

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, UNIFAL-MG

BIANCA GONÇALVES VASCONCELOS DE ALCÂNTARA

**METABOLÔMICA, FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-
INFLAMATÓRIO DE ESPÉCIES DE LAURACEAE**

ALFENAS/MG

2024

BIANCA GONÇALVES VASCONCELOS DE ALCÂNTARA

**METABOLÔMICA, FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-
INFLAMATÓRIO DE ESPÉCIES DE LAURACEAE**

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutora em Química
pelo Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Química Orgânica
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela A. Chagas de Paula

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

De Alcântara , Bianca Gonçalves Vasconcelos.
Metabolômica, Fitoquímica e Avaliação do Potencial Anti-inflamatório
de Espécies de Lauraceae / Bianca Gonçalves Vasconcelos De Alcântara . -
Alfenas, MG, 2023.
125 f. : il. -

Orientador(a): Daniela Aparecida Chagas de Paula.
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas,
Alfenas, MG, 2023.
Bibliografia.

1. Predição. 2. Inflamação. 3. Análises de correlação in silico. 4.
Alcaloides. I. Chagas de Paula, Daniela Aparecida, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

BIANCA GONÇALVES VASCONCELOS DE ALCÂNTARA

“METABOLÔMICA, FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE ESPÉCIES DE LAURACEAE”

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 01 de novembro de 2023.

Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Alessandra Regina Pepe Ambrozini
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Patrícia Sartorelli
Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Karen de Jesus Nicácio
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Aparecida Chagas de Paula, Professor do Magistério Superior**, em 22/04/2024, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1237305** e o código CRC **5DA522DA**.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus que me sustentou até aqui! Agradeço ao meu esposo Thiago, que me ajudou, apoiou e me levou a perseverar todos os dias por esse sonho. Obrigada por isso meu amor! Agradeço a minha mãe Maria Helena que apoiou e ajudou tanto nesses anos de doutorado, com suas palavras, ações e orações. Agradeço a amizade e apoio da minha irmã Lara, que foram fundamentais para tornar os dias mais leves.

Sou grata a minha orientadora Daniela, por permitir trabalhar com temas tão atuais e interessantes, possibilitando conhecer pessoas tão incríveis e produzir um trabalho que será lembrado. Muito obrigada pela paciência em transmitir seu conhecimento e por me ajudar a chegar ao final dessa caminhada. Agradeço a professora Marisi, que sempre com seu jeito tão alto astral nos ajudou e apoiou nos nossos trabalhos. Agradeço também a professora Danielle, que com sua sabedoria contribuiu muito para o crescimento de ideias.

Agradeço a equipe do Laboratório de Fitoquímica, Química Medicinal e Metabolômica (LFQMM), que fez parte por tantos anos da minha vida e, muito me ensinou, sobre a química, sobre a amizade, sobre o trabalho em equipe, sobre a liderança de um professor! Em todos esses anos, pude fazer muitas amizades e ter o privilégio de ter convivido com grandes doutores. Levarei um pouco de cada um comigo aonde quer que eu vá! Agradeço em especial ao Albert, que foi um importante amigo e parceiro de trabalho, aprendi muito com seu jeito leve e com todo conhecimento que sua curiosidade o instigou. Agradeço também a Heloísa, pela parceria e contribuição com o capítulo 2 deste trabalho! Foram anos de muito aprendizado, lutas e autoconhecimento, amadurecimento e crescimento, que me tornaram uma pessoa melhor e mais sábia. Agradeço enormemente todas as oportunidades que todo esse conhecimento e esse título trouxeram e ainda trarão!

Agradeço à toda equipe do ASTEBIOCHEM de Ribeirão Preto, que auxiliou nas análises de UPLC-UV-HRMS-ESI-ORBITRAP. Também agradeço a professora RuAngelie Edrada-Ebel pela contribuição sobre as abordagens metabolômicas.

Agradeço a Unifal-MG, que faz parte da minha vida desde agosto de 2010! Quantos anos, quantos aprendizados e quantas transformações aconteceram! Gratidão! Muito obrigada ao Programa de Pós Graduação em Química, que trabalha incessantemente para oferecer o melhor para nós! Obrigada aos órgãos de fomento pelos financiamentos que viabilizaram esta pesquisa.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UNIFAL-MG. Códigos de financiamento APQ-02353-17, Red-00570-16 e APQ 00207-18; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), códigos de financiamento 316204/2021-8 e 406837/2021-0.

RESUMO

A família Lauraceae possui uma grande diversidade de gêneros e espécies, das quais várias espécies são endêmicas do Brasil. Algumas espécies dessa família demonstraram propriedade anti-inflamatória para seus extratos ou substâncias isoladas. A inflamação é um distúrbio presente em uma ampla gama de patologias, que representa um alvo relevante de estudos para descoberta de novos tratamentos. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória de espécies pertencentes à família Lauraceae. Além disso, fazer um estudo metabolômico destas espécies, obter um modelo de predição *in silico* de atividade anti-inflamatória e selecionar uma espécie para realizar o estudo fitoquímico. Foi utilizada UPLC-HRMS para o estudo metabolômico. Utilizou-se modelo *ex vivo* para a avaliação anti-inflamatória, além de ferramentas estatísticas para obtenção do modelo de predição da atividade anti-inflamatória de extratos vegetais da família Lauraceae. A partir das estratégias metabolômicas foi possível direcionar o isolamento e purificação de um biomarcador de atividade anti-inflamatória. Os resultados *ex vivo* demonstraram que a maioria das espécies apresentou atividade anti-inflamatória superior a 50% de inibição, sendo que as espécies *Ocotea diospirifolia*, *Cinnamomum glaziovii*, *Nectandra membranacea*, *Ocotea odorifera* e *Persea major* apresentaram os maiores valores de porcentagem de inibição de PGE₂, estando acima de 77% de inibição. Diversos extratos demonstraram atividade anti-inflamatória pela primeira vez. Ainda, o estudo metabolômico permitiu caracterizar quimicamente as amostras e construir um modelo de predição PLS robusto, com valores de $R^2 = 0,99$ e $Q^2 = 0,92$ e valores preditos na validação externa muito próximos dos valores reais. Além disso, modelos adicionais de aprendizado de máquina ANN e SGD demonstraram ser robustos e corroboraram os resultados do modelo PLS. Entre os biomarcadores positivamente correlacionados com a atividade anti-inflamatória, os alcaloides do tipo aporfínicos e benzilisoquinolínicos foram anotados com nível 2 de confiança, conforme diretrizes metabolômicas. Além disso, foi possível isolar um dos biomarcadores da atividade anti-inflamatória, o novo alcaloide 2,10-dimetoxiaporfina, da espécie *O. odorifera*. Desta forma, este trabalho de uma maneira geral, produziu conhecimento novo sobre 18 espécies da família Lauraceae, que poderá servir de subsídio para futuros estudos de espécies da família Lauraceae; além de evidenciar o potencial para descoberta de novos compostos químicos.

Palavras-chave: Predição. Inflamação. Análises de correlação *in silico*. Alcaloides.

ABSTRACT

The Lauraceae family has a great diversity of genera and species, of which several species are endemic to Brazil. Some species of this family have demonstrated anti-inflammatory properties for their extracts or isolated substances. Inflammation is a disorder present in a wide range of pathologies that represents a relevant target for studies to discover new treatments. In this context, this work aimed to evaluate the anti-inflammatory activity for species belonging to the Lauraceae family. Furthermore, carry out a metabolomic study of these species, obtain an in-silico prediction model of anti-inflammatory activity and select a species to carry out a phytochemical study. UPLC-HRMS was used for the metabolomics study. An ex vivo model was used for anti-inflammatory evaluation. In addition to statistical tools to obtain a model for predicting the anti-inflammatory activity of plant extracts from the Lauraceae family. Using metabolomic strategies, it was possible to direct the isolation and purification of a biomarker of anti-inflammatory activity. The ex vivo results demonstrated that most species presented anti-inflammatory activity greater than 50% inhibition, with the species *Ocotea diospirifolia*, *Cinnamomum glaziovii*, *Nectandra membranacea*, *Ocotea odorifera* and *Persea major* presenting the highest values of percentage of PGE₂ inhibition, being above 77% inhibition. Several extracts demonstrated anti-inflammatory activity for the first time. Furthermore, the metabolomic study allowed us to chemically characterize the samples and build a robust PLS prediction model, with values of $R^2 = 0.99$ and $Q^2 = 0.92$ and values predicted in external validation very close to the real values. Furthermore, additional ANN and SGD machine learning models proved to be robust and corroborated the results of the PLS model. Among the biomarkers positively correlated with anti-inflammatory activity, aporphinic and benzyloisoquinoline alkaloids were noted with confidence level 2, according to metabolomic guidelines. Furthermore, it was possible to isolate one of the biomarkers of anti-inflammatory activity, the new alkaloid 2,10-dimethoxyaporphine, from the specie *O. odorifera*. Thus, this work in general produced new knowledge about 18 species of the Lauraceae family that could serve as a basis for future studies of species of the Lauraceae family; in addition to highlighting the potential for discovering new chemical compounds.

Keywords: Prediction. Inflammation. In silico correlation analyses. Alkaloids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema representando a via do chiquimato, com formação final dos alcaloides.....	24
Figura 2 -	Estrutura química dos esqueletos piperidínico, piridínico, quinolínico, isoquinolínico e indólico.....	25
Figura 3 -	Estrutura química representando o núcleo dos alcaloides benzilisoquinolínicos, aporfínicos, fenantrênicos e morfinânicos.....	26
Figura 4 -	Imagens representando as espécies <i>Ocotea odorifera</i> , <i>Ocotea diospyrifolia</i> , <i>Ocotea divaricata</i> e <i>Ocotea corymbosa</i>	28
Figura 5 -	Estrutura química do safrol.....	29
Figura 6 -	Imagens representando as espécies <i>Ocotea bicolor</i> , <i>Ocotea puberula</i> , <i>Ocotea pulchella</i> , <i>Ocotea aciphylla</i>	30
Figura 7 -	Imagem representando a espécie <i>Aniba firmula</i> e estrutura química da neolignana biciclo octana neo canelina isolada da mesma.....	31
Figura 8 -	Imagens representando as espécies <i>Cinnamomum triplinerve</i> e <i>Cinnamomum glaziovii</i>	32
Figura 9 -	Estrutura química da cânfora.....	33
Figura 10 -	Imagens representando as espécies <i>Persea willdenovii</i> e <i>Persea major</i>	34
Figura 11 -	Imagem representando a espécie <i>Endlicheria paniculata</i> e seu composto isolado, desidrodieugenol B.....	34
Figura 12 -	Imagens ilustrando as espécies <i>Nectandra membranacea</i> , <i>Nectandra oppositifolia</i> e <i>Nectandra grandiflora</i>	36
Figura 13 -	Imagem representando a espécie <i>Aiouea saligna</i>	37
Figura 14 -	Estrutura química do Zileuton.....	39
Figura 15 -	Estrutura química da PGE ₂ e do LTB ₄	39
Figura 16 -	Estrutura química dos coxibes celecoxibe e rofecoxibe.....	40
Figura 17 -	Estrutura química da dexametasona e betametasona.....	41

Figura 18 - Representação da estrutura química do licofelone.....	42
Figura 19 - Fluxograma do isolamento do biomarcador (ID 74 ou 76) da fração clorofórmio.....	62
Figura 20 - Gráfico da atividade anti-inflamatória superior a 75% de inibição de PGE ₂ , referente ao grupo G1.....	68
Figura 21 - Gráfico da atividade anti-inflamatória entre 75-50% de inibição de PGE ₂ , referente ao grupo G2.....	69
Figura 22 - Gráfico da atividade anti-inflamatória inferior a 50% de inibição de PGE ₂ , referente ao grupo G3.....	70
Figura 23 - Gráfico de dispersão PCA (PC1xPC2) das espécies de Lauraceae, sendo treino (verde) e teste (vermelho). Elipse hoteleira = 95%, R ² = 0,54, três componentes.....	72
Figura 24 - a) Distribuição 2D Score plot dos extratos de espécies de Lauraceae obtidos pelos mínimos quadrados parciais (PLS), modelo M2, mostrando dois primeiros componentes (dimensões de e b) 3D Score plot mostrando todos os três componentes (t[1], t[2] e t[3]). R ² Y de 0,99 e Q ² de 0,92 (p = 0,0002), modo positivo. Dados normalizados Unit Variance None (UVN). As figuras foram desenhadas com o software SIMCA®.....	74
Figura 25 - Gráfico de dispersão da regressão para os valores observados vs. previstos da inibição percentual da atividade anti-inflamatória, obtidos pelo modelo PLS para o conjunto de treinamento dos dados de Lauraceae, com R ² de 0,93. A figura foi obtida por meio do software SIMCA®.....	75
Figura 26 - Variáveis importantes para a projeção (VIPs) do modelo de atividade anti-inflamatória pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS), 3 componentes, modo positivo. A figura foi obtida por meio do software SIMCA®.....	76
Figura 27 - Visão geral dos coeficientes correlacionados com a atividade anti-inflamatória do modelo de predição pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS), 3 componentes, modo positivo. A figura foi obtida por meio do software SIMCA®.....	77
Figura 28 - Curvas ROC dos metabólitos anotados comuns aos modelos PLS e SGD indicam valores individuais de AUC satisfatórios (> 0,7). As figuras foram desenhadas via <i>software Metaboanalyst v 5.0</i>	88

Figura 29 - Cromatograma em 254 nm do grupo G10, obtido da fração alcaloídica por HPLC-UV-DAD (coluna C18 - 5 μ m 7,6 mm x 250 mm, fluxo de 1,0 mL/min, eluente: 5% a 100% de ACN:H ₂ O com 0,1% de ácido acético por 30 min).....	89
Figura 30 - Espectro de RMN de ¹ H do grupo G10, 300 MHz, CDCl ₃	90
Figura 31 - Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ¹ H do grupo G10, 300 MHz, CDCl ₃	91
Figura 32 - Fragmentos observados a partir do espectro de RMN de ¹ H para o grupo G10.....	91
Figura 33 - Mapa de contorno HSQC do grupo G10, 300 MHz, CDCl ₃	92
Figura 34 - Espectro de RMN de ¹³ C do grupo G10, 75 MHz, CDCl ₃	93
Figura 35 - Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ¹³ C do grupo G10, 75 MHz, CDCl ₃	94
Figura 36 - Espectro de RMN HMBC do grupo G10, 300 MHz, CDCl ₃	96
Figura 37 - Correlações obtidas por HMBC e estrutura proposta.....	97
Figura 38 - Espectro de NOESY ¹ H- ¹ H do grupo G10, 300 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ e correlação entre os hidrogênios indicados por setas.....	98
Figura 39 - Espectro de COSY ¹ H- ¹ H do grupo G10, 300 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ e correlação entre os hidrogênios indicados por setas.....	99
Figura 40 - Estrutura química da 2,10-dimetoxiaporfina.....	100
Figura 41 - Estrutura da talicarpina.....	101
Figura 42 - Distribuição normal do gráfico Q-Q dos dados de atividade biológica do grupo G1.....	113
Figura 43 - Distribuição normal do gráfico Q-Q dos dados de atividade biológica do grupo G2.....	113
Figura 44 - Distribuição normal do gráfico Q-Q dos dados de atividade biológica do grupo G3.....	114
Figura 45 - Cromatograma e espectros de massas do ID 25, <i>m/z</i> 330,1698, TR 8,91.....	116
Figura 46 - Espectro de massas do ID 25, <i>m/z</i> 330,1698, TR 8,91.....	116

Figura 47 -	Cromatograma e espectro de massas do ID 74, m/z 296,1646, TR 10,4.....	117
Figura 48 -	Cromatograma e espectro de massas do ID 74, m/z 296,1646, TR 10,43.....	117
Figura 49 -	Cromatograma e espectros de massas do ID 76, m/z 296,1646, TR 13,07.....	118
Figura 50 -	Espectro de massas do ID 76, m/z 296,1646, TR 13,07.....	118
Figura 51 -	Cromatograma e espectros de massas do ID 82, m/z 314,1748, TR 9,13.....	119
Figura 52 -	Espectro de massas do ID 82, m/z 314,1748, TR 9,13.....	119
Figura 53 -	Cromatograma e espectros de massas do ID 88, m/z 326,1749, TR 15,34.....	120
Figura 54 -	Espectro de massas do ID 88, m/z 326,1749, TR 15,34.....	120
Figura 55 -	Cromatograma e espectros de massas do ID 100, m/z 314,1396, TR 7,46.....	121
Figura 56 -	Espectro de massas do ID 100, m/z 314,1396, TR 7,46.....	121
Figura 57 -	Cromatograma e espectros de massas do ID 199, m/z 314,1745, TR 7,40.....	123
Figura 58 -	Espectro de massas do ID 199, m/z 314,1745, TR 7,40.....	123
Figura 59 -	Cromatograma e espectros de massas do ID 137, m/z 346,1644, TR 8,86.....	124
Figura 60 -	Espectro de massas do ID 137, m/z 346,1644, TR 8,86.....	124
Figura 61 -	Cromatograma e espectros de massas do ID 241, m/z 328,1538, TR 7,39.....	125
Figura 62 -	Espectro de massas do ID 241, m/z 328,1538, TR 7,39.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Identificação das espécies da família Lauraceae.....	50
Tabela 2 -	Agrupamento das subfrações obtidas por cromatografia em coluna para a fração clorofórmio.....	62
Tabela 3 -	Atividades biológicas relatadas na literatura para as espécies da família Lauraceae estudadas nesse trabalho e suas respectivas atividades no ensaio <i>ex vivo</i>	65
Tabela 4 -	Percentual de valores de inibição reais e calculados para os conjuntos de treinamento e teste de 20 amostras de Lauraceae, usando o modelo PLS.....	73
Tabela 5 -	Descrição CV-ANOVA para o modelo PLS – M2.....	74
Tabela 6 -	VIPs do modelo de predição, PLS, 3 componentes, modo positivo.....	77
Tabela 7 -	Resultados e métricas para a predição dos modelos de SGD e ANN.....	80
Tabela 8 -	Anotação química dos metabólitos apontados como biomarcadores da atividade anti-inflamatória pelas análises estatísticas de métodos dos mínimos quadrados parciais (PLS - M2), gradiente descendente estocástico (SGD) e redes neurais artificiais (ANN).....	81
Tabela 9 -	Anotação no modo de ionização positiva dos metabólitos comuns dos modelos de predição de mínimos quadrados parciais (PLS), descida de gradiente estocástico (SGD) e redes neurais artificiais (ANN).....	87
Tabela 10 -	Dados de RMN da 2,10-dimetoxiaporfina, 300 MHz, CHCl ₃	95
Tabela 11 -	Parâmetros numéricos para avaliação da distribuição dos dados do grupo G1 obtidos a partir de dados biológicos.....	111
Tabela 12 -	Parâmetros numéricos para avaliação da distribuição dos dados do grupo G2 obtidos a partir de dados biológicos.....	112
Tabela 13 -	Parâmetros numéricos para avaliação da distribuição dos dados do grupo G3 obtidos a partir de dados biológicos.....	112

LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANN	<i>Artificial neural network</i> / Redes neurais artificiais
ANOVA	Análise de variância
AUC	Área sob a curva
CAP	Cloranfenicol
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
COX	Cicloxygenase
CV-ANOVA	Variância dos resíduos preditivos validados cruzadamente
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DNP [®]	<i>Dictionary of natural products</i>
EtOH	Etanol
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
GNPS	<i>Global Natural Products Network</i>
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos
Hz	<i>Hertz</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>

HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
ID	Numeração referente ao par m/z / TR
IA	Inteligência artificial
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LFQMM	Laboratório de Fitoquímica, Química Medicinal e Metabolômica
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
m	Multiplicidade ou Multipleteo
m/z	Razão da massa pela carga
MAE	<i>Mean absolute error</i>
MeOH- <i>d</i> ₄	Metanol deuterado
MHz	Mega <i>Hertz</i>
MoNA	<i>MassBank of North America</i>
MSI	<i>Metabolites standard initiatives</i>
MZmine	<i>MZmine Development Team</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OPLS	Método dos mínimos quadrados parciais ortogonais
PCA	<i>Principal component analysis</i> / Análise de componentes principais
PGs	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLS	<i>Partial least squares</i> / Método dos mínimos quadrados parciais
ppm	Partes por milhão

<i>qui</i>	Quintupletto
Q ²	Coeficiente de correlação
QSAR	Estudos quantitativos de relação estrutura-atividade
R ²	Coeficiente de correlação
RBD	<i>Ring double bond</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSE	<i>Root mean squared error</i>
RDBE	<i>Ring double bond equivalents</i>
rpm	Rotação por minuto
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
s	Singleto
SIMCA [®]	<i>Soft independent modeling by class analogy</i>
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
TR	Tempo de Retenção
UPLC	<i>Ultra-high-performance liquid chromatography</i>
VIP	Variável importante para a projeção
Weka [®]	<i>Waikato Environment for Knowledge Analysis</i>
X	Variáveis preditoras
Y	Variáveis dependentes

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μ	Micro
™	Trademark
®	Marca Registrada
©	Copyright
δ	Deslocamento químico
J	Acoplamiento entre núcleos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	FAMÍLIA LAURACEAE	22
2.1.1	Princípios da biossíntese dos alcaloides	23
2.1.2	Principais classes de alcaloides em Lauraceae	25
2.1.3	Principais gêneros da família Lauraceae	26
2.2	ASPECTOS DA INFLAMAÇÃO	37
2.3	METABOLÔMICA	42
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA	44
2.5	<i>MACHINE LEARNING - ML</i>	45
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	METODOLOGIA	48
4.1	SOLVENTES, REAGENTES E MATERIAIS	48
4.2	AMOSTRAS E PREPARO DOS EXTRATOS	49
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	52
4.3.1	Ensaio <i>ex vivo</i> no sangue	52
4.3.2	Quantificação de PGE ₂ por LC-MS/MS	53
4.3.3	Análises estatísticas	54
4.4	UPLC-HRMS E TRATAMENTO DOS DADOS	54
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA E CONSTRUÇÃO DE MODELOS DE PREDIÇÃO	56
4.5.1	Análises no software SIMCA – PLS e OPLS	56
4.5.2	Análises no software Weka - seleção de atributos, ANN e SGD	57
4.5.3	Análises no software <i>MetaboAnalyst</i>	58
4.6	ANOTAÇÃO QUÍMICA	59
4.7	FITOQUÍMICA	59
4.7.1	Isolamento do alcaloide inédito	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>EX VIVO</i> NO SANGUE	64
5.2	METABOLÔMICA E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	71
5.2.1	Modelos Testes T1-T3	71

5.2.2 Modelos estatísticos e de predição finais nos softwares SIMCA e <i>Metaboanalyst</i>..	71
5.2.3 VIPs e análise de correlação do modelo PLS.....	76
5.2.4 Machine learning.....	80
5.2.5 Anotação Química.....	81
5.2.6 Curvas de característica operacional do receptor (ROC) e valores de área sob a curva (AUC).....	88
5.3 FITOQUÍMICA	89
6 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS	102
APÊNDICES.....	109

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais representam uma fonte rica e diversa para a descoberta e desenvolvimento de novas substâncias de interesse farmacológico, devido à variedade de metabólitos secundários com importância biológica que são biossintetizados por organismos vivos. Nos últimos anos o *Food and Drug Administration* aprovou um número impressionante de medicamentos modernos que também são oriundos de produtos naturais ou derivados deles (Chen *et al.*, 2016; Demarque *et al.*, 2020; Salem *et al.*, 2020).

Nas abordagens voltadas à fitoquímica clássica, a descoberta de produtos naturais bioativos, usualmente, começa com uma triagem biológica de extratos brutos, seguida de procedimentos de fracionamento até o isolamento e a identificação de possíveis substâncias ativas ou estruturas inéditas. Embora eficientes essas técnicas apresentam fases demoradas e muitas vezes ineficientes para descobrir novos compostos; o que leva a um número decrescente de novas descobertas quando comparado a novas estratégias (Demarque *et al.*, 2020). Assim, o fracionamento guiado por bioensaios ou por estratégias metabolômicas, usando métodos cromatográficos, pode auxiliar o isolamento e purificação de metabólitos ativos de seus extratos brutos. Com o uso de tecnologias como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a espectrometria de massa (MS) e a espectroscopia ultravioleta-visível, é possível a caracterização detalhada e a elucidação estrutural do composto isolado. Então, o potencial farmacológico do composto isolado pode ser testado e então, descoberto um novo composto potencialmente bioativo para uso na forma natural ou ser utilizado como esqueleto para novas sínteses e/ou semi-sínteses (Mahrous; Farag, 2015).

Ainda, considerando que a biodiversidade em fauna e flora permanecem amplamente inexploradas e, que as técnicas clássicas de isolamento de novas substâncias, frequentemente, envolvem o isolamento de compostos já identificados, a associação de ferramentas analíticas aliadas a tratamentos de dados *in silico*, como a metabolômica, representa uma importante estratégia para descoberta de novos produtos naturais. As análises metabolômicas permitem a identificação e/ ou quantificação de substâncias com peso molecular menor que 1000 *daltons*, produzidas por um sistema biológico, em um determinado momento e no tempo de análise da técnica, o que facilita e acelera a busca por novos agentes ativos. Assim, a associação da metabolômica com as análises estatísticas e *in silico*, fornecem uma melhor visualização dos dados e simplifica a análise necessária para alcançar o resultado pretendido (Demarque *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2019).

A família Lauraceae é originalmente encontrada em clima tropical e subtropical, predominantemente na Ásia e nas florestas tropicais das Américas. Entre os muitos gêneros dentro de Lauraceae, o gênero *Ocotea* pode ser considerado como um dos mais representativos, com espécies promissoras para estudos fitoquímicos e biológicos. Como por exemplo, a espécie *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, conhecida popularmente como sassafrás, que apresenta relato etno-farmacológico, para utilização de seu decocto no tratamento de condições inflamatórias, sendo sua atividade anti-inflamatória já comprovada em modelo *in vivo* para seu extrato bruto e frações (De Alcântara *et al.*, 2021; Silva Teles *et al.*, 2019). Ainda, dessa espécie, já foi isolado um alcaloide, a reticulina, que demonstrou atividade anti-inflamatória em ensaio *in vivo* (De Alcântara *et al.*, 2021).

A inflamação consiste em uma reação do organismo frente a diferentes estímulos, que envolvem a ativação, o recrutamento e a ação de células da imunidade inata e adaptativa. Representa um papel essencial na defesa do hospedeiro contra patógenos, sendo também igualmente importante para a reparação, regeneração e remodelação de tecidos, além da inflamação ser essencial para a regulação da homeostase dos tecidos (Greten; Grivennikov, 2019).

A inflamação é uma condição presente em diversas patologias. Ela pode se instalar de forma aguda ou crônica e, seu tratamento ou controle, se dá através do uso de agentes anti-inflamatórios. Para o tratamento de condições associadas à inflamação, existem algumas classes de medicamentos disponíveis, como os anti-inflamatórios não esteroidais clássicos (AINEs), os seletivos para inibição da cicloxigenase 2 (COX-2), importantes por não apresentarem os efeitos adversos oriundos da inibição da cicloxigenase 1 (COX-1) e, os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), sendo estes utilizados de acordo com a indicação clínica (Domingos *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019). No entanto, diversas doenças inflamatórias ainda precisam de tratamentos mais eficazes e com menores efeitos adversos, como a artrite reumatóide e outras.

Assim, a busca por extratos e substâncias potencialmente anti-inflamatórias é de extrema relevância. Nesse sentido, a metabolômica aliada a ensaios anti-inflamatórios possibilitam estudos mais modernos e abrangentes. Assim, após a obtenção dos dados metabolômicos dos extratos vegetais e os resultados dos ensaios biológicos, as análises estatísticas podem ser realizadas em *softwares* específicos como o Weka (*Waikato Environment for Knowledge Analysis*) e SIMCA[®] (*Soft Independent Modeling by Class Analogy*). Utilizando o Weka podem-se obter os atributos importantes da atividade biológica estudada para a construção de modelos de predição (Chagas-Paula *et al.*, 2015a). No software SIMCA[®], é possível realizar modelos supervisionados e não supervisionados, possibilitando análises mais

abrangentes e mais específicas, de acordo com o objetivo de cada estudo (Chagas-Paula *et al.*, 2015a).

Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar a atividade anti-inflamatória de espécies de Lauraceae, bem como a construção de modelos de predição da atividade anti-inflamatória das espécies de Lauraceae, além de utilizar estratégias metabolômicas para direcionar o isolamento de substâncias de uma das espécies mais promissoras com relação a propriedade farmacológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA LAURACEAE

Lauraceae é uma família pertencente à subclasse Magnoliidae, ordem Laurales, que apresenta grande importância econômica e industrial. Inclui cerca de 2850 espécies já descritas na literatura, apresentando uma distribuição tropical e subtropical, sendo encontrada predominantemente na Ásia e nas florestas tropicais das Américas. Consiste em mais de 65 gêneros, em sua maioria árvores e arbustos, com exceção do gênero *Cassytha*, que é composto de videiras parasitas (Damasceno *et al.*, 2019). Diante dessa vasta gama de espécies, ainda existem poucos estudos de composição química e atividade farmacológica destas relatados na literatura. Além disso, muitas espécies da família Lauraceae ainda não foram estudadas, o que ilustra a importância de novos estudos para as espécies dessa família.

Com relação à importância econômica das espécies dessa família, muitas são usadas em setores industriais, como as indústrias alimentícia, madeireira, farmacêutica e de perfumaria (Custódio; Florêncio Da Veiga Junior, 2014). Na indústria alimentícia, por exemplo, a espécie *Persea americana*, que produz o abacate, é bastante conhecida e explorada economicamente (Alkhalaf *et al.*, 2019).

Em relação à sua etnofarmacologia, as espécies de Lauraceae têm sido aplicadas como tratamento em diferentes patologias, como de doenças infecciosas, parasitárias, associadas a dor, reumatismos, condições inflamatórias, entre outras (Custódio; Florêncio Da Veiga Junior, 2014; Damasceno *et al.*, 2019).

Dentre as classes de metabólitos secundários reportados para espécies desta família, pode-se encontrar alcaloides, flavonoides, cumarinas, ésteres de benzoíla, pironas, acetilenos, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpênicas, lignanas e neolignanas, sendo que as neolignanas apresentam significativo potencial quimiotaxonômico no estudo das Lauraceae. Já os alcaloides representam outra classe importante em Lauraceae, onde diversos trabalhos relatam o isolamento de novos alcaloides e/ ou seu potencial farmacológico (De Alcântara *et al.*, 2021; Katchborian-Neto *et al.*, 2023). A maior parte dos estudos é de espécies dos gêneros de *Machilus*, *Ocotea* e *Nectandra* (Custódio; Florêncio Da Veiga Junior, 2014; Li *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020).

A seguir têm-se uma descrição da biossíntese dos alcaloides e as principais classes de alcaloides encontrados em Lauraceae, bem como sobre os gêneros da família Lauraceae

estudados nesse trabalho. Isso devido ao fato de que os alcaloides são compostos importantes quanto ao potencial farmacoterapêutico e representam uma classe importante da família Lauraceae. Ainda, visto que o objetivo desse trabalho se concentra no potencial anti-inflamatório para as espécies de Lauraceae, com ênfase para os alcaloides.

2.1.1 Princípios da biossíntese dos alcaloides

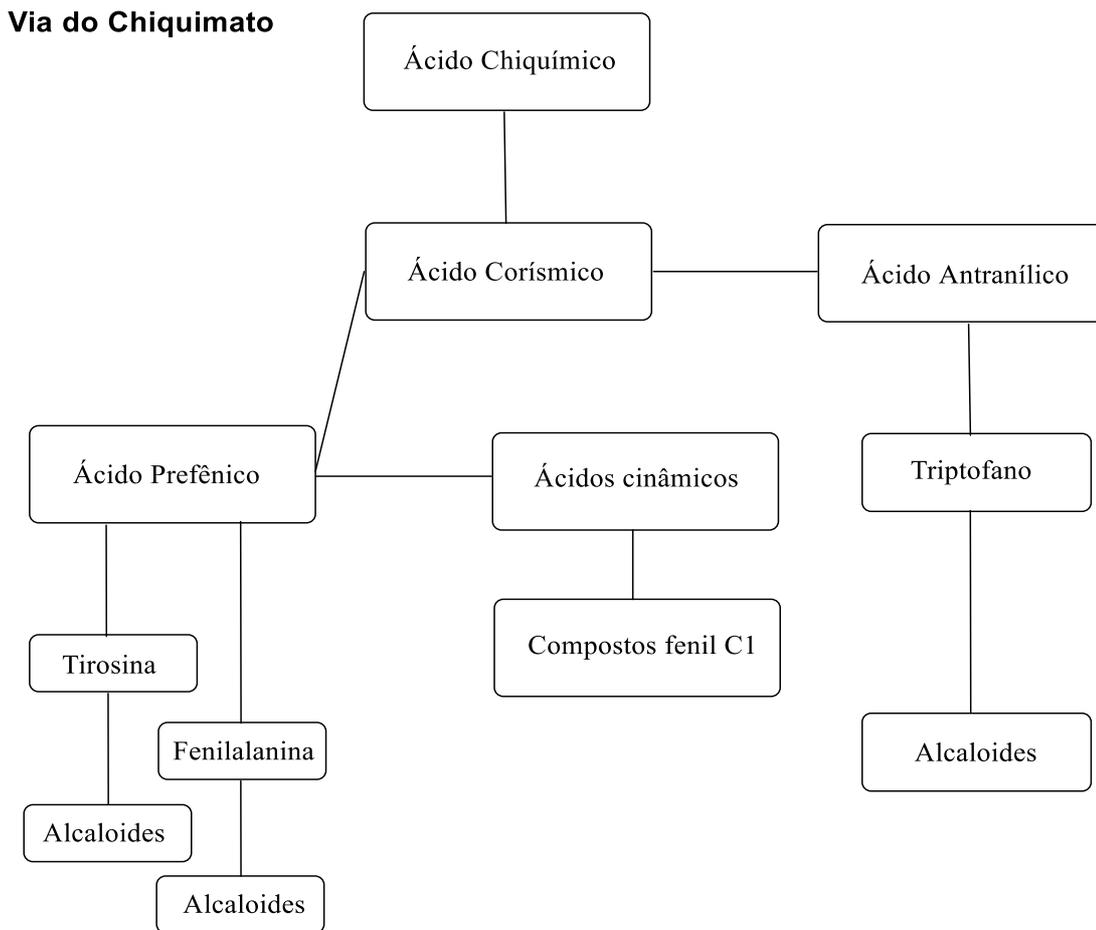
O metabolismo leva a formação de compostos fundamentais para a sobrevivência de todos os seres vivos e, apesar das grandes diferenças entre os diferentes organismos vivos, o metabolismo primário leva a formação de compostos comuns a todos, como os carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos. Esses compostos comuns a todos os seres vivos são chamados de metabólitos primários, sendo essenciais para a vida de todo organismo; já os metabólitos secundários, também denominados de metabólitos especializados, são produzidos por organismos específicos, ou grupos de organismos, sendo uma expressão da individualidade da determinada espécie. Os metabólitos secundários são produzidos em condições específicas e estão associados, principalmente, à evolução ou proteção dos mesmos e como resposta ao estresse submetido. Esses compostos oriundos do metabolismo secundário possuem valor nutricional e farmacológico importante para os seres humanos, possibilitando a descoberta de moléculas de interesse terapêutico para várias condições patológicas (Dewick, 2009).

Dessa forma, a biossíntese representa uma área de conhecimento fundamental na química de produtos naturais. Ainda, como existem diferentes vias biossintéticas, que levam a formação de diferentes classes de compostos bioativos, seu reconhecimento se faz importante para os estudos fitoquímicos e metabolômicos nas plantas e demais organismos que possam ser estudados quanto a sua composição química (Antonio; Veiga-junior; Wiedemann, 2020).

Considerando o metabolismo das plantas, as vias do ácido chiquímico (ou chiquimato) e dos aminoácidos, representam vias importantes para a biossíntese de alcaloides. Assim, os alcaloides podem ser biossintetizados pela via do chiquimato, além dos alcaloides oriundos de α e β aminoácidos. A via do chiquimato possui como precursor o ácido chiquímico, sendo uma via biossintética presente em plantas e microorganismos. A via do chiquimato e dos fenilpropanóides são duas vias interligadas para um grande número de metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas. A via do chiquimato envolve a condensação de eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato e, termina com a formação de três aminoácidos aromáticos, sendo a fenilalanina, a tirosina e o triptofano (Dewick, 2009).

Ainda, a partir do ácido chiquímico, há formação do ácido corísmico, um intermediário para a biossíntese do ácido prefênico e do ácido antranílico. A partir desses dois intermediários, várias etapas são envolvidas até a formação de metabólitos secundários importantes, como os alcaloides e os flavonoides, conforme esquema da Figura 1 (Dewick, 2009).

Figura 1 – Esquema representando a via do chiquimato, com formação final dos alcaloides.



Fonte: Da autora.

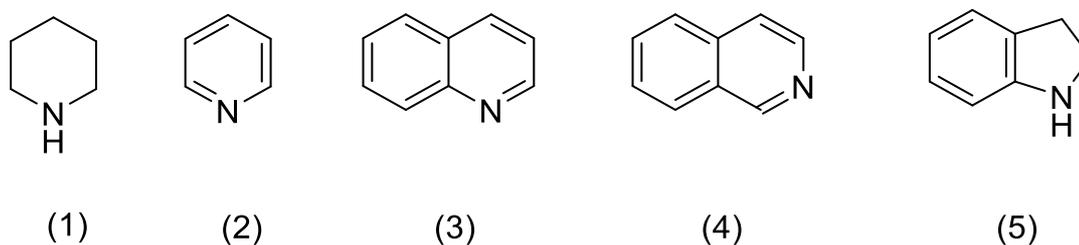
Ressaltando que, a biossíntese dos alcaloides ocorre predominantemente a partir de α -aminoácidos (o grupo amino está ligado no carbono 2, a partir da carboxila), como a tirosina, lisina, ornitina, triptofano; além de alguns β -aminoácidos também podem ser utilizados, como o ácido nicotínico e o ácido antranílico.

Assim, através de diversas etapas envolvidas na biossíntese dos alcaloides, é possível a obtenção de diferentes classes de alcaloides, diferindo de acordo com a família, gênero e, até mesmo, a espécie a ser estudada.

2.1.2 Principais classes de alcaloides em Lauraceae

Os alcaloides são compostos nitrogenados de baixo peso molecular encontrados principalmente em plantas, mas que também ocorrem em menor proporção em microrganismos e animais. Os alcaloides possuem um ou mais átomos de nitrogênio inseridos em um anel do esqueleto, tipicamente como aminas primárias, secundárias ou terciárias, o que geralmente confere basicidade ao alcaloide, facilitando o isolamento e purificação destes, através de métodos de extração ácido-base. Ainda, sua atividade biológica, muitas vezes, está relacionada a esta função amina. Os alcaloides são, frequentemente, classificados com base no anel contendo o nitrogênio, como por exemplo, com base nos anéis piperidínico, piridínico, quinolínico, isoquinolínico, indólico (Figura 2); embora alguns tipos sejam mais complexos em sua classificação (Dewick, 2009).

Figura 2 – Estrutura química dos esqueletos piperidínico, piridínico, quinolínico, isoquinolínico e indólico.



Fonte: Da autora.

Legenda: (1) piperidínico
 (2) piridínico
 (3) quinolínico
 (4) isoquinolínico
 (5) indólico.

