

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Química

Curso: Química Bacharelado

Fernando Leme Camargo

Análise HRMS do perfil fitoquímico de extratos da casca de *Aspidosperma spruceanum* Benth. ex. Müll.Arg.: desreplicação e fracionamento de extrato antioxidante

Brasília

2025

Fernando Leme Camargo

Análise HRMS do perfil fitoquímico de extratos da casca de *Aspidosperma spruceanum* Benth. ex. Müll.Arg.: desreplicação e fracionamento de extrato antioxidante

Trabalho apresentado a Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, como requisito para obtenção do título de Bacharel Química.

Orientador: Prof. Dr. Douglas da Costa Gontijo

BRASÍLIA

2025

AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho a minha família especialmente a minha mãe na qual sempre me ensinou que o mais essencial na vida são os estudos e sempre fez de tudo para que conseguisse alcançar minhas realizações estudantis e pessoais. Aos meus amigos Higor, Guilherme e Vinicius que conheço desde o ensino médio e compartilhamos nesse período muitas alegrias profissionais, pessoais e festas. Aos meus amigos do laboratório LaQuiMet Arthur, João, Ismaelia, Gustavo e Gabriel pelo suporte e os momentos descontraídos que vivemos. Ao meu orientador Professor Dr. Douglas Gontijo no qual me deu todo suporte, orientação, broncas, piadas e o mais importante, ajudou a me encontrar em uma área que nunca imaginava que iria me conquistar tanto, o senhor realmente fez com que meus sonhos profissionais fossem alcançados e pretendo seguir colhendo ainda mais os frutos que estamos plantando desde 2024. Aos que esqueci, me desculpem, mas não estou escrevendo minha biografia ainda, fica para a próxima

Eu vi a cara da morte e ela estava viva! - Cazuza em Boas novas 1988

RESUMO

O estudo da química de produtos naturais pode trazer grandes descobertas para diferentes áreas da pesquisa científica. De fato, vários fármacos hoje amplamente utilizados têm sua oriegm em pesquisa com produtos naturais. Neste sentido, extratos de diferentes espécies de Aspidosperma são usados ethnofarmacologicamente como agentes antimaláricos, sendo que ensaios biológicos in vitro e in vivo, corroboram o uso popular. Espécies de Aspidosperma são reconhecidas pela presença de alcaloides bioativos, com destaque para alcaloides indólicos monoterpenos do tipo aspidosperma. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a composição fitoquímica de extrato da casca de A. spruceanum, previamente identificado com potencial antioxidante e significativo teor de compostos fenólicos, além de alcaloides. Para tanto será analisado o perfil fitoquímico do extrato por HPLC-DAD, sendo o mesmo desreplicado por Espectrometria de Massar (HRMS). Por fim, será efetuado ainda o fracionamento HRMS dirigido do extrato antioxidante visando o isolamento e/ou alta purificação de metabólitos possivelmente responsáveis pela atividade observada. Uma vez supostamente identificados e purificados, novos ensaios bioquímicos/biológicos podem contribuir para a identificação de novos hits bioativos que possam ter valor terapêutico.

Palavras-chave: Química de Produtos Naturais; Desreplicação; Alcaloides; Compostos Fenólicos; Bioatividade.

ABSTRACT

The study of natural product chemistry can lead to significant discoveries across various areas of scientific research. Indeed, several widely used drugs today originate from natural product research. In this context, extracts from different *Aspidosperma* species are used ethnopharmacologically as antimalarial agents, with *in vitro* and *in vivo* biological assays corroborating their folk use. *Aspidosperma* species are recognized for the presence of bioactive alkaloids, notably *Aspidosperma*-type monoterpene indole alkaloids.

Thus, the objective of this work is to evaluate the phytochemical composition of the bark extract of *A. spruceanum*, which was previously identified as having antioxidant potential and a significant content of phenolic compounds, in addition to alkaloids. To this end, the phytochemical profile of the extract will be analyzed by HPLC-DAD and dereplicated using High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS). Finally, HRMS-guided fractionation of the antioxidant extract will be performed, aiming at the isolation and/or high purification of metabolites potentially responsible for the observed activity. Once putatively identified and purified, further biochemical/biological assays may contribute to the identification of new bioactive hits with potential therapeutic value.

Key-words: Natural Product Chemistry; Dereplication; Alkaloids; Phenolic Compounds; Bioactivity**.**

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial da família *Apocynaceae* (modificado de Heywood 1985)	09
Figura 2	Metabólitos identificados em famílias botânicas	09
Figura 3	Núcleo indólico do tipo aspidosperma representado na aspidoscarpina	10
Figura 4	Mapa de distribuição *Aspidosperma spruceanum* Benth. ex Müll.Arg	11
Figura 5	Alcaloides identificados em *Aspidosperma spruceanum*	12
Figura 6	Blocos construtores	15
Figura 7	Via do chiquimato	16
Figura 8	Via do mevalonato	17
Figura 9	Complexo formado do reagente Folin com ácido tânico	18
Figura 10	Formação dos flavonoides	20
Figura 11	Estrictosidina como precursor de diferentes alcaloides bioativos	21
Figura 12	Formação dos alcaloides do tipo aspidosperma e iboga	22
Figura 13	Compostos identificados no gênero *Aspidosperma* com atividade biológica	23
Figura 14	Mecanismo de ionização por eléctronspray	25
Figura 15	Complexo formado do reagente Folin com ácido tânico	27
Figura 16	Variação da absorção dos extratos a partir da redução do complexo Fe^{3+}– TPTZ para Fe^{2+}–TPTZ	28
Figura 17	Queda da absorbância do DPPH• na presença do ácido tânico	29
Figura 18	Quantificação de polifenóis em diferentes extratos das cascas de *A. spruce anum*	31
Figura 19	Quantificação do poder redutor (PFRAP) dos diferentes extratos de *A. spru ceanum.*	32
Figura 20	Cálculo do IC_{50} a partir do mecanismo DPPH• dos diferentes extratos de *A. spruce-naum.*	33
Figura 21	Cromatograma de separação utilizando HPLC preparativo	37
Figura 22	Cromatografia de camada delgada dos extratos/frações obtidos da casca da *Aspidosperma spruceanum* revelada com Dragendorff	39
Figura 23	Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos AB, AC e EtOH	40
Figura 24	Espectros no modo positivo dos extratos AB, AC e EtOH	41

Figura 25 Alcaloides do tipo aspidosperma identificados nos extratos AB, AC e EtOH 42

Figura 26 Espectros no modo negativo dos extratos AB, AC e EtOH 43

Figura 27 Lignanas identificadas no extrato **AB** da casca da *A. spruceanum* 44

Figura 28 Sobreposição dos espectros correspondente a Pirifolidina 50

Figura 29 Sobreposição dos espectros correspondente a Aspidoscarpina 51

Figura 30 Mecaanismo de fragmentação da Aspidoscarpina 52

Figura 31 Cromatografia de camada delgada das frações obtidas por separação em Sephadex 53
ção AB da *Aspidosperma spruceanum* revelada com Dragendorff

Figura 32 Cromatogramas sobrepostos das frações AB3 e AB4-F54 54

Figura 33 Espectros UV correspondentes aos compostos majoritários das frações AB3 e AB4 55

Figura 34 Cromatograma fração AB5-F54 56

Figura 35 Espectro UV correspondente ao composto isolado na fração AB5-F54 57

Figura 36 Cromatograma comparativo entre a fração AB3-F54 e os respectivos compostos 58
isolados

Figura 37 Espectros de UV correspondentes aos compostos isolados 1, 2 e 3 59

Figura 38 Espectro de massas do composto isolado 3 no modo negativo 60

Figura 39 Proposta de fragmentação do composto isolado 3 61

Figura 40 Espectro de massas do composto isolado 1 no modo negativo 62

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Métodos de extração e seus respectivos códigos	31
Tabela 2	Massa (g) e rendimento das frações obtidas a partir da separação por Sephadex da fração AB.	36
Tabela 3	Massa (g) e rendimento das frações obtidas a partir da separação por HPLC preparativo das frações AB3 e AB4.	37
Tabela 4	Dados de massas-ESI-MS/MS dos extratos AB, AC e EtOH do caule de *Aspidosperma spruceanum*	45
Tabela 5	Dados de massas dos compostos 1 e 3 isolados a partir das frações AB3 e AB4	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIMs – Alcaloides indólicos monoterpênicos

