

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

**ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO E DA ATIVIDADE INSETICIDA DE
Parahancornia amapa NO CONTROLE DE *Atta sexdens***

Lulliana Thalita Franco*

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

*** bolsista CNPq**

São Carlos - SP

2026

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Lulliana Thalita Franco, realizada em 10/03/2026.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar)

Profa. Dra. Jéssica Cristina Amaral (UFSCar)

Profa. Dra. Buana Carvalho de Almeida (UFPI)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder força, perseverança e amparo, permitindo-me superar desafios, aprender com as dificuldades e tornar esta conquista possível.

Ao meu querido pai Luiz Carlos Franco (*in memoriam*), que partiu no início do meu mestrado, mas que permanece vivo em cada conquista minha. Sua força, ensinamento e amor continuam sendo minha inspiração diária.

À minha mãe, Maria Franco, e à minha irmã, Giuliana Franco, pelo incentivo, amor incondicional, acolhimento e carinho ao longo de toda a minha trajetória.

Ao meu namorado Rodrigo Gounella, por estar ao meu lado em cada passo desta jornada. Seu amor, apoio, paciência e palavras de incentivo foram essenciais para que eu seguisse em frente, especialmente nos momentos mais desafiadores.

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes, pela orientação desde a iniciação científica, pela compreensão, apoio e pelo investimento constante neste projeto e no ensino de Química.

À Dra. Dorai Periotto e ao grupo do Dr. Odair Bueno, pelas análises e valiosas contribuições que foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

À Dra. Janaína Brandão, que me acompanhou desde a iniciação científica e contribuiu imensamente para o meu crescimento profissional. Sua orientação, paciência e dedicação foram essenciais em cada etapa desta jornada.

Aos meus queridos amigos Alicia e Carlos André, que encontrei durante esta jornada e que tanto me ensinaram. Agradeço pela amizade sincera e pelo apoio ao longo deste processo, que tornou cada etapa mais leve e significativa.

Ao Anderson Pires, pela coleta e fornecimento do material vegetal utilizado neste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Produtos Naturais, pela amizade, colaboração e pela valiosa troca de conhecimentos ao longo de toda a trajetória acadêmica.

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

Aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES, FAPESP, em especial ao CNPq, pela concessão da bolsa.

E por fim, agradeço a todos aqueles que não mencionei, mas que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento.

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

AcOEt - Acetato de etila

BOD- *Biochemical Oxygen Demand*

CD₃OD - Metanol deuterado

COSY - *Correlated Spectroscopy*

Da - Dalton

DMSO - Dimetil sulfóxido

ESI - *Electrospray Ionization*

EtOH - Etanol

FBMN - *Feature-Based Molecular Networking*

GNPS - *Global Natural Products Social Molecular Networking*

Hex - Hexano

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

LC-MS/MS - *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*

m/z - Relação massa-carga

MeOH - Metanol

MHz - Megahertz

MS - *Mass Spectrometry*

NOE - *Nuclear Overhauser Effect*

PAC_E_EtOH - *Parahancornia amapa* - cascas (extrato etanólico)

PAC_E_Hex - *Parahancornia amapa* - cascas (extrato hexânico)

PAC_F_AcOEt - *Parahancornia amapa* - cascas (fração acetato etila)

PAC_F_H₂O - *Parahancornia amapa* - cascas (fração aquosa)

PAC_F_Hex - *Parahancornia amapa* - cascas (fração hexânica)

PAC_F_MeOH - *Parahancornia amapa* - cascas (fração metanólica)

PAF_E_EtOH - *Parahancornia amapa* - folhas (extrato etanólico)

PAF_E_Hex - *Parahancornia amapa* - folhas (extrato hexânico)

ppm - Partes por milhão

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

rpm - Rotações por minuto

RT - Tempo de retenção

UHPLC-QTOF-MS/MS- *Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole
Time-of-Flight-Tandem Mass Spectrometry*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Classificação taxonômica de <i>Parahancornia amapa</i> (Huber) Ducke. ..	9
TABELA 1.2 - Constituintes químicos de <i>P. amapa</i>	11
TABELA 3.3 - Método gradiente exploratório utilizado na análise cromatográfica do extrato PAC_E_EtOH e das frações obtidas.	21
TABELA 3.4 - Frações obtidas por cromatografia em coluna por adsorção em sílica e respectivas fases móveis utilizadas.....	22
TABELA 3.5 - Método gradiente de eluição para o isolamento de compostos da fração orgânica de PAC_F_MeOH.	24
TABELA 3.6 - Método gradiente exploratório utilizado na análise por LC-MS/MS dos compostos isolados de <i>P. amapa</i>	25
TABELA 3.7 - Método gradiente exploratório utilizado na análise por LC-MS/MS dos extratos e frações de <i>P. amapa</i>	26
TABELA 4.8 - Rendimento dos extratos brutos de folhas e cascas de <i>P. amapa</i>	28
TABELA 4.9 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens</i> submetidas aos extratos brutos de folhas e cascas de <i>P. amapa</i>	30
TABELA 4.10 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens</i> submetidas às frações do extrato PAC_E_EtOH.	32
TABELA 4.11 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens</i> submetidas aos compostos isolados da fração orgânica de PAC_F_MeOH.	34
TABELA 4.12 - Valores dos halos de inibição dos extratos brutos de folhas e cascas de <i>P. amapa</i>	35
TABELA 4.13 - Valores dos halos de inibição das frações do extrato PAC_E_EtOH.	37
TABELA 4.14 - Rendimento das frações obtidas a partir do extrato PAC_E_EtOH..	39
TABELA 4.15 - Rendimento das subfrações obtidas a partir da fração PAC_F_MeOH.	40
TABELA 4.16 - Massa final dos compostos isolados da fração orgânica de PAC_F_MeOH.....	42
TABELA 4.17 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e HMBC (CD_3OD , 14,1T) do composto 1.	47
TABELA 4.18 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e HMBC (CD_3OD , 14,1T) do composto 2.	52

TABELA 4.19 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e HMBC (CD_3OD , 14, 1T) do composto	
3.	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Formigas cortadeiras e seu fungo simbiote. Fonte: Arantes, (2015). .	2
FIGURA 1.2 - Fungo simbiote (<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>) a partir da visão interna de um formigueiro na Unesp-Rio Claro. Fonte: Pio, (2024).....	3
FIGURA 1.3 - Estruturas químicas dos princípios ativos tóxicos: fipronil, deltametrina e sulfluramida.	5
FIGURA 1.4 - Estrutura química do sulfonato de perfluorooctano.....	5
FIGURA 1.5 - Estruturas químicas de inseticidas naturais de origem vegetal.....	7
FIGURA 1.6 - Exsicata de <i>Parahancornia amapa</i> (Huber) Ducke, espécime depositado em herbário, utilizada para documentação botânica da espécie. Fonte: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Flora e Funga do Brasil (2026).	10
FIGURA 3.7 - (a) Coleta das cascas e folhas da espécie <i>P. amapa</i> e (b) Folhas coletadas da espécie <i>P. amapa</i> . Fonte: Anderson Pires (imagem capturada durante a coleta).....	15
FIGURA 3.8 - Esquema do processo de coleta, secagem e moagem da amostra...	16
FIGURA 3.9 - Esquema do processo de extração da amostra.	16
FIGURA 3.10 - Fluxograma da extração de folhas e cascas de <i>P. amapa</i>	16
FIGURA 3.11 - Formigueiro mantido em condições laboratoriais na UNESP - Rio Claro.	17
FIGURA 3.12 - Fluxograma do fracionamento do extrato PAC_E_EtOH.....	23
FIGURA 3.13 - Fluxograma do fracionamento da fração PAC_F_MeOH.	24
FIGURA 3.14 - Fluxograma exemplificando as etapas de processamento dos dados. Fonte: Adaptado de YOSHIOKA (2021).....	27
FIGURA 4.15 - Curva de sobrevivência de operárias <i>A. sexdens</i> submetidas aos extratos brutos de folhas e cascas de <i>P. amapa</i>	30
FIGURA 4.16 - Curva de sobrevivência de operárias <i>A. sexdens</i> submetidas às frações do extrato PAC_E_EtOH.....	32
FIGURA 4.17 - Curva de sobrevivência de operárias <i>A. sexdens</i> submetidas aos compostos isolados da fração orgânica de PAC_F_MeOH.	34
FIGURA 4.18 - Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos de folhas e cascas por meio do ensaio de difusão em ágar.....	36
FIGURA 4.19 - Avaliação da atividade antifúngica das frações do extrato PAC_E_EtOH por meio do ensaio de difusão em ágar.....	37
FIGURA 4.20 - Perfil cromatográfico do extrato bruto PAC_E_EtOH (215nm).....	38

FIGURA 4.21 - (a) Perfil cromatográfico da fração PAC_F_AcOEt e (b) Perfil cromatográfico da fração PAC_F_MeOH.	39
FIGURA 4.22 - (a) Perfil cromatográfico da fração orgânica em 254 nm, (b) Perfil cromatográfico da fração orgânica em 215 nm e (c) Perfil cromatográfico da fração aquosa em 215 nm.	41
FIGURA 4.23 - Perfil cromatográfico de isolamentos dos compostos da fração orgânica de PAC_F_MeOH.	42
FIGURA 4.24 - Estruturas isoladas e caracterizadas de <i>P. amapa</i>	43
FIGURA 4.25 - Estrutura do composto 1.	44
FIGURA 4.26 - Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC H→C do composto 1.	45
FIGURA 4.27 - Principais acoplamentos observados no mapa de contorno COSY do composto 1.	45
FIGURA 4.28 - Proposta de fragmentação do composto 1.	48
FIGURA 4.29 - Estrutura do composto 2.	49
FIGURA 4.30 - Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC H→C do composto 2.	49
FIGURA 4.31 - Principais acoplamentos observados no mapa de contorno COSY do composto 2.	50
FIGURA 4.32 - Proposta de fragmentação do composto 2.	51
FIGURA 4.33 - Estrutura do composto 3.	53
FIGURA 4.34 - Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC H→C do composto 3.	54
FIGURA 4.35 - Principal acoplamento observado no mapa de contorno COSY do composto 3.	54
FIGURA 4.36 - Proposta de fragmentação do composto 3.	55
FIGURA 4.37 - <i>Cluster</i> N1 presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.	60
FIGURA 4.38 - Nodos únicos presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.	61

FIGURA 4.39 - Nodo único presente na rede molecular no modo positivo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.....	62
Figura 4.40 - <i>Cluster</i> N2 e nodo único presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.	64
FIGURA 4.41 - Nodos únicos e <i>cluster</i> (N3) e presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada	66
FIGURA 4.42 - Nodos únicos presentes na rede molecular. Os íons de <i>m/z</i> 365.1009, 545.1976 e 603.2023 detectados no modo positivo de ionização e o íon de <i>m/z</i> 521.2018 no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.	68
FIGURA 4.43 - <i>Cluster</i> de (N4) procianidina presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.	70
FIGURA 4.44 - <i>Cluster</i> de terpenos (P1) e nodo único presente na rede molecular no modo positivo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada	72
FIGURA 4.45 - <i>Cluster</i> (N5) e (N6) presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.	75
FIGURA 4.46 - <i>Cluster</i> (N7) e <i>Cluster</i> (N8) presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.	77
FIGURA 4.47 - Nodo único presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada	78
FIGURA 4.48 - Nodos únicos presentes na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.	80
FIGURA 4.49 - Nodo único presentes na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.	81

FIGURA 4.50 - <i>Cluster</i> (P2) presente na rede molecular no modo positivo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.....	82
FIGURA 4.51 - Nodo único presente na rede molecular no modo positivo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.....	83

RESUMO

ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO E DA ATIVIDADE INSETICIDA DE *Parahancornia amapa* NO CONTROLE DE *Atta sexdens*. As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* constituem importantes pragas agrícolas no Brasil, especialmente em plantios de *Pinus* e *Eucalyptus*, em razão da intensa desfolha associada ao cultivo do fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*. Embora o controle químico seja amplamente empregado, muitos inseticidas convencionais apresentam baixa biodegradabilidade e elevado impacto ambiental, o que tem estimulado a busca por estratégias alternativas de controle baseadas em produtos naturais. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial inseticida de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) no controle de formigas *Atta sexdens*. Foram realizadas extrações dos metabólitos das folhas e das cascas utilizando hexano e etanol. Observou-se que o extrato hexânico das folhas e o extrato etanólico das cascas apresentaram atividade inseticida significativa. Com base nesses resultados, o extrato etanólico das cascas, que apresentou 70% de atividade, foi selecionado para o fracionamento bioquímico, resultando inicialmente em uma fração metanólica mais ativa (≈90%). Essa fração foi posteriormente submetida à partição líquido-líquido, originando subfrações orgânica e aquosa. A partir da subfração orgânica, foi possível o isolamento e a caracterização estrutural de três compostos inéditos para a espécie, pertencentes à classe dos benzopiranos: um pterocarpano, um cromano e um dímero. Os compostos isolados apresentaram atividade inseticida moderada, entretanto, a maior atividade foi observada para a subfração aquosa, que apresentou 68% de mortalidade, sugerindo elevado teor de taninos condensados. A comparação entre os resultados dos compostos isolados, a subfração aquosa e a fração original indicou que a atividade inseticida mais pronunciada está associada à atuação conjunta dos metabólitos presentes na amostra, corroborando com a hipótese de efeito sinérgico. Adicionalmente, a análise do perfil químico da espécie por UHPLC-QTOF-MS/MS permitiu a anotação de diversos metabólitos secundários, incluindo as classes de flavonoides, catequinas, cumarinas, iridoides, ácidos fenólicos, pterocarpanos, lignanas, benzopiranos e terpenos. Os resultados obtidos ampliam o conhecimento do perfil químico de *P. amapa*, ainda pouco explorado na literatura, bem como de seu potencial biológico, destacando sua relevância como uma fonte promissora para o controle sustentável de formigas cortadeiras.

ABSTRACT

STUDY OF THE CHEMICAL PROFILE AND INSECTICIDAL ACTIVITY OF *Parahancornia amapa* IN THE CONTROL OF *Atta sexdens*. Leaf-cutting ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* are important agricultural pests in Brazil, especially in *Pinus* and *Eucalyptus* plantations, due to the intense defoliation associated with the cultivation of the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. Although chemical control is widely used, many conventional insecticides exhibit low biodegradability and high environmental impact, which has encouraged the search for alternative control strategies based on natural products. In this context, this study aimed to evaluate the insecticidal potential of *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) in the control of *Atta sexdens* ants. Metabolites from leaves and bark were extracted using hexane and ethanol. The hexane extract from the leaves and the ethanolic extract from the bark showed significant insecticidal activity. Based on these results, the ethanolic bark extract, which exhibited 70% activity, was selected for bioguided fractionation, initially resulting in a more active methanolic fraction ($\approx 90\%$). This fraction was subsequently subjected to liquid-liquid partitioning, yielding organic and aqueous subfractions. From the organic subfraction, three compounds previously unreported for the species were isolated and structurally characterized, belonging to the benzopyran class: one pterocarpan, one chroman, and one dimer. The isolated compounds showed moderate insecticidal activity; however, the highest activity was observed for the aqueous subfraction, which exhibited 68% mortality, suggesting a high content of condensed tannins. The comparison among the results obtained for the isolated compounds, the aqueous subfraction, and the original fraction indicated that the most pronounced insecticidal activity is associated with the combined action of the metabolites present in the sample, supporting the hypothesis of a synergistic effect. Additionally, the analysis of the chemical profile of the species by UHPLC-QTOF-MS/MS allowed the annotation of several secondary metabolites, including flavonoids, catechins, coumarins, iridoids, phenolic acids, pterocarpan, lignans, benzopyrans, and terpenes. The results obtained expand the knowledge of the chemical profile of *P. amapa*, which remains scarcely explored in the literature, as well as its biological potential, highlighting its relevance as a promising source for the sustainable control of leaf-cutting ants.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Formigas cortadeiras dos gêneros <i>Acromyrmex</i> e <i>Atta</i>	1
1.2	Fungo mutualista das formigas cortadeiras <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	2
1.3	Métodos de controle de formigas cortadeiras	4
1.4	O potencial inseticida de plantas como alternativa de controle.....	6
1.5	Família <i>Apocynaceae</i>	7
1.6	Espécie <i>Parahancornia amapa</i> (Huber) Ducke	9
1.7	Constituintes químicos da espécie <i>Parahancornia amapa</i>	10
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Coleta do material botânico de <i>Parahancornia amapa</i>	15
3.1.1	Obtenção dos extratos vegetais de folhas e cascas de <i>Parahancornia amapa</i>	15
3.2	Ensaio biológico	17
3.2.1	Atividade tóxica sobre operárias médias de <i>Atta sexdens</i>	17
3.2.1.1	Análise dos dados de toxicidade de <i>Atta sexdens</i>	19
3.2.2	Atividade antimicrobiana com o fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> ..	19
3.2.2.1	Análise dos dados de atividade antimicrobiana frente ao fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	20
3.3	Análise do perfil cromatográfico dos extratos e frações de <i>Parahancornia amapa</i> por HPLC-PDA	21
3.4	Fracionamento do extrato PAC_E_EtOH	22
3.4.1	Fracionamento da fração PAC_F_MeOH	23

3.4.2 Isolamento e caracterização dos compostos da fração orgânica de PAC_F_MeOH.....	24
3.5 Análise por UHPLC-QTOF-MS/MS dos extratos brutos e frações de <i>Parahancornia amapa</i>	26
3.5.1 Processamento dos dados obtidos por UHPLC-QTOF- MS/MS dos extratos brutos e frações de <i>Parahancornia amapa</i>	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Rendimento dos extratos brutos de folhas e cascas de <i>Parahancornia amapa</i>	28
4.2 Análise e seleção dos extratos e frações de <i>Parahancornia amapa</i>	28
4.2.1 Atividade tóxica sobre operárias médias de <i>A. sexdens</i>	29
4.2.1.1 Extratos brutos de folhas e cascas de <i>Parahancornia amapa</i>	29
4.2.1.2 Frações obtidas do extrato PAC_E_EtOH.....	31
4.2.1.3 Compostos isolados da fração PAC_F_MeOH do extrato PAC_E_EtOH	32
4.2.2 Atividade antimicrobiana com o fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> ..	35
4.2.2.1 Extratos e frações de <i>Parahancornia amapa</i>	35
4.3 Perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA	37
4.3.1 Perfil cromatográfico do extrato PAC_E_EtOH.....	37
4.3.2 Perfil cromatográfico das frações do extrato PAC_E_EtOH	38
4.3.3 Perfil cromatográfico da fração orgânica de PAC_F_MeOH e isolamento dos compostos	41
4.4 Metabólitos isolados e caracterizados da fração orgânica de PAC_F_MeOH	43
4.4.1 Pterocarpano (Composto 1)	43
4.4.2 Benzopirano (Composto 2).....	48
4.4.3 Cromano (Composto 3)	53
4.5 Anotação dos metabólitos secundários de <i>Parahancornia amapa</i>	56
4.5.1 Flavonoides	58
4.5.2 Catequinas e derivados	63

4.5.3	Cumarinas	65
4.5.4	Lignanas	67
4.5.5	Taninos	70
4.5.6	Terpenos	71
4.5.7	Ácidos fenólicos	73
4.5.8	Iridoides	79
4.5.9	Pterocarpanos	81
4.5.10	Benzopiranos	82
5	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	APÊNDICES	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*

As formigas cortadeiras conhecidas popularmente como quenquéns (*Acromyrmex*) e saúvas (*Atta*) são insetos pertencentes à classe Insecta, ordem Hymenoptera, família Formicidae, subfamília Myrmicinae e tribo Attini. Essas espécies são amplamente distribuídas no continente americano, com maior ocorrência na região neotropical (NICKELE *et al.*, 2013) abrangendo desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (ARAÚJO, 2024). A denominação popular de “formigas cortadeiras” está relacionada à eficiência desses insetos no corte de folhas frescas, que são utilizadas como substrato para o cultivo do seu fungo mutualista, essencial para o desenvolvimento da colônia (CORREA *et al.*, 2023; DELLA LUCIA *et al.*, 2014).

Esses insetos são classificados como eussociais, pois apresentam uma estrutura social altamente organizada e complexa em suas colônias, incluindo o cultivo de jardins de fungo, a manutenção de elevados níveis de higiene e um comportamento caracterizado por divisão de trabalho adaptada a cada casta específica (DELLA LUCIA *et al.*, 2014). Essa complexidade torna o manejo mais desafiador em comparação com outras espécies de insetos (ARAÚJO *et al.*, 2022).

Dessa forma, as formigas dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* constroem ninhos subterrâneos extensos, compostos por centenas de câmaras interconectadas e por trilhas que se abrem à superfície do solo (ZANETTI *et al.*, 2014). No interior dos ninhos, existem duas castas: temporária e permanente. A casta temporária é composta por indivíduos férteis que são as fêmeas aladas (içás ou tanajuras) e os machos alados (bitus), os quais surgem em determinadas épocas do ano para realizar o voo nupcial, responsável pela formação de novas colônias. Após o acasalamento, os machos morrem, enquanto as fêmeas fecundadas (futuras rainhas) fundam novos ninhos. Já a casta permanente é formada pela rainha e pelas operárias, sendo estas responsáveis por desempenhar diversas tarefas essenciais para o funcionamento da colônia, como forrageamento, defesa, cuidado com o fungo e com a prole (FIGURA 1.1) (CORREA *et al.*, 2023; DELLA LUCIA *et al.*, 2014; NICKELE *et al.*, 2013).



FIGURA 1.1 - Formigas cortadeiras e seu fungo simbiote. Fonte: Arantes, (2015).

Diante disso, as formigas-cortadeiras são consideradas uma das principais pragas herbívoras em sistemas agrícolas e florestais no Brasil, sendo responsáveis por danos que comprometem a produtividade e geram prejuízos econômicos significativos (CORREA *et al.*, 2023). A intensa atividade de corte e transporte de material vegetal para os ninhos pode resultar na rápida desfolha de plantas jovens, no enfraquecimento de árvores em áreas de reflorestamento e na redução do rendimento de culturas comerciais. Em sistemas de monocultura, como plantações de *Pinus* e *Eucalyptus*, o impacto dessas pragas tende a ser ainda mais severo, uma vez que as condições ambientais homogêneas e a ampla disponibilidade de recursos vegetais favorecem sua proliferação e atividade. Estudos indicam que as formigas-cortadeiras podem causar danos substanciais à vegetação, chegando a consumir aproximadamente 17% da produção florestal em sistemas tropicais (MASIULIONIS; SAMUELS, 2025; NICKELE *et al.*, 2013).

Diante desse cenário, as formigas têm sido alvo de numerosos estudos voltados ao desenvolvimento de estratégias de controle eficazes, com ênfase em abordagens que minimizem os impactos ambientais e promovam o manejo sustentável dessas pragas.

1.2 Fungo mutualista das formigas cortadeiras *Leucoagaricus gongylophorus*

O cultivo do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* no interior dos ninhos é uma característica das formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*

(ARAÚJO *et al.*, 2022). Esse fungo, pertencente à ordem Agaricales (Basidiomycota), família Lepiotaceae e gênero *Leucoagaricus*, estabelece com as formigas uma relação mutualística obrigatória. Devido à intensa interdependência entre esses dois organismos, qualquer interrupção no sistema simbiótico compromete seriamente a sobrevivência de toda a colônia (NICKELE *et al.*, 2013).

Nessa associação, ambas as espécies se beneficiam, assim, as formigas fornecem ao fungo fragmentos vegetais que servem como fonte de alimento e ainda garantem sua proteção contra parasitas. Em contrapartida, o fungo degrada o material vegetal principalmente por meio de enzimas como polissacaridases e proteinases, tornando os nutrientes assimiláveis principalmente para a rainha e as larvas (ZANDONAI, 2022; NICKELE *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2005).

A propagação do *L. gongylophorus* ocorre de forma vertical, durante o voo nupcial, as rainhas jovens e já fecundadas, carregam na cavidade bucal inóculos do fungo cultivado no ninho de origem. Ao se estabelecerem no solo, iniciam novos ninhos, garantindo a perpetuação do fungo simbiote (FIGURA 1.2) (NICKELE *et al.*, 2013).



FIGURA 1.2 - Fungo simbiote (*Leucoagaricus gongylophorus*) a partir da visão interna de um formigueiro na Unesp-Rio Claro. Fonte: Pio, (2024).

Além da interação mutualística, diversos outros microrganismos também estão presentes no interior dos formigueiros, influenciando a dinâmica desse sistema simbiótico. Dentre eles, destaca-se o fungo parasita do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), considerado o principal antagonista da simbiose. Esse

microrganismo representa uma ameaça significativa ao jardim fúngico, pois secreta compostos capazes de degradar as células do fungo, comprometendo seu crescimento (ARAÚJO *et al.*, 2022; ZANDONAI, 2022). Por outro lado, um importante aliado das formigas são as bactérias filamentosas (actinobactérias) do gênero *Pseudonocardia*, que vivem aderidas à cutícula das operárias, estas produzem metabólitos com propriedades antifúngicas capazes de inibir o desenvolvimento do *Escovopsis*. (DELLA LUCIA *et al.*, 2014; ZANDONAI, 2022).

Adicionalmente, também há a presença de leveduras negras, como as do gênero *Phialophora*, que atuam como antagonistas da relação entre as formigas e as bactérias do gênero *Pseudonocardia*. Essas leveduras podem interferir na eficácia da defesa microbiana contra patógenos. Também são frequentemente encontrados nos ninhos diversos fungos filamentosos oportunistas, oriundos tanto do substrato vegetal coletado pelas formigas quanto do solo ao redor do formigueiro (NICKELE *et al.*, 2013).

1.3 Métodos de controle de formigas cortadeiras

O controle de insetos pragas na agricultura é uma questão de grande importância, especialmente no caso das formigas cortadeira, que são consideradas pragas de difícil manejo (ARAÚJO *et al.*, 2022). Diante disso, diversos métodos de controle são utilizados com o objetivo de reduzir a atividade das formigas e preservar a produtividade das lavouras. Entre as principais estratégias utilizadas, destacam-se os métodos de controle mecânico, biológico e químico (FERNANDES *et al.*, 2007).

O controle químico é o método mais frequentemente utilizado, sendo as iscas granuladas a principal forma de aplicação, seguidas por técnicas de termonebulização de líquidos e gases e pelo uso de pós secos. As iscas são geralmente formuladas a partir de um substrato atrativo à base de polpa cítrica desidratada, combinado a princípios ativos tóxicos, como fipronil, deltametrina e a sulfluramida (FIGURA 1.3) (NICKELE *et al.*, 2013).

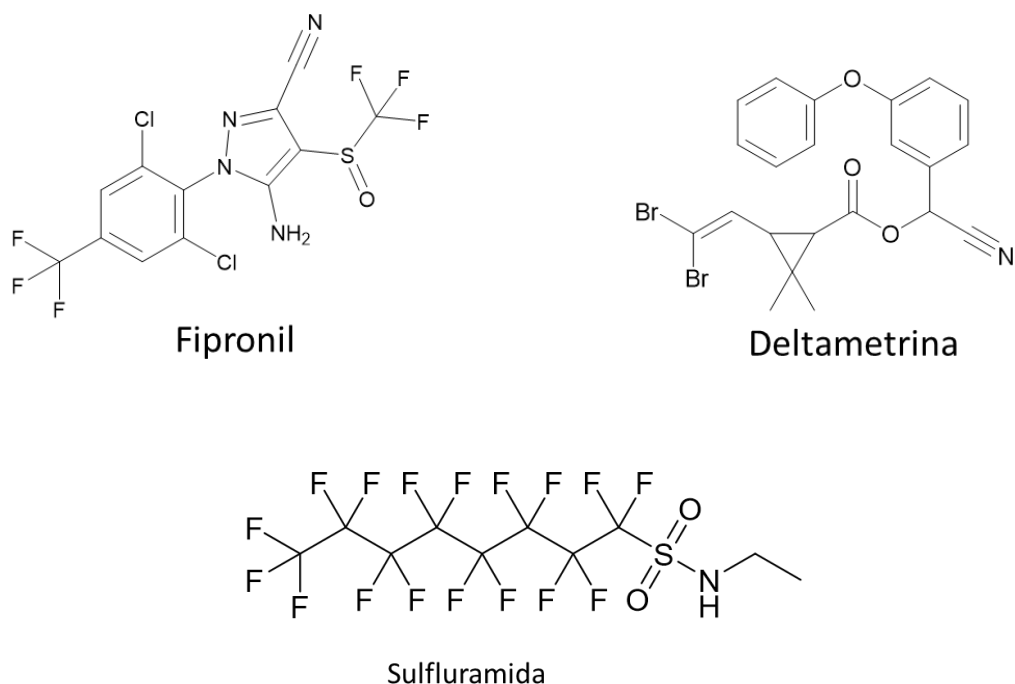


FIGURA 1.3 - Estruturas químicas dos princípios ativos tóxicos: fipronil, deltametrina e sulfluramida.

A sulfluramida destaca-se devido a sua eficácia no controle de muitas espécies de saúvas (ZANETTI *et al.*, 2003). No entanto, seu uso contínuo e disseminado tem levantado preocupações ambientais, isso se deve ao fato de que, ao se degradar no ambiente, a sulfluramida dá origem ao sulfonato de perfluorooctano (PFOS) (FIGURA 1.4), um poluente altamente persistente no meio ambiente (GUIDA *et al.*, 2023).

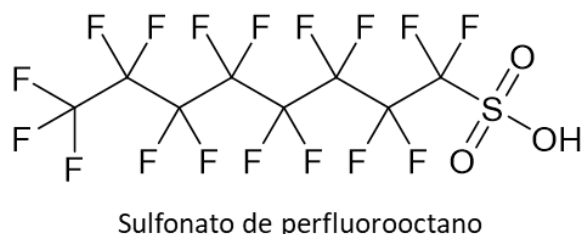


FIGURA 1.4 - Estrutura química do sulfonato de perfluorooctano.

O PFOS é caracterizado por cadeias longas de carbono totalmente fluoradas, nas quais a ligação carbono-flúor (C-F) confere alta estabilidade química à molécula. Como consequência, esse composto apresenta resistência a processos naturais de degradação, como hidrólise, fotólise e biodegradação, podendo permanecer no ambiente por longos períodos. Além disso, o PFOS possui potencial de bioacumulação na cadeia alimentar, é tóxico para organismos aquáticos e

terrestres e pode ser transportado a longas distâncias por correntes atmosféricas e hídricas (GUIDA *et al.*, 2023; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Diante dos riscos associados ao uso de inseticidas convencionais, tanto para a saúde humana quanto para os ecossistemas, torna-se fundamental o desenvolvimento de estratégias de controle mais específicas, eficazes e ambientalmente seguras para o manejo de formigas cortadeiras. Nesse contexto, abordagens baseadas em manejo integrado de pragas e no uso de tecnologias menos agressivas ao meio ambiente configuram alternativas promissoras para conciliar a proteção das lavouras com a preservação ambiental (MASIULIONIS; SAMUELS, 2025).

1.4 O potencial inseticida de plantas como alternativa de controle

A busca por compostos inseticidas de origem natural fundamenta-se principalmente na ampla diversidade da flora brasileira e no fato de que os metabólitos secundários produzidos pelas plantas são, em geral, biodegradáveis, apresentam menor persistência no ambiente e tendem a apresentar menor toxicidade quando comparados aos inseticidas sintéticos (CAMPOS *et al.*, 2019).

As plantas produzem compostos provenientes do metabolismo primário, indispensáveis ao seu crescimento e desenvolvimento, desempenhando funções relacionadas à geração de energia, ao armazenamento de nutrientes e à manutenção dos processos vitais. Paralelamente, sintetizam metabólitos secundários que, embora não estejam diretamente envolvidos nas funções fisiológicas básicas, exercem papel crucial na defesa contra herbívoros e patógenos, bem como na adaptação às condições ambientais. Em virtude dessas propriedades, tais substâncias representam a base química dos inseticidas botânicos (BIGI *et al.*, 2004; CORRÊA; SALGADO, 2011; VELASQUES *et al.*, 2017).

Atualmente, diversos metabólitos secundários de diferentes classes químicas já são empregados na agricultura, sendo obtidos a partir de plantas, fungos e bactérias. Entre os principais exemplos de inseticidas naturais de origem vegetal, destacam-se a piretrina, extraída das flores do *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae); a azadiractina, proveniente do óleo das sementes da *Azadirachta indica* (Meliaceae) e o alcaloide nicotina, isolado das folhas de *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) (FIGURA 1.5) (ISMAN, 2006; VELASQUES *et al.*, 2017).

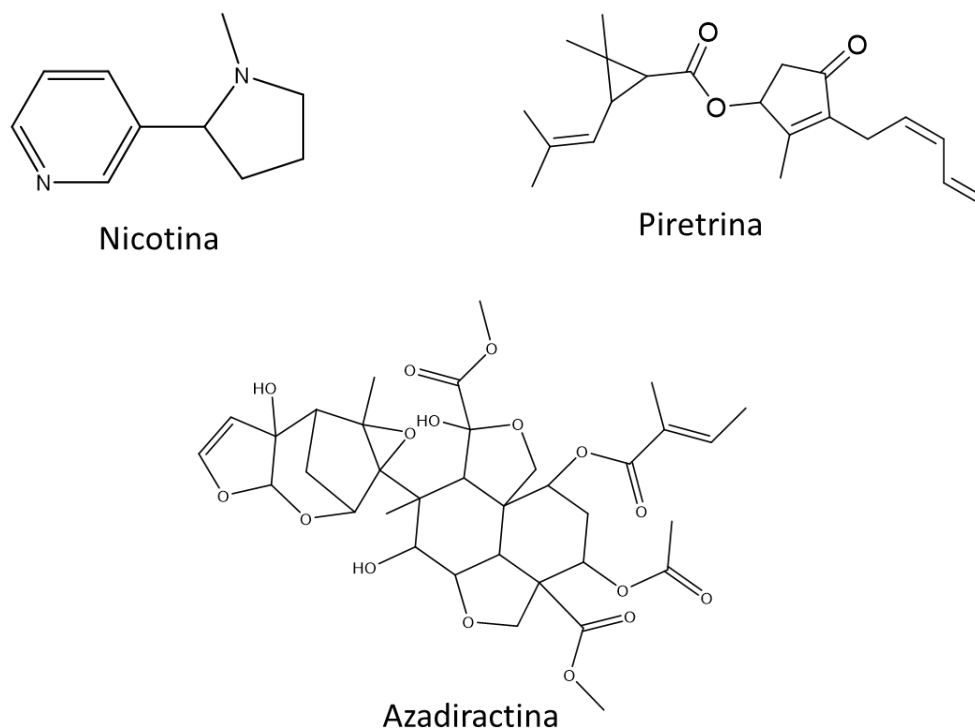


FIGURA 1.5 - Estruturas químicas de inseticidas naturais de origem vegetal.

No contexto do controle de formigas cortadeiras, como as saúvas (*A. sexdens*), e de seu fungo simbiote (*L. gongylophorus*), a literatura reporta diversas substâncias de origem vegetal com atividade biológica frente a esses organismos. Entre os compostos descritos, destacam-se o alcaloide ricinina, isolado de *Ricinus communis*, bem como limonoides e triterpenos presentes em *Cipadessa fruticosa* e *Cedrela fissilis*, com ação inseticida sobre as formigas. Além disso, extratos obtidos de *Sesamum indicum* demonstram atividade antifúngica frente ao fungo simbiote (NEBO, 2013). Desse jeito, esses compostos apresentam características favoráveis para o controle sustentável de pragas, como baixa toxicidade para mamíferos, reduzido impacto ambiental, alta biodegradabilidade, ausência de fitotoxicidade e disponibilidade em fontes vegetais abundantes (CAMPOS *et al.*, 2019; SHUBHAM TARASING *et al.*, 2025).

1.5 Família *Apocynaceae*

A família *Apocynaceae* Juss. *s.l.*, conhecida popularmente como *dogbane* (erva-do-diabo), é considerada uma das maiores famílias do reino vegetal (EL-KASHEF *et al.*, 2021). Evidências filogenéticas sugerem que sua origem ocorreu no sul da África há cerca de 34 milhões de anos, seguida por eventos de dispersão

que possibilitaram sua ampla distribuição por regiões como Austrália, Península Árábica, África Oriental, Madagascar e Américas (PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2023).

As espécies da família ocorrem predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, embora também estejam presentes em áreas de clima temperado (EL-KASHEF *et al.*, 2021). Atualmente, a Apocynaceae compreende aproximadamente 424 gêneros e mais de 4.600 espécies, organizadas em cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae (FERNANDES *et al.*, 2018; BHADANE *et al.*, 2018). Essa família apresenta ampla diversidade de hábitos de crescimento, incluindo árvores, arvoretas, arbustos e lianas. Uma característica marcante é a presença de látex branco e viscoso, amplamente distribuído nos tecidos vegetais e associado a mecanismos de defesa (RIBEIRO *et al.*, 1999).

No Brasil, a Apocynaceae está representada por cerca de 77 gêneros e 754 espécies, distribuídas em diferentes formações vegetais. A Mata Atlântica concentra a maior diversidade, com 367 espécies, evidenciando a relevância ecológica da família nesse bioma (COUTINHO; LOUZADA, 2018).

Diversas espécies apresentam importância econômica, medicinal e cultural. O gênero *Aspidosperma* Mart., por exemplo, é amplamente explorado na indústria madeireira, devido à elevada qualidade de sua madeira (COUTINHO; LOUZADA, 2018). Outras espécies são utilizadas na medicina tradicional, como *Hemidesmus indicus*, empregada no tratamento de infecções urinárias; *Carissa edulis*, utilizada no combate à malária; *Wrightia tinctoria* e *Nerium indicum*, tradicionalmente aplicadas no tratamento de infecções cutâneas (BHADANE *et al.*, 2018).

Do ponto de vista fitoquímico, a família Apocynaceae destaca-se pela expressiva diversidade de alcaloides, configurando-se como um dos grupos vegetais mais ricos em metabólitos secundários nitrogenados. Dentre esses compostos, os alcaloides indólicos são particularmente abundantes, apresentando diversidade estrutural e atividade biológica, com papéis significativos tanto nas interações ecológicas quanto em aplicações farmacêuticas (DEY *et al.*, 2017; BHADANE *et al.*, 2018). Um exemplo é a vincristina, isolada de *Catharanthus roseus*, utilizada no tratamento da leucemia (COUTINHO; LOUZADA, 2018). Além dos alcaloides, a família também produz uma variedade de outros metabólitos secundários, como terpenoides, esteroides, flavonoides, glicosídeos, iridoides e lignanas (ABE *et al.*, 1984; BHADANE *et al.*, 2018; MELO *et al.*, 2021a).

1.6 Espécie *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke

A espécie *Parahancornia amapa* pertence à família Apocynaceae e ao gênero *Parahancornia*, o qual é composto por sete espécies, dentre as quais se destacam: *Parahancornia amara*, *Parahancornia amapa*, *Parahancornia krukovichii*, *Parahancornia negroensis*, *Parahancornia oblonga*, *Parahancornia peruviana* e *Parahancornia surrogata* (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, FLORA E FUNGO DO BRASIL 2026).

A espécie *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke, popularmente conhecida como “amapá”, “mapá” ou “amapazeiro”, foi descrita e formalmente reconhecida em 1922 pelo botânico Adolpho Ducke (1876-1959), com sua publicação registrada nos Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, FLORA E FUNGO DO BRASIL, JBRJ 2026; HENRIQUE *et al.*, 2014). Trata-se de uma árvore frutífera de grande porte, podendo alcançar entre 40 e 50 metros de altura. A espécie é típica da região amazônica brasileira, com ocorrência nos estados do Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Maranhão (HENRIQUE *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016), além de estar presente em outros países, como as Guianas, Suriname e na Venezuela (SILVA *et al.*, 2011). Sua caracterização taxonômica está bem estabelecida, conforme apresentado na TABELA 1.1.

TABELA 1.1 - Classificação taxonômica de *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke.

<i>Parahancornia amapa</i> Ducke	
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Gentianales
Família	Apocynaceae
Gênero	<i>Parahancornia</i>
Espécie	<i>Parahancornia amapa</i> (Huber) Ducke.

Fonte: Adaptada de Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Flora e Funga do Brasil (2026).

A espécie apresenta grande relevância para as comunidades tradicionais da Amazônia, sendo utilizada tanto na alimentação quanto em tratamentos fitoterápicos para doenças respiratórias e gastrointestinais. Além disso, produz um exsudato branco (látex), popularmente conhecido como "leite de amapá", que constitui uma suspensão distinta da seiva elaborada e é amplamente utilizado no tratamento

de úlceras internas, dores estomacais, hepatite e sífilis (HENRIQUE *et al.*, 2014; DAVID,2023) Além do uso medicinal, sua madeira é altamente valorizada pela sua qualidade, sendo comumente utilizada na fabricação de compensados (FIGURA 1.6) (SILVA *et al*, 2011).

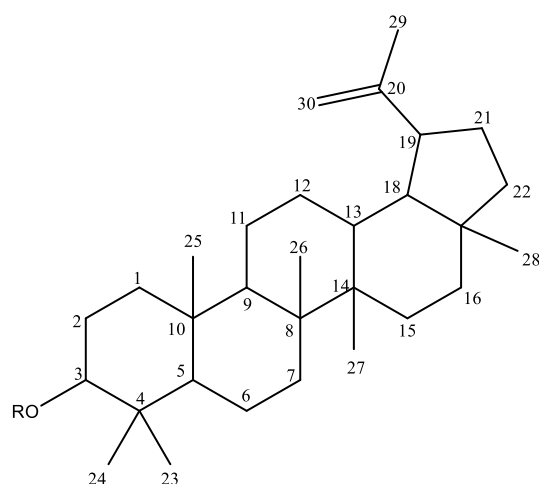


FIGURA 1.6 - Exsicata de *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke, espécime depositado em herbário, utilizada para documentação botânica da espécie. Fonte: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Flora e Funga do Brasil (2026).

1.7 Constituintes químicos da espécie *Parahancornia amapa*

Levantamentos bibliográficos mostram que os principais metabólitos identificados em *P. amapa* incluem triterpenos pentacíclicos, compostos feniletanoides e um alcaloide indólico. Na TABELA 1.2 encontram-se descritos os compostos já identificados em *P. amapa*.

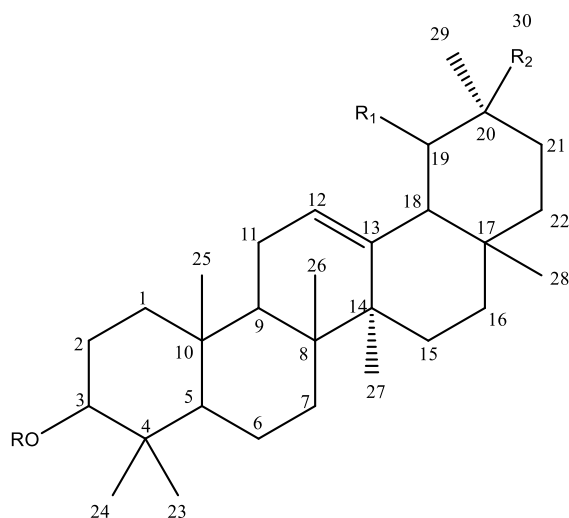
TABELA 1.2 - Constituintes químicos de *P. amapa*.



Triterpenos pentacíclicos

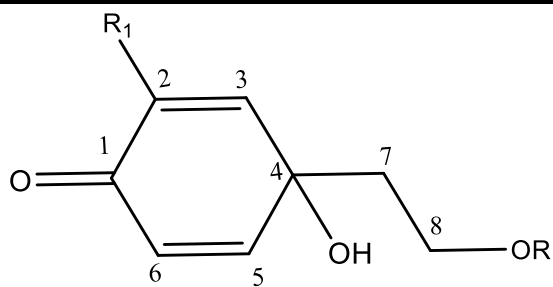
Composto	Referência
R=H	
R= Ac	
R= 3 β -O-acil-lupeol (cadeias C20, C22, C24 e C26)	
R= 3 β -O-(3-hidroxiacil)-lupeol (cadeias com C16, C18, C20, C22, C24 e C26)	
R=3 β -O-(3,5-dihidroxiacil)-lupeol (cadeias com C14 e C16)	(SOBRINHO <i>et al.</i> , 1991)
R= Derivados acetilados de 3 β -O-(3-hidroxiacil)-lupeol e 3 β -O-(3,5-dihidroxiacil)-lupeol (acetilação em C-3' e/ou C-5' do acil)	

TABELA 1.2 - Constituintes químicos de *P. amapa* (continuação).



Triterpenos pentacíclicos

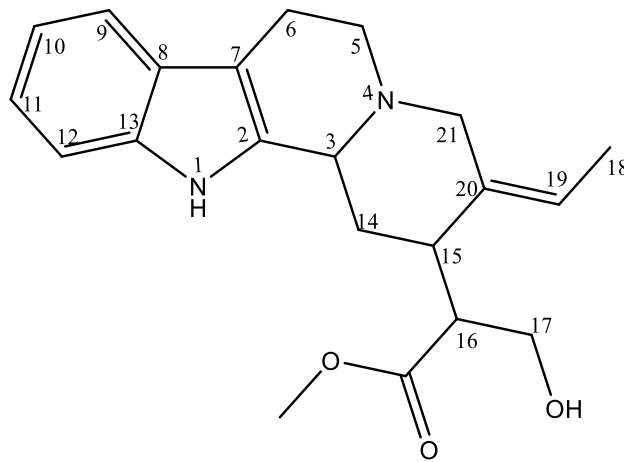
Composto	Referência
R = H; R ₁ = H; R ₂ = CH ₃	(SOBRINHO <i>et al.</i> , 1991)
R = Ac; R ₁ = H; R ₂ = CH ₃	
R = Ac; R ₁ = CH ₃ ; R ₂ = CH ₃	
R = Ac; R ₁ = CH ₃ ; R ₂ = CH ₃	



Feniletanoides

Composto	Referência
R= Glc; R ₁ = H	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2008)
R= Glc- (Ac) ₄ ; R ₁ =H	
R=H; R ₁ =H	
R= H; R ₁ = OCH ₃	

TABELA 1.2 - Constituintes químicos de *P. amapa* (continuação).



Alcaloide indólico (HENRIQUE *et al.*, 2014)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver alternativas para o controle da formiga cortadeira *Atta sexdens* a partir de produtos naturais derivados de *Parahancornia amapa*, visando reduzir os danos causados por essa praga agrícola, bem como minimizar os impactos ambientais associados ao uso de inseticidas convencionais.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos de cascas e folhas da espécie *Parahancornia amapa*;
- Avaliar a atividade inseticida e fungicida dos extratos, frações e compostos isolados de *P. amapa* frente a formiga *A. sexdens* e seu fungo simbiote *L. gongylophorus*;
- Isolar e caracterizar compostos bioativos por UHPLC- QTOF- MS/MS e RMN;
- Analisar o perfil químico dos extratos de *P. amapa* por UHPLC- QTOF- MS/MS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta do material botânico de *Parahancornia amapa*

As folhas e cascas da espécie de planta *P. amapa* foram coletadas em setembro de 2023 na comunidade de Auto Guajará, localizada no município de Abaetetuba, estado do Pará, Brasil (coordenadas geográficas: 1°68'70"S; 48°86'03"W). A identificação botânica da espécie foi devidamente realizada, e o material vegetal foi depositado no Herbário Prof^a Marlene Freitas da Silva, da Universidade do Estado do Pará, sob o número de registro MFS10805 (FIGURA 3.7).

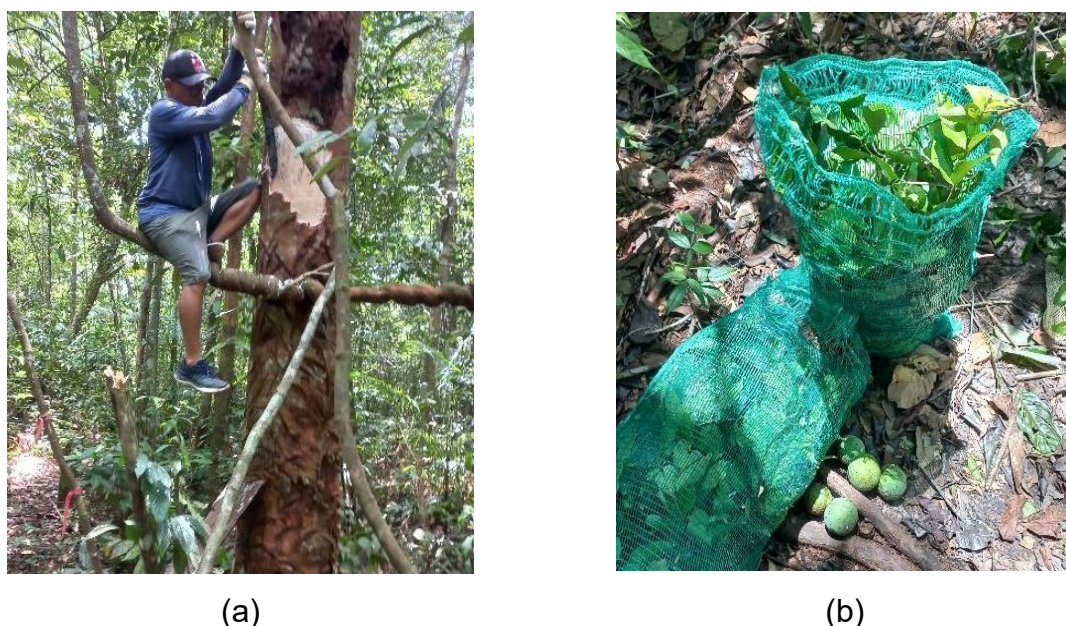


FIGURA 3.7 - (a) Coleta das cascas e folhas da espécie *P. amapa* e (b) Folhas coletadas da espécie *P. amapa*. Fonte: Anderson Pires (imagem capturada durante a coleta).

3.1.1 Obtenção dos extratos vegetais de folhas e cascas de *Parahancornia amapa*

As folhas e cascas foram inicialmente secas em estufa com circulação de ar, a 40 °C durante três dias. Após a secagem completa, 1000 g de cada material vegetal foi triturado em moinho de facas e submetido à extração com dois solventes de diferentes polaridades (hexano e etanol). A extração assistida por homogeneização foi realizada utilizando um agitador mecânico de hélice (RW20 digital Ika), com agitação a 1200 rpm a 28°C. Para cada solvente, a extração foi conduzida ao longo de três dias, com renovação diária do solvente, totalizando seis dias de extração para cada amostra vegetal.

Os extratos obtidos a partir da casca PAC_E_Hex (hexano) e PAC_E_EtOH (etanol) e das folhas PAF_E_Hex (hexano) e PAF_E_EtOH (etanol) foram filtrados em papel de filtro e, posteriormente, concentrados em evaporador rotativo BUCHI (Rotavapor® R-215, banho de aquecimento B-491, bomba de vácuo V-700 e controle de vácuo V-850). Em seguida, cada extrato foi transferido para recipientes individuais e armazenado em refrigerador, a fim de evitar contaminação e degradação dos compostos. Foi realizado o cálculo do rendimento dos extratos, e foram direcionados para ensaios biológicos. Os esquemas representativos das etapas descritas estão apresentados na FIGURA 3.8 e FIGURA 3.9 e o fluxograma da extração na FIGURA 3.10.

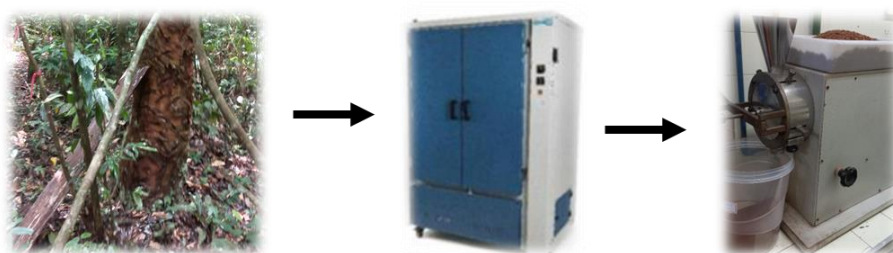


FIGURA 3.8 - Esquema do processo de coleta, secagem e moagem da amostra.



FIGURA 3.9 - Esquema do processo de extração da amostra.

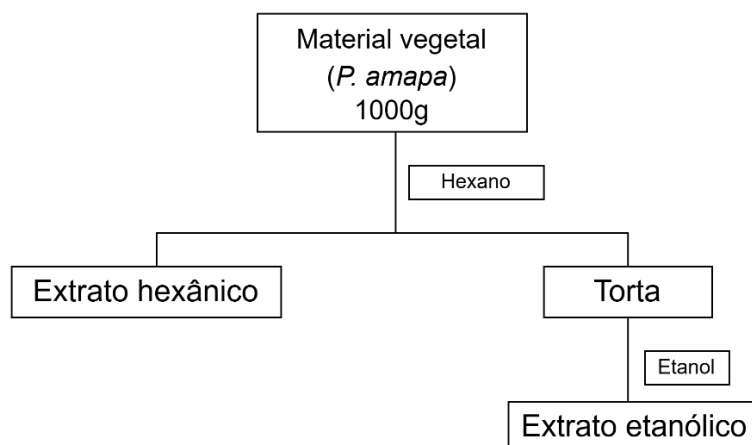


FIGURA 3.10 - Fluxograma da extração de folhas e cascas de *P. amapa*.

3.2 Ensaios biológicos

3.2.1 Atividade tóxica sobre operárias médias de *Atta sexdens*

Após a etapa de extração, realizou-se uma triagem dos extratos por meio de ensaios de toxicidade utilizando operárias de *A. sexdens*. Essa etapa teve como objetivo identificar o extrato com bom potencial inseticida, a fim de direcionar o processo de fracionamento bioguiado até o isolamento dos compostos com atividade biológica. As frações obtidas ao longo do fracionamento também foram submetidas a ensaios, permitindo o acompanhamento da atividade inseticida em cada etapa do processo.

Dessa forma, os ensaios de ingestão com as operárias *A. sexdens* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro, sob a orientação do Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

Para a realização dos bioensaios, foram utilizadas formigas operárias provenientes de colônias mantidas em condições laboratoriais (FIGURA 3.11). A manutenção das colônias incluiu o fornecimento diário de folhas de *Eucalyptus* sp., *Hibiscus* sp. e *Ligustrum* sp., além de flocos de aveia, farinha de milho e, eventualmente, outras plantas atrativas às saúvas, como folhas de amoreira.



FIGURA 3.11 - Formigueiro mantido em condições laboratoriais na UNESP - Rio Claro.

Para os experimentos, selecionaram-se operárias com massa corpórea entre 15 e 25 mg. Considerando que as formigas foram mantidas isoladas do

formigueiro, sem contato com o fungo simbiote e com os substratos vegetais que compõem sua dieta natural, foi fornecida uma dieta artificial sólida, previamente descrita por (BUENO *et al.*, 1997). A dieta foi preparada a partir da dissolução de 5 g de glicose, 1 g de peptona bacteriológica, 0,1 g de extrato de levedura e 1,5 g de ágar bacteriológico em 100 mL de água destilada. Após o preparo, a solução foi esterilizada em autoclave a 120°C e 1 atm por 15 min e, em seguida, vertida em placas de Petri com 10 cm de diâmetro.

Paralelamente, foram pesados 100 mg de cada extrato vegetal em frascos de vidro, aos quais foram adicionados 1 mL de solvente, obtendo-se uma concentração final de 100mg/mL, sendo metanol utilizado para os extratos polares e clorofórmio para os extratos apolares. As amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex e posteriormente incorporadas à dieta artificial ainda em estado líquido. Para o grupo controle, foi preparada uma dieta composta apenas pela formulação artificial acrescida do solvente correspondente, sem adição de extrato. Após a solidificação, as dietas foram embaladas com filme plástico e armazenadas sob refrigeração até o momento de utilização.

Os bioensaios foram conduzidos em placas de Petri (10 cm de diâmetro) forradas com papel filtro. Em cada placa foram disponibilizados aproximadamente 0,4 a 0,5 g da dieta experimental (controle ou contendo extrato), acondicionada sobre papel alumínio. Em seguida, dez formigas foram transferidas para cada placa. Cada tratamento foi realizado em quintuplicata.

As placas foram mantidas em estufa do tipo B.O.D., sob temperatura controlada de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa superior a 70 %. A dieta foi renovada a cada 24 horas, e os papéis filtro foram substituídos sempre que necessário, especialmente quando danificados pelas formigas, a fim de evitar contaminações e assegurar condições higiênicas adequadas. A mortalidade das operárias foi avaliada diariamente ao longo de um período total de 21 dias.

Esse ensaio também foi realizado para as frações obtidas, utilizando-se a concentração de 50 mg/mL, bem como aos compostos isolados na concentração de 1 mg/mL.

3.2.1.1 Análise dos dados de toxicidade de *Atta sexdens*

A análise dos dados foi realizada a partir das determinações das porcentagens acumuladas de formigas vivas por dia para cada tratamento, possibilitando a construção das curvas de sobrevivência. Posteriormente, o tempo de sobrevivência mediano foi determinado e as curvas de sobrevivência foram comparadas por meio do teste não paramétrico *log rank*, com nível de significância de 5 %, utilizando o *software* GraphPad Prisma, versão 3.0.

Nos bioensaios em que os extratos foram solubilizados em metanol ou clorofórmio, cada tratamento foi comparado ao respectivo grupo controle, constituído por dieta artificial acrescida apenas do solvente correspondente, a fim de verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas na sobrevivência das operárias ao longo do período experimental.

3.2.2 Atividade antimicrobiana com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

Após a etapa de extração, realizou-se uma triagem dos extratos por meio de ensaios antimicrobianos com o fungo *L. gongylophorus*. Essa etapa teve como objetivo identificar o extrato com bom potencial fungicida, a fim de direcionar o processo de fracionamento bioguiado até o isolamento dos compostos com atividade biológica. As frações obtidas ao longo do fracionamento também foram submetidas a esse ensaio.

Diante disso, as análises da atividade antifúngica foram realizadas pelo método de difusão em ágar por poço, utilizando como microrganismo o fungo *L. gongylophorus* (FF2006). Este foi isolado do jardim de fungos de *A. sexdens* e mantido em placa Petri contendo meio de cultura sólido específico (MIX), composto por 20 g extrato de malta, 17 g ágar, 5 g digestão enzimática de gelatina e 2 g extrato de levedura, e incubado em estufa tipo B.O.D a 25 °C durante 28 dias.

Após o período de incubação, iniciou-se o ensaio com a preparação do inóculo. Para isso, foram adicionados 5 mL de solução salina de NaCl a 0,9 % (m/v), previamente esterilizada em autoclave a 121 °C e 1 atm por 20 minutos, diretamente sobre o meio de cultura contendo o fungo, com a finalidade de remover os conídios. A suspensão obtida foi transferida, com auxílio de pipeta, para tubos Falcon de 15 mL e mantida em repouso por aproximadamente 3 minutos, visando a decantação das partículas de maior tamanho.

Posteriormente, a suspensão salina contendo o fungo foi adicionada ao caldo Sabouraud, previamente preparado na concentração de 39 g/L e esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm por 20 minutos, na proporção de 1:5 (uma parte da suspensão para cinco partes do caldo), sendo a mistura distribuída em frascos de 20 mL. Os frascos foram incubados em estufa tipo B.O.D. a 25 °C por um período de 15 dias, com o objetivo de promover o crescimento do fungo.

Em placas de Petri previamente preparadas contendo meio de cultura MIX, foram realizados orifícios de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Em seguida, 1 mL do inóculo foi pipetado sobre a superfície do meio, tomando-se o cuidado de não permitir o escoamento para o interior dos orifícios. O inóculo foi distribuído uniformemente com o auxílio de uma alça de drigalski previamente esterilizada. Após esse procedimento, as placas permaneceram em repouso por 30 minutos, permitindo a absorção do excesso de umidade pela superfície do ágar.