Os alcaloides são amplamente encontrados na família Lauraceae. Muitos destes alcaloides apresentam propriedades biológicas descritas na literatura, dentre elas a atividade anti-inflamatória. As principais classes de alcaloides encontrados em Lauraceae são os derivados benziltetrahydroisoquinolínicos ou benzilisoquinolínicos, aporfínicos, fenantrênicos, morfinânicos, indólicos, entre outros (Silva Teles *et al.*, 2019).

Os alcaloides benzilisoquinolínicos são muito relatados na família Lauraceae, sendo precursores de outras estruturas tri e tetracíclicas, como os alcaloides aporfínicos e fenantrênicos. O alcaloide reticulina por exemplo, é um dos principais representantes da classe de alcaloides benzilisoquinolínicos, pois é um intermediário para a biossíntese de vários outros

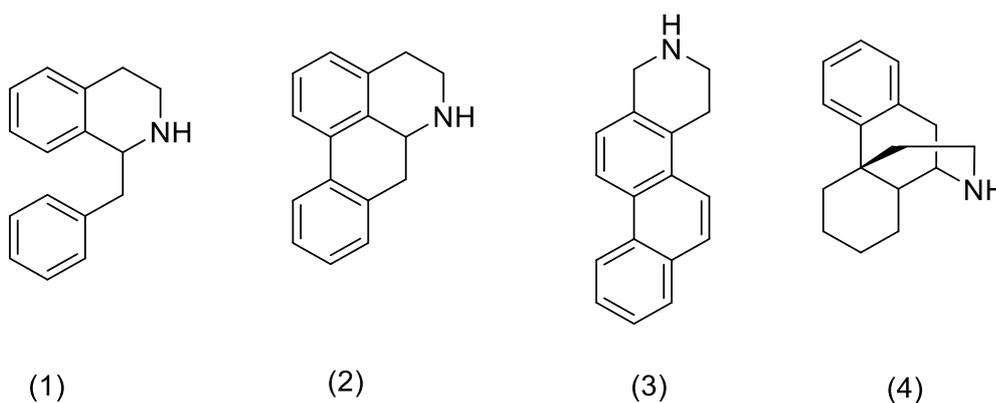
núcleos, além de possuir atividade anti-inflamatória (De Alcântara *et al.*, 2021; Silva Teles *et al.*, 2019).

Já os alcaloides aporfínicos (Figura 3) são os principais alcaloides da família Lauraceae, representando cerca de 62,9% dos alcaloides encontrados. As aporfinas são resultado de reações de acoplamento *orto-para* oxidativo ao grupo fenol, que geralmente é substituinte do anel benzil das benziltetrahydroisoquinolinas, originando um novo anel ao esqueleto (Silva Teles *et al.*, 2019).

Enquanto os alcaloides fenantrênicos (Figura 3), derivam do esqueleto da aporfina, após a clivagem do anel heterocíclico da isoquinolina; sendo encontrados, principalmente, nos gêneros *Ocotea*, *Cryptocarya*, entre outros (Silva Teles *et al.*, 2019).

Os alcaloides morfinânicos (Figura 3) são formados a partir do esqueleto benziltetrahydroisoquinolínico, que sofre modificações químicas originando o esqueleto tetracíclico característico do morfina. Nas espécies da família Lauraceae há um acoplamento oxidativo, originando os derivados morfina-7-en-6-ona (presentes em *Ocotea*), morfina-5-en-7-ona (presentes em *Ocotea*, *Nectandra*, entre outras espécies) e o desidromorfina (descrito no gênero *Beilschmiedia*) (Silva Teles *et al.*, 2019).

Figura 3 – Estrutura química representando os núcleos dos alcaloides benzilisoquinolínicos, aporfínicos, fenantrênicos e morfinânicos.



Fonte: Da autora.

Legenda: (1) benzilisoquinolínicos
 (2) aporfínicos
 (3) fenantrênicos
 (4) morfinânicos

2.1.3 Principais gêneros da família Lauraceae

O gênero *Ocotea* é o maior em número de espécies dentro da família Lauraceae, compreendendo, aproximadamente, 400 espécies e, com a terceira maior ocorrência de gênero na Floresta Amazônica, um dos biomas mais ricos em biodiversidade natural. As espécies estão distribuídas principalmente na América, do México à Argentina. *Ocotea* é considerado, atualmente, um dos gêneros mais antigos de Lauraceae, conforme resultados de estudos sistemáticos baseados em avaliações morfológicas e filogenéticas (Antonio; Veiga-Junior; Wiedemann, 2020). As espécies do gênero podem ser reconhecidas pelas folhas elípticas a obovadas simples, alternadas, duras, aromáticas e pelos seus frutos característicos (Salleh; Ahmad, 2017).

As espécies do gênero *Ocotea* apresentam importantes metabólitos secundários, incluindo alcaloides, flavonoides, neolignanas, lignanas, sesquiterpenos, benzopiranas, esteróides, alquilfenóis, arilpropenos, cumarinas, ésteres e saponinas; muitos dos quais exibiram atividades antiproliferativas, antifúngicas, anti-herpéticas, anti-inflamatórias e antimicrobianas interessantes (Antonio *et al.*, 2020; Antonio; Veiga-Junior; Wiedemann, 2020; Gontijo; Brandão; Gontijo, 2017; Salleh; Ahmad, 2017).

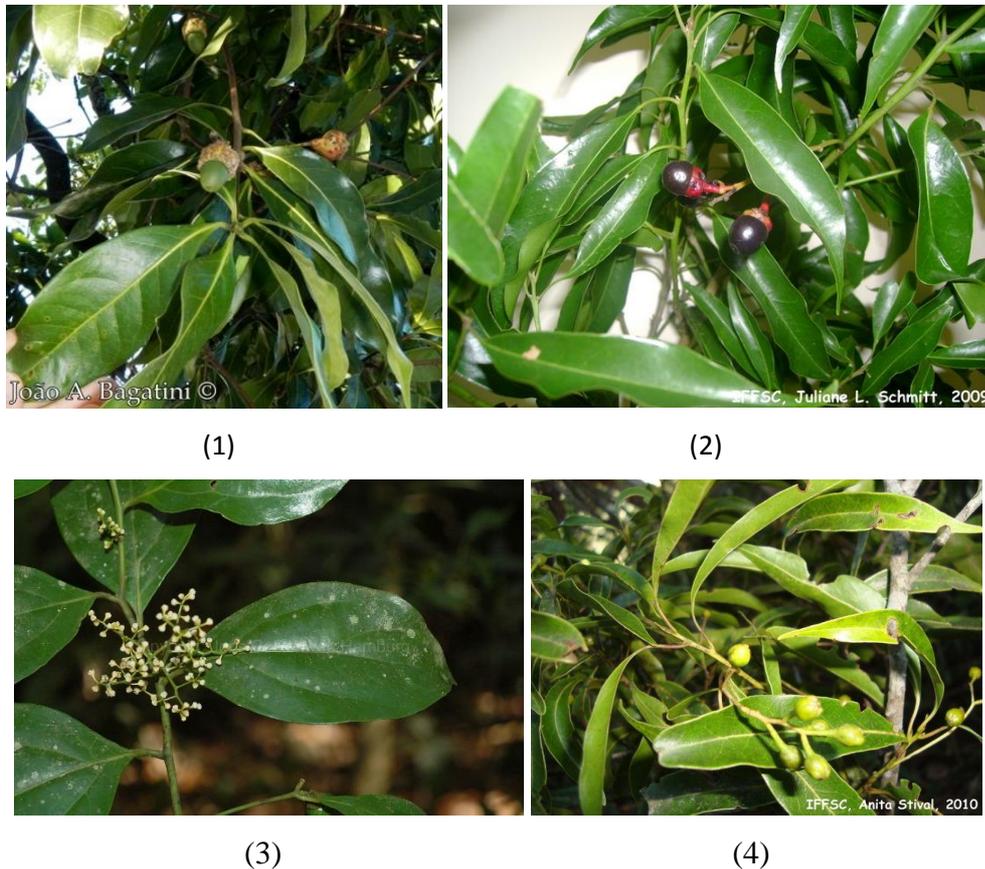
Segundo estudos etnofarmacológicos, o caule de *O. bullata* é conhecido pela ação contra dores de cabeça e infecções do trato urinário masculino; *O. quixos* apresenta potencial anestésico local e tem sido usada como infusão antidiarréica; *O. lancifolia* tem sido usada como antiparasitário; *O. caparrapi* tem sido usada para tratar picadas de insetos, picadas de cobra, bronquite e tumores (Salleh; Ahmad, 2017).

A espécie *Ocotea odorifera* (Figura 4, De Alcântara *et al.*, 2021) é tradicionalmente e cientificamente relatada como uma planta medicinal, nativa da floresta tropical atlântica do Brasil, sendo popularmente utilizada na forma de decocto para tratamento de condições inflamatórias associadas a reumatismos (De Alcântara *et al.*, 2021). A espécie *O. odorifera* também conhecida pelas sinonímias botânicas *Laurus odorifera* Vellozo; *Ocotea pretiosa* (Nees) Mez; *Ocotea pretiosa* var. *pretiosa* Vattimo; e é reconhecida popularmente por diferentes nomes, a depender da região do país, como canela-sassafrás ou sassafrás, sassafrasinho, casca-preciosa, canela-funcho, canela-sassafrás-folha-grande, louro-sassafrás, louro-tapinhoã, sassafrás-amarelo, sassafrás-preto, sassafrás-rajado, pau-funcho, sassafrás-doparaná (Botsaris, 2007)

A espécie *O. odorifera* teve sua madeira amplamente utilizada para fabricação de móveis e na construção civil, o que, aliado ao grande desmatamento da Mata Atlântica e

exploração da espécie para diversos fins, tornou-a uma espécie considerada em extinção (Martins *et al.*, 2014; Oltramari *et al.*, 2004).

Figura 4 – Imagens representando as espécies *Ocotea odorifera*, *Ocotea diospyrifolia*, *Ocotea divaricata* e *Ocotea corymbosa*.

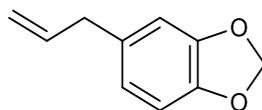


Fonte: <https://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Ocotea>, acesso em 06/10/2023.
<https://lauraceae.myspecies.info/taxonomy/term/12878/media>, acesso em 06/10/2023.
<https://www.sitiodamata.com.br/canela-fedida-ocotea-corymbosa.html>, acesso em 06/10/2023.

Legenda: (1) *Ocotea odorifera*
 (2) *Ocotea diospyrifolia*
 (3) *Ocotea divaricata*
 (4) *Ocotea corymbosa*

Seu óleo essencial também foi largamente explorado, por ser rico no composto safrol [5- (2-propenil) -1,3-benzodioxol] (Figura 5), um éter aromático, com odor intenso e característico. Ele possui diversas utilidades, entre elas, como flavorizante em bebidas, alimentos, cosméticos, além de ter sido usado como constituinte de pesticidas (Gontijo; Brandão; Gontijo, 2017; Mossi *et al.*, 2013).

Figura 5 – Estrutura química do safrol.



Fonte: Da autora.

Ainda, sobre a espécie *O. odorifera*, seu extrato bruto etanólico e frações, além do alcaloide isolado, a reticulina, demonstraram potencial ação anti-inflamatória, com mecanismo de ação de inibição dual nas vias cicloxigenase (COX) e da lipoxigenase (LOX). Essa evidência científica foi obtida em modelo experimental de edema de orelha *in vivo* em camundongos corroborando seu histórico etnofarmacológico como planta medicinal anti-inflamatória (De Alcântara *et al.*, 2021). Desta forma, considerando a atividade anti-inflamatória de *O. odorifera* e que, a espécie apresenta potencial para descoberta de substâncias inéditas/ ativas, uma vez que diversas substâncias foram detectadas e não apresentam relatos na literatura então essa espécie se torna um importante alvo para estudos fitoquímicos para o isolamento de substâncias ainda não reportadas na literatura (De Alcântara *et al.*, 2021).

Outra espécie desse gênero, a *Ocotea diospyrifolia* (Figura 4), apresentou significativo potencial anti-inflamatório em modelo experimental *in vivo* em camundongos, para o extrato etanólico das folhas, a fração acetato, os óleos essenciais das folhas e do caule e para os compostos isolados, atuando nas vias da COX e da LOX, inibindo o edema e o recrutamento celular, respectivamente (Silva *et al.*, 2021).

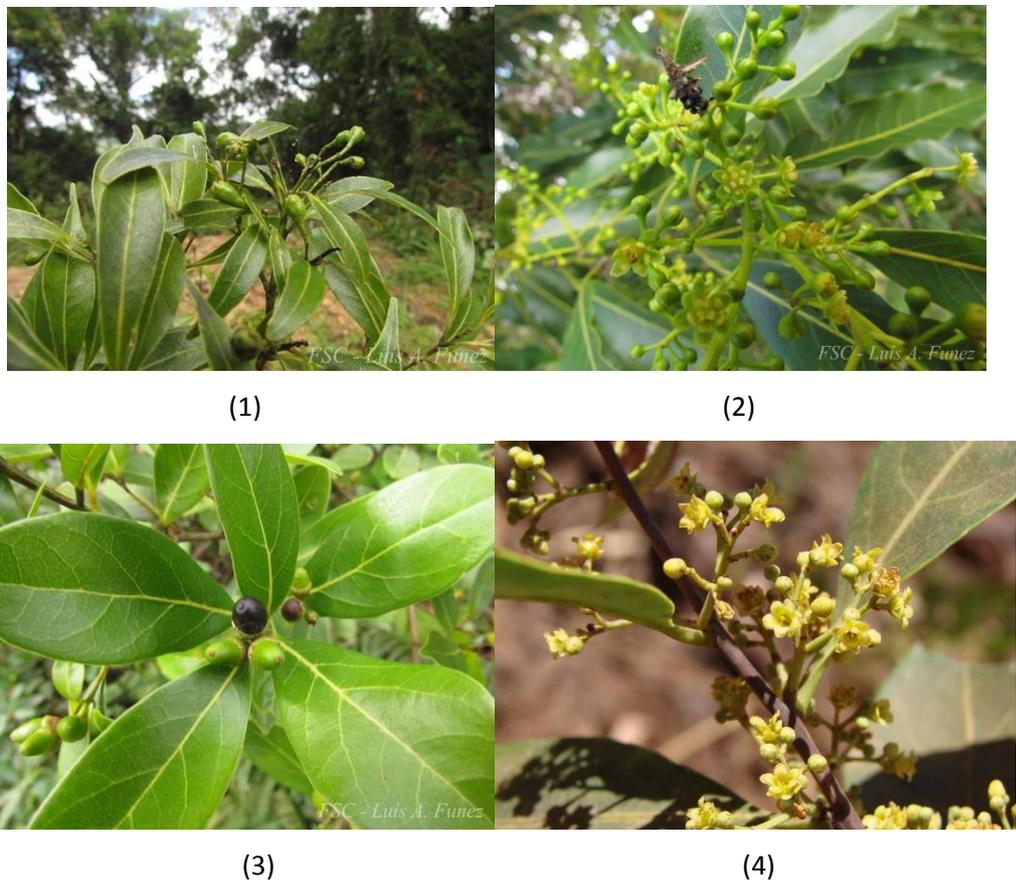
Quanto à espécie *Ocotea divarivata* (Figura 4), ainda não existem estudos na aliteratura que reportem sua composição química ou estudos farmacológicos. Já a espécie *Ocotea corymbosa* (Figura 4), também estudada neste trabalho, não foi avaliada quanto ao seu potencial farmacológico.

A espécie *Ocotea bicolor* (Figura 6) apresenta estudo sobre seu óleo essencial, que foi analisado por cromatografia gasosa, revelando a predominância de sesquiterpenos, δ -cadineno (7,39%), β -sesquifelandreno (6,67%), β -elemeno (5,41%) e α -cadinol (5,23%), além de apresentar atividade antioxidante (Damasceno *et al.*, 2017). Já a espécie *Ocotea aciphylla* (Figura 6), apresenta relato da sua atividade anticolinesterásica *in vitro*, apresentando baixa neurotoxicidade (Carneiro *et al.*, 2018). Em outro estudo, o extrato etanólico das folhas e as frações hexânica e acetato de etila de *Ocotea aciphylla* foram estudados quanto a sua atividade acaricida, em modelo experimental *in vitro*. Todas as amostras se mostraram eficazes contra os

diferentes estágios do parasita; ainda, a partir de estudos fitoquímicos, foi possível à caracterização de dois terpenóides (cadaleno 1 e esqualeno 2), um fenilpropanóide (dilapiol 3) e uma mistura fenólica contendo cinco proantocianetos, o que reforça o potencial químico do gênero (Conceição *et al.*, 2017).

A partir das folhas de *Ocotea puberula* (Figura 6), foi isolado o alcaloide oxoaporfina dicentrinona, que apresentou atividade antiparasitária contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Barbosa *et al.*, 2020).

Figura 6 – Imagens representando as espécies *Ocotea bicolor*, *Ocotea puberula*, *Ocotea pulchella*, *Ocotea aciphylla*.



Fonte: Disponível em: <https://floradesantacatarina.wordpress.com/lauraceae/>, acesso em 06 out. 2023.

<https://tropical.theferns.info/image.php?id=Ocotea+aciphylla>, acesso em 06/10/2023.

https://floradigital.ufsc.br/open_sp.php?img=9664, acesso em 06/10/2023.

Legenda: (1) *Ocotea bicolor*;

(2) *Ocotea puberula*;

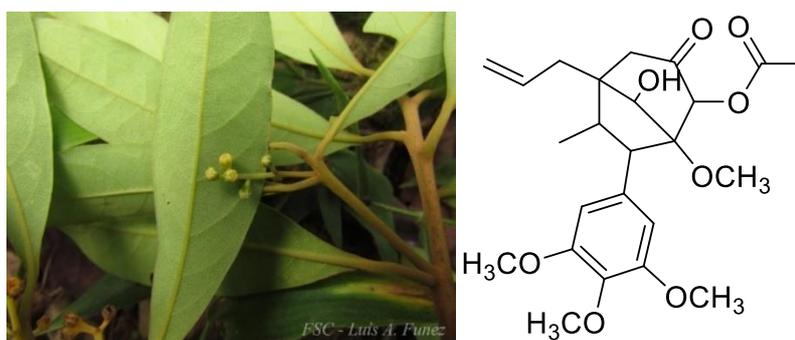
(3) *Ocotea pulchella*;

(4) *Ocotea aciphylla*.

Em um estudo do óleo essencial das folhas da espécie *Ocotea pulchella*, este demonstrou atividade *in vitro* contra duas diferentes formas associadas ao ciclo da Esquistossomose; onde foi testada uma nanoformulação do óleo contra *Biomphalaria glabrata* adulta e cercárias de *Schistosoma mansoni*, sendo que este causou mortalidade de *Biomphalaria glabrata* adulta, seus embriões de ovos e contra *Schistosoma mansoni* sendo, portanto, uma possível alternativa no controle do ciclo da esquistossomose (PASSOS *et al.*, 2020). A partir das folhas de *Ocotea pulchella*, obteve-se a fração acetato de etila que foi avaliada quanto ao potencial contra formas isoladas de *Sporothrix brasiliensis* sensíveis e de baixa suscetibilidade ao itraconazol, demonstrando uma significativa atividade (De Souza *et al.*, 2023).

Outro gênero importante em Lauraceae é o gênero *Aniba*, que apresenta várias classes de compostos químicos, como sesquiterpenoides, neolignanais, estilipironas e flavonoides, sendo que vários desses compostos demonstraram atividade anti-inflamatória, com destaque aos derivados octano bicíclicos de neolignanais (Figura 7), isolados da espécie *Aniba firmula* (Figura 7), que demonstraram potencial inibição das principais vias inflamatórias, COX e LOX (Santos *et al.*, 2019).

Figura 7 – Imagem representando a espécie *Aniba firmula* e a estrutura química da neolignana biciclo octana neo canelina isolada da mesma.



Fonte: <https://floradesantacatarina.wordpress.com/lauraceae>, acesso em 06 out. 2023.

As neolignanais e lignanais são dímeros de fenilpropano, normalmente classificados em três classes, as lignanais, neolignanais e oxineolignanais, com base no caráter da ligação C – C e da ligação de oxigênio que une as duas unidades típicas de fenilpropano que compõem suas estruturas gerais. Essas estruturas apresentam potencial atuação em vias da inflamação, como a via da COX-2 (Li *et al.*, 2018).

Já o gênero *Cinnamomum*, juntamente com os gêneros *Laurus* e *Persea*, são reconhecidos como os três gêneros mais valiosos economicamente na família Lauraceae. O gênero *Cinnamomum* apresenta diversas atividades biológicas associadas a ele, como atividade antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, antidiabética, anti-inflamatória e analgésica, dentre outras (Wang *et al.*, 2020). A espécie *Cinnamomum triplinerve* (Figura 8) possui estudo que demonstra sua atividade antioxidante para os extratos etanólicos de folhas, cascas e frutos, além da presença de compostos fenólicos, flavonoides e taninos (Silva *et al.*, 2019); já a espécie *Cinnamomum glaziovii* (Figura 8) até o momento não apresenta estudos sobre seus extratos e substâncias purificadas.

Figura 8 – Imagens representando as espécies *Cinnamomum triplinerve* e *Cinnamomum glaziovii*.



(1)

(2)

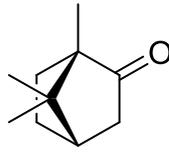
Fonte: <https://floradesantacatarina.wordpress.com/lauraceae/>, acesso em 06 out. 2023.

Legenda: (1) *Cinnamomum triplinerve*

(2) *Cinnamomum glaziovii*

Os principais compostos descritos na literatura para o gênero *Cinnamomum* são terpenos, fenilpropanóides, lignanas, flavonoides, compostos aromáticos, cumarinas, compostos alifáticos e esteróides (Wang *et al.*, 2020). Uma espécie bastante estudada e representativa do gênero é a espécie *Cinnamomum camphora*, que apresenta um óleo essencial rico no terpeno cânfora (Figura 9) e possui conhecida atividade anti-inflamatória (Xiao *et al.*, 2021).

Figura 9 – Estrutura química da cânfora.



Fonte: Da autora.

O gênero *Persea* possui espécies alimentícias de grande interesse econômico e industrial, como a *Persea americana*, que produz o abacate. Os extratos dos frutos e das sementes de *P. americana* demonstraram agir no ciclo celular, retardando o desenvolvimento e ativando a apoptose em algumas linhagens de células cancerosas, além de atuar na eliminação de radicais livres, evidenciados por estudos de extratos da fruta e do caroço de abacate. Ainda possui persenona A e vitaminas do complexo B que previnem a inflamação e a carcinogênese. Alguns trabalhos apontam o potencial antioxidante e anti-inflamatório do gênero *Persea* (Alkhalaf *et al.*, 2019; Vetal *et al.*, 2013).

Outra espécie importante, a *P. major* (Figura 10), é uma planta medicinal cultivada principalmente no Sul do Brasil, popularmente conhecida como “pau-andrade”, “abacate-do-mato” ou “canela-rosa”; ela possui estudo na literatura apontando para potencial ação de neuroproteção no hipocampo à partir do extrato metanólico obtido da casca de *P. major* (Cosmo *et al.*, 2007). Já a espécie *P. willdenovii* possui estudo que relata os efeitos de extratos e frações de folhas contra nematóides gastrointestinais caprinos (Santa Rosa *et al.*, 2018).

Figura 10 – Imagens representando as espécies *Persea willdenovii* e *Persea major*.



Fonte: <https://tropical.theferns.info/image.php?id=Persea+willdenovii>, acesso em 06 out. 2023.
<https://ufsc.br>, acesso em 07 nov. 2023.

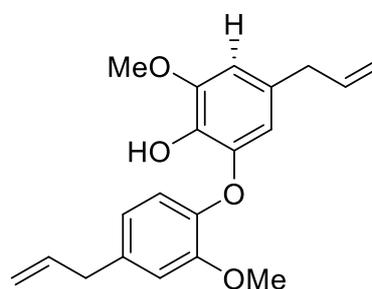
Legenda: (1) *Persea willdenovii*
 (2) *Persea major*

Outro gênero estudado nesse trabalho foi o *Endlicheria*; algumas espécies desse gênero apresentam relatos na literatura de atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimelanogênica, leishmanicidas e inibição da tirosinase enzimática de extratos e óleos essenciais. A espécie *Endlicheria paniculata* (Figura 11), é uma espécie que já apresenta um estudo demonstrando o potencial anti-inflamatório do composto purificado do extrato hexânico (Souza *et al.*, 2020), o desidrodieugenol B (Figura 11).

Figura 11 – Imagem representando a espécie *Endlicheria paniculata* e seu composto isolado.



(1)



(2)

Fonte: <https://floradesantacatarina.wordpress.com/lauraceae/>, acesso em 06 out. 2023.

Legenda: (1) *Endlicheria paniculata*
 (2) Desidrodieugenol B

Outro importante gênero dentro da família Laureceae contemplado nesse trabalho é o gênero *Nectandra*, que apresenta diversos usos etnofarmacológicos relatados na literatura, dentre eles propriedades anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, antifúngica, antidiarréica, antireumática, antipirética, energizante e hipotensora, sendo que a espécie *Nectandra angustifolia* exibiu atividade anti-inflamatória em ensaio de pata em camundongos induzida por formalina (Ferrini *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2005). A neolignana licarina A isolada das folhas de *Nectandra oppositifolia* (Figura 12), por exemplo, exibiu eficácia pré-clínica moderada contra a infecção por *Schistosoma mansoni*, o que reforça a diversidade de propriedades farmacológicas exibidas por extratos e/ou compostos isolados de espécies da família Lauraceae (Mengarda *et al.*, 2021).

Já a espécie *Nectandra membranacea* (Figura 12), apresentou promissora atividade antimalárica pela mistura de alcaloides (-)-gliazovina e (+)-aplogliazovina isolados das folhas da mesma, que apresentou valor de IC₅₀ de 32,18 µg/mL contra a cepa *Plasmodium berghei* NK65 (Bagnarello-Madrigal *et al.*, 2018). Em outro estudo realizado a partir do extrato bruto da casca de *Nectandra membranacea*, este apresentou atividade citotóxica *in vitro* contra as linhagens celulares tumorais humanas (Hep G2 e MDA-MB-231), bem como atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, além da levedura *Candida albicans*. Também, foram isolados do extrato da casca três sesquiterpenos, o ácido ilícico, o ácido cóstico e o ácido 3-isocóstico, todos isolados pela primeira vez em Lauraceae (Wu Xiujun *et al.*, 2006).

Figura 12 – Imagens ilustrando as espécies *Nectandra membranacea*, *Nectandra oppositifolia* e *Nectandra grandiflora*.



(1)

(2)



(3)

Fonte: <https://floradesantacatarina.wordpress.com/lauraceae/>, acesso em 06 out. 2023.
<https://tropical.theferns.info/image.php?id=Nectandra+grandiflora>, acesso em 06 out. 2023.

Legenda: (1) *Nectandra membranacea*
 (2) *Nectandra oppositifolia*
 (3) *Nectandra grandiflora*

Em um estudo de outra espécie do gênero *Nectandra*, o extrato bruto hidroetanólico das folhas da espécie *Nectandra grandiflora* (Figura 12), demonstrou atividade antioxidante e, o fracionamento guiado pelo bioensaio, levou ao isolamento do ácido protocatecuico e de dois glicosídeos de flavonol, a afzelina e a quercetrina, que também apresentaram atividade antioxidante e foram comparados aos antioxidantes comerciais rutina e butilhidroxitolueno, utilizados como grupo controle (Ribeiro *et al.*, 2005).

Já o gênero *Aiouea* apresenta poucos estudos descritos na literatura. O extrato etanólico do xilopódio da espécie *Aiouea trinervis* apresentou atividade *in vitro* contra as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Além disso, foi demonstrada atividade antitripanossômica para os butenólídeos isolados, que foram mais ativos contra as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* do que o medicamento de referência benzonidazol (Nunes

et al., 2020). Entretanto, a espécie *Aiouea saligna* (Figura 13), não possui estudos descritos na literatura, sendo uma espécie que apresenta todo seu arsenal químico ainda desconhecido.

Figura 13 – Imagem representando a espécie *Aiouea saligna*.



Fonte: <https://floradesantacatarina.wordpress.com/lauraceae/>, acesso em 06 out. 2023.

2.2 ASPECTOS DA INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório pode ser definido como uma resposta de defesa do organismo frente a algum dano, desordem ou lesão, oriundos de fontes química, física ou microbiológica (Greten; Grivennikov, 2019). É um processo presente no organismo, que envolve ativação, recrutamento e ação de células de imunidade inata e adaptativa. Apresenta um papel essencial na defesa do hospedeiro contra patógenos, sendo que a inflamação é igualmente importante para a reparação, regeneração e remodelação de tecidos; e ainda inflamações são essenciais para a regulação da homeostase do tecido (Greten; Grivennikov, 2019).

A inflamação é uma condição presente em diversas patologias e está associada tanto em processos agudos quanto crônicos. Pode ser considerada como uma reação envolvida em inúmeras enfermidades como, por exemplo, a artrite reumatoide, a asma, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, osteoporose, doença de Alzheimer, certos tipos de cânceres e o acidente vascular cerebral (Domingos *et al.*, 2019).

Quando acontece um estímulo inflamatório, ocorre liberação do ácido araquidônico, substância encontrada na membrana fosfolipídica das células, pela ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). O ácido araquidônico será então metabolizado por diferentes enzimas envolvidas

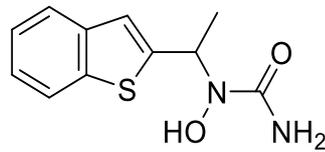
na cascata da inflamação, levando à liberação de diferentes mediadores atuantes no processo inflamatório (Parente, 2001; Slavich, 2015). Dentre elas as enzimas COX e LOX.

A enzima cicloxigenase apresenta diferentes isoformas, COX-1, COX-2 e COX-3; sendo as duas primeiras as mais estudadas. A maioria dos AINEs agem inibindo a COX, podendo agir seletivamente mais em uma das isoformas em relação a outra. A ação anti-inflamatória exibida por tais medicamentos está relacionada a inibição seletiva da COX-2, enquanto os efeitos adversos exibidos, principalmente no trato gastrointestinal, estão relacionados a inibição da COX-1. A isoforma COX-1 está associada com a regulação e proteção de algumas funções, como a homeostase dependente de plaquetas, a integridade da mucosa gástrica e a regulação do fluxo sanguíneo renal. Quando a via da COX é inibida, a formação de mediadores inflamatórios prostanóides por consequência também são inibidas, como as prostaglandinas (PGs), tromboxanos e prostaciclina (Meirer, Steinhilber, Proschak, 2014; Parente, 2001).

Uma outra enzima muito importante no metabolismo do ácido araquidônico é a enzima lipoxigenase (LOX). Ela é responsável pela produção dos mediadores inflamatórios leucotrienos e as lipoxinas. Esses mediadores atuam no recrutamento das células de defesa, em especial os neutrófilos. Os leucotrienos apresentam um sistema trieno conjugado de duplas ligações, sendo considerados mediadores que regulam a resposta imune inata e desempenham um papel significativo nas doenças inflamatórias crônicas (Peisino *et al.*, 2020).

As drogas que visam ação na via da LOX podem atuar em diferentes estágios, como a inibição direta de LOX, inibição da proteína ativadora da LOX, inibição da síntese de intermediários na formação do leucotrieno, bem como antagonismo do receptor de leucotrienos (Medzhitov, 2010; Meirer; Steinhilber; Proschak, 2014; Parente, 2001). Existem no mercado, inibidores específicos da LOX, como por exemplo, o medicamento Zileuton, cujo nome comercial é Zylflo (Figura 14); este é utilizado para o tratamento da asma crônica persistente, mas apresenta restrições devido a sua toxicidade hepática e curto tempo de meia-vida (Medzhitov, 2010; Meirer; Steinhilber; Proschak, 2014; Parente, 2001).

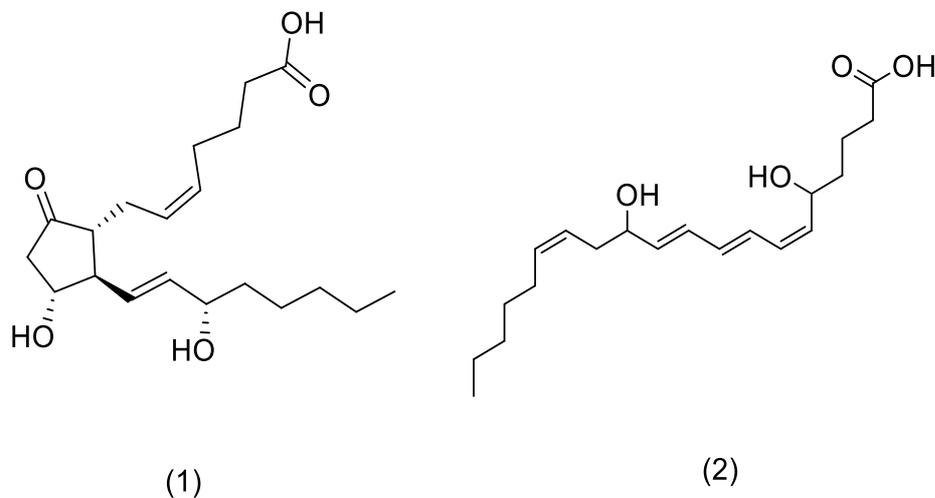
Figura 14 – Estrutura química do Zileuton.



Fonte: Da autora.

Os mediadores da inflamação supracitados, que são gerados durante o processo inflamatório podem atuar de diferentes formas. As PGs agem como mediadores inflamatórios e da dor, especialmente a PGE₂ (Figura 15), que é responsável por sintomas como aumento da permeabilidade vascular, formação de edema, vermelhidão e dor. No trato gastrointestinal, as PGs inibem a secreção de ácido clorídrico e pepsina, melhoram o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e estimulam a formação de muco, bem como a secreção de bicarbonato (Parente, 2001).

Figura 15 – Estrutura química da PGE₂ e do LTB₄.



Fonte: Da autora.
 Legenda: (1) PGE₂
 (2) LTB₄

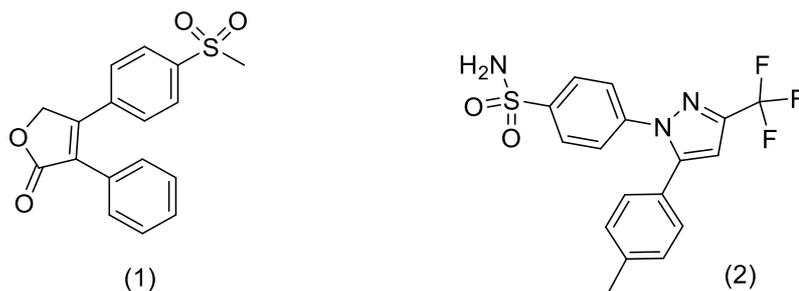
Os leucotrienos exibem uma associação importante nas doenças inflamatórias crônicas, sendo o leucotrieno B₄ (LTB₄) (Figura 15) um dos principais envolvidos nesta via. Eles são considerados quimiotáticos sobre os neutrófilos e macrófagos, células da defesa imune do hospedeiro envolvidas nas reações inflamatórias, levando à degranulação e liberação de enzimas lisossômicas e citocinas, acarretando em lesão tecidual. Os leucotrienos também estão envolvidos em reações de hipersensibilidade imediata, além de serem constritores potentes da

musculatura lisa das vias aéreas, levando à broncoconstrição (Medzhitov, 2010; Meirer; Steinhilber; Proschak, 2014; Parente, 2001).

Tanto os AINEs quanto os AIEs atuam na via da COX, inibindo a enzima COX diretamente ou indiretamente, respectivamente. Os AINEs atuam na cascata da inflamação inibindo as enzimas COX-1 e/ou COX-2, acarretando na diminuição dos principais mediadores dessa via, entre eles a PGE₂. Alguns exemplos de AINEs incluem a aspirina, a indometacina e o cetoprofeno. Esses agentes diminuem os sintomas agudos da inflamação, porém por não serem seletivos, podem apresentar efeitos adversos gastrointestinais pela inibição da enzima COX-1 (Chagas-Paula *et al.*, 2015a; Meirer; Steinhilber; Proschak, 2014).

Os chamados coxibes, inibidores seletivos de COX-2, foram desenvolvidos em decorrência da ausência de seletividade dos medicamentos anteriormente disponíveis. Os coxibes apresentam as mesmas propriedades anti-inflamatórias, anti-pirais e analgésicas observadas nos AINEs tradicionais, contudo não apresentam os efeitos adversos decorrentes da inibição de COX-1 (Parente, 2001). Estes inibidores foram classificados quanto ao grau de inibição da COX-2 em: inibidores seletivos da COX-2 de primeira geração, tais como meloxicam, naproxeno e nimesulida; e inibidores altamente seletivos da COX-2, de segunda geração, como celecoxibe, rofecoxibe (Figura 16). Porém, devido a efeitos adversos cardiovasculares severos, vários coxibes foram retirados do mercado (Parente, 2001).

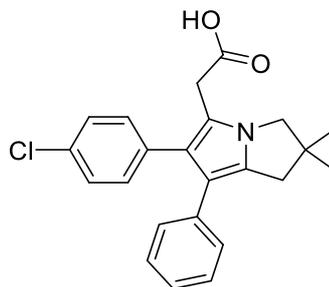
Figura 16 – Estrutura química dos coxibes celecoxibe e rofecoxibe.



Fonte: Da autora.
 Legenda: (1) Celecoxibe
 (2) Rofecoxibe

Quanto aos AIEs, também conhecidos como corticoides ou glicocorticoides, são medicamentos utilizados principalmente nas doenças crônicas. Dentre os corticoides disponíveis no mercado, tem-se a dexametasona e a betametasona (Figura 17). A eficácia desses fármacos no alívio de distúrbios inflamatórios ocorre devido a mimetização dos efeitos do

Figura 18 – Representação da estrutura química do licofelone.



Fonte: Da autora.

Devido às limitações e efeitos adversos observados nas terapias anti-inflamatórias disponíveis e a escassez de medicamentos AINEs que atuem em mais de uma via da cascata da inflamação, torna-se essencial à busca por novas substâncias multialvos e por novas substâncias anti-inflamatórias.

2.3 METABOLÔMICA

A metabolômica pode ser definida como uma abordagem analítica aplicável para a identificação e quantificação de metabólitos em um sistema biológico, sendo possíveis estudos para obtenção de impressões digitais completas de metabólitos, além de detectar diferenças entre metabólitos de diferentes amostras e gerar hipóteses para explicar essas diferenças. Na área de produtos naturais, a metabolômica é considerada uma análise em grande escala dos metabólitos de um determinado organismo em um tempo específico (Demarque *et al.*, 2020).

Com o advento de técnicas analíticas modernas, o grande conjunto de dados gerados pode ser interpretado de uma maneira holística. Assim, o metaboloma pode ser fonte para descoberta de novos conhecimentos biológicos, como uma atividade farmacológica (Demarque *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2019).

Entre os vários tipos de estudos metabolômicos, a impressão digital metabólica, por exemplo, geralmente tem por objetivo uma classificação rápida de amostras, sem requerer a identificação e quantificação de metabólitos. Análises estatísticas multivariadas podem ser aplicadas para determinar diferenças e classificar amostras em estudos deste tipo. Logo, o objetivo de estudos por meio de determinação de impressão digital metabólica não é identificar cada metabólito individual, mas comparar as impressões digitais de metabólitos que mudam em um determinado sistema biológico (Demarque *et al.*, 2020).

