

CAMILA LUIZA CUNHA

Desreplicação de extratos de flores do gênero *Aristolochia* com destaque ao isolamento dos constituintes químicos de *Aristolochia gigantea*

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Química

Orientadora: Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento

Araraquara
2022

C972d Cunha, Camila Luiza
Desreplicação de extratos de flores do gênero Aristolochia com destaque ao isolamento dos constituintes químicos de Aristolochia gigantea / Camila Luiza Cunha. -- Araraquara, 2022
146 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Isabele Rodrigues Nascimento

1. Aristolochiaceae. 2. Aristolochia. 3. Flores. 4. Espectrometria de massa. 5. Química vegetal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE:

" Desreplicação de extratos de flores do gênero *Aristolochia* com destaque ao isolamento dos constituintes químicos de *Aristolochia gigantea* ".

AUTORA: CAMILA LUIZA CUNHA

ORIENTADORA: ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Profª. Drª. ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. WARLEY DE SOUZA BORGES (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal do Espírito Santo

Profa. Dra. CLAUDIA QUINTINO DA ROCHA (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal do Maranhão - UFMA - São Luís

Prof. Dr. JOÃO HENRIQUE GHILARDI LAGO (Participação Virtual)
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC - UFABC

Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 27 de setembro de 2022





Certificado de aprovação Camila luiza

Data e Hora de Criação: 27/09/2022 às 19:09:22

Documentos que originaram esse envelope:

- Certificado de aprovação Camila luiza.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: c3b91e81dc2bb89c5ed8e65b464845b50a6e797122f2f865bf90b2b9dadbb885

[SHA512]: ffcdd0960bd757b8eb56ed64aea91c05ad3a136965e2478b1e8fdeec00f45be3c3cb5a4b1a14e2ac59543718344e1742974e76488552cbf02af212c0dd99501db

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - claudiarocha3@yahoo.com.br

Data/Hora: 27/09/2022 - 19:12:14, IP: 179.185.208.149

[SHA256]: d777c5fd789bf80d5925370d6ebf70a12be46768083c88d715b8f0f91deed34e



ASSINADO - ian.castro@unesp.br

Data/Hora: 27/09/2022 - 19:11:57, IP: 179.232.155.153, Geolocalização: [-21.792409, -48.182280]

[SHA256]: eac5b1b259ebc7d62feb8bb04fd13a144d132e0388b2e93aff82140e5295dbc



ASSINADO - isabele.nascimento@unesp.br

Data/Hora: 27/09/2022 - 19:16:55, IP: 186.217.251.68, Geolocalização: [-21.781145, -48.197662]

[SHA256]: 0df3f86662df1ee1dbbfa2459b2d2d760e1c1920150f32f125043f518eca1327



ASSINADO - joao.lago@ufabc.edu.br

Data/Hora: 27/09/2022 - 20:02:45, IP: 189.110.86.181, Geolocalização: [-23.657657, -46.542053]

[SHA256]: 343a50cbac3c9c8e429e50d1991220596bdea3e8085f9bb690f3ca5fdb4a2fcd



ASSINADO - Warley De Souza Borges (warley.borges@ufes.br)

Data/Hora: 27/09/2022 - 19:11:54, IP: 200.137.65.100

[SHA256]: ec8e6d83f7690e915d710087c22839c0e341b005896f10f0d6b8b951fee287c0

Histórico de eventos registrados neste envelope

27/09/2022 20:02:45 - Envelope finalizado por joao.lago@ufabc.edu.br, IP 189.110.86.181

27/09/2022 20:02:45 - Assinatura realizada por joao.lago@ufabc.edu.br, IP 189.110.86.181

27/09/2022 19:16:55 - Assinatura realizada por isabele.nascimento@unesp.br, IP 186.217.251.68

27/09/2022 19:16:42 - Envelope visualizado por isabele.nascimento@unesp.br, IP 186.217.251.68

27/09/2022 19:15:05 - Envelope visualizado por joao.lago@ufabc.edu.br, IP 189.110.86.181

27/09/2022 19:12:14 - Assinatura realizada por claudiarocha3@yahoo.com.br, IP 179.185.208.149

27/09/2022 19:11:57 - Assinatura realizada por ian.castro@unesp.br, IP 179.232.155.153

27/09/2022 19:11:54 - Assinatura realizada por warley.borges@ufes.br, IP 200.137.65.100

27/09/2022 19:10:50 - Envelope registrado na Blockchain por warley.borges@ufes.br, IP 200.137.65.100

27/09/2022 19:10:48 - Envelope encaminhado para assinaturas por warley.borges@ufes.br, IP 200.137.65.100

27/09/2022 19:09:23 - Envelope criado por warley.borges@ufes.br, IP 200.137.65.100

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Camila Luiza Cunha

Nome em citações bibliográficas: CUNHA, C. L.; CUNHA, CAMILA; CUNHA, CAMILA LUIZA; LUIZA CUNHA, CAMILA

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação: **Bacharelado em Química Ambiental**

Instituição: Universidade Federal do Tocantins

Monografia: Estudo do potencial químico e biológico das raízes de *Clitoria guianensis* Benth.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Cristina Holzbach

Período: 22/09/2011 - 20/10/2015

Mestrado: **Química, Área de Concentração - Química Orgânica**

Instituição: Universidade Estadual Paulista - Unesp, Instituto de Química de Araraquara

Dissertação: Lignoides de *Aristolochia warmingii* Mast.

Orientadora: Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento

Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior - CAPES

Período: 03/02/2016 - 02/03/2018

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2019: Docência no ensino superior: Fundamentos e práticas pedagógicas - 30h
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP.

2017-2018: Extensão universitária em programa especial de formação pedagógica de docentes - Química (Licenciatura) - 1152h
Universidade de Franca, UNIFRAN.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

CUNHA, C. L.; SIEBENEICHLER, S. C.; NASCIMENTO, I. R.; HOLZBACH, J. C. A New isoflavone and other constituents from roots of *Clitoria guianensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n.8, p.1753-1757, 2020.

SOARES, D. F.; CUNHA, C. L.; KRAUSER, M. O.; HOLZBACH, J. C. Phytochemical screening and antioxidant activity of *Clitoria guianensis*. **Revista Cereus**, v. 12, p. 127-134, 2020.

HOLZBACH, J. C.; FILHO, W. S.; CUNHA, C. L.; NASCIMENTO, I. R. Flavonol tri-o-glycoside and other chemical constituents from flowers of *Aristolochia trulliformis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1103-1107, 2019.

Apresentação de trabalhos

ESCALIANTE, G. A. S.; CUNHA, C. L.; NASCIMENTO, I. R. Phytochemical Analysis of *Aristolochia gigantea* Seeds using GC/MS Molecular Networking. In: 8th Brazilian Conference on Natural Products. 2021.

CRUZ, A. B.; CUNHA, C. L.; SOARES, D. F.; HOLZBACH, J. C. Identificação das classes de metabólitos secundários e isolamento de kaempferitrin das folhas de *Clitoria guianensis*. In: 43ª Reunião Anual Virtual da SBQ, 2020.

CUNHA, C. L.; NASCIMENTO, I. R.; ANTONIO, P. V. G. Tetrahydrofuran lignans from leaves of *Aristolochia warmingii* Mast. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Joinville-SC.

CUNHA, C. L.; NASCIMENTO, I. R. Furofuran lignans from leaves of *Aristolochia warmingii* Mast. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products and XXXII RESEM, 2017, Vitória-ES.

FERRARESSO, J. V.; CUNHA, C. L.; NASCIMENTO, I. R. Análise química por CG/EM das frações do extrato hexânico de folhas de *Aristolochia warmingii*. In: 30º Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2018, Araraquara-SP.

ANTONIO, P. V. G.; CUNHA, C. L.; NASCIMENTO, I. R. Fenilpropanoides de folhas de *Aristolochia warmingii*. In: 30º Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2018, Araraquara-SP.

SOARES FILHO, W. A.; NASCIMENTO, I. R.; CUNHA, C. L.; HOLZBACH, J. C. Flavonoides e lignanas de flores de *Aristolochia* sp. In: XXIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017, Araraquara-SP.

CUNHA, C. L.; SOARES, D. F.; AMUI, G. C.; FARIA, E. O.; HOLZBACH, J. C. Avaliação da atividade antioxidante e de toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos das folhas e raízes de *Clitoria guianensis*. In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia-SP.

CUNHA, C. L.; HOLZBACH, J. C.; FARIA, E. O. Estudo fitoquímico do extrato de acetato de etila das raízes da espécie *Clitoria guianensis* Benth. In: 11º Seminário de Iniciação Científica da UFT, 2015, Gurupi-TO.

CUNHA, C. L.; HOLZBACH, J. C.; FARIA, E. O. Avaliação da atividade antioxidante e de toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos das raízes de *Clitoria guianensis*. In: 10º Seminário de Iniciação Científica da UFT, 2014, Palmas-TO.

Participação em eventos científicos

42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Joinville-SC.

6th Brazilian Conference on Natural Products and XXXII RESEM, 2017, Vitória-ES.

38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia-SP.

I Semana Acadêmica Integrada de Biotecnologia e Química, 2014, Gurupi-TO.

I Semana Acadêmica Integrada - Universidade Integrada frente ao desenvolvimento sustentável, 2013, Gurupi-TO.

II Semana Acadêmica do Curso de Química Ambiental, 2011, Gurupi-TO.

Premiação

Prêmio de 1º Lugar (Apresentação Oral) na área de Ciências Exatas do 11º Seminário de Iniciação Científica da UFT, Universidade Federal do Tocantins, 2015.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me fizeram acreditar na minha força e meu potencial, que mesmo distantes sempre estiveram presentes me incentivando e lembrando todos os dias da minha essência e de tudo que fiz para chegar aqui.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, pelo ser humano incrível que é, que desde o mestrado sempre acreditou e depositou toda a confiança em mim, por todo incentivo, paciência, conselhos e ensinamentos. Pelo seu olhar generoso e cuidadoso, sempre preocupada com a nossa felicidade. Sou grata por ter convivido com a senhora nos últimos seis anos e por tudo que aprendi.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, Dra. Juliana Rodrigues e Dr. João Bronzel, não apenas pelos experimentos realizados, mas principalmente pela amizade, conversas agradáveis e conhecimentos compartilhados.

À Ana Zanatta, por ter contribuído tanto com esse trabalho, pelo apoio nas análises de Molecular Networking, pelos conselhos e, principalmente, por sua amizade e generosidade.

Ao Alexander Alves por sua amizade de todos esses anos, pela paciência e por ter me ensinado tanto sobre CG-EM.

Ao Miquéias Gomes por toda ajuda com as análises estatísticas; agradeço a você por nossa amizade, por todo incentivo e por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos Sâmilla, Mayra, Guilherme, Paulo e Karen, que sempre foram mais que irmãos para mim, por todo o companheirismo e por encherem a minha vida de momentos especiais.

A todos os funcionários do Instituto de Química, independente de função, por serem sempre tão dedicados e prestativos.

Ao Instituto de Química pelo espaço e suporte necessários para a realização desse trabalho.

Às agências de fomento à pesquisa CNPq e FAPESP.

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

RESUMO

O gênero *Aristolochia* (Aristolochiaceae) possui 84 espécies catalogadas no Brasil. Na medicina popular são amplamente utilizadas por serem abortivas/emenagogas, estomáquicas, analgésicas, no tratamento de picada de cobra, feridas e doenças da pele e por ajudarem no emagrecimento. Essas espécies são conhecidas por apresentar flores com características morfológicas e com mecanismo de polinização bem peculiares. Apesar dessas particularidades acerca do gênero *Aristolochia* há somente três estudos químicos relacionados a extratos de flores dessas espécies descritos na literatura. Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi contribuir para o conhecimento da composição química de flores de *Aristolochia*, por meio de métodos analíticos de desreplicação e através do isolamento e identificação estrutural dos compostos majoritários. Para isso a fração acetato de etila, obtida do extrato etanólico de flores de *A. gigantea*, foi submetida a fracionamento cromatográfico levando ao isolamento, e posterior identificação, de quatro fenilpropanoides, dois derivados do ácido benzoico, seis ácidos aristolóquicos e dois flavonoides. Dois dos fenilpropanoides isolados estão sendo descritos pela primeira vez na literatura. Um planejamento do tipo simplex centroide foi realizado para avaliar a influência de diferentes sistemas de solventes na extração dos constituintes químicos das flores de *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri*, *A. labiata*, *A. gehrtii* e *A. gigantea*. Os resultados revelaram que nenhum dos sistemas de solventes testados foi considerado ideal para ser usado no preparo de extratos de todas as espécies de flores de *Aristolochia*. Por fim, as frações hexânicas e metanólicas, obtidas a partir dos extratos obtidos no planejamento experimental, foram analisadas por técnicas analíticas de desreplicação. A análise das frações hexânicas por CG-EM sugeriu a presença de 37 substâncias pertencentes as classes dos terpenoides, ácidos graxos, álcoois, cetonas, lignanas, além de homólogos de alcanos. Já a análise das frações metanólicas por CLAE-EM, utilizando a abordagem de redes moleculares, permitiu anotar 17 substâncias pertencentes as classes dos alcaloides, lignanas e flavonoides.

Palavras-chave: Aristolochiaceae. *Aristolochia*. Espectrometria de massas. Redes moleculares

ABSTRACT

The genus *Aristolochia* (Aristolochiaceae) has 84 species cataloged in Brazil. In folk medicine these species are widely used because they are abortifacients/emmenagogues, stomachic, analgesic, in the treatment of snakebite, wounds and skin diseases and for helping to lose weight. These species are known to have flowers with very peculiar morphological characteristics and pollination mechanism. Despite these particularities concerning the genus *Aristolochia*, there are only three chemical studies related to flowers extracts described in the literature. Thus, the objective of this work was to contribute to the knowledge of the chemical composition of *Aristolochia* flowers, through analytical methods of dereplication and through the isolation and structural identification of the major compounds. For this, the ethyl acetate fraction, obtained from the ethanolic extract of *A. gigantea* flowers, was subjected to chromatographic fractionation leading to the isolation, and subsequent identification, of four phenylpropanoids, two benzoic acid derivatives, six aristolochic acids and two flavonoids. Two of the isolated phenylpropanoids are being described for the first time in the literature. A centroid simplex design was carried out to evaluate the influence of different solvent systems on the extraction of chemical constituents from the flowers of *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri*, *A. labiata*, *A. gehrtii* and *A. gigantea*. The results revealed that none of the tested solvent systems was considered ideal to be used in the preparation of extracts from all species of *Aristolochia* flowers. Finally, the hexane and methanolic fractions, obtained from the extracts obtained in the experimental design, were analyzed by analytical dereplication techniques. The analysis of hexane fractions by GC-MS suggested the presence of 37 compounds belonging to the classes of terpenoids, fatty acids, alcohols, ketones, lignans, in addition to homologs of alkanes. The analysis of the methanolic fractions by HPLC-MS, using the molecular network approach, allowed to note 17 compounds belonging to the classes of alkaloids, lignans and flavonoids.

Keywords: Aristolochiaceae. *Aristolochia*. Mass spectrometry. Molecular Networking

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de algumas substâncias bioativas identificadas em espécies de <i>Aristolochia</i>	20
Figura 2 - Estruturas florais em <i>Aristolochia</i> : limbo (lim), tubo (tub) e utrículo (utr). Flor em visão lateral (A) e frontal (B).....	22
Figura 3 - Sequência da visita de polinizadores e polinização das flores de <i>A. gigantea</i>	23
Figura 4 - Substâncias isoladas das flores de espécies de <i>Aristolochia</i>	25
Figura 5 - Destaque para as flores das espécies <i>Aristolochia gigantea</i> , <i>A. gehrtii</i> , <i>A. esperanzae</i> , <i>A. holostylis</i> , <i>A. gardneri</i> e <i>A. labiata</i>	27
Figura 6 - Construção da rede molecular por alinhamentos espectrais EM/EM	30
Figura 7 - Divisão das flores de <i>A. gigantea</i> em limbo (A) e tubo + utrículo (B)	36
Figura 8 - Procedimento utilizado para o preparo dos extratos do limbo de <i>A. gigantea</i>	37
Figura 9 - Fracionamento da fração acetato de etila do limbo de <i>A. gigantea</i>	38
Figura 10 - Espectros de RMN de ¹ H dos extratos etanólicos do limbo e tubo + utrículo de flores de <i>A. gigantea</i> (DMSO-d ₆ , 14,1 T).....	44
Figura 11 - Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos do limbo e tubo + utrículo de flores de <i>A. gigantea</i> em CLAE-DAD	45
Figura 12 - Espectro de RMN de ¹ H das frações hexânica (CDCl ₃ , 14,1 T), AcOEt, hidroalcoólica, (DMSO-d ₆ , 14,1 T) e extrato etanólico Soxhlet (D ₂ O, 14,1 T) de flores de <i>A. gigantea</i>	46
Figura 13 - Correlações observadas no mapa de contorno HMBC para a substância I	48
Figura 14 - Ácidos aristolóquicos isolados da fração acetato de etila do limbo de <i>A. gigantea</i>	51
Figura 15 - Expansões dos espectros de RMN de ¹ H de VII-XII (14,1 T, DMSO-d ₆), destacando o padrão de substituição e multiplicidade dos hidrogênios ligados a carbono aromáticos.....	52
Figura 16 - Flavonoides isolados da fração acetato de etila do limbo de <i>A. gigantea</i>	54
Figura 17 - Gráficos de contorno e cromatogramas da melhor condição obtida pelo planejamento simplex centroide	60

Figura 18 - Preparo das misturas de extratos a partir das frações hexânica e metanólica.....	63
Figura 19 - Espectros de RMN de ¹ H das misturas das frações metanólicas de flores de <i>Aristolochia</i> (CD ₃ OD, 14,1 T): (A) expansão da região δ 0,0-3,3, (B) expansão da região δ 3,3-5,0 e (C) expansão da região δ 5,0-9,0	64
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹ H ampliado da fração metanólica das flores de <i>A. gehrtii</i> (CD ₃ OD, 14,1 T), destacando os sinais da kusunoquina.....	65
Figura 21 - Perfil cromatográfico das frações metanólicas de flores de <i>Aristolochia</i> por CLAE-EM	66
Figura 22 - Rede molecular gerada para os dados de CLAE-EM/EM das frações metanólicas de flores de <i>Aristolochia</i>	67
Figura 23 - Clusters de substâncias específicas de espécies de <i>Aristolochia</i>	67
Figura 24 - Representação dos clusters e estruturas químicas correspondentes aos nodos dos alcaloides.....	69
Figura 25 - Proposta de fragmentação para o íon tetrahidroprotoberberínico <i>m/z</i> 582	70
Figura 26 - Proposta de fragmentação para o íon benzilisoquinolínico <i>m/z</i> 597	70
Figura 27 - Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 344	71
Figura 28 - Representação dos clusters e estruturas químicas correspondentes à família molecular das lignanas.	72
Figura 29 - Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 369	73
Figura 30 - Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 355	73
Figura 31 - Representação do cluster e estrutura química correspondente ao nodo da chalcona.....	74
Figura 32 - Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 435	74
Figura 33 - Representação dos clusters e estruturas químicas correspondentes aos nodos dos flavonoides.....	75
Figura 34 - Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 627	76
Figura 35 - Cromatograma da série homóloga de n-alcanos C ₈ -C ₄₀ em CG-EM	78
Figura 36 - Cálculo do IR para ácido palmítico utilizando a equação de Van Den Dool e Kratz.....	79
Figura 37 - (A) Espectro de massas obtido para o ácido palmítico (B). Espectro de massas presente na biblioteca Wiley MS Database com 93% de similaridade.....	79

Figura 38 - Comparação dos cromatogramas das frações hexânicas de flores de *Aristolochia* obtidos por CG-EM.80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Aristolochia</i> com suas distribuições geográficas e nomes populares.....	26
Tabela 2 - Planejamento simplex centroide para definição do solvente extrator	39
Tabela 3 - Análise de variância para avaliação do modelo matemático ajustado aos dados experimentais usando método dos mínimos quadrados.....	40
Tabela 4 - Rendimento das frações e extratos do limbo de <i>A. gigantea</i>	45
Tabela 5 - Dados de RMN de ¹ H de I e II (14,1 T, CD ₃ OD, δ em ppm, <i>J</i> em Hz).....	48
Tabela 6 - Dados de RMN de ¹ H de III , IV e V (14,1 T, CD ₃ OD, δ em ppm, <i>J</i> em Hz,)	49
Tabela 7 - Dados de RMN de ¹ H de VI (14,1 T, CD ₃ OD, δ em ppm, <i>J</i> em Hz)	50
Tabela 8 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de VII-XII (14,1 T, DMSO-d ₆ , δ em ppm, <i>J</i> em Hz).....	53
Tabela 9 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de XIII e XIV (14,1 T, δ em ppm, <i>J</i> em Hz) ..	55
Tabela 10 - Massas de extratos obtidas no planejamento simplex centróide	58
Tabela 11 - Número de picos dos cromatogramas obtidos para cada condição de solventes gerada pelo modelo simplex centróide	59
Tabela 12 - Melhores solventes de extração e equação de regressão para o modelo aplicado para cada espécie estudadas	61
Tabela 13 - Anotações das substâncias presentes nas frações metanólicas de flores de <i>Aristolochia</i>	68
Tabela 14 - Proposta de identificação dos compostos presentes nas frações hexânicas de flores de <i>Aristolochia</i> analisadas por CG-EM.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
Ae	<i>A. esperanzae</i>
Aga	<i>A. gardneri</i>
Age	<i>A. gehrtii</i>
Agg	<i>A. gigantea</i>
Ah	<i>A. holostylis</i>
Al _{MS}	<i>A. labiata</i> MS
Al _{MG}	<i>A. labiata</i> MG
ANOVA	Análise de variância
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia em fase gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>dl</i>	Dupleto largo
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
EtOH	Etanol
FM	Fase móvel
<i>g</i> HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
<i>g</i> HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
IR _{cal}	Índice de retenção calculado
IR _{lit}	Índice de retenção da literatura
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
PC	Ponto central
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>s</i>	Simpleto

<i>s/</i>	Simpleto largo
<i>tl</i>	Tripleto largo
TFA	Ácido trifluoroacético
<i>g</i> TOCSY	Total correlation spectroscopy
T _R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Família Aristolochiaceae Juss.....	18
1.2 Gênero <i>Aristolochia</i> L.....	18
1.3 Morfologia floral de <i>Aristolochia</i>	21
1.4 As espécies <i>A. gigantea</i> , <i>A. gehrtii</i> , <i>A. esperanzae</i> , <i>A. holostylis</i> , <i>A. gardneri</i> e <i>A. labiata</i>	25
1.5 Identificação de compostos em matrizes complexas	28
1.6 <i>Molecular Networking</i> na investigação de extratos vegetais.....	29
2. OBJETIVOS	32
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	33
3.1 Solventes	33
3.2 Equipamentos	33
3.3 Análises cromatográficas	34
3.4 Coleta e identificação do material vegetal.....	35
3.5 Preparo e triagem química dos extratos de flores de <i>A. gigantea</i>	35
3.6 Isolamento e purificação das substâncias do limbo das flores de <i>A. gigantea</i>	36
3.7 Preparo e análise cromatográfica dos extratos das flores das espécies <i>A. esperanzae</i> , <i>A. holostylis</i> , <i>A. gardneri</i> , <i>A. labiata</i> , <i>A. gehrtii</i> e <i>A. gigantea</i>	38
3.8 Ajuste do modelo matemático ao conjunto de dados.....	40
3.9 Análise por CLAE-DAD das frações metanólicas das flores das espécies <i>A. esperanzae</i> , <i>A. holostylis</i> , <i>A. gardneri</i> , <i>A. labiata</i> , <i>A. gehrtii</i> e <i>A. gigantea</i>	41
3.10 Análises por CLAE-EM/EM das frações metanólicas das flores das espécies <i>A. esperanzae</i> , <i>A. holostylis</i> , <i>A. gardneri</i> , <i>A. labiata</i> , <i>A. gehrtii</i> e <i>A. gigantea</i>	41
3.10.1 <i>Molecular Networking</i>	42
3.11 Análises por CG-EM das frações hexânicas das flores das espécies <i>A. esperanzae</i> , <i>A. holostylis</i> , <i>A. gardneri</i> , <i>A. labiata</i> , <i>A. gehrtii</i> e <i>A. gigantea</i>	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Análise dos extratos de flores de <i>A. gigantea</i>	44
4.1.1 Fenilpropanoides (I-IV).....	47
4.1.2 Derivados do ácido benzoico (V e VI).....	50
4.1.3 Ácidos aristolóquicos (VII-XII).....	51
4.1.4 Flavonoides (XIII-XIV).....	54

4.2 Escolha do solvente extrator no preparo dos extratos de flores de <i>Aristolochia</i> utilizando o planejamento experimental simplex centróide	57
4.3 Preparo das misturas de extratos obtidas no planejamento experimental	62
4.4 Análise dos extratos por RMN de ¹ H e anotação dos compostos através da espectrometria de massas e análise das redes de interações moleculares.....	63
4.5 Determinação da composição química das frações hexânicas de flores de <i>Aristolochia</i> por CG-EM.....	77
4.5.1 Identificação dos componentes apolares de flores de <i>Aristolochia</i>	79
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
APÊNDICES	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família Aristolochiaceae Juss

A família Aristolochiaceae Juss, pertencente à ordem Piperales (APG IV, 2016), é composta por duas subfamílias, Asaroideae e Aristolochioideae. A subfamília Asaroideae é constituída pelos gêneros *Asarum* L. e *Saruma* Oliv., enquanto a subfamília Aristolochioideae é representada pelos gêneros *Aristolochia* L. e *Thottea* Rottb. Esses quatro gêneros reúnem cerca de 600 espécies amplamente distribuídas pelo mundo, prevalecendo principalmente nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (FREITAS; DOWELD, 2021; FREITAS, 2020).

Com cerca de 550 espécies, o gênero *Aristolochia* L. é o mais representativo da família Aristolochiaceae e o único encontrado em terras brasileiras, tendo 84 espécies catalogadas até o momento (Aristolochiaceae, 2022; FREITAS; DOWELD, 2021; GONZÁLEZ, 2012).

1.2 Gênero *Aristolochia* L.

O nome do gênero *Aristolochia* tem origem das palavras gregas "*aristos*", que significa "mais adequado ou melhor", e "*locheia*", que significa "descarga uterina ou expulsão da placenta", fazendo referência ao uso popular dessas plantas para expulsão da placenta após o parto (AL-BARHAM et al., 2017; FERNANDEZ, et al., 2019; FREITAS, 2016).

As espécies pertencentes ao gênero *Aristolochia* são frequentemente trepadeiras, ocasionalmente ervas, subarbustos ou arbustos. São usualmente conhecidas como "cipó mil homens", "milome", "jarrinha", "papo de peru", "patinho", "mata-porcos", "serpentaria", "caçaú" e "batatinha" (FRANÇA et al., 2005; FREITAS, 2016; NASCIMENTO et al., 2010).

Em seu manuscrito Ruiz (1805) relata o uso de plantas de *Aristolochia* em preparos de garrafadas, utilizadas para o tratamento de doenças, bem como para a construção civil. Por se tratar de uma trepadeira, os caules, após descascados, eram usados para a confecção de cordas grossas, como correias e corrimãos de pontes, para amarrarem e ligarem os postes, além de servir como vigas para construção de cabanas por índios no Peru.

Na medicina popular essas espécies são amplamente utilizadas por serem abortivas/emenagogas, estomáquicas, analgésicas, antialérgicas, anti-inflamatórias, antiasmáticas, antissépticas, expectorantes, sedativas, depurativas e por ajudarem no emagrecimento. São usadas ainda como relaxante muscular, no tratamento de vermes intestinais, malária, picada de cobra, feridas e doenças da pele (FRANCISCO et al., 2008; LERMA-HERRERA, et al., 2022; PACHECO et al., 2009).

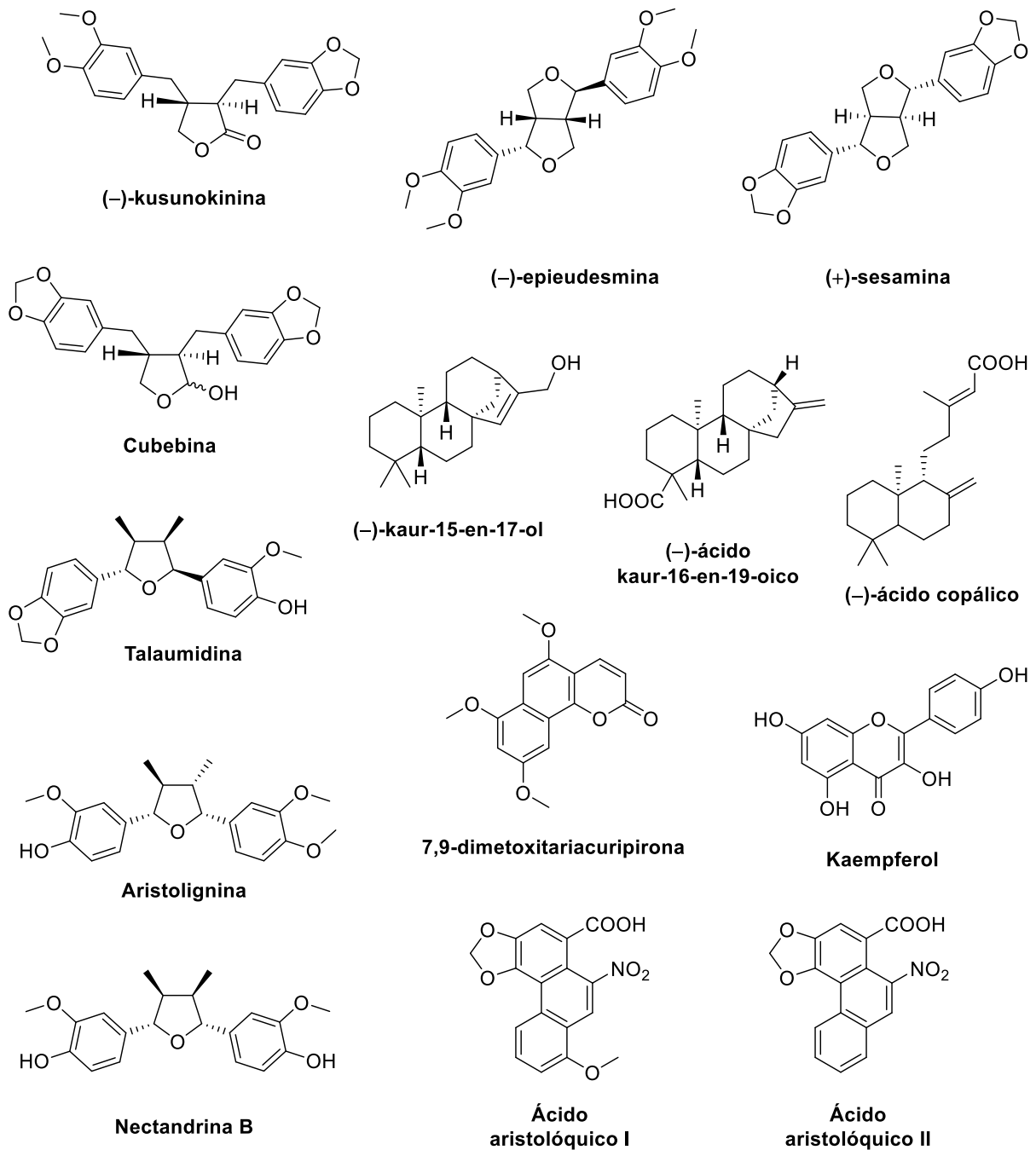
Espécies pertencentes ao gênero *Aristolochia* possuem um histórico significativo de estudos de composição química e de atividade biológica reportados na literatura. São cerca de 200 espécies estudadas com aproximadamente 750 compostos isolados, tendo entre eles lignoides, alcaloides, terpenoides e derivados fenólicos (CHAWLA, et al., 2013; KUO et al., 2012; LERMA-HERRERA, et al., 2022; LOPES et al., 2001).

A lignana (–)-kusunoquinina (Figura 1), muito comum em espécies de *Aristolochia*, é reconhecida por reduzir a viabilidade larval da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis*, além de apresentar atividade anticancerígena significativa (MESSIANO et al., 2008; TEDASEN, et al., 2020). Já a lignana cubebina destaca-se por suas atividades anti-inflamatória, analgésica, anti-histamínica, leishmanicida, tripanocida, antiprotozoária, vasorelaxante, citotoxicidade em células tumorais e antimicrobiana (MACEDO et al., 2020; RAJALEKSHMI et al., 2016).

Outros compostos isolados de espécies de *Aristolochia* que apresentam atividades biológicas comprovadas são as lignanas tetrahidrofurofurânicas (–)-epieudesmina e (+)-sesamina, que demonstraram atividade antitripanosomal, as lignanas tetrahidrofurânicas talaumidina, aristolignina e nectandrina B, que possuem atividade neuroprotetora, os terpenos (–)-kaur-15-en-17-ol, (–)-ácido kaur-16-en-19-oico e (–)-ácido copálico, que apresentam atividades inseticida, antiespasmódica e antitripanosomal, respectivamente, a cumarina 7,9-dimetoxitariacuripirona, com atividade antimicobacteriana, e o flavonoide kaempferol, com propriedades anti-inflamatórias (Figura 1) (KUO et al., 2012).

As espécies do gênero *Aristolochia* também apresentam, em sua composição, os ácidos aristolóquicos I e II (Figura 1), cujas propriedades nefrotóxicas e carcinogênicas trazem graves riscos para quem faz uso indiscriminado desse tipo de planta (JI, et al., 2021; LUKINICH-GRUIA, et al., 2022).

Figura 1 - Estruturas químicas de algumas substâncias bioativas identificadas em espécies de *Aristolochia*



Os ácidos aristolóquicos são considerados marcadores quimiotaxonômicos da família Aristolochiaceae comumente encontrados em espécies dos gêneros *Aristolochia* e *Asarum* (FAN et al., 2020).

Esses metabólitos especializados são produzidos por essas plantas como forma de defesa, dificultando ataques por animais herbívoros. Mesmo com o auxílio desses artifícios, a coevolução planta-animal possibilitou que alguns insetos

desenvolvessem formas para superar as defesas produzidas pelas plantas, adquirindo a capacidade de sequestrar e armazenar toxinas em seus tecidos corporais para serem usadas como defesa química contra seus próprios predadores. Isso é o que a borboleta *Battus polydamas* (Papilionidae, Troidinii) faz com várias espécies de *Aristolochia* (FREITAS, et al., 2019; MEGA, et al., 2015; PRIESTAP, et al., 2012). Após se alimentarem das folhas de *Aristolochia*, os ácidos aristolóquicos passam a fazer parte do corpo da lagarta, fazendo com que as larvas de *B. polydamas* sofram baixas taxas de predação, uma vez que, quando em ameaça liberam, através de suas glândulas osmeteriais, fluidos contendo essas substâncias (OPITZ; MÜLLER, 2009).

As informações apresentadas deixam claro que as espécies de *Aristolochia* desempenham um papel importante não apenas como fonte de compostos bioativos para o ser humano, mas também na conservação e perpetuação de insetos.

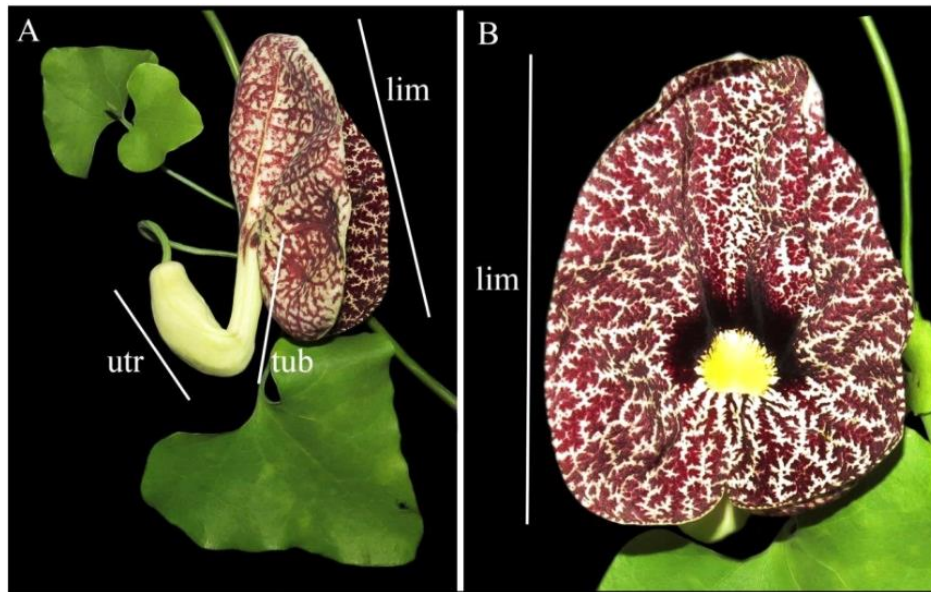
1.3 Morfologia floral de *Aristolochia*

A família Aristolochiaceae apresenta características morfológicas bem peculiares em suas estruturas reprodutivas. Suas flores possuem formato tubular, que em muitas das vezes remetem a forma de um cachimbo. São essas particularidades que facilitam a identificação de membros pertencentes a esse grupo de plantas, em especial às espécies relacionadas ao gênero com maior diversidade, *Aristolochia* L. As flores das espécies de *Aristolochia* demonstram uma estrutura floral que compreende três regiões distintas: utrículo, tubo e limbo (Figura 2) (FREITAS, 2016; MARTIN et al., 2017; OELSCHLÄGEL et al., 2009; SOUSA, 2011).

O arranjo básico das flores é pouco variável dentro do gênero, porém há grandes variações em seus tamanhos e ornamentações, podendo medir de 1-2 cm, como é o caso das espécies *A. bahiensis* e *A. nevesarmondiana*, até flores que vão de 28-35 cm como é o caso *A. gigantea* e *A. grandiflora*, consideradas algumas das maiores do mundo (FREITAS, 2016; HIPÓLITO et al., 2012; SOUSA, 2011).

As flores de grande parte das espécies de *Aristolochia* exalam um cheiro extremamente desagradável e nauseante, que se assemelha a esterco ou até mesmo carne em putrefação. Entretanto, algumas plantas apresentam flores que possuem aromas mais agradáveis, parecidos com os de citronela e limão (ERBAR et al., 2017; HIPÓLITO et al., 2012).

Figura 2 - Estruturas florais em *Aristolochia*: limbo (lim), tubo (tub) e utrículo (utr). Flor em visão lateral (A) e frontal (B)



Fonte: Freitas (2016)

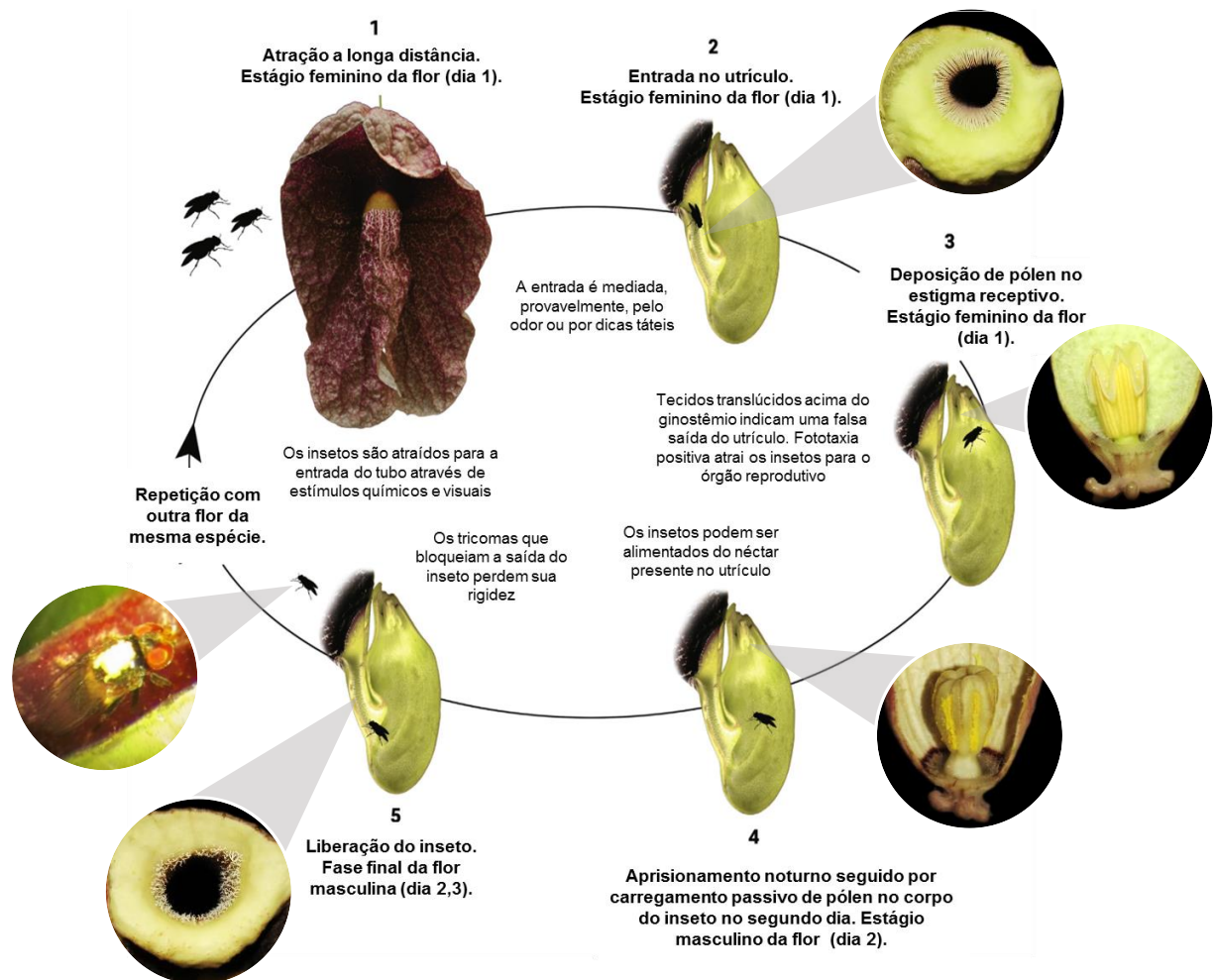
O aroma floral das espécies de *Aristolochia* exerce um papel importante no processo de polinização. Essas plantas utilizam como estratégia o odor emitido para simular a presença de recursos úteis para os polinizadores com a finalidade de atraí-los, ou seja, anunciam uma recompensa que não é fornecida aos mesmos. Este tipo de associação é chamado de polinização por engodo, e é comumente encontrada em plantas polinizadas por insetos (HIPÓLITO et al., 2012; OELSCHLÄGEL et al., 2009; PINHEIRO, 2014; RUPP, et al., 2021).

De modo geral, essas espécies vegetais podem simular, para os insetos responsáveis pela polinização e através do odor, a existência de restos de animais em decomposição (procurados para alimentação e/ou oviposição), fonte de néctar e pólen (buscados como uma fonte de alimento), local de abrigo, além de poderem emitir sinais associados à existência de um parceiro sexual, atraindo insetos que tentam copular com certas estruturas florais (PINHEIRO, 2014).

Nas espécies de *Aristolochia* o processo de polinização ocorre quando o inseto, atraído pelos odores, adentra o tubo floral, cuja parede interna é revestida por estruturas denominadas tricomas (“pelos”) orientadas para o interior da flor que bloqueiam a entrada impedindo-o de sair, onde é aprisionado no interior do utrículo no primeiro dia da antese (maturação e abertura da flor); este é chamado de estágio feminino. Considerando que o inseto aprisionado traz consigo, preso ao corpo, grãos

de pólen de outras flores coespecíficas, a flor visitada é finalmente fecundada após um dia, mudando para o estágio masculino. É somente nesse estágio que o pólen é depositado nas anteras, e assim o polinizador recebe novamente os grãos de pólen. A fase masculina é caracterizada por modificações na estrutura floral, ou seja, ao alcançar a maturação, os tricomas desprendem-se naturalmente, permitindo a liberação do polinizador, que reiniciará o ciclo com a busca de novas flores. Desta forma, o processo de polinização, como um todo, é resumido em quatro etapas: atração, aprisionamento, retenção e, por fim, liberação dos polinizadores (Figura 3) (HIPÓLITO et al., 2012; JÚNIOR, 2005; MARTIN et al., 2017).

Figura 3 - Sequência da visita de polinizadores e polinização das flores de *A. gigantea*



Fonte: Adaptado de Martin et al., (2017) e Freitas (2016)

Recentemente, Oelschlägel e colaboradores (2015) realizaram estudos com *A. rotunda* e propuseram uma nova forma de polinização denominada cleptomiofilia, a qual baseia-se na ideia de que as flores de *A. rotunda*, e certamente as de outras

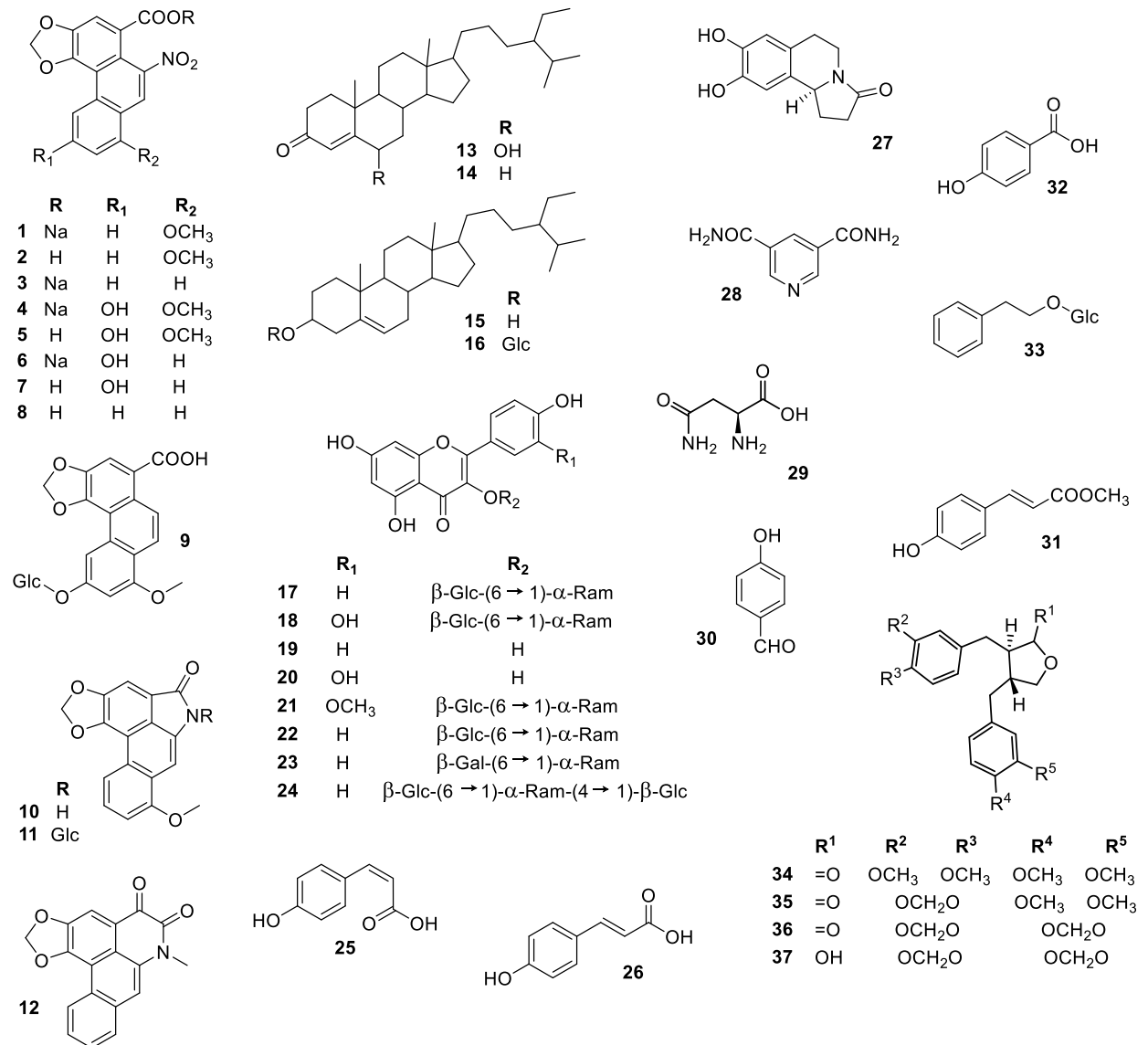
espécies de *Aristolochia*, imitam semioquímicos de insetos com o intuito de atrair seus polinizadores. O estudo constatou que os principais polinizadores de *A. rotunda* são moscas fêmeas pertencentes à família Chloropidae. Essas moscas são conhecidas por se alimentarem das secreções de insetos (família Miridae) que foram capturados por predadores artrópodes (aranhas, gafanhotos, centopeiras e caranguejos, por exemplo). A análise dos componentes voláteis mostrou que os mirídeos recém-mortos e as flores de *A. rotunda* liberaram os mesmos constituintes químicos, e que, por coincidência, são os mesmos usados pelas moscas Chloropidae para encontrar suas fontes de alimento. Com isso foi possível concluir que *A. rotunda* mimetiza substâncias químicas emitidas por insetos com o objetivo de enganar essas moscas e induzi-las ao processo de polinização, o que certamente não resulta em nenhum ganho para o inseto. Esse estudo mostra a grande especificidade em relação aos compostos voláteis produzidos por *Aristolochia*, sugerindo o quanto o sistema de polinização por cleptomiofilia é complexo e específico.

Investigações acerca da composição química do aroma floral de espécies de *Aristolochia* possibilitaram identificar uma variedade de terpenoides (α e β -pineno, β -cedreno, canfeno, sabineno, limoneno, cariofileno, germacreno A e D) em *A. arborea* (KAISER, 2006). *Aristolochia gigantea* tem em sua composição a presença principalmente de (*E*) e (*Z*)-citral, citronelol, citronelal e linalol, bem como dimetil dissulfeto, 2-heptanona e 3-metil-1-butanol (MARTIN et al., 2017). *Aristolochia cymbifera* apresenta uma vasta gama de compostos de diferentes classes, tendo ésteres (3-metil-butanoato de benzila e butanoato de benzila), álcool benzílico e dissulfeto de dimetila presentes em maior concentração (JOHNSON; JURGENS, 2010). Além disso, *A. rotunda* possui voláteis compostos de ésteres, álcoois e hidrocarbonetos alifáticos (OELSCHLÄGEL et al., 2015).

Apesar das espécies pertencentes ao gênero *Aristolochia* apresentarem uma forma de polinização diferenciada, há somente três estudos químicos relacionados com extratos metanólicos de flores de *Aristolochia* descritos na literatura. Dois desses estudos foram realizados com as espécies *A. kaempferi* e *A. zollingeriana* dos quais foram isolados aristolocatos de sódio (**1**, **3**, **4** e **6**), ácidos aristolóquicos (**2**, **5**, **7**, **8** e **9**), aristolactamas (**10** e **11**), cepharadiona A (**12**), quatro terpenoides (**13-16**), os flavonoides kaempferol-3-O-rutinosídeo (**17**) e quercetina-3-O-rutinosídeo (**18**), um alcaloide piridínico (**28**), asparagina (**29**), um derivado C₆-C₁ (**30**) e um derivado C₆-C₃ (**31**) (CHIANG et al., 1998; WU et al., 1998) (Figura 4).

Em um estudo recente com flores de *A. trulliformis*, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foram isolados sete flavonoides (**18-24**), um derivado C₆-C₁ (**22**), um derivado C₆-C₂ (**33**), dois derivados C₆-C₃ (**25** e **26**), e um alcaloide tetraidroisoquinolínico (**27**) (Figura 4) (HOLZBACH et al., 2019).

Figura 4 - Substâncias isoladas das flores de espécies de *Aristolochia*



1.4 As espécies *A. gigantea*, *A. gehrtii*, *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri* e *A. labiata*

As espécies de *Aristolochia* são plantas perenes que podem ser encontradas em praticamente todo o território brasileiro, sendo que algumas apresentam uma distribuição mais restrita, enquanto outras são achadas sem dificuldades

(Aristolochiaceae, 2022). Devido, principalmente, as suas características morfológicas, essas plantas podem ser popularmente reconhecidas por diferentes denominações, sendo que algumas espécies compartilham o mesmo nome, uma vez que possuem uma estrutura floral básica comum que remetem a essas espécies. A Tabela 1 apresenta as seis espécies de *Aristolochia* que foram estudadas nesse trabalho, com seus respectivos nomes populares e distribuição geográfica.

Tabela 1 - Espécies de *Aristolochia* com suas distribuições geográficas e nomes populares

Espécie	Distribuição geográfica	Nomes populares
<i>A. gigantea</i> Mart. & Zucc	Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná	Cipó-de-cobra Milhome-gigante Milhomens Papo-de-perú Papo-de-peru-do-grande
<i>A. esperanzae</i> Kuntze	Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo	Cachimbo-de-turco Jarrinha-do-cerrado Milhomes Papo-de-perú Patito
<i>A. gehrtii</i> Hoehne	Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo	Milhome-branco Milhome-miudo
<i>A. holostylis</i> F. González	Tocantins Nordeste Ceará, Maranhão, Piauí, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso	Flor-de-sapo
<i>A. gardneri</i> Duch	Pará, Bahia, Piauí, Goiás	-
<i>A. labiata</i> Willd	Tocantins, Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina	Angelicó Buta Crista-de-galo Milhomens Papo-de-peru Peru-bosta

Fonte: Flora e Funga do Brasil, 2022.

As flores de *A. gigantea*, *A. esperanzae* e *A. gehrtii* foram coletadas de exemplares cultivados no Instituto de Química (IQ/Unesp), em Araraquara-SP. As flores de *A. holostylis* e *A. gardneri*, coletadas em Monte Alegre-GO, e de *A. labiata*, coletada em Moema-MG e em Dourados-MS, são espécies nativas encontradas nessas regiões do Brasil (Figura 5).

O tamanho e o aroma das flores também variam entre as espécies. As flores de *A. gigantea* têm cerca de 30 cm; *A. esperanzae* e *A. labiata* sendo por volta de 12

cm; *A. gehrtii*, *holostylis* e *A. gardneri* variando de 3-5 cm. As espécies *A. labiata* e *A. esperanzae* emitem um odor extremamente desagradável, de matéria em decomposição, enquanto *A. gigantea* e *A. holostylis* apresentam um cheiro adocicado semelhante à citronela e caramelo, respectivamente. Já as espécies *A. gehrtii* e *A. gardneri* não apresentam aroma característico detectado (nota da autora).

Figura 5 - Destaque para as flores das espécies *Aristolochia gigantea*, *A. gehrtii*, *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri* e *A. labiata*



A. gigantea



A. gehrtii



A. esperanzae



A. holostylis



A. gardneri



A. labiata

Fonte: Fotos tiradas pela autora

A vasta quantidade e variedade de compostos obtidos a partir de estudos fitoquímicos de espécies de *Aristolochia* têm contribuído tanto para a compreensão acerca do gênero, quanto para descoberta de constituintes com atividades farmacológicas promissoras.

Se tratando de flores, a quantidade de material pode ser uma dificuldade durante o estudo. Desse modo, a utilização de técnicas analíticas hifenadas torna-se indispensável na obtenção tanto do perfil metabólico quanto das informações

estruturais de substâncias presentes nos extratos vegetais, podendo distinguir compostos previamente isolados de novas moléculas. O estudo das flores de *Aristolochia* por técnicas modernas pode direcionar para o isolamento de novos constituintes, ou aqueles que despertem interesse biológico, em análises futuras, auxiliando na racionalização dos estudos fitoquímicos.

Desse modo, o estudo das flores de espécies de *Aristolochia*, os quais apresentam poucos relatos sobre a descrição química e biológica na literatura, abre caminho para a descoberta de novas substâncias com potencial químico e biológico passíveis de serem explorados e aplicados futuramente.

1.5 Identificação de compostos em matrizes complexas

A maioria dos extratos vegetais é constituído por uma mistura complexa de metabólitos com diferentes características, tanto espectroscópicas quanto físico-químicas. Atualmente as técnicas hífenadas, ou seja, aquelas que resultam do acoplamento de uma técnica eficiente de separação, como a cromatografia líquida ou cromatografia gasosa, com uma ou mais técnicas de detecção espectroscópica ou espectrométrica, como por exemplo, espectrometria de massa (EM), infravermelho (IV), ultravioleta-visível (DAD) ou espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), tornaram-se uma das ferramentas com maior eficiência e rapidez para a análise de matrizes complexas, capazes de fornecer diversas informações estruturais dos compostos ali presentes, antes mesmo de serem isolados, sendo necessários apenas alguns miligramas do analito (SARKER; NAHAR, 2012; STORION; GONÇALVES; MARCUCCI, 2020).

As técnicas analíticas hífenadas tornaram-se ferramentas poderosas para desreplicação de extratos vegetais, permitindo a rápida identificação de metabólitos conhecidos, mesmo que em misturas complexas, minimizando o isolamento de substâncias já descritas na literatura. Dessa forma, é possível direcionar os estudos para a descoberta e identificação de substâncias inéditas, conduzindo ao isolamento e identificação de compostos de interesse, economizando tempo e auxiliando principalmente na prospecção de compostos bioativos presentes nesses extratos (ARORA; BANERJEE, 2019; HUBERT; NUZILLARD; RENAULT, 2017; PILON, et al. 2020; ZANI; CARROLL, 2017).

Dentre as principais técnicas hífenadas utilizadas para a desreplicação dos extratos estão Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (CLAE-EM), fornecendo informações estruturais que podem ser comparadas com bases de dados disponíveis e auxiliando na caracterização de extratos vegetais (ALLARD; GENTA-JOUE; WOLFENDER, 2017).

A CG-EM é utilizada principalmente para análise de compostos voláteis e estáveis termicamente às altas temperaturas. Porém, compostos polares, não voláteis e termolábeis também podem ser analisados após processo de derivatização. É uma técnica muito útil na identificação de compostos presentes em extratos apolares devidos aos grandes bancos de dados espectrais. Já a CLAE-EM é utilizada nas análises de compostos mais polares, sendo capaz de fornecer dados estruturais importantes, que, quando comparados aos bancos de dados EM-EM de produtos naturais, tornam-se indispensáveis na desreplicação de extratos vegetais (PILON, et al. 2020; SALEM et al. 2020).

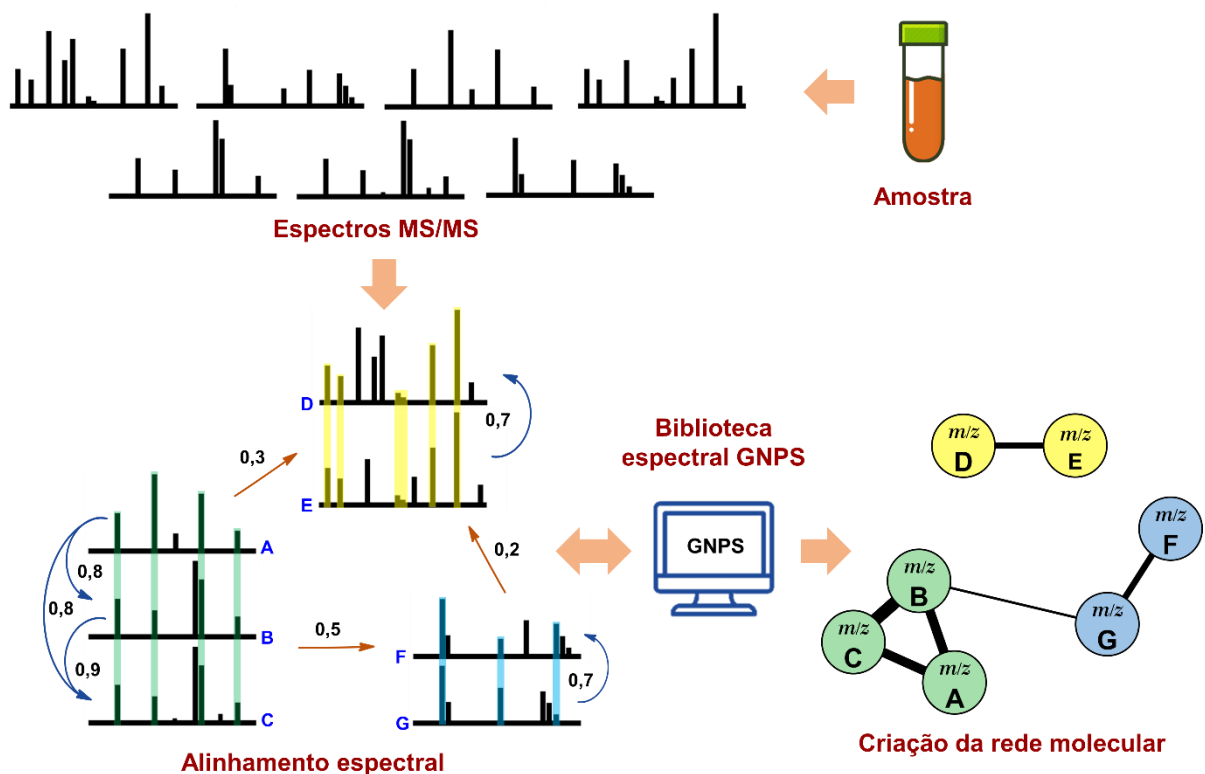
1.6 *Molecular Networking* na investigação de extratos vegetais

A rede molecular, do inglês *Molecular Networking*, é uma ferramenta que possibilita a anotação de substâncias presentes em matrizes complexas de forma rápida e eficiente. As redes moleculares tornaram-se uma estratégia poderosa na busca de novos produtos naturais, uma vez que moléculas conhecidas podem ser identificadas inicialmente, evitando assim seu reisolamento e, por consequência, tempo, custos e esforços podem ser economizados durante os estudos (PURVES, et al. 2016).

A partir da rede molecular é possível fazer a comparação entre os espectros de massas de cada um dos íons de moléculas detectados em um extrato, a partir de um experimento de EM, bem como entre os fragmentos desses íons (EM/EM). A comparação desses dados permite determinar a similaridade espectral entre os padrões de fragmentação EM/EM dos diferentes íons detectados e organizá-los em *clusters*. Considerando que moléculas semelhantes apresentaram padrões de fragmentação semelhantes em EM/EM, a rede molecular produz um mapa de similaridade espectral que possibilita visualizar moléculas com perfil estrutural equivalente (PURVES, et al. 2016; QUINN, et al. 2017).

As substâncias agrupadas podem ainda ter seus espectros de massas comparados a um banco de dados de espectrometria de massas (Figura 6). Foi a partir das redes moleculares que surgiu a *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS), uma plataforma de dados virtual, acesso aberto, alimentada pela comunidade científica. Com o advento do GNPS, é possível analisar os dados agrupados e compará-los, de forma automática, com os dados disponíveis na plataforma GNPS, possibilitando tanto a anotação de substâncias com espectros de EM/EM de referência disponíveis no GNPS, quanto a extrapolação dessas anotações através das redes moleculares, permitindo a detecção de análogos e até mesmo a identificação de novos compostos nas matrizes estudadas (NOTHIAS, et al. 2018; WANG, et al. 2016).

