

**Chamada CNPq Nº 32/2023**

**Bolsas no País**

**Linha II-PDS (Pós-doutorado sênior)**

**ÁREA DE CONHECIMENTO: FARMACOGNOSIA**

**Investigação quimiotaxonômica, atividades biológicas e aspectos botânicos de espécies de *Eugenia P. Micheli ex L.*, voltados ao desenvolvimentos de fitomedicamentos inovadores**

**Chemotaxonomic investigation, biological activities and botanical aspects of *Eugenia P. Micheli ex L.* species, aimed at developing innovative phytomedicines**

**LORENE ARMSTRONG**

Projeto de pesquisa apresentado para seleção de bolsa de Pós-doutorado sênior no país, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ.

Supervisora: Profa. Dra. Jane Manfron

**Ponta Grossa-PR**

**2023**

## RESUMO

A biodiversidade brasileira, que é composta por seis biomas, nos proporciona um arsenal de espécies vegetais que ainda não foram investigadas. O estudo quimiotaxonômico de espécies nativas brasileiras ainda carece de estudos. O gênero *Eugenia* P. Micheli ex. L., pertencente à família Myrtaceae Juss. é amplamente distribuído no Brasil. Além de apresentar propriedades medicinais relevantes, possui valor nutricional e econômico. Apresenta classes químicas diversas, tais como, flavonoides, terpenoides e taninos. Neste trabalho, será realizada a análise botânica (morfoanatômica e histoquímica) e química de folhas, além de atividades biológicas dos óleos voláteis de espécies de *Eugenia*. As técnicas analíticas hífenadas, como por exemplo, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) permitem a identificação e quantificação destes compostos nas amostras vegetais, pois são métodos de análises altamente sensíveis e seletivos. Aliadas a essas técnicas, as redes moleculares, agrupam as substâncias alvo e permitem fazer a correlação química entre espécies. A coleta das espécies será realizada no estado do Paraná (Curitiba e Ponta Grossa), as quais serão devidamente identificadas para proceder os demais ensaios de controle de qualidade botânico, químicos, obtenção das redes moleculares e identificação das substâncias voláteis, bem como das atividades biológicas. Desta forma, espera-se contribuir com dados quimiotaxonômicos, bioativos e botânicos de espécies nativas do gênero *Eugenia* a fim de contribuir com o desenvolvimento de fitomedicamentos inovadores, contribuindo com o desenvolvimento científico e tecnológico dos estudos no país.

**Palavras-chave:** Atividades biológicas. Metabolômica. Morfoanatomia. Redes moleculares.

## ABSTRACT

Brazilian biodiversity, which is made up of six biomes, provides us, an arsenal of plant species that have not yet been investigated. The chemotaxonomic study of native Brazilian species still lacks studies. The genus *Eugenia* P. Micheli ex. L., belonging to the Myrtaceae Juss. family. It is widely distributed in Brazil. In addition to presenting relevant medicinal properties, it has nutritional and economic value. It has different chemical classes, such as flavonoids, terpenoids and tannins. In this work, botanical (morphoanatomical and histochemical) and chemical analysis of leaves will be carried out, in addition to the biological activities of volatile oils from *Eugenia* species. Hyphenated analytical techniques, such as gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) allow the identification and quantification of these compounds in plant samples, as they are highly sensitive and selective analysis methods. Combined with these techniques, molecular networking group targets substances and allow to identify chemical correlation between species. Species will be collected in the state of Paraná (Curitiba and Ponta Grossa), which will be duly identified to carry out other botanical and chemical quality control tests, obtaining molecular networking and identifying volatile substances, as well as biological activities. In this way, it is expected to contribute with chemotaxonomic, bioactive and botanical data on native species of the genus *Eugenia* in order to contribute to the development of innovative phytomedicines, contributing to the scientific and technological development of studies in the country.

**Keywords:** Biological activities. Metabolomics. Morphoanatomy. Molecular networking.

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO .....	3
2- PROBLEMATIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	8
3- OBJETIVOS.....	10
4- METODOLOGIA.....	11
6- PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO.....	20
7- REFERÊNCIAS.....	21

## 1-INTRODUÇÃO

### 1.1 A Farmacognosia e a biodiversidades brasileira

A Farmacognosia é uma área que estuda diferentes fontes de produtos naturais, dentre essas, podem ser citadas as plantas, animais, algas, microrganismos (terrestres e marinhos). São inúmeras as investigações que podem ocorrer dentro desta área, desde a botânica, farmacologia, química, o estudo da biossíntese, o isolamento de metabólitos de interesse com potencial medicinal ou que podem ser usados como marcadores taxonômicos, a avaliação das atividades biológicas, etc. (HEINRICH *et al.*, 2012; CAHLÍKOVÁ *et al.*, 2020).

Com relação às plantas medicinais, estas são utilizadas desde a antiguidade, e seus estudos e observações já levaram à descoberta de importantes substâncias utilizadas na atualidade, tais como, morfina (*Papaver somniferum* L.), atropina (*Atropa belladonna* L.), cafeína (*Coffea arabica* L.), digoxina (*Digitalis lanata* Ehrh.), dentre outras (CALIXTO, 2019; CAHLÍKOVÁ *et al.*, 2020). Com essas descobertas históricas para a área de produtos naturais, buscas incessantes por novos compostos continuaram e novas pesquisas foram surgindo. Observa-se que muitos dos compostos químicos isolados de plantas possuem atividades biológicas de interesse mundial, tais como, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticâncer, antiviral, citotóxica e anticoagulante. (PILON *et al.*, 2017; NEWMAN; CRAGG, 2020). Além disso, podem ter aplicação cosmética e alimentícia (PILON *et al.*, 2017).

O conceito de biodiversidade é definido como uma variada e complexa relação dos seres vivos com seu sistema ecológico, compreendendo as espécies e, também a genômica, metabolômica e proteômica. Neste quesito o Brasil sai na frente, pois apresenta seis biomas (Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampa e Pantanal), representando 10 a 20% das espécies vivas no mundo, portanto, demonstra um grande potencial na busca por novos produtos naturais e novas aplicações tecnológicas (PILON *et al.*, 2017; VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018; CARVALHO; CONTE-JÚNIOR, 2021).

Muitas espécies medicinais nativas do Brasil, apresentaram substâncias de interesse, podendo-se citar o jaborandi (*Pilocarpus jaborandi* Holmes) como exemplo, do qual é extraída a pilocarpina (CARVALHO; CONTE-JÚNIOR, 2021) e a espécie erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.), que contém os terpenoides analgésicos e anti-inflamatórios no seu óleo essencial (CALIXTO, 2019).

