

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

**Investigação Química de *Dictyoloma vandellianum*: Avaliação do Perfil Químico e do
Potencial Antibacteriano frente a *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Karen Moraes Borges*

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

***bolsista CAPES**



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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Karen Moraes Borges, realizada em 31/07/2025.

Comissão Julgadora:

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

Prof. Dr. Tiago Venâncio (UFSCar)

Profa. Dra. Adriana Aparecida Lopes (UNAERP)

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

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.”

Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus Orixás que foram a força, o sustento e o alívio que eu precisei para trilhar e findar esta jornada. Graças as bênçãos deles obtive motivação, foco, pensamentos positivos e principalmente caminhos abertos para que todo o projeto fosse finalizado.

Aos meus pais-avós Alvarez e Conceição, que foram incansáveis em me apoiar em todas as formas que precisei, em especial no cuidado com as minhas filhas Sofia e Luanna, as quais também agradeço, pois se não fossem por elas, esse objetivo não seria tão significativo. Estar longe deles foi a maior dificuldade enfrentada, mas não desistir foi o maior presente que eu podia ofertá-los.

Aos meus pais biológicos Jameson e Lúdia, e aos meus irmãos e irmãs Christian, Danrley, Rafaella, Larissa, Byanca e Jamily, que me deram conselhos, conversaram e de suas formas e possibilidades também me apoiaram.

Ao meu namorado, Arthur Sousa, que enfrentou junto comigo todas as dificuldades que apareceram, fossem acadêmicas, fossem pessoais, obrigada por ter estado comigo em momentos tão cruciais, talvez sem sua presença incansável, eu não teria conseguido.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva a quem devo este trabalho e minha gratidão, não só acadêmica, mas pessoal, brilhante como professora e incrível como ser-humano, obrigada por tudo!

Aos amigos e colegas de trabalho e laboratório Alicia, Chrys, Karol, Artur, Anderson, Duda, Elayne, pelas contribuições tanto em conhecimento, como em momentos de descontração, em especial ao Dr. Carlos André que esteve comigo em todo o processo de construção desse trabalho e também nos conselhos, nos momentos de descontração e nos cafés ao longo dos dias.

Aos amigos que fiz por essa estrada e que estiveram comigo nos momentos mais inimagináveis possíveis e que vibraram e choraram comigo, que são a família que pude escolher Antônio, Yara, Maciel, Lara Kelly, Ana Gabriele, Natasha, Matheus Guardiano, Nayara, Fernanda, Davi, Nathalia e Jennifer, jamais esquecerei do quanto vocês são incríveis e o quanto estiveram me apoiando sempre, o quanto nos apoiamos sempre! Viver São Carlos com vocês tornou os dias mais leves, as dores menores e as alegrias indescritíveis.

A todos que de alguma forma contribuíram para a formalização dessa etapa, meu muito obrigada. Citar todos talvez levasse não apenas páginas, mas livros inteiros e todos tiveram contribuições importantíssimas para a conclusão deste ciclo.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES, FAPESP, CNPq, em especial a CAPES, pela concessão da bolsa. Bolsas não são bonificações, são os artificios necessários para o andamento da ciência e da pesquisa brasileira.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
BOD	Biological Oxygen Demand (Câmara Incubadora)
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COSY	Correlation Spectroscopy
DAD	Diodo Array Detector
DMSO	Dimetilsulfóxido
FBMN	Feature-Based Molecular Networking
FID	Fracionamento Intermediário Direcionado
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem
MIC	Minimum Inhibitory Concentration (CIM)
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
MS-DIAL	Mass Spectrometry Data Independent AnaLysis
MS-FINDER	Software para Anotação de Metabólitos
NBY	Nutrient Broth Yeast

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
PDA	Photodiode Array Detector
Rt	Tempo de Retenção
SPE	Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alcaloides isolados de <i>P. alatum</i>	5
Figura 2. 7,8-diidroxirutaecarpina isolado de <i>P. amurense</i>	5
Figura 3. 7-hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina (17) e 8-hidroxi-N-metilflindersin (18).....	6
Figura 4. Parvifloranina A, Parvifloranina B e Geiparvarin	7
Figura 5. Zanthoxyloside, isolado do extrato do caule de <i>Zanthoxylum schinifolium</i>	8
Figura 6. Cumarinas isoladas de <i>E. alata</i>	8
Figura 7. Estrutura da Clausanisumine isolada de <i>Clausena anisum-olens</i> como atividade anti-HIV. 12	
Figura 8. Novos compostos identificados em <i>D. vandellianum</i>	15
Figura 9. 3,3-dimethylallylspatheliacromene metil éter isolado do extrato da raiz de <i>Dictyoloma vandellianum</i>	16
Figura 10. Compostos 2, 5 e 6 isolados da raiz de <i>D. vandellianum</i>	17
Figura 11. Lesões ocasionadas por Cancro cítrico em folhas, galhos e frutos em citros	18
Figura 12. Localização vista por satélite da área de coleta do material vegetal.....	20
Figura 13. Esquema ilustrativo da preparação dos extratos brutos de <i>D. vandellianum</i>	21
Figura 14. Gráfico de Eluição do Gradiente de Exploração de Metabólitos em HPLC-PDA	23
Figura 15. Sistema de Extração em Fase Sólida (SPE).....	24
Figura 16. Frações SPE	25
Figura 17. Gráfico de eluição da análise das frações obtidas por SPE	26
Figura 18. Fluxograma das etapas de processamento dos dados e visualização da rede molecular	29
Figura 19. Representação do método de microdiluição em microplaca.....	31
Figura 20. Cromatograma do extrato bruto dos galhos finos de <i>D. vandellianum</i> (HPLC-PDA, 254 nm). A eluição majoritária dos picos ocorre entre 12 e 20 minutos, indicando predominância de metabólitos de polaridade moderada, como lactonas oxigenadas, cumarinas e possíveis alcaloides com absorção em 254 nm.....	34
Figura 21. Cromatograma do extrato bruto dos frutos de <i>Dictyoloma vandellianum</i> obtido por HPLC-PDA. Apresenta picos em região intermediária da eluição (25–35 min), indicando predominância de metabólitos de baixa polaridade, como triterpenos, cumarinas preniladas e outros compostos lipofílicos.....	35
Figura 22. Cromatograma do extrato bruto do caule de <i>Dictyoloma vandellianum</i> . Apresenta picos discretos e distribuídos entre 5 e 40 minutos, sem sinais predominantes, indicando baixo teor de compostos cromofóricos e perfil fitoquímico menos complexo.	36
Figura 23. Cromatograma do extrato bruto das folhas de <i>D. vandellianum</i> obtido por HPLC-PDA. Apresenta picos bem definidos em toda a extensão do gradiente, com ênfase entre 20 e 35 minutos, refletindo a riqueza fitoquímica da matriz foliar com compostos de baixa a média polaridade	37
Figura 24. Cromatograma com destaque para as regiões correspondentes às frações SPE. As áreas sombreadas indicam os intervalos de tempo de retenção associados às eluições com 50% ACN, 70% ACN e 100% ACN, respectivamente.	38
Figura 25. Comparação dos perfis cromatográficos do extrato bruto e frações obtidas por SPE de folhas de <i>Dictyoloma vandellianum</i>	39
Figura 26. Demonstração do perfil cromatográfico e espectral antes da filtragem do branco e seleção de espectros MS/MS adquiridos.....	41
Figura 27. Efeito da Filtragem de Interferentes e MS2 Acquired no Perfil Químico dos Extratos.....	41
Figura 28. Avaliação Cruzada de Fragmentação Experimental e Compatibilidade Estrutural In Sílico.	43
Figura 29. Rede molecular gerada a partir dos dados UHPLC-QTOF-MS/MS dos extratos de folhas de <i>Dictyoloma vandellianum</i> , construída na plataforma GNPS por meio do módulo Feature-Based Molecular Networking (FBMN)	60
Figura 30. Cromatograma do composto isolado 1, destacado para posterior análise estrutural por RMN e UHPLC-QTOF-MS/MS.	61

Figura 31. Espectro de Hidrogênio: experimento realizado em MeOD obtido em Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear 400 MHz	62
Figura 32. Espectro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$: Experimento realizado em MeOD obtido em equipamento de RMN 100MHz.....	64
Figura 33. Representação parcial da estrutura elucidada destacando a porção aromática funcionalizada e os carbonos oxigenados interpretados até o momento	65
Figura 34. Estrutura parcial proposta com base nas correlações do HSQC	67
Figura 35. Proposta de elucidação estrutural obtida a partir das análises dos experimentos em RMN	68
Figura 36. Elucidação estrutural da substância 1 com base nas correlações COSY (\leftrightarrow) e HMBC (\rightarrow)	68
Figura 37. Mapa de contorno $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC da substância 1 isolada de <i>Dictyoloma vandellianum</i> ...	70
Figura 38. Correlações de longo alcance $^2\text{JCH}/^3\text{JCH}$ identificadas no mapa de contorno HMBC da substância 1.	71
Figura 39. Correlações escalares entre prótons no espectro COSY da substância 1.....	71
Figura 40. Espectro de dissociação do íon precursor m/z 346,2381 obtido por MS/MS em modo ESI positivo.....	72
Figura 41. Mecanismo proposto de fragmentação para o íon m/z 346, destacando as perdas sequenciais e os íons característicos.....	73
Figura 42. Cromatograma indicando a posição da segunda substância isolada para caracterização por RMN, destacada em laranja.	74
Figura 43. Composto 1 identificado no estudo de Sartor e colaboradores.....	75
Figura 44. Espectro de Hidrogênio para a substância isolada (0), experimento realizado em MeOD obtido em Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear 400 MHz.	76
Figura 45. Espectro de Carbono para a substância isolada (0).....	77
Figura 46. Correlações HMBC (\rightarrow) e COSY (\leftrightarrow) observadas nos experimentos	78
Figura 47. Espectro bidimensional COSY para a substância (0)	79
Figura 48. Mapa de Contorno HSQC para a substância (0).....	80
Figura 49. Mapa de correlação HMBC para a substância (0)	80
Figura 50. Coleta IV da fração SPE_1	81
Figura 51. Cromatograma do íon extraído m/z 360	83
Figura 52. Proposta de fragmentação baseada em dados de UHPLC-QTOF-MS/MS para a substância (3).....	84
Figura 53. Espectro de Hidrogênio para a Coleta IV [Substância (3)].....	85
Figura 54. Espectro de Carbono para a Coleta IV [Substância (3)]	86
Figura 55. Análise da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos de <i>Dictyoloma vandellianum</i> Frente à <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> por Microdiluição em Placa	88

RESUMO

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE *Dictyoloma vandellianum*: AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO FRENTE A *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. A *Dictyoloma vandellianum* é uma espécie da família Rutaceae reconhecida por sua diversidade de metabólitos secundários com potencial biológico. Este trabalho teve como objetivo caracterizar compostos presentes nos extratos de folhas da planta, com foco na prospecção de substâncias com possível atividade antibacteriana frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causador do cancro cítrico. Foram obtidos extratos brutos utilizando solventes de diferentes polaridades e, em seguida, analisados por HPLC-PDA para avaliação do perfil cromatográfico. A análise detalhada dos constituintes foi conduzida por UHPLC-QTOF-MS/MS, em ambos os modos de ionização, seguida de processamento por plataformas metabolômicas (MS-DIAL, MS-FINDER e GNPS), com anotação in silico e construção de rede molecular. A abordagem revelou a presença de compostos das classes dos flavonoides, alcaloides, quinolonas e cumarinas. Três substâncias foram isoladas por fracionamento cromatográfico e submetidas à elucidação estrutural por espectroscopia de RMN unidimensional e bidimensional, com validação pelos padrões de fragmentação observados em espectrometria de massas. As estruturas identificadas não são inéditas, porém foram identificadas com alto padrão de confiabilidade pelos métodos utilizados. Os resultados obtidos reforçam o potencial de *D. vandellianum* como fonte de metabólitos bioativos e estabelecem uma base sólida para futuras investigações. Os próximos passos incluem a testagem dos compostos isolados frente ao fitopatógeno e a caracterização estrutural de novos constituintes ainda não identificados.

Palavras-chave: Compostos bioativos; rede molecular; produtos naturais; fitopatógenos bacterianos.

ABSTRACT

CHEMICAL INVESTIGATION OF *Dictyoloma vandellianum*: EVALUATION OF THE CHEMICAL PROFILE AND ANTIBACTERIAL POTENTIAL AGAINST *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. *Dictyoloma vandellianum* is a species of the Rutaceae family known for its diversity of secondary metabolites with biological potential. This study aimed to characterize compounds present in leaf extracts of the plant, focusing on the prospecting of substances with potential antibacterial activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, the causal agent of citrus canker. Crude extracts were obtained using solvents of different polarities and subsequently analyzed by HPLC-PDA to assess the chromatographic profile. A detailed analysis of the constituents was carried out by UHPLC-QTOF-MS/MS in both ionization modes, followed by data processing using metabolomics platforms (MS-DIAL, MS-FINDER, and GNPS), with *in silico* annotation and molecular networking. This approach revealed the presence of compounds belonging to the classes of flavonoids, alkaloids, quinolones, and coumarins. Three substances were isolated through chromatographic fractionation and structurally characterized by one- and two-dimensional NMR spectroscopy, with validation based on fragmentation patterns observed in mass spectrometry. Although the identified structures are not novel, they were confirmed with a high level of confidence using the employed analytical methods. The results reinforce the potential of *D. vandellianum* as a source of bioactive metabolites and provide a solid foundation for future investigations. Next steps include testing the isolated compounds against the phytopathogen and structural characterization of additional constituents yet to be identified.

Keywords: Bioactive compounds; molecular networking; natural products; bacterial phytopathogens.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1 Família Rutaceae	4
3.2 Estudos de Usos e Aplicações de Extratos e Compostos da Família Rutaceae	10
3.3 O gênero <i>Dictyoloma</i>	13
3.3.1 <i>Dictyoloma vandellianum</i>	14
3.4 Cancro cítrico - <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i>	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Obtenção dos Extratos	20
4.2 Análise do Perfil Químico de <i>Dictyoloma vandellianum</i> por HPLC-PDA	21
4.2.1 Fracionamento por Extração em Fase Sólida (SPE)	23
4.2.2 Análise do Perfil Obtido do Fracionamento SPE	25
4.3 Análise por UHPLC-QTOF-MS/MS	27
4.4 Processamento de Dados UHPLC-QTOF-MS/MS para Obtenção de Rede Molecular	28
4.5 Isolamento de Compostos das Folhas de <i>Dictyoloma vandellianum</i>	29
4.6 Ensaios Biológicos com <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i>	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Análise do Perfil Químico de <i>Dictyoloma vandellianum</i> por HPLC-PDA dos extratos Brutos	33
5.2 Resultados da Análise dos Dados Obtidos em UHPLC-QTOF-MS/MS	40
5.2.1 Processamento de dados	40
5.3 Interpretação da Rede Molecular	57
5.4 Caracterização Estrutural por Ressonância Magnética Nuclear	61
5.5 Resultados de Atividade Bacteriana e <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i>	87
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem fontes promissoras de metabólitos secundários com potencial farmacológico e agrícola, especialmente no combate a fitopatógenos de interesse agrônomico. No contexto da citricultura, destaca-se a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente etiológico do cancro cítrico, uma das doenças mais devastadoras que acometem os pomares de citros no Brasil e no mundo. Essa fitobactéria demanda estratégias eficazes de controle, que incluam compostos bioativos naturais como alternativas sustentáveis e ambientalmente seguras aos pesticidas sintéticos.

Dentro desse escopo, espécies da família Rutaceae são amplamente reconhecidas por sua diversidade química, sendo particularmente ricas em alcaloides, flavonoides, cumarinas e quinolonas. O gênero *Dictyoloma*, pertencente a essa família, embora pouco explorado, apresenta registros etnobotânicos e químicos promissores. Estudos anteriores, como o de Sartor et al. (2003), já demonstraram a presença de derivados de 4-quinolonas com potencial antimicrobiano em extratos dessa planta, o que motiva sua investigação mais aprofundada.

A presente pesquisa teve como objetivo geral o estudo químico de extratos de folhas de *Dictyoloma vandellianum*, com foco na caracterização de metabólitos secundários por técnicas de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN), e posterior avaliação da plausibilidade de seus efeitos antibacterianos frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Especificamente, buscou-se a obtenção dos extratos brutos da planta, a análise do perfil químico dos extratos por HPLC acoplado a detector de arranjo de diodos (HPLC-PDA), realização de análise por UHPLC-QTOF-MS/MS em modos positivo e negativo e o processamento dos dados obtidos por meio das plataformas MS-DIAL, MS-FINDER e GNPS, com construção de redes moleculares e anotações in silico e o isolamento e elucidação dos compostos bioativos por técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

A metodologia combinou extração por solventes orgânicos, análise do perfil químico por HPLC-PDA, prospecção de compostos por UHPLC-QTOF-MS/MS e aplicação de ferramentas de metabolômica para anotação de compostos. Compostos isolados foram caracterizados por espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC) e confirmados por fragmentação em espectrometria de massas de alta resolução. As análises foram conduzidas de forma a integrar evidências espectrais e químicas para validação estrutural confiável.

Como resultado, foram observados perfis químicos ricos e complexos, com destaque para a identificação de substâncias pertencentes às classes de alcaloides, flavonoides e quinolonas. A análise de rede molecular permitiu agrupar compostos com similaridade de fragmentação, indicando a presença de núcleos estruturais recorrentes e revelando a diversidade de constituintes presentes nos extratos.

A validação cruzada entre os dados de RMN e MS/MS possibilitou a confirmação estrutural de duas quinolonas previamente identificadas em estudos com a espécie, o que reforça a consistência dos resultados obtidos e a fidelidade dos métodos empregados. Esses achados confirmam o potencial da planta como fonte de metabólitos secundários com possível aplicação no controle fitossanitário, e fornecem suporte para investigações futuras voltadas à avaliação da bioatividade dessas substâncias frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Dessa forma, o presente trabalho contribui significativamente para o aprofundamento do conhecimento químico sobre *Dictyoloma vandellianum*, ampliando as evidências sobre sua composição metabólica e fortalecendo sua relevância no contexto da química de produtos naturais com aplicação agrícola.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial químico e biológico de *Dictyoloma vandellianum* por meio do isolamento e da caracterização estrutural de metabólitos secundários utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas, com posterior avaliação da atividade bactericida dos extratos brutos no controle de doenças bacterianas de interesse agrícola, frente a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver métodos cromatográficos utilizando HPLC-PDA visando à separação e ao isolamento de compostos presentes nos extratos de *Dictyoloma vandellianum*;
- Aplicar espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-QTOF-MS/MS) associada à construção de rede molecular para a triagem e anotação de metabólitos secundários *in Silico*;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos brutos frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente etiológico do cancro cítrico;
- Realizar a caracterização estrutural dos compostos isolados por meio de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

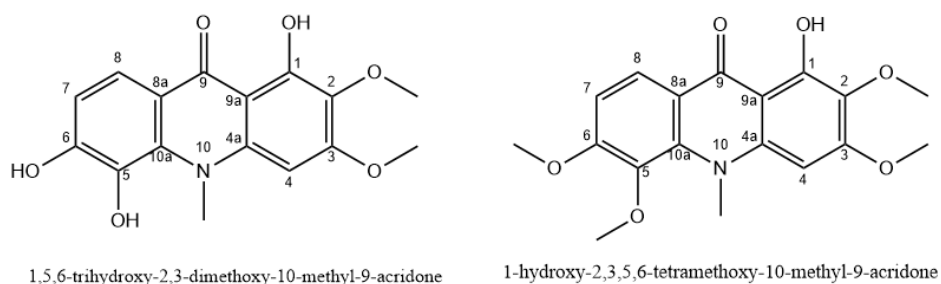
3.1 Família Rutaceae

A Família Rutaceae, da ordem Rurales, possui ampla distribuição mundial nas regiões temperadas e tropicais. Esta família integra mais de 1900 espécies e cerca de 150 gêneros, dos quais, cerca de 50 podem ser encontrados no Brasil, tendo grande variedade de ocorrência nas Florestas Amazônica e Atlântica. As plantas que fazem parte da Família Rutaceae são angiospérmicas, possuindo flores, podendo ocorrer em forma de arbustos, árvores e ervas perenes. Os gêneros *Citrus*, *Ruta* e *Pilocarpus*, constituem os gêneros mais conhecidos das Rutáceas (Filho *et al.*, 2020; Pirani, 2005; Albuquerque, 1976).

Em relação à fitoquímica, a família *Rutaceae* apresenta uma grande variedade de metabólitos secundários como alcaloides derivados de ácido antranílico, cumarinas, lignanas, flavonoides, terpenoides e limonoides. Tais metabólitos, em especial as cumarinas e os alcaloides são considerados marcadores químicos das rutáceas e indicadores sistemáticos cruciais para entender a diversidade, evolução e classificação dessa família (Waterman, 1975).

Os alcaloides furoquilínicos e indólicos são frequentemente encontrados em espécies da família Rutaceae, a presença ou ausência destes compostos e suas variações estruturais servem como indicadores de relações evolutivas entre espécies e gêneros dentro da família ligada à adaptação ecológica como defesa contra herbívoros e microrganismos, refletindo estratégias químicas de sobrevivência, além de indicar base genética comum para sua biossíntese (Dreyer, 1970).

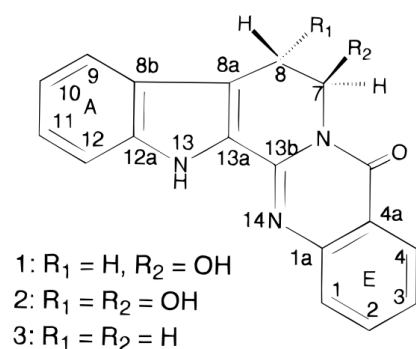
A espécie *Pleiocarpus alatum* foi estudada por Bandara *et al* (1990) por ser uma planta medicinal bastante conhecida no Sri Lanka e na Índia. Sua atividade medicinal foi atribuída aos alcaloides e cumarinas encontrados e isolados dos extratos da casca da raiz de *P. alatum*. Entre os compostos isolados, neste estudo destaca-se os alcaloides 1,5,6-trihidroxi-2,3-dimetoxi-10-metil-9-acridona e 1-hidroxi-2,3,5,6-tetrametoxi-10-metil-9-acridona sendo compostos isolados inéditos presentes na planta, ambas estruturas são observadas na Figura 1, a seguir.

Figura 1. Alcaloides isolados de *P. alatum*

Fonte: Bandara *et al* (1990), adaptado

Estes compostos foram isolados pela primeira vez nesta pesquisa, sendo o 1,5,6-trihidroxi-2,3-dimetoxi-10-metil-9-acridona totalmente inédito, sem ocorrência na literatura com grupos hidroxila nas posições 1, 5 e 6, além de grupos metoxi nas posições 2 e 3. Já o composto 1-hidroxi-2,3,5,6-tetrametoxi-10-metil-9-acridona já era conhecido por sua obtenção via metilação do alcaloide 1,6-dihidroxi-2,3,5-trimetoxi-10-metil-9-acridona utilizando diazometano como agente metilante, porém, foi reportado pela primeira vez como produto natural obtido do isolamento do extrato de *P. alatum* (Badara *et al.*, 1990).

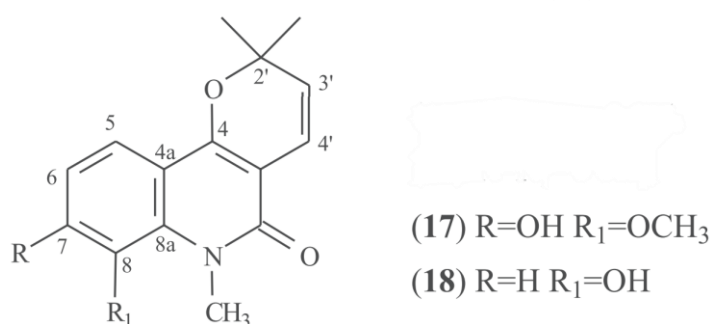
Uma planta tradicional da medicina chinesa, *Phellodendron amurense* pertencente a família Rutaceae, comumente usada como analgésico foi estudada por Ikuta, Urabe e Nakamura (1998) com o objetivo de isolar compostos provenientes dos tecidos calogênicos da planta e assim obter informações quimiotaxonômicos e de sua biossíntese, na qual foi isolado o alcaloide 7,8-diidroxirutaecarpina, derivado indolopiridoquinazolina, composto inédito, sem relato na literatura tanto em origem natural como sintética. Este composto pode ser observado na Figura 2, abaixo.

Figura 2. 7,8-diidroxirutaecarpina isolado de *P. amurense*

Fonte: Ikuta, Urabe e Nakamura (1998)

No extrato metanólico do caule de *Rauia resinosa*, foram identificados os alcaloides observados na Figura 3, abaixo, 7-hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina (17) e 8-hidroxi-N-metilflindersin (18) ambos de ocorrência inédita na literatura, sendo este segundo considerado inédito por ter sido descrito pela primeira vez como um produto natural, o qual já havia sido descrito sinteticamente. A presença de alcaloides específicos derivados do ácido antranílico é um marcador químico importante em rutáceas, novas descobertas contribuem para a compreensão evolutiva e podem servir como protótipos para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas em química medicinal. Avaliações adicionais são essenciais para determinar a extensão de sua relevância em diferentes contextos (Albarici *et al.*, 2010).

Figura 3. 7-hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina (17) e 8-hidroxi-N-metilflindersin (18)

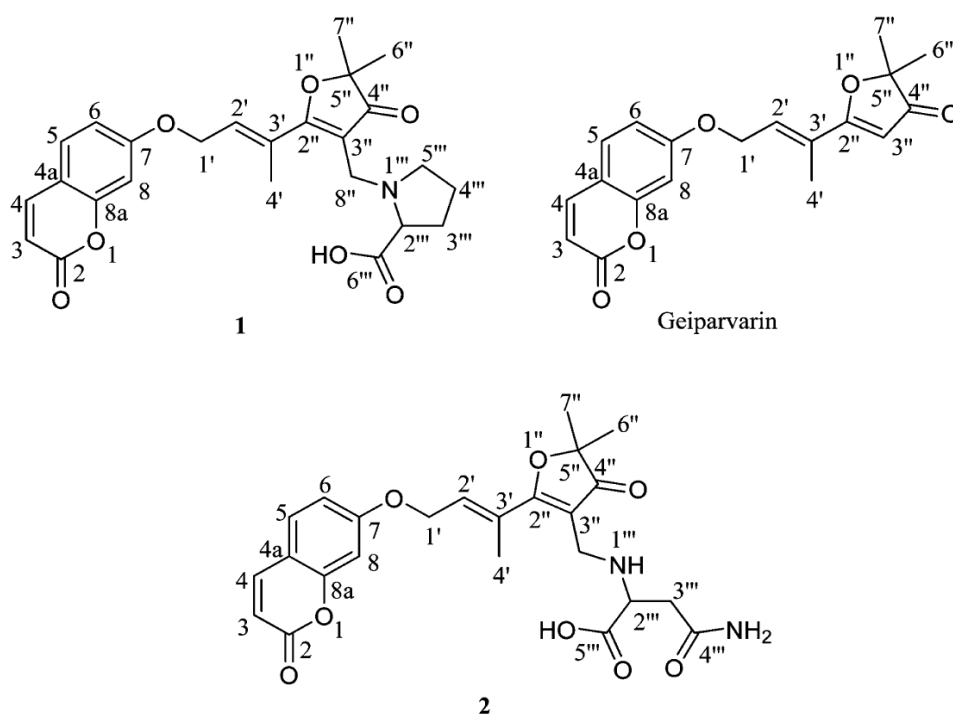


Fonte: Albarici *et al.* (2010)

Cabral e seus colaboradores identificaram em *Conchocarpus fontanesianus* os alcaloides dictamina, γ -fagarina, skimianina e 2-fenil-1-metil-4-quinolona. Estes alcaloides já eram conhecidos na literatura, entretanto foram pela primeira vez identificados em *C. fontanesianus*. Os compostos foram obtidos dos extratos de caule da espécie e evidenciam o valor do bioma da Mata Atlântica como um reservatório de biodiversidade química, reforçando a necessidade de sua preservação. Também sugerem que espécies nativas podem se tornar fontes valiosas de produtos farmacêuticos, beneficiando a economia local e a pesquisa científica

Geijera parviflora, planta também pertencente às rutáceas, nativa da Austrália, foi estudada por Shou e seus colaboradores (2013) objetivando o isolamento de novos compostos. Nesta pesquisa foram encontrados dois novos alcaloides nomeados de Parvifloranina A (1) e Parvifloranina B (2), ambos com esqueleto de 11 carbonos ligados a aminoácidos, são observados na Figura 3 a seguir, sendo relatados como de ocorrência inédita na natureza.

Figura 4. Parvifloranina A, Parvifloranina B e Geiparvarin



Fonte: Shou *et al.*, (2013)

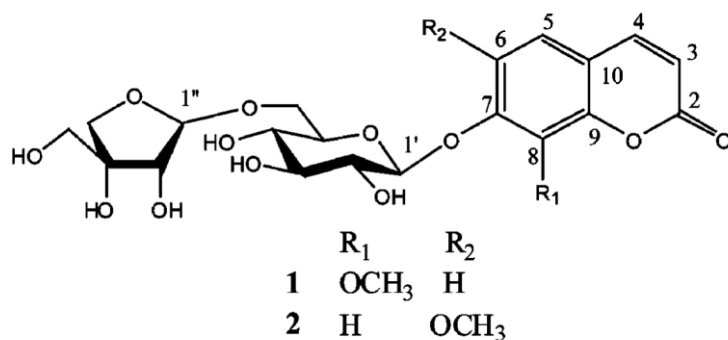
A Parvifloranina A (1) observa-se como uma mistura de dois enântiômeros [(S)-1 e (R)-1] na proporção 1:4, entre suas características químicas é relatada a presença de um grupo lactona com uma cadeia lateral derivada da pirrolidina. A Parvifloranina B (2) é diferenciada da A pela presença do grupo amino secundário e uma substituição por asparagina, ambos os compostos são relatados como derivados do Geiparvarin indicado como precursor característico da planta (Shou *et al.*, 2013).

Assim como os alcaloides, as cumarinas também são reconhecidas como marcadores quimiotaxonômicos importantes nas rutáceas devido à sua diversidade e frequente ocorrência na família. Furocumarinas e outras variantes, são comumente encontradas na família como produtos metabólicos típicos e a presença ou ausência destes tipos de cumarinas, ou cumarinas simples e piranocumarinas é usada para diferenciar espécies ou gêneros dentro da família Rutaceae, auxiliando na classificação botânica. Além disso, a presença de cumarinas em um gênero ou espécie da família Rutaceae pode ser indicador de boa atividade antimicrobiana (Ribeiro; Kaplan, 2002; Garcia-Argáez *et al.*, 2003).

O gênero *Zanthoxylum*, amplamente conhecido pela sua diversidade em alcaloides, é também fonte de diversas cumarinas. Na espécie *Zanthoxylum schinifolium* foram identificadas e caracterizadas 12 cumarinas em extratos do caule da planta por Li *et al.* (2013)

como a escopolina, escopoletina. Além de cumarinas já reportadas na literatura, foi isolada uma cumarina inédita nomeada de Zanthoxyloside, observada na Figura 4 abaixo, uma cumarina glicosilada, com um grupo apiofuranosil ligado ao glicopiranosídeo.

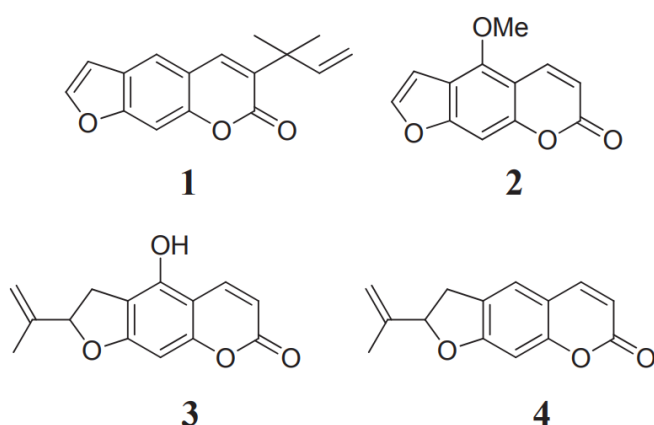
Figura 5. Zanthoxyloside, isolado do extrato do caule de *Zanthoxylum schinifolium*



Fonte: Li *et al.* (2013)

García-Beltrán e seus colaboradores (2014) ressaltam a importância das cumarinas como marcadores quimiotaxonômicos da família Rutaceae ao identificarem cumarinas substituídas do tipo 3-(1',1'-dimetilalil) em *Esenbeckia alata*, assemelhando-se a um pequeno grupo de rutáceas o qual inclui *Ruta* e *Clausena*. Embora essas substituições já fossem conhecidas em outras espécies do gênero *Esenbeckia*, este estudo confirma pela primeira vez a presença dessas cumarinas específicas em *E. alata*.

Figura 6. Cumarinas isoladas de *E. alata*



Fonte: García-Beltrán *et al.* (2014)

As cumarinas reportadas na pesquisa de García-Beltrán *et al.* (2014), podem ser observadas na Figura 5, acima. A Chalepensisina (1) com um núcleo cumarínico fusionado a um

furano, o grupo substituinte principal é o 2,2-dimetilciclopropil ligado no carbono 3 do anel cumarínico. O Bergapteno (2) é uma furocumarina linear, com um grupo metoxi no carbono 5 e um anel furano fusionado no sistema cumarínico, sua biossíntese envolve a prenilação de um precursor cumarínico seguido por oxidação e fechamento do anel furano. A Leptofilidina (3) é uma cumarina prenilada, com um grupo 1,1-dimetilalil no carbono 3 e uma hidroxila no carbono 7. O grupo prenilado é uma característica comum em cumarinas de Rutaceae, mas a posição 3 com uma configuração dimetilalil é mais rara. A Isoangenomilina (4) estruturalmente semelhante à leptofilidina, exceto pela presença de um grupo metoxi no carbono 7, em vez de uma hidroxila. O grupo 1,1-dimetilalil está presente no carbono 3 do núcleo cumarínico.

Além da identificação de novos compostos, outros estudos também contribuem para o entendimento da biossíntese das rutáceas. O estudo de Amaral *et al.* (2020) apresenta avanços significativos nessa compreensão, apresentando o estudo dos avanços na biossíntese de piranocumarinas, com ênfase na xantiletina e seselina isolados das raízes de *Citrus sinensis* e *Citrus limonia*. Os autores utilizaram experimentos de marcação isotópica com glicose D-[1-¹³C] para confirmar que o anel pirano dessas moléculas é formado pela via do metileritritol fosfato (MEP), enquanto o esqueleto cumarínico se origina da via do chiquimato. A análise detalhada foi realizada utilizando métodos combinados de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

Na família Rutaceae também se destaca a importância dos limonoides como marcadores químicos significativos, derivados de precursores triterpenoides por vias bioquímicas específicas. Embora a diversidade estrutural dos limonoides seja menor na Rutaceae em comparação à Meliaceae, ela ainda apresenta variabilidade considerável em alguns gêneros. As subfamílias da Rutaceae, como Aurantioideae, Rutoideae e Cneoroideae, reforçam a afinidade química com gêneros próximos e sugerindo a inclusão de alguns na subfamília Cneoroideae devido à presença de limonoides complexos e cromonas preniladas. Além disso, as rutáceas se destacam pela produção prolífica de alcaloides derivados de ácido antranílico e triptofano, bem como pelas prenilcoumarinas e cromonas, características raramente encontradas em outras famílias de Sapindales (Silva *et al.*, 2021). Análises como as relatadas fornecem suporte químico para a classificação taxonômica e apontam possíveis relações filogenéticas dentro da ordem Sapindales.

3.2 Estudos de Usos e Aplicações de Extratos e Compostos da Família Rutaceae

O estudo dos usos e aplicações dos extratos e compostos isolados provenientes de espécies da família Rutaceae permeia a pesquisa científica desde os primeiros achados. Em 1979, Cassady *et al.* verificaram a atividade antitumoral dos compostos micromelina e a escopoletina isolados de *Micromelum integerrimum*. Apesar da atividade antitumoral demonstrada por esses compostos terem sido inconsistente e dependente de vários fatores, como dose e solubilidade nos veículos de teste. A micromelina, em particular, apresentou uma atividade inicial promissora contra o sistema de leucemia linfocítica P-388, mas não manteve a eficácia em testes subsequentes ou em doses menores. Apesar da necessidade de estudos adicionais, este representa uma das primeiras investigações sistemáticas com foco em *Micromelum integerrimum*.