Figura 6 - Construção da rede molecular por alinhamentos espectrais EM/EM



Fonte: Adaptado de Watrous et al. (2012)

Uma rede molecular é formada por *clusters*, nodos e arestas, onde os *clusters* são os diferentes conjuntos de dados espectrais similares, cada nodo, dentro de um *cluster*, representa um espectro de EM/EM, que se conecta através de uma aresta pelo grau de similaridade espectral entre todos os espectros EM/EM dos íons

detectados. Para calcular a similaridade, os espectros EM/EM são simplificados em vetores no espaço, que são utilizados para calcular uma pontuação de cosseno que varia de 0 a 1 (1 indica que os espectros são idênticos), permitindo determinar o grau de similaridade espectral entre todos os espectros EM/EM. Dessa forma, aqueles que apresentarem cosseno acima de 0,7 (definido pelo usuário) são agrupados em um único *cluster* (QUINN, et al. 2017; WATROUS, et al. 2012).

Na representação visual de uma rede molecular, a espessura e distância das arestas que conectam os nodos indicam o grau de similaridade entre os espectros EM/EM comparados. Quanto maior for a espessura e menor a distância entre os nodos maior será a similaridade (QUINN, et al. 2017; WATROUS, et al. 2012).

Portanto, as redes moleculares tornam-se uma estratégia valiosa para organização e interpretação dos dados de espectrometria de massa obtidos a partir de matrizes complexas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi contribuir para o conhecimento da composição química de flores de *Aristolochia*, por meio de métodos analíticos de desreplicação e através do isolamento e identificação estrutural dos compostos majoritários.

Objetivos específicos:

- ✓ Isolar e identificar as substâncias presentes na fração acetato de etila das flores de *A. gigantea*, através de técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas, para servir de padrões nas análises das demais flores de *Aristolochia*;
- ✓ Avaliar a influência de diferentes sistemas de solventes para a extração dos constituintes químicos das flores de *Aristolochia*;
- ✓ Analisar e comparar os extratos orgânicos das espécies *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri*, *A. labiata*, *A. gehrtii* e *A. gigantea*, através de técnicas analíticas de desreplicação por CLAE-EM e CG-EM.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica e Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara-SP, coordenado pela Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento.

3.1 Solventes

Os solventes deuterados [(CD₃OD e CDCl₃ com pureza ≥ 99,8% para D); (DMSO-*d*₆ D, 99,9%)] utilizados nos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram da marca Sigma-Aldrich™ e CIL®. Os solventes não deuterados empregados no preparo dos extratos, nos processos cromatográficos e nas etapas de partição das frações foram grau HPLC e das marcas J.T.Baker®, M.Tedia® e Panreac®. A água foi destilada e deionizada em aparelho da marca Milli-Q (resistividade mínima 18,2 MΩ.cm à 25 °C).

3.2 Equipamentos

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas utilizando cromatógrafo JASCO® com controlador LC-Net II/ADC, bomba PU-2086 Plus, injetor automático AS-2055 Plus, detector de arranjo de fotodiodos MD-2018 Plus e detector de dicroísmo circular CD-2095. No modo analítico foi empregada coluna C-18 ODS OmniSpher® (4,6 × 250 mm, 5 μm, Varian®), enquanto no modo semipreparativo foi utilizada coluna C-18 ODS Luna® (10 × 250 mm, 5 μm, Phenomenex®). As amostras analisadas por CLAE foram previamente submetidas a extrações em fase sólida com cartuchos de fase reversa Macherey-Nagel C18 ec (3,0 mL; 500 mg, Chromabond®) e, na sequência, filtradas em microfiltro de PVDF (13 mm; 0,22 μm, Exacta®).

As análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM-EM) foram realizadas utilizando sistema LC Shimadzu® com bomba LC-20AD, injetor automático SIL-20AHT, forno de coluna modelo CTO-20A com temperatura de 40 °C, módulo de comunicação CBM-20A acoplado a um detector de arranjo de diodos SPD-M20A e espectrômetro de massas Amazon SL Bruker® com analisador *ion trap* (IT) e fonte de ionização por *electrospray* (ESI) em modos positivo

e negativo. As separações foram feitas em coluna Kinetex 5 μ C18 100Å (150 x 2,1 mm) equipada com pré-coluna Ultra C₁₈. A voltagem do capilar foi regulada para 4500 V, a voltagem da placa para 500 V e temperatura para 300 °C; o gás nebulizador com pressão de 50 psi e vazão do gás de secagem de 10,0 L/min. A faixa de aquisição foi de m/z 50-1000 com 80% de amplitude de fragmentação. Os espectros de massas foram adquiridos nos modos negativo e positivo.

Nas análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) utilizou-se cromatógrafo a gás Shimadzu QP2020 equipado com injetor automático AOC-20i Shimadzu e interface com um espectrômetro de massas. A coluna utilizada foi ZB-5HT (30 m x 0,25 μ m x 0,25 mm). A temperatura do forno da coluna foi programada utilizando uma rampa de aquecimento iniciando-se em 140 °C (5 min) e elevada a uma taxa de 3 °C.min⁻¹ até 320 °C (10 min). A temperatura do injetor foi de 270 °C e modo de injeção split 1/15, gás de arraste hélio (99,999%), pressão de 88,5 kPa, velocidade linear de 37,8 cm/sec., fluxo total na coluna de 1 mL/min. Condições do espectrômetro de massas: temperatura da fonte de íons e interface de 280 °C, modo de impacto de elétrons a 70 eV, faixa das massas de aquisição de m/z 35-700 Da.

A eliminação dos solventes das amostras foi feita à pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório Büchi® (Waterbath B-480) e capela de exaustão.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear unidimensional (¹H, ¹³C, *g*NOESY e *g*TOCSY) e bidimensional (*g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC) foram adquiridos em espectrômetro Bruker, modelo Avance III HD 600 (14,1 T), com frequência de 600 MHz para o núcleo de ¹H e de 151 MHz para o ¹³C. Todas as amostras foram analisadas em uma sonda criogênica de 5 mm com detecção inversa e três canais de aquisição (¹H, ¹³C e ¹⁵N) na temperatura de 23 °C.

3.3 Análises cromatográficas

Para o fracionamento cromatográfico em coluna foi utilizada coluna de vidro com 2,8 cm de diâmetro e 72,0 cm de comprimento, preenchida com Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich®).

Para a cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada sílica gel (2-25 μ m, 60 Å, Sigma-Aldrich®). As revelações das cromatoplas foram efetuadas

mediante o uso de iodo sublimado e por irradiações na região de absorção no UV (254 e 365 nm).

3.4 Coleta e identificação do material vegetal

As flores das espécies *A. gigantea*, *A. gehrtii* e *A. esperanzae* foram coletadas no Instituto de Química da UNESP de Araraquara-SP, localizada a -21,8071367 de latitude e -48,19264537 de longitude e altitude de 648 m. As espécies *A. holostylis* e *A. gardneri* foram coletadas no município de Monte Alegre-GO em uma região localizada a -13.109782 de latitude e -46.726003 de longitude e altitude de 603 m. As flores de *A. labiata* foram coletadas no município de Moema-MG em uma região localizada a -19.91674996 de latitude e -45.33304453 de longitude e altitude de 809 m. e no município de Dourados-MS a 22'11'44'S de latitude e 54'56'9'W de longitude.

A identificação do material vegetal foi realizada pelo Dr. Joelcio Freitas. Uma excisada de cada uma das espécies estudadas foi depositada nos herbários do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão (MBML) e da Universidade Federal da Grande Dourados (DDMS), e registrada com os números MBML 54021 (*A. gehrtii*), MBML 54015 (*A. holostylis*), MBML 54014 (*A. gardneri*), MBML 54017 (*A. gigantea*), MBML 55048 (*A. labiata* MG), DDMS 6500 (*A. labiata* MS) e MBML 55049 (*A. esperanzae*). O material botânico foi registrado no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/SisGen) sob os números A3486D8 (*A. labiata*, *A. gigantea*, *A. esperanzae*) e AAAB0F4 (*A. gehrtii*, *A. holostylis*, *A. gardneri*).

3.5 Preparo e triagem química dos extratos de flores de *A. gigantea*

As flores de *A. gigantea* foram divididas em duas partes, limbo e tubo + utrículo (Figura 7) e secas em estufa a 35 °C por 48 horas.

Após secagem, o material vegetal foi moído com auxílio de um moinho de facas. Ambas as partes foram extraídas com EtOH. Para isso, foram feitas quatro extrações, com um intervalo de 24 horas entre cada uma, utilizando uma proporção de 5,0 g de material vegetal para 20 mL de solvente, para ambas as partes. Os extratos etanólicos do limbo e tubo + utrículo foram analisados por RMN de ¹H e CLAE-DAD, a fim de comparar os seus perfis químicos.

Figura 7 - Divisão das flores de *A. gigantea* em limbo (A) e tubo + utrículo (B)



Fonte: Autora (2022)

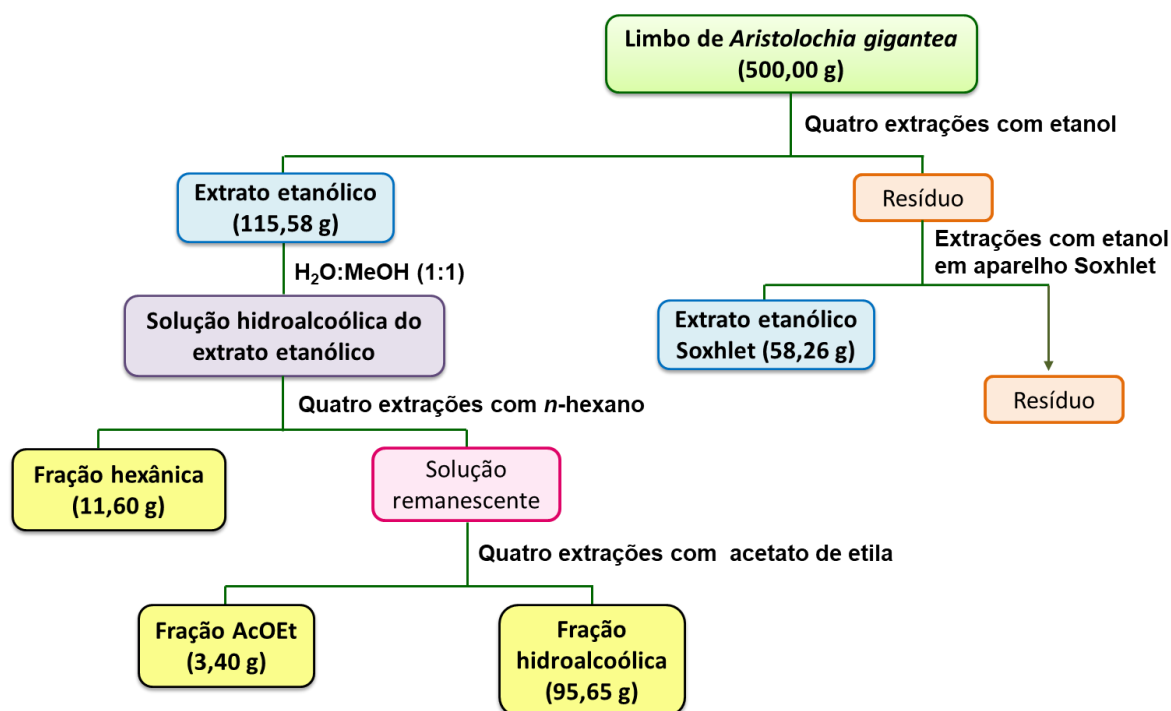
Com base nos perfis espectral e cromatográfico do limbo e tubo + utrículo optou-se pelo preparo, em maior escala, do extrato etanólico do limbo de *A. gigantea*.

3.6 Isolamento e purificação das substâncias do limbo das flores de *A. gigantea*

O limbo moído (500,0 g) foi submetido a sucessivas extrações à temperatura ambiente com etanol (2,2 L) na proporção de 1:4 (material vegetal (g):solvente (L)). As extrações foram realizadas a cada 24 horas, sendo que após a filtração a biomassa foi suspensa novamente no mesmo solvente, totalizando quatro extrações. Em cada filtração, o material foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo. Por fim, o resíduo remanescente foi extraído até exaustão com etanol em aparelho Soxhlet (Figura 8).

O extrato etanólico (115,58 g) foi submetido a extração líquido-líquido. O extrato foi solubilizado em 100 mL de uma solução hidroalcoólica 1:1 (MeOH:H₂O) e submetido a extrações com *n*-hexano e acetato de etila. Para cada solvente foram realizadas quatro extrações com 150 mL cada, resultando em uma fração hexânica (11,60 g) e uma fração acetato de etila (3,40 g). A porção remanescente deu origem a fração hidroalcoólica (95,65 g) (Figura 8).

Figura 8 - Procedimento utilizado para o preparo dos extratos do limbo de *A. gigantea*



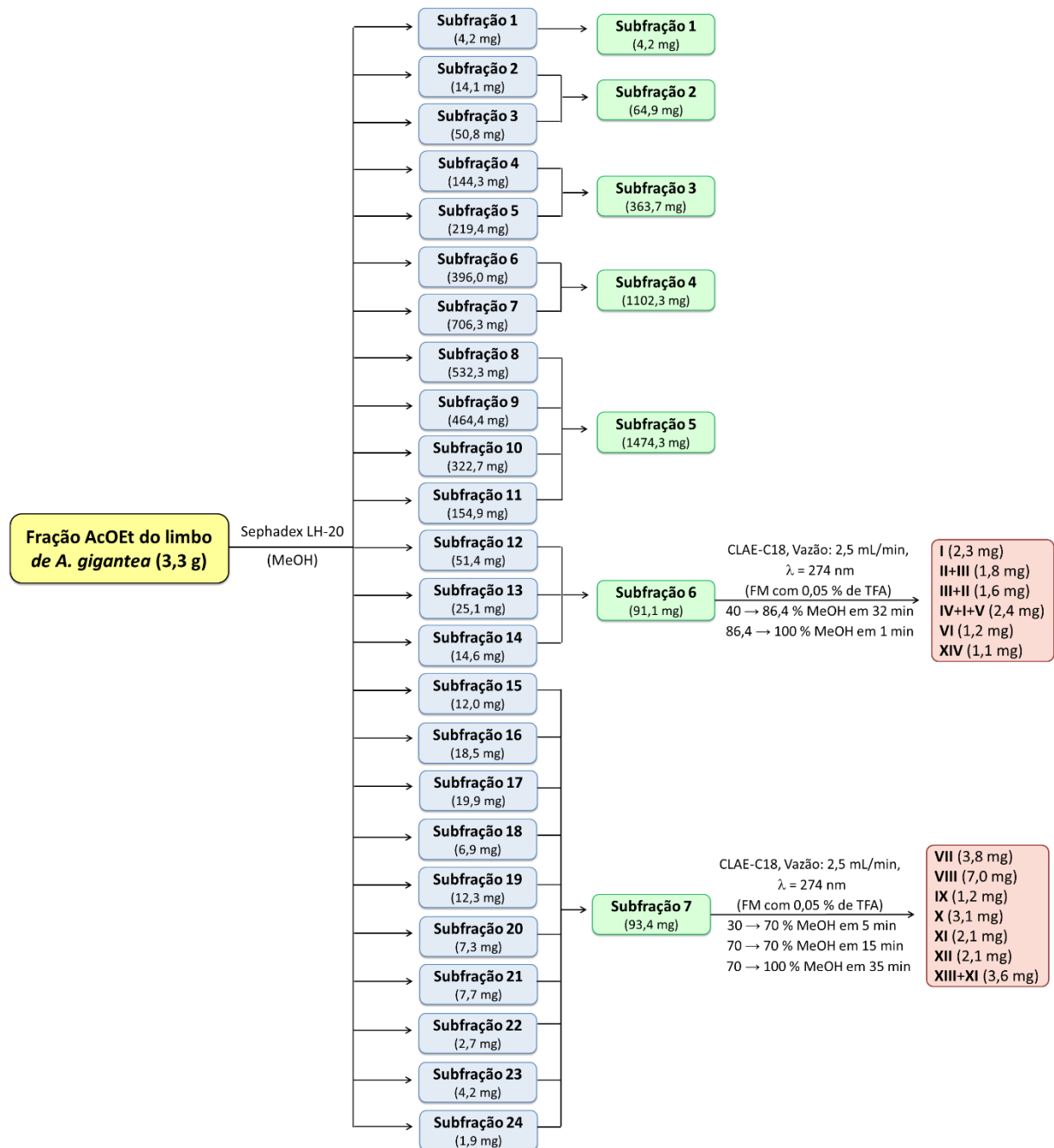
As frações hexânica, acetato de etila, hidroalcoólica e o extrato etanólico Soxhlet foram secas e analisadas por CCD, RMN de ^1H e CLAE-DAD.

Uma porção da fração acetato de etila do limbo de flores de *A. gigantea* (3,3 g) foi submetida à cromatografia por exclusão com fase estacionária de Sephadex LH-20 (Φ 2,8 x 72,0 cm) e fase móvel isocrática de MeOH 100%. Foram coletadas 24 subfrações de aproximadamente 25 mL cada. Todas as subfrações foram analisadas por RMN de ^1H e CLAE-DAD (gradiente exploratório de MeOH/H₂O 5→100% de MeOH em 40 minutos com 0,05% de TFA). As que apresentaram perfis semelhantes foram reunidas em uma mesma subfração e renumeradas de 1-7 (Figura 9).

A subfração 6 foi submetida à CLAE em escala semipreparativa, e resultou no isolamento e identificação de sete substâncias, sendo quatro fenilpropanoides (I-IV), dois ácidos benzoicos (V-VI) e um flavonoide glicosilado (XIV).

A subfração 7 foi submetida à CLAE em escala semipreparativa, resultando no isolamento e identificação de sete substâncias, sendo seis ácidos aristolóquicos (VII-XII) e um flavonoide (XIII).

Figura 9 - Fracionamento da fração acetato de etila do limbo de *A. gigantea*



3.7 Preparo e análise cromatográfica dos extratos das flores das espécies *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri*, *A. labiata*, *A. gehrtii* e *A. gigantea*

Realizou-se um planejamento experimental do tipo simplex centroide para definição do melhor solvente extrator. O número de condições testadas foi baseado na equação $2^k - 1$, onde k é o número de componentes (solventes) utilizados, que foram selecionados com base no triângulo de seletividade de Snyder (1997), visto que

solventes encontrados em diferentes grupos no triângulo apresentam características de seletividade diferentes.

Foram testadas seis combinações de solventes diferentes; três combinações com componentes puros, três combinações binárias e uma combinação ternária, sendo realizada uma triplicata no ponto central, Tabela 2.

Tabela 2 - Planejamento simplex centroide para definição do solvente extrator

Experimento	Composição em pseudocomponentes			Composição real (%)		
	AcOEt	EtOH	CHCl ₃	AcOEt	EtOH	CHCl ₃
1	1	0	0	100	0	0
2	0	1	0	0	100	0
3	0	0	1	0	0	100
4	½	½	0	50	50	0
5	0	½	½	0	50	50
6	½	0	½	50	0	50
7(n = 3)	⅓	⅓	⅓	33,33	33,33	33,33

As flores das espécies *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri*, *A. labiata*, *A. gehrtii* e *A. gigantea* foram secas em estufa a 35 °C por 48 horas. Após secagem, o material vegetal foi moído, submetido a três extrações de 30 minutos em aparelho de ultrassom, sendo que a cada 15 minutos a água do banho era trocada para evitar o aquecimento. Cada extração foi realizada na proporção de 1:10 (material vegetal (g):solvente (mL)), sendo que para cada combinação foi utilizado 1,0 g do material vegetal. Os extratos obtidos foram analisados por CLAE-DAD.

Como resposta, utilizou-se o número de picos observados em 250 nm, exceto para espécie *A. holostylis* que foi analisada em 250 e 274 nm, comprimentos de onda ótimo para a análise por CLAE-DAD dos extratos estudados. A partir desse planejamento experimental foi possível definir a melhor combinação capaz de extrair maior número de substâncias das flores de *Aristolochia*, dentre as condições testadas.

Os solventes empregados nos processos de extração foram reutilizados ao decorrer das extrações e, após o término das mesmas, foram adequadamente descartados em frascos previamente rotulados e encaminhados ao descarte, conforme as Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos do IQ/Unesp.

3.8 Ajuste do modelo matemático ao conjunto de dados

A escolha do modelo matemático usado para descrever o comportamento dos dados experimentais, foi feita analisando a adequação de cada um dos modelos às repostas obtidas para as espécies estudadas.

Os modelos verificados foram modelo linear (Equação 1), modelo quadrático (Equação 2) e modelo cúbico especial (Equação 3),

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 \quad (\text{Equação 1})$$

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad (\text{Equação 2})$$

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 \quad (\text{Equação 3})$$

onde y é a estimativa das repostas (número de picos), β_1 , β_2 , β_3 , β_{12} , β_{13} , β_{23} e β_{123} são os coeficientes do modelo, x_1 , x_2 e x_3 são os componentes das misturas (CHCl_3 , AcOEt e EtOH).

Tabela 3 - Análise de variância para avaliação do modelo matemático ajustado aos dados experimentais usando método dos mínimos quadrados

Fonte de variação	SQ	g.l.	MQ
Regressão	$SQ_{reg} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{p - 1}$
Resíduo	$SQ_{res} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_{res} = \frac{SQ_{res}}{n - p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Total	$SQ_{tot} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	$MQ_{tot} = \frac{SQ_{tot}}{n - 1}$

SQ, soma quadrática; g.l., graus de liberdade; MQ, média quadrática; m , número total de níveis no planejamento; n_i , número total de experimentos; p , número de coeficientes do modelo; \hat{y}_i , valor estimado pelo modelo para o nível i ; y_{ij} , réplica realizada em cada nível individual; \bar{y}_i , média das réplicas realizadas no mesmo conjunto de condições experimentais e \bar{y} , média global.

O ajuste do modelo escolhido foi feito com base na análise de variância (ANOVA) no nível de confiança de 95% (Tabela 3), que possibilitou avaliar a significância da regressão utilizada, bem como a qualidade dos ajustes às respostas obtidas nos experimentos (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2001). Para o tratamento dos dados utilizou-se o *software* Statistica versão 10.

3.9 Análise por CLAE-DAD das frações metanólicas das flores das espécies *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri*, *A. labiata*, *A. gehrtii* e *A. gigantea*

Para a análise do perfil químico de cada um dos nove extratos obtidos, para cada espécie, no planejamento experimental, foi realizado extrações utilizando *n*-hexano e MeOH. Primeiramente cada extrato foi submetido a três extrações com *n*-hexano (20 mL cada) em aparelho ultrassom por 3 minutos cada, e a parte solúvel deu origem a uma fração hexânica. Em seguida os resíduos foram extraídos com MeOH (3 x 20 mL) e a parte solúvel resultou na fração metanólica, a qual foi analisada por CLAE-DAD.

As frações metanólicas foram submetidas individualmente a *clean-up* por extração em fase sólida (SPE) em cartuchos de fase reversa C₁₈. Os cartuchos foram primeiramente ativados com MeOH (3,0 mL) e equilibrados com 3,0 mL de MeOH:H₂O 95:5 (v/v), posteriormente as amostras foram aplicadas e eluídas com 1 mL de MeOH:H₂O 95:5 (v/v). Após secas as amostras foram preparadas solubilizando 5,0 mg em 1 mL de 95:5 ACN:H₂O (v/v) e em seguida filtradas em microfiltro de PVDF. As amostras foram analisadas por CLAE-DAD utilizando um gradiente linear de fase móvel composta por H₂O e ACN acidificada com 0,025% TFA, de 5 a 100% de ACN em 50 minutos. O volume de injeção foi de 20 µL e a vazão de 1 mL.min⁻¹.

3.10 Análises por CLAE-EM/EM das frações metanólicas das flores das espécies *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri*, *A. labiata*, *A. gehrtii* e *A. gigantea*

Para uma análise com maior representatividade foi preparada uma mistura das frações metanólicas de cada espécie separadamente. Para isso foi retirado 1 mg de cada uma das nove frações metanólicas, com o intuito de obter uma combinação que representasse todas as condições testadas para cada espécie.

Em seguida, cada mistura foi submetida à uma etapa de *clean-up*, como descrito na seção 3.9, p. 41. Após a secagem, as misturas foram solubilizadas em ACN:H₂O 95:5 (v/v) tendo a concentração ajustada para 1 mg.mL⁻¹, e na sequência, filtradas em microfiltro de PVDF. As amostras foram analisadas por CLAE-EM/EM, utilizando um gradiente linear e fase móvel composta por H₂O e ACN acidificada com 0,1% de ácido fórmico, de 5 a 100% de ACN em 40 minutos. O volume de injeção foi de 1 µL e a vazão de 0,5 mL.min⁻¹.

3.10.1 Molecular Networking

A rede molecular foi criada usando o fluxo de trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Os dados foram filtrados removendo todos os íons de fragmento EM/EM dentro de +/- 17 Da do precursor *m/z*. Os espectros de EM/EM foram filtrados por janela escolhendo apenas os 6 íons de fragmento superiores na janela de +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi fixada em 2,0 Da e uma tolerância de fragmento de íon EM/EM de 0,9 Da. Uma rede foi criada onde as bordas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,7 e mais de 4 picos correspondentes. Além disso, as bordas entre dois nós foram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós apareceu nos respectivos 10 nós mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100 e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS (WANG, et al., 2016). Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca deveriam ter uma pontuação acima de 0,7 e pelo menos 4 picos correspondentes.

3.11 Análises por CG-EM das frações hexânicas das flores das espécies *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri*, *A. labiata*, *A. gehrtii* e *A. gigantea*

Para análise dos compostos apolares, uma mistura utilizando 1 mg de cada uma das nove frações hexânicas de cada espécie também foi preparada. As amostras foram solubilizadas em *n*-hexano:AcOEt 70:30 (v/v), tendo suas concentrações

ajustadas para 1 mg.mL⁻¹ e na sequência filtradas em microfiltro de PVDF e analisadas por CG-EM. O volume de amostra injetado foi de 1 µL.

A análise das frações hexânicas das flores de *Aristolochia* foi feita com base nos índices de retenção linear de cada pico, calculados a partir da equação proposta Van Den Dool e Kratz, 1963 (Equação 4). Para isso foi utilizada uma série homóloga de *n*-alcanos Sigma-Aldrich (C₈-C₄₀) como padrão, onde o índice de retenção de cada um dos componentes foi obtido a partir da interpolação dos tempos de retenção relacionados a cada componente presente na amostra com os tempos de retenção dos padrões dos hidrocarbonetos, ou seja, aqueles hidrocarbonetos eluídos antes e após cada componente de interesse.

$$IR = 100n + 100 \left(\frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right) \quad (\text{Equação 4})$$

A partir da equação temos que t_x é o tempo de retenção de um componente x , t_n é o tempo de retenção do n -alcano eluído antes do componente x , t_{n+1} é o tempo de retenção do n -alcano eluído após o componente x , e n é número de carbonos do n -alcano eluído antes ao componente x .

A identificação dos componentes presentes nos extratos estudados foi realizada com base na análise e comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis nas bibliotecas Wiley MS Database, NIST8 e NIST14. Para a análise foi estabelecido um limite mínimo de similaridade de 70% entre o espectro da amostra e o espectro da biblioteca. Além disso, foi feita a comparação entre os índices de retenção calculados com os índices de retenção da literatura (NIST).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise dos extratos de flores de *A. gigantea*

As análises realizadas para os extratos etanólicos do limbo e tubo + utrículo das flores de *A. gigantea* por RMN de ^1H (Figura 10, Apêndices A e B) mostraram perfis espectrais semelhantes entre os dois extratos. Entretanto, ao analisar os perfis cromatográficos por CLAE-DAD (Figura 11, Apêndice C) observou-se que o extrato de limbo apresentava maior quantidade de picos ao longo do cromatograma. Desta maneira, optou-se por fracionar, isolar e identificar os constituintes químicos do extrato etanólico do limbo de *A. gigantea*.

Figura 10 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos etanólicos do limbo e tubo + utrículo de flores de *A. gigantea* ($\text{DMSO}-d_6$, 14,1 T)

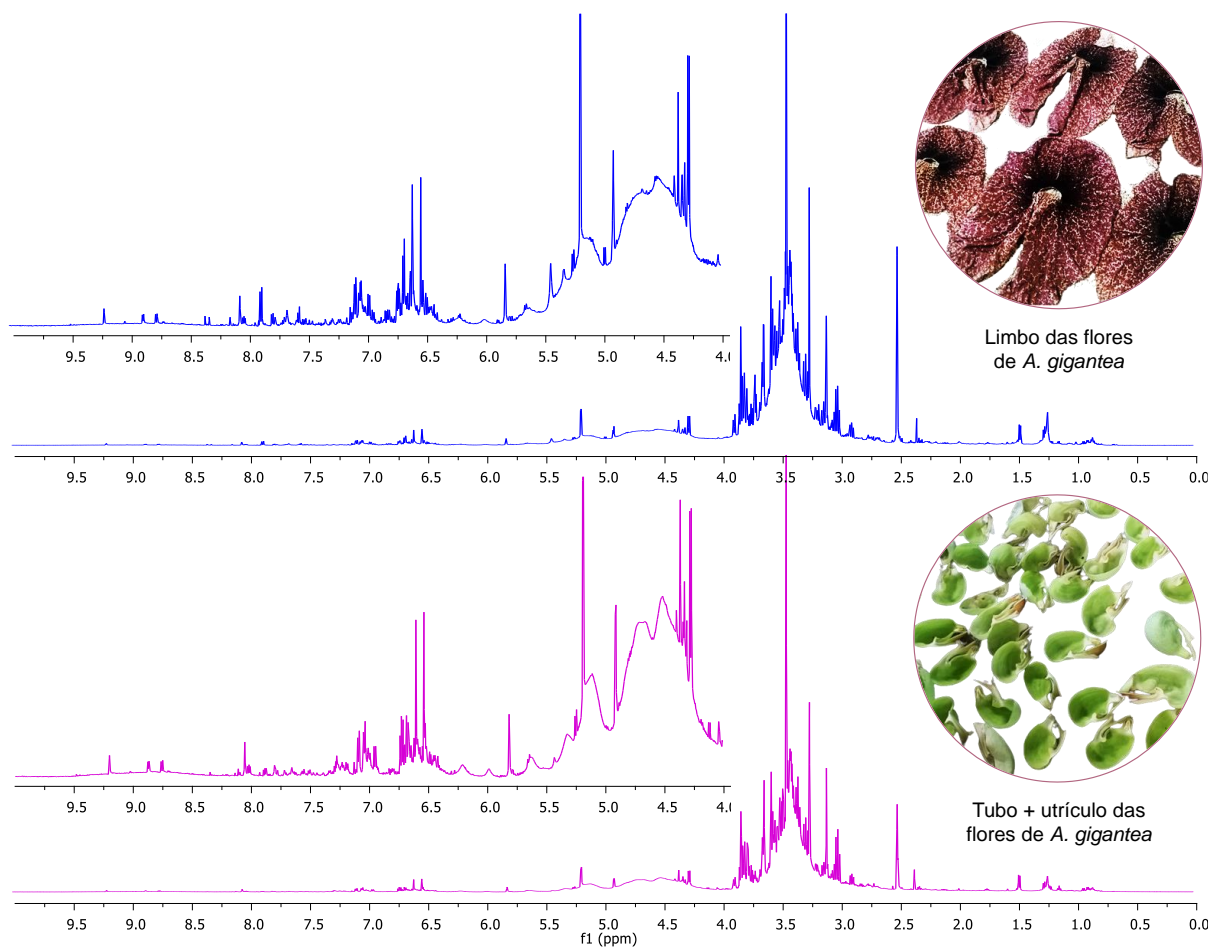
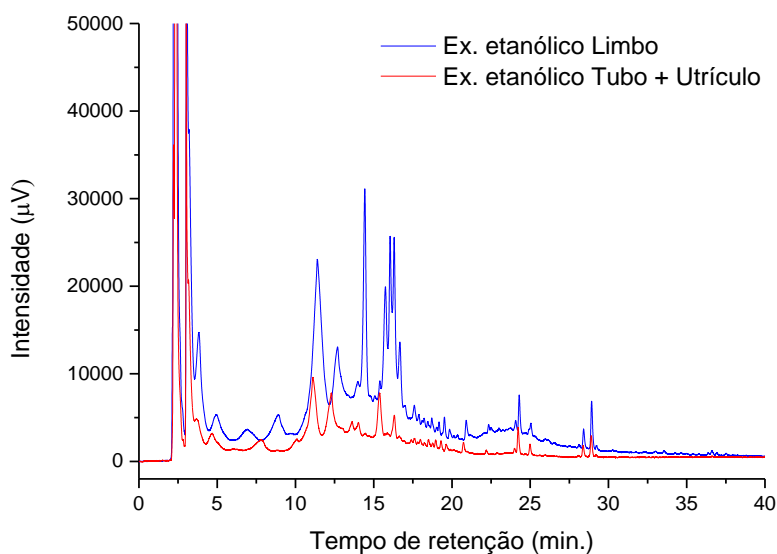


Figura 11 - Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos do limbo e tubo + utrículo de flores de *A. gigantea* em CLAE-DAD



Condições: Coluna Zorbax RX-C18 (Agilent®, 4,6 × 250 mm, 5 µm), FM 5 → 100 % ACN em 40 min com 0,05% de TFA, vazão 1,0 mL/min, $\lambda = 274$ nm.

Os rendimentos obtidos dos extratos etanólico e etanólico Soxhlet e das frações hexânica, acetato de etila, hidroalcoólica do limbo de *A. gigantea* estão apresentados na Tabela 4. O extrato etanólico foi o que apresentou maior rendimento, tendo a fração hidroalcoólica com o maior percentual em massa, seguida das frações hexânica e acetato de etila.

Tabela 4 - Rendimento das frações e extratos do limbo de *A. gigantea*

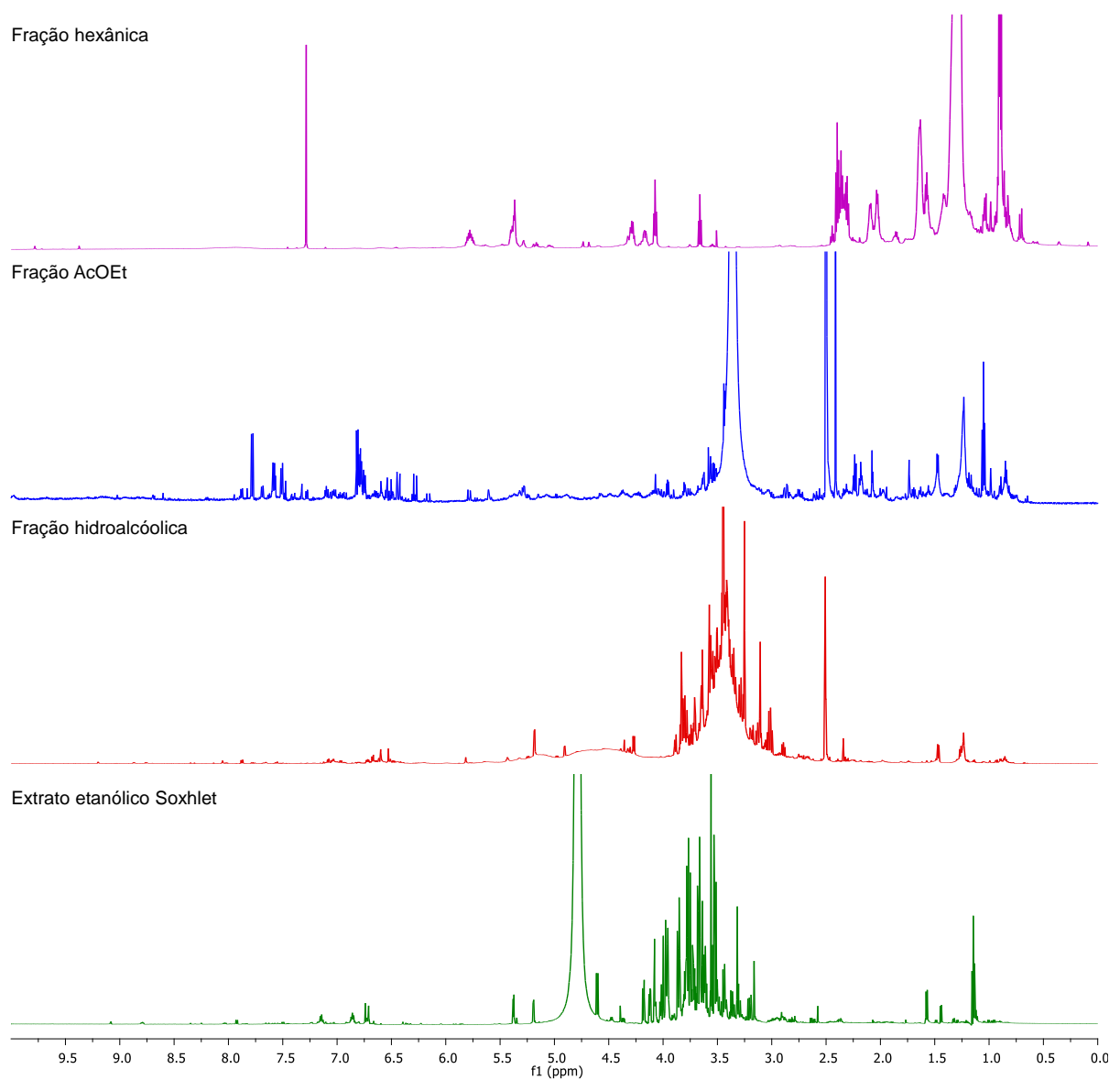
Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
Extrato etanólico	115,6	23,1*
• Fração hexânica	11,6	10,1**
• Fração acetato de etila	3,4	2,9**
• Fração hidroalcoólica	95,6	83,1**
Extrato etanólico Soxhlet	58,3	11,6*

* Massa do material vegetal: 500,00 g; ** Massa do extrato etanólico.

Os espectros de RMN de ^1H das frações hexânica, acetato de etila, hidroalcoólica do limbo de *A. gigantea* estão apresentados na Figura 12. O espectro de RMN de ^1H da fração hexânica apresentou sinais na região de hidrogênios

oximetínico (δ 3-4), olefínicos (δ 5-6), alifáticos (δ 0,5-2,5) (Apêndice D). Na fração acetato de etila foi possível notar, principalmente, sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (δ 6-8), oximetínicos (δ 3-4), alifáticos (δ 0,5-2,5) (Apêndice E). O perfil cromatográfico dessa fração foi o que apresentou maior número de picos, sugerindo elevada diversidade de metabólica (Apêndice F).

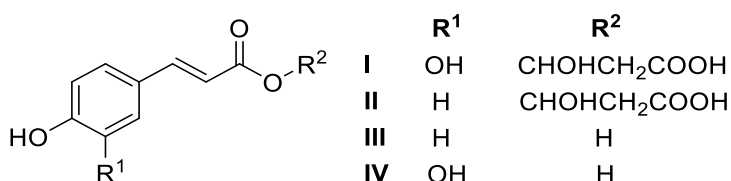
Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H das frações hexânica (CDCl_3 , 14,1 T), AcOEt, hidroalcoólica, (DMSO-d_6 , 14,1 T) e extrato etanólico Soxhlet (D_2O , 14,1 T) de flores de *A. gigantea*



Nos espectros de RMN de ^1H da fração hidroalcoólica e extrato etanólico Soxhlet (Apêndices G e I), observou-se sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, oximetínicos, alifáticos. A presença de uma elevada quantidade de sinais na região entre δ 3,2-4,2 sugeriu grande quantidade de açúcares presente nesses extratos. Diferente da fração acetato de etila, os perfis cromatográficos da fração hidroalcoólica e extrato etanólico demonstraram poucos picos.

Com base na análise conjunta desses dados, nota-se que, apesar do baixo rendimento, a fração acetato de etila foi a que apresentou os melhores perfis espectral e cromatográfico para estudos de isolamento e identificação dos constituintes, deixando claro a importância da etapa de partição com diferentes solventes orgânicos. Após etapas de separação da fração acetato de etila dos limbos das flores de *A. gigantea* (seção 3.6, pág. 36), foram isoladas e identificadas quatorze substâncias, sendo quatro fenilpropanoides (I-IV), dois ácidos benzoicos (V-VI), seis ácidos aristolóquicos (VII-XII) e dois flavonoides (XIII-XIV).

4.1.1 Fenilpropanoides (I-IV)



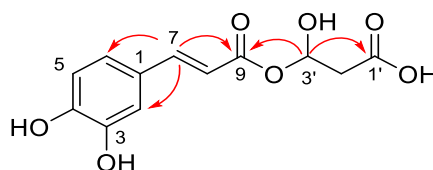
O espectro de RMN de ^1H de I (APÊNDICE K, Tabela 5) apresentou um padrão de deslocamento químico e multiplicidade dos hidrogênios que sugeriu a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído em δ 6,78 (d, $J = 8,2$ Hz), 6,95 (dd, $J = 8,2, 1,9$ Hz) e 7,06 (d, $J = 1,9$ Hz). Observou-se, ainda, dois sinais referentes aos hidrogênios olefínicos H-7 e H-8 com constantes de acoplamento características a hidrogênios com configuração *trans* em δ 7,58 (d, $J = 15,9$ Hz) e δ 6,32 (d, $J = 15,9$ Hz). Notou-se dois sinais referentes aos hidrogênios metilênicos H-2' em δ 2,82 (dd, $J = 16,4, 9,2$ Hz) e δ 2,95 (dd, $J = 16,4, 3,6$ Hz) e um sinal atribuído ao hidrogênio oximetínico H-3' em δ 5,42 (dd, $J = 9,2; 3,6$ Hz).

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H de **I** e **II** (14,1 T, CD_3OD , δ em ppm, J em Hz)

Posição	I		II	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	127,7	-	127,1	-
2	115,0	7,06 (d, $J = 1,9$)	131,3	7,47 (d, $J = 8,6$)
3	146,8	-	116,8	6,81 (d, $J = 8,6$)
4	149,8	-	161,3	-
5	116,4	6,78 (d, $J = 8,2$)	116,8	6,81 (d, $J = 8,6$)
6	123,1	6,95 (dd, $J = 8,2; 1,9$)	131,3	7,47 (d, $J = 8,6$)
7	147,4	7,58 (d, $J = 15,9$)	146,9	7,65 (d, $J = 15,9$)
8	114,7	6,32 (d, $J = 15,9$)	114,8	6,39 (d, $J = 15,9$)
9	168,4	-	168,4	-
1'	174,0	-	174,2	-
2'	37,8	2,82 (dd, $J = 16,4; 9,2$) 2,95 (dd, $J = 16,4; 3,6$)	37,9	2,82 (dd, $J = 16,0; 8,8$) 2,95 (dl, $J = 16,0$)
3'	71,4	5,42 (dd, $J = 9,2; 3,6$)	71,5	5,42 (dl, $J = 5,7$)

O espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ (APÊNDICE L, Tabela 5) de **I** exibiu 12 sinais atribuíveis a seis carbonos aromáticos (δ 115,0 - 149,8), dois carbonos carboxílicos (δ 168,4 e 174,0), dois carbonos olefínicos (δ 114,7 e 147,4), um carbono oximetínico (δ 71,4) e um metilênico (δ 37,8).

Os valores de deslocamento químico de ^{13}C foram atribuídos com base nas correlações observadas nos mapas de contornos HSQC (APÊNDICE M) e HMBC (APÊNDICE N). As correlações a longa distância observadas entre H-7 (δ 7,58) e os carbonos aromáticos em δ 123,1 (C-6) e 115,0 (C-2) e com o carbono carboxílico em δ 168,4 (C-9), bem como as interações de H-3' (δ 5,42) com os carbonos carboxílicos δ 168,4 (C-9) e 174,0 (C-1') (Figura 13), permitiram sugerir a estrutura de **I** como sendo o ácido (*E*)-3-((3-(3,4-dihidroxifenil)acrilóil)oxi)-3-hidroxi-propanoico.

Figura 13 - Correlações observadas no mapa de contorno HMBC para a substância **I**

Após análise conjunta dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C -DEPTQ, HMQC e HMBC (APÊNDICES O - R), observou-se que a substância **II** foi isolada em mistura com **III** na proporção de 1:1.

A substância **II** apresentou um perfil espectral de RMN de ^1H semelhante ao de **I** com relação aos hidrogênios metilênicos H-2' em δ 2,82 (dd, $J = 16,0, 8,8$ Hz) e 2,95 (dl, $J = 16,0$ Hz), ao hidrogênio oximetínico H-3' em δ 5,42 (dl, $J = 5,7$ Hz) e aos hidrogênios olefínicos H-7 e H-8 de configuração *trans* em δ 7,65 (d, $J = 15,9$ Hz) e 6,39 (d, $J = 15,9$ Hz). A diferença entre os espectros foi com relação à simetria no anel aromático 1,4-dissubstituído em δ 6,81 (d, $J = 8,6$ Hz; H-2,6) e δ 7,47 (d, $J = 8,6$ Hz; H-3,5), indicando a ausência da hidroxila em C-3 em **II** em relação à **I** (Tabela 5). A mesma semelhança espectral foi observada ao comparar os dados de RMN de ^{13}C , após as devidas atribuições dos sinais.

A estrutura da substância **II** foi sugerida como sendo com o ácido (*E*)-3-hidroxi-3-((3-(4-hidroxifenil)acrilóil)oxi)propanoico. As substâncias **I** e **II** estão sendo descritas pela primeira vez na literatura.

A substância **III** foi isolada em uma mistura com **II** (**III:II**), enquanto a substância **IV** foi isolada em mistura com **I** e **V** (**IV:I:V**) (APÊNDICES S - Z, Tabela 6).

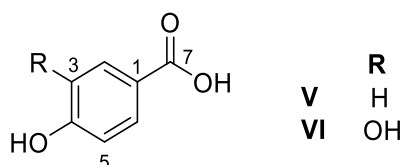
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H de **III**, **IV** e **V** (14,1 T, CD_3OD , δ em ppm, J em Hz,)

Posição	Ácido <i>p</i> -cumárico (GEORGE, 2018)		Ácido cafeico (GEORGE, 2018)		Ácido <i>p</i> - hidroxibenzoico (LEE et. al, 2012)	
	III		IV		V	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	127,2	-	127,7	-	123,1	-
2	131,1	7,45 (d, $J = 8,6$)	115,0	7,04 (d, $J = 2,0$)	133,0	7,87 (d, $J = 8,8$)
3	116,8	6,81 (d, $J = 8,6$)	146,8	-	116,0	6,82 (d, $J = 8,8$)
4	161,1	-	149,4	-	163,3	-
5	116,8	6,81 (d, $J = 8,6$)	116,4	6,78 (d, $J = 8,2$)	116,0	6,82 (d, $J = 8,8$)
6	131,1	7,45 (d, $J = 8,6$)	122,9	6,93 (dd, $J = 8,2; 2,0$)	133,0	7,87 (d, $J = 8,8$)
7	146,6	7,60 (d, $J = 15,9$)	147,0	7,53 (d, $J = 15,9$)	170,2	-
8	115,6	6,28 (d, $J = 15,9$)	115,5	6,22 (d, $J = 15,9$)	-	-
9	171,2	-	171,2	-	-	-

Após análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C -DEPTQ, HSQC e HMBC e devidas atribuições dos sinais, os dados foram comparados com os da literatura

(GEORGE, 2018; LEE et. al, 2012 Tabela 6) e as substâncias identificadas com os já conhecidos ácido *p*-cumárico (III), ácido cafeico (IV) e ácido *p*-hidroxibenzoico (V).

4.1.2 Derivados do ácido benzoico (V e VI)



O espectro de RMN de ^1H de VI (APÊNDICE AA, Tabela 7) apresentou um padrão de deslocamento químico hidrogênios que indica a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído em δ 7,41-7,44 (m, H-2,6) e 6,79 (d, $J = 8,0$, H-5).

O espectro de RMN de ^{13}C -DEPTQ, HSQC e HMBC de VI (APÊNDICE BB-DD) exibiram sete sinais atribuíveis a seis carbonos aromáticos em δ 115,7-151,5 e um sinal de um carbono carboxílico em δ 170,4 (Tabela 7).

Após comparar os dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos com os descritos na literatura identificou-se a substância VI como ácido protocatecuico (SHATAER, et al., 2020).

Tabela 7- Dados de RMN de ^1H de VI (14,1 T, CD_3OD , δ em ppm, J em Hz)

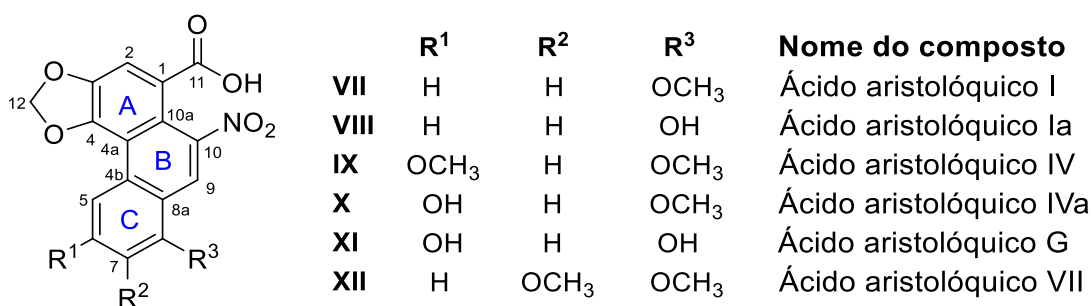
Posição	VI		Ácido protocatecuico (SHATAER, et al., 2020)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	123,2	-	123,0	-
2	117,7	7,41-7,44 (m)	117,7	7,23 (m)
3	146,0	-	145,9	-
4	151,5	-	151,4	-
5	115,7	6,79 (d, $J = 8,0$)	115,7	6,77 (d, $J = 8,0$)
6	123,8	7,41-7,44 (m)	123,9	7,21 (d, $J = 8,0$)
7	170,4	-	170,3	-

4.1.3 Ácidos aristolóquicos (VII-XII)

Os ácidos aristolóquicos possuem uma estrutura formada por um anel fenantreno substituído por um ácido carboxílico em C-1, um grupo nitro em C-10 e um grupamento metilenodioxílico em C-3,4 (Figura 14). Estes compostos são marcadores quimiotaxonômicos da família Aristolochiaceae (LOPES et al., 2001).

O estudo fitoquímico da fração acetato de etila de flores de *A. gigantea* resultou no isolamento de seis ácidos aristolóquicos (VII-XII) (Figura 14).

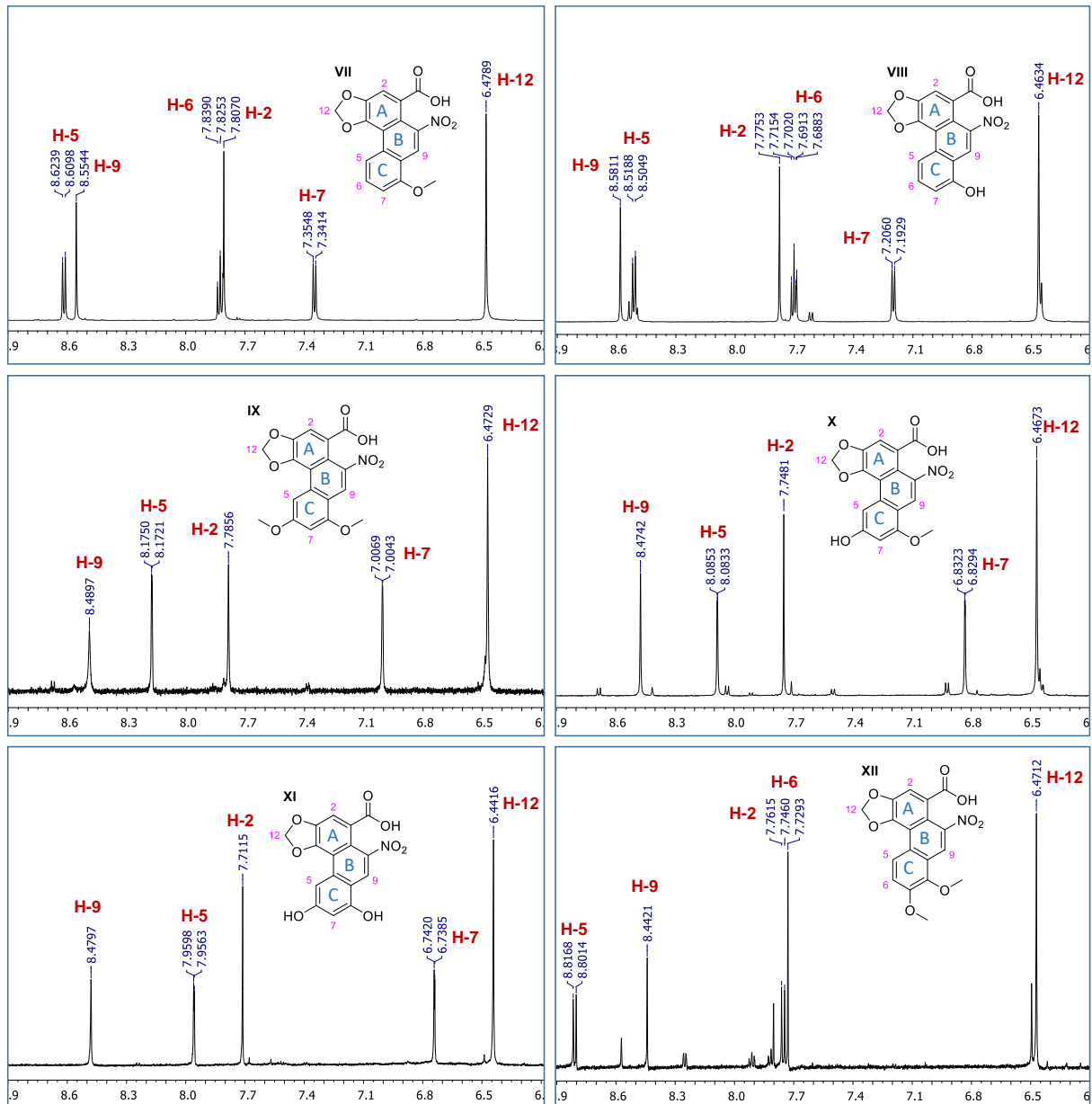
Figura 14 - Ácidos aristolóquicos isolados da fração acetato de etila do limbo de *A. gigantea*



Os espectros de RMN de ¹H de VII-XII apresentaram, como características principais, sinais de hidrogênios desblindados (δ 6,4-8,8), típicos de hidrogênios ligados a carbono aromáticos pertencentes a sistemas altamente conjugados, incluindo os simpletos referentes aos hidrogênios H-2 (δ 7,71-7,81) e H-9 (δ 8,44-8,58), além do sinal característico de hidrogênios metilenodioxílicos aromáticos (δ 6,44-48), Tabela 8 e Figura 15.

Os padrões de substituição dos anéis B e C dos ácidos aristolóquicos VII-XII foram determinados com base nos valores de deslocamento químico, constantes de acoplamento e multiplicidades dos sinais (Figura 15), nas correlações observadas nos mapas de contorno HMQC e HMBC (APENDICES EE-VV), bem como a comparação com os dados de substâncias anteriormente isoladas e identificadas em nosso grupo de pesquisa e com os dados descritos na literatura (Tabela 8).

Figura 15 - Expansões dos espectros de RMN de ^1H de **VII-XII** (14,1 T, $\text{DMSO-}d_6$), destacando o padrão de substituição e multiplicidade dos hidrogênios ligados a carbono aromáticos



Os seis ácidos aristolóquicos isolados da fração acetato de etila do limbo de flores de *A. gigantea* já foram descritos anteriormente em outras partes da planta para diversas de espécies de *Aristolochia* (KUO et al., 2012; LOPES et al., 2001). Contudo, apenas os compostos **VII** e **X** já tinham sido isolados em flores de *A. zollingeriana* (CHIANG et al., 1998), e os ácidos **VII**, **IX**, **XI** e **XII** estão sendo relatados pela primeira vez em flores de *Aristolochia*.

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **VII-XII** (14,1 T, DMSO- d_6 , δ em ppm, J em Hz)

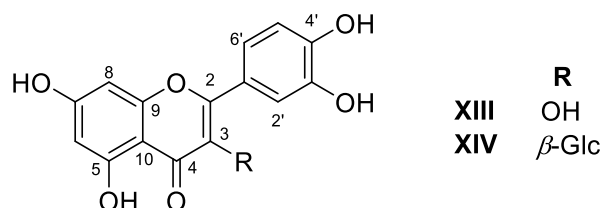
Posição	Ácido aristolóquico I (CAI, CAI, 2010)		Ácido aristolóquico Ia (URZÚA et. al,1983)		Ácido aristolóquico IV (PISTELLI et. al, 1983)		Ácido aristolóquico IVa (ZHANG, JIANG, 2006)		Ácido aristolóquico G (CAI, CAI, 2010)		Ácido aristolóquico VII (YU, 2005)	
	VII		VIII		IX		X		XI		XII	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
1	*	-	*	-	*	-	*	-	*	-	*	-
2	112,5	7,81 (s)	112,3	7,78 (s)	112,3	7,78 (s)	112,4	7,75 (s)	112,0	7,71 (s)	111,5	7,73 (s)
3	146,3	-	146,3	-	146,1	-	145,8	-	145,9	-	145,8	-
4	146,1	-	146,3	-	*	-	146,4	-	146,1	-	145,7	-
4a	117,2	-	118,3	-	*	-	116,9	-	116,6	-	*	-
4b	130,2	-	130,5	-	*	-	132,0	-	132,2	-	*	-
5	119,5	8,62 (d, $J = 8,3$)	117,6	8,51 (d, $J = 8,1$)	101,6	8,17 (d, $J = 1,8$)	104,0	8,08 (d, $J = 2,1$)	103,6	7,96 (d, $J = 2,1$)	123,4	8,81 (d, $J = 9,3$)
6	132,0	7,83 (tl, $J = 8,3$)	132,2	7,70 (tl, $J = 8,1$)	162,8	-	161,6	-	*	-	117,7	7,75 (d, $J = 9,3$)
7	109,2	7,35 (d, $J = 8,3$)	113,1	7,20 (d, $J = 8,1$)	99,4	7,01 (d, $J = 1,8$)	99,9	6,83 (d, $J = 2,1$)	102,0	6,74 (d, $J = 2,1$)	151,2	-
8	156,6	-	155,9	-	157,9	-	158,5	-	*	-	144,7	-
8a	118,9	-	*	-	113,6	-	112,5	-	112,2	-	*	-
9	119,5	8,55 (s)	120,7	8,58 (s)	119,8	8,49 (s)	120,7	8,47 (s)	121,5	8,48 (s)	119,8	8,44 (s)
10	146,1	-	145,5	-	*	-	143,0	-	*	-	*	-
10a	118,7	-	117,4	-	117,9	-	118,0	-	118,1	-	116,2	-
11	168,2	-	168,2	-	168,3	-	168,4	-	168,4	-	167,8	-
12	103,1	6,48 (s)	103,1	6,46 (s)	106,1	6,47 (s)	103,1	6,47 (s)	102,9	6,44 (s)	103,3	6,47 (s)
CH ₃ O-6	-	-	-	-	55,6	3,98 (s)	-	-	-	-	-	-
CH ₃ O-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61,7	4,00 (s)
CH ₃ O-8	56,5	4,05 (s)	-	-	56,8	4,06 (s)	56,5	4,00 (s)	-	-	56,6	3,98 (s)
HO-6	-	-	-	-	-	-	-	10,78 (s)	-	-	-	-

*Valores de ^{13}C não observados

4.1.4 Flavonoides (XIII-XIV)

Dois flavonoides (Figura 16) foram isolados da fração acetato de etila do limbo de flores de *A. gigantea*.

Figura 16 - Flavonoides isolados da fração acetato de etila do limbo de *A. gigantea*



O espectro de RMN de ^1H da substância **XIII** (APÊNDICE WW) apresentou um padrão de deslocamento químico e multiplicidade de hidrogênios que evidencia a presença de dois sistemas aromáticos sendo um anel trissubstituído em δ 7,66 (d, $J = 2,2$ Hz), δ 7,53 (dd, $J = 8,5; 2,2$ Hz) e δ 6,88 (d, $J = 8,5$ Hz), e um outro sistema tetrassubstituído em δ 6,41 (d, $J = 2,0$ Hz) e δ 6,18 (d, $J = 2,0$ Hz). A presença de um simpleto em δ 12,48, sinal comumente observado em flavonoides, sugeriu uma hidroxila quelada na molécula. Por meio das correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC (APÊNDICE XX e YY), bem como com a comparação dos dados obtidos com os presentes na literatura foi possível identificar **XIII** como sendo a quercetina (ZHANG *et. al*, 2017) (Tabela 9).

O espectro de RMN de ^1H de **XIV** (APÊNDICE ZZ, Tabela 9) apresentou um padrão de deslocamento químico e multiplicidade dos hidrogênios semelhantes aos da substância **XIII**. A diferença se deu pela presença de um duplete em δ 5,24 (H-1''), atribuído ao hidrogênio anomérico, com constante de acoplamento de 7,5 Hz, sugerindo uma configuração β da unidade glicosídica.

Com base na análise conjunta dos experimentos de DEPTQ, HSQC e HMBC (AAA-CCC) e dos dados existentes na literatura (Tabela 9), a substância **XIV** foi identificada como sendo isoquercitrina (HAN, et al., 2004).

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **XIII** e **XIV** (14,1 T, δ em ppm, J em Hz)

Posição	XIII (DMSO- d_6)		Quercetina (ZHANG et. al., 2017)		XIV (CD $_3$ OD)		Isoquercitrina (HAN, et al., 2004)	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	147,5	-	147,4	-	158,9	-	158,2	-
3	*	-	136,4	-	135,5	-	135,4	-
4	*	-	176,5	-	179,3	-	179,2	-
5	160,7	-	161,4	-	162,8	-	162,7	-
6	98,5	6,18 (d, $J = 2,0$)	98,8	6,20 (d, $J = 1,9$)	99,8	6,18 (sl)	99,8	6,17 (d, $J = 2,0$)
7	163,4	-	164,4	-	165,8	-	165,7	-
8	93,7	6,41 (d, $J = 2,0$)	94,0	6,42 (d, $J = 1,9$)	94,7	6,36 (sl)	94,6	6,35 (d, $J = 2,0$)
9	156,6	-	156,8	-	158,3	-	158,8	-
10	103,4	-	103,7	-	105,5	-	105,5	-
1'	122,3	-	122,6	-	122,9	-	123,1	-
2'	115,4	7,66 (d, $J = 2,2$)	115,7	7,69 (d, $J = 2,0$)	117,5	7,71 (sl)	117,4	7,71 (d, $J = 2,4$)
3'	145,4	-	145,7	-	145,8	-	145,6	-
4'	147,6	-	148,3	-	149,8	-	149,6	-
5'	116,0	6,88 (d, $J = 8,5$)	116,2	6,90 (d, $J = 7,9$)	115,9	6,86 (d, $J = 8,4$)	115,8	6,85 (d, $J = 8,6$)
6'	120,3	7,53 (dd, $J = 8,5; 2,2$)	120,6	7,55 (dd, $J = 7,9; 2,0$)	123,3	7,57 (dl, $J = 8,4$)	122,8	7,56 (dd, $J = 8,6; 2,4$)
1''	-	-	-	-	104,2	5,24 (d, $J = 7,5$)	104,2	5,23 (d, $J = 7,6$)
2''	-	-	-	-	75,6	3,45 (t, $J = 8,9$)	75,6	3,22-3,51 (m)
3''	-	-	-	-	78,2	3,20-3,25 (m)	78,2	3,22-3,51 (m)
4''	-	-	-	-	71,0	3,36 (t, $J = 9,2$)	71,1	3,22-3,51 (m)
5''	-	-	-	-	78,0	3,49 (t, $J = 8,3$)	77,9	3,22-3,51 (m)
6''	-	-	-	-	62,4	3,58 (dd, $J = 11,9; 5,3$) 3,72 (dd, $J = 11,9; 1,8$)	62,4	3,58 (dd, $J = 12,0; 5,2$) 3,71 (dd, $J = 12,0; 2,4$)
HO-5	-	12,48 (s)	-	12,52 (s)	-	12,33 (s)	-	-

Ambos os flavonoides já foram isolados em outras partes de espécies de *Aristolochia* (KUO et al., 2012; LOPES et al., 2001). Um estudo recente, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, com flores de *A. trulliformis* levou ao isolamento da quercetina (HOLZBACH et al., 2019). A isoquercitrina está sendo descrita pela primeira vez em flores de *Aristolochia*.

