



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQUI**

ASSUMANE JOAQUIM ACHUATE

**APLICAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR
ELETROSPRAY E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA CLASSIFICAR
ESPÉCIES DE *MICONIA* SPP.**

Uberlândia

2023

ASSUMANE JOAQUIM ACHUATE

APLICAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA CLASSIFICAR ESPÉCIES DE *MICONIA* SPP.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção de título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto

Uberlândia

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo (a) próprio (a) autor (a).

A179	Achuate, Assumane Joaquim, 1986-
2023	Aplicação de espectrometria de massas com ionização por eletrospray e métodos quimiométricos para classificar espécies de <i>Miconia</i> spp. [recurso eletrônico] / Assumane Joaquim Achuate. - 2023. Orientadora: Waldomiro Borges Neto . Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.640 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Química. I. , Waldomiro Borges Neto, 1970-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. III. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902 Telefone:

(34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 387, PPGQUI				
Data:	Cinco de dezembro de dois mil e vinte e três	Hora de início:	9h	Hora de encerramento:	12h
Matrícula do Discente:	12212QMI008				
Nome do Discente:	Assumane Joaquim Achuate				
Título do Trabalho:	“Aplicação de espectrometria de massas com ionização por eletrospray e métodos quimiométricos para classificar espécies de Miconia spp.”				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Instrumentação Analítica e Preparo de Amostras				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	“Aplicação de Métodos Quimiométricos”				

Reuniu por webconferência, *link*: <https://meet.google.com/tbm-hsmx-b>; <https://meet.google.com/cqb-ewtd-ios>; <https://meet.google.com/rqh-yxxf-axa>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: **Sérgio Antônio Lemos de Moraes**, da Universidade Federal de Uberlândia; **Frederico Garcia Pinto**, da Universidade Federal de Viçosa e **Waldomiro Borges Neto**, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidenta da mesa, Dr. **Waldomiro Borges Neto**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadores (as), que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o a) candidato (a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Waldomiro Borges Neto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 05/12/2023, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=5510315&infra_siste... 1/2](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=5510315&infra_siste...)

05/12/23, 14:36

SEI/UFU - 4930359 - Ata

Documento assinado eletronicamente por **Sergio Antônio Lemos de Moraes, Professor (a) do**



Magistério Superior, em 05/12/2023, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Garcia Pinto, Usuário Externo**, em 05/12/2023, às 14:23, 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://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4930359** e o código CRC **04E42031**.

Dedico este trabalho aos meus pais Joaquim Achuate (in memoriam) e Tunica Sunde, uma mulher guerreira que lhe ensinou tudo o que sabe e estimula suas maiores virtudes.

Em especial à minha amada esposa Kerna Matequera Achuate que soube viver sem a minha presença física durante o período de formação.

Aos meus filhos Yassin Assumane Achuate, Sualdin Assumane Achuate e Jaquelin Isabel Assumane Achuate

Meu orientador, o Professor Dr. Waldomiro Borges Neto, que me instigou a ser a melhor versão de mim mesmo, do início ao fim do processo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Deus, que em todos os dias da minha vida me deu força interior para superar as dificuldades e nunca desistir daquilo que acredito;

Aos meus Irmãos Assane Achuate, Fátima Achuate, Achuate e Filomena Achuate pela energia que sempre me forneceram;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto, pelo devido acompanhamento acadêmico e não só, mas como também pelo convívio, apoio, compreensão e, principalmente, pela confiança depositada em meu trabalho;

Ao Professor Dr. Alberto de Oliveira e a Doutoranda Tiara da Costa Silva pela parceria no trabalho;

Aos meus colegas do Laboratório de Quimiometria do Triângulo (LQT): Lucas Gustavo, Carlos Alface, Grazielly Amaral, Maria Teresa, Edvando Teles, e Rodrigo, que compartilharam conhecimentos comigo e pela ajuda sempre que necessário;

Aos meus amigos e compatriotas, Moisés Mbié, Daniel Sevene, Alegre Cadeado, Ivo Amildon Ricardo e Nélio Inoque por estarem sempre ao meu lado;

À Mayta, secretária do Programa de Pós-Graduação em Química pela disponibilidade em facultar de informações relevantes desde minha saída de Moçambique;

À Universidade Púnguè de Moçambique pelo afastamento para a realização do meu mestrado e pelo suporte financeiro da bolsa;

À Universidade Federal de Uberlândia e aos seus funcionários que forneceram toda a estrutura física e tecnológica para a realização deste trabalho, principalmente à Secretária do Programa de Pós-Graduação em Química, pelo acompanhamento em todos os processos técnico-administrativos;

Ao Laboratório de Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia e ao Laboratório de Nanobiotecnologia Professor Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (IGEB-UFU);

Finalmente, a todos os que colaboraram para fazer deste trabalho uma realidade é uma tarefa complexa. Portanto, agradeço aos demais que não os mencionei aqui, mas que direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso deste trabalho.

RESUMO

Por apresentarem propriedades terapêuticas as plantas medicinais são utilizadas para o tratamento, cura e prevenção de doenças, sendo esta prática clínica considerada uma das mais antigas da humanidade. Entre as plantas com propriedades medicinais o gênero *Miconia* é notável. Este gênero se destaca por ser um dos maiores grupos da família Melastomataceae e estarem distribuídas em todo Continente Americano. No Brasil, o gênero *Miconia* é encontrado em quase todas as formações vegetais e é representado por 26 espécies em Minas Gerais, onde quatro dessas espécies, a saber, *M. albicans*, *M. chamissois*, *M. cuspidata* e *M. rubiginosa* foram estudadas neste trabalho. O presente estudo tem como objetivo desenvolver métodos analíticos capazes de classificar as 4 espécies de *Miconia* usando a técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) e métodos quimiométricos. O uso dos métodos quimiométricos de Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA) e Dados Aplicados a Modelagem Independente e Suave de Analogia de Classes (DD-SIMCA) para extrair as informações nos espectros de massas permitiu o desenvolvimento de modelos estáveis, robustos e fáceis de interpretar. A utilização da técnica de espectrometria de massas em combinação com métodos quimiométricos para classificar as amostras das 4 espécies mostrou-se eficiente, pois os modelos PLS-DA e DD-SIMCA construídos foram capazes de discriminar corretamente todas as amostras das espécies de *Miconia* em suas respectivas classificações, obtendo-se uma eficiência de 100% e valores de sensibilidade e especificidade iguais a 1. Os modelos PLS-DA desenvolvidos apresentaram Erros Quadráticos Médio de Calibração (RMSEC), Validação Cruzada (RMSECV) e Previsão (RMSEP) abaixo de 1, demonstrando boa exatidão. Deste modo, os métodos analíticos desenvolvidos podem se tornar uma alternativa viável no controle de qualidade de produtos naturais e poderão ser utilizados para o desenvolvimento dos fármacos e tratamento de doenças.

Palavras-chave: Gênero *Miconia*. ESI-MS. Quimiometria. PLS-DA. DD-SIMCA.

ABSTRACT

Because they have therapeutic properties, medicinal plants are used to treat, cure and prevent diseases, and this clinical practice is considered one of the oldest in humanity. Amongst the plants with medicinal properties, the genus *Miconia* is notable. This genus stands out for being one of the largest groups in the Melastomataceae family and for being distributed throughout the American continent. In Brazil, the genus *Miconia* is found in almost all plant formations and is represented by 26 species in Minas Gerais, where four of these species, namely *M. albicans*, *M. chamissois*, *M. cuspidata* and *M. rubiginosa* were studied in this work. This study aims to develop analytical methods capable of classifying the 4 species of *Miconia* using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and chemometric methods. The use of Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) and Data Driven Smooth Independent Modelling of Class Analogy (DD-SIMCA) chemometric methods to extract the information in the mass spectra enabled the development of stable, robust and easy-to-interpret models. The use of the mass spectrometry technique in combination with chemometric methods to classify the samples of the 4 species proved to be efficient, since the PLS-DA and DD-SIMCA models built were able to correctly discriminate all the samples of the *Miconia* species in their respective classifications, obtaining an efficiency of 100% and sensitivity and specificity values equal to 1. The PLS-DA models developed have Root Mean Square Errors of Calibration (RMSEC), Cross Validation (RMSECV) and Prediction (RMSEP) below 1, demonstrating good accuracy. In this way, the analytical methods developed could become a viable alternative for quality control of natural products, and could be used for drug development and treatment of diseases.

Keywords: Genus *Miconia*. ESI-MS. Chemometrics. PLS-DA. DD-SIMCA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Classificação dos fármacos aprovados pela FDA no período de 1981 a 2019.....	16
Figura 2-Espécies de gênero <i>Miconia</i> spp. estudadas	21
Figura 3-Esquema de um espectrômetro de massas	23
Figura 4-Ilustração do processo de ionização por eletrospray.	24
Figura 5-Organização dos dados espectrais para construção da matriz X	26
Figura 6-Matriz de dados X e o vetor de classes y usados no PLS-DA	28
Figura 7-Gráfico de estimativa do modelo PLS-DA	29
Figura 8-Gráfico de Leverage versus Q Resíduals	31
Figura 9-Gráfico do modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento	33
Figura 10-Gráfico do modelo DD-SIMCA na etapa de teste	34
Figura 11-Processo de preparo do material vegetal e dos extratos.....	39
Figura 12-Gráfico dos espectros normalizados de massas obtidos das 4 espécies do gênero <i>Miconia</i>	41
Figura 13- Gráfico de estimativas do modelo PLS-DA para amostras da espécie <i>M. albicans</i>	42
Figura 14-Gráfico de estimativas do modelo PLS-DA para amostras da espécie <i>M. chamissois</i>	44
Figura 15-Gráfico de estimativas do modelo PLS-DA para amostras da espécie <i>M. cuspidata</i>	47
Figura 16-Identificação de outliers no Modelo PLS-DA da espécie <i>M. rubiginosa</i> através do gráfico Q Residuals versus Leverage	49

Figura 17-Gráfico de estimativas do modelo PLS-DA para amostras da espécie <i>M. rubiginosa</i>	49
Figura 18-Gráfico dos pesos do modelo PLS-DA para espécie <i>M. albicans</i>	51
Figura 19- Gráfico dos pesos do modelo PLS-DA para espécie <i>M. chamissois</i>	52
Figura 20-Gráfico dos pesos do modelo PLS-DA para espécie <i>M. cuspidata</i>	52
Figura 21-Gráfico dos pesos do modelo PLS-DA para espécie <i>M. rubiginosa</i>	52
Figura 22- Estrutura dos compostos identificados por ESI-MS nos EE de espécies de <i>Miconia</i>	58
Figura 23-Gráfico de resultado das amostras de <i>M. albicans</i> pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento	60
Figura 24-Gráfico de verificação externa em amostras de <i>M. albicans</i> pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento	61
Figura 25-Gráfico de aceitação em amostras da <i>M. albicans</i> pelo modelo DD-SIMCA na etapa de teste	61
Figura 26-Gráfico de resultado das amostras de <i>M. chamissois</i> pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento.....	63
Figura 27-Gráfico de verificação externa em amostras de <i>M. chamissois</i> pelo modelo DD- SIMCA na etapa de treinamento	63
Figura 28-Gráfico de aceitação em amostras da <i>M. chamissois</i> pelo modelo DD-SIMCA na etapa de teste.....	64
Figura 29-Gráfico de resultado das amostras de <i>M. cuspidata</i> pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento	65
Figura 30-Gráfico de verificação externa em amostras de <i>M. cuspidata</i> pelo modelo DD- SIMCA na etapa de treinamento	66

Figura 31-Gráfico de aceitação em amostras da <i>M. cuspidata</i> pelo modelo DDSIMCA na etapa de teste	66
Figura 32-Gráfico de resultado das amostras de <i>M. rubiginosa</i> pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento	68
Figura 33-Gráfico de verificação externa em amostras de <i>M. rubiginosa</i> pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento	68
Figura 34-Gráfico de aceitação em amostras da <i>M. rubiginosa</i> pelo modelo DDSIMCA na etapa de teste	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Equações de Figuras de Mérito aplicadas na validação dos modelos	36
Tabela 2-Código das exsiccatas consultadas e o local de coleta das espécies da <i>Miconia</i>	38
Tabela 3-Teor de umidade, massa da amostra e volume de solvente para o preparo dos extratos.	38
Tabela 4-Parâmetros de classificação obtidos do modelo PLS-DA da espécie <i>M. albicans</i> ...	43
Tabela 5-Tabela de Confusão do modelo PLS-DA da espécie <i>M. albicans</i>	43
Tabela 6-Parâmetros de classificação obtidos do modelo PLS-DA da espécie <i>M. chamissois</i>	45
Tabela 7-Tabela de Confusão do modelo PLS-DA da espécie <i>M. chamissois</i>	46
Tabela 8-Parâmetros de classificação obtidos do modelo PLS-DA da espécie <i>M. cuspidata</i> .	47
Tabela 9-Tabela de Confusão do modelo PLS-DA da espécie <i>M. cuspidata</i>	48
Tabela 10-Parâmetros de classificação obtidos do modelo PLS-DA da espécie <i>M. rubiginosa</i>	50
Tabela 11-Tabela de Confusão do modelo PLS-DA da espécie <i>M. rubiginosa</i>	51
Tabela 12- Proposta de identificação para os principais íons presentes nas espécies <i>M. albicans</i> , <i>M. chamissois</i> , <i>M. cuspidata</i> e <i>M. rubiginosa</i> por ESI-MS. Continua.....	55
Tabela 13-Tabela de confusão do modelo DD-SIMCA nos conjuntos de treinamento e de teste para espécie de <i>M. albicans</i>	62
Tabela 14-Tabela de confusão do modelo DD-SIMCA nos conjuntos de treinamento e de teste para espécie de <i>M. chamissois</i>	65
Tabela 15-Tabela de confusão do modelo DD-SIMCA nos conjuntos de treinamento e de teste para espécie de <i>M. cuspidata</i>	67

Tabela 16-Tabela de confusão do modelo DD-SIMCA nos conjuntos de treinamento e de teste para espécie de <i>M. cuspidata</i>	70
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ESI-MS	Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray
ESI	Ionização por Eletrospray (do inglês, <i>Ionization by Electrospray</i>)
PLS-DA	Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (do inglês, <i>Discriminant Analysis with Partial Least Squares Method</i>)
DD-SIMCA	Dados Aplicados a Modelagem Independente e Suave de Analogia de Classes (do inglês, <i>data driven – soft independent modeling of class analogy</i>)
PC	Componente Principal (do inglês, <i>Principal Component</i>)
PCA	Análise de Componentes Principais
PLS	Quadrados Mínimos Parciais (do inglês, <i>Partial Least Squares</i>)
VL	Variável Latente
RMSEC	Erro Quadrático Médio de Calibração (do inglês, <i>Root Mean Squared Error of Calibration</i>)
RMSECV	Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada (do inglês, <i>Root Mean Squared Error of Cross Validation</i>)
RMSEP	Erro Quadrático Médio de Previsão (do inglês, <i>Root Mean Squared Error of Prediction</i>)
FP	Taxa de Falso Positivo
VP	Taxa de Verdadeiro Positivo
FN	Taxa de Falso Negativo
VN	Taxa de Verdadeiro Negativo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.2 Objetivo geral	19
1.1.3 Objetivos específicos.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Cerrado	20
2.2 A Família Melastomataceae	20
2.2.1 O gênero <i>Miconia</i>	21
3. Técnica Analítica	22
3.1 Espectrometria de Massas (MS).....	22
3.2 Espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray (ESI-MS)	24
4. Quimiometria	25
4.1 Organização e Pré-Processamento de dados	25
4.2 Métodos de classificação.....	27
4.3 Análises Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA)	27
4.4 Detecção de Amostras Anômalas (<i>Outlier</i>)	30
4.5 Dados Aplicados a Modelagem Independente e Suave de Analogia de Classes (DD-SIMCA).....	32
4.6 Validação de modelos de classificação	34
5. METODOLOGIA	37
5.1 Materiais.....	37
5.2 Solventes	37
5.3 Software	37
5.4 Coleta, preparo do material vegetal e dos extratos.....	37

5.5 Preparo do material vegetal e dos extratos.....	38
5.6 Análise dos extratos das espécies do gênero <i>Miconia</i> por ESI-MS	39
5.7 Modelos quimiométricos.....	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
6.1 Espectros de massas de amostras das espécies de gênero <i>Miconia</i> analisadas por ESI-MS.....	41
6.2 Modelo PLS-DA da espécie <i>M. albicans</i>	41
6.2.1 Validação do modelo PLS-DA da espécie <i>M. albicans</i>	42
6.3 Modelo PLS-DA da espécie <i>M. chamissois</i>	44
6.3.1 Validação do modelo PLS-DA da espécie <i>M. chamissois</i>	45
6.4 Modelo PLS-DA da espécie <i>M. cuspidata</i>	46
6.4.1 Validação do modelo PLS-DA da espécie <i>M. cuspidata</i>	47
6.5 Modelo PLS-DA da espécie <i>M. rubiginosa</i>	48
6.5.1 Validação do modelo PLS-DA da espécie <i>M. rubiginosa</i>	50
6.6 Proposta de identificação dos principais íons para a discriminação das espécies do gênero <i>Miconia</i>	53
7. Resultados dos modelos DD-SIMCA	60
7.1 Modelo DD-SIMCA da espécie <i>M. albicans</i>	60
7.1.1 Validação do modelo DD-SIMCA da espécie <i>M. albicans</i>	62
7.2 Modelo DD-SIMCA da espécie <i>M. chamissois</i>	62
7.2.1 Validação do modelo DD-SIMCA da espécie <i>M. chamissois</i>	64
7.3 Modelo DD-SIMCA da espécie <i>M. cuspidata</i>	65
7.3.1 Validação do modelo DD-SIMCA da espécie <i>M. cuspidata</i>	67
7.4 Modelo DD-SIMCA da espécie <i>M. rubiginosa</i>	67
7.4.1 Validação do modelo DD-SIMCA da espécie <i>M. rubiginosa</i>	69

9. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICE	84

1. INTRODUÇÃO

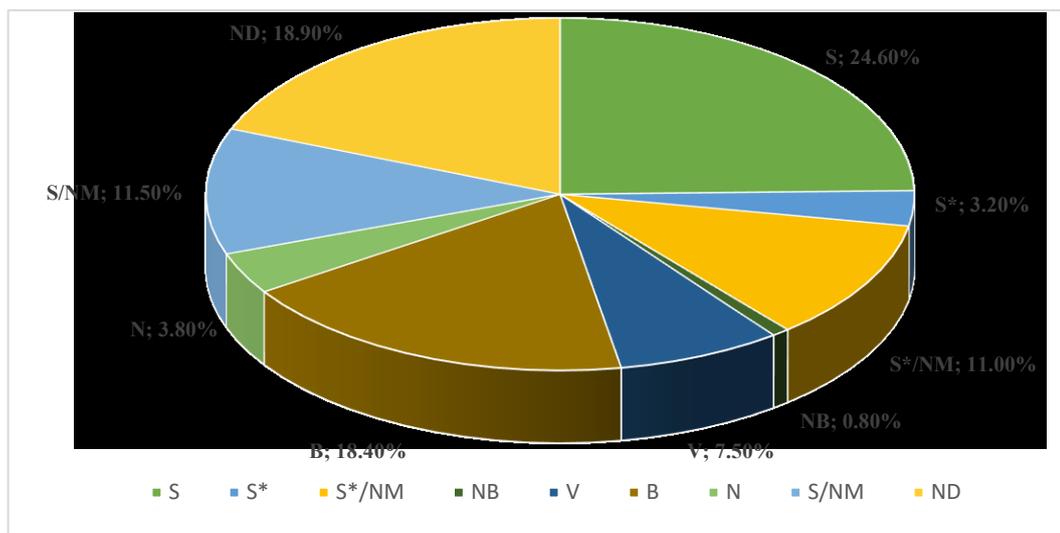
A utilização de produtos naturais (PNs) para fins medicinais é uma prática que acompanha a história da humanidade desde a evolução das primeiras civilizações. Por apresentarem grande fonte de PNs biologicamente ativos, os PNs alcançaram grande valor na sociedade devido ao conhecimento de algumas moléculas com propriedades clínicas (CHALUB et al., 2018; MAJUMDAR; SOMANI, 2018; STUDENT et al., 2021; LEITZKE et al., 2022).

Segundo Vicente (2019), PNs como sendo substâncias químicas ou compostos obtidos a partir de plantas, fungos e microrganismos e possuem atividade biológica ou farmacológica e tem sido utilizado no tratamento de várias doenças.

Os PNs são a principal fonte de produção de medicamentos, como compostos ativos isolados, medicamentos brutos e como derivados. Muitos medicamentos que são derivados de PNs utilizados atualmente foram descobertos através do conhecimento etnomédico dos povos tribais (SINGH et al., 2017; CAMPOS; ALBUQUERQUE, 2021). Atualmente, os PNs com propriedades medicinais contribuem para a descoberta de novos princípios ativos, principalmente no desenvolvimento de novos antibióticos (CARLOS et al., 2022).

Em 2020 um estudo apresentado graficamente na Figura 1, relatou a importância dos produtos naturais para a descoberta de novos medicamentos, mostrando que de 1.881 fármacos aprovados pela agência regulatória *Food and Drug Administration* (FDA) no período de 1981 a 2019, 3,8% foram produzidos a partir de PNs inalterados (N), 24,6% eram fármacos sintéticos (S), 18,4% compostos constituídos por macromoléculas biológicas (B), além de 7,5% das vacinas (V) e 49,2% dos fármacos restantes terem sido inspirados nas estruturas de PNs. Esses fármacos foram classificados com as seguintes categorias: produto natural inalterado (N), produto natural "botânico" (NB), droga puramente sintética (S), macromolécula biológica como peptídeo (B), derivado de um produto natural com modificação semissintética (ND), sintético com farmacóforo de produtos naturais (S*), vacina (S) e fármacos produzidos com conhecimento baseado em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Figura 1-Classificação dos fármacos aprovados pela FDA no período de 1981 a 2019



Fonte: adaptado de Newman e Cragg (2020).

Os PNs, graças à sua diversidade química e bioatividade, representam uma opção viável que podem ser usados como exemplos no desenvolvimento de novos fármacos. Dentre os PNs utilizados como fármacos também se destaca o gênero *Miconia*. As espécies do gênero *Miconia* possuem propriedades farmacológicas e são utilizadas para tratamento de diversas doenças na medicina tradicional. Das quatro espécies do gênero (*M. albicans*, *M. chamissois*, *M. cuspidata* e *M. rubiginosa*) selecionadas neste estudo, somente a *M. cuspidata* que não apresenta estudos nas literaturas em relação ao potencial farmacológico e a composição química. *M. albicans* é a espécie com mais relatos sobre uso medicinal devido às suas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antidiabéticas (LIMA, R. D. C. L, KONGSTAD; FRANZYK; STAERK, 2018; SABBAG CUNHA; CRUZ; SEVERO MENEZES, 2019). Em relação a composição química do gênero *Miconia*, já foram identificados os ácidos fenólicos, quinonas, fenilpropanoides, lignanas, taninos hidrolisáveis, triterpenos, esteroides e flavonoides. Os compostos mais identificados desse gênero são os triterpenos ácido oleanólico e ácido ursólico.

Devido aos estudos promissores apresentados por *Miconia albicans* em relação ao seu potencial biológico, as 4 espécies deste gênero foram selecionadas neste trabalho a fim de verificar as semelhanças e diferenças em termos das atividades biológicas e da composição química. As folhas dessas espécies apresentam semelhanças em suas características físicas, principalmente depois de serem trituradas, podem ocorrer erros na sua identificação se feito por análise visual, portanto, é necessário se fazer uma análise química para diferenciá-las.

O estudo da composição química das espécies de *Miconia* pode trazer informações relevantes que permitam classificar cada espécie assim como descobrir os compostos químicos que regem tal distinção, identificando dentre as espécies quais realmente possuem atividade medicinal. Para isso a técnica analítica de espectrometria de massas tem se mostrado promissora, onde obtemos espectros de massa com quantidade de informação química suficiente para solucionar essa questão. Entretanto a complexidade dos dados espectrais necessita de um tratamento multivariado visando extrair informações correlacionadas com a propriedade de interesse, no caso classificar as 4 espécies de *Miconia* estudadas pelos pesquisadores do NUPPeN-UFU. Portanto, é necessário a utilização da técnica de espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray (ESI-MS) associado aos métodos quimiométricos para extrair e tratar as informações a partir desses espectros de massas. Esta técnica consiste na ionização de átomos ou moléculas, seguida da separação de íons na fase gasosa em diferentes razões massa/carga (m/z) e detecção e processamento dos sinais e nos fornece informações da amostra acerca da sua constituição química, propriedades químicas e de seus constituintes.

A técnica MS por estar associada à natureza dos íons gerados, auxilia na demanda da compreensão dos processos químicos envolvidos na formação e na estabilização das espécies analisadas. Existem diferentes modos de ionização, dentre elas podemos destacar a ionização por eletrospray (ESI). Os espectros de massas obtidos nessa técnica caracterizam-se pela presença de íons fragmentados e de precursores relativamente intensos. Portanto, essa técnica é amplamente utilizada para amostragem por infusão direta em análises qualitativa e quantitativa (VESSECCHI et al., 2008). Devido à complexidade dos dados espectrais, é necessário um tratamento multivariado para extrair informações correlacionadas com a propriedade de interesse, no caso de separar as espécies do gênero *Miconia*.

A análise quantitativa de grande quantidade de dados empregado na Química pode ser realizada com mais eficiência quando as técnicas analíticas são aliadas aos métodos quimiométricos (BRUNS, R. E.; FAIGLE, 1985). Os métodos analíticos propostos nesse trabalho são de fácil interpretação e eficientes, fazendo com que sejam alternativas viáveis para classificar as espécies do gênero *Miconia* visando diferenciar uma determinada espécie das outras em termo das atividades biológicas e composição química.

Para extrair informações confiáveis e relevantes de forma rápida e eficiente dos dados multivariados, os pesquisadores utilizam métodos quimiométricos (JIMÉNEZ-CARVELO et al., 2019). Devido à complexidade dos dados espectrais é necessário se fazer um tratamento

multivariado aos dados para extrair informações correlacionadas com a propriedade de interesse. A utilização dos métodos quimiométricos são importantes para a obtenção de informações quantitativas e qualitativas a partir de espectros complexos e dados multivariados. O presente trabalho visa o desenvolvimento de métodos analíticos usando a técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray aliada aos métodos quimiométricos de Análises Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA) e Dados Aplicados a Modelagem Independente e Suave de Analogia de Classes (DD-SIMCA) para classificar as 4 espécies de *Miconia*, uma vez que estudos com essa temática não foram publicados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.2 Objetivo geral

O projeto tem como objetivo geral, desenvolver métodos analíticos capazes de classificar as 4 espécies de *Miconia* usando a técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) e métodos quimiométricos (PLS-DA e DD-SIMCA).

1.1.3 Objetivos específicos

- ✓ Identificar e coletar as espécies de *Miconia* ssp.;
- ✓ Preparar os extratos etanólicos das folhas;
- ✓ Realizar análises dos extratos etanólicos por ESI-MS;
- ✓ Construir modelos de PLS-DA e DD-SIMCA para classificar as 4 espécies de *Miconia*;
- ✓ Validar e comparar os modelos construídos;
- ✓ Identificar os íons responsáveis pela discriminação das 4 espécies de *Miconia*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerrado

O Cerrado brasileiro é uma savana tropical localizada na região central e apresenta a maior diversidade florística do mundo com mais de 7.000 espécies entre as áreas de savana. O bioma perdeu 46% de sua cobertura vegetal nativa e apenas 19,8% da vegetação nativa do Cerrado permanece intacta. Além disso, o Cerrado ainda possui cerca de 27 milhões de hectares de áreas de vegetação nativa desprotegidas. Enquanto isso, 28,7% da área do bioma Amazônia é protegida por unidades de conservação, onde 10,5% pertence à Proteção Integral e 18,2% ao uso Sustentável da Biodiversidade (POLIZEL et al., 2021).

