

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO METABOLÔMICO DE ESPÉCIES DE *Picramnia* E
REAValiaÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DO
GÊNERO**

Alicia Ludymilla Cardoso de Souza*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de MESTRA
EM QUÍMICA, área de concentração:
QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

*** bolsista CNPq**

**São Carlos – SP
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Alicia Ludymilla Cardoso de Souza, realizada em 28/04/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (FCFRP/USP)

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

À Deus, pela sua infinita graça e bondade, à
minha família e amigos, pelo carinho, apoio
e grande incentivo.

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que à Ele entreguei minhas preocupações e Ele foi o meu sustento. Não me permitiu tropeçar, nem desanimar e me abençoou com a motivação, a sabedoria e o discernimento, necessários aos meus caminhos.

À minha mãe Selma Maria Moraes Cardoso, por ser meu ponto de apoio, mesmo longe, pelo seu carinho, seu cuidado e por ser meu maior exemplo de fé e perseverança.

Ao meu avô, Sebastião Cardoso e minha avó Maria de Lourdes, pelo imenso zelo, preocupação e torcida.

Ao meu pai, Francisco Juriti, aos meus irmãos, Erik Magnus e Emanuelle Dias, aos tios, tias, primos, primas e demais familiares, pelas palavras de incentivo, as conversas, o acolhimento e os bons momentos juntos, que foram fundamentais depois de tanto tempo longe de casa.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pelo seu apoio contínuo, sua paciência, confiança, motivação e imenso conhecimento, que é fonte de inspiração.

Ao Me. Carlos André Ferreira Moraes, pela amizade, a paciência, o cuidado, a orientação e os ensinamentos, durante todo o trabalho, que contribuíram de forma significativa para minha formação.

À Dra. Danielle Fernandes da Silva, pelos ensaios antimicrobianos, ao Dr. Luciano Silva Pinto, pelas análises LC-MS/MS e ao Dr. Leonardo Maurici Borges, pelos conhecimentos botânicos e coleta do material vegetal.

A todos os integrantes do Laboratório de Produtos Naturais: Gabriel, Karine, Eduarda, Dianne, Vitória, Jesus, Antônio, Yara, Renato, Karen, Felipe, Emerson, Sean, Artur, Karoline, Janaína, Luciano, Danielle e Lucas, pela amizade, por tornarem essa rotina mais leve com momentos de descontração e pelas trocas de

conhecimentos e experiências. Em especial agradeço ao Sean Araújo, Artur Cruz e Karoline Mazuy, pelo auxílio, aprendizados, análises e contribuições significativas em meu trabalho.

A todo o corpo docente e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos (PPGQ-UFSCar), pela oferta do Mestrado Acadêmico e pelos grandes ensinamentos, essenciais para a minha formação.

Aos demais funcionários deste departamento, por todo apoio e por juntos tornarem este lugar um ambiente propício para o meu desenvolvimento profissional. Em especial, à técnica, Dra. Dorai Periotto Zandonai, pela sua amizade, grande auxílio e paciência, pelos aprendizados, as ótimas conversas e a companhia no dia-a-dia do laboratório.

À amiga Lorena Borges, pelo apoio, incentivo, amizade e companhia.

Aos grandes amigos William Fontenele e João Victor Evaristo, pelo apoio incondicional, seja perto ou longe, nos momentos bons e nos mais difíceis, tornando tudo mais leve para seguir. Vocês são muito importantes para mim!

Aos amigos de infância de Parnaíba, por tanto apoio e carinho. Está sendo incrível crescer ao lado de vocês e acompanhar nossos diferentes passos. Torço para que cada um alcance os seus sonhos e os tornem realidade!

Aos professores e professoras da licenciatura no Instituto Federal de Educação (IFPI) - *Campus* Parnaíba, que me deram a formação base necessária para que eu pudesse estar onde estou hoje.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES, FAPESP, em especial ao CNPq, pela concessão da bolsa (130553/2021-2).

E por fim, agradeço a todos aqueles que não mencionei, mas que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento, compartilhando experiências, conhecimentos e rotina em São Carlos, tornando estes dias mais gratificantes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APG	<i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
ACN	Acetonitrila
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FBMN	<i>Feature-Based Molecular Networking</i>
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>
LC-SPE-NMR	<i>Liquid Chromatography - Solid Phase Extraction - Nuclear Magnetic Resonance</i>
MeOH	Metanol
MHz	MegaHertz
MS	Espectrometria de massas
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
PS_F	Extrato etanólico das folhas
PS_H	Extrato hidroalcólico das folhas
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>

SPSC	Herbário da Universidade Federal de São Carlos
UHPLC-QTOF-MS/MS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography - Quadrupole Time of Fly - Tandem Mass Spectrometry</i>
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Classificação taxonômica de <i>P. sellowii</i> Planch.....	6
TABELA 1.2 - Diversidade química de espécies do gênero <i>Picramnia</i>	9
TABELA 1.3 - Estruturas dos metabólitos secundários isolados do gênero <i>Picramnia</i>	12
TABELA 3.4 - Gradiente exploratório utilizado na análise preliminar do perfil químico dos extratos.....	21
TABELA 3.5 - Fases móveis utilizadas no fracionamento do extrato etanólico de <i>P. sellowii</i> (código PS_F).	22
TABELA 3.6 - Fases móveis utilizadas no fracionamento do extrato hidroalcolico de <i>P. sellowii</i> (código PS_H).	23
TABELA 3.7 - Gradiente exploratório utilizado para análise no sistema UHPLC-QTOF-MS/MS	24
TABELA 3.8 - Isolados da bactéria fitopatogênica <i>Xanthomonas citri ssp. citri</i> . ..	27
TABELA 4.9 - Rendimentos do PS_F e PS_H de <i>P. sellowii</i>	30
TABELA 4.10 - Rendimentos das frações do extrato etanólico de <i>P. sellowii</i>	32
TABELA 4.11 - Informações dos extratos de espécies de <i>Picramnia</i> utilizados nas análises.	42
TABELA 4.12 – Resultados obtidos a partir dos ensaios de CIM e CBM.....	65
TABELA 13 - Dados de RMN de H^1 e C^{13} de 1 (D_2O , 400MHz).....	70
TABELA A.13 - Metabólitos identificados usando a ferramenta de rede molecular e espectros MS/MS.	91
TABELA A.15 - Ácidos clorogênicos, ácido 3-O-cafeoilchiquímico, catequinas, flavanona-cromona e flavonois, detectados nas espécies <i>Picramnia</i> , <i>Quassia amara</i> e <i>Trichilia catigua</i> , utilizando dados MS/MS com um modo de ionização negativa e positiva.	129
TABELA A.16 – Antraquinonas glicosídicas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas, diantronas, quassinoides e vitanolídeos detectados nas espécies <i>Picramnia</i> , <i>Quassia amara</i> e <i>Trichilia catigua</i> , usando dados MS/MS com modo de ionização negativo e positivo.	130

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Tradicional Bayesiana representativa com as linhagens dos atuais gêneros descritos na família Picramniaceae.....	3
FIGURA 1.2 – À Esquerda, a chave do clado Rosídeas, táxon superior ao clado que contém a ordem Picramniales, irmão do clado com as ordens [Sapindales (Huerteales (Malvales, Brassicales))]. À direita, a distribuição geográfica dos gêneros <i>Picramnia</i> (verde), <i>Alvaradoa</i> (preto) e <i>Nothotalisia</i> (vermelho).	4
FIGURA 1.3 – A espécie <i>P. sellowii</i> Planch. e sua distribuição geográfica em mapa interativo do SiBBR.....	6
FIGURA 1.4 – Lesões do cancro cítrico em frutos, folhas e galhos, com modo de ação da infecção do fitopatógeno nos tecidos.....	17
FIGURA 3.5 - Localização por satélite do material vegetal coletado no Parque Estadual de Porto Ferreira.	19
FIGURA 3.6 - Representação do processo de coleta, secagem e moagem das folhas de <i>P. sellowii</i>	20
FIGURA 3.7 - Representação do processo de extração das folhas de <i>P. sellowii</i> ...	20
FIGURA 3.8 - Fluxograma exemplificando as etapas de processamento dos dados e visualização da rede molecular.	25
FIGURA 3.9 - Representação do método de CIM em microplaca de 96 orifícios para a bactéria <i>X. citri</i>	28
FIGURA 3.10 - Representação do método de C BM em placas de ágar.	29
FIGURA 4.11 - Perfil cromatográfico obtido de PS_H.....	31
FIGURA 4.12 – Perfil cromatográfico obtido de PS_F.....	31
FIGURA 4.13 - Cromatograma de PS_F e proposta de fracionamento.	32
FIGURA 4.14 - Gráfico comparativo do perfil cromatográfico de PS_F e frações F1 a F4, em gradiente exploratório em λ 254nm, H ₂ O:MeOH - 95:5 a 100%.....	33
FIGURA 4.15 - Dados brutos obtidos após a conversão no msConvert (.mzML)..	35
FIGURA 4.16 - Redução significativa das informações no MS-DIAL após o alinhamento dos dados.	36
FIGURA 4.17 – Informações estruturais, possível fórmula, erro, classe, <i>score</i>	36
FIGURA 4.18 - Comparativo do espectro experimental com <i>in silico</i>	37
FIGURA 4.19 - Rede evidenciando os nodos formados por diferentes íons e o agrupamento por similaridade.....	38
FIGURA 4.20 - Rede molecular gerada após o FBMN, com evidência das classes, usando dados MS/MS com um modo de ionização negativo.	39
FIGURA 4.21 - Rede molecular gerada após o FBMN, com evidência das classes, usando dados MS/MS com um modo de ionização positivo.	40

FIGURA 4.22 - Rede molecular para amostras das espécies <i>Picramnia</i> , <i>Quassia amara</i> e <i>Trichilia catigua</i> , usando dados MS/MS com modo de ionização positivo.	43
FIGURA 4.23 - <i>Cluster</i> dos ácidos clorogênicos e ácido 3-O-cafeoilshiquímico produzidos por amostras das espécies <i>Picramnia</i> , <i>Quassia amara</i> e <i>Trichilia catigua</i> , com modo de ionização negativo. As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda. MS não detecta estereoquímica, exceto em alguns casos particulares.	46
FIGURA 4.24 - <i>Cluster</i> de catequinas e flavanona-cromona produzidas por espécies de <i>Picramnia</i> , e amostras de <i>Trichilia catigua</i> . As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda.	48
FIGURA 4.25 - <i>Cluster</i> de flavonóis produzidos por amostras de espécies de <i>Picramnia</i> . As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda.	50
FIGURA 4.26 - <i>Cluster</i> de antraquinonas glicosiladas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas e diantronas produzidos por amostras de espécies de <i>Picramnia</i> . As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda.	53
FIGURA 4.27 - <i>Cluster</i> de quassinoides produzidos por espécies de <i>Picramnia</i> e amostras de <i>Quassia amara</i> , com um modo de ionização negativo A e modo de ionização positivo B. As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda.....	57
FIGURA 4.28 - <i>Cluster</i> de vitanolídeos produzidos por amostras de espécies de <i>Picramnia</i> , com um modo de ionização negativo. As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda.....	61
FIGURA 4.29 - Cromatograma da fração PsF1, no modo isocrático de eluição, com destaque da substância 1 coletada.	66
FIGURA 4.30 - Estrutura do ácido 5-O-cafeoilquínico.....	67
FIGURA 4.31 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC (→) e COSY (↔) da substância 1	68
FIGURA 4.32 - Proposta de fragmentação da substância 1	69
FIGURA 33 - Espectro de RMN de ¹ H (D ₂ O, 400MHz) da substância 1 , com ampliação da região dos sinais de δ 8,00 a 6,00.	71
FIGURA 34 - Mapa de contorno HMBC (D ₂ O, 400MHz) da substância 1	71
FIGURA 35 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC (D ₂ O, 400MHz) da substância 1	72
FIGURA 36 - Espectro de RMN de ¹³ C, DEPT-135 (D ₂ O, 100MHz) da substância 1 , com ampliação dos sinais da região de δ 41,20 a 37,50.	72
FIGURA 37 - Mapa de contorno de COSY (D ₂ O, 400MHz) da substância 1	73
FIGURA 38 - Mapa de contorno de HSQC (D ₂ O, 400MHz) da substância 1	73

FIGURA 39 - Espectro de RMN de ¹³ C (D ₂ O, 100MHz) da substância 1 , com ampliação dos sinais da região de δ 41,5 a 37,9.	74
FIGURA 40 - Mapa de contorno HMBC (D ₂ O, 600MHz) da substância 1	74
FIGURA A.33 - Cromatograma da fração H1.	88
FIGURA A.34 - Cromatograma da fração H2.	88
FIGURA A.35 - Cromatograma da fração H3.	89
FIGURA A.36 - Cromatograma da fração H4.	89
FIGURA A.37 - Cromatograma da fração F1.	89
FIGURA A.38 - Cromatograma da fração F2.	90
FIGURA A.39 - Cromatograma da fração F3.	90
FIGURA A.40 - Cromatograma da fração F4.	90
FIGURA A.41 - Rede molecular para amostras das espécies <i>Picramnia</i> , <i>Quassia amara</i> e <i>Trichilia catigua</i> , usando dados MS/MS com modo de ionização negativo.	95
FIGURA A.49 - Espectros de MS e MS/MS dos ácidos clorogênicos e seus derivados, substâncias 1 e 2	96
FIGURA A.50 - Espectros de MS e MS/MS dos ácidos clorogênicos e seus derivados, substâncias 3 e 4	97
FIGURA A.51 - Espectros de MS e MS/MS dos ácidos clorogênicos e seus derivados, substâncias 5 e 6	98
FIGURA A.52 - Espectros de MS e MS/MS dos ácidos clorogênicos e seus derivados, substâncias 7 e 8	99
FIGURA A.53 - Espectros de MS e MS/MS de catequinas e flavanonas-cromonas, substâncias 9 e 10	100
FIGURA A.54 - Espectros de MS e MS/MS de catequinas e flavanonas-cromonas, substâncias 11 e 12	101
FIGURA A.55 - Espectros de MS e MS/MS de catequinas e flavanonas-cromonas, substâncias 13 e 14	102
FIGURA A.56 - Espectros de MS e MS/MS de catequinas e flavanonas-cromonas, substâncias 15 e 16	103
FIGURA A.57 - Espectros de MS e MS/MS de flavonóis, substâncias 17a , 17b , 18a , e 18b	104
FIGURA A.58 - Espectros de MS e MS/MS de flavonóis, substâncias 19 e 20	105
FIGURA A.59 - Espectros de MS e MS/MS de flavonóis, substâncias 21 e 22	106
FIGURA A.60 - Espectros de MS e MS/MS de antraquinonas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas e diantronas, substâncias 23 e 24	107
FIGURA A.61 - Espectros de MS e MS/MS de antraquinonas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas e diantronas, substâncias 25 e 26	108
FIGURA A.62 - Espectros de MS e MS/MS de antraquinonas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas e diantronas, substâncias 27 e 29	109

FIGURA A.63 - Espectros de MS e MS/MS de antraquinonas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas e diantronas, substâncias 30 e 31	110
FIGURA A.64 - Espectros de MS e MS/MS de antraquinonas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas e diantronas, substâncias 32 e 33	111
FIGURA A.65 - Espectros de MS e MS/MS de quassinoides, substâncias 34 e 35	112
FIGURA A.66 - Espectros de MS e MS/MS de quassinoides, substância 38	113
FIGURA A.67 - Espectros de quassinoides detectados mas não incluídos nos agrupamentos desta classe metabólica.	114
FIGURA A.68 - Espectros de MS e MS/MS de vitanolídeos, substâncias 39a e 39	115
FIGURA A.69 - Espectros de MS e MS/MS de vitanolídeos, substâncias 40a e 41	116
Figura A.70 - Espectros de MS e MS/MS de vitanolídeos, substâncias 42 e 43 ...	117
FIGURA A.71 - Esquema proposto de fragmentação para as antronas C-glicosídicas: picramniosídeo D (24) e debenzoil-picramniosídeo D (25).	118
FIGURA A.72 - Esquema proposto de fragmentação para a oxantronas C-glicosídicas: debenzoil-maiosídeo D (31).	119
FIGURA A.73 - Esquema proposto de fragmentação para os quassinoides: nigaquilactona K (35) e 11-oxonigaquilactona K (36).	120
FIGURA A.74 - Esquema proposto de fragmentação para os quassinoides: quassin.	121
FIGURA A.75 - Esquema proposto de fragmentação para o quassinóide: bruceina M.	122
Figura A.76 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: A , formação de aduto com ácido fórmico (39a).	123
Figura A.77 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: B , 4 β ,27-dihydroxy-1-oxo-7-methoxywitha-2,5,24-trienolide (39).	124
Figura A.78 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: formação de aduto com ácido fórmico (40a) e 27-glucosyl-4 β -hydroxy-1-oxo-7-methoxywitha-2,5,24-trienolide (40).	125
FIGURA A.79 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: 27-deglucosyl-27-hydroxy-7-dehydroxy-7-methoxy-daturametelin I (41).	126
FIGURA A.80 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: 2,3-dihydro-3-methoxywithaferin A (42).	127
FIGURA A.81 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: 27-dehydroxi-2,3-dihydro-3-methoxywithaferin A (43).	128

RESUMO

ESTUDO METABOLÔMICO DE ESPÉCIES DE *Picramnia* E REAValiaÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DO GÊNERO. A espécie *Picramnia sellowii* Planch. é uma espécie da ordem Picramniales, da família Picramniaceae, tendo como nome vernacular Gogóia. Em revisões sobre o gênero *Picramnia* e de acordo com a reclassificação na APG IV, o marcador quimiotaxonômico dessa família são as antraquinonas. Devido à complexidade desses metabólitos, a metabolômica é a técnica que investiga e auxilia na identificação ou quantificação de forma a contribuir não apenas para a taxonomia, mas para avanços na indústria farmacêutica a partir da busca de compostos ativos nas plantas. Por meio da espectrometria de massas em tandem, é possível acelerar a desreplicação de moléculas usando redes moleculares, antes do posterior isolamento dos compostos e, a seguir, identificar as moléculas potencialmente bioativas. Ainda, o cancro cítrico é uma doença importante para a citricultura em diversos países, como Brasil e Estados Unidos, os dois maiores produtores de laranja do mundo. Causado pela bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri*, a doença afeta todas as variedades e espécies cítricas comercialmente importantes. O controle químico do cancro cítrico em áreas endêmicas é baseado exclusivamente em bactericidas cúpricos. Os bactericidas cúpricos não possuem atividade curativa ou sistêmica e, portanto, são aplicados no manejo preventivo do cancro cítrico. Desta forma, utilizou-se metabolômica baseada em UHPLC-QTOF-MS/MS não direcionada, juntamente com redes moleculares, para identificar as classes de metabólitos secundários presentes em *P. sellowii*. A rede molecular obtida a partir das análises permitiu a visualização de flavonóides glicosilados, catequinas, ácidos clorogênicos, vitanolídeos, antronas diméricas e quassinóides em espécies de *Picramnia*. Assim, a fim de buscar novos bactericidas com baixa toxicidade ambiental, primeiro realizamos testes microbiológicos nos extratos e frações de *P. sellowii*, avaliando sua concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). As cepas de *Xanthomonas* usadas ao longo deste estudo eram resistentes, tolerantes e suscetíveis ao cobre. Os resultados foram promissores com as frações F3 e F2, a primeira na concentração de 125 µg mL⁻¹ (CIM e CBM) contra as cepas resistentes, tolerantes e suscetíveis, a última na concentração de 250 µg mL⁻¹ (CIM e CBM), 125 µg mL⁻¹ e 250 µg mL⁻¹ contra cepas resistentes, tolerantes e suscetíveis, respectivamente. Ainda, esse foi o primeiro relato da presença, isolamento e identificação estrutural do ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) no gênero *Picramnia* e primeiro perfil químico realizado por LC-MS/MS do extrato etanólico das folhas de *P. sellowii*, levando à anotação de quassinóides, contribuindo assim para o conhecimento quimiotaxonômico da espécie.

ABSTRACT

METABOLOMIC STUDY OF SPECIES OF *Picramnia* AND REVALUATION OF THE MORPHOLOGICAL CLASSIFICATION OF THE GENUS. The species *Picramnia sellowii* Planch. is a species of the order Picramniales, in the family Picramniaceae, with the vernacular name “Gogoia”. In reviews of the genus *Picramnia* and according to the APG IV reclassification, the chemotaxonomic marker of this family are the anthraquinones. Due to the complexity of these metabolites, metabolomics is the technique that investigates and assists in the identification or quantification in order to contribute not only to taxonomy, but to advances in the pharmaceutical industry from the search for active compounds in plants. Through tandem mass spectrometry, it is possible to accelerate the dereplication of molecules using molecular networks, before the subsequent isolation of compounds and then identify the potentially bioactive molecules. By means of tandem mass spectrometry, it is possible to accelerate the dereplication of molecules using molecular networks, before the subsequent isolation of the compounds and, subsequently, to identify potentially bioactive molecules. Still, citrus canker is an important disease for citrus cultivation in several countries, such as Brazil and the United States, the two largest orange producers in the world. Caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, the disease affects all commercially important citrus varieties and species. Chemical control of citrus canker in endemic areas is based exclusively on cupric bactericides. Cupric bactericides have no curative or systemic activity and are therefore applied in preventive management of citrus canker. Thus, metabolomics based on untargeted UHPLC-QTOF-MS/MS along with molecular networks was used to identify the classes of secondary metabolites present in *P. sellowii*. The library obtained from the analyses allowed the visualization of glycosylated flavonoids, catechins, chlorogenic acids, vitanolídeos, dimeric anthrones and quassinoids in *Picramnia* species. Thus, in order to search for new bactericides with low environmental toxicity, we first performed microbiological tests on *P. sellowii* extracts and fractions, evaluating their minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The *Xanthomonas* strains used throughout this study were resistant, tolerant and susceptible to copper. The results were promising with the fractions F3 and F2, the former at concentration of 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC and MBC) against resistant, tolerant and susceptible strains, the latter at concentration of 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC and MBC), 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against resistant, tolerant and susceptible strains, respectively. Furthermore, this was the first report of the presence, isolation and structural identification of 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA) in the genus *Picramnia* and first profile performed by LC-MS/MS of the ethanolic extract of *P. sellowii* leaves, thus contributing to the chemotaxonomic knowledge of the species.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - A QUÍMICA NA CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	1
1.2 - POSICIONAMENTOS TAXONÔMICOS	3
1.2.1 - Família Picramniaceae	3
1.2.2 - Gênero <i>Picramnia</i>	5
1.2.3 - Espécie <i>Picramnia sellowii</i> Planch.	5
1.2.4 - Marcadores quimiotaxonômicos	7
1.3 - QUIMIODIVERSIDADE DO GÊNERO <i>Picramnia</i>	8
1.4 - CANCRO CÍTRICO (<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .).....	16
2 - OBJETIVOS	18
2.1 - OBJETIVO GERAL	18
2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 - MATERIAL BOTÂNICO	19
3.2 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	19
3.2.1 - Análise do perfil químico de <i>P. sellowii</i> por HPLC-PDA	21
3.3 - FRACIONAMENTO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)	22
3.4 - ANÁLISE POR UHPLC-QTOF-MS/MS	23
3.4.1 - Processamento dos dados obtidos por UHPLC-QTOF-MS/MS	25
3.5 - ENSAIO BIOLÓGICO COM <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	27
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS	30
4.1.1 - Perfil químico obtido de <i>P. sellowii</i> por HPLC-DAD	30
4.1.2 - Perfil das frações de <i>P. sellowii</i> por HPLC-DAD	32
4.2 - DADOS OBTIDOS POR UHPLC-QTOF-MS/MS.....	34
4.2.1 - Processamento dos dados	34
4.2.2 - Dados obtidos com base nas redes moleculares	40
4.2.3 - As classes de metabólitos secundários observadas em espécies de <i>Picramnia</i>	44
4.3 - EVIDÊNCIAS QUÍMICAS E CLASSIFICAÇÃO DE <i>Picramnia</i>	61
4.4 - ENSAIO BIOLÓGICO	64
4.5 - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	66
4.5.1 - Ácido 5-<i>O</i>-cafeoilquínico (1)	67
5 - CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICE	88

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A QUÍMICA NA CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Desde o passado, o crescente interesse na busca de compostos químicos provenientes de plantas se deve à importante utilidade desses produtos naturais como recursos terapêuticos para a humanidade (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006). Aliado a isso, constantes estudos relacionados à diversidade do reino vegetal e às relações evolutivas entre as plantas eram desenvolvidos com o objetivo de uma classificação natural (NYFFELER, 2003; HEMSLEY e POOLE, 2004).

A botânica sistemática, como parte essencial a taxonomia, é quem organiza todo o reino vegetal se dedicando ao estudo da classificação, identificação, diversidade, distribuição, nomenclatura e evolução das plantas. Dessa forma, a taxonomia está inserida como o ramo que se dedica a delimitar, descrever e denominar um grupo específico de plantas, os quais são chamados de *táxons*. A taxonomia engloba ainda o estudo das diferentes unidades taxonômicas e a sua dinâmica de evolução, e é justamente a descrição da história evolutiva das espécies que é chamada de filogenia, organizada nas conhecidas árvores filogenéticas (JUDD, 2009).

A filogenia dos *táxons* é construída a partir de características morfológicas que são decorrentes de diversos processos evolutivos, bem como a partir de características fisiológicas e de distribuição geográfica, os quais são considerados métodos botânicos clássicos (WALTERS, 1963). Dessa forma, se torna evidente que ter conhecimento da constituição química é essencial, uma vez que a produção de metabólitos secundários pode indicar que determinadas espécies possuem rotas biossintéticas em comum, associadas a genes ou um conjunto deles, sendo assim restritos a um determinado grupo de plantas. Essa observação abriu um

amplo campo de estudos chamado de quimiotaxonomia (GOTTLIEB, 1982; HEGNAUER, 1986).

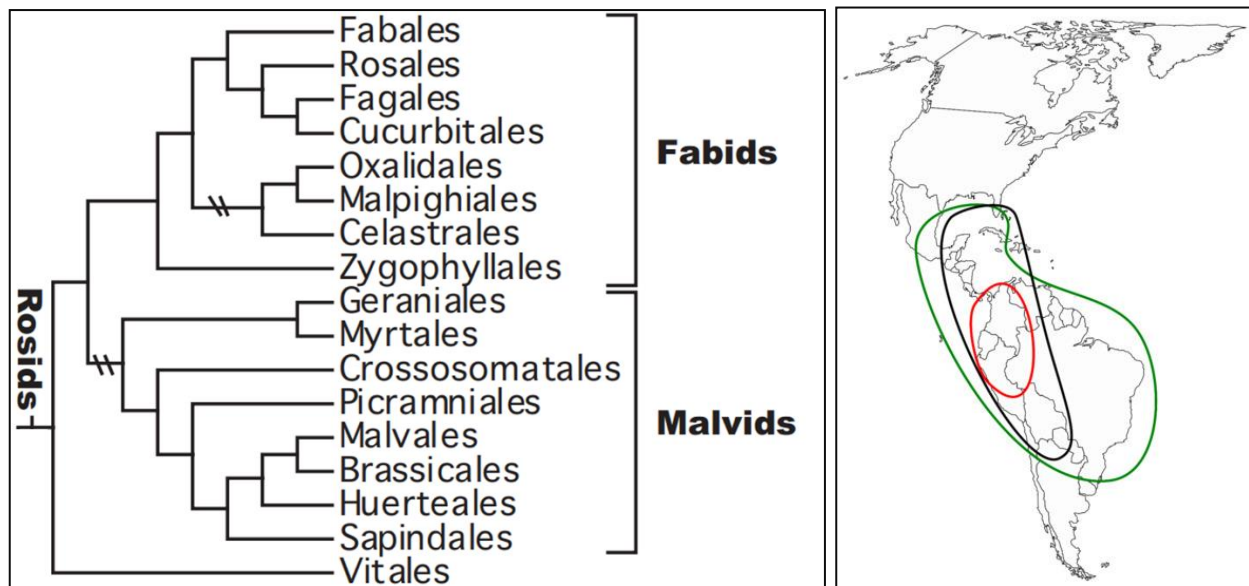
Para a quimiotaxonomia, a existência de um padrão comum no metabolismo secundário pode vir a prover evidências que sejam mais precisas do que por apenas similaridades morfológicas (REYNOLDS, 2007). De modo mais amplo, assim como a botânica sistemática, podemos chamar de quimiossistemática a aplicação desses dados químicos para o estudo das relações e avanços evolutivos, na qual também era chamada por GOTTLIEB (1982) como quimiossistemática micromolecular.

De modo geral, a química de produtos naturais ajudaria na obtenção mais racional de novas moléculas ativas a partir do estudo fitoquímico comparado associado com a correta classificação botânica dos *táxons*, bem como auxiliando no conhecimento da distribuição de compostos que são exclusivos de algumas famílias. No entanto, apenas uma pequena proporção das plantas foi estudada quanto aos seus constituintes, evidenciando a importância da continuidade dos estudos quimiossistemáticos (WINK, 2003).

Mais recentemente foi adotado um novo termo chamado de quimiofenética das plantas, que são estudos que vão além das informações micro e macromoleculares. Nele, é envolvido a combinação de todos os dados fitoquímicos e até mesmo de produtos raros obtidos, formando assim uma matriz de metabólitos secundários, de modo a auxiliar a caracterização de clados que até então eram apoiados apenas por informações de sequências de DNA (ZIDORN, 2019).

Atualmente na APG-IV, Picramniaceae é o único membro da ordem Picramniales no clado Rosídeas (FIGURA 1.2), sendo um táxon superior irmão do clado [Sapindales (Huerteales (Malvales, Brassicales))] (SHIPUNOV et al., 2020). Com distribuição neotropical e possuindo cerca de 50 espécies, contém geralmente arbustos dioicos (nomenclatura botânica que descreve plantas arbóreas que apresentam indivíduos masculinos e femininos separados) com folhas alternas do tipo espiraladas, inflorescências longas e flores geralmente pequenas, que são mais presentes em indivíduos masculinos. O fruto pode ser em formato samaroide, contendo uma ou duas sementes (KUBITZKI, 2007). No Brasil, essa família pode ser encontrada em florestas em diferentes regiões biogeográficas, exceto os Pampas (PIRANI e DEVECCHI, 2016).

FIGURA 1.2 – À Esquerda, a chave do clado Rosídeas, táxon superior ao clado que contém a ordem Picramniales, irmão do clado com as ordens [Sapindales (Huerteales (Malvales, Brassicales))]. À direita, a distribuição geográfica dos gêneros *Picramnia* (verde), *Alvaradoa* (preto) e *Nothotalisia* (vermelho).



Fonte: Adaptado de Angiosperm Phylogeny Group (2016) e Shipunov (2020).

1.2.2 - Gênero *Picramnia*

O gênero *Picramnia* compreende aproximadamente 40 espécies, que estão distribuídas entre o México, a Flórida (EUA), a América Central e América do Sul, compreendendo a região das Antilhas até o sul do Paraguai, o sul do Brasil e o norte da Argentina (PIRANI e DEVECCHI, 2016; PIRANI, 2002). Segundo Pirani (1990a), dessas espécies, 19 podem ser encontradas no Brasil, das quais 12 são exclusivas do país, onde *P. sellowii* Planch., *P. latifolia* Tul. e *P. ramiflora* Planch. são as espécies mais distribuídas por todo território brasileiro, comparadas às outras do gênero que possuem distribuição mais restrita a algumas regiões.

Morfologicamente, algumas características presentes na família permanecem nas espécies desse gênero, alterando alguns aspectos como o tamanho das árvores, que são porte pequeno ou arbustos, inflorescência racemosa, flores unissexuadas em plantas dióicas, com frutos baga de cor viva com uma semente (PIRANI, 1990b; PIRANI, 2002; KUBITZKI, 2007).

1.2.3 - Espécie *Picramnia sellowii* Planch.

O nome *Picramnia sellowii* Planch. foi descrito e aceito em 1846, por Hooker no *London Journal of Botany* (IPNI, 2023), possuindo atualmente uma precisa caracterização taxonômica (TABELA 1.1) e geográfica (FIGURA 1.3). A espécie está amplamente distribuída em toda América do Sul, compreendendo o Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai. Pode ser encontrada em florestas estacionais semidecíduais e matas ciliares, sendo mais expressivo o aparecimento de flores e frutos nos meses de outubro a maio (PIRANI, 2002).

São geralmente arbustos com folhas compostas, pecioladas e alternas. Apresenta casca do caule com coloração cinza acastanhada, madeira amarelo-

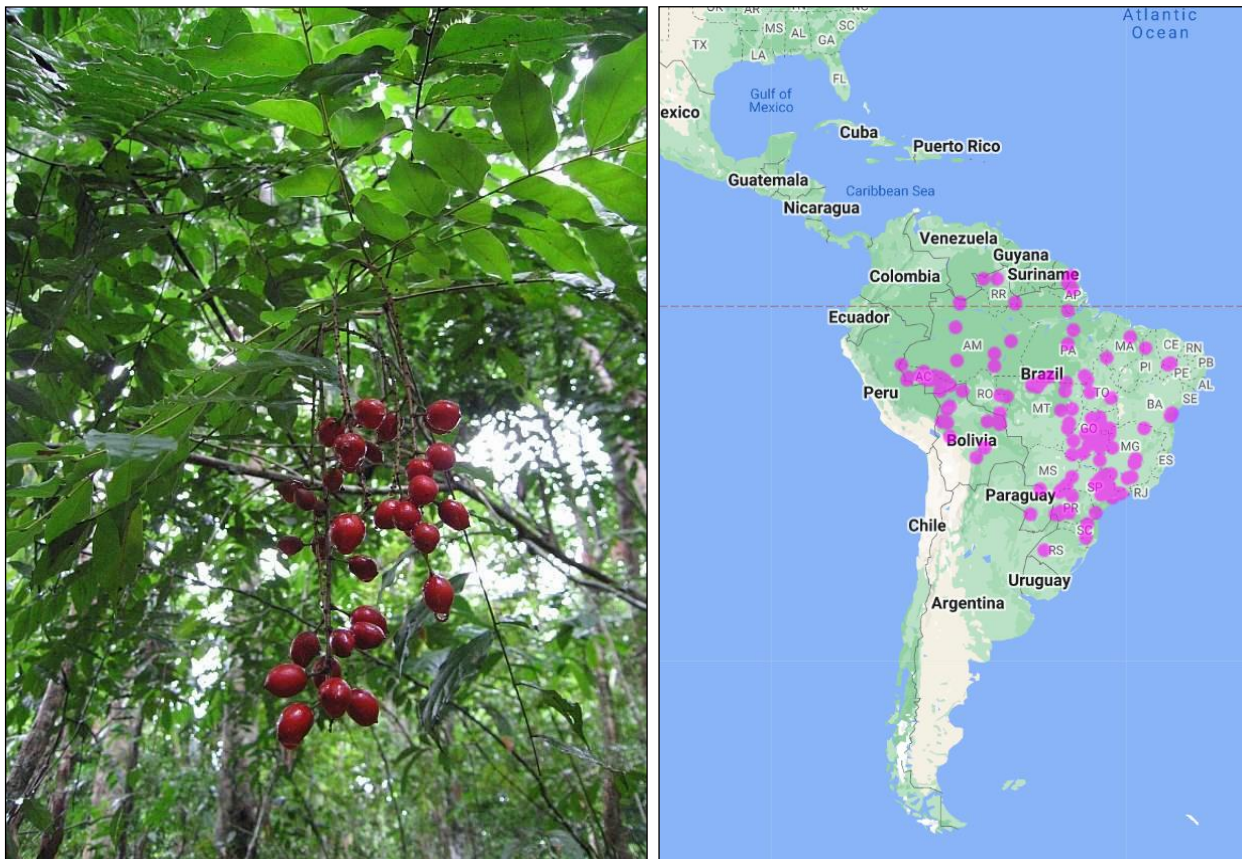
acastanhada, flores creme-esverdeadas e fruto baga simples com tons que variam do avermelhado ao vinho, com poucas sementes (PIRANI, 2002; CORTADI, 2010).

TABELA 1.1 - Classificação taxonômica de *P. sellowii* Planch.

<i>Picramnia sellowii</i> Planch.	
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Picramniales
Família	Picramniaceae
Gênero	<i>Picramnia</i>
Nome comum	Gogóia

Fonte: Adaptado de SiBBr (2023).

FIGURA 1.3 – A espécie *P. sellowii* Planch. e sua distribuição geográfica em mapa interativo do SiBBr.



Fonte: Adaptado de POWO (2023) e SiBBr (2023), Leaflet | Map data ©OpenStreetMap.

1.2.4 - Marcadores quimiotaxonômicos

Para a sobrevivência, crescimento e reprodução, todos os organismos necessitam da atividade metabólica de diferentes compostos orgânicos. Dessa forma, o metabolismo será o conjunto de todas as reações que ocorreram no interior das células desse organismo. Esses processos reacionais levam à obtenção de uma diversidade de produtos, ou compostos químicos, chamados de metabólitos. Estes são originados a partir de duas vias do metabolismo vegetal: o metabolismo primário e o secundário (DEWICK, 2009).

Nas plantas, os metabólitos primários são originados a partir dos processos fotossintéticos e são distribuídos universalmente nas diferentes espécies. Como exemplo tem-se os aminoácidos, carboidratos, lipídeos e a clorofila. Já os metabólitos secundários são originados a partir de um metabolismo especializado que as diferentes plantas utilizam para sua sobrevivência, adaptação e defesa. Como exemplo tem-se os alcaloides, terpenos e compostos fenólicos (DEWICK, 2009).

Como consequência de sua especialidade, os metabólitos secundários possuem uma distribuição mais limitada, visto que são uma expressão individual das espécies. Dessa forma, colaboram para os estudos taxonômicos, na quimiosistemática, devido seu padrão de ocorrência em algumas linhagens vegetais. Por sua utilização como marcadores químicos facilitando a identificação, classificação e consolidação de filogenias, passaram posteriormente a serem chamados de marcadores quimiotaxonômicos (YANG, 2021).

Podem ser citadas as famílias Simaroubaceae, Rutaceae e Meliaceae que apresentam limonoides e quassinoides como marcadores sistemáticos, enquanto que as antraquinonas aparecem muito expressivas nos gêneros *Picramnia* e *Alvaradoa* (LOGACHEVA e SHIPUNOV, 2017; SILVA et al., 2022). O que se pode evidenciar é que existem diferenças muito consistentes entre os limonoides encontrados em

Rutaceae daqueles presentes em Meliaceae, enquanto os quassinoides estão restritos a Simaroubaceae. Justamente devido ao uso dos quassinoides neste contexto, como marcadores com grande diversidade estrutural, isto implica a exclusão de *Picramnia* de Simaroubaceae. As espécies deste gênero acumulam antraquinonas, que até o momento não foram encontradas em nenhum outro grupo de Simaroubaceae (SILVA et al., 2022).

Atualmente, já existem estudos de vias metabólicas e acompanhamento de parâmetros químicos relacionados a afinidade em diferentes grupos, bem como trabalhos de isolamento de marcadores quimiossistemáticos são realizados utilizando equipamentos e técnicas computacionais mais modernas e sensíveis que podem levar a uma detecção precisa destes marcadores em quantidades traço (ZHOU et al., 2014; GIMENES et al., 2020; SILVA et al., 2022). Dessa forma, a realização de um estudo utilizando um método analítico moderno que combine espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) e redes moleculares, pode representar o início da aplicação da análise metabolômica baseada em LC-MS à quimiossistemática do gênero *Picramnia*. Essa aplicação permitirá a identificação de potenciais marcadores sistemáticos, e a este respeito pode gerar a confirmação da presença ou prova definitiva da ausência de quassinoides neste gênero. Isso deve ser considerado crucial para manter um status separado para o gênero *Picramnia* na família Picramniaceae, como já mostrado anteriormente.

1.3 - QUIMIODIVERSIDADE DO GÊNERO *Picramnia*

Em um levantamento bibliográfico realizado dos metabólitos secundários já encontrados nas espécies do gênero *Picramnia*, podem ser citados uma diversidade de antraquinonas, antronas e oxantonas e alguns derivados simples de fenilpropanoides, cumarinas, triterpenos e esteroides, das 10 espécies estudadas:

P. sellowii, *P. parvifolia*, *P. antidesma*, *P. hirsuta*, *P. teapensis*, *P. latifolia*, *P. polyantha*, *P. pentandra*, *P. glazioviana*, *P. macrostachys*.

Dentre os trabalhos já publicados com a espécie *P. sellowii*, Balderrama et al., (2001) e Leon e Juan (1975) citam o isolamento, de triterpenoides, antraquinonas, antronas, antronas glicosiladas e esteróis. Em ensaio de citotoxicidade bioguiado utilizando *P. sellowii*, Aponte et al. (2008) cita o uso da espécie na medicina tradicional, por tribos indígenas, para doenças de pele e relata o isolamento e identificação de dois constituintes químicos, a natalo-emodina e o crisofanol, descrevendo a ação citotóxica da natalo-emodina contra uma linhagem celular de câncer de pulmão humano. Apenas um trabalho (CAM, 1973) com *P. sellowii* relata seu perfil químico. O que deixa evidente a necessidade de mais estudos sobre a constituição química desta espécie e seu potencial. Na TABELA 1.2 encontram-se sumarizados os constituintes químicos já identificados ou isolados nas espécies estudadas do gênero *Picramnia*. Na TABELA 1.3 encontram-se as estruturas citadas.

TABELA 1.2 - Diversidade química de espécies do gênero *Picramnia*.

Espécie	Ocorrência	Substância	[Ref.]
<i>Picramnia sellowii</i>	casca	betulinic acid	Cam, 1975.
		epibetulinic acid	
	partes aéreas	Physcion	Leon and Juan, 1975.
		Emodin	
		Chrysophanol	
folhas	picramnioside A	Balderrama et al., 2001.	
	picramnioside C		
<i>Picramnia parvifolia</i>	casca, galhos, e folhas	nataloe-emodin	Aponte et al., 2008.
		Chrysophanol	
		Physcion	
		Emodin	
		Chrysophanol	
<i>Picramnia antidesma</i>	folhas	Aloe emodin	Solis et al., 1995.
		Rhein	
		aloe-emodin	
		aloe-emodin anthrone	
		picramnioside A	

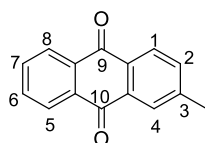
TABELA 1.2 - Diversidade química de espécies do gênero *Picramnia* (continuação).

Espécie	Ocorrência	Substância	[Ref.]
<i>Picramnia antidesma</i>	folhas	picramnioside B picramnioside C	Solis et al., 1995.
<i>Picramnia antidesma</i>	raízes	Uveoside anthrone β -sitosterol Emodin 7-hydroxycoumarin	Hernandez-Medel, <i>et.al.</i> , 1998.
	galhos	mayoside Saroside	Hernandez-Medel, <i>et.al.</i> , 1999.
	casca da raiz	10-epi-uveoside	Hernández-Medel and Pereda-Miranda, 2002.
<i>Picramnia hirsuta</i>	raízes	Mayoside	Hernandez-Medel, <i>et.al.</i> , 1996.
	raízes	Emodin Chrysophanol Aloe emodin 7-hydroxycoumarin β -sitosterol	Hernandez-Medel et al., 1998.
<i>Picramnia teapensis</i>	casca de galhos	picramnioside F mayoside C 1-O- β -D-glucopyranosyl emodin 8-O- β -D-glucopyranosyl emodin	Rodríguez-Gamboa et al., 2000.
<i>Picramnia teapensis</i>	casca	picramniosides D picramniosides E mayoside mayoside B Emodin Oxanthrone 7-hydroxycoumarin 7-Benzoyl 3,7-dibenzoyl	Rodríguez-Gamboa et al., 1999.
			Rodríguez-Gamboa et al., 2001.

TABELA 1.2 - Diversidade química de espécies do gênero *Picramnia* (continuação).

Espécie	Ocorrência	Substância	[Ref.]
<i>Picramnia latifolia</i>	raízes e folhas	picramniosides G picramniosides H mayosides D mayosides E 6,8-dihidroxi-10-methyl-7H-benz[de]anthracen-7-one 6,8-dihidroxi-4-methyl-7H-benz[de]anthracen-7-one nataloe-emodin Chrysophanein Chrysophanol 1,5-dihidroxi-7-methoxy-3-methylanthraquinone Pulmatin	Diaz et al.,2004.
<i>Picramnia polyantha</i>	frutos	Aloe-emodin β -sitosterol	Hernández - Mendel et al., 2009.
<i>Picramnia pentandra</i>	casca	3-epibetulinic acid	Herz, Santhanam and Wahlberg, 1972.
<i>Picramnia glazioviana</i>	folhas	picraviane A picraviane B	Gimenes et. al, 2019.
<i>Picramnia macrostachys</i>	folhas	Chrysophanol Physcion	Arana and Julca, 1986.

TABELA 1.3 - Estruturas dos metabólitos secundários isolados do gênero *Picramnia*.

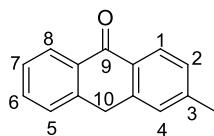


Anthraquinona

Compostos	Nomenclatura	Origem	[Ref.]
1 = OH, 6 = OMe, 8 = OH	physcion	<i>Picramnia macrostachys</i> , <i>Picramnia sellowii</i> e <i>Picramnia parvifolia</i>	Arana and Julca, 1986; Leon and Juan, 1975; Popinigis et al., 1980.
1 = OH, 6 = OH, 8 = OH	emodin	<i>Picramnia antidesma</i> , <i>Picramnia hirsuta</i> , <i>Picramnia sellowii</i> , <i>Picramnia parvifolia</i> e <i>Picramnia teapensi</i>	Hernandez-Medel et.al., 1998; Hernandez-Medel et.al., 1998; Leon and Juan, 1975; Popinigis et al., 1980; Rodríguez-Gamboa et al., 1999.
1 = OH, 8 = OH	chrysophanol	<i>Picramnia sellowii</i> , <i>Picramnia macrostachys</i> , <i>Picramnia latifolia</i> , <i>Picramnia hirsuta</i> e <i>Picramnia parvifolia</i> .	Aponte et al., 2008; Arana and Julca, 1986; Diaz et al., 2004; Hernandez Medel et.al., 1998; Popinigis et al., 1980.
1 = OH, 3 = COOH, 8 = OH	rhein	<i>Picramnia parvifolia</i>	Popinigis et al., 1980.
1 = OH, 3 = CH ₂ OH, 8 = OH	Aloe-emodin	<i>Picramnia polyantha</i> e <i>Picramnia antidesma</i>	Hernández-Mendel et al., 2009; Solis et al., 1995.
1 = OH, 7 = OH, 8 = OH	nataloe-emodin	<i>Picramnia sellowii</i> e <i>Picramnia latifolia</i>	Aponte et al., 2008; Diaz et al., 2004.
1 = OGlc, 8 = OH	chrysophanein	<i>Picramnia latifolia</i>	Diaz et al., 2004.

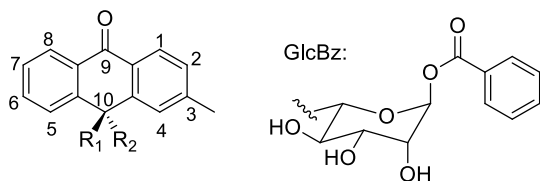
Anthraquinona (continuação)

Compostos	Nomenclatura	Origem	[Ref.]
1 = OH, 5 = OH, 7 = OMe	1,5-dihidroxi-7-methoxy-3-methylanthraquinone	<i>Picramnia latifolia</i>	Diaz et al., 2004.
1 = OH, 8 = OGlc	pulmatin	<i>Picramnia latifolia</i>	Diaz et al., 2004.
1 = OGlc, 6 = OH, 8 = OH	1-O-β-D-glucopyranosyl emodin	<i>Picramnia teapensis</i>	Rodríguez-Gamboa et al., 1999.
1 = OH, 6 = OH, 8 = OGlc	8-O-β-d-glucopyranosyl emodin	<i>Picramnia teapensis</i>	Rodríguez-Gamboa et al., 1999.



Antronas

Compostos	Nomenclatura	Origem	[Ref.]
1 = OH, 3 = CH ₂ OH, 8 = OH,	Aloe-emodin anthrone	<i>Picramnia antidesma</i>	Solis et al., 1995.



Antronas C-glicosídicas

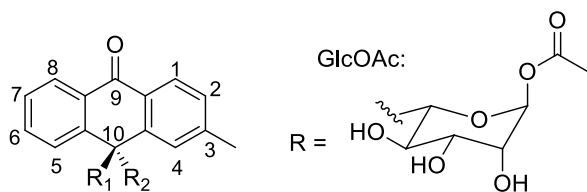
Compostos	Nomenclatura	Origem	[Ref.]
1 = OH, 8 = OH, R ₁ = H, R ₂ = GlcBz	uveoside	<i>Picramnia antidesma</i>	Hernandez-Medel et.al., 1998.
1 = OH, 8 = OH, R ₁ = GlcBz, R ₂ = H	Picramnioside G	<i>Picramnia latifolia</i>	Diaz et al., 2004.

Antronas C-glucosídicas (continuação)

Compostos	Nomenclatura	Origem	[Ref.]
1 = OH, 8 = OH, R ₁ = GlcBz, R ₂ = H	10-epi- uveoside	<i>Picramnia antidesma</i>	Hernández-Medel and Pereda-Miranda, 2002.
1 = OH, 8 = OH, R ₁ = H, R ₂ = GlcBz	Picramnioside H	<i>Picramnia latifolia</i>	Diaz et al., 2004.
1 = OH, 6 = OH, 8 = OH, R ₁ = GlcBz, R ₂ = H	Picramnioside D	<i>Picramnia teapensis</i>	Rodríguez-Gamboa et al., 1999.
1 = OH, 6 = OH, 8 = OH, R ₁ = H, R ₂ = GlcBz	Picramnioside E	<i>Picramnia teapensis</i>	Rodríguez-Gamboa et al., 1999.
1 = OGlc, 6 = OH, 8 = OH, R ₁ = H, R ₂ = GlcBz	Picramnioside F	<i>Picramnia teapensis</i>	Rodríguez-Gamboa et al., 2000.
1 = OH, 3 = CH ₂ OH, 8 = OH, R ₁ = GlcBz, R ₂ = H	Picramnioside A	<i>Picramnia sellowii</i> and <i>Picramnia antidesma</i>	Balderrama et al., 2001; Solis et al., 1995.
1 = OH, 6 = OH, 8 = OH, R ₁ = GlcBz, R ₂ = OH	mayoside	<i>Picramnia antidesma</i> , <i>Picramnia hirsuta</i> and <i>Picramnia teapensis</i>	Hernandez-Medel et.al., 1999; Hernandez-Medel, et.al., 1996; Rodríguez-Gamboa et al., 1999.
1 = OH, 6 = OH, 8 = OH, R ₁ = OH, R ₂ = GlcBz	saroside	<i>Picramnia antidesma</i>	Hernandez-Medel et.al., 1999.
1 = OH, 8 = OH, R ₁ = OH, R ₂ = GlcBz	Mayoside D	<i>Picramnia latifolia</i>	Diaz et al., 2004.

Antronas C-glucosídicas (continuação)

Compostos	Nomenclatura	Origem	[Ref.]
1 = OH, 8 = OH, R ₁ = GlcBz, R ₂ = OH	Mayoside E	<i>Picramnia latifolia</i>	Diaz et al., 2004.
1 = OH, 6 = OH, 8 = OH, R ₁ = GlcBz, R ₂ = OH	Mayoside B	<i>Picramnia teapensis</i>	Rodríguez-Gamboa et al., 1999.
1 = OH, 6 = OH, 8 = OGlc, R ₁ = GlcBz, R ₂ = OH	Mayoside C	<i>Picramnia teapensis</i>	Rodríguez-Gamboa et al., 2000.
1 = OH, 6 = OH, 8 = OH, R ₁ = OH, R ₂ = GlcBz	Oxanthrone	<i>Picramnia teapensis</i>	Rodríguez-Gamboa et al., 1999.