ACN- Acetonitrila

CCD- Cromatografia de camada delgada

DAD – *Diode Array Detector*

DAHP – Ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosônico-7-fosfato

DPPH• – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

ESI – *Electrospray Ionization*

FDA – *Food and Drug Administration*

PFRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*

GPP – Geranil difosfato

HMG–CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*

IPP – Isopentenil pirofosfato

PAL – Fenilalanina amônia-liase

PEP – Fosfoenolpiruvato

SAM – S-adenosilmetionina

SET – *Single Electron Transfer*

SPLET – *Sequential Proton Loss–Electron Transfer*

TPTZ- Tris(2-piridil) -s-triazina

UV–VIS – Ultravioleta–Visível

IC_{50} – Concentração inibitória média

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem
® – Marca registrada
→ – Direção/transformação química
NH_3 – Amônia
Fe^{3+} / Fe^{2+} – Íons férricos e ferrosos

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	07
2	**Revisão Bibliográfica**	11
2.1	**Biossintese de metabólitos secundários**	14
2.1.1	**Via do ácido chiquímico**	15
2.1.2	**Via do mevalonato**	17
2.1.3	**Formação dos compostos fenólicos**	17
2.2	**Métodos de caracterização e análise fitoquímica**	24
2.2.1	**A importância da espectrofotometria UV-VIS na prospecção de extratos vegetais**	24
2.2.2	**Espectrometria de massas (HRMS-ESI)**	26
2.3	**Atividades biológicas e antioxidante**	27
3	**JUSTIFICATIVA**	30
4	**Objetivos Gerais**	36
4.1	**Objetivos específicos**	34
5	**RESULTADOS ESPERADOS**	35
6	**METODOLOGIA**	35
6.1	**Separação cromatográfica**	36
6.1.1	**Sephadex**	36
6.1.2	**Separação da fração AB3 e AB4 utilizando HPLC preparativo**	37
6.2	**Perfil cromatográfico dos extratos por cromatografia liquida de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD)**	38
6.2.1	**Preparo das amostras**	38

6.2.2 **Parâmetros cromatográficos** 39

6.3 **Obtenção dos espectros de massas por ESI-MS/MS**

7 **DISCUSSÕES E RESULTADOS** 39

8 **CONCLUSÃO** 58

9 **BIBLIOGRAFIA**

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa multidisciplinar com Produtos Naturais (PN) de origem vegetal desempenha papel central tanto na prospecção de agentes terapêuticos quanto na obtenção de matérias-primas para a síntese de novos compostos bioativos. Esses produtos apresentam ampla diversidade estrutural, resultando em diferentes classes químicas, como terpenos, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos, saponinas, alcaloides, lignanas, entre outras (Dewick, 2009). A singularidade e a complexidade estrutural e físico-química dessas moléculas conferem aos produtos naturais um valor inestimável, posicionando-os como uma fonte primária para o desenvolvimento de moléculas com aplicações diversificadas nos setores farmacêutico, cosmético, biotecnológico, agroquímico e alimentar.

O estudo aprofundado dos metabólitos secundários vegetais exige, por sua vez, uma abordagem intrinsecamente integrada e multidisciplinar. Essa investigação abrange áreas do conhecimento que vão desde a química orgânica e analítica, passando pela bioquímica e botânica, até disciplinas de biologia molecular e farmacologia. A complexidade inerente a essas substâncias, aliada à intricada rede de seus processos biossintéticos, reforça a necessidade de uma investigação que transcenda as fronteiras disciplinares. Somente por meio de uma visão abrangente é possível promover a compreensão completa de suas propriedades físico-químicas, funções biológicas e, consequentemente, de seu potencial de aplicação.

Nesse contexto, a expressiva atividade biológica demonstrada por diversos metabólitos secundários de origem vegetal os coloca em uma posição de destaque na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos. A relevância desses compostos é corroborada por sua vasta diversidade estrutural, que lhes permite interagir de maneira específica e eficaz com múltiplos alvos bioquímicos e farmacológicos no organismo. A importância histórica e contínua dos produtos naturais é inegável: uma análise abrangente do período de 1981 a 2019 revelou que aproximadamente 65% dos medicamentos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos, são derivados de produtos naturais ou possuem suas estruturas inspiradas neles para fins de síntese e otimização molecular (NEWMAN; CRAGG, 2020). Esses dados reforçam o valor estratégico dos produtos naturais como recursos promissores para inovação terapêutica, reforçando a relevânica de pesquisas contínuas que integrem

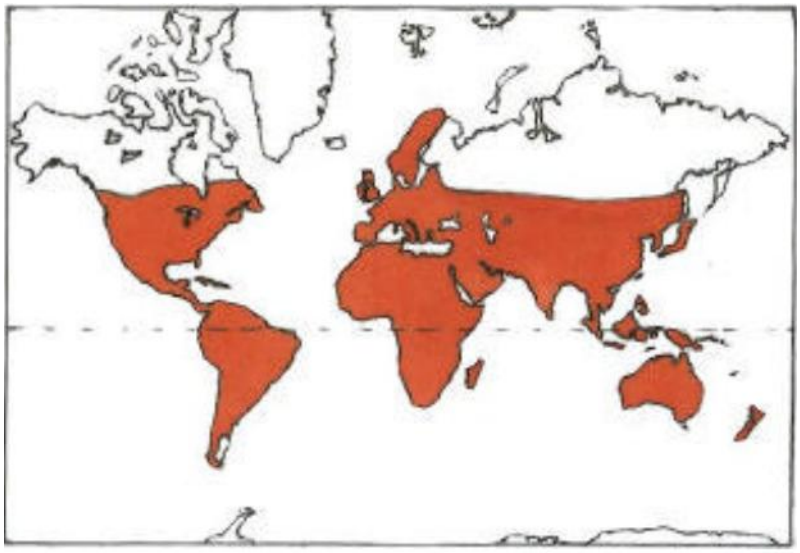
abordagens químicas, biológicas e tecnológicas para explorar seu potencial de forma sustentável e eficiente.

A importância econômica dos produtos naturais transcende significativamente o setor farmacêutico, abrangendo um mercado global que demonstra um crescimento exponencial e sustentado. A mudança no paradigma de consumo, impulsionada pela crescente demanda por alternativas mais saudáveis, naturais e sustentáveis, tem catalisado a expansão de diversos segmentos. Isso inclui o mercado de alimentos funcionais, nutracêuticos, cosméticos naturais e fitoterápicos, que se consolidam como pilares da bioeconomia. Estima-se que o mercado global de produtos naturais e orgânicos continue sua robusta trajetória ascendente, com previsões indicando que o setor de ingredientes naturais para cosméticos, por exemplo, alcançará um valor de mercado expressivo até 2025, refletindo a clara preferência do consumidor por insumos de origem vegetal em detrimento de seus análogos sintéticos (SANTOS-MIRANDA, 2022).

Adicionalmente, a bioprospecção de produtos naturais configura-se como um investimento estratégico de alto retorno para a inovação tecnológica e o desenvolvimento de patentes. A complexidade estrutural e a bioatividade intrínseca dessas moléculas oferecem estruturas químicos únicas, cuja replicação por síntese pura é frequentemente desafiadora e economicamente inviável, conferindo um alto valor agregado e exclusividade aos produtos. O Brasil, em particular, como detentor da maior biodiversidade do planeta, possui um potencial imensurável para se estabelecer como líder global nesse mercado. Para concretizar esse potencial, é imperativo um investimento contínuo e robusto em pesquisa e desenvolvimento, que deve ser acompanhado por um arcabouço regulatório que garanta a exploração sustentável dos recursos e a repartição justa e equitativa dos benefícios, em conformidade com a legislação de acesso ao patrimônio genético (MARQUES *et al.*, 2022).