Essa primeira etapa do trabalho, que consistiu no isolamento e identificação dos constituintes químicos majoritários presentes em flores de *A. gigantea*, permitiu avaliar como que essa matriz tão pouco estudada se comporta quanto a produção de metabólitos especializados.

Considerando a diversidade de substâncias isoladas e identificadas e que apenas duas subfrações foram estudadas, sugere-se que as flores de *A. gigantea* sejam uma fonte promissora para estudos químicos futuros.

4.2 Escolha do solvente extrator no preparo dos extratos de flores de *Aristolochia* utilizando o planejamento experimental simplex centróide

Com o objetivo de conhecer a composição química das flores de *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri*, *A. labiata*, *A. gehrtii* e *A. gigantea*, parte deste trabalho consistiu em investigar a eficiência do processo extrativo empregando diferentes misturas de solventes no preparo dos extratos, e verificar se esses sistemas auxiliam na extração do maior número de substâncias para cada uma dessas matrizes.

Deste modo, levou-se em consideração os efeitos sinérgico e antagônico dos solventes em relação a cada uma das espécies estudadas. Se a junção de dois ou mais componentes conduz a uma resposta maior que a resposta associada a um único componente, tem-se um efeito sinérgico. Por outro lado, se a junção desses mesmos componentes contribuir para redução da resposta, o efeito é de antagonismo.

O planejamento experimental do tipo simplex centróide é importante para compreender essas interações sinérgicas e antagônicas entre diferentes solventes extratores e matrizes complexas, visto que as diferentes forças intermoleculares inerentes desses sistemas permitem a extração de metabólitos que, em muitos casos, não poderiam ser obtidos com a utilização de um único solvente. Dessa forma, os extratos obtidos a partir desse tipo de planejamento experimental podem fornecer maior variedade e quantidade de metabólitos do que aqueles obtidos pelos métodos tradicionais de extração (SOARES, et al., 2018; GARCIA, et al., 2010).

O planejamento, utilizando como componentes CHCl_3 , EtOH e AcOEt (seção 3.7, p. 38), foi composto de sete experimentos com triplicata no ponto central. As massas dos extratos obtidos estão apresentadas na Tabela 10.

Os nove extratos das flores de *A. esperanzae*, *A. holostylis*, *A. gardneri*, *A. labiata*, *A. gehrtii* e *A. gigantea* foram analisados por CLAE-DAD, tendo o número de picos como variável dependente (Tabela 11). O comprimento de onda de 250 nm foi escolhido com base no número e intensidade dos picos. A espécie *A. holostylis* foi a única que teve sua resposta baseada na média do número de picos observados em 250 e 274 nm, uma vez que apresentou picos diferentes em 274 nm daqueles observados em 250 nm. Optou-se, portanto, em trabalhar com ambos os comprimentos de onda para essa espécie.

Tabela 10 - Massas de extratos obtidas no planejamento simplex centróide

Espécie	Massas dos extratos (mg)								
	CHCl ₃	CHCl ₃ : EtOH 1:1	EtOH	EtOH: AcOEt 1:1	AcOEt	AcOEt: CHCl ₃ 1:1	PC ₁ *	PC ₂ *	PC ₃ *
<i>A. gehrtii</i>	52,2	63,4	47,4	52,0	83,3	48,8	49,9	42,7	47,6
<i>A. holostylis</i>	32,5	65,5	169,4	61,2	28,7	22,1	38,8	39,3	38,1
<i>A. esperanzae</i>	21,3	63,6	99,8	71,3	19,9	20,5	44,4	39,4	41,5
<i>A. gardneri</i>	23,3	57,6	70,0	29,7	17,1	23,5	30,8	29,1	40,5
<i>A. gigantea</i>	33,5	74,1	98,2	77,3	23,4	29,2	48,3	53,8	45,8
<i>A. labiata</i> MG	26,0	40,3	36,8	36,1	26,9	28,6	24,6	23,2	24,2
<i>A. labiata</i> MS	27,0	32,9	26,0	28,4	25,3	27,4	27,1	25,7	21,6

*Ponto Central = AcOEt:EtOH:CHCl₃ (1/3:1/3:1/3), em triplicata.

A escolha dos solventes extratores baseou-se na seleção de componentes que pudessem extrair simultaneamente tanto os compostos com maior polaridade como os compostos de baixa polaridade. Além disso, optou-se por solventes com diferentes seletividades, a fim de extrair uma maior variedade de compostos dentre os presentes nas matrizes estudadas, e dessa forma entender como ocorre a produção dos metabolitos em flores de espécies de *Aristolochia*.

O resultado do planejamento experimental para as espécies estudadas está apresentado na Tabela 11. As superfícies de resposta, levando em consideração o número de picos em função das proporções de solventes utilizada para cada espécie, juntamente com os cromatogramas para a melhor condição, estão expostos na Figura 17.

Para a espécie *A. labiata* foram realizadas coletas em diferentes estados (Minas Gerais e Mato Grosso) com intuito de analisar a influência dessas regiões sobre a composição química dessas espécies. A espécie *A. labiata* MG exibiu uma maior quantidade de picos em seu cromatograma, fato esse que pode estar relacionado com a concentração dos compostos nessas matrizes, uma vez que seus perfis são semelhantes (Figura 17).

Tabela 11 - Número de picos dos cromatogramas obtidos para cada condição de solventes gerada pelo modelo simplex centróide

Espécie	Número de picos observados em 250 nm *								
	CHCl ₃ ³	CHCl ₃ : EtOH 1:1	EtOH	EtOH: AcOEt 1:1	AcOEt	AcOEt: CHCl ₃ 1:1	PC ₁ **	PC ₂ **	PC ₃ **
<i>A. gehrtii</i>	24	27	38	23	20	22	23	24	23
<i>A. esperanzae</i>	37	20	17	19	27	29	20	21	19
<i>A. gardneri</i>	51	24	26	19	17	27	19	18	18
<i>A. gigantea</i>	38	21	19	20	17	18	16	17	17
<i>A. holostylis</i> *	51	56	47	49	52	50	58	56	59
<i>A. labiata</i> MS	35	22	15	28	21	22	20	21	21
<i>A. labiata</i> MG	42	40	34	38	35	30	39	38	38

*A espécie *A. holostylis* teve sua resposta baseada na média do número de picos observados em 250 e 274 nm.

**Ponto central.

As análises de variância (ANOVA) para os modelos ajustados aos dados experimentais obtidos estão apresentados nos APÊNDICES RRR-XXX. Através dos dados da ANOVA foi possível deduzir quais os fatores significativos dentro de intervalo de confiança de 95% e qual a significância estatística da regressão. Com base nos dados apresentados na Tabela 11 foram geradas equações de regressão para os modelos polinomiais quadrático e cúbico especial (Tabela 12, seção 3.8, p. 40), capazes de prever a melhor proporção de solventes extratores que resulta no maior número de picos.

Com base nos resultados apresentados na Figura 17 foi possível inferir que não existe um mesmo sistema de solventes ideal que possa ser utilizado para todas as espécies. Além disso, as respostas associadas às misturas dos componentes resultaram em um efeito antagônico, uma vez que as essas não contribuíram significativamente para o aumento da resposta, quando comparada aos componentes puros.

Para a maioria das espécies estudadas observou-se que com o aumento de CHCl₃ na mistura há uma melhora na eficiência de extração, exceto para a espécie *A. gehrtii*, que teve a extração mais eficiente (maior número de picos observados no cromatograma) com o aumento de EtOH (Tabela 12, Figura 17).

Figura 17 - Gráficos de contorno e cromatogramas da melhor condição obtida pelo planejamento simplex centroide

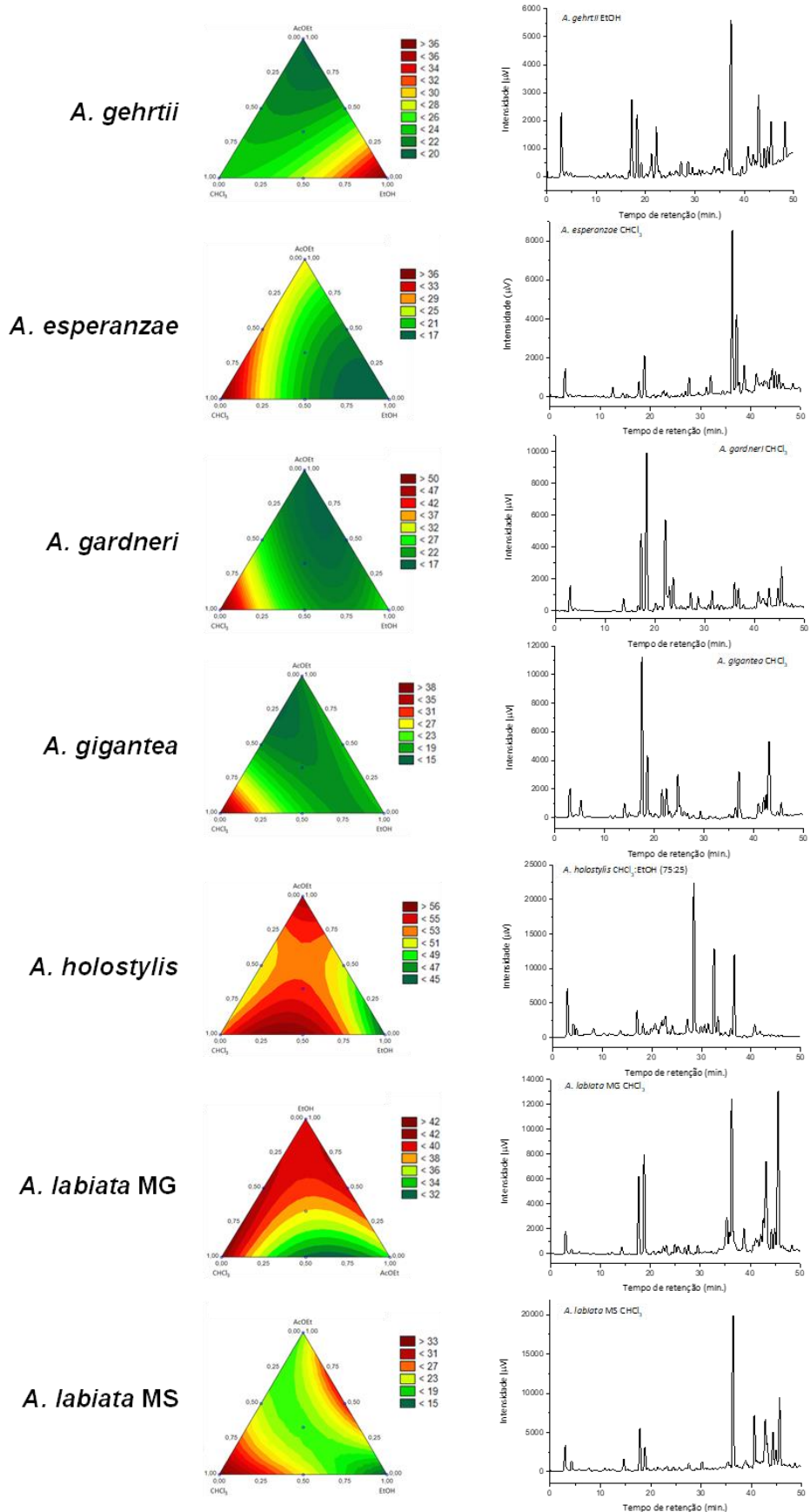


Tabela 12 - Melhores solventes de extração e equação de regressão para o modelo aplicado para cada espécies estudadas

Espécie analisada	Melhor solvente de extração (%)	Equação de regressão	Modelo
<i>A. gehrtii</i>	EtOH (100)	$y = 23,949x_1 + 37,949x_2 + 19,949x_3 - 14,974x_1x_2 + 1,026x_1x_3 - 22,974x_2x_3$ ±0,536 ±0,536 ±0,536 ±2,342 ±2,342 ±2,342	Modelo quadrático
<i>A. esperanzae</i>	CHCl ₃ (100)	$y = 37,141x_1 + 17,141x_2 + 27,141x_3 - 30,820x_1x_2 - 14,820x_1x_3 - 14,820x_2x_3$ ±1,081 ±1,081 ±1,081 ±4,726 ±4,726 ±4,726	Modelo quadrático
<i>A. gardneri</i>	CHCl ₃ (100)	$y = 51,269x_1 + 26,269x_2 + 17,269x_3 - 63,384x_1x_2 - 33,384x_1x_3 - 15,384x_2x_3$ ±1,44 ±1,44 ±1,44 ±6,306 ±6,306 ±6,306	Modelo quadrático
<i>A. gigantea</i>	CHCl ₃ (100)	$y = 38,154x_1 + 19,154x_2 + 17,154x_3 - 33,077x_1x_2 - 41,077x_1x_3 + 4,923x_2x_3$ ±0,909 ±0,909 ±0,909 ±3,976 ±3,976 ±3,976	Modelo quadrático
<i>A. holostylis</i>	CHCl ₃ :EtOH (75:25)	$y = 52,766x_1 + 44,989x_2 + 55,989x_3 + 32,228x_1x_2 - 13,772x_1x_3$ ±1,164 ±1,067 ±1,067 ±5,092 ±5,092	Modelo quadrático
<i>A. labiata</i> MS	CHCl ₃ (100)	$y = 34,0x_1 + 14,0x_2 + 21,0x_3 - 22,0x_1x_3 + 42,0x_2x_3 - 123,0x_1x_2x_3$ ±1,361 ±1,361 ±1,491 ±7,000 ±5,092 ±5,092	Modelo cúbico
<i>A. labiata</i> MG	CHCl ₃ (100)	$y = 42,130x_1 + 34,5543x_2 + 39,1304x_3 - 26,2391x_1x_2 + 11,7609x_2x_3$ ±1,64 ±1,79 ±1,64 ±7,82 ±7,82	Modelo quadrático

É importante destacar que o planejamento experimental utilizado resultou apenas na melhor condição de extração dentre as testadas. Para a otimização dessas extrações seria necessária a utilização de pontos axiais ou até mesmo o uso de um novo sistema de solventes. Porém, esse não era o objetivo, uma vez que a intenção foi verificar se a utilização de diferentes tipos de solventes resultaria em uma extração com maior variedade de metabólitos, o que não pode ser observado.

Com isso, essa parte do trabalho serviu para que pudéssemos entender como essas matrizes se comportam frente a utilização de diferentes solventes, embasando estudos futuros que possam ser realizados pelo grupo de pesquisa.

Os próximos tópicos deste trabalho estão voltados para a desreplicação por CLAE-EM e CG-EM dos extratos obtidos a partir do planejamento experimental.

4.3 Preparo das misturas de extratos obtidas no planejamento experimental

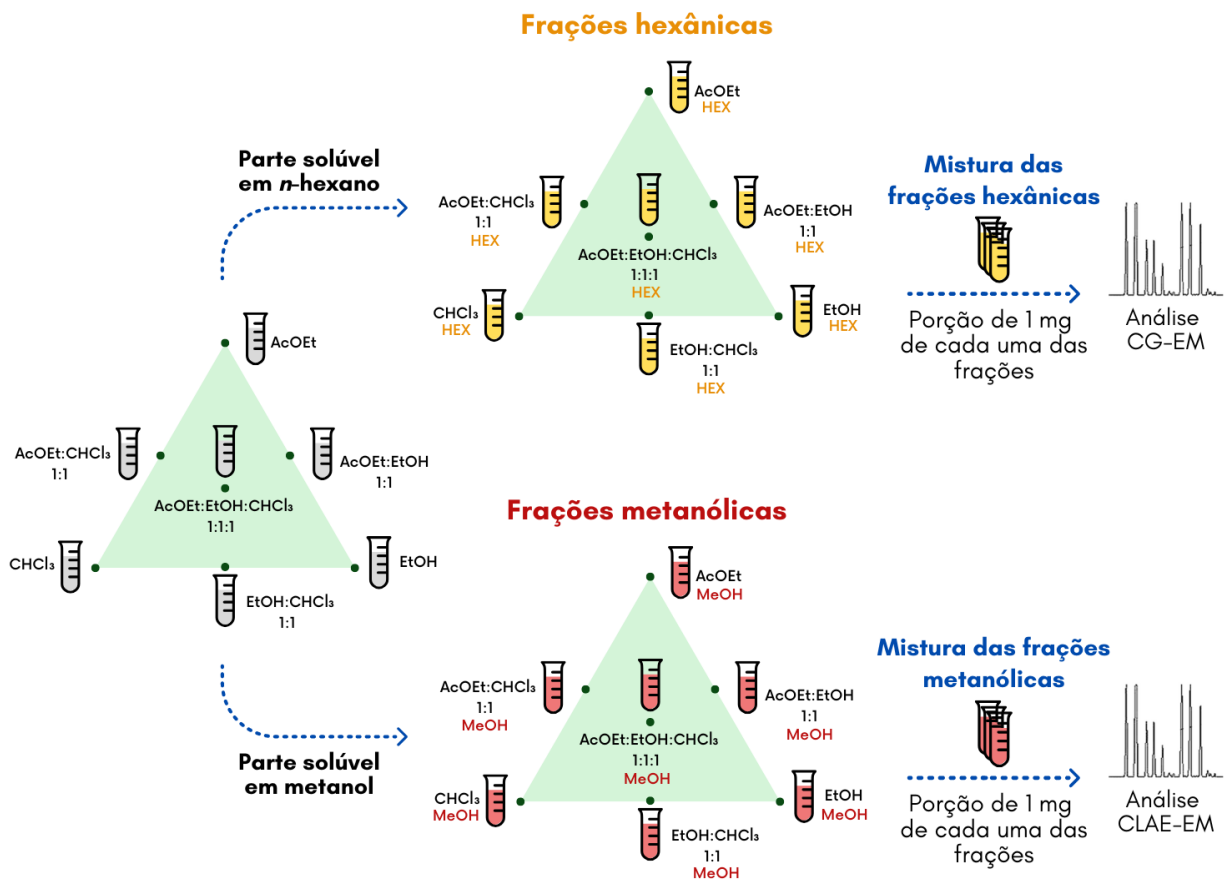
O planejamento experimental indicou que cada uma das espécies estudadas apresenta um tipo de resposta frente aos sistemas de solventes utilizados para a extração. Com isso, optou-se em unir todos os extratos obtidos para cada espécie e analisá-los de forma conjunta, a fim de obter uma análise mais representativa.

Com a intenção de analisar tanto os compostos de maior polaridade como aqueles de baixa polaridade, todos os extratos obtidos foram fracionados utilizando metanol e *n*-hexano. Em seguida, uma mistura constituída por uma fração de todas as condições testadas foi preparada (Figura 18).

Partindo do planejamento de misturas simplex centroide, de cada uma das espécies individualmente, as frações hexânicas foram obtidas a partir da parte solúvel em *n*-hexano de cada uma das condições testadas (Figura 18). A mistura, por sua vez, foi obtida pela combinação de uma fração (1 mg) de cada um dos pontos das frações hexânicas, podendo assim ser analisado por CG-EM.

As frações metanólicas, assim como sua mistura correspondente, foram obtidas de forma semelhante e tiveram seus perfis analisados por CLAE-EM. Os resultados das análises das misturas metanólica e hexânica serão discutidos nos itens a seguir desse trabalho.

Figura 18 - Preparo das misturas de extratos a partir das frações hexânica e metanólica

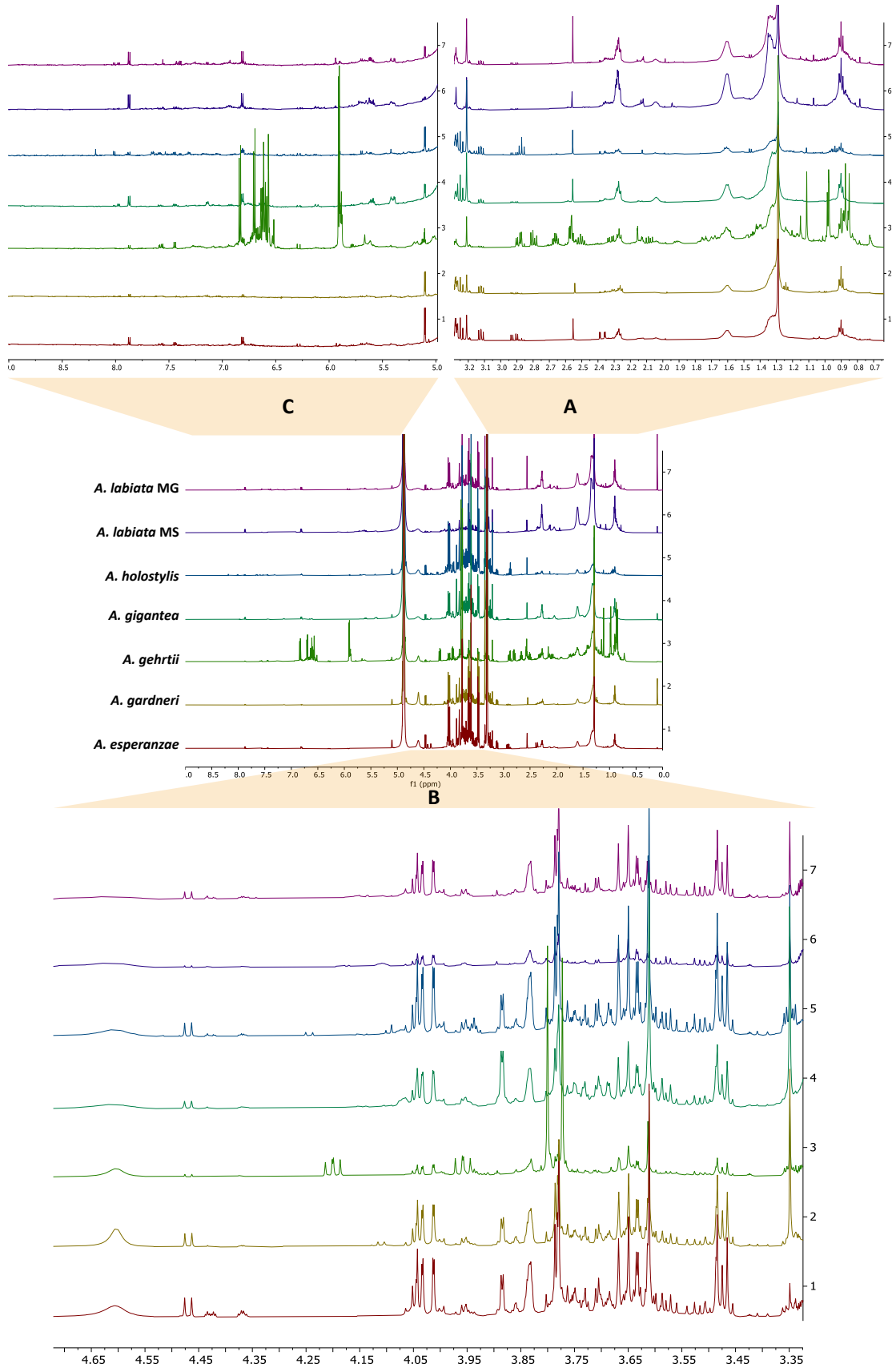


O preparo da mistura de extratos tem como objetivo trazer uma maior representatividade nas análises das matrizes estudadas, uma vez que o planejamento experimental não resultou em uma mistura de solvente ideal para cada espécie. Assim, a mistura garante que substâncias presentes em todos os pontos sejam analisadas.

4.4 Análise dos extratos por RMN de ^1H e anotação dos compostos através da espectrometria de massas e análise das redes de interações moleculares

As misturas das frações metanólicas de cada espécie estudada (seção 3.10, p. 41) foram analisados por RMN de ^1H e os resultados estão apresentados na Figura 19 (APÊNDICES YYY-EEEE). A partir desses experimentos foi possível comparar os perfis espectrais dos extratos das flores das espécies *A. labiata* MG e MS, *A. holostylis*, *A. gigantea*, *A. gehrtii*, *A. gardneri* e *A. esperanzae* (Figura 19).

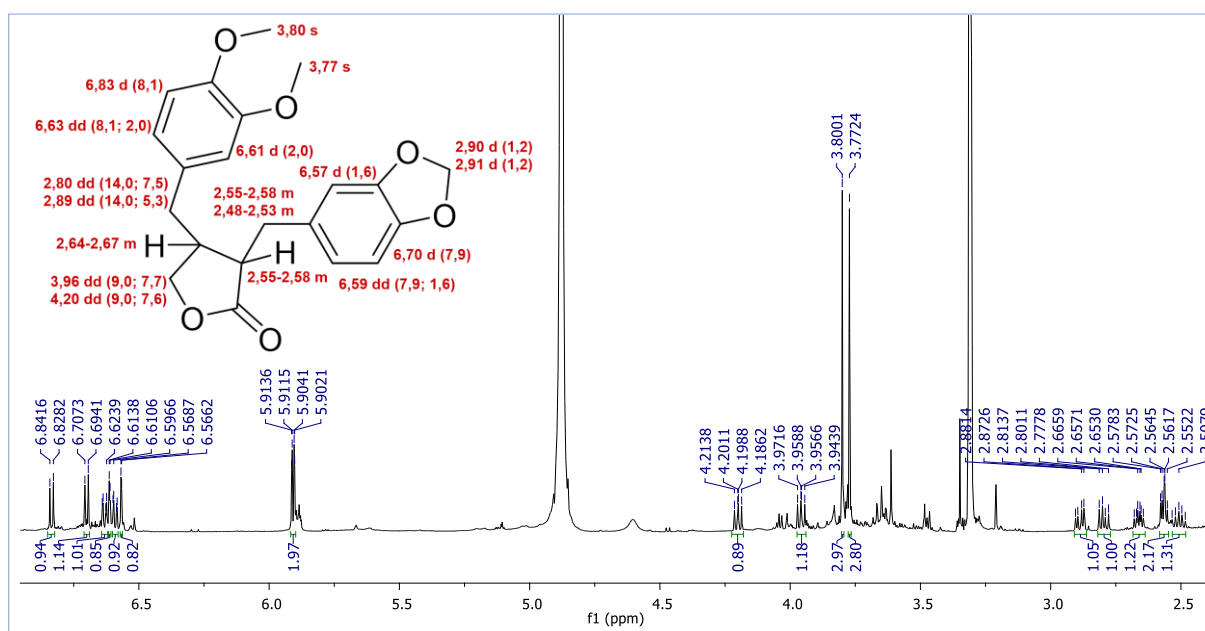
Figura 19 - Espectros de RMN de ^1H das misturas das frações metanólicas de flores de *Aristolochia* (CD_3OD , 14,1 T): (A) expansão da região δ 0,0-3,3, (B) expansão da região δ 3,3-5,0 e (C) expansão da região δ 5,0-9,0



No geral, todas as espécies estudadas, com exceção de *A. gehrtii*, apresentaram perfis espectrais semelhantes, tanto em valores de deslocamentos químicos e quanto de multiplicidade dos sinais.

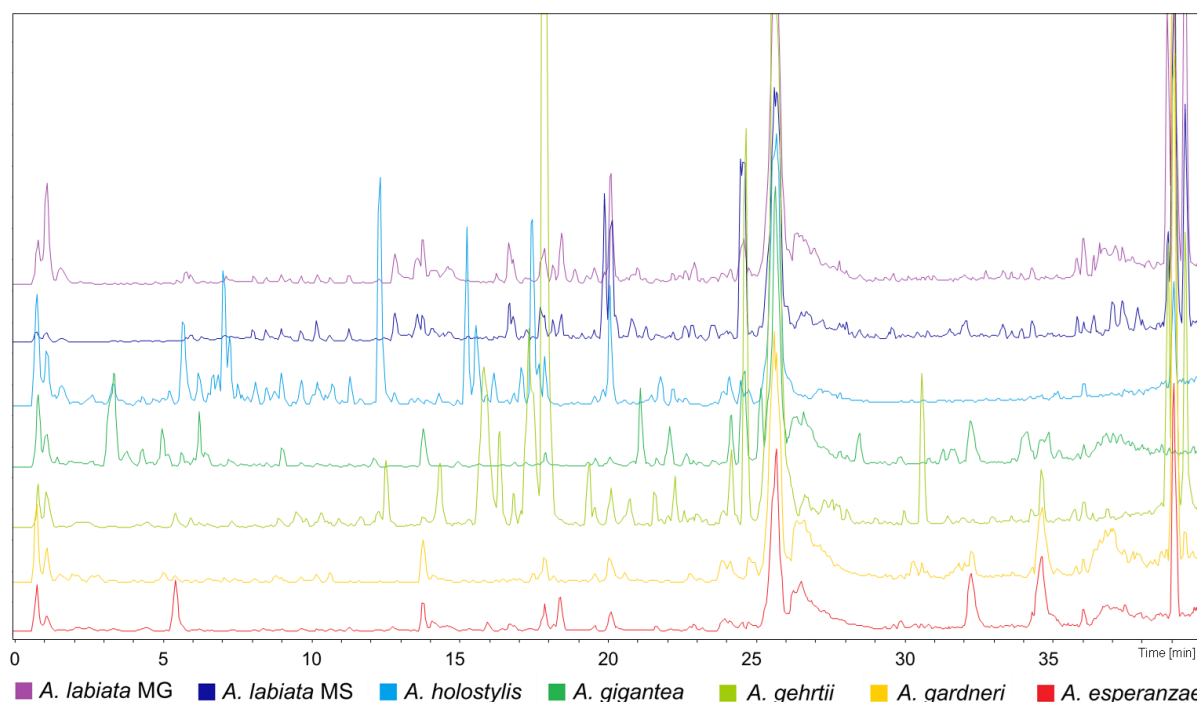
Para a espécie *A. gehrtii*, observou-se sinais intensos na região de hidrogênios ligados a carbono aromáticos e olefínicos em δ 6,6-8,8, hidrogênios oximetínico em δ 3,9-4,2, hidrogênios referentes a metoxilas aromáticas em δ 3,8 e hidrogênios metilênicos em δ 2,5-2,9. Análise mais criteriosa desses dados e comparação com substâncias isoladas previamente dessa espécie vegetal (sin. *A. giberti*, NOGUEIRA, 2014) permitiram identificar a lignana dibenzilbutirolactônica kusunoquinina em grande concentração na fração (Figura 20).

Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H ampliado da fração metanólica das flores de *A. gehrtii* (CD_3OD , 14,1 T), destacando os sinais da kusunoquinina.



As misturas das frações metanólicas das flores também foram analisadas por CLAE-EM (Figura 21). Ao contrário das análises realizadas por RMN de ^1H , as misturas apresentaram perfis cromatográficos diferentes, sugerindo uma variedade significativa de metabólitos presentes nas espécies vegetais.

Figura 21 - Perfil cromatográfico das frações metanólicas de flores de *Aristolochia* por CLAE-EM



Condições CLAE-EM: Coluna Kinetex 5 μ C18 100 \AA (150 x 2,1 mm), H₂O:ACN, 5 \rightarrow 100% de ACN em 40 minutos, com 0,1% de ácido fórmico, volume de injeção de 1 μ L, vazão de 0,5 mL.min⁻¹, concentração de 1 mg.mL⁻¹.

A análise dos compostos presentes nas frações metanólicas de flores de *Aristolochia* por meio de plataforma GNPS gerou uma rede molecular composta por 1257 íons precursores, representados pelos nodos que foram agrupados em 563 *clusters* de acordo com a similaridade química (valor de cosseno) (Figura 22).

Com base no perfil de fragmentação dos íons das substâncias protonadas, bem como na comparação dos dados obtidos com aqueles presentes na literatura, foi possível anotar 17 substâncias nas frações metanólicas de flores de *Aristolochia* (Tabela 13), representadas por três famílias químicas: alcaloides (**a-e**), lignanas (**f-k**) e flavonoides (**l-q**), determinadas a partir dos íons precursores e das perdas neutras características de cada classe. Além disso, observou-se a presença de *clusters* com substâncias específicas encontradas apenas em determinadas espécies (Figura 23). No entanto, elas não apresentaram correlação de seus dados EM/EM com a referência espectral da biblioteca GNPS, sugerindo que possam ser substâncias específicas produzidas pelo gênero, e por isso não serem encontradas no banco de dados do GNPS ou até mesmo substâncias inéditas.

Figura 22 - Rede molecular gerada para os dados de CLAE-EM/EM das frações metanólicas de flores de *Aristolochia*

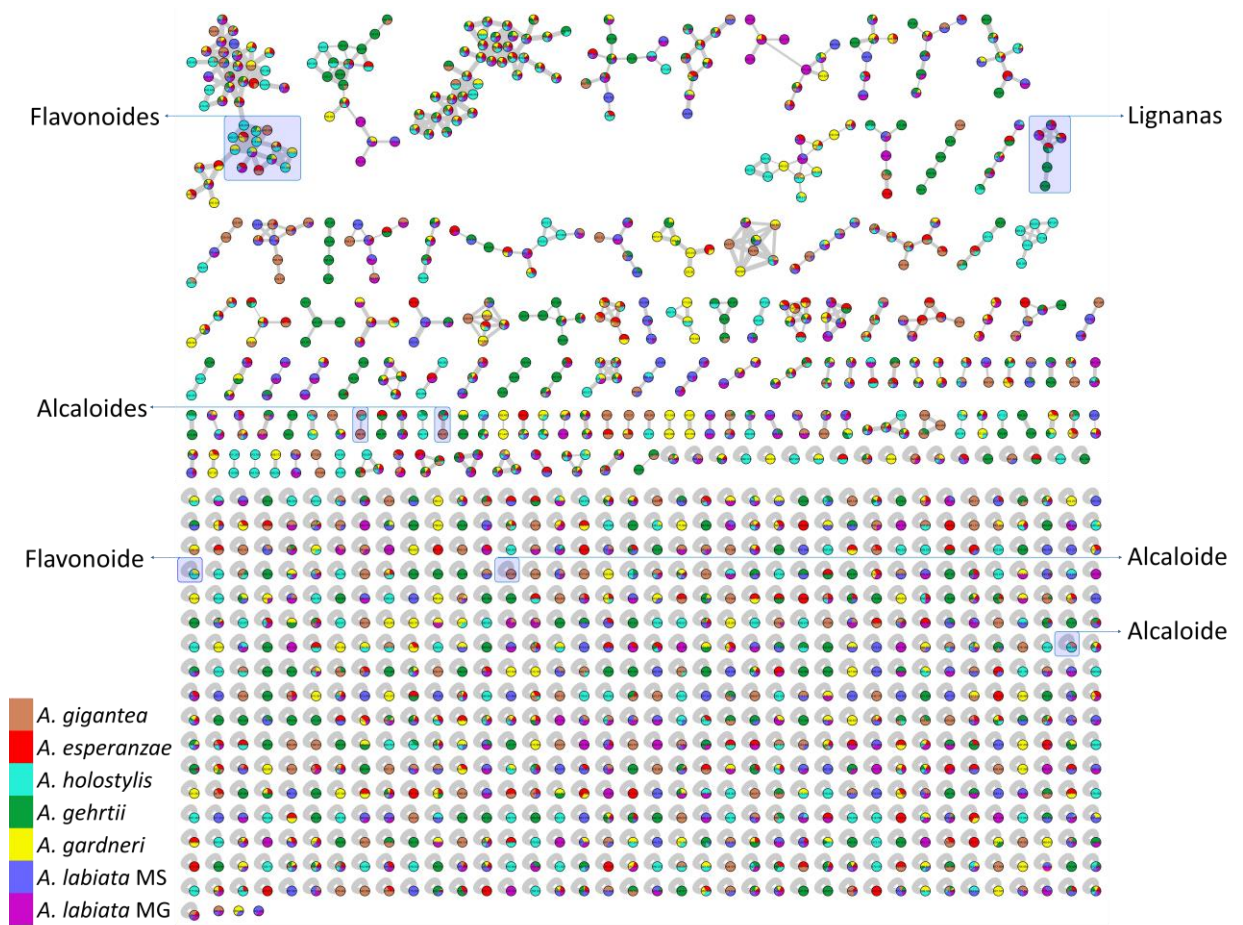


Figura 23 - Clusters de substâncias específicas de espécies de *Aristolochia*

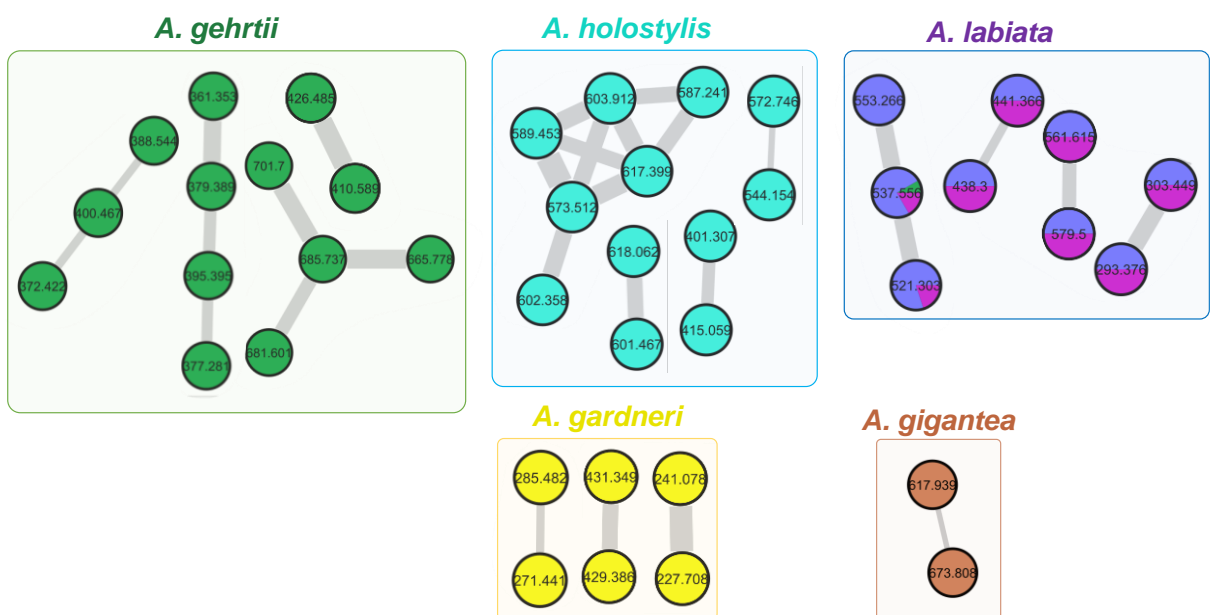


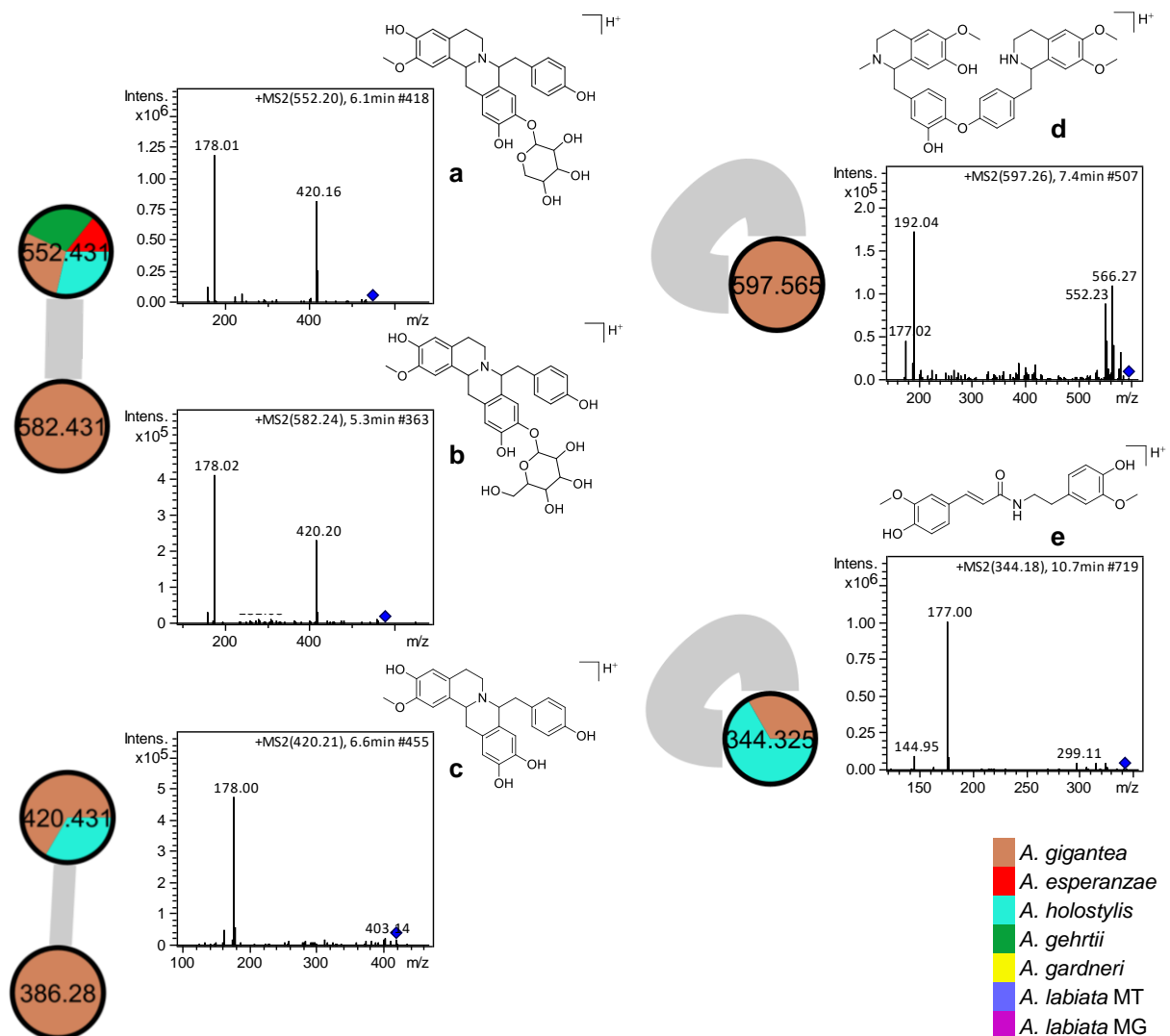
Tabela 13 - Anotações das substâncias presentes nas frações metanólicas de flores de *Aristolochia*

N	T_R (min)	[M+H]⁺	EM/EM	Anotação	Espécie	Referência
a	6,1	552	420, 178	8-[4'-hidroxibenzil]-2-metoxi-10-O-[xilopiranosil]berbin-3,11-diol	Agg, Ah, Ae, Age	Lopes, 1992
b	5,3	582	420, 178	10-O-[glicopiranosil]-8-[4'-hidroxibenzil]-2-metoxi-berbin-3,11-diol	Agg	Lopes, 1992
c	6,6	420	178	8-[4'-hidroxibenzil]-2-metoxiberbin-3,10,11-triol	Agg, Ah	Lopes, 1992
d	7,4	597	566, 552, 192, 177	Pampulhamina	Agg	Cortes, et al. 1987
e	10,7	344	177	<i>N</i> -feruloil-3-O-metildopamina	Ah, Agg	Holzbach, Lopes, 2010
f	16,0	369*	351, 320, 299	Dimetilmatairesinol	Ae, Aga, Age, Al _{MG} , Al _{MS}	Li, et al. 2019
g	18,4	353*	335, 283	Kusunoquinina	Ae, Age, Al _{MG} , Al _{MS}	Holzbach, et al. 2019
h	12,2	341*	323, 271	Matairesinol	Ae, Al _{MG} , Al _{MS}	Ren, et al. 2021
i	14,3	357	339, 321	Xantoxilol	Age	Cunha, 2018
j	17,8	371	353, 321, 303	Fargesina	Age	Cunha, 2018
k	14,4	355	337, 305, 285	Episesamina	Age, Ae, Ah	Cunha, 2018
l	6,9	435	273	Chalconaringenina 2'-O-hexose	Ah, Aga	Yim et al. 2015
m	7,6	465	303	Quercetina-3-O-hexose	Ah, Aga, Al _{MG}	Wu, et al. 1999
n	6,6	627	465, 303	Quercetina-3-O-hexose-hexose	Agg, Ae	Wu, et al. 1999
o	6,7	597	465, 303	Quercetina-3-O-hexose-pentose	Ah, Aga, Age, Al _{MG}	Xie, et al. 2004
p	7,3	581	449, 287	Kaempferol-3-O-hexose-pentose	Ah, Aga	Xie, et al. 2004
q	7,8	611	479, 317	Isorhamnetina-3-O-hexose-pentose	Ah, Aga	She, et al. 2012

*[M+H⁺-H₂O]*A. esperanzae* = Ae; *A. gardneri* = Aga; *A. gehrtii* = Age; *A. gigantea* = Agg; *A. holostylis* = Ah; *A. labiata* MS = Al_{MS}; *A. labiata* MG = Al_{MG}

Os íons precursoros de valores pares em m/z 552 (a), 582 (b), 420 (c) e 344 (e) indicaram a presença de substâncias nitrogenadas com número ímpar de átomos de nitrogênio nessas moléculas (Figura 24). Com base nas substâncias já descritas em *Aristolochia* (LOPES; NASCIMENTO, SILVA, 2001; KUO, et al., 2012), sugeriu-se que esses compostos sejam alcaloides.

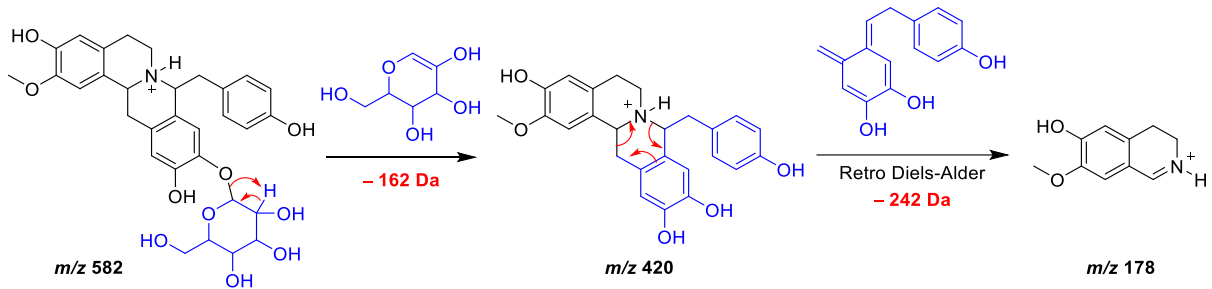
Figura 24 - Representação dos *clusters* e estruturas químicas correspondentes aos nodos dos alcaloides



Os espectros EM/EM dos íons precursoros m/z 552 (a), 582 (b) e 420 (c) apresentaram perdas características que levaram à formação do íon produto em m/z 178, que é normalmente atribuído aos alcaloides do tipo tetrahydroprotoberberínico. A formação desse fragmento ocorre tipicamente por meio de clivagens via retro Diels-Alder, como observado na Figura 25 (LIMA et al., 2020).

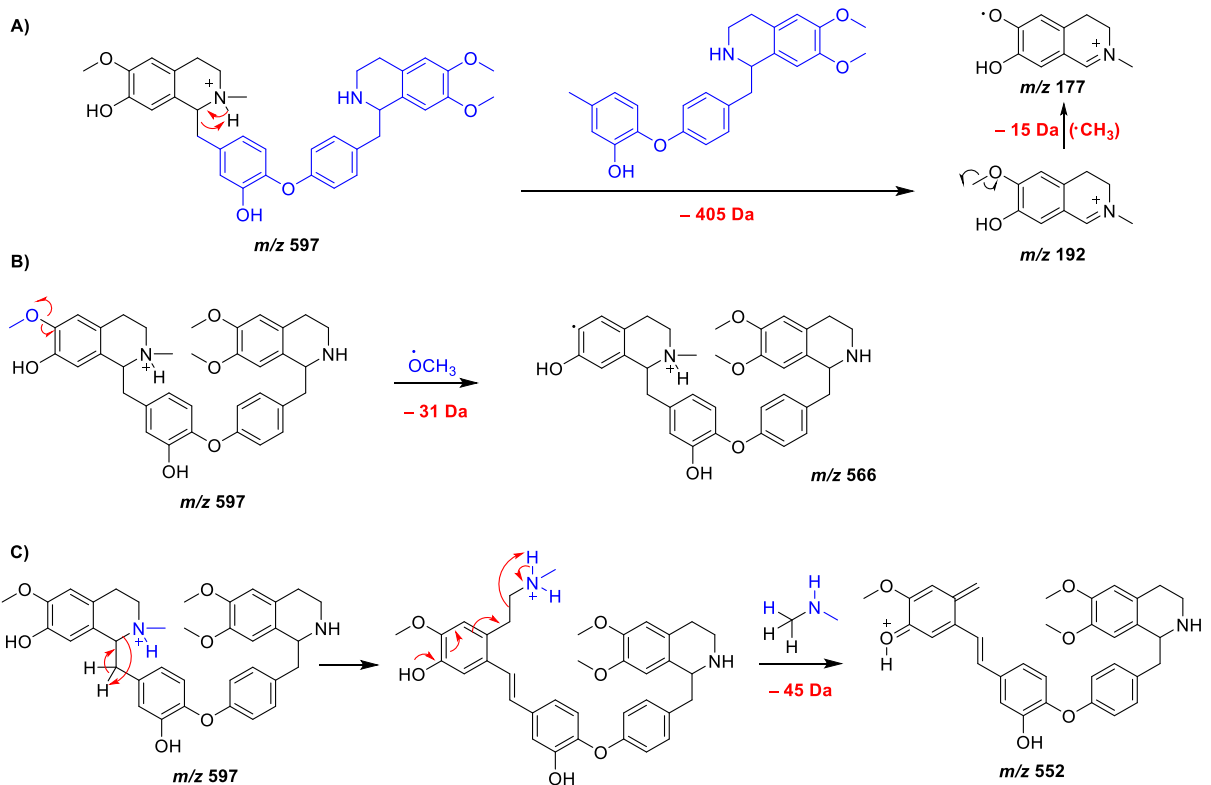
As substâncias **a** e **b** foram agrupadas em um mesmo *cluster* por apresentarem um padrão fragmentação característico de substâncias O-glicosiladas, sendo observado perdas neutras de 132 e 162 Da, sugerindo a presença de unidades dos monossacarídeos pentose e hexose, respectivamente, nessas estruturas (VUKICS; GUTTMAN, 2010).

Figura 25 - Proposta de fragmentação para o íon tetrahidroprotoberberínico m/z 582



A substância **d**, que exibe o íon $[M+H]^+$ em m/z 597 (Figura 26), foi observada na rede molecular como um nodo individual encontrada apenas na espécie *A. gigantea*.

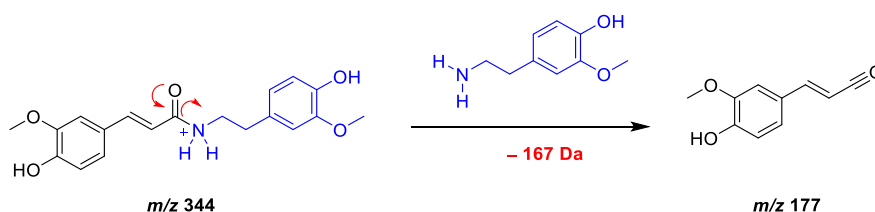
Figura 26 - Proposta de fragmentação para o íon benzilisoquinolínico m/z 597



Para esta substância, a fragmentação de segunda ordem resultou na formação do íon produto m/z 192 $[M+H-405]^+$ decorrente da perda neutra de 405 Da, característico de alcaloides do tipo benzilisoquinólicos (Figura 26 A) (LIMA et al., 2020; QING et al., 2020). Além disso, as perdas neutras de 31 e 45 Da indicaram a eliminação de unidades de metilamina e dimetilamina, respectivamente, estando de acordo com a estrutura proposta (Figura 26 B e C).

A análise do espectro EM/EM do íon precursor m/z 344 (**e**) apresentou uma perda de 167 Da, resultado da doação de um par de elétrons pelo grupo carbonila, levando a formação do íon acílio e clivagem da ligação C-N (DEMARQUE, et al., 2016), para produzir o íon produto m/z 177. Este padrão de fragmentação indica a estrutura de um derivado de alcalamida (Figura 27).

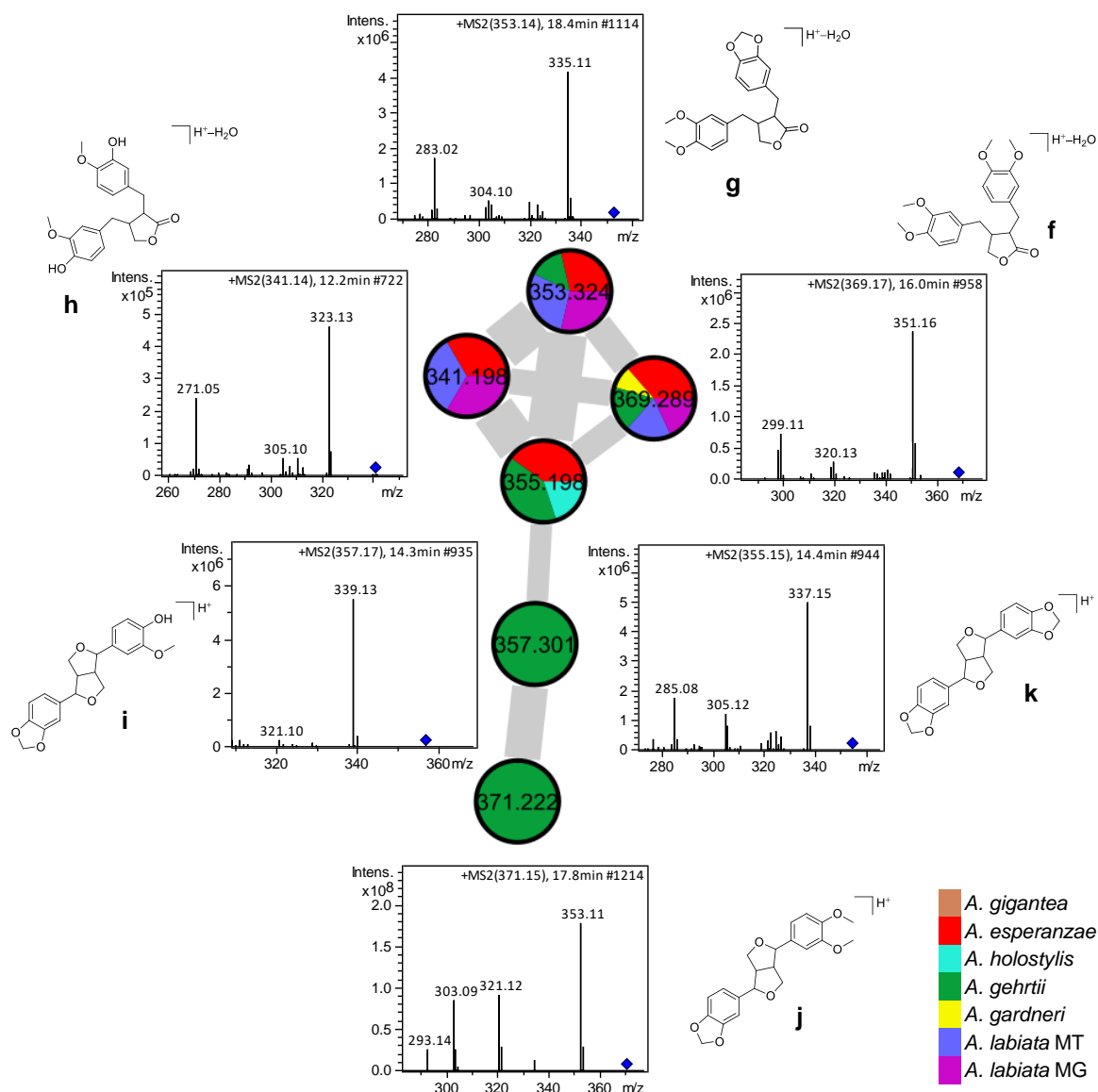
Figura 27 - Proposta de fragmentação para o íon m/z 344



Em dois estudos anteriores com a espécie *A. gigantea*, realizados pelo próprio grupo de pesquisa, foi possível o isolamento e identificação das substâncias **a**, **b** e **c** nas folhas e a substância **e** nas raízes (LOPES, 1992; HOLZBACH; LOPES, 2010). Ainda em folhas de *A. gigantea*, a substância **d** também foi isolada (CORTES, et al., 1987), corroborando dessa forma com as anotações propostas.

A família molecular das lignanas foi observada em um *cluster* da rede molecular. A análise dos espectros EM/EM possibilitou observar a presença de íons precursores com padrão de fragmentação característico dessa família molecular em modo positivo, onde as perdas de moléculas de água consecutivas são comumente observadas (EKLUND, et al., 2008) (Figura 28).

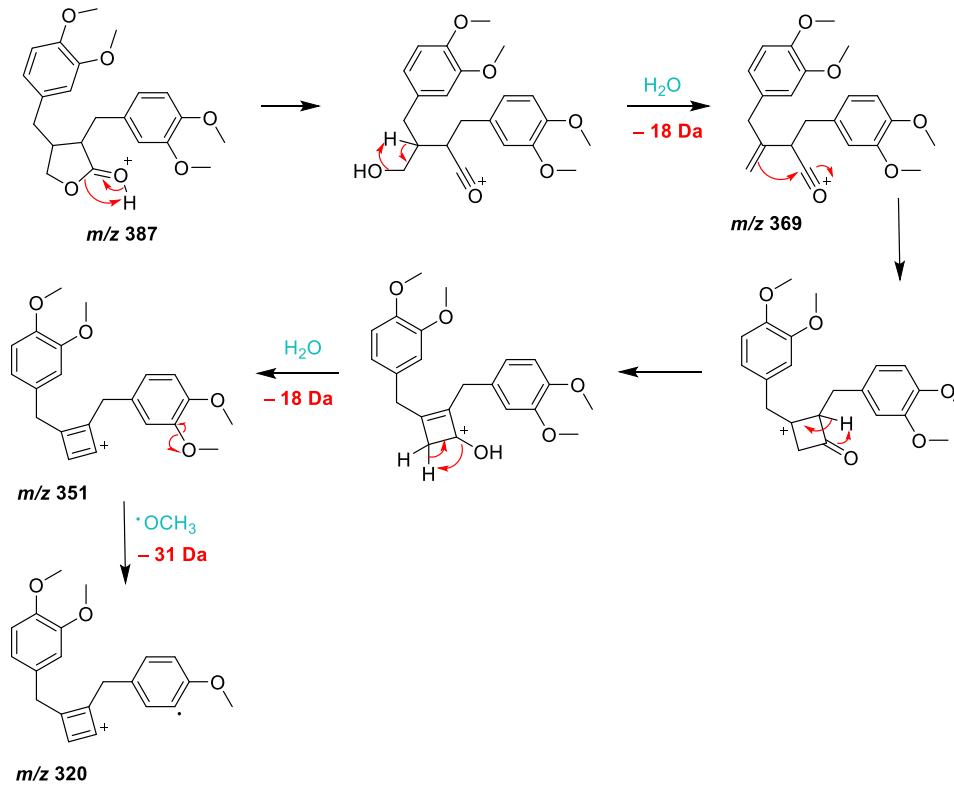
Figura 28 - Representação dos *clusters* e estruturas químicas correspondentes à família molecular das lignanas.



Os íons precursoros em m/z 369 (f), 353 (g) e 341 (h) foram anotados como sendo lignanas do tipo dibenzilbutirolactônica. Pela análise dos seus espectros de EM/EM, observou-se a perda consecutiva de duas moléculas de água. A primeira perda ocorre na fonte de ionização antes da detecção no espectrômetro de massas. Essa perda ocorre com a protonação da lactona, que leva à formação do íon acílio através da doação de um par de elétrons e da clivagem da ligação C-O, levando a formação do íon precursor $[M+H-H_2O]^+$. Em seguida ocorre a segunda perda neutra de 18 Da, responsável pela formação do íon produto $[M+H-2H_2O]^+$. A perda de água

ainda na fonte de ionização antes da detecção é específica para esse tipo de lignanas em modo positivo (Figura 29) (EKLUND et al., 2008).

Figura 29 - Proposta de fragmentação para o íon m/z 369

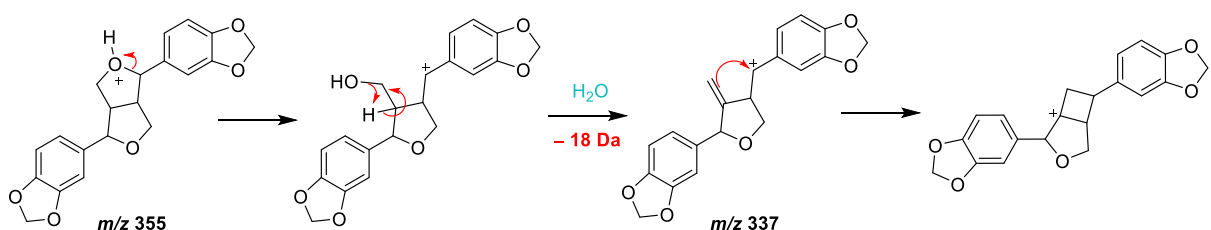


Fonte: Adaptado de EKLUND, et al., 2008

Os dados de RMN de 1H , juntamente com as anotações obtidas a partir do GNPS, reforçaram a proposta para a substância **g**, anotada como a kusunoquinina, que foi identificada na fração metanólica de *A. gehrtii*, e pôde ser observada nas espécies *A. labiata* MS, *A. labiata* MG e *A. esperanzae*.

Com base nos espectros de EM/EM dos íons m/z 357 (i), 371 (j) e 355 (k) foi possível anotar três lignanas do tipo tetraidrofurfurânica, tendo em comum a perda de uma molécula de água do anel tetraidrofurfurano (Figura 30) (EKLUND, et al., 2008).