Durante esse período, as amostras dos extratos vegetais foram preparadas na concentração de 100 mg/mL utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. Em seguida, foram aplicados 50 µL da amostra no interior do orifício, fechou-se as placas de Petri com papel filme e foram incubadas em B.O.D. a 25 °C por um período de 15 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Como controle negativo, utilizou-se apenas o solvente DMSO, por ser considerado não tóxico para os organismos em baixas concentrações.

Esse ensaio também foi realizado para frações, utilizando-se uma concentração de 50 mg/mL.

3.2.2.1 Análise dos dados de atividade antimicrobiana frente ao fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

Após o período de incubação, as placas foram avaliadas quanto à uniformidade do crescimento fúngico e à presença de possíveis contaminantes. Em seguida, procedeu-se à leitura dos resultados por meio da medição dos halos de inibição, utilizando-se uma régua milimetrada sobre fundo branco.

3.3 Análise do perfil cromatográfico dos extratos e frações de *Parahancornia amapa* por HPLC-PDA

O extrato PAC_E_EtOH foi selecionado para o estudo por apresentar boa atividade inseticida frente à formiga *A. sexdens*. Inicialmente, seu perfil cromatográfico foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para a análise, o extrato foi solubilizado em metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich®) na concentração de 10 mg/mL. Em seguida, a amostra foi filtrada utilizando filtros de seringa (PTFE; 25 mm × 0,45 µm) e acondicionada em vials.

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência SHIMADZU® Prominence, composto por três bombas de solvente (LC-20AR), auto-injetor (SIL-10AF), controlador de sistema (CBM-20A), detector UV-Vis com arranjo de diodos (SPD-M20A), desgasificador (DGU-20A) e *software* LabSolutions™, versão 5.90. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna analítica Phenomenex® Gemini C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm).

As fases móveis empregadas foram água ultrapura Milli-Q® (linha A) e acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich®) (linha B). A eluição foi conduzida por meio de um gradiente exploratório (TABELA 3.3), com fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 5 µL e monitoramento do sinal no comprimento de onda (λ) de 215 nm e 254 nm.

O perfil cromatográfico obtido permitiu direcionar as etapas subsequentes de fracionamento do extrato. As frações resultantes foram analisadas sob mesmas condições cromatográficas do extrato bruto, possibilitando a comparação direta entre os perfis, a identificação dos constituintes majoritários e a avaliação da simplificação da fração em relação ao extrato inicial.

TABELA 3.3 - Método gradiente exploratório utilizado na análise cromatográfica do extrato PAC_E_EtOH e das frações obtidas.

Tempo (min)	H ₂ O (%)	ACN (%)
00,00	95	5
40,00	0	100
45,00	0	100
47,00	95	5
60,00	95	5

3.4 Fracionamento do extrato PAC_E_EtOH

O extrato PAC_E_EtOH (40 g) foi submetido a um primeiro fracionamento por cromatografia em coluna de adsorção, utilizando sílica gel (70-230 mesh) como fase estacionária. A coluna empregada apresentava aproximadamente 46 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro interno.

A eluição foi realizada sob pressão ambiente, empregando-se solventes em ordem crescente de polaridade como fase móvel: hexano, acetato de etila, metanol e água (TABELA 3.4). Esse procedimento resultou na obtenção de quatro frações distintas, denominadas: PAC_F_Hex (hexano), PAC_F_AcOEt (acetato de etila), PAC_F_MeOH (metanol) e PAC_F_H₂O (água). O fluxograma do fracionamento está representado na FIGURA 3.12.

As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, com temperatura controlada entre 35-40 °C, transferidas para frascos de vidro, pesadas, armazenadas sob refrigeração. Em seguida, as frações PAC_F_AcOEt e PAC_F_MeOH foram direcionadas aos ensaios biológicos, com o objetivo de avaliar sua atividade inseticida e/ou fungicida, orientando, assim, possíveis etapas subsequentes de fracionamento. Além disso, os perfis cromatográficos de ambas as frações também foram analisados por HPLC- PDA.

TABELA 3.4 - Frações obtidas por cromatografia em coluna por adsorção em sílica e respectivas fases móveis utilizadas.

Frações	Sistema de eluição
PAC_F_Hex	100% Hexano
PAC_F_AcOEt	100% Acetato de etila
PAC_F_MeOH	100% Metanol
PAC_F_H ₂ O	100% Água

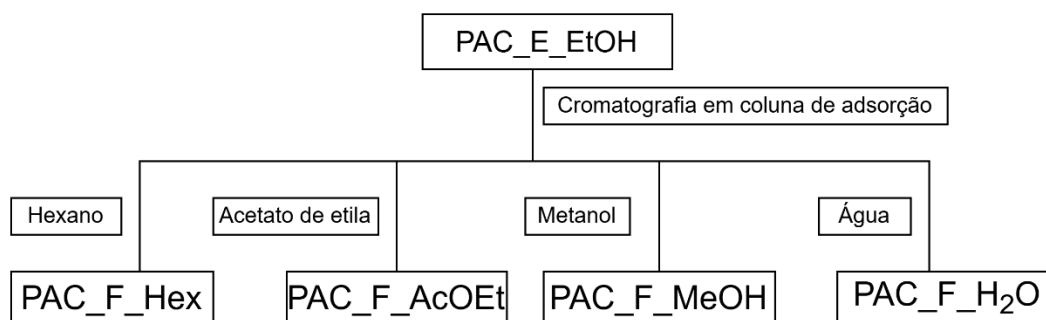


FIGURA 3.12 - Fluxograma do fracionamento do extrato PAC_E_EtOH.

3.4.1 Fracionamento da fração PAC_F_MeOH

A fração PAC_F_MeOH apresentou o melhor resultado nos ensaios de toxicidade frente às formigas e atividade moderada no ensaio fungicida, sendo, portanto, selecionada para a continuidade do estudo. Em seguida, procedeu-se à partição líquido-líquido da fração utilizando um funil de separação de 2000 mL. Para isso, 4 g da amostra foram solubilizados em 400 mL de água destilada e, em seguida, adicionou-se clorofórmio na mesma proporção (1:1, v/v), realizando-se três extrações líquido-líquido sucessivas. O fluxograma da partição está representado na FIGURA 3.13.

A fase orgânica obtida foi então submetida a um procedimento de limpeza (*clean-up*) por meio de três extrações com água destilada, na mesma proporção (1:1, v/v), com o objetivo de remover impurezas hidrossolúveis.

A fase orgânica e a fase aquosa foram posteriormente concentradas sob pressão reduzida, utilizando evaporador rotativo a 37 °C para a fase orgânica e 42° C para a fase aquosa. As frações secas foram transferidas para recipientes individuais e armazenadas sob refrigeração, a fim de minimizar riscos de contaminação e degradação dos compostos. Em seguida foram submetidas a análises de HPLC-PDA.

O procedimento descrito foi repetido três vezes, totalizando 10 g de material inicial submetido à partição. Todas as etapas foram conduzidas em capela de exaustão, em conformidade com as normas de segurança para manipulação de solventes orgânicos voláteis e tóxicos.

Adicionalmente, visando reduzir o impacto ambiental e o consumo excessivo de solventes, todo o clorofórmio utilizado nas extrações foi recuperado por destilação e reutilizado nas etapas subsequentes.

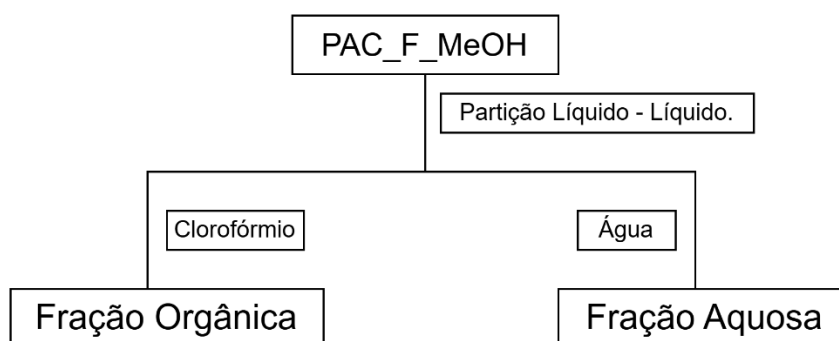


FIGURA 3.13 - Fluxograma do fracionamento da fração PAC_F_MeOH.

3.4.2 Isolamento e caracterização dos compostos da fração orgânica de PAC_F_MeOH

O isolamento dos compostos da fração orgânica (350 mg), obtida a partir da partição líquido-líquido da fração PAC_F_MeOH, foi realizada por HPLC-PDA em modo gradiente de eluição, utilizando uma coluna analítica Phenomenex® Gemini C18 (250 × 4,6 mm; partículas de 5 µm). A composição da fase móvel seguiu o gradiente descrito na TABELA 3.5. O volume de injeção empregado foi de 25 µL, com fluxo de 1 mL/min, concentração de 20 mg/mL e o monitoramento cromatográfico foi realizado nos comprimentos de onda de (λ) 215 e 254 nm.

TABELA 3.5 - Método gradiente de eluição para o isolamento de compostos da fração orgânica de PAC_F_MeOH.

Tempo (min)	H ₂ O (%)	ACN (%)
00,00	55	45
30,00	0	100
40,00	0	100
45,00	55	45
50,00	55	45

As frações coletadas durante o processo de purificação por HPLC foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e, posteriormente, submetidas à análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C{¹H}, utilizando metanol deuterado (CD₃OD) como solvente. As análises foram realizadas em um espectrômetro Bruker® DRX operando a 14,1 T. Os espectros unidimensionais

e bidimensionais obtidos foram processados e analisados com o *software* MestReNova® (MNova©).

Como complemento à elucidação estrutural, os compostos foram analisados por um cromatógrafo líquido de ultraeficiência (Agilent 1290 Infinity II) acoplado a um espectrômetro de massas Agilent G6545B Q-TOF (Agilent Technologies Inc.) equipado com uma fonte de ionização *eletrospray* (ESI). As fases móveis foram constituídas por H₂O (linha A) e ACN (linha B), ambas acidificadas com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico (FA). As análises foram realizadas utilizando a coluna Agilent® Zorbax XDB-C18 (2,1 × 100 mm; partículas de 1,8 µm), volume de injeção de 3 µL, fluxo de 0,3 mL/min, e empregando-se o método descrito na TABELA 3.6.

TABELA 3.6 - Método gradiente exploratório utilizado na análise por LC-MS/MS dos compostos isolados de *P. amapa*.

Tempo (min)	H ₂ O + FA 0,1%	ACN + FA 0,1%
00,00	0	100
09,00	0	100
10,00	95	5
12,00	95	5

Foram adquiridos os dados MS nos modos positivo e negativo de ionização, utilizando o modo auto MS/MS, com monitoramento dos íons na faixa de *m/z* 50-500. Ao longo da análise, as condições de ionização foram: pressão do gás nebulizador 35 psi, fluxo do gás de secagem de 12 L/min, temperatura do gás de secagem de 350 °C, fluxo do *sheath gas* 10 L/min e temperatura do *sheath gas* de 300 °C. Os parâmetros da fonte foram ajustados para voltagem do capilar 2700 V, voltagem do *skimmer* 60 V e voltagem do fragmentor 110 V. A taxa de aquisição dos espectros foi de oito espectros por segundo. Os dados de LC-MS/MS foram adquiridos e processados utilizando o *software* MassHunter Workstation, versão B.09.00 (Agilent Technologies©).

Em seguida, os mesmos foram direcionados aos ensaios inseticidas frente à formiga *A. sexdens*, conforme metodologia descrita no item 3.2.1.

3.5 Análise por UHPLC-QTOF-MS/MS dos extratos brutos e frações de *Parahancornia amapa*

Para a análise do perfil químico dos extratos brutos e das frações por LC-MS/MS, foram preparadas soluções estoque na concentração inicial de 1 mg/mL, utilizando solvente grau LC-MS LiChrosolv® (Sigma-Aldrich®). As soluções foram filtradas em filtros de seringa de PTFE com porosidade de 0,22µm e, posteriormente, diluídas até a concentração final de 100ppm. Após o preparo, as amostras foram acondicionadas em vials apropriados para análise. Ao todo, foram analisadas dez amostras.

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Agilent 1290 Infinity II, acoplado a um espectrômetro de massas Agilent G6545B Q-TOF (Agilent Technologies Inc.), equipado com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI). As fases móveis foram constituídas por H₂O (linha A) e ACN (linha B), ambas acidificadas com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico (FA). As análises foram realizadas utilizando a coluna Agilent® Zorbax XDB-C18 (2,1 × 100 mm; partículas de 1,8 µm), volume de injeção de 3 µL, fluxo de 0,3 mL/min, e empregando-se o método descrito na TABELA 3.7.

TABELA 3.7 - Método gradiente exploratório utilizado na análise por LC-MS/MS dos extratos e frações de *P. amapa*.

Tempo (min)	H ₂ O + FA 0,1%	ACN + FA 0,1%
00,00	95	5
18,00	0	100
22,00	0	100
23,00	95	5
28,00	95	5

Foram adquiridos os dados MS nos modos positivo e negativo de ionização, utilizando o modo auto MS/MS, com monitoramento dos íons na faixa de *m/z* 50-1500. Ao longo da análise, as condições de ionização foram: pressão do gás nebulizador 35 psi, fluxo do gás de secagem de 12 L/min, temperatura do gás de secagem de 325 °C, fluxo do *sheath gas* 11 L/min e temperatura do *sheath gas* de 320 °C. Os parâmetros da fonte foram ajustados para voltagem do capilar 3100 V, voltagem do *skimmer* 65 V e voltagem do fragmentor 110 V. A taxa de aquisição dos espectros foi de três espectros por segundo. Todos os dados de LC-MS/MS foram

adquiridos e processados utilizando o *software* MassHunter Workstation, versão B.09.00 (Agilent Technologies©).

3.5.1 Processamento dos dados obtidos por UHPLC-QTOF- MS/MS dos extratos brutos e frações de *Parahancornia amapa*

Os dados obtidos nos modos de ionização positivo e negativo foram utilizados para a construção da rede molecular do tipo *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) (FIGURA 3.14) com o objetivo de auxiliar na anotação dos compostos presentes nas amostras. Inicialmente, os dados brutos adquiridos por UHPLC-QTOF-MS/MS, utilizando o *software* MassHunter Workstation, foram gerados no formato (.d). Em seguida, esses arquivos foram convertidos para o formato (.mzML), necessário para o processamento em *softwares* de alinhamento e tratamento de dados, por meio do programa MsConvert, ferramenta disponibilizada pelo pacote ProteoWizard (CHAMBERS *et al.*, 2012).

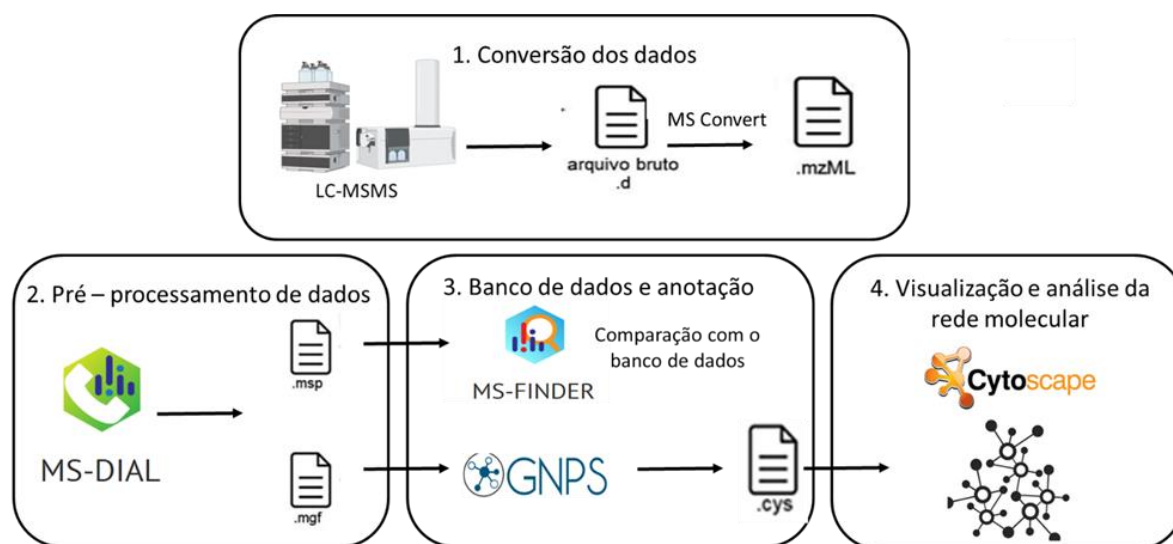


FIGURA 3.14 - Fluxograma exemplificando as etapas de processamento dos dados.

Fonte: Adaptado de YOSHIOKA (2021).

Após a conversão, os dados foram submetidos ao pré-processamento e alinhamento no *software* MS-DIAL (TSUGAWA *et al.*, 2020). As informações resultantes desse alinhamento foram então exportadas no formato (.msp), compatível com a ferramenta MS-FINDER, a qual foi empregada para auxiliar no processo de anotação dos compostos por meio de fragmentação *in silico*, sendo especialmente útil nos casos em que espectros de referência não estão disponíveis em bancos de dados públicos (MALLMANN *et al.*, 2023).

Adicionalmente, os arquivos foram exportados no formato (.mgf) e submetidos à plataforma GNPS para a execução do fluxo de trabalho FBMN (WANG, *et al.*, 2016). Os parâmetros de filtragem adotados foram: tolerância de massa para íons precursores de 0,02 Da e para íons fragmentados de 0,05 Da. Para a construção da rede molecular, foi definido um mínimo de quatro fragmentos compartilhados e valor mínimo de cosseno de similaridade de 0,7. Por fim, a rede molecular gerada foi exportada para a plataforma Cytoscape, versão 3.8.2, para análise e visualização dos dados (SHANNON *et al.*, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento dos extratos brutos de folhas e cascas de *Parahancornia amapa*

A etapa de extração é fundamental para a determinação e quantificação dos compostos ativos presentes em materiais vegetais. Variáveis como o tipo de solvente e o tempo de extração influenciam diretamente tanto no rendimento do processo quanto na qualidade dos compostos obtidos (WANG *et al.*, 2014).

Na TABELA 4.8 são apresentados os rendimentos obtidos para cada extrato, considerando-se a massa inicial de 1000 g de material vegetal.

TABELA 4.8 - Rendimento dos extratos brutos de folhas e cascas de *P. amapa*.

Extratos	Massa final (g)	Rendimento (%)
PAF_E_Hex	33,0	3,3
PAF_E_EtOH	339,0	34,0
PAC_E_Hex	14,3	1,4
PAC_E_EtOH	57,0	5,7

4.2 Análise e seleção dos extratos e frações de *Parahancornia amapa*

O estudo teve início com a preparação dos extratos a partir das cascas e das folhas de *P. amapa*. Com o objetivo de conduzir o trabalho por meio de uma abordagem bioguiada, esses extratos foram inicialmente submetidos a ensaios de toxicidade utilizando operárias de *A. sexdens*, bem como a ensaios antifúngicos com fungo *L. gongylophorus*.

Entre os extratos avaliados, aquele que demonstrou boa atividade inseticida e/ou fungicida foi selecionado para a primeira etapa de fracionamento, realizada por cromatografia em coluna de adsorção. As frações obtidas foram novamente submetidas aos ensaios biológicos, a fim de verificar a manutenção ou intensificação da atividade.

Posteriormente, a fração que apresentou resultados promissores foi direcionada a uma nova etapa de fracionamento, por meio da técnica de partição líquido-líquido. Esse procedimento possibilitou o isolamento de compostos, os quais foram novamente avaliados nos ensaios biológicos.

4.2.1 Atividade tóxica sobre operárias médias de *A. sexdens*

4.2.1.1 Extratos brutos de folhas e cascas de *Parahancornia amapa*

Os resultados obtidos para os extratos foram analisados por meio de análises gráficas das curvas de sobrevivência e de tabelas que apresentam as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o tempo mediano de sobrevivência (Md) e as interpretações estatísticas obtidas pelo teste de *log-rank*.

A FIGURA 4.15 apresenta o gráfico com as curvas de sobrevivência das operárias de *A. sexdens*, evidenciando o efeito dos diferentes extratos ao longo do período experimental. De forma complementar, a TABELA 4.9 apresenta os valores de mortalidade acumulada diária, permitindo uma visualização quantitativa detalhada da progressão da mortalidade observada nos diferentes tratamentos.

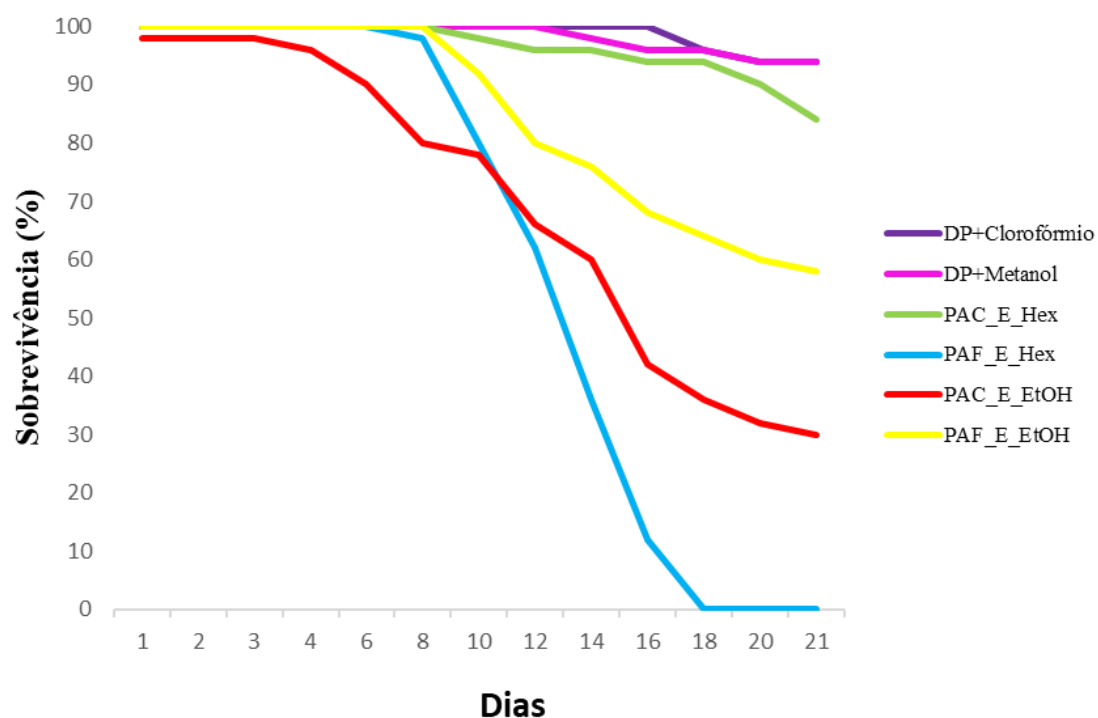


FIGURA 4.15 - Curva de sobrevivência de operárias *A. sexdens* submetidas aos extratos brutos de folhas e cascas de *P. amapa*.

TABELA 4.9 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens* submetidas aos extratos brutos de folhas e cascas de *P. amapa*.

Tratamento	% Acumulada de mortalidade por dia													Md
	1	2	3	4	6	8	10	12	14	16	18	20	21	
DP+Metanol	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	6	6	>21a
DP+Clorofórmio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6	6	>21a
PAF_E_Hex	0	0	0	0	0	2	20	38	64	88	100	100	100	14b
PAF_E_EtOH	0	0	0	0	0	0	8	20	24	32	36	40	42	>21b
PAC_E_Hex	0	0	0	0	0	0	2	4	4	6	6	10	16	>21a
PAC_E_EtOH	2	2	2	4	10	20	22	34	40	58	64	68	70	16b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste *log rank* ($p < 0,05$).

Após o término dos 21 dias de experimento, e considerando os resultados das análises estatísticas, verificou-se que, entre os extratos obtidos a partir das folhas, o PAF_E_Hex destacou-se como o mais ativo. Esse extrato apresentou diferença significativa na mortalidade das operárias em comparação ao controle, com início da mortalidade a partir do 8º dia, seguido de aumento progressivo, atingindo 50% no 14º dia e 100% no 18º dia de avaliação. Em contraste, o PAF_E_EtOH

demonstrou menor eficácia inseticida, alcançando 42% de mortalidade ao final dos 21 dias, não atingindo 50% de mortalidade durante o período analisado.

Em relação aos extratos obtidos das cascas, o PAC_E_EtOH, quando comparado com seu grupo controle, apresentou diferença significativa na mortalidade, com efeito observado já no 1º dia de exposição e aumento gradual da mortalidade ao longo do tempo, atingindo 50% no 16º dia e 70% no final do experimento. Por outro lado, o PAC_E_Hex apresentou desempenho reduzido, não diferindo de forma significativa em relação ao respectivo grupo controle.

Portanto, considerando os ensaios inseticidas realizados com os extratos de *P. amapa*, verificou-se atividade biológica relevante para o extrato PAF_E_Hex e PAC_E_EtOH. Diante desses resultados, o PAC_E_EtOH foi inicialmente selecionado para o prosseguimento dos estudos.

4.2.1.2 Frações obtidas do extrato PAC_E_EtOH

Os resultados obtidos para as frações foram analisados por meio de análises gráficas das curvas de sobrevivência e de tabelas que apresentam as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o tempo mediano de sobrevivência (Md) e as interpretações estatísticas obtidas pelo teste de *log-rank*.

O primeiro fracionamento cromatográfico do extrato PAC_E_EtOH resultou na obtenção de quatro frações. No entanto, devido à necessidade de uma quantidade mínima de amostra para a realização dos bioensaios, apenas as frações, PAC_F_AcOEt e PAC_F_MeOH foram avaliadas, uma vez que as demais não apresentaram massa suficiente para o teste.

Após o término dos 21 dias de experimento, e considerando os resultados das análises estatísticas, verificou-se que, a fração PAC_F_MeOH apresentou maior atividade inseticida em comparação ao respectivo grupo controle, atingindo 50% de mortalidade no 13º dia e aproximadamente 90% ao final do período experimental. Em contraste, a fração PAC_F_AcOEt, apresentou mortalidade acumulada de 38% ao final dos 21 dias, não atingindo 50% de mortalidade durante o período analisado. Esses resultados são apresentados graficamente na FIGURA 4.16 e de forma detalhada na TABELA 4.10.

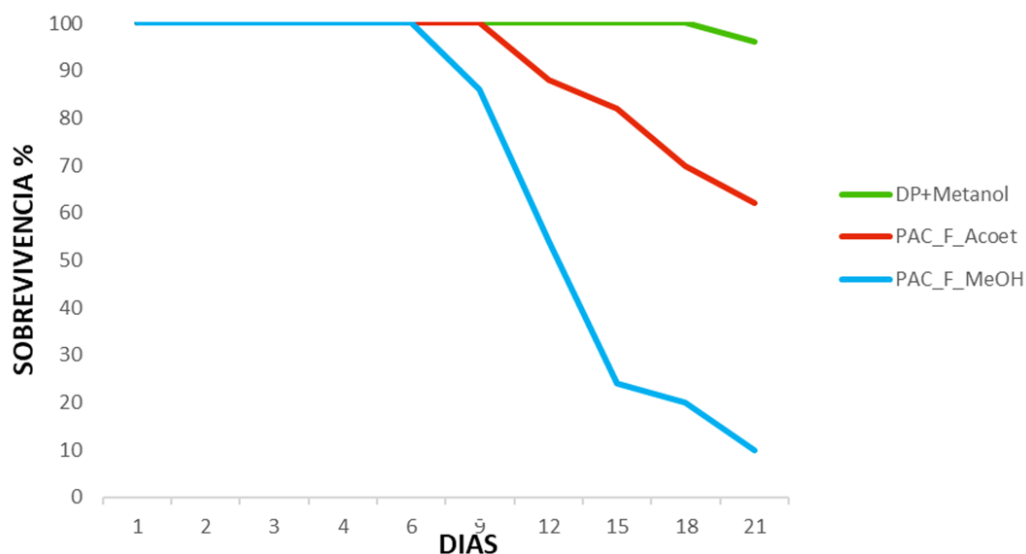


FIGURA 4.16 - Curva de sobrevivência de operárias *A. sexdens* submetidas às frações do extrato PAC_E_EtOH.

TABELA 4.10 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens* submetidas às frações do extrato PAC_E_EtOH.

Tratamento	% Acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	4	6	9	12	15	18	21	
DP+ Metanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	>21 ^a
PAC_F_AcOEt	0	0	0	0	0	0	12	18	30	38	>21 ^a
PAC_F_MeOH	0	0	0	0	0	14	46	76	80	88	13 ^b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste *log rank* ($p < 0,05$).

Com base nesses resultados, a fração PAC_F_MeOH, que apresentou o maior efeito inseticida, foi selecionada para a continuidade do estudo, com o objetivo de isolar e identificar os compostos bioativos.

4.2.1.3 Compostos isolados da fração PAC_F_MeOH do extrato PAC_E_EtOH

Os resultados obtidos para os compostos foram analisados por meio de análises gráficas das curvas de sobrevivência e de tabelas que apresentam as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o tempo mediano de sobrevivência (Md) e as interpretações estatísticas obtidas pelo teste de *log-rank*.

De acordo com a TABELA 4.11 e a FIGURA 4.17, os compostos isolados da fase orgânica da partição líquido-líquido da fração PAC_F_MeOH apresentaram

atividade inseticida moderada quando comparados ao grupo controle, não atingido 50% de mortalidade ao final do experimento. O composto pertencente à classe dos pterocarpanos apresentou aproximadamente 41% de mortalidade ao final de 21 dias de experimento. De forma semelhante, o composto da classe dos cromanos resultou em cerca de 40% de mortalidade no mesmo período, enquanto o composto pertencente à classe dos benzopiranos apresentou menor efeito, com aproximadamente 25% de mortalidade ao término do ensaio.

Além da avaliação dos compostos isolados, a fração aquosa obtida após a partição também foi submetida ao ensaio biológico, apresentando atividade inseticida relevante em comparação ao grupo controle, com mortalidade de 50% no 17º dia e 68% ao final dos 21 dias. Essa fração possivelmente é rica em compostos fenólicos, especialmente taninos, os quais são amplamente reconhecidos na literatura como importantes metabólitos de defesa vegetal contra herbívoros. Taninos podem exercer efeitos tóxicos e adstringentes sobre insetos, principalmente devido à sua capacidade de formar complexos com proteínas e enzimas digestivas, reduzindo a assimilação de nutrientes e comprometendo o funcionamento do trato digestório (EL-ASWAD *et al.*, 2023).

Ao comparar esses resultados com aqueles previamente obtidos para a fração de origem PAC_F_MeOH, a qual apresentou aproximadamente 90% de mortalidade, observou-se que nenhum dos sistemas avaliados isoladamente (compostos ou fração aquosa) reproduziu o mesmo nível de atividade inseticida. Esses resultados sugerem que a elevada atividade observada para a fração PAC_F_MeOH esteja associada à atuação conjunta de diferentes metabólitos presentes na mistura, sendo compatível com a hipótese de um efeito sinérgico, o qual é parcialmente reduzido após a separação dos constituintes.

TABELA 4.11 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens* submetidas aos compostos isolados da fração orgânica de PAC_F_MeOH.

Tratamento	% Acumulada de mortalidade por dia										Md
	1	2	3	4	6	9	12	15	18	21	
DP+Metanol	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6	>21a
PAC_I_Pterocarpano (Composto 1)	4	8	8	8	10	10	12	14	38	41	>21a
PAC_I_Benzopirano (Composto 2)	0	0	0	0	2	4	4	8	16	25	>21a
PAC_I_Cromano (Composto 3)	0	0	0	0	0	2	6	18	36	40	>21a
PAC_F_H ₂ O_02	2	2	2	2	2	4	12	24	64	68	17b

* Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste *log rank* ($p < 0,05$).

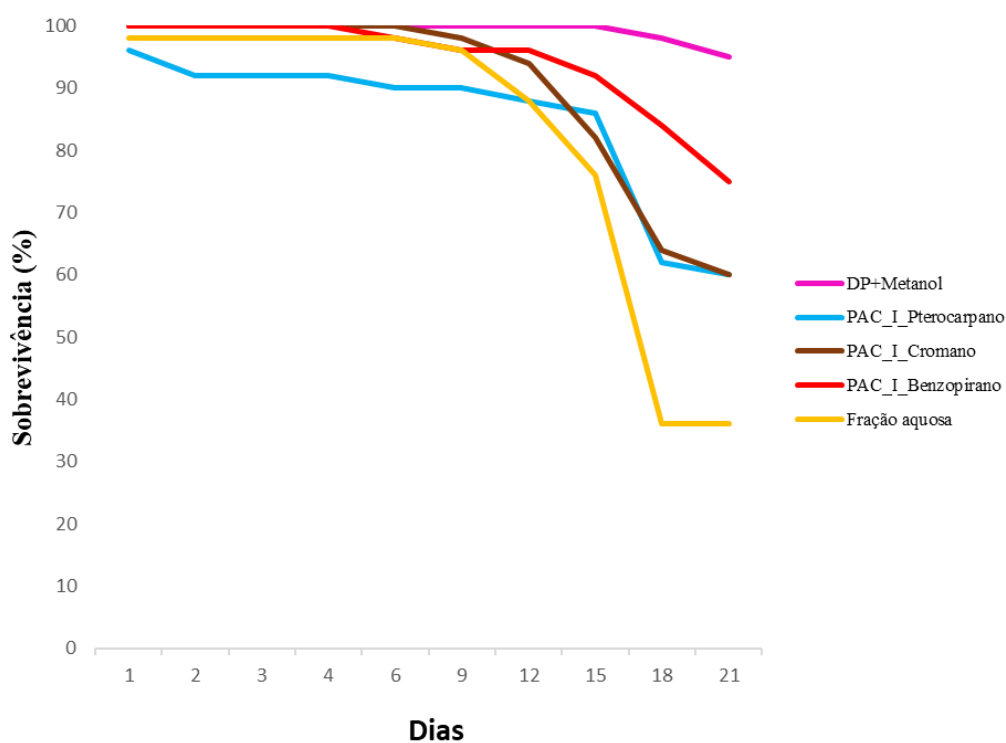


FIGURA 4.17 - Curva de sobrevivência de operárias *A. sexdens* submetidas aos compostos isolados da fração orgânica de PAC_F_MeOH.

4.2.2 Atividade antimicrobiana com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

4.2.2.1 Extratos e frações de *Parahancornia amapa*

O ensaio antimicrobiano frente ao fungo simbiote *L. gongylophorus* foi realizado por meio da técnica de difusão em ágar por poço, utilizando, na triagem inicial, os extratos brutos obtidos das cascas e das folhas de *P. amapa*. Nesse método, a amostra, em concentração conhecida, é introduzida no interior do poço e difunde-se pelo meio de cultura previamente inoculado com o fungo, formando um gradiente de concentração e, na presença de atividade antifúngica, observa-se a formação de um halo de inibição ao redor do poço (SCORZONI *et al.*, 2016). Para a interpretação dos resultados, considerou-se como indicativo de atividade antimicrobiana a formação de halo de inibição com diâmetro igual ou superior a 10 mm (AMPARO *et al.*, 2020).

O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos como média do diâmetro do halo de inibição, acompanhada do respectivo desvio padrão. Os valores obtidos encontram-se apresentados na TABELA 4.12, enquanto as imagens dos ensaios estão ilustradas na FIGURA 4.18.

TABELA 4.12 - Valores dos halos de inibição dos extratos brutos de folhas e cascas de *P. amapa*.

Extratos	Média (mm)	DP (mm)
Controle negativo	6,0	0,0
PAF_E_Hex	6,0	0,0
PAF_E_EtOH	8,8	2,5
PAC_E_Hex	6,0	0,0
PAC_E_EtOH	11,0	0,6

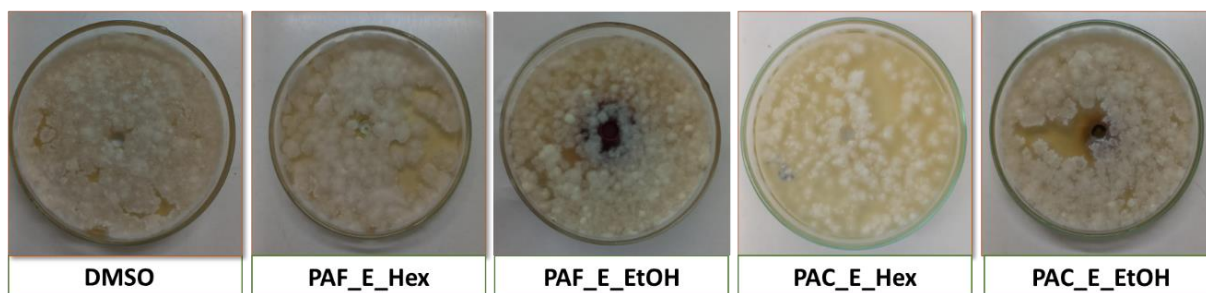


FIGURA 4.18 - Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos de folhas e cascas por meio do ensaio de difusão em ágar.

O controle negativo (DMSO) não apresentou halo de inibição frente ao microrganismo, indicando que o solvente utilizado no preparo das soluções não possui atividade antimicrobiana. Dessa forma, pode-se afirmar que o DMSO não interferiu nos resultados obtidos nos ensaios. Esse solvente é amplamente empregado no preparo de soluções de extratos vegetais em testes de difusão em ágar por poços, em razão de sua elevada capacidade de solubilização e da ausência de atividade antimicrobiana nas concentrações usualmente empregadas (VALGAS *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos indicaram que o extrato PAC_E_EtOH apresentou halo de inibição de 11,0 mm em relação ao controle. Os demais extratos avaliados apresentaram halos de inibição inferiores a 10 mm, sendo que a maioria exibiu valores médios em torno de 6 mm, correspondentes ao diâmetro do próprio poço, o que indica, segundo AMPARO *et al.*, 2020, ausência de atividade antifúngica frente ao microrganismo avaliado.

Esse mesmo ensaio foi realizado com as frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico por coluna de adsorção do extrato bruto PAC_E_EtOH, especificamente as frações PAC_F_AcOEt e PAC_F_MeOH (TABELA 4.13 e FIGURA 4.19). Dentre essas, a fração PAC_F_MeOH apresentou atividade antifúngica moderada, com halo médio de inibição de 15,8 mm em relação ao controle. Em contraste, a fração PAC_F_AcOEt apresentou halo inferior a 10 mm, não sendo considerada ativa.

TABELA 4.13 - Valores dos halos de inibição das frações do extrato PAC_E_EtOH.

Frações	Média (mm)	DP (mm)
Controle negativo	6,0	0,0
PAC_F_AcOEt	9,1	2,1
PAC_F_MeOH	15,8	1,9

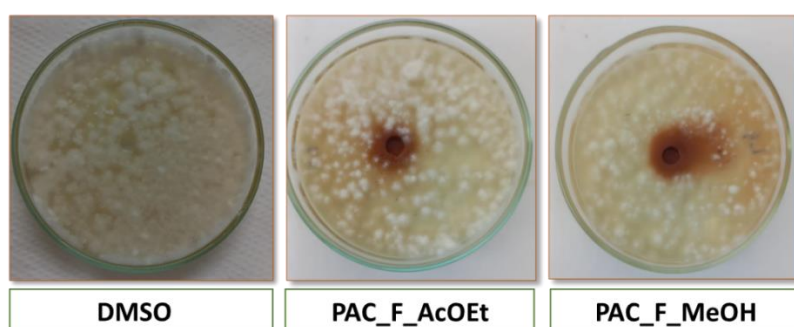


FIGURA 4.19 - Avaliação da atividade antifúngica das frações do extrato PAC_E_EtOH por meio do ensaio de difusão em ágar.

4.3 Perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA

4.3.1 Perfil cromatográfico do extrato PAC_E_EtOH

O extrato selecionado para o estudo foi PAC_E_EtOH, por apresentar resultados promissores nos ensaios biológicos, sendo então submetido à análise por HPLC-PDA. A partir do perfil cromatográfico obtido, foi possível avaliar a distribuição dos constituintes da amostra nas condições empregadas no método, o que contribuiu para a definição da estratégia de fracionamento e para o planejamento das análises subsequentes.

A

FIGURA 4.20 apresenta o cromatograma do extrato PAC_E_EtOH, no qual se observa elevada complexidade da matriz, evidenciada pela baixa resolução cromatográfica e pela presença de um pico largo distribuído ao longo de todo o cromatograma. De acordo com MA *et al.*, 2018, esse perfil sugere a presença de taninos condensados, os quais constituem misturas complexas de oligômeros e polímeros com diferentes graus de polimerização. A elevada heterogeneidade

estrutural desses compostos promove uma eluição contínua ao longo do tempo, impedindo a separação em picos individuais e resultando no chamado “pico não resolvido”.

Diante desse resultado, optou-se pela utilização da cromatografia em coluna de adsorção em sílica como técnica inicial de fracionamento, com o objetivo de simplificar a matriz e permitir uma separação mais eficiente de seus constituintes.

A cromatografia em coluna de adsorção é amplamente empregada nas etapas iniciais de fracionamento de extratos complexos, pois permite a separação dos constituintes com base nas diferentes interações físico-químicas entre as moléculas da amostra e a superfície do material sólido que compõe a fase estacionária (adsorvente) (ZHANG *et al.*, 2018). À medida que a fase móvel percola pela coluna, os compostos menos fortemente adsorvidos deslocam-se mais rapidamente e eluem primeiro, enquanto aqueles com maior afinidade pela fase estacionária permanecem retidos por mais tempo, eluindo apenas com o aumento da força eluente do solvente. Dessa forma, ocorre a separação progressiva dos constituintes do extrato ao longo da coluna, permitindo a coleta de frações com menor complexidade química (DEBNATH *et al.*, 2025).

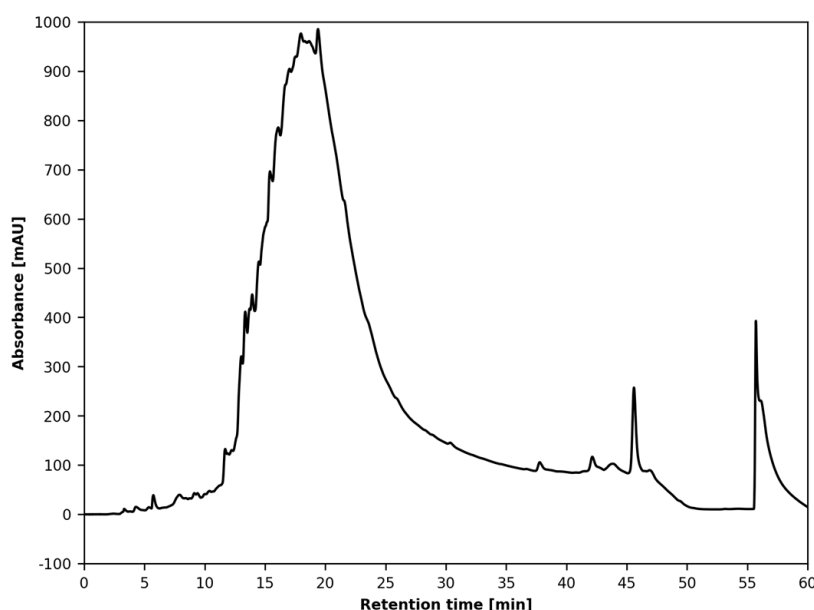


FIGURA 4.20 - Perfil cromatográfico do extrato bruto PAC_E_EtOH (215nm).

4.3.2 Perfil cromatográfico das frações do extrato PAC_E_EtOH

Diante do perfil cromatográfico observado para o extrato bruto, procedeu-se ao primeiro fracionamento por cromatografia em coluna de adsorção. A

partir de 40 g do extrato PAC_E_EtOH, foram obtidas quatro frações, cujos rendimentos estão apresentados na TABELA 4.14.

TABELA 4.14 - Rendimento das frações obtidas a partir do extrato PAC_E_EtOH.

Frações	Massa final (g)	Rendimento %
(PAC_F_Hex)	0,1	0,2
(PAC_F_AcOEt)	2,7	6,7
(PAC_F_MeOH)	36,1	90,0
(PAC_F_H ₂ O)	0,1	0,1

Com o objetivo de avaliar a eficácia do processo de fracionamento e verificar a distribuição dos constituintes químicos, as frações PAC_F_AcOEt e PAC_F_MeOH selecionadas em função do rendimento, foram submetidas à análise por HPLC-PDA. Os perfis cromatográficos obtidos estão apresentados na FIGURA 4.21.

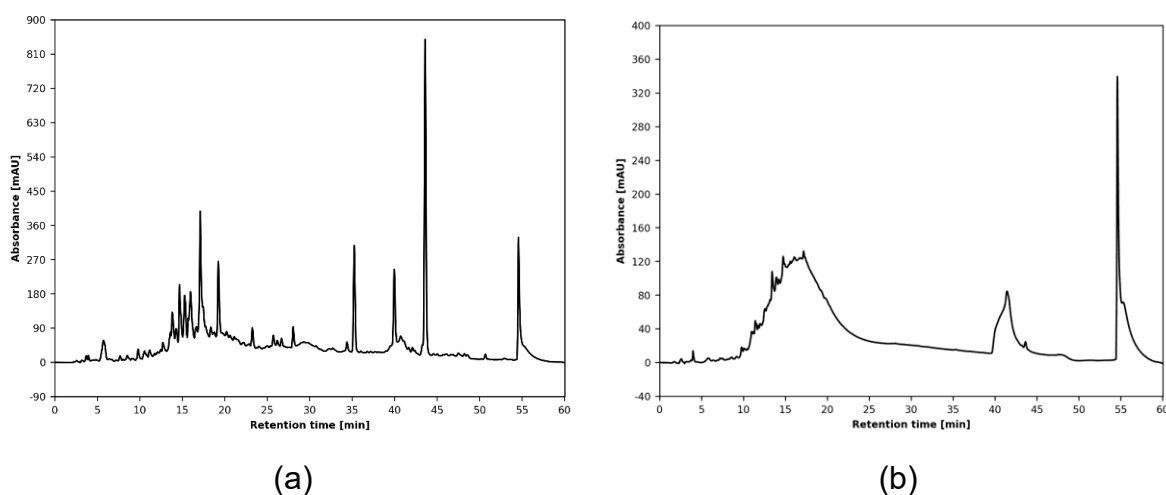


FIGURA 4.21 - (a) Perfil cromatográfico da fração PAC_F_AcOEt e (b) Perfil cromatográfico da fração PAC_F_MeOH.

De acordo com os ensaios biológicos que orientaram o desenvolvimento deste trabalho, a fração PAC_F_MeOH apresentou a melhor atividade biológica e foi selecionada para a continuidade do estudo, visando ao isolamento dos compostos bioativos. No entanto, a análise do seu perfil cromatográfico revelou que essa fração ainda apresentava elevada complexidade, com comportamento semelhante ao do extrato bruto.

Diante desse resultado, após a realização de diferentes testes preliminares, optou-se pela aplicação de uma etapa adicional de fracionamento por partição líquido-líquido, utilizando clorofórmio como fase orgânica, com o objetivo de promover a simplificação da fração e facilitar a separação de seus constituintes. Trata-se de uma técnica clássica de pré-tratamento de amostras, amplamente empregada devido à sua capacidade de gerar frações mais seletivas. O princípio da técnica baseia-se na diferença de solubilidade dos analitos entre as fases aquosa e orgânica, sendo a eficiência da extração determinada tanto pela afinidade do soluto pelo solvente de extração quanto pelo número de extrações realizadas (QUEIROZ *et al.*, 2001).

A massa inicial utilizada nesse fracionamento foi de 10 g. Os rendimentos obtidos a partir da partição líquido-líquido estão apresentados na

TABELA 4.15, enquanto os perfis cromatográficos das subfrações resultantes encontram-se ilustrados na FIGURA 4.22.

TABELA 4.15 - Rendimento das subfrações obtidas a partir da fração PAC_F_MeOH.

Fração	Massa final (g)	Rendimento (%)
CHCl ₃ (Fração orgânica)	0,35	3,5
H ₂ O (Fração aquosa)	8,5	85,0

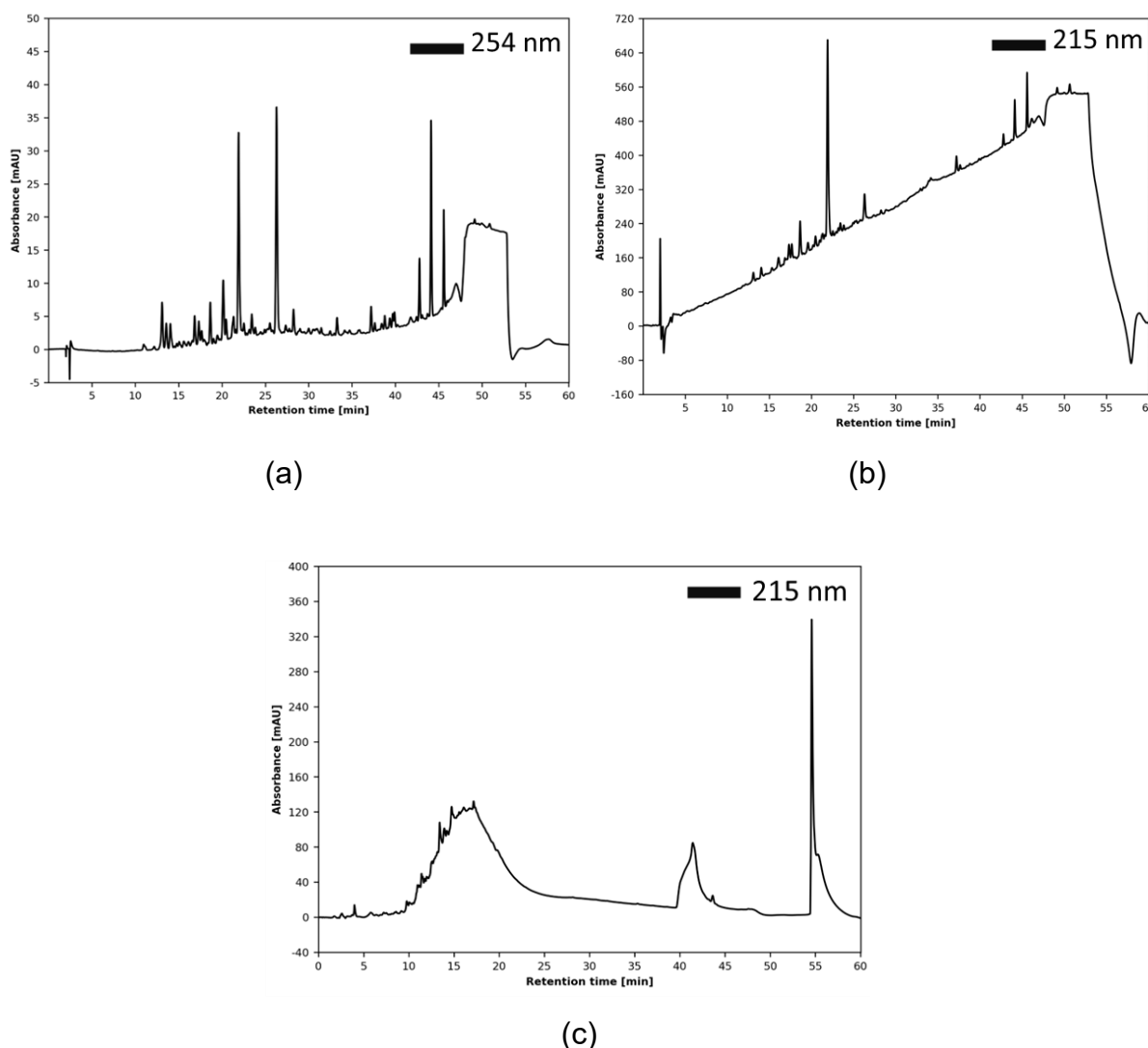


FIGURA 4.22 - (a) Perfil cromatográfico da fração orgânica em 254 nm, (b) Perfil cromatográfico da fração orgânica em 215 nm e (c) Perfil cromatográfico da fração aquosa em 215 nm.

Diante disso, observou-se a eficácia da técnica de partição líquido-líquido na simplificação da fração PAC_F_MeOH. O perfil cromatográfico obtido após essa etapa evidenciou uma redução significativa da complexidade da amostra, com melhor definição dos picos cromatográficos, o que viabilizou o prosseguimento do estudo para as etapas de isolamento dos compostos.

4.3.3 Perfil cromatográfico da fração orgânica de PAC_F_MeOH e isolamento dos compostos

Após a partição líquido-líquido da fração PAC_F_MeOH, a subfração clorofórmica apresentou características adequadas para o isolamento e foi direcionada ao HPLC-PDA.

Durante o procedimento, a maioria das frações foram coletadas, entretanto, em razão da baixa massa obtida, apenas três compostos apresentaram quantidade suficiente para posterior caracterização estrutural. A detecção foi realizada nos comprimentos de onda de (λ) 215 e 254 nm. O cromatograma representativo do processo de isolamento está apresentado na FIGURA 4.23 e a massa final dos compostos isolados estão apresentados na TABELA 4.16.

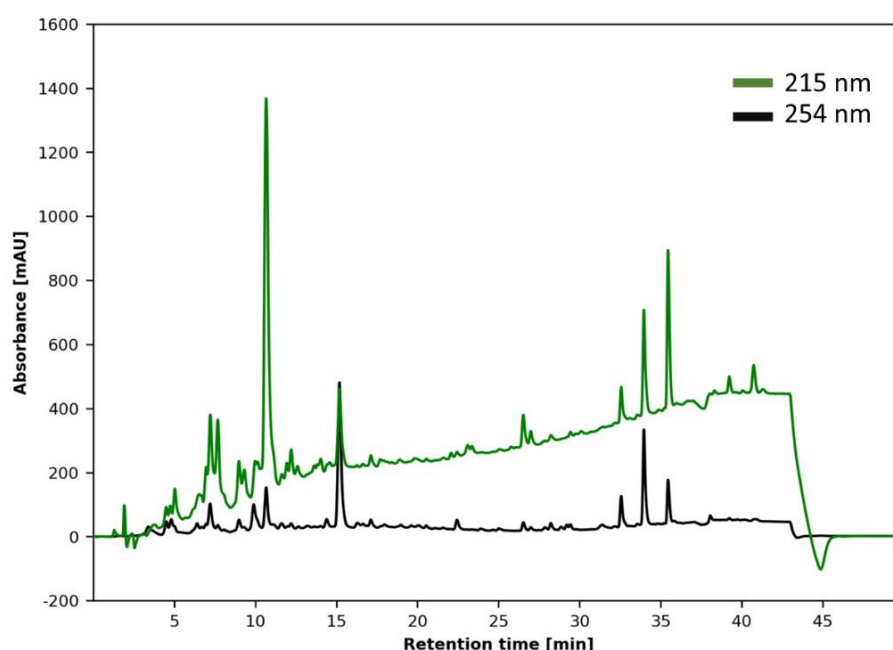


FIGURA 4.23 - Perfil cromatográfico de isolamentos dos compostos da fração orgânica de PAC_F_MeOH.

TABELA 4.16 - Massa final dos compostos isolados da fração orgânica de PAC_F_MeOH.

Composto	Massa final (mg)
Pterocarpano	3,5
Composto 1	
Benzopirano	1,4
Composto 2	
Cromano	3,1
Composto 3	

4.4 Metabólitos isolados e caracterizados da fração orgânica de PAC_F_MeOH

Foram isolados três compostos, todos pertencentes à classe dos benzopiranos, especificamente um cromano e um pterocarpano, conforme ilustrado na FIGURA 4.24. Dentre esses compostos, todos são relatados pela primeira vez como produtos naturais, com exceção do cromano, previamente descrito apenas de forma sintética.

A elucidação estrutural dos compostos foi realizada por meio de análises de RMN de ^1H e ^{13}C , complementadas por experimentos bidimensionais (COSY, HMBC e HSQC), por experimento de NOE 1D e análises por LC-MS/MS.

Os espectros de RMN e de LC-MS/MS obtidos para cada composto encontram-se apresentados no APÊNDICE A e B. Adicionalmente, os dados espectrais foram comparados com aqueles descritos em estudos anteriores para estruturas semelhantes, que será exposto na seção seguinte, reforçando a confiabilidade das identificações propostas.

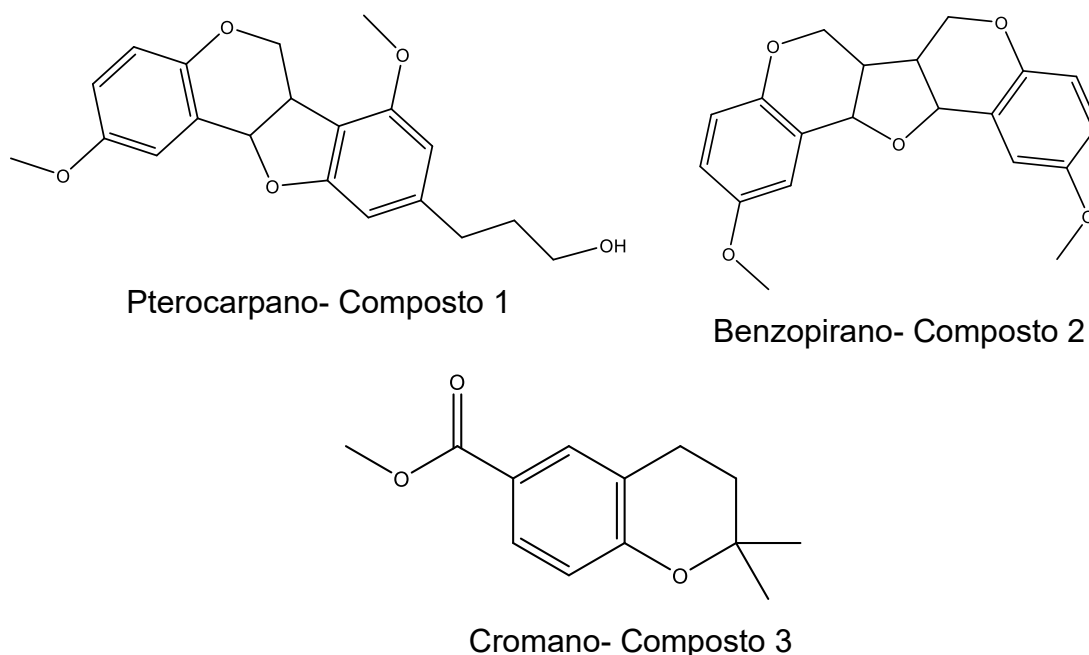


FIGURA 4.24 - Estruturas isoladas e caracterizadas de *P. amapa*.

4.4.1 Pterocarpano (Composto 1)

O composto isolado da fração orgânica proveniente da partição líquido-líquido da fração PAC_F_MeOH foi identificado como pertencente à classe dos pterocarpanos e denominado, segundo a nomenclatura IUPAC, 3-(2,7-dimetoxi-6a,11a-diidro-6H-benzofuro[3,2-c]cromeno-9-il)propan-1-ol (FIGURA 4.25). Os dados

de RMN de ^1H e ^{13}C (TABELA 4.17) foram comparados com aqueles descritos para um composto estruturalmente semelhante reportado por AHMAD *et al.*, 2006.