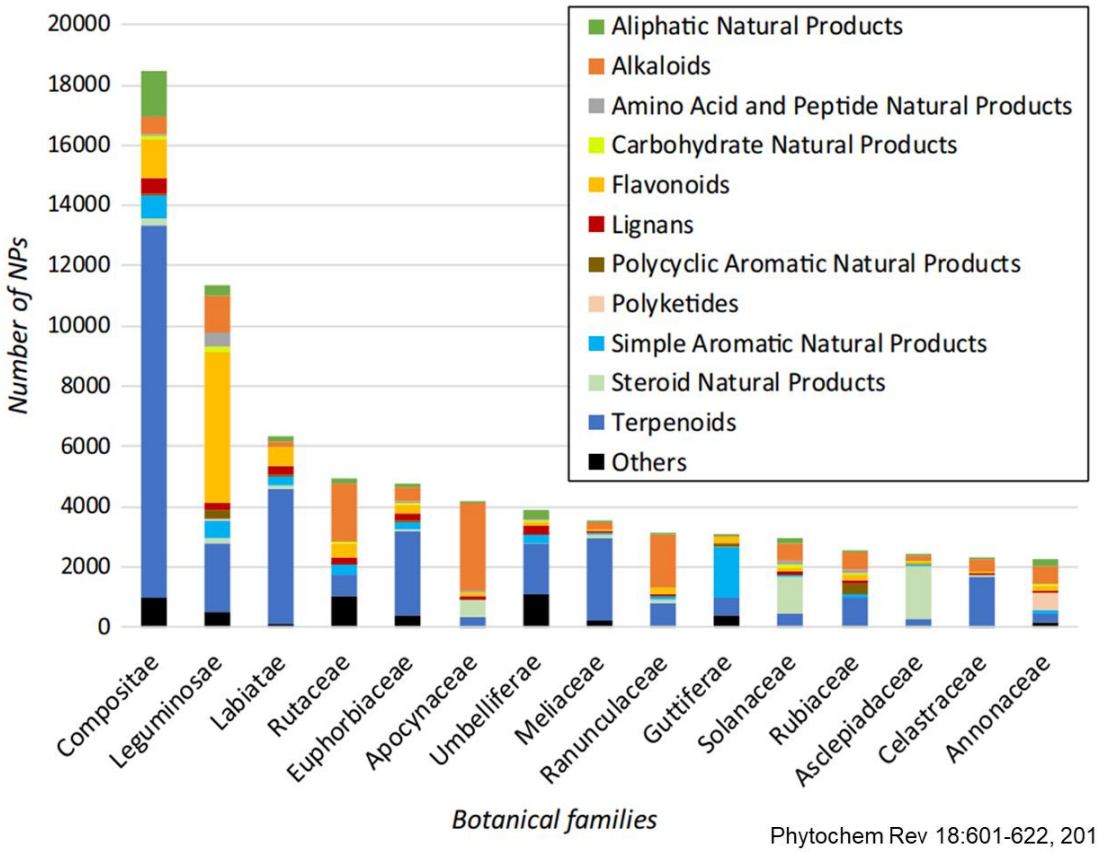
Nesse contexto, a família botânica Apocynacea é notável por sua vasta diversidade, compreendendo 424 gêneros e mais de 4.600 espécies de árvores, arbustos e ervas (MORALES-JADÁN *et al.*, 2020), (Figura 1). Além do valor comercial, essa família botânica é reconhecida pela produção de uma diversidade de metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, terpenos, esteroides, que conferem a muitas de suas espécies um significativo valor etnofarmacológico e consequentemente terapêutico (BHADANE *et al.*, 2018).

Figura 1. Distribuição mundial da família *Apocynaceae* (modificado de Heywood, 1985).



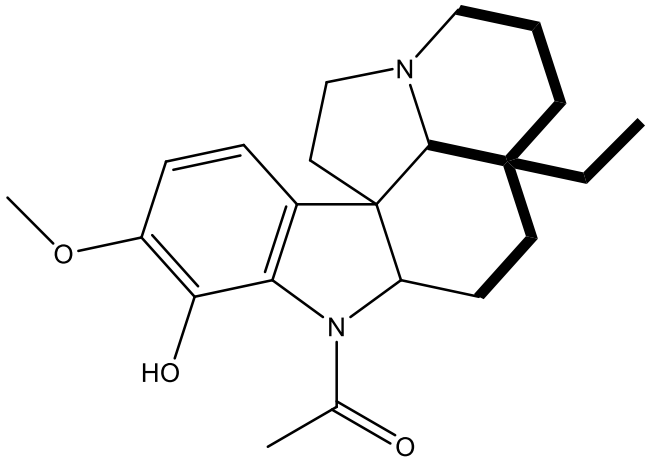
De fato, espéces da família Apocynaceae, encontram-se entre as mais estudas, com amplo destaque para metabólitos do tipo alcaloides (Figura 2) que estão entre os metabólitos encontrados em maior quantidade nessa família botânica. Além de alcaloides há registros de terpenóides, esteroides e em menor quantidade lignanas.

Figura 2. Metabólitos identificados em famílias botânicas.



Dentro desta família, há destaque para o gênero Aspidosperma, no qual sua madeira, como a "peroba", é tradicionalmente valorizada por sua durabilidade e resistência na construção civil e na fabricação de móveis (Lorenzi et al.,2009), possuindo alto valor agregado. Espécies de *Aspidosperma* são reconhecidas na medicina tradicional, especialmente na Amazônia, onde são utilizadas por comunidades indígenas para fins medicinais, sugerindo um potencial para a prospecção de novos compostos bioativos, alinhando-se ao interesse geral no gênero *Aspidosperma* como fonte de fármacos, com destaque para a investigação de seus alcaloides. Esse gênero é caracterizado por apresentar uma grande variabilidade de alcaloides indólicos, entre eles o núcleo conservado do tipo aspidosperma (Figura 3). Estudos mostram que esses alcaloides são usados para o tratamento de doenças cardiovasculares (MACHADO. et al., 2022), malária (DOLABELA. et al., 2014), leishimania (Ferreira. et al., 2004), antimicrobiana, antioxidante, antibacteriana, antidiabética, antitumoral, anti-inflamatória, antiasmática, anticancerígena, anticonvulsivante entre outros (ISLAM; LUCKY, 2019). Assim, o estudo de diferentes espécies de *Aspidosperma* de uso popular é um importante indicativo para um estudo profundo dessas substâncias afim de se descobrir potenciais fármacos e/ou percursores para modificações estruturais de novos fármacos.

Figura 3. Núcleo indólico do tipo aspidosperma representado na aspidoscarpina.



2. Revisão Bibliografica

O gênero Aspidosperma compreende diversas espécies de árvores e arbustos, muitas das quais são reconhecidas por seu valor madeireiro e medicinal. Entre elas, a espécie *A. spruceanum* Benth. ex Müll.Arg. que se destaca por sua ampla distribuição e notável adaptabilidade ecológica. Esta espécie é nativa de uma vasta região da América do Sul, abrangendo o Brasil, a Bolívia, o Peru e as Guianas (Figura 4).

Já no território brasileiro, *A. spruceanum* ocorre em múltiplos domínios fitogeográficos, o que sublinha sua resiliência e importância botânica. Sua presença é registrada na Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Essa distribuição heterogênea sugere uma grande adaptabilidade e a capacidade de prosperar em condições ambientais diversas, desde florestas úmidas até áreas de savana sazonalmente secas. A importância ecológica da espécie é reforçada pelo seu papel na composição florística e na dinâmica sucessional desses biomas.