Os constituintes químicos de *Zanthoxylum integrifolium*, espécie amplamente estudada em rutáceas, foram avaliados para atividade antiplaquetária por Chen e seus colaboradores (1999). Vários compostos foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir a agregação de plaquetas induzida por diferentes agentes, como trombina, ácido araquidônico, colágeno e o fator ativador de plaquetas. Entre os compostos analisados destaca-se a Prudomestina, um flavonoide da classe das flavonas, com forte atividade capaz de inibir a agregação plaquetária em concentrações de 20µg/mL. Os autores destacam a possível aplicação terapêutica desses compostos, especialmente no desenvolvimento de agentes antiplaquetários para prevenir condições como trombose.

Alguns alcaloides e flavonoides obtidos dos extratos de caule e folhas de *Neoraputia paraensis* foram estudados para avaliar sua capacidade de inibição da enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Trypanossoma cruzi* a fim de interferir no metabolismo energético do parasita. Os flavonoides altamente oxigenados e isoflavonoides mostraram ser os mais ativos como 3',4',7,8-tetrametoxi-5,6-(2'',2''-dimetilpirano)-flavona, 3',4',5,7,8-pentametoxiflavona, 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona, 3',4'-metilenodioxi-5,6,7-trimetoxiflavona e 5-hidroxi-3',4'-metilenodioxi-6,7-dimetoxiflavona, Esses flavonoides possuem várias substituições metoxi (-OCH₃), hidroxila (-OH) e grupos metilenodioxi, que caracterizam a alta oxigenação. A pesquisa focou no isolamento e caracterização dos alcaloides não demonstrando estudos sobre sua atividade de inibição enzimática (Moraes *et al.*, 2003).

No estudo da atividade antibacteriana de *Hortia oreadica*, foram identificados quatro derivados do ácido diidrocinâmico, isolados do extrato n-hexânico, além da guianina,

um limonoide, e da dictamina, um alcaloide furoquinolínico, ambos isolados do extrato de diclorometano. Em relação à atividade antibacteriana, o extrato n-hexânico demonstrou maior eficácia geral, atribuída à presença de compostos lipofílicos que facilitam a permeação através das membranas bacterianas. A dictamina apresentou atividade significativa contra *Streptococcus sanguinis*, *S. mutans* e *Lactobacillus casei*, enquanto a guianina mostrou eficácia contra *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis* e *L. casei*. Esses resultados destacam o potencial dessas substâncias no desenvolvimento de novos agentes antibacterianos para controle de cáries e formação de placas dentárias (Severino *et al.*, 2009).

Terezan *et al.* (2010) investigaram a toxicidade de extratos e compostos isolados de *Spiranthera odoratissima* contra formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*) e seu fungo simbiótico (*Leucoagaricus gongylophorus*). Foram identificados alcaloides furoquinolínicos, 1-metil-2-fenilquinolin-4-ona e limonoides, sendo que o ácido limonéxico e a 1-metil-2-fenilquinolin-4-ona foram descritos pela primeira vez no gênero *Spiranthera*. Os extratos e os alcaloides apresentaram forte atividade fungicida, inibindo até 100% do crescimento do fungo, enquanto o ácido limonéxico mostrou a maior toxicidade às formigas, reduzindo a sobrevivência mediana para 3 dias. Os resultados destacam o potencial da planta para o controle biológico sustentável de pragas agrícolas.

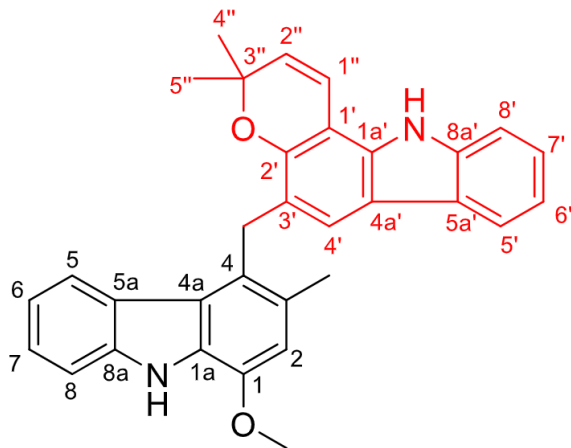
Outro estudo voltado para a área agrícola utilizando plantas da família Rutaceae refere-se a análise de Nebo *et al.* (2014) dos alcaloides (evolitrine e graveolina), cumarinas (psoraleno e chalepensina) e flavonoides (como flavona), destacando seu alto potencial fitotóxico. No bioensaio de coleóptilos de trigo, a graveolina demonstrou inibição superior a 85%, enquanto psoraleno e chalepensina inibiram consistentemente o crescimento mesmo em baixas concentrações. Nos ensaios com espécies padrão, graveolina e psoraleno apresentaram efeitos semelhantes ou superiores ao herbicida comercial Logran®, especialmente na inibição de germinação e crescimento radicular *Lepidium sativum*.

Seguindo na abordagem agrícola, o uso de produtos naturais derivados das rutáceas para utilização em novos herbicidas como alternativa sustentável no desenvolvimento de agroquímicos é indicado no estudo dos efeitos de oito alcaloides isolados da planta *Ruta graveolens* sobre as atividades fotossintéticas realizado por Sampaio *et al.* (2018). Destes oito destacou-se a graveolina, atuando como inibidor do transporte de elétrons durante a fase luminosa da fotossíntese e como regulador do crescimento vegetal e, a mistura homóloga de quinolonas, inibiu tanto o transporte de elétrons quanto a transferência de energia. Ambos

reduziram a biomassa seca de *Lolium perenne* (planta-alvo) em até 23%, desempenho comparável ao herbicida comercial DCMU.

Na área da química medicinal as rutáceas também são bastante exploradas na busca de compostos bioativos com atividade em diferentes áreas da medicina e com potenciais aplicações farmacêuticas. O estudo dos frutos de *Clausena anisum-olens* levou ao isolamento de *Clausanisumine*, visto na Figura abaixo, um alcaloide bicabazolado prenilado com uma nova estrutura de carbono, o qual foi testado para atividade antiviral anti-HIV em células T-linfoides (C8166). O composto Demonstrou uma potente inibição da transcriptase reversa do HIV-1, com valor de concentração efetiva (EC_{50}) de 18,58 nM. A *Clausanisumine* é o primeiro exemplo de um alcaloide bicabazolado prenilados, ou seja, um alcaloide dimérico de carbazol, apresentando em sua estrutura um composto heterocíclico com dois anéis benzênicos fundidos a um anel pirrol, o que demonstrou notável atividade anti-HIV (Liu *et al.*, 2021). A química medicinal frequentemente explora compostos com novas estruturas químicas para inovar em terapias.

Figura 7. Estrutura da Clausanisumine isolada de *Clausena anisum-olens* como atividade anti-HIV



clausanisumine (1)

Fonte: Liu *et al.* (2021)

Seguindo na área da química medicinal Sousa *et al.* (2022) investigaram o extrato etanólico de *Rauia resinosa* e isolou uma nova flavona, além de outros compostos conhecidos, com foco na avaliação de atividade citotóxica contra células cancerígenas. Entre os compostos analisados, a flavona 3',4',5,7,8-pentametoxiflavona destacou-se por sua atividade antiproliferativa, exibindo um índice de seletividade superior a 2,0 contra as linhagens T24 (carcinoma de bexiga) e TOV-21G (adenocarcinoma ovariano), com valores de concentração inibitória próximos a 30 µg/mL. Esses resultados indicam que a flavona citada possui potencial promissor como agente anticâncer devido à sua seletividade e eficácia.

Os compostos isolados da planta *Murraya paniculata*, incluindo os novos metabolitos varanasine e schroffanone, também demonstraram atividade citotóxica significativa contra células cancerígenas, especialmente na linhagem HL-60 (leucemia). O composto varanasine mostrou o melhor desempenho, com um IC₅₀ de 12 µM, induzindo apoptose de maneira dose-dependente, evidenciada por alterações morfológicas, fragmentação nuclear (DAPI), redução do potencial da membrana mitocondrial e aumento da autofagia (marcada por fluorescência de acridina laranja). Estudos de detecção e quantificação de proteínas confirmaram que varanasine e minumicrolin promoveram a clivagem de caspase-3 e a redução da expressão de Poli(ADP-ribose Polimerase-1 (PARP-1), destacando seu potencial como agentes anticancerígenos promissores (Kumari *et al.*, 2024).

Diante da ampla diversidade química e biológica apresentada pelas espécies da família Rutaceae, evidencia-se o imenso potencial dessas plantas na descoberta de novos compostos bioativos. Seja no desenvolvimento de agentes terapêuticos, em química medicinal, ou no avanço de alternativas sustentáveis na agricultura, os estudos destacados neste texto ilustram a relevância dessas espécies para a pesquisa científica. Apesar dos avanços, muitos compostos ainda carecem de investigações aprofundadas quanto à sua atividade, mecanismos de ação e viabilidade de aplicação. Assim, a continuidade e a ampliação dessas pesquisas são de extrema importância para explorar e validar o papel das rutáceas como uma rica fonte de inovações científicas e tecnológicas.

3.3 O gênero *Dictyoloma*

O gênero *Dictyoloma* inclui apenas duas espécies, sendo estas *Dictyoloma vandellianum* e *D. peruvianum*. Este gênero foi historicamente alvo de controvérsias taxonômicas sendo inicialmente classificado na família Rutaceae e, posteriormente, na Simaroubaceae. Até que evidências químicas sustentaram sua inclusão definitiva na Rutaceae (Vieira, *et al.*, 1988).

A *Dictyoloma peruviana* é uma pequena árvore pertencente nativa da Bolívia, possui relevância tanto etnobotânica quanto científica devido ao uso tradicional de sua casca na medicina popular para o tratamento da leishmaniose. Alguns alcaloides eram destacados em sua composição como as dictyolomidas A e B pertencentes à classe de 4-quinolinonas, a planta também é conhecida por conter outros tipos de compostos bioativos, como cromonas preniladas

e limonoides, em espécies relacionadas do gênero. Do ponto de vista botânico, a *D. peruviana* representa uma fonte promissora de compostos naturais bioativos (Lavaud *et al.*, 1995).

A *Dictyoloma vandellianum* é uma planta endêmica do Brasil com relevância em estudos químicos e sistemáticos. A planta é rica em metabólitos secundários, incluindo alcaloides, como 2-quinolonas, cromonas preniladas e limonoides. Sua posição taxonômica foi revisada ao longo do tempo, sendo hoje considerada parte de um subgrupo especial dentro da família Rutaceae. Em geral *D. vandellianum* combina características químicas únicas com relevância taxonômica, sendo um exemplo interessante de biodiversidade brasileira (Sartor *et al.*, 2003).

3.3.1 *Dictyoloma vandellianum*

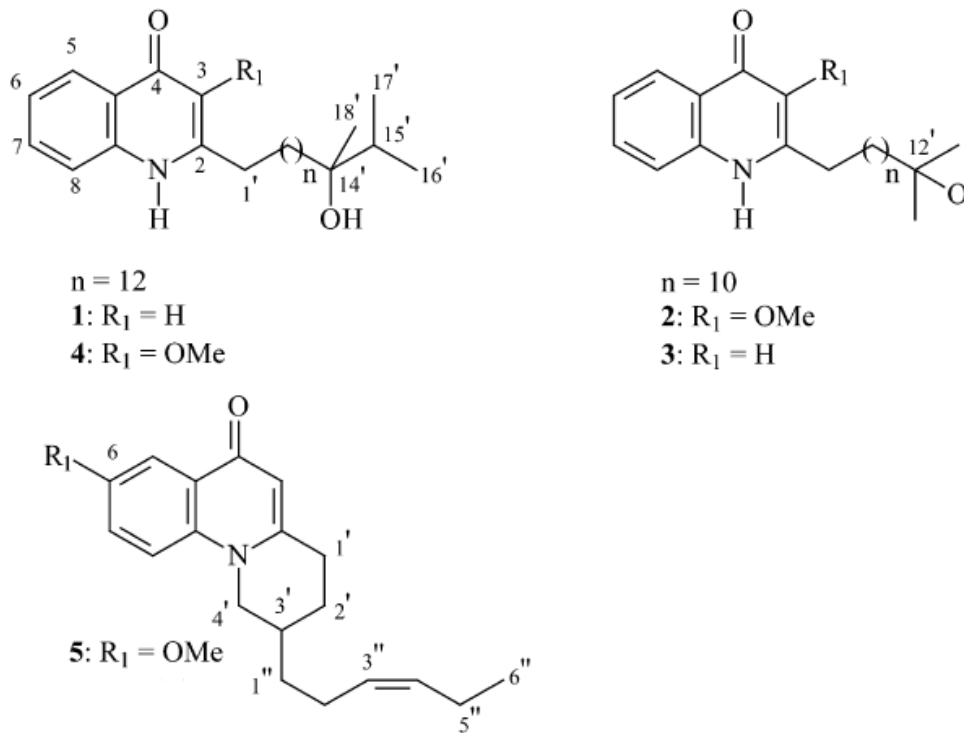
Os principais trabalhos envolvendo *Dictyoloma vandellianum* envolvem pesquisas quimiotaxonômicas e de isolamento de compostos para entendimentos de suas vias biossintéticas. Um dos primeiros trabalhos com a planta, esta ainda nomeada como *D. incanescens*, relata a identificação de um novo alcaloide encontrado na casca do tronco, identificado como N,N-dimetil-5-metoxitriptamina. O trabalho destaca que a ocorrência deste alcaloide é uma característica comum da família Rutaceae, à qual a planta pertence (Pachter; Zacharias; Ribeiro, 1959).

Vieira *et al.* (1988) destacaram o isolamento de três limonoides e dois alcaloides a partir dos frutos e caule de *D. vandellianum*. Os limonoides identificados, incluindo deacetilspathelina e derivados hidroxibutenolídeos, e os alcaloides encontrados são típicos da família Rutaceae, fornecendo evidências químicas que sustentam a inclusão do gênero nessa família, uma questão discutida desde sua descrição inicial em 1825. As análises químicas e transformações realizadas confirmaram as estruturas dos compostos, reforçando a proximidade química entre subfamílias relacionadas, como Spathelioideae, e consolidando a posição taxonômica de *D. vandellianum* nas Rutaceae.

Do ponto de vista químico, a planta é rica em metabólitos secundários com importância tanto para a sistemática do gênero quanto para o entendimento das relações evolutivas dentro da ordem Rurales. O isolamento de cinco novos alcaloides isolados das folhas de *Dictyoloma vandellianum*, pertencentes à classe das 2-alkil-4(1H)-quinolonas, incluindo novos compostos apresentando estruturas únicas, caracterizadas por cadeias alifáticas longas e substituintes hidroxila e metoxila em posições específicas, revela a importância química, pois

demonstra a presença de metabólitos típicos de grupos avançados dentro de Rutaceae, como Zanthoxyleae, destacando a complexidade biossintética do gênero *Dictyoloma*. Além disso, os resultados contribuem para o entendimento da evolução química na ordem Rutales, evidenciando o papel de *D. vandellianum* na produção de metabólitos bioativos com potencial sistemático e farmacológico. Os novos compostos 2-(14'-Hidroxi-14',15'-dimetilhexadecanil)-4-quinolona, 2-(12'-Hidroxi-12'-metiltridecanil)-3-metoxi-4-quinolona, 2-(12'-Hidroxi-12'-metiltridecanil)-4-quinolona, 2-(14'-Hidroxi-14',15'-dimetilhexadecanil)-3-metoxi-4-quinolona e 6-Metoxicictyolomida A (Sartor *et al.*, 2003), podem ser observados na Figura 8 abaixo identificados de 1 a 5, respectivamente.

Figura 8. Novos compostos identificados em *D. vandellianum*

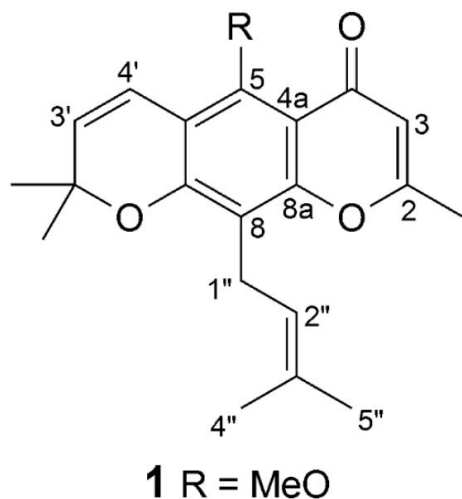


Fonte: Sartor *et al.* (2003)

Assim como outras plantas pertencentes a família Rutaceae, as aplicações envolvendo a *Dictyoloma vandellianum* são variadas. Um estudo identificou dez compostos isolados de *D. vandellianum*, incluindo seis piranochromonas, sendo uma inédita, identificada como 3,3-dimethylallylspatheliacromene metil éter, cromeno 1 Figura 9 abaixo, e cinco já conhecidas. Além disso, foram isolados dois alcaloides, o 8-metoxi-N-metilflindersina e 8-metoxiflindersina e dois limonoides, limonina diosfenol e rutaevina. As estruturas químicas foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas, como IR, NMR e MS, confirmando a presença de heterociclos oxigenados e grupos funcionais como metoxila e prenila,

características relevantes para a bioatividade dos compostos. A descoberta de compostos inéditos, como o cromeno **1**, destaca o potencial químico inexplorado da espécie (Alves *et al.*, 2017).

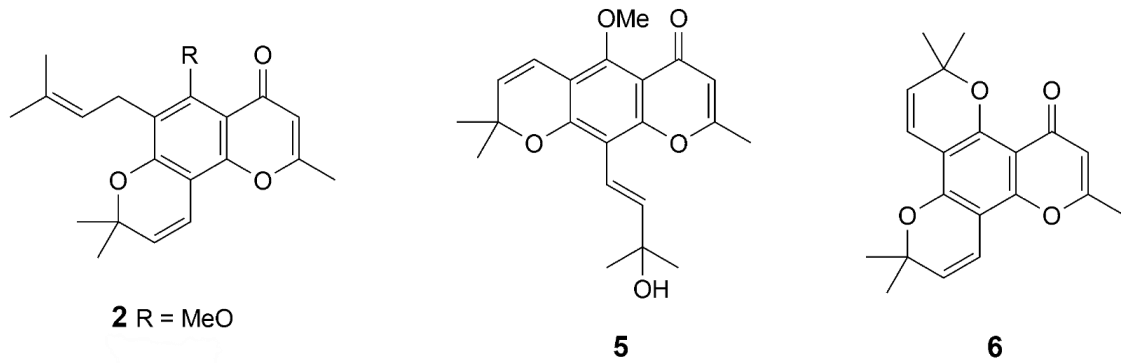
Figura 9. 3,3-dimethylallylspatheliacromene metil éter isolado do extrato da raiz de *Dictyoloma vandellianum*



Fonte: Alves *et al.* (2017)

O composto **1** possui um núcleo de piranochromona com um grupo metóxi na posição 5 e uma cadeia lateral dimetilalil (3,3-dimetilalil) conectada à posição 3 do núcleo cromeno. Quanto à atividade citotóxica, os compostos foram avaliados contra quatro linhagens tumorais (B16-F10, HepG2, K562 e HL-60) e células não tumorais (PBMC). O composto **1** foi o mais ativo, apresentando IC_{50} de 6,26 $\mu\text{g/mL}$ em células B16-F10 e 11,65 $\mu\text{g/mL}$ em PBMC. Outros destaques incluem o composto **5**, 5-O-metilcneoromocromona K (Figura 10), mais ativo contra a linhagem K562 ($IC_{50} = 10,01 \mu\text{g/mL}$), e os compostos **2**, 6-(3-metilbut-2-enil) alopteroxilina metil éter, e **6**, espatelia-bis-cromeno (Figura 10), que exibiram as menores IC_{50} contra HL-60. Apesar das atividades moderadas em comparação à doxorrubicina, os resultados indicam que as piranochromonas isoladas são candidatos promissores para o desenvolvimento de terapias anticâncer, sua complexidade química contribui para a atividade citotóxica observada, especialmente com modificações estruturais para melhorar a eficácia (Alves *et al.*, 2017).

Figura 10. Compostos 2, 5 e 6 isolados da raiz de *D. vandellianum*



Fonte: Alves *et al.* (2017)

O potencial farmacológico anti-inflamatório de compostos isolados de *Dictyoloma vandellianum* foi também avaliado por Opretzka e seus colaboradores (2019). Os autores analisaram o potencial de três cromonas naturais isoladas da raiz da planta como agentes anti-inflamatórios. Os compostos foram purificados e testados quanto à citotoxicidade, estabilidade metabólica e efeitos farmacológicos *in vitro* e *in vivo*. A cromona *5-O-methylcneorumchromone* K destacou-se por seu perfil farmacocinético superior e ausência de efeitos colaterais motores em camundongos. *In vitro*, todas as cromonas inibiram a produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) em macrófagos estimulados, enquanto *in vivo*, a *5-O-methylcneorumchromone* K reduziu significativamente edema, hiperalgesia e níveis de citocinas inflamatórias em um modelo de inflamação induzida. Os efeitos foram atribuídos à inibição da atividade de NF- κ B e à ativação do receptor de glicocorticoides, destacando esta cromona como uma promissora candidata para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios.

Na área agrícola *Dictyoloma vandellianum* teve seu potencial uso pouco explorado, porém com sugestões promissoras. Um estudo envolvendo diversas plantas da família Rutaceae explora a inadequação de plantas nativas desta família da América do Sul como hospedeiras potenciais do psíldeo asiático dos citros, *Diaphorina citri*. A pesquisa classifica diferentes espécies em quatro grupos baseados na adequação como hospedeiras para o desenvolvimento do inseto, analisando fatores como sobrevivência e reprodução. A *D. vandellianum* foi classificada como uma planta não hospedeira do *Diaphorina citri*, pois não suporta seu desenvolvimento, reprodução ou sobrevivência prolongada, tampouco serve como refúgio temporário. Por não contribuir para a proliferação do vetor nem para a propagação do *Huanglongbing* (HLB) ou *greening*, essa espécie nativa do Brasil pode ser utilizada como barreira ecológica em pomares, ajudando a reduzir a movimentação do psíldeo de áreas

externas para as plantações. Seu uso, integrado a outras estratégias de manejo, representa uma abordagem sustentável no combate à disseminação do HLB (Felisberto *et al.*, 2019).

Em resumo, *Dictyoloma vandellianum* revela-se uma espécie de grande interesse científico, unindo relevância no campo da sistemática botânica e evolução química com potenciais aplicações farmacológicas e agrícolas. Os compostos isolados destacam-se por sua diversidade estrutural e atividades biológicas promissoras, enquanto sua resistência ao *Diaphorina citri* aponta para usos estratégicos na proteção de culturas agrícolas, bem como instiga maior exploração na área da química agrícola. Esses avanços reforçam a necessidade de ampliar os estudos sobre a espécie, explorando ainda mais suas contribuições para a ciência e suas possibilidades de aplicações práticas.

3.4 Cancro cítrico - *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*

O cancro cítrico, uma doença bacteriana causada por *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* afeta todas as variedades comerciais de citros. Esta doença acarreta sintomas em todas as partes aéreas das plantas jovens. O *X. citri* coloniza as superfícies foliares e forma biofilmes estruturados que protegem a bactéria contra estresses ambientais e promovem a infecção, a penetração ocorre por aberturas naturais, como estômatos, ou ferimentos causados por insetos ou ferramentas. Após entrar na planta, o patógeno desencadeia uma infecção que resulta no desenvolvimento de lesões em forma de pústulas elevadas e erupções em folhas, frutos e ramos (Martins *et al.*, 2020) conforme observado na Figura 11, abaixo.

Figura 11. Lesões ocasionadas por Cancro cítrico em folhas, galhos e frutos em citros



Fonte: Fundecitrus (2024), adaptado.

Após a infecção e aparecimento das lesões ocorre a desfolhação e a queda dos frutos em consequência do agravamento da doença. O patógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é inicialmente reconhecido por receptores de reconhecimento de patógenos da planta, que detecta

padrões moleculares associados ao patógeno como flagelina e lipopolissacarídeos. Esse reconhecimento ativa a imunidade desencadeada por padrões caracterizada pela produção de espécies reativas de oxigênio, deposição de calose e expressão de genes de defesa. Contudo, o *X. citri* utiliza o sistema de secreção para injetar fatores de virulência nas células hospedeiras, sendo o principal deles a proteína PthA4, que interage com genes de suscetibilidade promovendo alterações que favorecem o crescimento bacteriano e o desenvolvimento do cancro. Como resultado, a planta tem dificuldade em manter suas respostas de defesa devido à reprogramação de genes relacionados ao crescimento celular e divisão, induzidos pelo patógeno. Além disso, o *X. citri* forma biofilmes na superfície das folhas, o que aumenta sua resistência a condições adversas e a compostos antimicrobianos (Martins *et al.*, 2020).

A *Xanthomonas* é disseminada principalmente por chuvas com vento, que transportam o inóculo e causam ferimentos nas plantas, facilitando a infecção. O patógeno prospera em condições de alta umidade e temperaturas entre 20°C e 30°C, típicas de regiões tropicais e subtropicais. O tecido jovem é o mais suscetível à infecção, enquanto tecidos maduros apresentam maior resistência. A bactéria sobrevive principalmente nas lesões de plantas infectadas e tem curta sobrevivência em superfícies inanimadas ou no solo. Além disso, a presença do minador dos citros (*Phyllocnistis citrella*) intensifica a doença ao criar ferimentos que facilitam a entrada do patógeno, aumentando a severidade e a incidência do cancro cítrico (Ferrence *et al.*, 2018).

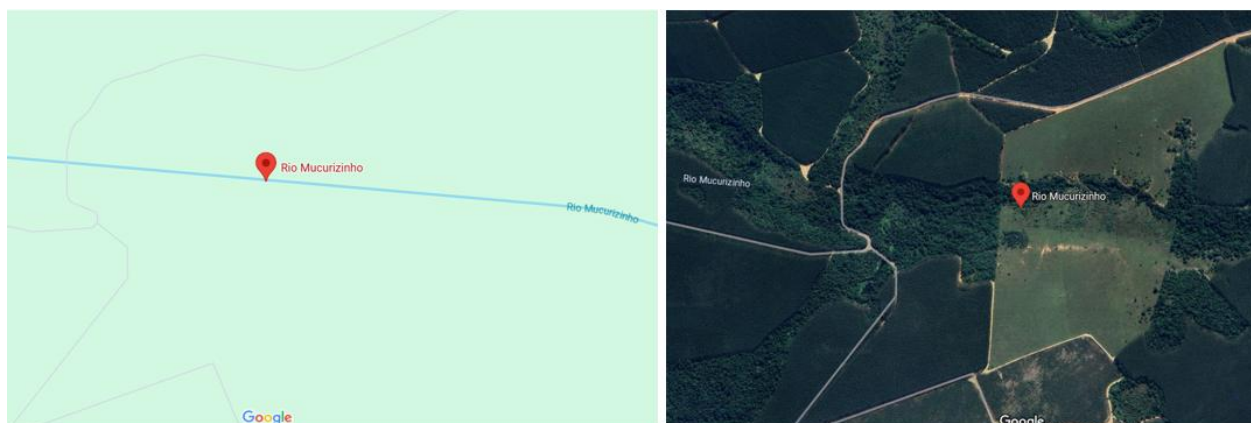
O cancro cítrico foi identificado no Brasil em 1957, no estado de São Paulo, e as primeiras ações envolveram a erradicação rigorosa de árvores infectadas e árvores próximas. Durante décadas, protocolos rigorosos de erradicação foram implementados, mas enfrentaram desafios como a disseminação da doença por fatores como a mineração foliar por insetos. A fim de conter a infecção, uma instrução normativa foi publicada em 2018 pela Secretaria de Defesa Agropecuária permitindo que estados definissem estratégias locais para erradicação e controle do cancro cítrico, instruindo ao manejo integrado com bactericidas e pulverização de cobre na plantação e eliminação de plantas contaminadas. Para regiões onde a erradicação não é viável ou a praga é mais difícil de controlar, é indicado reduzir os impactos da doença sem necessariamente eliminar a praga, incluindo monitoramento, o controle de plantas hospedeiras e outras práticas que minimizem os riscos de disseminação (Brasil, 2018; Behlau, 2020).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos Extratos

Os extratos brutos de *Dictyoloma vandellianum* foram obtidos a partir de amostras disponíveis na extratoteca do Laboratório de Produtos Naturais (PN) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ – UFSCar). De acordo com o registro da extratoteca e dados do Re flora – Herbário Virtual, o material botânico foi coletado pelo Botânico J. R. Pirani em 14 de maio de 2000, na floresta ao longo do Rio Mucurizinho, na Rodovia de Murici (sentido Itabatã, km 12) no município de Nova Viçosa – Bahia, vista na imagem da localização via satélite na Figura 12 abaixo.

Figura 12. Localização vista por satélite da área de coleta do material vegetal



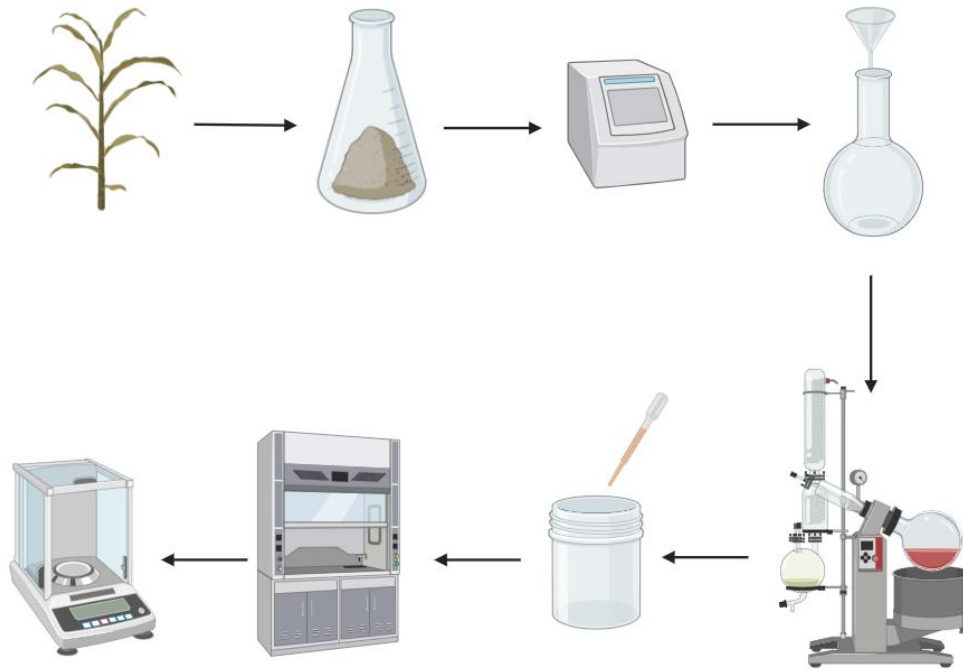
Fonte: Google Maps (2025), adaptado.

As amostras vegetais entregues à equipe do PN incluíam folhas, frutos, galhos finos e caule. Estas partes foram inicialmente secas em estufa com circulação de ar por sete dias a 40 °C. Após a secagem, o material foi triturado, homogeneizado e submetido à extração sequencial com três solventes em ordem crescente de polaridade: hexano (C₆H₁₄), diclorometano (CH₂Cl₂) e metanol (CH₃OH).

Para cada etapa extrativa, aproximadamente 1 L do solvente foi adicionado ao material vegetal acondicionado em frascos tipo Erlenmeyer. A extração foi realizada por agitação em banho de ultrassom a 25 °C por 45 minutos. Em seguida, o extrato foi filtrado, concentrado sob pressão reduzida em rotaevaporador, e o extrato residual obtido foi transferido com o auxílio de uma pipeta Pasteur para frascos menores e levado à capela de exaustão para secagem completa.

O procedimento foi repetido sequencialmente com os três solventes para cada parte vegetal. Os extratos resultantes foram armazenados em freezer (-20 °C) para posterior análise. Neste trabalho, optou-se por investigar o extrato metanólico obtido de cada uma das partes (folhas, frutos, galhos finos e caule) de *D. vandellianum*. Na Figura 13 abaixo apresenta-se a representação do processo de obtenção dos extratos.

Figura 13. Esquema ilustrativo da preparação dos extratos brutos de *D. vandellianum*.



Fonte: Autoria Própria (2025), criado com BioRender

4.2 Análise do Perfil Químico de *Dictyoloma vandellianum* por HPLC-PDA

A análise cromatográfica dos extratos metanólicos das diferentes partes de *Dictyoloma vandellianum*, sendo as folhas, galhos, frutos, casca do fruto e caule, foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector por arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA). Os extratos foram previamente solubilizados em metanol grau HPLC (CH₃OH; Sigma-Aldrich®) na concentração de 20 mg/mL. As soluções foram então submetidas a um processo de filtração manual com seringa, utilizando filtros acopláveis descartáveis com membrana porosa (0,45 µm), com o objetivo de remover resíduos sólidos e reduzir o conteúdo de clorofila residual antes da injeção cromatográfica, processo conhecido como *clean up* da amostra.

As análises foram conduzidas em sistema SHIMADZU® Prominence, equipado com três unidades de bombeamento de solvente LC-20AR (bomba de recirculação), auto-injetor SIL-10AF de injeção automática de amostras, controlador de sistema CBM-20A, detector por arranjo de diodos SPD-M20A (UV-Vis) e desgaseificador DGU-20A. O sistema foi operado com o software LabSolutions™, versão 5.90. A separação cromatográfica foi realizada em coluna analítica Gemini C18 (Phenomenex®, 250 × 4,6 mm, 5 µm).

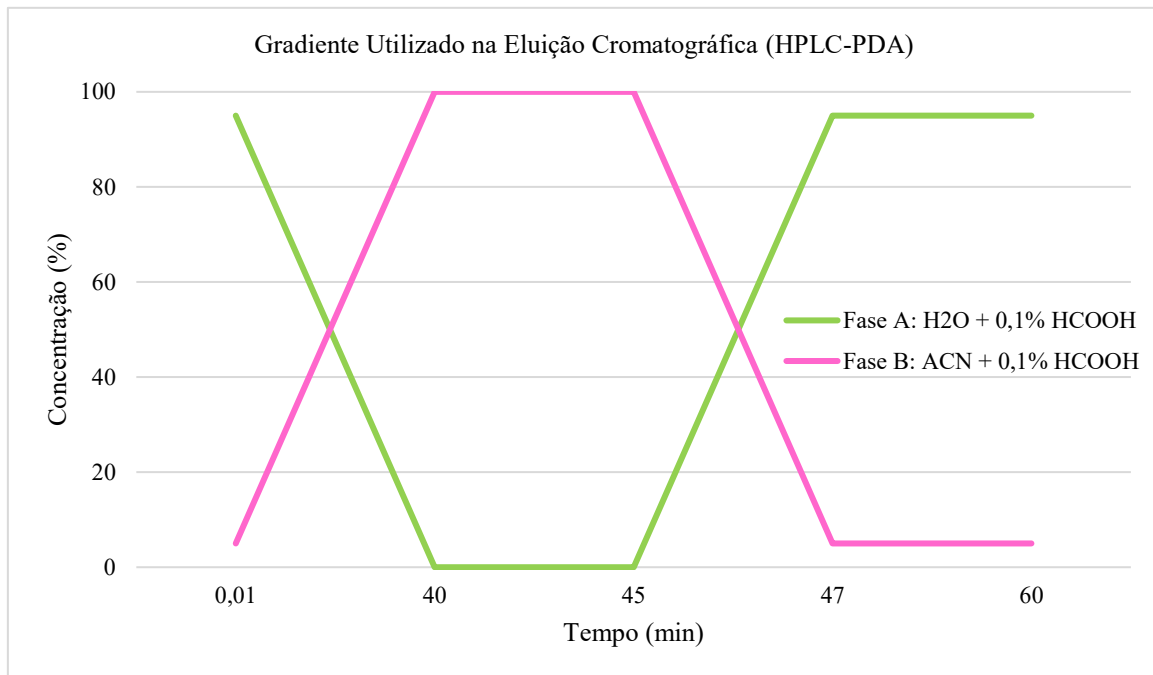
O volume de injeção adotado para as análises cromatográficas foi de 10 µL. O método exploratório foi conduzido em sistema de gradiente linear utilizando fase móvel binária composta por água ultrapura Milli-Q® acidificada com 0,1% de ácido fórmico como fase A e acetonitrila grau HPLC Sigma-Aldrich®, igualmente acidificada com 0,1% de ácido fórmico como fase B. O gradiente elucional padrão seguiu a programação descrita na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1. Programa de gradiente utilizado para a análise em HPLC-PDA.