No Brasil foram aprovadas legislações para incentivar o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, como o Decreto nº 5.813 de 2006 que aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a qual preconiza o desenvolvimento de toda a cadeia produtiva de plantas destes, para atender aos critérios de qualidade, eficácia, eficiência e segurança de uso (BRASIL, 2006).

Neste mesmo ano, foi publicada a Portaria nº 971/GM/MS, que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), a qual inclui a Fitoterapia e implementação de ações e serviços relacionados a Fitoterapia e plantas medicinais (BRASIL, 2006a). Aliada a estas políticas aprovadas pelo governo, foi publicada também uma lista de 71 plantas medicinais, que consta na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (RENISUS).

Todas essas políticas incentivaram pesquisadores a buscar novas substâncias de espécies da flora brasileira, tanto nativas quanto exóticas, no intuito de identificá-las e, também de testar a bioatividade e produção de fitoterápicos.

## **1.2 Análise morfoanatômica de plantas medicinais**

A identificação das espécies vegetais é o primeiro passo da pesquisa científica com plantas, sendo, portanto de fundamental importância para os estudos subsequentes, botânico, químico ou de atividades biológicas. Após a descrição morfológica é realizado o depósito da exsicata em herbários, o que contribui com dados para as floras local, nacional e mundial (ALLARD *et al.*, 2018; KLEIN-JÚNIOR *et al.*, 2021).

Após a análise morfológica, a microscopia permite diferenciar as estruturas presentes nas plantas, por exemplo, tipos de parênquimas, estômatos, tricomas, características peculiares das células epidérmicas e da cutícula (BETIM *et al.*, 2020; MANFRON, 2021). Testes histoquímicos complementares, podem ajudar na identificação de constituintes químicos da planta de forma qualitativa e indicar a correta compartimentalização de substâncias/grupos químicos. Diferentes técnicas de microscopia podem ser utilizadas, como a microscopia óptica, eletrônica de varredura e de luz polarizada, sendo técnicas complementares para evidenciação das estruturas anatômicas. (MACHADO *et al.*, 2019; BETIM *et al.*, 2020; UPTON *et al.*, 2020; KLEIN-JÚNIOR *et al.*, 2021).

Atualmente, essa técnica associada a técnicas moleculares, cromatográficas e espectrométricas estão sendo associadas para melhor identificação de organismos

(UPTON *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2021). Contudo, essas técnicas podem apresentar limitações, como por exemplo, para materiais moídos, processados ou degradados por aditivos (UPTON *et al.*, 2020; MANFRON, 2021).

Análises farmacobotânicas clássicas aliadas a técnicas recentes de identificação de biologia molecular, podem fornecer dados valiosos quanto à variação genética, denotando também as diferenças e semelhanças estruturais.

### **1.3 Técnicas analíticas aplicadas a produtos naturais**

Ao longo dos anos, o desenvolvimento tecnológico permitiu que técnicas avançadas, como as técnicas hífenadas: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Cromatografia em Camada Delgada (CLAE-CCD); Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM/EM); Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM/EM); Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Ressonância Magnética Nuclear (CLAE-RMN); Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLUE-EM) sejam aplicadas para que possibilitem a identificação de substâncias ativas nos insumos ativos vegetais (DEMARQUE *et al.*, 2020).

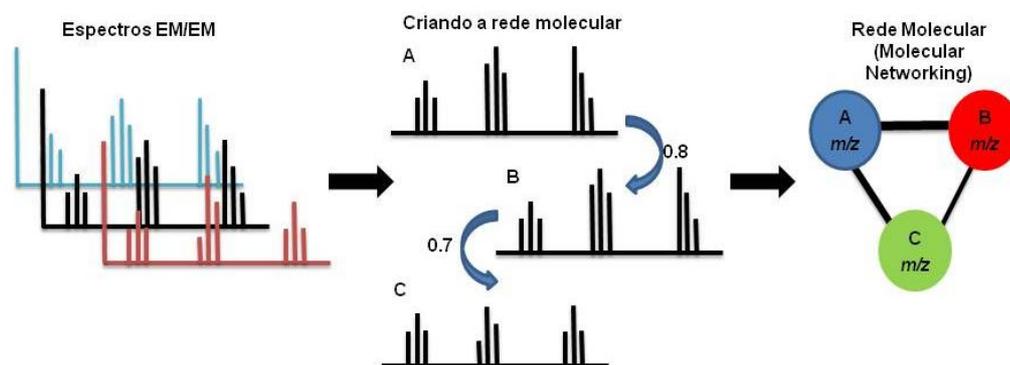
A rede molecular é uma ferramenta auxiliar na análise de espectrometria de massas em *tandem*, que também organiza grandes conjuntos de dados de espectros de massas com base na similaridade entre fragmentação de padrões de íons precursores relacionados e compara o espectros EM/EM agrupados com bancos de dados da plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Partindo de extratos brutos ou frações, os espectros gerados em espectrômetros de massa (EM/EM) são inseridos na plataforma GNPS, que é uma plataforma de acesso gratuito criada pela Universidade de San Diego (Califórnia, EUA). Um programa chamado MATLAB agrupa as substâncias de acordo com os parâmetros selecionados na plataforma e de acordo com a similaridade das substâncias através dos espectros de EM/EM, faz o reconhecimento do íon molecular e dos fragmentos de íons. Os metabólitos secundários são agrupados pelo valor angular do cosseno (0-1), sendo selecionado um valor de corte nos parâmetros da análise, por exemplo, se um valor 0,7 for selecionado, as substâncias geradas terão um valor de similaridade igual ou superior a este, sendo que com valor 1 as

substâncias que possuem total similaridade (WATROUS *et al.*, 2012; YANG, 2013; ALLARD *et al.*, 2016).

Este programa também faz a correlação de textos e atributos, como por exemplo, a atribuição de cores e valores de  $m/z$  para os nós, em que um nó representa uma substância e pontes (traços) representam seu parentesco; os grupos de metabólitos secundários são visualizados no programa Cytoscape (WATROUS *et al.*, 2012; YANG, 2013; ALLARD *et al.*, 2016). A análise da rede molecular gerada permite a identificação de grupos de substâncias conhecidas, as quais são desreplicadas por meio da biblioteca de compostos da plataforma GNPS. Também é possível selecionar grupos de substâncias desconhecidas, observar perdas de massas conhecidas e possíveis substâncias análogas (WATROUS *et al.*, 2012; ALLARD *et al.*, 2016).

Na Figura 1 pode ser visto um esquema de como é gerada a rede molecular, em que são analisados os espectros de EM/EM, ocorre a aplicação das fórmulas matemáticas até a conversão dos textos em atributos e a visualização final da rede molecular.