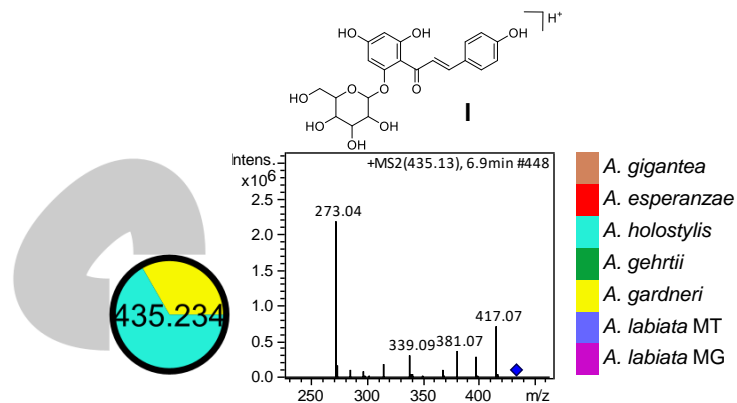
Figura 30 - Proposta de fragmentação para o íon m/z 355



Das seis lignanas anotadas, quatro já foram descritas em espécies de *Aristolochia*, inclusive sendo isoladas recentemente em nosso grupo de pesquisa de flores de *A. trulliformis* e de folhas de *A. warmingii* (HOLZBACH et al. 2019; CUNHA, 2018).

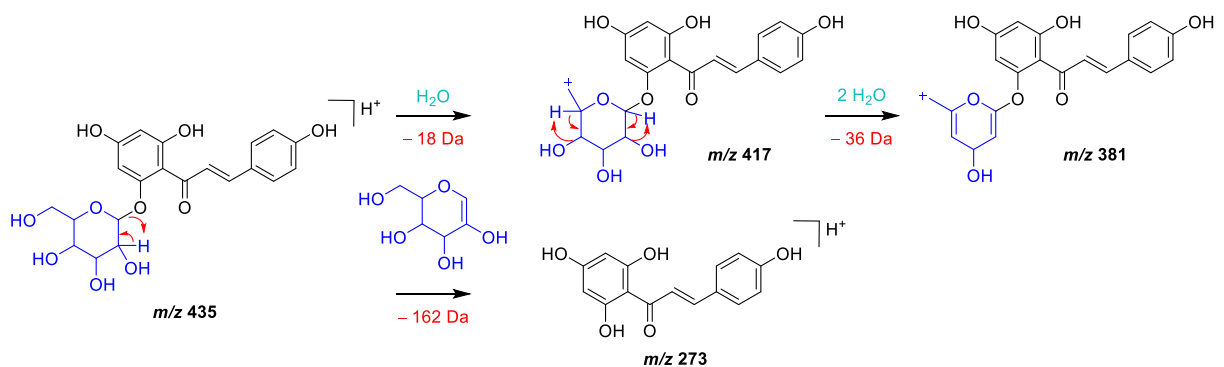
A análise do perfil de fragmentação observado no espectro de EM-EM para o íon m/z 435 (I) permitiu sugerir a presença de uma chalcona, que foi observada como um único nodo da rede molecular e encontrada apenas nas espécies *A. holostylis* e *A. gardneri* (Figura 31).

Figura 31 - Representação do *cluster* e estrutura química correspondente ao nodo da chalcona



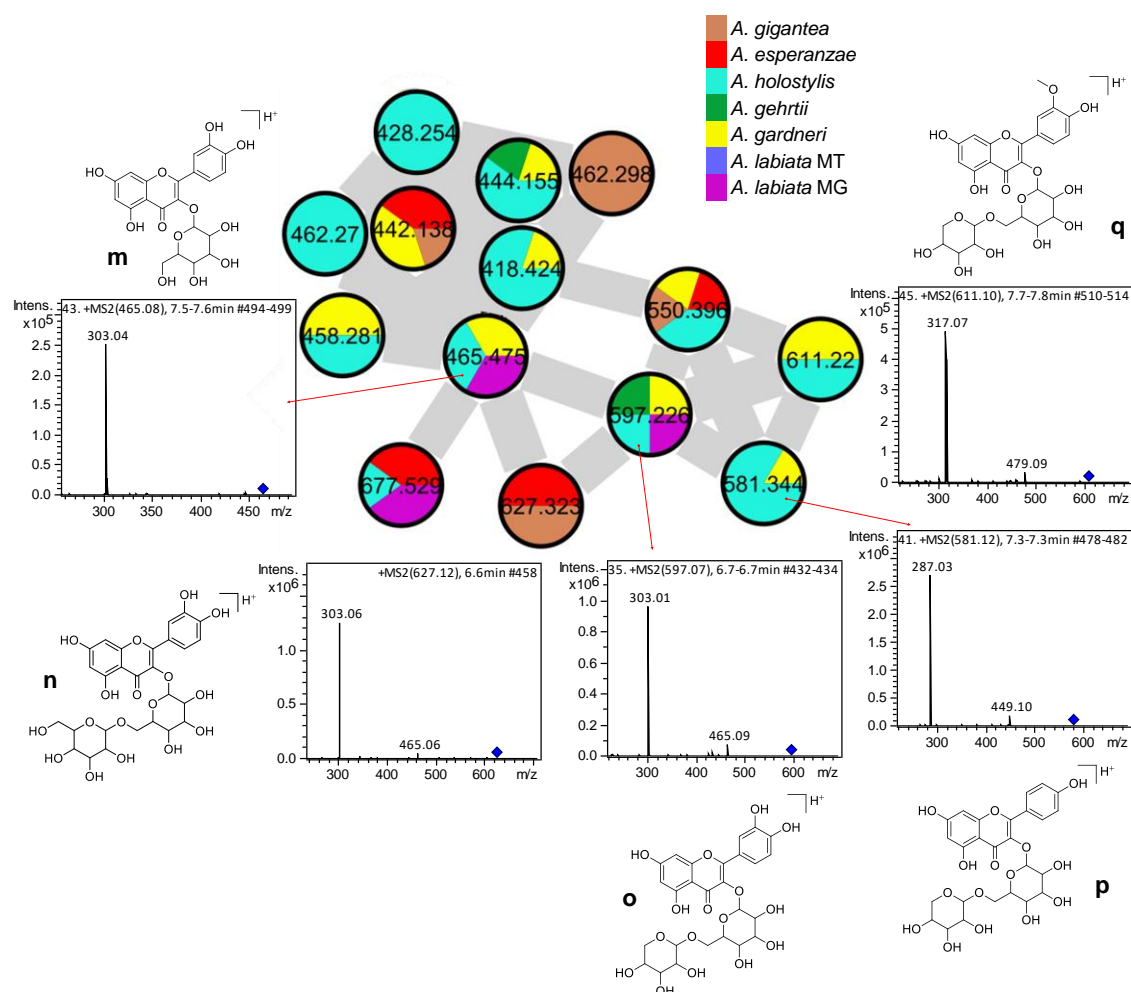
No espectro de EM/EM do íon m/z 435 (I) observou-se o íon produto m/z 417, obtido após perda de uma molécula de água (18 Da), seguido de mais duas perdas consecutivas de água (36 Da), resultando no íon produto m/z 381. Observa-se também de um pico base em m/z 273, formado após a perda de uma unidade de hexose (162 Da) (Figura 32).

Figura 32 - Proposta de fragmentação para o íon m/z 435



A classe dos flavonóis glicosilados foi agrupada em um único cluster da rede molecular, sendo dividido em flavonoides mono e diglicosilados (Figura 33). As perdas das unidades de açúcar permitiram identificar as agliconas kaempferol, quercetina e isorhamnetina.

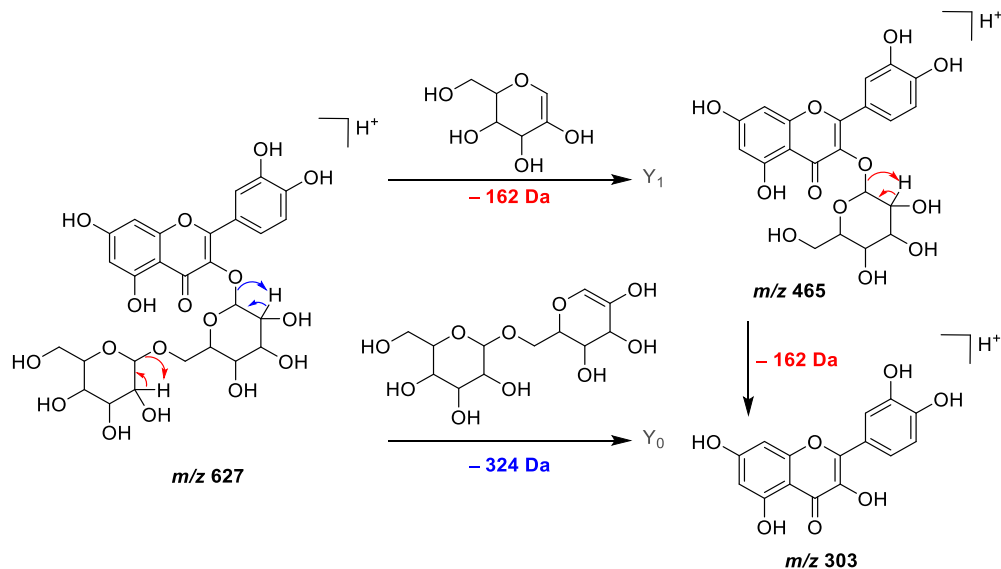
Figura 33 - Representação dos *clusters* e estruturas químicas correspondentes aos nodos dos flavonoides



As análises dos espectros de EM/EM dos íons precursores m/z 465 (**m**), 627 (**n**) e 597 (**o**) apresentaram fragmentações características de flavonoides O-glicosilados derivados da quercetina (CUYKENS; CLAYES, 2004; VUKICS; GUTTMAN, 2010). Os íons precursores m/z 627 (**n**) e 597 (**o**) apresentaram perdas neutras de 162 Da (hexose) e 132 Da (pentose), respectivamente, gerando assim os íons produtos Y_1^+ em m/z 465. A formação do íon produto Y_0^+ em m/z 303, atribuído à aglicona do flavonol quercetina, foi resultado das perdas neutras de 324 Da e 294 Da, respectivamente, evidenciando a presença de duas unidades de açúcar nas estruturas de **n** e **o** (Figura 34).

O espectro de massas EM/EM registrado para o íon precursor com m/z 465 (**m**) apresentou uma perda neutra de 162 Da (hexose), responsável por gerar o íon produto Y_0^+ em m/z 303, também atribuído à aglicona da quercetina.

Figura 34 - Proposta de fragmentação para o íon m/z 627



A análise dos espectros de massas EM/EM dos íons precursores em m/z 581 (**p**) e 611 (**q**) também mostraram fragmentações características de flavonóis *O*-glicosilados. O dissacarídeo foi identificado pelas perdas de 132 Da (pentose), levando à formação dos íons produtos em m/z 449 e 479, respectivamente, bem como perdas de 294 Da (pentose-hexose), resultando nos íons produtos em m/z 287 e 317, atribuídos às agliconas dos flavonóis kaempferol e isorhamnetina, respectivamente. Dentre os flavonóis descritos, os compostos **m** e **n** já foram descritos em estudos anteriores com espécies de *Aristolochia* (WU, et al., 1999).

Se considerarmos a importância da estrutura floral para a sobrevivência e perpetuação das plantas, bem como sua capacidade em reconhecer e se adaptar rapidamente aos fatores bióticos e abióticos que ofereçam riscos a sua permanência, por exemplo com a produção de compostos de defesa, podemos inferir alguns pontos para os compostos anotados nesse trabalho.

Os alcaloides registrados foram encontrados principalmente nas espécies *A. gigantea* e *A. holostylis*. Esses compostos são conhecidos por atuarem no combate a patógenos e predadores, devido a sua toxicidade, e por estarem envolvidos nos processos de crescimento, metabolismo e reprodução das plantas, influenciando até

no desenvolvimento de plantas competidoras (HEINRICH, et al., 2021; DESMET, et al., 2021). A presença desses metabólitos nas flores de *A. gigantea* e *A. holostylis* pode indicar que esses alcaloides estejam atrelados ao sistema de defesa dessas plantas.

As lignanas são substâncias frequentemente encontradas na família Aristolochiaceae e estão relacionadas a proteção das plantas contra insetos e agentes patogênicos. Por exemplo, as lignanas (-)-kusunoquinina, (+)-eudesmina e (+)-sesamina, isoladas de *A. pubescens* e *A. malmeana*, respectivamente, apresentaram atividade inseticida (MESSIANO et al., 2008; NASCIMENTO, et al., 2004). A elevada proporção de kusunoquinina encontrada em *A. gehrtii* sugere que essa lignana também possa estar envolvida no mecanismo de defesa das flores da espécie.

Se levarmos em consideração a diversidade em cores, tamanhos e formas das estruturas florais das *Aristolochia*, a presença de flavonoides se torna coerente, uma vez que esses compostos estão relacionados principalmente com a pigmentação, realizando um papel essencial na atração de polinizadores e na proteção contra estresses bióticos e abióticos (LAOUÉ, et al., 2022; ZAYNAB, et al., 2018), o que é indispensável para a sobrevivência em biomas como o cerrado, que é o caso das espécies *A. holostylis* e *A. gardineri* que foram as que mais apresentaram essa classe de compostos.

4.5 Determinação da composição química das frações hexânicas de flores de *Aristolochia* por CG-EM

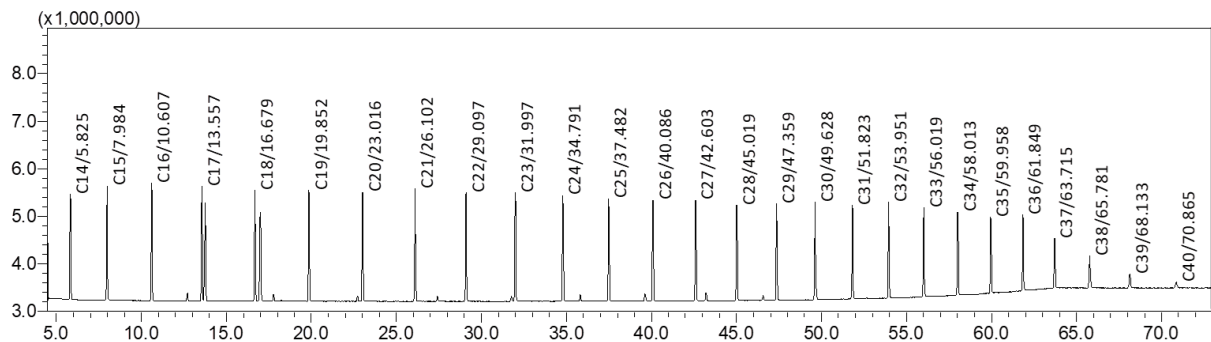
As misturas das frações hexânicas das espécies *A. labiata* MS, *A. holostylis*, *A. gigantea*, *A. gehrtii*, *A. gardineri* e *A. esperanzae* foram analisadas por CG-EM. Os índices de retenção linear dos componentes foram calculados a partir da equação de Van Den Dool e Kratz (Equação 4, seção 3.11, p. 42), tendo uma série homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₄₀) como referência.

A análise e comparação dos espectros de massas das substâncias detectadas com os das bibliotecas disponíveis não são o bastante para propor a identificação dos componentes presentes nos extratos. Devido a presença de isômeros, muitos dos espectros de massas podem apresentar o mesmo padrão de fragmentação dificultando a sua proposta de identificação. Uma estratégia para contornar essa situação seria a injeção de padrões autênticos para confirmar a estrutura de um

determinado composto. Porém, quando se trata de misturas complexas, essa é uma tarefa impossível. É por isso que o índice de retenção é tão importante nas análises de CG-EM, sendo que é a partir desse valor, obtido por interpolação do tempo de retenção de um componente X presente na amostra em relação aos tempos de retenção de dois padrões da série homóloga de *n*-alcanos, que é possível fazer sugestões dos compostos presentes nas amostras.

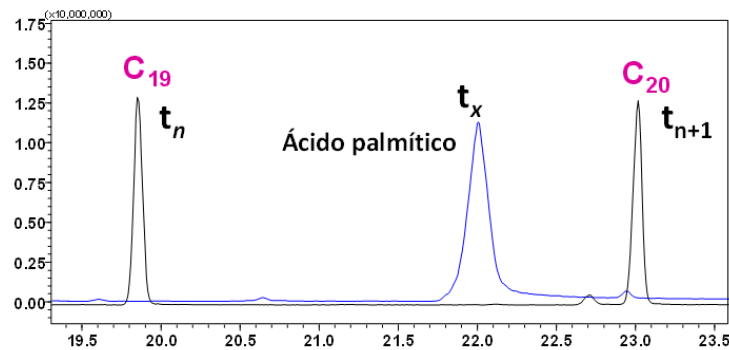
No cromatograma do padrão de *n*-alcanos (Figura 35) foram observados nove picos de possíveis contaminantes, de baixa intensidade com t_R 12,706, 17,775, 22,709, 27,407, 31,755, 35,807, 39,626, 43,214 e 46,564 min, além de dois picos de maior intensidade com t_R 13,749 e 16,991 min. Observou-se ainda que, nas condições cromatográficas empregadas na análise dos *n*-alcanos, os hidrocarbonetos C₈-C₁₃ coeluíram com o solvente. No entanto, nenhum desses fatores influenciaram na determinação dos índices de retenção dos componentes das amostras analisadas.

Figura 35 - Cromatograma da série homóloga de *n*-alcanos C₈-C₄₀ em CG-EM



Dessa forma, os índices de retenção dos componentes em todas as amostras foram calculados levando em consideração os tempos de retenção dos hidrocarbonetos eluídos antes e após cada componente analisado. Os cálculos do índice de retenção para o ácido palmítico, por exemplo, presente em todas as amostras analisadas, está representado na Figura 36.

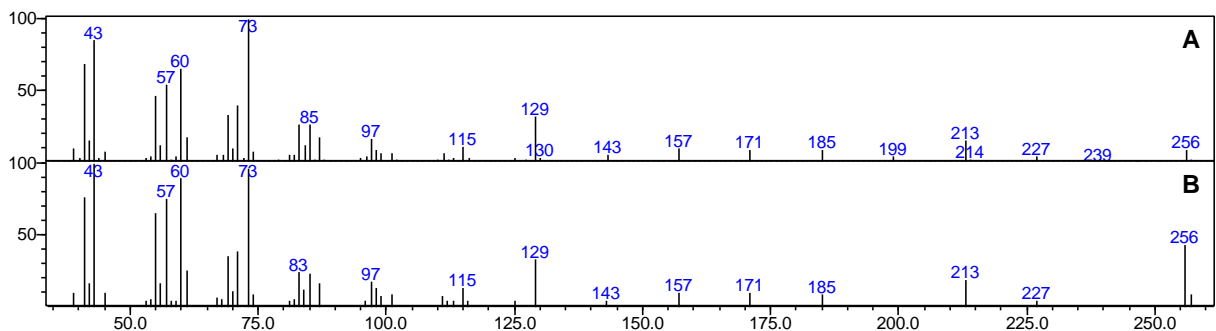
Figura 36 - Cálculo do IR para ácido palmítico utilizando a equação de Van Den Dool e Kratz



$$IR = 100 \cdot (19) + 100 \left(\frac{21,992 - 19,852}{23,016 - 19,852} \right) = 1968$$

Após a obtenção do valor do índice de retenção calculado ($IR_{\text{cal}} = 1968$), o ácido palmítico foi proposto com base na comparação do valor obtido com o valor do índice de retenção presente na literatura, $IR_{\text{lit}} = 1971$ (NIST, 2019). Além disso, foi feita a comparação do espectro de massas, obtido experimentalmente para o ácido palmítico, com o encontrado nas bibliotecas de espectros (NIST e Wiley) através do software GCMS solutions, versão 2.61, com no mínimo 70% de similaridade (Figura 37 A e B), bem como a análise do padrão de fragmentação observado nos espectros de massas obtidos. Essas análises foram realizadas para todos os componentes de todas as frações estudadas.

Figura 37 - (A) Espectro de massas obtido para o ácido palmítico (B). Espectro de massas presente na biblioteca Wiley MS Database com 93% de similaridade

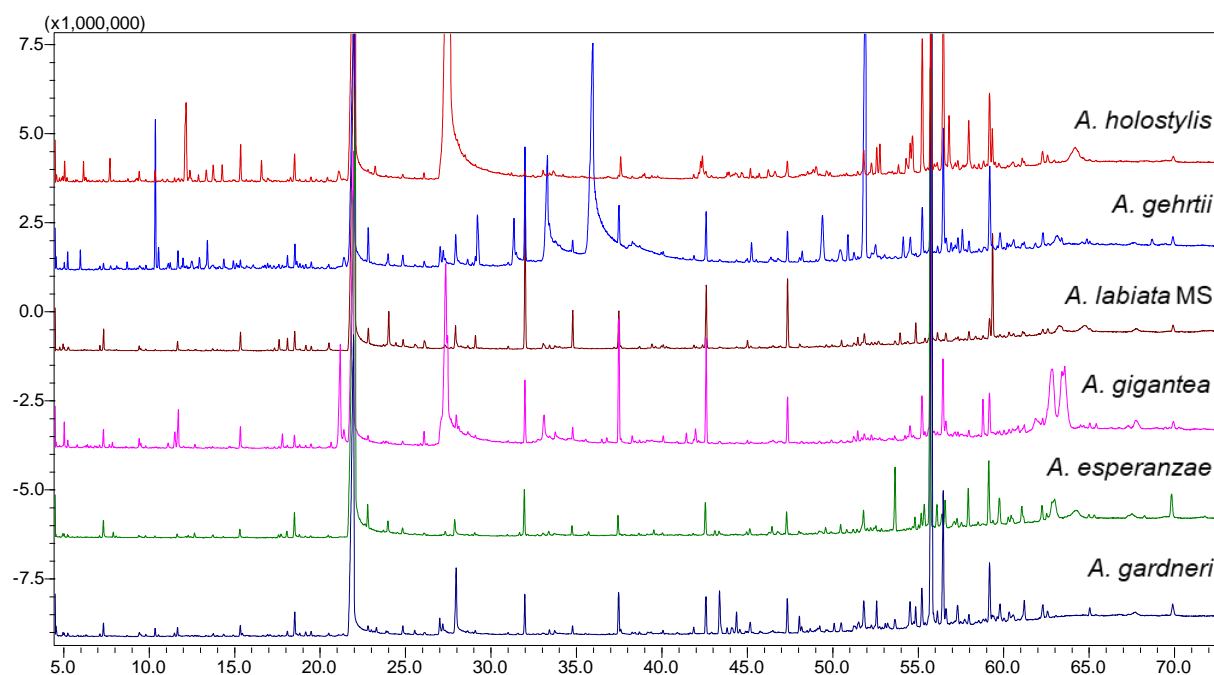


4.5.1 Identificação dos componentes apolares de flores de *Aristolochia*

As análises por CG-EM possibilitaram avaliar o perfil químico das frações hexânicas de flores de *Aristolochia*. Com base nos cromatogramas obtidos observou-

se que existem algumas semelhanças entre as espécies *A. gigantea*, *A. labiata* MS, *A. esperanza* e *A. gardneri* (Figura 38). As espécies *A. holostylis* e *A. gehrtii*, apesar de apresentarem alguns picos em comum, demonstraram um perfil cromatográfico que não segue o mesmo padrão das demais, principalmente no intervalo de tempo de retenção de 30-55 minutos (Figura 38).

Figura 38 - Comparação dos cromatogramas das frações hexânicas de flores de *Aristolochia* obtidos por CG-EM.



A partir da comparação dos índices de retenção e padrão de fragmentação das substâncias encontradas com os dados da literatura e bancos de dados foi possível propor a identificação de 37 substâncias das 103 detectadas por CG-EM. Entre os compostos detectados estão oito terpenoides, quatorze ácidos graxos, um álcool, duas cetonas, uma lignana, além de onze homólogos de alcanos de cadeia linear (Tabela 14).

As espécies com o maior número de compostos detectados foram *A. gehrtii* e *A. esperanzae* com 29 substâncias, seguido das espécies *A. gigantea* e *A. labiata* MS com 27 e as espécies *A. holostylis* e *A. gardneri* com 22 e 23 compostos detectados, respectivamente.

Tabela 14 - Proposta de identificação dos compostos presentes nas frações hexânicas de flores de *Aristolochia* analisadas por CG-EM

Picos	Composto	T _R (min)	IR _{cal}	IR _{lit}	Similaridade %	Área %					
						Aga	Ae	Al _{MS}	Age	Agg	Ah
1	Ácido decanoico	5,033	-	1380	96	-	0,04	-	0,07	0,46	0,21
2	α -copaeno	5,229	-	1377	90	-	-	-	0,26	-	-
3	β -cubebeno	5,966	-	1419	94	-	-	-	0,30	-	-
4	-	6,16	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23
5	-	7,114	-	-	-	-	-	0,14	-	-	-
6	-	7,322	-	-	-	0,30	0,51	0,66	-	0,47	-
7	-	7,706	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,33
8	-	7,895	-	-	-	-	0,13	-	-	-	-
9	Ácido dodecanoico	9,411	1554	1566	95	0,08	0,03	0,14	-	0,27	0,12
10	-	10,348	-	-	-	0,24	0,05	0,03	2,77	-	0,16
11	Óxido de cariofileno	10,547	1598	1592	95	0,05	-	-	0,4	-	-
12	-	11,504	-	-	-	0,08	-	-	-	0,6	0,05
13	-	11,658	-	-	-	0,26	0,12	0,33	0,33	1,3	-
14	-	12,153	-	-	-	-	-	-	-	-	2
15	-	12,65	-	-	-	-	0,14	-	-	-	-
16	-	12,94	-	-	-	-	-	-	0,22	-	0,09
17	-	13,335	-	-	-	-	-	0,03	0,62	-	0,19
18	-	13,746	-	-	-	-	0,11	0,09	-	-	0,3
19	-	14,269	-	-	-	-	-	-	-	-	0,24
20	Ácido tetradecanoico	15,34	1757	1767	96	0,33	0,28	0,75	0,14	0,66	0,62
21	-	16,573	-	-	-	-	-	-	-	-	0,32
22	-	17,601	-	-	-	-	0,09	0,44	-	-	-
23	-	17,713	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-
24	Hexahidrofarnesil acetona	18,085	1844	1847	91	-	0,20	0,46	-	-	-
25	Ácido pentadecanoico	18,517	1858	1867	94	0,79	0,97	0,75	0,54	0,38	0,49
26	Ácido 9-hexadecenoico	21,177	1942	1942	93	-	-	-	-	5,86	0,35

Picos	Composto	T _R (min)	IR _{cal}	IR _{lit}	Similaridade %	Área %					
						Aga	Ae	Al _{MS}	Age	Agg	Ah
27	Ácido 9-hexadecenoico	21,391	1949	1942	94	-	-	-	0,39	1,19	-
28	Ácido palmítico	21,992	1968	1971	95	27,64	56,02	44,39	19,63	23,75	24,98
29	Hexadecanoato de etila	22,815	1994	1993	96	0,15	0,76	0,59	0,72	0,13	0,03
30	-	23,22	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17
31	Ácido heptadecanoico	24,02	2033	2086	87	-	0,34	1,49	0,2	-	-
32	Ácido heptadecanoico	24,855	2060	2086	93	0,24	0,20	0,30	0,26	0,1	0,06
33	Heneicosano	26,096	2099	2100	95	0,14	0,12	0,44	0,15	0,44	0,10
34	Ácido linoleico	27,028	2131	2140	95	0,49	-	-	0,63	-	-
35	-	27,204	-	-	-	0,18	-	-	0,28	1,96	-
36	Ácido oleico	27,348	2142	2152	88	-	-	-	-	13,88	-
37	Ácido oleico	27,456	2145	2153	90	-	0,13	-	-	5,79	44,29
38	Ácido esteárico	27,964	2161	2172	94	2,72	0,78	0,80	0,94	0,48	-
39	Docosano	29,084	2200	2200	95	0,09	0,09	0,52	0,18	-	-
40	-	29,206	-	-	-	-	-	-	1,74	-	-
41	-	31,342	-	-	-	-	-	-	1,58	-	-
42	Tricosano	31,987	2300	2300	95	1,38	1,71	6,52	2,60	2,13	0,08
43	-	33,106	-	-	-	-	-	-	-	1,46	-
44	-	33,298	-	-	-	-	-	-	5,51	-	-
45	Tetracosano	34,779	2400	2400	95	0,28	0,32	1,54	0,26	0,41	-
46	-	35,959	-	-	-	-	-	-	21,14	-	-
47	Pentacosano	37,487	2500	2500	95	1,56	0,69	1,74	1,03	4,36	0,06
48	-	37,587	-	-	-	0,20	0,03	0,13	-	-	0,47
49	-	38,263	-	-	-	-	-	-	-	0,35	-
50	Hexacosano	40,079	2600	2600	94	0,14	0,08	0,14	-	0,21	-
51	-	41,431	-	-	-	-	-	-	-	0,32	-
52	-	41,869	-	-	-	0,22	0,06	0,13	0,10	0,11	0,06
53	1-Tetracosanol	41,968	2675	-	95	-	-	-	-	0,52	-

Picos	Composto	T _R (min)	IR _{cal}	IR _{lit}	Similaridade %	Área %					
						Aga	Ae	Al _{MS}	Age	Agg	Ah
54	-	42,151	-	-	-	-	-	-	-	0,09	0,12
55	-	42,271	-	-	-	-	-	-	-	-	0,35
56	-	42,368	-	-	-	-	-	0,13	-	-	0,56
57	Heptacosano	42,576	2699	2700	94	1,41	1,19	2,76	1,16	3,51	0,19
58	-	43,375	-	-	-	1,88	0,17	-	-	-	-
59	-	43,815	-	-	-	0,20	-	-	-	-	0,11
60	-	43,926	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14
61	-	44,367	-	-	-	0,73	-	-	-	-	-
62	-	44,654	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11
63	-	44,715	-	-	-	-	-	-	-	-	0,09
64	Octacosano	44,959	2800	2800	95	-	0,10	0,35	0,07	0,11	-
65	-	45,139	-	-	-	0,47	0,29	-	-	-	0,17
66	-	45,244	-	-	-	-	-	-	0,54	-	-
67	Nonacosano	47,347	2900	2900	94	1,27	0,89	3,05	0,76	1,63	0,29
68	-	48,053	-	-	-	0,55	-	-	0,12	-	-
69	-	48,209	-	-	-	0,16	-	-	0,26	-	-
70	-	49,396	-	-	-	-	-	-	2,14	-	-
71	Triacotano	49,62	3000	3000	91	-	0,22	0,10	-	-	0,14
72	-	50,083	-	-	-	0,28	-	-	-	-	-
73	-	50,489	-	-	-	0,38	0,30	0,23	0,68	-	-
74	Hinoquinina	50,818	3057	3096	87	-	0,12	0,09	0,71	-	-
75	-	51,19	-	-	-	-	0,15	0,21	0,23	0,25	-
76	-	51,419	-	-	-	-	0,15	0,33	0,05	0,36	0,08
77	Hentriacontano	51,8	3100	3100	95	1,23	0,96	0,46	14,69	0,25	0,42
78	-	52,209	-	-	-	0,12	0,15	-	-	0,22	0,2
79	α-tocoferol	52,518	3135	3138	95	0,90	0,20	0,11	0,44	-	0,49
80	-	52,674	-	-	-	-	-	0,18	-	-	0,49

Picos	Composto	T _R (min)	IR _{cal}	IR _{lit}	Similaridade %	Área %					
						Aga	Ae	Al _{MS}	Age	Agg	Ah
81	-	53,649	-	-	-	0,47	2,69	0,19	-	0,15	-
82	-	53,839	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13
83	-	53,933	-	-	-	-	-	0,54	-	-	-
84	-	54,122	-	-	-	-	-	-	0,55	-	-
85	-	54,286	-	-	-	-	-	-	-	0,15	0,41
86	-	54,527	-	-	-	1,14	-	-	0,70	0,72	0,72
87	-	54,661	-	-	-	-	-	-	-	0,20	0,90
88	-	54,806	-	-	-	0,59	0,41	0,87	-	-	-
89	Stigmasterol	55,175	3261	3248	93	1,57	0,48	-	1,32	1,93	2,83
90	-	55,35	-	-	-	-	0,90	-	-	-	-
91	16-hentriacontanona	55,706	3287	3304	92	37,6	17,62	20,52	4,01	14,89	5,18
92	-	56,093	-	-	-	0,46	0,87	0,33	0,16	-	-
93	γ -sitosterol	56,387	3323	3351	94	5,53	0,53	-	3,90	3,49	5,12
94	-	56,569	-	-	-	0,45	0,97	0,42	0,73	0,82	-
95	-	56,803	-	-	-	-	-	-	-	-	1,26
96	-	57,955	-	-	-	0,36	1,59	0,44	0,36	0,25	1,02
97	-	58,785	-	-	-	-	-	-	-	1,40	-
98	Stigmast-4-en-3-ona	59,169	3459	3458	92	2,41	2,71	0,94	2,54	1,71	1,44
99	-	59,325	-	-	-	0,06	-	4,71	-	-	0,57
100	-	59,784	-	-	-	0,65	1,35	-	0,52	-	-
101	-	61,202	-	-	-	0,73	-	-	-	-	-
102	5- α -stigmastano-3,6-diona	62,291	3624	3601	83	0,59	0,60	0,27	0,37	0,23	0,30
103	-	62,564	-	-	-	0,25	0,27	0,22	-	-	0,17

A. gardneri = Aga; *A. esperanzae* = Ae; *A. labiata* MS = AIMS; *A. gehrtii* = Age; *A. gigantea* = Agg; *A. holostylis* = Ah

T_R (min) = tempo de retenção em minutos; IR_{cal} = índice de retenção calculado; IR_{lit} = índice de retenção da literatura; Similaridade % = similaridade entre o espectro da amostra e o espectro da biblioteca; Área % = área relativa.

A partir da proposta de identificação baseada na análise dos dados espectrais de CG-EM, observou-se que as substâncias, com maior porcentagem de área relativa presentes em todas as amostras, foram ácido palmítico (**28**) e 16-hentriacontanona (**91**) (Figura 38, Tabela 14).

Para as espécies *A. holostylis* e *A. gigantea* observou-se picos referentes ao ácido oleico (**36**) com elevadas porcentagens de área relativa (13,88%).

Os alcanos de cadeias longas C21 (**33**), C22 (**39**), C23 (**42**), C24 (**45**), C25 (**47**), C26 (**50**), C27 (**57**), C28 (**64**), C29 (**67**), C30 (**71**) e C31 (**77**) foram identificados nos extratos de flores de *Aristolochia* após análise comparativa tanto dos espectros de massas quanto com a própria série homóloga dos hidrocarbonetos. Dentre os alcanos identificados, hentriacontano (C31, **77**), pentacosano (C25, **47**) e tricosano (C23, **42**) foram os que apresentaram maior porcentagem de área relativa nas espécies *A. gehrtii*, *A. gigantea* e *A. labiata* MS, respectivamente.

Dentre as substâncias identificadas, verificou-se que β -cubebeno (**3**), ácido dodecanoico (**9**), óxido de cariofileno (**11**), ácido tetradecanoico (**20**), ácido 9-hexadecenoico (**27**), ácido palmítico (**28**), ácido oleico (**36**), tricosano (**42**), pentacosano (**47**), hexacosano (**50**), heptacosano (**57**), octacosano (**64**), nonacosano (**67**), hinoquinina (**74**), stigmasterol (**89**) e γ -sitosterol (**93**) já foram relatadas em estudos anteriores com óleos essenciais e extratos hexânicos de espécies de *Aristolochia* (SOUMYA et al., 2016; MARTINS et al., 2014; KUO et al., 2012; MARCHESINI et al., 2009).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da fração acetato de etila das flores de *A. gigantea* levou ao isolamento e a identificação de 14 substâncias, sendo quatro fenilpropanoides, dois derivados do ácido benzoico, seis ácidos aristolóquicos e dois flavonoides. Dois dos fenilpropanoides isolados estão sendo descritos pela primeira vez na literatura.

O planejamento experimental de misturas simplex centroide permitiu verificar que não existe um sistema de solventes, entre os testados, ideal para todas as flores sugerindo uma variação na composição química dessas matrizes.

A análise das frações metanólicas, utilizando a abordagem de redes moleculares, permitiu anotar 17 substâncias pertencentes as classes dos alcaloides, lignanas e flavonoides. Já a análise das frações hexânicas por CG-EM sugeriu a presença de 37 substâncias pertencentes a família dos terpenoides, ácidos graxos, álcoois, cetonas, lignana, além de homólogos de alcanos.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi possível fazer algumas sugestões que podem ser usadas para nortear o grupo de pesquisa em estudos futuros, entre elas estão:

- ✓ Estudar as demais frações de flores de *A. gigantea*, uma vez que além de possuir maior quantidade de material vegetal, esta espécie demonstrou ser promissora para estudos fitoquímicos;
- ✓ Otimizar o processo de extração de flores das espécies de *Aristolochia* para obtenção do maior de números de substâncias, partindo dos sistemas de solventes utilizados neste trabalho;
- ✓ Estudar individualmente as espécies *A. holostylis*, *A. gardneri*, *A. labiata* e *A. gehrtii* que apresentaram *clusters* exclusivos, não anotados pelo GNPS (Figura 23), sugerindo a presença substâncias encontradas apenas nestas matrizes. Além disso, a espécie *A. gardneri* apresentou um perfil espectral e cromatográfico diferentes daqueles observados para as demais espécies. Portanto, estas matrizes demonstraram ser interessantes para estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-BARHAM, M. B.; AL-JABER, H. I.; AL-QUDAH, M. A.; ZARGA, M. H. A. New aristolochic acid and other chemical constituents of *Aristolochia maurorum* growing wild in Jordan. **Natural Product Research**, v. 31, n. 3, p. 245-252, 2017.
- ALLARD, P. M.; GENTA-JOUVE, G.; WOLFENDER, J. L. Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 36, p. 40-49, 2017.
- APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, p. 1-20, 2016.
- Aristolochiaceae** in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB15749>>. Acesso em: 21 ago. 2022
- ARORA, N.; BANERJEE, A. K. Dereplication in natural product discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 101-102, 2019.
- BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2001.
- CAI, Y.; CAI, T. G. Two new aristolochic acid derivatives from the roots of *Aristolochia fangchi* and their cytotoxicities. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1093-1095, 2010.
- CHAWLA, P.; CHAWLA, A.; SHAH, G.; BAGHEL, U. S.; DHAWAN, R. K. A review on pharmacognosy and biological activities of *Aristolochia*. **Asian Journal of Research in Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 101-110, 2013.
- CHIANG, C. -Y.; LEU, Y.-L.; CHAN, Y. -Y.; WU, T. -S. Sodium aristolochates from the flowers and fruits of *Aristolochia zollingeriana*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 45, n.1, p. 93-97, 1998.
- CORTES, D.; DADOUN, H.; PAIVA, R. L. R.; OLIVEIRA, A. B. Nouveaux alcaloïdes bis-benzylisoquinoleiques isolés des feuilles de *Aristolochia gigantea*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 5, p. 910-914, 1987.
- CUNHA, C. L. **Lignoides de *Aristolochia warmingii* Mast.** 2018. 182 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.
- CUYKENS, F.; CLAYES, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1-15, 2004.

- DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432-455, 2016.
- DESMET, S.; MORREEL, K.; DAUWE, R. Origin and function of structural diversity in the plant specialized metabolome. **Plants**, v. 10, n. 11, p. 2393, 2021.
- EKLUND, P. C.; BACKMAN, M. J.; KRONBERG, L. Å.; SMEDS, A. I.; SJÖHOLM, R. E. Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 1, p. 97-107, 2008.
- ERBAR, C.; HEILER, A.; LEINS, P. Nectaries in fly-deceptive pitcher-trap blossoms of *Aristolochia*. **Flora**, v. 232, p. 128-141, 2017.
- FAN, Y.; LI, Z.; XI, J. Recent developments in detoxication techniques for aristolochic acid-containing traditional Chinese medicines. **RSC Advances**, v. 10, n. 3, p. 1410-1425, 2020.
- FERNANDEZ, E.; FERRERAS, I.; FARRELL, B. D.; MEDEIROS, B. A. S.; ROMERO-GONZALEZ, G. A. Studies in *Aristolochia* (Aristolochiaceae) of Hispaniola. **Phytotaxa**, v. 420, n. 1, p. 1-20, 2019.
- FRANÇA, V. C.; VIEIRA, K. V. M.; LIMA, E. D. O., BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V.; SILVA, M. S. D. Phytochemical study of the aerial parts of *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 326-330, 2005.
- FRANCISCO, C. S.; MESSIANO, G. B.; LOPES, L. M. X.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E.; CAPELLARI, L. Classification of *Aristolochia* species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 168-175, 2008.
- FREITAS, J. **Aristolochiaceae Juss. no Espírito Santo, Brasil**. 2016. 142 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) - Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2016.
- FREITAS, J. **Sistemática de *Aristolochia* subsér. *Anthocaulicae* F. Gonzalez (Aristolochiaceae)**. 2020. 190 f. Tese (Doutor em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana - Feira de Santana, 2020.
- FREITAS, J.; BRAUN, D. V.; TONINI, L.; SERPA-FILHO, A.; ALVES-ARAÚJO, A. A New herbivory report from southeastern Brazil: *Aristolochia hypoglauca* Kuhl (Piperales: Aristolochiaceae) as a host plant for *Battus polydamas* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Papilionidae). **Entomological News**, v. 128, n. 4, p. 336-341, 2019.

FREITAS, J.; DOWELD, A. B. *Aristolochia macginitieana* (Aristolochiaceae), a replacement name for *Aristolochia triangularis* MacGinitie non *Aristolochia triangularis* Chamisso. **Phytotaxa**, v. 500, n. 1, p. 59-60, 2021.

GARCIA, L. M. Z.; OLIVEIRA, T. F. de.; SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design-Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 103, n. 1, p. 1-7, 2010.

GEORGE, Y. P. Secondary Metabolites from the leaves and stems of *Leonotis nepetifolia* (Lamiaceae). **Tropical Journal of Natural Product Research**. v. 2, n. 6, p 293-296, 2018.

GONZÁLEZ, F. Florística y sistemática filogenética innecesariamente disyuntas: el caso de *Aristolochia*, *Euglypha* y *Holostylis*. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias**. v. 36, n. 139, p. 193-202, 2012.

HAN, J. T.; BANG, M. H.; CHUN, O. K.; KIM, D. O.; LEE, C. Y.; BAEK, N. I. Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 4, p. 390-395, 2004.

HEINRICH, M.; MAH, J.; AMIRKIA, V. Alkaloids used as medicines: Structural phytochemistry meets biodiversity-an update and forward look. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1836, 2021.

HIPÓLITO, J.; VIANA, B. F.; SELBACH-SCHNADELBACH, A.; GALETTO, L.; KEVAN, P. G. Pollination biology and genetic variability of a giant perfumed flower (*Aristolochia gigantea* Mart. and Zucc., Aristolochiaceae) visited mainly by small Diptera. **Botany**, v. 90, n. 9, p. 815-829, 2012.

HOLZBACH, J. C.; FILHO, W. A. S.; CUNHA, C. L.; NASCIMENTO, I. R. Flavonol Tri-O-glycoside and other chemical constituents from flowers of *Aristolochia trulliformis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1103-1107, 2019.

HOLZBACH, J. C.; LOPES, L. M. X. Aristolactams and alkamides of *Aristolochia gigantea*. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9462-9472, 2010.

HOLZBACH, J. C.; SOARES F. W.; CUNHA, C. L.; NASCIMENTO, I. R. Flavonol tri-O-glycoside and other chemical constituents from Flowers of *Aristolochia trulliformis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.30, n.5, p.1103-1107, 2019.

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**, v. 16, n. 1, p. 55-95, 2017.

JI, H.; HU, J.; ZHANG, G.; SONG, J.; ZHOU, X.; GUO, D. Aristolochic acid nephropathy: A scientometric analysis of literature published from 1971 to 2019. **Medicine**, v. 100, n. 27, 2021.

JOHNSON, S. D.; JÜRGENS, A. Convergent evolution of carrion and faecal scent mimicry in fly-pollinated angiosperm flowers and a stinkhorn fungus. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 796-807, 2010.

JÚNIOR, L. C. Potencial Ornamental das Aristoloquiáceas. **Ornamental Horticulture**, v. 11, n. 2, p. 82-88, 2005.

KAISER, R. Flowers and fungi use scents to mimic each other. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 806-807, 2006.

KUO, P. C.; LI, Y. C.; WU, T. S. Chemical constituents and pharmacology of the *Aristolochia* (馬兜鈴 mǎdōu líng) species. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 2, n. 4, p. 249-266, 2012.

LAOUÉ, J.; FERNANDEZ, C.; ORMEÑO, E. Plant flavonoids in mediterranean species: a focus on flavonols as protective metabolites under climate stress. **Plants**, v. 11, n. 2, p. 172, 2022.

LEE, S. Y.; KIM, K. H.; LEE, I. K.; LEE, K. H.; CHOI, S. U.; LEE, K. R. A new flavonol glycoside from *Hylomecon vernalis*. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 3, p. 415-421, 2012.

LERMA-HERRERA, M. A.; BEIZA-GRANADOS, L.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; NAVARRO-SANTOS, P.; HERRERA-BUCIO, R.; AVIÑA-VERDUZCO, J.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, H. A. Biological activities of organic extracts of the genus *Aristolochia*: A review from 2005 to 2021. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3937, 2022.

LI, Z. J.; WU, L.; SI, C. L.; WANG, J. H.; YAN, X. N.; YU, H. Y.; CONG, R. Z.; WANG, S. Y.; WEI, R. Chemical constituents of *Pinus pumila* cones. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 55, n. 6, p. 1187-1189, 2019.

LIMA, B. R.; SILVA, F. M. A.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A.; SILVA-FILHO, F. A.; BARISON, A.; COSTA, E. V.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Integrative approach based on leaf spray mass spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for comprehensive characterization of isoquinoline-derived alkaloids in leaves of *Onychopetalum amazonicum* RE Fr. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 1, p. 79-89, 2020.

LOPES, L. M. X. 8-Benzylberbine alkaloids from *Aristolochia gigantea*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 4005-4009, 1992.

LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. **Research Advances in Phytochemistry**, v. 2, p. 19-108, 2001.

LUKINICH-GRUIA, A. T.; NORTIER, J.; PAVLOVIĆ, N. M.; MILOVANOVIĆ, D.; POPOVIĆ, M.; DRĂGHIA, L. P.; PĂUNESCU, V.; TATU, C. A. Aristolochic acid I as an emerging biogenic contaminant involved in chronic kidney diseases: A comprehensive review on exposure pathways, environmental health issues and future challenges. **Chemosphere**, v. 297, n. 134111, p. 1-15, 2022.

MACEDO, A. L.; MARTORANO, L. H.; ALBUQUERQUE, A. C. F. D.; FIOROT, R. G.; CARNEIRO, J. W.; CAMPOS, V. R.; VASCONCELOS, T. R. A.; VALVERDE, A. L.; MOREIRA, D. L.; SANTOS JR, F. M. D. Absolute configuration of (-)-cubebin, a classical lignan with pharmacological potential, defined by means of chiroptical spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 2030-2037, 2020.

MARCHESINI, A. M.; PRADO, G. G.; MESSIANO, G. B.; MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. Chemical constituents of *Aristolochia giberti*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p. 1598-1608, 2009.

MARTIN, K. R.; MORE, M.; HIPÓLITO, J.; CHARLEMAGNE, S.; SCHLUMBERGER, B. O.; RAGUSO, R. A. Spatial and temporal variation in volatile composition suggests olfactory division of labor within the trap flowers of *Aristolochia gigantea*. **Flora**, v. 232, p. 153-168, 2017.

MARTINS, G. F.; PEREIRA, M. D. P.; LOPES, L. M. X.; SILVA, T.; ROSA, P. T. V.; BARBOSA, F. P.; MESSIANO, G. B.; KRETTLIE, A. U. Intraspecific variability of *Holostylis reniformis*: concentration of lignans, as determined by maceration and supercritical fluid extraction (SFE-CO₂), as a function of plant provenance and plant parts. **Química Nova**, n. 37, n. 2, p. 281-287, 2014.

MEGA, N. O.; SCALCO, V. W.; ATENCIO, G. W. G.; DE MORAIS, A. B. B.; ROMANOWSKI, H. P. *Battus polydamas* (Lepidoptera: Papilionidae) uses the open-field *Aristolochia sessilifolia* (Piperales: Aristolochiaceae) as its host plant in Uruguayan savanna areas. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 762-769, 2015.

MESSIANO, G. B.; VIEIRA, L.; MACHADO, M. B.; LOPES, L. M.; BORTOLI, S. A.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2655-2659, 2008.

NASCIMENTO, D. S.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. A. A família Aristolochiaceae Juss. no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 414-422, 2010.

NASCIMENTO, I. R.; MURATA, A. T.; BORTOLI, S. A.; LOPES, L. M. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatalis* larvae. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 60, n. 4, p. 413-416, 2004.

NOGUEIRA, C. R. **Biotransformação e sequestro de micromoléculas de *Aristolochia giberti* por *battus polydamas***. 2014. 288 f. (Tese em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014

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**, v. 81, n. 4, p. 758-767, 2018.

OELSCHLÄGEL, B.; GORB, S.; WANKE, S.; NEINHUIS, C. Structure and biomechanics of trapping flower trichomes and their role in the pollination biology of *Aristolochia* plants (Aristolochiaceae). **New Phytologist**, v. 184, n. 4, p. 988-1002, 2009.

OELSCHLÄGEL, B.; NUSS, M.; TSCHIRNHAUS, M.; PÄTZOLD, C.; NEINHUIS, C.; DÖTTERL, S.; WANKE, S. The betrayed thief-the extraordinary strategy of *Aristolochia rotunda* to deceive its pollinators. **New Phytologist**, v. 206, n. 1, p. 342-351, 2015.

OPITZ, S. E. W; MÜLLER, C. Plant chemistry and insect sequestration. **Chemoecology**, v. 19, n. 3, p. 117-154, 2009.

PACHECO, A. G. OLIVEIRA, P. M.; VELOSO, D. P.; ALCÂNTARA, A. F. C. ¹³C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1245-1262, 2009.

PILON, A. C.; SELEGATO, D. M.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C. P.; PINHO, D. R.; CARNEVALE NETO, F.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBO, I.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. Metabolômica de plantas: Métodos e desafios. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 329-354, 2020.

PINHEIRO, F. Polinização por engodo. In: **Biologia da polinização**. RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. (Orgs.) 1ª ed. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 527 p., 2014, cap. 15, p. 327-341.

PISTELLI, L.; NIERI, E.; BILIA, A. R.; MARSILI, A.; SCARPATO, R. Chemical constituents of *Aristolochia rigida* and mutagenic activity of aristolochic acid IV. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 9, p. 1605-1608, 1993.

PRIESTAP, H. A.; VELANDIA, A. E.; JOHNSON, J. V.; BARBIERI, M. A. Secondary metabolite uptake by the *Aristolochia*-feeding papilionoid butterfly *Battus polydamas*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 40, p. 126-137, 2012.

PURVES, K.; MACINTYRE, L.; BRENNAN, D.; HREGGVIÐSSON, G. Ó.; KUTTNER, E.; ÁSGEIRSDÓTTIR, M. E.; KUTTNER, E.; ÁSGEIRSDÓTTIR, M. E.; YOUNG, L.

C.; GREEN, D. H.; EDRADA-EBEL, R.; DUNCAN, K. R. Using molecular networking for microbial secondary metabolite bioprospecting. **Metabolites**, v. 6, n. 1, p. 2, 2016.

QING, Z.; XU, Y.; YU, L.; LIU, J.; HUANG, X.; TANG, Z.; CHENG, P.; ZENG, J. Investigation of fragmentation behaviours of isoquinoline alkaloids by mass spectrometry combined with computational chemistry. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

QUINN, R. A.; NOTHIAS, L. F.; VINING, O.; MEEHAN, M.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P. C. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 143-154, 2017.

RAJALEKSHMI, D. S.; KABEER, F. A.; MADHUSOODHANAN, A. R.; BAHULAYAN, A. K.; PRATHAPAN, R.; PRAKASAN, N.; VARUGHESE, S.; NAIR, M. S. Anticancer activity studies of cubebin isolated from *Piper cubeba* and its synthetic derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 1767-1771, 2016.

REN, W.; WU, H.; TIAN, Z.; ZHANG, W.; DONG, W.; JIANG, H.; LIU, Y. Phytochemical and chemotaxonomic study on the dried rhizome of *Menispermum dauricum* DC. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 94, 2021.

RUIZ, H. **Memoria sobre las virtudes y usos de las planta llamada en el Perú bejuco de la estrella**. Madrid, Imprenta de D. José Del Collado, 1805, 58 p.

RUPP, T.; OELSCHLÄGEL, B.; RABITSCH, K.; MAHFOUD, H.; WENKE, T.; DISNEY, R. H. L.; NEINHUIS, C.; WANKE, S.; DÖTTERL, S. Flowers of Deceptive *Aristolochia microstoma* are pollinated by phorid flies and emit volatiles known from invertebrate carrion. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, n. 658441, p. 1-11, 2021.

SALEM, M. A.; PEREZ DE SOUZA, L.; SERAG, A.; FERNIE, A. R.; FARAG, M. A.; EZZAT, S. M.; ALSEEKH, S. Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. **Metabolites**, v. 10, n. 1, p. 37, 2020.

SARKER, S.D.; NAHAR, L. Hyphenated techniques and their applications in natural products analysis. In: **Natural Products Isolation**. Humana Press, p. 301-340, 2012.

SHATAER, D.; ABDULLA, R.; MA, Q. L.; LIU, G. Y.; AISA, H. A. Chemical composition of extract of *Corylus avellana* shells. **Chemistry of Natural Compounds**, p. 1-3, 2020.

SHE, G.; SUN, F.; LIU, B. Three new flavonoid glycosides from *Oxytropis myriophylla*. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 1, p. 208-212, 2012.

SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. L.; KIRKAND, J.J. **Practical HPLC Method Development**, second ed., Ed. John Wiley, New York, 1997.

SOARES, P. K.; MARCHEAFAVE, G. G.; GOMES, A. D. A.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Mixture design PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprints of fractionated organic and basic extracts from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. **Chromatographia**, v. 81, n. 8, p. 1189-1200, 2018.

SOUMYA, M.; RASHMI, T. R.; FRANCIS M. S. Influence of seasons and plant parts on the essential oil composition of the endemic species *Aristolochia krisagathra* Sivarajan and Pradeep. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 9, p. 252-257, 2016.

SOUSA, J. H. **Ecologia e Biologia da Polinização de *Aristolochia gigantea* (Aristolochiaceae) Mart. e Zucc.** 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Biomonitoramento) - Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

STORION, A. C.; GONÇALVES, C. P.; MARCUCCI, M. C. Técnicas analíticas hifenadas na identificação de marcadores químicos e adulterações em produtos naturais. **Revista Virtual de Química**. v. 12, n. 4, p. 878-887, 2020.

TEDASEN, A.; DOKDUANG, S.; SUKPONDMA, Y.; LAILERD, N.; MADLA, S.; SRIWIRIYAJAN, S.; RATTANABUREEAB, T.; TIPMANEEA, V.; GRAIDIST, P. (-)-Kusunokinin inhibits breast cancer in *N*-nitrosomethylurea-induced mammary tumor rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 882, p. 173311, 2020.

URZÚA, A.; SALGADO, G.; CASSELS, B. K.; ECKHARDT, G. Aristolochic acids in *Aristolochia chilensis* and the *Aristolochia*-feeder *Battus archidamas* (Lepidoptera). **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 48, n. 5, p. 1513-1519, 1983.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, n. 1, p. 463-471, 1963.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 29, n. 1, p. 1-16, 2010.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; BANDEIRA, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

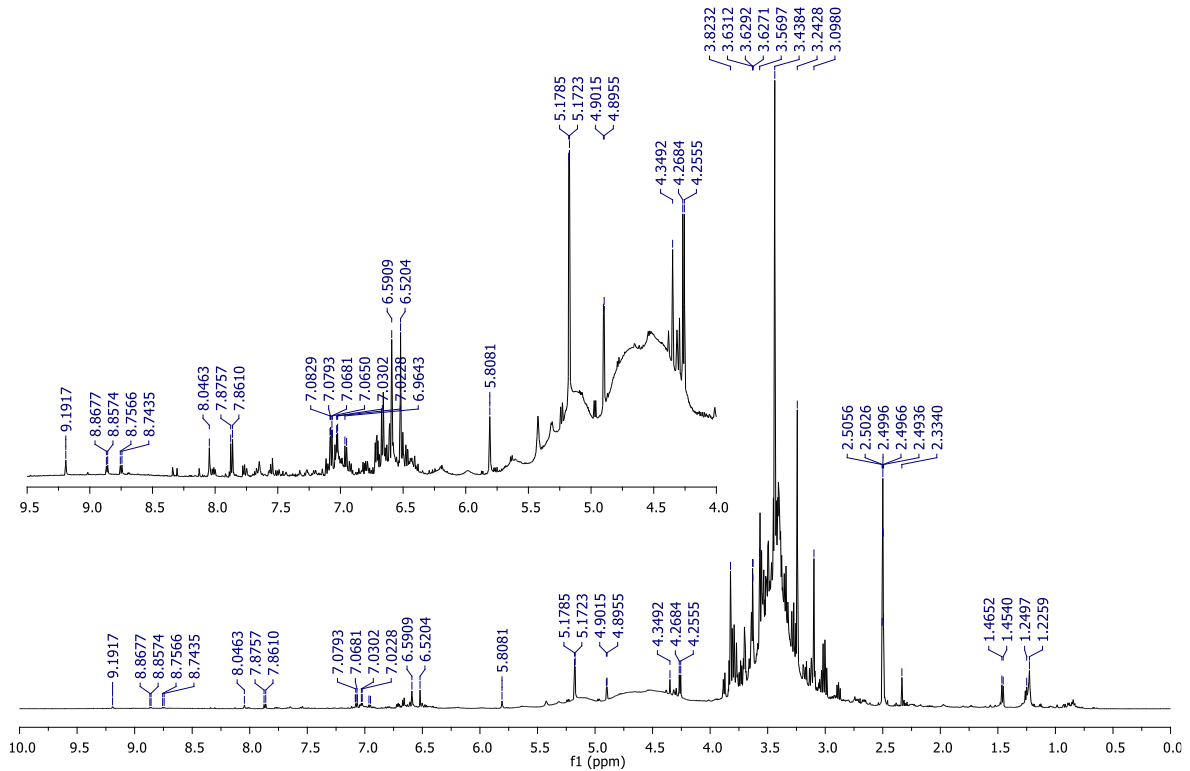
WATROUS, J.; ROACH, P.; ALEXANDROV, T.; HEATH, B. S.; YANG, J. Y.; KERSTEN, R. D.; VOORT, M. V. D.; POGLIANO, K.; GROSS, H.; RAAIJMAKERS, J. M.; MOORE, B. S.; LASKIN, J.; BANDEIRA, N.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. E1743-E1752, 2012.

- WU, T. S.; LEU, Y. L.; CHAN, Y. Y. Constituents of the fresh leaves of *Aristolochia cucurbitifolia*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 4, p. 571-573, 1999.
- WU, T. S.; LEU, Y.-L.; CHAN, Y.-Y. Aristofolin-A, a denitro-aristolochic acid glycoside and other constituents from *Aristolochia kaempferi*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2509-2510, 1998.
- XIE, C.; VEITCH, N. C.; HOUGHTON, P. J.; SIMMONDS, M. S. Flavonoid glycosides and isoquinolinone alkaloids from *Corydalis bungeana*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 22, p. 3041-3047, 2004.
- YIM, S. H.; LEE, Y. J.; PARK, K. D.; LEE, S.; SHIN, B. A.; JUNG, D. W.; WILLIAMS, D. R.; KIM, H. J. Phenolic Constituents from the Flowers of *Hamamelis japonica* Sieb. et Zucc. **Natural Product Sciences**, v. 21, n. 3, p. 162-169, 2015.
- YU, L. L.; HUANG, R.; LV, Y. P.; ZHAO, Y.; CHEN, Y. A new biflavonoid from *Aristolochia contorta*. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 10, p. 789-791, 2005.
- ZANI, C. L.; CARROLL, A. R. Database for rapid dereplication of known natural products using data from MS and fast NMR experiments. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 6, p. 1758-1766, 2017.
- ZAYNAB, M.; FATIMA, M.; ABBAS, S.; SHARIF, Y.; UMAIR, M.; ZAFAR, M. H.; BAHADAR, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 198-202, 2018.
- ZHANG, X. Y.; SHEN, J.; ZHOU, Y.; WEI, Z. P.; GAO, J. M. Insecticidal constituents from *Buddlej aalbiflora* Hemsl. **Natural Product Research**, v. 31, n. 12, p. 1446-1449, 2017.
- ZHANG, Y. T.; JIANG, J. Q. Alkaloids from *Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 89, n. 11, p. 2665-2670, 2006.

APÊNDICES

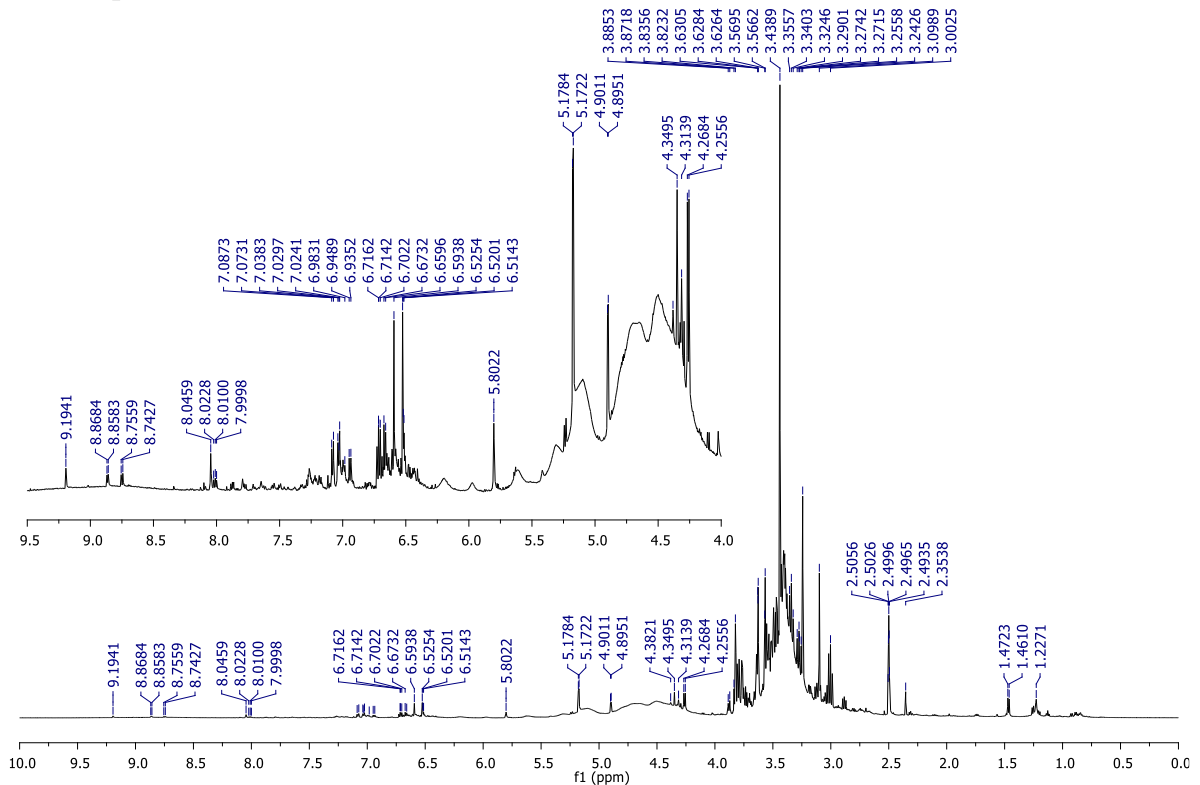
APÊNDICE A - Espectro de RMN de ¹H do extrato etanólico do limbo de flores de *A. gigantea* (DMSO-*d*₆, 14,1 T).