O Brasil é um dos países com a maior biodiversidade do mundo e grande propensão para o estudo de produtos naturais. O país é representado por seis biomas continentais (Floresta Amazônica, Pantanal, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga e Pampa) e apresenta o bioma Cerrado que cobre uma área de cerca de 2,8 milhões de km². O cerrado brasileiro é a maior região neotropical das savanas existentes no mundo e ocupa aproximadamente 45% da América do Sul. Além disso, a América do Sul apresenta o segundo bioma do Cerrado mais extenso e foi identificada como um dos hotspots de biodiversidade do mundo (BEZERRA et al., 2022; GIMENEZ et al., 2020; SANTOS; FERREIRA; LENZI, 2018).

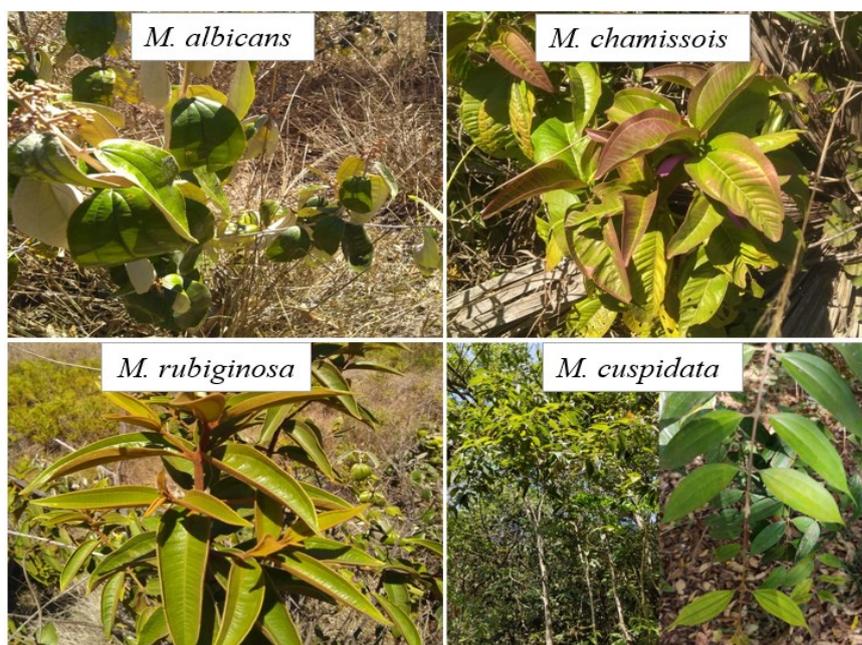
2.2 A Família Melastomataceae

Melastomataceae é uma família de angiospermas com aproximadamente 5.159 espécies e 177 gêneros distribuídos nos trópicos. Cerca de 98% das espécies são encontradas em Neotropicais (MELO et al., 2021; PASSOS et al., 2022). No Brasil, os neotrópicos representam dois terços das espécies conhecidas. Eles ocorrem em 68 gêneros, dos quais 21 são endêmicos, com aproximadamente 1.500 espécies (ALBUQUERQUE et al., 2013). No Brasil, a família Melastomataceae ocupa sexta maior família de Angiospermas, com 1.393 espécies e 69 gêneros, sendo os gêneros *Miconia* são os mais representativos (IGLESIAS; DUTRA, 2017).

2.2.1 O gênero *Miconia*

Dentre as fontes de PNs abundantemente disponíveis, as plantas pertencentes ao gênero *Miconia* se destacam por ser um dos maiores grupos da família Melastomataceae e estarem distribuídas em todo Continente Americano com aproximadamente 1.900 espécies. No Brasil, este gênero encontra-se em quase todas as formações vegetais, com mais de 282 espécies, das quais 125 são endêmicas e ocupa a quinta posição em termos de número de espécies situados nos biomas de Mata Atlântica, Amazônico e no domínio Cerrado. (OLIVEIRA SABBAG CUNHA et al., 2021). As folhas e ramos das espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular para o tratamento da artrite reumatóide e redução da dor e inflamação, já os caules são utilizados como febrífugo e no tratamento do vitiligo. Em Minas Gerais, este gênero é representado por 26 espécies, das quais, as quatro estudadas neste trabalho (*M. albicans*, *M. chamissois*, *M. cuspidata* e *M. rubiginosa*) foram selecionadas e são apresentadas na Figura 2 (FERREIRA; BORGES; FIUZA, 2019; FERREIRA et al., 2022).

Figura 2-Espécies de gênero *Miconia* spp. estudadas



Fonte: O autor

M. albicans, conhecida popularmente como “canela-de-velho”, árvore pequena que atinge aproximadamente 6 m de altura, ocorrendo do sul do Brasil ao sul do México (DIAS et al., 2018). As folhas são simples, as flores são brancas e as sementes possuem cotilédones foliáceos (DIAS et al., 2018; FERREIRA; BORGES; FIUZA, 2019), e as folhas são utilizadas

no tratamento de artrite reumatoide, alívio de dores articulares e inflamação (LIMA et al., 2020a, 2020b). Este gênero no Estado de Minas Gerais pode ser encontrado em campo sujo, cerrado sentido restrito e bordas de mata e Cerradão (DE REZENDE; ROMERO; GOLDENBERG, 2014).

M. chamissois Naudin, conhecida popularmente como “Folha de Bolo”, “Sabiazeira” ou “Pixirica” arvoretas com altura de 4,5 m, localizada na Bolívia e no Brasil. Também podem ser encontradas na Amazônia, Caatinga e Cerrado em lugares úmidos. Apresenta folhas brancas e ramos glabros, folhas elípticas a oval-elípticas e panículas grandes com até 28 cm de comprimento e possuem uma estrutura que envolve os estames antessépalos com projeção basal ampla, contínua desde a porção ventral até a dorsal, formando uma bainha (DE REZENDE; ROMERO; GOLDENBERG, 2014).

M. rubiginosa, conhecida por “capororoquina”, arvoreta ou arbusto com altura que varia de 1 até 5 m, com folhas curtas-pecioladas, geralmente elípticas a oval-oblongas. Esta espécie pode ser encontrada na Costa Rica e Bolívia. No Brasil, é encontrada em cerrados dos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia e São Paulo. A frutificação acontece entre fevereiro e meados de abril. O fruto é uma baga violácea com poucas sementes por lóculo (FERREIRA et al., 2013; DE REZENDE; ROMERO; GOLDENBERG, 2014; GOLDENBERG, 2016; GOLDENBERG et al., 2022).

M. cuspidata Naudin, conhecida por “pixirica”, possui forma de arvoretas ou árvores com altura que varia entre 5 e 8 m (DE REZENDE, 2012), é caracterizada por apresentar folhas concolores com até 10 mm de comprimento e baga com 40 - 50 sementes. Podem ser localizadas na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica em floresta seca e savana amazônica. No Brasil, este gênero é encontrado em mata seca em Minas Gerais (DE REZENDE; ROMERO; GOLDENBERG, 2014).

3. Técnica Analítica

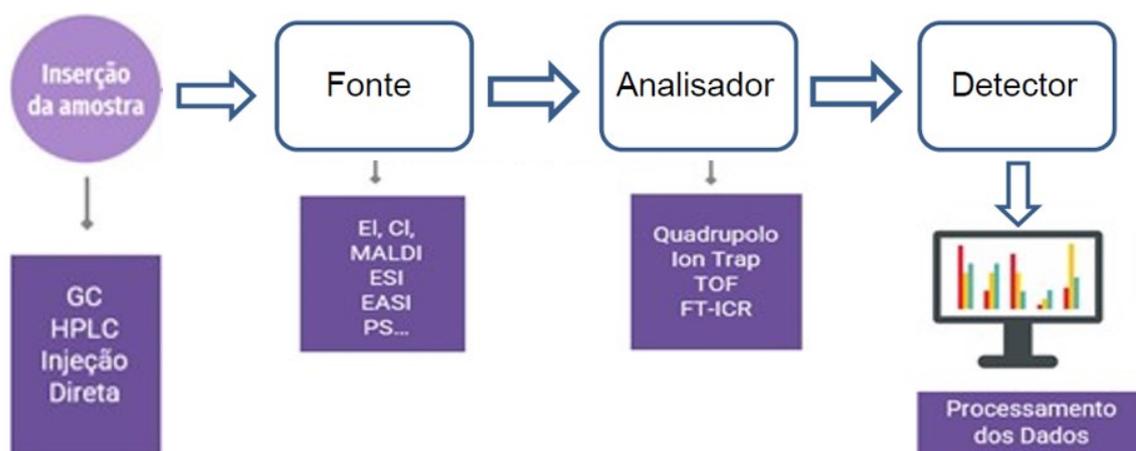
3.1 Espectrometria de Massas (MS)

A espectrometria de massas (MS – do inglês *Mass Spectrometry*) é definida como técnica que consiste na separação de íons gasosos da amostra de acordo com suas razões massa/carga (m/z). Esta técnica fornece informações acerca da constituição química de uma

amostra e de algumas propriedades químicas de seus constituintes. A técnica MS é utilizada na análise qualitativa e quantitativa de componentes de uma amostra ou mistura, no cálculo da massa molecular, na caracterização estrutural e estudo da reatividade de compostos e, em alguns casos, da fórmula molecular do analito. Portanto, as informações específicas na estrutura do analito, sobre a identificação de certos grupos funcionais, em alguns casos, na determinação de parte da estrutura, também podem ser obtidas através da análise detalhada e racionalizada do espectro de massas (VESSECCHI et al., 2008).

Essa técnica envolve a ionização de átomos ou moléculas, seguida da separação dos mesmos de acordo com suas razões massa/carga (m/z) e, então, detecção e processamento dos sinais. O primeiro componente de um espectrômetro de massas é uma fonte de ionização, responsável por conferir carga aos analitos. A formação dos íons pode ocorrer a partir da aplicação de uma alta energia, como por exemplo na ionização por impacto de elétrons, ou através de reações ácido/base. Os íons gerados são acelerados por campos elétricos e magnéticos até chegarem aos analisadores, que os separam de acordo com suas diferentes razões massa/carga (m/z) e/ou pelas fragmentações dos analitos de interesse. Por fim os íons são enviados ao detector, que mede a sua abundância por meio da conversão em sinais elétricos. Esses sinais são processados por um sistema de aquisição de dados, fornecendo os espectros de massas (Figura 3) (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; HOFFMAN, E.; STROOBANT, 2007).

Figura 3-Esquema de um espectrômetro de massas



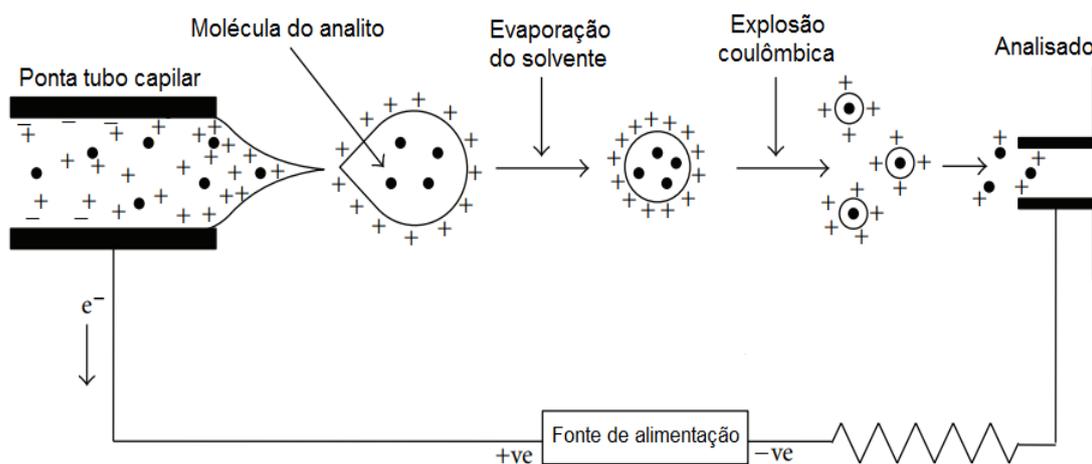
Fonte: O autor

3.2 Espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray (ESI-MS)

A ionização por eletrospray (ESI – do inglês *Electrospray ionization*) (Figura 4) é uma técnica analítica que permite a geração de íons em fase gasosa a partir de espécies em soluções aquosas. Essa técnica consiste em borrifar uma solução contendo a amostra na ponta de um tubo capilar que sofre a ação de um potencial elétrico para dentro de uma câmara aquecida. Com a evaporação do solvente, as gotas diminuem de tamanho e ocorre um aumento da repulsão eletrostática entre as cargas das suas superfícies. Esse fenômeno favorece a liberação dos íons, formando-se assim um fino spray de partículas carregadas (CROTTI et al., 2006).

A principal vantagem do eletrospray é que a dessolvatação dos íons (processo de separação dos íons de uma substância iônica quando ela se dissolve em água) ocorre gradualmente em temperaturas relativamente baixas (tipicamente, de temperatura ambiente até 80 °C), de forma a não gerar fragmentos nem moléculas ionizadas. Assim, muitos dos íons gerados na fase gasosa mantêm exatamente a mesma estrutura e carga das espécies em solução. (MORAES et al., 2003). Essa técnica tem a capacidade de analisar amostras de grandes massas moleculares com alta sensibilidade espectral. A Figura 4 representa o processo de ionização por eletrospray.

Figura 4-Ilustração do processo de ionização por eletrospray.



Fonte: Adaptado de BANERJEE; MAZUMDAR (2012)

4. Quimiometria

Em 1971, o químico sueco S. Wold criou o termo quimiometria. Mais tarde, ele colaborou com B.R. Kowalski, outro químico que vinha trabalhando em métodos matemáticos de identificação de padrões. Em 1974, eles estabeleceram a Sociedade Internacional de Quimiometria. O desenvolvimento da quimiometria se deve ao fato de que as análises univariadas não serem mais suficientes para descrever e modelar experimentos químicos.

A Quimiometria é definida como aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal para tratamento de dados químicos, visando extrair informações químicas relevantes através da análise de dados e obter melhores resultados analíticos. A quimiometria se baseia na matemática para diferentes aplicações de extração de informação. Ela apresenta algumas vantagens como: melhor razão sinal-ruído, minimizar o efeito da presença de interferentes, análise exploratória e controle de *outliers* (MASSART, 1998)

A quimiometria apresenta algumas contribuições em suas linhas de pesquisa que incluem o desenvolvimento e a aplicação das técnicas de planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, resolução de curvas, monitoramento e modelagem de processos multivariados, processamento de sinais analíticos, calibração multivariada, métodos de inteligência artificial, seleção de variáveis, entre outras. Ela é aplicada em diferentes áreas, com destaque: na indústria, análises químicas, alimentos, saúde, medicamentos, combustíveis, meio ambiente etc. Com aplicações ao longo de toda cadeia produtiva, em estudos de adulterações e contaminações, quantificações e classificação de amostras, no monitoramento do controle de qualidade, entre outras (FERREIRA, 2015; MASSART, 1998; RICHARD, BRERETON., 2003). Para aplicar os métodos quimiométricos com sucesso, é indispensável organizar e quando necessário realizar um pré-processamento dos dados analíticos.

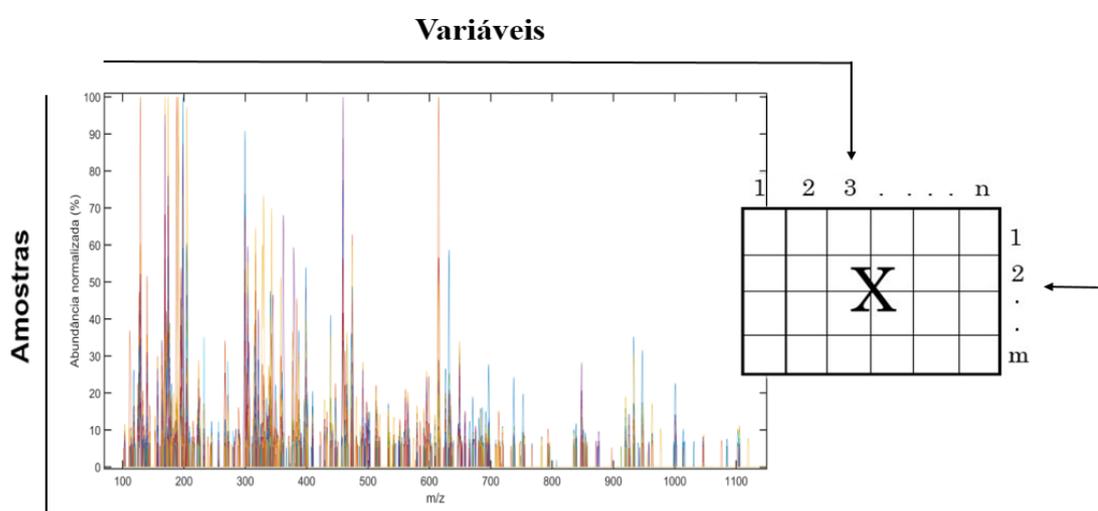
4.1 Organização e Pré-Processamento de dados

Para transformar o sinal analítico em um arquivo numérico a organização dos dados é fundamental. Após a obtenção das medidas, é necessário exportá-las em um formato numérico que possa ser lido por um programa específico. Para conjunto de dados que apresentam muitas variáveis, a alta dimensionalidade pode tornar o tratamento de dados mais difícil. Portanto, com

uso da ferramenta matemática é possível reduzir as variáveis e alcançar a melhor visualização espacial dos dados, permitindo uma interpretação mais precisa.

Para obtenção de informações quantitativas e qualitativas a partir de dados multivariados, a utilização de métodos quimiométricos é indispensável. Na realização dos procedimentos multivariados, os dados são organizados numa matriz **X** composta de linhas e colunas, onde cada linha corresponde a uma amostra “**m**” e cada coluna uma variável “**n**”, na qual $m = 1,2,3,\dots, m$ e $n = 1,2,3,\dots, n$, conforme representado na Figura 5 (FERREIRA, 2015).

Figura 5-Organização dos dados espectrais para construção da matriz **X**



Fonte: O autor.

Após a organização dos dados experimentais na matriz **X**, geralmente realiza um pré-tratamento dos dados visando minimizar efeitos indesejáveis como flutuações de Linha de Base, espalhamentos, ruídos, normalização e retirada de informações não relevantes. É importante realizar o pré-tratamento dos dados, pois isso permite reduzir as variações indesejáveis que não foram retiradas durante a obtenção dos dados e que não serão eliminadas naturalmente durante a análise quimiométrica. Essas variações podem influenciar os resultados finais (FERREIRA, 2015). Em espectros de massas é recomendado normalizar os picos pelo sinal de maior intensidade e retirar os picos com baixa intensidade (picos de m/z com intensidade menor de 5%).

Depois do pré-tratamento dos dados caso precise fazer-se um pré-processamento dos dados, essa etapa é importante para eliminar ou minimizar efeitos de tendências nos modelos quimiométricos construídos. Em dados espectrais o mais utilizado é Centrar os Dados na Média

que consiste em centralizar cada variável em relação à sua média. (WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, 1987).

A centralização dos dados na média é feita quando todas as variáveis forem medidas numa mesma unidade e possuírem a mesma magnitude. Este pré-processamento admite que a presença de ruídos não afete negativamente na análise. Para centralizar a matriz de dados na origem, subtrai-se cada elemento de cada coluna pela média da respectiva coluna (FERREIRA, 2015), conforme a Equação 1.

$$X_{ij(cm)} = X_{ij} - \bar{X}_j \quad (1)$$

Onde $X_{ij} (cm)$ é o valor centrado na média para a variável j na amostra i ; X_{ij} é o valor da variável j na amostra i ; e \bar{X}_j é a média dos valores das variáveis na coluna j .

4.2 Métodos de classificação

Os métodos de classificação também são chamados de métodos de reconhecimento de padrões e dividem-se em: métodos supervisionados e métodos não supervisionados (FERREIRA, 2015). Os métodos supervisionados são usados quando a propriedade de interesse é decisiva, isto é, cada uma das amostras é descrita por um conjunto de medidas experimentais, denominada de “padrão” e são classificadas de acordo com uma propriedade de interesse (bom/ruim; falso/verdadeiro; ativo/não ativo, etc.).

Os métodos de classificação são aplicados na identificação de perfis e impressões digitais, autenticação, detecção de falsificação, avaliação da qualidade de vários produtos alimentares, interpretação de dados, entre outros. Os métodos mais usados são: Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA), Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classe (SIMCA) e K-ésimo Vizinhos mais Próximos (KNN) (FERREIRA, 2015). Os métodos não supervisionados são usados para a análise exploratória dos dados, quando não temos informações relativas a propriedade de interesse. Os mais aplicados são: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) (FERREIRA, 2015).

4.3 Análises Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA)

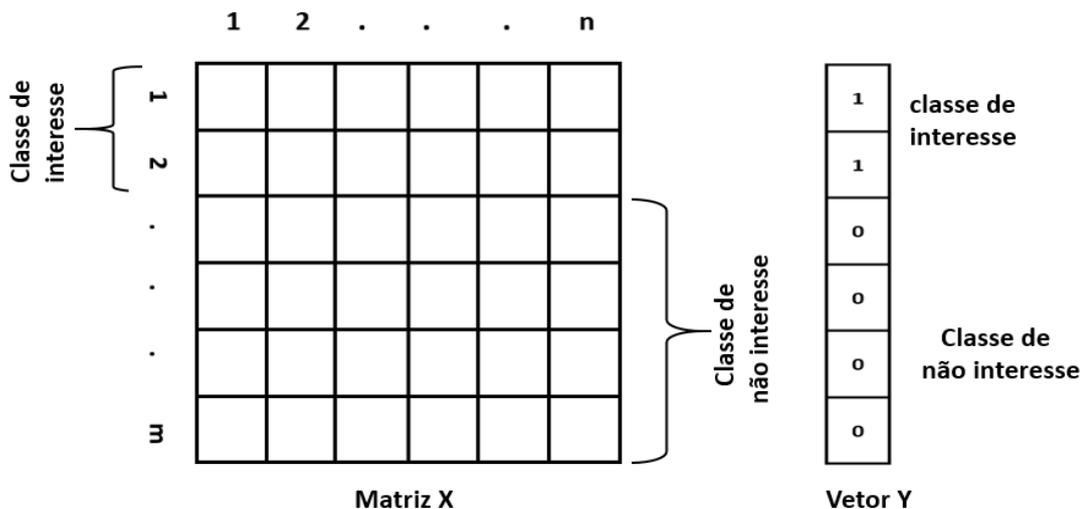
A Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (do inglês, *Partial Least Squares with Discriminant Analysis* - PLS-DA) é um método de reconhecimento de padrões supervisionado utilizado para classificação de amostras que permite construir modelos capazes

de prever a classe de amostras desconhecidas. Nos métodos supervisionados exigem que se tenha conhecimento prévio das amostras e suas respectivas classes para determinar as regras que serão usadas para classificá-las (BARKER; RAYENS, 2003).

Este método é baseado no método de regressão por Quadrados Mínimos Parciais (do inglês, *Partial Least Squares* - PLS). Ambos métodos apresentam os mesmos princípios matemáticos, a diferença entre eles está na matriz de correlação Y . No caso do PLS-DA (método onde a matriz de correlação é uma matriz linha, ou seja, um vetor), a matriz Y é composta por dois valores (normalmente 0 e 1), que indicam se uma amostra pertence ou não a uma classe pré-definida, enquanto no PLS, a matriz Y é composta por valores numéricos que representam alguma propriedade da amostra. Idealmente, os valores previstos pelo modelo PLS-DA seriam 0 e 1 entretanto os valores previstos não são 0 ou 1 e sim próximos a estes, sendo necessário calcular um valor limite para separação das classes, representado no gráfico por uma linha tracejada denominado de *threshold*. Com base no teorema de Bayes, o valor de limiar "*threshold*" é previsto entre 0 e 1. Assim, esse limiar admite que os valores previstos de Y seguem uma distribuição igual à que vai ser observada para as amostras futuras (BARKER; RAYENS, 2003).

No modelo PLS-DA os dados espectrais são organizados numa matriz X e um vetor y contendo a informação da classe pertencente de cada amostra, onde atribuiu-se o número 0 para amostras da classe de não interesse e número 1 para amostras da classe de interesse, conforme Figura 6.

Figura 6-Matriz de dados X e o vetor de classes y usados no PLS-DA



Fonte: O autor

No conjunto de treinamento quando se tem a acima de 20 amostras é recomendado o método de validação cruzada pelo critério da veneziana que é realizado em blocos de amostras, onde na etapa de treinamento o número total de amostras é dividido em um número definido de blocos, em cada bloco um número pequeno de amostras são retiradas aleatoriamente, um modelo é construído com as demais amostras para prever as amostras retiradas, esse processo se repete até que todas as amostras do conjunto de treinamento tenham sido retiradas e previstas pelos respectivos modelos. (MASSART, 1998; VOLPE et al., 1999).

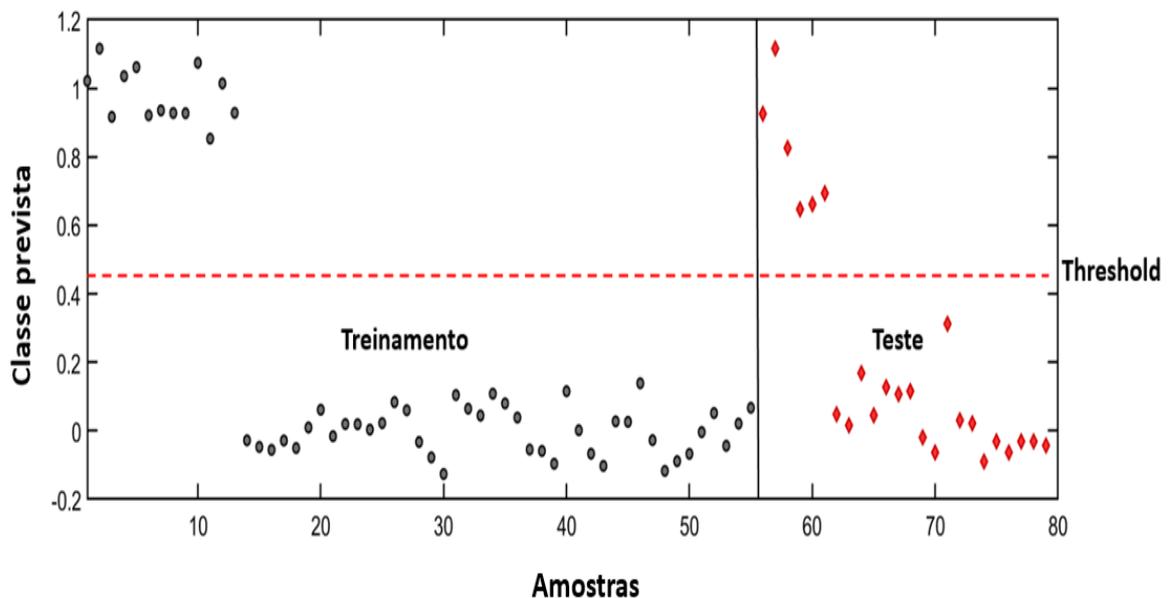
O Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada (RMSECV), é determinado de acordo com a Equação 2.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (2)$$

Onde, y_i corresponde o valor real para a propriedade de interesse da amostra “ i ”, \hat{y}_i é o valor da propriedade de interesse da amostra “ i ” previsto pelo modelo e n é o número de amostras de calibração.

O modelo PLS-DA apresenta um gráfico de estimativas conforme a Figura 7, onde as amostras que se encontram acima do *threshold* do conjunto de treinamento (●) e de teste (◆) são classificadas como pertencentes à classe 1 (classe de interesse) e, as amostras encontradas abaixo do *threshold* do conjunto de treinamento e de teste são classificadas como pertencentes à classe 0 (classe de não interesse).