**Figura 1.** Representação da obtenção da rede molecular (Fonte: ARMSTRONG, 2016)

Recentemente, um estudo de óleos voláteis foi aplicado, utilizando redes moleculares, utilizando espectros obtidos por CG-EM não somente mais extratos brutos e frações (PILON *et al.*, 2022), bem como, em substâncias voláteis de produtos naturais (SANTOS *et al.*, 2023).

Com os dados obtidos por meio da rede molecular, é possível selecionar amostras de interesse (estudos bioguiados e perfil químico) e pesquisar substâncias alvo (tanto marcadores químicos, como outras substâncias interferentes), em conjunto com análises de outras técnicas de identificação de compostos. Dessa forma, a metabolômica é uma ferramenta se torna uma excelente aliada na busca por substâncias de interesse.

#### 1.4 O gênero *Eugenia* P. Micheli ex L.

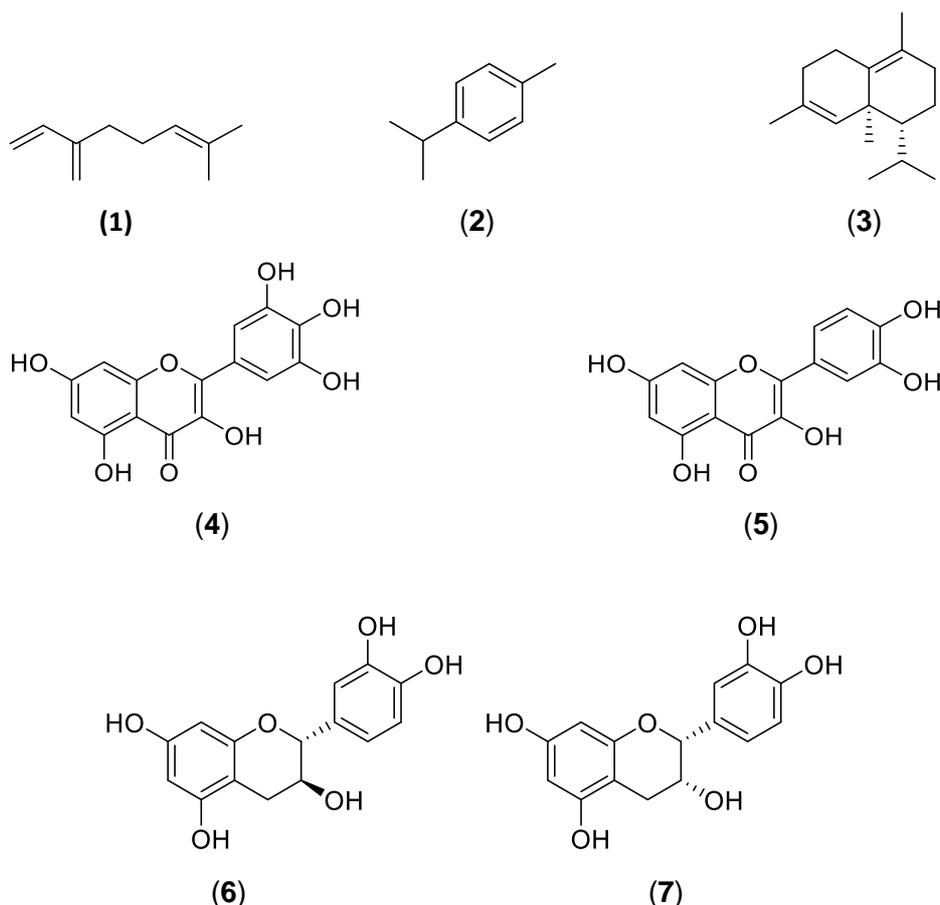
O gênero *Eugenia* pertence à família Myrtaceae Juss. e contém 1024 espécies aceitas (POWO, 2023), sendo amplamente distribuído no Brasil (FIGURA 2). Apresenta potencial econômico, farmacêutico e cosmético devido às suas propriedades medicinais e nutricionais (ARAÚJO *et al.*, 2019).



**Figura 2-** Distribuição do gênero *Eugenia* no Brasil (Fonte: POWO, 2023).

O gênero *Eugenia* apresenta uma diversidade de espécies, tais como, uvaia (*E. pyriformis* Cambess.), grumixama (de *E. brasiliensis* Lam.), cereja-do-Rio-Grande (*E. involucrata* DC.), grumixama (de *E. brasiliensis* Lam.), pitanga (*E. uniflora* L.), *E. beaurepaireana* (Kiaerskou) Legrand, *Eugenia dysenterica* DC., *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC., cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC., dentre outras. Todas essas espécies apresentam frutos comestíveis, tendo importância nutricional e econômica. Também podem ser usadas na medicina popular, como a pitanga, por exemplo, para tratar distúrbios intestinais, bem como anti-hipertensivo. Estudos farmacológicos de partes de plantas desse gênero (folhas e frutos) apresentam atividades antiparasitária, antirreumática, anti-inflamatória, diuréticos, antidiarreicos (RODRIGUES *et al.*, 2013; DE SOUZA *et al.*, 2018).

O gênero *Eugenia* apresenta diferentes constituintes de classes químicas como flavonoides, taninos, terpenoides, flavonoides e ácidos fenólicos (DE SOUZA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2020). Como exemplos de terpenoides, pode-se citar os monoterpenos limoneno (1), o cimeno (2) e o sesquiterpeno  $\gamma$ -cadinene (3), presentes em óleos essenciais; os flavonoides miricetina (4) e quercetina (5); os taninos, catequina (6) e epicatequina (7) (DE SOUZA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2020), (FIGURA 3).



**Figura 3-** Estruturas de diferentes classes químicas encontradas no gênero *Eugenia*

Este trabalho tem como objetivo contribuir com a metabolômica, testar atividades biológicas inseticida e repelente contra *Aedes aegypti*; *Solenopsis invicta* Buren e *Solenopsis richteri* e inseticida contra *Cimex lectularius*, além de fornecer dados botânicos de espécies de *Eugenia* que habitam o estado do Paraná, a fim de promover o desenvolvimento de fitomedicamentos inovadores.

## 2-PROBLEMATIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil possui uma rica biodiversidade, contando com 49.989 plantas (nativas, cultivadas e naturalizadas) (FLORA DO BRASIL, 2020). Estudos ainda estão sendo aprimorados para identificação botânica, genética e química das espécies. Deve-se realizar a correta identificação botânica, além de controle de qualidade botânico (macro e microscópico) e físico-químico. Diferentes técnicas analíticas podem apoiar as técnicas já existentes na literatura, por exemplo, CG-EM, o qual fornece dados valiosos para identificação de substâncias voláteis. Juntamente com estas investigações, torna-se importante a avaliação de atividades biológicas de interesse farmacêutico. Dessa forma, é importante a realização de ensaios bioquímicos, tanto de

extratos quanto de frações e de óleos voláteis. Essas técnicas aliadas às redes moleculares, permitirão uma busca guiada por substâncias alvo ou de interesse.