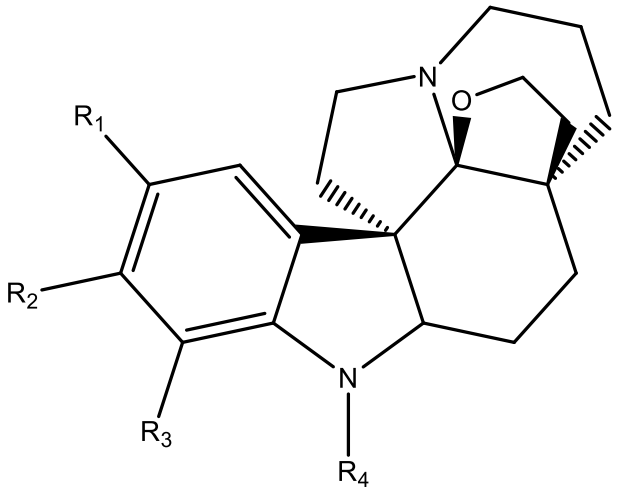
Figura 4. Mapa de distribuição *Aspidosperma spruceanum* Benth. ex Müll.Arg



Fonte: Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira- acesso dia 06-11-2025

O interesse científico em *A. spruceanum* reside, em grande parte, em seu rico perfil fitoquímico, caracterizado pela presença de alcaloides indólicos, metabólitos secundários complexos típicos da família Apocynaceae. A literatura científica descreve o isolamento de, pelo menos, dezenove tipos distintos de alcaloides indólicos a partir desta espécie, destacando-se a aspidoalbina (Figura 5A), N-acetil-N-despropionilaspiodoalbina (Figura 5B) e Des-O-metilaspidolimidina (Figura 5C) (Bragas Oliveira et al. 2008). A diversidade estrutural desses alcaloides confere à espécie um significativo potencial farmacológico, evidenciado por uma gama de atividades terapêuticas relevantes. Tais atividades incluem o potencial anti-leishmania, sugerindo uso no tratamento da leishmaniose (MORALES-JADÁN *et al.*, 2020), anti-hipertensivo (MONTEIRO, N. O. *et al.*, 2022), antiplasmódio (REINA *et al.*, 2014) e antimalárico (DOLABELA *et al.*, 2015). A presença desses alcaloides reforça o potencial da espécie como fonte de novos agentes terapêuticos, estimulando a continuidade dos estudos fitoquímicos e farmacológicos.

Figura 5. Alcaloides identificados em *Aspidosperma spruceanum*



A: R_1=R_2=OMe; R_3=OH; R_4=COEt

B: R_1=R_2=Ome; R_3=OH; R_4=COMe

C: R_1=H; R_2 = R_3=OH; R_4=COMe

Neste contexto, a extração de metabólitos secundários é uma etapa crucial para a identificação e caracterização química de compostos bioativos presentes em matrizes vegetais. Tradicionalmente, empregam-se métodos extrativos clássicos, como a maceração e a percolação, que frequentemente seguem uma marcha analítica baseada no aumento gradual da polaridade dos solventes. Essa abordagem sequencial permite o fracionamento e a obtenção de diferentes classes de compostos em extratos distintos (BITWELL *et al.*, 2023). Adicionalmente, o fracionamento pode ser otimizado por meio de técnicas de extração seletiva, que exploram as propriedades físico-químicas dos metabólitos, como o caráter ácido ou básico. Essa seletividade é fundamental para o isolamento de frações enriquecidas, a exemplo da extração de alcaloides, onde o aproveitamento do seu caráter básico facilita a separação dessas moléculas de outras substâncias presentes na matriz vegetal (DJILANI *et al.*, 2006).

Por sua vez, a extração é complementada pela caracterização química e avaliação biológica dos extratos obtidos. De fato, diferentes técnicas como cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta performance acoplada a variados detectores como ultravioleta e espectrometria de massas fazem parte da rotina da pesquisa fitoquímica. Nesta perspectiva, são várias também as abordagens de trabalho, desde análises mais simples de determinação de perfil fitoquímica, passando por desreplicação de matrizes complexas, até análises metabolômicas, alvos e não-alvos(WOLFENDER *et al.*, 2015). Além disso, a avaliação fitoquímica é complementada pela realização de ensaios químicos e bioquímicas mais simples, econômicos e rápidos, a fim de se avaliar um potencial bioatividade, dado o alto poder preditivo de alguns ensaios. Assim, avaliações de quantificação de metabólitos e determinação de atividade antioxidante por análises UV, estão entre as mais utilizadas para prospecção de amostras fitoquímicas com potencial terapêutico. Assim, ensaios de quantificação, como a determinação de compostos fenólicos totais, são de grande importância para a padronização de extratos, estabelecendo um perfil químico robusto que permite correlacionar a concentração de metabólitos secundários com uma possível atividade biológica observada. Essa quantificação é indispensável para o controle de qualidade e para garantir a reprodutibilidade e a segurança no desenvolvimento de agentes fitoterápicos e nutracêuticos, por exemplo. Por outro lado, a relevância dos ensaios antioxidantes é justificada pelo papel do estresse oxidativo na etiologia de diversas patologias crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, cânceres e processos inflamatórios. A avaliação da capacidade antioxidante, por meio de métodos como o DPPH•, é

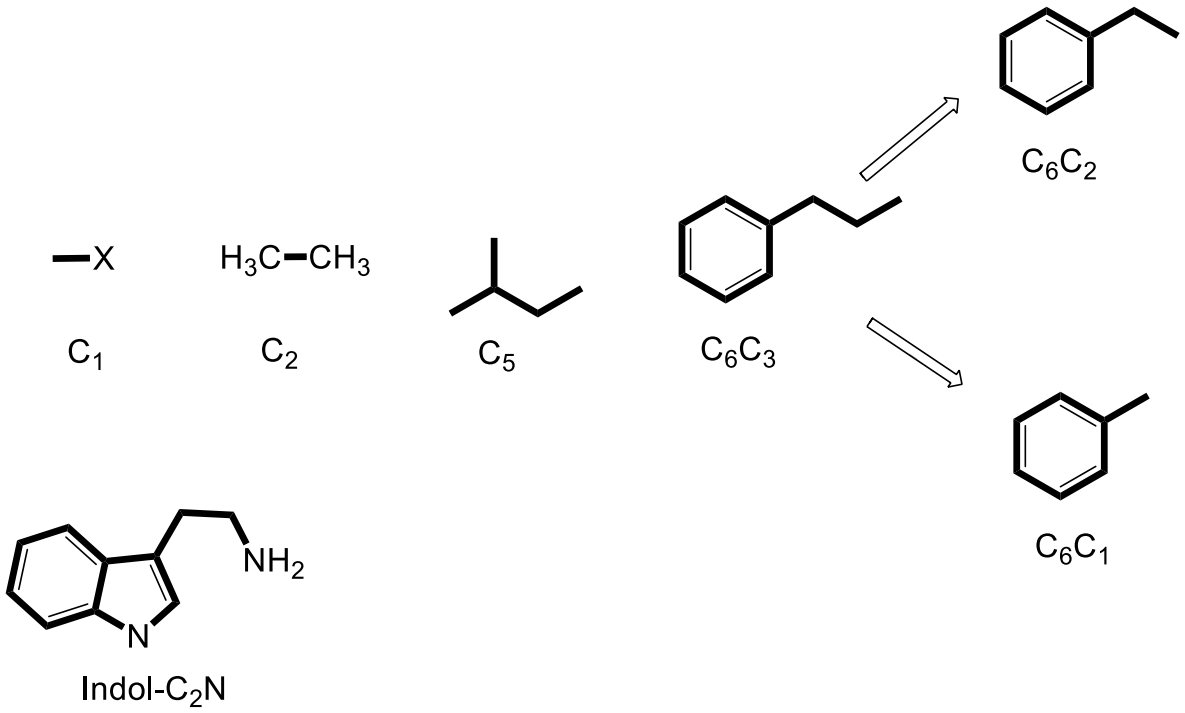
importante para identificar e validar substâncias que podem inibir a oxidação e proteger os sistemas biológicos contra os radicais livres, posicionando-as como promissoras fontes de agentes terapêuticos (BARBOSA, V. *et al.*, 2023).

2.1 Biossíntese de metabólitos secundários

O metabolismo vegetal é dividido em primário e secundário. Enquanto o metabolismo primário engloba as rotas essenciais para a sobrevivência e o crescimento da planta (como fotossíntese, respiração e síntese de proteínas), o metabolismo secundário é responsável pela produção de uma grande variabilidade de compostos, conhecidos como metabólitos secundários. Estes compostos não são diretamente necessários para a sobrevivência celular imediata, mas desempenham funções cruciais na interação da planta com o ambiente, atuando como agentes de defesa bióticos contra herbívoros e patógenos, atrativos para polinizadores e dispersores de sementes, e como protetores contra estresses abióticos, como a radiação UV, estresse híbrido e salinidade (ZHANG, M. *et al.*, 2025).