Já o perfil metabólico é um outro tipo de estudo metabolômico que concentra-se na análise de um grande grupo de metabólitos que está relacionado a uma via metabólica específica ou a uma classe de compostos, sendo uma estratégia mais direcionada do que a impressão digital. Assim, são necessários métodos analíticos específicos para a determinação e identificação do grupo de metabólitos de interesse para o estudo (Wolfender *et al.*, 2015).

Para os estudos metabolômicos diferentes metodologias analíticas podem ser empregadas para determinar a composição química de uma determinada amostra. A escolha da metodologia ideal dependerá do objetivo do estudo. Técnicas hífenadas como a cromatografia líquida de alta ou ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização tipo *electrospray* e analisador de alta resolução de tecnologia *Orbitrap* (UPLC-*HRMS-ESI-Orbitrap*) são bastante utilizadas (Sumner; Mendes; Dixon, 2003). O ionizador por *electrospray* (ESI) é um dos métodos de ionização de escolha, por ser capaz de ionizar a grande maioria dos metabólitos comuns em estudos metabolômicos, de média a alta polaridade, exceto substâncias sem grupos funcionais ou que sofrem supressão iônica (Crotti, 2006). Quanto ao analisador *Orbitrap*TM ele também é um dos mais utilizados, por registrar a oscilação dos íons, cuja frequência fornece informações sobre a massa do íon com alta resolução (Liu; Locasale, 2017). Ele permite a determinação da fórmula molecular dos metabólitos das amostras analisadas e a sua desreplicação, dispensando uma série de etapas prévias de purificação e isolamentos comuns em estudo clássicos de produtos naturais.

O processo de desreplicação, também denominado de anotação molecular, consiste na determinação da fórmula molecular dos metabólitos a partir da massa exata, descrita através da razão da massa pela carga (m/z) de seus prováveis íons. Isso permite uma comparação com bases de dados, possibilitando uma avaliação preliminar da composição química presente em determinada amostra. Essas medições de massas precisas reduzem o número de composições elementares previstas, o que facilita as buscas em bancos de dados de substâncias (Nielsen *et al.*, 2011), sendo possível proceder a desreplicação para os biomarcadores de determinada atividade biológica, bem como para toda a amostra/extrato desejados.

Esse processo pode ser realizado em diversos softwares. No MZmine, por exemplo, é possível utilizar bancos de dados abrangentes como o *Dictionary of Natural Products*[®] - DNP ou banco de dados específico para determinada espécie estudada. Ainda pode ser realizada em softwares como o Qualbrowser/Xcalibur[®], nos quais são geradas possíveis fórmulas moleculares para cada m/z observada, onde são considerados, ainda, diversos parâmetros para chegar à fórmula molecular mais provável para aquele dado, tais como padrão isotópico, regra do N, entre outras. Dentre as bases de dados online mais utilizadas atualmente para processos

de desreplicação de produtos naturais, pode se citar o DNP, *Chem net base*, o *KNAPSAcK family databases*, *MassBank of North America - MoNA* e *Global Natural Products Network - GNPS* (Hubert; Nuzillard; Renault, 2017).

Sendo assim, a desreplicação é um processo fundamental em estudos metabolômicos, pois além de vislumbrar o arsenal de metabólitos secundários, também pode guiar o isolamento de substâncias potencialmente inéditas, que não apresentam nenhum *hit* - candidato, substâncias relatada previamente na literatura (Chagas-Paula *et al.*, 2015b; Tawfik *et al.*, 2017).

Metabolites Standard Initiative (MSI) estabeleceu 5 níveis de confiança para as anotações químicas. No nível 0, há a identificação completa da estrutura, a partir dos dados espectroscópicos e espectrométricos da molécula isolada, inédita ou conhecida. Já no nível 1, há comparação dos dados espectrométricos e espectroscópicos com um padrão autêntico conhecido (Creek *et al.*, 2014; Hubert; Nuzillard; Renault, 2017). Para os níveis 2 e 3, não há comparação com o padrão. No nível 2 é quando há a determinação da estrutura comparando-se com bases de dados e descrições na literatura. Já no nível 3, determina-se apenas a classe da substância discriminada ou a estrutura mais provável. No nível 4, relata-se apenas informações quanto à presença e/ou ausência do metabólito em questão (Hubert; Nuzillard; Renault, 2017), sendo que, qualquer um destes níveis já é suficiente para prosseguir os estudos a depender do objetivo do estudo.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

As análises estatísticas permitem avaliar se existe correlação entre os dados sobre a composição química de amostras, obtidos por técnicas analíticas, com resultados oriundos de ensaios farmacológicos *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. Permite também a construção de modelos de predição de atividade biológica para novas espécies, determinação de biomarcadores, entre muitas outras aplicações (Caesar *et al.*, 2019).

Após os dados metabolômicos serem devidamente tratados, eles podem então ser analisados estatisticamente por diversos *softwares* com distintas metodologias. As análises estatísticas podem ser multivariadas ou univariadas, que analisam múltiplas variáveis de uma única vez ou uma por vez, respectivamente. Podem ser também supervisionadas (quando há informação de classes/ atividade biológica) e não supervisionadas (sem informação de classes). Os métodos de análises multivariadas não supervisionados permitem gerar gráficos de análise

de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA), que exploram de modo geral um conjunto de dados, verificando tendências e formando agrupamentos de acordo com as similaridades das amostras, sem considerar nenhuma prévia classificação dos dados (Chagas-Paula *et al.*, 2015b).

Os métodos de análise estatística supervisionados são utilizados para avaliar conjuntos de dados conhecidos, ou seja, que possuem informação prévia, a fim de verificar padrões e regras para classificar amostras, determinar biomarcadores e prever informações sobre novos dados. Uma linha muito comum é a utilização de ensaios com atividades farmacológicas, possibilitando uma comparação por similaridade, com amostras, já sabidamente ativas e não ativas para aquela determinada atividade. Os métodos supervisionados podem ser classificados como lineares ou não lineares. Dentre os lineares, pode-se citar o método dos mínimos quadrados parciais (PLS) e o método dos mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS). Dentre os métodos não lineares, pode-se citar as redes neurais artificiais (ANN) e algoritmo genético (Golbraikh; Tropsha, 2002; Mahadevan *et al.*, 2008; Madsen; Lundstedt; Trygg; Holmes, 2007; Yi *et al.*, 2016).

Em amostras complexas, como é o caso de amostras de extratos de espécies de plantas, o grande número de variáveis e o grande número de amostras normalmente analisadas, tornam os dados com alto grau de colinearidade. Este fato pode ser um problema em potencial para modelos de regressão múltipla comuns. Mas a regressão PLS é capaz de integrar aspectos de regressão múltipla e análise de componente principal, tornando-se um bom ponto de partida para a análise bioquimiométrica (Caesar *et al.*, 2019).

Ainda, pode-se utilizar a seleção de atributos antes de proceder com tais análises, onde previamente é realizada uma seleção das variáveis independentes para determinado modelo. Assim, dentro do conjunto de dados, ocorre a pré-seleção das variáveis que são mais importantes para delimitar o modelo a ser desenvolvido, eliminando as variáveis redundantes, que são correlacionadas entre si, ou seja, representam a mesma variação em relação ao dado supervisionado (Wang *et al.*, 2019).

2.5 MACHINE LEARNING - ML

As técnicas de aprendizado de máquina (do inglês *Machine Learning - ML*) fazem o reconhecimento de padrões ou possuem a capacidade de aprender continuamente ou de fazer previsões com base em um conjunto de dados, sendo a inteligência artificial (IA) um exemplo de ML (Kouznetsova *et al.*, 2019). Com o rápido desenvolvimento e utilização da IA em

diversas áreas, as abordagens de ML para avaliar dados de cromatografia acopladas a espectrometria de massas de alta resolução, têm ganhado destaque nas pesquisas envolvendo produtos naturais e metabolômica.

Os métodos de ML se dividem em duas categorias, o ML supervisionado e o ML não supervisionado. O ML supervisionado é treinado usando os dados de treinamento; este método envolve três etapas, a seleção de dados de treinamento, a otimização do modelo e previsão de novo conjunto de dados (Tian *et al.*, 2018).

As redes neurais artificiais (ANN) são métodos não lineares de inteligência artificial, empregados para analisar interações complexas que ocorrem em diferentes níveis de organizações biológicas. Como processos biológicos geralmente seguem uma resposta não linear, nesses casos, são necessários métodos de reconhecimento de padrões não lineares para caracterizar dados metabolômicos (Yi *et al.*, 2016).

O gradiente descendente estocástico (SGD) é um algoritmo de otimização frequentemente usado em aplicativos de aprendizado de máquina para encontrar os parâmetros do modelo que correspondem ao melhor ajuste entre as saídas previstas e reais, permitindo a melhoria e otimização das redes neurais. Esse método executa cálculos sobressalentes para o conjunto de dados, onde recalcula gradientes para as instâncias associadas antes de cada atualização de parâmetro (Zhang *et al.*, 2020).

Então, estas técnicas de aprendizagem de máquina podem ser úteis para análise dos dados metabolômicos e a construção de modelos de predição de atividade farmacológica previstos neste trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial anti-inflamatório de extratos de espécies da família Lauraceae, desenvolver um modelo de predição de atividade anti-inflamatória para extratos de espécies desta família. Além disso, pesquisar e desreplicar os biomarcadores desta atividade e selecionar uma espécie para realizar estudo fitoquímico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Abaixo estão descritos os objetivos específicos:

- a) analisar a composição química dos extratos por UPLC-HRMS;
- b) avaliar o potencial anti-inflamatório em modelo *ex vivo*;
- c) construir modelos de predição de atividade anti-inflamatória para extratos da família Lauraceae;
- d) proceder à anotação química das substâncias correlacionadas com a atividade anti-inflamatória;
- e) selecionar uma das espécies com atividade anti-inflamatória para realizar estudo fitoquímico;
- f) realizar a fitoquímica e isolamento de substâncias do extrato da espécie selecionada;
- g) elucidar a estrutura química do composto isolado.

4 METODOLOGIA

4.1 SOLVENTES, REAGENTES E MATERIAIS

Todos os solventes utilizados para as análises em cromatografia seja por cromatografia líquida de alta eficiência (LC), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) ou cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-HRMS) foram grau HPLC. A acetonitrila (ACN) e hexano foram da marca Sigma-Aldrich®, metanol (MeOH) e etanol (EtOH) da marca Tedia e o ácido acético glacial J. T. Baker. A água ultrapura foi obtida em equipamento Millipore. Os padrões PGE₂, cloranfenicol (CAP), dexametasona, lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O26:B6, ácido fórmico, indometacina foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. As amostras foram homogeneizadas em vórtex QL-901. A purificação das amostras de plasma foi realizada por extração em fase sólida utilizando-se um sistema *Manifold Supelco* e cartuchos *Supelclean*TM (LC-18 SPE 500mg, #57012). As amostras foram analisadas por LC-MS/MS e a separação cromatográfica foi em coluna de fase reversa (2,7 µm, 3×100 mm) acoplada a uma pré-coluna de fase reversa (1,8 µm, 2,1×5 mm). Foi utilizado o *software* LabSolutions® para aquisição e o tratamento dos dados e, após, foi utilizado o programa *GraphPad Prism*® (versão 9.1.2) para computação dos dados.

O moinho de facas utilizado para triturar as amostras de plantas foi o Cróton TE-625; as amostras das espécies foram submetidas à lavadora ultrassônica (L110 Schuster) para obtenção dos extratos e utilizou-se Microfiltros *SimplePure* de politetrafluoroetileno - PTFE (poros de 0,45 µm de diâmetro) para filtrar os extratos de plantas ressuspensos após o *clean up* por partição líquido-líquido com hexano grau HPLC. As análises de UPLC-HRMS foram obtidas em equipamento *Thermo Scientific Exactive*TM equipado com a tecnologia *Orbitrap*TM, *Thermo Scientific*®. Para a avaliação dos extratos, utilizou coluna cromatográfica C₁₈ (150 x 3 mm e 3 µm de diâmetro de partícula; ACE®, Aberdeen, Escócia). Os dados UPLC-HRMS obtidos no formato .mzXML foram convertidos usando o *software* ProteoWizard-Msconvert, versão 3.0 (Proteowizard Software Foundation). O tratamento dos dados foi realizado no *software* MZmine 2.53 (MZmine Development Team, Free Software Foundation Inc.), para obtenção dos cromatogramas sobrepostos, das amostras de extratos, obtidos em MS1 no modo *full scan*. Utilizou-se o LC-MS/MS para as análises e concentrador de amostras a vácuo (*Eppendorf*®). Os *softwares* SIMCA® 17.0.2 (Sartorius) e Weka 3.9.5 (*The University of Waikato*) foram utilizados para análises estatísticas multivariadas nos estudos metabolômicos.

A anotação química foi realizada utilizando-se o *software* QualBrowser/Xcalibur[®] 2.1.0 (Thermo Scientific[™]) para a obtenção da fórmula molecular mais provável, além dos bancos de dados *Dictionary of Natural Products*[®] – CHEMnetBASE (DNP), *SciFinder* e o MoNA para comparações dos fragmentos de massas. O *software* *MetaboAnalyst* 5.0 foi utilizado para a construção das análises de característica operacional do receptor (ROC) e área sob a curva (AUC), além do gráfico de dispersão PCA. Todas as estruturas químicas encontradas nesse trabalho foram desenhadas no *software* *ChemBioDraw* Ultra[®] 13.0. A Rotação ótica para a substância isolada foi medida em polarímetro automático (Jasco, Modelo: P-2000).

Para o isolamento foi utilizada sílica gel 60 - 70 a 230 Mesh, além de placas com base de alumínio com sílica gel 60 e luz ultravioleta ($\lambda = 254$ ou 365 nm) como revelador. A fração aquosa obtida foi liofilizada em liofilizador LJJ04 Científica.

As frações foram avaliadas por HPLC-UV-DAD analítico. Para a determinação estrutural foi utilizado espectrômetro Bruker a 300MHz e a amostra foi preparada em clorofórmio deuterado (CDCl_3) para as análises de RMN unidimensional de ^1H e de ^{13}C e bidimensionais HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) e, posteriormente, a amostra foi preparada em metanol deuterado ($\text{MeOH-}d_4$) para as análises de *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (NOESY) e *Homonuclear Correlation Spectroscopy* (COSY).

4.2 AMOSTRAS E PREPARO DOS EXTRATOS

Para realização do estudo *ex vivo*, 18 espécies de Lauraceae foram analisadas. O estudo foi registrado no Sistema Nacional de Governança do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen nº A913C3F). Uma pequena quantidade do material vegetal das espécies OO, OC, OCB, EP, EPB e NG (Tabela 1) disponíveis na região de Alfenas-MG, Brasil foi coletado. A quantidade de material vegetal coletada não comprometeu a sobrevivência desses espécimes. Todas as espécies coletadas, foram depositadas no herbário da UNIFAL-MG. Para as espécies que foram coletadas na região de Alfenas-MG, as folhas frescas foram secas em estufa de ar circulante, à temperatura de 40°C , por 72 horas. Após a secagem, o material foi triturado, individualmente, em moinho de facas. O restante das espécies de Lauraceae disponíveis no herbário da UNIFAL-MG foram incluídas no estudo por doação de 1 folha pelo herbário, desde que não compromettesse a qualidade do voucher.

Foram estudadas as folhas das espécies para a maioria das plantas, exceto para *Endlicheria paniculata* e *Ocotea corymbosa*, que além das folhas, também foi estudado o caule, totalizando 20 extratos (Tabela 1).

Tabela 1- Identificação das espécies da família Lauraceae. (Continua)

Código	Identificação	Número da Exsicata	Coleta	Identificador
AF	<i>Aniba firmula</i> (Nees & Mart.) Mez	# 2649	Gaspar Lopes -	Pereira, DGS
AS	<i>Aiouea saligna</i> Meisn.	# 1585	Fazenda Bem-te- vi -	Pereira, DGS
CG	<i>Cinnamomum glaziovii</i> (Mez) Kosterm.	# 1550	Fazenda Tropical Junho/2007	Pereira, DGS
CT	<i>Cinnamomum triplinerve</i> (Ruiz & Pav.) Kosterm.	# 690	Parque Municipal de Alfenas Janeiro/2008	Caneiro, MS
EPL	<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J.F. Mac Folha	# 183	Gaspar Lopes Junho/2016	Chagas, DA
EPB	<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J.F. Macbr. Caule	#183	Gaspar Lopes Junho/2016	Chagas, DA
NG	<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & Mart.	# 2735	Gaspar Lopes Junho/2016	Chagas, DA
NM	<i>Nectandra membranacea</i> (Sw.) Griseb.	# 182	Pousada do Porto Janeiro/2008	Caneiro, MS
NO	<i>Nectandra oppositifolia</i> Nees & Mart.	# 2672	Fragmento M Junho/2012	Ribeiro

Tabela 1- Identificação das espécies da família Lauraceae.

(Continua)

Código	Identificação	Número da Excicata	Coleta	Identificador
OA	<i>Ocotea aciphylla</i> (Nees & Mart.) Mez	# 924	Pousada do Porto Janeiro/2008	Pereira, DGS
OB	<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil	# 1549	Fazenda Tropical Junho/2007	Pereira, DGS
OCL	<i>Ocotea corymbosa</i> (Meisn.) Mez Folha	# 2736	Gaspar Lopes Junho/2016	Chagas, DA
OD	<i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez	# 2579	Fragmento M Dezembro/2012	Magda
ODI	<i>Ocotea divaricata</i> (Nees) Mez	# 710	Poços de Caldas Fevereiro/2010	Pereira, DGS
OCB	<i>Ocotea corymbosa</i> (Meisn.) Mez Caule	# 2736	Gaspar Lopes Junho/2016	Chagas, DA
OP	<i>Ocotea pulchella</i> (Nees & Mart.) Mez	# 175	Pousada do Porto Janeiro/2008	Caneiro, MS
OPB	<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	# 1748	Pousada do Porto Janeiro/2008	Pereira, DGS
OO	<i>Ocotea odorifera</i> Vell. Rohwer	# 2970	Prefeitura Alfenas Novembro/2016	Chagas, DA
PM	<i>Persea major</i> (Nees) L.E. Kopp	# 2348	Fazenda São José Agosto/2012	Bruno

Tabela 1- Identificação das espécies da família Lauraceae.

(Conclusão)

Código	Identificação	Número da Excicata	Coleta	Identificador
PW	<i>Persea willdenovii</i> Kosterm.	# 1000	São Tomé Janeiro/2008	Pereira, DGS

Fonte: Da autora.

Os extratos foram preparados utilizando 20 mg das folhas ou caule secos, triturados individualmente em almofariz, utilizando pistilo e nitrogênio líquido. Ao material triturado foi adicionado 2 mL da solução etanol:água MiliQ, na proporção 7:3, em tubo tipo *eppendorf*. Após isso, todas as amostras foram colocadas em banho de ultrassom por 15 minutos, sendo então centrifugadas para recolher o sobrenadante. Depois disso, realizou-se o *clean-up* por partição com hexano grau HPLC (2 x 200 µL), para a retirada de substâncias apolares e, então, filtrou-se em filtro de seringa de membrana de PTFE de 0,45 µm de diâmetro de poro (De Alcântara *et al.*, 2021).

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

4.3.1 Ensaios *ex vivo* no sangue

Para realização dos ensaios *ex vivo* coletou-se sangue venoso de voluntários saudáveis, conforme descrito e aprovado pelo o comitê de ética número 60344622.1.0000.5142 (15 de Agosto de 2022). O sangue foi coletado de doadores que não usaram anti-inflamatórios a pelo menos 15 dias antes da coleta, com idade entre 20 e 35 anos. O sangue foi coletado em seringa com heparina. Foram autoclavados os materiais utilizados para pipetar, para plaqueamento das amostras e sangue, bem como o tampão fosfato salina (PBS 1x), utilizado para a diluição das amostras. Todo o plaqueamento foi realizado em capela de fluxo laminar devidamente esterelizada.

O ensaio *ex vivo* foi realizado conforme metodologia já padronizada (Rosa *et al.*, 2021). Foram utilizadas placas de 96 poços, com 200 µL sangue (heparinizado) por poço. Após isso, foram adicionados 25 µL de solução salina (PBS 1x) no controle negativo e 25 µL das amostras. As amostras do controle positivo (dexametasona e indometacina) e dos extratos foram avaliados na concentração final no poço de 1 e 10 µg/mL, respectivamente.

Após 5 minutos de incubação, foi adicionado o indutor da inflamação. O indutor da inflamação no sangue utilizado foi 25 μL do LPS bacteriano (*E. coli* O26:B6) a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Logo, a placa foi incubada em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$ por 24 h. Após a incubação, centrifugou-se a placa por 5 minutos a 1000 rpm, 89,6 força G, à 4 $^\circ\text{C}$ e, retirou-se o plasma sobrenadante, que foi utilizado para a quantificação do mediador inflamatório PGE_2 .

O ensaio de quantificação do mediador inflamatório PGE_2 , foi realizado nas amostras, sendo que aos 100 μL do plasma de cada amostra testada, adicionou-se 500 μL de uma mistura 1:1 (v/v) de ACN:MeOH para precipitação de proteínas. Em seguida, homogeneizou em vórtex por 30 s aproximadamente. Após isso, realizou centrifugação das amostras a 6000 rpm ou 3225,6 força G por 10 minutos, à 4 $^\circ\text{C}$ e, após, retirou-se 500 μL do sobrenadante, tomando-se o cuidado para não ressuspender as proteínas. Logo após isso, adicionou-se 4,5 mL de água Milli-Q ao sobrenadante de cada amostra, que posteriormente foi submetida à extração em fase sólida.

Para a realização da extração em fase sólida, primeiro condicionou-se os cartuchos Supelclean, adicionando-se 2 mL de MeOH, depois 2 mL de água Milli-Q acidificada 0,1% com ácido acético. Após isso, aplicou-se toda a amostra ao cartucho (5 mL), passou-se mais 2 mL de água Milli-Q acidificada 0,1% com ácido acético. Após isso, a amostra foi coletada em tubo plástico de 2 mL (fundo redondo) passando-se 2 mL de MeOH acidificado com 0,1% ácido acético. Após isso, as amostras foram submetidas à completa secagem em concentrador de amostras a vácuo por 6 h.

4.3.2 Quantificação de PGE_2 por LC-MS/MS

A quantificação de PGE_2 foi realizada segundo metodologia previamente validada (Rosa *et al.*, 2021). As amostras secas no concentrador de amostras a vácuo (item 4.2.1) foram ressuspensas em 100 μL de solução do padrão interno CAP em ACN (grau HPLC) a 25 ng/mL para injeção no LC-MS/MS. O volume de injeção foi 20 μL . A separação cromatográfica foi conduzida a 30 $^\circ\text{C}$ em uma coluna de fase reversa (3 \times 100 mm) acoplada a uma coluna-guarda de fase reversa (2,1 \times 5 mm).

A fase móvel foi constituída de: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). O gradiente cromatográfico do método foi de 40% a 100% do B em 3 min, mantido por 1 min a 100% e depois retornado com 40% de B em 0,50 min, seguido do acondicionamento da coluna com 40% de B, mantido por 4 min. Totalizando 8,5 min de corrida cromatográfica, com o fluxo de 0,3 mL/min. Foi utilizado nitrogênio gasoso no fluxo

de 2 L/min, nitrogênio gasoso de secagem no fluxo de 15 L/min a 450°C, tensão de interface 3,5 kV, temperatura DL de 250°C, detector tensão 2,44 kV e gás de colisão argônio a 230 kPa. A detecção da PGE₂ e do CAP no espectrômetro de massas foi por método de monitoramento de reações selecionadas (do inglês *Selected Reaction Monitoring* - SRM), no modo de ionização negativo, sendo os íons precursores formados principalmente a partir da desprotonação das moléculas dos analitos [M-H]⁻. A aquisição e o tratamento dos dados, foram realizados utilizando o *software* LabSolutions®.

4.3.3 Análises estatísticas

Testes de normalidade foram realizados por meio de gráficos Q-Q e testes de *Shapiro-Wilk* para cada conjunto de dados. Posteriormente, os resultados do ensaio anti-inflamatório *ex vivo* foram analisados estatisticamente por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de *Dunnett* e expressos como média ± erro médio padrão. O programa utilizado para computação dos dados foi *GraphPad Prism*®.

4.4 UPLC-HRMS E TRATAMENTO DOS DADOS

As amostras de extratos obtidas, como descrito na seção 4.2, foram submetidas a análise UPLC-UV-HRMS, onde o espectrômetro foi operado usando os modos positivo e negativo para a análise de todos os extratos. A fonte de ionização utilizada foi ESI e o instrumento usava a tecnologia *Orbitrap* como analisador. A injeção das amostras foi realizada pela Dra. Rosana Casoti no grupo de pesquisa ASTERBIOCHEM da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP.

Para a avaliação dos extratos, utilizou-se o seguinte método cromatográfico: coluna cromatográfica C₁₈ (150 x 3 mm e 3 µm de diâmetro de partícula); fase móvel em gradiente com fluxo de 400 µL/min compreendido de ACN/água, ambas as fases acidificadas com 0,1% ácido fórmico. Gradiente de 2–55% ACN em 17 min, 55–100% ACN até 20 min, 100% ACN até 24 min, 100–2% de ACN por 3 min., seguido de 2% de ACN por 3 minutos; a temperatura da coluna foi controlada a 30°C; a faixa de varredura de *m/z* 120–1200 para MS completo e 80–800 *m/z* para fragmentação. ESI-MS (resolução de 70.000) com *lock mass*; máximo tempo de injeção: 250 ms; taxa do fluxo de gás = 30; taxa do fluxo de gás auxiliar = 10; voltagem do spray no modo positivo (3,6 kV) e no modo negativo (3,2kV); nível das S-lentes = 55. Gás nitrogênio foi utilizado como nebulizador. O volume de amostra injetada foi de 5

μL e as temperaturas do forno e da estante foram 45°C e 10°C , respectivamente. As amostras foram analisadas aleatoriamente, sendo uma replicata da amostra e uma do branco analisadas no início, meio e fim da sequência das análises.

Os dados brutos foram separados em seus respectivos modos positivo e negativo e convertidos para o formato mzXML usando o *software* ProteoWizard-MSconvert. Com o emprego do *software* MZmine os parâmetros utilizados no processamento foram otimizados visando obter dados alinhados, com mínima influência de ruído e que fossem representativos dos extratos analisados. A otimização dos dados envolveu os seguintes parâmetros: a deconvolução, os isótopos foram eliminados, os picos idênticos nos diferentes extratos foram alinhados e os espaços vazios foram preenchidos. Assim, para cada modo de ionização, os seguintes parâmetros foram os selecionados:

- Modo positivo: detecção de massa usando o algoritmo de massa exata (nível de ruído, $2,0\text{E}6$); construção de cromatograma (intervalo de tempo mínimo em minutos, 0,1; altura mínima, $2,0\text{E}6$; tolerância m/z , $0,001\ m/z$ ou 5,0 ppm); deconvolução usando o ponto de corte de linha de base (altura mínima do pico, $2,0\text{E}6$; duração do pico, 0,1 a 1,0; nível de base, $2,0\text{E}6$); eliminação dos isótopos (tolerância m/z , $0,001\ m/z$ ou 3 ppm; tolerância do tempo de retenção (TR) 15, 0,1; carga máxima, 1; isótopo representativo, mais intenso); alinhamento usando o *join aligner* (tolerância m/z , $0,001\ m/z$ ou 3 ppm, peso para m/z 15, tolerância do TR 0,5 absoluto, peso para o TR, 15); *gap filling* (tolerância da m/z 0,001 ou 5 ppm, tolerância de intensidade 10%, tolerância da m/z 0,001 ou 3 ppm).
- Modo negativo: detecção de massa usando o algoritmo de massa exata (nível de ruído, $2,0\text{E}6$); construção de cromatograma (intervalo de tempo mínimo em minutos, 0,1; altura mínima, $2,0\text{E}6$; tolerância m/z , $0,001\ m/z$ ou 3,0 ppm); deconvolução usando o ponto de corte de linha de base (altura mínima do pico, $1,0\text{E}6$; duração do pico, 0,1 a 1,0; nível de base, $1,0\text{E}3$); eliminação dos isótopos (tolerância m/z , $0,001\ m/z$ ou 3 ppm; tolerância do TR 15, 0,1; carga máxima, 1; isótopo representativo, mais intenso); alinhamento usando o *join aligner* (tolerância m/z , $0,001\ m/z$ ou 3 ppm, peso para m/z 15, tolerância do TR 0,5 absoluto, peso para o TR, 15); *gap filling* (tolerância da m/z 0,001 ou 5 ppm, tolerância de intensidade 10%, tolerância da m/z 0,001 ou 3 ppm).

Após o processamento dos dados, as matrizes de dados geradas foram exportadas no formato .csv. Foram excluídos os pares m/z /TR presentes no branco, além daqueles com TR maior que 22 minutos e m/z menor que 144 Da para detecção de MS¹.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA E CONSTRUÇÃO DE MODELOS DE PREDIÇÃO

A partir dos resultados da avaliação da atividade anti-inflamatória e dos dados cromatográficos e espectrométricos de cada extrato (previamente tratados no MZmine e exportados deste *software* em formato .csv), foram realizadas as análises estatísticas multivariadas nos *softwares* Weka e SIMCA. Os dados da atividade anti-inflamatória foram adicionados na última coluna da planilha excel em formato .csv, para efetuar as análises estatísticas supervisionadas. Os valores de atividade foram incluídos de diferentes formas (porcentagem de inibição e classes de inibição) para testar a melhor forma para obtenção de um adequado modelo de predição.

4.5.1 Análises no *software* SIMCA – PLS e OPLS

Para as análises estatísticas, os dados dos modos positivo e negativo foram analisados reunidos e separados. Os dados também foram testados sem normalização no *software* SIMCA e com as diferentes opções de normalização disponíveis UV, UNV, Par, ParN,Ctr, *Freeze*. Sendo testados modelos PLS-DA e OPLS, com utilização de diferentes componentes. Componentes é a terminologia utilizada pelo *software* e literatura (Chagas-Paula *et al.*, 2015b; Nicácio *et al.*, 2022) referente aos eixos (dimensões) do PLS. Assim, foram construídos diversos modelos supervisionados pela a atividade anti-inflamatória para selecionar o melhor método adequado aos dados conforme resultados de validação cruzada.

Os modelos estatísticos foram treinados com 70% dos dados, e 30% dos dados foram separados aleatoriamente como grupo de teste para subsequente validação externa (AS, OA, OCB, OCL, OD e PM). A distribuição das amostras nestes grupos foi de maneira a representar as diferentes porcentagens de inibição das amostras (Tabela 4) (Chagas-Paula *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015; Ghosh *et al.*, 2020). Então, para isso as amostras foram inicialmente ordenadas pelos valores de porcentagem de inibição, iniciando dos mais baixos para os mais altos, com uma em cada quatro amostras movidas para o grupo de teste.

Foram realizados três testes preliminares (T1-T3) com um corte de 3,5E7. Para a construção do modelo T1, foram selecionados oito atributos no *software* Weka e a construção do modelo de predição foi no *software* SIMCA[®] utilizando PLS, com 2 componentes.

Para o modelo T2, foram consideradas todas as m/z obtidas no tratamento de dados, sem seleção de atributos, utilizando os valores de porcentagem de inibição para supervisionar o modelo PLS e com dados normalizados de 0-1.

No modelo T3, também foram consideradas todas as m/z obtidas no tratamento de dados, sem seleção de atributos, com normalização dos dados de 0-1, utilizando supervisão por classes para o modelo PLS, com 2 componentes.

Dentre os melhores modelos de PLS, M1 (dados do modo positivo e negativo) e M2 (dados do modo positivo), foram construídos com normalização dos dados por *Unit Variance None* (UVN) e com 3 componentes. Esses modelos foram supervisionados pelos valores percentuais de inibição obtidos pelo ensaio biológico *ex-vivo* experimental, uma variável Y contínua.

Para o melhor modelo selecionado, obteve-se as variáveis importantes para a projeção (VIPs), possibilitando determinar os biomarcadores da atividade anti-inflamatória, bem como os coeficientes de correlação com esta atividade.

4.5.2 Análises no *software* Weka - seleção de atributos, ANN e SGD

No *software* Weka, dois modelos adicionais de aprendizado de máquina (ML) foram criados, treinados e validados. Inicialmente, os dados da área dos picos foram normalizados (0 a 1) usando seleção de função de atributo não supervisionada (variáveis X: m/z e TR). Estes, foram selecionados pelo algoritmo *CfsSubsetEval* e *BestFirst* que avaliam o grau de importância individual de cada descritor, considerando sua capacidade preditiva e o grau de redundância entre eles. Os conjuntos de atributos altamente correlacionados com a classe, mas com baixa intercorrelação, foram selecionados deixando a maior quantidade de descritores possíveis sem que as informações presentes sejam redundantes ou desnecessárias (Witten; Frank; Hall, 2011). Os parâmetros utilizados para seleção de atributos no *software* Weka foram descritos no Apêndice B. Os atributos importantes foram classificados usando o *Attribute Selected Classifier* (*Attribute Selected Classifier* - E "weka.attributeSelection.CorrelationAttributeEval" -S "weka.attributeSelection.Ranker" -T -1.7976931348623157E308 -N -1" -W weka.classifiers.functions.LinearRegression -- -S 0 -R 1.0E-8 -num-casas decimais 4). Posteriormente, os atributos ranqueados foram coletados pelo

teste de correlação de Pearson (0,100 a 0,339). Os pares $m/z/TR$ com os maiores valores de correlação positiva foram então agrupados totalizando 114 pares $m/z/TR$ dos 306 obtidos do tratamento de dados do MZmine (Baldim *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2015).

A partir dos dados selecionados, foram realizados a construção do modelos de predição pelo método de ANN. Primeiramente utilizando os dados Y categóricos, ou seja, com informação sobre a classe de inibição. Sendo uma classificação binária: (A) alto potencial anti-inflamatório - grupos G1/G2 que reúne amostras com valores de inibição da produção de PGE_2 >50% de inibição e (B) baixo potencial - grupo G3 que tem amostras com valores de inibição <50%. Outro teste independente foi realizado utilizando os dados Y numéricos, por porcentagem de inibição para construção do modelo de predição.

A avaliação foi realizada com o mesmo conjunto de treinamento (70%) e conjunto de teste (30%) dos modelos PLS, utilizando validação cruzada 5 vezes. O ANN utilizou o método *MultilayerPerceptron* com os seguintes parâmetros: L 0,5 -M 0,2 -N 500 -V 0 -S 0 -E 20 -H a. O conjunto de dados utilizado incluiu os 6 atributos com maior correlação com os valores de atividade anti-inflamatória previamente selecionados. Ele foi executado com duas camadas ocultas.

O treinamento do modelo foi de 500 “*epochs*” com uma taxa de aprendizado de 0,03; todos os demais parâmetros foram utilizados de acordo com padrão do *software*.

Depois, um modelo SGD para regressão logística de classe binária (SGD -F 1 -L 0,03 -R 1,0E-4 -E 500 -C 0,001 -S 1), foi realizado para todos os pares $m/z/TR$ positivamente correlacionados que tiveram valores de correlação superiores à média (n=46 pares $m/z/TR$, $corr > 0,176$). As instâncias correspondem às espécies amostrais de Lauraceae supervisionadas pela mesma classificação binária utilizada na ANN.

A exatidão, precisão, *F-Measure*, MAE (*Mean Absolute Error*), RMSE (*Root Mean Squared Error*) e ROC de ambos os modelos, ANN e SGD, foram determinados para métricas gerais e validação.

4.5.3 Análises no *software MetaboAnalyst*

A planilha do arquivo Excel .csv com os dados tratados foi importada para o *software MetaboAnalyst* para realizar as análises de ROC e AUC. Os dados foram previamente normalizados pela soma, transformados por raiz cúbica e autoescalados (centrados na média

e divididos pelo desvio padrão de cada variável) antes das análises clássicas de curvas ROC univariadas, com intervalo de confiança de 95%. Um modelo de *Heatmap* adicional foi realizado para auxiliar na visualização dos dados, onde cada célula colorida no mapa, corresponde à abundância (média) na matriz de dados.

Além disso, foi avaliado o domínio de aplicabilidade para a família Lauraceae por meio do método não supervisionado de PCA para os dados metabolômicos de todas as amostras das espécies de Lauraceae, sendo diferenciado o mesmo grupo treino (verde) e teste (vermelho) da análise PLS. A análise PCA foi obtida com elipse hoteleira de 95%, R^2 de 0,54, com três componentes.

4.6 ANOTAÇÃO QUÍMICA

Para cada biomarcador correlacionado com a propriedade anti-inflamatório *ex vivo* conforme resultados das análises estatísticas multivariadas foram anotadas as fórmulas moleculares mais prováveis no software *QualBrowser/Xcalibur*[®]. Sendo considerados os parâmetros de carga provável do íon m/z ; *double bond/ring equivalentes* (RDBE) fracionário, considerando que o método de ionização foi por ESI; erro de tolerância máximo de 3-10 ppm; a abundância relativa do isótopo M^{+1} dividido pela abundância do carbono 13 (1,123) para chegar ao número provável de carbonos; além da presença de átomos de cloro, enxofre e bromo (Apêndice D).

Para auxiliar na desreplicação, o abrangente banco de produtos naturais DPN e o banco de dados *SciFinder* foram usados para pesquisar possíveis acertos para cada fórmula molecular determinada no Xcalibur. Além disso, o MoNA também foi utilizado para comparação de espectros de fragmentos de massa na literatura. O nível de confiança da identificação desta pesquisa foi considerado nível dois, de acordo com o que foi preconizado pelo MSI (Creek *et al.*, 2014; Spicer *et al.*, 2017; Nicácio *et al.*, 2022).

4.7 FITOQUÍMICA

Ao observar a presença de um biomarcador (ID 74 ou 76) com valor positivo de correlação com atividade anti-inflamatória, VIP >1 (VIP 1,194/correlação 0,011) no modelo PLS M2, a espécie ativa que contém esse biomarcador foi selecionada (*Ocotea odorifera*) para o isolamento dele.

As folhas da espécie *Ocotea odorifera* foram coletadas em maior escala no centro da cidade de Alfenas - MG, na Praça Fausto Monteiro, em frente à Prefeitura Municipal, latitude -21425227 e longitude -45949797, em junho de 2018. Foi coletada apenas quantidade de material vegetal necessária para a realização do estudo, sem comprometer a sobrevivência do exemplar. O acesso ao Patrimônio Genético/CTA foi cadastrado no SisGen (A913C3F).

Utilizou-se 2 kg de folhas da *O. odorifera* para obtenção do extrato bruto. Estas folhas foram secas em estufa de ar circulante, sob temperatura de 40°C, por 72 horas até estarem completamente secas (sem umidade e variação no peso). Depois de secas, as folhas foram trituradas em moinho de facas tipo cróton TE-625.

Posteriormente realizou-se a remaceração em frasco mariote com 4,2 L de etanol 99,5% por 24 horas e através da filtração separou-se o material de interesse. Foi adicionado cerca de 1,5 L de etanol no dia seguinte para continuar a extração, este procedimento foi repetido por 4 dias no intervalo de aproximadamente 24 horas. A cada dia, o extrato foi concentrado em rotaevaporador (com pressão reduzida e temperatura de 40°C) e, o etanol recuperado, foi reutilizado na extração, adicionando-se, aproximadamente, 1,5 L de etanol para completar o volume (De Alcântara *et al.*, 2021).

