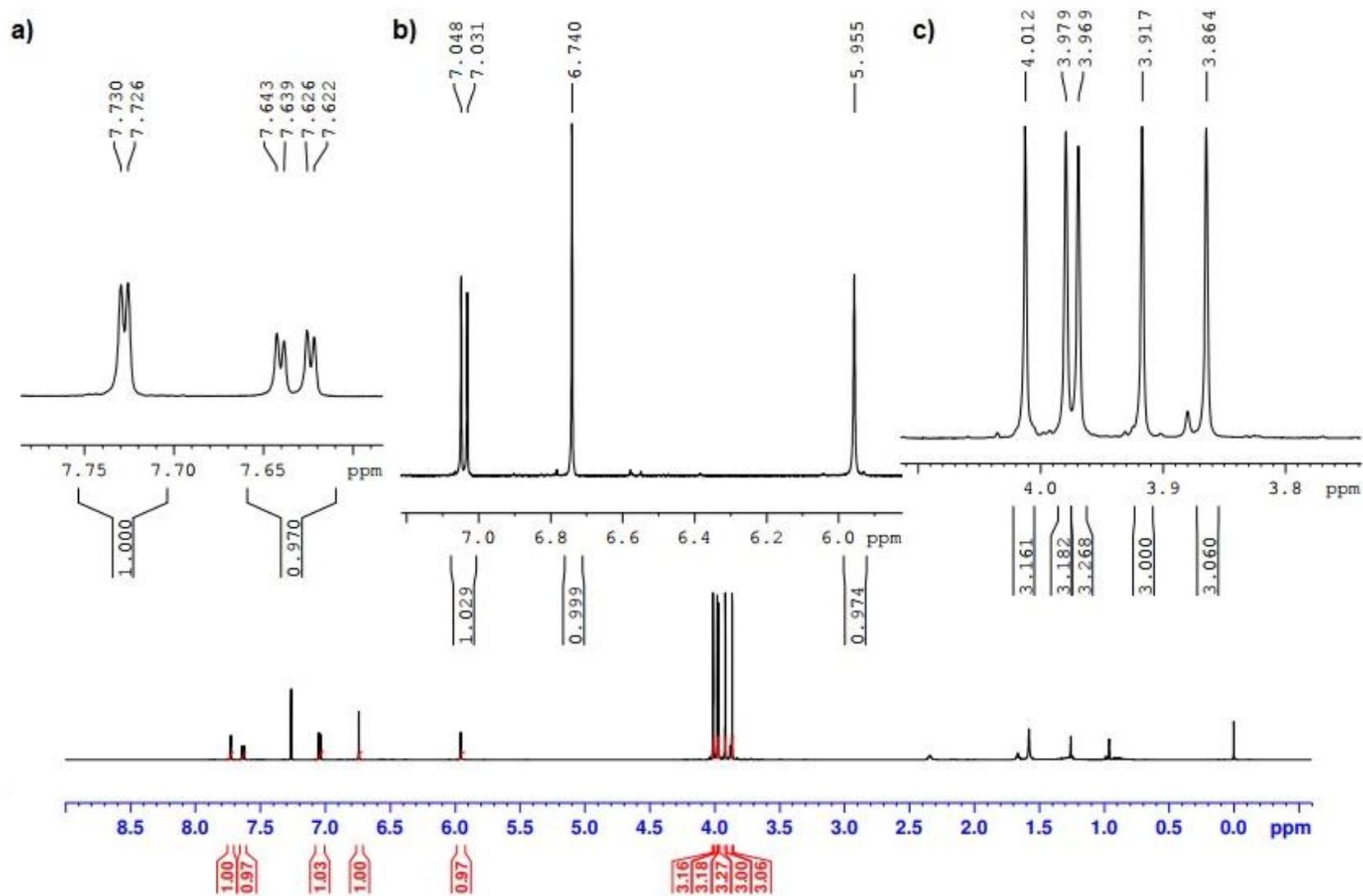


Figura 24. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **6**, com expansões das regiões em a) 7,75-7,60 ppm e b) 7,00-6,00 e c) 4,0-3,8 ppm.

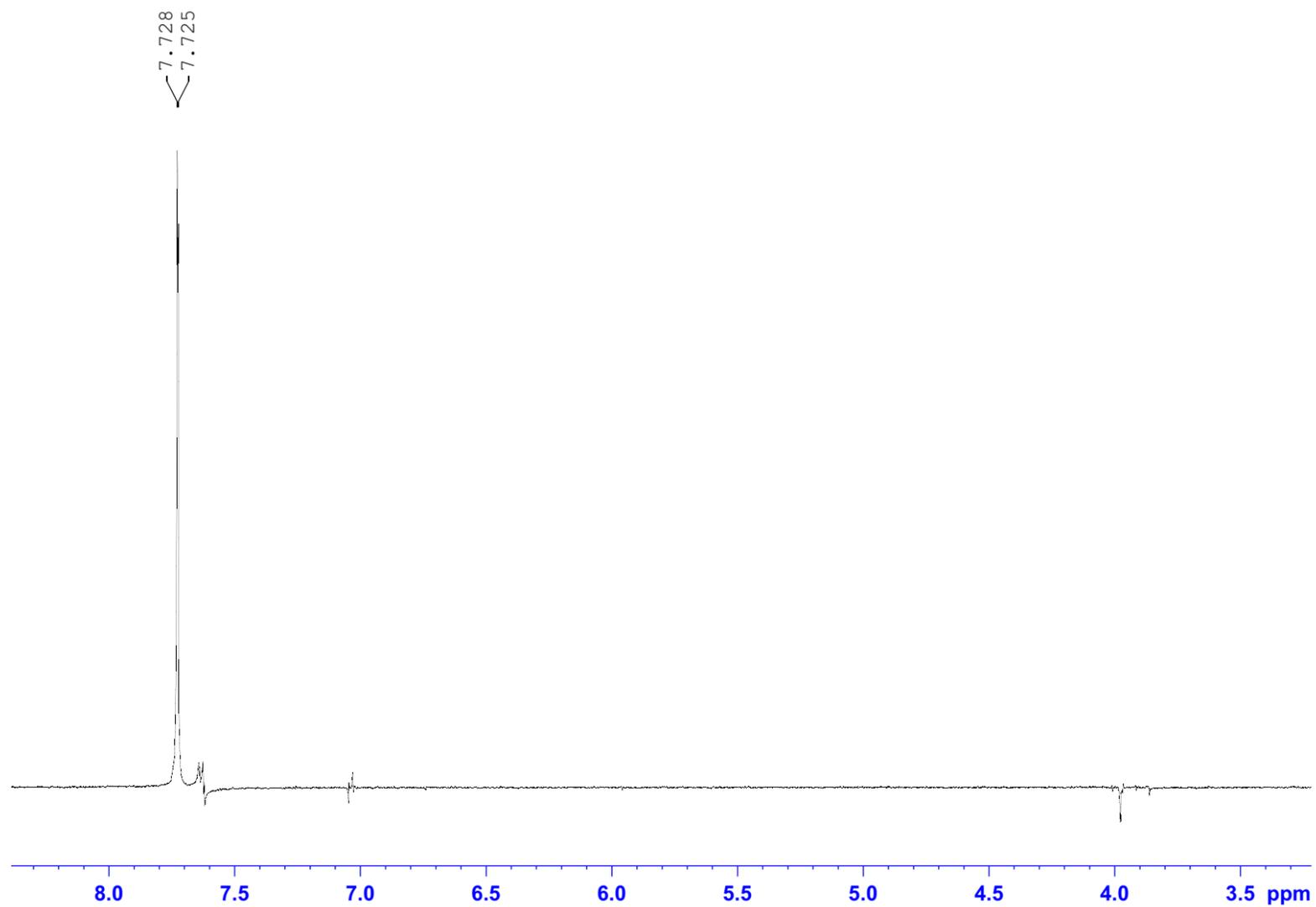


Figura 25. Espectro de NOE 1D ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **6**, irradiado em  $\delta_{\text{H}}$  7,72 ppm.

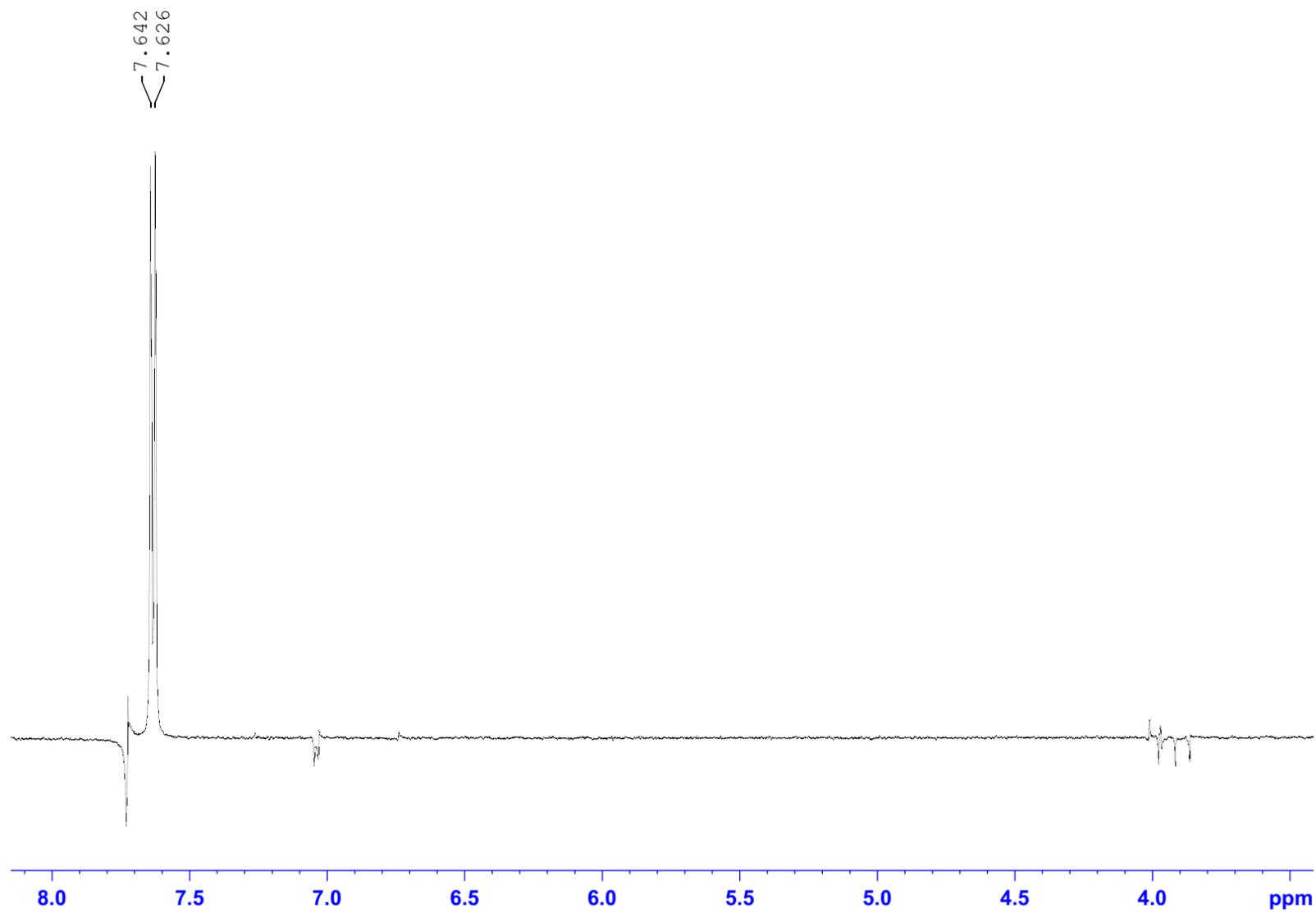


Figura 26. Espectro de NOE 1D ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **6**, irradiado em  $\delta_{\text{H}}$  7,63 ppm.

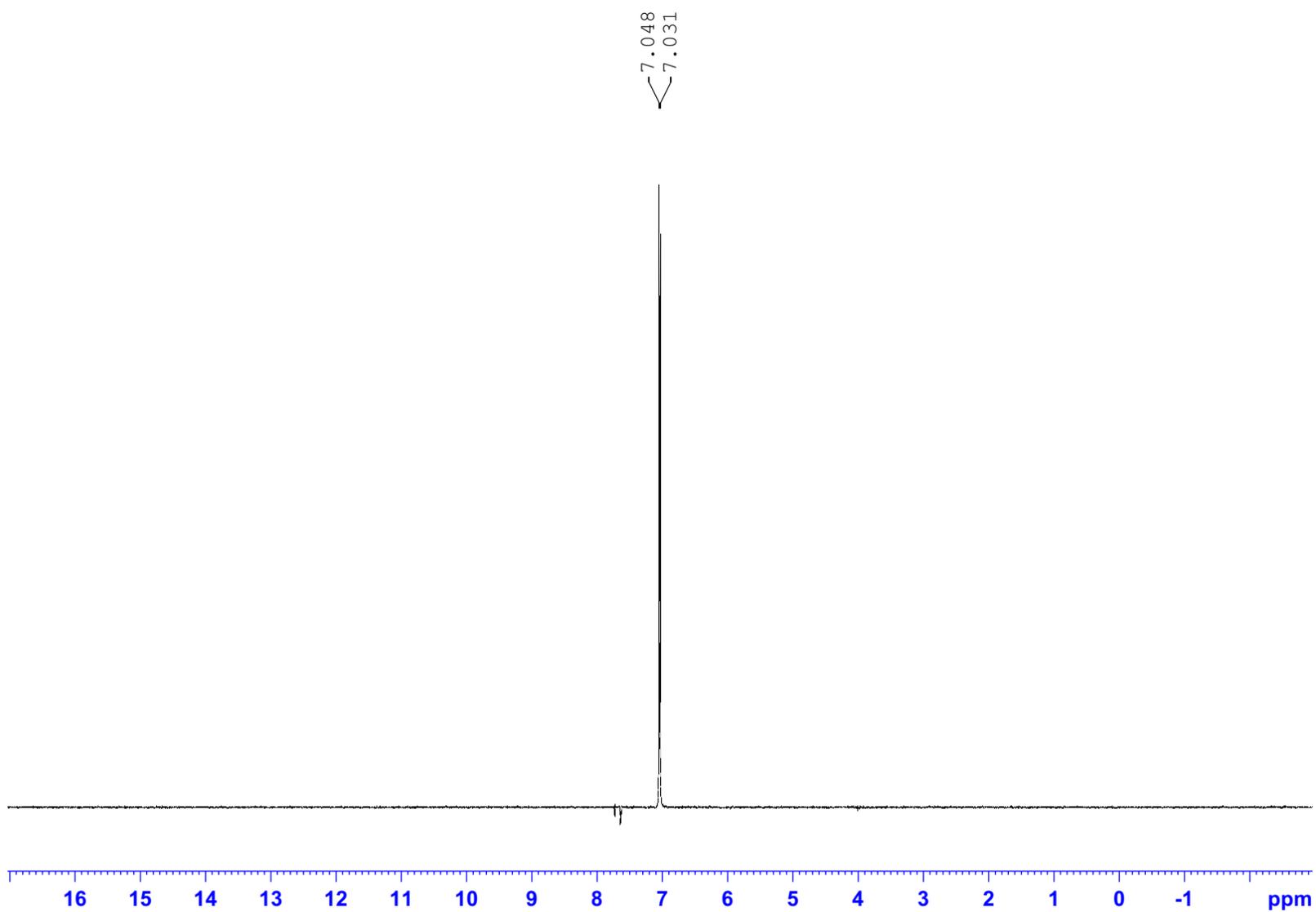


Figura 27. Espectro de NOE 1D (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) do composto **6**, irradiado em  $\delta_{\text{H}}$  7,04 ppm.

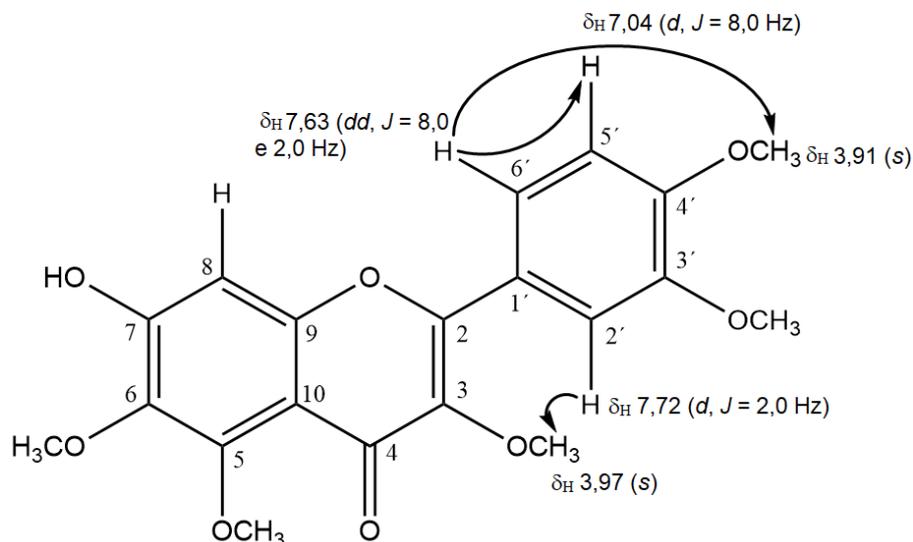
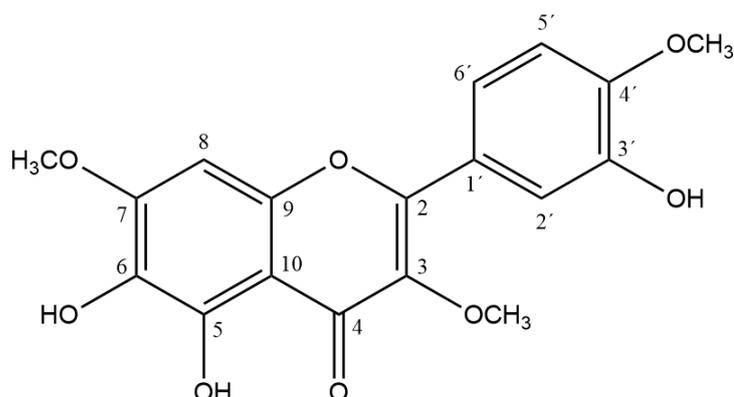


Figura 28. Correlações observadas no experimento de NOE 1D para confirmação dos grupos metoxilas em C-3 e C-4'.

Tabela 7. Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e NOE 1D ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **6** e comparação com a literatura.

Composto <b>6</b>			Referência (Chen <i>et al</i> , 1997) ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)	NOE 1D	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)
8	6,73 (s, 1H)	-	6,77 (s, 1H)
6'	7,63 ( <i>dd</i> , $J = 8,0$ e 2,0 Hz, 1H)	7,04 ( <i>d</i> , $J = 8,0$ Hz); 3,97 (s)	7,79 ( <i>dd</i> , $J = 9,0$ e 2,2 Hz, 1H)
5'	7,04 ( <i>d</i> , $J = 8,0$ Hz, 1H)	-	6,99 ( <i>d</i> , $J = 9,0$ Hz, 1H)
2'	7,72 ( <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	3,91 (s)	7,80 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ Hz, 1H)
3-OCH <sub>3</sub>	$\delta_{\text{H}}$ 3,97 (s, 3H)		3,98 (s, 3H)
5-OCH <sub>3</sub>	4,01 (s, 3H)	-	4,02 (s, 3H)
6-OCH <sub>3</sub>	3,96 (s, 3H)	-	3,97 (s, 3H)
7-OH	5,95 (s, 1H)	-	-
3'-OCH <sub>3</sub>	3,86 (s, 3H)	-	3,91 (s, 3H)
4'-OCH <sub>3</sub>	3,91 (s, 3H)	-	3,95 (s, 3H)

#### 4.1.7 – 5,6,3'-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (oxianina B) (7)



O composto **7** foi isolado como um sólido amarelo da fração 27 do extrato acetato de etila 1, apresentando solubilidade em clorofórmio.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostra que composto **7** apresenta sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,77 (*d*,  $J = 1,5$  Hz, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  7,60 (*dd*,  $J = 8,5$  e 1,5 Hz, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  7,00 (*d*,  $J = 8,5$  Hz, 1H), caracterizando um anel aromático trissubstituído, com deslocamentos muito semelhantes às flavonas metoxiladas **4**, **5** e **6**. Além disso também são observados sinais relativos a um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,49 (*s*, 1H) atribuído a posição 8 do anel A deste flavonoide. O simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  12,50 (*s*, 1H) é característico de hidroxila quelatogênica na posição 5, onde a ligação de hidrogênio com o grupo carbonila do anel C, forma um anel de seis membros com deslocamento químico em região desblindada (da Silva et al, 2009). Na região entre 4,00-3,80 ppm, são observados sinais de três metoxilas em  $\delta_{\text{H}}$  3,95 (*s*, 3H),  $\delta_{\text{H}}$  3,91 (*s*, 3H) e 3,84 (*s*, 3H), o que mostra que este composto é uma trimetoxiflavona (figura 29).

A comparação dos dados espectroscópicos do composto **7** com a literatura, permitiram identificar a estrutura química da flavona metoxilada 5,6,3'-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona, também chamado de oxianina B (tabela 8) (Wangchuk et al, 2013). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  deste composto e suas expansões estão nas figuras 112 - 114 do apêndice A.

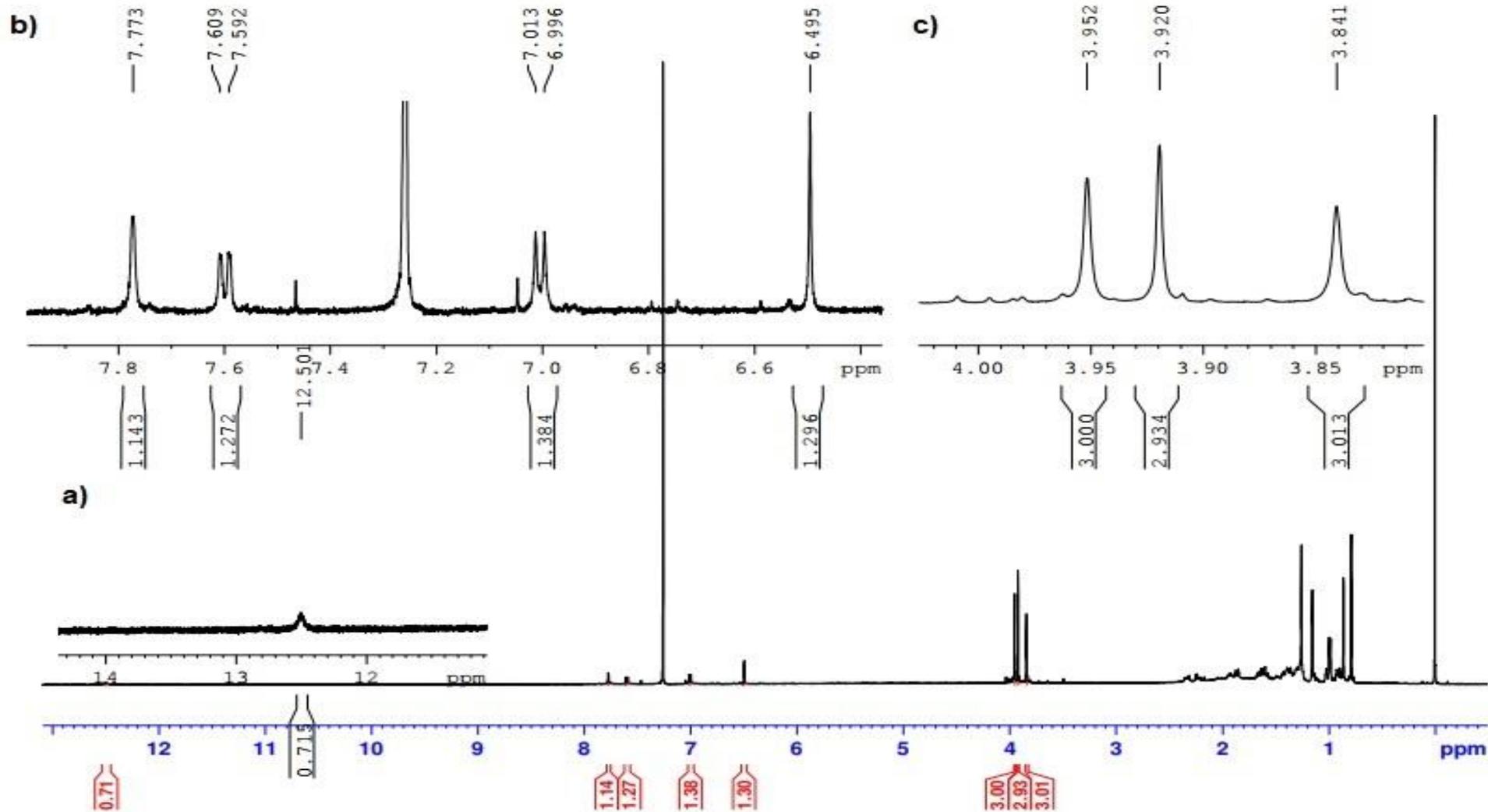


Figura 29. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) do composto **7** com expansões das regiões entre a) 14,0-12,0 ppm, b) 7,80-6,50 ppm e c) 4,00-3,80 ppm.

Tabela 8. Dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **7** e comparação com a literatura.

Composto <b>7</b>		Referência (Wangchuk et al, 2013) (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidade, $J$ , n° de H)
6	6,49 (s, 1H)	6,52 (s, 1H)
2'	7,77 ( <i>d</i> , $J = 1,5$ Hz, 1H)	7,54 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)
5'	7,00 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)	6,94 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)
6'	7,60 ( <i>dd</i> , $J = 8,5$ e $1,5$ Hz, 1H)	7,61 (s, 1H)
3-OCH <sub>3</sub>	3,91 (s, 3H)	3,77 (s, 3H)
5-OH	12,50 (s, 1H)	12,73 (s, 1H)
7-OCH <sub>3</sub>	3,84 (s, 3H)	3,84 (s, 3H)
4'-OCH <sub>3</sub>	3,95 (s, 3H)	3,83 (s, 3H)

## 5. Análises dos extratos de *L. artemisiifolia* através de CLAE-IES-EM/EM

Os extratos de *L. artemisiifolia* foram analisados por CLAE-IES-EM/EM para a obtenção de seus perfis cromatográficos. Os nove extratos (EA1, EA2 e EE) foram analisados no modo negativo de ionização para a anotação dos compostos. Considerando também a presença de compostos cuja ionização ocorre somente no modo positivo de ionização, foram escolhidos os extratos EA1 da planta *in vitro* e o EE da estação chuvosa, como amostras representativas para estas análises. O método cromatográfico utilizado permitiu a separação e detecção de diferentes íons precursores em ambos os modos de ionização.

No modo negativo, os extratos de *L. artemisiifolia* apresentaram um perfil cromatográfico muito similar, apresentando compostos de média e baixa polaridade nos extratos EA1 e EA2. Como esperado, os extratos etanólicos (EE) apresentaram também compostos de alta polaridade, os quais se apresentaram ausentes ou com intensidade muito baixa na planta *in vitro* (figuras 30, 31 e 32). Por outro lado, a análise no modo positivo de ionização se diferenciou por não permitir a detecção destes compostos de maior polaridade, além também de apresentar outros picos referentes a compostos apolares entre 19,0 – 22,00 min (figura 33).

Os íons precursores detectados nas análises de CLAE-IES-EM/EM nos modos positivo e negativo, foram anotados através da busca da massa exata e comparação dos espectros de fragmentação (EM/EM) na base de dados Metlin (Guijas et al, 2018). Esta pesquisa revelou a presença de terpenoides, flavonas polimetoxiladas e outras classes de flavonóides, com a presença de isômeros em diferentes tempos de retenção. A literatura mostra que as flavonas polimetoxiladas apresentam no espectro de massas perdas de radicais metila ( $\bullet\text{CH}_3$ ), que levam ao íon produto  $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$  (modo de íon negativo), que é a principal característica para a identificação desta classe de flavonoides (Fránski et al, 2018). Porém, dependendo da extensão da metilação do flavonoide, o íon produto  $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$  tende a dominar o espectro de massas, dificultando a distinção dos isômeros posicionais, pois apresenta o mesmo padrão de fragmentação (Cuykens & Claeys, 2004; Justesen, 2001) (figura 34).

Base peak chromatogram, m/z: 150.0000 - 700.0000

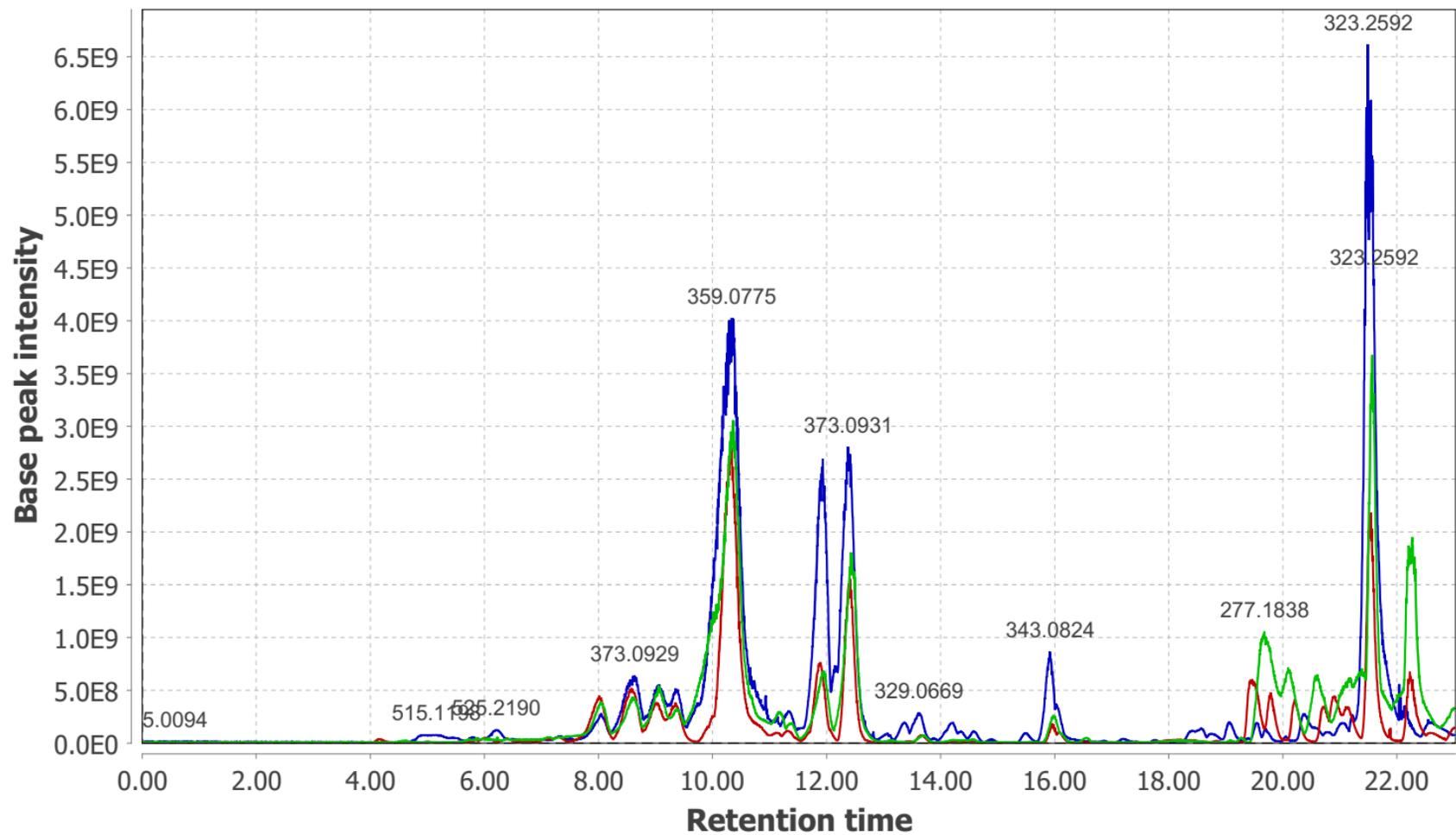


Figura 30. Cromatograma de íons extraídos no modo negativo de ionização, do extrato EA1 (estação seca, chuvosa e planta in vitro). Legendas de cores: verde (estação seca), vermelho (estação chuvosa) e azul (planta in vitro). Os cromatogramas foram processados no *software* MZmine 2.

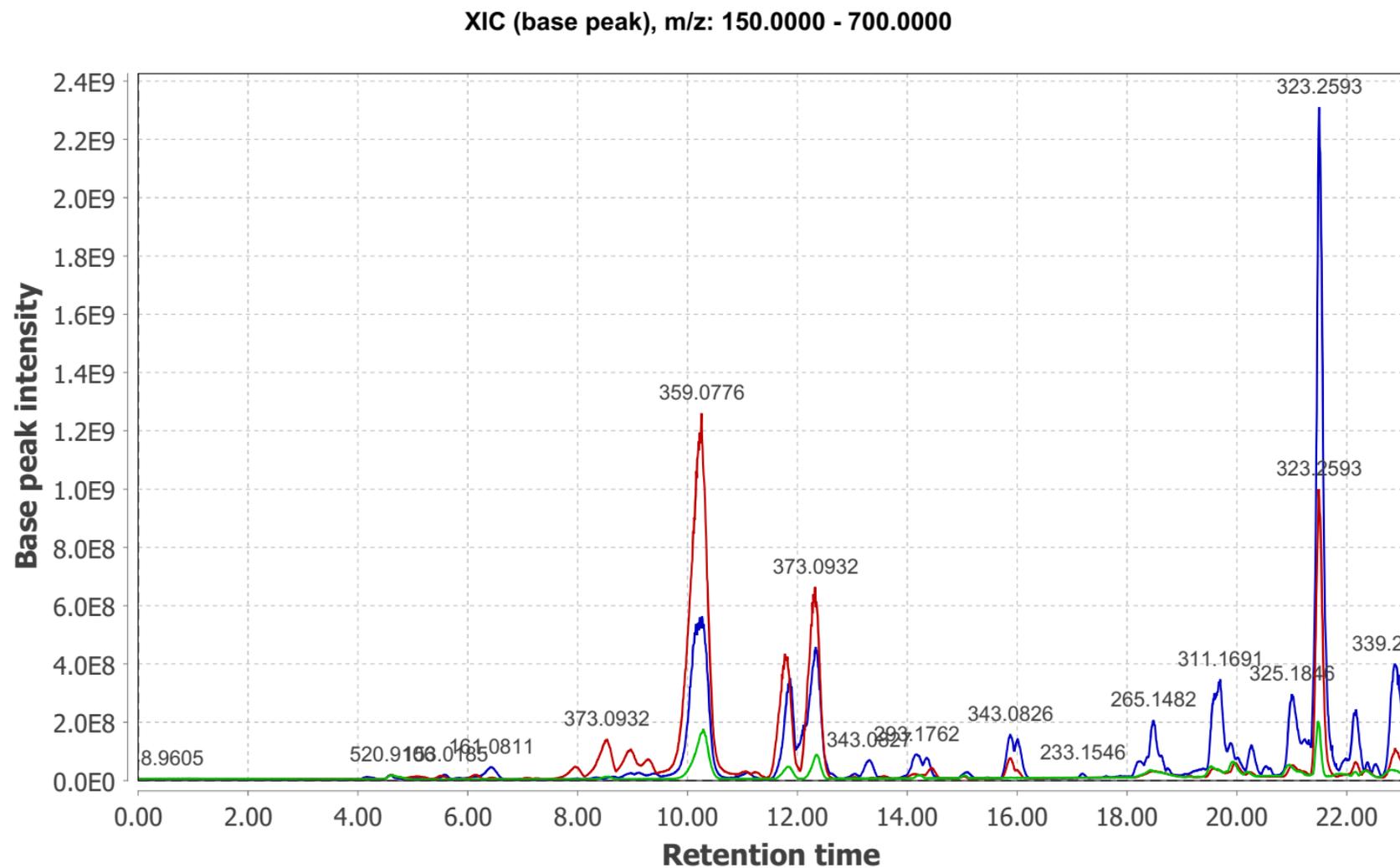


Figura 31. Cromatogramas de íons extraídos no modo negativo de ionização, do extrato EA2 (estação seca, chuvosa e planta in vitro). Legendas de cores: verde (estação seca), vermelho (estação chuvosa) e azul (planta in vitro). Os cromatogramas foram processados no *software* MZmine 2.

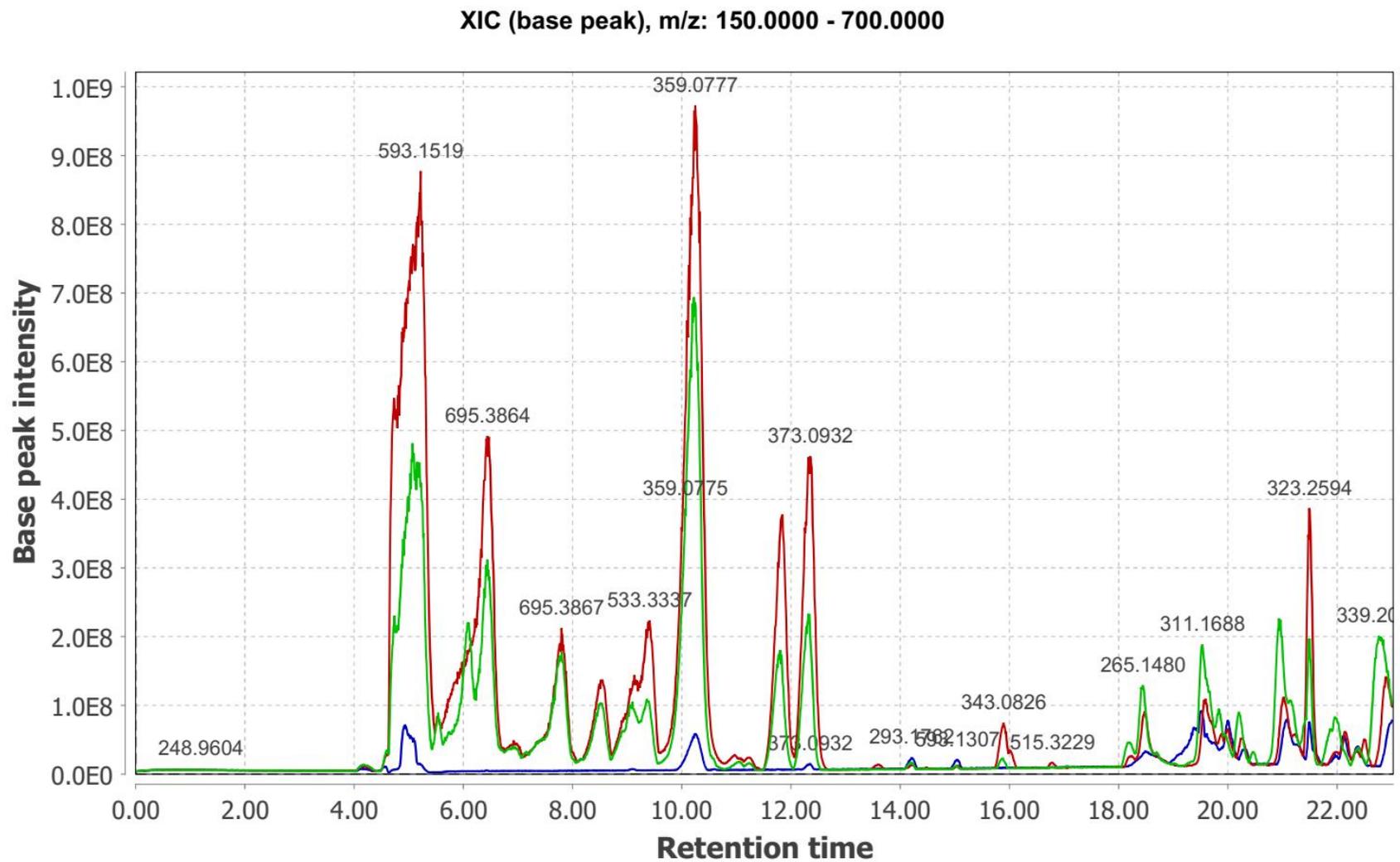


Figura 32. Cromatogramas de íons extraídos no modo negativo de ionização, dos extratos EE (estação seca, chuvosa e planta in vitro). Legendas de cores: verde (estação seca), vermelho (estação chuvosa) e azul (planta in vitro). Os cromatogramas foram processados no *software* MZmine 2.

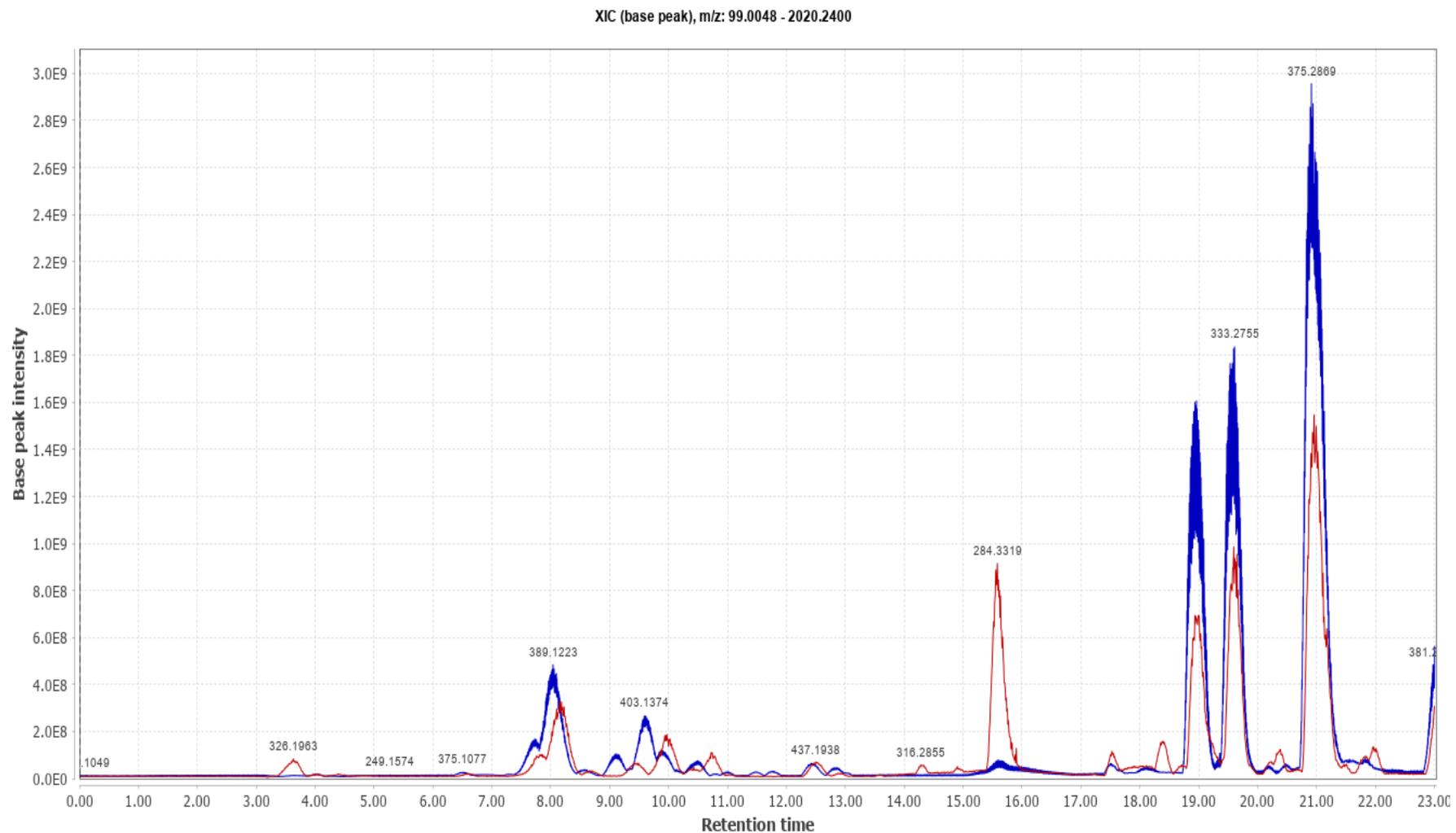


Figura 33. Cromatogramas de íons extraídos no modo positivo de ionização, dos extratos EA1 (planta in vitro; cor azul) e EE (estação chuvosa; cor vermelha). Os cromatogramas foram processados no *software* MZmine 2.

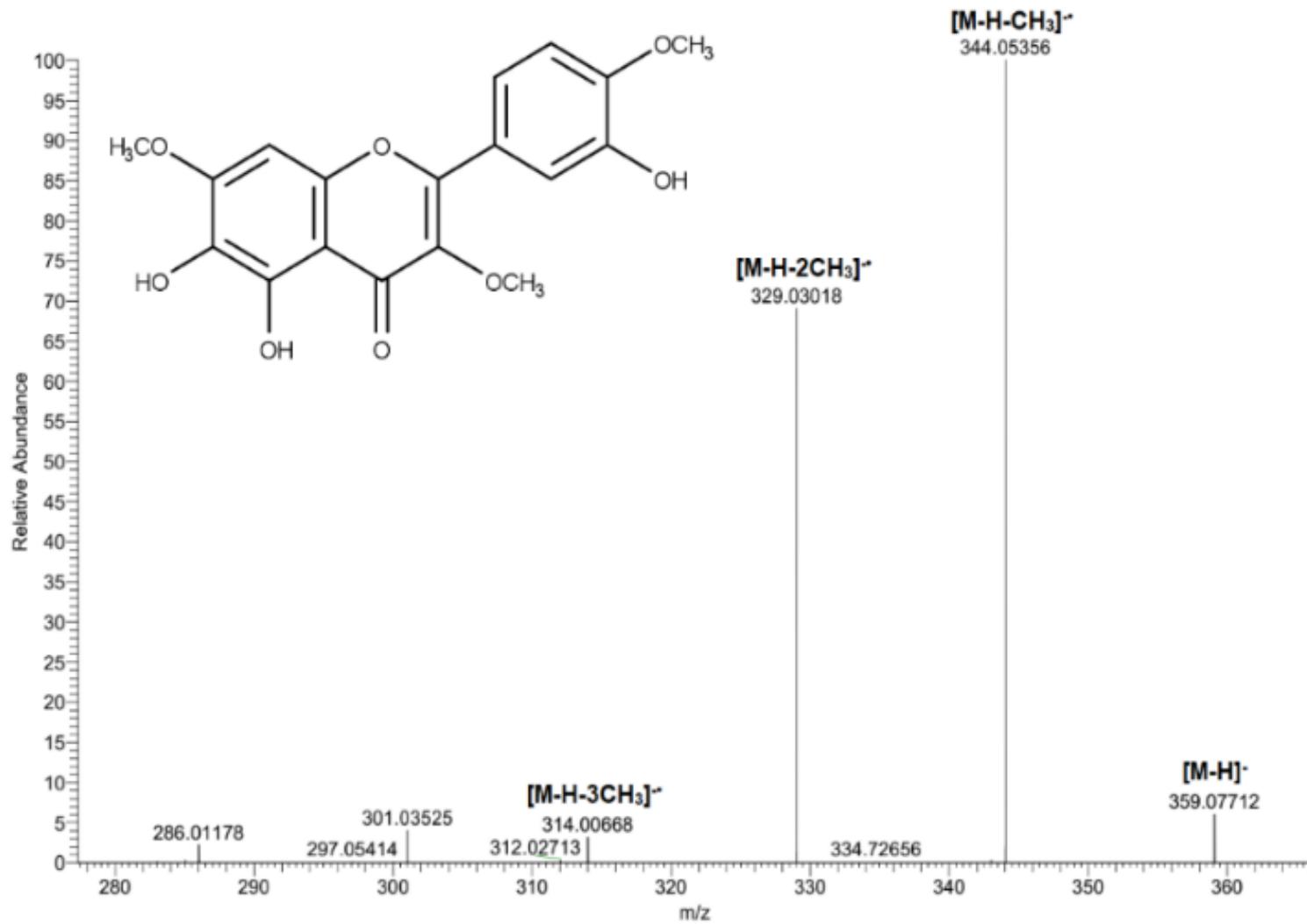


Figura 34. Espectro de massas da oxianina B, destacando a presença de íons produtos formados pelas perdas do radical metila.

O gênero *Lomatozona* não possui estudo químicos na literatura, o que impossibilitou uma correlação taxonômica com outras espécies para comparação desses dados. Nesse sentido o isolamento dos compostos majoritários dos extratos de *L. artemisiifolia* foi fundamental para a confirmação das classes químicas presentes nessa espécie, bem como a atribuição destes aos sinais observados nos cromatogramas, de forma a auxiliar na anotação de outros metabólitos secundários relacionados.

Assim, os compostos quercetagetina-3,5,6,3',4'-pentametil éter (**2**), crisoplenetina (**5**) e paquidopol (**6**) foram atribuídos aos íons precursores  $m/z$  387,10904  $m/z$  373,0932 e  $m/z$  343,0825, respectivamente. Entretanto, observou-se nos cromatogramas mais de um pico correspondente a essas massas exatas, além também de um padrão de fragmentação muito similar, indicando a presença de isômeros de posição destes flavonoides (figura 35 e 36).

A biossíntese das flavonas metoxiladas mostra que estas são produzidas a partir das flavonas, que por sua vez derivam das flavanonas, como a naringenina e o eriodictiol, destacadas em amarelo na figura 37 (Jiang et al, 2016; Dewick, 2009).

Wolfender e colaboradores (2019) propõem o uso de dois tipos de informações ortogonais para a identificação de metabólitos secundários em extratos vegetais. Nas análises de CLAE-IES-EM/EM isso pode ser realizado pela correspondência entre os tempos de retenção ( $T_r$ ) e os espectros de fragmentação (EM/EM) dos compostos desconhecidos no extrato com padrões de alta pureza. Assim os extratos de *L. artemisiifolia* foram comparados com os padrões de catequina, epi-catequina, kaempferol, luteolina e naringenina por CLAE-IES-EM/EM no modo negativo. A presença das flavanonas luteolina e naringenina foi confirmada no extrato EA2 pela correspondência do  $T_r$  e EM/EM, o que não ocorreu para os demais padrões comparados, indicando a ausência das classes de catequinas e flavonóis em *L. artemisiifolia* (figuras 38 e 39).

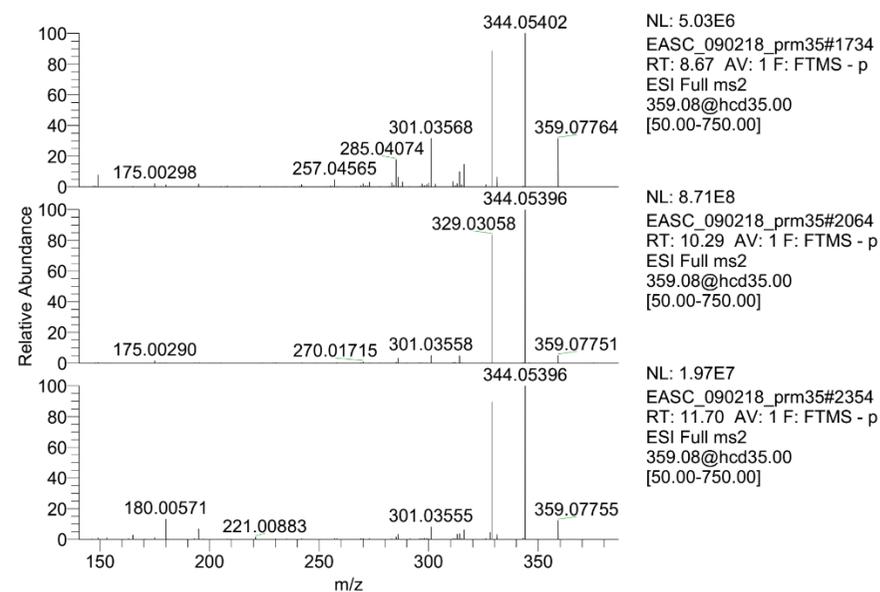
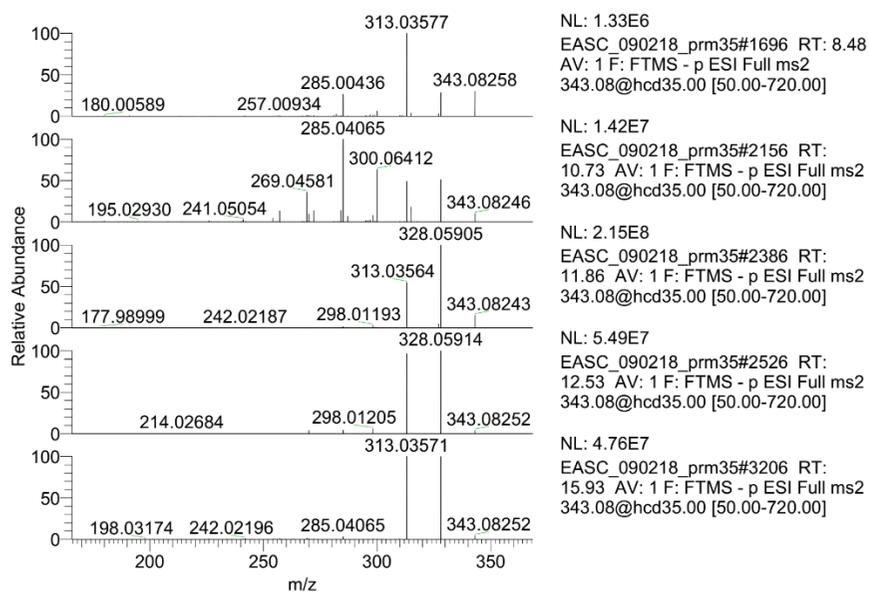
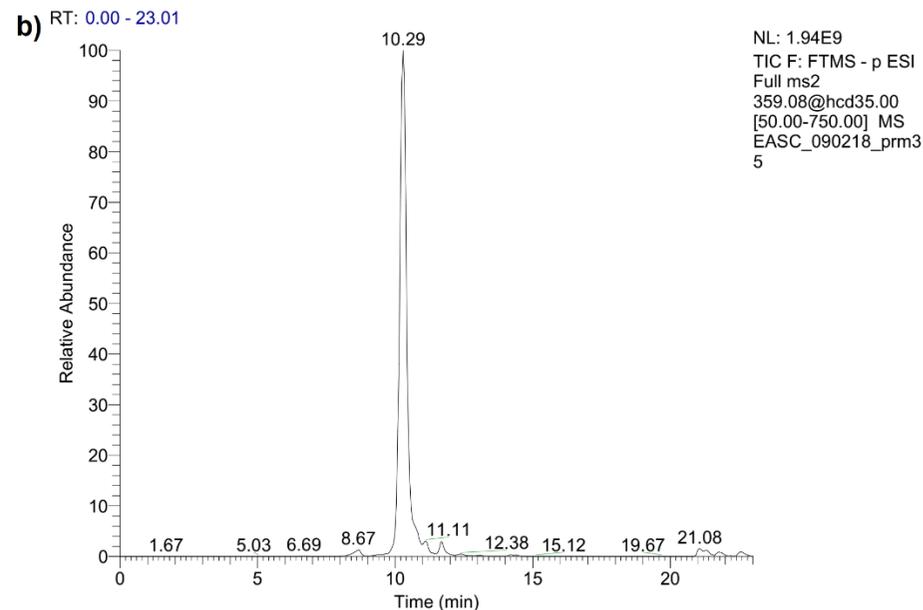
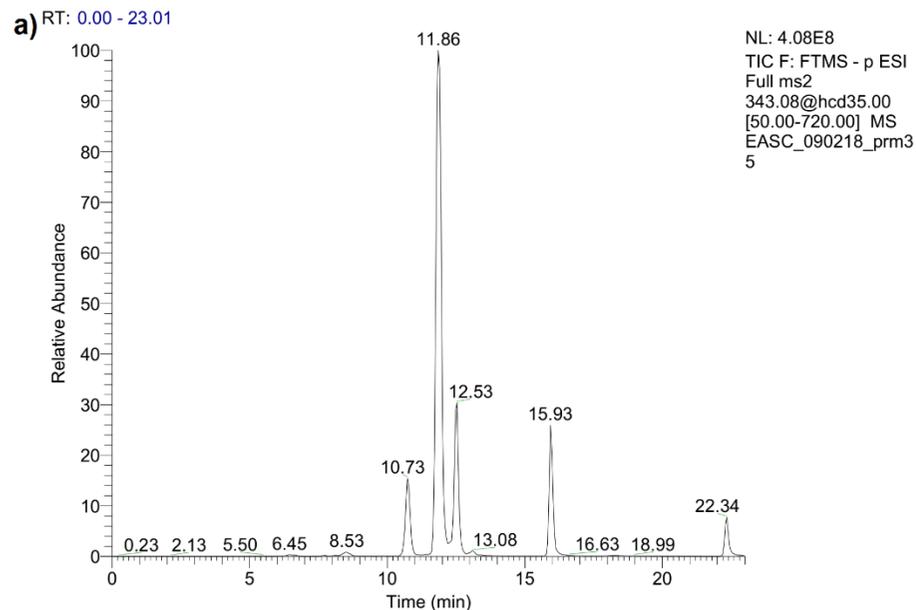


Figura 35. Cromatogramas e espectros de massas (EM/EM) dos isômeros dos íons precursores (a)  $m/z$  343,0825 (Tr. 8,48,10,73, 11,86, 12,53, 13,08 e 15,93 min) (e) (b)  $m/z$  359,0776 (Tr. 8,67, 10,29 e 11,70 min).

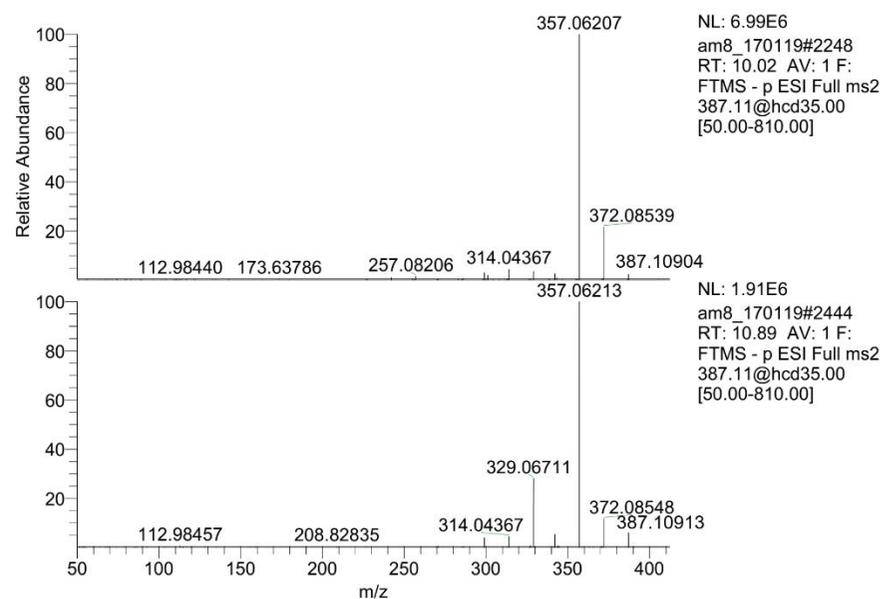
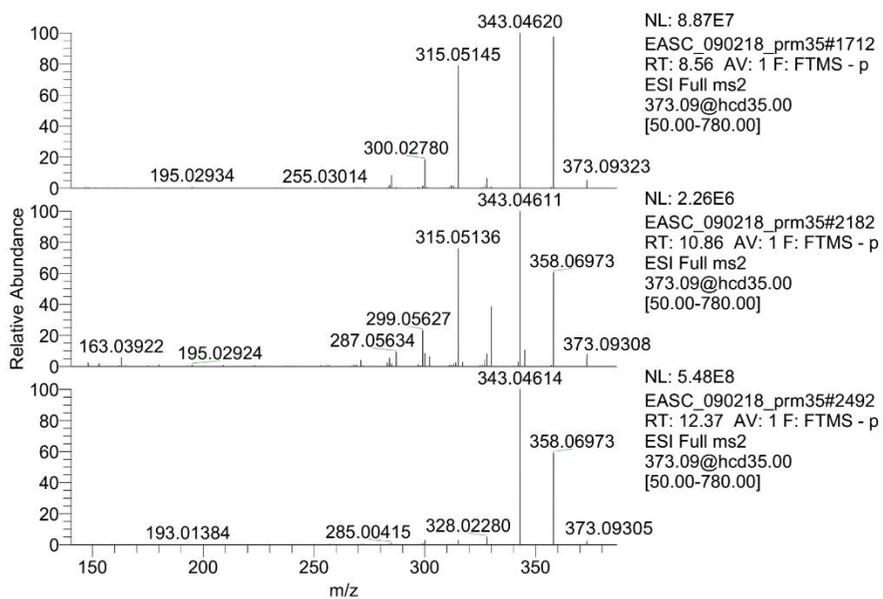
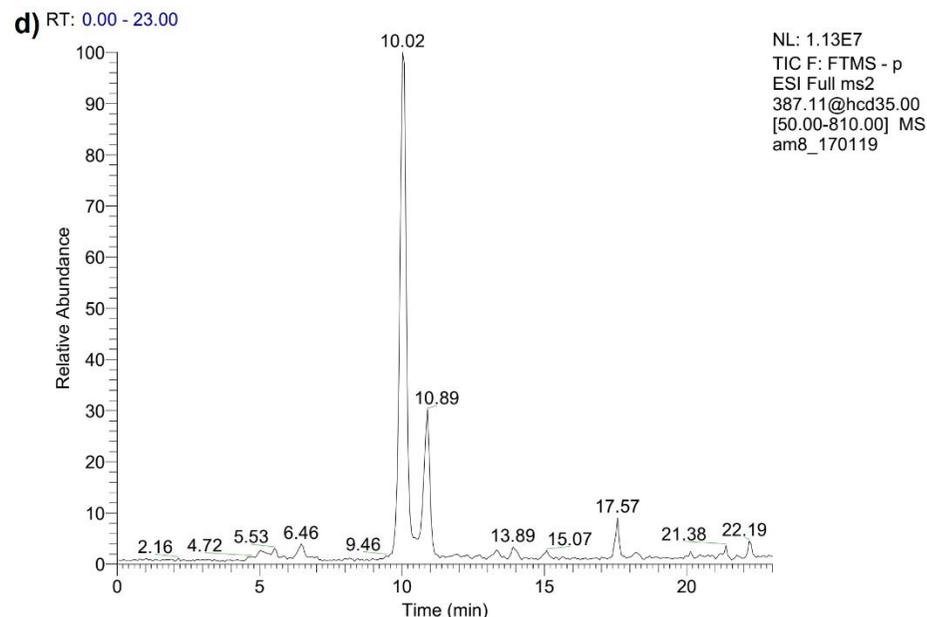
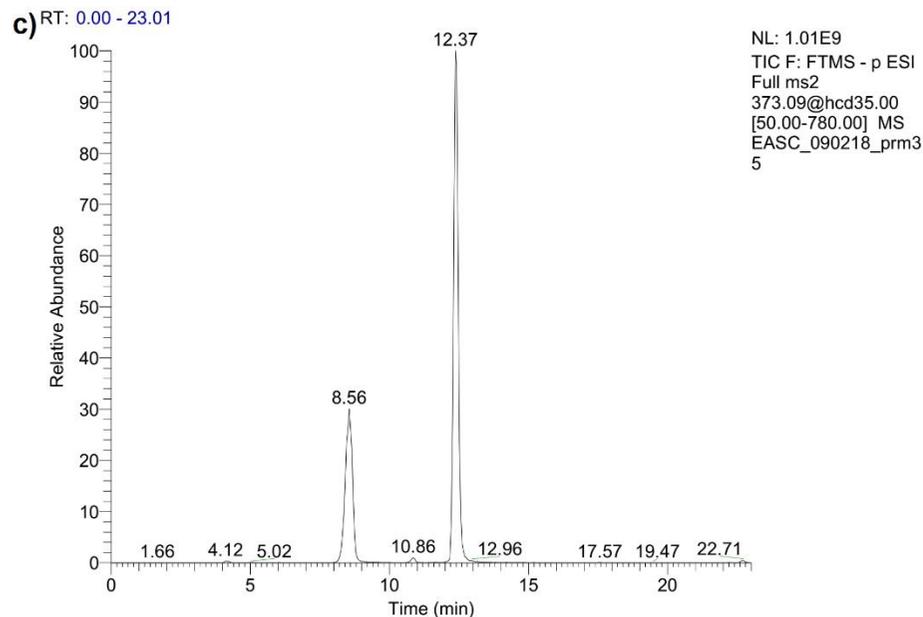


Figura 36. Cromatogramas e espectros de massas (EM/EM) dos isômeros dos íons precursores (a)  $m/z$  373,0932 (Tr. 8,56, 10,86 e 12,37 min) e (b)  $m/z$  387,1091 (Tr. 10,02, e 10,89 min).

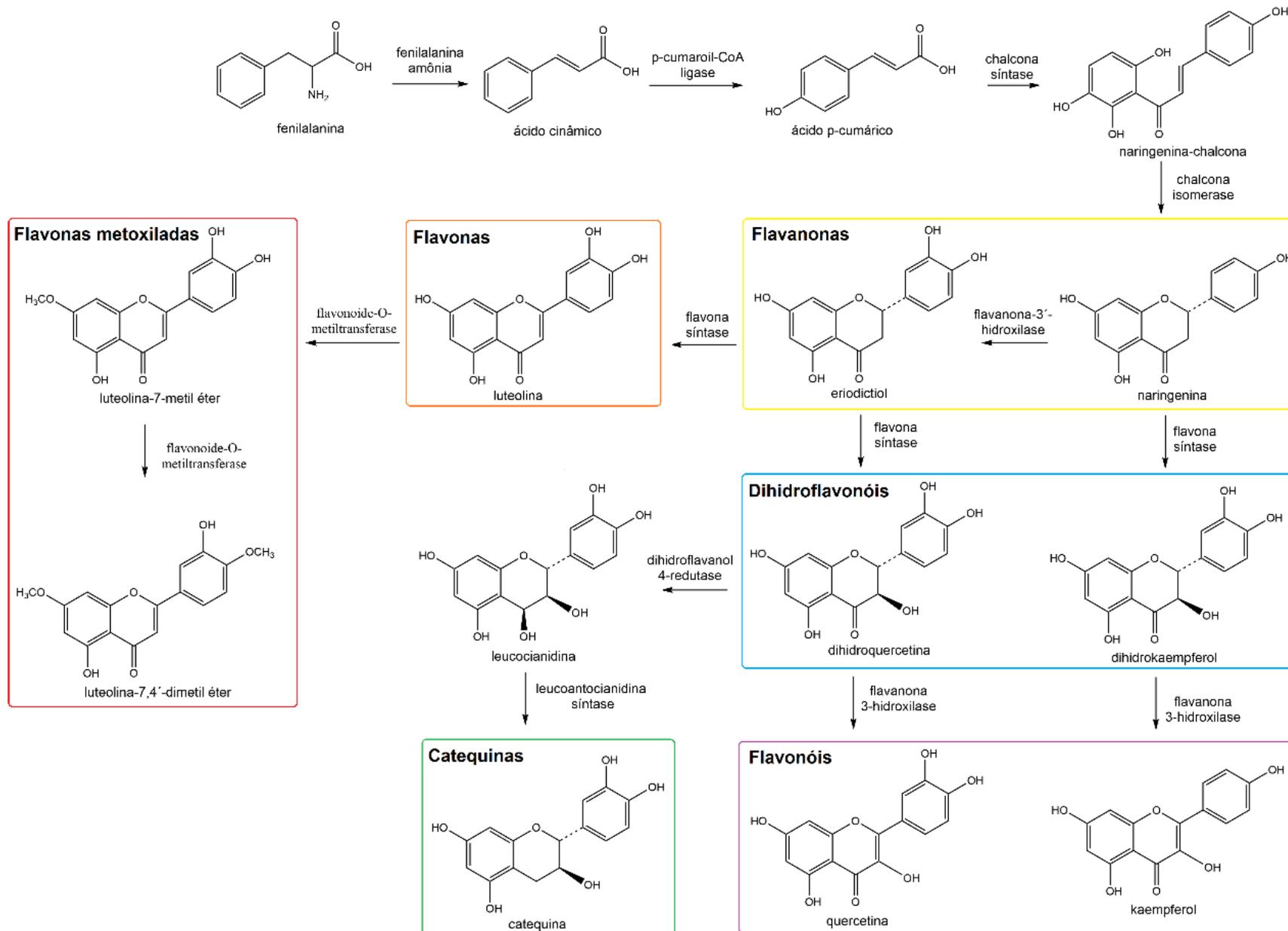


Figura 37. Rota de biossíntese das subclasses de flavonoides. (Retirado de Jiang et al 2016 e Dewick, 2009, com modificações).

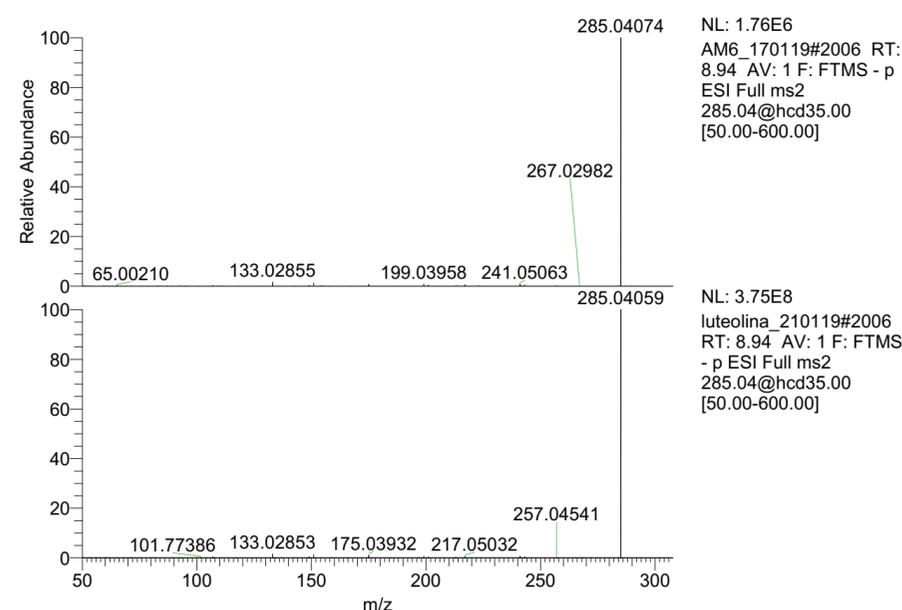
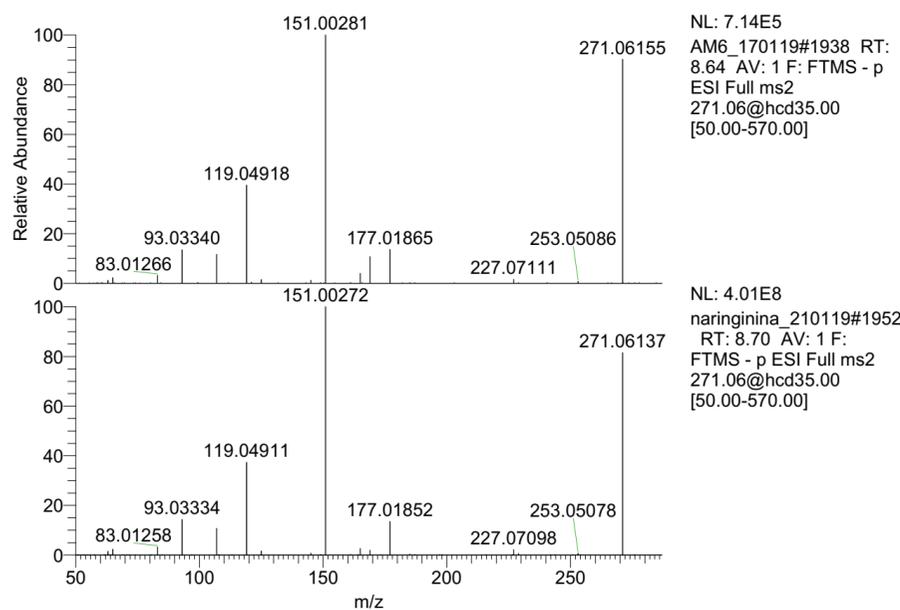
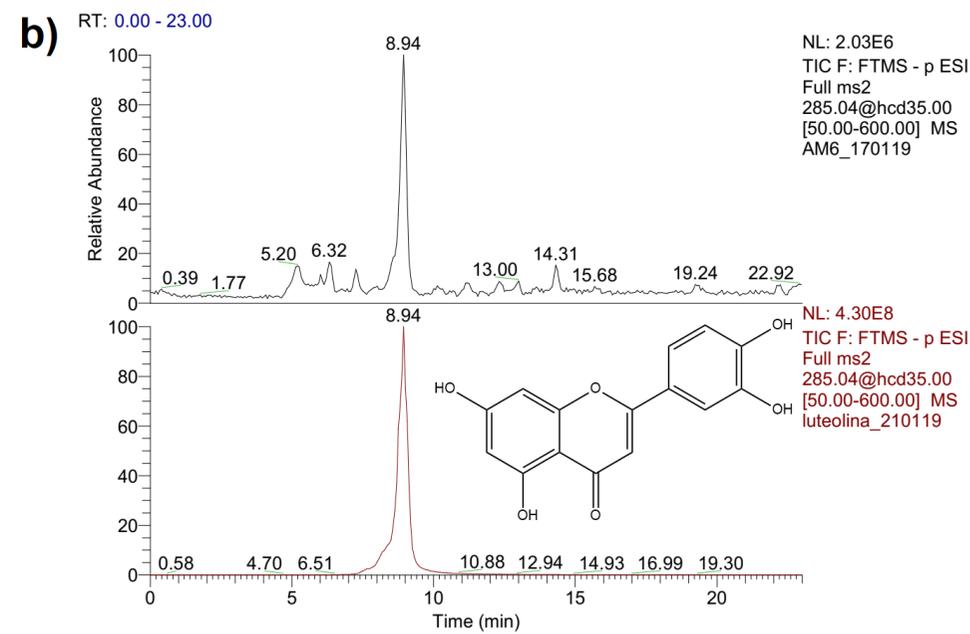
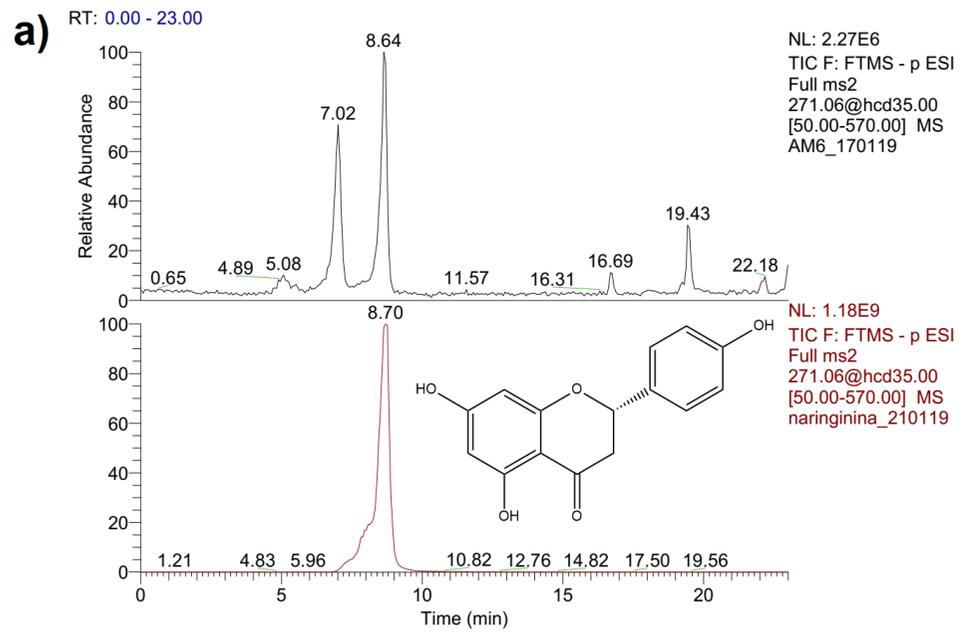


Figura 38. Comparação do extrato acetato 2 da estação chuvosa (EA2) com os padrões (a) naringenina e (b) luteolina por CLAE-IES-EM/EM.

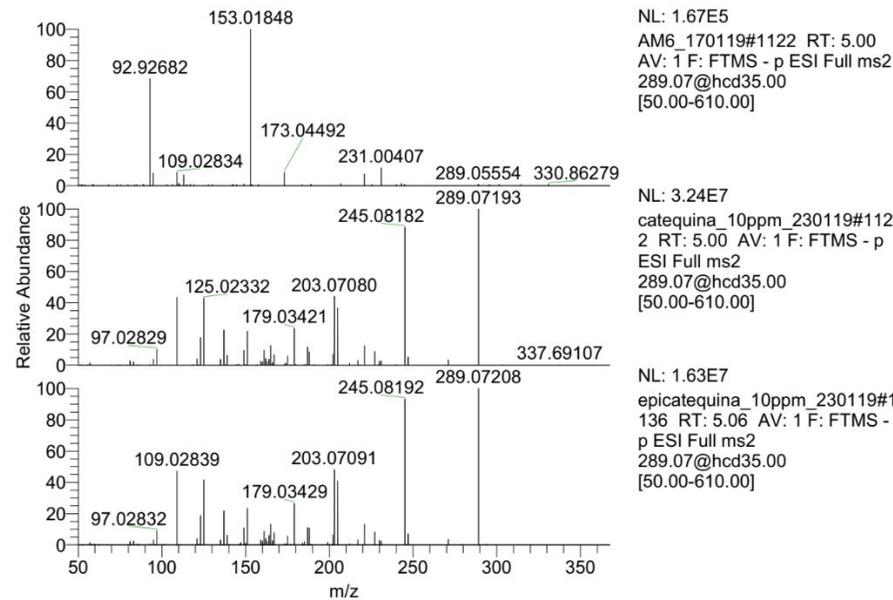
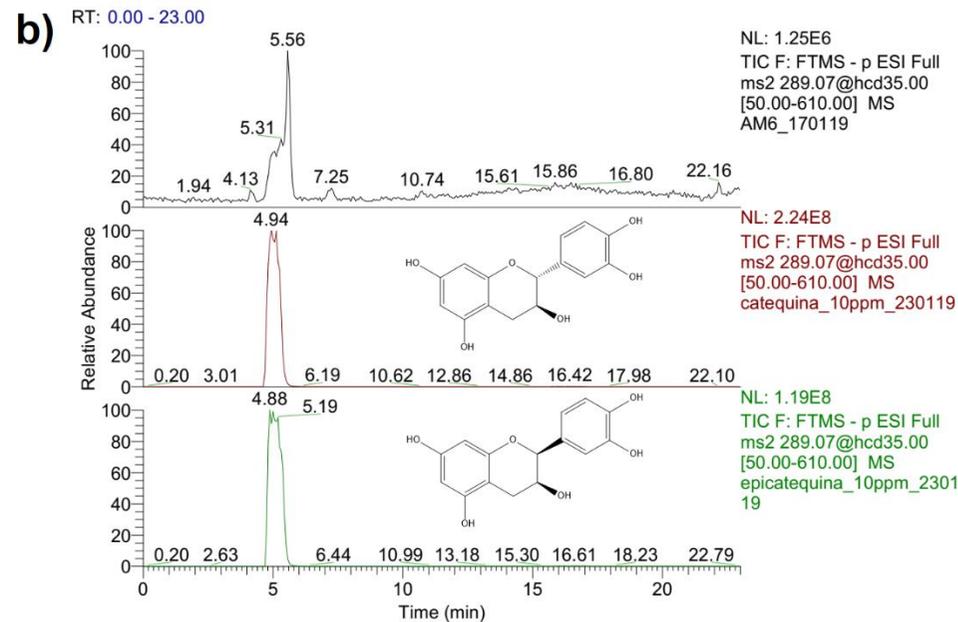
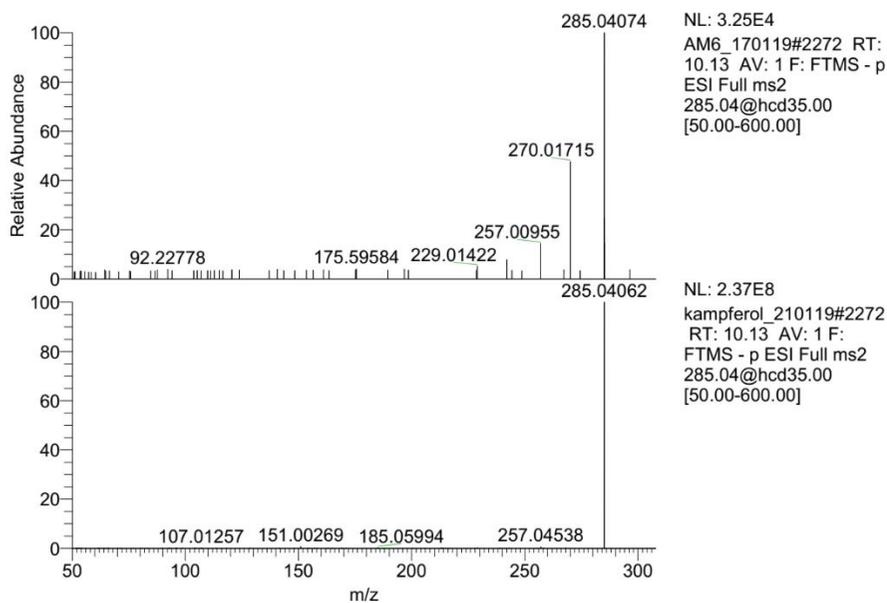
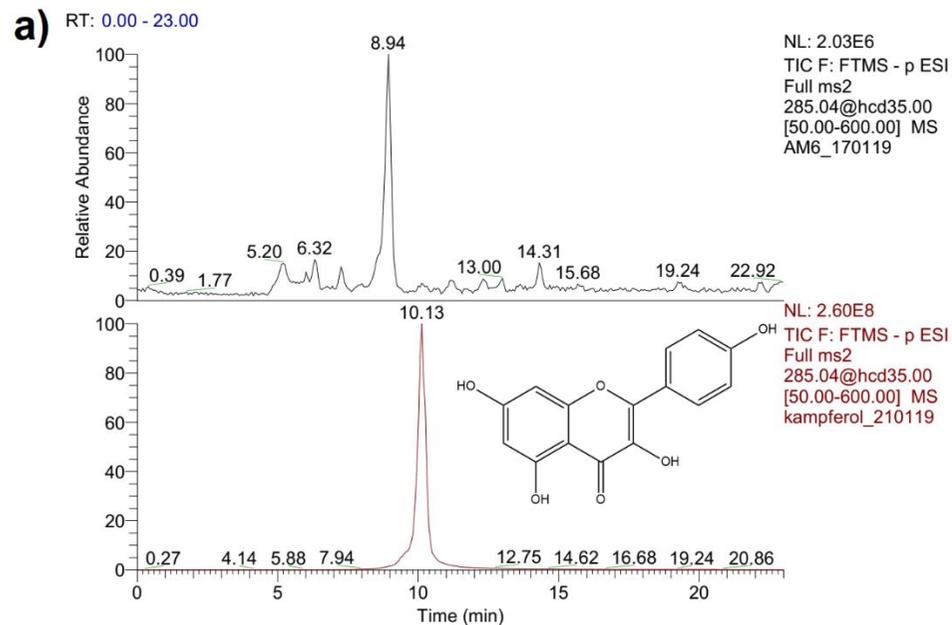


Figura 39. Comparação do extrato acetato 2 da estação chuvosa (EA2) com os padrões kaempferol, catequina e epicatequina por CLAE-IES-EM/EM.

Segundo Cuykens e Claeys (2004) na identificação de flavonoides agliconas através de espectrometria de massas por *eletrospray*, os fragmentos mais importantes a serem observados são resultantes da clivagem C-C do anel C, os quais produzem como íons produtos os fragmentos  $i,jA^-$  e  $i,jB^-$ . Estes fragmentos são gerados pela reação Retro Diels-Alder (RDA) e são informativos do tipo e número de substituintes nos anéis A e B. Na nomenclatura proposta por Ma e colaboradores (1997), as letras *i* e *j* referem-se as ligações quebradas (figura 40).

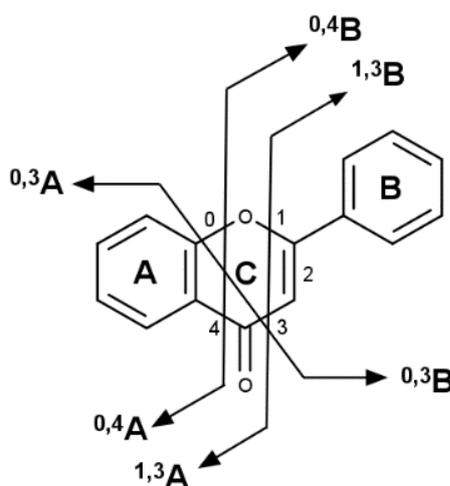


Figura 40. Nomenclatura dos íons de produtos diagnósticos da fragmentação via reação RDA. (Adaptado de Cuykens et al 2004).

No espectro de massa da naringenina ( $m/z$  271,06155  $[M-H]^-$ ) foram observados os íons diagnósticos  $m/z$  151,00281 ( $[^{1,3}A-H]^-$ ) e  $m/z$  119,04918 ( $[^{1,3}B-H]^-$ ), referentes à clivagem na ligação C1-C3 e o íon  $m/z$  107,01273 atribuído ao fragmento  $[^{0,4}A-H]^-$ , confirmando a presença de dois grupos hidroxila no anel A. Apesar da baixa intensidade dos sinais observados no espectro de fragmentação da luteolina ( $m/z$  285,04074  $[M-H]^-$ ) em 35eV, foi possível atribuir os íons diagnósticos  $[^{1,3}A-H]^-$  e  $[^{1,3}B-H]^-$  aos sinais em  $m/z$  151,00278 e  $m/z$  133,02847, respectivamente (figura 41).

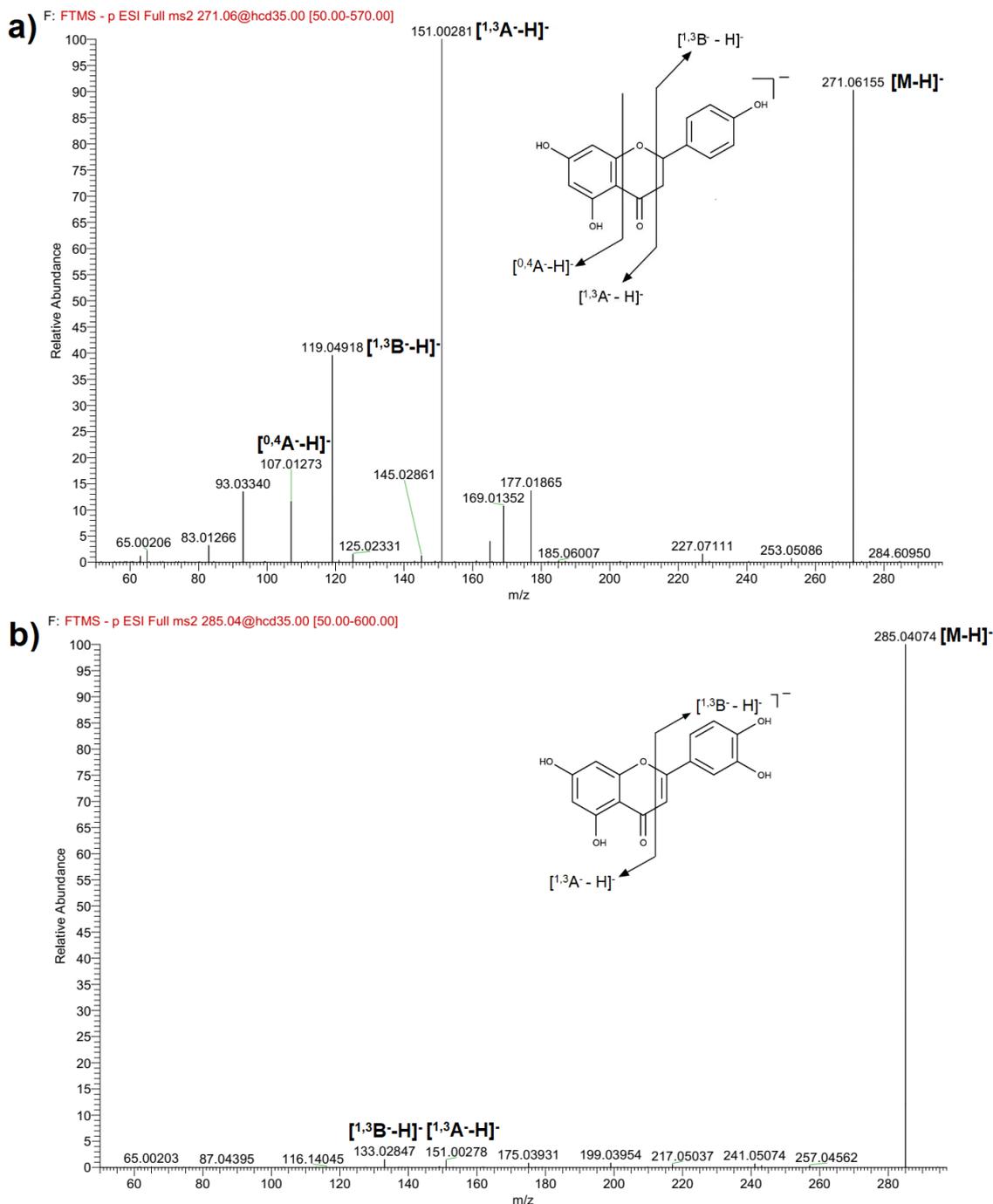
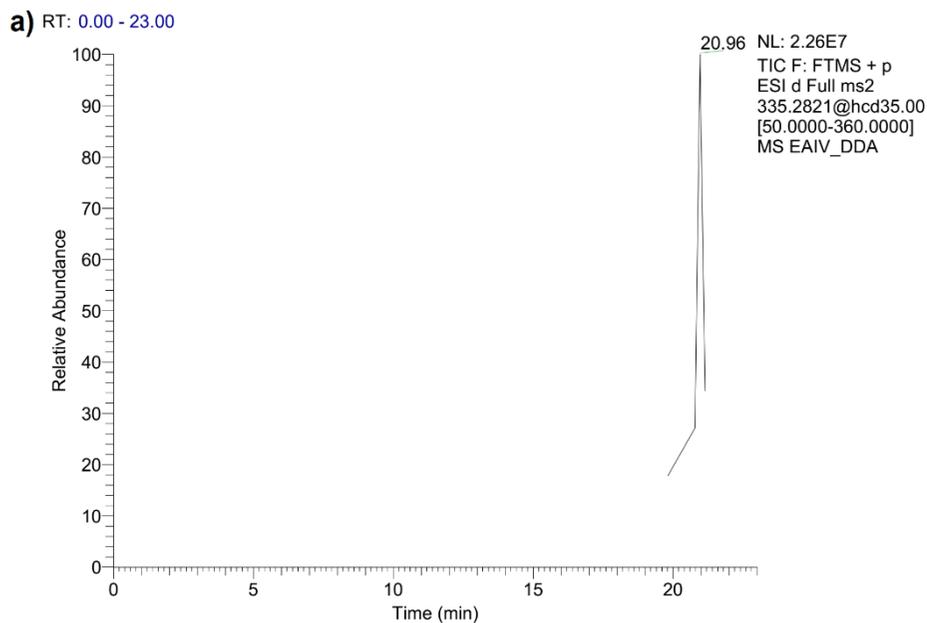
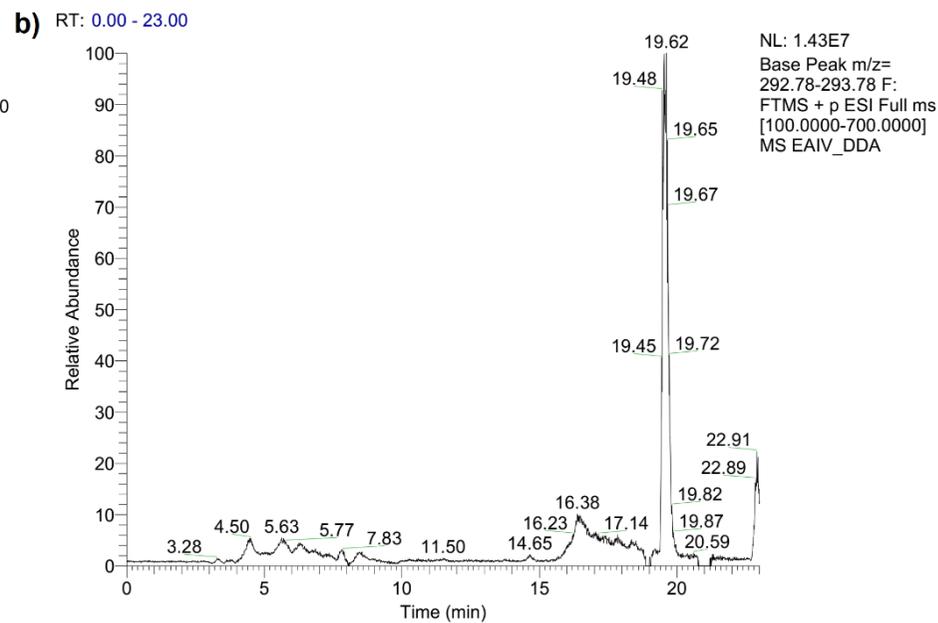
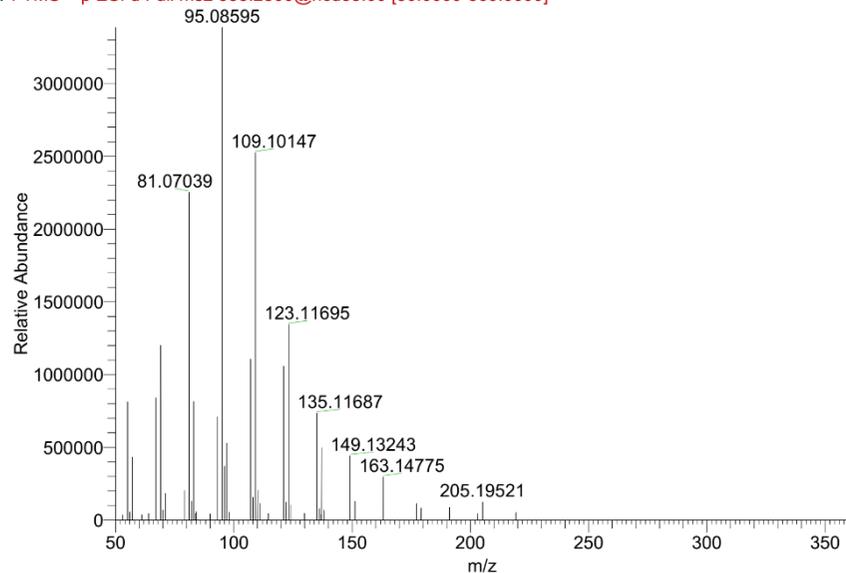


Figura 41. Espectro de massas de alta resolução no modo de íon negativo (35 eV) de (a) naringenina e (b) luteolina, com íons de produtos diagnósticos gerados pela reação RDA.