Os metabólitos secundários são agrupados em grandes classes, como terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos, e sua biossíntese tem origem a partir dos metabólitos primários. A complexidade e a especificidade dessas rotas biossintéticas são orientadas por enzimas altamente especializadas, que catalisam reações de modificação química, como oxidações, reduções, descarboxilações, transaminações e ciclizações (DEWICK, 2009). Dessa forma, blocos construtores C_1, C_2, C_5 C_6C_1, C_6C_2, C_6C_3, indol-C_2N dentre outros são responsáveis pela enorme variabilidade estrutural observada nos produtos naturais (Figura 6).

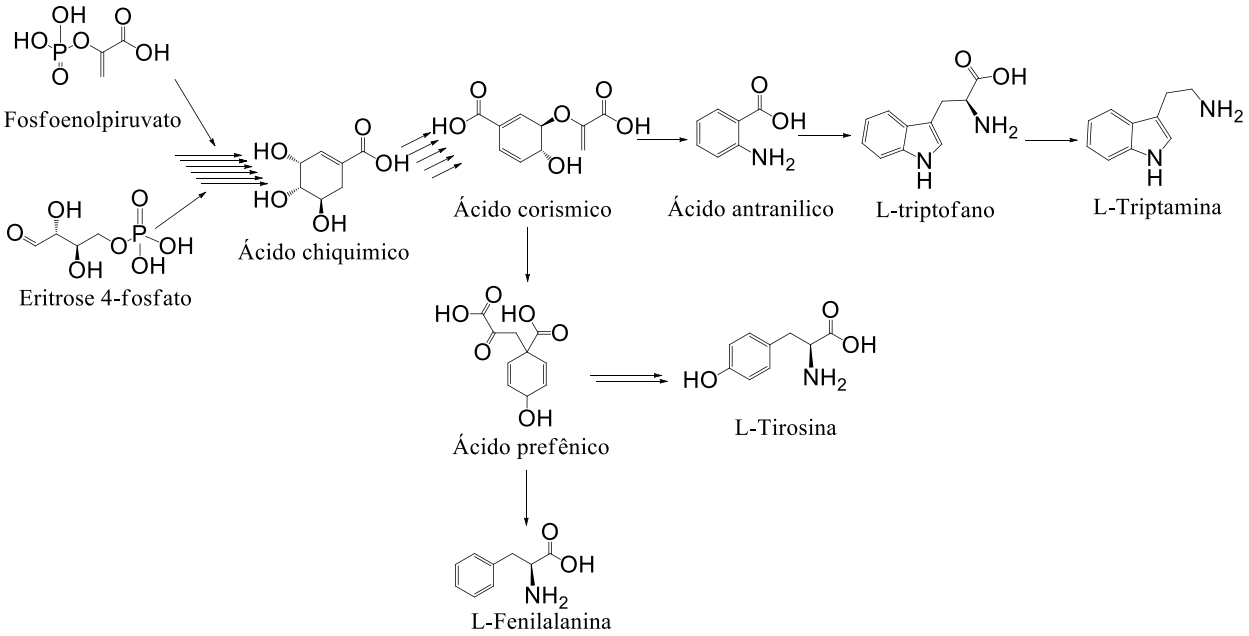
Figura 6. Blocos construtores



2.1.1 Via do ácido chiquímico

A via do chiquimato é uma rota metabólica fundamental presente em plantas, fungos, bactérias e algas, responsável pela síntese de compostos aromáticos essenciais. Essa via inicia-se com a condensação do fosfoenolpiruvato (PEP) e da eritrose-4-fosfato, formando o ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosônico-7-fosfato (DAHP), que passa por uma sequência de reações enzimáticas até gerar o ácido chiquímico (Figura 7). A partir dele, ocorre uma nova série de transformações que culmina na formação do corismato, considerado o intermediário central e o ponto de ramificação para os diversos produtos derivados dessa via (SHENDE; BAUMAN; MOORE, 2024). A importância fisiológica do chiquimato deriva de seu papel na produção de metabólitos essenciais que não podem ser sintetizados por animais, incluindo os aminoácidos aromáticos.

Figura 7. Via biossintética do chiquimato.



A partir do corismato, três ramificações metabólicas distintas levam à formação dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. A fenilalanina e a tirosina derivam do intermediário pré-fenato, gerado pela ação da corismato mutase. Esse composto pode seguir duas rotas principais: a via aromática pré-fenato-deshidrogenase, levando à tirosina, ou a via pré-fenato-desidratase, conduzindo à fenilalanina(CHEN, R. *et al.*, 2025). Já o triptofano é produzido por uma sequência de reações iniciadas com a formação de antranilato, resultante da conversão do corismato por meio da enzima antranilato sintase. O antranilato é convertido em indol-3-glicerol-fosfato e, posteriormente, em triptofano. Esses três aminoácidos desempenham papéis centrais na síntese proteica e atuam como precursores de metabólitos secundários de grande importância fisiológica.

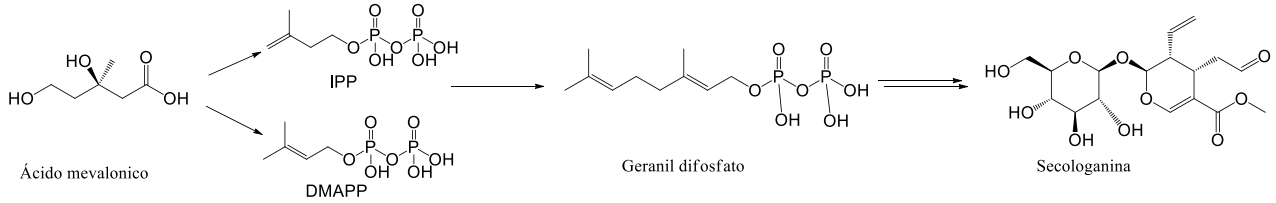
Além de sua função primária, os aminoácidos derivados da via do chiquimato possuem relevância metabólica ampliada. A fenilalanina é precursora de compostos fenólicos e da via fenilpropanóide; a tirosina, de hormônios vegetais, pigmentos e certos alcaloides; enquanto o triptofano é precursor direto das auxinas e de importantes alcaloides indólicos (PEREZ-GARCÍA et al., 2024). Assim, essa via conecta diretamente o metabolismo primário ao secundário, permitindo a diversificação estrutural de compostos bioativos nas plantas. Estudos recentes destacam que a regulação fina

dessa rota é essencial para a manutenção do crescimento vegetal e da resposta ao estresse (SHENDE; BAUMAN; MOORE, 2024).

2.1.2 Via do mevalonato

O processo inicia-se com a condensação sequencial de moléculas de acetil-CoA, resultando na formação de HMG-CoA, o qual é reduzido a mevalonato pela enzima HMG-CoA redutase — etapa considerada limitante da via. O mevalonato passa por reações subsequentes de fosforilação e descarboxilação, originando o isopentenil pirofosfato (IPP), o monômero isoprenoide essencial (Figura 8). Em seguida, o IPP sofre isomerização para gerar o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), e ambos se condensam para formar geranil difosfato (GPP), precursor imediato de monoterpenos, incluindo aqueles que seguem para a biossíntese de iridoides (HUGHES; SHANKS, 2002). A partir do GPP, inicia-se a via específica dos iridoides, que envolve a conversão de GPP em geraniol e, posteriormente, sua oxidação e ciclização para formar iridodiol, 7-desoxiloganol e loganol. Transformações enzimáticas sucessivas, mediadas por oxidases, redutases e glicosiltransferases, conduzem à formação de loganato e etapa final, o loganato é convertido em secologanina.