Oxantronas C-glucosídicas

Compostos	Nomenclatura	Origem	[Ref.]
1 = OH, 3 = CH ₂ OH, 8 = OH, R ₁ = GlcBz, R ₂ = H	Picramnioside B	<i>Picramnia antidesma</i>	Solis et al., 1995.
1 = OH, 3 = CH ₂ OH, 8 = OH, R ₁ = H, R ₂ = GlcBz	Picramnioside C	<i>Picramnia sellowii</i> and <i>Picramnia antidesma</i>	Balderrama et al., 2001; Solis et al., 1995.

1.4 - CANCRO CÍTRICO (*Xanthomonas citri subsp. citri.*)

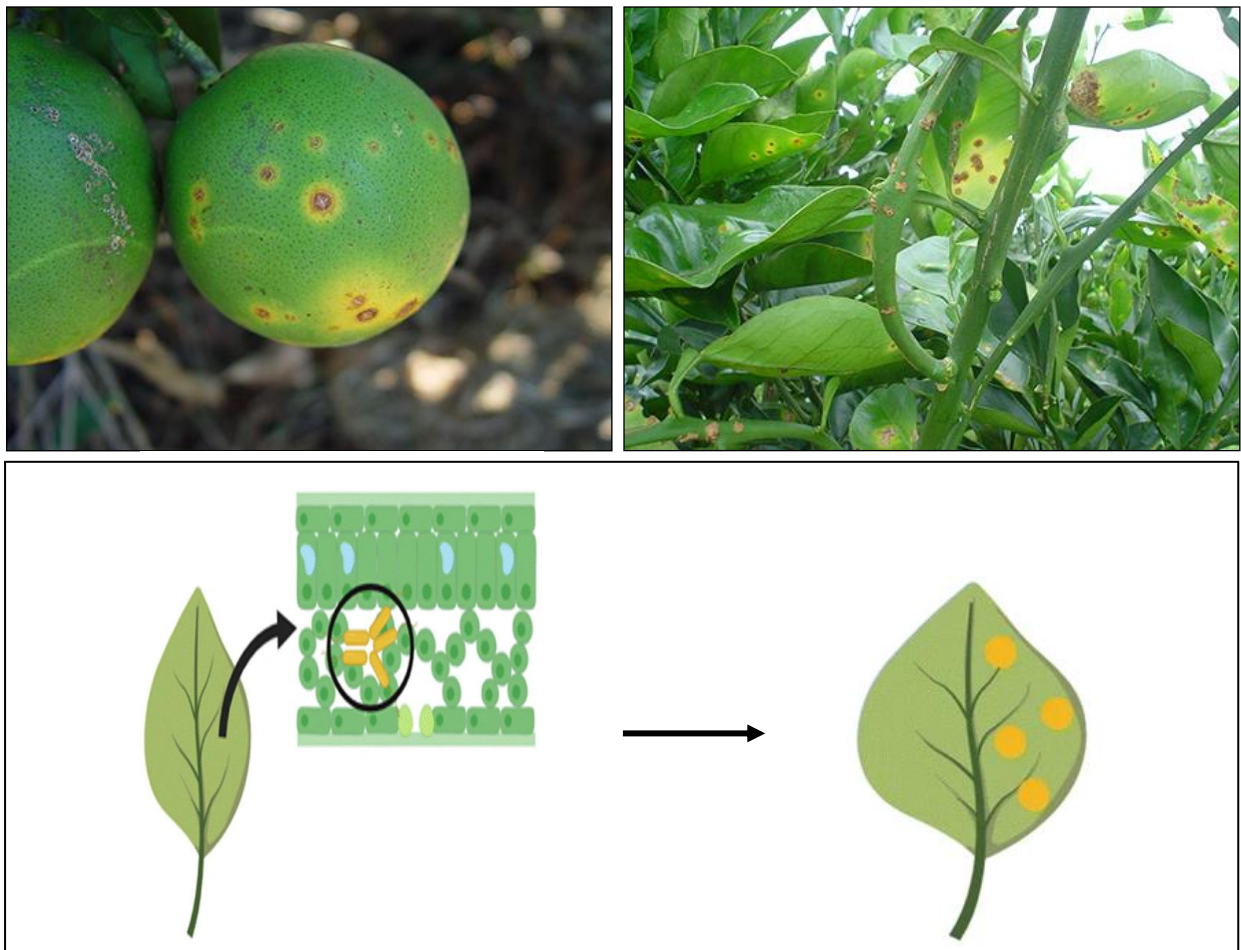
O cancro cítrico é uma das principais doenças que afetam as variedades comerciais dos citros, causada pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri subsp. citri*. Essa doença leva ao aparecimento de sintomas em todas as partes aéreas das plantas jovens, onde inicialmente ocorre o surgimento de erupções em relevo na superfície dos frutos, folhas e nos galhos (FIGURA 1.4), que são como fontes locais de inoculação da bactéria (MARTINS et al., 2020). Posteriormente, ocorre desfoliação e queda dos frutos devido a infecção severa dessas plantas, que apresentam maior concentração do inóculo nas fases iniciais das lesões do que nas lesões mais velhas (FERENCE et al., 2018).

A transmissão é facilitada por insetos, tempestades e até mesmo por pequenos machucados causados pelas ferramentas usadas nos pomares. De um modo geral, o fitopatógeno age formando um biofilme que auxilia no fator de virulência, aumentando o processo infeccioso. Se em condições de temperatura e umidade favoráveis, as células bacterianas penetram no tecido (FIGURA 1.4) através dos estômatos ou das feridas presentes na superfície. O ciclo de infecção permanece com o escapamento dessas bactérias e infecção em novos indivíduos (MARTINS et al., 2020).

Há 60 anos o cancro cítrico está presente no estado de São Paulo e constantes esforços são direcionados na tentativa de erradicar essa doença. Por ser a maior área produtora de laranja do mundo, uma legislação federal conhecida como Instrução Normativa nº21 (BRASIL, 2018) foi publicada para regulamentar o controle da doença no país. Dentre os conjuntos de medidas em áreas sob erradicação, é citada a eliminação da planta infectada e pulverização de cobre nas árvores vizinhas das plantas doente, como forma de conter a disseminação (BEHLAU, 2021).

Porém, muito embora alguns desses bactericidas à base de cobre sejam eficientes para a contenção, não existe capacidade de que o inóculo seja suprimido completamente e assim, uma reaplicação é necessária. Entretanto, a reaplicação constante e em excesso favorece o surgimento de cepas resistentes e compromete o controle esperado (BEHLAU, GOCHEZ e JONES, 2020). Evidenciando a necessidade da busca por novos compostos mais ecológicos que possam não só inibir o crescimento do fitopatógeno, bem como possa atuar suprimindo o crescimento da doença na planta, a partir do estímulo do seu sistema imunológico (MARTINS et al., 2020).

FIGURA 1.4 – Lesões do cancro cítrico em frutos, folhas e galhos, com modo de ação da infecção do fitopatógeno nos tecidos.



Fonte: Adaptado de FUNDECITRUS (2023) e MARTINS (2020).

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Desenvolver protocolos analíticos através de UHPLC-QTOF-MS/MS, para avaliar o perfil químico de *Picramnia sellowii* Planch. para detectar quassinoides.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

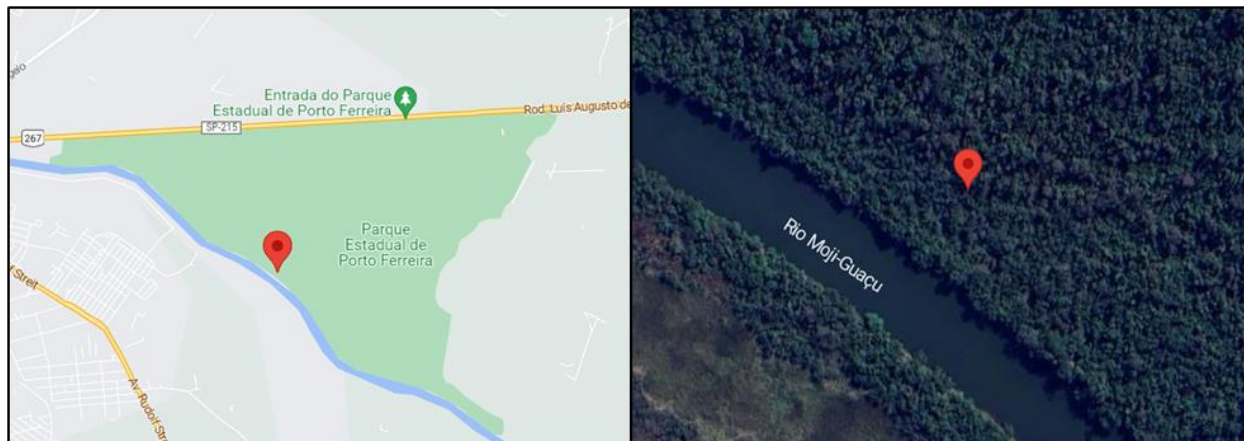
- Preparar e obter o extrato etanólico das folhas de *P. sellowii*;
- Desenvolver métodos cromatográficos por HPLC-DAD;
- Desenvolver métodos de fracionamento dos metabólitos secundários dos extratos por SPE-C18;
- Realizar o estudo metabolômico e a construção de biblioteca de dados a partir da desreplicação das frações de extrato, utilizando análises de UPLC-QTOF-MS/MS, em conjunto com diferentes bases de dados de redes moleculares.
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato, frente a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri subsp. citri* causadora da doença Cancro Cítrico.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL BOTÂNICO

A espécie *P. sellowii* foi coletada no município de Porto Ferreira - SP, em uma trilha na floresta estacional semidecidual localizada às margens do rio Moji-Guaçu, no Parque Estadual de Porto Ferreira (21°51'22.1"S, 47°26'07.4"W), conforme indicado na (FIGURA 3.5). A exsicata foi preparada para identificação taxonômica inequívoca da espécie, e em seguida, o espécime (L.M. Borges 1237) foi depositado como um *voucher* no Herbário da Universidade Federal de São Carlos (SPSC), no Departamento de Botânica.

FIGURA 3.5 - Localização por satélite do material vegetal coletado no Parque Estadual de Porto Ferreira.



Fonte: Adaptado de Google Maps (2023).

3.2 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Após a coleta, as folhas de *P. sellowii* foram secas em estufa com circulação de ar, a 40°C durante 7 dias. Quando completamente seco, o material foi triturado em liquidificador industrial (FIGURA 3.6) e submetidos à extração em EtOH e uma mistura EtOH:H₂O (1:1), utilizando banho de ultrassom (sonicador), por

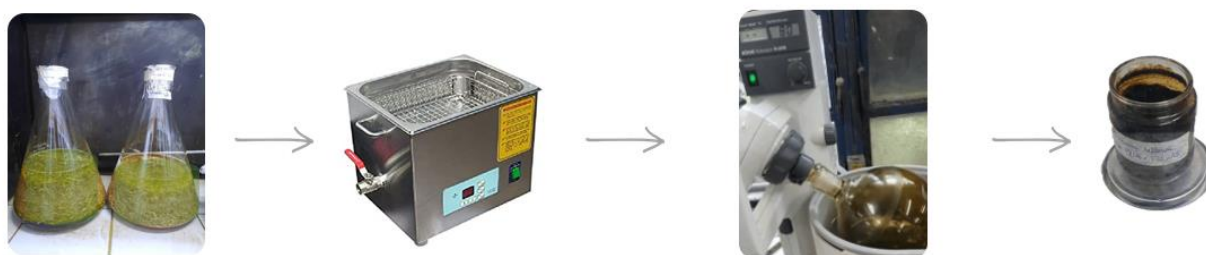
2 h à 40°C, três vezes consecutivas, obtendo ao final, os extratos etanólico (Ps_F) e hidroalcolólico (Ps_H) (FIGURA 3.7). Em um segundo momento, com base em resultados preliminares obtidos por LC-MS/MS, foram realizadas microextrações, utilizando o mesmo processo, com MeOH e outro com CH₂Cl₂, obtendo os extratos PSeI_CH₂Cl₂ e PSeI_MeOH.

Os extratos etanólico, hidroalcolólico e aqueles obtidos por microextração foram filtrados em filtro de papel comum e secos em um evaporador rotativo BUCHI (Rotavapor® R-215, banho de aquecimento B-491, bomba de vácuo V-700, controle de vácuo V-850). Posteriormente, todos os extratos foram transferidos para diferentes frascos, pesados e etiquetados, sendo em seguida feito o cálculo do rendimento e direcionados para armazenamento em refrigerador.

FIGURA 3.6 - Representação do processo de coleta, secagem e moagem das folhas de *P. sellowii*.



FIGURA 3.7 - Representação do processo de extração das folhas de *P. sellowii*.



3.2.1 -Análise do perfil químico de *P. sellowii* por HPLC-PDA

Alíquotas de cada extrato, foram solubilizadas em MeOH grau HPLC (Sigma-Aldrich®) a fim de serem obtidas amostras com concentração de 3 mg/mL. As amostras preparadas passaram por um *clean up* para eliminação da clorofila e foram armazenadas em *vials*.

Em seguida, foram submetidas a análise do perfil químico em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (SHIMADZU® Prominence, três unidades de bombeamento de solvente LC-20AR, auto-injetor SIL-10AF, controlador de sistema CBM-20A, detector UV/VIS SPD-M20A, degaseificador DGU-20A, software LabSolutions™, versão 5.90), utilizando uma coluna analítica Phenomenex® Gemini C18 (250 x 4,6 mm, partícula de 5µm). Para a separação no modo reverso, foram preparadas as fases: H₂O (ultrapura Milli-Q®) + ácido fórmico 0,1% (linha A) e MeOH (grau HPLC Sigma-Aldrich®) + ácido fórmico 0,1% (linha B). Um gradiente de eluição (exploratório padrão) com fluxo de 1 mL/min (TABELA 3.4) e volume de injeção de 15 µL foi monitorado no comprimento de onda de λ 254 nm.

TABELA 3.4 - Gradiente exploratório utilizado na análise preliminar do perfil químico dos extratos.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
00,00	95	5
40,00	0	100
45,00	0	100
47,00	95	5
60,00	95	5

Solvente A = água + 0,1% ácido fórmico (v/v)

Solvente B = metanol + 0,1% ácido fórmico (v/v)

3.3 - FRACIONAMENTO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Para melhor detecção nas análises por LC-MS/MS a partir de amostras menos complexas e a possibilidade de concentração de analitos de interesse, foi realizado um fracionamento por extração em fase sólida (SPE) utilizando um cartucho C-18 Supelco® (SUPELCLEAN™ LC-18, 10 g em massa, 60 mL em volume, partícula de 45 µm). Dessa forma, 60 mL de MeOH grau HPLC (Sigma-Aldrich®) foi aplicado para ativação e limpeza do cartucho. Para a eluição, foi utilizado cinco vezes o volume morto de cada fração, onde a porcentagem de solvente (TABELA 3.5 e TABELA 3.6) foi escolhida com base no cromatograma do perfil químico obtido por HPLC-PDA. Para aplicação da amostra, o cartucho foi inicialmente condicionado na primeira fase móvel e em seguida 500 mg dos extratos de *P. sellowii* (PS_F e PS_H) foram solubilizados nessa mistura. Após a coleta das frações com as fases planejadas, o cartucho foi limpo com uma mistura de MeOH:CHCl₃ e depois somente MeOH.

TABELA 3.5 - Fases móveis utilizadas no fracionamento do extrato etanólico de *P. sellowii* (código PS_F).

Frações coletadas	Fase móvel para eluição (%)
F1	20
F2	30
F3	40
F4	100

Eluente = MeOH + 0,1% de ácido fórmico (v/v)

A fim de verificar a eficiência do fracionamento, foram preparadas amostras com as frações, conforme o item 3.2.1, para análise no equipamento HPLC-PDA SHIMADZU® utilizando a mesma coluna analítica Phenomenex® Gemini C18 e o gradiente de eluição descrito na TABELA 3.4 (item 3.2.1) com

monitoramento no comprimento de onda de λ 254 nm. O rendimento das frações foi calculado.

TABELA 3.6 - Fases móveis utilizadas no fracionamento do extrato hidroalcólico de *P. sellowii* (código PS_H).

Frações coletadas	Fase móvel para eluição (%)
H1	20
H2	45
H3	70
H4	100

Eluente = MeOH + 0,1% de ácido fórmico (v/v)

Ao final, obteve-se as frações F1-F4 do extrato etanólico e as frações H1-H4 do extrato hidroalcólico de *P. sellowii*, que foram armazenadas para análises posteriores.

3.4 - ANÁLISE POR UHPLC-QTOF-MS/MS

As amostras para a aquisição dos dados de LC-MS/MS foram previamente tratadas a partir de *clean up* com um cartucho SPE C-18 Supelco® (Supelclean™ LC-18, 1 g em massa, 6 mL em volume, partícula de 45 μ m), e posteriormente, elas foram diluídas em ACN:H₂O (1:1) na concentração de 50 ppm e armazenadas em *vials*. Todos os solventes utilizados na análise foram de grau LC-MS LiChrosolv® (Sigma-Aldrich®).

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de ultra-eficiência (Agilent 1290 Infinity II) acoplado a um espectrômetro de massas Agilent G6545B Q-TOF (Agilent Technologies Inc.) equipado com uma fonte de ionização *electrospray* (ESI). As fases móveis eram compostas por: H₂O + ácido fórmico 0,1% (linha A) e ACN + ácido fórmico 0,1% (linha B). Uma coluna Agilent® Zorbax SB-

C18 (50 × 3,0 mm; partícula de 1.8 µm) mantida a 33 °C foi utilizada para a separação. O volume de injeção foi de 2 µL e o fluxo a 0,3 mL/min, no seguinte gradiente: 5% a 100% de B em 15 min, mantendo a condição de gradiente a 100% de B durante 2 min, em seguida retornando novamente para sua condição inicial em 5% de B até um o tempo 17,20 min e sendo mantido em 5% de B até 20 min para recondicionamento (TABELA 3.7).

TABELA 3.7 - Gradiente exploratório utilizado para análise no sistema UHPLC-QTOF-MS/MS

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
00,00	95	5
15,00	0	100
17,00	0	100
17,20	95	5
20,00	95	5

Solvente A = água + 0,1% ácido fórmico (v/v)

Solvente B = acetonitrila + 0,1% ácido fórmico (v/v)

Foram adquiridos os dados de MS nos modos positivo e negativo, utilizando o modo *auto* MS/MS, realizando o monitoramento dos íons no intervalo de m/z 120-1500 durante o progresso da análise, com os seguintes parâmetros de ionização: pressão do gás nebulizador 35 psi, fluxo do gás de secagem 10 L/min, temperatura do gás de secagem 300 °C, fluxo do *sheath gas* 11 L/min, temperatura do *sheath gas* 320 °C. Os parâmetros da fonte: voltagem do capilar 3000 V, voltagem do *skimmer* 65 V, voltagem do fragmentor 110 V. A taxa de aquisição dos espectros foi de cinco espectros por segundo.

Toda a aquisição dos dados de LC-MS/MS foram obtidas utilizando o *software* MassHunter Workstation, versão B.09.00 (Agilent Technologies©).

3.4.1 - Processamento dos dados obtidos por UHPLC-QTOF-MS/MS

A partir da análise MS, um grande volume de dados é adquirido. Para a construção de redes moleculares, esse conjunto de dados precisou ser organizado no módulo de análise *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN), até a visualização e análise da rede molecular (FIGURA 3.8). Dessa forma, os dados brutos adquiridos por UHPLC-QTOF-MS/MS nos modos positivo e negativo, utilizando o *software* MassHunter Workstation, fornecem os arquivos em uma extensão no formato (.d) que necessita de conversão para que sejam tratados em um *software* apropriado para o alinhamento dos dados.

FIGURA 3.8 - Fluxograma exemplificando as etapas de processamento dos dados e visualização da rede molecular.



Fonte: Adaptado de YOSHIOKA (2021).

Utilizando o msConvert, uma ferramenta do grupo ProteoWizard® (CHAMBERS et. al, 2012), todos esses dados foram convertidos para o formato

(.mzML). Em seguida, esses arquivos foram pré-processados, deconvoluídos e alinhados em um único *feature* na ferramenta MS-DIAL (TSUGAWA et al., 2020) para a geração de uma matriz de dados única. Essa matriz obtida foi extraída no formato (.msp), um formato de entrada para a ferramenta MS-FINDER (TSUGAWA et al., 2016), onde foram geradas anotações por meio do agrupamento dos dados de MS/MS por similaridade (*clusters*), ao comparar espectros de referência de bancos de dados de metabólitos secundários. Os bancos de dados selecionados nessa ferramenta foram: FooDB, PlantCyc, ChEBI, LipidMAPS, DrugBank, KNApSAcK, NNPDB, NPA, COCONUT, PubChem, UNPD e METLIN.

Após esse processamento, os arquivos foram exportados no formato (.mgf) e submetidos à plataforma GNPS© (WANG et al., 2016) ao fluxo de trabalho FBMN. Os parâmetros do filtro do GNPS foram definidos para: tolerância de massa de íons precursores $\Delta 0,02$ Da; tolerância de massa de íons fragmentados: $\Delta 0,06$ Da. Para a criação da rede molecular usou-se um mínimo de 4 para fragmentos semelhantes, mínimo de pares cossenos de 0,7 e 2 para o tamanho mínimo do *cluster*. O FBMN foi exportado para a plataforma Cytoscape©, versão 3.8.2 (SHANNON et al., 2003) para análise e visualização da rede molecular gerada.

3.4.1.1 - Análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A partir das informações obtidas por UHPLC-QTOF-MS/MS, utilizando as redes moleculares adquiridas, foram direcionadas metodologias por HPLC-PDA no modo preparativo para isolamento das moléculas anotadas. Os cromatogramas das frações obtidas foram trabalhados em métodos de eluição no modo isocrático, com metodologia direcionada para o comportamento específico de cada fração, utilizando uma coluna semipreparativa Phenomenex® Gemini C18 (250 x 10 mm; 5 μ m).

Para todas as coletas realizadas, as amostras foram secas e analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, equipamento Bruker® DRX 9,4 T (400 MHz para RMN H^1 e 100 MHz para RMN C^{13}). Os espectros obtidos foram tratados no *software* MestReNova® (MNova©), Mestrelab Research S.L., versão 12.0.0 (Willcott, 2009).

3.5 - ENSAIO BIOLÓGICO COM *Xanthomonas citri subsp. citri*.

Para o desenvolvimento do ensaio biológico, foram utilizadas cepas de *Xanthomonas citri subsp. citri*., fornecidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), do município de Araraquara - SP. Os três isolados de bactérias fitopatogênicas eram resistentes, tolerantes e suscetíveis ao cobre (TABELA 3.8). Os ensaios foram realizados em triplicata para o cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando o método de microdiluição seriada em microplacas de 96 orifícios, para determinar os valores mínimos de concentração do composto que é capaz de inibir o crescimento dos microorganismos.

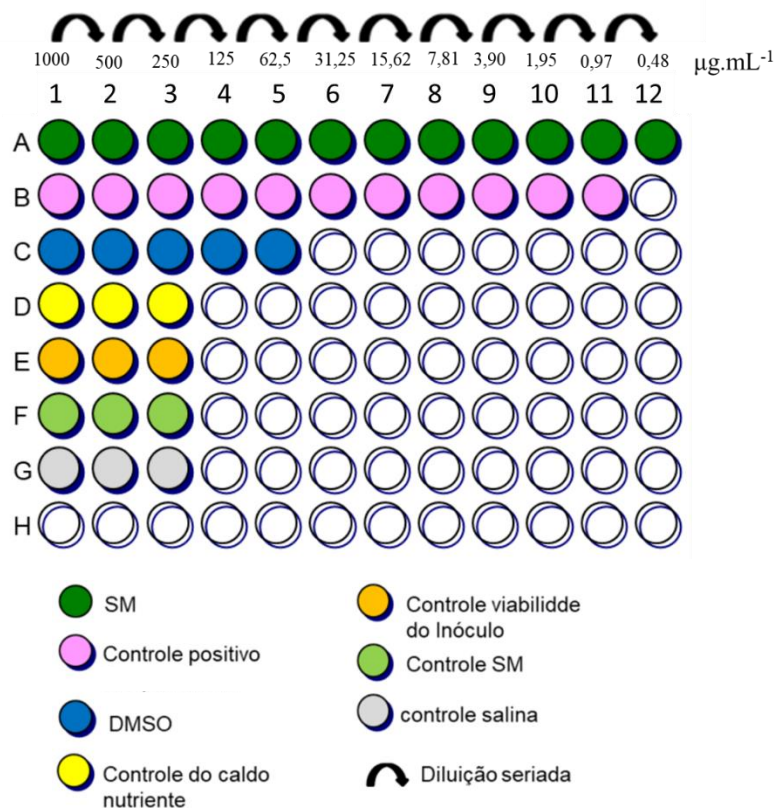
TABELA 3.8 - Isolados da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri ssp. citri*.

Isolado	Local de origem	Ano de isolamento	Cu(II)
1645	Bella Vista, Corrientes - Argentina	2003	Resistente
1666	Rondon - Paraná	2011	Tolerante
12	Paranavaí - Paraná	1997	Sensível

O preparo do inóculo seguiu as diretrizes pré-estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), para obter 5×10^5 UFC (Unidade Formadora de Colônia), com as seguintes etapas: crescimento dos isolados por 72h em caldo nutriente, suspensão em solução salina 0,9%, padronização da turbidez para a concentração de 10^5 UFC/mL, retirada de uma alíquota para o inóculo com posterior adição de solução salina e caldo nutriente.

As amostras ensaiadas (extratos: PS_F, PS_H, PS_MeOH, PS_CH₂Cl₂ e frações F1-F4) foram dissolvidas em DMSO a 0,5 mg/mL e posteriormente foi adicionado o caldo de nutriente, obtendo concentrações seriadas na faixa de 1000 µg/mL à 0,195 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado o Sulfato de cobre pentahidratado, e o controle negativo utilizado foi o DMSO, com uma solução de 5% (v/v). Orifícios contendo apenas o inóculo foram incluídos para o controle da viabilidade dos isolados, sendo adicionados também orifícios não inoculados, contendo apenas o caldo nutriente, para garantia da esterilidade do meio, e contendo apenas solução salina (FIGURA 3.9). Ao final, as microplacas foram seladas com plástico filme e guardadas por 72 h em uma Câmara Incubadora BOD a uma temperatura de 28°C.

FIGURA 3.9 - Representação do método de CIM em microplaca de 96 orifícios para a bactéria *X. citri*.



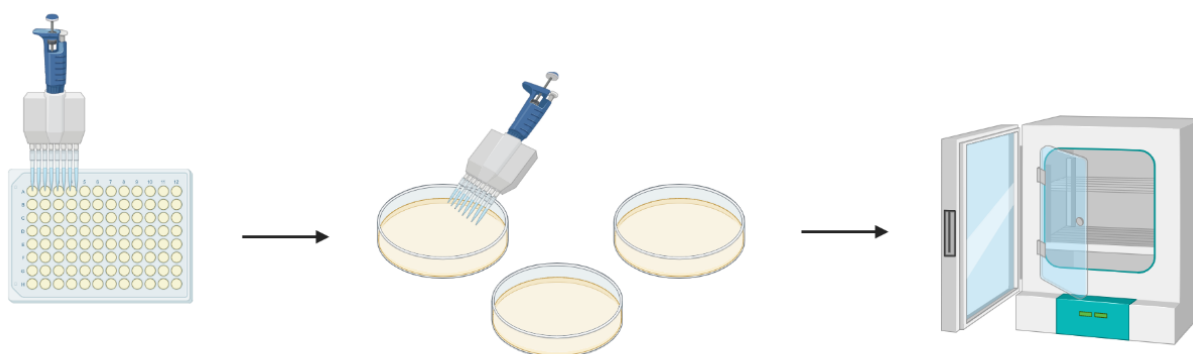
Fonte: Adaptado de SILVA (2017).

Ao final, os dados da CIM foram obtidos por meio da adição de 30 μL resazurina (Sigma-Aldrich®) em solução aquosa (0,02%), em casa uma das microplacas. A resazurina, de coloração azul, representa a ausência de crescimento microbiano, com mudança para a coloração rosa na presença de células bacterianas.

Onde não houve crescimento microbiano, a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada também em triplicata, utilizando os mesmos isolados de bactéria (TABELA 3.8). A CBM foi determinada pela subcultura de uma alíquota de 5 μL das amostras dos testes de CIM, retiradas de uma placa onde não houve a adição de resazurina, após 72 h de tratamento. Com uma pipeta multicanal foi transferida uma alíquota retirada de cada orifício que apresentou CIM, semeando-as em placas de petri contendo o meio de crescimento microbiano Ágar Nutriente.

As placas de ágar foram levadas à Câmara Incubadora BOD, sendo mantidas em temperatura de 28°C e após um período de 72 h avaliou-se os resultados identificando em quais concentrações houve crescimento bacteriano (FIGURA 3.10). A CBM foi determinada como a menor concentração que matou $\geq 99,9\%$ de bactérias após 72 h de tratamento antimicrobiano.

FIGURA 3.10 - Representação do método de CBM em placas de ágar.



Fonte: Elaboração BioRender©.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção trata da descrição dos dados e da discussão dos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa, sendo apresentados e discutidos na ordem em que foi apresentada a metodologia deste trabalho.

4.1 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS

As massas das folhas e os respectivos rendimentos dos extratos PS_F e PS_H de *P. sellowii* foram obtidos como demonstra a TABELA 4.9. Em seguida, os extratos foram submetidos à análise do perfil cromatográfico em HPLC-PDA (item 3.2.1), utilizando o gradiente exploratório padrão em λ 254nm, H₂O:MeOH - 95:5 a 100% descrito na TABELA 3.6 do item 3.2.1.

TABELA 4.9 - Rendimentos do PS_F e PS_H de *P. sellowii*.

	Ps_F	Ps_H
Massa inicial do material vegetal	468 g	468 g
Massa do extrato obtido	44,64 g	35,85 g
Rendimento (%)	9,53%	7,66%

4.1.1 - Perfil químico obtido de *P. sellowii* por HPLC-DAD

Os perfis cromatográficos obtidos, (FIGURA 4.11) e (FIGURA 4.12) conforme o item 3.2.2 deram uma evidência prévia sobre as interferências específicas das amostras que seriam trabalhadas, auxiliando assim na decisão do fracionamento, para que as amostras não causassem problemas na detecção e concentração dos analitos que se tinham interesse na amostra original, objetivando também o

enriquecimento e purificação das amostras a serem utilizadas nas demais análises. Nessa etapa o preparo de amostra seria importantíssimo, visto que esperava-se obter a anotação de compostos em concentrações traço em um sistema de alta resolução. Dessa forma, foram propostos os fracionamentos de ambos os extratos, PS_F e PS_H. Ficou evidente que PS_F se mostrou ter no perfil uma melhor separação para a obtenção de frações com maior possibilidade de isolamento de substâncias puras.

FIGURA 4.11 - Perfil cromatográfico obtido de PS_H.

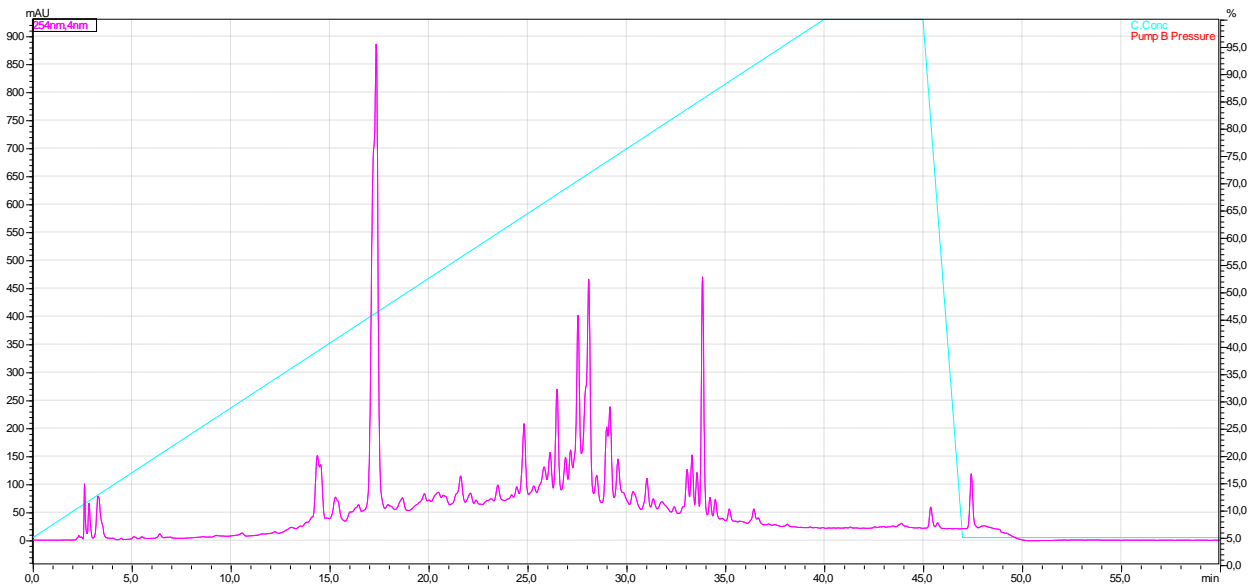
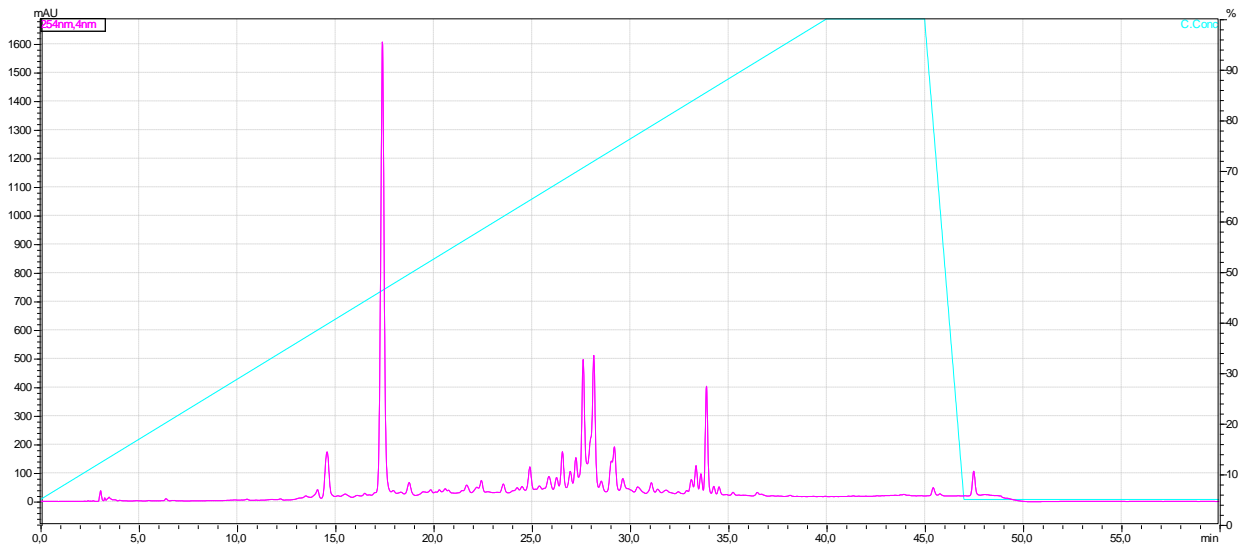


FIGURA 4.12 – Perfil cromatográfico obtido de PS_F.



4.1.2 - Perfil das frações de *P. sellowii* por HPLC-DAD

A partir da análise dos perfis cromatográficos de ambos os extratos (FIGURA 4.11 e FIGURA 4.12), foram feitas as escolhas dos fracionamentos para a obtenção das frações descritas no item 3.3, como detalham as tabelas 3.7 e 3.8 (FIGURA 4.13). Objetivando a coleta da fração F1, foram realizadas sucessivas etapas de fracionamentos do extrato PS_F, partindo de 500 mg em cada processo, até o uso de 3 g de extrato, sendo obtidas as massas e os rendimentos das frações conforme descrito na TABELA 4.10.

FIGURA 4.13 - Cromatograma de PS_F e proposta de fracionamento.

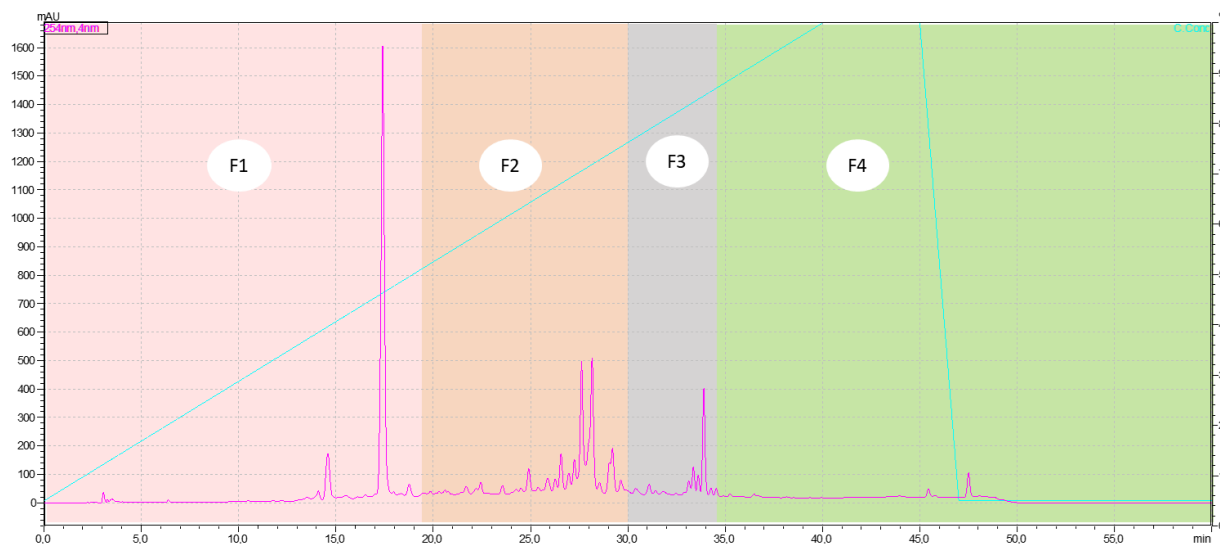


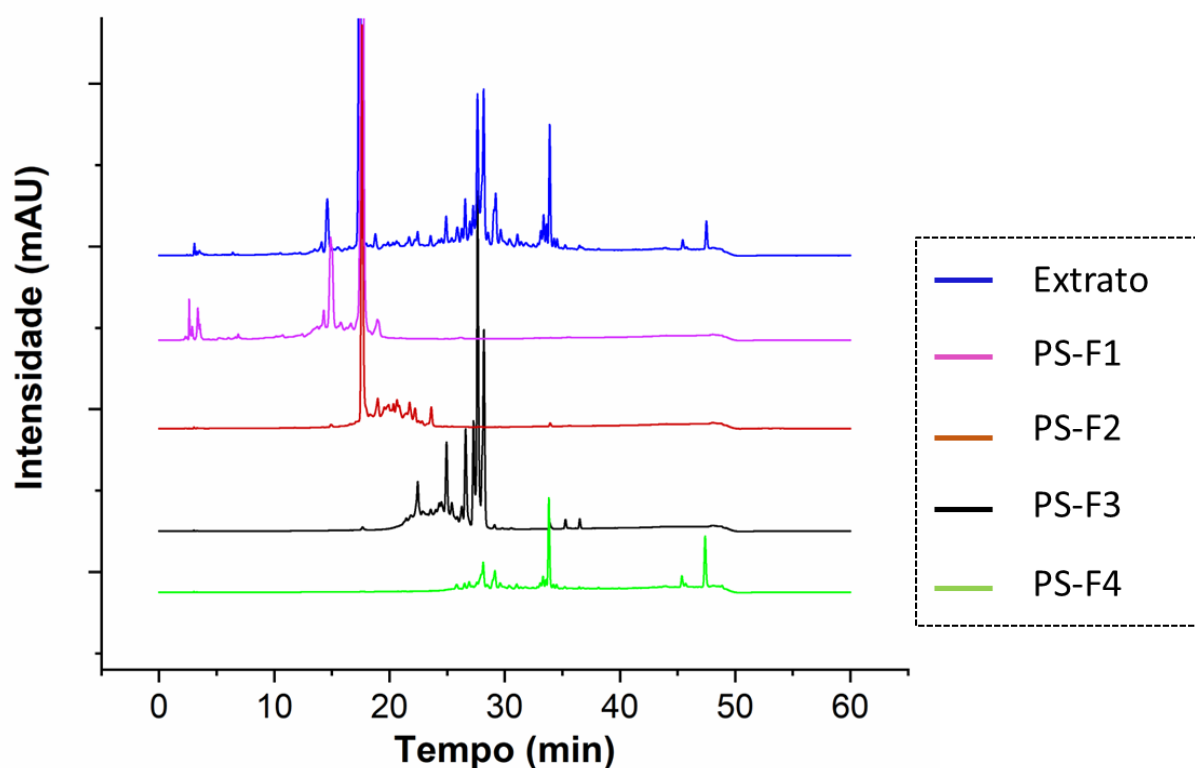
TABELA 4.10 - Rendimentos das frações do extrato etanólico de *P. sellowii*.

SPE de PS_F				
	F1	F2	F3	F4
Força de eluição (% MeOH)	20	30	40	100
Massa obtida (mg)*	938,2	160,9	206,4	642,8
Rendimento (%)	31,27	5,36	6,88	21,42

* Utilizando-se 3g de extrato etanólico

Como forma de verificar a eficiência do fracionamento, todas as frações obtidas dos diferentes extratos, PS_F e PS_H, foram direcionadas para a análise por HPLC-DAD (item 3.2.1). Os cromatogramas obtidos das frações H1 a H4 desta seção, estão apresentados nas FIGURAS A.41 a A.44 do Apêndice. As frações F1 a F4 tiveram seus cromatogramas plotados em um gráfico para comparação e melhor visualização na FIGURA 4.14 e seus cromatogramas apresentados nas FIGURAS A.45 a A.48 do Apêndice.

FIGURA 4.14 - Gráfico comparativo do perfil cromatográfico de PS_F e frações F1 a F4, em gradiente exploratório em λ 254nm, H₂O:MeOH - 95:5 a 100%.



No gráfico pode ser observado que cada fração enriquecida foi potencialmente recuperada, bem como o quanto foi simplificada cada amostra que seria submetida à análise por UHPLC-QTOF-MS/MS em relação aos seus interferentes. O SPE no preparo de amostra tem se tornado cada vez mais aplicado para investigações metabólicas (RABINOWITZ e KIMBALL, 2007; LU et al., 2008;

ZHOU et al., 2012). Assim como evidenciado na literatura, foi observado que podem funcionar como um método eficiente para extrair a amostra e remover substâncias interferentes (como metabólitos abundantes). Um grande componente de interferência e abundante que se pode citar de um extrato de folhas, é a clorofila, que não sendo um metabólito de interesse para muitas análises, pode mascarar outros compostos causando supressão de íons e uma resposta de sinal insatisfatória.

Ainda, na literatura observa-se que a retenção de compostos pouco abundantes na fase sólida da SPE é uma boa estratégia de enriquecimento (MITRA, 2003). Neste trabalho foi possível notar que o SPE melhorou o rendimento de extração, e que também foi vantajoso, uma vez que enriqueceu algumas frações com compostos esperados em quantidades traço, que serão detalhados nos tópicos posteriores.

4.2 - DADOS OBTIDOS POR UHPLC-QTOF-MS/MS

4.2.1 - Processamento dos dados

Para o entendimento do processo de obtenção do FBMN, é necessário um detalhamento dos *softwares* utilizados, bem como esses *softwares* fornecem os dados e resultados necessários até a obtenção das redes moleculares.

Os dados brutos obtidos após a conversão no msConvert (.mzML), conforme exibido na FIGURA 4.15, são tratados no MS-DIAL. Em um primeiro momento é realizado o filtro dos interferentes contidos no branco e dos espectros de MS/MS adquiridos. Nessa etapa de alinhamento dos dados, o *software* compara milhares de espectros obtidos por segundo de análise e agrupa os espectros de uma mesma substância que esteja contida em diferentes amostras, sendo comparado pelo seu tempo de retenção (FIGURA 4.16).

A partir desse tratamento já se observa uma redução significativa dos dados evidenciados pelo software. Após o alinhamento, uma tabela com as informações de substâncias e localização dessas substâncias em cada amostra é gerada. Essas informações são exportadas para o MS-FINDER. Nesse *software*, são obtidas informações comparadas com os bancos de dados selecionados no tratamento. Neles, os dados de MS/MS são comparados e agrupados, a partir de um *match* com espectros dessas bibliotecas. O programa sugere possíveis classes, fórmulas moleculares, estrutura, bem como um *score* da possibilidade de realmente ser aquela classe, sendo aceitáveis valores acima de 5 (FIGURA 4.17). Fornecendo também um comparativo de um espectro experimental, com um *in silico* (FIGURA 4.18).

FIGURA 4.15 - Dados brutos obtidos após a conversão no msConvert (.mzML).

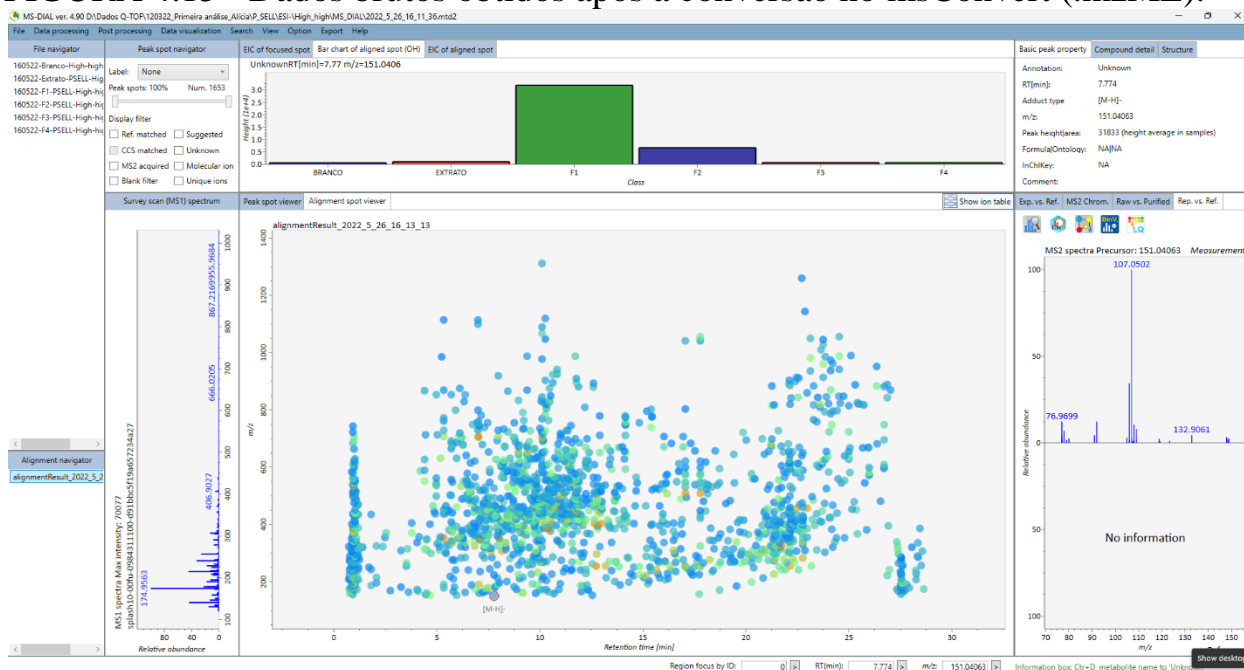


FIGURA 4.16 - Redução significativa das informações no MS-DIAL após o alinhamento dos dados.



FIGURA 4.17 – Informações estruturais, possível fórmula, erro, classe, score.