Os diterpenos isolados acetato labdan-8-ol-15-il (**1**), labdan-8,15-diol (**2**) e ácido 8-hidroxiabdan-15-óico (**3**), foram atribuídos aos picos cromatográficos verificados nos extratos analisados por CLAE-IES-EM/EM, possibilitando o estudo de sua fragmentação (figuras 42 e 43).



EAIV\_DDA #6014 RT: 20.96 AV: 1 NL: 3.38E6  
F: FTMS + p ESI d Full ms2 335.2800@hcd35.00 [50.0000-360.0000]



EAIV\_DDA #5561 RT: 19.49 AV: 1 NL: 9.81E5  
F: FTMS + p ESI d Full ms2 293.2837@hcd35.00 [50.0000-320.0000]

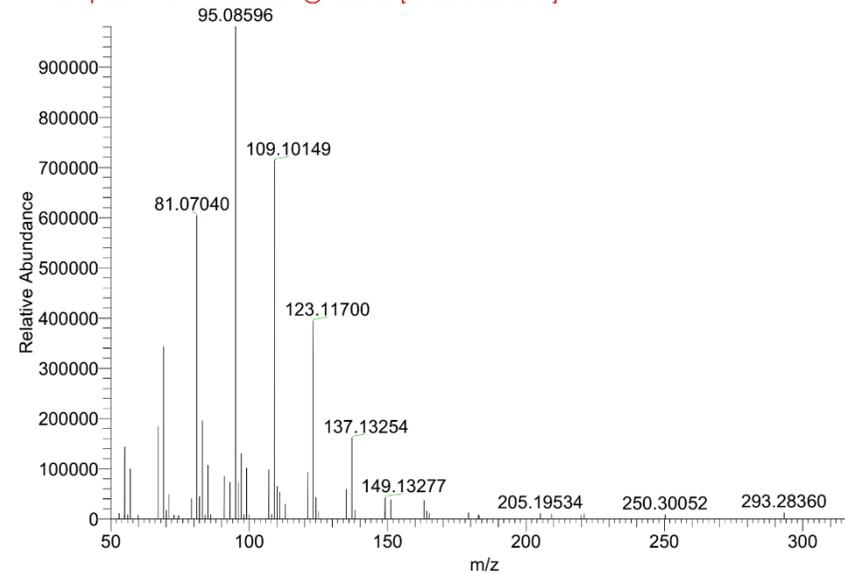
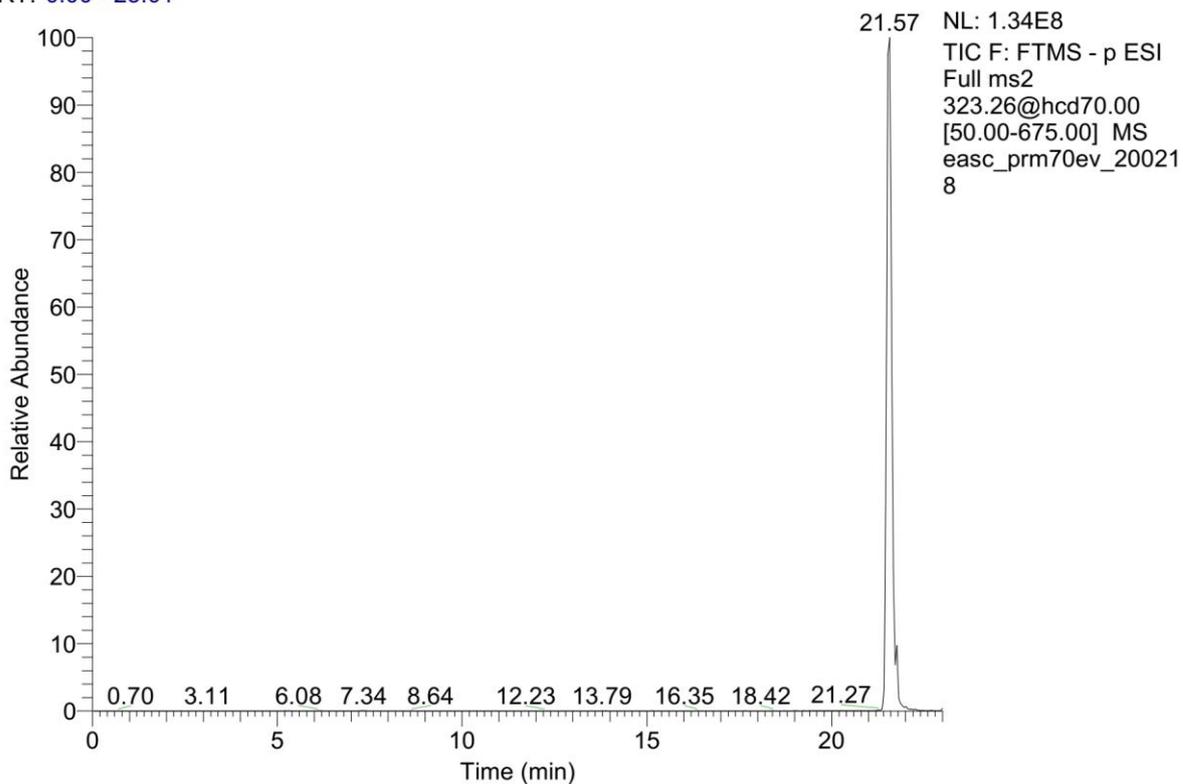


Figura 42. Cromatogramas e espectros de massas dos íons atribuídos aos compostos isolados (a) acetato labdan-8-ol-15-il (**1**) ( $m/z$  335,2821  $[M-H_2O+H]^+$ ) e (b) 8,15-labdanodiol (**2**) ( $m/z$  293,2837  $[M-H_2O+H]^+$ ).

RT: 0.00 - 23.01



easc\_prm70ev\_200218 #4299 RT: 21.57 AV: 1 NL: 2.65E7  
F: FTMS - p ESI Full ms2 323.26@hcd70.00 [50.00-675.00]

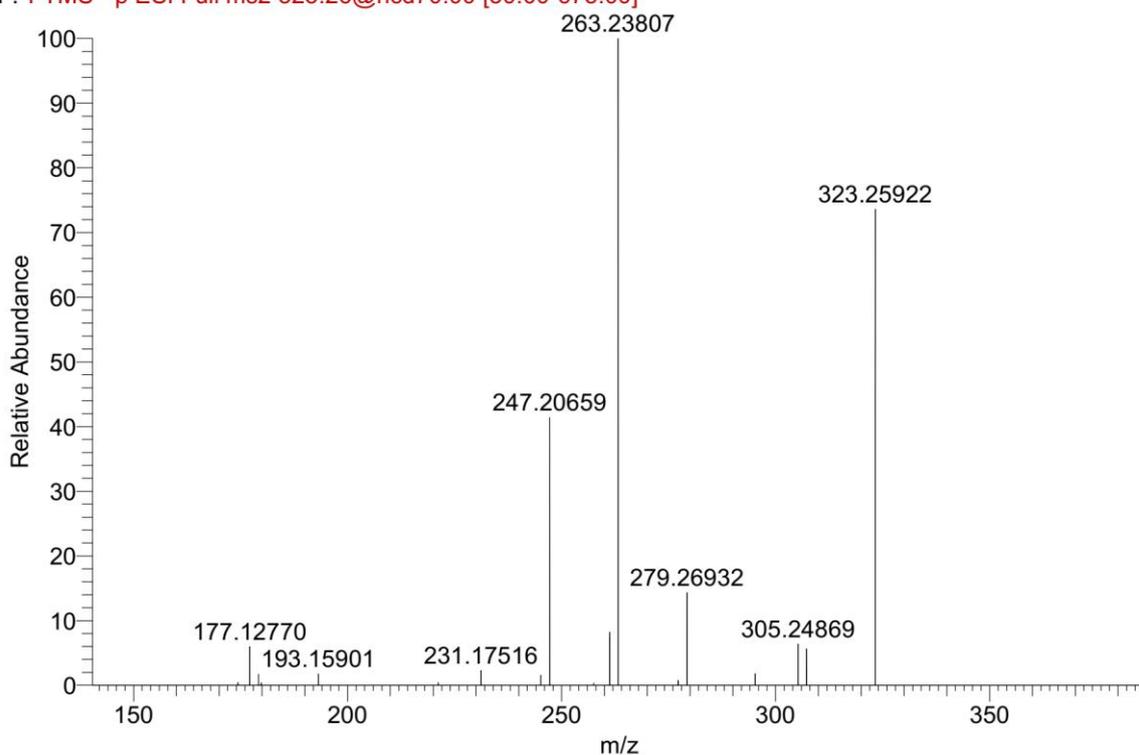


Figura 43. Cromatogramas e espectros de massas do íon precursor atribuído ao composto isolado ácido 8-hidroxi-15-labdanóico (**3**) ( $m/z$  323,25922 [M-H]).

No modo negativo de ionização foi possível observar o ácido 8-hidroxilabdan-15-óico (**3**), atribuído ao íon precursor  $m/z$  323,25922  $[M-H]^-$ . O espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  323,25922  $[M-H]^-$  em 70 eV permitiu a observação dos íons  $m/z$  305,24857,  $m/z$  279,26935 e  $m/z$  57,03333, os quais foram justificados através de um mecanismo de fragmentação, baseado nas fórmulas atribuídas aos íons fragmentos (figuras 44 e 45).

F: FTMS - p ESI Full ms2 323.26@hcd70.00 [50.00-675.00]

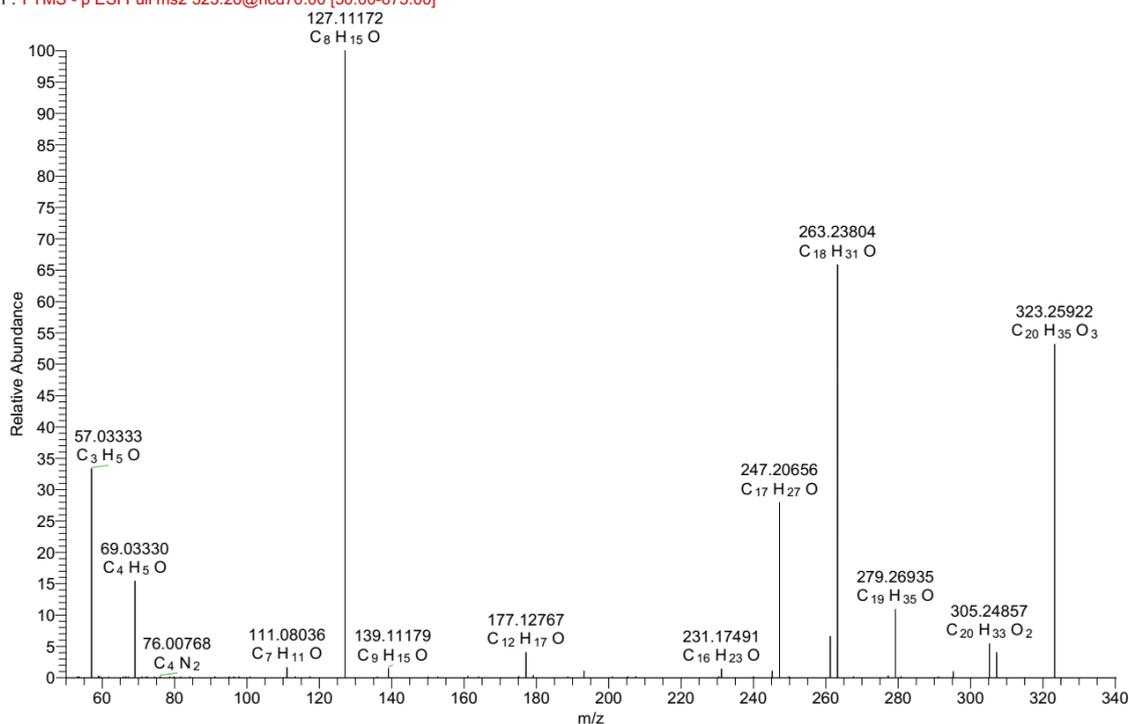


Figura 44. Espectro de fragmentação do íon precursor  $m/z$  323,25922  $[M-H]^-$  com as fórmulas atribuídas a cada íon fragmento.

No espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  323,25922  $[M-H]^-$  podem ser observadas duas perdas neutras de dióxido de carbono ( $-CO_2$ ) e água ( $-H_2O$ ), referentes as transições de  $m/z$  323,25922  $\rightarrow$   $m/z$  279,26935 e  $m/z$  323,25922  $\rightarrow$  305,24857, respectivamente. Estas perdas de dióxido de carbono e água, indicam a presença de grupos ácido carboxílico e hidroxila na estrutura de diterpenos. A perda de água está associada a fragmentação por rearranjo remoto de hidrogênio, um mecanismo que envolve uma eliminação-1,2 intramolecular (II), com conseqüente formação de uma ligação dupla, levando a formação do fragmento em  $m/z$  305,24857 (Demarque et al, 2016). Para isso ocorra a carga negativa deve estar localizada na hidroxila em C-15.

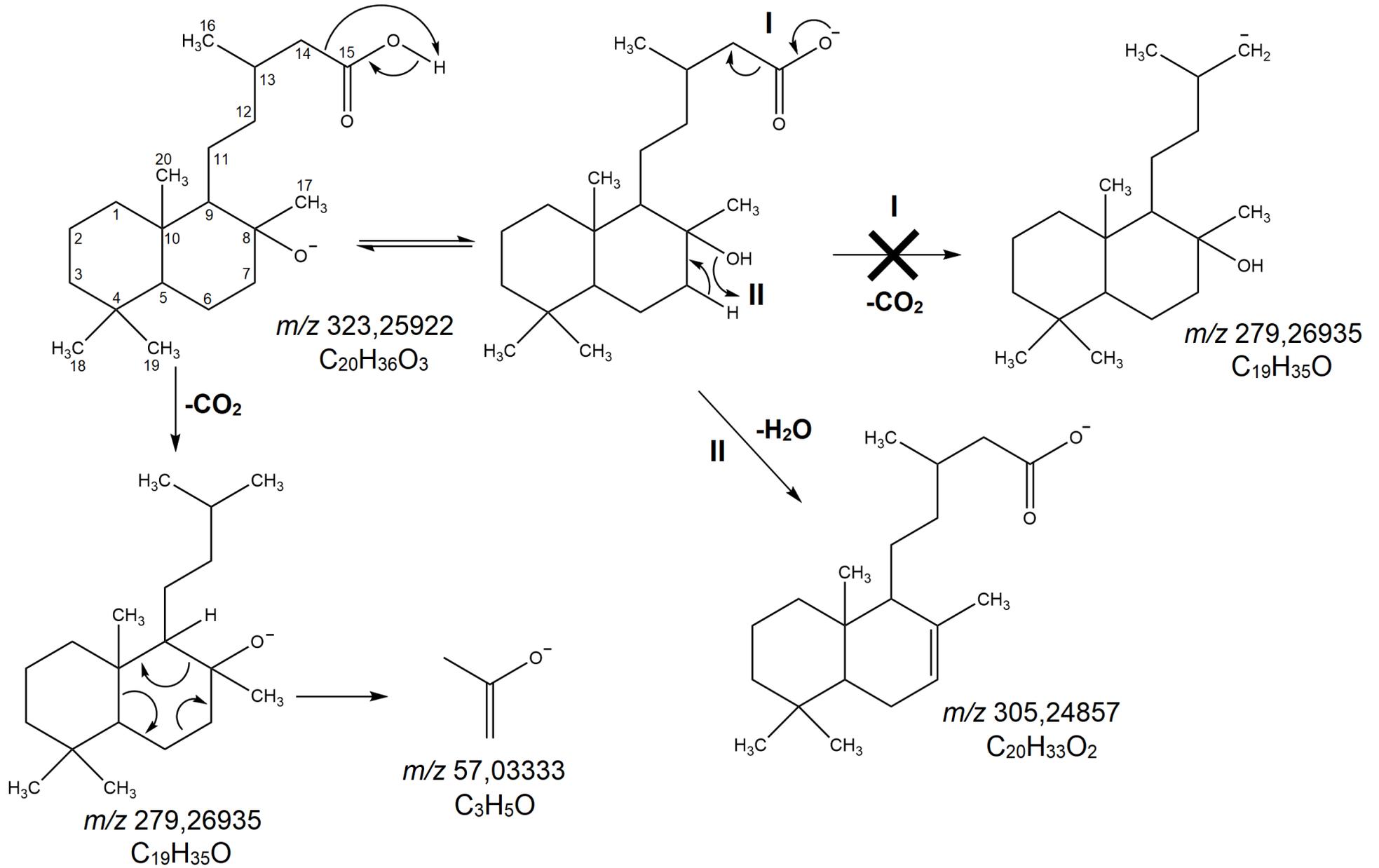
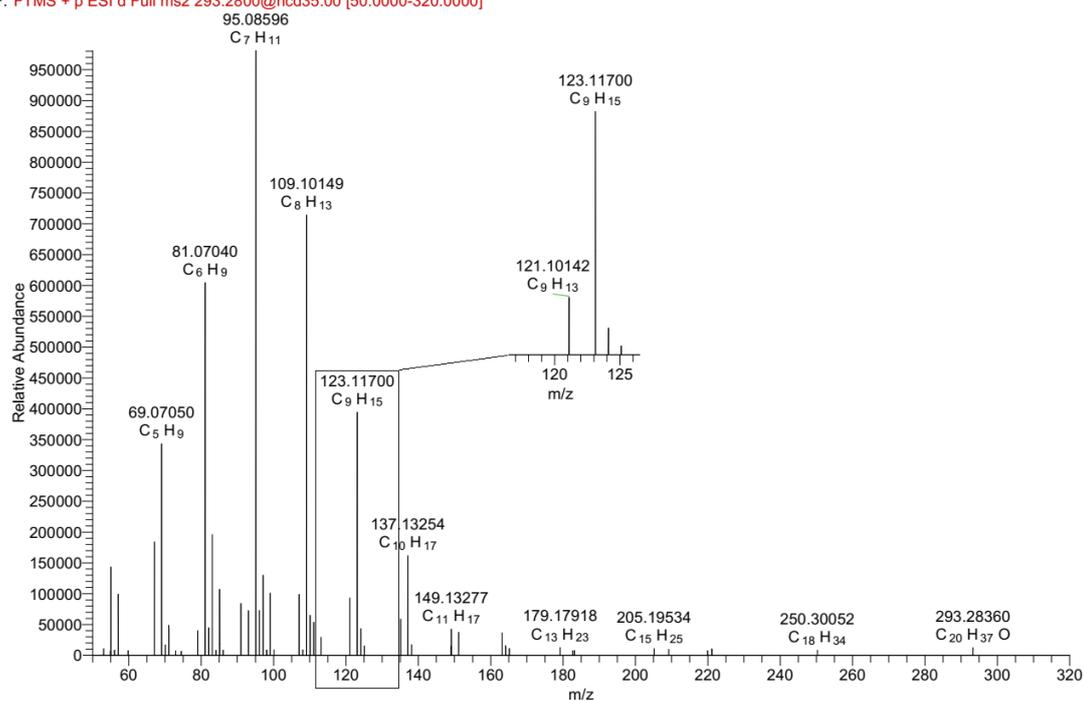


Figura 45. Proposta de fragmentação para o íon precursor  $m/z$  323,25922 [M-H]<sup>-</sup>, com base nos trabalhos de Aguiar et al (2018) e Amaral (2009).

A perda de dióxido de carbono (-CO<sub>2</sub>) poderia ocorrer através de um mecanismo de indução de carga, com a migração da carga negativa do grupo carboxilato para o carbono α-carbonil. Entretanto, a carga negativa é muito pouco estabilizada (Aguiar et al, 2018). Então, o processo é precedido pela migração do cátion H<sup>+</sup> da hidroxila do carbono C-15 para a hidroxila em C-8, permitindo que perda de dióxido de carbono ocorra através do rearranjo remoto de hidrogênio, onde a ligação dupla é formada na molécula de CO<sub>2</sub> eliminada, formando assim o fragmento em *m/z* 279,26935. Por fim, o fragmento em *m/z* 57,0333 pode ser explicado através de uma reação de cicloversão pericíclica.

Os diterpenos acetato labdan-8-ol-15-il (**1**) e o labdan-8,15-diol (**4**) foram detectados no modo positivo de ionização como moléculas protonadas com perda neutra de água, atribuídos aos íons *m/z* 335,29413 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> e *m/z* 293,28360 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, em um processo pode ocorrer através do mecanismo de rearranjo remoto de hidrogênio, levando a formação de ligação dupla em C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>, ou através da clivagem por indução simples e a formação de um carbocátion terciário, sendo que ambos os processos são viáveis (figuras 46 e 47).

a) F: FTMS + p ESI d Full ms2 293.2800@hcd35.00 [50.0000-320.0000]



b) F: FTMS + p ESI d Full ms2 335.2800@hcd35.00 [50.0000-360.0000]

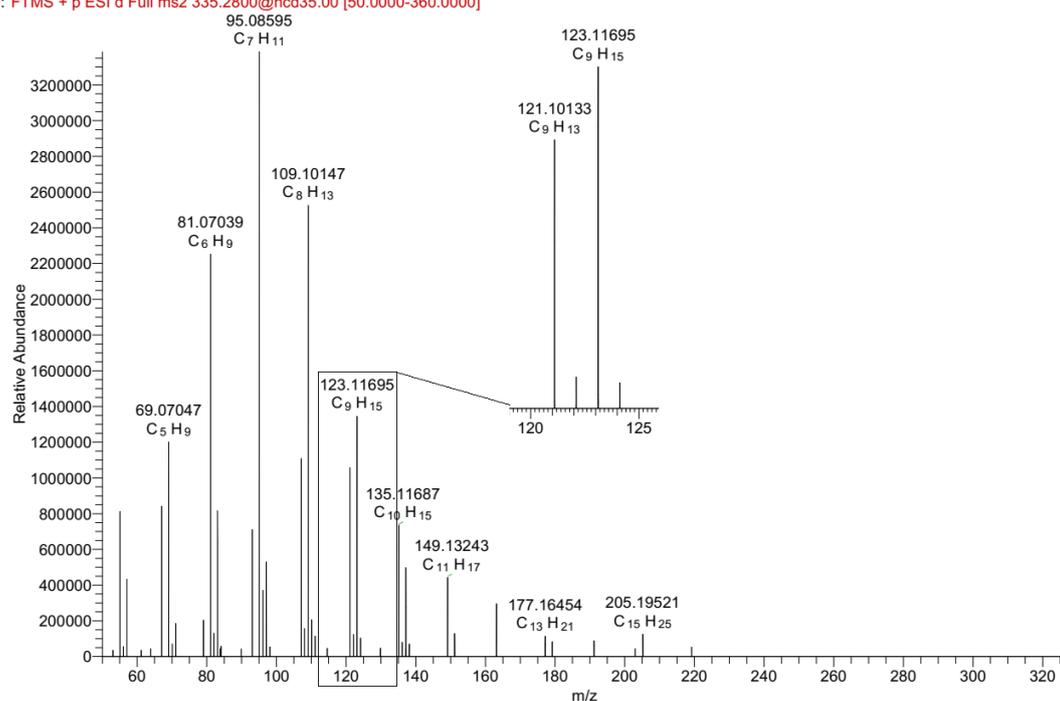


Figura 46. Espectros de fragmentação EM/EM dos íons  $m/z$  335,29413  $[M-H_2O+H]^+$  e  $m/z$  293,28360  $[M-H_2O+H]^+$ .

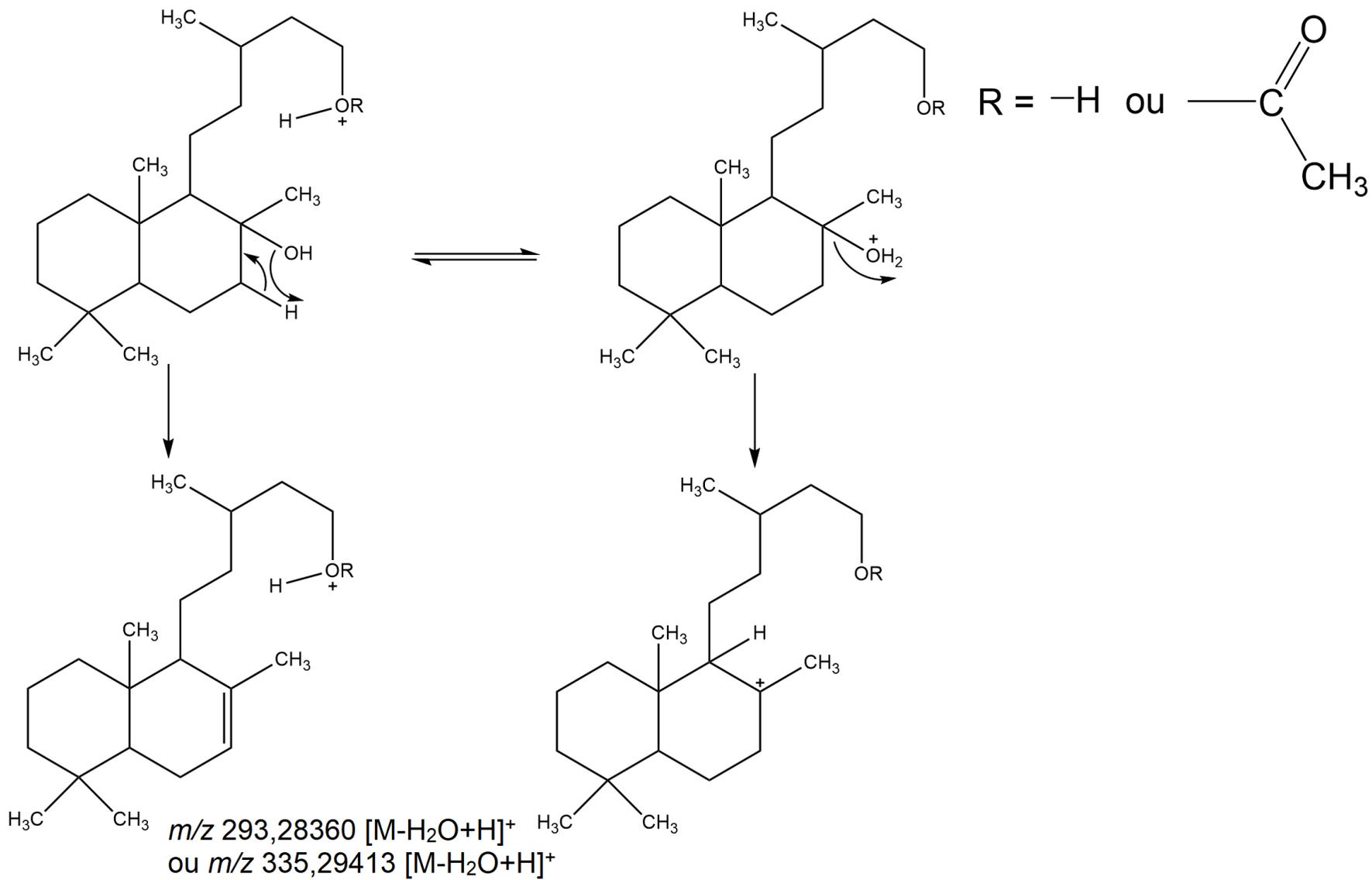


Figura 47. Proposta de mecanismo de formação dos íons  $m/z$  335,29434  $[M-H_2O+H]^+$  e  $m/z$  293,28360  $[M-H_2O+H]^+$  com base nos trabalhos de Aguiar et al (2018) e Amaral (2009).

Assim as análises de CLAE-IES-EM/EM permitiram a atribuição dos compostos isolados acetato labdan-8-ol-15-il (**1**), oxianina B (**3**), labdan-8,15-diol (**4**) e ácido 8-hidroxiabdan-15-óico (**7**) e a identificação dos flavonoides luterolina e naringenina, confirmados com uso de padrões. Além disso identificou-se também uma série de outros flavonoides polimetoxilados, isômeros de posição das FPMs isoladas quercetagetina-3,5,6,3',4'-pentametil éter (**2**) ( $m/z$  387,10904), crisoplenetina (**5**) ( $m/z$  373,0932) e paquidopol (**6**) ( $m/z$  343,0825).

Observou-se que o perfil químico dos extratos de *L. artemisiifolia* é caracterizado por flavonoides das subclasses de flavanonas, flavonas e uma série de flavonas polimetoxiladas. Os diterpenos labdanos, também se mostraram característicos desta espécie, apesar de terem sido identificados em menor quantidade. A análise de CLAE-IES-EM/EM, entretanto, indica uma série de íons precursores ainda não identificados e, portanto, esta investigação foi continuada através das análises por redes moleculares com uso da plataforma GNPS. Um aspecto a ser destacado é a diferença entre os extratos etanólicos das plantas nativas e *in vitro*, principalmente em relação ao íon  $m/z$  593,1519, que apresenta uma abundância isotópica muito baixa no extrato EE *in vitro*. Isso é um indício de variações no metabolismo secundário entre esses dois grupos de plantas. Portanto, os dados de CLAE-IES-EM/EM foram usados para uma análise quimiométrica para comparação entre os metabólitos secundários das plantas nativas do Cerrado e *in vitro*.

## 6. Identificação de metabólitos secundários de *L. artemisiifolia* através de análises por redes moleculares e espectrometria de massas

As análises de cromatografia clássica e de CLAE-IES-EM/EM mostraram a presença de metabólitos pertencentes às classes de diterpenos labdanos e flavonoides. Considerando que os dados das análises de CLAE-IES-EM/EM ainda apresentavam metabólitos secundários não identificados, incluindo os indicados pela análise quimiométrica, foi realizada uma análise por redes moleculares na plataforma GNPS, buscando-se fazer a anotação destes compostos presentes nos extratos de *L. artemisiifolia*.

Esta abordagem tem como vantagem permitir a anotação de compostos presentes em várias amostras de forma simultânea, mostrando as similaridades estruturais entre eles. Isto baseia-se no agrupamento de compostos que apresentam semelhanças nos padrões de fragmentação EM/EM, formando *clusters*, onde os espectros de fragmentação EM/EM de cada íon precursor são representados por nós (Aron et al, 2020).

Para que isso ocorra é necessário a seleção de parâmetros tanto na aquisição dos dados como também na construção das redes moleculares (Amaral, 2018). A plataforma GNPS utiliza os fragmentos detectados para cada íon precursor, seja para comparação com a biblioteca espectral como também para o agrupamento dos íons nos *clusters* da rede molecular. Portanto, foi selecionado a melhor energia de colisão para formação de espectros de fragmentação EM/EM informativos, ou seja, que apresentem o maior número de íons produtos levem a identificação de perdas de grupos que auxiliem na anotação da substância (Aguilar et al, 2018).

Nesse sentido a energia de 35 eV foi a que melhor possibilitou a observação de fragmentos de íons produtos informativos quanto a estrutura química de flavonoides, nos modos positivo e negativo. Como discutido na seção 5, os espectros de flavonas e flavanonas adquiridos em 35 eV, levaram à observação de íons de produtos diagnósticos  $[^{1,3}\text{A}^- \text{H}]^-$  e  $[^{1,3}\text{B}^- \text{H}]^-$  para estas subclasses. Observou-se também que para as flavonas polimetoxiladas a energia de 35 eV levou à formação de fragmentos relacionados a perda de metila ( $\bullet\text{CH}_3$ ), fragmentos diagnósticos dessa subclasse (figura 48).

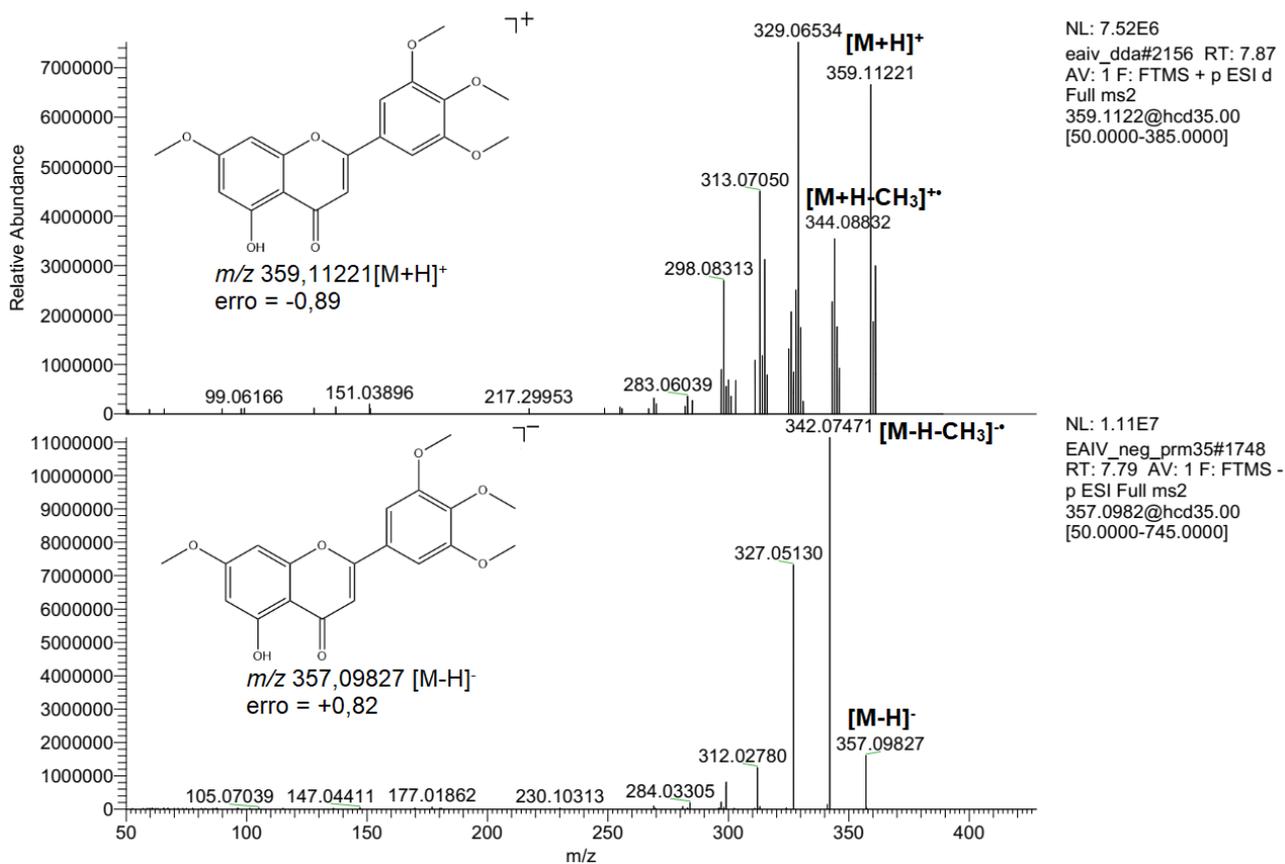


Figura 48. Espectro de fragmentação EM/EM dos íons precursores a)  $m/z$  359,11221 e b)  $m/z$  357,09827 nos modos positivo e negativo de ionização em 35 eV.

A literatura sugere o uso de maiores energias de ionização no modo negativo para a fragmentação de flavonas polimetoxiladas (Cuykens & Claeys, 2004) (figura 49). Apesar de haver um aumento no número de íons produtos, não houve mudança nas anotações obtidas na plataforma GNPS para estas substâncias.

F: FTMS - p ESI Full ms2 359.08@hcd70.00 [50.00-750.00]

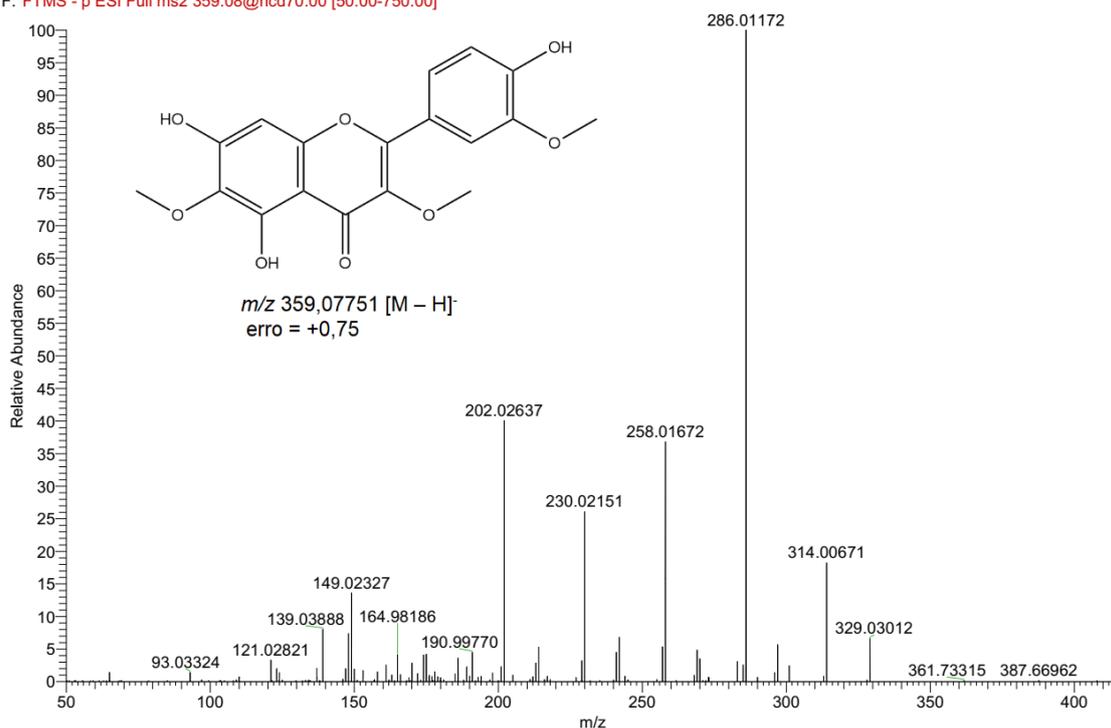


Figura 49. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  359,07751 [M-H]<sup>-</sup> no modo negativo de ionização em 70 eV.

Por outro lado, em relação aos diterpenoides, observou-se diferença significativa entre os dois modos de ionização, sendo que no modo negativo foi necessário a utilização de 70 eV para alcançar-se uma fragmentação razoável (figura 50).

Portanto, para a análise por redes moleculares foram usados os dados de CLAE-IES-EM/EM analisados no modo positivo de ionização adquiridos em 35 eV, enquanto que no modo negativo utilizou-se os dados obtidos em 35 eV e 70 eV.

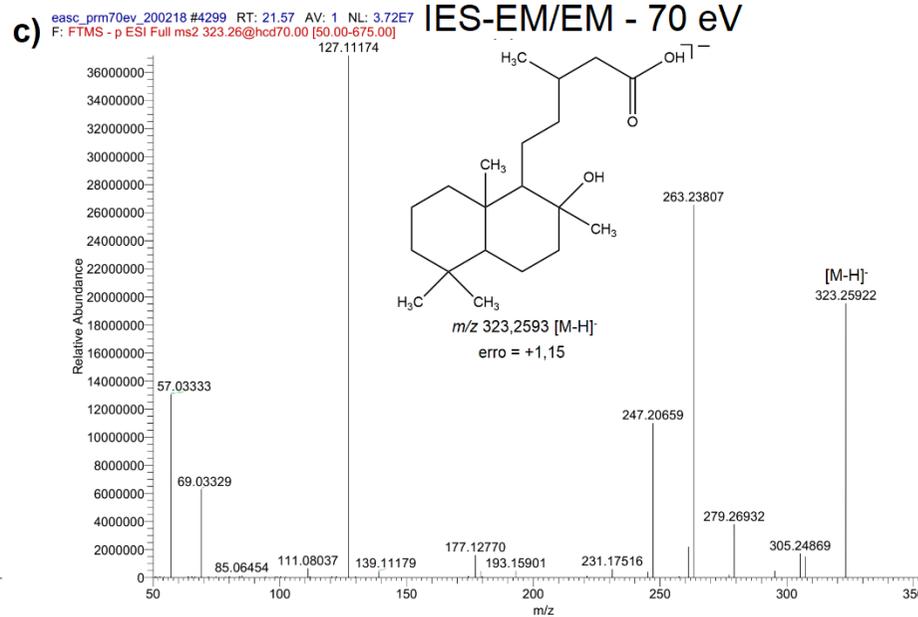
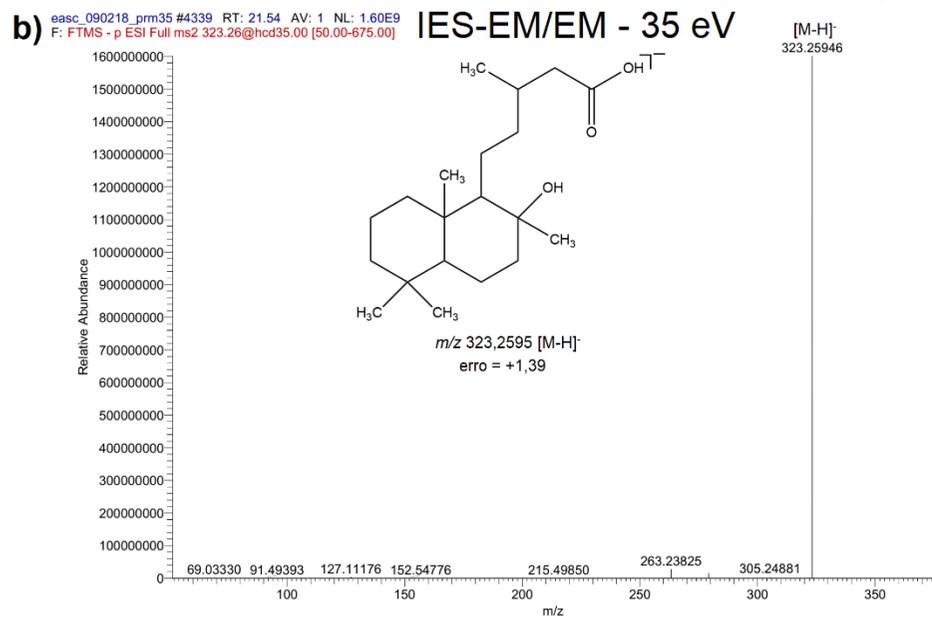
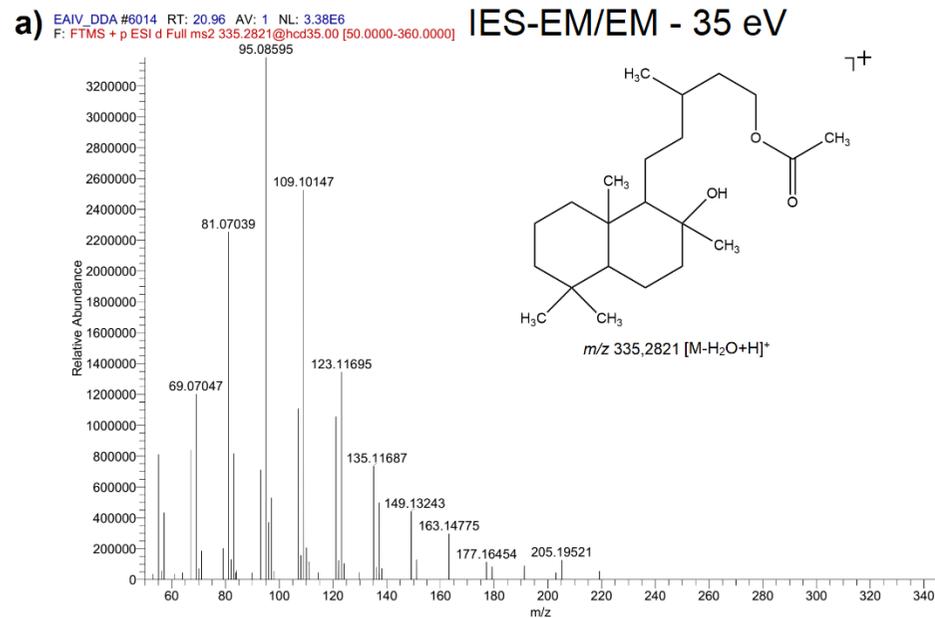


Figura 50. Espectro de fragmentação EM/EM dos íons precursores a)  $m/z$  335,2821 no modo positivo de ionização em 35 eV, b)  $m/z$  323,2595 no modo negativo em 35eV e c)  $m/z$  323,2593 no modo negativo em 70 eV.

## 6.1 Análise por redes moleculares no modo *feature-based molecular networking*

Inicialmente os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo negativo foram usados para uma análise de rede molecular clássica, a qual requer um número menor de etapas de pré-processamento. A rede molecular gerada obteve um grande número de compostos anotados pela biblioteca do GNPS, entretanto apresentou baixa qualidade uma vez que foi observado nos *clusters* o agrupamento de nós referentes ao mesmo íon precursor. Além disso foi notado a presença de nós referentes ao branco (cor roxa) em vários *clusters*, referentes a interferentes da fase móvel (figura 51).

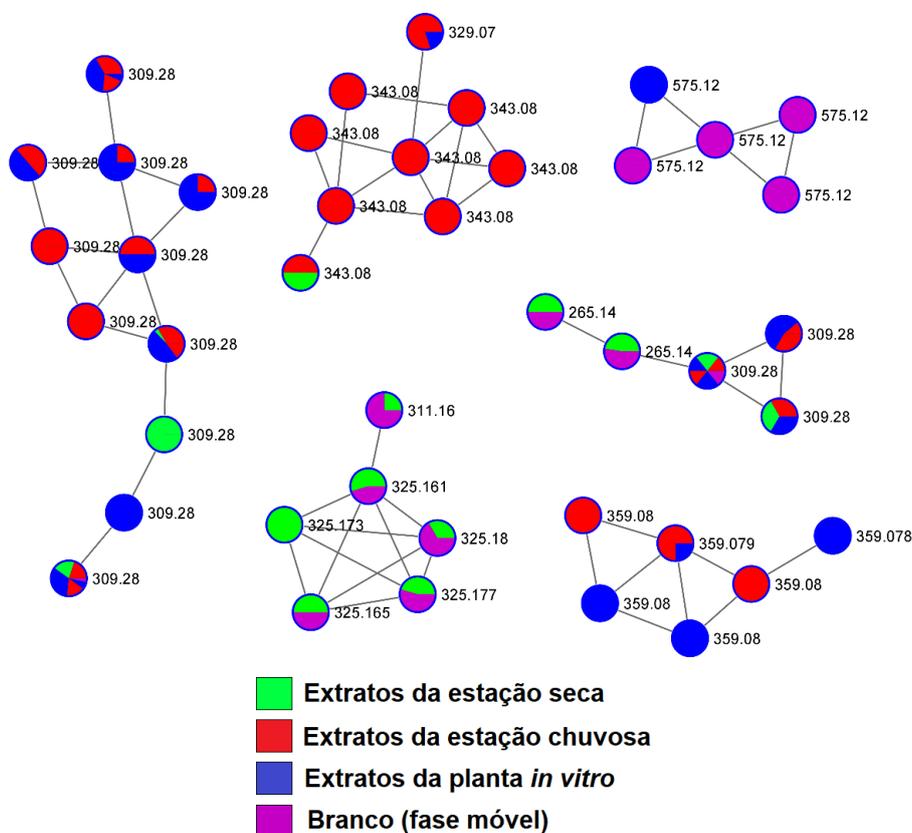


Figura 51. Rede molecular clássica com os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo negativo. (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=b5db3c1063214e708e4441dcf3eadd7d>)

A repetição de nós do mesmo íon precursor pode ser associada ao processo de construção das redes moleculares no modo clássico, que utiliza o algoritmo MScCluster para agrupar os espectros referentes ao mesmo sinal cromatográfico, formando espectros consenso (Pilon et al, 2021). Uma desvantagem é que este algoritmo não leva em consideração os tempos de

retenção agrupando isômeros e isóbaros. Existe também a possibilidade de ocorrerem falhas que levam a formação de múltiplos nós referentes ao mesmo composto, o que possivelmente ocorreu na rede molecular criada no modo negativo (Nothias et al, 2020).

Além disso a presença de flavonoides isoméricos nos extratos de *L. artemisiifolia*, como demonstrado na seção 5 (figura 35 – pág. 73), indica a necessidade da incorporação do tempo de retenção na análise por redes moleculares desta espécie. Nesse contexto, optou-se por realizar as análises por redes moleculares no modo *feature-based molecular networking* (FBMN), o qual se apresenta como ferramenta complementar à rede molecular clássica. No FBMN, informações como padrões isotópicos e o tempo de retenção são incorporadas à rede molecular, através de uma série de etapas de pré-processamento dos dados de CLAE-IES-EM/EM que envolvem detecção do EM1 e EM/EM, construção e deconvolução de cromatogramas, agrupamento de isótopos, alinhamento dos picos cromatográficos e a etapa de *gap filling*, que busca íons precursores em comum entre as amostras, mesmo que não tenham sido detectados (Olivon et al, 2017). Uma vez que as análises de CLAE-IES-EM/EM dos extratos de *L. artemisiifolia* foram adquiridos nas mesmas condições cromatográficas, estas mostraram-se adequadas para análise por redes moleculares pelo FBMN.

Os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo positivo e negativo de *L. artemisiifolia* foram pré-processados no *software* MZmine 2 e após realizadas estas etapas, os dados foram inseridos na plataforma GNPS para construção de rede moleculares no modo FBMN (figuras 52 e 53). Os resultados podem ser acessados nos seguintes endereços eletrônicos:

FBMN no modo negativo:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=180c29ac072b43ddb4061dc1cd7c16>

FBMN no modo positivo:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=d47d56dc33fe42828d1e5f8c366a0f13>

As redes moleculares apresentaram em geral menos nós referentes ao branco quando comparadas ao modo clássico. Foi possível observar a detecção de isômeros que ocorrem em diferentes tempos de retenção, especialmente para as flavonas polimetoxiladas. Os compostos anotados pela correspondência dos dados de fragmentação EM/EM com os dados da biblioteca espectral do GNPS podem ser conferidos nas tabelas 9 e 10.

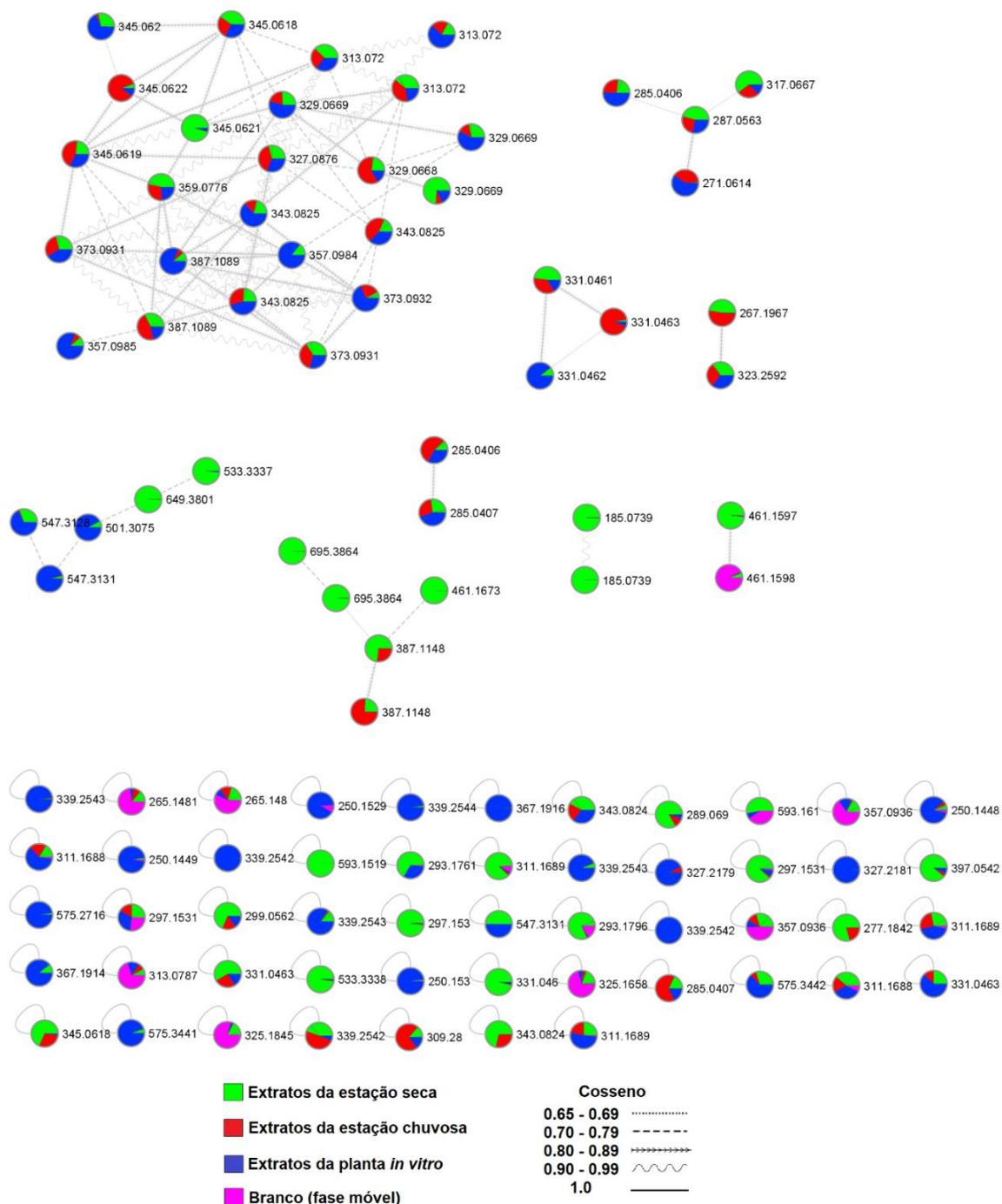


Figura 52. Rede molecular com os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo negativo através do *feature-based molecular networking*.

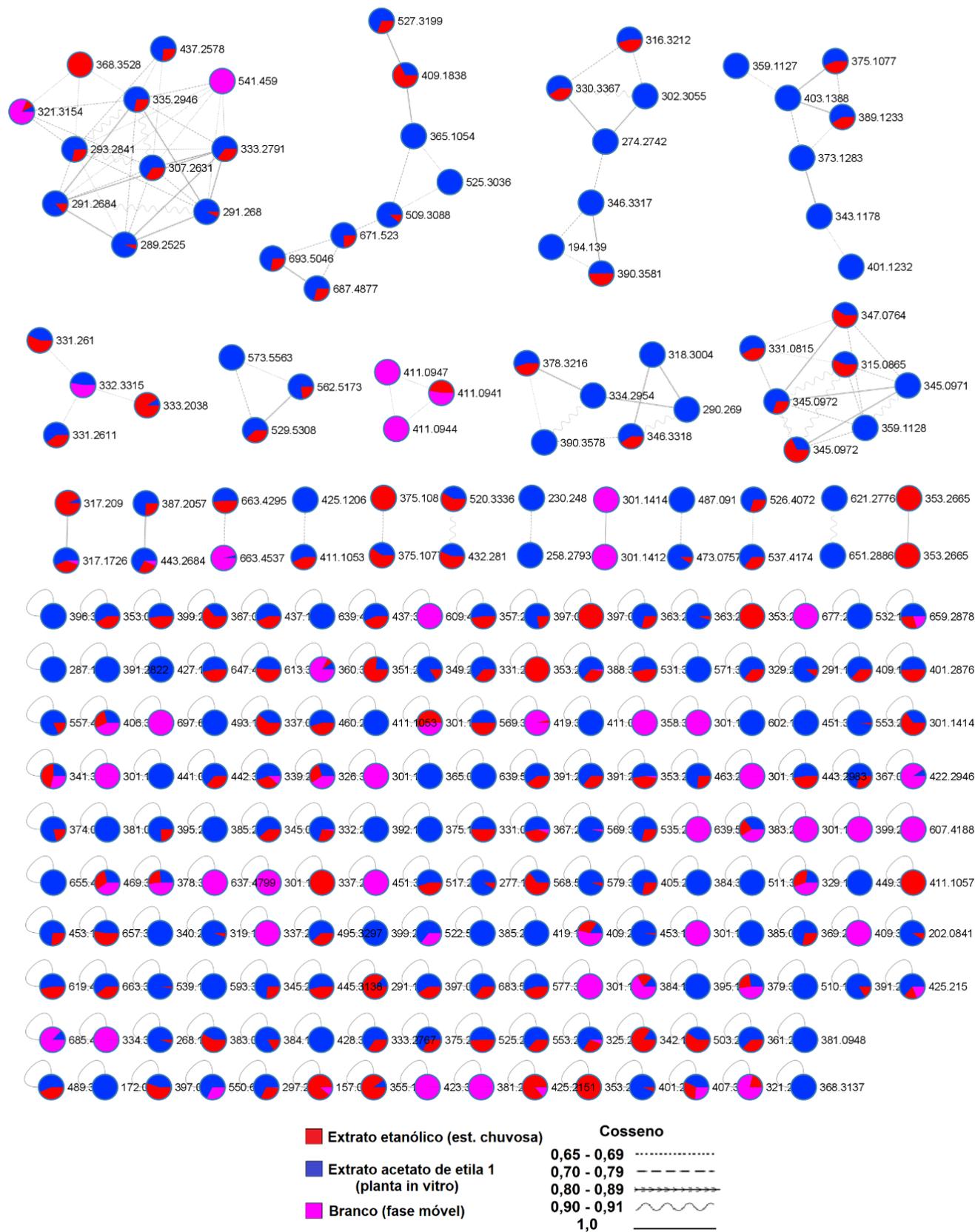


Figura 53. Rede molecular com os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo positivo através do *feature-based molecular network*.

Os flavonoides foram a classe de compostos mais abundante em *L. artemisiifolia*, com representantes das subclasses de flavanona, flavona, flavona polimetoxilada e flavonoide C-glicosilado (figura 54).

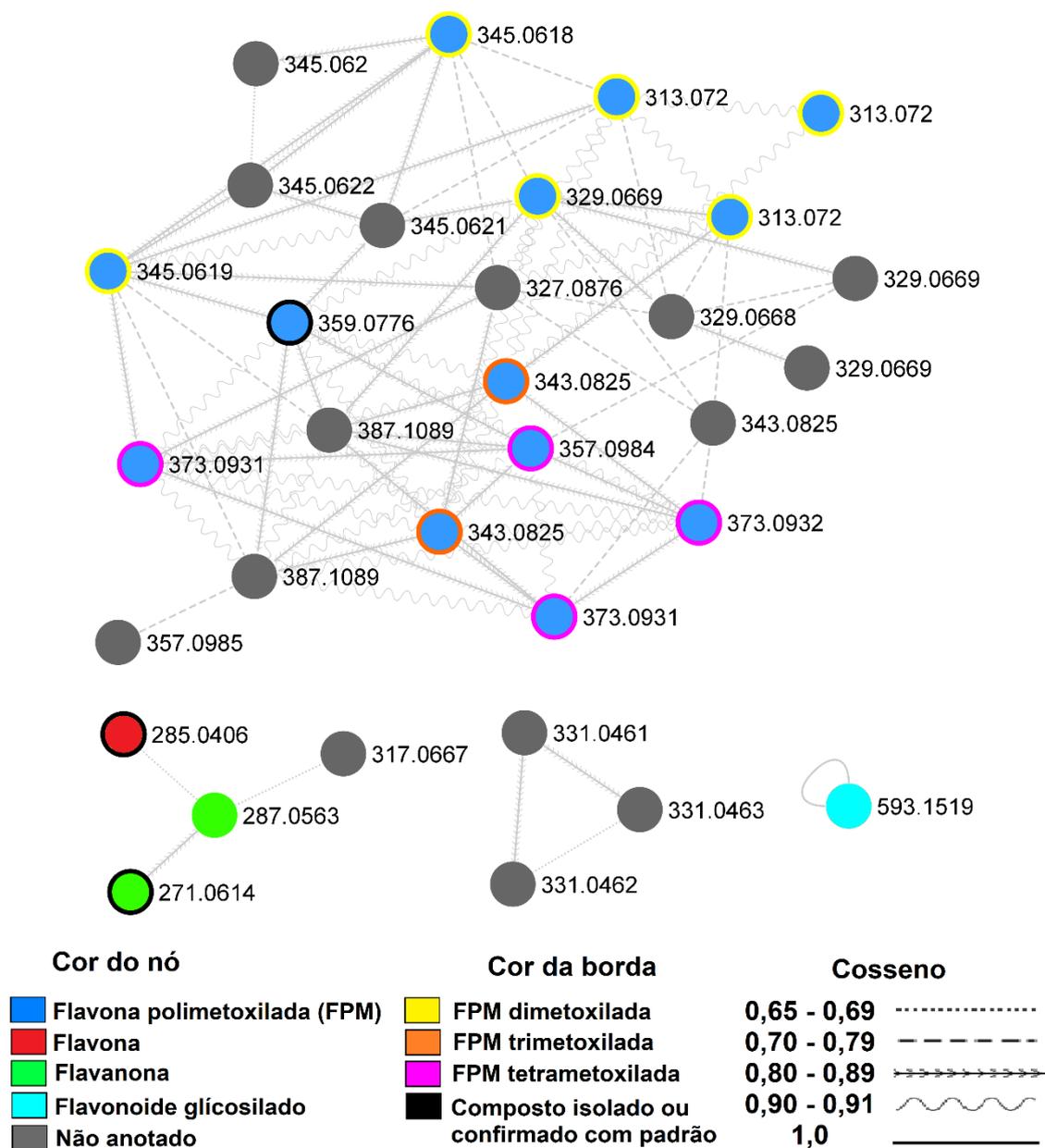


Figura 54. Rede molecular com os dados no modo negativo de ionização, com as subclasses de flavonoides anotadas em *L. artemisiifolia*.

Na rede molecular com os dados no modo negativo, formou-se um *cluster* que apresentou o agrupamento de várias flavonas polimetoxiladas (FPM), onde pode-se diferenciá-las quanto ao grau de metilação (figura 54). Esta foi a subclasse de flavonoides que apresentou maior número de compostos, com a presença de isômeros de posição para uma mesma massa exata. Como os

dados de espectrometria de massas foram adquiridos em um equipamento de alta resolução, as perdas de radical metila ( $\bullet\text{CH}_3$ ) foram medidas com precisão (Faqueti & Sandjo, 2018). Como já discutido na seção 5, a caracterização de FPMs por IES-EM/EM é realizada pela presença de fragmentos de íons diagnóstico  $[\text{M}-\text{H}-15]^-$ ,  $[\text{M}-\text{H}-30]^-$ ,  $[\text{M}-\text{H}-45]^-$  que correspondem a perda de grupos metilas, indicando o grau de metilação. Por exemplo, o espectro de fragmentação do íon precursor  $m/z$  313,0720 (Tr. 16,05 min), apresenta os íons fragmentos  $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$  (-15,0235 Da) e  $[\text{M}-\text{H}-2\text{CH}_3]^-$  (-30,0470 Da), resultantes das transições de  $m/z$  313,07172  $\rightarrow$   $m/z$  298,04813 e  $m/z$  313,07172  $\rightarrow$   $m/z$  283,02472, respectivamente, confirmando a presença de duas metoxilas (figura 55). Esta informação, entretanto, não permite a distinção entre os isômeros de posição dessas FPMs. Isso ocorreu, por exemplo, com o íon precursor  $m/z$  359,0776 atribuído à oxianina B (seção 5; figura 34), o qual foi anotado como jaceidina, também uma FPM trimetoxilada (tabela 9). O mesmo aconteceu com os íons precursores  $m/z$  313,0720 em 7,81, 12,08 e 16,06 min, anotados como cirsimaritina e seus isômeros de posição. Da mesma forma os íons precursores  $m/z$  373,0931 em 8,56 e 10,81 min foram anotados como crisoplenetina e seus isômeros. Esta última corresponde a flavona polimetoxilada isolada e descrita na seção 4 (item 4.1.4).

Dessa forma, as anotações obtidas pela comparação com a biblioteca espectral do GNPS foram consideradas a nível de subclasse, sendo atribuídos o número de grupos metoxila e hidroxilas desses compostos. A dificuldade associada a distinção entre os isômeros de posição das FPMs com análises de IES-EM/EM já é conhecida e relatada na literatura (Cuykens & Claeys, 2004; Justesen, 2001). Observou-se que mesmo usando-se os dados de fragmentação em 70 eV, com a presença de mais íons fragmentos, houve uma anotação muito similar para esta subclasse de flavonoides.

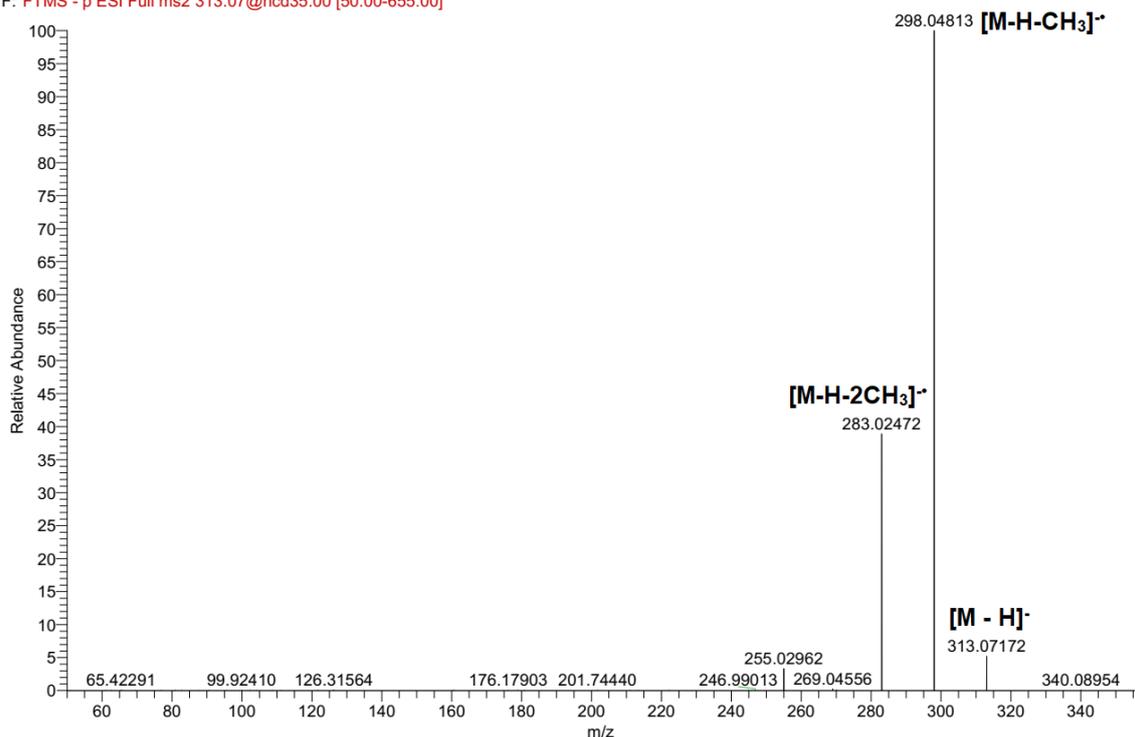


Figura 55. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  313,07172  $[M-H]^-$  em 16,05 min, mostrando os íon produtos  $[M-H-CH_3]^-$  (-15,0235 Da) e  $[M-H-2CH_3]^-$  (-30,0470 Da).

A análise no modo positivo de ionização permitiu estender a anotação das FPMs para aquelas que não possuem grupos hidroxilas e, portanto, não foram detectadas no modo negativo. Através da biblioteca espectral do GNPS foram anotadas as FPMs 4',5,6,7-tetrametóxilflavona, 3,7,3',4',5'-pentametóxilflavona e quercetagetina hexametil éter, atribuídas aos íons  $m/z$  343,1178  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  373,1283  $[M+H]^+$  e  $m/z$  403,1388  $[M+H]^+$ , com valores de cosseno acima de 0,79, indicando uma alta similaridade espectral com os espectros de referência (figura 56 e 57). Observou-se também uma melhor fragmentação desta subclasse no modo positivo de ionização, como já descrito na literatura.

Verificou também nós na rede molecular do modo negativo que não apresentaram anotação. Isso possivelmente está associado a falta de espectros de fragmentação EM/EM de referência para estes compostos.

Assim, buscou-se realizar uma anotação destes nós, com uso da ferramenta *in silico* Network Annotated Propagation (NAP), o qual faz uma predição da estrutura química através dos algoritmos o *Fusion* e *Consensus*, que atuam quando uma anotação se faz presente no *cluster* ou está ausente, respectivamente (figuras 58 e 59) (Pilon et al, 2021). Em seguida é feito uma

classificação das prováveis estruturas de acordo com a conectividade dos nós presentes nos *clusters*. Isso baseia-se no princípio de que os nós conectados nos *clusters* estão estruturalmente relacionados (da Silva et al, 2018).

As anotações foram consideradas efetivas quando houve um consenso nas dez estruturas mais prováveis na lista de candidatos prevista pelo NAP, permitindo-se inferir quanto a subclasse a qual pertence o íon precursor (figuras 135 – 154 do apêndice B). Dessa forma, desde que os candidatos pertencessem a mesma subclasse, a anotação desta foi verificada pelo padrão de fragmentação do íon precursor em questão. Ressalta-se que as estruturas propostas devem ser consideradas em um nível 3 de anotação, conforme discutido na seção 1.5. O resultado da análise da rede molecular no modo negativo pelo NAP pode ser acessado no seguinte endereço:

<https://proteomics2.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=fe920f4f651b414f874436d726786c7d>

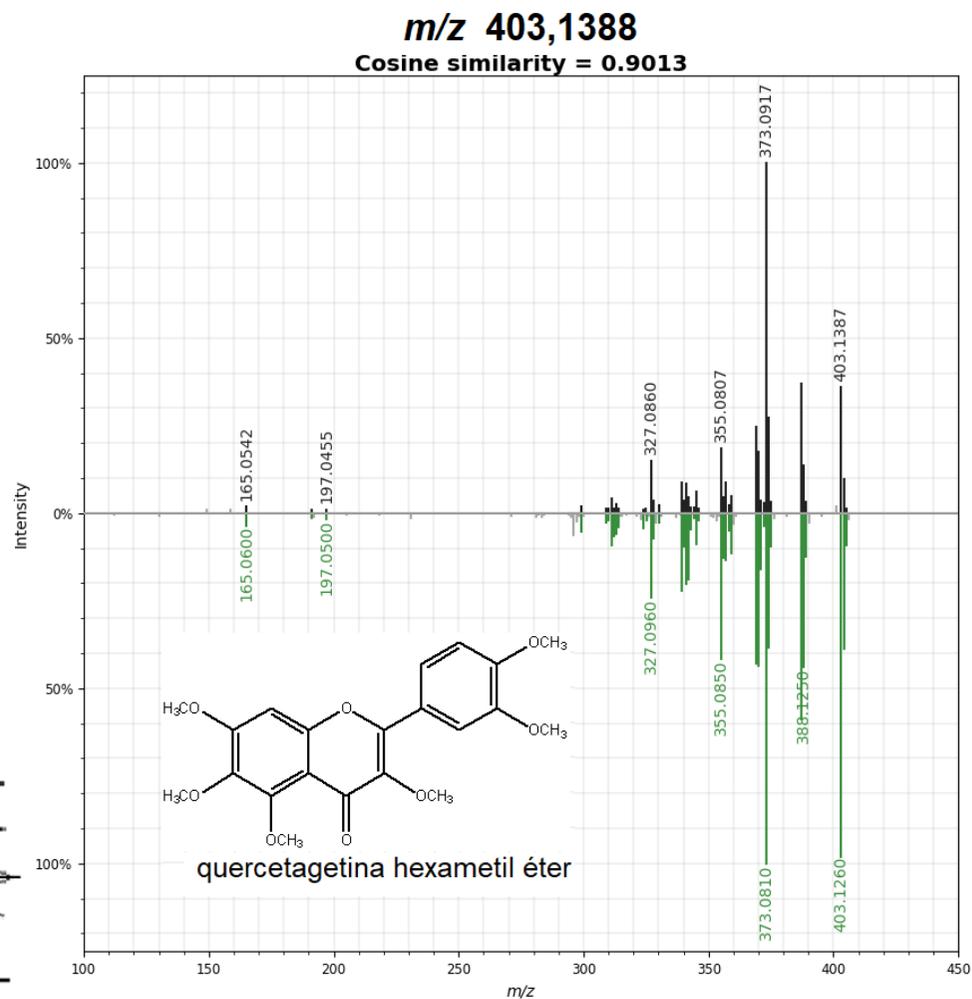
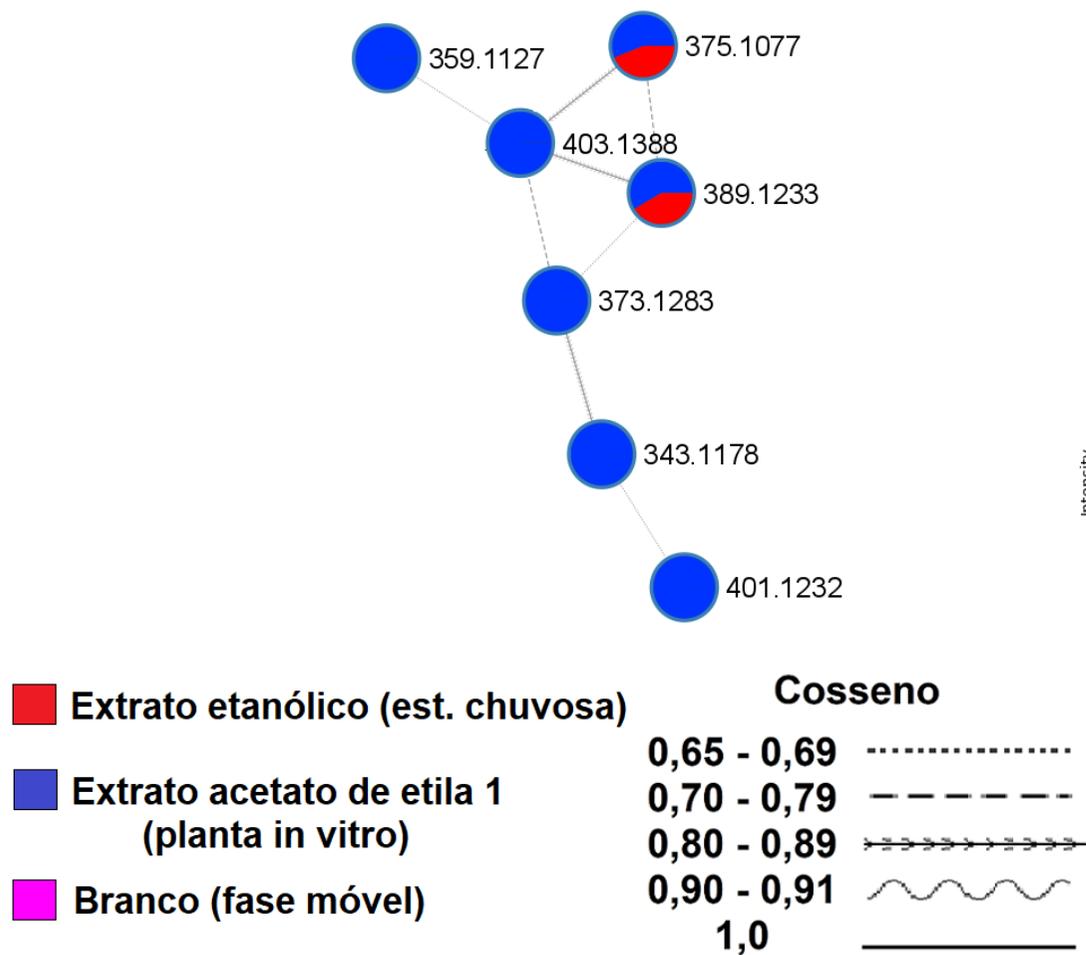


Figura 56. Expansão da rede molecular no modo positivo, mostrando o cluster em que foram anotados os nós *m/z* 343,1178, *m/z* 373,1283 e *m/z* 403,1388. Ao lado a comparação do espectro de fragmentação da FPM anotada como quercetagetina hexametil éter (*m/z* 403,1388) com o espectro de referência da biblioteca do GNPS. Legenda: espectro superior (íon precursor da amostra) e espectro inferior (referência da biblioteca do GNPS).

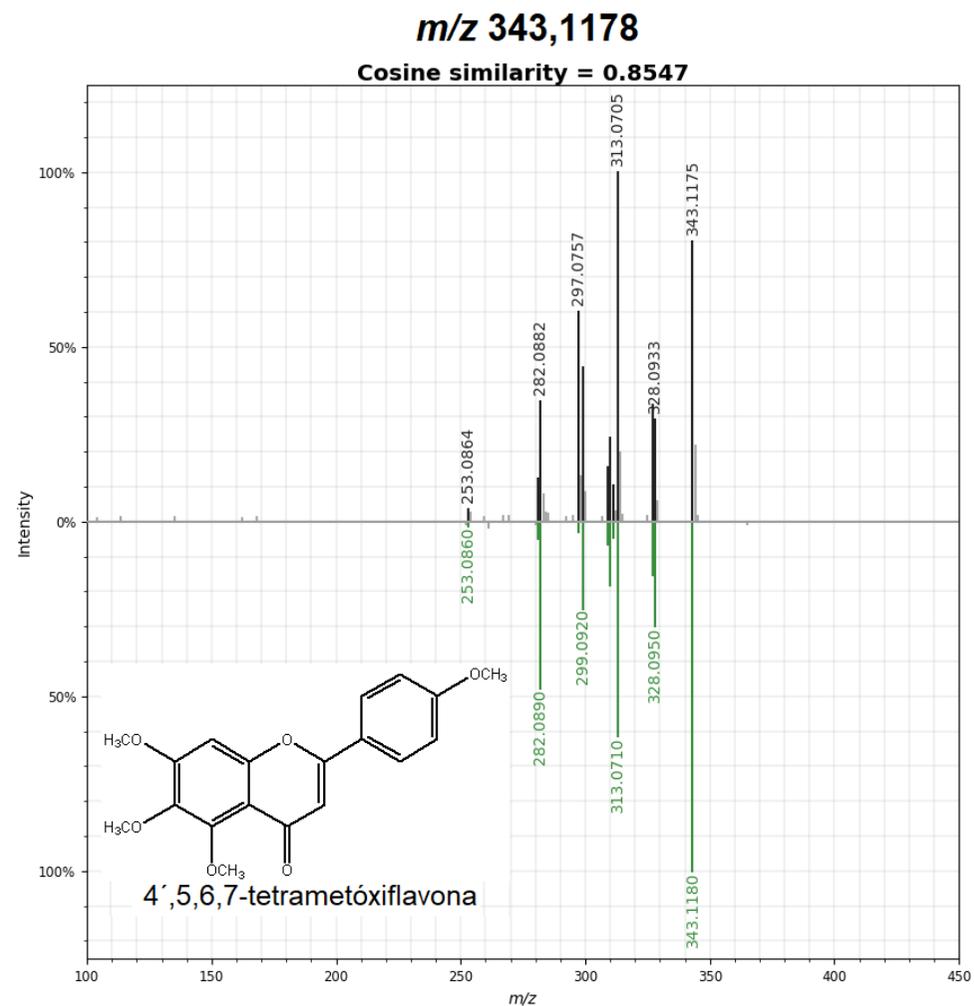
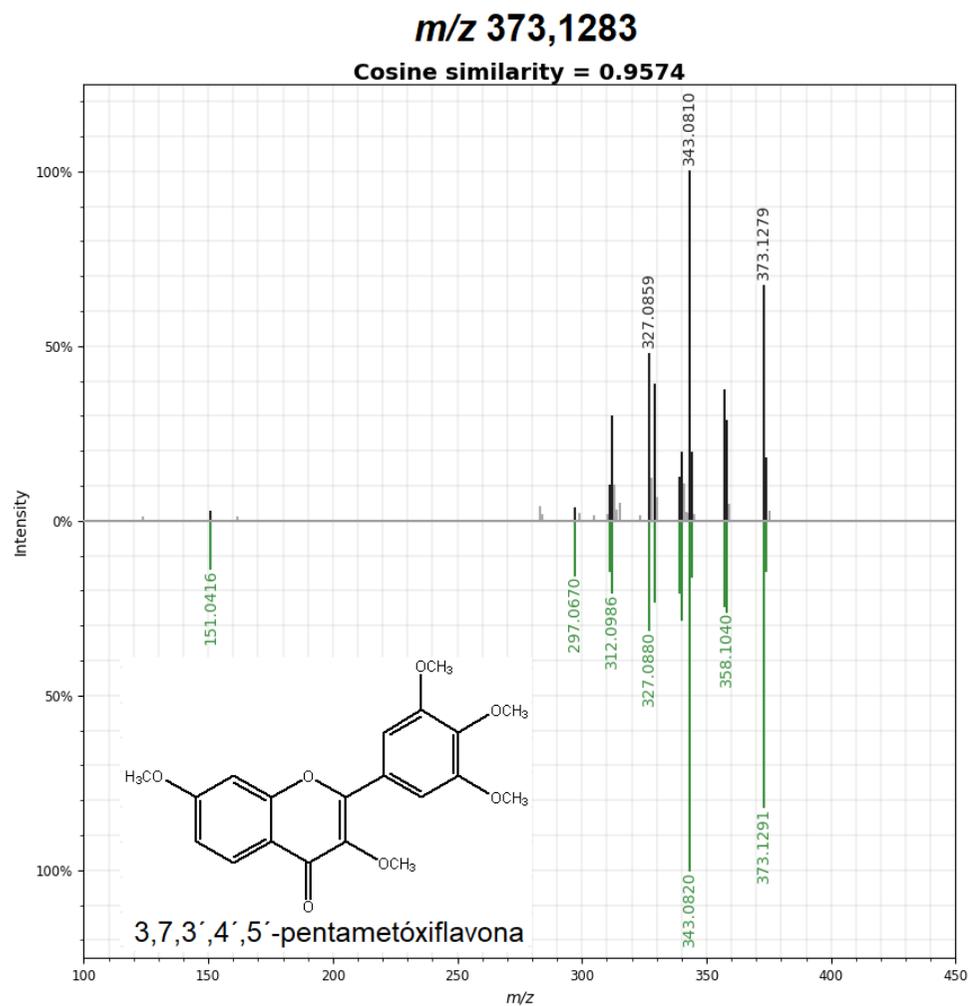


Figura 57. Comparação dos espectros de fragmentação das FPMs anotadas como 3,7,3',4',5'-pentametóxi flavona ( $m/z$  373,1283) e quercetagina hexametil éter ( $m/z$  403,1388) com o espectro de referência da biblioteca do GNPS. Legenda: espectro superior (ion precursor da amostra) e espectro inferior (referência da biblioteca do GNPS).

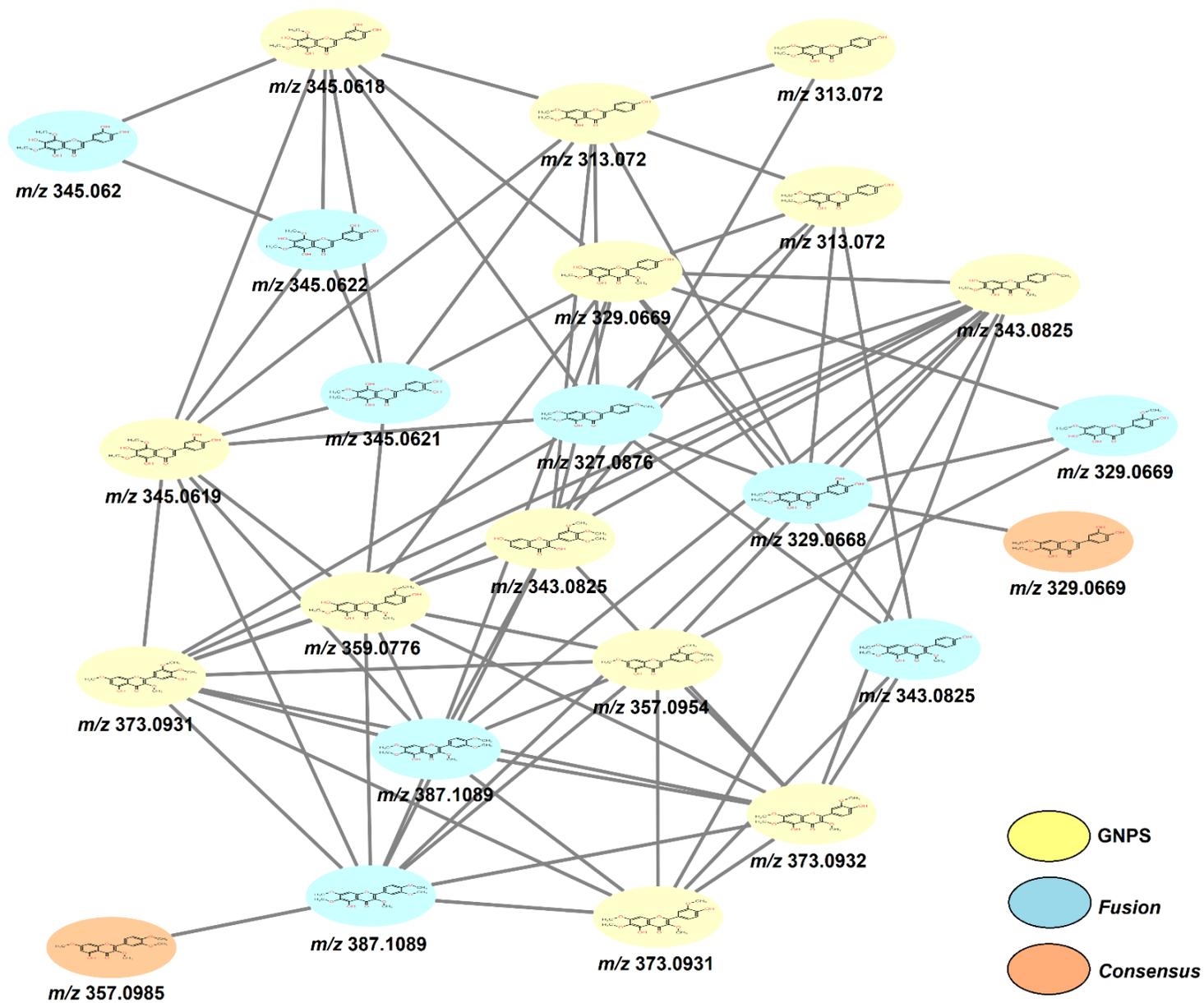


Figura 58. Cluster de FPMs anotada através do Network Annotated Propagation (NAP). As cores dos nós indicam as anotações pela biblioteca espectral do GNPS (amarelo) e através dos algoritmos *Fusion* (azul) e *Consensus* (laranja).