Logo, os extratos rotaevaporados foram reunidos e então solubilizados em uma solução de etanol e água MiliQ (1:2 v/v), acidificada com ácido acético até pH 2, para solubilizar e permitir que os alcaloides presentes ficassem na forma protonada polar (De Alcântara *et al.*, 2021).

Com o extrato bruto solubilizado, realizaram-se as extrações líquido-líquido, utilizando-se solventes com polaridades crescentes, sendo hexano, acetato de etila e clorofórmio os solventes escolhidos; para cada um deles utilizou-se 250 mL por 3 vezes. Antes da extração com clorofórmio, o pH foi ajustado para 8, para que os alcaloides que se encontravam na forma protonada devido ao pH ácido, fossem desprotonados e pudessem ser extraídos com clorofórmio.

A solução hidroetanólica que restou no funil de separação, teve o pH neutralizado (pH=7). As frações orgânicas foram concentradas em rotaevaporador. A fração aquosa foi liofilizada, a uma temperatura média de -42°C e pressão média de 1000 mmHg. Após isso as frações foram mantidas no freezer a -20 °C, até que fossem submetidas às etapas de isolamento posteriores.

4.7.1 Isolamento do alcaloide inédito

Através das análises metabolômicas foi possível direcionar o estudo fitoquímico para a fração alcaloídica de *O. odorifera*, por ser a fração rica em alcaloides, onde seria possível o então isolamento de um dos biomarcadores da inflamação de m/z 296,1646 (ID 74 ou 76), presente entre as VIPs e com correlação positiva para o modelo PLS M2. Assim, a fração alcaloídica (obtida com o solvente clorofórmio) foi submetida a cromatografia em coluna clássica (CC) (Figura 19), onde utilizou-se os seguintes materiais:

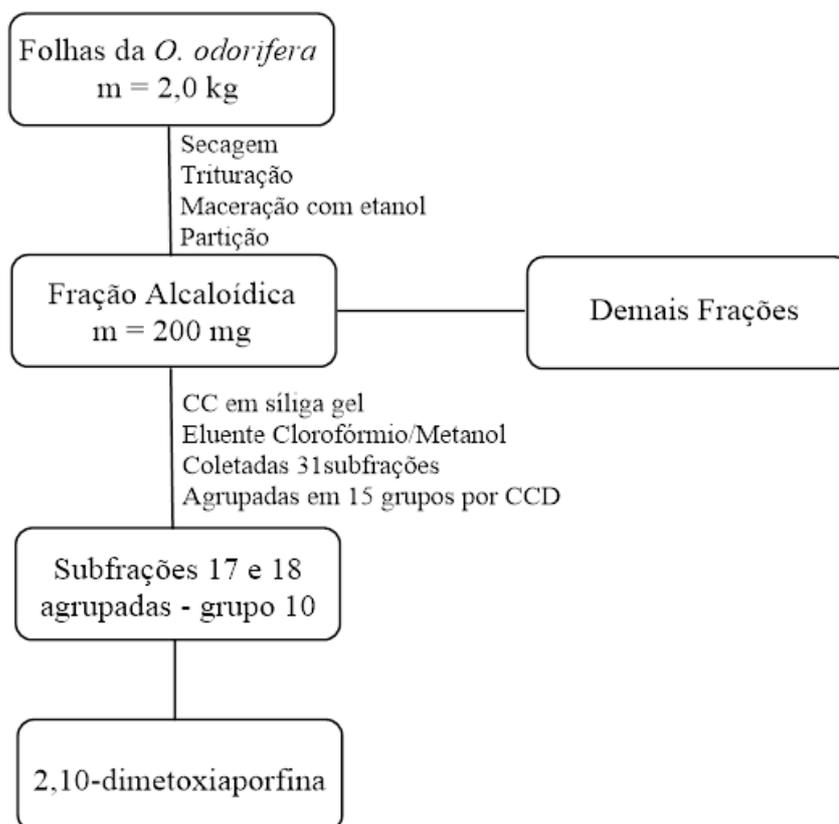
- 200 mg da amostra;
- Coluna simples de 1,5 cm de diâmetro;
- 6g de sílica gel 60 - 70 a 230 Mesh;

Os eluentes utilizados foram:

- Clorofórmio 100%;
- Clorofórmio/Metanol 9:1 (v/v);
- Clorofórmio/Metanol 8:2 (v/v);
- Clorofórmio/Metanol 7:3 (v/v);
- Metanol 100%.

Todos os eluentes (125 mL) foram acidificados com 1% de ácido acético. Também foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD), para acompanhar o fracionamento e verificar quais subfrações poderiam ser agrupadas, de acordo com seu perfil cromatográfico. Para a CCD foram utilizadas placas com base de alumínio sílica gel 60 e luz ultravioleta ($\lambda = 254$ ou 365 nm) como revelador.

Figura 19 - Fluxograma do isolamento do biomarcador (ID 74 ou 76) da fração clorofórmio.



Fonte: Da autora.

Foram obtidas 31 subfrações de cerca de 10 mL cada, que foram agrupadas em 15 grupos (G1-G15) de acordo com o seu perfil cromatográfico obtido por CCD, conforme Tabela 2 abaixo:

Tabela 2 - Agrupamento das subfrações obtidas por cromatografia em coluna para a fração clorofórmio.

Nome do grupo	Subfrações	Nome do grupo	Subfrações
G1 (5,3mg)	1	G9 (25,4mg)	15 e 16
G2 (7,2mg)	2	G10 (30mg)	17 e 18
G3 (10,1mg)	3 a 6	G11 (22mg)	19 a 21
G4 (11,4mg)	7 e 8	G12(15mg)	22 a 24
G5 (8mg)	9	G13(10mg)	25
G6 (6,1mg)	10	G14 (3,1mg)	26
G7 (17,2mg)	11 a 13	G15(4,5mg)	27 a 31
G8 (10,1mg)	14	-	-

Fonte: Da autora.

As frações desejáveis tiveram seus perfis metabólicos avaliados através de análises por HPLC-UV-DAD analítico. As análises foram desenvolvidas em coluna de fase reversa C18

analítica, 150 x 3 mm, 0,5 µm de diâmetro de partícula, e método cromatográfico gradiente de 5% a 100% de acetonitrila em água (0,1 % ácido acético) por 30 minutos e fluxo de 1 mL/min.

Nestas análises do grupo 10 (G10, sub frações 17 e 18), foi possível observar a presença de uma substância majoritária, sendo esta submetida a técnica de RMN unidimensional de ^1H e de ^{13}C e bidimensionais HSQC, HMBC, NOESY, COSY e rotação ótica específica para determinação estrutural. A amostra foi preparada em CDCl_3 para as primeiras análises de RMN e, posteriormente, a amostra foi preparada em $\text{MeOH-}d_4$ para as análises de NOESY e COSY.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *EX VIVO* NO SANGUE

As amostras de extratos de plantas da família Lauraceae demonstraram promissores resultados de atividade anti-inflamatória no modelo experimental utilizado, sendo que das 20 amostras estudadas (18 extratos de folhas e 2 extratos de galhos, Tabela 3), dez amostras inibiram a liberação de PGE₂ em mais de 75% e foram agrupadas no grupo 1 - G1 (Figura 20), que incluiu o extrato das folhas de *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez (OD), *O. bicolor* Vattimo-Gil (OB); *O. pulchella* (Nees & Mart.) Mez (OP); *Cinnamomum glaziovii* (Mez) Kosterm. (CG); *O. puberula* (Rich.) Nees (OP); *O. aciphylla* (Nees & Mart.) Mez (OA); *Persea major* (Nees) L.E. Kopp (PM); *Nectandra membranacea* (Sw.) Griseb. (NM); *O. odorifera* Vell. Rower (OO); *O. divaricata* (Nees) Mez (ODI).

Sete das amostras foram moderadamente ativas, apresentando de 50 a 75% de inibição, compondo assim o grupo 2 - G2 (Figura 21) composto por caules (EPB) e folhas (EPL) de *Endlicheria paniculata* (Spreng.) J.F. Mac, e extrato de folhas de *Aniba firmula* (Nees & Mart.) Mez (AF), *Nectandra oppositifolia* Nees & Mart. (NO), folhas de *Ocotea corymbosa* (Meisn.) Mez (OCL), *Aiouea saligna* Meisn. (AS), *Cinnamomum triplinerve* (Ruiz & Pav.) Kosterm. (CT).

Enquanto apenas três amostras exibiram menos de 50% de inibiçãoreunidas no grupo 3 - G3 (Figura 22), o extrato de caules de *Ocotea corymbosa* (Meisn.) Mez (OCB) e o extrato de folhas de *Nectandra grandiflora* Nees & Mart. (NG) e *Persea willdenovii* Kosterm (PW).

Tabela 3 – Atividades biológicas relatadas na literatura para as espécies da família Lauraceae estudadas nesse trabalho e suas respectivas atividades no ensaio *ex vivo*. (Continua)

Código	Identificação	Atividade relatada na literatura (extratos e/ou compostos isolados)	Atividade <i>ex vivo</i>	Porcentagem de inibição
Anti-inflamatória				
AF	<i>Aniba firmula</i> (Nees & Mart.) Mez	(Santos <i>et al.</i> , 2019) (Extrato e biciclo octano neo canelina, inibição edema de orelha – 0,5 mg/orelha).	50-75%	62,49%
AS	<i>Aiouea saligna</i> Meisn.	-	50-75%	67,05%
CG	<i>Cinnamomum glaziovii</i> (Mez) Kosterm.	-	> 75%	85,07%
CT	<i>Cinnamomum triplinerve</i> (Ruiz & Pav.) Kosterm.	Atividade antioxidante (Silva <i>et al.</i> , 2019) (Extratos etanólicos de folhas, cascas e frutos)	50-75%	73,18%
EPL	<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J.F. Mac Folha	Regula a inflamação, a angiogênese e a deposição de colágeno (Souza <i>et al.</i> , 2020) (Extrato hexânico e desidrodieugenol B, modelo de esponja de implante murino)	50-75%	62,30%
EPB	<i>Endlicheria paniculata</i> (Spreng.) J.F. Mac Caule	-	50-75%	53,04%
NG	<i>Nectandra grandiflora</i> Nees & Mart.	Antitumoral e antioxidante (Moreno <i>et al.</i> , 1993; Ribeiro <i>et al.</i> , 2005)	<50%	42,75%
NM	<i>Nectandra membranacea</i> (Sw.) Griseb.	Atividade antimalárica (Bagnarello-Madrigal <i>et al.</i> , 2018) (Mistura de alcaloides (-)-gliazovina e (+)-aplogliazovina isolados das folhas)	> 75%	81,49%
NO	<i>Nectandra oppositifolia</i> Nees & Mart.	Antiparasitária e antihelmíntica (Mengarda <i>et al.</i> , 2021) (Conserva <i>et al.</i> , 2019)	50-75%	51,73%
OA	<i>Ocotea aciphylla</i> (Nees & Mart.) Mez	Acaricida e anticolinesterase (Conceição <i>et al.</i> , 2017; Carneiro <i>et al.</i> , 2017)	> 75%	76,22%

Tabela 3 – Atividades biológicas relatadas na literatura para as espécies da família Lauraceae estudadas nesse trabalho e suas respectivas atividades no ensaio *ex vivo*. (Conclusão)

Código	Identificação	Atividade relatada na literatura (extratos e/ou compostos isolados)	Atividade <i>ex vivo</i>	Porcentagem de inibição
OB	<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil	Atividade antioxidante (Damasceno <i>et al.</i> , 2017) (óleo essencial)	> 75%	76,98%
OCL	<i>Ocotea corymbosa</i> (Meisn.) Mez Folha	-	50-75%	71,22%
OCB	<i>Ocotea corymbosa</i> (Meisn.) Mez Caule	-	<50%	44,83%
OD	<i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez	Anti-inflamatória (Silva <i>et al.</i> , 2021) (Extrato, inibição edema de orelha – 0,5 mg/orelha).	> 75%	83,11%
ODI	<i>Ocotea divaricata</i> (Nees) Mez	-	> 75%	84,58%
OP	<i>Ocotea pulchella</i> (Nees & Mart.) Mez	Antiviral (Marina <i>et al.</i> , 2018)	> 75%	75,74%
OPB	<i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees	Antifúngica, antinociceptiva e antiparasitária* (Words, 2019; Montrucchio <i>et al.</i> , 2012 ; Barbosa <i>et al.</i> , 2020) (*Alcaloide oxiaporfina isolado)	> 75%	77,02%
OO	<i>Ocotea odorifera</i> Vell. Rohwer	Anti-inflamatória (De Alcântara <i>et al.</i> , 2021) (Extrato e reticulina, inibição edema de orelha – 0,5 mg/orelha)	> 75%	78,04%
PM	<i>Persea major</i> (Nees) L.E. Kopp	Neuroprotetora (Fedalto <i>et al.</i> , 2013) (Extrato metanólico obtido da casca)	> 75%	77,93%
PW	<i>Persea willdenovii</i> Kosterm.	Antihelmíntica (Santa Rosa <i>et al.</i> , 2018) (Extrato etanólico/ acetato de etila obtido das folhas)	<50%	20,42%

Fonte: Da autora.

Nota: As amostras com – significam as que não apresentam estudos sobre seus extratos e compostos purificados até o ano de 2022.

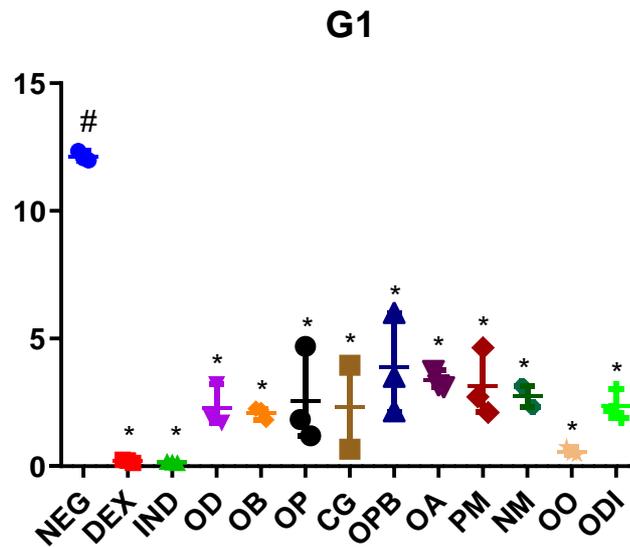
Os resultados anti-inflamatórios apresentaram uma distribuição normal no teste de *Shapiro-Wilk* (Tabelas 11, 12 e 13 e Figuras 40, 41 e 42, Apêndice C) e a análise estatística utilizando ANOVA *one way*, seguida do teste de comparação múltipla de *Dunnnett* mostraram resultados promissores para a atividade anti-inflamatória.

É importante mencionar que as amostras de G1 e G2 foram todas estatisticamente comparáveis aos controles positivos (dexametasona e indometacina) e distintas do controle negativo (veículo).

Entre as amostras consideradas mais ativas nesse ensaio, as espécies CG, OD, NM apresentaram porcentagem de inibição de PGE₂ acima de 80%. Enquanto as espécies OO, PM, OA, OB e OP apresentaram valores de porcentagem de inibição de PGE₂ superior a 75%. Dentre esses extratos ativos, alguns já possuem evidências científicas da atividade anti-inflamatória por outros modelos experimentais (Tabela 2). Como por exemplo, os extratos de OD e de OO, avaliadas em modelo de edema de orelha e recrutamento de neutrófilos em camundongos, descritos na literatura (Silva *et al.*, 2021; De Alcântara *et al.*, 2021). Desta forma, essas espécies demonstraram sua atividade anti-inflamatória via inibição das vias da COX e LOX, possibilitando a redução dos efeitos agudos e crônicos de processos inflamatórios.

NM apresenta estudos na literatura demonstrando seu potencial antitumoral, antimicrobiano e antimalárico (Bagnarello-MadrigaL *et al.*, 2018; Wu Xiujun *et al.*, 2006); contudo é a primeira vez que sua atividade anti-inflamatória é descrita, o que reforça a importância deste trabalho no direcionamento de novos estudos.

Figura 20 – Gráfico da atividade anti-inflamatória superior a 75% de inibição de PGE₂, referente ao grupo G1.



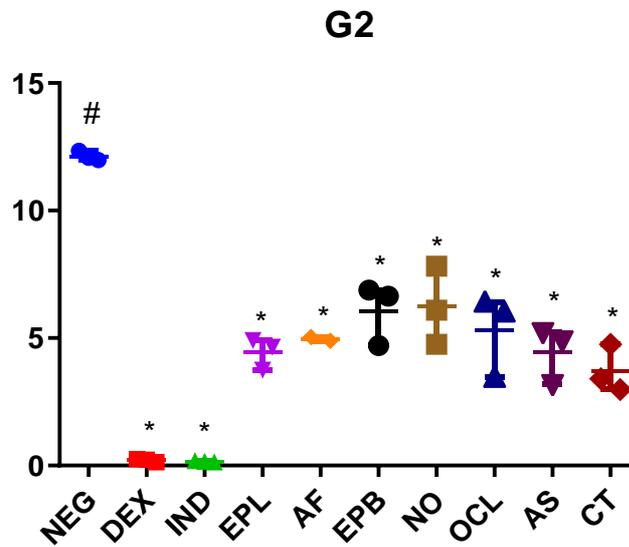
Fonte: Da autora.

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de *Dunnett*. * indica diferença significativa em comparação ao veículo, $P \leq 0,001$; # indica diferença significativa em comparação com o fármaco referência, dexametasona, $P \leq 0,001$. A figura foi obtida via software PRISMA v 9.0.

Controle negativo - NEG; Dexametasona - DEX; Indometacina - IND; *Ocotea diospyrifolia* (OD); *Ocotea bicolor* (OB); *Ocotea pulchella* (OP); *Cinnamomum glaziovii* (CG); *Ocotea puberula* (OPB); *Ocotea aciphylla* (OA); *Persea major* (PM); *Nectandra membranacea* (NM); *Ocotea odorifera* (OO); *Ocotea divaricata* (ODI).

Dentre as amostras consideradas moderadamente ativas, (G2, Figura 21), os extratos das folhas de *E. paniculata* (EPL) e *A. firmula* (AF) também foram relatados na literatura por sua atividade anti-inflamatória (Souza *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2019), o que corroboram os resultados obtidos neste trabalho. A AF foi descrita por conter neolignanas bicíclicas, como o biciclo-[1,2,3]octano neolignana, que apresentou potente atividade anti-inflamatória *in vivo* diminuindo os níveis de PGE₂ e o recrutamento de neutrófilos (Santos *et al.*, 2019).

Figura 21 - Gráfico da atividade anti-inflamatória entre 75-50% de inibição de PGE₂, referente ao grupo G2.



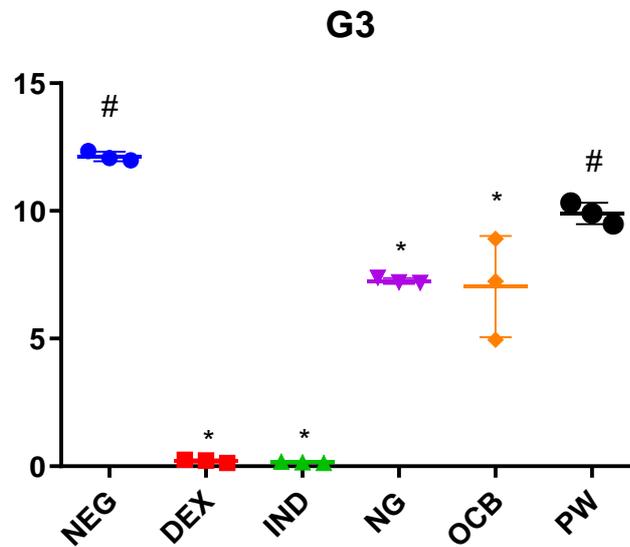
Fonte: Da autora.

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de *Dunnett*. * indica diferença significativa em comparação ao veículo, $P \leq 0,001$; # indica diferença significativa em comparação com o fármaco referência, dexametasona, $P \leq 0,001$. A figura foi obtida via software PRISMA v 9.0.

Controle negativo - NEG; Dexametasona - DEX; Indometacina - IND; *Endlicheria paniculata* Folhas (EPL); *Aniba firmula* (AF); *Endlicheria paniculata* Caule (EPB); *Nectandra oppositifolia* (NO); *Ocotea corymbosa* Folhas (OCL); *Aiouea saligna* (AS); *Cinnamomum triplinerve* (CT).

Desta forma, as amostras dos grupos G1 e G2, apresentam grande potencial para descoberta de substâncias ativas e biomarcadores relacionados à atividade anti-inflamatória, sendo uma excelente fonte para estudos fitoquímicos para isolamento de possíveis substâncias anti-inflamatórias.

Figura 22 – Gráfico da atividade anti-inflamatória inferior a 50% de inibição de PGE₂, referente ao grupo G3.



Fonte: Da autora.

Nota: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de *Dunnett*. * indica diferença significativa em comparação ao veículo, $P \leq 0,001$; # indica diferença significativa em comparação com o fármaco referência, dexametasona, $P \leq 0,001$. A figura foi obtida via software PRISMA v 9.0.

Controle negativo - NEG; Dexametasona - DEX; Indometacina - IND; *Nectandra grandiflora* (NG); *Ocotea corymbosa* Caule (OCB) e *Persea willdenovii* (PW).

Ainda, analisando o gráfico da Figura 22, apenas a amostra PW se assemelha estatisticamente ao controle negativo, sendo que as duas outras amostras, NG e OCB, apresentam significativa diferença do grupo controle negativo e, portanto, são ligeiramente ativas. Assim, seus possíveis compostos isolados também podem apresentar significativa atividade anti-inflamatória. Portanto, tais amostras não devem ter suas propriedades anti-inflamatórias subestimadas preliminarmente antes de adicionais estudos, até mesmo em outros modelos experimentais.

Desta maneira, considerando todos os resultados obtidos pelo ensaio anti-inflamatório *ex vivo* dos 20 extratos das espécies da família Lauraceae, pode-se dizer que somente um dos extratos foi considerado inativo e outros dois, com porcentagem de inibição $< 50\%$, logo, a família de fato, demonstrou grande potencial como fonte de amostras e substâncias inibidoras da produção de PGE₂ e atividade anti-inflamatória.

5.2 METABOLÔMICA E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Dentro das análises estatísticas multivariadas, diferentes testes foram realizados antes de obter-se os modelos finais de análise e predição da atividade anti-inflamatória; assim, os resultados dos principais testes são demonstrados a seguir, sendo os modelos testes T1-T3 uma ilustração de algumas tentativas para obtenção de um modelo robusto e adequado. Após isso, são apresentados os modelos M1 e M2, realizados em segundo momento, no *software* SIMCA[®], sendo que o modelo M2, foi o melhor modelo obtido, com adequado ajuste preditivo.

5.2.1 Modelos testes T1-T3

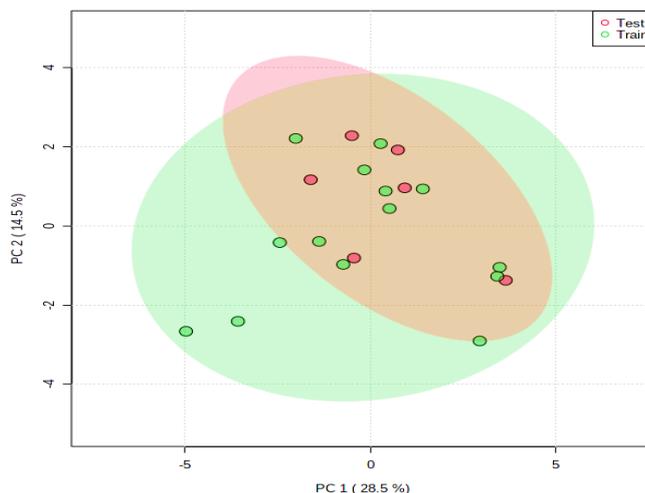
A construção do modelo de predição T1 no *software* SIMCA[®], obteve bons valores de correlação e predição (R^2 0,874; Q^2 0,699). Já para o modelo T2, foram obtidos valores de correlação e predição de R^2 0,961 Q^2 0,727. Enquanto o modelo T3, apresentou R^2 0,924 Q^2 0,856.

Contudo, apesar de bons valores de R^2 e Q^2 para os modelos T1-T3, estes não puderam ser considerados, pois ao realizar a desreplicação das VIPs, observou-se problema no tratamento de dados, visto que não se encontrava nenhuma das substâncias descritas na literatura para a família. Logo, foi necessário reiniciar o tratamento de dados, com mais atenção a cada etapa, sendo os parâmetros finais após a correção, descritos no Apêndice A.

5.2.2 Modelos estatísticos e de predição finais nos *softwares* SIMCA e *Metaboanalyst*

Primeiramente, foi realizada a análise sobre o espaço de dados metabolômicos dos respectivos conjuntos de treinamento e teste por análise de PCA no *software* *Metaboanalyst*. A análise adquiriu $R^2 = 0,54$, com três componentes e, portanto, considerada bem ajustada, permitiu verificar que as amostras do grupo teste e treino estão no mesmo espaço químico (Figura 23). Esta análise estatística multivariada não supervisionada permitiu também a obtenção de uma visão geral das amostras avaliadas, avaliando os extratos de acordo com sua similaridade química independentemente do resultado da atividade anti-inflamatória.

Figura 23 - Gráfico de dispersão da análise do componente principal (PCA) (PC1xPC2) das espécies de Lauraceae, sendo treino (verde) e teste (vermelho). Elipse hoteleira = 95%, $R^2 = 0,54$, três componentes. A figura foi obtida através do software *Metaboanalyst v 5.0*.



Fonte: Da autora.

Nota: Grupo treino - AF, CG, CT, EPL, EPB, NG, NM, NO, OB, ODI, OO, OP, OPBe PW. Grupo teste - AS, AO, OCL, OCB, OD, PM e AF.

O modelo M1 adquiriu qualidade de ajuste adequada com $R^2 = 0,77$ e robustez satisfatória com $Q^2 = 0,66$ baseado nos valores comumente aceitos (R^2 e $Q^2 > 0,5$) para estudos metabolômicos (Oliveira *et al.*, 2015; Ghosh *et al.*, 2020).

No entanto, este modelo estatístico, denominado M1, construído com os dados de modos de ionização positivos e negativos, não foi capaz de prever com precisão os valores de inibição de PGE₂. O teste de validação externa exibiu valores distantes dos valores reais de inibição percentual obtidos para essas espécies no ensaio anti-inflamatório (conjunto de teste externo - AS, OA, OCB, OCL, OD e PM). O teste de validação externa é analisado para avaliar se o modelo estatístico pode prever corretamente a porcentagem de inibição de dados externos que são provenientes de amostras que não foram usadas para construir e treinar o modelo. A validação externa é padrão ouro para avaliação de modelos estatísticos metabolômicos (Chagas-Paula *et al.*, 2015a; Chen *et al.*, 2018). Portanto, o modelo M1 foi considerado insatisfatório para fazer uma previsão confiável dos valores de inibição da porcentagem de liberação de PGE₂.

Uma vez que M1 não demonstrou resultados ruins na validação externa, um segundo modelo PLS (M2, Figura 24), com apenas os dados do modo de ionização positiva, que foi construído usando três componentes, apresentou valores métricos satisfatórios de R^2 em 0,99 e

Q^2 em 0,92. Além disso, mostrou-se robusto o suficiente para obter predições inibitórias de PGE₂ satisfatórias segundo resultados da validação externa. A maioria dos valores percentuais de inibição de PGE₂ previstos no conjunto de teste externo foi semelhante aos valores obtidos experimentalmente, conforme Tabela 4. Por exemplo, na amostra OA, o valor experimental obtido foi de 76% e a predição foi de 77%.

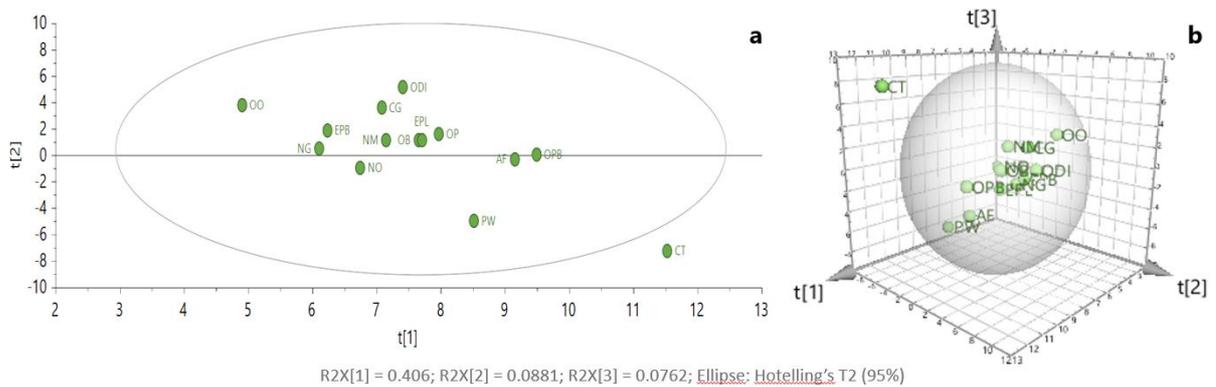
Tabela 4 - Percentual de valores de inibição reais e calculados para os conjuntos de treinamento e teste de 20 amostras de Lauraceae, usando o modelo PLS.

ID	% Inibição Valores reais	% Inibição Valores Preditos	Erro	Grupo
AS	67	49,93	0,4730	Teste
OA	76	77,46	0,5890	Teste
OCL	59	54,47	0,9679	Teste
OCB	44	67,71	5,5014	Teste
OD	83	68,91	0,0055	Teste
PM	77	55,84	0,4357	Teste
AF	62	60,12	0,1342	Treino
CG	85	86,67	0,5855	Treino
CT	73	77,20	1,000	Treino
EPL	62	64,28	0,4158	Treino
EPB	53	57,94	0,5521	Treino
NG	42	46,35	0,3947	Treino
NM	81	72,01	0,5603	Treino
NO	51	48,85	0,5520	Treino
OB	76	69,55	0,4438	Treino
ODI	84	92,85	0,1660	Treino
OO	78	71,87	0,7819	Treino
OP	75	75,24	0,5304	Treino
OPB	77	74,60	0,0687	Treino
PW	20	19,45	0,9560	Treino

Fonte: Da autora.

Adicionalmente, a validação interna deste modelo pela análise de teste de variância dos resíduos preditivos validados cruzadamente (CV-ANOVA) assumiu p -valor $< 0,05$ (Tabela 5), corroborando os resultados. O CV-ANOVA é uma ferramenta de diagnóstico relevante para avaliar a confiabilidade dos modelos PLS e dos mínimos quadrados ortogonais parciais (OPLS) (Eriksson; Trygg; Wold, 2008).

Figura 24 - a) Distribuição 2D *Score plot* dos extratos de espécies de Lauraceae obtidos pelos mínimos quadrados parciais (PLS), modelo M2, mostrando dois primeiros componentes (dimensões de) e b) 3D *Score plot* mostrando todos os três componentes (t[1], t[2] e t[3]). R²Y de 0,99 e Q² de 0,92 (p = 0,0002), modo positivo. Dados normalizados *Unit Variance None* (UVN). As figuras foram desenhadas com o software SIMCA®.



Fonte: Da autora.

Tabela 5 – Descrição CV-ANOVA para o modelo PLS – M2.

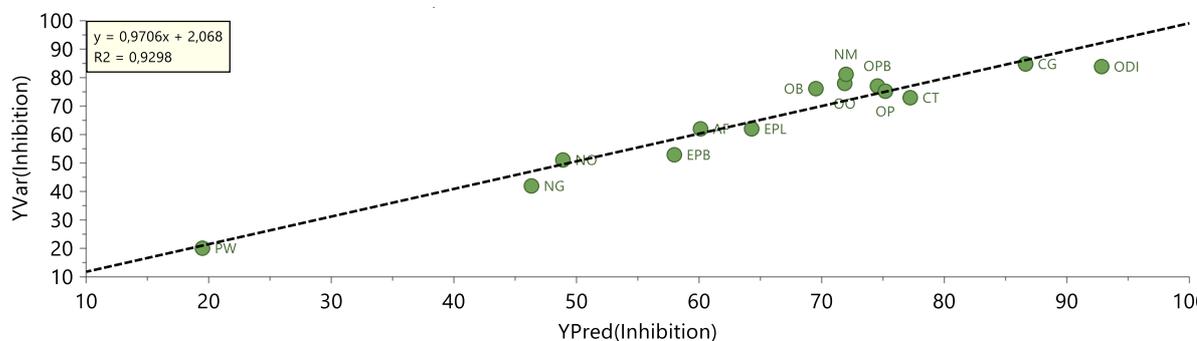
M	SS	DF	MS	F	<i>p</i>	SD
Inibição						
Total corr.	14	14	1			1
Regressão	12,64	5	2,53	16,71	0,00025	1,59
Residual	1,36	9	0,15			0,39

Fonte: Da autora.

Nota: SS - SS do conjunto de dados corrigido pela média, DF - graus de liberdade; MS - média quadrada; F - significância do modelo, *p* - *p*-valor, SD - desvio padrão.

Além disso, a regressão observada *versus* a predita dos valores percentuais de inibição obtidos por PLS para o modelo anti-inflamatório adquiriu um excelente valor de R² de 0,93. Na Figura 25, é possível observar que no eixo X os valores percentuais de inibição previstos, enquanto o eixo Y representa os valores reais do conjunto de dados.

Figura 25 - Gráfico de dispersão da regressão para os valores observados vs. previstos de inibição percentual de anti-inflamatórios obtidos pelo modelo PLS para o conjunto de treinamento Lauraceae e R^2 adquirido de 0,93. A figura foi obtida por meio do software SIMCA®.



Fonte: Da autora.

A linha de regressão projetada no gráfico é representada no centro diagonal. Considerando que a maioria dos pontos de dados está relativamente próximo da linha de regressão estimada, o modelo estatístico foi realmente bem-sucedido.

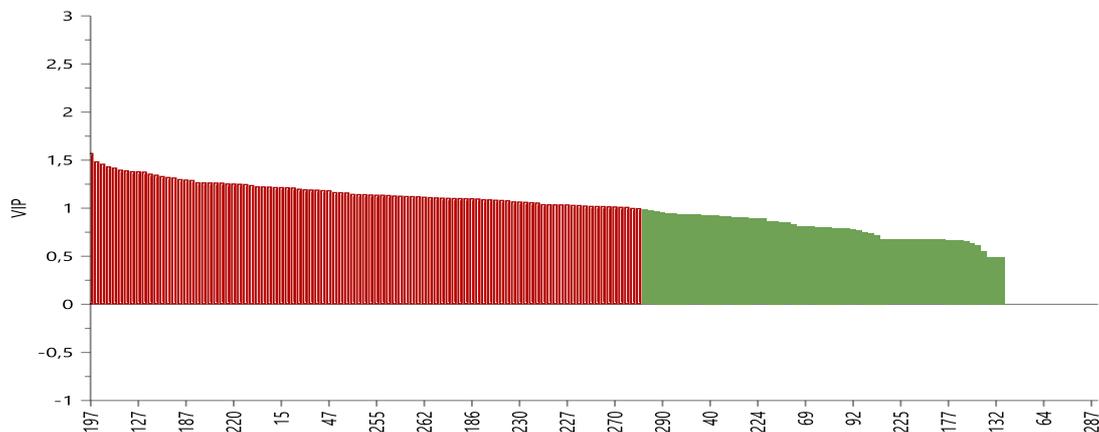
Uma das maiores vantagens observadas do PLS é que ele tem a capacidade de analisar dados altamente colineares e ruidosos. Os benefícios da redução de variáveis são a redução de tempo e custo computacional; o risco reduzido de *overfitting* e a capacidade aprimorada de modelar a interpretação (Gromski *et al.*, 2015). Pode-se supor que o próprio conjunto de dados PLS simplesmente reduziria o tamanho dos dados em um número menor de novos eixos seria suficiente para que o M1 tivesse dado certo. No entanto, a redução das variáveis dos dados originais tem sido utilizada para melhorar tanto a robustez dos modelos quanto os resultados da previsão, independentemente do uso de modelos classificatórios usando variáveis categóricas ou modelos de regressão usando variáveis contínuas (Chen *et al.*, 2018; Kouznetsova *et al.*, 2019; Amante *et al.*, 2019). Assim como foi feito para M2, selecionando apenas os dados detectados no modo positivo de ionização eliminando os dados do modo negativo.

A seleção de dados detectados no modo positivo foi planejada pela presença de alcaloides ser comum em espécies de plantas da família Lauraceae. Pois os alcaloides ionizam preferencialmente no modo positivo, pela protonação do átomo de nitrogênio em suas estruturas químicas (Habib *et al.*, 2021) e que comumente apresentam várias atividades farmacológicas, como a atividade anti-inflamatória (Oliveira *et al.*, 2015) (Ghosh *et al.*, 2020) (Custódio; Florêncio da Veiga Junior, 2014b) (Silva Teles *et al.*, 2019; Habib *et al.*, 2021).

5.2.3 VIPs e análise de correlação do modelo PLS M2

Os valores de VIPs foram obtidos para o modelo PLS M2 para fornecer informações sobre a importância das variáveis X (pares de $m/z/ t_R$) para o modelo. Considerando os valores de $VIP > 1$, 93 pares de $m/z/ t_R$ foram obtidas (Tabela 6) para o modelo e, portanto, essas VIPs são as principais responsáveis por diferenciar as amostras de acordo aos respectivos percentuais de inibição da liberação de PGE_2 (Figura 26).

Figura 26 - Variáveis importantes para a projeção (VIPs) do modelo de atividade anti-inflamatória pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS), 3 componentes, modo positivo. A figura foi obtida por meio do software SIMCA[®].

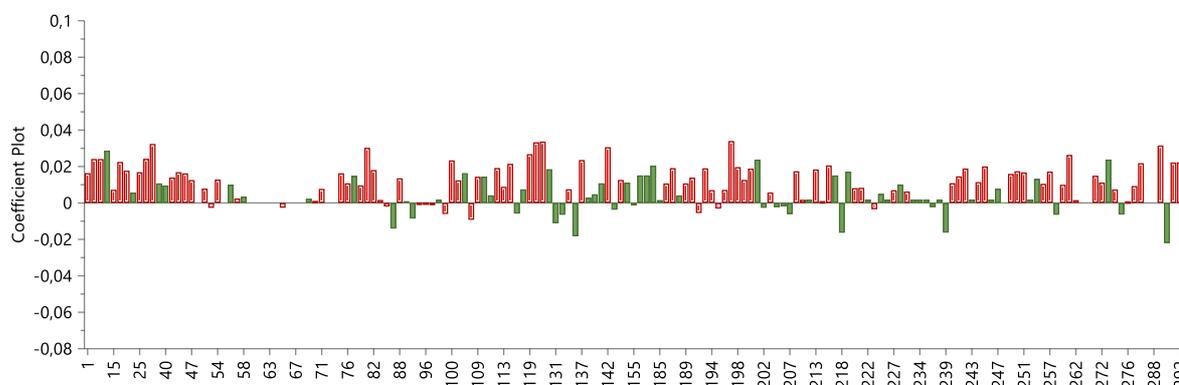


Fonte: Da autora.

Nota: Em vermelho $VIP > 1,0$.