Figura 7-Gráfico de estimativa do modelo PLS-DA



Fonte: O autor

O método PLS-DA tem como vantagens: os dados espectrais são modelados pelas variáveis latentes, que são combinações lineares das variáveis originais. Neste método é possível fazer a análise da Variável Importante na Projeção (VIP) para identificar quais variáveis dos dados analíticos foram mais relevantes para a discriminação das classes. (BALLABIO; CONSONNI, 2013).

4.4 Detecção de Amostras Anômalas (*Outlier*)

Para verificar a qualidade do conjunto de treinamento a ser usado para construção do modelo é importante garantir que as amostras formem um conjunto representativo. No entanto, se o perfil de uma amostra for diferente das demais ou com valores experimentais atípicos, ela é considerada uma amostra anômala ou *Outlier*. Essas amostras podem ter uma influência inadequada no modelo e devem ser removidas do conjunto de treinamento antes da construção do modelo. As amostras anômalas podem ocorrer por vários motivos, como erros de digitação, erros de laboratório ou erros instrumentais. Essas amostras podem afetar a qualidade global do modelo quimiométrico (PAULO; MARTINS; FERREIRA, 2013; VOLPE et al., 1999).

A detecção das amostras anômalas é feita usando duas grandezas: *leverage* e resíduos de *Student*. *Leverage* pode ser definido como a distância de uma amostra ao centroide do conjunto de dados e resíduos é a diferença entre o valor observado e previsto pelo modelo. O *leverage* é calculado segundo a Equações 3 ou 4 (VOLPE et al., 1999).

$$h_{ii} = \frac{1}{n} + (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}})^t (\mathbf{x}^t \mathbf{x})^{-1} (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}}) \quad (3)$$

Onde: h_{ii} é o *leverage* para a i -ésima observação; n é o número de observações; \mathbf{x}_i é o espectro de i -ésima amostra; $\bar{\mathbf{x}}$ é o espectro médio e $\mathbf{x}^t \mathbf{x}$ é a matriz de variância-covariância.

Leverage também pode ser calculado, medindo a distância de uma amostra ao centro do conjunto de calibração por meio do cálculo da distância Euclidiana no espaço das componentes principais (VOLPE et al., 1999).

$$\mathbf{H} = \mathbf{T} \mathbf{T}^t \quad (4)$$

Onde, \mathbf{T} é a matriz dos escores e \mathbf{H} elementos do diagonal.

É importante também analisar os resíduos dos valores medidos que são calculadas por validação cruzada. As amostras para as quais o modelo não é adequado ou falta ajuste apresentam altos resíduos. Para obter a influência de cada amostra em particular, temos o

resíduo de *Student*, que para a amostra i , é calculado conforme as Equações 5 e 6 (VOLPE et al., 1999).

$$Lresc_i = \sqrt{\frac{(c-c)^2}{(n-1)(1-h_i)}} \quad (5)$$

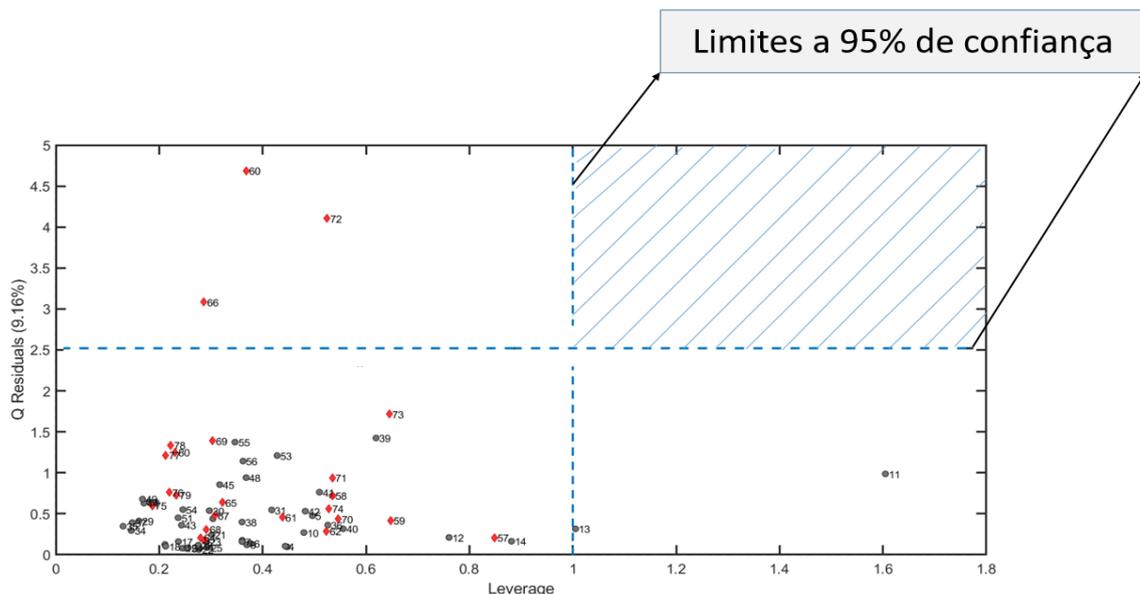
$$\text{Resíduo de Student}_i = \frac{(c-c_i)}{Lresc \sqrt{1-h_i}} \quad (6)$$

Onde $Lresc_i$ é o resíduo da medida da amostra i corrigido pela *leverage*; h_i é o *leverage* para a i -ésima observação; $c_i - c$ erro de previsão e n – número de amostras de conjunto de calibração.

Amostras anômalas ou *outliers* são amostras que apresentam um perfil diferente das demais e podem ter uma influência inadequada no modelo. Elas são encontradas no primeiro quadrante, que são amostras que apresentam elevado nível de resíduos e um grande distanciamento entre o centro do modelo quimiométrico. O gráfico de *Leverage* versus *Q residuals* é usado para identificar amostras anômalas.

A identificação das amostras anômalas (*outliers*) é feita por meio do gráfico de *leverage* versus *Q Residuals*, com nível de significância de 5%. Amostras que apresentam um alto valor de *leverage* e alto valor de resíduos e fora dos limites de confiança a 95% (região hachurada na Figura 8) são consideradas *outliers*. Elas precisam ser retiradas do conjunto de calibração para evitar informações errôneas que possam diminuir a eficiência de previsão do modelo a ser desenvolvido.

Figura 8-Gráfico de Leverage versus Q Residuals



Fonte: O autor

4.5 Dados Aplicados a Modelagem Independente e Suave de Analogia de Classes (DD-SIMCA)

O método de Dados Aplicados a Modelagem Independente e Suave de Analogia de Classes (do inglês, *Data Driven – Soft Independent Modeling of Class Analogy - DD-SIMCA*) utiliza cálculos dos limites de confiança que delimitam a classe alvo. O método DD-SIMCA é um método *one class* que permite desenvolver modelos de classificação utilizando as informações das amostras da classe de interesse e depois identificar se as informações de uma nova amostra se assemelham a essa classe ou não (ZONTOV et al., 2017).

Para a construção do modelo DD-SIMCA seguem os seguintes procedimentos: Primeira etapa, uma matriz de dados \mathbf{X} é decomposta pela análise de componentes principais (PCA), conforme a Equação 7 (POMERANTSEV; RODIONOVA, 2013).

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad (7)$$

Onde \mathbf{T} [$(i \times A)$, ex: $40 \times A$] pertence a matriz dos escores, \mathbf{P} [$(j \times A)$, ex: $(783 \times A)$] a matriz de pesos, \mathbf{E} [$(i \times j)$, ex: (40×783)] a matriz de resíduos e A é o número de componentes principais.

Na segunda etapa, para cada objeto $I = 1, \dots, I$ do conjunto de treinamento, são calculadas duas distâncias segundo as Equações 8 e 9. A primeira é a distância de escores (SD), que representa a posição de uma amostra dentro do espaço dos escores. A segunda é a distância *outlier* (OD), que caracteriza uma distância para a amostra fora do espaço dos escores (ZONTOV et al., 2017).

$$h_i = t_i^t (\mathbf{T}^t \mathbf{T})^{-1} t_i = \sum_{a=1}^t \frac{t_{ia}^2}{\lambda_a} \quad (8)$$

$$v_i = \sum_{j=1}^J e_{ij}^2 \quad (9)$$

onde λ_a , $a = 1, \dots, A$ são os elementos diagonais da matriz $\mathbf{T}^t \mathbf{T} = \Lambda = \text{diag}(\lambda_1, \dots, \lambda_A)$.

A distância total percorrida por cada amostra é calculada conforme a Equação 10, onde h_o e v_o representa parâmetros de escala e N_h e N_v representa números de graus de liberdade (ZONTOV et al., 2017).

$$c = N_h \frac{h}{h_0} + N_v \frac{v}{v_0} \quad (10)$$

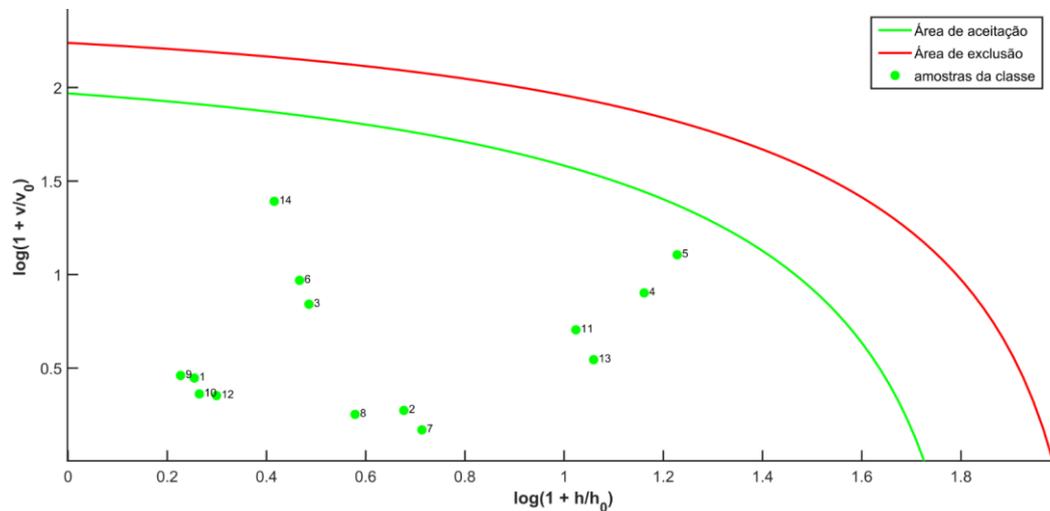
A terceira etapa determina a área de aceitação para a classe de interesse, levando a importância a rejeição incorreta da hipótese nula de que a amostra é autêntica (classe alvo), Equação 11 (ZONTOV et al., 2017).

$$c \leq c_{crit}(\alpha) = X^{-2}(1 - \alpha, N_h + N_v) \quad (11)$$

Onde, $(1 - \alpha)$ representa os quantis da distribuição de chi-quadrado para $(N_h + N_v)$ graus de liberdade.

No modelo DD-SIMCA, a curva verde limita a área de aceitação e a curva vermelha limita a área exclusão (externa). As amostras do conjunto de treinamento são distinguidas por um ponto verde na área de aceitação, que pertencem à classe de interesse e fora dessa área entre as duas linhas verde e vermelha serão consideradas como amostras não detectadas (extrema) (Figura 9) (LUAN et al., 2022). No gráfico de resultado do modelo DD-SIMCA, os parâmetros v e h representam distância para a amostra fora do espaço dos escores (OD) e posição de uma amostra dentro do espaço dos escores (SD) respectivamente, v_0 e h_0 representam os fatores de escala (POMERANTSEV, 2008; ZONTOV et al., 2017).

Figura 9-Gráfico do modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento

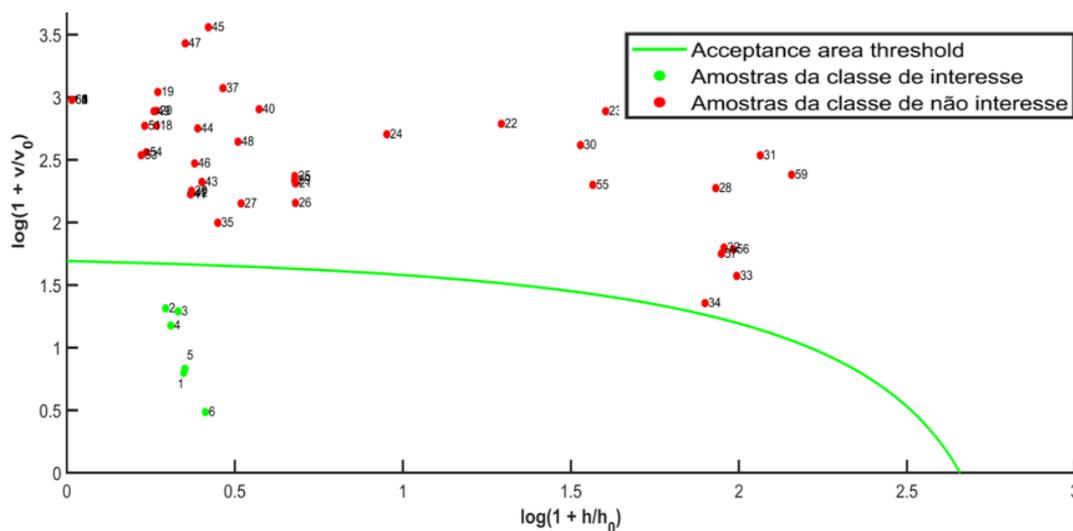


Fonte: O autor

Após a etapa de treinamento, o modelo DD-SIMCA é avaliado por um conjunto teste ou previsão para verificar sua capacidade preditiva. Para classificar as amostras preditas é estabelecido uma área de aceitação (*threshold*) representada por uma linha (—) que separa as amostras da classe de interesse (●) e as da classe de não interesse (●). Assim, amostras desconhecidas são inseridas ao modelo e classificadas conforme sua classe, ou seja, se pertencem ou não a classe de interesse. A Figura 10 representa resultado da etapa de teste do

modelo DD-SIMCA, onde pode se observar, as amostras que pertencem à classe de interesse são representadas dentro da área verde, enquanto as amostras que não pertencem à classe são representadas na região fora da área verde.

Figura 10-Gráfico do modelo DD-SIMCA na etapa de teste



Fonte: O autor

O método DD-SIMCA apresenta vantagens como: oferece método duplo de estimativa para dados regulares, clássico e para dados contaminados, robusto; com uma abordagem orientada por dados para avaliação de distribuições de distâncias e estabelece uma associação com os níveis de significância extremos e discrepantes (POMERANTSEV; RODIONOVA, 2013).

4.6 Validação de modelos de classificação

A validação é definida como a etapa utilizada para analisar se o modelo proposto apresenta forma adequada e dentro dos objetivos desejados (confiabilidade analítica). Esta etapa garante a qualidade das medições químicas através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, evitando que resultados distorcidos sejam utilizados (VALDERRAMA et al., 2014). Quando um modelo é proposto, sempre existe uma etapa de validação para comprovar e avaliar os valores produzidos pelo modelo em relação a cada amostra predita.

O desempenho do modelo em relação às classes preditas foi observada através de seguintes parâmetros: taxas de falsos positivos (FP), falsos negativos (FN), verdadeiro positivo

(VP), verdadeiro negativo (VN), sensibilidade, especificidade, eficiência e coeficiente de correlação de Matthew's. A taxa de FP significa uma amostra negativa ser classificada como positiva e FN significa uma amostra positiva ser classificada como negativa. As taxas de FP, FN, VP e VN foram determinadas segundo as Equações 12, 13, 14 e 15 respectivamente (PINHO; CRISTINA; MATTOS, 1999; ALMEIDA et al., 2013).

$$FP = \frac{fp}{fp+vn} \times 100 \quad (12)$$

$$FN = \frac{fn}{fn+vp} \times 100 \quad (13)$$

$$VP = \frac{vp}{vp+fp} \times 100 \quad (14)$$

$$VN = \frac{vn}{vn+fn} \times 100 \quad (15)$$

Onde, fp representa quantidade de amostras falso positiva, vn quantidade de amostras verdadeira negativa, fn quantidade de amostras falso negativa e vp quantidade de amostras verdadeira positiva.

Os parâmetros de sensibilidade e especificidade foram calculados com bases nas Equações 16 e 17 (Tabela 1). A sensibilidade é quando o modelo classifica corretamente as amostras verdadeiras positivas e a especificidade é quando o modelo classifica corretamente as amostras verdadeiras negativas. (XU et al., 2012). A Equação 18 foi utilizada para calcular o Coeficiente de Correlação de Matthew's, onde pode originar valores entre (-1), zero e (+1), sendo que o valor-1 representa uma classificação inversa, zero representa uma classificação aleatória e +1 representa uma classificação perfeita. A eficiência foi calculada pela média aritmética dos valores de sensibilidade e especificidade segundo Equação 19 (ALMEIDA et al., 2013).

Os erros quadrados médios de calibração (RMSEC), validação cruzada (RMSECV) e previsão (RMSEP), também foram usados para avaliação do modelo de calibração. Esses erros nos fornecem informações sobre a eficiência e o ajuste do modelo em relação aos dados de cada grupo de RMSEC, RMSECV e RMSEP. Os erros são calculados a partir das amostras de calibração, validação cruzada e do conjunto de teste, conforme as Equações 20, 21 e 22 da Tabela 1 (ABASI et al., 2019; BI et al., 2016).

Tabela 1-Equações de Figuras de Mérito aplicadas na validação dos modelos

Designação	Figura de mérito	Equação
Equação 16	Sensibilidade	$\frac{vp}{vp + fn}$
Equação 17	Especificidade	$\frac{vn}{vn + fp}$
Equação 18	Coefficiente de correlação de Matthew's	$\frac{(vp + vn) - (fp + fn)}{\sqrt{(vp + fp)x(vp + fn)x(vn + fp)x(vn + fn)}}$
Equação 19	Eficiência	$\frac{vp + vn}{vp + vn + fp + fn}$
Equação 20	RMSEC	$\frac{\sqrt{\sum(y_{pre} - y_{exp})^2}}{nc}$
Equação 21	RMSECV	$\frac{\sqrt{\sum(y_{pre} - y_{exp})^2}}{nc}$
Equação 22	RMSEP	$\frac{\sqrt{\sum(y_{pre} - y_{exp})^2}}{np}$

Nota: Nas Equações 20, 21 e 22: onde y_{pre} representa variáveis previstas pelo modelo, y_{exp} são medidas variáveis, nc é o número de amostras presentes no grupo de calibração e np é o número de amostras de previsão.

5. METODOLOGIA

5.1 Materiais

- Balança de luz infravermelha para determinação da umidade, da marca QUIMIS e modelo Kett FD-600;
- Balança analítica da marca SHIMADZU e modelo ATX224;
- Balança da marca BEL ENGINEERING;
- Liofilizador da marca TERRONI e modelo LS3000;
- Lavadora ultra-sônica da marca UNIQUE e modelo USC-750;
- Evaporador rotatório da marca IKA e modelo RV 10 com banho de aquecimento e controle digital;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da marca AGILENT[®], modelo Infinity 1260, acoplado a um Espectrômetro de Massas de alta resolução tipo *Quadropole (Time of Flight)* Q-TOF da marca AGILENT[®] e modelo 6520 B com fonte de ionização por eletrospray (ESI).

5.2 Solventes

- Solventes utilizados para o preparo dos extratos são: hexano e etanol da marca Isofar. Os solventes foram destilados para maior grau de pureza.

5.3 Software

- MATLAB[®] versão R2021a (Mathworks Inc.), PLS-Toolbox[®] versão 9.2 (Eigenvetor Research) e DD-SIMCA GUI Tool.

5.4 Coleta, preparo do material vegetal e dos extratos

A coleta de folhas das 4 espécies do gênero *Miconia* foi feita pelo laboratório de Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (NUPPeN-UFU), sob coordenação do Professor Dr. Alberto de Oliveira. As espécies foram identificadas pela professora Dr. Rosana Romero, que é especialista na família Melastomatacea e acompanhou as coletas. As coordenadas foram obtidas através do aplicativo “Minhas coordenadas”. Todas as espécies já possuíam exsiccatas registradas no Herbário

Uberlandense (HUFU) e foram consultadas (Tabela 2). O material foi levado para o Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) da Universidade Federal de Uberlândia para o preparo dos extratos. As espécies foram coletadas em diferentes locais do Município de Uberlândia-MG.

Tabela 2-Código das exsicatas consultadas e o local de coleta das espécies da *Miconia*

Espécies do gênero <i>Miconia</i>	Código da Exsicata	Local de coleta	Coordenadas
		Reserva do Clube	S 18°58'58,17037''
<i>M. albicans</i>	HUFU00062324	Caça e Pesca Itororó	W 48°17'47,73527''
		Reserva do Clube	S 19°00'07,6''
<i>M. chamissois</i>	HUFU00062483	Caça e Pesca Itororó	W 48°18'47,3''
			S 18°54'28,19748''
<i>M. cuspidata</i>	HUFU00062810	Parque do Sabiá	W 48°13'41,79454''
		Reserva do Clube de	S 18°59'2,03064''
<i>M. rubiginosa</i>	HUFU00063838	Caça e Pesca Itororó	W 48°17'53,0735''

Fonte: O autor, 2022

5.5 Preparo do material vegetal e dos extratos

Após a coleta, as folhas das quatro espécies foram separadas e colocadas para secar a temperatura ambiente no período de 7 dias. Para determinação do teor de umidade das folhas secas foi utilizado o método gravimétrico através de uma balança de luz infravermelha, onde cerca de 1,0 g das folhas foram monitoradas a uma temperatura de 105 °C durante 15 minutos até que o teor de umidade estivesse abaixo de 10% (Figura 3). Em seguida as folhas foram trituradas em um multiprocessador.

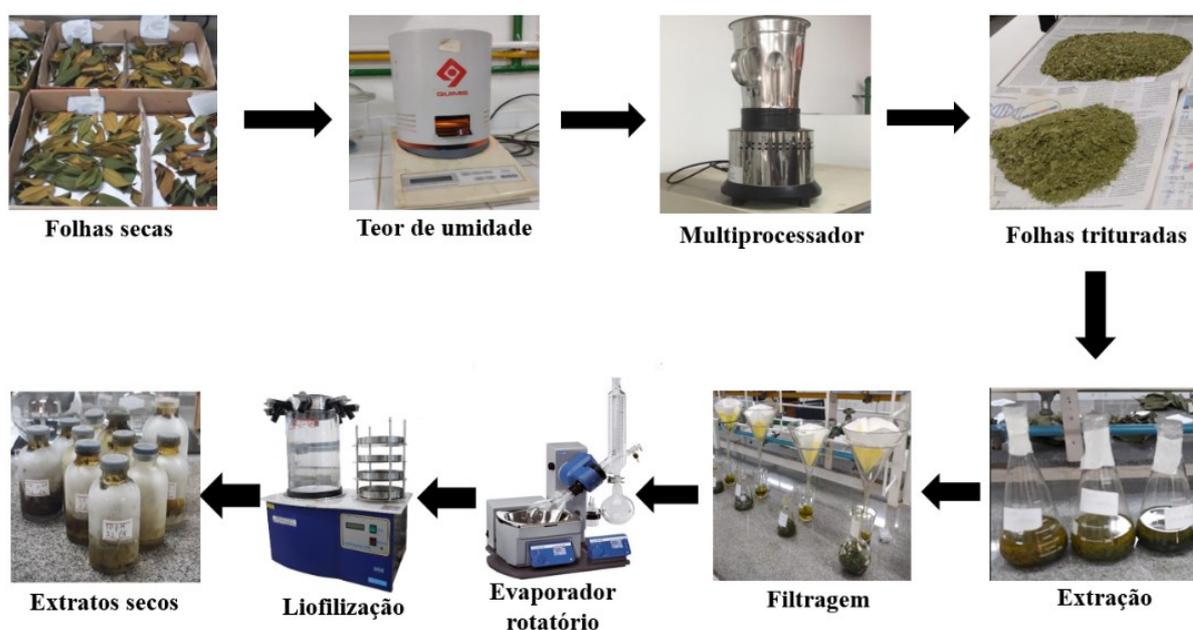
Tabela 3-Teor de umidade, massa da amostra e volume de solvente para o preparo dos extratos.

Espécies do gênero <i>Miconia</i>	Teor de umidade das folhas secas (%)	Massa das folhas secas (g)	Volume de extração de hexano/etanol (mL)
<i>M. albicans</i>	7,2	22,06	150
<i>M. chamissois</i>	7,8	21,20	80
<i>M. cuspidata</i>	8,2	21,10	70
<i>M. rubiginosa</i>	5,2	22,19	100

Fonte: O autor, 2022

O procedimento para obtenção dos extratos das espécies de *Miconia*, conforme esquematizado na Figura 11, constituiu-se em submeter as folhas trituradas à extração através do processo de maceração. Após serem trituradas, inicialmente as folhas foram colocadas em contato com hexano até cobrir toda a amostra e mantidas durante 48 horas a temperatura ambiente. A cada 2 dias, o solvente foi filtrado e evaporado em um evaporador rotatório a pressão reduzida com banho de 40 °C para obter os extratos hexânicos (EH). Ao material remanescente da extração com hexano, foi adicionado o etanol para obtenção dos extratos etanólicos (EE) sendo repetido o mesmo procedimento para obtenção dos EH. Após a remoção do solvente, o EE foi congelado e liofilizado para remoção de água. Os EH foram obtidos inicialmente para remoção dos compostos mais apolares e obtenção de um EE sem interferência desses compostos. O EE é o extrato de interesse do trabalho. Devido a maior polaridade do etanol é possível extrair os compostos de maior polaridade.

Figura 11-Processo de preparo do material vegetal e dos extratos



Fonte: O autor, 2022

5.6 Análise dos extratos das espécies do gênero *Miconia* por ESI-MS

Os extratos etanólicos das espécies de *Miconia* foram analisados ESI-MS por infusão direta utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução tipo Q-TOF (Agilent modelo 6520 B), acoplado a um cromatógrafo líquido (marca Agilent modelo Infinity 1260) que foi utilizado apenas para injeção direta e automatizada das amostras no espectrômetro de massas.

Os parâmetros cromatográficos foram: 0,2 mL min⁻¹ de fluxo constante da fase móvel com a composição de 90% metanol e 10% de água acidificada com ácido fórmico (0,1% (v v⁻¹)), o volume de injeção das amostras foi de 2 µL. Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8 L min⁻¹ a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 kVA. As análises de ESI-MS foram realizadas no modo negativo, uma vez que a presença de compostos fenólicos é bastante relatada no gênero *Miconia* e esses compostos apresentam boa ionização no neste modo. As análises foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia Professor Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (IGEB-UFU). Em seguida os espectros de massas foram encaminhados ao Laboratório de Quimiometria do Triângulo (LQT-UFU) para as análises quimiométricas. A proposta de identificação dos principais íons responsáveis pela discriminação das espécies do gênero *Miconia* foi realizada a partir dos valores de *m/z* obtido dos espectros de alta resolução por infusão direta. Foram realizadas buscas na literatura dos valores de *m/z* seguido pelo cálculo do erro (ppm) a partir da equação: $ErrO_{(ppm)} = \frac{massa\ experimental - massa\ exata}{massa\ exata} \times 10^6$. A massa exata dos compostos foi calculada utilizando o programa ChemDraw® 16.0 e a proposta de identificação foi realizada considerando valores de erro menores que 5 ppm.