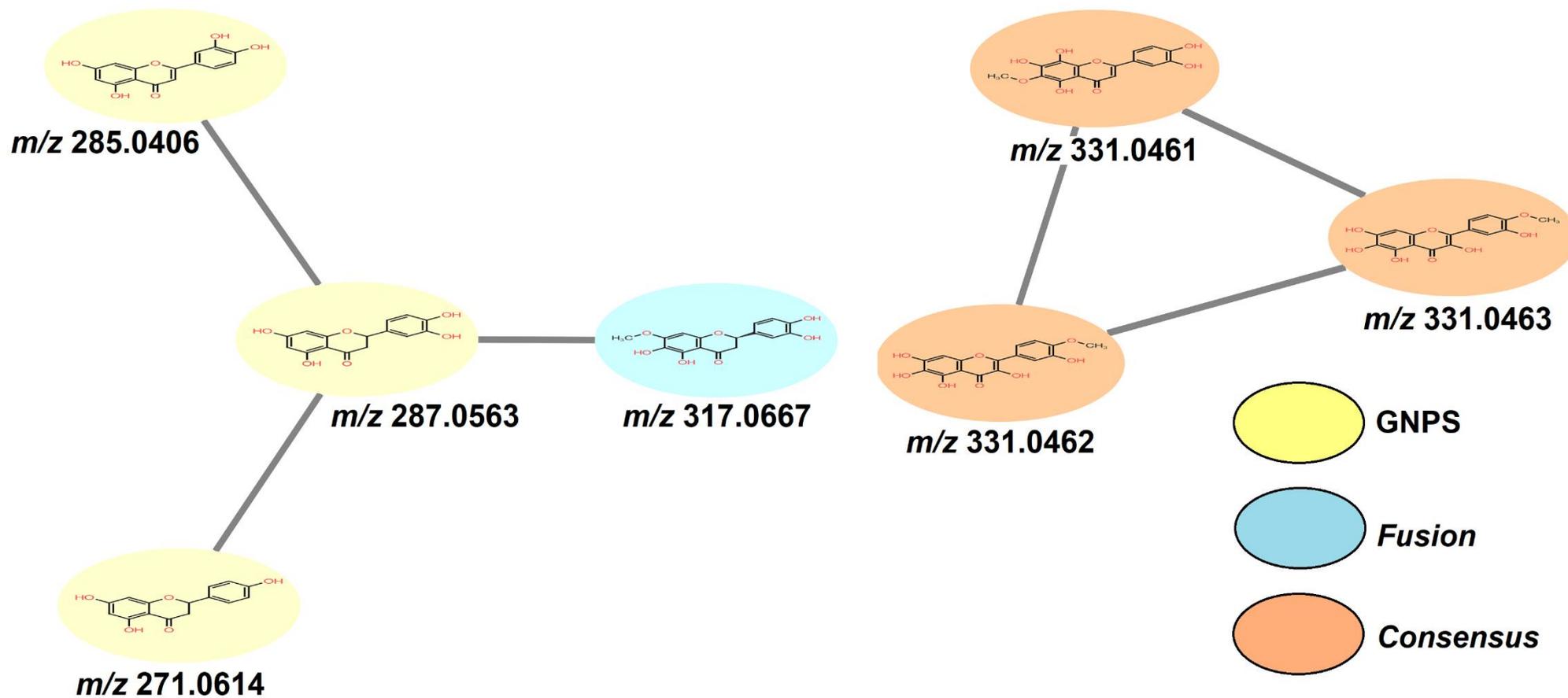


Figura 59. Clusters de flavanonas, flavonas e flavonas metoxiladas através do Network Annotated Propagation (NAP). As cores dos nós indicam as anotações pela biblioteca espectral do GNPS (amarelo) e através dos algoritmos *Fusion* (azul) e *Consensus* (laranja).

Os flavonoides luteolina e naringenina, identificados pela comparação com padrões comerciais (seção 5; figura 38 – pág. 76), foram identificados em um *cluster* menor, conectados aos íons  $m/z$  287,0563 e  $m/z$  317,0667. Este último não obteve anotação com a biblioteca espectral do GNPS anotação. Assim, sua anotação foi obtida através da predição *in silico* do NAP.

O espectro de massas dos íons  $m/z$  287,0563 e  $m/z$  317,0667 apresentou íons referentes a fragmentação pela reação retro Diels-Alder, que foram usados para confirmação da anotação. O íon  $m/z$  287,0563 conectado a luteolina e naringenina, apresentou diferença de massa de 2 u e 16 u, respectivamente. Isso indica a ausência de uma dupla ligação entre os carbonos C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> em relação à luteolina, e um grupo hidroxila a mais em relação à naringenina, o que permite dizer que é uma flavanona. O espectro de massas confirmou estas observações, onde notou-se a presença dos íons diagnósticos [<sup>1,3</sup>A<sup>-</sup> - H]<sup>-</sup> e [<sup>1,3</sup>B<sup>-</sup> - H]<sup>-</sup>, atribuídos aos fragmentos  $m/z$  151,00255 e  $m/z$  135,04395, além também do [<sup>0,4</sup>A<sup>-</sup> - H]<sup>-</sup> referente ao fragmento  $m/z$  107,01254, permitindo a confirmação da anotação desta flavanona como o eriodictiol. O íon  $m/z$  317,0667, foi anotado pelo NAP através do algoritmo *Fusion*, uma vez que este íon está conectado ao íon  $m/z$  287,0563, já anotado. Para a confirmação desta anotação, a nível de subclasse, considerou-se que as dez estruturas mais prováveis, estão condizentes com a subclasse de flavanona metoxilada, a qual apresenta poucos relatos na literatura (Seito et al, 2011; Kamperdick et al, 2002) (figura 140 do apêndice B). O espectro de massas do íon  $m/z$  317,0667, apresentou os íons diagnósticos [<sup>1,3</sup>A<sup>-</sup>-CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> e [<sup>1,3</sup>B<sup>-</sup>-H]<sup>-</sup> atribuídos aos íons  $m/z$  181,01331 e  $m/z$  135,04396, respectivamente, permitindo anotá-lo como o composto 2,3-dihidro-5,7,4'-trihidroxi-6-metóxi-flavonol (figura 60).

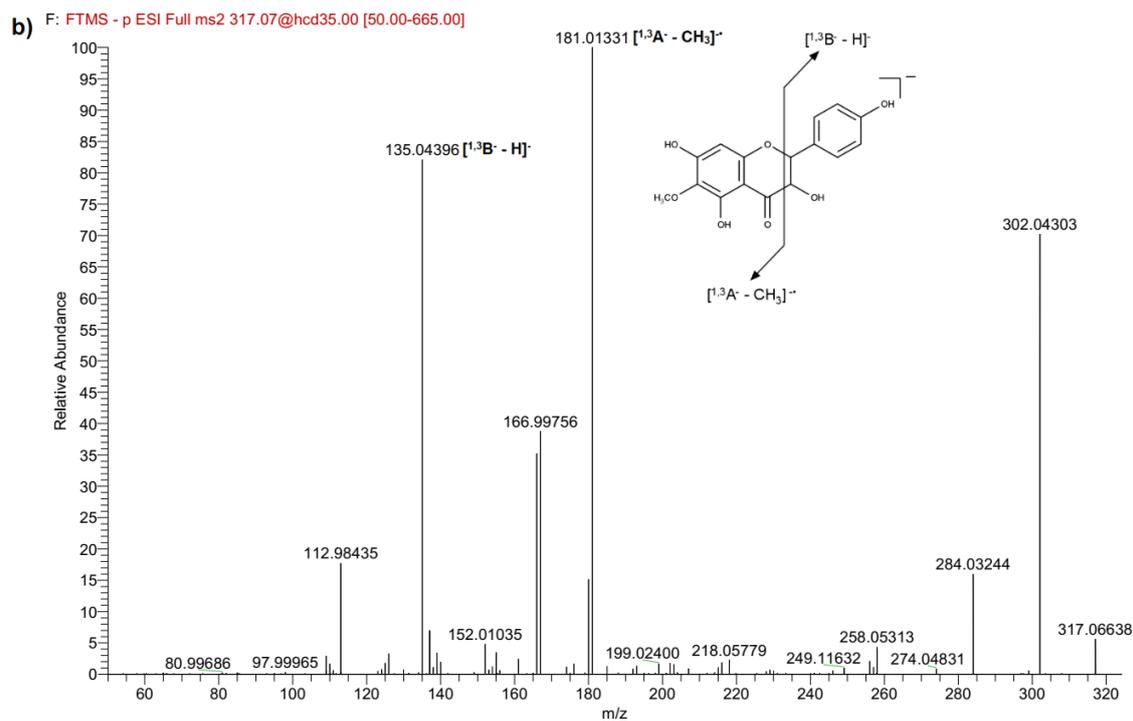
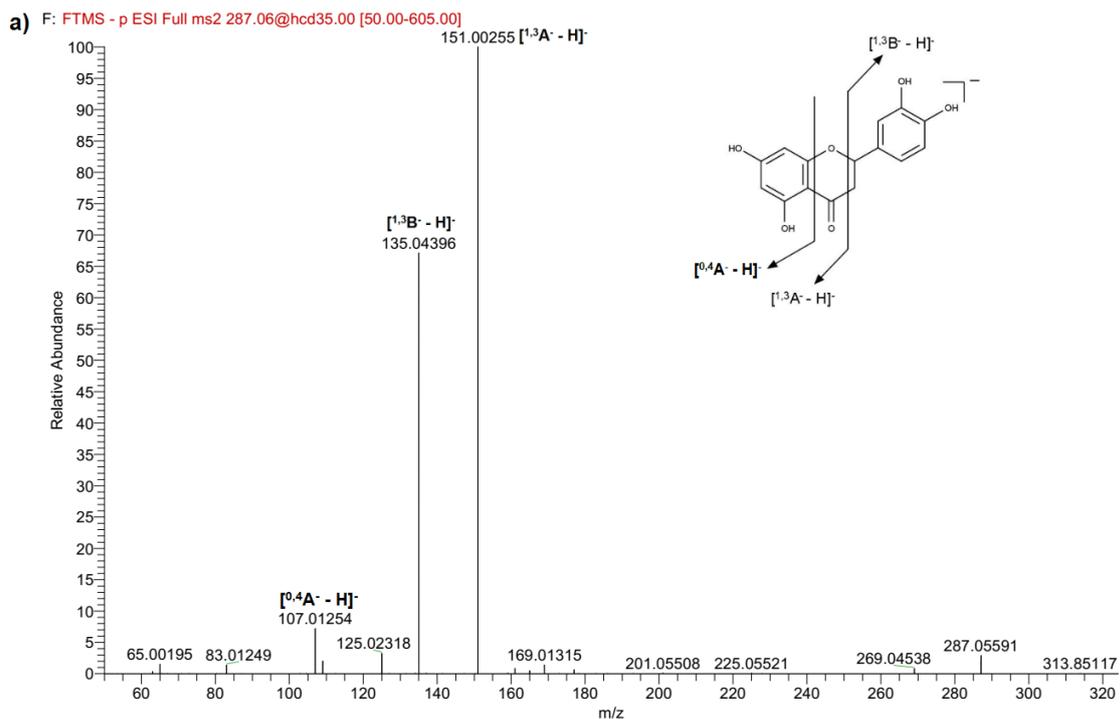


Figura 60. Espectro de fragmentação EM/EM dos íons (a)  $m/z$  287,0563 [M-H]<sup>-</sup> e (b)  $m/z$  317,0667 [M-H]<sup>-</sup>.

Os íons precursores  $m/z$  331,0461, detectados nos tempos de retenção 6,22, 7,99 e 9,13 min, foram agrupados um mesmo *cluster* e não apresentaram similaridade espectral com nenhum outro composto da rede molecular. Através da sua massa exata, foi atribuída a fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>O<sub>8</sub> (erro = -0,49),

compatível com a estrutura química de flavonas. Através do NAP foi possível anotar estes íons como pertencentes à subclasse de flavonas metoxiladas (figura 59). O espectro de massas desses íons apresentou uma perda relativa a somente um grupo metila. Além disso foi possível atribuir o fragmento  $m/z$  181,01 ao íon diagnóstico  $[^{1,3}A^- - H]^-$ , gerado pela fragmentação retro Diels-Alder (figura 61).

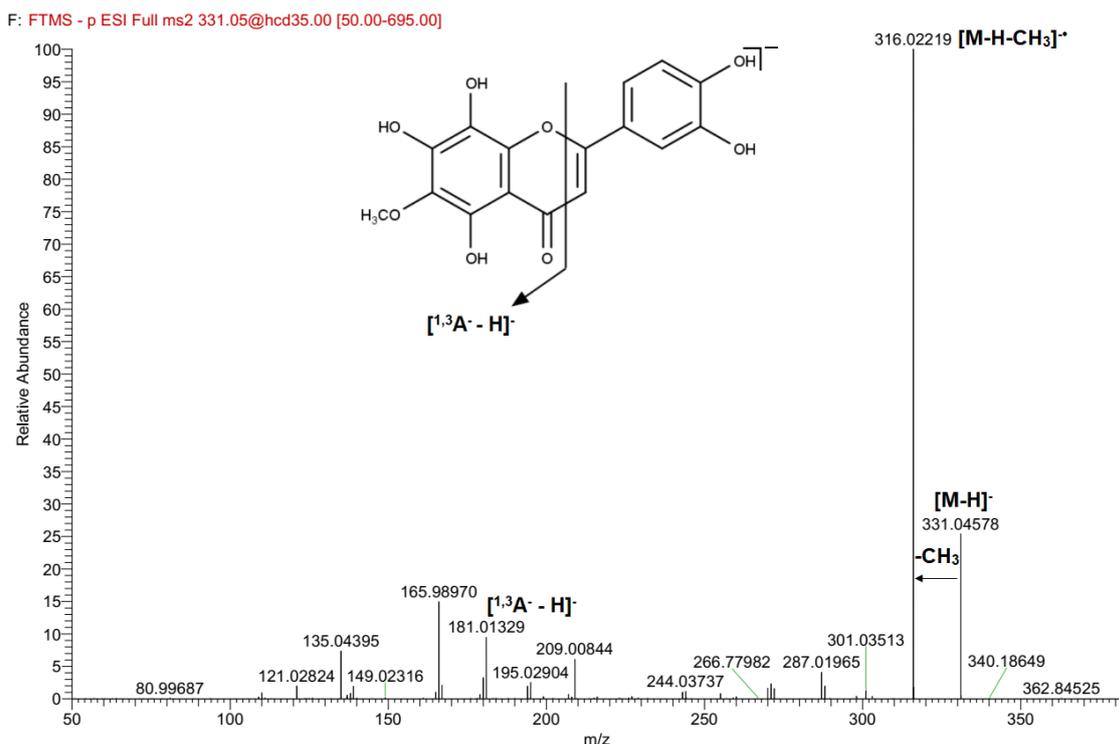


Figura 61. Espectro de fragmentação do íon precursor  $m/z$  331,0461  $[M-H]^-$  (Tr. 8,00 min).

A subclasse de flavonoide C-glicosilado também foi identificada em *L. artemisiifolia*, apresentando como um único representante o íon precursor  $m/z$  593,1519, anotado como a vicenina-2. Este composto não apresentou similaridade espectral com nenhum outro na rede molecular, o que indica não haver outros flavonoides glicosilados em *L. artemisiifolia*.

Vários trabalhos da literatura descrevem de que forma os flavonoides C-glicosilados, O-glicosilados e O,C-glicosilados podem ser diferenciados através da análise de IES-EM/EM (Geng et al, 2016; Ferreres et al, 2007; Cuykens & Claeys, 2005). A inspeção do espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  593,1519 mostra a ausência do íon fragmento da aglicona, tipicamente

observado em flavonoides O-glicosilados e O,C-glicosilados (Cuykens & Claeys, 2005). Por outro lado observa-se a presença dos íon fragmentos diagnósticos [aglicona + 83]<sup>-</sup> e [aglicona + 113]<sup>-</sup>, atribuídos aos íons fragmentos  $m/z$  353,07 e  $m/z$  383,08 que caracterizam este flavonoide como um C-glicosídeo, com aglicona correspondendo à apigenina (figura 62) (Geng et al, 2016). Além disso verificou-se também que os íons fragmentos  $m/z$  503,12,  $m/z$  473,11,  $m/z$  413,11,  $m/z$  383,08 e  $m/z$  353,07, são gerados pela perda sucessiva dos fragmentos  $^{0,2}X^-_0$  (120 u) e  $^{0,3}X^-_0$  (90 u) das duas unidades de açúcar (figura 63) (Kacklicki et al, 2016; Silva et al, 2013). Assim, o íon precursor  $m/z$  593,15173 foi caracterizado como um flavonoide C-glicosilado, anotado pelo GNPS como a vicenina-2, já relatado em outras espécies de Asteraceae (Gobbo-Neto et al, 2008).

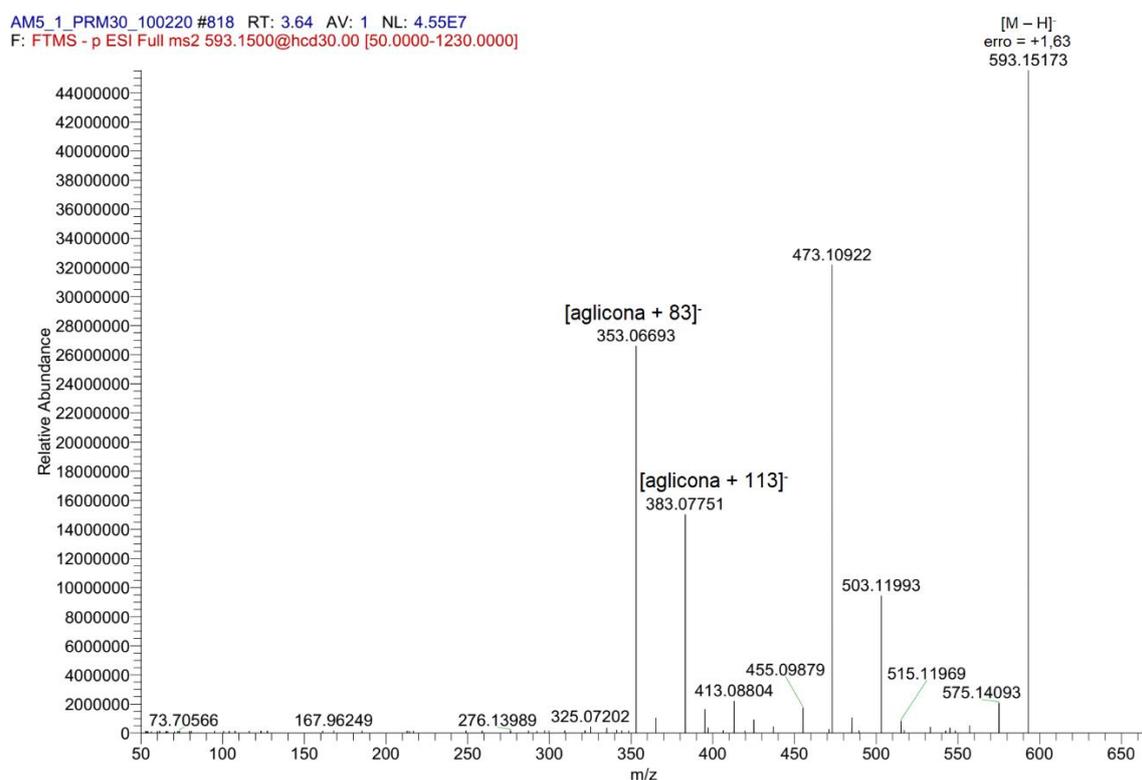


Figura 62. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  593,15173 [M-H]<sup>-</sup>.

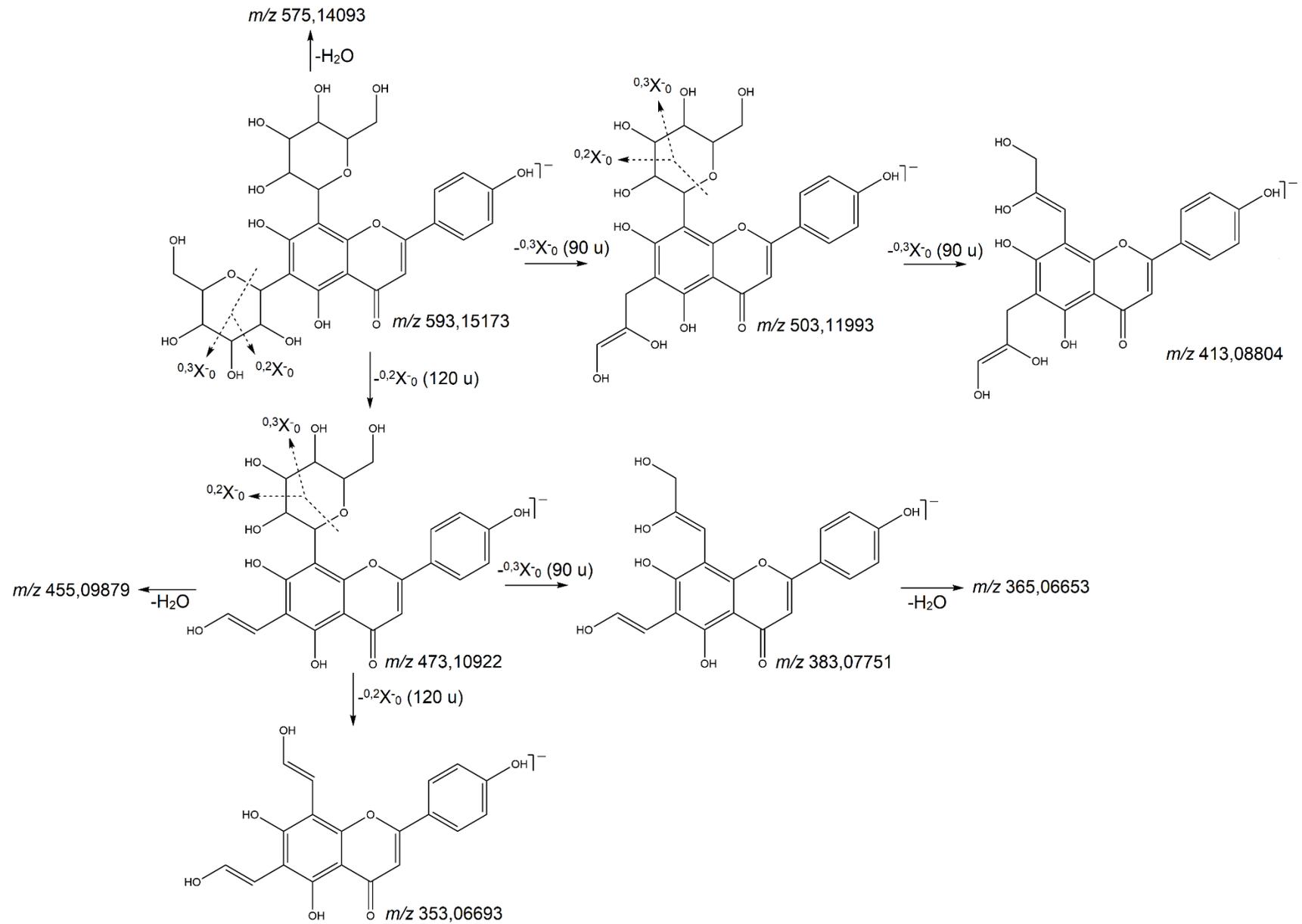


Figura 63. Proposta de fragmentação da vicenina-2 com base nos íons fragmentos observados no espectro de fragmentação EM/EM. (Retirado de Silva et al, 2017, com modificações.

A espécie *L. artemisiifolia* também se caracteriza pela presença de diterpenos labdanos, conforme evidenciado pelo isolamento dos compostos acetato labdan-8-ol-15-il (**1**), labdan-8,15-diol (**2**) e ácido 8-hidroxiabdan-15-óico (**3**). Na análise pelo GNPS estes compostos foram atribuídos aos nós presentes nos *clusters* formados pelas redes moleculares, buscando-se por outros compostos com estruturas similares.

No modo negativo de ionização somente foi detectado o ácido 8-hidroxiabdan-15-óico (**3**), atribuído ao íon precursor  $m/z$  323,25922 [M-H]<sup>-</sup>, conforme discutido na seção 5. A anotação obtida através com a biblioteca espectral do GNPS para este íon precursor coincide com a sua identificação estrutural, levando a uma anotação de nível 1 (figura 64 e 65). Este íon apresentou-se conectado ao íon  $m/z$  267,19653 [M-H]<sup>-</sup>, o qual não foi anotado pelo GNPS. Mesmo utilizando-se o NAP, não foi possível atribuir uma classe, uma vez que o número de estruturas previstas não foi o suficiente para um consenso. Já no modo positivo de ionização foi possível realizar a detecção dos diterpenos acetato labdan-8-ol-15-il (**1**) e labdan-8,15-diol (**2**), atribuídos aos íons  $m/z$  335,29413 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> e  $m/z$  293,28360 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, que de forma semelhante ao ácido 8-hidroxiabdan-15-óico (**3**), também foram anotados através do GNPS, com uma coincidência com a identificação estrutural desses compostos (figura 66 e 67).

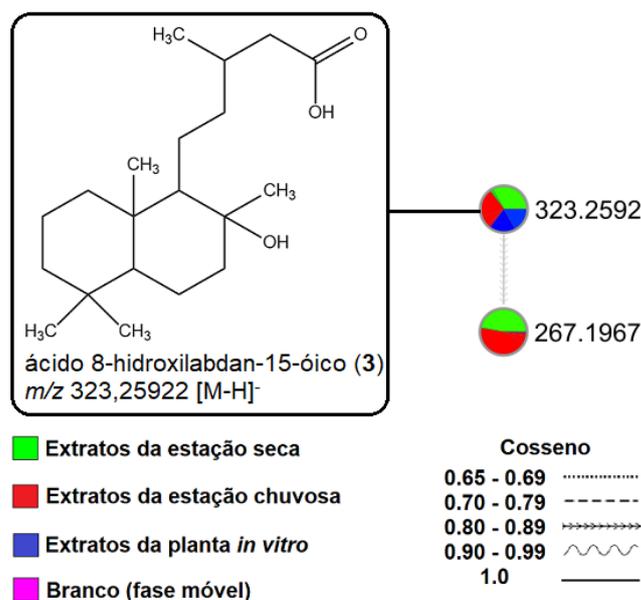


Figura 64. Anotação do íon precursor  $m/z$  323,25922 [M-H]<sup>-</sup> como o ácido 8-hidroxiabdan-15-óico (**3**), na rede molecular no modo negativo.

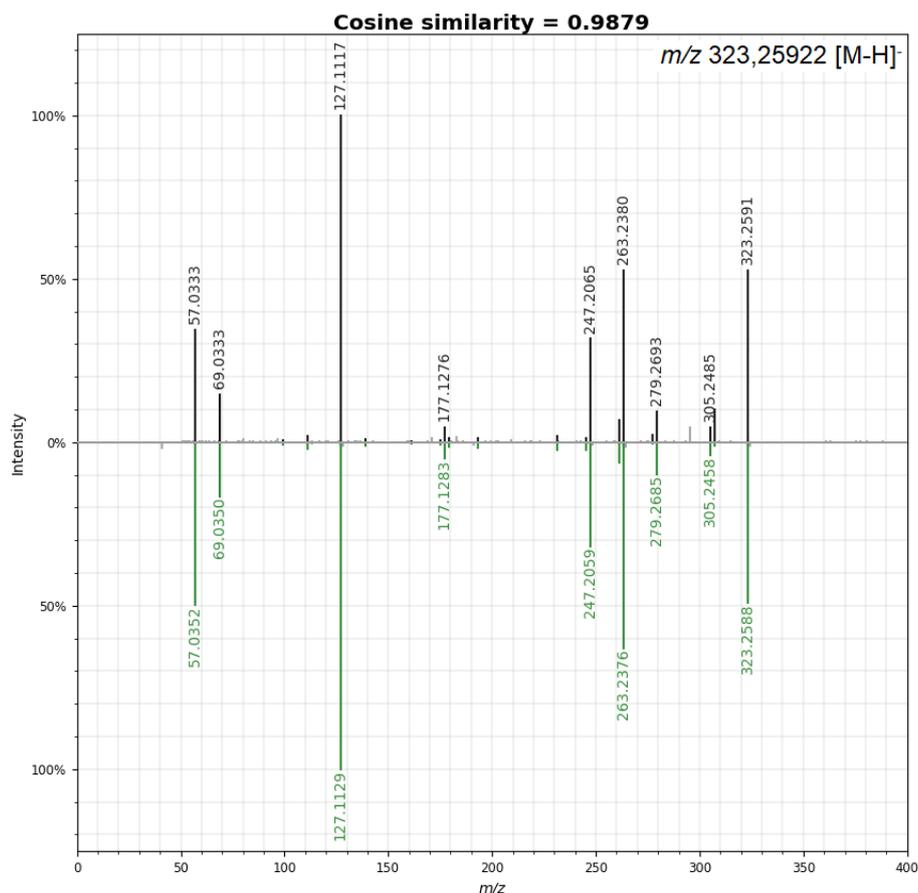


Figura 65. Comparação do espectro de fragmentação do diterpeno anotado como ácido 8-hidroxilabdan-15-óico (**3**) com a biblioteca de referência. Legenda: espectro da amostra na porção superior (preto) e o espectro de referência da biblioteca do GNPS na parte inferior (verde).

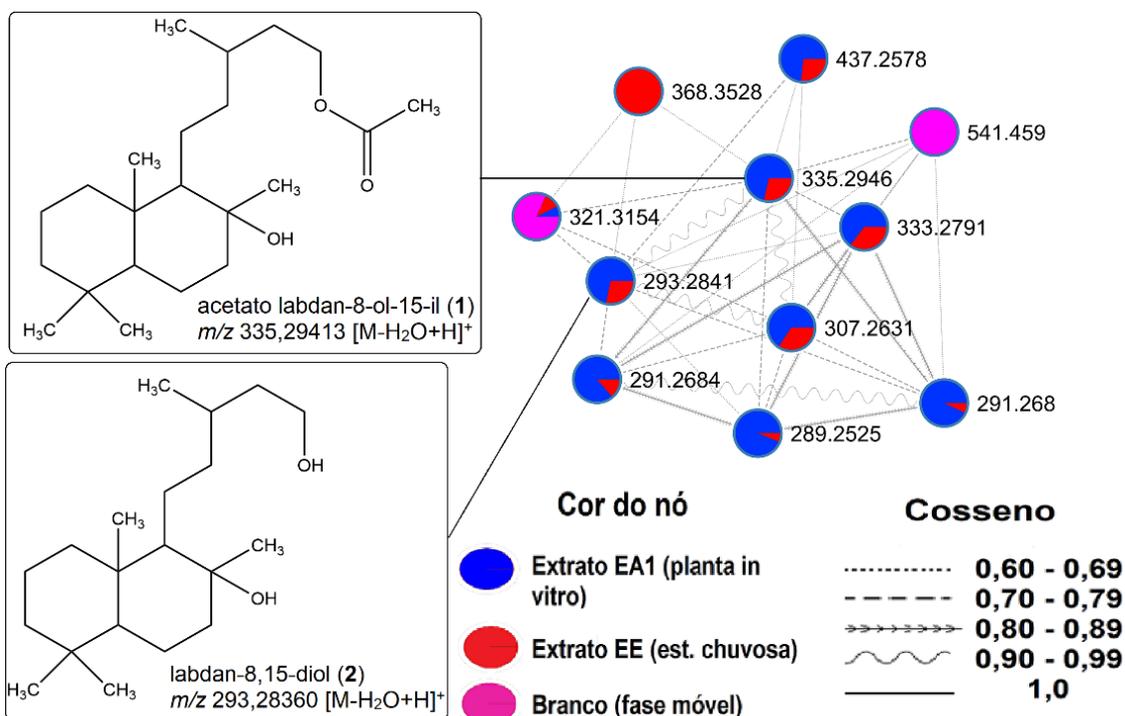


Figura 66. Anotação dos íons *m/z* 335,29413 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> e *m/z* 293,28360 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> como o acetato labdan-8-ol-15-il (**1**) e labdan-8,15-diol (**2**).

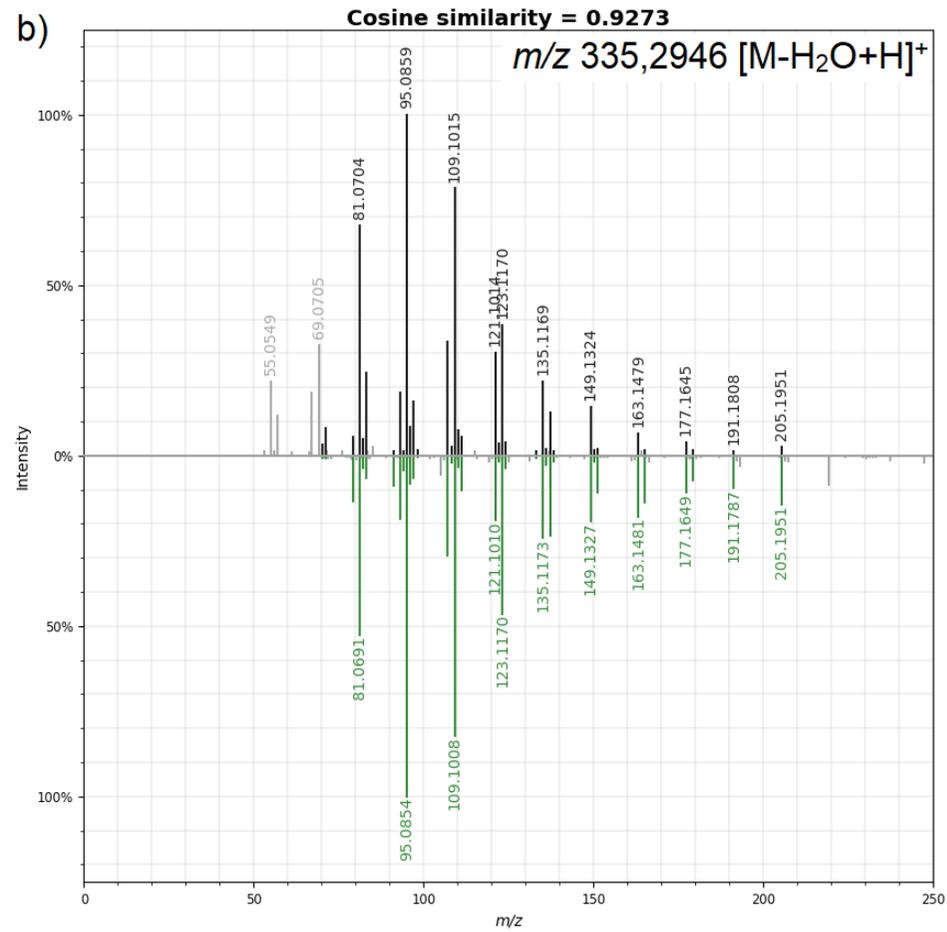
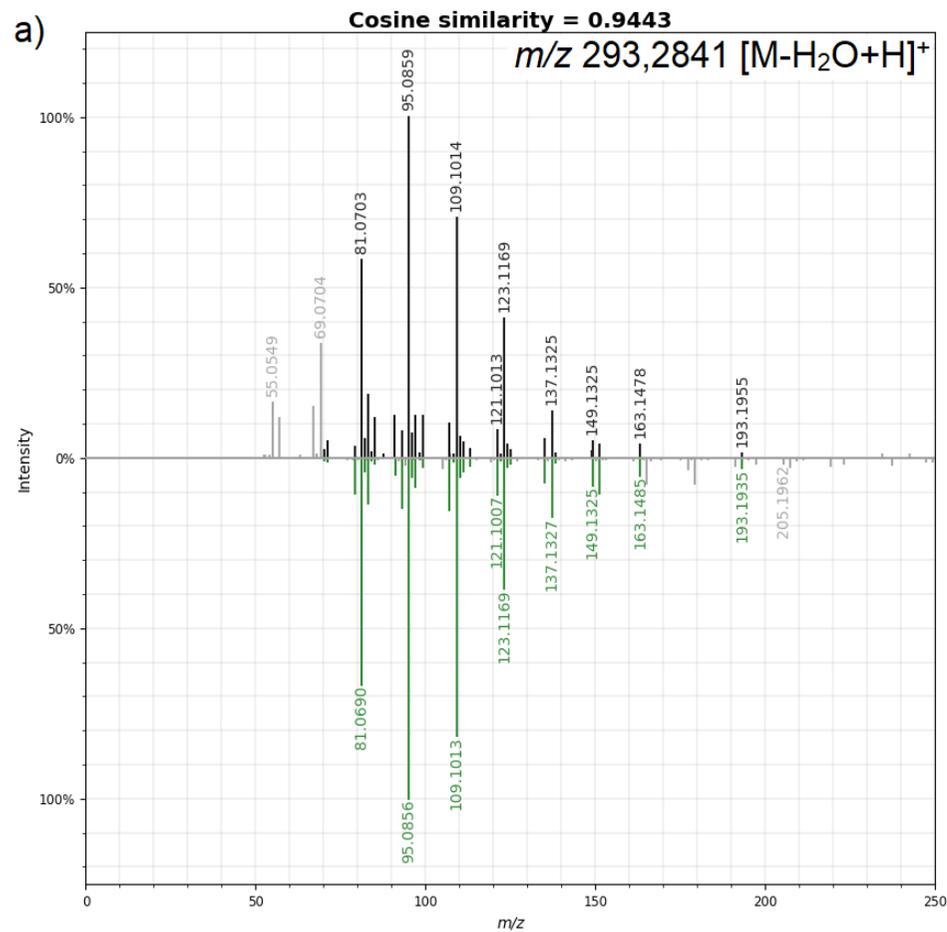


Figura 67. Comparação dos espectros de fragmentação dos diterpenos anotados (a) acetato labdan-8-ol-15-il (**1**) e (b) labdan-8,15-diol (**2**) com a biblioteca de referência. Legenda: espectro da amostra na porção superior (preto) e o espectro de referência da biblioteca do GNPS na parte inferior (verde).

As análises por redes moleculares permitiram acessar de forma efetiva o conteúdo químico de *L. artemisiifolia*, expandindo a identificação dos metabólitos secundários desta espécie, com um total de 32 compostos. O FBMN em conjunto com a ferramenta *in silico* NAP, mostrou-se bastante útil nesse aspecto, principalmente em relação à classe de flavonas polimetoxiladas, que apresentou um número expressivo de compostos. O pré-processamento do FBMN, permitiu não somente a detecção de isômeros de posição em diferentes tempos de retenção, mas também a incorporação da intensidade relativa dos íons precursores, permitindo observar sua abundância nos extratos de cada grupo de plantas.

As anotações do GNPS puderam ser correlacionadas com os dados experimentais de fragmentação para sua confirmação, sendo que em seis casos houve uma coincidência entre substâncias previamente identificadas e a anotação obtida pela comparação com a biblioteca espectral desta plataforma, confirmando assim sua eficiência.

Através do NAP foi possível a identificação da subclasse de flavanona polimetoxilada, a qual possui poucos relatos na literatura, confirmada pela correlação da estrutura proposta com os dados de EM. A classe de diterpenos labdanos também pode ser anotada com uso do GNPS e do NAP, indicando a presença de outros compostos desta classe além dos previamente isolados.

Por fim, considerando-se que a fragmentação dos diterpenos labdanos por *eletrospray* possui poucos relatos na literatura, foi proposto um mecanismo de fragmentação para os diterpenos acetato labdan-8-ol-15-il (1) e labdan-8,15-diol (4), com base em alguns fragmentos que puderam ser compreendidos através de reações de fragmentação neste modo de ionização.

Os dados de espectrometria de massa dos compostos anotados estão nas tabelas 9 (modo negativo) e 10 (modo positivo). No apêndice B estão organizados os espectros dos compostos anotados e sua correspondência com os da biblioteca espectral do GNPS (figuras 115 – 134) e o consenso de estruturas preditas pelo NAP usado para anotação em nível de classe (figuras 135 – 154).

Tabela 9. Compostos anotados através das análises de CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares (GNPS e NAP).

Compostos	Tr (min.)	Fórmula molecular	Aduto	<i>m/z</i> (experimental)	<i>m/z</i> (calculado)	Error (ppm)	EM/EM	Nível de anotação
naringenina	8,69	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	271,06143	271,06119	+0,86	177,02, 151,00, 119,05, 107,01 e 93,03	1
não anotado	18,26	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	267,19653	267,19657	-0,14	251,17, 239,16, 221,15, 207,17, 191,14, 179,14 e 71,05	4
luteolina	6,00	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	285,04074	285,04046	+0,98	241,05, 217,05, 199,04, 151,00, 133,03 e 107,01	1
eriodictiol	7,28	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	287,05597	287,05608	-0,49	151,00, 135,04, 107,01, 83,01 e 65,00	2
cirsimaritina ou isômeros	7,81	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	313,07169	313,07176	-0,23	298,05, 283,02, 269,05, 255,03, 205,01, 163,00 e 117,03	2
cirsimaritina ou isômeros	11,99	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	313,07172	313,07176	-0,036	298,05, 283,02, 269,05, 255,03, 163,00 e 117,03	2
cirsimaritina ou isômeros	16,05	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	313,07172	313,07176	-0,036	298,05, 283,02 e 255,03	2
flavanona metoxilada	7,17	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	317,06638	317,06667	-0,93	302,04, 284,03, 258,05, 181,01, 167,00, 136,99, 135,04 e 112,98	3
ácido 8-hidroxiabdan-15-óico	21,50	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	323,25922	323,25917	+0,72	307,23, 305,25, 279,27, 263,24, 247,21, 127,11, 69,03 e 57,03	1
flavona trimetoxilada	10,01	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	327,08725	327,08741	-0,31	312,06, 297,04, 294,05, 269,05, 266,06, 222,07, 177,02 e 117,03	3
flavona dimetoxilada	8,45	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	329,06650	329,06667	-0,54	314,04, 299,02, 286,01, 271,02, 258,02, 180,01, 164,98 e 119,05	3

flavona dimetoxilada	10,10	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	329,06659	329,06667	-0,26	314,04, 299,02, 286,01, 179,00 e 133,03	3
flavona dimetoxilada	10,68	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	329,06656	329,06667	-0,35	314,04, 299,02 e 286,01	3
4',5,7-trihidroxi-3,6-dimetóxilavona	13,61	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	329,06653	329,06667	-0,44	313,04, 299,02, 271,02, 243,03, 227,03, 199,04, 171,04, 133,03, 110,00 e 65,00	2
flavona metoxilada	6,22	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	331,04575	331,04536	-0,49	316,06, 301,04, 287,02, 257,05, 209,01, 181,01, 165,99, 135,04 e 121,03	3
flavona metoxilada	7,98	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	331,04581	331,04536	-1,37	316,02, 287,02, 271,02, 209,01, 181,01, 165,99, 135,04 e 121,03	3
flavona metoxilada	9,13	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	331,04550	331,04594	-0,44	316,02, 288,02, 272,02, 209,01, 181,01, 165,99, 135,04 e 121,03	3
flavona dimetoxilada	6,46	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	343,08255	343,08232	+0,57	328,06, 313,04, 300,03, 285,00, 269,05 e 160,02	3
5,7-dihidroxi-3,6,4'-trimetóxilavona	11,84	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	343,08221	343,08232	-0,34	328,06, 313,04, 298,01 e 285,04	2
robinetina trimetil éter	15,88	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	343,08215	343,08232	-0,51	328,06, 313,04, 285,04 e 269,05	2
flavona dimetoxilada	7,16	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	345,06174	345,06159	0,43	330,04, 315,01, 287,02, 27,02, 195,03, 195,03, 180,01, 149,02 e 121,03	3
3',4',5,7-tetrahidroxi-6,8-dimetóxilavona ou isômeros	9,08	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	345,06131	345,06159	-0,82	330,04, 315,01, 287,02, 271,02 e 149,02	2
3',4',5,7-tetrahidroxi-6,8-dimetóxilavona ou isômeros	9,32	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	345,06131	345,06159	-0,82	330,04, 315,02, 287,02, 223,02, 195,03, 180,01, 164,98, 149,02 e 121,03	2

flavona dimetoxilada	10,54	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	345,06180	345,06159	0,61	330,04, 287,02, 223,02, 165,99, 315,02, 271,05, 195,03, 133,03 e 121,03	302,07, 258,05, 180,01	3
flavona dimetoxilada	10,90	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	345,06146	345,06159	-0,38	330,04, 287,02, 223,02, 195,03, 180,01, 135,04 e 121,03	302,07, 258,05, 135,04	3
corimbosina	7,81	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	357,09827	357,09798	0,82	342,07, 299,06, 177,02	327,05, 284,03, 269,01 e 312,03	2
flavona tetrametoxilada	10,89	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	357,09821	357,09798	0,65	342,07, 299,02, 243,10, 227,03 e 221,12	327,05, 286,05, 271,02, 314,04	3
jaceidina	10,27	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	359,07751	359,07724	+0,75	329,03, 314,01 e 286,01		2
crisoplenetina ou isômero	8,56	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	373,09323	373,09289	+0,91	358,07, 315,05, e 135,04	343,05, 300,03, 285,00 195,03	2
crisoplenetina ou isômero	10,81	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	373,09311	373,09289	+0,58	358,07, 315,05, 271,06, 256,04, 195,03, 163,04 e 148,02	343,05, 299,06, 287,06, 330,07	2
miricetina 3,7,3',4'-tetrametil éter	12,35	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	373,09311	373,09289	+0,58	358,07, 315,05, 300,03 e 285,00	343,05, 328,02	2
flavona pentametoxilada	10,11	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	387,10913	387,10854	+1,52	372,08, 329,07, 314,04 e 299,02	357,06, 342,04	3
flavona pentametoxilada	10,23	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	387,10904	387,10854	+1,29	372,08, 329,07, 313,07, 299,02, 257,08 e 195,03	357,06, 327,02, 314,04, 301,07, 342,04	3
vicenina-2	3,66	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	593,15173	593,15119	+0,91	575,14, 473,11, 353,07	515,12, 455,10, 383,08 e 503,12	2

Tabela 10. Compostos anotados através das análises de CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares (GNPS e NAP) no modo positivo de ionização.

Compostos anotados	Tr (min.)	Fórmula molecular	Aduto	<i>m/z</i> (experimental)	<i>m/z</i> (calculado)	Error (ppm)	EM/EM	Nível de anotação
labdan-8,15-diol	19,49	C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> O	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	293,28360	293,28389	-0,99	250,30, 205,20, 179,18, 163,15, 149,13, 137,13, 123,12, 121,10, 109,10, 81,07, 69,07 e 57,07	1
acetato labdan-8-ol-15-il	20,96	C <sub>22</sub> H <sub>39</sub> O <sub>2</sub>	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	335.29413	335,29445	-0,97	219,21, 205,20, 177,16, 163,15, 137,13, 123,12, 121,10, 109,10, 95,09, 81,07, 69,07 e 57,07	1
4',5,6,7-tetrametóxi flavona	11,03	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	343,11746	343,11761	-0,45	328,09, 327,09, 313,07, 299,09, 297,08, 289,09, 253,09, 168,04, 113,50 e 79,97	2
3,7,3',4',5'-pentametóxi flavona	9,04	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	373,12811	373,12817	-0,19	359,10, 357,10, 343,08, 329,10, 327,09, 312,10, 297,08, 283,10, 269,08, 185,72, 151,04, 107,08 e 76,98	2
quercetagina hexametil éter	9,63	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	403,13864	403,13874	-0,26	387,11, 373,09, 369,10, 355,08, 339,09, 327,09, 311,09, 299,09, 248,82, 220,27, 184,51 e 165,05	2

## 7. Análise quimiométrica dos dados de CLAE-IES-EM

As análises de CLAE-IES-EM no modo negativo de ionização permitiram observar o perfil químico dos diferentes tipos de extratos (EA1, EA2 e EE) do material vegetal das plantas nativas (estações seca e chuvosa) e obtidas por micropropagação *in vitro*, gerando um total de nove extratos. Considerando-se as diferenças das condições de crescimento e desenvolvimento de *L. artemisiifolia* em hábitat natural, e nas condições para a micropropagação *in vitro*, foi realizado uma análise quimiométrica com estes dados para a comparação dos extratos.

Para uma maior eficiência na análise de quimiometria são necessárias etapas de pré-processamento de forma construir uma matriz com os dados mais relevantes das amostras (Castillo et al, 2011). No caso de análises cromatográficas é recomendado o tratamento para remoção de sinais de interferentes da fase móvel, alinhamento e normalização dos picos, entre outras etapas (Pérez-Lopez et al, 2021). Neste trabalho, os dados de CLAE-IES-EM foram pré-processados no *software* RStudio para a construção da matriz de dados (seção 3, item 3.11). Em seguida a matriz de dados foi carregada na plataforma MetaboAnalyst (versão 4.0), onde os dados foram escalonados pelo centramento na média, no qual as variáveis passam a ter média zero, o que faz com que as coordenadas fiquem centralizadas. Dessa forma, a comparação entre as intensidades relativas pode ser feita com mais facilidade (Souza & Poppi, 2012).

Inicialmente foram realizadas as análises hierárquica de clusters (HCA) e de componentes principais (PCA), ambos métodos não supervisionados, nos quais as amostras se agrupam de forma natural (de Santana et al, 2020). A HCA realiza o agrupamento de amostras baseado nas suas tendências e similaridades, enquanto que a PCA permite observar a estrutura de dados, detectando padrões. Na HCA foi obtido um dendrograma, onde é possível observar a separação dos extratos de superfície (EA1\_ES, EA1\_EC e EA1\_IV) dos demais. Além disso, o extrato de superfície *in vitro* (EA1\_IV) diferencia-se dos extratos da estação seca e chuvosa, EA1\_ES e EA1\_EC, respectivamente (figura 68). Na PCA, as percentagens de variância explicada pelas 5 primeiras PCs são de 67,7%, 18,6%, 10,3%, 1,8% e 0,8%, (figura 156 do apêndice C).

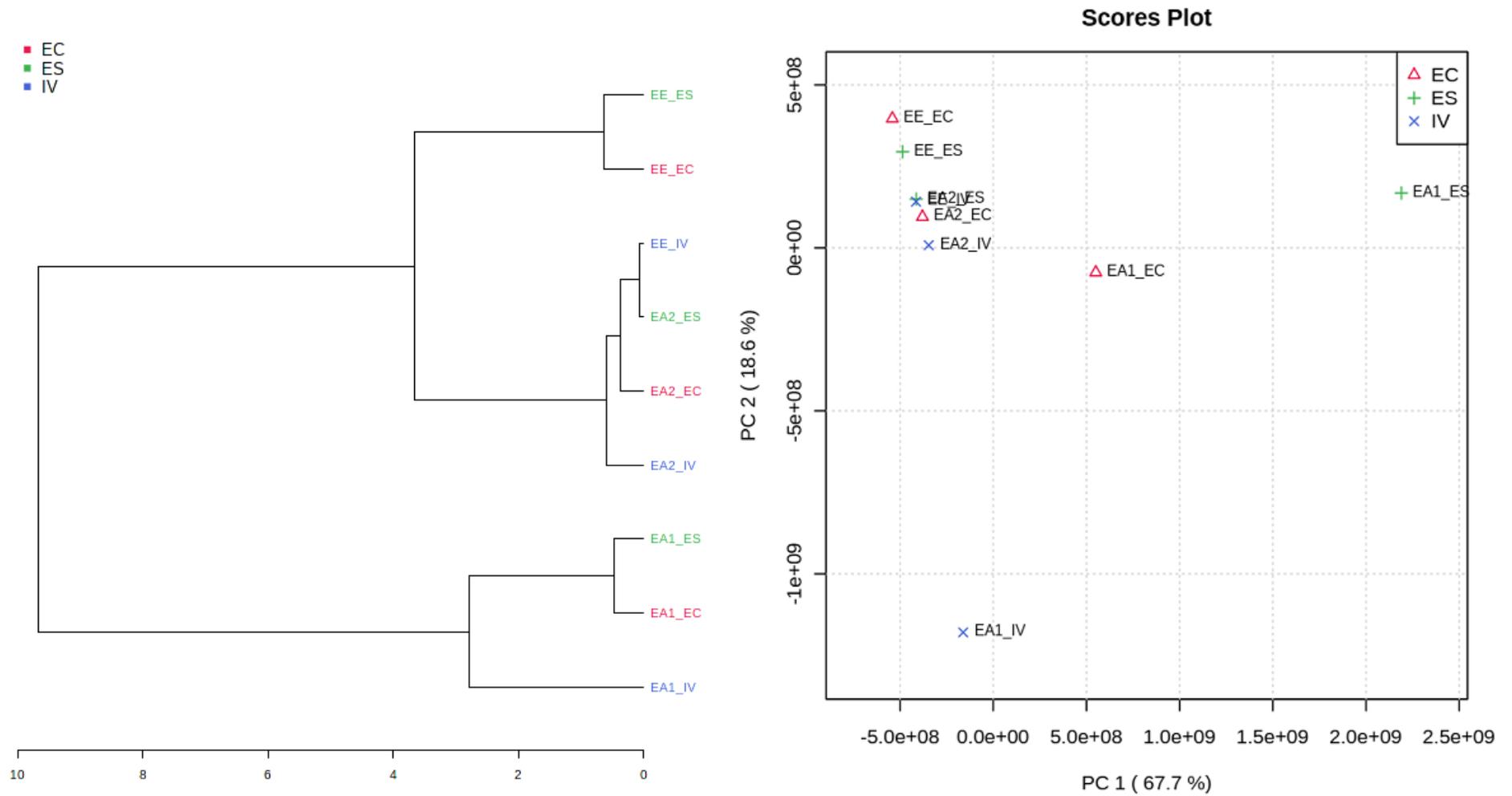


Figura 68. Dendrograma obtido na análise hierárquica de clusters (HCA) e gráfico de escores da análise de componentes principais (PCA). Legenda: EC – estação chuvosa; ES – estação seca; IV – in vitro.

A primeira e segunda componentes explicam 86,3% da variância dos dados. Observou-se uma separação entre os extratos EA1, das plantas coletadas nas estações seca e chuvosa, em relação a planta *in vitro*. Os extratos acetato de etila 1 das estações seca e chuvosa (EA1\_ES e EA1\_EC) foram posicionados na parte positiva de PC1, enquanto que o extrato da planta *in vitro*, EA1\_IV, ficou na parte negativa desta componente, indicando uma composição química diferente entre plantas nativas e *in vitro*, relacionada aos metabolitos especializados presentes na superfície de *L. artemisiifolia* (figura 68).

Através da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) buscou-se observar o agrupamento quando considerado as informações de origem dos extratos. A PLS-DA é um método de reconhecimento de padrões supervisionado, o qual exige o conhecimento sobre a identidade ou característica das amostras e constrói modelos de classificação com base em informações contidas nestas (Ballabio & Consonni, 2013). As informações de *L. artemisiifolia* consideradas foram a estação de coleta para as plantas nativas do Cerrado e a condição de crescimento *in vitro*. O gráfico de escores da PLS-DA apresentou um padrão de agrupamento muito similar ao gráfico da PCA, apenas com a diferença que houve separação dos extratos etanólicos das plantas nativas (EE\_EC e EE\_ES) na parte negativa da componente 1 (figura 69). Análise conjunta dos gráficos de escores e pesos permitiu observar as variáveis ( $m/z$ ) responsáveis pela separação dos extratos. Assim foi possível relacionar os íons  $m/z$  277,18 e  $m/z$  291,20 ao extrato EA1 da estação seca, os íons  $m/z$  593,15 e  $m/z$  695,39 ao extrato etanólico da estação chuvosa e o íon  $m/z$  339,25 ao extrato EA1 da planta *in vitro*.

Através da análise PLS-DA, foram geradas as variáveis importantes na projeção (VIP), indicando os demais íons precursores ( $m/z$ ) responsáveis pela separação dos extratos (figura 70). A abundância isotópica, observada pela intensidade dos íons nos extratos ou mesmo a sua ausência, pode explicar o agrupamento e a separação no gráfico de escores da PLS-DA (figura 69).

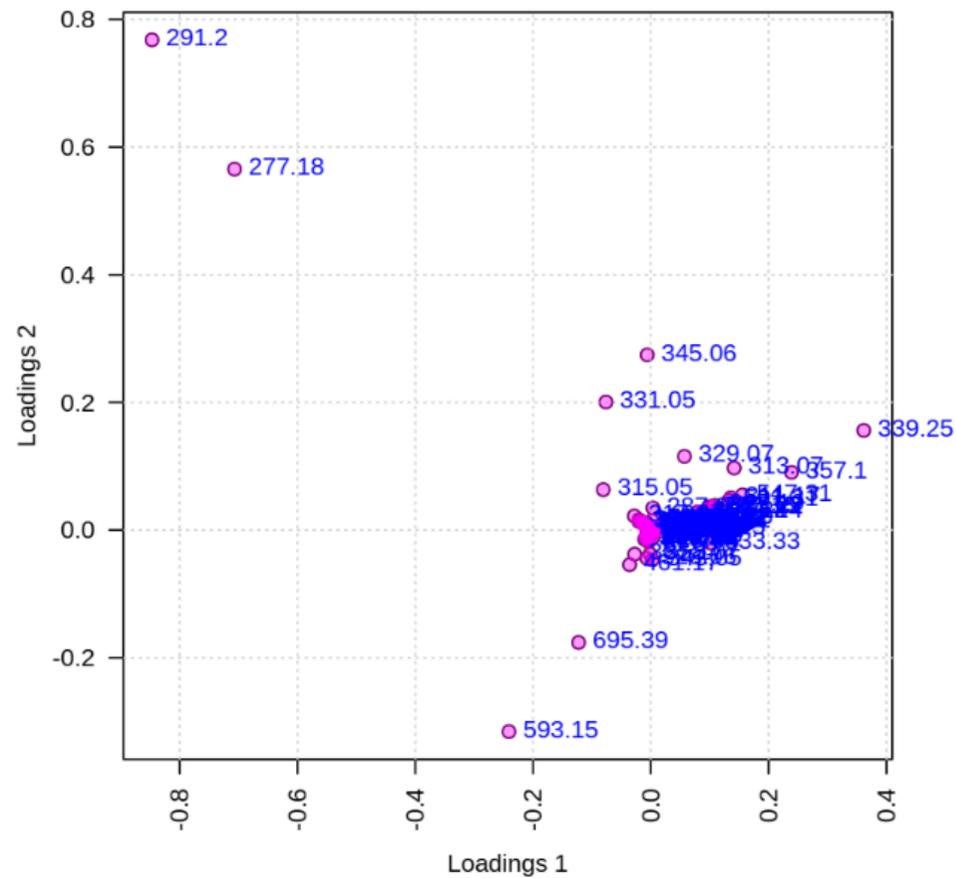
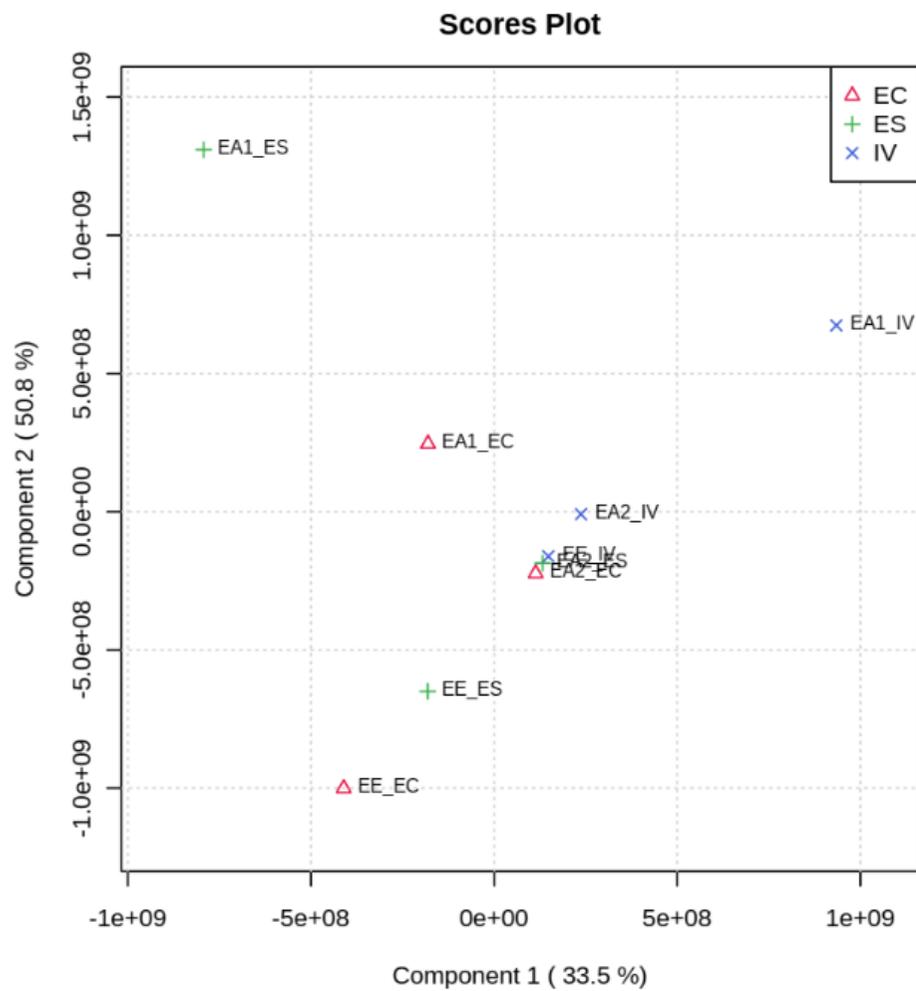


Figura 69. Gráfico de escores e de pesos da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Legenda: EC – estação chuvosa; ES – estação seca; IV – in vitro.

O íon em  $m/z$  593,15, por exemplo, apresenta alta intensidade nos extratos etanólicos dos extratos das estações chuvosa e seca, mas apresenta intensidade muito baixa no extrato etanólico *in vitro*. O mesmo comportamento ocorreu com os íons  $m/z$  331,0456 e  $m/z$  357,0984. Por outro lado, a maioria dos íons selecionados nas variáveis importantes da projeção apresentou sinais de maior intensidade no extrato da planta *in vitro*, que é o caso dos íons precursores em  $m/z$  339,2541 e  $m/z$  501,3074.

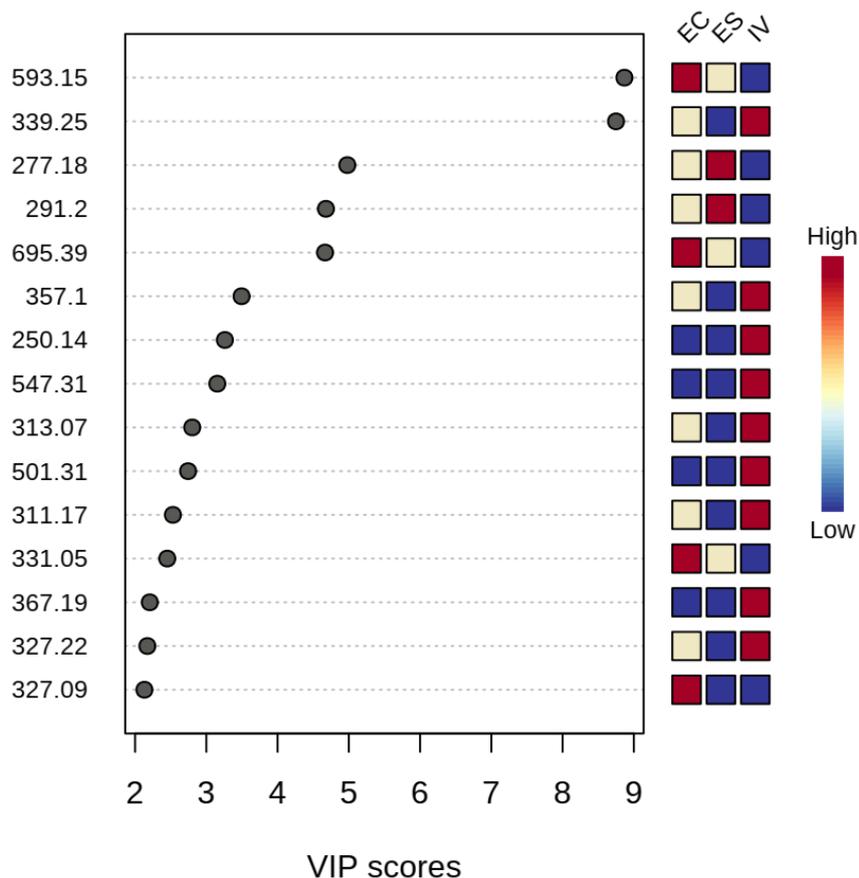


Figura 70. Variáveis importantes na projeção (VIP) geradas pela análise de PLS-DA.

A análise de PLS-DA e VIP indicaram os íons precursores em comum entre os dois grupos, mas que se diferenciam pela sua abundância isotópica nos extratos, principalmente em relação ao extrato EA1. Esses dados apontam para um conteúdo químico diferente, presente na superfície da planta e, portanto, relacionado ao exsudato produzido e secretado pelos tricomas glandulares de *L. artemisiifolia in vitro*. As análises por redes moleculares foram então conduzidas afim de estender a identificação dos metabólitos secundários de *L. artemisiifolia* e permitir observar as classes cuja produção se diferenciam pelo meio de crescimento entre as plantas nativas do Cerrado e *in vitro*.

## 8. Comparação entre as espécies de *L. artemisiifolia* nativas do Cerrado e *in vitro*

As análises quimiométricas e de rede moleculares permitiram verificar as diferenças e semelhanças do conteúdo químico entre as espécies de *L. artemisiifolia* nativas do Cerrado e *in vitro*. De modo geral observou-se a produção dos mesmos metabólitos secundários entre os dois grupos, conforme mostra o mapa de rede molecular obtido com os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo negativo (figura 71). A análise por redes moleculares no modo FBMN, permitiu a quantificação relativa dos íons precursores em comum entre plantas nativas e *in vitro*, representadas nos nós como diagramas de pizza, cuja proporção corresponde a área do pico cromatográfico detectado no cromatograma de íons extraídos (Olivon et al, 2017; Nothias et al, 2020). Assim podemos perceber metabólitos secundários que apresentaram maior abundância nos extratos da planta *in vitro*, indicados pela porção azul dos nós, como mostra a figura 71.

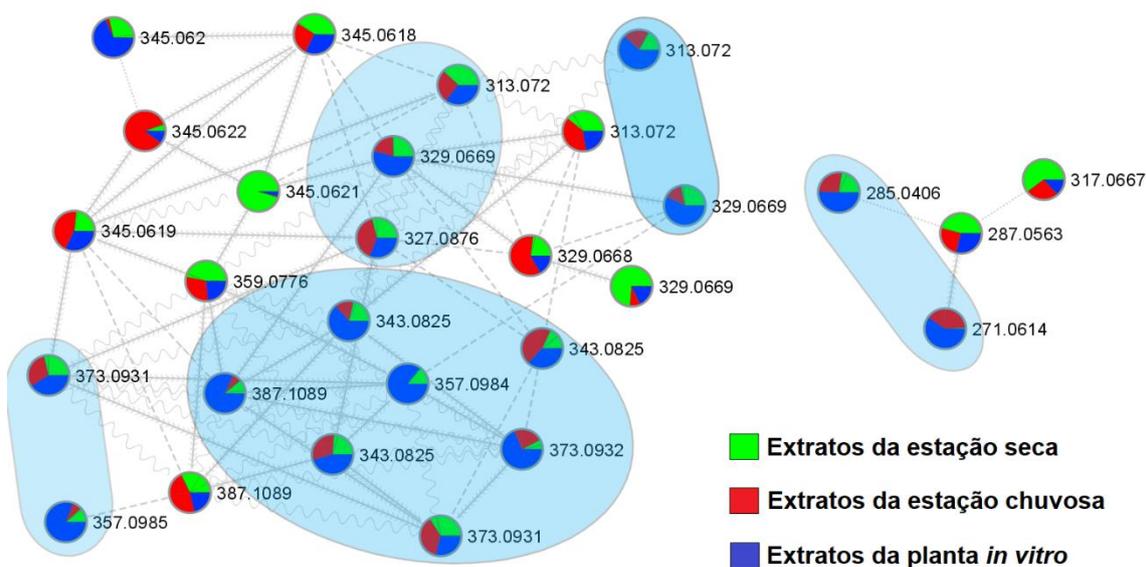


Figura 71. Rede molecular no modo FBMN com os dados de CLAE-IES-EM/EM no modo negativo, destacando os íons que apresentaram maior abundância nos extratos de *L. artemisiifolia* *in vitro*.

De fato, a micropropagação *in vitro* é considerada uma estratégia bem estabelecida para a produção de metabólitos secundários, sendo considerada uma forma de obtenção alternativa ao extrativismo de recursos naturais e tem sido utilizada na produção de fármacos vegetais (Devrnja et al, 2020; Rao & Ravishankar, 2002). Além disso, é um método eficiente para a conservação de

espécies raras e ameaçadas de extinção, que é o caso de *L. artemisiifolia* (Muraseva & Kotiskova, 2020; Moreira, 2018).

Apesar dos estudos destacarem a produção de metabólitos secundários por meio da micropropagação *in vitro*, geralmente ocorrem diferenças na composição química entre as espécies nativas e *in vitro*. Isso ocorre porque o crescimento das espécies em campo se dá no meio ambiente em condições não controladas, no qual estão submetidas ao estresse ambiental, como a intensa radiação ultravioleta, presença de predadores, variação de umidade e nutrientes do solo, entre outros fatores (Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Szakiel et al, 2011).

Por outro lado, na micropropagação *in vitro* as condições de crescimento são controladas, criando-se um microambiente definido que permite o acesso aos nutrientes necessários para a sobrevivência da planta, constituindo uma condição melhor para a produção de metabólitos secundários (Oliveira et al 2020). No entanto, nem sempre isso se reflete em uma composição química igual ao das espécies encontradas no campo, podendo ocorrer variações seja pela presença ou ausência dos metabólitos secundários e também na quantidade destes, o que foi verificado neste trabalho. A análise de PLS-DA e VIP permitiram observar quais são estes metabólitos, sendo que alguns puderam ser atribuídos com base na anotação obtida com plataforma GNPS (tabela 11).

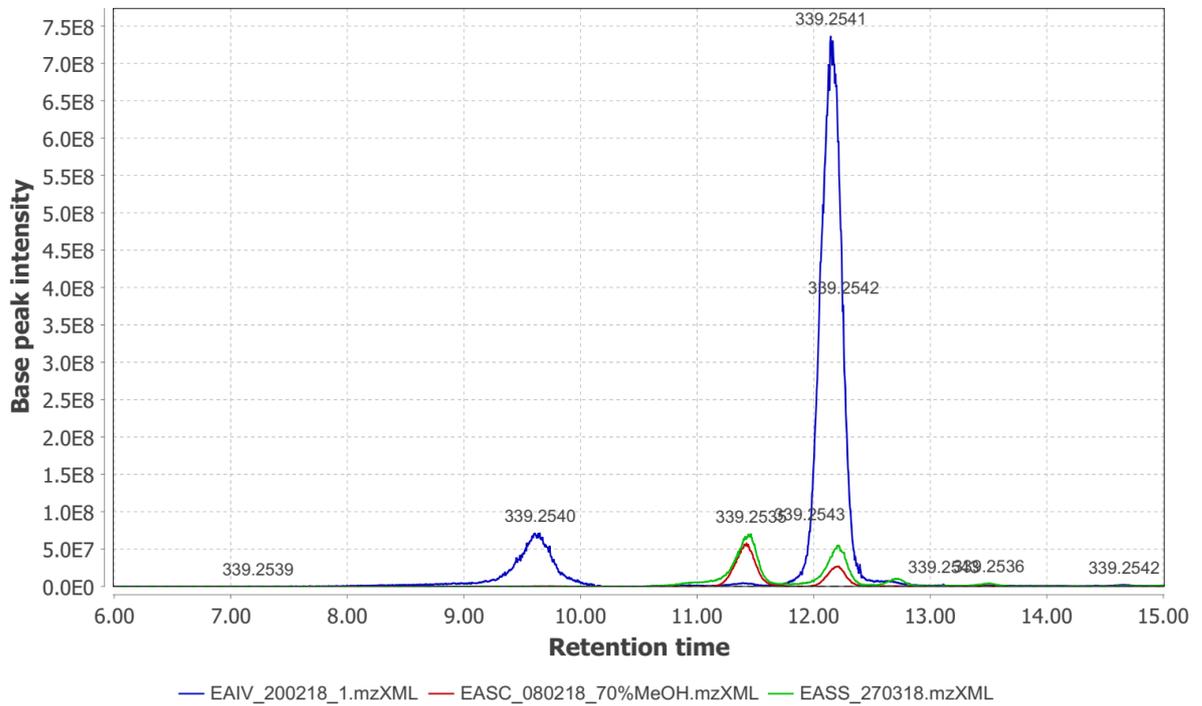
Dentre os metabólitos que se encaixam nesta situação está o flavonoide glicosilado anotado como a vicenina-2 ( $m/z$  593,1519 [M-H]<sup>-</sup>). Este composto é apontado pela análise das variáveis importantes na projeção (VIP), como o responsável pela diferenciação entre os extratos etanólicos das plantas nativas e *in vitro* (seção 6). Uma comparação entre os cromatogramas desses extratos permite verificar uma abundância isotópica maior deste íon nos extratos das plantas nativas (figura 72).

Outros íons selecionados pelo VIP apresentam maior abundância isotópica nos extratos da planta *in vitro*, como é o caso da flavona polimetoxilada anotada cirsimarina ( $m/z$  313,0720 [M-H]<sup>-</sup>, Tr 16,02 min.) e os íons precursores  $m/z$  339,2543 (Tr. 12,15 min.) e  $m/z$  501,3075, que não foram anotados (figura 72 e 73, respectivamente).



a)  $m/z$  339,2543

XIC (base peak),  $m/z$ : 339.2500 - 339.2600



b)  $m/z$  501,3075

XIC (base peak),  $m/z$ : 501.3000 - 501.3200

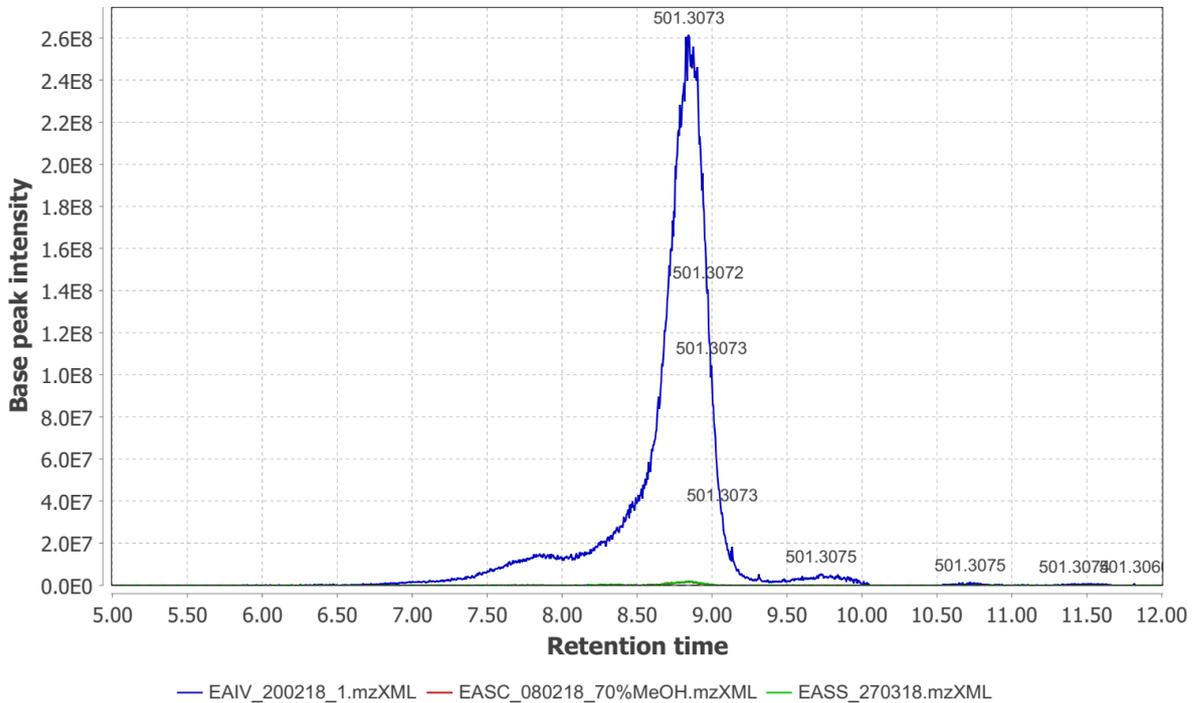


Figura 73. Cromatogramas de íons extraídos dos íons precursores a)  $m/z$  339,2543  $[M-H]^-$  (Tr. 12,15 min) no extratos acetato 1 e b)  $m/z$  501,3073  $[M-H]^-$  (Tr 8,90 min), selecionados na análise de VIP. Legendas de cores: verde (estação seca), vermelho (estação chuvosa) e azul (planta in vitro).

Assim, no que se refere ao uso e aplicação de extratos vegetais obtidos por meio da micropropagação *in vitro*, é importante observar as possíveis variações dos metabólitos da espécie produzidas através desta técnica. Neste trabalho foi demonstrado que a análise rede molecular em conjunto com a análise multivariada pode ser uma ferramenta útil para esta proposta, permitindo observar os metabólitos que se diferenciam entre as espécies em estudo.

Com base nos resultados deste trabalho é possível inferir que a espécie *in vitro* de *L. artemisiifolia* se diferencia das crescidas em ambiente natural principalmente pelo conteúdo químico presente na superfície foliar desta planta, relacionado ao exsudado produzido pelos tricomas glandulares desta espécie. De fato, a literatura relata que as plantas *in vitro* se desenvolvem de forma diferente das espécies encontradas na natureza, principalmente em relação a estruturas vegetais específicas, como os tricomas glandulares. Há relatos na literatura de que as condições de crescimento da micropropagação *in vitro* podem levar a anormalidades na morfologia e fisiologia da planta, influenciando assim na produção de metabólitos secundários (Stanojković et al, 2020; Uzelac et al, 2020; Sota et al, 2019). Neste estudo sugerimos que as diferenças nos teores de alguns metabólitos secundários, podem ser explicados com base nesta diferenciação anatômica vegetal dos tricomas glandulares entre espécies *in vivo* e *in vitro*.

Tabela 11. Anotação dos compostos selecionados pela análise de variáveis importantes na projeção (VIP) da PLS-DA através da plataforma GNPS.

Compostos	Tr (min.)	Fórmula molecular	Aduto	<i>m/z</i> (experimental)	<i>m/z</i> (calculado)	Error (ppm)	EM/EM	Nível de anotação
vicenina-2	3,66	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	593,15173	593,15119	+0,91	575,14, 515,12, 503,12, 473,11, 455,10, 383,08 e 353,07	2
não anotado	12,14	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	339,25418	339,25408	+0,29	328,57, 294,59, 279,23, 246,72, 226,68, 223,21 e 183,01	4
não anotado	19,45	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N	[M-H] <sup>-</sup>	277,18408	277,18359	-1,76	79,96	4
não anotado	21,62	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N	[M-H] <sup>-</sup>	291,19992	291,19925	+2,30	79,96	4
não anotado	5,90	C <sub>33</sub> H <sub>59</sub> O <sub>15</sub>	[M+HCOO] <sup>-</sup>	695,38647	695,38533	-1,65	649,38, 487,33 e 161,04	4
Corimbosina	7,81	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	357,09827	357,09798	0,82	342,07, 327,05, 312,03, 299,06, 284,03, 269,01 e 177,02	2
não anotado	19,54	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	250,14490	250,14487	+0,13	-	4
não anotado	7,49	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	547,31305	547,31239	+1,21	381,27, 363,25, 339,25 e 103,02	4
cirsimaritina ou isômeros	16,05	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	313,07172	313,07176	-0,036	298,05, 283,02 e 255,03	2
não anotado	8,84	C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> O <sub>9</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	501,30737	501,30691	+1,10	339,25	4
não anotado	20,36	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N	[M-H] <sup>-</sup>	311,16891	311,16795	+3,09	293,21, 274,88, 243,10, 223,17, 201,11, 174,96, 149,10, 127,08 e 87,04	4
flavona metoxilada	7,98	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	331,04581	331,04536	-1,37	316,02, 287,02, 271,02, 209,01, 181,01, 165,99, 135,04 e 121,03	3
não anotado	21,22	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	367,19174	367,19148	0,70	323,20, 310,16, 295,21, 205,16, 149,10, 108,02 e 95,01	4
não anotado	11,13	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	327,21790	327,21713	-0,33	312,03, 309,21, 297,04, 284,03, 269,05, 239,13, 229,14, 221,12, 211,13, 171,10, 97,06, 85,03 e 57,03	4
flavona trimetoxilada	10,01	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	327,08725	327,08741	-0,31	312,06, 297,04, 294,05, 269,05, 266,06, 222,07, 177,02 e 117,03	3

## 9. Avaliação dos extratos de *L. artemisiifolia* na atividade nematicida *in vitro* de *Pratylenchus brachyurus*

O estudo químico de *L. artemisiifolia* permitiu a identificação de vários flavonoides. Recentemente, estudos tem mostrado o uso de flavonoides no controle populacional de fitonematóides (Bano et al, 2020). Silva (2019) avaliou a atividade nematicida *in vitro* do extrato EA1 de *L. artemisiifolia* no controle biológico dos nematoides *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita*, apresentando taxas de mortalidade de 90,55% e 49,50%, respectivamente. O ensaio em campo com *P. brachyurus* e *M. incognita* permitiu uma redução da população desses nematoides em 54,40% e 66,59%, respectivamente. O resultado obtido por Silva (2019), pode ser atribuído a presença dos flavonoides, classe de compostos que apresentou maior número de compostos identificados em *L. artemisiifolia* e que possui atividade nematicida relatada na literatura (Bano et al, 2020; Faizi et al, 2011).

Neste trabalho foi realizada uma avaliação *in vitro* da atividade dos extratos EA1, EA2 e EE de *L. artemisiifolia* das estações seca e chuvosa, na mortalidade de juvenis (J2) do nematoide *P. brachyurus*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Nematologia da Escola de Agronomia da UFG, sob supervisão da profa. Dra. Mara Rúbia da Rocha. A metodologia escolhida para este ensaio utiliza uma solução de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>), a qual é capaz de penetrar a cutícula dos nematoides e colorindo o seu interior, o que permitiu a distinção entre os nematoides vivos e mortos (figura 74) (Jatala, 1975).

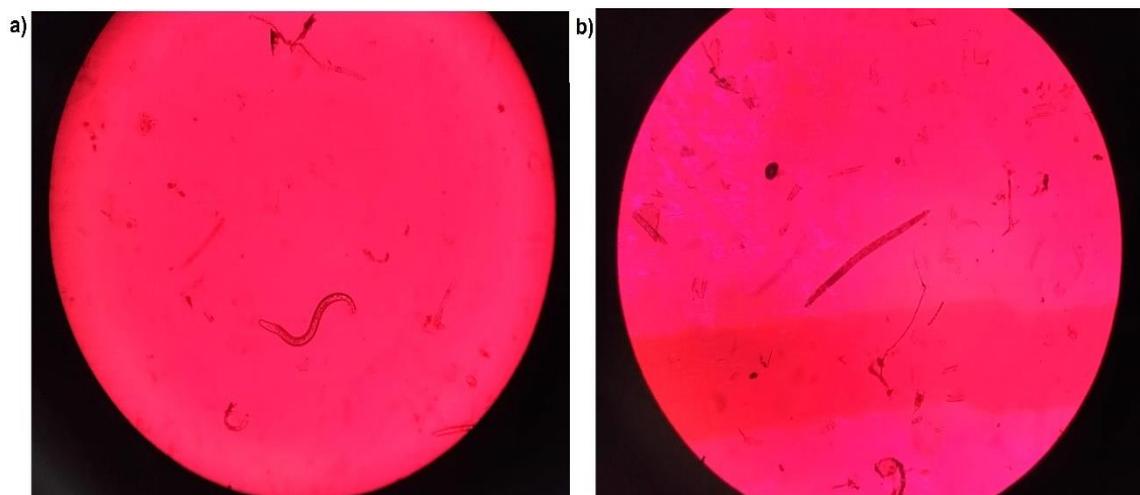


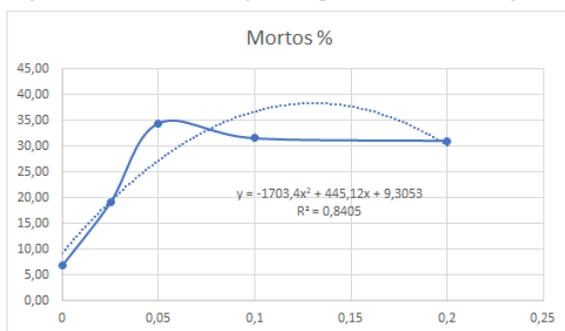
Figura 74. Contagem dos juvenis (J2) de *P. brachyurus* na câmara de Peters com uso da solução de KMnO<sub>4</sub> (0,05%) para a distinção dos nematoides (a) vivos e (b) mortos. Fonte: autoria própria.

Inicialmente os extratos de *L. artemisiifolia* foram testados nas concentrações de 0,0%, 0,025%, 0,05%, 0,1% e 0,2%. A preparação dos extratos foi feita em diluição seriada, sendo que foi necessário a adição de uma solução de etanol (1,25%) e agitação pelo ultra-turrax para solubilização dos extratos.

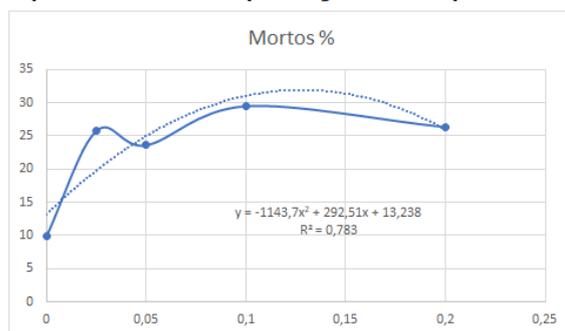
Após a extração do nematoides, foi preparada uma solução dos juvenis J2 de *P. brachyurus* calibrada para aproximadamente 100 juvenis/mL. Em seguida os extratos de *L. artemisiifolia* foram aplicados na solução dos nematoides. A contagem de nematoides vivos e mortos foi realizada após 24 horas de exposição dos juvenis J2 de *P. brachyurus* aos extratos. Os dados da contagem foram tratados estatisticamente e em todos os ensaios foi necessário realizar a transformação pelo método de Box & Cox (1964), buscando-se atender aos pressupostos da normalidade. O ensaio foi considerado para avaliação desde que houvesse diferença significativa em relação a testemunha, nesse caso a solução de nematoides sem aplicação dos extratos, a um nível de 5% de probabilidade, o que foi indicado por  $p < 0,05$ . Com exceção do extrato EA1 da estação seca, os demais extratos testados atenderam a esta condição.

Os resultados do ensaio nematicida indicaram uma taxa de mortalidade que variou de 26,68 à 31,66%, o que indicou uma atividade nematicida pouco eficiente para os extratos de *L. artemisiifolia* na concentração de 0,2% (figura 75).

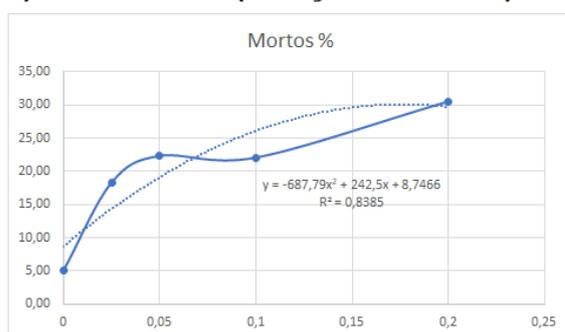
**a) Extrato EA1 (estação chuvosa)**



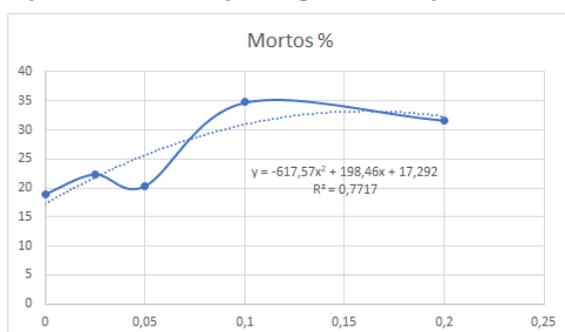
**d) Extrato EA2 (estação seca)**



**b) Extrato EA2 (estação chuvosa)**



**e) Extrato EE (estação seca)**



**c) Extrato EE (estação chuvosa)**

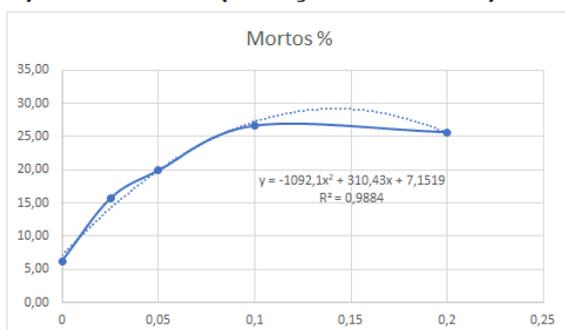


Figura 75. Resultado do ensaio nematicida com os extratos de *L. artemisiifolia* nas concentrações de 0,0%, 0,025%, 0,05%, 0,1% e 0,2%.

Considerando-se que a baixa taxa de mortalidade pode estar relacionada a concentração testada, foi realizado um outro ensaio, aumentando-se a concentração para 0,8%. Os extratos acetato de etila 1 e 2, entretanto, não se solubilizaram o suficiente e somente o extrato etanólico foi selecionado para este ensaio, nas concentrações de 0,0%, 0,1%, 0,2%, 0,4% e 0,8%. Verificou-se um aumento da taxa de mortalidade, calculada em 39,88% na concentração de 0,2% do extrato etanólico. O aumento da concentração deste extrato mostrou pouca influência na taxa de mortalidade que baixou para 33,13% e 32,61%, nas concentrações de 0,4% e 0,8% (figura 76).

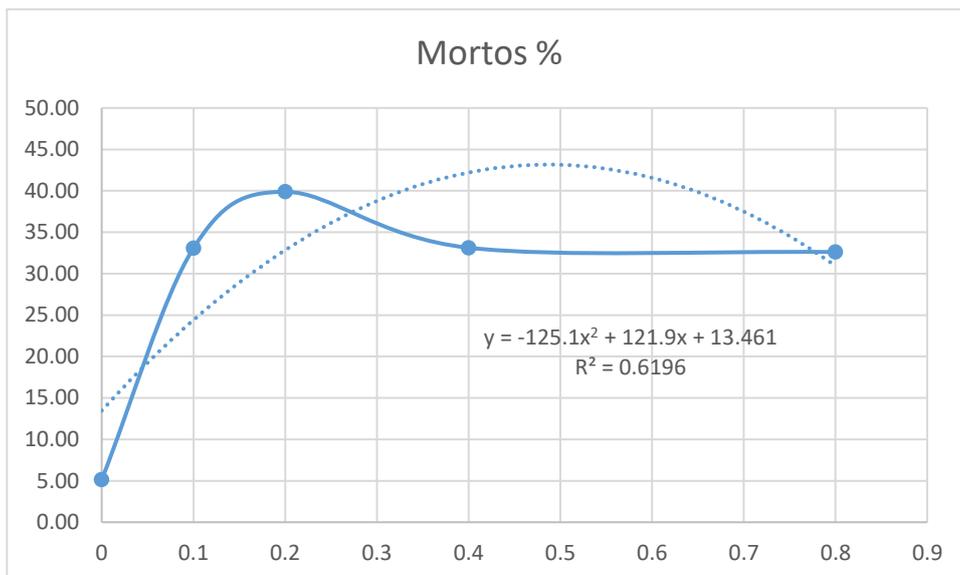


Figura 76. Resultado do ensaio nematocida do extrato etanólico da estação chuvosa.

Assim conclui-se que os extratos de *L. artemisiifolia* não foram efetivos no controle do nematoide *P. brachyurus*, apresentando baixas taxas de mortalidade que diferem do relatado por Silva (2019), principalmente em relação ao extrato EA1.

# Conclusão

## 10. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta o estudo químico da espécie *Lomatozona artemisiifolia* Baker. As análises de CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares foram aplicadas com sucesso no estudo dos extratos de *L. artemisiifolia*, permitindo a identificação de flavonoides e diterpenos labdanos. A classe de flavonoides foi a que apresentou maior diversidade estrutural, sendo identificadas as subclasses de flavanona, flavanona metoxilada, flavona, flavona polimetoxilada, e flavonoide glicosilado. As substâncias descritas neste trabalho são relatadas pela primeira vez tanto na espécie *L. artemisiifolia* como para o gênero *Lomatozona*, representando assim uma contribuição ao conhecimento químico desta espécie endêmica do Cerrado. Isto contribui para a compreensão das atividades biológicas já relatadas para os extratos desta espécie, bem como para o planejamento de ensaios biológicos com estes no futuro. As classes identificadas em *L. artemisiifolia* estão de acordo com as relatadas na literatura para as espécies da tribo Eupatorieae encontradas no Parque Estadual da Serra Dourada, encontrando-se em comum metabólitos das classes de diterpenos labdanos, flavonas, flavonoides glicosilados e flavonoides metoxilados.