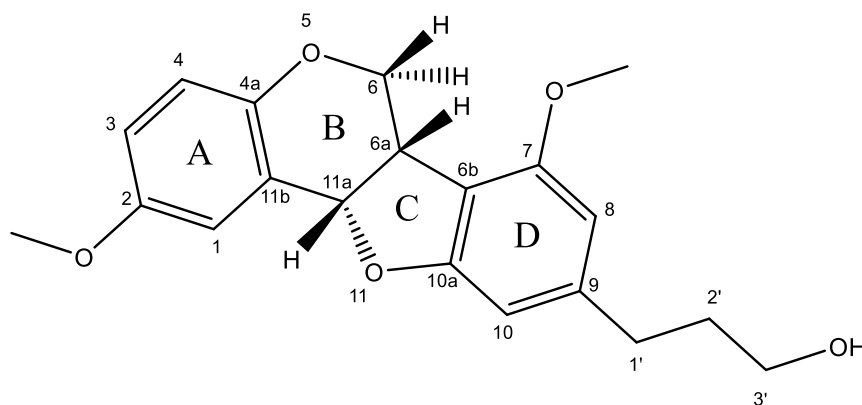


FIGURA 4.25 - Estrutura do composto 1.

A análise do espectro de RMN de ^1H revelou presença de sinais de hidrogênios aromáticos. Foram observados um duplete em δ 6,76 (H-4, *d*, $J = 8,1$ Hz, 1H) e um duplo duplete em δ 6,82 (H-3, *dd*, $J = 8,1$ e $2,0$ Hz, 1H), os quais esses dois hidrogênios estão em acoplamento *orto*, confirmado pela constante de acoplamento $J = 8,1$ Hz. Adicionalmente, o sinal em δ 6,95, observado como um duplete (H-1, *d*, $J = 2,0$ Hz, 1H), encontra-se em acoplamento *meta* com o hidrogênio H-3, δ 6,82 evidenciado pela constante de $J = 2,0$ Hz. Esses sinais foram atribuídos ao anel aromático A.

Além disso, foi observado, o sinal em δ 6,73 (*sl*, 2H), integrando para dois hidrogênios, os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-10 do anel aromático D. A presença de um único sinal pode ser explicada pela elevada similaridade do ambiente químico em que o H-8 e H-10 se encontram, resultando em deslocamentos químicos muito próximos e sobreposição dos sinais no espectro de RMN de ^1H .

Na sequência, o mapa de contorno HMBC foi analisado com o objetivo de atribuir os sinais dos demais carbonos dos anéis aromáticos, permitindo a elucidação completa dos anéis A e D (FIGURA 4.26). A partir dessa análise, verificou-se que dois carbonos do anel A (C-2 e C-4a) apresentam deslocamentos químicos mais elevados em relação aos demais, com valores de δ 149,1 e δ 147,6, respectivamente, sugerindo a influência de grupos vizinhos retiradores de densidade eletrônica. Comportamento semelhante foi observado para os carbonos do anel D (C-7 e C-10a), que apresentaram deslocamentos em δ 145,2 e δ 147,5, igualmente indicativos da presença de substituintes com efeito retirador de densidade eletrônica.

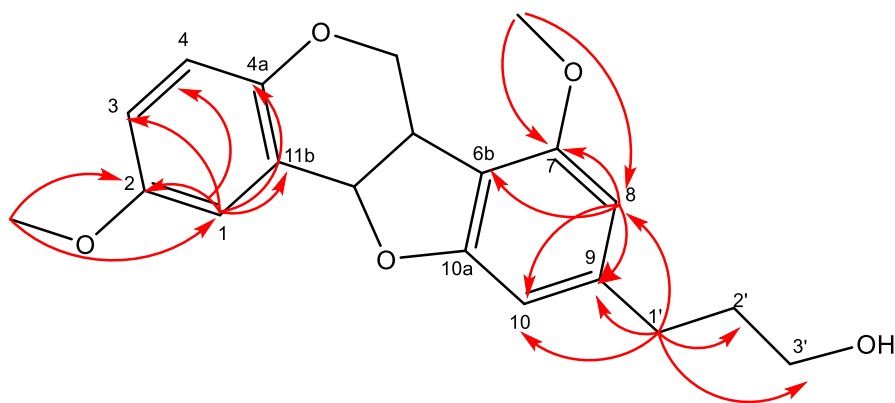


FIGURA 4.26 - Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC H→C do composto 1.

No espectro de RMN de ^1H , também foram observados sinais característicos do anel heterocíclico do esqueleto de pterocarpanos, em δ 5,49 (H-11a, *d*, $J=6,3$ Hz, 1H) e na região δ 3,49-3,44 (H-6a, *m*, 1H), os quais foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos localizados na junção entre os anéis B e C (ARAÚJO *et al.*, 2008). Essa atribuição foi confirmada por meio da análise do mapa de contorno COSY, no qual foi possível visualizar o acoplamento entre esses dois hidrogênios (FIGURA 4.27).

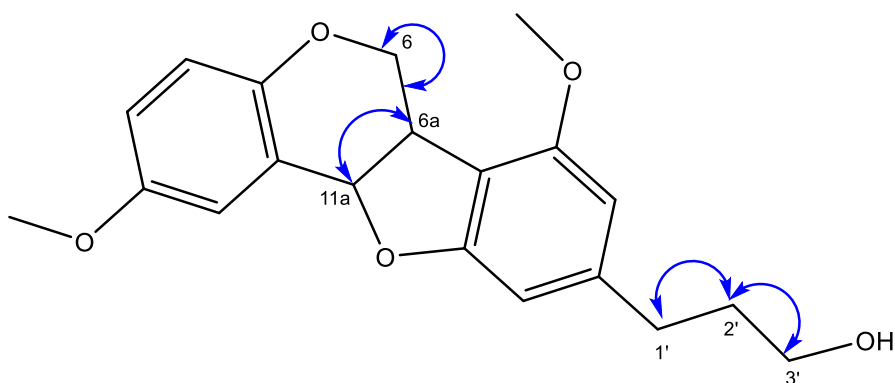


FIGURA 4.27 - Principais acoplamentos observados no mapa de contorno COSY do composto 1.

A estereoquímica relativa entre o H-11a e H-6a foi determinada a partir da análise conjunta da constante de acoplamento vicinal e do experimento de NOE unidimensional. A constante de acoplamento observada ($J = 6,3$ Hz) é compatível com uma relação *cis* entre esses prótons. Essa atribuição foi corroborada pela observação de efeitos NOE entre H-11a e H-6a, indicando proximidade espacial e sugerindo que ambos se encontram orientados na mesma face do anel, em uma configuração relativa *cis*.

Duplo dupletos em δ 3,84 (H-6 α , *dd*, J = 11,1; 5,3 Hz, 1H) e δ 3,75 (H-6 β , *dd*, J = 11,1; 7,3 Hz, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios oximetilênicos do anel B. Esses sinais apresentam uma constante de acoplamento comum de J =11,1 Hz, característica de acoplamento geminal, indicando que H-6 α e H-6 β estão ligados ao mesmo átomo de carbono. Essa atribuição foi corroborada pela análise do espectro bidimensional de HSQC, no qual ambos os prótons apresentam correlação com o carbono em δ 65,0 (C-6). Adicionalmente, o mapa de contorno COSY evidenciou o acoplamento entre H-6 α e H-6 β , bem como permitiu a identificação dos acoplamentos com hidrogênios vicinais.

Diante disso, os hidrogênios (H-6 α e H-6 β) foram identificados como diastereotópicos, em decorrência da presença de um centro estereogênico adjacente, que gera ambientes químicos distintos e, conseqüentemente, sinais separados no espectro de RMN de ^1H . Além disso, experimento de NOE 1D possibilitou a atribuição da configuração relativa de cada hidrogênio (δ 3,84, H-6 α e δ 3,75, H-6 β) fornecendo evidências sobre sua orientação espacial na molécula.

Ainda analisando o espectro de RMN de ^1H , também foi possível identificar a presença de dois grupos metoxila na estrutura, evidenciados pelos simpletos em δ 3,82 (2-OMe, *s*, 3H) e δ 3,85 (7-OMe, *s*, 3H), com ambos, integrando para três hidrogênios. A determinação das posições foi realizada por meio da análise do mapa de contorno HMBC, no qual as correlações observadas permitiram associar o grupo metoxila em δ 3,82 ao carbono em δ 149,1 (C-2) do anel aromático A, bem como o grupo em δ 3,85 ao carbono em δ 145,2 (C-7) do anel aromático D (FIGURA 4.26).

Por fim, a presença de uma cadeia lateral hidroxipropílica foi sugerida a partir dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H em δ 3,57 (*t*, J =6,5 Hz, 2H), δ 2,61-2,65 (*m*, 2H) e δ 1,89-1,77 (*m*, 2H). A confirmação dessa cadeia foi confirmada pela análise do mapa de contorno COSY e por meio do mapa de contorno HMBC possibilitou a determinação da posição dessa cadeia na estrutura.

TABELA 4.17 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e HMBC (CD_3OD , 14,1T) do composto 1.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$ (Lit.)	$\delta^1\text{H}$ (Lit.)	HMBC
1	110,4	6,95 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	110,6	7,27 (<i>sl</i>)	C-11a,C-4,C-3,C-11b,C-4a,C-2
2	149,1	-	149,1	-	-
3	119,7	6,82 (<i>dd</i> , $J = 8,1; 2,0$ Hz, 1H)	119,5	7,25 (<i>sl</i>)	-
4	116,1	6,76 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz, 1H)	-	-	C-1,C-4a,C-2
4a	147,6	-	147,5	-	-
5	-	-	-	-	-
6	65,0	H β 3,75 e (<i>dd</i> , $J = 11,1$ e 5,3 Hz, 1H) H α 3,84 (<i>dd</i> , $J = 11,1$ e 7,2 Hz, 1H)	69,9	(4,22, <i>t</i> , $J = 9,5$ Hz) (4,33, <i>dd</i> , $J = 9,5; 4,1$ Hz) (3,73-3,72, <i>m</i>)	C-6a,C-11a,C-6b C-6a,C-11a,C-4a C-6,C-11a,C-6b,C-11b,C-7
6a	55,5	3,49-3,44 (<i>m</i> , 1H)	52,3	-	-
6b	129,8	-	134,3	-	-
7	145,2	-	-	-	-
8	114,0	6,73 (<i>sl</i> , 1H)	119,7	6,86 (<i>dd</i> , $J = 8,2; 1,1$ Hz)	C-7,C-9,C-6b,C-10
9	136,9	-	145,6	-	-
10	117,9	6,73 (<i>sl</i> , 1H)	110,7	6,99 (<i>sl</i>)	C-7,C-9,C-6b,C-10
10a	147,5	-	147,6	-	-
11	-	-	-	-	-
11a	89,0	5,49 (<i>d</i> , $J = 6,3$ Hz, 1H)	89,6	5,69 (<i>dd</i> , $J = 6,2$ Hz)	C-6a,C-6,C-1,C-6b,C-11b,C-10a
11b	134,7	-	128,2	-	-
2-OCH ₃	56,3	3,82 (<i>s</i> , 3H)	56,5	3,88 (<i>s</i>)	C-2,C-1
7-OCH ₃	56,7	3,85 (<i>s</i> , 3H)	56,4	3,82 (<i>s</i>)	C-7,C-8
1'	32,9	2,61-2,65 (<i>m</i> , 2H)	36,2	3,17-3,13 (<i>m</i>)	C-2',C-3',C-9,C-10
2'	35,9	1,89 -1,77 (<i>m</i> , 2H)	-	-	C-1', C-3', C-9
3'	62,2	3,57 (<i>t</i> , $J = 6,5$ Hz, 2H)	-	-	C-1',C-2'

*Dados de RMN * $\delta^1\text{H}$ (Lit.) e $\delta^{13}\text{C}$ (Lit.) de um composto em CDCl_3 (AHMAD *et al.* 2006).

A estrutura proposta foi corroborada por meio da análise dos dados de espectrometria de massas, obtidos no modo negativo de ionização. Nessa análise, foi identificado o íon precursor de m/z 341,1405, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_5$, com erro de 0,14 ppm.

A partir do espectro de MS/MS e do mecanismo de fragmentação (FIGURA 4.28), observou-se o íon m/z 326, atribuído à perda radicalar de CH_3 (15

Da), o íon base m/z 311, resultante da perda neutra de uma unidade CH_2O (30 Da) e o íon m/z 283, correspondente à perda neutra da cadeia lateral hidroxipropílica (58 Da).

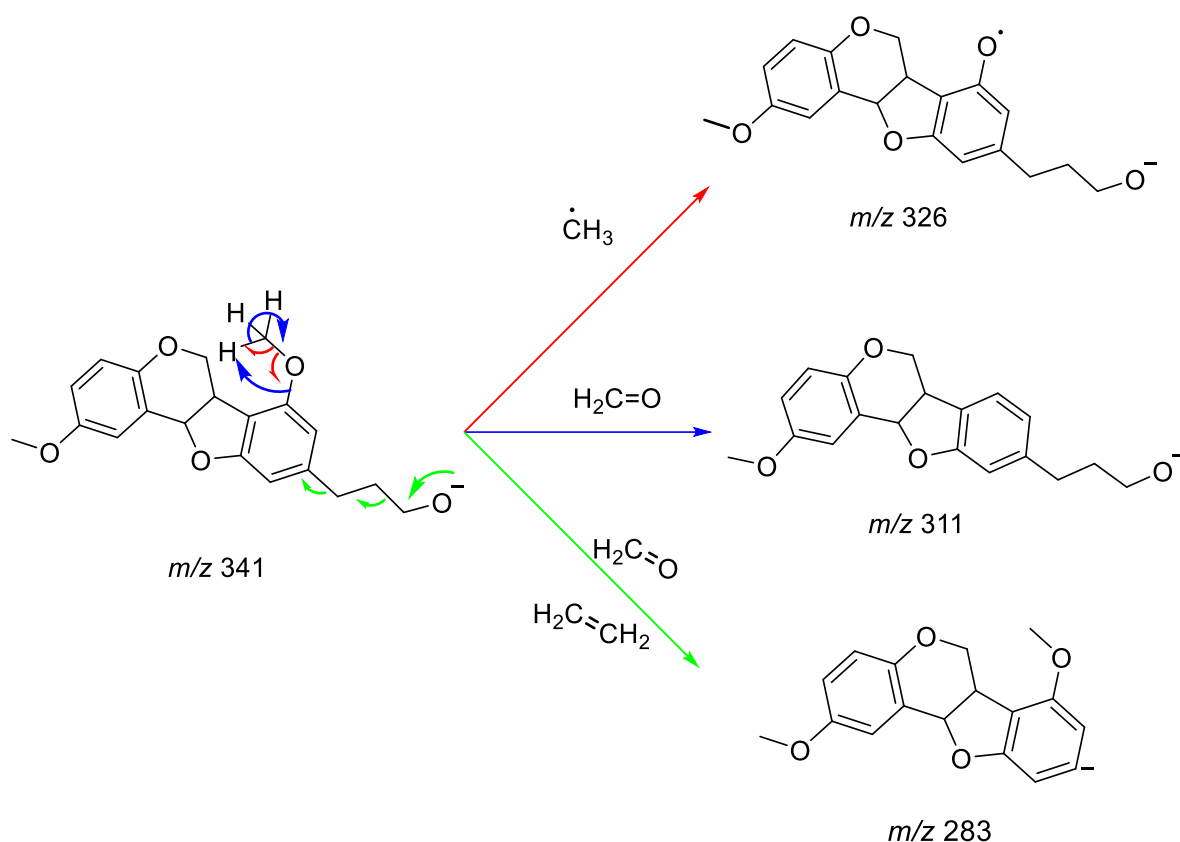


FIGURA 4.28 - Proposta de fragmentação do composto 1.

4.4.2 Benzopirano (Composto 2)

O composto isolado da fração orgânica proveniente da partição líquido-líquido da fração PAC_F_MeOH foi identificado como pertencente à classe dos benzopiranos e denominado, segundo a nomenclatura IUPAC, 2,11-dimetoxi-6a,6b,12b,13a-tetraidro-6H,7H-furo[3,2-c:4,5-c'] bis [1] benzopirano (FIGURA 4.29). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C (TABELA 4.18) foram comparados com aqueles descritos para um composto estruturalmente semelhante reportado por AHMAD *et al.*, 2006.

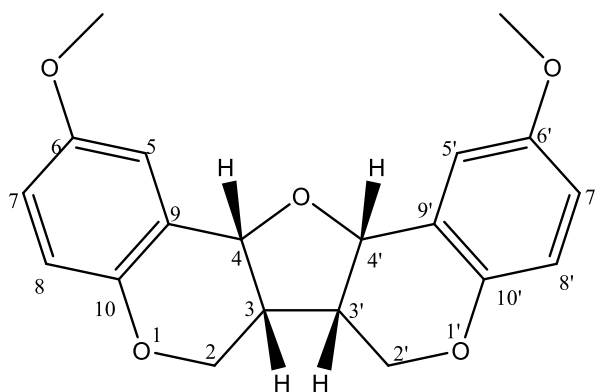


FIGURA 4.29 - Estrutura do composto 2.

Na análise do espectro de RMN de ^1H revelou a presença de sinais de hidrogênios aromáticos. O sinal δ 6,79 (H-8, *d*, $J=8,1$ Hz) e o sinal δ 6,84 (H-7, *dd*, $J=8,1$ e $1,9$ Hz, 1H), estão em acoplamento *orto*, conforme indicado pela constante de acoplamento $J=8,1$ Hz. Já o duplete observado em δ 6,95 (H-5, *d*, $J=1,9$ Hz, 1H) apresenta acoplamento *meta* com o hidrogênio em δ 6,84 (H-7), evidenciado pela constante de $J=1,9$ Hz.

Na sequência, o mapa de contorno HMBC foi analisado com o intuito de atribuir os sinais dos demais carbonos aromáticos, bem como identificar suas relações com a vizinhança. A partir do hidrogênio em δ 6,95 (H-5), observaram-se correlações com os carbonos em δ 87,4 (C-4); δ 120,1 (C-7); δ 133,6 (C-9); δ 147,1 (C-10) e δ 149,1 (C-6) (FIGURA 4.30). Dentre os carbonos aromáticos, os carbonos em δ 147,1 (C-10) e δ 149,1 (C-6) apresentaram deslocamentos químicos elevados em comparação aos demais, o que sugere a influência de grupos vizinhos retiradores de densidade eletrônica. Análises semelhantes foram feitas para os hidrogênios em δ 6,79 e δ 6,84, investigando suas correlações com os carbonos e conferindo maior confiabilidade às atribuições dos deslocamentos químicos.

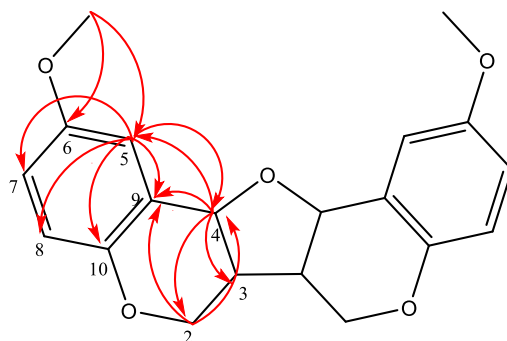


FIGURA 4.30 - Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC H $\rightarrow$ C do composto 2.

No espectro de RMN de ^1H , também foi observado o sinal em δ 4,73 (H-4, *d*, $J=4,5$ Hz) atribuído a um hidrogênio oximetileno, e o sinal na região δ 3,19 - 3,15 (H-3, *m*, 1H). Esses sinais foram associados aos prótons ligados aos carbonos localizados na junção entre os anéis pirano e furano. Essa atribuição foi corroborada pela análise do mapa de contorno COSY, no qual foi possível observar o acoplamento entre H-4 e H-3, assim como os acoplamentos com os sinais em δ 4,26-4,23 (H-2, *m*, 1H) e δ 3,85-3,84 (H-2, *m*, 1H) (FIGURA 4.31). Ressalta-se que a constante de acoplamento observada para o sinal em δ 4,73 ($J=4,5$ Hz) é referente com uma relação *cis* entre H-3 e H-4 na estrutura.

Posteriormente, por meio da análise do mapa de contorno HMBC, foram observadas as principais correlações do sinal em δ 4,73 com os carbonos em δ 55,1 (C-3); δ 72,4 (C-2); δ 110,9 (C-5) e δ 133,5 (C-9) (FIGURA 4.30).

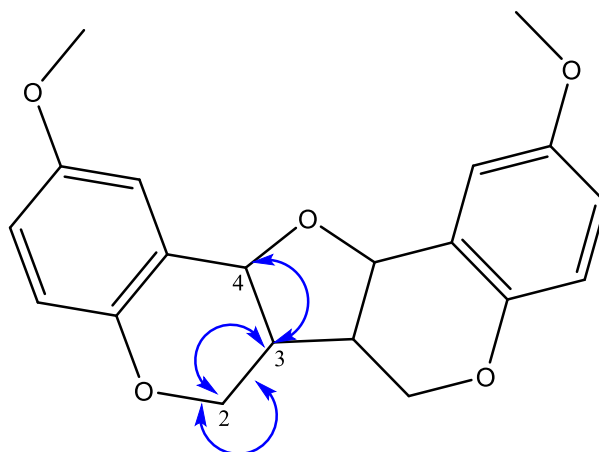


FIGURA 4.31 - Principais acoplamentos observados no mapa de contorno COSY do composto 2.

Os sinais em δ 4,26-4,23 (H-2, *m*, 1H) e δ 3,85-3,84 (H-2, *m*, 1H) no espectro de RMN de ^1H apresentam-se como multipletos. A análise do mapa de contorno HSQC revelou que ambos os prótons estão ligados ao mesmo átomo de carbono, com deslocamento químico em δ 72,4 (C-2). Adicionalmente, o espectro bidimensional COSY evidencia o acoplamento entre esses dois sinais. Dessa forma, com base na análise conjunta dos espectros, foi determinado que esses hidrogênios geminais são diastereotópicos, em decorrência da presença de um centro estereogênico adjacente, o que justifica os diferentes deslocamentos químicos observados.

A presença do sinal em δ 3,86 (6-OCH₃, *s*, 3H) corresponde a um grupo metoxila. A determinação da posição desse substituinte foi realizada por meio da

análise do espectro bidimensional HMBC, no qual foram observadas correlações com os carbonos em δ 149,1 (C-6) e δ 110,9 (C-5).

Com base no conjunto de atribuições realizadas, foi proposto que a molécula isolada corresponde a uma estrutura dimérica simétrica. Essa hipótese fundamentou-se, principalmente, na observação de um sinal em δ 55,5 ppm (C-3), atribuído a um carbono trissubstituído, cujo hidrogênio associado apresenta integração correspondente a um único próton no espectro de RMN de ^1H . Adicionalmente, o valor de deslocamento químico desse carbono é indicativo da ausência de heteroátomo adjacente, e a inexistência de correlações adicionais envolvendo esse sinal no mapa de contorno HMBC reforça a proposta de simetria estrutural. Diante dessas evidências, a amostra foi submetida à análise por LC-MS/MS, a qual corroborou a proposta estrutural sugerida ao revelar um íon precursor de m/z 341,1359, no modo positivo de ionização. Esse valor é compatível com uma estrutura dimérica simétrica, apresentando fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_5$ e erro de massa de 0,73ppm.

A análise do espectro de MS/MS e da proposta de fragmentação (FIGURA 4.32) revelou inicialmente a formação do íon fragmento m/z 323, atribuído à perda de uma molécula de H_2O (18 Da). O íon m/z 291, associado à perda conjunta de H_2 (2 Da) e de um grupo CH_2O (30 Da). Já o íon m/z 137 originou-se a partir de um rearranjo de hidrogênio, seguido da perda de 186 Da.

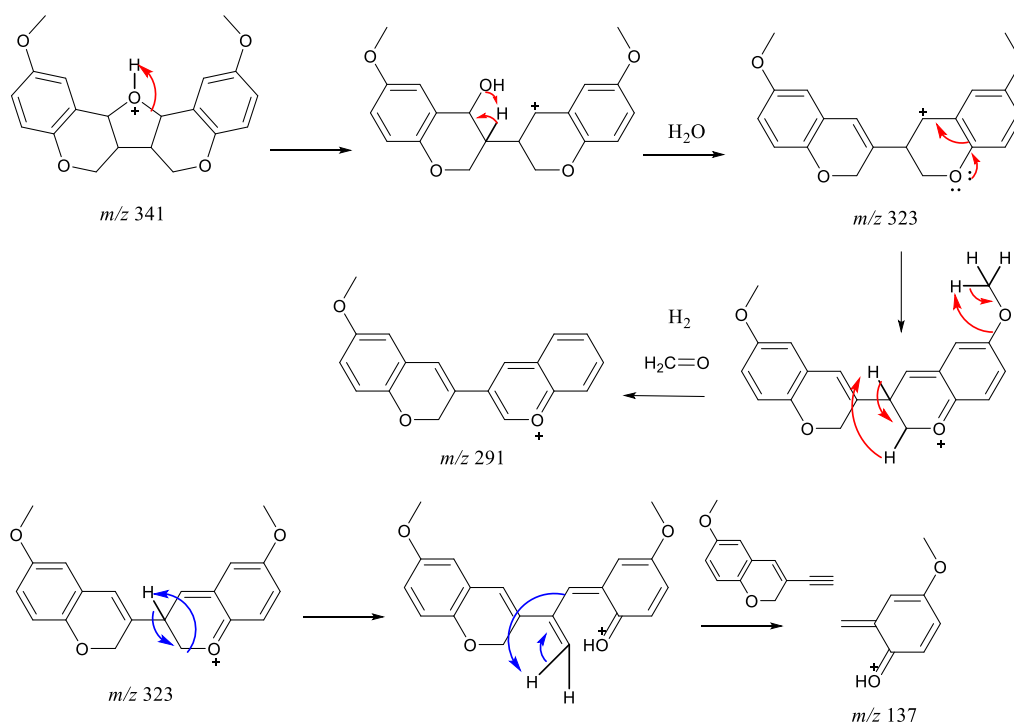


FIGURA 4.32 - Proposta de fragmentação do composto 2.

TABELA 4.18 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e HMBC (CD_3OD , 14,1T) do composto 2.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$ (Lit.)	$\delta^1\text{H}$ (Lit.)	HMBC
1	-	-	-	-	-
2	72,4	H α 3,85-3,82 (m, 1H) H β 4,26-4,24 (m, 1H)	69,9	(4,22, t, J= 9,5 Hz) (4,33, dd, J= 9,5; 4,1 Hz)	C-4, C-9
3	55,1	3,18-3,15 (m, 1H)	52,3	(3,73-3,72, m)	C-2, C-4, C-9
4	87,4	4,73 (d, J=4,5 Hz, 1H)	89,6	5,69 (dd, J= 6,2 Hz)	C-2, C-3, C-9
5	110,9	6,95 (d, J=1,9 Hz, 1H)	110,6	7,27 (sl)	C-7, C-8, C-9, C-10
6	149,1	-	149,1	-	-
7	120,1	6,82 (dd, J=8,1 e 1,9HZ, 1H)	119,5	7,25 (sl)	C-9, C-5, C-6, C-8, C-10
8	116,1	6,79 (d, J=8,1 Hz, 1H)	-	-	C-9, C-5, C-6, C-10
9	133,6	-	128,2	-	-
10	147,1	-	147,5	-	-
6-OCH $_3$	56,4	3,86 (s, 3H)	56,5	3,88 (s)	C-5, C-6
1'	-	-	-	-	-
2'	72,4	H α 3,85-3,82 (m, 1H) H β 4,26-4,24 (m, 1H)	69,9	(4,22, t, J= 9,5 Hz) (4,33, dd, J= 9,5; 4,1 Hz)	C-4', C-9'
3'	55,1	3,18-3,15 (m, 1H)	52,3	(3,73-3,72, m)	C-2', C-4', C-9'
4'	87,4	4,73 (d, J=4,5 Hz, 1H)	89,6	5,69 (dd, J= 6,2 Hz)	C-2', C-3', C-9'
5'	110,9	6,95 (d, J=1,9 Hz, 1H)	110,6	7,27 (sl)	C-7', C-8', C-9', C-10'
6'	149,1	-	149,1	-	-
7'	120,1	6,82 (dd, J=8,1 e 1,9HZ, 1H)	119,5	7,25 (sl)	C-9', C-5', C-6', C-8', C-10'
8'	116,1	6,79 (d, J=8,1 Hz, 1H)	-	-	C-9', C-5', C-6', C-10'
9'	133,6	-	128,2	-	-
10'	147,1	-	147,5	-	-
6'-OCH $_3$	56,4	3,86 (s, 3H)	56,5	3,88 (s)	C-5', C-6'

*Dados de RMN * $\delta^1\text{H}$ (Lit.) e $\delta^{13}\text{C}$ (Lit.) de um composto em CDCl_3 (AHMAD *et al.*, 2006).

4.4.3 Cromano (Composto 3)

A substância metil 2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato (FIGURA 4.33) pertence à classe dos cromanos e foi isolada da fração orgânica obtida a partir da partição líquido-líquido da fração PAC_F_MeOH. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C (TABELA 4.19) foram comparados com aqueles descritos para o cromano sintético correspondente, conforme reportado por BATISTA *et al.*, 2008.

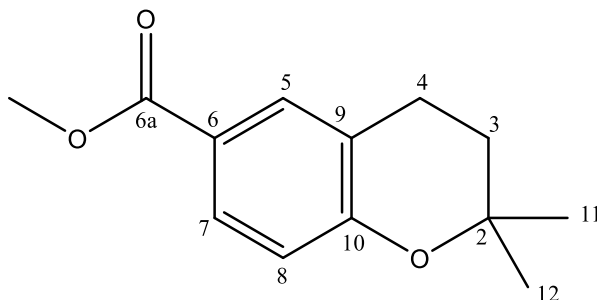


FIGURA 4.33 - Estrutura do composto 3.

No espectro de RMN de ^1H , foram inicialmente observados sinais de hidrogênios aromáticos. O duplete em δ 6,79 (H-8, *d*, $J=8,4$ Hz, 1H) e um duplo duplete em δ 7,70 (H-7, *dd*, $J=8,4$ e 2,3 Hz, 1H) indicam hidrogênios em acoplamento *orto*, conforme evidenciado pela constante de acoplamento $J=8,4$ Hz. O sinal em δ 7,77 (H-5, *d*, $J=2,3$ Hz, 1H), observado como um duplete, apresenta acoplamento *meta* com o hidrogênio em δ 7,70 (H-7), confirmado pela constante $J=2,3$ Hz. Esse conjunto de sinais é característico de um anel aromático trissubstituído.

A análise do espectro bidimensional de HMBC, permitiu realizar a atribuição dos demais sinais de carbono do sistema aromático e sua vizinhança. Tendo como o ponto de partida o hidrogênio em δ 7,77 (H-5), foram observadas correlações de longa distância com os carbonos em δ 26,1 (C-4), δ 115,3 (C-8), δ 122,0 (C-6), δ 130,2 (C-7), δ 161,4 (C-10) e δ 169,0 (C-6a) (FIGURA 4.34). Análises análogas foram realizadas para os demais hidrogênios aromáticos, permitindo a confirmação das atribuições propostas.

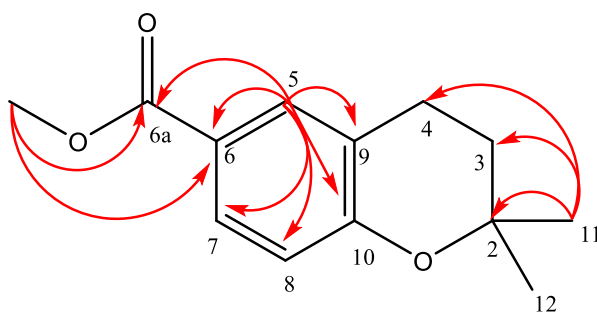


FIGURA 4.34 - Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC H→C do composto 3.

Dentre os carbonos correlacionados, o sinal em δ 161,4 (C-10) foi atribuído a um carbono não hidrogenado, cujo deslocamento químico elevado é compatível com a presença de um grupo vizinho retirador de densidade eletrônica. O sinal observado em δ 169,0 (C-6a) também corresponde a um carbono não hidrogenado e, por situar-se na região característica de carbonos carbonílicos, indica a presença de um grupo carbonila na estrutura.

Ainda com base nos dados do espectro unidimensional de RMN de ^1H , foram observados sinais referentes à porção alifática da molécula, incluindo um simpleto em δ 1,26 (H-11 e H-12, s, 6H), além de sinais na região δ 1,76-1,71 (H-3, *m*, 2H) e δ 2,71-2,66 (H-4, *m*, 2H). Os hidrogênios metilênicos em δ 1,76-1,71 e δ 2,71-2,66 apresentam correlação no mapa de contorno COSY, evidenciando acoplamento entre eles e confirmando que se encontram em posições vicinais na estrutura (FIGURA 4.35). Em relação ao simpleto em δ 1,26, que integra para seis hidrogênios, este indica a presença de dois grupos metila equivalentes, os quais apresentam os mesmos deslocamentos químicos tanto no espectro de RMN de ^1H quanto no de ^{13}C (δ 29,1).

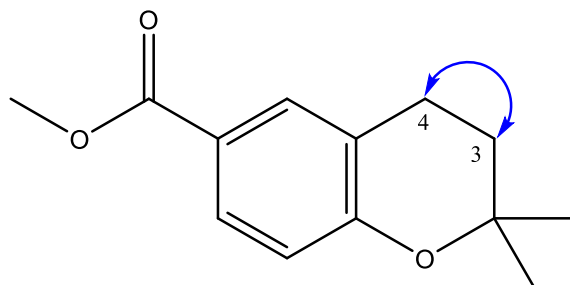


FIGURA 4.35 - Principal acoplamento observado no mapa de contorno COSY do composto 3.

Diante disso, a análise do mapa de contorno HMBC permitiu estabelecer a posição dos grupos metila na estrutura, bem como definir a sua vizinhança (FIGURA

4.34). Foram observadas correlações com os carbonos em δ 44,6 (C-3), δ 26,1 (C-4) e com um carbono não hidrogenado em δ 71,46 (C-2), indicando que ambos se encontram ligados a esse carbono. Esse conjunto de correlações já descrita é compatível com a presença de um anel cromano na estrutura da molécula.

Por fim, foi observado um simpleto em δ 3,84 (6-OCH₃, s, 3H), integrando para três hidrogênios, atribuído aos hidrogênios de um grupo metoxila. A posição relativa desse grupo foi definida a partir das correlações observadas no espectro de HMBC, permitindo completar a elucidação estrutural da molécula.

A análise por espectrometria de massas permitiu a identificação do íon precursor de m/z 221,1169 no modo positivo de ionização, correspondente à fórmula molecular C₁₃H₁₆O₃, com erro de 2,36 ppm. A partir do espectro de MS/MS e o mecanismo de fragmentação (FIGURA 4.36), observou-se o íon produto de m/z 165, o qual foi atribuído à clivagem do anel pirânico, resultando na perda de parte da subestrutura heterocíclica. O íon m/z 189 foi formado pela perda neutra de uma unidade de CH₃OH (32 Da) a partir do íon precursor, e o fragmento m/z 69 atribuído à abertura do anel pirânico, acompanhada de uma perda neutra de 152 Da.

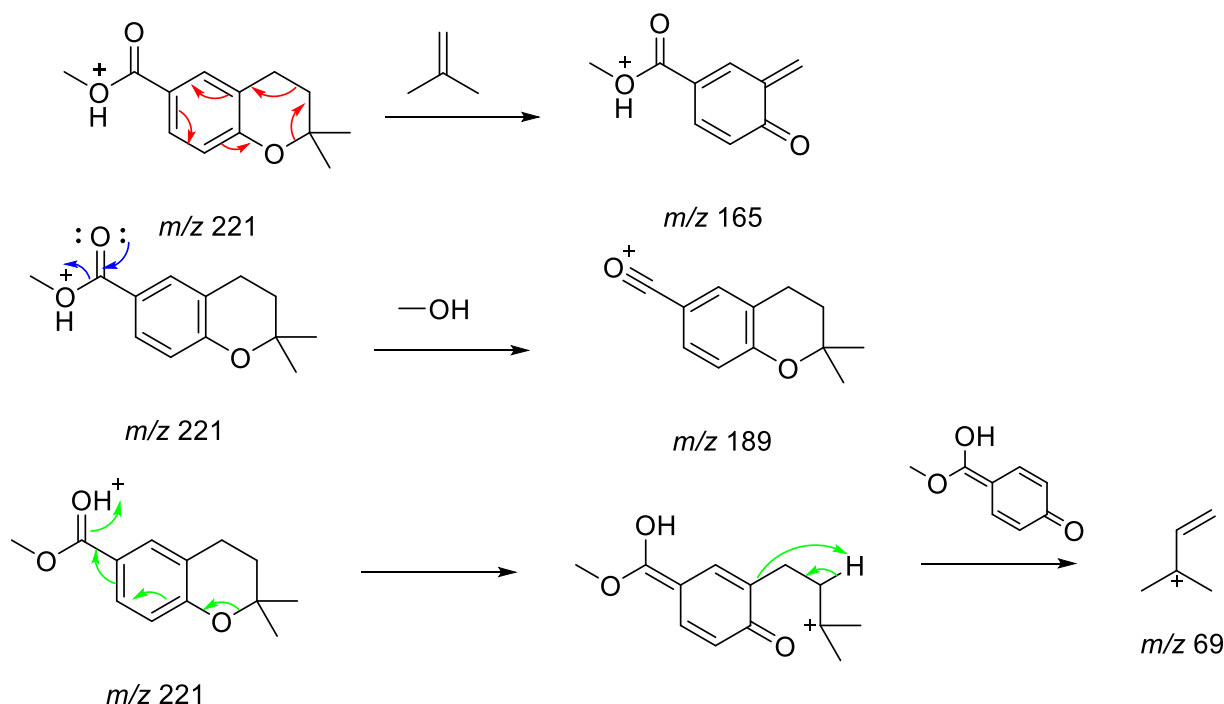


FIGURA 4.36 - Proposta de fragmentação do composto 3.

TABELA 4.19 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e HMBC (CD_3OD , 14,1T) do composto 3.

Posição	δ ^1H	$\delta^{13}\text{C}$	δ ^1H (Lit.)	$\delta^{13}\text{C}$ (Lit.)	HMBC
1	-	-	-	-	-
2	-	71,4	-	77,3	-
3	1,73 (m, 2H)	44,6	1,77 (t, $J=6,5$ Hz, 2H)	32,7	C-4,C-2a,C-2b,C-2
4	2,68 (m, 2H)	26,1	2,76 (t, $J=6,5$ Hz, 2H)	21,9	C-3,C-2,C-4a,C-5,C-8a
4a	-	130,6	-	120,6	-
5	7,77 (d, $J=2,2$ Hz, 1H)	132,6	7,79 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	128,7	C-4,C-4a,C-8a,C-6a
6	-	121,1	-	122,5	-
6a	-	169,0	-	166,8	-
6-OCH ₃	3,84 (s, 3H)	52,2	3,79 (s, OCH ₃ , 3H)	51,7	C-6a,C-6
7	7,70 (dd, $J=8,4$ e $2,2$ Hz, 1H)	130,2	7,76 (dd, $J=8,5, 2,0$ Hz, 1H)	131,0	C-8,C-5,C-8a,C-6a
8	6,79 (d, $J=8,4$ Hz, 1H)	115,5	6,75 (d, $J=8,5$ Hz, 1H)	116,1	C-6,C-7,C-8a,C-6a
8a	-	161,4	-	157,1	-
11	1,26 (s, 6H)	29,1	1,37 (s, 6H)	26,3	C-2,C-3,C-4
12	1,26 (s, 6H)	29,1	1,37 (s, 6H)	26,3	C-2,C-3,C-4

*Dados de RMN * δ ^1H (Lit.) e $\delta^{13}\text{C}$ (Lit.) do cromano sintético em CDCl_3 . (BATISTA *et al.*, 2008).

4.5 Anotação dos metabólitos secundários de *Parahancornia amapa*

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é amplamente empregada em estudos voltados à análise de misturas complexas, por fornecer informações fundamentais como tempo de retenção, massa molecular e padrões de fragmentação, os quais auxiliam na anotação dos compostos presentes nas amostras analisadas (KEMAYOU *et al.*, 2025).

Nesse contexto, os dados brutos obtidos por UHPLC-QTOF-MS/MS a partir dos extratos das folhas e das cascas, bem como das frações do extrato etanólico da casca, foram inicialmente submetidos a um pré-processamento em *softwares* especializados, etapa essencial para a construção das redes moleculares via *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) e a identificação putativa dos compostos. Nesse processo, foram empregados os *softwares* MSConvert, MS-DIAL e MS-FINDER, conforme descrito no item 3.5.1.

A construção das redes moleculares foi realizada na plataforma GNPS, utilizando o módulo FBMN, que se baseia na organização dos dados em *features*. Cada *feature* corresponde a um conjunto de informações como a razão *m/z*, o tempo de retenção e os espectros de fragmentação (MS/MS). Na rede molecular, cada *feature* é representada por um nodo, exibido no formato de um gráfico em pizza, no qual as cores indicam a distribuição relativa dos íons entre as diferentes amostras analisadas (PILON *et al.*, 2021).

Assim, as cores verde claro e azul claro representam os extratos hexânico (PAF_E_Hex) e etanólico (PAF_E_EtOH) das folhas respectivamente. As cores amarelo e azul escuro correspondem aos extratos hexânico (PAC_E_Hex) e etanólico (PAC_E_EtOH) das cascas. As cores vermelho, laranja, rosa e verde muito claro indicam as frações hexânica (PAC_F_Hex), acetato de etila (PAC_F_AcOEt), metanólica (PAC_F_MeOH) e aquosa (PAC_F_H₂O) do extrato etanólico da casca, respectivamente. Por fim, as cores roxo e lilás são as frações obtidas por partição líquido-líquido, correspondentes às fases orgânica (PAC_F_CHCl₃) e aquosa. (PAC_F_H₂O_02).

Os dados foram adquiridos nos modos positivo e negativo de ionização. Diante disso, no modo de ionização negativo, a rede apresenta 1370 nodos, dos quais uma parte encontra-se organizada em 68 *clusters*, sendo 37 *clusters* formados por três ou mais nodos e 31 *clusters* compostos por dois nodos. Os demais correspondem a nodos isolados, que não apresentaram similaridade espectral suficiente para o agrupamento. No modo positivo de ionização, a rede apresenta um total de 4033 nodos, com 116 *clusters* identificados, sendo 64 *clusters* compostos por três ou mais nodos e 52 *clusters* formados por dois nodos. A rede molecular global, considerando ambos os modos de ionização, encontra-se apresentada no APÊNDICE C.

A partir da análise das bibliotecas espectrais, das redes moleculares e dos métodos *in silico*, possibilitou a anotação de 47 compostos pertencentes a diferentes classes químicas, os quais serão detalhados na seção seguinte, sendo 37 anotados no modo negativo e 10 no modo positivo de ionização. Todas as anotações foram realizadas considerando uma faixa de erro aceitável de até 5 ppm para os íons precursores. A tabela dos compostos anotados encontra-se no APÊNDICE F.

Os espectros de massas referentes a cada composto, bem como as propostas de fragmentação apresentadas para estruturas selecionadas, encontram-se reunidos nos APÊNDICE D e E.

4.5.1 Flavonoides

Para as amostras de *P. amapa* analisadas, foram anotados 13 compostos da classe dos flavonoides, observados nos modos positivo e negativo de ionização, os quais são relatados pela primeira vez para a espécie.

No modo negativo de ionização, foram anotados 9 flavonoides glicosilados no *cluster* N1 (FIGURA 4.37). Os íons precursores de m/z 609,1486, m/z 447,0940 e m/z 463,0878 apresentaram, em seus espectros de fragmentação, um íon produto comum de m/z 301, correspondente à aglicona quercetina (WANG, P. *et al.*, 2023), indicando a presença desse núcleo estrutural nas moléculas analisadas. A formação desse fragmento é atribuída a perdas neutras características de unidades glicosídicas, como de 308, 146 e 162 Da, compatíveis, respectivamente, com rutinose, ramnose e glicose (LYU *et al.*, 2021). Esses dados confirmam o caráter glicosilado dos metabólitos, sendo que a principal diferença estrutural entre eles está no tipo de açúcar ligado à aglicona.

Diante disso, os íons de m/z 609,1486, 447,0940 e 463,0878 foram putativamente atribuídos, respectivamente, a quercetina 3-rutinosídeo (rutina), quercetina-3-rhamnosídeo (quercitrina) e quercetina-3-O-glucosídeo (Isoquercetina). Adicionalmente, o íon precursor de m/z 595,1296 também apresentou o fragmento diagnóstico m/z 301, sendo anotado como quercetina-3-latirosídeo.

A anotação da rutina foi confirmada por co-injeção de um padrão, o qual apresentou tempo de retenção coincidente (RT = 6,19 min) e espectro de fragmentação compatível com o observado nas amostras de *P. amapa*. Ademais, o padrão de rutina se agrupou no mesmo *cluster* que outros nodos previamente anotados, exibindo alta similaridade espectral, o que reforça a atribuição desses nodos como flavonoides estruturalmente relacionados.

No mesmo *cluster*, também foram observados os íons m/z 593,1519 e m/z 431,0991, cujos espectros MS/MS evidenciaram a formação do íon fragmento m/z 285, correspondente à aglicona kaempferol, assim, a formação desse fragmento está associada a perdas neutras de 308 e 146 Da respectivamente, compatíveis com unidades glicosídicas rutinose e ramnose. Com base nesses dados, o íon de m/z 593,1519 foi anotado como kaempferol 3-O-rutinosídeo (nicotiflorina) e m/z 431,0991 como kaempferol-3-O-rhamnosídeo (afzelina). Adicionalmente, o íon precursor de m/z 579,1357 foi anotado como kaempferol-3-latirosídeo, uma vez que seu espectro MS/MS também apresentou o fragmento m/z 285.

O íon m/z 623,1630, cujo espectro de fragmentação apresentou um íon produto m/z 315, correspondente à aglicona isorhamnetina, que foi originado pela perda neutra de uma unidade glicosídica de 308 Da, foi anotado como isorhamnetina-3-O-rutinosídeo. Já o íon precursor de m/z 433,1146 foi anotado como naringenina-7-O-glicosídeo, uma vez que seu espectro MS/MS evidenciou a perda de 162 Da, resultando na formação do íon produto correspondente à aglicona naringenina (m/z 271).

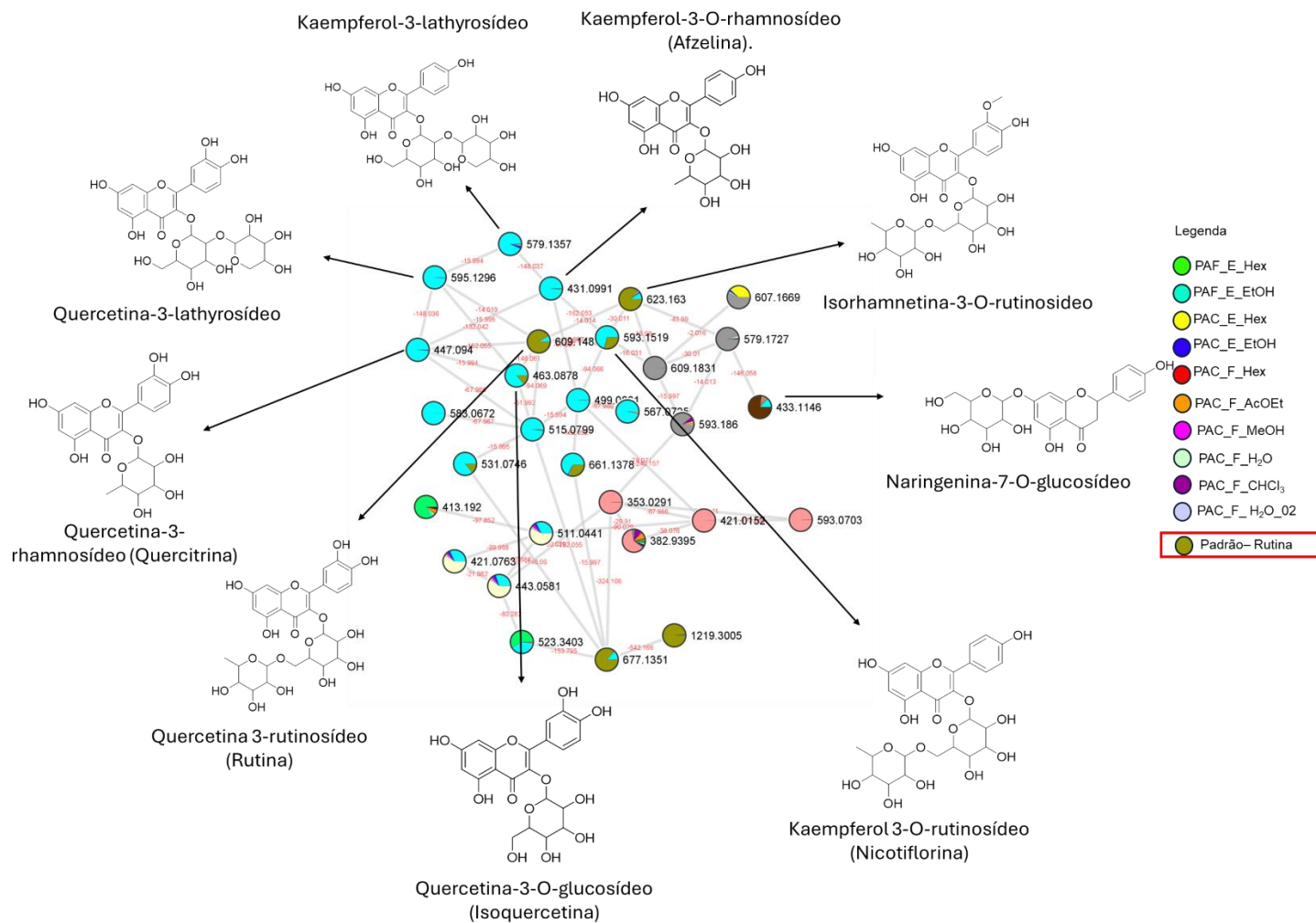


FIGURA 4.37 - *Cluster* N1 presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

Em nodos únicos da rede molecular obtida no modo negativo de ionização (FIGURA 4.38), foram anotados flavonoides na forma aglicona, como m/z 285,0421, que apresentou em seu espectro de fragmentação, íons produto em m/z 268, m/z 257 e m/z 211, os quais são descritos na literatura como fragmentos característicos de kaempferol (FATHONI *et al.*, 2017). O íon precursor em m/z 271,0614 que foi putativamente identificado como naringenina, uma vez que seu espectro MS/MS exibiu íons produto em m/z 227, m/z 199 e m/z 151, em concordância com os padrões de fragmentação reportados na literatura (XU *et al.*, 2009). E o íon m/z 287,0565, que apresentou fragmentos em m/z 269 e m/z 151, compatíveis com o padrão de fragmentação descrito para dihidrokaempferol, permitindo sua anotação (XIA *et al.*, 2022).

A anotação da naringenina e kaempferol foi confirmada por co-injeção de um padrão de referência, apresentando tempo de retenção coincidente e espectro de fragmentação semelhante ao observado nas amostras analisadas.

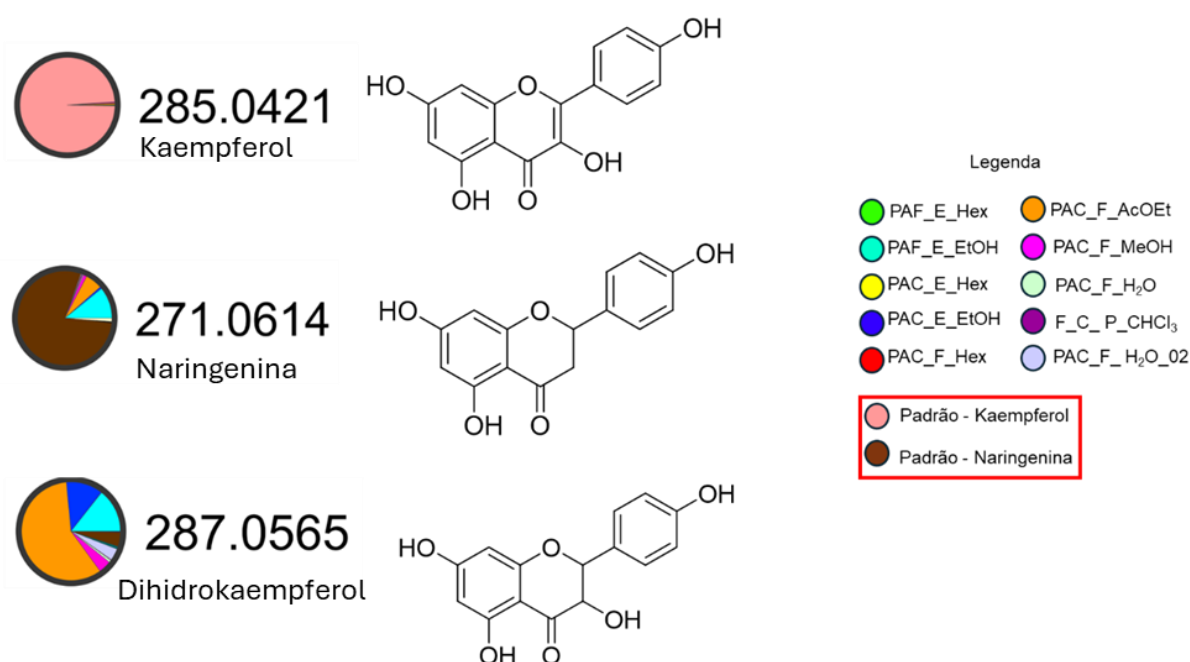


FIGURA 4.38 - Nodos únicos presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

De forma complementar às observações obtidas a partir da rede molecular no modo negativo de ionização, a análise no modo positivo permitiu a anotação de mais um flavonoide. O íon precursor de m/z 303,0489 (FIGURA 4.39) foi observado como nodo único e foi anotado como quercetina. Seu padrão de fragmentação apresentou íon produto m/z 275, resultante da perda direta de CO (28

Da), bem como, íons m/z 257 e 229, atribuídos, respectivamente, à perda sequencial de H_2O (18 Da) e CO (28 Da). Esses resultados são consistentes com o padrão de fragmentação de quercetina descrito por WANG *et al.*, 2023.

Além disso, no modo positivo de ionização, também foram observados flavonoides já descritos no modo negativo, evidenciando a recorrência de metabólitos estruturalmente relacionados em ambos os modos de ionização.

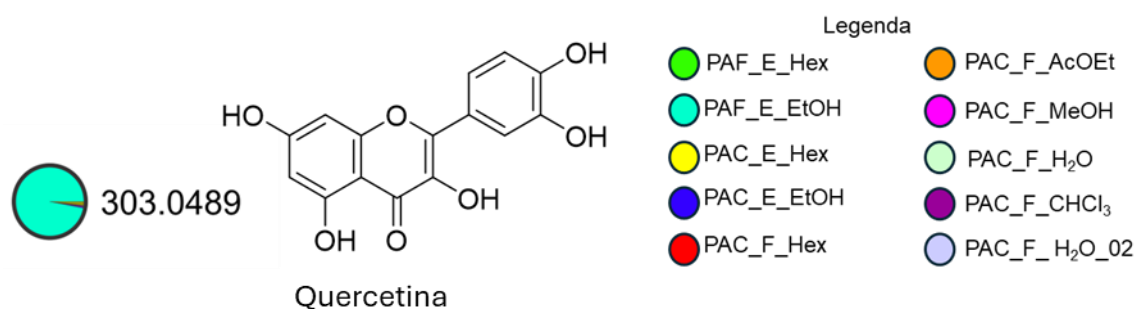


FIGURA 4.39 - Nodo único presente na rede molecular no modo positivo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

Com o objetivo de exemplificar as propostas de fragmentação atribuídas aos flavonoides anotados neste estudo, foram elaboradas propostas de fragmentação para os compostos isoquercetina e afzelina, as quais se encontram apresentadas no APÊNDICE E.

Diante disso, os flavonoides são classes de metabólitos secundários encontrados em muitas espécies e podem ser divididos em seis grupos: antocianidinas, flavanóis, flavanonas, flavonas, flavonóis e isoflavonas (JAN *et al.*, 2022). São amplamente distribuídos em diferentes tecidos e órgãos das plantas, como frutos, caules, flores, folhas e sementes e exercem várias atividades como a regulação do crescimento celular, atração de insetos polinizadores e a proteção contra estresses bióticos e abióticos (CHEN *et al.*, 2023; KUMAR; PANDEY, 2013).

Além de seu papel nas plantas, os flavonoides apresentam grande importância farmacológica, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas (CHEN *et al.*, 2023), além de atuarem como potenciais agentes pesticidas naturais. Estudos ressaltam que os flavonoides podem ser considerados biopesticidas promissores na proteção de cultivos, uma vez que são capazes de interferir em processos fisiológicos de pragas, afetando sua digestão, crescimento e desenvolvimento (PEREIRA *et al.*, 2024).

Diversos flavonoides já foram isolados e identificados em espécies da família Apocynaceae, apresentando diferentes aplicações biológicas. Compostos como kaempferol, quercetina e seus derivados glicosilados foram relatados em espécies do gênero *Periploca* (HUANG *et al.*, 2019). De acordo com BHADANE *et al.*, 2018, a rutina já foi isolada de várias espécies do gênero *Wrightia*, enquanto rutina, quercetina e kaempferol também foram identificados nos frutos de espécies do gênero *Carissa*. Adicionalmente, outros estudos fitoquímicos relataram a ocorrência de flavonoides como naringenina, isorhamnetina, quercetina-3-O-glicosídeo e quercetina-3-O-lathyrosídeo em diferentes espécies (CHIEN *et al.*, 1979; AQUINO *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2020). Diante disso, a presença recorrente dessa classe de metabólitos em diversos gêneros da família Apocynaceae sugere que compostos estruturalmente relacionados também possam ocorrer em *P. amapa*, hipótese que é corroborada pelas anotações obtidas a partir das redes moleculares construídas no presente estudo.

4.5.2 Catequinas e derivados

No modo negativo de ionização, o *cluster* N2 (Figura 4.40) é composto por três nodos, os quais compreendem catequinas e derivados. Nesse *cluster*, foram observados isômeros de m/z 289,0731 e m/z 289,0714, apresentando tempos de retenção de 4,91 min e 5,52 min, os quais foram putativamente atribuídos a catequina e epicatequina. Esses compostos ainda foram relatados para a espécie *P. amapa*.

O espectro de MS/MS dos íons isoméricos, evidenciou inicialmente o íon produto m/z 271, resultante da perda de H₂O (18 Da). A partir do íon precursor, foi observada uma clivagem retro-Diels-Alder (RDA) no anel C, originando o íon m/z 151. Em sequência, ocorreu uma nova perda de 42 Da, levando à formação do íon m/z 109. Ademais, também foram observados outros íons fragmentos característicos, coerentes com os padrões de fragmentação descritos na literatura para catequinas. (XU *et al.*, 2021).

A anotação da catequina foi confirmada por uma co-injeção de um padrão de referência, o qual apresentou alta similaridade tanto no padrão de fragmentação quanto no tempo de retenção quando comparada ao composto presente na amostra.

O íon precursor de m/z 305,0667, presente no mesmo *cluster*, foi sugerido como (epi) galocatequina, com base na diferença de massa de 16 Da em

relação à (epi) catequina, correspondente à presença de uma hidroxila adicional na estrutura. Em seu espectro de fragmentação apresentou o íon m/z 167, resultante de uma perda neutra de 137 Da, atribuída à fragmentação RDA no anel C e posteriormente a perda de 42 Da obtendo o íon m/z 125.

Além disso, foi observada a presença de outro derivado de catequina detectado como nodo único na rede molecular, o qual foi anotado como C-8, C-7-O- δ -lactona- (epi) catequina, apresentando íon precursor de m/z 341,0671 (Figura 4.40). A análise do espectro de fragmentação evidenciou a formação de um íon base m/z 189, resultante de uma perda neutra de 152 Da, característica de uma fragmentação RDA.