Tempo (min)	Concentração A (%)	Concentração B (%)
0,01	95	5
40,00	0	100
45,00	0	100
47,00	95	5
60,00	95	5

Fonte: Autoria Própria (2025)

O perfil cromatográfico de cada extrato foi obtido a partir da leitura do espectro de absorção na faixa de 200 a 600 nm. Os cromatogramas gerados foram utilizados para fins de comparação qualitativa entre os diferentes extratos e posterior correlação com os dados de espectrometria de massas e rede molecular. Conforme observado na Tabela 1, acima, a separação cromatográfica foi conduzida sob um gradiente linear de eluentes durante 60 minutos, conforme observado na Figura 14, a seguir.

Figura 14. Gráfico de Eluição do Gradiente de Exploração de Metabólitos em HPLC-PDA

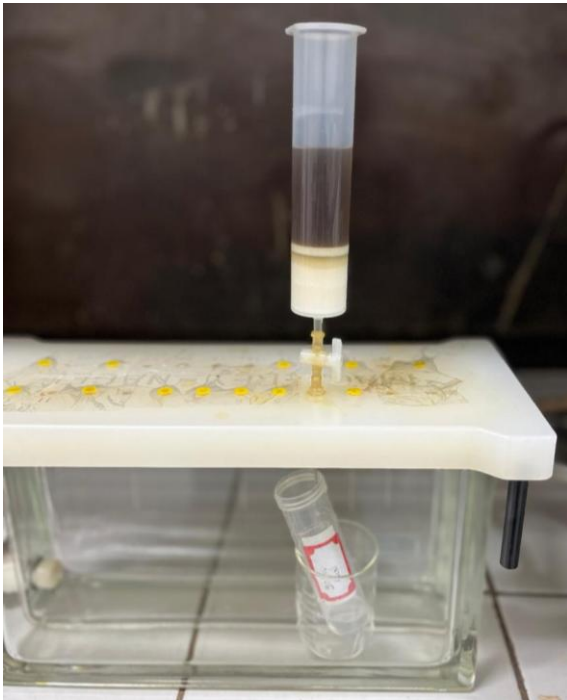
Fonte: Autoria Própria (2025)

Como ilustrado na Figura 14, o gradiente iniciou com 95% da fase A e 5% da fase B, promovendo uma mudança progressiva até atingir 100% da fase B aos 40 minutos, condição mantida até 45 minutos. Posteriormente, o sistema retornou à condição inicial (95% A e 5% B) aos 47 minutos, que foi mantida até o final da análise, aos 60 minutos. Esse perfil visou maximizar a separação de metabólitos com diferentes polaridades, permitindo uma varredura eficiente e abrangente dos compostos presentes nos extratos analisados.

4.2.1 Fracionamento por Extração em Fase Sólida (SPE)

Com base no perfil químico obtido por HPLC-PDA dos extratos metanólicos, foi realizado o fracionamento por Extração em Fase Sólida (SPE), com o objetivo de concentrar os compostos detectados em frações enriquecidas, favorecendo a posterior caracterização química. Aproximadamente 515 mg do extrato metanólico das folhas de *Dictyoloma vandellianum* foram utilizados para o fracionamento. O extrato foi previamente solubilizado em uma mistura de acetonitrila e água (ACN:H₂O), na mesma proporção da primeira fase de eluição. Em seguida, foi utilizado um cartucho de fase reversa C18 (SUPELCLEAN™ LC-18, Supelco®, 10g, 60mL, 45µm), previamente ativado com 100mL de acetonitrila grau HPLC, garantindo o condicionamento adequado da fase estacionária., conforme a Figura 15, abaixo.

Figura 15. Sistema de Extração em Fase Sólida (SPE)



Fonte: Autoria Própria (2024)

A eluição foi realizada utilizando volumes equivalentes a cinco vezes o volume morto do cartucho para cada condição de polaridade, conforme listado na Tabela 2, a seguir. Antes da adição da amostra, o cartucho foi condicionado na primeira fase móvel em acetonitrila e água (ACN:H₂O) e em seguida, a amostra de *D.vandellianum* solubilizada nessa mistura foi repassada para o cartucho.

Tabela 2. Porcentagem de solvente utilizado para o fracionamento das amostras

FRACIONAMENTO SPE		
FRAÇÃO	ACN (%)	H ₂ O
SPE_1	50%	50%
SPE_2	70%	30%
SPE_3	100%	-
LIMPEZA		ACN:CHCl ₃ 1:1 100% ACN

Fonte: Autoria Própria (2025)

Após a coleta das frações, o cartucho foi submetido a uma etapa de limpeza utilizando inicialmente 100mL de uma mistura ACN:CHCl₃ (1:1, v/v), seguida por 100mL de acetonitrila pura. Essa etapa teve como finalidade a remoção de compostos fortemente retidos e o preparo do cartucho para descarte ou reutilização. As frações eluídas foram transferidas para frascos de vidro tipo *vial* (20mL, transparentes), sendo posteriormente submetidas à secagem

em capela de exaustão com fluxo de ar forçado, para posterior cálculo do rendimento em massa, podendo ser observadas na Figura 16, abaixo.

Figura 16. Frações SPE



Fonte: Autoria Própria (2025)

As frações secas foram redissolvidas em acetonitrila grau HPLC e analisadas novamente por HPLC-PDA, com o objetivo de verificar a eficiência do fracionamento e observar a distribuição dos compostos originalmente presentes no extrato bruto.

4.2.2 Análise do Perfil Obtido do Fracionamento SPE

As frações obtidas por Extração em Fase Sólida (SPE) foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA), a fim de avaliar a eficiência da separação e a distribuição dos metabólitos originalmente presentes no extrato bruto. A redissolução das frações foi realizada em metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich®), mantendo-se a concentração proporcional ao teor seco previamente obtido para cada uma, de modo a garantir comparabilidade entre os cromatogramas.

As análises cromatográficas foram conduzidas utilizando o equipamento SHIMADZU® Prominence, previamente descrito no item 4.2, operando sob as mesmas condições padronizadas de gradiente exploratório utilizadas para o extrato bruto. O programa de eluição foi estabelecido em um gradiente linear de 60 minutos, iniciando com 5% da Fase B (ACN + 0,1% HCOOH) e 95% da Fase A (H₂O Milli-Q® + 0,1% HCOOH), com aumento

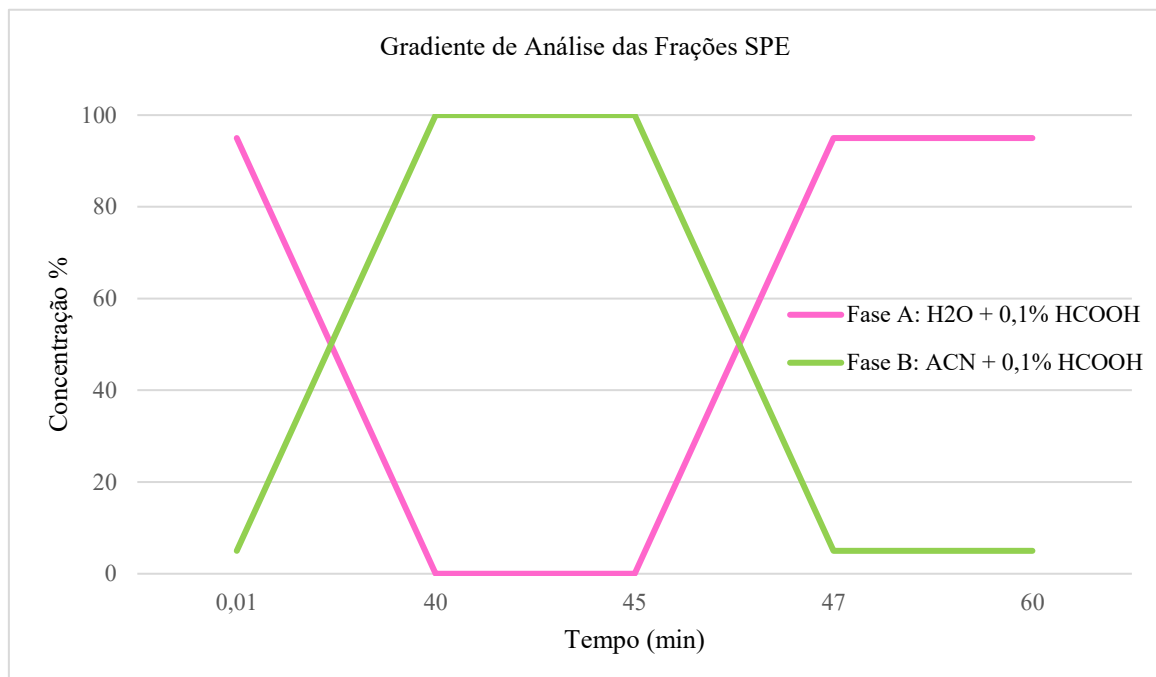
gradual da Fase B até atingir 100% ao final de 40 minutos, mantendo-se nesta condição até 45 minutos. Posteriormente, foi realizado o retorno à condição inicial (5% B) com estabilização até os 60 minutos, conforme detalhado na Tabela 3 e representado no gráfico de eluição na Figura 15, a seguir.

Tabela 3. Programa de gradiente utilizado para a análise das frações SPE em HPLC-PDA.

Tempo (min)	Concentração a (%)	Concentração b (%)
0,01	95	5
40,00	0	100
45,00	0	100
47,00	95	5
60,00	95	5

Fonte: Autoria Própria (2025)

Figura 17. Gráfico de eluição da análise das frações obtidas por SPE



Fonte: Autoria Própria (2025)

Os cromatogramas gerados para cada fração foram registrados e armazenados em banco de dados interno, com o objetivo de documentar o perfil de eluição obtido para cada condição de polaridade aplicada no fracionamento. Os dados cromatográficos foram utilizados posteriormente como base comparativa para a seleção de amostras a serem submetidas à análise por LC-MS/MS e RMN, conforme descrito nos itens subsequentes desta metodologia.

4.3 Análise por UHPLC-QTOF-MS/MS

As análises por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-QTOF-MS/MS) foram aplicadas tanto aos extratos brutos metanólicos das folhas de *Dictyoloma vandellianum* no modo full scan, quanto às frações obtidas por SPE. As amostras foram previamente preparadas por diluição em metanol grau LC-MS (Sigma-Aldrich®), nas concentrações finais de 100ppm e 50ppm, conforme a necessidade de sensibilidade e resposta espectral. As soluções foram acondicionadas em frascos tipo vial de vidro incolor e armazenadas em geladeira até o momento da análise.

As análises foram realizadas em sistema UHPLC- Agilent 1290 Infinity II acoplado ao espectrômetro de massas Agilent G6545B Q-TOF (Agilent Technologies Inc.), equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI). O sistema foi operado com coluna Agilent® Zorbax SB-C18 (50 × 3,0 mm; partícula de 1.8 µm), mantida a temperatura constante de 35 °C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (Milli-Q®) contendo 0,1% de ácido fórmico (linha A) e acetonitrila grau LC-MS contendo 0,1% de ácido fórmico (linha B). O volume de injeção utilizado foi de 1µL, com fluxo constante de 0,3mL/min.

O gradiente exploratório adotado para separação cromatográfica foi iniciado com 10% de fase A e 90% de fase B, mantido até 12 minutos, em seguida a concentração foi aumentada para 100% de fase B entre 12 e 15 minutos, com manutenção até 17 minutos e retorno para 5% de fase B e 95% de fase A entre 17 e 19 minutos, permanecendo nesta condição até os 22 minutos para condicionamento da coluna. A pressão operacional foi mantida constante em aproximadamente 1300 bar ao longo de toda a análise.

A aquisição dos dados de espectrometria de massas foi realizada nos modos de ionização positiva e negativa, utilizando o modo automático de fragmentação (Auto MS/MS). Os espectros foram obtidos no intervalo de m/z 120–1500, com taxa de aquisição de cinco espectros por segundo. Os parâmetros da fonte de ionização ESI incluíram: pressão do gás nebulizador de 35psi, fluxo do gás de secagem de 10L/min, temperatura do gás de secagem de 300 °C, fluxo do sheath gas de 11 L/min e temperatura do sheath gas de 320 °C. As voltagens operacionais foram: capilar a 3000V, fragmentor a 110V e skimmer a 65V.

Todos os dados obtidos foram processados e armazenados por meio do software MassHunter Workstation, versão B.09.00 (Agilent Technologies©), utilizado para aquisição,

visualização e exportação dos espectros e cromatogramas para posterior tratamento estatístico e interpretação.

4.4 Processamento de Dados UHPLC-QTOF-MS/MS para Obtenção de Rede Molecular

Os dados gerados a partir das análises por UHPLC-QTOF-MS/MS foram submetidos a um fluxo de processamento computacional com o objetivo de gerar redes moleculares baseadas em similaridade espectral. As amostras analisadas nos modos de ionização positiva e negativa produziram arquivos em formato bruto (.d), adquiridos por meio do software MassHunter Workstation, versão B.09.00 (Agilent Technologies©). Para permitir o alinhamento e a extração de características espectrais em ambiente apropriado, esses arquivos foram inicialmente convertidos para o formato aberto .mzML utilizando o software MSConvert, parte do pacote ProteoWizard (Chambers *et al.*, 2012).

Os arquivos .mzML foram então importados para a plataforma MS-DIAL (Tsugawa *et al.*, 2020), onde passaram por etapas de pré-processamento, que incluíram extração de picos (peak picking), deconvolução, alinhamento e normalização. A partir dessas operações, foi gerada uma matriz única de dados representando os features detectados com suas respectivas intensidades, tempos de retenção, massas e espectros MS/MS associados. Essa matriz foi exportada nos formatos .msp e .mgf, utilizados nas etapas subsequentes de anotação e organização da rede.

Os arquivos .msp foram submetidos ao software MS-FINDER (Tsugawa *et al.*, 2016) para anotação dos metabólitos, com base na similaridade espectral em relação a bancos de dados públicos de metabólitos secundários. As bibliotecas utilizadas incluíram FooDB, PlantCyc, ChEBI, LipidMAPS, DrugBank, KNApSACk, NANPDB, NPA, COCONUT, PubChem, UNPD e METLIN. A ferramenta agrupou os espectros de fragmentação por similaridade, possibilitando a atribuição putativa de estruturas moleculares com base nos fragmentos e pesos moleculares. Esses procedimentos podem ser melhores observados na Figura a seguir, que mostra o fluxograma do tratamento até a obtenção da rede molecular.

Figura 18. Fluxograma das etapas de processamento dos dados e visualização da rede molecular



Fonte: Yoshioka (2021), adaptado

Os dados estruturados foram então organizados em arquivos .mgf e .cys e submetidos à plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) (Wang *et al.*, 2016), no módulo Feature-Based Molecular Networking (FBMN). Os parâmetros adotados no fluxo FBMN incluíram: tolerância de massa para íons precursores de $\Delta 0,02$ Da, tolerância para fragmentos de $\Delta 0,06$ Da, mínimo de quatro fragmentos compartilhados por nó e índice de similaridade (cosseno) $\geq 0,7$, com dois como valor mínimo de membros por cluster. A rede gerada foi exportada e visualizada na plataforma Cytoscape, versão 3.8.2 (Shannon *et al.*, 2003), onde foram aplicadas rotinas de organização e filtragem de nós para melhor interpretação da conectividade molecular.

4.5 Isolamento de Compostos das Folhas de *Dictyoloma vandellianum*

O isolamento dos compostos presentes nas folhas de *Dictyoloma vandellianum* foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência em modo preparativo (prep-HPLC), utilizando sistema previamente descrito, acoplado a detector por arranjo de fotodiodos (PDA). O método cromatográfico empregado foi desenvolvido com base no perfil obtido nas análises exploratórias das frações SPE, sendo ajustado para condições isocráticas com proporção fixa

entre as fases móveis, a fim de favorecer a eluição dos compostos nas janelas de retenção previamente determinadas. A fração escolhida para o processo de isolamento foi determinada com base na análise do perfil obtido nos experimentos em UPLC-QTOF-MS/MS.

As separações foram conduzidas utilizando coluna semi-preparativa do tipo fase reversa, Phenomenex Gemini C18 (250 × 10 mm, 5 µm), operada sob fluxo compatível com as dimensões e capacidade de carga da coluna. A fase móvel foi composta por um sistema binário constituído por água ultrapura Milli-Q® contendo 0,1% de ácido fórmico (linha A) e acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich®) contendo 0,1% de ácido fórmico (linha B). O método foi conduzido em modo isocrático, com proporção constante de 50:50 (v/v) entre as fases A e B, e tempo total de corrida de 30 minutos por injeção.

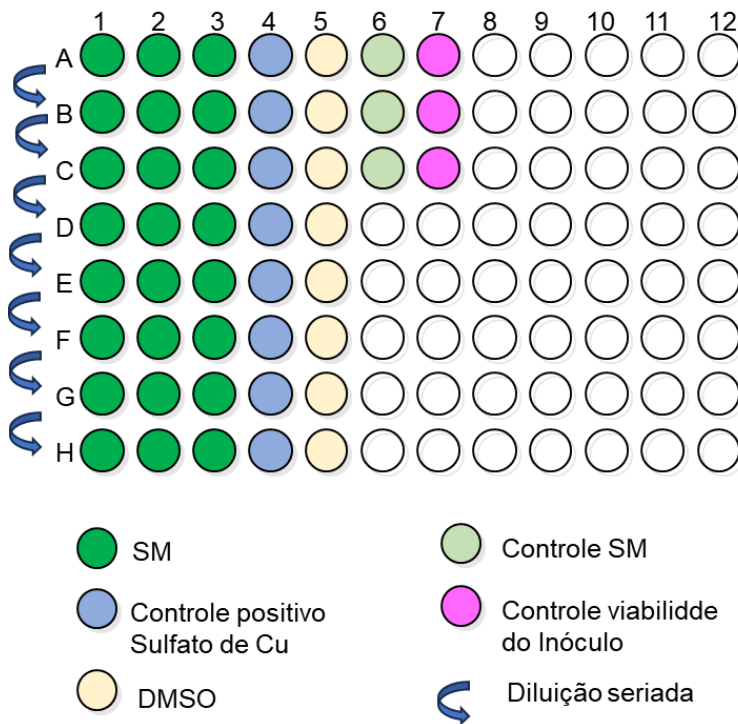
A coleta dos compostos observados nas regiões de interesse foi realizada de forma automatizada, por meio de programação de tempo de retenção associada às respostas espectrais nos comprimentos de onda de 254 e 320 nm, conforme os parâmetros inseridos no software de controle do sistema cromatográfico. Os compostos isolados foram transferidos para frascos apropriados, concentradas por evaporação do solvente sob fluxo de ar em capela de exaustão, e redissolvidas posteriormente na etapa de análise por espectroscopia de RMN.

Na etapa de análise e caracterização, todas as amostras coletadas foram redissolvidas em metanol deuterado (MeOD) e analisadas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , utilizando equipamento Bruker® DRX de 9,4 T (operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C). Além dos experimentos unidimensionais, também foram conduzidas análises bidimensionais do tipo HSQC, COSY e HMBC, com o objetivo de auxiliar na elucidação estrutural dos compostos. Os espectros obtidos foram processados e interpretados no software MestReNova® (MNova©), versão 12.0.0, desenvolvido por Mestrelab Research S.L. (Willcott, 2009).

4.6 Ensaio Biológico com *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *Dictyoloma vandellianum* (folhas, galhos finos, caule e frutos) frente à bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri* foi conduzida por meio do método de microdiluição em microplaca, segundo protocolo adaptado do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (NCCLS, 2003), conforme observado na Figura 19, a seguir.

Figura 19. Representação do método de microdiluição em microplaca



Fonte: Silva (2017), adaptado.

A cepa utilizada foi mantida em meio de cultura NBY (*Nutrient Broth Yeast*), composto por caldo nutriente ($8,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), K_2HPO_4 ($2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), glicose ($5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), conforme recomendação de Schaad *et al.* (2001) para o crescimento de xantomonas fitopatogênicas. O inóculo foi preparado a partir de culturas com 72 horas de crescimento, suspensas em solução salina estéril a 0,9% e padronizadas para uma concentração final de $10^5 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$.

As amostras foram inicialmente solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente diluídas com o meio NBY estéril, utilizando dois protocolos de diluição seriada: de $2000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $15,62 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e de $400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $3,125 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As soluções foram distribuídas em microplacas estéreis de 96 poços, com adição de $100 \text{ }\mu\text{L}$ de caldo NBY e $20 \text{ }\mu\text{L}$ do inóculo bacteriano padronizado. Foram incluídos os seguintes controles: positivo (sulfato de cobre pentahidratado), negativo (DMSO a 5% v/v), controle de viabilidade contendo apenas inóculo e de esterilidade contendo apenas meio de cultura.

As microplacas foram seladas com plástico filme e incubadas em Câmara Incubadora BOD a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 horas. Após esse período, foi adicionada a cada poço uma alíquota de $30 \text{ }\mu\text{L}$ de solução aquosa de resazurina a 0,02% (m/v), preparada conforme

Palomino *et al.* (2002). A resazurina é um indicador redox que, na presença de células bacterianas viáveis, sofre redução a resofurina, promovendo alteração de coloração de azul indicando ausência de crescimento, para rosa intenso indicando crescimento bacteriano. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração da amostra na qual não foi observada alteração da coloração (azul mantido), indicando total inibição do crescimento microbiano.

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), foram utilizadas placas paralelas aos testes de CIM que não receberam adição do revelador. Com o auxílio de uma pipeta multicanal, 5 μ L dos conteúdos dos poços que apresentaram inibição foram transferidos para placas de Petri (140 \times 15 mm) contendo meio NBY solidificado com ágar. As placas foram incubadas a 28 °C por 72 horas em Câmara BOD. A CBM foi definida como a menor concentração capaz de eliminar $\geq 99,9\%$ das bactérias, indicada pela ausência total de crescimento de colônias visíveis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

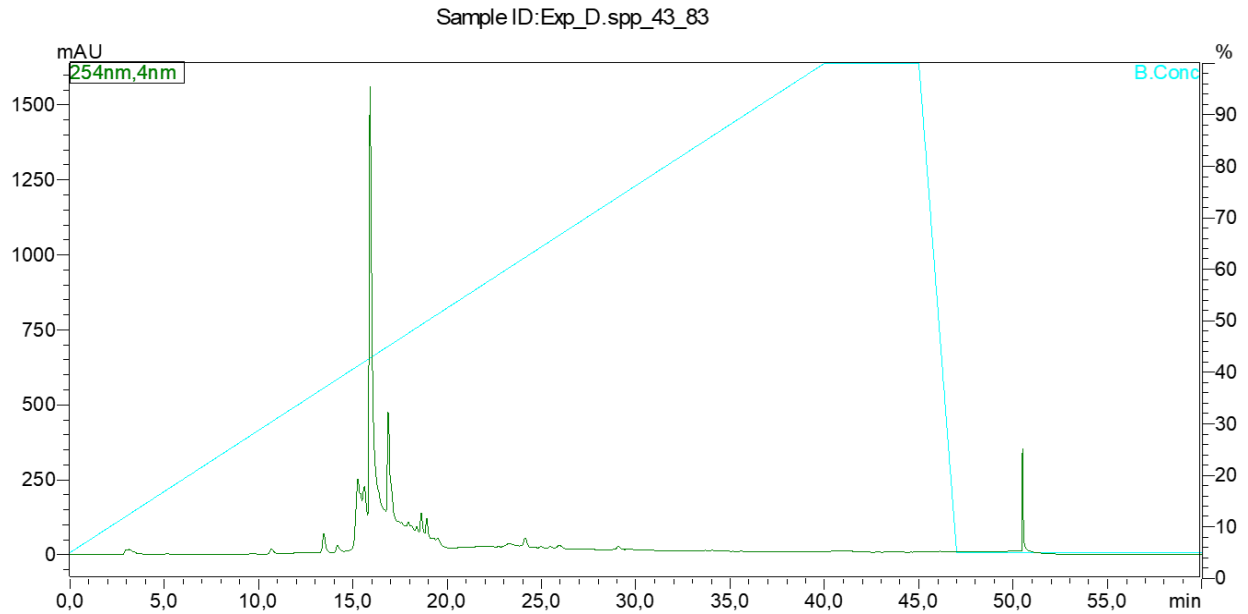
5.1 Análise do Perfil Químico de *Dictyoloma vandellianum* por HPLC-PDA dos extratos Brutos

A análise por HPLC-PDA dos extratos brutos de *Dictyoloma vandellianum* permitiu a observação de perfis químicos distintos para cada órgão vegetal avaliado: galhos finos (Exp_D.spp_43_83), frutos (Exp_D.spp_43_83_cascas), caule (Exp_D.spp_63_84) e folhas (Exp_Di_20_82). Cada cromatograma obtido revelou variações qualitativas e quantitativas nos metabólitos presentes, refletindo a diversidade fitoquímica característica da espécie, bem como indicando possíveis estratégias de direcionamento para isolamento de compostos bioativos.

O sistema cromatográfico utilizado foi o Shimadzu® Prominence, com detecção por arranjo de diodos (PDA), equipado com coluna Phenomenex® Gemini C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), volume de injeção de 10 µL e sistema de gradiente linear de acetonitrila (ACN) com 0,1% de ácido fórmico, partindo de 5% até 100% de ACN em fase reversa. Os cromatogramas foram exportados utilizando o software LabSolutions™, versão 5.90, conforme descrito na Seção 4.2 da Metodologia.

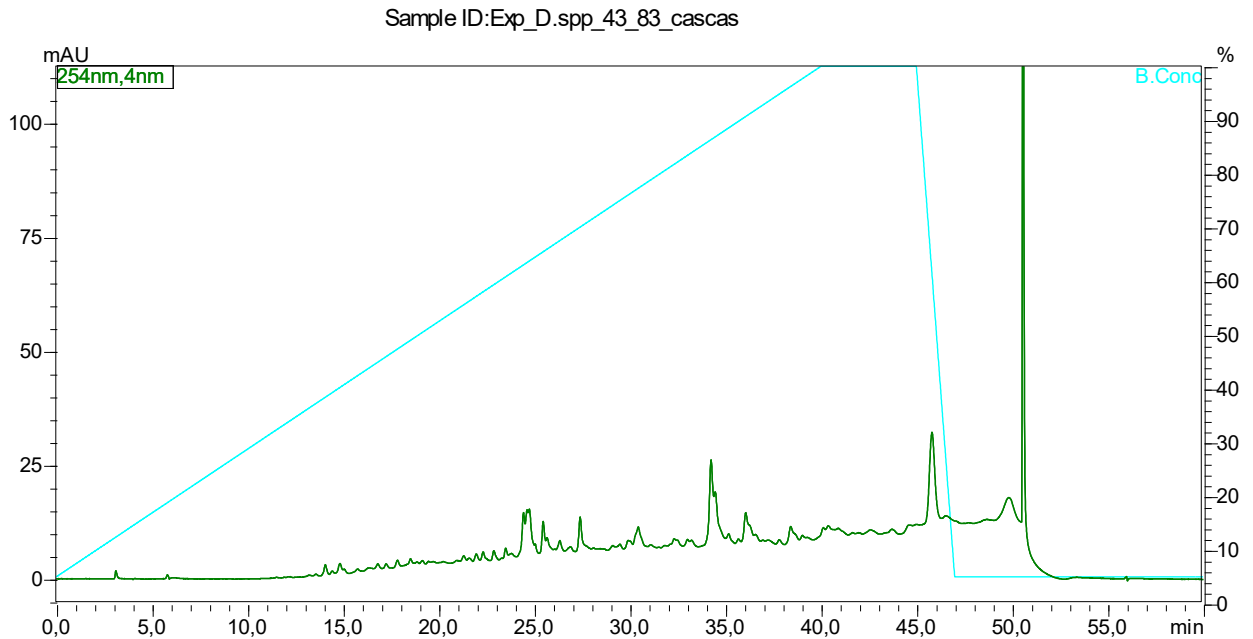
O cromatograma do extrato dos galhos finos de *Dictyoloma vandellianum* (Sample ID: Exp_D.spp_43_83), obtido por HPLC-PDA, Figura 20 a seguir, revelou um perfil concentrado entre 12 e 20 minutos, com o pico de maior intensidade em aproximadamente 15 minutos. Esta faixa de eluição, localizada na fase inicial do gradiente de acetonitrila, sugere predominância de compostos de polaridade moderada a alta, como cumarinas oxigenadas, alcaloides ou lactonas com grupos hidroxila. A ausência de picos relevantes após os 25 minutos reforça a escassez de metabólitos apolares nesta amostra, o que se mostra atípico para um tecido lenhoso, e pode indicar o predomínio de substâncias de defesa em galhos mais jovens ou com funções secundárias. A presença de múltiplos sinais agudos e próximos em uma região concentrada sugere boa separação de compostos potencialmente bioativos (Cafeo *et al.*, 2024; Dugan *et al.*, 2024).

Figura 20. Cromatograma do extrato bruto dos galhos finos de *D. vandellianum* (HPLC-PDA, 254 nm). A eluição majoritária dos picos ocorre entre 12 e 20 minutos, indicando predominância de metabólitos de polaridade moderada, como lactonas oxigenadas, cumarinas e possíveis alcaloides com absorção em 254 nm.



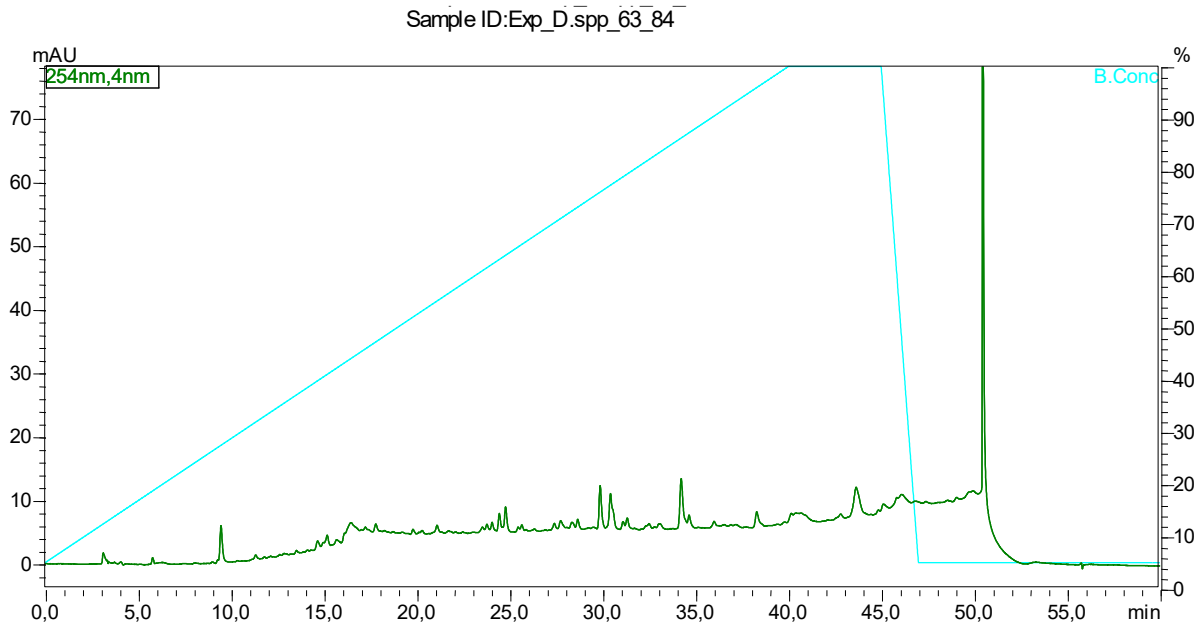
O cromatograma do extrato dos frutos de *Dictyoloma vandellianum* (Sample ID: Exp_D.spp_43_83_cascas) observado na Figura 21 a seguir, evidenciou um perfil com eluição majoritária entre 25 e 35 minutos, com múltiplos picos de intensidade moderada, e um pico isolado e mais intenso em aproximadamente 45 minutos. Esse comportamento revela a presença de metabólitos de baixa polaridade, característicos de frutos com função protetiva e atrativa, como cumarinas preniladas, terpenoides oxigenados e compostos lipofílicos de alto peso molecular. A diversidade de picos nesta faixa reforça a complexidade fitoquímica do extrato, sugerindo seu potencial bioativo. O pico isolado no final do gradiente (45 min) indica um composto extremamente apolar, passível de isolamento direcionado, possivelmente relacionado a triterpenos, esteróis ou ésteres longos com potencial farmacológico (Vilkickyte; Raudone 2021; Cafeo *et al.*, 2024).

Figura 21. Cromatograma do extrato bruto dos frutos de *Dictyoloma vandellianum* obtido por HPLC-PDA. Apresenta picos em região intermediária da eluição (25–35 min), indicando predominância de metabólitos de baixa polaridade, como triterpenos, cumarinas preniladas e outros compostos lipofílicos.



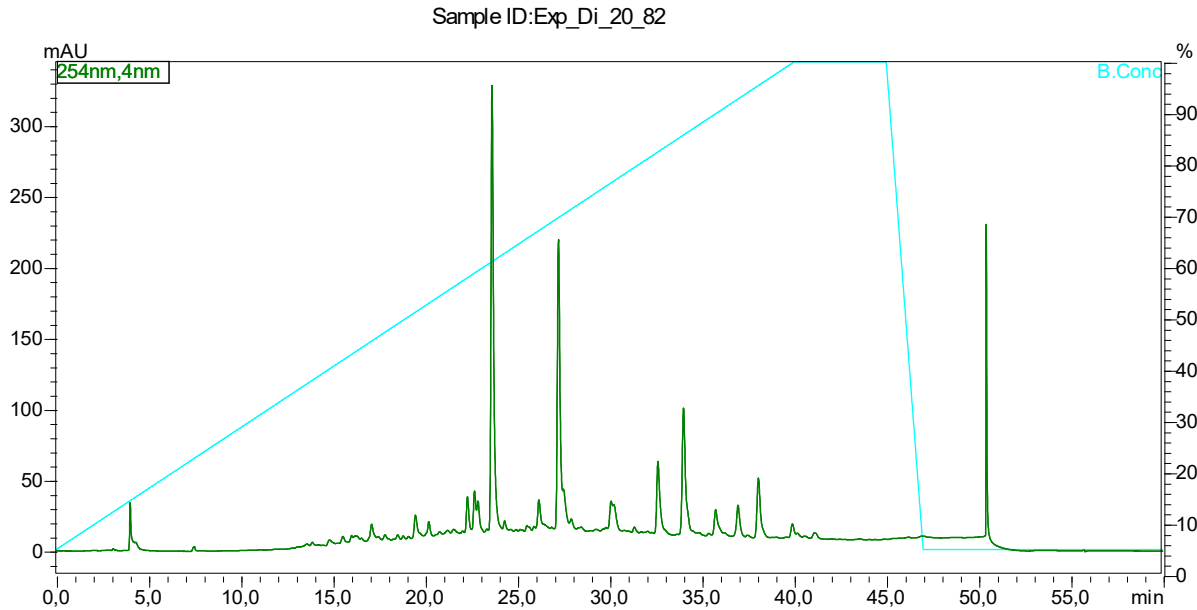
O cromatograma do extrato do caule de *Dictyoloma vandellianum* (Figura 22, a seguir), apresentou picos de baixa intensidade distribuídos entre 5 e 40 minutos, sem sinais predominantes ou compostos majoritários. Esse comportamento indica uma matriz com baixo conteúdo de metabólitos secundários cromofóricos, como alcaloides, cumarinas ou flavonoides conjugados, reforçando o papel estrutural e menos biossintético do tecido caulinar. Os sinais observados sugerem a presença de constituintes de baixa polaridade, porém em concentração diluída, ou de compostos pouco absorventes a 254 nm, como ácidos fenólicos simples, ligninas modificadas ou metabólitos estruturais com baixa conjugação eletrônica. A ausência de eluição expressiva em regiões intermediárias ou finais reforça a hipótese de perfil fitoquímico menos expressivo nesse órgão vegetal (Vrancheva *et al.*, 2021).

Figura 22. Cromatograma do extrato bruto do caule de *Dictyoloma vandellianum*. Apresenta picos discretos e distribuídos entre 5 e 40 minutos, sem sinais predominantes, indicando baixo teor de compostos cromofóricos e perfil fitoquímico menos complexo.