Limbo_EtOH

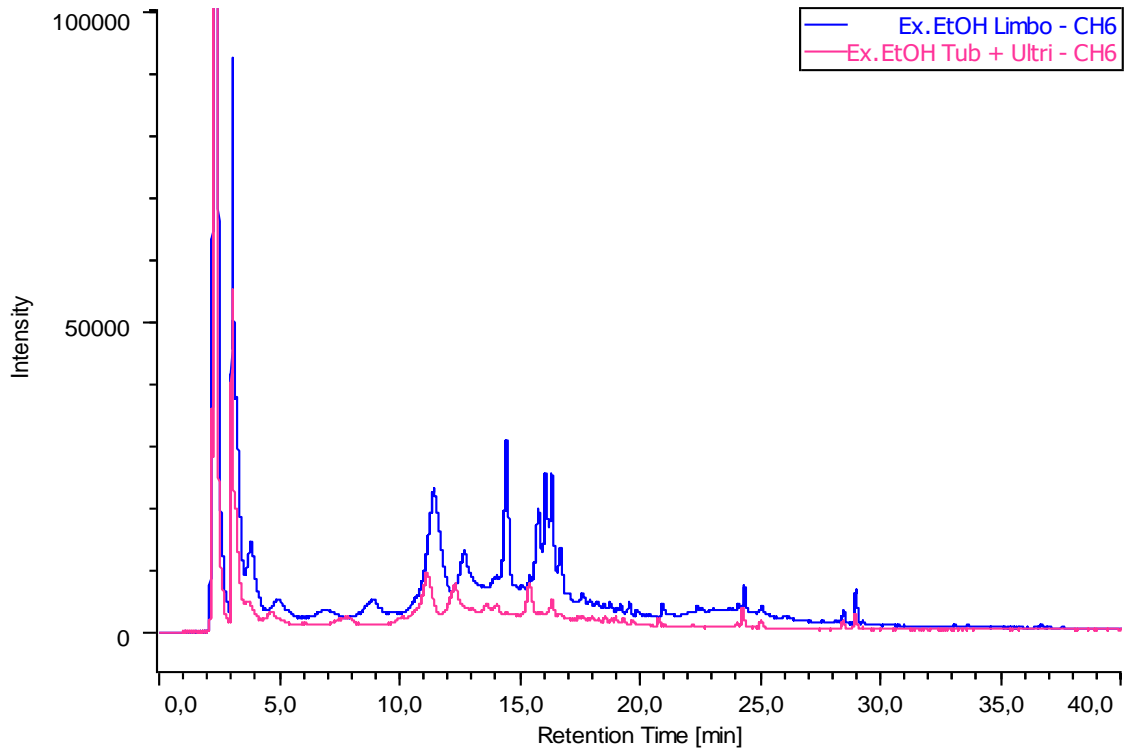


APÊNDICE B - Espectro de RMN de ¹H do extrato etanólico do tubo + utrículo de flores de *A. gigantea* (DMSO-*d*₆, 14,1 T).

Tubo+Utrículo_EtOH

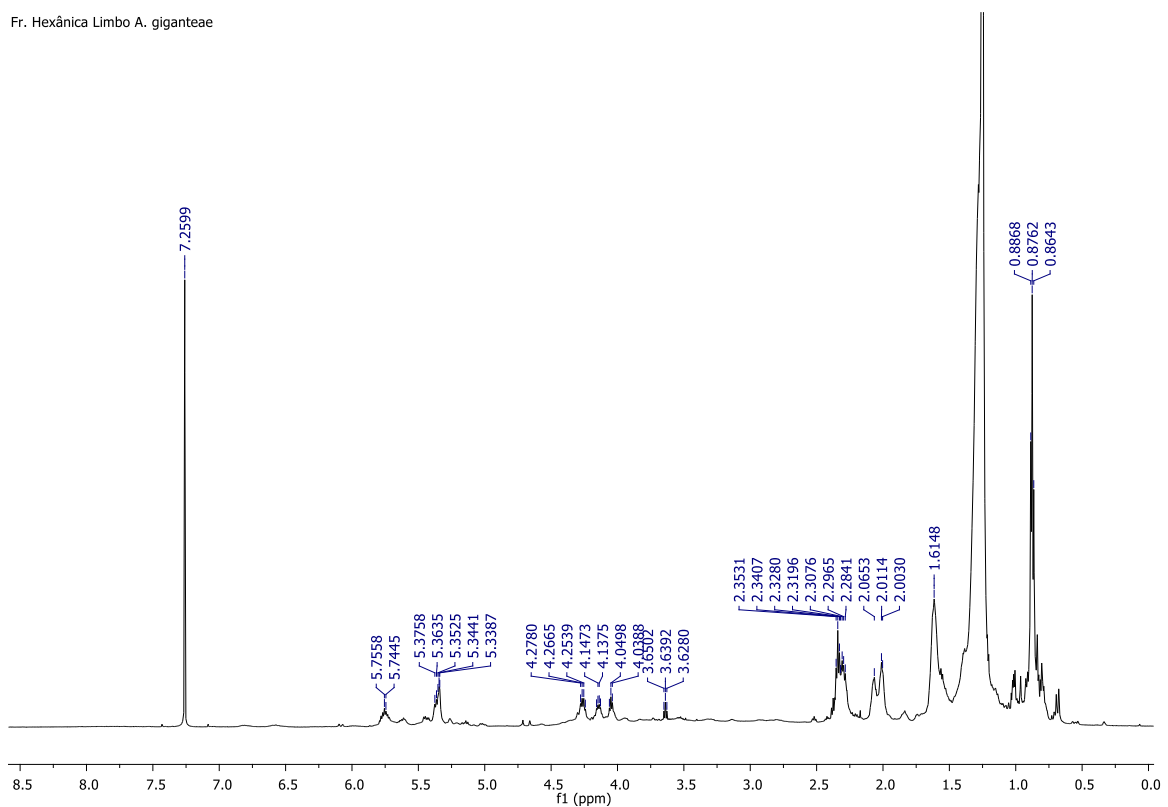


APÊNDICE C - Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos do limbo e tubo + utrículo em CLAE. Condições: Coluna Zorbax RX-C18 (Agilent®, 4,6 × 250 mm, 5 µm), FM 5 → 100 % ACN em 40 min com 0,05% de TFA, vazão 1,0 mL/min, $\lambda = 274$ nm.



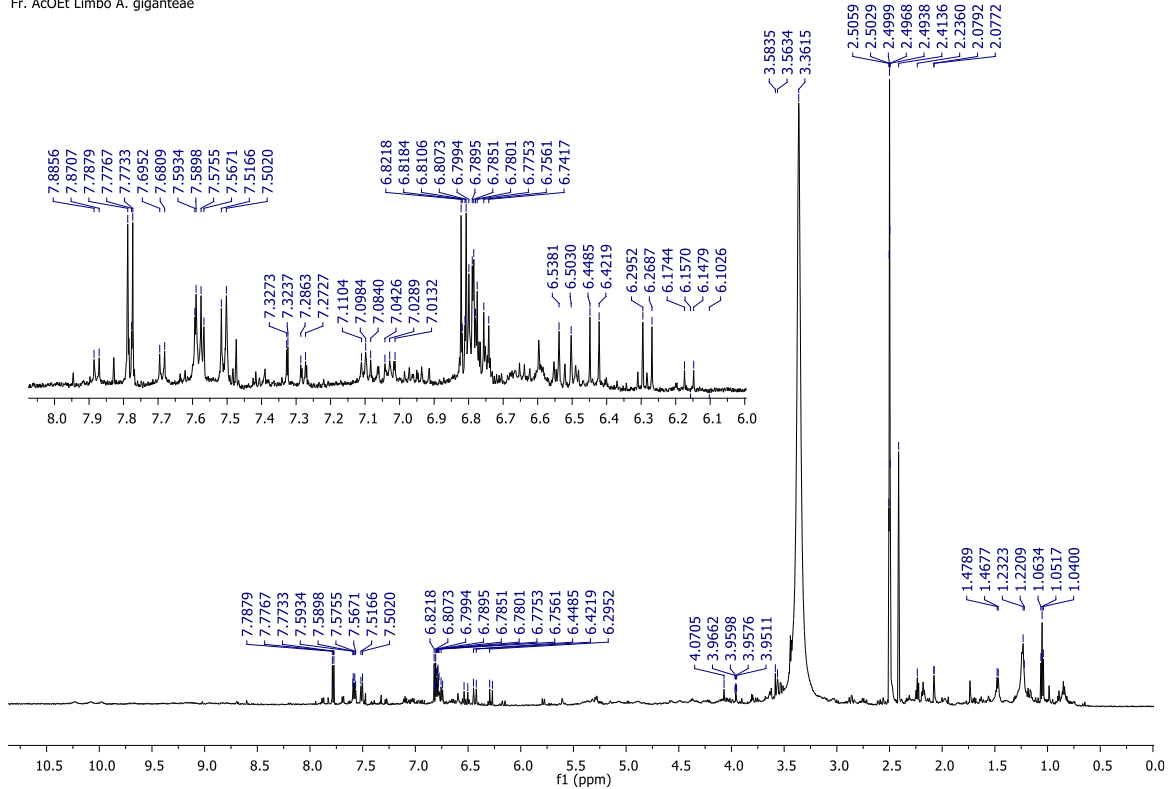
APÊNDICE D - Espectro de RMN de ^1H da fração hexânica do limbo de flores de *A. gigantea* (CDCl_3 , 14,1 T).

Fr. Hexânica Limbo *A. gigantea*

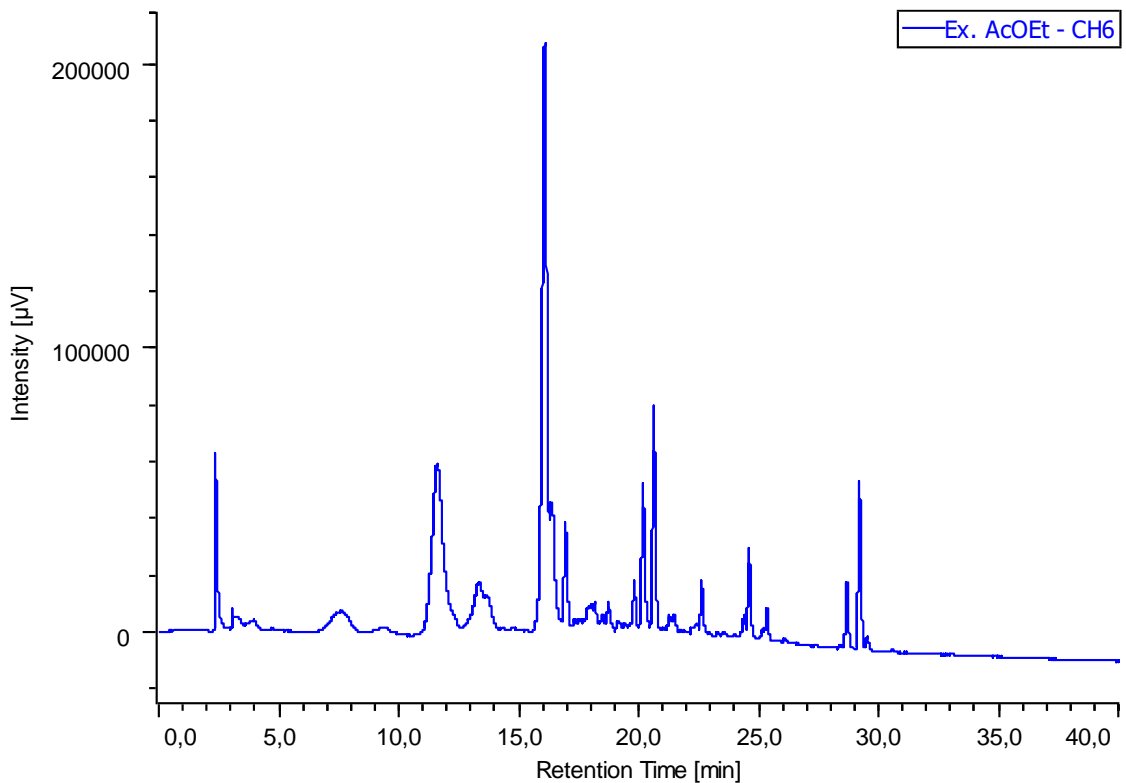


APÊNDICE E - Espectro de RMN de ^1H da fração AcOEt do limbo de flores de *A. gigantea* (DMSO- d_6 , 14,1 T).

Fr. AcOEt Limbo *A. gigantea*

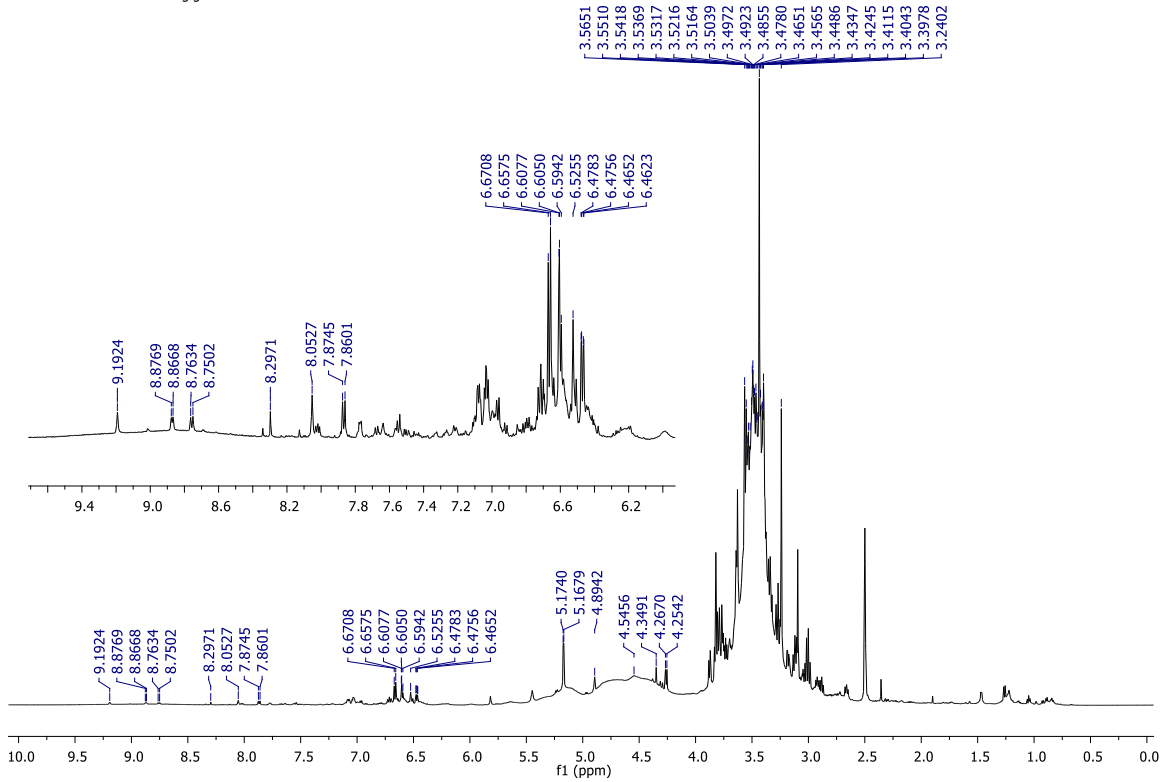


APÊNDICE F - Perfil cromatográfico da fração AcOEt do limbo em CLAE. Condições: Coluna Zorbax RX-C18 (Agilent®, 4,6 × 250 mm, 5 μm), FM 5 \rightarrow 100 % ACN em 40 min com 0,05% de TFA, vazão 1,0 mL/min, $\lambda = 274$ nm.

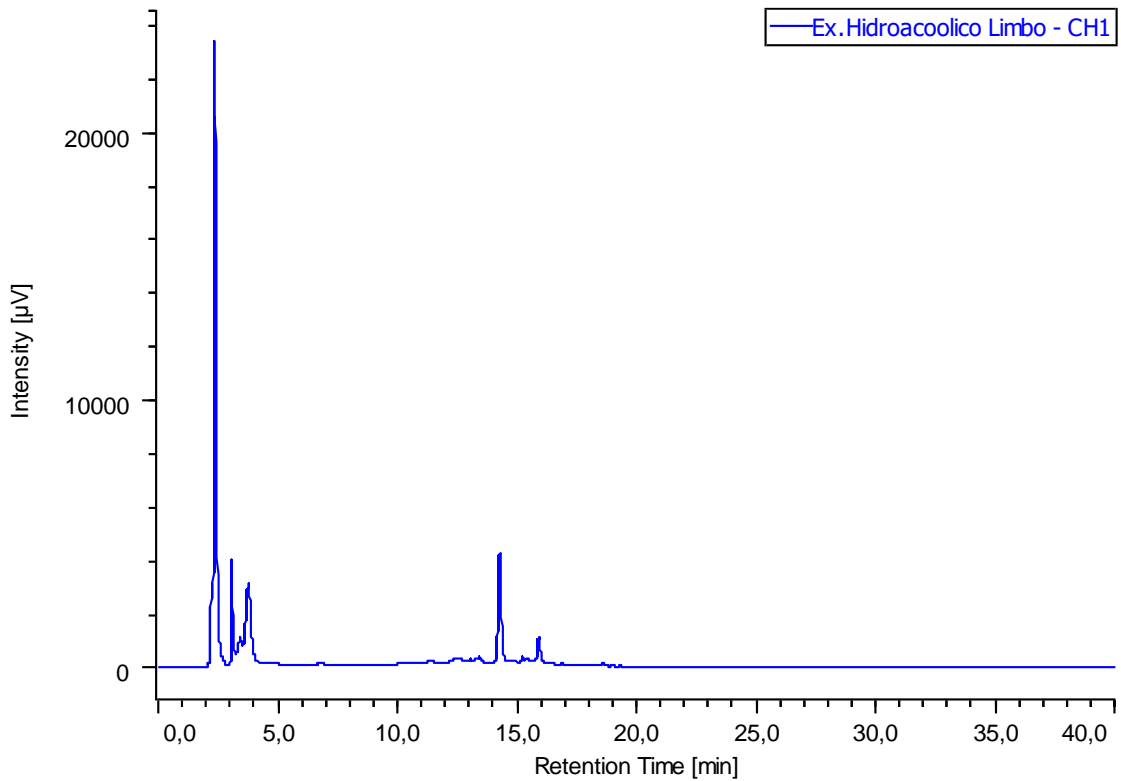


APÊNDICE G - Espectro de RMN de ¹H da fração hidroalcoólica do limbo de flores de *A. gigantea* (DMSO-d₆, 14,1 T).

Fr. Hidroalcoólica Limbo *A. gigantea*

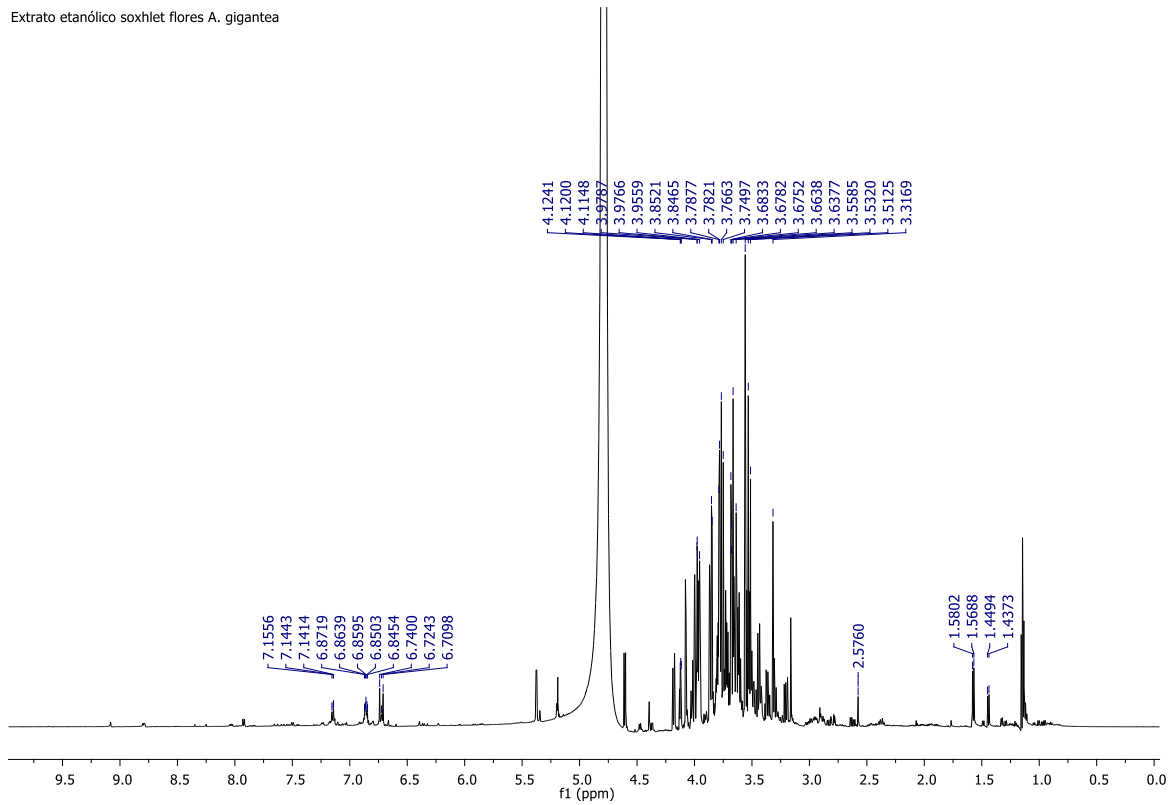


APÊNDICE H - Perfil cromatográfico da fração hidroalcoólica do limbo em CLAE. Condições: Coluna Zorbax RX-C18 (Agilent®, 4,6 × 250 mm, 5 µm), FM 5 → 100 % ACN em 40 min com 0,05% de TFA, vazão 1,0 mL/min, λ = 254 nm.

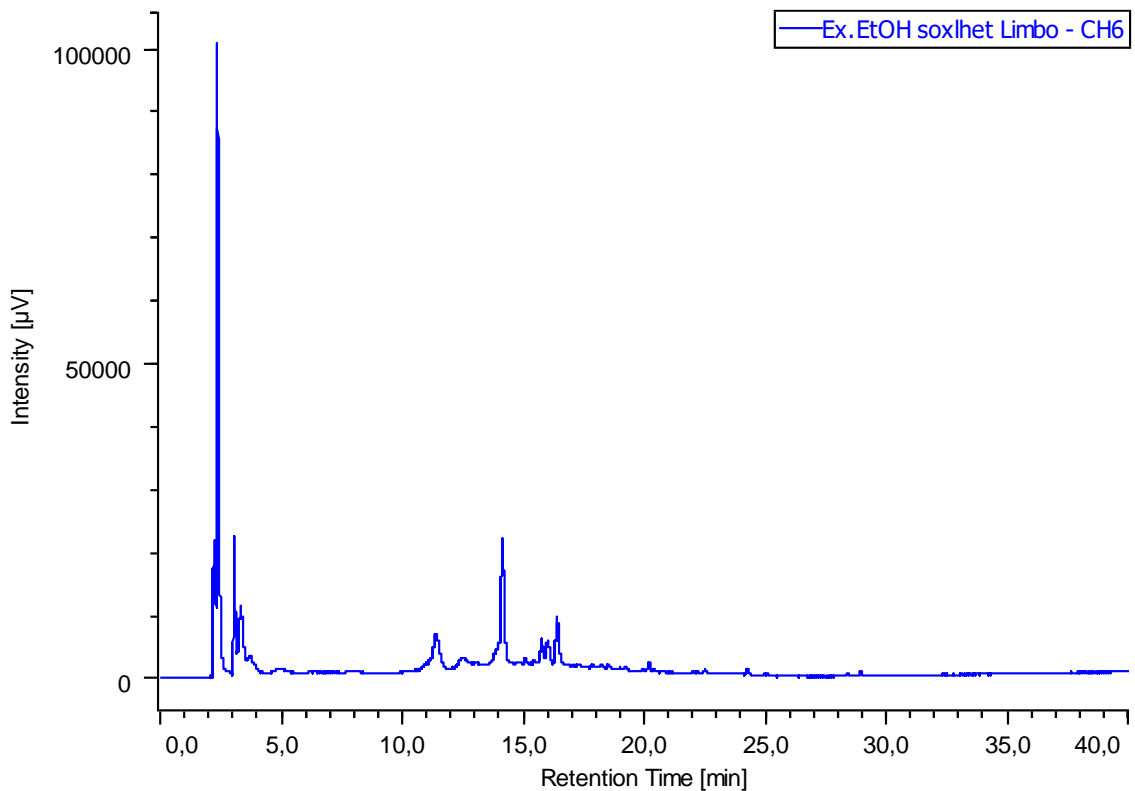


APÊNDICE I - Espectro de RMN de ^1H do extrato etanólico Soxhlet do limbo de *A. gigantea* (D_2O , 14,1 T).

Extrato etanólico soxhlet flores *A. gigantea*

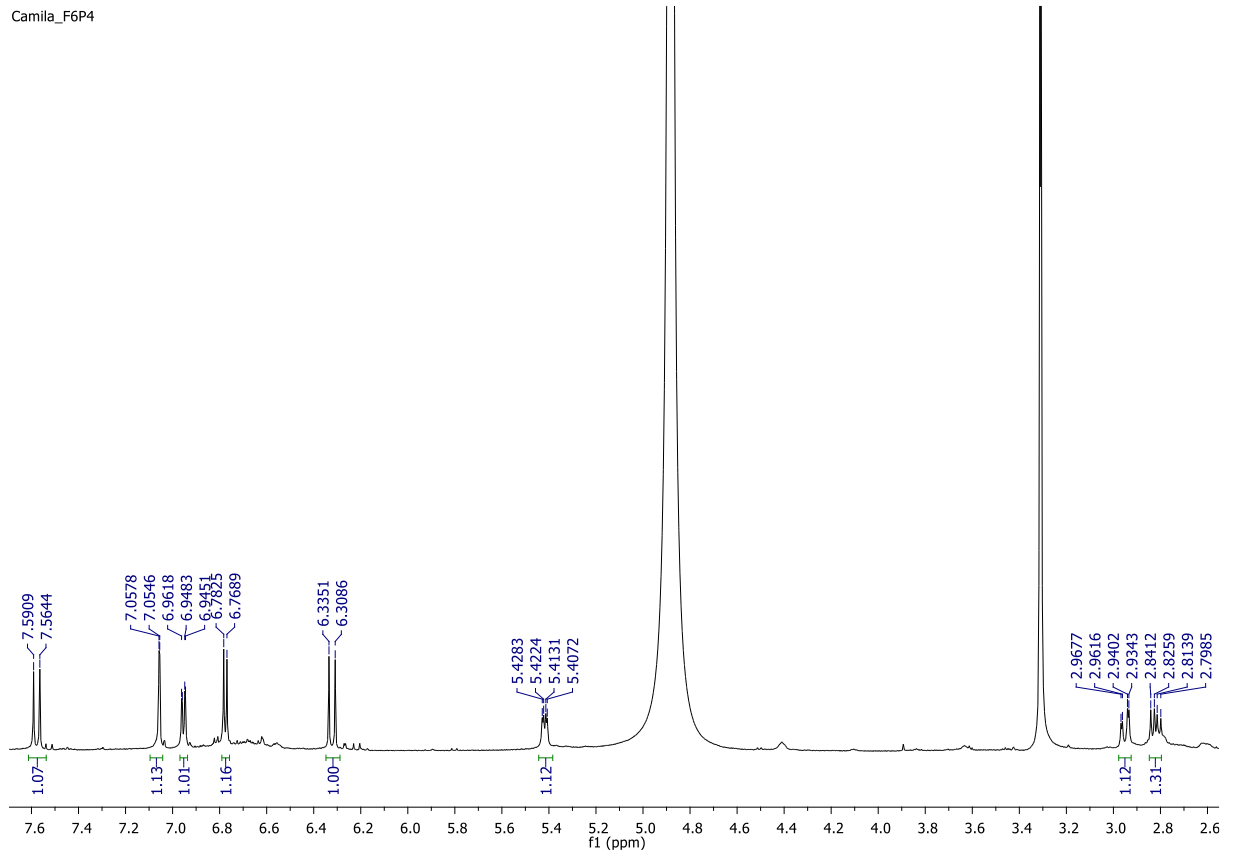


APÊNDICE J - Perfil cromatográfico do extrato etanólico Soxhlet do limbo. Condições: Coluna Zorbax RX-C18 (Agilent®, 4,6 × 250 mm, 5 μm), FM 5 → 100 % ACN em 40 min com 0,05% de TFA, vazão 1,0 mL/min, $\lambda = 274$ nm.



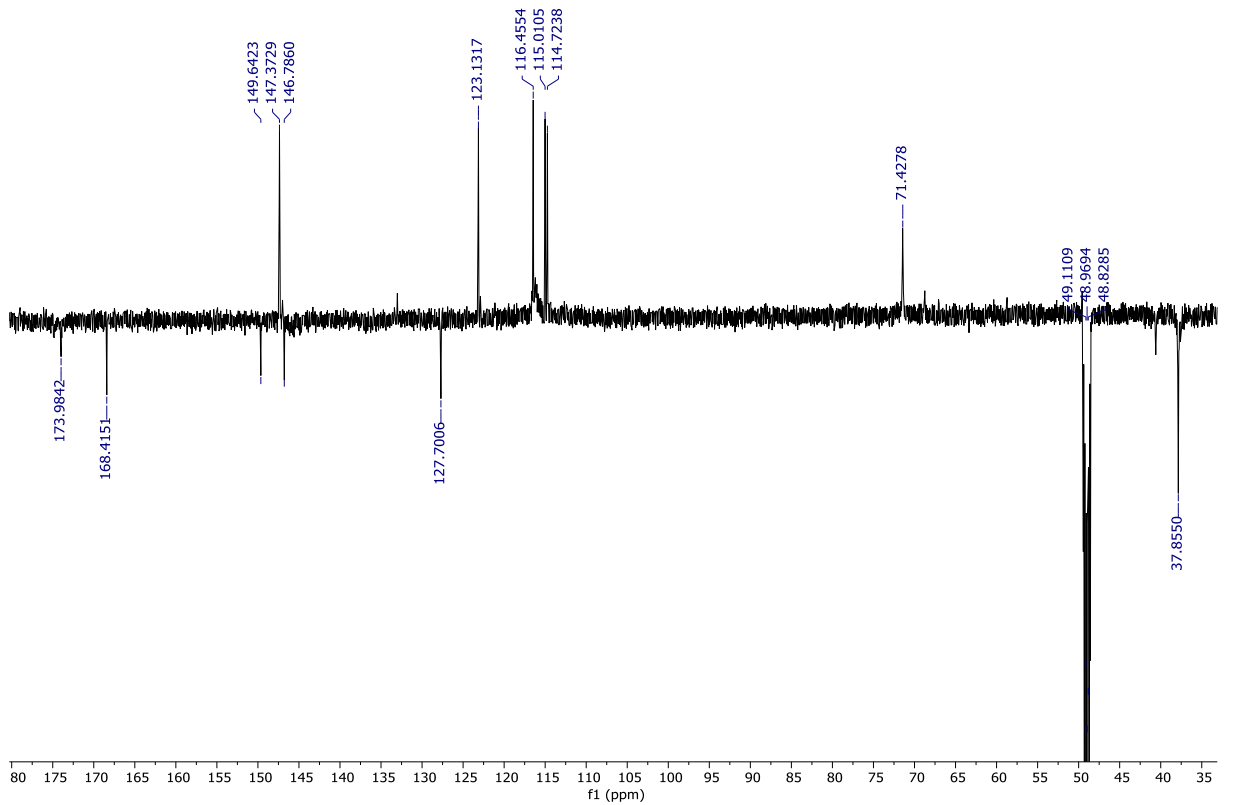
APÊNDICE K – Espectro de RMN de ¹H ampliado de I (CD₃OD, 14,1 T).

Camila_F6P4

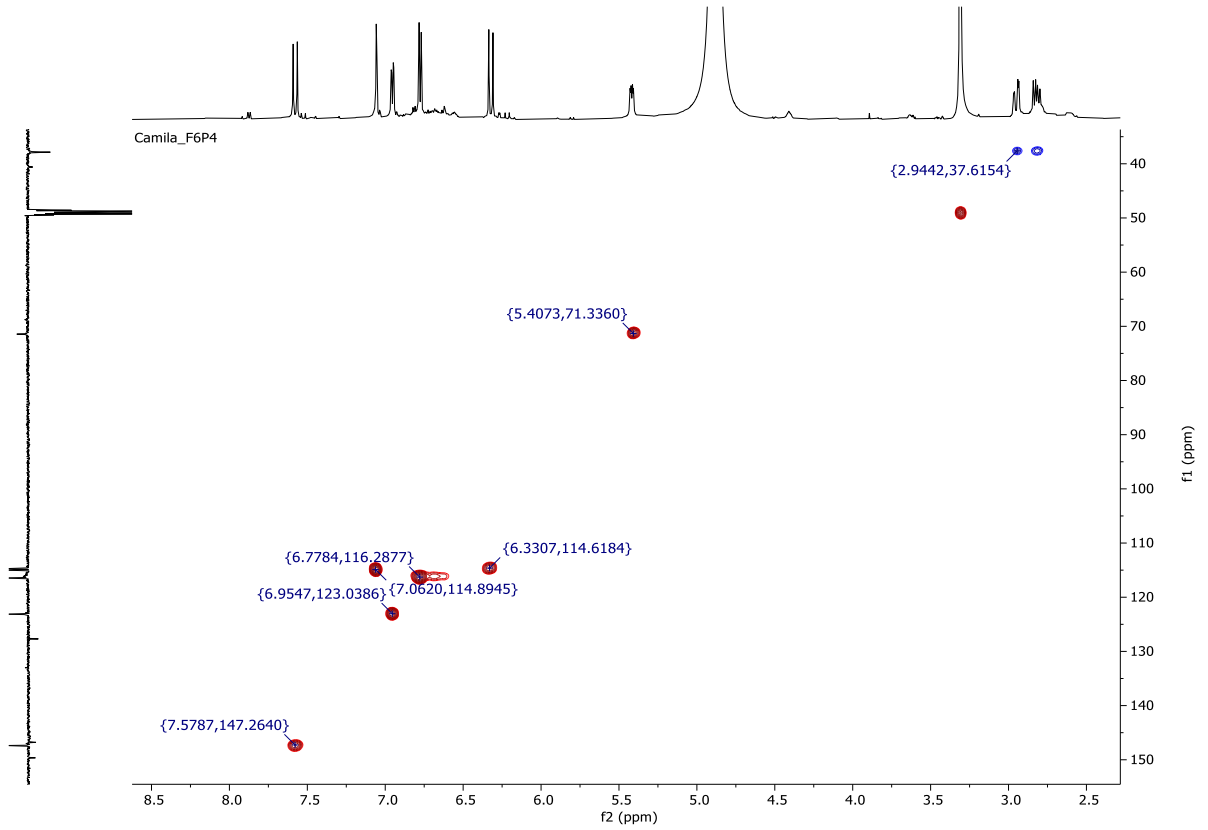


APÊNDICE L - Espectro de RMN de ¹³C (DEPTQ) de I (CD₃OD, 14,1 T).

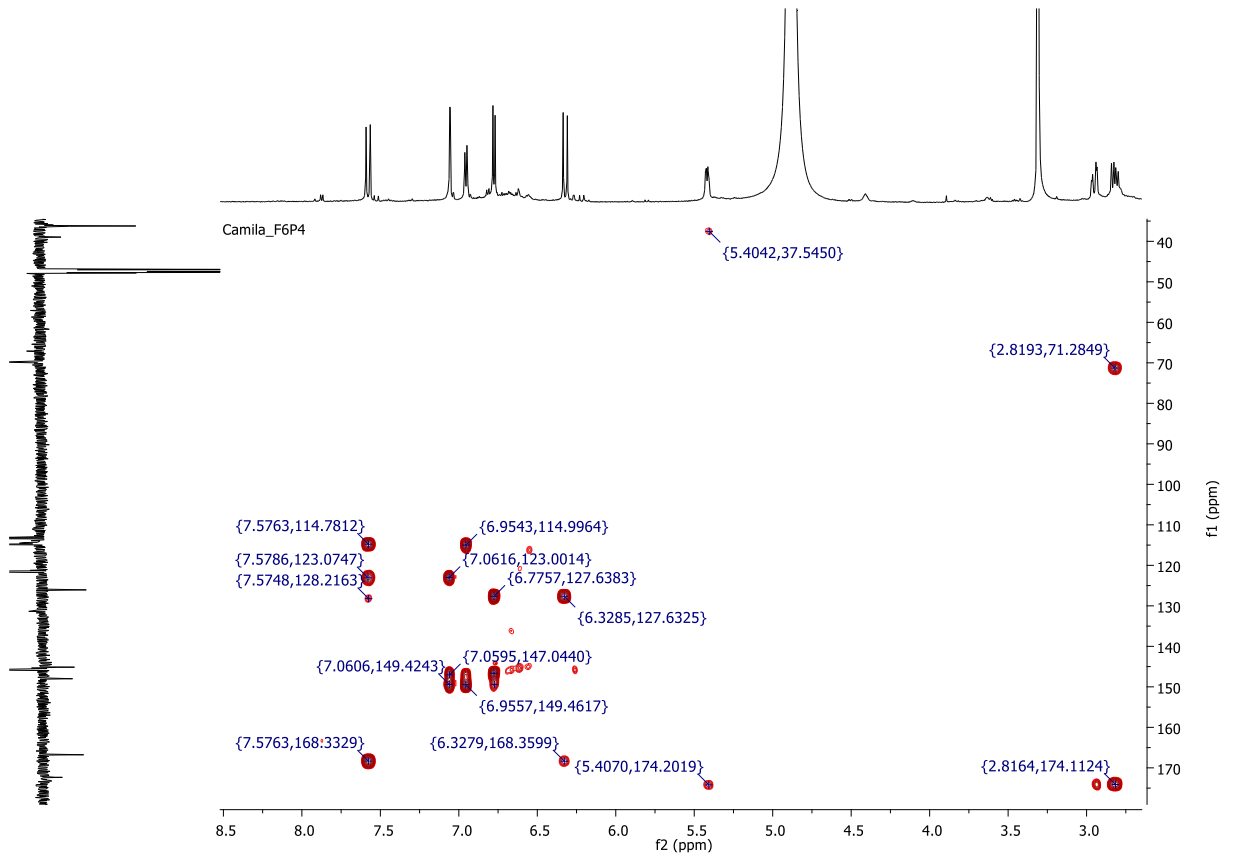
Camila_F6P4



APÊNDICE M - Mapa de contornos HSQC de I (CD₃OD, 14,1 T).

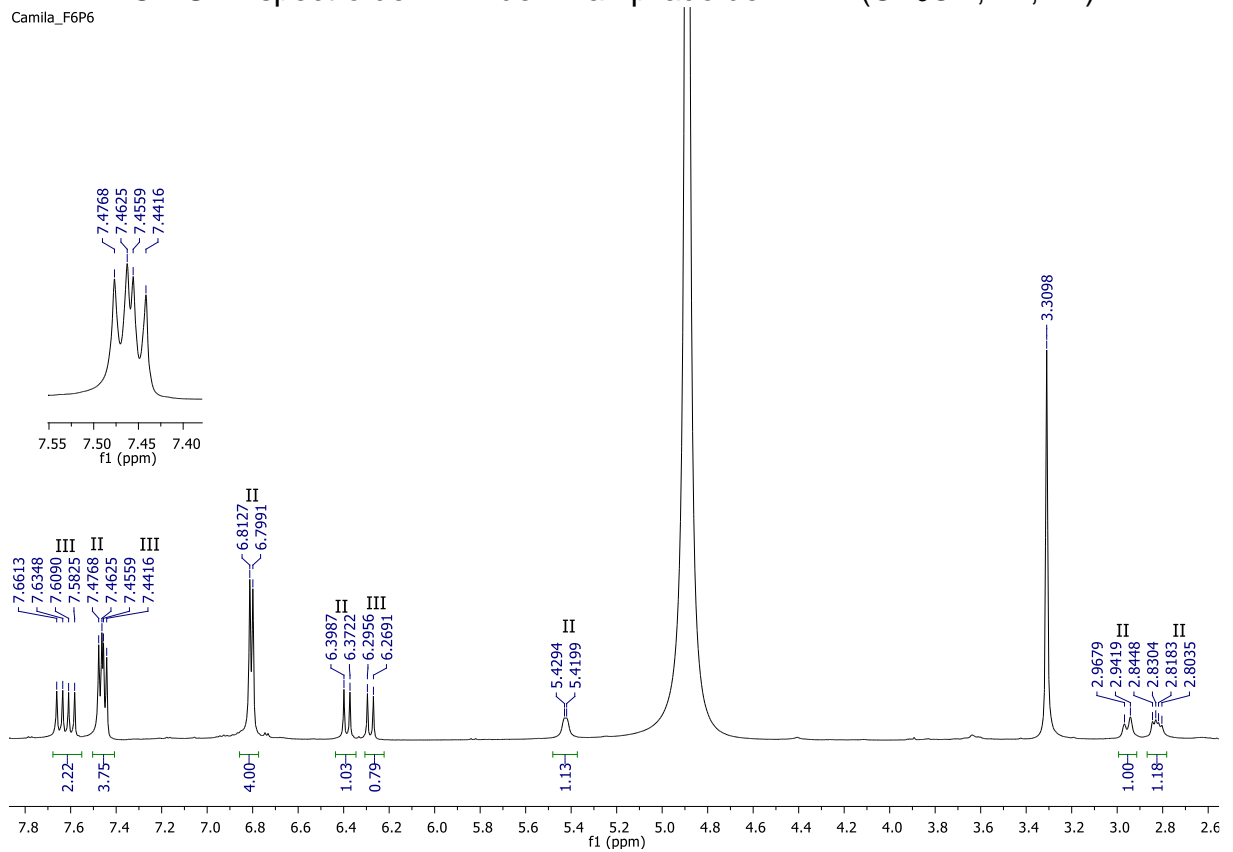


APÊNDICE N - Mapa de contornos HMBC de I (CD₃OD, 14,1 T).



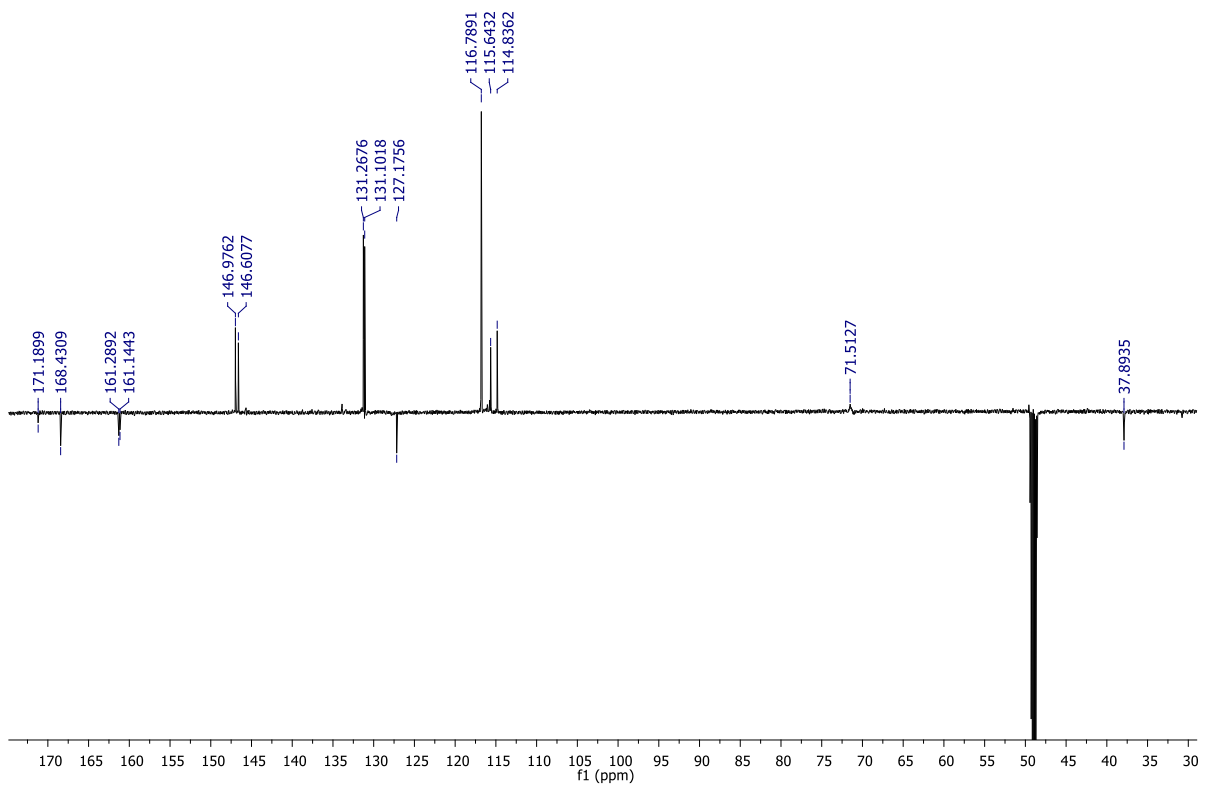
APÊNDICE O - Espectro de RMN de ^1H ampliado de **II** + **III** (CD_3OD , 14,1 T).

Camila_F6P6

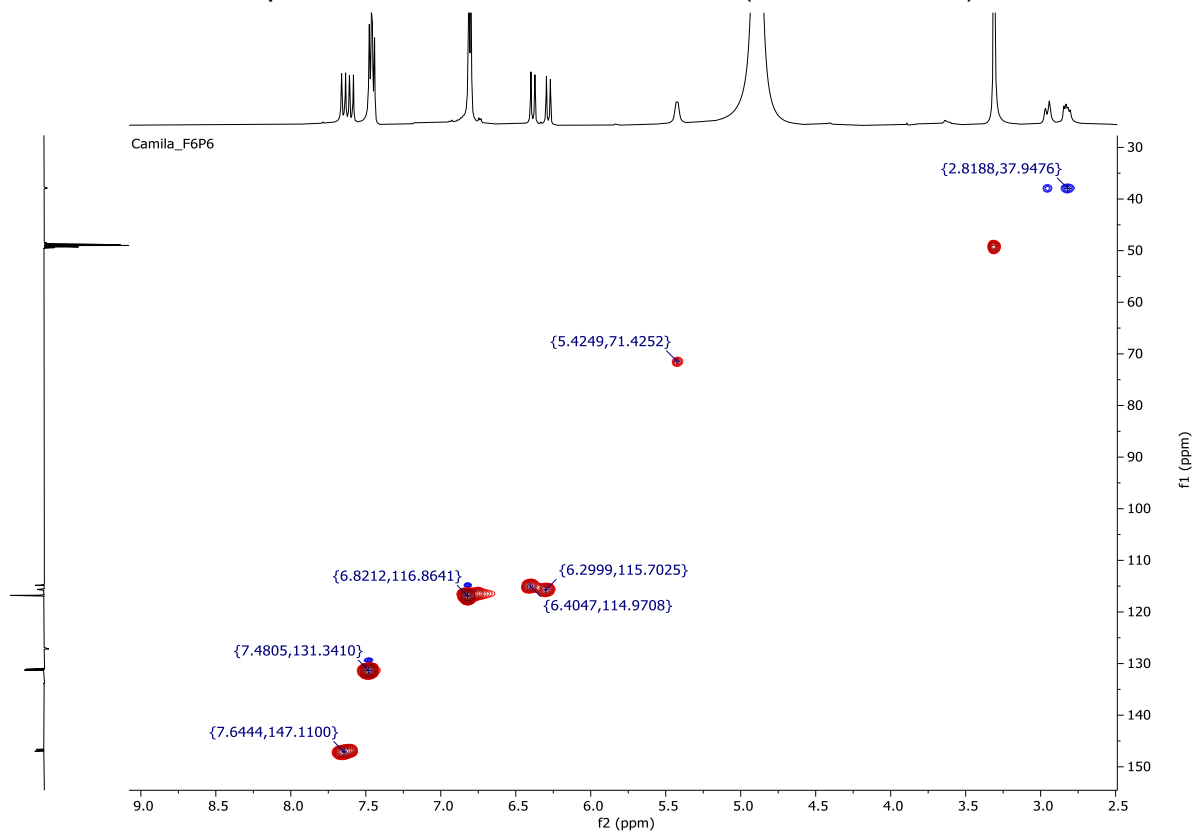


APÊNDICE P - Espectro de RMN de ^{13}C NMR (DEPTQ) de **II** + **III** (CD_3OD , 14,1 T).

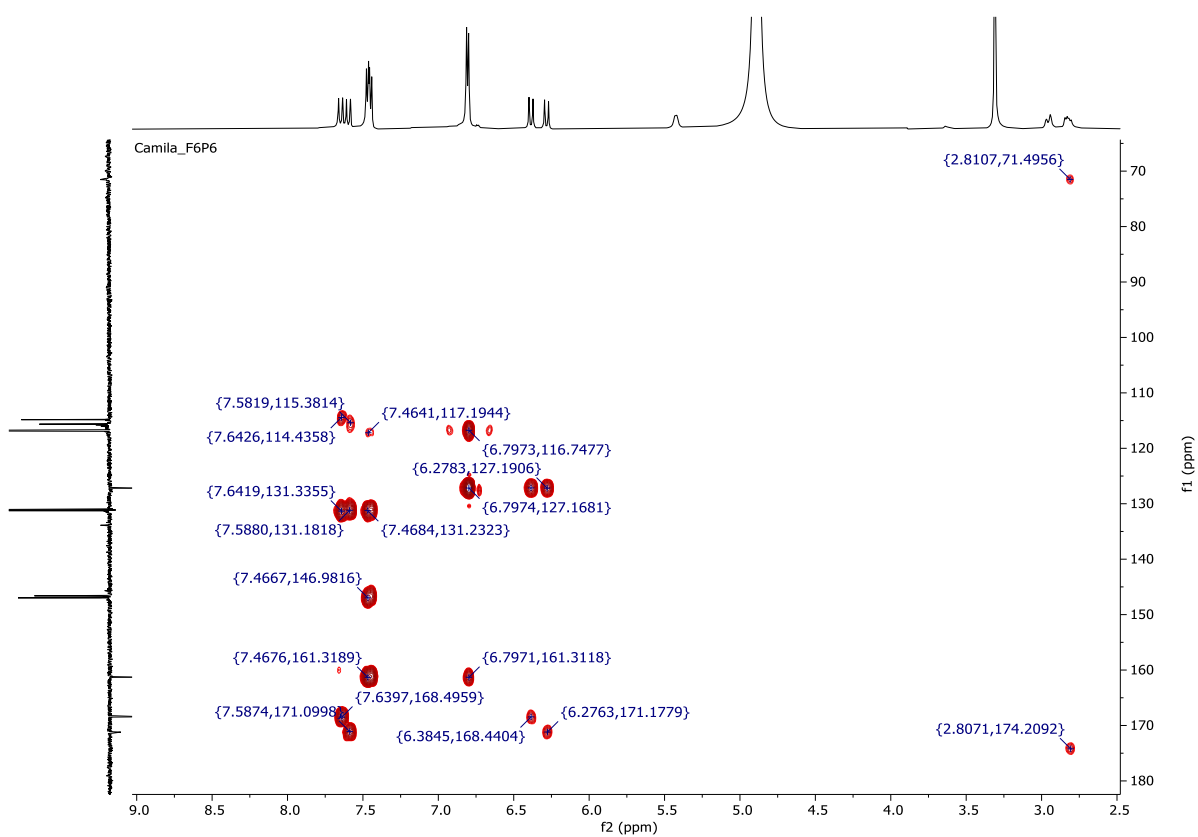
Camila_F6P6



APÊNDICE Q - Mapa de contornos HSQC de II + III (CD₃OD, 14,1 T).

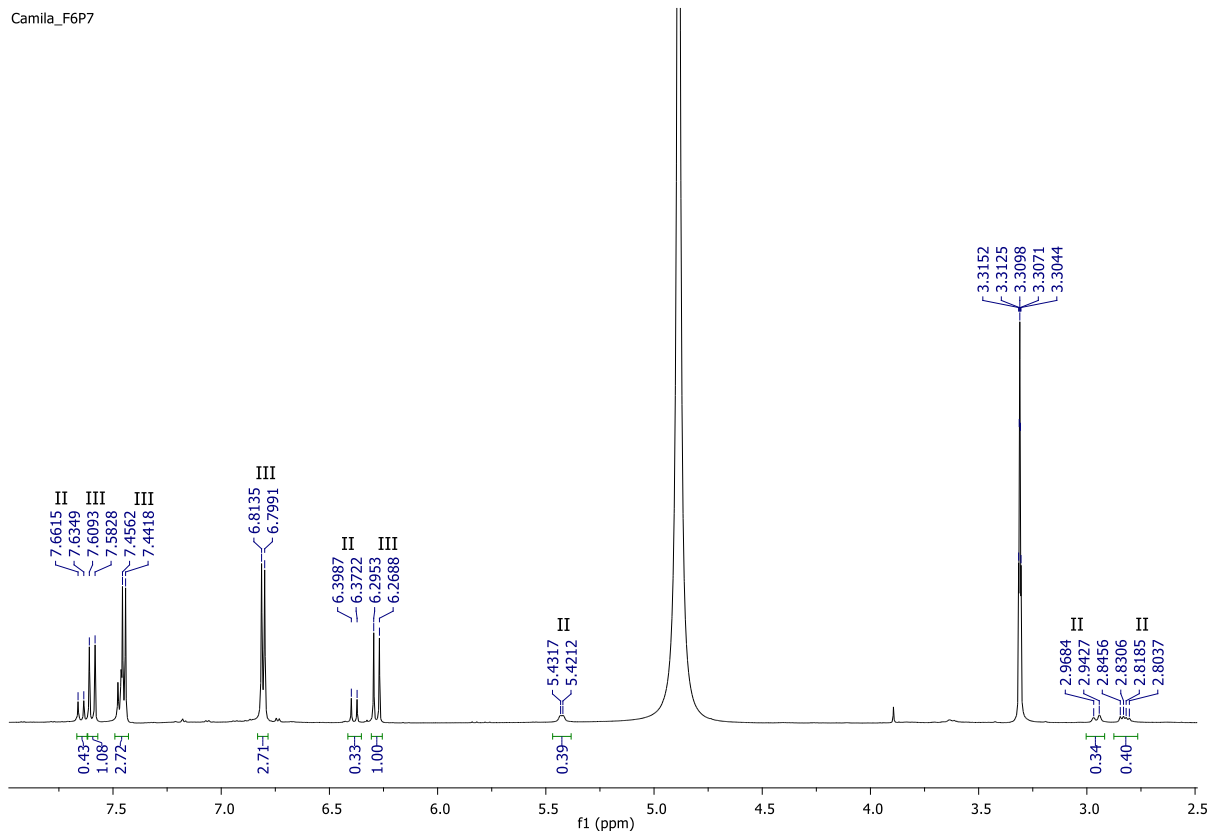


APÊNDICE R - Mapa de contornos HMBC de II + III (CD₃OD, 14,1 T).



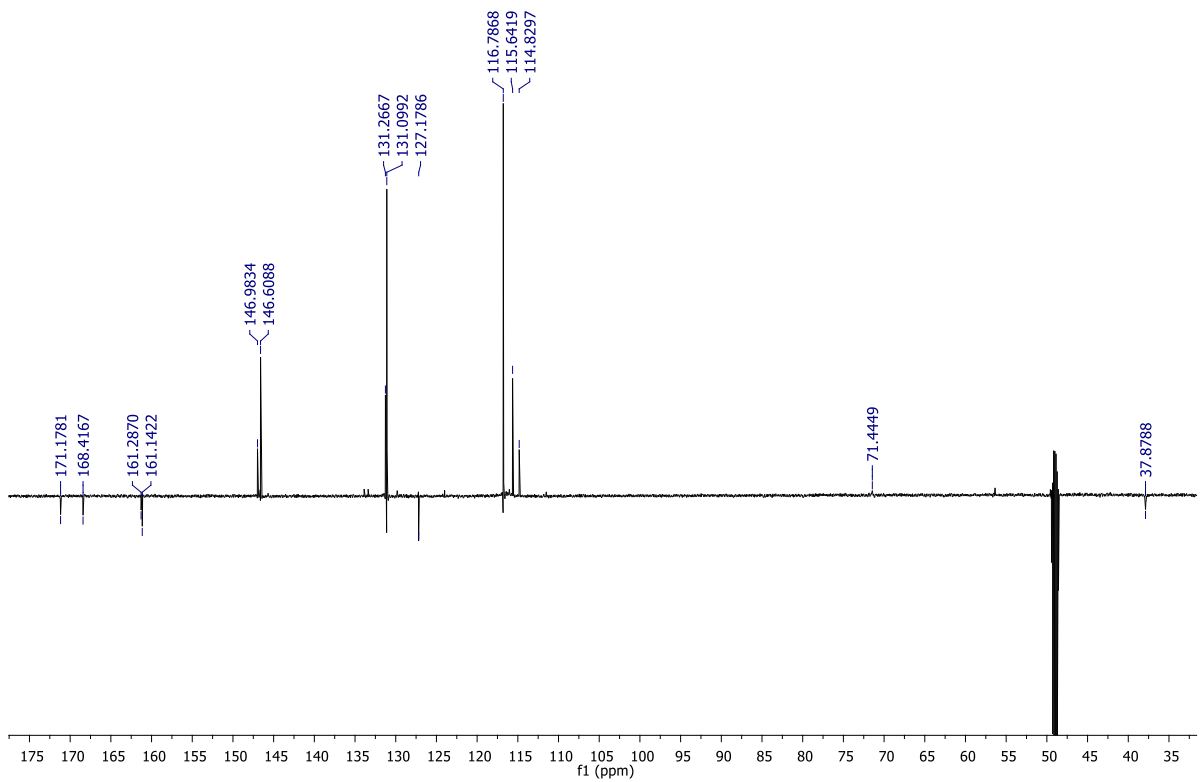
APÊNDICE S - Espectro de RMN de ¹H de III + II (CD₃OD, 14,1 T).

Camila_F6P7

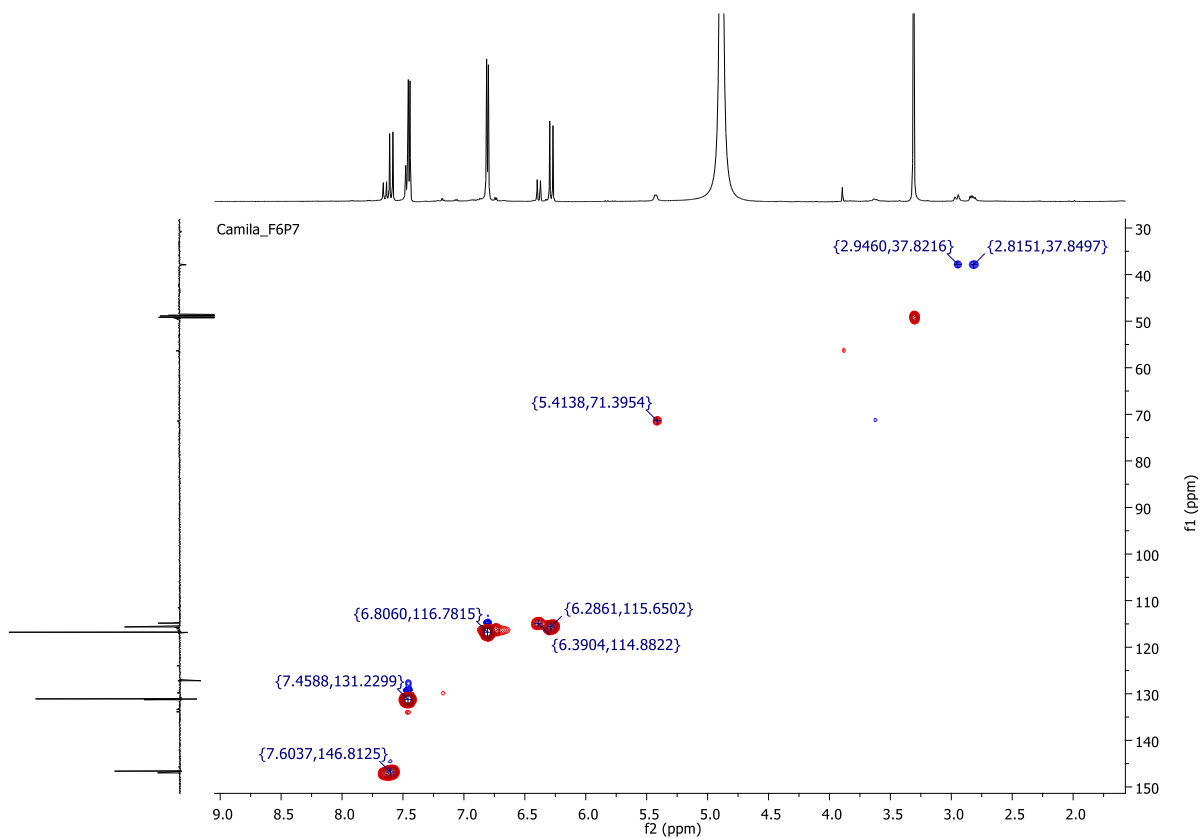


APÊNDICE T - Espectro de RMN de ¹³C NMR (DEPTQ) de III + II (CD₃OD, 14,1 T).