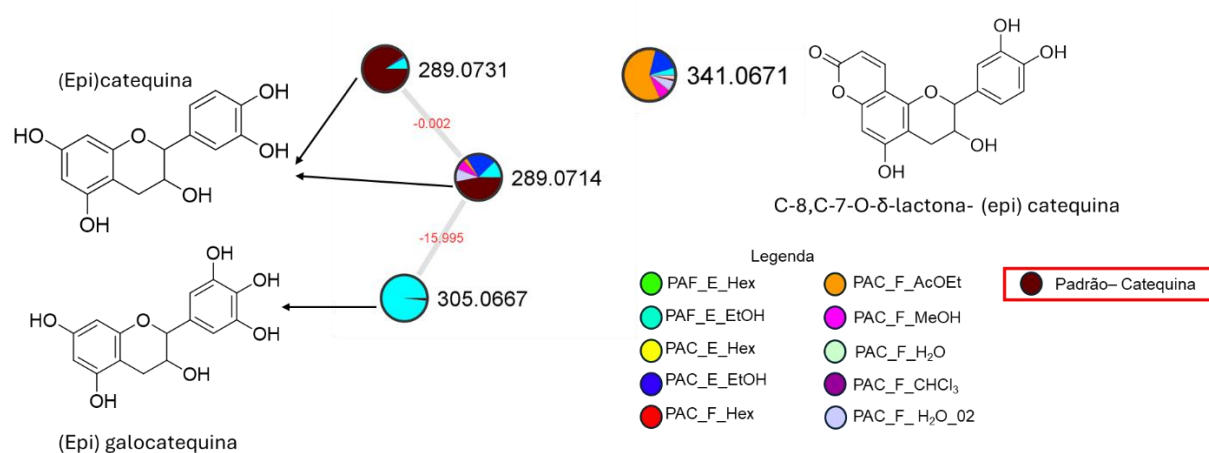


Figura 4.40 - *Cluster* N2 e nodo único presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

Foi elaborada uma proposta de fragmentação para a catequina, com o objetivo de exemplificar os padrões de fragmentação observados nesse composto (APÊNDICE E).

Diante disso, a catequina é um composto polifenólico pertencente à classe dos flavonoides, especificamente ao subgrupo dos flavan-3-óis. Trata-se de um metabólito secundário de origem vegetal, amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado também em diversos alimentos, como cacau, chás e frutas vermelhas. Do ponto de vista estrutural, a catequina apresenta dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico do tipo di-hidropirano. A presença de dois centros quirais nos carbonos C-2 e C-3 é responsável pela existência de diastereoisômeros, sendo a forma *trans* denominada catequina e a forma *cis* denominada epicatequina (CIOANCA *et al.*, 2024; GANESHPURKAR; SALUJA, 2020).

Esse composto é de grande relevância biológica, pois apresenta diversas propriedades bioativas, sendo amplamente reconhecidos por seus benefícios à saúde, que incluem atividade antioxidante, anti-inflamatória, além de efeitos associados à proteção cardiovascular e à prevenção de processos carcinogênicos (CIOANCA *et al.*, 2024). Além disso, estudos demonstram que derivados de catequina podem apresentar atividade antimicrobiana e fitotóxica, o que confere a essas moléculas potenciais para uso como agentes pesticidas naturais (VELURI *et al.*, 2004).

Conforme já discutido na seção referente aos flavonoides (item 4.5.1), essa classe de metabólitos, incluindo os derivados de catequina (flavan-3-óis), é amplamente relatada na literatura para diversas espécies da família Apocynaceae. Como exemplo, no estudo realizado por BASTOS *et al.*, 2017, a catequina foi isolada da espécie *Hancornia speciosa*, evidenciando que essa classe de compostos fenólicos também pode ocorrer em diferentes gêneros da família, incluindo *Parahancornia*.

4.5.3 Cumarinas

No total, foram anotados quatro compostos da classe das cumarinas, detectados nos modos negativo de ionização, os quais são relatados pela primeira vez para a espécie.

No modo negativo, o íon precursor de m/z 191,0349 foi putativamente identificado como escopoletina (FIGURA 4.41). A análise do espectro de fragmentação evidenciou a formação do fragmento m/z 176, atribuído à clivagem radicalar de um grupo metila (15 Da) presente na estrutura. A partir desse íon intermediário, ocorreu uma perda de CO (28 Da), resultando no fragmento m/z 148. Em seguida, foi observada uma nova eliminação de CO (28 Da), que originou o íon produto m/z 120 (SHAHZAD *et al.*, 2022).

Outro íon anotado como nodo único na rede molecular foi a isofraxidina, apresentando íon precursor de m/z 221,0456 (FIGURA 4.41). A análise do espectro de fragmentação revelou a formação de íons m/z 206, 190 e 163, os quais são compatíveis com os padrões descritos na literatura para essa estrutura (LIU *et al.*, 2022). O fragmento m/z 206 foi atribuído à perda radicalar inicial de um grupo metila (15 Da). Em seguida, esse fragmento sofreu uma segunda perda radicalar correspondente a outro grupo metila, originando o íon base m/z 190. Além disso, o íon

m/z 163, foi obtido diretamente a partir do íon precursor por perdas sequenciais, envolvendo a eliminação de CO (28 Da) seguida da perda de uma unidade CH₂O (30 Da).

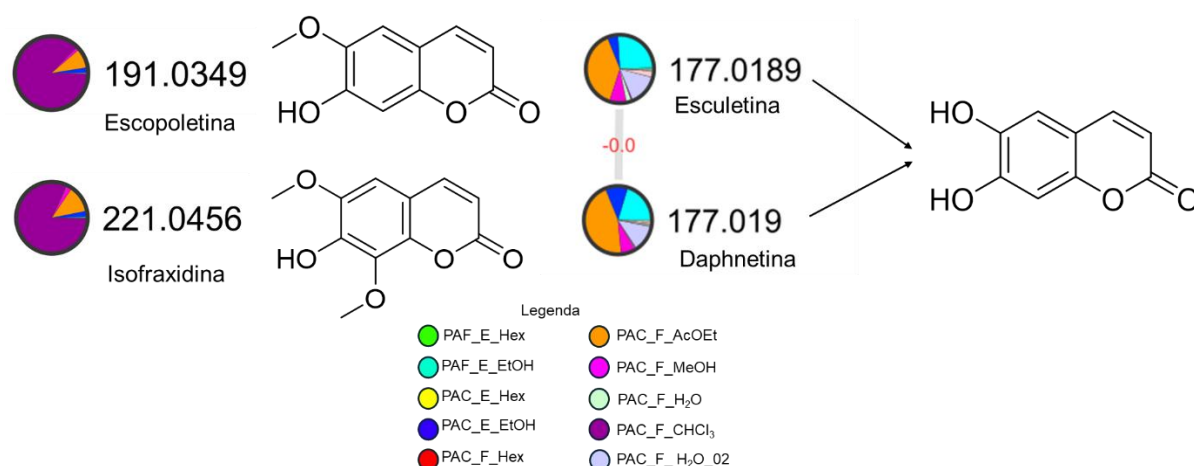


FIGURA 4.41 - Nós únicos e *cluster* (N3) e presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nós indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada

Em relação ao *cluster* N3 é constituído por dois nós isoméricos com íons precursores de m/z 177,0189 (RT: 5,24 min) e m/z 177,0190 (RT: 5,64 min). Esses íons correspondem a metabólitos de fórmula molecular C₉H₆O₄, compatível com di-hidroxicumarinas, como esculetina (6,7-diidroxicumarina) e daphnetina (7,8-diidroxicumarina), que diferem apenas pela posição das hidroxilas no anel aromático. Os espectros de fragmentação apresentaram padrões característicos comuns a esses isômeros, incluindo os íons fragmento m/z 149 e 121. O íon m/z 149 foi atribuído à eliminação inicial de uma unidade de CO (28 Da) a partir do íon precursor, enquanto o fragmento m/z 121 resultou de uma eliminação adicional de CO (28 Da) a partir do íon intermediário, configurando perdas sequenciais de monóxido de carbono, conforme descrito na literatura (WANG, Y. *et al.*, 2016).

Foram elaboradas propostas de fragmentação para as cumarinas escopoletina e isofraxidina, com o objetivo de exemplificar os padrões de fragmentação para essa classe (APÊNDICE E).

Dessa forma, as cumarinas são produtos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal e exercem diversas funções biológicas, além de apresentarem várias aplicações (HUSSAIN *et al.*, 2018). Nas plantas, esses compostos podem atuar na regulação do crescimento, participar de processos metabólicos como respiração e fotossíntese, e contribuir para a defesa contra

infecções e estresses ambientais. Do ponto de vista farmacológico, as cumarinas destacam-se por suas propriedades antioxidantes, anticancerígenas, antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (LIU *et al.*, 2022). Além disso, essas substâncias têm sido amplamente investigadas na área agrícola, devido à sua atuação como agentes naturais no controle de insetos, patógenos e plantas daninhas (HUSSAIN *et al.*, 2018).

Assim, diversas cumarinas já foram identificadas em espécies da família Apocynaceae, indicando que esses metabólitos também podem estar presentes em *P. amapa*, contribuindo para o perfil químico da espécie, que ainda é pouco explorado. Nesse contexto, a cumarina escopoletina já foi isolada de *Laseguea erecta* (CARVALHO *et al.*, 2006), bem como na espécie *Echites hirsuta* (CHIEN *et al.*, 1979).

4.5.4 Lignanas

Neste estudo, foram anotados quatro compostos da classe das lignanas ainda não relatados para a espécie, sendo três detectados no modo positivo de ionização e um no modo negativo, todos observados como nodos únicos na rede molecular, sem formação de *clusters*.

O primeiro íon anotado no modo positivo foi a justicidina B (FIGURA 4.42), uma lignana que apresentou íon precursor de m/z 365,1009. A análise do espectro de fragmentação revelou padrões compatíveis com os descritos por GUAN *et al.*, 2025. O íon fragmento m/z 335 foi atribuído à perda neutra de uma unidade de CH_2O (30 Da), enquanto o fragmento m/z 305 foi originado pela eliminação sequencial de outro grupo CH_2O . Adicionalmente, foi observada o íon produto m/z 321, gerado a partir do íon precursor por perda de CO_2 (44 Da), correspondente à uma clivagem do grupo metilenodióxi presente na molécula.

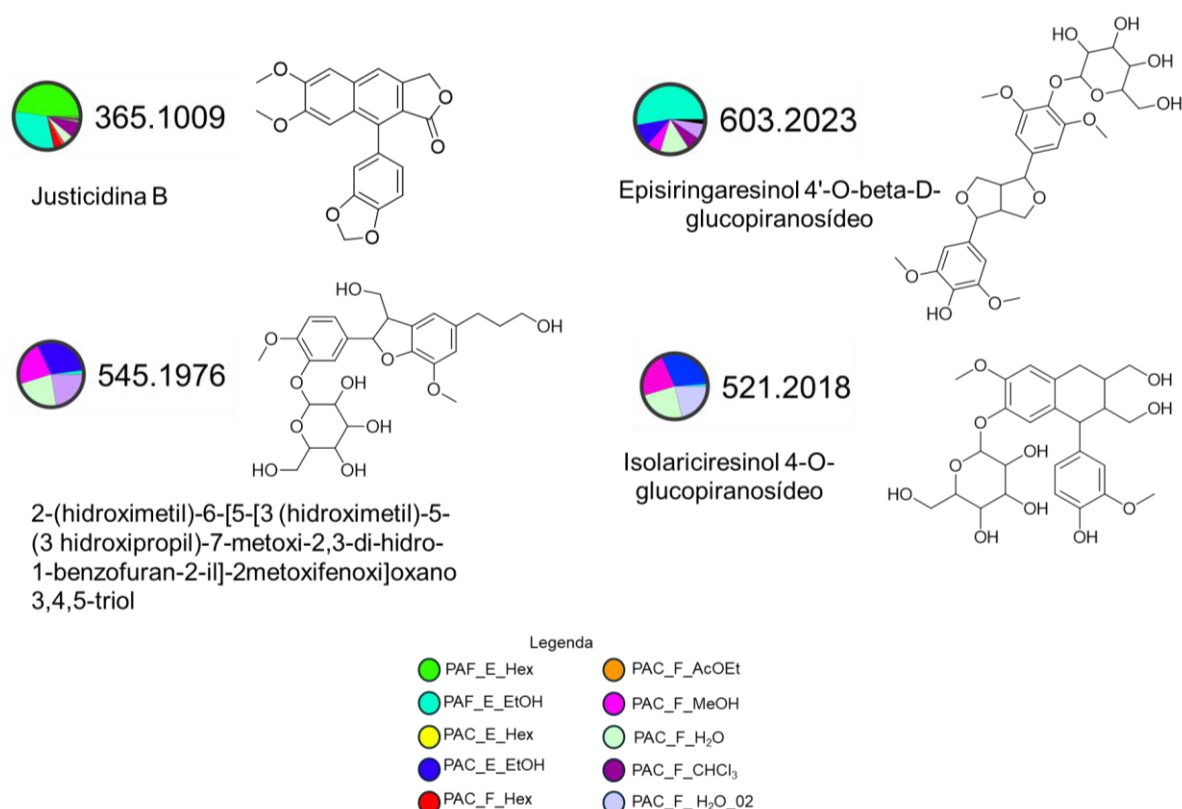


FIGURA 4.42 - Nós únicos presentes na rede molecular. Os íons de m/z 365.1009, 545.1976 e 603.2023 detectados no modo positivo de ionização e o íon de m/z 521.2018 no modo negativo de ionização. As cores dos nós indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

Ainda no modo positivo, foram visualizados os íons de m/z 545,1976 e m/z 603,2023 (FIGURA 4.42), ambos detectados como adutos de sódio $[M+Na]^+$. Esses íons foram anotados como 2 - (hidroximetil)-6- [5- [3 (hidroximetil)-5-(3 hidroxipropil) -7-metoxi-2,3-di-hidro-1-benzofuran-2-il] -2 metoxifenoxi] oxano 3,4,5-triol e episiringaresinol 4'-O-beta-D-glucopiranosídeo respectivamente.

Para o primeiro íon (m/z 545,1976), a análise do espectro de MS/MS mostrou inicialmente a formação do íon m/z 515, correspondente à perda neutra de uma unidade de CH_2O (30 Da). Também foi observado o íon m/z 383, atribuído à eliminação de uma unidade glicosídica (162 Da).

O segundo íon (m/z 603,2023), quando submetido a análise de MS/MS, apresentou íon produto m/z 573, originado pela perda neutra de um grupo CH_2O (30 Da). O íon m/z 441 originado pela perda da porção glicosídica (162 Da) da molécula e o m/z 423 atribuído pela eliminação sequencial de uma unidade de H_2O (18 Da) (ZHANG *et al.*, 2023).

No modo negativo, a estrutura anotada foi isolariciresinol 4-O-glucopiranosídeo, apresentando íon precursor de m/z 521,2018. Dessa forma, ao analisar seu espectro MS/MS, revelou um perfil condizente descrito por GUAN *et al.*, 2022 para esse composto. Foi observado o íon m/z 359, que se formou devido a perda de uma unidade glicosídica (162 Da). A partir desse íon, ocorreu a clivagem radicalar de um grupo CH_3 (15 Da), resultando no íon m/z 344. Além disso, no íon m/z 359 observou-se uma fragmentação RDA, originando o m/z 271.

Para a justicidina B e 2-(hidroximetil)-6-[5-[3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-di-hidro-1-benzofuran-2-il]-2-metoxifenoxi]oxano-3,4,5-triol, foi elaborada uma proposta de fragmentação, com o objetivo de exemplificar os padrões de fragmentação observados para esses metabólitos.

As lignanas constituem uma classe de produtos naturais amplamente distribuída no reino vegetal, caracterizada por compostos cujo esqueleto estrutural resulta na dimerização de unidades fenilpropanoides (ZHANG *et al.*, 2023). Nas plantas, esses metabólitos desempenham funções importantes, atuando principalmente na defesa contra patógenos e herbívoros, além de participarem de processos relacionados ao controle do crescimento e ao desenvolvimento vegetal (LEWIS; DAVIN, 1999; BICALHO, 2016).

Devido à ampla variedade de atividades biológicas descritas, as lignanas têm despertado interesse científico, incluindo efeitos antitumoral, antiviral, antibacteriana, antifúngica e inseticida (LEWIS; DAVIN, 1999). Estudos prévios indicam que determinadas lignanas apresentam atividade contra insetos-praga, incluindo a formiga-cortadeira. Nesse contexto, um trabalho desenvolvido pelo Grupo de Produtos Naturais da UFSCar, em 2016, relatou o isolamento de três lignanas estruturalmente semelhantes às identificadas nesta pesquisa, cujas frações enriquecidas demonstraram atividade inseticida contra *Atta sexdens* e seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* (BICALHO, 2016).

Estudos fitoquímicos com espécies da família Apocynaceae também evidenciam a ocorrência frequente de lignanas, indicando que essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída na família. Em *Urceola rosea*, por exemplo, foram isoladas lignanas a partir do caule com alta similaridade estrutural às observadas nesse estudo (DONG *et al.*, 2019). Além disso, o trabalho de CARVALHO *et al.*, 2006 relatou a presença de pinoresinol, uma lignana do tipo furofurânica, na espécie *Laseguea erecta*, estruturalmente relacionada ao composto anotado.

4.5.5 Taninos

No *cluster* N4 do modo negativo de ionização foram observados três nodos correspondentes a isômeros com a mesma fórmula molecular $C_{30}H_{26}O_{12}$, apresentando íons precursores de m/z 577,1366 (RT: 4,54 min), 577,1346 (RT: 5,27 min) e 577,1364 (RT: 7,3 min) (FIGURA 4.43). Esses íons foram anotados como procianidina B e ocorrem sob diferentes formas isoméricas (B1, B2 e B3). Entretanto, com base apenas nos dados de MS/MS, não foi possível atribuir com precisão qual isômero específico corresponde a cada nodo observado.

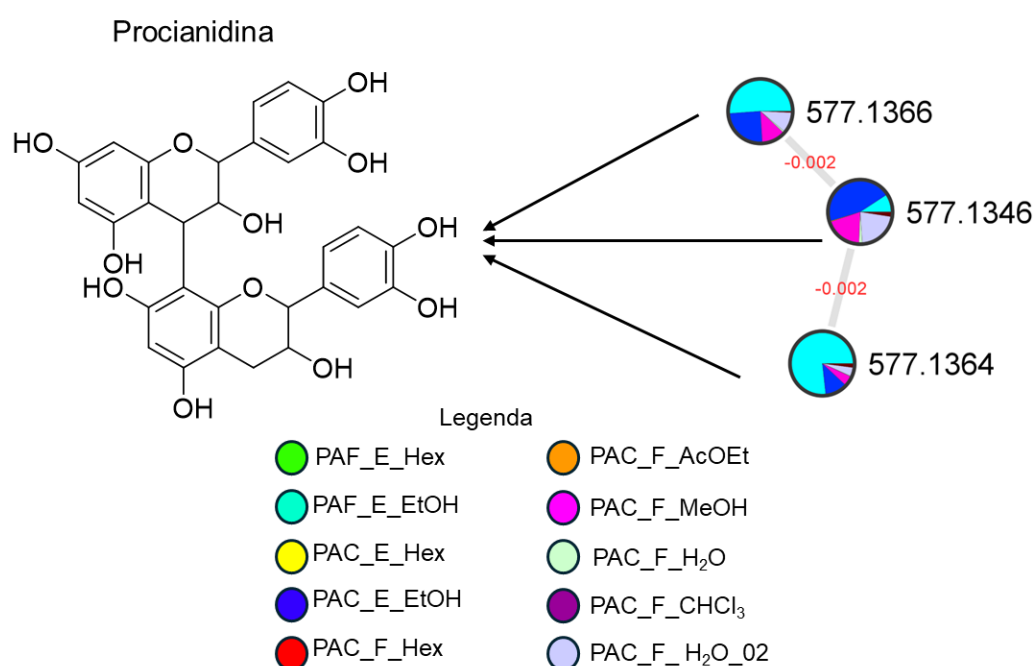


FIGURA 4.43 - *Cluster* de (N4) procianidina presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

A análise do espectro de fragmentação revelou padrões característicos de procianidina. As principais vias de fragmentação incluem a clivagem da ligação interflavanoide, resultando na formação do íon m/z 289, correspondente à unidade monomérica de (epi) catequina. A partir desse fragmento, foi observado uma quebra RDA, que originou o íon m/z 151. Além disso, verificou-se um rearranjo de hidrogênio associado à clivagem do anel C de uma unidade monomérica de (epi) catequina, acompanhado de perda neutra de 150 Da, levando à formação do fragmento em m/z 425 (RUE *et al.*, 2018).

Diante disso, foi elaborada uma proposta de fragmentação para esse composto, a qual se encontra apresentada no APÊNDICE E.

De modo geral, os taninos são macromoléculas complexas de natureza polifenólica, caracterizadas pela presença de grupos hidroxila, o que lhes confere capacidade de formar complexos com diferentes moléculas. Essas substâncias apresentam propriedades adstringentes e são amplamente distribuídas no reino vegetal, sendo encontradas em diversas plantas, e também em frutas, vegetais, leguminosas e determinados grãos (DAS *et al.*, 2020; SILVA; COSTA, 2014).

De acordo com suas variações estruturais, os taninos são classificados em duas classes principais: taninos hidrolisáveis, cuja estrutura é baseada em um álcool polihídrico, geralmente glicose, esterificado com ácidos fenólicos, como o ácido gálico; e taninos condensados, também conhecidos como proantocianidinas, que apresentam estruturas mais complexas formadas por polímeros de flavan-3-óis, como catequina e epicatequina (ABDULLAHI *et al.*, 2022).

Plantas ricas em taninos têm sido tradicionalmente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diarreias, hipertensão arterial, feridas, entre outras aplicações terapêuticas. Além disso, esses compostos também apresentam atividade inseticida, associada às suas propriedades adstringentes, atuando como repelentes alimentares e à capacidade de se ligarem a enzimas digestivas no trato intestinal dos insetos, reduzindo a absorção de nutrientes e causando danos ao intestino médio (DAS *et al.*, 2020; EL-ASWAD *et al.*, 2023).

Diversos estudos na literatura relatam a atividade inseticida de taninos. Nesse contexto EL-ASWAD *et al.*, 2023 avaliaram extratos provenientes de diferentes fontes vegetais, como folhas de Urtiga, casca de feijão, chá preto e chá verde, frente a larvas da lagarta-do-algodoeiro, observando elevada atividade inseticida em extratos ricos em taninos condensados e hidrolisáveis.

Além disso, a ocorrência de taninos já foi reportada em espécies da família Apocynaceae. O estudo RAHIM *et al.*, 2022 descreve a presença desses compostos em extratos de folhas de *Alstonia angustiloba*. Em particular, proantocianidinas já foram previamente identificadas em espécies do gênero *Hancornia*, como *Hancornia speciosa* (CARNEIRO JUNIOR *et al.*, 2024).

4.5.6 Terpenos

Foram anotados três compostos pertencentes à classe dos terpenos, uma classe amplamente descrita em estudos anteriores para *P. amapa* (SOBRINHO

et al., 1991). Desses, dois correspondem a triterpenos pentacíclicos e um a terpeno glicosilado, todos observados no modo positivo de ionização.

Diante disso, íons precursores de m/z 439,3570 e m/z 425,3763 (FIGURA 4.44), pertencentes ao *cluster* P1 foram anotados como ácido oleanólico e lupenona respectivamente. Para o íon precursor de ácido oleanólico ($[M + H - H_2O]$), o espectro de fragmentação apresentou o íon produto m/z 393, resultante da perda combinada de uma molécula de H_2O (18 Da) e CO (28 Da), totalizando uma perda neutra de 46 Da. A partir do íon m/z 393, observou-se uma reação RDA no terceiro anel da estrutura, originando o fragmento m/z 203. Adicionalmente, a clivagem RDA direta do íon precursor gerou o íon produto m/z 231 (AYATOLLAHI *et al.*, 2011).

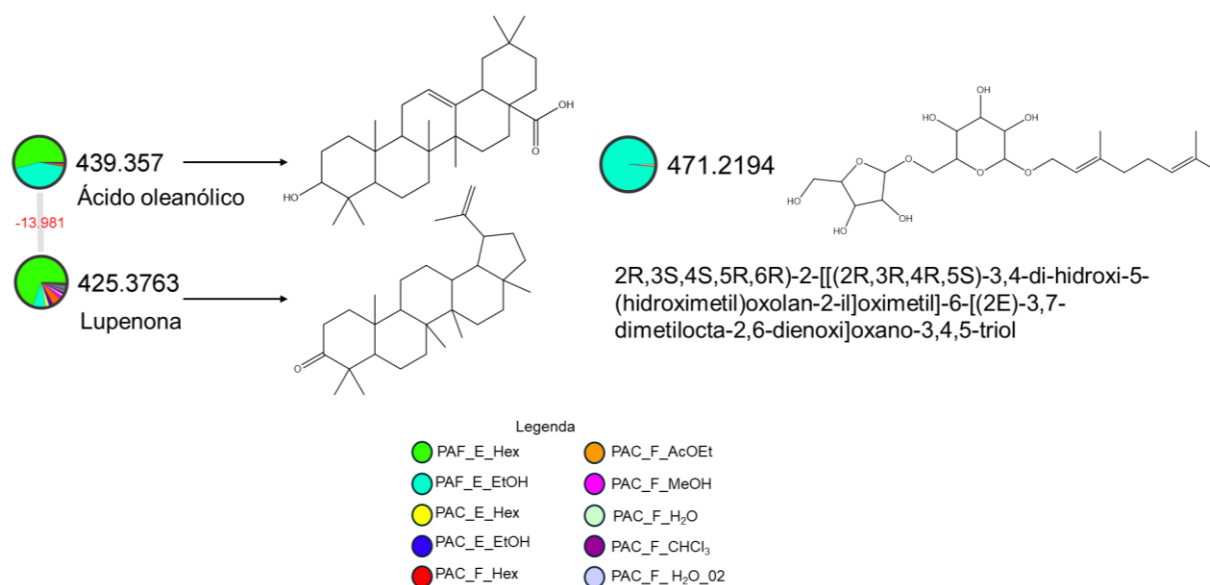


FIGURA 4.44 - *Cluster* de terpenos (P1) e nodo único presente na rede molecular no modo positivo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada

Em relação ao espectro de fragmentação do íon precursor da lupenona (m/z 425,3763), foi observado a perda de CO (28 Da), resultando no íon produto m/z 397. A fragmentação subsequente desse íon ocorreu por meio de uma reação RDA, originando o fragmento m/z 191. Esses padrões de fragmentação estão em concordância com os dados previamente descritos na literatura para triterpenos (CARVALHO *et al.*, 2010).

No nodo único (FIGURA 4.44), o íon precursor sodiado $[M+Na]^+$ de m/z 471,2194 foi identificado putativamente como 2R,3S,4S,5R,6R)-2-[[[(2R,3R,4R,5S)-3,4-di-hidroxi-5-(hidroximetil) oxolan-2-il] oximetil] -6- [(2E) -3,7-dimetilocta-2,6-dienoxi] oxano-3,4,5-triol. Assim, analisando seu espectro de MS/MS foi observado o

fragmento m/z 335, referente a parte glicosilada da molécula. A partir do fragmento m/z 335, ocorreu uma perda neutra de 132 Da, referente a uma unidade de pentose, resultando no íon produto m/z 203.

Foram elaboradas propostas de fragmentação para o ácido oleanólico e 2R,3S,4S,5R,6R) -2- [[(2R,3R,4R,5S) -3,4-di-hidroxi-5-(hidroximetil) oxolan-2 il]oximetil] -6- [(2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienoxi]oxano-3,4,5-triol, com o intuito de representar as quebras características (APÊNDICE E).

Os terpenos compreendem uma ampla e diversificada classe de metabólitos secundários de origem vegetal. Esses compostos apresentam algumas características como fragrância, sabor e coloração, e exercem funções ecológicas importantes, atuando principalmente como defensivos naturais, incluindo atividades inseticida, repelente e antimicrobiana. Quimicamente, os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (C_5) presentes em sua estrutura, como monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}) e triterpenos (C_{30}) (IYER *et al.*, 2023).

Diversas plantas têm sido estudadas devido ao elevado teor de terpenos com atividade inseticida, como por exemplo a espécie *Melia azedarach* (CABRAL *et al.*, 2008) e principalmente a *Azadirachta indica*, amplamente reconhecida como referência no estudo de compostos terpênicos bioativos (MORDUE; NISBET, 2000).

No que se refere aos triterpenos em Apocynaceae, o ácido oleanólico já foi previamente relatado em muitas espécies, como em *Plumeria rubra* e *Plumeria obtusa* (EL-KASHEF *et al.*, 2021; MALASPINA *et al.*, 2024). Além disso, um estudo de revisão sobre triterpenos dessa família descreve a ocorrência de Lupenone em *Caralluma burchardii* (EL-KASHEF *et al.*, 2021). Nesse contexto, a presença dessa classe de metabólitos tem sido amplamente documentada na literatura para *P. amapa* (SALLES *et al.*, 2025) reforçando a coerência dos resultados observados no presente estudo.

4.5.7 Ácidos fenólicos

Neste estudo, foram anotados doze compostos pertencentes à classe dos ácidos fenólicos e seus derivados. Todos esses compostos são relatados pela primeira vez para a espécie estudada, com exceção do composto cornosídeo, que é amplamente descrito na literatura para *P. amapa* (SALLES *et al.*, 2025).

O *cluster* N5 (FIGURA 4.45), é constituído por dois nodos que apresentam a mesma fórmula molecular $C_7H_{12}O_6$, com íons precursores de m/z 191,0566 e m/z 191,0568, assim, estes foram identificados putativamente como isômeros do ácido quínico. A análise do espectro de fragmentação revelou íons característicos, como m/z 173, atribuído à perda de uma molécula de H_2O (18 Da) e m/z 85, formado pela perda neutra sequencial de 88 Da, padrão de fragmentação amplamente descrito na literatura para o ácido quínico (SHAHZAD *et al.*, 2022).

O *cluster* N6 (FIGURA 4.45) é composto por nodos correspondentes a derivados do ácido quínico, os quais compartilham o íon fragmento m/z 191, indicando a presença desse esqueleto estrutural. Entre esses derivados, o íon precursor de m/z 353,0894, observado também como um isômero, apresentou em seu espectro de MS/MS, além do íon m/z 191, os fragmentos característicos m/z 161 e m/z 85. Com base nesse padrão de fragmentação, semelhante ao descrito na literatura, o composto foi anotado como ácido clorogênico (GUAN *et al.*, 2025). Essa anotação foi posteriormente confirmada por co-injeção de um padrão de referência, uma vez que o tempo de retenção e o perfil de fragmentação da amostra mostraram-se compatíveis com os observados para o padrão.

O íon precursor de m/z 337,0929 foi anotado como ácido cumaroilquínico. A análise do espectro de fragmentação evidenciou a formação do íon fragmento m/z 191, resultante da eliminação da unidade cumaroil, bem como do íon m/z 173, originado pela perda subsequente de uma molécula de H_2O (18 Da) (BRAGA GONÇALVES *et al.*, 2023).

Ainda nesse *cluster*, foi observada a presença do íon precursor de m/z 329,0885, correspondente a um glicosídeo fenólico anotado como phloracetophenone 4'-O-glucoside. No espectro de MS/MS, esse composto apresentou íon fragmento de m/z 209, obtido por rearranjo de hidrogênio seguido de uma eliminação de 120 Da. A partir desse íon (m/z 209) ocorreu uma perda adicional de H_2O (18 Da), resultando no fragmento m/z 191, comum aos demais metabólitos do *cluster*.

O íon precursor de m/z 315,1082, foi anotado como cornosídeo, assim, diante da análise do espectro de fragmentação, foi observado o íon m/z 153, obtido da perda de uma unidade glicosídica (162 Da), bem como o íon m/z 108, atribuído a uma clivagem radicalar sequencial da cadeia lateral da estrutura (45 Da).

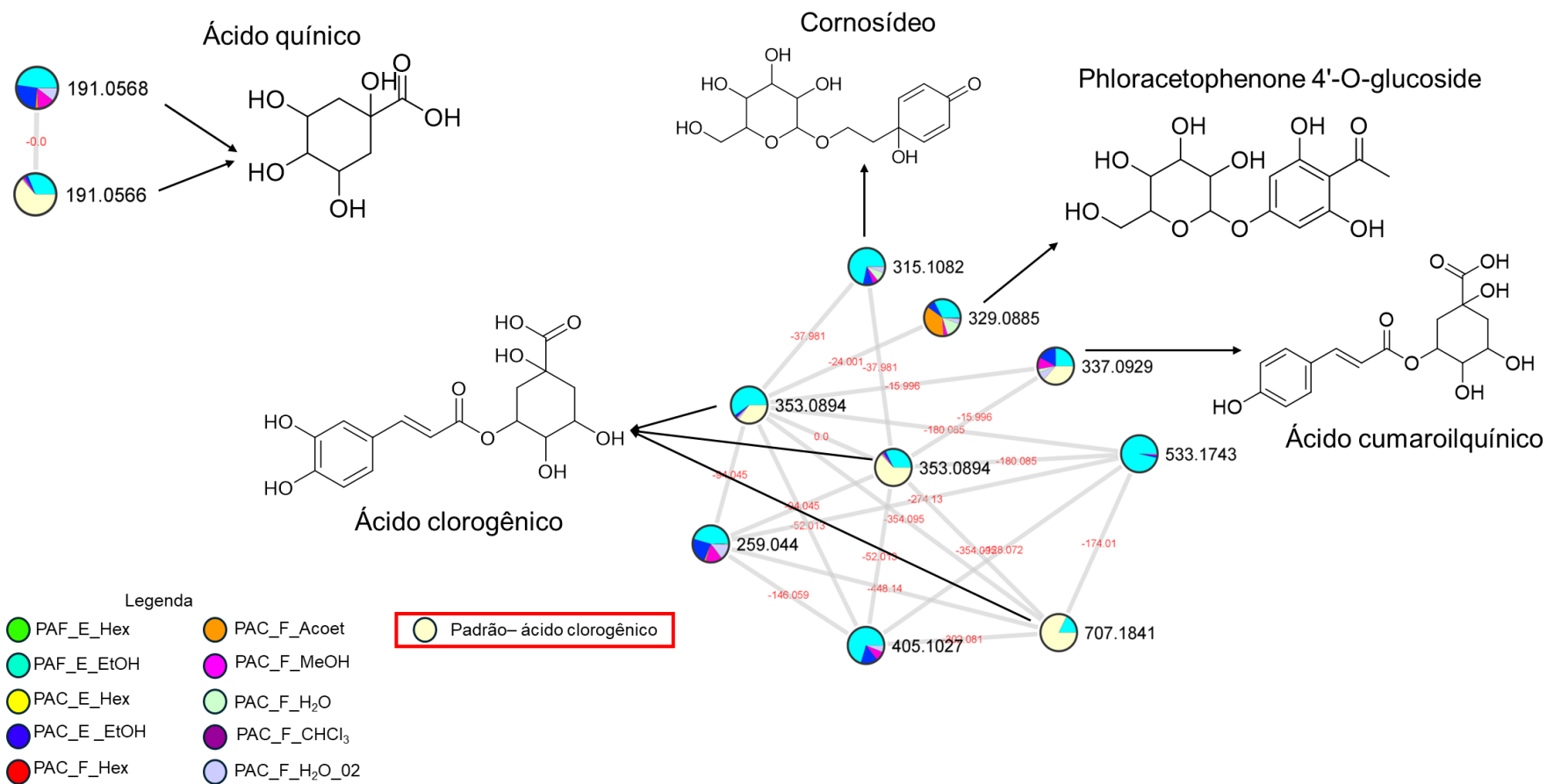


FIGURA 4.45 - *Cluster* (N5) e (N6) presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

Na análise do *cluster* N7 (FIGURA 4.46), foram anotados quatro compostos. Desses, dois pertencem à classe dos ácidos fenólicos, enquanto os outros dois são possivelmente artefatos gerados durante o procedimento de extração.

O íon precursor de m/z 179,0352 foi anotado como ácido cafeico, apresentando no espectro de fragmentação o íon base de m/z 135, atribuído à perda de CO_2 (44 Da). O fragmento m/z 107 foi obtido pela perda neutra de 72 Da, associada à eliminação da cadeia lateral a partir do íon precursor (SANTOS *et al.*, 2013). Essa anotação foi confirmada por uma co-injeção de um padrão o qual apresentou tempo de retenção e espectro de fragmentação equivalente ao observado na amostra. O íon de m/z 153,0196 foi anotado como ácido 2,3-diidroxibenzóico, cujo espectro de fragmentação apresentou o fragmento m/z 109, também decorrente da perda de CO_2 (44 Da), característica comum a ácidos fenólicos (RUAN *et al.*, 2019).

Os outros dois compostos, com íons precursores de m/z 207,0662 e m/z 181,0510, correspondem a derivados de compostos fenólicos, possivelmente artefatos, resultantes da esterificação do grupo carboxílico do ácido cafeico e do ácido 2,3-diidroxibenzóico, respectivamente. Assim, estes foram identificados putativamente como, cafeato de etila e protocatecuato de etila.

No *cluster* N8 (FIGURA 4.46), foram anotados dois compostos. Entre eles, ácido ferúlico que apresentou íon precursor de m/z 193,0502, cujo espectro de MS/MS evidenciou fragmentos característicos, como m/z 149, originado pela eliminação do grupo CO_2 (44 Da) e m/z 134, atribuído a uma clivagem radicalar subsequente com perda de um grupo CH_3 (15 Da) (FU *et al.*, 2024). Este composto também foi confirmado por uma co-injeção de um padrão de referência.

Considerando o padrão de fragmentação observado e a diferença de massa de 30 Da em relação ao ácido ferúlico, o íon precursor de m/z 223,0611 foi sugerido como sendo o ácido sinápico. De acordo com a literatura, o perfil de fragmentação desse composto é consistente, sendo observados os íons m/z 208, correspondente a uma perda radicalar de CH_3 (15 Da) e m/z 164, resultante da eliminação sequencial do grupo CO_2 (44 Da) (DEL MAR CONTRERAS; CASTRO, 2020).

Adicionalmente, o íon de m/z 201,0171 foi verificado como ácido cafeico na forma $[M + Na - 2H]$. Ressalta-se que esse composto já havia sido previamente descrito na amostra na forma desprotonada $[M-H]^-$, localizado no *cluster* N7.

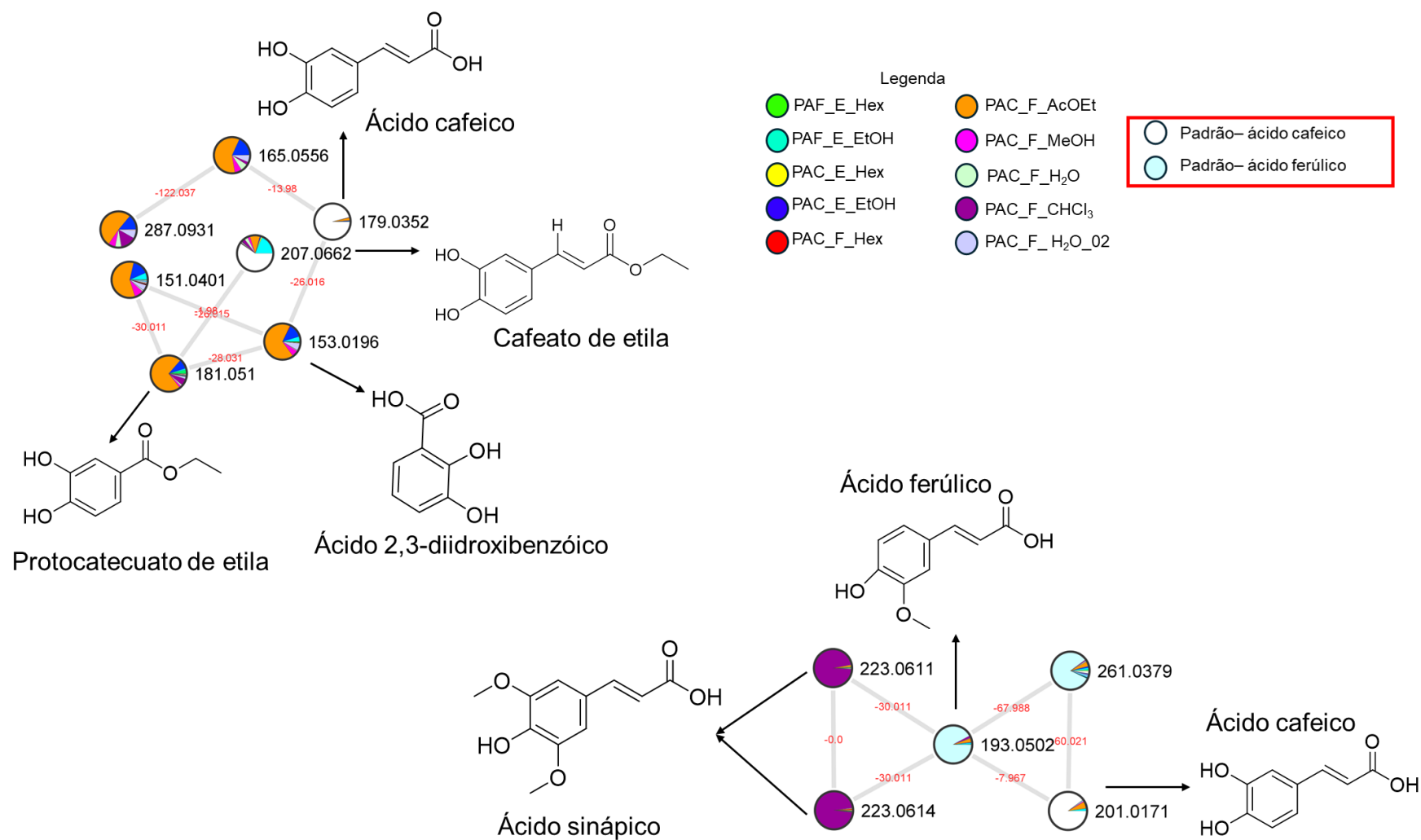


FIGURA 4.46 - *Cluster* (N7) e *Cluster* (N8) presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

Ainda no modo de ionização negativo na rede molecular, foi visualizado o íon m/z 137,0244 (FIGURA 4.47) representado por nodo único, o qual foi anotado como ácido salicílico (2-hidroxibenzóico). Diante disso, no espectro de fragmentação, observou-se íon base m/z 93, que se refere a eliminação neutra do CO_2 (44 Da) (WANG *et al.*, 2023).

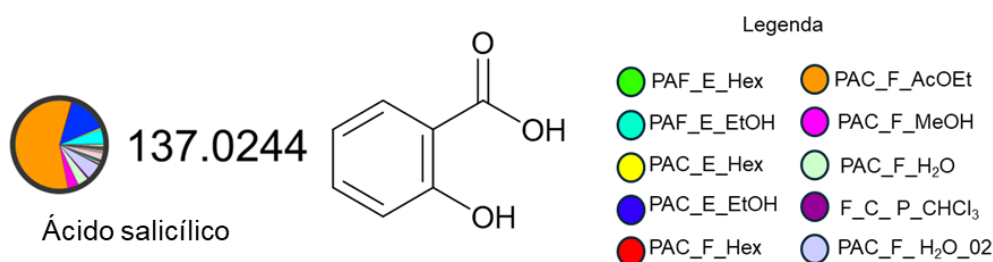


FIGURA 4.47 - Nodo único presente na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada

Foram elaboradas propostas de fragmentação para o ácido clorogênico, fhloracetophenone 4'-O-glucoside e o cornosídeo, com o objetivo de exemplificar as principais perdas observadas nessas estruturas, bem como os padrões de fragmentação característicos de compostos estruturalmente semelhantes (APÊNDICE E).

Dessa forma, os ácidos fenólicos constituem importantes metabólitos secundários sintetizados naturalmente por plantas e fungos. Nas plantas, esses compostos desempenham diversas funções biológicas, destacando-se a defesa contra fatores bióticos e abióticos. Além disso, apresentam propriedades amplamente reconhecidas que conferem benefícios à saúde humana, incluindo atividades antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória e antibacteriana (VALANCIENE *et al.*, 2020).

Estruturalmente, os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de grupos hidroxila fenólicos e grupo carboxílico, podendo ser classificados em dois subgrupos: ácidos hidroxibenzóicos, que apresentam substituições hidroxila diretamente no anel benzênico, e ácidos hidroxicinâmicos, que possuem uma cadeia lateral insaturada contendo uma ligação dupla carbono-carbono, além de substituições hidroxila no anel aromático (LU *et al.*, 2025).

Estudos conduzidos por CZERNIEWICZ *et al.*, 2016 demonstraram que plantas como *Hypericum perforatum*, *Juglans regia*, *Mentha piperita* e *Sambucus nigra*

são ricas em ácidos fenólicos e apresentaram atividade repelente contra duas espécies de pulgões, o pulgão-da-batata e o pulgão-da-aveia. Além disso, em outro estudo, foi relatado o efeito inseticida do ácido cafeico sobre larvas da praga agrícola *Spodoptera litura* (PUNIA *et al.*, 2023).

No trabalho realizado por WANG, R. *et al.*, 2023, o ácido clorogênico é descrito como um fitoquímico bioativo com propriedades pesticidas, especialmente eficaz contra a mosca-branca. Em uma revisão recente destaca os ácidos benzoico, cafeico, clorogênico, sinápico e ferúlico como agentes com atividade fungicida, reforçando o caráter pesticida dessa classe de compostos (BOULOGNE *et al.*, 2012).

No contexto fitoquímico da família Apocynaceae, diversos ácidos fenólicos já foram reportados em diferentes espécies. Em *Hancornia speciosa* e *Himatanthus drasticus*, foram identificados ácido cafeico e ácido clorogênico (MELO *et al.*, 2021b). Além disso, estudos relatam a presença de ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido ferúlico nos frutos de *Carissa carandas*, e nas folhas de *Catharanthus roseus* (BHADANE *et al.*, 2018)

4.5.8 Iridoides

A partir da rede molecular construída no modo de ionização negativo, foi possível anotar dois compostos pertencentes à classe dos iridoides. O nodo correspondente ao íon precursor de m/z 401,1088 foi identificado putativamente como o iridoide glicosilado 10-dehidrogardenosídeo (FIGURA 4.48). Diante da análise do espectro de MS/MS do composto, evidenciou a formação do fragmento m/z 221, resultante da perda neutra de 180 Da (porção glicosilada da molécula). Adicionalmente, foi observado o fragmento m/z 267, associada a abertura do anel glicosilado, com perda sequencial de 134 Da. A partir desse íon, ocorreu ainda a eliminação de uma molécula de H₂O (18 Da), originando o íon base m/z 249.

O segundo iridoide anotado foi deoxiloganina com íon precursor de m/z 373,1514 (FIGURA 4.48). No espectro de MS/MS, observou-se o fragmento m/z 358, obtido por uma clivagem radicalar de um grupo CH₃ (15 Da). Também foi observado o fragmento m/z 211, originado pela eliminação da unidade glicosídica da molécula, e m/z 193, formado a partir de perda sequencial de uma molécula de H₂O (18 Da).

As propostas de fragmentação para ambos os compostos se encontram no APÊNDICE E.

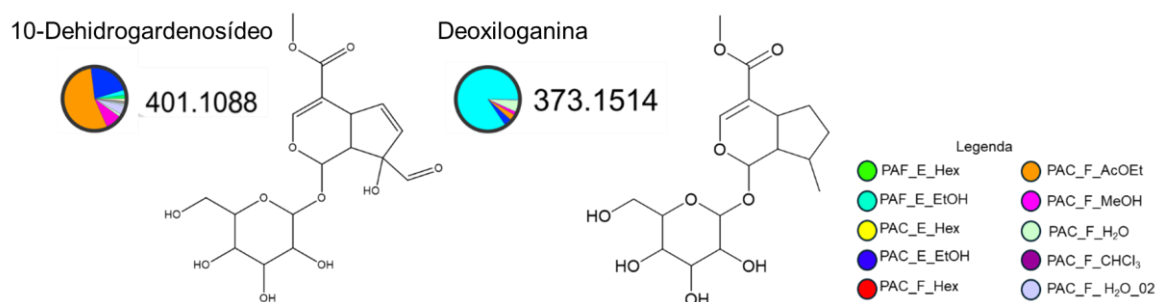


FIGURA 4.48 - Nós únicos presentes na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nós indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

Os iridoides constituem uma classe importante de produtos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal. Esses compostos são derivados monoterpênicos e frequentemente atuam como intermediários biossintéticos na formação de alcaloides indólicos (AKHTER *et al.*, 2018). Os iridoides são encontrados em diversas espécies vegetais e podem ser classificados, de acordo com suas características estruturais, em iridoides glicosilados, iridoides não glicosilados (agliconas), seco-iridoides e bis-iridoides (DOBLER *et al.*, 2011).

Do ponto de vista biológico, os iridoides apresentam uma ampla gama de atividades, incluindo ações cardiovasculares, anti-inflamatórias, antiespasmódicas, antitumorais, antivirais, imunomoduladoras e repelentes. Embora os mecanismos de percepção gustativa em insetos diferem daqueles observados em humanos, esses compostos são amargos ao paladar humano e tendem também a atuar como repelentes para insetos (DOBLER *et al.*, 2011).

Diante dos estudos disponíveis na literatura, observa-se que diversos iridoides apresentam atividade pesticida, com destaque para a ação inseticida. Nesse contexto, o trabalho de TZAKOU *et al.*, 2007 merece destaque ao investigar a espécie *Galium melanantherum*, da qual foram isolados sete iridoides glicosilados. Esses compostos tiveram sua bioatividade avaliada frente a formigas (*Crematogaster scutellaris*) e cupins (*Kaloterms flavicollis*), apresentando elevados níveis de toxicidade. Esses resultados reforçam o papel dos iridoides como metabólitos secundários envolvidos na defesa vegetal, evidenciando o potencial dessa classe de compostos no controle de insetos sociais.

Além disso, os iridoides constituem uma classe relevante de metabólitos secundários na família Apocynaceae. A literatura reporta a presença desses compostos em diversas espécies do gênero *Plumeria*, incluindo *Plumeria rubra*

(AKHTER *et al.*, 2018) , bem como em outras espécies da família, como *Allamanda schottii*, *Himatanthus sukuuba*, *Himatanthus fallax* e *Himatanthus articulatus* (PATEL, 2024). Especificamente, o 10-dehidrogardenosídeo já foi relatado em *Allamanda neriifolia* (ABE *et al.*, 1984), enquanto a deoxiloganina foi previamente descrita em *Vinca rosea*, reforçando a coerência das anotações realizadas no presente estudo (BATTERSBY, 1970).

4.5.9 Pterocarpanos

No presente estudo, foi isolado um composto pertencente à classe dos pterocarpanos, que apresentou íon precursor de m/z 341,1402 e foi identificado como 3-(2,7-dimetoxi-6a,11a-diidro-6H-benzofuro[3,2-c] cromeno-9-il) propan-1-ol. Com o objetivo de localizar esse metabólito na rede molecular, realizou-se a co-injeção do composto previamente isolado, evidenciando sua representação como um nodo único na rede molecular construída no modo de ionização negativa (FIGURA 4.49). A caracterização estrutural desse composto, bem como a respectiva proposta de fragmentação, encontra-se descritas no item 4.4.1.

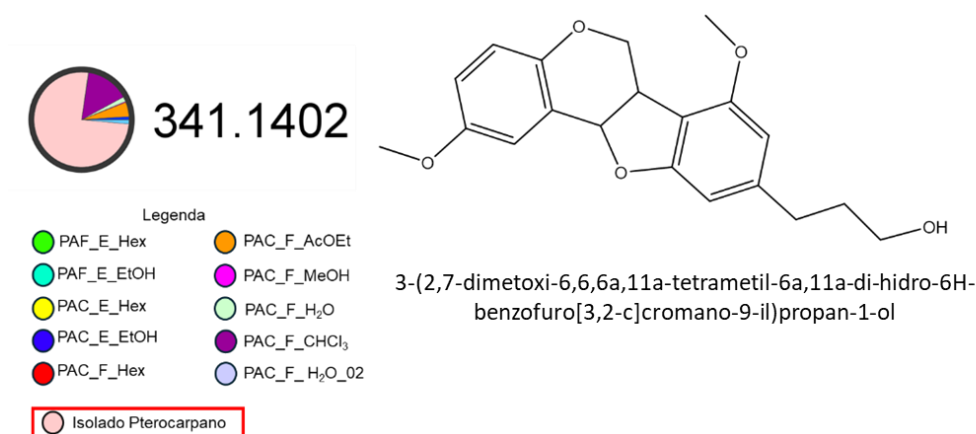


FIGURA 4.49 - Nodo único presentes na rede molecular no modo negativo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

Os pterocarpanos constituem o segundo maior grupo de isoflavonoides, sendo superados apenas pelas isoflavonas, e são caracterizados por um sistema tetracíclico formado pela fusão dos anéis benzofurano e benzopirano (SELVAM *et al.*, 2017) . Esses compostos são frequentemente classificados como fitoalexinas, uma vez que são biossintetizados pelas plantas como parte de seus mecanismos químicos de defesa, especialmente em resposta a fatores de estresse, como radiação UV,

ataque de patógenos e outros estímulos ambientais (HUANG, 2021; SELVAM *et al.*, 2017).

Diversos estudos relatam que os pterocarpanos apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas, antitumorais, antioxidantes e inseticidas, com destaque para seu potencial anticancerígeno, especialmente frente a linhagens relacionadas a câncer de ovário, colo do útero e melanoma, o que ressalta a relevância dessa classe de metabólitos no contexto farmacológico e biológico (SELVAM *et al.*, 2017)

4.5.10 Benzopiranos

Nesse estudo, foram isolados dois compostos com esqueleto benzopirano, classificados na subclasse dos cromanos. O composto com íon precursor de m/z 221,1660 foi identificado como 2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato e foi observado na rede molecular no modo positivo de ionização agrupado em um *cluster* (FIGURA 4.50). Assim, com base na diferença de massa de 14 Da e na similaridade dos espectros de fragmentação, o íon precursor de m/z 207,1000 foi anotado como ácido 2,2-dimetilcromano-6-carboxílico, um análogo estrutural do cromoano, indicando a presença de metabólitos estruturalmente relacionados na amostra.

A discussão detalhada referente à caracterização estrutural do composto isolado, bem como a proposta de fragmentação, encontra-se apresentada no item 4.4.3.

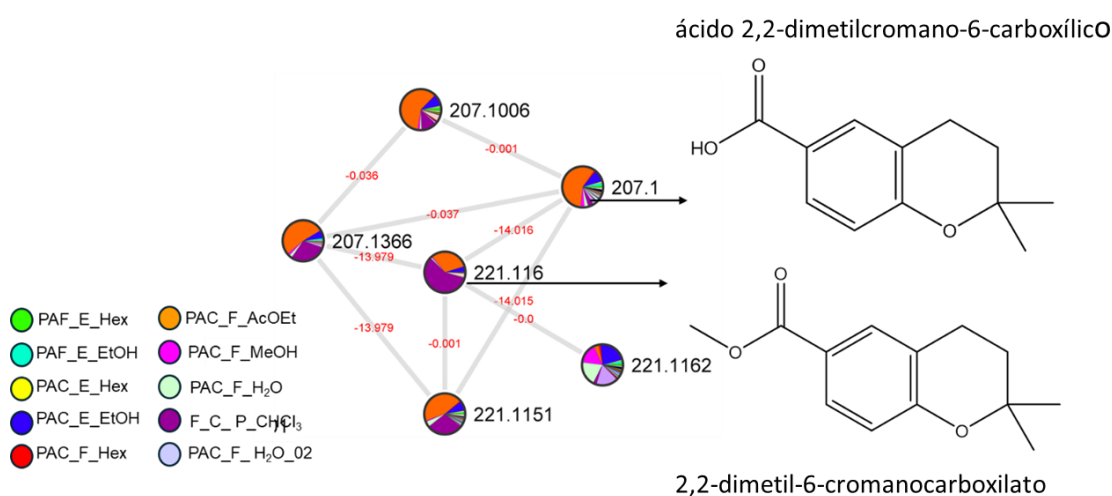


FIGURA 4.50 - *Cluster* (P2) presente na rede molecular no modo positivo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

O outro composto isolado foi localizado na rede molecular construída no modo positivo de ionização como nodo único (FIGURA 4.51), apresentando íon precursor de m/z 341,1354 e sendo identificado como 2,11-dimetoxi-6a,6b,12b,13a-tetraidro-6H,7H-furo[3,2-c:4,5-c'] bis [1] benzopirano. Para confirmar sua posição na rede molecular, realizou-se a co-injeção do composto previamente isolado. A caracterização detalhada desse composto, bem como a respectiva proposta de fragmentação estão descritas no item 4.4.2.

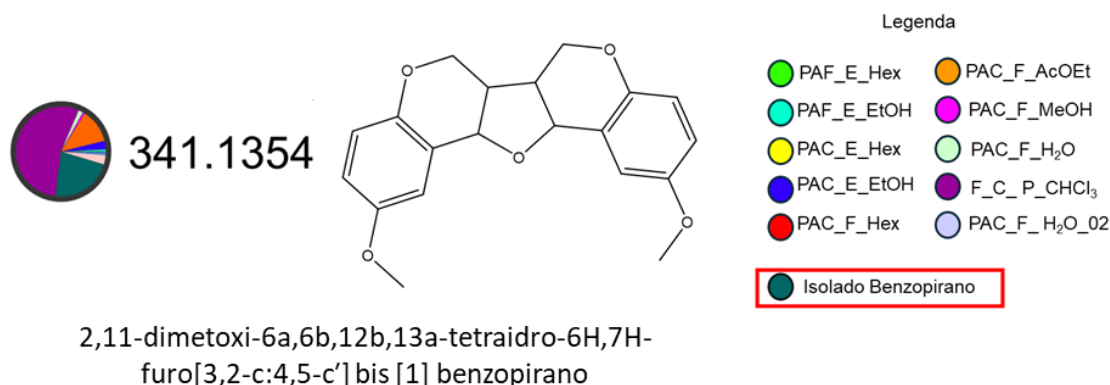


FIGURA 4.51 - Nodo único presente na rede molecular no modo positivo de ionização. As cores dos nodos indicam a contribuição relativa de cada amostra, conforme a legenda apresentada.

Os benzopiranos constituem uma classe estrutural ampla de metabólitos naturais, caracterizada pela presença de um anel benzênico fundido a uma porção heterocíclica oxigenada de seis membros (XI *et al.*, 2024). Essa classe engloba diferentes subclasses, como cromanos, cromanonas, cromonas e cromenos. Compostos que apresentam esse núcleo estrutural são frequentemente relatados na literatura em razão de suas diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, inseticidas e antitumorais, o que evidencia o potencial farmacológico associado ao núcleo benzopirano, em especial ao núcleo cromânico (BABU, 2017).

5 CONCLUSÃO

O estudo conduzido com a espécie *Parahancornia amapa* evidenciou atividade inseticida para os extratos etanólico das cascas e hexânico das folhas. Dentre esses, o extrato etanólico das cascas foi selecionado para dar início ao trabalho, sendo submetido a fracionamento bioquímico com base nos ensaios de toxicidade frente às operárias de *Atta sexdens*. Esse processo resultou no isolamento e na caracterização de três compostos pertencentes à classe dos benzopiranos, especificamente um pterocarpano e um cromano, todos inéditos como produtos naturais.

Os compostos isolados da fase orgânica da partição líquido-líquido apresentaram atividade inseticida moderada contra *A. sexdens*. Em contraste, a fração aquosa resultante desse processo exibiu alta atividade, possivelmente associada à predominância de compostos fenólicos, especialmente taninos. A análise comparativa entre os resultados obtidos para os compostos isolados, a fração aquosa e a fração de origem indicam que a atividade inseticida mais pronunciada está associada à atuação conjunta dos metabólitos presentes na mistura, sendo esse comportamento compatível com a hipótese de um efeito sinérgico.