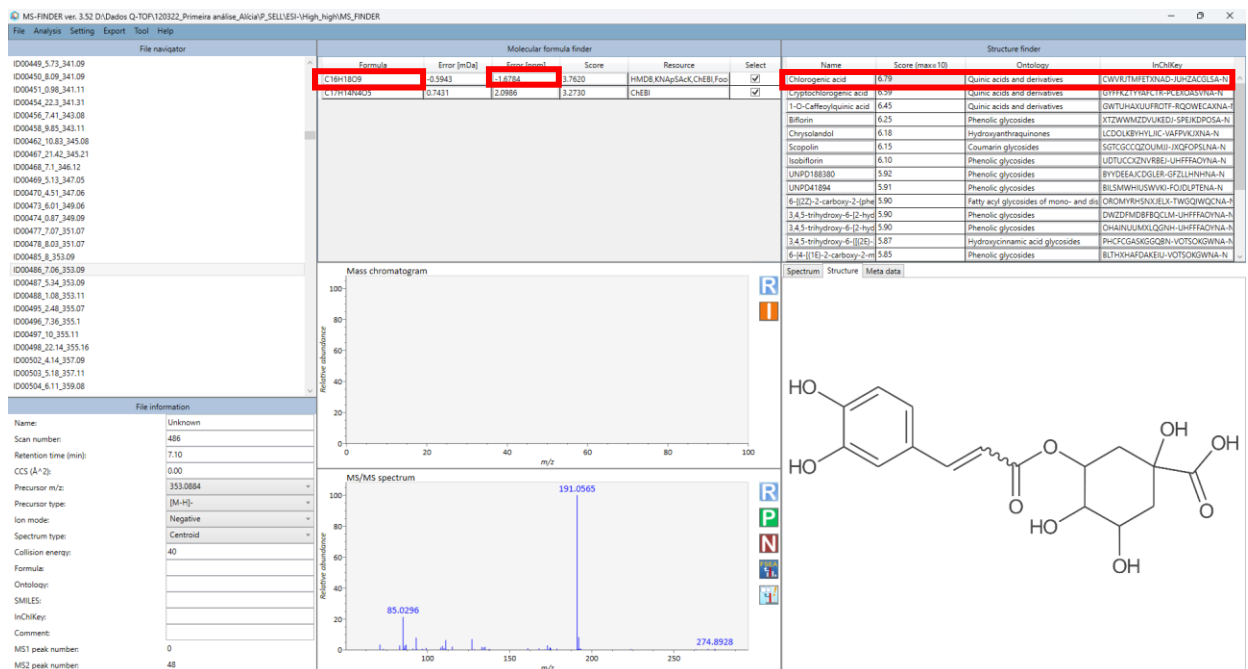
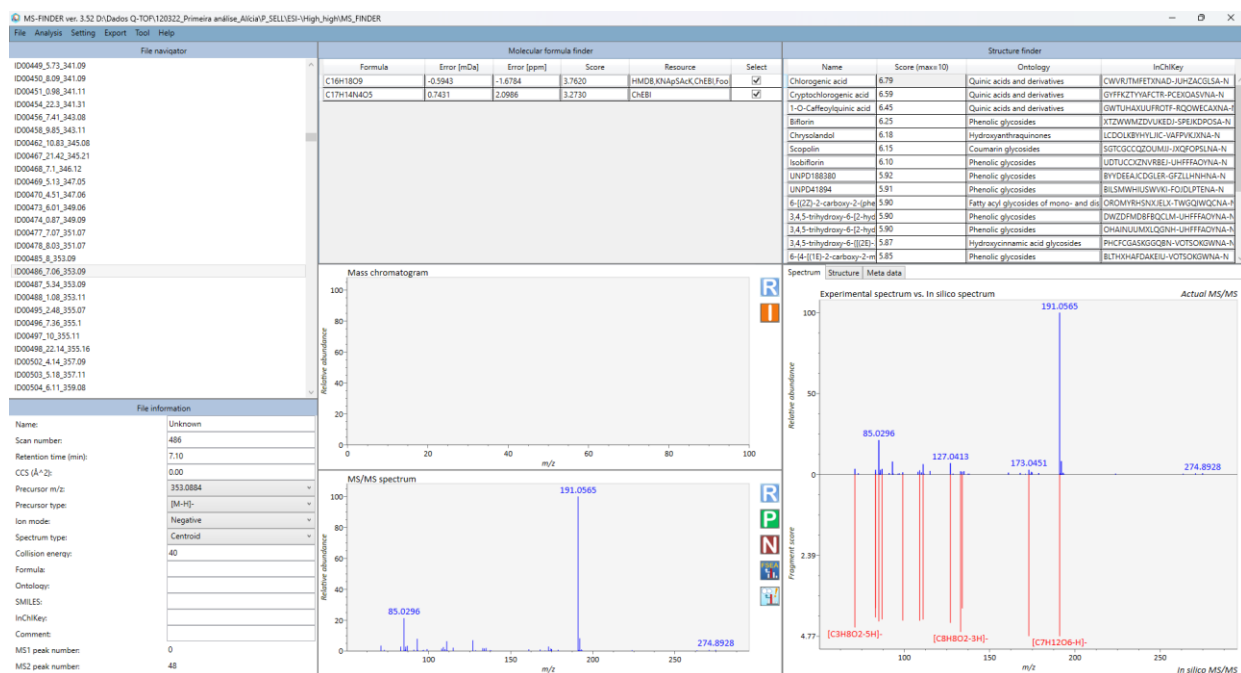
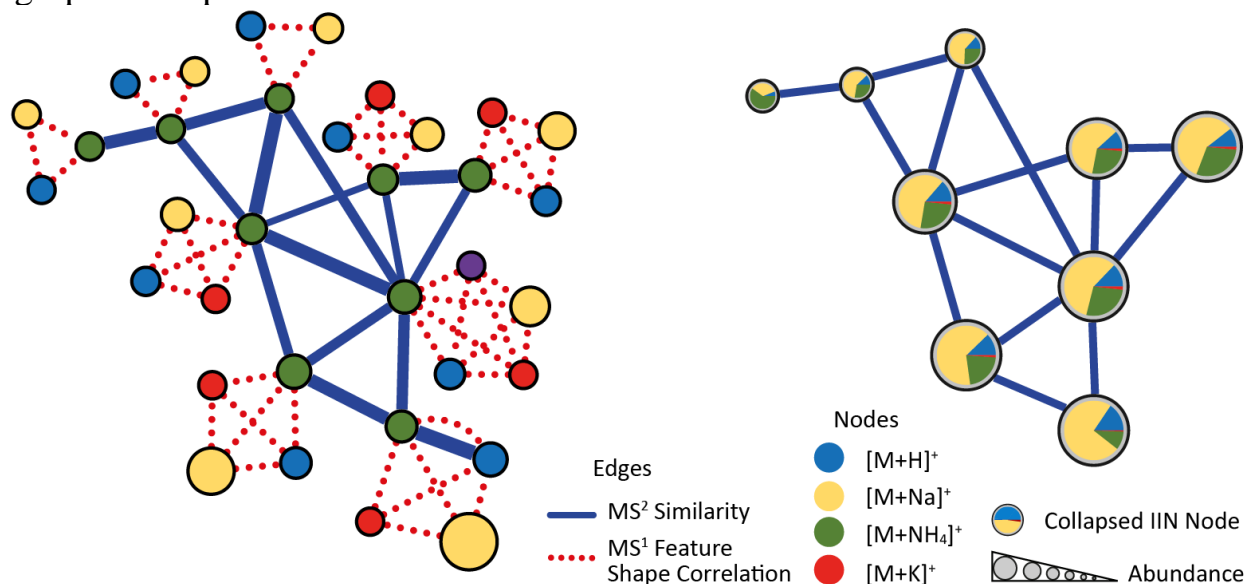


FIGURA 4.18 - Comparativo do espectro experimental com *in silico*.



No MS-FINDER, os dados são exportados para o GNPS. O GNPS agrupa os espectros consensos, comparados pelo MS/MS e o mesmo precursor, formando nós. Os nós, ou nós, contêm a abundância de cada um dos íons que podem ser gerados de um composto, dessa forma ficando agrupado nos nós todos os espectros de uma mesma substância. Esses nós posteriormente são agrupados por similaridade. A cor e a largura desses arcos de agrupamento representam o grau de similaridade química entre os espectros MS/MS dos nós em consenso, gerando as conhecidas redes moleculares. A rede molecular obtida nessa análise pode ser melhor compreendida a partir da imagem representativa (FIGURA 4.19) fornecida pela plataforma GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/>).

FIGURA 4.19 - Rede evidenciando os nodos formados por diferentes íons e o agrupamento por similaridade.



Fonte: Adaptado de Schmid et al., (2021) e retirado de <https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/fbmn-iin/>.

A partir de todo esse processamento, as redes moleculares (FIGURA 4.20 e FIGURA 4.21) completas obtidas, após a remoção do branco, trouxeram uma diversidade de informações de diferentes classes, formando o perfil das folhas de *P. sellowii* obtido por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) e redes moleculares, com estruturas e classes consideradas inéditas para o gênero, que serão discutidas nos seguintes tópicos. Nessas redes não ampliadas, fica evidenciado as classes encontradas de modo geral na espécie, que possuem pelo menos um nodo anotado pela biblioteca GNPS (WANG et al., 2016).

FIGURA 4.20 - Rede molecular gerada após o FBMN, com evidência das classes, usando dados MS/MS com um modo de ionização negativo.

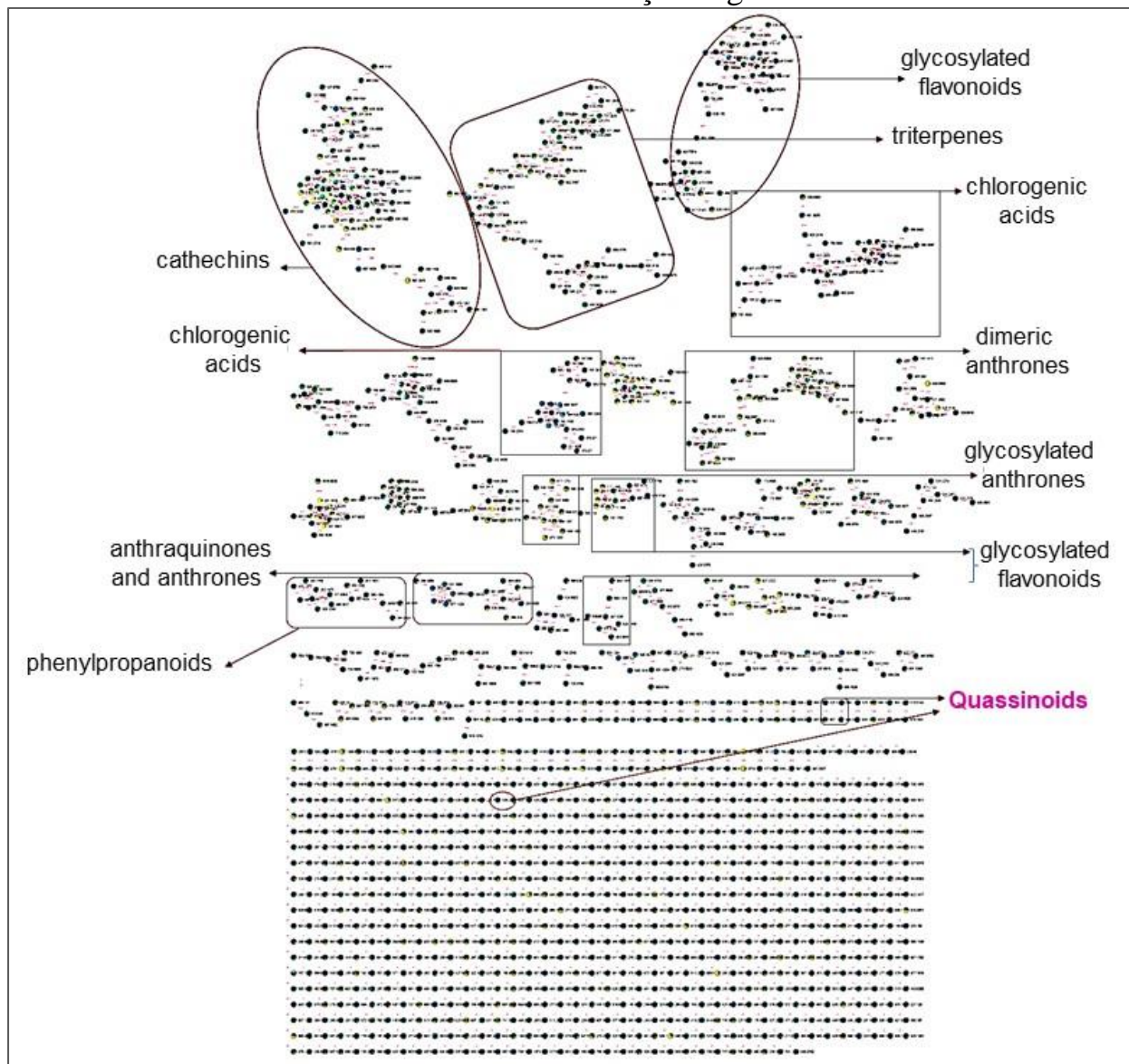
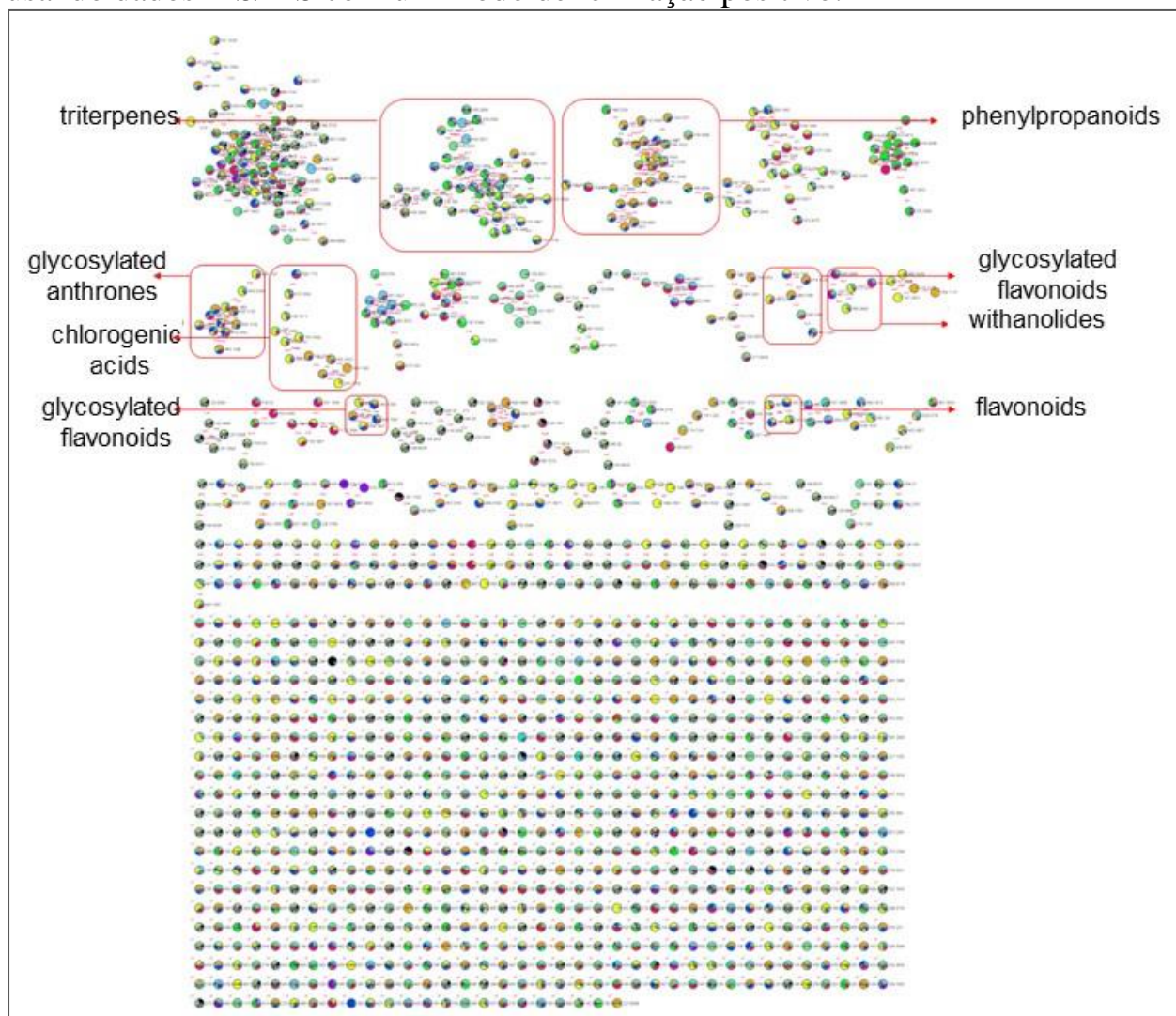


FIGURA 4.21 - Rede molecular gerada após o FBMN, com evidência das classes, usando dados MS/MS com um modo de ionização positivo.



4.2.2 - Dados obtidos com base nas redes moleculares

Inesperadamente para este trabalho, os dados anotados nos modos positivo e negativo nas análises realizadas com a espécie, além de exibirem a presença de compostos conhecidos, como antraquinonas, antronas e antronas glicosiladas já reportadas anteriormente na espécie *P. sellowii* (APONTE et al., 2008; BALDERRAMA et al., 2001), evidenciavam uma rede de famílias químicas que

eram bem distintas do que foi encontrado na literatura e também relacionadas às espécies já trabalhadas por Silva e outros colaboradores deste grupo de pesquisa. Como observado nas imagens, FIGURA 4.20 e FIGURA 4.21, a rede molecular permitiu a visualização de flavonóis glicosilados, catequinas, ácidos clorogênicos, vitanolídeos, antranas diméricas e quassinoides. A TABELA A.14, no Apêndice, contém os principais dados desses espectros. Essas informações novas obtidas podem ter sido perdidas em trabalhos passados porque uma técnica analítica sensível que permitisse a detecção, identificação e quantificação de uma variedade de compostos vegetais, mesmo em baixa abundância, ainda não havia sido estabelecida em nosso laboratório. Como resultado, há uma grande chance de que flavonóides glicosilados, catequinas, ácidos clorogênicos, vitanolídeos, antranas diméricas e quassinoides não tenham sido obtidos devido à ausência de instrumentos de LC-MS em nosso laboratório naquele momento.

Essa descoberta e o contínuo interesse no estudo taxonômico da família, direcionou o trabalho para a realização de novas análises em LC-MS/MS a partir da investigação e comparação do perfil químico de *P. sellowii* com outras espécies do gênero *Picramnia*. Dessa forma foram utilizados extratos de quatro espécies, que integravam a biblioteca de extratos (extratoteca) do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar. As espécies foram *P. bahiensis* Turcz., *P. ciliata* Mart., *P. glazioviana* Engl., e *P. oreadica* Pirani, cujas informações estão listadas na TABELA 4.11.

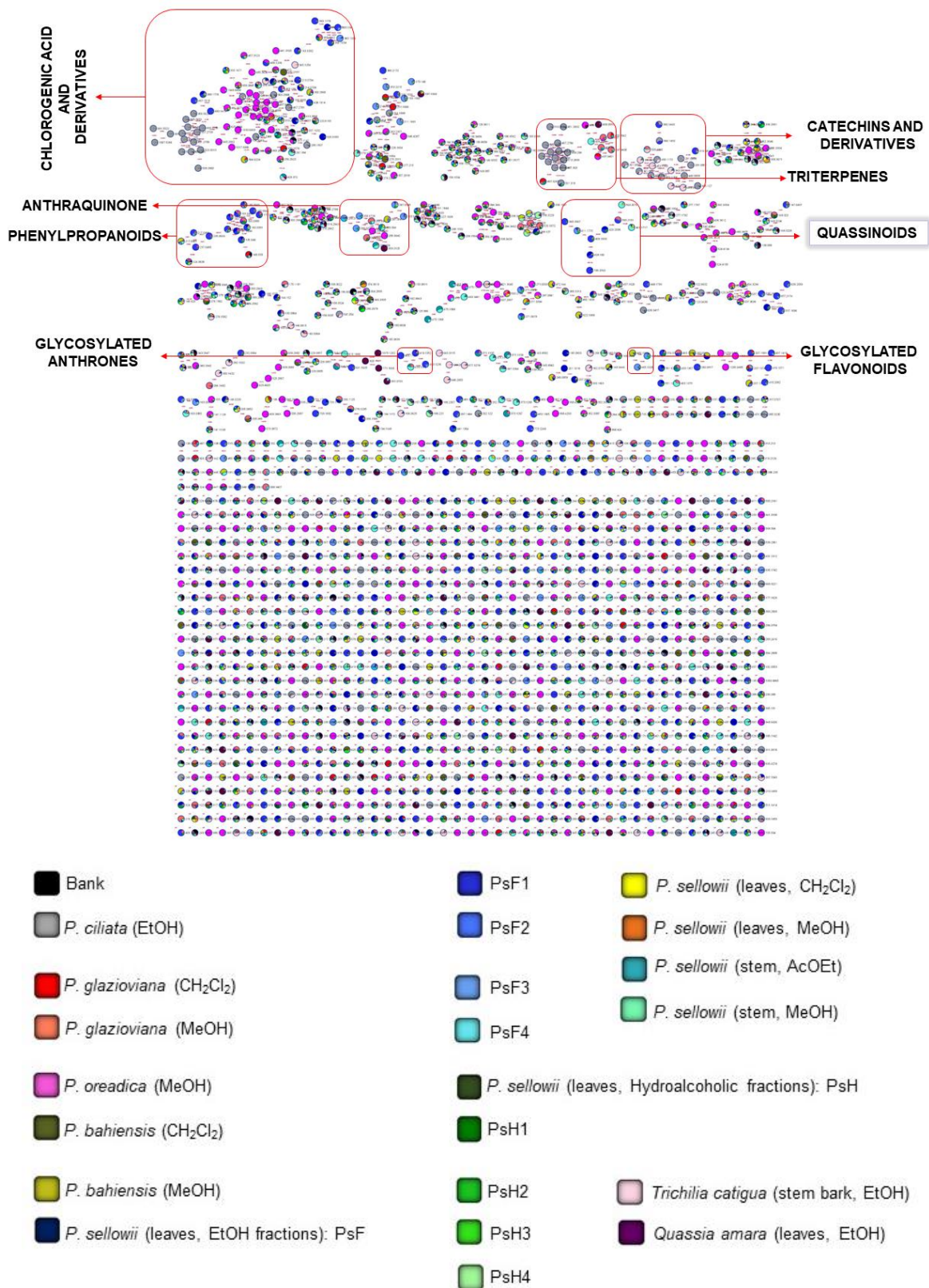
De modo geral, após a reunião de todos os dados das análises, as famílias químicas anotadas obtidas nos modos de ionização negativo e positivo foram amplamente detectadas em todas as espécies de *Picramnia* estudadas. Além disso, objetivando a identificação e detecção dos quassinoides, os extratos da biblioteca também foram analisados usando uma comparação direta com padrões autênticos identificadas a partir de extratos etanólicos de *Quassia amara* L. e

Trichilia catigua A.Juss., espécies da família Simaroubaceae e Meliaceae, respectivamente. Assim, obtendo a rede molecular de todas amostras das espécies de *Picramnia*, bem como das espécies *Quassia amara* e *Trichilia catigua*, usando dados MS/MS com modo de ionização positivo e negativo. As cores representam os extratos apresentados de acordo com a legenda (FIGURA 4.22) e as famílias moleculares de flavonóides glicosilados, catequinas, ácidos clorogênicos, vitanolídeos, antranas diméricas e quassinoides serão discutidas nos próximos tópicos. A rede molecular gerada no modo de ionização negativo encontra-se no Apêndice (FIGURA A.41).

TABELA 4.11 - Informações dos extratos de espécies de *Picramnia* utilizados nas análises.

Espécie	Parte da planta	Tipo de extrato
<i>P. glazioviana</i>	Galhos	MeOH
	Folhas	CH ₂ Cl ₂
<i>P. ciliata</i>	Folhas	EtOH
<i>P. bahiensis</i>	Folhas	CH ₂ Cl ₂
		MeOH
<i>P. oreatica</i>	Galhos	EtOH

FIGURA 4.22 - Rede molecular para amostras das espécies *Picramnia*, *Quassia amara* e *Trichilia catigua*, usando dados MS/MS com modo de ionização positivo.



4.2.3 - As classes de metabólitos secundários observadas em espécies de *Picramnia*

A partir de todas as análises foi obtida uma rede molecular constituída pelas classes de compostos: os flavonoides glicosilados, catequinas, ácidos clorogênicos, vitanolídeos, antronas diméricas e quassinoides em espécies de *Picramnia*. Abordando de modo geral, os flavonoides são uma classe de metabólitos secundários fenólicos produzidos por plantas e fungos, possuem mais de 15.000 compostos que são de ocorrência natural, amplamente distribuídos na natureza (SLÁMOVÁ et al., 2018). Já as catequinas são as unidades estruturais básicas dos taninos condensados, que são encontrados em muitas plantas medicinais (BAE et al., 2020).

Tratando-se dos ácidos clorogênicos, são compostos fenólicos de ocorrência natural encontrados em todas as plantas superiores e, do ponto de vista químico, constituem uma grande família de ésteres formados entre o ácido quínico e um ou mais derivados do ácido trans-hidroxicinâmico, mais comumente cafeico, *p*-cumárico e ácido ferúlico (GIL e WIANOWSKA, 2017). Os vitanolídeos, do inglês *withanolides*, são um grupo de esteroides C₂₈ polioxigenados de ocorrência natural, construídos sob um esqueleto ergostano e suas estruturas podem variar com base no grau de insaturação de seus anéis e no número de substituintes oxigenados (CHEN, HE e QIU, 2011). Os quassinoides que podem variar em diferentes grupos de esqueletos básicos, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₂ e C₂₅, são triterpenos degradados altamente oxigenados que são encontrados de forma exclusiva nas plantas da família Simaroubaceae (ALMEIDA et al., 2007; VIEIRA e BRAZ-FILHO, 2006).

Antraquinonas, antronas e oxantronas são de grande interesse em *Picramnia*, o que raramente levou pesquisadores a procurarem por outras classes de compostos que podem ter potencial importância sistemáticas e importantes que

venham a estar presentes na planta. Como exemplo, flavonoides (incluindo catequinas e flavanona-cromona) e ácidos clorogênicos, uma vez que eles são geralmente encontrados na maioria, senão em todas as plantas angiospermas.

Todas as cores atribuídas nesses tópicos se referem à legenda da rede molecular gerada com todas as espécies e apresentada na FIGURA 4.22. Os espectros aqui discutidos fazem parte do Apêndice (FIGURA A.50-A.71), que podem ser ampliados para melhor visualização.

4.2.3.1 - Ácidos clorogênicos e derivados

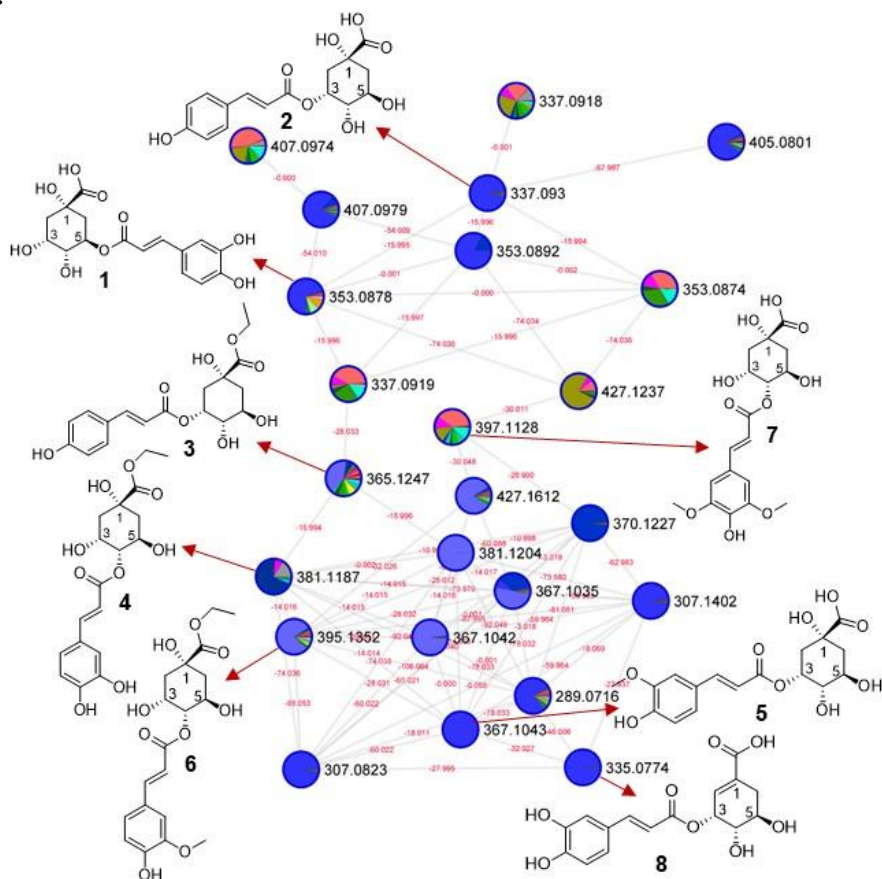
Enfatizando sobre a presença dos ácidos clorogênicos anotados, eles foram amplamente detectados em vários extratos brutos e frações de *P. sellowii*. Nas famílias anotadas de ácido clorogênico obtidas no modo de ionização negativa (FIGURA 4.23), a monoesterificação ocorre na posição 3 ou 5, e 4 do ácido quínico com os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinapínico. Eles foram detectados principalmente nas frações etanólicas PsF1–PsF3, obtidas após purificação em coluna SPE, bem como em *P. bahiensis*, *P. ciliata*, *P. glazioviana* e *P. oreadica*.

Alguns desses ácidos clorogênicos encontrados podem ser artefatos do procedimento de isolamento (a carboxila do ácido quínico sendo esterificada pelo etanol). A FIGURA 4.23 apresenta ácidos clorogênicos e ácido cafeoilquínico, ácido 5-*O*-cafeoilquínico (1), ácido 3-*O*-*p*-cumaroilquínico (2), 3-*O*-*p*-cumaroilquinato de etila (3), 4-*O*-cafeoilquinato de etila (4), ácido trans-3-*O*-feruloilquínico (5), 4-*O*-feruloilquinato de etila (6), ácido 4-*O*-sinapoilquínico (7) e ácido 3-*O*-cafeoilchiquímico (8). Até onde se sabe na literatura encontrada, este é o primeiro relato sobre ácidos clorogênicos e ácido 3-*O*-cafeoilchiquímico de Picramniaceae. Além disso, a *Picramnia* possui ácido clorogênico como derivado do ácido 5-*O*-

cafeoil-quínico (**1**) em comum com a *Trichilia catigua*, que foi isolada da casca do caule (LONGHINI et al., 2017).

O ácido quínico foi numerado de acordo com a nomenclatura da IUPAC (1976). A nomenclatura atual usada para os ácidos clorogênicos é ambígua, visto que a porção do ácido quínico é um tipo de ciclitol e pelas regras descritas no sistema IUPAC, o ácido clorogênico é o ácido 5-*O*-cafeoilquínico. No entanto, quando a IUPAC publicou as regras para compostos de ciclitol (1976), o nome trivial ácido clorogênico era conhecido como ácido 3-*O*-cafeoilquínico. De acordo com a IUPAC, parece mais apropriado tratar os ácidos clorogênicos como ciclitóis (KREMR et al., 2016; MAGAÑA et al., 2021).

FIGURA 4.23 - *Cluster* dos ácidos clorogênicos e ácido 3-*O*-cafeoilshiquímico produzidos por amostras das espécies *Picramnia*, *Quassia amara* e *Trichilia catigua*, com modo de ionização negativo. As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda. MS não detecta estereoquímica, exceto em alguns casos particulares.



4.2.3.2 - Catequinas e derivados

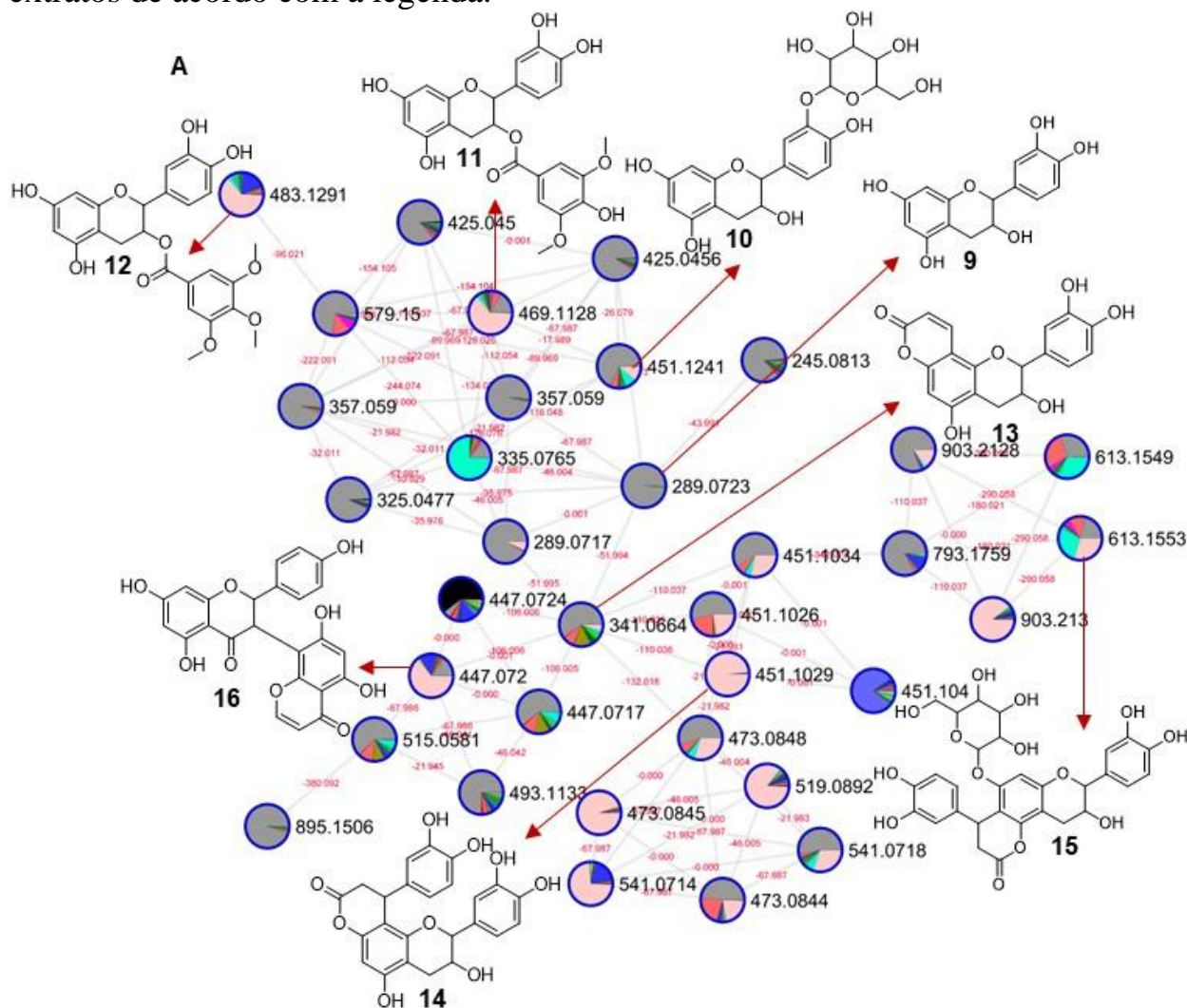
As catequinas foram amplamente detectadas em amostras obtidas de *P. ciliata*, mas encontrados de forma limitada entre as outras espécies de *Picramnia*, como *P. sellowii* (FIGURA 4.24). Além disso, as catequinas se mostraram mais comuns em *T. catigua*. A catequina ou epicatequina (**9**) só foi observada em amostras de *P. ciliata*, a catequina-3'-*O*-glucopiranosídeo ou catequina-3'-*O*-glucuronídeo (**10**) se apresentou como responsável por quase todo tamanho do nodo para *P. ciliata*. Derivados *O*-metilados da catequina-3-*O*-galato simples foram encontrados em maior porcentagem em *T. catigua* quando comparados às espécies de *Picramnia*, como catequina-3-*O*-galato-3",5"-dimetil (**11**) (ou lisidiciquina (QU et al., 2008) e catequina-3-*O*-galato-3",4",5"-trimetil (**12**) [ou 3-*O*-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-epicatequina] (AGBO et al., 2014).

A catequina simples conhecida que contém um substituinte δ -lactona, filocumarina (**13**) (C-8,C-7-*O*- δ -lactona-catequina ou C-8,C-7-*O*- δ -lactona-epicatequina) foi detectada em maior teor em *P. ciliata*. Apesar de nomes triviais serem mais convenientes, esse método de nomenclatura leva a alguma confusão. A maioria desses nomes triviais são derivados do nome botânico, por exemplo, filocumarina provém de *Phyllocladus trichomanoides* (Podocarpaceae) (FOO, 1989). Entretanto, esses nomes triviais acabam se tornando cada vez mais artificiais por não fornecerem informações sobre a estrutura química ou a biossíntese do composto.

Espécies de *Picramnia* e *T. catigua* apresentam algumas semelhanças marcantes em termos de produção de epicatequinas ou catequinas substituídas por fenilpropanóides (flavanlignanas). No entanto, a cinchonaína Ia (**14**) ou cinchonaína Ib, e seus derivados epi- e catequinas, respectivamente, foram detectados apenas em *T. catigua*, enquanto a cinchonaína Id 7-*O*- β -D-glucopiranosídeo (**15**) foi encontrada

tanto em *T. catigua*, quanto em espécies de *Picramnia*. Algumas flavanlignanas já foram isoladas de espécies de *Trichilia* (RESENDE et al., 2011; KOWA et al., 2019; GOMES et al., 2020), porém, cinchonaína Id 7-O-β-D-glucopiranosídeo (**15**) (ITO et al., 2000) foi detectado pela primeira vez nesta espécie, sugerindo que *T. catigua* deve ser reexaminada para encontrar e isolar este composto para caracterização e confirmação. Esse pode ser considerado como o primeiro registro de catequinas e flavanonas-cromonas de *Picramnia* ou de outros gêneros de Picramniaceae, reforçando que Picramniaceae tem forte afinidade com *Trichilia* (Meliaceae).

FIGURA 4.24 - Cluster de catequinas e flavanona-cromona produzidas por espécies de *Picramnia*, e amostras de *Trichilia catigua*. As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda.

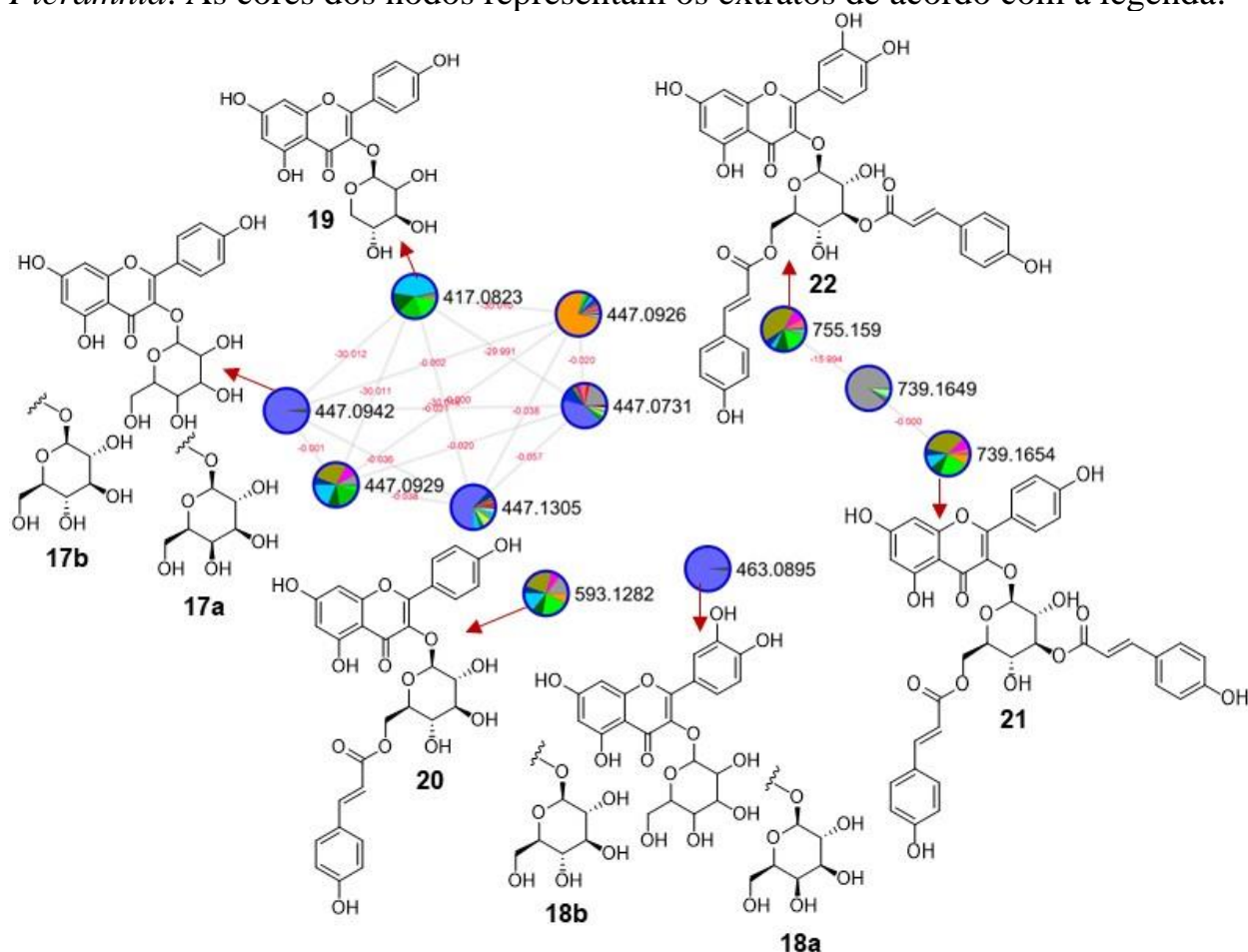


4.2.3.3 - Flavonoides

Os flavonóis glicosilados (FIGURA 4.25) parecem ser mais comuns em espécies de *Picramnia*, incluindo canferol-3-*O*- β -D-galactosídeo (trifolina) (**17a**) ou canferol-3-*O*- β -D-glucosídeo (astragalina) (**17b**) (AZIMOVA e VINOGRADOVA, 2013; RIAZ et al., 2018), quercetina-3-*O*- β -D-galactosídeo (hiperosídeo) (**18a**) (AZIMOVA e VINOGRADOVA, 2013; RAO et al., 2019) ou quercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (isoquercetrina) (**18b**) (KIM et al., 2004), canferol-3-*O*- α -L-arabinosídeo (canferol-3-*O*- β -D-xilósido) (**19**) (ISHIKURA e SATO, 1977; CHO et al., 2003), canferol-3-*O*-(6-*O*-*trans*-*p*-cumaroil)-glicopiranosídeo (**20**) [sinônimos: tribulosídeo (6"-*O*-*p*-cumaroiltrifolina) 6"-*O*-(*p*-cumaroil)astragalina, tilirosídeo], canferol-3-*O*-(3,6-di-*O*-*trans*-*p*-cumaroil)-glicopiranosídeo (**21**) [Sinônimos: 3" ,6"-Di-*O*-(*p*-cumaroil)astragalina, (3",6"-di-*O*-*p*-cumaroiltrifolina)] (JUNGBLUT et al., 1995) e 3",6"-di-*O*-(*p*-cumaroil)isoquercetrina (**22**) [quercetina, 3-(3",6"-di-*p*-cumarilglicosídeo)] (JUNGBLUT et al., 1995). No entanto, canferol-3-*O*- β -D-galactosídeo (trifolina) (**17a**) ou canferol-3-*O*- β -D-glicosídeo (astragalina) (**17b**) e quercetina-3-*O*- β -D-galactosídeo (hiperosídeo) (**18a**) ou quercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (isoquercetrina) (**18b**) foram observados apenas em *P. sellowii*. A quercetina-3-*O*- β -D-galactosídeo (hiperosídeo) (**18a**) foi isolada da espécie *Azadirachta indica* (Meliaceae) (RAO et al., 2019).

O gênero *Picramnia* tem sido amplamente investigado, mas não há registros de flavonóis relatados até o momento. Nas investigações deste trabalho com várias espécies, foi revelada a presença de seis flavonóis, novamente indicando a forte afinidade de *Picramnia* com Meliaceae e agora com um segundo gênero, *Azadirachta*.

FIGURA 4.25 - *Cluster* de flavonóis produzidos por amostras de espécies de *Picramnia*. As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda.



4.2.3.4 - Antraquinonas, antronas glicosiladas, oxantronas glicosiladas e antronas diméricas

Justamente pelo gênero *Picramnia* ser considerado uma fonte potencial de antraquinonas, antronas e antronas glicosiladas, seus extratos foram investigados apenas em busca de novos tipos. Antraquinonas glicosídicas já foram relatadas em *P. glazioviana*, *P. latifolia* Tul. (DIAZ et al., 2004) e *P. teapensis* (RODRÍGUEZ-GAMBOA et al., 2000). No entanto, o crisofanol-8-*O*- β -D-glicosídeo (**23**) (MALIK e MÜLLER, 2016) foi detectado quase que em todo o nodo pela primeira vez em *P. bahiensis* e menor presença em *P. oreadica* e *P. sellowii*.

Uma antrona C-glicosilada, picramniosídeo D (**24**), foi relatado em *P. teapensis* (RODRÍGUEZ-GAMBOA et al., 1999) e, neste estudo, foi detectado nos extratos e frações de *P. sellowii*. A segunda antrona C-glicosilada (**25**) exhibe resultados de MS/MS semelhantes ao picramniosídeo D (**24**), exceto pela presença de um grupo benzoíla. Os fragmentos observados em m/z 297 $[C_{17}H_{13}O_5]^-$ nos espectros de ambos os compostos, são provenientes da perda de ácido benzóico em **24** e H_2O em **25**, e posterior clivagem retro-Diels-Alder do anel glicosil, que permitiu a atribuição da molécula desprotonada em 403,1030 $[M-H]^-$ para o composto **25** e sua estrutura foi estabelecida como debenzoil-picramniosídeo D (FIGURA A.71). Este parece ser um novo composto detectado apenas em extratos e frações de *P. sellowii*.

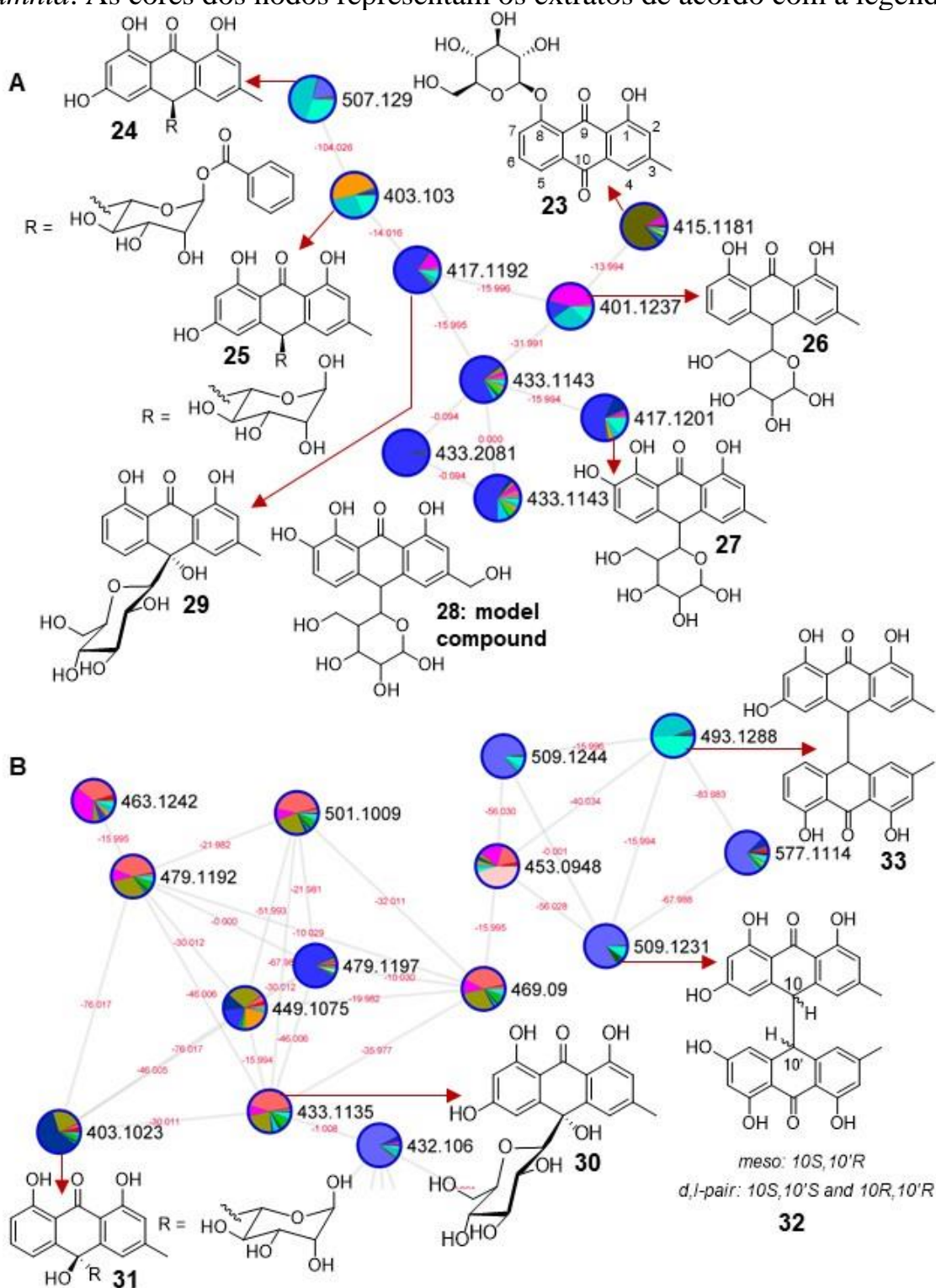
As antronas C-glucosídeos, crisaloína (11-desoxialoína) (**26**) e nataloína (**27**), (FRANZ e GRÜN, 1983; EL SAYED et al., 2016) foram detectadas pela primeira vez em espécies de *Picramnia*. As antronas: **26**, foi detectada principalmente em *P. oreadica* e **27**, em *P. sellowii* (fração PsF1). Uma antrona C-glucosídica também foi identificada por comparação com um composto modelo, a 7-hidroxioloína B (**28**), isolado de *Aloe vera* (L.) Burm.f. (KUSHWAHA et al., 2021). As oxantronas C-glicosiladas, cassialoína (**29**) e rumejaposídeo E (**30**) (KRENN et al., 2004; JIANG et al., 2007; YANG et al., 2013) foram detectados nos extratos e frações de *P. sellowii*, e em *P. oreadica* e *P. bahiensis*.

A oxantrona C-glicosídica, mayosídeo D [10-C-(4-O-benzoil-R-arabinopiranosil)-3-metil-1,8,10-trihidroxiantracên-9-ona] foi relatada a partir de *P. latifolia* (DIAZ et al., 2004). O composto **31** forneceu dados de MS/MS que suportam um α -arabinopiransídeo e um grupo hidroxila em C-10 de um esqueleto antrônico, suportando a estrutura proposta para **31** como debenzoil-maiosídeo D. O espectro de massas mostrou uma molécula desprotonada em 403,1030 $[M-H]^-$ e fragmentos em m/z 270 $[C_{15}H_{10}O_5]^-$ e 253 $[C_{15}H_9O_4]^-$. O grupo hidroxila em C-10 auxilia a

clivagem da ligação C10-C-arabinopiranosídeo, levando a um esqueleto de antraquinona com m/z 253 $[C_{15}H_9O_4]^-$. O fragmento em m/z 270 ocorre devido à perda de H_2O , seguido da clivagem retro-Diels-Alder do anel α -arabinopiranosídeo, levando a um eten-1-ol em C-10, que perde acetileno com migração de hidroxila para C-10, seguido pela perda do radical hidrogênio para dar o ânion radical de elétrons pares $[C_{15}H_{10}O_5]^{\cdot-}$ com m/z 270 (FIGURA A.72). Os dados de MS/MS apoiam a presença de debenzoil-mayosídeo D em *P. bahiensis* e os extratos e frações de *P. sellowii* (FIGURA 4.26). O composto **31** parece ser um novo composto. De modo geral, fica evidente que mais investigações fitoquímicas detalhadas das espécies de *Picramnia* serão essenciais para isolar os novos compostos **25** e **31**, e aqueles detectados pela primeira vez nas espécies estudadas.

Dímeros de diantrona e diantraquinona formados pelo acoplamento oxidativo de duas antraquinonas e antronas individuais, respectivamente, foram encontrados em plantas (YOUNES et al., 2018; MAI et al., 2001). Neste trabalho, emodina biantrona (**32**) e palmidina C (**33**) foram detectadas principalmente nos extratos e frações de *P. sellowii* (FIGURA 4.26). Este parece ser o primeiro relato sobre diantronas obtidas de Picramniaceae ou das famílias aliadas da ordem dos Sapindales. Dois glicosídeos de diantrona foram isolados de *Alvaradoa amorphoides* (Picramniaceae), que foram citadas apenas em um resumo de congresso e sua identificação espectrométrica não foi discutida (WINKELMANN et al., 2002).

FIGURA 4.26 - Cluster de antraquinonas glicosiladas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas e diantronas produzidos por amostras de espécies de *Picramnia*. As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda.



4.2.3.5 - Quassinoides

Para garantir a presença de quassinoides nas análises e que os espectros de massa pudessem ser usados como padrões autênticos, foi analisado o extrato etanólico das folhas de *Quassia amara*, no qual esperávamos encontrar quassinoides. *Quassia* é um membro da família Simaroubaceae que nunca teve sua classificação questionada. Os quassinoides foram detectados em maior porcentagem nesta espécie do que na *Picramnia* (FIGURA 4.27).