5.7 Modelos quimiométricos.

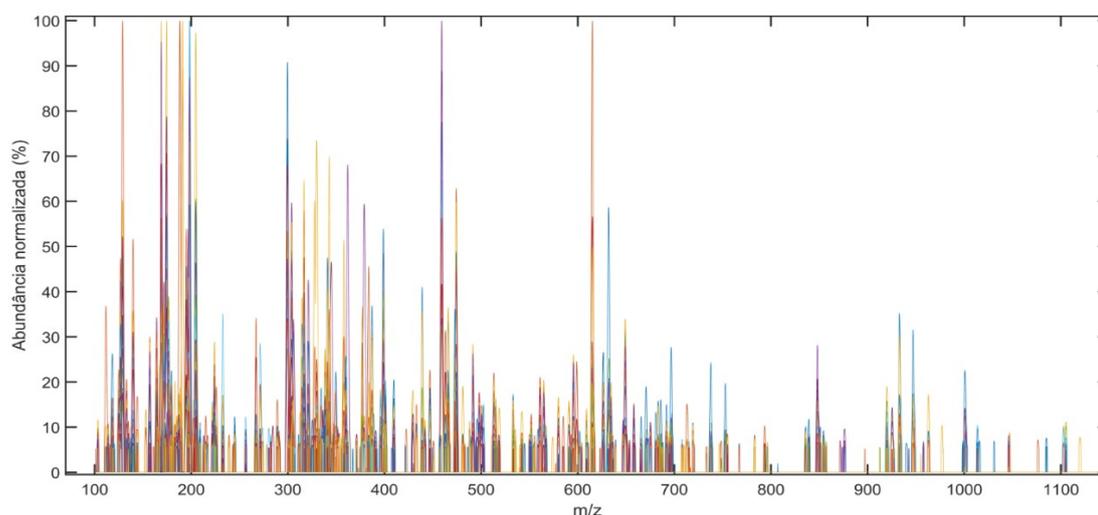
Os modelos PLS-DA e DD-SIMCA foram construídos usando o ambiente MATLAB® versão R2021a (Mathworks Inc.) com o auxílio do software PLS-Toolbox® versão 9.2 (Eigenvetor Research) e DD-SIMCA GUI Tool. A partir de 20 amostras de cada uma das espécies de *Miconia* preparadas (80 no total), foram separadas em dois conjuntos (treinamento e teste), 14 no conjunto de treinamento (totalizando 56) e 6 no conjunto de teste (totalizando 24) para a construção dos modelos PLS-DA. E para os modelos DD-SIMCA foram utilizadas 14 amostras para o conjunto de treinamento (amostras da classe alvo), e 66 para conjunto de teste, sendo 6 (amostras da classe alvo) e 60 (amostras de outras classes) totalizando 80 amostras.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Espectros de massas de amostras das espécies de gênero *Miconia* analisadas por ESI-MS

O gráfico de espectro de massas na Figura 12, representa as 80 amostras das 4 espécies do gênero *Miconia* (*M. albicans*, *M. chamissois*, *M. cuspidata* e *M. rubiginosa*). Os espectros foram adquiridos em modo negativo e normalizados pelo pico de maior intensidade. Os mesmos foram usados para construção dos modelos PLS-DA e DD-SIMCA nas etapas de calibração (treinamento) e validação (teste).

Figura 12-Gráfico dos espectros normalizados de massas obtidos das 4 espécies do gênero *Miconia*



Fonte: O autor

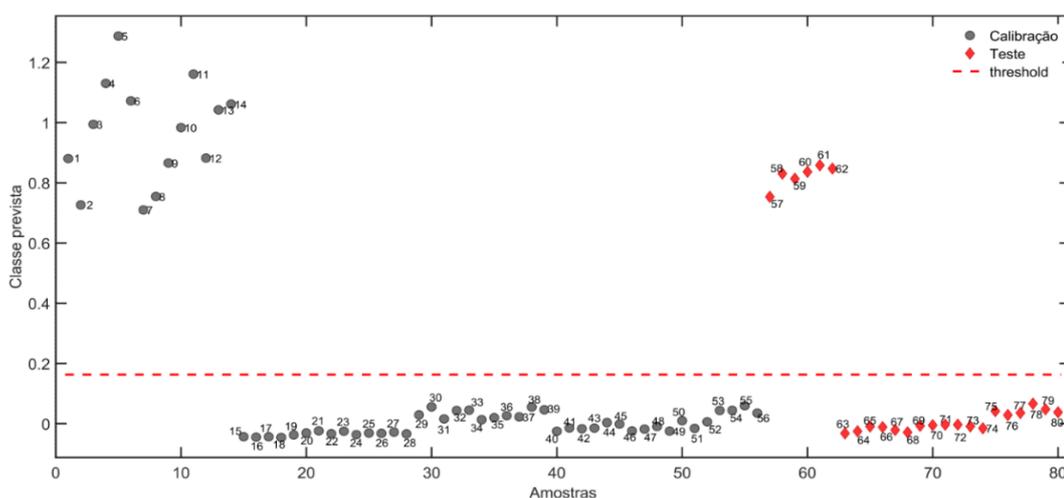
É possível notar que a informação gráfica acima é complexa, sendo difícil a sua interpretação por análise visual devido as sobreposições de sinais, portanto, justifica-se a utilização de métodos quimiométricos para a extração de informações mais simples de serem interpretadas.

6.2 Modelo PLS-DA da espécie *M. albicans*

O modelo foi desenvolvido utilizando 3 variáveis latentes (VL), capturando 76,23 e 98,37% de variância explicada nos blocos **X** e **y**, respectivamente. A validação cruzada foi realizada por janelas venezianas (*venetian blinds*) utilizando 14 janelas com 4 amostras.

O modelo PLS-DA foi construído com 20 amostras de cada espécie (totalizando 80), das quais 14 foram separadas para o conjunto de treinamento (totalizando 56) e 6 para o conjunto de teste (totalizando 24). O gráfico de estimativas do modelo PLS-DA, conforme Figura 13, mostra que todas as amostras foram classificadas corretamente, onde verifica-se que houve a separação das classes de forma eficiente, sendo que as amostras da classe de interesse estão acima da linha tracejada (*threshold*), enquanto as da classe de não interesse encontram-se abaixo da linha tracejada. Portanto, 14 amostras são da classe de interesse, pertencente ao conjunto de treinamento e 6 ao conjunto de teste, todas outras foram consideradas da classe de não interesse. Para o modelo construído não foram observadas amostras anômalas (*outliers*) de acordo com os valores de *Q residuals* (resíduo espectral) versus *Leverage*.

Figura 13- Gráfico de estimativas do modelo PLS-DA para amostras da espécie *M. albicans*



Fonte: O autor

As amostras de 1 a 14 (treinamento) e de 57 a 62 (teste) foram classificadas como pertencentes a classe de *M. albicans*. Enquanto as amostras de 15 a 28 (treinamento) e de 63 a 68 (teste) são *M. cuspidata*; de 29 a 42 (treinamento) e de 69 a 74 (teste) são *M. chamissois* e de 43 a 56 (treinamento) e de 75 a 80 (teste) são *M. rubiginosa*.

6.2.1 Validação do modelo PLS-DA da espécie *M. albicans*

O modelo PLS-DA foi validado produzindo os resultados apresentados na Tabela 4. Verifica-se que os valores de RMSEC, RMSECV e RMSEP são baixos e considerados aceitáveis, demonstrando uma boa concordância entre os parâmetros RMSEC e RMSEP, pois o valor de RMSEP é maior que o valor RMSEC, logo o modelo desenvolvido não apresenta

tendência em suas previsões. Os valores da sensibilidade e especificidade iguais a 1, mostra que o modelo classificou corretamente todas as amostras verdadeiras positivas e verdadeiras negativas. Portanto, os resultados dos parâmetros evidenciam uma boa eficiência do modelo.

Tabela 4-Parâmetros de classificação obtidos do modelo PLS-DA da espécie *M. albicans*

Parâmetros	Valores do modelo PLS-DA
RMSEC	0,0915
RMSECV	0,1345
RMSEP	0,1377
Especificidade (Cal, CV, Prev)	1,0
Sensibilidade (Cal, CV, Prev)	1,0

Cal = calibração; CV = validação cruzada; Prev = previsão

A Tabela de Confusão do modelo PLS-DA da espécie *M. albicans* construído, mostra que todas as amostras foram classificadas corretamente nas 2 classes, onde os valores da eficiência e o Coeficiente de Matthew's apresentaram valores igual a 1 e os valores de vp e vn igual a 100% e valores de fp e fn igual a 0% para os conjuntos de treinamento e de teste, conforme ilustra a Tabela 5. Isto mostra que o modelo apresenta um bom ajuste e um ótimo desempenho.

Tabela 5-Tabela de Confusão do modelo PLS-DA da espécie *M. albicans*

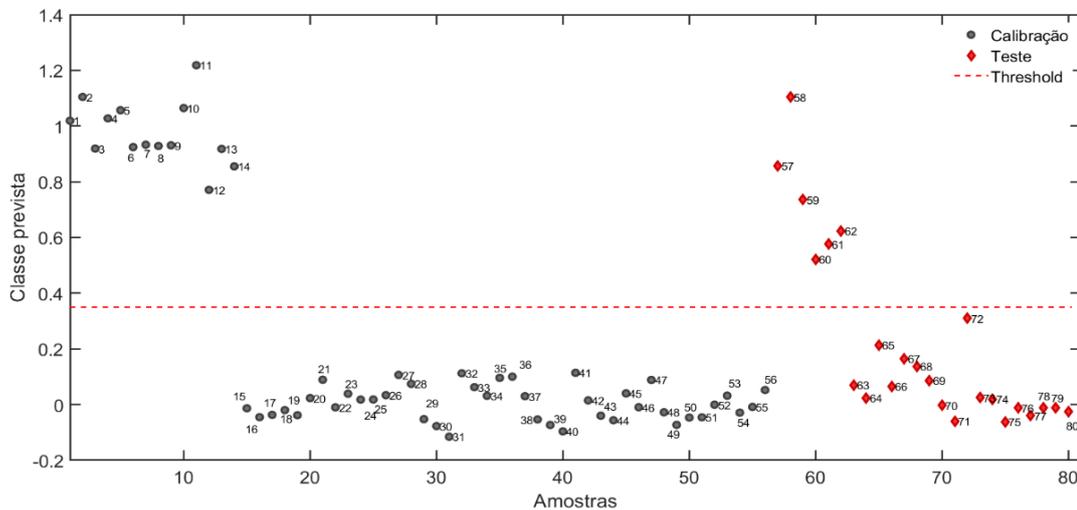
		Tabela de Confusão				
		VP	FP	VN	FN	N
Treinamento	Classe 1	100	0	100	0	14
	Classe 0	100	0	100	0	42
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1				
Teste	Classe 1	100	0	100	0	6
	Classe 0	100	0	100	0	18
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1				

6.3 Modelo PLS-DA da espécie *M. chamissois*

O modelo foi desenvolvido com 5 VL e capturou 90,16 e 97,51% de variância explicada nos blocos **X** e **y**, respectivamente. A validação cruzada foi realizada por janelas venezianas (*venetian blinds*) utilizando 16 janelas com 2 amostras.

No modelo temos 80 amostras no total, das quais 20 de cada espécie, onde 14 foram separadas para o conjunto de treinamento (totalizando 56) e 6 para o conjunto de teste (totalizando 24). O gráfico de estimativas do modelo PLS-DA da Figura 14, ilustra que todas as amostras das 2 etapas (treinamento e teste) foram classificadas corretamente, onde observa-se a separação das classes de forma eficiente, sendo as amostras da classe de interesse posicionadas acima da linha tracejada (*threshold*), enquanto as da classe de não interesse abaixo da linha tracejada. Então 14 amostras são da classe de interesse do conjunto de treinamento e 6 do conjunto de teste, as restantes são da classe de não interesse. No modelo desenvolvido não foram identificadas amostras anômalas (*outlier*) através do gráfico *Q residuals* (referente ao resíduo espectral) versus *leverage*.

Figura 14-Gráfico de estimativas do modelo PLS-DA para amostras da espécie *M. chamissois*



Fonte: O autor

As amostras de 1 a 14 (treinamento) e de 57 a 62 (teste) foram classificadas como pertencentes a classe de *M. chamissois*. Enquanto as amostras de 15 a 28 (treinamento) e de 63 a 68 (teste) são *M. cuspidata*; de 29 a 42 (treinamento) e de 69 a 74 (teste) são *M. rubiginosa* e de 43 a 56 (treinamento) e de 75 a 80 (teste) são *M. albicans*.

6.3.1 Validação do modelo PLS-DA da espécie *M. chamissois*

O modelo PLS-DA construído da espécie *M. chamissois* foi validado como mostra os resultados dos parâmetros de classificação apresentados na Tabela 6. Os valores dos parâmetros obtidos de RMSEC, RMSECV e RMSEP são baixos e considerados aceitáveis, ilustrando uma boa concordância entre os parâmetros RMSEC e RMSEP, pois nota-se que RMSEC apresenta valor menor do que RMSEP. Os valores da sensibilidade e especificidade são iguais a 1, ou seja, o modelo classificou corretamente todas as amostras verdadeiras positivas e verdadeiras negativas, mostrando um ótimo desempenho.

Tabela 6-Parâmetros de classificação obtidos do modelo PLS-DA da espécie *M. chamissois*

Parâmetros	Valores do modelo PLS-DA
RMSEC	0,1379
RMSECV	0,1788
RMSEP	0,2476
Especificidade (Cal, CV, Prev)	1,0
Sensibilidade (Cal, CV, Prev)	1,0

A Tabela de Confusão do modelo PLS-DA da espécie *M. chamissois* da Tabela 7, mostra que todas as amostras das 2 classes foram classificadas corretamente, onde o modelo apresentou os valores da eficiência e o Coeficiente de Matthew's iguais a 1, os valores de vp e vn igual a 100% e valores de fp e fn igual a 0% para os conjuntos de treinamento e de teste, mostrando um bom ajuste e um ótimo desempenho.

Tabela 7-Tabela de Confusão do modelo PLS-DA da espécie *M. chamissois*

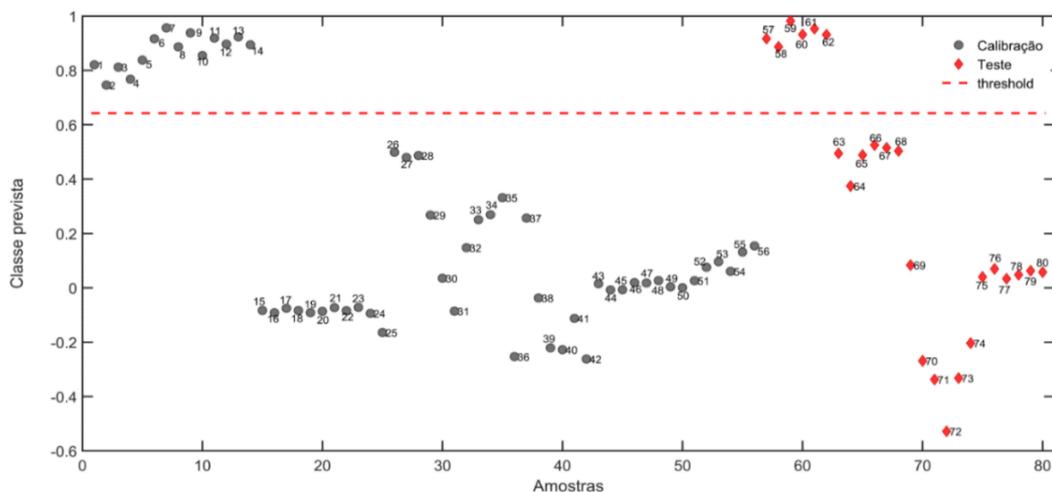
		Tabela de Confusão				
		VP	FP	VN	FN	N
Treinamento	Classe 1	100	0	100	0	14
	Classe 0	100	0	100	0	42
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1				
Teste	Classe 1	100	0	100	0	6
	Classe 0	100	0	100	0	18
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1				

6.4 Modelo PLS-DA da espécie *M. cuspidata*

O modelo PLS-DA foi desenvolvido com 4 VL e capturou 86,06 e 93,29% de variância explicada nos blocos **X** e **y**, respectivamente. A validação cruzada foi realizada por janelas venezianas (*venetian blinds*) utilizando 14 janelas com 2 amostras.

O modelo PLS-DA foi desenvolvido com 20 amostras de cada espécie (totalizando 80), onde 14 foram utilizadas para o conjunto de treinamento (totalizando 56) e 6 para o conjunto de teste (totalizando 24). Onde 14 amostras são da classe de interesse (conjunto de treinamento) e 6 de conjunto de teste, todas outras foram consideradas classe de não interesse. O gráfico de estimativas do modelo PLS-DA da Figura 15, mostra que todas as amostras das 2 classes foram classificadas corretamente e verifica-se que houve a separação das classes de forma eficiente, onde as amostras da classe de interesse estão acima da linha tracejada (*threshold*), enquanto as da classe de não interesse encontram-se abaixo da linha tracejada.

A observação de possíveis amostras anômalas (*outlier*) foi feita através do gráfico Q *Residuals* (referente ao resíduo espectral) versus *Leverage*, com base no mesmo, não foram identificadas amostras *outliers*.

Figura 15-Gráfico de estimativas do modelo PLS-DA para amostras da espécie *M. cuspidata*

Fonte: O autor

As amostras de 1 a 14 (treinamento) e de 57 a 62 (teste) foram classificadas como pertencentes a classe de *M. cuspidata*. Enquanto as amostras de 15 a 28 (treinamento) e de 63 a 68 (teste) são *M. chamissois*; de 29 a 42 (treinamento) e de 69 a 74 (teste) são *M. rubiginosa* e de 43 a 56 (treinamento) e de 75 a 80 (teste) são *M. albicans*.

6.4.1 Validação do modelo PLS-DA da espécie *M. cuspidata*

O modelo PLS-DA foi validado apresentando os resultados dos parâmetros de classificação da Tabela 8, onde verifica-se que os valores de RMSEC, RMSECV e RMSEP são baixos e considerados aceitáveis. Portanto, avaliando a exatidão do modelo através dos valores de erros quadráticos médios RMSEC, RMSECV, RMSEP, observa-se que RMSEC apresenta valor menor do que RMSEP e os valores de especificidade e sensibilidade são iguais a 1, demonstrando que os resultados dos parâmetros do modelo foram satisfatórios.

Tabela 8-Parâmetros de classificação obtidos do modelo PLS-DA da espécie *M. cuspidata*

Parâmetros	Valores do modelo PLS-DA
RMSEC	0,1856
RMSECV	0,2203
RMSEP	0,2621
Especificidade (Cal, CV, Prev)	1,0
Sensibilidade (Cal, CV, Prev)	1,0

O modelo PLS-DA da espécie *M. cuspidata* desenvolvido foi validado segundo os parâmetros de mérito presentes na Tabela de Confusão, da Tabela 9. O modelo apresenta resultados da eficiência e o Coeficiente de Matthew's iguais a 1 e os valores de vp e vn igual a 100% e de fp e fn igual a 0% para os conjuntos de treinamento e de teste, demonstrando um ótimo desempenho.

Tabela 9-Tabela de Confusão do modelo PLS-DA da espécie *M. cuspidata*

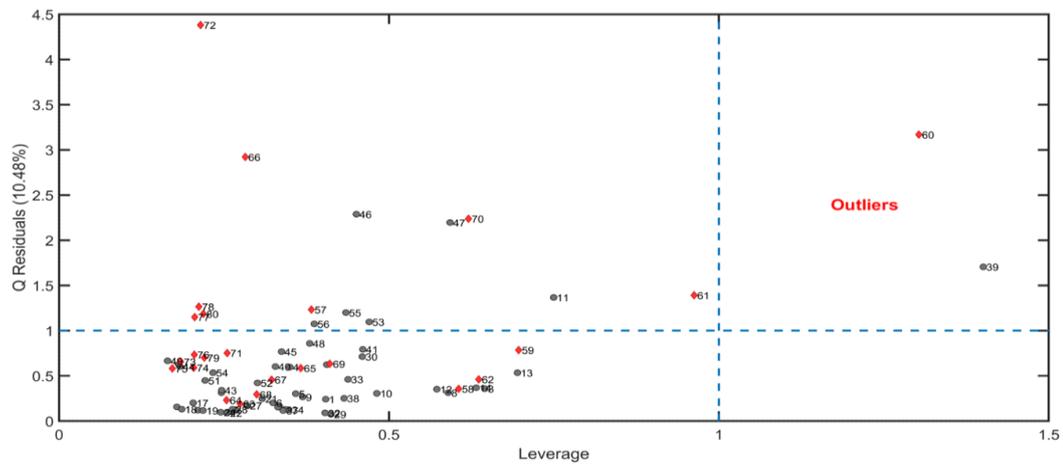
		Tabela de Confusão				
		VP	FP	VN	FN	N
Treinamento	Classe 1	100	0	100	0	14
	Classe 0	100	0	100	0	42
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1				
Teste	Classe 1	100	0	100	0	6
	Classe 0	100	0	100	0	18
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1				

6.5 Modelo PLS-DA da espécie *M. rubiginosa*

O modelo foi construído com 5 VL e capturou 90,44 e 97,69% de variância explicada nos blocos **X** e **y**, respectivamente. A validação cruzada foi realizada por janelas venezianas (*venetian blinds*) utilizando 14 janelas com 2 amostras.

Na construção do modelo foram identificadas 2 amostras anômalas (*outliers*) através do gráfico Q *Residuals* (referente ao resíduo espectral) versus *Leverage* (Figura 16). As amostras que foram consideradas como *outliers* se encontram no primeiro quadrante, que são amostras que apresentam elevado nível de resíduos e um grande distanciamento do centro do modelo quimiométrico, portanto, a amostra 39 do conjunto de treinamento e pertencente a classe da *M. albicans* foi retirada do conjunto de amostras antes da reconstrução do modelo.

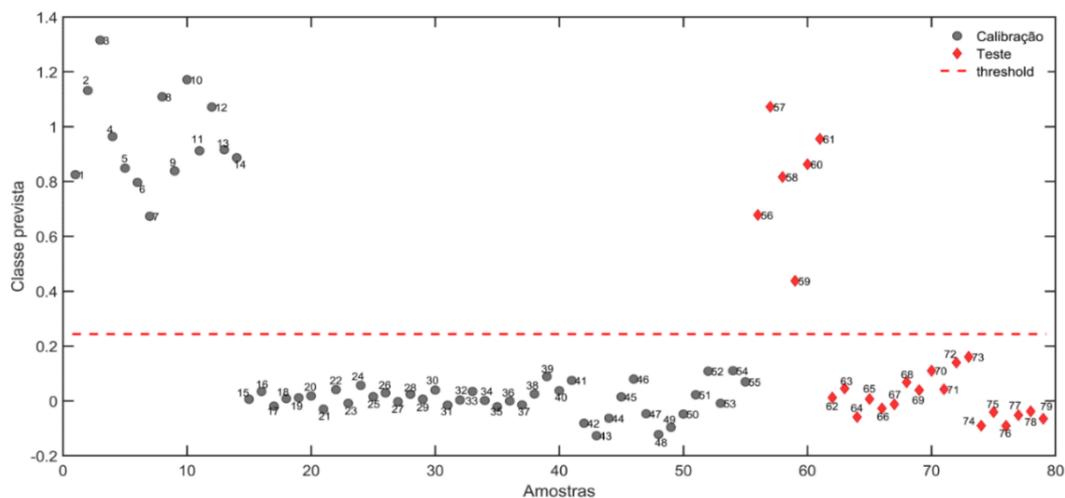
Figura 16-Identificação de outliers no Modelo PLS-DA da espécie *M. rubiginosa* através do gráfico Q Residuals versus Leverage



Fonte: O autor

O modelo PLS-DA da espécie *M. rubiginosa* foi construído com 79 amostras, onde temos 14 amostras nas classes das *Miconias: rubiginosa, cuspidata e albicans* e 13 amostras na classe da *chamissois*, para o conjunto de treinamento (totalizando 55) e 6 para o conjunto de teste (totalizando 24). Portanto, 14 amostras são da classe de interesse, pertencente ao conjunto de treinamento e 6 do conjunto de teste, todas outras foram consideradas da classe de não interesse. O gráfico de estimativas do modelo da Figura 17, mostra que todas as amostras foram classificadas corretamente, sendo as amostras que estão acima da linha tracejada (*threshold*), pertencem a classe de interesse e as que estão abaixo da linha tracejada pertencem a classe de não interesse.

Figura 17-Gráfico de estimativas do modelo PLS-DA para amostras da espécie *M. rubiginosa*



Fonte: O autor

As amostras de 1 a 14 (treinamento) e de 56 a 61 (teste) foram classificadas como pertencentes a classe de *M. rubiginosa*. Enquanto as amostras de 15 a 28 (treinamento) e de 62 a 67 (teste) são *M. cuspidata*; de 29 a 41 (treinamento) e de 68 a 73 (teste) são *M. chamissois* e de 42 a 55 (treinamento) e de 74 a 79 (teste) são *M. albicans*.

6.5.1 Validação do modelo PLS-DA da espécie *M. rubiginosa*

A exatidão do modelo construído foi observada através dos valores de erros quadráticos médios RMSEC, RMSECV e RMSEP, sendo o valor de RMSEP maior que o valor RMSEC e os valores da especificidade e sensibilidade são iguais a 1, mostrando que o modelo apresenta uma boa exatidão e ajuste, conforme os resultados dos parâmetros apresentados na Tabela 10.

Tabela 10-Parâmetros de classificação obtidos do modelo PLS-DA da espécie *M. rubiginosa*

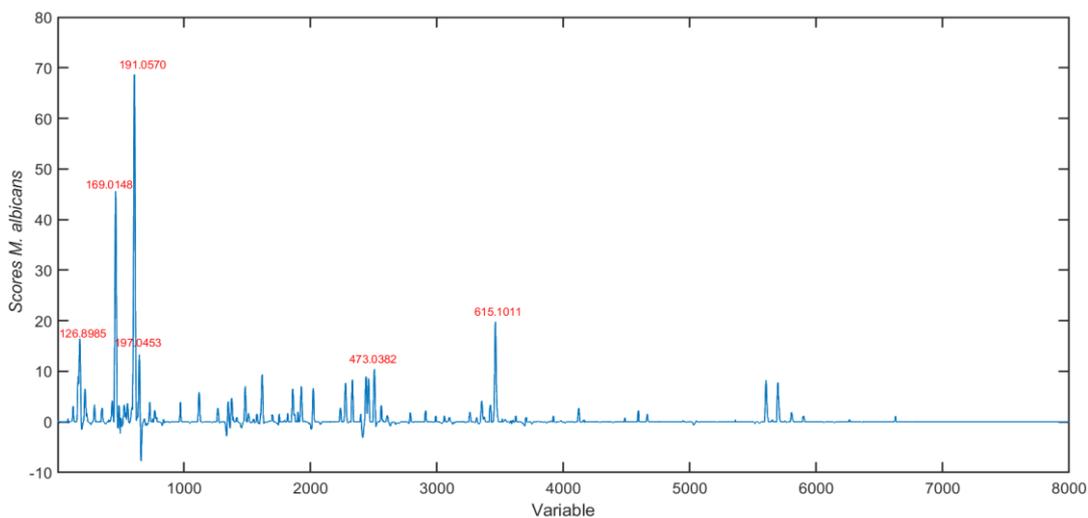
Parâmetros	Valores do modelo PLS-DA
RMSEC	0,1151
RMSECV	0,1435
RMSEP	0,1616
Especificidade (Cal, CV, Prev)	1,0
Sensibilidade (Cal, CV, Prev)	1,0

Na Tabela de Confusão do modelo PLS-DA (Tabela 11), mostra que os valores da eficiência e o Coeficiente de Matthew's são iguais 1 e os valores de vp e vn igual a 100% e de fp e fn igual a 0% para os conjuntos de treinamento e de teste, assim o modelo classificou corretamente todas as amostras nas 2 classes.