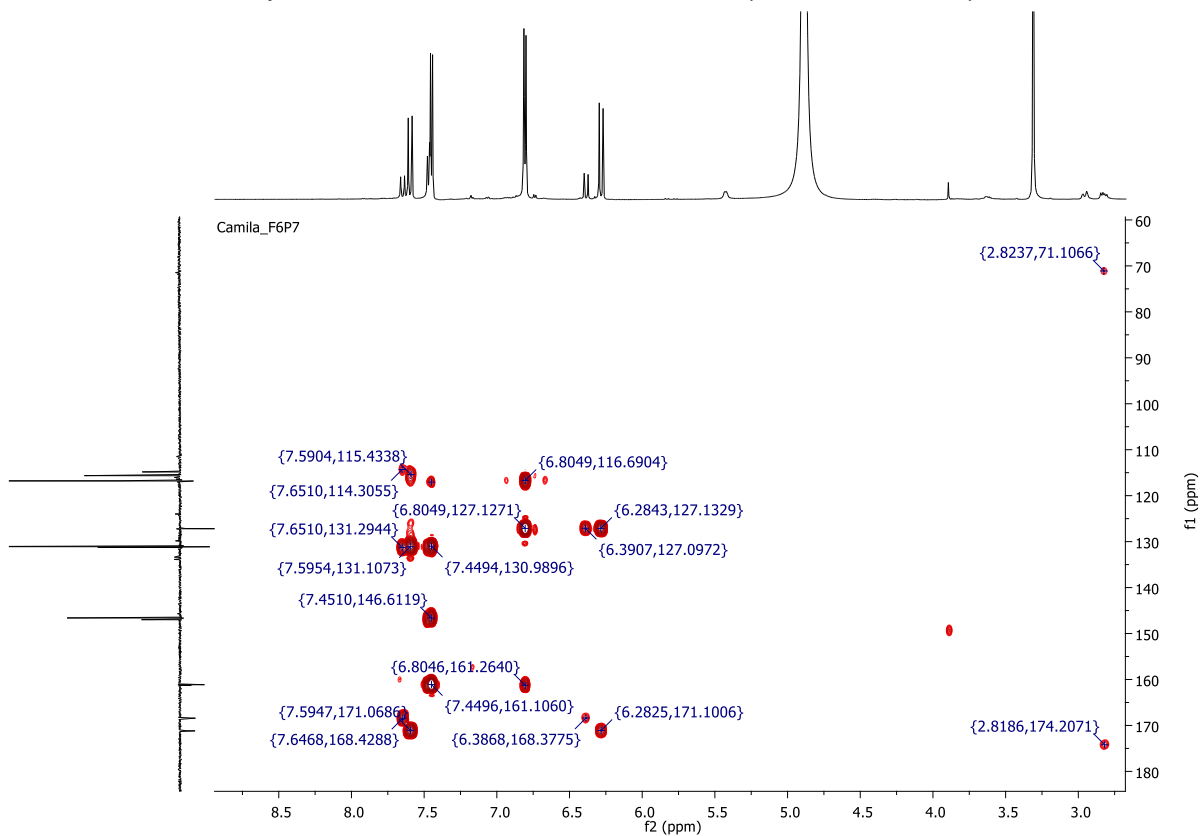
Camila_F6P7



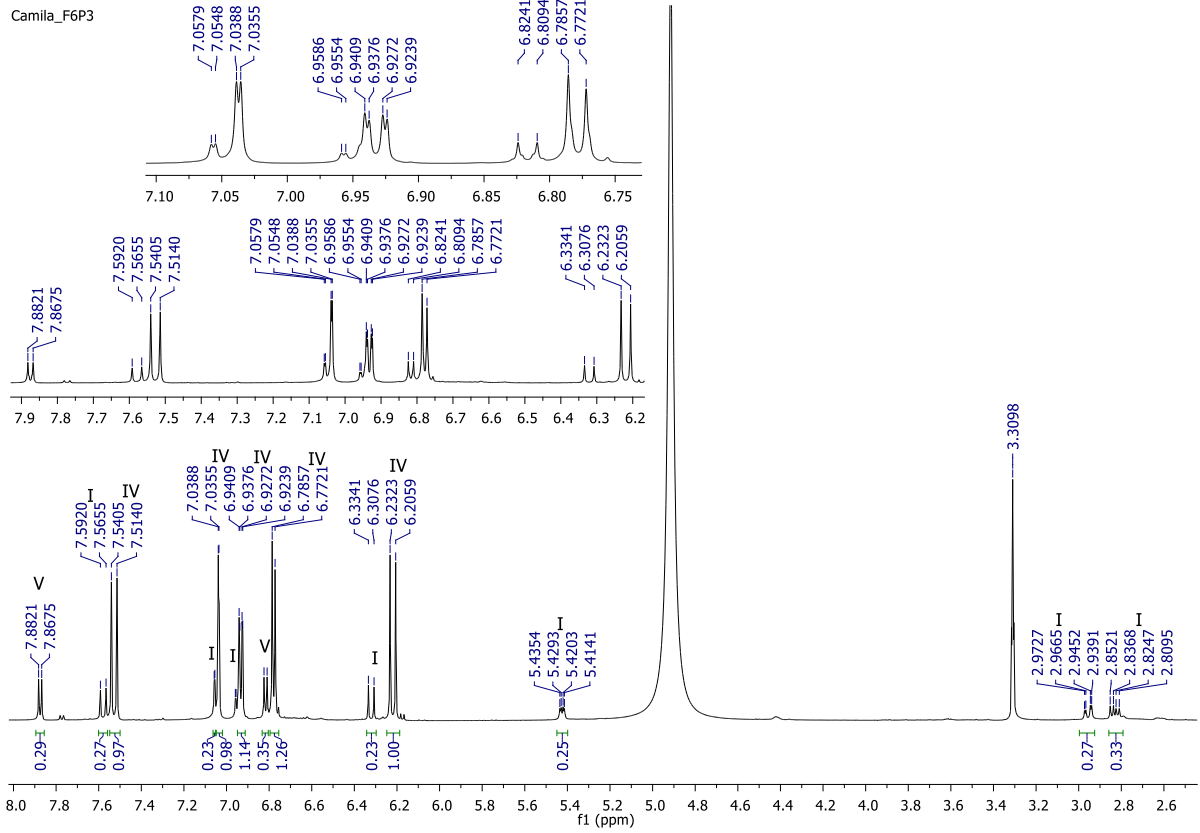
APÊNDICE U - Mapa de contornos HSQC de III + II (CD₃OD, 14,1 T).



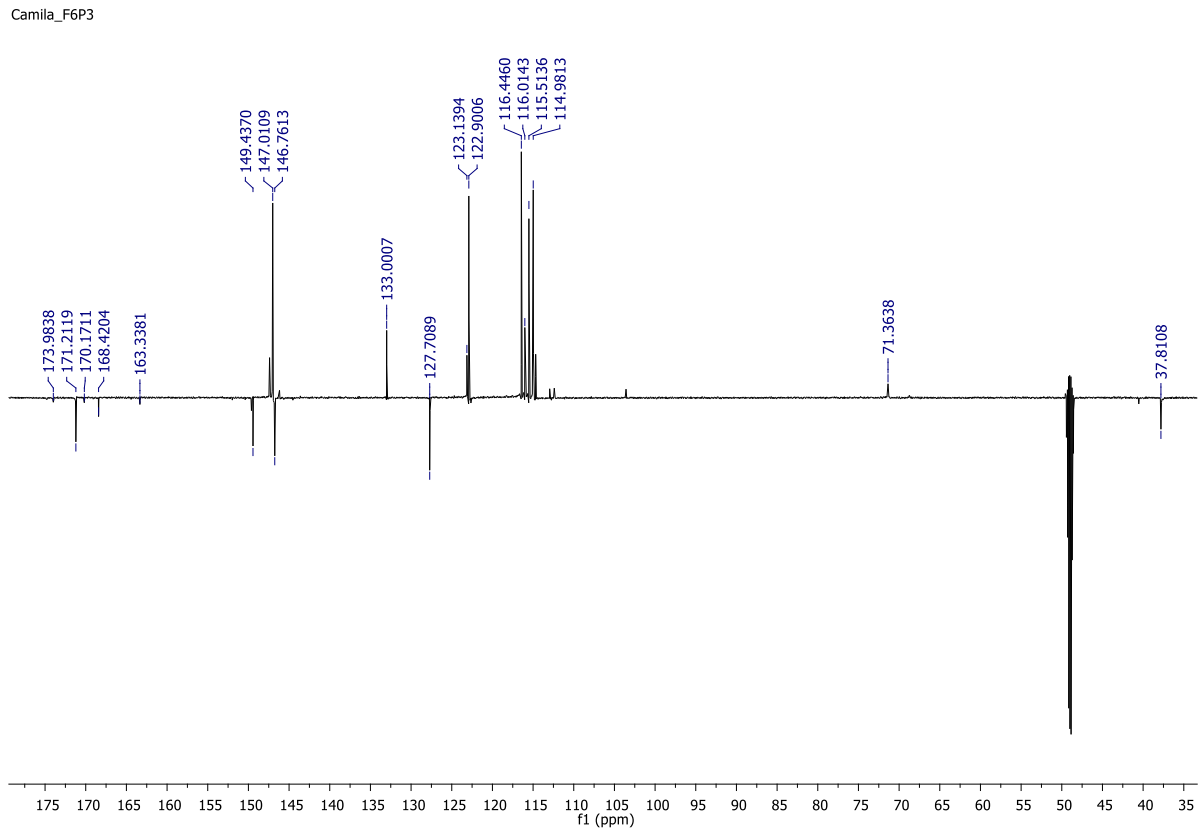
APÊNDICE V - Mapa de contornos HMBC de III + II (CD₃OD, 14,1 T).



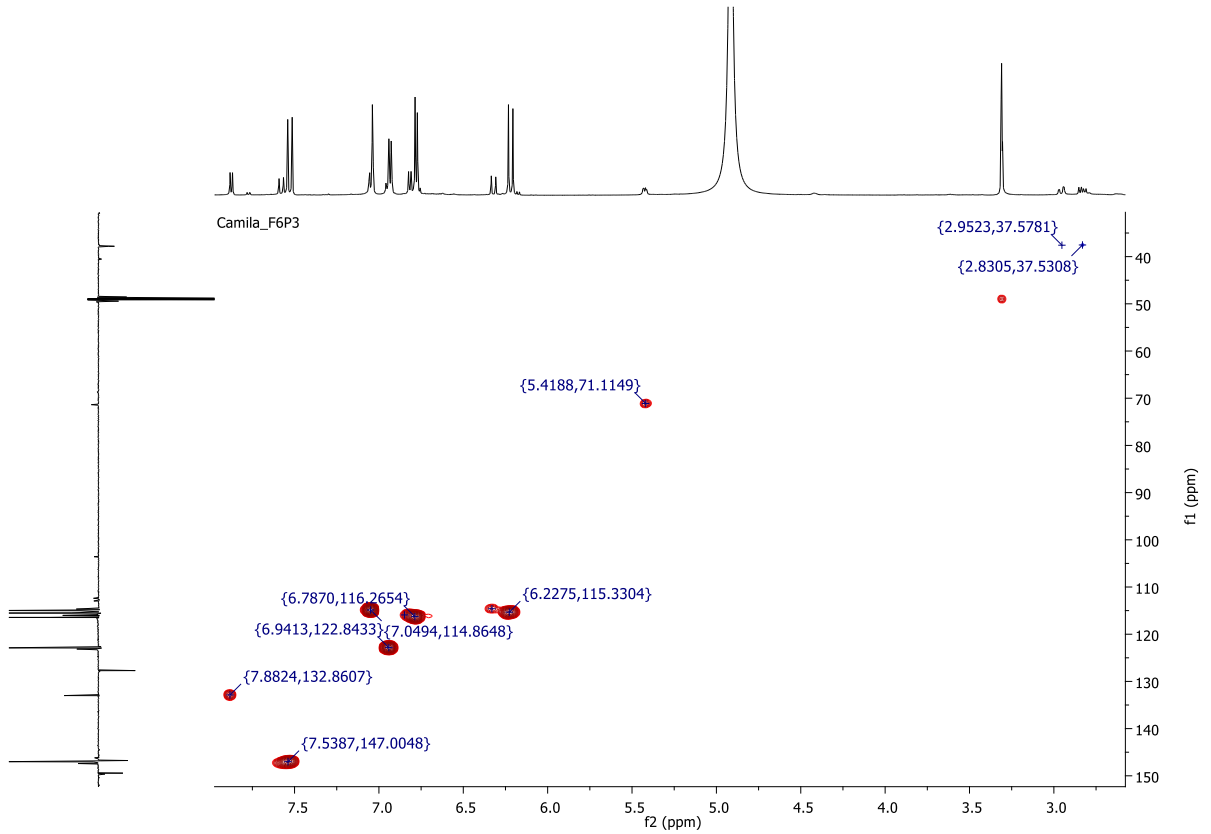
APÊNDICE W - Espectro de RMN de ¹H de IV + I + V (CD₃OD, 14,1 T).



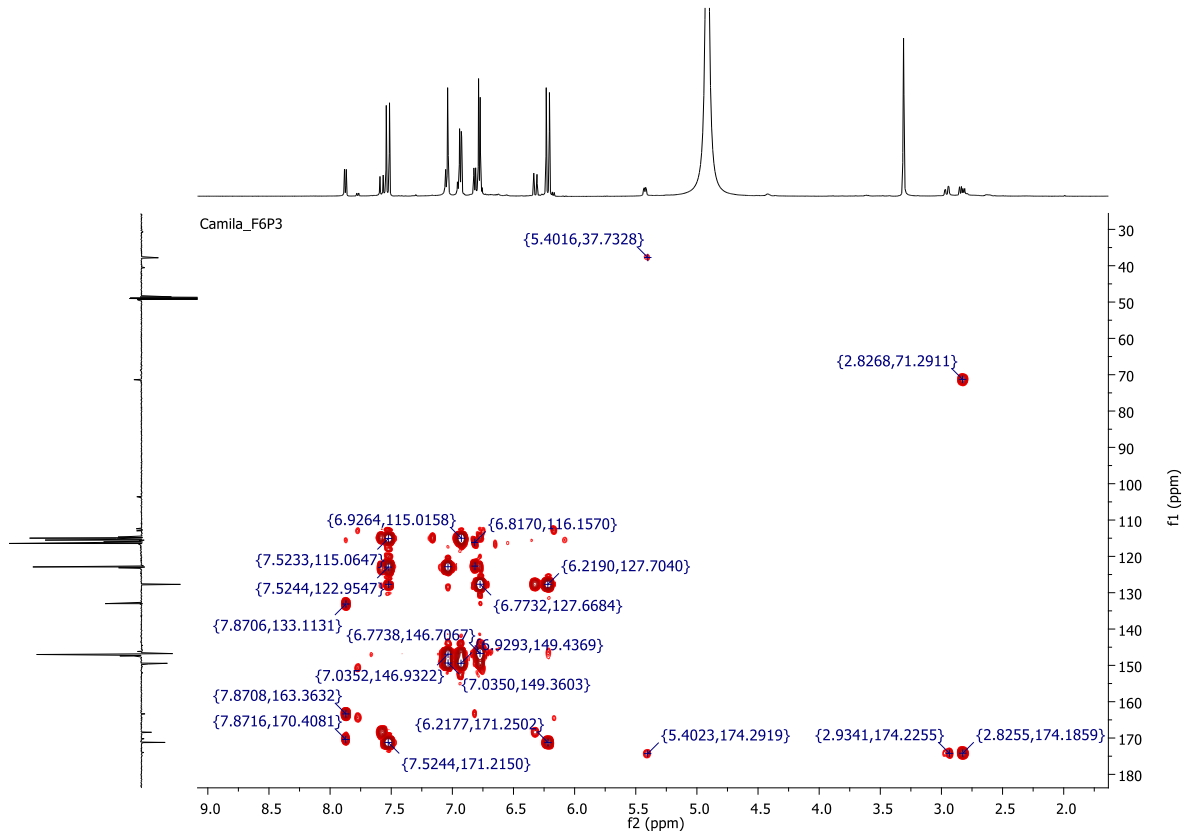
APÊNDICE X - Espectro de RMN de ¹³C NMR (DEPTQ) de IV + I + V (CD₃OD, 14,1 T).



APÊNDICE Y - Mapa de contornos HSQC de IV + I + V (CD₃OD, 14,1 T).

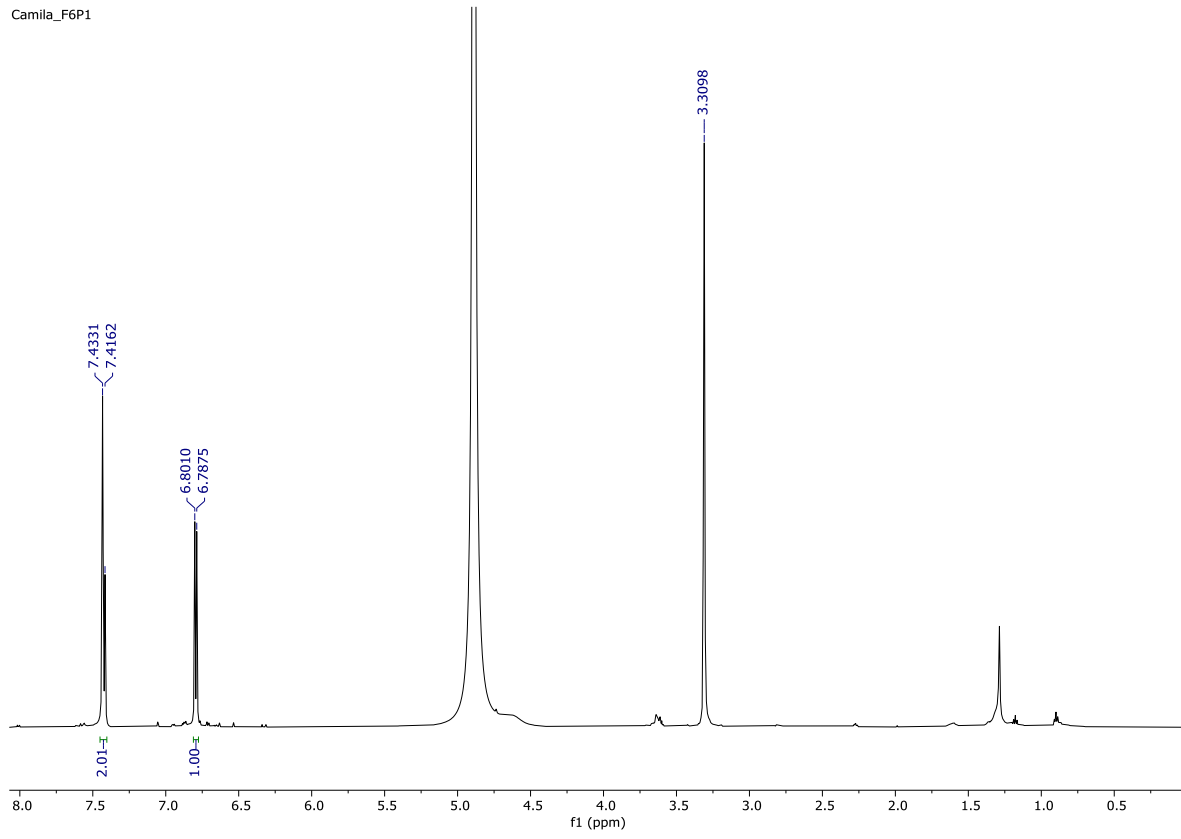


APÊNDICE Z - Mapa de contornos HMBC de IV + I + V (CD₃OD, 14,1 T).

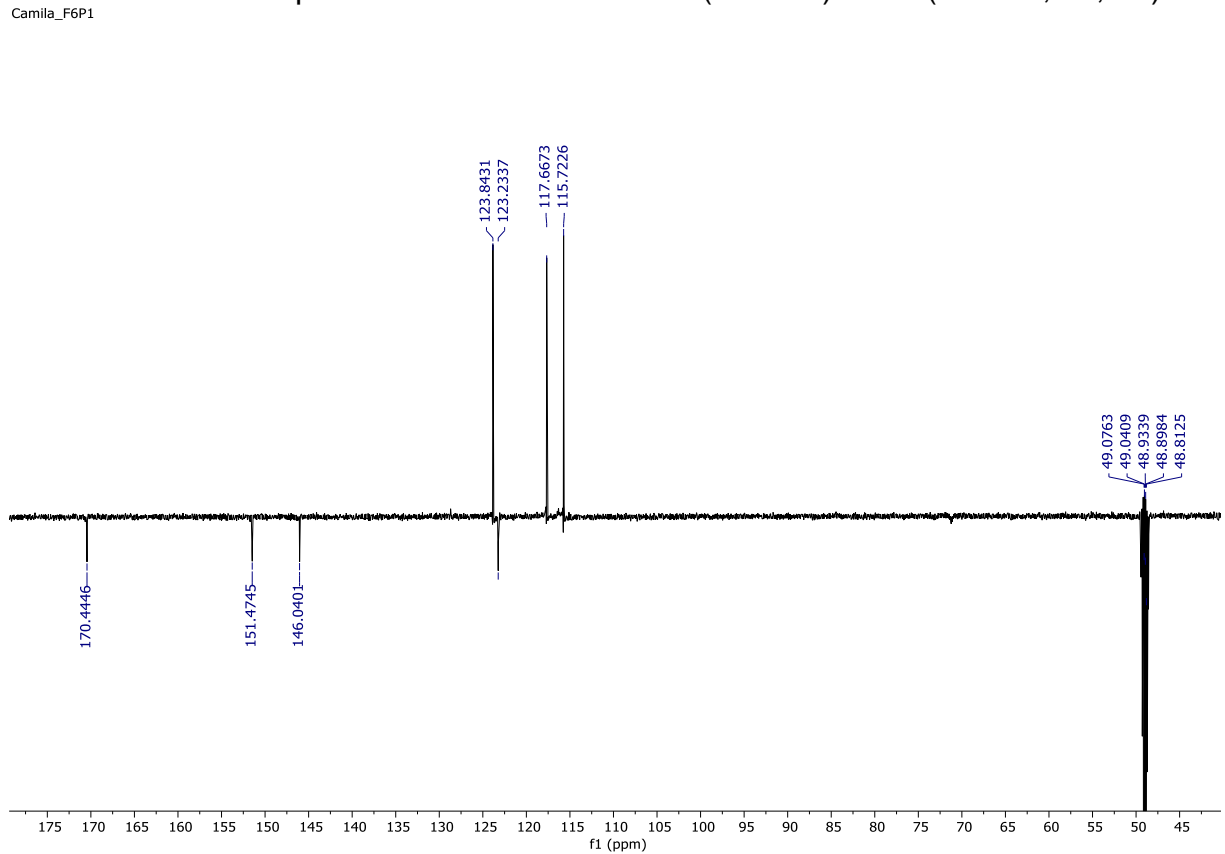


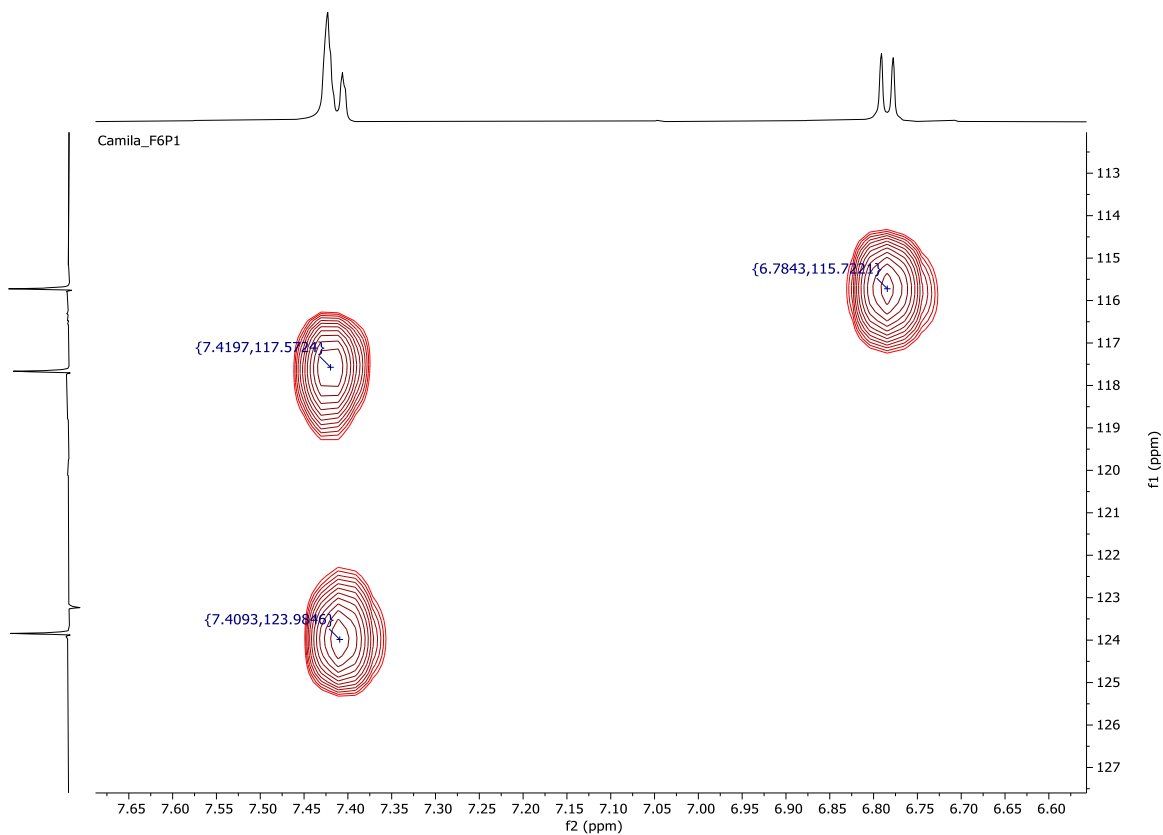
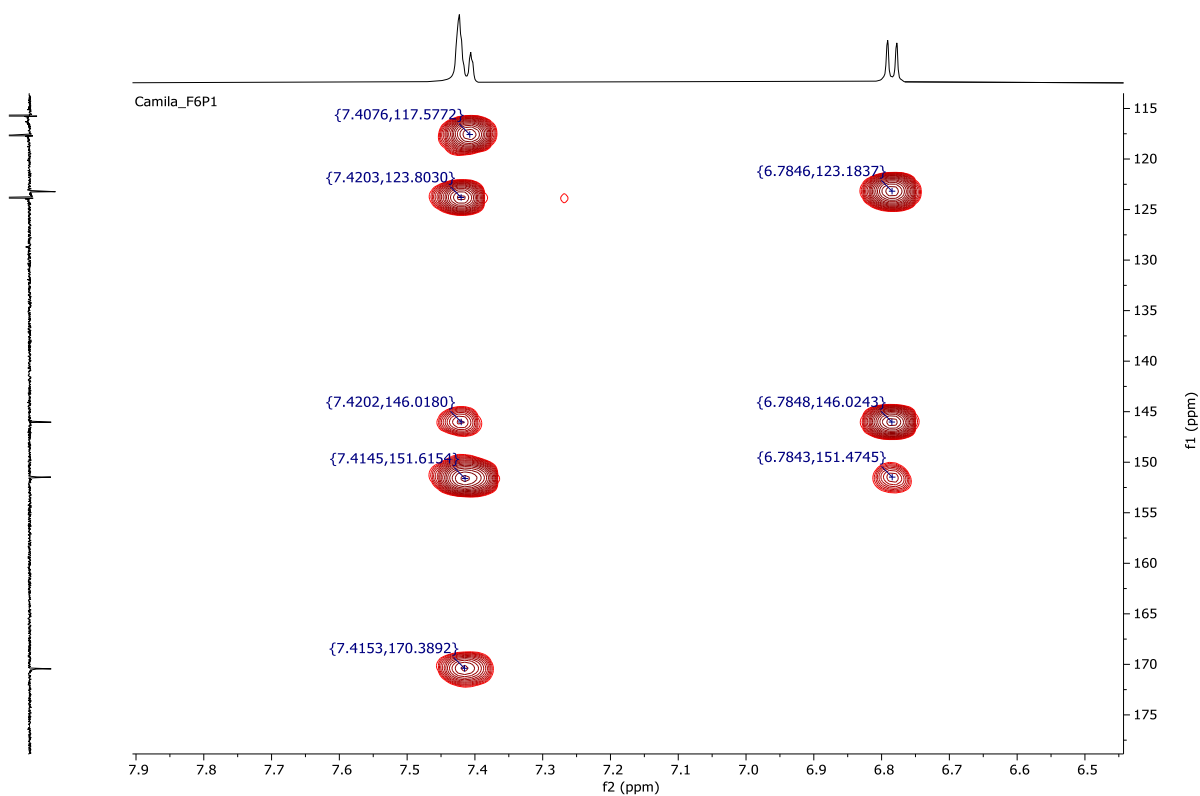
APÊNDICE AA - Espectro de RMN de ^1H de VI (CD_3OD , 14,1 T).

Camila_F6P1

**APÊNDICE BB** - Espectro de RMN de ^{13}C NMR (DEPTQ) de VI (CD_3OD , 14,1 T).

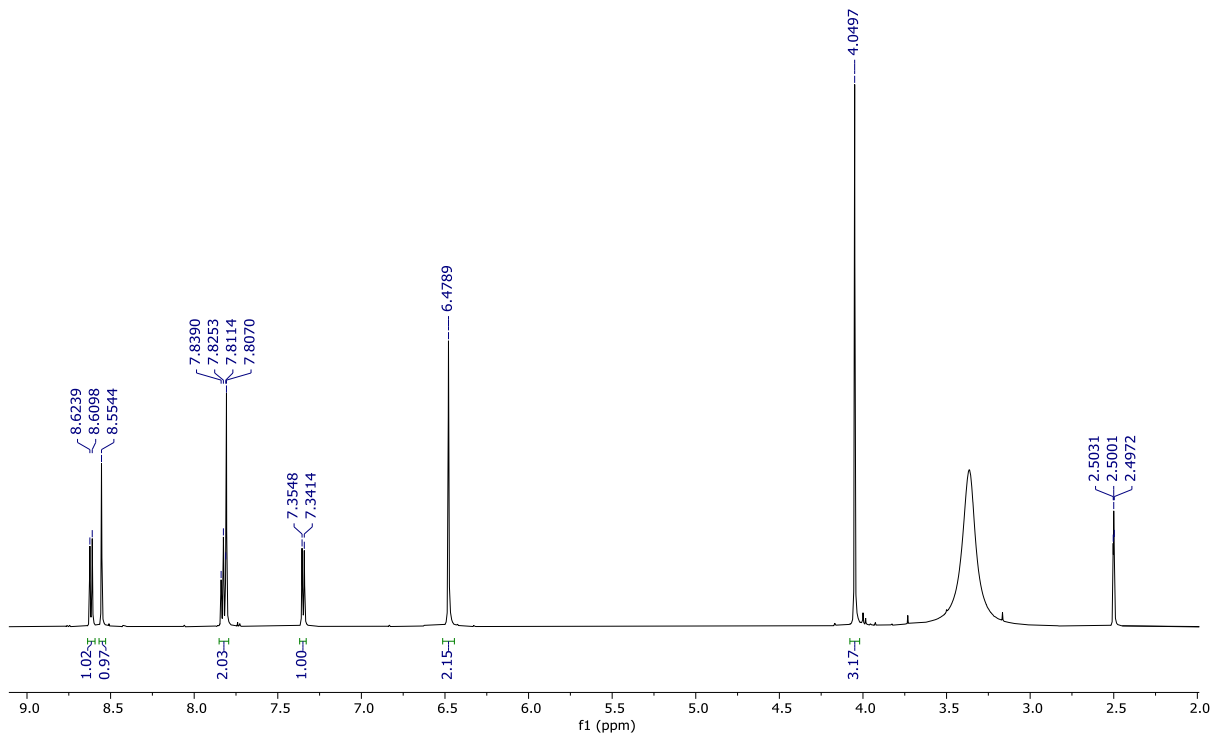
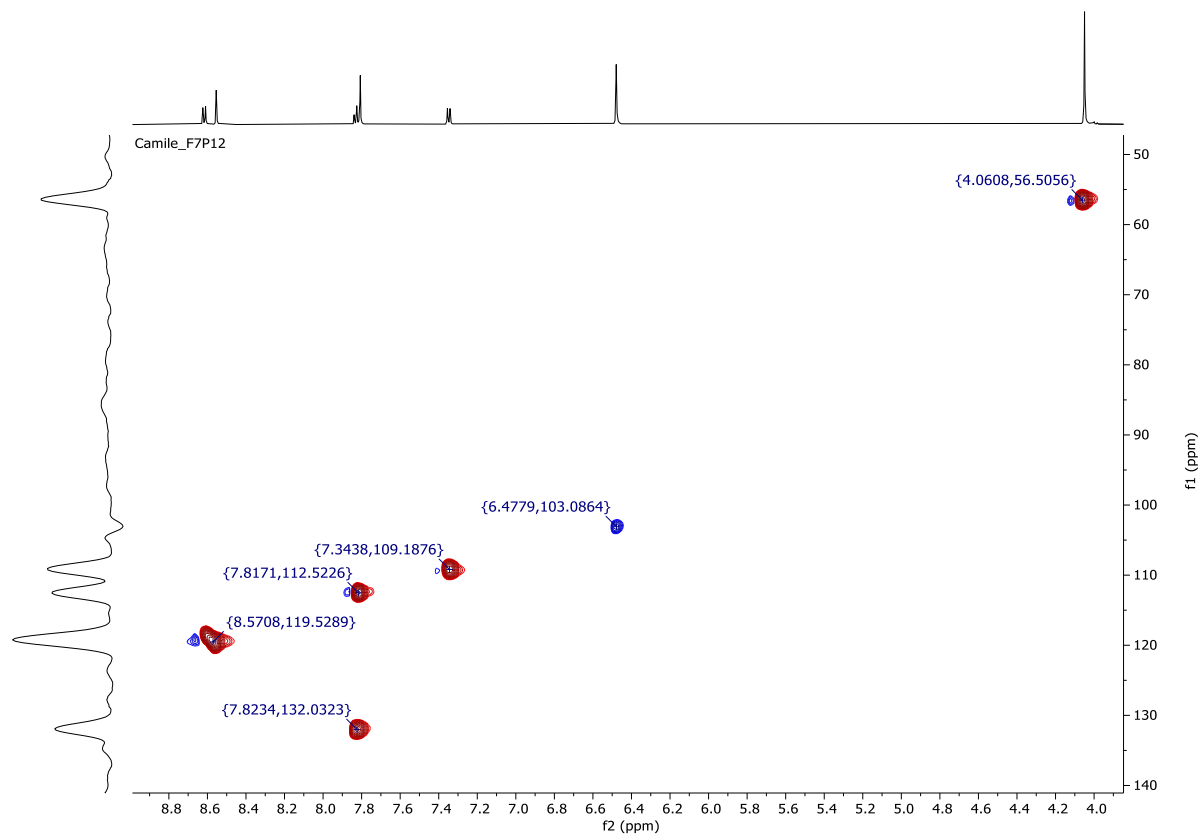
Camila_F6P1



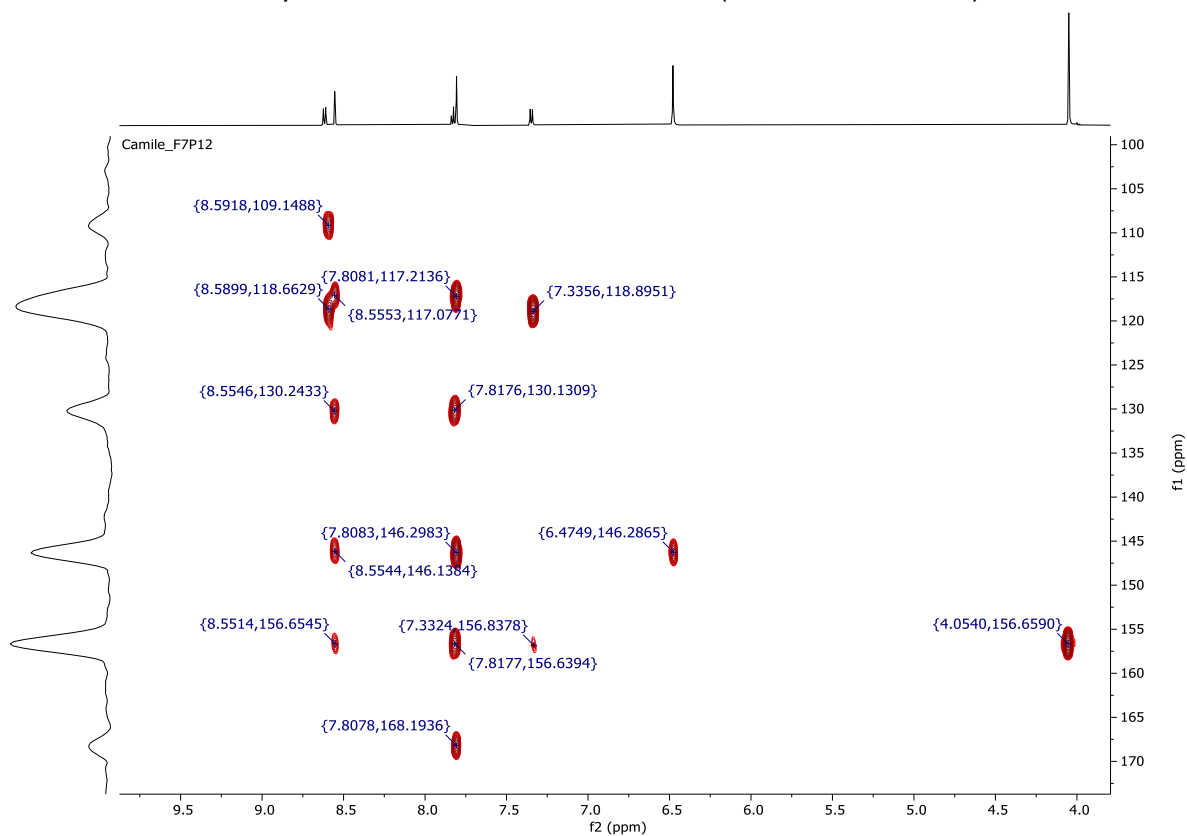
APÊNDICE CC - Mapa de contornos HSQC de VI (CD₃OD, 14,1 T).**APÊNDICE DD - Mapa de contornos HMBC de VI (CD₃OD, 14,1 T).**

APÊNDICE EE - Espectro de RMN de ^1H de VII (DMSO- d_6 , 14,1 T).

Camila_F7p12

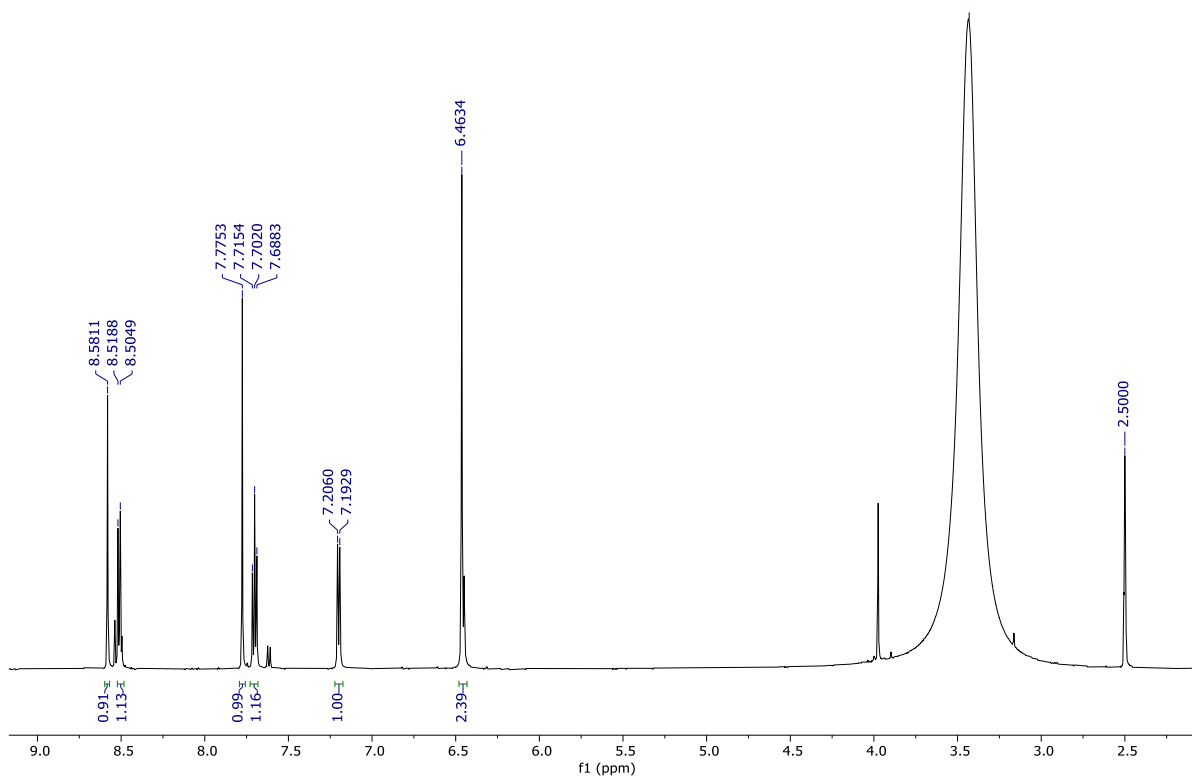
APÊNDICE FF - Mapa de contornos HSQC de VII (DMSO- d_6 , 14,1 T).

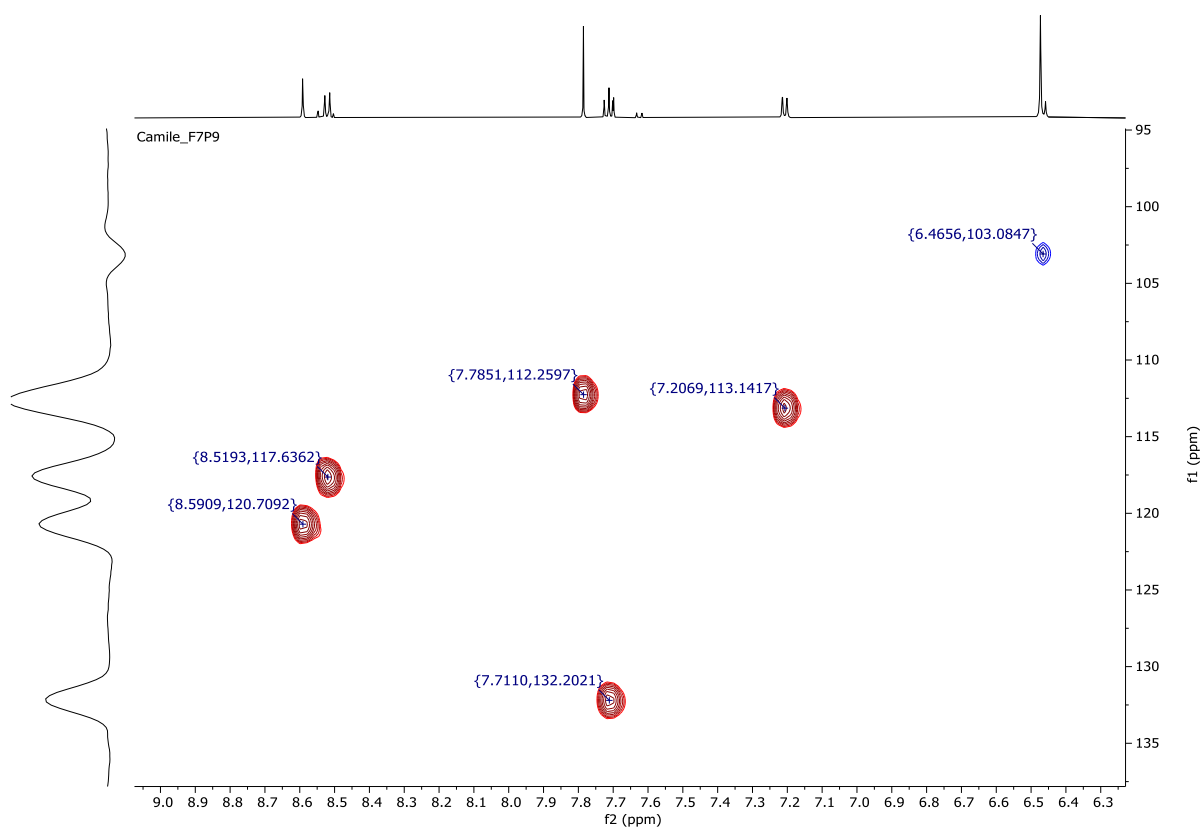
APÊNDICE GG - Mapa de contornos HMBC de VII (DMSO-d₆, 14,1 T).

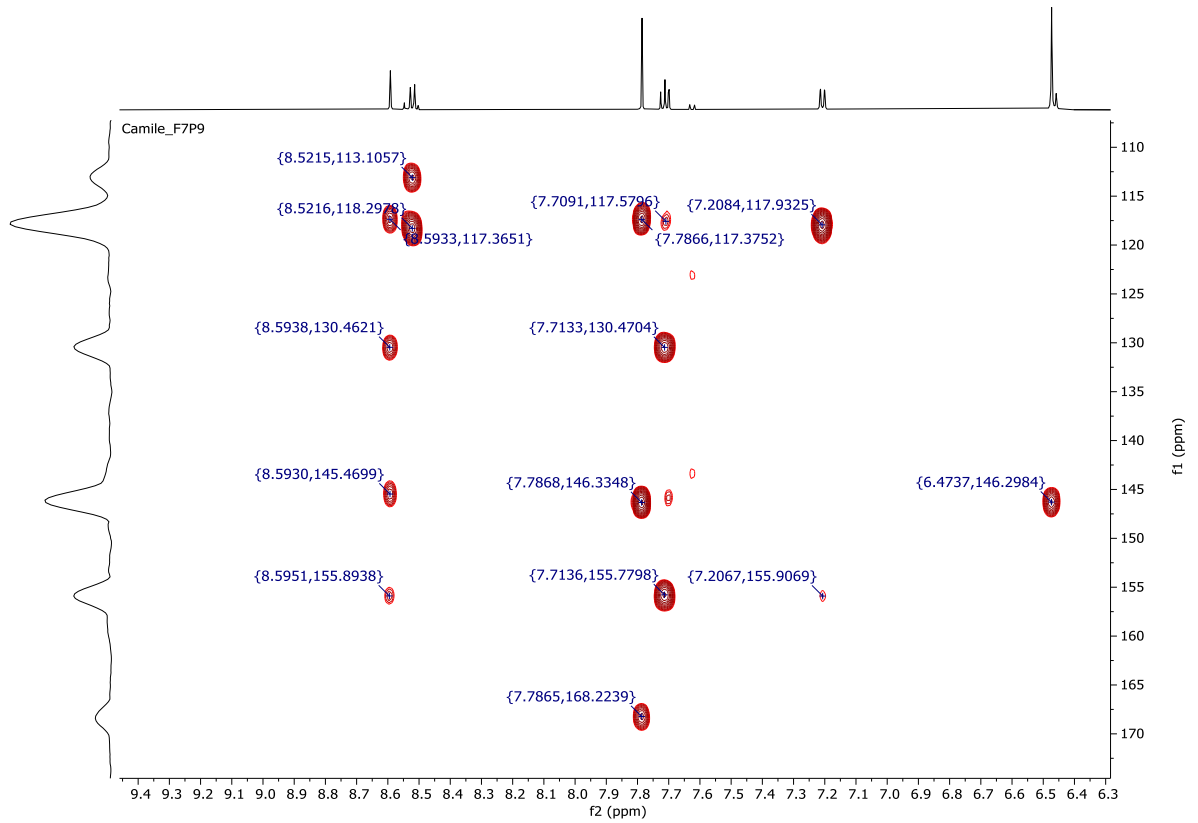


APÊNDICE HH - Espectro de RMN de ¹H de VIII (DMSO-d₆, 14,1 T).

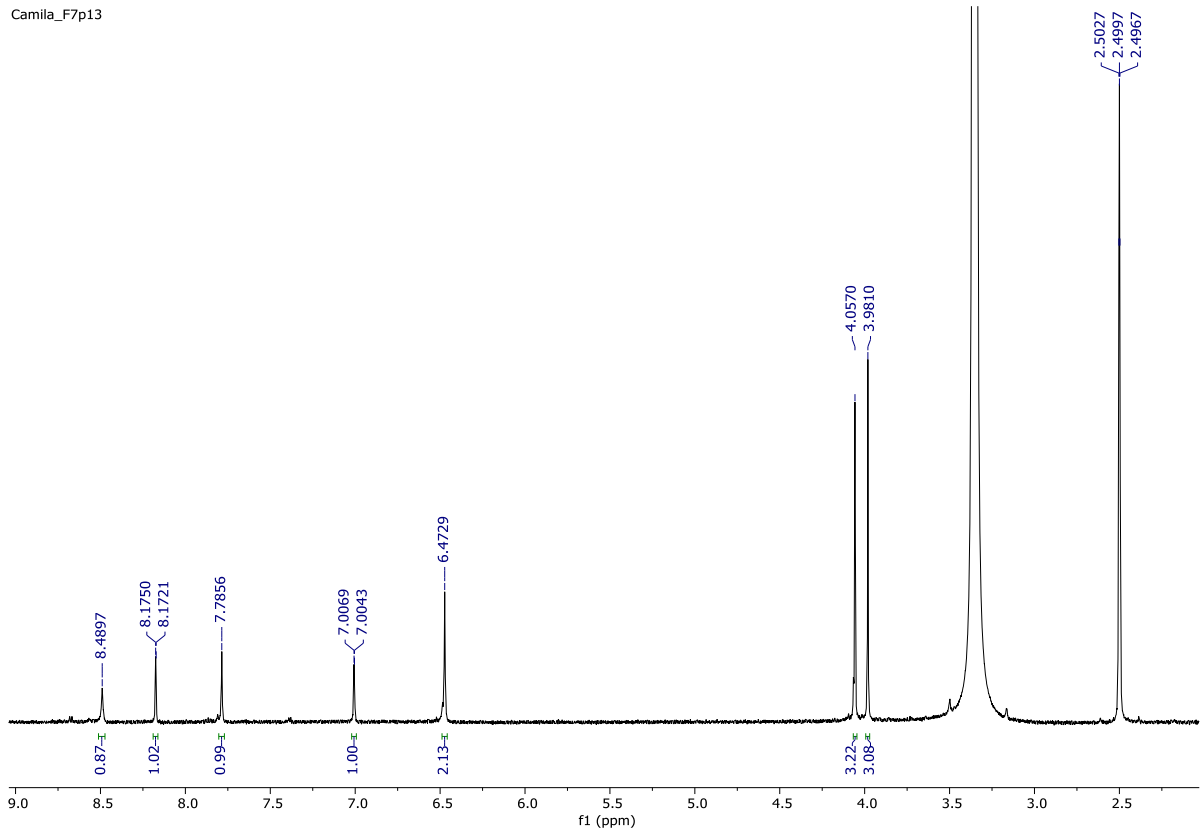
Camila_F7p9



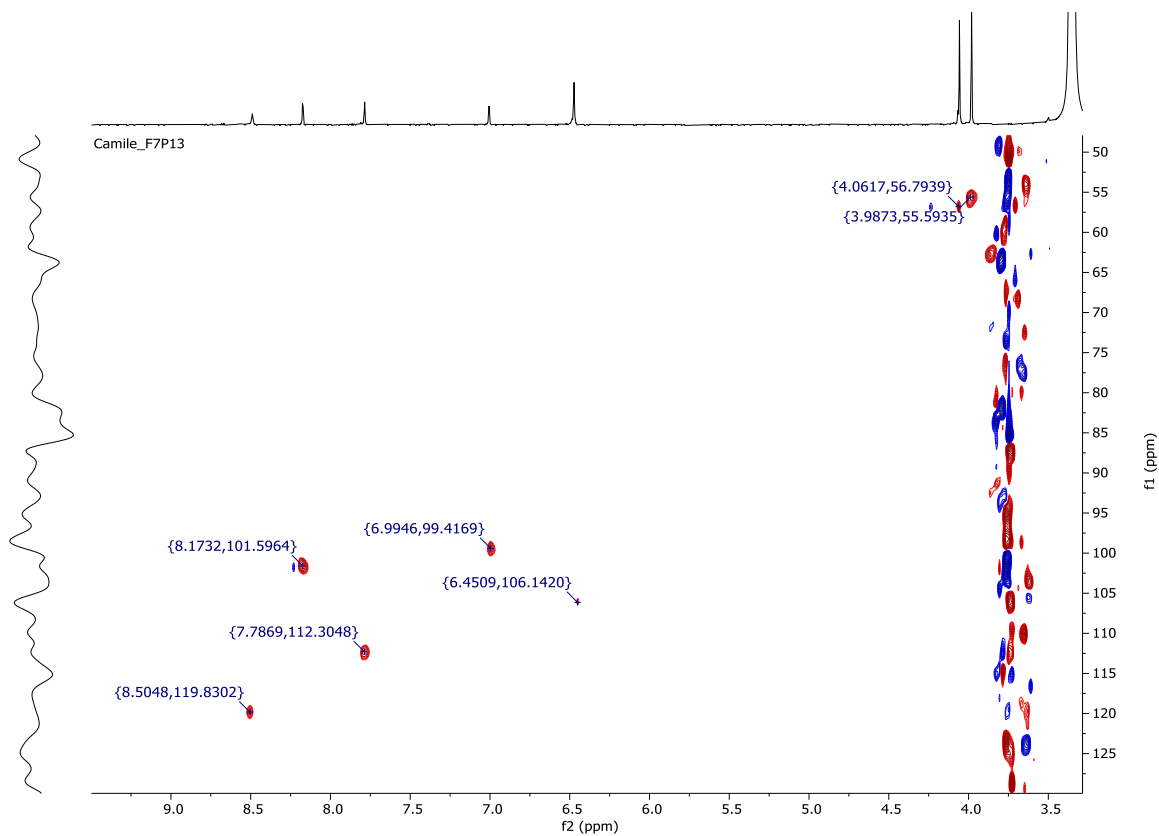
APÊNDICE II - Mapa de contornos HSQC de VIII (DMSO-d₆, 14,1 T).**APÊNDICE JJ - Mapa de contornos HMBC de VIII (DMSO-d₆, 14,1 T).**



APÊNDICE KK - Espectro de RMN de ¹H de IX (DMSO-d₆, 14,1 T).

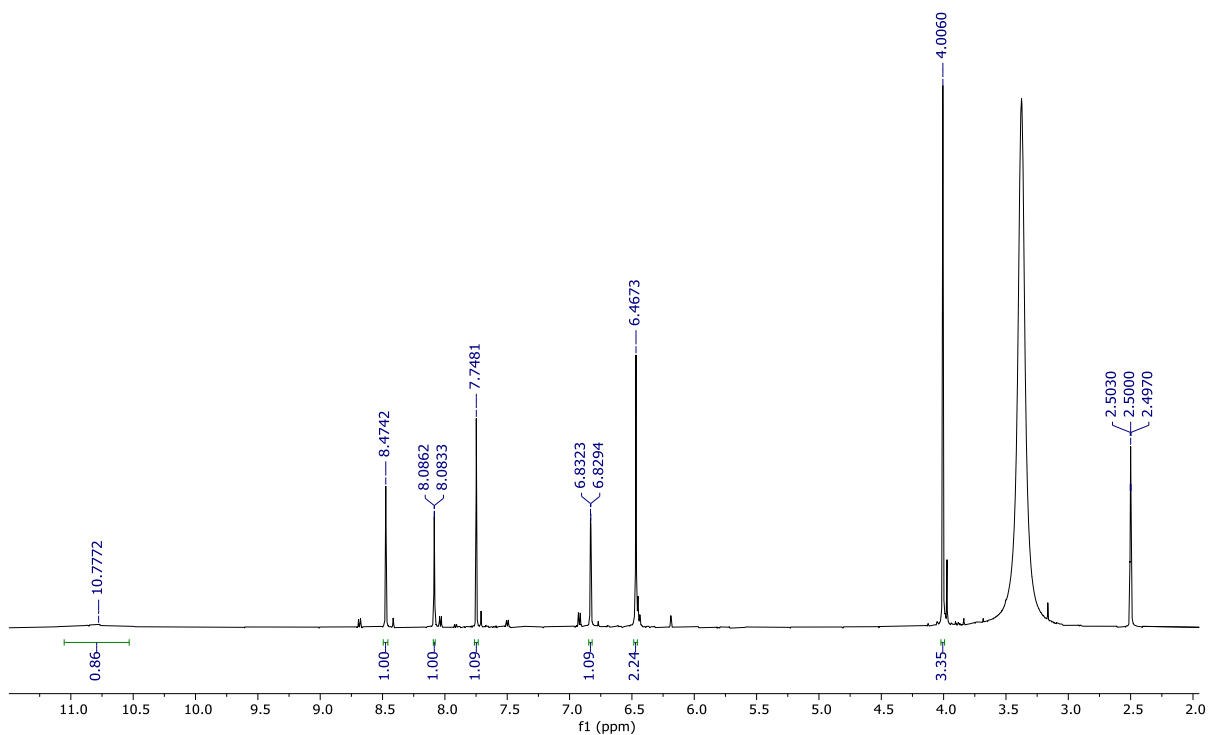


APÊNDICE LL - Mapa de contornos HSQC de IX (DMSO-d₆, 14,1 T).



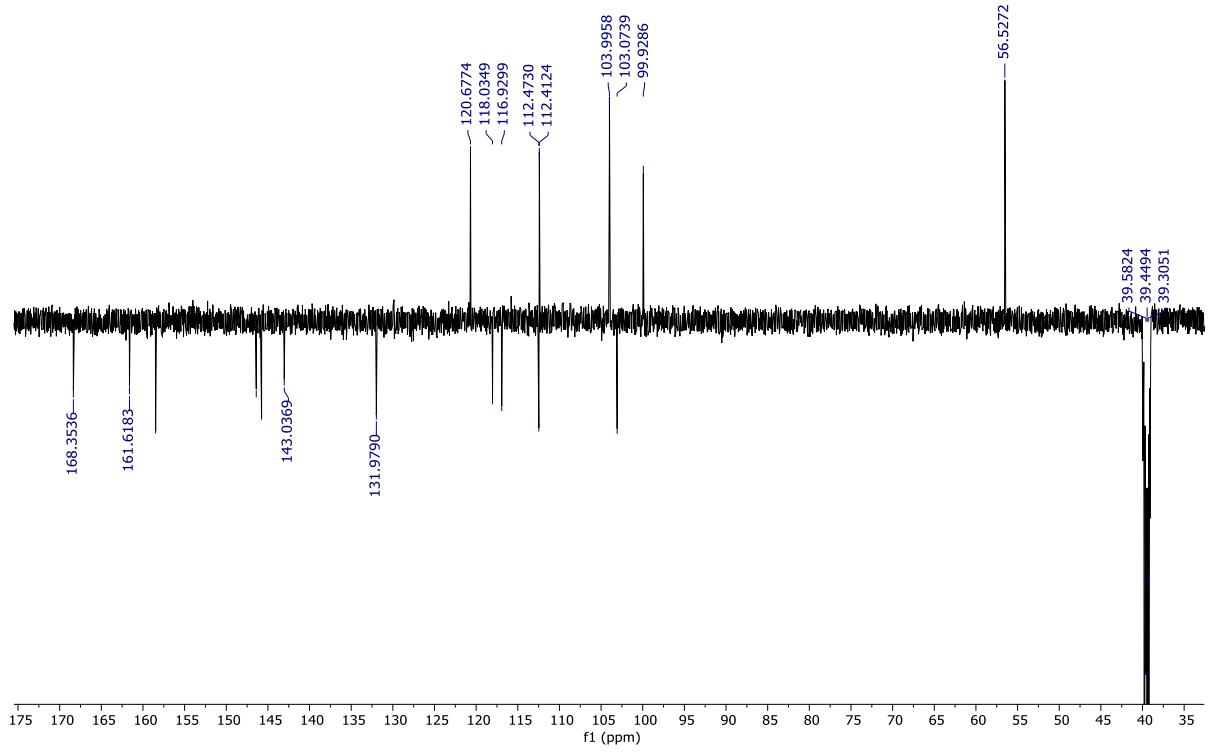
APÊNDICE MM - Espectro de RMN de ^1H de X (DMSO- d_6 , 14,1 T).