Os quassinoides conhecidos, picrasin G (**34**) e nigaquilactona K (**35**), foram detectados pela primeira vez em *Q. amara*, e ambos foram relatados na espécie *Picrasma quassioides* (DUAN et al., 2021; XU et al., 2016). O quassinóide **36** apresentou dados de MS/MS semelhantes a **35**, e ambos fornecem um fragmento devido à perda neutra de CO₂ resultando nos fragmentos em m/z 403,1762 [M-H]⁻ e em m/z 359 [M-H-CO₂]⁻, 405,1925 [M-H]⁻, e 361 [M-H-CO₂]⁻, respectivamente (FIGURA A.73). Ambos os compostos fornecem fragmentos pela perda neutra de H₂O em m/z 341 e 343, dos fragmentos em m/z 359 e 361, respectivamente. A perda de água ocorreu aparentemente no álcool terciário C-13. O espectro de massas indicou 2 unidades de massa a menos para o composto **36**, sugerindo uma carbonila em C-11, pois era o único local restante no esqueleto que permitia a formação de uma carbonila em comparação com o quassinóide **35**. Assim, o único local para formar um o ânion hidroxila em **36** estava em C-13, o que implica que a perda de H₂O ocorre por uma via diferente. Um átomo de H na posição α em relação ao grupo C=O é removido pelo ânion hidroxila em C-13, formando um grupo hidroxila em C-13. Sua desprotonação forma o ânion conjugado enolato com o grupo carbonila em C-11, e a subsequente eliminação de H₂O resulta no fragmento 13,18-eno em m/z 341. O fragmento em m/z 247 proveniente da clivagem retro-Diels-Alder do anel-A, ocorre apenas no quassinóide **36** (FIGURA A.73). O quassinóide **35** não mostrou um

fragmento semelhante, presumivelmente devido ao seu envolvimento na interação de ligação de hidrogênio intramolecular (quelação) com o grupo hidroxila em C-11 e o grupo carbonila em C-1. Assim, o fragmento em m/z 247 suporta a estrutura proposta de **36** como 11-oxonigaquilactona K.

Algumas correspondências relacionadas a esta família molecular incluem o derivado de indaquassina, **37**, com uma molécula desprotonada em 509,2033 $[M-H]^-$ e fragmento em m/z 409 para $[M-H-C_5H_8O_2]^-$, indicando a presença de um substituinte tigloiloxila ($CH_3CH=CCH_3COOR$) em seu esqueleto. Dois derivados de indaquassin são esterificados por ácido tigloil em C-6, indaquassin D e E. Ainda, indaquassin E tem a fórmula química $C_{25}H_{34}O_{11}$ e massa molecular exata de 510,21011 Da. Assim, o derivado indaquassin foi caracterizado como indaquassin E (**37**). Indaquassin E foi relatado em *Q. indica* (DUAN et al., 2021).

Impreterivelmente, a ênfase tem sido dada aos quassinoides que foram encontrados em espécies de *Picramnia*, onde um deles foi detectado em modo de ionização positiva, o shinjuglicosídeo B (**38**) (FIGURA 4.27), que foi relatado em *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) (DUAN et al., 2021).

Várias correspondências com quassinoides foram observadas em todas as amostras analisadas, entretanto, apenas um pequeno *cluster* nesta família molecular foi identificado no modo de ionização negativa, onde o aglomerado consistia em 4 quassinoides. No modo de ionização positiva, apenas um quassinoide foi identificado. No entanto, avaliando os espectros MS e MS/MS obtidos nas análises, dois deles (FIGURA A.67, Apêndice), correspondem a dois quassinoides com fragmentações características que confirmam suas respectivas estruturas, ou seja, quassin e bruceína M. No modo de ionização positiva quassin (FIGURA A.74, Apêndice) produziu uma molécula protonada em 389,1944 $[M+H]^+$ e íons produtos a m/z 343 $[M+H-CO_2-H_2 = C_{21}H_{27}O_4]^+$, 301 $[M+H-CO_2-CO-CH_4 = C_{19}H_{25}O_3]^+$, 269 $[m/z$ 301 $- H_3COH = C_{18}H_{21}O_2]^+$, 251 $[m/z$ 269 $- H_2O = C_{18}H_{19}O]^+$ e 223 $[m/z$ 251 $-$

$\text{CO} = \text{C}_{17}\text{H}_{19}]^+$ (Esquema S6). Quassin já foi relatado em *Picrasma quassioides* (DUAN et al., 2021). A bruceína M (FIGURA A.75, Apêndice) foi obtida no modo de ionização negativa e mostrou uma molécula desprotonada em 425,1814 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e íons produtos em m/z 351 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{C}=\text{O} = \text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_6]^-$, 292 $[m/z$ 351 $-\text{H}_2\text{C}=\text{O}-\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{O}^\bullet = \text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4]^-$, e 230 $[m/z$ 292 $\text{HOHC}=\text{CHOH}-\text{H}_2 = \text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2]^-$. Na literatura, a bruceína M foi isolada da *Brucea javanica* (DUAN et al., 2021). Neste trabalho, quassin foi detectado apenas em *Quassia amara* e bruceína M estava presente nas frações etanólicas PsF2 e PsF3, e na fração hidroalcoólica PsH2 de *P. sellowii*, no extrato metanólico dos galhos de *P. glazioviana* e extrato etanólico das folhas de *P. ciliata*.

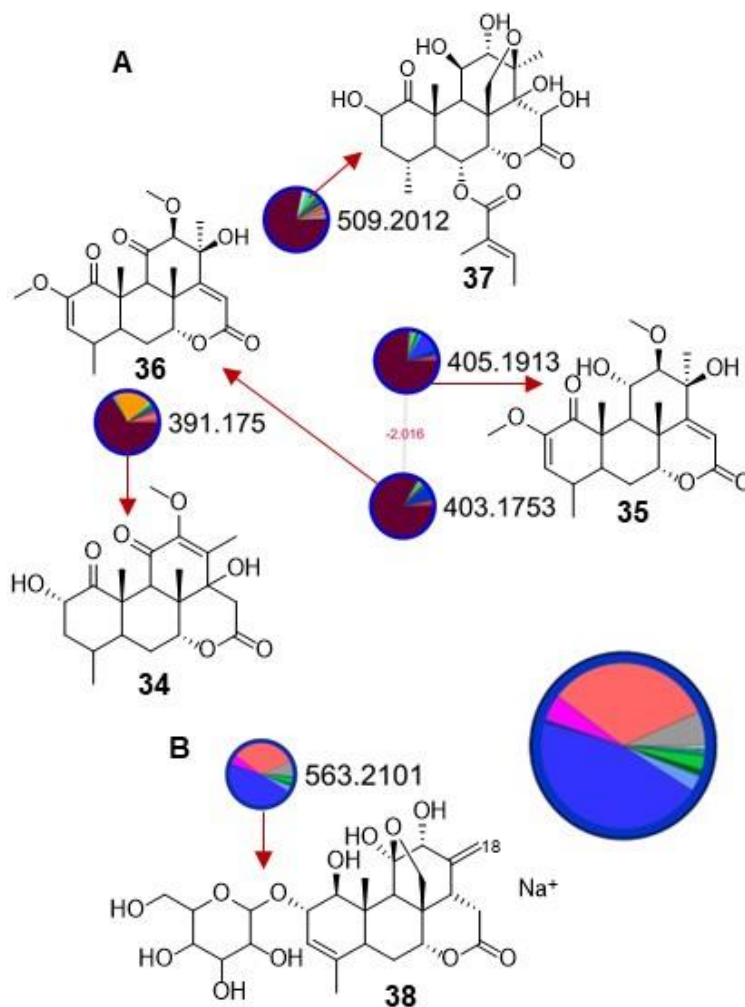
É notável que as espécies de *Picramnia* produzem quassinoides tipicamente de simaroubaceos. Os quassinoides **34–37** foram detectados em maior quantidade em *Q. amara*, em ordem decrescente de quantidade, **34** em *P. glazioviana*, *P. oreadica* e *P. sellowii*, **35–37** em *P. sellowii* e *P. oreadica*. O quassinóide **38** só foi detectado em espécies de *Picramnia*, em ordem decrescente de quantidade, em *P. sellowii*, *P. glazioviana*, *P. ciliata* e *P. oreadica*.

Todos os quassinoides detectados são quassinoides C_{20} , que é um grande grupo com mais de 300 compostos (DUAN et al., 2021). Os quassinoides detectados possuem um esqueleto de carbono intacto, que indicam de forma convincente a forte afinidade entre *Picramnia* e gêneros simaroubaceos. O que pode levar a concluir que *Ailanthus*, *Brucea*, *Picrasma* (Simaroubaceae) e *Picramnia* parecem estar intimamente relacionados por esses quassinoides detectados. *Picramnia* tem em comum os quassinoides **34**, **35**, e quassin com *Picrasma*, e **38** em comum *Ailanthus* e bruceína M com *Brucea*.

Quassia é conhecido por conter um quassinóide C_{25} , cinco quassinoides C_{20} e cinco quassinoides C_{19} (DUAN et al., 2021). No entanto, novas investigações

sobre a espécie *Q. amara* serão essenciais para isolar o novo composto **36** e aqueles detectados pela primeira vez nesta espécie estudada (**34**, **35** e quassin).

FIGURA 4.27 - *Cluster* de quassinoides produzidos por espécies de *Picramnia* e amostras de *Quassia amara*, com um modo de ionização negativo A e modo de ionização positivo B. As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda.



4.2.3.6 - Vitanolídeos

Os vitanolídeos são lactonas esteróides oxigenadas que ocorrem em várias espécies de Solanaceas e também foram identificados pela rede molecular do GNPS. Eles também foram relatados nas famílias: Taccaceae, Fabaceae, Dioscoreaceae, Myrtaceae e Lamiaceae, parecendo estarem completamente ausentes

nas famílias Sapindales (DHAR et al., 2015). Aparentemente, esta é a primeira vez que a ocorrência de vitanolídeos é relatada em espécies de *Picramnia*, o que diferencia esse gênero de todos os outros gêneros de Simaroubaceae.

Os vitanolídeos foram detectados em quantidades muito maiores em *P. ciliata*, mas também aparecem em *P. sellowii* e *P. glazioviana* (FIGURA 4.28). Os tipos de vitanolídeos descritos aqui são mais conhecidos em Solanaceae como 4 β ,27-dihidroxi-1-oxo-7-acetoxivita-2,5,24-trienolideo, 2,3-dihidro-3-metoxivitaferin A em *Iochroma gesnerioides* (ALFONSO e KAPETANIDIS, 1994) e daturametelina I em *Datura metel* (MISICO et al., 2011). Os *clusters* desta família molecular incluem um derivado de vitanolídeo (**39a**) como uma molécula desprotonada em 529,2805 [M-H]⁻ e o íon fragmento em *m/z* 483 para [M-H-HCOOH]⁻, indicando um aduto formado pelo ácido fórmico (FIGURA A.76, Apêndice). O derivado de vitanolídeo **39** como uma molécula desprotonada em 483,2904 [M-H]⁻ também foi observado e exibiu resultados espectrais de MS/MS semelhantes aos de **39a**, com exceção da presença de um grupo formiato. O fragmento em *m/z* 151 devido à clivagem retro-Diels-Alder do anel-B e a posterior perda de um CO deu uma boa indicação dos padrões de substituição dos anéis A e B, suportando a presença do sistema 4 β -hidroxi-1-oxo-7-metoxivita-2,5-dienolideo (FIGURA A.77, Apêndice). Estes dados confirmaram a presença de 4 β ,27-dihidroxi-1-oxo-7-metoxivita-2,5,24-trienolideo (**39**). O ácido fórmico reage com uma das ligações duplas carbono-carbono no composto **39** para produzir **39a** (FIGURA 4.28). O composto **39** parece ser novo, diferindo daquele isolado de *Iochroma gesnerioides* citado acima pela mudança no substituinte em C-7 (ou seja, -OMe no primeiro e -OAc no segundo).

Um segundo derivado de vitanolídeo foi identificado (**40a**) como uma molécula desprotonada em 691,3318 [M-H]⁻ e um fragmento em *m/z* 645 para [M-H-HCOOH]⁻, também indicando um aduto com o ácido fórmico (FIGURA A.78, Apêndice). O fragmento em *m/z* 483 [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻ indicou a presença de um

substituinte glicosil. Além disso, a existência de um fragmento em m/z 439 para $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO_2]^-$ indicou que o substituinte glicosil estava localizado em C-27 em comparação com os dados espectrais de MS/MS obtidos para o composto **39**. Com base na evidência acima, o segundo derivado vitanolídico foi o 27-glucosil-4 β -hidroxi-1-oxo-7-metoxivita-2,5,24-trienolídeo (**40**) (FIGURA 4.28).

As anotações incluíam o derivado daturametelina I (**41**). A daturametelina I (27-glucosil-7-hidroxi-1-oxovita-3,5,24-trienolideo) tem uma fórmula química de $C_{34}H_{48}O_{10}$ com uma massa molecular exata de 616,32475 Da. O espectro de massa de **41** exibiu uma molécula desprotonada em 467,2800 $[M-H]^-$ para $C_{29}H_{39}O_5$ e sua comparação com a daturametelina I indicou a ausência do substituinte glicosil em C-27 ($C_{34}H_{48}O_{10} - C_6H_{10}O_5 = C_{28}H_{38}O_5$) e a presença de um grupo metoxila em C-7 ($C_{28}H_{38}O_5 + CH_2 = C_{29}H_{39}O_5$). O fragmento observado em m/z 452 para $[M-H-Me]^-$ e a perda de CO_2 novamente levou ao ânion $[C_{27}H_{36}O_3]^-$ em m/z 408, o que foi consistente com a perda de um radical metila em C-10, deixando um radical em C-10 estabilizado via conjugação com a ligação dupla C5-C6. A perda de CO_2 manteve o radical, confirmando a sua estabilidade e a presença do sistema insaturado no anel-B. Da mesma forma, a perda do radical metil, do grupo metoxil, levando a uma carbonila em C-7 com uma transferência simultânea do radical em H-7, para o radical em C-6 para dar o ânion $[C_{27}H_{33}O_5]^-$ confirmando o grupo metoxila em C-7 (FIGURA A.79, Apêndice). O pico em $[M-H-CO_2]^-$ em todos os compostos (**39–41**) é um diagnóstico para o modelo básico dos vitanolídeos, um ergostano C28 com uma cadeia lateral modificada formando uma δ -lactona entre C-22 e C-26 (FIGURA 4.28). Portanto, a substância **41** é 27-deglucosil-27-hidroxi-7-desidroxi-7-metoxi-daturametelina I, que parece ser um novo composto.

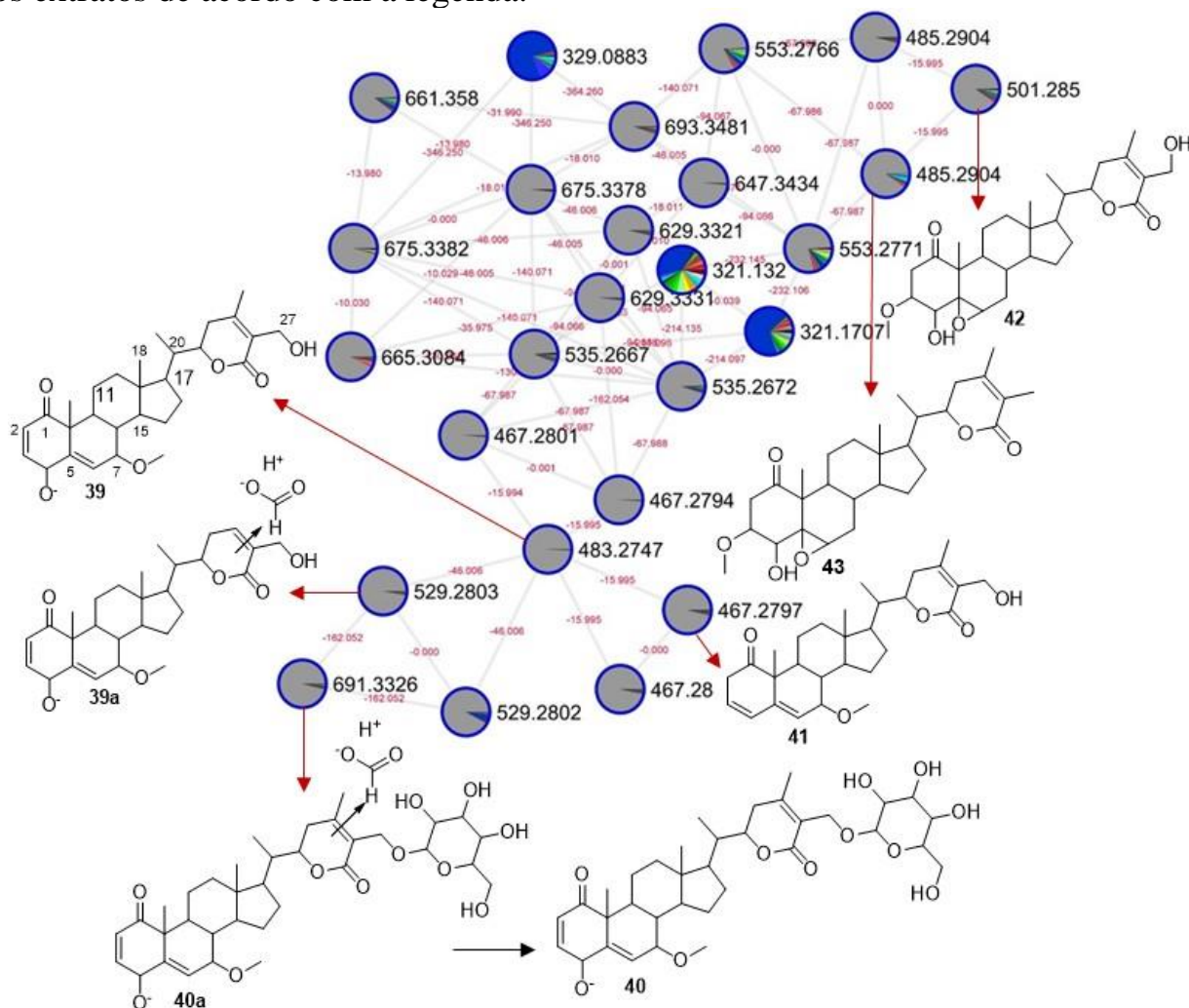
O cluster desta família molecular também incluiu 2,3-dihidro-3-metoxivitaferin A (**42**), como mencionado anteriormente e previamente isolado de *Iochroma gesnerioides*, e os dados espectrais de MS/MS obtidos foram consistentes

com sua estrutura (FIGURA A.80, Apêndice). O quinto derivado de vitanolídeo (**43**) mostrou características espectrais MS/MS de 27-desidroxí-2,3-di-hidro-3-metoxivitaferin A. Enquanto o composto **42** mostra fragmentos com perda de CO₂ e água, caracterizando a δ-lactona hidroxilada em C-27, o composto **43** mostra uma perda de CO₂ {[C₂₉H₄₁O₆⁻ - CO₂] em *m/z* 441 [C₂₈H₄₁O₄⁻]}, mas com a perda de água somente após a abertura do epóxido (FIGURA A.81, Apêndice). O 27-desidroxí-2,3-di-hidro-3-metoxivitaferin A (**43**) também parece ser um novo composto.

O estudo atual revela quatro novos compostos (**39–41** e **43**), no entanto, *P. ciliata*, *P. sellowii* e *P. glazioviana* produzem vitanolídeos simples quando comparados com os quase 650 membros diferentes desta família de compostos (MISICO et al., 2011).

Todos os dados obtidos a partir deste estudo foram organizados em uma tabela, para melhor visualização das classes anotadas em seus respectivos extratos e frações utilizados para a análise (TABELA A.17 e TABELA A.18, Apêndice).

FIGURA 4.28 - *Cluster* de vitanolídeos produzidos por amostras de espécies de *Picramnia*, com um modo de ionização negativo. As cores dos nodos representam os extratos de acordo com a legenda.



4.3 - EVIDÊNCIAS QUÍMICAS E CLASSIFICAÇÃO DE *Picramnia*

Como mencionado anteriormente, os seguintes grupos parecem ser os mais importantes nas análises realizadas: - Ácidos clorogênicos: *Picramnia* tem ácido clorogênico em comum com *Trichilia catigua*; - Catequinas: catequinas substituídas por fenilpropanoides (flavanlignanas), como as cinchonaínas, também podem ser consideradas como um indicador da afinidade de *Picramnia* com Meliaceae, onde cinchonaína Ia e cinchonaína Ib ocorrem em *T. catigua*, *T. gilgiana*

e *T. ramalhoi*; - Glicosídeos de flavonol: quercetina-3-O-galactosídeo (hiperosídeo) foram detectados em espécies de *Picramnia* e isolados do gênero intimamente relacionado *Azadirachta indica* (Meliaceae) e, portanto, glicosídeos de flavonol também podem ser considerados como um indicador de sua afinidade com Meliaceae; - Antraquinonas, antronas e antronas glicosiladas: a co-ocorrência de um grande número de antrona e oxantrona C-glicosídeos em *Picramnia* e *Alvaradoa* apontam de forma convincente para afinidades entre eles, e ambos os gêneros também compartilham antraquinonas peculiares com *Euodia meliaefolia*, *Ruta graveolens*, *Zanthoxylum acanthopodium*, e *Murraya tetramera*, gêneros rutáceos, e com *Harrisonia perforada* (Simaroubaceae), mostrando a estreita relação entre *Picramnia*, Rutaceae e Simaroubaceae; - Quassinoides: sete quassinóides foram anotados em *Picramnia*, os marcadores sistemáticos de Simaroubaceae, implicando sua reinclusão nesta família.

Uma das aplicações mais promissoras da metabolômica não direcionada na quimiotaxonomia é a identificação de biomarcadores. De fato, devido à baixa quantidade de material necessário, é possível investigar várias espécies para estudos de quimiotaxonomia e obter biomarcadores em concentrações indetectáveis. A baixa concentração de várias classes de compostos provavelmente foi responsável pela alta diversidade no conteúdo metabolômico de *Picramnia*, tendo permanecido desconhecido por vários anos.

As características químicas acima relacionam *Picramnia* em Simaroubaceae. A presença de quassinoides em espécies de *Picramnia* é persistente e comparável com sua ocorrência em gêneros simaroubaceos. Embora os quassinoides ofereçam a evidência mais convincente em favor de tal ligação, existem outros dados químicos de apoio e foram descritos anteriormente. Outra evidência a favor dessa relação vem dos ácidos clorogênicos, catequinas e flavonóides

glicosídeos, que são encontrados em grupos aliados, como Meliaceae e antraquinonas em Rutaceae.

Alvaradoa foi atribuído tanto a Simaroubaceae quanto a Picramniaceae, e o único tipo de quassinóide conhecido chaparrin (DE VILLATORO et al., 1974) foi relatado por alguns autores, mas de pouco valor na resolução de sua classificação. Esta informação é de grande importância e indica a necessidade de mais trabalhos como o desenvolvido neste estudo, que levará à anotação de quassinoides, e serão ferramentas importantes no posicionamento de *Alvaradoa* em Simaroubaceae.

A detecção de vitanolídeos em *P. ciliata*, *P. sellowii* e *P. glazioviana*, os quais parecem estar completamente ausentes nas famílias Sapindales, diferencia este gênero de todos os outros de Simaroubaceae. De fato, a ocorrência esporádica de tipos micromoleculares particulares em táxons não relacionados é um fenômeno geral (SILVA et al., 1987).

Os quassinoides detectados são típicos de sua classe e, embora haja pouca informação direta sobre sua biossíntese em *Picramnia*, não há razão para suspeitar que ela difere daquela em Simaroubaceae. As enzimas necessárias para a biossíntese de protolimonoides foram caracterizadas a partir de espécies vegetais produtoras de limonoides e quassinoides, como em Meliaceae e Simaroubaceae, e de acordo com os dados resultantes, o triterpeno (20S)-tirucalla-7,24-dien-3 β -ol é considerado o precursor geral dos limonoides e quassinoides (AARTHY et al., 2018; HODGSON et al., 2019; LIAN et al., 2020; PANDREKA et al., 2021; CHUANG et al., 2022). Se enzimas semelhantes catalisam a formação de limonoides e quassinoides, alguma conexão entre táxons contendo limonoides e quassinoides pode ser antecipada. Conforme discutido acima, os glicosídeos de flavonol também podem ser considerados como um indicador de sua afinidade com Meliaceae.

Com base nas evidências acima, a interpretação dos dados químicos é consistente com a classificação tradicional de *Picramnia* em Simaroubaceae.

4.4 - ENSAIO BIOLÓGICO

A descoberta de novos produtos naturais bioativos para a agricultura pode ser inspirada por informações populares ou alcançada pela triagem de uma coleção de extratos para bioatividade usando ensaios *in vitro* e *in vivo*. Quando um extrato natural é considerado bioativo, geralmente é realizado um fracionamento guiado por bioensaio. A falha em isolar os compostos bioativos durante o fracionamento guiado por bioensaio é muito comum e dispendiosa. Portanto, é importante detectar as moléculas bioativas candidatas antes de sua purificação, a fim de racionalizar o procedimento de isolamento aplicado a essas substâncias. Por meio da espectrometria de massas em *tandem* é possível identificar as moléculas potencialmente bioativas antes do seu isolamento. Assim, a extração das folhas de *P. sellowii* foi realizada como discutido anteriormente, e os extratos brutos diclorometano e metanol de *P. sellowii* e as frações obtidas após purificação em coluna SPE (frações etanólicas PsF1–PsF4) foram bioensaiados contra *Xanthomonas citri subsp. citri*.

O controle químico do cancro cítrico em áreas endêmicas é baseado exclusivamente em bactericidas cúpricos, por isso seu uso como controle positivo no teste de CIM. Os bactericidas cúpricos, contudo, estes não possuem atividade curativa ou sistêmica e, portanto, são aplicados no manejo preventivo do cancro cítrico. Assim, a fim de buscar novos bactericidas com baixa toxicidade ambiental, primeiro foram realizados testes microbiológicos nos extratos e frações de *P. sellowii*, avaliando sua concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Um problema generalizado com a aplicação repetida de bactericidas de cobre é o desenvolvimento de cepas resistentes a estes. Cepas resistentes ao cobre foram detectadas apenas na Argentina (BEHLAU et al., 2013). As cepas de *Xanthomonas* usadas ao longo deste estudo eram resistentes, tolerantes

e suscetíveis ao cobre. Os resultados foram promissores com as frações PsF3 e PsF2, a primeira na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CIM e CBM) contra as cepas resistentes, tolerantes e suscetíveis, a última na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CIM e CBM), 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra cepas resistentes, tolerantes e suscetíveis, respectivamente.

Anteriormente a este estudo, foi considerado que a *Picramnia* deveria receber um status de alto interesse em relação a novas investigações sobre sua atividade antibacteriana, uma vez que acumula antraquinonas, antronas e antronas glicosiladas, que são agentes bactericidas (DIAZ-MUÑOZ et al., 2018). No entanto, os dados metabolômicos baseados em LC-MS mostraram que as frações PsF3 e PsF2 são muito ricas em ácidos clorogênicos (TABELA A.15, Apêndice), enquanto os derivados de antraquinona foram encontrados apenas em quantidades limitadas (TABELA A.16, Apêndice). Dessa forma, esforços direcionados ao desenvolvimento de procedimentos de isolamento aplicado a essas substâncias foram iniciados a fim de confirmar sua respectiva atividade antibacteriana.

Os extratos brutos de diclorometano, metanol e EtOH:H₂O de *P. sellowii* e as frações obtidas após purificação em coluna SPE (frações etanólicas F1–F4) foram analisados, os resultados estão apresentados na TABELA 4.12.

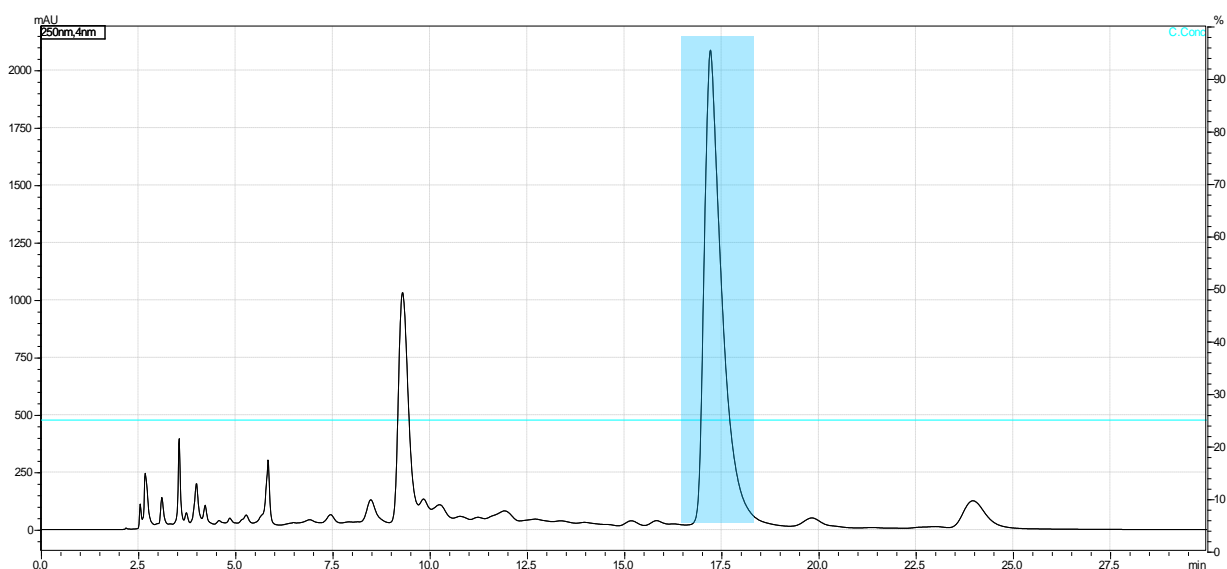
TABELA 4.12 – Resultados obtidos a partir dos ensaios de CIM e CBM.

CIM e CBM			
Amostras	Cepas resistentes	Cepas tolerantes	Cepas suscetíveis
<i>Ps</i> -EtOH	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Ps</i> -EtOH:H ₂ O	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Ps</i> -CH ₂ Cl ₂	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Ps</i> -MeOH	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Ps</i> -F1	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Ps</i> -F2	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	125 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Ps</i> -F3	125 $\mu\text{g mL}^{-1}$	125 $\mu\text{g mL}^{-1}$	125 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Ps</i> -F4	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Sulfato de cobre pentahidratado	>400 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$

4.5 - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

A partir dos dados obtidos por LC-MS/MS, o procedimento de isolamento foi iniciado pelas frações suscetíveis a presença de ácidos clorogênicos e seus derivados. Apesar de serem mais presentes nas frações PsF3 e PsF2, o início do procedimento se deu pela fração que continha maior massa após o fracionamento por SPE, assim, sendo escolhida a fração PsF1. Dessa forma, esforços foram direcionados pela busca de metodologias por HPLC-PDA no modo preparativo para isolamento das moléculas anotadas. A substância **1** foi coletada em um modo isocrático de eluição (FIGURA 4.29), com uma coluna semipreparativa de fase reversa Phenomenex® Gemini C18 (250 x 10 mm, partícula de 5 μ m), onde foram preparadas as fases: H₂O (ultrapura Milli-Q®) + ácido fórmico 0,1% (linha A) e MeOH (grau HPLC Sigma-Aldrich®) + ácido fórmico 0,1% (linha B). A eluição ocorreu com fluxo de 3 mL/min, MeOH 25% em 30 min e volume de injeção de 50 μ L, sendo monitorado no comprimento de onda de λ 254nm.

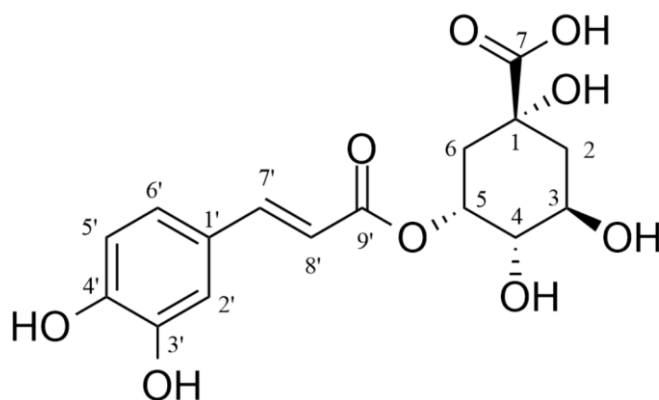
FIGURA 4.29 - Cromatograma da fração PsF1, no modo isocrático de eluição, com destaque da substância 1 coletada.



4.5.1 - Ácido 5-*O*-cafeoilquínico (1)

A substância **1** isolada da fração PsF1 é um ácido clorogênico conhecido como ácido 5-*O*-cafeoilquínico (FIGURA 4.30). Sua identificação foi feita principalmente pela análise dos dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, COSY, HSQC, HMBC e MS (FIGURAS 4.33-4.40), bem como a partir da comparação desses dados com os da literatura.

FIGURA 4.30 - Estrutura do ácido 5-*O*-cafeoilquínico.



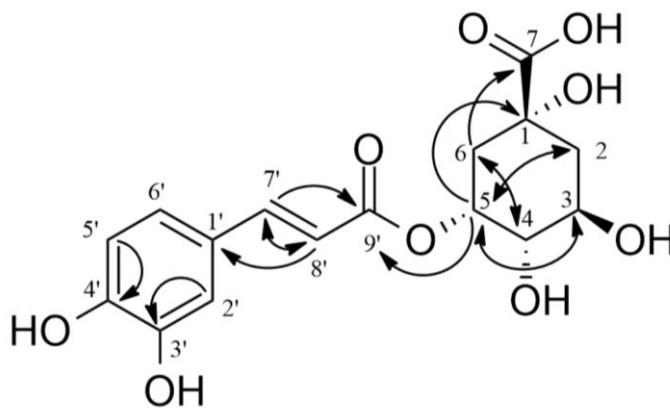
No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.33), sinais na região típica de absorção de hidrogênios aromáticos foram observados em δ 7,09 (sl, H-2'), 7,00 (d, $J = 8,2$ Hz, H-5') e 6,89 (dl, $J = 8,2$ Hz, H-6'), os quais são sinais característicos de H de anéis aromáticos trissubstituídos. Sendo confirmado também pela característica dos sinais de H-5' e H-6', os quais apresentam constante de acoplamento *orto* ($J = 8,2$ Hz), *orto* e *meta* observado como um dubleto largo em δ 6,89, respectivamente, e H-2' com acoplamento *meta* δ 7,09 (sl, H-2'). Os dois sinais em δ 7,50 (d, $J = 15,9$ Hz, H-7') e 6,24 (d, $J = 15,9$ Hz, H-8') mostram constante de acoplamento típico de sistemas olefínicos conjugado ao sistema aromático, e com isomerização *trans*.

Para conectar o sistema olefínico ao anel aromático, observou-se a partir do mapa de contorno HMBC (FIGURAS 4.34-4.35, Apêndice) a correlação dos sinais entre δ 6,24 (H-8') e δ 129,72 (C-1'). A vizinhança desse sistema olefínico foi

observada pela correlação δ 7,50 (H-7') com δ 171,43 (C-9'), este último sendo um sinal de carbono não hidrogenado, observado pela sua ausência no DEPT-135 (FIGURA 4.36). Ainda, as correlações principais observadas: δ 2,11 (H-6) com δ 179,89 (C-7); δ 5,29 (H-5) com δ 171,43 (C-9') e δ 77,83 (C-1); δ 7,00 (H-5') com δ 150,24 (C-4') e δ 7,09 (H-2') com δ 147,33 (C-3'), onde ambos carbonos citados são não hidrogenados conforme o DEPT-135.

No do mapa de contorno COSY (FIGURA 4.37), foi observada a correlação δ 7,50 (H-7') com δ 6,24 (H-8'), interação dos H olefínicos, bem como as correlações: δ 2,11 (H-6) com δ 4,26 (H-4); δ 5,29 (H-5) com δ 2,25 (H-2) e δ 3,86 (H-3), que formam a porção do ácido quínico (FIGURA 4.31). O mapa de contorno HSQC (FIGURA 4.38 e 4.40) esclarece a correlação dos hidrogênios C-6 e C-2, a partir das correlações: δ 2,11 (H-6) com δ 39,45 (C-6) e δ 2,24 (H-2) com δ 39,63 (C-2).

FIGURA 4.31 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC (\rightarrow) e COSY (\leftrightarrow) da substância **1**.



O que se pode destacar com o espectro de RMN de $C^{13}\{H^1\}$, são os sinais dos carbonos em 3, 4 e 5, que de acordo com os dados de WEI et al. (2010), o isômero ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA) apresenta sinais acima de 70 ppm nessas posições, com deslocamentos: δ 71,66 (C-3), δ 73,77 (C-4), δ 72,04 (C-5). Sinais aproximados foram obtidos nesse experimento (FIGURA 4.39), apresentando os

seguintes deslocamentos: δ 73,62 (C-3), δ 72,26 (C-4), δ 74,42 (C-5). Os dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ estão organizados na TABELA 4.13.

O isômero presente também pôde ser confirmado a partir das fragmentações do espectro de MS (FIGURA 4.32). O 5-CQA a partir da saída do hidrogênio da hidroxila em *para* e conjugação até a carboxila do éster, e transferência deste hidrogênio à carboxila leva ao fragmento predominante em m/z 191 [ácido quínico – H] $^-$, ou seja rearranjo do hidrogênio remoto (DEMARQUE et al., 2016). O fragmento em menor intensidade em m/z 179 [ácido cafeico – H] $^-$ se forma por um mecanismo similar, transferência de um hidrogênio do anel quínico para a carboxila do éster. Posterior perda de água este íon pode levar ao m/z 161. Os dados acima foram comparados com aqueles publicados por XIE, ZHONG e CHEN (2012), confirmando a estrutura proposta. No Apêndice (FIGURA A.50) encontram-se os espectros de MS e MS/MS obtidos.

FIGURA 4.32 - Proposta de fragmentação da substância **1**.

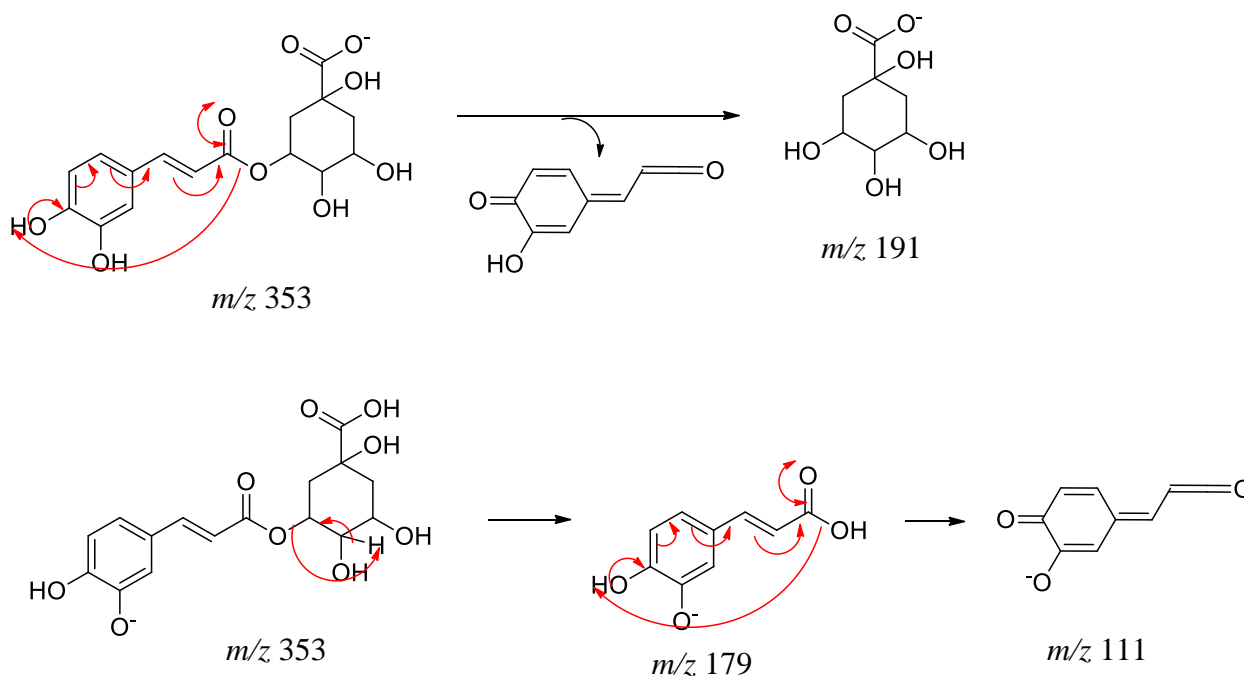


TABELA 13 - Dados de RMN de H¹ e C¹³ de **1** (D₂O, 400MHz)

Posição	δ_H de 1	δ_H Ácido 5-O- cafeoilquínico*	δ_C de 1	δ_C Ácido 5-O- cafeoilquínico**
1	-	-	77,8	79,9
2	2,24 (<i>ta</i> , $J = 13,9$ Hz)	2,08 (<i>m</i>)	39,6	40,2
3	4,26 (<i>qa</i> , $J = 3,9$ Hz)	4,15 (<i>q</i> , $J = 3,2$ Hz)	72,2	73,8
4	3,85 (<i>dd</i> , $J = 3,2$ Hz; $J = 8,5$ Hz)	3,78 (<i>dd</i> , $J_1 = 3,2$ Hz, $J_2 = 9,6$ Hz)	74,4	75,9
5	5,29 (<i>td</i> , $J = 4,2$; $J = 8,9$ e $J = 8,9$ Hz)	5,23 (<i>m</i>)	73,6	74,2
6	2,11 (<i>m</i>)	1,93 (<i>m</i>)	39,4	41,4
7	-	-	179,8	184,0
1'	-	-	129,7	130,1
2'	7,09 (<i>sl</i>)	7,08 (<i>s</i>)	117,9	118,2
3'	-	-	147,3	147,4
4'	-	-	150,2	150,2
5'	6,89 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz)	6,84 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz)	125,6	119,3
6'	7,00 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz)	7,02 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz)	118,9	125,7
7'	7,50 (<i>d</i> , $J = 15,9$ Hz)	7,54 (<i>d</i> , $J_1 = 3,2$ Hz, $J_2 = 16$ Hz)	149,2	149,2
8'	6,24 (<i>d</i> , $J = 15,9$ Hz)	6,28 (<i>dd</i> , $J_1 = 3,2$ Hz, $J_2 = 16$ Hz)	117,0	117,8
9'	-	-	171,4	172,3

*PUKALSKAS et al., (2010)

**SANTOS et al., (2004)

FIGURA 33 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 400MHz) da substância **1**, com ampliação da região dos sinais de δ 8,00 a 6,00.

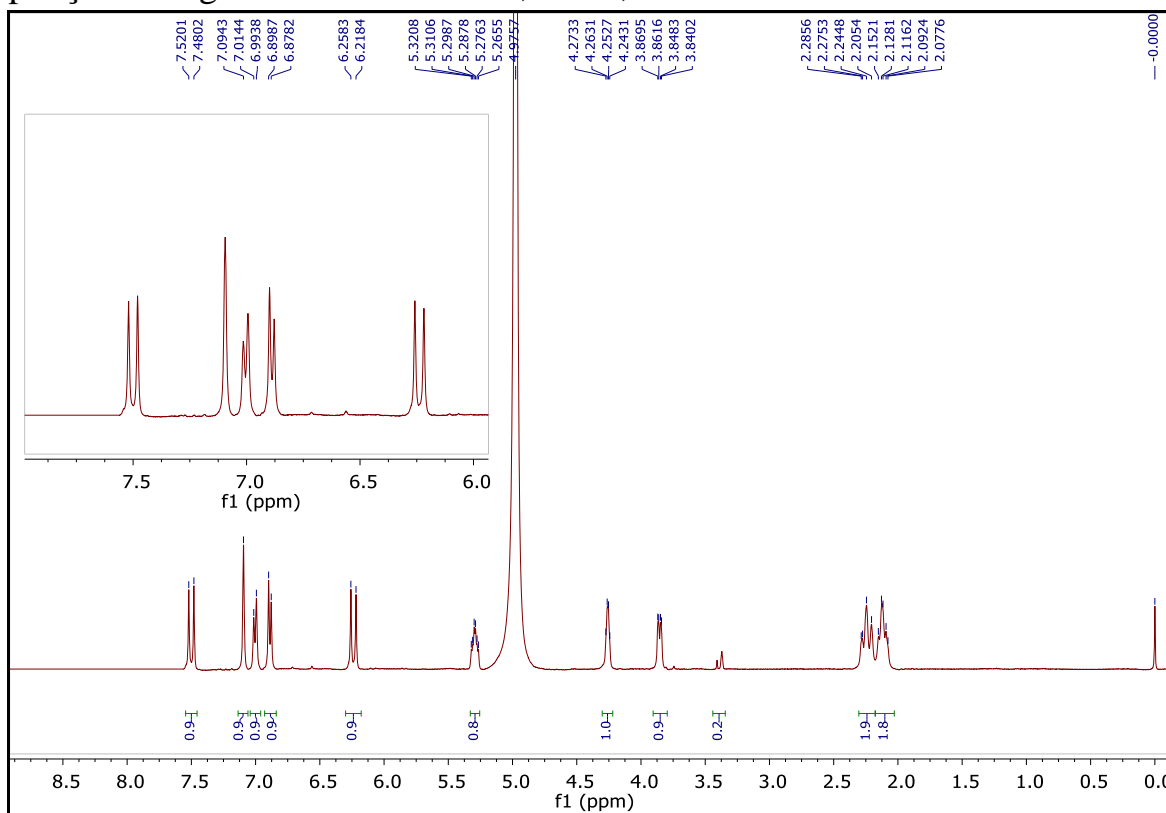


FIGURA 34 - Mapa de contorno HMBC (D_2O , 400MHz) da substância **1**.

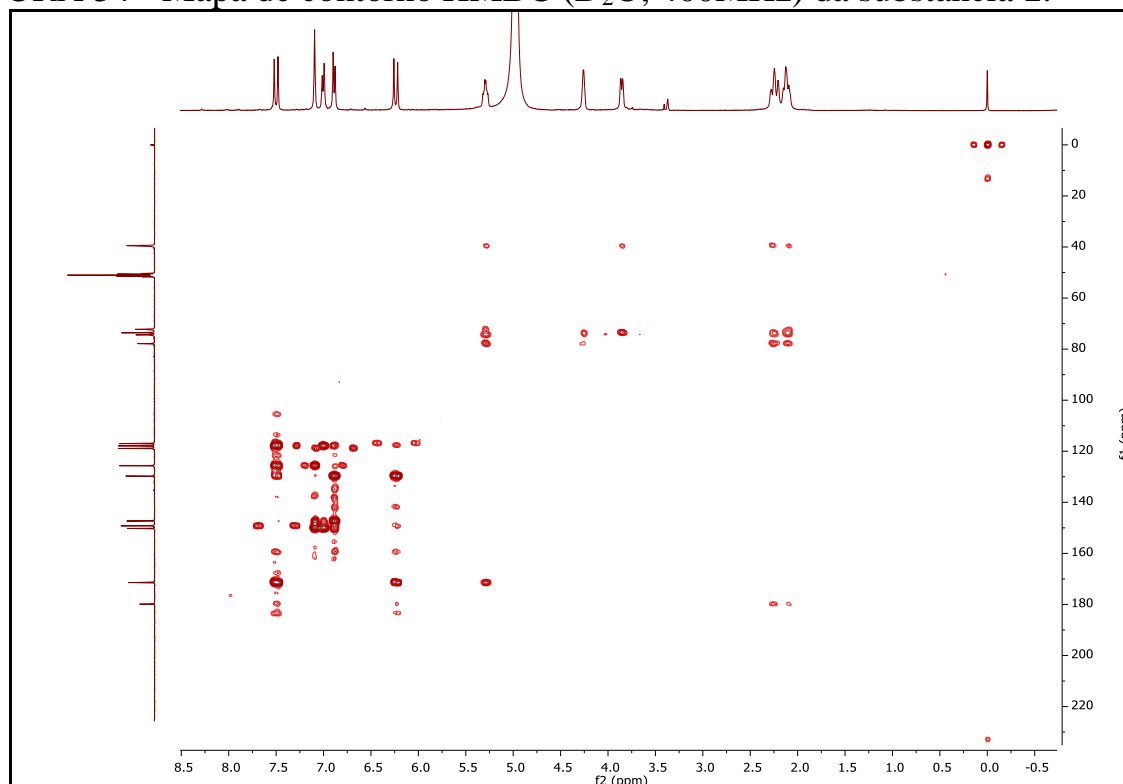


FIGURA 35 – Ampliação do mapa de contorno de HMBC (D_2O , 400MHz) da substância **1**.

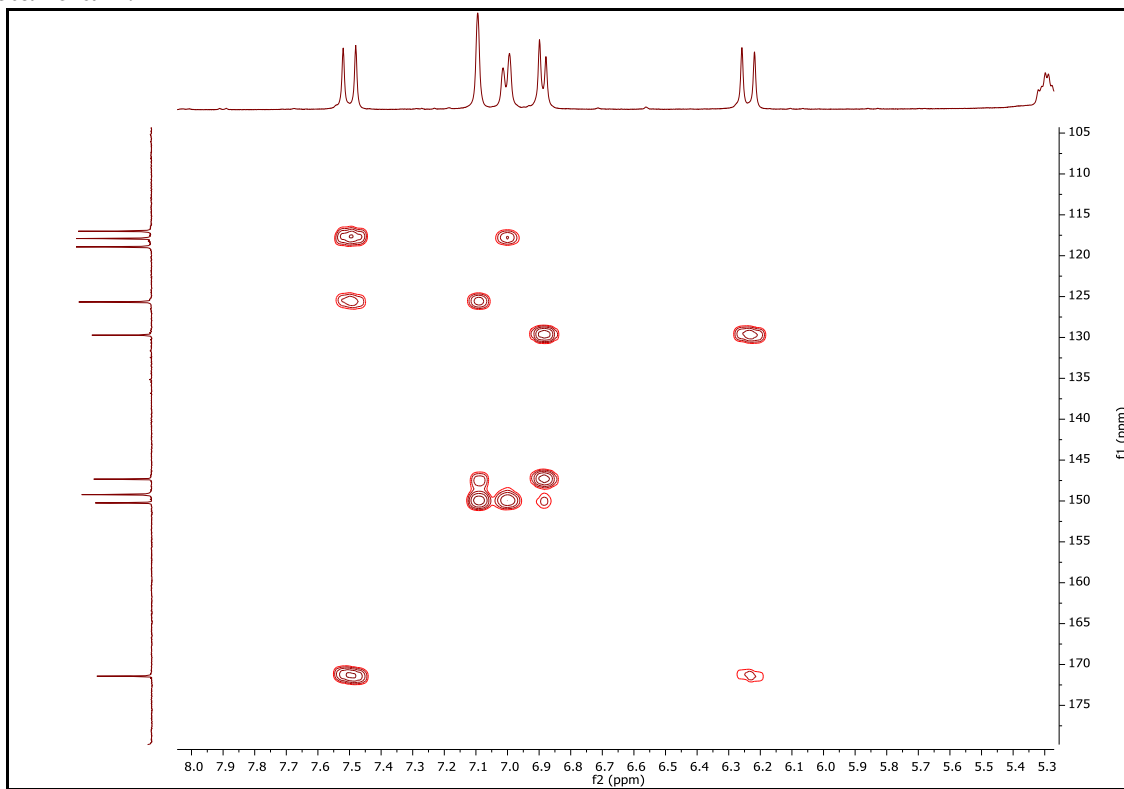


FIGURA 36 - Espectro de RMN de ^{13}C , DEPT-135 (D_2O , 100MHz) da substância **1**, com ampliação dos sinais da região de δ 41,20 a 37,50.