Ainda, considerando as VIPs, pela análise da Figura 26 é possível observar a magnitude dos coeficientes das VIPs, que demonstram o grau de influência da variável. Enquanto que o sinal do coeficiente de correlação (Figura 27) determina a direção da influência, seja positiva ou negativa. Dessa forma, pela análise de correlação (Figura 27, Tabela 6) é possível observar quais variáveis, inclusive quais VIPs, estão correlacionadas positiva ou negativamente com a propriedade anti-inflamatória. Assim, podem-se selecionar os pares de $m/z/ t_R$, referentes aos biomarcadores (Tabela 6), que provavelmente contribuíram diretamente na atividade biológica observada *ex vivo* (Chagas-Paula *et al.*, 2015b).

Figura 27 – Visão geral dos coeficientes correlacionados com a atividade anti-inflamatória do modelo de predição pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS), 3 componentes, modo positivo. A figura foi obtida por meio do software SIMCA®.



Fonte: Da autora.

Nota: Em vermelho e para cima VIP > 1,0 correlacionado com a atividade anti-inflamatória. Em verde e para baixo VIP > 1,0 não correlacionado com a atividade anti-inflamatória.

Logo, a partir da VIPs do modelo de predição, pode-se correlacionar cada ID (numeração referente ao par $m/z/ t_R$), para assim, fazer a caracterização das substâncias importantes para a atividade anti-inflamatória do modelo. Portanto, na Tabela 6, é possível observar as descrições das VIPs quanto a m/z , t_R e valor da correlação.

Tabela 6 - VIPs do modelo de predição, PLS-DA, 3 componentes, modo positivo. (Continua)

ID	m/z	TR	VIP	Coefficiente de Correlação
197	336,0866	12,33	1,575	0,034
27	290,2689	16,05	1,463	0,024
44	199,0754	18,12	1,435	0,014
291	340,2819	18,94	1,401	0,022
79	297,1666	10,35	1,395	0,030
18	151,0353	2,45	1,386	0,018
127	257,1509	19,99	1,385	0,033
128	257,1509	19,95	1,381	0,034
9	246,2425	15,81	1,360	0,024
1	146,0809	2,70	1,349	0,016
200	398,1596	13,83	1,335	0,019
45	397,1434	19,23	1,325	0,017
257	160,0966	2,08	1,319	0,017
119	160,1332	2,36	1,303	0,027
187	326,1385	10,45	1,298	0,019
213	366,0971	11,09	1,294	0,018
71	195,0867	2,85	1,270	0,008
57	200,0777	18,22	1,268	0,002

Tabela 6 - VIPs do modelo de predição, PLS-DA, 3 componentes, modo positivo. (Continua)

ID	<i>m/z</i>	TR	VIP	Coefficiente de Correlação
260	327,1584	18,84	1,267	0,009
114	797,5172	21,78	1,258	0,021
220	394,092	12,24	1,257	0,008
49	201,0908	17,63	1,255	0,008
244	342,1598	11,25	1,252	0,011
191	384,144	13,71	1,241	0,014
198	329,1566	8,50	1,228	0,019
100	314,1396	7,46	1,227	0,024
274	241,9996	1,72	1,225	0,007
54	397,1435	20,69	1,221	0,013
15	162,0758	2,31	1,220	0,007
113	613,4825	21,67	1,219	0,009
142	300,1439	3,15	1,216	0,031
249	357,1523	11,78	1,204	0,016
97	297,1444	5,23	1,197	0,0001
221	338,1019	10,17	1,195	0,008
76	296,1646	13,07	1,194	0,011
88	326,1749	15,34	1,189	0,013
70	305,0656	8,27	1,167	0,001
82	314,1748	9,13	1,164	0,018
203	370,1643	11,98	1,149	0,006
193	366,0972	14,54	1,143	0,019
241	328,1538	7,39	1,141	0,015
84	297,1442	3,10	1,133	0,002
289	295,1131	2,69	1,127	0,032
109	287,1739	2,69	1,126	0,014
137	346,1644	8,86	1,125	0,024
262	355,1019	7,53	1,119	0,002
199	314,1745	7,40	1,116	0,013
133	296,1644	14,66	1,113	0,008
28	360,1494	2,80	1,110	0,032
17	218,2113	12,47	1,108	0,023
46	414,1697	20,54	1,107	0,016
209	336,0865	9,78	1,106	0,002
94	281,1493	7,28	1,105	0,0002
186	340,1544	11,58	1,104	0,011
208	342,1698	9,85	1,102	0,017
99	314,1737	7,40	1,093	-0,006
215	372,1438	12,24	1,092	0,001
250	342,1693	10,37	1,088	0,017
25	330,1698	8,91	1,086	0,017
86	310,1797	14,91	1,083	-0,002
230	356,1492	10,28	1,069	0,006
195	354,17	11,54	1,067	-0,003
145	465,1028	9,55	1,063	0,013

Tabela 6 - VIPs do modelo de predição, PLS-DA, 3 componentes, modo positivo. (Conclusão)

ID	m/z	TR	VIP	Coefficiente de Correlação
216	532,3488	21,73	1,059	0,021
96	340,1501	6,83	1,043	-0,0003
196	350,1022	11,38	1,041	0,007
194	380,112	12,43	1,040	0,007
223	342,1332	10,93	1,040	-0,003
227	342,1331	11,01	1,039	0,007
251	372,1804	9,44	1,034	0,017
286	262,2375	12,82	1,033	0,022
65	419,1254	20,30	1,028	-0,003
101	553,4248	21,22	1,024	0,012
192	384,1804	12,80	1,023	-0,006
189	356,1491	11,68	1,020	0,011
270	340,1501	6,85	1,019	0,015
293	265,1545	7,37	1,015	0,022
292	265,1545	7,35	1,014	0,022
276	163,0389	7,46	1,003	0,001
78	310,1798	12,59	1,001	0,009
8	147,0831	2,75	1,487	0,024
261	208,1331	6,15	1,422	0,026
242	339,1221	13,11	1,268	0,019
279	219,1871	18,90	1,267	0,009
47	199,0753	20,58	1,187	0,013
272	326,1384	12,22	1,168	0,011
245	344,149	8,58	1,147	0,020
74	296,1646	10,43	1,147	0,016
255	244,1285	3,14	1,141	0,011
108	298,1434	6,65	1,138	-0,009
112	301,1618	6,38	1,130	0,019
240	366,0968	11,42	1,071	0,011
52	419,1251	20,34	1,024	-0,003

Fonte: Da autora.

Nota: ID - numeração referente ao par m/z /TR; m/z - razão massa carga; TR - tempo de retenção; VIP - variável importante para projeção.

Assim, as VIPs > 1 correlacionados positivamente pelo modelo PLS com a atividade anti-inflamatória foram desreplicadas via identificação de nível 1 (Item 5.2.4).

5.2.4 Machine learning

O modelo SGD que aplica um algoritmo de aumento de gradiente com a incorporação de aleatoriedade foi também utilizado neste trabalho. O SGD tem sido usado com sucesso para prever respostas biológicas de moléculas em estudos quantitativos de relação estrutura-atividade (QSAR) e metabolômicos (GROMSKI *et al.*, 2015; GHOSH *et al.*, 2020). Da mesma forma, ANN é um método não linear, usado para analisar interações complexas que ocorrem em diferentes níveis de organizações biológicas, como os processos biológicos que geralmente seguem uma resposta não linear (AMANTE *et al.*, 2019). Juntamente com o modelo PLS M2, os modelos SGD e ANN foram capazes de prever a atividade anti-inflamatória de inibição de PGE₂ com exatidão e precisão satisfatórias (Tabela 7).

A precisão, exatidão, erro médio absoluto (MAE) e erro quadrático médio (RMSE) foram avaliados para medir a qualidade do ajuste dos modelos. A precisão da validação cruzada (5 vezes) e dos conjuntos de teste foi de 78%/ 83% e 71%/ 83%, respectivamente, para os modelos ANN e SGD (Tabela 7). Assim, todos estes resultados obtidos apresentaram métricas gerais satisfatórias.

Tabela 7 - Resultados e métricas para a predição dos modelos de gradiente descendente estocástico (SGD) e redes neurais artificiais (ANN).

Modelo	N° Att	Etapa de modelagem	Exatidão	Classificação incorreta	Precisão	F-medido	RMSE	MAE	ROC
ANN	6	Treino (n= 14)	85,72% (12)	14,28% (2)	0,86	0,92	0,30	0,19	0,83
		5 fold CV	78,57% (11)	21,43% (3)	0,72	0,75	0,37	0,25	0,63
		Teste (n= 6)	83,33% (5)	16,66% (1)	0,83	0,91	0,36	0,28	0,80
SGD	47	Treino (n= 14)	92,85% (13)	7,14% (1)	0,93	0,91	0,22	0,14	1,00
		5 fold CV	71,42% (10)	28,57% (4)	0,71	0,71	0,39	0,25	0,75
		Teste (n= 6)	83,33% (5)	16,66% (1)	0,92	0,85	0,37	0,31	0,80

Fonte: Da autora.

Nota: N° Att. - número de atributos selecionados; F-medido - ; RMSE - *Root Mean Squared Error*; MAE - *Mean Absolute Error*; ROC - *Receiver Operating Characteristic*.

5.2.5 Anotação Química

A desrepliação foi realizada para as VIPs positivamente correlacionadas com a atividade anti-inflamatória conforme resultados do modelo PLS M2, além das selecionadas para classificação SGD e variáveis importantes utilizadas para construção da ANN, que foram consideradas os biomarcadores da propriedade anti-inflamatória segundo estas análises (Tabela 8).

A maioria destes metabólitos apresentou compostos correspondentes no *Dictionary of Natural Products* © (Tabela 8).

Tabela 8 - Anotação química dos metabólitos apontados como biomarcadores da atividade anti-inflamatória pelas análises estatísticas de métodos dos mínimos quadrados parciais (PLS - M2), gradiente descendente estocástico (SGD) e redes neurais artificiais (ANN). (Continua)

Modelo PLS							
ID	<i>m/z</i>	TR	RBD	Erro (ppm)	Extrato	FM [M+H] ⁺	Hits SciFinder
1	146,0809	2,7	1,5	-1,29	OO	C ₆ H ₁₂ NO ₃	77
8	147,0831	2,75	-	-	-	-	-
9	246,2425	15,81	-0,5	-0,59	OB	C ₁₄ H ₃₂ NO ₂	-
17	218,2113	12,47	-0,5	-0,48	OD	C ₁₂ H ₂₈ NO ₂	2
18	151,0353	2,45	5,5	-2,92	PW	C ₈ H ₇ O ₃	13
25	330,1698	8,91	8,5	-0,65	OD	C ₁₉ H ₂₄ NO ₄	83
27	290,2689	16,05	-0,5	-0,08	NO	C ₁₆ H ₃₆ NO ₃	7
28	360,1494	2,8	0,5	-0,63	OO	C ₁₂ H ₂₆ NO ₁₁	-
44	199,0754	18,12	8,5	0,27	OA	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	36
45	397,1434	19,23	16,5	-0,32	OA	C ₂₆ H ₂₁ O ₄	2
46	414,1697	20,54	15,5	-0,23	OA	C ₂₆ H ₂₄ NO ₄	1
47	199,0753	20,58	8,5	-1,74	OA	C ₁₃ H ₁₁ O ₂	36
54	397,1435	20,69	16,5	-0,39	OA	C ₂₆ H ₂₁ O ₄	2
74	296,1646	10,43	9,5	0,35	OO	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂	14
76	296,1646	13,07	9,5	1,09	OO	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂	14
79	297,1666	10,35	9,5	2,82	OD	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂	14
82	314,1748	9,13	8,5	-0,04	OD	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃	50
88	326,1749	15,34	9,5	-1,38	OD	C ₂₀ H ₂₄ NO ₃	25
100	314,1396	7,46	9,5	-2,47	OB	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄	83
101	553,4248	21,22	-	-	-	-	-
109	287,1739	2,69	-	-	-	-	-
112	301,1618	6,38	-0,5	4,28	OD	C ₁₀ H ₂₅ N ₂ O ₈	-
114	797,5172	21,78	-	-	OB	-	-
119	160,1332	2,36	-	-	-	-	-
127	257,1509	19,99	-	-	-	C ₁₃ H ₁₇ N ₆	6

Tabela 8 - Anotação química dos metabólitos apontados como biomarcadores da atividade anti-inflamatória pelas análises estatísticas de métodos dos mínimos quadrados parciais (PLS - M2), gradiente descendente estocástico (SGD) e redes neurais artificiais (ANN). (Continua)

Modelo PLS							
ID	<i>m/z</i>	TR	RBD	Erro (ppm)	Extrato	FM [M+H] ⁺	Hits SciFinder
128	257,1509	19,95	8,5	-0,16	AS	C ₁₃ H ₁₇ N ₆	6
137	346,1644	8,86	-	-	-	-	-
142	300,1439	3,15	4,5	-0,21	NG	C ₁₄ H ₂₂ NO ₆	2
145	465,1028	9,55	11,5	-0,07	OA	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	85
186	340,1544	11,58	10,5	-0,28	CT	C ₂₀ H ₂₂ NO ₄	63
187	326,1385	10,45	10,5	-1,36	CT	C ₁₉ H ₂₀ NO ₄	103
189	356,1491	11,68	10,5	-1,26	CT	C ₂₀ H ₂₂ NO ₅	79
191	384,144	13,71	11,5	-0,17	CT	C ₂₁ H ₂₂ NO ₆	52
193	366,0972	14,54	13,5	-2,63	CT	C ₂₀ H ₁₆ NO ₆	24
197	336,0866	12,33	13,5	-0,43	CT	C ₁₉ H ₁₄ NO ₅	16
198	329,1566	8,5	5,5	-0,71	CT	C ₁₂ H ₂₁ N ₆ O ₅	-
199	314,1745	7,4	-	-	-	-	-
200	398,1596	13,83	11,5	-0,59	CT	C ₂₂ H ₂₄ NO ₆	32
208	342,1698	9,85	-	-	-	-	-
213	366,0971	11,09	-	-	-	-	-
216	532,3488	21,73	3,5	1,39	NG	C ₂₇ H ₅₀ NO ₉	3
240	366,0968	11,42	13,5	-1,13	CT	C ₂₀ H ₁₆ NO ₆	24
241	328,1538	7,39	9,5	-0,69	CT	C ₁₉ H ₂₂ NO ₄	145
242	339,1221	13,11	11,5	-2,95	CT	C ₂₀ H ₁₉ O ₅	161
244	342,1598	11,25	10,5	1,52	CT	C ₁₉ H ₂₀ NO ₅	59
245	344,149	8,58	9,5	-1,21	CT	C ₁₉ H ₂₂ NO ₅	55
249	357,1523	11,78	1,5	2,09	CT	C ₁₂ H ₂₅ N ₂ O ₁₀	-
250	342,1693	10,35	9,5	-0,28	OA	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	90
251	372,1804	9,44	9,5	-0,83	OA	C ₂₁ H ₂₆ NO ₅	65
255	244,1285	3,14	3,5	-3,33	OB	C ₁₀ H ₁₈ N ₃ O ₄	-
257	160,0966	2,08	1,5	-0,31	OA	C ₇ H ₁₄ NO ₃	60
261	208,1331	6,15	4,5	-0,69	NO	C ₁₂ H ₁₈ NO ₂	42
270	340,1501	6,85	6,5	-0,48	AF	C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₆	1
272	326,1384	12,22	10,5	-1,15	EPL	C ₁₉ H ₂₀ NO ₄	103
286	262,2375	12,82	-0,5	-0,69	EPB	C ₁₄ H ₃₂ NO ₃	3
289	295,1131	2,69	7,5	1,78	CG	C ₁₂ H ₁₅ N ₄ O ₅	1
291	340,2819	18,94	2,5	-8,11	EPB	C ₂₀ H ₃₈ NO ₃	5
292	265,1545	7,35	-	-	-	-	1
293	265,1545	7,37	5,5	-0,49	EPB	C ₁₄ H ₂₁ N ₂ O ₃	1

Tabela 8 - Anotação química dos metabólitos apontados como biomarcadores da atividade anti-inflamatória pelas análises estatísticas de métodos dos mínimos quadrados parciais (PLS - M2), gradiente descendente estocástico (SGD) e redes neurais artificiais (ANN). (Continua)

Modelo ANN							
ID	<i>m/z</i>	TR	RBD	Erro (ppm)	Extrato	FM	Hits
28	360,1494	2,80	0,5	-0,63	OO	C ₁₂ H ₂₆ NO ₁₁ [M+H] ⁺	-
100	314,1396	7,46	9,5	-2,47	OB	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄ [M+H] ⁺	83
315	187,0971	11,61	2,5	-2,79	OO	C ₉ H ₁₅ O ₄ [M-H] ⁻	41
335	447,1517	8,13	6,5	1,34	OB	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₂ [M-H] ⁻	41
359	331,2489	15,62	1,5	0,64	CT	C ₁₈ H ₃₅ O ₅ [M-H] ⁻	6
362	723,1733	18,63	-		CT	C ₃₉ H ₃₁ O ₁₄ [M-H] ⁻	31
Modelo SGD							
ID	<i>m/z</i>	TR	RBD	Erro (ppm)	Extrato	FM	Hits
25	330,1698	8,91	8,5	-0,65	OD	C ₁₉ H ₂₄ NO ₄ [M+H] ⁺	83
28	360,1494	2,80	0,5	-0,63	OO	C ₁₂ H ₂₆ NO ₁₁ [M+H] ⁺	-
38	266,1228	2,07	1,5	-1,91	OD	C ₁₀ H ₂₀ NO ₇ [M+H] ⁺	2
69	358,201	9,24	8,5	-0,82	OD	C ₂₁ H ₂₇ NO ₄ [M+H] ⁺	17
74	296,1646	10,43	9,5	0,35	OO	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂ [M+H] ⁺	14
76	296,1646	13,07	9,5	0,35	OO	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂ [M+H] ⁺	14
77	300,1591	5,95	8,5	-1,82	OD	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃ [M+H] ⁺	54
79	297,1666	10,35	9,5	2,81	OD	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂ [M+H] ⁺	14
82	314,1748	9,13	8,5	-0,04	OD	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃ [M+H] ⁺	50
86	310,1797	14,91	9,5	-1,02	OB	C ₂₀ H ₂₄ NO ₂ [M+H] ⁺	7
87	326,1748	10,90	9,5	-1,38	OD	C ₂₀ H ₂₄ NO ₃ [M+H] ⁺	25
88	326,1749	15,34	9,5	-1,38	OD	C ₂₀ H ₂₄ NO ₃ [M+H] ⁺	25
93	328,1538	9,21	-	-	-	-	-

Tabela 8 - Anotação química dos metabólitos apontados como biomarcadores da atividade anti-inflamatória pelas análises estatísticas de métodos dos mínimos quadrados parciais (PLS - M2), gradiente descendente estocástico (SGD) e redes neurais artificiais (ANN). (Continua)

Modelo SGD							
ID	<i>m/z</i>	TR	RBD	Erro (ppm)	Extrato	FM	Hits
99	314,1737	7,40	8,5	-5,60	OB	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃ [M+H] ⁺	3
100	314,1396	7,46	9,5	-2,47	OB	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄ [M+H] ⁺	83
111	349,1544	17,53	12,5	-1,69	OB	C ₂₁ H ₂₁ N ₂ O ₃ [M+H] ⁺	12
112	301,1618	6,38	-0,5	4,28	OD	C ₁₀ H ₂₅ N ₂ O ₈ [M+H] ⁺	-
116	344,1854	8,29	8,5	-1,84	OD	C ₂₀ H ₂₆ NO ₄ [M+H] ⁺	59
131	324,1953	15,04	9,5	-1,62	OD	C ₂₁ H ₂₆ NO ₂ [M+H] ⁺	4
132	651,3427	15,34	-				-
133	296,1644	14,66	9,5	-1,30	OD	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂ [M+H] ⁺	14
135	265,1655	2,19	0,5	3,41	OD	C ₁₂ H ₂₅ O ₆ [M+H] ⁺	2
177	219,1742	8,23	4,5	-0,74	ODI	C ₁₅ H ₂₃ O [M+H] ⁺	408
182	285,221	12,20	6,5	-0,78	ODI	C ₂₀ H ₂₉ O [M+H] ⁺	53
184	532,3402	20,35	8,5	3,13	ODI	C ₂₉ H ₄₆ N ₃ O ₆ [M+H] ⁺	-
229	507,2279	21,18	14,5	8,67	OB	C ₂₇ H ₃₁ N ₄ O ₆ [M+H] ⁺	-
241	328,1538	7,39	9,5	-0,69	CT	C ₁₉ H ₂₂ NO ₄ [M+H] ⁺	145
250	342,1693	10,37	9,5	-0,28	OA	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ [M+H] ⁺	90
298	223,0456	2,14	2,5	-1,84	OB	C ₇ H ₁₁ O ₈ [M-H] ⁻	2
304	195,0504	2,03	1,5	-3,62	OB	C ₆ H ₁₁ O ₇ [M-H] ⁻	12
308	481,2571	20,18	8,5	9,22	OO	C ₂₀ H ₃₃ N ₈ O ₆ [M-H] ⁻	-
311	593,1522	9,84	13,5	1,33	OO	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ [M-H] ⁻	174
315	187,0971	11,61	2,5	-3,38	CG	C ₉ H ₁₅ O ₄ [M-H] ⁻	41
330	563,1412	10,61	13,5	0,86	OB	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄ [M-H] ⁻	94

Tabela 8 - Anotação química dos metabólitos apontados como biomarcadores da atividade anti-inflamatória pelas análises estatísticas de métodos dos mínimos quadrados parciais (PLS - M2), gradiente descendente estocástico (SGD) e redes neurais artificiais (ANN). (Conclusão)

Modelo SGD							
ID	<i>m/z</i>	TR	RBD	Erro (ppm)	Extrato	FM	Hits
333	563,1414	11,04	13,5	0,86	OB	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄ [M-H] ⁻	94
335	447,1517	8,13	6,5	1,34	OB	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₂ [M-H] ⁻	41
336	310,1453	13,46	10,5	0,88	OB	C ₁₉ H ₂₀ NO ₃ [M-H] ⁻	65
350	545,2973	12,18	5,5	1,04	ODI	C ₂₇ H ₄₅ O ₁₁ [M-H] ⁻	2
351	545,2972	10,78	5,5	1,04	ODI	C ₂₇ H ₄₅ O ₁₁ [M-H] ⁻	2
352	267,1604	12,86	4,5	0,93	ODI	C ₁₅ H ₂₃ O ₄ [M-H] ⁻	574
353	271,1553	11,07	3,5	0,64	ODI	C ₁₄ H ₂₃ O ₅ [M-H] ⁻	11
354	399,2391	11,43	4,5	0,53	ODI	C ₂₁ H ₃₅ O ₇ [M-H] ⁻	51
355	545,2975	11,17	10,5	1,38	ODI	C ₂₇ H ₄₅ O ₁₁ [M-H] ⁻	2
357	287,2233	16,51	1,5	1,49	OO	C ₁₆ H ₃₁ O ₄ [M-H] ⁻	27
359	331,2489	15,62	1,5	0,91	OO	C ₁₈ H ₃₅ O ₅ [M-H] ⁻	6
362	723,1733	18,63	-	-	OO	-	-

Fonte: Da autora.

Nota: ID - numeração referente ao par *m/z*/TR; *m/z* - razão massa carga; TR - tempo de retenção; RBD - *ring double bond*; FM - fórmula molecular; [M+H]⁺ - íons pseudomoleculares modo positivo. [M-H]⁻ - íons pseudomoleculares modo negativo. Extrato com maior área para cada *m/z*

Os íons de fragmentos de varreduras independentes (MS^E) obtidos foram verificados manualmente quanto aos fragmentos descritos na literatura para elevar a anotação química para o nível 2 de confiança, conforme definido pela MSI (Creek *et al.*, 2014; Nicácio *et al.*, 2022). Assim, sete íons, foram anotados com nível 2 de confiança (Tabela 9). Com relação aos sete íons que puderam ser anotados com nível de 2 de confiança, pode se notar que consistiam basicamente de alcaloides aporfínicos, benzilisoquinolínicos, morfínânicos e fenantrênicos. Alguns desses metabólitos foram relatados anteriormente para a família Lauraceae (Ghosh *et al.*, 2020; De Alcântara *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021) (Tabela 9), o que deu maior confiança à estas anotações químicas. Além disso, a maioria dos metabólitos foi definidos como biomarcadores para espécies de Lauraceae que possuem atividade anti-inflamatória, inclusive, o alcaloide reticulina (Katchborian-Neto *et al.*, 2023).

Podem-se citar também os compostos já descritos por sua atividade anti-inflamatória na literatura como a reticulina, a armepavina e a isoboldina, (Liu *et al.*, 2006; Chou *et al.*, 2014; De Alcântara *et al.*, 2021). A reticulina (ID 25), conforme mencionado anteriormente, é um alcaloide relatado por exibir atividade anti-inflamatória por inibição dupla das vias COX e LOX em modelo experimental *in vivo* (De Alcântara *et al.*, 2021), o que reforça ainda mais os resultados obtidos nestes trabalhos.

Além disso, um dos íons de m/z 296,1646 (ID 74 ou 76) pôde ser isolado e identificado com o maior nível de confiança, nível 0, uma vez que foi possível obter, além dos dados de espectrometria de massas, todos os demais dados necessários para a sua completa elucidação estrutural (seção 5.3).

Tabela 9 - Anotação no modo de ionização positiva dos metabólitos comuns dos modelos de predição de mínimos quadrados parciais (PLS), descida de gradiente estocástico (SGD) e redes neurais artificiais (ANN).

ID	VIP	Coef. Corr.	CorrP	[M+H]	TR	Erro (ppm)	FM	Classe	Hits	MS ²
25*	1,09	1,69E-02	1,99E-01	330,1698	8,92	-0,65	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	Alcaloide benzilisoquinolínico	Reticulina ¹	192,1014; 137,0593; 143,0488; 177,0778; 175,0749; 122,0360
74*	1,15	1,63E-02	2,48E-01	296,1646	10,44	0,35	C ₁₉ H ₂₁ NO ₂	Alcaloides aporfina, benzilisoquinolínico e fenantrênico	Nuciferina / 2-metil-(para-metoxi-benzil)-7-metoxi-isoquinolina/dimetilamino-etil fenantreno ²	#
76*	1,19	1,08E-02	1,96E-01	296,1645	13,07	0,35	C ₁₉ H ₂₁ NO ₂	Alcaloides aporfina, benzilisoquinolínico e fenantrênico	Nuciferina / 2-metil-(para-metoxi-benzil)-7-metoxi-isoquinolina/dimetilamino-etil fenantreno ²	#
82*	1,16	1,81E-02	2,24E-01	314,1748	9,14	-0,04	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	Alcaloide benzilisoquinolínico	Armpavina ³	121,0647; 143,0489; 283,1320; 175,0750; 137,0595; 251,1059; 122,0681
88*	1,19	1,35E-02	2,24E-01	326,1749	15,34	-1,38	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	Alcaloide aporfínico	3-metoxinuciferina ²	265,1219; 250,0984; 235,0751; 219,0803; 207,0803; 191,0854; 179,0855
100**	1,23	2,34E-02	2,81E-01	314,1396	7,47	-2,46	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	Alcaloide aporfínico	Norisoboldina (laureiptina)/laetanina or lauroilsina ²	297,1112; 237,0901; 219,0806; 282,0876;/ 265,0849; 297,1112; 209,0953; 165,0690
137	1,11	1,26E-02	1,74E-01	346,1644	8,86	-	C ₁₉ H ₂₃ NO ₅	Alcaloide benzilisoquinolínico	Reticulina-N-óxido ²	137,75; 175,07; 299,12; 192,10
199	1,12	2,35E-02	1,74E-01	314,1745	7,40	-1,63	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	Alcaloide benzilisoquinolínico	Anicanina ⁴	206,1178; 107,0493
241*	1,14	1,46E-02	2,12E-01	328,1538	7,39	-0,685	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	Alcaloide aporfínico	Isoboldina ²	297,1028; 265,0842; 237,0899

Fonte: Da autora.

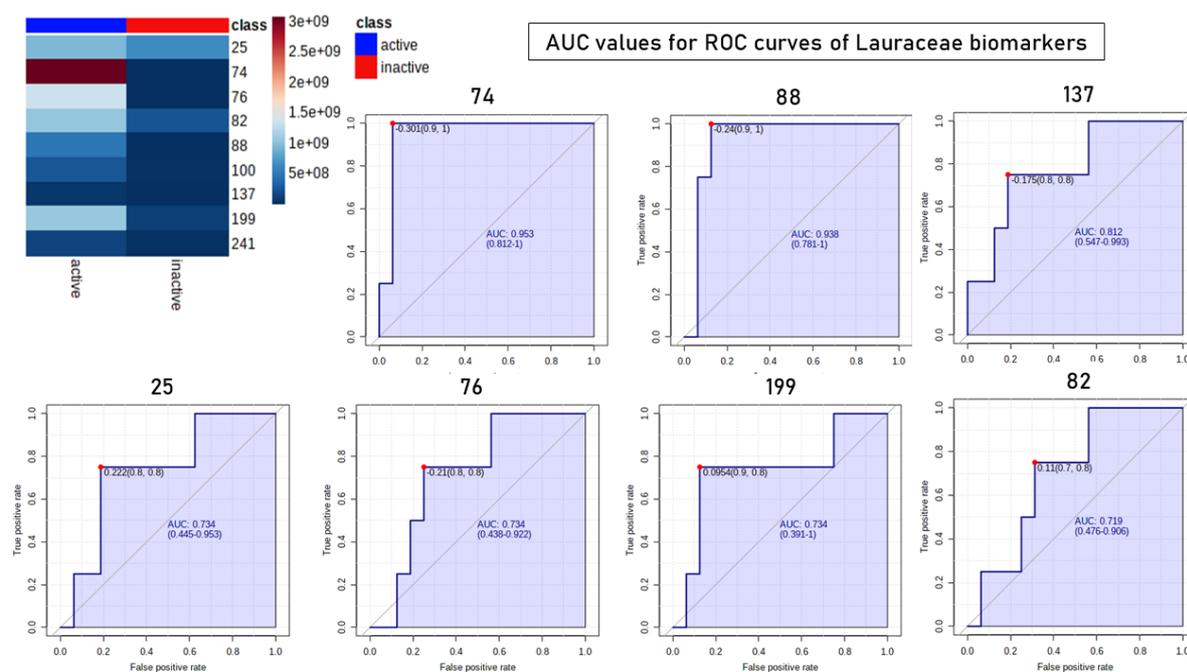
Nota: Metabólitos importantes como biomarcadores anti-inflamatórios de acordo com modelos de previsão de mínimos quadrados parciais (PLS), descida de gradiente estocástico (SGD)* e redes neurais artificiais (ANN)**, que podem ser anotados com nível 3 ou superior de confiança de acordo iniciativa padrão metabólica (MSI). ** Biomarcador comum entre os três modelos de predição. ID - numeração referente ao par *m/z*/TR. Coef. Corr. - Coeficiente de Correlação; CorrP - valores de correlação de *Pearson*; [M+H] - íons pseudomoleculares MS1 modo positivo; TR - tempo de retenção; FM - fórmula molecular; ms2 - fragmentos de íons ms2. * Biomarcador comum entre os modelos. ¹ Alcaloide encontrado no gênero *Ocotea* (De Alcântara *et al.*, 2021) (Silva Teles *et al.*, 2019). ² Alcaloides encontrados no gênero *Ocotea* (Silva Teles *et al.*, 2019). ³ Alcaloide encontrado no gênero *Cryptocarya* (Silva Teles *et al.*, 2019). ⁴ Alcaloide encontrado no gênero *Aniba* (Silva Teles *et al.*, 2019). # anotada com nível máximo de confiança como 2,10-dimetoxiaporfina após isolamento e elucidação estrutural descritos no item 5.3. Cromatogramas e espectros presentes no Apêndice E.

5.2.6 Curvas de característica operacional do receptor (ROC) e valores de área sob a curva (AUC)

Os diagramas ROC indicam a taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) de um teste, que é plotada no eixo y contra a taxa de falsos positivos (especificidade) que está no eixo x, gerando assim a relação ROC/AUC (Hoo; Candlish; Teare, 2017).

Desta forma, foi possível observar que sete (ID: 25, 74, 76, 82, 88, 137 e 199) dos nove metabólitos da Tabela 9, anotados como principais biomarcadores da atividade anti-inflamatória das espécies estudadas, expressaram valores AUC relevantes ($>0,7$) de acordo com suas curvas ROC específicas e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (Figura 28). Enquanto apenas dois destes metabólitos anotados (ID: 100 e 241) exibiram valores de AUC mais baixos, mas, ainda assim, sendo valores de $AUC > 0,5$ (Figura 28). Os resultados de AUC obtidos reforçam a credibilidade dos resultados das análises estatísticas multivariadas (PLS, ANN e SGD) e modelos de predição validados, pois esses metabólitos foram confirmados como variáveis relevantes para discriminar as amostras entre grupos ativos e inativos para a atividade anti-inflamatória via inibição da liberação de PGE_2 .

Figura 28 - Curvas ROC dos metabólitos anotados comuns aos modelos PLS e SGD indicam valores individuais de AUC satisfatórios ($> 0,7$). As figuras foram desenhadas via *software Metaboanalyst v 5.0*.



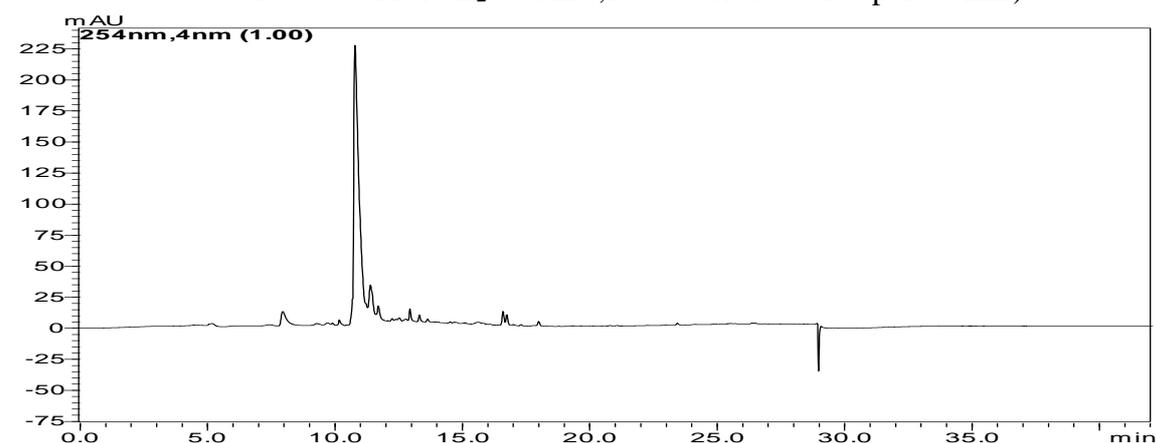
Fonte: Da autora.

5.3 FITOQUÍMICA

O extrato bruto de *O. odorifera* (OO), uma das espécies mais ativas, selecionada para a etapa fitoquímica por conter alcaloides biomarcadores da atividade anti-inflamatória (Tabela 9), teve rendimento de 335,87 g (16,8% em relação ao peso seco das folhas). A fração clorofórmio deste extrato teve um rendimento de 0,23 g (0,068% em relação ao extrato bruto).

Esta fração por ser rica em alcaloides foi selecionada para etapa cromatográfica. As sub-frações obtidos na etapa cromatográfica por cromatografia de coluna clássica foram reunidas de acordo com similaridade quanto ao perfil cromatográfico em CCD. Posteriormente, análises em HPLC-UV-DAD das amostras reunidas indicou a presença de uma substância majoritária no grupo G10 (Figura 29).

Figura 29 - Cromatograma em 254 nm do grupo G10, obtido da fração alcaloídica por HPLC-UV-DAD (coluna C18 - 5 μ m 7,6 mm x 250 mm, fluxo de 1,0 mL/min, eluente: 5% a 100% de ACN:H₂O com 0,1% de ácido acético por 30 min).

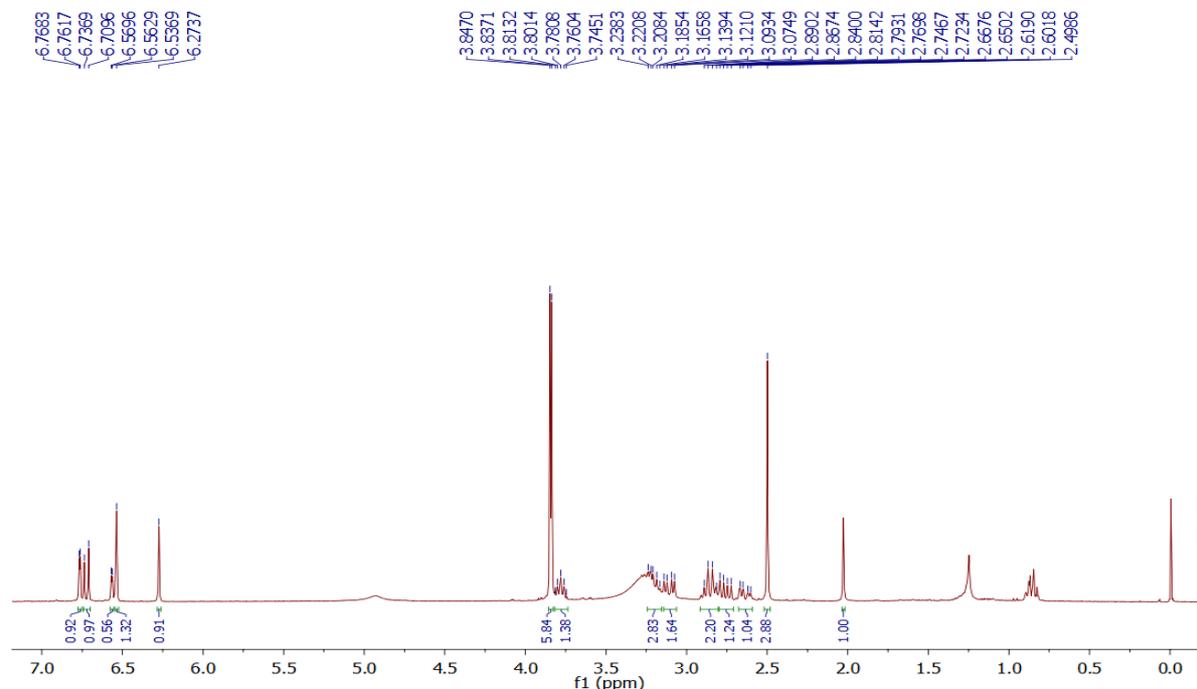


Fonte: Da autora.

Foram realizadas análises pelas técnicas de RMN de ¹H, ¹³C, HMBC e HSQC para esta substância do grupo G10. No espectro de RMN de ¹H (Figura 30, 31 e Tabela 10) foi identificada a presença de cinco prótons aromáticos. Sendo os hidrogênios H-3 δ 6,54 (1H, *s*) e H-1 δ 6,27 (1H, *s*) em posição *meta* um em relação ao outro, em um dos anéis aromáticos, o tetra-substituído, demonstrado pelo valor da constante de acoplamento ⁴J₁₋₃ de 2 Hz. Os sinais δ_{H-8} 6,72 (1H, *d*, *J*: 8,50 Hz), δ_{H-11} 6,76 (1H, *d*, *J*: 2 Hz), δ_{H-9} 6,56* (1H, *dd*, *J*: 2 Hz e 8,5 Hz) são do outro anel aromático, neste caso tri-substituído. O padrão de desdobramento de sinais sugere que os hidrogênios 8 e 9 estão nas posições *orto* um em relação ao outro, indicado pela constante de acoplamento a três ligações, sendo ³J₈₋₉ acima de 8 Hz, conforme descrito na literatura (PAVIA *et al.*, 2015). Além disso, um dos hidrogênios encontra-se em posição *meta*

um em relação ao outro, demonstrado pelo valor da constante de acoplamento ${}^4J_{9-11}$, que é de 2 Hz.