O cromatograma do extrato das folhas de *Dictyoloma vandellianum*, visto na Figura 23 a seguir, revelou o perfil mais complexo entre todas as partes vegetais analisadas, com eluição significativa a partir dos 18 minutos e picos de maior intensidade concentrados entre 24 e 34 minutos. Esse comportamento é compatível com a presença de metabólitos de baixa polaridade, tais como flavonoides prenilados, cumarinas oxigenadas, lignanas apolares, triterpenos oxidados e, potencialmente, alcaloides oxigenados do tipo hidroquinolínico, cuja ocorrência já foi reportada em espécies da família *Rutaceae* e que apresentam boa absorção em 254 nm. A elevada densidade e resolução dos picos reforçam o caráter fitoquimicamente ativo da matriz foliar, apontando para um conjunto diversificado de compostos cromofóricos com potencial bioativo (Sartor *et al.*, 2003; Vilckickyte; Raudone, 2021)

Figura 23. Cromatograma do extrato bruto das folhas de *D. vandellianum* obtido por HPLC-PDA. Apresenta picos bem definidos em toda a extensão do gradiente, com ênfase entre 20 e 35 minutos, refletindo a riqueza fitoquímica da matriz foliar com compostos de baixa a média polaridade



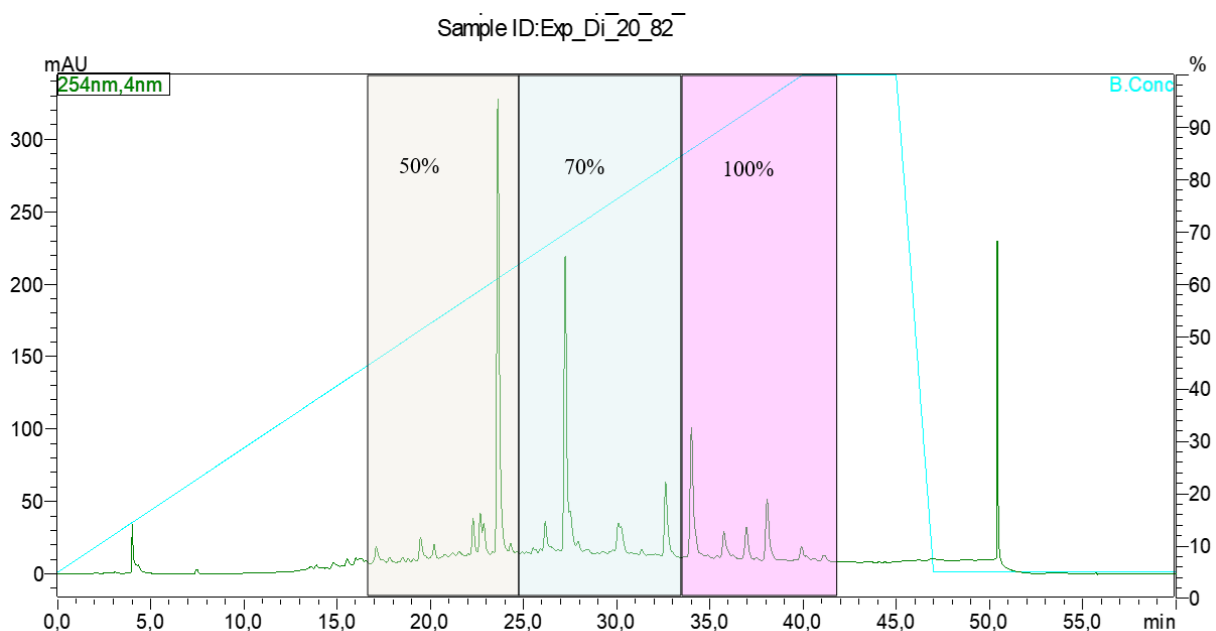
Embora os cromatogramas obtidos para os demais extratos (galhos finos, frutos e caule) tenham apresentado perfis químicos interessantes e com picos detectáveis em diferentes faixas do gradiente, o extrato das folhas (Exp_Di_20_82) destacou-se por sua complexidade, definição de sinais e intensidade de resposta. A eluição bem distribuída entre 18 e 39 minutos, com maior concentração de picos entre 24 e 34 minutos, indicou a presença de metabólitos com características estruturais compatíveis com compostos de interesse em produtos naturais, como alcaloides quinolinônicos oxigenados, flavonoides prenilados e triterpenos oxidados. Diante desse perfil mais promissor, foi escolhido o extrato das folhas para a etapa de fracionamento e posterior isolamento, sendo submetido ao processo de purificação por extração em fase sólida (SPE). Essa escolha visou aumentar a seletividade e o rendimento das frações, reduzindo interferentes e otimizando a recuperação de metabólitos minoritários para as análises subsequentes.

5.1.1 Rendimento e Análise do Perfil Obtido do Fracionamento SPE

O extrato metanólico das folhas de *Dictyoloma vandellianum* foi submetido à extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos C18 e sistema de eluição gradiente com acetonitrila (ACN) em solução acidificada. Foram utilizadas três etapas sequenciais de eluição: 50% ACN (SPE_1), 70% ACN (SPE_2) e 100% ACN (SPE_3), além de uma fração de limpeza,

a qual não foi considerada para as análises posteriores. As etapas de eluição foram definidas a partir do cromatograma do extrato bruto de folhas conforme observado na Figura 24, abaixo.

Figura 24. Cromatograma com destaque para as regiões correspondentes às frações SPE. As áreas sombreadas indicam os intervalos de tempo de retenção associados às eluições com 50% ACN, 70% ACN e 100% ACN, respectivamente.



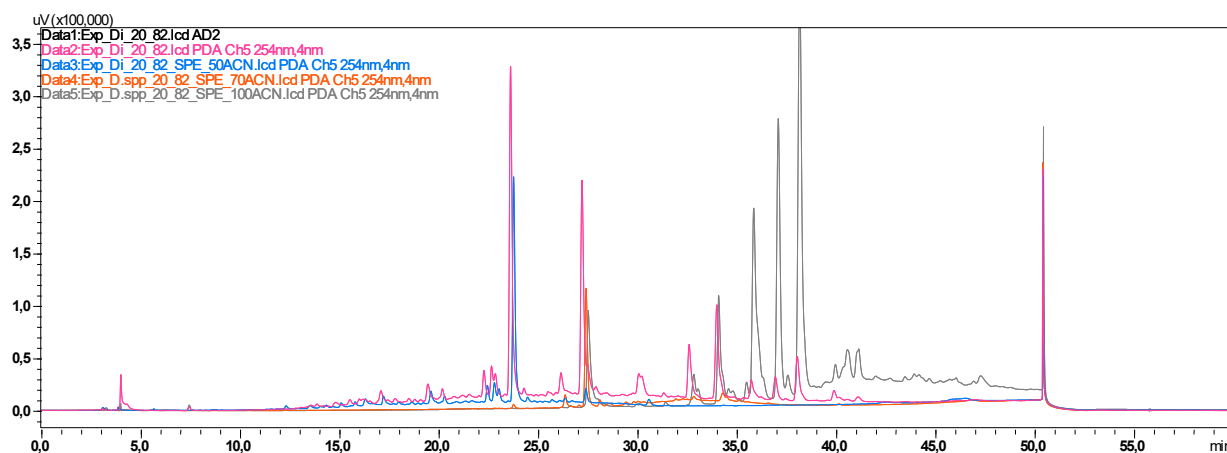
A massa inicial aplicada no SPE foi de 515,1 mg. A fração SPE_1 resultou em 144,2 mg, a SPE_2 em 98,2 mg e a SPE_3 em 97,2 mg. A fração de limpeza apresentou 107 mg. Com isso, o rendimento total obtido nas frações analisadas foi de 446,6 mg, o que representa uma recuperação de 86,7% em relação à amostra original. A perda de 68,5 mg (13,3%) pode ser atribuída à retenção em cartucho, à manipulação experimental ou à presença de compostos altamente polares ou insolúveis nas condições adotadas.

A escolha da técnica de SPE visou o pré-fracionamento direcionado do extrato bruto, a fim de reduzir sua complexidade química e permitir maior seletividade nas etapas de isolamento. O fracionamento baseado na polaridade dos compostos facilitou a organização das classes de metabólitos em subgrupos com maior homogeneidade química, otimizando tanto o rendimento das análises por UHPLC-QTOF-MS/MS quanto o sucesso nas abordagens de isolamento cromatográfico.

A avaliação dos cromatogramas obtidos por HPLC-PDA ($\lambda = 254 \text{ nm}$) mostrou redistribuição significativa dos compostos inicialmente presentes no extrato bruto (Exp_Di_20_82). A fração SPE_1 (50% ACN) concentrou substâncias de maior polaridade, evidenciadas por múltiplos sinais majoritários entre 15 e 25 minutos de tempo de retenção,

compatíveis com alcaloides oxigenados, flavonoides glicosilados e ácidos fenólicos. Já a fração SPE_2 (70% ACN) exibiu picos definidos entre 25 e 35 minutos, sugerindo a presença de metabólitos com polaridade intermediária, como alcaloides quinolínicos e cumarinas substituídas. A fração SPE_3 (100% ACN), por sua vez, apresentou compostos menos polares, com sinais de maior intensidade entre 35 e 40 minutos, perfil condizente com triterpenos, furanocumarinas ou alcaloides apolares não oxigenados. Conforme pode ser observado no cromatograma comparativo da Figura 25, abaixo.

Figura 25. Comparação dos perfis cromatográficos do extrato bruto e frações obtidas por SPE de folhas de *Dictyoloma vandellianum*



Legenda: Cromatogramas HPLC-PDA (254 nm) do extrato metanólico bruto de folhas (Exp_Di_20_82) e das frações obtidas por extração em fase sólida (SPE) com solventes de polaridades crescentes. O traçado rosa representa o extrato bruto (Exp_Di_20_82), azul a fração 50%, laranja a fração, 70% ACN e cinza a fração 100% ACN. Observa-se a redistribuição seletiva dos compostos ao longo do tempo de retenção, refletindo a separação por polaridade promovida pela SPE.

A sobreposição dos cromatogramas das frações SPE com o cromatograma do extrato bruto revela boa correspondência entre os picos e comprova a eficiência do fracionamento na redistribuição química das classes compostas. O padrão obtido também reforça a estabilidade do sistema cromatográfico e a reprodutibilidade da separação por SPE. A etapa foi essencial para a seleção racional das frações submetidas à análise por UHPLC-QTOF-MS/MS e posterior elucidção estrutural por RMN.

Além disso, a fração SPE_3 (100% ACN), apesar de ter apresentado menor rendimento gravimétrico, revelou picos intensos e definidos, reforçando a eficácia da separação por afinidade com a fase reversa. Esses resultados justificam a aplicação da SPE como etapa preparativa robusta para estudos metabolômicos e isolamento fitoquímico de compostos bioativos com potencial bactericida.

5.2 Resultados da Análise dos Dados Obtidos em UHPLC-QTOF-MS/MS

5.2.1 Processamento de dados

O processamento dos dados obtidos por UHPLC-QTOF-MS/MS foi fundamental para a construção das redes moleculares baseadas em características (FBMN – Feature-Based Molecular Networking), permitindo a visualização de compostos majoritários, agrupamentos químicos e possíveis classes estruturais nos extratos de *Dictyoloma vandellianum*. Inicialmente, os dados brutos adquiridos foram convertidos para o formato .mzML por meio do software MSConvert (ProteoWizard), assegurando compatibilidade com as plataformas de análise subsequentes. O arquivo correspondente ao branco foi utilizado como referência de alinhamento e subtração de fundo, permitindo eliminar interferentes exógenos, como ruído instrumental e contaminantes.

Em seguida, os arquivos .mzML foram processados no software MS-DIAL, onde foi realizado o deconvolução espectral com um valor sigma de 0,5, detectando picos com intensidade entre 1000 e 3000. Foram considerados até 30 espectros MS/MS por feature. Durante o alinhamento entre amostras, utilizou-se o próprio branco como arquivo de referência, com tolerância de tempo de retenção de 0,05 minutos e tolerância de massa de 0,02 Da, assegurando elevada precisão na comparação entre compostos presentes nas diferentes frações.

A etapa de identificação no MS-DIAL envolveu critérios restritivos: similaridade espectral mínima de 80%, valor de p-score de 0,01, FDR de 0,05 e pelo menos 100 fragmentos por espectro, aumentando a confiabilidade da anotação prévia das substâncias com base nos bancos de dados utilizados. Foram considerados adutos em ambos os modos (positivo e negativo), o que ampliou a abrangência na detecção de diferentes classes químicas.

Em uma etapa inicial do processamento, foi aplicado um filtro específico para eliminar interferentes presentes na amostra do branco, bem como para selecionar exclusivamente os espectros de MS/MS adquiridos. Durante o alinhamento dos dados, o *software* MS-DIAL realiza a comparação de milhares de espectros gerados por segundo ao longo da análise cromatográfica, agrupando aqueles que pertencem a uma mesma substância com base em sua similaridade espectral e proximidade no tempo de retenção. Esse procedimento é essencial para reduzir a complexidade dos dados e garantir a exclusão de ruídos, artefatos e compostos oriundos de contaminações de sistema ou reagentes. A aplicação do marcador “MS2 acquired” assegura que apenas os picos que possuem espectros de

fragmentação válidos sejam mantidos para as etapas subsequentes de anotação estrutural. As Figuras 26 e 27, abaixo, ilustram comparativamente o perfil químico obtido antes e após o processamento, evidenciando a eficácia da filtragem por branco e da seleção por MS/MS.

Figura 26. Demonstração do perfil cromatográfico e espectral antes da filtragem do branco e seleção de espectros MS/MS adquiridos

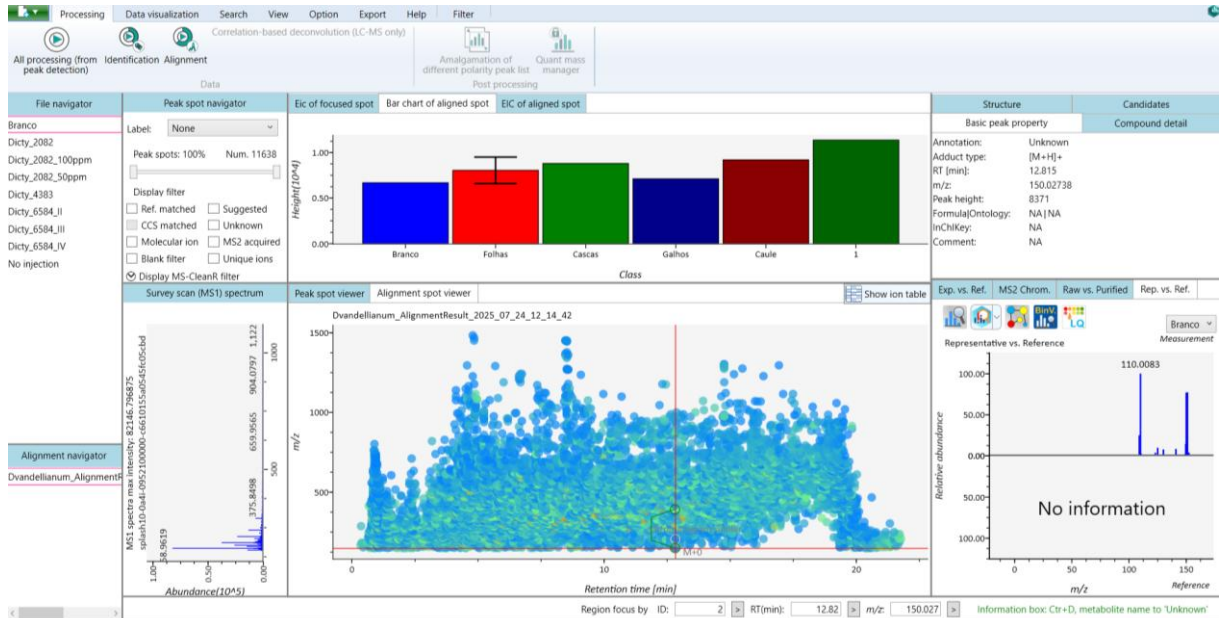


Figura 27. Efeito da Filtragem de Interferentes e MS2 Acquired no Perfil Químico dos Extratos



Após essa triagem, os dados foram exportados em formato compatível para o software MS-FINDER, onde foram geradas as predições estruturais baseadas nos espectros MS/MS. Foram sugeridas fórmulas moleculares, ontologias químicas e estruturas candidatas com base nos escores de fragmentação simulada (*in silico*), utilizando bancos como FooDB,

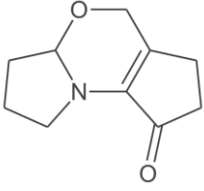
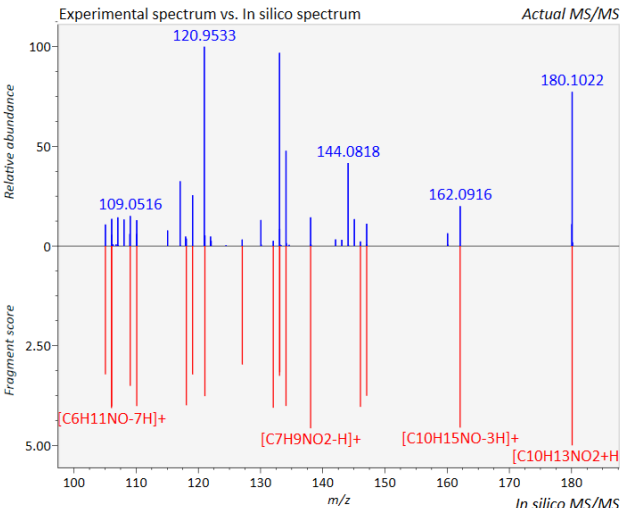
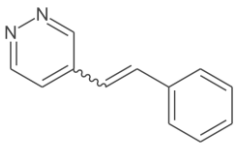
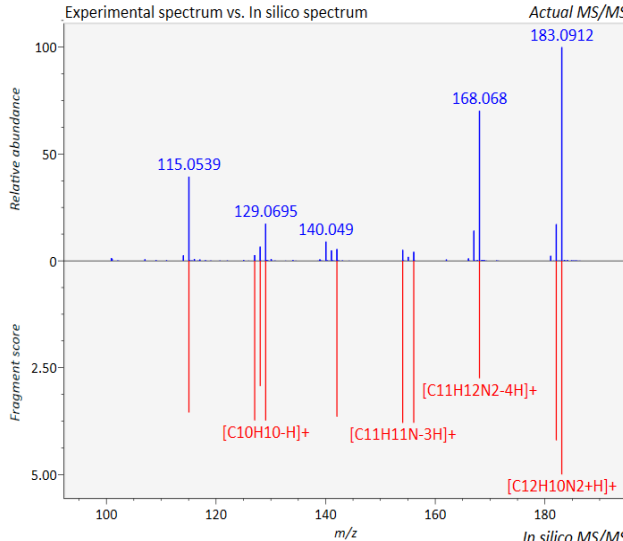
PlantCyc, ChEBI, LipidMAPS, DrugBank, KNApSACk, NANPDB, NPA, COCONUT, PubChem, UNPD e METLIN. Compostos com score acima de 5 e espectros com alta coerência entre fragmentos experimentais e simulados foram priorizados. Além disso, a plausibilidade biossintética foi considerada, especialmente quanto à viabilidade da produção desses metabólitos em espécies da família *Rutaceae*, como proposto por estudos recentes da área.

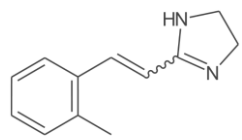
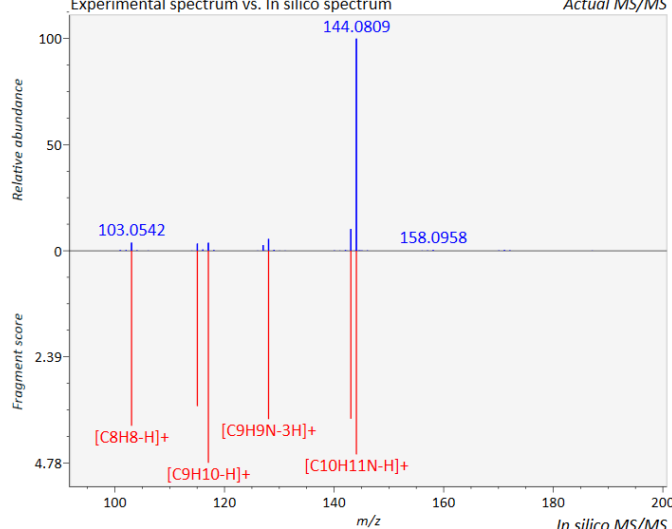
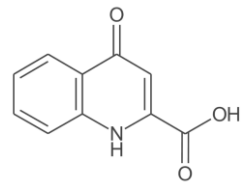
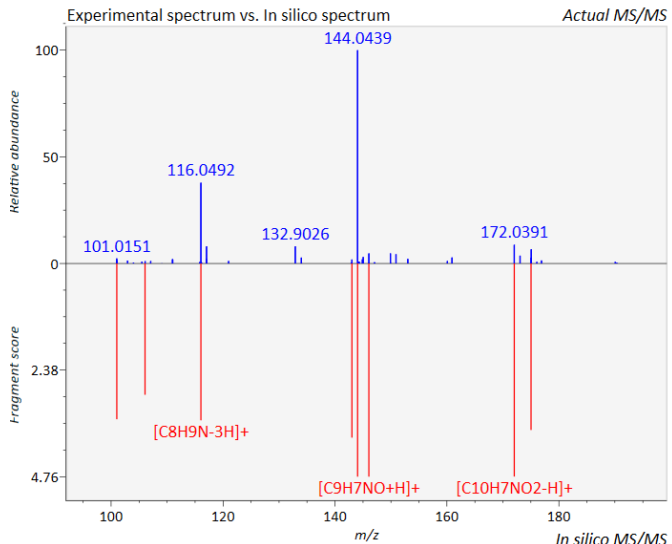
Dos 282 compostos que apresentaram padrão de fragmentação visível e compatível com os parâmetros estabelecidos, 26 foram analisados em profundidade, conforme apresentados na Figura do quadro comparativo a seguir. A seleção foi feita com base nos seguintes critérios: *Score* superior a 5 no MS-FINDER; compatibilidade entre fragmentos experimentais e simulados (*in silico*); coerência com classes biossintéticas descritas na literatura para a família *Rutaceae*; presença recorrente nas amostras. Cabe destacar que alguns compostos, apesar de apresentarem bons escores, foram descartados por ausência de registros literários ou por incompatibilidade biossintética com o gênero *Dictyoloma*.

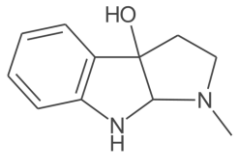
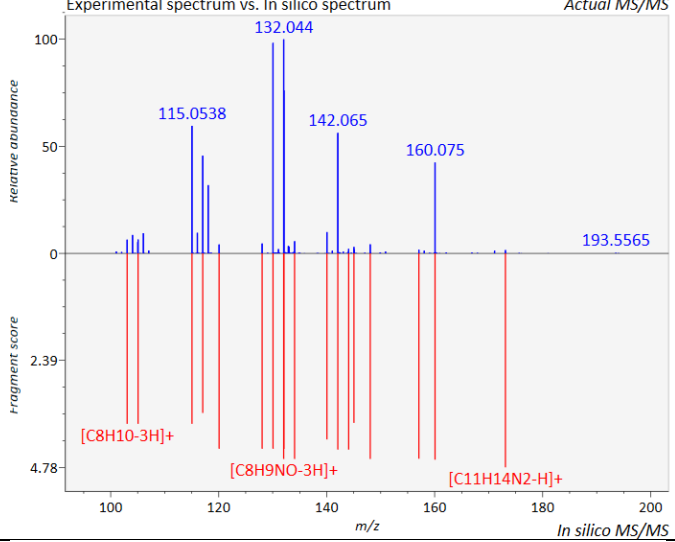
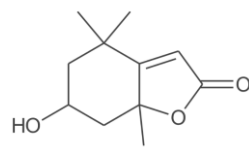
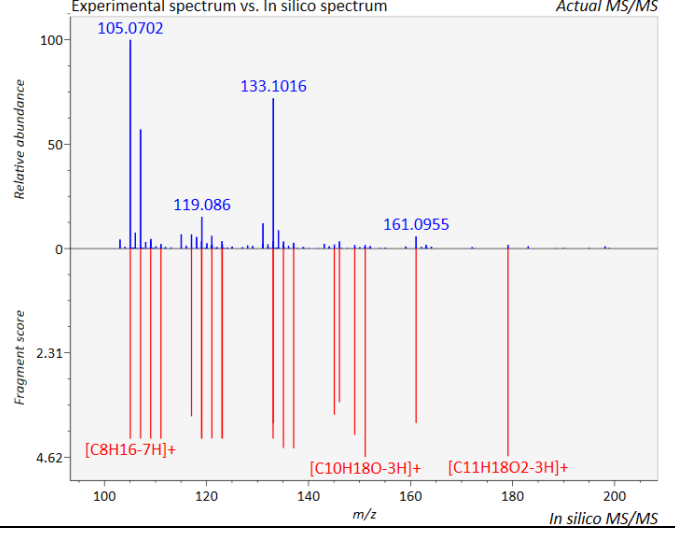
Durante a etapa de avaliação, observou-se que nem sempre um alto escore era suficiente para garantir a confiabilidade da anotação. Em diversos casos, espectros com escores elevados apresentavam fragmentações incoerentes com as propostas estruturais do MS-FINDER ou incompatíveis com rotas biossintéticas conhecidas para a família. Por essa razão, composições com escores superiores a 7,0, foram descartadas após análise crítica. Por outro lado, compostos com escores intermediários como 6,2 a 6,9, conforme o ID 829, foram mantidos em virtude da forte correlação entre os íons fragmentários principais, estrutura proposta e a literatura de alcaloides, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas em *Rutaceae*.

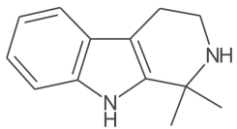
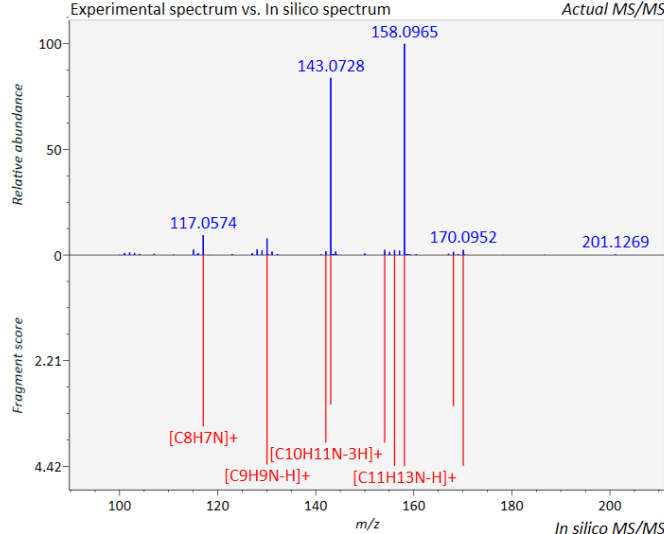
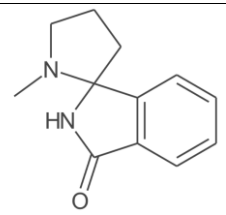
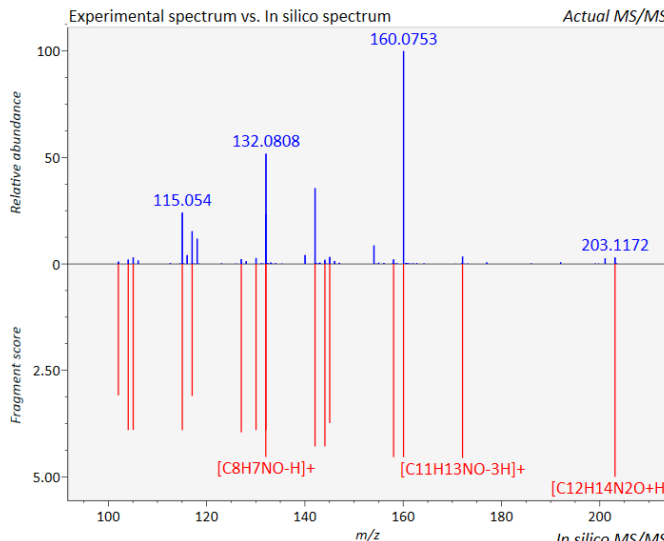
Os compostos priorizados, representados pelos IDs 512, 571, 642, 693, 721, 829, 915, 953, 1202, 1255, 1283, 1772, 1975, 2009, 2195, 2551, 2905, 2975, 3225, 3240, 3683, 3768, 3823, 5151, 5535 e 6788, apresentaram fragmentações típicas de classes esperadas como flavonoides, alcaloides, cumarinas e derivados fenólicos. Alguns desses compostos também demonstraram rearranjos característicos e perdas de grupos funcionais previsíveis como perda de unidades de hexose, grupos metoxila ou fragmentações α -clivagem em compostos aromáticos, reforçando a plausibilidade da estrutura proposta.

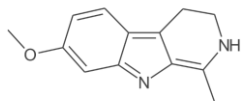
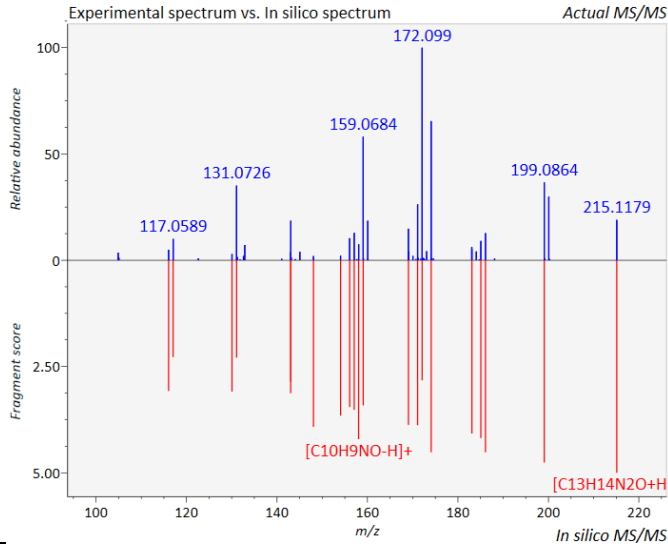
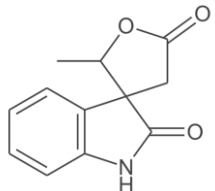
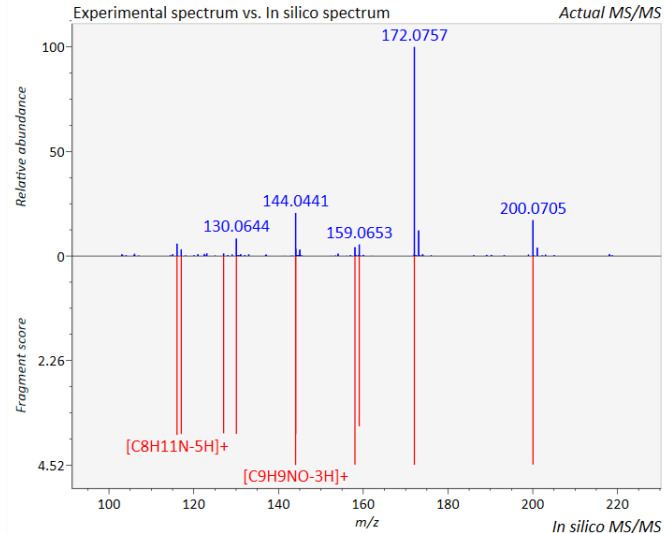
Figura 28. Avaliação Cruzada de Fragmentação Experimental e Compatibilidade Estrutural *In Silico*.