Figura 8. Via do mevalonato

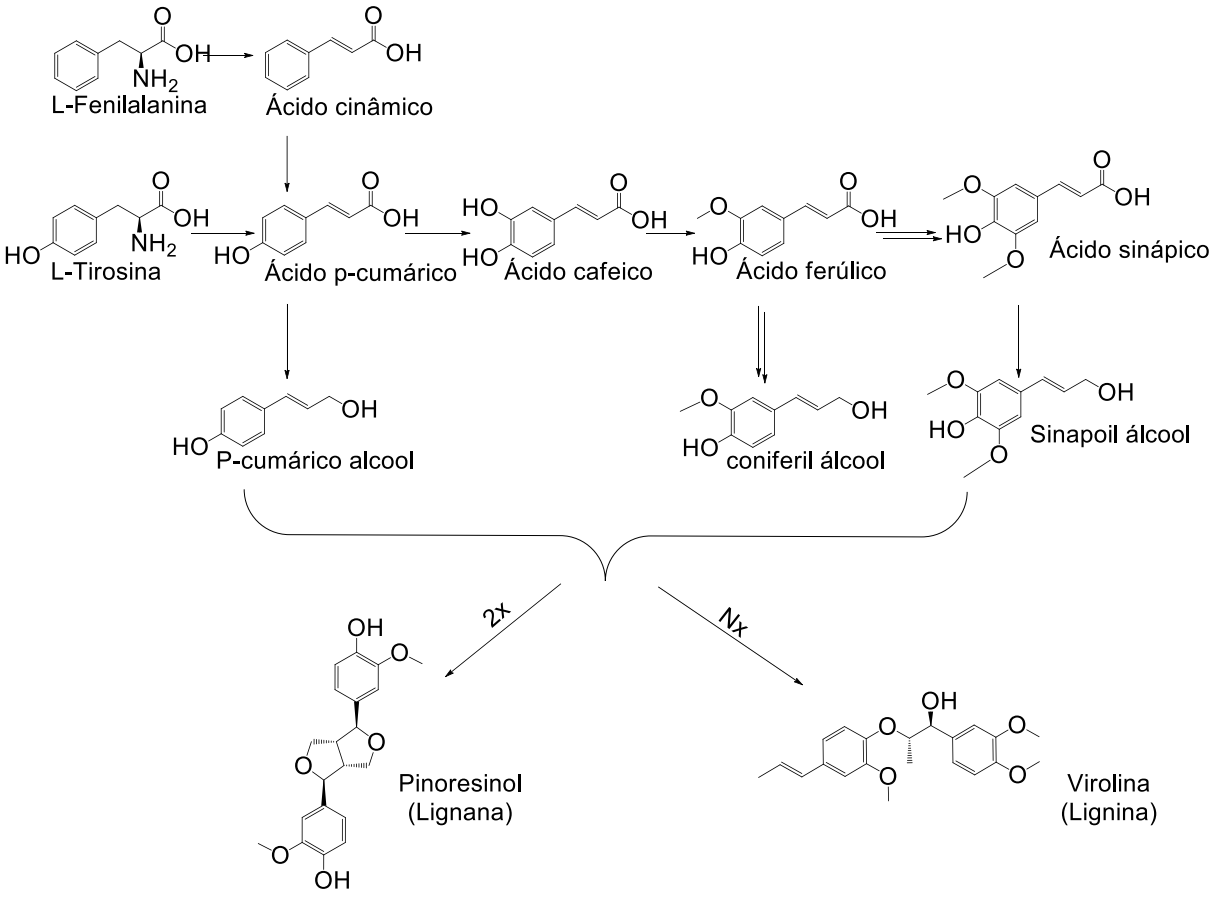


2.1.3 Formação dos compostos fenólicos

A L-fenilalanina e a L-tirosina atuam como blocos construtores C_6C_3 e são precursoras de uma ampla variedade de produtos naturais. Na primeira etapa, ocorre a eliminação de amônia (NH_3) para gerar ácido cinâmico, no caso da L-fenilalanina. Para a L-tirosina, forma-se diretamente o ácido *p*-cumárico, uma vez que sua conversão direta em ácido cinâmico é limitada devido à ausência de enzimas específicas (Figura 9) (DEWICK, 2009).

A oxidação do ácido *p*-cumárico por oxigenases, seguida de redução mediada por NADPH, leva à formação do ácido cafeico. Este pode ser metilado pela enzima S-adenosilmetionina (SAM), resultando no ácido ferúlico. Processo semelhante se repete para a síntese do ácido sinápico. Esses ácidos hidroxicinâmicos podem ser reduzidos, convertendo suas funções carboxílicas em alcoólicas, dando origem aos monolignóis (Figura 9). Uma vez formados, os monolignóis sofrem oxidação enzimática, gerando radicais fenóxidos que se acoplam para formar ligninas, lignanas e neolignanas (ZHANG, Y.; NAEBE, 2021).

Figura 9. Formação de fenólicos



Lignanas, são metabólitos secundários formados pelo acoplamento oxidativo específico entre dois resíduos de monolignóis, resultando em dímeros C_6C_3–C_6C_3 com ligações carbono-carbono ou carbono-oxigênio definidas. Esses compostos estão amplamente distribuídos em plantas superiores e desempenham funções ecológicas, envolvendo defesa e sinalização. Além disso, apresentam relevância farmacológica devido às atividades antioxidante, antiviral, anticâncer e moduladora de receptores estrogênicos (ZHANG, J. et al., 2021)

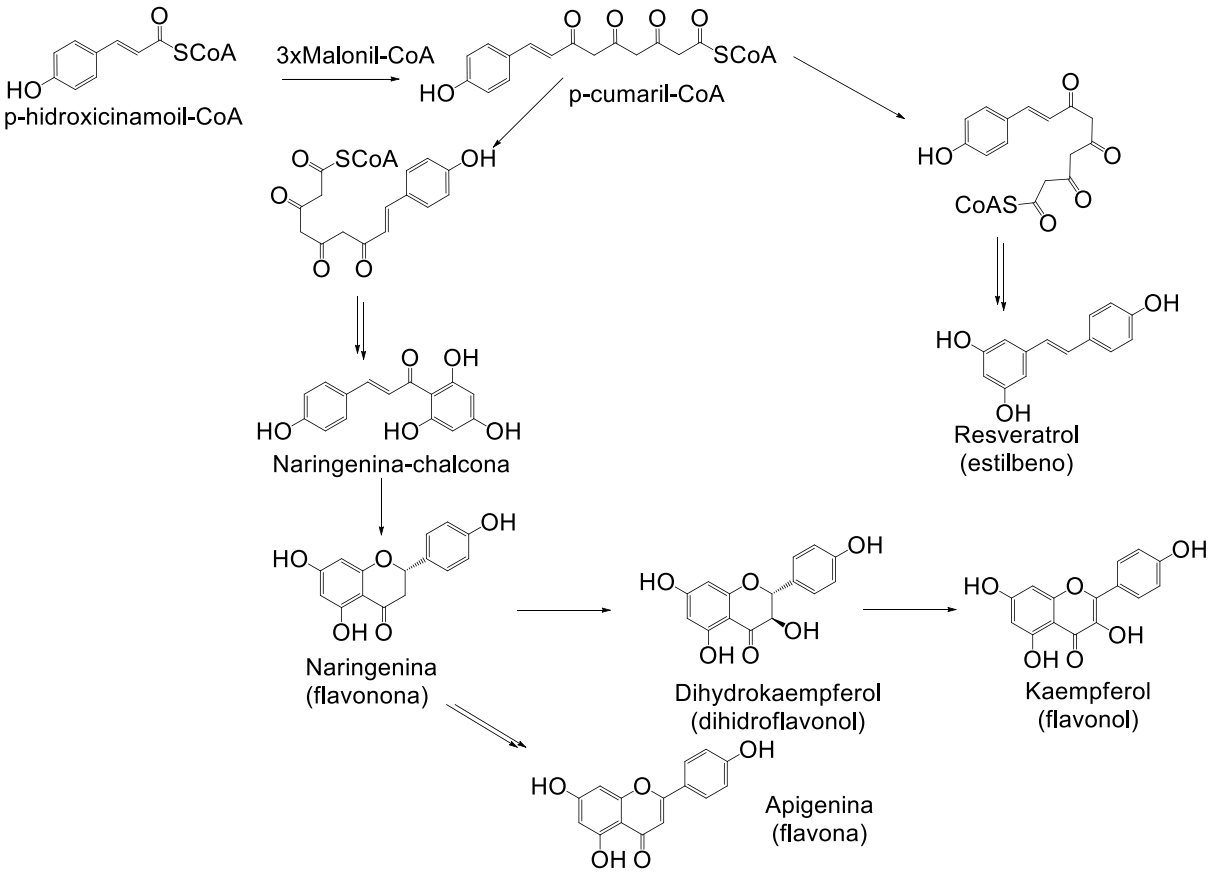
As lignanas diferem das neolignanas dado que estas últimas apresentam padrões de acoplamento alternativos entre unidades C_6C_3, não restritos ao tradicional acoplamento β-β ou β-O-4. Nas neolignanas, o acoplamento ocorre entre um monolignol e um derivado oxidado de outro monolignol, possibilitando uma maior diversidade estrutural. Essas moléculas estão associadas a propriedades biológicas relevantes, como atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e citotóxica (FOLQUITTO *et al.*, 2019)