As redes moleculares apresentam-se como uma ferramenta potencial na identificação de substâncias alvo. São utilizadas no exterior desde 2012, e agora amplamente aderida no Brasil por grupos de pesquisa de produtos naturais, sendo possível selecionar os grupos que contém as substâncias de interesse para o seu reconhecimento (ALLARD, 2016; WANG et al., 2016). Esta técnica aliada a metodologias analíticas relativamente rápidas e eficientes, isto é, o que é propiciado pelo CG-EM contribuirão para a identificação de marcadores químicos de espécies nativa do gênero *Eugenia* distribuídas na região Sul do país, especificamente, em Curitiba e Ponta Grossa, para realização de um amplo estudo quimiotaxonômico de substâncias presentes em óleos voláteis.

O desenvolvimento deste projeto permitirá a investigação quimiotaxonômica e de atividades biológicas do gênero *Eugenia*, contribuindo com o crescimento científico e tecnológico na área de pesquisa e também da Universidade Estadual de Ponta Grossa. A identificação dos marcadores e a validação do método analítico em CG-EM permitirá a identificação de substâncias. O auxílio do uso de redes moleculares contribuirá para identificar em grupos na rede a presença das classes químicas e identificar espécies que produzem compostos semelhantes, fazendo uma correlação interespecies. Será possível fazer uma análise em conjunta dos dados, das substâncias alvo e de substâncias interferentes, além do branco, correlacionando com a massa visualizada no espectro.

### **-Motivação pessoal**

O interesse pessoal pela presente proposta vem do percurso profissional e acadêmico da candidata, a qual vislumbrou grande potencial na área de Farmacognosia, tendo trabalhado com a técnica de redes moleculares durante o doutorado-sanduíche e em colaboração no Brasil. Além do contato com novas técnicas computacionais que contribuem de forma especial para as análises. Essa trajetória estimulou o desejo de contribuir com essa área no Brasil. Portanto, espera-se que seja agregado conhecimento pessoal e científico a todos os envolvidos, estimulando a área de pesquisa e contribuindo para o desenvolvimento da área de produtos naturais no Brasil. Estudos com CG-EM em produtos naturais e redes

moleculares ainda são escassos, por isso pretende-se ampliar a correlação de dados químicos entre espécies nativas no país.

Além disso, o vínculo com o programa de pós-graduação permitirá coorientar dois alunos de iniciação científica, um de mestrado e um doutorado. Sendo a candidata professora substituta na Universidade Estadual de Ponta Grossa desde 2018, o projeto permitirá uma aplicabilidade de técnicas previamente desenvolvidas no exterior e que poderão ser inseridas neste laboratório. Devido ao incentivo acadêmico visando a internacionalização das universidades, este projeto terá parceria com a Universidade do Mississippi (EUA) a qual a supervisora Dra. Jane Manfron tem sólida parceria, e serão desenvolvidos os testes de atividades biológicas.

Devidos ao exposto, espera-se contribuir com o desenvolvimento científico, tecnológico e de inovação do país.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Realizar o estudo metabolômico e de atividades biológicas de óleos voláteis e morfoanatômico de folhas de espécies do gênero *Eugenia* Micheli ex L. que habitam o estado do Paraná.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Realizar estudo botânico (macroscópico, microscópico e histoquímico) de folhas de espécies de *Eugenia*;
- Obter o óleo essencial de folhas de espécies de *Eugenia* por aparelho de Clevenger;
- Realizar as atividades biológicas: inseticida e repelente contra *Aedes aegypti*; *Solenopsis invicta* Buren e *Solenopsis richteri* e inseticida contra *Cimex lectularius*;
- Utilizar redes moleculares como ferramenta auxiliar na visualização dos grupos moleculares de marcadores químicos da espécie e dos padrões injetados, como forma complementar de identificação;
- Identificar os principais constituintes presentes nas espécies do gênero *Eugenia*, por cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrometria de massas;

-Otimizar os parâmetros de análise (espectrométricos e cromatográficos), obtendo-se um método para análise simultânea dos compostos de interesse de interesse;

## 5-METODOLOGIA

### 5.1 Material vegetal

O material vegetal será coletado no estado do Paraná, nas regiões de Curitiba e Ponta Grossa. Serão coletadas inicialmente cerca de seis amostras (TABELA 1) de diferentes espécies do gênero *Eugenia*, as quais tem relatos de uso popular medicinal na literatura. O levantamento destas espécies foi realizado no site *Species Link* (<https://specieslink.net/>), totalizando um levantamento de 36 espécies. As amostras iniciais serão submetidas à identificação para depósito em herbário com número de registro e exsicata. O material será separado para identificação botânica e realização do controle de qualidade botânico e validação de metodologia analítica, análise de redes moleculares e atividades biológicas.

TABELA 1-Espécies do gênero *Eugenia* (região de Curitiba e dos Campos Gerais)

	Espécie	Curitiba	Ponta Grossa
1	<i>E. uniflora</i> L.	x	x
2	<i>E. pyriformis</i> Cambess.	x	x
3	<i>E. speciosa</i> Cambess.	x	x
4	<i>E. myrcianthes</i> Nied.	x	x
5	<i>E. pitanga</i> (O. Berg. Nied)	x	x
6	<i>E. longipedunculata</i> Nied.	x	-

#### 5.1.2 Espécies presentes no Parque Estadual de Vila Velha (Ponta Grossa-Paraná)

	Espécie
1	<i>E. neoverrucosa</i> Sobral
2	<i>E. uruguayensis</i> Cambess.
3	<i>E. pluriflora</i> DC.
4	<i>E. subterminalis</i> DC.
5	<i>E. longipedunculata</i> Nied.

6	<i>E. pitanga</i> (O. Berg. Nied)
7	<i>E. puniceifolia</i> (Kunth) DC.

## 5.2 Análise botânica

### 5.2.1 Material vegetal

Folhas das espécies serão fixadas em solução de FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 70% v/v) (JOHANSEN, 1940) por cinco dias e lavadas em água destilada para retirada do excesso de FAA. Posteriormente, serão armazenados em etanol 70% (BERLYN; MIKSCHE, 1976). Serão realizadas secções transversais e paradérmicas de *E. uniflora* L.; *E. pyriformis* Cambess.; *E. speciosa* Cambess.; *E. myrcianthes* Nied.; *E. pitanga* (O. Berg. Nied) e *E. longipedunculata* Nied.