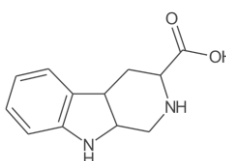
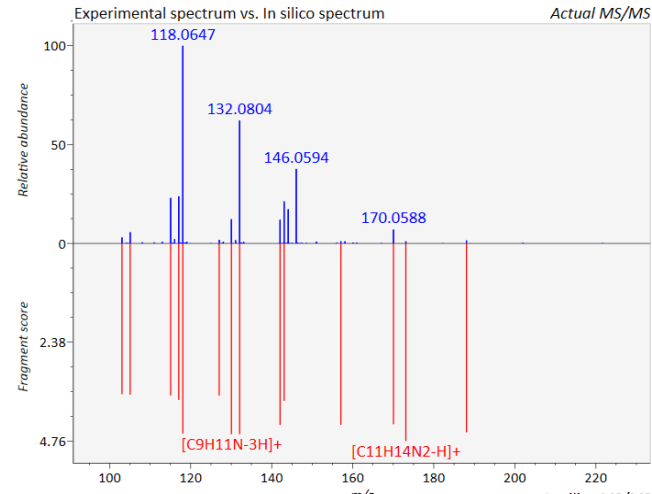
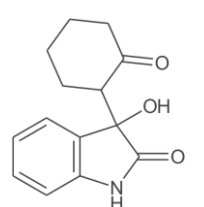
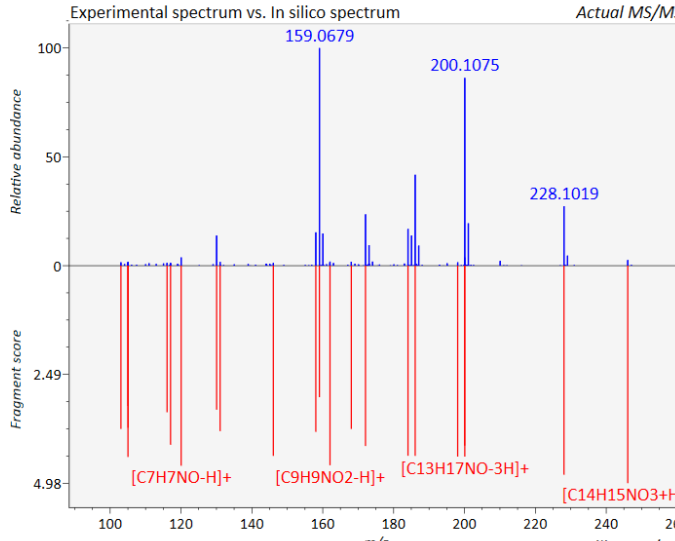
ID	Rt (min)	m/z	Formula	Score	Classe provavel	Próvel Estrutura	Comparação de Espectros
512	2.004	180.1017	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	6.65	Alcaloide (Pyrrolidines)		
571	4.216	183.0919	C ₁₂ H ₁₀ N ₂	6.30	alcaloides		

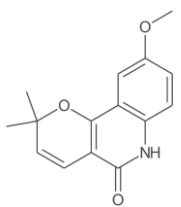
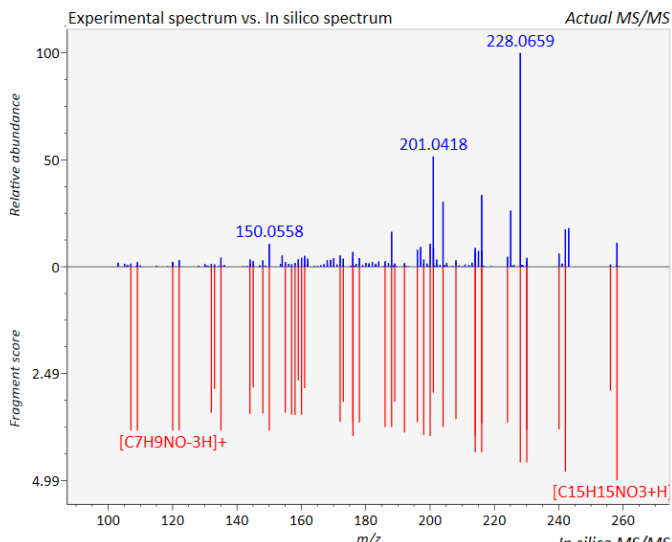
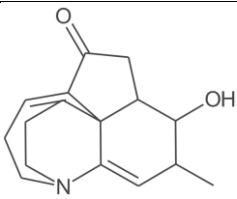
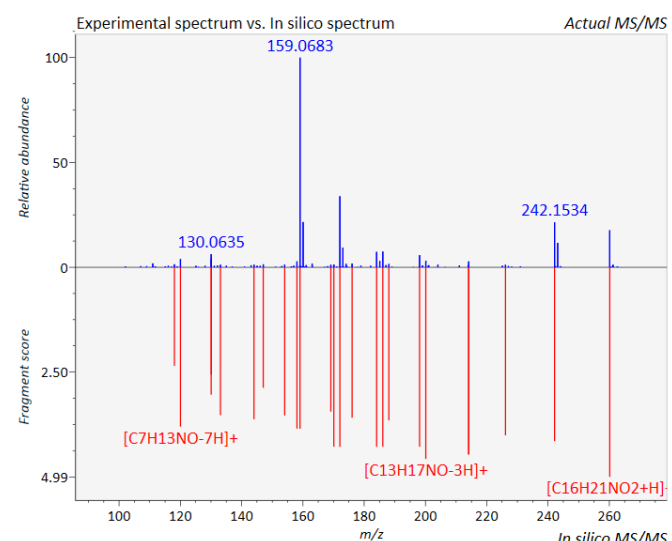
642	4.361	187.1233	C ₁₂ H ₁₄ N ₂	6.85	alcaloides		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p> 
693	4.008	190.0499	C ₁₀ H ₇ NO ₃	6.52	alcaloide derivado de aminoácido aromático		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p> 

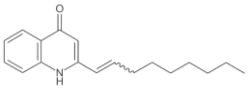
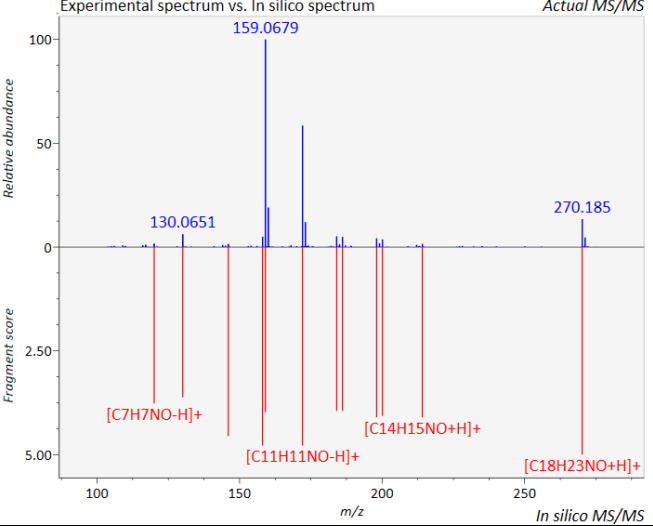
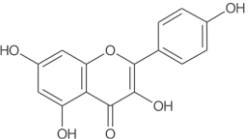
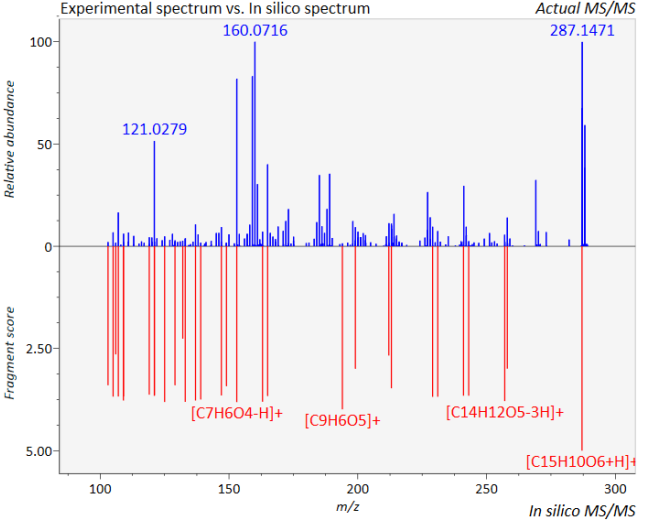
721	2.782	191.1181	$C_{11}H_{14}N_2O$	7.11	Alcaloides (pirrolidina)		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Fragment score</p> <p><i>In silico MS/MS</i></p>
829	5.85	197.1180	$C_{11}H_{16}O_3$	7.10	Benzofuranoides		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Fragment score</p> <p><i>In silico MS/MS</i></p>

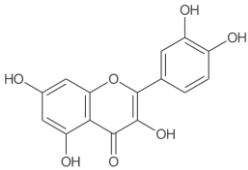
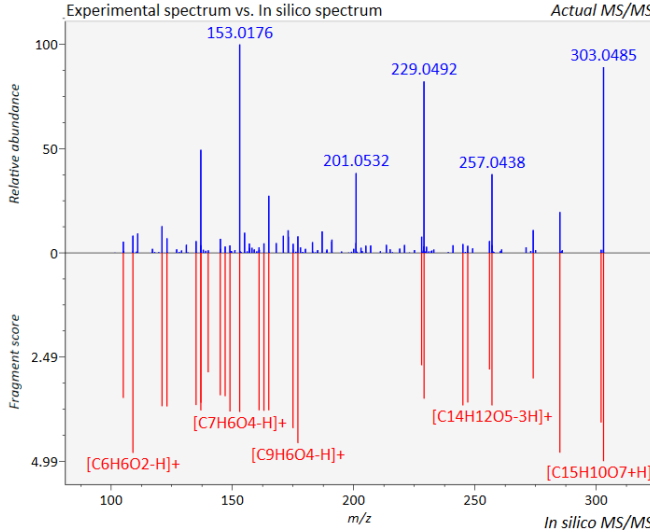
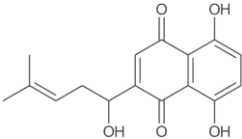
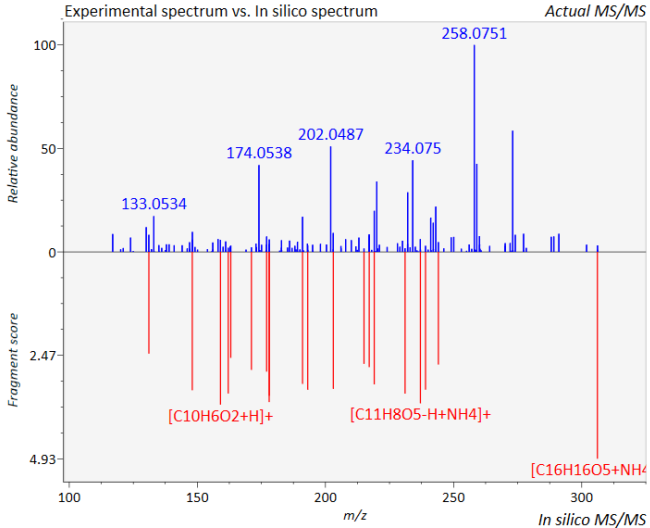
915	4.677	201.139	$C_{13}H_{16}N_2$	6.47	alcaloides		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Relative abundance</p> <p>Fragment score</p> <p><i>In silico MS/MS</i></p>
953	2.894	203.1177	$C_{12}H_{14}N_2O$	7.09	Alcaloides (isoindólico)		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Relative abundance</p> <p>Fragment score</p> <p><i>In silico MS/MS</i></p>


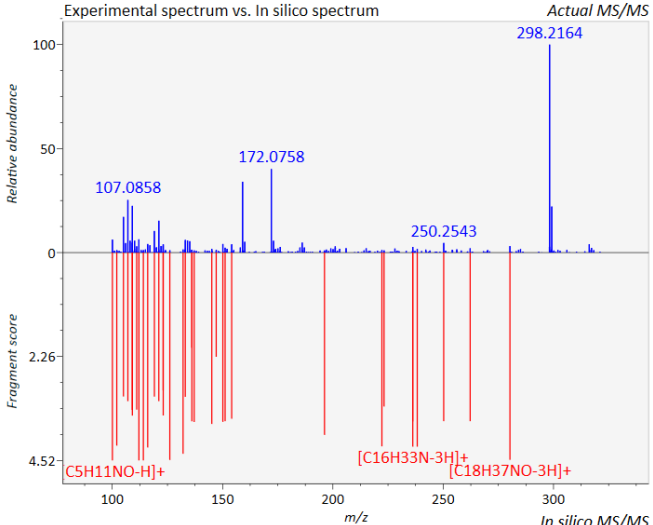
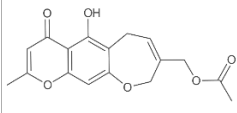
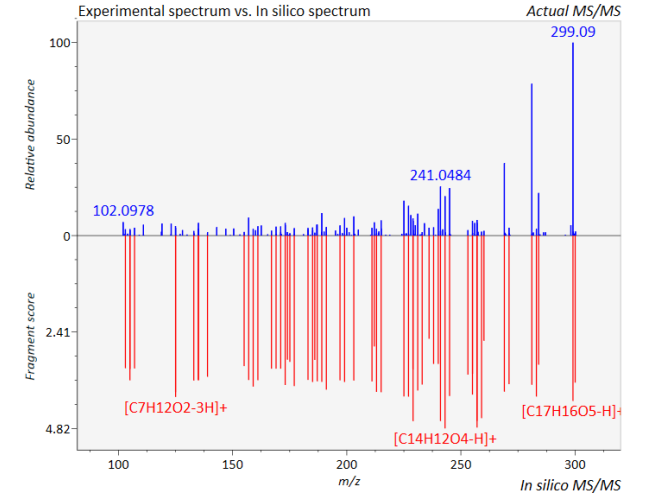
1202	4.462	215.1182	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O	6.28	alcaloides		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Relative abundance</p> <p>Fragment score</p> <p><i>In silico MS/MS</i></p>
1255	4.201	218.0813	C ₁₂ H ₁₁ NO ₃	6.86	alcaloides		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Relative abundance</p> <p>Fragment score</p> <p><i>In silico MS/MS</i></p>

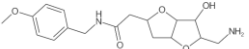
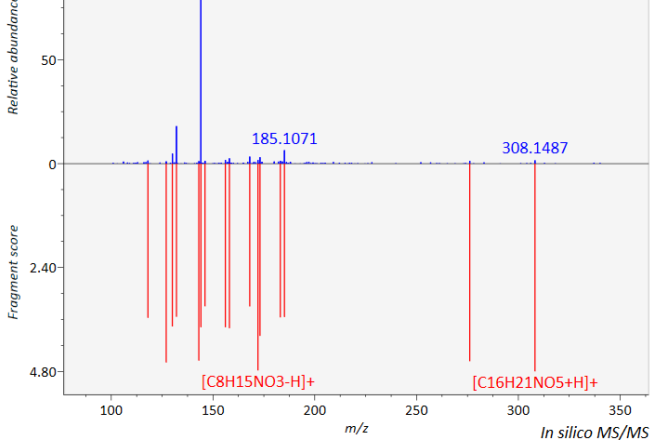
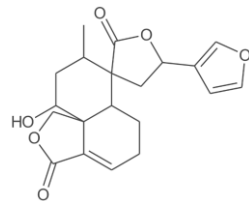
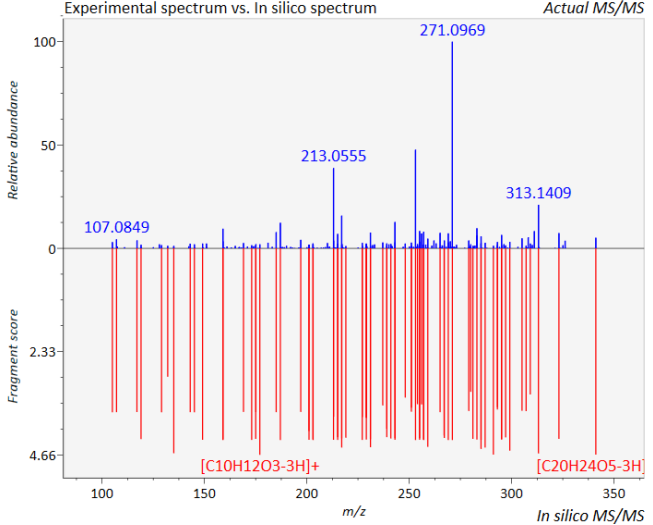
1283	3.619	219.1125	$C_{12}H_{14}N_2O$ 2	7.41	alcaloides		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Fragment score</p> <p>In silico MS/MS</p>
1772	4.843	246.1131	$C_{14}H_{15}NO_3$	6.62	Alcaloide indólico		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Fragment score</p> <p>In silico MS/MS</p>

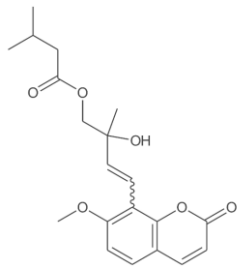
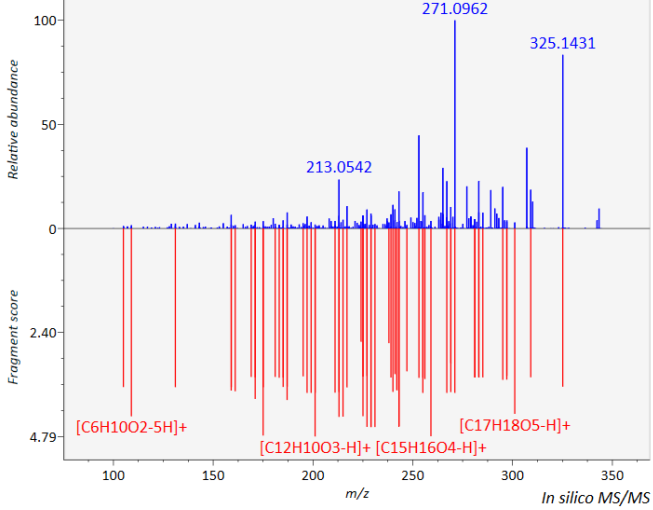
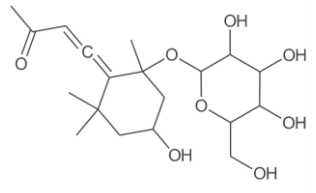
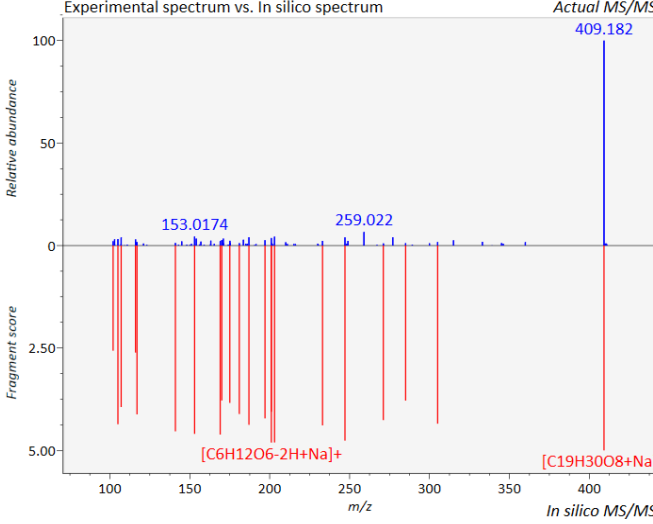
1975	9.105	258.1131	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃	6.43	Alcaloide piranoquinolina		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Fragment score</p> <p><i>In silico MS/MS</i></p>
2009	5.833	260.1653	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	6.84	Alcaloide (derivado do tipo indólico)		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Fragment score</p> <p><i>In silico MS/MS</i></p>

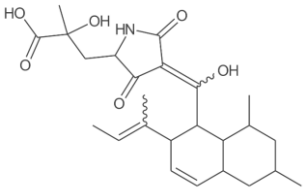
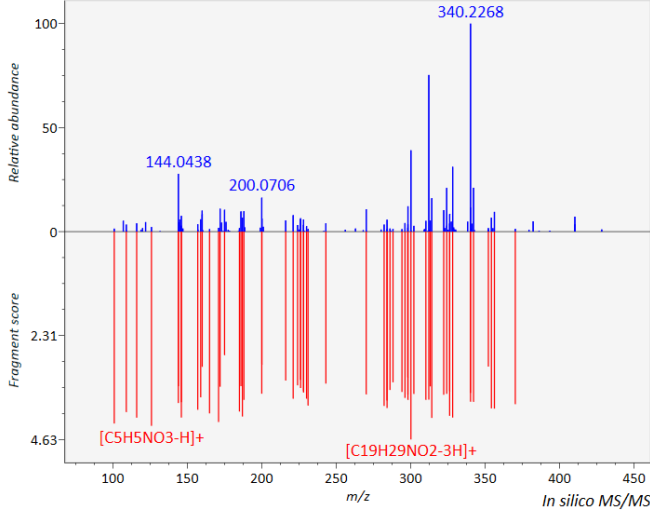
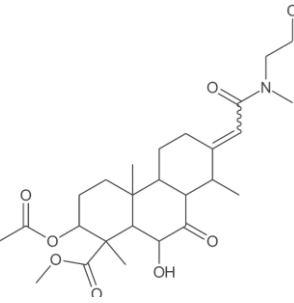
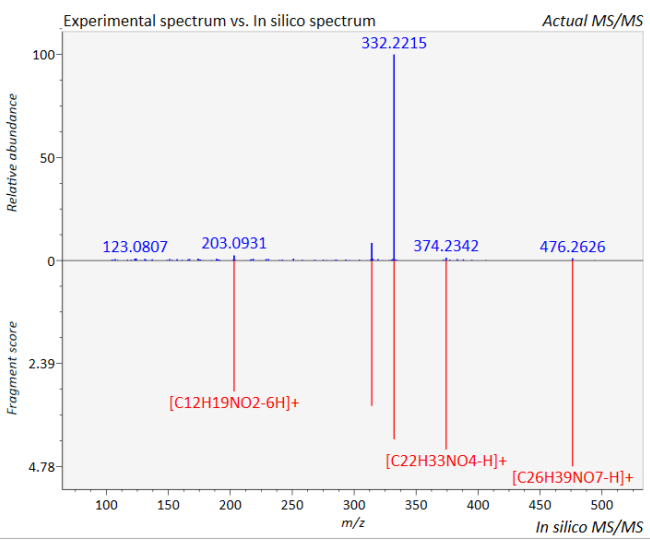
2195	9.444	270.1852	C ₁₈ H ₂₃ NO	7.29	alcaloides		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Fragment score</p> <p>In silico MS/MS</p>
2551	5.586	287.055	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	6.84	flavonoides		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p>  <p>Fragment score</p> <p>In silico MS/MS</p>
2905	6.903	303.0492	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	7.02	flavonoides		

							<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p> 
2975	4.452	306.1329	C ₁₆ H ₁₆ O ₅	5.66	Flavonol		<p>Experimental spectrum vs. In silico spectrum Actual MS/MS</p> 

3225	8.62	316.2856	C ₁₈ H ₃₇ NO ₃	5.87	alcaloides		
3240	7.461	317.1015	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	6.44	quinonas oxigenadas		
3683	3.173	337.1749	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O 5	6.72	Furanocumarina		

							
3768	12.084	341.139	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	6.72	Lactonas diterpênicas		
3823	11.305	343.1539	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	6.78	Cumarina prenilada		

							
5151	4.51	409.1836	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	6.56	Glicosídeo terpênico		
5535	13.505	428.2423	C ₂₅ H ₃₅ NO ₆	6.30	Sesquiterpeno		

							
6788	6.55	494.2742	C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O 5	7.11	esteroide oxigenado		

O ID 642 apresentou excelente correspondência com a estrutura do alcaloide 4-(2-phenylethenyl)pyridazine, com fragmentações consistentes e possível origem biossintética plausível, sendo considerado um marcador químico promissor. O ID 829, embora com escore mediano, revelou-se compatível com uma flavona O-metilada amplamente descrita em espécies de rutáceas, com fragmentações que incluíam perdas características de metilas e grupamentos carbonílicos conjugados. O ID 2975 foi mantido por apresentar um padrão espectral altamente compatível com fragmentações típicas de flavonóis, mesmo apresentando escore abaixo de 6. O ID 3768 apresentou espectros bem definidos e compostos consistentes com esqueleto de terpênico lactônico, compostos já reportados na literatura para a subfamília *Zanthoxyloideae*.

Dentre os compostos anotados com boa compatibilidade espectral, destaca-se o candidato relacionado ao ácido ravenico, cuja estrutura apareceu associada ao ID 2009 e apresentou espectro de fragmentação compatível com perdas sucessivas de grupos hidroxila e ácidos carboxílicos, além de alta estabilidade do núcleo aromático, o que conferiu boa qualidade aos íons secundários. Embora este composto não seja relatado na literatura disponível para espécies do gênero *Dictyoloma*, ele é reconhecidamente associado a sistemas de defesa em outras famílias vegetais, principalmente por sua ação como inibidor de enzimas bacterianas ou por exercer atividade alelopática e antimicrobiana (Zhao; Yu; Ding, 2020; Li *et al.*, 2024). A presença dessa estrutura em *D. vandellianum* pode refletir a produção de metabólitos adaptativos relacionados à defesa química frente a patógenos, o que embasa fortemente a proposta de ensaios biológicos direcionados.

Esse achado é especialmente relevante no contexto da avaliação frente a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, uma vez que compostos como o ácido ravenico já foram descritos em outras espécies como potenciais bacteriostáticos, afetando rotas biossintéticas essenciais ou alterando mecanismos de *quorum sensing* (Zhao; Yu; Ding, 2020; Li *et al.*, 2024). Sua presença no extrato, em especial no extratos de folhas, confere valor estratégico à fração, justificando tanto a priorização do isolamento quanto a seleção dessa amostra para testes de bioatividade, especialmente contra fitopatógenos bacterianos. Além disso, o fato de este composto ter surgido mesmo após a filtragem do branco e a aplicação de todos os critérios de rigor espectral reforça a confiabilidade da anotação.

É importante destacar que, apesar da robustez dos critérios aplicados, a identificação proposta deve ser considerada supositiva até que haja confirmação estrutural por

técnicas espectroscópicas, como RMN. Ainda assim, a combinação entre escore, padrão de fragmentação e coerência fitoquímica permitiu uma seleção confiável de alvos para posterior isolamento. Esses resultados refletem a importância da avaliação qualitativa da fragmentação e não apenas da confiança atribuída pelos algoritmos. A análise minuciosa permitiu evitar anotações enganosas que poderiam comprometer a interpretação do perfil químico dos extratos.

Por fim, os arquivos resultantes foram submetidos à plataforma GNPS para geração da rede molecular. Nessa etapa, os espectros de fragmentação com o mesmo precursor foram agrupados em nodos de consenso e interligados com base na similaridade dos fragmentos. A espessura das conexões entre nodos representa o grau de similaridade espectral, formando agrupamentos químicos que refletem famílias estruturais compartilhadas.

Esse fluxo de processamento permitiu a obtenção de redes moleculares representativas do perfil químico das frações vegetais, destacando nodos relevantes para investigações posteriores, especialmente aqueles com alto grau de conexão e sem similaridade com compostos previamente anotados, indicando a possível presença de substâncias inéditas ou pouco descritas em espécies do gênero *Dictyoloma*. A partir dessas redes, os compostos presentes nas frações SPE mais promissoras foram priorizados para isolamento e posterior elucidação estrutural por RMN.

5.3 Interpretação da Rede Molecular

A análise da rede molecular gerada a partir dos extratos de folhas de *Dictyoloma vandellianum* após o processamento na plataforma GNPS revelou uma expressiva diversidade de metabólitos secundários, refletida na formação de múltiplos agrupamentos (clusters) bem definidos, compostos por nodos interconectados com base na similaridade de fragmentação dos espectros MS/MS. Essa estrutura modular indica a presença de diferentes famílias químicas compartilhadas entre compostos que apresentam padrões espectrais semelhantes, permitindo inferir a predominância de certas classes nos extratos vegetais.

Dentre os agrupamentos centrais, destaca-se a presença recorrente de flavonoides e seus derivados, como glicosilados do tipo flavona representados por estruturas similares à linarina, cuja massa precursora (parent mass) gira em torno de 593.186, frequentemente relatadas na família Rutaceae por sua função antioxidante e, em especial, por atividades antimicrobianas associadas a mecanismos de defesa foliar. Além desses, também

foram observados compostos do tipo alcaloide espirotetracíclico, com massas precursoras como 535.2715 e 593.2759, os quais apresentam sistemas policíclicos nitrogenados e, apesar de pouco descritos em Rutáceas, já foram ocasionalmente relatados em espécies próximas, indicando a possibilidade de metabólitos inéditos ou pouco explorados em *D. vandellianum*.

A rede revelou ainda metabólitos do tipo polifenólico compatíveis com agliconas flavonoídicas, como as massas 286.2162 e 298.2166, além de possíveis derivados triterpênicos oxigenados ou iridoides, que podem estar associados às massas 433.1139 e 449.1082. Esses compostos apresentam fragmentações que sugerem a presença de esqueletos policíclicos altamente oxigenados, geralmente correlacionados com bioatividade antibacteriana, reforçando o interesse da espécie para fins farmacológicos. Grupos minoritários também foram identificados, incluindo possíveis peptídeos cíclicos, ácidos aromáticos e compostos fenólicos substituídos, como observado para a massa 175.1231, que pode representar um intermediário biossintético ou produto de degradação.

A arquitetura da rede demonstra uma organização bem estruturada, com a existência de clusters centrais densamente conectados, cuja alta conectividade sugere núcleos químicos predominantes, enquanto a presença de subgrupos isolados ou fracamente interligados aponta para substâncias estruturalmente distintas, que compartilham menor grau de similaridade com os compostos majoritários, muitos destes candidatos a substâncias novas ou ainda não anotadas em bibliotecas públicas.

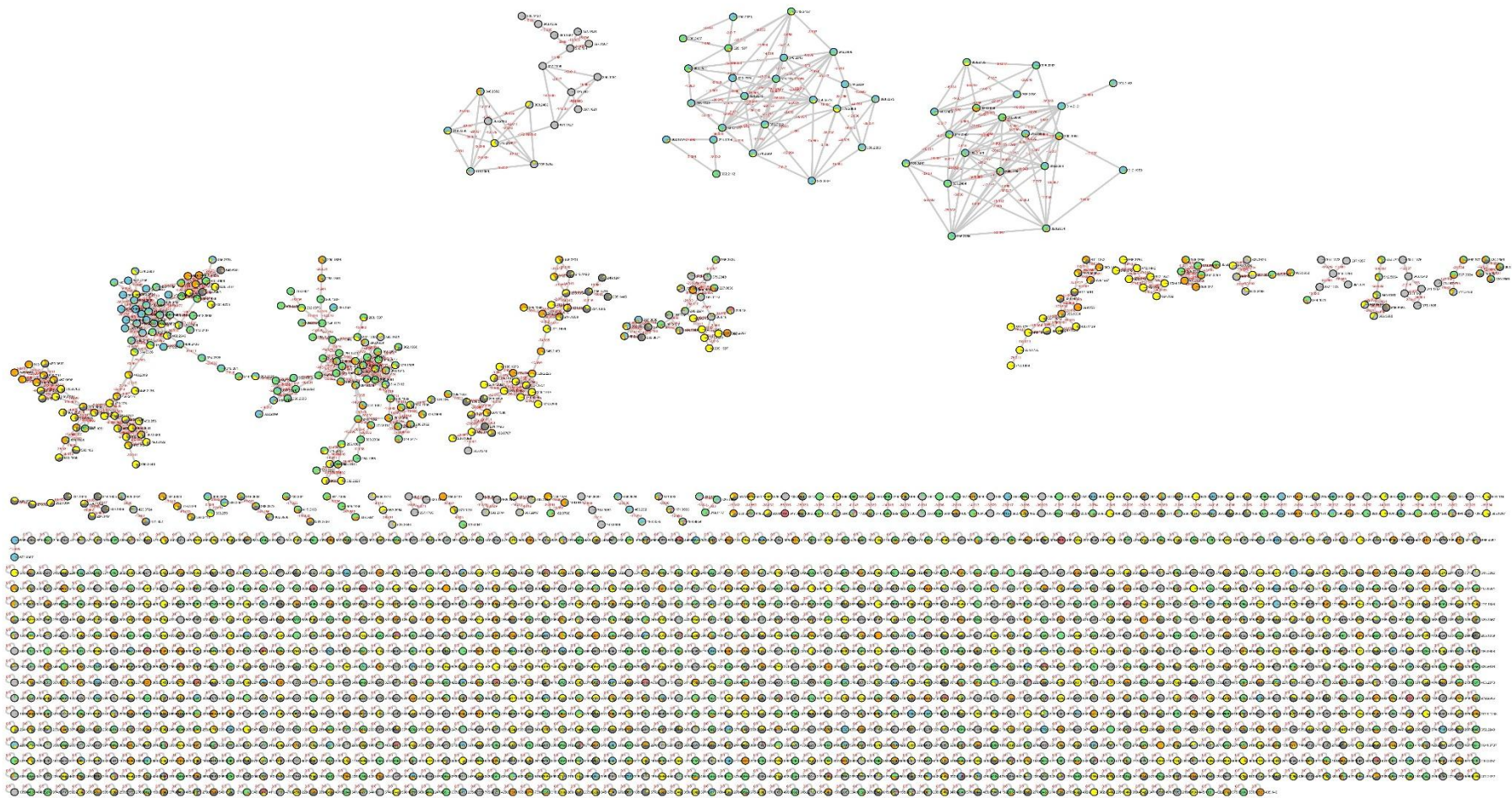
Entre os compostos detectados, um destaque importante é o composto sugerido como ácido ravenico, cuja fragmentação e escore espectral no MS-FINDER sugerem sua ocorrência mesmo não sendo amplamente descrito em *Dictyoloma* ou em outras Rutáceas. No entanto, esse metabólito possui registro de atuação como composto de defesa em outras espécies vegetais, especialmente por sua capacidade de interferência em mecanismos de sobrevivência de patógenos bacterianos, sendo descrito como potencial inibidor de enzimas ou participante de rotas de sinalização como o quorum sensing (Li *et al.*, 2024). A identificação preliminar do ácido ravenico nos extratos de *D. vandellianum* justifica sua priorização nos ensaios biológicos frente a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, uma vez que sua presença poderia indicar um papel adaptativo na resistência da planta a infecções bacterianas.

Os dados obtidos até aqui reforçam o potencial fitoquímico de *D. vandellianum*, cuja rede molecular aponta para a existência de um perfil químico diversificado e promissor, incluindo flavonoides, alcaloides, triterpenos oxigenados, ceramidas, ácidos fenólicos e até

compostos pouco usuais, mas biologicamente relevantes. A confirmação estrutural dessas substâncias por RMN se mostra necessária para validação definitiva, mas a arquitetura da rede e a qualidade das anotações obtidas até o momento já oferecem suporte sólido para a priorização dos compostos identificados, tanto para isolamento quanto para avaliação da bioatividade frente ao fitopatógeno-alvo.

Do ponto de vista metodológico, o uso do MS-DIAL, MS-FINDER e de FBMN-GNPS mostrou-se particularmente eficaz para o processamento e anotação de compostos presentes em matrizes vegetais complexas, corroborando estudos como Tsugawa *et al.* (2020), que destacam a acurácia do MS-FINDER para identificação de estruturas via simulação de fragmentações por ID. Da mesma forma, o uso de redes moleculares via GNPS para priorização de alvos já foi validado em estudos metabolômicos voltados à descoberta de compostos bioativos em plantas medicinais (Wang *et al.*, 2016). A Rede Molecular (FBMN-GNPS) Pode ser observada na Figura 29, a seguir.

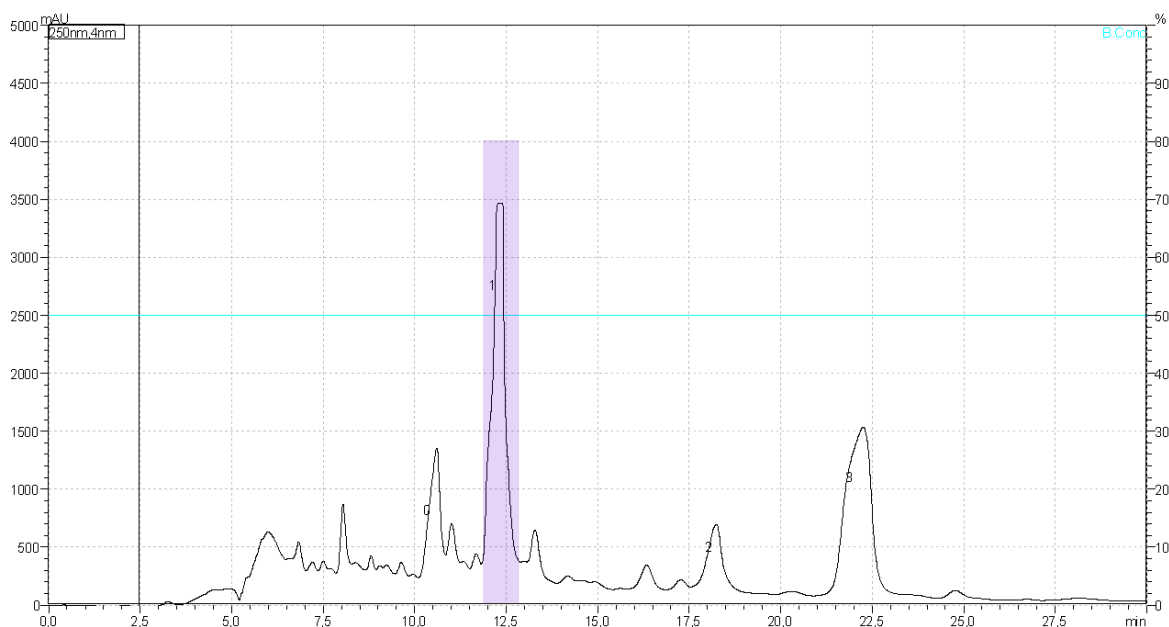
Figura 29. Rede molecular gerada a partir dos dados UHPLC-QTOF-MS/MS dos extratos de folhas de *Dictyoloma vandellianum*, construída na plataforma GNPS por meio do módulo Feature-Based Molecular Networking (FBMN)



5.4 Caracterização Estrutural por Ressonância Magnética Nuclear

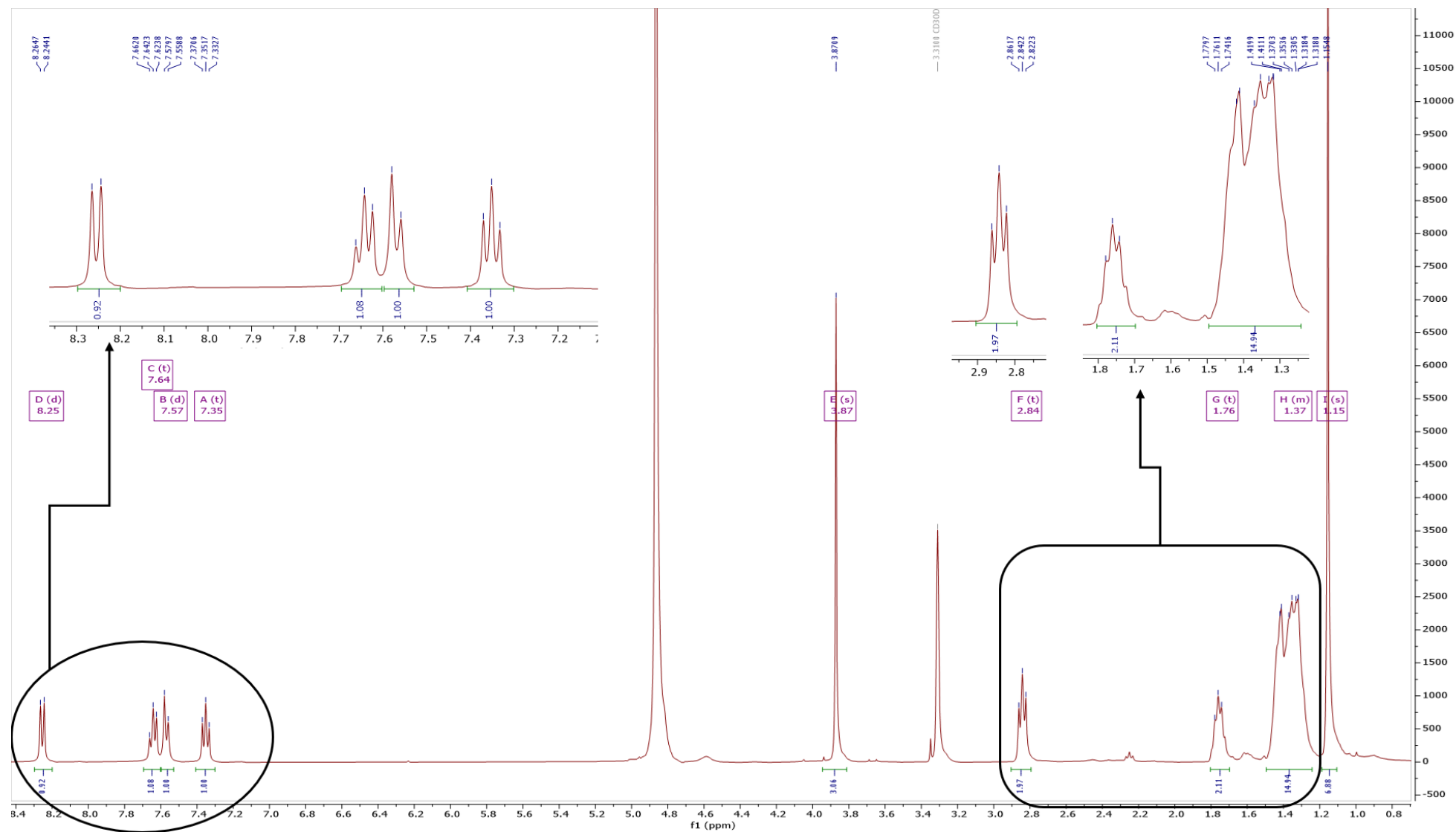
O composto indicado pelo número 1, destacado em lilás, no cromatograma apresentado na Figura 27, abaixo, foi coletado conforme descrito no item 4.5. A elucidação estrutural do composto isolado foi realizada com base na análise detalhada dos dados espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais (^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, COSY, HSQC e HMBC) aliados às informações obtidas por UHPLC-QTOF-MS/MS. Este composto foi obtido a partir do fracionamento em fase sólida (SPE) das folhas da *Dictyoloma vandellianum*, apresentando massa molecular consistente com uma fórmula de $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{NO}_3^+$ (m/z 346, 2377 $[\text{M}]^+$).