Adicionalmente, a análise do perfil químico da espécie por LC-MS/MS revelou a presença de diversos metabólitos ainda não relatados para *P. amapa*, resultado condizente com a escassez de estudos fitoquímicos disponíveis nos estudos para essa espécie. Entre os compostos anotados destacam-se iridoides, flavonoides, ácidos fenólicos, triterpenos, lignanas, cumarinas e benzopiranos, evidenciando a elevada diversidade do perfil químico da planta.

Os resultados apresentados nesta pesquisa ressaltam a importância da investigação da composição química de *P. amapa*, com potencial aplicação no controle de pragas agrícolas. Essa abordagem contribui para o desenvolvimento de estratégias mais sustentáveis na agricultura, ao reduzir a dependência de pesticidas sintéticos e minimizar seus impactos ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAHI, A.; KHAIRULMAZMI, A.; TIJJANI, A.; ABUBAKAR, A. I.; ISMAIL, M. R. "Plant biomolecule antimicrobials: an alternative control measures for food security and safety". In: *Herbal biomolecules in healthcare application*, Chap.17, 381-406, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1616/B978-0-323-85852-6.00024-X>.
- ABE, F.; MORI, T.; YAMAUCHI, T. "Iridoids of Apocynaceae. III. Minor Iridoids from *Allamanda neriifolia*". *Che. Pharm. Bull.*, 32-(8), 1984. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.32.2947>.
- AHMAD, V. U.; IQBAL, S.; NAWAZ, S. A.; CHOUDHARY, M. I.; FAROOQ, U.; ALI, S. T.; AHMAD, A.; BADER, S.; KOUSAR, F.; ARSHAD, S.; TAREEN, R. B. "Isolation of four new pterocarpanes from *Zygophyllum eurypterum* (syn. *Z. atriplicoides*) with enzyme-inhibition properties". *Chemistry & Biodiversity*, 3-(9): 996-1003, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200690109>.
- AKHTER, N.; MAHMOOD, R.; PARVEEN, S.; KHATOON, T.; RAFIQ, F.; SATTAR, S. "Phytopharmacological review of iridoids isolated from *Plumeria genus*". *J. Chem. So. Pak.*, 40-(3): 550-555, 2018.
- AMPARO, T. R.; RODRIGUES, I. V.; SEIBERT, J. B.; ALMEIDA, T. C.; CABRAL, V. A. R.; VIEIRA, P. M. de A.; BRANDÃO, G. C.; DE OLIVEIRA, M. L. G.; DA SILVA, G. N.; DOS SANTOS, O. D. H.; FILHO, S. A. V.; TEIXEIRA, L. F. M.; DE SOUZA, G. H. B. "Antibacterial substances from leaves of *Protium spruceanum* (Burseraceae): in vitro and in silico evaluation". *Braz. J. Pharm. Sci.*, 56: e18167, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902020000118474>.
- AQUINO, A. B.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; DA MATTA, C. B. B.; EPIFÂNIO, W. A. D. N.; AQUINO, P. G. V.; SANTANA, A. E. G.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. "The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae)". *Sci. World J.*, 2013: 170837, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/218627>.
- ARANTES, J. T. "Estudo desvenda mecanismo evolutivo que pode levar ao controle de formigas". Agência FAPESP, 16 de dezembro de 2015. Disponível em: https://agencia.fapesp.br/estudo_desvenda_mecanismo_evolutivo_que_pode_levar_ao_controle_de_formigas/22442. Acesso em: 20/01/2026.
- ARAÚJO, S.S. Biossensores contendo acetilcolinesterase de formigas cortadeiras para screening de potenciais inseticidas naturais. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química- UFSCar. Tese de doutorado, 145 p.
- ARAÚJO, R. M.; PINHEIRO, S. M.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. "Complete NMR data assignments for novel pterocarpanes from *Harpalyce brasiliensis*". *Magn. Reson. Chem.*, 46-(9): 890-893, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrc.2269>
- ARAÚJO, S.S.; SEIBERT, J.B.; RUANI, A.; CRUZ, A.S.; CRUZ, R.A.; PEREIRA, A.K.; ZANDONAI, D.P.; FORIM, M.R.; SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O.C; FERNANDES, J. B. "The symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales,

Agaricaceae) as a target organism to control leaf-cutting ants". *Insects*, 13-(4):1-28, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects13040359>.

AYATOLLAHI, A. M.; GHANADIAN, M.; AFSHARYPOUR, S.; ABDELLA, O. M.; MIRZAI, M.; ASKARI, G. "Pentacyclic triterpenes in *Euphorbia microsciadia* with their T-cell proliferation activity". *Iran. J. Pharm. Res.*, 10-(2): 287-294, 2011.

AZEVEDO FERNANDES, G. E.; DE OLIVEIRA MOTA, N. F.; SIMÕES, A. O. "Flora das cangas da serra dos Carajás, Pará, Brasil: Apocynaceae". *Rodriguésia*, 69-(1): 1-12, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667530>.

BASTOS, K. X.; DIAS, C. N.; NASCIMENTO, Y. M.; DA SILVA, M. S.; LANGASSNER, S. M. Z.; WESSJOHANN, L. A.; TAVARES, J. F. "Identification of phenolic compounds from *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) leaves by UHPLC Orbitrap-HRMS". *Molecules*, 22-(1):143,1-11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22010143>.

BATISTA, J. M.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. "Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents". *Biol. Pharm. Bull.*, 31-(3): 538-543, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.31.538>.

BHADANE, B. S.; PATIL, M. P.; MAHESHWARI, V. L.; PATIL, R. H. "Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: a review". *Phytother. Res.*, 32-(7): 1181-1210, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.6066>.

BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L. V.; DE GROOTE, S. T. C. S.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. "Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*". *Pest Manag. Sci.*, 60-(9): 933-938, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.892>.

BICALHO, K.U. *Annona Mucosa* (Annonaceae) para o controle de pragas: estudo fitoquímico biomonitorado, síntese de mímicos e desenvolvimento de processos de nanoencapsulação. São Carlos. Programa de Pós Graduação em Química, 2016. UFSCar, Tese de doutorado.

BOULOGNE, I.; PETIT, P.; OZIER-LAFONTAINE, H.; DESFONTAINES, L.; LORANGER-MERCIRIS, G. "Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review". *Environ. Chem. Lett.*, 10-(4): 325-347, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-012-0359-1>.

BRAGA GONÇALVES, F. M.; DE SOUSA, A. L.; DE OLIVEIRA, R. R. "Use of mass spectrometry as a tool for the search or identification of flavonoids in Urticaceae". *Rodriguésia*, 74: e01152022, 2023.

BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. "Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais". *An. Soc.*

Entomol. Brasil, 26-(1): 107-113, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860202374049>.

C. SOBRINHO, D.; HAUPTLI, M. B.; APPOLINÁRIO, E. V.; KOLLENZ, C. L. M.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. "Triterpenoids isolated from *Parahancornia amapa*". *J. Braz. Chem. Soc.*, 2-(1): 15-20, 1991. DOI <https://doi.org/10.5935/0103-5053.19910004>.

CABRAL, M. M. O.; CRESCENTE, E. R. F.; MENDONÇA, P. M.; GOMES, C. M. S.; OLIVEIRA, V. C.; KELECOM, A. "Melia azedarach L. extracts and their activity on *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae)". *Rev. Bras. Farmacogn.*, 18-(Supl.): 699-702, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500011>.

CAMPOS, E. V. R.; PROENÇA, P. L. F.; OLIVEIRA, J. L.; BAKSHI, M.; ABHILASH, P. C.; FRACETO, L. F. "Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: future perspectives". *Ecol. Indic.*, 105: 483-495, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.038>.

CARNEIRO JUNIOR, W. de O.; GUIMARÃES, M. L. R.; FREITAS, K. M.; PEREIRA, R. S.; PÁDUA, R. M. de; CAMPANA, P. R. V.; BRAGA, F. C. "Structural characterization of a proanthocyanidin-rich fraction from *Hancornia speciosa* leaves and its effect on the release of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress in THP-1 cells". *J. Ethnopharmacol.*, 333: 118471, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118471>.

CARVALHO, M. G. de; ALVES, C. C. F.; WERLE, A. A.; BRAZ-FILHO, R. "Metabólitos especiais isolados de *Laseguea erecta* (Apocynaceae)". *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16-(4): 525-531, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000400010>.

CARVALHO, M. G.; DE ALBUQUERQUE, L. A.; ALVES, C. C. F.; CASCON, V. "Cornoside and other constituents from the latex of *Parahancornia amapa* (Hub.) Ducke (Apocynaceae), a medicinal plant in Northern Brazil". *Rev. Bras. Farmacogn.*, 18-(Supl.): 607-610, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500004>.

CARVALHO, T. C.; POLIZELI, A. M.; TURATTI, I. C. C.; SEVERIANO, M. E.; DE CARVALHO, C. E.; AMBRÓSIO, S. R.; CROTTI, A. E. M.; DE FIGUEIREDO, U. S.; VIEIRA, P. C.; FURTADO, N. A. J. C. "Screening of filamentous fungi to identify biocatalysts for lupeol biotransformation". *Molecules*, 15-(9): 6401-6411, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules15096140>.

CHAMBERS, M. C.; MACLEAN, B.; BURKE, R.; AMODEI, D.; RUDERMAN, D. L.; NEUMANN, S.; GATTO, L.; FISCHER, B.; PRATT, B.; EGERTSON, J.; HOFF, K.; KESSNER, D.; TASMAN, N.; SHULMAN, N.; FREWEN, B.; BAKER, T. A.; BRUSNIAK, M. Y.; PAULSE, C.; CREASY, D.; FLASHNER, L.; KANI, K.; MOULDING, C.; SEYMOUR, S. L.; NUWAYSIR, L. M.; LEFEBVRE, B.; KUHLMANN, F.; ROARK, J.; RAINER, P.; DETLEV, S.; HEMENWAY, T.; HUHMER, A.; LANGRIDGE, J.; CONNOLLY, B.; CHADICK, T.; HOLLY, K.; ECKELS, J.; DEUTSCH, E. W.; MORITZ, R. L.; KATZ, J. E.; AGUS, D. B.; MACCOSS, M.; TABB, D. L.; MALLICK, P. "A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics". *Nat. Biotechnol.*, 30-(10): 918-920, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.2377>.

CHEN, S.; WANG, X.; CHENG, Y.; GAO, H.; CHEN, X. "A review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids". *Molecules*, 28-(13):4982,1-27, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28134982>.

CHIEN, M. M.; SVOBODA, G. H.; SCHIFF, P. L.; SLATKIN, D. J.; KNAPP, J. E. "Chemical constituents of *Echites hirsuta* (Apocynaceae)". *J. Pharm. Sci.*, 68-(2): 225-227, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.2600680236>.

CIOANCA, O.; LUNGU, I. I.; MITA-BACIU, I.; ROBU, S.; BURLEC, A. F.; HANCIANU, M.; CRIVOI, F. "Extraction and purification of catechins from tea leaves: an overview of methods, advantages, and disadvantages". *Separations*, 11-(6):171,1-23, 2024. <https://doi.org/10.3390/separations11060171>.

CORREA, K. C. S.; MOREIRA, A. C.; ABD EL-RAHEEM IBRAHIM, A. G.; RAMOS DE JESUS, H. C.; MICOCCI, K. C.; CRIZÓSTOMO KOCK, F. V.; BUENO, O. C.; VENÂNCIO, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOUZA, D. H. F. "Identification and characterization of a recombinant cysteine peptidase (AsCathL) from leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Formicidae)". *Protein Expr. Purif.*, 201: 106174, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106174>.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. "Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão". *Rev. Bras. Pl. Med.*, 13-(4): 500-506, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000400016>.

COUTINHO, T. S.; LOUZADA, R. B. "Flora of the Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Apocynaceae". *Rodriguésia*, 69-(2): 399-411, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869231>.

CZERNIOWICZ, P.; CHRZANOWSKI, G.; SYTYKIEWICZ, H.; SPRAWKA, I.; LESZCZYNSKI, B. Aphidicidal and deterrent activity of phenolic acid extracts from some herbal plants towards *Myzus persicae* (Sulz.) and *Rhopalosiphum padi* (L.). *Fresen. Environ. Bul.* 25(12a):5714-5721, 2016.

DAS, A. K.; ISLAM, M. N.; FARUK, M. O.; ASHADUZZAMAN, M.; DUNGANI, R. "CarvA". *S. Afr. J. Bot.*, 135: 58-70, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.008>.

DAVID, E. S.; RABELO, É. M.; MARTINS, R. L.; SILVA, S. S. M. A. de. "Estudo fitoquímico, microbiológico, citotoxicidade e antioxidante do látex *Brosimum parinarioides* spp. parinarioides Ducke (Moraceae) com o *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocynaceae)". *Rev. Arquivos Científ. (IMMES)*, 6-(1): 1-6, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v9n2p16-20>.

DEL MAR CONTRERAS, M.; CASTRO, E. "Extraction strategies to recover bioactive compounds, incorporation into food and health benefits: current works and future challenges". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 60-(22): 3771-3805, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9040393>.

DELLA LUCIA, T. M.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. "Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges". *Pest Manag. Sci.*, 70-(1): 14-23, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3660>.

DEY, A.; MUKHERJEE, A.; CHAUDHURY, M. "Alkaloids from Apocynaceae: origin, pharmacotherapeutic properties, and structure-activity studies". *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 52: 373-488, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63931-8.00010-2>.

DOBLER, S.; PETSCHENKA, G.; PANKOKE, H. "Coping with toxic plant compounds - the insect's perspective on iridoid glycosides and cardenolides". *Entomol. Exp. Appl.*, 140-(1): 108-124, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.015>.

DONG, D. D.; LI, H.; JIANG, K.; QU, S. J.; TANG, W.; TAN, C. H.; LI, Y. M. "Diverse lignans with anti-inflammatory activity from *Urceola rosea*". *Fitoterapia*, 134: 258-264, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.02.011>.

EL-ASWAD, A. F.; AISU, J.; KHALIFA, M. H. "Biological activity of tannins extracts from processed *Camellia sinensis* (black and green tea), *Vicia faba* and *Urtica dioica* and *Allium cepa* essential oil on three economic insects". *J. Plant Dis. Prot.*, 130-(3): 495-508, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00680-x>.

EL-KASHEF, D. F.; HAMED, A.; KHALIL, H. E.; KAMEL, S. "Triterpenes and sterols of family Apocynaceae (2013-1955), a review". *Pharmacol. Phytochem.* 4(2):21-39, 2021.

FATHONI, A.; SAEPUDIN, E.; CAHYANA, A. H.; RAHAYU, D. U. C.; HAIB, J. "Identification of nonvolatile compounds in clove (*Syzygium aromaticum*) from Manado". *AIP Conf. Proc.*, 1848: 020048, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.4991183>.

FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; CORREA, A.G.; BACCI JUNIOR, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. "O futuro dos produtos naturais no controle de formigas". In: simpósio de mirmecologia, 18., 2007. Biológico, São Paulo, 69, 221-224, 2007.

FU, D.; WANG, H. D.; WANG, T.; XU, C.; HAN, Y. "Structural analyses on intramolecular acidic site variation using phase transition experiments and computation". *AIChE J.*, 70-(4): e18342, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/aic.18342>.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. "The pharmacological potential of catechin". *Indian J. Biochem. Biophys.*, 57-(5): 321-330, 2020. WOS:000583043100001.

GOMES DE SIQUEIRA, C.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. "Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L." *Appl. Environ. Microbiol.*, 64-(12): 4820-4822, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.4820-4822.1998>.

GUAN, H.; LI, P.; WANG, Q.; ZENG, F.; WANG, D.; ZHOU, M.; ZHOU, M.; HE, X.; LIAO, S.; PAN, W. "Systematically exploring the chemical ingredients and absorbed

constituents of *Polygonum capitatum* in hyperuricemia rat plasma using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS". *Molecules*, 27-(11): 3521,1-22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27113521>.

GUAN, L.; LUO, H.; LIU, S.; MING, X.; HU, M.; LUO, L.; TAN, J.; XIAO, S. "In-depth exploration of chemical constituents from *Justicia procumbens* L. through UHPLC-Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry". *Molecules*, 30-(17): 3554,1-12, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules30173554>.

GUIDA, Y.; TORRES, F. B. M.; BARIZON, R. R. M.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A. "Confirming sulfluramid (EtFOSA) application as a precursor of perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in Brazilian agricultural soils". *Chemosphere*, 325: 138357, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138370>.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, R. de C. S.; NUNOMURA, S. M.; SILVA, S. G. "Constituintes químicos isolados dos galhos e cascas de amapazeiro (*Parahancornia amapa*, Apocynaceae)". *Acta Amazon.*, 44-(4): 507-514, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201305233>.

HUANG, X. P. "Pterocarpanes and their biological activities: a review". *Phytochem. Rev.*, 20-(5): 1083-1130, 2021. DOI: <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20210528.602>.

HUANG, M.; SHEN, S.; LUO, C.; REN, Y. "*Genus Periploca* (Apocynaceae): a review of its classification, phytochemistry, biological activities and toxicology". *Molecules*, 24-(15):2479,1-50, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24152749>.

HUSSAIN, M. I.; QAMAR ABBAS, S.; REIGOSA, M. J. "Activities and novel applications of secondary metabolite coumarins - atividades e novas aplicações das cumarinas enquanto metabólitos secundários". *Planta Daninha*, 36: e018168362, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582018360100016>.

ISMAN, M. B. "Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world". *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 45-66, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>.

IYER, M.; PAL, K.; UPADHYE, V. "Phytochemicals and cancer". In: *Recent Frontiers in Phytochemicals: Applications in Food, Pharmaceutical, Cosmetic and Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier, 2023, cap. 17, p. 295-308

JAN, R.; KHAN, M.; ASAF, S.; LUBNA; ASIF, S.; KIM, K. "Bioactivity and therapeutic potential of kaempferol and quercetin: new insights for plant and human health". *Plants*, 11-(19), 2623,1-18, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11192623>.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, FLORA E FUNGA DO BRASIL. *Parahancornia*. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB33748>>. Acesso em: 05 fev. 2026.

JESUS, L. Aplicação da metodologia doe na extração de pigmentos e compostos fenólicos da casca do café: um estudo de otimização. 2024. - Lavras, Bacharel em Química- Lavras-MG.

KEMAYOU, G. P. M.; LIU, S.-Q.; WOUAMBA, S. C. N.; LI, B.; YU, H.-H.; TIAN, X.; QIU, Y.-X.; WANG, H.-Z.; KOUAM, S. F.; WANG, W.; YANG, Y. "Schisandraceae family fruits: exploring chemophenetic significance, UPLC/MSⁿ database, phytochemistry, and pharmacological potential". *Fitoterapia*, 182: 105748, 2025. DOI: <https://doi.org/106415.10.1016/j.fitote.2025.106415>.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview". *Sci. World J.* 162750, 1-16, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.

LEWIS, N. G.; DAVIN, L. B. "Lignans: biosynthesis and function". In: BARTON, D. H. R.; NAKANISHI, K. (eds.). *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Oxford: Elsevier, 1999. v. 2, p. 813-849.

LIU, H.; YANG, L.; WAN, C.; LI, Z.; YAN, G.; HAN, Y.; SUN, H.; WANG, X. "Exploring potential mechanism of Ciwujia tablets for insomnia by UPLC-Q-TOF-MS/MS, network pharmacology, and experimental validation". *Front. Pharmacol.*, 13: 884403, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.990996>.

LU, C.; ZHANG, J.; ZHAO, X.; ZI, Y.; XIAO, X. "Biotransformation of phenolic acids in foods: pathways, key enzymes, and technological applications". *Food Chem.*, 434: 137403, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods14132187>.

LYU, Q.; WEN, X.; LIU, Y.; SUN, C.; CHEN, K.; HSU, C. C.; LI, X. "Comprehensive profiling of phenolic compounds in white and red Chinese bayberries (*Morella rubra* Sieb. et Zucc.) and their developmental variations using tandem mass spectral molecular networking". *J. Agric. Food Chem.*, 69-(2): 434-445, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04117>.

MA, W.; WAFFO-TÉGUO, P.; PAISSONI, M. A.; JOURDES, M.; TEISSEDE, P.-L. "New insight into the unresolved HPLC broad peak of Cabernet Sauvignon grape seed polymeric tannins combining CPC and Q-ToF approaches". *Food Chemistry*, 249: 168-175, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.005>.

MALASPINA, P.; INGEGNERI, M.; BETUZZI, F.; DI GRISTINA, E.; CORNARA, L.; TROMBETTA, D.; SMERIGLIO, A. "Beyond the scent: new evidence about micromorphological, phytochemical and biological features of *Plumeria rubra* 'Tonda Palermitana' (Apocynaceae)". *Plants*, 13-(17): 2479, 1-21, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13172479>.

MALLMANN, L. P.; RIOS, A. O.; RODRIGUES, E. "MS-FINDER and SIRIUS for phenolic compound identification from high-resolution mass spectrometry data". *Food Res. Int.*, 163: 112315, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112315>.

MASIULIONIS, V. E.; SAMUELS, R. I. "Investigating the biology of leaf-cutting ants to support the development of alternative methods for the control and management of these agricultural pests". *Annu. Rev. Entomol.*, 70: 1-20, 2025

MELO, A. C. O.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. de. "Látex de plantas da família Apocynaceae: uma revisão". *Res. Soc. Dev.*, 10-(8): e861082126, 2021a. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture15060642>.

MELO, A. C. O.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. de. "Latex of Apocynaceae family plants: a review". Res. Soc. Dev., 10-(8): e861082126, 2021b.

MORAIS, F. S.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; SILVA, A. B.; PESSOA, O. D. L.; FREITAS, C. D. T.; ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, A. C.; RAMOS, M. V. "Chemical profiling of secondary metabolites from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel latex with inhibitory action against the enzymes α -amylase and α -glucosidase: in vitro and in silico assays". J. Ethnopharmacol., 253: 112647, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112644>.

MORDUE, A. J.; NISBET, A. J. "Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects". An. Soc. Entomol. Bras., 29-(4): 615-632, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000400001>.

NASCIMENTO, R. A.; NUNOO, D. B. O.; BIZKARGUENAGA, E.; SCHULTES, L.; ZABALETA, I.; BENSKIN, J. P.; SPANÓ, S.; LEONEL, J. "Sulfluramid use in Brazilian agriculture: a source of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) to the environment". Environ. Pollut., 242: 1436-1443, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.122>.

NEBO, L. Estudo de *Schinus terebinthifolius*, *Anacardium humile* e *Macaírea urundeuva* no controle de formigas cortadeiras". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química- UFSCar, 2013- Tese de doutorado.

NICKELE, M. A.; PIE, M. R.; REIS FILHO, W.; PENTEADO, S. do R. C. "Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras". Pesq. Florest. Bras., 33-(73): 53-72, 2013.

PATEL, D. K. "Bioactive plant product plumeride and plumericin and their importance in medicine". J. Pharmacogn. Phytochem., 13-(2): 289-294, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104412>.

PEREIRA, V.; FIGUEIRA, O.; CASTILHO, P. C. "Flavonoids as insecticides in crop protection-a review of current research and future prospects". Pest Manag. Sci., 80-(4): 1012-1034, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13060776>.

PÉREZ-LÓPEZ, A. V.; LIM, S. D.; CUSHMAN, J. C. "Humboldt review: tissue succulence in plants: carrying water for climate change". J. Plant Physiol., 289:154081, 1-22, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154081>.

PUNIA, A.; SINGH, V.; THAKUR, A.; CHAUHAN, N. S. "Impact of caffeic acid on growth, development and biochemical physiology of insect pest, *Spodoptera litura* (Fabricius)". Heliyon, 9-(3): e14027, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14593>.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. "Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica". Quím. Nova, 24-(1): 27-36, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100013>.

RAHIM, N. A.; ROSLAN, M. N. F.; MUHAMAD, M.; SEENI, A. "Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content and LC-MS profiling of leaves extracts of *Alstonia angustiloba*". *Separations*, 9-(9): 234.1-22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/separations9090234>.

RIBEIRO, J. E. L.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; DA S. COSTA, M. A.; DE BRITO, J. M.; DE SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNCAO, P. A. C. L.; DA C. PEREIRA, E.; DA SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCOPPIO, L. C. "Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central". Manaus: INPA, 816 p.1999.

RUAN, J.; YAN, J.; ZHENG, D.; SUN, F.; WANG, J.; HAN, L.; ZHANG, Y.; WANG, T. "Comprehensive chemical profiling in the ethanol extract of *Pluchea indica* aerial parts by liquid chromatography/mass spectrometry analysis of its silica gel column chromatography fractions". *Molecules*, 24 (15):2784,1-20, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24152784>.

RUE, E. A.; RUSH, M. D.; VAN BREEMEN, R. B. "Procyanidins: a comprehensive review encompassing structure elucidation via mass spectrometry". *Mass Spectrom. Rev.*, 37-(4): 442-464, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9507-3>.

SALLES, R. C. de O.; NUNOMURA, S. M.; LOPES, N. P.; NUNOMURA, R. de C. S. "Comparative study of the chemical composition of amapa latex from *Parahancornia amapa* and *Brosimum parinarioides* by HPLC-UV-DAD". *Quim. Nova*, 48-(6): 673-680, 2025. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20250187>.

SANTOS, J. L. A.; BISPO, V. S.; FILHO, A. B. C.; PINTO, I. F. D.; DANTAS, L. S.; VASCONCELOS, D. F.; ABREU, F. F.; MELO, D. A.; MATOS, I. A.; FREITAS, F. P.; GOMES, O. F.; MEDEIROS, M. H. G.; MATOS, H. R. "Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of coconut water (*Cocos nucifera* L.) and caffeic acid in cell culture". *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 85-(4): 1233-1242, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-37652013105312>.

SCORZONI, L.; SANGALLI-LEITE, F.; DE LACORTE SINGULANI, J.; DE PAULA E SILVA, A. C. A.; COSTA-ORLANDI, C. B.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. "Searching new antifungals: the use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds". *J. Microbiol.Meth.*, 123:68-76, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.005>.

SELVAM, C.; JORDAN, B. C.; PRAKASH, S.; MUTISYA, D.; THILAGAVATHI, R. "Pterocarpan scaffold: a natural lead molecule with diverse pharmacological properties". *Phytochem. Rev.*, 16-(4): 681-701, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.01.023>.

SHAHZAD, M. N.; AHMAD, S.; TOUSIF, M. I.; AHMAD, I.; RAO, H.; AHMAD, B.; BASIT, A. "Profiling of phytochemicals from aerial parts of *Terminalia neotaliala* using LC-ESI-MS² and determination of antioxidant and enzyme inhibition activities". *PLoS ONE*, 17-(3): e0265312, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266094>.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks". *Genome Res.*, 13-(11): 2498-2504, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.

SILVA, L. R.; COSTA, R. "Health benefits of nongallated and gallated flavan-3-ols: a prospectus". In: Recent Advances in Gallate Research. New York: Nova Science Publishers, 1-24, 2014.

SILVA, M. da S.; FANTINI, A. C.; SHANLEY, P. "Látex de amapá (*Parahancornia fasciculata* (Poir) Benoist, Apocynaceae): remédio e renda na floresta e na cidade". *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi Ciênc. Hum.*, 6-(2): 291-306, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1981-81222011000200003>.

SILVA, S. L. da; NASCIMENTO, A. A. do; RIBEIRO, E. F. B.; RIBEIRO, R. B.; ALVES, C. M.; SANTOS, A. M. dos; BURMANN, A. P. R.; MIRA NETO, R. de A. "Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae)". *Acta Amazon.*, 46-(1): 31-38, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201501746>.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; BACCI JR., M.; SIQUEIRA, C. G.; SILVA, A.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. "Isolation and maintenance of symbiotic fungi of ants in the tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae)". *Neotrop. Entomol.*, 34-(1): 1-7, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000100001>.

TARASING, P. S.; MOHI-UD-DIN, S.; GANI, M.; FIRDOOS, M.; SRIVASTAVA, K.; ALI KHAN, A. "Botanical insecticides: a sustainable alternative for eco-friendly insect pest management". *Biol. Forum*, 17-(1): 1-8, 2025. DOI: <https://doi.org/10.65041/BiologicalForum.2025.17.7.30>.

TSUGAWA, H.; IKEDA, K.; TAKAHASHI, M.; SATOH, A.; MORI, Y.; UCHINO, H.; OKAHASHI, N.; YAMADA, Y.; TADA, I.; BONINI, P.; HIGASHI, Y.; OKAZAKI, Y.; ZHOU, Z.; ZHU, Z. J.; KOELMEL, J.; CAJKA, T.; FIEHN, O.; SAITO, K.; ARITA, M.; ARITA, M. "A lipidome atlas in MS-DIAL 4". *Nat. Biotechnol.*, 38-(10): 1173-1181, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0531-2>.

TZAKOU, O.; MYLONAS, P.; VAGIAS, C.; PETRAKIS, P. V. "Iridoid glucosides with insecticidal activity from *Galium melanantherum*". *Z. Naturforsch. C*, 62-(7-8): 451-456, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-823>.

VALANCIENE, E.; JONUSKIENE, I.; SYRPAS, M.; AUGUSTINIENE, E.; MATULIS, P.; SIMONAVICIUS, A.; MALYS, N. "Advances and prospects of phenolic acids production, biorefinery and analysis". *Molecules*, 10-(6): 874, 1-41, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10060874>.

VALGAS, C.; DE SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A. "Screening methods to determine antibacterial activity of natural products". *Braz. J. Microbiol.*, 38-(2): 369-380, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>.

VELASQUES, J.; CARDOSO, M. H.; ABRANTES, G.; FRIHLING, B. E.; FRANCO, O. L.; MIGLIOLO, L. "The rescue of botanical insecticides: a bioinspiration for new niches and needs". *Pest Manag. Sci.*, 73-(12): 2365-2376, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.10.00>.

VELURI, R.; WEIR, T. L.; BAIS, H. P.; STERMITZ, F. R.; VIVANCO, J. M. "Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives". *J. Agric. Food Chem.*, 52-(5): 1077-1082, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf040453d>.

WANG, P.; CHI, J.; GUO, H.; WANG, S. X.; WANG, J.; XU, E. P.; DAI, L. P.; WANG, Z. M. "Identification of differential compositions of aqueous extracts of *Cinnamomi ramulus* and *Cinnamomi cortex*". *Molecules*, 28-(5):1-22, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28052015>.

WANG, X. Q.; WEI, F. Y.; WEI, Z. F.; ZHANG, L.; LUO, M.; ZHANG, Y. H.; ZU, Y. G.; FU, Y. J. "Homogenate-assisted negative-pressure cavitation extraction for determination of organic acids and flavonoids in honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) by LC-MS/MS". *Sep. Purif. Technol.*, 135: 284-292, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.07.046>.

WANG, R.; ZHANG, Q.; QU, C.; WANG, Q.; WANG, J.; LUO, C. "Toxicity, baseline of susceptibility, detoxifying mechanism and sublethal effects of chlorogenic acid, a potential botanical insecticide, on *Bemisia tabaci*". *Front. Plant Sci.*, 14:1-9, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1150853>.

WANG, Y.; ZHAO, M.; OU, Y.; ZENG, B.; LOU, X.; WANG, M.; ZHAO, C. "Metabolic profile of esculin in rats by ultra-high-performance liquid chromatography combined with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry". *J. Chromatogr. B*, 1020: 131-138, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.027>.

XI, Y.; WANG, H.; SUN, L.; MA, X.; ZHANG, S.; ZHANG, Z. "Recent advances in the structures and bioactivities of benzopyrans derived from marine fungi: a review". *Front. Pharmacol.*, 15:1-19, 23 October, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.148231>.

XIA, M.; YAO, M.; LI, J.; ZHANG, J.; YU, Y.; YANG, S.; ZHONG, G.; PEI, N.; OUYANG, H.; FENG, Y. "Characterization of chemical constituents of *Oxytropis microphylla* (Pall.) DC. by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry". *Separations*, 9-(10): 297, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/separations9100297>.

XU, Y.; LIANG, P. L.; CHEN, X. L.; GONG, M. J.; ZHANG, L.; QIU, X. H.; ZHANG, J.; HUANG, Z. H.; XU, W. "The impact of citrus-tea cofermentation process on chemical composition and contents of Pu-Erh tea: an integrated metabolomics study". *Front. Nutr.*, 8, 1-13, 16 September, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.737539>.

XU, F.; LIU, Y.; ZHANG, Z.; YANG, C.; TIAN, Y. "Quasi-MSⁿ identification of flavanone 7-glycoside isomers in Da Chengqi Tang by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Chin. Med.*, 4:15, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1186/1749-8546-4-15>.

ZANDONAI, D. Estudos dos metabólitos secundários de *Exophiala spinifera* em diferentes condições de cocultivos com *Leucoagaricus gongylophorus* para o controle de formigas cortadeiras. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química- UFSCar, 2022 Tese de doutorado, 145 p.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; MEDEIROS, A. G. B.; SOUZA-SILVA, A. "Combate sistemático de formigas-cortadeiras com iscas granuladas, em eucaliptais com cultivo mínimo". Rev. Árvore, 27-(3): 377-384, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622003000300016>.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, J. C.; DA SILVA, W. L. P.; RIBEIRO, G. T.; LEMES, P. G. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. Forests, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 439-454, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/f5030439>.

ZHANG, L.; LI, J.; HU, L.; WANG, Y.; WU, Z.; MENG, Y.; LIANG, Z.; YANG, L.; WEI, G.; HUANG, Y. "Identification of lignans and quality assessment in *Dendrobium officinale* under different cultivation modes". Rapid Commun. Mass Spectrom., 37-(16): e9516, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.9541>.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. "Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review". Chin. Med., 13:20, 1-26, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.

APÊNDICES

A. ESPECTROS DE RMN, ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 14,1T).

Composto 1

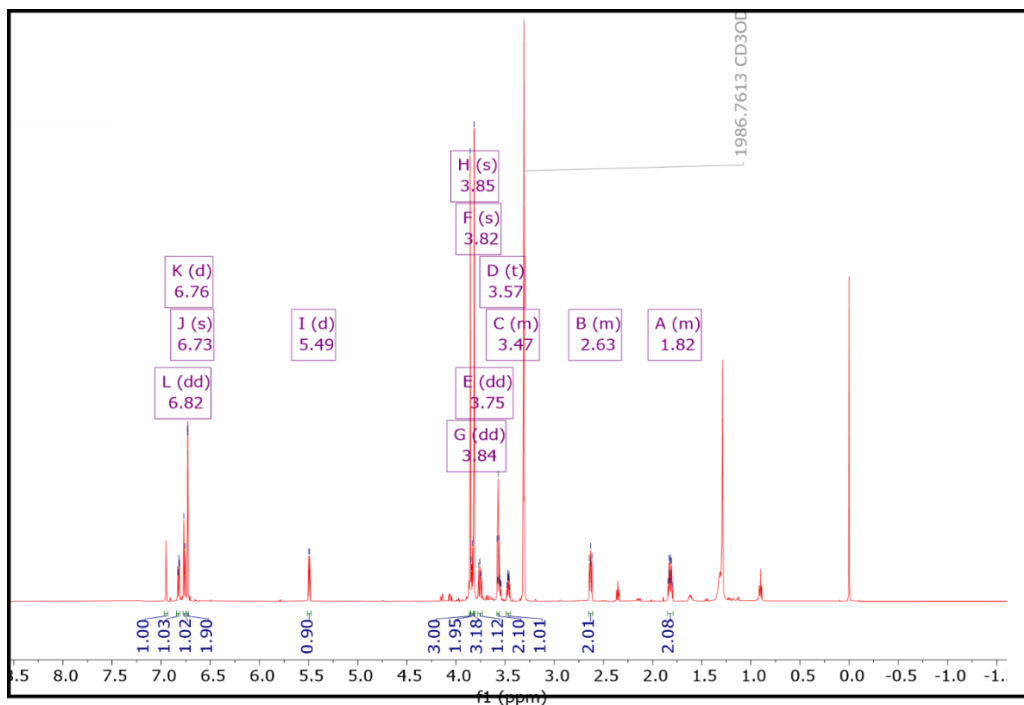


FIGURA A.1: Espectro de RMN de ^1H .

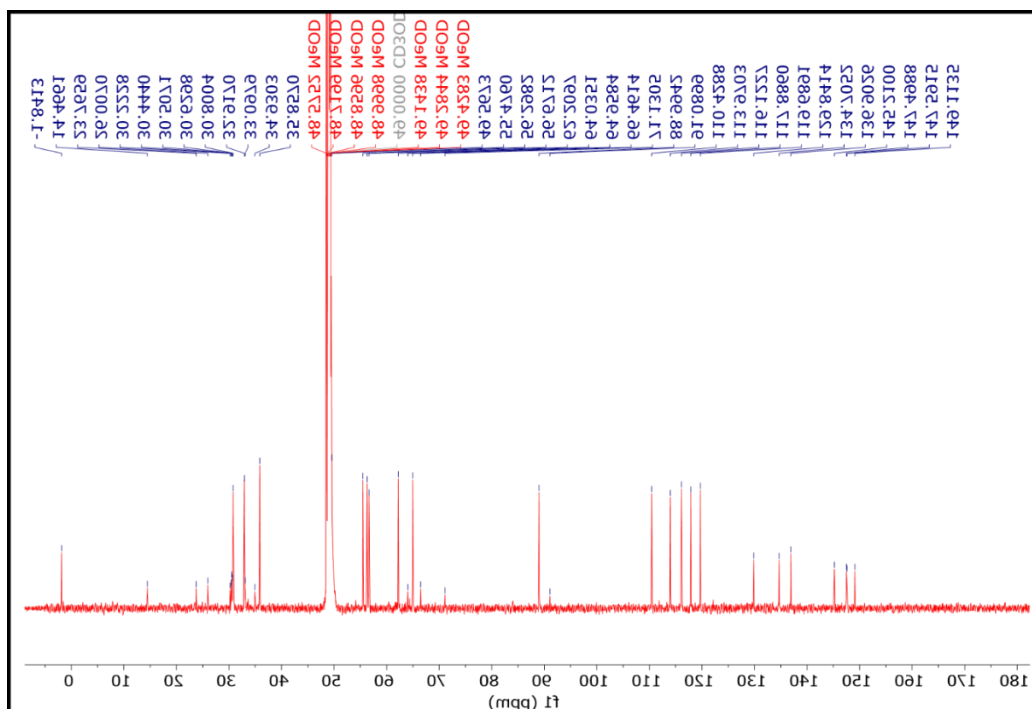


FIGURA A.2: Espectro de RMN de ^{13}C .

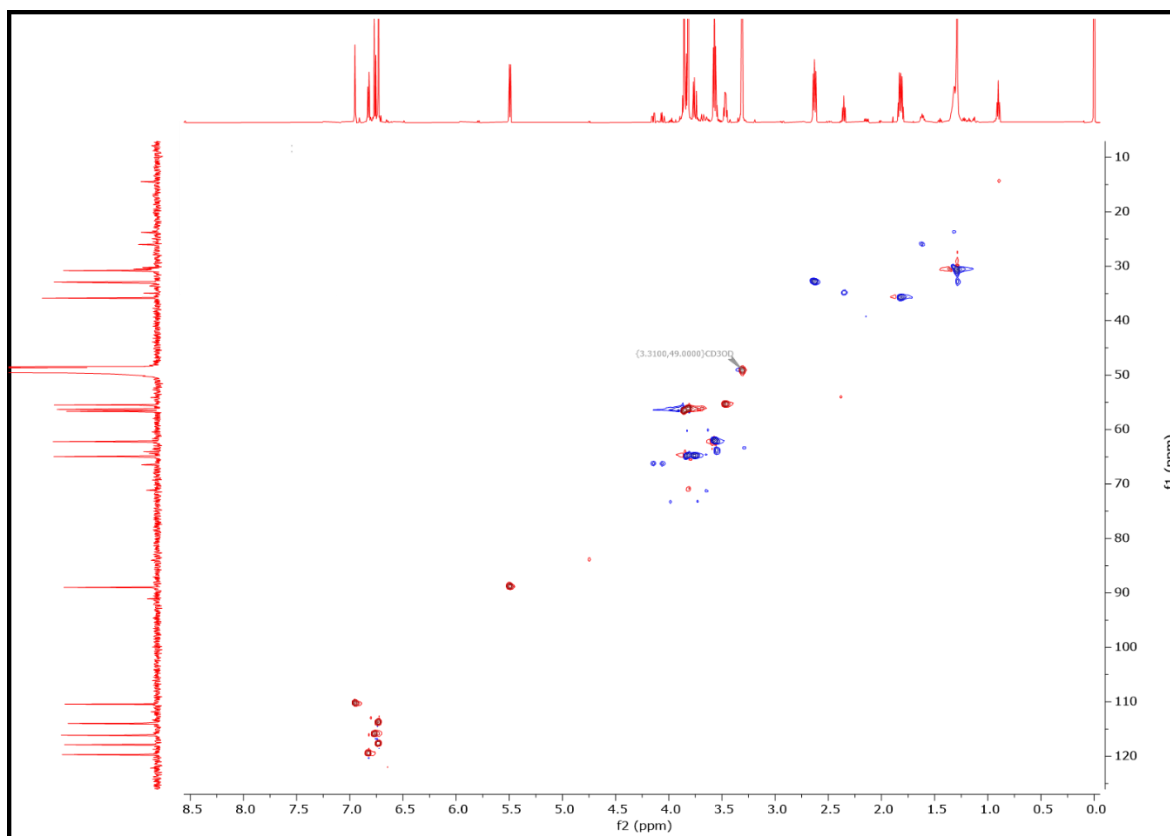


FIGURA A.3: Espectro bidimensional HSQC.

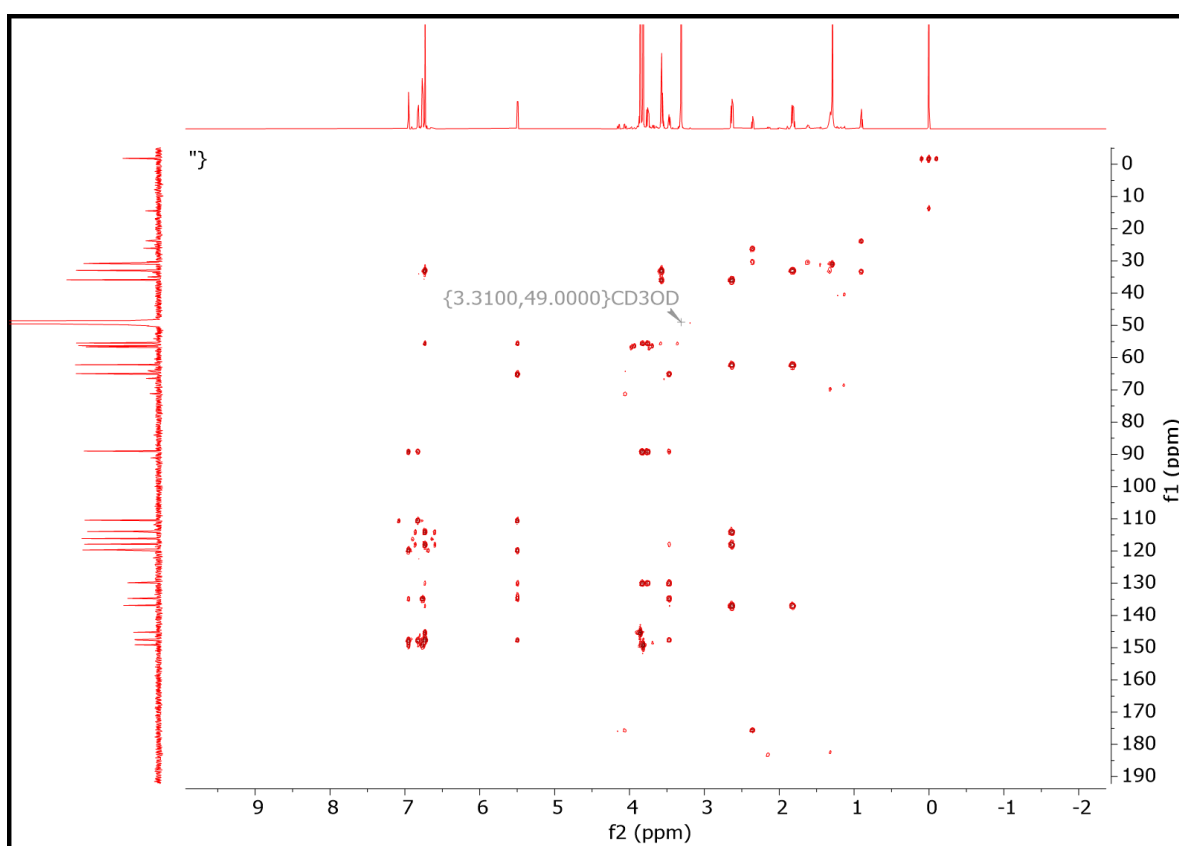


FIGURA A.4: Espectro bidimensional HMBC.

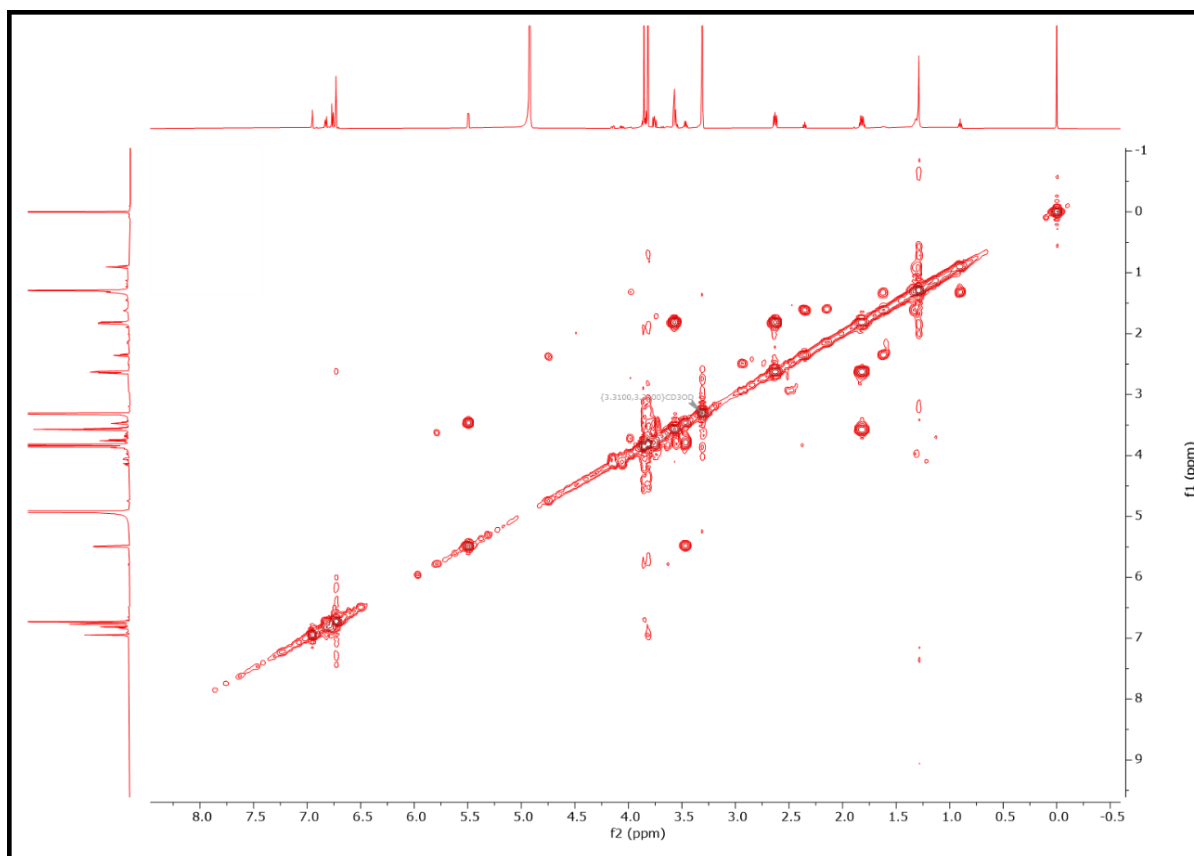


FIGURA A.5: Espectro bidimensional COSY.

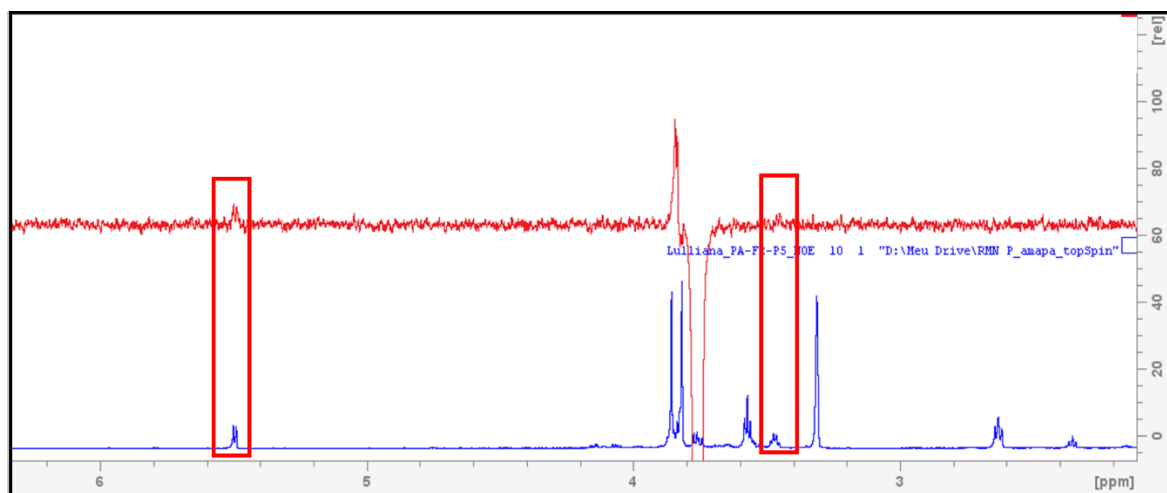


FIGURA A.6: Comparação entre o espectro de RMN de ^1H (azul) e o espectro de NOE 1D (vermelho), obtido por irradiação seletiva do sinal em δ 3,75 ppm.

Composto 2

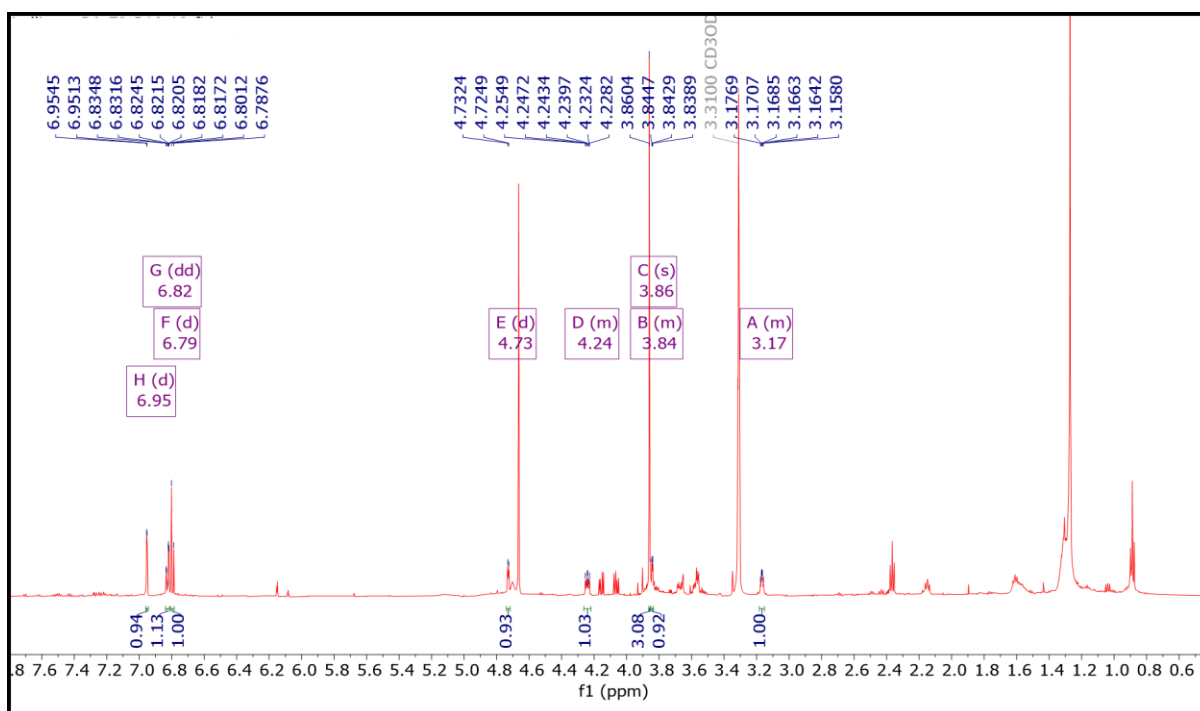


FIGURA A-7: Espectro de RMN de ^1H .

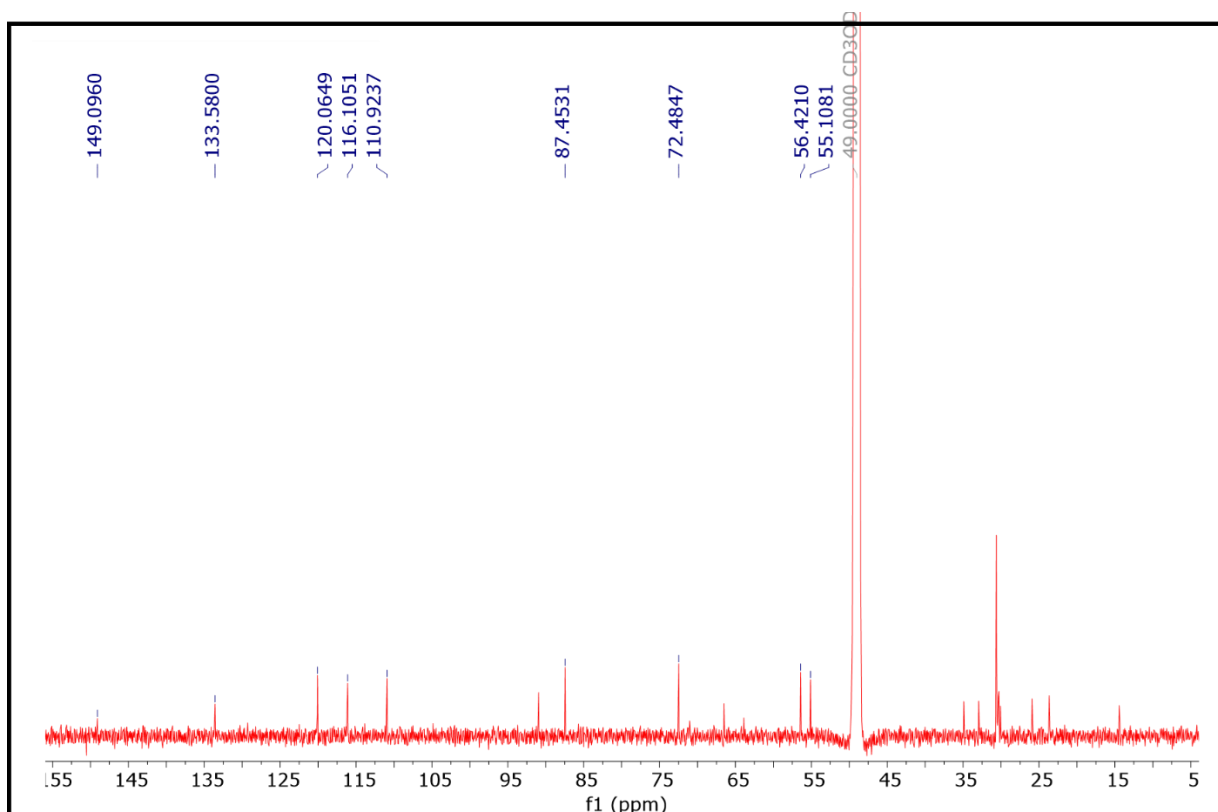
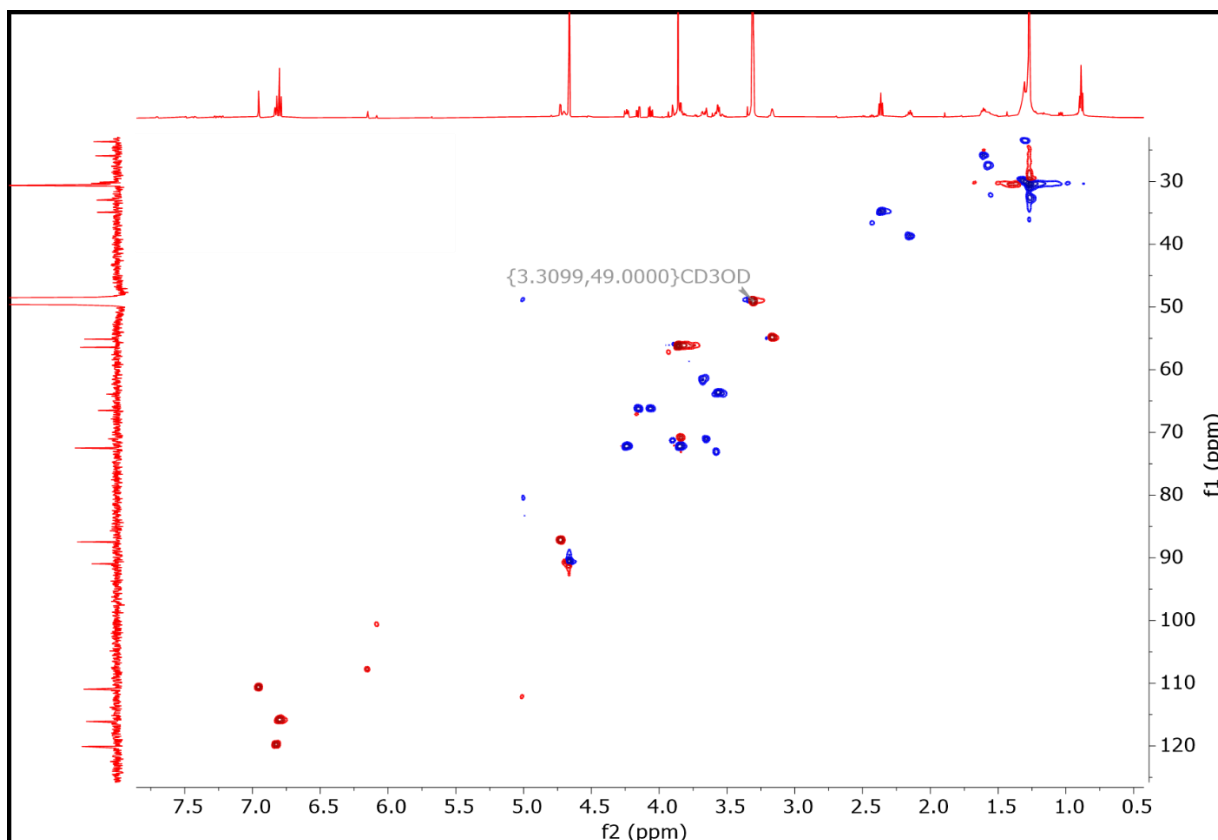
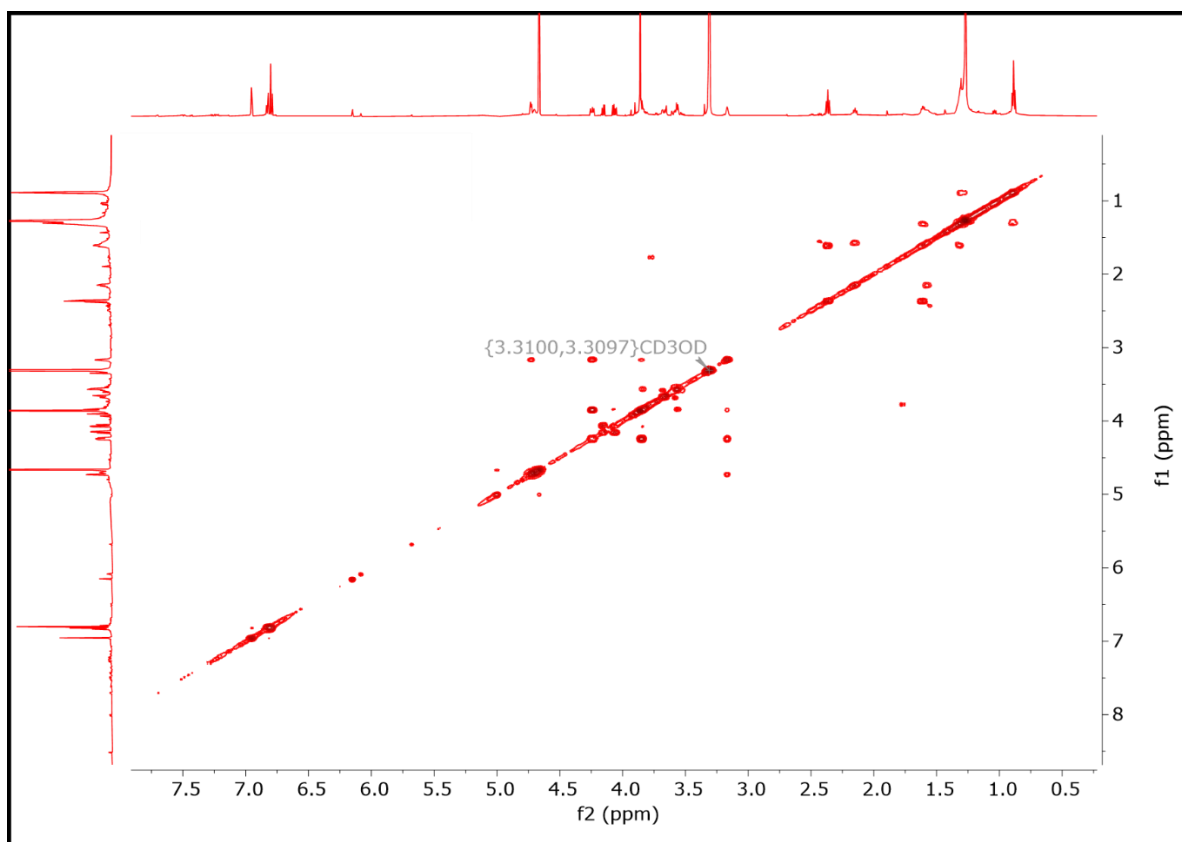


FIGURA A 8: Espectro de RMN de ^{13}C .