Camila_F7p8

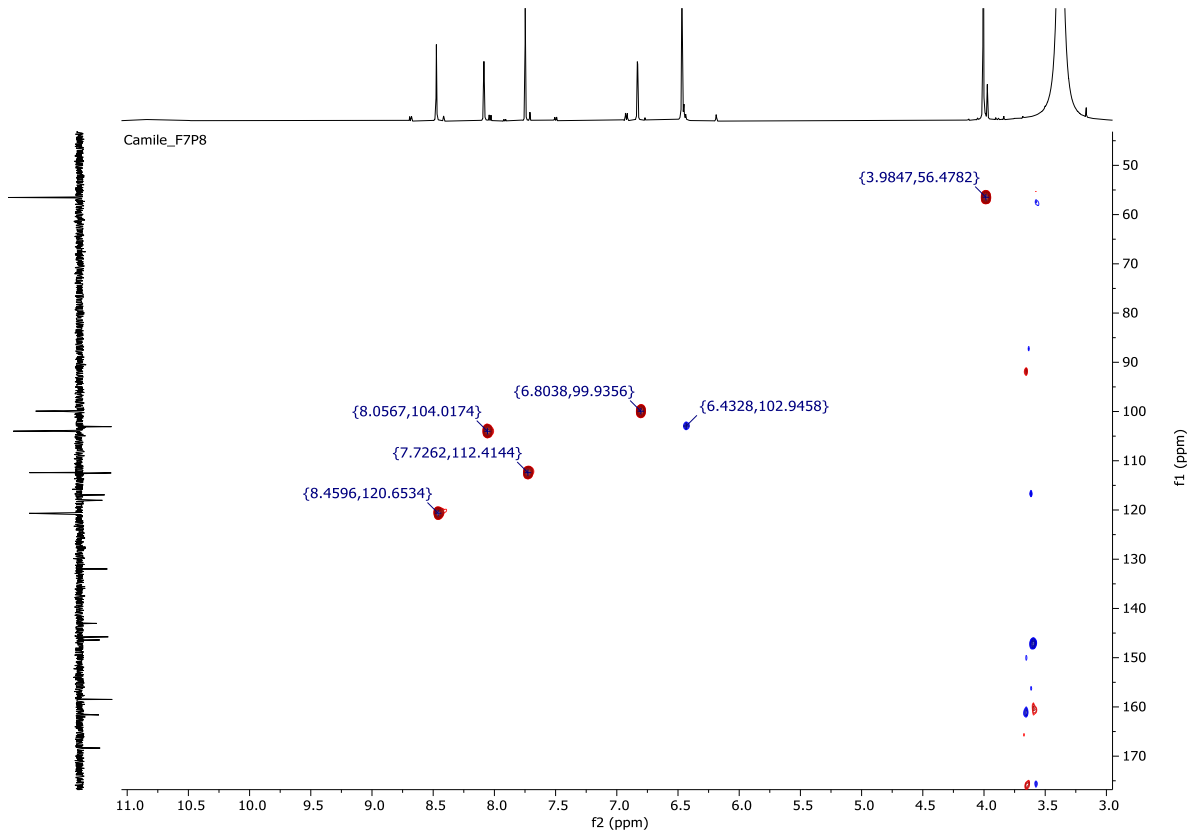


APÊNDICE NN - Espectro de RMN de ^{13}C NMR (DEPTQ) de X (DMSO- d_6 , 14,1 T)

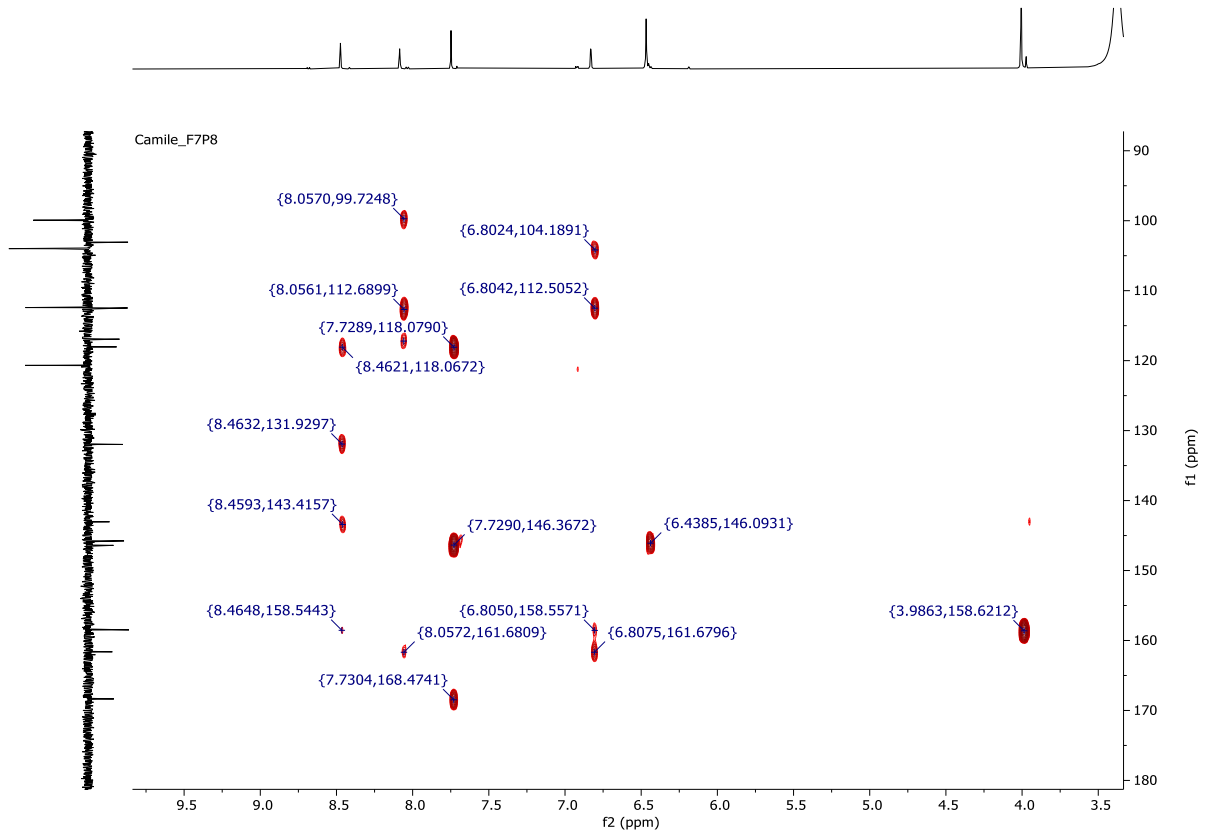
Camile_F7P8



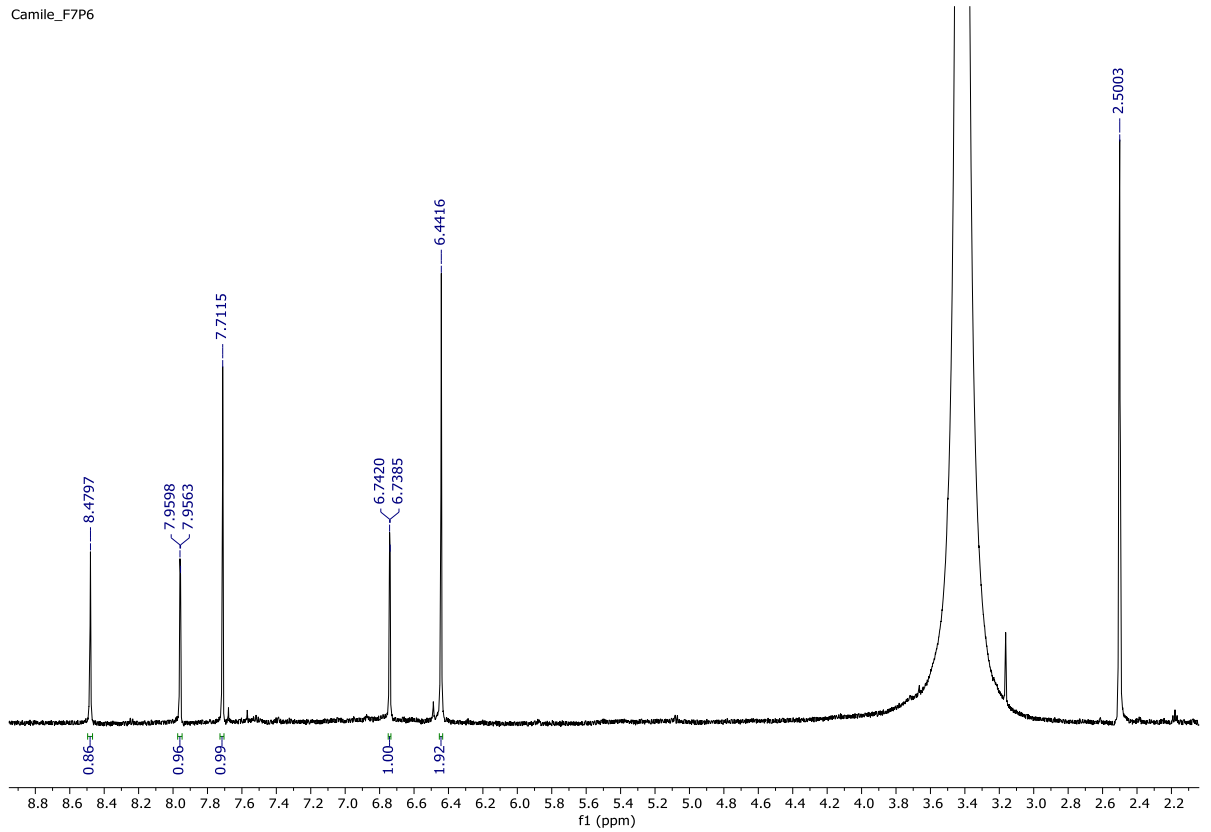
APÊNDICE OO - Mapa de contornos HSQC de X (DMSO-d₆, 14,1 T).



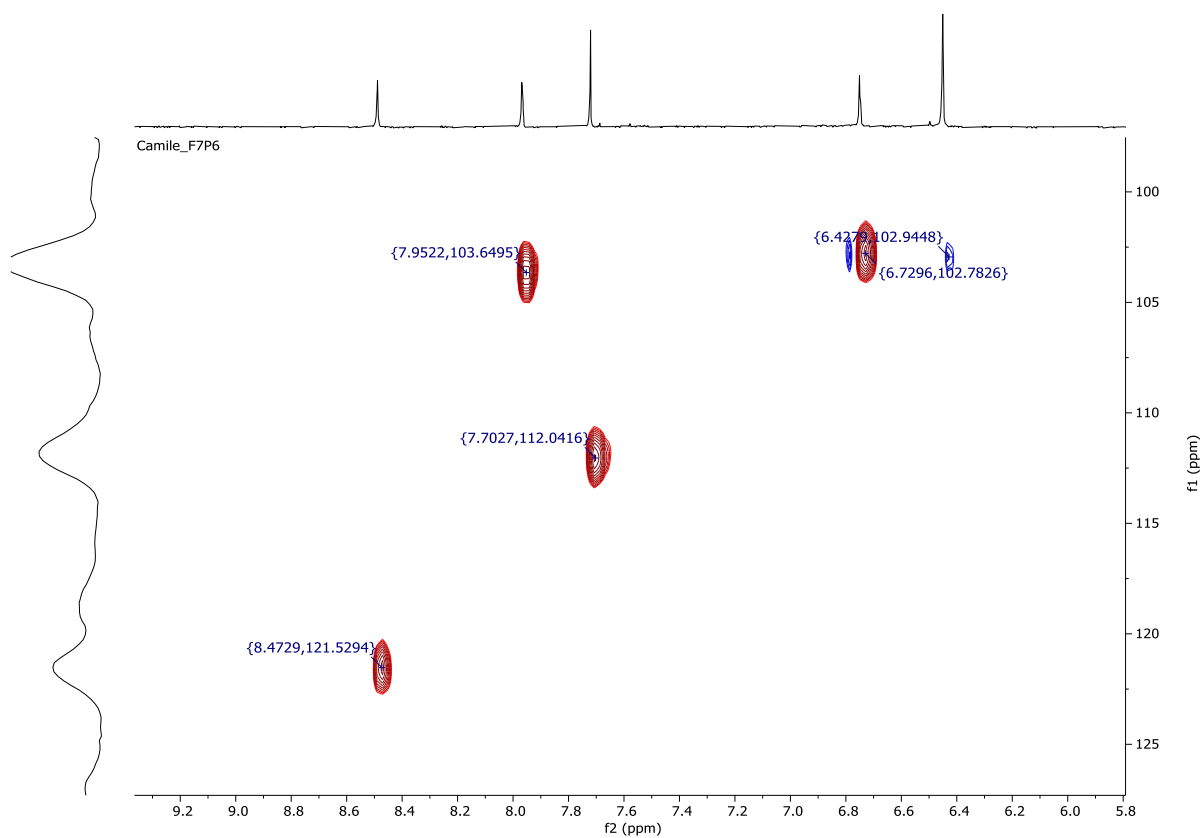
APÊNDICE PP - Mapa de contornos HMBC de X (DMSO-d₆, 14,1 T).



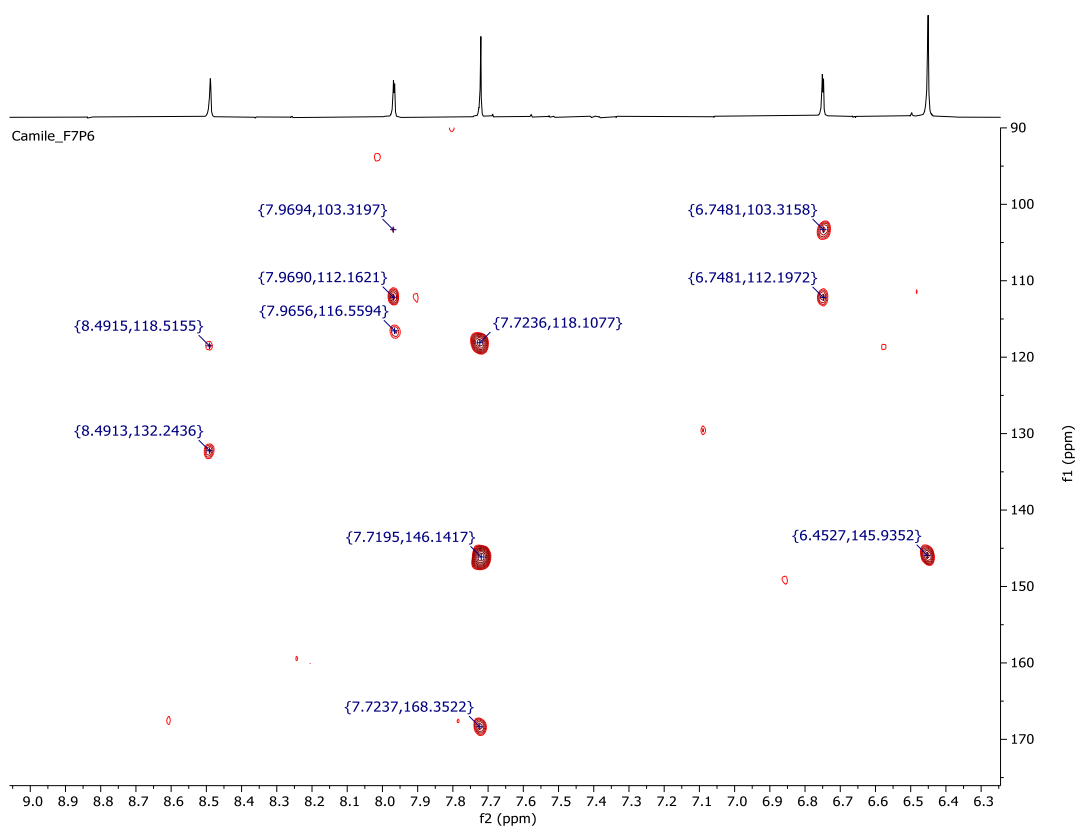
APÊNDICE QQ - Espectro de RMN de ^1H de XI (DMSO- d_6 , 14,1 T).



APÊNDICE RR - Mapa de contornos HSQC de XI (DMSO- d_6 , 14,1 T).

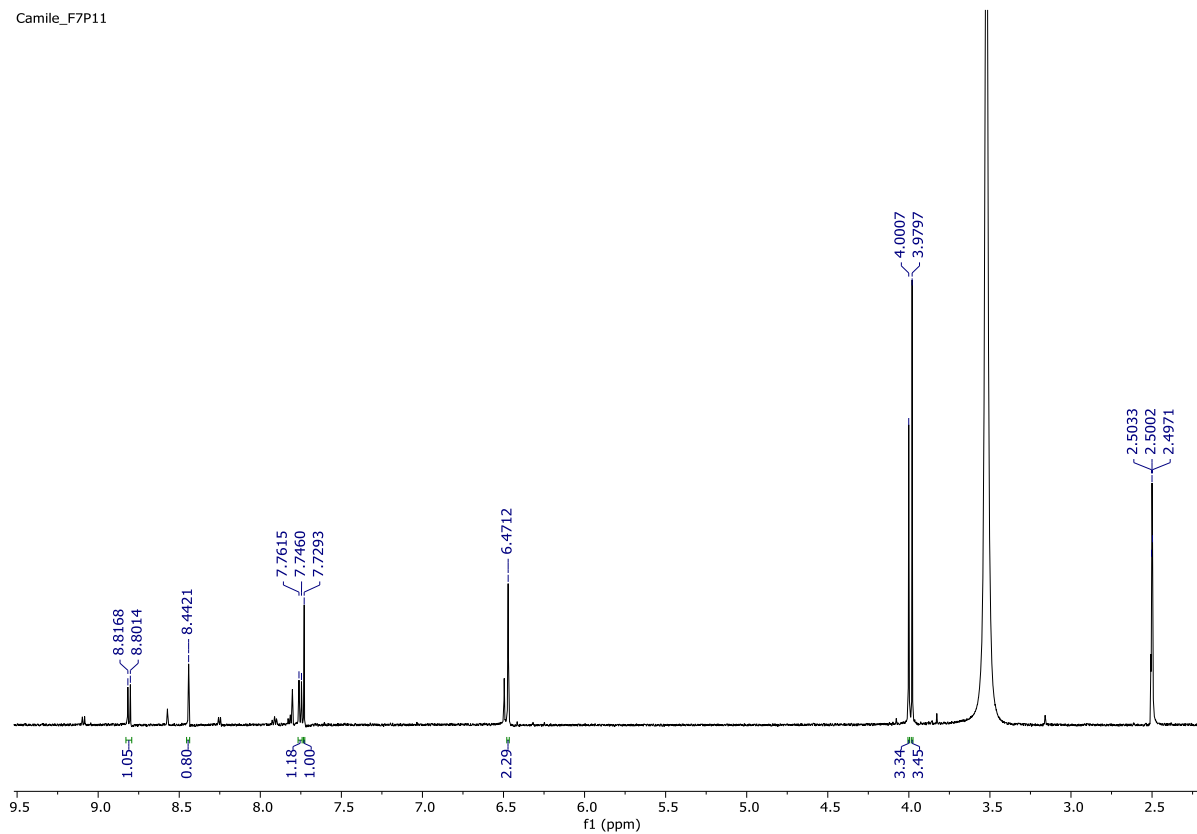


APÊNDICE SS - Mapa de contornos HMBC de **XI** (DMSO-d₆, 14,1 T).

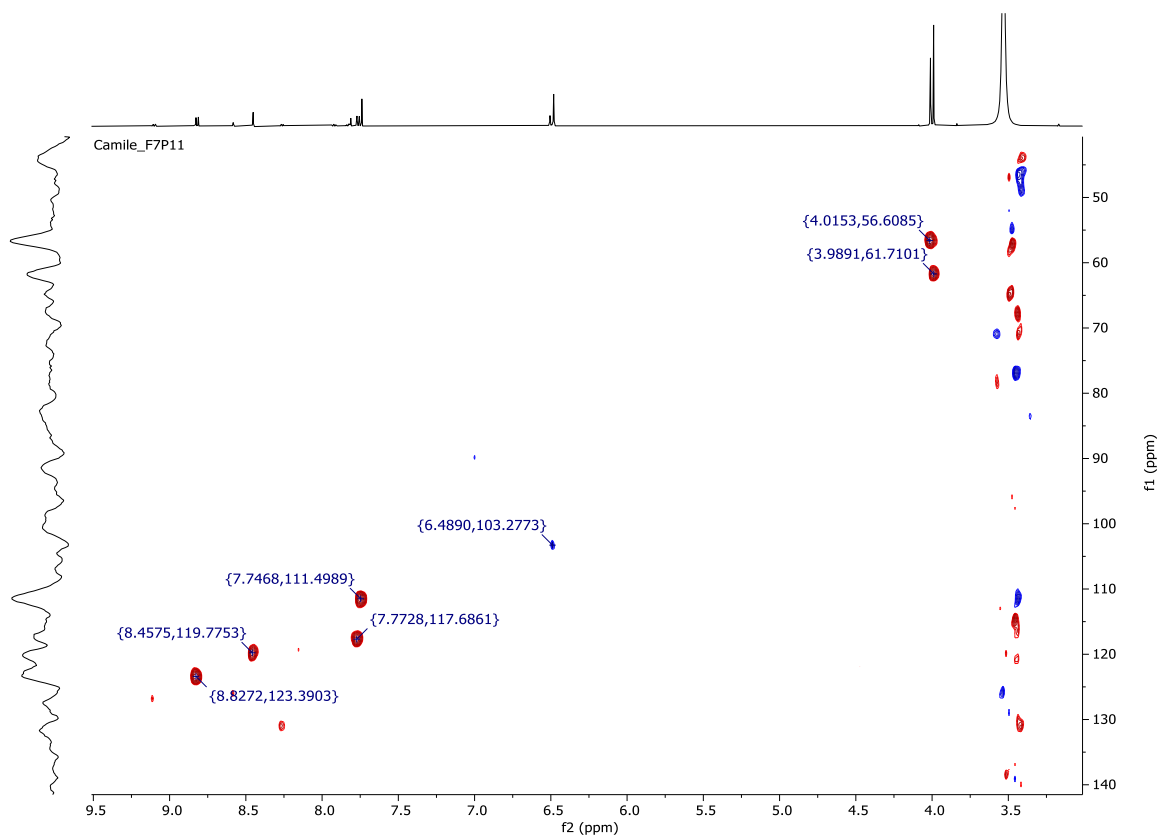


APÊNDICE TT - Espectro de RMN de ¹H de **XII** (DMSO-d₆, 14,1 T).

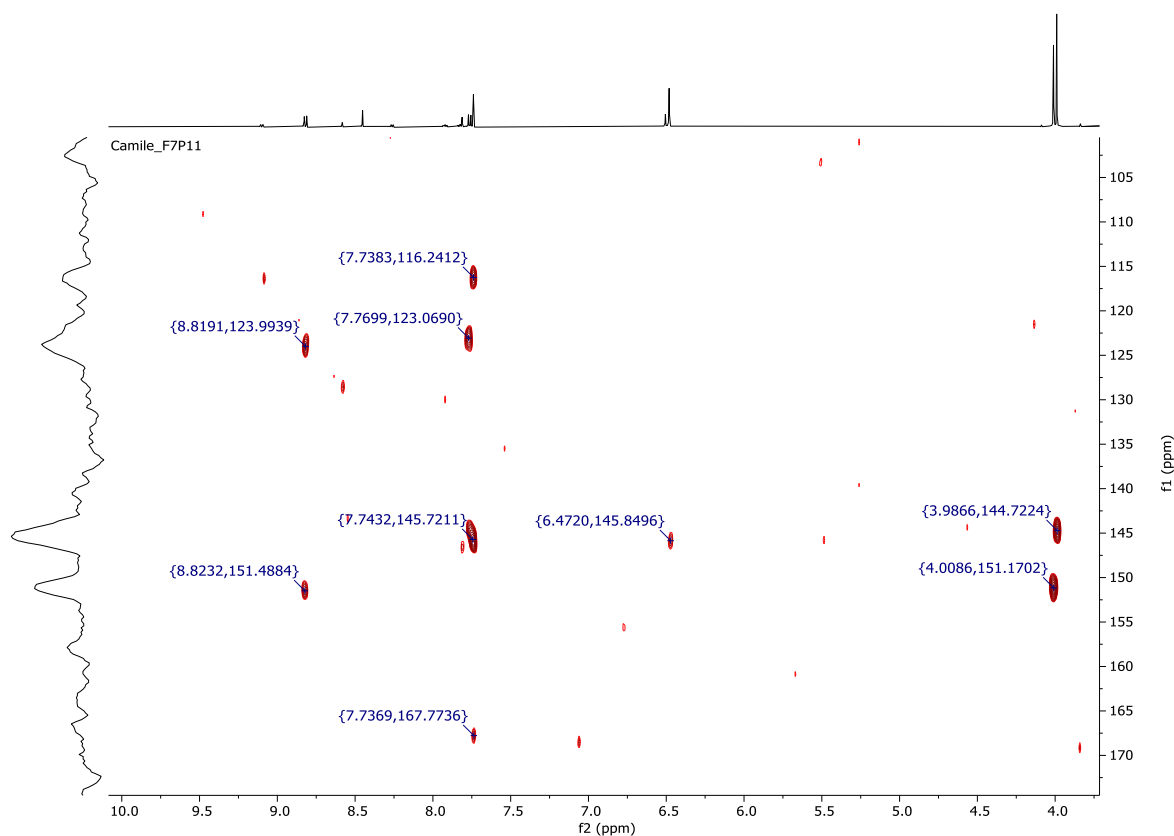
Camile_F7P11



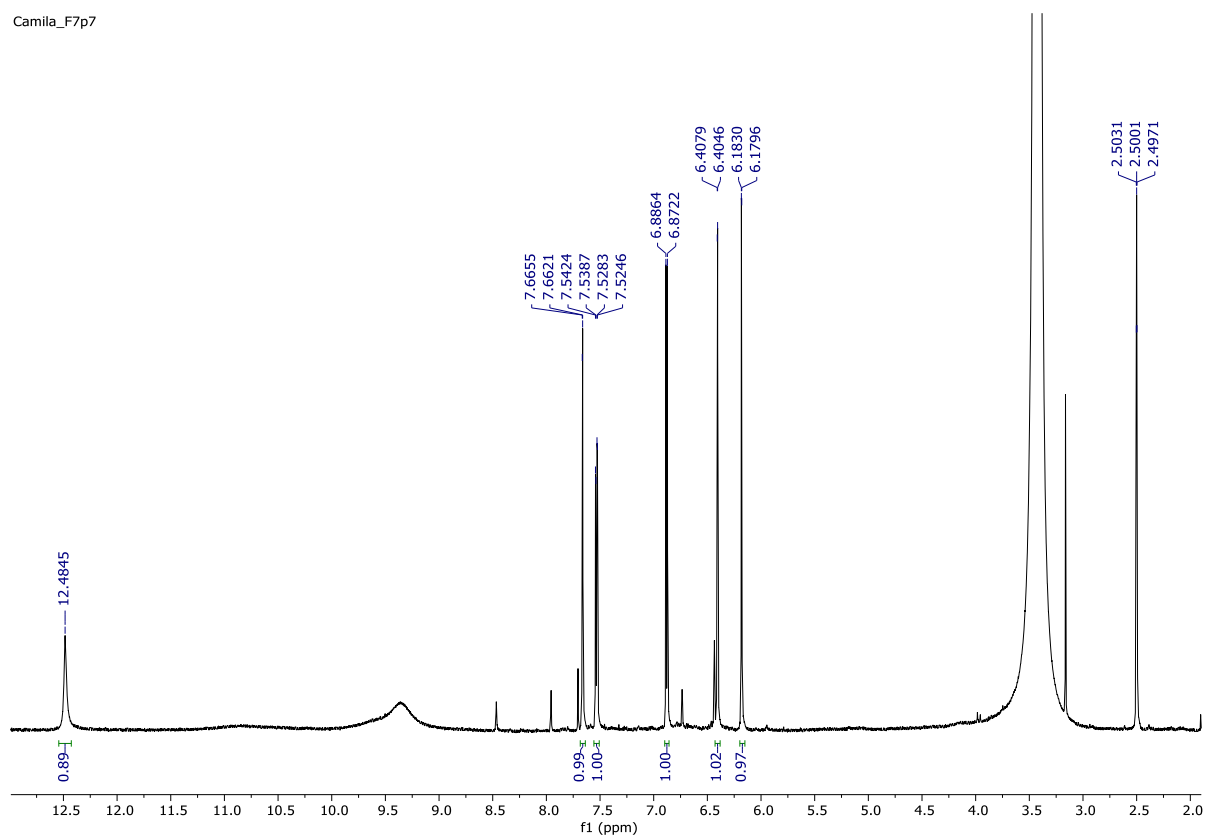
APÊNDICE UU - Mapa de contornos HSQC de XII (DMSO-d₆, 14,1 T).



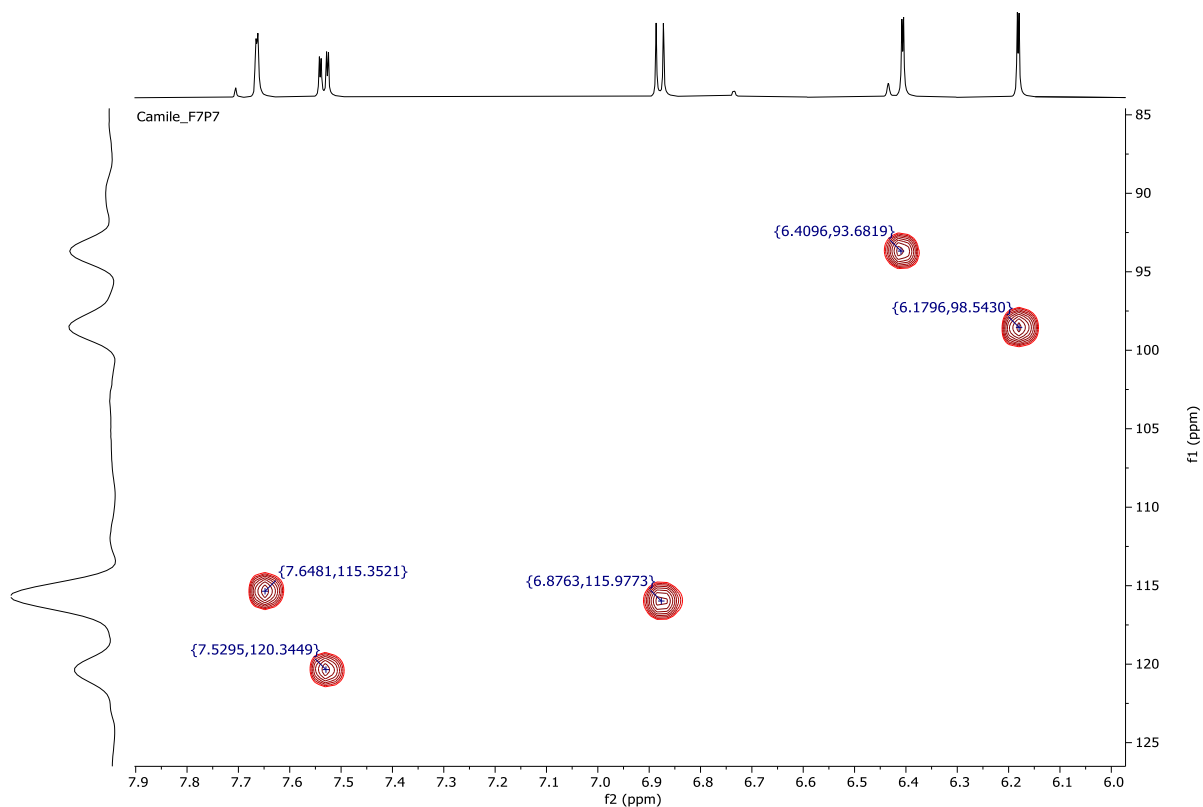
APÊNDICE VV - Mapa de contornos HMBC de XII (DMSO-d₆, 14,1 T).



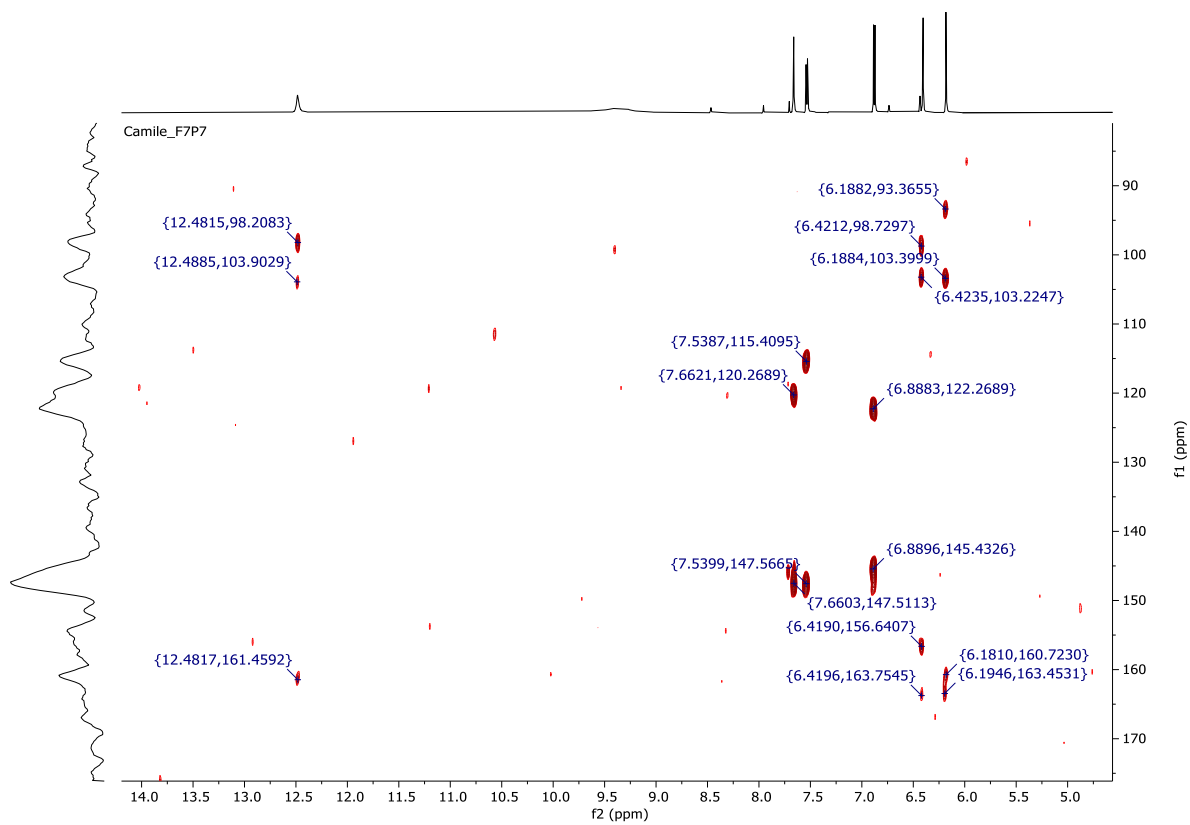
APÊNDICE WW - Espectro de RMN de ^1H de XIII (DMSO- d_6 , 14,1 T).



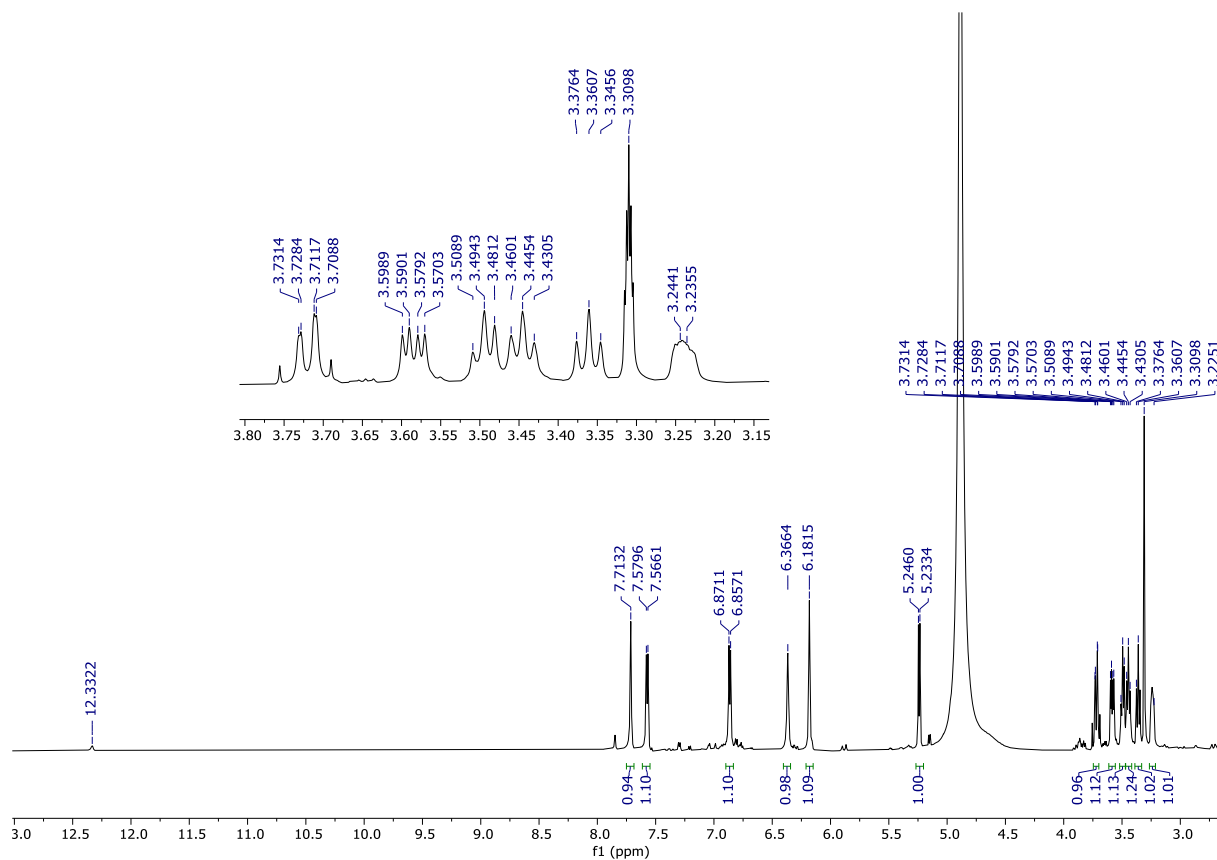
APÊNDICE XX - Mapa de contornos HSQC de XIII (DMSO- d_6 , 14,1 T).



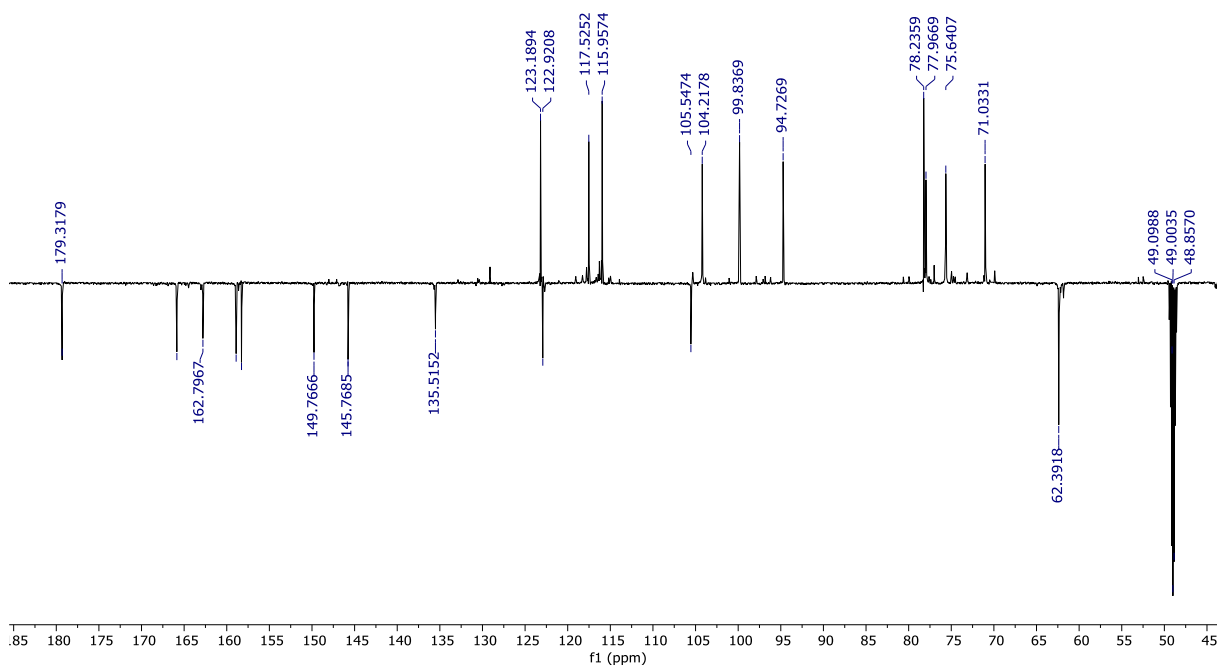
APÊNDICE YY - Mapa de contornos HMBC de XIII (DMSO- d_6 , 14,1 T).



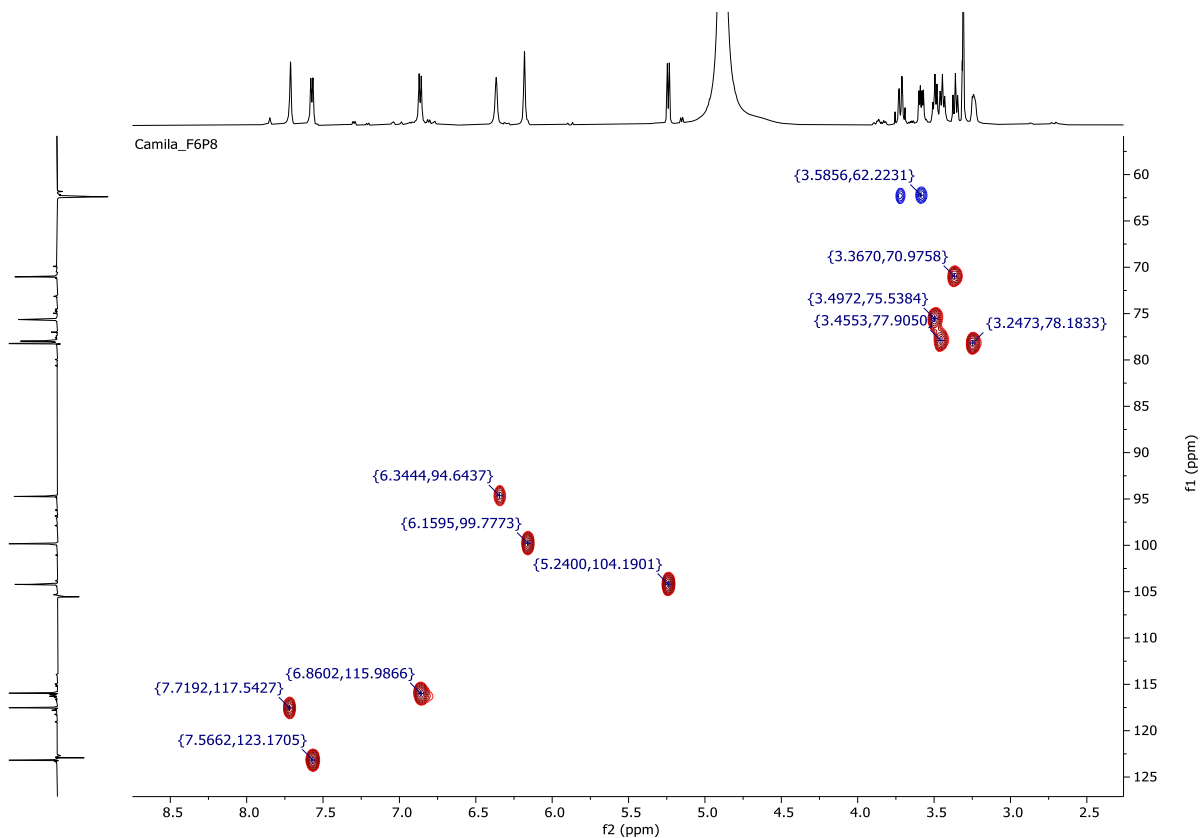
APÊNDICE ZZ - Espectro ampliado de RMN de ^1H de XIV (CD_3OD , 14,1 T).



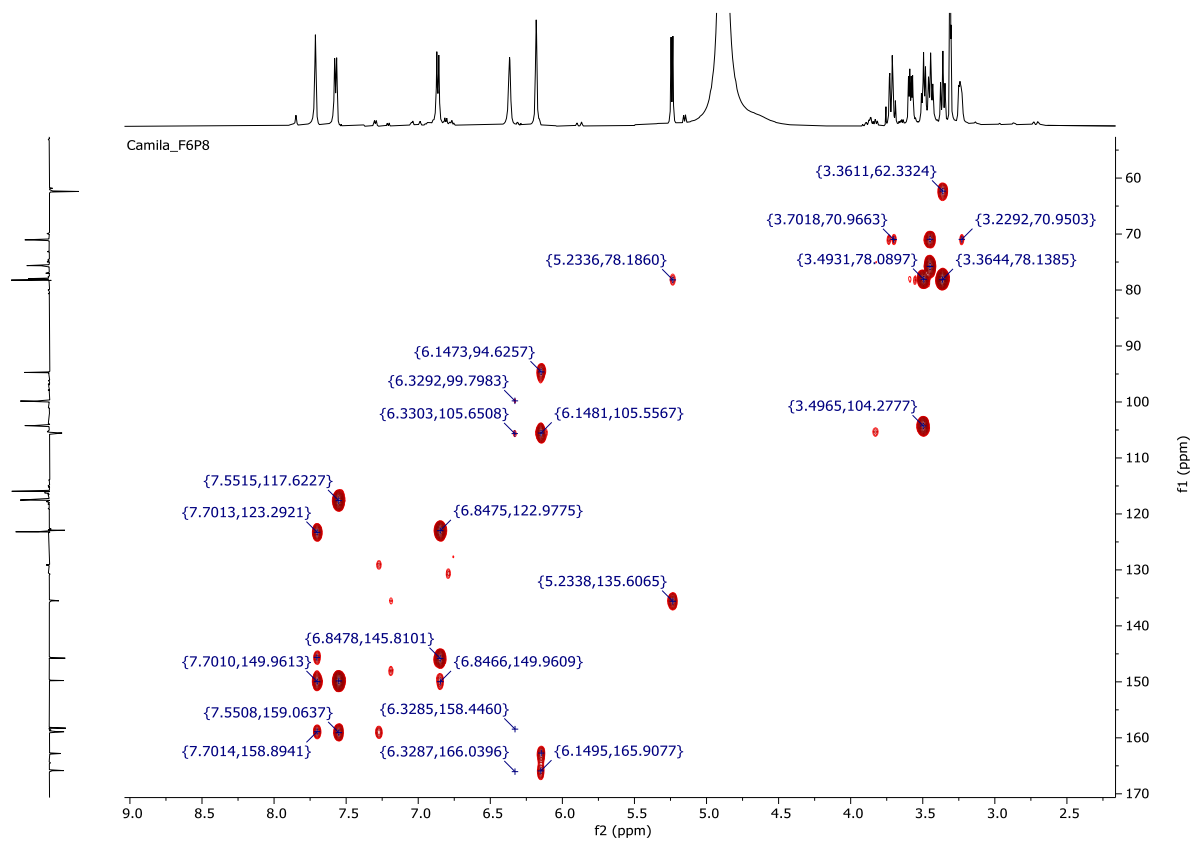
APÊNDICE AAA - Espectro de RMN de ^{13}C NMR (DEPTQ) de XIV (CD_3OD , 14,1 T).

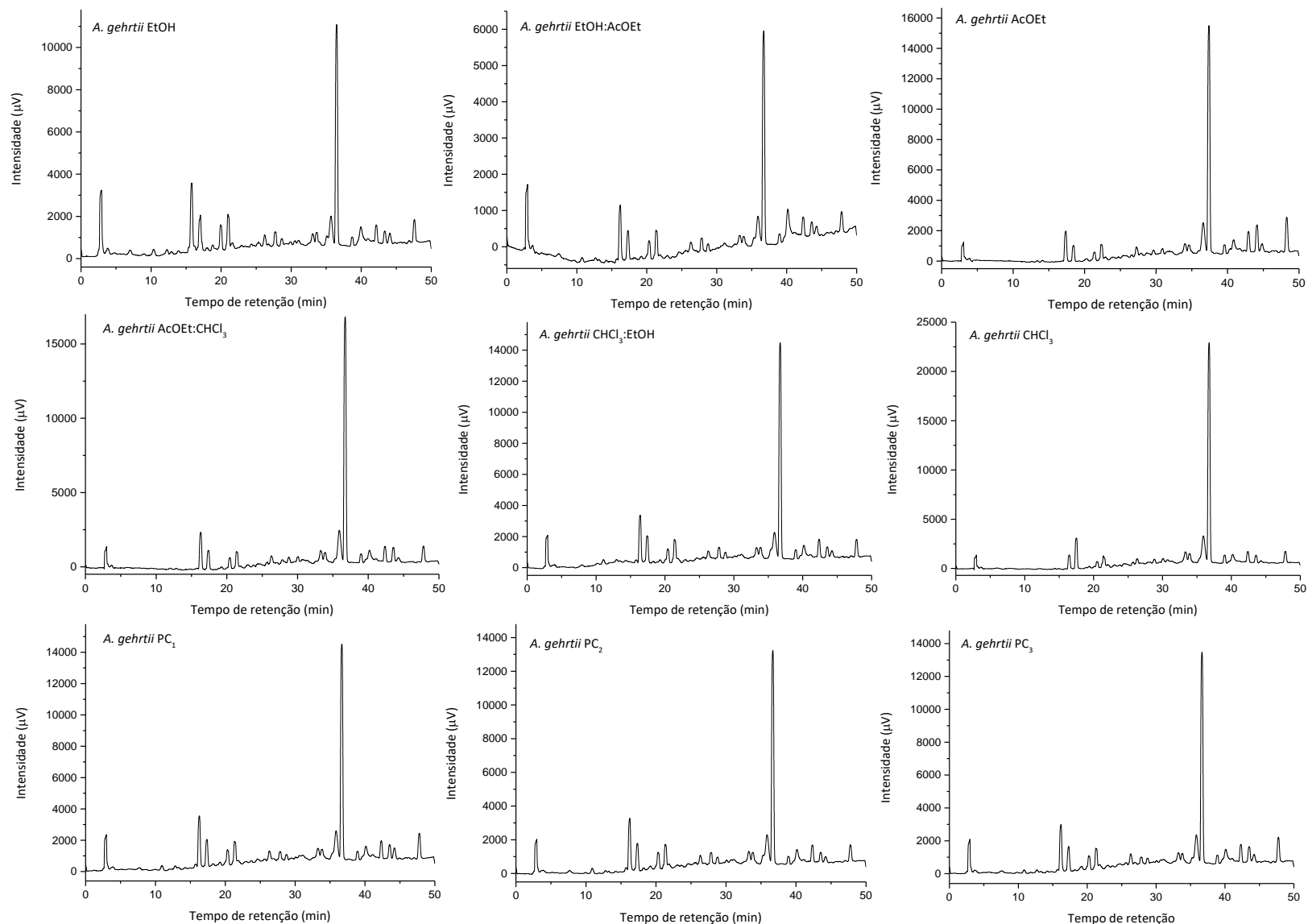


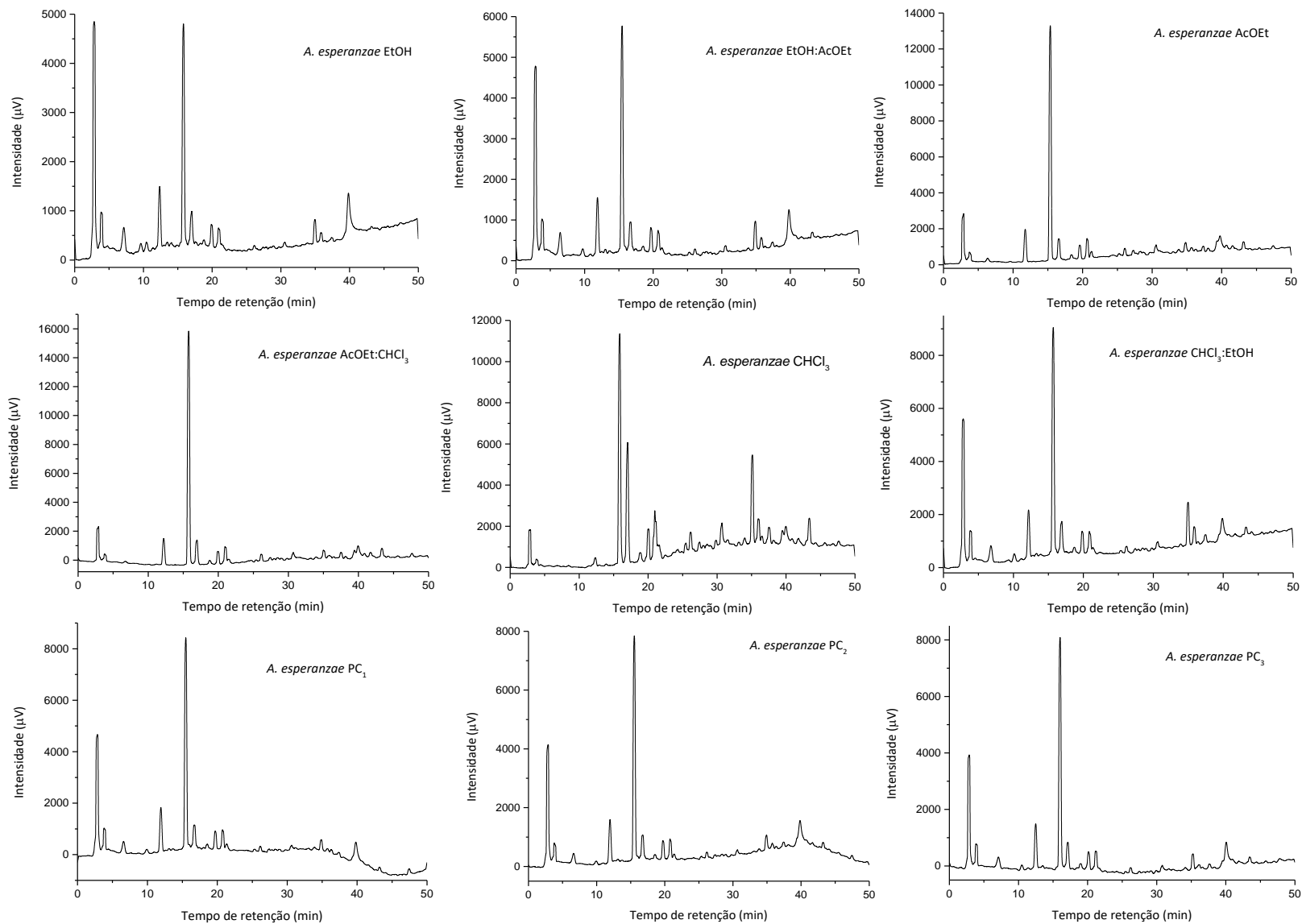
APÊNDICE BBB - Mapa de contornos HSQC de XIV (CD_3OD , 14,1 T).

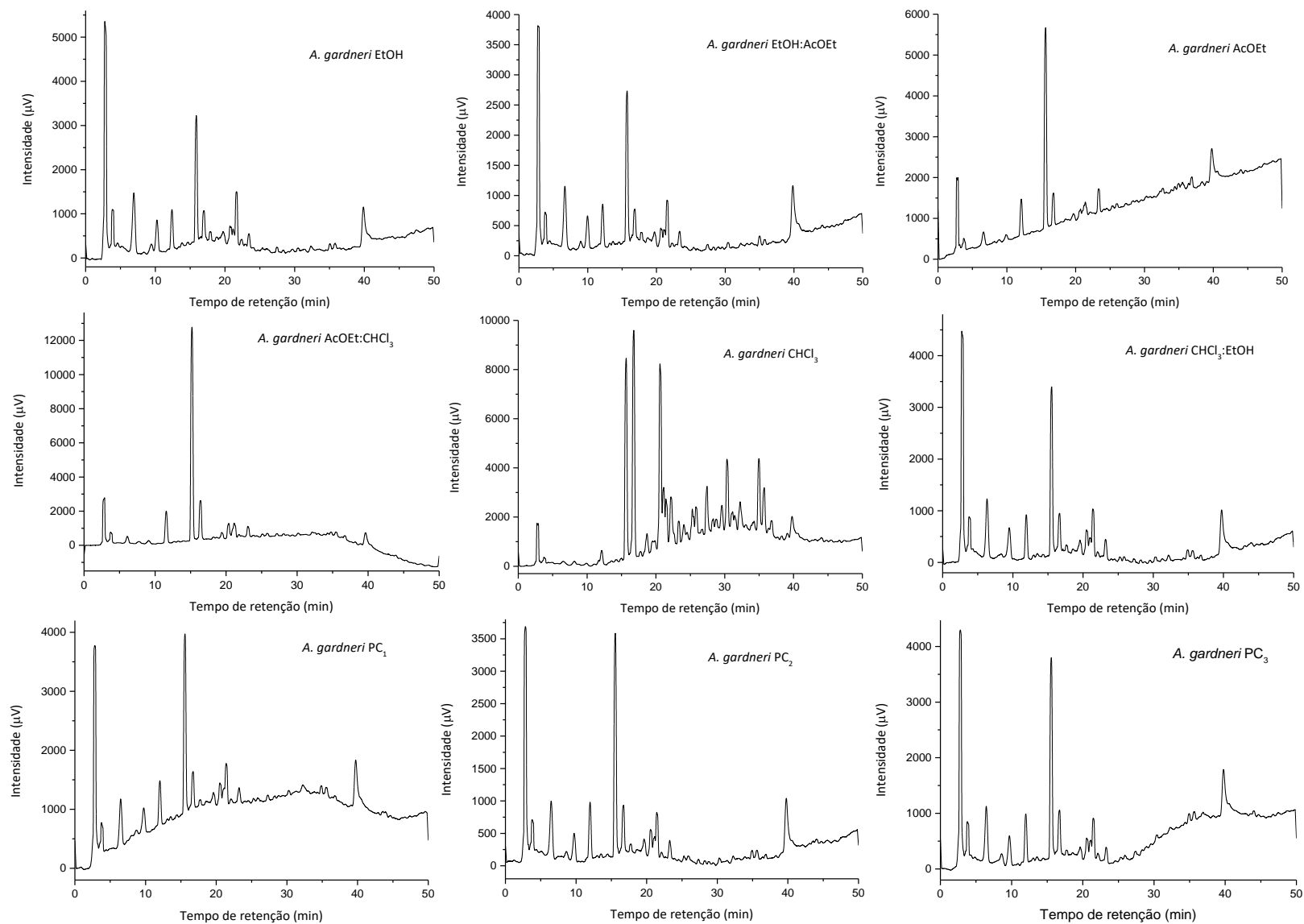


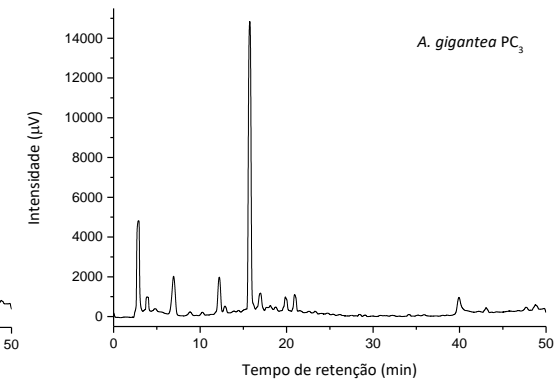
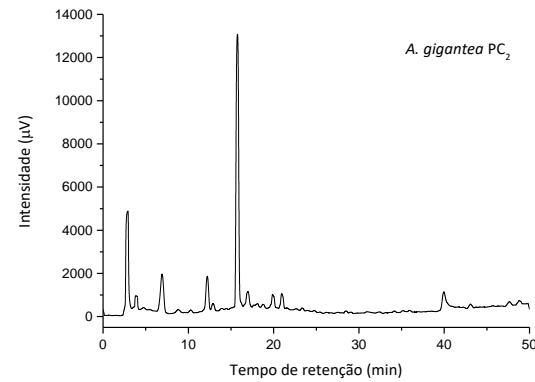
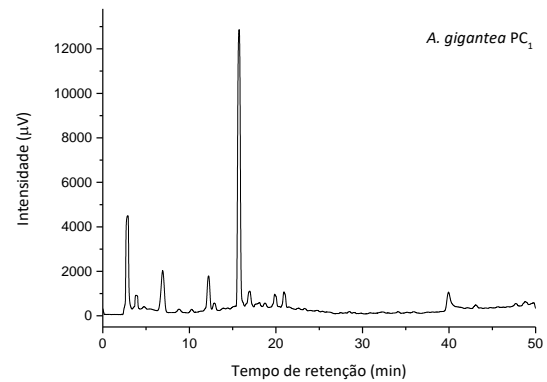
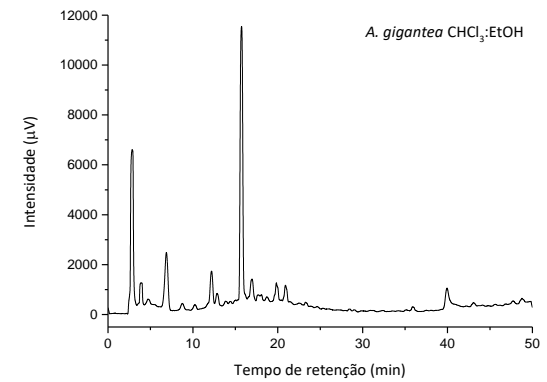
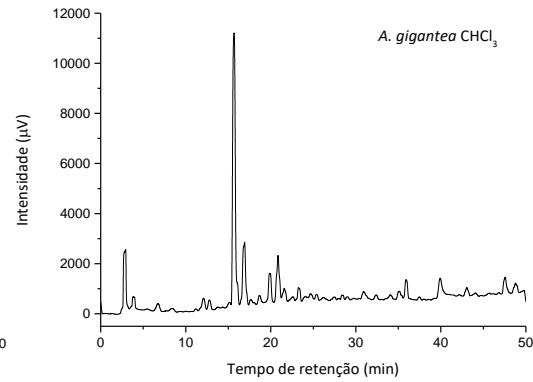
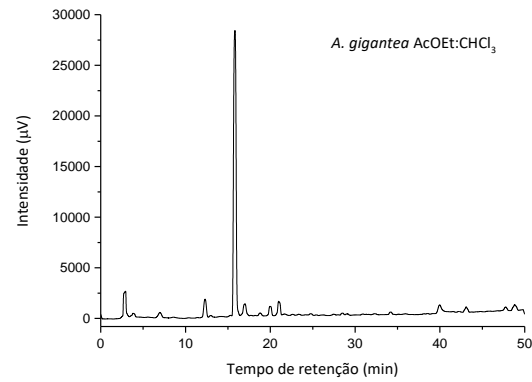
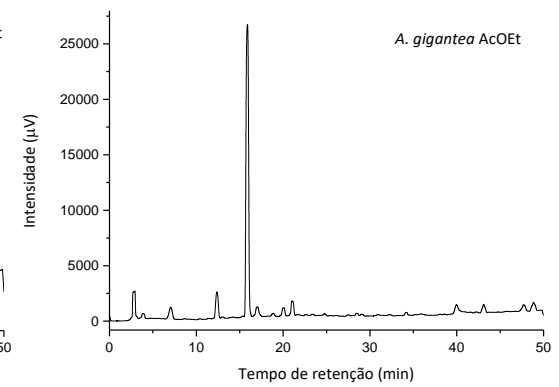
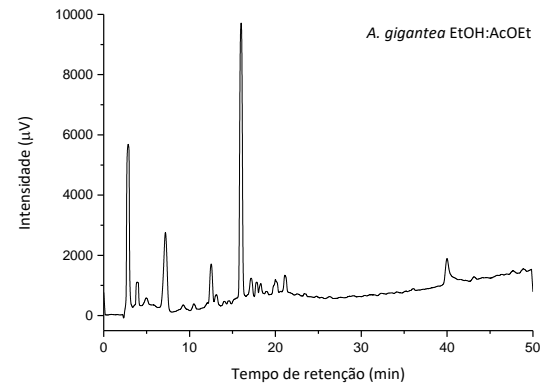
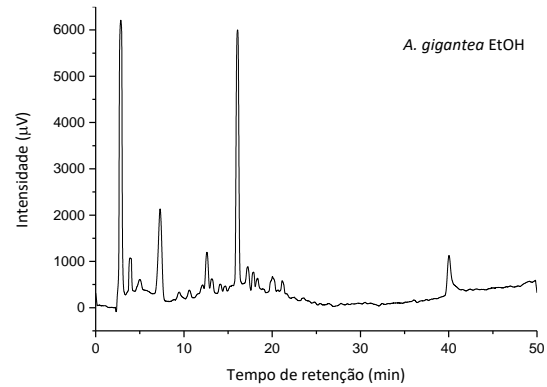
APÊNDICE CCC - Mapa de contornos HMBC de XIV (CD₃OD, 14,1 T).