Os extratos das espécies de *L. artemisiifolia* nativas do Cerrado e *in vitro* foram analisados por CLAE-IES-EM/EM e comparados através de quimiometria. Esta, por sua vez, revelou os metabólitos secundários cuja produção foi influenciada pelas condições de crescimento no campo e micropropagação *in vitro*. Observou-se que alguns desses metabólitos se diferenciam entre os dois grupos, principalmente em relação com o conteúdo químico do exsudado da planta *in vitro*. A literatura sugere que isso pode estar associado a uma possível anormalidade no desenvolvimento dos tricomas glandulares da planta obtida por micropropagação *in vitro*, fato já observado em outras espécies. Na análise de PLS-DA e VIP foram indicadas os compostos responsáveis pela diferenciação das espécies nativas e *in vitro*, sendo que alguns destes puderam ser anotados através da plataforma GNPS.

Os extratos de *L. artemisiifolia* não foram efetivos na mortalidade de juvenis (J2) de *Pratylenchus brachyurus*. Ressalta-se, entretanto, que a composição química de *L. artemisiifolia* descrita neste trabalho pode servir de base para sua avaliação em outras atividades biológicas de interesse.

Por fim, através do estudo químico de *L. artemisiifolia* é realizada uma contribuição ao conhecimento químico do gênero *Lomatozona*, cujas espécies não possuem estudos dos seus constituintes químicos. Com base nos estudos anteriores com esta espécie, foi possível correlacionar os metabólitos secundários identificados com a anatomia vegetal e também com as atividades biológicas avaliadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrol, V., Kushwaha, M., Arora, D., Mallubhotla, S., & Jaglan, S. Mutation, Chemoprofiling, Dereplication, and Isolation of Natural Products from *Penicillium oxalicum*. *ACS Omega*, 6(25), 16266–16272, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00141>

Aguiar, G. P., Crevelin, E. J., Dias, H. J., Ambrósio, S. R., Bastos, J. K., Heleno, V. C. G., Vessecchi, R., & Crotti, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry of labdane-type acid diterpenes. *Journal of Mass Spectrometry*, 53(11), 1086–1096, 2018. <https://doi.org/10.1002/jms.4284>

Amaral, L. S. *Análise de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados à Cupressus lusitanica*. 164, 2009.

Amorim, D. E. Chemical constituents of *Pseudobrickellia brasiliensis* leaves (Spreng.) R. M. King & H. *Rev Bras Pl Med*, 18(2), 408–414, 2016.

Arbain, D., Nofrizal, Syafni, N., Ismed, F., Yousuf, S., & Choudhary, M. I. Bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from Indonesian red betle leaves (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.). *Phytochemistry Letters*, 24, 163–166, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.02.006>

Aron, A. T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L. F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., Petras, D., Gauglitz, J. M., Sikora, N., Vargas, F., van der Hooft, J. J. J., Ernst, M., Kang, K. Bin, Aceves, C. M., Caraballo-Rodríguez, A. M., Koester, I., Weldon, K. C., Bertrand, S., Roullier, C. & Dorrestein, P. C. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols*, 15(6), 1954–1991, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5>

Baldisera, S. S., Schwengber, R. P., Ferreira, P. G. da S., Jacomassi, E., Gazim, Z. C., & Santana-Gomes, S. de M. *Achillea millefolium* antagonism to *Pratylenchus brachyurus*. *Journal of Phytopathology*, 169(1), 28–36, 2021. <https://doi.org/10.1111/jph.12955>

Bano, S., Iqbal, E. Y., Lubna, Zik-ur-Rehman, S., Fayyaz, S., & Faizi, S. Nematicidal activity of flavonoids with structure activity relationship (SAR) studies against root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology*, 157(2), 299–309, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01988-w>

Begum, S., Ayub, A., Zehra, S. Q., & Siddiqui, B. S. Chemical constituents of the aerial parts of *lantana camara*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49(3), 566–567, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10600-013-0674-1>

Bell, C. A., Atkinson, H. J., Andrade, A. C., Nguyen, H. X., Swibawa, I. G., Lilley, C. J.,

McCarthy, J., & Urwin, P. E. A high-throughput molecular pipeline reveals the diversity in prevalence and abundance of *Pratylenchus* and *Meloidogyne* species in coffee plantations. *Phytopathology*, 108(5), 641–650, 2018. <https://doi.org/10.1094/PHTO-10-17-0343-R>

Bezerra, A. M. Considerações sobre conservação da biodiversidade nas ecorregiões do bioma Cerrado. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal, 2018.

Bohlmann, F., Knoll, K.-H, King, R. M., Robinsons, H. Neue  $\alpha$ -santalen- und labdan-derivate aus *ayapana aiuygdalina*. *Phytochemistry*, 18, 1997-2002, 1979. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82719-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82719-3)

Box, G. E. P., & Cox, D. R. An Analysis of Transformations Author ( s ): G . E . P . Box and D . R . Cox Published by : Wiley for the Royal Statistical Society Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2984418> Accessed : 08-03-2016 06 : 53 UTC Your use of the JSTOR archive indicates. *Journal, Source Statistical, Royal Series, Society*, 26(2), 211–252, 1964.

Buffon, D. E. Isolamento e identificação de princípios ativos de *Callophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae). Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

Caboni, P., & Ntalli, N. G. Botanical nematicides, recent findings. *ACS Symposium Series*, 1172, 145–157, 2014. <https://doi.org/10.1021/bk-2014-1172.ch011>

Cardoso, J. C., & da Silva, J. A. T. Micropropagation of *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae), an endangered endemic medicinal species from the Brazilian cerrado biome. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 49(6), 710–716, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9558-0>

Carvalho, J. M. F. C., Silva, M. M. de A., & Lacerda, M. J. *Fatores Inerentes À Micropropagação República Federativa do Brasil*. 2006.

Castillo, S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L., & Orešič, M. Algorithms and tools for the preprocessing of LC-MS metabolomics data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 108(1), 23–32, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.03.010>

Chacon-Morales, P. A., Amaro-Luis, J. M., Rojas Fermin, L. B., Rios Tesch, N. N., Lucena Escalona, M. E., Rodriguez Pena, M. A., Peixoto, P. A., Jacquet, R., Deffieux, D., Pouysegu, L., & Quideau, S. Hemisynthesis and Bactericidal Activity of Several Substituted Benzoic Acid Esters of 13(S)-Labdan-8 $\alpha$ ,15-Diol, a Diterpene from *Oxylobus glanduliferus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 55(4), 677–684, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02777-6>

Chahal, R., Nanda, A., Akkol, E. K., Sobarzo-sánchez, E., Arya, A., Kaushik, D., Dutt, R., Bhardwaj, R., Rahman, M. H., & Mittal, V. *Ageratum conyzoides* L. And its

secondary metabolites in the management of different fungal pathogens. *Molecules*, 26(10), 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26102933>

Chen, Jie, Montanari, A. M., & Widmer, W. W. Two New Polymethoxylated Flavones, a Class of Compounds with Potential Anticancer Activity, Isolated from Cold Pressed Dancy Tangerine Peel Oil Solids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(2), 364–368, 1997. <https://doi.org/10.1021/jf960110i>

Chen, Jixiang, Li, Q. X., & Song, B. Chemical Nematicides: Recent Research Progress and Outlook. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(44), 12175–12188, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02871>

Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D. S., & Xia, J. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W486–W494, 2018. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>

Cortelo, P. C., Demarque, D. P., Dusi, R. G., Albernaz, L. C., Braz-Filho, R., Goncharova, E. I., Bokesch, H. R., Gustafson, K. R., Beutler, J. A., & Espindola, L. S. A Molecular Networking Strategy: High-Throughput Screening and Chemical Analysis of Brazilian Cerrado Plant Extracts against Cancer Cells. *Cells*, 10(3), 1–13, 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10030691>

Crüseemann, M., O'Neill, E. C., Larson, C. B., Melnik, A. V., Floros, D. J., Da Silva, R. R., Jensen, P. R., Dorrestein, P. C., & Moore, B. S. Prioritizing Natural Product Diversity in a Collection of 146 Bacterial Strains Based on Growth and Extraction Protocols. *Journal of Natural Products*, 80(3), 588–597, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00722>

Cuyckens, F., & Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1–15, 2004. <https://doi.org/10.1002/jms.585>

Cuyckens, F., & Claeys, M. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-O-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(3), 364–372, 2005. <https://doi.org/10.1002/jms.794>

da Silva, R. R., Wang, M., Nothias, L. F., van der Hooft, J. J. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Fox, E., Balunas, M. J., Klassen, J. L., Lopes, N. P., & Dorrestein, P. C. Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation. *PLoS Computational Biology*, 14(4), 1–26, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006089>

da Silva, T. M. S., De Carvalho, M. G., & Braz-Filho, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* moric. *Quimica Nova*, 32(5), 1119–1128, 2009. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000500008>

Dantas, C. A. G., Abreu, L. S., da Cunha, H. N., Veloso, C. A. G., Souto, A. L., de Fátima Agra, M., de Oliveira Costa, V. C., da Silva, M. S., & Tavares, J. F. Dereplication of phenolic derivatives of three *Erythroxylum* species using liquid chromatography coupled with ESI-MS<sup>n</sup> and HRESIMS. *Phytochemical Analysis*, February, 1–16, 2021. <https://doi.org/10.1002/pca.3043>

de Oliveira, J. A. M., Bernardi, D. I., Balbinot, R. B., Cabral, M. R. P., Zanqueta, É. B., Endo, E. H., Dias Filho, B. P., Nakamura, T. U., Figueiredo, M. C., Ruiz, A. L. T. G., Foglio, M. A., do Carmo, M. R. B., Sarragiotto, M. H., & Baldoqui, D. C. New cadinenes-sesquiterpene from *Chromolaena laevigata* (lam.) R. M. King & H. Rob (Asteraceae) aerial parts and biological activities. *Natural Product Research*, 0(0), 1–8, 2020. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1747456>

de Oliveira, M. E. B. S., Sartoratto, A., & Carlos Cardoso, J. In Vitro Calli Production Resulted in Different Profiles of Plant-Derived Medicinal Compounds in *Phyllanthus amarus*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24), 1–15, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25245895>

de Oliveira, C. M., Almeida, N. O., Côrtes, M. V. de C. B., Júnior, M. L., da Rocha, M. R., & Ulhoa, C. J. Biological control of *Pratylenchus brachyurus* with isolates of *Trichoderma* spp. on soybean. *Biological Control*, 152, 104425, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104425>

de Santana, F. B., de Souza, A. M., Almeida, M. R., Breikreitz, M. C., Filgueiras, P. R., Sena, M. M., & Jesus Poppi, R. Experimento Didático De Quimiometria Para Classificação De Óleos Vegetais Comestíveis Por Espectroscopia No Infravermelho Médio Combinado Com Análise Discriminante Por Mínimos Quadrados Parciais: Um Tutorial, Parte V. *Química Nova*, 43(3), 371–381, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170480>

De Souza, A. V., Pinto, J. E. B. P., Bertolucci, S. K. V., Corrêa, R. M., Costa, L. C. D. B., & Dyer, W. E. In vitro propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): A threatened endemic medicinal plant. *HortScience*, 42(7), 1665–1669, 2007. <https://doi.org/10.21273/hortsci.42.7.1665>

Devrnja, N., Krstić-Milošević, D., Janošević, D., Tešević, V., Vinterhalter, B., Savić, J., & Čalić, D. In vitro cultivation of tansy (*Tanacetum vulgare* L.): a tool for the production of potent pharmaceutical agents. *Protoplasma*, 258(3), 587–599, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01588-9>

Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthese Approach. In *Journal of Chemical Information and Modeling*, Vol. 53, Issue 9, 2009.

Di Ottavio, F., Gauglitz, J. M., Ernst, M., Panitchpakdi, M. W., Fanti, F., Compagnone, D., Dorrestein, P. C., & Sergi, M. A UHPLC-HRMS based metabolomics and chemoinformatics approach to chemically distinguish 'super foods' from a variety of plant-based foods. *Food Chemistry*, 313(July 2019), 126071, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126071>

Dzomba, P., Mureya, C., & Gwatidzo, L. Nematicidal Activity of phytocompounds from *Piliostigma thonningii* Stem Bark Against *Meloidogyne javanica*. *Chemistry Africa*, 3(4), 937–947, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42250-020-00158-z>

Egan, J. M., Van Santen, J. A., Liu, D. Y., & Linington, R. G. Development of an NMR-Based Platform for the Direct Structural Annotation of Complex Natural Products Mixtures. *Journal of Natural Products*, 84, 4, 1044–1055, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01076>

Emerenciano, V. P., Militão, J. S. L. T., Campos, C. C., Romoff, P., Kaplan, M. A. C., Zambon, M., & Brant, A. J. C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(9), 947–957, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00033-3)

Ernst, M., Kang, K. Bin, Caraballo-Rodríguez, A. M., Nothias, L. F., Wandy, J., Chen, C., Wang, M., Rogers, S., Medema, M. H., Dorrestein, P. C., & van der Hooft, J. J. J. Molnetenhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. *Metabolites*, 9 (7), 2019. <https://doi.org/10.3390/metabo9070144>

Faizi, S., Fayyaz, S., Bano, S., Yawar Iqbal, E., Lubna, L., Siddiqi, H., & Naz, A. Isolation of nematicidal compounds from *tagetes patula* L. yellow flowers: Structure-activity relationship studies against cyst nematode *heterodera zae* infective stage larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9080–9093, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf201611b>

Faqueti, L., Sandjo, L. P. Mass spectrometry as a tool in the structure elucidation of rare natural products. Chapter 5, 203-244. In: Diniz, M. F. F. M., Scotti, L., Scotti, M. T. & Alves, M. F. Natural Products and Drug Discovery. Editora UFPB, 2018.

Ferreira, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), 1039–1042, 2011. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542011000600001>

Ferreira, G. M. *Caracterização fitoquímica de frações enriquecidas com flavonoides e proantocianidinas por CLUE-DADESI/EM de espécies medicinais do gênero Ouratea*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto. 2018.

Ferreres, F., Giz-Izquierdo, A., Andrade, P. B., Valentão, P., Tomás-Barberán, F. A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161, 214 -223, 2007.

Figueiredo, B. N. S., Sato, M. O., Moura, L. T. S., Mariano, S. M. B., Alvim, T. da C., Soares, I. M., Kawai, S., Ascêncio, S. D., Santos, H. D., Paiva, J. A., Sato, M., & Maruo, V. M. Preliminary report on the effect of savanna plants *leucaena leucocephala*, *parkia platycephala* and *senna alata* against eggs and immature stages of trichostrongylid

nematodes in vitro. *Pathogens*, 9(12), 1–10, 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9120986>

Fox Ramos, A. E., Alcover, C., Evanno, L., Maciuk, A., Litaudon, M., Duplais, C., Bernadat, G., Gallard, J. F., Jullian, J. C., Mouray, E., Grellier, P., Loiseau, P. M., Pomel, S., Poupon, E., Champy, P., & Beniddir, M. A. Revisiting Previously Investigated Plants: A Molecular Networking-Based Study of *Geissospermum laeve*. *Journal of Natural Products*, 80(4), 1007–1014, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01013>

Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F., & Robinson, H. *Classification of Compositae*. 1977, 171–189, 1994.

García-Sánchez, E., Ramírez-López, C. B., Talavera-Alemán, A., León-Hernández, A., Martínez-Muñoz, R. E., Martínez-Pacheco, M. M., Gómez-Hurtado, M. A., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., & Del Río, R. E. Absolute configuration of (13 R)- and (13 S)-labdane diterpenes coexisting in *ageratina jocotepecana*. *Journal of Natural Products*, 77(4), 1005–1012, 2014. <https://doi.org/10.1021/np500022w>

Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2), 374–381, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian *arnica* *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1193–1204, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf072812l>

Gobbo-Neto, L., Gates, P. J. & Lopes, N. P. Negative ion ‘chip-based’ nanospray tandem mass spectrometry for the analysis of flavonoids in glandular trichomes of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 3802–3808, 2008. <https://doi.org/10.1002/rcm.3802>

Godinho, T. F., Marques, A., Rodrigues, A. C. P., Correia, L. P. de S., Marques, A., Fernandes, J. S. C., Bianche, J. J., Gonçalves, J. F., Laia, M. L. Genetic Analysis of *Caryocar Brasiliense* Donor Trees Using Microsatellite Molecular Markers. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 9 (31), 245-252, 2015.

Guijas, C., Montenegro-Burke, J. R., Domingo-Almenara, X., Palermo, A., Warth, B., Hermann, G., Koellensperger, G., Huan, T., Uritboonthai, W., Aisporna, A. E., Wolan, D. W., Spilker, M. E., Benton, H. P., & Siuzdak, G. METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns. *Analytical Chemistry*, 90(5), 3156–3164, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04424>

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. PAST : Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis PAST : PALEONTOLOGICAL STATISTICS

SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS Even a cursory glance at the recent paleontological literature should convince anyone that. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1–9, 2001.

Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, K., Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai, M. Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., ... Nishioka, T. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*, 45 (7), 703–714, 2010. <https://doi.org/10.1002/jms.1777>

Hubert, J., Nuzillard, J. M., & Renault, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? *Phytochemistry Reviews*, 16 (1), 55–95, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9448-7>

Jang, J. Y., Dang, Q. Le, Choi, Y. H., Choi, G. J., Jang, K. S., Cha, B., Luu, N. H., & Kim, J. C. Correction to Nematicidal Activities of 4-Quinolone Alkaloids Isolated from the Aerial Part of *Triumfetta grandidens* against *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (14), 3803, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01535>

Jatala, P. Efficiency of potassium permanganate in differentiating between live and dead nematodes. *Annals of Applied Biology*, 80(1), 109–113, 1975. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1975.tb01605.x>

Jiang, N., Doseff, A. I., & Grotewold, E. (2016). Flavones: From biosynthesis to health benefits. *Plants*, 5 (2), 1 - 25, 2016. <https://doi.org/10.3390/plants5020027>

Julio, L. F., Barrero, A. F., Herrador Del Pino, M. M., Arteaga, J. F., Burillo, J., Andres, M. F., Díaz, C. E., & González-Coloma, A. Phytotoxic and Nematicidal Components of *Lavandula luisieri*. *Journal of Natural Products*, 79(2), 261–266, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00501>

Justesen, U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36(2), 169–178, 2001. <https://doi.org/10.1002/jms.118>

Kachlicki, P., Piasecka, A., Stobiecki, M., & Marczak, Ł. Structural characterization of flavonoid glycoconjugates and their derivatives with mass spectrometric techniques. *Molecules*, 21 (11), 1–21, 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules21111494>

Kamperdick, C., Hong Van, N., & Van Sung, T. Constituents from *Miliusa balansae* (Annonaceae). *Phytochemistry*, 61(8), 991–994, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00374-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00374-6)

Kilit, A. C., Köse, E. O., Imir, N. G., & Aydemir, E. Anticancer and antimicrobial activities

of diosmin. *Genetics and Molecular Research*, 20 (1), 1–18, 2021. <https://doi.org/10.4238/gmr18752>

Lee, J., da Silva, R. R., Jang, H. S., Kim, H. W., Kwon, Y. S., Kim, J. H., & Yang, H. In silico annotation of discriminative markers of three *Zanthoxylum* species using molecular network derived annotation propagation. *Food Chemistry*, 295(May), 368–376, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.099>

Lopes, N. P., & Vieira, P. C. Natural Products Chemistry: What's the Next Step? *ACS Omega*, 2(12), 8794–8795, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01671>

Leiva, N. P. F., de Melo Santana-Gomes, S., Zabini, A. V., Velázquez, L. M. G., & Dias-Arieira, C. R. Soil chemical properties and their relationship with phytonematode populations inside and outside patches of soybean fields. *Rhizosphere*, 15, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100231>

Ma, Y. L., Li, Q. M., Van Den Heuvel, H., & Claeys, M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357–1364, 1997. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(199708\)11:12<1357::AID-RCM983>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(199708)11:12<1357::AID-RCM983>3.0.CO;2-9)

Mabry, T. J., Markham, K. R. & Thomas, M. B. Reagents and Procedures for the Ultraviolet Spectral Analysis of Flavonoids, 1970. In: Mabry, T. J., Markham, K. R. & Thomas, M. B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag New York Inc. 1970. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0>

Maniei, F., Amiri Moghaddam, J., Crüseman, M., Beemelmans, C., König, G. M., & Wägele, H. From Persian Gulf to Indonesia: interrelated phylogeographic distance and chemistry within the genus *Peronia* (Onchidiidae, Gastropoda, Mollusca). *Scientific Reports*, 10(1), 1–14, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69996-8>

Márquez, L. A. Y., Gomes, C. B., Bellé, C., Dallagnol, L. J., & de Araújo Filho, J. V. Unveiling the structure and distribution of plant-parasitic nematode communities in soybean fields in southern of the Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 160(2), 457–468, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02256-1>

Medema, M. H. The year 2020 in natural product bioinformatics: An overview of the latest tools and databases. *Natural Product Reports*, 38(2), 301–306, 2021. <https://doi.org/10.1039/d0np00090f>

Michel, T., Halabalaki, M., & Skaltsounis, A. L. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta Medica*, 79(7), 514–532, 2013. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328300>

Mittermeier, R. A., Turner, W. R., Larsen, F. W., Brooks, T. M. & Gascon, C. Chapter 1 - Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. *In: Zachos, F. E. & Habel, J. C. Biodiversity Hotspots*, 1 - 22, 2011. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20992-5_1)

Moreira, M. P. *Lomatozona artemisiifolia* Baker: micropropagação, fitoquímica e atividade inseticida no controle de *Bemisia tabaci* – MEAM1. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás. 2018.

Morimoto, M. Chemical defense against insects in *Heterotheca subaxillaris* and three Orobanchaceae species using exudates from trichomes. *Pest Management Science*, 75(9), 2474–2481, 2019. <https://doi.org/10.1002/ps.5395>

Muraseva, D. S., & Kostikova, V. A. In vitro propagation of *Spiraea betulifolia* subsp. *aemiliana* (Rosaceae) and comparative analysis of phenolic compounds of microclones and intact plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 144(3), 493–504, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01971-7>

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B. & Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853 -858, 2000.

Nakajima, J. N., Junqueira, T. V., Freitas, F. S., & Teles, A. M. Comparative analysis of red lists of the Brazilian flora: Asteraceae. *Rodriguesia*, 63, 2012. <https://doi.org/10.1590/s2175-78602012000100004>

Nakajima, J. N., Dematteis, M., Loeuille, M. B., Teles, A. M., Heiden, G., Angelo Schneider, A., Ritter, M., Oliveira, C. T., Hattori, E. K. O., Roque, N., Ferreira, S. C., Magenta, M., Júnior, J. B. A. B., Esteves, R., Almeida, G. S. S., Saavedra, M. M., Monge, M., Soares, P. N., Sancho, G., Mondin, C. A., Fernandes, A. C., Pereira, A. C. M., Kutschenko, D. C., Filho, L. A. F. S., Prieto, P. V., Borges, R. F. A. X., Penedo, T. S. A. P., Messina, T., Moraes, M. M. V., Moraes, M. A. & Coelho, M. A. N. (2013) Asteraceae, pág. 239. *In: Martinelli, G. & Moraes M. A. Livro vermelho da flora do Brasil*. Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. 1ª Edição. Rio de Janeiro.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

Nogueira, M. S., Da Costa, F. B., Brun, R., Kaiser, M., & Schmidt, T. J. Ent-pimarane and ent-kaurane diterpenes from *Aldama discolor* (Asteraceae) and their antiprotozoal activity. *Molecules*, 21(9), 1–14, 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules21091237>

Nothias, L. F., Nothias-Esposito, M., Da Silva, R., Wang, M., Protsyuk, I., Zhang, Z., Sarvepalli, A., Leyssen, P., Touboul, D., Costa, J., Paolini, J., Alexandrov, T., Litaudon, M., & Dorrestein, P. C. Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. *Journal of Natural*

*Products*, 81(4), 758–767, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00737>

Nothias, L. F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., Protsyuk, I., Ernst, M., Tsugawa, H., Fleischauer, M., Aicheler, F., Aksenov, A. A., Alka, O., Allard, P. M., Barsch, A., Cachet, X., Caraballo-Rodriguez, A. M., Da Silva, R. R., Dang, T., ... Dorrestein, P. C. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*, 17(9), 905–908, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>

Ntalli, N. G., & Caboni, P. Botanical nematicides: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(40), 9929–9940, 2012. <https://doi.org/10.1021/jf303107j>

Oksman-Caldentey, K. M., & Inzé, D. Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9(9), 433–440, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.006>

Olivon, F., Grelier, G., Roussi, F., Litaudon, M., & Touboul, D. MZmine 2 Data-Preprocessing to Enhance Molecular Networking Reliability. *Analytical Chemistry*, 89(15), 7836–7840, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01563>

Olivon, F., Retailleau, P., Desrat, S., Touboul, D., Roussi, F., Apel, C., & Litaudon, M. Isolation of Picrotoxanes from *Austrobuxus carunculatus* Using Taxonomy-Based Molecular Networking. *Journal of Natural Products*, 83(10), 3069–3079, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00636>

Oliveira, T. S., Thomaz, D. V., Neri, H. F. da S., Cerqueira, L. B., Garcia, L. F., Gil, H. P. V., Pontarolo, R., Campos, F. R., Costa, E. A., Santos, F. C. A., Gil, E. S. & Paulo César Ghedini, P. C. Neuroprotective Effect of *Caryocar brasiliense* Camb. Leaves Is Associated with Anticholinesterase and Antioxidant Properties. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1 – 12, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9842908>

Pereira Feitosa, L. G., Monge, M., Lopes, N. P., & Rodrigues de Oliveira, D. C. (2021). Distribution of flavonoids and other phenolics in *Mikania* species (Compositae) of Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 97, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104273>

Pereira, R. C. G., Evangelista, F. C. G., Júnior, V. S. S., Sabino, A. P., Maltarollo, V. G., Freitas, R. P., Duarte, L. P. Cytotoxic Activity of Triterpenoids from *Cheiloclinium cognatum* Branches against Chronic and Acute Leukemia Cell Lines. *Chemistry & Biodiversity*, 17, 1 - 13, 2021. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000773>

Pérez-Cova, M., Bedia, C., Stoll, D. R., Tauler, R., & Jaumot, J. MSroi: A pre-processing tool for mass spectrometry-based studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 215, 2020). <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2021.104333>

Perruchon, O., Schmitz-Afonso, I., Grondin, C., Casaregola, S., Afonso, C., & Elomri,

A. Combination of UHPLC-MS/MS-molecular networking approach and FTICR-MS for the metabolic profiling of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 195, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113857>

Pilon, A. C., Vieira, N. C., Amaral, J. G., Monteiro, A. F., Silva, R. R., Spíndola, L. S., Castro-Gamboa, I. & Lopes, N. P. Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. *Química Nova*, 1 – 12, 2021. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170777>

Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101–153, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1)

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020. URL <https://www.R-project.org/>

Remy, S., Solis, D., Silland, P., Neyts, J., Roussi, F., Touboul, D., & Litaudon, M. Isolation of phenanthrenes and identification of phorbol ester derivatives as potential anti-CHIKV agents using FBMN and NAP from *Sagotia racemosa*. *Phytochemistry*, 167, 1-5, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112101>

Ressel, K., & Guilherme, F. A. G. Ten years from propagule to mature plant of *butia purpurascens* glassman (Arecaceae): An endemic and endangered palm of the Brazilian cerrado. *Brazilian Journal of Biology*, 82, 1–7, 2022. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.233941>

Ribeiro Neto, J. A., Pimenta Tarôco, B. R., Batista dos Santos, H., Thomé, R. G., Wolfram, E., & Maciel de A Ribeiro, R. I. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 260, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112547>

Ribeiro, R. N., & Teles, A. M. Eupatorieae (Asteraceae) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. *Rodriguesia*, 66(3), 887–903, 2015. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566316>

Rios, M. Y., León-Rivera, I., Ríos-Gomez, R., Córdova-Albores, L. C., & Aguilar-Guadarrama, A. B. Phytotoxic and nematicide evaluation of *Croton ehrenbergii* (Euphorbiaceae). *Pest Management Science*, 75(8), 2158–2165, 2019. <https://doi.org/10.1002/ps.5336>

Ríos V., E., León, A., Chávez, M. I., Torres, Y., Ramírez-Apan, M. T., Toscano, R. A., Bravo-Monzón, Á. E., Espinosa-García, F. J., & Delgado, G. Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha* and *Mikania cordifolia* and their cytotoxic and anti-inflammatory evaluation. *Fitoterapia*, 94, 155–163, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.02.006>

Ruttkies, C., Neumann, S. & Posch, S. Improving MetFrag with statistical learning of fragment annotations. *BMC Bioinformatics*, 20, 376, 1 - 12, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2954-7>

Sano, E. E., Rodrigues, A. A., Martins, E. S., Bettiol, G. M., Bustamante, M. M. C., Bezerra, A. S., Couto, A. F., Vasconcelos, V., Schüler, J., & Bolfe, E. L. (2019). Cerrado ecoregions: A spatial framework to assess and prioritize Brazilian savanna environmental diversity for conservation. *Journal of Environmental Management*, 232, 818–828, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.108>

Sansone, S. A., Schober, D., Atherton, H. J., Fiehn, O., Jenkins, H., Rocca-Serra, P., Rubtsov, D. V., Spasic, I., Soldatova, L., Taylor, C., Tseng, A., & Viant, M. R. Metabolomics standards initiative: Ontology working group work in progress. *Metabolomics*, 3(3), 249–256, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0069-z>

Santana, I. Cientistas buscam nematocida natural a partir de resíduos agroindustriais. Embrapa.br. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/59679073/cientistas-buscam-nematocida-natural-a-partir-de-residuos-agroindustriais>. Acesso em: 27/07/2021

Sawada, Y., Nakabayashi, R., Yamada, Y., Suzuki, M., Sato, M., Sakata, A., Akiyama, K., Sakurai, T., Matsuda, F., Aoki, T., Hirai, M. Y., & Saito, K. RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: A plant-specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry*, 82, 38–45, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.07.007>

Scotti, M. T., Emerenciano, V., Ferreira, M. J. P., Scotti, L., Stefani, R., Da Silva, M. S., & Mendonça, F. J. B. Self-organizing maps of molecular descriptors for sesquiterpene lactones and their application to the chemotaxonomy of the Asteraceae family. *Molecules*, 17(4), 4684–4702, 2012. <https://doi.org/10.3390/molecules17044684>

Sebai, E., Serairi, R., Saratsi, K., Abidi, A., Sendi, N., Darghouth, M. A., Wilson, M. S., Sotiraki, S., & Akkari, H. Hydro-Ethanollic Extract of *Mentha pulegium* Exhibit Anthelmintic and Antioxidant Properties In Vitro and In Vivo. *Acta Parasitologica*, 65(2), 375–387, 2020. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00169-3>

Seito, L. N., Ruiz, A. L. T. G., Vendramini-Costa, D., Tinti, S. V., De Carvalho, J. E., Bastos, J. K., & Di Stasi, L. C. Antiproliferative activity of three methoxylated flavonoids isolated from *Zeyheria montana* mart. (Bignoniaceae) leaves. *Phytotherapy Research*, 25(10), 1447–1450, 2011. <https://doi.org/10.1002/ptr.3438>

Silva, A. C. R., Bizzo, H. R., Vieira, R. F., Bringel, J. B. A., Azevedo, D. A., Uekane, T. M., & Rezende, C. M. Characterization of volatile and odor-active compounds of the essential oil from *Bidens graveolens* Mart. (Asteraceae). *Flavour and Fragrance Journal*, 35(1), 79–87, 2020. <https://doi.org/10.1002/ffj.3538>

Silva, D. B., Turatti, I. C. C., Gouveia, D. R., Ernst, M., Teixeira, S. P., & Lopes, N. P. Mass Spectrometry of flavonoid vicenin-2, based sunlight barriers in *Lychnophora* species. *Scientific Reports*, 4, 2014. <https://doi.org/10.1038/srep04309>

Silva, L. C. *Lomatozonia artemisiifolia* Baker: cultivo *in vitro*, reforço populacional e utilização no biocontrole de nematoides. Tese de doutorado. Universidade Federal de Goiás. 2019.

Silva, M. V. G., Silva, S. A., Teixeira, T. L., Oliveira, A., Morais, S. A. L., Silva, C. V. S., Espindola, L. S. & Sousa, R. M. F. Essential oil from leaves of *Eugenia calycina* Cambes: Natural larvicidal against *Aedes aegypti*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101, 1202–1208, 2020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10732>

Simon, M. F., Grether, R., De Queiroz, L. P., Skemae, C., Pennington, R. T., & Hughes, C. E. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), 20359–20364, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903410106>

Sota, V., Themeli, S., Zekaj, Z., & Kongjika, E. Exogenous cytokinins application induces changes in stomatal and glandular trichomes parameters in rosemary plants regenerated *in vitro*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(1), 25–28, 2019. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.1.25-28>

Souza, A. V., Bertoni, B. W., França, S. C., & Pereira, A. M. S. Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla velutina* K. Schum.), uma planta medicinal do Cerrado. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13(3), 319–327, 2011. <https://doi.org/10.1590/s1516-05722011000300011>

Souza, A. M. & Poppi, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. *Química Nova*, Vol. 35, No. 1, 223-229, 2012.

SpeciesLink network. Disponível em: <https://specieslink.net/>. Acesso em: 01/09/2021.

Stanojković, J., Todorović, S., Pećinar, I., Lević, S., Čalić, S., & Janošević, D. Leaf glandular trichomes of micropropagated *Inula britannica* – Effect of sucrose on trichome density, distribution and chemical profile. *Industrial Crops and Products*, 160, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113101>

Sukmarini, L. Recent Advances in Discovery of Lead Structures from Microbial Natural Products: Genomics- and Metabolomics-Guided Acceleration. *Molecules*, 26, 2542, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26092542>

Szakiel, A., Pączkowski, C. & Henry, M. Influence of environmental abiotic factors on

the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*, 10(4), 471–491, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9177-x>

Sy, L. -K., Brown, G. D. Three sesquiterpenes from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 48, 7, 1207-1211, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\) 01047-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97) 01047-9)

Taleb-Contini, S. H., Salvador, M. J., Watanabe, E., Ito, I. Y., & Rodrigues De Oliveira, D. C. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(4), 403–408, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000400007>

Taleb-Contini, S. H., Schorr, K., Da Costa, F. B., & De Oliveira, D. C. R. Detection of flavonoids in glandular trichomes of *Chromolaena* species (Eupatorieae, Asteraceae) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(2), 315–321, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000200019>

Thomas, J. B., Paris, D. N. S., Thomas, J. B., & Paris, D. N. S. *Handbook of Basic Tables for Chemical Analysis Third Edition Chapter 3 Thin Layer Chromatography*. 2010. <https://doi.org/10.1201/b10385-4>

Thorpe, T. A. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180, 2007. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>

Trindade, L. M. P. Morfoanatomia, Tricomas glandulares e Fitoquímica de *Lomatozona artemisiifolia* (Asteraceae - Eupatorieae) - Uma planta endêmica do Cerrado de Goiás. Universidade Federal de Goiás. 2013.

Tu, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*, 17(10), 1217–1220, 2011. <https://doi.org/10.1038/nm.2471>

Tu, Y. Artemisinin—A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(35), 10210–10226, 2016. <https://doi.org/10.1002/anie.201601967>

Urones, J. G., Basabe, P., Marcos, I. S., Díez Martín, D., Sexmero, M. J., Peral, M. H., & Broughton, H. B. Chemistry of labdane diol from *Cistus ladaniferus*, L. synthesis of 12-Nor-ambreinolide and  $\alpha$  and  $\beta$ -levantenolides. *Tetrahedron*, 48(47), 10389–10398, 1992. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)88343-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)88343-5)

Uzelac, B., Stojičić, D., & Budimir, S. *Glandular Trichomes on the Leaves of Nicotiana tabacum: Morphology, Developmental Ultrastructure, and Secondary Metabolites*. 2021. In: *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites*. Springer Nature Switzerland AG 2020 [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30185-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30185-9_1)

Venegas-Molina, J., Molina-Hidalgo, F. J., Clicque, E., & Goossens, A. Why and How to Dig into Plant Metabolite–Protein Interactions. *Trends in Plant Science*, 26(5), 472–483, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.12.008>

Vieira, R. F., da Silveira Agostini-Costa, T., de Belem das Neves Alves, R., Rennó Azevedo, V. C., Figueira, G. M., da Silva Gomes, I., Inglis, P. W., Pozzobon, M. T., Peñaloza, A. del P. de S., Ritter, M. R., dos Santos, S., & da Silva, D. B. Chemical and phylogenetic characterization of Guaco (*Mikania laevigata*; *M. glomerata*) germplasm. *Biochemical Systematics and Ecology*, 90, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104029>

Wagner, G. J. Secreting glandular trichomes: More than just hairs. *Plant Physiology*, 96(3), 675–679, 1991. <https://doi.org/10.1104/pp.96.3.675>

Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kaponov, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W. T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., ... Bandeira, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828–837, 2016. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>

Wangchuk, P., Keller, P. A., Pyne, S. G., Korth, J., Samten, Taweechotipatr, M., Rattanajak, R., & Kamchonwongpaisan, S. Antimicrobial, antimalarial and cytotoxicity activities of constituents of a Bhutanese variety of *Ajania nubigena*. *Natural Product Communications*, 8(6), 733–736, 2013. <https://doi.org/10.1177/1934578x1300800613>

Wolfender, J. L., Nuzillard, J. M., Van Der Hooft, J. J. J., Renault, J. H., & Bertrand, S. (2019). Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics. *Analytical Chemistry*, 91(1), 704–742, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05112>

Wollenweber, E., Dörr, M., Fritz, H., Papendieck, S., Yatskievych, G., & Roitman, J. N. (1997). Exudate flavonoids in Asteraceae from Arizona, California and Mexico. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C - Journal of Biosciences*, 52(5–6), 301–307, 1997. <https://doi.org/10.1515/znc-1997-5-604>

# APÊNDICES

Apêndice A – Espectros de IES-EM e RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , NOE 1D, HSQC e HMBC dos compostos isolados.

LKVLA09\_pos\_frag375\_55nce #35 RT: 0.16 AV: 1 NL: 2.75E5  
T: FTMS + p ESI Full ms2 375.3000@hcd55.00 [50.0000-385.0000]

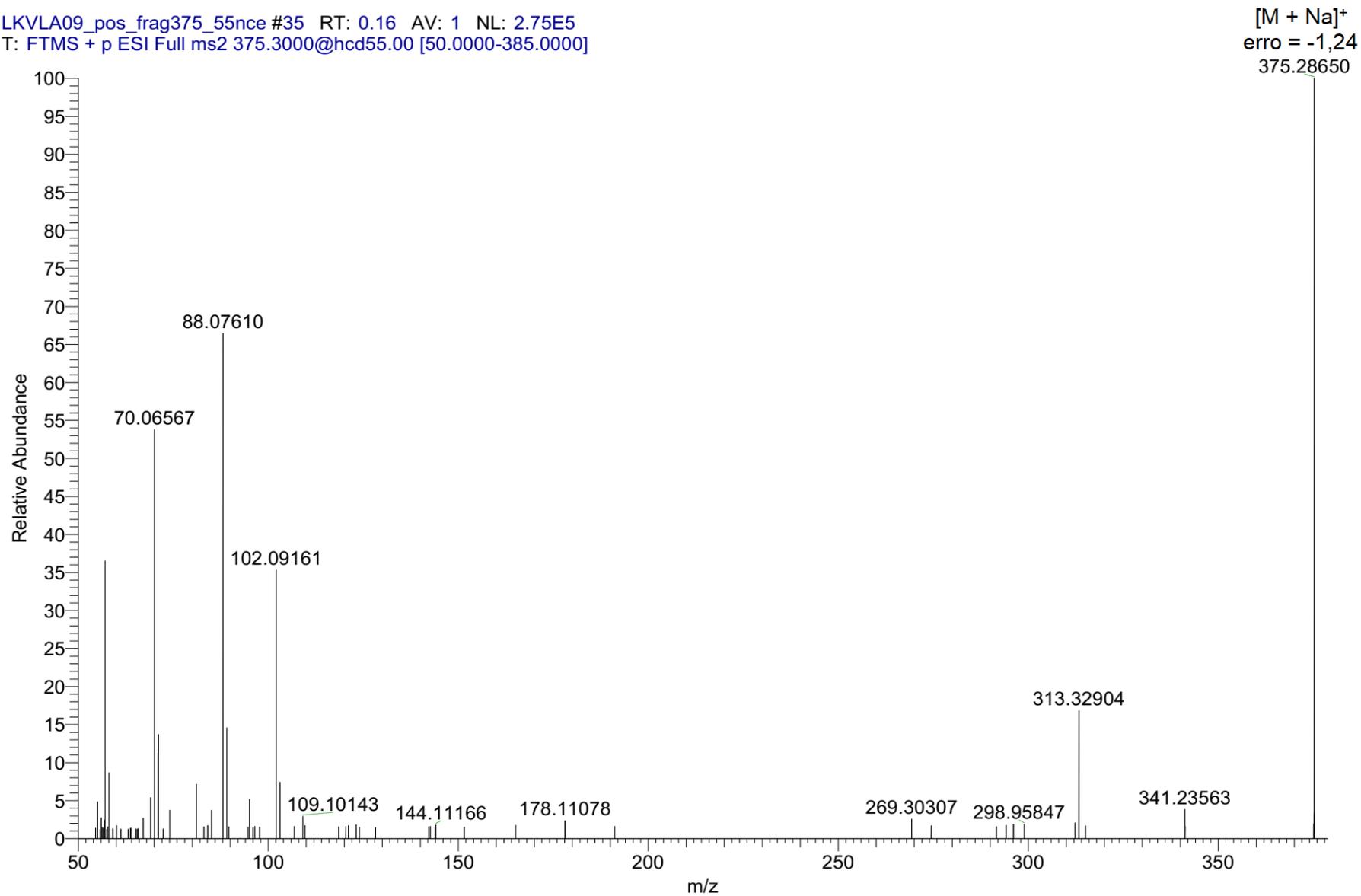


Figura 77. Espectro de IES-EM do composto 1.



Current Data Parameters  
NAME lkvla09 2d  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20200109  
Time\_ 9.19  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBI 1H/  
PULPROG zg  
TD 65536  
SOLVENT CDC13  
NS 16  
DS 0  
SWH 10000.000 Hz  
FIDRES 0.152588 Hz  
AQ 3.2767999 sec  
RG 32  
DW 50.000 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.2 K  
D1 3.0000000 sec  
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----  
SFO1 500.1330885 MHz  
NUC1 1H  
P1 10.00 usec  
PLW1 10.00000000 W

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 500.1300124 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00

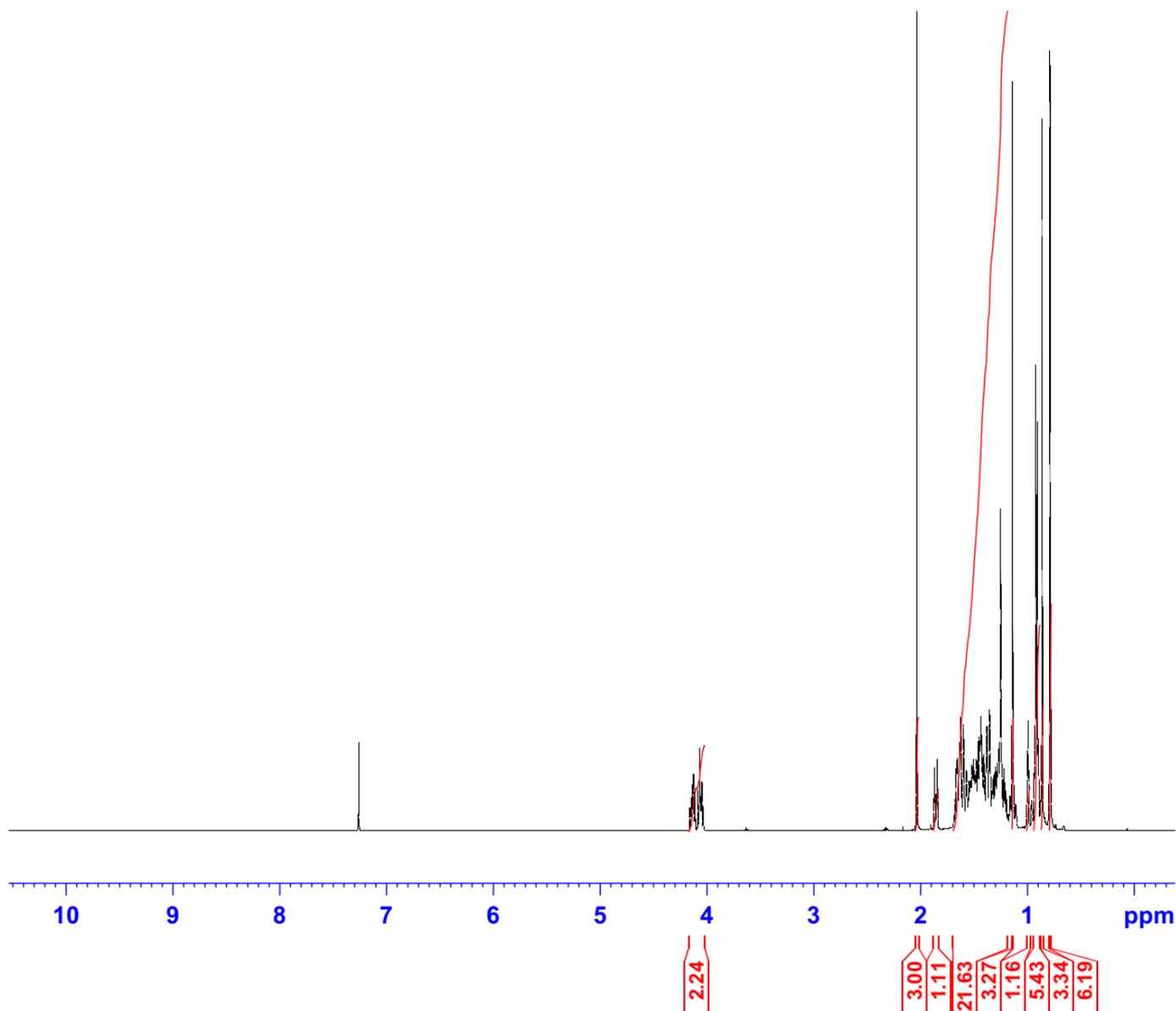


Figura 78. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto 1.

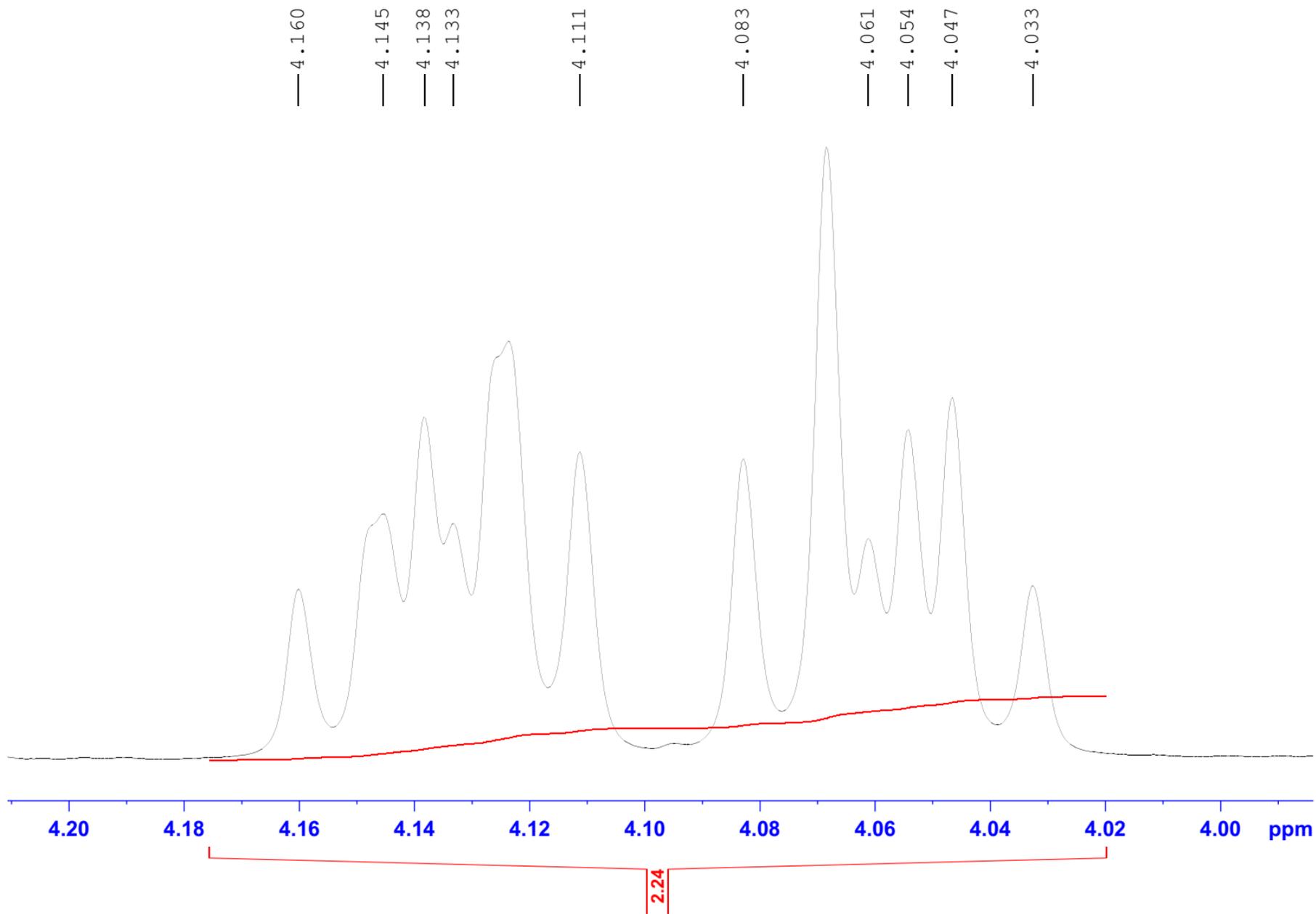


Figura 79. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão das regiões entre 4,22 – 3,96.

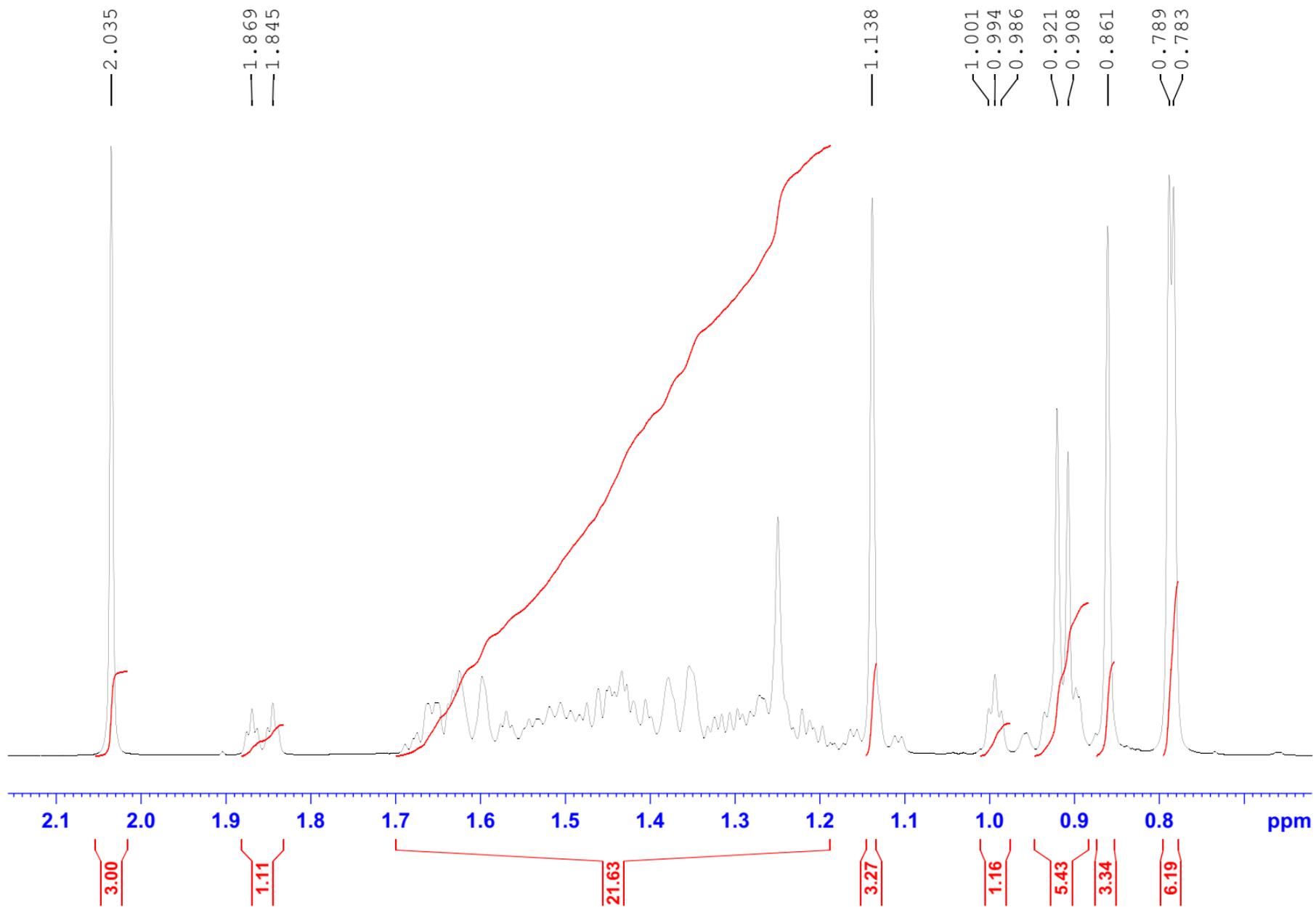


Figura 80. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão das regiões entre 2,10 – 0,70 ppm.

"lkvla09 2d" 21 1 C:\Bruker\TopSpin3.6.2\examdata

carbono CDCl3 /dados/nmr\_data/pn2/nmr rmn 10

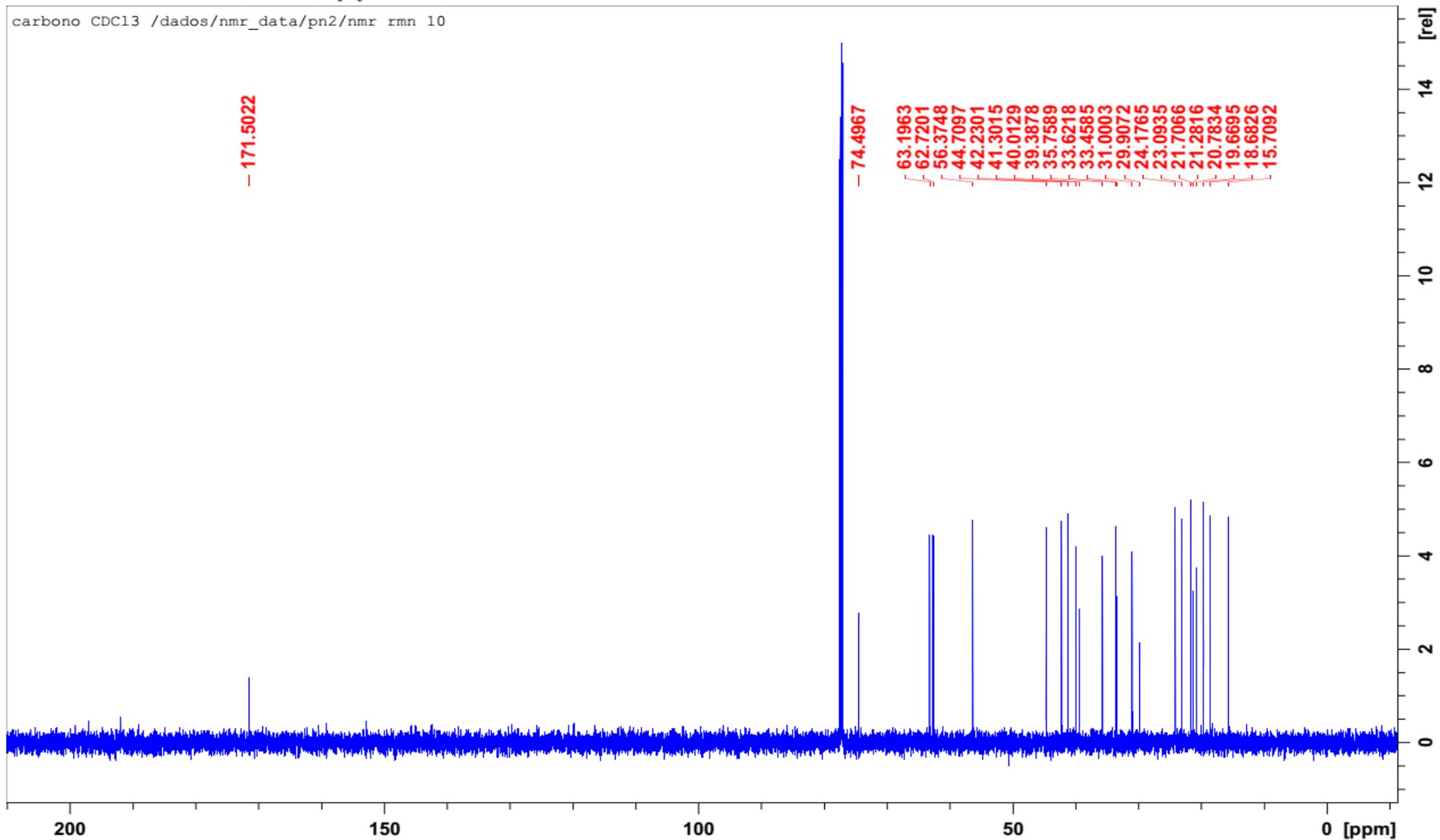


Figura 81. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) do composto 1.

"lkvla09 2d" 22 1 C:\Bruker\TopSpin3.6.2\examdata

C13DEPT135 CDC13 /dados/nmr\_data/pn2/nmr rmn 10

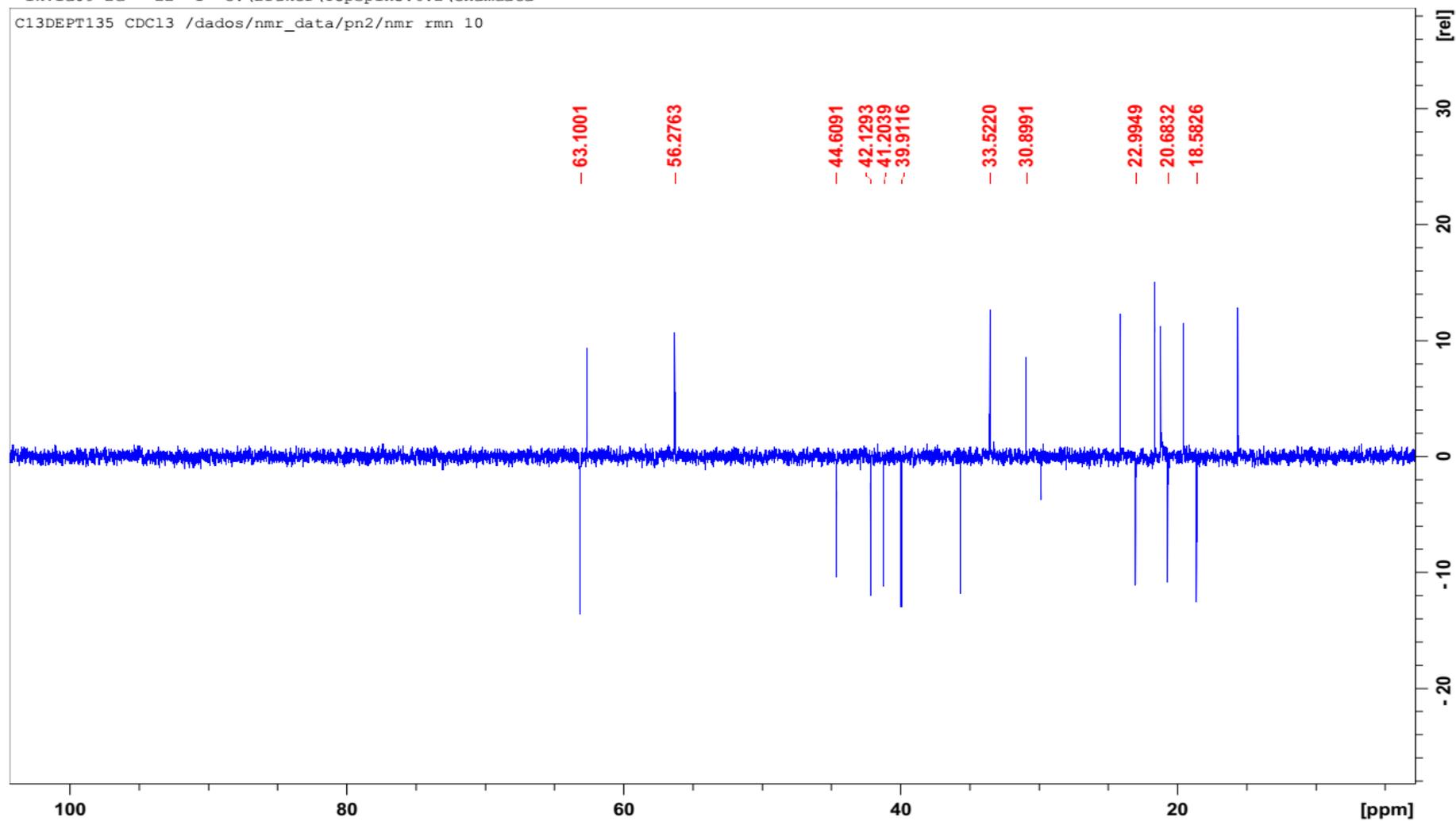


Figura 82. Espectro de <sup>13</sup>C Dept-135 (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) do composto 1.

"lkvla09 2d" 200 1 C:\Bruker\TopSpin3.6.2\examdata

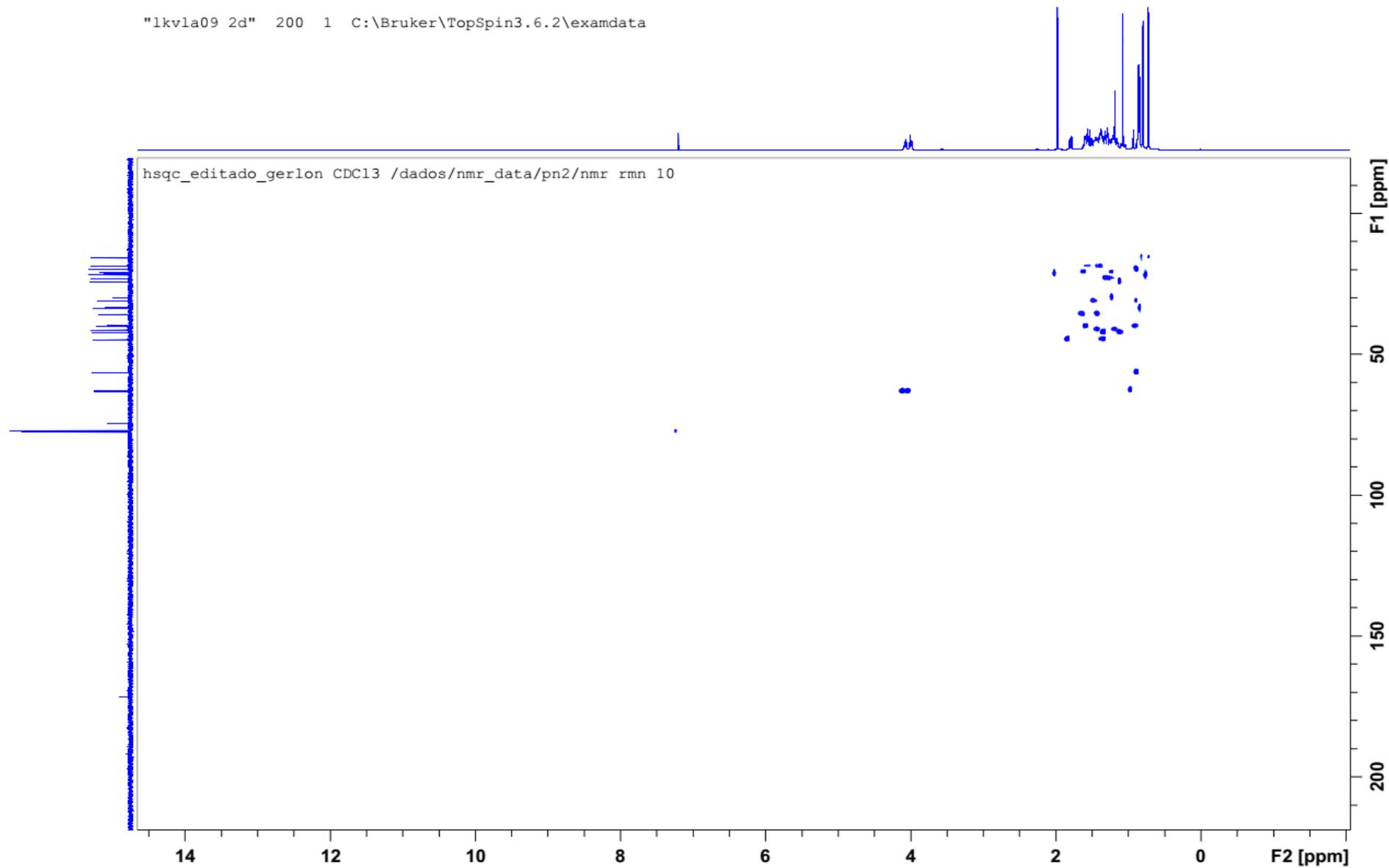


Figura 83. Experimento de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) do composto 1.

"lkvla09 2d" 2 1 C:\Bruker\TopSpin3.6.2\examdata

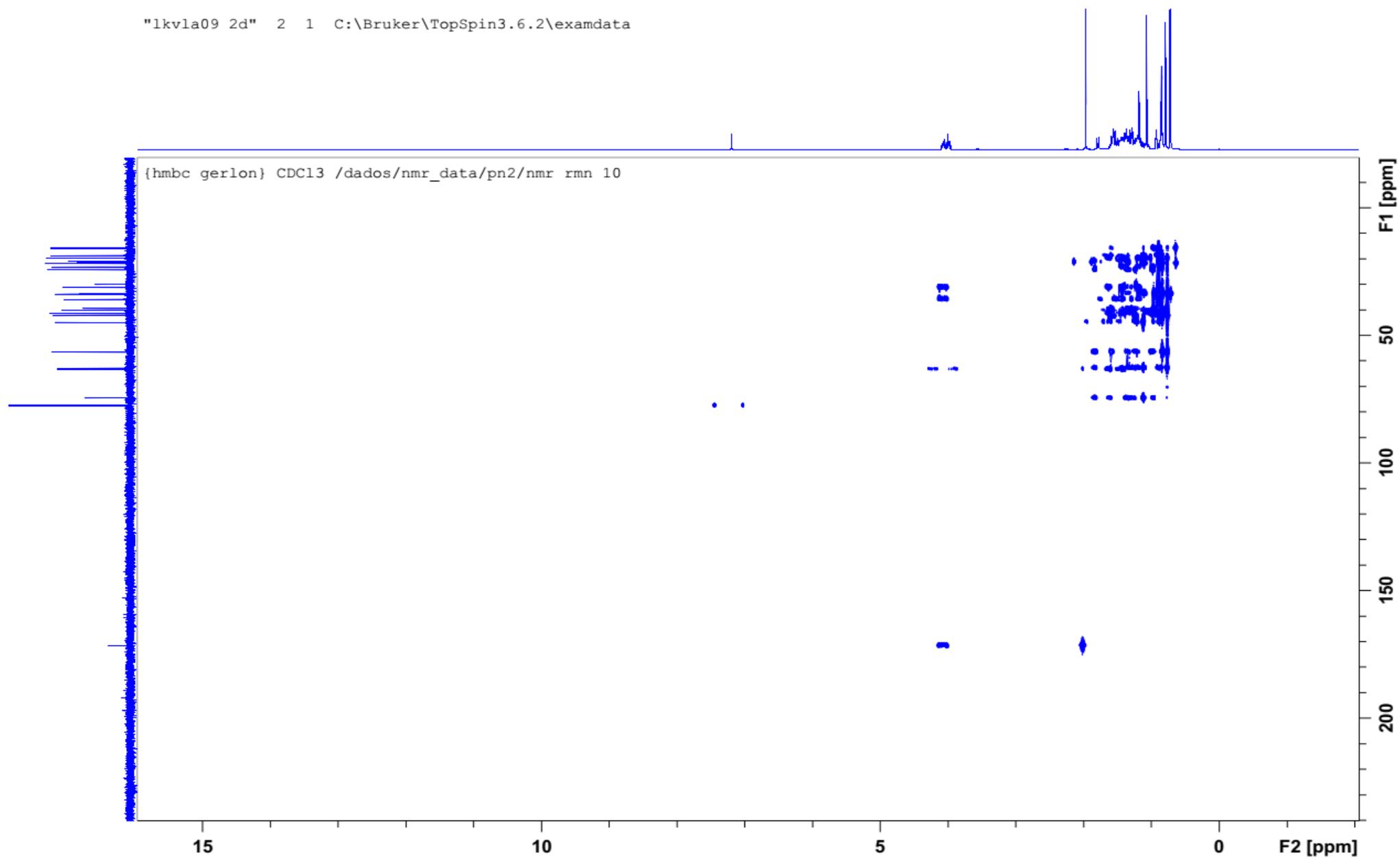


Figura 84. Experimento de HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) do composto 1.

VLA03\_NCE55\_020819 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 3.38E6  
T: FTMS - p ESI Full ms2 309.30@hcd55.00 [50.00-320.00]

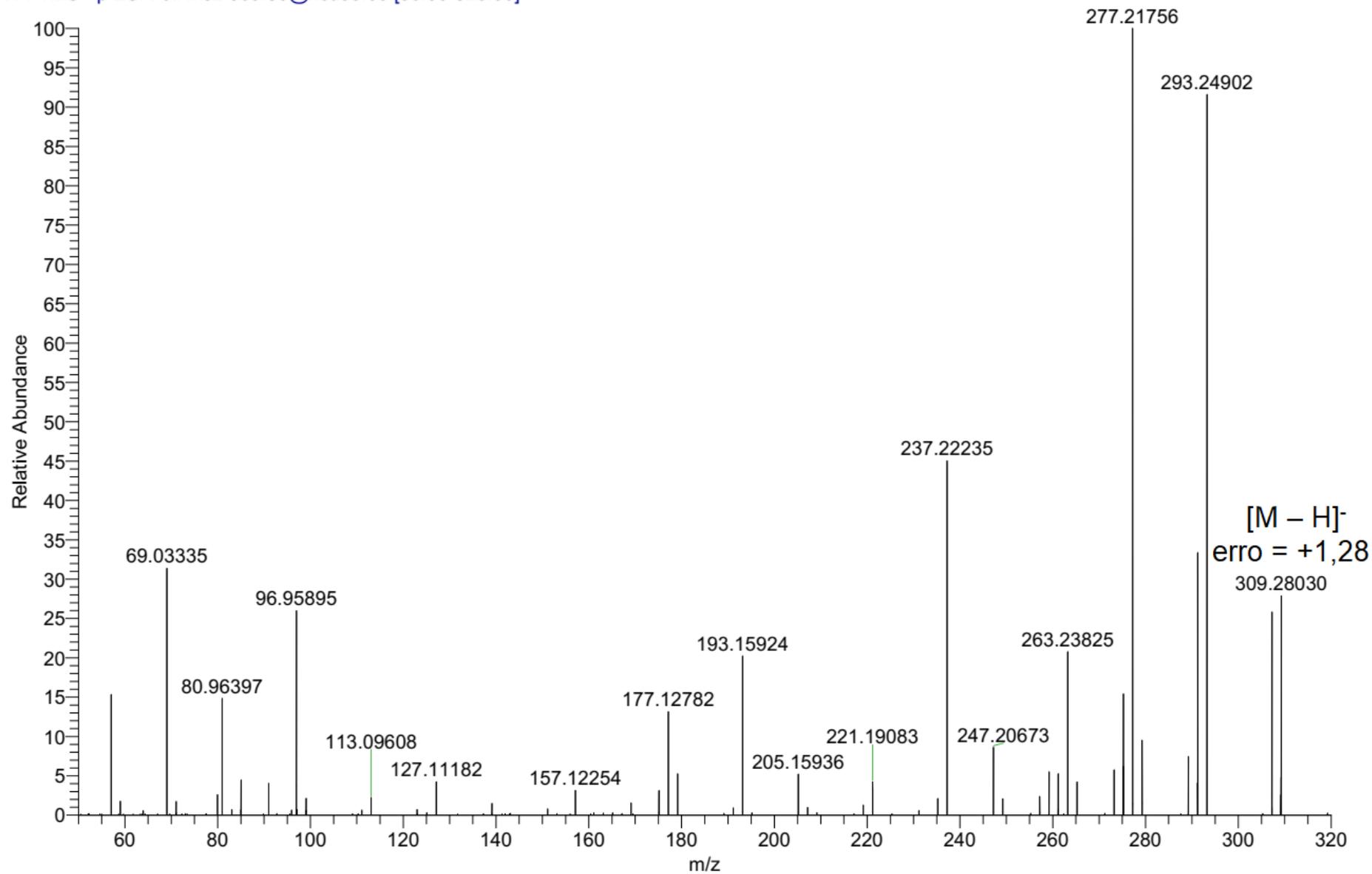


Figura 85. Espectro de IES-EM do composto 2.



Current Data Parameters  
NAME lkvla08 2d  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20181106  
Time\_ 20.58  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm BBO BB-1H  
PULPROG zg30  
TD 65536  
SOLVENT CDCl3  
NS 16  
DS 2  
SWH 10000.000 Hz  
FIDRES 0.152588 Hz  
AQ 3.2767999 sec  
RG 114  
DW 50.000 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.4 K  
D1 1.0000000 sec  
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====  
SFO1 500.1330885 MHz  
NUC1 1H  
P1 11.75 usec  
PLW1 22.0000000 W

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 500.1300081 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00

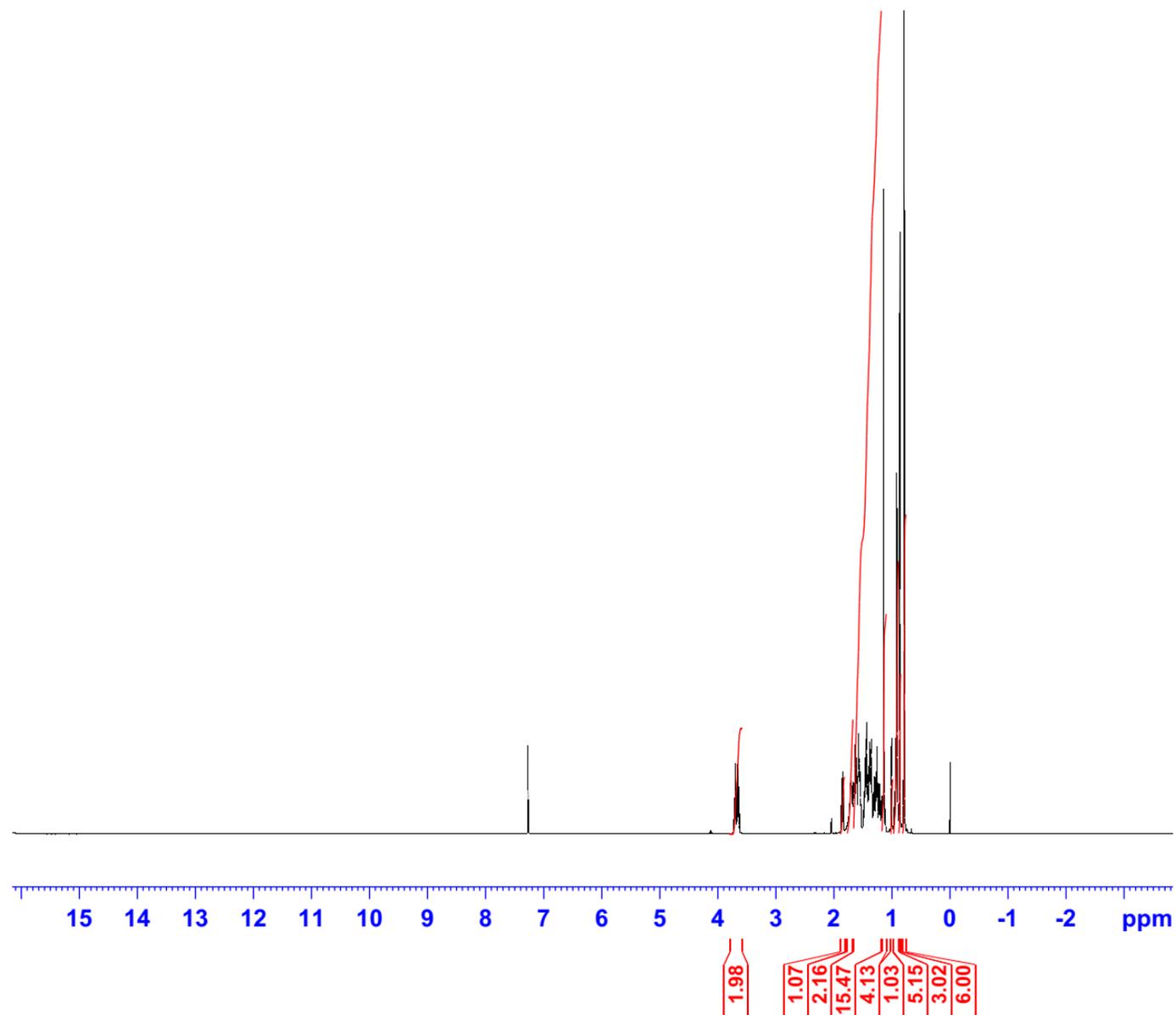


Figura 86. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **2**.

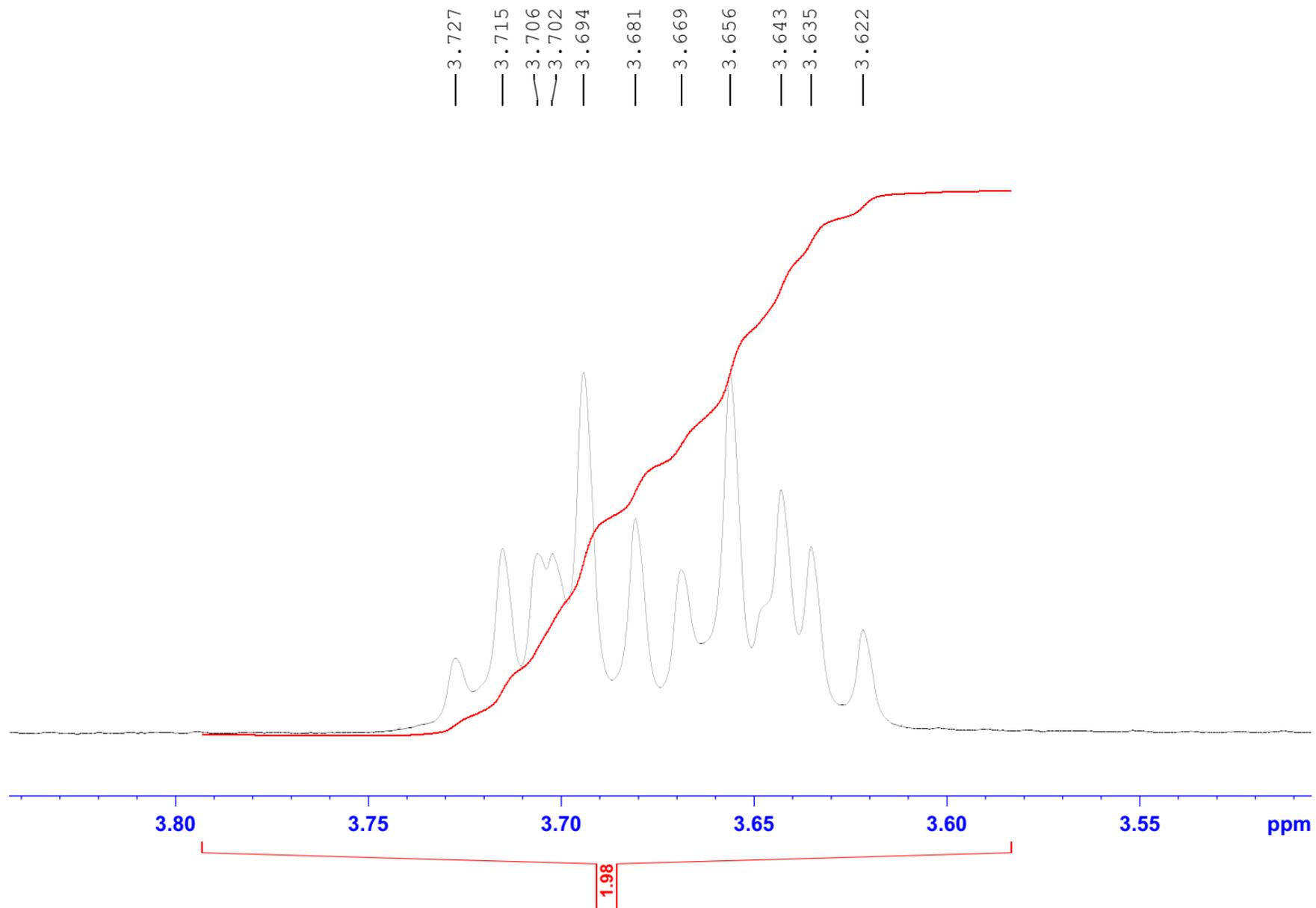


Figura 87. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 3,80 - 3,55 ppm do composto 2.

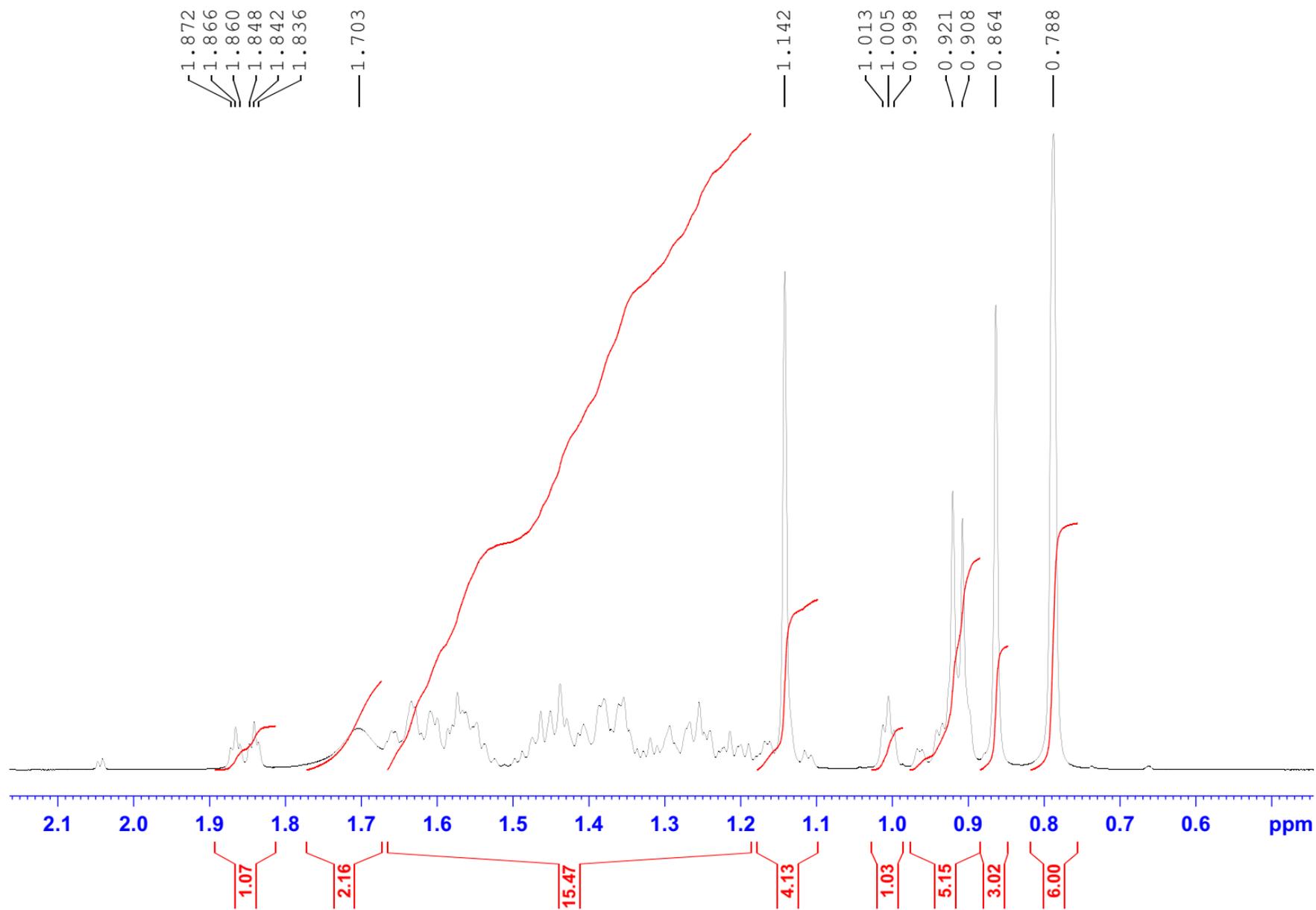


Figura 88. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 2,10 – 0,60 ppm do composto **2**.

"1kvla08 2d" 200 1 C:\Bruker\TopSpin3.6.2\examdata

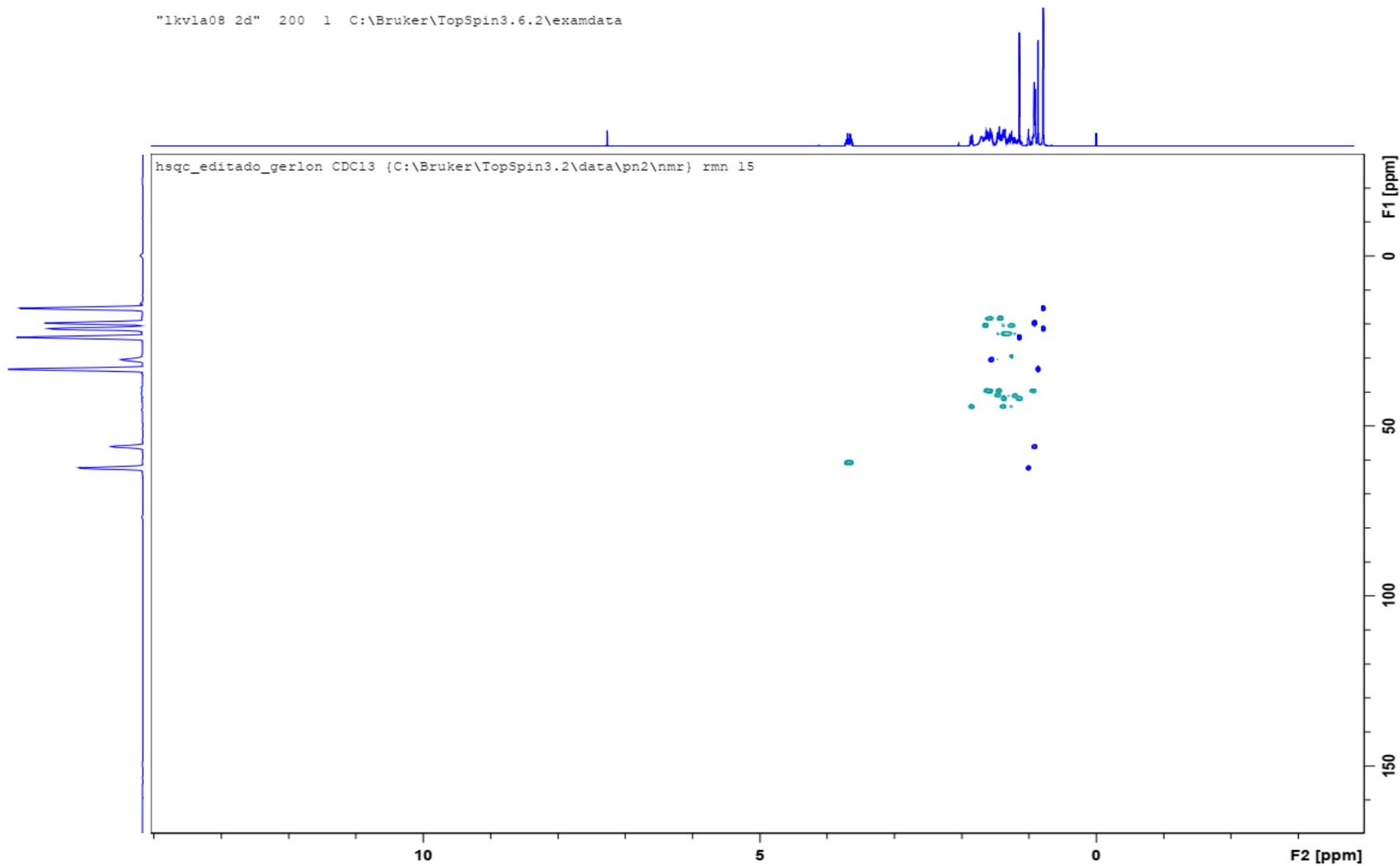


Figura 89. Experimento de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) do composto **2**.