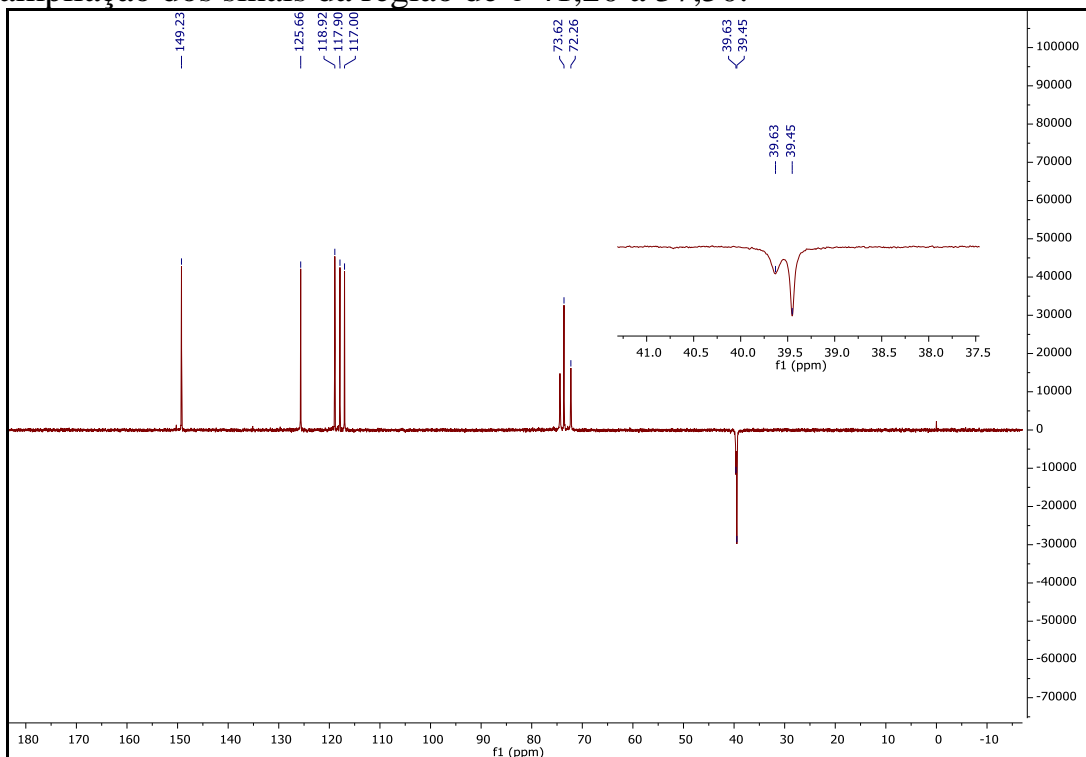


FIGURA 37 - Mapa de contorno de COSY (D_2O , 400MHz) da substância **1**.

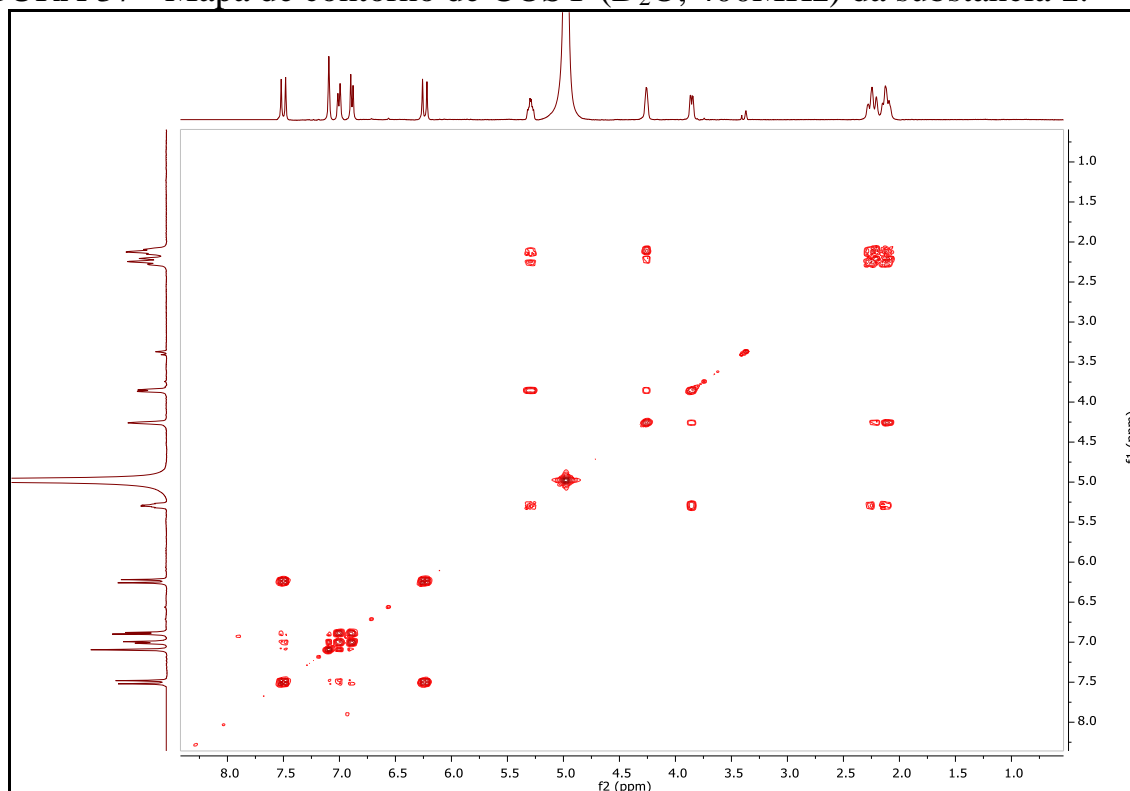


FIGURA 38 - Mapa de contorno de HSQC (D_2O , 400MHz) da substância **1**.

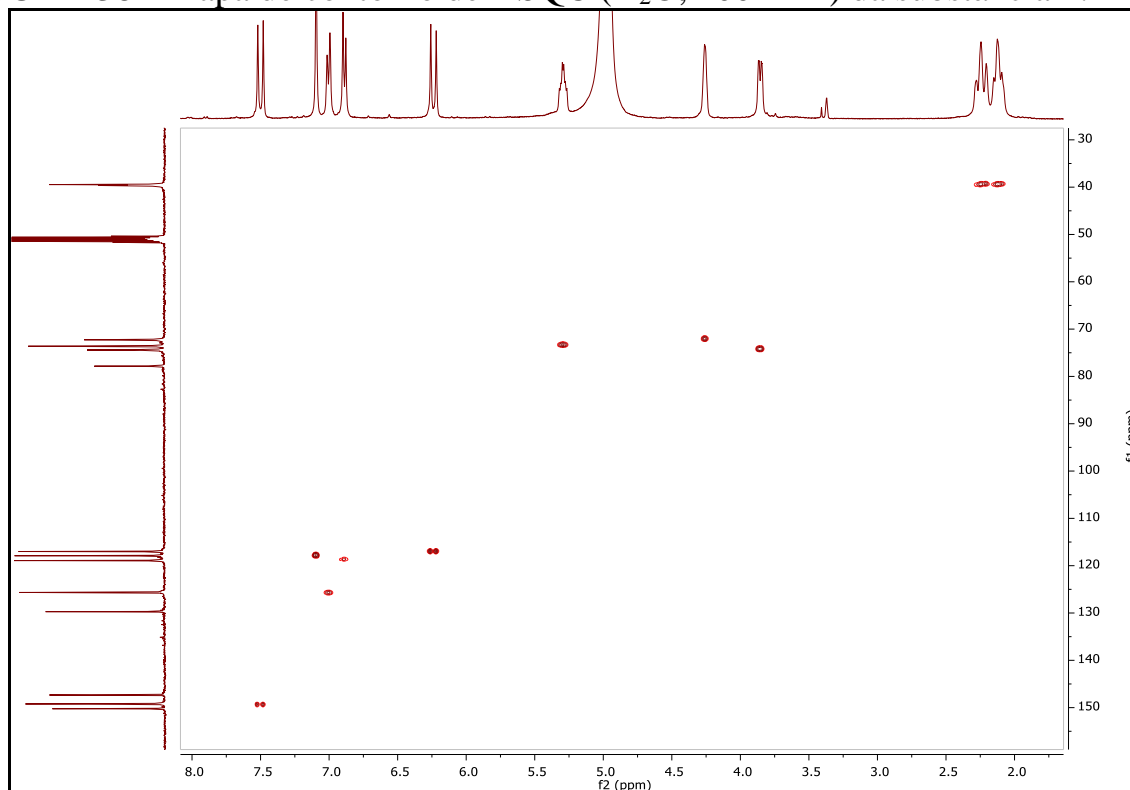


FIGURA 39 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 100MHz) da substância **1**, com ampliação dos sinais da região de δ 41,5 a 37,9.

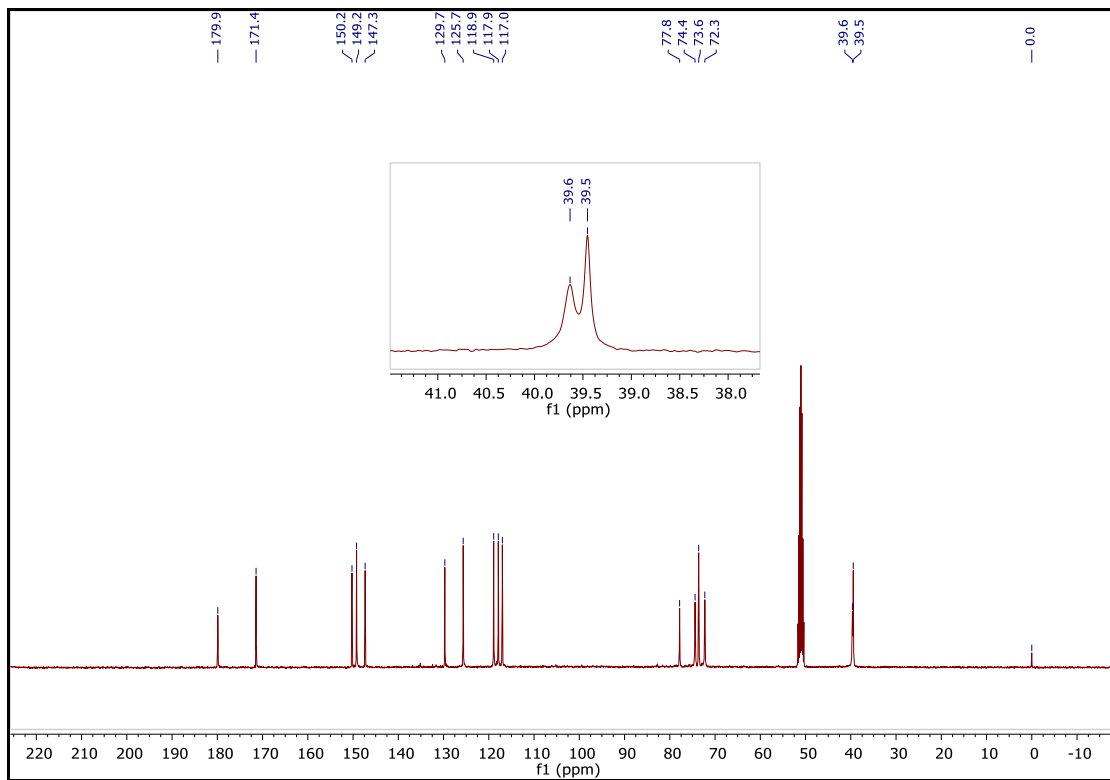
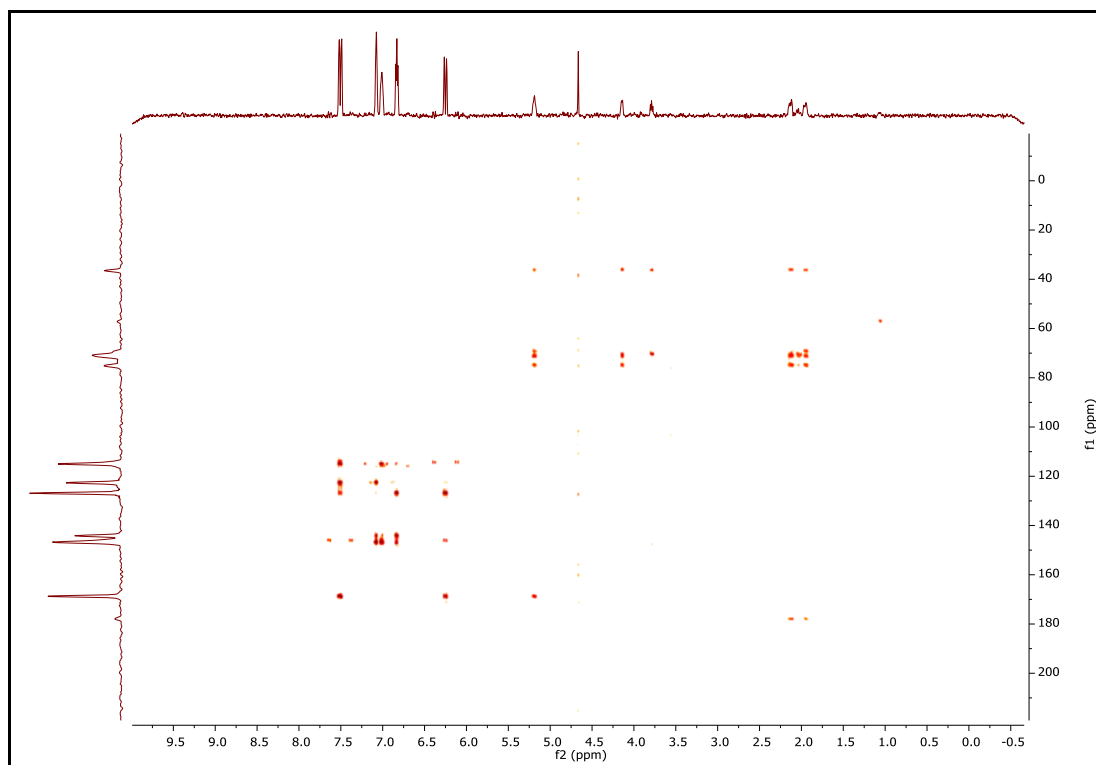


FIGURA 40 - Mapa de contorno HMBC (D_2O , 600MHz) da substância **1**.



5 - CONCLUSÃO

Este foi o primeiro trabalho realizado com a espécie *P. sellowii* utilizando a plataforma *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS) e a criação da rede molecular via *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) como ferramentas da metabolômica para anotação dos metabólitos secundários. Os resultados sugerem que as abordagens metabólicas com LC-MS *untargeted*, podem ser potencialmente utilizadas como ferramentas quimiotaxonômicas em larga escala, além de identificar moléculas potencialmente bioativas antes do subsequente isolamento do composto.

As cepas de *Xanthomonas* usadas ao longo deste estudo eram resistentes, tolerantes e suscetíveis ao cobre. Os resultados foram promissores com as frações F3 e F2, a primeira na concentração de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CIM e CBM) contra as cepas resistentes, tolerantes e suscetíveis, a última na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CIM e CBM), $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra cepas resistentes, tolerantes e suscetíveis, respectivamente.

Os caracteres químicos ligam fortemente o gênero *Picramnia* com a família Simaroubaceae. Os quassinoides oferecem o máximo de provas convincentes a favor de tal ligação, ainda, outros dados químicos a favor desta relação vêm dos ácidos clorogênicos, com o isolamento e identificação de uma estrutura não relatada em *P. sellowii*, bem como a presença de catequinas, glicosídeos flavonois, que aparecem em grupos aliados, tais como as Meliaceae, e as antraquinonas em Rutaceae. Surpreendentemente, estas classes de constituintes estão sendo relatados pela primeira vez em *Picramnia*.

Por fim, conclui-se que os objetivos do projeto foram alcançados com êxito, onde foi possível o desenvolvimento de um protocolo analítico (via UHPLC-QTOF-MS/MS) que possibilitou avaliar o perfil químico de *Picramnia sellowii*

Planch. e detectar os quassinoides. De forma que esse foi o primeiro perfil realizado por LC-MS/MS do extrato etanólico das folhas de *P. sellowii*, contribuindo assim para o conhecimento quimiotaxonômico da espécie. Ainda, esse foi o primeiro relato da presença, isolamento e identificação estrutural do ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) no gênero *Picramnia*.

REFERÊNCIAS

- AARTHY, Thiagarayaselvam et al. Tracing the biosynthetic origin of limonoids and their functional groups through stable isotope labeling and inhibition in neem tree (*Azadirachta indica*) cell suspension. **BMC plant biology**, v. 18, p. 1-21, 2018.
- AGBO, Matthias Onyebuchi et al. Isolation and structure elucidation of polyphenols from *Loranthus micranthus* Linn. parasitic on *Hevea brasiliensis* with antiinflammatory property. **EXCLI journal**, v. 13, p. 859, 2014.
- ALFONSO, Dorothée; KAPETANIDIS, Ilias. Withanolides from *Iochroma gesnerioides*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 1, p. 179-183, 1994.
- ALMEIDA, Maria Mozarina Beserra et al. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Química Nova**, v. 30, p. 935-951, 2007.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.
- ARANA, A.; JULCA, T. *Picramnia macrostachys* Ami (Simaroubaceae). **Rev. Peru. Bioquim**, v. 8, p. 16-19, 1986.
- AZIMOVA, S. S.; VINOGRADOVA, V. I. Physicochemical and pharmacological properties of flavonoids. **Natural compounds—flavonoids. New York (NY): Springer**, p. 86-87, 2013.
- BAE, Joonseo et al. Activity of catechins and their applications. **Biomedical Dermatology**, v. 4, p. 1-10, 2020.
- BEHLAU, Franklin et al. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 409-418, 2013.
- BEHLAU, Franklin. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, n. 1, p. 1-12, 2021.
- BEHLAU, Franklin; GOCHEZ, Alberto M.; JONES, Jeffrey B. Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 200-212, 2020.

BRASIL (2018) Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária – Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa no. 21, de 25 de abr. de 2018. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de Maio de 2018. No. 90, Seção 1, p 9–12.

CAM, J.J.L. Triterpenoides y derivados antraquinonicos obtenidos de *Picramnia sellowii* (Simaroubaceae). **Bol. Soc. Quim.** Peru. 41:14-30, 1973.

CHAMBERS, M., MACLEAN, B., BURKE, R. et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 918-920, 2012.

CHEN, Li-Xia; HE, Hao; QIU, Feng. Natural withanolides: an overview. **Natural product reports**, v. 28, n. 4, p. 705-740, 2011.

CHO, E. J. et al. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 544-551, 2003.

CHUANG, Ling et al. Identification of early quassinoid biosynthesis in the invasive tree of heaven (*Ailanthus altissima*) confirms evolutionary origin from protolimonoids. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

CORTADI, Adriana et al. Estudio farmacobotánico de hojas, cortezas y leños de Simaroubaceae sensu lato de Argentina. Parte I. *Alvaradoa subovata* Cronquist, *Picramnia parvifolia* Engl., *Picramnia sellowii* Planch. y *Castela coccinea* Griseb. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 9, n. 1, p. 38-55, 2010.

DE VILLATORO, Bertha Soto et al. Chrysophanic acid, chrysophanein and chaparrin from *Alvaradoa amorphoides*. **Phytochemistry**, 1974.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 2009. 546p

DHAR, Niha et al. A decade of molecular understanding of withanolide biosynthesis and in vitro studies in *Withania somnifera* (L.) Dunal: prospects and perspectives for pathway engineering. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 1031, 2015.

DIAZ, Fredyc et al. Anthrone and oxanthrone C-glycosides from *Picramnia latifolia* collected in Peru. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 352-356, 2004.

- DIAZ-MUNOZ, Gaspar et al. Anthraquinones: an overview. **Studies in natural products chemistry**, v. 58, p. 313-338, 2018.
- DUAN, Zhi-Kang et al. Quassinoids: Phytochemistry and antitumor prospect. **Phytochemistry**, v. 187, p. 112769, 2021.
- EL SAYED, Abeer M. et al. In vivo diabetic wound healing effect and HPLC-DAD-ESI-MS/MS profiling of the methanol extracts of eight Aloe species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 352-362, 2016.
- REFERENCE, Christopher M. et al. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 6, p. 1302, 2018.
- FERNANDO, Edwino S.; QUINN, Christopher J. Picramniaceae, a new family, and a recircumscription of Simaroubaceae. **Taxon**, v. 44, n. 2, p. 177-181, 1995.
- FOO, Lai Yeap. Flavanocoumarins and flavanophenylpropanoids from *Phyllocladus trichomanoides*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2477-2481, 1989.
- FRANZ, Gerhard; GRÜN, Michael. Chemistry, occurrence and biosynthesis of C-glycosyl compounds in plants. **Planta medica**, v. 47, n. 03, p. 131-140, 1983.
- FUNDECITRUS. Cancro cítrico. Fundecitrus: ciência e sustentabilidade para a citricultura, 2023. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro>. Acesso em: 19 mar. 2023.
- GIL, Marta; WIANOWSKA, Dorota. Chlorogenic acids—their properties, occurrence and analysis. **Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, sectio AA—Chemia**, v. 72, n. 1, 2017.
- GIL, Marta; WIANOWSKA, Dorota. Chlorogenic acids—their properties, occurrence and analysis. **Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, sectio AA—Chemia**, v. 72, n. 1, 2017.
- GIMENES, Leila et al. Structure elucidation and absolute configuration determination of nortriterpenoids from *Picramnia glazioviana*. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 6, p. 1859-1875, 2020.
- GOMES, Angélica F. et al. Chemical constituents, antioxidant, anti-inflammatory and, antinociceptive activities of *Trichilia ramalhoi*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 22, p. 4789-4793, 2021.

GOTTLIEB, O. R. **Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology**. An Essay into a Novel Botanical Discipline, Berlin: Springer-Verlag, 1st ed, v.19, 1982.

HEGNAUER, Robert. Phytochemistry and plant taxonomy—An essay on the chemotaxonomy of higher plants. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1519-1535, 1986.

HEMSLEY, Alan R.; POOLE, Imogen (Ed.). **The evolution of plant physiology**. Elsevier, 2004. Disponível em: <
http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/The-Evolution-of-Plant-Physiology-by-Hensley---Poole--2004-.pdf>. Acesso em: 30 Mar. 2023.

HERNANDEZ-MEDEL, M. D. R. & PEREDA-MIRANDA, R. Cytotoxic anthraquinone derivatives from *Picramnia antidesma*. **Planta medica**, v. 68, n. 06, p. 556-558, 2002.

HERNANDEZ-MEDEL, M. D. R.; LOPEZ-PEREZ, J. L.; TRIGOS, A. Anthraquinones from *Picramnia hirsuta* stem. *Revista Latinoamericana de Química*, v. 26, p. 86-90, 1998.

HERNÁNDEZ-MEDEL, M. del R. et al. Characterization and biological activity of fatty acids from *Picramnia polyantha* fruits. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 37, n. 3, p. 262-269, 2009.

HERNANDEZ-MEDEL, M. del R. et al. Mayoside, an oxanthrone from *Picramnia hirsuta*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 1, p. 279-282, 1996.

HERNANDEZ-MEDEL, Maria Del R. et al. An anthrone from *Picramnia antidesma*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2599-2601, 1998.

HERNANDEZ-MEDEL, Maria Del R. et al. Diastereomeric C-glycosyloxantrones from *Picramnia antidesma*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1379-1383, 1999.

HODGSON, Hannah et al. Identification of key enzymes responsible for protolimonoid biosynthesis in plants: Opening the door to azadirachtin production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 34, p. 17096-17104, 2019.

HOOKER, W. J. et al. The London journal of botany : containing figures and descriptions of such plants as recommend themselves by their novelty, rarity, history, or uses : together with botanical notices and information and occasional portraits and memoirs of eminent botanists. **London J. Bot.** London, H.

Baillière, v.5, p. 578, 1846. Disponível em:
<<https://www.biodiversitylibrary.org/page/775949>>. Acesso em: 20 mar. 2023.

IPNI, International Plant Names Index, 2023. Published on the Internet <
<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:301399-2>>, The Royal
Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian
National Herbarium. [Retrieved 20 March 2023].

ISHIKURA, Nariyuki; SATO, Shuji. Isolation of new kaempferol glycosides from
the leaves of *Euonymus*. **The botanical magazine= Shokubutsu-gaku-zasshi**, v.
90, p. 83-87, 1977.

ITO, Hideyuki et al. Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity
against human oral tumor cell lines. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.
48, n. 5, p. 687-693, 2000.

IUPAC. Nomenclature of cyclitols. **Biochemistry Journal**, v. 153, p. 23-31, 1976.

JIANG, Lili; ZHANG, Shuwei; XUAN, Lijiang. Oxanthrone C-glycosides and
epoxynaphthoquinol from the roots of *Rumex japonicus*. **Phytochemistry**, v. 68, n.
19, p. 2444-2449, 2007.

JUDD, Walter S. et al. **Sistemática Vegetal:- Um Enfoque Filogenético**. 3^a ed.
Artmed, Porto Alegre. 612p., 2009. Disponível em: <
[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5813296/mod_resource/content/1/JUDD_](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5813296/mod_resource/content/1/JUDD_et_al-2009-Sistemica_vegetal_um_e.pdf)
[et_al-2009-Sistemica_vegetal_um_e.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5813296/mod_resource/content/1/JUDD_et_al-2009-Sistemica_vegetal_um_e.pdf)>. Acesso em: 30 Mar. 2023.

JUNGBLUT, Tim P. et al. Structures of UV-B induced sunscreen pigments of the
Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Angewandte Chemie International Edition in**
English, v. 34, n. 3, p. 312-314, 1995.

KIM, Hye Young et al. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides*
O. with glycation inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 2-
3, p. 227-230, 2004.

KOWA, Theodora K. et al. Antileishmanial and cytotoxic activities of a new
limonoid and a new phenyl alkene from the stem bark of *Trichilia gilgiana*
(Meliaceae). **Natural product research**, v. 34, n. 22, p. 3182-3188, 2020.

KREMR, Daniel et al. Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature:
a review. **Química Nova**, v. 39, p. 530-533, 2016.

- KRENN, Liselotte et al. Anthrone C-glucosides from *Rheum emodi*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 4, p. 391-393, 2004.
- KUBITZKI, K. Picramniaceae. In: Kubitzki, K. (eds) Flowering Plants · Eudicots. The Families and Genera of Vascular Plants, **Springer**, Berlin, Heidelberg, v. 9, p. 301-303, 2007.
- KUSHWAHA, Prem Prakash et al. Identification of natural inhibitors against SARS-CoV-2 drugable targets using molecular docking, molecular dynamics simulation, and MM-PBSA approach. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, p. 728, 2021.
- LIAN, Xufan et al. Characterization of a 2, 3-oxidosqualene cyclase in the toosendanin biosynthetic pathway of *Melia toosendan*. **Physiologia plantarum**, v. 170, n. 4, p. 528-536, 2020.
- LOGACHEVA, Maria D.; SHIPUNOV, Alexey B. Phylogenomic analysis of *Picramnia*, *Alvaradoa*, and *Leitneria* supports the independent Picramniales. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 55, n. 3, p. 171-176, 2017.
- LONGHINI, Renata et al. *Trichilia catigua*: therapeutic and cosmetic values. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 254-271, 2017.
- LU, Wenyun; BENNETT, Bryson D.; RABINOWITZ, Joshua D. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. **Journal of chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 236-242, 2008.
- MAGAÑA, Armando Alcázar et al. Caffeoylquinic acids: Chemistry, biosynthesis, occurrence, analytical challenges, and bioactivity. **The plant journal**, v. 107, n. 5, p. 1299-1319, 2021.
- MAI, Le Phuong et al. Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. **Journal of natural products**, v. 64, n. 9, p. 1162-1168, 2001.
- MALIK, Enas M.; MÜLLER, Christa E. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. **Medicinal research reviews**, v. 36, n. 4, p. 705-748, 2016.
- MARTINS, Paula Maria Moreira et al. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 213-236, 2020.

- MISICO, Rosana I. et al. Withanolides and related steroids. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products Vol. 94**, p. 127-229, 2011.
- MITRA, S. Sample preparation techniques in analytical chemistry, v.162. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2003.
- NYFFELER, Reto. **Plant Systematics and Evolution**, vol. 239, no. 3/4, 2003, pp. 292–94. *JSTOR*. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/23645181>>. Acesso em: 30 Mar. 2023.
- PANDREKA, Avinash et al. Limonoid biosynthesis 3: Functional characterization of crucial genes involved in neem limonoid biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 184, p. 112669, 2021.
- PIRANI, J.R. 2002. Simaroubaceae In: WANDERLEY, M.G.L., SHEPHERD, G.J., GIULIETTI, A.M., MELHEM, T.S., BITTRICH, V., KAMEYAMA, C. (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 2, pp: 313-322. Disponível em< http://botanica.sp.gov.br/files/2016/06/FFESP-Volume-II_06_24.pdf>. Acesso em 25 mar. 2023.
- PIRANI, José Rubens. As espécies de *Picramnia* Sw.(Simaroubaceae) do Brasil: uma sinopse. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, p. 115-180, 1990b.
- PIRANI, José Rubens. Diversidade taxonômica e padrões de distribuição geográfica em *Picramnia* (Simaroubaceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, p. 19-44, 1990a.
- PIRANI, José Rubens; DEVECCHI, Marcelo Fernando. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Picramniaceae. **Rodriguésia**, v. 67, p. 1447-1449, 2016.
- POPINIGIS, I. et al. Pharmacognostic study of *Picramnia parvifolia* Engler. Simaroubaceae. **Trib Farm**, v. 48, p. 24-43, 1980.
- POWO, "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, 2023. Published on the Internet: <<http://www.plantsoftheworldonline.org/>>
- PUKALSKAS, Audrius et al. Isolation, identification and activity of natural antioxidants from costmary (*Chrysanthemum balsamita*) cultivated in Lithuania. **Food chemistry**, v. 122, n. 3, p. 804-811, 2010.
- QU, Jing et al. Structural characterization of constituents with molecular diversity in fractions from *Lysidice brevicalyx* by liquid chromatography/diode-array

detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 6, p. 755-765, 2008.

RABINOWITZ, Joshua D.; KIMBALL, Elizabeth. Acidic acetonitrile for cellular metabolome extraction from *Escherichia coli*. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 16, p. 6167-6173, 2007.

RAO, Pasupuleti Sreenivasa; SUBRAMANAYAM, Gangapatnam; SRIDHAR, Perali Ramu. Quercetin 3-galactoside from *Azadirachta indica*. **Journal of Advances in Molecular Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2019.

RESENDE, Flávia O. et al. Phenylpropanoid substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 2087-2093, 2011.

REYNOLDS, Tom. The evolution of chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2887-2895, 2007.

RODRÍGUEZ-GAMBOA, Tatiana et al. Anthrone and oxanthrone C, O-diglycosides from *Picramnia teapensis*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 837-841, 2000.

RODRÍGUEZ-GAMBOA, Tatiana et al. Two anthrones and one oxanthrone from *Picramnia teapensis*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 4, p. 583-586, 1999.

RODRÍGUEZ-GAMBOA, Tatiana et al. Two anthrones and one oxanthrone from *Picramnia teapensis*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 4, p. 583-586, 1999.

SANTOS, Anderson Rogério dos et al. Constituintes polares das folhas de *Machaonia brasiliensis* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 27, p. 525-527, 2004.

SCHMID, Robin et al. Ion identity molecular networking for mass spectrometry-based metabolomics in the GNPS environment. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 3832, 2021.

SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SHIPUNOV, Alexey et al. First Phylogeny of Bitterbush Family, Picramniaceae (Picramniales). **Plants**, v. 9, n. 2, p. 284, 2020.

SiBBr, Sistema da Informação sobre a Biodiversidade Brasileira, 2023. Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/274706#overview>>. Acesso em 23 de mar. de 2023.

SIGRIST, Renata et al. Mass Spectrometry-Guided Genome Mining as a Tool to Uncover Novel Natural Products. **Journal of Visualized Experiments: Jove**, n. 157, 2020.

SILVA, D. F. da. Eficácia dos flavonóides hesperidina e naringenina e o fenol ácido isovanílico complexados com Mg (II), para o controle da bactéria *xanthomonas citri* ssp. *citri*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2017. Tese de doutorado, 137 p.

SILVA, M. G. F.; GOTTLIEB, Otto R. Evolution of quassinoids and limonoids in the Rutales. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 1, p. 85-103, 1987.

SILVA, M.G. F, DA SILVA PINTO, L., AMARAL, J.C. et al. Nortriterpenes, chromones, anthraquinones, and their chemosystematics significance in Meliaceae, Rutaceae, and Simaroubaceae (Sapindales). **Brazilian Journal of Botany**, v. 45, n. 1, p. 15-40, 2022.

SLÁMOVÁ, Kristýna; KAPEŠOVÁ, Jana; VALENTOVÁ, Kateřina. “Sweet flavonoids”: Glycosidase-catalyzed modifications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 2126, 2018.7

THOMAS, W.W. *Nothotalisia*, a new genus of Picramniaceae from tropical America. **Brittonia**, v. 63, p. 51-61, 2011.

THOMAS, William Wayt et al. *Aenigmanu*, a new genus of Picramniaceae from Western Amazonia. **TAXON**, v. 70, n. 6, p. 1239-1247, 2021.

TSUGAWA, H., IKEDA, K., TAKAHASHI, M. et al. A lipidome atlas in MS-DIAL 4. **Nature biotechnology**, v. 38, n. 10, p. 1159-1163, 2020.

TSUGAWA, H., KIND, T., NAKABAYASHI, R. et al. Hydrogen rearrangement rules: computational MS/MS fragmentation and structure elucidation using MS-FINDER software. **Analytical chemistry**, v. 88, n. 16, p. 7946-7958, 2016.

VIEGAS JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, Ivo J. Curcino; BRAZ-FILHO, Raimundo. Quassinoids: structural diversity, biological activity and synthetic studies. **Studies in natural products chemistry**, v. 33, p. 433-492, 2006.

WALTERS, Stuart Max. Methods of classical plant taxonomy. In: SWAIN, T. (ed.). **Chemical Plant Taxonomy**. Academic Press, p. 1-15, 1963.

WANG, M., CARVER, J.J., PHELAN, V.V. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WEI, Feifei et al. Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 857-865, 2010.

WILLCOTT, M. R. MestRe Nova. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 36, p. 13180-13180, 2009.

WINK, Michael. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

WINKELMANN, K., STICHER, O., HEILMANN, J. 50th Annual Congress of the Society For Medicinal Plant Research, 2017, Barcelona. New dianthrone glucosides, anthrone C,O-diglycosides and a naphthalene glycoside from *Alvaradoa amorphoides*. **Revista de Fitoterapia**, v.2, S1, p. 293, 2017. Disponível em: <
https://www.fitoterapia.net/php/descargar_documento.php?id=4759&doc_r=sn&num_volumen=7&secc_volumen=5952>. Acesso em: 30 mar. 2023.

XIE, Cen; ZHONG, Dafang; CHEN, Xiaoyan. Identification of the ortho-benzoquinone intermediate of 5-O-caffeoylquinic acid in vitro and in vivo: comparison of bioactivation under normal and pathological situations. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 40, n. 8, p. 1628-1640, 2012.

XU, Jian et al. Quassinoids from the stems of *Picrasma quassioides* and their cytotoxic and NO production-inhibitory activities. **Fitoterapia**, v. 110, p. 13-19, 2016.

YANG, Meng-Yue et al. Cytochalasans and azaphilones: suitable chemotaxonomic markers for the Chaetomium species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-17, 2021.

YOSHIOKA, Jeniffer Miho. Investigação do efeito alelopático dos extratos da aroeira-preta *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão no desenvolvimento das sementes das braquiárias *Urochloa decumbens* Stapf e *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2021. Dissertação de mestrado, 261 p.

YOUNES, M., AGGETT, P., AGUILAR, F., et al. Safety of hydroxyanthracene derivatives for use in food. **EFSA Journal**, v. 16, n. 1, p. e05090, 2018.

ZHOU, Bin et al. LC-MS-based metabolomics. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 2, p. 470-481, 2012.

ZHOU, Ying et al. Flavonoids and anthraquinones from *Murraya tetramera* CC Huang (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 57, p. 78-80, 2014.

ZIDORN, Christian. Plant chemophenetics— A new term for plant chemosystematics/plant chemotaxonomy in the macro-molecular era. **Phytochemistry**, v. 163, p. 147-148, 2019.

APÊNDICE

FIGURA A.41 - Cromatograma da fração H1.

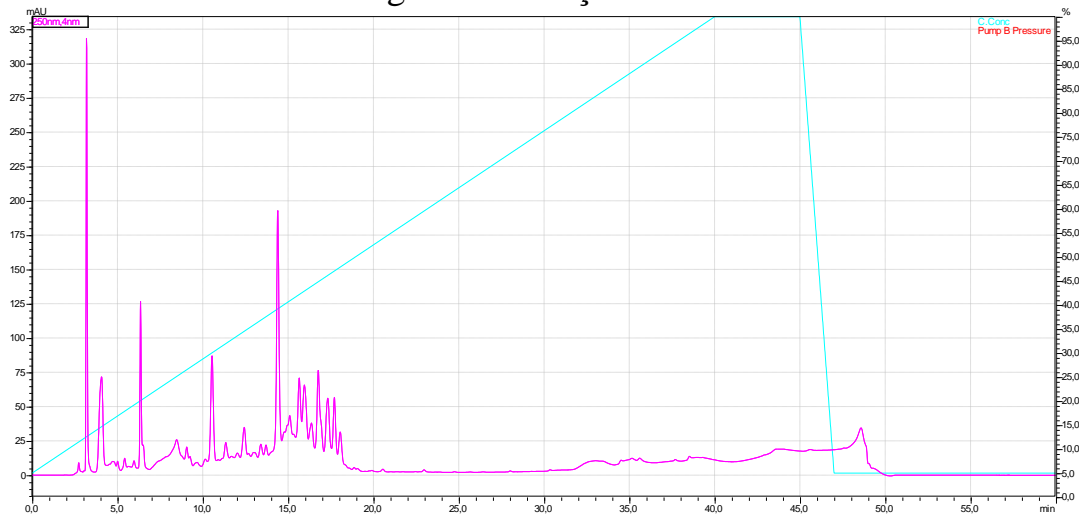


FIGURA A.42 - Cromatograma da fração H2.

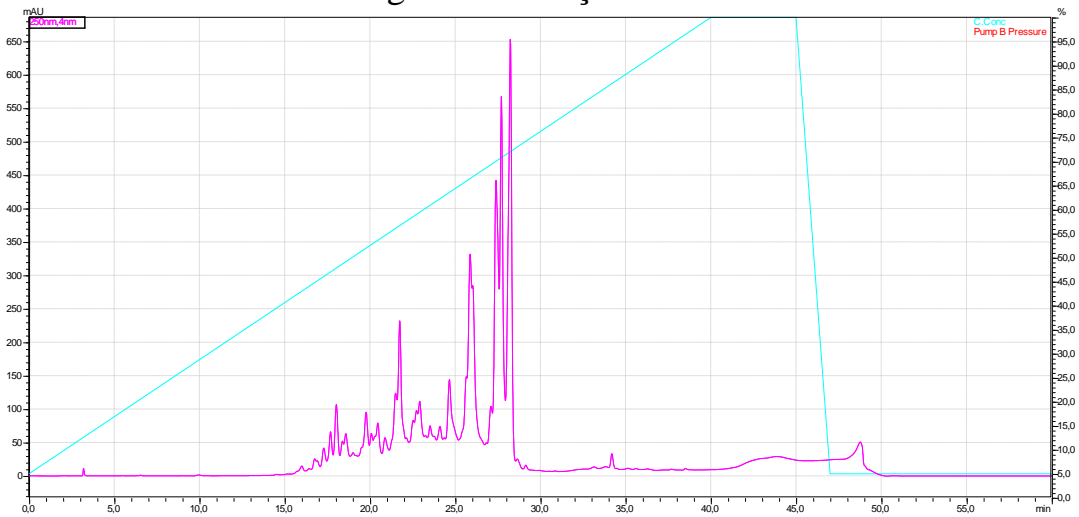


FIGURA A.43 - Cromatograma da fração H3.

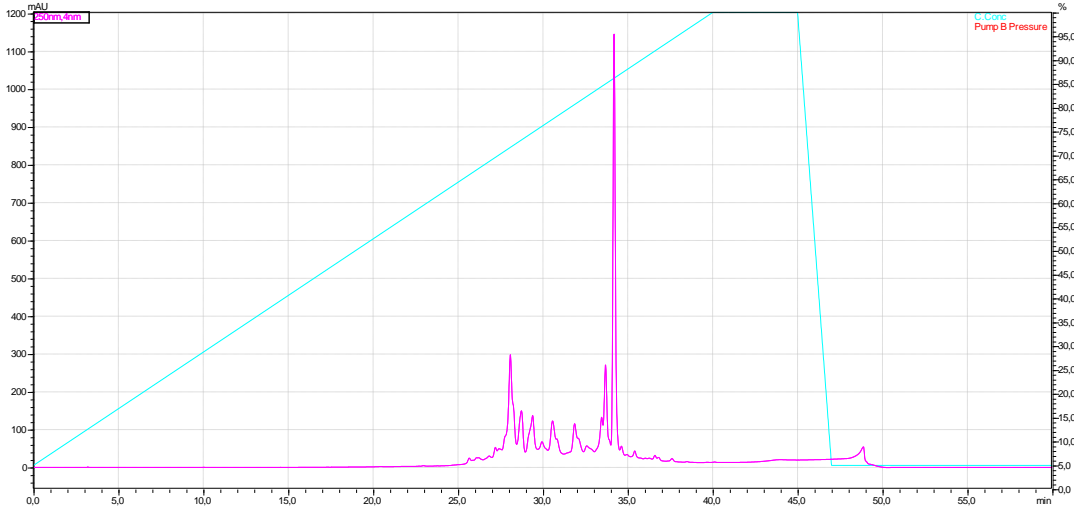


FIGURA A.44 - Cromatograma da fração H4.

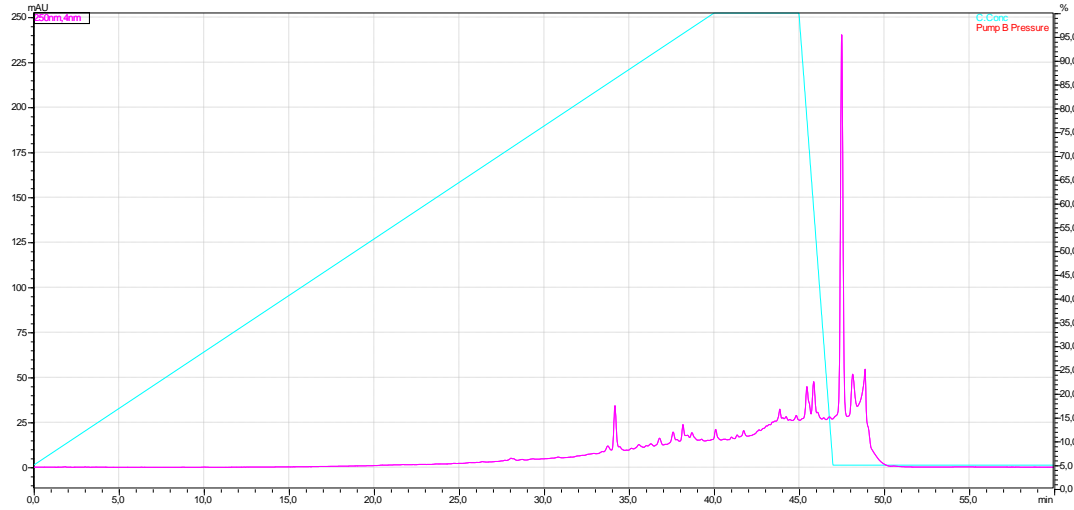


FIGURA A.45 - Cromatograma da fração F1.

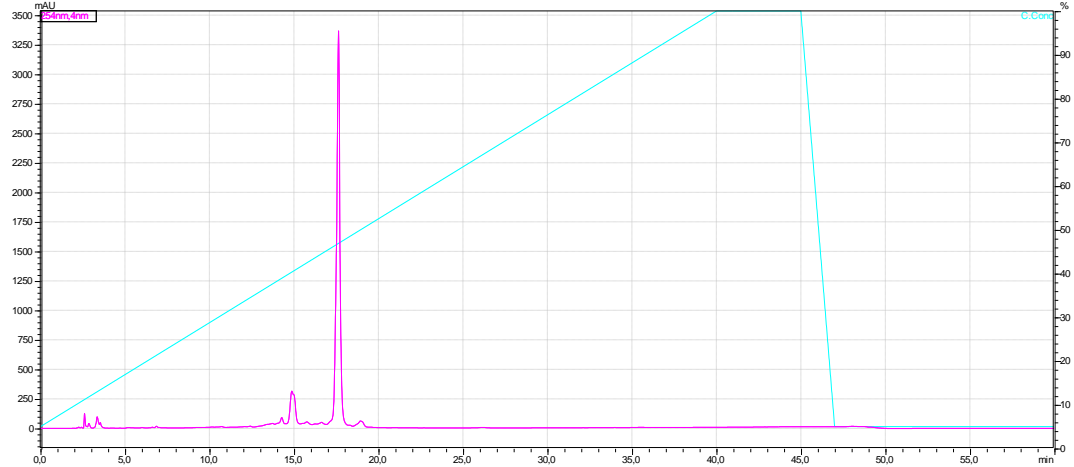


FIGURA A.46 - Cromatograma da fração F2.

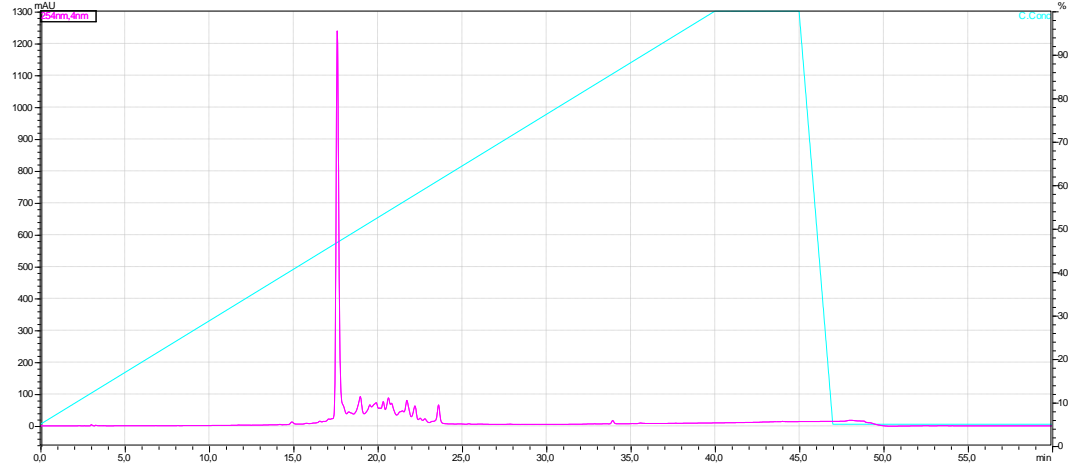


FIGURA A.47 - Cromatograma da fração F3.

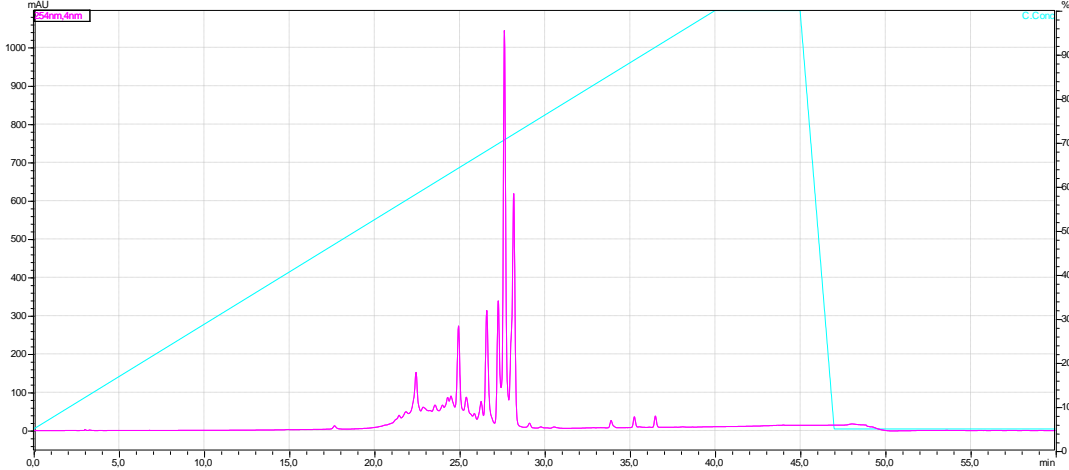


FIGURA A.48 - Cromatograma da fração F4.

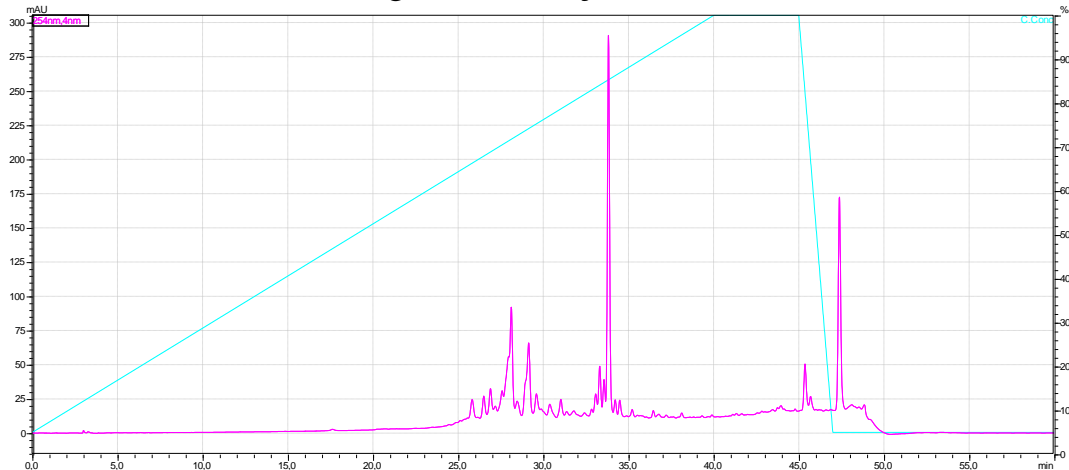


TABELA A.14 - Metabólitos identificados usando a ferramenta de rede molecular e espectros MS/MS.