Tabela 11-Tabela de Confusão do modelo PLS-DA da espécie *M. rubiginosa*

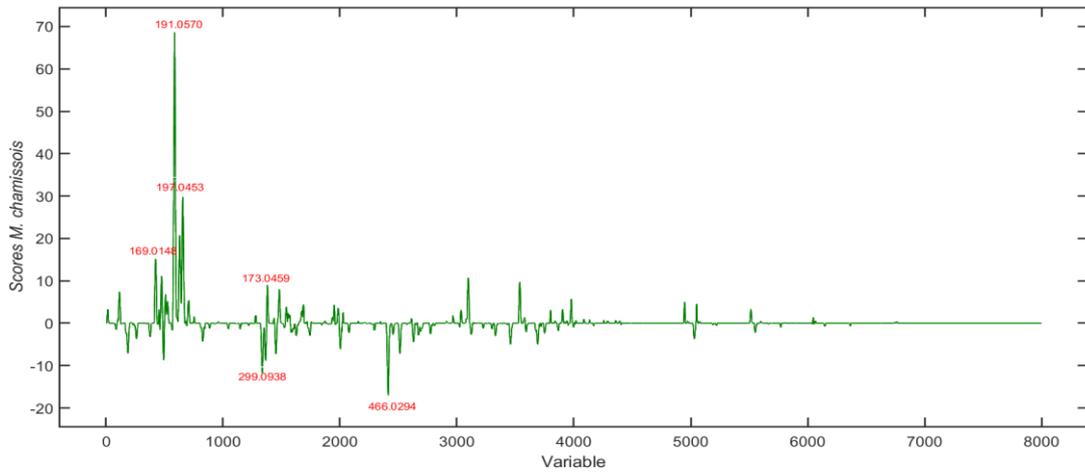
		Tabela de Confusão				
		VP	FP	VN	FN	N
Treinamento	Classe 1	100	0	100	0	14
	Classe 0	100	0	100	0	41
	Sensibilidade = 1 Eficiência = 1		Especificidade = 1 Coeficiente de Correlação Matthew's = +1			
Teste	Classe 1	100	0	100	0	6
	Classe 0	100	0	100	0	18
	Sensibilidade = 1 Eficiência = 1		Especificidade = 1 Coeficiente de Correlação Matthew's = +1			

Os gráficos de pesos dos modelos PLS-DA (Figuras 18, 19, 20 e 21) mostram os íons identificados e mais significativos para discriminação de classes nas quatro espécies do gênero *Miconia*.

Figura 18-Gráfico dos pesos do modelo PLS-DA para espécie *M. albicans*

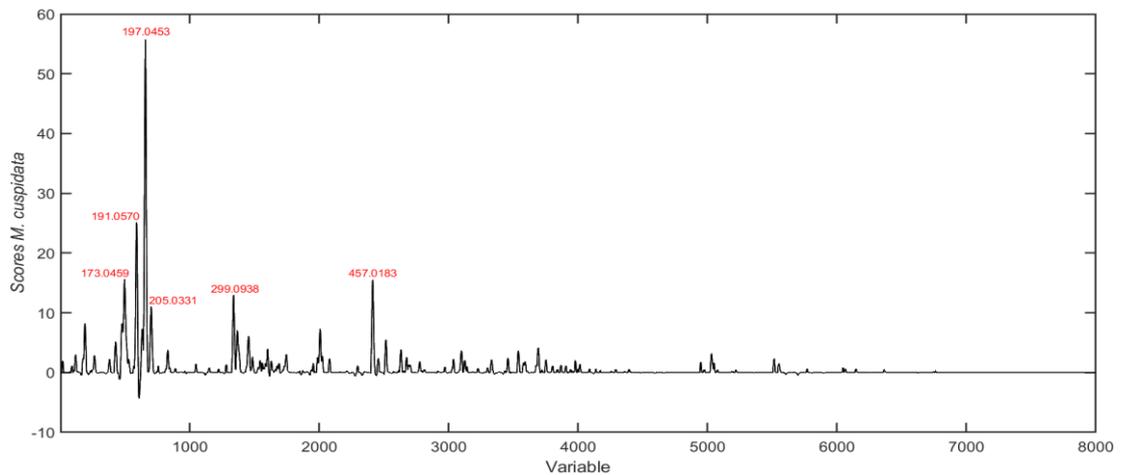
Fonte: O autor

Figura 19– Gráfico dos pesos do modelo PLS-DA para espécie *M. chamissois*



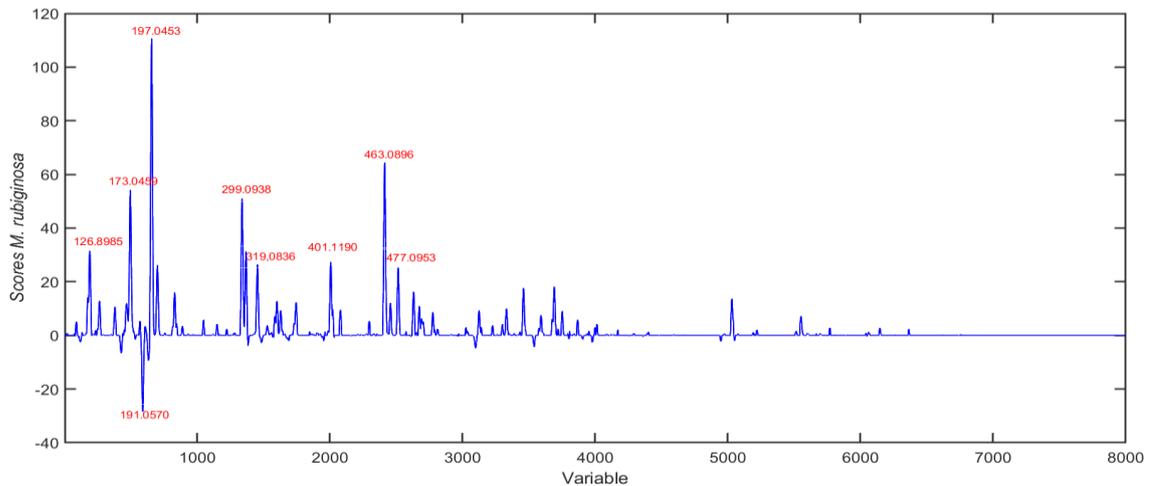
Fonte: O autor

Figura 20–Gráfico dos pesos do modelo PLS-DA para espécie *M. cuspidata*



Fonte: O autor

Figura 21–Gráfico dos pesos do modelo PLS-DA para espécie *M. rubiginosa*



Fonte: O autor

6.6 Proposta de identificação dos principais íons para a discriminação das espécies do gênero *Miconia*

Através dos modelos PLS-DA foi possível discriminar os íons m/z que classificam as espécies do gênero *Miconia*. A proposta de identificação desses íons foi realizada a partir da m/z obtidas nos espectros por infusão direta em alta resolução. A Tabela 12 mostra a proposta de identificação dos íons discriminantes, o erro em ppm e a espécie em que ele foi identificado. Os espectros em alta resolução dos íons identificados encontram-se no APÊNDICE.

Tabela 12- Proposta de identificação para os principais íons presentes nas espécies *M. albicans*, *M. chamissois*, *M. cuspidata* e *M. rubiginosa* por ESI-MS. *Continua*

(<i>m/z</i>) [<i>M</i> – <i>H</i>] ⁻	Massa Exata	Erro (ppm)	Fórmula Molecular	Proposta de identificação	Espécie	Referências
126,9047	–	–	–	n.i	<i>M. albicans</i> <i>M. rubiginosa</i>	–
169,0144	169,0142	1,18	C ₇ H ₆ O ₅	Ácido gálico	<i>M. albicans</i> <i>M. chamissois</i>	(SINGH et al., 2016, CORRÊA et al., 2021)
173,0459	173,0455	2,31	C ₇ H ₁₀ O ₅	Ácido chiquímico	<i>M. cuspidata</i> <i>M. chamissois</i> <i>M. rubiginosa</i>	(NURAZAH et al., 2017)
191,0567	191,0561	3,14	C ₇ H ₁₂ O ₆	Ácido quínico	<i>M. albicans</i> <i>M. cuspidata</i> <i>M. chamissois</i> <i>M. rubiginosa</i>	(GOUVEIA; CASTILHO, 2010, CORRÊA et al., 2021)
197,0460	197,0455	2,54	C ₉ H ₁₀ O ₅	Galato de etila	<i>M. albicans</i> <i>M. cuspidata</i> <i>M. chamissois</i> <i>M. rubiginosa</i>	(SINGH et al., 2016, QUINTANS-JÚNIOR et al., 2020)
205,0355	–	–	–	n.i	<i>M. cuspidata</i>	–
215,0345	–	–	–	n.i	<i>M. rubiginosa</i>	–
299,0915	299,0925	-3,34	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	Farrerol	<i>M. chamissois</i> <i>M. cuspidata</i> <i>M. rubiginosa</i>	(TARAWNEH et al., 2014)
319,0838	319,0823	4,70	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	Ácido <i>p</i> -coumaroil chiquímico	<i>M. rubiginosa</i>	(BEN SAID et al., 2017)
401,1190	–	–	–	n.i	<i>M. rubiginosa</i>	–
457,0265	–	–	–	n.i	<i>M. cuspidata</i>	–

Tabela 12- Proposta de identificação para os principais íons presentes nas espécies *M. albicans*, *M. chamissois*, *M. cuspidata* e *M. rubiginosa* por ESI-MS. conclusão

463,0896	463,0882	4,96	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercetin- <i>O</i> -hexosídeo	<i>M. rubiginosa</i>	(BEN SAID et al., 2017)
477,0918	477,0933	-3,14	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	Canferol- <i>O</i> -hexosídeo	<i>M. rubiginosa</i>	(GHAREEB et al., 2018)
615,1020	615,0992	4,55	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	Quercetin- <i>O</i> -galoil-hexosídeo	<i>M. albicans</i>	(QUINTANS-JÚNIOR et al., 2020, CORRÊA et al., 2021)
933,0643	933,0640	0,32	C ₄₁ H ₂₆ O ₂₆	2- <i>O</i> -galoilpunicalina isômero	<i>M. chamissois</i>	(SINGH et al., 2016)
466,0297 ^a	466,0283	3,00				
947,0791	–	–	–			
				n.i	<i>M. albicans</i>	–
473,0378 ^a	–	–	–			

Nota: – : não obtido. ^a[M – 2H]⁻². N.i: não identificado.

No gráfico de pesos do modelo PLS-DA de *M. albicans* (Figura 18), o íon em m/z 191,0567 foi atribuído como ácido quínico ($C_7H_{12}O_6$), um ciclitol (GOUVEIA; CATILHO, 2010). Os ácidos fenólicos m/z 169,0144 e m/z 197,0460 foram atribuídos como ácido gálico ($C_7H_6O_5$) e galato de etila ($C_9H_{10}O_5$) (SINGH et al., 2016). O íon m/z 473,0378 $[M - 2H]^{-2}$ não foi identificado, esse sinal é referente a dupla desprotonação que ocorre em moléculas de elevada massa molecular e com hidroxilas disponíveis sendo o íon $[M - H]^{-}$ m/z 933,0643. O flavonóide m/z 615,1020 foi identificado como quercetina-*O*-galoilhexosídeo ($C_{28}H_{24}O_{16}$) (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2020, CORRÊA et al., 2021, MANZANO et al., 2022, DO NASCIMENTO et al., 2023). O ácido quínico (m/z 191), ácido gálico (m/z 169) e galato de etila (m/z 197) já foram identificados em outros trabalhos, por exemplo, nos frutos e folhas de *M. albicans* (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2020, CORRÊA et al., 2021, MANZANO et al., 2022). O ácido gálico (m/z 169) já foi isolado dos galhos e folhas de *M. myriantha* (LI et al., 2001).

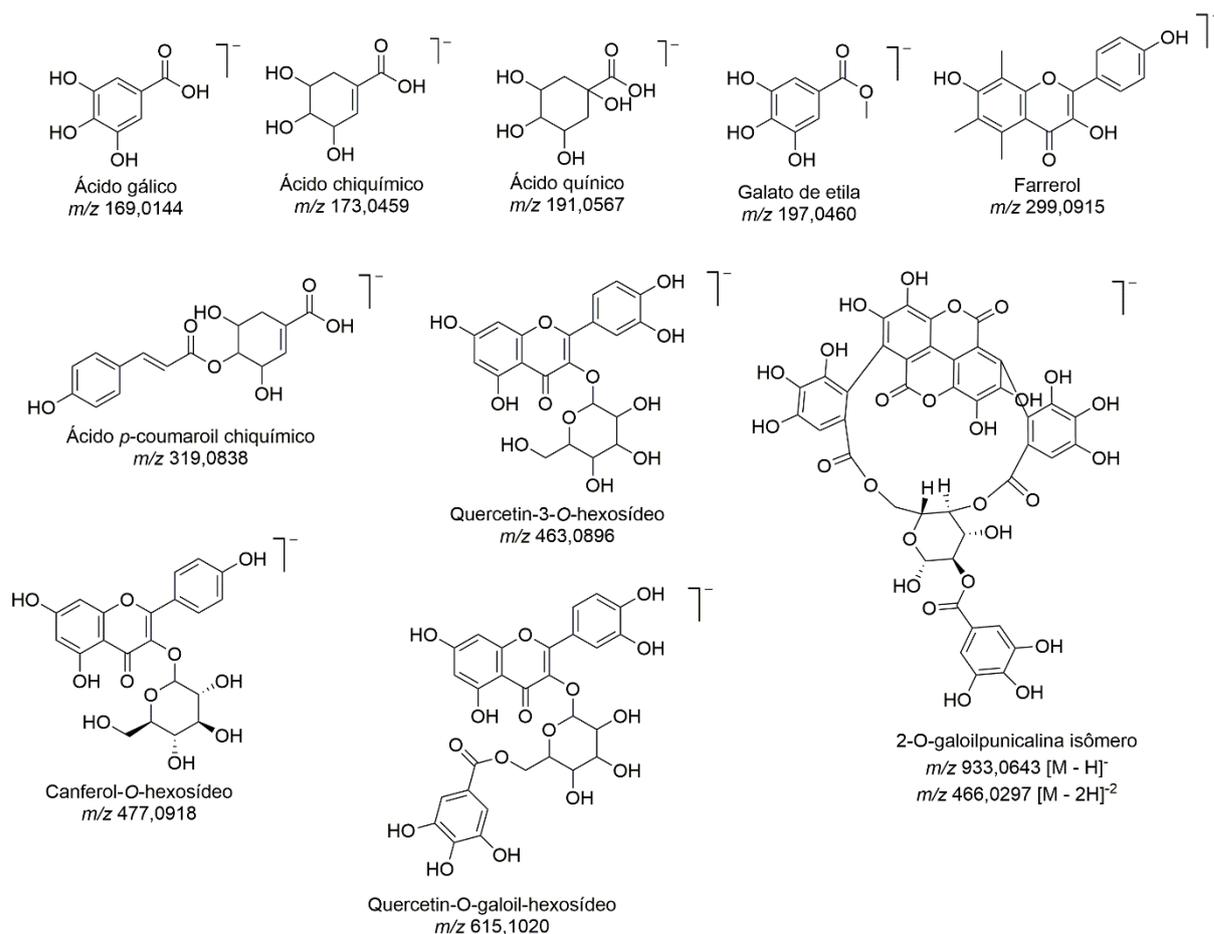
Na Figura 19, do gráfico de pesos do Modelo PLS-DA da espécie *M. chamissois* o íon m/z 191,0567 foi atribuído como ácido quínico ($C_7H_{12}O_6$) (GOUVEIA; CATILHO, 2010). Os ácidos fenólicos m/z 169,0144 e m/z 197,0460 foram identificados respectivamente como ácido gálico e galato de etila (SINGH et al., 2016). O íon m/z 173,0459 foi identificado como o ácido chiquímico ($C_7H_{10}O_5$) (NURAZAH et al., 2017) e o íon m/z 299,0915 foi identificado como farreol (TARAWNEH et al., 2014). O íon m/z 466,0294 corresponde ao $[M - H]^{-2}$ referente a dupla desprotonação da molécula de m/z 933,0643 $[M - H]^{-}$ identificada como 2-*O*-galoilpunicalina ($C_{41}H_{26}O_{26}$) (SINGH et al., 2016).

No gráfico de pesos (Figura 20), do modelo PLS-DA de *M. cuspidata*, o íon em m/z 197,0460 corresponde ao galato de etila ($C_9H_{10}O_5$) (SINGH et al., 2016, QUINTANS-JÚNIOR et al., 2020). Os íons em m/z 191,0567 e m/z 173,0459 foram identificados como ácido quínico ($C_7H_{12}O_6$) e ácido chiquímico ($C_7H_{10}O_5$), respectivamente. O íon em m/z 299,0915 foi identificado como farrerol (TARAWNEH et al., 2014) e os íons m/z 205,0355 e m/z 457,0265 não foram identificados.

No gráfico de pesos do modelo PLS-DA de *M. rubiginosa* (Figura 21), o íon m/z 197,0460 corresponde ao galato de etila ($C_9H_{10}O_5$) (SINGH et al., 2016, QUINTANS-JÚNIOR et al., 2020). Os íons m/z 191,0567 e m/z 173,0459 foram identificados como ácido quínico ($C_7H_{12}O_6$) e ácido chiquímico ($C_7H_{10}O_5$), respectivamente. O íon em m/z 299,0915 foi identificado como farrerol (TARAWNEH et al., 2014; YIN et al., 2019). Os íons m/z 319,0838, m/z 463,0896 e m/z 477,0918 foram atribuídos como ácido *p*-coumaroil chiquímico ($C_{16}H_{16}O_7$), quercetin-*O*-hexosídeo ($C_{21}H_{20}O_{12}$) (BEN SAID et al., 2017) e canferol-*O*-hexosídeo

(C₂₁H₂₁O₁₁) (GHAREEB et al., 2018), respetivamente. Os íons *m/z* 126,9047 e *m/z* 401,1190 não foram identificados. A estrutura dos compostos identificados nas espécies de *Miconia* encontram-se na Figura 22.

Figura 22- Estrutura dos compostos identificados por ESI-MS nos EE de espécies de *Miconia*.



Fonte: O autor.

Os compostos identificados nas 4 espécies do gênero *Miconia* podem estar relacionados com as atividades reportadas na literatura, bem como o uso farmacológico na medicina tradicional. A quercetina-O-galoil hexosídeo (*m/z* 615,1020) por exemplo, identificado na *M. albicans*, além de apresentar atividade antioxidante que é normalmente esperada para flavonoides, apresentou atividade anti-inflamatória promissora em uma série de ensaios *in-vitro* (MASUDA et al., 2001). O principal uso da *M. albicans* na medicina popular, é para o tratamento de dores e inflamação (LISBOA et al., 2017, RIBEIRO et al., 2017, VIEIRA; AZEVEDO, 2019). Além disso, muitos estudos avaliaram o potencial anti-inflamatório da espécie (GOMES et al., 2021; LIMA et al., 2020a). Outro composto anotado, o ácido gálico

(m/z 169,0144) presente nas espécies de *M. albicans* e *M. chamissois*, também possui propriedades anti-inflamatórias reportadas em inúmeros estudos, como mostra a revisão feita por Bai et al., (2021). Além da atividade anti-inflamatória outras atividades biológicas foram reportadas para esse composto como: antioxidante, antimicrobiana, anticâncer, entre outras (KAHKESHANI et al., 2018).

O ácido quínico (m/z 191,0567) identificado nas espécies de *M. albicans*, *M. chamissois*, *M. cuspidata* e *M. rubiginosa*, assim como o ácido gálico identificado na *M. albicans* e *M. chamissois*, possuem estudos reportando diversas atividades biológicas como demonstra o levantamento feito por Benali et al., (2022), que incluem potencial antidiabético, antimicrobiano, anticâncer, antiviral, entre outros. O composto farrerol já foi isolado dos caules de *M. prasina* (TARAWNEH et al., 2014). Estudos mostraram que o composto possui efeito antioxidante, atividade anti-inflamatória, vasoativa, antitumoral e antimicrobiana (QIN et al., 2022). No trabalho de CI et al., (2015), foi avaliado o mecanismo pelo qual o farrerol exerce atividade antioxidante nas células. O farrerol (20 e 40 mg/kg) aliviou a inflamação das vias aéreas com asma alérgica induzida por ovalbumina.

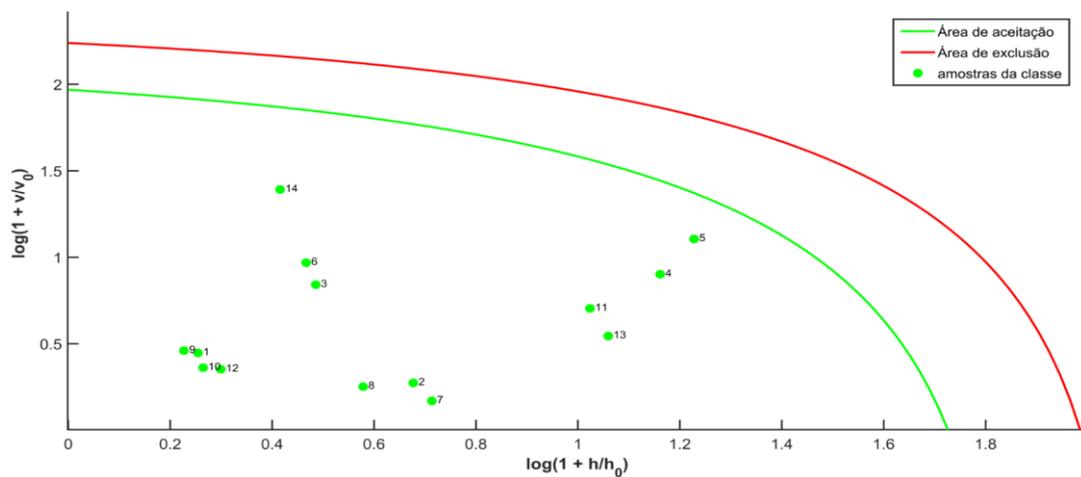
Os gráficos de pesos dos modelos PLS-DA (Figuras 18, 19, 20 e 21), mostram quais variáveis foram mais significativas para discriminação de classes das amostras das 4 espécies do gênero *Miconia*. No gráfico de pesos (Figura 18), constata-se que as variáveis mais significativas para discriminar a *M. albicans* foram os íons: m/z 191,0567, m/z 169,0144, m/z 197,0460, m/z 473,0378 (referente ao composto m/z 947,0791 $[M - H]^-$) e m/z 615,1020. Na Figura 19 para a *M. chamissois* foram os íons: m/z 191,0567, m/z 169,0144, m/z 197,0460, m/z 299,0915 e m/z 466,0297 (referente ao composto m/z 933,0643 $[M - H]^-$). Na Figura 20 para a *M. cuspidata* foram os íons: m/z 197,0460, m/z 191,0567, m/z 173,0459 e m/z 299,0915 e na Figura 21 para a *M. rubiginosa* foram os íons m/z 197,0460, m/z 191,0567, m/z 173,0459 e m/z 299,0915, m/z 319,0838, m/z 463,0896 e m/z 477,0918, respectivamente. Sendo tais íons encontrados em maior intensidade. Portanto, esses íons podem ser considerados marcadores potenciais para as 4 espécies de *Miconia* e orientar as moléculas dos compostos que estão sendo testados para funcionar como biomarcadores no controle de qualidade de produtos naturais e ainda auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes para o tratamento de doenças.

7. Resultados dos modelos DD-SIMCA

7.1 Modelo DD-SIMCA da espécie *M. albicans*

A Figura 23 mostra a região de aceitação do qui-quadrado do modelo DD-SIMCA da classe-alvo para amostras do conjunto de treinamento. O modelo foi construído com 2 Componentes Principais (PCs) onde o valor de α (alfa) estabelecido foi de 0,01. No modelo pode-se observar que nenhuma amostra da classe de interesse foi classificada incorretamente ou encontrada na área dos extremos (espaço entre as linhas verde e vermelha). Não foram verificadas amostras anômalas (espaço após a linha vermelha).

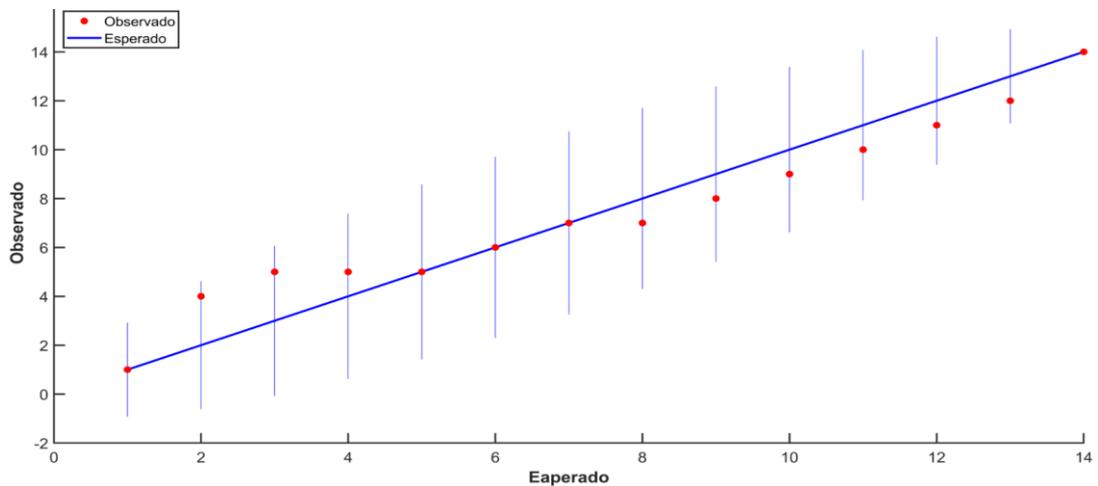
Figura 23-Gráfico de resultado das amostras de *M. albicans* pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento



Fonte: O autor

A observação de possíveis amostras discrepantes no conjunto de treinamento foi feita através do número de amostras extremas observadas e os valores teoricamente esperados, apresentados no gráfico de verificação externa (Figura 24). Onde pode se observar na figura que todas as amostras estão dentro da área de tolerância (indicada em linhas verticais), o que demonstra que o conjunto de treinamento não contém amostras discrepantes.

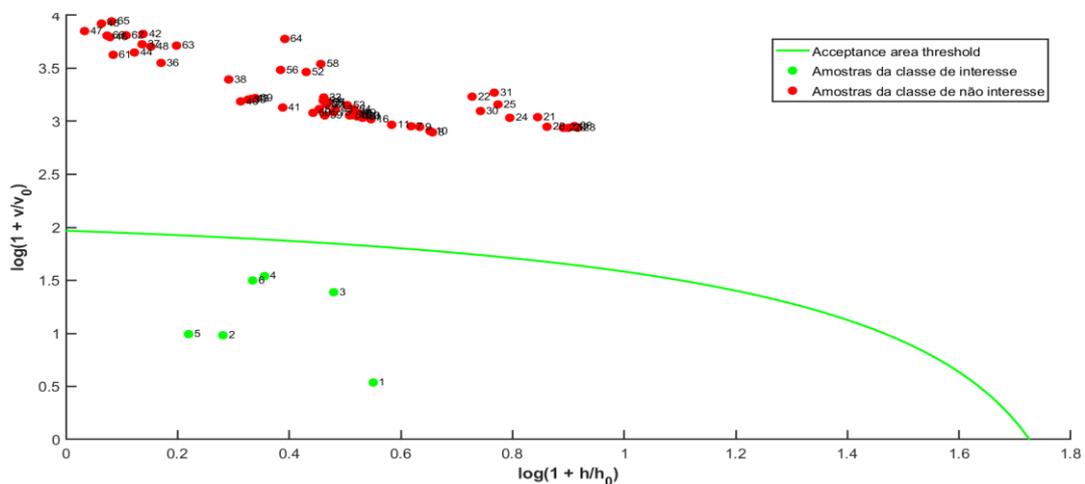
Figura 24-Gráfico de verificação externa em amostras de *M. albicans* pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento



Fonte: O autor

A capacidade preditiva do modelo DD-SIMCA foi avaliada por meio de dados de um conjunto de teste composta por 6 amostras da classe alvo e 60 amostras das classes não alvo. No Gráfico de aceitação da Figura 25, observa-se que as 6 amostras da classe alvo (*M. albicans*) estão dentro da área de aceitação (área delimitada pela curva de cor verde), demonstrando uma classificação correta, enquanto que as amostras das 60 amostras das outras *Miconias* estão fora da área de aceitação, ou seja, todas foram classificadas corretamente como pertencentes a classe de não interesse, indicando que os perfis espectrais dessas amostras diferem dos perfis das amostras da classe alvo.