"lkvla08 2d" 300 1 C:\Bruker\TopSpin3.6.2\examdata

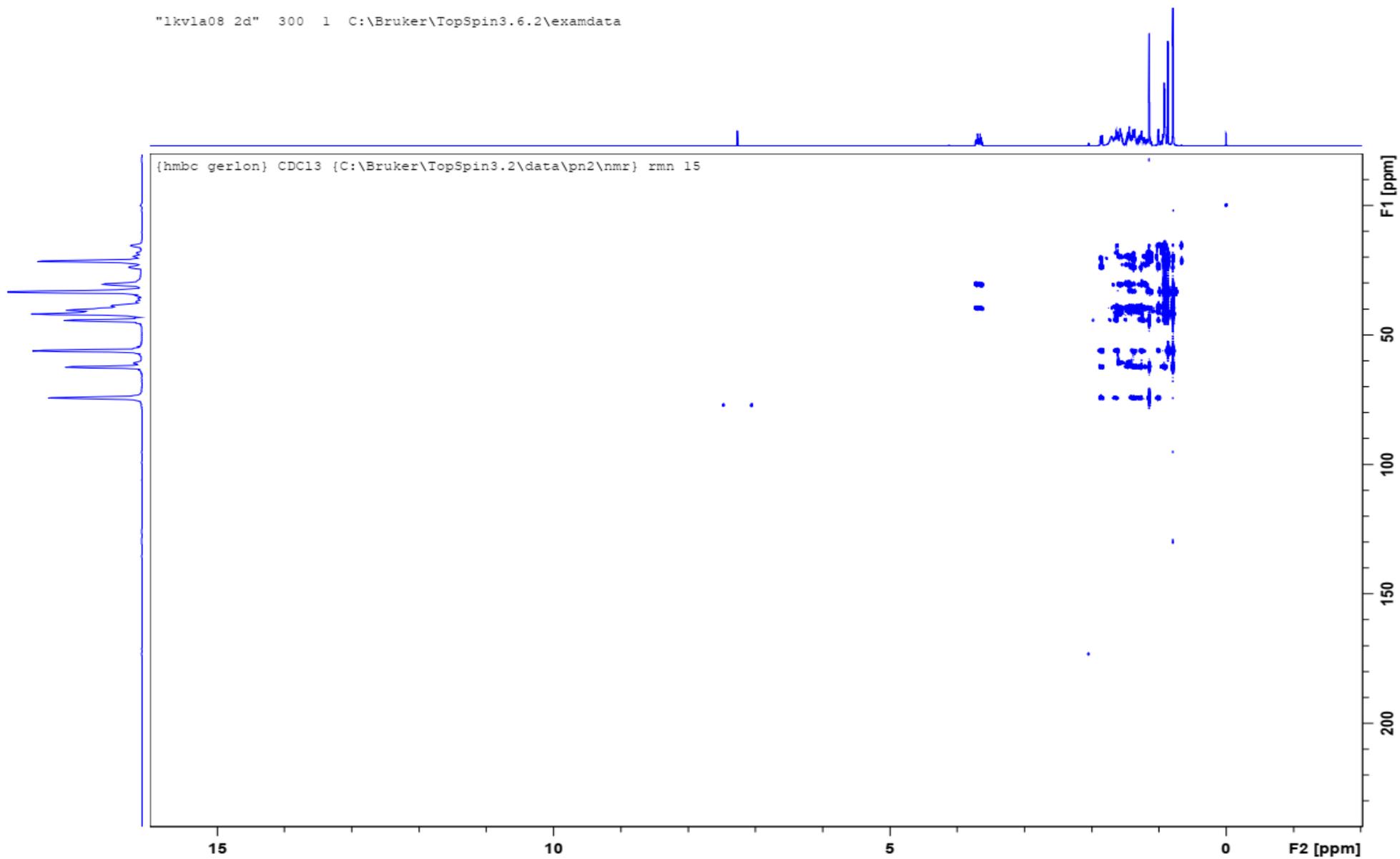
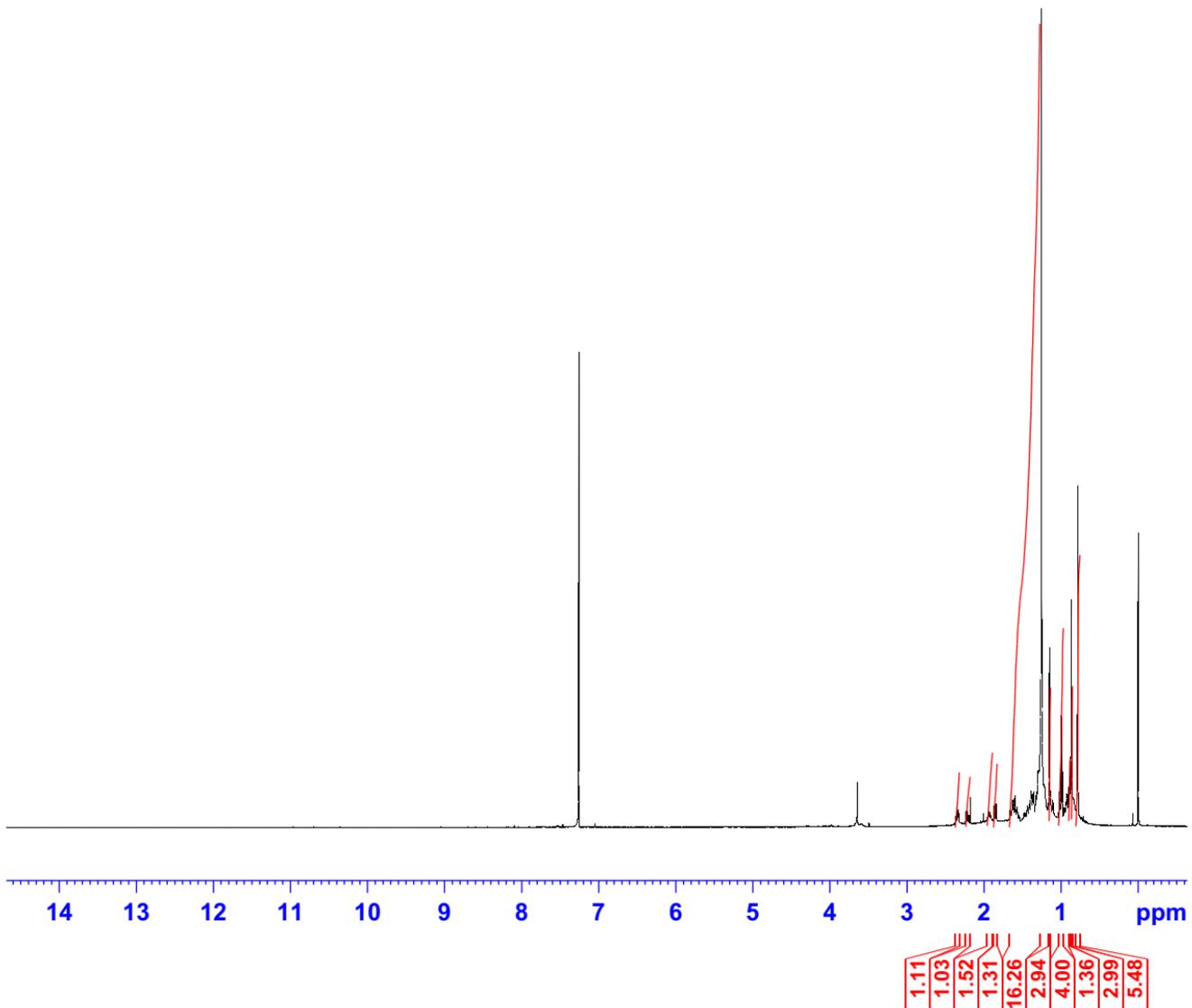


Figura 90. Experimento de HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) do composto 2.



```
Current Data Parameters
NAME      lkvla 10
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20191018
Time      9.14
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm TBI 1H/13
PULPROG   zg
TD        65536
SOLVENT   CDC13
NS         8
DS         0
SWH       10000.000 Hz
FIDRES    0.152588 Hz
AQ        3.2767999 sec
RG         114
DW        50.000 usec
DE        6.50 usec
TE        298.3 K
D1        1.00000000 sec
TD0       1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      500.1330885 MHz
NUC1       1H
P1        10.40 usec
PLW1      11.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        500.1300114 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
PC        1.00
```

Figura 91. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) do composto 3.

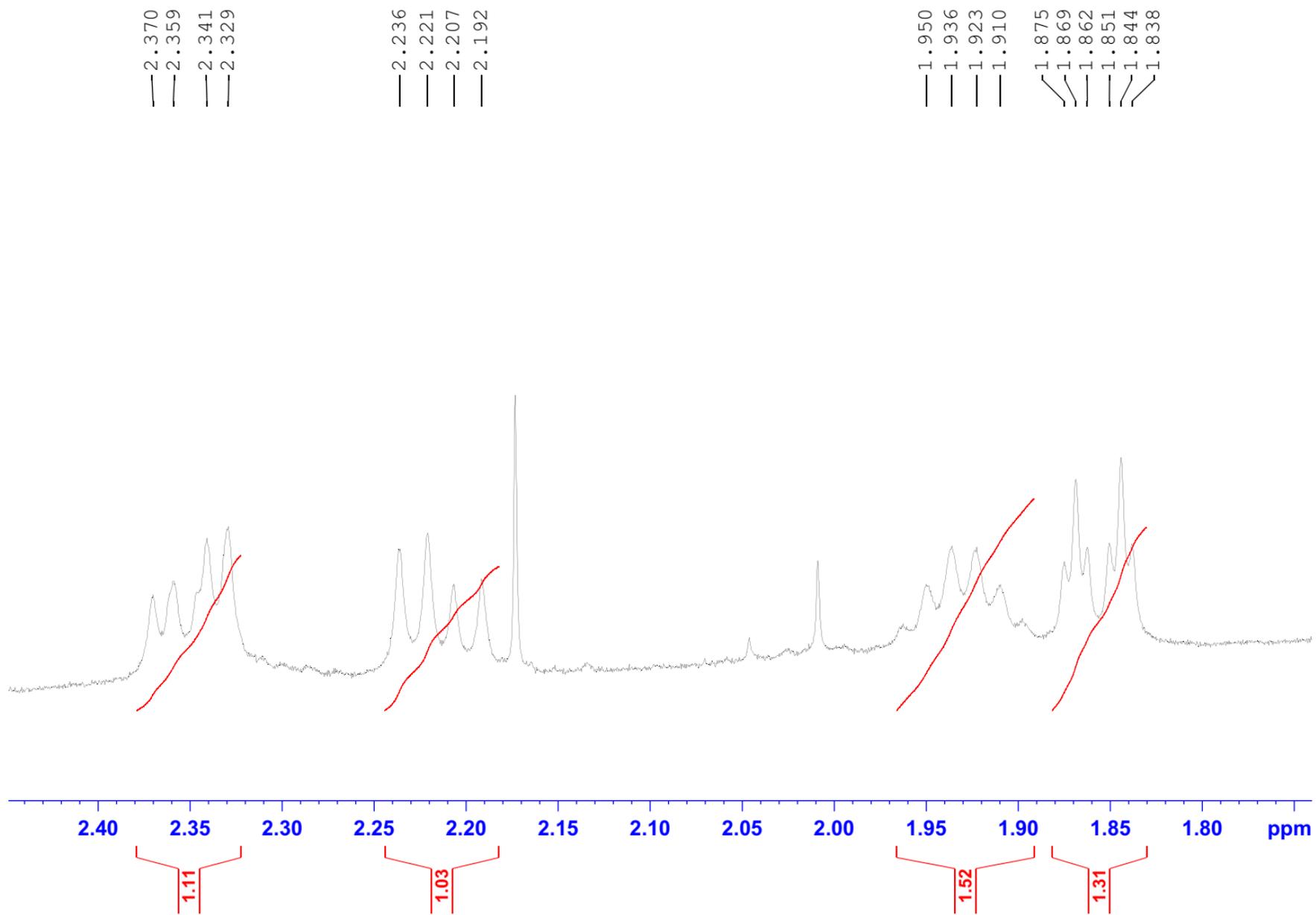


Figura 92. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 2,40 – 1,75 ppm do composto 3.

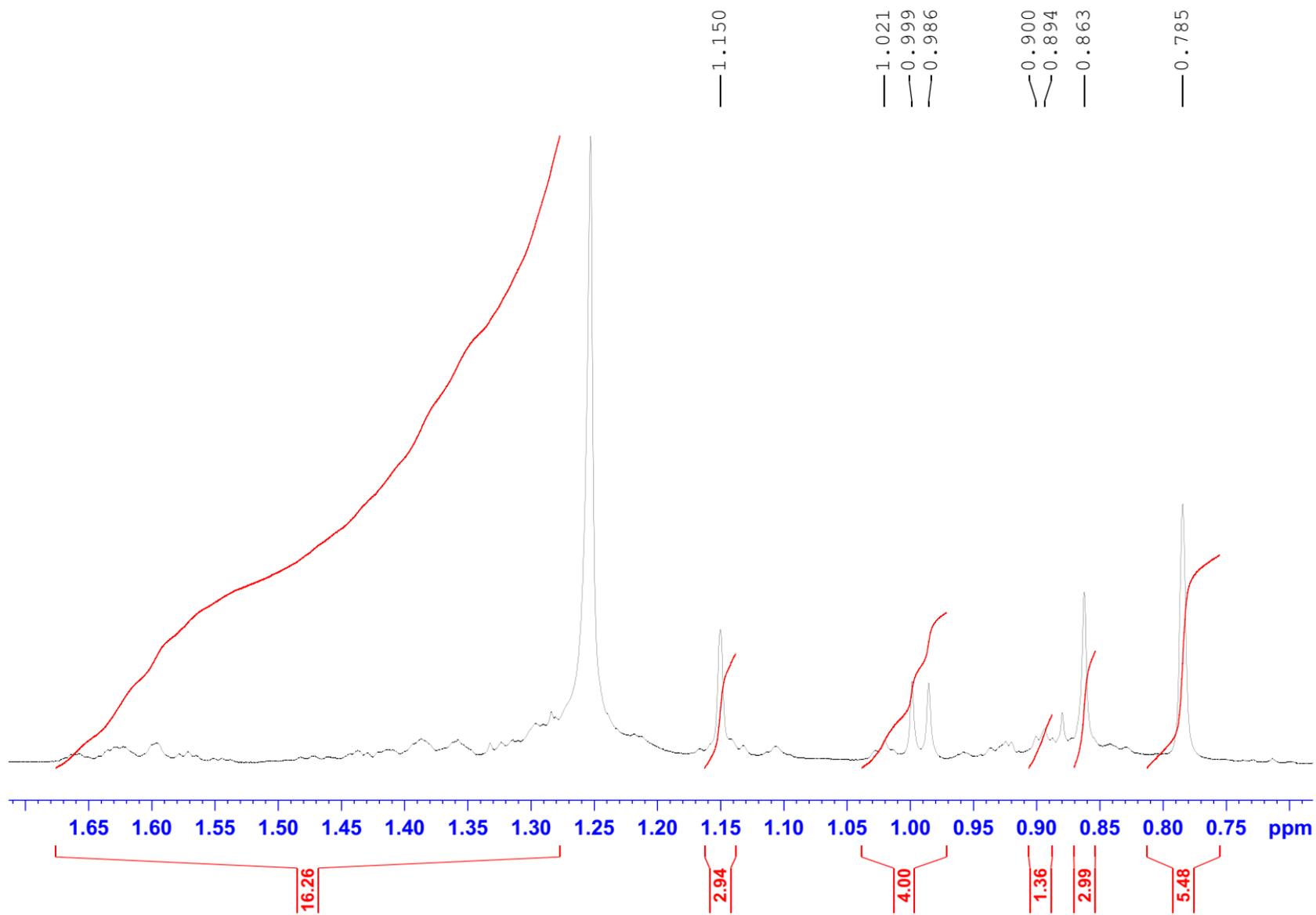
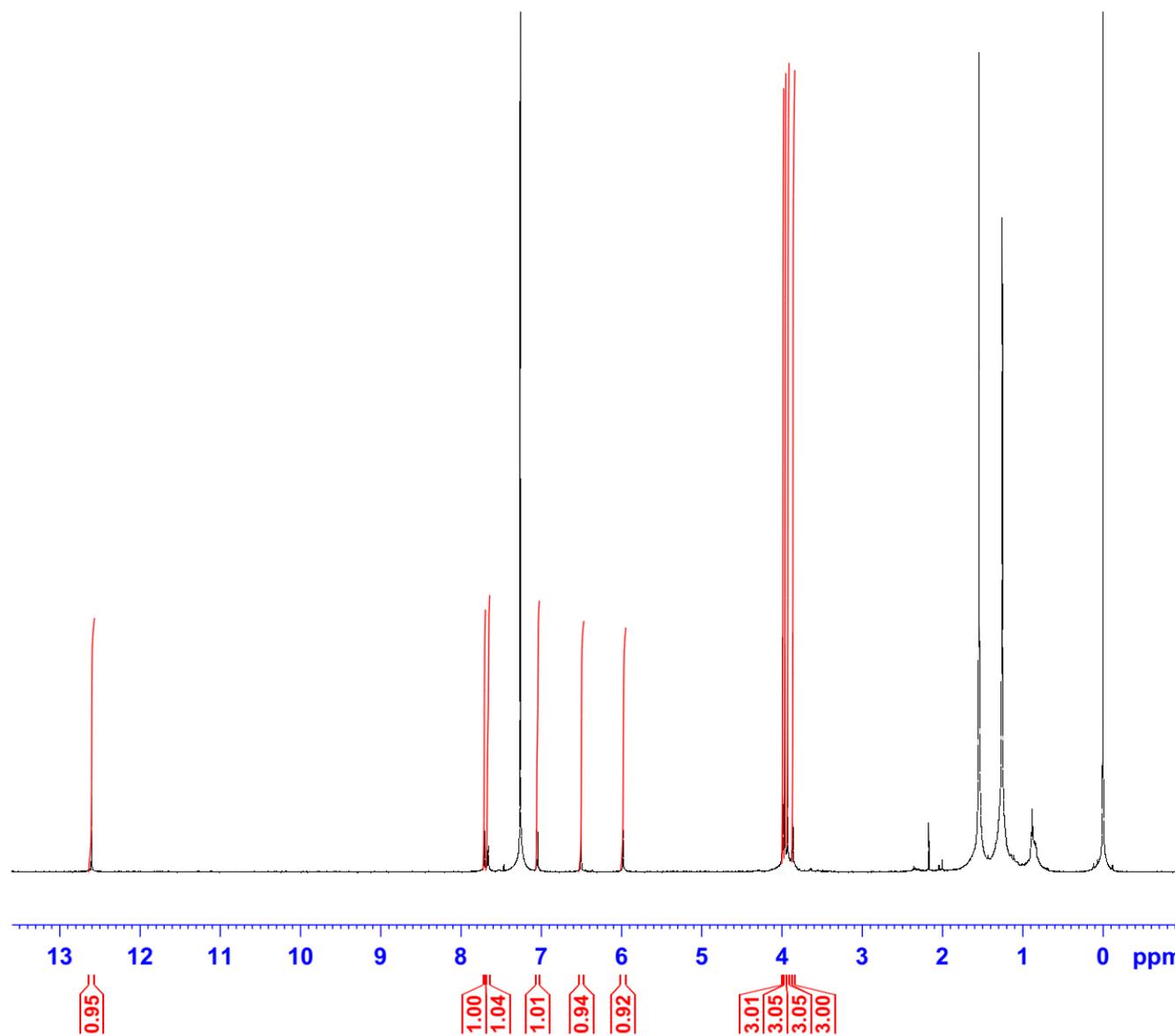


Figura 93. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 2,40 – 1,75 ppm do composto **3**.



Current Data Parameters  
NAME via 06 1  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20180927  
Time\_ 16.24  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBI 1H/  
PULPROG zg30  
TD 65536  
SOLVENT CDCl3  
NS 16  
DS 0  
SWH 10000.000 Hz  
FIDRES 0.152588 Hz  
AQ 3.2767999 sec  
RG 203  
DW 50.000 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.2 K  
D1 1.00000000 sec  
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====  
SFO1 500.1330885 MHz  
NUC1 1H  
P1 8.00 usec  
PLW1 13.00000000 W

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 500.1300114 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00

Figura 94. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto 4.

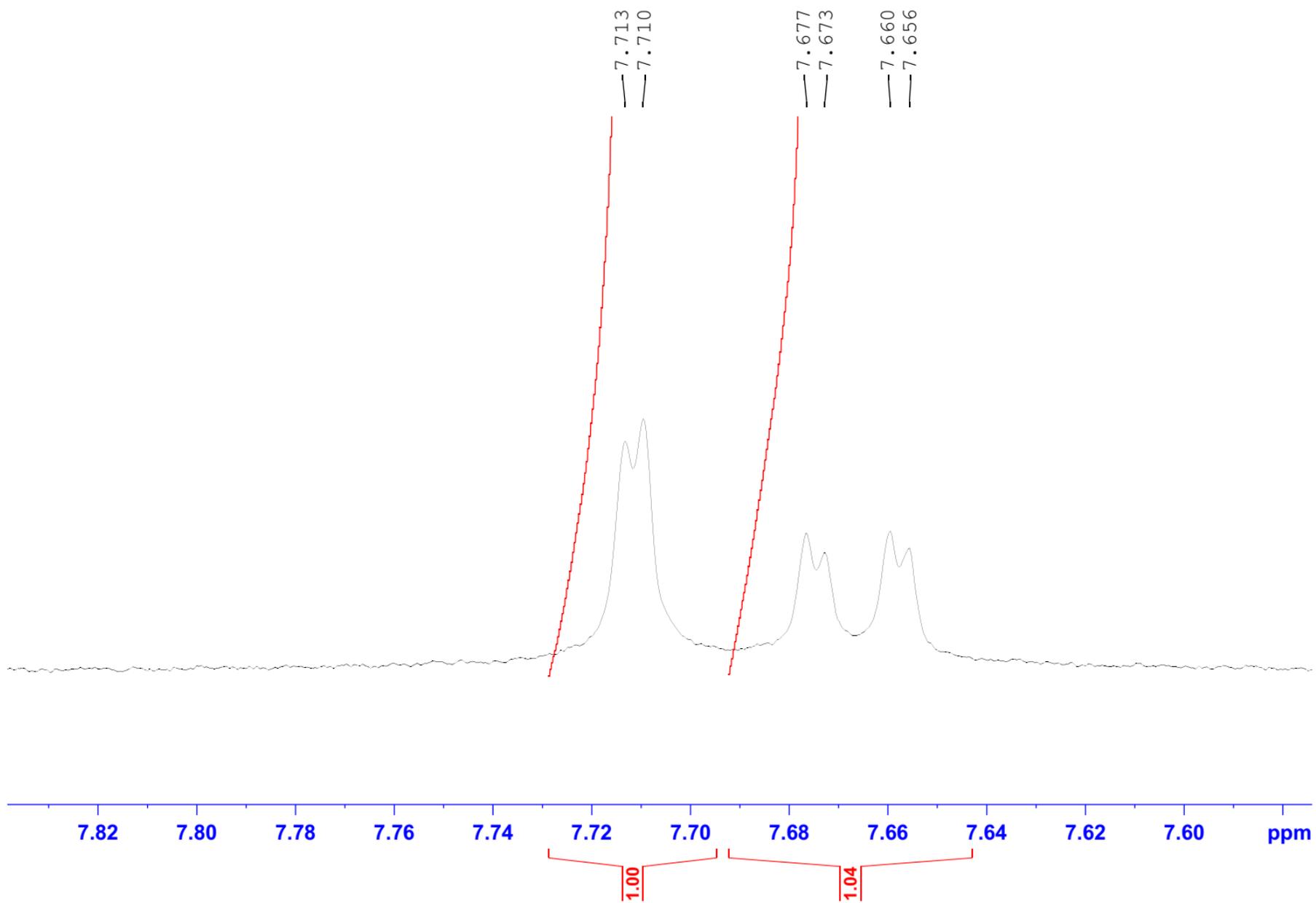


Figura 95. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) com expansão da região entre 7,82 – 7,55 ppm do composto 4.

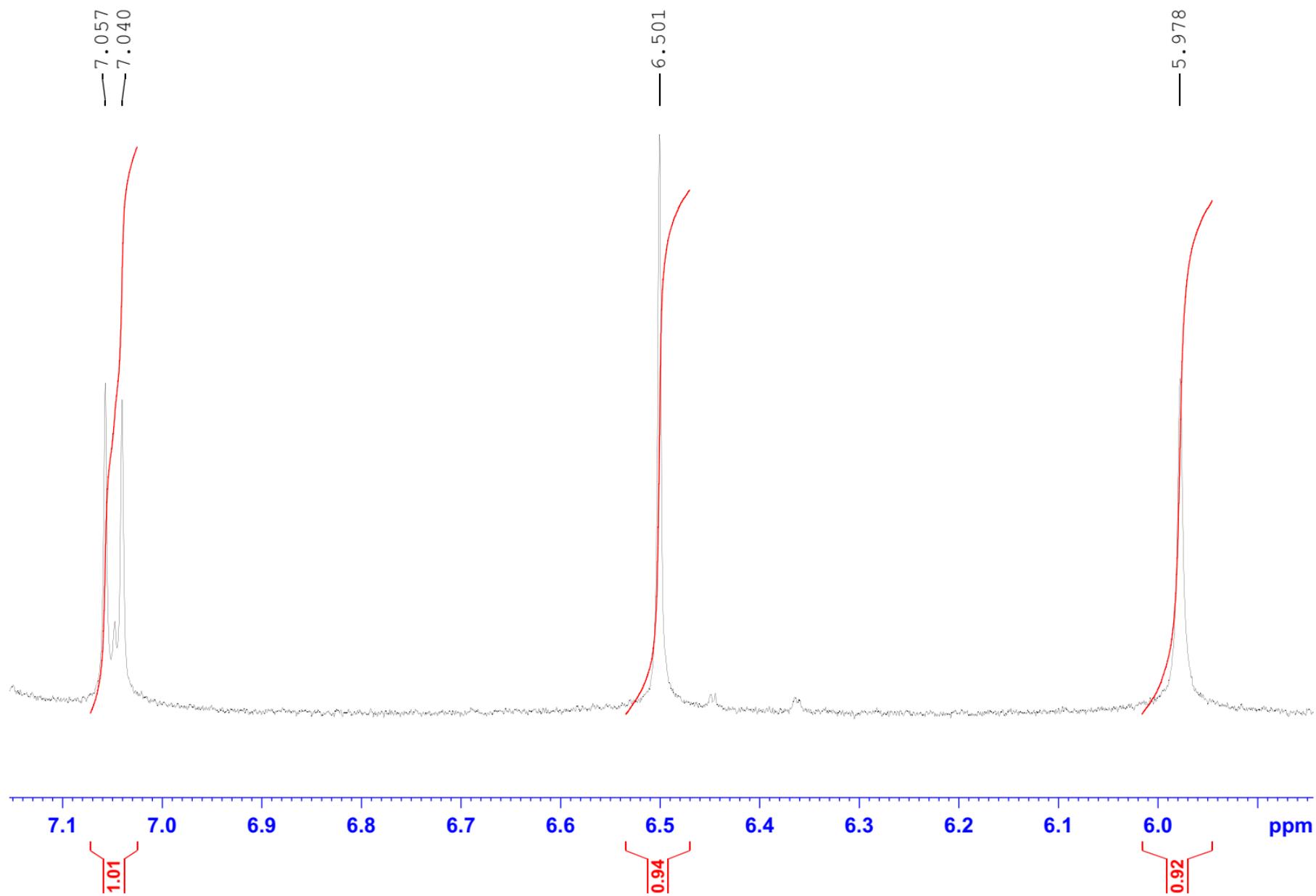


Figura 96. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 7,10 – 5,55 ppm do composto 4.

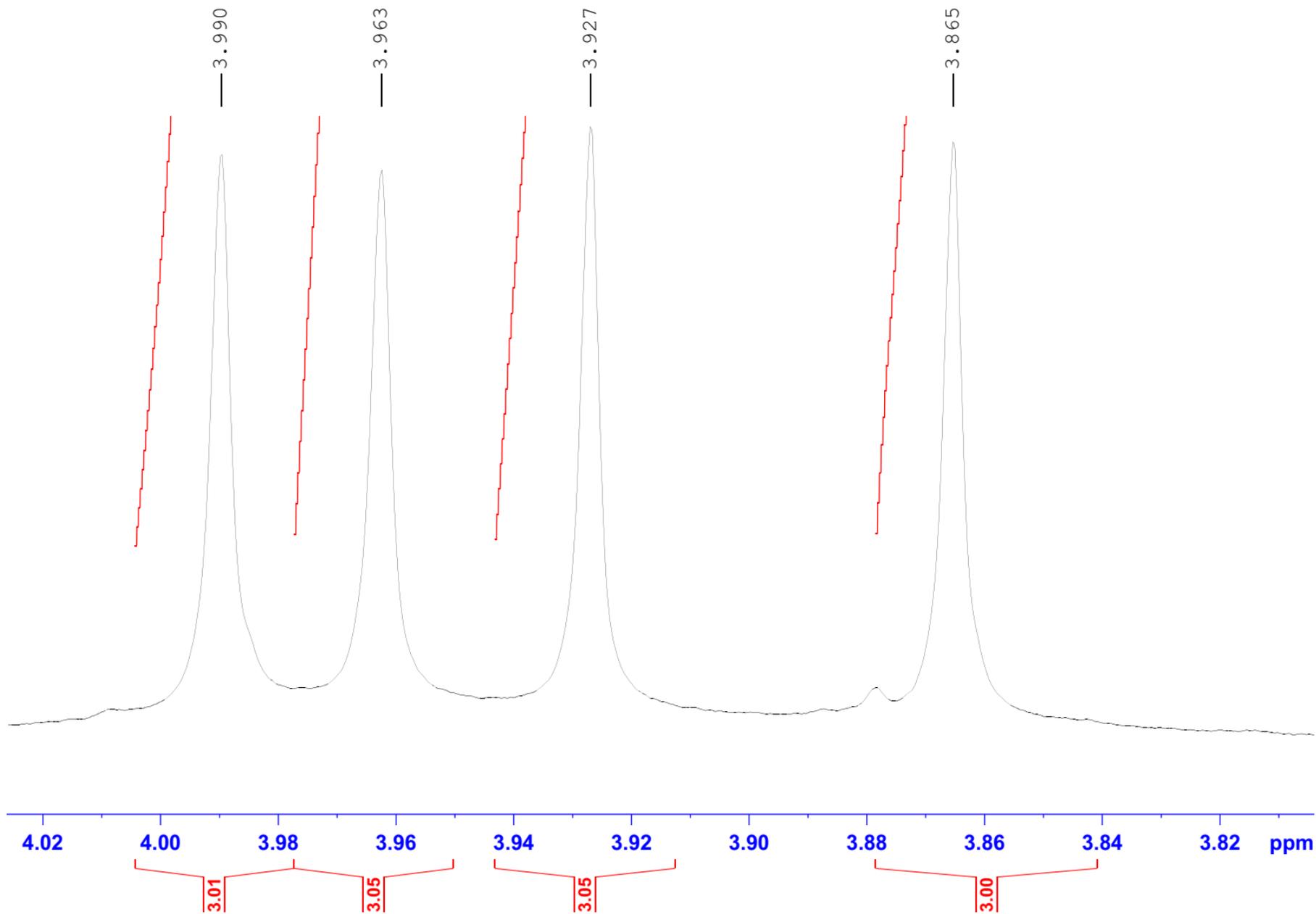


Figura 97. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 7,10 – 5,55 ppm do composto **4**.

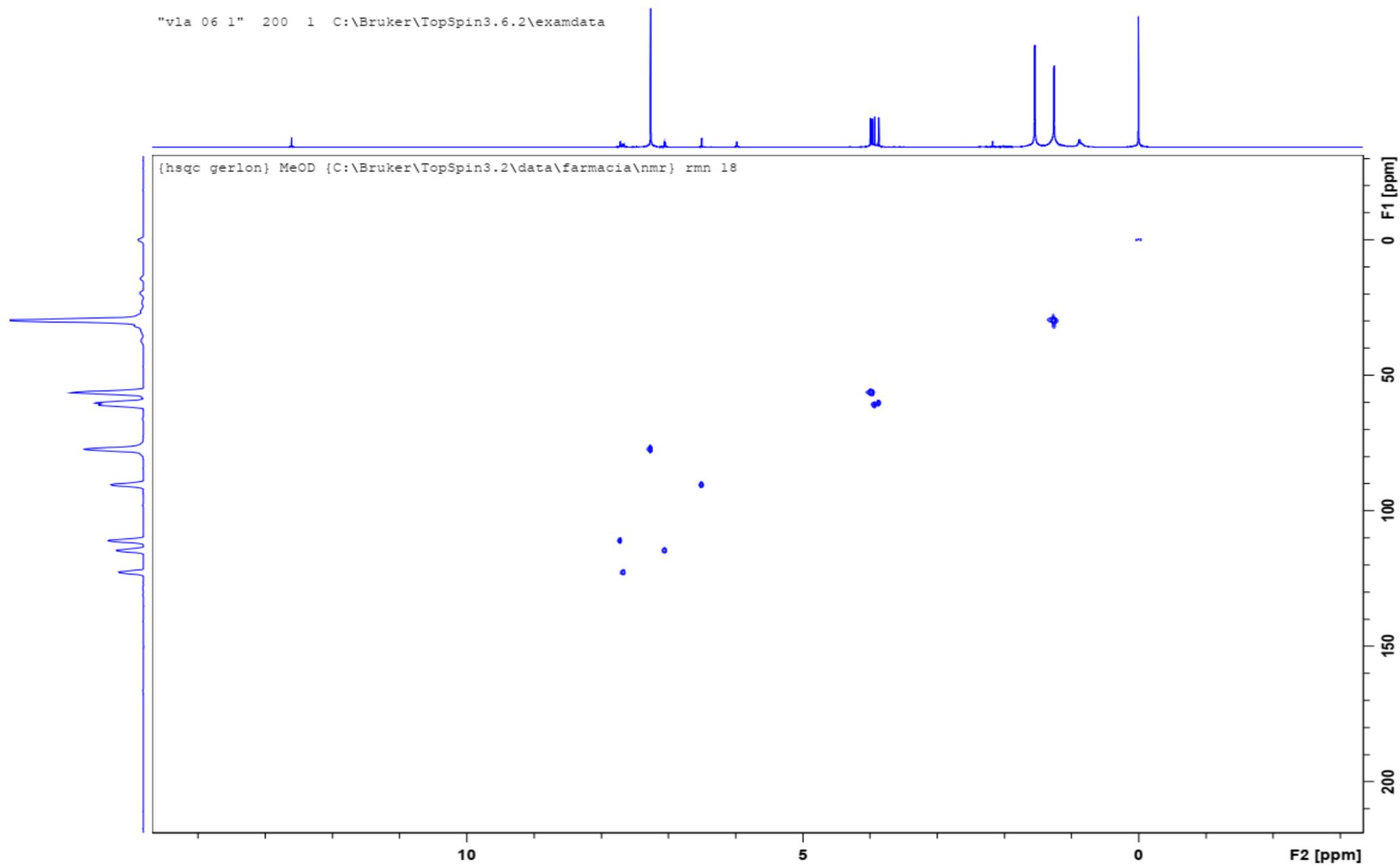


Figura 98. Experimento de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto 4.

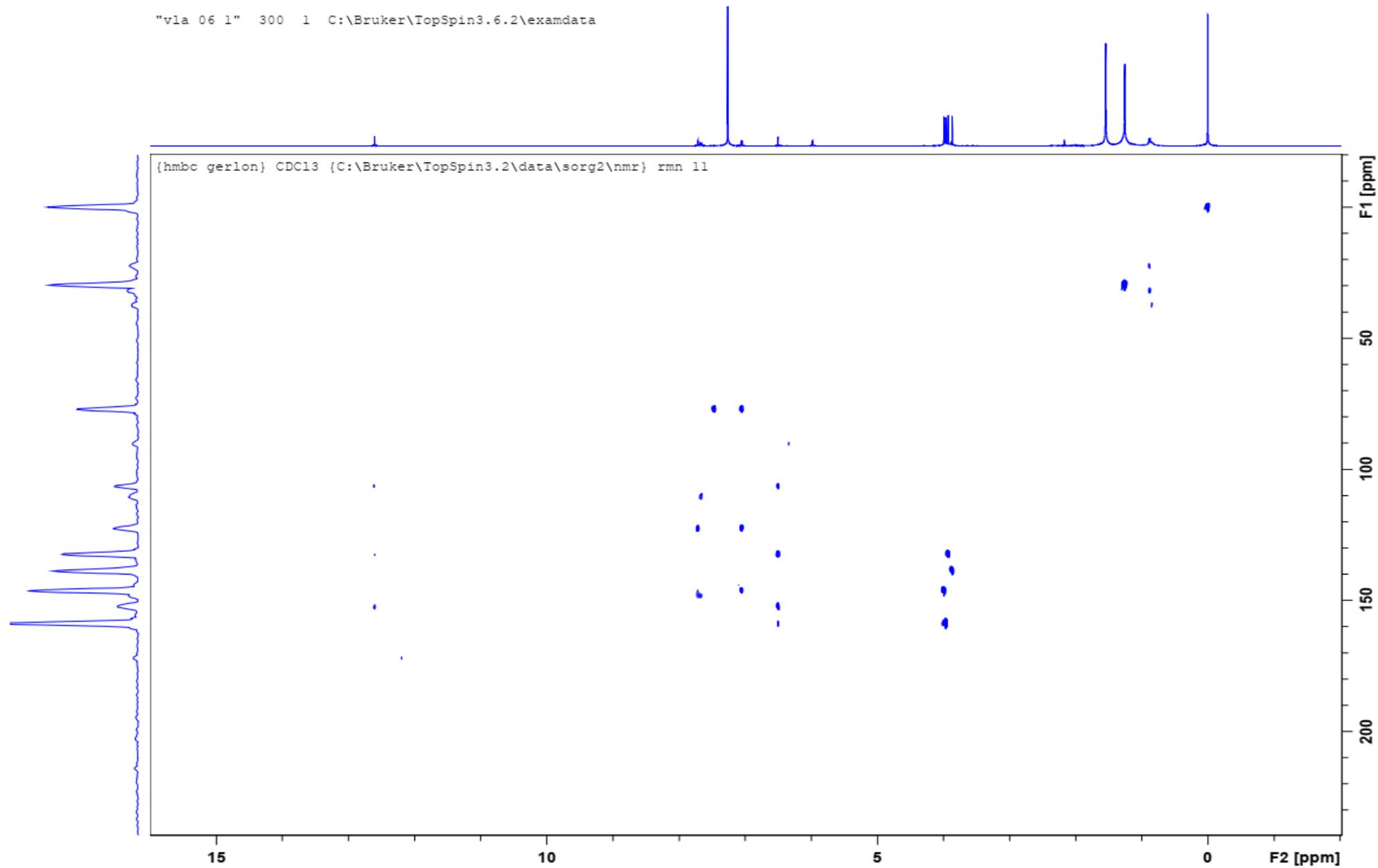
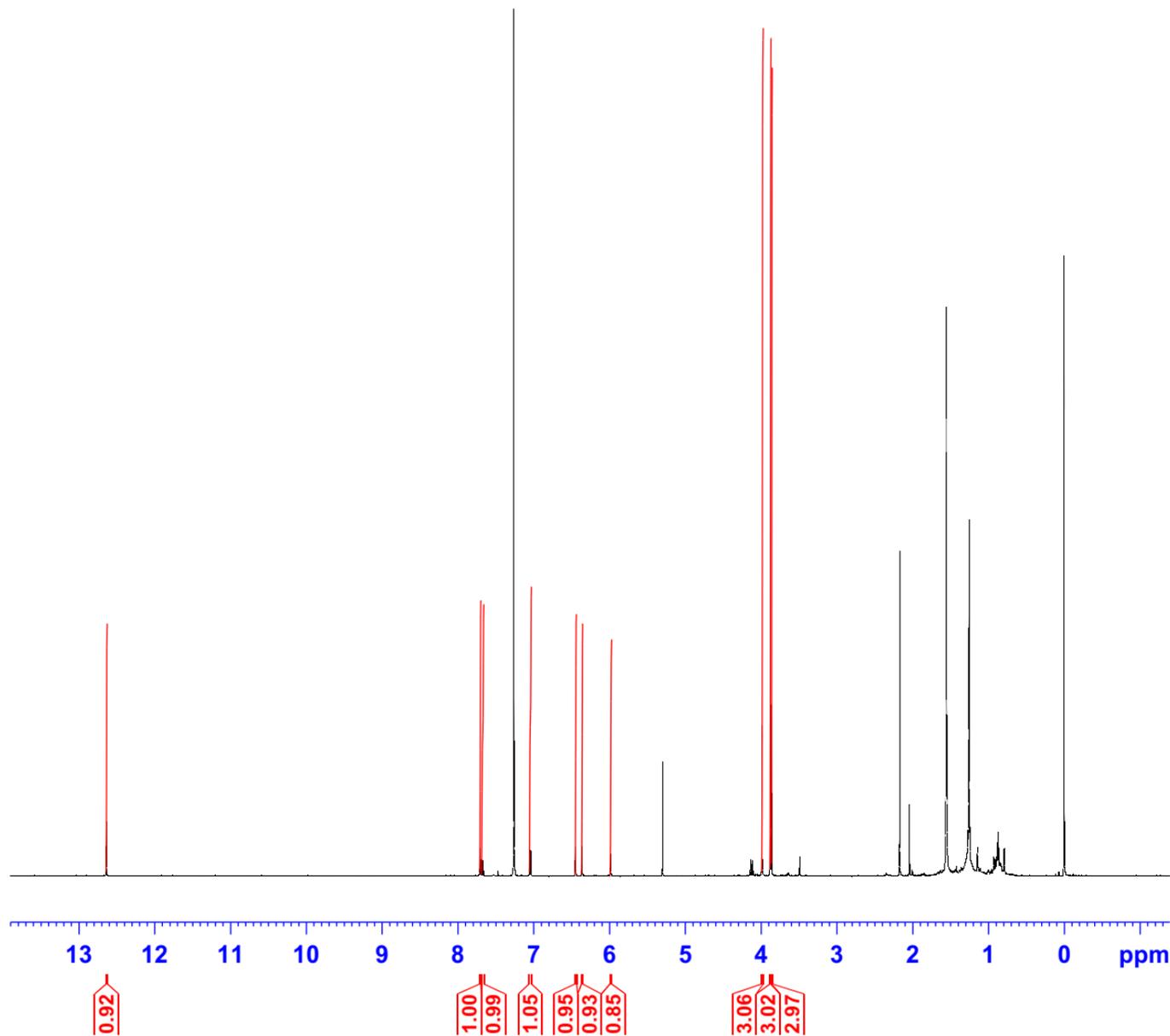


Figura 99. Experimento de HMBc (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) do composto 4.



Current Data Parameters  
NAME vla 07  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20180920  
Time\_ 9.11  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBI 1H/  
PULPROG zg30  
TD 65536  
SOLVENT CDCl3  
NS 16  
DS 2  
SWH 10000.000 Hz  
FIDRES 0.152588 Hz  
AQ 3.2767999 sec  
RG 203  
DW 50.000 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.1 K  
D1 1.00000000 sec  
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----  
SFO1 500.1330885 MHz  
NUC1 1H  
P1 8.00 usec  
PLW1 13.00000000 W

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 500.1300116 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0 Hz  
GB 0  
PC 1.00

Figura 100. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto 5.

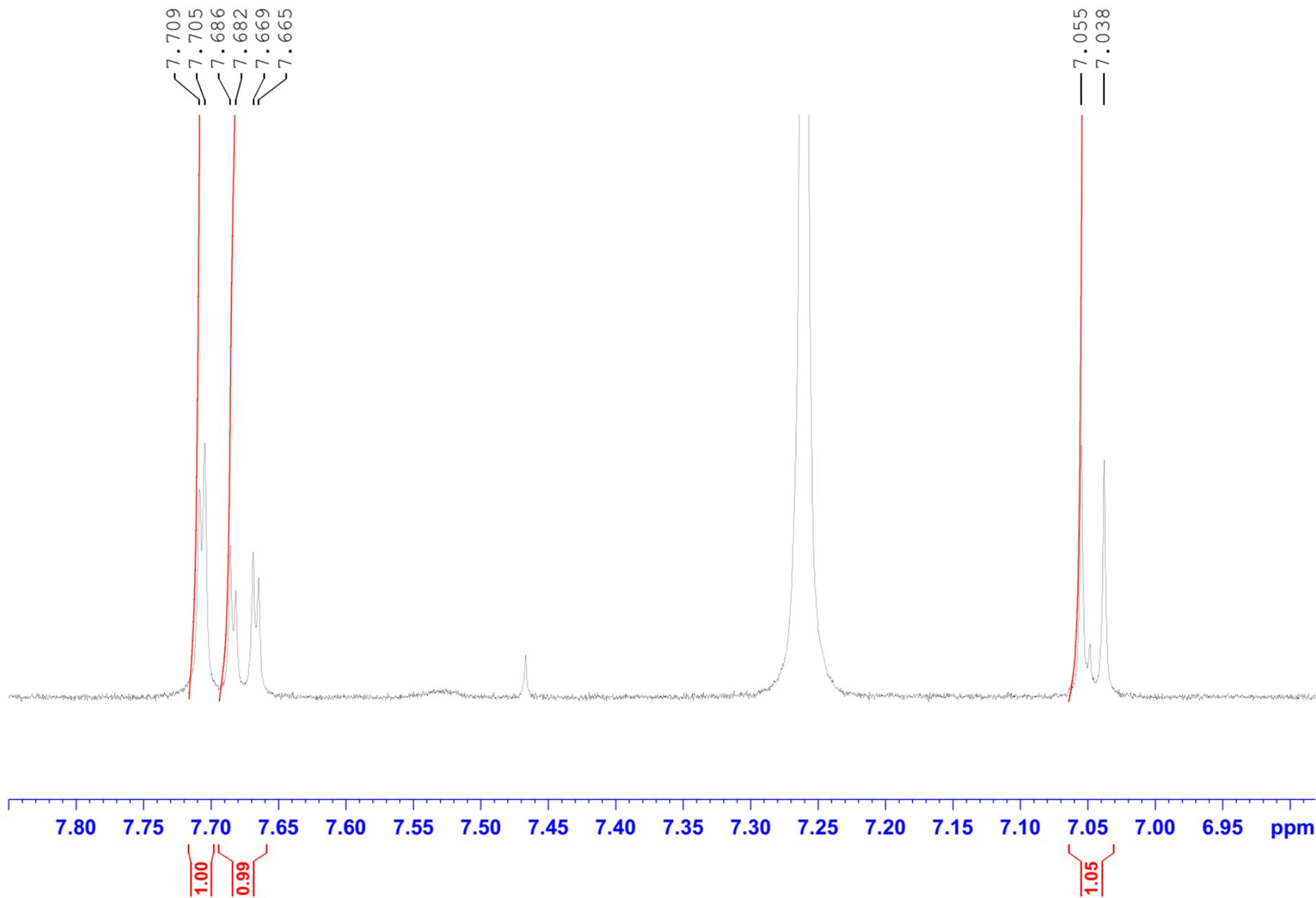


Figura 101. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 7,80 – 6,90 ppm do composto **5**.

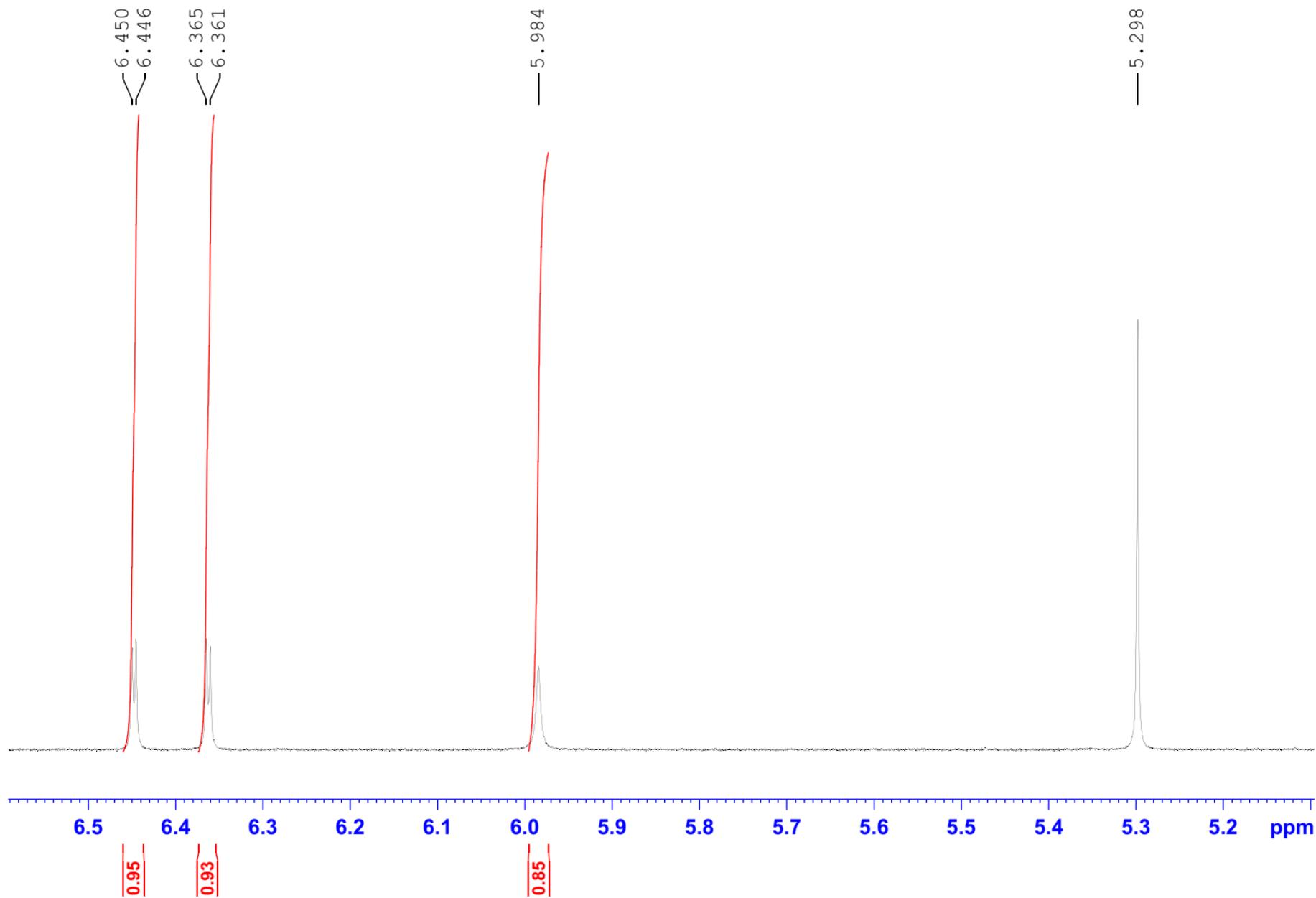


Figura 102. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 6,50 – 5,10 ppm do composto 5.

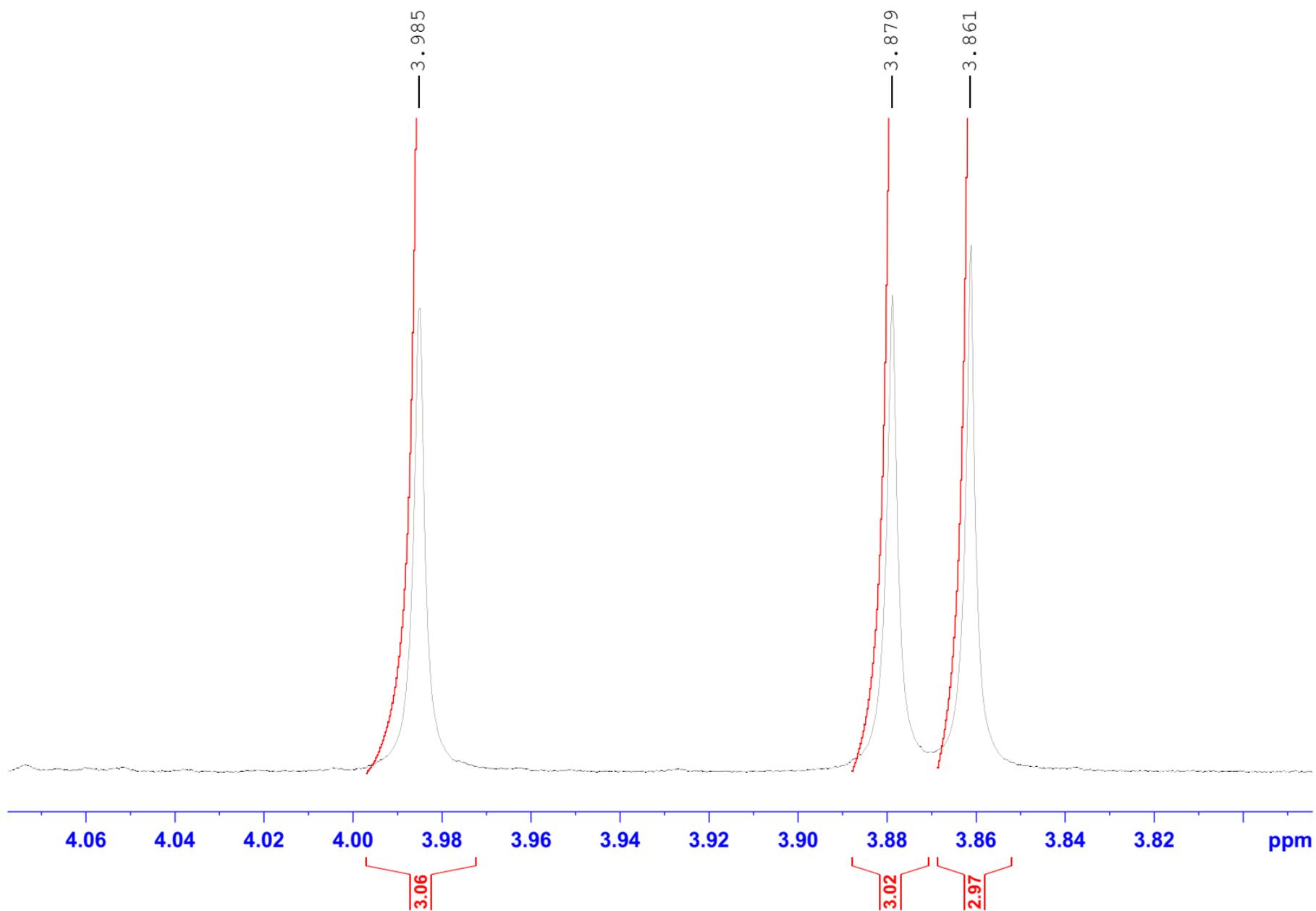


Figura 103. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 4,06 – 3,81 ppm do composto 5.



Current Data Parameters  
NAME s fr 36 41 c3  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20170911  
Time\_ 9.44  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm BBO BB-1H  
PULPROG zg  
TD 65536  
SOLVENT CDC13  
NS 16  
DS 0  
SWH 10000.000 Hz  
FIDRES 0.152588 Hz  
AQ 3.2767999 sec  
RG 101  
DW 50.000 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.2 K  
D1 1.00000000 sec  
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====  
SFO1 500.1324261 MHz  
NUC1 1H  
P1 11.75 usec  
PLW1 22.00000000 W

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 500.1300128 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0 Hz  
GB 0  
PC 1.00

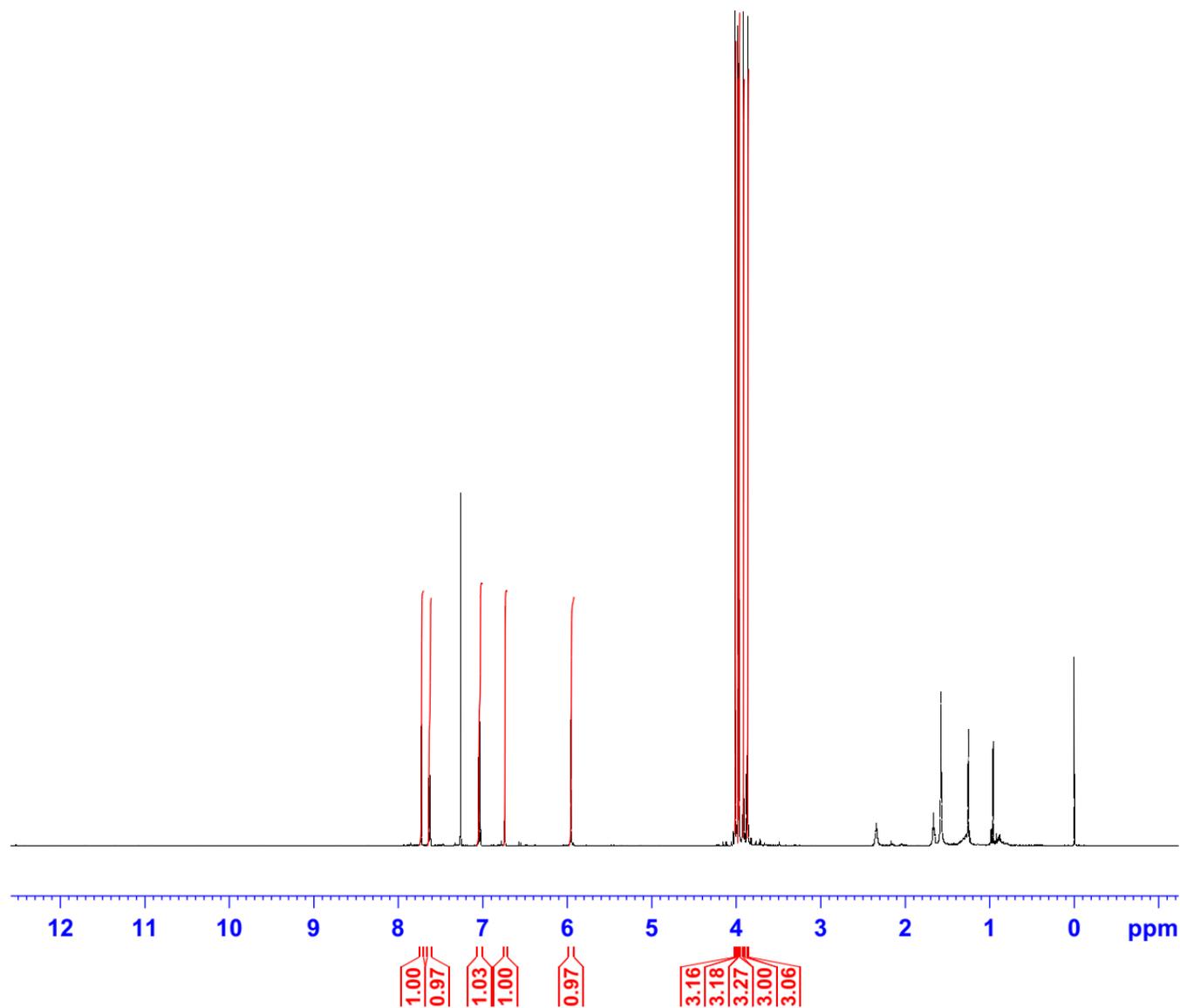


Figura 104. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto 6.

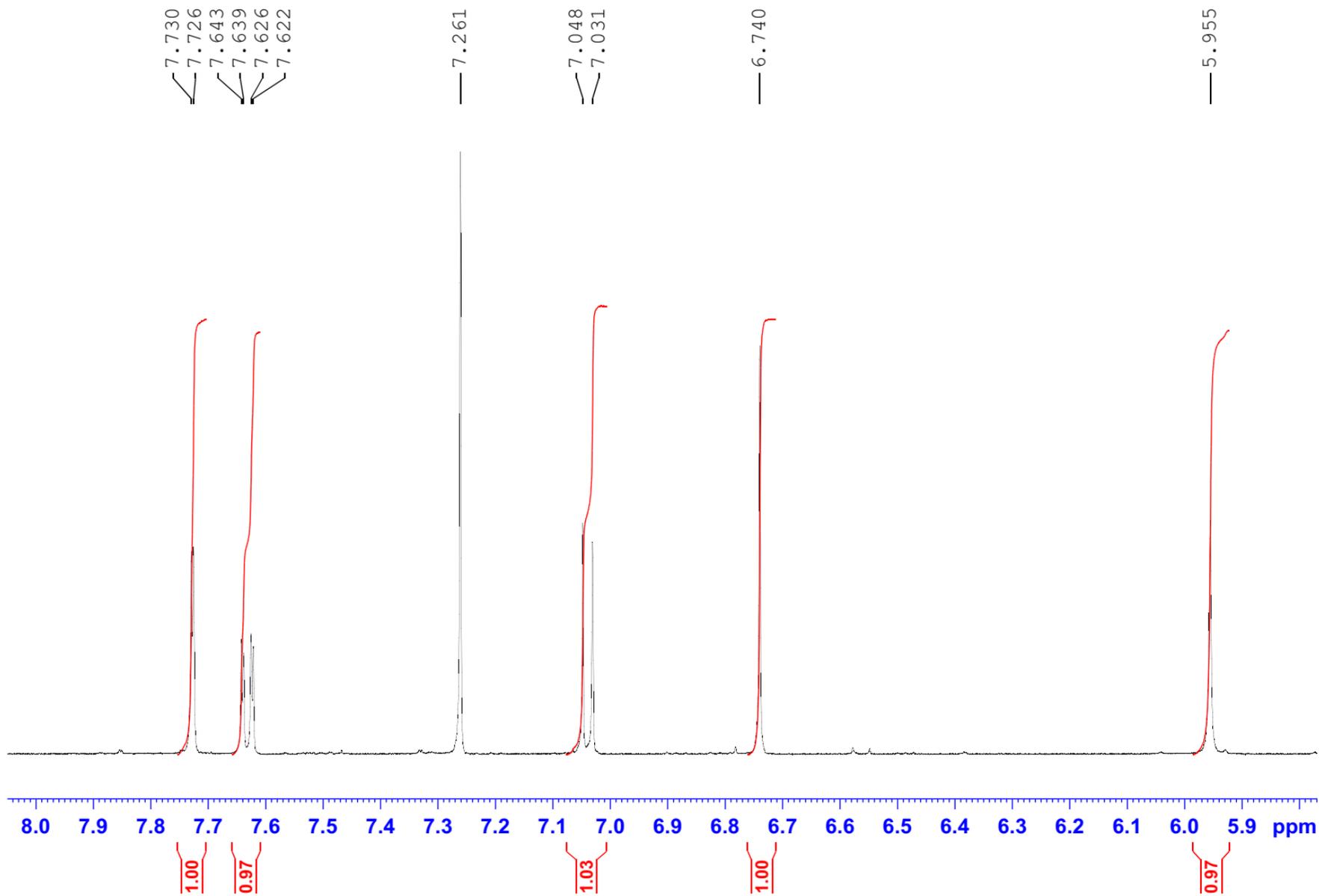


Figura 105. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 8,00 – 5,50 ppm do composto **6**.

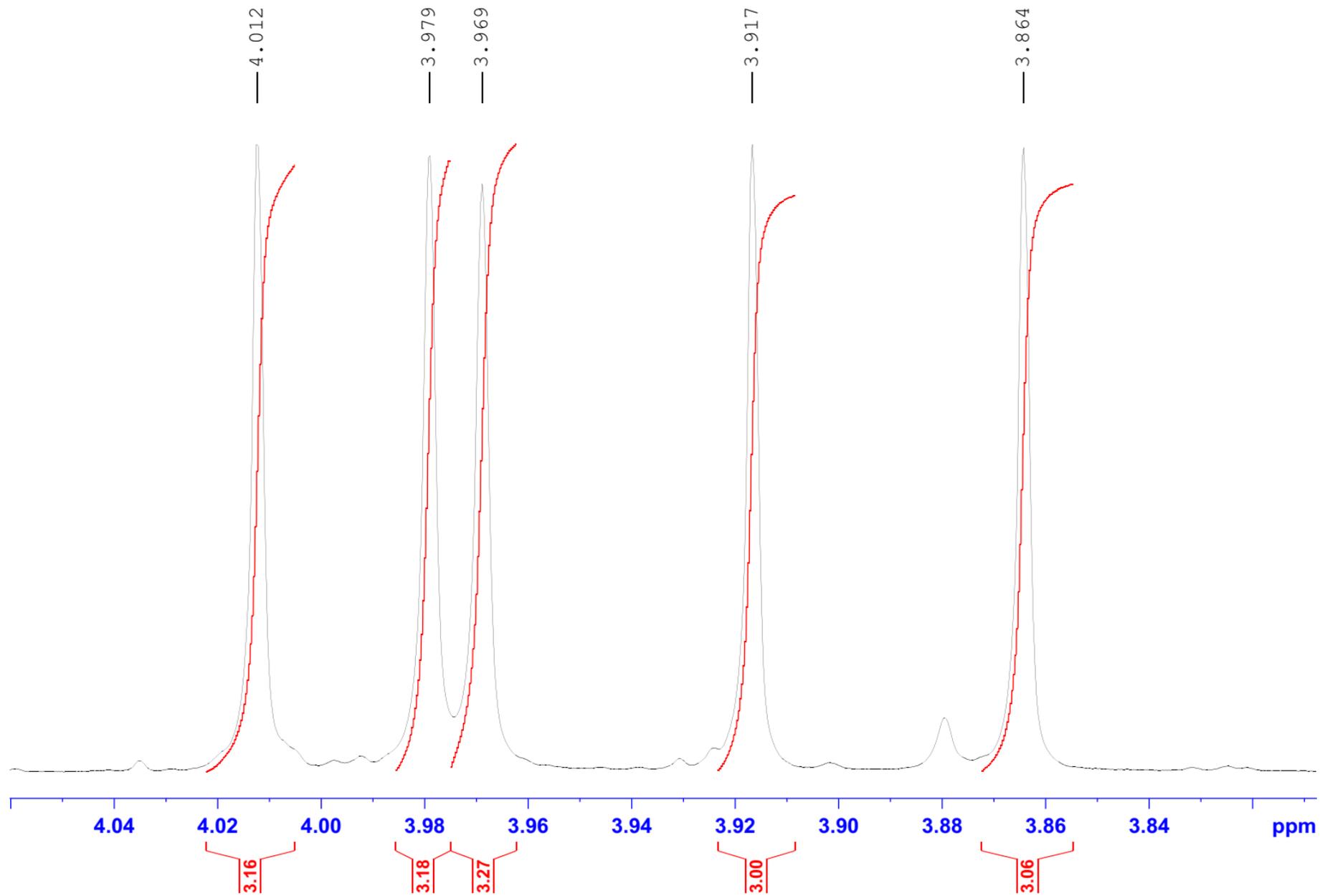


Figura 106. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 4,04 – 3,85 ppm do composto **6**.



Figura 107. Espectro de NOE 1D ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **6**, irradiado em  $\delta_{\text{H}}$  7,72 ppm.

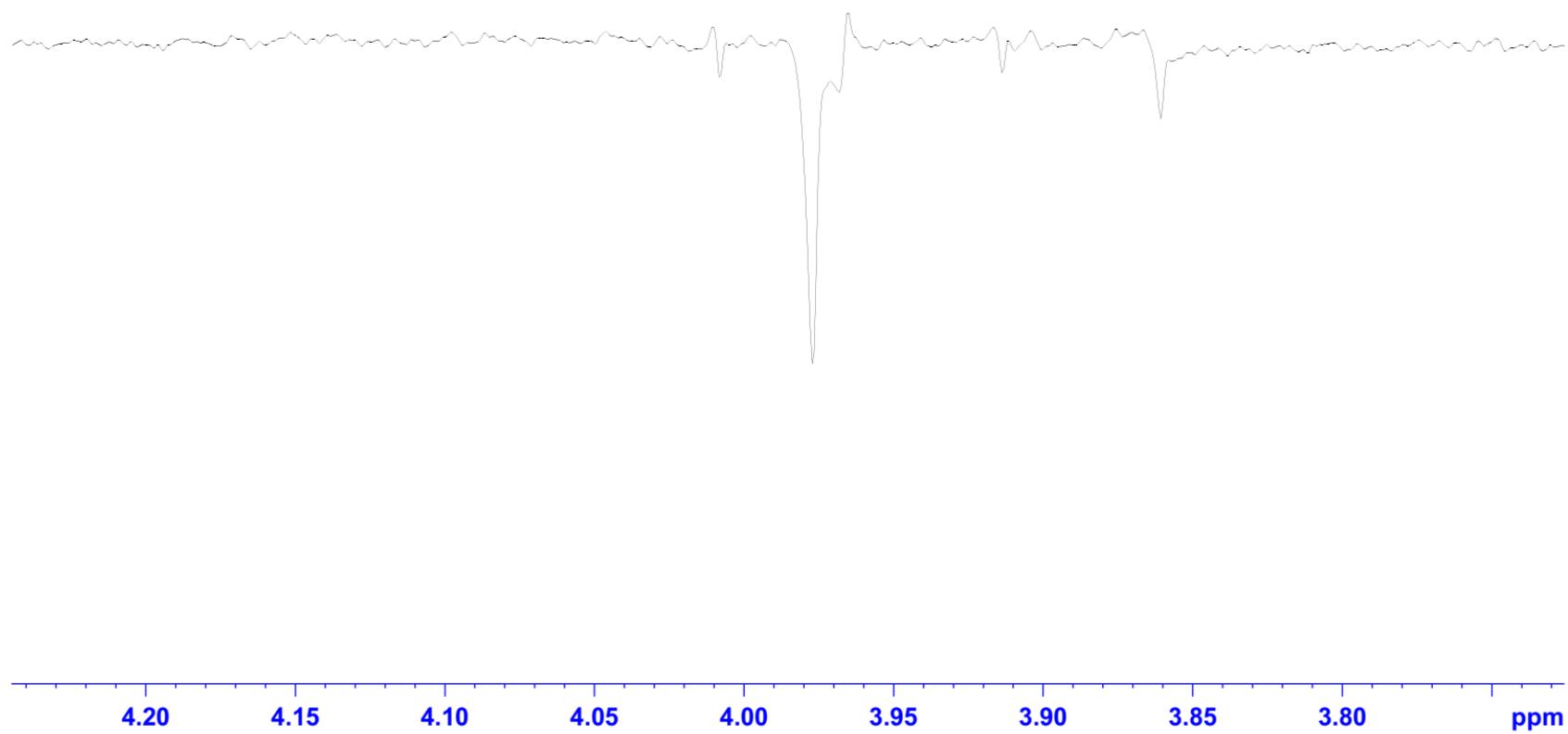


Figura 108. Espectro de NOE 1D ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **6**, irradiado em  $\delta_{\text{H}}$  7,72 ppm, com expansão da região entre 4,20 – 3,80 ppm.

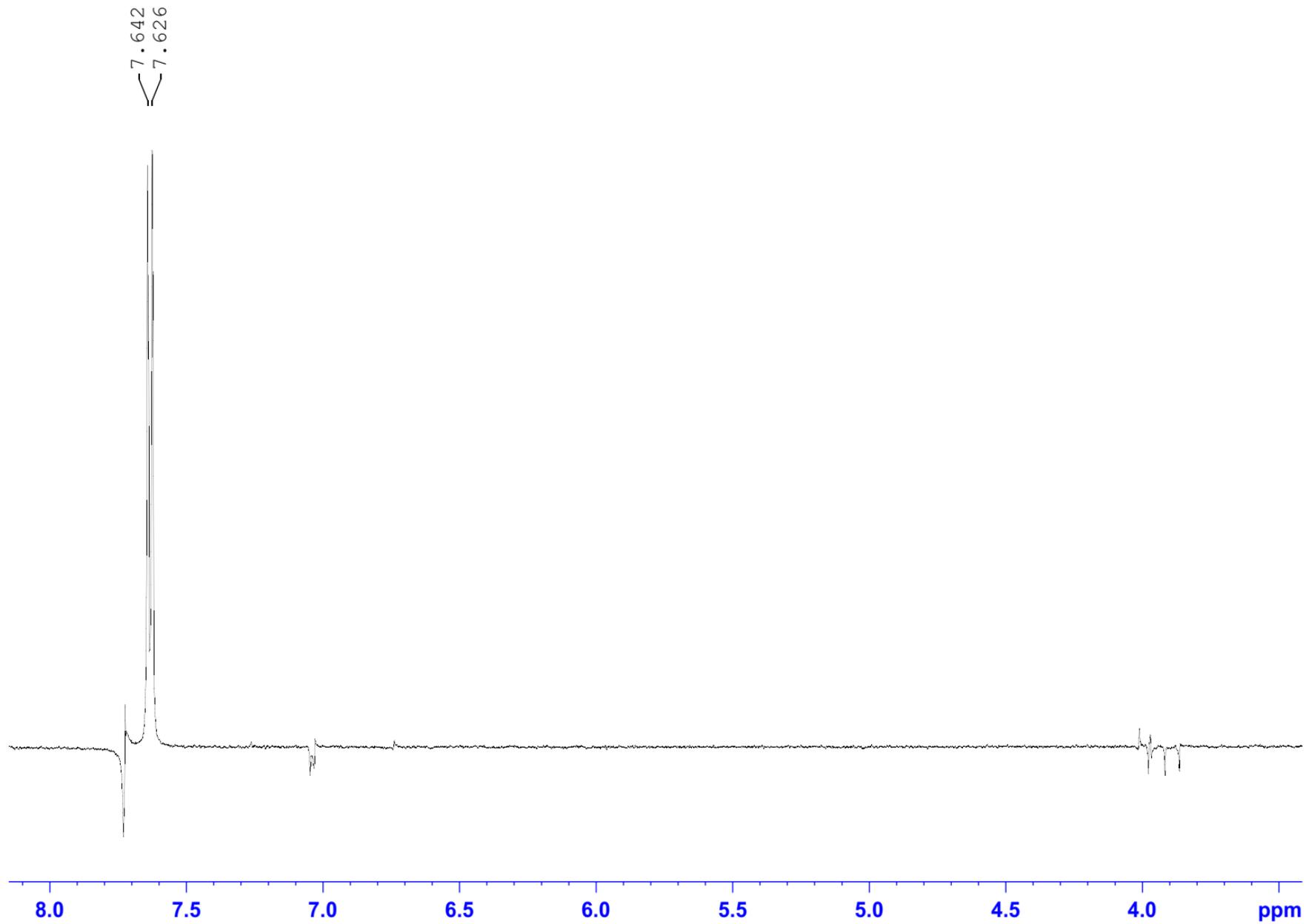


Figura 109. Espectro de NOE 1D (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) do composto **6**, irradiado em  $\delta_{\text{H}}$  7,63 ppm.

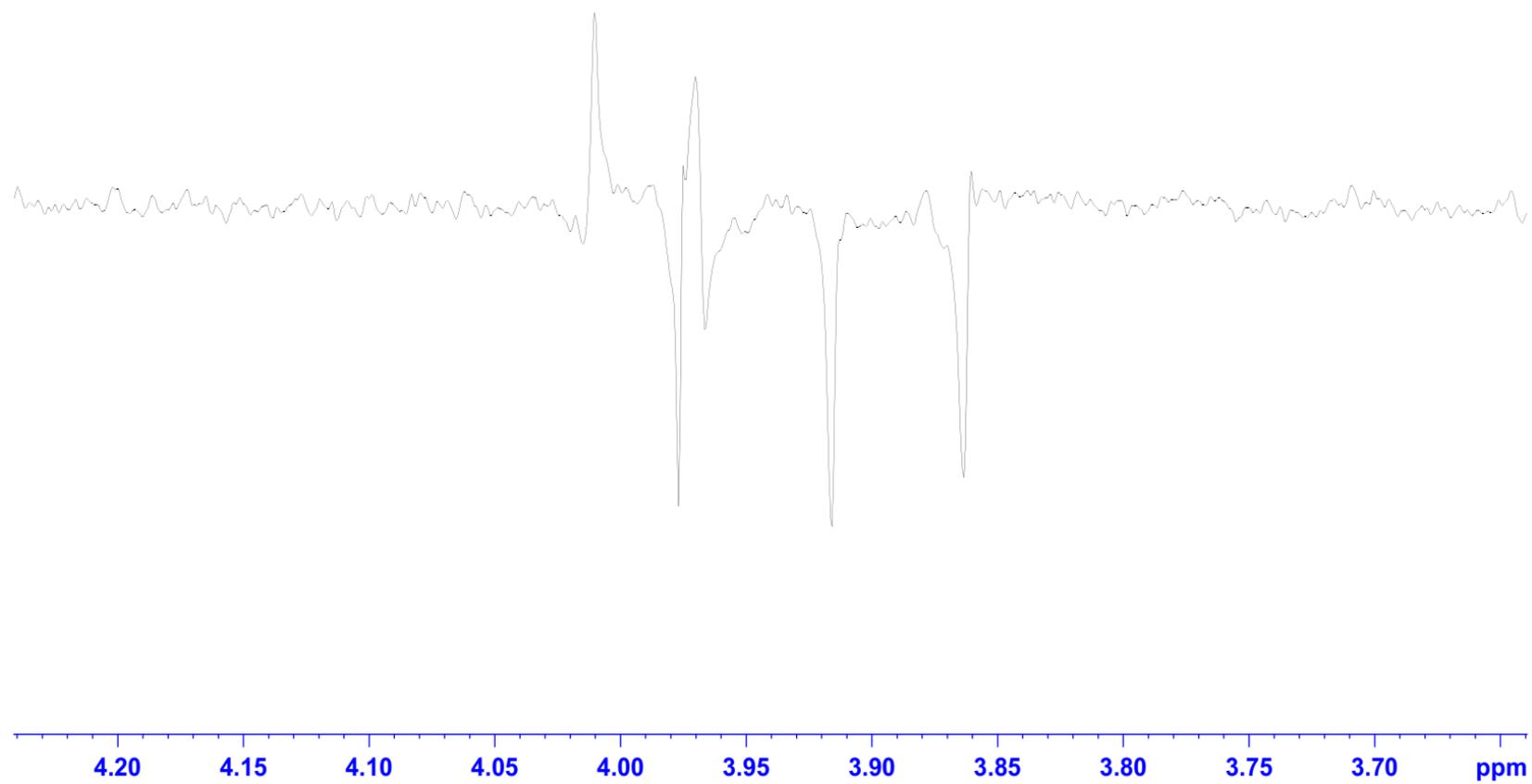


Figura 110. Espectro de NOE 1D ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto **6**, irradiado em  $\delta_{\text{H}}$  7,63 ppm, com expansão da região entre 4,20 – 3,70 ppm.

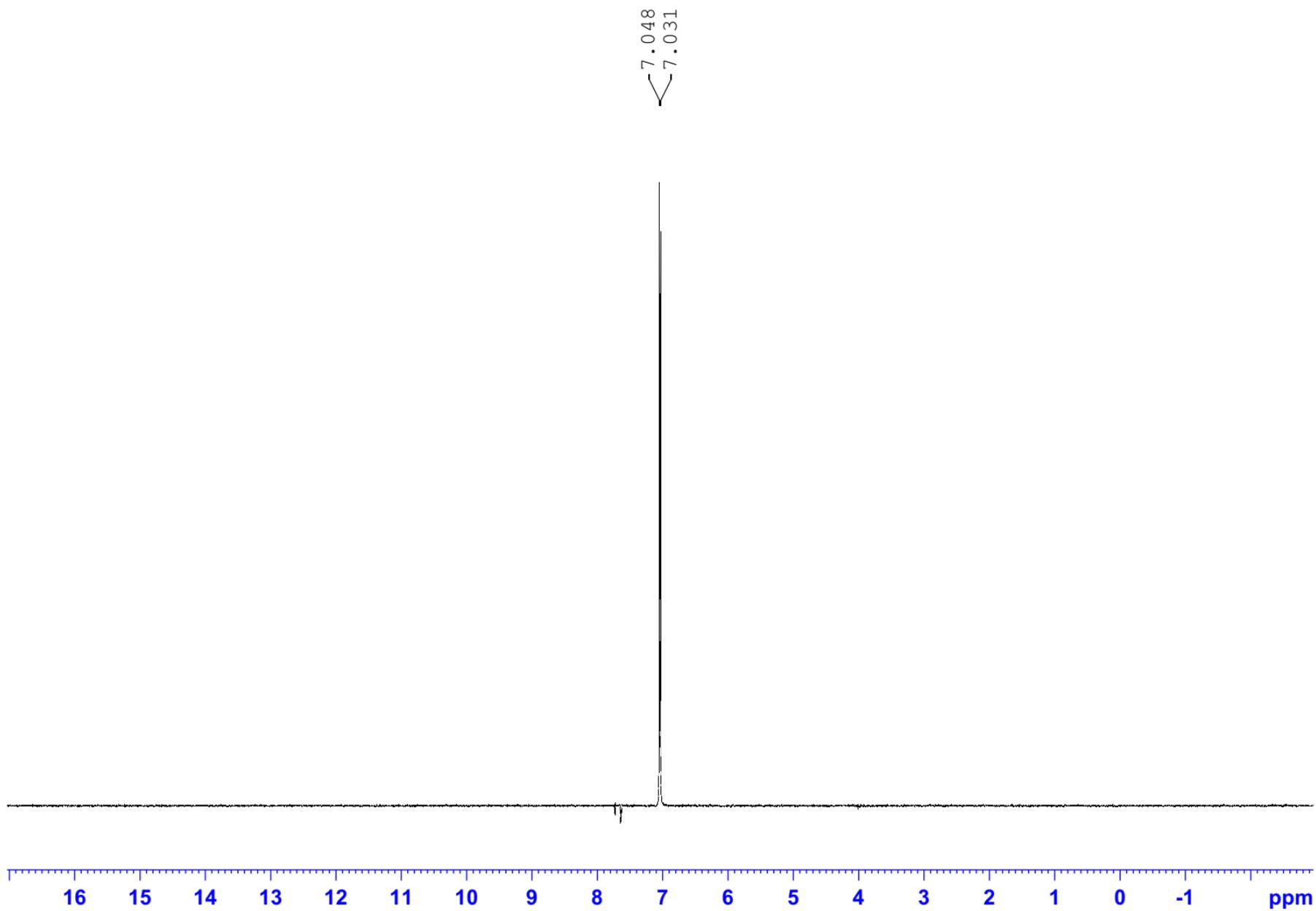
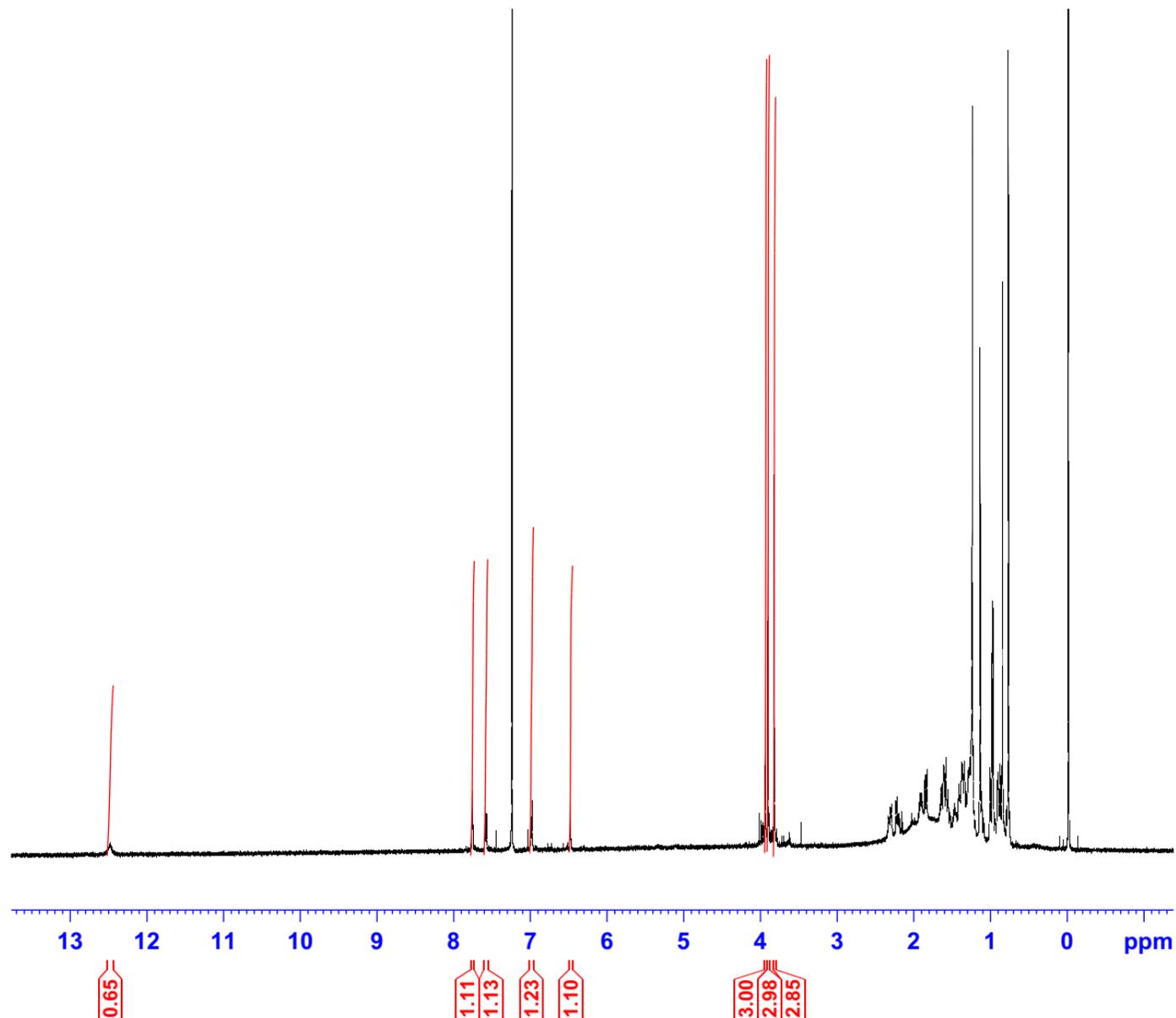


Figura 111. Espectro de NOE 1D (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) do composto **6**, irradiado em  $\delta_H$  7,04 ppm.



Current Data Parameters  
NAME s fr 67 68 c3  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20170911  
Time\_ 9.51  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm BBO BB-1H  
PULPROG zg  
TD 65536  
SOLVENT CDCl3  
NS 32  
DS 0  
SWH 10000.000 Hz  
FIDRES 0.152588 Hz  
AQ 3.2767999 sec  
RG 203  
DW 50.000 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.2 K  
D1 1.00000000 sec  
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====  
SFO1 500.1324261 MHz  
NUC1 1H  
P1 11.75 usec  
PLW1 22.00000000 W

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 500.1300241 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0 Hz  
GB 0  
PC 1.00

Figura 112. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do composto 7.

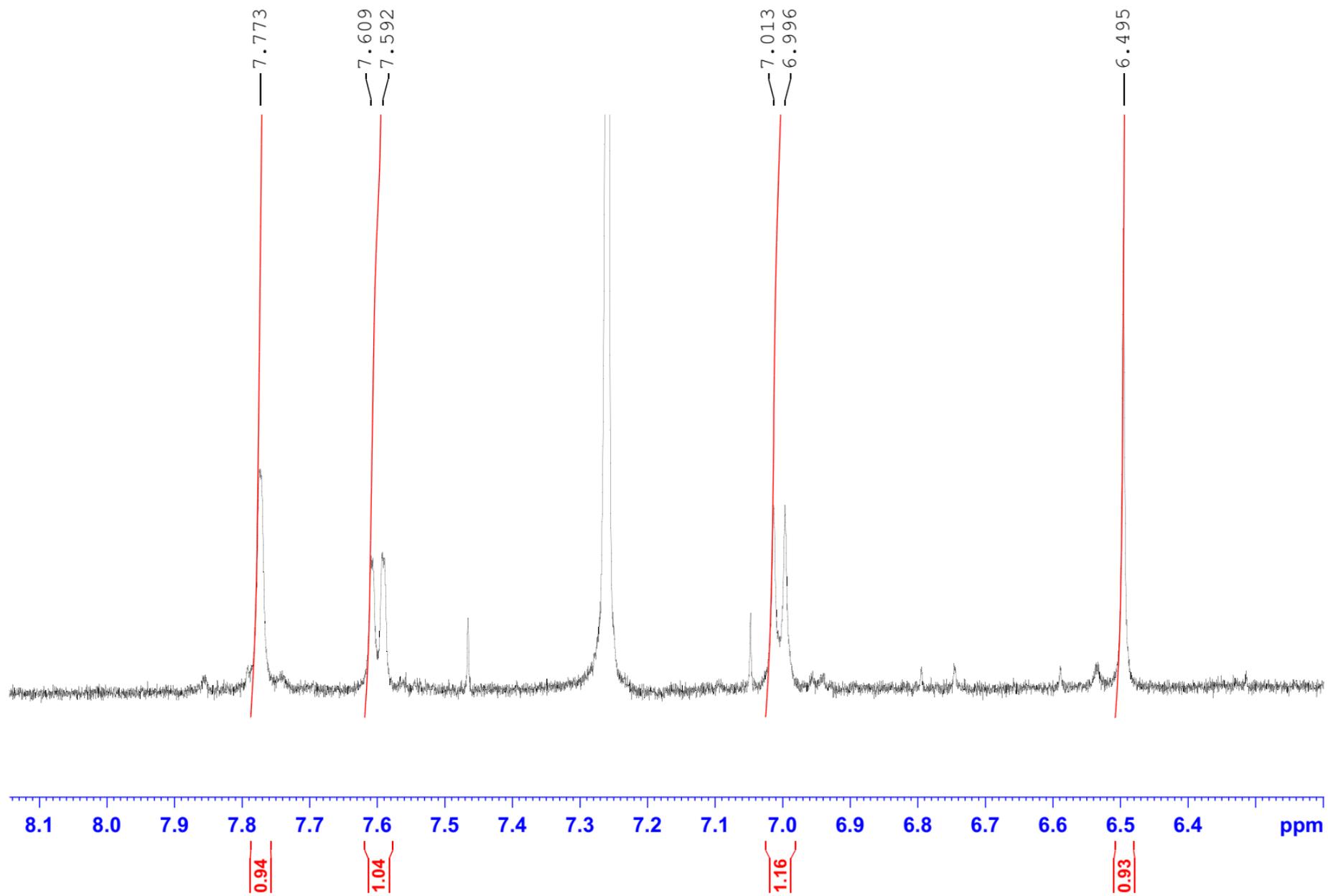


Figura 113. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 8,10 – 6,40 ppm do composto 7.

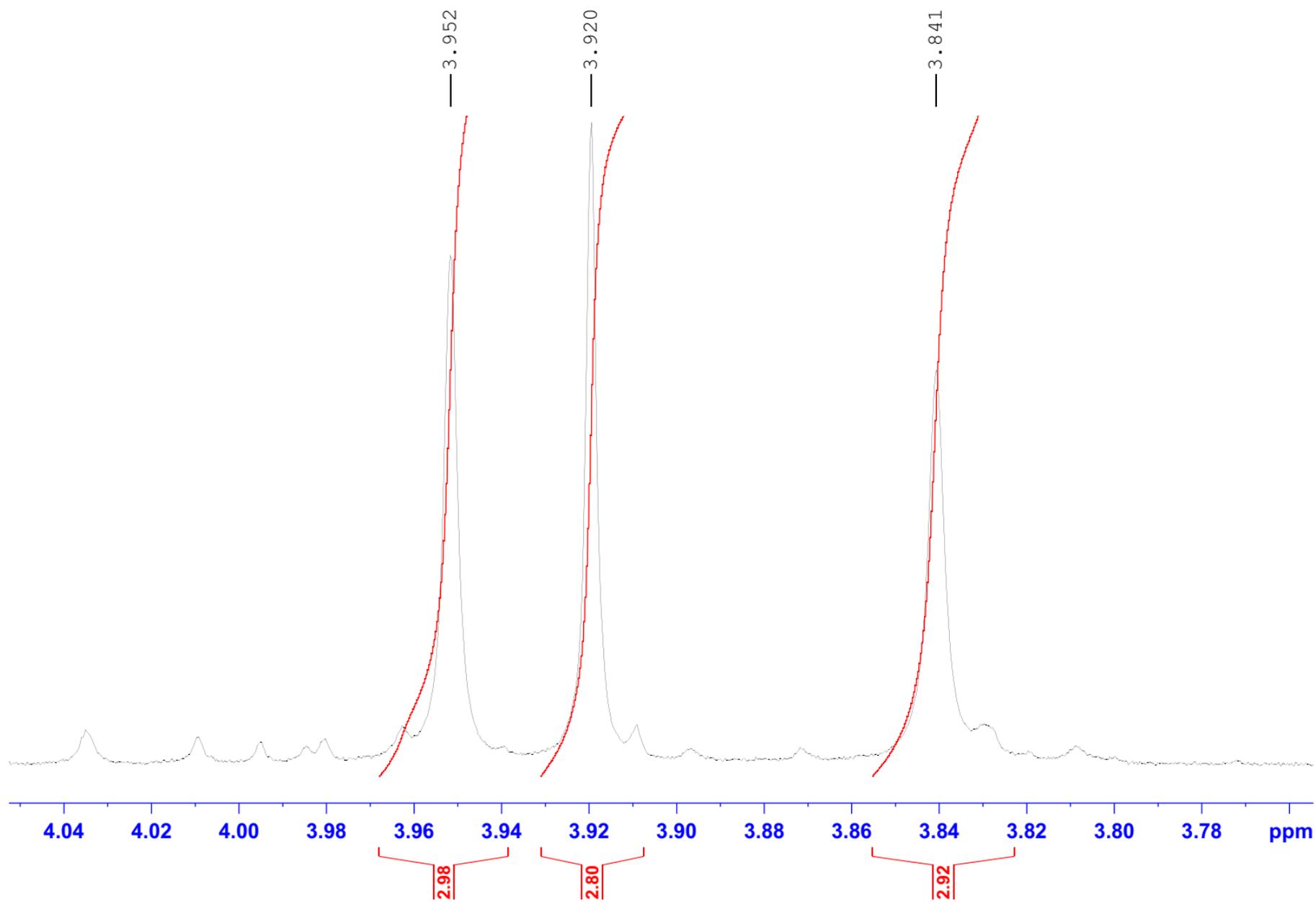


Figura 114. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) com expansão da região entre 4,04 – 3,78 ppm do composto 7.