#### -Análise microscópica

As secções obtidas da planta fresca serão observadas em microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura. Para as análises de MEV-FEG (Feixe eletrônico por emissão de campo), as amostras fixadas em FAA serão desidratadas em série crescente de solução etanólica (80%, 90% e 100% p/v). Após essa etapa, as amostras serão submetidas ao ponto crítico em aparelho Bal-Tec CPD030, utilizando CO<sub>2</sub> líquido e após secas, juntamente com a droga vegetal serão fixadas em stubs de alumínio com fitas adesivas de dupla face e seguido do revestimento com ouro, para tornar as amostras condutivas. Será realizada a espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) para obtenção dos espectros de composição química dos cristais.

#### -Testes histoquímicos

Uma série de múltiplos testes histoquímicos serão realizados utilizando diferentes reagentes químicos e corantes. Secções transversais à mão livre de material fresco serão expostas a floroglucinol/HCl para detectar vestígios de lignina. Os reagentes Ellram, Wagnere Dragendorff serão utilizados para detectar alcaloides. Dicromato de potássio (10%) e cloreto férrico (5%) serão utilizados para detectar a presença de substâncias fenólicas. Solução de vanilina clorídrica (0,5%) será aplicada para revelar taninos condensados. Sudam III e Sudam Black serão usados para detectar compostos lipofílicos. Além disso, o sulfato de azul do Nilo será utilizado para

detecção de lipídios neutros e/ou ácidos; solução de iodo (2%) para identificação de grãos de amido; solução de vermelho de rutênio (0,002%) para pectinas; teste PAS (reagente de ácido periódico-Schiff) para polissacarídeos; e Xilidina Ponceau e azul de Coomassie para evidenciar proteínas (ALMEIDA *et al.*, 2023).

### **5.3 Obtenção dos óleos voláteis**

Para os procedimentos abaixo as folhas serão secas em estufa a 35 °C e devidamente rasuradas.

#### *-Obtenção do óleo essencial*

Os óleos essenciais serão extraídos de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6 ed. (2019) e em aparelho de Clevenger.

### **5.4 Análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas**

As amostras serão injetadas em equipamento de CG-EM, a 250 °C, temperatura da coluna 60 °C, rampa de aquecimento de 60 a 210 °C, a 3 °C/min, totalizando 50 min. Coluna cromatográfica DB-5, 30 m × 0.25 mm, gás hélio (sob 79.7 kPa a 1,30 mL/min com velocidade linear de 41.6 cm/s e volume de 1 µL a 1:60 split (PILON *et al.*, 2022).

### **5.5 Obtenção da rede molecular**

As amostras serão analisadas em um método exploratório padronizado, numa faixa de  $m/z$  35–400, em modo positivo. Os cromatogramas obtidos das análises de serão convertidos para arquivos de mzxML ou mzML, por meio do programa MSConvert ([www.proteowizard.sourceforge.net](http://www.proteowizard.sourceforge.net)). Os arquivos convertidos serão submetidos para a plataforma GNPS molecular networking (<http://gnps.ucsd.edu>). A rede molecular será gerada pela interconexão de espectros das amostras comparadas, utilizando-se também um branco do solvente da análise e processada pelo programa Cytoscape 3.2.1.

### **5.6 Pesquisa das atividades biológicas dos óleos essenciais**

#### **5.6.1 Verificação da atividade inseticida**

##### **5.6.1.1 Mosquitos *Aedes aegypti***

*Aedes aegypti* usados neste estudo serão provenientes do Mosquito and Fly Research Unit, Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology, USDA-ARS, Gainesville, Florida, USA. Os mosquitos serão criados até o estágio adulto, alimentando-se as larvas com uma dieta larval de 2% de pó de fígado bovino 3:2 (agora Foods, Bloomington, Illinois) e levedura de cerveja (Lewis Laboratories Ltd., Westport, CT, EUA). Os ovos serão eclodidos e criados até o estágio de pupa em uma sala com ambiente controlado a uma temperatura de  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $60 \pm 10\%$  UR em um regime de fotoperíodo de 12:12 (L:D) h. Os adultos serão alimentados com cotonetes umedecidos com solução de sacarose a 10%, colocados no topo de telas de gaiolas de 4 L.

#### 5.6.2 Ensaio de picada de mosquito

Os ensaios serão conduzidos usando um sistema de bioensaio de módulo in vitro de seis células Klun e Debboun (K & D) desenvolvido por KLUN et al. (2005) O sistema K&D consiste em um reservatório de seis poços com cada um dos poços de  $4 \times 3$  cm contendo 6 mL de solução de alimentação (CPDA-1  $\pm$  ATP). As preparações de CPDA-1 e ATP contém um marcador verde fluorescente o que permite a identificação dos mosquitos que foram alimentados com a solução. DEET (97% de pureza N,N-dietil-3-metilbenzamida) será o controle positivo (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e etanol (Fisher Scientific Chemical Co. Fairlawn, NJ, EUA) será utilizado como solvente controle. Estoque e diluições de todos os óleos essenciais e DEET serão preparados em etanol. Todos os óleos essenciais e o DEET serão avaliados nas dosagens de  $10\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

A temperatura da solução será mantida em  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por meio de banho de circulação. As diluições e os controles serão aplicados aleatoriamente a seis porções marcadas de  $4 \times 3$  cm de tira de nylon, que será posicionada sobre os seis poços cobertos por membrana. Um módulo K & D de seis células contendo cinco fêmeas de 6 a 15 dias por célula será disposta sobre os seis poços, as portas dos alçapões serão abertas e os mosquitos terão acesso por 3 minutos, após serão coletados de volta ao módulo. Os mosquitos serão esmagados e a presença de corante verde (ou não) no intestino será utilizado como indicador de alimentação. Uma réplica consiste em seis tratamentos: quatro amostras, DEET e etanol como controle de solvente. Cinco réplicas serão realizadas por dia usando novos lotes de mosquitos em cada repetição.

### 5.6.3 Atividade repelente in vitro

As análises serão conduzidas usando o sistema de Ali e Khan (A & K) desenvolvido por Ali et al. (2016) para avaliação quantitativa da repelência contra mosquitos. Os valores de dosagem mínima efetiva (DME) neste teste serão determinados usando um método descrito por KATRITZKY et al. (2010). Resumidamente, o sistema de teste consiste em uma gaiola de alumínio dobrável de 30 × 30 × 30 cm com uma folha de acrílico transparente com fenda de 120 × 35 mm através da qual será fixada a caixa de sangue contendo um dispositivo de alimentação removível. A parte superior da caixa de sangue possui uma porta deslizante utilizada para expor as fêmeas ao tratamento durante o teste. Áreas retangulares de 4 × 7,5 cm serão marcadas na folha de colágeno que corresponde à medida dos reservatórios retangulares de líquido. Os tratamentos serão aplicados em um volume de 107 µL usando uma micropipeta. O colágeno tratado será fixado no reservatório de alimentação contendo a solução de alimentação usando uma fina camada de graxa (Dow Coming Corp., Midland, MI, EUA). O dispositivo de alimentação será então empurrado para dentro da caixa de sangue e a porta deslizante será aberta para expor as fêmeas ao tratamento. O número de fêmeas pousando e mordendo será registrado visualmente por 1 min. Para garantir o pouso e a mordida adequados serão usadas 3-4 gaiolas de cada vez.