Figura 25-Gráfico de aceitação em amostras da *M. albicans* pelo modelo DD-SIMCA na etapa de teste



Fonte: O autor

7.1.1 Validação do modelo DD-SIMCA da espécie *M. albicans*

A eficiência do modelo construído foi validada com base nos parâmetros de sensibilidade e especificidade onde são iguais a 1, indicando que o modelo classificou a 100% todas as amostras em ambas as etapas (teste e treinamento). Na Tabela 13, observa-se que os valores de eficiência e o coeficiente de Matthew são iguais a 1, e os valores de vp e vn são a 100% e fp e fn é 0% para o conjunto de treinamento e teste, o que representa um desempenho perfeito.

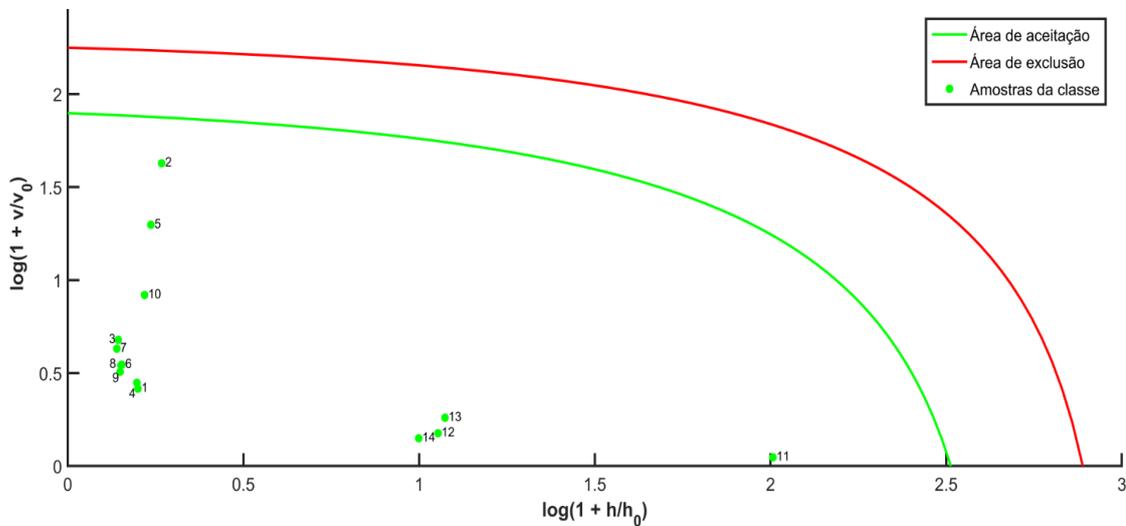
Tabela 13-Tabela de confusão do modelo DD-SIMCA nos conjuntos de treinamento e de teste para espécie de *M. albicans*

		Tabela de Confusão				
		VP	FP	VN	FN	N
Treinamento	Classe alvo	100	0	100	0	14
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
	Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1			
Teste	Classe alvo	100	0	100	0	6
	Classe não alvo	100	0	100	0	60
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1				

7.2 Modelo DD-SIMCA da espécie *M. chamissois*

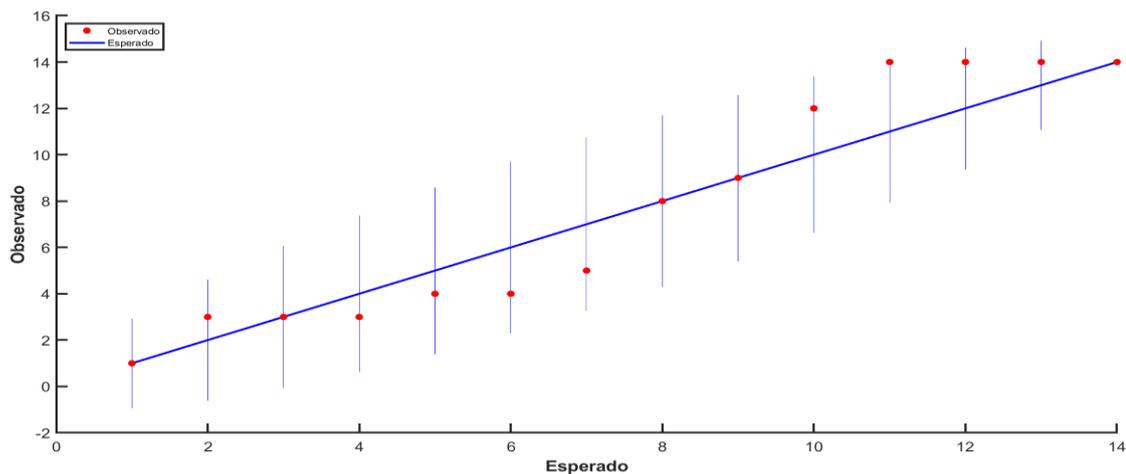
O modelo DD-SIMCA foi construído usando 2 PCs com um valor de α estabelecido de 0,01. Na Figura 26, observa-se que nenhuma amostra da classe de interesse foi classificada incorretamente ou encontrada na área dos extremos (espaço entre as linhas verde e vermelha). Não foram observadas amostras anômalas (espaço após a linha vermelha).

Figura 26-Gráfico de resultado das amostras de *M. chamissois* pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento



O gráfico de verificação externa das amostras (Figura 27) mostra que todas as amostras estão dentro da área de tolerância, o que demonstra que o conjunto de treinamento não contém amostras discrepantes.

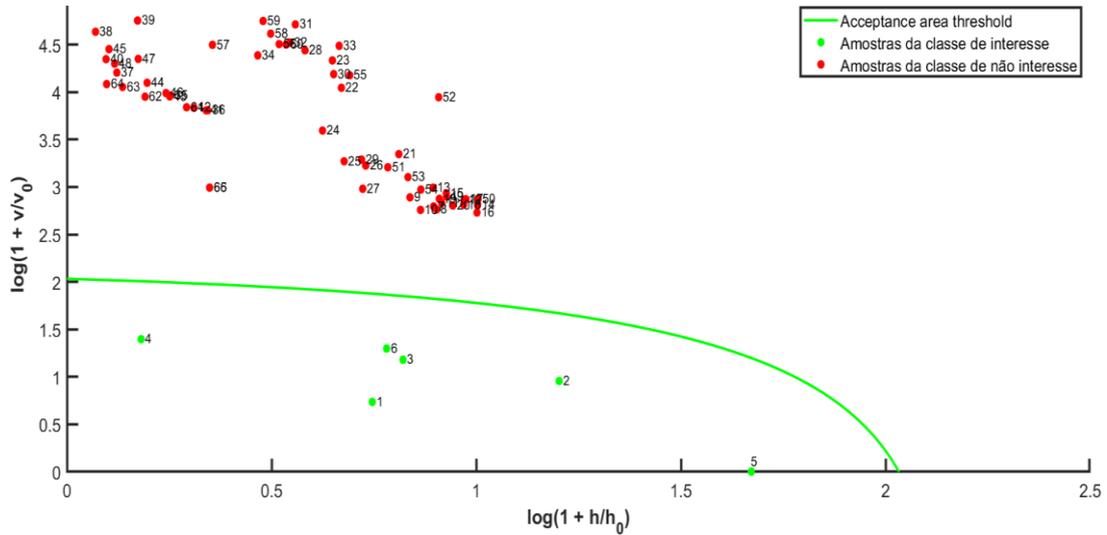
Figura 27-Gráfico de verificação externa em amostras de *M. chamissois* pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento



O modelo DD-SIMCA foi avaliado usando um conjunto de teste composto por 6 amostras da classe alvo e 60 amostras das outras classes de *Miconia*. Na Figura 28, pode se notar que todas as amostras de *M. chamissois* estão dentro da área de aceitação (área delimitada

pela curva de cor verde), demonstrando uma classificação correta, enquanto que as amostras das outras classes estão fora da área de aceitação.

Figura 28-Gráfico de aceitação em amostras da *M. chamissois* pelo modelo DD-SIMCA na etapa de teste



Fonte: O autor

7.2.1 Validação do modelo DD-SIMCA da espécie *M. chamissois*

A exatidão do modelo construído foi observada através dos valores da especificidade e sensibilidade, onde são iguais a 1, mostrando que o modelo classificou todas as amostras em ambas as etapas de teste e de treinamento. Na Tabela 14, mostra que os valores da eficiência e o Coeficiente de Matthew's são iguais a 1 e os valores de vp e vn igual a 100% e de fp e fn igual a 0% para os conjuntos de treinamento e de teste, representando uma classificação perfeita.

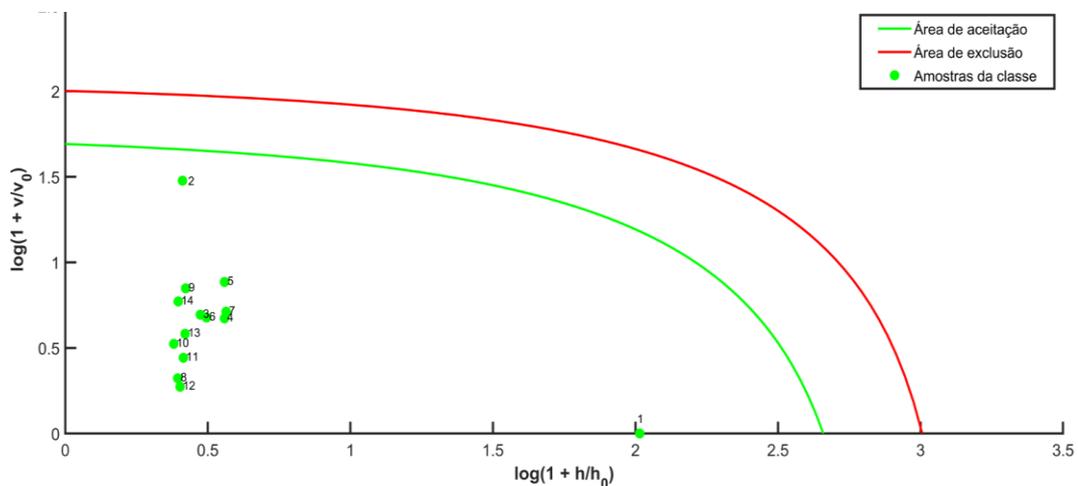
Tabela 14-Tabela de confusão do modelo DD-SIMCA nos conjuntos de treinamento e de teste para espécie de *M. chamissois*

		Tabela de Confusão				
		VP	FP	VN	FN	N
Treinamento	Classe alvo	100	0	100	0	14
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
	Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1			
Teste	Classe alvo	100	0	100	0	6
	Classe não alvo	100	0	100	0	60
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
		Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1		

7.3 Modelo DD-SIMCA da espécie *M. cuspidata*

A Figura 29 mostra a área de aceitação do qui-quadrado do modelo DD-SIMCA da classe-alvo para o conjunto de treinamento. O modelo foi desenvolvido com 2 PCs e o valor de α constituído foi de 0,01. Pode-se observar no modelo que nenhuma amostra foi classificada como extrema (espaço entre as linhas verde e vermelha), nota-se também que todas as amostras de classe de interesse estão dentro da área de aceitação, demarcadas pela linha verde, isto é, foram classificadas corretamente. Para o modelo construído, não foram identificadas amostras *outliers* (espaço após a linha vermelha).

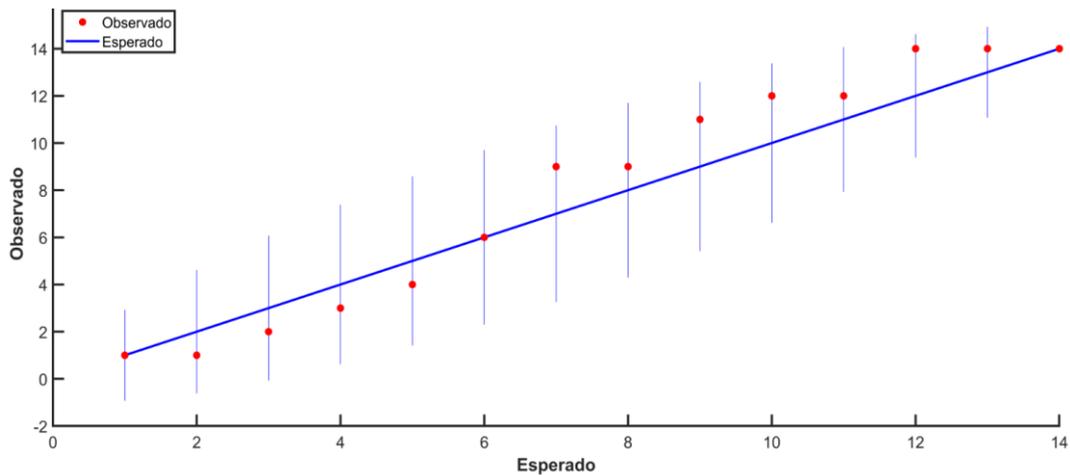
Figura 29-Gráfico de resultado das amostras de *M. cuspidata* pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento



Fonte: O autor

Na Figura 30, do gráfico de verificação externa das amostras, observa-se que todas amostras estão dentro da área de tolerância (linhas verticais), o que constitui que o conjunto de treinamento não contém amostras discrepantes.

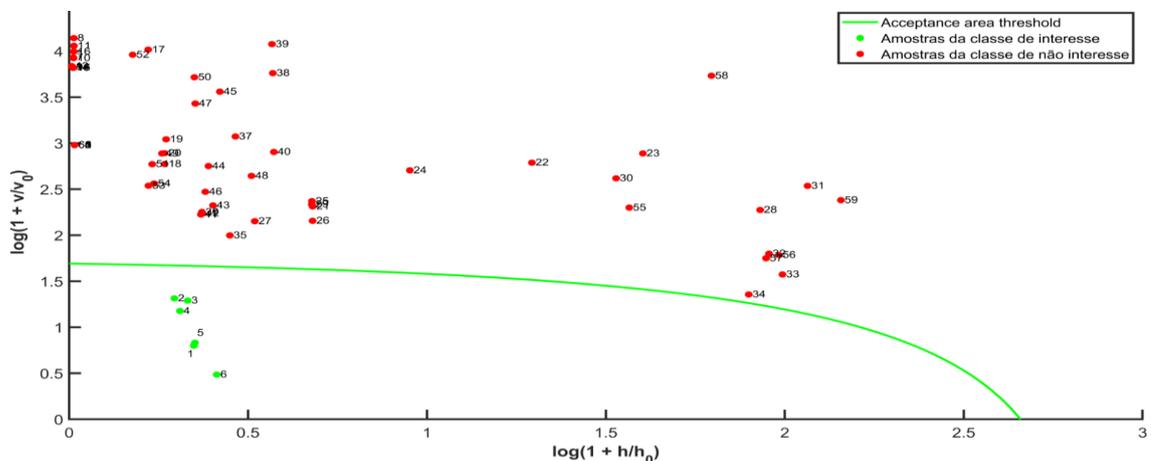
Figura 30-Gráfico de verificação externa em amostras de *M. cuspidata* pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento



Fonte: O autor

O modelo DD-SIMCA foi avaliado usando dados de um conjunto de teste composto por 6 amostras da classe alvo e 60 amostras das outras espécies. Na Figura 31, pode se observar que todas as amostras do conjunto de teste estão dentro da área de aceitação, que é delimitada pela curva verde. Por outro lado, as amostras do conjunto de treinamento estão fora da área de aceitação.

Figura 31-Gráfico de aceitação em amostras da *M. cuspidata* pelo modelo DDSIMCA na etapa de teste



Fonte: O autor

7.3.1 Validação do modelo DD-SIMCA da espécie *M. cuspidata*

A exatidão do modelo construído foi verificada pelos valores de especificidade e sensibilidade, onde são iguais a 1, notando que o modelo classificou a 100% todas as amostras em ambas etapas (teste e treinamento). Pode-se observar pela Tabela 15, que os valores de eficiência e o coeficiente de Matthew são iguais a 1, e os valores de vp e vn são a 100% e fp e fn é 0% para o conjunto de treinamento e teste, o que representa um desempenho perfeito e excelente.

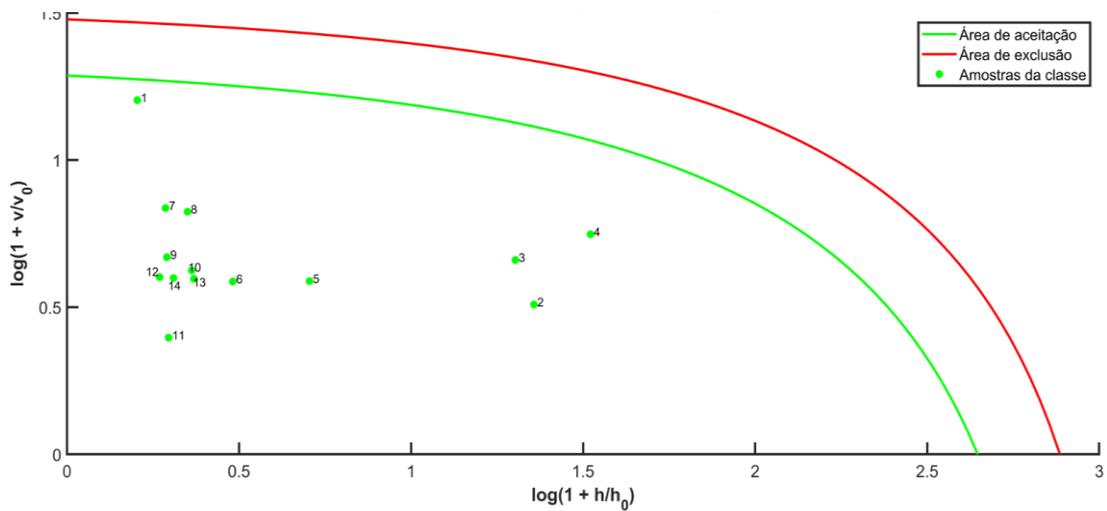
Tabela 15-Tabela de confusão do modelo DD-SIMCA nos conjuntos de treinamento e de teste para espécie de *M. cuspidata*

		Tabela de Confusão				
		VP	FP	VN	FN	N
Treinamento	Classe alvo	100	0	100	0	14
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
	Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1			
Teste	Classe alvo	100	0	100	0	6
	Classe não alvo	100	0	100	0	60
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1				

7.4 Modelo DD-SIMCA da espécie *M. rubiginosa*

O modelo DD-SIMCA foi desenvolvido usando 2 PCs, onde o valor de α estabelecido foi de 0,01. Na Figura 32, pode-se observar que nenhuma amostra da classe de interesse foi classificada incorretamente ou encontrada na área dos extremos (espaço entre as linhas verde e vermelha) e todas as mostras de classe de não interesse foram classificadas corretamente. Não foram observadas amostras anômalas (espaço após a linha vermelha).

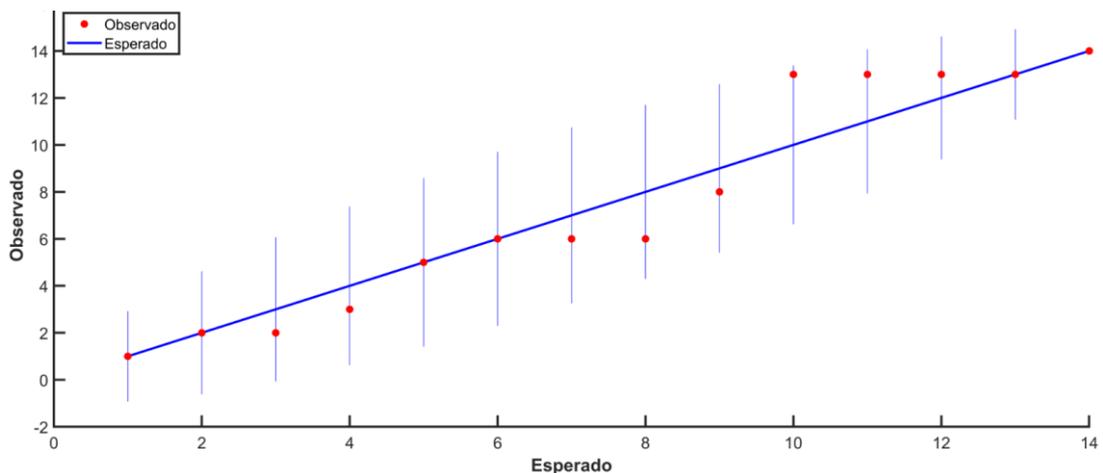
Figura 32-Gráfico de resultado das amostras de *M. rubiginosa* pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento



Fonte: O autor

No gráfico de verificação externa em amostras (Figura 33), verifica-se que todas as amostras se enquadram na área de tolerância, conforme mostra as linhas verticais. Isso demonstra que o conjunto de treinamento não contém discrepantes.

Figura 33-Gráfico de verificação externa em amostras de *M. rubiginosa* pelo modelo DD-SIMCA na etapa de treinamento

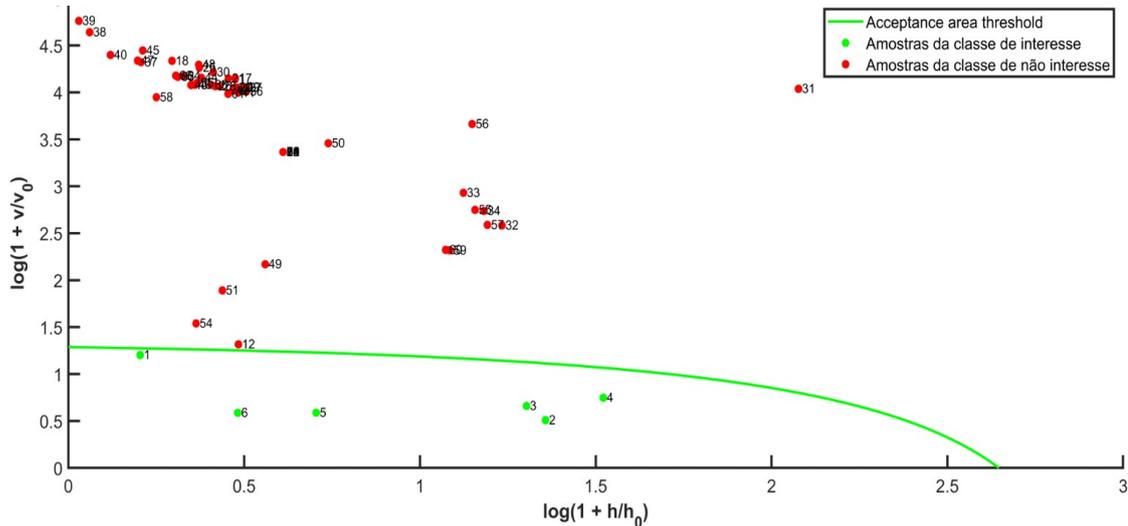


Fonte: O autor

O modelo DD-SIMCA foi avaliado usando dados de um conjunto de teste composto por 6 amostras da classe alvo e 60 amostras das outras espécies. Na Figura 34, observa-se que todas as amostras estão dentro da área de aceitação, provando uma classificação correta. Por outro

lado, as amostras das outras classes foram classificadas corretamente como da classe não interesse, pois estão fora da área de aceitação.

Figura 34-Gráfico de aceitação em amostras da *M. rubiginosa* pelo modelo DDSIMCA na etapa de teste



Fonte: O autor

7.4.1 Validação do modelo DD-SIMCA da espécie *M. rubiginosa*

A exatidão do modelo construído foi verificada com base nos valores de especificidade e sensibilidade, que são iguais a 1. Isso demonstra que o modelo classificou a 100% todas as amostras nos dois conjuntos de teste e de treinamento. A partir da tabela 16, pode-se observar que os valores de eficiência e o coeficiente de Matthew são iguais a 1, e os valores de vp e vn são 100 e fp e fn são iguais 100% para conjunto de treinamento e teste representando classificação perfeita e ótimo desempenho.

Tabela 16-Tabela de confusão do modelo DD-SIMCA nos conjuntos de treinamento e de teste para espécie de *M. rubiginosa*

		Tabela de Confusão				
		VP	FP	VN	FN	N
Treinamento	Classe alvo	100	0	100	0	14
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
	Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1			
Teste	Classe alvo	100	0	100	0	6
	Classe não alvo	100	0	100	0	60
	Sensibilidade = 1		Especificidade = 1			
	Eficiência = 1		Coeficiente de Correlação Matthew's = +1			

Os modelos PLS-DA e DD-SIMCA construídos demonstraram a mesma eficiência na separação das classes, alcançando uma precisão de 100% na distinção entre as classes. Embora o método PLS-DA nos proporcionou gráficos de pesos que ajudaram na identificação dos íons mais significativos, o DD-SIMCA por ser um método one class possui a vantagem de futuramente classificar amostras que não sejam da classe de interesse, uma vez que o modelo construído é treinado para classificar baseando-se apenas na classe alvo.

Os modelos quimiométricos PLS-DA e DD-SIMCA construídos para classificar as espécies de *Miconia* analisadas com a técnica de ESI-MS foram capazes de discriminar corretamente as classes das espécies de *Miconia*, com uma taxa de classificação de 100% para os dois métodos.

Trindade et al., (2023), no seu trabalho usou a técnica de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) aliado ao método quimiométrico (Análise de Componentes Principais-PCA) para determinação do potencial antioxidante de espécies do gênero *Vismia* (*V. cayennensis*, *V. guianensis* e *V. aff. guianensis*). Ele conseguiu separar as amostras da espécie *V. cayennensis* das demais. Neste modelo de PCA, as três primeiras Componentes Principais (PCs) foram responsáveis por 82,05% da variância total dos dados, forneceram assim informações significativas para a discriminação das amostras. A partir da análise quimiométrica conseguiu observar através do gráfico biplot de PCA das diferentes espécies de *Vismia* baseados nos espectros ESI-MS no modo negativo que possuem elevado

potencial para atividade antioxidante. No outro estudo realizado por Luz (2019), usou o método de análise discriminante de mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) aliado a cromatografia líquida de ultra-eficiência e a espectrometria de massas em alta resolução (UPLC-QTOF-MSE) para classificar e diferenciar as amostras dos extratos de folhas, galho e casca de baraúna. Este método provou ser rápido e eficaz na distinção entre cada grupo (folha-galho; folha-casca; casca-galho), destacando claramente as diferenças entre eles. Com a ajuda deste método e dos gráficos de S-Plot e variável de importância na projeção (VIP) conseguiu identificar 23 compostos nas amostras de extratos de folhas, galhos e cascas de baraúna.

Os métodos analíticos PLS-DA e DD-SIMCA propostos no trabalho são de fácil interpretação e eficientes, fazendo com que sejam alternativas viáveis para serem implementados no controle de qualidade de produtos naturais.

9. CONCLUSÕES

Os métodos desenvolvidos combinando os métodos quimiométricos com a técnica de espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray, mostraram-se assertivos para classificação de amostras das espécies do gênero *Miconia*, extraindo de maneira satisfatória informações complexas contidas nos espectros de massas.

Os modelos quimiométricos PLS-DA e DD-SIMCA construídos apresentaram resultados satisfatórios com uma taxa de classificação de 100% para ambos os modelos e uma boa concordância entre os parâmetros RMSEC e RMSEP (RMSEC apresenta valor menor do que RMSEP), provando que os modelos PLS-DA não apresentam tendências em suas previsões. A sensibilidade e especificidade dos dois métodos apresentaram valores iguais a 1, indicando a correta discriminação de todas as amostras dos conjuntos de treinamento e de teste para todos os modelos.

Os métodos produziram resultados promissores e compatíveis, e podem ser considerados adequados para o desenvolvimento de métodos para classificação de amostras das espécies do gênero *Miconia*. Sendo promissor a possível identificação dos íons mais significativos na discriminação das amostras através de análise de pesos, pode-se concluir que esses íons podem ser considerados como biomarcadores no controle de qualidade de produtos naturais e ainda auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes para o tratamento de doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASI, S.; MINAEI, S.; JAMSHIDI, B.; & FATHI, D. Scientia horticulturae rapid measurement of apple quality parameters using wavelet de-noising transform with Vis / NIR analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 252, n. February, p. 7–13, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.085>

ALBUQUERQUE, L. B.; AQUINO, F. G.; COSTA, L. C.; MIRANDA, Z. J. G.; & SOUSA, S. R. Espécies de melastomataceae juss. com potencial para restauração ecológica de mata ripária no cerrado. **Polibotânica**, n. 35, p. 1–19, 2013.