Proposed compounds identify	RT min	Molecular formula	[M-H] ⁻ Measured	Mass accuracy (ppm)	MS/MS main fragments
Chlorogenic acids and 3-O-caffeoylshikimic acid					
5-O-caffeoylquinic acid (1)	3.6	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0884	1.7	191.06; 161.02; 135.05; 111.05
3-O- <i>p</i> -coumaroylquinic acid (2)	0.3	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337.0930	0.3	191.06; 163.04; 149.06; 119.05
ethyl 3-O- <i>p</i> -coumaroylquinic acid (3)	6.4	C ₁₈ H ₂₂ O ₈	365.1253	3.0	163.04; 145.03; 119.05; 85.03
ethyl 4-O-caffeoylquinic acid (4)	5.9	C ₁₈ H ₂₂ O ₉	381.1201	2.6	191.06; 179.04; 161.02; 135.05
<i>trans</i> -3-O-feruloylquinic acid (5)	5.3	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.1045	2.7	191.06; 179.04; 161.02; 135.05
ethyl 4-O-feruloylquinic acid (6)	6.5	C ₁₉ H ₂₄ O ₉	395.1360	3.0	191.06; 179.04; 161.02; 149.06; 135.05
4-O-sinapoylquinic acid (7)	4.7	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₀	397.1144	1.0	329.09; 191.06; 179.04; 161.02; 135.05
3-O-caffeoylshikimic acid (8)	6.9	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	335.0774	0.6	275.05; 179.04; 161.02; 135.05
Catechins and Flavanone-chromone					
catechin (9) (or epicatechin)	4.3	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0726	2.8	245.08; 221.08; 203.07; 187.04; 151.04; 137.05; 123.05; 109.03
catechin-3'-O-glucopyranoside (10) (catechin-3'-O-glucuronide)	5.7	C ₂₄ H ₂₀ O ₉	451.1051	3.5	341.07; 323.06; 297.08; 231.03; 217.02; 189.02; 177.02; 151.04; 123.05; 109.03
Catechin-3-O-gallate-3'',5''-dimethyl (11) (lysidicichin)	4.4	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₀	469.1150	2.1	341.07; 315.09; 289.07; 245.08; 205.05; 179.04; 151.04; 135.05; 109.03
catechin-3-O-gallate-3'',4'',5''-trimethyl (12) [or 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin]	6.2	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₀	483.1288	-1.9	341.07; 289.07; 245.08; 205.05; 179.03; 151.04; 109.03
phyllocoumarin (13) (C-8,C-7-O-δ-lactone-catechin, or C-8,C-7-O-δ-lactone-epicatechin)	6.0	C ₁₈ H ₁₄ O ₇	341.0678	3.2	323.06; 281.05; 231.03; 217.01; 203.04; 189.02; 177.02; 151.04; 123.05; 109.03
cinchonain Ia (14), or cinchonain Ib, epi- and catechins derivatives	3.8	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	451.1254	1.8	289.07; 245.08; 203.07; 179.04; 161.08; 137.02; 109.03
cinchonain Id 7-O-β-D-glucopyranoside (15)	5.5	C ₃₀ H ₃₀ O ₁₄	613.1552	-1.8	451.10; 341.07; 289.07; 217.01; 161.02; 109.03
naringenin(3→8)-5,7-dihydroxichromone (16)	7.8	C ₂₄ H ₁₆ O ₉	447.0716	-1.3	429.06; 403.08; 323.02; 295.02; 251.03; 223.04; 151.04; 123.05

TABELA A.14 - Metabólitos identificados usando a ferramenta de rede molecular e espectros MS/MS (continuação).

Proposed compounds identify	RT min	Molecular formula	[M-H] ⁻ Measured	Mass accuracy (ppm)	MS/MS main fragments
Flavonols					
canferol-3- <i>O</i> -β-D-galactoside (trifolin) (17a), or canferol-3- <i>O</i> -β-D-glucoside (astragalín) (17b)	5.9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0939	1.3	285.04; 284.03; 270.05; 255.03; 227.04
quercetin-3- <i>O</i> -β-D-galactoside (hyperoside) (18a), or quercetin-3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside (isoquercitrin) (18b)	5.5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0896	3.0	301.03; 300.03; 283.02; 243.03; 161.02; 151.00
canferol-3- <i>O</i> -α-L-arabinoside (canferol-3- <i>O</i> -β-D-xyloside) (19)	6.1	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	417.0811	-3.8	284.03; 255.03; 227.03; 170.06; 107.01
canferol-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -trans- <i>p</i> -coumaroyl)-glucopyranoside (20) [synonyms: tribuloside, 6''- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyltrifolin, 6''- <i>O</i> -(<i>para</i> -coumaroyl)astragalín, tilirosid]	7.1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	593.1315	2.4	447.09; 285.04; 284.03; 255.03; 145.03
Canferol-3- <i>O</i> -(3,6-di- <i>O</i> -trans- <i>p</i> -coumaroyl)-glucopyranoside (21) [synonyms: 3'',6''-di- <i>O</i> -(<i>para</i> -coumaroyl)astragalín, (3'',6''-di- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyltrifolin)]	8.6	C ₃₉ H ₃₂ O ₁₅	739.1677	1.2	593.13; 453.12; 447.09; 285.04; 255.03; 229.05; 163.04; 151.00; 145.03
3'',6''-di- <i>O</i> -(<i>para</i> -coumaroyl)isoquercitrin (22) [quercetin 3-(3'',6''-di- <i>p</i> -coumaryl)glucoside]	8.1	C ₃₉ H ₃₂ O ₁₆	755.1616	-0.3	609.12; 469.11; 463.09; 323.08; 301.04; 285.04; 203.04; 179.04; 161.02; 145.03; 135.05
Anthraquinone glycoside, Anthrone C-glycosides, Oxanthrone C-glycosides, and Dianthrones					
chrysophanol-8- <i>O</i> -β-D-glycoside (23)	9.3	C ₂₅ H ₂₀ O ₆	415.1180	-1.7	253.05; 224.05
picramnioside D (24)	9.6	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₀	507.1289	-1.6	297.07; 255.07; 211.08
debenzoyl-picramnioside D (25)	7.0	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	403.1030	-1.2	297.08; 255.07; 239.07; 211.08
chrysaloin (11-deoxyaloin) (26)	7.0	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	401.1237	-1.2	281.08; 239.07
nataloin (27)	5.6	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.1191	0.0	297.08; 255.07; 225.06
7-hydroxyaloin B (28) Model compound					
cassialoin (29)	6.9	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.1188	-0.7	297.08; 254.06; 240.04
rumejaposide E (30)	5.5	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.1136	-0.9	270.05; 253.05; 241.05; 224.04; 197.06
debenzoyl-mayosides D (31)	6.5	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	403.1023	3.0	270.05; 253.05; 240.04; 193.07

TABELA A.14 - Metabólitos identificados usando a ferramenta de rede molecular e espectros MS/MS (continuação).

Proposed compounds identify	RT min	Molecular formula	[M-H] ⁻ Measured	Mass accuracy (ppm)	MS/MS main fragments
Anthraquinone glycoside, Anthrone C-glycosides, Oxanthrone C-glycosides, and Dianthrones					
emodin bianthrone (32)	12.4	C ₃₀ H ₂₂ O ₈	509.1245	0.6	491.11; 478.11; 463.12; 311.17; 256.05; 254.06; 225.06; 211.04; 197.06
palmidin C (33)	14.3	C ₃₀ H ₂₂ O ₇	493.1289	-0.8	254.06; 238.06; 226.06; 225.06
Quassinoids					
picrasin G (34)	7.7	C ₂₁ H ₂₈ O ₇	391.1771	2.3	373.16; 347.19; 332.16; 329.18; 317.14; 314.15; 299.13; 287.10; 242.13
nigakilactone K (35)	8.5	C ₂₂ H ₃₀ O ₇	405.1925	1.5	361.20; 346.18; 343.19; 331.16; 328.17; 316.13; 313.14; 296.14; 289.14; 285.14
11-oxonigakilactone K (36)	8.9	C ₂₂ H ₂₈ O ₇	403.1762	1.5	359.19; 344.16; 341.18; 329.14; 326.15; 311.13; 285.15; 247.13
indaquassin E (37)	6.9	C ₂₅ H ₃₄ O ₁₁	509.2033	1.0	409.15; 391.14; 361.10; 311.12; 285.11; 267.10
Proposed compounds identify	RTmin	Molecular formula	[M+H] ⁺ Measured	Mass accuracy	MS/MS main fragments
shinjuglycoside B (38)	5.0	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₂	563.2111 [M+Na] ⁺	1.2	401.16; 383.15; 353.14; 325.14; 337.11; 293.11; 203.05
Proposed compounds identify	RT min	Molecular formula	[M-H] ⁻ Measured	Mass accuracy (ppm)	MS/MS main fragments
Vitanolídeos					
4β,27-dihidroxi-l-oxo-7-methoxywitha-2,5,24-trienolide + Formic acid (39a)	10.3	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	529.2805	0.4	483.27; 468.25; 453.23; 439.29; 395.30; 339.23; 227.15; 185.14
4β,27-dihidroxi-l-oxo-7-methoxywitha-2,5,24-trienolide (39)	10.0	C ₂₉ H ₄₀ O ₆	483.2745	-1.4	468.25; 453.23; 439.28; 421.27; 395.30; 339.23; 281.19; 227.14; 185.10; 151.08

TABELA A.14 - Metabólitos identificados usando a ferramenta de rede molecular e espectros MS/MS (continuação).

Proposed compounds identify	RT min	Molecular formula	[M-H] ⁻ Measured	Mass accuracy (ppm)	MS/MS main fragments
Vitanolídeos					
27-glucosyl-4β-hydroxy-l-oxo-7-methoxywitha-2,5,24-trienolide + Formic acid (40a)	8.0	C ₃₆ H ₅₂ O ₁₃	691.3318	-2.5	645.33; 601.34; 525.28; 483.27; 439.28; 405.24 343.22
27-deglucosyl-27-hydroxy-7-dehydroxy-7-methoxy-daturametelin I (41)	13.5	C ₂₉ H ₄₀ O ₅	467.2800	-0.6	452.26; 449.27; 437.23; 423.29; 419.22; 408.27; 405.28; 395.26; 393.24; 387.27; 379.30; 375.23; 371.19; 364.28; 361.29; 351.27; 349.25; 327.20; 307.21; 295.21; 283.21; 235.13; 191.14
2,3-dihidro-3-methoxyvitaferin A (42)	9.3	C ₂₉ H ₄₂ O ₇	501.2848	-2.0	457.30; 413.30; 383.26; 365.25; 339.27; 321.26; 283.21; 267.17; 191.14
27-Dehydroxi-2,3-dihidro-3-methoxyvitaferin A (43)	12.1	C ₂₉ H ₄₂ O ₆	485.2902	-1.0	467.28; 455.24; 441.30; 423.29; 411.25; 397.31; 383.26; 367.26; 365.25; 353.21; 339.27; 321.26; 309.22; 295.21; 273.15; 229.15; 191.14

FIGURA A.49 - Rede molecular para amostras das espécies *Picramnia*, *Quassia amara* e *Trichilia catigua*, usando dados MS/MS com modo de ionização negativo.

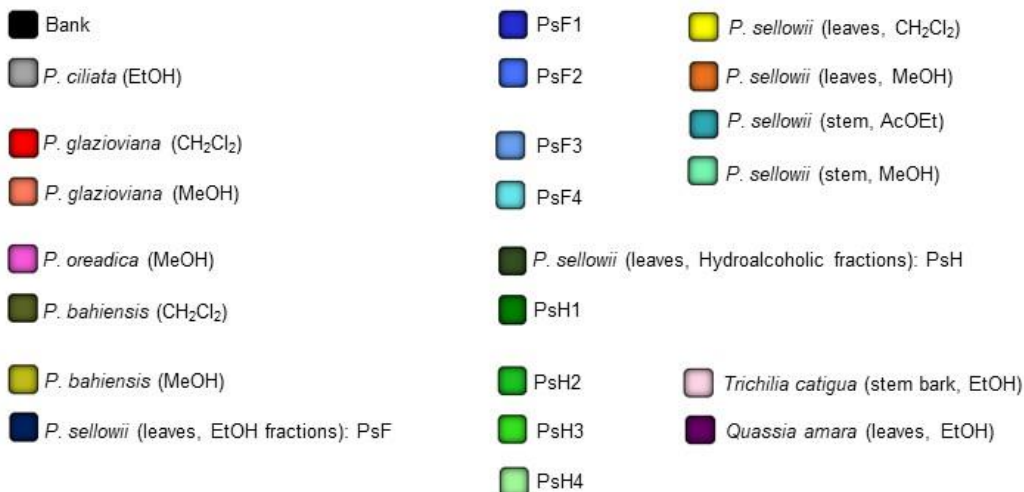
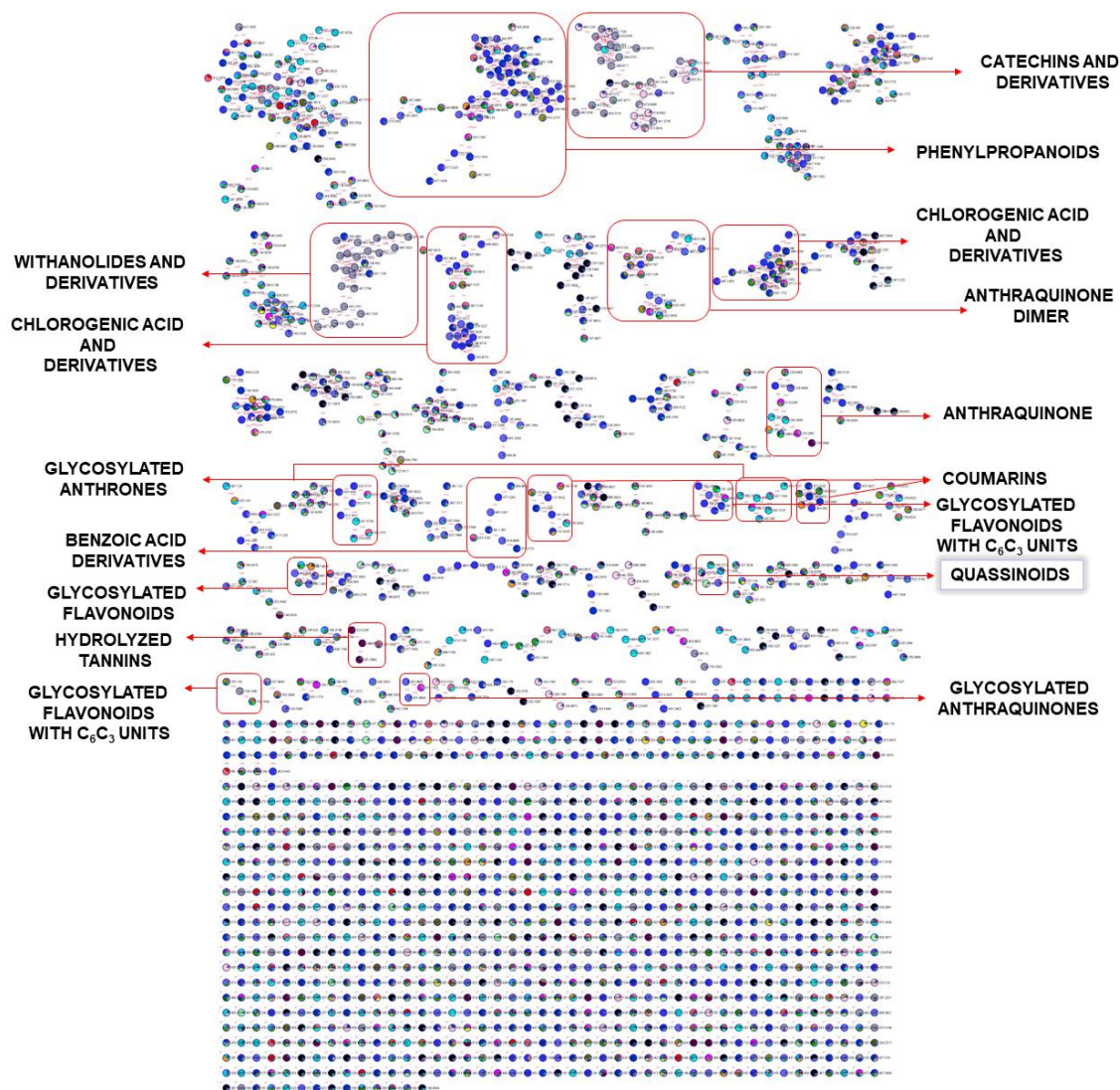
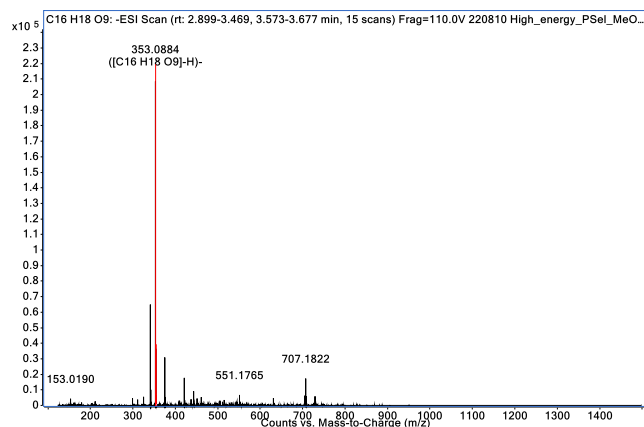
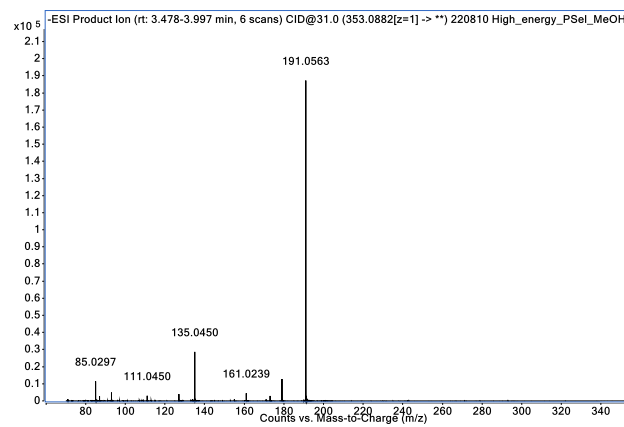


FIGURA A.50 - Espectros de MS e MS/MS dos ácidos clorogênicos e seus derivados, substâncias **1** e **2**.

5-O-caffeoylquinic acid (**1**) - 353.0884 [M-H]⁻

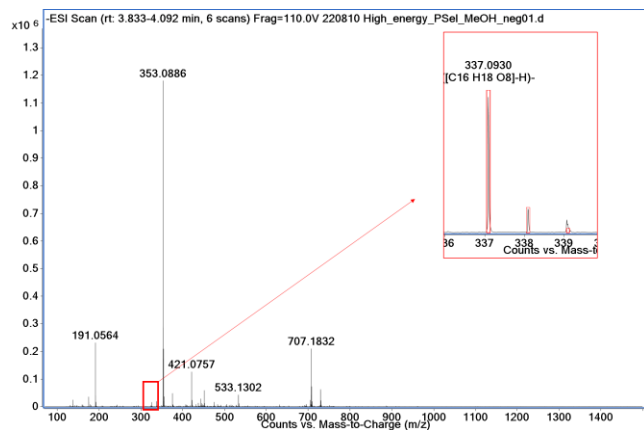


MS spectrum

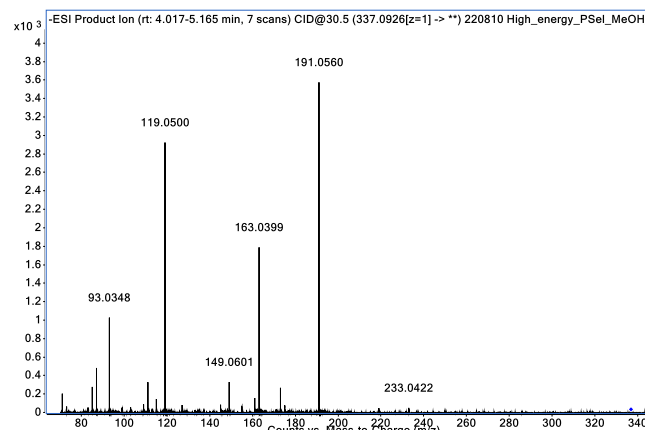


MS/MS spectrum

3-O-p-coumaroylquinic acid (**2**) 337.0930 [M-H]⁻

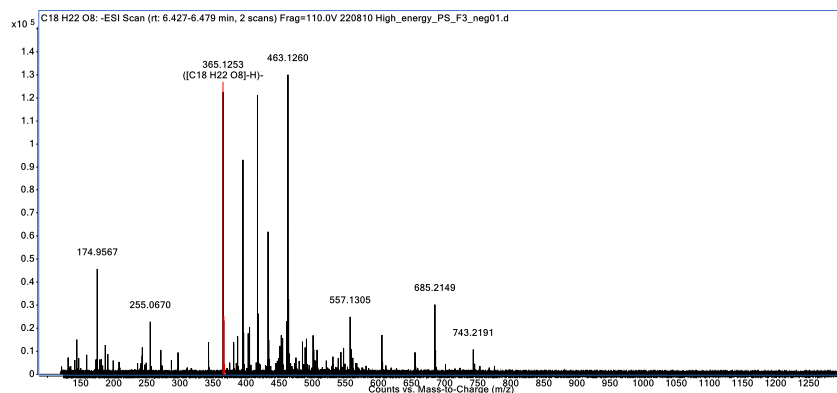


MS spectrum

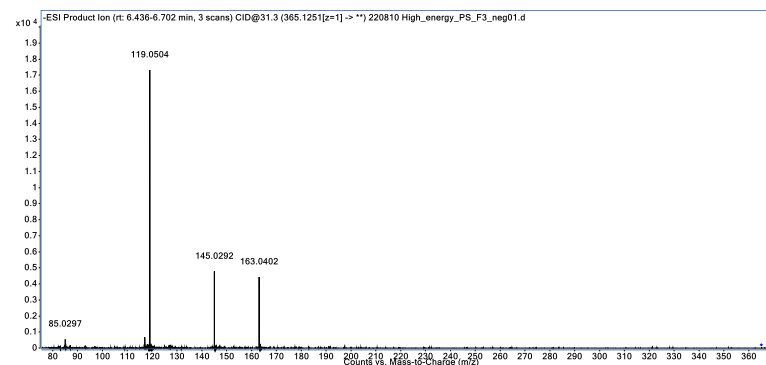


MS/MS spectrum

FIGURA A.51 - Espectros de MS e MS/MS dos ácidos clorogênicos e seus derivados, substâncias **3** e **4**.
ethyl 3-*O*-*p*-coumaroylquinatate (**3**) 365.1253 [M-H]⁻

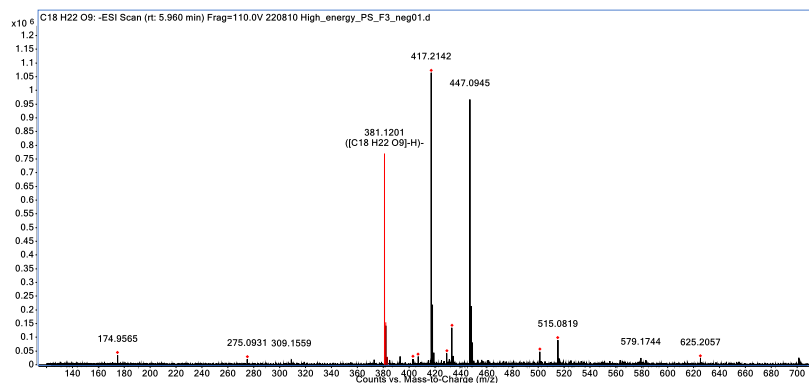


MS spectrum

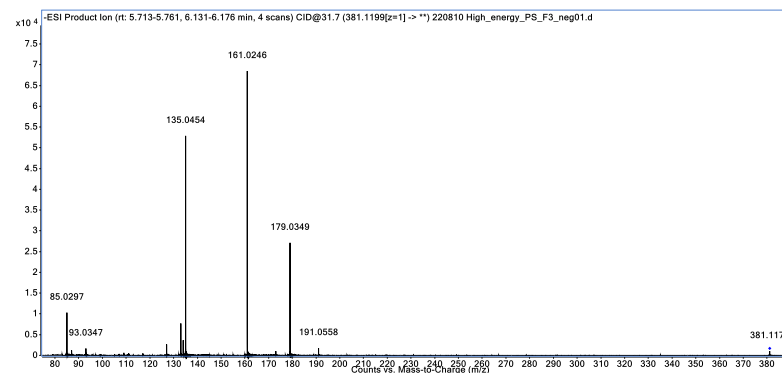


MS/MS spectrum

ethyl 4-*O*-caffeoylquinatate (**4**) 381.1201 [M-H]⁻

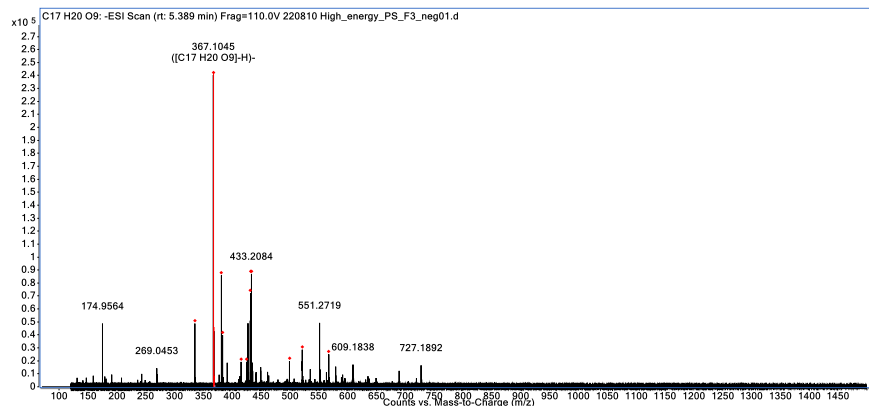


MS spectrum

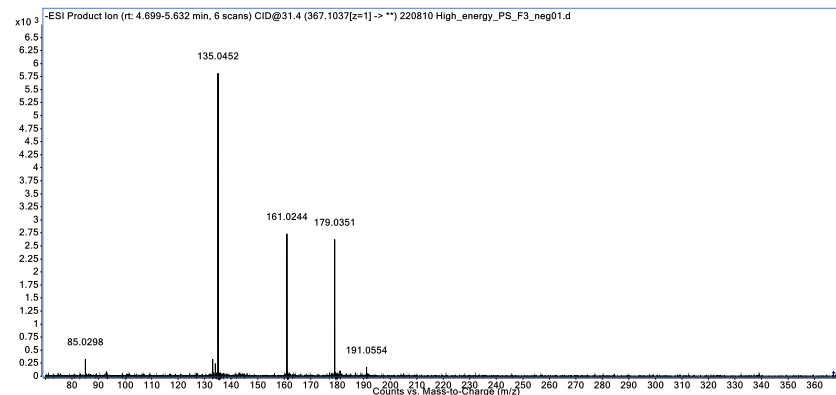


MS/MS spectrum

FIGURA A.52 - Espectros de MS e MS/MS dos ácidos clorogênicos e seus derivados, substâncias **5** e **6**.
trans-3-*O*-feruloylquinic acid (**5**) 367.1045 [M-H]⁻

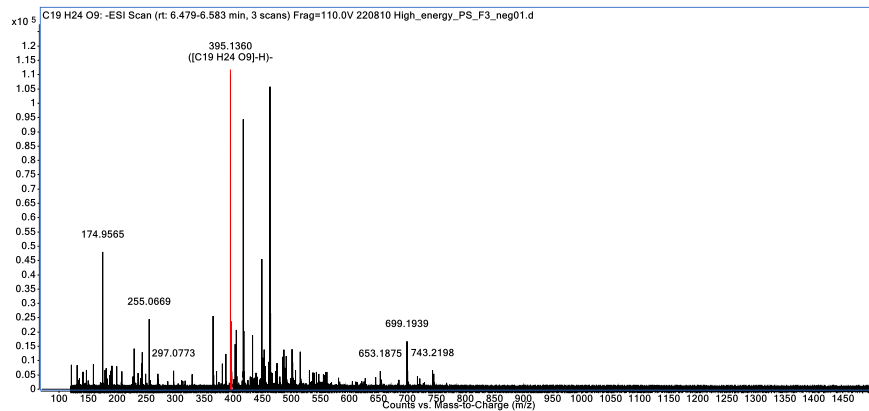


MS spectrum

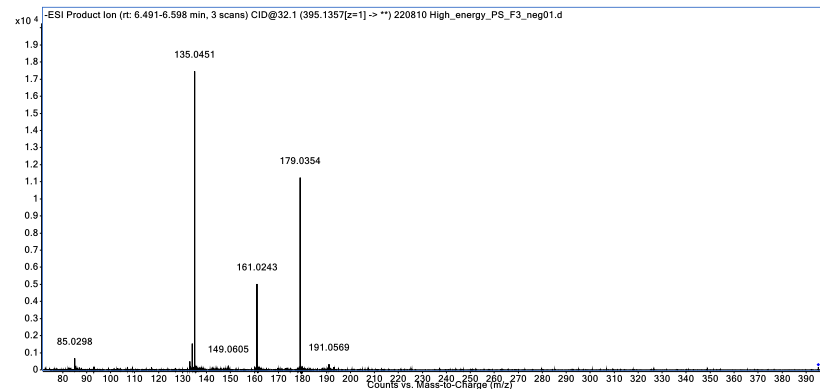


MS/MS spectrum

ethyl 4-*O*-feruloylquinic acid (**6**) 395.1360 [M-H]⁻



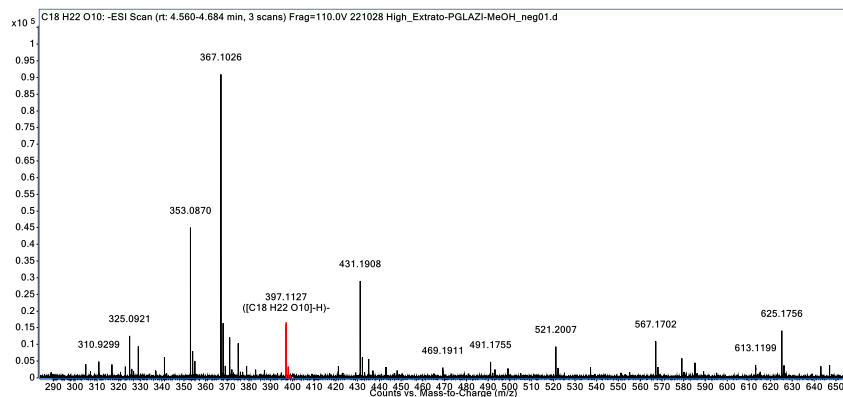
MS spectrum



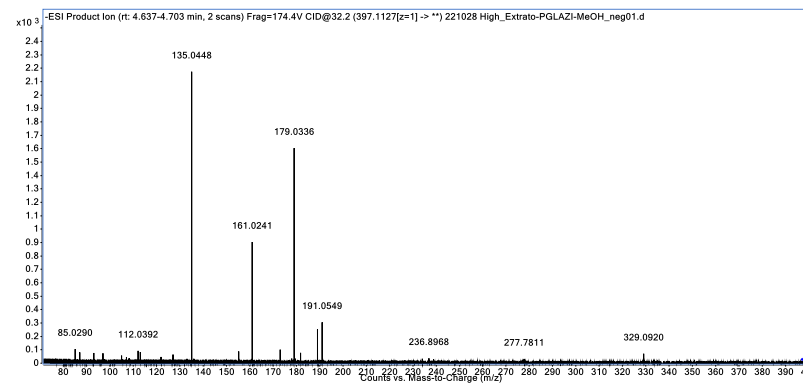
MS/MS spectrum

FIGURA A.53 - Espectros de MS e MS/MS dos ácidos clorogênicos e seus derivados, substâncias **7** e **8**.

4-*O*-sinapoylquinic acid (**7**) 397.1144 [M-H]⁻

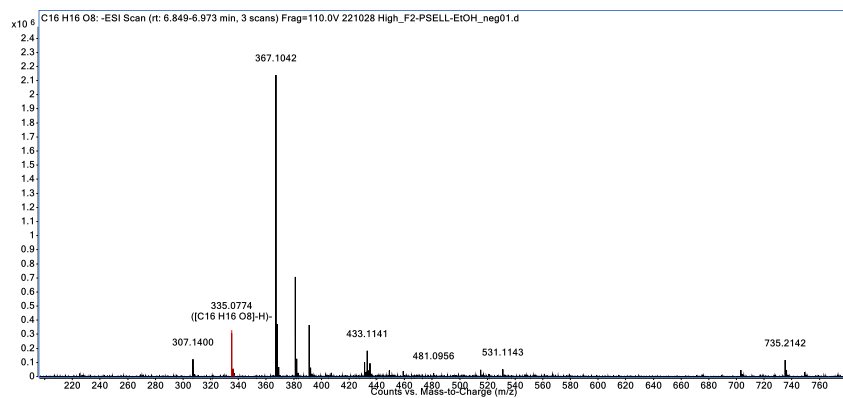


MS spectrum

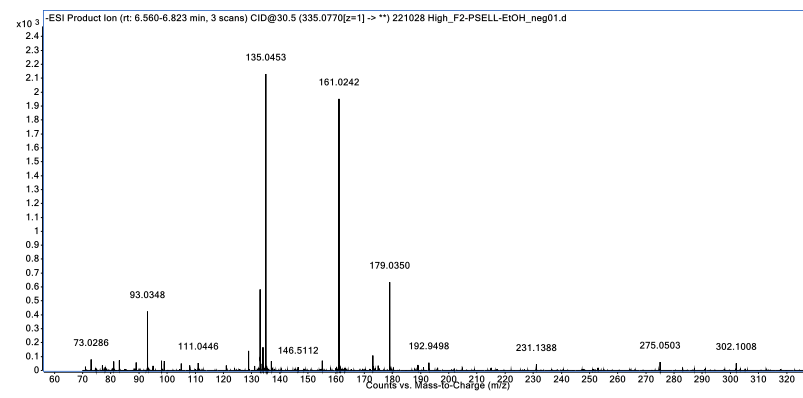


MS/MS spectrum

3-*O*-caffeoylshikimic acid (**8**) 335.0774 [M-H]⁻

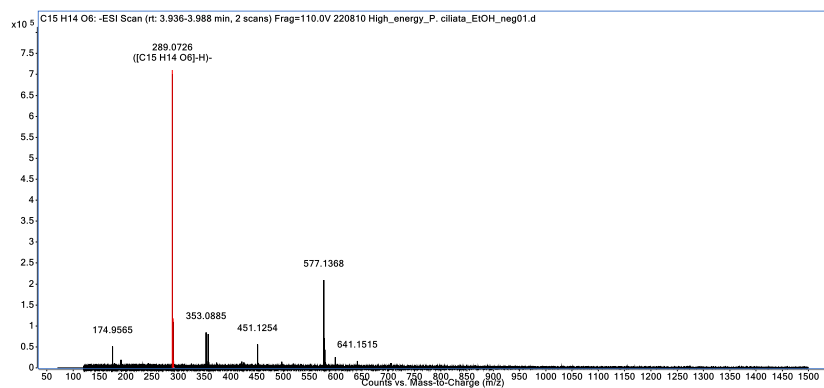


MS spectrum

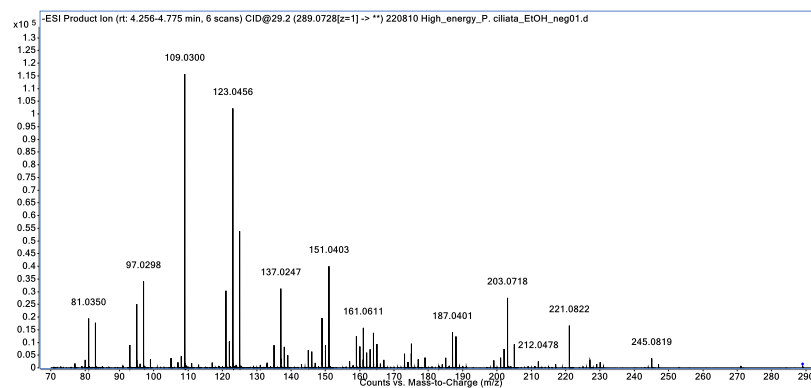


MS/MS spectrum

FIGURA A.54 - Espectros de MS e MS/MS de catequinas e flavanonas-cromonas, substâncias **9** e **10**. catechin (**9**) (or epicatechin) 289.0726 [M-H]⁻

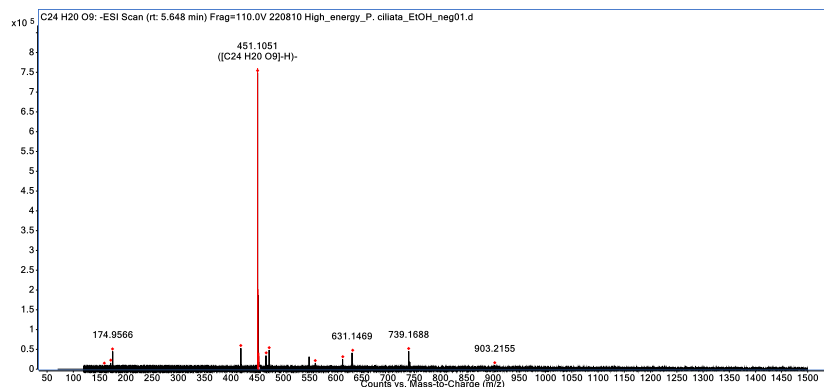


MS spectrum

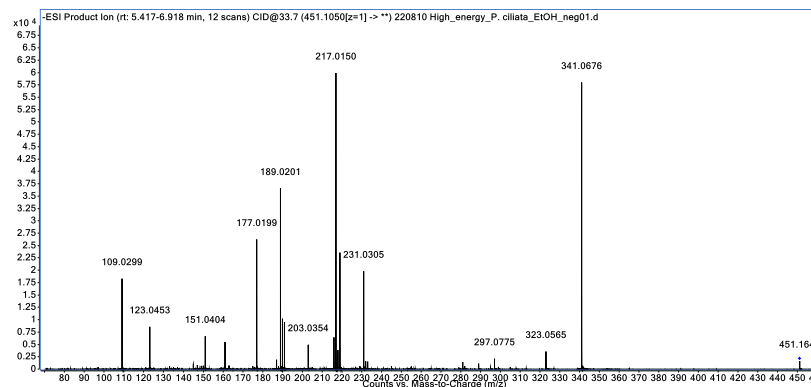


MS/MS spectrum

catechin-3'-O-glucopyranoside (**10**) (catechin-3'-O-glucuronide) 451.1051 [M-H]⁻

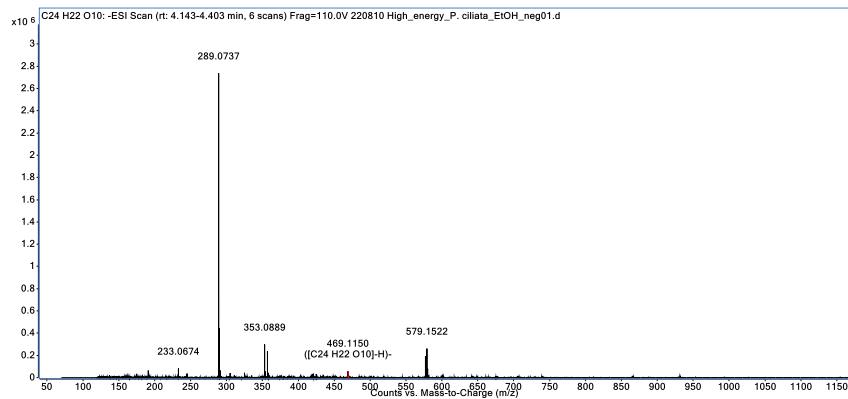


MS spectrum

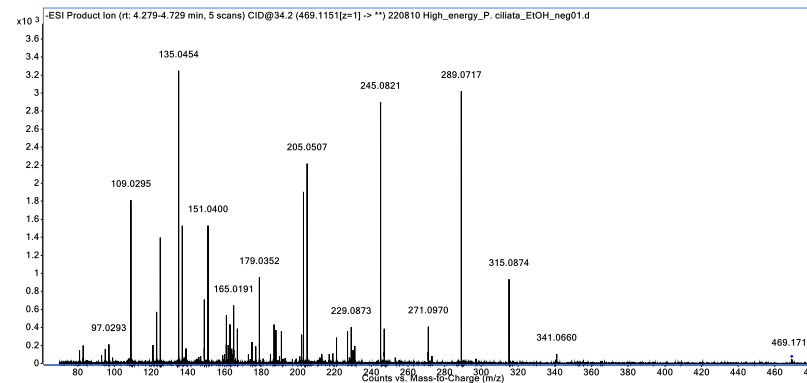


MS/MS spectrum

FIGURA A.55 - Espectros de MS e MS/MS de catequinas e flavanonas-cromonas, substâncias **11** e **12**.
 Catechin-3-O-gallate-3'',5''-dimethyl (11) (lysidicichin) 469.1150 [M-H]⁻

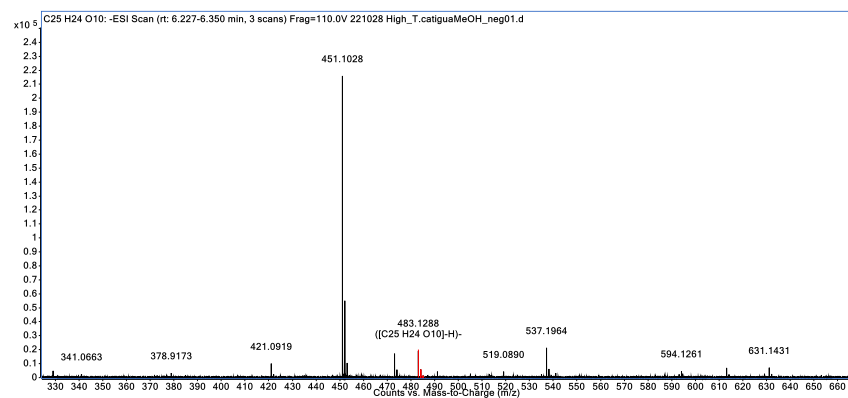


MS spectrum

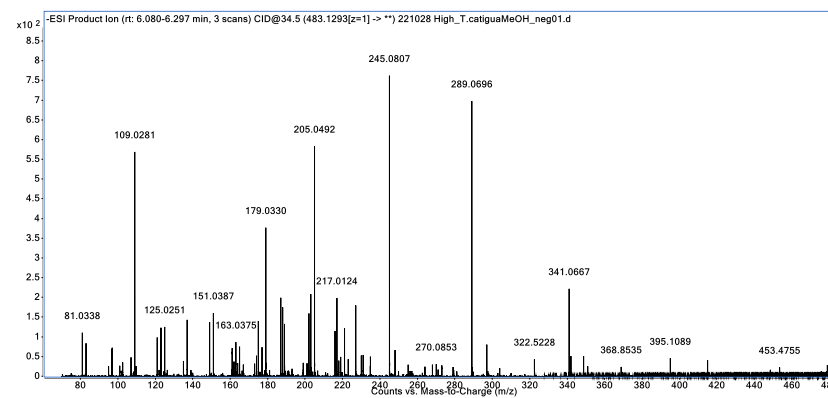


MS/MS spectrum

catechin-3-O-gallate-3'',4'',5''-trimethyl (12) [or 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin] 483.1288 [M-H]⁻

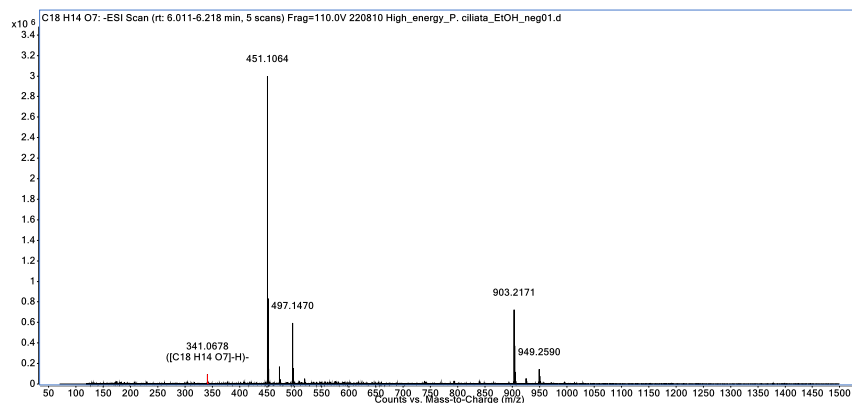


MS spectrum

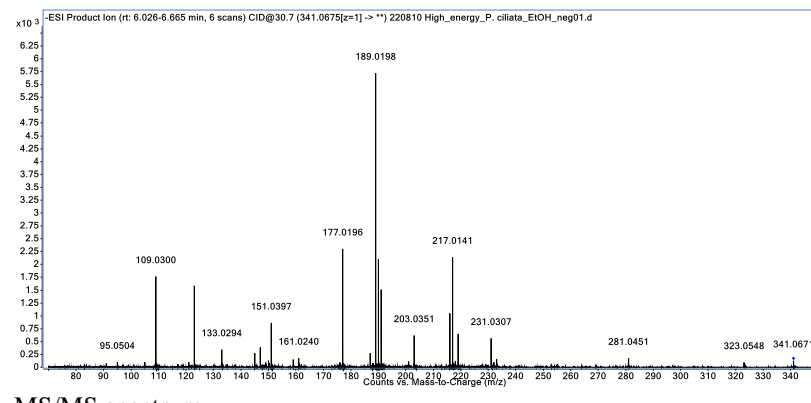


MS/MS spectrum

FIGURA A.56 - Espectros de MS e MS/MS de catequinas e flavanonas-cromonas, substâncias **13** e **14**.
 phyllocoumarin (**13**) (C-8,C-7-O- δ -lactone-catechin, or C-8,C-7-O- δ -lactone-epicatechin) 341.0678 [M-H]⁻

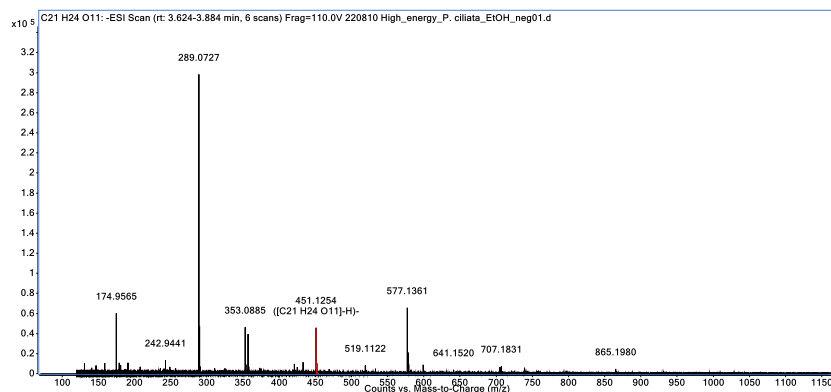


MS spectrum

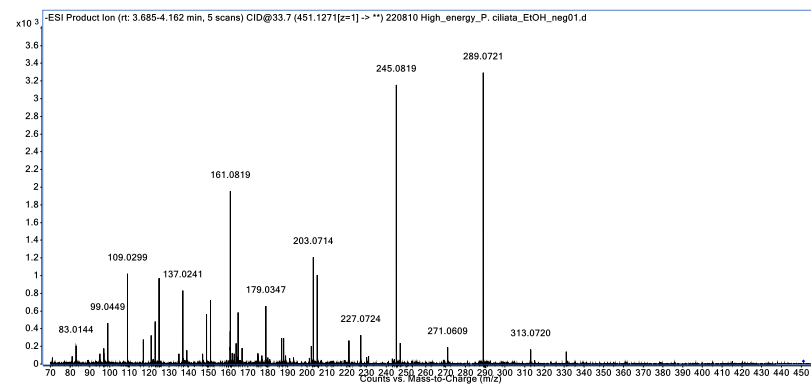


MS/MS spectrum

cinchonain Ia (**14**), or cinchonain Ib, epi- and catechins derivatives 451.1254 [M-H]⁻

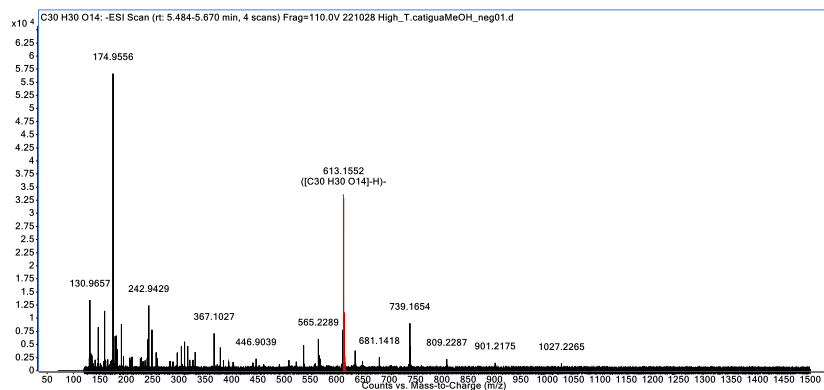


MS spectrum

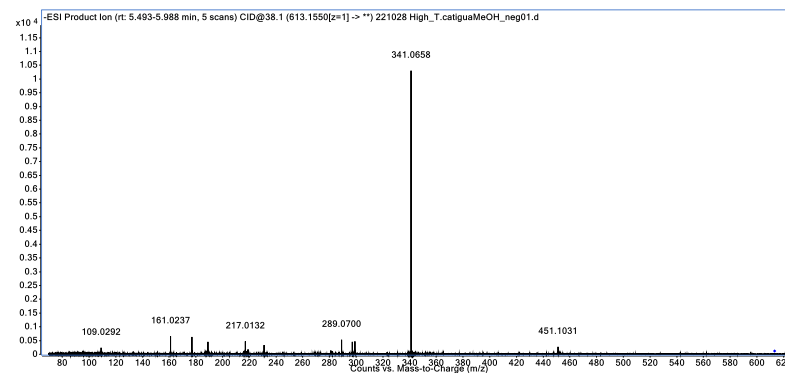


MS/MS spectrum

FIGURA A.57 - Espectros de MS e MS/MS de catequinas e flavanonas-cromonas, substâncias **15** e **16**.
 cinchonain Id 7-*O*-β-D-glucopyranoside (**15**) 613.1552 [M-H]⁻

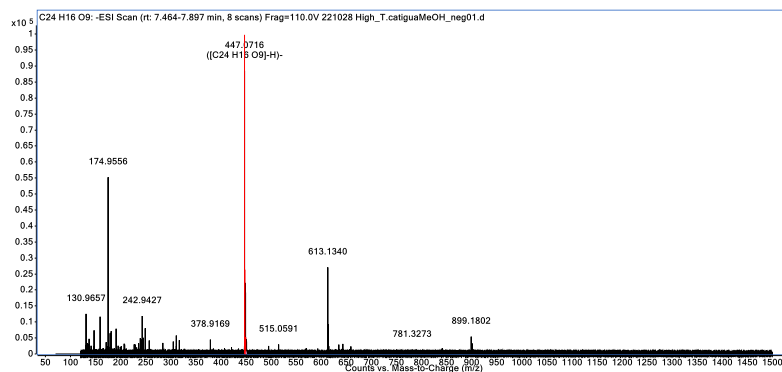


MS spectrum

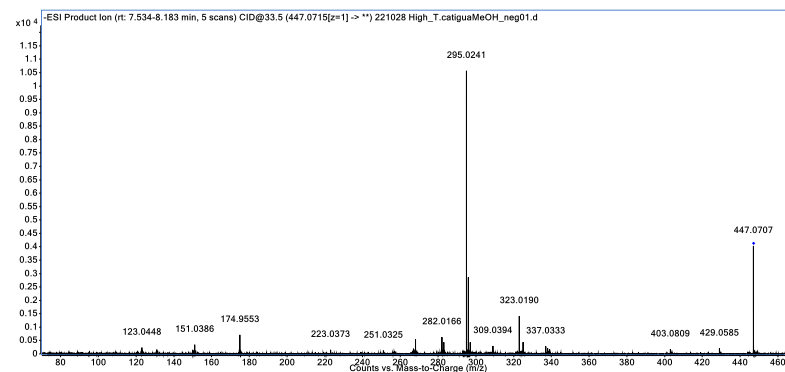


MS/MS spectrum

naringenina(3→8)-5,7-dihidroxi-chromone (**16**) 447.0716 [M-H]⁻

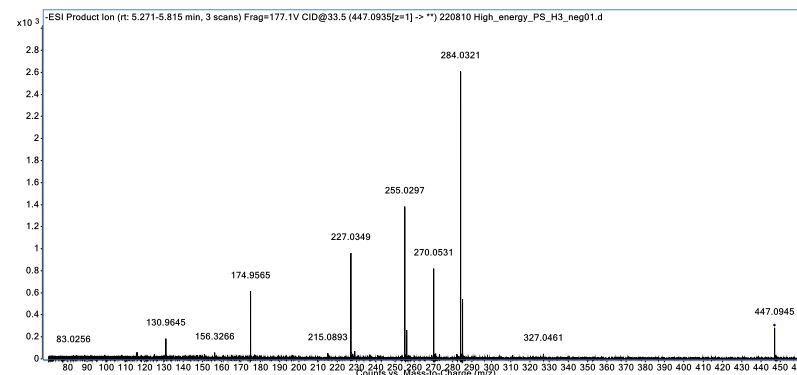
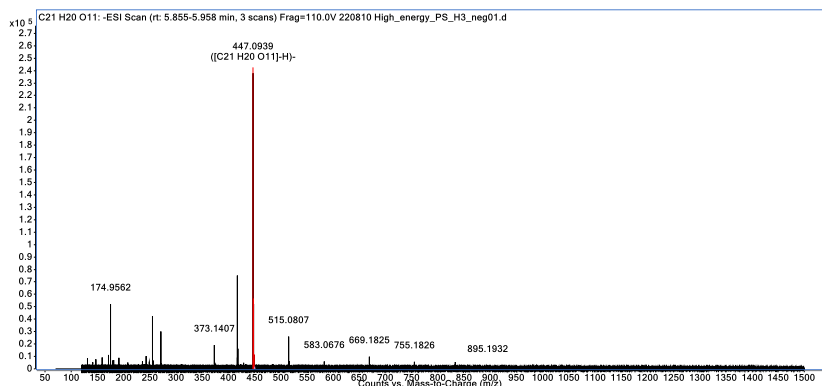