Figura 30 - Espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ do grupo G10, 300 MHz, CDCl_3 .



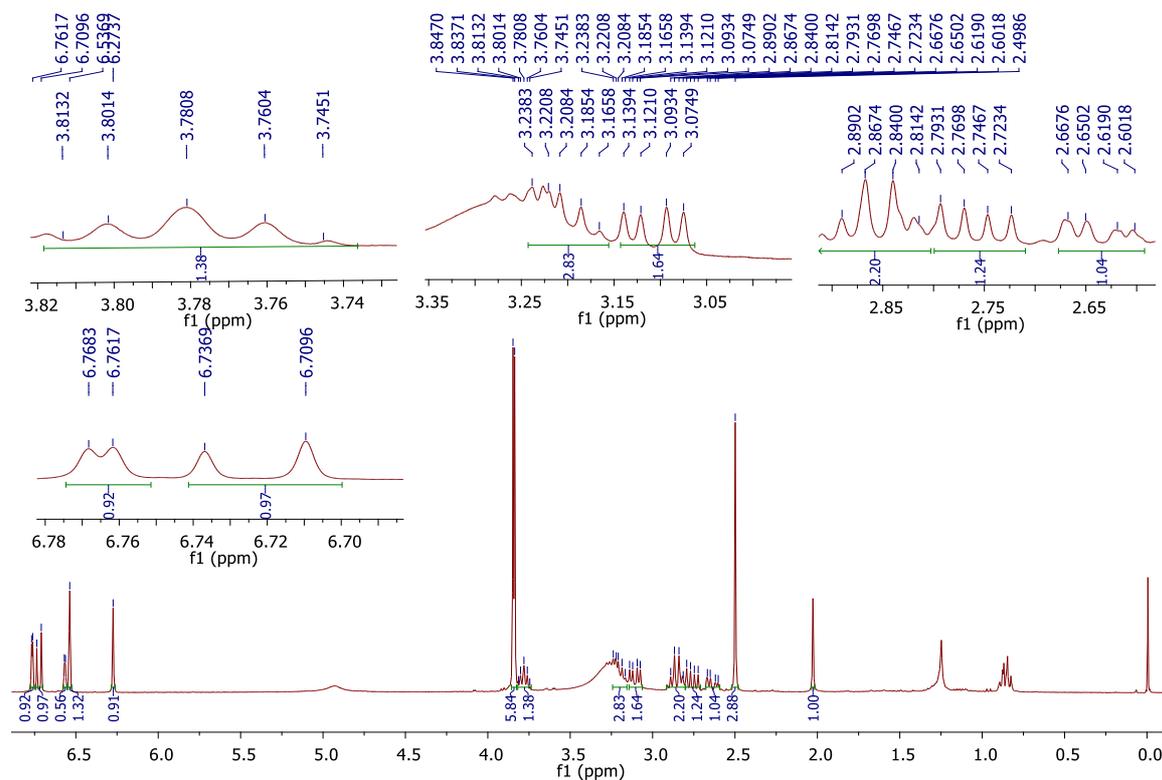
Fonte: Da autora.

Além desses sinais, também foi observada a presença de hidrogênios em $\delta_{\text{H-6}}$ 2,50, que integra para três hidrogênios, sendo um singlete. Este sinal refere-se a uma metila, e como seu valor de deslocamento químico está mais desblindado, sugere-se que esteja ligada a um átomo eletronegativo como o nitrogênio.

Foram observados alguns sinais na região características dos hidrogênios metilênicos, sendo $\delta_{\text{H-5}}$ 3,20 (1H, *m*) e 2,85* (1H, *m*); $\delta_{\text{H-4}}$ 2,85* (1H, *m*) e 2,64 (1H, *m*) e $\delta_{\text{H-7}}$ 3,10 (1H, *dd*, *J*: 6,60 e 13,8 Hz) e δ 2,76 (1H, *dd*, *J*: 13,8 e 6,60 Hz). Esses dois últimos hidrogênios na posição 7 estão correlacionando com o hidrogênio 6a a três ligações, além disso o valor da constante J_{7-6a} : 6,60 Hz, sugere que os hidrogênios estão em axial- equatorial. A constante em J_{7a-7b} : 13,8 Hz possivelmente é devido ao acoplamento geminal. Também foi observado um sinal de hidrogênio metínico em δ 3,77 (1H, *qui*, *J*: 6,60 Hz) referente ao H6a.

Foram observados singletos em δ_{12a} 3,85 e δ_{12b} 3,84 cada qual com uma integral referente a 3 hidrogênios, indicando que eles não correlacionam com nenhum outro próton. O valor de deslocamento alto indica que possivelmente esses hidrogênios estão próximos a um átomo eletronegativo, sendo esse valor um indicativo da presença de metoxila (O-CH_3).

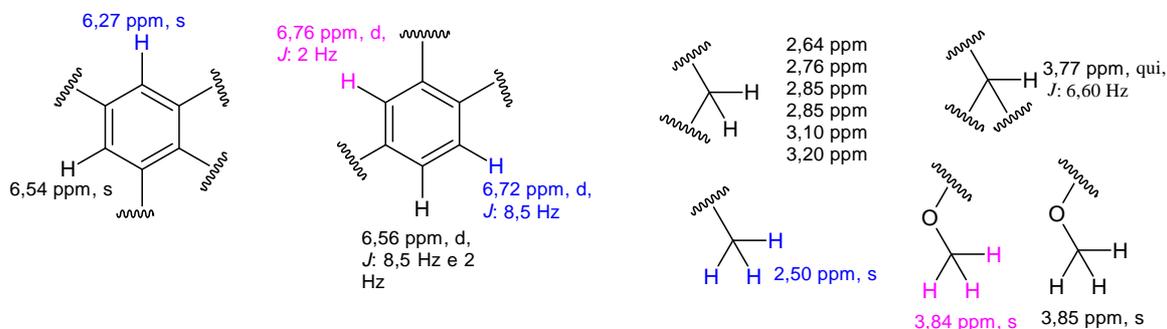
Figura 31 - Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H do grupo G10, 300 MHz, CDCl_3 .



Fonte: Da autora.

Assim, a partir dos dados de RMN de ^1H foi possível verificar a presença dos seguintes grupos na estrutura da molécula: um anel tetrasubstituído, um anel trissubstituído, um grupo metílico, três grupos metilênicos, um grupo metínico e duas metoxilas, conforme pode-se observar na Figura 32.

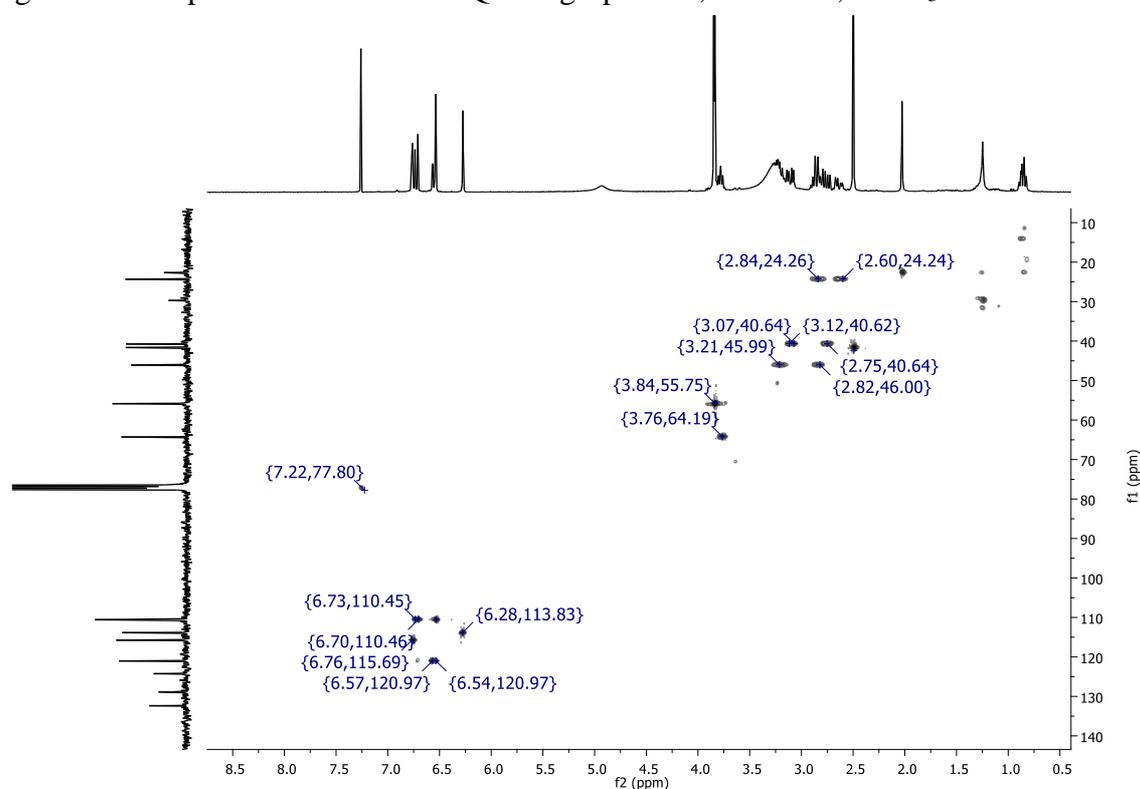
Figura 32 - Fragmentos observados a partir do espectro de RMN de ^1H para o grupo G10.



Fonte: Da autora.

Pela técnica de RMN bidimensional, $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC (Figura 33) foi verificada a correlação dos hidrogênios metílicos em $\delta_{\text{H-6}}$ 2,50 com $\delta_{\text{C-6}}$ 41,77, mais desblindados devido à ligação do carbono com o nitrogênio. Além disso, foi observada a correlação de $\delta_{\text{H-7}}$ 3,10 com o carbono metilênico em $\delta_{\text{C-7}}$ 40,86. Adicionalmente, foi observada a correlação dos hidrogênios $\delta_{\text{H-4}}$ 2,85 e $\delta_{\text{H-5}}$ 3,20 com os carbonos metilênicos em $\delta_{\text{C-4}}$ 24,48 e $\delta_{\text{C-5}}$ 46,20, respectivamente. Os $\delta_{\text{H-1}}$ 6,27 e $\delta_{\text{H-3}}$ 6,54 correlacionaram-se, respectivamente, com $\delta_{\text{C-1}}$ 113,98 e $\delta_{\text{C-3}}$ 110,68, referentes ao anel tetra-substituído. Notou-se a correlação com $\delta_{\text{H-6a}}$ 3,77 e $\delta_{\text{C-6a}}$ 64,43, sendo esse sinal referente ao hidrogênio e carbono metínicos.

Figura 33 – Mapa de contorno de HSQC do grupo G10, 300 MHz, CDCl_3 .

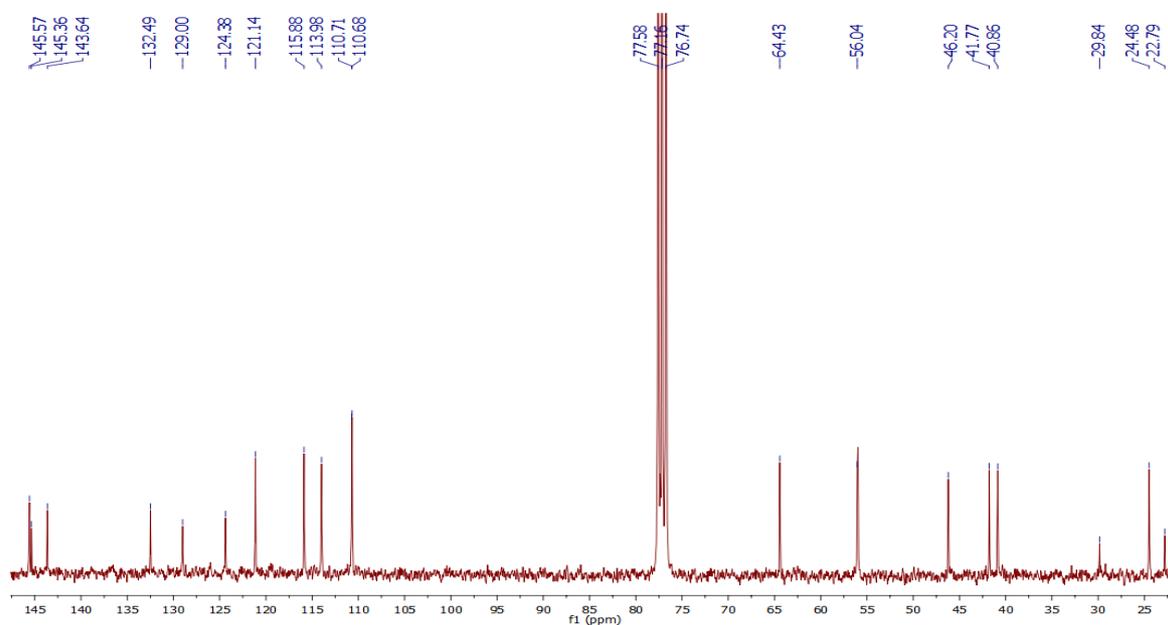


Fonte: Da autora.

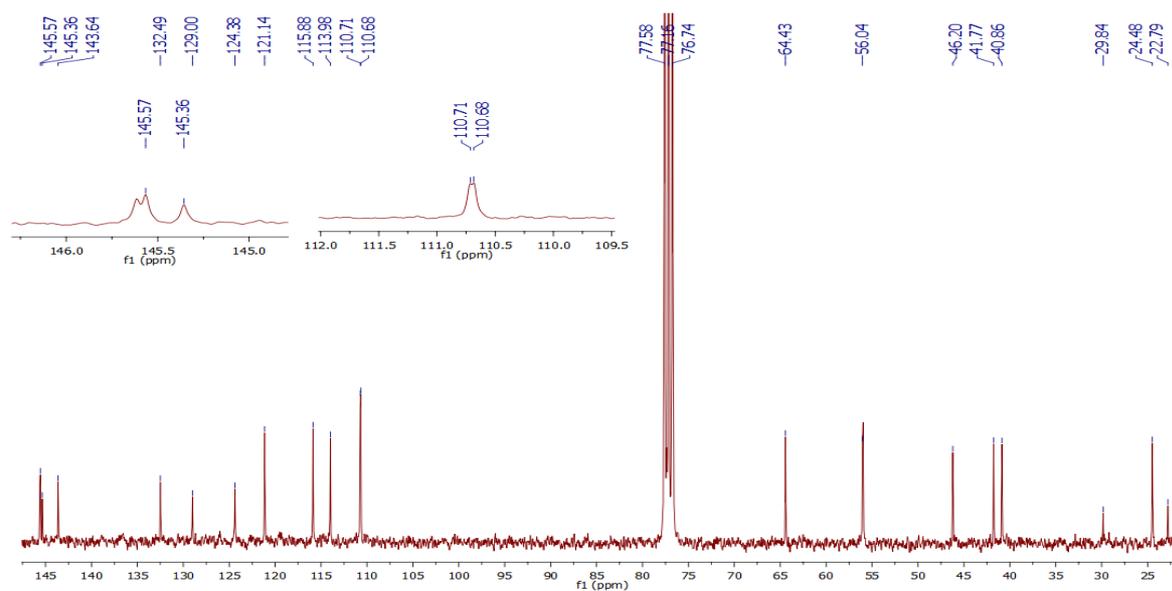
Na análise de RMN ^{13}C (Figura 34, 35 e Tabela 10) observou-se 19 sinais de carbonos. Dentre esses, foi observada a presença de 12 carbonos na região dos aromáticos ou oleofínicos, ou seja, na região que abrange o deslocamento químico entre 110-175 ppm, sendo eles: $\delta_{\text{C-1}}$ 113,98; $\delta_{\text{C-2}}$ 145,61; $\delta_{\text{C-3}}$ 110,68; $\delta_{\text{C-3a}}$ 143,68; $\delta_{\text{C-7a}}$ 132,49; $\delta_{\text{C-8}}$ 110,71; $\delta_{\text{C-9}}$ 121,14; $\delta_{\text{C-10}}$ 145,57; $\delta_{\text{C-11}}$ 115,88; $\delta_{\text{C-11a}}$ 145,36; $\delta_{\text{C-11b}}$ 124,38 e $\delta_{\text{C-11c}}$ 129,00. Foi observada a presença de três carbonos na região dos metilênicos, ou seja, entre 15 e 55 ppm, dentre eles $\delta_{\text{C-4}}$ 24,48; $\delta_{\text{C-5}}$ 46,20 e $\delta_{\text{C-7}}$ 40,86.

Foi observada também a presença de um carbono metínico δ_{C-6a} 64,43, sendo que, normalmente, esse sinal aparece com um deslocamento químico entre 20-60. Entretanto, quando o mesmo está próximo de algum átomo eletronegativo, maior será a desblindagem, por isso foi notado o valor de deslocamento químico um pouco acima do esperado. Também foi verificada a presença de três carbonos de metila sendo eles: δ_{C-6} 41,77; δ_{C-12a} 56,04 e δ_{C-12b} 55,97, esses carbonos apresentam-se mais desblindados, pois estão diretamente ligados a átomos eletronegativos. O C-6 está ligado a um átomo de nitrogênio, enquanto, C-12a e C-12b estão mais desblindados, pois estão ligados a um átomo de oxigênio que é mais eletronegativo que o nitrogênio.

Figura 34 - Espectro de RMN de ^{13}C do grupo G10, 75 MHz, CDCl_3 .



Fonte: Da autora.

Figura 35 - Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C do grupo G10, 75 MHz, CDCl_3 .

Fonte: Da autora.

Tabela 10 - Dados de RMN da 2,10-dimetoxiaporfina, 300 MHz, CDCl₃.

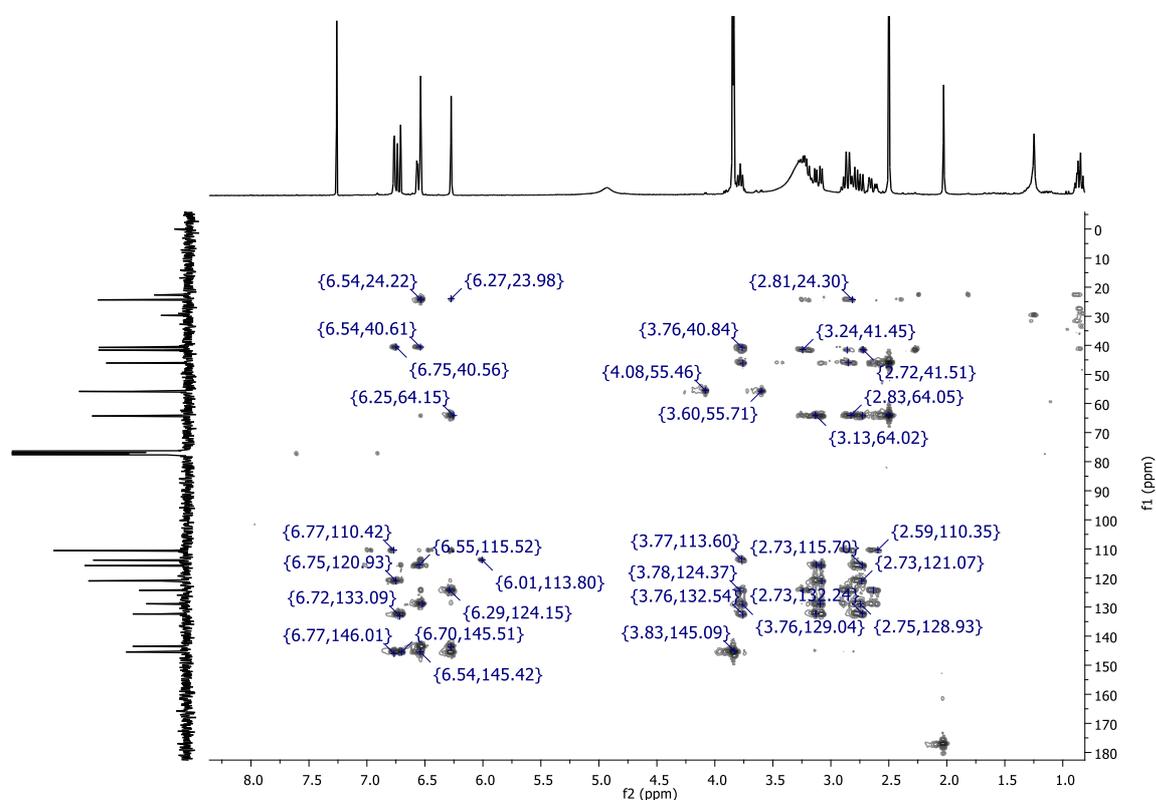
Posição	δ ¹ H (<i>m</i> , J/Hz)	δ ¹³ C (HSQC)	Dados de RMN (Kupchan <i>et al.</i>) CDCl ₃ , 400 MHz
1	6,27 (1H, <i>s</i>)	113,98	δ 7,23 (<i>d</i> , 1 H, 1 H, $J_{1,3} = 2,4$ Hz)
2	-	145,61	
3	6,54 (1H, <i>s</i>)	110,68	6,61 (<i>d</i> , 1 H, 1 H, $J_{3,1} = 2,4$ Hz)
3a	-	143,64	
4	2,85* (1H, <i>m</i>) e 2,64 (1H, <i>m</i>)	24,48	
5	3,20 (1H, <i>m</i>) e 2,85* (1H, <i>m</i>)	46,20	
6	2,50 (3H, <i>s</i>)	41,77	2,55 (<i>s</i> , 3 H, NCH ₃)
6a	3,77 (1H, <i>m</i> $J=6,60$ Hz)	64,43	
7	3,10 (1H <i>dd</i> $J= 6,60$ e $13,8$ Hz) 2,76 (1H <i>dd</i> $J=13,8$ e $6,60$ Hz)	40,86	
7a	-	132,49	
8	6,72 (1H, <i>d</i> $J=8,50$ Hz)	110,71	7,16 (<i>d</i> , 1 H, 1H, $J_{8,9} = 8$ Hz)
9	6,56* (1H, <i>dd</i> $J=2$ Hz- $8,5$ Hz)	121,14	
10	-	145,57	
11	6,76 (1H, <i>d</i> $J=2$ Hz)	115,88	7,10 (<i>d</i> , 1 H, 1 H, $J_{9,11} = 2,5$ Hz)
11a	-	145,36	
11b	-	124,38	
11c	-	129,00	
12a	3,85 (3H, <i>s</i>)	56,04	3,85 e 3,84 (<i>s</i> , 6 H, OCH ₃)
12b	3,84 (3H, <i>s</i>)	55,97	

Fonte: Da autora.

Nota: * sinal sobreposto

Também foi utilizada a técnica $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Figura 36), que permite verificar a conectividade entre átomos de carbono e hidrogênio que estão ligados a duas ligações ou mais, permitindo observar correlações até 4J . Foram observadas correlações de grande importância para a determinação estrutural, como entre o hidrogênio 1 e 3 que possuem respectivamente, $\delta_{\text{H-1}}$ 6,27 e $\delta_{\text{H-3}}$ 6,54, que correlacionam com os carbonos: $\delta_{\text{C-2}}$ 145,61; $\delta_{\text{C-3a}}$ 143,64; $\delta_{\text{C-11b}}$ 124,38, sugerindo a proximidade desses átomos. Além disso, o hidrogênio δ_{H} 6,27 também correlaciona com os carbonos δ_{C} 64,43 e δ_{C} 110,68. Enquanto o hidrogênio 3 com δ_{H} 6,54 correlaciona com os carbonos $\delta_{\text{C-4}}$ 24,48; $\delta_{\text{C-11c}}$ 129,07 e $\delta_{\text{C-1}}$ 113,98.

Figura 36 – Mapa de contorno de HMBC do grupo G10, 300 MHz, CDCl_3 .



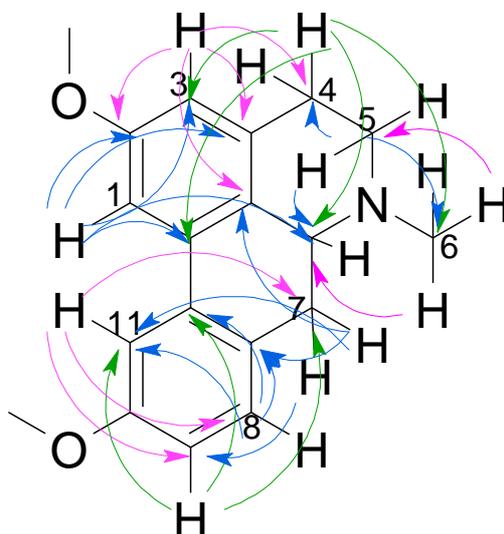
Fonte: Da autora.

Para o hidrogênio 4 em $\delta_{\text{H-4}}$ 2,85, foram observadas as seguintes correlações com os carbonos $\delta_{\text{C-6}}$ 41,77; $\delta_{\text{C-6a}}$ 64,43; $\delta_{\text{C-3}}$ 110,68; $\delta_{\text{C-11b}}$ 124,38. O outro hidrogênio na posição 4, em $\delta_{\text{H-4}}$ 2,64 apresentou correlações com $\delta_{\text{C-3}}$ 110,68; $\delta_{\text{C-11b}}$ 124,38 e $\delta_{\text{C-11c}}$ 129,00. O hidrogênio 5 ($\delta_{\text{H-5}}$ 3,20) apresentou correlações com os carbonos $\delta_{\text{C-4}}$ 24,48; $\delta_{\text{C-6}}$ 41,77 e $\delta_{\text{C-6a}}$ 64,43. O outro hidrogênio em $\delta_{\text{H-5}}$ 2,85 está sobreposto ao sinal do hidrogênio 4. O $\delta_{\text{H-6}}$ 2,50 correlaciona com o carbono 5 (δ 46,20) e 6a (δ 64,43).

Os hidrogênios em δ_{H-7} 3,10 e δ_{H-7} 2,76 também apresentaram correlações com os seguintes carbonos: δ_{C-11} 115,88; δ_{C-9} 121,14; δ_{C-7a} 132,49 e δ_{C-11c} 129,00. As correlações no mapa de contorno de HMBC dos hidrogênios 8, 9 e 11, confirmaram a presença do anel aromático trissubstituído. O hidrogênio δ_{H-8} 6,72 correlaciona com os carbonos δ_{C-10} 145,57; δ_{C-11} 115,88; δ_{C-9} 121,14 e δ_{C-7a} 132,49. O hidrogênio δ_{H-9} 6,56 com δ_{C-11} 115,88; δ_{C-11c} 129,0 e δ_{C-11a} 145,36. Enquanto δ_{H-11} 6,76 com δ_{C-9} 121,14; δ_{C-8} 110,71 e δ_{C-10} 145,57.

Ao comparar com os dados de Kupchan *et al.* (Tabela 10), embora com pequena diferença para alguns valores, referentes a aquisição dos dados, somando a todos os experimentos adquiridos neste trabalho, com todas as correlações entre os grupos presentes na estrutura da molécula, pode-se obter a estrutura proposta (Figura 37).

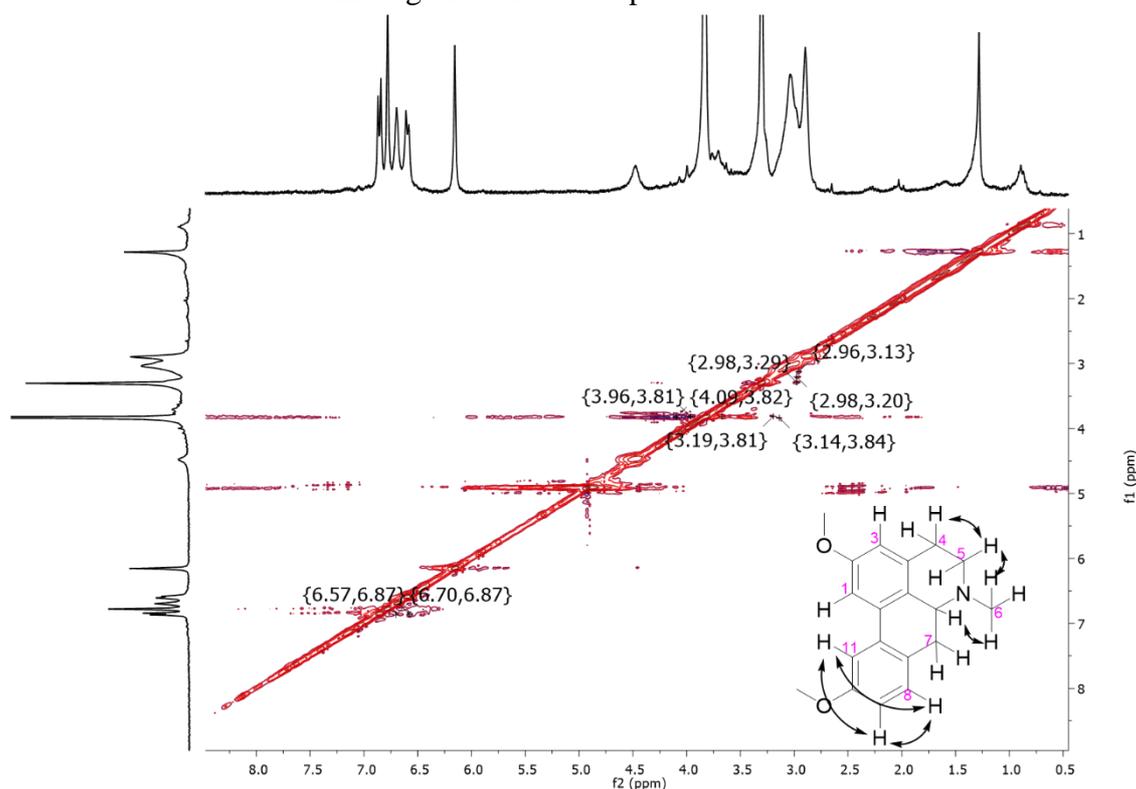
Figura 37- Correlações obtidas por HMBC e estrutura proposta.



Fonte: Da autora.

Ainda, outra técnica utilizada foi a NOESY 2-D 1H-RMN (Figura 38), um experimento baseado no efeito NOE, que permite observar as correlações entre os hidrogênios presentes na estrutura da molécula que estão próximos espacialmente, ou seja, a uma distância de até 5 Å (EDISON E SCHROEDER, 2010). Quanto mais próximo mais intenso os picos. Foram observadas algumas sutis diferenças nos valores de deslocamentos químicos e no formato dos sinais neste experimento, quando comparados aos espectros analisados anteriormente. Isso se deve ao uso de um solvente diferente, o metanol deuterado neste caso e clorofórmio deuterado em todos os demais espectros. No entanto, isso não comprometeu em nada a interpretação dos dados.

Figura 38 – Espectro de NOESY ^1H - ^1H do grupo G10, 300 MHz, MeOH- d_4 e correlação entre os hidrogênios indicados por setas.



Fonte: Da autora.

Assim, a partir do NOESY ^1H - ^1H , foram observadas as correlações entre o hidrogênio $\delta_{\text{H-9}}$ 6,58-6,61 (dubleto) com $\delta_{\text{H-8}}$ 6,84-6,87 (dubleto). O hidrogênio 8 também correlaciona com os hidrogênios 11 ($\delta_{\text{H-11}}$ 6,70). Os hidrogênios 1 e 3, ambos singletos com valores de deslocamento químico de 6,16 ppm e 6,78 ppm, não apresentaram correlações entre si (Figura 38).

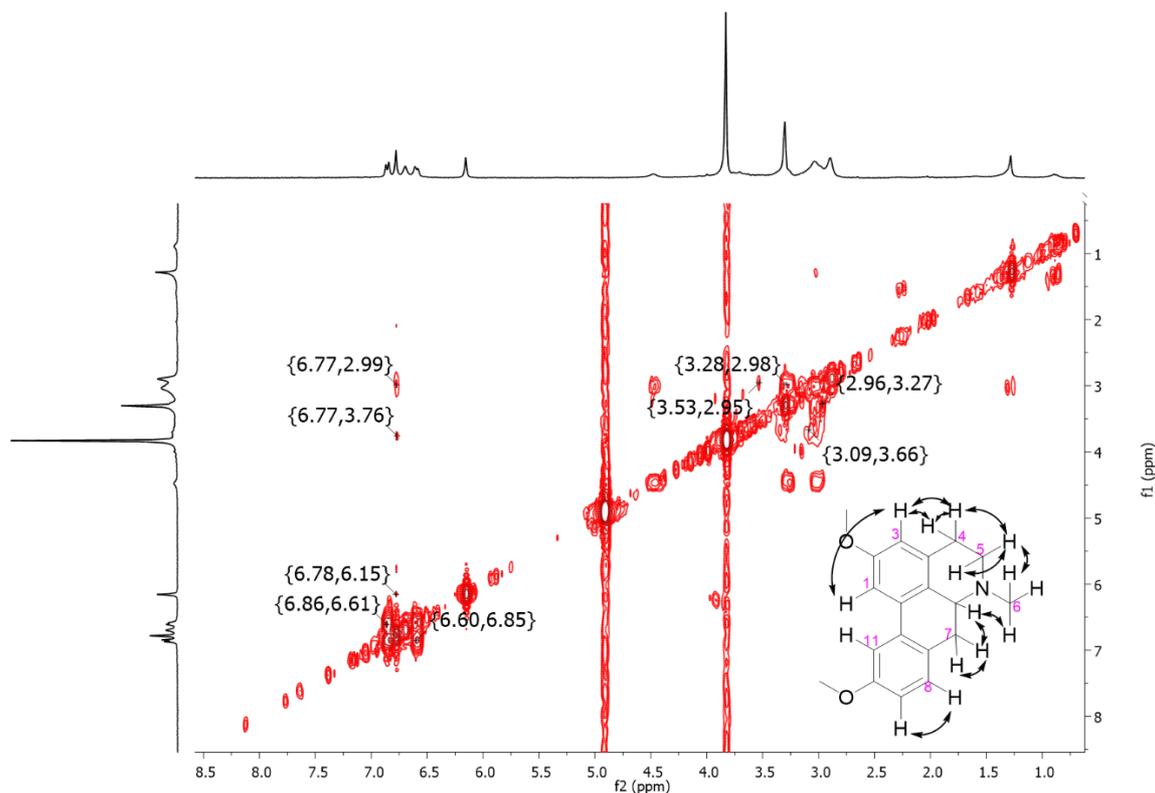
Outras correlações que são visíveis são referentes entre os hidrogênios que estão na faixa de deslocamento entre 2,85 ppm e 3,16 ppm, eles aparecem como um multipletto. Possivelmente as correlações observadas são entre os hidrogênios H-4 e H-5 e entre H-7 e H-6, também observou correlações entre o hidrogênio 5 com H-6. E entre os hidrogênios 6a e 6, conforme é observado na Figura 38.

Já a técnica COSY permite observar hidrogênios que estão a $^{2,3}J$, através do acoplamento geminal e vicinal. Os acoplamentos observados podem ser visualizados no espectro contido na Figura 39.

Foram observadas correlações entre $\delta_{\text{H-1}}$ 6,15 com $\delta_{\text{H-3}}$ 6,77. O hidrogênio com $\delta_{\text{H-3}}$ 6,77; por sua vez, correlaciona com o hidrogênio $\delta_{\text{H-4}}$ 2,99. Enquanto o hidrogênio 4 correlaciona com $\delta_{\text{H-5}}$ 3,27, esse por sua vez, tem um acoplamento geminal com $\delta_{\text{H-5}}$ 3,00. Outra

correlação observada nessa estrutura é o acoplamento vicinal entre os hidrogênios δ_{H-8} 6,87-6,84 e δ_{H-9} 6,58-6,61. Também é observado acoplamento entre o δ_{H-6a} 3,59-3,71 com δ_{H-6} 2,95 e δ_{H-7} 3,1.

Figura 39 – Espectro de COSY 1H - 1H do grupo G10, 300 MHz, MeOH-*d*4 e correlação entre os hidrogênios indicados por setas.

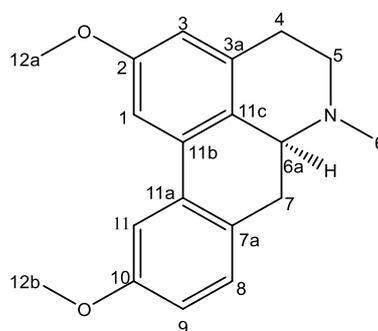


Fonte: Da autora.

A partir dos dados de RMN uni e bidimensional foi possível elucidar a estrutura do composto 2,10-dimetoxiaporfina (Figura 36) com massa $[M+H]^+$ 296,165054 (VIP 74 ou 76), $[\alpha]^{25}_D +76^\circ$ e fórmula molecular $C_{19}H_{22}NO_2$, onde foram observados os sinais de três metilas, três carbonos metilênicos, seis metinas e sete carbonos quaternários. É importante ressaltar que a maior parte de *Ocotea* spp. é relatada na literatura com a biossíntese de isômeros 6a S-(+) para alcaloides aporfínicos semelhantes, como coclaurina, reticulina e isoboldina (Silva *et al.*, 2021). Portanto, com base no resultado de rotação óptica específica ($[\alpha]^{25}_D +76^\circ$) e na biossíntese referente a ligação da dopamina e 4-hidroxifenil-acetaldeído pela reação de *Mannich*, que é bem conhecida por controlar a estereoquímica do produto norcoclaurina, um precursor dos esqueletos benziltetrahydroisoquinolínicos e aporfínicos (Dewick, 2009), bem como,

comparando-se com o resultado obtido por Kupchan *et al.* para essa a 2,10-dimetoxiaporfina, a configuração da posição 6a é S (Figura 40).

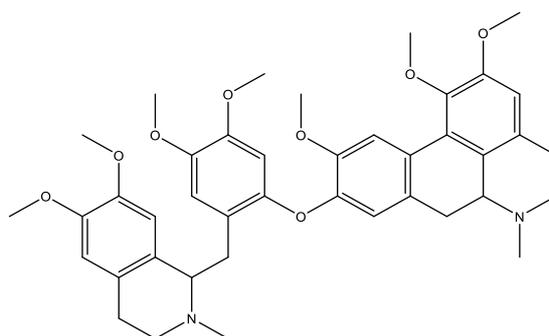
Figura 40 - Estrutura química da 2,10-dimetoxiaporfina.



Fonte: Da autora.

A substância identificada 2,10-dimetoxiaporfina já havia sido mencionada na literatura, tendo sido relatada sua obtenção por meio de síntese, como um óleo amarelo. Contudo, não existem relatos sobre seu isolamento diretamente da planta ou outra fonte biológica, apenas a sua síntese por meio da clivagem da molécula de talicarpina (Figura 41) com a utilização de sódio e amônia líquida (Marekov; Sidjimov, 1981; Kupchan *et al.*, 1978). Assim, a (+)-2,10-dimetoxiaporfina, um alcaloide aporfínico, pode ser considerada uma substância inédita isolada de produto natural.

Figura 41 – Representação da estrutura química da talicarpina.



Fonte: Da autora.

Assim, o isolamento desse novo alcaloide reforça a importância de estudos metabômicos e fitoquímicos, buscando o isolamento de novos compostos ou substâncias com potencial aplicação para estudos farmacológicos.