## Apêndice B – Espectros de fragmentação EM/EM dos compostos e classes anotadas através das análises de CLAE-IES-EM/EM e redes moleculares

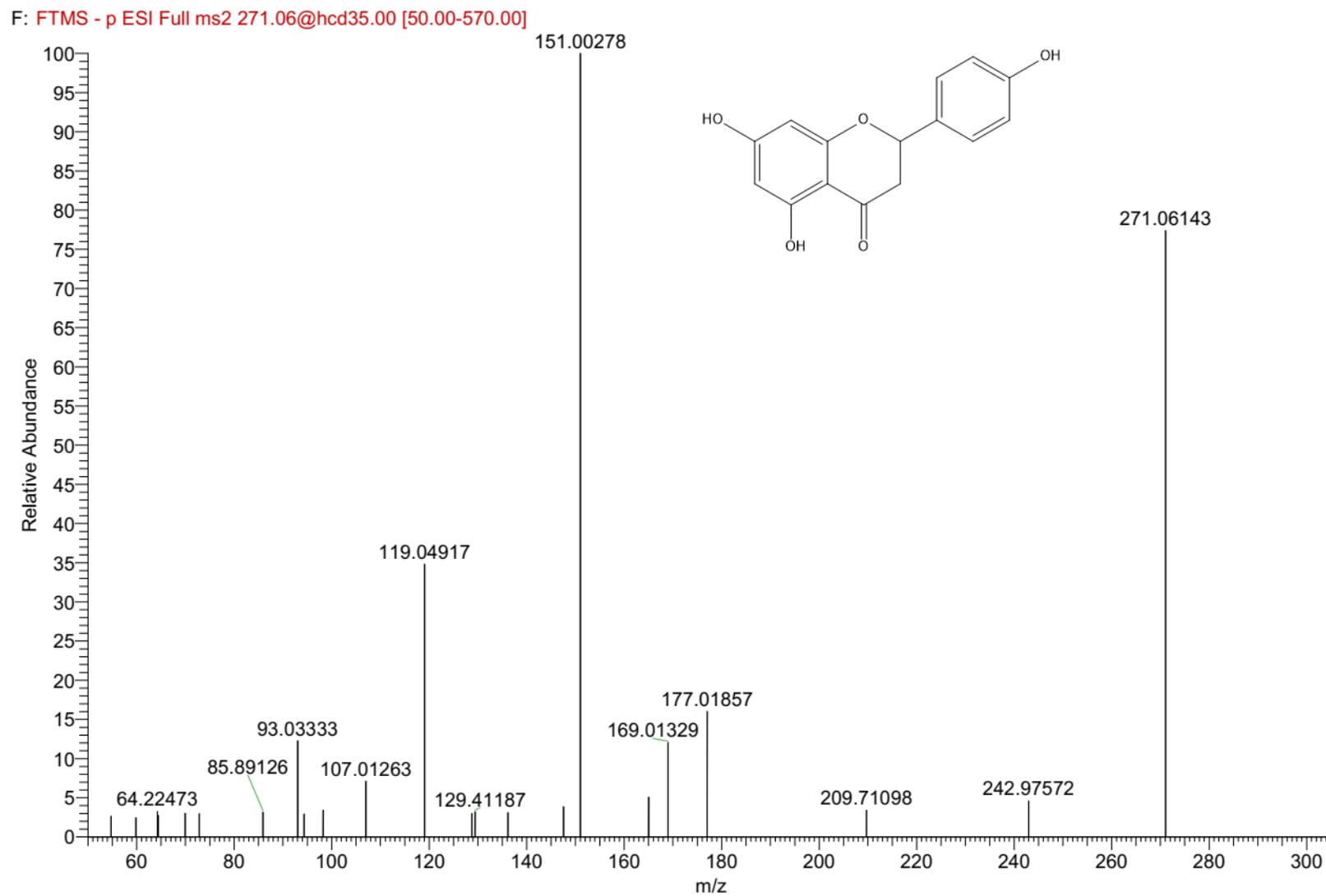


Figura 115. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  271,06143  $[M-H]^-$  identificado como a naringenina.

F: FTMS - p ESI Full ms2 267.20@hcd70.00 [50.00-565.00]

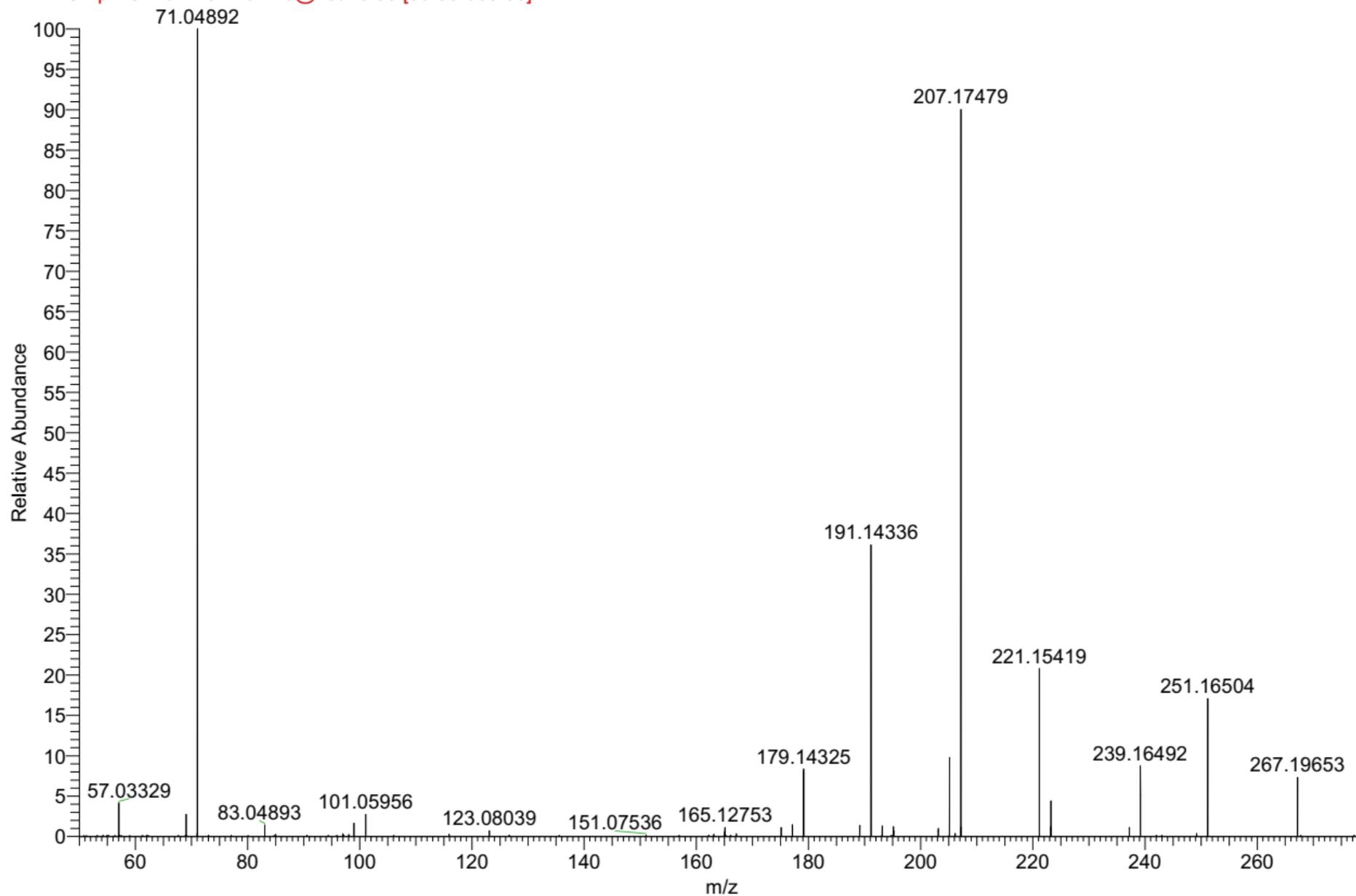


Figura 116. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  267,19653 [M-H]<sup>-</sup>; não anotado.

F: FTMS - p ESI Full ms2 285.04@hcd35.00 [50.00-600.00]

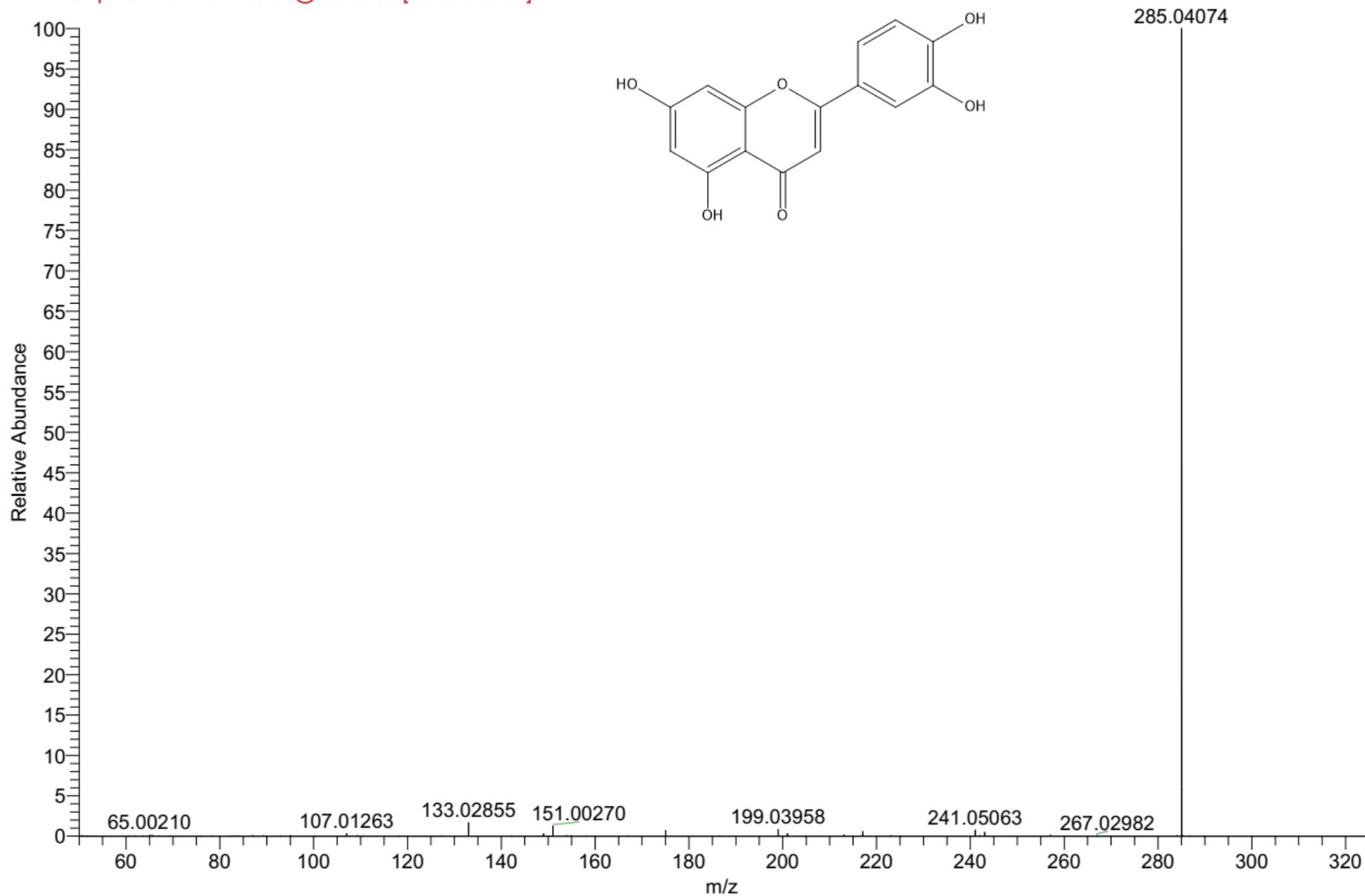


Figura 117. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor m/z 285,04068 [M-H]<sup>-</sup> identificado como a luteolina.

F: FTMS - p ESI Full ms2 287.06@hcd35.00 [50.00-605.00]

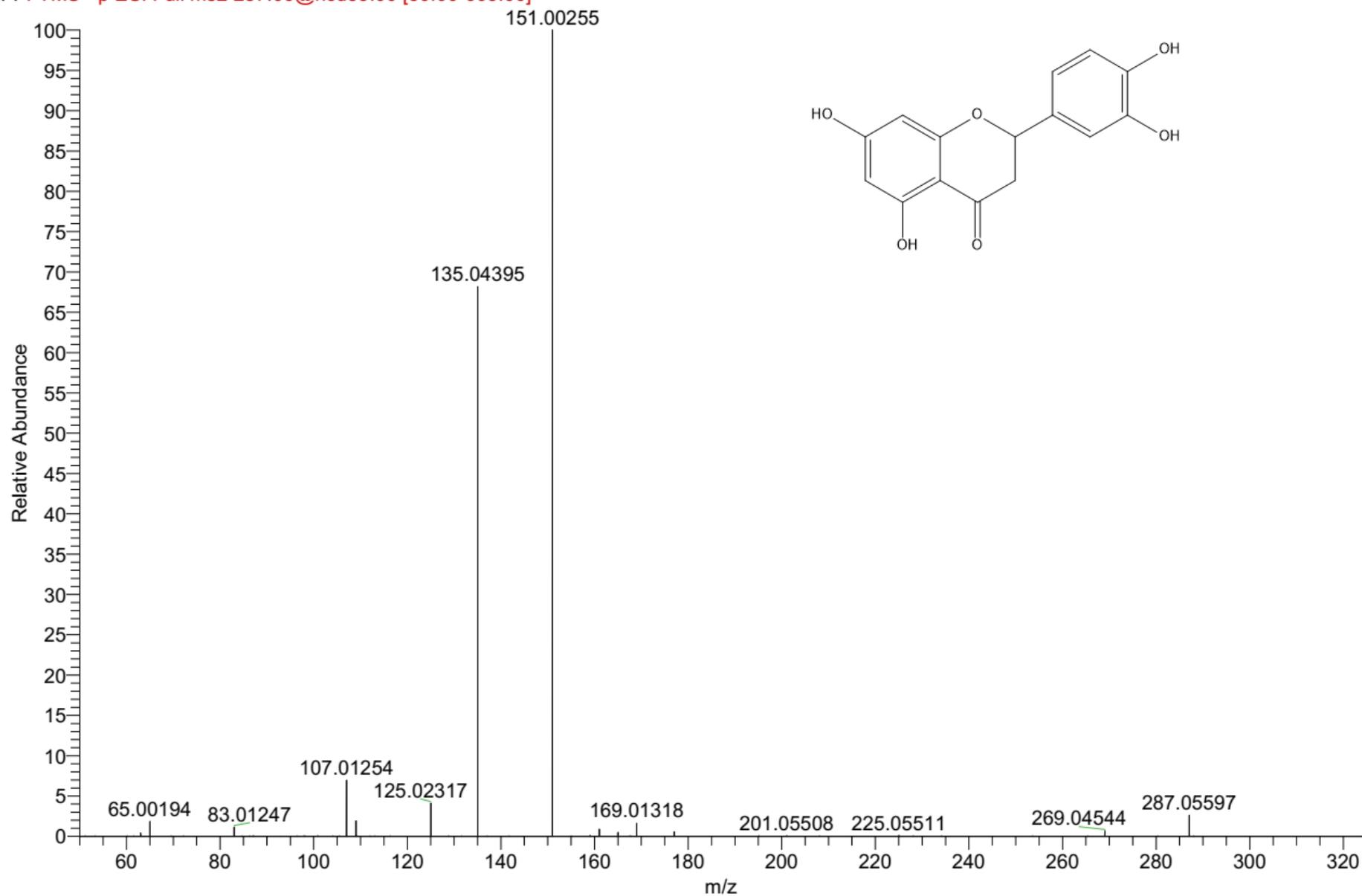


Figura 1158. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  287,05597 [M-H]<sup>-</sup> anotado como a eriodictiol.

F: FTMS - p ESI Full ms2 313.07@hcd35.00 [50.00-655.00]

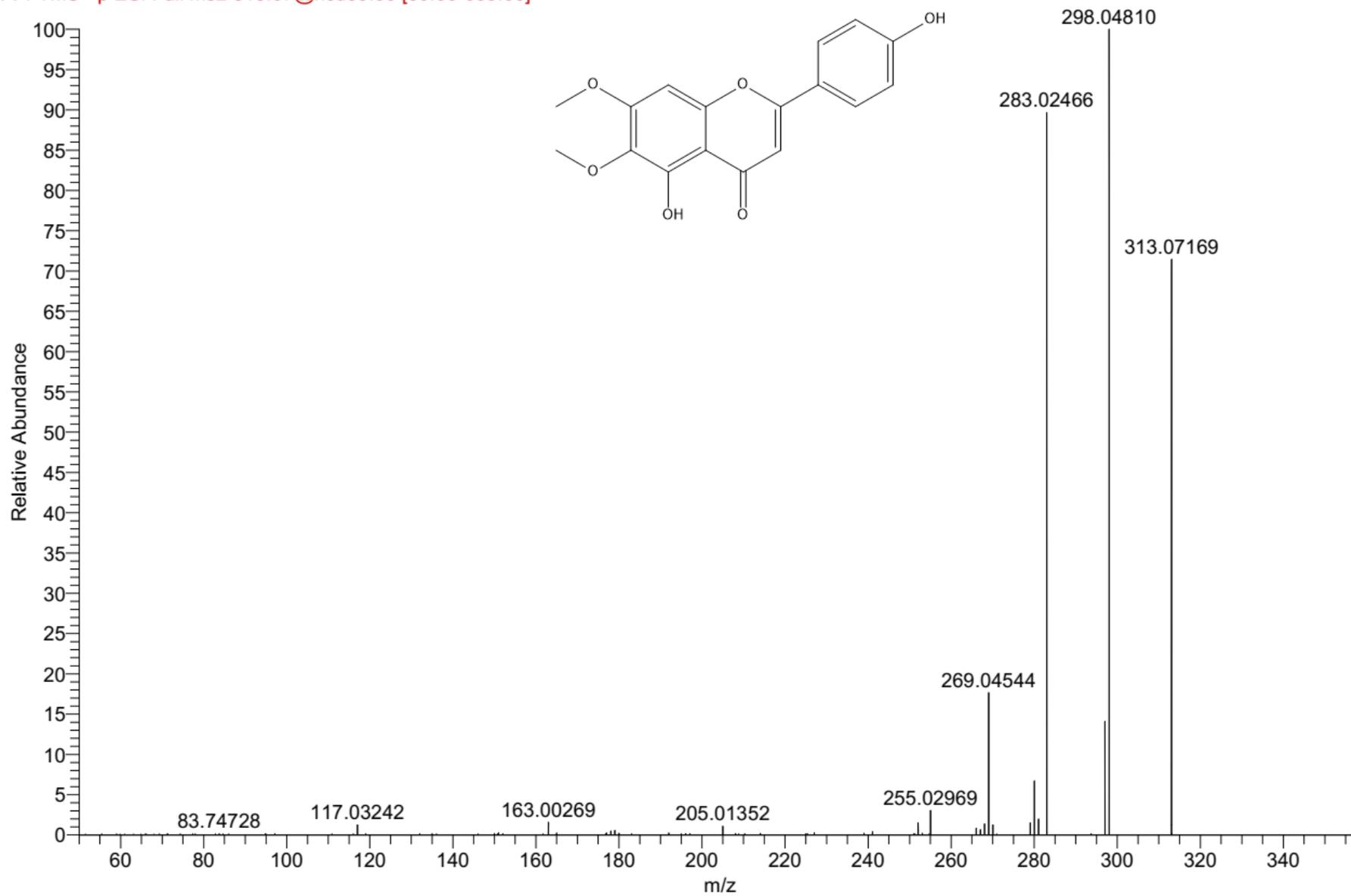


Figura 119. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  313,07169 [M-H]<sup>-</sup> em 7,81 min anotado como a cirsimarina ou isômeros.

F: FTMS - p ESI Full ms2 313.07@hcd35.00 [50.00-655.00]

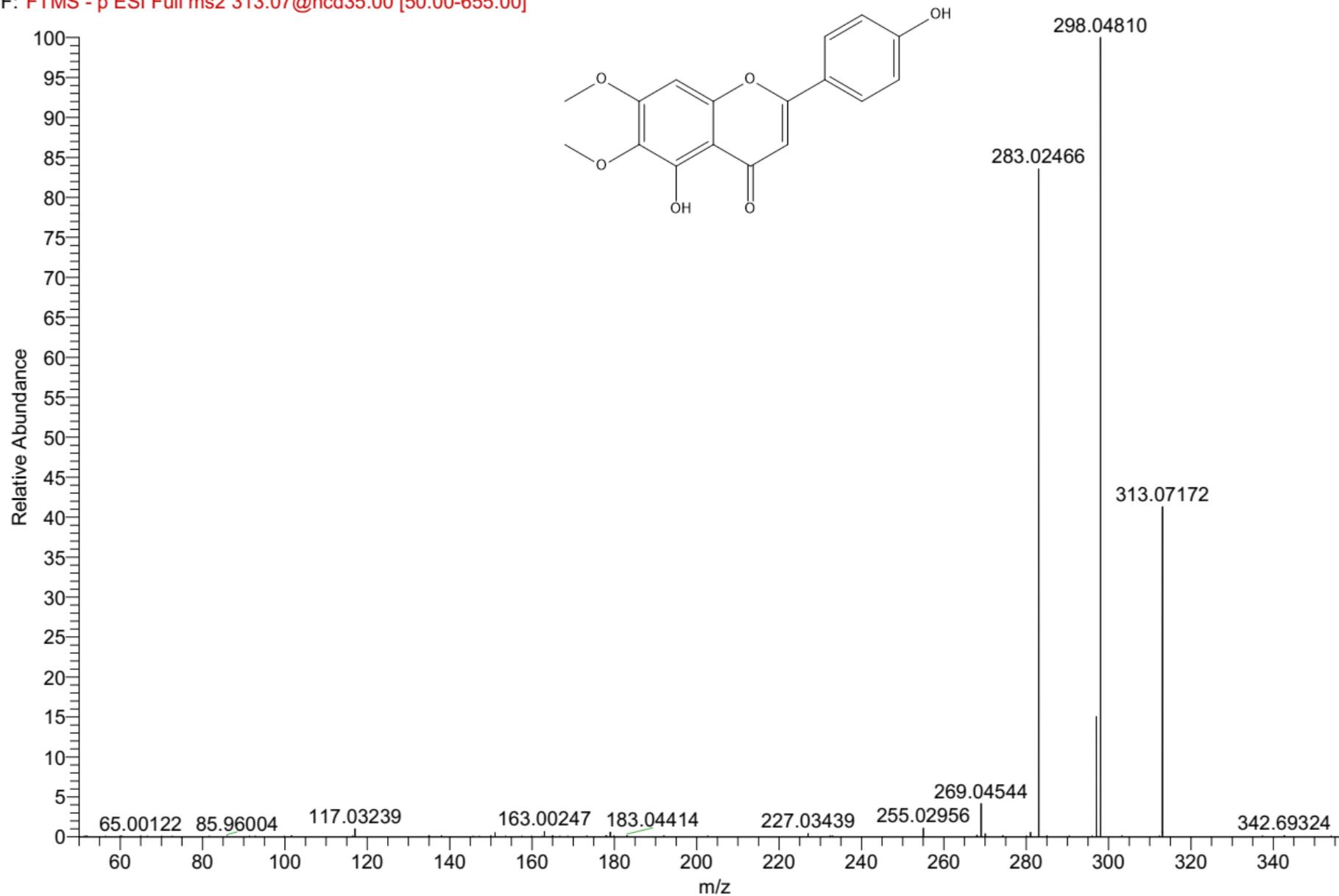


Figura 120. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  313,07172  $[M-H]^-$  em 11,99 min anotado como a cirsimarina ou isômeros.

F: FTMS - p ESI Full ms2 313.07@hcd35.00 [50.00-655.00]

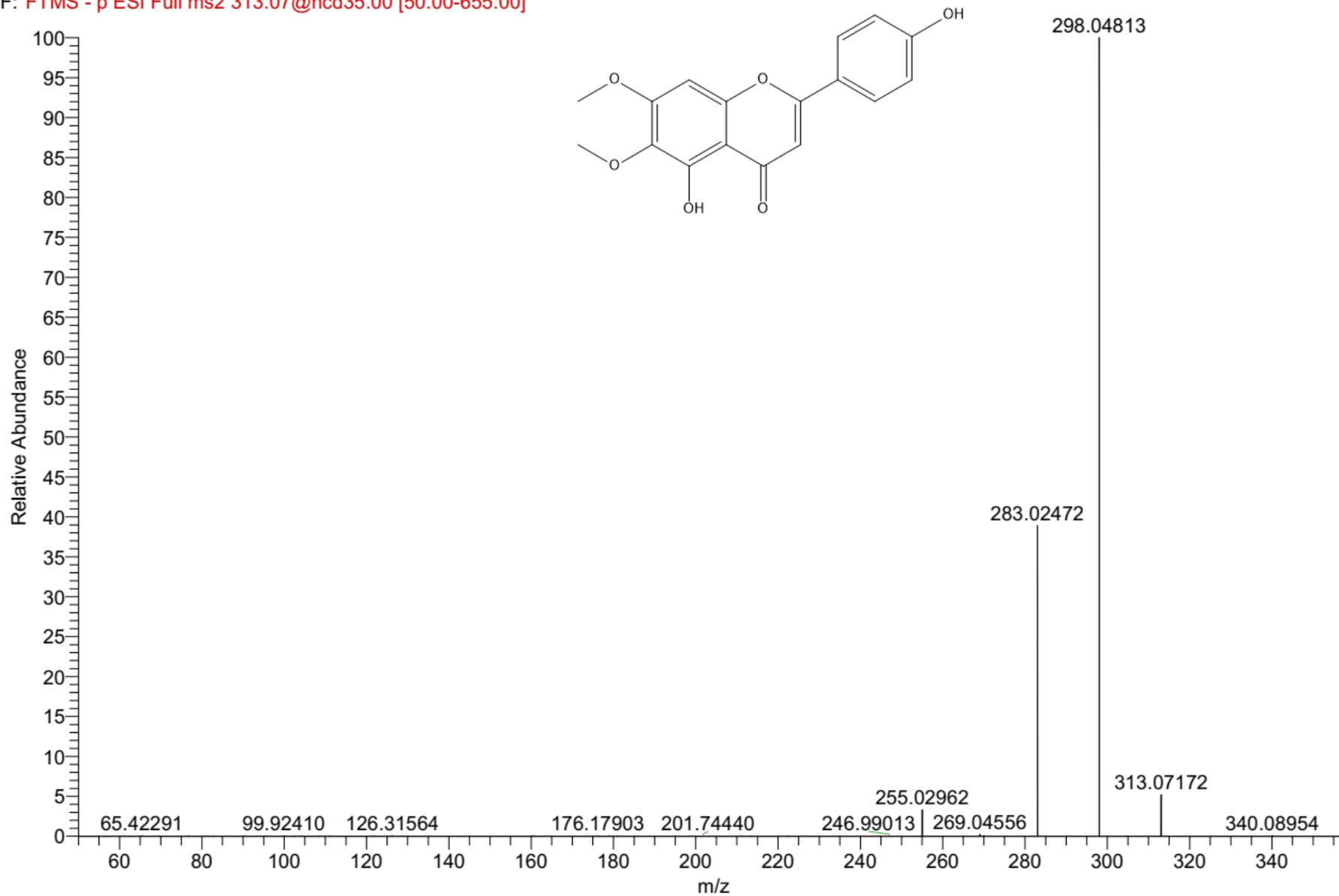


Figura 122. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  313,07172 [M-H]<sup>-</sup> em 16,05 min anotado como a cirsimarina ou isômeros.

F: FTMS - p ESI Full ms2 323.26@hcd70.00 [50.00-675.00]

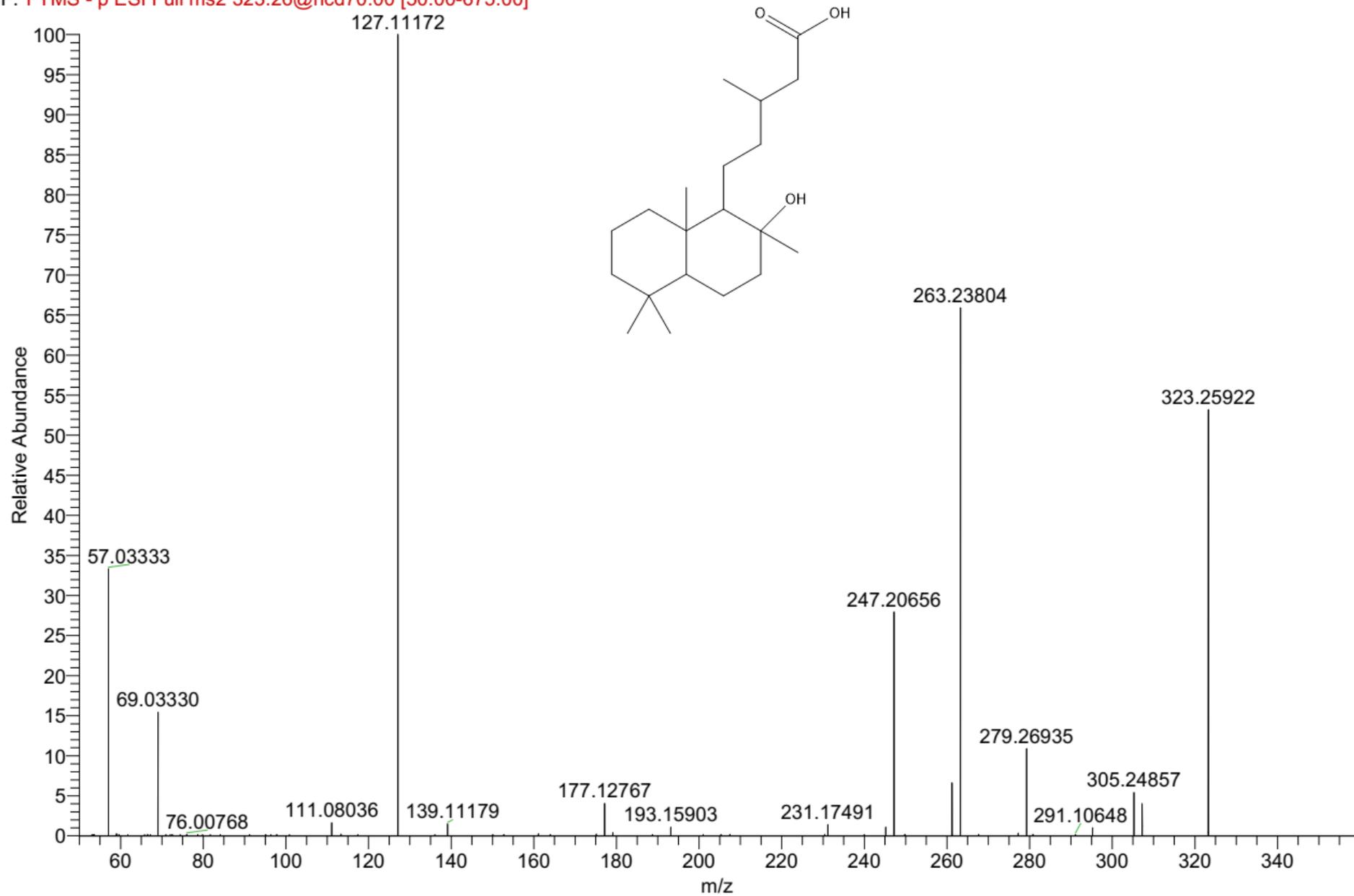


Figura 123. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  323,25922 [M-H]<sup>-</sup> identificado como o ácido 8-hidroxilabdan-15-óico.

F: FTMS - p ESI Full ms2 329.07@hcd35.00 [50.00-690.00]

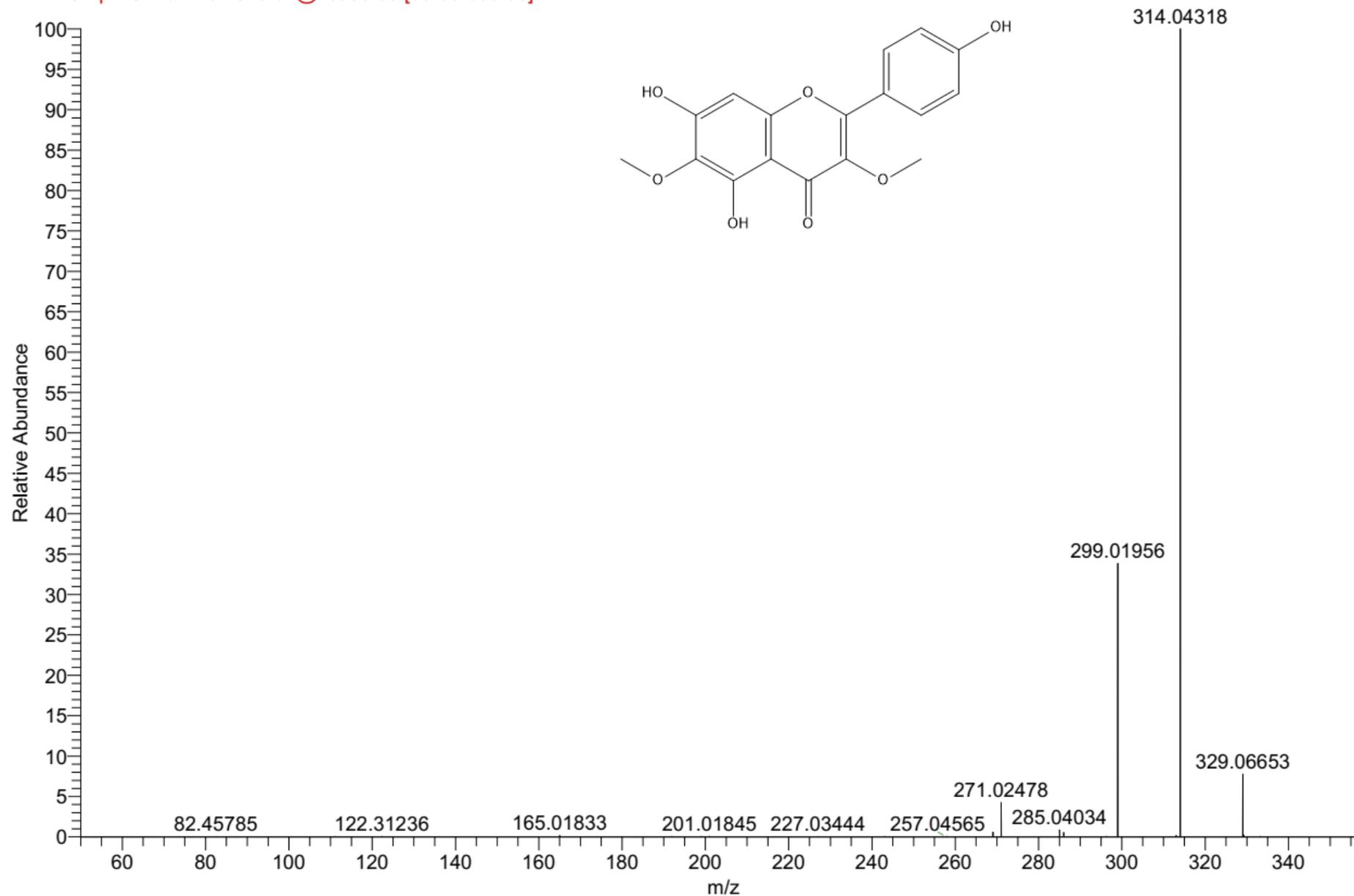


Figura 124. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  329,06653  $[M-H]^-$  em 13,61 min anotado como a 4',5,7-trihidroxi-3,6-dimetóxi-flavona.

F: FTMS - p ESI Full ms2 343.08@hcd35.00 [50.00-720.00]

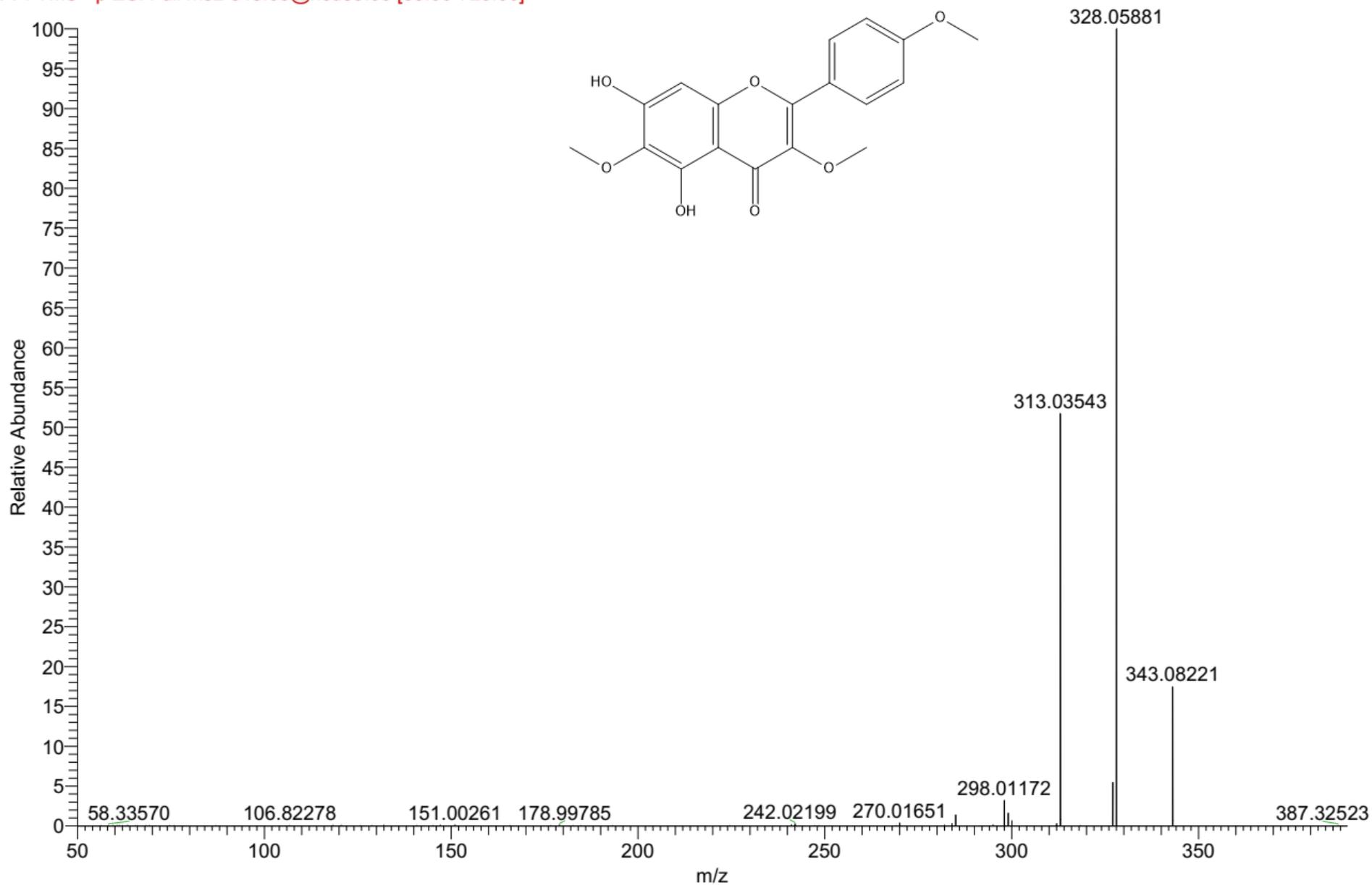


Figura 125. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  343,08221  $[M-H]^-$  em 11,84 min anotado 5,7-dihidroxi-3,6,4'-trimetóxi-flavona.

F: FTMS - p ESI Full ms2 343.08@hcd35.00 [50.00-720.00]

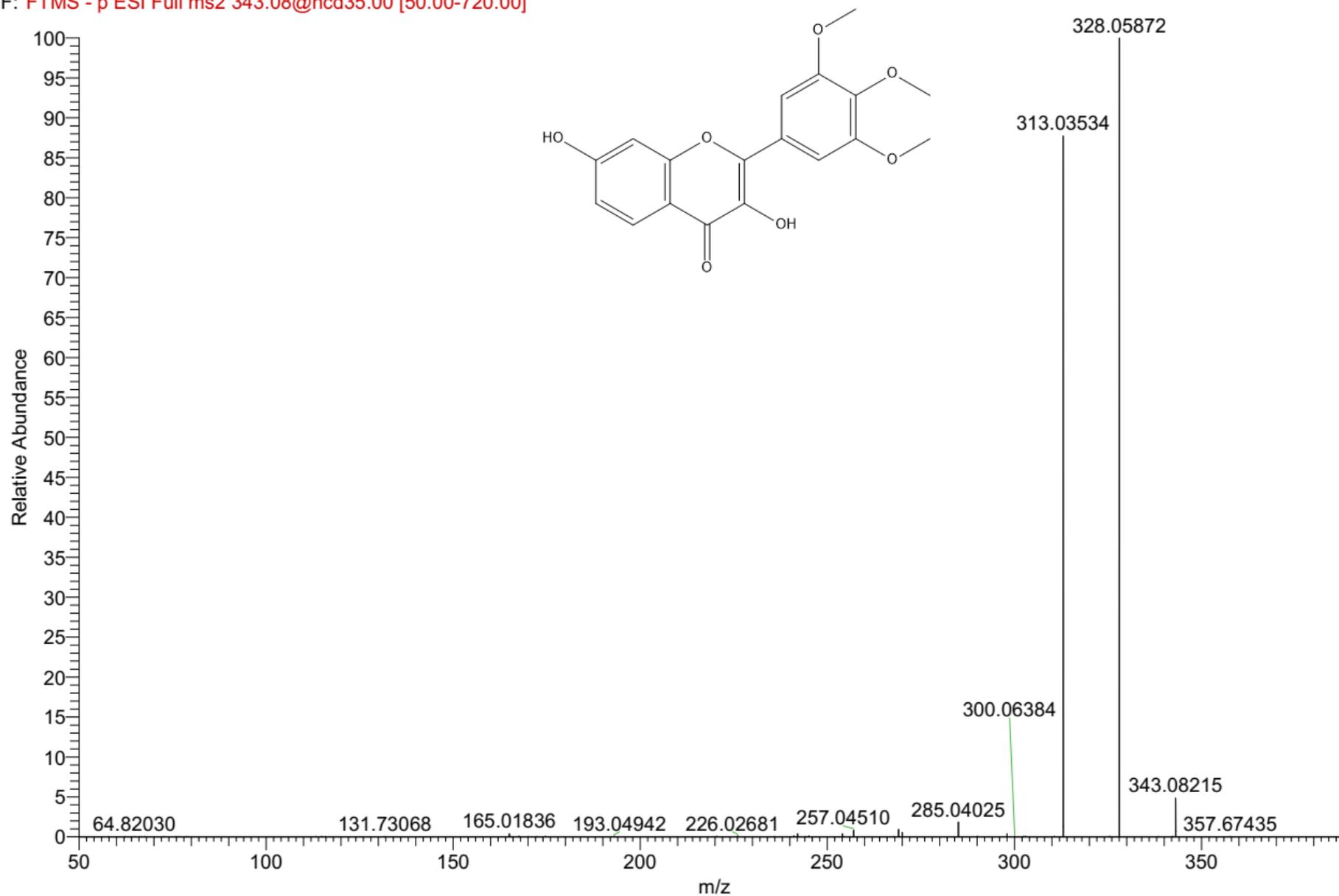


Figura 126. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  343,08221  $[M-H]^-$  em 15,88 min anotado como robinetina trimetil éter.

F: FTMS - p ESI Full ms2 345.06@hcd35.00 [50.00-720.00]

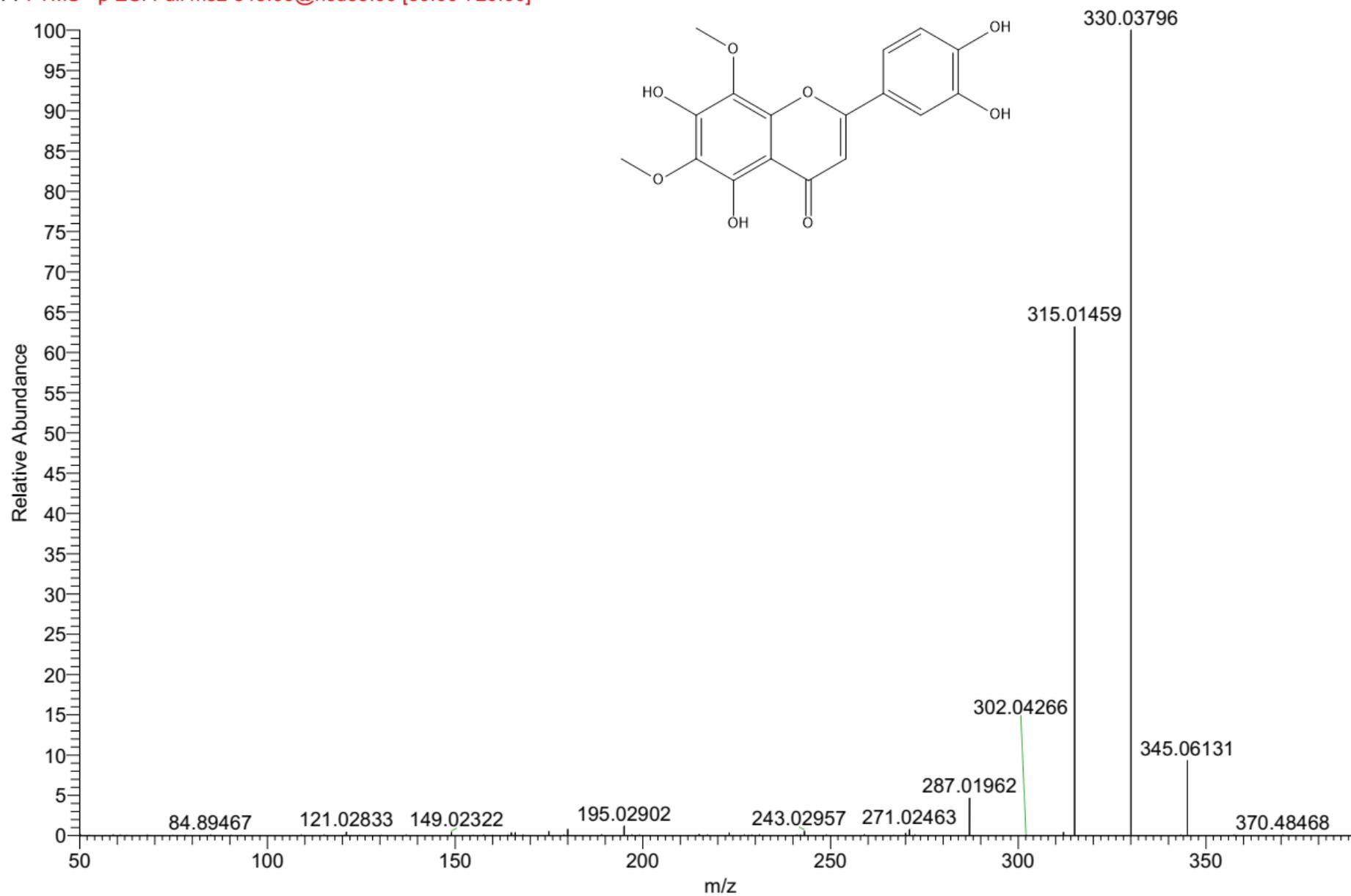


Figura 127. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  345,06131  $[M-H]^-$  em 9,08 min anotado como 3',4',5,7-tetrahydroxi-6,8-dimetóxi-flavona ou isômeros.

F: FTMS - p ESI Full ms2 345.06@hcd35.00 [50.00-720.00]

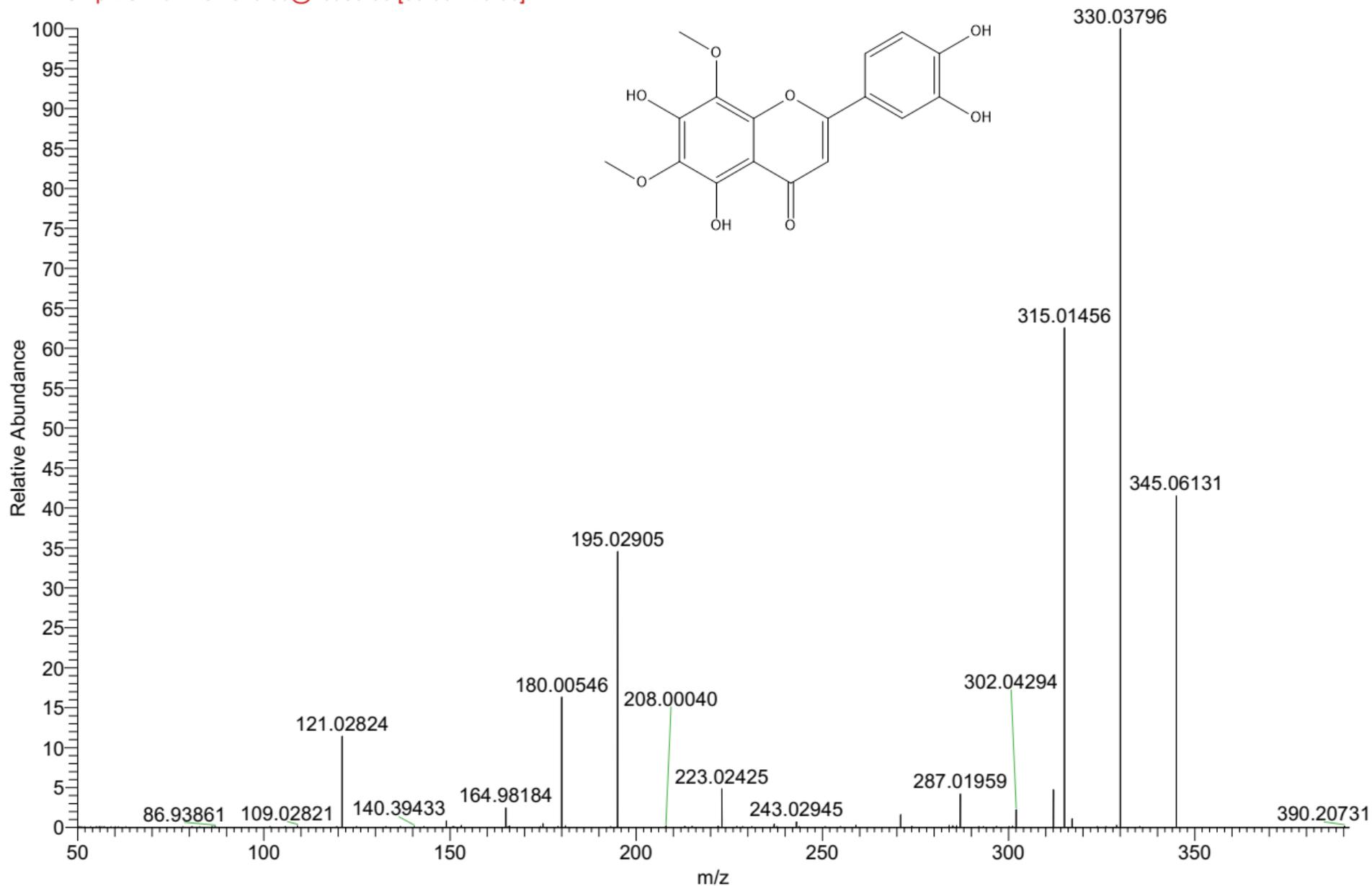


Figura 128. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  345,06131  $[M-H]^-$  em 9,32 min anotado como 3',4',5,7-tetrahydroxi-6,8-dimetóxi-flavona ou isômeros.

F: FTMS - p ESI Full ms2 357.1000@hcd35.00 [50.0000-745.0000]

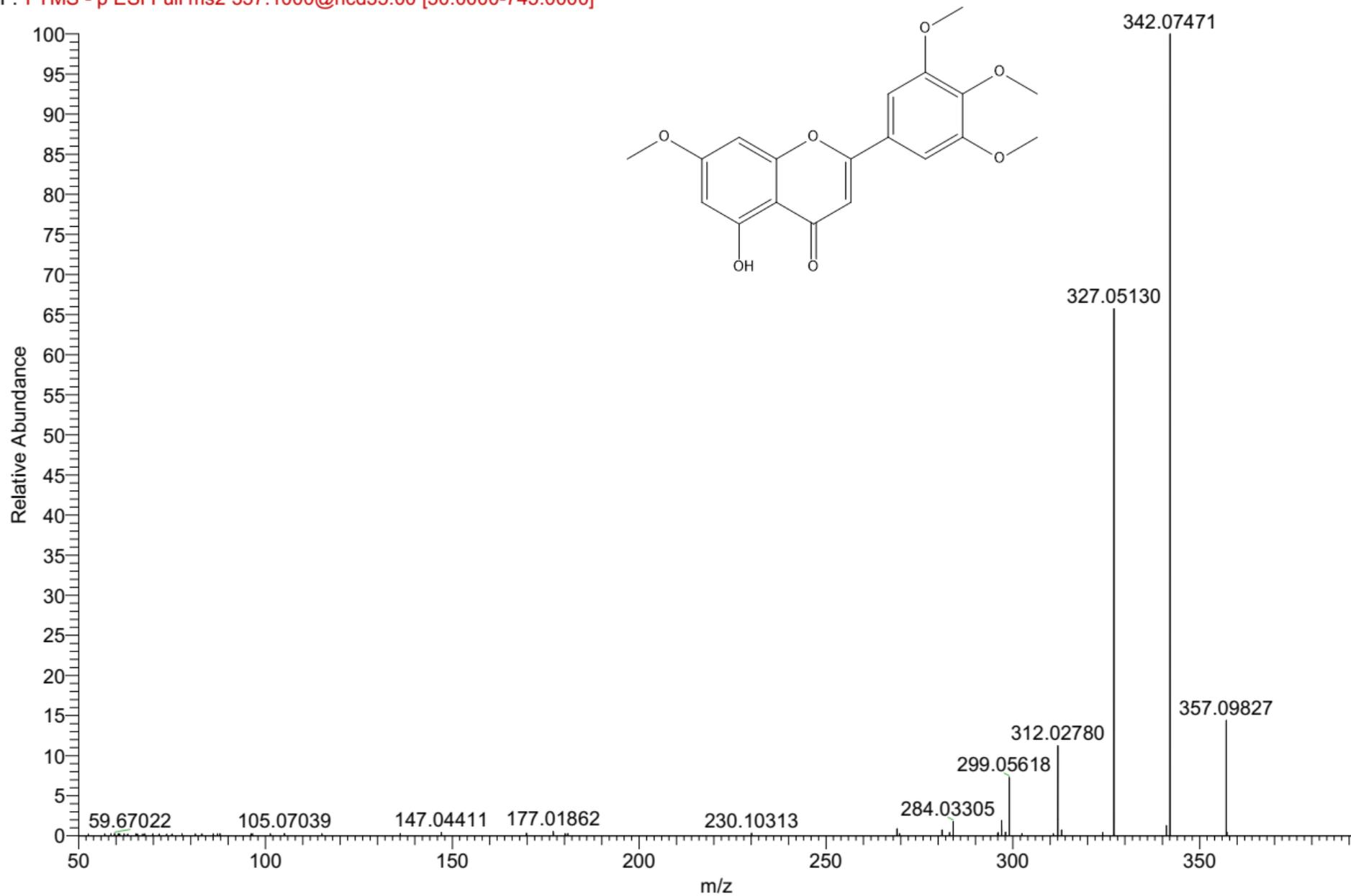


Figura 129. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  357,09827  $[M-H]^-$  em 7,81 min anotado como corimbosina.

F: FTMS - p ESI Full ms2 359.08@hcd35.00 [50.00-750.00]

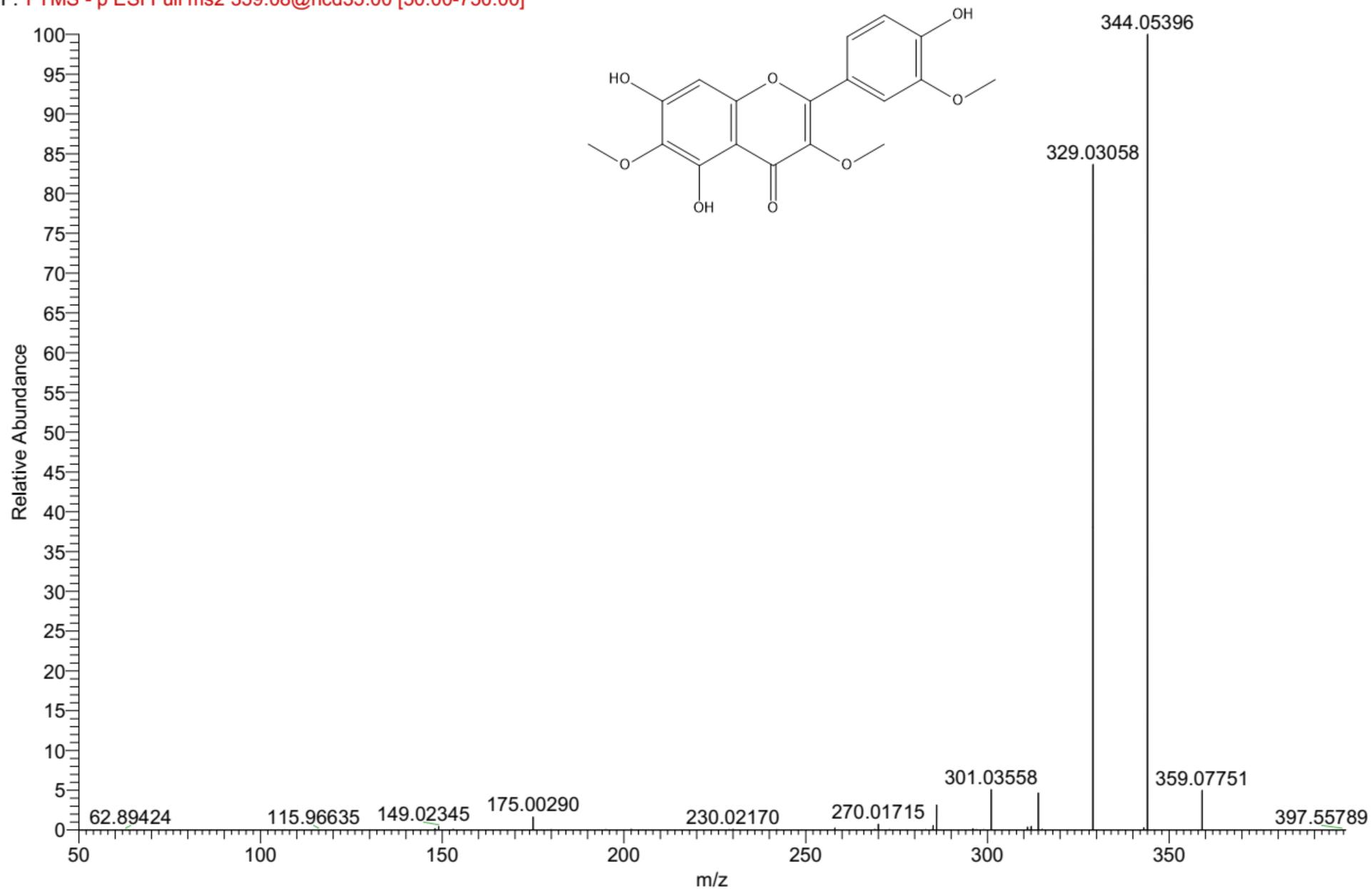


Figura 130. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  359,07751 [M-H]<sup>-</sup> em 10,27 min anotado como jaceidina.

F: FTMS - p ESI Full ms2 373.09@hcd35.00 [50.00-780.00]

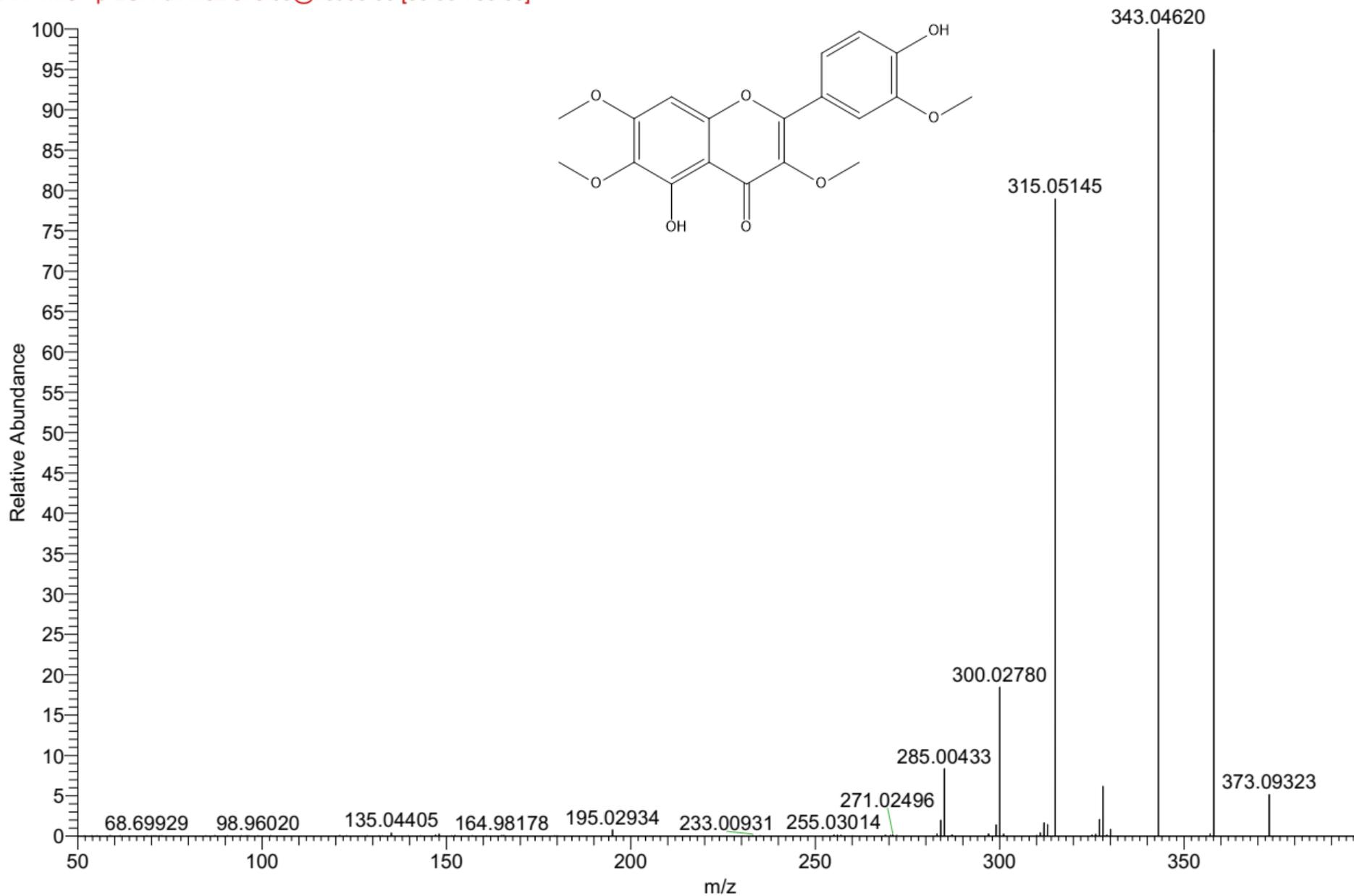


Figura 131. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  373,09323  $[M-H]^-$  em 8,56 min anotado como crisopenetina ou isômeros.

F: FTMS - p ESI Full ms2 373.09@hcd35.00 [50.00-780.00]

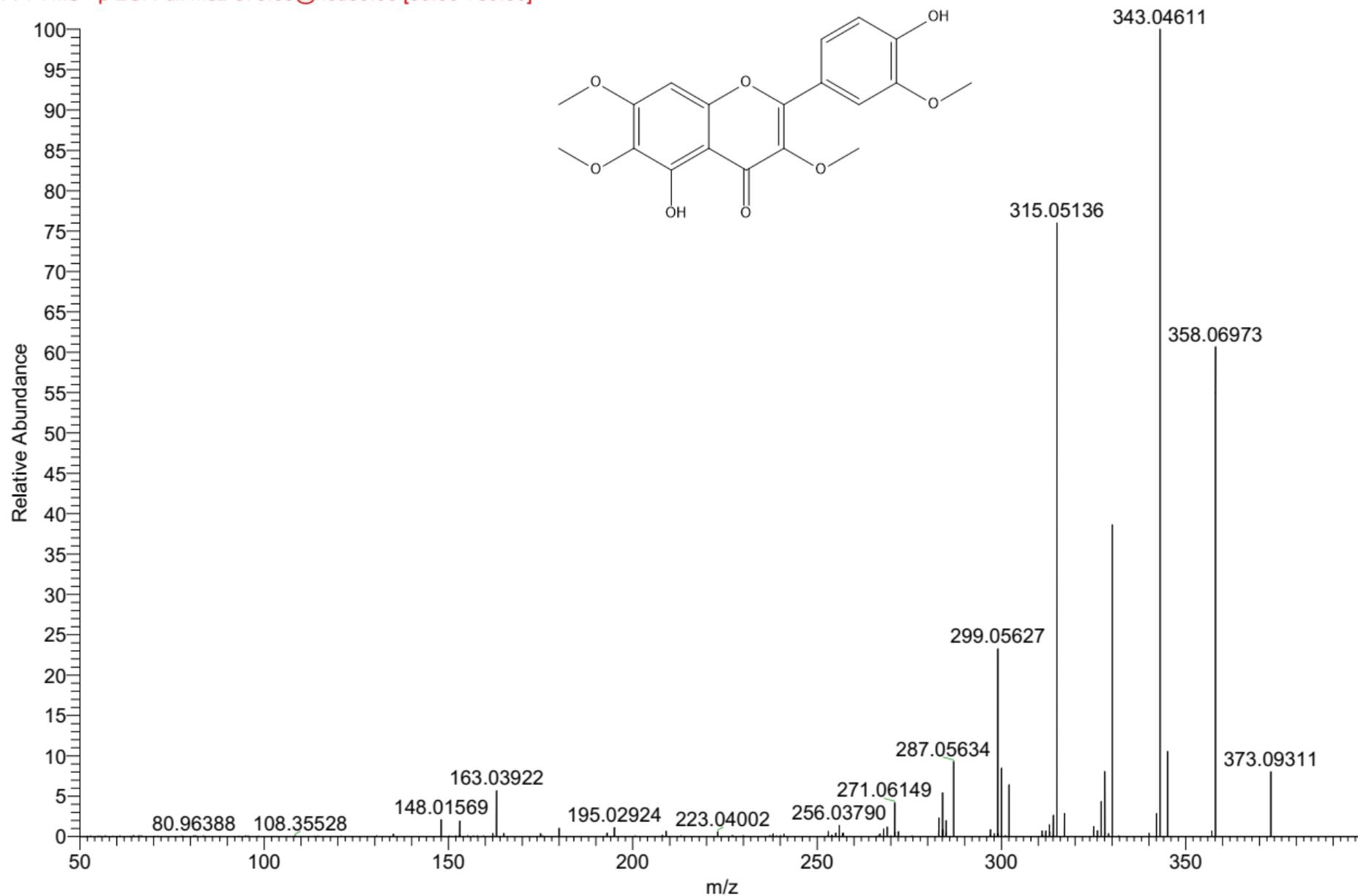


Figura 132. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  373.09311  $[M-H]^-$  em 10,81 min anotado como crisoplenetina ou isômeros.

F: FTMS - p ESI Full ms2 373.09@hcd35.00 [50.00-780.00]

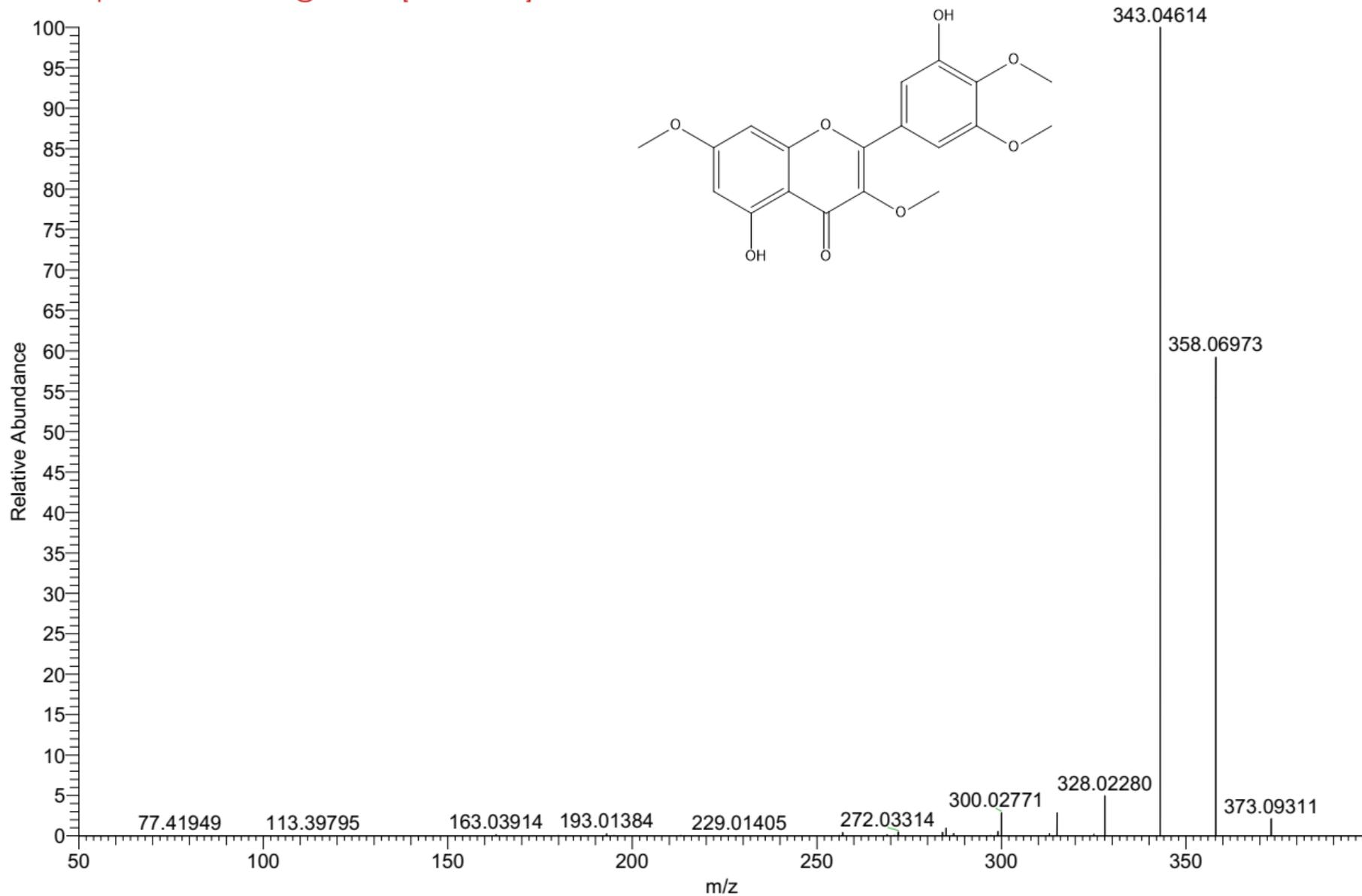


Figura 133. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  373.09311 [M-H]<sup>-</sup> em 12,35 min anotado como miricetina 3,7,3',4'-tetrametil éter.

F: FTMS - p ESI Full ms2 593.1500@hcd30.00 [50.0000-1230.0000]

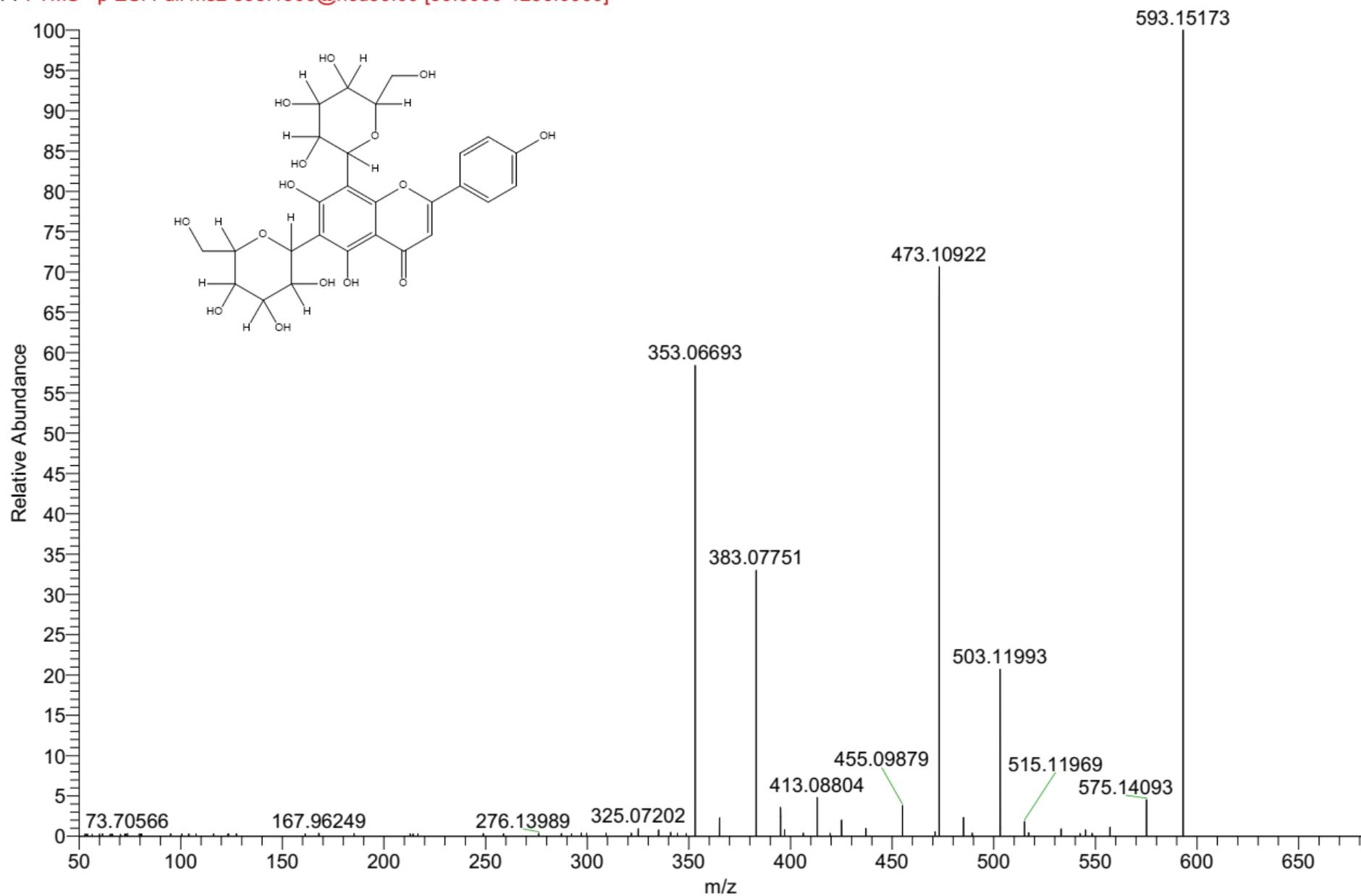


Figura 134. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  593,15173  $[M-H]^-$  anotado como vicentina-2.

F: FTMS + p ESI d Full ms2 343.1176@hcd35.00 [50.0000-370.0000]

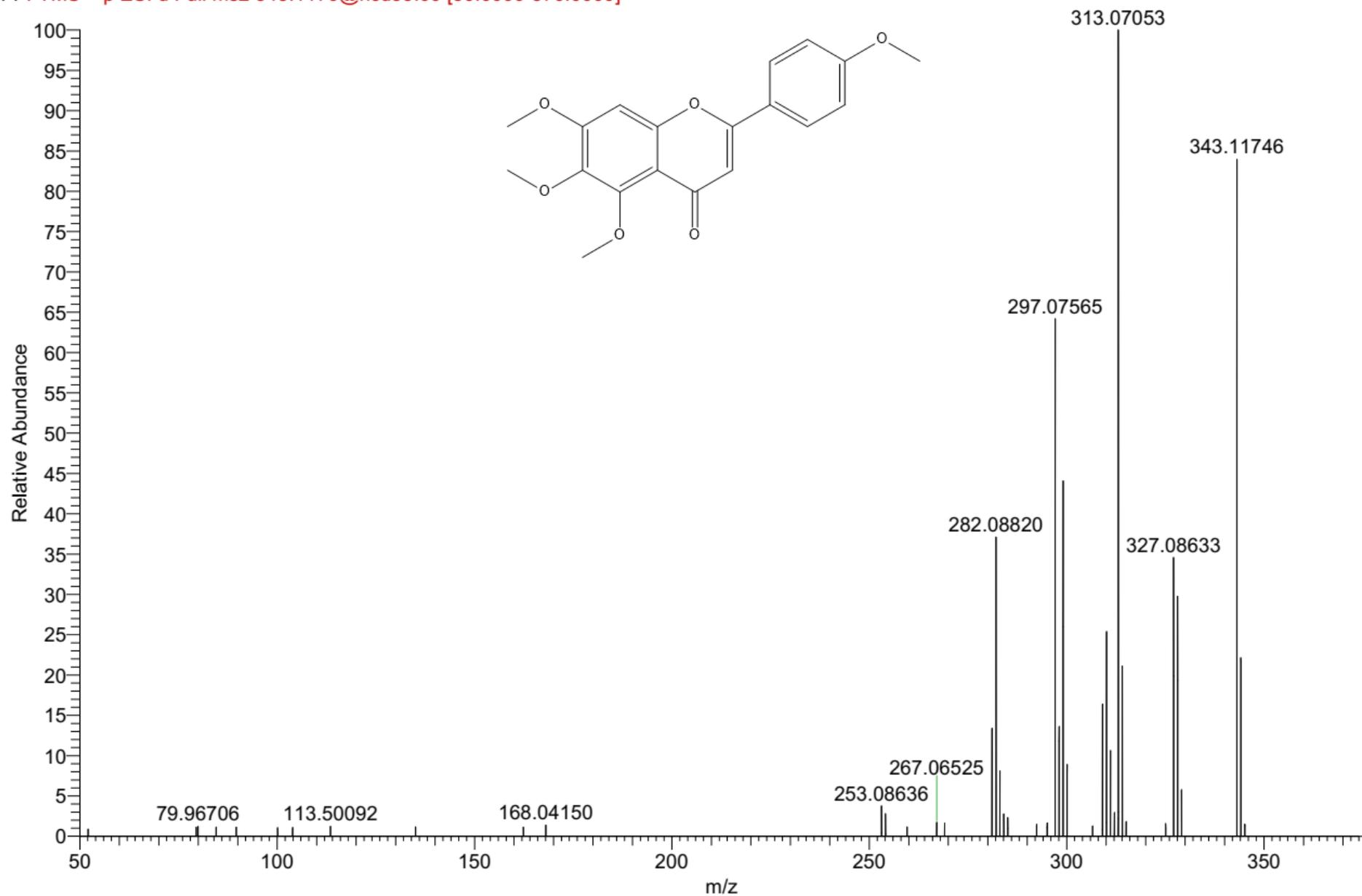


Figura 135. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  343,11746  $[M+H]^+$  anotado como 4',5,6,7-tetrametóxi-flavona.

F: FTMS + p ESI d Full ms2 373.1278@hcd35.00 [50.0000-400.0000]

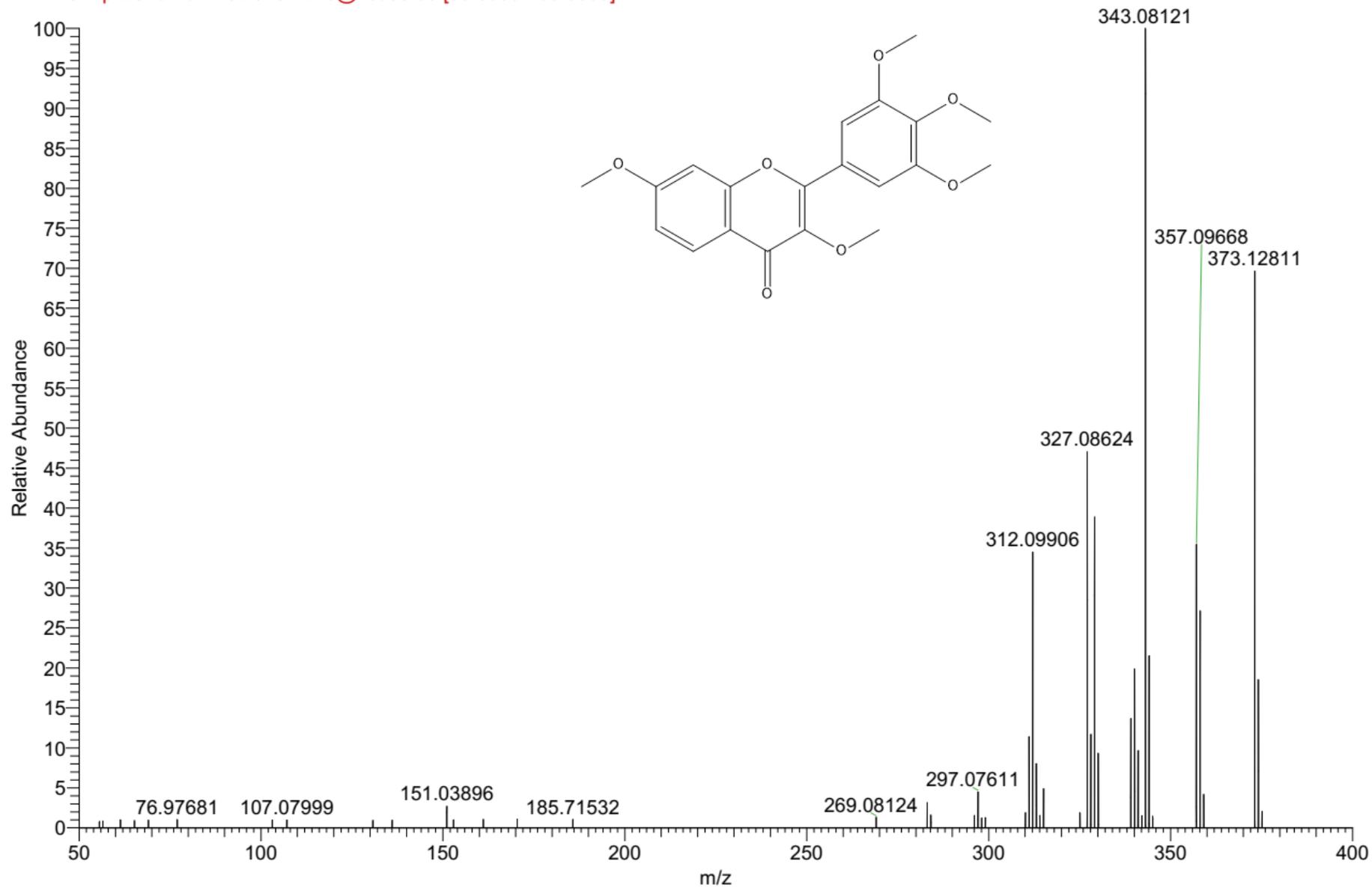


Figura 136. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  373,12811  $[M+H]^+$  anotado como 3,7,3',4',5'-pentametóxi flavona.

F: FTMS + p ESI d Full ms2 403.1383@hcd35.00 [50.0000-430.0000]

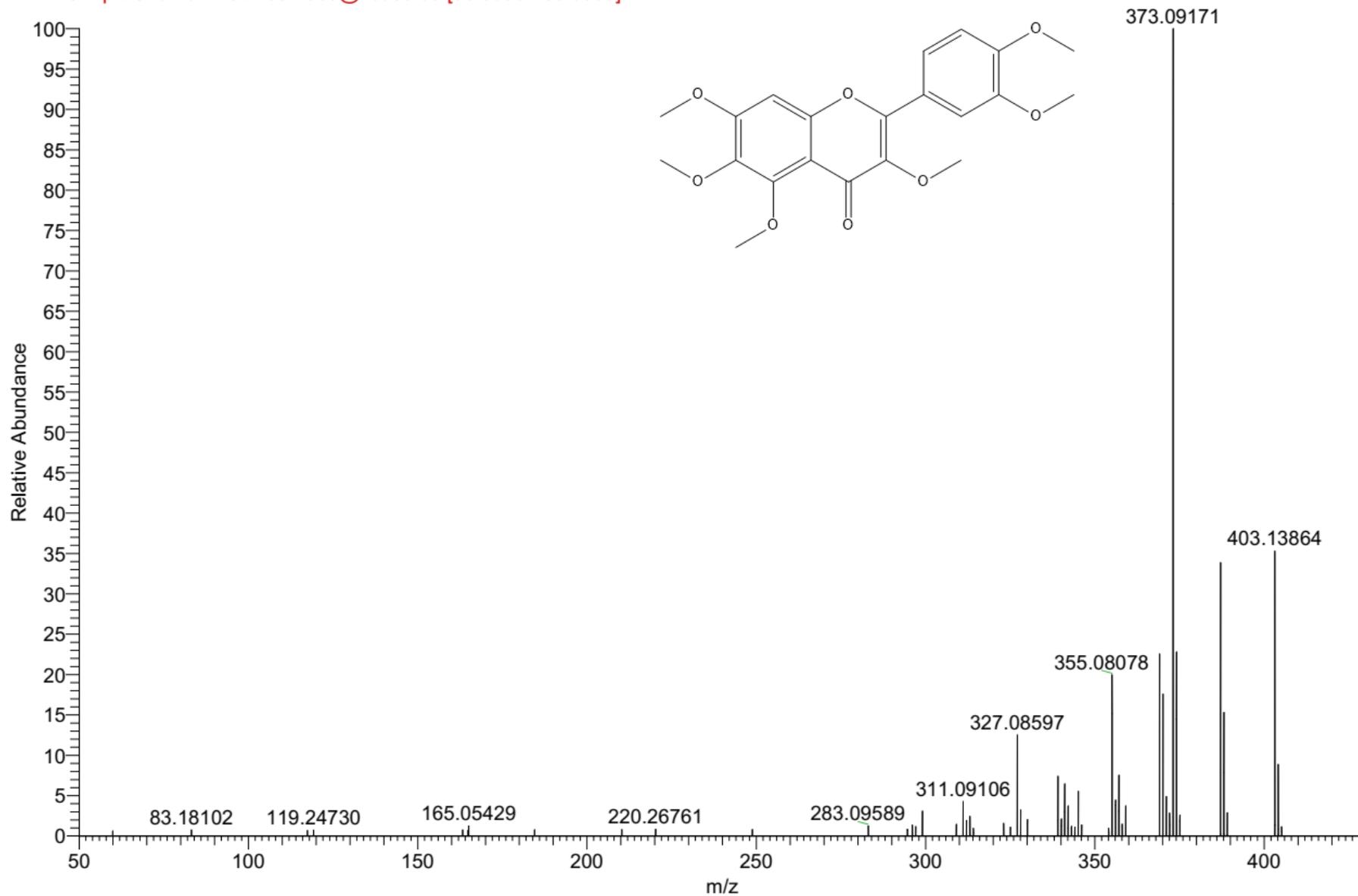


Figura 137. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  403,13864  $[M+H]^+$  anotado como quercetagina hexametil éter.

F: FTMS + p ESI d Full ms2 293.2837@hcd35.00 [50.0000-320.0000]

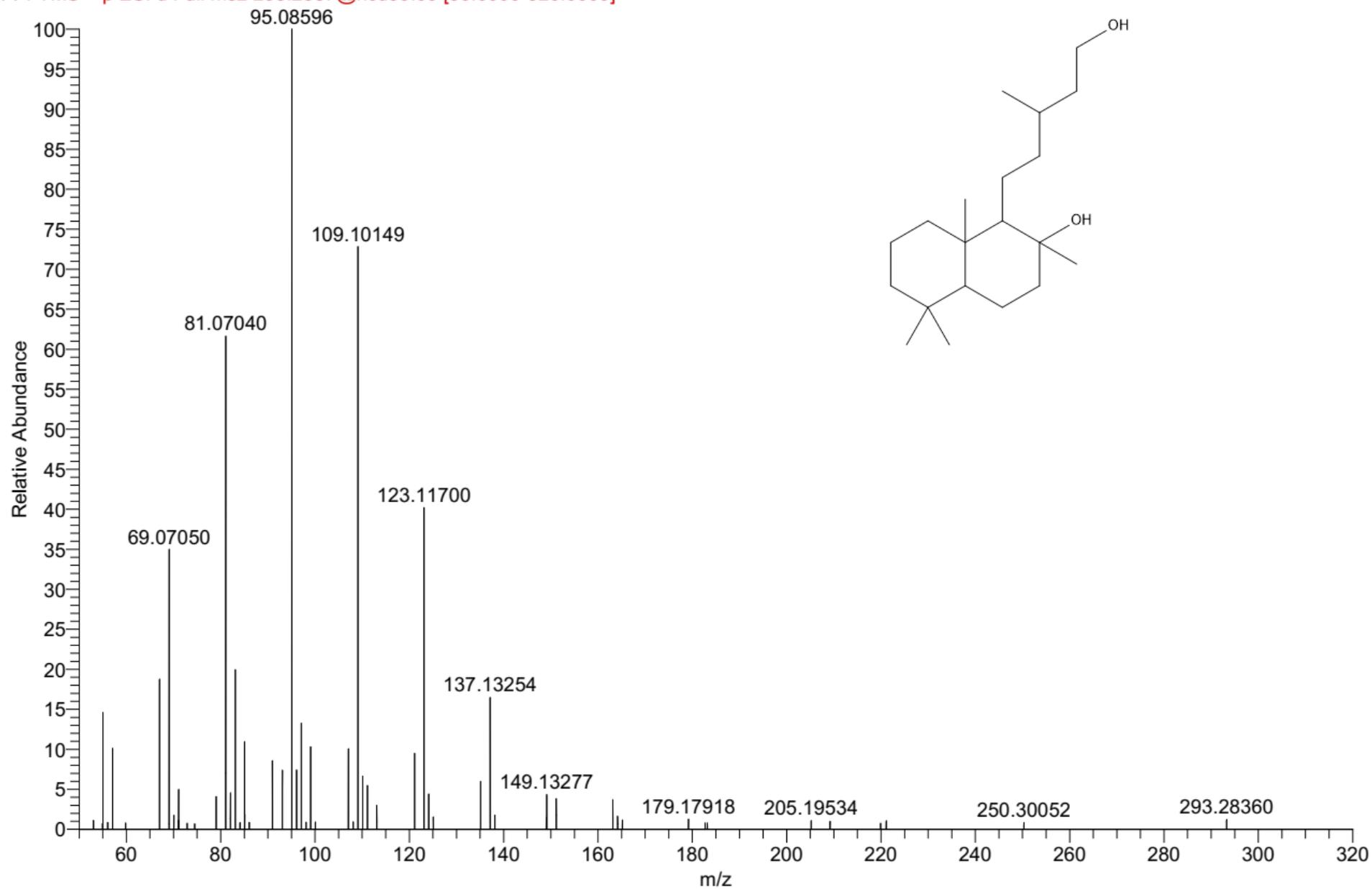


Figura 138. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  293,28360  $[M-H_2O+H]^+$  identificado como labdan-8,15-diol.