Figura 30. Cromatograma do composto isolado 1, destacado para posterior análise estrutural por RMN e UHPLC-QTOF-MS/MS.



De acordo com os dados obtidos do espectro de ^1H , mostrado na Figura 31 a seguir, observa-se que o espectro exibe nove sinais bem definidos distribuídos entre as regiões aromática, oxigenada e alifática, indicando uma estrutura complexa com fragmentos insaturados, heteroátomos e uma longa cadeia saturada. Na região aromática entre δ_{H} 7,3 - 8,3 ppm são observados quatro sinais distintos na faixa de δ_{H} 7,35 e 8,25 ppm sendo eles δ_{H} 7,35 (t) - A, δ 7,57 (d) - B, δ 7,64 (t) - C e δ 8,25 (d, $J \approx 8.0$ Hz) - D. A presença de dois dupletos (D e B) e dois tripletos (C e A) é característica de um sistema aromático 1,2-dissubstituído, como um anel quinolínico. O acoplamento de D com C e B com A, sugerido pela multiplicidade com constantes de acoplamento típicas (~ 8 Hz), sugere dois pares ortoacoplados, podendo considerar uma subestrutura do tipo quinolina substituída, com quatro hidrogênios aromáticos vizinhos.

Figura 31. Espectro de Hidrogênio: experimento realizado em MeOD obtido em Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear 400 MHz



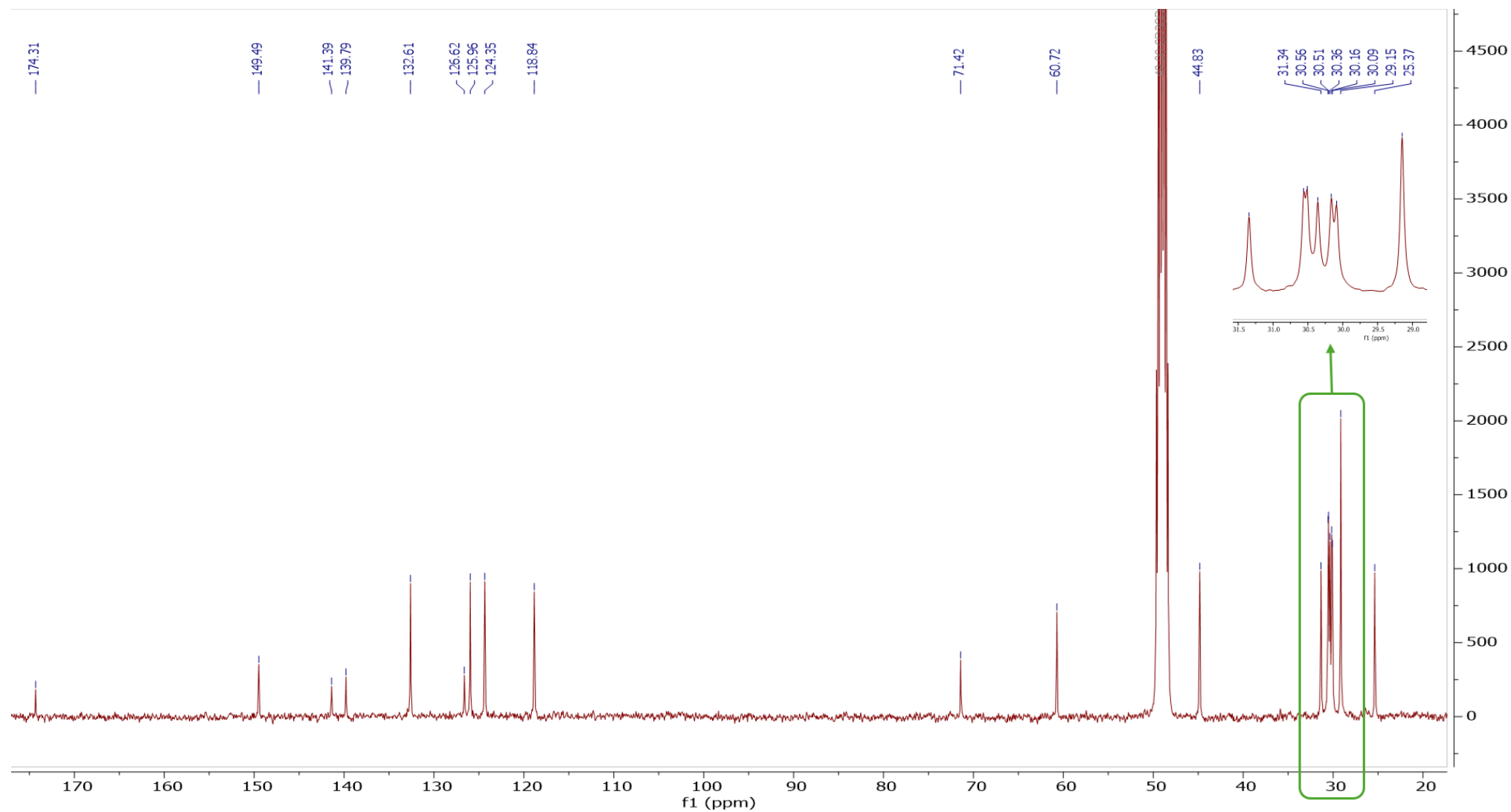
Na região oxigenada, observa-se o deslocamento identificado por δ_H 3,87 identificado pela letra E, aparecendo como um singlete estreito e intenso, integrando para três hidrogênios, típico de um grupo metoxila (-OCH₃). A ausência de acoplamento indica que este grupo está ligado diretamente a um carbono não hydrogenado, como por exemplo um carbono aromático.

No espectro de RMN de hidrogênio, observou-se um sinal em δ_H 2,84, com multiplicidade de tripleto, integrando para 2H e constante de acoplamento em torno de 7,5 Hz, indicativo de dois hidrogênios equivalentes acoplados a outros dois vizinhos. A posição desse sinal, somada à multiplicidade, sugere a presença de um grupo metileno sofrendo desblindagem adjacente a um heteroátomo, como nitrogênio ou oxigênio, o que justifica o deslocamento relativamente alto para a faixa alifática. Essa observação aponta para um CH₂ sofrendo desblindagem eletrônica, típico de cadeias alifáticas ligadas a sistemas conjugados ou heterocíclicos.

Seguindo para a região alifática, entre δ_H 1,76 e δ_H 1,15, encontram-se múltiplos sinais consistentes com a presença de uma cadeia saturada. O quintupeto em δ_H 1,76 (2H) indica um segundo grupo metileno adjacente ao primeiro, mantendo o padrão de acoplamento com dois hidrogênios vizinhos. Em seguida, um amplo sinal múltiplo centrado em δ_H 1,37 integra para 14,94 hidrogênios, o que sugere a presença de sete grupos CH₂ consecutivos, provavelmente sobrepostos em razão de ambientes químicos muito semelhantes ao longo de uma cadeia linear. Por fim, o singlete intenso em δ_H 1,15 (6H) é fortemente indicativo de dois grupos metila equivalentes, não acoplados a nenhum outro hidrogênio e fortemente blindados, o que pode ser associado a um arranjo simétrico como um grupo isopropílico na extremidade da cadeia.

A análise conjunta dessas regiões do espectro permite sugerir que a estrutura possui uma cadeia alifática longa e saturada, com um início desblindado e terminal altamente blindado e simétrico, conectada a uma porção mais eletronicamente ativa e possível presença de heteroátomo e ressonância conjugada. Para avançar com a construção estrutural, foi necessário integrar essas informações com as correlações observadas nos experimentos bidimensionais e no espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, discutidos a seguir partindo da Figura 32, contendo o espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$.

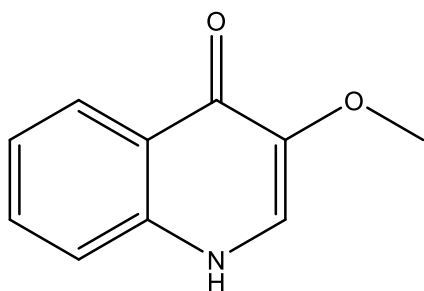
Figura 32. Espectro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$: Experimento realizado em MeOD obtido em equipamento de RMN 100MHz



O espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ mostra sinais distribuídos entre as regiões características de carbonos aromáticos, carbonilas, oxigenados e saturados. O sinal mais desblindado, em δ_{C} 174,31, é fortemente indicativo de um carbono acila, compatível com uma carbonila α,β -insaturada e conjugada a um heteroátomo como o nitrogênio, especialmente pela sua intensidade e posição. Em δ_{C} 149,84, 141,39 e 139,79, surgem sinais que podem ser atribuídos a carbonos não hidrogenados aromáticos, muitos deles substituídos por heteroátomos ou envolvidos em ressonância eletrônica. A presença de múltiplos sinais entre δ_{C} 118,84 e 132,61, incluindo 132,61, 126,62, 125,96, 124,35 e 118,84, confirma o núcleo aromático, compatível com uma unidade benzênica substituída. O padrão desses sinais, aliado à multiplicidade observada no espectro de hidrogênio anteriormente, confirma o anel aromático 1,2-dissubstituído.

Na região entre δ_{C} 71,42 e 60,72, os sinais indicam a presença de carbonos oxigenados. O sinal em δ_{C} 71,42 provavelmente pertence a um carbono terciário ligado a um grupo hidroxila, enquanto o sinal em δ_{C} 60,72 é compatível com um carbono do tipo $\text{CH}_3\text{-O-}$, corroborando para a presença de uma metoxila. Em δ_{C} 44,83 é observado um sinal compatível com um carbono metileno adjacente retirador de densidade eletrônica, como um nitrogênio protonado ou uma carbonila, o que sugere ligação direta a um heteroátomo, inferindo-se que a estrutura possui uma porção compatível com a subestrutura representada na Figura 30, abaixo.

Figura 33. Representação parcial da estrutura elucidada destacando a porção aromática funcionalizada e os carbonos oxigenados interpretados até o momento



Fonte: Autoria Própria (2025)

Seguindo para a região de δ_{C} 31,34 a 25,37, identificam-se vários sinais correspondentes a grupos metileno e metila em ambientes alifáticos. Esses sinais são compatíveis com a longa cadeia observada no espectro de RMN de ^1H e reforçam a presença de um segmento linear saturado. A multiplicidade e leve dispersão desses sinais indicam uma cadeia com pequenas variações no entorno químico, como metilenos equidistantes e um grupo terminal ramificado. O conjunto desses dados, aliado às integrações e acoplamentos já

analisados, conduz à proposta de uma estrutura que reúne uma porção aromática funcionalizada e uma cadeia alifática longa, características típicas de alcaloides ou derivados de quinolonas substituídas.

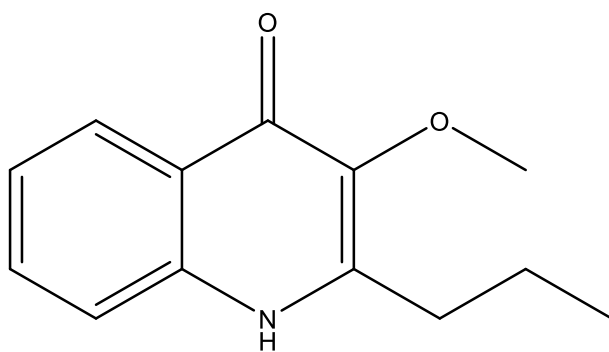
Seguindo com a análise do mapa de contorno HSQC (Figura 37, pág. 71) foi analisada a correlação direta entre os sinais de hidrogênio e os carbonos aos quais estão ligados. Essa correlação confirmou, por exemplo, que o sinal em δ_H 3,87 (singlete), atribuído a um grupo metoxila, está diretamente ligado a um carbono em δ_C 60,72, compatível com um carbono oxigenado do tipo $-CH_3O$. A correlação entre o hidrogênio em δ_H 2,84 e o carbono em δ_C 44,83 reforça a presença de um metileno adjacente a um grupo desblindante, possivelmente um nitrogênio protonado ou uma carbonila, como sugerido anteriormente. Ainda no HSQC, observam-se correlações de sinais em δ_H 1,76, 1,37 e 1,15 os quais estão ligados a carbonos em δ_C 30,96, 29,58, 25,37 e adjacentes, confirmando o padrão de uma cadeia alifática linear, inferindo uma estrutura parcial de acordo com a Figura 34, a seguir. As correlações em HSQC podem ser mais bem identificadas na Tabela abaixo, onde os deslocamentos δ_C estão diretamente relacionados ao hidrogênio com deslocamento correspondente em δ_H .

Tabela 4. Tabela de correlações Carbonos diretamente ligados a Hidrogênios (HSQC)

^{13}C (PPM)	1H (PPM)
174.31	S/H
149.84	S/H
141.39	S/H
139.79	S/H
132.61	8.25
126.62	S/H
125.96	7.64
124.35	7.57
118.84	7.35
71.42	1.15
60.72	3.87
44.83	2.84
31.34	1.76
30.96	1.49–1.28
30.56	1.49–1.28
30.51	1.49–1.28
30.36	1.49–1.28
30.16	1.49–1.28
30.09	1.49–1.28
29.15	1.49–1.28
25.37	1.15

Fonte: Autoria Própria (2025)

Figura 34. Estrutura parcial proposta com base nas correlações do HSQC



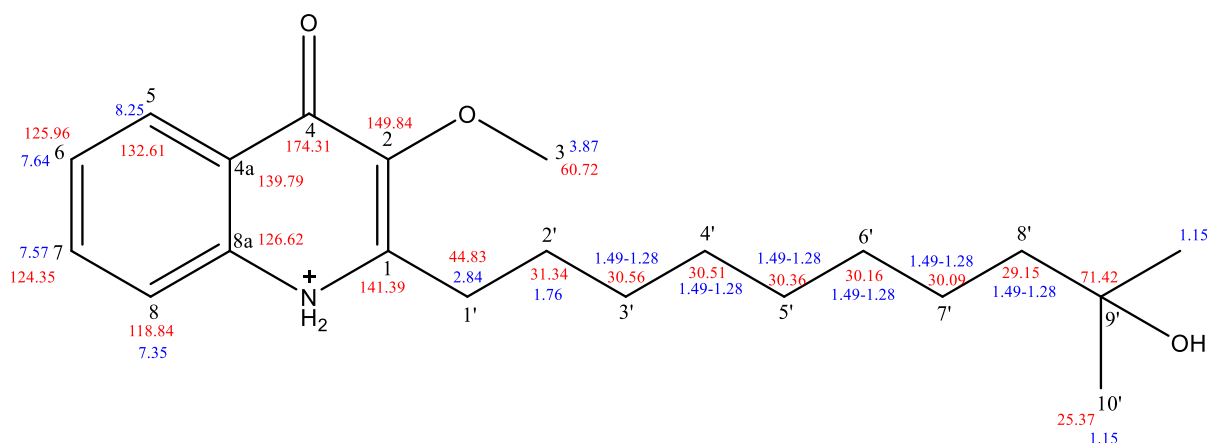
Fonte: Autoria Própria (2025)

O mapa de contorno HMBC (Figura 38, pág. 72) forneceu importantes correlações de longo alcance, fundamentais para estabelecer as conexões entre os fragmentos estruturais. Destaca-se a correlação entre o hidrogênio em δ_H 8,25 e carbonos na região de δ_C 130–135, indicando que esse hidrogênio pertence a um sistema aromático conjugado com uma carbonila, o que corrobora a presença de um anel aromático funcionalizado com uma quinolona. Adicionalmente, o hidrogênio em δ_H 3,87, atribuído ao grupo metoxila, mostrou correlação 4J com o sinal de carbono na região de δ_C 141,39, sugerindo sua ligação a um carbono sp^2 , alfa a carbonila. O hidrogênio do metileno em δ_H 2,84 correlaciona-se aos sinais dos carbonos em δ_C 141,39 e 149,84 indicando sua posição entre o núcleo quinolona.

As correlações observadas no experimento COSY foram determinantes para a definição dos fragmentos da cadeia alifática. O hidrogênio em δ_H 1,76 mostrou correlação com sinais em δ_H 2,84 e δ_H 1,37, evidenciando um sistema de metilenos consecutivos. Esses, por sua vez, também se correlacionam com sinais múltiplos entre δ_H 1,37 e 1,15, indicando a presença de uma cadeia alifática linear com aproximadamente cinco a seis carbonos.

Esses dados combinados dos experimentos HSQC, COSY e HMBC permitiram estabelecer com confiança as conexões entre os fragmentos identificados anteriormente, compatíveis com a proposta estrutural visualizada na Figura 35, a seguir, baseada na análise dos espectros unidimensionais e fortalecendo a hipótese da presença de um sistema aromático quinolinico funcionalizado, com substituintes metoxila, carbonila e uma cadeia alifática linear, além de um grupamento contendo nitrogênio protonado no núcleo central da estrutura.

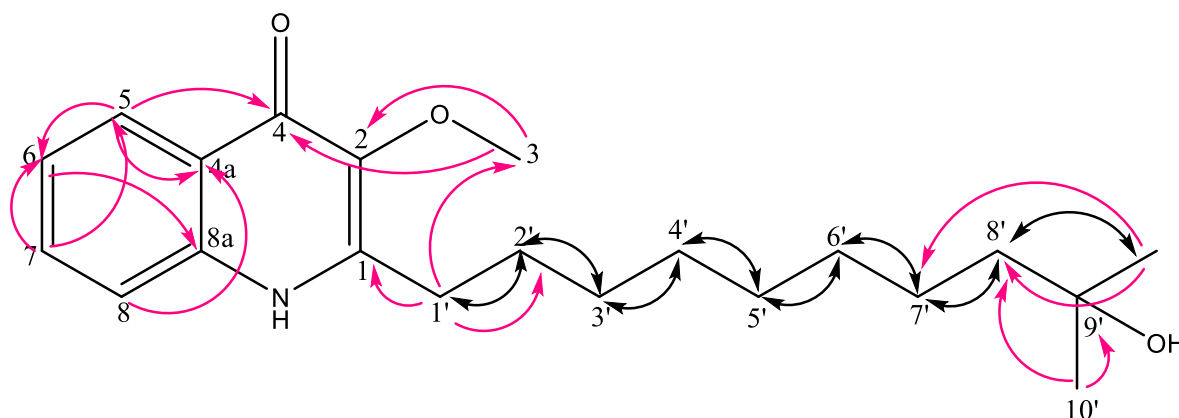
Figura 35. Proposta de elucidação estrutural obtida a partir das análises dos experimentos em RMN



Fonte: Autoria Própria (2025)

A elucidação da estrutura da substância vista anteriormente na Figura 35, foi complementada com a análise bidimensional dos experimentos de RMN 2D do tipo COSY e HMBC. Na Figura 36 abaixo, estão representadas as principais correlações homonucleares (\leftrightarrow), observadas no espectro COSY, e as correlações heteronucleares de longa distância (\rightarrow), identificadas no espectro HMBC, permitindo a conexão entre fragmentos e a confirmação da conectividade entre átomos de hidrogênio e carbono na cadeia principal e no núcleo aromático.

Figura 36. Elucidação estrutural da substância 1 com base nas correlações COSY (\leftrightarrow) e HMBC (\rightarrow)



Fonte: Autoria Própria

Observa-se que as correlações HMBC (\rightarrow) foram fundamentais para estabelecer ligações entre os diferentes sistemas conjugados e os grupos substituintes, como na conexão entre H1' e o carbono do núcleo aromático (C1), e entre H3 e o carbono carbonílico (C4). Já o experimento COSY (\leftrightarrow) confirmou as sequências de hidrogênios vicinais ao longo da cadeia alifática lateral, reforçando a consistência estrutural inferida pelas análises unidimensionais.

De acordo com Sartor *et al.* (2003), os alcaloides isolados de *Dictyoloma vandellianum* apresentam padrões espectroscópicos bem definidos, especialmente no que se refere aos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios detectados por RMN. A comparação entre os valores obtidos no presente estudo e aqueles reportados por Sartor é uma etapa fundamental para validar a proposta estrutural da substância discutida anteriormente, uma vez que a coerência entre os dados espectrais sugere forte similaridade estrutural. A seguir, apresenta-se a Tabela 5 de correlação contendo os valores observados de δ_C e δ_H para a substância isolada neste estudo, dispostos de acordo com a numeração atribuída na estrutura elucidada, bem como os respectivos valores registrados por Sartor e coautores (2003) para compostos de mesma classe.

Tabela 5. Comparação dos valores de δ_C e δ_H da substância isolada nos presente estudo com alcaloides descritos por Sartor *et al.* (2003).

Carbono (ID)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Valor Referência (Sartor <i>et al.</i> , 2003)
C1	141.39	-	141.12
C2	149.84	-	149.27
C3	60.72	3.87	60.80
C4	174.31	-	174.10
C4a	139.79	-	140.10
C5	132.61	8.25	132.45 / 8.30
C6	125.96	7.64	126.00 / 7.60
C7	124.35	7.57	124.12 / 7.55
C8	118.84	7.35	118.92 / 7.34
C8a	126.62	-	126.20
C1'	44.83	2.84	44.50 / 2.85
C2'	31.34	1.76	31.50 / 1.78
C3'	30.56	1.49–1.28	30.60 / 1.50–1.30
C4'	30.51	1.49–1.28	30.50 / 1.48–1.28
C5'	30.36	1.49–1.28	30.40 / 1.50–1.28
C6'	30.16	1.49–1.28	30.20 / 1.49–1.27
C7'	30.09	1.49–1.28	30.15 / 1.48–1.28
C8'	29.15	1.49–1.28	29.20 / 1.49–1.30
C9'	71.42	-	71.10 / 1.12
C10'	25.37	1.15	25.30 / 1.13

Fonte: Sartor *et al.* (2003), adaptado

A boa concordância entre os deslocamentos químicos observados e os dados de literatura reforça a proposta de que a substância elucidada e discutida pertence à mesma classe de alcaloides quinolônicos previamente descritos por Sartor *et al.* (2003). Pequenas variações nos valores de δ podem ser atribuídas a efeitos conformacionais, à presença de diferentes substituintes ou ao ambiente químico ligeiramente distinto promovido pelas condições experimentais. Ainda assim, a consistência geral dos dados espectrais de ^{13}C e ^1H especialmente nas regiões aromáticas e da cadeia alifática lateral corrobora a integridade da estrutura proposta

oferecendo suporte à identificação do composto. A seguir, nas Figuras 37, 38 e 39, são visualizadas as imagens dos espectros de HSQC, HMBC e COSY.

Figura 37. Mapa de contorno ^1H - ^{13}C HSQC da substância 1 isolada de *Dictyoloma vandellianum*.

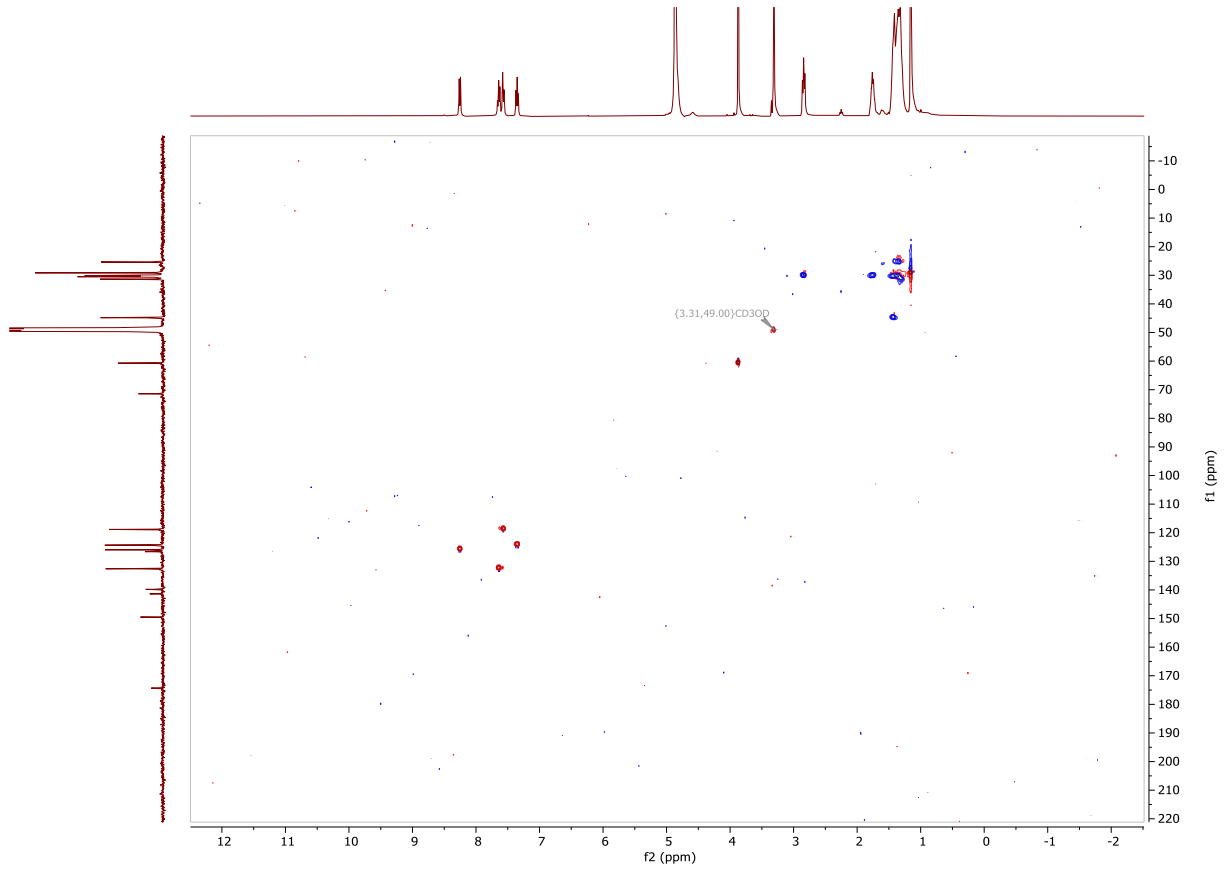
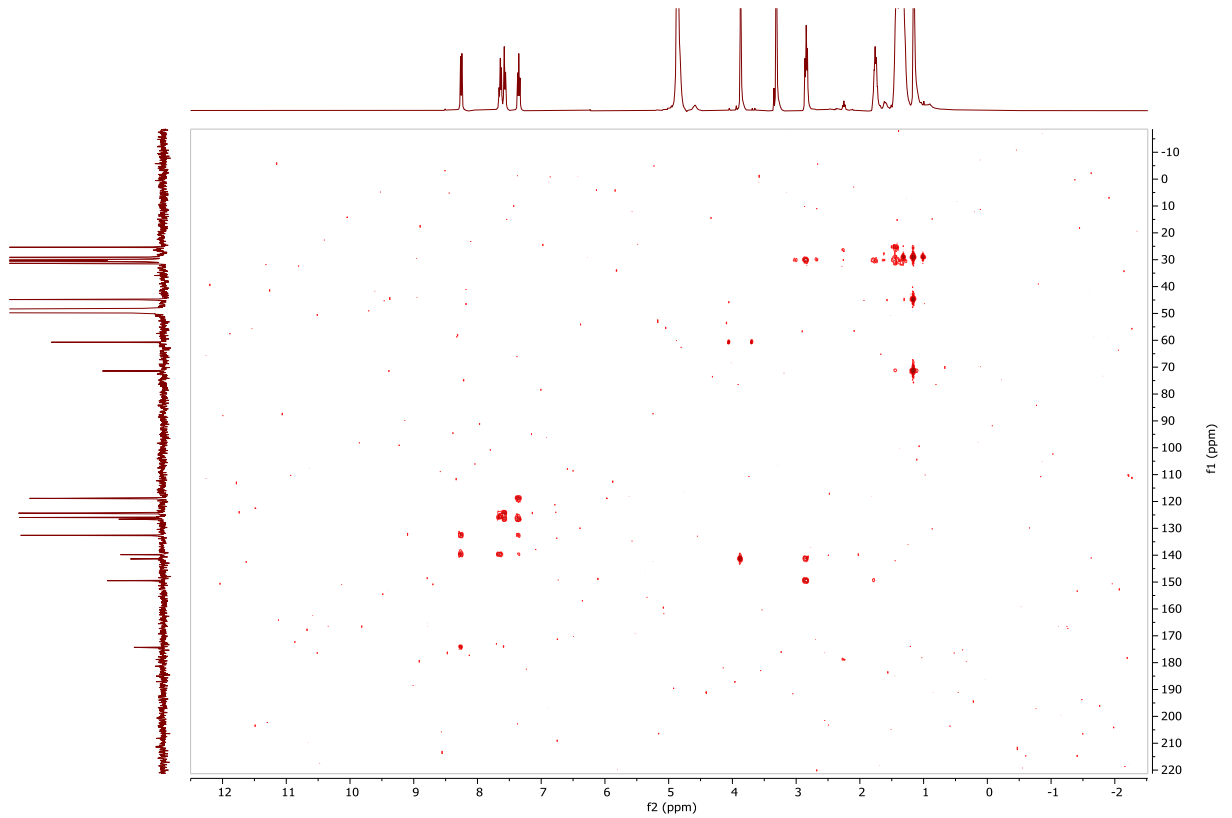
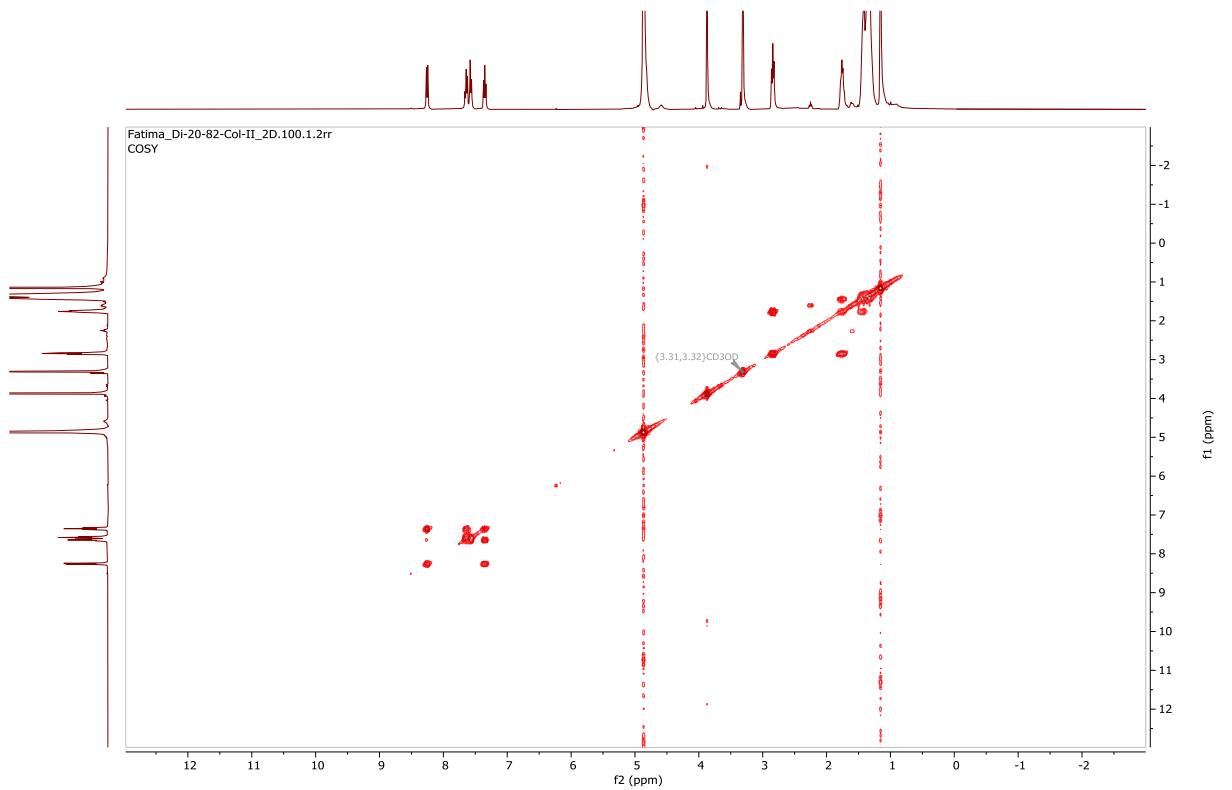
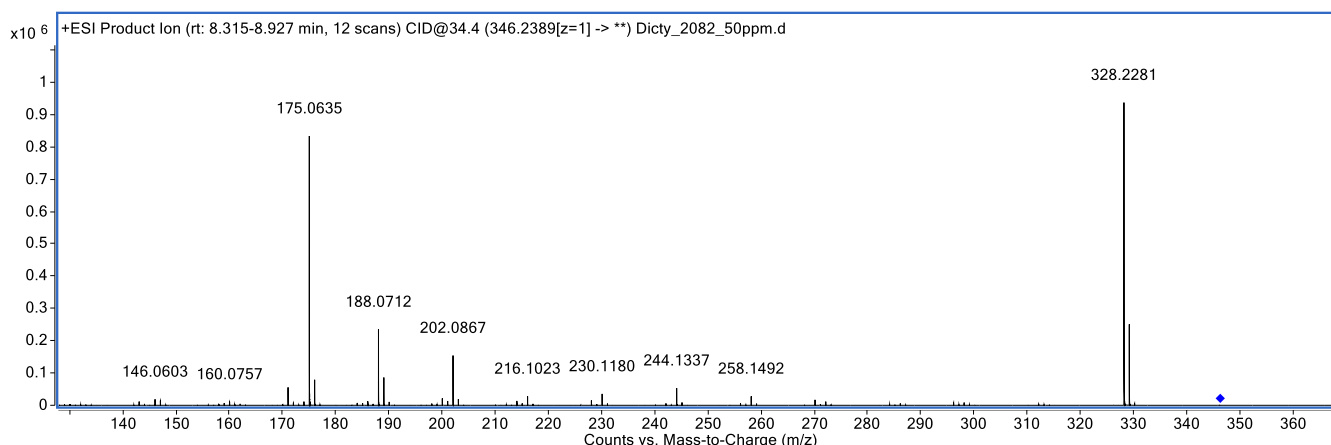


Figura 38. Correlações de longo alcance $^2\text{JCH}/^3\text{JCH}$ identificadas no mapa de contorno HMBC da substância 1.**Figura 39.** Correlações escalares entre prótons no espectro COSY da substância 1.