MS spectrum



MS/MS spectrum

FIGURA A.58 - Espectros de MS e MS/MS de flavonois, substâncias **17a**, **17b**, **18a**, e **18b**.
kaempferol-3-*O*- β -D-galactoside (trifolin) (**17a**), or kaempferol-3-*O*- β -D-glucoside (astragalin) (**17b**) 447.0939 [M-H]⁻



quercetin-3-*O*- β -D-galactoside (hyperoside) (**18a**), or quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside (isoquercetrin) (**18b**) 463.0896 [M-H]⁻

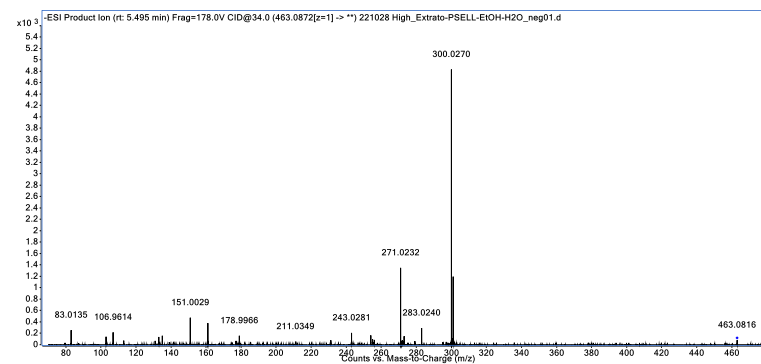
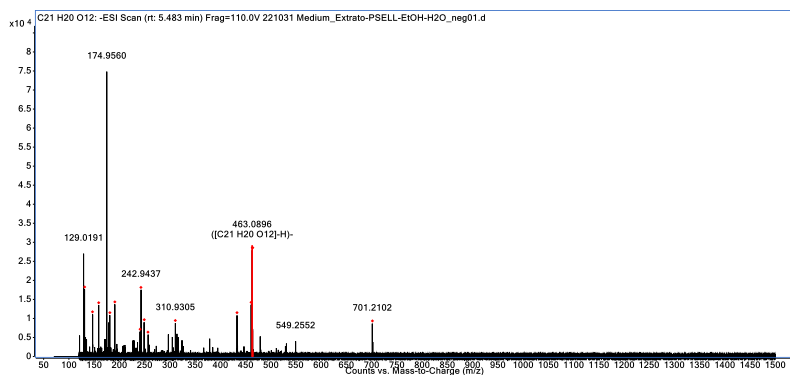
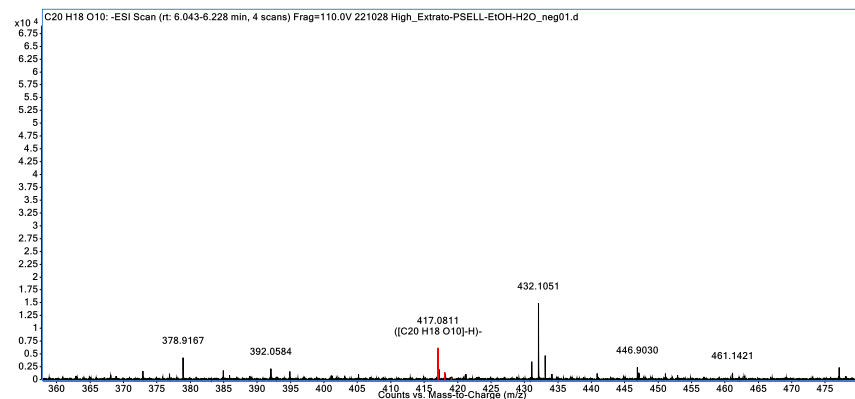
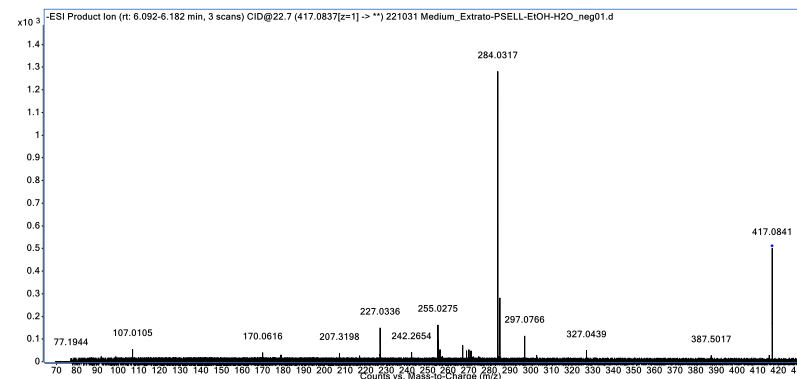


FIGURA A.59 - Espectros de MS e MS/MS de flavonois, substâncias **19** e **20**.

kaempferol-3-*O*- α -L-arabinoside (kaempferol-3-*O*- β -D-xyloside) (**19**) 417.0811 [M-H]⁻

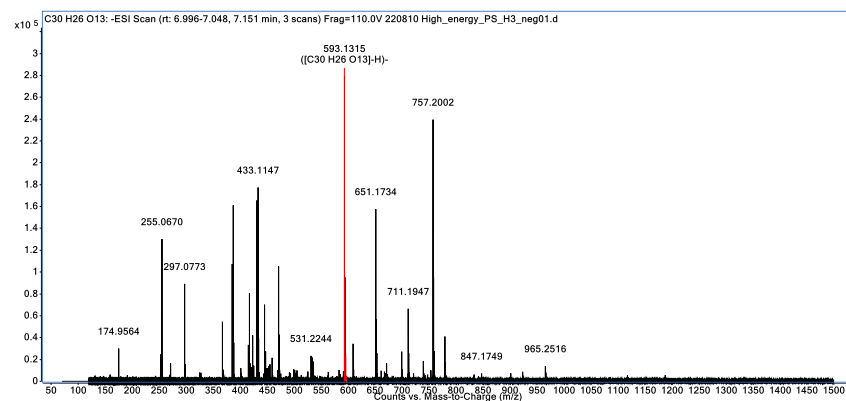


MS spectrum

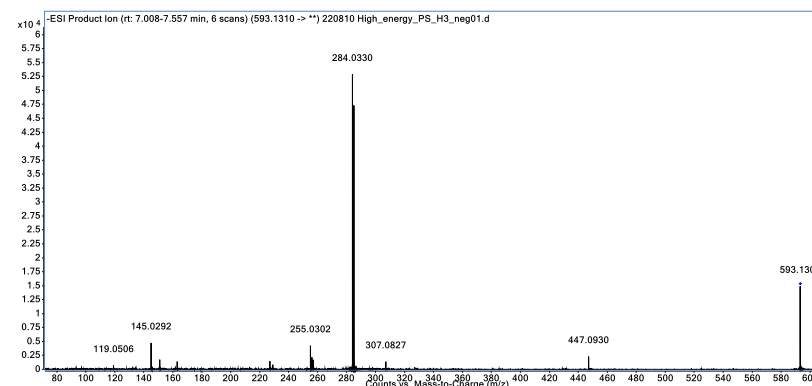


MS/MS spectrum

kaempferol-3-*O*-(6-*O*-trans-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside (**20**) [synonyms: tribuloside, 6''-*O*-*p*-coumaroyltrifolin, 6''-*O*-(*p*-coumaroyl)astragalin, tilirosid] 593.1315 [M-H]⁻



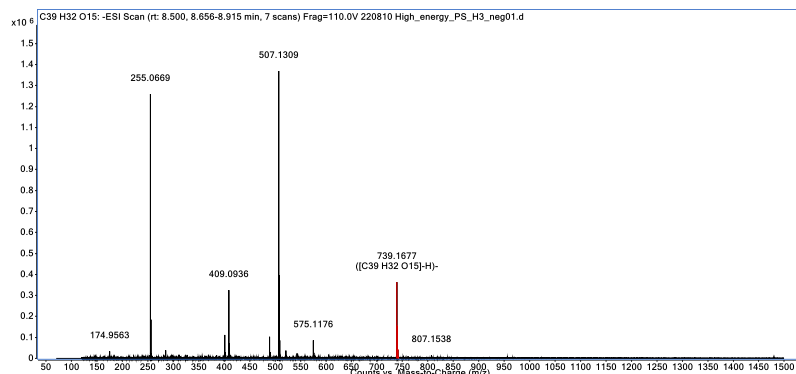
MS spectrum



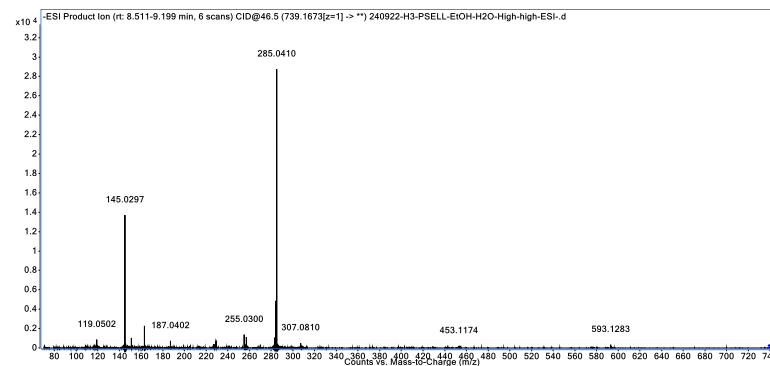
MS/MS spectrum

FIGURA A.60 - Espectros de MS e MS/MS de flavonois, substâncias **21** e **22**.

Kaempferol-3-*O*-(3,6-di-*O*-trans-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside (**21**) [synonyms: 3'',6''-di-*O*-(*para*-coumaroyl)astragalin, (3'',6''-di-*O*-*p*-coumaroyl)trifolin] 739.1677 [M-H]⁻

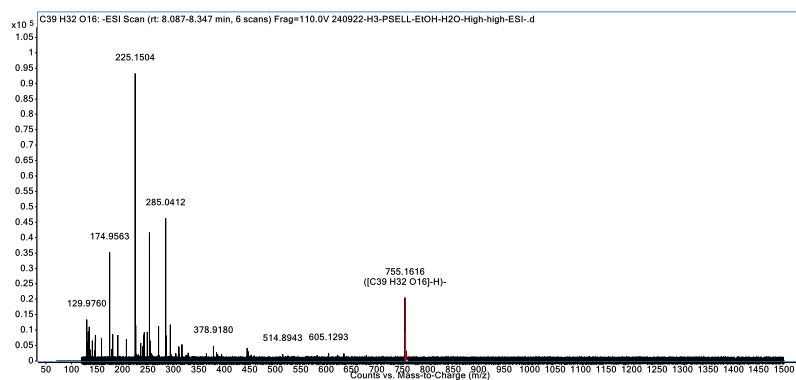


MS spectrum

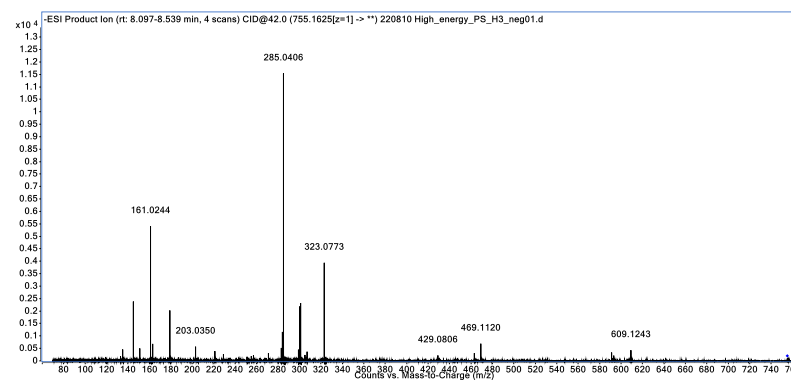


MS/MS spectrum

3'',6''-di-*O*-(*para*-coumaroyl)isoquercitrin (**22**) [quercetin 3-(3'',6''-di-*p*-coumaryl)glucoside] 755.1616 [M-H]⁻



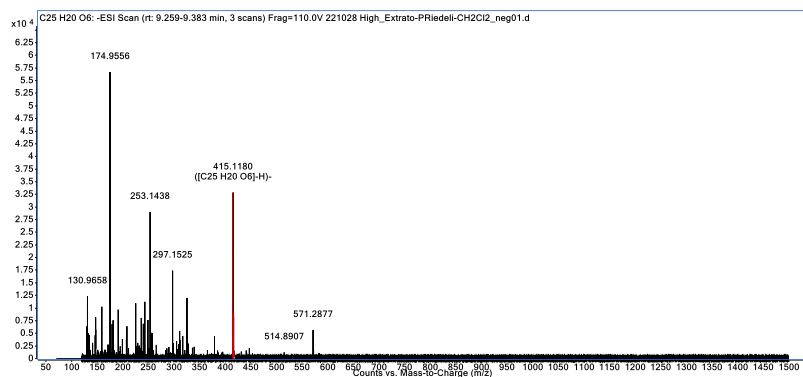
MS spectrum



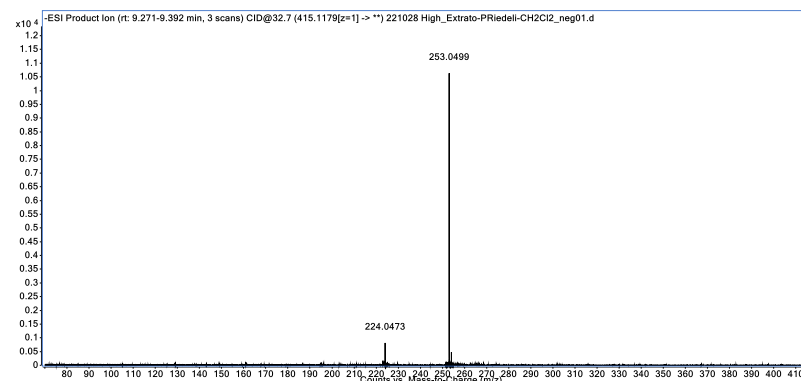
MS/MS spectrum

FIGURA A.61 - Espectros de MS e MS/MS de antraquinonas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas e diantronas, substâncias **23** e **24**.

chrysophanol-8-O-β-D-glycoside (**23**) 415.1180 [M-H]⁻

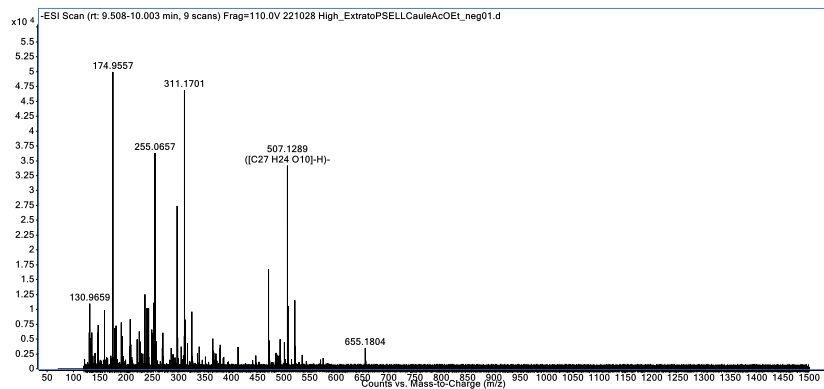


MS spectrum

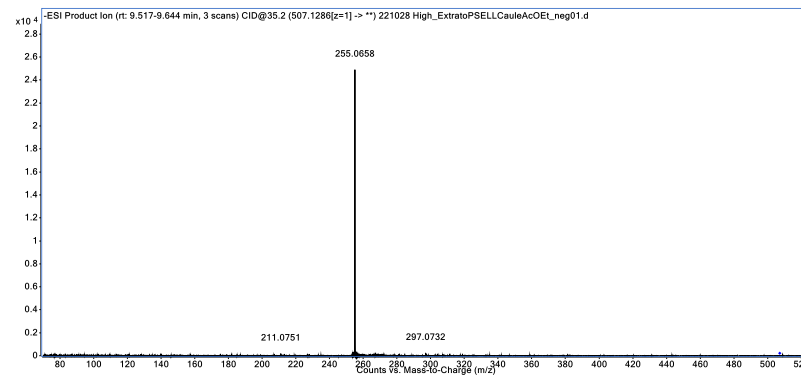


MS/MS spectrum

picramnioside D (**24**) 507.1289 [M-H]⁻



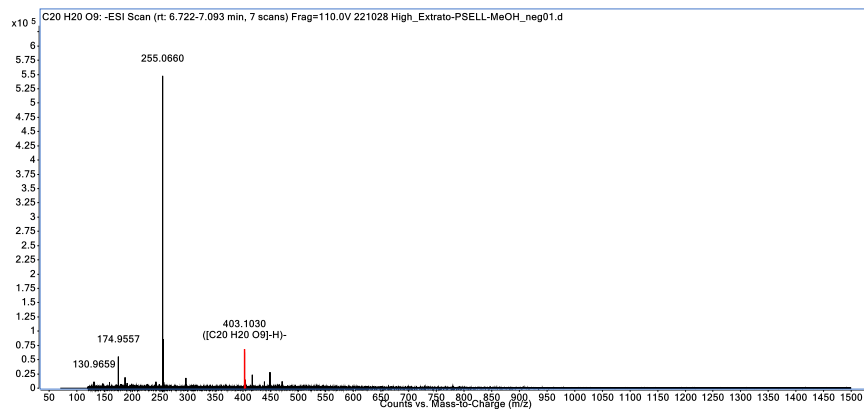
MS spectrum



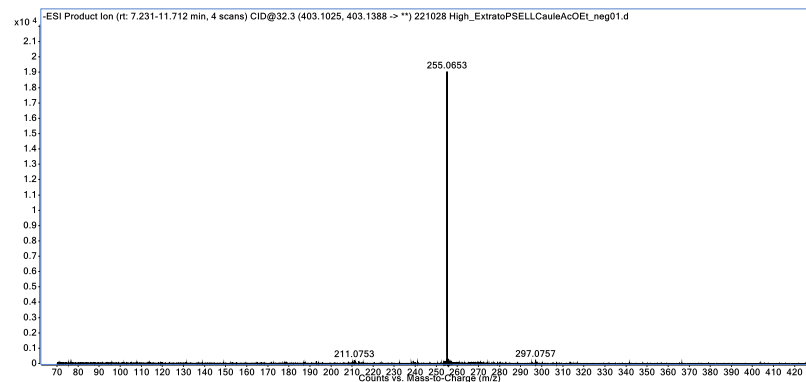
MS/MS spectrum

FIGURA A.62 - Espectros de MS e MS/MS de antraquinonas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas e diantronas, substâncias **25** e **26**.

debenzoyl-picramnioside D (**25**) 403.1030 [M-H]⁻

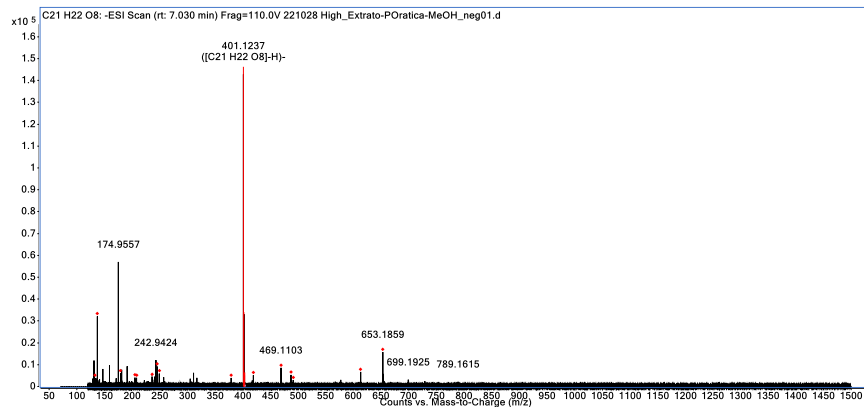


MS spectrum

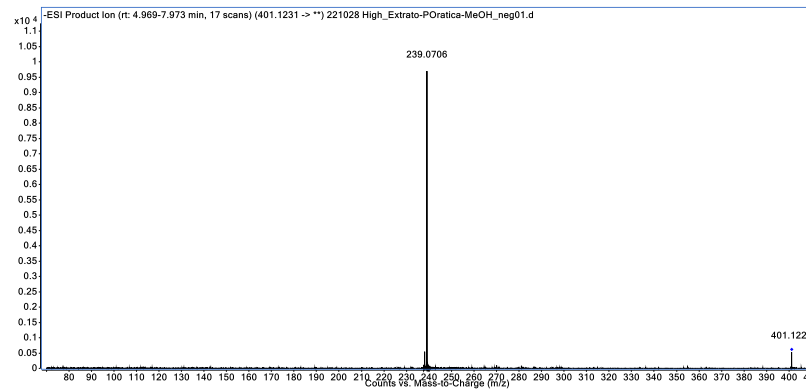


MS/MS spectrum

chrysaloin (11-deoxyaloin) (**26**) 401.1237 [M-H]⁻



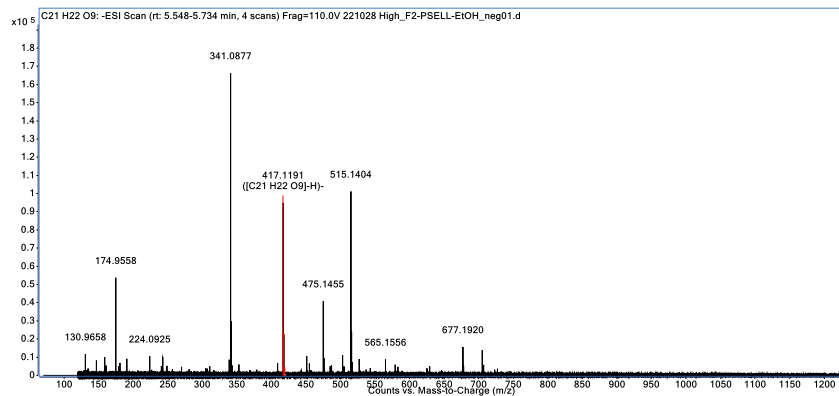
MS spectrum



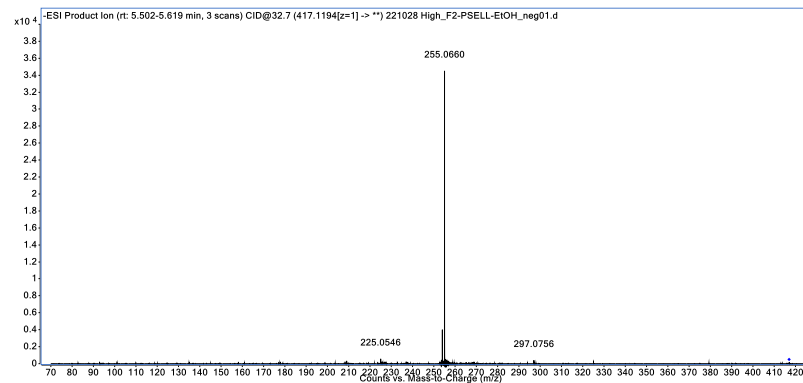
MS/MS spectrum

FIGURA A.63 - Espectros de MS e MS/MS de antraquinonas, antronas *C*-glicosiladas, oxantronas *C*-glicosiladas e diantronas, substâncias **27** e **29**.

nataloin (**27**) 417.1191 [M-H]⁻

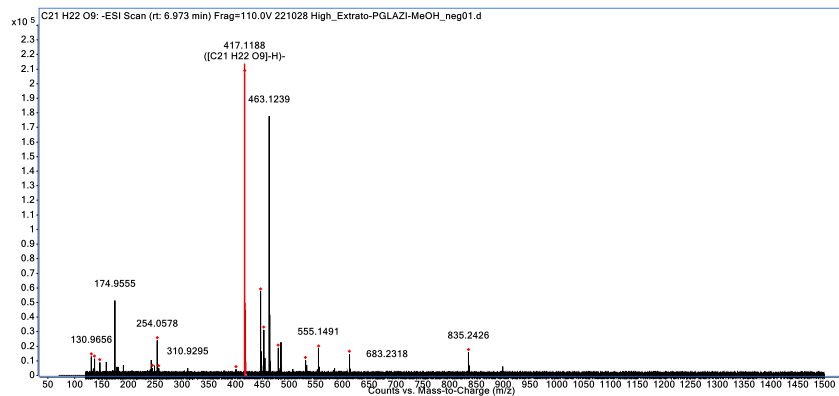


MS spectrum

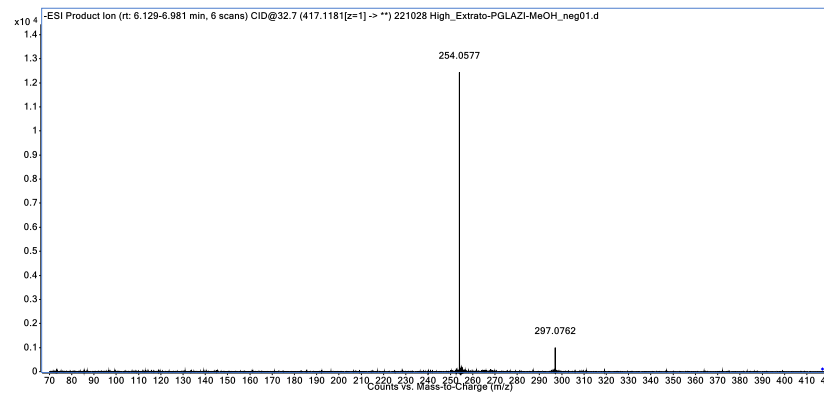


MS/MS spectrum

cassialoin (**29**) 417.1188 [M-H]⁻



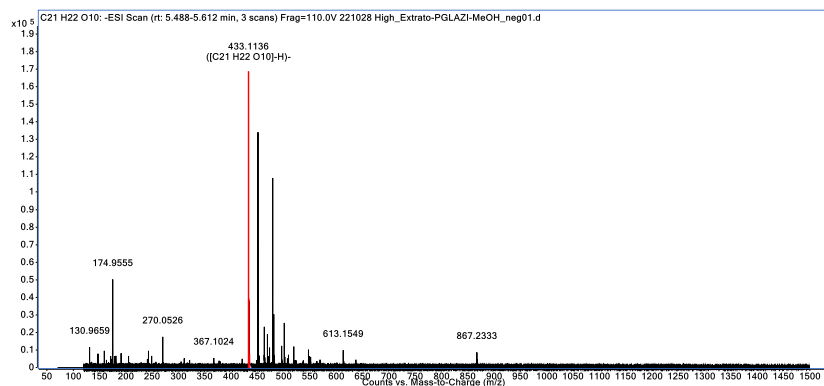
MS spectrum



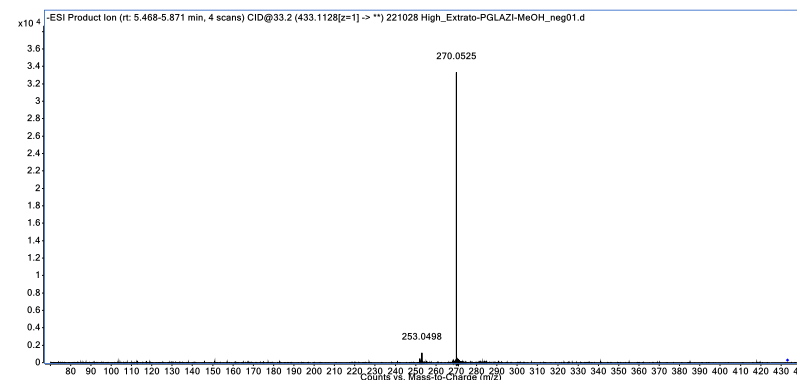
MS/MS spectrum

FIGURA A.64 - Espectros de MS e MS/MS de antraquinonas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas e diantronas, substâncias **30** e **31**.

rumejaposide E (**30**) 433.1136 [M-H]⁻

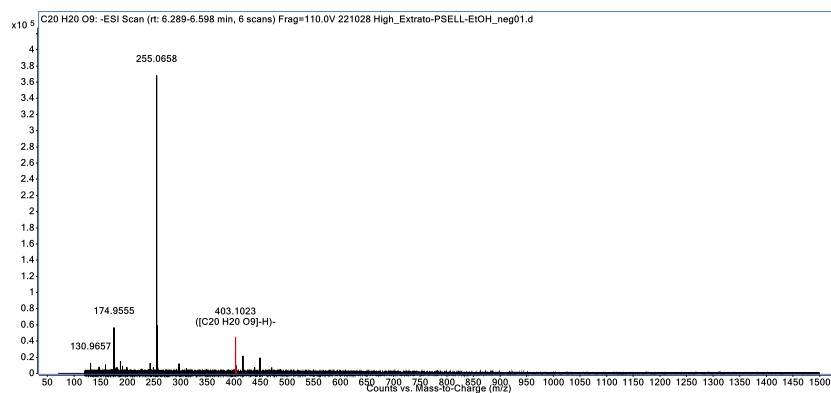


MS spectrum

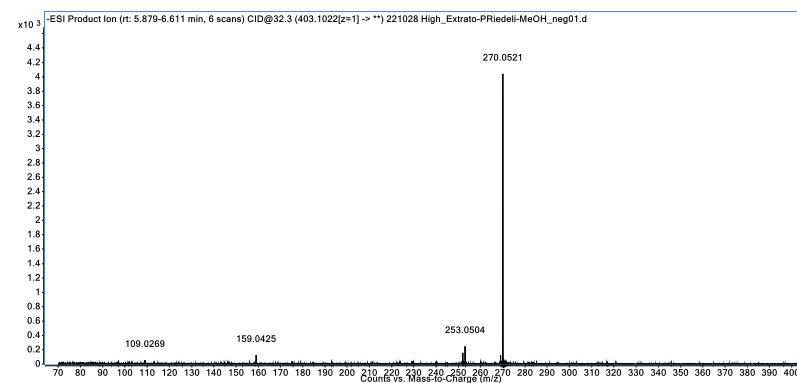


MS/MS spectrum

debenzoyl-mayosides D (**31**) 403.1023 [M-H]⁻



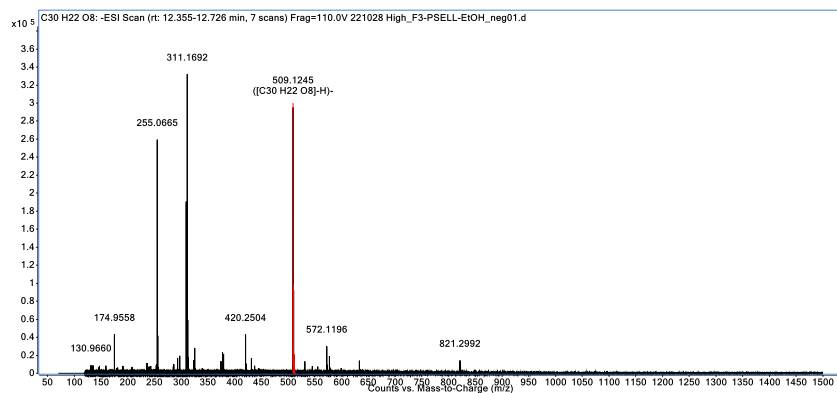
MS spectrum



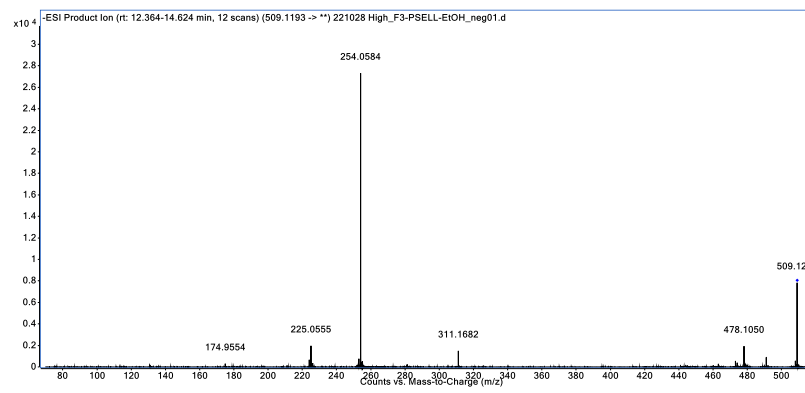
MS/MS spectrum

FIGURA A.65 - Espectros de MS e MS/MS de antraquinonas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas e diantronas, substâncias **32** e **33**.

emodin bianthrone (**32**) 509.1245 [M-H]⁻

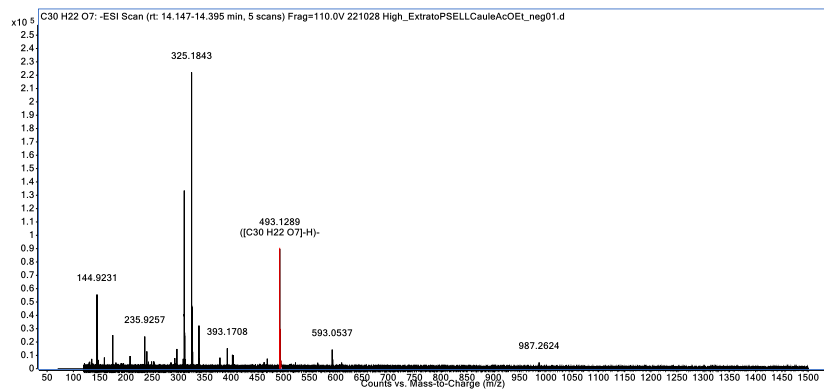


MS spectrum

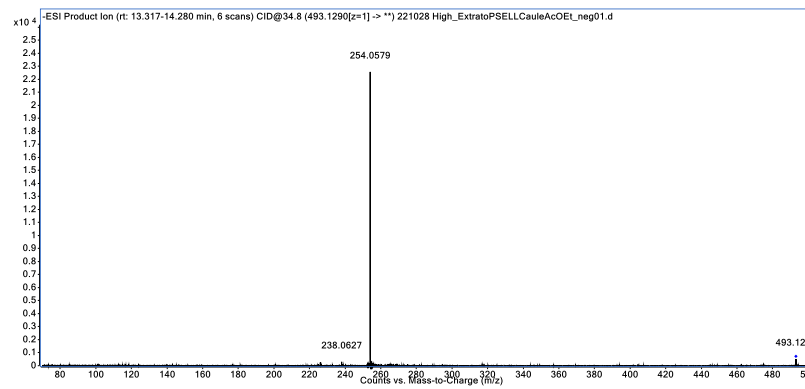


MS/MS spectrum

palmidin C (**33**) 493.1289 [M-H]⁻

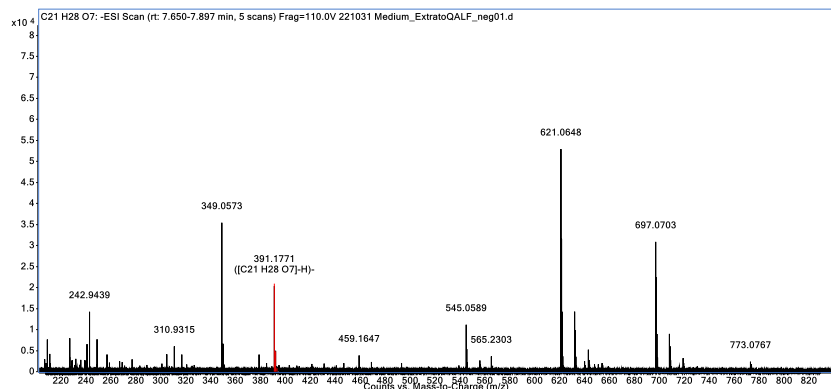


MS spectrum

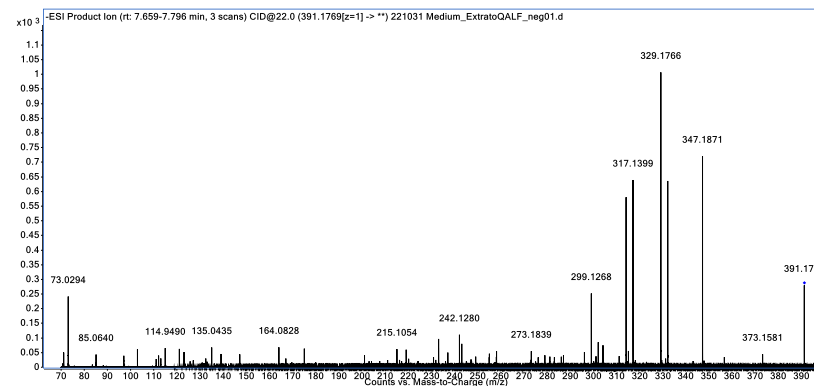


MS/MS spectrum

FIGURA A.66 - Espectros de MS e MS/MS de quassinoides, substâncias **34** e **35**.
picrasin G (**34**) 391.1771 [M-H]⁻

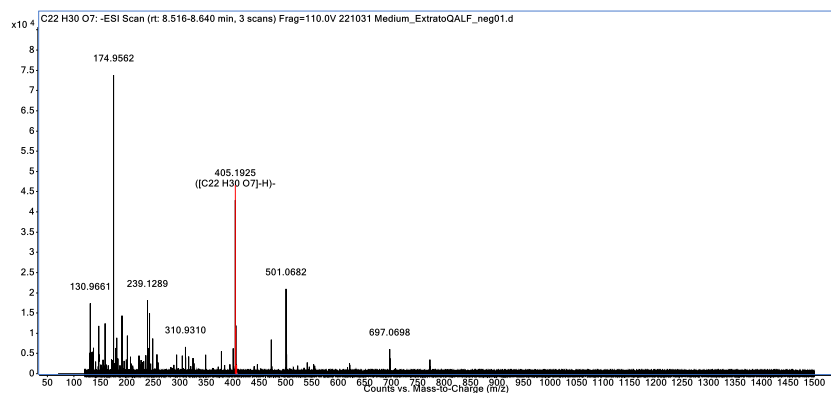


MS spectrum

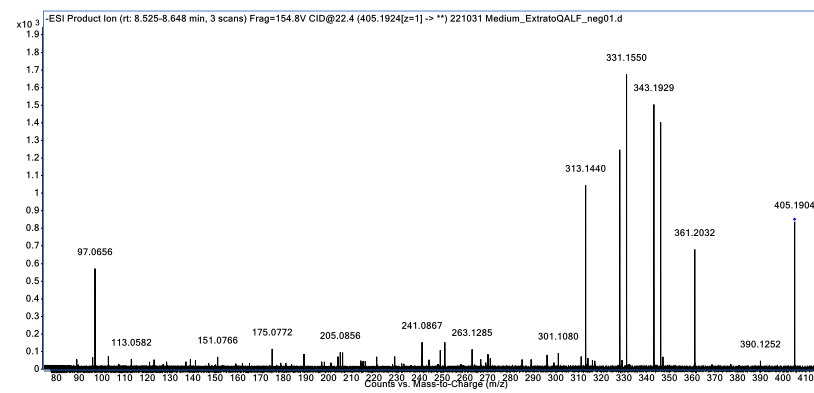


MS/MS spectrum

nigakilactone K (**35**) 405.1925 [M-H]⁻

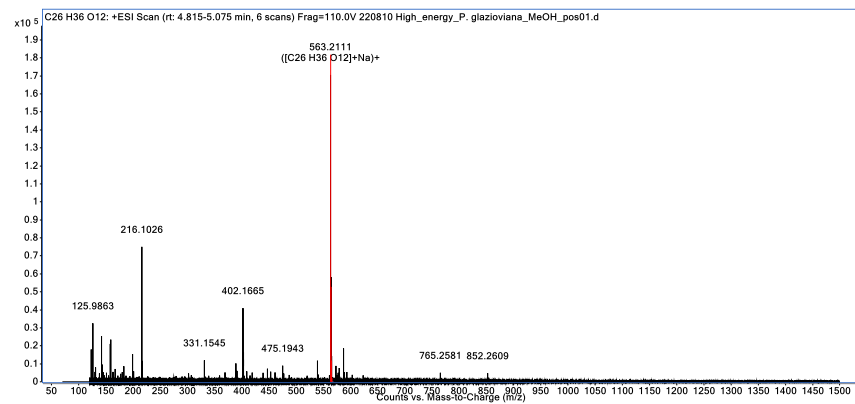


MS spectrum

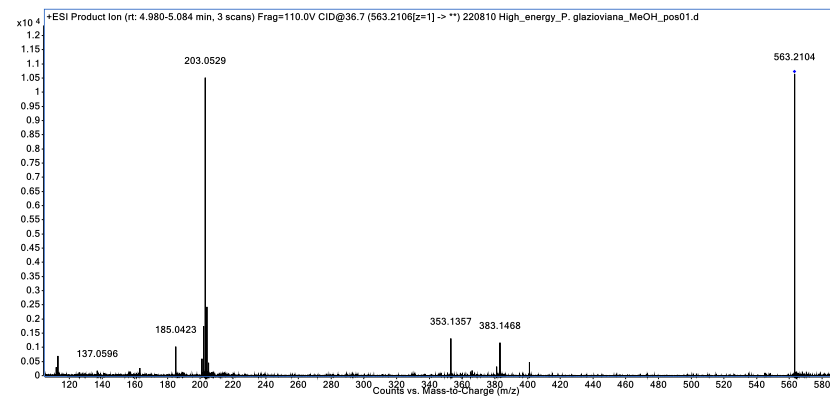


MS/MS spectrum

FIGURA A.67 - Espectros de MS e MS/MS de quassinoides, substância **38**.
shinjuglycoside B (**38**) 563.2111 [M+Na]⁺



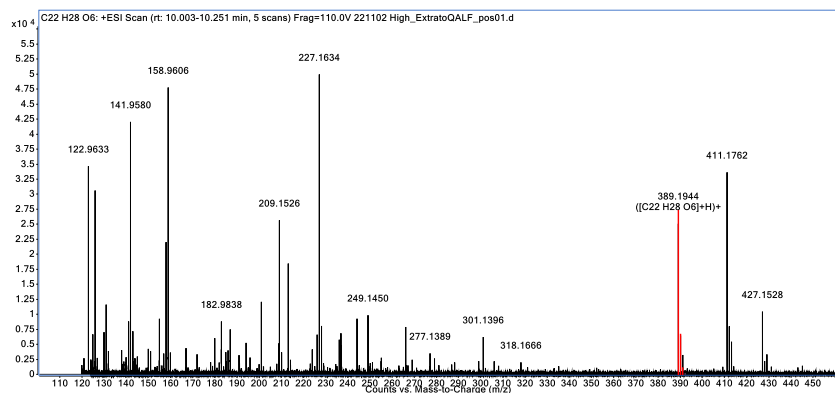
MS spectrum



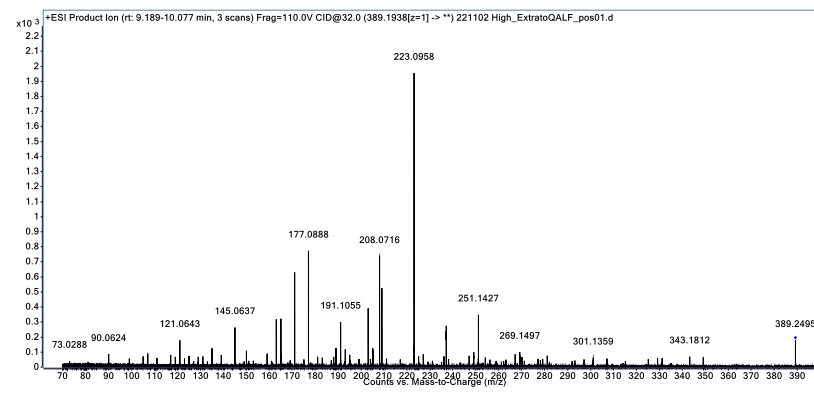
MS/MS spectrum

FIGURA A.68 - Espectros de quassinoides detectados mas não incluídos nos agrupamentos desta classe metabólica.

Quassin 389.1944 [M+H]⁺ (-3.9 ppm)

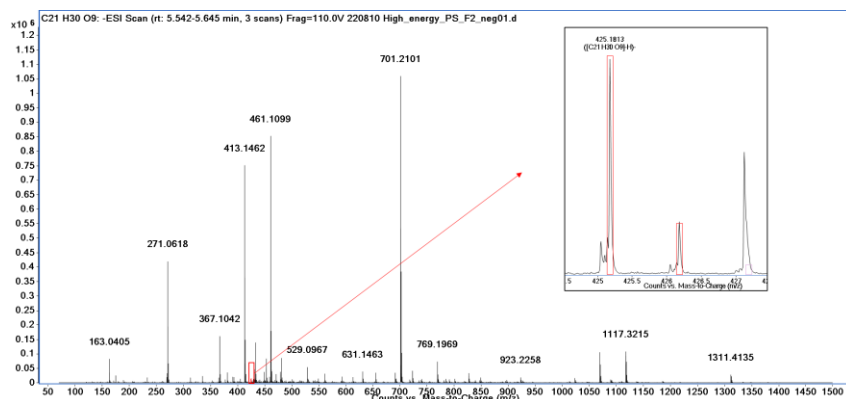


MS spectrum

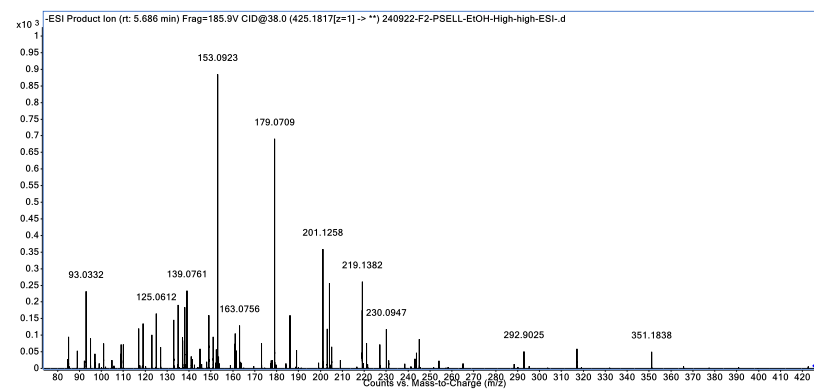


MS/MS spectrum

bruceine M 425.1814 [M-H]⁻ (0.5 ppm)



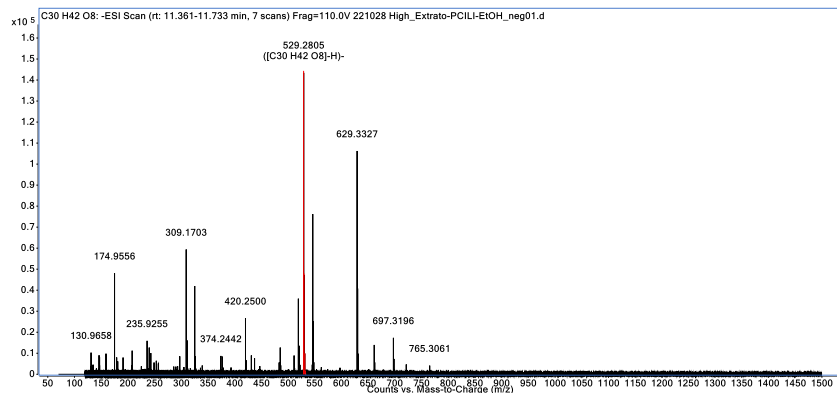
MS spectrum



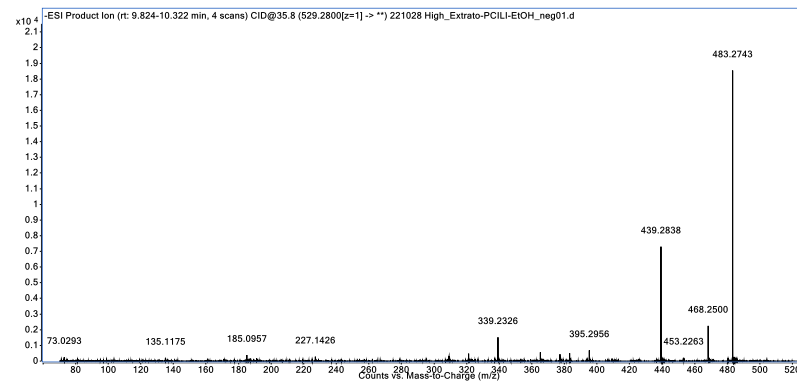
MS/MS spectrum

FIGURA A.69 - Espectros de MS e MS/MS de vitanolídeos, substâncias **39a** e **39**.