F: FTMS + p ESI d Full ms2 335.2821@hcd35.00 [50.0000-360.0000]

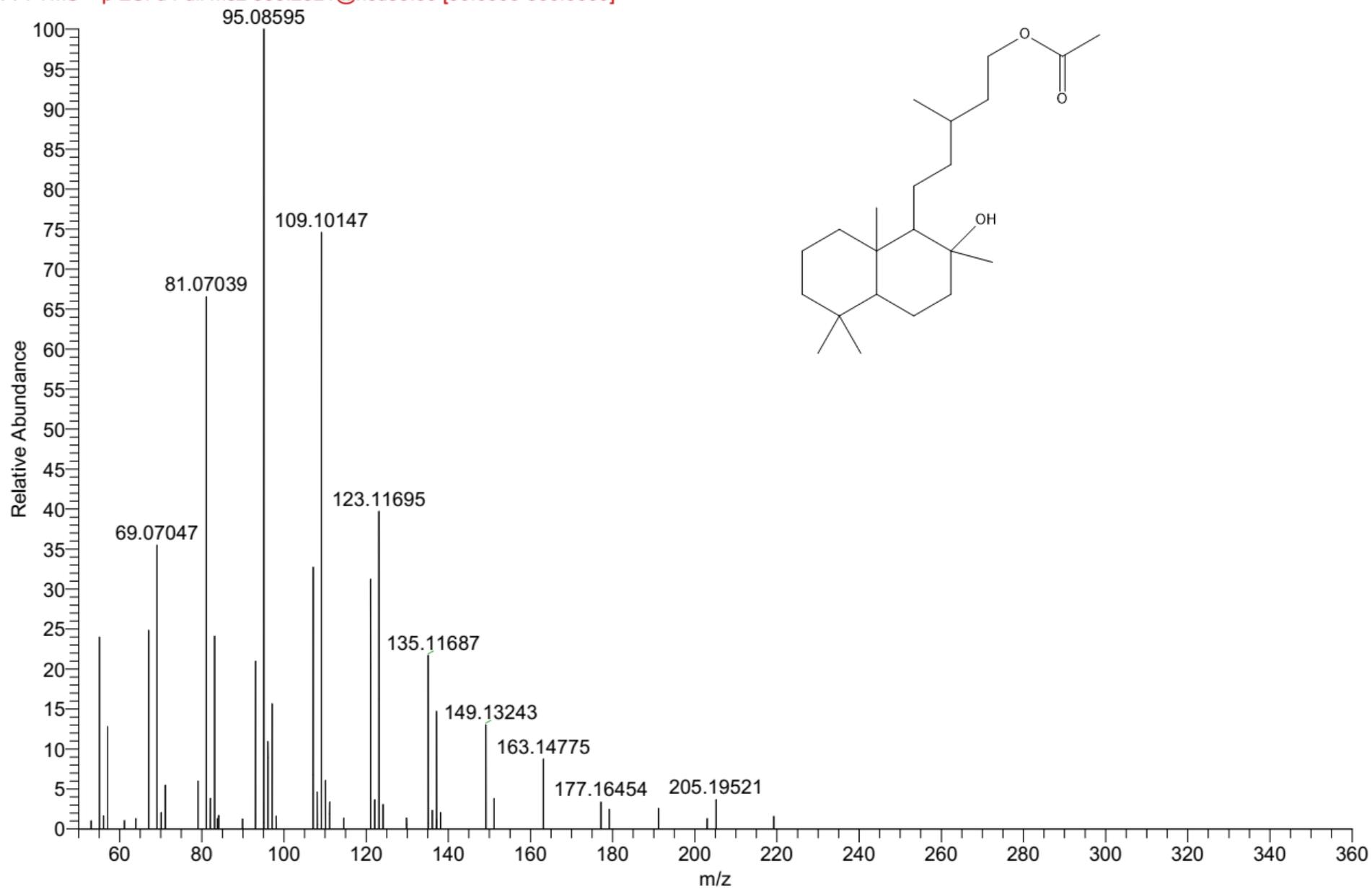


Figura 139. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  335.29413  $[M-H_2O+H]^+$  identificado como acetato labdan-8-ol-15-il.

F: FTMS - p ESI Full ms2 317.07@hcd35.00 [50.00-665.00]

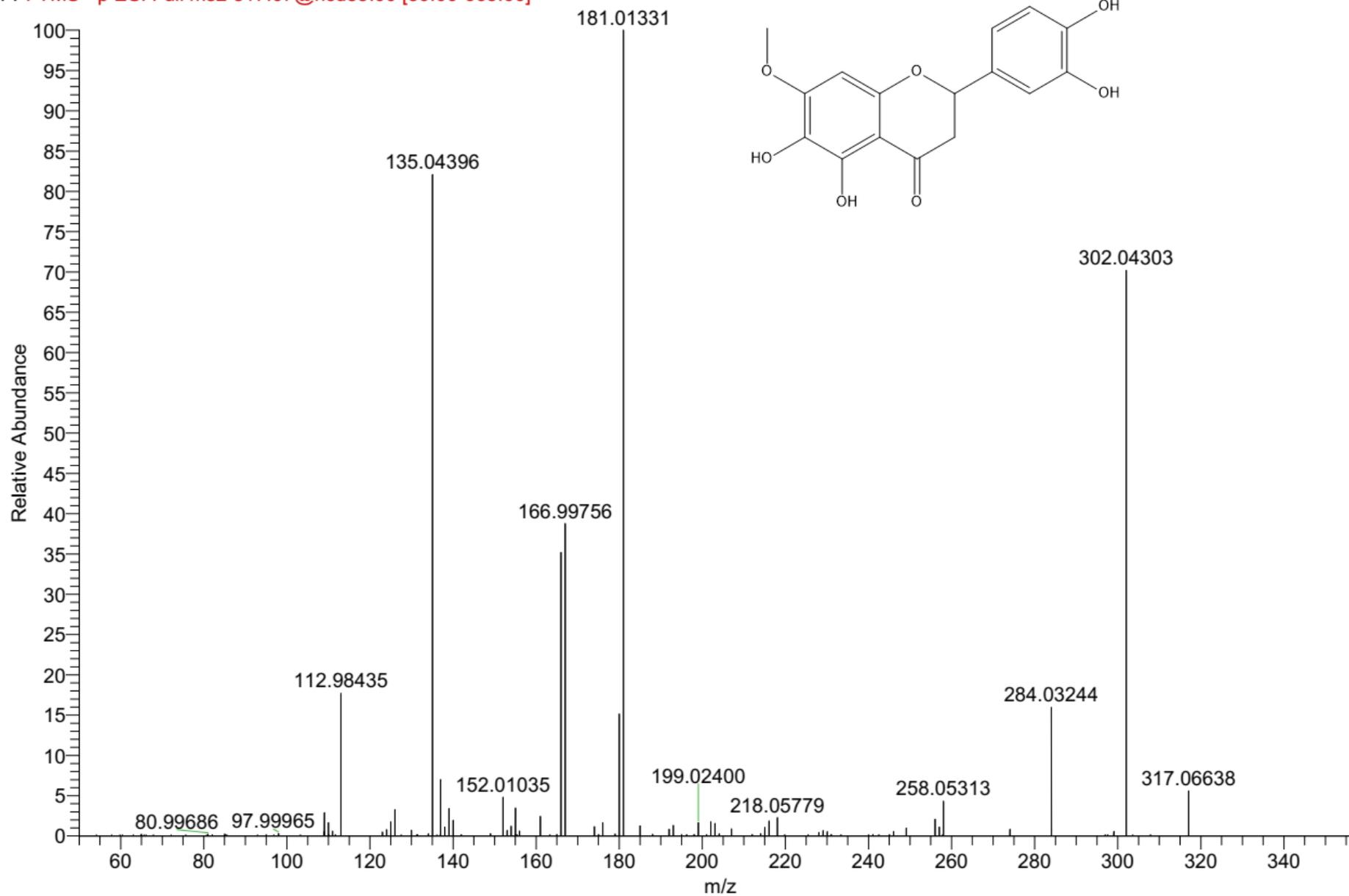


Figura 140. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  317,06638 [M-H]<sup>-</sup> anotado como uma flavanona metoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 327.08@hcd35.00 [50.00-685.00]

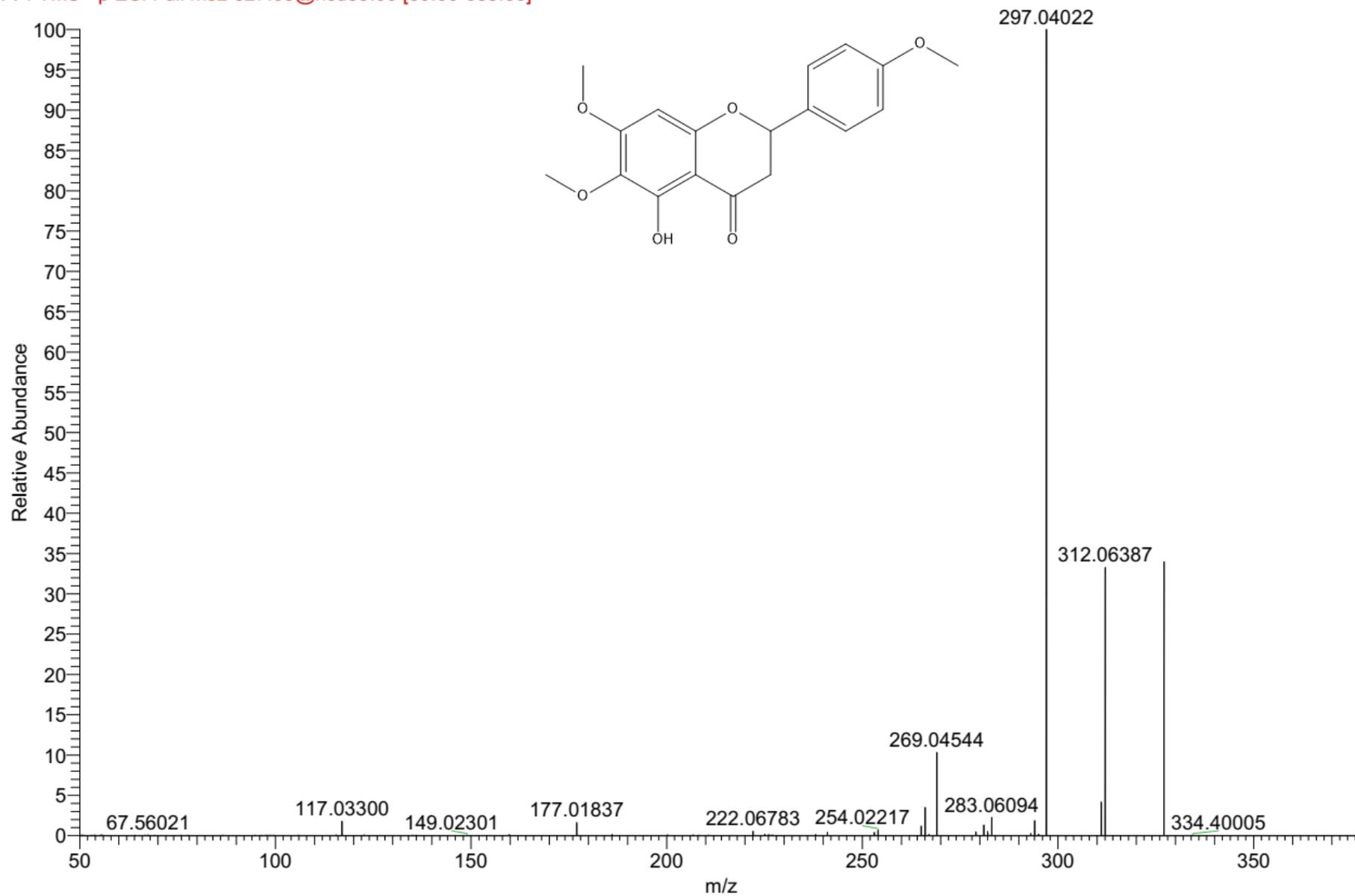


Figura 141. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  327,08725 [M-H]<sup>-</sup> anotado como uma flavona trimetoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 329.07@hcd35.00 [50.00-690.00]

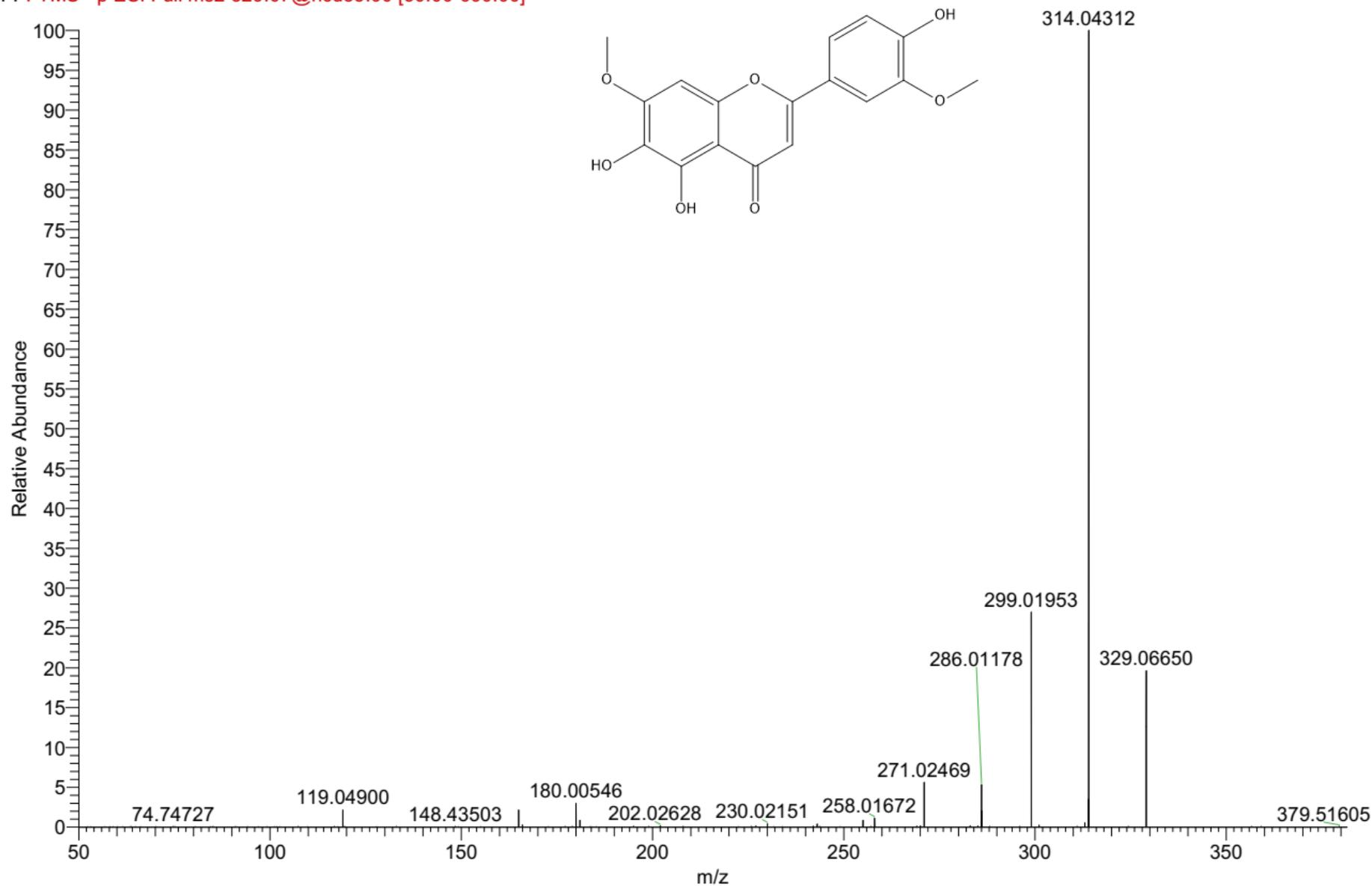


Figura 142. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  329,06650 [M-H]<sup>-</sup> em 8,36 min anotado como uma flavona dimetoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 329.07@hcd35.00 [50.00-690.00]

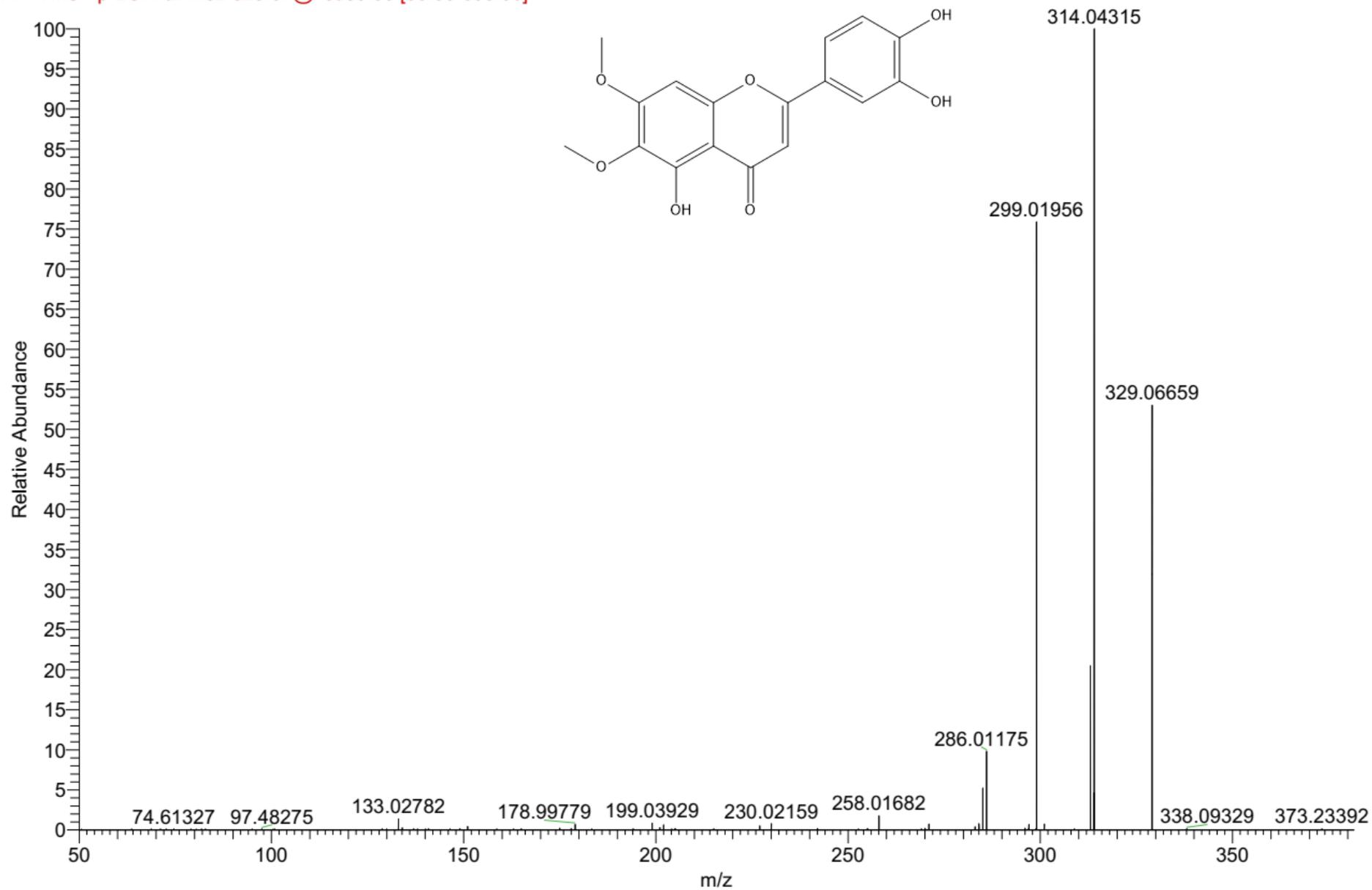


Figura 143. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  329,06659 [M-H]<sup>-</sup> em 10,10 min anotado como uma flavona dimetoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 329.07@hcd35.00 [50.00-690.00]

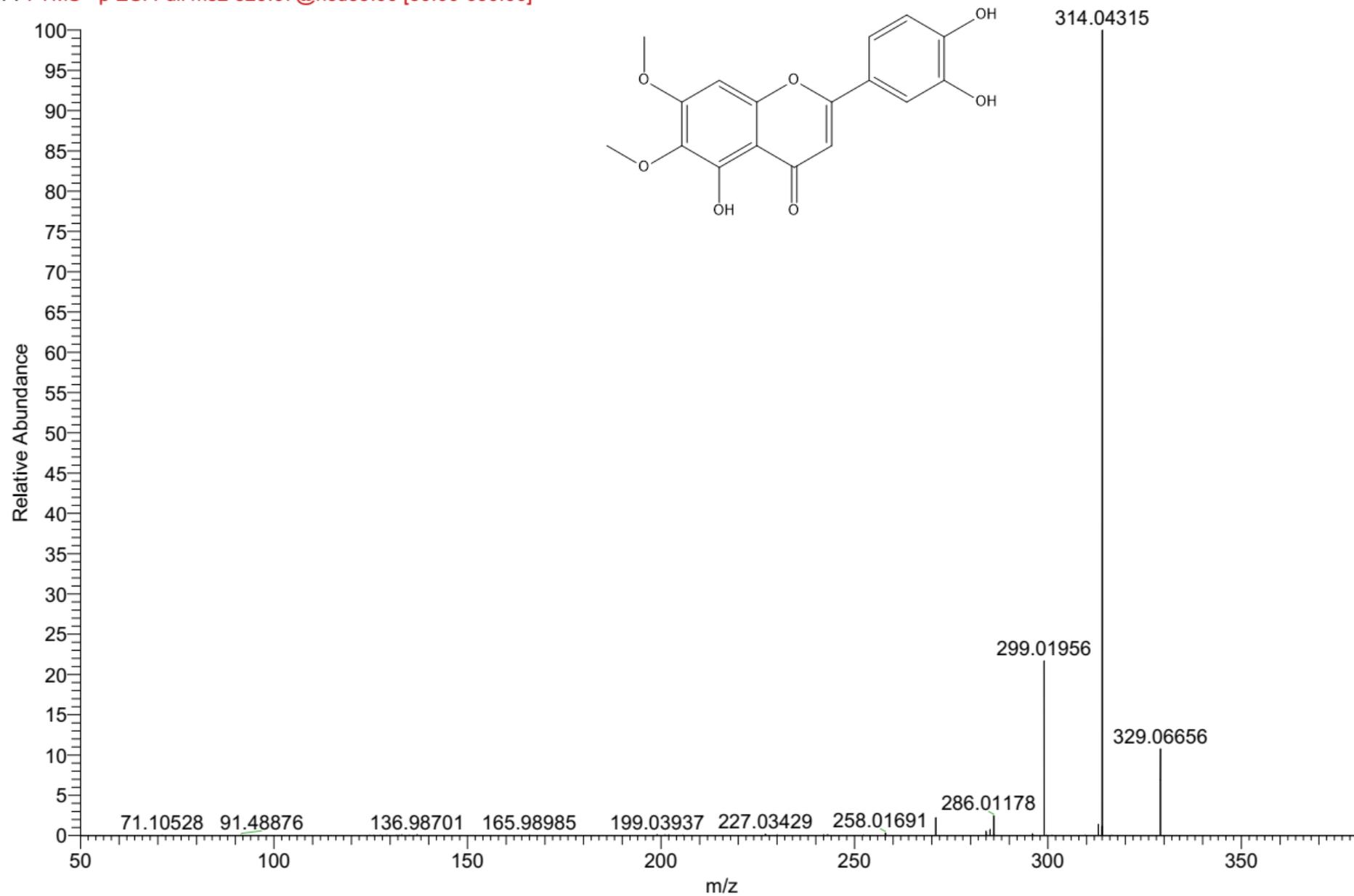


Figura 144. Espectro de fragmentação EM/EM do íon precursor  $m/z$  329,06656  $[M-H]^-$  em 10,68 min anotado como uma flavona dimetoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 331.05@hcd35.00 [50.00-695.00]

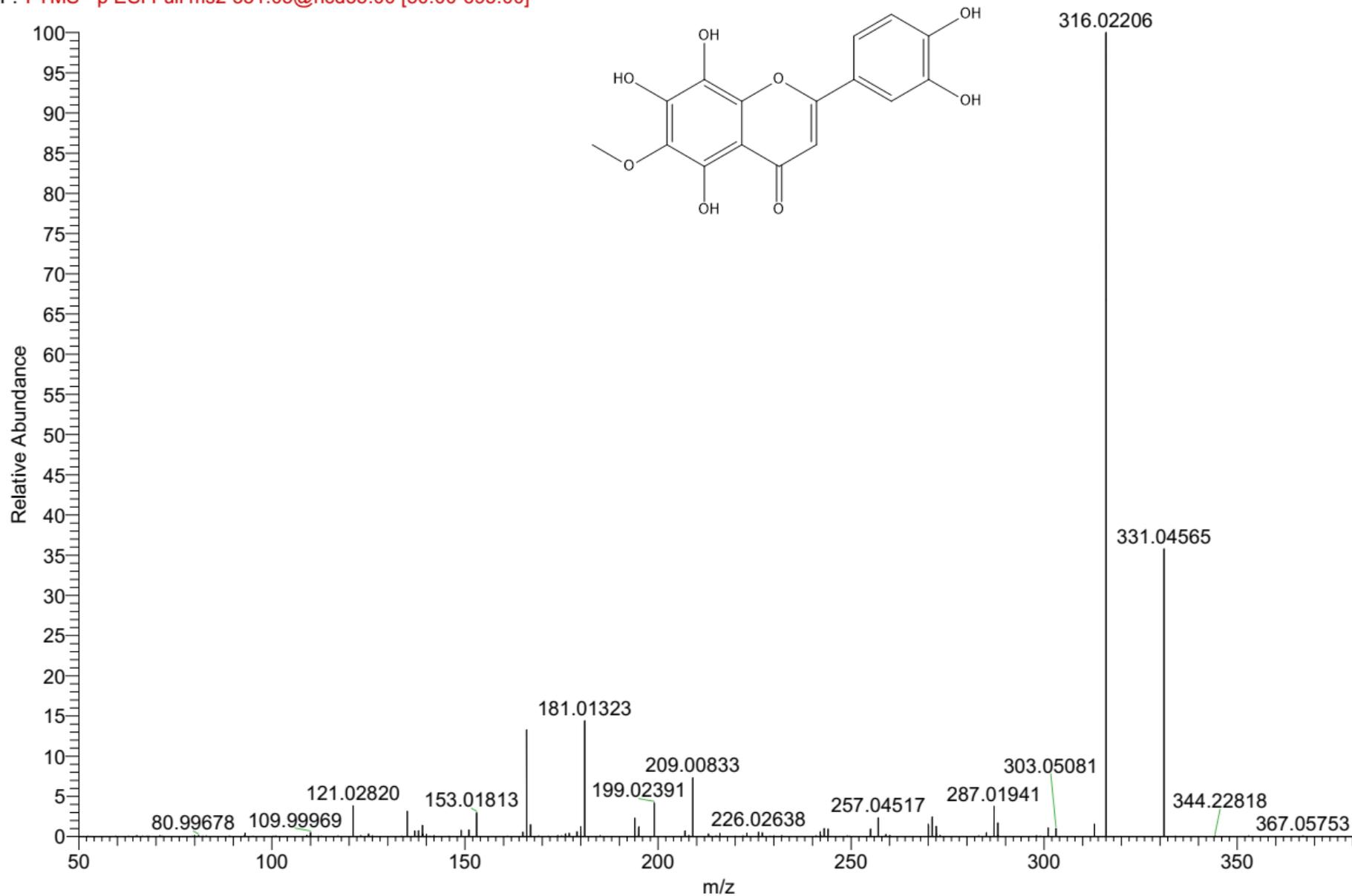


Figura 145. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  331,04565  $[M-H]^-$  em 6,22 min anotado como uma flavona metoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 331.05@hcd35.00 [50.00-695.00]

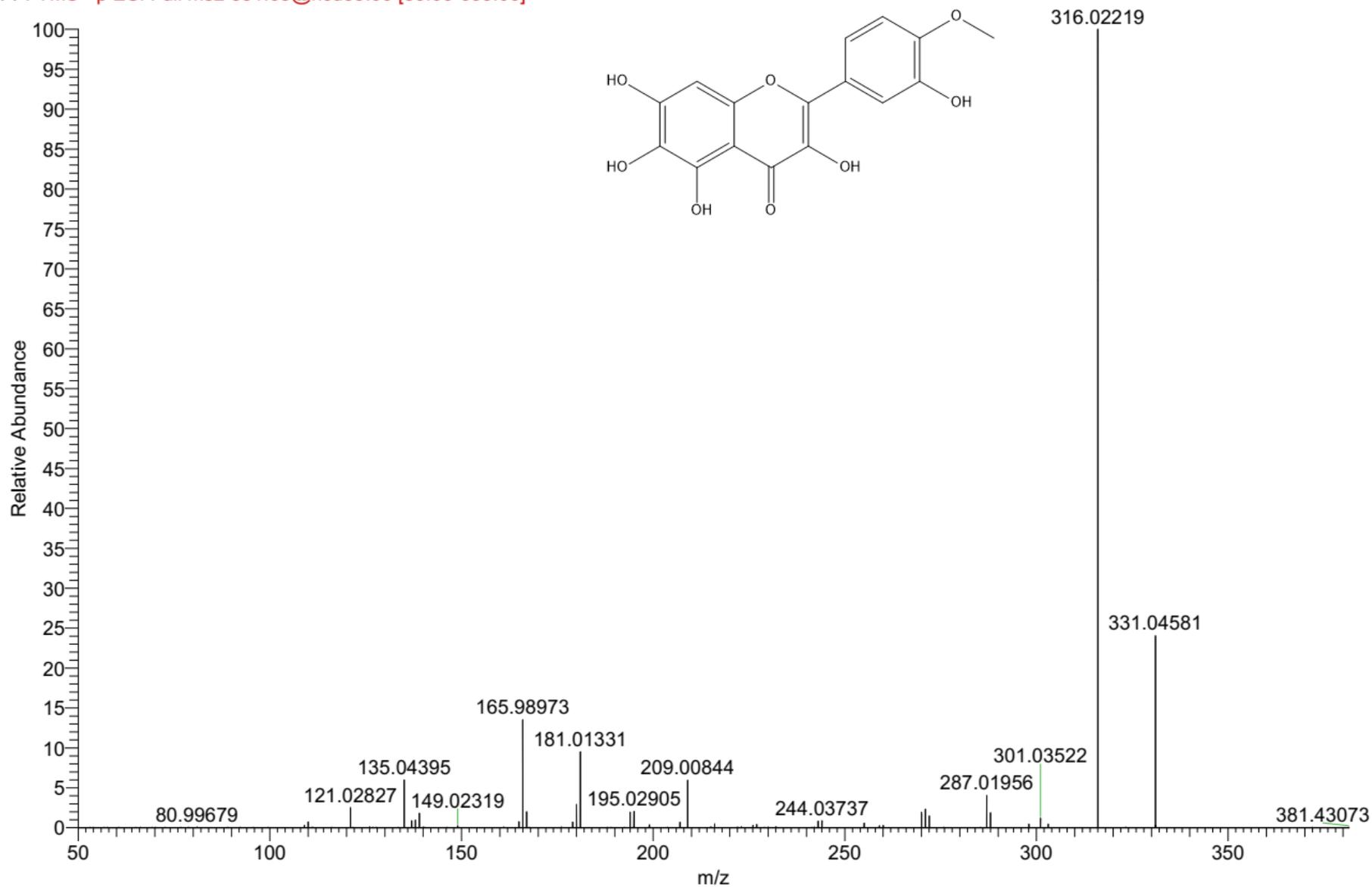


Figura 146. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  331,04581  $[M-H]^-$  em 7,98 min anotado como uma flavona metoxilada.

EASS\_270318\_prm\_35eV #1849 RT: 9.10 AV: 1 NL: 1.97E5  
F: FTMS - p ESI Full ms2 331.05@hcd35.00 [50.00-695.00]

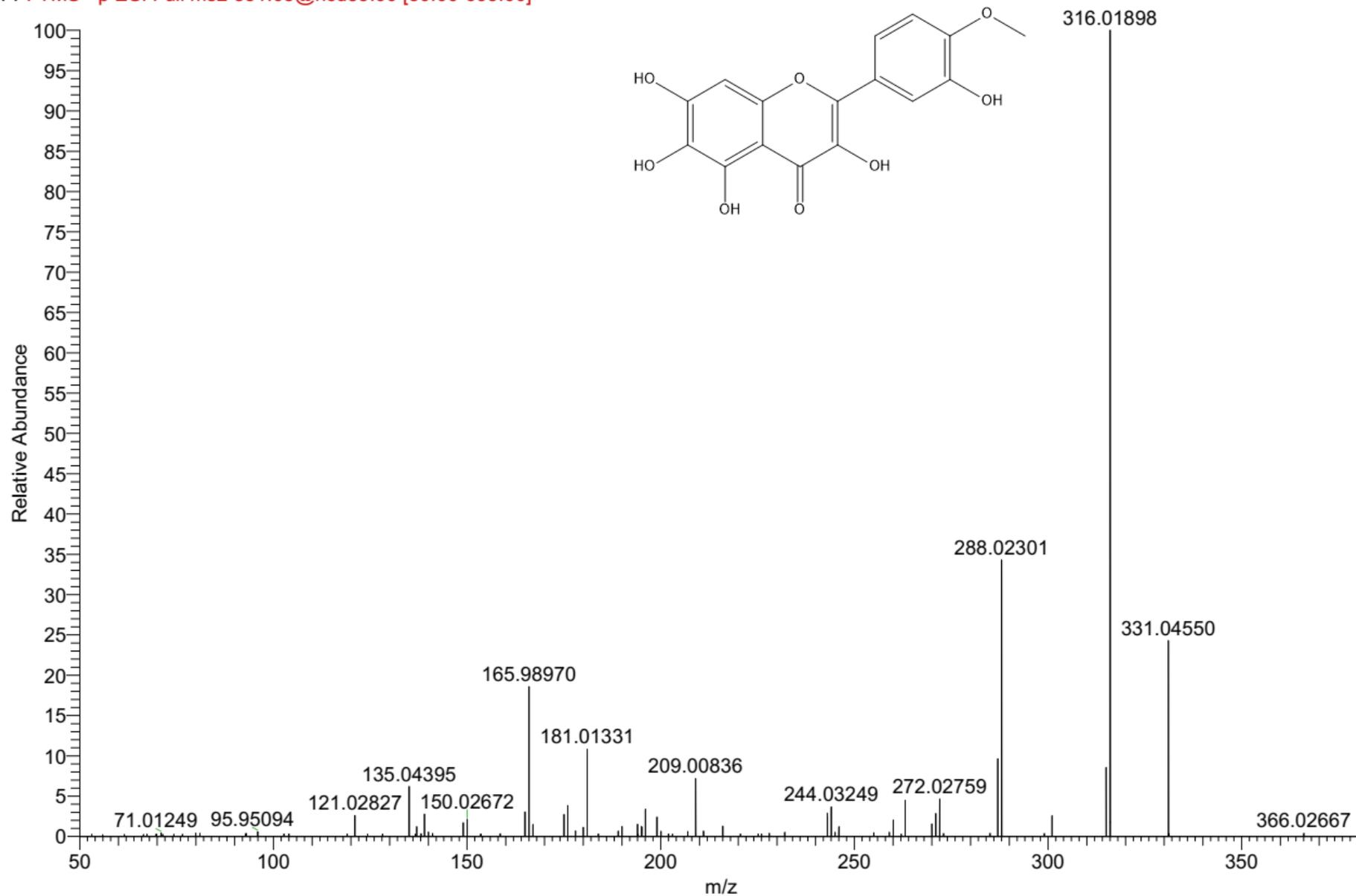


Figura 147. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  331,04550  $[M-H]^-$  em 9,13 min anotado como uma flavona metoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 343.08@hcd35.00 [50.00-720.00]

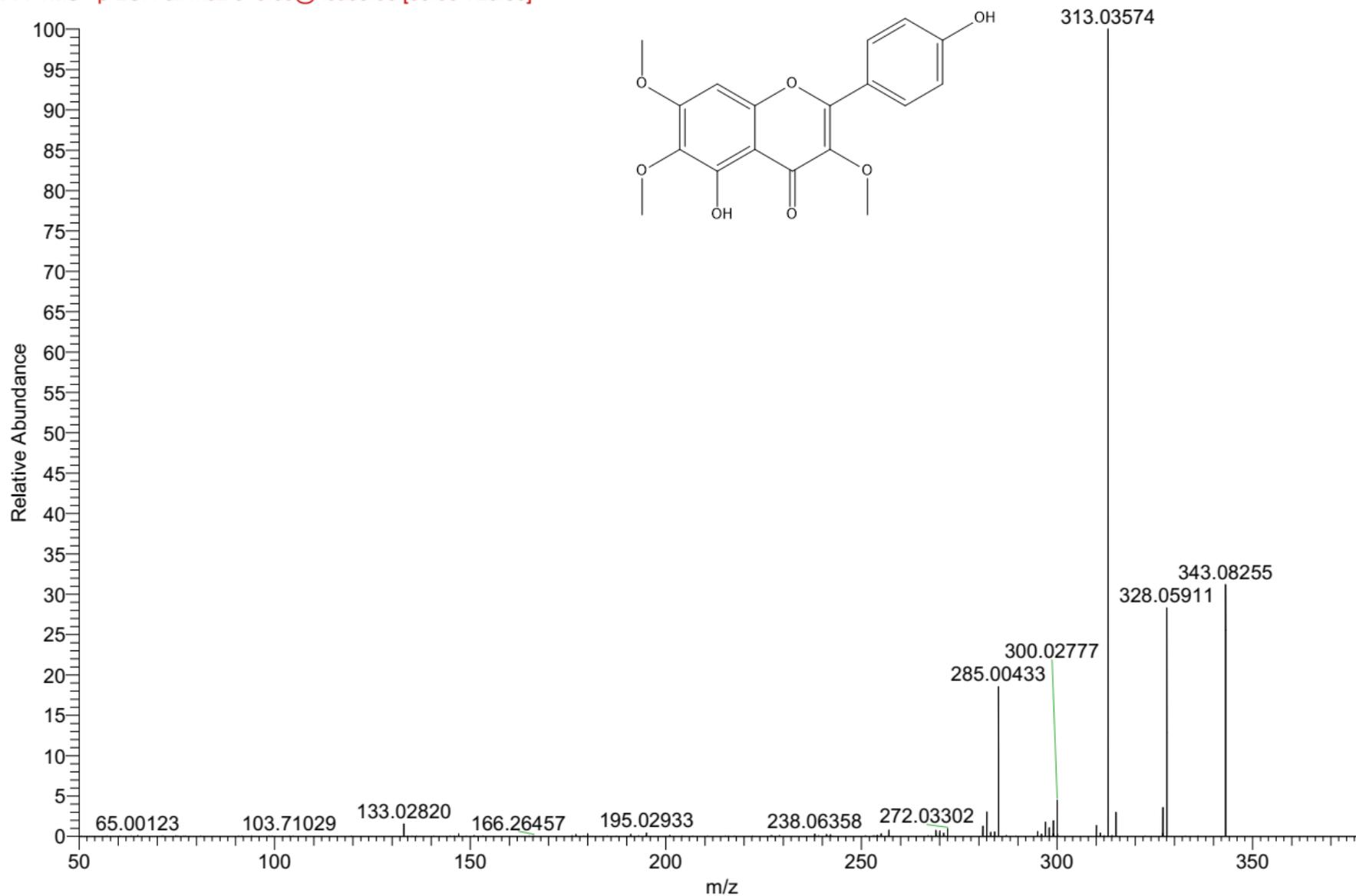


Figura 148. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  343,08255  $[M-H]^-$  em 6,46 min anotado como uma flavona metoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 345.0616@hcd35.00 [50.0000-720.0000]

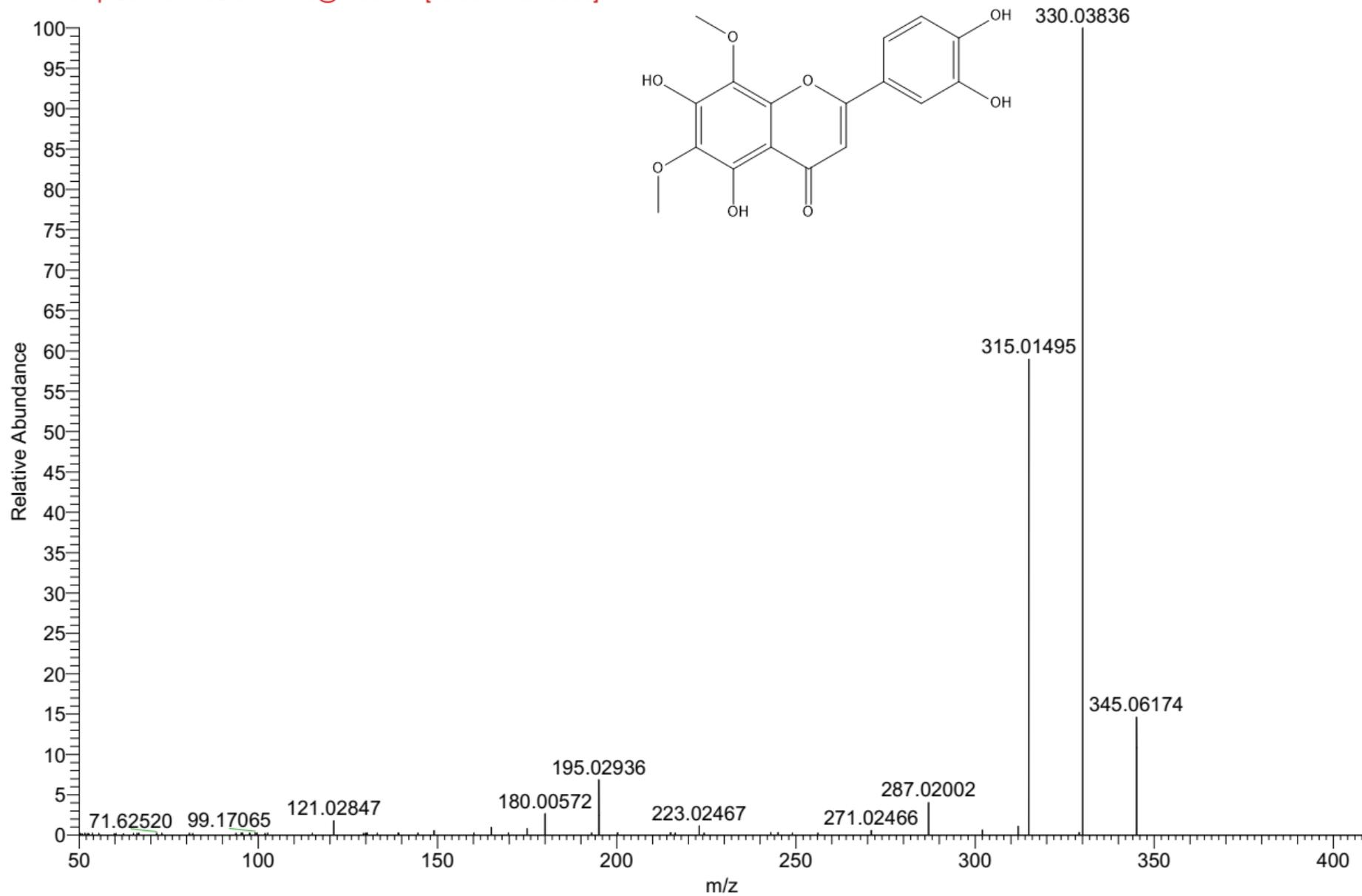


Figura 149. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  345,06174  $[M-H]^-$  em 7,16 min anotado como uma flavona dimetoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 345.06@hcd35.00 [50.00-720.00]

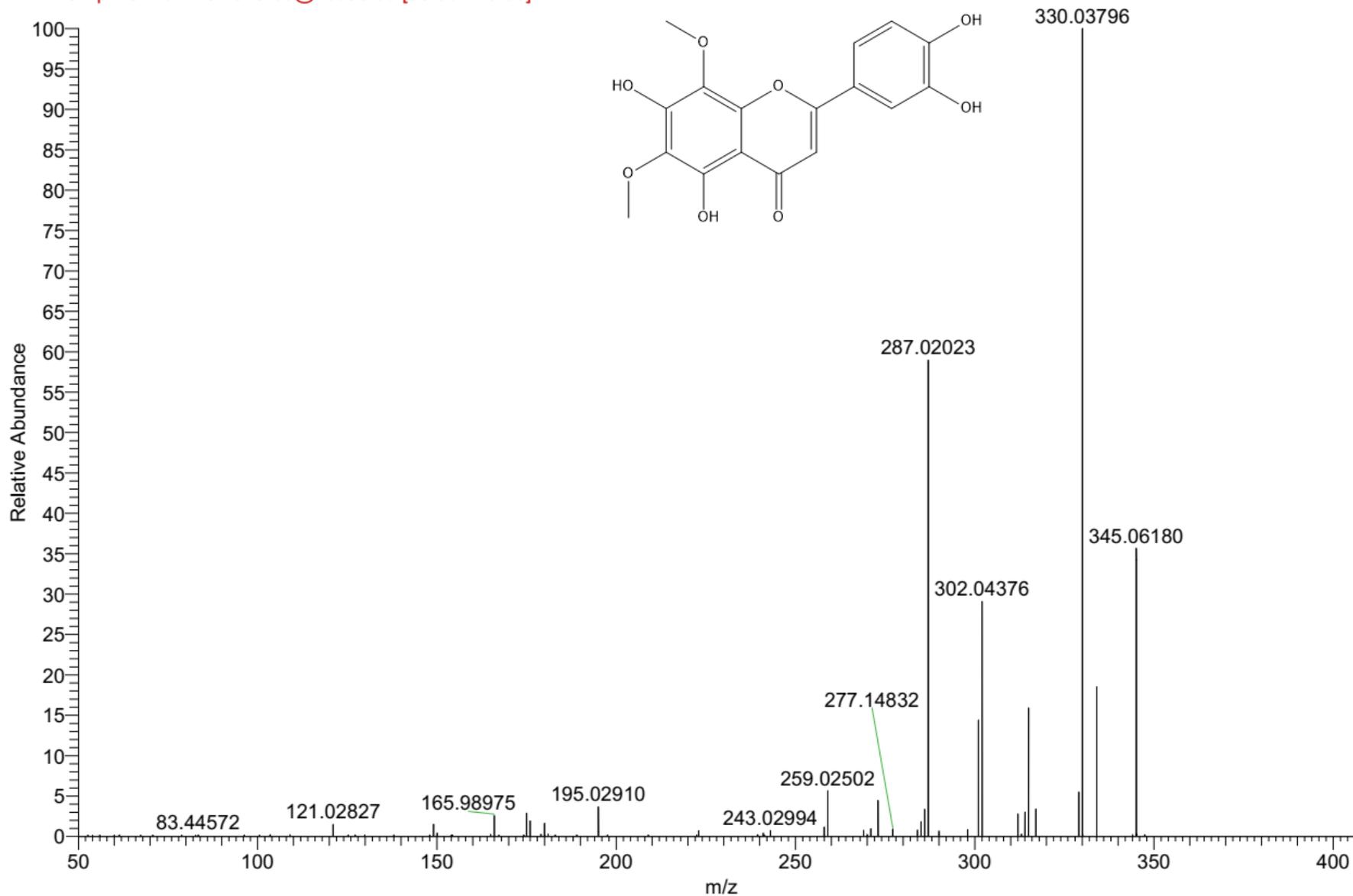


Figura 150. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  345,06180  $[M-H]^-$  em 10,54 min anotado como uma flavona dimetoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 345.06@hcd35.00 [50.00-720.00]

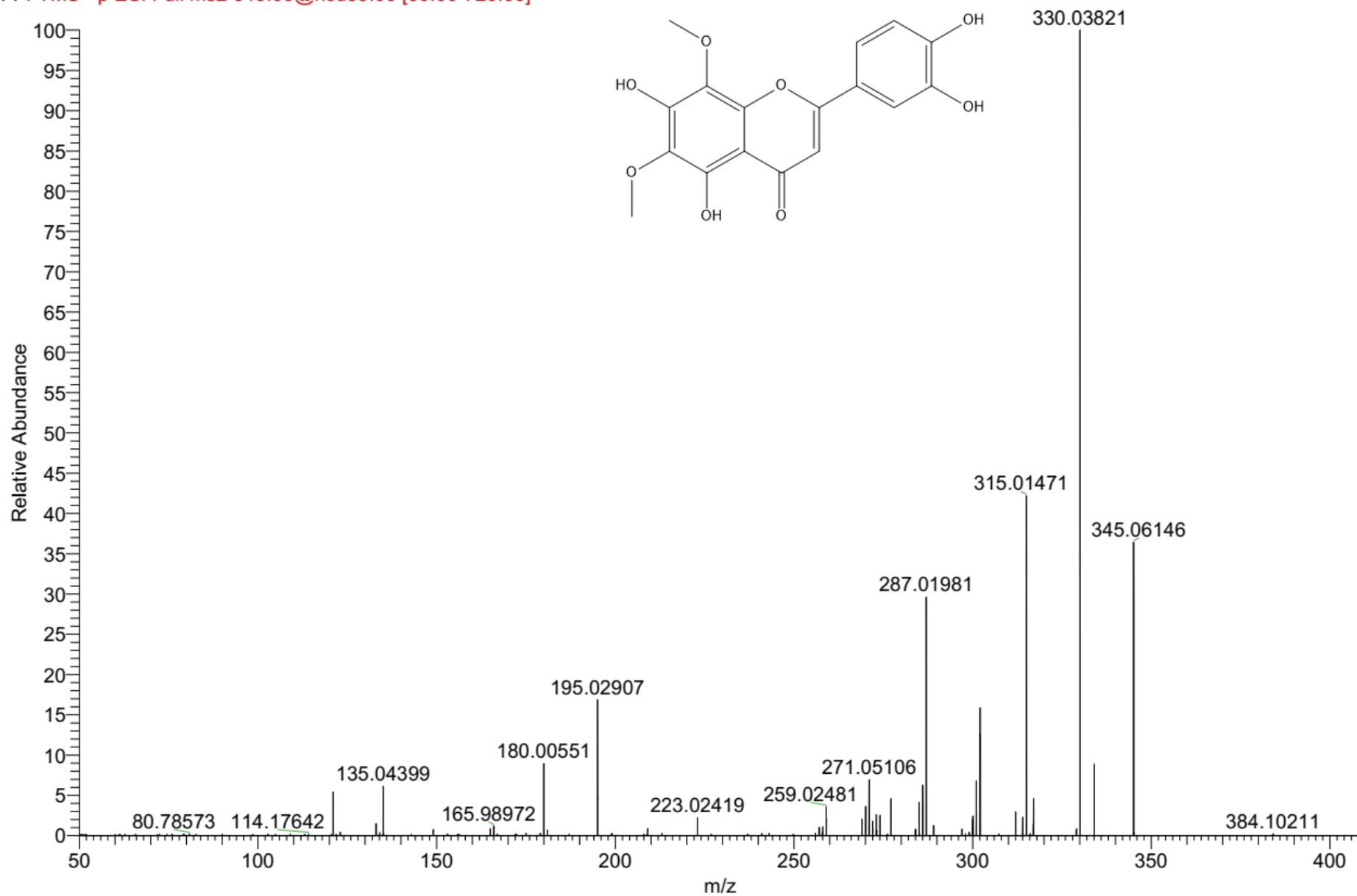


Figura 151. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  345,06146  $[M-H]^-$  em 10,90 min anotado como uma flavona dimetoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 357.1000@hcd35.00 [50.0000-745.0000]

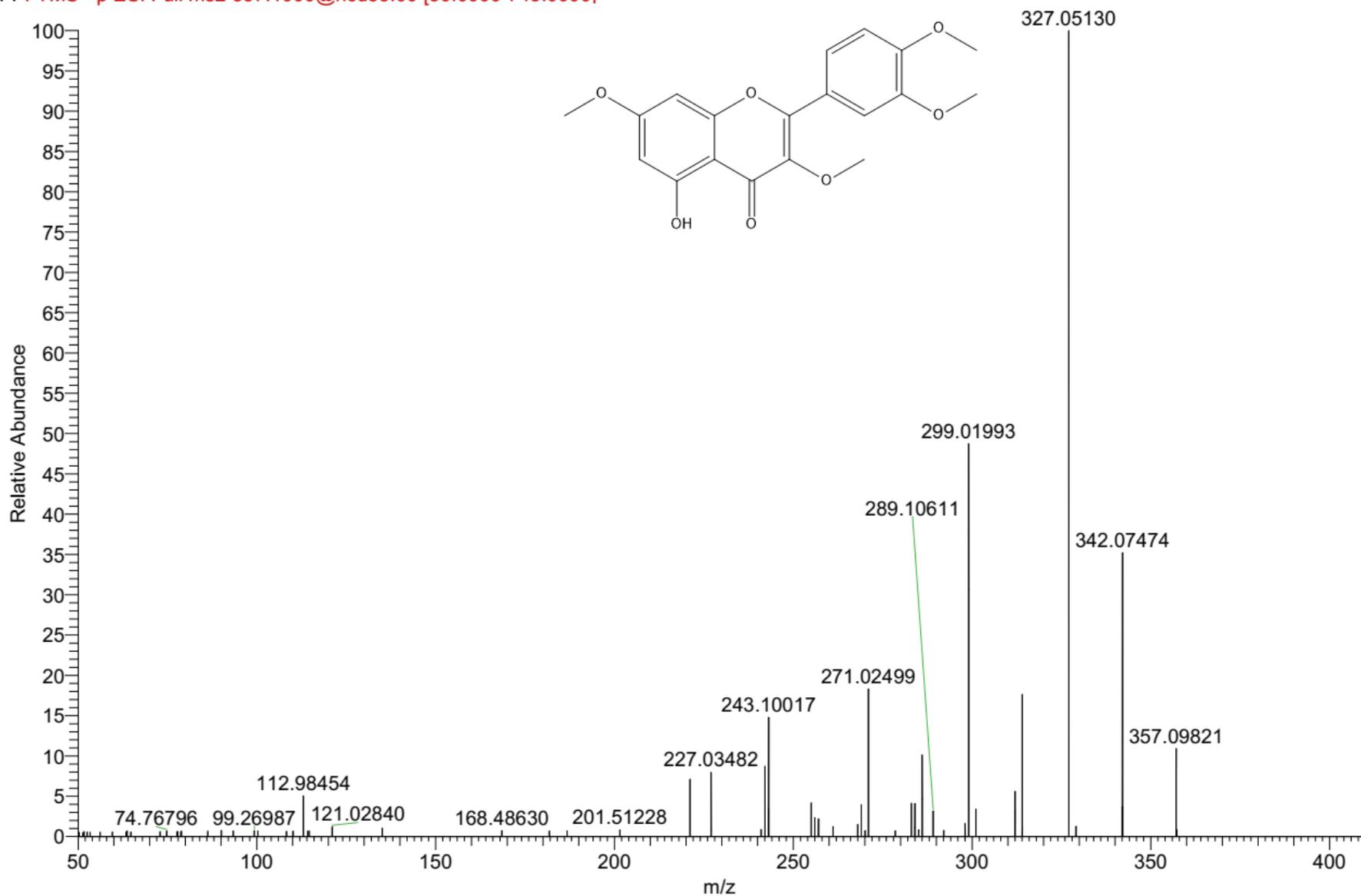


Figura 152. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  357,09821  $[M-H]^-$  em 10,89 min anotado como uma flavona tetrametóxilflavona.

F: FTMS - p ESI Full ms2 387.11@hcd35.00 [50.00-810.00]

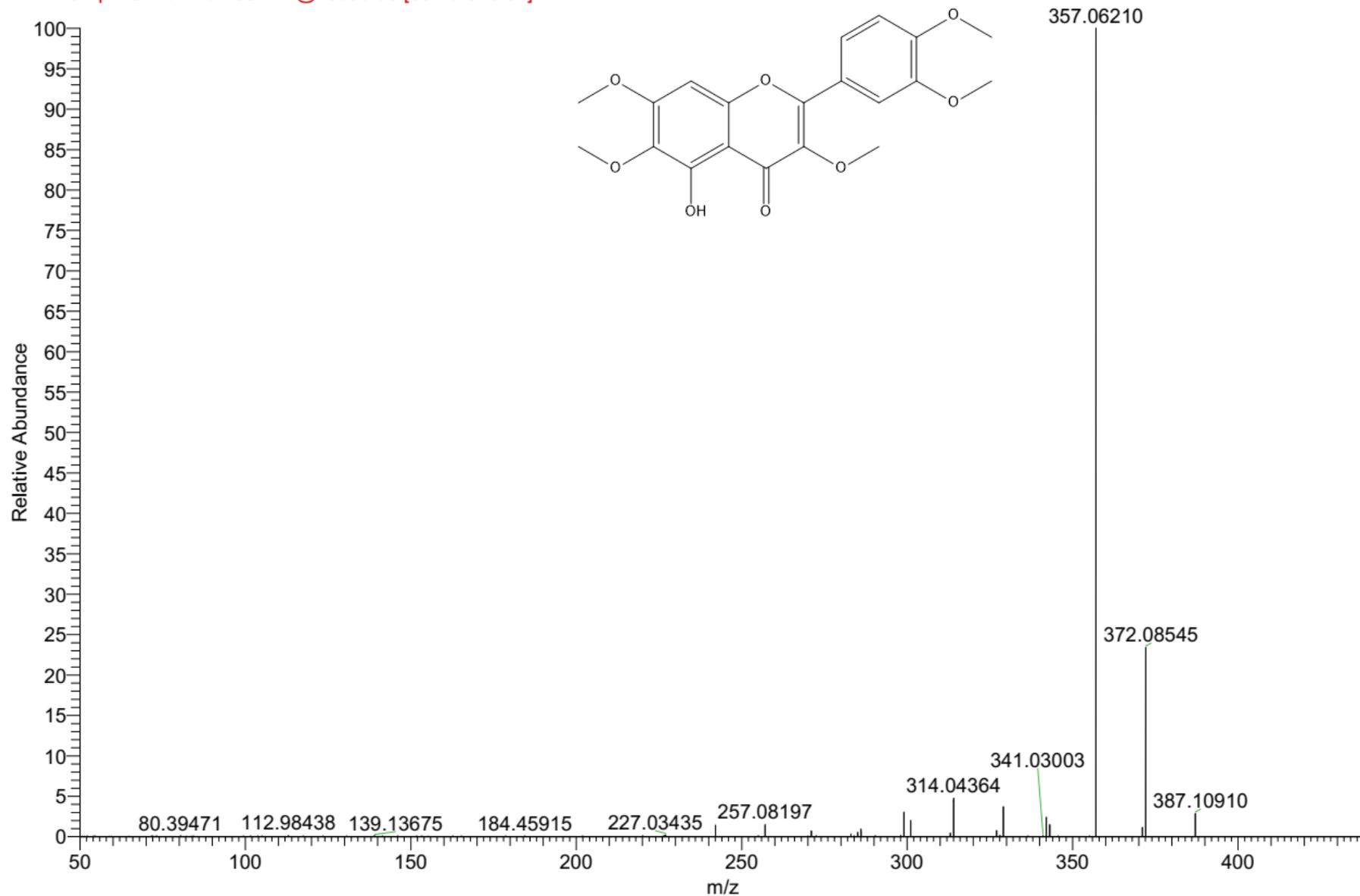


Figura 153. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  387,10910  $[M-H]^-$  em 10,11 min anotado como uma flavona pentametoxilada.

F: FTMS - p ESI Full ms2 387.11@hcd35.00 [50.00-810.00]

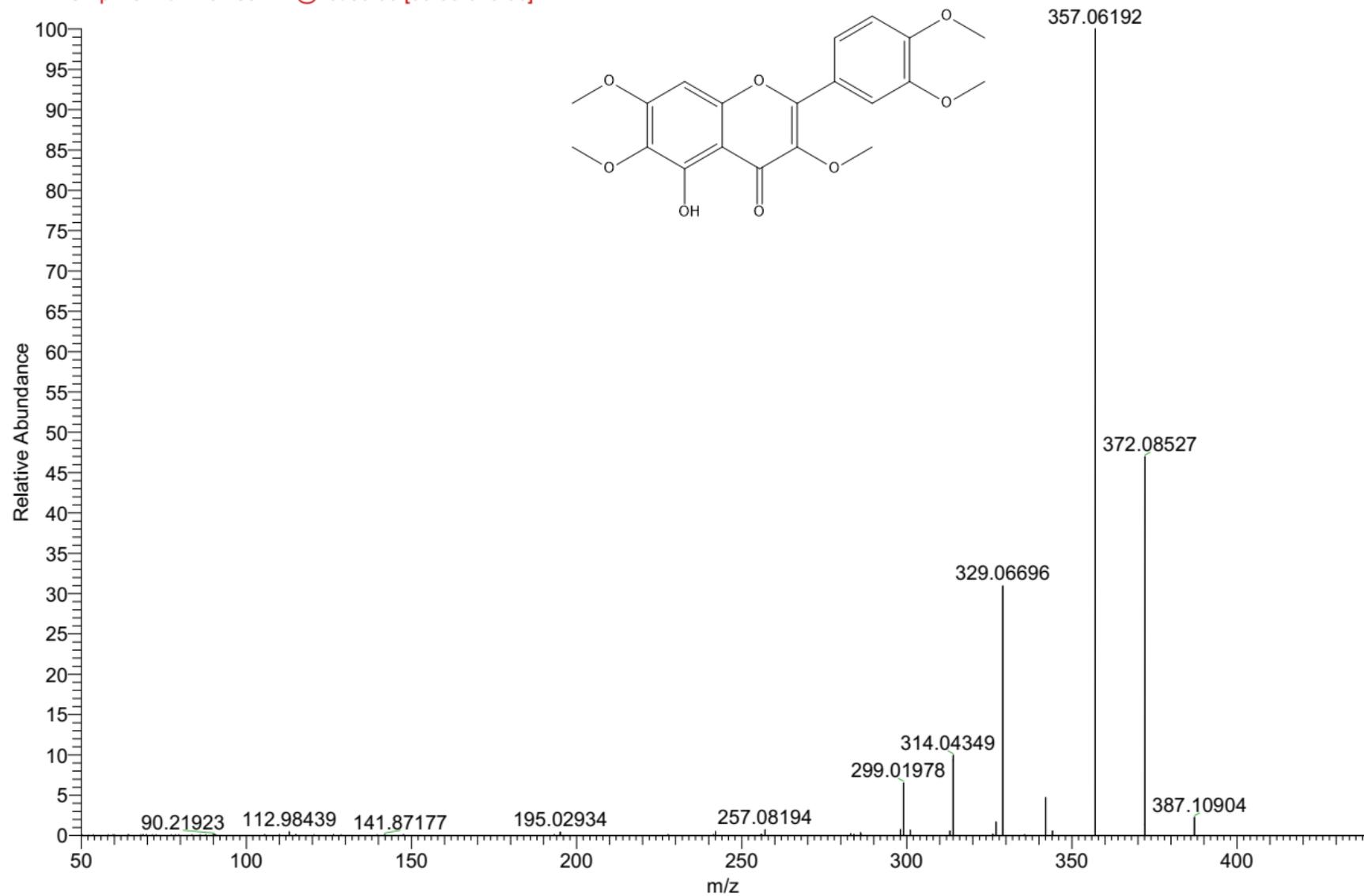


Figura 154. Espectro de fragmentação EM/EM dos íon precursor  $m/z$  387,10904  $[M-H]^-$  em 10,23 min anotado como uma flavona pentametoxilada.

## Apêndice C – Dados da análise de quimiometria.

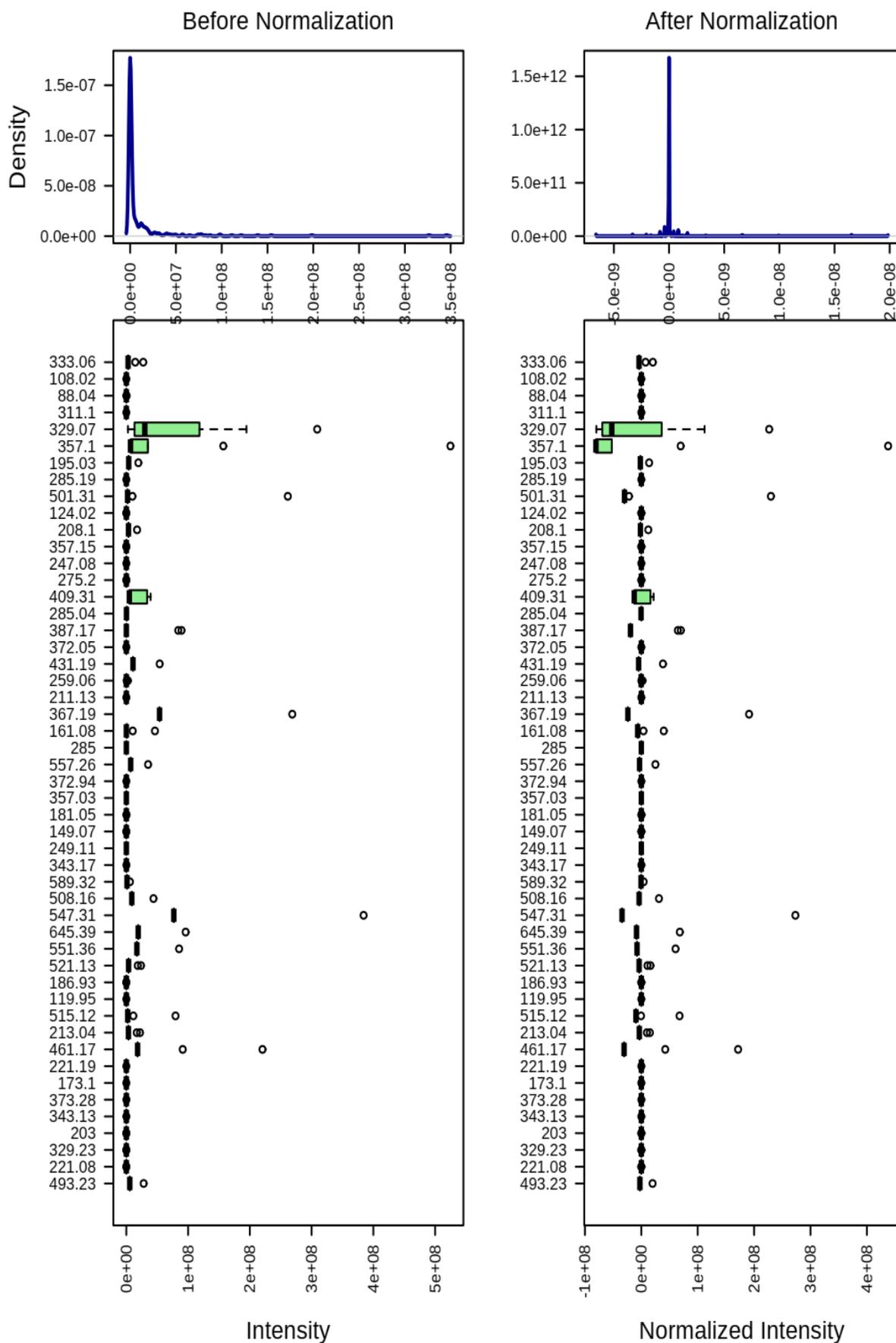


Figura 155. Escalonamento por centramento na média com a matriz dos dados de CLAE-IES-EM/EM no modo negativo.

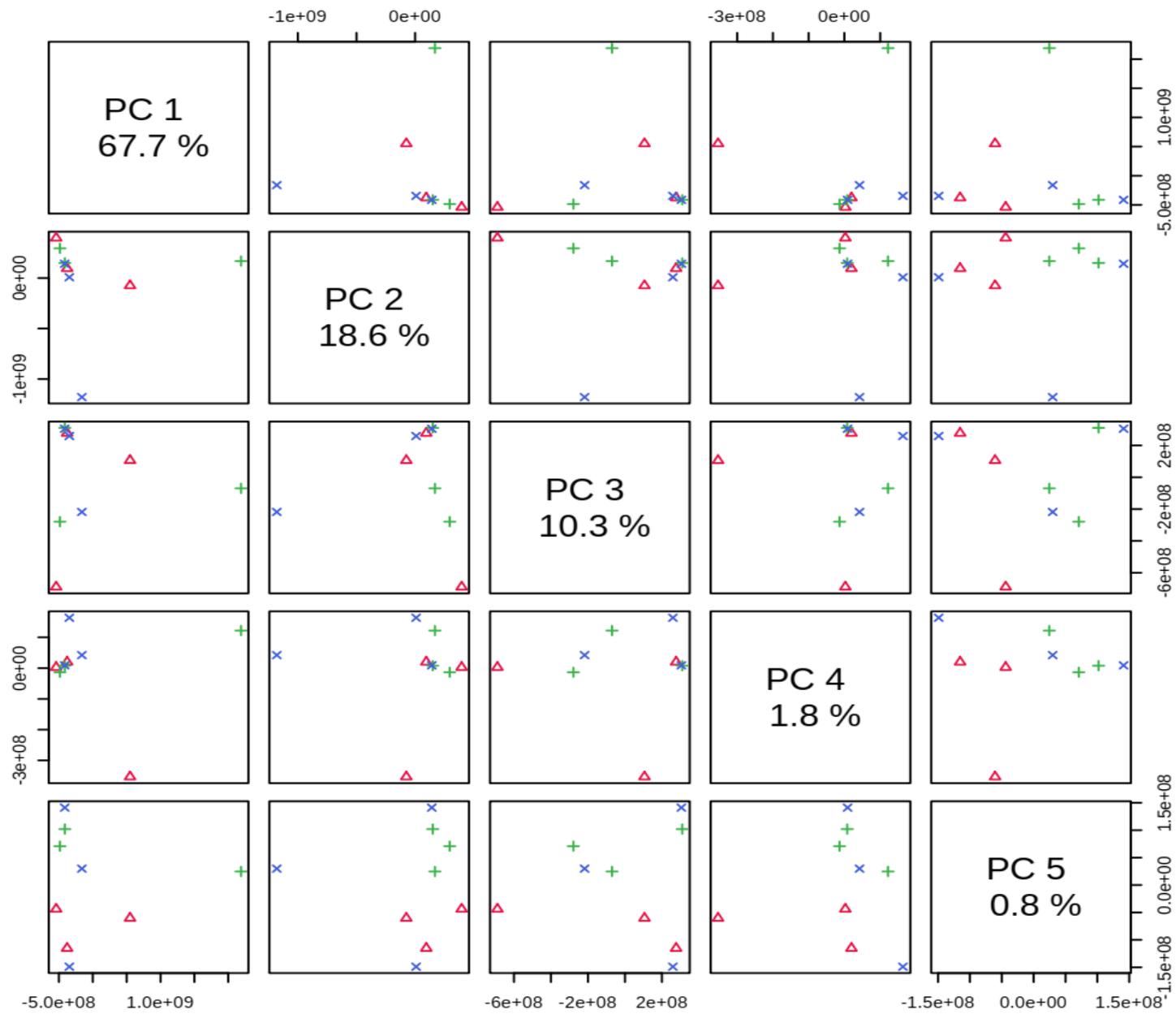


Figura 156. Percentagem de variância dos dados explicada pelas cinco primeiras PCs na análise de PCA.

## Apêndice D – Manuscrito do artigo

*Lomatozona artemisiifolia* Baker (Asteraceae): Chemical study of a threatened Cerrado plant and comparison of its *in vivo* and *in vitro* species through LC-ESI-MS/MS and chemometric analysis

### Abstract

Brazilian Cerrado is recognized as a “hotspot” due to the presence of endemic species, with a great biological potential. The specie *Lomatozona artemisiifolia*, is found in Brazilian Midwest Cerrado and is currently threatened with extinction. Efforts for its conservation in Cerrado biome have been made with the use of *in vitro* micropropagation, demanding a comparative analysis between *in vivo* and *in vitro* species. For this propose we realized the chemical study of *L. artemisiifolia* through LC-ESI-MS/MS and molecular networking analysis in the GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) and using *in silico* annotation with NAP (*Network Annotation Propagation*) to extend the annotations, leading to observe a series of flavonoid and labdane diterpenes as the most representative secondary metabolites of this plant. Also, molecular networking and multivariate statistical analysis were correlated, allowing to observe metabolite differences between *in vivo* and *in vitro* species, emerging from field growth and micropropagation conditions. Finally, these observations allowed to conclude that glandular trichomes, vegetal structures responsible for the production and secretion of secondary metabolites, looks like to be involved in the metabolite variation among *in vivo* and *in vitro* species.

### 1. Introduction

Brazilian Cerrado is recognized as a “hotspot” due to the presence of endemic species, most of them until unknown and yet to be investigated (Rabeling et al, 2019; Godinho et al, 2015; Myers et al, 2002). Many studies have described the pharmacological potential of these species, some of them threatened with extinction, presenting important biological activities such as

insecticide, cytotoxic, anticholinesterase and antioxidant (Pereira et al, 2020; Silva et al, 2020; Silva et al, 2019; Oliveira et al, 2018).

*Lomatozona artemisiifolia* Baker belongs to the Asteraceae family and has restricted occurrence in the Brazilian Midwest Cerrado, more specifically in the Goiás state (Ribeiro & Teles, 2015). One of the main features of *L. artemisiifolia* is the presence of glandular trichomes over the entire aerial part of the plant, which have many biological functions including the production and secretion of secondary metabolites (Trindade et al, 2014). Depending on the species, it's related with defense mechanisms in the surface of the plant, once secreted specialized metabolites, such as phenylpropanoids, flavonoids, terpenoids among others, may exhibit toxicity to predators or pathogens (Tian et al, 2017; Champgne & Boutry, 2016; Wagner, 1991). *L. artemisiifolia* was included in the red list of Brazilian Asteraceae species threatened with extinction (Nakajima et al 2012) and concerning its conservation in the Cerrado biome, it was realized a study of cultivation and *in vitro* micropropagation (da Silva, 2019; Moreira, 2018).

The present research reports the chemical study of *L. artemisiifolia* describing the main secondary metabolites identified. Regarding the lack of studies concerning the chemical content of species from *Lomatozona* genus, we proceeded to the isolation and structural elucidation of major compounds, leading to the identification of four polymethoxylated flavones and three labdane diterpenes. Then, extracts were analyzed through LC-ESI-MS/MS and molecular networking in GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*), for the dereplication of labdane diterpenes, polymethoxylated flavones, methoxylated flavones, flavanones and a glycosylated flavonoid. Also, network annotated propagation was used to extend the annotation of compounds that didn't match with GNPS library. Furthermore, LC-ESI-MS data were submitted to a chemometric analysis to compare *in vivo* and *in vitro* species, showing important differences on the chemical content of compounds related with glandular trichomes, which points to modifications in the anatomy of this vegetal structure present in the foliar surface of the *in vitro* plant.

## 2. Results and discussion

### 2.2 Differentiation between *in vitro* plants and native *L. artemisiifolia* through multivariate statistical analysis

An early botanical study of *L. artemisiifolia* reports the presence of glandular trichomes, distributed over the entire aerial parts of the plant (Trindade et al, 2014). These vegetal structures are recognized for the secretion of an exudate, a continuous layer formed on the plant surface, related with the protection against herbivory, light reflectance and reducing of leaf temperature (Wagner, 1991; Morimoto, 2019). To study the chemical composition of the exudate, fresh aerial parts of *L. artemisiifolia* were briefly rinsed with ethyl acetate to afford EA1 extract. In addition, ethyl acetate and ethanol extracts were prepared by maceration with dried and grounded vegetal material, to extract intracellular secondary metabolites, affording the EA2 and EE extracts, respectively (Section 4.4).

LC-ESI-MS/MS analysis in negative ion mode with *L. artemisiifolia* extracts were performed to have an overview of its chemical profile. Although extracts from different seasons (dry and wet) and *in vitro* plant showed apparently a very similar chemical profile (Figure 1), chemometric analysis allowed to observe differences in the secondary metabolites content between *in vitro* and native Cerrado plants.

The chemometric analysis was performed in MetaboAnalyst 4.0, for the comparison between *in vitro* and *in vivo* plants (dry and wet seasons). First, LC-ESI-MS data was processed in RStudio software to remove interfering signals of mobile phase and create a data matrix with the most relevant ions present in *L. artemisiifolia* extracts. Different types of extracts (EA1, EA2 and EE) were obtained from vegetal material collected in Midwest Brazilian Cerrado (dry and wet seasons) and *in vitro* micropropagated plants, reaching nine extracts.

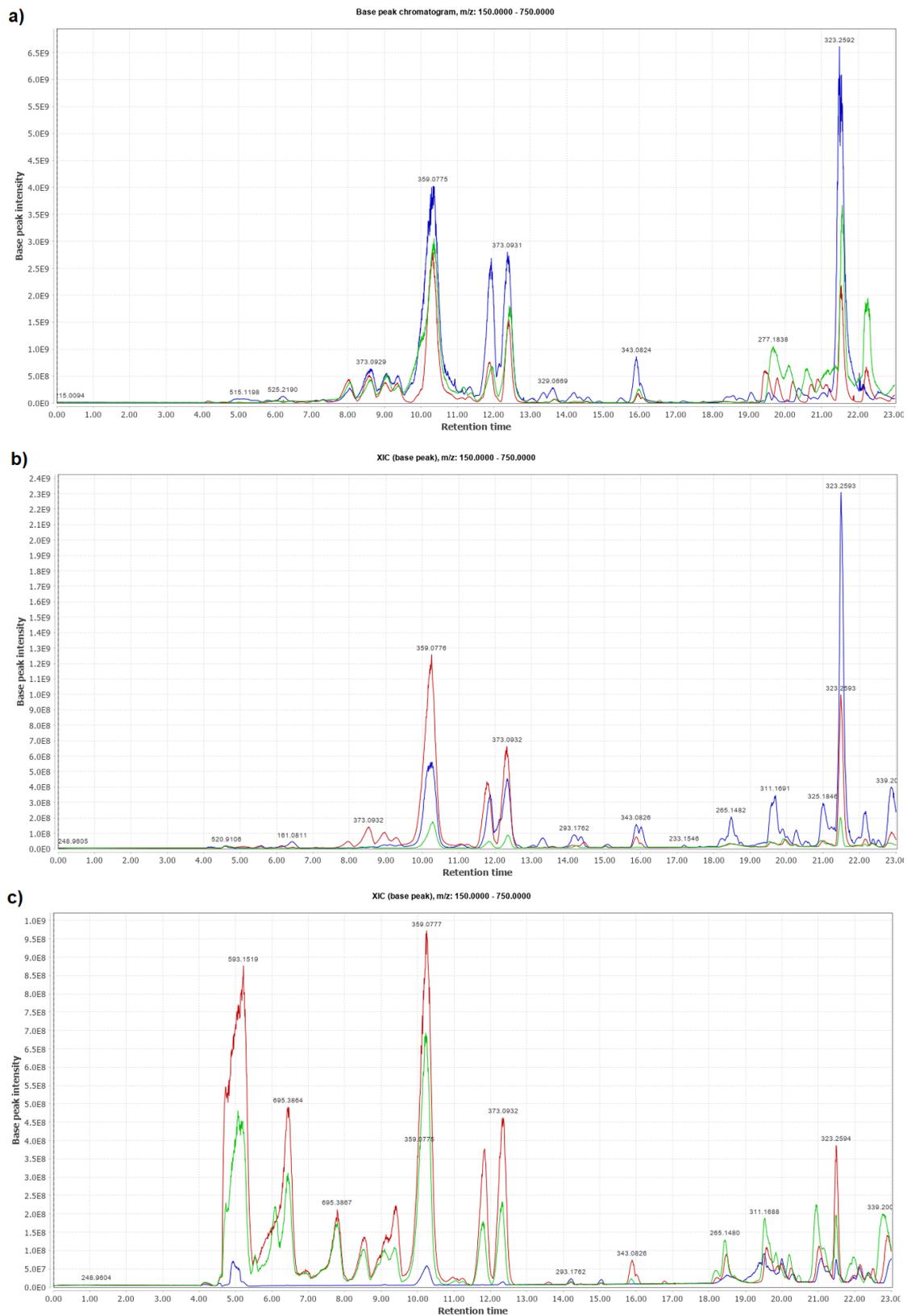


Figure 1. Extracted ion chromatograms of the EA1 (a), EA2 (b) and EE (c) extracts from the aerial parts of *L. artemisiifolia*. Color legend: Green – Dry season; Red – Wet season; Blue – *In vitro* plant.

Hierarchical cluster and partial least squares discriminant analysis was used to evaluate the grouping of extracts with similar chemical profile. In the hierarchical cluster analysis a dendrogram was obtained, where it's possible to observe the separation of surface extracts (EA1\_ES, EA1\_EC and EA1\_IV) from the others (Figure 2-a). Also, *in vitro* surface extract (EA1\_IV) differentiates from dry and wet season extracts, EA1\_ES and EA1\_EC, respectively, indicating a different chemical composition between *in vivo* and *in vitro* plant. Interestingly, as evidenced in PLS-DA graph of scores (Figure 2-b), this differentiation occurs only with chemical content of the surface of the plant, once EA2 and EE extracts appeared grouped and surface extracts separated, mainly from *in vitro* plant. The PLS-DA graph of loadings retrieved the most important variables ( $m/z$ ) responsible for this separation of the extracts (Figure 3-a).

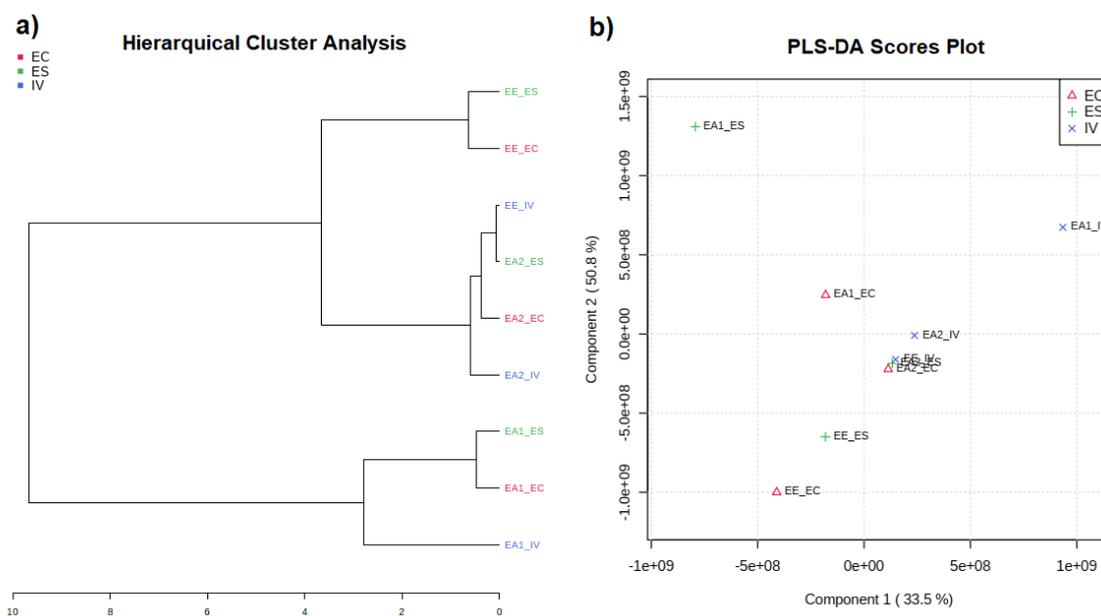


Figure 2. HCA dendrogram and PLS-DA score plot obtained from multivariate analysis.

Using the variable importance in projection (VIP) plot was possible to observe that the high intensity or the absence of these ions in the LC-ESI-MS analysis of the extracts, can explain this behavior (Figure 3-b) (Table 2). For instance, the ion at  $m/z$  593.15 presents high intensity signal in the ethanol extracts of wet and dry season extracts, showing very low intensity in the *in vitro* ethanol extract. The same behavior occurred with the flavonoids at  $m/z$  331,0456

and  $m/z$  357.0984. On the other hand, the majority of the selected ions in VIP score presented higher intensity signals in the *in vitro* extract, which is the case of the precursor ions at  $m/z$  339.2541 and  $m/z$  501.3074. That suggests a different chemical content present in the surface of the plant and thus related to the exudate produced and secreted by the glandular trichomes of *in vitro* *L. artemisiifolia*.

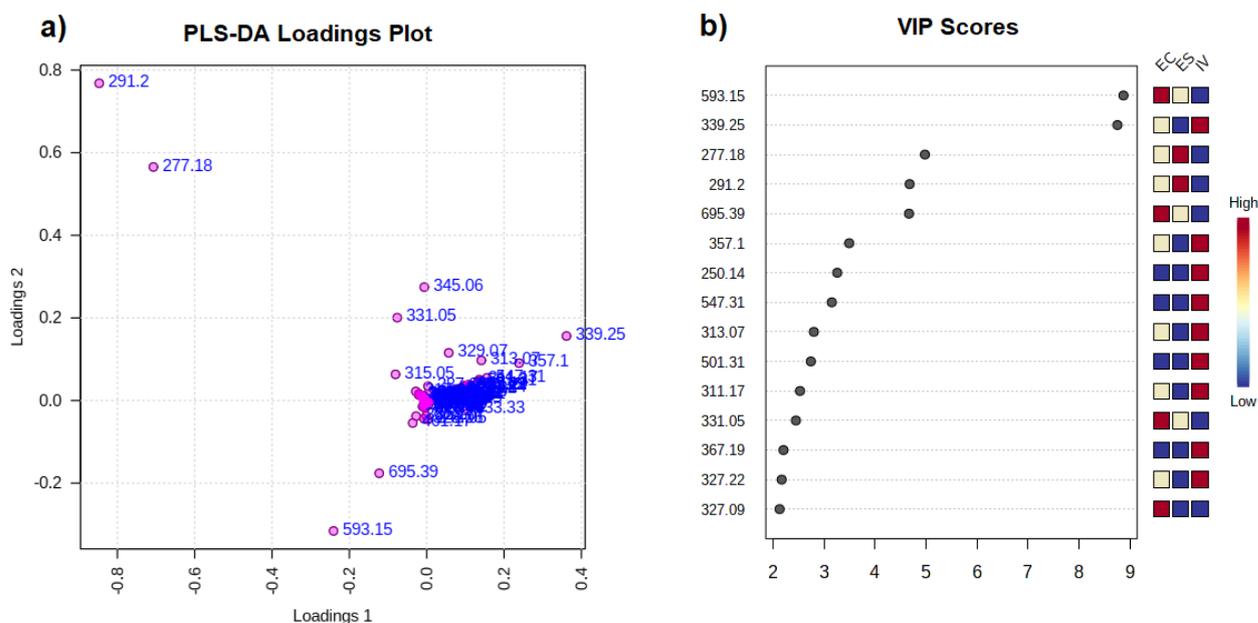


Figure 3. PLS-DA loadings plot and VIP score with the variables ( $m/z$ ) responsible for the grouping in PLS-DA analysis.

### 2.2.2 – Dereplication of *L. artemisiifolia* extracts through mass spectrometry and molecular network analysis

A molecular network analysis in the GNPS was performed for the dereplication of *L. artemisiifolia* extracts. Considering the lack of chemical information concerning species from *Lomatozona* genus, initially we performed the isolation through chromatography of the major compounds (section 2.2): labdan-8-ol-15-yl-acetate (**1**), quercetagetin-3,5,6,3',4'-pentamethyl ether (**2**), oxyanin B (**3**), 8,15-labdanediol (**4**), chrysosplenetin (**5**), pachypodol (**6**) and 8-hydroxi-15-labdanoic acid (**7**), which were elucidated through uni- and bidimensional nuclear magnetic resonance, mass spectrometry techniques and literature data comparison (Tables S1-S7 and Figures S1-S19). These

compounds, reported for the first time in this genus and species, allowed to observe the main chemical class constituents of *L. artemisiifolia*.

An inspection of mass spectrum of the major precursor ions detected in the LC-ESI-MS/MS analysis was made based on the search of the exact mass and comparison of MS2 fragments in Metlin database. This search revealed the presence of many polymethoxylated flavones (PMFs) and other flavonoid classes, with the presence of many precursor ions with same exact mass, at different retention times. Indeed, literature shows that PMFs presents in the MS spectrum losses of methyl radicals ( $\bullet\text{CH}_3$ ) that leads to the product ion  $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$  (negative ion mode), which is diagnostic fragment ions for the identification of this flavonoid class (Frański et al, 2018). However, depending on the extension of methylation of the flavonoid, the product ion  $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$  tends to dominate the role spectrum making it difficult to distinguish positional isomers, as it presents the same fragmentation pattern (Figure 4).

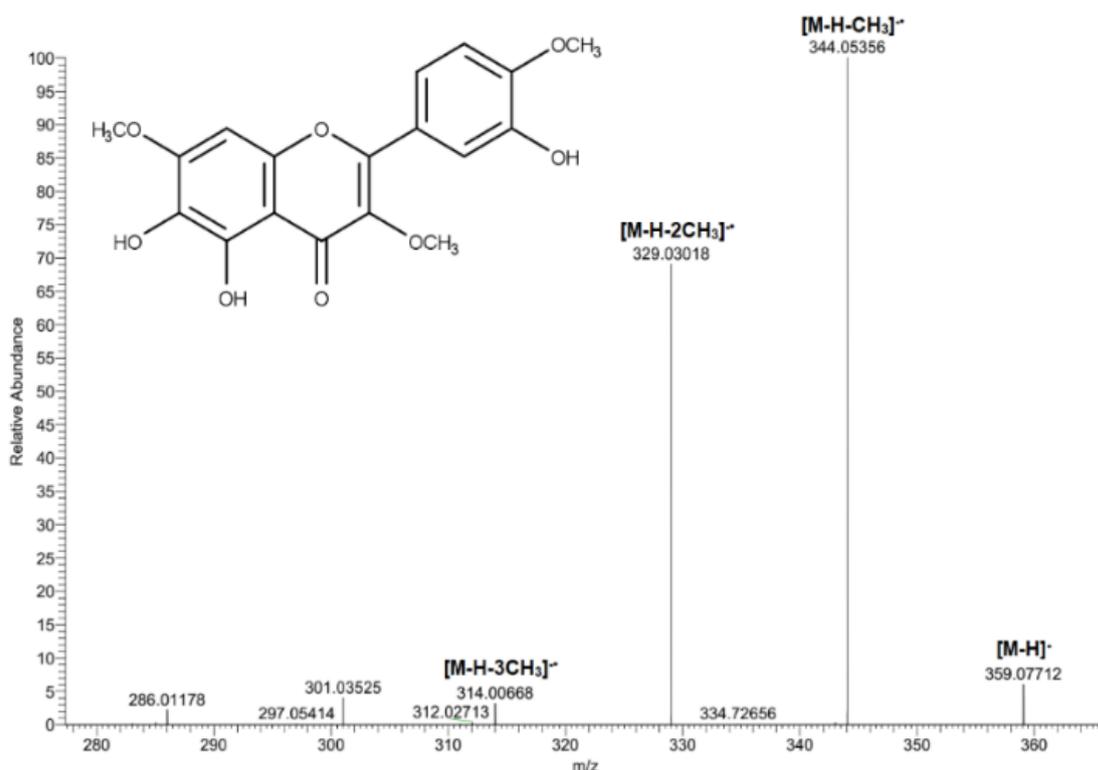


Figure 4. LC-ESI-MS/MS spectra of oxyanin B, highlighting the presence of products ions formed by methyl radical losses.