### 5.6.4 Atividade larvicida contra *Aedes aegypti*

Ovos de *A. aegypti* serão chocados e as larvas serão mantidas durante a noite no copo de incubação conforme previamente descrito. Cinco larvas de *A. aegypti* de um dia de vida serão adicionadas em uma gota de água a cada poço da placa de 24 poços (BD Labware, Franklin Lakes, NJ) usando uma pipeta Pasteur. Cinquenta microlitros de dieta larval (2% de pasta de 3:2 Beef Liver em pó (Now Foods, Bloomingdale, Illinois) e levedura de cerveja (Lewis Laboratories Ltd., Westport, CT) serão adicionados a cada poço usando um Finnpiquette stepper (Thermo Fisher, Vantaa, Finlândia). Todos os óleos essenciais serão diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Onze microlitros de cada óleo essencial em teste serão adicionados aos poços marcados, enquanto 11 µL de DMSO serão adicionados aos tratamentos de controle. Após a aplicação do tratamento, as placas serão movimentadas em vários sentidos para garantir uma mistura uniforme dos óleos essenciais. A mortalidade larval será registrada 24 h após o tratamento. Larvas que não mostrarem movimento no

poço após a perturbação manual da água serão registradas como mortas. Uma série de 5 concentrações variando entre 125 - 7,8 para óleos essenciais serão usados em cada tratamento para obter uma faixa de mortalidade. Os tratamentos serão replicados 10 vezes para cada essência.

### 5.3.5 Análise estatística

Como o sistema de ensaio do módulo K&D pode trabalhar com apenas 4 tratamentos junto com controles negativos e positivos, a fim de fazer comparações diretas entre as amostras de teste e compensar a variação na resposta geral entre as réplicas, a atividade de dissuasão de mordida foi quantificada como Índice de Dissuasão de Mordida (BDI) (ALI et al., 2012). Os BDI's foram calculados usando a seguinte fórmula (A):

$$(A) \quad [BDI_{i,j,k}] = \left[ \frac{PNB_{i,j,k} - PNB_{c,j,k}}{PNB_{d,j,k} - PNB_{c,j,k}} \right]$$

Onde  $PNB_{i,j,k}$  denota a proporção de fêmeas que não mordem quando expostas ao composto de teste  $i$  para replicação  $j$  e dia  $k$  ( $i=1-4$ ,  $j=1-5$ ,  $k=1-2$ ),  $PNB_{c,j,k}$  denota a proporção de fêmeas que não mordem o controle de solvente “c” para replicação  $j$  e dia  $k$  ( $j=1-5$ ,  $k=1-2$ ) e  $PNB_{d,j,k}$  denota a proporção de fêmeas que não mordem em resposta ao DEET “d”(controle positivo) para replicação  $j$  e dia  $k$  ( $j=1-5$ ,  $k=1-2$ ). Esta fórmula faz um ajuste para a variação entre dias na resposta e incorpora informações do controle de solvente, bem como do controle positivo.

Um valor de BDI de 0 indica um efeito semelhante ao etanol, enquanto um valor significativamente maior que 0 indica um efeito de dissuasão de mordida em relação ao etanol. Os valores do BDI não significativamente diferentes de 1 são semelhantes ao DEET. Os valores de BDI serão analisados usando SAS Proc ANOVA [único fator: composto de teste (fixo)], (SAS Institute 2012), e as médias serão separadas usando o Teste de Faixa Múltipla Ryan-Einot-Gabriel-Welsch. Para determinar se os intervalos de confiança incluem os valores de 0 ou 1 para tratamentos, o procedimento de comparação múltipla de Scheffe com a opção de CLM será usado no SAS. Os valores de LC50 para dados larvicidas foram calculados usando SAS, Proc Probit. A

toxicidade será comparada entre os tratamentos com base no IC de 95% não sobreposto (SAVIN et al., 1977).

#### 5.3.6 Atividade inseticida contra formigas-lava-pés

*Solenopsis invicta* Buren e *Solenopsis richteri* Forel serão usadas neste estudo e serão obtidas sob condições naturais de campo no University Field Station, University of Mississippi, 15 County Road 2078, Abbeville, MS 38601.

#### 5.3.7 Ensaio de escavação

A repelência do óleo volátil de espécies de *Eugenia* desse projeto será determinada contra *S. invicta* e *S. richteri* Forel, usando o ensaio de escavação descrito por Ali et al. (2021). O lado interno da placa de Petri da arena será revestido com Insect a Slip (BioQuip Products 2321 Gladwick Street Rancho Dominguez, CA 90220, EUA) para evitar a fuga das formigas. A areia (Premium Play Sand, Plassein International, Longview, TX) será peneirada em uma peneira de teste padrão #35 USA (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) para obter um tamanho uniforme de 1 mm, lavada com água deionizada e seca a 150 °C por 6 h. Quatro g de areia desinfectada serão pesadas em um prato de pesagem de alumínio canelado de tamanho de 45 mL (Fisher Scientific, 300 Industry Drive Pittsburgh, PA 15275). Cada tratamento será aplicado em um volume de 400 µL a 4 g de areia e bem misturado na panela de alumínio com uma pequena espátula. Após a evaporação do solvente, será adicionada água deionizada. Os frascos serão preenchidos com areia tratada enquanto a areia do tratamento controle será tratada apenas com o solvente. Os frascos serão, então, parafusados às tampas fixadas no fundo da arena. Cinquenta fire ants operárias híbridas serão introduzidas no centro da placa de Petri da arena. O experimento será conduzido a  $25 \pm 2$  °C de temperatura e  $50 \pm 10\%$  de umidade relativa. Após cavar a areia, as mostrarão uma tendência a se acomodar dentro dos frascos e o número de operárias presentes no interior do frasco dependerá do nível de atividade do tratamento repelente. Após 24 h, as formigas instaladas em cada frasco serão contadas e a areia será recolhida em placas de alumínio, seca a 150 °C por 1 h e pesadas. Uma série de concentrações serão testadas até que a amostra seja reprovada no teste de repelência. O experimento será realizado em triplicata. Os dados serão analisados usando a análise de variância e as médias foram separadas

usando o teste de intervalo múltiplo Ryan-Einot-Gabriel-Welsch em  $P \leq 0,05$  (SAS 9,4 (2012)).