As ligninas, por sua vez, são polímeros fenólicos complexos resultantes do acoplamento oxidativo não enzimático de radicais derivados dos monolignóis principalmente para-cumárico. Constituem o segundo polímero mais abundante da biosfera e desempenham papel estrutural fundamental na parede celular vegetal, conferindo rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbianos. Sua formação ocorre predominantemente por meio de reações de acoplamento radicalar dirigidas por peroxidases e lacases (SINGH *et al.*, 2024).

Já a biossíntese dos flavonoides, outra classe de fenólicos de grande importância, ocorre majoritariamente por meio da integração entre a via do chiquimato, responsável pela produção de aminoácidos aromáticos e a via do acetato (policetídeos) (Figura 10). Inicialmente, a fenilalanina produzida pelo chiquimato é convertida em ácido cinâmico pela ação da fenilalanina amônia-liase (PAL). Em seguida, o ácido cinâmico é hidroxilado pela cinnamato-4-hidroxilase, formando o ácido p-cumárico. Este é então ativado pela 4-cumarato-CoA ligase, originando o p-cumaril-CoA, (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

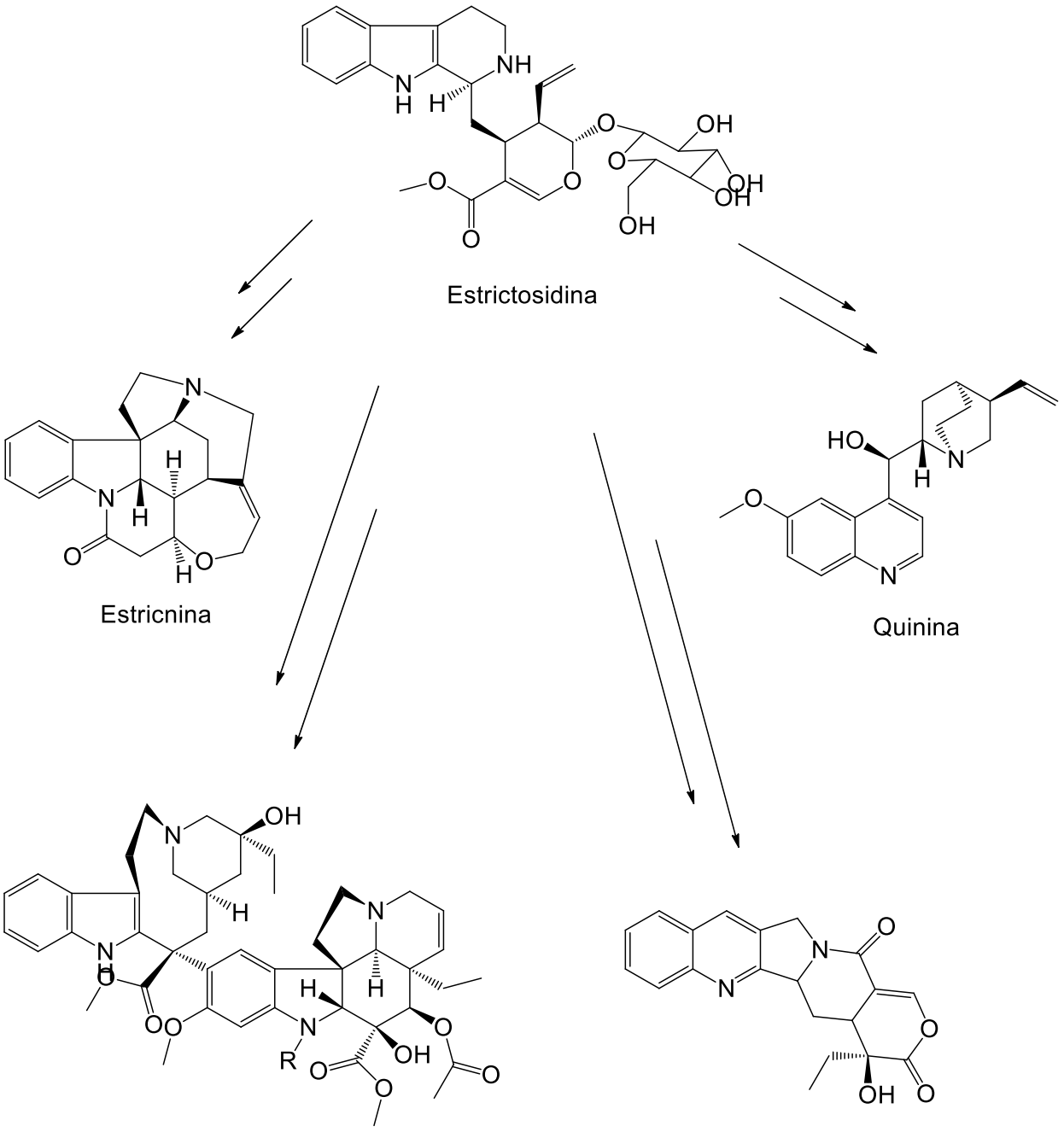
Assim, o *p*-cumaril-CoA condensa-se com três unidades de malonil-CoA por ação da chalcona sintase, formando a naringenina-chalcona. A conversão da chalcona em flavanona é catalisada pela chalcona isomerase, gerando compostos como a naringenina, a partir da qual diversas ramificações metabólicas são estabelecidas. A modificação estrutural posterior ocorre por meio de enzimas de hidroxilação, metilação, acilação e glicosilação, resultando na grande diversidade de flavonoides (Figura 10) encontrada nos vegetais (MAO; LUO; CAI, Z., 2025).

Figura 10. Formação dos flavonoides



Ainda a partir da via do chiquimato, mas agora a partir de processos de descarboxilação e não desaminação, têm-se a biossíntese dos alcaloides aromáticos. Sobretudo para espécies de *Aspidosperma*, destaca-se os alcaloides indólicos. A biossíntese dos alcaloides indólicos monoterpênicos inicia-se a partir da condensação de dois precursores principais: o núcleo indólico proveniente do triptofano e o esqueleto monoterpênico derivado da secologanina (Figura 8). A reação fundamental que integra essas duas unidades é catalisada pela strictosidina sintase, formando a estrictosidina, considerada o ponto central de toda a via biossintética (Figura 11)(ZHANG, M. *et al.*, 2025). A partir desse intermediário universal, diversos rearranjos, oxidações, glicosilações e ciclizações promovem a diversidade estrutural característica desses metabólitos especializados.

Figura 11. Estrictosidina como precursor de diferentes alcaloides bioativos.