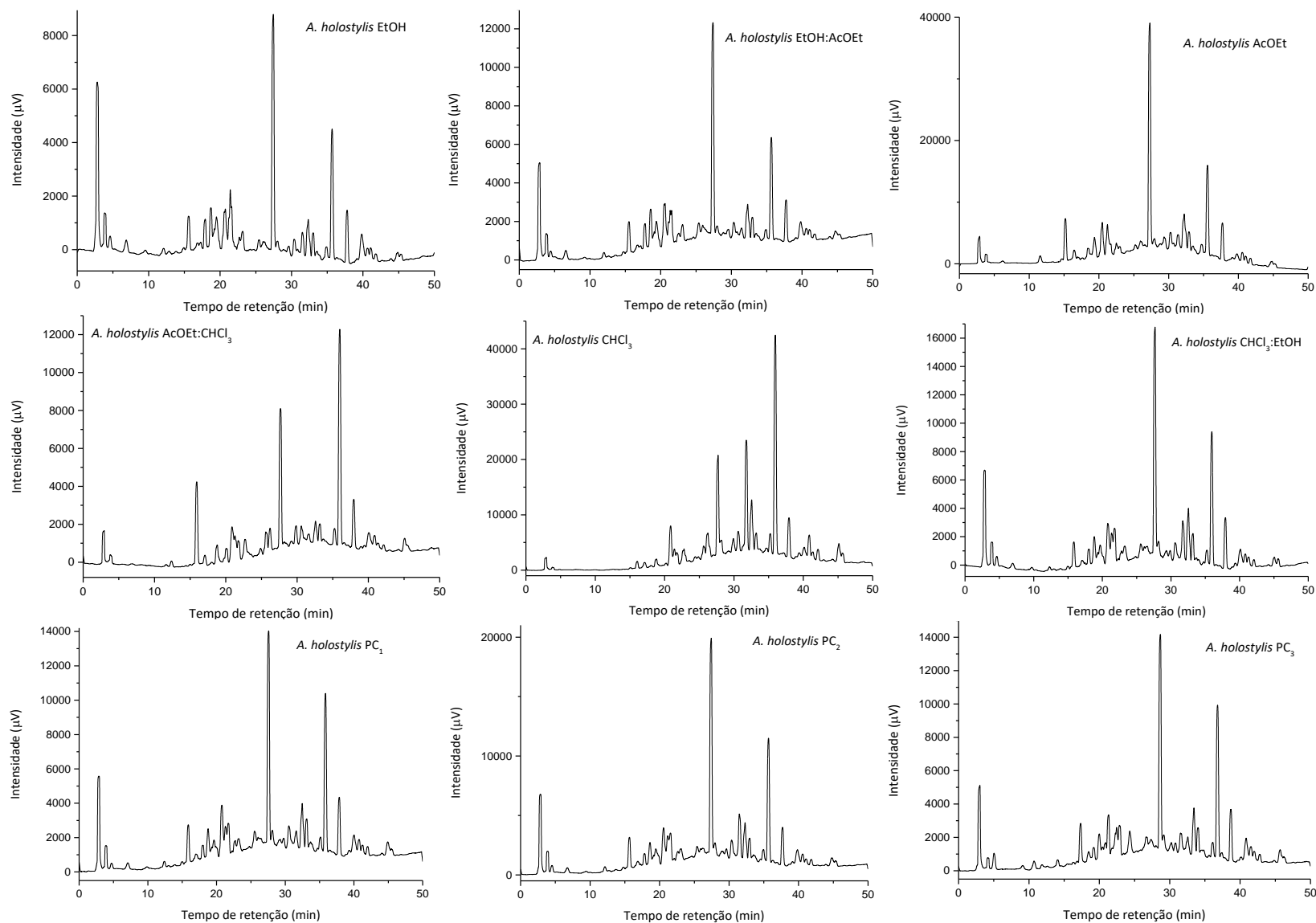


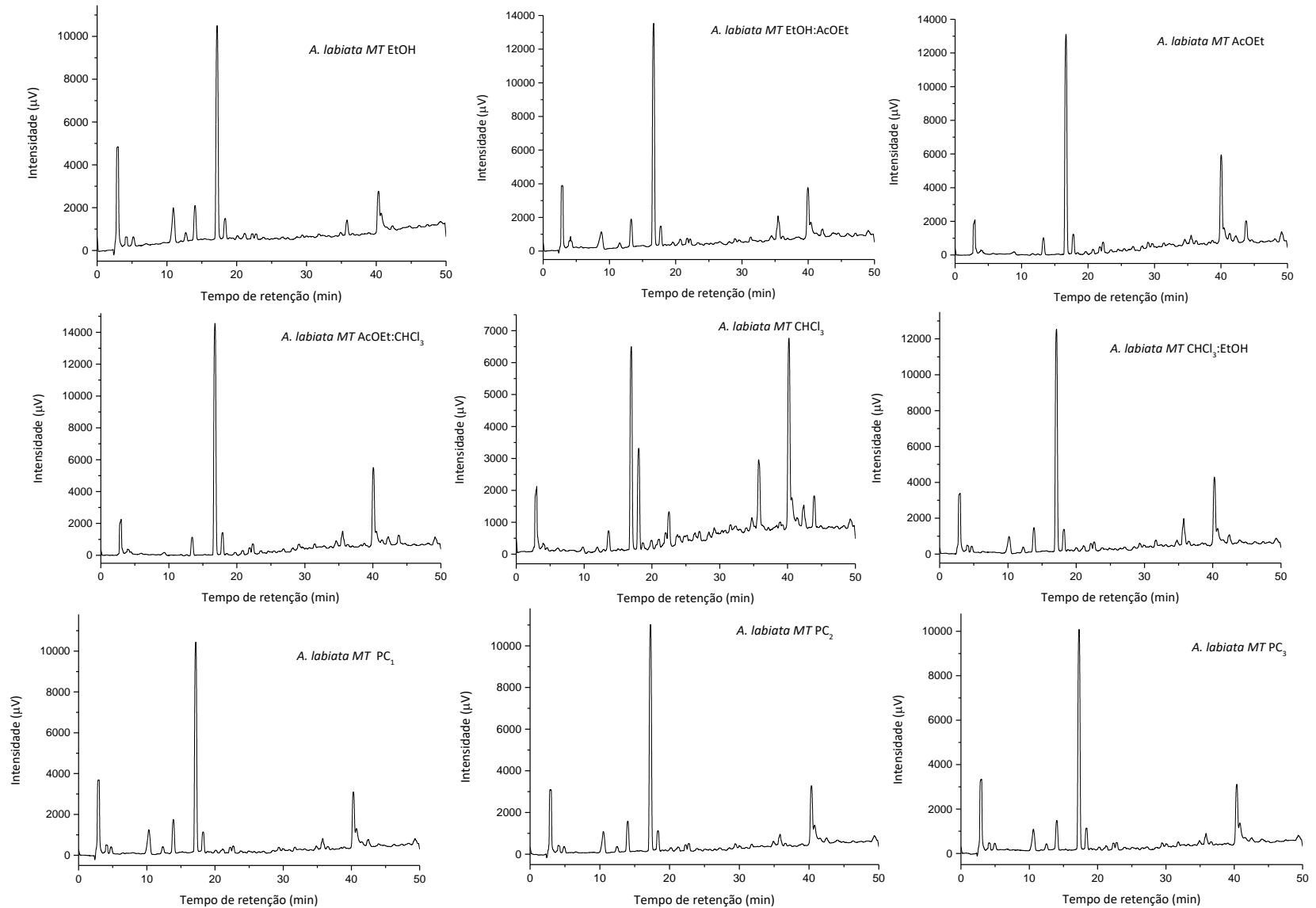
APÊNDICE DDD- Cromatogramas do planejamento simplex centroide para a *A. gehrtii* em $\lambda = 250$ nm

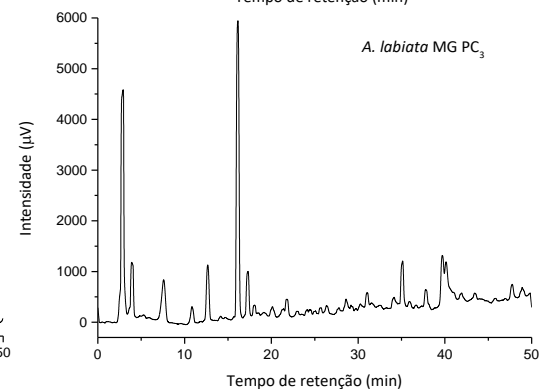
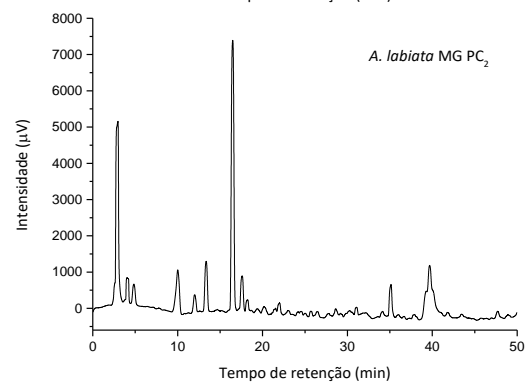
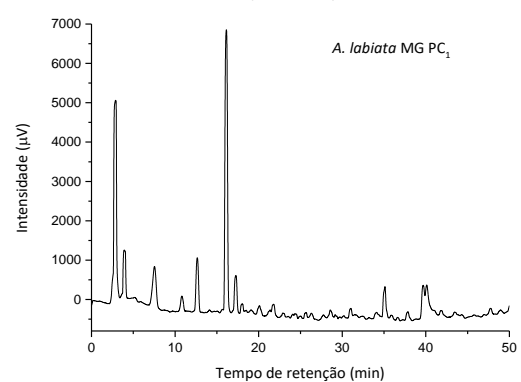
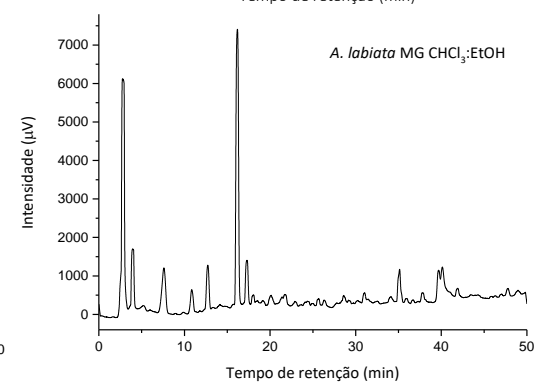
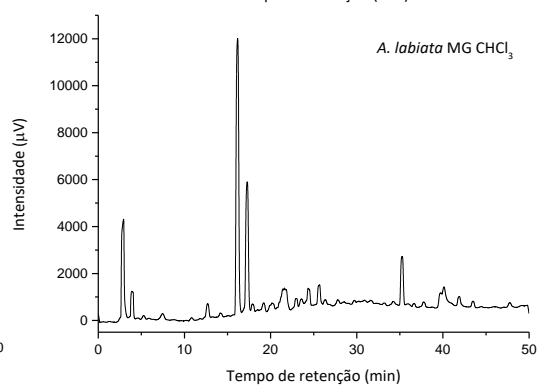
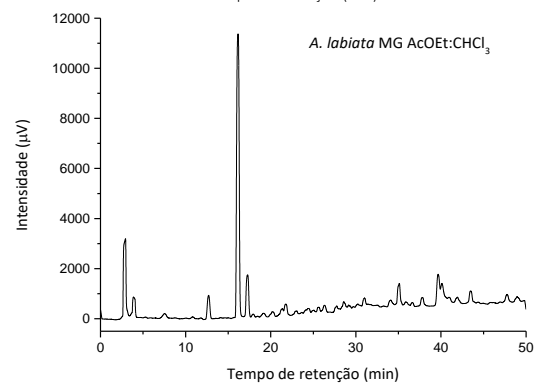
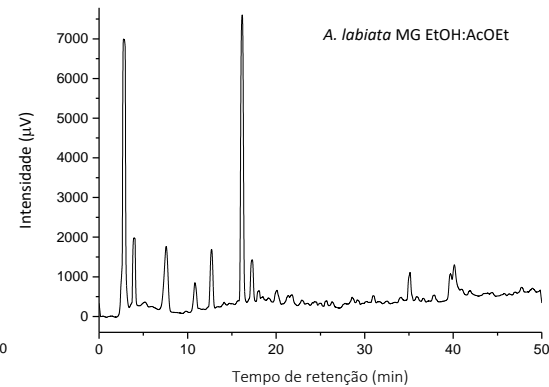
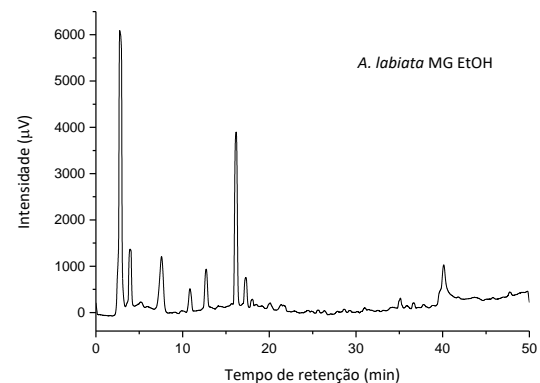
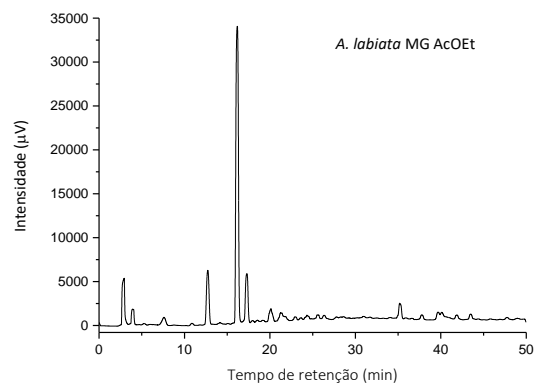
APÊNDICE EEE - Cromatogramas do planejamento simplex centroide para a *A. esperanzae* em $\lambda = 250$ nm

APÊNDICE FFF- Cromatogramas do planejamento simplex centroide para a *A. gardneri* em $\lambda = 250$ nm

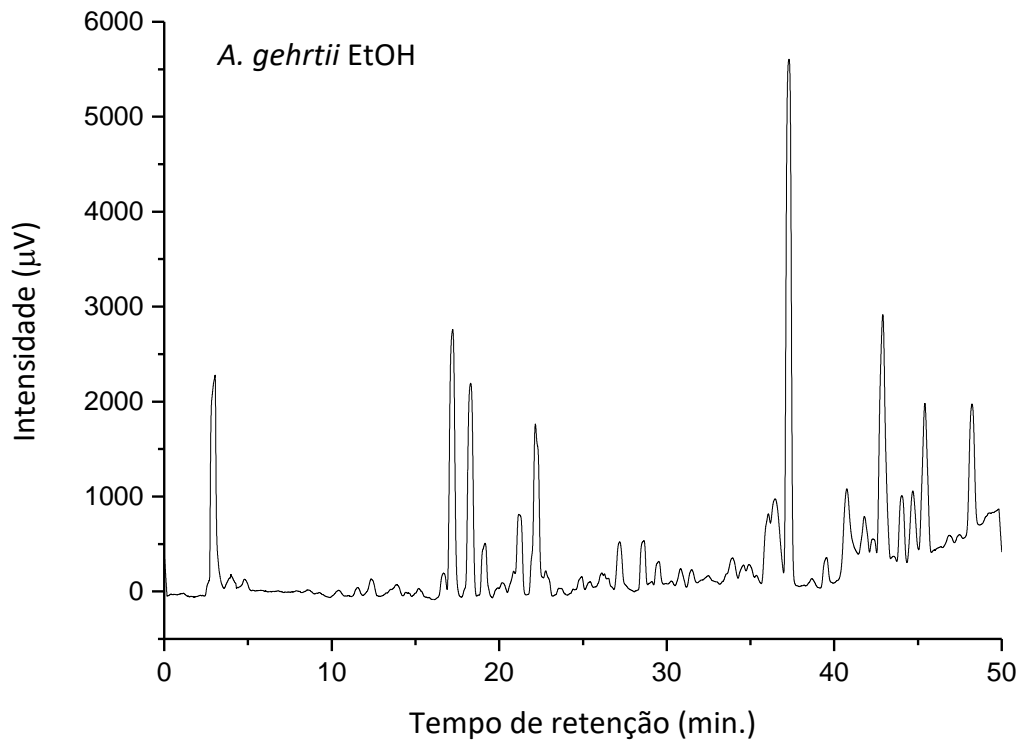
APÊNDICE GGG - Cromatogramas do planejamento simplex centroide para a *A. gigantea* em $\lambda = 250$ nm

APÊNDICE HHH- Cromatogramas do planejamento simplex centroide para a *A. holostylis* em $\lambda = 250$ nm

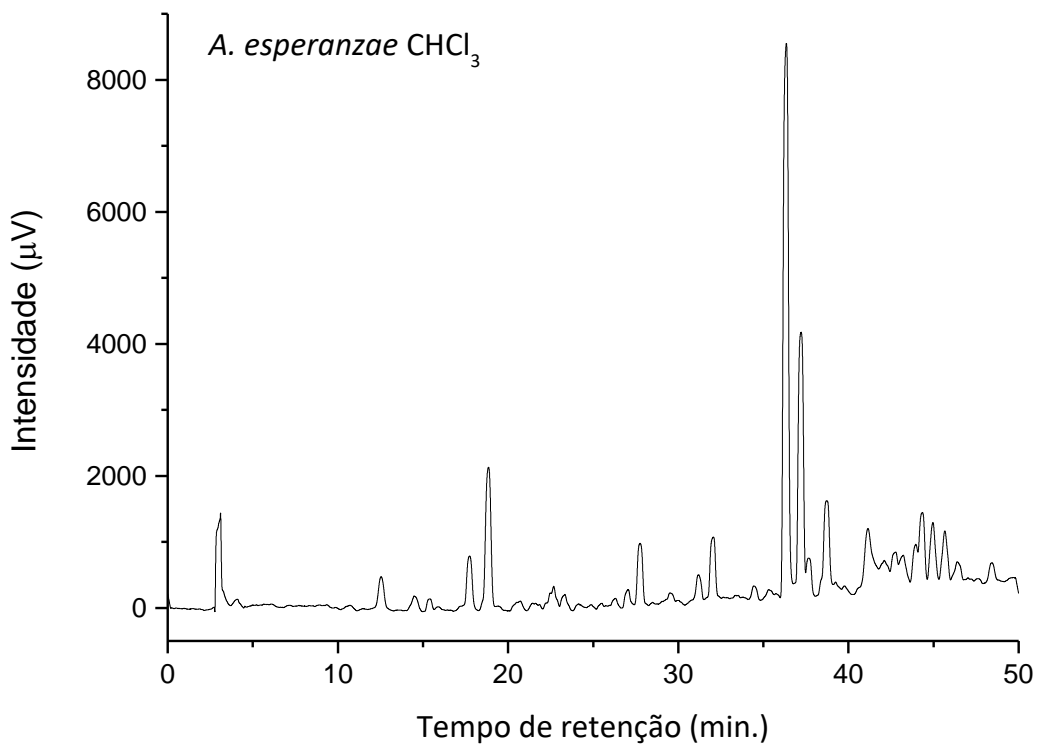
APÊNDICE III- Cromatogramas do planejamento simplex centroide para a *A. labiata* MT em $\lambda = 250$ nm

APÊNDICE JJJ- Cromatogramas do planejamento simplex centroide para a *A. labiata* MG em $\lambda = 250$ nm

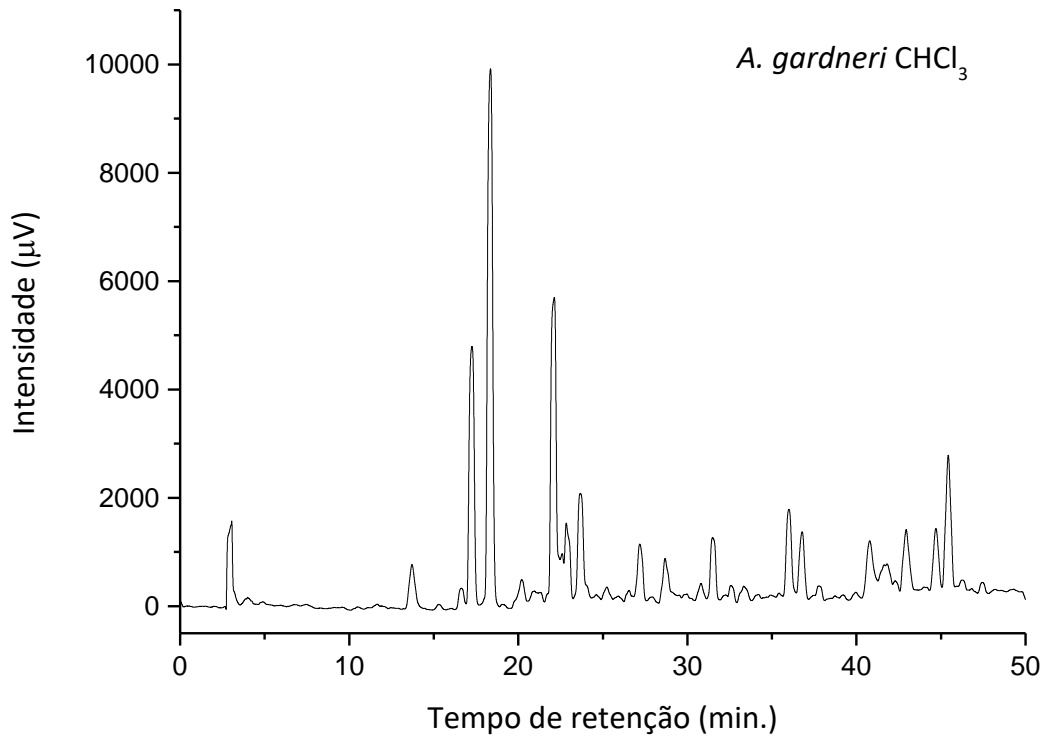
APÊNDICE KKK- Cromatograma validação da melhor condição para *A. gehrtii* em $\lambda = 250$ nm



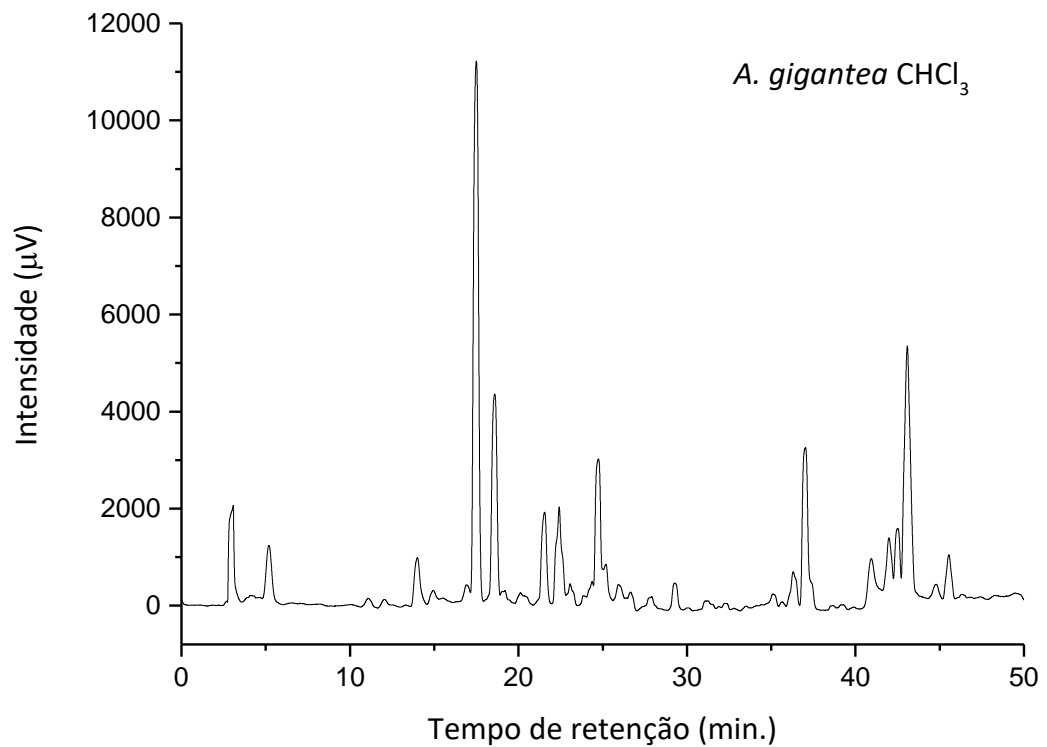
APÊNDICE LLL- Cromatograma validação da melhor condição para *A. esperanzae* em $\lambda = 250$ nm



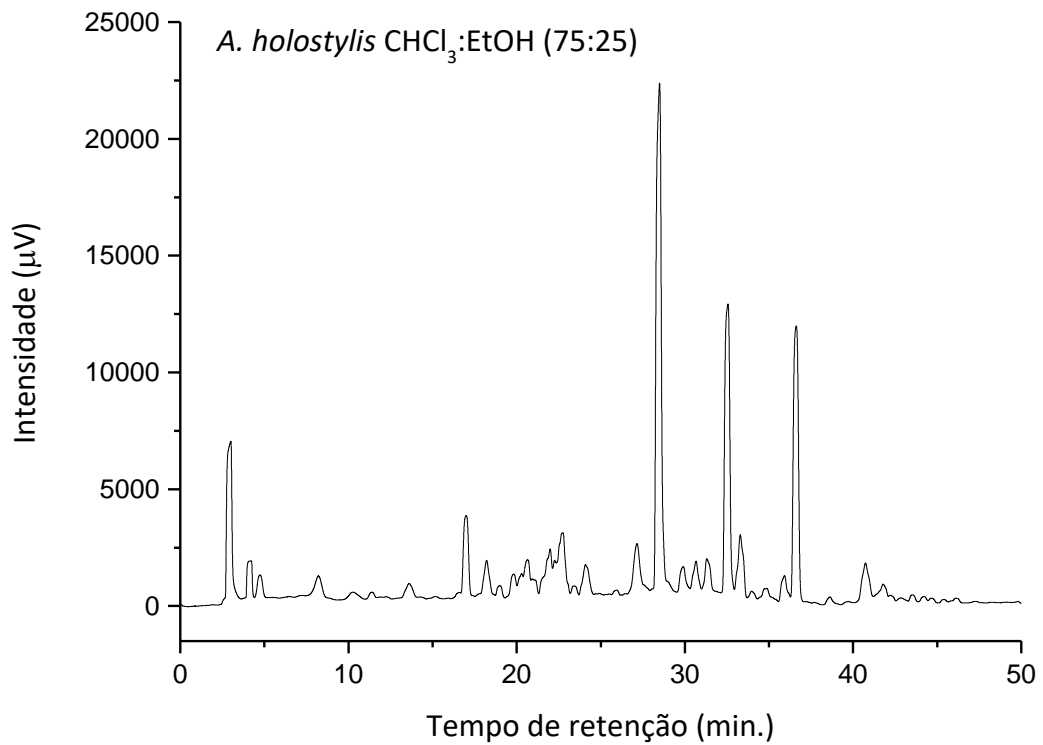
APÊNDICE MMM- Cromatograma validação da melhor condição para *A. gardneri* em $\lambda = 250$ nm



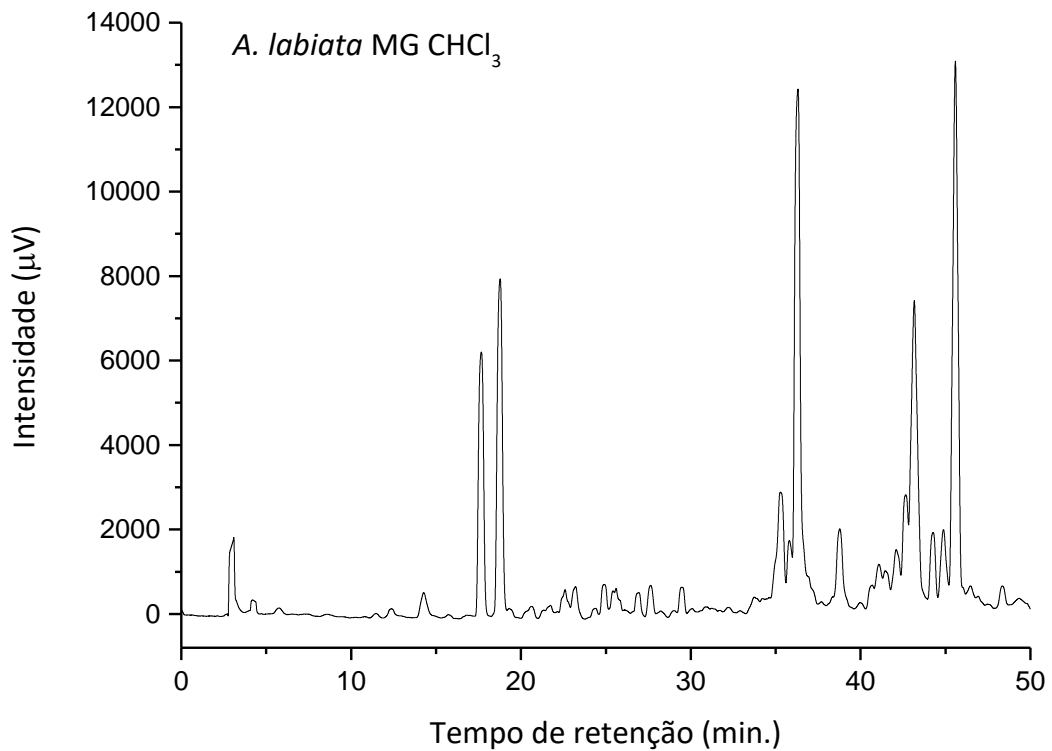
APÊNDICE NNN- Cromatograma validação da melhor condição para *A. gigantea* em $\lambda = 250$ nm



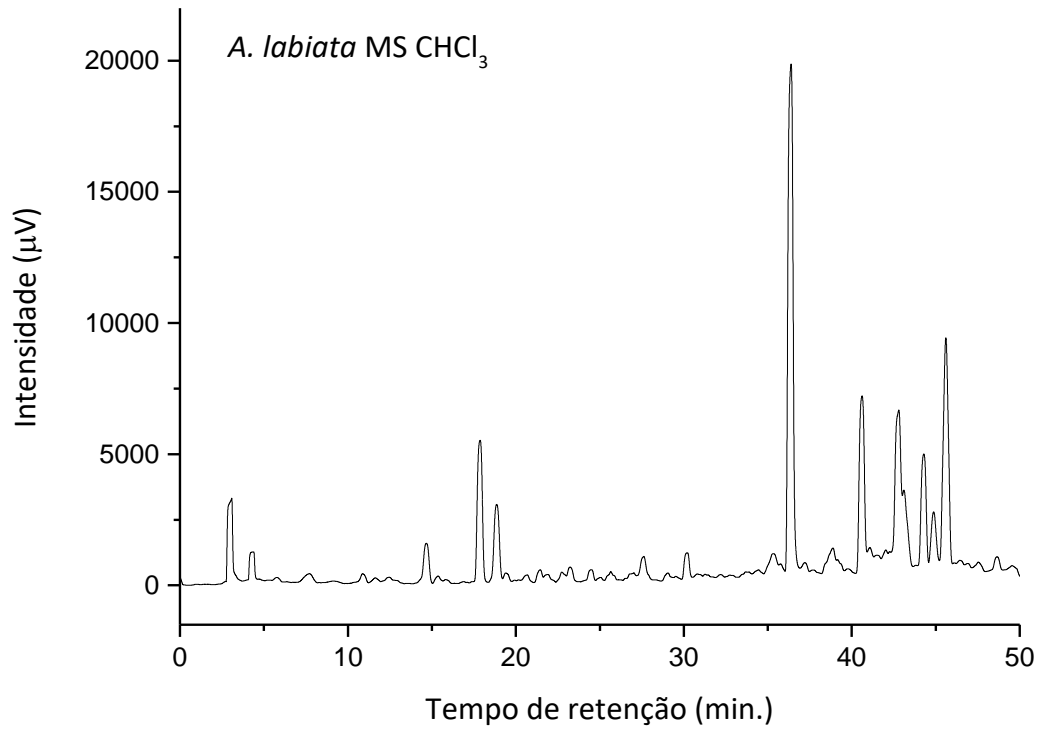
APÊNDICE OOO- Cromatograma validação da melhor condição para *A. holostylis* em $\lambda = 250$ nm



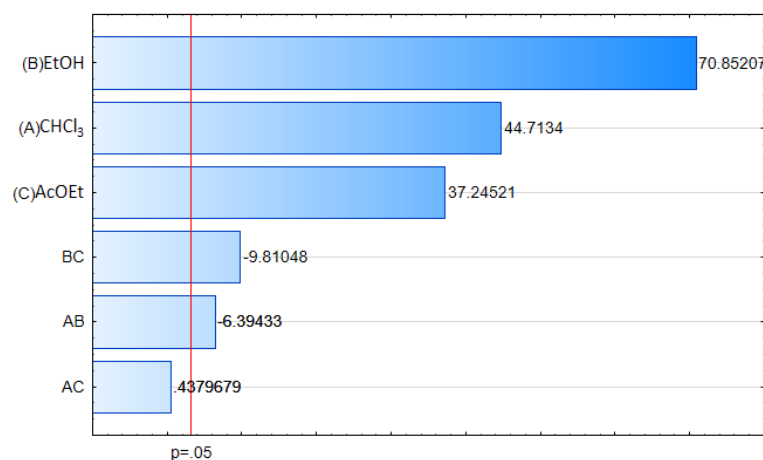
APÊNDICE PPP- Cromatograma validação da melhor condição para *A. labiata* MG em $\lambda = 250$ nm



APÊNDICE QQQ- Cromatograma validação da melhor condição para *A. labiata* MS em $\lambda = 250$ nm



APÊNDICE RRR- Gráfico de Pareto e tabela ANOVA para os efeitos da composição obtidos no planejamento simplex centroide para a espécie *A. gehrtii*

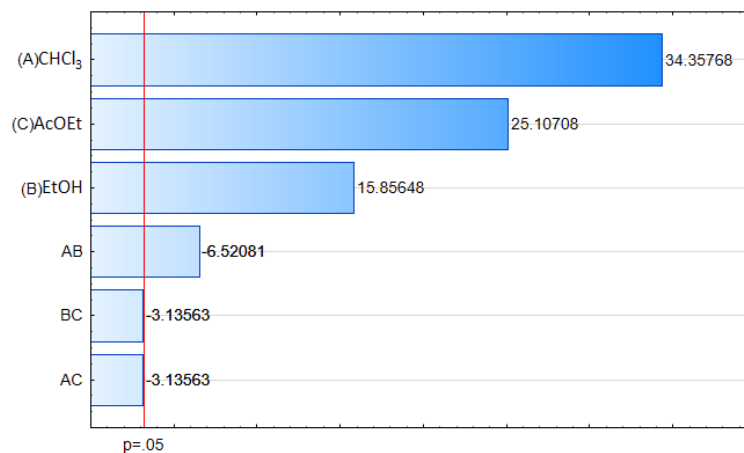


ANOVA para o efeito dos solventes extratores sobre o número de picos utilizando modelo quadrático para a espécie *A. gehrtii*

Fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	Valor de F	Valor de <i>p</i>
Regressão	220,0171	5	44,00342	151,4235	0,000839
Resíduo	0,8718	3	0,29060		
Falta de ajuste	0,2051	1	0,20513	0,6154	0,514929
Erro puro	0,6667	2	0,33333		
Total	220,8889	8	27,61111		
F_{calculado}				F_{tabelado}	
F (MQ _{reg} /MQ _{res})	151,4235			F _{5,3}	9,01
F (MQ _{faj} /MQ _{ep})	0,6154			F _{1,2}	18,51

SQ, soma quadrática; g.l., graus de liberdade; MQ, média quadrática; reg, regressão; res, resíduo; faj, falta de ajuste; ep, erro puro.

APÊNDICE SSS- Gráfico de Pareto e tabela ANOVA para os efeitos da composição obtidos no planejamento simplex centroide para a espécie *A. esperanzae*

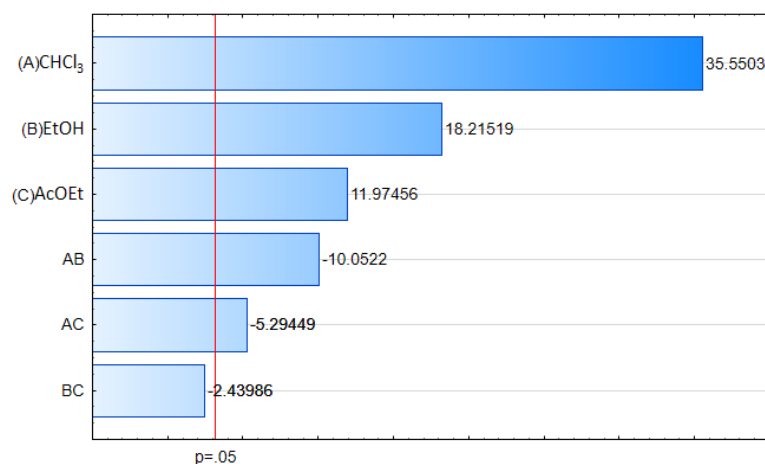


ANOVA para o efeito dos solventes extratores sobre o número de picos utilizando modelo quadrático para a espécie *A. esperanzae*

Fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	Valor de F	Valor de <i>p</i>
Regressão	334,0043	5	66,80085	56,4310	0,003629
Resíduo	3,5513	3	1,18376		
Falta de ajuste	1,5513	1	1,55128	1,5513	0,339074
Erro puro	2,0000	2	1,00000		
Total	337,5556	8	42,19444		
F_{calculado}				F_{tabelado}	
F (MQ _{reg} /MQ _{res})	56,4310			F _{5,3}	9,01
F (MQ _{faj} /MQ _{ep})	1,5513			F _{1,2}	18,51

SQ, soma quadrática; g.l., graus de liberdade; MQ, média quadrática; reg, regressão; res, resíduo; faj, falta de ajuste; ep, erro puro.

APÊNDICE TTT- Gráfico de Pareto e tabela ANOVA para os efeitos da composição obtidos no planejamento simplex centroide para a espécie *A. gardneri*

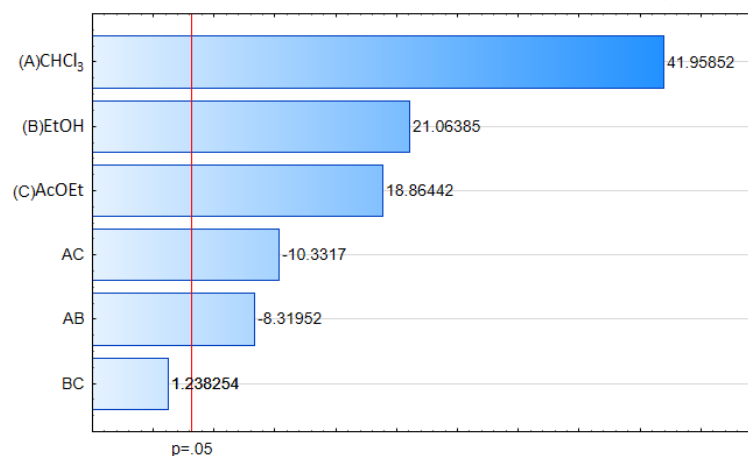


ANOVA para o efeito dos solventes extratores sobre o número de picos utilizando modelo quadrático para a espécie *A. gardneri*

Fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	Valor de F	Valor de <i>p</i>
Regressão	905,6794	5	181,13590	85,9752	0,001947
Resíduo	6,3205	3	2,10684		
Falta de ajuste	5,6538	1	5,65385	16,9615	0,054208
Erro puro	0,6667	2	0,33333		
Total	912,00	8	114,00		
F_{calculado}				F_{tabelado}	
F (MQ _{reg} /MQ _{res})	85,9752			F _{5,3}	9,01
F (MQ _{faj} /MQ _{ep})	16,9615			F _{1,2}	18,51

SQ, soma quadrática; g.l., graus de liberdade; MQ, média quadrática; reg, regressão; res, resíduo; faj, falta de ajuste; ep, erro puro

APÊNDICE UUU- Gráfico de Pareto e tabela ANOVA para os efeitos da composição obtidos no planejamento simplex centroide para a espécie *A. gigantea*

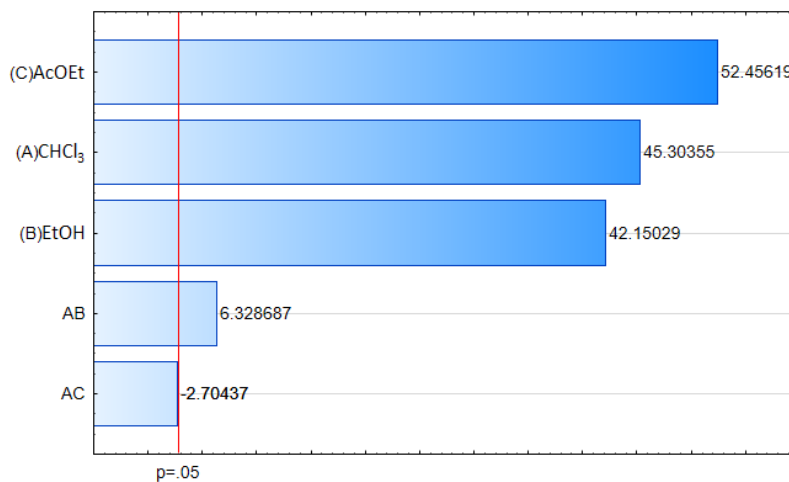


ANOVA para o efeito dos solventes extratores sobre o número de picos utilizando modelo quadrático para a espécie *A. gigantea*

Fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	Valor de F	Valor de <i>p</i>
Regressão	369,4872	5	73,89744	88,2245	0,001874
Resíduo	2,5128	3	0,83761		
Falta de ajuste	1,8462	1	1,84615	5,5385	0,142857
Erro puro	0,6667	2	0,33333		
Total	372,00	8	46,50		
F_{calculado}				F_{tabelado}	
F (MQ _{reg} /MQ _{res})	88,2245			F _{5,3}	9,01
F (MQ _{faj} /MQ _{ep})	5,5385			F _{1,2}	18,51

SQ, soma quadrática; g.l., graus de liberdade; MQ, média quadrática; reg, regressão; res, resíduo; faj, falta de ajuste; ep, erro puro

APÊNDICE VVV- Gráfico de Pareto e tabela ANOVA para os efeitos da composição obtidos no planejamento simplex centroide para a espécie *A. holostylis*

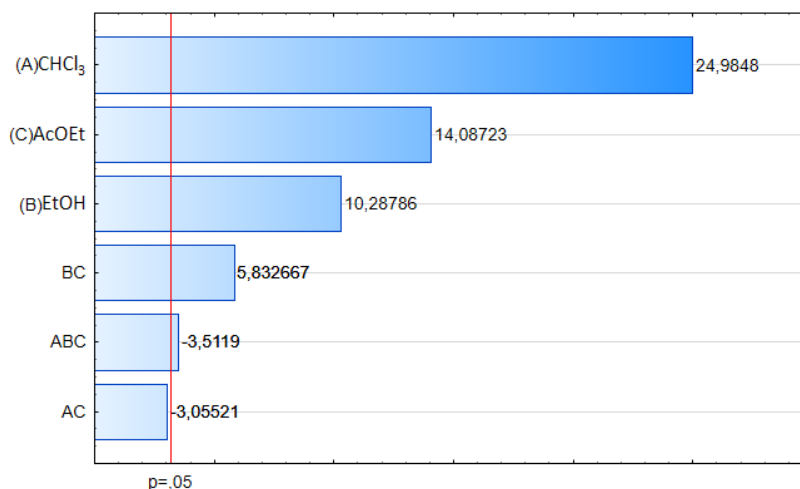


ANOVA para o efeito dos solventes extratores sobre o número de picos utilizando modelo quadrático para a espécie *A. holostylis*

Fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	Valor de F	Valor de <i>p</i>
Regressão	96,7059	4	24,17648	17,53093	0,008422
Resíduo	5,5163	4	1,37908		
Falta de ajuste	3,5163	2	1,75815	1,75815	0,362562
Erro puro	2,0000	2	1,00000		
Total	102,2222	8	12,77778		
F_{calculado}				F_{tabelado}	
F (MQ _{reg} /MQ _{res})	17,53093			F _{4,4}	6,39
F (MQ _{faj} /MQ _{ep})	1,75815			F _{2,2}	19,00

SQ, soma quadrática; g.l., graus de liberdade; MQ, média quadrática; reg, regressão; res, resíduo; faj, falta de ajuste; ep, erro puro

APÊNDICE WWW- Gráfico de Pareto e tabela ANOVA para os efeitos da composição obtidos no planejamento simplex-centroide para a espécie *A. labiata* MS

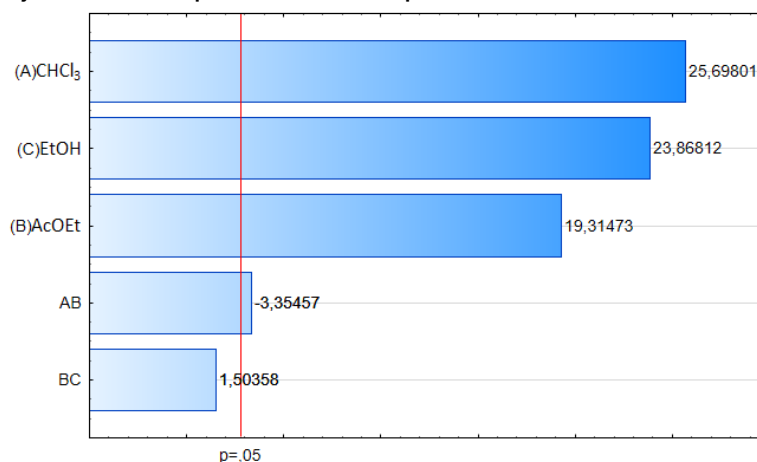


ANOVA para o efeito dos solventes extratores sobre o número de picos utilizando cúbico especial para a espécie *A. labiata* MS

Fonte de variação	SQ	g.l	MQ	Valor de F	Valor de <i>p</i>
Regressão	248,8889	5	49,77778	22,400	0,013972
Resíduo	6,6667	3	2,22222		
Falta de ajuste	6,0000	1	6,00000	18,000	0,051317
Erro puro	0,6667	2	0,33333		
Total	255,5556	8	31,94444		
F_{calculado}				F_{tabelado}	
F (MQ _{reg} /MQ _{res})	22,400			F _{5,3}	9,01
F (MQ _{faj} /MQ _{ep})	18,000			F _{1,2}	18,55

SQ, soma quadrática; g.l., graus de liberdade; MQ, média quadrática; reg, regressão; res, resíduo; faj, falta de ajuste; ep, erro puro

APÊNDICE XXX - Gráfico de Pareto e tabela ANOVA para os efeitos da composição obtidos no planejamento simplex-centroide para a *A. labiata* MG



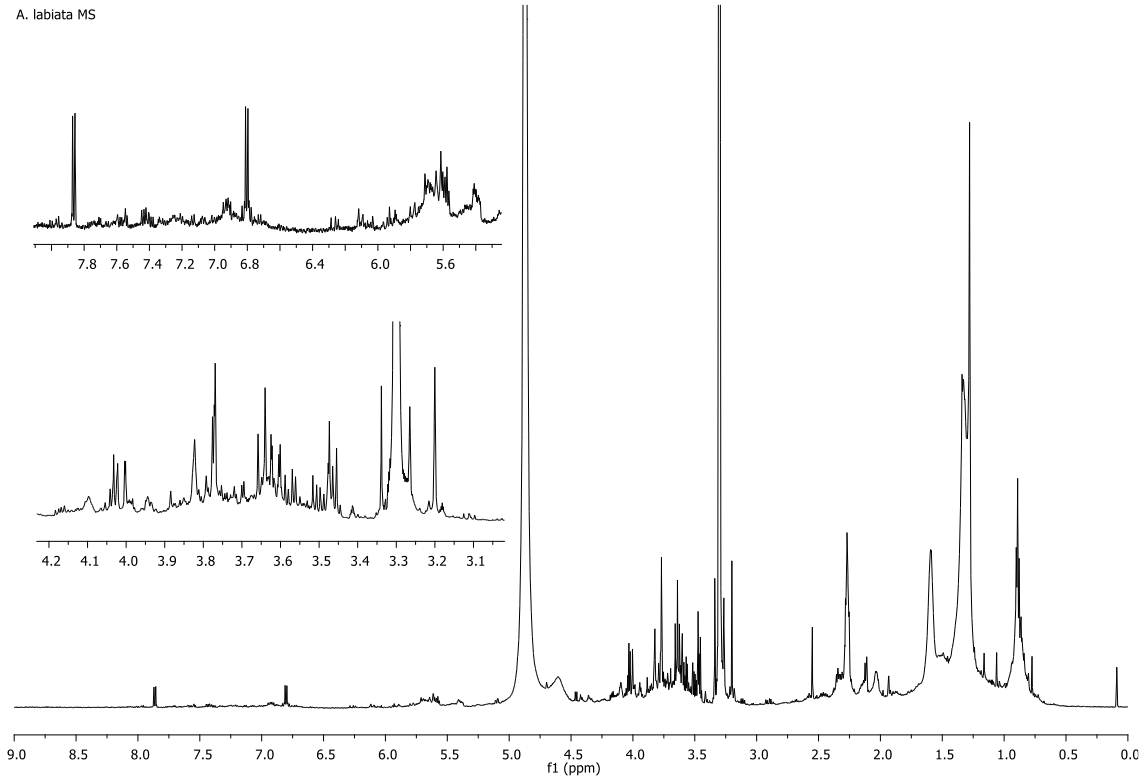
ANOVA para o efeito dos solventes extratores sobre o número de picos utilizando modelo quadrático para a espécie *A. labiata* MG

Fonte de variação	SQ	g.l	MQ	Valor de F	Valor de <i>p</i>
Regressão	80,98551	4	20,24638	6,22272	0,052199
Resíduo	13,01449	4	3,25362		
Falta de ajuste	12,34783	2	6,17391	18,52174	0,051225
Erro puro	0,66667	2	0,33333		
Total	94,00000	8	11,75000		
F_{calculado}				F_{tabelado}	
F (MQ _{reg} /MQ _{res})	6,22272			F _{4,4}	6,39
F (MQ _{faj} /MQ _{ep})	18,52174			F _{2,2}	19,00

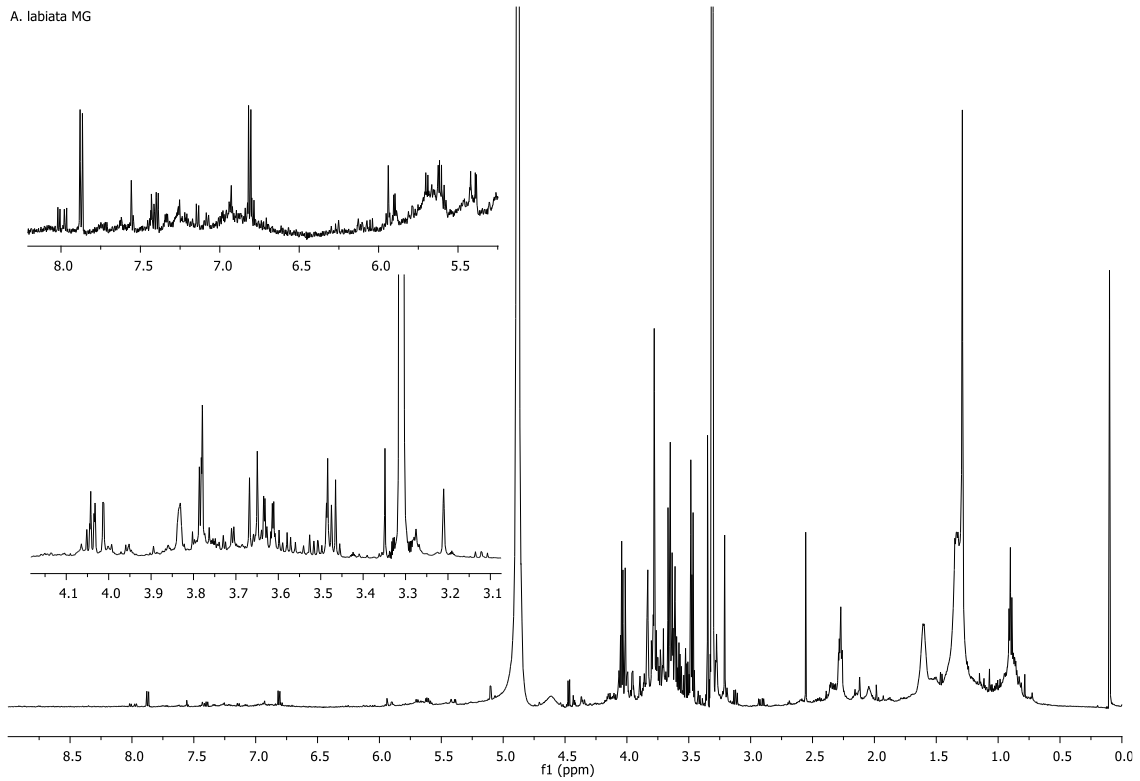
SQ, soma quadrática; g.l., graus de liberdade; MQ, média quadrática; reg, regressão; res, resíduo; faj, falta de ajuste; ep, erro puro.

APÊNDICE YYY- Espectro de RMN de ^1H de flores de *A. labiata* MG (CD_3OD , 14,1 T).

A. labiata MS

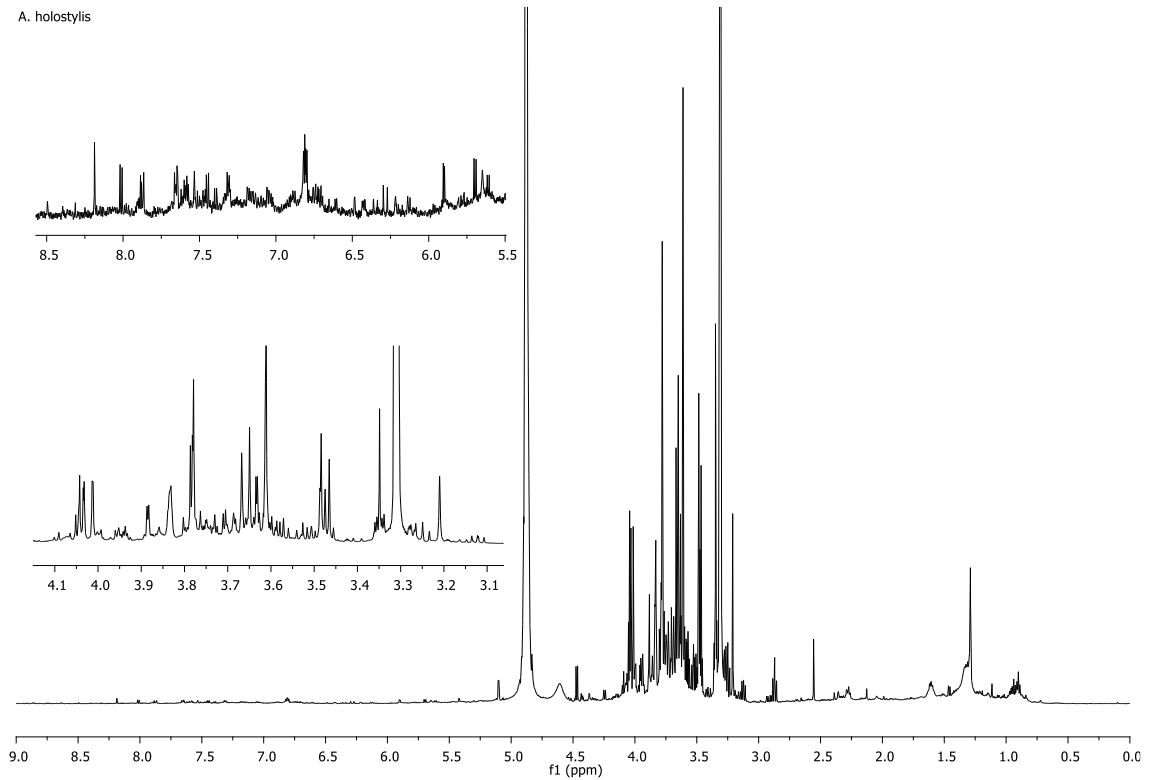
**APÊNDICE ZZZ-** Espectro de RMN de ^1H de flores de *A. labiata* MS (CD_3OD , 14,1 T).

A. labiata MG



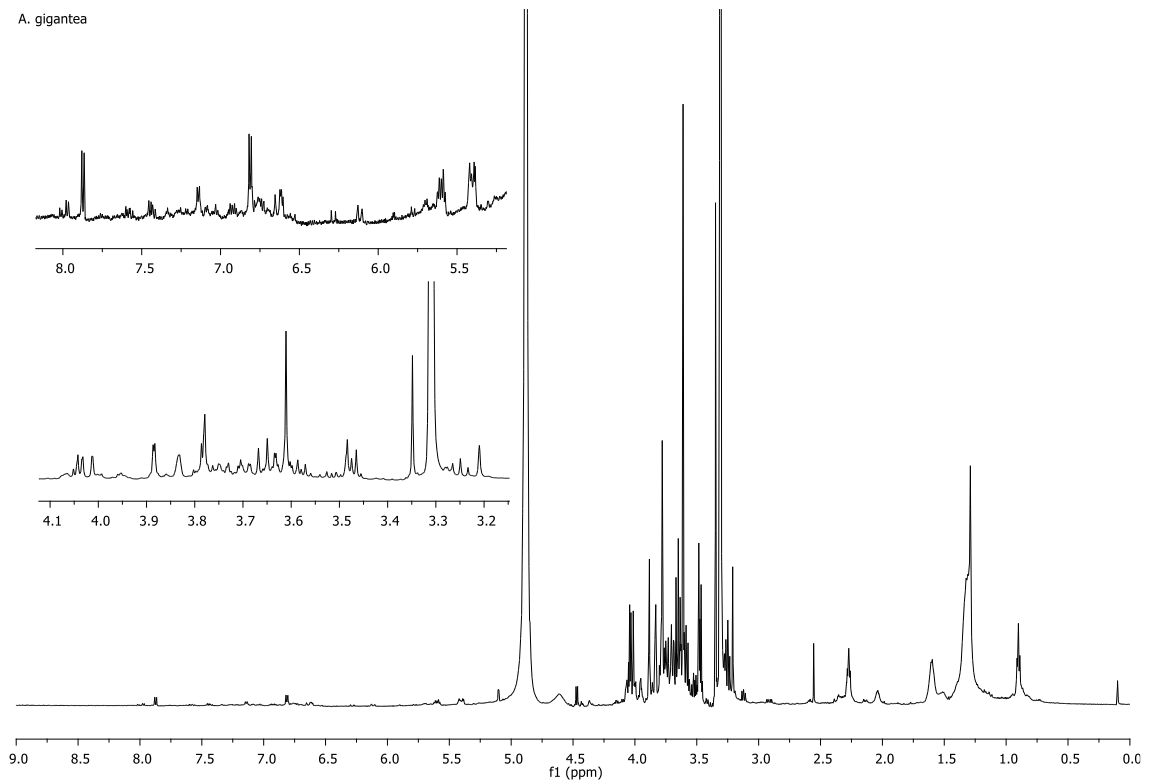
APÊNDICE AAAA- Espectro de RMN de ^1H de flores de *A. holostylis* (CD_3OD , 14,1 T).

A. holostylis



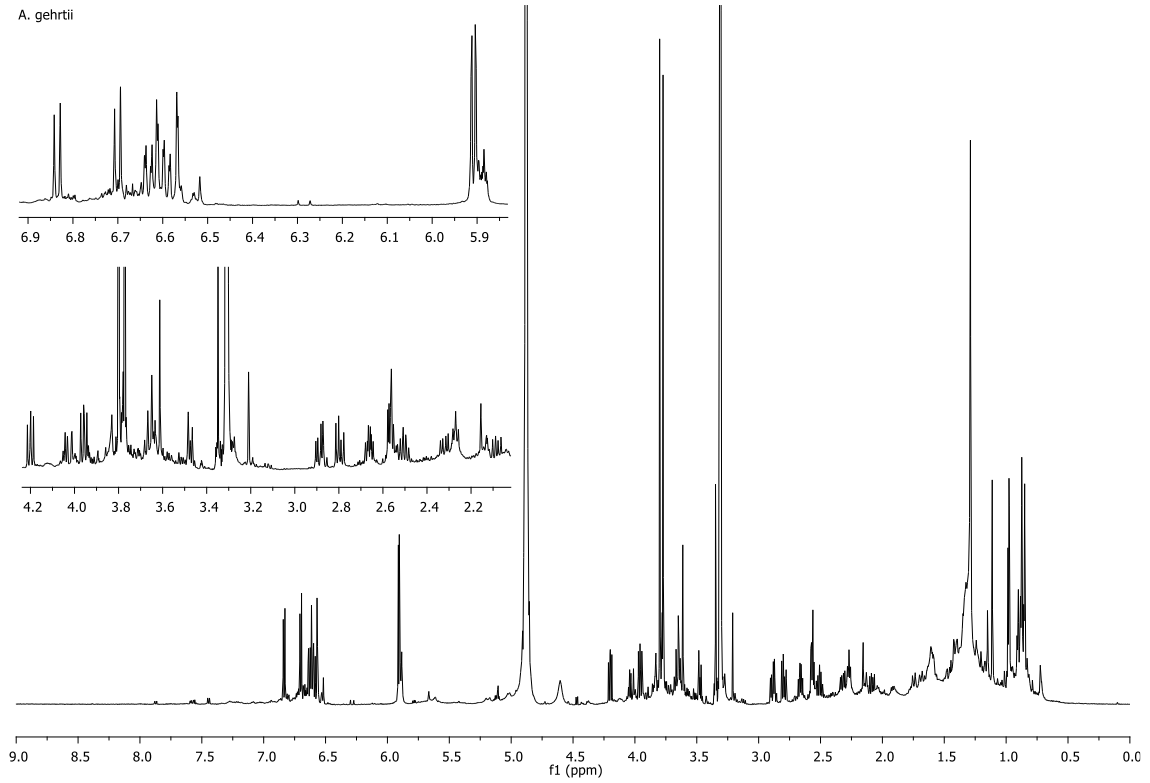
APÊNDICE BBBB- Espectro de RMN de ^1H de flores de *A. gigantea* (CD_3OD , 14,1 T).

A. gigantea

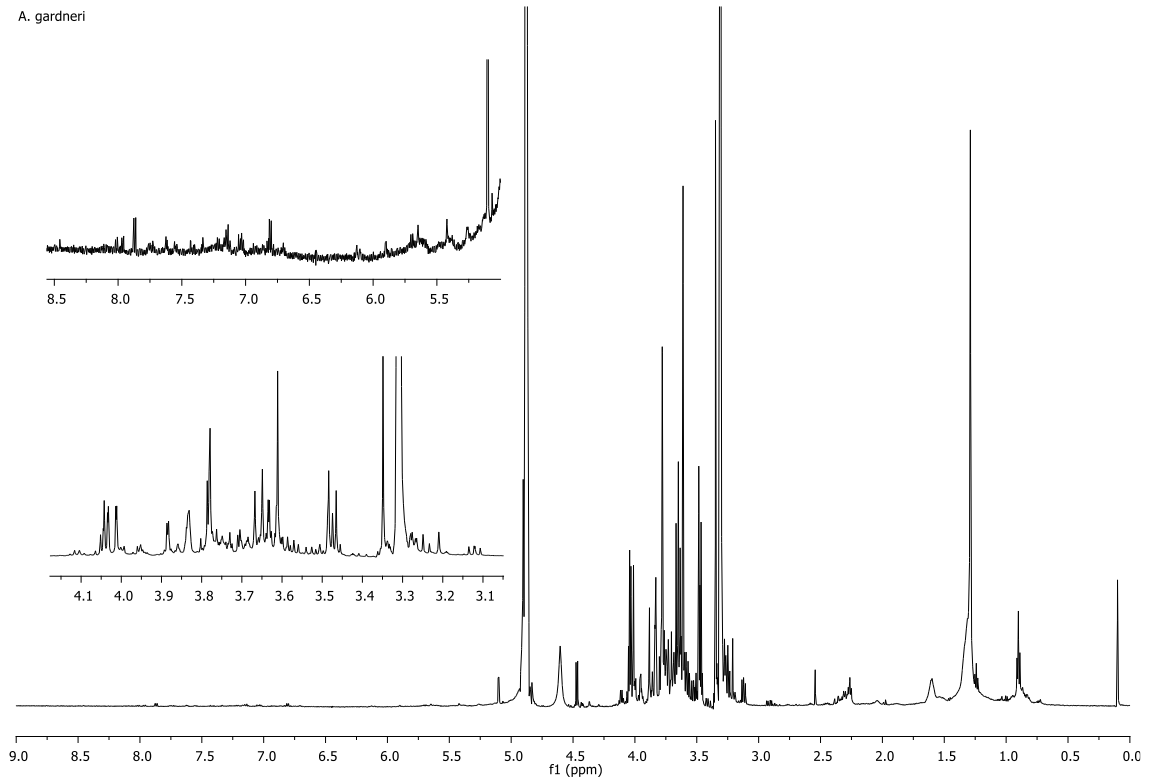


APÊNDICE CCCC- Espectro de RMN de ^1H de flores de *A. gehrtii* (CD_3OD , 14,1 T).

A. gehrtii

**APÊNDICE DDDD-** Espectro de RMN de ^1H de flores de *A. gardneri* (CD_3OD , 14,1 T).

A. gardneri



APÊNDICE EEEE- Espectro de RMN de ^1H de flores de *A. esperanzae* (CD_3OD , 14,1 T).

A. esperanzae