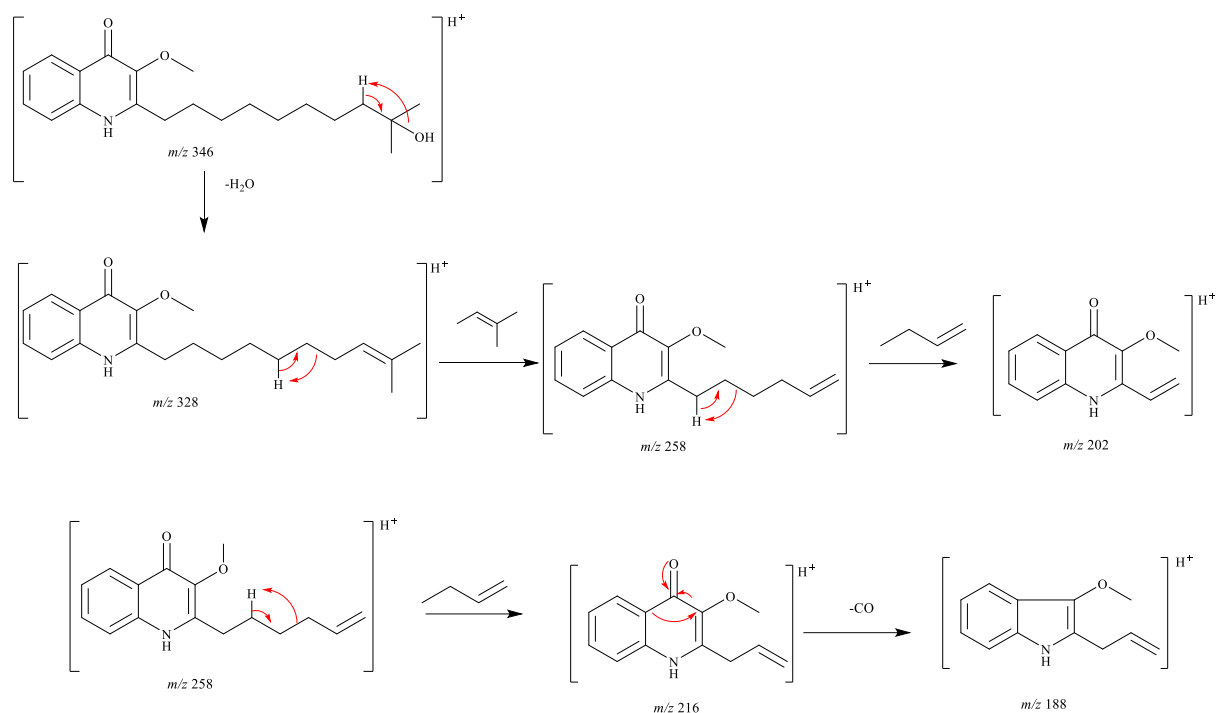
A elucidação estrutural da substância foi corroborada não apenas pelos dados de RMN uni e bidimensionais, mas também pelas análises de espectrometria de massas do tipo tandem (MS/MS), que reforçaram a presença de grupos funcionais específicos e o arranjo da cadeia lateral alifática. O íon precursor observado em m/z 346,2381 na Figura 40 abaixo corresponde ao pseudomolecular $[M+H]^+$ da estrutura atribuída à substância, confirmando a massa molecular esperada para o alcaloide do tipo 4-quinolona funcionalizado com uma cadeia 9'-hidroxi-9'-metildecil.

Figura 40. Espectro de dissociação do íon precursor m/z 346,2381 obtido por MS/MS em modo ESI positivo



A primeira fragmentação significativa, com formação do íon fragmento m/z 328, resulta da eliminação de uma molécula de água (18 Da), consistente com a presença do grupo terminal hidroxila na cadeia lateral. A perda de H_2O e a formação de uma dupla ligação no carbono terciário geram uma estrutura insaturada estabilizada, evidenciando um processo de desidratação comum nesse tipo de alcaloide, conforme observado na Figura 41, a seguir.

Figura 41. Mecanismo proposto de fragmentação para o íon m/z 346, destacando as perdas sequenciais e os íons característicos.



Fonte: Autoria Própria (2025)

Na sequência, a fragmentação do íon em m/z 328 conduz ao pico de m/z 258, decorrente da quebra da extremidade da cadeia alifática com liberação de um fragmento isopropenílico (C_3H_6). Essa quebra é favorecida pela estabilidade da nova dupla ligação formada, e o pico correspondente apresenta intensidade considerável no espectro, sustentando essa via fragmentária.

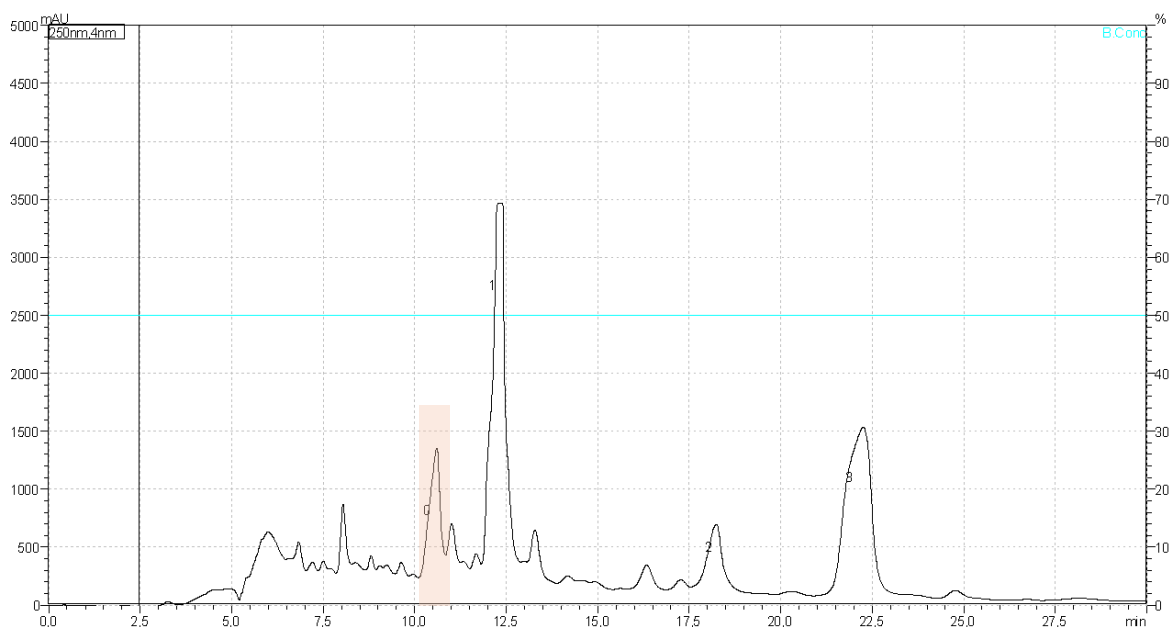
A possibilidade de uma fragmentação contínua e direta com a geração do íon m/z 202, atribuída à perda subsequente de um grupo butilênico (C_4H_8) da porção restante da cadeia. A formação deste fragmento revela um padrão de quebra alifática progressiva, que preserva o núcleo quinolônico conjugado, sugerindo a resistência da porção aromática frente à colisão induzida por dissociação.

Abaixo, seguindo em outra via observando o pico em m/z 216, provavelmente derivado de uma quebra alternativa da cadeia lateral ainda insaturada, enquanto o fragmento de m/z 188 é resultante da remoção completa da cadeia lateral alifática, deixando apenas o esqueleto da quinolona funcionalizada, indicando a estabilidade do núcleo aromático-metoxilado e sua resistência à fragmentação sob energia moderada.

Esses dados de espectrometria de massas, quando analisados em conjunto com as correlações HMBC, HSQC e COSY obtidas por RMN, fortalecem a proposta estrutural e confirmam a identidade do composto isolado. A coerência entre os fragmentos observados e os caminhos de dissociação propostos validam a caracterização como um derivado de 4-oxoquinolina com substituinte alifático ramificado em C-2 e grupo metoxi em C-3.

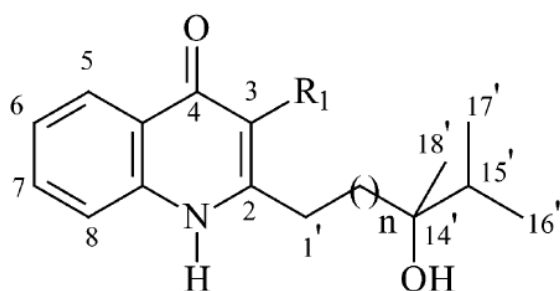
A segunda substância caracterizada neste estudo, foi coletada na mesma fração SPE_1, identificada no cromatograma abaixo com o número 0 e destacado em laranja. A elucidação estrutural do composto isolado foi realizada com base na análise detalhada dos dados espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais (^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, COSY, HSQC e HMBC).

Figura 42. Cromatograma indicando a posição da segunda substância isolada para caracterização por RMN, destacada em laranja.



A análise espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do composto isolado indicou fortemente tratar-se de uma 2-(14'-hidroxi-14',15'-dimetil-hexadecil)-4-quinolona, estrutura análoga à descrita por Sartor *et al.* (2003) como composto 1 ($R_1 = \text{H}$), observado na Figura 43 a seguir, cuja identidade foi confirmada pela correlação entre os sinais nos espectros uni e bidimensionais.

Figura 43. Composto 1 identificado no estudo de Sartor e colaboradores



$$n = 12$$

$$1: R_1 = H$$

$$4: R_1 = OMe$$

Fonte: Sartor *et al.* (2003)

No espectro de RMN de 1H (Figura 44, pág. 77), foram observados quatro sinais no intervalo de δ_H 7,40 - 8,21 ppm, consistentes com o padrão de acoplamento de um sistema aromático 1,2-dissubstituído, típico da porção A do núcleo quinolônico: δ 8,21 (*dd*, H-5), 7,70 (*ddd*, H-6), 7,60 (*d*, H-8) e 7,40 ppm (*t*, H-7). A presença do hidrogênio vinílico do sistema 4(1H)-quinolona foi evidenciada por um singlete em δ 6,24 ppm, atribuído ao H-3, confirmando a ausência de um grupo metoxila em C-3. Essa característica é diagnóstica da ausência de substituição nessa posição, distinguindo-o de compostos metoxilados, como o composto 4.

Na região alifática, destaca-se um sinal tripletado em δ 2,73 ppm (H-1'), típico de um metileno ao carbono C-2 do sistema carbonílico α,β -insaturado. A sequência da cadeia é sustentada por múltiplos sinais de metilenos no intervalo de δ 1,85 a 2,27 ppm, e pela presença de um grupo isopropila terminal, caracterizado por um quarteto (δ 1,76 ppm, H-15') acoplado a dois dupletos (δ 1,08 e 1,15 ppm, Me-16' e Me-17'). O grupo (Me-18') aparece como um singlete em δ 1,62 ppm. A presença de um grupo hidroxila ligado a um carbono terciário é sustentada por essa região química e confirmada no espectro de RMN ^{13}C (Figura 45, pág. 78) por um sinal característico em δ_C 82,2 ppm (C-14').

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais consistentes com a estrutura proposta, incluindo o carbono C-2 em δ 154,3 ppm, C-3 em 108,5 ppm e o carbono carbonílico C-4 em 179,1 ppm. Os demais sinais aromáticos aparecem entre δ 125,7 e 140,3 ppm. A cadeia alifática revelou os sinais esperados para os carbonos metilênicos (δ 23,3–34,3 ppm), bem como os carbonos dos grupos metila terminais (δ 19,0 e 26,1 ppm), isopropila (δ 35,0 ppm) e hidroxila terciária (δ 82,2 ppm)

Figura 44. Espectro de Hidrogênio para a substância isolada (0), experimento realizado em MeOD obtido em Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear 400 MHz.

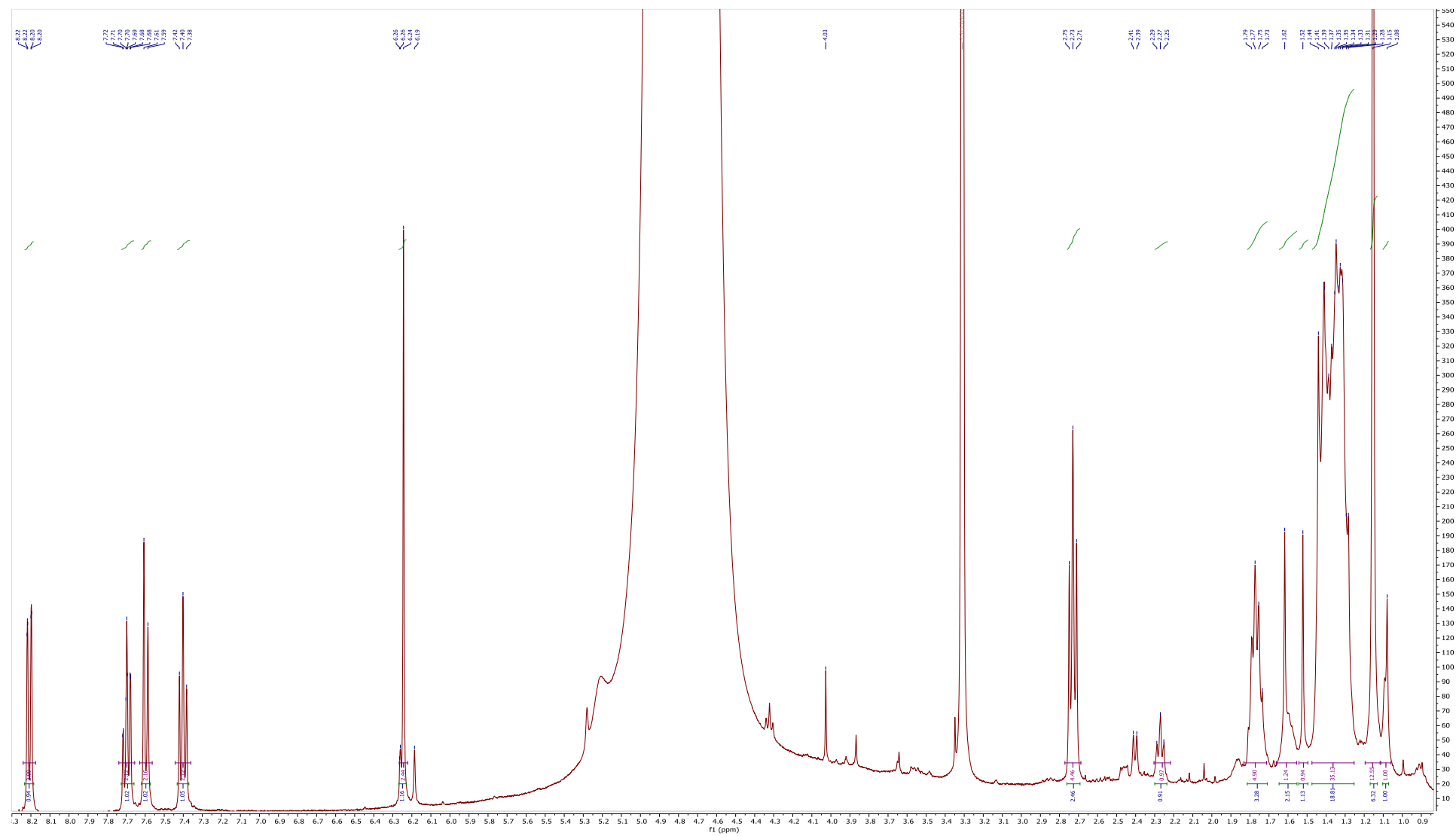
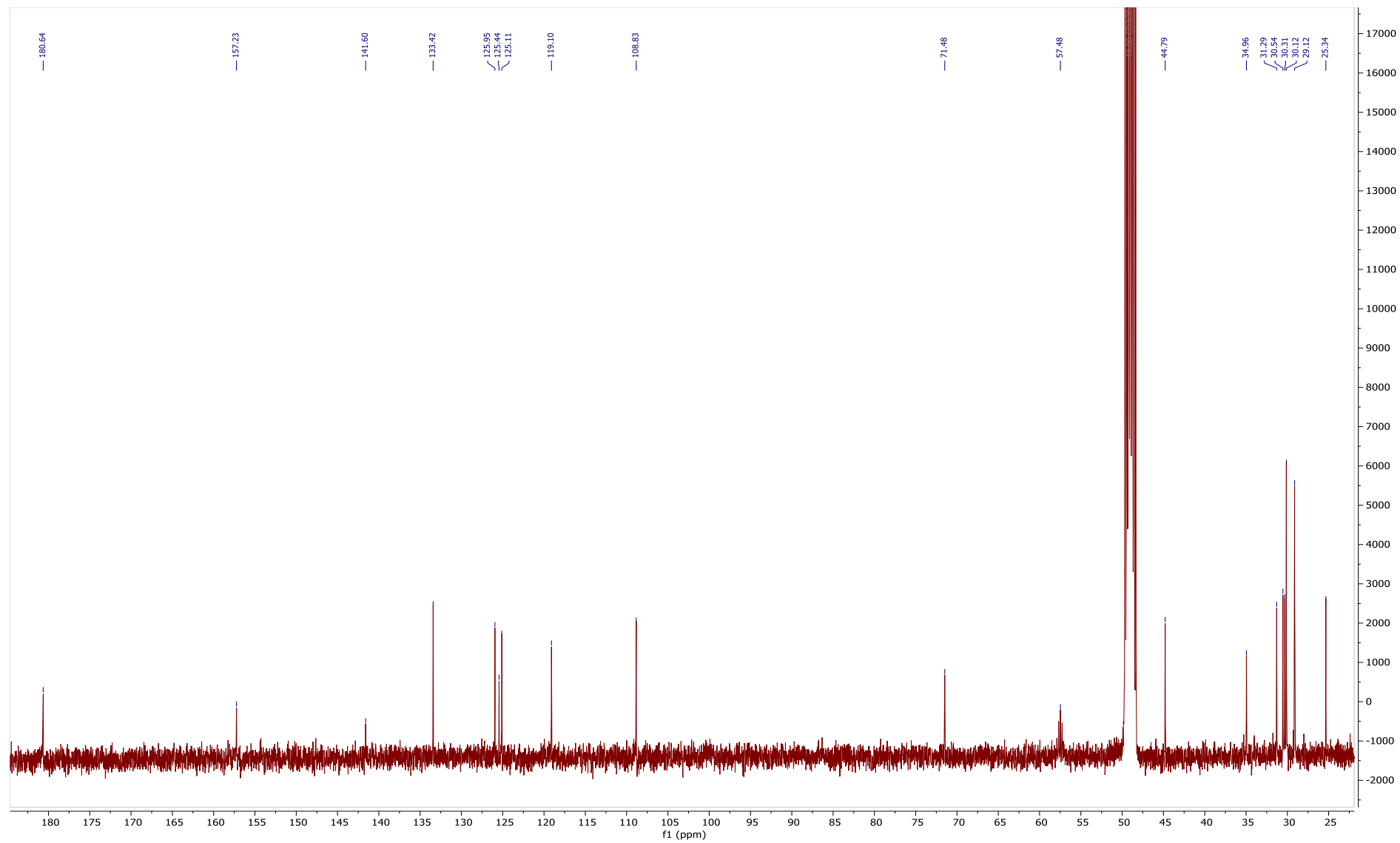


Figura 45. Espectro de Carbono para a substância isolada (0)



As correlações do espectro de COSY (Figura 47, pág. 80) mostraram acoplamentos claros entre os hidrogênios do sistema aromático, e também entre H-15' e as metilas Me-16'/17', além das correlações esperadas ao longo da cadeia alifática. O mapa de contorno HSQC (Figura 48, pág. 81) confirmou as atribuições dos hidrogênios aos respectivos carbonos, incluindo a conexão direta entre H-3 (δ 6,24 ppm) e C-3 (δ 108,5 ppm), além de Me-18' com C-18' (δ 26,1 ppm).

Por fim, o mapa de correlação de HMBC (Figura 49, pág. 81) foi decisivo para confirmar a posição da cadeia alifática no C-2 do anel quinolônico, evidenciado pela correlação de H-1' com C-2, além de correlações entre os hidrogênios da isopropila e o carbono terciário C-14'. Tais dados, em conjunto, permitiram confirmar a identidade do composto como sendo a 2-(14'-hidroxi-14',15'-dimetil-hexadecil)-4-quinolona. Abaixo, na Figura 46, podem ser observadas as principais correlações COSY (\leftrightarrow) e HMBC (\rightarrow) observadas nos experimentos

Figura 46. Correlações HMBC (\rightarrow) e COSY (\leftrightarrow) observadas nos experimentos

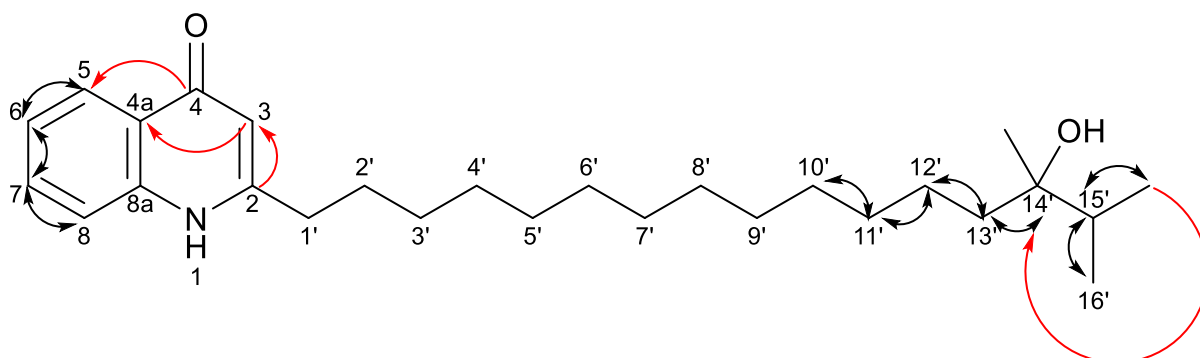


Tabela 6. Dados de RMN – 2-(14'-hydroxy-14',15'-dimethylhexadecyl)-4-quinolone

Sinal (δ , ppm)	Atribuição
8.21 (dd)	H-5 (aromático)
7.70 (ddd)	H-6
7.60 (d)	H-8
7.40 (t)	H-7
6.24 (s)	H-3 (vinílico da quinolona)
2.73 (t)	H-10' (α ao anel)
2.27 (t)	H-11'
1.76 (q)	H-15' (isopropil)
1.62 (s)	Me-18' (CH ₃ em C terciário)
1.15 (s)	Me-16' (CH ₃ do isopropil)
1.08 (s)	Me-17' (CH ₃ do isopropil)
1.85 (m)	Parte da cadeia alifática
82.2 (C)	C-14' (C terciário ligado a OH e Me)
26.1 (CH ₃)	C-18'
35.0 (CH)	C-15'
19.0 (2 \times CH ₃)	C-16'/17'
40.1 (CH ₂)	C-13' (α -OH)
23.3 (CH ₂)	C-11'

34.3 (CH ₂)	C-10' (α -quinolona)
157.3 (C-2)	C-2
108.5 (C-3)	C-3
179.1 (C-4)	C-4
125.7–140.3 (aromáticos)	C-5 a C-8a (aromático)

Fonte: Autoria Própria (2025)

Figura 47. Espectro bidimensional COSY para a substância (0)

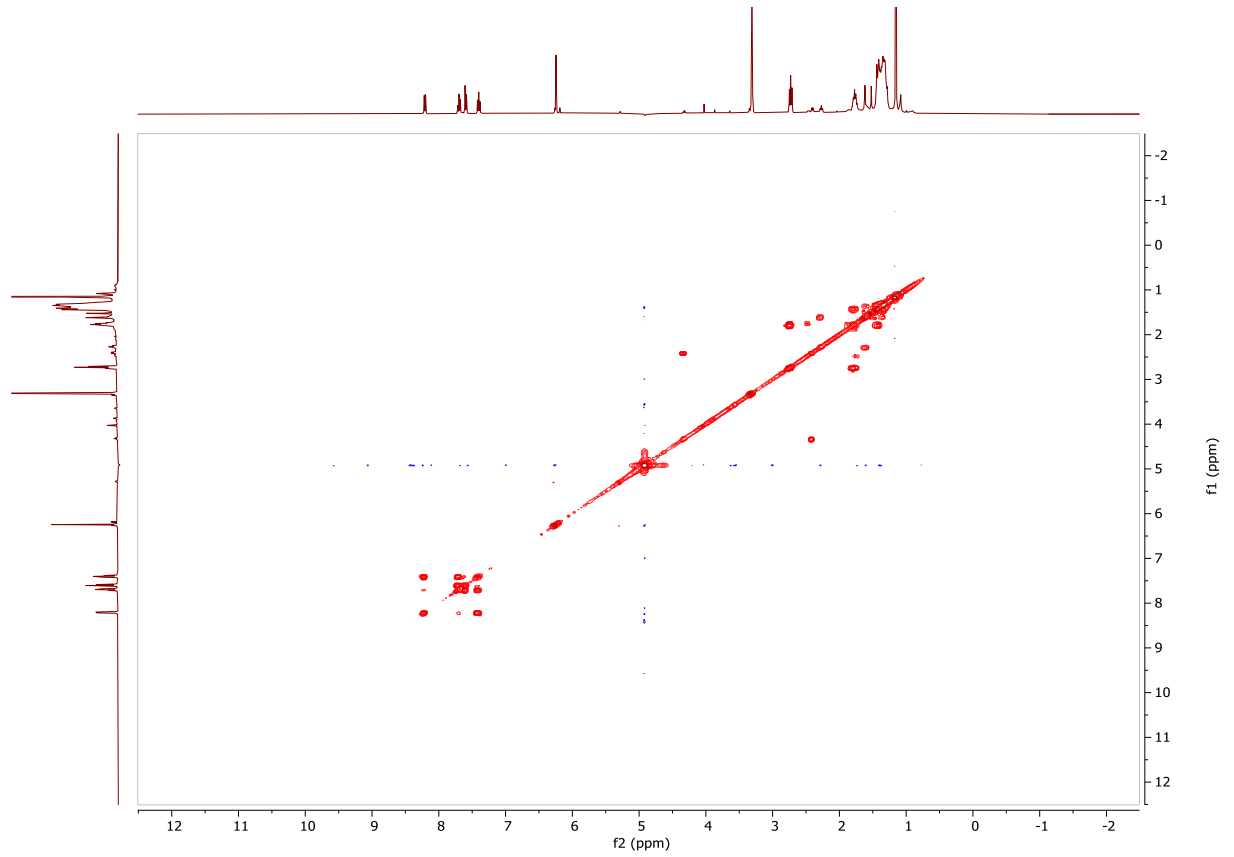
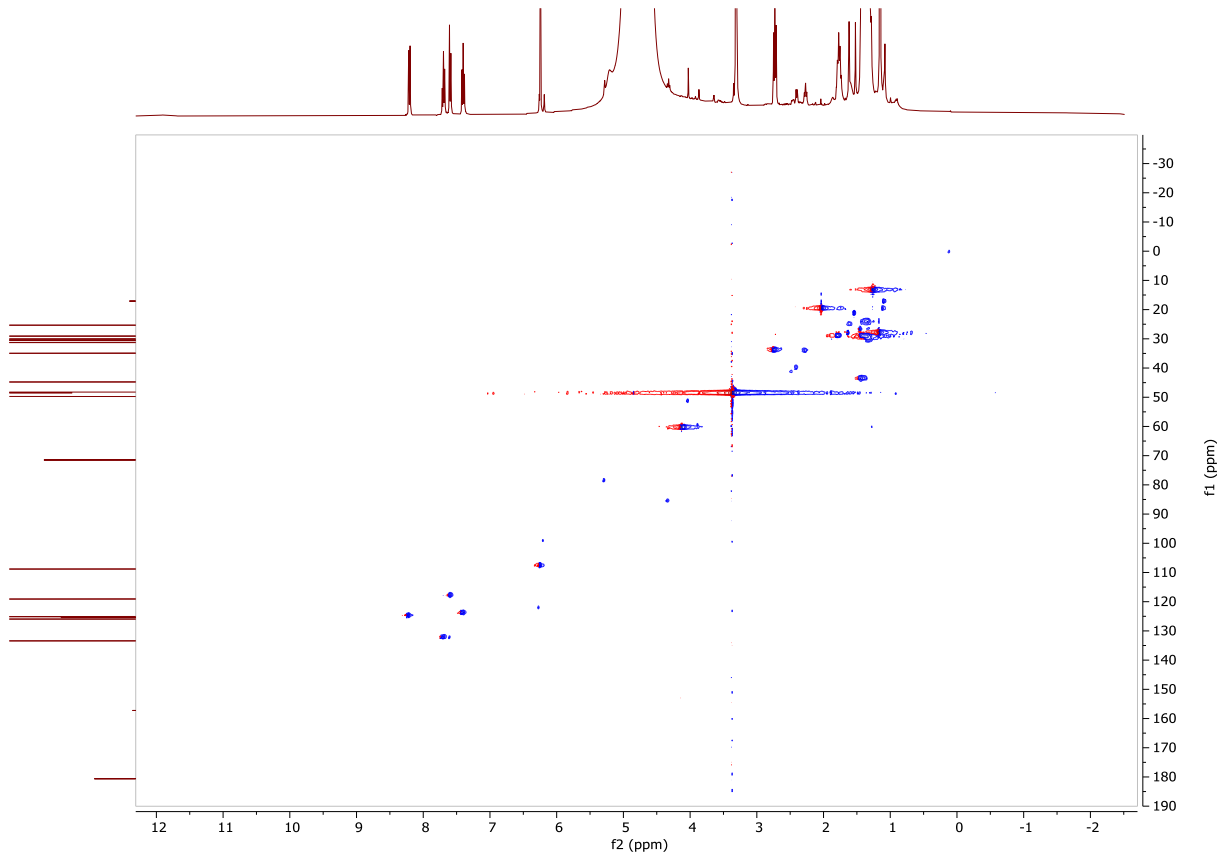
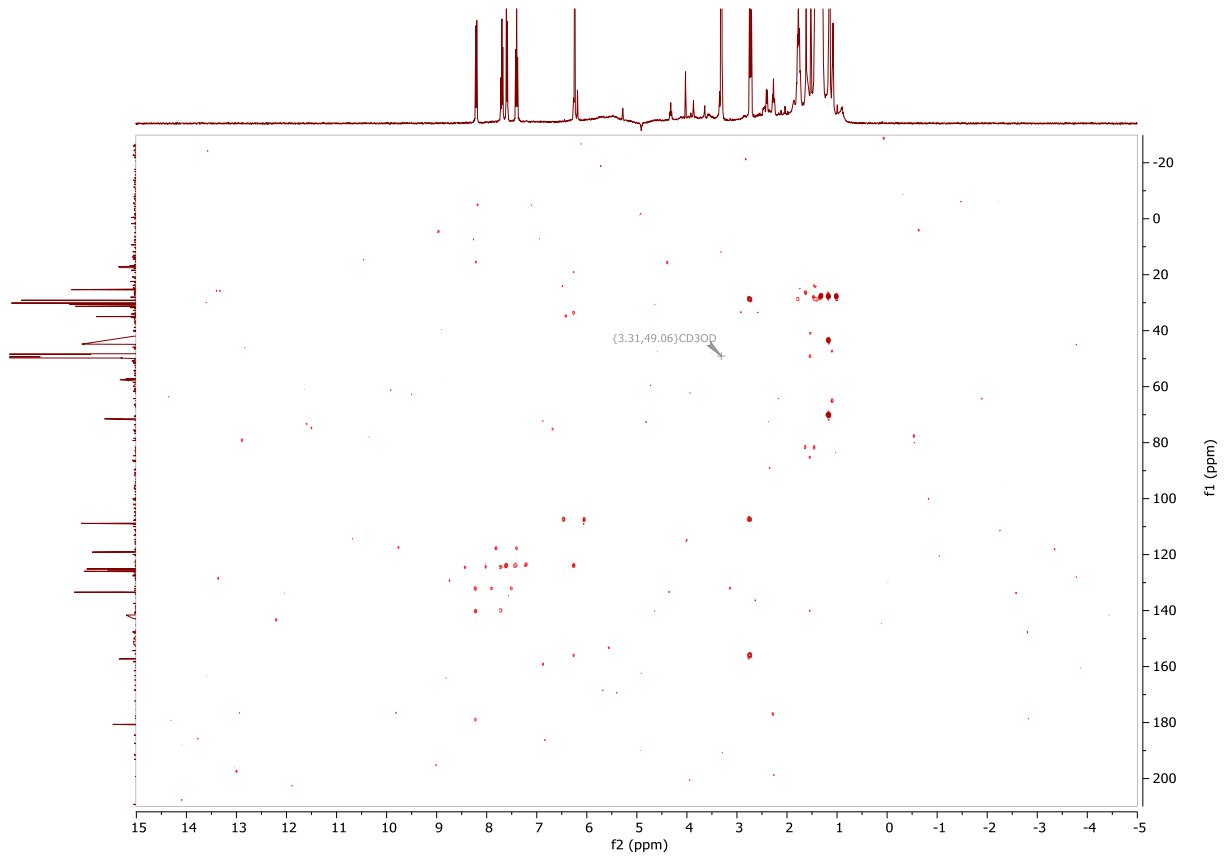
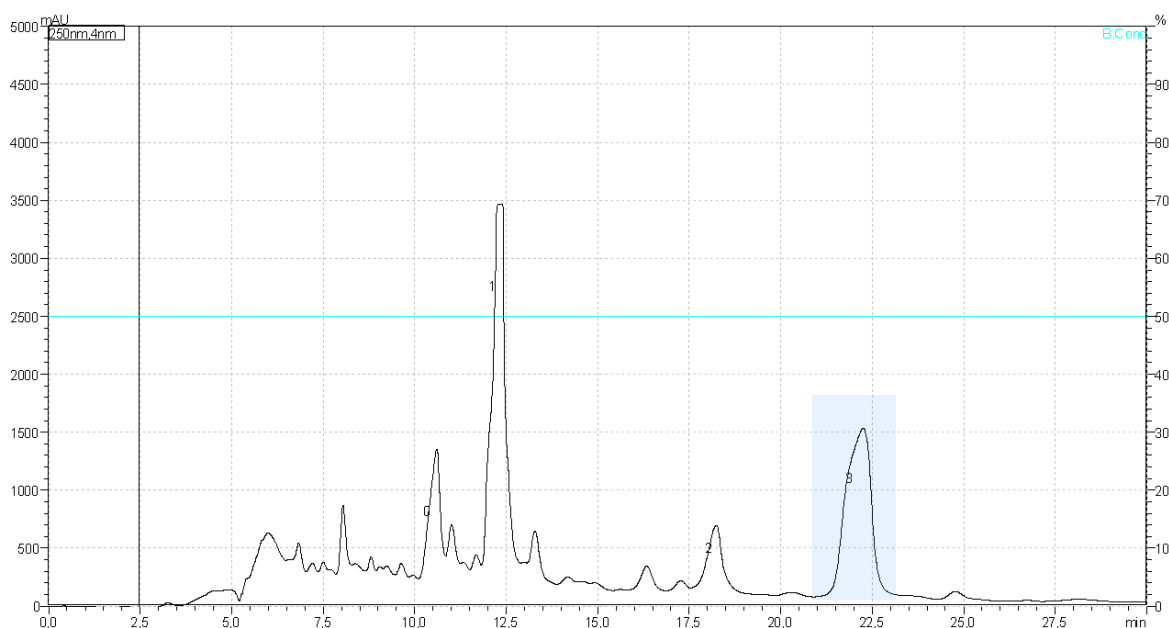


Figura 48. Mapa de Contorno HSQC para a substância (0)**Figura 49.** Mapa de correlação HMBC para a substância (0)

A terceira caracterização corresponde a coleta da substância IV, identificada como número 3 no cromatograma abaixo e destacada em azul.

Figura 50. Coleta IV da fração SPE_1



Esta substância, diferentemente das outras foi elucidada cruzando dados de RMN unidimensional (^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$) com os dados obtidos por UHPLC-QTOF-MS/MS. A elucidação estrutural do composto isolado baseou-se na integração dos dados de espectroscopia de RMN unidimensional (^1H e ^{13}C) com o padrão de fragmentação observado por espectrometria de massas em tandem (MS/MS), permitindo confirmar de forma robusta a identidade da substância como uma 2-(14'-hidroxi-14',15'-dimetil-hexadecil)-3-metoxi-4-quinolona.