### 5.3.8 Ensaio de Toxicidade

Para se determinar a toxicidade dos óleos voláteis contra formigas-lava-pés, será utilizado o bioensaio de toxicidade descrito por Ali et al. (2021). As soluções estoque e as diluições das amostras de óleo essencial foram preparadas em etanol. Areia lavada com água e desinfetada será usada em todos esses bioensaios. Três gramas de areia serão pesadas em placas de 42 mL estriadas em alumínio. As concentrações serão preparadas em um volume de 300  $\mu\text{L}$  de etanol. Trezentos  $\mu\text{L}$  de solução de tratamento serão despejados em 3 g de areia e completamente misturados com uma pequena espátula. Esta areia será secar até a evaporação total do solvente. Uma vez que o solvente evaporou, a areia será umedecida pela adição de 0,5  $\mu\text{L/g}$  de água deionizada. A areia do tratamento controle será tratada apenas com solvente. A areia tratada será transferida para placas de petri de 60 x 15 mm. Para evitar a fuga das formigas, o lado interno dessas placas será revestido com Insect a Slip. Dez formigas operárias híbridas serão transferidas em cada placa de Petri que serão cobertas com tampas para evitar o ressecamento da areia. Uma ponta de cotonete embebida em água será colocada em cada placa de Petri uma hora após a liberação das formigas para fornecer um suprimento contínuo de umidade. O número de formigas mortas será registrado após 24 h de tratamento. LC50 serão calculados usando análise Probit (SAS 2012).

### 5.3.9 Atividade inseticida contra *Cimex lectularius*

#### 5.3.9.1 Criação dos insetos (percevejos)

As cepas de *Cimex lectularius*: Bayonne 'Resistente a inseticidas' e Ft. Dix 'Susceptível foram fornecidas pelo Dr. Changlu Wang, Departamento de Entomologia, Universidade Rutgers, New Brunswick, NJ e têm sido criadas em massa no National Center of Natural Products Research, Oxford, Mississippi. Os insetos serão alimentados em frascos de vidro transparente de 473 mL, contendo papel-toalha (papel 92 -padrão multiuso) como abrigos. Os frascos serão cobertos com pano de malha fina para ventilação e mantidos no lugar com um elástico (CAMPBELL E

MILLER, 2015). Os frascos serão mantidos em uma câmara de crescimento a 26 °C e 60% de umidade relativa com um fotoperíodo de 13:11 h claro/escuro. Os insetos serão alimentados com sangue de coelho desfibrinado (Hemostat, CA) semanalmente.

Os insetos serão alimentados de acordo com o método descrito por Montes et al. (2002). Alimentadores de sangue (CG-1836-75 ChemGlass, NJ) serão ligados a um banho de água utilizando tubos de látex e um pedaço de membrana de parafilme "M" será esticado ao longo do fundo do alimentador. Será colocada uma quantidade de 5 mL de sangue de coelho desfibrinado (Hemostat) no centro oco do material de vidro. O parafilme fornece uma barreira para o inseto se alimentar. O banho-maria foi ajustado para circular e aquecer o sangue a 37°C.

#### 5.3.9.2 Ensaio tópico

Estudos inseticidas com os óleos essenciais das quatro espécies de Piper serão conduzidos de acordo com o procedimento descrito por Romero et al. (2009). Os insetos adultos serão separados usando uma pinça de peso pena nas placas de Petri. Os insetos serão anestesiados com CO<sub>2</sub> e 1 µL de uma solução de tratamento em acetona será colocada na superfície dorsal do abdômen com um dispensador de repetição de mão (Hamilton Co., Reno, NV) equipado com uma seringa de vidro de 50 mL (Hamilton Co). Insetos controle receberão apenas 1 µL de acetona. Após o tratamento, os insetos serão transferidos para os frascos de vidro transparente de 20 mL contendo tira de papel (padrão 92 - papel multiuso) e mantidos na câmara de crescimento. Os dados para a mortalidade dos insetos serão registados aos 1, 2, 3, 5 e 7 dias após o tratamento. Os insetos serão considerados mortos quando nenhuma parte do corpo se mover, após serem tocados com uma agulha. Ocorrerão 3 repetições com 10 insetos (ambos os sexos)/réplica. Quatro doses serão utilizadas, 125, 50, 25 e 12,5 µg EO/inseto e a deltametrina será usada como inseticida padrão.

#### 5.3.9.3 Teste residual

Ensaio residuais foram feitos usando o método de papel filtro em uma placa de Petri, conforme descrito por Campbell e Miller (2015) com pequenas modificações. Um disco de papel de filtro de 20 cm<sup>2</sup> (Whatman # 1) será tratado com uma alíquota de 100 µL de cada concentração de tratamento (25, 50 e 100 µg EO/cm<sup>2</sup>) usando pipeta. A alíquota de 100 µL de tratamento deve cobrir completamente o papel de

filtro. Os papéis de filtro tratados, serão então colocados na placa de Petri (50 mm x 9 mm, Falcon). Os tratamentos de controle receberão apenas acetona. Dez insetos adultos serão liberados no papel de filtro e a mortalidade será registrada durante 7 dias como mencionado anteriormente. Serão utilizadas 3 repetições com 10 insetos/replicação. A deltametrina será usada como padrão.

#### 5.3.9.4 Teste de fumigação

Os insetos serão submetidos à toxicidade por vapor em frascos de vidro transparente de 125 mL. Um pequeno pedaço de papel será colocado no fundo de uma jarra para fornecer um substrato para os insetos descansarem durante os testes com os óleos voláteis. Bed bugs serão introduzidos nos frascos 2-4 h antes do tratamento para se aclimatarem. Uma solução de tratamento ou alíquota de acetona de 2 µL será depositada diretamente na superfície interna da parede lateral da garrafa a 4 cm do fundo da garrafa usando uma seringa a 50 µL (Hamilton Company, Reno, NV acoplada a um PB600, Reno, NV). Cinco concentrações: 15,6, 31,25, 62,5, 125 e 250 µg EO/125 cm<sup>2</sup> serão testadas contra os insetos. Os frascos serão colocados na câmara de crescimento e os dados para mortalidade serão registrados 24 h após o tratamento. O 2,2-diclorovinil-dimetilfosfato (DDVP) será usado como padrão.