6 CONCLUSÕES

Através das abordagens metabolômicas, associadas aos ensaios *ex vivo* e às análises estatísticas, foi possível construir modelos de predição da atividade anti-inflamatória com domínio de aplicação para extratos de espécies da família Lauraceae. Também foi possível observar que a maioria das espécies estudadas nesse trabalho apresentou significativo potencial anti-inflamatório, superior a 50% de inibição, corroborando o potencial anti-inflamatório das espécies de Lauraceae descritas na literatura. Vale ressaltar que, de um total de 18 espécies, apenas três apresentaram porcentagem de inibição da produção de PGE₂ inferior a 50%, no modelo experimental *ex vivo* utilizado. O modelo de predição PLS adquiriu valores satisfatórios de R² em 0,99 e Q² em 0,92. Além disso, os modelos de aprendizado de máquina ANN e SGD corroboraram o modelo PLS. Alcaloides do tipo aporfínicos e benzilisoquinolínicos puderam ser anotados pelos níveis 0, 2 e 3 de confiança e mostraram-se importantes marcadores anti-inflamatórios. Alguns desses metabólitos já demonstraram potencial anti-inflamatório descrito na literatura, corroborando esses resultados. Além disso, pela primeira vez, muitos extratos de Lauraceae mostraram ser anti-inflamatórios e foram aplicados para construir um modelo de predição da atividade anti-inflamatória, usando variáveis Y numéricas (inibição percentual) ou categóricas (ativo/inativo) com ajuste e poder preditivo adequados. Portanto, esses modelos de predição podem ser úteis para prever novos extratos ativos e estudar seus principais compostos ativos.

O trabalho também permitiu o isolamento de um novo alcaloide, através da obtenção da fração alcaloídica da espécie *Ocotea odorifera*. Assim, foi possível isolar uma substância ainda não descrita em plantas, a (+)-2,10-dimetoxiaporfina, um alcaloide aporfínico, identificado a partir das técnicas de RMN uni e bidimensionais. Outros alcaloides já isolados de *O. odorifera* e outras espécies de *Ocotea*, já apresentaram potencial anti-inflamatório comprovado em ensaio *in vivo* e *ex vivo*, sendo que este biomarcador de atividade anti-inflamatória apontado nas análises estatísticas (ID 74 ou 76), possivelmente trata-se de um novo candidato para futuros estudos farmacológicos e biológicos.

REFERÊNCIAS

- ALKHALAF, M. I. *et al.* Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 1358–1362, 2019.
- AMANTE, E. *et al.* Untargeted metabolomic profile for the detection of prostate carcinoma-preliminary results from PARAFAC2 and PLS-DA Models. **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 1–11, 2019.
- ANTONIO, Ananda S., VEIGA-JUNIOR, Valdir F., WIEDEMANN, Larissa Silveira Moreira. *Ocotea* complex: A metabolomic analysis of a Lauraceae genus. **Phytochemistry**, v. 173, p. 112314, 2020.
- BALDIM, J. L. *et al.* The Correlation between Chemical Structures and Antioxidant, Prooxidant, and Antitrypanosomatid Properties of Flavonoids. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- BARBOSA, H. *et al.* Interaction of dicentrinone, an antitrypanosomal aporphine alkaloid isolated from *Ocotea puberula* (Lauraceae), in cell membrane models at the air-water interface. **Bioorganic Chemistry**, v. 101, p. 103978, 2020.
- BOTSARIS, A. S. *et al.* Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: The archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, 2007.
- CAESAR, L. K. *et al.* Opportunities and Limitations for Untargeted Mass Spectrometry Metabolomics to Identify Biologically Active Constituents in Complex Natural Product Mixtures. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 3, p. 469–484, 2019.
- CARNEIRO *et al.* In vitro Anticholinesterase and Neurotoxicity Activities of *Ocotea aciphylla* Fractions Monique. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 62, p. 179–188, 2017.
- CHAGAS-PAULA, D. A. *et al.* Prediction of anti-inflammatory plants and discovery of their biomarkers by machine learning algorithms and metabolomic studies. **Planta Medica**, v. 81, n. 6, p. 450–458, 2015.
- CHAGAS-PAULA, D. A. *et al.* A metabolomic approach to target compounds from the Asteraceae family for dual COX and LOX inhibition. **Metabolites**, v. 5, n. 3, p. 404–430, 2015.
- CHEN, D. Q. *et al.* Metabolomic application in toxicity evaluation and toxicological biomarker identification of natural product. **Chemico-Biological Interactions**, v. 252, p. 114–130, 2016.
- CHEN, H. *et al.* Classification and quantitation of milk powder by near-infrared spectroscopy and mutual information-based variable selection and partial least squares. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 189, p. 183–189, 2018.

CHESTER, K. *et al.* In vitro Anticholinesterase and Neurotoxicity Activities of *Ocotea aciphylla* Fractions Monique. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 62, p. 179–188, 2017.

CHOU, D. J. *et al.* Alkaloids of *Linderae Radix* suppressed the lipopolysaccharide-induced expression of cytokines in cultured macrophage RAW 264.7 cells. **Humanitas Medicine**, v. 4, n. 4, p. 28.1-28.27, 2014.

CONCEIÇÃO, R. S. *et al.* In vitro acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 275–282, 2017.

CONSERVA, G. A. A. *et al.* Butenolides from *Nectandra oppositifolia* (Lauraceae) displayed anti-*Trypanosoma cruzi* activity via deregulation of mitochondria. **Phytomedicine**, v. 54, p. 302–307, 2019.

COSMO, S. A. *et al.* Gastroprotective effect of hydroalcoholic extract from barks of *Persea major* Kopp (Lauraceae) in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 533–537, 2007.

CROTTI, M. A. E. *et al.* Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

CREEK, D. J. *et al.* Metabolite identification: are you sure? And how do your peers gauge your confidence? **Metabolomics**, v. 10, n. 3, p. 350–353, 2014.

CUSTÓDIO, D. L.; FLORÊNCIO DA VEIGA JUNIOR, V. Custódio, Dayana Lacerda Florêncio da Veiga Junior, Valdir Lauraceae alkaloids. **RSC Adv.**, v. 4, n. 42, p. 21864–21890, 2014.

DAMASCENO, C. S. B. *et al.* Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils in the Family Lauraceae: A Systematic Review of the Literature. **Planta Medica**, v. 85, n. 13, p. 1054–1072, 2019.

DEMARQUE, D. P. *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

DE ALCÂNTARA, B. G. V. *et al.* Confirmation of ethnopharmacological anti-inflammatory properties of *Ocotea odorifera* and determination of its main active compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, n. 113378, 2021.

DE LUCIA, Frank C. E GOTTFRIED, Jennifer L. Influence of variable selection on partial least squares discriminant analysis models for explosive residue classification. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 2, p. 122–128, 2011.

DEWICK, PAUL. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd ed. **John Wiley & Sons, Ltd.**, 2009.

DOMINGOS, O. D. S. *et al.* Anti-inflammatory derivatives with dual mechanism of action from the metabolomic screening of *Poincionella pluvirosa*. **Molecules**, v. 24, n. 23, 2019.

ERIKSSON, Lennart Trygg e JOHAN, Wold Svante. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS[®] models. **Journal of Chemometrics**, v. 22, n. 11–12, p. 594–600, 2008.

FEDALTO, M. L. *et al.* Neuroprotection of *Persea major* extract against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices involves increased glutamate uptake and modulation of A1 and A2A adenosine receptors. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 789–795, 2013.

FERRINI, L. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Nectandra angustifolia* (Laurel Amarillo) ethanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 272, p. 113937, 2021.

GHOSH, T. *et al.* Predictive Modeling for Metabolomics Data. **Methods in Molecular Biology**, v. 2104, p. 313–336, 2020.

GONTIJO, D. C. *et al.* Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves, **Food Chemistry**, v.230, p. 618–626, 2017.

GRETEN, Florian R. e GRIVENNIKOV, Sergeii. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity**, v. 51, n. 1, p. 27–41, 2019.

GOLBRAIKH, Alexander e TROPSHA, Alexander. Beware of Q²! **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 20, p. 269–276, 2002.

GROMSKI, P. S. *et al.* A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, v. 879, p. 10–23, 2015.

HOO, Zhe Hui; CANDLISH, Jane; DAWN Teare. What is an ROC curve? **Emergency Medicine Journal**, v. 34, n. 6, p. 357–359, 2017.

HUBERT, Jane; NUZILLARD, Jean Marc, RENAULT, Jean Hugues. 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.

KATCHBORIAN-NETO, A. *et al.* Bioprospecting-based untargeted metabolomics identifies alkaloids as potential anti-inflammatory bioactive markers of *Ocotea* species (Lauraceae). **Phytomedicine**, v. 120, n. August, 2023.

KAUR, Gaganpreet e SILAKARI, Om. Multiple target-centric strategy to tame inflammation. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 12, p. 1361–1376, 2017.

KOUZNETSOVA, V. L. *et al.* Recognition of early and late stages of bladder cancer using metabolites and machine learning. **Metabolomics**, v. 15, n. 7, p. 1–15, 2019.

- KUPCHAN, S. M. *et al.* Proaporphine-aporphine dimers and bisaporphine derived from the tumor-inhibitory alkaloid thalicarpine. **The Journal of Organic Chemistry**, v.43, 105-108 (1978).
- LI, C. *et al.* Correlation of LOX-5 and COX-2 expression with inflammatory pathology and clinical features of adenomyosis. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 1, p. 727–733, 2019.
- LIU, C. P. *et al.* Inhibition of (S)-armepavine from *Nelumbo nucifera* on autoimmune disease of MRL/MpJ-lpr/lpr mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 531, n. 1–3, p. 270–279, 2006.
- LIU, Xiaojing e LOCASALE, Jason W. Metabolomics: A Primer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 4, p. 274–284, 2017.
- MADSEN, Rasmus; LUNDSTEDT, Torbjörn; TRYGG, Johan. Chemometrics in metabolomics - A review in human disease diagnosis. **Analytica Chimica Acta** v. 659, p. 23–33, 2010.
- MAHADEVAN, S. *et al.* Analysis of Metabolomic Data Using Support Vector Machines. **Anal Chem**, v. 80, n. 19, p. 7562–7570, 2008.
- MARINA, A. P. *et al.* In vitro antiviral activity of Brazilian Cerrado plant extracts against animal and human herpes viruses. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 10, p. 106–115, 2018.
- MAREKOV, N. L e SIDJIMOV, A. K. Biosynthesis of aporphine - benzyloisoquinoline alkaloids. I. Reticuline as a precursor of thalicarpine in *Thalictrum minus*. **Tetrahedron Letters**, v. 22, 2.311-2.312, 1981.
- MARTINS, E. M. *et al.* Development and characterization of microsatellite loci for *Ocotea* species (Lauraceae) threatened with extinction. v. 13, n. 3, p. 5138–5142, 2014.
- MEDZHITOV, Ruslan. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.
- MEIRER, Karin; STEINHILBER, Dieter; PROSCHAK, Ewgenij. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: Interfering with multiple pathways. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 83–91, 2014.
- MENGARDA, A. C. *et al.* Licarin A, a neolignan isolated from *Nectandra oppositifolia* Nees & Mart. (Lauraceae), exhibited moderate preclinical efficacy against *Schistosoma mansoni* infection. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 9, p. 5154–5162, 2021.
- MENG, Hu; LIU, Ying; LUHUA, Lai. Diverse Ways of Perturbing the Human Arachidonic Acid Metabolic Network to Control Inflammation. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 8, p. 2242–2250, 2015.

- MONTRUCCHIO, D. P. *et al.* Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Medica**, v. 78, n. 14, p. 1543–1548, 2012.
- MORENO, P. R. H. *et al.* Chemical constituents and antitumour activity of *Nectandra grandiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 31, n. 3, p. 189–192, 1993.
- MOSSI, A. J. *et al.* Essential oil of *Ocotea odorifera*: An alternative against *Sitophilus zeamais*. v. 29, n. 2, 2013.
- NICÁCIO, K. DE J. *et al.* Anti-Inflammatory Markers of Hops Cultivars (*Humulus lupulus* L.) Evaluated by Untargeted Metabolomics Strategy. **Chemistry and Biodiversity**, v. 19, n. 4, 2022.
- NIELSEN, K. F. *et al.* Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 11, p. 2338–2348, 2011.
- NEWTON, Robert. Anti-inflammatory glucocorticoids: Changing concepts. **European Journal of Pharmacology**, v. 724, n. 1, p. 231–236, 2014.
- NUNES, F. O. *et al.* Antitrypanosomal butanolides from *Aiouea trinervis*. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 323–333, 2020.
- OLIVEIRA, T. B. *et al.* Study of chromatographic retention of natural terpenoids by chemoinformatic tools. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 1, p. 26–38, 2015.
- OLTRAMARI, A. C. *et al.* Safrole analysis by GC-MS of prototrophic (*Ocotea odorifera* Vell. Rohwer) cell cultures. p. 231–235, 2004.
- PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxigenase/cyclooxygenase inhibition: Is two better than One? **Journal of Rheumatology**, v. 28, n. 11, p. 2375–2382, 2001.
- PEISINO, M. C. O. *et al.* Health-Promoting Properties of Brazilian Unconventional Food Plants. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 9, p. 4691–4700, 2020.
- RHEN, Turk. e CIDLOWSKI, John A. Anti-inflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 2005.
- RIBEIRO, A. B. *et al.* A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3 B, p. 526–530, 2005.
- ROSA, W. *et al.* In vivo anti-inflammatory activity of Fabaceae species extracts screened by a new ex vivo assay using human whole blood. **Phytochemical Analysis**, p. 1–25, July 2021.

SALLEH, Wan. MOHD Nuzul Hakimi e AHMAD, Farediah. Phytochemistry and biological activities of the genus *Ocotea* (Lauraceae): A review on recent research results (2000-2016). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 5, p. 204–218, 2017.

SANTA ROSA, S. S. *et al.* In vitro anthelmintic and cytotoxic activities of extracts of *Persea willdenovii* Kosterm (Lauraceae). **Journal of Helminthology**, v. 92, n. 6, p. 674–680, 2018.

SANTOS, M. F. C. *et al.* New bicyclic [3.2.1] octane neolignans derivatives from *Aniba firmula* with potent in vivo anti-inflammatory activity on account of dual inhibition of PGE₂ production and cell recruitment. **Phytochemistry Letters**, v. 30, p. 31–37, Jan. 2019.

SILVA, A. F. *et al.* Chemistry of leaves, bark, and essential oils from *Ocotea diospyrifolia* and anti-inflammatory activity – Dual inhibition of edema and neutrophil recruitment. **Phytochemistry Letters**, v. 42, n. July 2020, p. 52–60, 2021.

SILVA, A. F. G. *et al.* Antioxidant activity and quantification of phenols, flavonoids and total tannins of *Cinnamomum triplinerve* (Lauraceae). **Ciência e Natura**, v. 41, p. e34, 2019.

SILVA TELES, M. M. R. *et al.* Alkaloids of the Lauraceae. **Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 82, p. 147–304, 2019.

SLAVICH, George. M. Understanding inflammation, its regulation, and relevance for health: A top scientific and public priority. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 45, p. 13–14, 2015.

SOUZA, R. A. C. *et al.* Dehydrodieugenol B and hexane extract from *Endlicheria paniculata* regulate inflammation, angiogenesis, and collagen deposition induced by a murine sponge model. **Fitoterapia**, v. 147, p. 104767, 2020.

SPICER, R. *et al.* Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. **Metabolomics**, v. 13, n. 9, p. 1–16, 2017.

TAWFIK, N. F. *et al.* Metabolomics and Dereplication Study of the Endophytic Fungus *Aspergillus chevalieri* in Search of Bioactive Natural Compounds. **Journal of Advanced Pharmacy Research**, v. 0547, n. 2, p. 100–109, 2017.

TIAN, X. *et al.* Towards enhanced metabolomic data analysis of mass spectrometry image: Multivariate Curve Resolution and Machine Learning. **Analytica Chimica Acta**, v. 1037, p. 211–219, 2018.

VETAL, S. *et al.* Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of type-A procyanidine polyphenols from bark of *Cinnamomum zeylanicum* in rats. **Food Science and Human Wellness**, v. 2, n. 2, p. 59–67, 2013.

WANG, J. *et al.* Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Cinnamomum* (Lauraceae): A review. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104675, 2020.

WANG, X. J. *et al.* Novel applications of mass spectrometry-based metabolomics in herbal medicines and its active ingredients: Current evidence. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 38, n. 4–5, p. 380–402, 2019.

WITTEN, Ian. H.; FRANK, Eibe; HALL, Mark. A. Ian H. **Data mining: practical machine learning tools and techniques**. 3rd ed., Burlington, USA; Elsevier, 2011.

WOLFENDER, J. L. *et al.* Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136–164, 2015.

WORDS, KEY. Antifungal activity of *Ocotea odorifera* (Vell.) Rowher, *Ocotea puberula* (Rich.) Nees and *Cinnamodendron dinisii* Schwanke essential oils. **BioRxiv**, p. 25–29, 2019.

XIAO, S. *et al.* The anti-inflammatory potential of *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl essential oil in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, p. 113516, 2021.

YI, L. *et al.* Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 914, p. 17–34, 2016.

ZHANG, H. *et al.* Deep learning for sea cucumber detection using stochastic gradient descent algorithm. **European Journal of Remote Sensing**, v. 53, n. sup1, p. 53–62, 2020.

APÊNDICE A - Parâmetros utilizados no *software* Mzmine

Import – Importa os dados das análises no *software* Xcalibur (*.raw), porém previamente separados em dados de detecção no modo negativo e positivo e transformados no formato *.mzXML pelo *software* MSFileReader (Thermo Fisher Scientific). Importa os dados de cada modo de detecção separadamente.

Detecção de massa: algoritmo de massa exata (nível de ruído: 2.0E6);

Intervalo de tempo mínimo em min, 0,1; Altura mínima, 2,0E6; tolerância m/z , 0,001 m/z ou 5,0 ppm; altura do pico, 2,0E6; duração do pico, 0,1 a 1,0;

Linha de base: 2,0E6; deisótopo, tolerância m/z : 0,001 m/z ou 3 ppm; tolerância ao tempo de retenção em min, 0,1; carga máxima, 1;

Isótopo representativo: mais intenso;

Filtragem: (tempo de retenção: 1,5 a 28; faixa de duração de pico: 0,1 a 1);

Alinhamento *Join Aligner*: (tolerância m/z , 0,001 m/z ou 3 ppm; peso para m/z , 15; tolerância ao tempo de retenção, 0,5 absoluto; peso para tempo de retenção, 15);

Gap filling: (tolerância m/z , 0,001 m/z ou 5 ppm; tolerância de intensidade, 10%; m/z , 0,001 a 3).

APÊNDICE B - Parâmetros utilizados para seleção de atributos – *software Weka 3.9.5*

Open file: Abre os dados exportados do *software* MZmine.

Dados no formato .csv contendo a informação das classes de atividade anti-inflamatória (seleção supervisionada).

Para normalizar os dados: *Choose – Filters – Unsupervised – Attribute – Normalize -- Apply*
Para seleção de atributos: *Select Attributes:*

Attribute evaluator= CfsSubsetEval – Attribute Evaluator -- Choose – Attribute Selection – CfsSubsetEval (ANN).

Abaixo vai em: *Search Method – Choose – Best First*

Search Method= GeneticSearch

PopulationSize= Z= 50

MaxGenerations= G= 100

CrossoverProb= C= 0.6

MutationProb= M= 0.033

ReportFrequency= R= 20

Seed= S= 1

APÊNDICE C – Avaliação da normalidade dos dados da atividade anti-inflamatória

Tabela 11 - Parâmetros numéricos para avaliação da distribuição dos dados do grupo G1 obtidos a partir de dados biológicos.

Teste <i>Shapiro-Wilk</i>	NEG	DEX	IND	OD	OB	OP	CG	OPB	OA	PM	NM	OO	ODI
W	0,9231	0,9119	0,9868	0,8433	0,8191	0,8818	0,9156	0,9711	0,8322	0,9197	0,982	0,8639	0,9179
valor <i>p</i>	0,4633	0,4243	0,7804	0,2227	0,161	0,3296	0,4371	0,6738	0,1939	0,4513	0,7429	0,2783	0,4451
Passed normality test (alpha=0,05)?	Yes												
<i>p</i> value summary	ns												
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Fonte: Da autora.

Tabela 12 - Parâmetros numéricos para avaliação da distribuição dos dados do grupo G2 obtidos a partir de dados biológicos.

Teste <i>Shapiro-Wilk</i>	NEG	DEX	IND	EPL	AF	EPB	NO	OCL	AS	CT
W	0,9231	0,9119	0,9868	0,9067	0,8929	0,8315	0,9949	0,8451	0,8677	0,9157
valor <i>p</i>	0,4633	0,4243	0,7804	0,4072	0,3631	0,192	0,8633	0,2275	0,2889	0,4375
Passed normality test (alpha=0,05)?	Yes									
<i>p</i> value summary	ns									
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

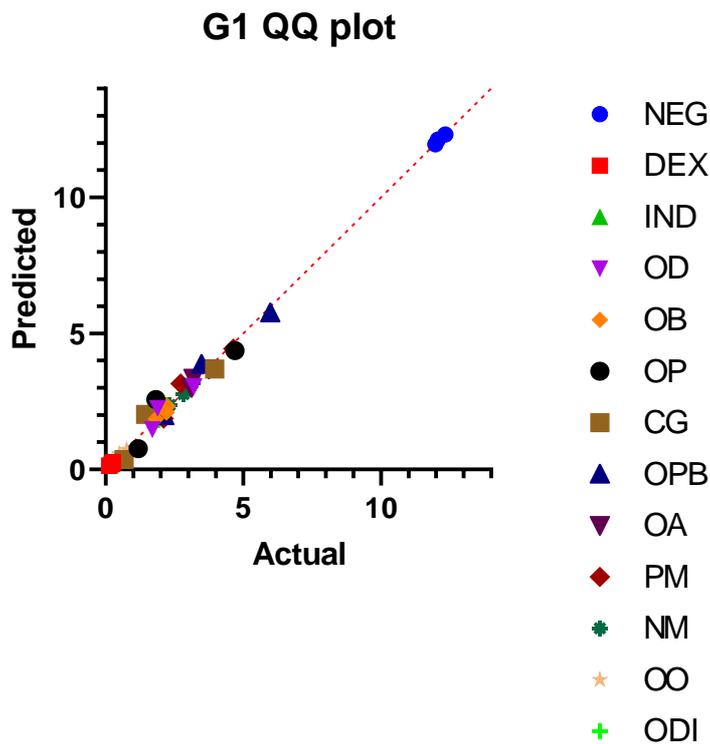
Fonte: Da autora.

Tabela 13 - Parâmetros numéricos para avaliação da distribuição dos dados do grupo G3 obtidos a partir de dados biológicos.

Teste <i>Shapiro-Wilk</i>	NEG	DEX	IND	NG	OCB	PW
W	0,9231	0,9119	0,9868	0,8242	0,9921	1,000
valor <i>p</i>	0,4633	0,4243	0,7804	0,1736	0,8302	>0,99
Passed normality test (alpha=0,05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>p</i> value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3	3

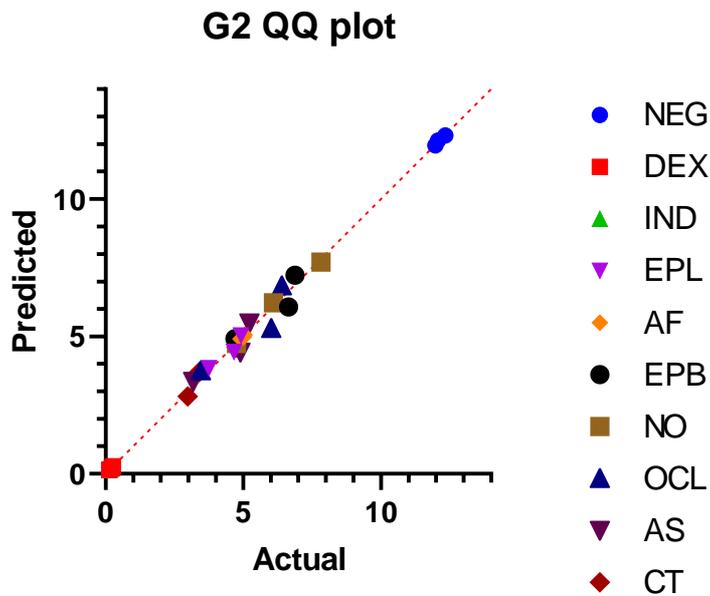
Fonte: Da autora.

Figura 42 - Distribuição normal do gráfico Q-Q dos dados de atividade biológica do grupo G1.



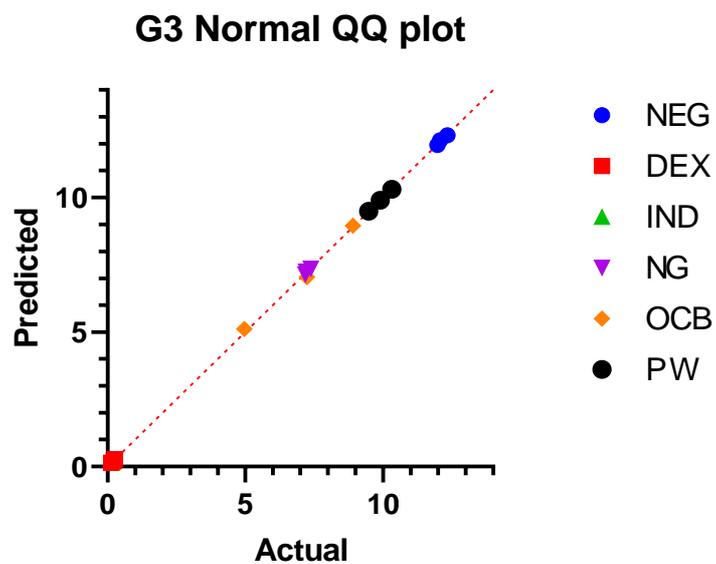
Fonte: Da autora.

Figura 43 - Distribuição normal do gráfico Q-Q dos dados de atividade biológica do grupo G2.



Fonte: Da autora.

Figura 44 - Distribuição normal do gráfico Q-Q dos dados de atividade biológica do grupo G3.



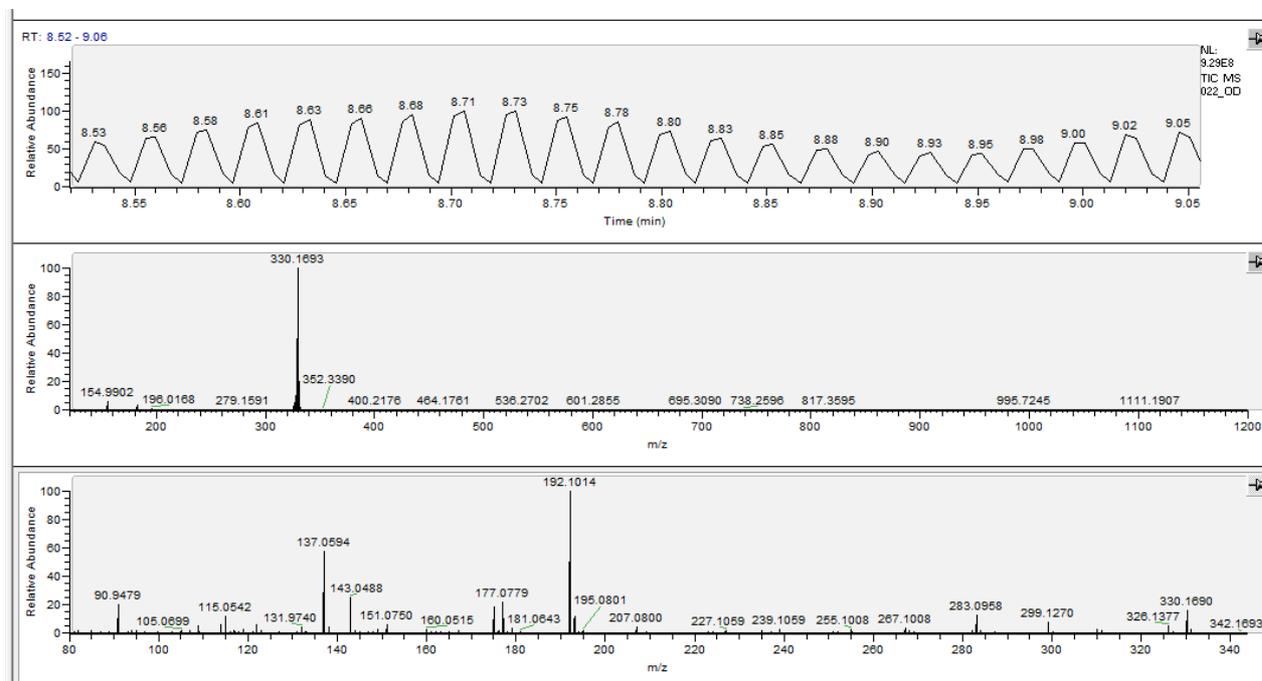
Fonte: Da autora.

APÊNDICE D – Desrepliação no *software* Xcalibur

- Software Xcalibur: *Qual Browser – open file*
- *Toggle info bar – Elemental composition*
- *Charge*: -1 para o modo negativo e +1 para o modo positivo.
- *Nitrogen-Rule*: Considerar regras para número par de elétrons => Even-electron íons, sendo íon de m/z ímpar => número par de N ou zero; íon de m/z par => número ímpar de N.
- RDB (*Double bond/ring equivalents*): RDB fracionário, para os dados gerados por ESI como fonte de ionização).
- *Mass tolerance*: 3.00 ppm (erro).
- Abundância relativa do isótopo $M^{+1} / 1,123$.
- Para verificar se na fórmula molecular há a presença dos átomos bromo, cloro ou enxofre, a proporção entre a m/z e o isótopo M^{+2} deve ser a seguinte:
 - 1 : 1 => Br
 - 3 : 1 => Cl
 - 1 : 0.05 => S

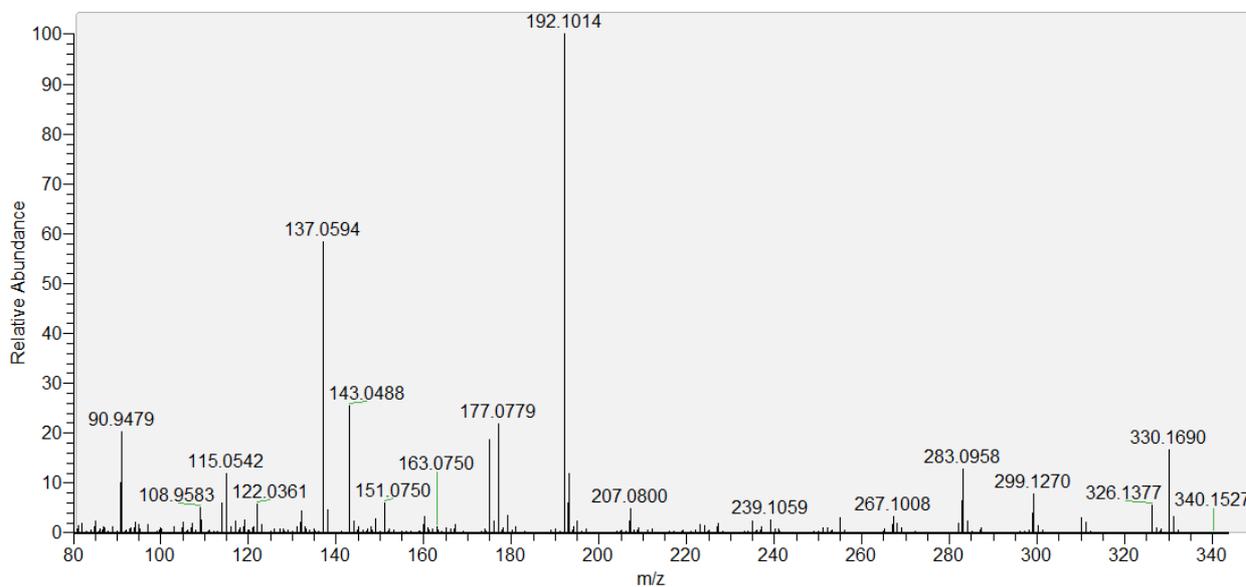
APÊNDICE E – Cromatograma e espectros de massas obtidos por UPLC-HRMS

Figura 45 – Cromatograma e espectros de massas do ID 25, m/z 330,1698, TR 8,91.



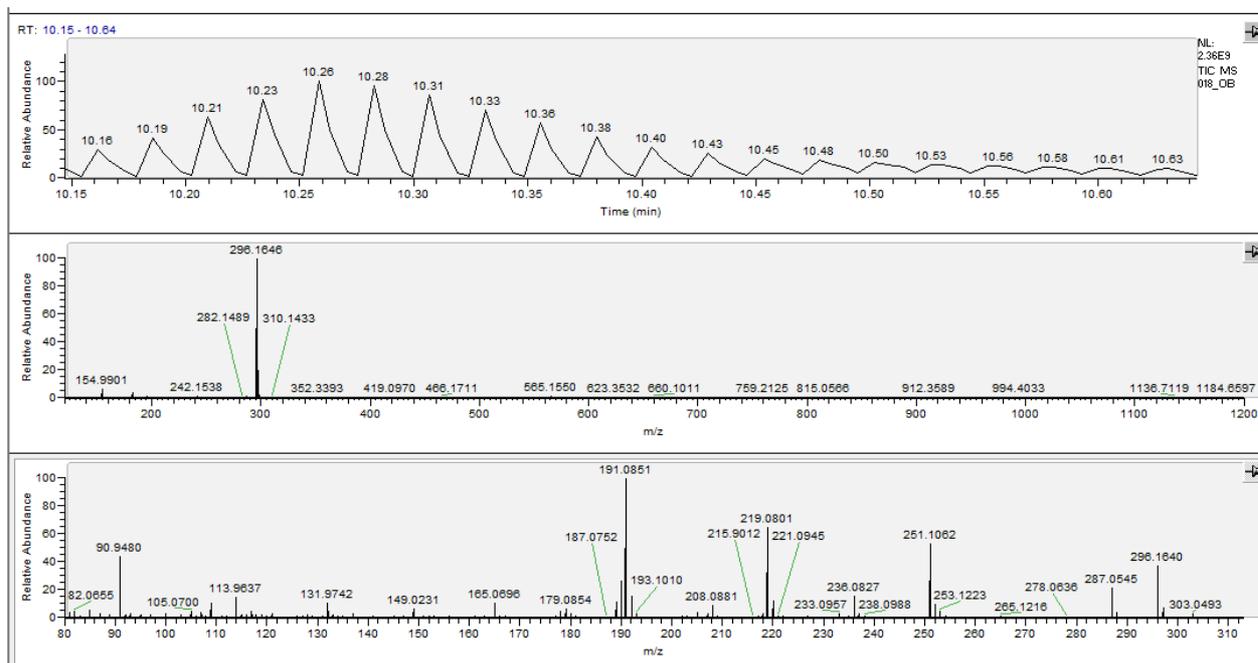
Fonte: Da autora.

Figura 46 – Espectro de massas do ID 25, m/z 330,1698, TR 8,91.



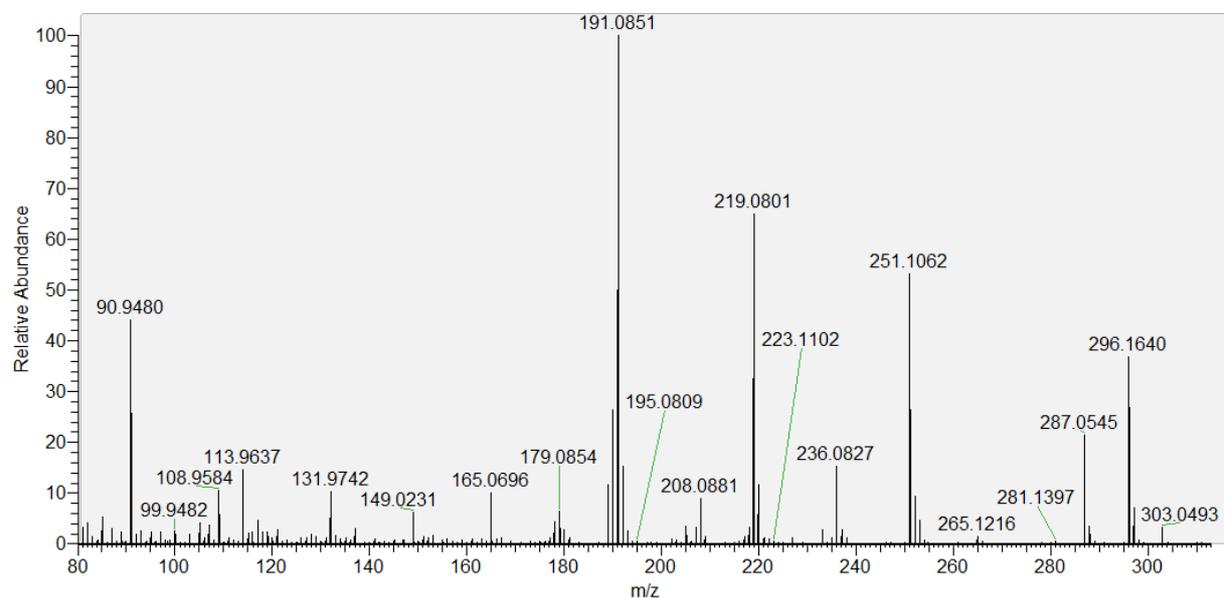
Fonte: Da autora.

Figura 47 – Cromatograma e espectros de massas do ID 74, m/z 296,1646, TR 10,43.

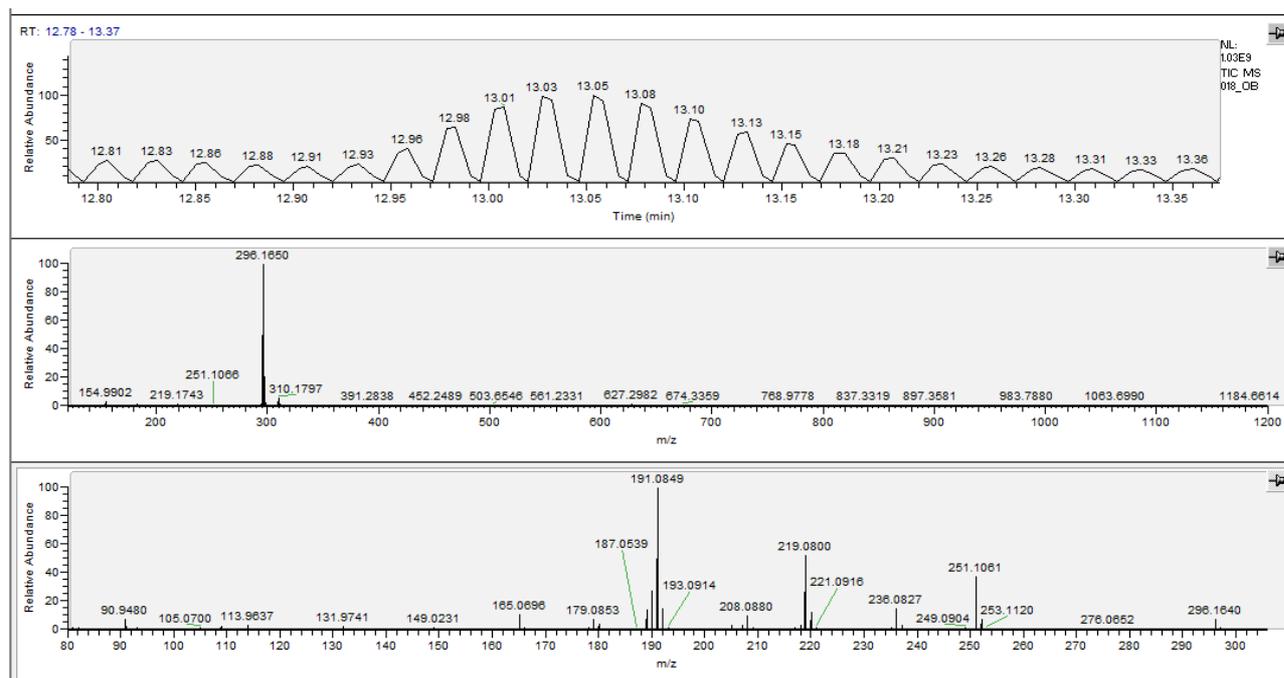


Fonte: Da autora.