Tabela 7. Atribuição dos Sinais de RMN e Validação Estrutural por MS/MS

Átomo	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Observações
OMe	3,80 (s)	60	Grupo metoxila no C-3
H-5	8,22 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz, 1H)	132,6	Aromático
H-6	7,61 (<i>t</i> , $J = 7,6$ Hz, 1H)	128–135	Aromáticos
H-7	7,53 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz, 1H)	118,8	Aromático
H-8	7,32 (<i>t</i> , $J = 7,6$ Hz, 1H)	124,4	Aromático
H-1'	2,80 (<i>brt</i> , $J = 7,8$ Hz, 2H)	40	Ligado ao C-2
H-2'	1,72 (m)	34	Metileno da cadeia
Me-16' / Me-17'	1,08 / 0,89 (s)	22 / 23	CH_3 do isopropil
Me-18'	1,25 (s)	26	CH_3 isolado (C-14')
C-4	—	174,3	Carbonila da quinolona
C-2	—	149,5	Ligado à cadeia lateral

Fonte: Autoria Própria (2025)

No espectro de RMN ^1H (Figura 53, pág. 86), observou-se um sinal δ 3,80 ppm integrando para 3H, sugerindo uma metoxila. A presença do grupo metoxila no C-3 é uma informação crucial para distinção estrutural da quinolona, pois permite diferenciá-la de análogos não metoxilados que apresentam padrões de fragmentação distintos

A região aromática revelou um sistema do tipo ABCD, com quatro sinais entre δ 8,22 e 7,32 ppm, típicos dos prótons do anel benzênico da quinolona. Os sinais para os hidrogênios H-5, H-6, H-7 e H-8, são similares aos relatados para as estruturas anteriores, indicando um anel aromático 1,2-dissubstituído. Os respectivos carbonos aromáticos aparecem no espectro de RMN ^{13}C (Figura 54, pág. 87) entre δ_{C} 112 e 135, enquanto a carbonila α,β -insaturada do anel quinolônico (C-4) possui um sinal intenso em δ_{C} 174,3

Na região alifática do espectro de ^1H , os sinais de δ_{H} 2,80 e 1,72 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-1' e H-2', respectivamente, indicando o início da longa cadeia lateral saturada. Essa cadeia se estende até um sistema isopropílico terminal, cujo sinal em δ_{H} 1,12 (s, 6H) corresponde as duas metilas (Me-16' e Me-17'). O sinal no espectro de RMN de ^{13}C em δ_{C} 71,4 sugere um carbono oxigenado. A eliminação de H_2O no espectro de MS/MS (Figura 51, pág. 84) corrobora para a presença do grupo hidroxila.

A análise por espectrometria de massas em tandem (MS/MS), obtida a partir do precursor $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 360, revelou uma série de fragmentos que corroboram fortemente a estrutura proposta. A primeira fragmentação observada gerou um íon de m/z 342, correspondente à eliminação de uma molécula de água (18 Da).

Um fragmento de grande relevância, observado em m/z 175, resulta da quebra da ligação entre o anel e a cadeia lateral, com perda de um grupo alquila extenso ($\text{C}_{11}\text{H}_{21}$). Este fragmento corresponde ao núcleo quinolona intacto, validando a presença do anel quinolônico. Adicionalmente, o fragmento de m/z 188 resulta de uma quebra posterior ao C-3 e está associado à presença da metoxilação neste carbono. Esse fragmento aparece em diversas rotas de fragmentação propostas no mecanismo e é consistente com a presença de uma 3-metoxi-quinolona, reforçando a atribuição feita com base no RMN ^1H e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$.

Outros fragmentos observados, como m/z 244, 216 e 202, decorrem da perda sequencial de segmentos da cadeia alifática, incluindo grupos etila e propila. A existência de fragmentos em m/z 326, 312 e 258 demonstra o desprendimento gradual de fragmentos da extremidade da cadeia e indica a alta estabilidade do núcleo aromático quinolônico, além de

reforçar a posição da substituição no C-2. A rota de fragmentação com geração do íon m/z 216, por exemplo, envolve a perda de C_2H_4 e posterior rearranjo com eliminação de CO , o que reafirma a localização da carbonila e a extensão do sistema aromático estabilizado.

Portanto, a integração dos dados espectrais de RMN e MS/MS, incluindo o reconhecimento de fragmentos diagnósticos e a consistência química das rotas de fragmentação, permite confirmar a estrutura como sendo a 2-(14'-hidroxi-14',15'-dimetil-hexadecil)-3-metoxi-4-quinolona. A presença dos fragmentos m/z 342 (por perda de água), m/z 188 (indicando grupo metoxila), e m/z 175 (núcleo aromático intacto) são evidências críticas que validam a proposta estrutural com elevado grau de confiança.

Figura 51. Cromatograma do íon extraído m/z 360

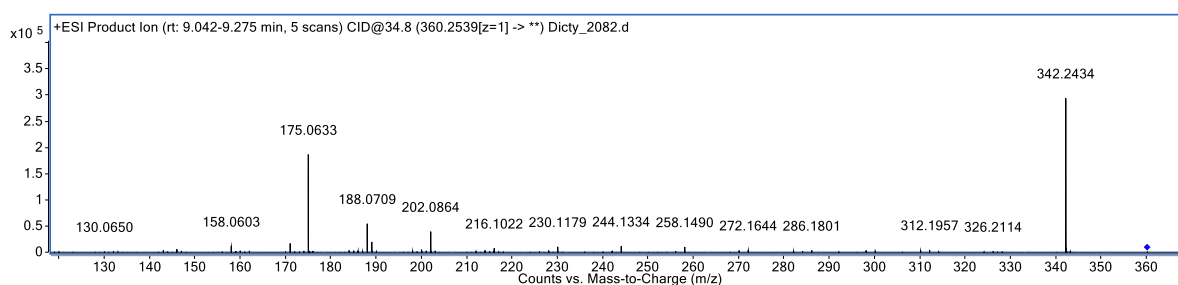


Figura 52. Proposta de fragmentação baseada em dados de UHPLC-QTOF-MS/MS para a substância (3)

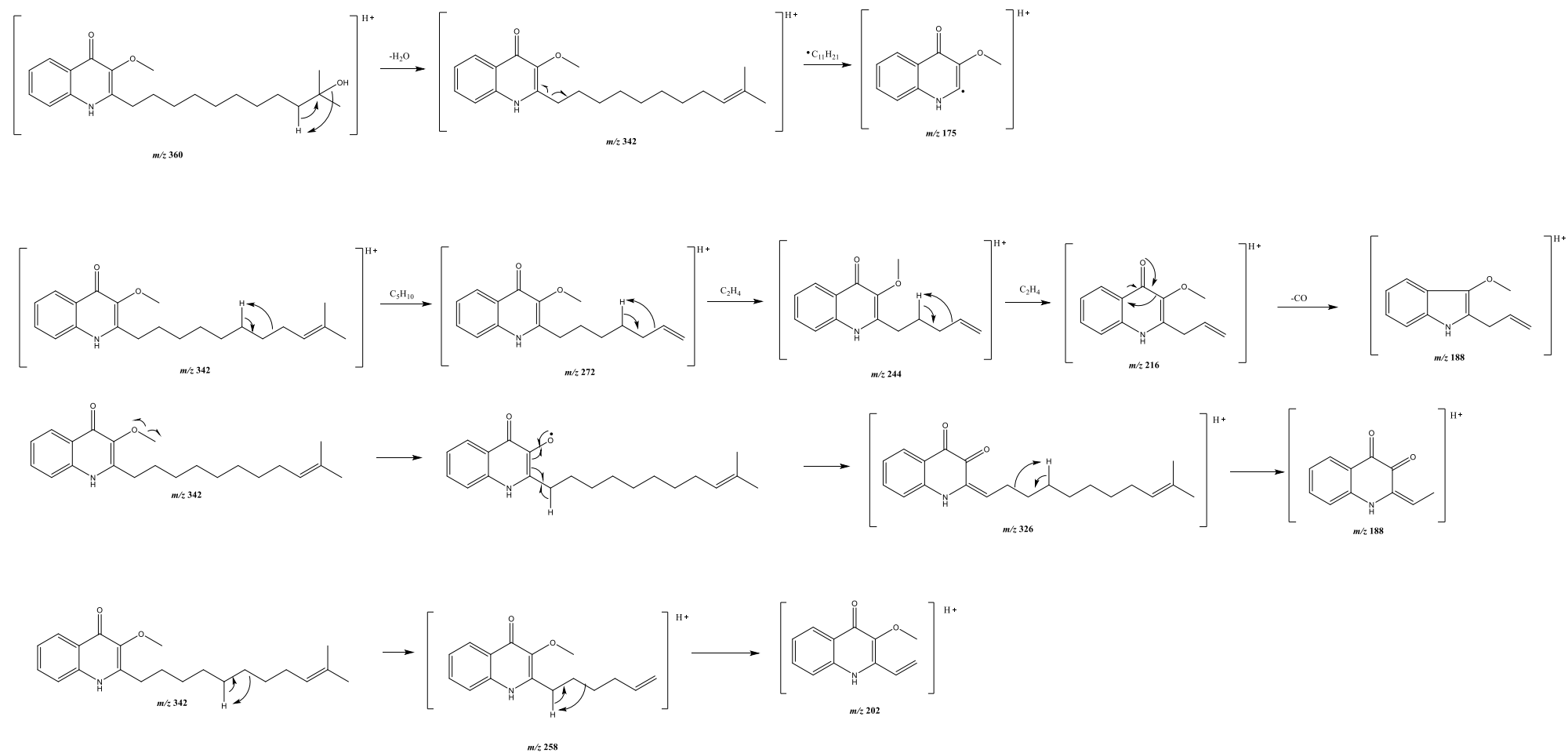


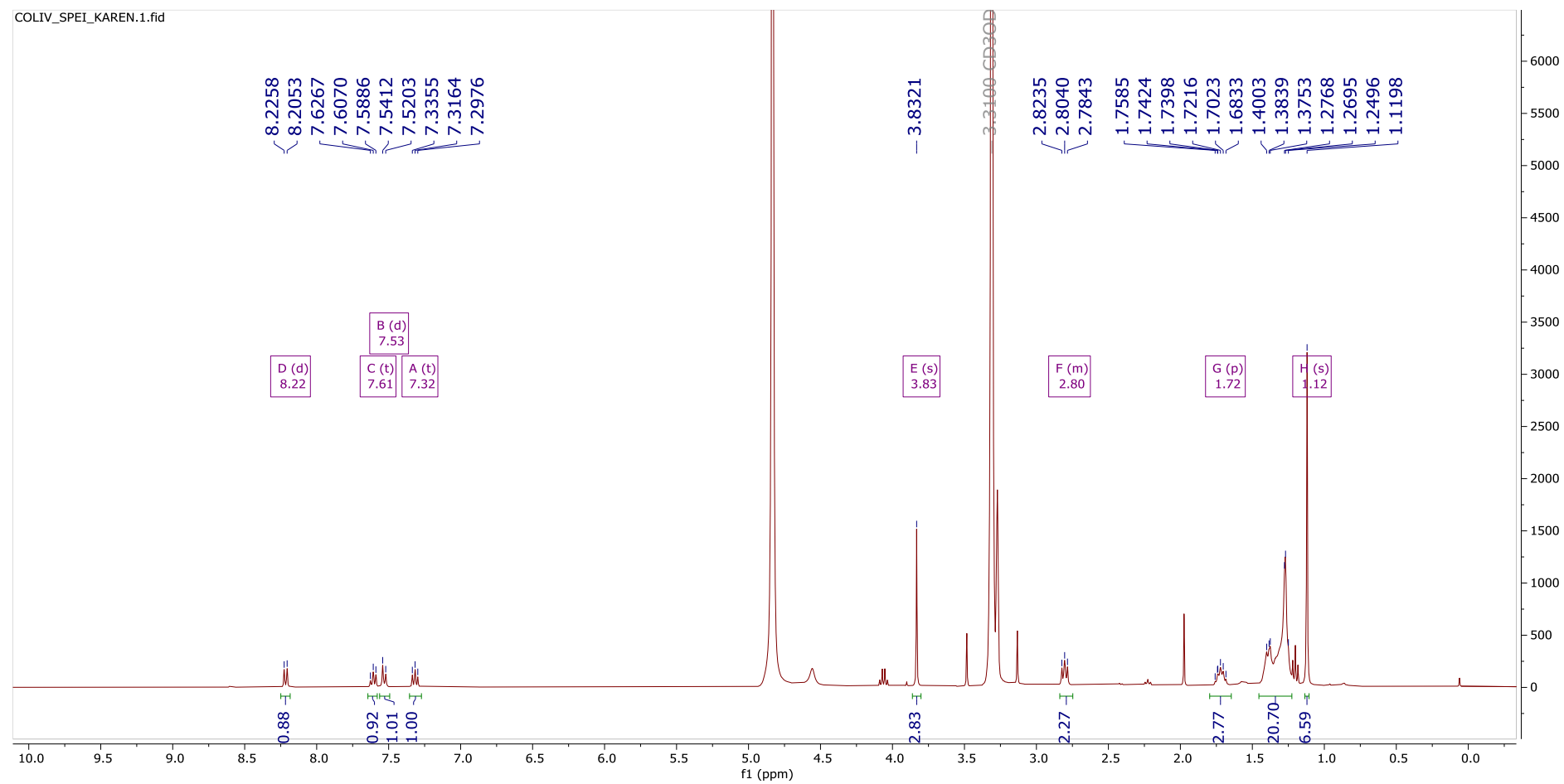
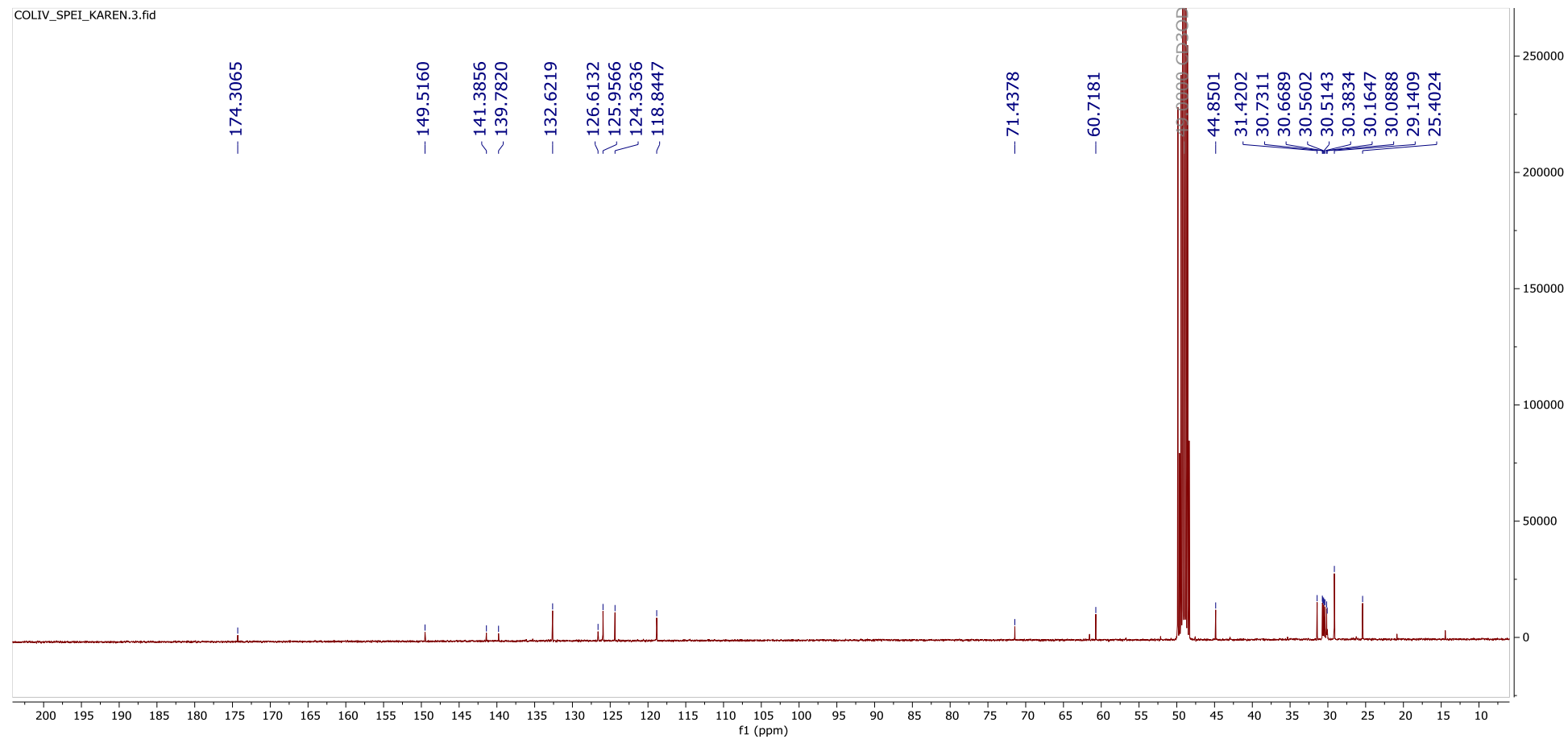
Figura 53. Espectro de Hidrogênio para a Coleta IV [Substância (3)]

Figura 54. Espectro de Carbono para a Coleta IV [Substância (3)]

5.5 Resultados de Atividade Bacteriana e *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*

A avaliação da atividade bacteriana dos extratos brutos de *Dictyoloma vandellianum* foi conduzida frente à cepa de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, utilizando o ensaio de microdiluição em placas de 96 poços com resazurina como indicador de viabilidade. Este corante permite distinguir entre poços com crescimento bacteriano (cor rosa) e poços onde houve inibição do crescimento (cor azul/violeta), possibilitando a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) dos extratos, conforme descrito nos procedimentos metodológicos da seção 4.6.

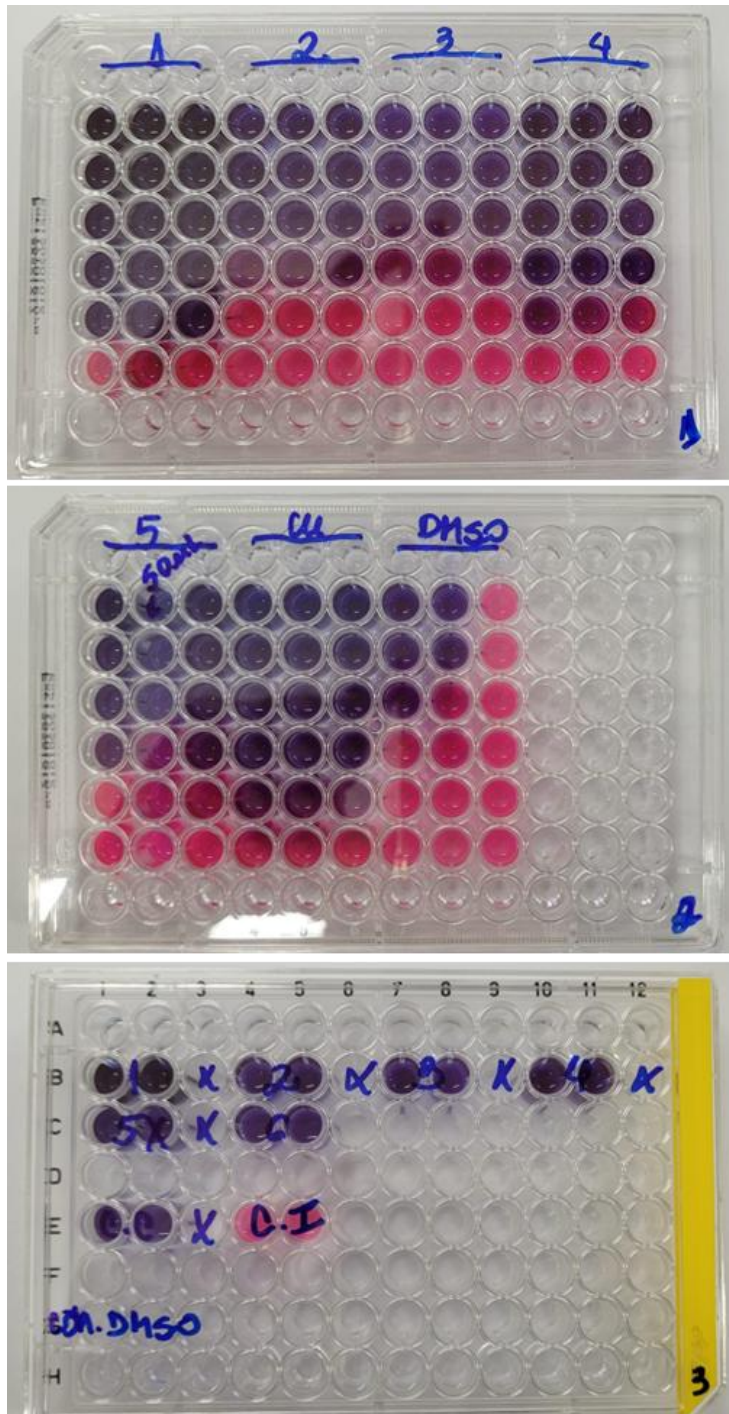
Foram testados os extratos brutos de folhas, frutos, casca dos frutos, galhos finos e caule, em concentrações variando de 1000 a 7,8 µg/mL, distribuídas em diluições seriadas decrescentes. Os experimentos foram realizados em triplicata, conforme registrado na Tabela 4, com controles apropriados incluídos nas placas: DMSO (controle de solvente) e sulfato de cobre pentahidratado (controle positivo). A Placa 3 foi dedicada aos controles do meio de cultivo e do inóculo.

Tabela 8. Concentrações Mínimas Inibitórias (MIC) dos Extratos Brutos de *Dictyoloma vandellianum* Frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

MIC µG/ML			
Extratos	Triplícatas		
	1°	2°	3°
1 – Folhas	125	125	125
2 - Frutos	500	500	500
3 – Casca do Fruto	500	500	500
4 – Galhos finos	250	250	250
5 – Caule	250	250	250
DMSO	1000	1000	1000
Cu	250	250	250

Fonte: Autoria própria (2025)

Figura 55. Análise da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos de *Dictyoloma vandellianum* Frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por Microdiluição em Placa



Legenda: Imagens das placas de 96 poços utilizadas no ensaio de microdiluição para determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos extratos brutos de folhas (1), frutos (2), casca do fruto (3), galhos finos (4) e caule (5) de *D. vandellianum*. As placas 1 e 2 representam as triplicatas dos extratos testados (numerações indicadas na parte superior) e controles positivos: sulfato de cobre pentahidratado (Cu) e DMSO (controle de solvente). A placa 3 apresenta os controles experimentais: controle do inóculo (CI), do meio de cultura (caldo nutriente) e dos extratos. A viragem de cor de roxo para rosa indica crescimento bacteriano, permitindo a determinação visual da MIC como a menor concentração na qual não ocorre mudança de cor.

Fonte: Autoria própria (2025)

Conforme os resultados demonstrados na Tabela 4 e na Figura 26, acima, o extrato de folhas apresentou a melhor atividade frente à *X. citri*, com MIC de 125 µg/mL em todas as repetições. Os extratos de frutos e casca de frutos apresentaram MIC de 500 µg/mL, sugerindo menor atividade. O extrato de galhos finos apresentou MIC intermediária de 250 µg/mL, assim como o extrato de caule, que oscilou entre 250 e 500 µg/mL entre as repetições.

O controle de solvente (DMSO) apresentou MIC de 1000 µg/mL, indicando ausência de atividade relevante sobre a bactéria e confirmando que os efeitos observados são atribuíveis aos metabólitos presentes nos extratos. O controle positivo com sulfato de cobre (CU) apresentou MIC consistente de 250 µg/mL, validando o ensaio.

A análise visual das placas reforça os dados obtidos: a Placa 1 concentra os extratos de 1 a 4 (folhas a galhos), e a Placa 2 inclui o extrato de caule (nº 5), além dos controles Cu (cobre) e DMSO. Já a Placa 3 apresenta os controles de crescimento e inóculo, demonstrando a viabilidade do sistema experimental.

Os resultados obtidos apontam para a presença de metabólitos com potencial atividade bactericida no extrato de folhas, especialmente alcaloides oxigenados ou outros compostos nitrogenados, frequentemente descritos como ativos contra bactérias gram-negativas. Esse desempenho justifica a escolha do extrato foliar como matriz prioritária para o fracionamento via SPE e posterior isolamento e identificação estrutural dos compostos majoritários bioativos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como foco a investigação fitoquímica de *Dictyoloma vandellianum*, com o objetivo de caracterizar compostos bioativos com potencial aplicação no controle do cancro cítrico, doença causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e considerada uma das principais ameaças à citricultura. Todos os objetivos propostos foram plenamente alcançados. A obtenção dos extratos brutos a partir das folhas secas da planta foi realizada com sucesso, utilizando solventes de polaridades distintas. A análise inicial do perfil químico por HPLC-PDA permitiu avaliar a complexidade e diversidade dos constituintes presentes nos extratos, servindo como base para a etapa posterior de prospecção e anotação molecular.

As análises por UHPLC-QTOF-MS/MS, realizadas nos modos positivo e negativo, associadas ao processamento de dados por plataformas metabolômicas como MS-DIAL, MS-FINDER e GNPS, revelaram uma grande diversidade de metabólitos secundários. A construção de redes moleculares contribuiu para a organização dos dados em agrupamentos com similaridade estrutural, destacando-se a presença de compostos pertencentes às classes dos flavonoides, alcaloides, quinolonas e cumarinas. Essas observações corroboram dados já relatados na literatura sobre espécies da família Rutaceae, à qual *D. vandellianum* pertence.

Dentre os compostos detectados, três substâncias foram isoladas e submetidas a elucidação estrutural detalhada por meio de espectroscopia de RMN unidimensional e bidimensional (^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, HSQC, HMBC e COSY), com validação cruzada pelas rotas de fragmentação observadas em espectrometria de massas de alta resolução. Nenhum dos compostos isolados é inédito, sendo todos compatíveis com estruturas já descritas anteriormente em estudos fitoquímicos envolvendo a espécie. No entanto, a redetecção dessas substâncias em diferentes frações, associada à confirmação estrutural por técnicas modernas, reforça a fidelidade metodológica adotada e valida a abordagem integrada utilizada na identificação de constituintes em matrizes vegetais complexas.

A presença confirmada de derivados de quinolonas, classe de compostos amplamente conhecida por seu potencial antimicrobiano, é especialmente relevante frente ao objetivo aplicado do trabalho. A análise integrada entre os dados espectrais e os mecanismos de fragmentação fortaleceu a robustez dos resultados, conferindo alto grau de confiabilidade às estruturas atribuídas. Além disso, o conjunto de dados obtido fornece uma base valiosa para aprofundamentos futuros, especialmente no tocante à atividade biológica desses compostos frente ao fitopatógeno alvo.

Como perspectiva futura, propõe-se a realização de ensaios microbiológicos com os compostos isolados frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, a fim de avaliar sua eficácia como agentes bactericidas. Ainda, é recomendável a continuidade do fracionamento e da caracterização estrutural dos demais constituintes presentes nos extratos, com especial atenção à investigação de interações sinérgicas entre frações bioativas. Dessa forma, o presente estudo estabelece bases concretas para a pesquisa e o desenvolvimento de novas estratégias fitossanitárias sustentáveis, apoiadas em produtos naturais oriundos da biodiversidade brasileira

REFERÊNCIAS

- ALBARICI, T. R. *et al.* Cumarinas e alcaloides de *Rauia resinosa* (rutaceae). **Química Nova**, [S.L.], v. 33, n. 10, p. 2130-2134, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010001000024>.
- ALBUQUERQUE, B. W. P. de. Revisão Taxonômica das Rutaceae do Estado do Amazonas. **Acta Amazonica**, [S.L.], v. 6, n. 31, p. 5-67, 1976. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1809-43921976063s005>.
- ALVES, I. M. *et al.* Pyranochromones from *Dictyoloma vandellianum* A. Juss and Their Cytotoxic Evaluation. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. e1600276, 16 fev. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600276>.
- AMARAL, J. C. *et al.* Advances in the Biosynthesis of Pyranocoumarins: isolation and 13c-incorporation analysis by high-performance liquid chromatography•ultraviolet•solid-phase extraction•nuclear magnetic resonance data. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 83, n. 5, p. 1409-1415, 6 maio 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00607>.
- BANDARA, B. M. R. *et al.* Acridone alkaloids and coumarins from *Pleiospermium alatum*. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 297-301, jan. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)89054-d](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(90)89054-d).
- BEHLAU, F.. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 1-12, 24 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-020-00377-2>.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 21, de 25 de abril de 2018**. Estabelece critérios e procedimentos para o reconhecimento e a manutenção do status fitossanitário de áreas em relação ao Cancro Cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 25 abr. 2018. Seção 1, p. 12.
- CABRAL, R. S. *et al.* Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 374-380, abr. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000219>.
- CAFEO, G. *et al.* Extraction and Chromatographic Approaches for Coumarin, Furocoumarin, and Polymethoxyflavone Characterization in Foods. **Foods**, [S.L.], v. 13, n. 16, p. 2517, 12 ago. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods13162517>.
- CASSADY, J. M. *et al.* An Investigation of the Antitumor Activity of *Micromelum integerrimum* (Rutaceae). **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 274-278, maio 1979. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np50003a005>.
- CHAMBERS, M. C. *et al.* A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 918-920, out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2377>.
- CHEN, I. *et al.* Chemical Constituents and Biological Activities of the Fruit of *Zanthoxylum integrifoliolum*. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 62, n. 6, p. 833-837, 13 maio 1999. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np980471n>.

- DREYER, D. L.. Chemotaxonomy of the Rutaceae. VII. Alkaloids in *Evodia xanthoxyloides*. **The Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 35, n. 7, p. 2420-2422, jul. 1970. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo00832a074>.
- DUGAN, D. *et al.* Phytochemical Profiling Studies of Alkaloids and Coumarins from the Australian Plant *Geijera parviflora* Lindl. (Rutaceae) and Their Anthelmintic and Antimicrobial Assessment. **Metabolites**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 259, 30 abr. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo14050259>.
- FELISBERTO, P. A. de C. *et al.* Unsuitability of indigenous South American Rutaceae as potential hosts of *Diaphorina citri*. **Pest Management Science**, [S.L.], v. 75, n. 7, p. 1911-1920, 22 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.5304>.
- REFERENCE, C. M. *et al.* Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 1302-1318, 8 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12638>.
- FILHO, D. E. S. *et al.* Compostos químicos isolados de extratos e óleos essenciais do gênero *Zanthoxylum* Linnaeus (Rutaceae) e seu potencial antimicrobiano. **Hoehnea**, [S.L.], v. 47, p. 88, 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-88/2019>.
- FUNDECITRUS. **Cancro Cítrico**. 2024. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro>. Acesso em: 28 dez. 2024.
- GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. *et al.* Cumarinas presentes en especies del género *Casimiroa*. *Revista de la Sociedad Química de México*, v. 47, n. 2, p. 151-154, 2003.
- GARCÍA-BELTRÁN, O. *et al.* Coumarins isolated from *Esenbeckia alata* (Rutaceae). **Biochemical Systematics And Ecology**, [S.L.], v. 52, p. 38-40, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2013.12.011>.
- GOOGLE. **Mapa do Rio Mucurizinho – Nova Viçosa, Bahia, Brasil**. Google Maps. 2024. Disponível em: https://www.google.com.br/maps/place/Rio+Mucurizinho/@-18.0237319,-39.7612187,2040m/data=!3m1!1e3!4m6!3m5!1s0xcabc46a3b3f4f7:0xc896d7470bc4dc0b!8m2!3d-18.0241609!4d-39.7612653!16s%2Fg%2F11bxfyl7dz?entry=ttu&g_ep=EgoyMDI0MTIxMS4wIKXMDSOA SAFQAw%3D%3D Acesso em: 29 dez. 2024
- IKUTA, A.; URABE, H.; NAKAMURA, T.. A New Indolopyridoquinazoline-Type Alkaloid from *Phellodendron amurense* Callus Tissues. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 61, n. 8, p. 1012-1014, 7 jul. 1998. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np970406y>.
- KUMARI, S. *et al.* Prioritization of the Secondary Metabolites for the Rapid Annotation Based on Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Assessment: varanasine and schroffanone from *murraya paniculata* and cytotoxic evaluation. **Journal Of Proteome Research**, [S.L.], v. 23, n. 11, p. 4940-4950, 30 set. 2024. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c00356>.
- LAVAUD, C. *et al.* 4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 317-320, set. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00265-9](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(95)00265-9).
- LI, S. *et al.* Network pharmacology and experimental verification to explore the anti-superficial thrombophlebitis mechanism of Mailuo shutong pill. **Journal Of**

Ethnopharmacology, [S.L.], v. 322, p. 117668, mar. 2024. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2023.117668>.

LI, W. *et al.* Coumarins and Lignans from *Zanthoxylum schinifolium* and Their Anticancer Activities. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 61, n. 45, p. 10730-10740, 4 nov. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf403479c>.

LIU, Y. *et al.* Clausanisumine, a Prenylated Bicarbazole Alkaloid from the Fruits of *Clausena anisum-olens* and Its Potential Anti-HIV Activity. **The Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 86, n. 24, p. 17722-17726, 24 nov. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.1c02020>.

MARTINS, P. M. M. *et al.* *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. **Tropical Plant Pathology**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 213-236, jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-020-00376-3>.

MORAES, V. R. de S. *et al.* Enzymatic inhibition studies of selected flavonoids and chemosystematic significance of polymethoxylated flavonoids and quinoline alkaloids in *Neoraputia* (Rutaceae). **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 380-387, maio 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532003000300007>.

NEBO, L. *et al.* Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. **Phytochemistry Letters**, [S.L.], v. 8, p. 226-232, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2014.02.010>.

OPRETZKA, L. C. F. *et al.* Natural chromones as potential anti-inflammatory agents: pharmacological properties and related mechanisms. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 72, p. 31-39, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.044>.

PACHTER, I. J.; ZACHARIAS, D. E.; RIBEIRO, O.. Indole Alkaloids of *Acer saccharinum* (the Silver Maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrina*, and *Mimosa hostilis*. **The Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 24, n. 9, p. 1285-1287, set. 1959. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo01091a032>.

PIRANI, J. R.. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rutaceae. **Rodriguésia**, [S.L.], v. 56, n. 86, p. 189-204, jan. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2175-78602005568634>.

REFLORA - Herbário Virtual. ***Dictyoloma vandellianum* (4701)**. 2024. Disponível em: <https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=4826319>. Acesso em 29 dez. 2024.

RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C.. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em angiospermae. **Química Nova**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 533-538, jul. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000400004>.

SAMPAIO, O. M. *et al.* Evaluation of Alkaloids Isolated from *Ruta graveolens* as Photosynthesis Inhibitors. **Molecules**, [S.L.], v. 23, n. 10, p. 2693, 19 out. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23102693>.

SARTOR, C. F. P. *et al.* Alkaloids from *Dictyoloma vandellianum*: their chemosystematic significance. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 63, n. 2, p. 185-192, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00006-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00006-2).

- SEVERINO, V. G. P. *et al.* Determination of the antibacterial activity of crude extracts and compounds isolated from *Hortia oreadica* (Rutaceae) against oral pathogens. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 535-540, set. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822009000300015>.
- SHANNON, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 2498-2504, nov. 2003. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1239303>.
- SHOU, Q. *et al.* Parvifloranines A and B, Two 11-Carbon Alkaloids from *Geijera parviflora*. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 76, n. 7, p. 1384-1387, 12 jul. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np400376r>.
- SILVA, M. F. das G. F. da *et al.* Nortriterpenes, chromones, anthraquinones, and their chemosystematics significance in Meliaceae, Rutaceae, and Simaroubaceae (Sapindales). **Brazilian Journal Of Botany**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 15-40, 7 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40415-021-00733-9>.
- SOUSA, J. A. C. *et al.* New flavone, and cytotoxicity activity of *Rauia resinosa* ethanolic extract and constituents. **Natural Product Research**, [S.L.], v. 37, n. 14, p. 2415-2420, 10 fev. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2022.2039138>.
- TEREZAN, A. P. *et al.* Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 882-886, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532010000500016>.
- TSUGAWA, H. *et al.* Hydrogen Rearrangement Rules: computational ms/ms fragmentation and structure elucidation using ms-finder software. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 88, n. 16, p. 7946-7958, 4 ago. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00770>.
- TSUGAWA, H. *et al.* A lipidome atlas in MS-DIAL 4. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 38, n. 10, p. 1159-1163, 15 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-020-0531-2>.
- VIEIRA, P. C. *et al.* The chemosystematics of *Dictyoloma*. **Biochemical Systematics And Ecology**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 541-544, dez. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-1978\(88\)90060-9](http://dx.doi.org/10.1016/0305-1978(88)90060-9).
- VILKICKYTE, G.; RAUDONE, L.. Optimization, Validation and Application of HPLC-PDA Methods for Quantification of Triterpenoids in *Vaccinium vitis-idaea* L. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 1645, 16 mar. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26061645>.
- WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 34, n. 8, p. 828-837, ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3597>.
- WATERMAN, P. G.. Alkaloids of the Rutaceae: their distribution and systematic significance. **Biochemical Systematics And Ecology**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 149-180, out. 1975. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-1978\(75\)90019-8](http://dx.doi.org/10.1016/0305-1978(75)90019-8).

ZHAO, X.; YU, Z.; DING, T.. Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 425, 17 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8030425>.