4 β ,27-dihydroxy-1-oxo-7-methoxywitha-2,5,24-trienolide + Formic acid (**39a**) 529.2805 [M-H]⁻

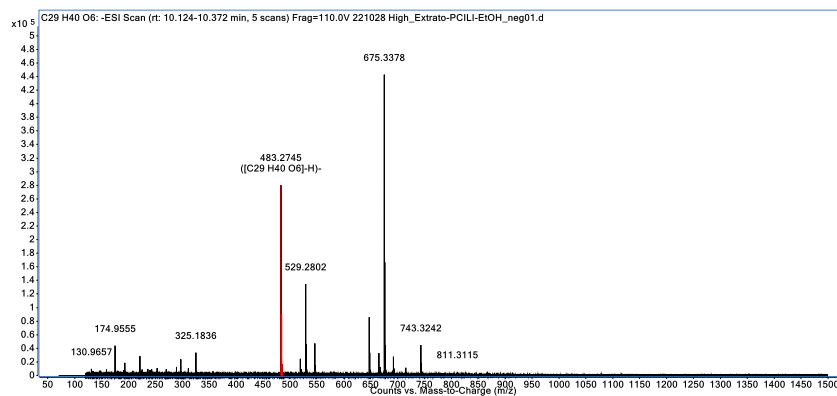


MS spectrum

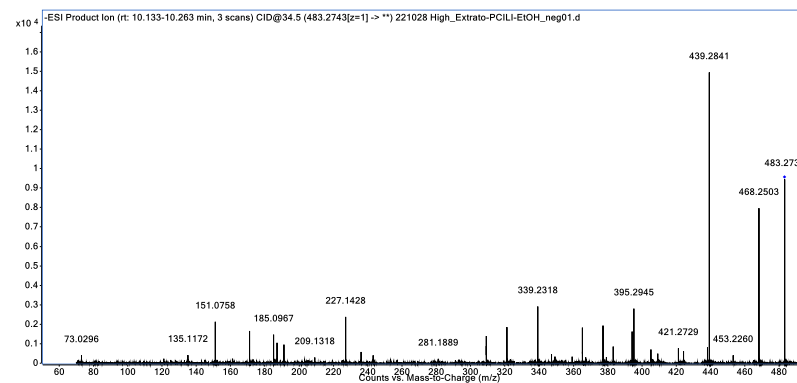


MS/MS spectrum

4 β ,27-dihydroxy-1-oxo-7-methoxywitha-2,5,24-trienolide (**39**) 483.2745 [M-H]⁻



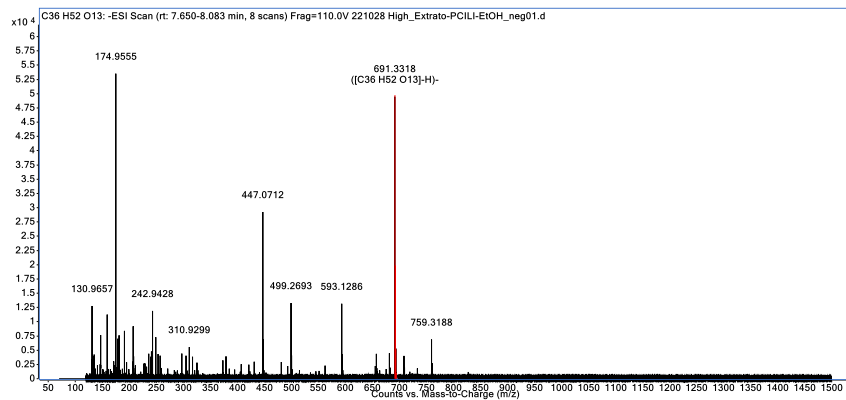
MS spectrum



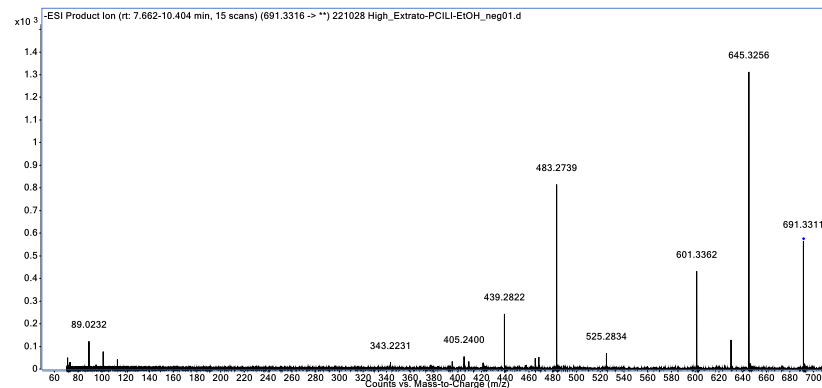
MS/MS spectrum

FIGURA A.70 - Espectros de MS e MS/MS de vitanolídeos, substâncias **40a** e **41**.

27-glucosyl-4 β -hydroxy-1-oxo-7-methoxywitha-2,5,24-trienolide + Formic acid (**40a**) 691.3318 [M-H]⁻

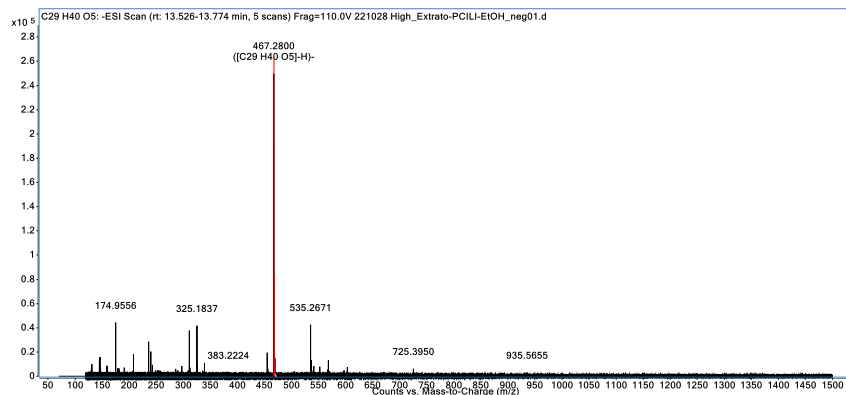


MS spectrum

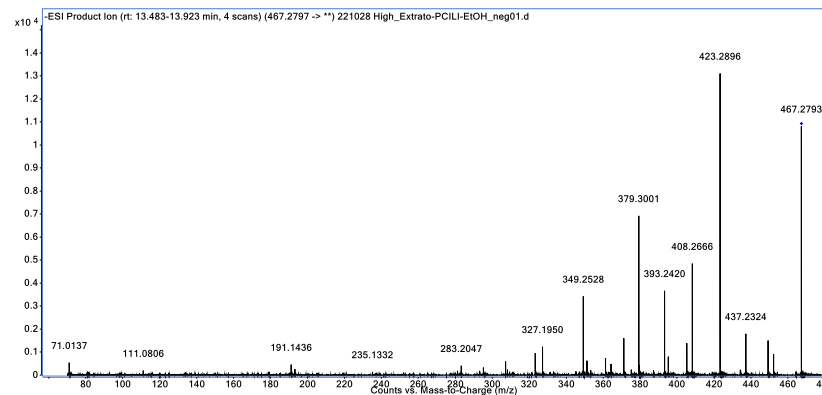


MS/MS spectrum

27-deglucosyl-27-hydroxy-7-dehydroxy-7-methoxy-daturametelin I (**41**) 467.2800 [M-H]⁻



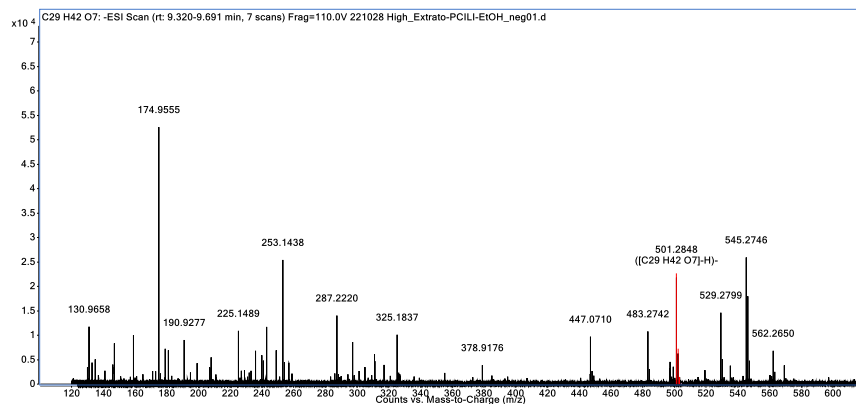
MS spectrum



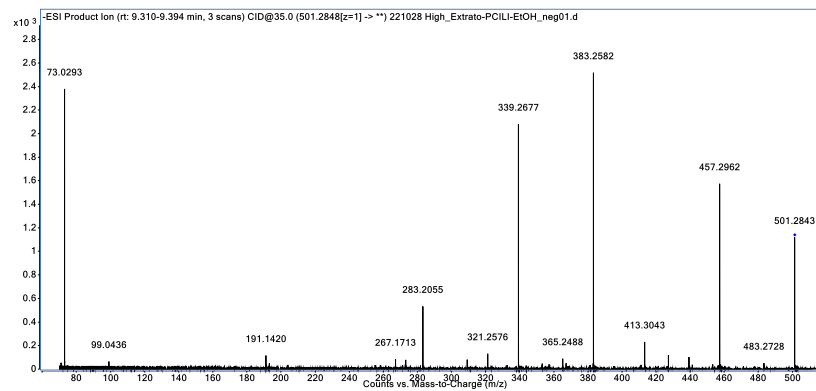
MS/MS spectrum

Figura A.71 - Espectros de MS e MS/MS de vitanolídeos, substâncias **42** e **43**.

2,3-dihidro-3-metoxywithaferin A (**42**) 501.2848 [M-H]⁻

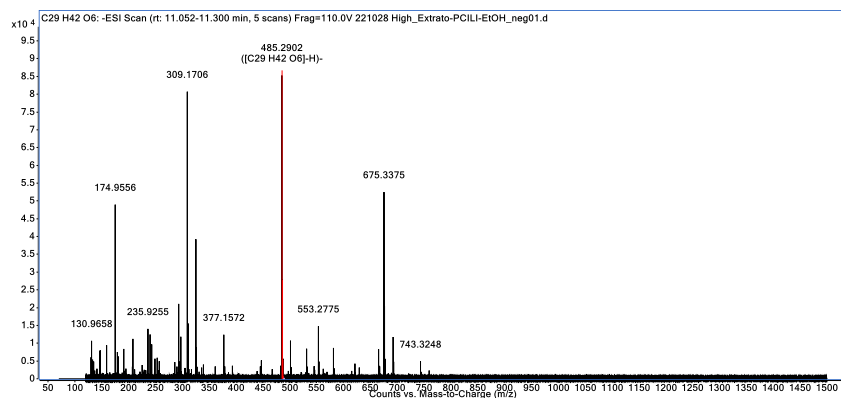


MS spectrum

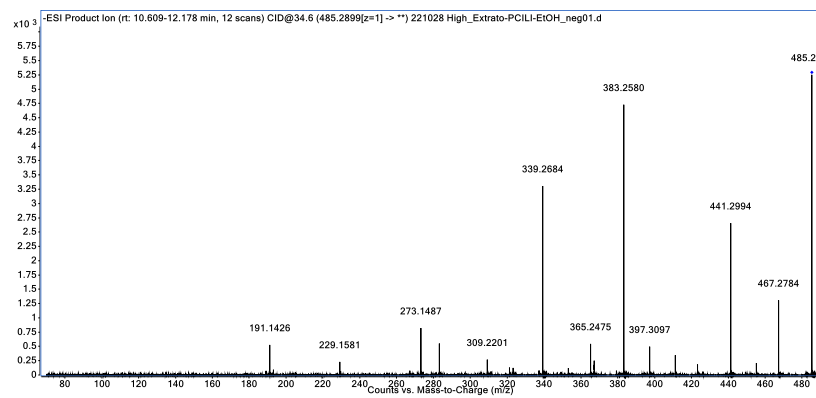


MS/MS spectrum

27-Dehidroxi-2,3-dihidro-3-metoxywithaferin A (**43**) 485.2902 [M-H]⁻



MS spectrum



MS/MS spectrum

FIGURA A.72 - Esquema proposto de fragmentação para as antronas C-glicosídicas: picramniosídeo D (**24**) e debenzoil-picramniosídeo D (**25**).

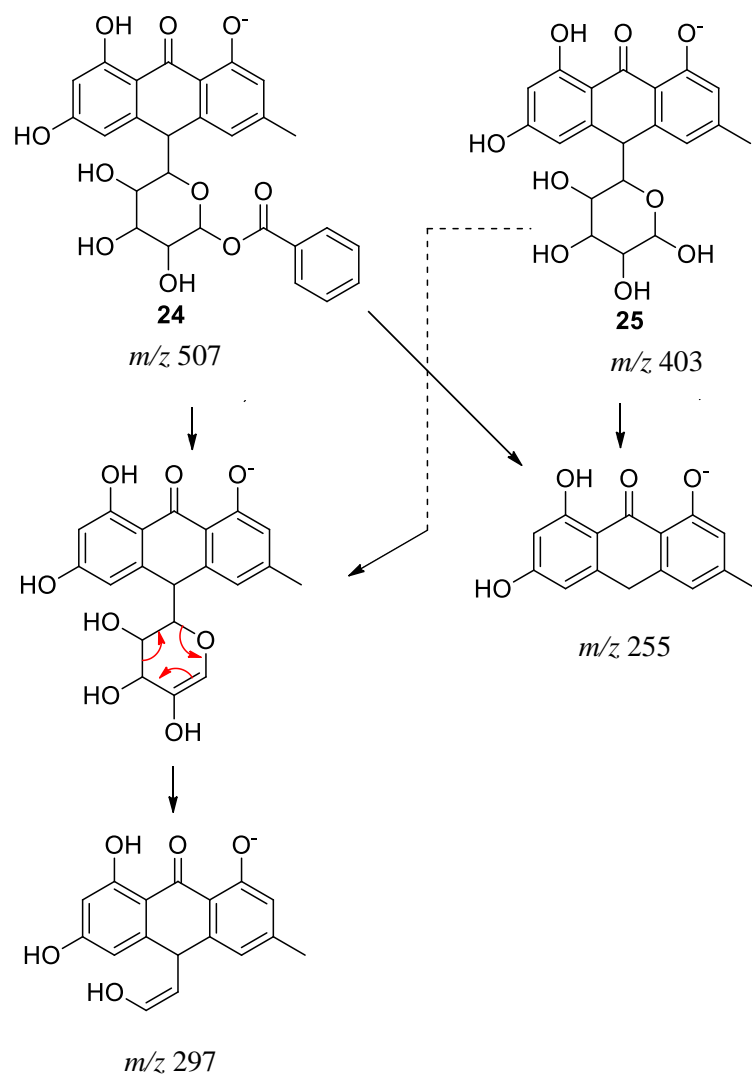


FIGURA A.73 - Esquema proposto de fragmentação para a oxantrona *C*-glicosídica: debenzoil-maiosídeo D (**31**).

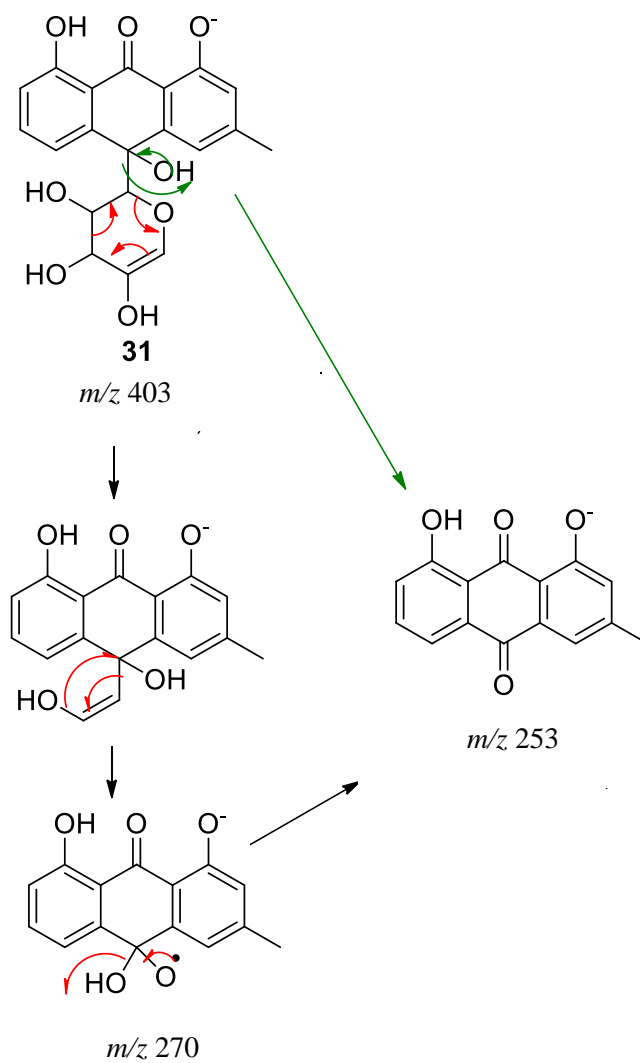


FIGURA A.74 - Esquema proposto de fragmentação para os quassinoides: nigaquilactona K (**35**) e 11-oxonigaquilactona K (**36**).

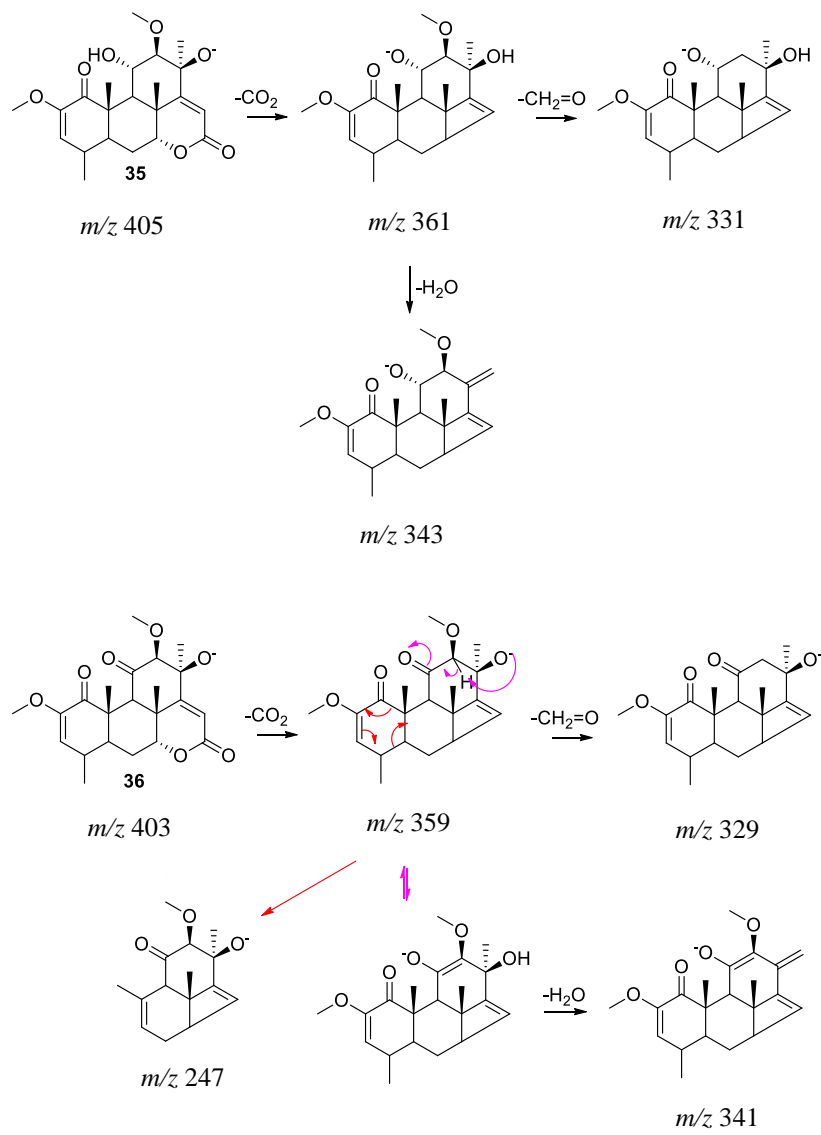


FIGURA A.75 - Esquema proposto de fragmentação para os quassinoides: quassin.

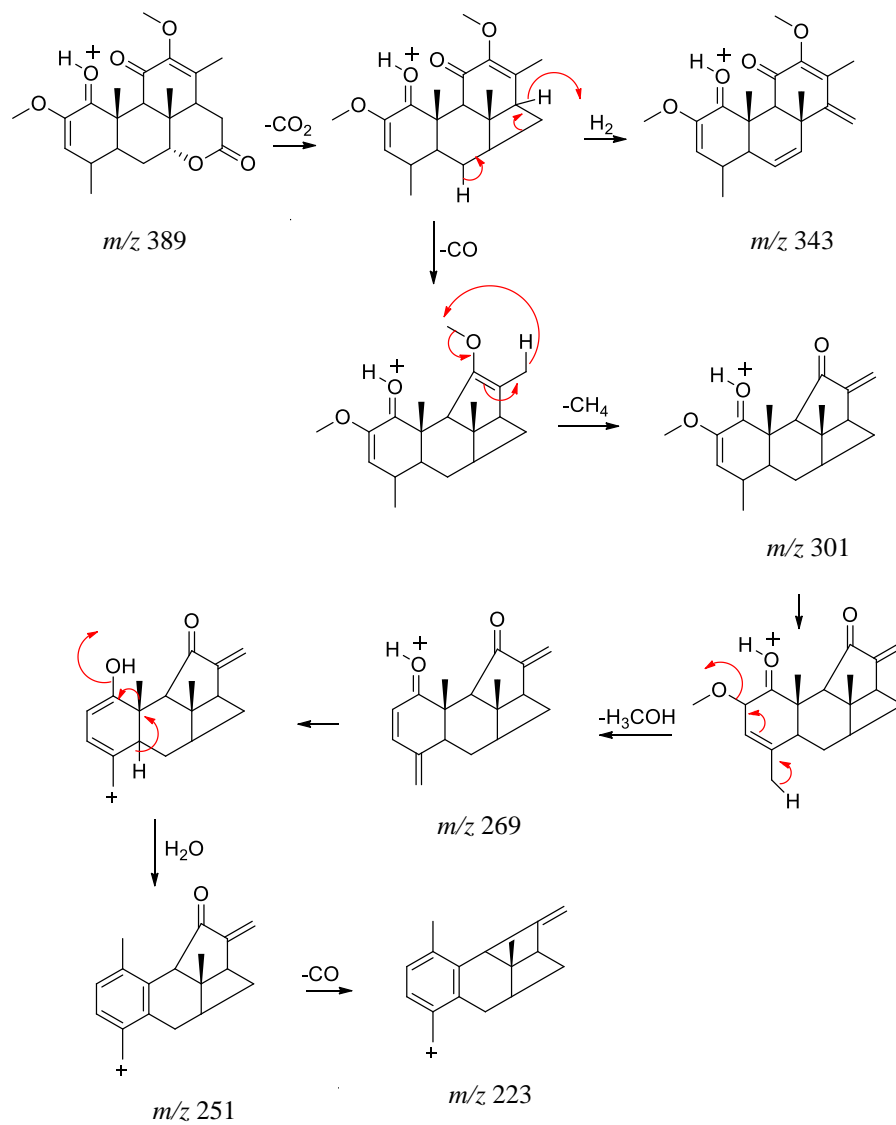


FIGURA A.76 - Esquema proposto de fragmentação para o quassinóide: bruceína M.

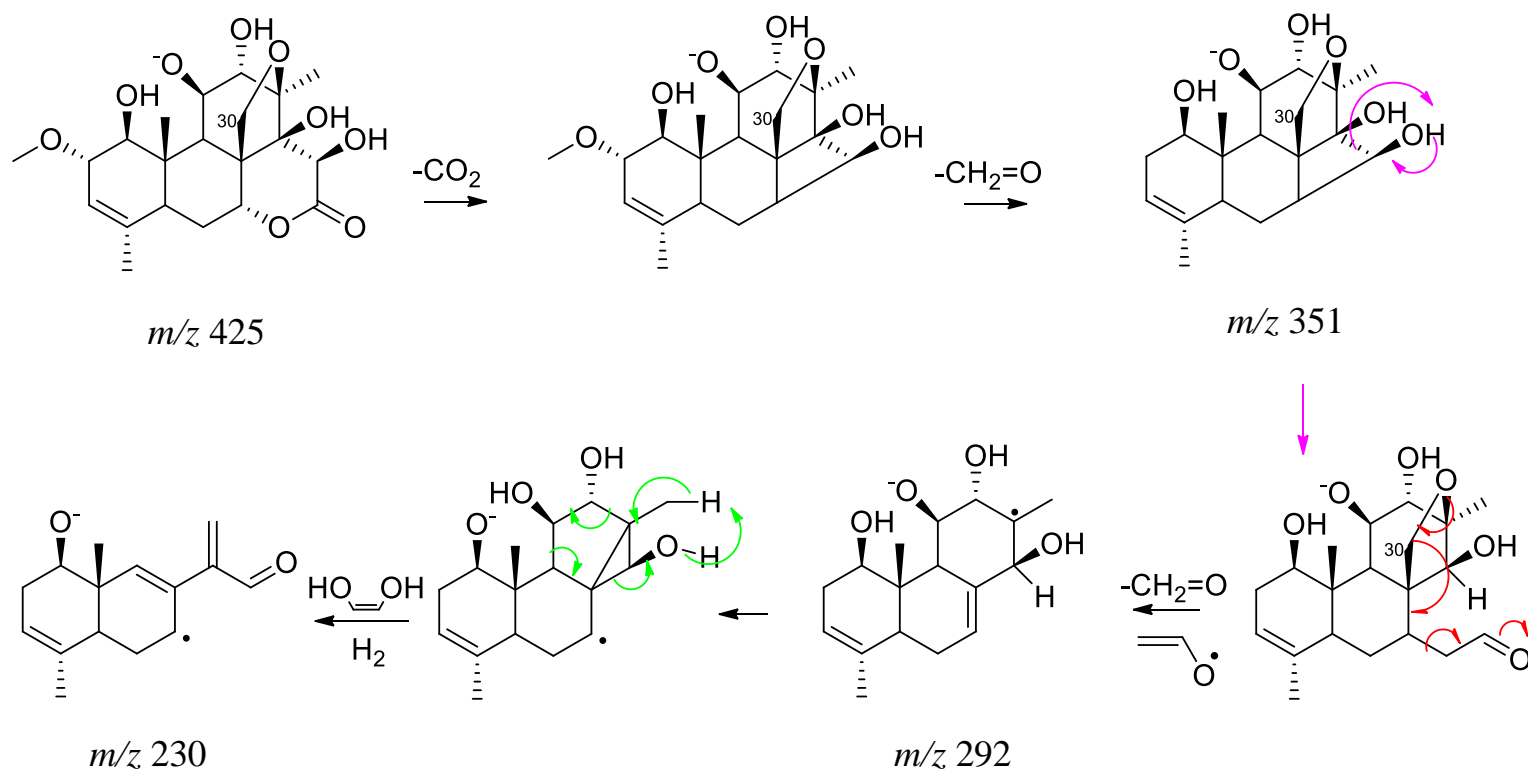


Figura A.77 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: **A**, formação de aduto com ácido fórmico (**39a**).

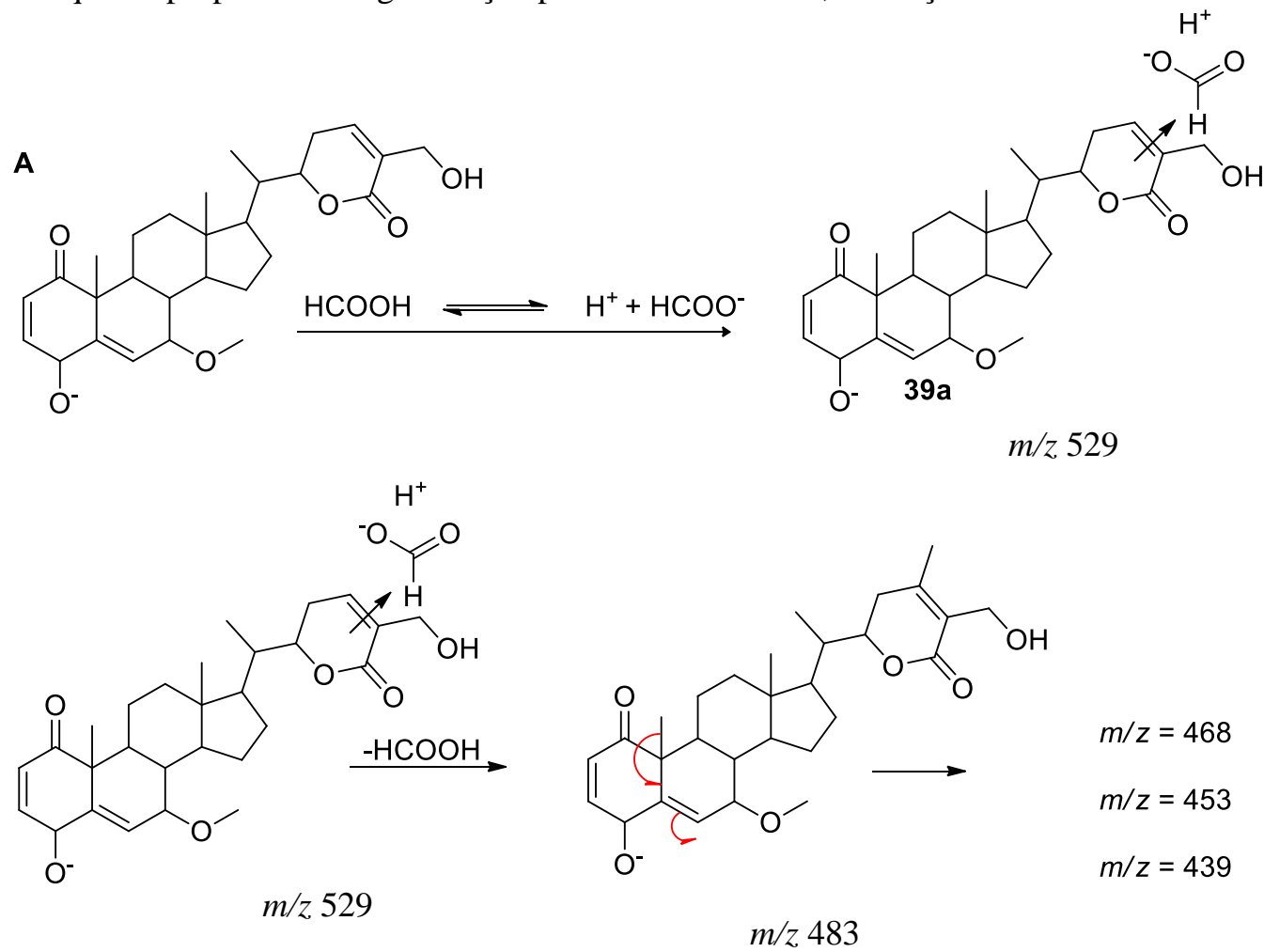


Figura A.78 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: **B**, 4 β ,27-dihydroxy-1-oxo-7-methoxywitha-2,5,24-trienolide (**39**).

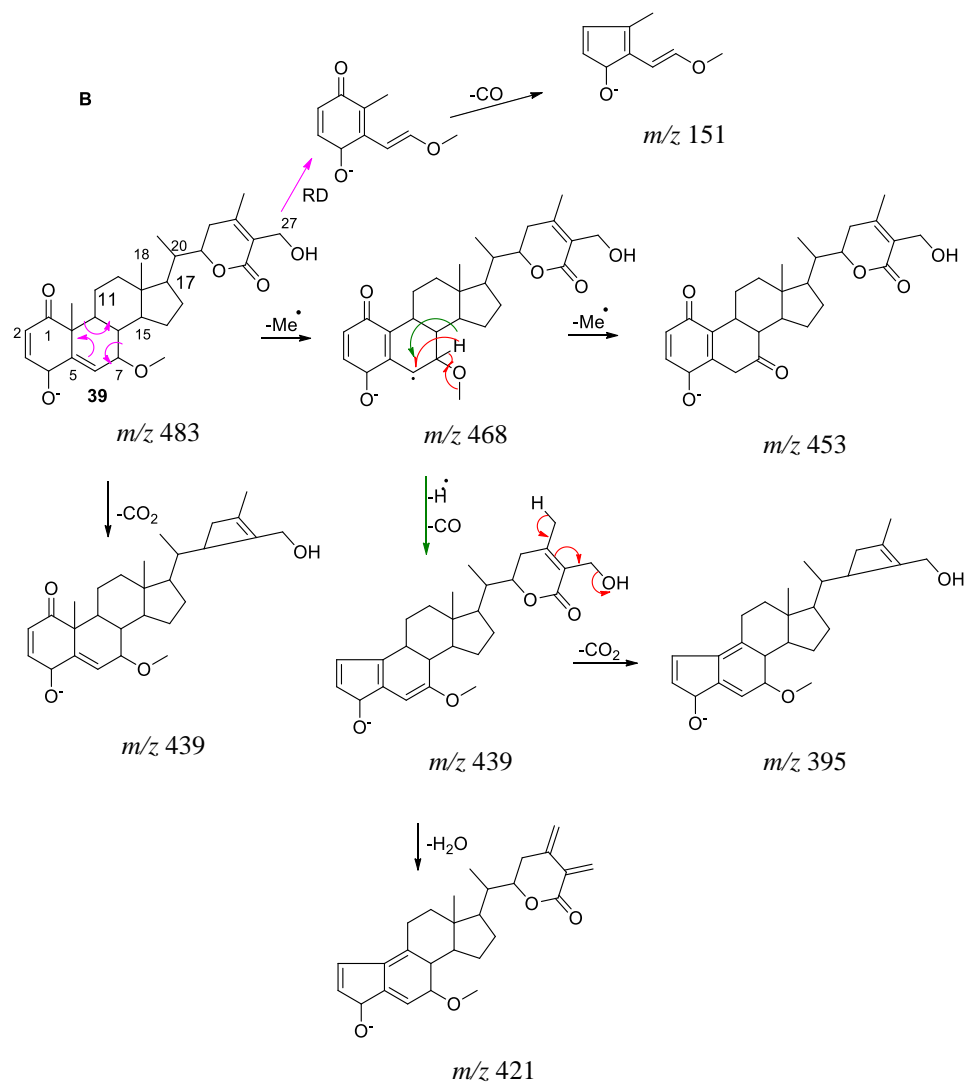


Figura A.79 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: formação de aduto com ácido fórmico (**40a**) e 27-glucosyl-4β-hydroxy-1-oxo-7-methoxywitha-2,5,24-trienolide (**40**).

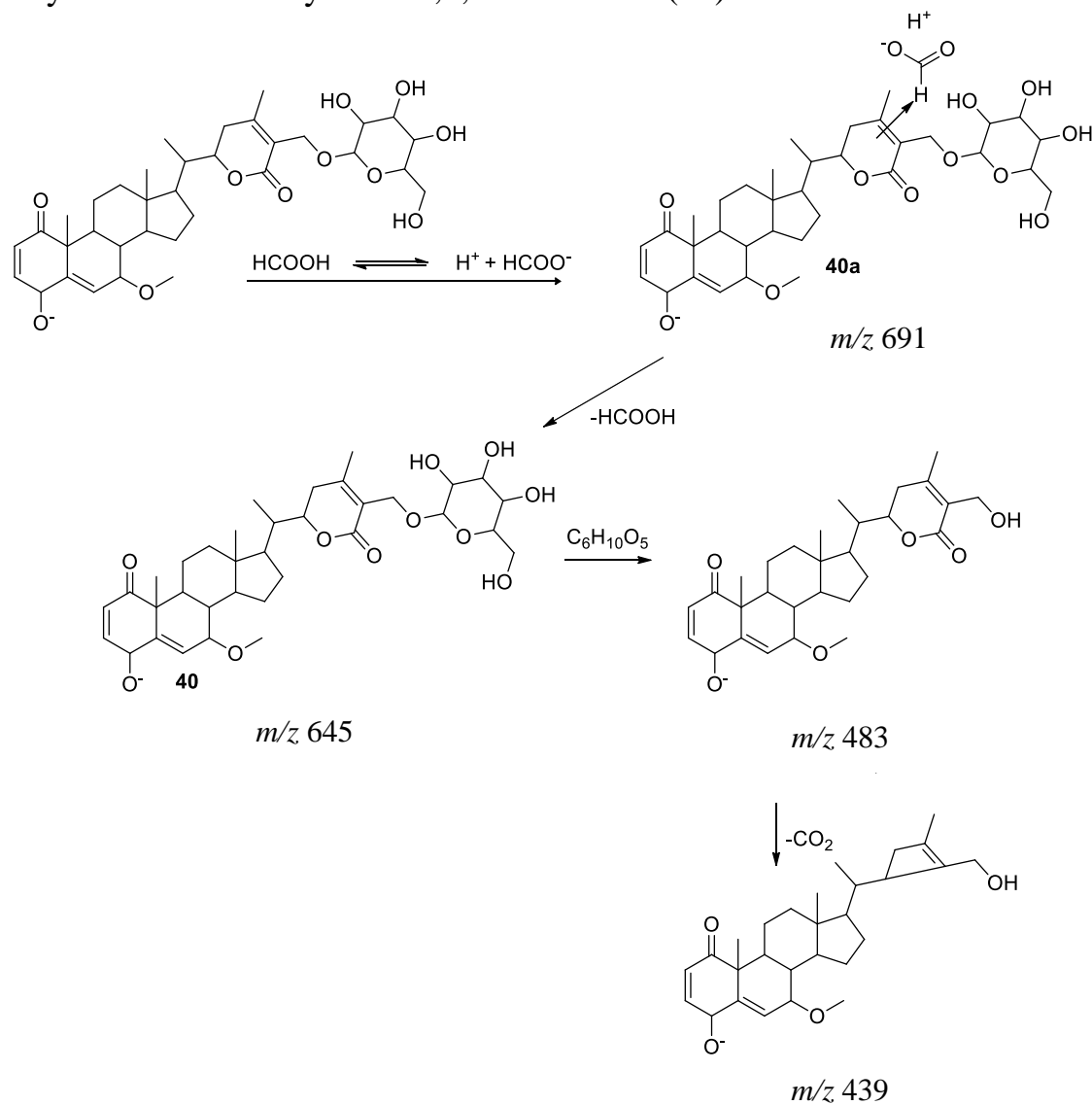


FIGURA A.80 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: 27-deglucosyl-27-hydroxy-7-dehydroxy-7-methoxy-daturametelin I (**41**).

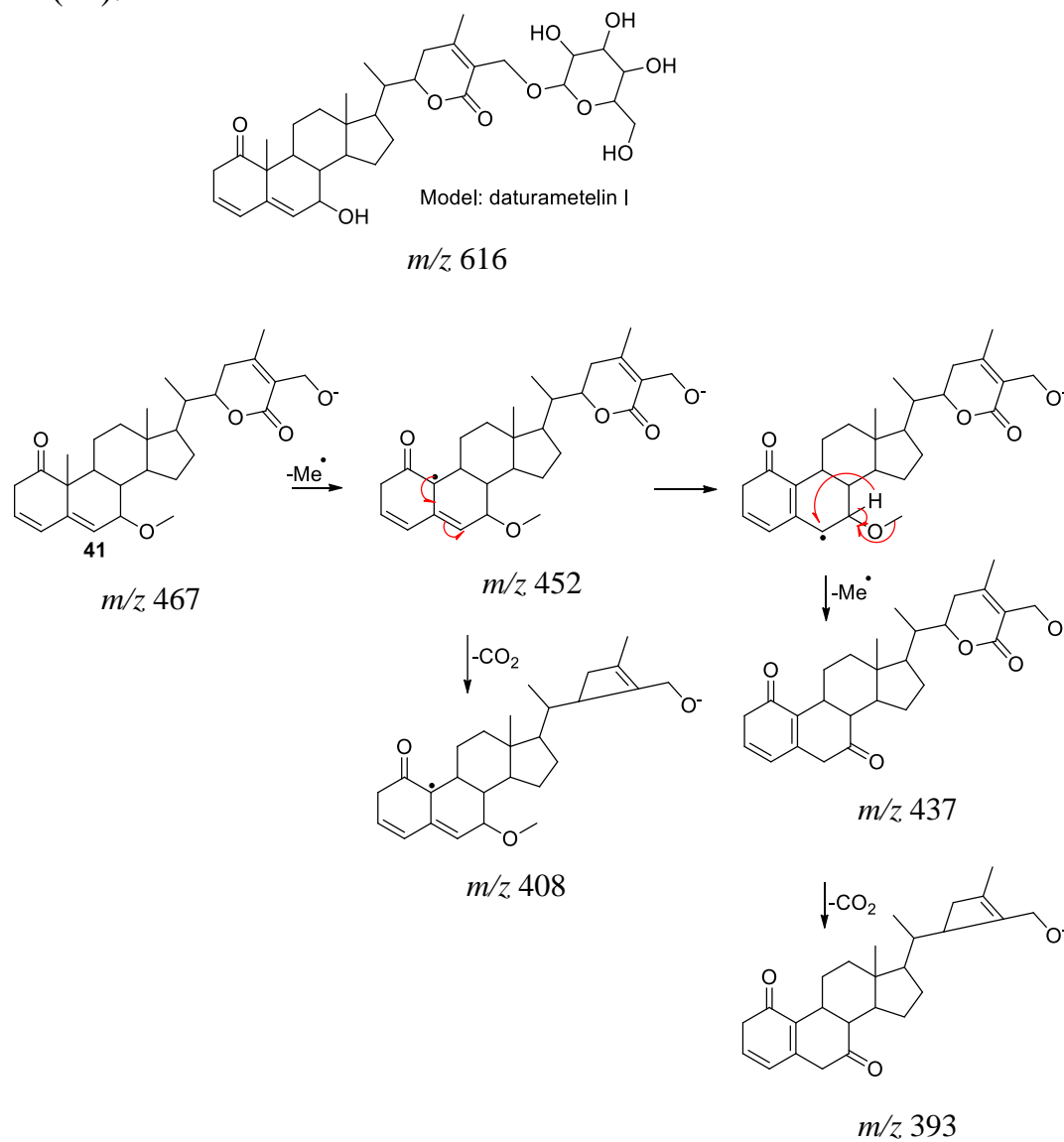


FIGURA A.81 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: 2,3-dihidro-3-metoxyywithaferin A (**42**).

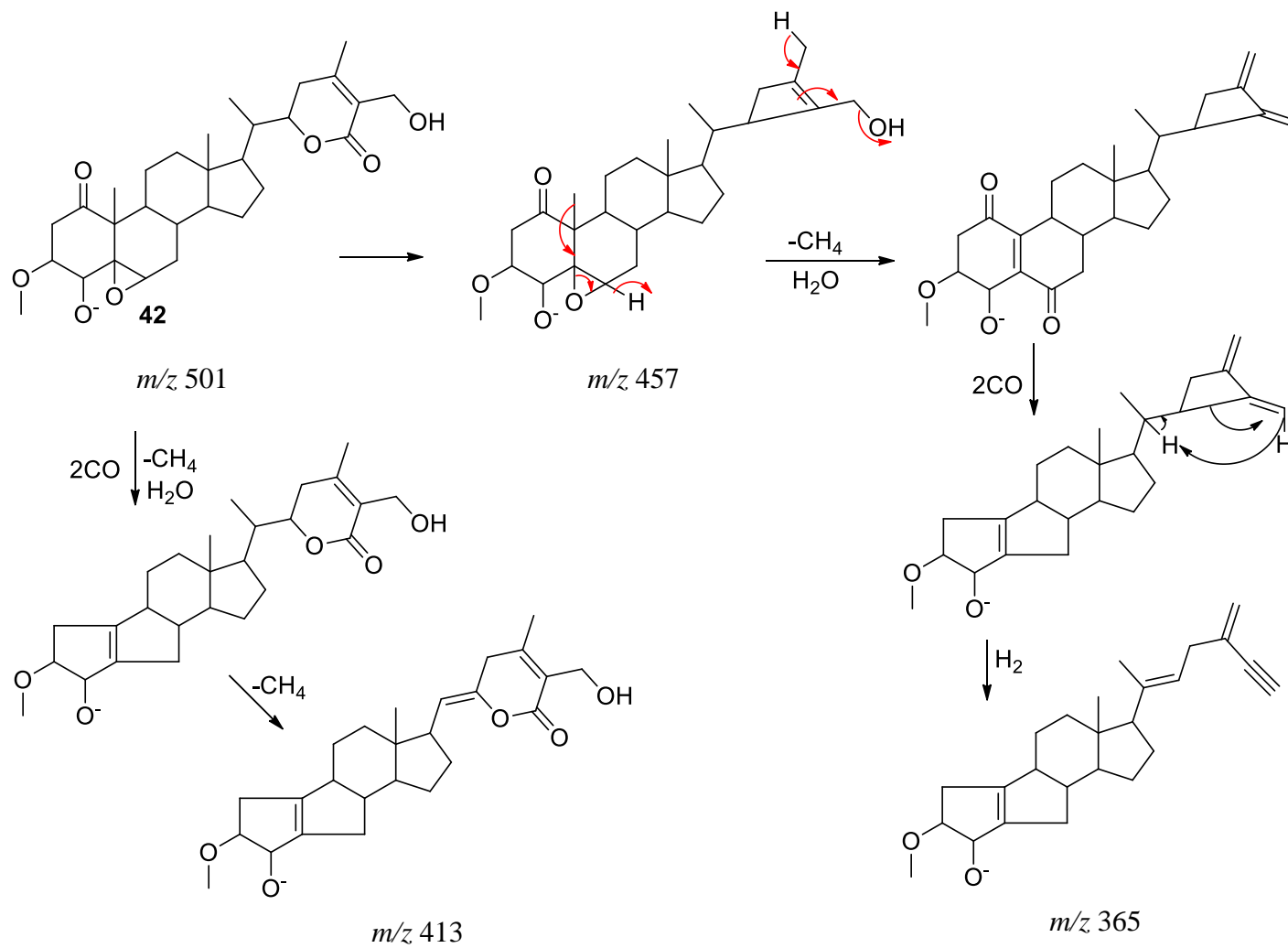


FIGURA A.82 - Esquema proposto de fragmentação para vitanolídeos: 27-dehidroxi-2,3-dihidro-3-metoxiwitaferin A (**43**).

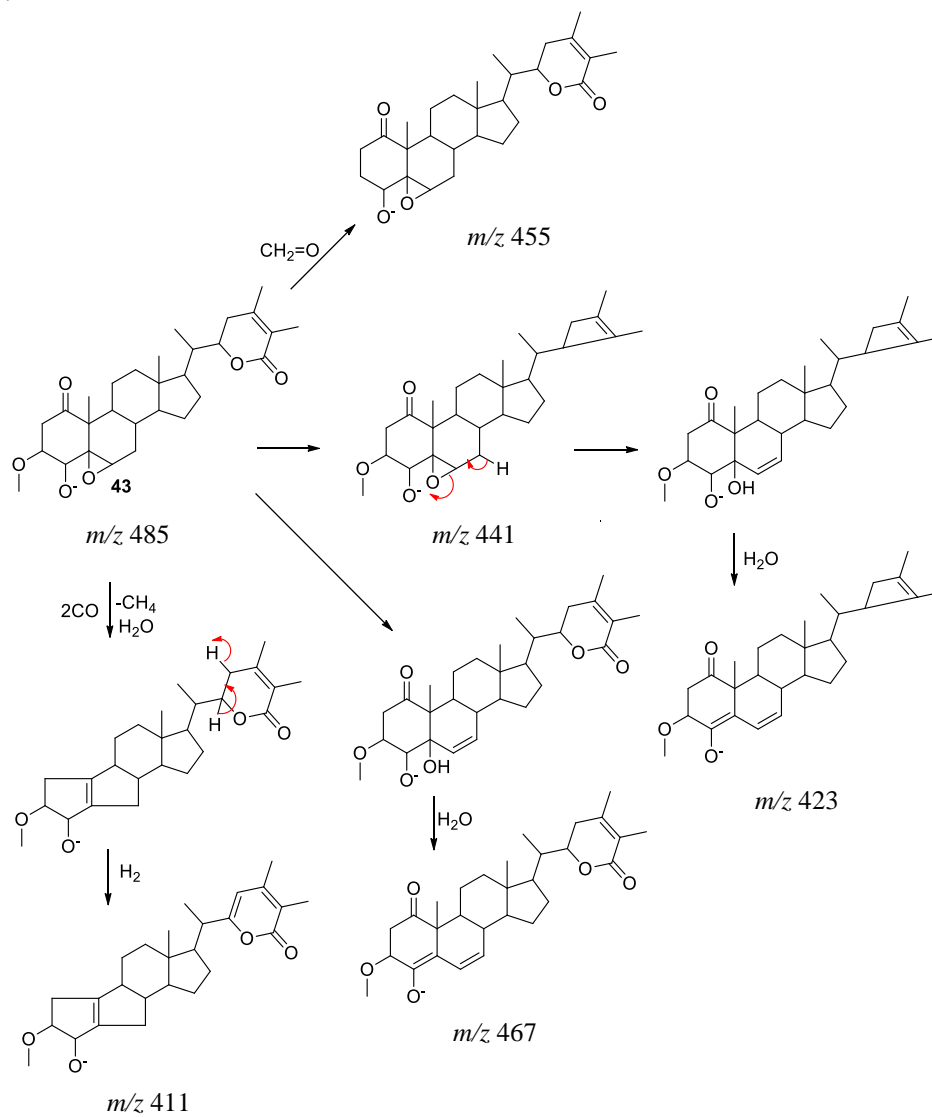


TABELA A.15 - Ácidos clorogênicos, ácido 3-O-cafeoilchiquímico, catequinas, flavanona-cromona e flavonóis, detectados nas espécies *Picramnia*, *Quassia amara* e *Trichilia catigua*, utilizando dados MS/MS com um modo de ionização negativa e positiva.

Planta/extratos	Classes de metabólitos secundários anotadas				
<i>P. sellowii</i>	Chlorogenic acid	3-O-caffeoyl-shikimic acid	Catechin	Flavanone-chromone	Flavonol
Extrato-folhas	3*				
CH ₂ Cl ₂	3*				
MeOH	3*				
EtOH PsF					
SPE, EtOH					
PsF1	4			16*	20*- 22*
PsF2	1, 2, 5	8			
PsF3	3, 6		10*- 13*		17a/17b, 18a/18b
PsF4	7*		10*- 13*, 15		19, 20, 21*, 22*
Hidroalcólico PsH					
SPE Hidroalcólico					
PsH1					19*- 22*
PsH2					19*
PsH3					19*, 20, 21, 22*
PsH4					
Extrato-galhos					
AcOEt	3*				
MeOH	3*				
<i>P. bahiensis</i> extrato-folhas					
MeOH	7*		13*		20-22
CH ₂ Cl ₂					
<i>P. ciliata</i>					
Folhas-EtOH	4*		9, 10, 11*, 13, 15	16*	20*
<i>P. glazioviana</i>					
Galhos-MeOH	1*, 7		10*- 12*		20*- 22*
Folhas-CH ₂ Cl ₂	3*, 6*		13*, 15	16*	20*, 21*
<i>P. oreadica</i>					
Galhos-EtOH	4*, 7*				
<i>T. catigua</i> , casca-galhos-EtOH			10*, 11, 12, 13*, 14, 15	16	
<i>Q. amara</i>					
Folhas-EtOH					

*Composto detectado em quantidades menores.

TABELA A.16 – Antraquinonas glicosídicas, antronas C-glicosiladas, oxantronas C-glicosiladas, diantronas, quassinoides e vitanolídeos detectados nas espécies *Picramnia*, *Quassia amara* e *Trichilia catigua*, usando dados MS/MS com modo de ionização negativo e positivo.

Planta/extratos	Classes de metabólitos secundários anotadas					
<i>P. sellowii</i>	Anthraquinon e glycoside	Anthrone C-glycoside	Oxanthrone C-glycoside	Dianthron e	Quassinoid	Withanolide
Extrato-folhas CH ₂ Cl ₂	23*					
MeOH		25	30			
EtOH PsF						
SPE, EtOH						
Psf1		27	29, 31		38	
Psf2		24, 25*, 26*		32, 33*	34*- 36*	40*- 43*
Psf3					38*	
Psf4	23*	24, 25*- 27*	29*- 31*	32*, 33	37*	42*, 43*
Hidroalcólico						
Psh						
SPE Hidroalcólico						
Psh1				32*		
Psh2						
Psh3					35*, 36*, 38*	
Psh4			30*			
Extrato-galhos						
AcOEt		24*-26*	29*	33		
MeOH		27*				
<i>P. bahiensis</i>						
extrato-folhas						
MeOH			29*- 31*			
CH ₂ Cl ₂	23					
<i>P. ciliata</i>						
Folhas-EtOH					38*	39-43
<i>P. glazioviana</i>						
Galhos-MeOH		27*			34*, 38	42*, 43*
Folhas-CH ₂ Cl ₂		27*				
<i>P. oreadica</i>						
Galhos-EtOH	23*	26	29*- 31*		34*- 38*	
<i>T. catigua</i> , casca-galhos-EtOH						
<i>Q. amara</i>					34-37	
Folhas-EtOH						

*Composto detectado em quantidades menores.