As chemometric analysis showed differences in the metabolites between *in vivo* and *in vitro* plants, based on the intensities of specific precursor ions at a

given retention time, we used featured based molecular networking (FBMN) in GNPS, to link this information with the annotations of molecular networking analysis. FBMN provided useful information about the relative quantification of the ions detected in each extract, displayed as pie charts, indicating the proportion of the peak area detected in the extracted ion chromatogram (XIC). Also, data preprocessing in MZmine 2 allowed to separate positional isomers in FBMN (Nothias *et al*, 2020; Olivon *et al*, 2017), which was useful for the annotation of polymethoxylated flavones in this study, in some cases detected at different retention times with the same exact mass ( $m/z$ ).

This approach provided an annotation of some compounds indicated by the VIP score plot in the PLS-DA analysis for the differentiation of *in vivo* and *in vitro* plants, using GNPS libraries and for the nodes that didn't have a match, network annotated propagation (NAP) was performed to extend the annotation. NAP is part of the GNPS *in silico* tools and uses the spectral similarity of the nodes in the clusters to propagate the spectral search in databases (such as SUPNAT, GNPS, NPAtlas and CHEBI), predicting possible structures for non-annotated nodes with an *in silico* fragmentation matching and providing the annotation at a class level (da Silva *et al*, 2018). Once a given node have a match with GNPS library, NAP can propagate the annotation to the other nodes in the cluster, with the use of *Fusion* and *Consensus* algorithms, reranking the possible candidates listed. The annotations achieved with GNPS libraries and NAP were verified by the study of fragmentation patterns and comparison with literature. NAP predictions at class level, using the *Fusion* and *Consensus* score, were considered when a consensus of the predicted chemical structures was achieved for a given compound class. Also, annotation was categorized according to the Metabolomics Standards Initiative (Sansone *et al* 2007; Wolfender *et al*, 2019).

Molecular networking analysis were performed with LC-ESI-MS/MS data acquired in negative and positive ion modes (fig. 5 and 6). After preprocessing in MZmine 2 software, molecular networks were built in featured based molecular networking allowing the annotation of 38 compounds (positive and negative ion modes (Tables 1 and 2).

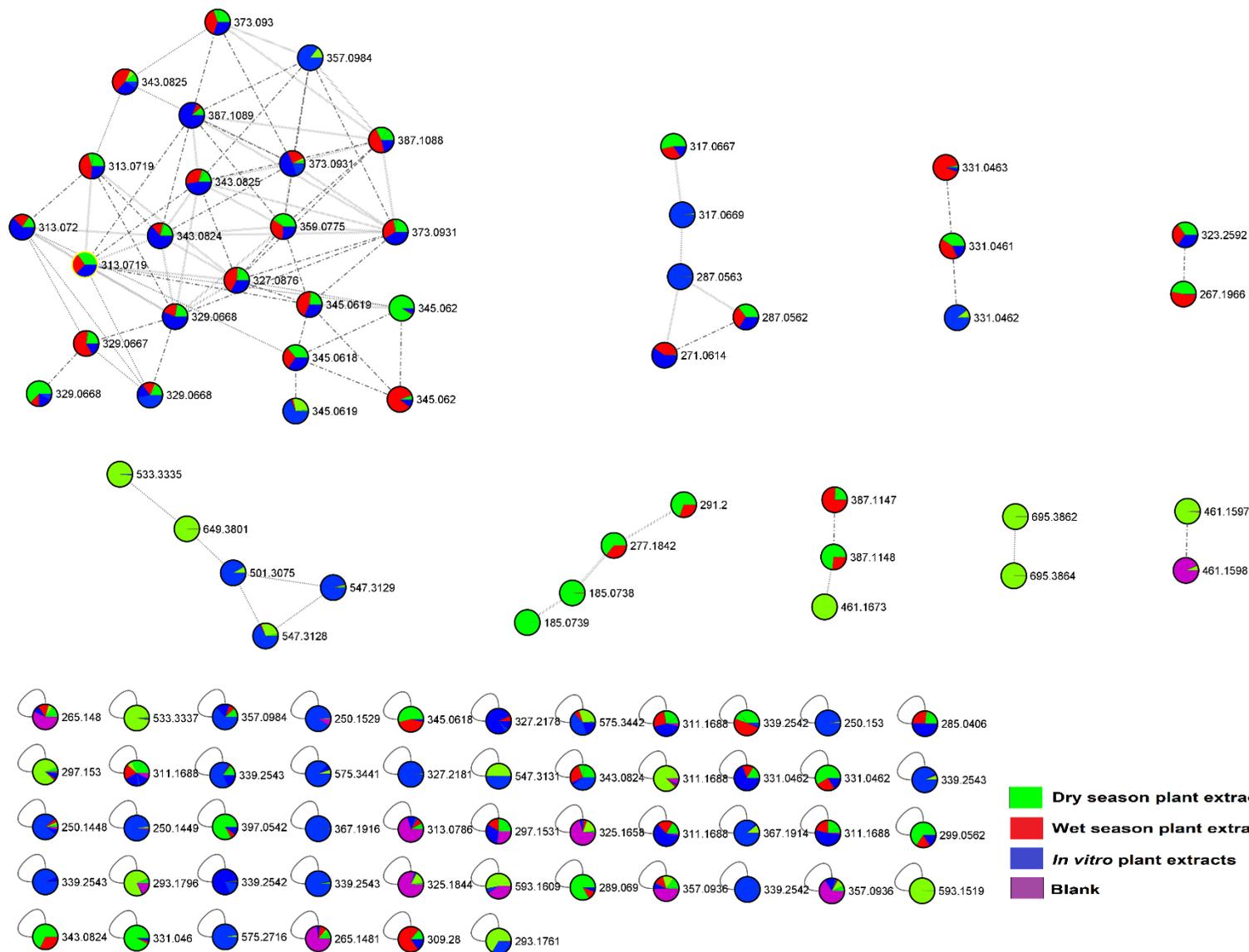


Figure 5. Feature-based molecular network in negative ion mode.



Flavonoids were the most abundant class of secondary metabolites identified in *L. artemisiifolia*, with representatives from the subclasses of flavanones, flavones, polymethoxylated flavones and glycosylated flavones (Figure 7).

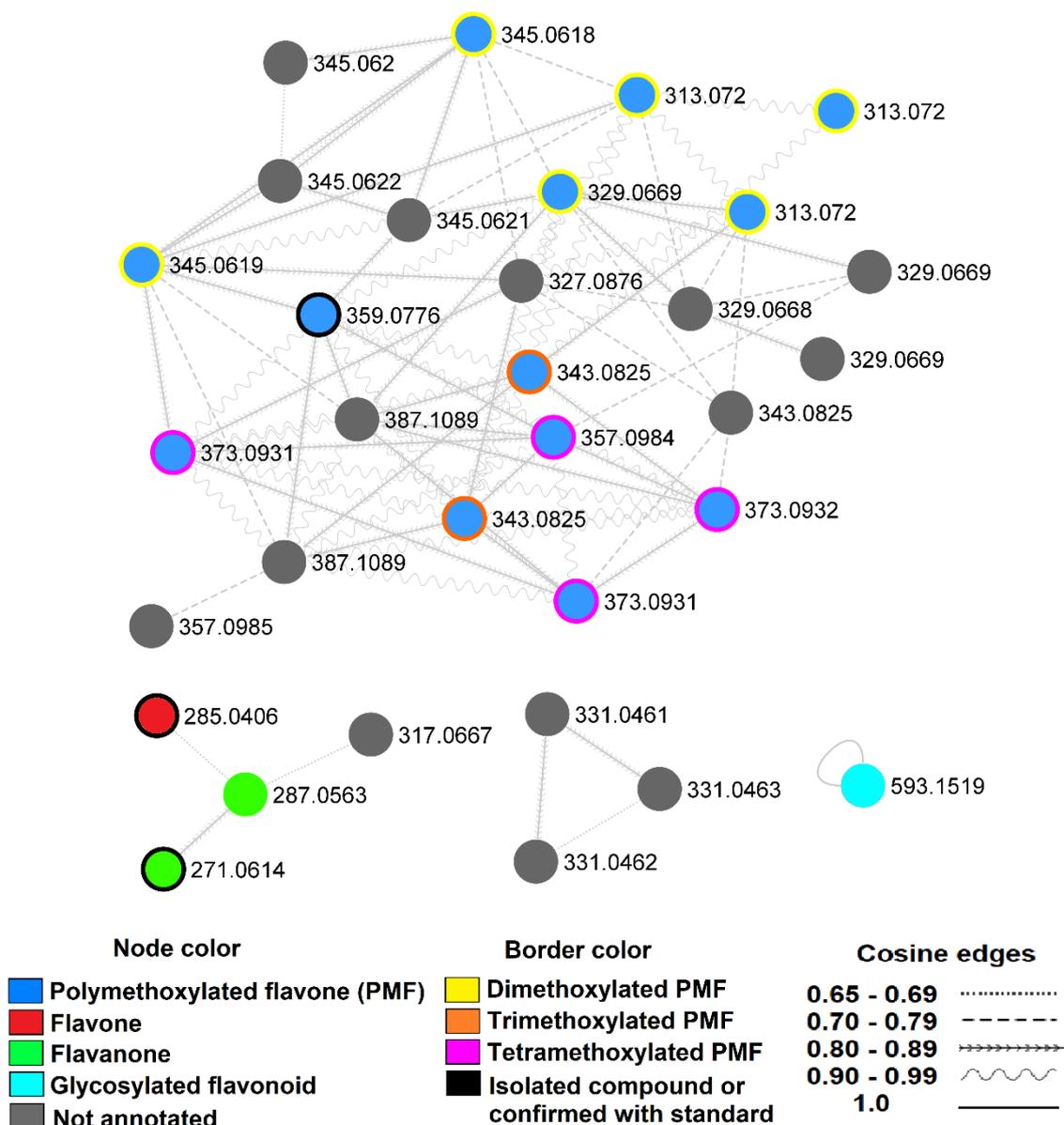


Figure 7. Molecular network with negative ion mode with the annotated flavonoid subclasses in *L. artemisiifolia*.

Several polymethoxylated flavones (PMFs) were clustered and annotated in the molecular networking in both ionization modes, varying according to the degree of methylation of the flavonoid. In the negative ion mode, the isolated compound oxyanin B ( $m/z$  359.0776) could be attributed in the LC-ESI-MS/MS

chromatograms, since a unique exact mass was found for this flavonoid (Figure 8). Using the GNPS spectral library this precursor ion was annotated as jaceidin, showing that for this subclass positional isomers couldn't be distinguished, which is in agreement with literature (Cuykens et al 2004). As discussed earlier, characterization of this class through ESI-MS/MS involve the detection of diagnostic fragments  $[M-H-15]^-$ ,  $[M-H-30]^-$  and  $[M-H-45]^-$ , which corresponds to the loss of methyl groups. Although these fragments are characteristic of PMFs, it doesn't allow the distinction of positional isomers.

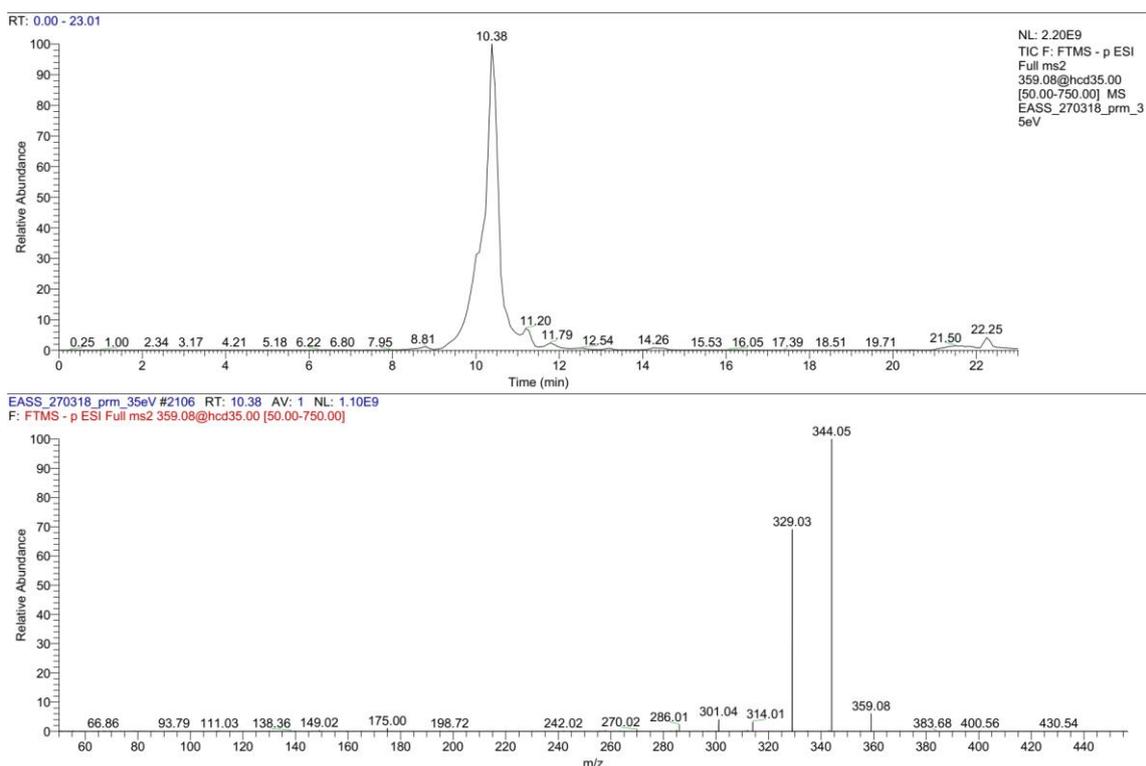


Figure 8. Chromatogram of the precursor ion  $m/z$  359.0776 showing a single peak and HR-ESI-MS/MS mass spectrum.

In fact, positional isomers as the precursor ions at  $m/z$  345.1619 were all annotated as the same compound, in this case, 3',4',5,7-tetrahydroxy-6,8-dimethoxyflavone (Table 2). The same occurred with the precursor ion  $m/z$  373.0931 with two isomers at the retention times 10.81 min and 12.35 min, both annotated as chrysopenetin with a gold spectrum match in GNPS. Interestingly, it corresponds to the same compound isolated from EA1 extract and the reference library for this annotation share in common the same mass spectrometry instrument (Q Exactive Orbitrap) used in the analysis. Thus, with a few exceptions, majority of polymethoxylated flavones were annotated at

subclass level. However, as the main fragment in the mass spectrum of this class is the product ion  $[M-H-CH_3]^{\cdot-}$ , analysis in a high-resolution equipment can provide an accurate mass measurement of the losses, which is useful to identify the degree of methylation. For instance, the precursor ion at  $m/z$  313.0720 (Rt 16.05 min) were annotated as cirsimarin, by a match with GNPS library. Mass spectrum of this compound shows the product ions  $[M-H-CH_3]^{\cdot-}$  (-15.0235 Da) and  $[M-H-2CH_3]^{\cdot-}$  (-30,0470 Da) from the transitions of  $m/z$  313,07172  $\rightarrow$   $m/z$  298.04813 and  $m/z$  313,07172  $\rightarrow$   $m/z$  283.02472, respectively, confirming the presence of two methyl groups (Figure 9). Once this cluster presented GNPS library matches, was possible to propagate the annotations using *Fusion* score, as shown in figure 11. The study of the fragmentation pattern allowed to putatively annotate these compounds as di-, tri-, tetra- and pentamethoxy flavones, by the confirmation of the transitions corresponding to the loss of methyl groups (-15.0235 Da).

F: FTMS - p ESI Full ms2 313.07@hcd35.00 [50.00-655.00]

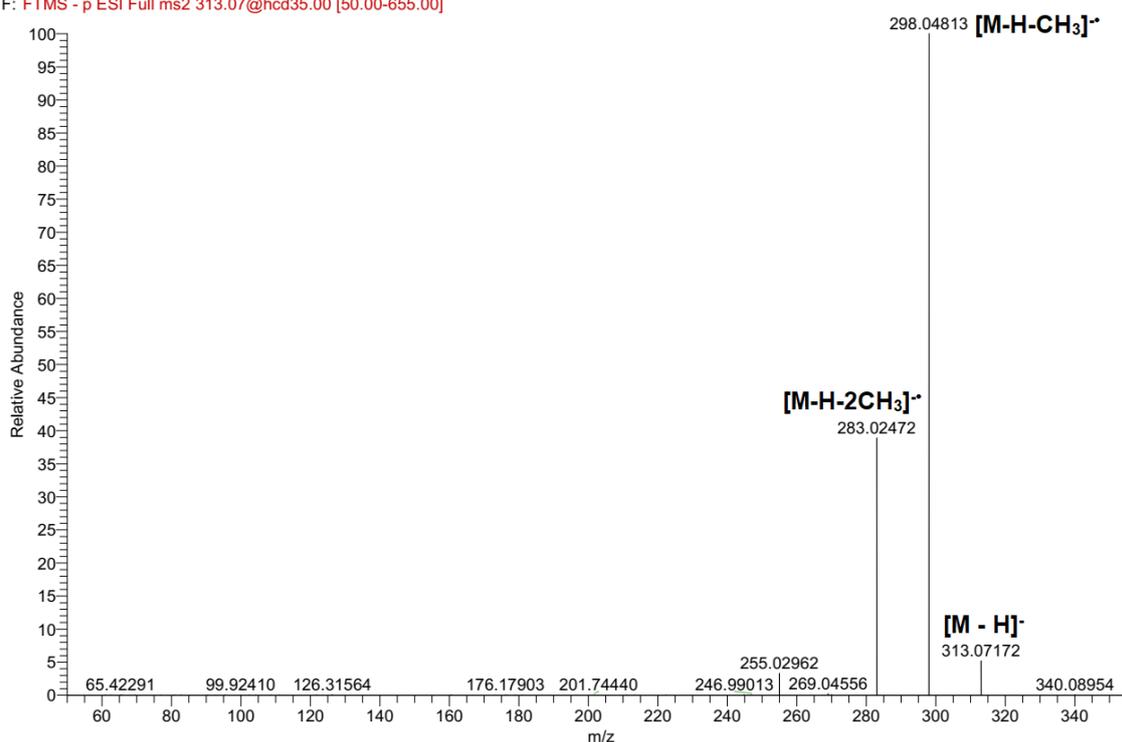


Figure 9. HR-ESI-MS/MS mass spectrum of the precursor ion  $m/z$  313.07172  $[M-H]^{\cdot-}$  showing the radical methyl losses.

In positive ion mode, it was possible to extend the annotation of this class, for the PMFs lacking a hydroxy (-OH) group, which wasn't detectable in negative

mode, which is case of the precursor ions  $m/z$  343.1178  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  373.1283  $[M+H]^+$  e  $m/z$  403.1388  $[M+H]^+$ , annotated as 4',5,6,7-tetramethoxyflavone, 3,7,3',4',5'-pentamethoxyflavone and hexamethylquercetagenin, respectively (Figures 10 and 11).

Furthermore it was noted nodes in the molecular network in negative ion mode without an annotation, probably due to the lack of reference spectra in the GNPS library. Considering the presence of node that presented a match with GNPS libraries, *network annotated propagation* (NAP), was used to annotate these nodes at subclass level, using *Fusion* and *Consensus* score (Figures 12 and 13). The annotations were considered correct since a consensus with the ten most probably structures were achieved for a subclass. The subclass was confirmed by the study of its MS/MS fragmentation spectra. The results of NAP analysis in the negative ion mode can be accessed in the following link:

<https://proteomics2.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=fe920f4f651b414f874436d726786c7d>



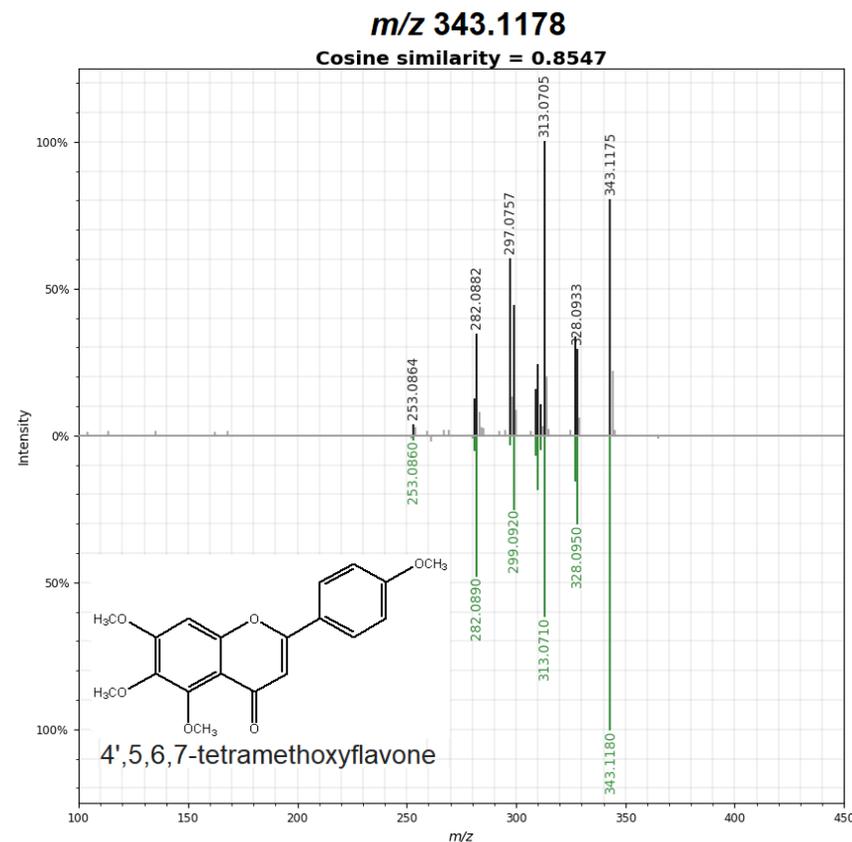
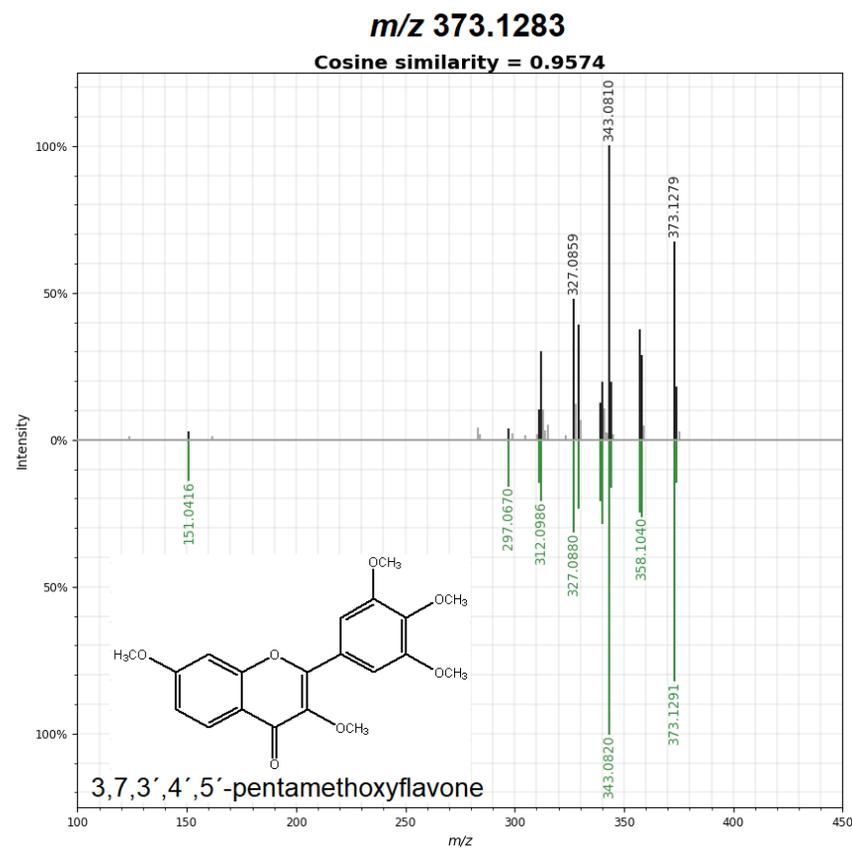


Figure 11. Comparison of the fragmentation spectra of PMFs annotated as 3,7,3',4',5'-pentamethoxyflavone (*m/z* 373.1283) and quercetagenin hexamethyl ether (*m/z* 403.1388) with the spectrum of GNPS library reference. Legend: upper spectrum (precursor ion of the sample) and lower spectrum (GNPS library reference).

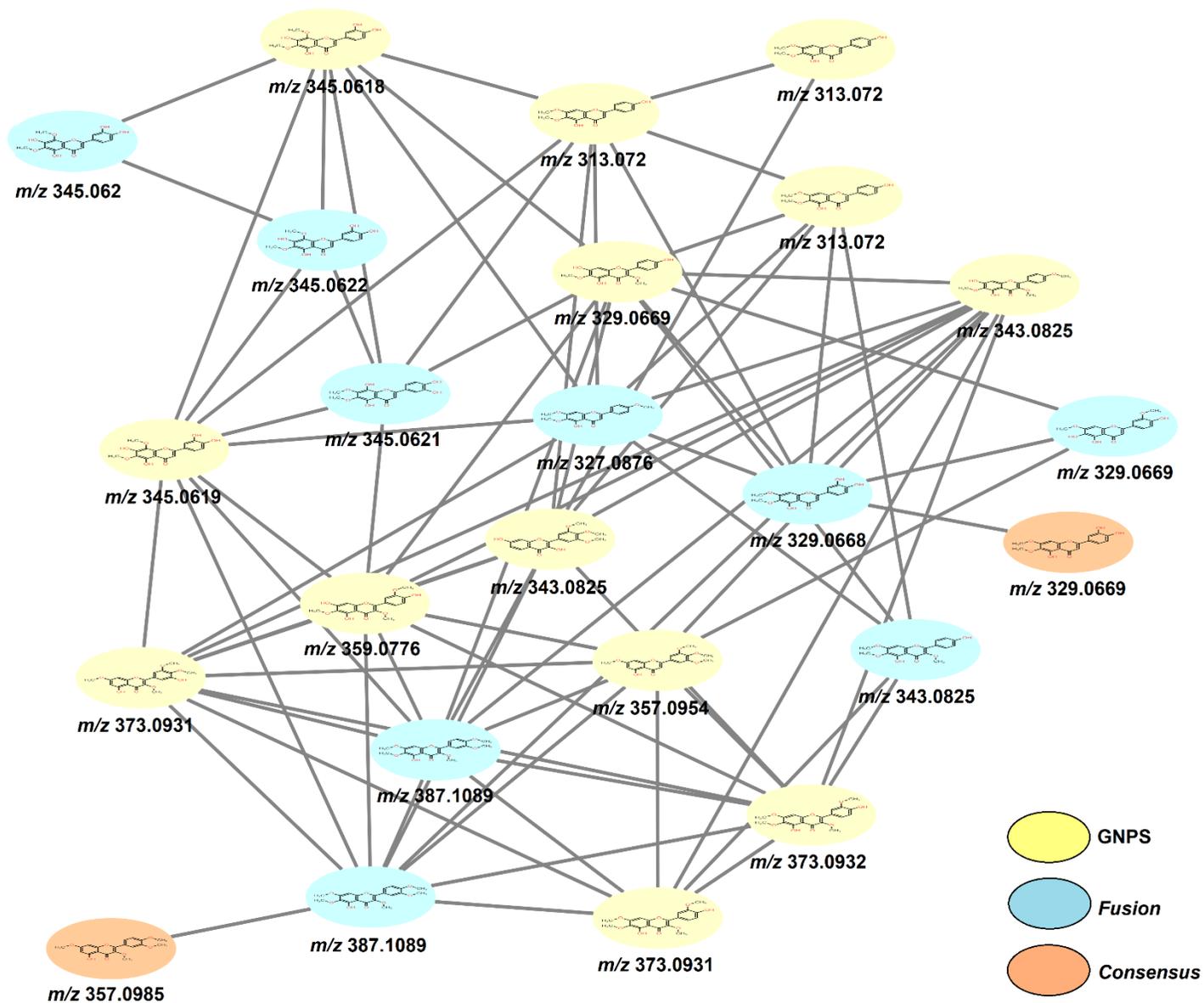


Figure 12. Cluster with the annotated PMFs through Network Annotated Propagation (NAP). The colors in the nodes shows the annotations through the GNPS spectral library (yellow), Fusion (blue) and Consensus (orange) algorithms.

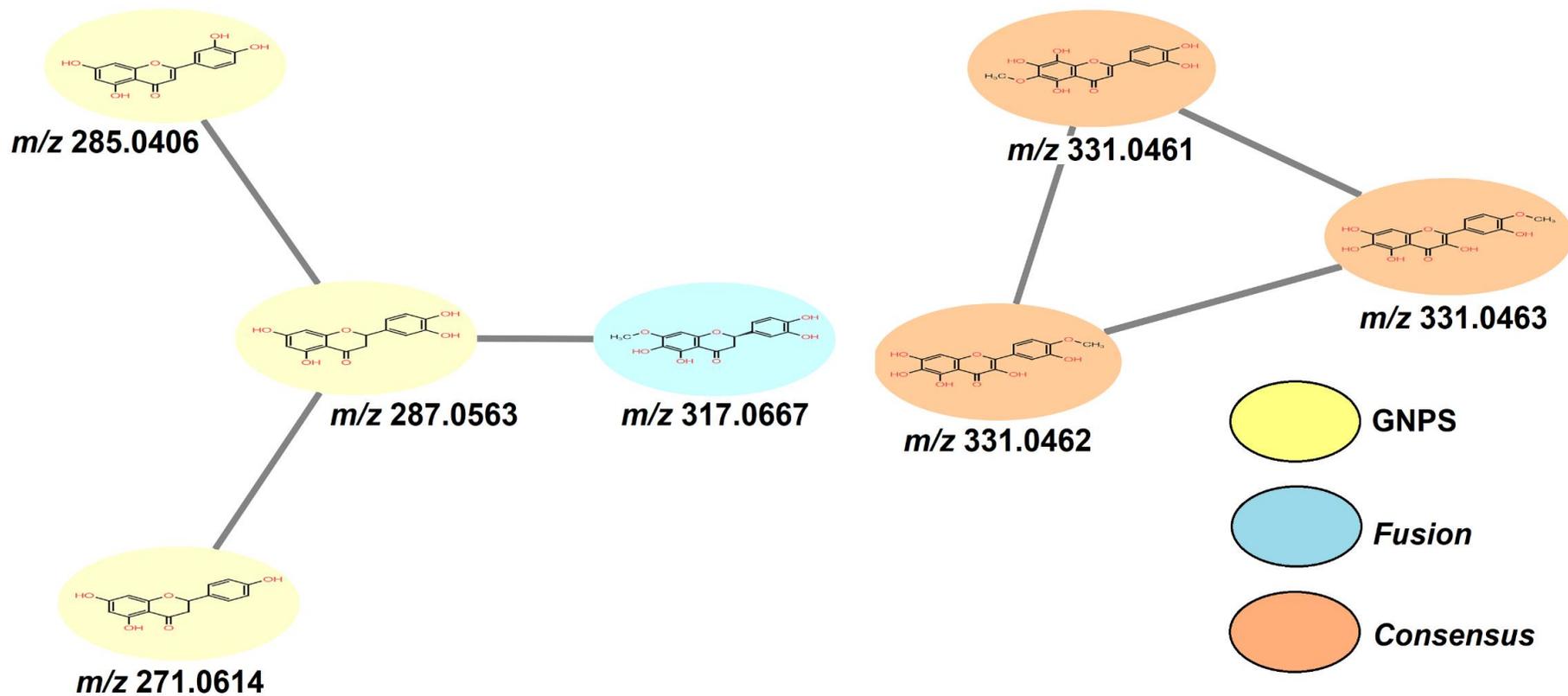


Figure 13. Clusters with the annotation of flavanones, flavones and methoxylated flavones through *Network Annotated Propagation* (NAP). The colors in the nodes shows the annotations through the GNPS spectral library (yellow), Fusion (blue) and Consensus (orange) algorithms.

The flavonoids naringenin ( $m/z$  271.0612), luteolin ( $m/z$  285.0406) and eriodyctiol ( $m/z$  287.0563) were annotated using GNPS library and retro Dials-Alder reactions were used to confirm these annotations. Mass spectrum of naringenin showed diagnostic products ions at  $m/z$  151.00 ( $[^{1,3}A^- - H]^-$ ) and  $m/z$  119.05 ( $[^{1,3}B^- - H]^-$ ), whilst eriodyctiol presented  $m/z$  151.00 ( $[^{1,3}A^- - H]^-$ ) and  $m/z$  135.04 ( $[^{1,3}B^- - H]^-$ ). Both compounds showed a signal at  $m/z$  107.01 attributed to the fragment  $[^{0,4}B^- - H]^-$ , confirming the substitution of two hydroxy groups in the A-ring (Figure 14). The diagnostic fragments  $[^{1,3}A^- - H]^-$  and  $[^{1,3}B^- - H]^-$  were also observed for luteolin at  $m/z$  151.00 and  $m/z$  133.03, respectively, although it appeared with a very low intensity signals in the spectrum at 35 eV. NAP was used to propagate the annotation to the node with  $m/z$  317.0667 in this cluster. The precursor ion at  $m/z$  317.0669 was putatively annotated as a methoxylated flavanone, using *Fusion* score, presenting signals at  $m/z$  135.04 and  $m/z$  167.00, corresponding to  $[^{1,3}B^- - H]^-$  and  $[^{1,3}A^- - CH_3]^-$ .

*Consensus* score were used to annotate the precursor ions  $m/z$  331.0462 which occurs as positional isomers at three different retention times (7.98 min, 12.30 min and 12.98 min) (Figure 13). Putatively, these ions were annotated as methoxylated flavone ( $m/z$  331,0456) presenting fragments at 165.99 ( $[^{0,3}A^- - CH_3 - H]^-$ ) and  $m/z$  139.00 ( $[^{0,4}A^- - CH_3]^-$ ), which allowed to propose three hydroxy groups and one methoxy group at A-ring.

The relative quantification showed that flavonoids are more abundant in the EA1 extract which corresponds to the exudate content of *L. artemisiifolia*. This allows to infer that these annotated flavonoids, especially polymethoxylated flavones, are produced by the glandular trichomes as already described for other Asteraceae species (Akimanya et al, 2015).

Continuing, a glycosylated flavonoid was attributed for the precursor ion  $m/z$  593.1519  $[M - H]^-$  which was annotated as vicenin-2 with GNPS library. This ion appeared as a singleton, showing that there aren't similar compounds of this class in *L. artemisiifolia* and found only in the ethanol extracts, specially from native Cerrado plants, where it appeared more abundant (Figure 15).

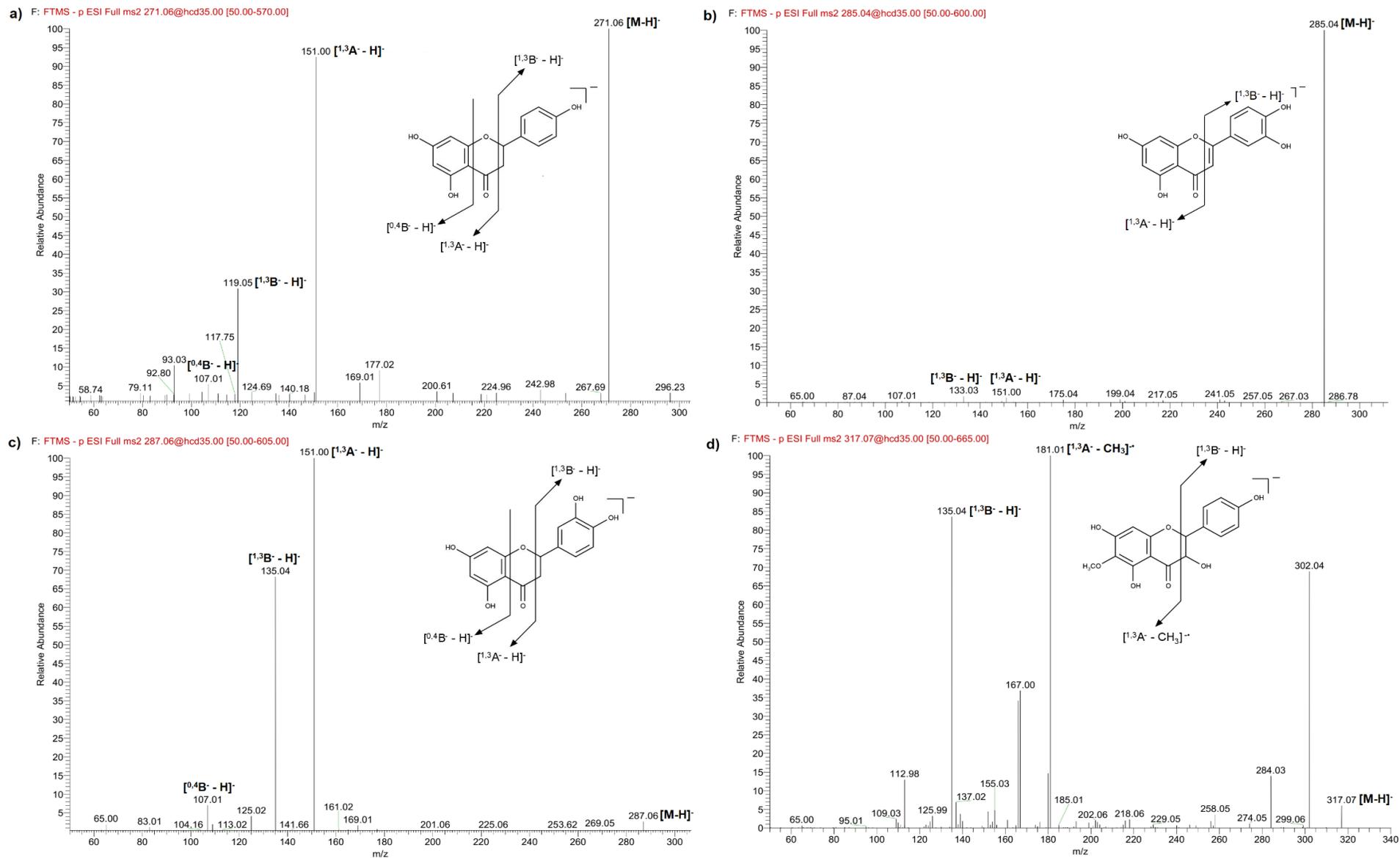


Figure 14. HR-ESI-MS/MS in the negative ion mode of (a) naringenin, (b) luteolin, (c) eriodyctiol and (d) methoxylated flavanone with diagnostic products ions.

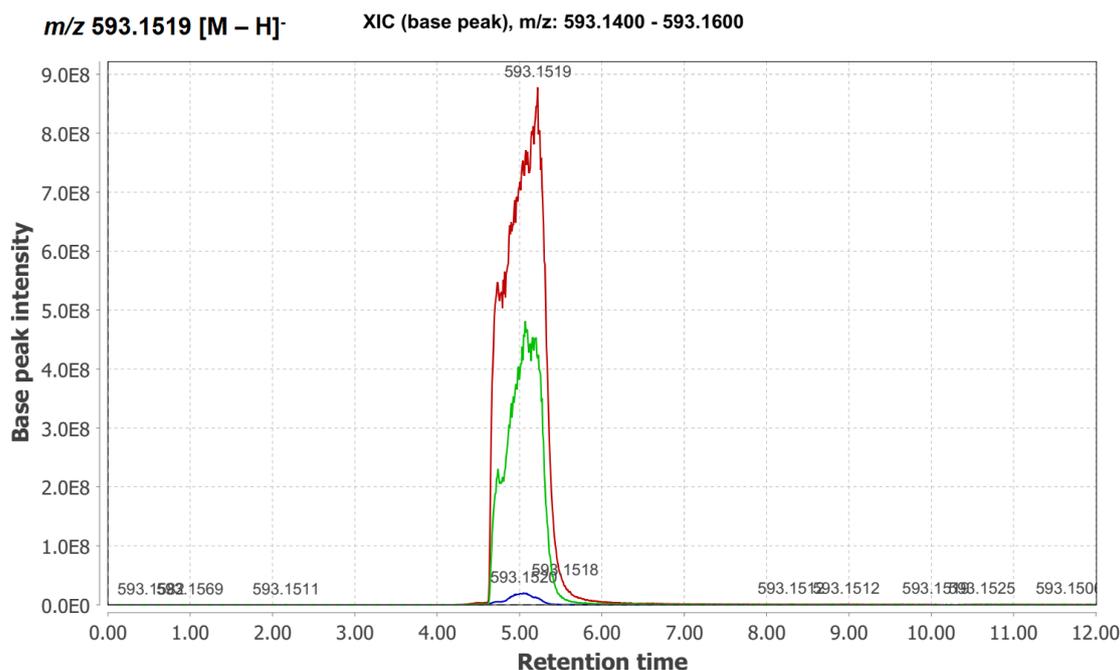


Figure 15. Extracted ion chromatograms of the precursor ion  $m/z$  593.1519 [M-H]<sup>-</sup>. Color legend: Green – Dry season; Red – Wet season; Blue – *In vitro* plant.

In fact, as demonstrated by the PLS-DA graph of loadings and the VIP score plot, this metabolite evidences the differentiation of ethanol extracts between *in vivo* and *in vitro* plants. The presence of vicenin-2 and its absorption properties of the UV light has been pointed in *Lichnophora* species, also belonging to the Asteraceae family, to be involved in the solar protection of this plant species (Silva *et al*, 2014). A similar function may be involved with *L. artemisiifolia* and can explain the high content detected for this metabolite in the native Cerrado plants, where UV radiation exposure is more intense comparing to the greenhouse used for *in vitro* micropropagation.

Several studies had covered the diagnostic fragments used for the differentiation between C-glycoside, O-glycoside and O,C-glycoside flavonoids through ESI-MS/MS analysis (Geng *et al*, 2016; Ferreres *et al*, 2007; Cuykens & Claeys, 2005). An inspection of the MS/MS spectrum of the ion at  $m/z$  593.1520, allows to observe the presence of the diagnostic fragments [aglycone+83]<sup>-</sup> and [aglycone+113]<sup>-</sup>, characterizing this flavonoid as a C-glycoside (Figure 16). Furthermore, it's possible to infer that the fragments at  $m/z$  503.12,  $m/z$  473.11,  $m/z$  413.11,  $m/z$  383.08 and  $m/z$  353.07 are product ions generated by successive

losses of  $^{0,2}X^-_0$  (90 u) and  $^{0,3}X^-_0$  (120 u) of the two sugar units (Figure 17). Also, absence of the radical aglycone ion in the mass spectrum, typically observed in O-glycoside and O,C-glycoside flavonoids, allow to identify this compound as a C-glycoside flavonoid, annotated as vicenin-2 with GNPS spectral library (Cuyckens & Claeys, 2005).

AM5\_1\_PRM30\_100220 #818 RT: 3.64 AV: 1 NL: 4.55E7  
F: FTMS - p ESI Full ms2 593.1500@hcd30.00 [50.0000-1230.0000]

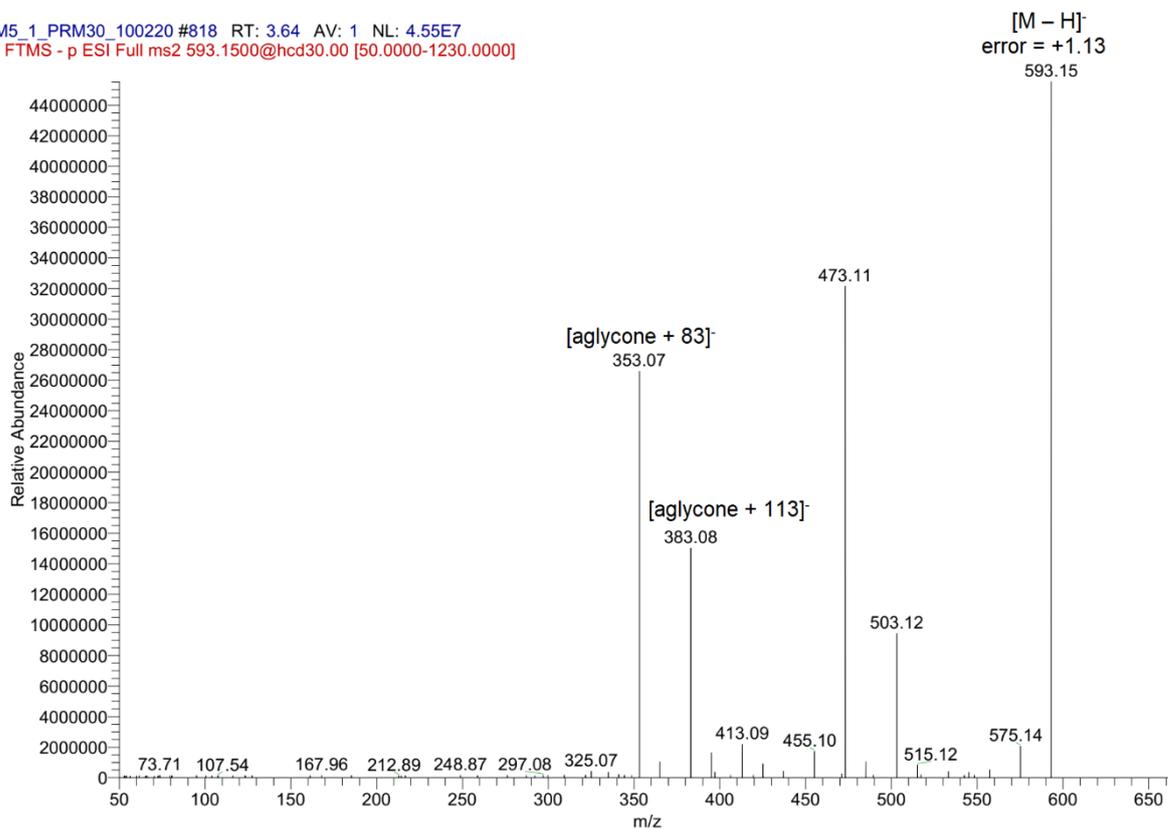


Figure 16. MS/MS fragmentation spectra of the precursor ion  $m/z$  593.1520  $[M - H]^-$  annotated as vicenin-2.

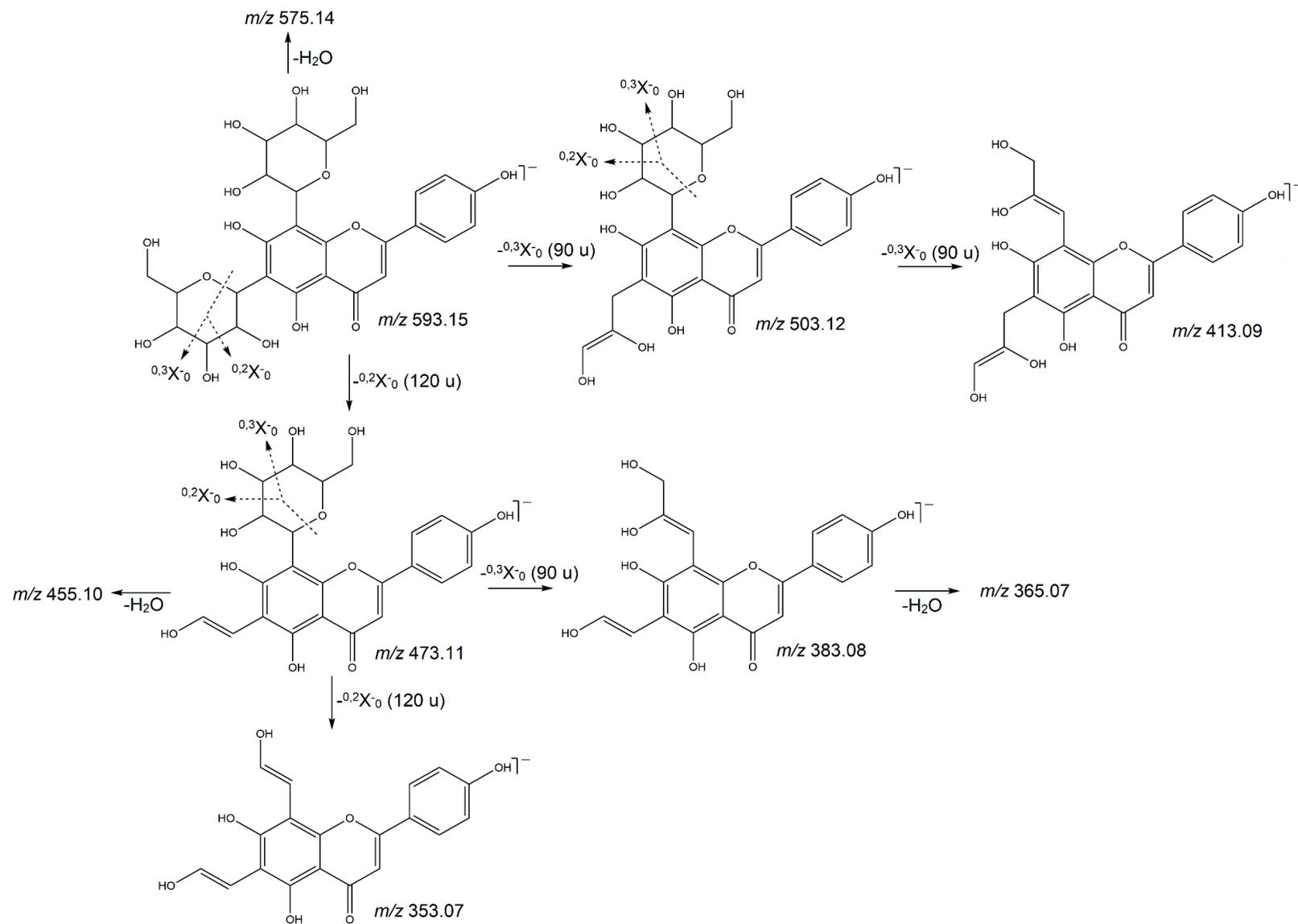


Figure 17. Propose of fragmentation of the precursor ion  $m/z$  593.1520  $[\text{M} - \text{H}]^-$  annotated as vicenin-2, based in the fragments observed in the MS/MS fragmentation spectra. (Based on the work of de Silva et al, 2017, with modifications).

Table 1. Compounds annotated through LC-ESI-MS/MS analysis and molecular networking in GNPS in negative ion mode.

Compounds	RT (min.)	Molecular formula	Aduct	<i>m/z</i> (experimental)	<i>m/z</i> (calculated)	Error (ppm)	MS/MS	Annotation level
naringenin	8.69	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	271.06143	271.06119	+0.86	177.02, 151.00, 119.05, 107.01 and 93.03	1
luteolin	6.00	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	285.04068	285.04046	+0.77	241.05, 217.05, 199.04, 151.00, 133.03 and 107.01	1
eryodictiol	7.28	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	287.05637	287.05608	-0.99	151.00, 135.04, 107.01, 83.01 and 65.00	2
cirsimaritin or isomers	7.81	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	313.07169	313.07176	-0.23	298.05, 283.02, 269.05, 255.03, 205.01, 163.00 and 117.03	3
cirsimaritin or isomers	11.99	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	313.07172	313.07176	-0.036	298.05, 283.02, 269.05, 255.03, 163.00 and 117.03	3
cirsimaritin or isomers	16.05	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	313.07172	313.07176	-0.036	298.05, 283.02 and 255.03	3
methoxylated flavanone	7.17	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	317.06638	317.06667	-0.93	302.04, 284.03, 258.05, 181.01, 167.00, 136.99, 135.04 and 112.98	3
8-hydroxy-15-labdan-oic acid	21.50	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	323.25922	323.25917	+0.72	307.23, 305.25, 279.27, 263.24, 247.21, 127.11, 69.03 and 57.03	1

trimethoxylated flavone	10.01	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	327.08725	327.08741	-0.31	312.06, 294.05, 266.06, 177.02 and 117.03	297.04, 269.05, 222.07,	3
dimethoxylated flavone	8.36	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	329.06650	329.06667	-0.54	314.04, 286.01, 258.02, 164.98 and 119.05	299.02, 271.02, 180.01,	3
dimethoxylated flavone	10.10	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	329.06659	329.06667	-0.26	314.04, 286.01, 133.03	299.02, 179.00 and	3
dimethoxylated flavone	10.68	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	329.06656	329.06667	-0.35	314.04, 286.01	299.02 e	3
4',5,7-trihydroxy-3,6-dimethoxyflavone	13.61	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	329.06653	329.06667	-0.44	313.04, 271.02, 227.03, 171.04, 110.00 and 65.00	299.02, 243.03, 199.04, 133.03,	2
methoxylated flavone	6.22	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	331.04575	331.04536	-0.49	316.06, 287.02, 209.01, 165.99, 121.03	301.04, 257.05, 181.01, 135.04 and	3
methoxylated flavone	7.98	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	331.04581	331.04536	-1.37	316.02, 271.02, 181.01, 135.04 and 121.03	287.02, 209.01, 165.99,	3
methoxylated flavone	9.13	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	331.04550	331.04594	-0.44	316.02, 272.02, 181.01, 135.04 and 121.03	288.02, 209.01, 165.99,	3

dimethoxylated flavone	6.46	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	343.08255	343.08232	+0.57	328.06, 300.03, 269.05 and 160.02	313.04, 285.00,	3
5,7-dihydroxy-3,6,4'- trimethoxyflavone	11.84	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	343.08221	343.08232	-0.34	328.06, 298.01 and 285.04	313.04,	2
robinetin trimethyl ether	15.88	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	343.08215	343.08232	-0.51	328.06, 285.04 and 269.05	313.04,	3
dimethoxylated flavone	7.16	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	345.06174	345.06159	0.43	330.04, 287.02, 195.03, 149.02 and 121.03	315.01, 195.03, 180.01,	3
3',4',5,7-tetrahydroxy- 6,8-dimethoxyflavone or isomers	9.08	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	345.06131	345.06159	-0.82	330.04, 287.02, 149.02	315.01, 271.02 and	2
3',4',5,7-tetrahydroxy- 6,8-dimethoxyflavone or isomers	9.32	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	345.06131	345.06159	-0.82	330.04, 287.02, 195.03, 164.98, 121.03	315.02, 223.02, 180.01, 149.02 and	2
dimethoxylated flavone	10.54	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	345.06180	345.06159	0.61	330.04, 302.07, 271.05, 223.02, 180.01, 133.03 and 121.03	315.02, 287.02, 258.05, 195.03, 165.99,	3
dimethoxylated flavone	10.90	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	345.06146	345.06159	-0.38	330.04, 302.07, 271.05, 223.02, 180.01, 121.03	315.02, 287.02, 258.05, 195.03, 135.04 and	3

corymbosin	7.81	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	357.09827	357.09798	0.82	342.07, 312.03, 284.03, 177.02	327.05, 299.06, 269.01 and	2
tetramethoxylated flavone	10.89	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	357.09821	357.09798	0.65	342.07, 314.04, 286.05, 243.10, 221.12 and	327.05, 299.02, 271.02, 227.03, 112.98	3
jaceidin	10.27	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	359.07751	359.07724	+0.75	329.03, 286.01	314.01 and	2
chryso splenetin isomers	or 8.56	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	373.09323	373.09289	+0.91	358.07, 328.02, 300.03, 195.03 and	343.05, 315.05, 285.00, 135.04	2
chryso splenetin isomers	or 10.81	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	373.09311	373.09289	+0.58	358.07, 330.07, 299.06, 271.06, 195.03, 148.02	343.05, 315.05, 287.06, 256.04, 163.04 and	2
myricetin 3,7,3',4'-tetramethyl ether	12.35	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	373.09311	373.09289	+0.58	358.07, 328.02, 300.03 and	343.05, 315.05, 285.00	2
pentamethoxylated flavone	10.11	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	387.10913	387.10854	+1.52	372.08, 342.04, 314.04, 271.03	357.06, 329.07, 299.02 and	3

pentamethoxylated flavone	10.23	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	387.10904	387.10854	+1.29	372.08, 342.04, 327.02, 313.07, 301.07, 257.08 and 195.03	357.06, 329.07, 314.04, 314.04, 299.02,	3
vicenin-2	5.05	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	593.15173	593.15119	+0.91	575.14, 503.12, 455.10, 353.07	515.12, 473.11, 383.08 and	2

Table 2. Compounds annotated through LC-ESI-MS/MS analysis and molecular networking in GNPS in positive ion mode.

Compounds	RT (min .)	Molecular formula	Aduct	<i>m/z</i> (experimental)	<i>m/z</i> (calculated)	Error (ppm)	MS/MS	Annotation level
4',5,6,7-tetramethoxyflavone	11.03	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	343.11746	343.11761	-0.45	328.09, 327.09, 313.07, 299.09, 297.08, 289.09, 253.09, 168.04, 113.50 and 79.97	2
3,7,3',4',5'-pentamethoxyflavone	9.04	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	373.12811	373.12817	-0.19	359.10, 357.10, 343.08, 329.10, 327.09, 312.10, 297.08, 283.10, 269.08, 185.72, 151.04, 107.08 and 76.98	2
hexametilquercetagenin	9.63	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	403.13864	403.13874	-0.26	387.11, 373.09, 369.10, 355.08, 339.09, 327.09, 311.09, 299.09, 248.82, 220.27, 184.51 and 165.05	2
8,15-labdanediol	19.49	C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> O	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	293.28360	293.28389	-0.99	250.30, 205.20, 179.18, 163.15, 149.13, 137.13, 123.12, 121.10, 109.10, 81.07, 69.07 and 57.07	1
labdan-8-ol-15-yl-acetate	20.96	C <sub>22</sub> H <sub>39</sub> O <sub>2</sub>	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	335.29413	335.29445	-0.97	219.21, 205.20, 177.16, 163.15, 137.13, 123.12, 121.10, 109.10, 95.09, 81.07, 69.07 and 57.07	1

## 2.4 Comparison of the chemical composition between *in vivo* and *in vitro* *Lomatozona artemisiifolia*

Featured based molecular network and chemometrics analysis enabled to check the differences and similarities of the chemical content between *in vivo* and *in vitro* *Lomatozona artemisiifolia*. It was possible to observe by the relative quantification in FBMN, that common compounds between *in vivo* and *in vitro* *L. artemisiifolia*, are equal or more abundant in the latter. This is in agreement with several studies which states that the defined microenvironment and access to nutrients on soil of *in vitro* micropropagation constitute better conditions for the production of secondary metabolites, in contrast to the ambiental stress found for the field growth species (Uzelac et al 2020). In fact, *in vitro* micropropagation is considered a well-established way to produce secondary metabolites as an alternative to the extractivism of natural resources and has been used in the production of plant pharmaceuticals (Devrnja et al, 2020; Rao & Ravishankar, 2002). Furthermore, is efficient method for the conservation of rare and endangered species (Muraseva & Kotiskova, 2020), which is the case of *L. artemisiifolia*. Despite studies highlight the production of secondary metabolites through *in vitro* micropropagation, differences in the chemical composition between *in vivo* and *in vitro* species usually occurs, as verified in the present study (Oliveira et al 2020). Thus, regarding the use and application of plant extracts obtained through *in vitro* micropropagation, it's important to observe possible metabolite variations of the *in vitro* species. In this work it was demonstrated that molecular networking together with multivariate analysis can be a useful tool for this propose.

Chemometrics analysis allowed to observe these metabolites in the PLS-DA and VIP analysis. Some of these compounds could be annotated by the molecular network analysis in GNPS (table 3). For instance, the inspection of the selected precursor ions of VIP score graph, allowed to observe a higher isotopic abundance on the *in vitro* plant extracts, which is case of the polymethoxylated flavones annotated as corymbosin ( $m/z$  357.0984 [M-H]<sup>-</sup>, Rt 9.95 min) and cirsimaritin ( $m/z$  313.0720 [M-H]<sup>-</sup>, Rt 16.02 min.), along with the precursor ions  $m/z$  339.2543 [M-H]<sup>-</sup> (Rt. 12.15 min.) and  $m/z$  501.3075 [M-H]<sup>-</sup>, that couldn't be annotated (Figure 22).

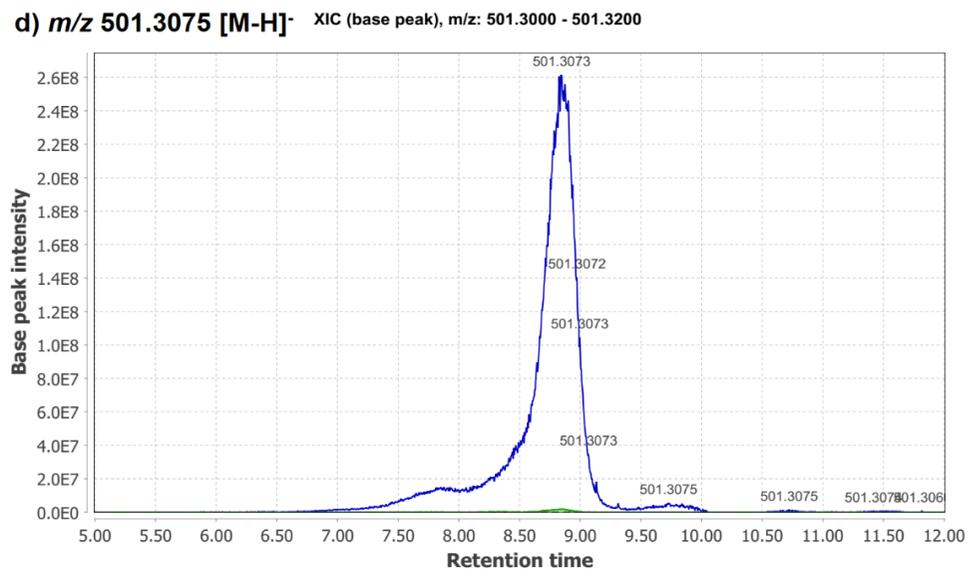
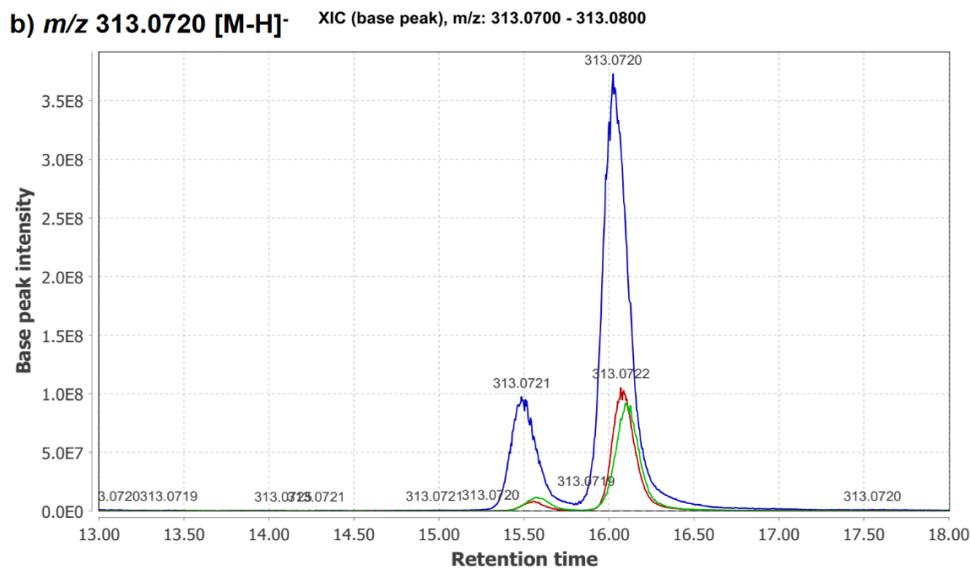
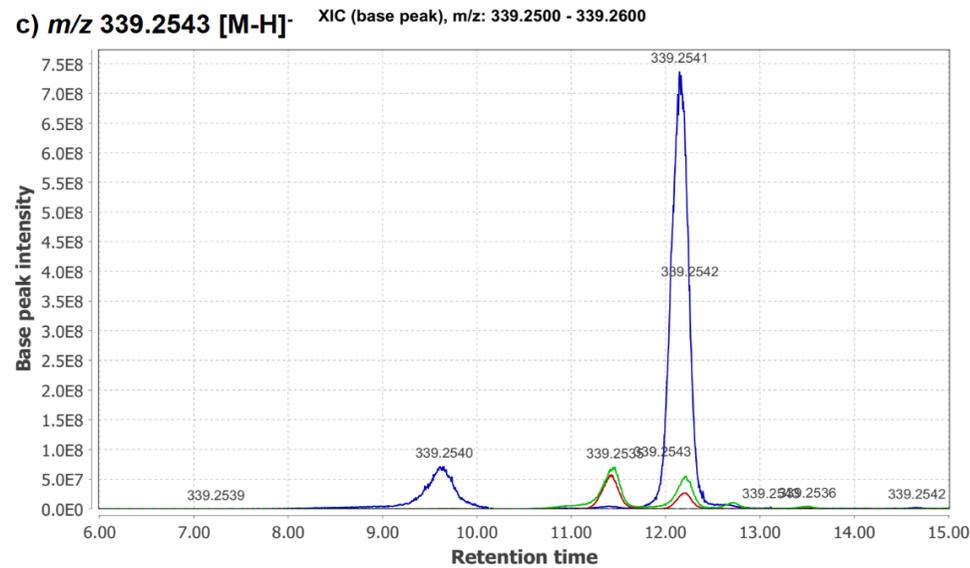
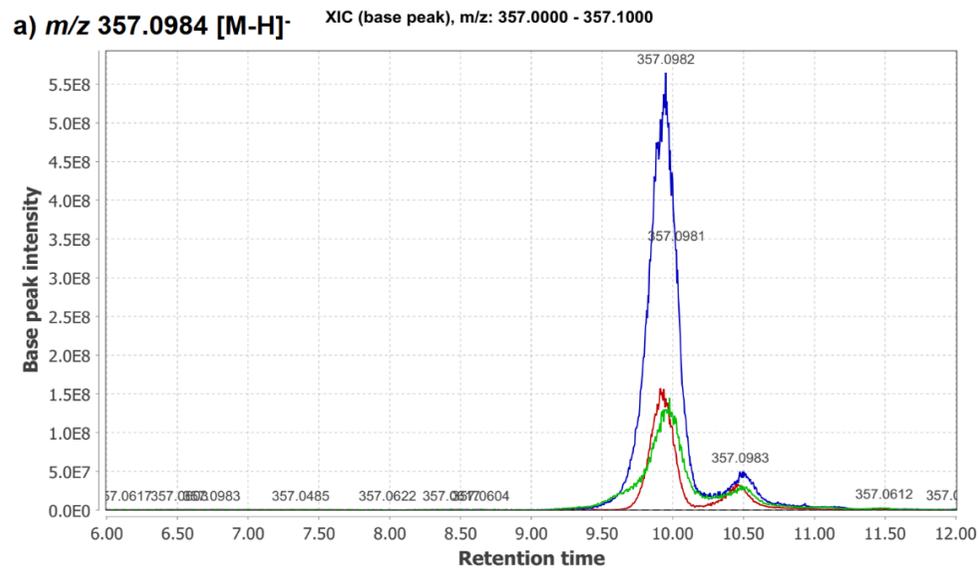


Figure 22. Extracted ion chromatogram of the precursor ions  $m/z$  357.0984 [M-H]<sup>-</sup> (Rt 9.95 min),  $m/z$  313.0720 [M-H]<sup>-</sup> (Rt 16.02 min.),  $m/z$  339.2543 [M-H]<sup>-</sup> (Rt. 12.15 min.) and  $m/z$  501.3075 [M-H]<sup>-</sup>. Color legend: Green – Dry season; Red – Wet season; Blue – *In vitro* plant.

Table 3. Compounds annotated for the precursor ions selected in variable importance in projection (VIP) analysis of PLS-DA through GNPS.

Compounds	RT (min.)	Molecular formula	Aduct	<i>m/z</i> (experimental)	<i>m/z</i> (calculated)	Error (ppm)	MS/MS	Annotation level
vicenin-2	3.66	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	593.15173	593.15119	+0.91	575.14, 515.12, 503.12, 473.11, 455.10, 383.08 and 353.07	2
not annotated	12.14	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	339.25418	339.25408	+0.29	328.57, 294.59, 279.23, 246.72, 226.68, 223.21 and 183.01	-
not annotated	19.45	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N	[M-H] <sup>-</sup>	277.18408	277.18359	-1.76	79.96	-
not annotated	21.62	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N	[M-H] <sup>-</sup>	291.19992	291.19925	+2.30	79.96	-
not annotated	5.90	C <sub>33</sub> H <sub>59</sub> O <sub>15</sub>	[M+HC OO] <sup>-</sup>	695.38647	695.38533	-1.65	649.38, 487.33 and 161.04	-
corymbosin	7.81	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	357.09827	357.09798	0.82	342.07, 327.05, 312.03, 299.06, 284.03, 269.01 and 177.02	2
not annotated	19.54	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	250.14490	250.14487	+0.13	-	-
not annotated	7.49	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	547.31305	547.31239	+1.21	381.27, 363.25, 339.25 and 103.02	-
cirsimaritin or isomers	16.05	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	313.07172	313.07176	-0.036	298.05, 283.02 and 255.03	2
not annotated	8.84	C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> O <sub>9</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	501.30737	501.30691	+1.10	339.25	-
not annotated	20.36	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N	[M-H] <sup>-</sup>	311.16891	311.16795	+3.09	293.21, 274.88, 243.10, 223.17, 201.11, 174.96, 149.10, 127.08 and 87.04	-

methoxylated flavone	7.98	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	331.04581	331.04536	-1.37	316.02, 287.02, 271.02, 209.01, 181.01, 165.99, 135.04 and 121.03	3
not annotated	21.22	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	367.19174	367.19148	0.70	323.20, 310.16, 295.21, 205.16, 149.10, 108.02 and 95.01	-
not annotated	11.13	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	327.21790	327.21713	-0.33	312.03, 309.21, 297.04, 284.03, 269.05, 239.13, 229.14, 221.12, 211.13, 171.10, 97.06, 85.03 and 57.03	-
trimethoxylated flavone	10.01	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	327.08725	327.08741	-0.31	312.06, 297.04, 294.05, 269.05, 266.06, 222.07, 177.02 and 117.03	3

So far, it's possible to infer that *in vitro* *L. artemisiifolia* differentiates from *in vivo* species only in the chemical content present on foliar surface of this plant, highly related to the glandular trichomes spread over the entire aerial parts of this species. In fact, literature reports that *in vitro* plants develop differently from *in vivo* species and regarding specific vegetal structures such as glandular trichomes, the growth conditions may lead to abnormalities in the plant morphology and physiology, thus influencing the production of secondary metabolites (Stanojkvic et al 2021; Uzelac et al 2020; Sota et al 2019). In this study we suggest that the absence as well as the low content of some compounds of *in vitro* *L. artemisiifolia*, can be explained based on this vegetal anatomic differentiation of the glandular trichomes between *in vivo* and *in vitro* species. However, further investigations concerning histochemical analysis are required to confirm this hypothesis.

### 3. Conclusions

In this work we present the phytochemical study of *L. artemisiifolia*, a threatened endangered species from Brazilian Cerrado biome. Thus, with the use of LC-ESI-MS/MS and molecular networking analysis we describe a series of flavonoids, the most abundant class in this specie, together with labdane diterpenes. Furthermore, molecular networking annotation through GNPS platform was combined with a chemometric analysis in order to compare *in vivo* and *in vitro* species and clarify which class of metabolites has its production influenced by the growth conditions in field and by *in vitro* micropropagation. It was possible to observe differences among the metabolites present in the exudate of *L. artemisiifolia* found in the Cerrado biome and *in vitro* individuals. According to the literature this is possible associated with abnormalities on the development of glandular trichomes in the *in vitro* plant, already observed in other *in vitro* species. Finally, this work is the first chemical study of *L. artemisiifolia*, demonstrating how recent chemoinformatic tools in mass spectrometry can be used successfully for the annotation of compounds in an unknown species and representing a contribution to the chemical knowledge of *Lomatozona* genera.

## Acknowledgements

### Declaration of competing interest

### Appendix. Supplementary data

- NMR data (1D and 2D) of the isolated compounds **1** – **7** (Tables S1-S7 and Figures S1-S19);
- Molecular networking complementary information.

## 4. Experimental

### 4.1 General experimental procedures

Chromatographic column was realized using silica gel 60 (70 – 230 mesh) purchased from Macherey–Nagel and P. A. solvents purchased from Synth, Neon and Biograde. Isolation procedures were accompanied by analytical TLC analysis, carried out with silica gel GF<sub>254</sub> plates (4 x 5 cm – Macherey-Nagel) supported in aluminum, while preparative TLC were prepared in a glass plate (20 x 20 cm). NMR spectra (1 and 2D) were acquired in a Bruker Avance III spectrometer (500 MHz), using CDCl<sub>3</sub> and TMS as internal reference standard (Cambridge Isotopes Laboratories Inc.). LC-ESI-MS/MS analysis were performed in a Thermo Scientific Q Exactive Focus CLUE-EM/EM mass spectrometer coupled to a UHPLC Dionex UltiMate 3000. Chromatographic profiles were obtained using an ACE C<sub>18</sub> reverse phase column (100 x 4.6 mm – 3.0 μm) and mobile phase was a mixture of deionized water and methanol, both acidified with formic acid (0.1% v/v), keeping a flow of 1.0 mL/min. Column temperature was kept in 40°C and MS data was acquired between 150-700 *m/z* mass range, in negative ion mode. Samples were prepared in a concentration of 1.0 mg/mL and filtered using PVDF 0.45 μm filters and 10 μL of each sample was injected in the analysis.

## 4.2 Plant material

The aerial parts of *L. artemisiifolia* were collected in the Federal University of Goiás Biologic Reserve “Prof. José Angelo Rizzo”, placed on the Serra Dourada State Park, localized in the counties of Mossâmedes, Cidade de Goiás and Buritis de Goiás (Goiás state, Brazil). The vegetal material was collected in two seasons of 2016, in a dry (April to September) and wet (October to March) seasons. The specie was identified by prof. Dr. Aristônio Magalhães Teles (Biological Sciences Institute, UFG) and a voucher specimen (4253) was deposited in the Federal University of Goiás Herbarium. The present research project was registered in the National System of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (Sisgen) under registration AFCEC88.

## 4.3 *In vitro* plant material

*In vitro* *L. artemisiifolia* were produced by Moreira (2018) through micropropagation studies from the seeds of *L. artemisiifolia* collected in Serra Dourada State Park (Brazil, Goiás state), under Marashige-Skoog medium, in the Tissue Culture Laboratory (LabCultive) from UFG, under supervision of Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov, which provided the vegetal material for this study.

## 4.4 Extraction and isolation

The aerial parts of *L. artemisiifolia* were collected in the Biological Reserve “Professor José Angelo Rizzo”, placed on the Serra Dourada State Park (Goiás state, Brazil), in the Midwest Brazilian Cerrado. To remove the metabolite content present in the surface of the leaves and stem, fresh aerial parts of *L. artemisiifolia* were rinsed with ethyl acetate for 5 minutes. The organic solvent was eliminated under vacuum at 40°C using a rotatory evaporator to give the ethyl acetate 1 extract (EA1). Then, the vegetal material was dried, grounded in a knife mill and macerated with ethyl acetate and ethanol, to afford, after elimination of organic solvent, ethyl acetate 2 (EA2) and ethanol (EE) extracts (table 1). This procedure was adopted for plants collected in dry and wet seasons, and also for the *in vitro* plant. A total of nine extracts were prepared and used in this study. Sample

masses and extraction yield of the vegetal material collected in dry and wet seasons, as well as the *in vitro* plant are reported in table 3.

Table 4. Mass and extraction yield of the extracts from aerial parts of *L. artemisiifolia*.

Source	Fresh vegetal material mass (g)	EA1 (g) (Yield)	EA2 (g)(Yield)	EE (g) (Yield)
Dry season	200.0 g	9.02 g (4.51%)	1.44 g (0.72%)	1.13 g (0.56%)
Wet season	120.0 g	12.65 g (10.54%)	1.85 g (1.54%)	1.10 g (0.92%)
<i>In vitro</i> plant	5.0 g	286.8 mg (5.73%)	61.4 mg (1.23%)	129.1 mg (2.58%)

An aliquot of the EA1 extract was submitted to a silica gel 60 (70 -230 mesh) column chromatography using an increasing gradient of n-hexane-EtOAc (100:0 to 10:90) affording 33 fractions, gathered according to their similarity in TLC analysis. Fractions 21, 25 and 27 were purified in another silica gel 60 column chromatography (CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 100:0 to 90:10), affording the isolated compounds labdan-8-ol-15-yl-acetate (**1**) (46.1 mg), quercetagenin-3,5,6,3',4'-pentamethyl ether (**2**) (4.8 mg), oxyanin B (**3**) (2.7 mg), 8,15-labdane diol (**4**) (99.3 mg). Subfraction 10-25 obtained from the fraction 25 column was purified by a preparative TLC (CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 98:2), allowing the isolation of chrysosplenetin (**5**) (1.3 mg) e pachypodol (**6**) (1.3 mg). Finally, EA1 extract from wet season was extracted with n-hexane to remove apolar compounds affording n-hexane extract (HE) (763.4 mg), which was submitted to a column chromatographic with silica gel 60 (70 – 230 mesh) (n-hexane/EtOAc and CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 100:00 to 10:100), to afford 8-hydroxi-15-labdanoic acid (**7**) (1.4 mg). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data can be found in the supplementary material (Tables S1-S7) together with 1 and 2 D NMR spectra (Figures S1-S19).

#### 4.5 LC-ESI-MS/MS analysis

LC-ESI-MS/MS analysis were carried out in a Thermo Scientific Q Exactive Focus CLUE-MS/MS mass spectrometer coupled to a UHPLC Dionex UltiMate 3000 system in the Regional Center for Technological Development and Innovation of Federal University of Goiás (CRTI – UFG). Chromatographic profiles were obtained on an ACE C<sub>18</sub> (100 x 4.6 mm – 3.0 µm) reverse phase column, using a mobile phase of methanol and deionized water, both acidified with formic acid (0.1% v/v), keeping a flow rate of 1.0 mL.min<sup>-1</sup>. Gradient elution method was as follows: 70% MeOH for 13 min, 70-100% MeOH for 3 min, 100-70% MeOH for 2 min, 70% MeOH for 5 min, totalizing 23 minutes of analysis. Column temperature was kept at 40°C and MS data were acquired in a range of 150-750 *m/z* on negative and positive ion modes. Samples were prepared at a concentration of 1.0 mg.mL<sup>-1</sup>, dissolved in methanol and filtered in 0.45 µm PVDF filters and 10 µL of each sample was injected.

#### 4.6 MZmine 2 LC-ESI-MS/MS data preprocessing parameters

LC-ESI-MS/MS data acquired in negative and positive ionization modes were preprocessed prior to the molecular networking analysis following the protocol in the GNPS documentation (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/featurebasedmolecularnetworking-with-mzmine2/>). Initially files were converted from .RAW to .mzXML files using MSconvert part of ProteoWizard software package version 3.0. The .mzXML files were processed in MZmine 2 version 2.53. Mass detection were performed with noise level values of 1000000 and 0 for MS1 and MS2, respectively. ADAP chromatogram build was used with a minimum group size of scans of 5, a group intensity threshold of 3000000, a minimum peak intensity of 1000000 and *m/z* tolerance of 0.01 (or 5 ppm). Chromatograms were deconvoluted using a minimum peak height of 3000000, peak duration range of 0.09 to 10.00 min and a baseline level of 1000000. MS2 scans were paired using an *m/z* tolerance of 0.025 Da and retention time tolerance range of 0.15 min. Isotopes were grouped using a *m/z* tolerance of 0.0 or 5.0 ppm, retention time tolerance of 0.1 and maximum charge of 1. Peak alignment was performed using *m/z* tolerance of 0.0 ppm or 5.0, retention time tolerance of 0.2, *m/z* and retention time weights of 75

and 25, respectively. Then the peak list was filtered keeping only the peaks with MS<sup>2</sup> scans. Gap-filling was realized with peak finder module, using intensity tolerance of 10%, *m/z* tolerance of 0.0 or 5.0 ppm and retention time tolerance of 0.1. The peak area quantification and the spectral data was exported to a .csv and .mgf files, respectively. These files, together with a metadata file with information about the samples, were uploaded in GNPS.

#### 4.7 FBMN molecular networking parameters

Molecular networks were built with LC-ESI-MS/MS data acquired in negative and positive ion modes in the featured based molecular networking mode in GNPS (Nothias, L-F. et al, 2020). The molecular networks were created on GNPS website with the tolerance values were set 0.02 for both precursor and MS<sup>2</sup> masses. The network was created, presenting cosine score above 0.65 and more than 4 matched peaks for the edge filtering. The spectra of the network were searched in GNPS libraries where matched compounds were obtained with score threshold above 0.65 and only if a minimum of 4 matched peaks were achieved. The molecular network was visualized in Cytoscape version 3.8.2. The molecular networking analysis for positive and negative ion modes can be accessed through the links below:

Negative ion mode:  
<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=180c29ac072b43ddb4061dc1cd7c16>

Positive ion mode:  
<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=d47d56dc33fe42828d1e5f8c366a0f13>

#### 4.8 Network Annotation Propagation (NAP) search parameters

Network Annotation Propagation (NAP) was set following the GNPS documentation workflow (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/nap/>). The 10 first candidate structures of the neighbor nodes were selected for fusion and consensus re-ranking. Adducts

of  $[M-H]^-$  and  $[M+H]^+$  were expected for the precursor ions in negative and positive ion mode. Compound class were selected for “flavonoids”, “prenol lipids” and “organooxygen compounds”, according to the classes already annotate in the clusters. Cosine value was set to 0.65 and the structures databases were chosen (GNPS, SUPNAT and NPAtlas).

#### 4.10 Data pre-processing in RStudio and multivariate statistical analysis in MetaboAnalyst 4.0

LC-ESI-MS/MS data files were converted from .RAW to .mzXML files using MSconvert part of ProteoWizard software package version 3.0. The .mzXML files were pre-processed in RStudio software version 1.2.5033, where all sample data were crossed against blank, removing the common signals ( $m/z$ ). The resulting table containing the precursor ions information (extracts, season of collection or *in vitro*,  $m/z$  and signal intensity) were exported as a data matrix in a .csv file and uploaded in MetaboAnalyst 4.0. Data matrix was normalized by mean centering prior to hierarquical cluster (HCA) and principal square least discriminant analysis (PLS-DA).

#### References

Akimanya, A.; Midiwo, J. O.; Matayoshi, J.; Okanga, F.; Masila, V. M.; Walker, L.; Tekwani, B. L.; Muhammad, I.; Omosa, L. K. Two polymethoxylated flavonoids with antioxidant activities and a rearranged clerodane diterpenoid from the leaf exudates of *Microglossa pyrifolia*. *Phytochemistry Letters*, v. 11, p. 183–187, 2015.

Aron, A. T; et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols*, 2020.

Champagne, A. & Boutry, M. Proteomics of terpenoid biosynthesis and secretion in trichomes of higher plant species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1864 (2016) 1039–1049.

Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using metaboanalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 68, e86.

Cuykens, F. & Claeys, M. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-*O*-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. *J. Mass Spectrom.* 2005; 40: 364–372.

Cuykens, F. & Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 2004; 39: 1–15.

Da Silva, L. C. *Lomatozona artemisiifolia* Baker: cultivo *in vitro*, reforço populacional e utilização no biocontrole de nematoides. Doctoral thesis. Federal University of Goiás, 2019.

Da Silva, R.R. Wang, M., Nothias, L.F., van der Hooft, J.J.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Fox, E., Balunas, M.J., Klassen, J.L., Lopes, N.P., Dorrestein, P.C., 2018. Propagating annotations of molecular networks using *in silico* fragmentation. *PLoS Comput. Biol.* 14, 1–26.

Devrnja, N.; Krstić-Milošević, D.; et al. *In vitro* cultivation of tansy (*Tanacetum vulgare* L.): a tool for the production of potent pharmaceutical agents. *Protoplasma*, 2020.

Espinosa-Leal, C.; Puente-Garza, C. A.; García-Lara, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* (2018) 248:1–18.

Ferreres, F.; et al. Characterization of *C*-glycosyl flavones *O*-glycosylated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161 (2007) 214–223.

Frański, R.; Gierczyk, B.; Kozik, T.; Popena, Ł.; Beszterda, M. Signals of diagnostic ions in the product ion spectra of  $[M-H]^-$  ions of methoxylated flavonoids. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2019; 33:125-132.

Geng, P. Comprehensive characterization of *C*-glycosyl flavones in wheat (*Triticum aestivum* L.) germ using UPLC-PDA-ESI/HRMSn and mass defect filtering. *J. Mass Spectrom.* 2016, 51, 914–930.

Godinho, T. F.; Marques, A.; Rodrigues, A. C. P.; Correia, L. P. de S.; Marques, A.; Fernandes, J. S. C.; Bianche, J. J.; Gonçalves, J. F.; Laia, M. L. de. Genetic Analysis of *Caryocar Brasiliense* Donor Trees Using Microsatellite Molecular Markers. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 9(31): 245-252, 2015.

Lai, Z.; Tsugawa, H.; et al. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nature Methods*, Vol. 15, 53-56, 2018.

Liu, Y; Jing, S-. J.; et al. Non-volatile natural products in plant glandular trichomes. *Natural Products Reports*, 36, 626-665, 2019.

Morimoto, M. Chemical defense against insects in *Heterotheca subaxillaris* and three Orobanchaceae species using exudates from trichomes. *Pest Manag Sci*, 75, 2474-2481, 2019.

Muraseva, D. S & Kostikova, V. A. In vitro propagation of *Spiraea betulifolia* subsp. *aemiliana* (Rosaceae) and comparative analysis of phenolic compounds of microclones and intact plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2020.

Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000, 403, 853–858.

Moreira, M. P. *Lomatozona artemisiifolia* Baker: micropropagação, fitoquímica e atividade inseticida no controle de *Bemisia tabaci* MEAM 1. Master's dissertation. Federal University of Goiás, 2018.

Morimoto, M. Chemical defense against insects in *Heterotheca subauxillaris* and three Orobanchaceae species using exudates from trichomes. *Pest Management Science*, 75, 2474-2481, 2019.

Nakajima, J. N.; Junqueira, T. V.; Freitas, F. S.; Teles, A. M. Comparative analysis of red lists of the Brazilian flora: Asteraceae. *Rodriguésia* 2012, 63, 39-54.

Nothias, L-F. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature methods*, 2020.

Oliveira, M. E. B. S.; Sartoratto, A; Cardoso, J. C. In Vitro Calli Production Resulted in Different Profiles of Plant-Derived Medicinal Compounds in *Phyllanthus amarus*. *Molecules* 2020, 25, 5895.

Oliveira, T. S. de; Thomaz, D. V.; Neri, H.F. da S.; et al. Neuroprotective Effect of *Caryocar brasiliense* Camb. Leaves Is Associated with Anticholinesterase and Antioxidant Properties. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

Olivon, F. et al. MZmine 2 Data-Preprocessing to Enhance Molecular Networking Reliability. *Anal. Chem.* 2017, 89, 7836-7840.

Pereira, C. G de; Evangelista, V. S dos S. J.; Sabino, A. A.; Maltarollo, V. G. Cytotoxic Activity of Triterpenoids from *Cheilocladium cognatum* Branches against Chronic and Acute Leukemia Cell Lines. *Chem. Biodiversity*, 17, 2020.

Pilon, A. C. et al. Mass Spectral Similarity Networking and Gas-Phase Fragmentation Reactions in the Structural Analysis of Flavonoid Glycoconjugates. *Anal. Chem.* 2019, 91, 10413-10423.

Rabeling, S.C.; Lim, J.L.; Tidon, R.; Neff, J.L.; Simpson, B.B.; Pawar, S. Seasonal variation of a plant-pollinator network in the Brazilian Cerrado: Implications for community structure and robustness. *PLoS ONE* 14(12) (2019).

Rao, S. R. & Ravishankar, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20 (2002) 101–153.

Remy, S.; Solis, D.; et al. Isolation of phenanthrenes and identification of phorbol ester derivatives as potential anti-CHIKV agents using FBMN and NAP from *Sagotia racemose*. *Phytochemistry*, 167, 2019.

Ribeiro, R. N. & Teles, A. M. Eupatorieae (Asteraceae) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. *Rodriguésia*, v. 66, n. 3, p. 887-903, 2015.

Ruttkies, C.; Schymanski, E. L.; Wolf, S.; Hollender, J.; Neumann, S. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond *in silico* fragmentation. *J Cheminform* (2016) 8:3.

Sansone, S. A., Schober, D., Atherton, H. J., Fiehn, O., Jenkins, H., Rocca-Serra, P., Rubtsov, D. V., Spasic, I., Soldatova, L., Taylor, C., Tseng, A., & Viant, M. R. Metabolomics standards initiative: Ontology working group work in progress. *Metabolomics*, 3(3), 249–256, 2007.

Silva, A. C. R.; Bizzo, H.R.; Vieira, R. F., et al. Characterization of volatile and odor-active compounds of the essential oil from *Bidens graveolens* Mart. (Asteraceae). *Flavour Fragr J.* 2020; 35:79–87.

Silva, M. V. S. G.; Silva, S. A.; Teixeira, T. L.; Oliveira, A. de; Morais, A. A. L.; Silva, C. V. da; Espindola, L. S.; Sousa, R. M. F. Essential oil from leaves of *Eugenia calycina* Cambes: Natural larvicidal Against *Aedes aegypti*. *J Sci Food Agric* 2021; 101: 1202–1208.

Silva, D. B., Turatti, I. C. C., Gouveia, D. R., Ernst, M., Teixeira, S. P., & Lopes, N. P. Mass Spectrometry of flavonoid vicenin-2, based sunlight barriers in *Lychnophora* species. *Scientific Reports*, 4, 2014. <https://doi.org/10.1038/srep04309>

Stanojkovic, J.; Todorovic, S.; et al. Leaf glandular trichomes of micropropagated *Inula britannica* – Effect of sucrose on trichome density, distribution and chemical profile. *Industrial Crops & Products*, 160, 2021.

Sota, V.; Themeli, S.; Zeka, Z.; Kongjika, E. Exogenous cytokinins application induces changes in stomatal and glandular trichomes parameters in rosemary plants regenerated in vitro. *J Microbiol Biotech Food Sci*: 9 (1) 25-28, 2019.

Tian, N.; Liu, F.; Wang, P.; Zhang, X.; Li, X.; Wu, G. The molecular basis of glandular trichome development and secondary metabolism in plants. *Plant Gene*, 17, 2017.

Trindade, L. M. P.; Fernandes, Y. S.; Gonçalves, L. de A. Diversidade e desenvolvimento dos tricomas glandulares de *Lomatozona artemisiifolia* Baker (Asteraceae - Eupatorieae) - uma planta endêmica do Cerrado de Goiás. *IHERINGIA, Sér. Bot.*, v. 69, n. 2, p. 235-243, 2014.

Uzelac, B. et al. Glandular Trichomes on the Leaves of *Nicotiana tabacum*: Morphology, Developmental Ultrastructure, and Secondary Metabolites. *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites, Reference Series in Phytochemistry*, 2020.

Xiao, C-J.; Liu, Y-C.; et al. Localization of Two Labdane Diterpenoids in the Peltate Glandular Trichomes of *Leonorus japonicus* by Laser Microdissection Coupled with UPLC-MS/MS. *Phytochem. Anal.*, 28, 404–409, 2017.

Wagner, G. J. Secreting Glandular Trichomes: More than Just Hairs. *Plant Physiol.* (1991) 96, 675-679.

Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnol* 2016, 34, 828-837.

Wolfender, J. L., Nuzillard, J. M., Van Der Hooft, J. J. J., Renault, J. H., & Bertrand, S. (2019). Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics. *Analytical Chemistry*, 91(1), 704–742, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05112>