FIGURAA 9: Espectro bidimensional HSQC.



FIGURAA 10: Espectro bidimensional COSY.

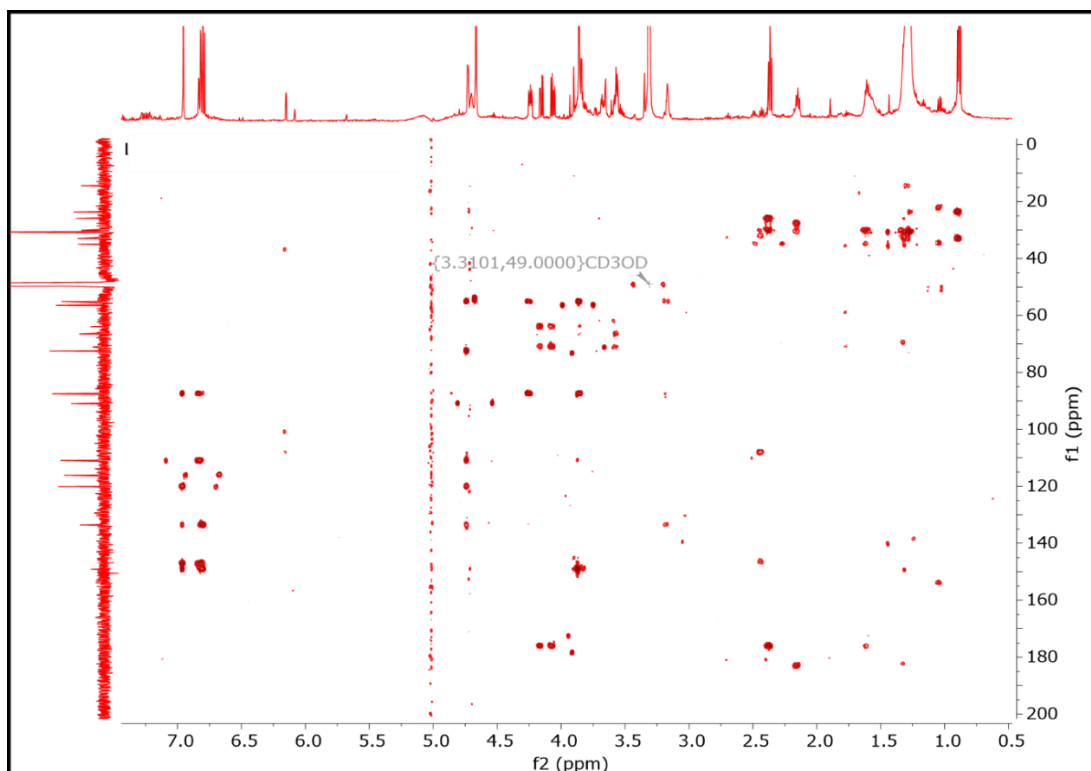


FIGURA A 11: Espectro bidimensional HMBC.

Composto 3

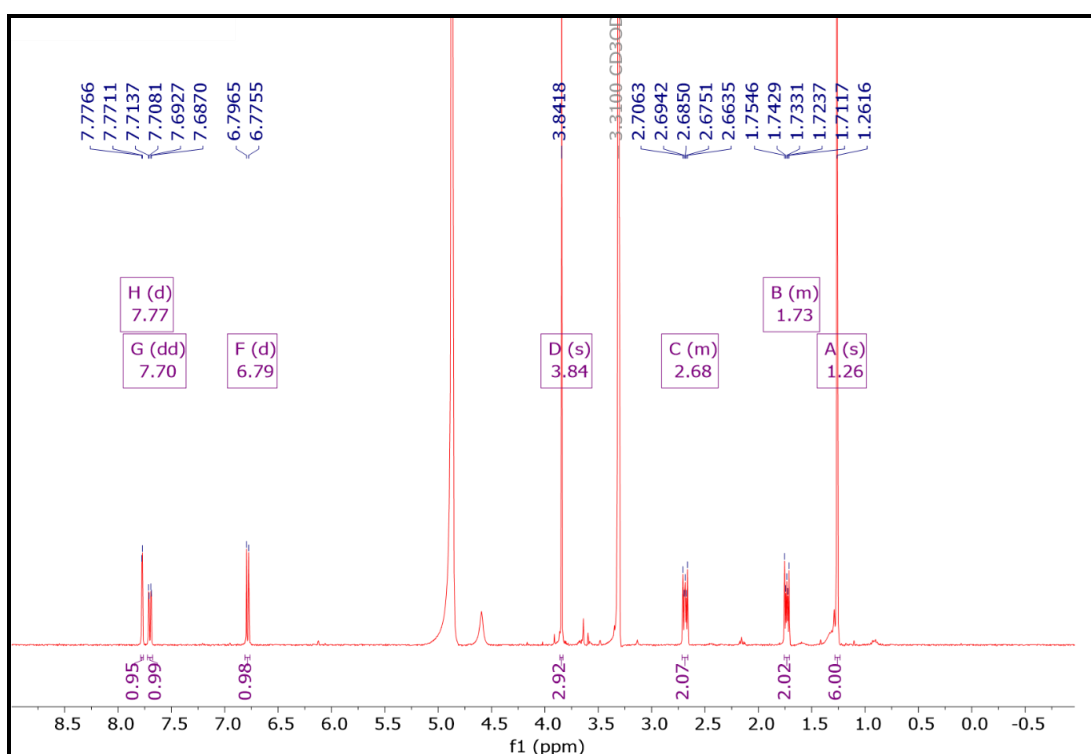


FIGURA A12: Espectro de RMN de ^1H .

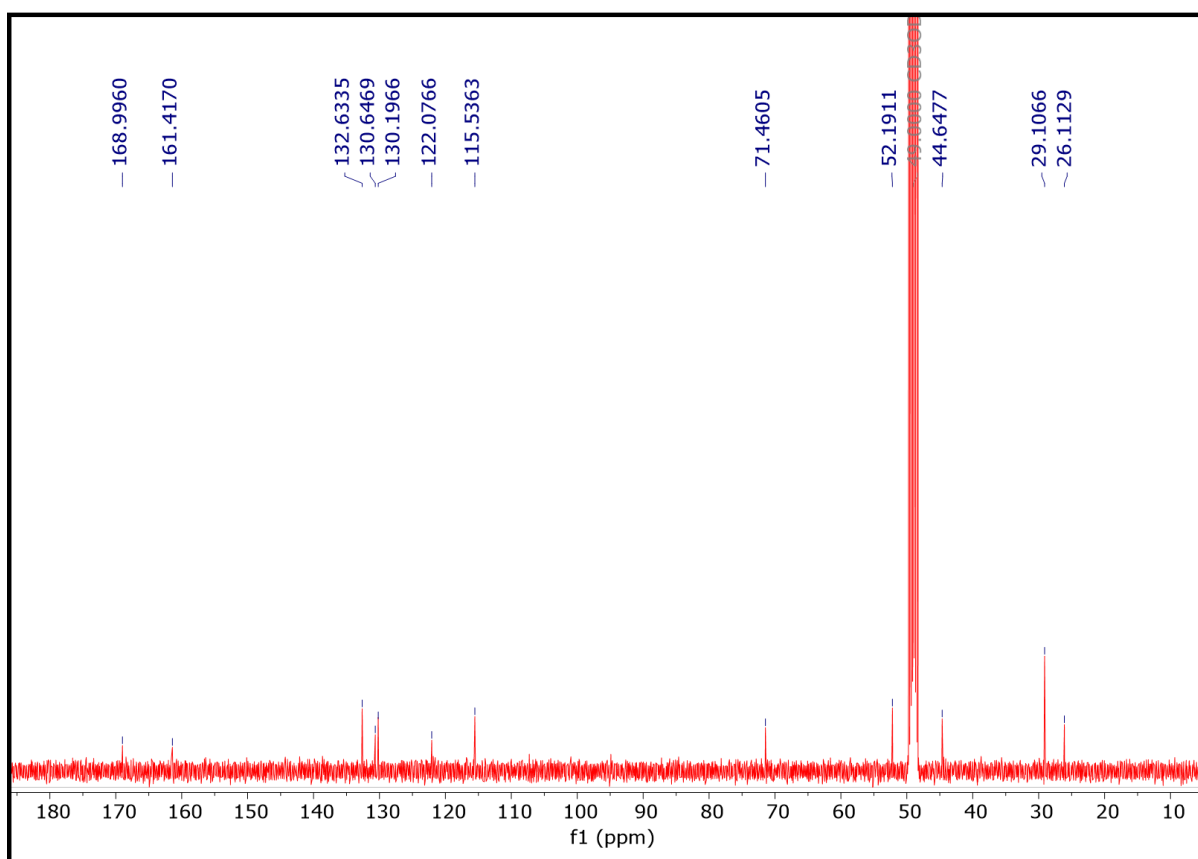


FIGURA A13: Espectro de RMN de ^{13}C .

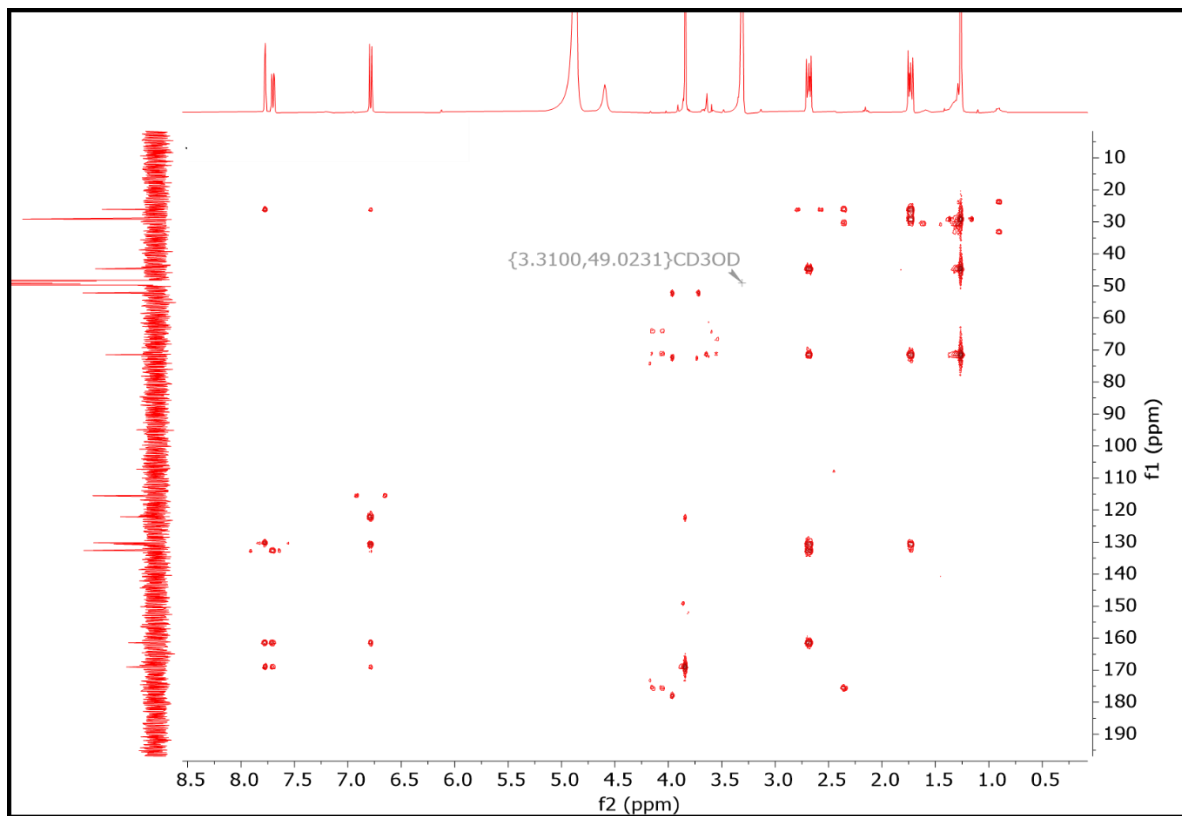


FIGURA A14: Espectro bidimensional HMBC.

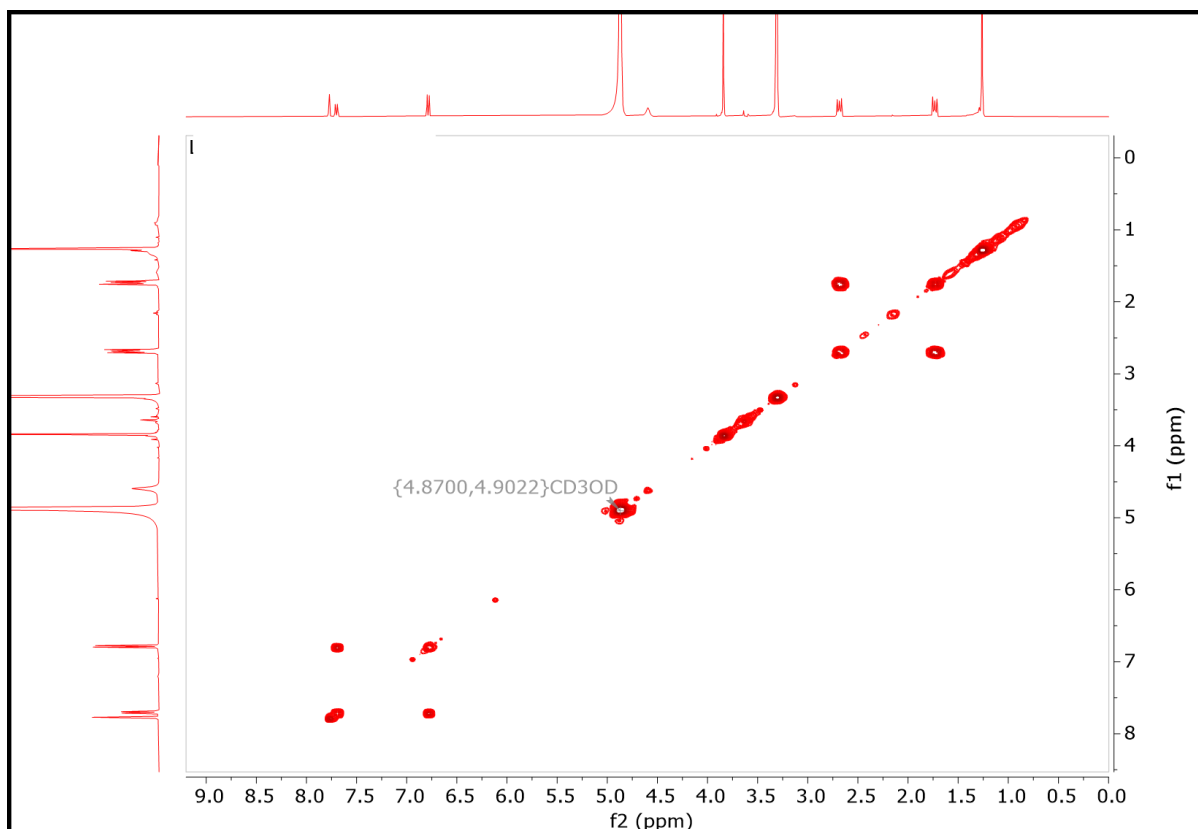


FIGURA A15:Espectro bidimensional COSY.

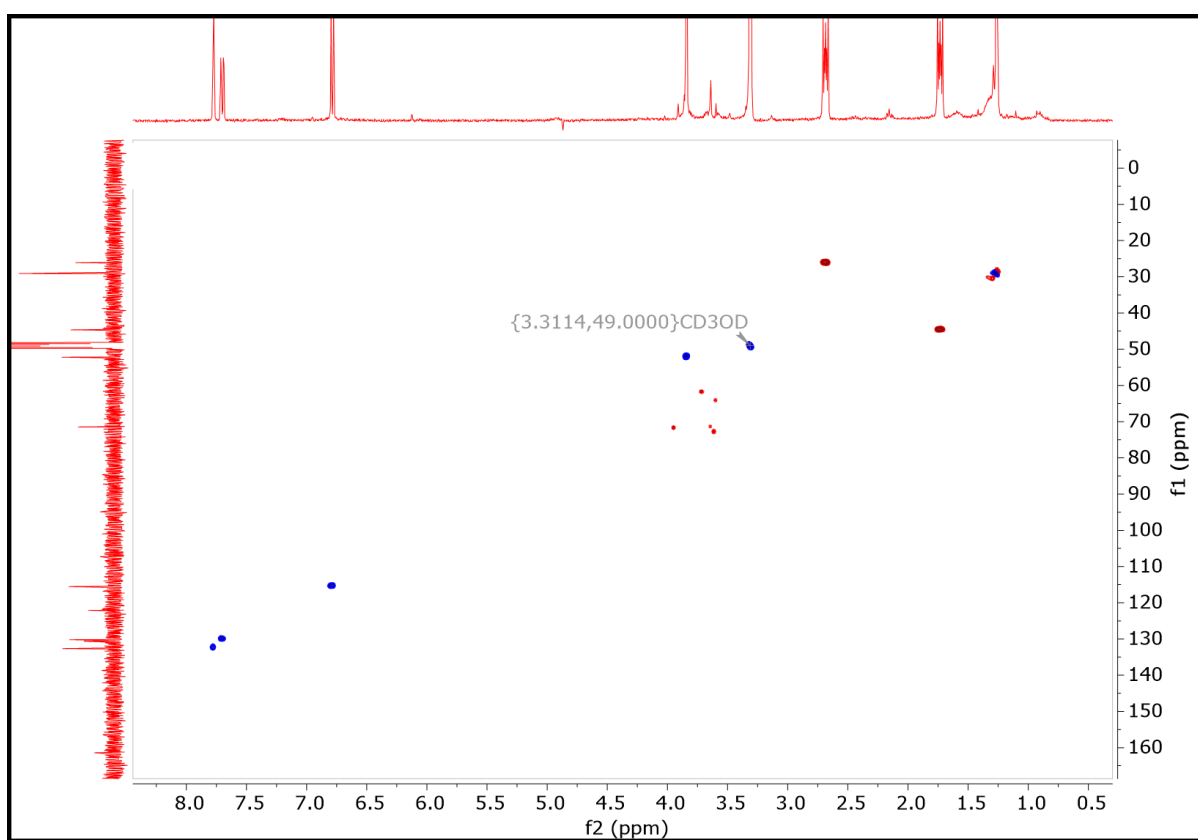


FIGURA A16:Espectro bidimensional HSQC.

B. ESPECTROS OBTIDOS POR LC-MS/MS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Composto 1- Pterocarpano

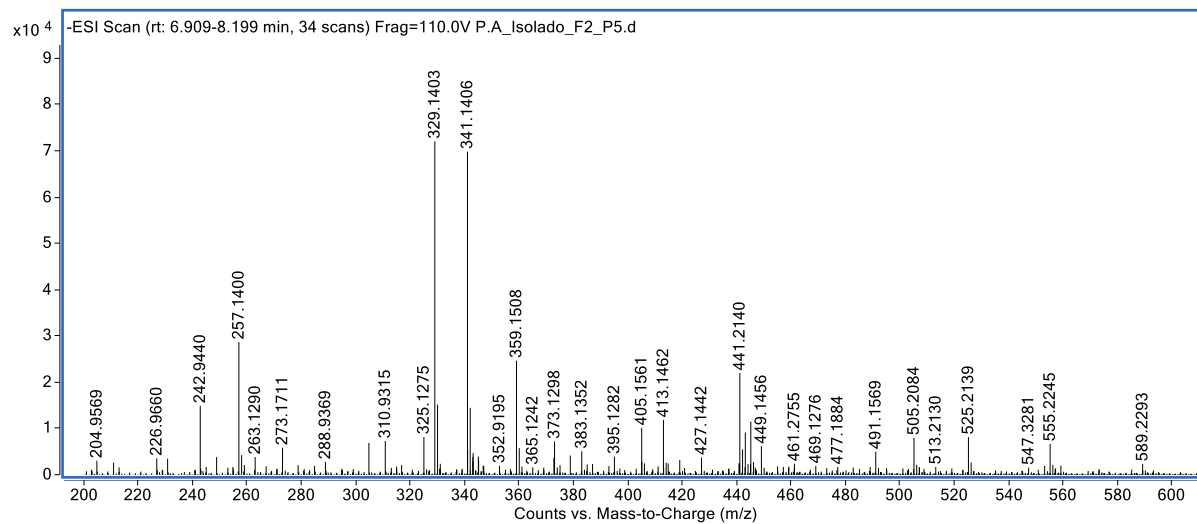


FIGURA B.1: Espectro de MS do composto 1.

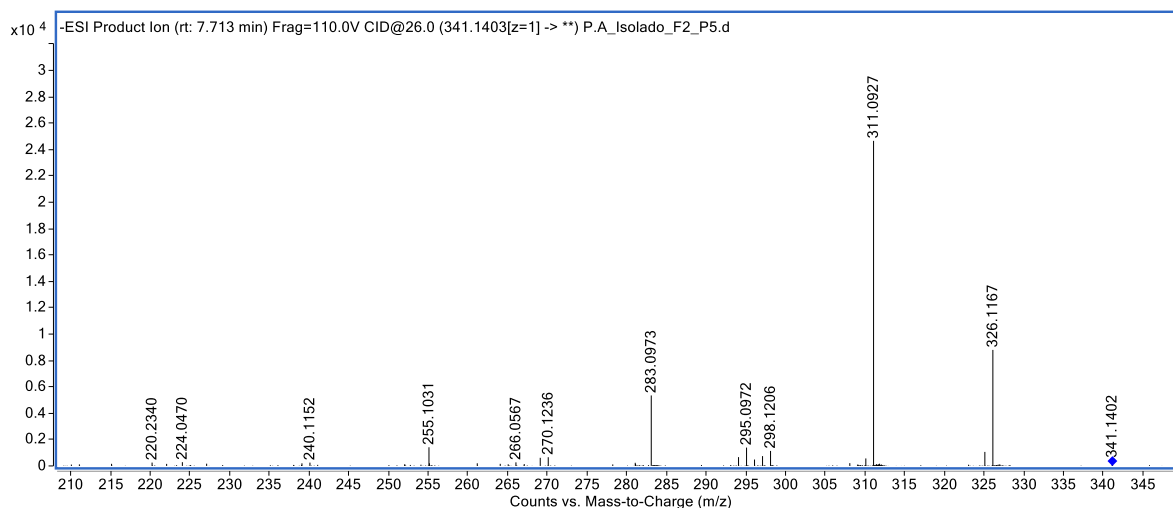


FIGURA B.2: Espectro de MS/MS do composto 1.

Composto 2- Benzopirano

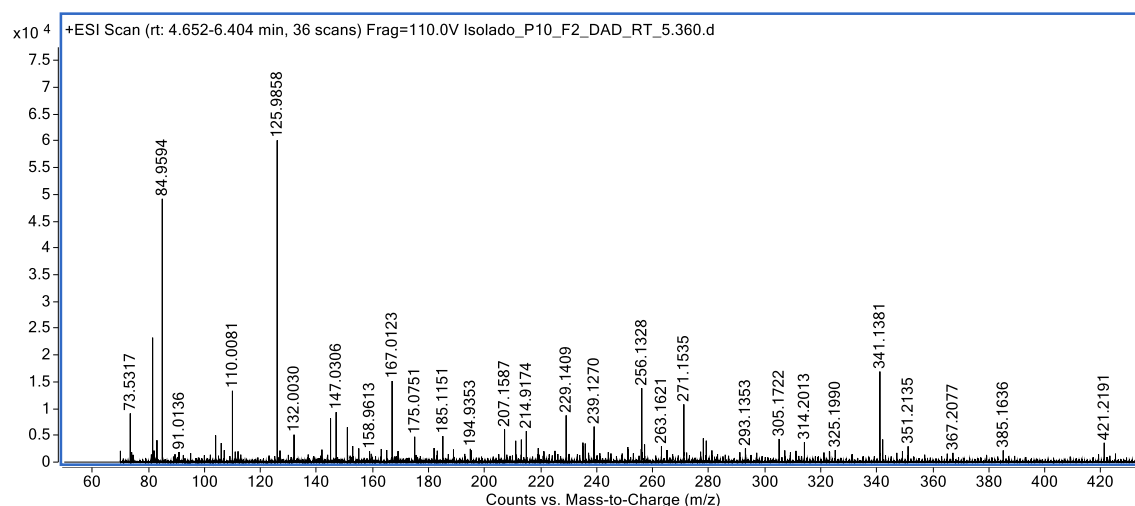


FIGURA B.3: Espectro de MS do composto 2.

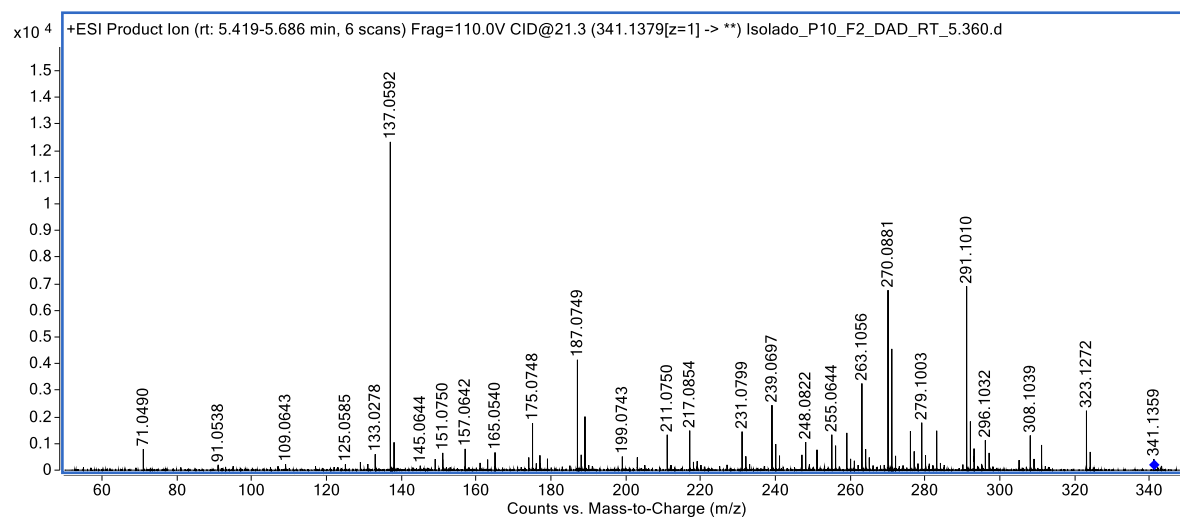


FIGURA B.4: Espectro de MS/MS do composto 2.

Composto 3- Cromano

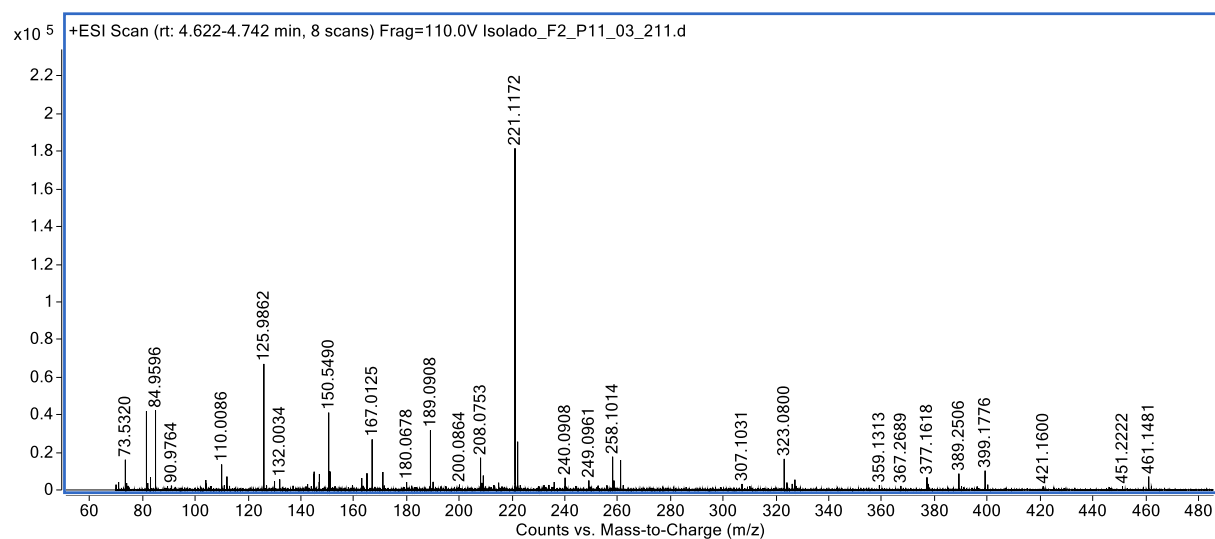


FIGURA B.5: Espectro de MS do composto 3.

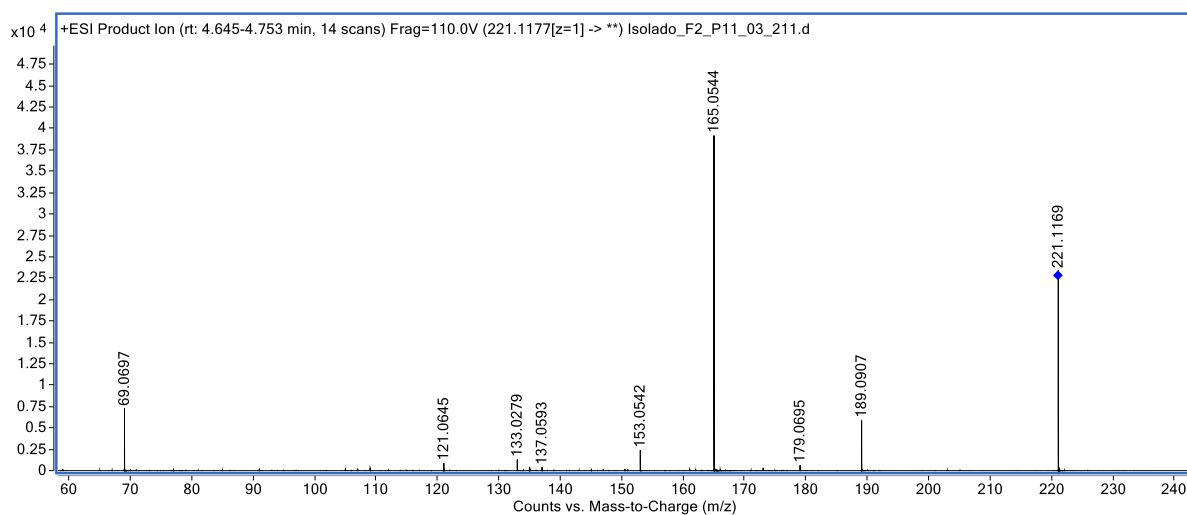


FIGURA B.6: Espectro de MS/MS do composto 3.

C. REDE MOLECULAR GLOBAL DO MODO POSITIVO E NEGATIVO DE IONIZAÇÃO.

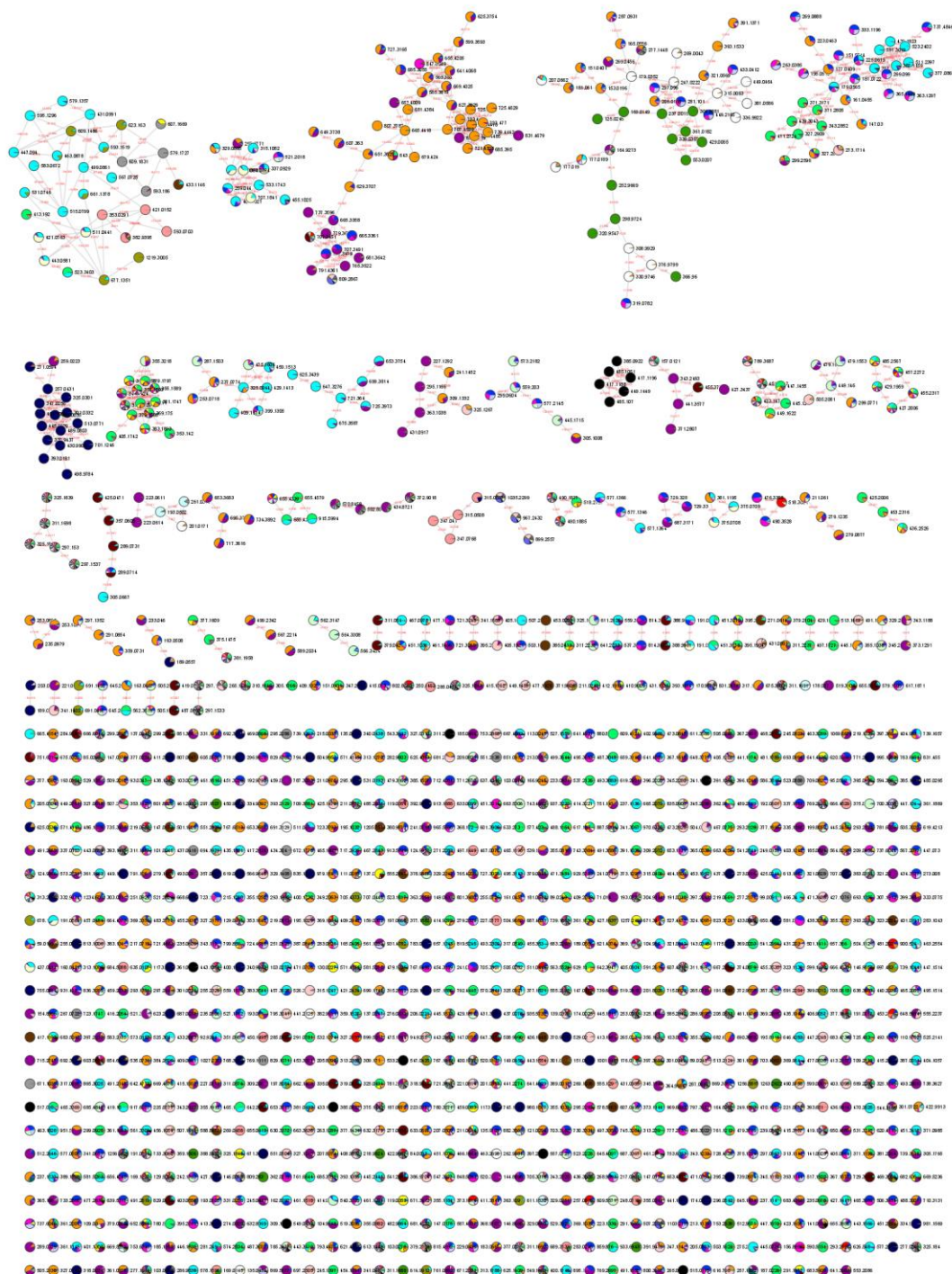


FIGURA C1: Representação geral da rede molecular obtida no modo negativo de ionização.

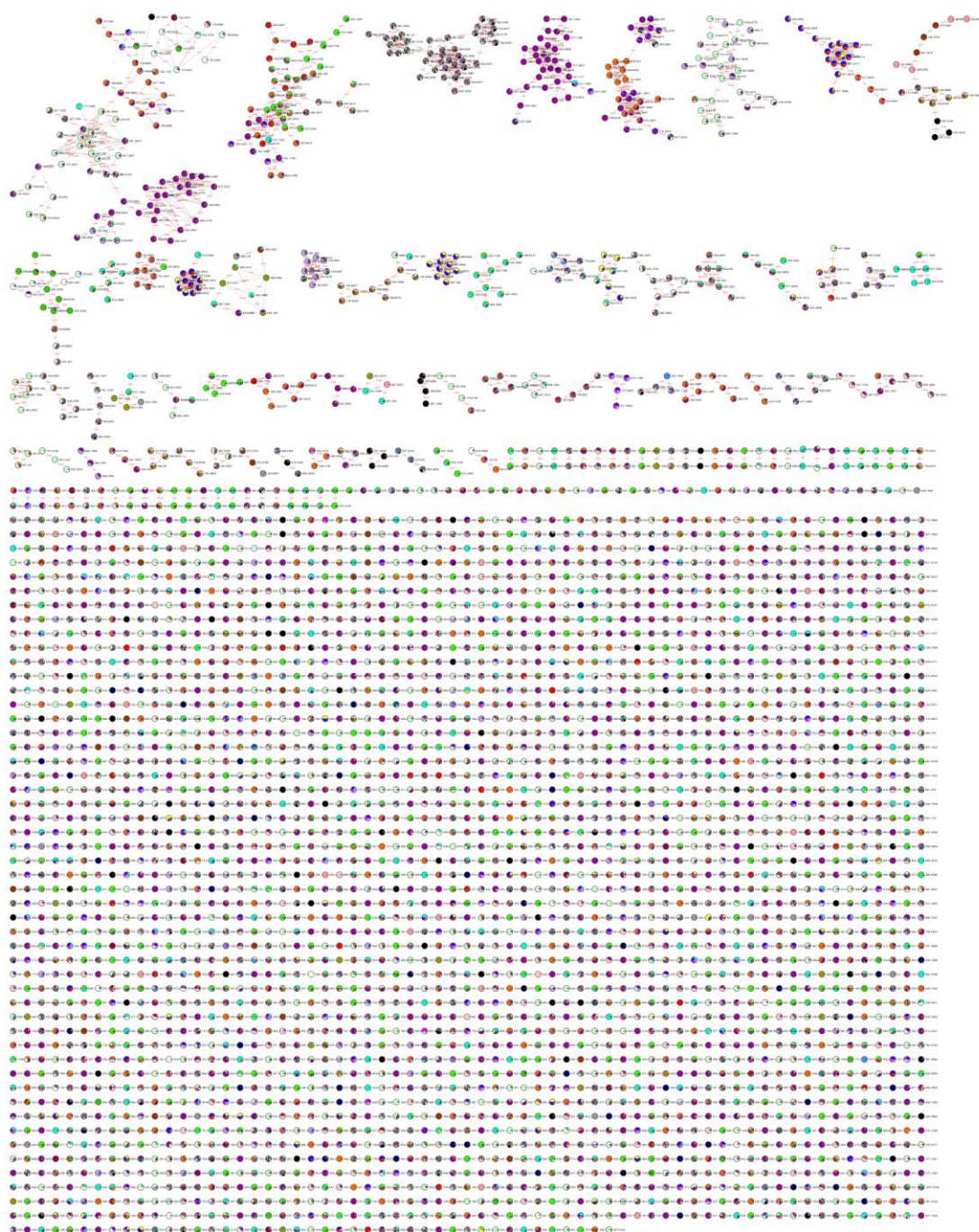


FIGURA C2: Representação geral da rede molecular obtida no modo positivo de ionização.

D. ESPECTROS OBTIDOS POR LC-MS/MS DOS COMPOSTOS ANOTADOS

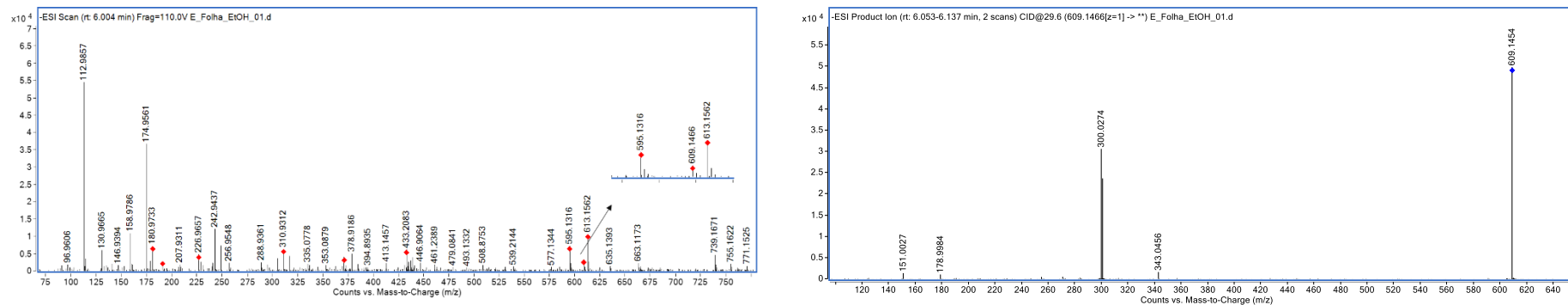


FIGURA D1: Espectros MS e MS/MS de quercetina 3-rutinosídeo (rutina).

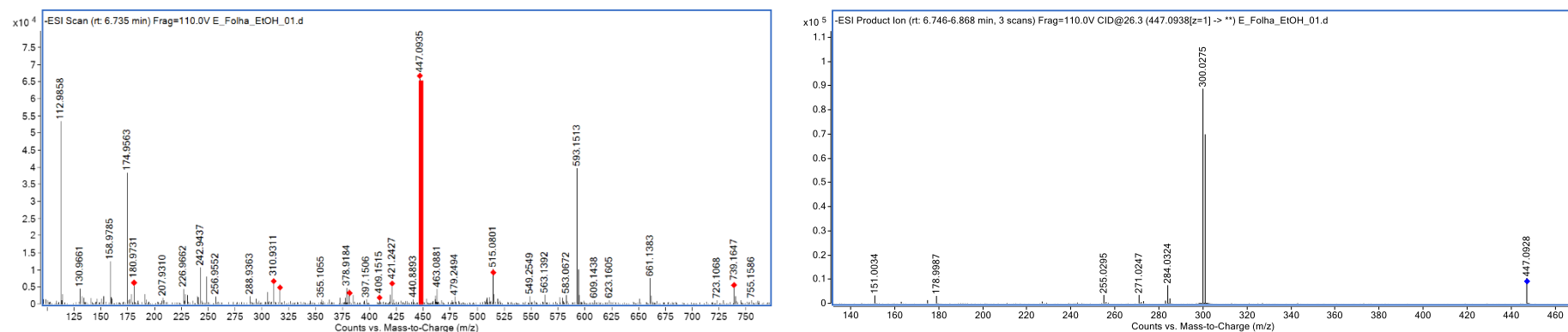


FIGURA D2: Espectros MS e MS/MS de quercetina-3-rhamnosídeo (quercitrina).

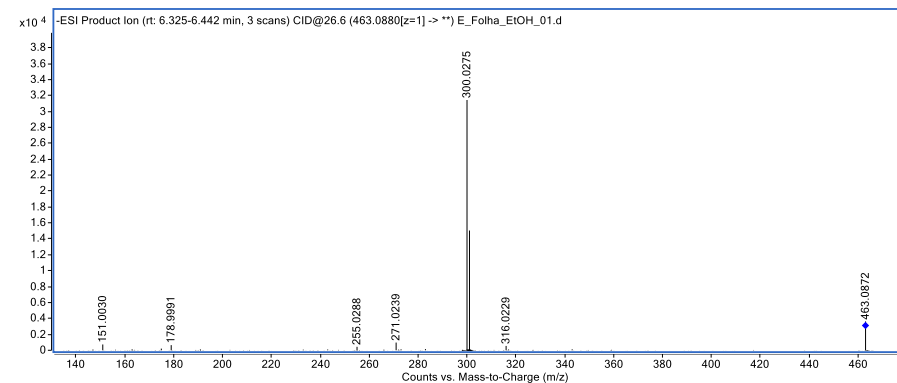
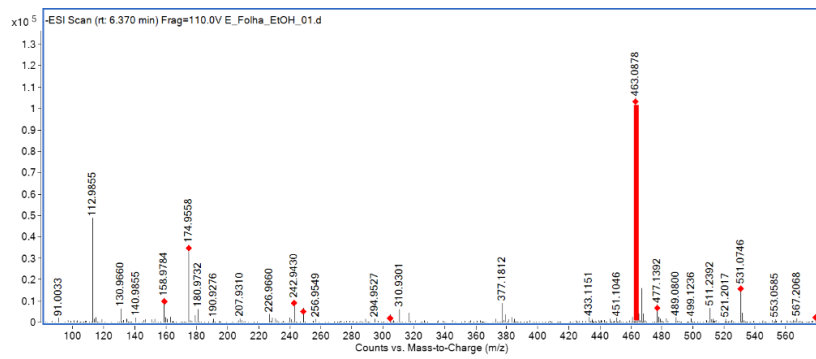


FIGURA D3: Espectros MS e MS/MS de quercetina 3-O-glucosídeo (isoquercetina).

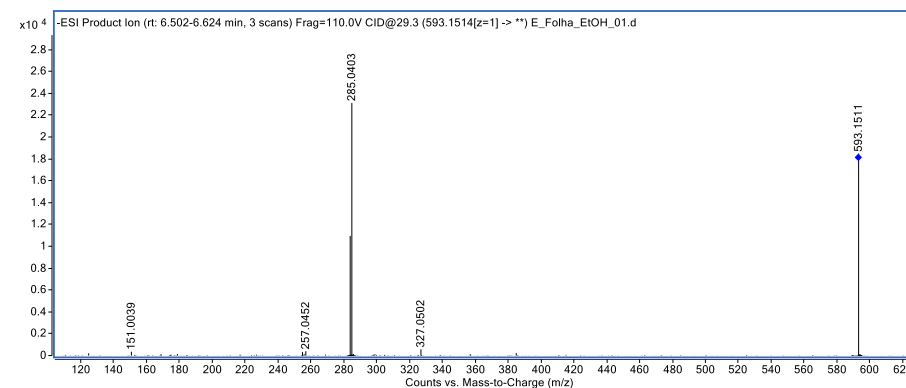
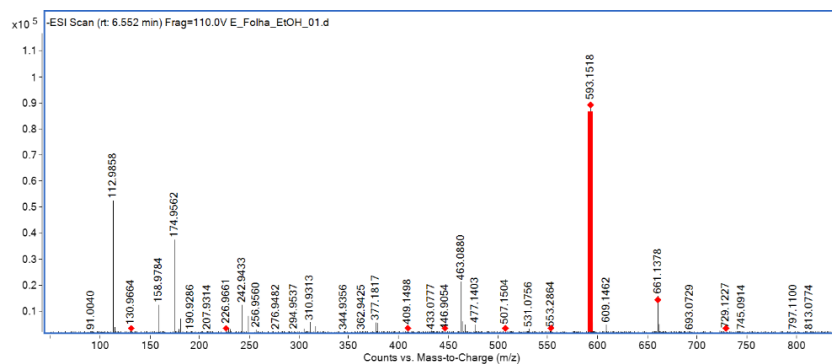


FIGURA D4: Espectros MS e MS/MS de kaempferol 3-O-rutinosídeo.

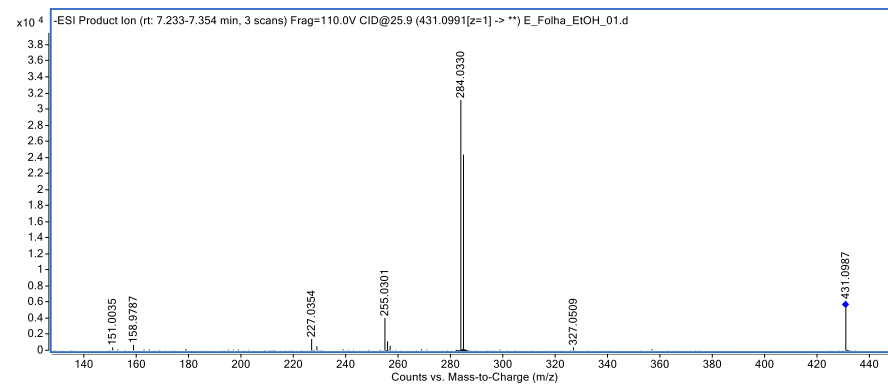
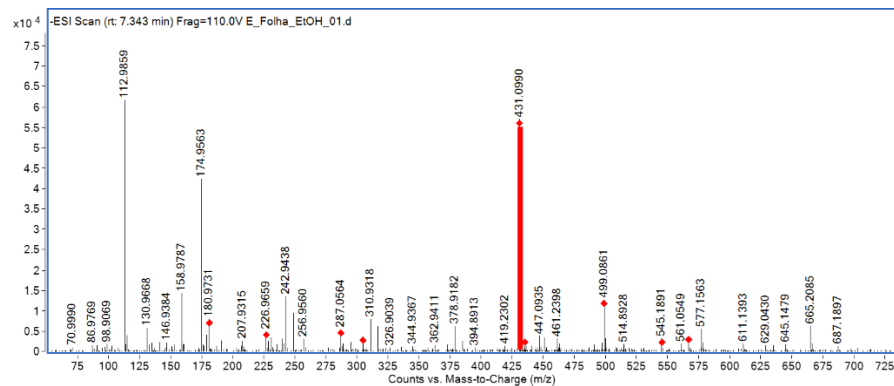


FIGURA D5: Espectros MS e MS/MS de kaempferol 3-O-rhamnosídeo.

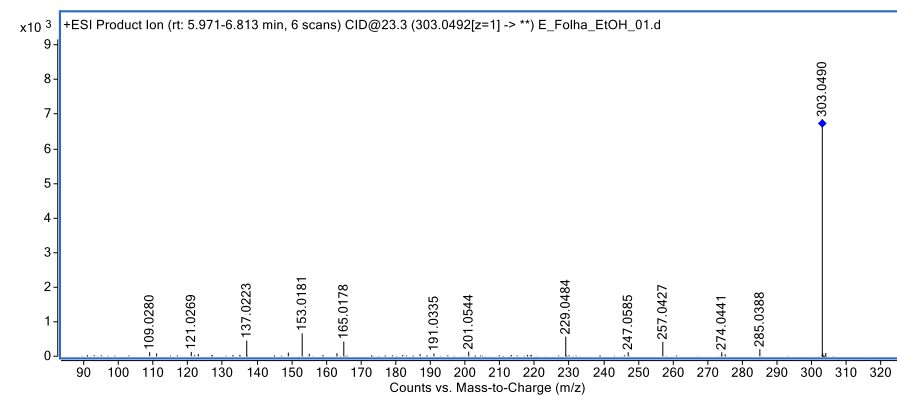
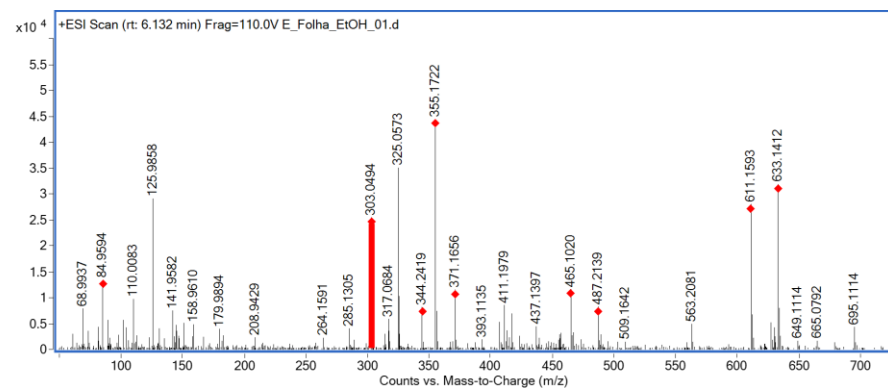


FIGURA D6: Espectros MS e MS/MS de quercetina.

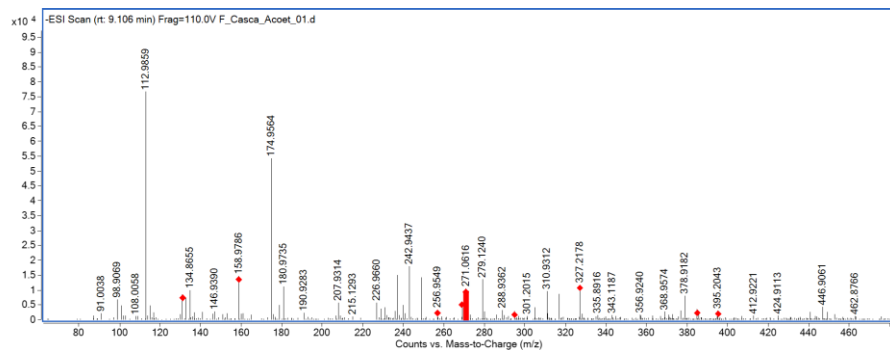


FIGURA D7: Espectros MS e MS/MS de naringenina.

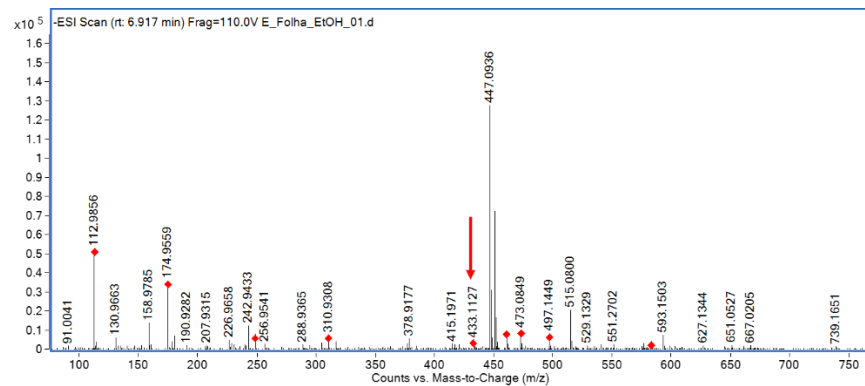
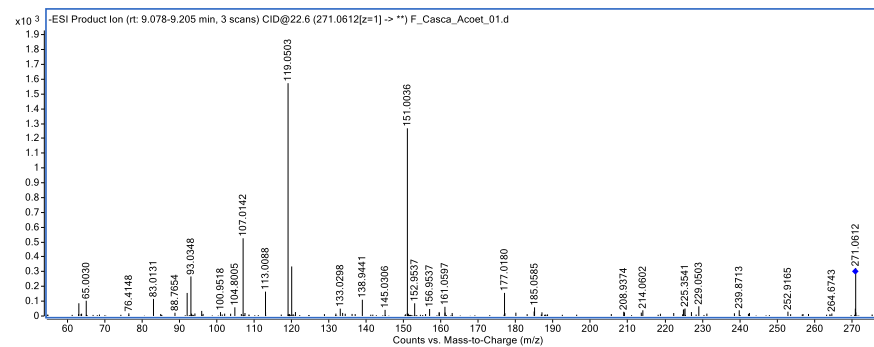


FIGURA D8: Espectros MS e MS/MS de naringenina-7-O-glucosideo (prunina).

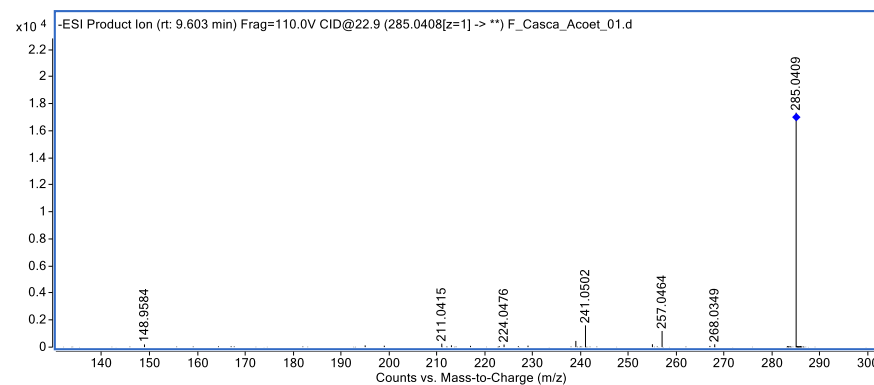
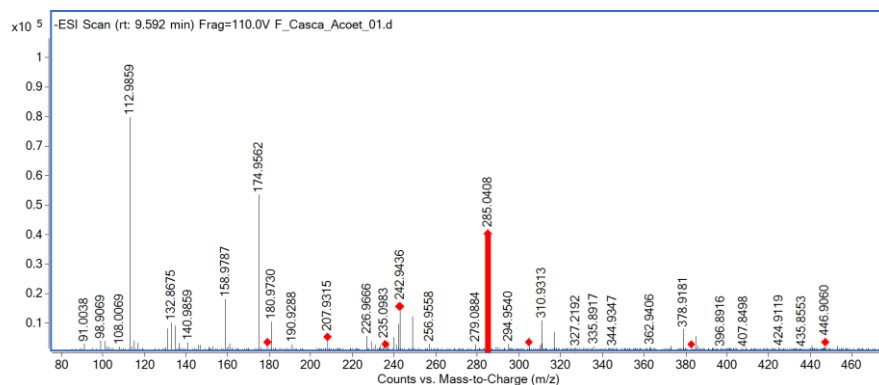


FIGURA D9: Espectros MS e MS/MS de kaempferol.