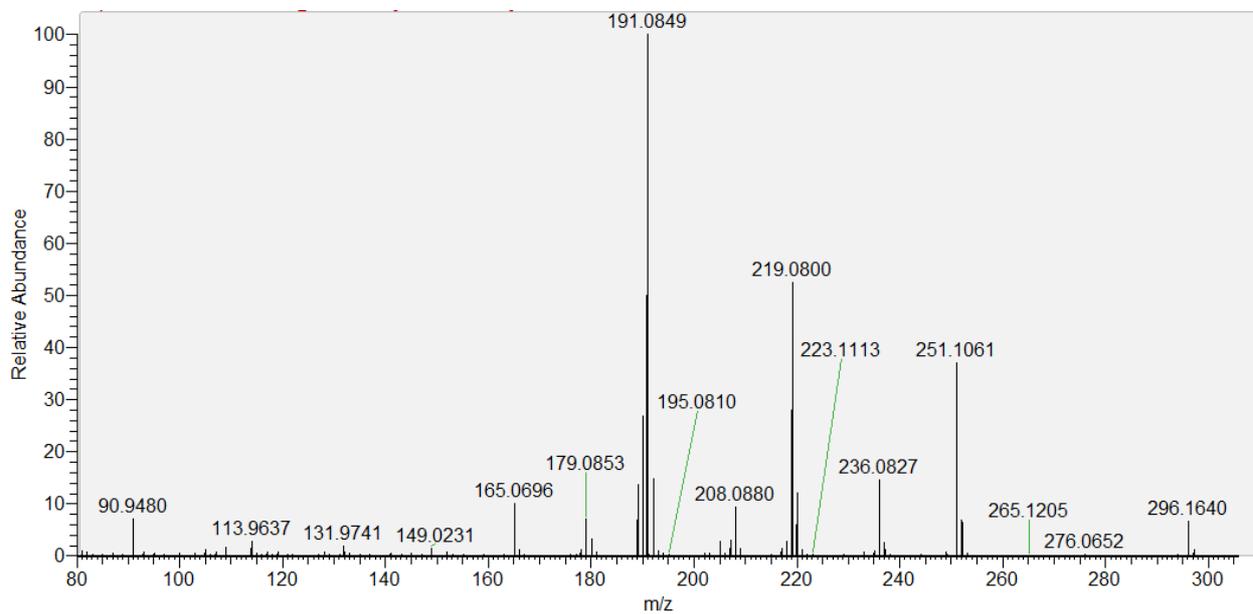
Figura 48 – Cromatograma e espectro de massas do ID 74, m/z 296,1646, TR 10,43.



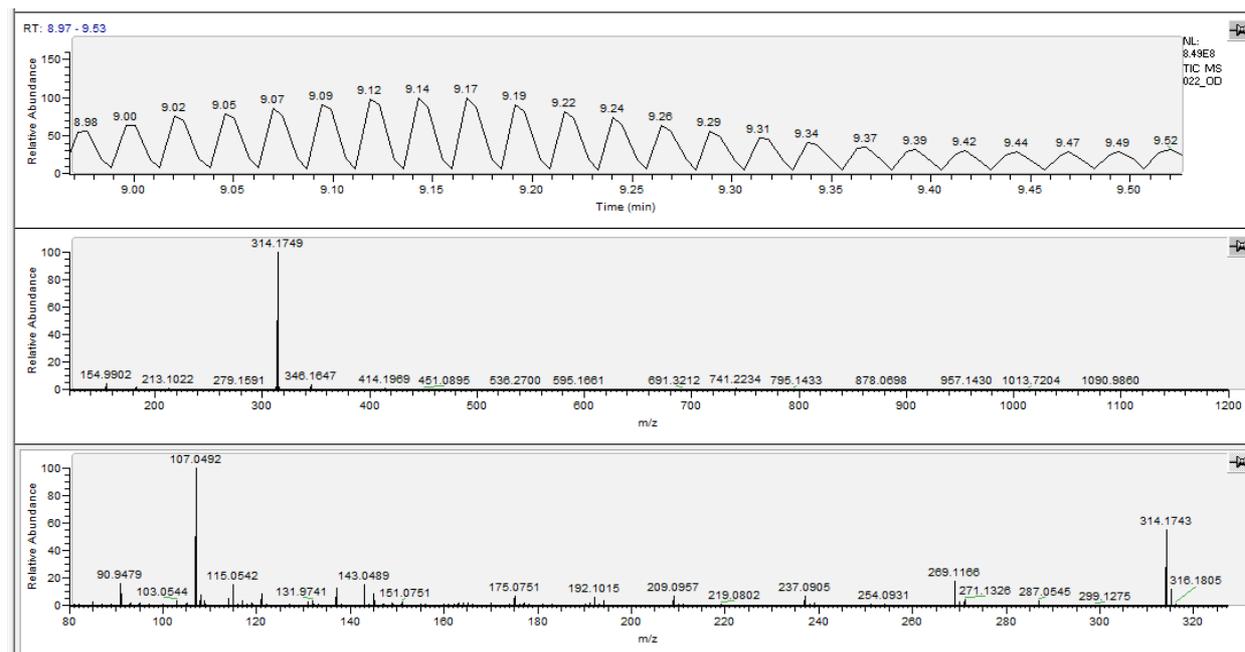
Fonte: Da autora.

Figura 49 – Cromatograma e espectros de massas do ID 76, m/z 296,1646, TR 13,07.

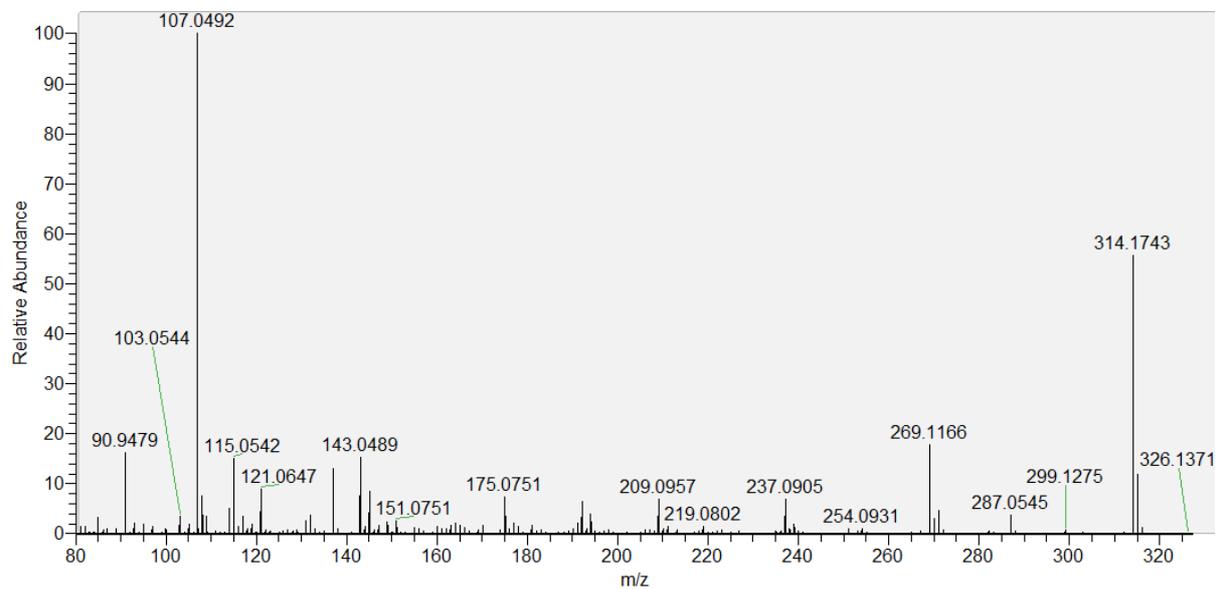
Fonte: Da autora.

Figura 50 – Espectro de massas do ID 76, m/z 296,1646, TR 13,07.

Fonte: Da autora.

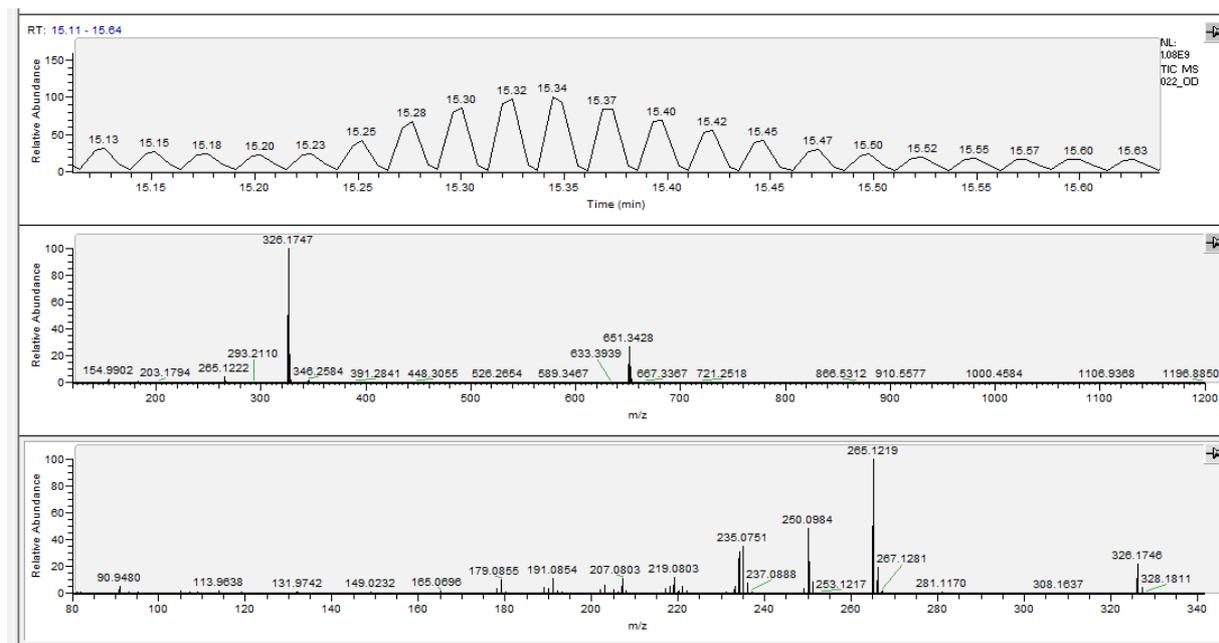
Figura 51 – Cromatograma e espectros de massas do ID 82, m/z 314,1748, TR 9,13.

Fonte: Da autora.

Figura 52 – Espectro de massas do ID 82, m/z 314,1748, TR 9,13.

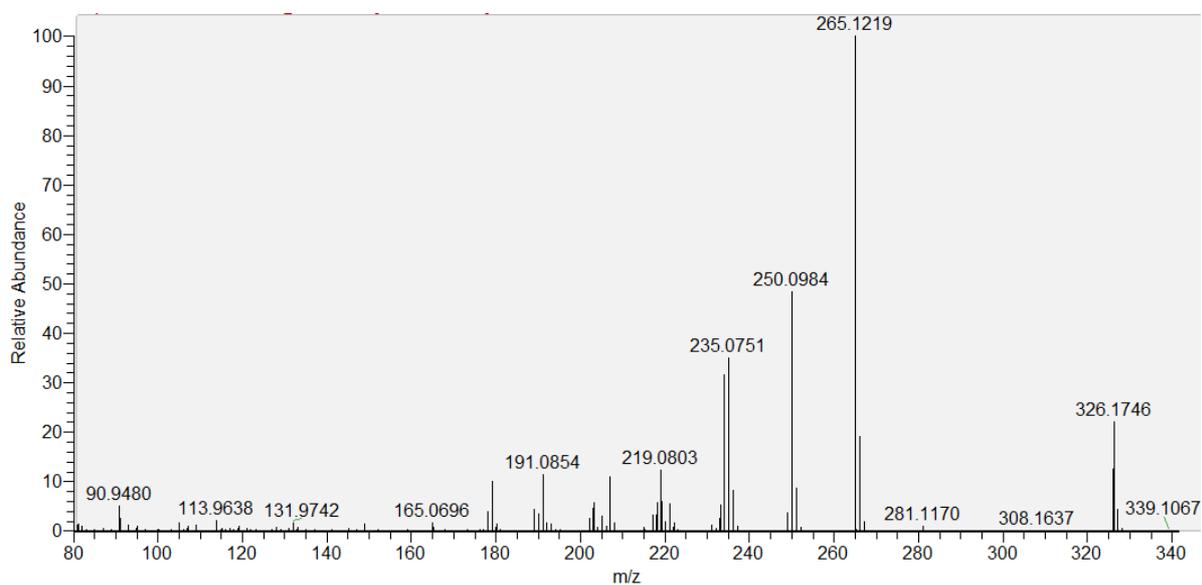
Fonte: Da autora.

Figura 53 – Cromatograma e espectros de massas do ID 88, m/z 326,1749, TR 15,34.



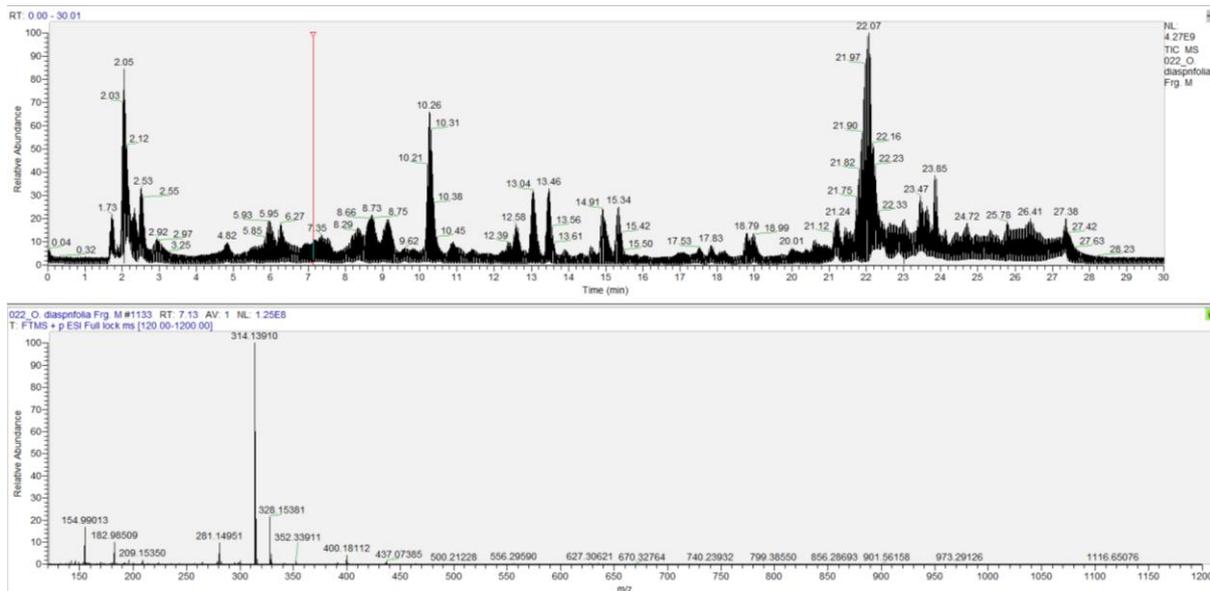
Fonte: Da autora.

Figura 54 – Espectro de massas do ID 88, m/z 326,1749, TR 15,34.



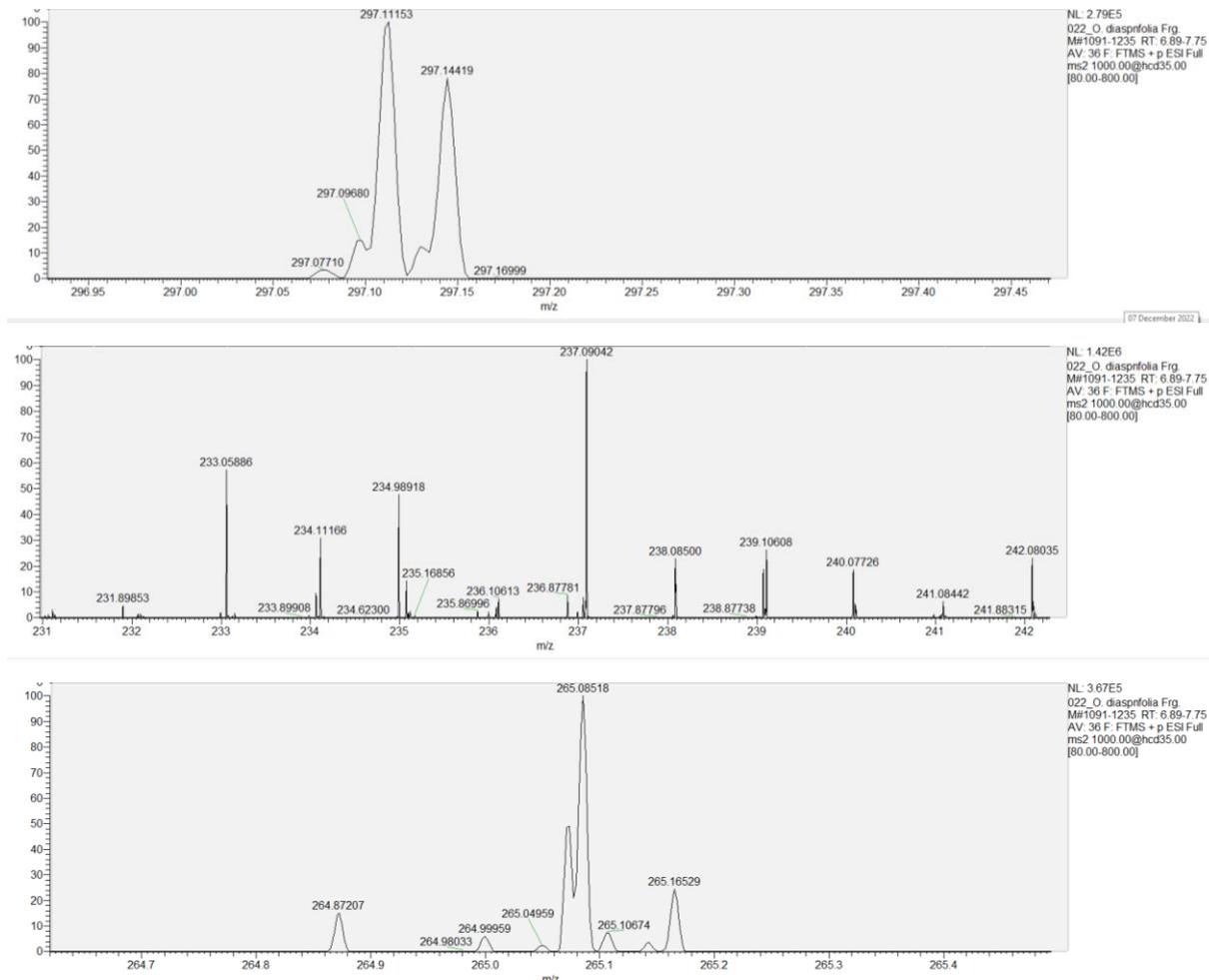
Fonte: Da autora.

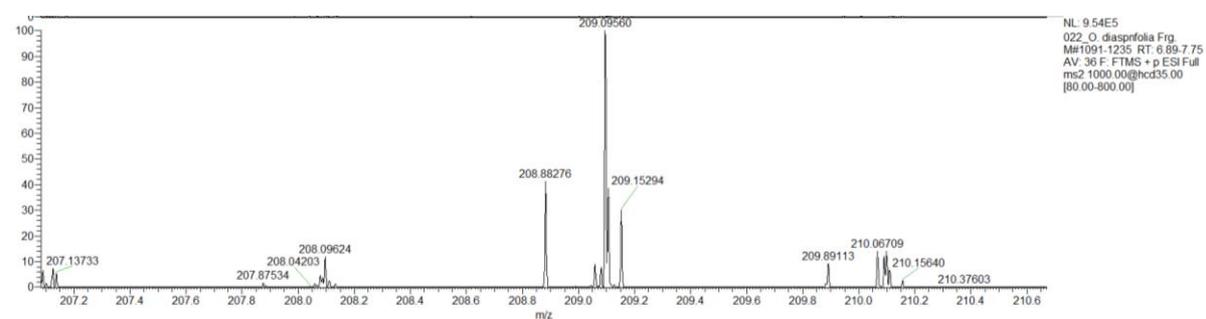
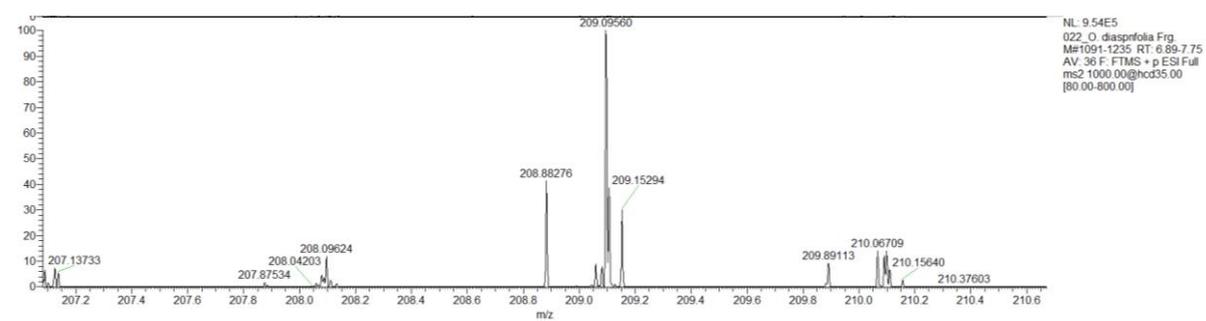
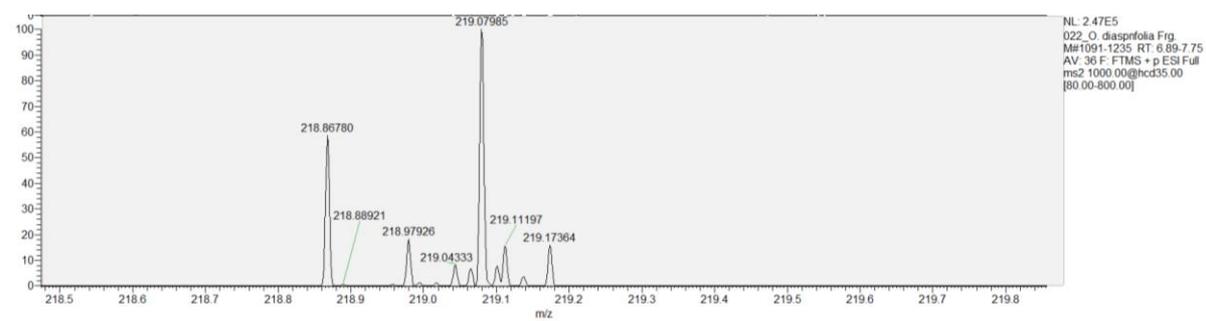
Figura 55 – Cromatograma e espectros de massas do ID 100, m/z 314,1396, TR 7,46.



Fonte: Da autora.

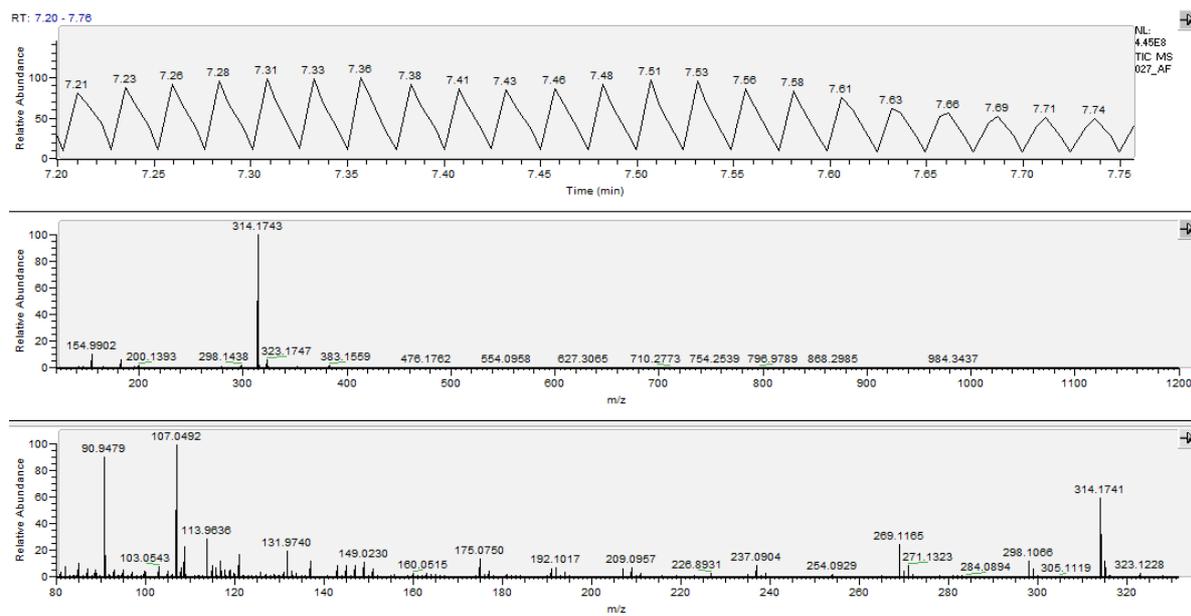
Figura 56 – Espectros de massas do ID 100, m/z 314,1396, TR 7,46.





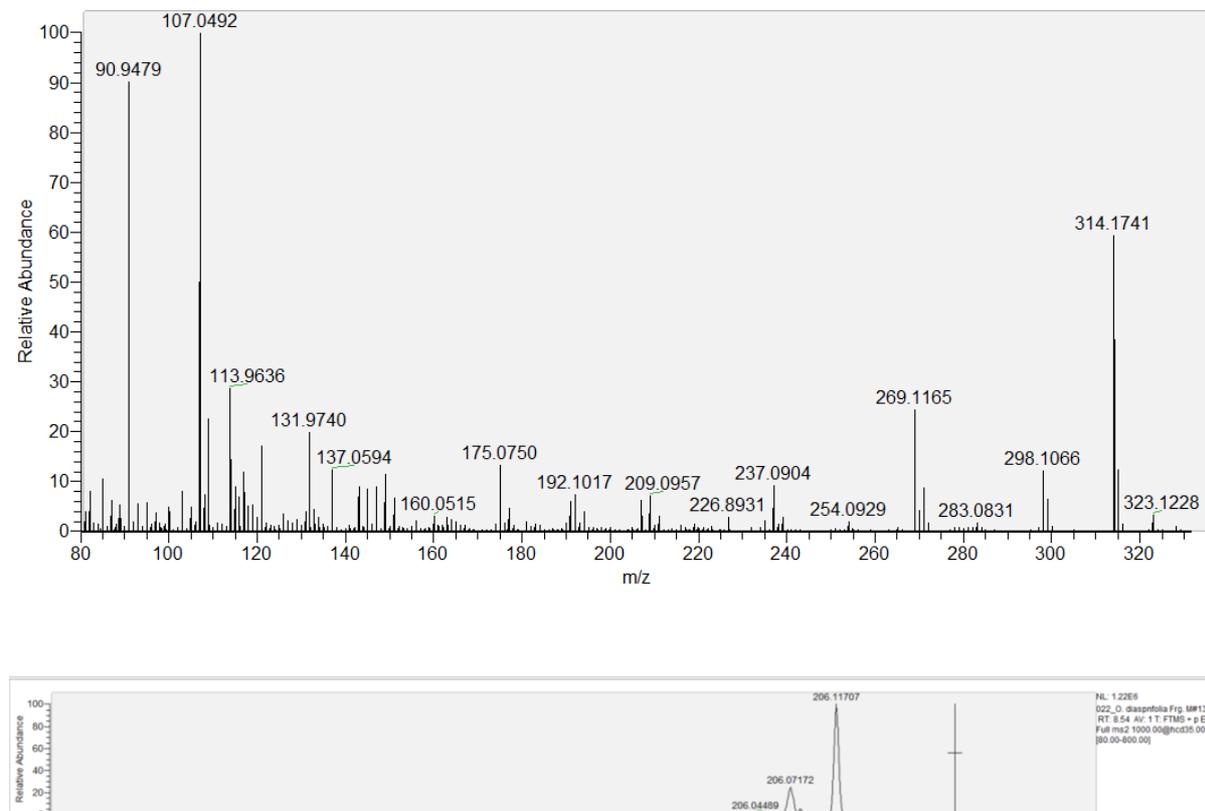
Fonte: Da autora.

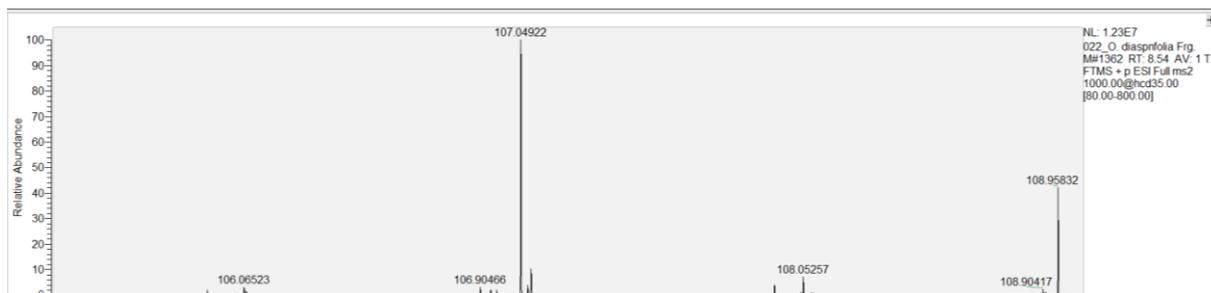
Figura 57 – Cromatograma e espectros de massas do ID 199, m/z 314,1745, TR 7,40.



Fonte: Da autora.

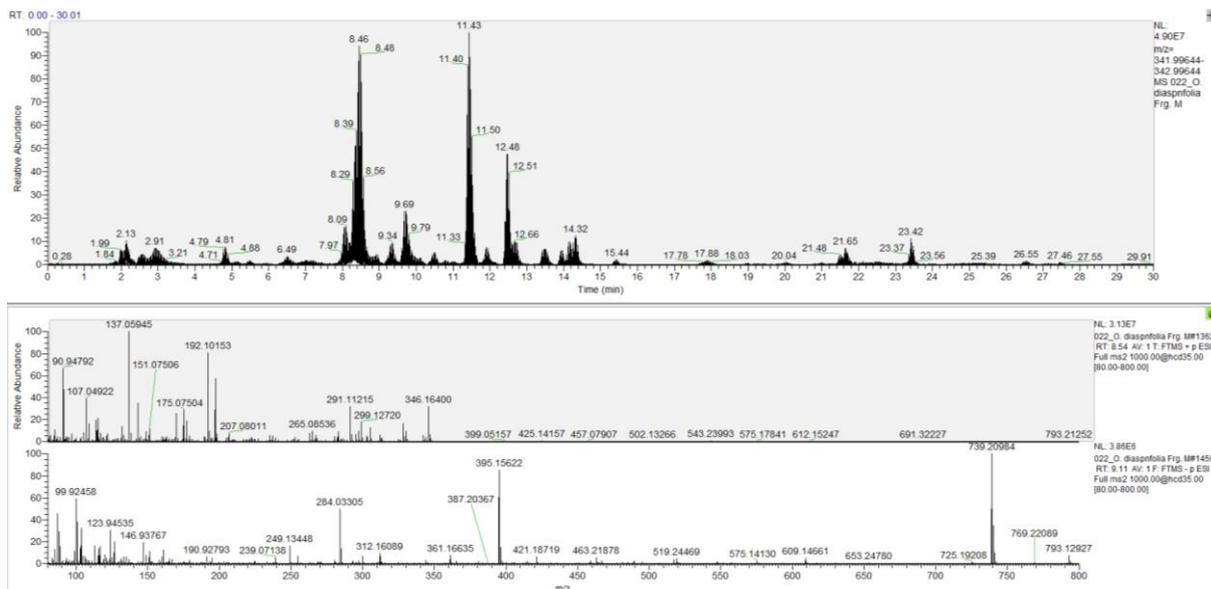
Figura 58 – Espectro de massas do ID 199, m/z 314,1745, TR 7,40.





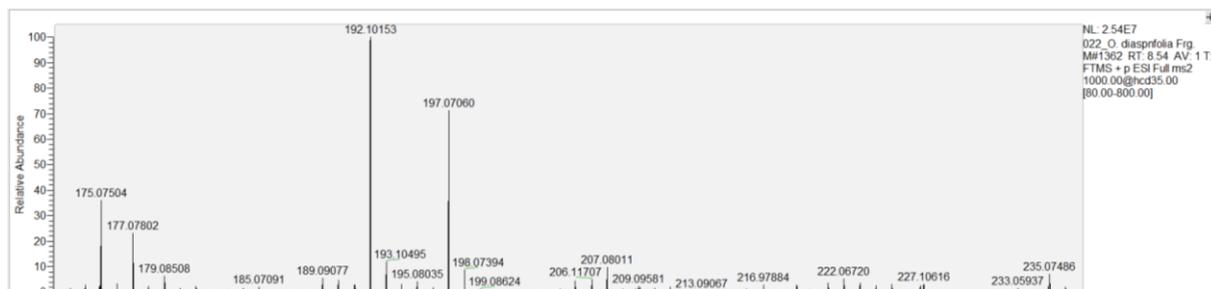
Fonte: Da autora.

Figura 59 – Cromatograma e espectros de massas do ID 137, m/z 346,1644, TR 8,86.



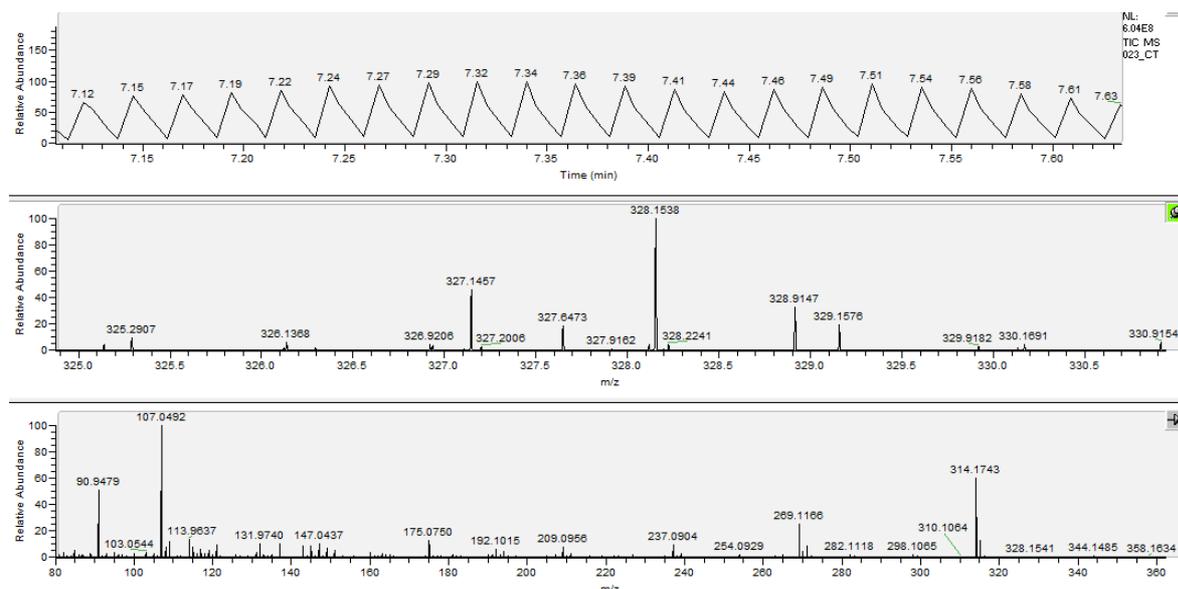
Fonte: Da autora.

Figura 60 – Espectro de massas do ID 137, m/z 346,1644, TR 8,86.



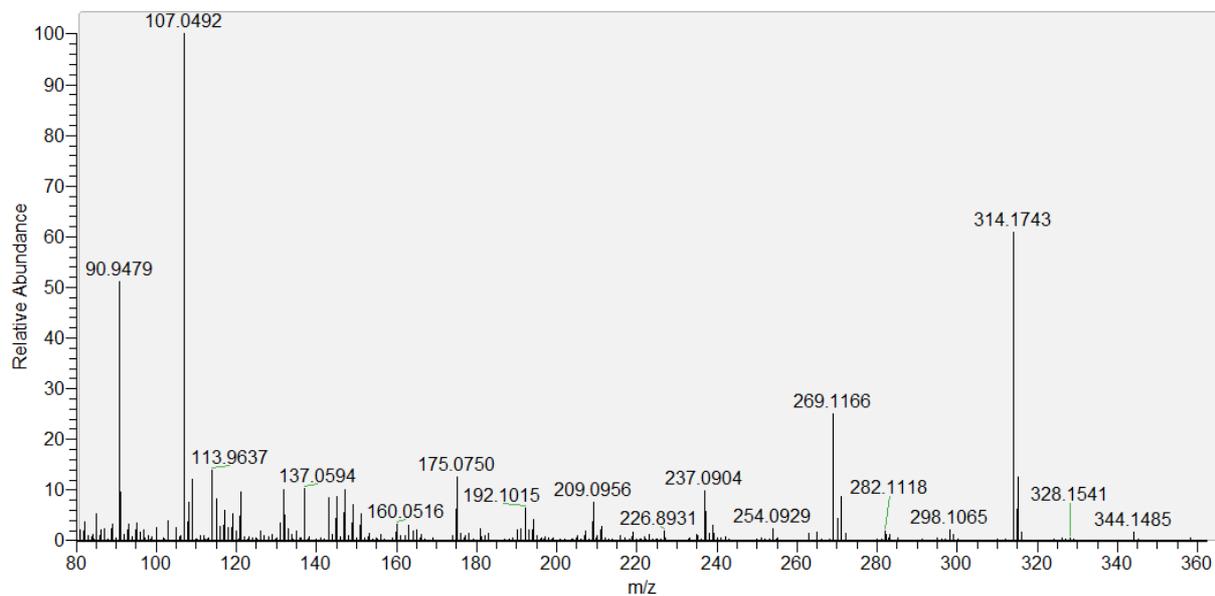
Fonte: Da autora.

Figura 61 – Cromatograma e espectros de massas do ID 241, m/z 328,1538, TR 7,39.



Fonte: Da autora.

Figura 62 – Espectro de massas do ID 241, m/z 328,1538, TR 7,39.



Fonte: Da autora.