### 5.7 Análise estatística

Os dados experimentais serão apresentados como médias ± desvio padrão amostral. Quando apropriado, a comparação de médias entre os grupos será realizada por análise variâncias unifatorial (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Duncan. Para isso, a homocedasticidade de todo o conjunto de dados será formalmente verificada pelo teste de Brown-Forsythe usando o *software* TIBCO Statistica v. 13.3 (TIBCO Statistica Ltd, Tulsa, EUA).

## 6-PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO:

*Etapas do desenvolvimento do trabalho para 1 ano:*

- 1- Revisão de literatura;
- 2- Coleta e preparo do material vegetal;
- 3- Controle de qualidade botânico, ensaios químicos e de atividades biológicas;

- 4- Realização de redes moleculares;
- 5- Análise dos espectros em redes moleculares;
- 6- Elaboração de resumos e participação em eventos científicos;
- 7- Elaboração de relatório e redação de artigo científico.

Etapa de trabalho/2024	Agosto-Setembro	Outubro-Novembro	Dezembro-Janeiro	Fevereiro-Março	Abril-Maio	Junho-Julho
1	X	X	X			
2	X	X	X			
3	X	X	X	X	X	X
4			X	X	X	X
5					X	X
6					X	X

## 7-REFERÊNCIAS

- ALLARD, P. M.; PÉRESSE, T.; BISSON, J.; GINDRO, K.; MARCOURT, L.; PHAM, V. C.; ROUSSI, F.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J.-L. Integration of Molecular Networking and *In-Silico* MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Anal. Chem.**, v. 88, n. 6, p. 3317–23, 2016;
- ALLARD, P. M.; BISSON, J.; AZZOLLINI, A.; PAULI, G. F.; CORDELL, G. A.; WOLFENDER, J. L. Pharmacognosy in the digital era: shifting to contextualized metabolomics. **Current opinion in Biotechnology**. v. 54, p. 57-64, 2018;
- ALMEIDA, V. P. *et al.* Investigations on the morpho-anatomy and histochemistry of the European mistletoe: *Viscum album* L. subsp. *album*. **Scientific reports**. v. 13; 4604, 2023;
- ARAÚJO, F. F.; NERI-UMA, I. A.; CASTRO-DA-CUNHA, G. R. PASTORE, G. M. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, v. 121, p. 57–72, 2019;
- BETIM, F. C. M.; BARBOSA, V.; OLIVEIRA, C. F.; MIGUEL, O. G.; RAMAN, V.; BUDEL, J. M.; MIGUEL, M. D.; DIAS, J. F. Microscopy and histochemistry of *Ocotea nutans* (Nees) Mez (Lauraceae). **Flora**. v. 273; 151708, 2020;

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p.;

BRASIL. Portaria nº 971, de 03 de Maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) do Sistema Único de Saúde. Saúde Legis: Sistema de Legislação e Saúde;

CAHLÍKOVÁ<sup>1</sup>, L.; ŠAFRATOVÁ, M.; HOŠŤÁLKOVÁ, J. C.; HULCOVÁ, D.; BREITEROVÁ, K.; CAHLÍKOVÁ, O. L.; ŠAFRATOVÁ, K.; HOŠŤÁLKOVÁ, A.; CHLEBEK, J.; HULCOVÁ, D.; BREITEROVÁ, K.; OPLETA, L. Pharmacognosy and Its Role in the System of Profile Disciplines in Pharmacy. **Natural Product Communications**. V. 15, n. 9, p.1-7, 2020;

CALIXTO, L. A.; SIMÕES, R. A.; BORGES, K. B. Validação analítica aplicada ao controle de qualidade. *In*: EMERY, F. S.; MARCHETTI, J. M. **Controle de qualidade**. Editora Atheneu; Coleção Farmácia; 2019;

CARVALHO, A. P. A.; CONTE-JÚNIOR, C. A. Health benefits of phytochemicals from Brazilian native foods and plants: Antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, and risk factors of metabolic/endocrine disorders control. **Trends in Food Science & Technology**; v. 11;, p. 534-548, 2021;

DEMARQUE, D.; DUSI, R. G.; SOUSA, F. D. M.; GROSSI, S.; SILVERIO, M. R. S.; LOPES, N; P.; ESPINDOLA, L. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific reports**. v. 10, 1051, 2020;

DE OLIVEIRA, G. G. *et al.* Dereplication of Flavonoid Glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* by Untargeted Tandem Mass Spectrometry-Based Molecular Networking. **Planta medica**. v.83, p. 636–646, 2017;

HEINRICH, M. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy**. Churchill Livingstone; 2ª edição, 2012;

KLEIN-JUNIOR, L. C. *et al.* Quality Control of Herbal Medicines: From Traditional Techniques to State-of-the-art Approaches. **Planta Medica**. v. 87, p. 964–988, 2021;

MACHADO, C. D. *et al.*, *Schinus molle*: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p.1–10, 2019;

MANFRON, J. Farmacobotânica: uma ferramenta importante para a detecção de adulterações em matérias-primas vegetais. *In*: BARATTO, L. A Farmacognosia no Brasil:

Memórias da Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 1. ed. — Petrópolis, RJ : Ed. Do Autor, 2021;

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*. v. 83; n. 3; p. 770-883, 2020;

PILLON *et al.* NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific reports**. n. 7; 7215, 2017;

POWO (2023). "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/> Retrieved 28 June 2023."

SANTOS, L. S. *et al.* Chemotaxonomic evaluation of different species from the Myrtaceae Family by UPLC-qToF/MS-MS coupled to supervised classification based on genus.

**Biochemical Systematics and Ecology**; v. 90, 104028, 2020;

SOUZA, A. M. *et al.* Traditional Uses, Phytochemistry, and Antimicrobial Activities of Eugenia Species – A Review. **Planta Medica**, 2018; v. 84: p.1232–1248;

UPTON, R. *et al.* Botanical ingredient identification and quality assessment: strengths and limitations of analytical techniques. **Phytochem Ver**. v. 19, p. 1157-1177, 2020;

VALLI, M.; RUSSO, M. H.; BOLZANI, V. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.. 90(1 Suppl. 1): p. 763-778, 2018;

YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X.; BOUDREAU, P. D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; FELICIO, R.; FENNER, A.; WONG, W. R.; LININGTON, R. G; ZHANG, L.; DEBONSI, H. M.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. Molecular networking as a dereplication strategy. **J. Nat. Prod**. v. 76, n. 9, p. 1686-99, 2013.

WATROUS, J.; ROACH, P.; ALEXANDROV, T.; HEATH, B. S.; YANG, J. Y.; KERSTEN, R. D.; VAN DER VOORT, M.; POGLIANO, K.; GROSS, H.; RAAJIMAKERS, J. M.; MOORE, B. S.; LASKIN, J.; BANDEIRA, N.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 109, n. 26, p. E1743–52, 2012.