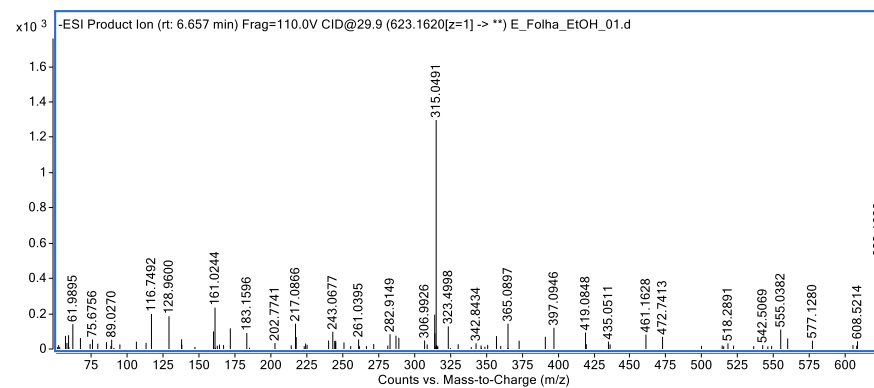
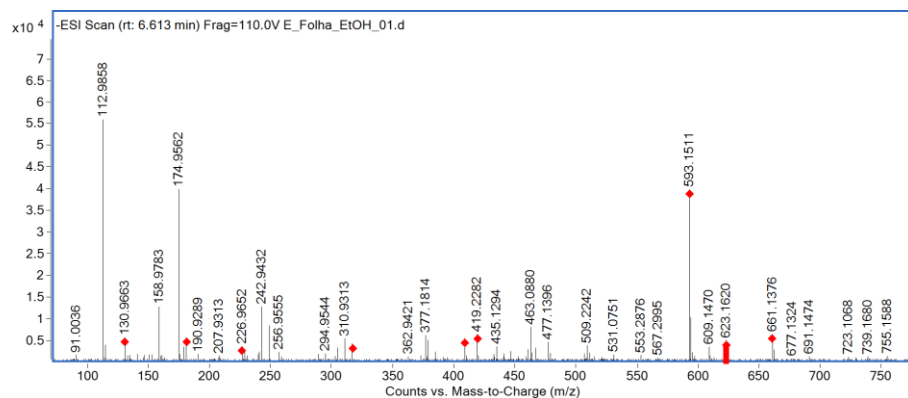


FIGURA D10: Espectros MS e MS/MS de isorhamnetina-3-O-rutinosideo (narcissina).

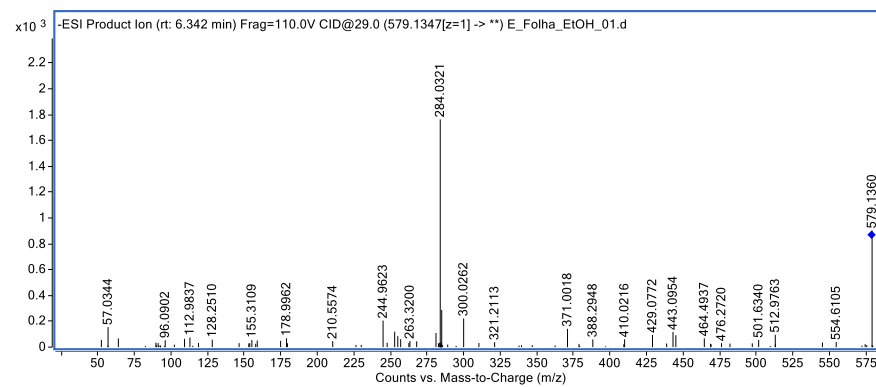
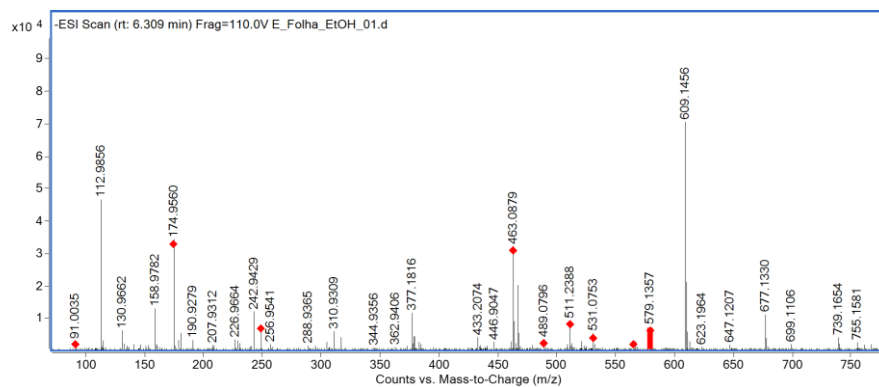


FIGURA D11: Espectros MS e MS/MS de kaempferol-3-latirosideo.

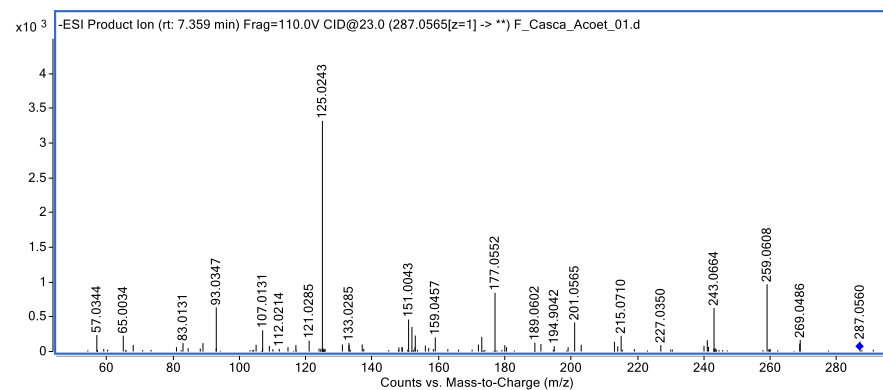
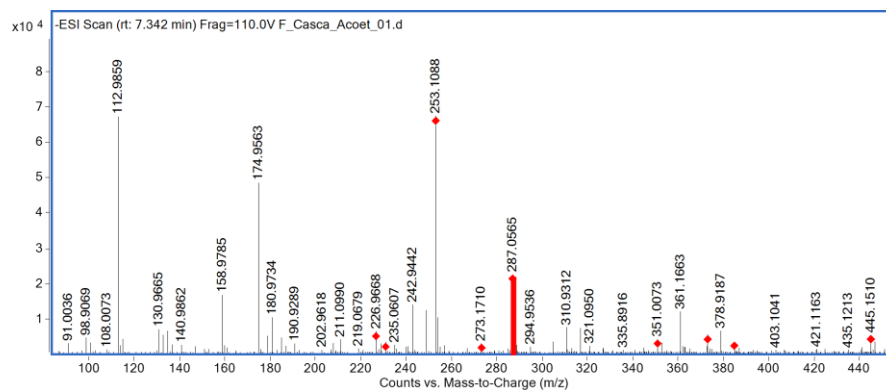


FIGURA D12: Espectros MS e MS/MS de 3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidrocromen-4-one (dihidrokaempferol).

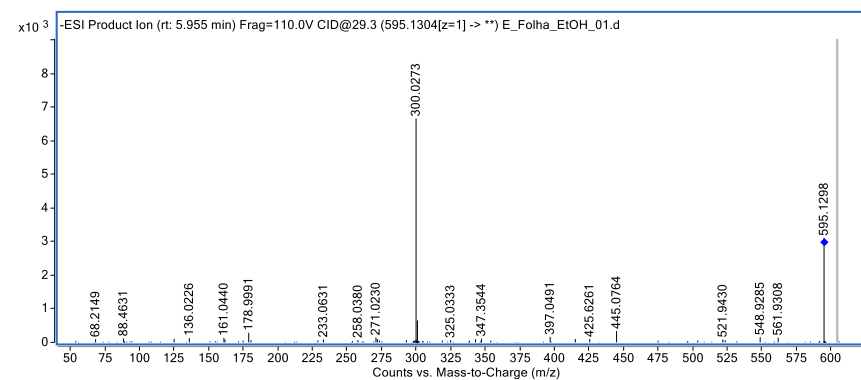
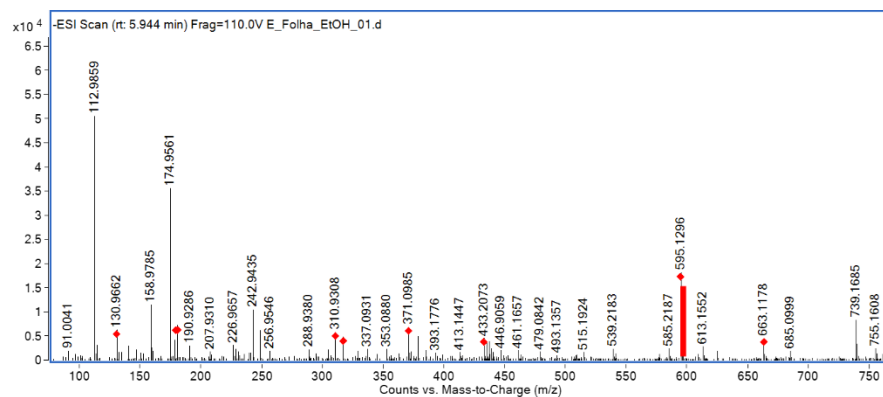


FIGURA D13: Espectros MS e MS/MS de quercetina 3-latirosideo.

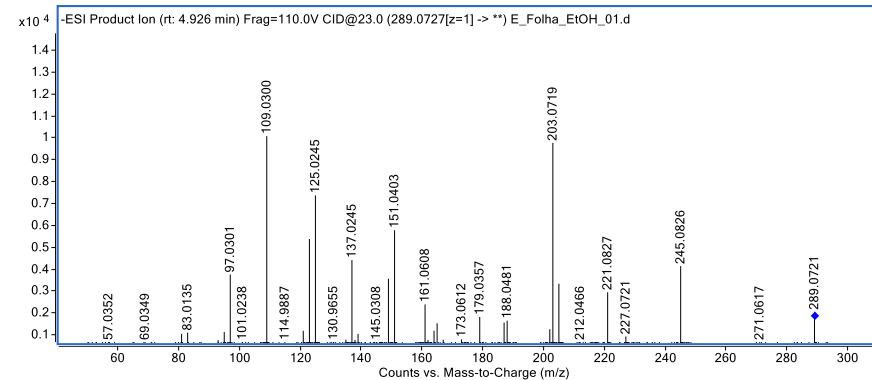
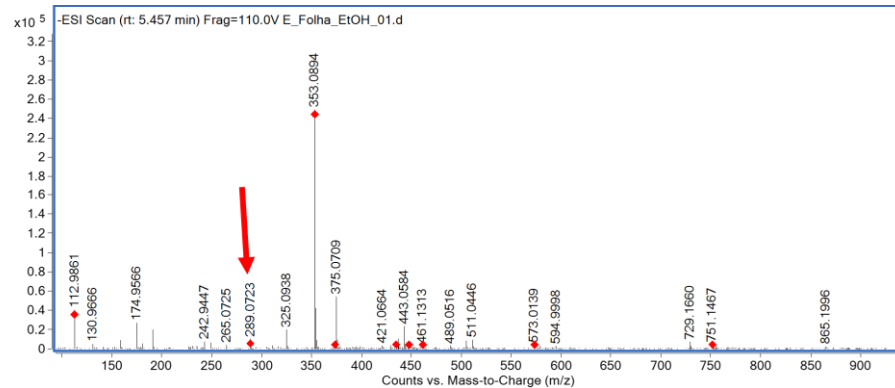


FIGURA D14: Espectros MS e MS/MS de catequina/epicatequina.

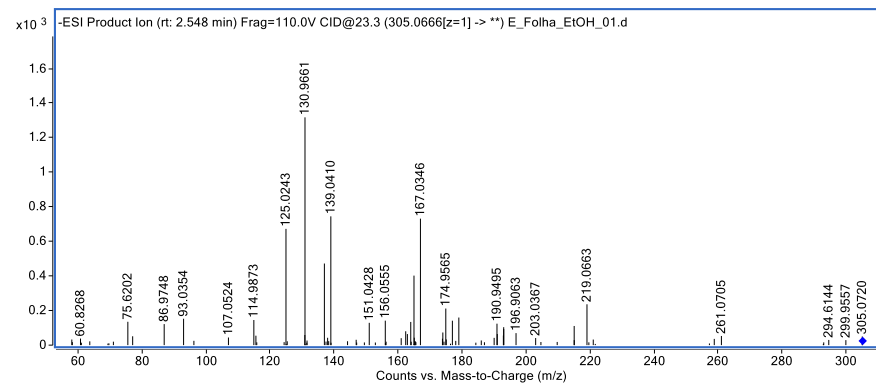
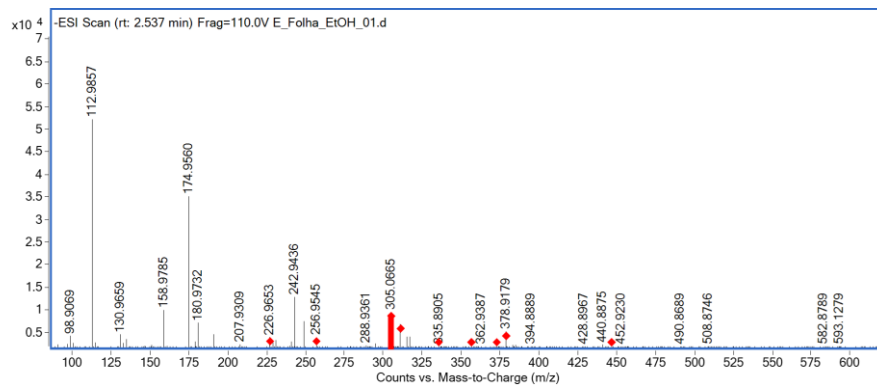


FIGURA D15: Espectros MS e MS/MS de (epi)galocatequina.

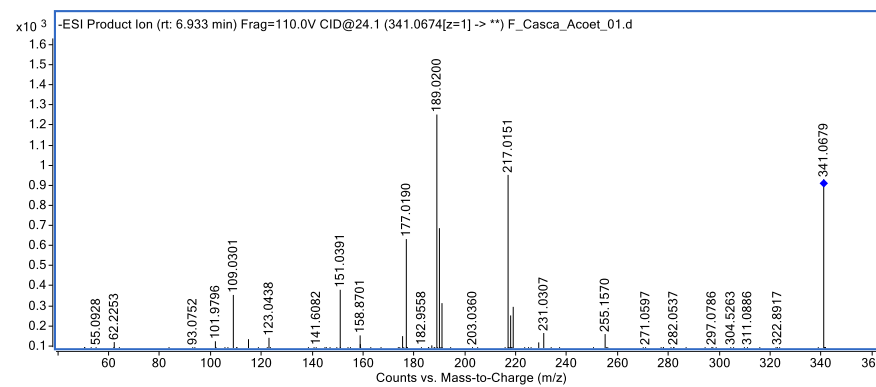
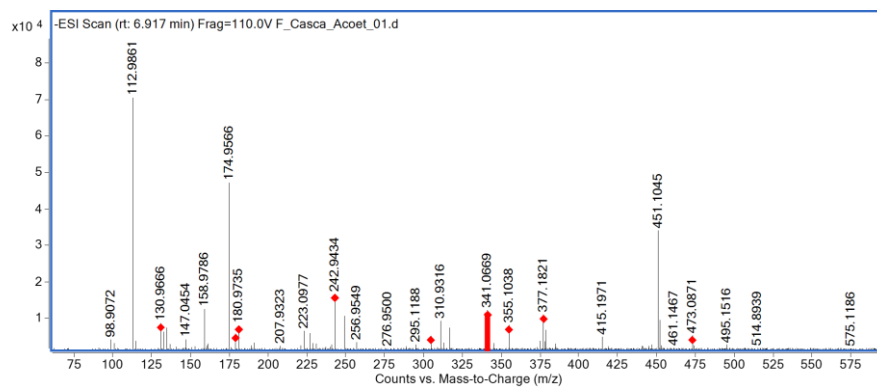


FIGURA D16: Espectros MS e MS/MS de C-8,C-7-O-δ-lactone- (epi)catequina.

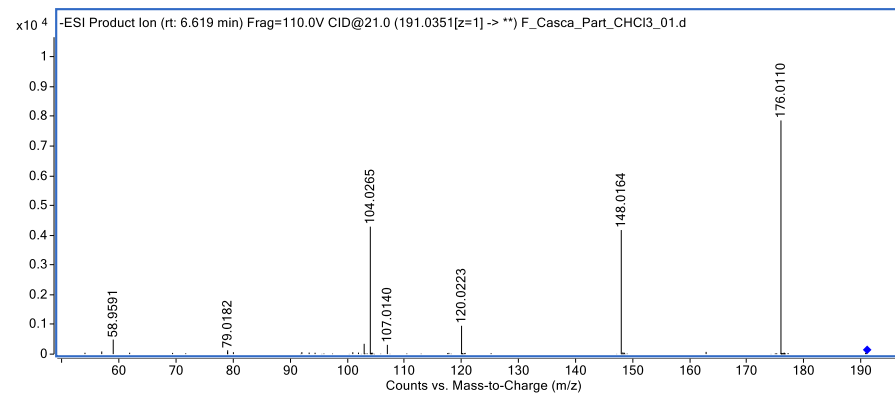
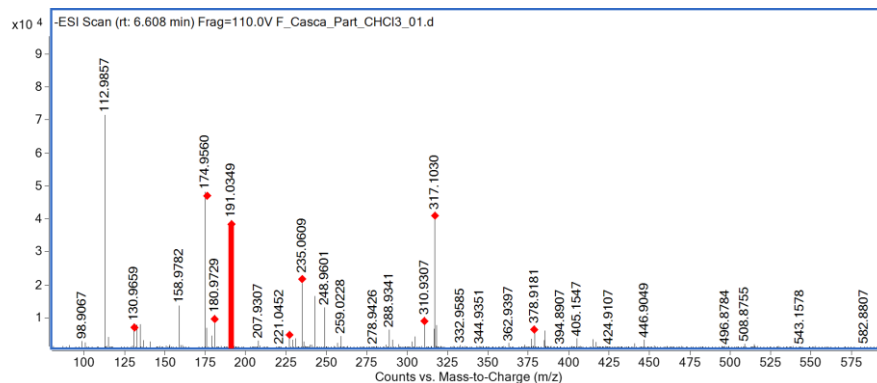


FIGURA D17: Espectros MS e MS/MS de escopoletina.

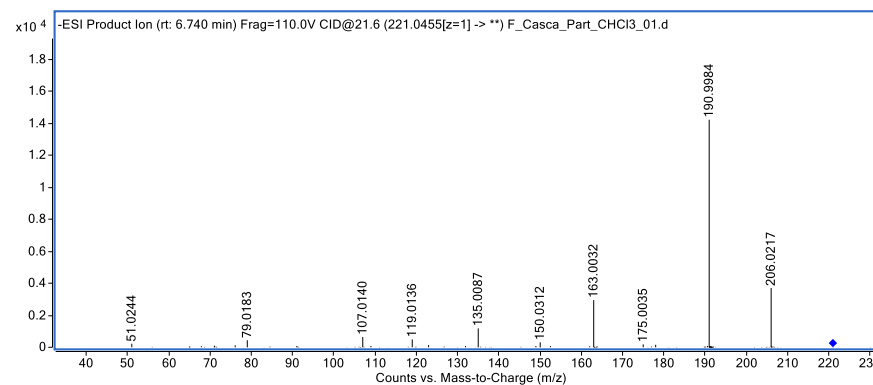
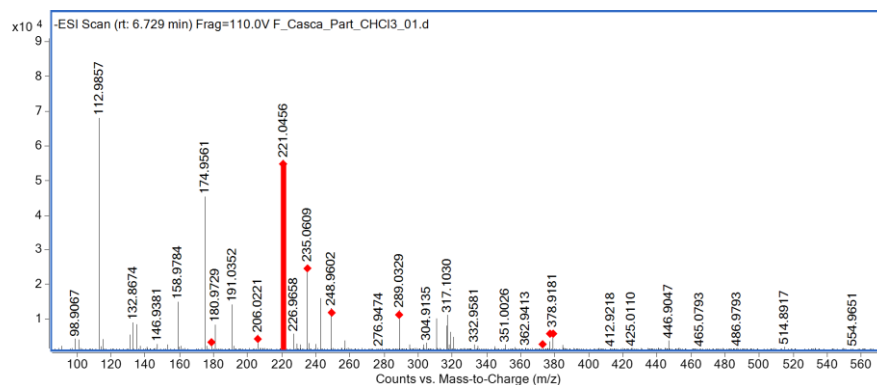


FIGURA D18: Espectros MS e MS/MS de isofraxidina.

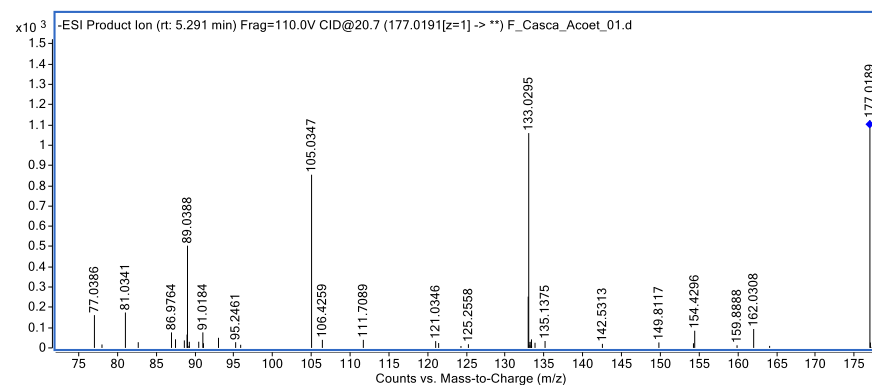
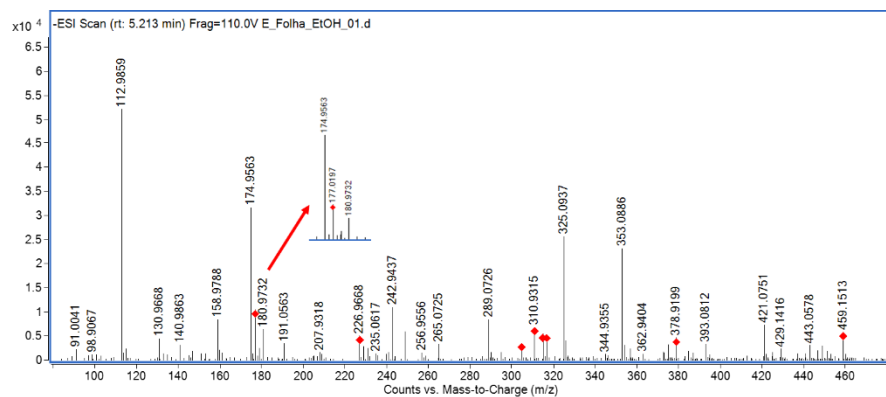


FIGURA D19: Espectros MS e MS/MS de esculetina.

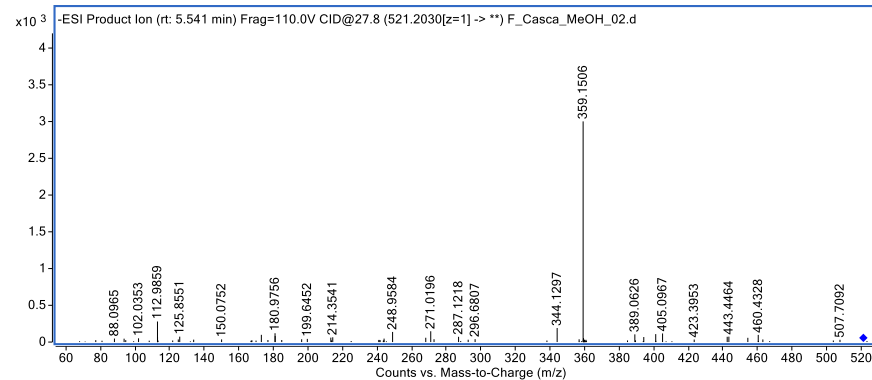
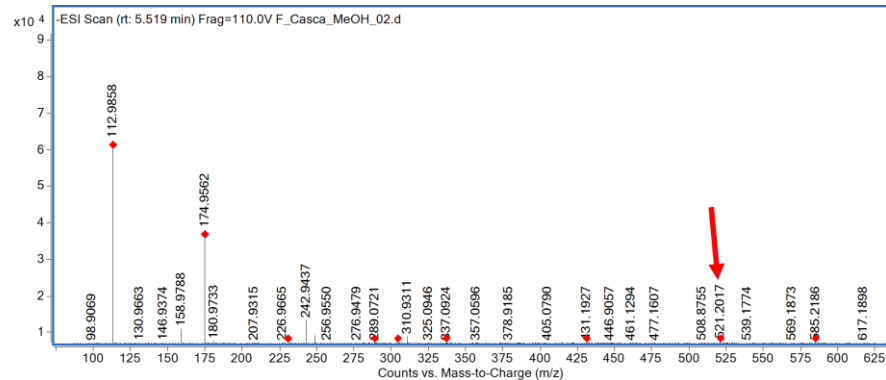


FIGURA D20: Espectros MS e MS/MS de isolariciresinol 4-O-glucopiranosideo.

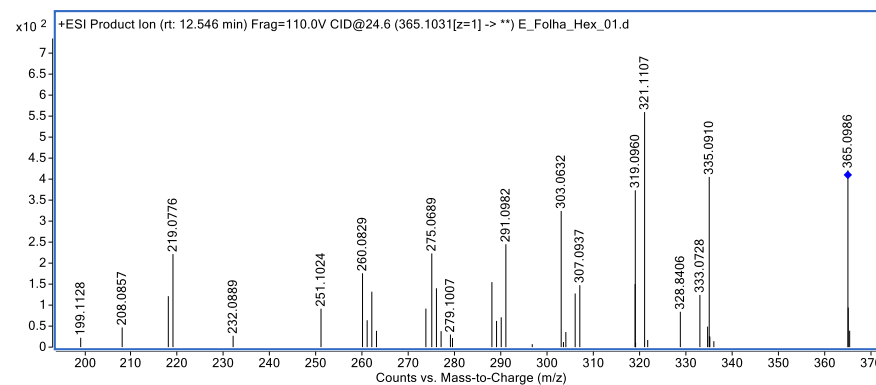
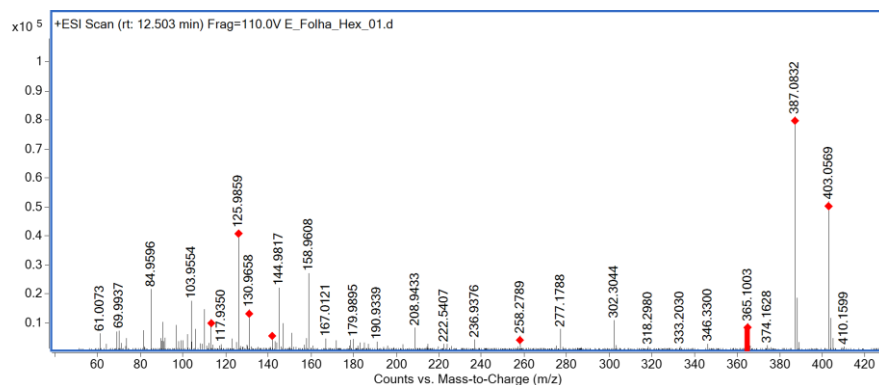


FIGURA D21: Espectros MS e MS/MS de justicidin B.

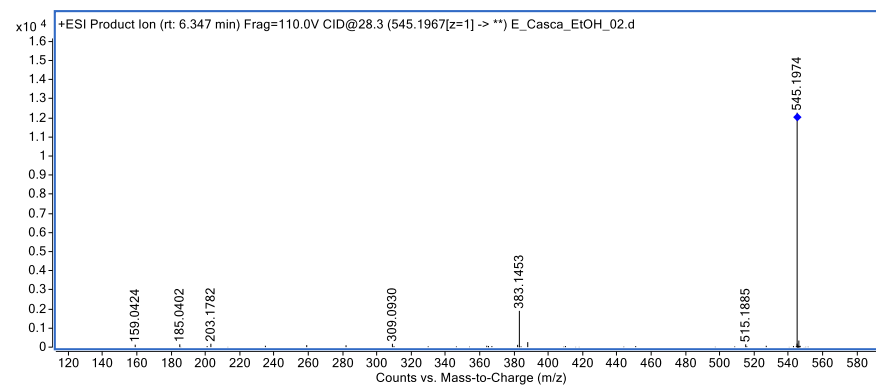
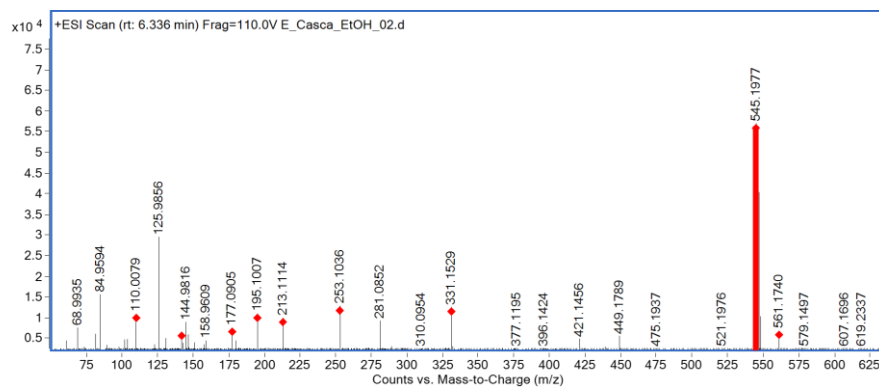


FIGURA D22: Espectros MS e MS/MS de 2- (hidroximetil)-6-[5-[3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-di-hidro-1-benzofuran-2-il]-2-metoxifenoxi]oxano-3,4,5-triol.

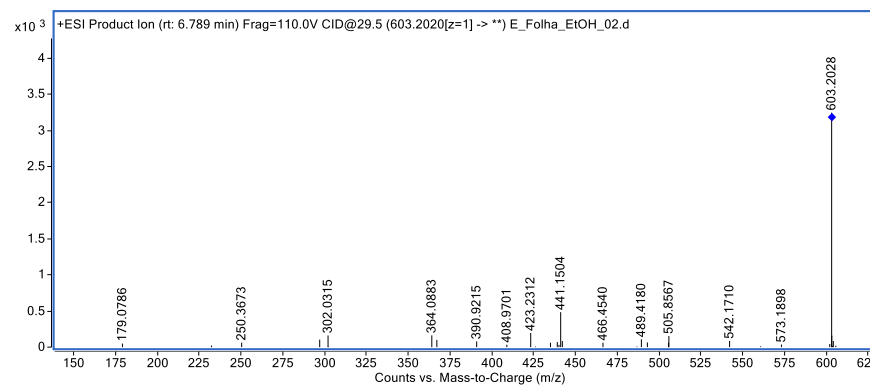
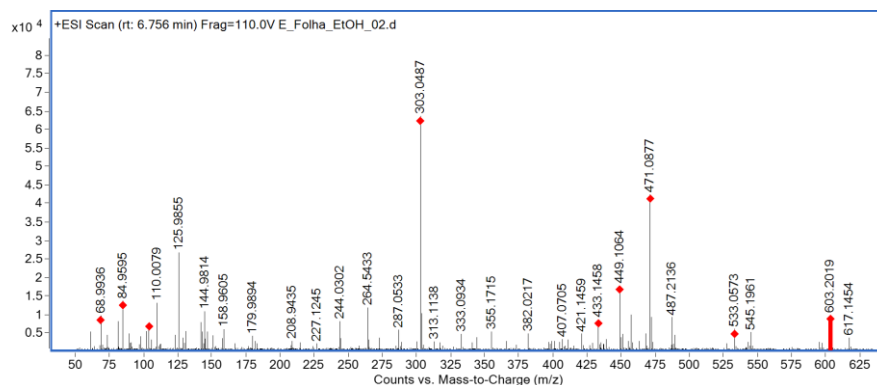


FIGURA D23: Espectros MS e MS/MS de episiringaresinol 4'-O-beta-D-glucopiranosideo.

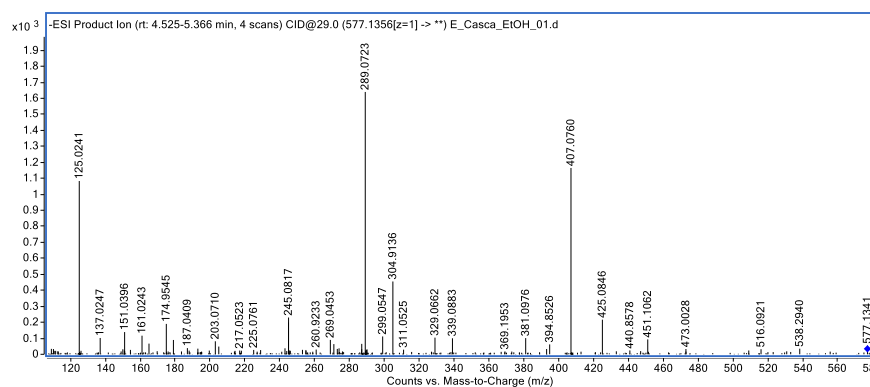
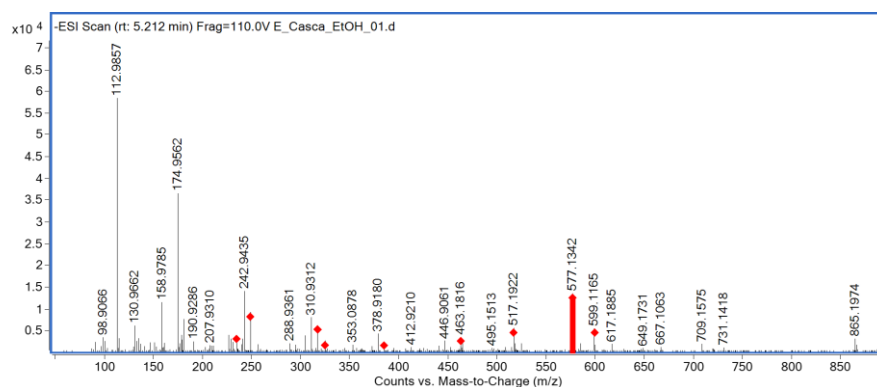


FIGURA D24: Espectros MS e MS/MS de procianidina.

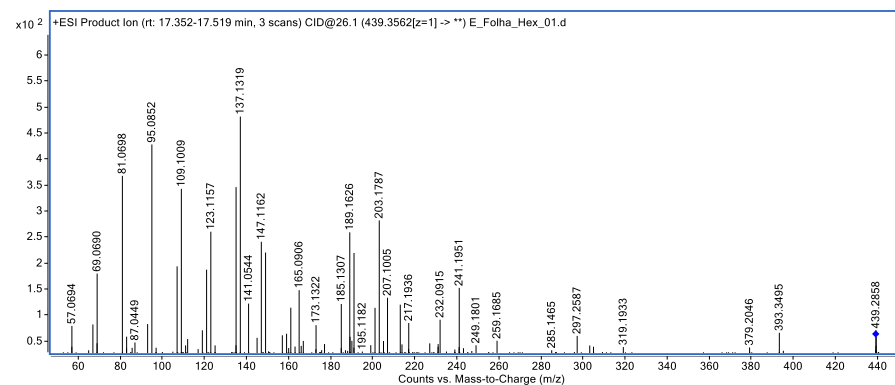
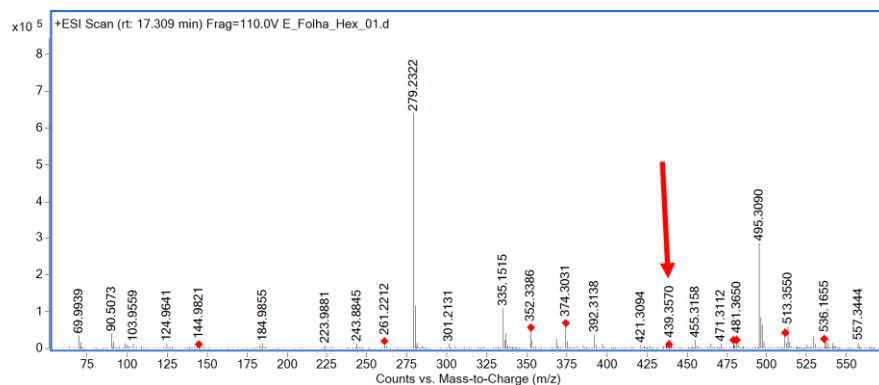


FIGURA D25: Espectros MS e MS/MS de ácido oleanólico.

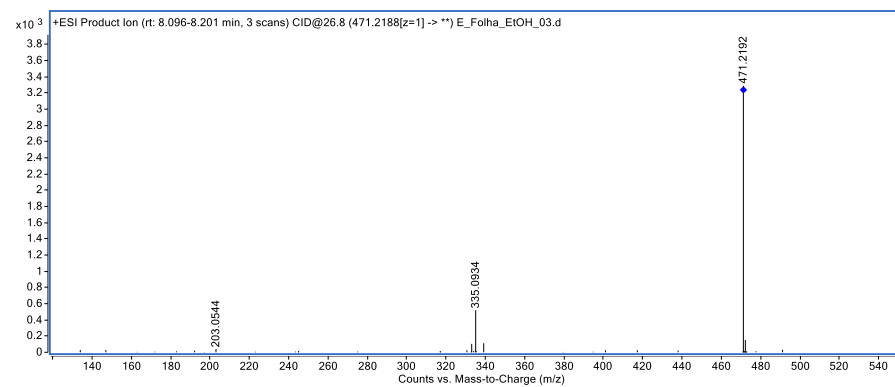
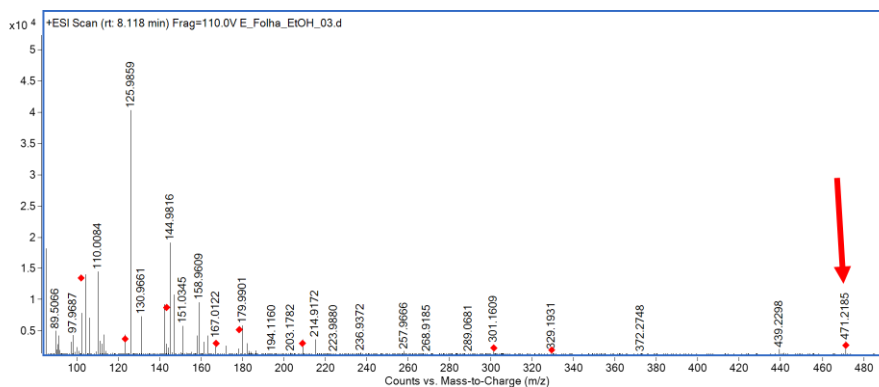


FIGURA D26: Espectros MS e MS/MS de (2R,3S,4S,5R,6R)-2-[[[(2R,3R,4R,5S)-3,4-di-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]oximetil]-6-[(2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienoxi]oxano-3,4,5-triol.

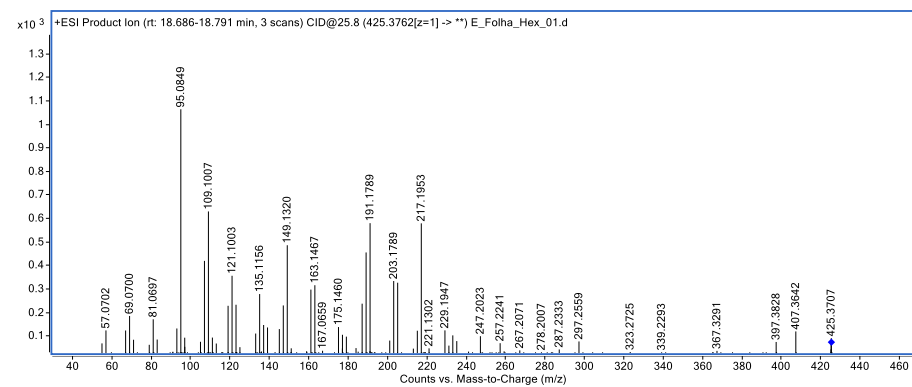
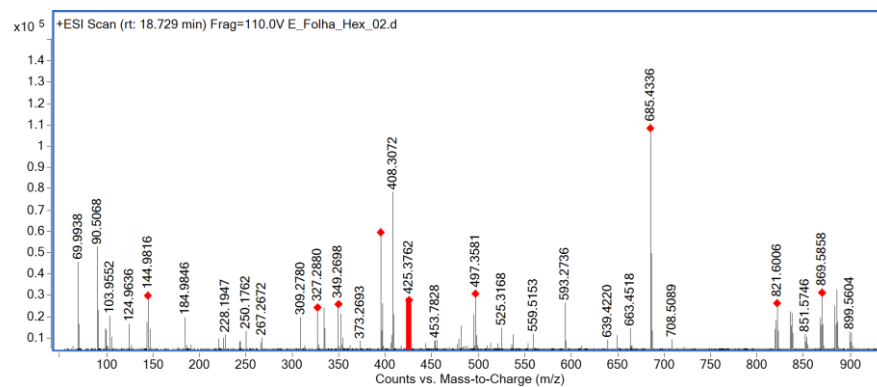


FIGURA D27: Espectros MS e MS/MS de luteona.

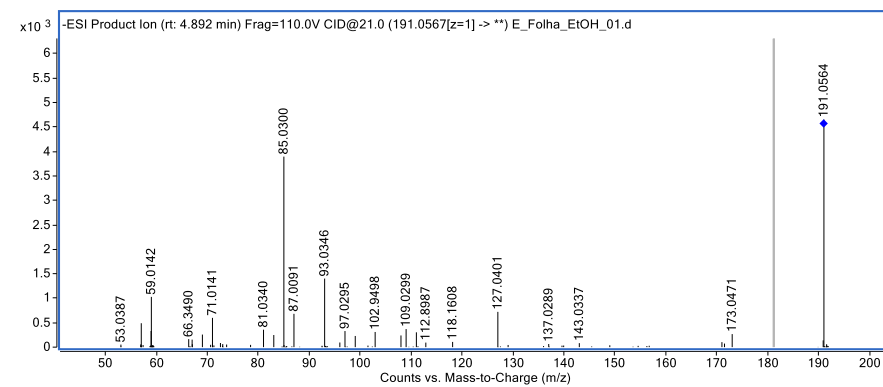
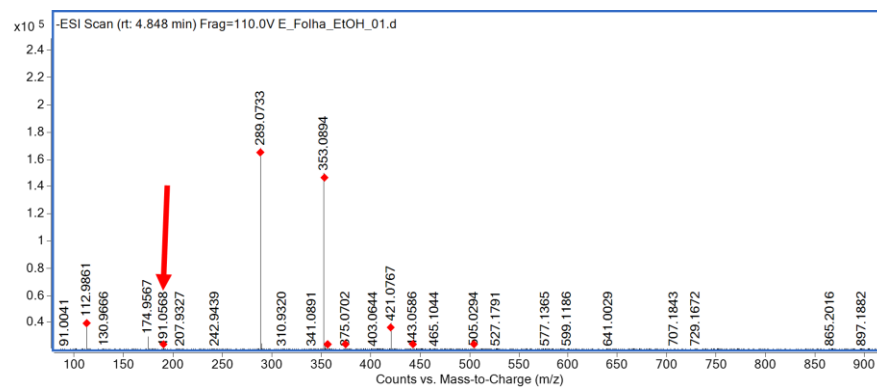


FIGURA D28: Espectros MS e MS/MS de ácido quínico.

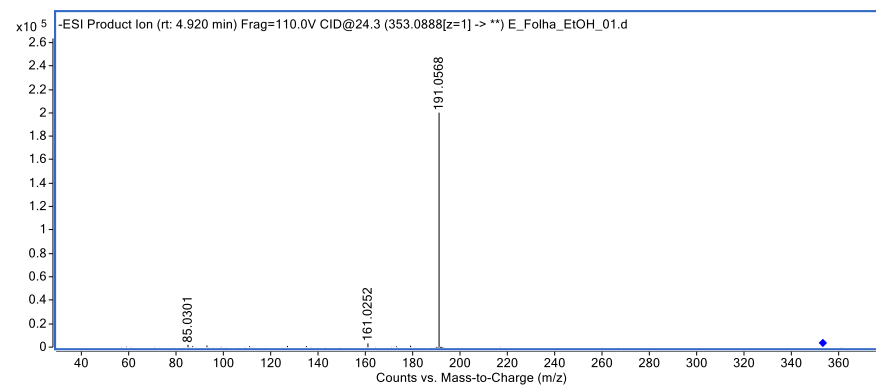
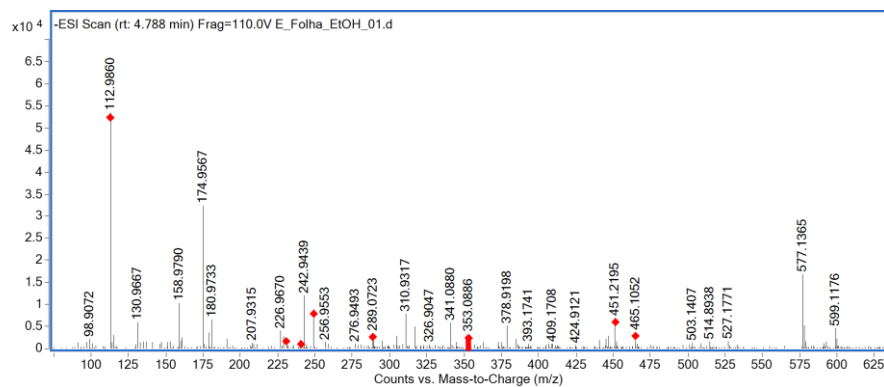


FIGURA D29: Espectros MS e MS/MS de ácido clorogênico.

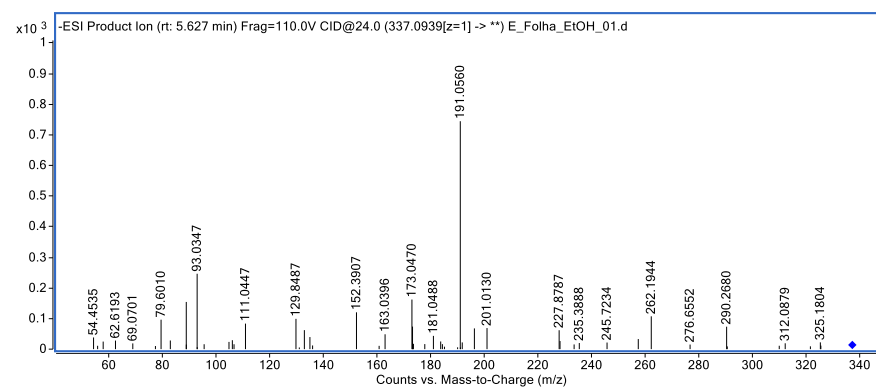
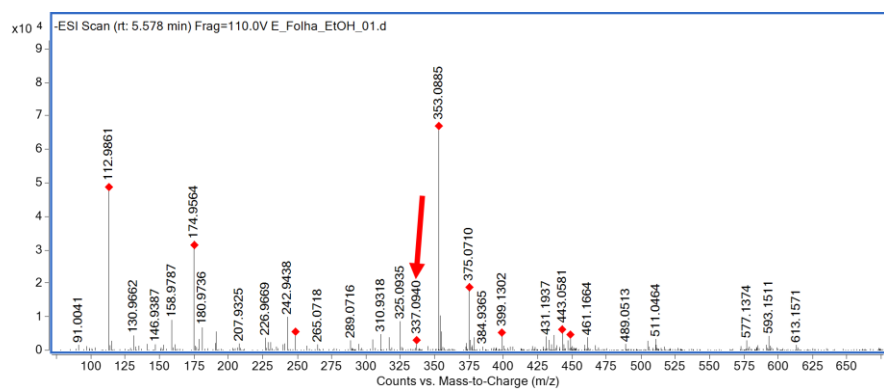


FIGURA D30: Espectros MS e MS/MS de ácido cumarilquínico.

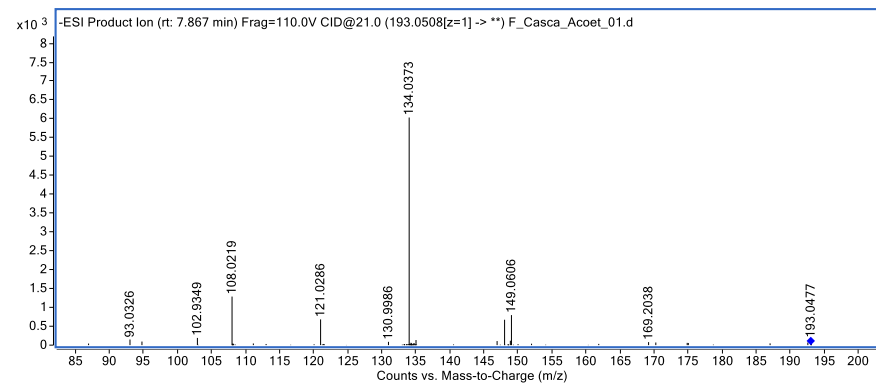
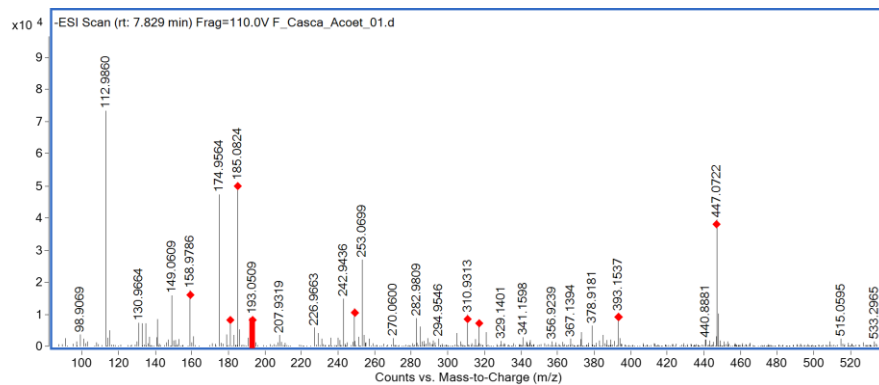


FIGURA D31: Espectros MS e MS/MS de ácido ferúlico.

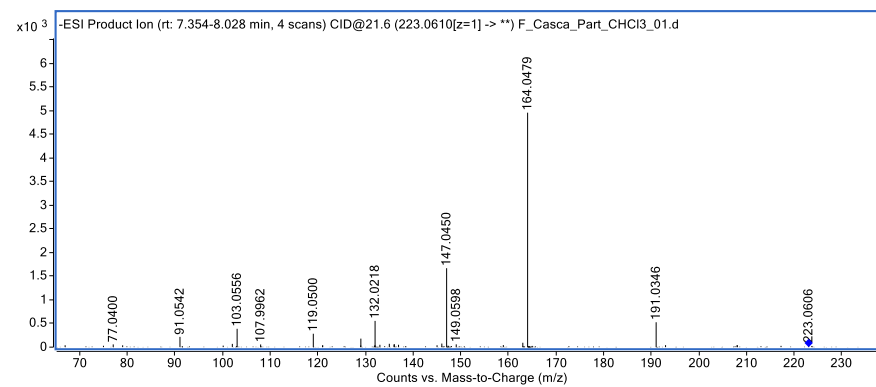
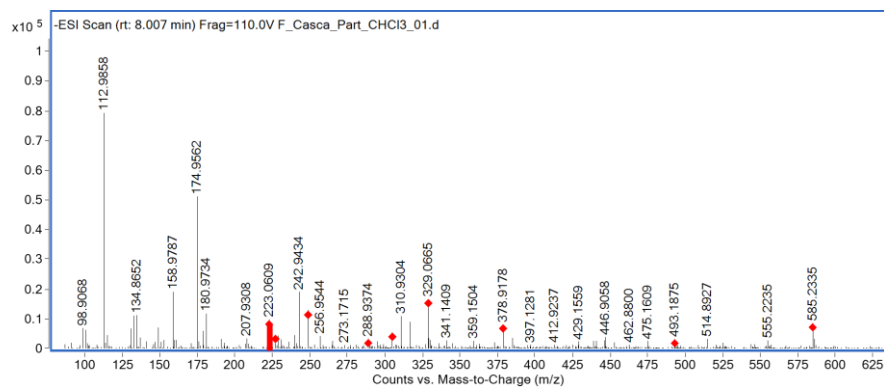


FIGURA D32: Espectros MS e MS/MS de ácido sinápico.

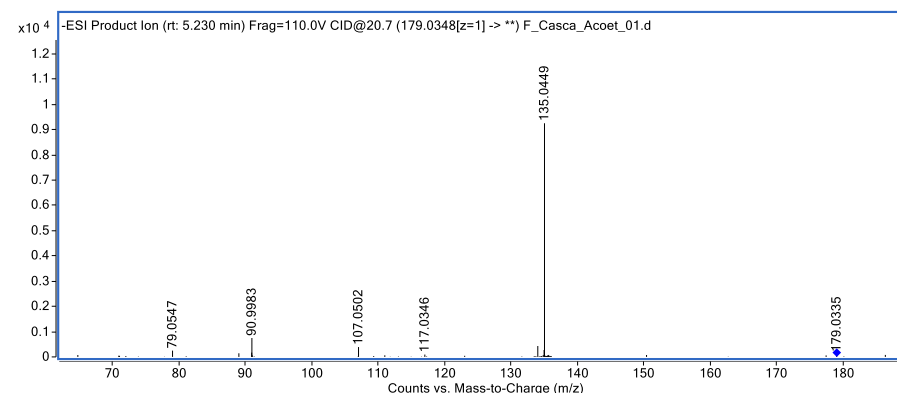
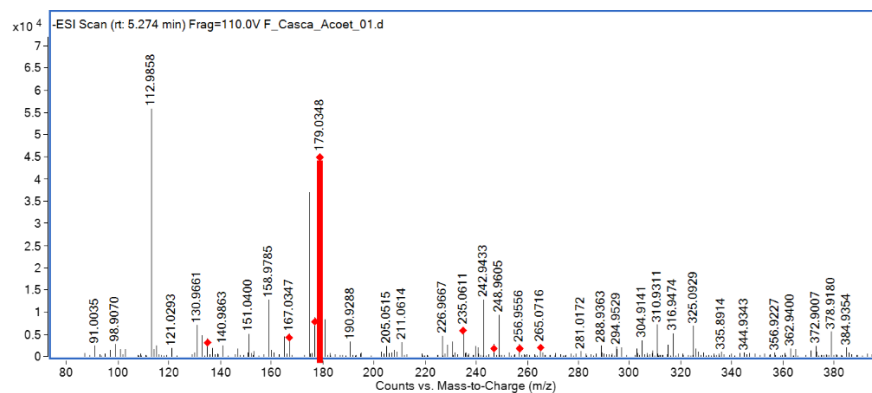


FIGURA D33: Espectros MS e MS/MS de ácido cafeico.

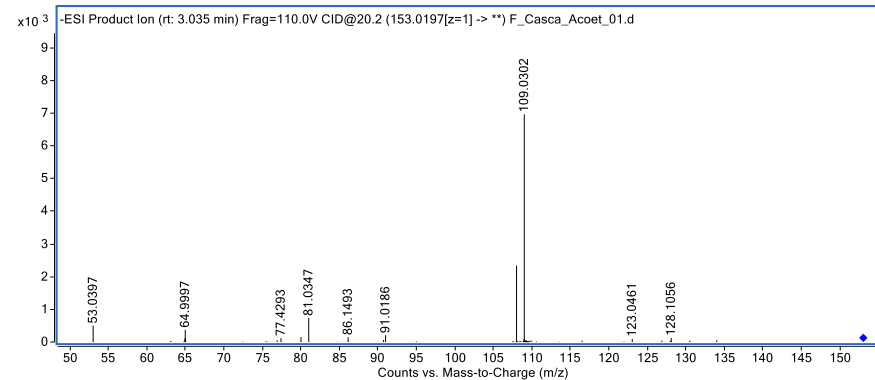
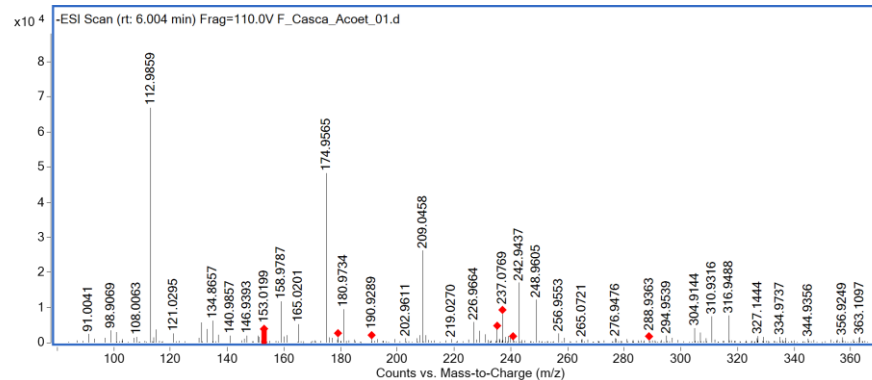


FIGURA D34: Espectros MS e MS/MS de ácido 2,3-diidroxibenzoico.

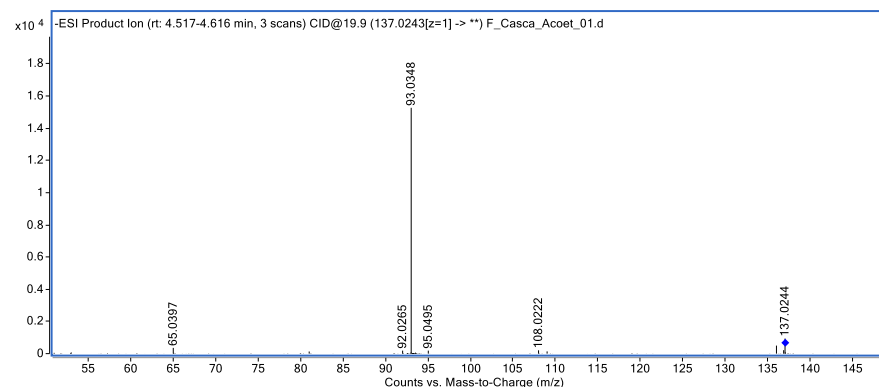
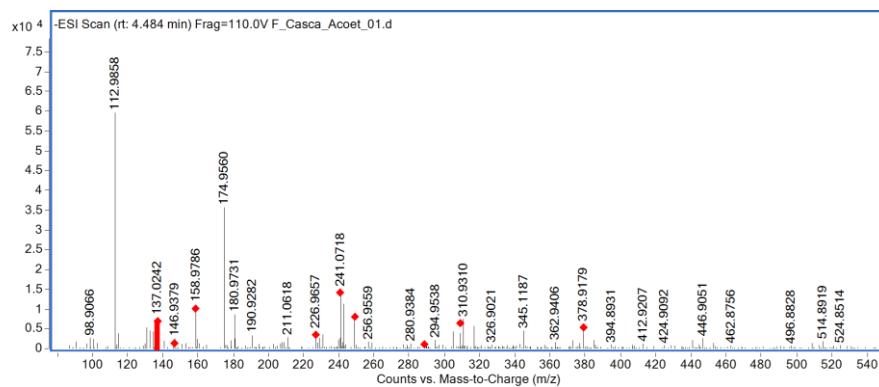


FIGURA D35: Espectros MS e MS/MS de ácido salicílico.

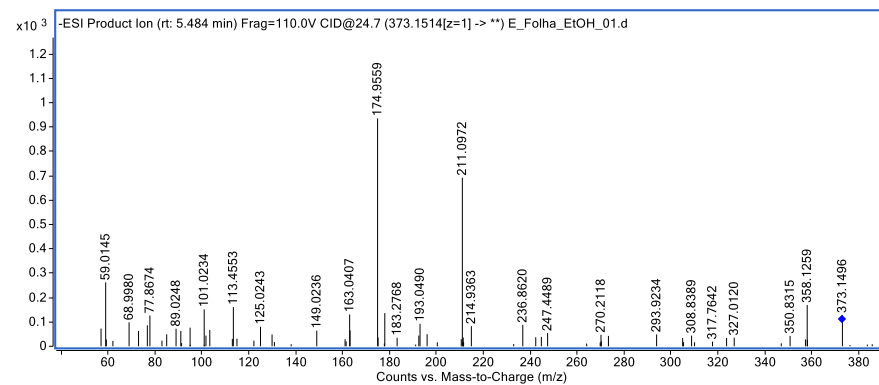
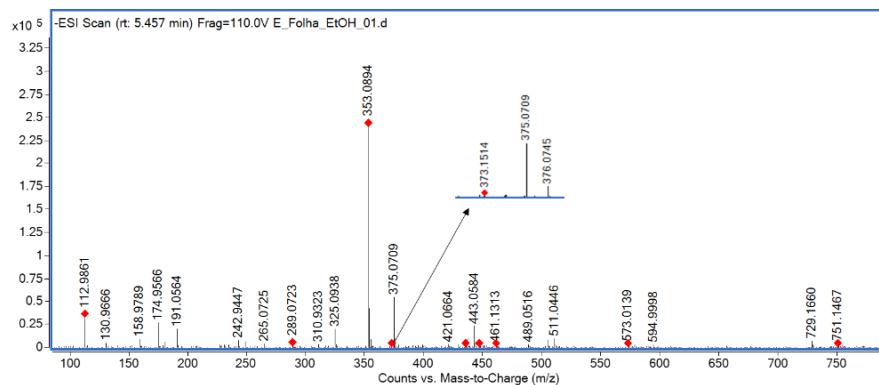


FIGURA D36: Espectros MS e MS/MS de deoxiloganina.