ALMEIDA, M. R.; FIDELIS, C. H. V; BARATA, L. E. S.; & POPPI, R. J. Talanta classi fication of amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. **Talanta**, v. 117, p. 305–311, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.025>

BAI, J., ZHANG, YUNSEN, TANG, C., HOU, Y., AI, X., CHEN, X., ZHANG, YI, WANG, X., MENG, X., Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 133, 110985. 2021. <https://10.1016/j.biopha.2020.110985>

BALLABIO, D.; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. **Analytical Methods**. n. June 2009, p. 3790–3798, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3ay40582f>

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to Access the information beyond the molecular weight of the analyte. **International journal of analytical chemistry**. v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**. p. 166–173, 2003. <https://doi.org/10.1002/cem.785>

BEN SAID, R.; ARAFA I, H.; USAM A, M.; ABDULLAH SULAIMAN, A.-A.; KOWALCZYK, M.; MOLDOCH, J.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by

liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 1-18, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18030512>

BENALI, T., BAKRIM, S., GHCHIME, R., BENKHAIRA, N., EL OMARI, N., BALAHBIB, A., TAHA, D., ZENGIN, G., HASAN, M.M., BIBI, S., BOUYAHYA, A., Pharmacological insights into the multifaceted biological properties of quinic acid. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 19, 1–30. 2022. <https://doi.org/10.1080/02648725.2022.2122303>

BEZERRA, F. G. S.; DE TOLEDO, P. M.; VON RANDOW, C.; DE AGUIAR, A. P. D., LIMA, P. V. P. S.; DOS ANJOS, L. J. S.; & BEZERRA, K. R. A. Spatio-temporal analysis of dynamics and future scenarios of anthropic pressure on biomes in Brazil. **Ecological Indicators**, v. 137, n. September 2021, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108749>

BI, Y.; YUAN, K.; XIAO, W.; WU, J.; SHI, C.; XIA, J.; CHU, G.; ZHANG, G.; & ZHOU, G. Analytica chimica acta a local pre-processing method for near-infrared spectra , combined with spectral segmentation and standard normal variate transformation. **Analytica Chimica Acta**, v. 909, p. 30–40, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.010>

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria, **Quimica Nova**, v. 8, n. 1964, p. 84–99, 1985.

CAMPOS, J. L. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Indicators of conservation priorities for medicinal plants from seasonal dry forests of northeastern Brazil. **Ecological Indicators**, v. 121, p. 106993, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106993>

CARLOS, A.; MENEZES, P. DE; VINÍCIUS, M.; VENTURA, A.; DE, C. F., CASTRO, S.; ANTÔNIO, F.; SOARES, L.; FAVARETO, R.; & TAQUES, A. S. Prospecção fitoquímica , físico-química e atividades biológicas do extrato etanólico floral de *Miconia chamissois* Naudin. (Melastomataceae). **Hoehnea**, v. 08, n. versão 1, 2022. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-50-2021>

CHALUB, L. DOS R.; SPAZIANI, A. O.; ABILIO, C.; BUENO, A. B.; GIRALDELLI, S. I.; SOBREIRA, M. M.; & KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Avaliação da atividade antimicrobiana e cicatrizante de plantas medicinais em ratos. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. S 1, p. 42, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.10.079>

CI, X.; CHU, X.; WEI, M.; YANG, X.; CAI, Q.; DENG, X. Different effects of farrerol on an OVA-induced allergic asthma and LPS-induced acute lung injury. **Plos One**, v. 7, n. 4, p. e34634, 2012. <https://10.1371/journal.pone.0034634>

CI, X.; LV, H.; WANG, L.; WANG, X.; PENG, L.; QIN, F. X.-F.; CHENG, G. The antioxidative potential of farrerol occurs via the activation of Nrf2 mediated HO-1 signaling in RAW 264.7 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 239, n., p. 192-199, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.032>

CORRÊA, J. G. D. S.; BIANCHIN, M.; LOPES, A. P.; SILVA, E.; AMES, F. Q.; POMINI, A. M.; CARPES, S. T.; DE CARVALHO RINALDI, J.; CABRAL MELO, R.; KIOSHIMA, E. S.; BERSANI-AMADO, C. A.; PILAU, E. J. et al. Chemical profile, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) fruits extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 273, n., p. 113979, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113979>

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; & LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200020>

DE REZENDE, A. R. Sistemática e conservação de *Miconia* seção *Miconia* DC. (Melastomataceae) no estado de Minas Gerais, Brasil. **(Dissertação)**. UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. Instituto de Biologia. Programa de Pós-Graduação em **Biologia Vegetal i**, p. 34–35, 2012. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/12431>

DE REZENDE, A. R.; ROMERO, R.; GOLDENBERG, R. Sinopse de *Miconia* seção *Miconia* DC. (Melastomataceae) no estado de Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 273–287, 2014.

DIAS, A. C. C.; SERRA, A. C.; SAMPAIO, D. S.; BORBA, E. L.; BONETTI, A. M.; & OLIVEIRA, P. E. Unexpectedly high genetic diversity and divergence among populations of the apomictic Neotropical tree *Miconia albicans*. **Plant Biology**, v. 20, n. 2, p. 244–251, 2018. <https://doi.org/10.1111/plb.12654>

DO NASCIMENTO, S. N.; MAZZEI, J. L.; TOSTES, J. B. D. F.; NAKAMURA, M. J.; VALENTE, L. M. M.; DE LIMA, R. C.; NUNES, P. C. G.; DE AZEREDO, E. L.; BERRUETA,

L. A.; GALLO, B.; SIANI, A. C. *Miconia albicans* (Melastomataceae) to treat Chikungunya viral infection: An effectual symptom-driven ethnomedicinal repurposing of an anti-inflammatory species? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 318, n., p. 116875, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116875>

FERREIRA, H. D.; BORGES, L. L.; FIUZA, T. D. S. Estudo morfo-anatômico, triagem fitoquímica, avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações das folhas de *Miconia albicans* (Sw.) Triana. p. 372–391, 2019. **Jornal of Social Technology Environment** <https://doi.org/10.21664/2238-8869.2019v8i2.p372-391>

FERREIRA, J. DE F.; LÓPEZ, M. H. M.; GOMES, J. V. D.; NASCIMENTO MARTINS, D. H.; FAGG, C. W.; MAGALHÃES, P. O.; DAVIES, N. W.; SILVEIRA, D.; & FONSECA-BAZZO, Y. M. Seasonal chemical evaluation of *Miconia chamissois* Naudin from Brazilian Savanna. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 1–16, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27031120>

FERREIRA, F.; LIMA, A.; FERREIRA, R. G.; PIVARI, M. Levantamento de plantas medicinais e do conhecimento etnobotânico no município de Baependi, Minas Gerais, Brasil. **MGBiota**, v. 5, n., p. 4-26, 2013.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações. Editora Unicamp. Campinas - SP. 2015. <https://doi.org/10.7476/9788526814714>

GHAREEB, M.; SAAD, A.; AHMED, W.; REFAHY, L.; NASR, S. HPLC-DAD-ESI-MS/MS characterization of bioactive secondary metabolites from *Strelitzia nicolai* leaf extracts and their antioxidant and anticancer activities In vitro. **Pharmacognosy Research**, v. 10, n., p. 368-378, 2018. https://doi.org/10.4103/pr.pr_89_18

GIMENEZ, V. M. M.; E SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; JANUARIO, A. H., COSTA, E. J. X.; & PAULETTI, P. M. Influence of environmental, geographic, and seasonal variations in the chemical composition of *Miconia* species from Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 91, n. January, p. 104049, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104049>

GOLDENBERG, R. Melastomataceae: *Miconia* Ruiz & Pav. In: WANDERLEY, M. G. L. et al. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**, São Paulo: Instituto de Botânica, FAPESP, cap. p. 330. 2016

GOLDENBERG, R.; BACCI, L. F.; CADDAH, M. K.; MEIRELLES, J. *Miconia* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (2022). Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB9666>>. Acesso em: 19 ago. 2022.

GOMES, T. P. O.; SOUZA, J. I. N.; SOMERLATE, L. C.; MENDONÇA, V. A.; LIMA, N. M.; CARLI, G. P.; CASTRO, S. B. R.; DE JESUS, A. S. A. T.; DIAS, J. V. L.; OLIVEIRA, M. A. L.; ALVES, C. C. S.; CARLI, A. P. *Miconia albicans* and *Curcuma longa* herbal medicines positively modulate joint pain, function and inflammation in patients with osteoarthritis: a clinical study. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 377-391, 2021. <https://10.1007/s10787-020-00781-9>

GOUVEIA, S. C.; CASTILHO, P. C. Characterization of phenolic compounds in *Helichrysum melaleucum* by high-performance liquid chromatography with on-line ultraviolet and mass spectrometry detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 13, p. 1851-1868, 2010. <https://doi.org/10.1002/rcm.4585>

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. Mass Spectrometry – Principles and applications. 3rd ed. p. 502, 2007.

IGLESIAS, D. T.; DUTRA, V. F. Melastomataceae na área de proteção ambiental Mestre Álvaro, Serra, Espírito Santo, Brasil. **Rodriguesia**, v. 68, n. 5, p. 1921–1937, 2017. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768524>

JIMÉNEZ-CARVELO, A. M.; GONZÁLEZ-CASADO, A.; BAGUR-GONZÁLEZ, M. G.; & CUADROS-RODRÍGUEZ, L. Alternative data mining / machine learning methods for the analytical evaluation of food quality and authenticity – A review. **Food Research International**, v. 122, n. February, p. 25–39, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.063>

KAHKESHANI, N., FARZAEI, F., FOTOUHI, M., ALAVI, S.S., BAHRAMSOLTANI, R., NASERI, R., MOMTAZ, S., ABBASABADI, Z., RAHIMI, R., FARZAEI, M.H., BISHAYEE, A. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases : A mechanistic review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 22, 225-237. 2018. <https://10.22038/IJBMS.2019.32806.7897>

LEITZKE, A. F.; BERNEIRA, L. M.; BRUNO, N.; MOREIRA, B. C.; MARIOTTI, K. D. C.; & VENZKE, D. Química de produtos naturais aplicados a reveladores de impressões

digitais latentes. **Quimica Nova**, v. 45, n. 4, p. 424–434, 2022.

LIMA, R. D. C. L, KONGSTAD, K. T.; FRANZYK, H.; STAERK, D. High-resolution PTP1B inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of PTP1B inhibitors from *Miconia albicans*. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1755, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23071755>

LIMA, R. D. C. L, KONGSTAD, K. T., FRANZYK, H., & STAERK, D. Evidence for the involvement of IL-1 β and TNF- α in anti-inflammatory effect and antioxidative stress profile of the standardized dried extract from *Miconia albicans* Sw . (Triana) Leaves (Melastomataceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 259, n. May, p. 112908, 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112908>

LIMA, T. C.; MATOS, S. S.; CARVALHO, T. F.; SILVEIRA-FILHO, A. J.; COUTO, L. P. S. M.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S. S.; MARA, A.; SILVA, O., HEIMFARTH, L.; PASSOS, F. R. S.; GANDHI, S. R., LIMA, B. S., & SILVA, F. A. Evidence for the involvement of IL-1 β and TNF- α in anti-inflammatory effect and antioxidative stress profile of the standardized dried extract from *Miconia albicans* Sw. (Triana) Leaves (Melastomataceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 259, n. April, p. 112908, 2020b. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112908>

LISBOA, M.; PINTO, A.; BARRETO, P.; RAMOS, Y.; SILVA, M.; CAPUTO, M.; ALMEIDA, M. Estudo etnobotânico em comunidade quilombola Salamina/Putumujú em Maragogipe, Bahia. **Revista Fitos**, v. 11, n. 1, p. 48-61, 2017. <https://10.5935/2446-4775.20170006>

LUAN, J., PAIXÃO, D.; ELEM, T.; DOS, T.; CARAMÊS, S.; PARRA, D.; MIRNA, B.; & GIGANTE, L. Adulteration detection in goat dairy beverage through NIR Spectroscopy and DD - SIMCA. **Food Analytical Methods**, p. 783–791, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02151-9>

LUZ, LUCIA DOS REIS. Perfil químico e atividade citotóxica dos extratos de folha, galho e casca de baraúna: abordagem metabolômica e quimiométrica. **Dissertação** (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019., p. 68–79, 2019. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/40139> . Acesso em: 17 ago. 2022

MAJUMDAR, A. S.; SOMANI, S. J. **Natural products in lifestyle diseases: In Vitro Screening**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102081-4.00012-5>

MANZANO, M. I.; CENTA, A.; VEIGA, A. D. A.; DA COSTA, N. S.; BONATTO, S. J. R.; DE SOUZA, L. M.; SMIDERLE, F. R. Phytochemical evaluation and anti-inflammatory potential of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Extracts. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 18, p. 5954, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27185954>

MASUDA, T., IRITANI, K., YONEMORI, S., OYAMA, Y., TAKEDA, Y. Isolation and antioxidant activity of galloyl flavonol glycosides from the seashore plant, pemphis acidula. **Biosci. Biotechnol Biochem**, 65, 1302–1309. 2001. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.1302>

MASSART. Handbook of chemometrics and qualimetrics. **Amsterdã: Elsevier Science**, v. Volume 20B, 1998. <https://doi.org/https://doi.org/10.14393/ufu.di.2017.115>

MELO, L. R. F.; VASCONCELOS, T.; REGINATO, M.; CAETANO, A. P. S.; & DE BRITO, V. L. G. Evolution of stamen dimetrisism in Melastomataceae, a large radiation of pollen flowers. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 48, n. December 2020, p. 125589, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2021.125589>

MORAES, M. C. B.; LUCIO, C.; FUNDAMENTAL, D. D. Q.; QUÍMICA, I. DE, PAULO, U. D. S.; PROF, A.; & PRESTES, L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas Maria Carolina B. Moraes. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556–563, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400019>

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. 770–803, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

NURAZAH, Z.; IDRIS, A. S.; KUSHAIRI, A.; DIN, A. M.; ABRIZAH, O.; RAMLI, U. S. Metabolomics unravel differences between Cameroon *Dura* and Deli *Dura* oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic backgrounds against basal stem rot. **Journal of Oil Palm Research**, v. 29, n. 2, p. 227-241, 2017. <https://doi.org/10.21894/jopr.2017.2902.07>

OLIVEIRA SABBAG CUNHA, G.; MOREIRA DA SILVA, D.; DOS SANTOS, M. L.; DE MORAES FILHO, M. O.; DO Ó PESSOA, C.; DE JESUS GUIMARÃES, C.; SOUZA

SILVA, M. F.; & SEVERO MENEZES, A. C. Chemical constituents and cytotoxic activity of *Miconia burchellii* Triana (Melastomataceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v. 137, p. 345–350, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.11.008>

PASSOS, L. S.; TELLES, F. J.; GOLDENBERG, R.; AMANO, E.; & MAIA, F. R. What is the role of stamen appendages in the buzz-pollinated *Huberia insignis* (Melastomataceae)? **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 293, n. September 2021, p. 152113, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2022.152113>

PAULO, J.; MARTINS, A.; FERREIRA, M. M. C. QSAR Modeling: Um novo pacote computacional open source para gerar e validar modelos QSAR. **Quimica Nova**, v. 36, n. 4, p. 554–560, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000400013>

PINHO, A. D. A.; CRISTINA, M.; MATTOS, F. I. DE. Validade da citologia cervicovaginal na detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de colo de útero Validity of cervicovaginal cytology for detection of cancerous and precancerous lesions of the cervix. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**. n. 3. 1999. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442002000300011>

POLIZEL, S. P.; VIEIRA, R. M. DA S. P.; POMPEU, J.; FERREIRA, Y. DA C.; SOUSA-NETO, E. R. DE; BARBOSA, A. A.; & OMETTO, J. P. H. B. Analysing the dynamics of land use in the context of current conservation policies and land tenure in the Cerrado – MATOPIBA region (Brazil). **Land Use Policy**, v. 109, n. March 2020, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2021.105713>

POMERANTSEV, A. L. Acceptance areas for multivariate classification derived by projection methods. **Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society**, n. February, 2008. <https://doi.org/10.1002/cem.1147>

POMERANTSEV, A. L.; RODIONOVA, O. Y. Concept and role of extreme objects in PCA /. **Journal of Chemometrics**, n. April 2012, 2013. <https://doi.org/10.1002/cem.2506>

QIN, X.; XU, X.; HOU, X.; LIANG, R.; CHEN, L.; HAO, Y.; GAO, A.; DU, X.; ZHAO, L.; SHI, Y.; LI, Q. The pharmacological properties and corresponding mechanisms of farrerol: a comprehensive review. **Pharmaceutical Biology**, v. 60, n. 1, p. 9-16, 2022. <https://10.1080/13880209.2021.2006723>

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GANDHI, S. R.; PASSOS, F. R. S.; HEIMFARTH, L.; PEREIRA, E. W. M.; MONTEIRO, B. S.; DOS SANTOS, K. S.; DUARTE, M. C.; ABREU, L. S.; NASCIMENTO, Y. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S. et al. Dereplication and quantification of the ethanol extract of *Miconia albicans* (Melastomaceae) by HPLC-DAD-ESI/MS/MS, and assessment of its anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles in a mice arthritis-like model: Evidence for involvement of TNF- α , IL-1 β and IL-6. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 258, n., p. 112938, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112938>

RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. D. O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, n., p. 69-102, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.023>

RICHARD. G. BRERETON. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. **John Wiley & Sons.**, p. 489, 2003. <https://doi.org/10.1002/0470863242>

SABBAG CUNHA, G. O.; CRUZ, D. C. DA; SEVERO MENEZES, A. C. An Overview of *Miconia* Genus: Chemical Constituents and Biological Activities. **Pharmacognosy Reviews**, v. 13, n. 26, p. 77–88, 2019. <https://doi.org/10.5530/phrev.2019.2.8>

SANTOS, P. S.; FERREIRA, L. G.; LENZI, Í. L. C. Caracterização Biofísica Das Pastagens Na Bacia Hidrográfica Do Rio Vermelho (Go), Bioma Cerrado, Brasil. **Boletim de Geografia**, v. 36, n. 3, p. 53, 2018. <https://doi.org/10.4025/bolgeogr.v36i3.35269>

SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; SHARMA, K. R.; KUMARA, B. Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in Different Plant Parts of *Terminalia arjuna* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. **Natural Product Commun**, v. 11, n. 2, p. 239-44, 2016. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100227>

SINGH, H., BHUSHAN, S.; ARORA, R.; SINGH, H.; ARORA, S.; & SINGH, B. ScienceDirect Alternative treatment strategies for neuropathic pain : Role of Indian medicinal plants and compounds of plant origin-A review. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 92, p. 634–650, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.079>

STUDENT, M. T.; KUMAR, R. R.; OMMENTS, R. E. C.; PRAJAPATI, A.; BLOCKCHAIN, T.-A.; MI, A. I.; RANDIVE, P. S. N.; CHAUDHARI, S.; BARDE, S., DEVICES, E.; MITTAL, S.; SCHMIDT, M. W. M.; Id, S. N. A.; PREISER, W. F. E.;

OSTROFF, E.; CHOUDHARY, R.; BIT-Cell, M.; IN, S. S.; FULLFILLMENT, P.; FELLOWSHIP, W. No Covariance Structure Analysis of Health-Related Indices for the Elderly at Home, Focusing on Subjective Feelings of Health Title. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2021.

TARAWNEH, A. H.; LEÓN, F.; IBRAHIM, M. A.; PETTAWAY, S.; MCCURDY, C. R.; CUTLER, S. J. Flavanones from *Miconia prasina*. **Phytochemistry Letters**, v. 7, n., p. 130-132, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.11.001>

Trindade, M.; Rolim, R.; Araujo, J.; Maia G & Corrêa, G. M. Chemometric analysis and evaluation of antioxidant potential from organic extracts of *Vismia* spp. Análise quimiométrica e avaliação do potencial antioxidante dos extratos orgânicos. v 23 n. 6. **Concilium**. 2023. <https://doi.org/10.53660/CLM-1160-23D41>

VALDERRAMA, L.; GONÇALVES, R. P.; MARÇO, P. H.; & VALDERRAMA, P. Espectroscopia Uv-Vis e Método Quimiométrico na Avaliação de Adulterações e Fraudes em Azeite de Oliva Extra Virgem. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 5, n. 2, p. 32–40, 2014. <https://doi.org/10.14685/rebrapa.v5i2.170>

VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; & CROTTI, A. E. M. Application of computational quantum chemistry to chemical processes involved in mass spectrometry. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 840–853, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000400026>

VICENTE, A. F. Consumo de «produtos naturais» e «suplementos alimentares» numa Unidade de Saúde Familiar: estudo exploratório. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**. Vol. 35 N.º 1 (2019). p. 30–36, 2019. <https://doi.org/10.32385/rpmgf.v35i1.12168>

VIEIRA, B.; AZEVEDO, M. M. D. Plantas Medicinais da Mata Atlântica na Comunidade Brejal, Distrito de Posse, Petrópolis, RJ, Brasil. **Diversidade e Gestão**, v. 3, n. 1, p. 94-100, 2019.

VOLPE L. O. PEDRO, MARISA S. MELGO, ALEXANDRE M. ANTUNES, MÁRCIA M. C. FERREIRA. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**. v. 5 . n. January , 1999. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000500016>

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis.

Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 2, n. 1–3, p. 37–52, 1987.
[https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9)

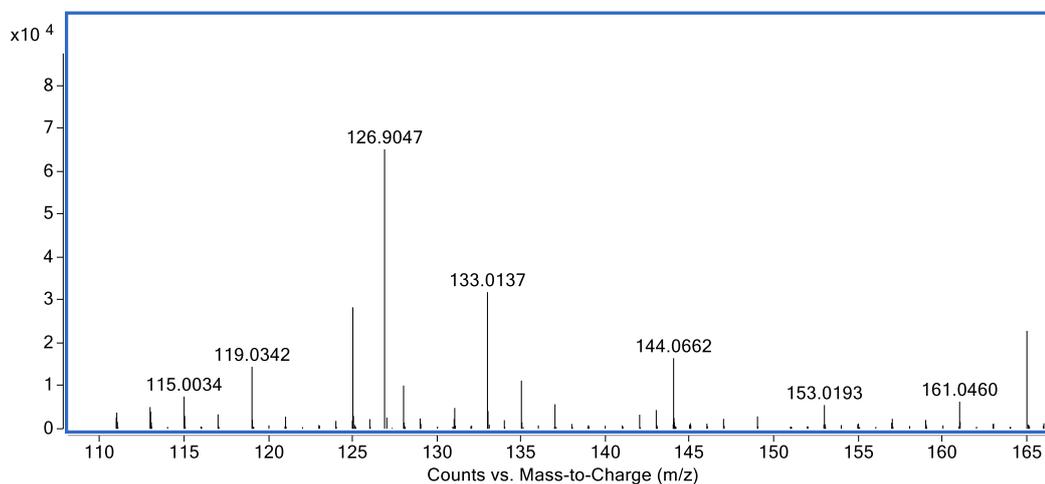
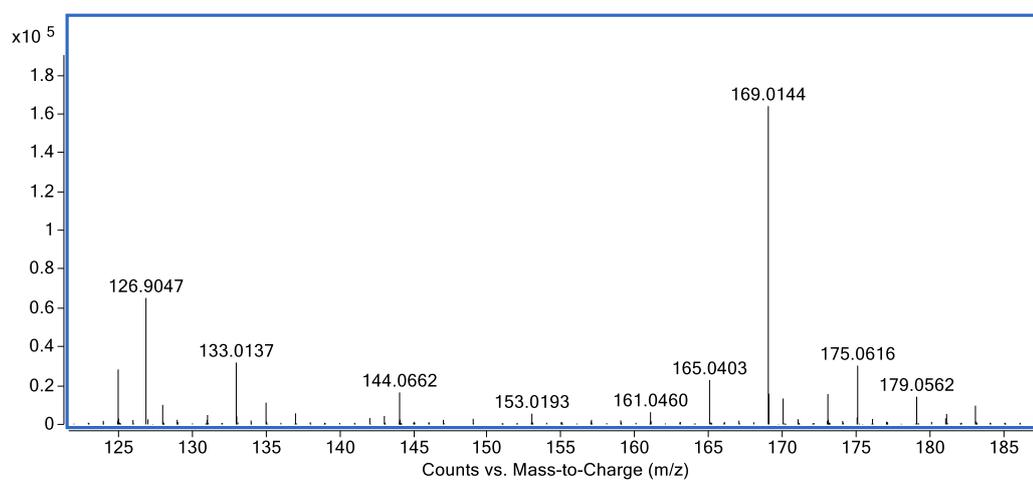
XU, L., CAI, C. B., CUI, H. F., YE, Z. H., & YU, X. P. Rapid discrimination of pork in Halal and non-Halal Chinese ham sausages by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and chemometrics. **Meat Science**, v. 92, p. 506–510, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.05.019>

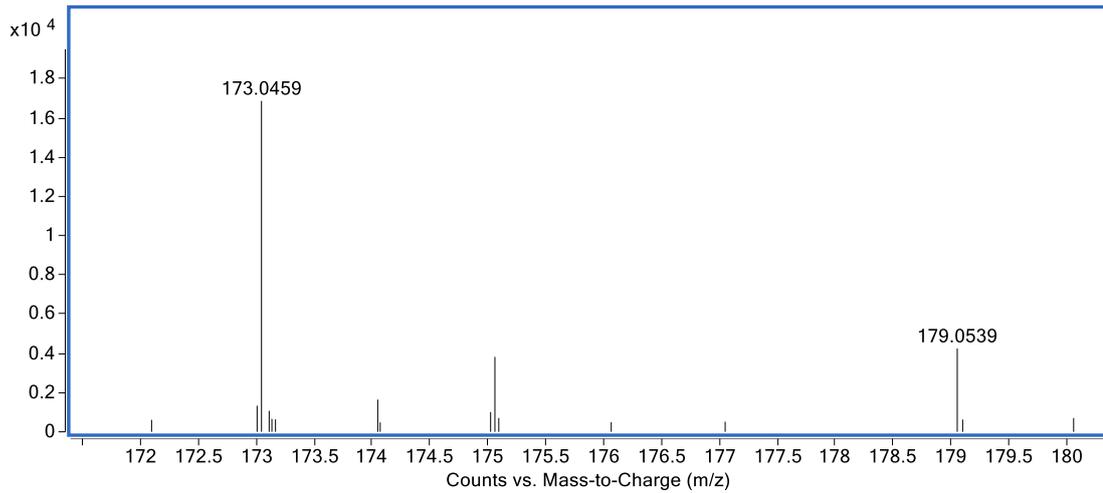
YIN, J.; MA, Y.; LIANG, C.; WANG, H.; SUN, Y.; ZHANG, L.; JIA, Q. A Complete Study of Ferrerol Metabolites Produced *in Vivo* and *in Vitro*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 19, p. 3470, 2019. <https://10.3390/molecules24193470>

ZONTOV, Y. V.; RODIONOVA, O. Y.; KUCHERYAVSKIY, S. V.; & POMERANTSEV, A. L. DD-SIMCA – A MATLAB GUI tool for data driven SIMCA approach. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 167, p. 23–28, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2017.05.010>

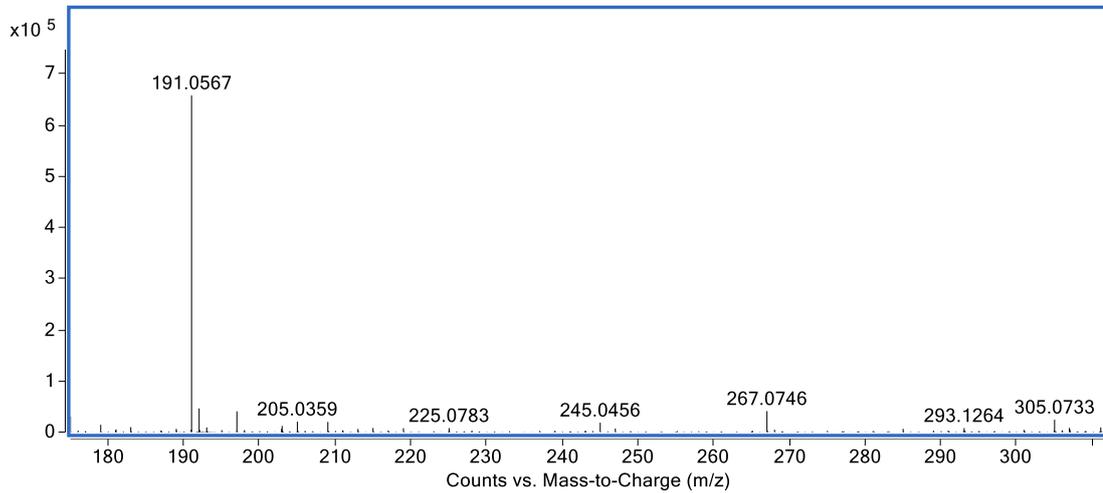
APÊNDICE

Espectros de massas dos compostos identificados por ESI-MS

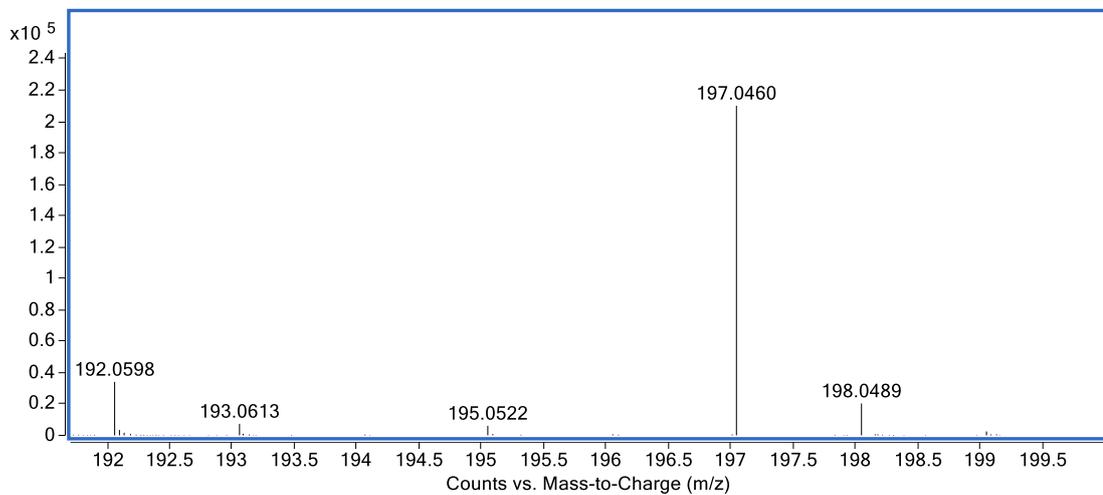
Espectro ESI-MS m/z 126,9047 $[M - H]^-$ obtido de *M. albicans*.Espectro ESI-MS m/z 169,0144 $[M - H]^-$ obtido de *M. albicans*.