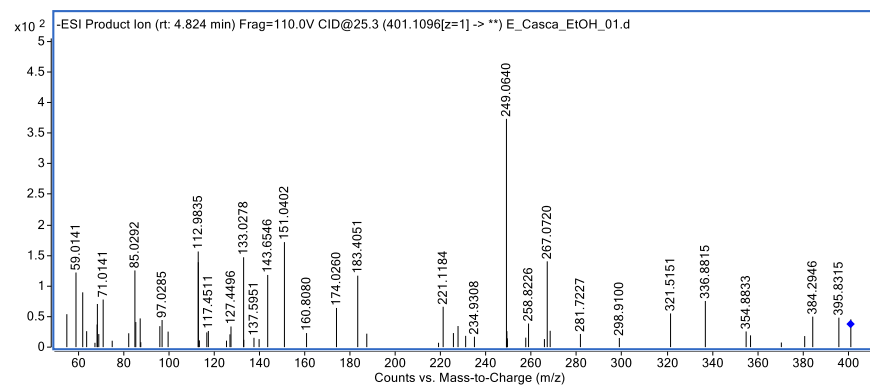
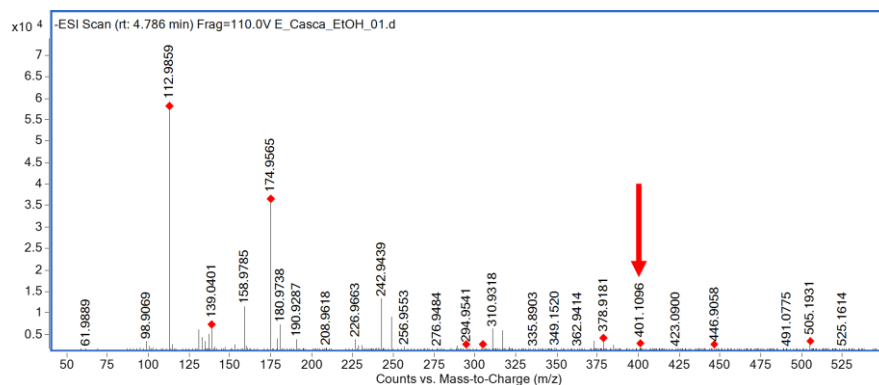


FIGURA D37: Espectros MS e MS/MS de 10-dehidrogardenosideo.

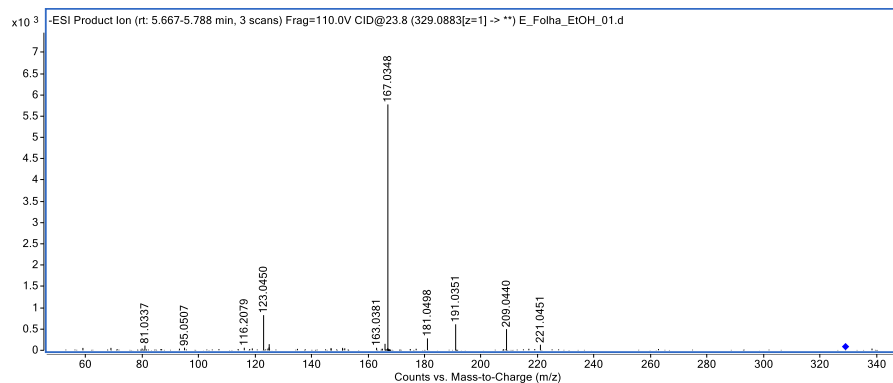
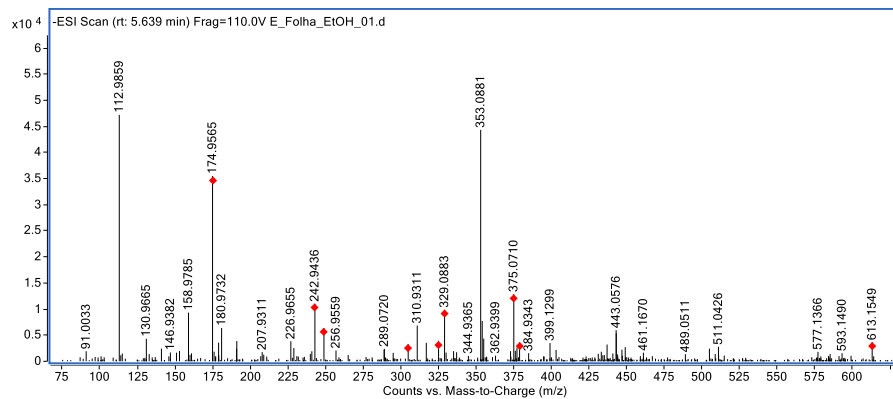


FIGURA D38: Espectros MS e MS/MS de phloracetophenone 4-O-glucosideo.

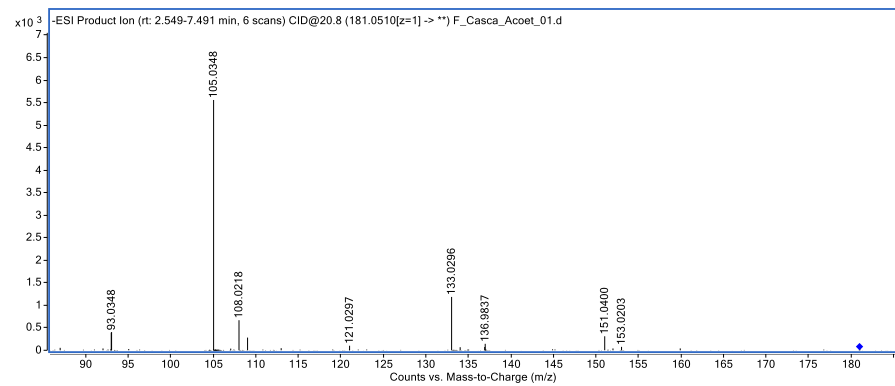
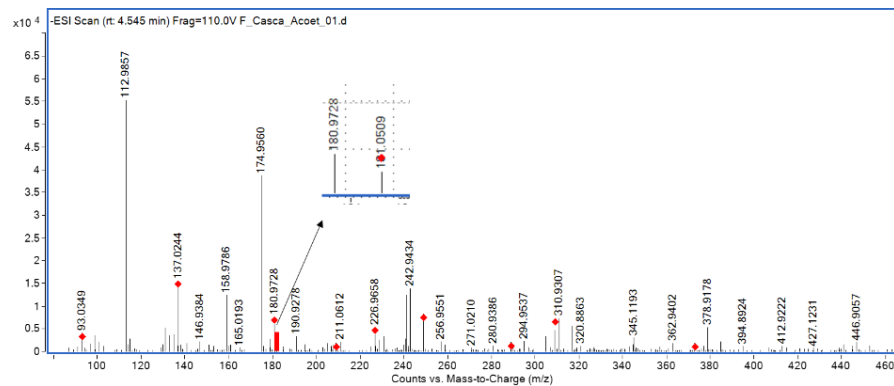


FIGURA D39: Espectros MS e MS/MS de protocatecuato de etila.

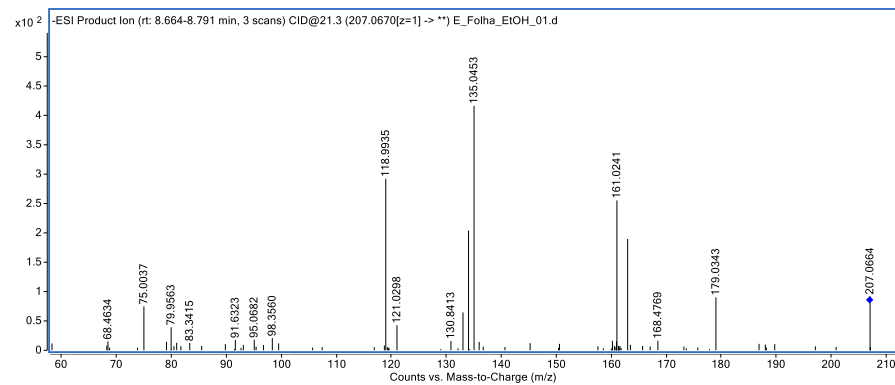
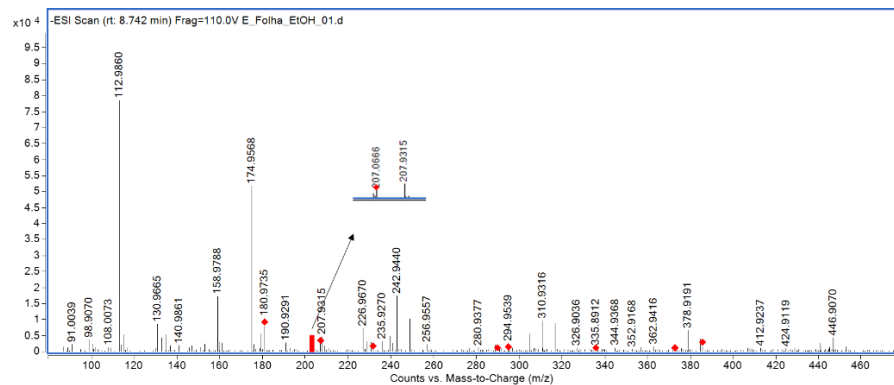


FIGURA D40: Espectros MS e MS/MS de cafeato de etila.

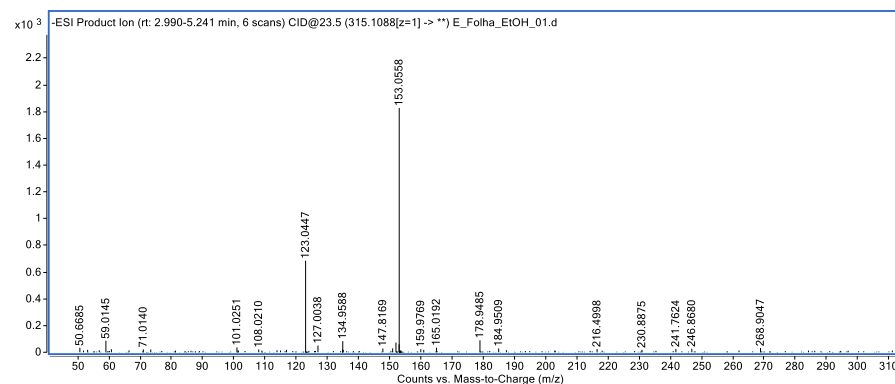
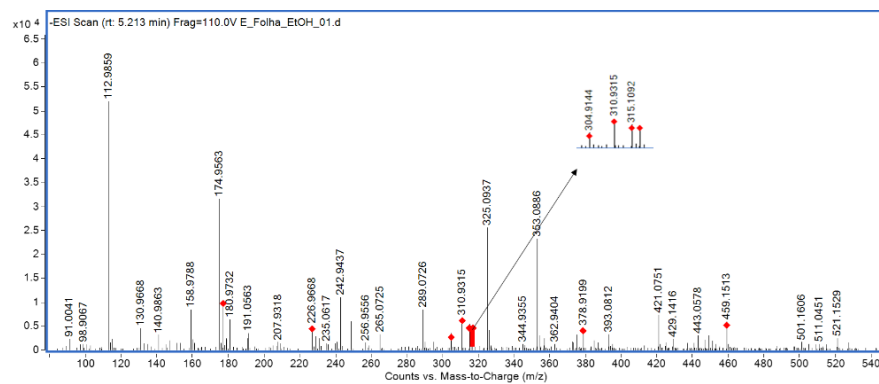


FIGURA D41: Espectros MS e MS/MS de cornosídeo.

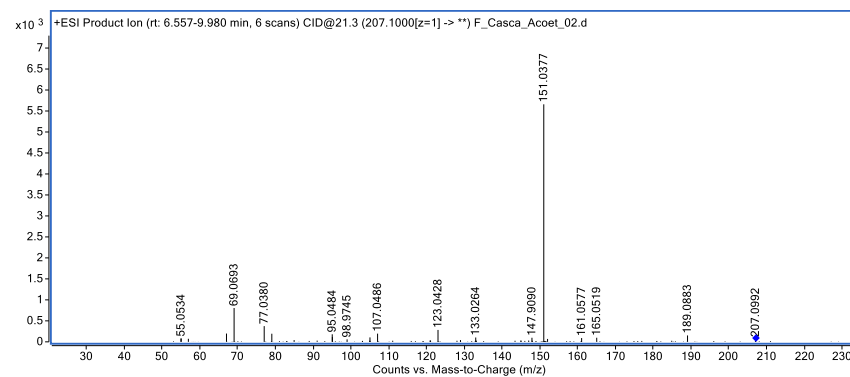
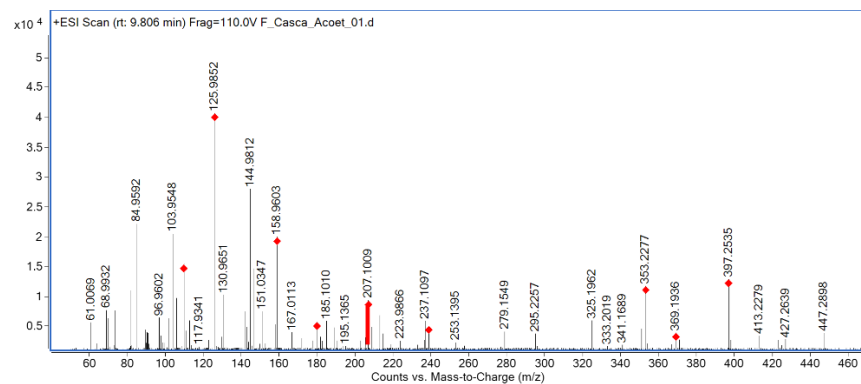


FIGURA D42: Espectros MS e MS/MS de ácido 2,2-dimetilcromano-6-carboxílico.

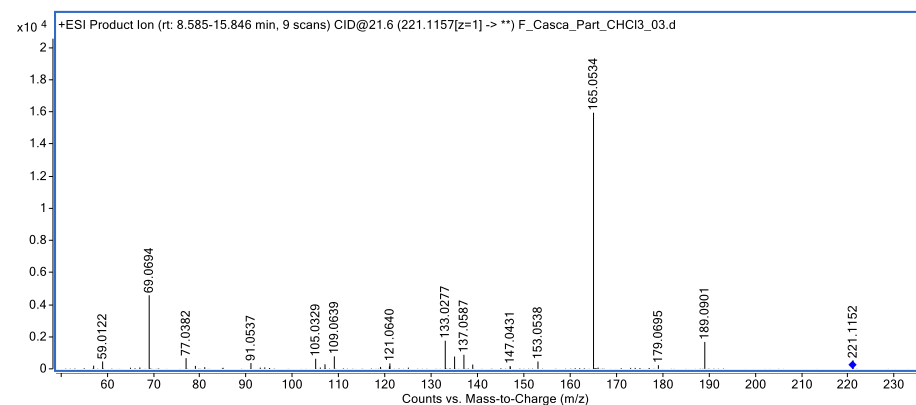
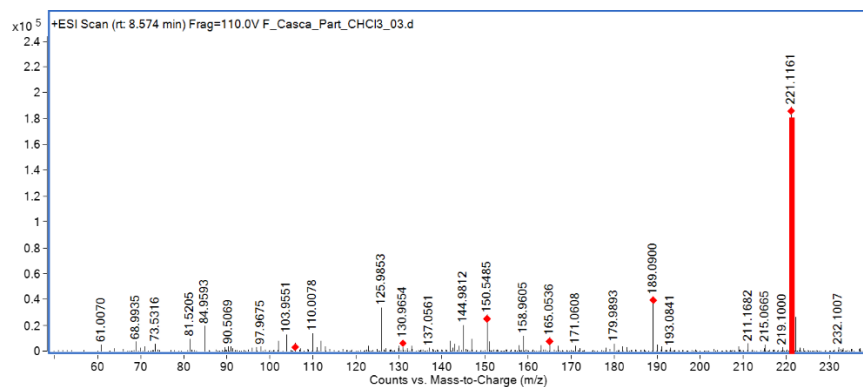


FIGURA D43: Espectros MS e MS/MS do composto isolado 3 (Cromano) :2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato.

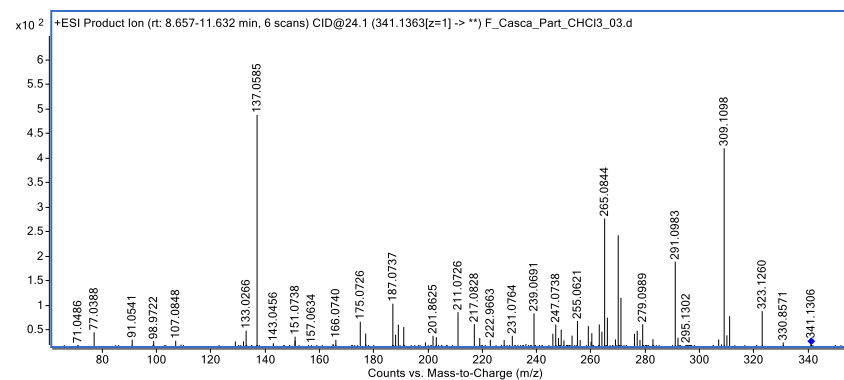
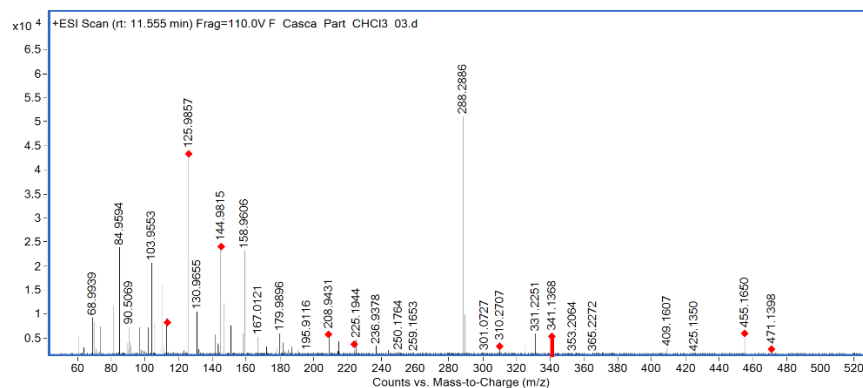


FIGURA D44: Espectros MS e MS/MS do composto isolado 2 (Benzopirano): 2,11-dimetoxi-6a,6b,12b,13a-tetraidro-6H,7H-furo[3,2-c:4,5-c'] bis [1] benzopirano.

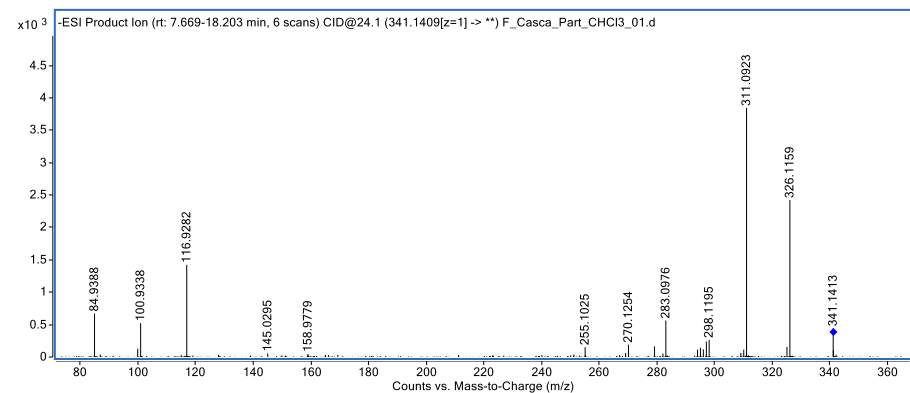
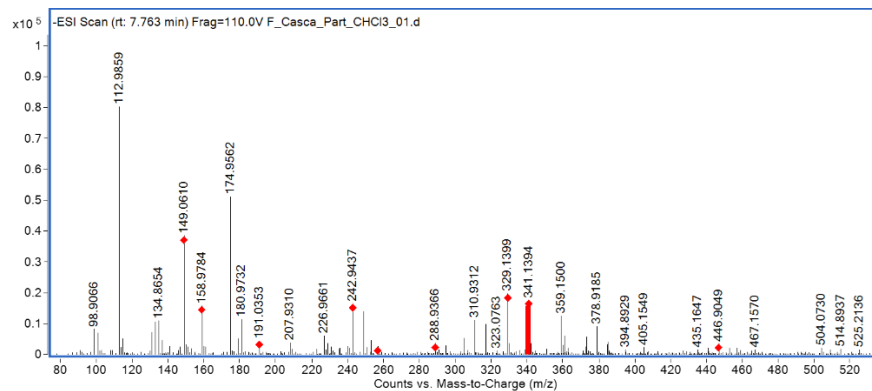


FIGURA D45: Espectros MS e MS/MS do composto isolado 1 (Pterocarpano): (3-(2,7-dimetoxi-6,6,6a,11a-tetrametil-6a,11a-dihidro-6H-benzofuro[3,2-c] cromano-9-il) propan-1-ol).

E. PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO

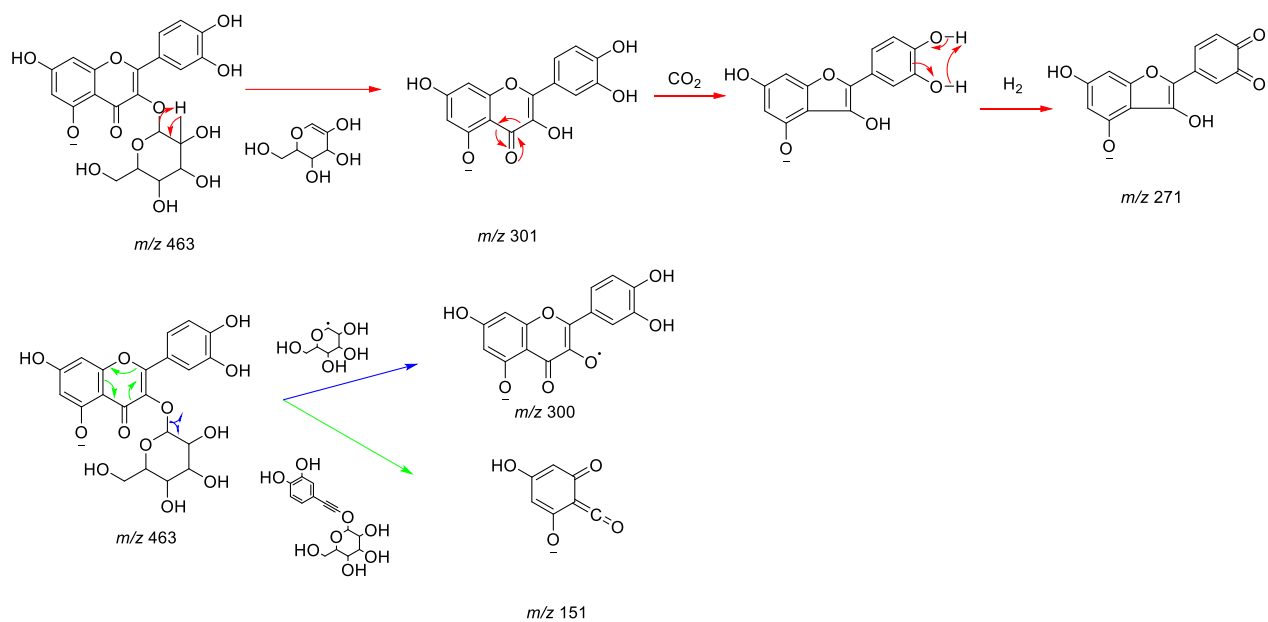


FIGURA E1: Proposta de fragmentação Quercetina 3-O-glucosídeo.

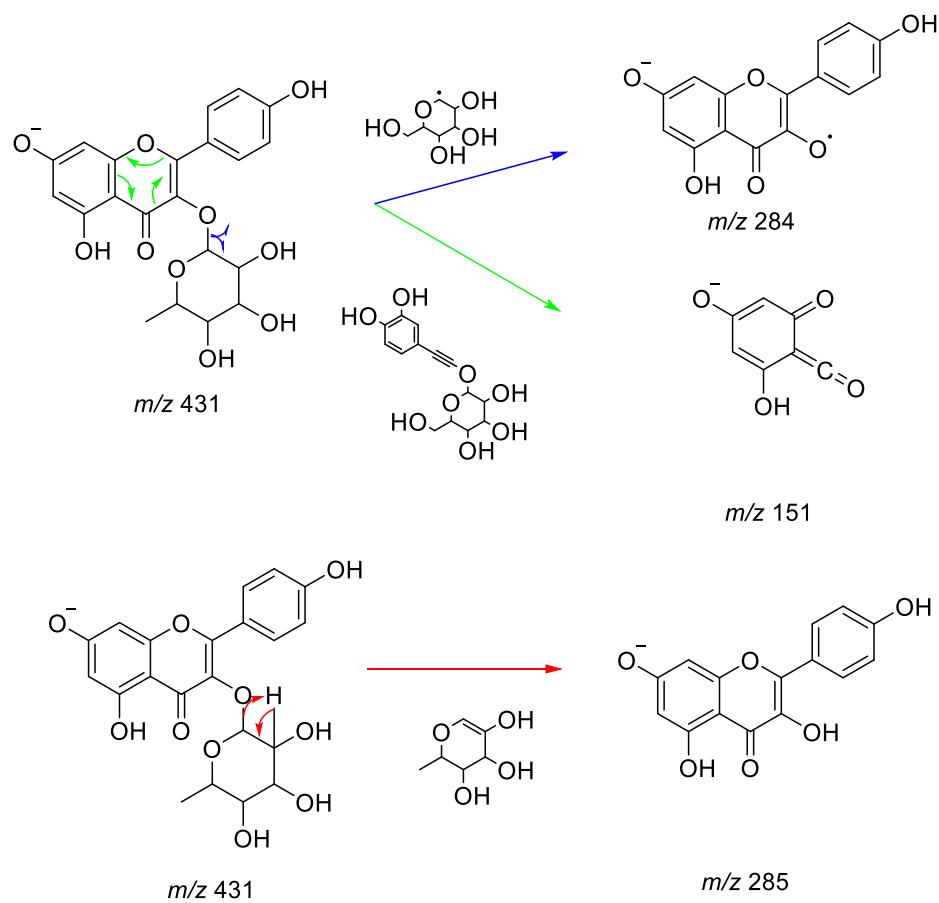


FIGURA E2: Proposta de fragmentação Afzelina.

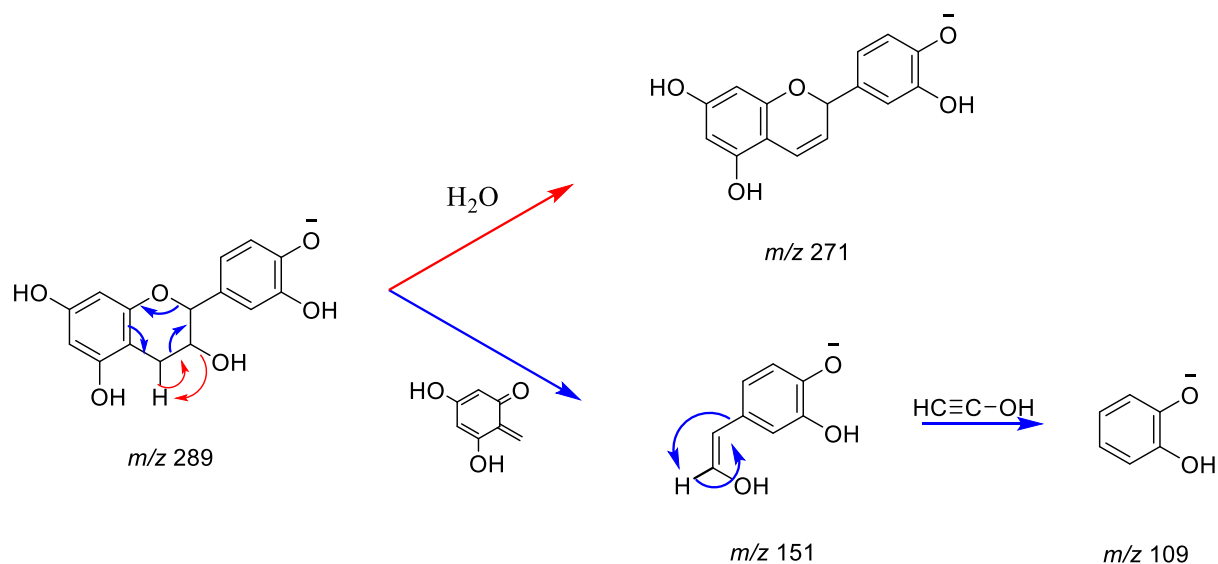


FIGURA E3: Proposta de fragmentação Catequina.

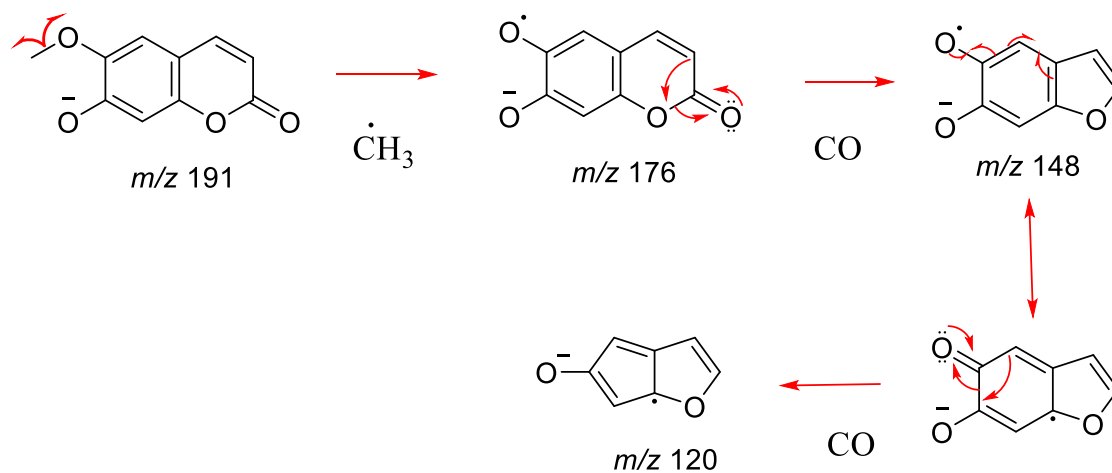


FIGURA E4: Proposta de fragmentação Escopoletina.

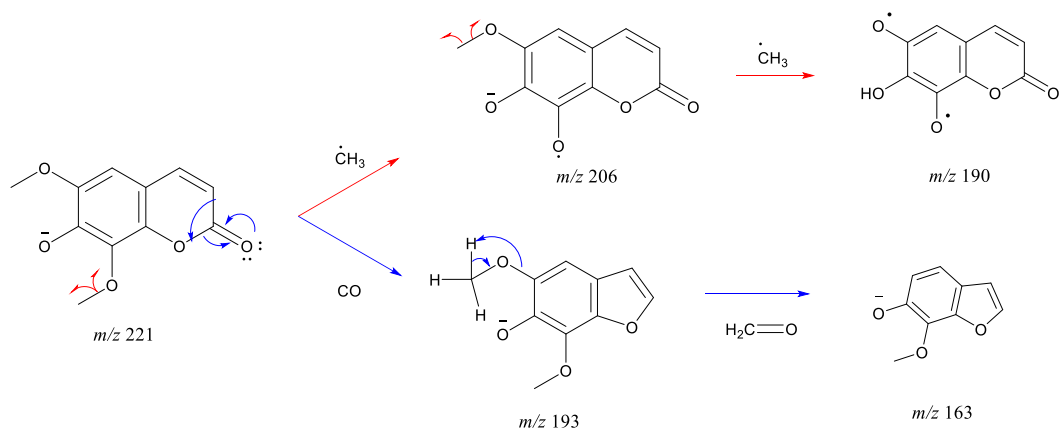


FIGURA E5: Proposta de fragmentação Isofraxidina.

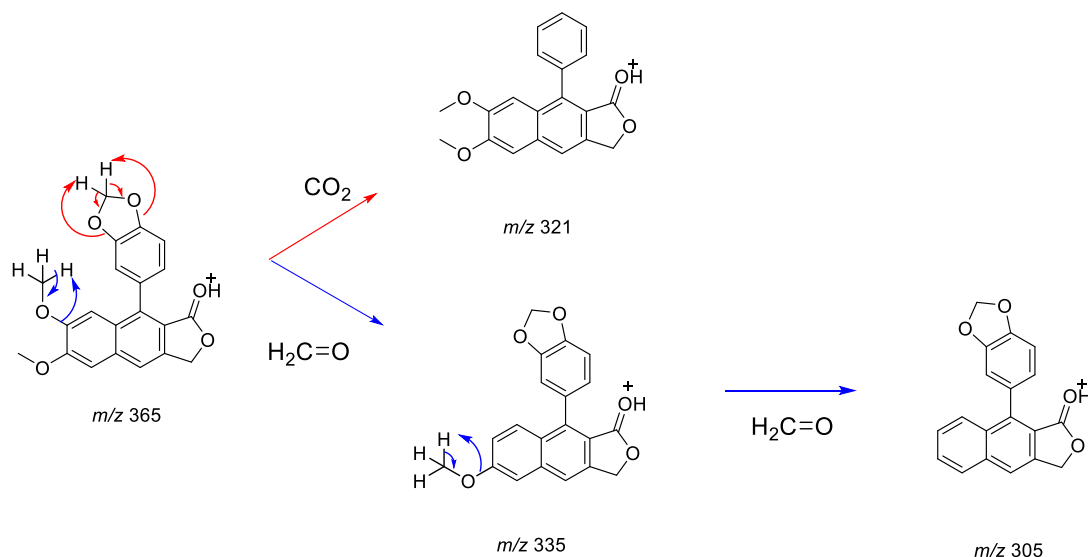


FIGURA E6: Proposta de fragmentação Justicidina B.

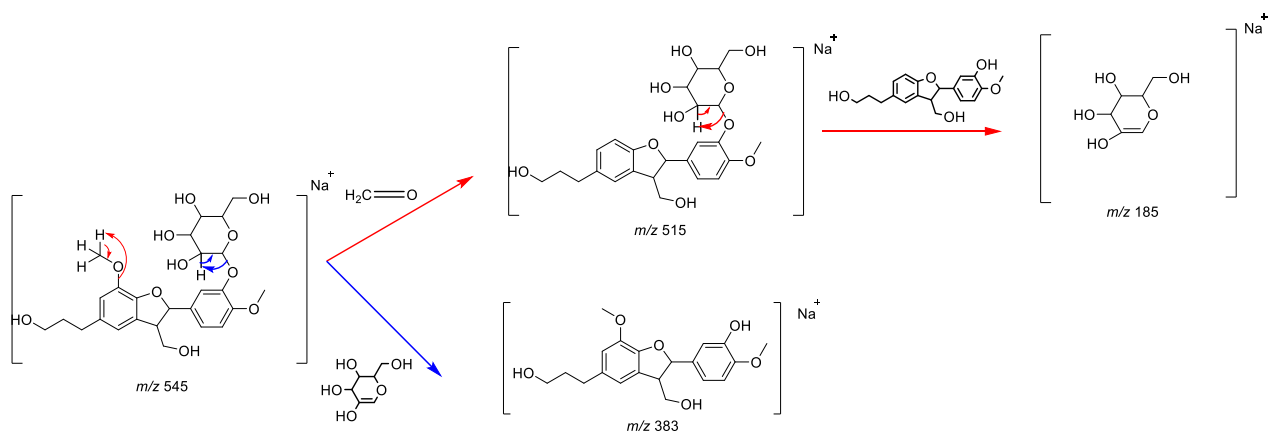


FIGURA E7: Proposta de fragmentação 2-(hidroximetil)-6-[5-[3 (hidroximetil)-5-(3 hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-di-hidro-1-benzofuran-2-il]-2 metoxifenoxi]oxano-3,4,5-triol.

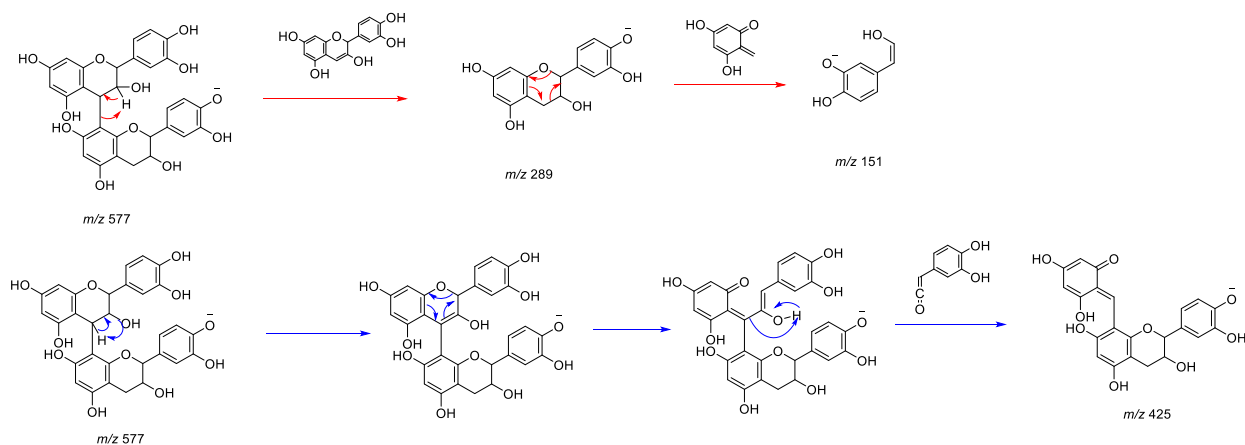


FIGURA E8: Proposta de fragmentação Procianidina.

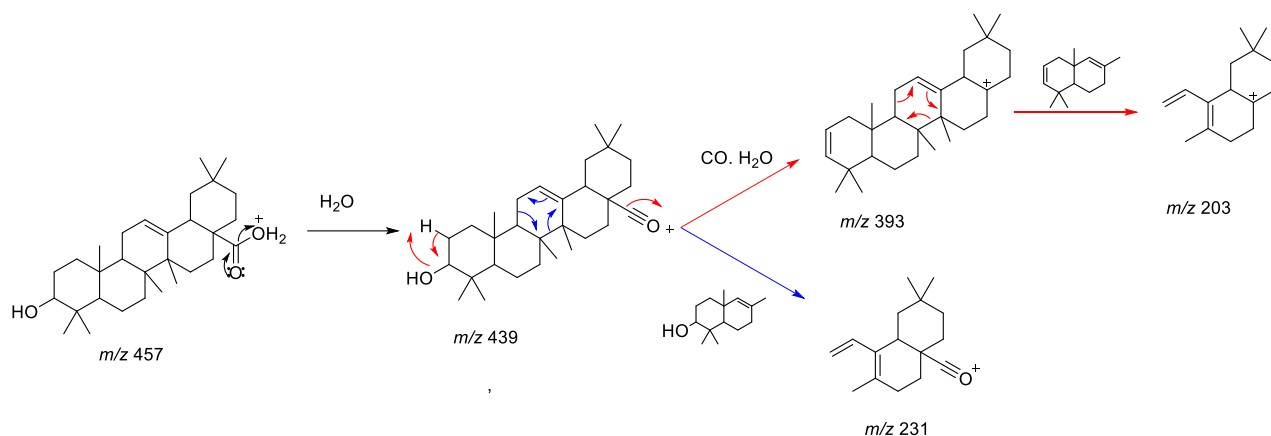


FIGURA E9: Proposta de fragmentação Ácido oleanólico.

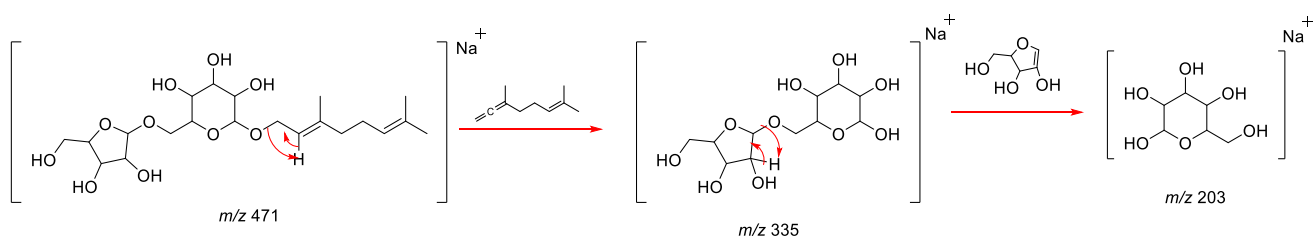


FIGURA E10: Proposta de fragmentação 2R,3S,4S,5R,6R)-2-[[[(2R,3R,4R,5S)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]oximetil]-6-[(2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienoxi]oxano-3,4,5-triol.

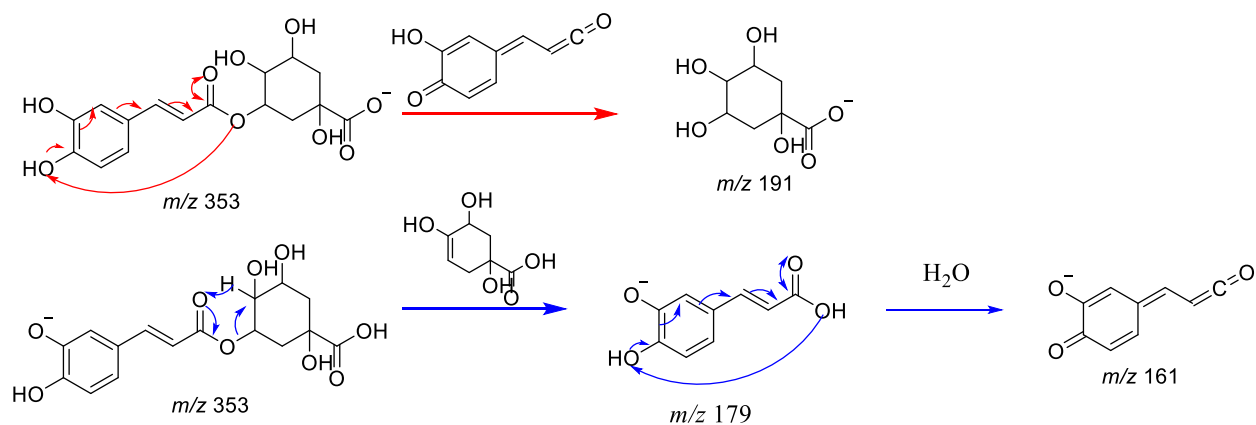


FIGURA E11: Proposta de fragmentação Ácido clorogênico.

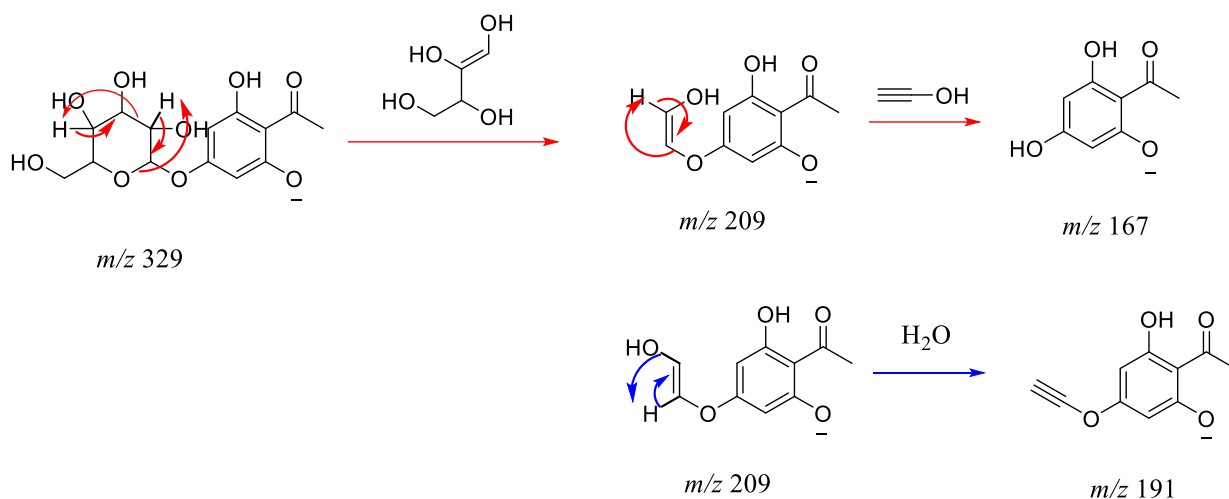


FIGURA E12: Proposta de fragmentação Phloracetophenone 4-O-glucosídeo.

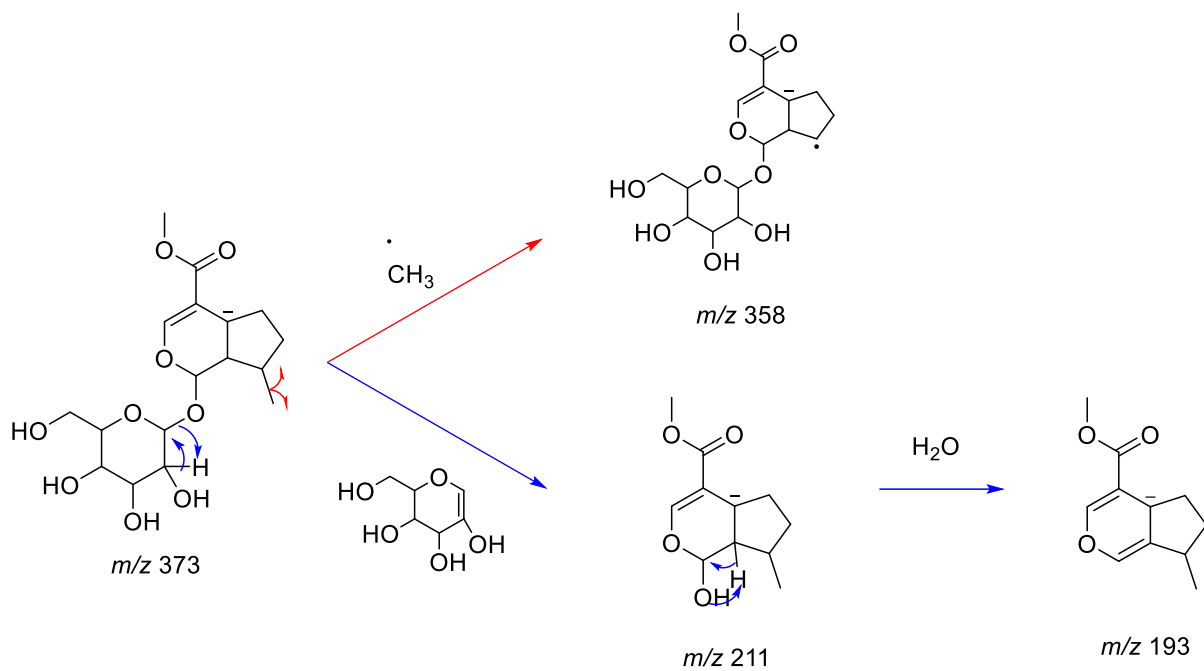


FIGURA E13: Proposta de fragmentação Deoxiloganina.

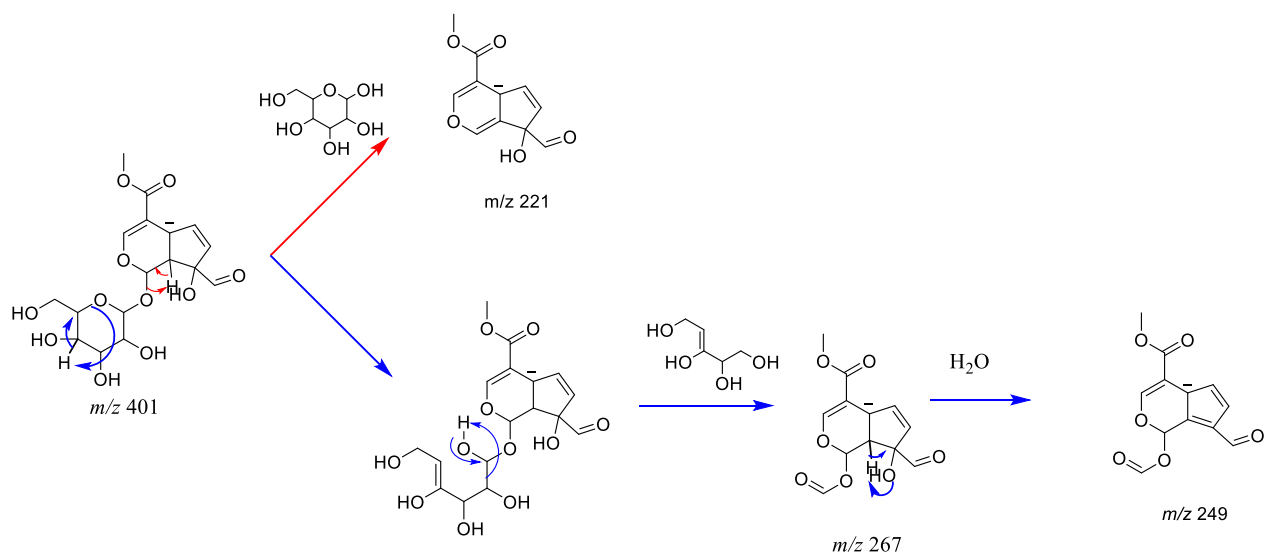


FIGURA E14: Proposta de fragmentação 10-Dehidrogardenosídeo.

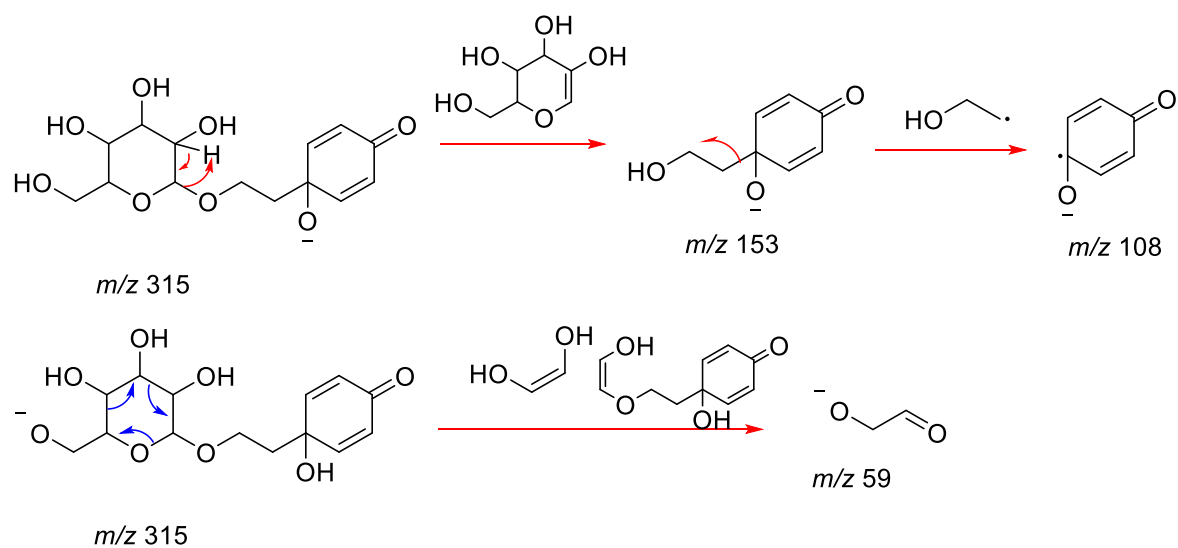


FIGURA E15: Proposta de fragmentação Cornosídeo.

F. TABELA COM METABÓLITOS ANOTADOS

TABELA F1- Metabólitos anotados usando a ferramenta de rede molecular e espectros MS/MS.

Anotação	RT (min)	Fórmula molecular	MS	Erro (ppm)	MS/MS
Flavonoides					
Quercetina 3-rutinosídeo	6,19	C ₂₇ H ₃₀ H ₁₆	609,1466 [M-H] ⁻	0,81	343; 301; 300; 151
Quercetina-3-rhamnosídeo	6,79	C ₂₁ H ₂₀ H ₁₁	447,0935 [M-H] ⁻	0,48	301; 300; 271; 151
Quercetina 3-O-glucosídeo	6,50	C ₂₁ H ₂₀ H ₁₂	463,0878 [M-H] ⁻	-0,86	301; 300; 271; 151
Kaempferol 3-O-rutinosídeo	6,55	C ₂₇ H ₃₀ H ₁₅	593,1518 [M-H] ⁻	1,02	285; 284; 257; 151
Kaempferol-3-O-rhamnosídeo	7,28	C ₂₁ H ₂₀ H ₁₀	431,0990 [M-H] ⁻	1,46	285; 284; 255; 227
Quercetina	6,82	C ₁₅ H ₁₀ H ₇	303,0494 [M+H] ⁺	-1,75	275; 257; 229; 153
Kaempferol-3-latirosídeo	6,31	C ₂₆ H ₂₈ H ₁₅	579,1357 [M-H] ⁻	0,22	300; 284; 57
Quercetina-3-latirosídeo	5,94	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595,1296 [M-H] ⁻	-1,44	300; 271; 136
Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo.	6,67	C ₂₈ H ₃₂ H ₁₆	623,1620 [M-H] ⁻	0,39	315; 161; 89
Naringenina-7-O-glucosídeo	6,71	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433,1127 [M-H] ⁻	-3,05	271; 175; 93
Kaempferol	9,35	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0408 [M-H] ⁻	1,19	268; 257; 211
Naringenina	6,91	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271,0620 [M-H] ⁻	2,96	227; 151; 119.

TABELA F1- Metabólitos anotados usando a ferramenta de rede molecular e espectros MS/MS (continuação).

Dihidrokaempferol	7,34	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	287.0565 [M-H] ⁻	1,35	269; 151; 125
Catequinas e derivados					
Epicatequina	5,52	C ₁₅ H ₁₄ H ₆	289.0723 [M-H] ⁻	1,86	271; 151; 109
Catequina	4,91	C ₁₅ H ₁₄ H ₆	289.0723 [M-H] ⁻	1,86	271; 151; 109
(Epi)galocatequina	2,78	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305.0665 [M-H] ⁻	-0,58	219;167;137;125
C-8,C-7-O-δ-lactona (Epi)catequina	6,85	C ₁₈ H ₁₄ H ₇	341.0669 [M-H] ⁻	0,66	217;189; 177;151
Cumarinas					
Escopoletina	6,55	C ₁₀ H ₈ O ₄	191.0349 [M-H] ⁻	-0,43	176; 148; 120; 104
Isofraxidina	6,73	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	221.0456 [M-H] ⁻	0,24	206; 190; 163
Esculetina	5,24-	C ₉ H ₆ O ₄	177.0189 [M-H] ⁻	-2,44	149;133; 121; 105
Daphnetina	5,64	C ₉ H ₆ O ₄	177.0190 [M-H] ⁻	-2,44	149;133;121; 105
Lignan					
Justicidina B	12,59	C ₂₁ H ₁₆ O ₆	365.1003 [M+H] ⁺	-4,56	335; 321; 305
2-(hidroximetil)-6-[5-[3 (hidroximetil)-5-(3 hidroxipropil)-7-metoxi-2,3-di-hidro-1-benzofuran-2-il]-2 metoxifenoxi] oxano-3,4,5-triol	6,33	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	545.1977 [M+Na] ⁺	-3,00	515; 383;185
Episyringaresinol 4'-O-beta-D-glucopiranosídeo	6,80	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃	603.2019 [M+Na] ⁺	-4,83	573; 441;423

TABELA F1- Metabólitos anotados usando a ferramenta de rede molecular e espectros MS/MS (continuação).

Isolariciresinol 4-O-glucopiranosídeo	5,47	C ₂₆ H ₃₄ O ₄	521.2017 [M-H] ⁻	2,18	359; 344; 271
Taninos					
Procianidina		C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1342 [M-H] ⁻	-1,65	425; 289; 151
Terpenos					
Ácido oleanólico	17,64	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	439.3570 [M+H+H ₂ O] ⁺	-0,13	393; 203; 231
Lupenona	18,77	C ₃₀ H ₄₈ O	425.3762 [M+H] ⁺	-3,74	367; 203; 149
2R,3S,4S,5R,6R)-2-[[[(2R,3R,4R,5S)-3,4-di-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]oximetil]-6-[(2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienoxi]oxano-3,4,5-triol	8,25	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₀	471.2183 [M+Na] ⁺	-3,3	303; 203
Ácidos fenólicos					
Ácido quínico	4,93	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.0568 [M-H] ⁻	3,60	173; 127; 85; 71
Ácido clorogênico	5,46	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0886 [M-H] ⁻	2,25	191; 161; 85
Ácido cumaroilquínico	5,58	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	337.0940 [M-H] ⁻	3,29	191; 173; 93
Ácido cafeico	5,29	C ₉ H ₈ O ₄	179.0346 [M-H] ⁻	-2,14	135; 107; 79
Ácido 2,3-di-hidroxibenzóico	3,08	C ₇ H ₆ O ₄	153.0199 [M-H] ⁻	3,71	109; 91; 81
Ácido ferúlico	6,55	C ₁₀ H ₁₀ O ₈	193.0509 [M-H] ⁻	1,39	149; 134; 121; 108
Ácido sinápico	7,40	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223.0609 [M-H] ⁻	-1,33	91; 164; 47

TABELA F1- Metabólitos anotados usando a ferramenta de rede molecular e espectros MS/MS (continuação).

Ácido salicílico	4,59	C ₇ H ₆ O ₃	137.0242 [M-H] ⁻	-1,59	108; 93; 92
Phloracetophenone 4-O-glucosídeo	5,70	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	329,0852 [M-H] ⁻	2,11	209; 191; 167
Cafeato de etila	8,68	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	207.0666 [M-H] ⁻	1,53	179; 161; 135; 121
Cornosídeo	3,21	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	315.1092 [M-H] ⁻	2,09	153; 108; 59
Protocatecuato de etila	7,53	C ₉ H ₁₀ O ₄	181,0509 [M-H] ⁻	1,48	151; 133; 105
Iridoides					
Deoxiloganina	5,46	C ₁₇ H ₂ O ₁₉	373.1514 [M-H] ⁻	2,66	358; 211; 193
10-Dehidrogardenosídeo	4,85	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₁	401.1096 [M-H] ⁻	1,66	267; 249; 221
Pterocarpano					
3-(2,7-dimetoxi-6,6,6a,11a-tetrametil-6a,11a-di-hidro-6H-benzofuro[3,2-c]cromano-9-il)propan-1-ol	7,71	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	341.1402 [M-H] ⁻	1,03	326; 311; 283
Benzopiranos					
2,2-dimetil-6-cromanocarboxilato	8,66	C ₁₃ H ₁₆ O ₃	221,1667 [M+H] ⁺	-2,33	189; 165; 69
2,11-dimetoxi-6a,6b,12b,13a-tetraidro-6H,7H-furo[3,2-c:4,5-c'] bis [1] benzopirano	8,57	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	341,1368 [M+H] ⁺	-4,5	323;191;137
ácido 2,2-dimetilcromano-6-carboxílico	6,59	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	207,1009 [M+H] ⁺	-3,24	189; 151; 69