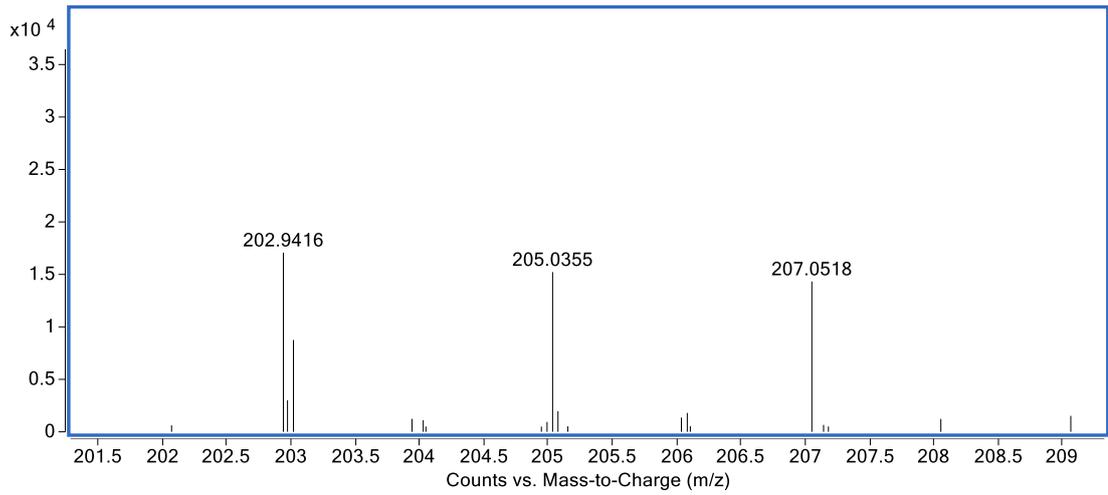
Espectro ESI-MS m/z 173,0459 $[M - H]^-$ obtido de *M. chamissois*.



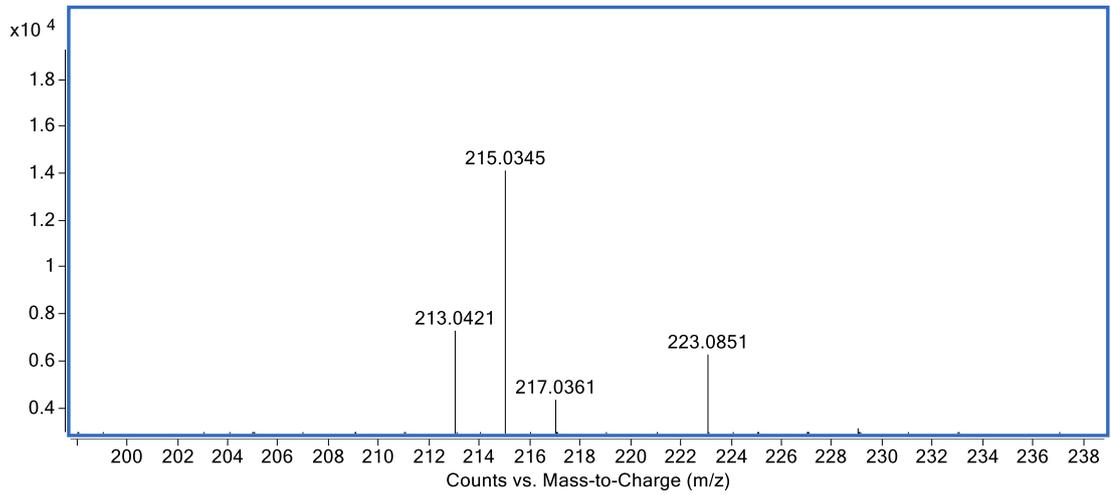
Espectro ESI-MS m/z 191,0567 $[M - H]^-$ obtido de *M. albicans*.



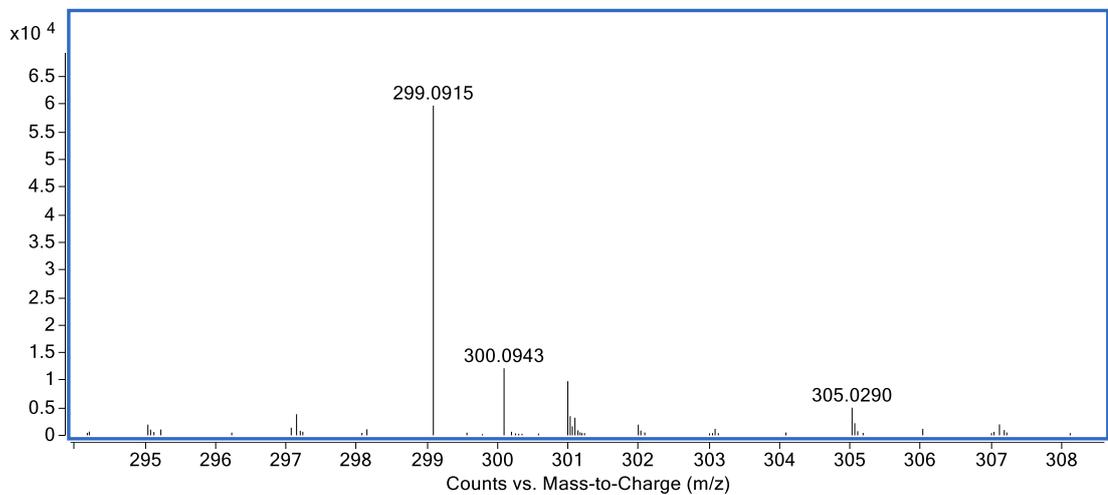
Espectro ESI-MS m/z 197,0460 $[M - H]^-$ obtido de *M. chamissois*.



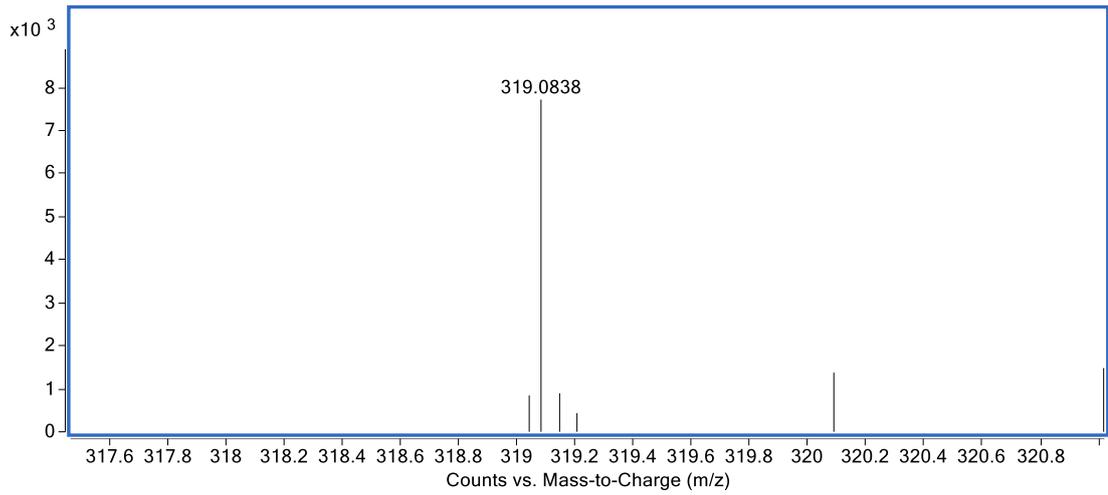
Espectro ESI-MS m/z 205,0355 $[M - H]^-$ obtido de *M. cuspidata*.



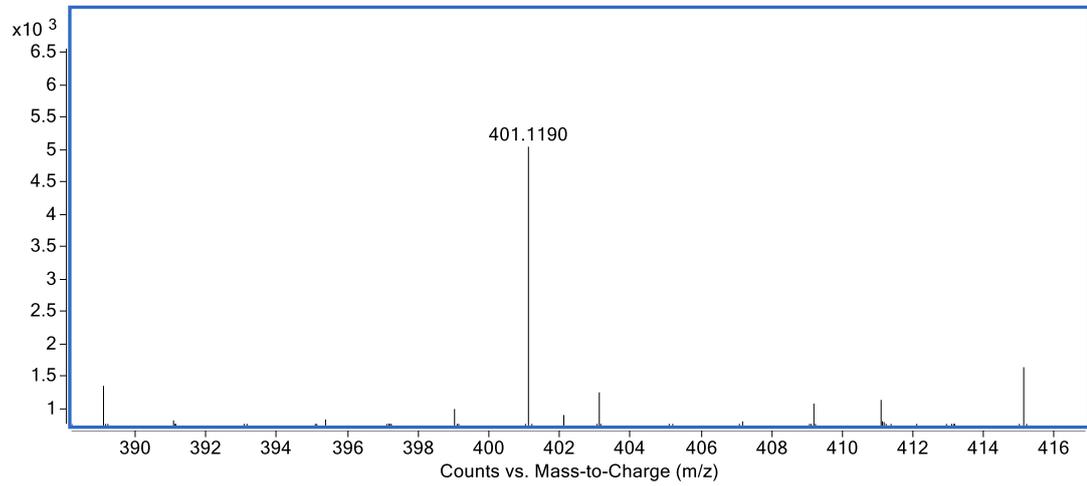
Espectro ESI-MS m/z 215,0345 $[M - H]^-$ obtido de *M. cuspidata*.



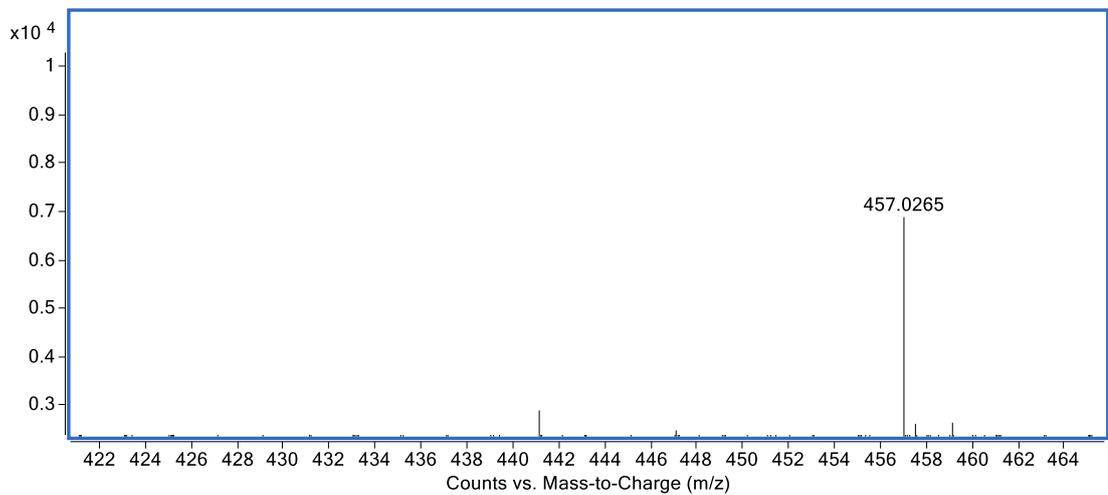
Espectro ESI-MS m/z 299,0915 $[M - H]^-$ obtido de *M. chamissois*.



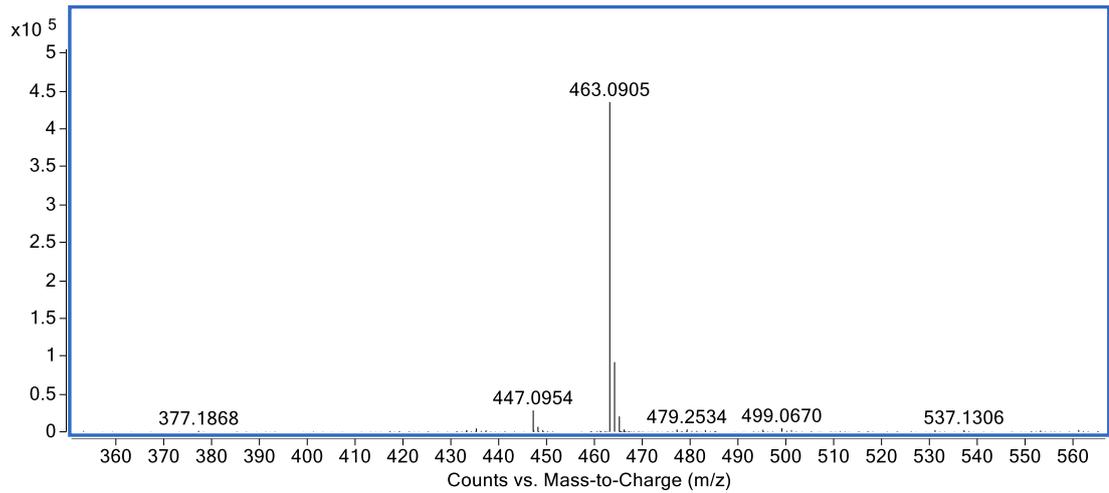
Espectro ESI-MS m/z 319,0838 $[M - H]^-$ obtido de *M. rubiginosa*.



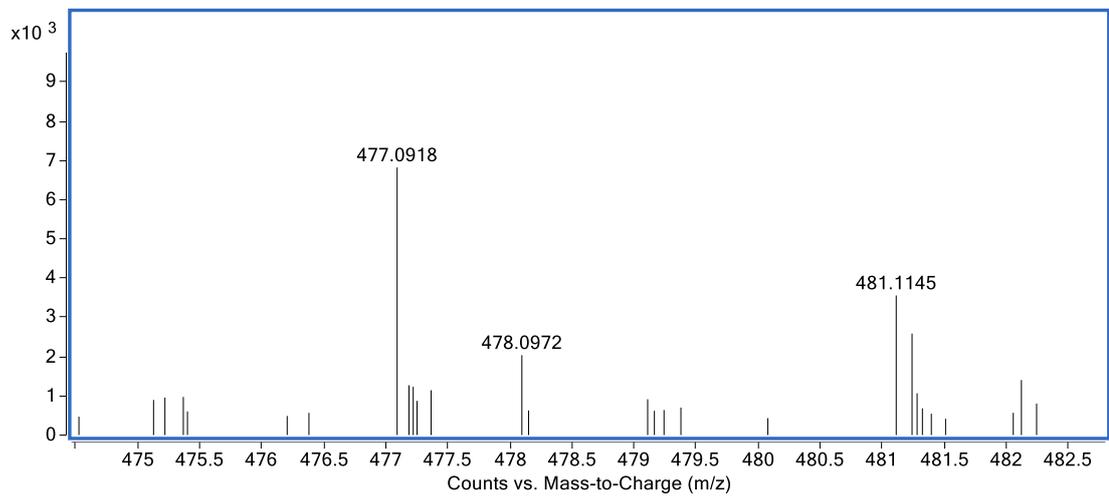
Espectro ESI-MS m/z 401,1190 $[M - H]^-$ obtido de *M. rubiginosa*.



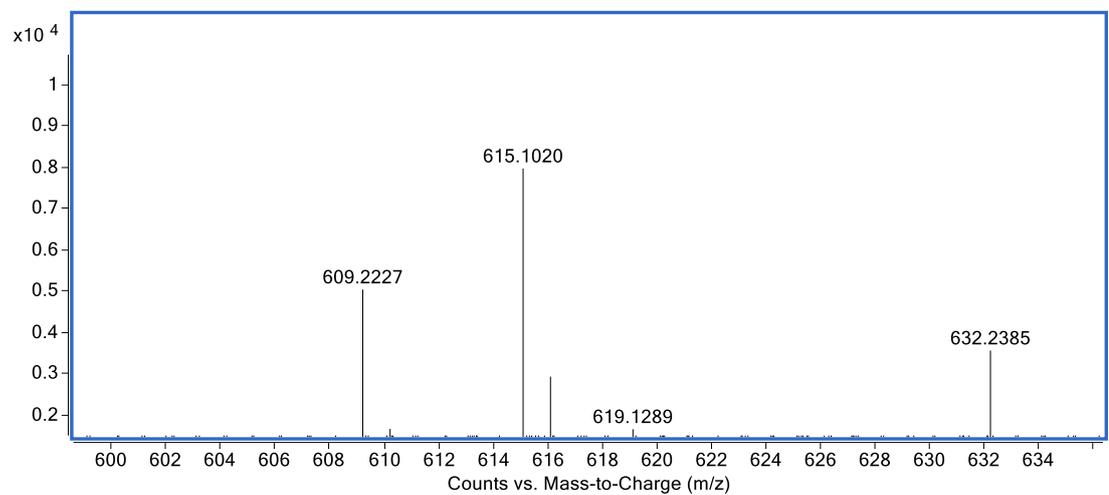
Espectro ESI-MS m/z 457,0265 $[M - H]^-$ obtido de *M. cuspidata*.



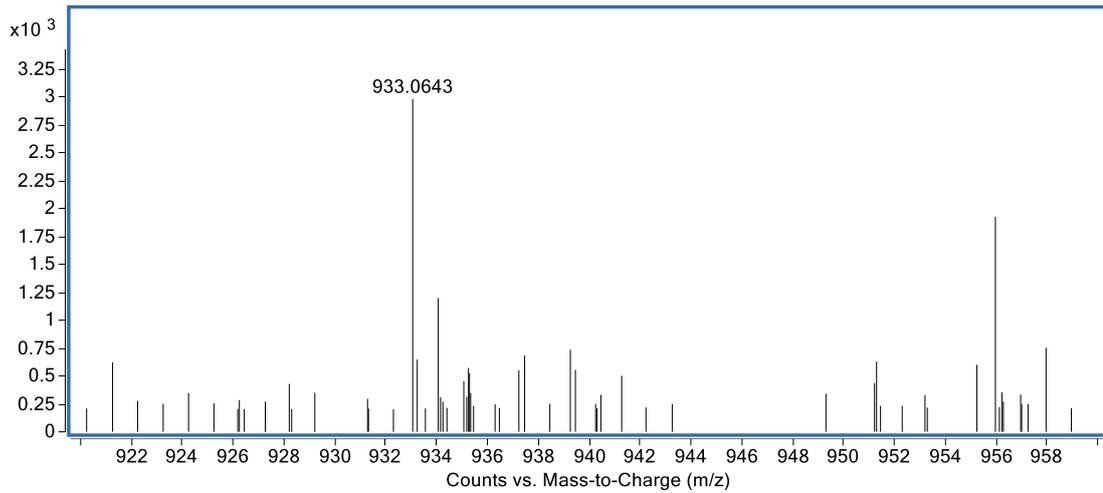
Espectro ESI-MS m/z 463,0905 $[M - H]^-$ obtido de *M. rubiginosa*.



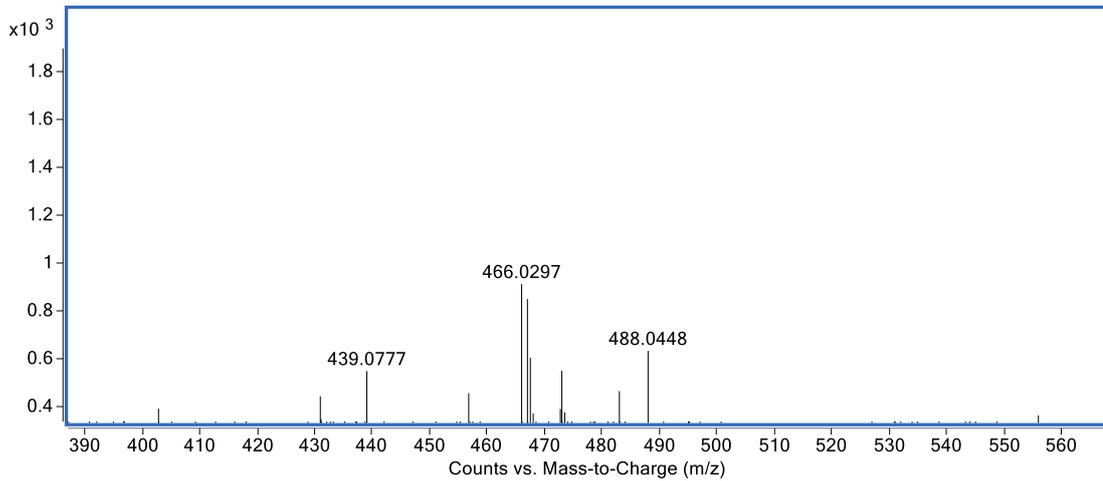
Espectro ESI-MS m/z 477,0918 $[M - H]^-$ obtido de *M. rubiginosa*.



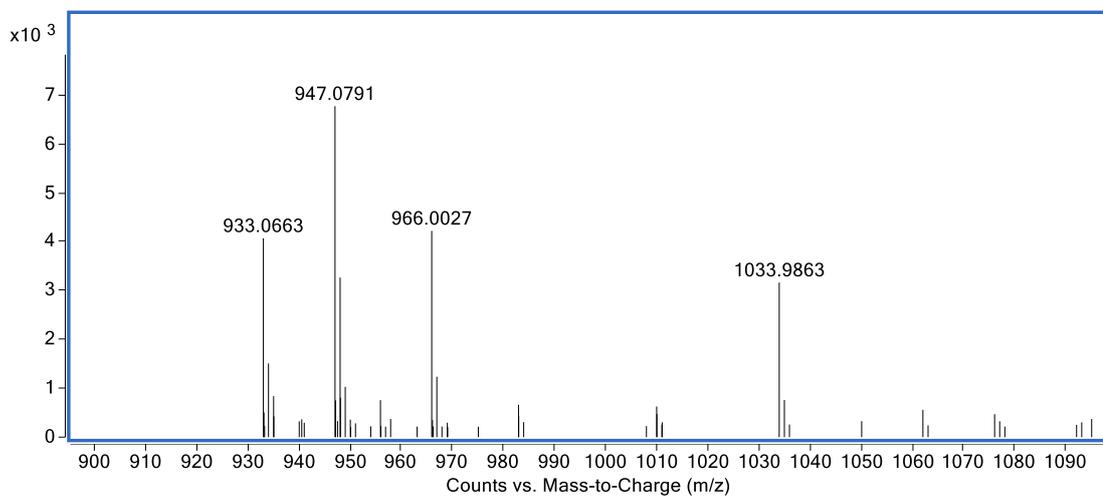
Espectro ESI-MS m/z 615,1020 $[M - H]^-$ obtido de *M. albicans*.



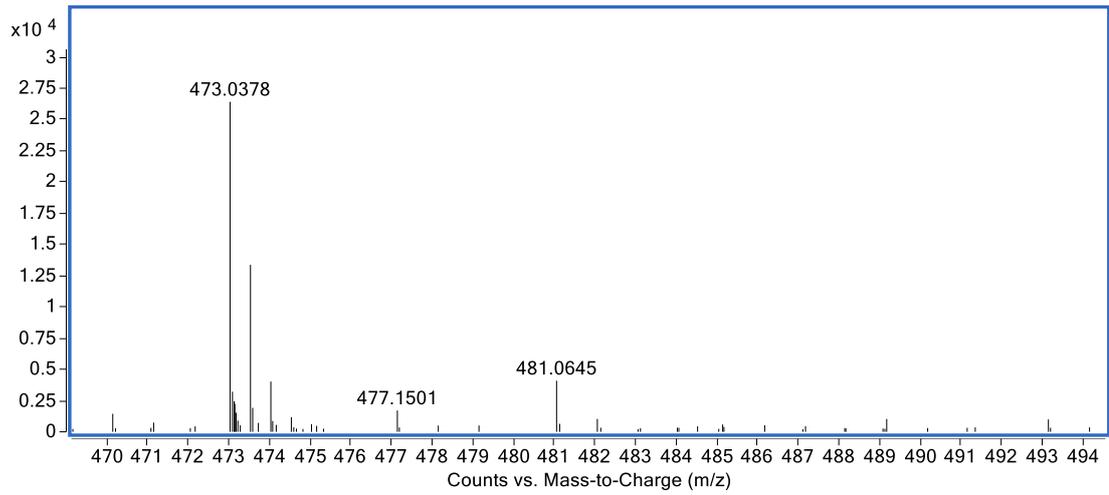
Espectro ESI-MS m/z 933,0643 $[M - H]^-$ obtido de *M. chamissois*.



Espectro ESI-MS m/z 466,0297 $[M - 2H]^{2-}$ proveniente do ion m/z 933,0642 $[M - H]^-$ obtido de *M. chamissois*.



Espectro ESI-MS m/z 947,0791 $[M - H]^-$ obtido de *M. albicans*.



Espectro ESI-MS m/z 473,0378 $[M - 2H]^{2-}$ proveniente do íon m/z 947,0791 $[M - H]^{-}$ obtido de *M. albicans*.