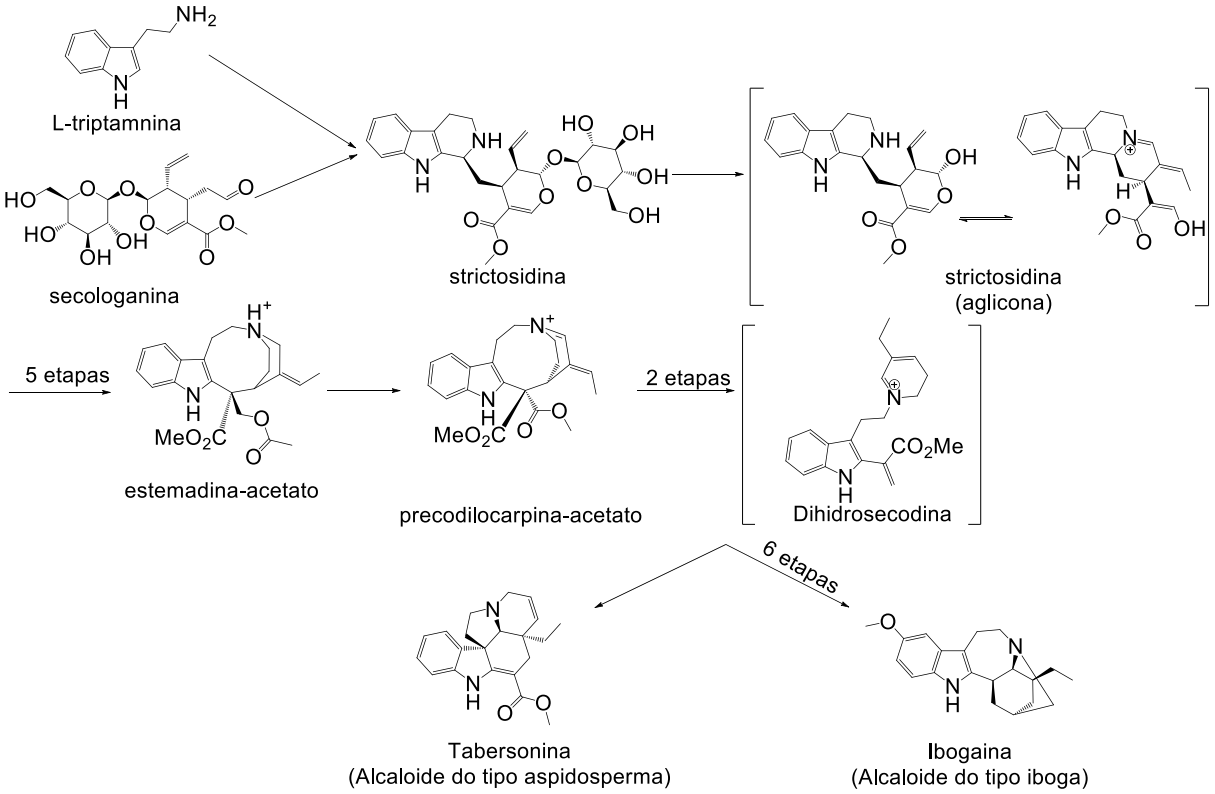


No caso específico dos alcaloides do tipo Aspidosperma, sua formação envolve, inicialmente, a desglicosilação da estrictosidina, seguida da geração do intermediário estrictosidina aglicona, altamente reativo. Rearranjos intramoleculares guiados por enzimas específicas promovem a formação do esqueleto aspidospérmico, caracterizado por uma estrutura pentacíclica complexa (Figura 12). As etapas após a ciclização incluem oxidações, reduções e modificações de grupos funcionais que

originam alcaloides como tabersonina (Figura 12). Essas transformações são altamente controladas e específicas de cada espécie vegetal, o que explica a variedade química encontrada dentro da subclasse. (LI et al., 2021; YANG; MATSUDA, 2022).

Já os alcaloides da classe iboga derivam de rotas biossintéticas que, embora também iniciadas pela estrictosidina, seguem caminhos enzimáticos distintos. Após a formação da aglicona, ocorre uma ciclização específica que conduz à formação do esqueleto ibogano, marcado por uma fusão rígida de anéis e pela presença comum de substituintes metoxilados ou hidroxilados. Alcaloides como ibogaína (Figura 12) derivam de etapas adicionais de oxidação e metilação (KUTTAN et al., 2020). Estudos recentes têm elucidado enzimas-chave responsáveis pelos rearranjos estruturais únicos dessa rota, reforçando seu potencial biotecnológico para a produção sustentável desses metabólitos.

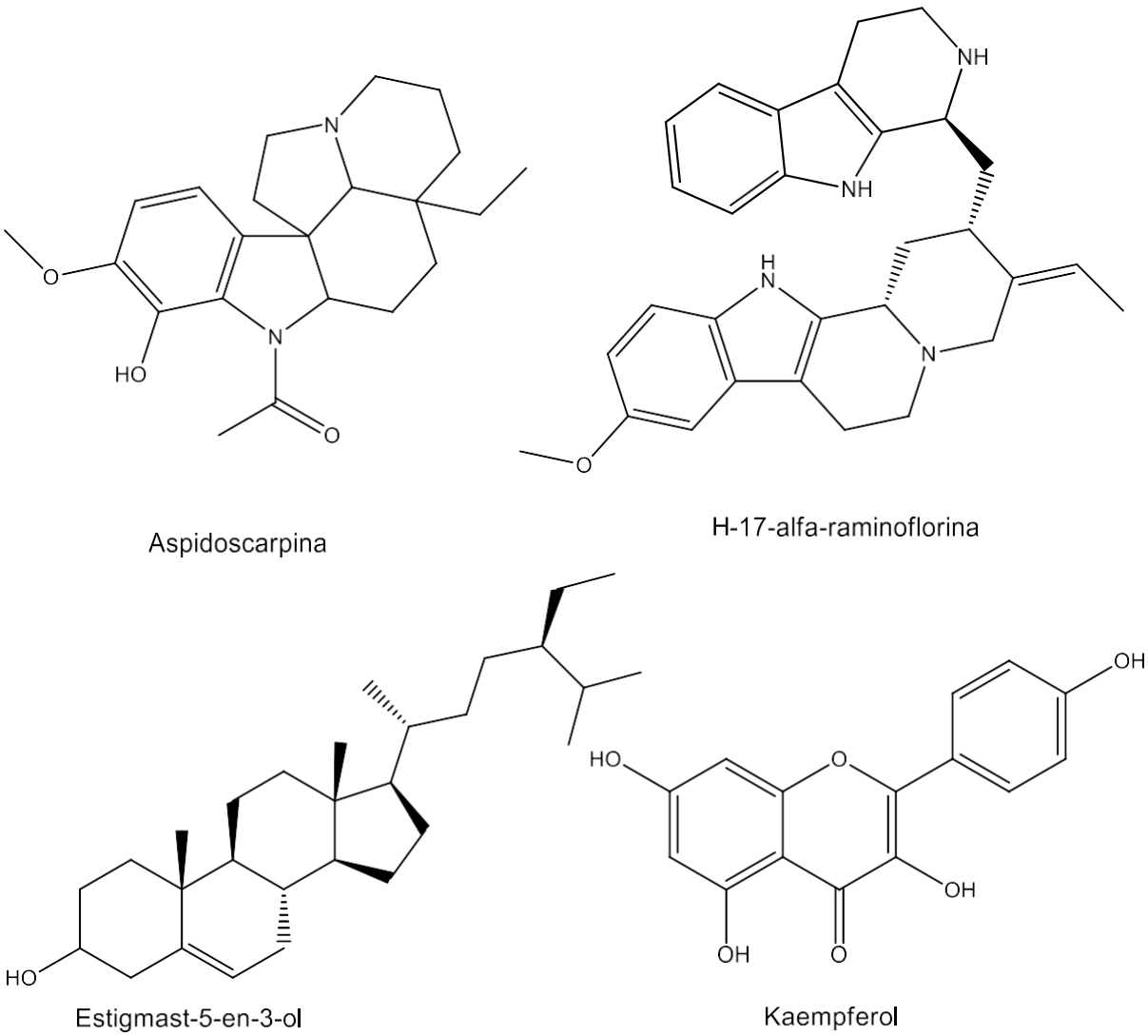
Figura 12. Formação dos alcaloides do tipo aspidosperma e iboga.



Neste contexto, diversos estudos têm demonstrado o potencial terapêutico de compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides presentes em diferentes espécies do gênero *Aspidosperma*. Entre esses metabólitos, destaca-se a aspidoscarpina, descrita como portadora de atividade antiprozotoária, bem como o alcaloide H-17-α-

ramoniflorina, cuja ação anti-*Leishmania* foi reportada em investigações recentes. Além disso, outras substâncias, como o kaempferol e o estigmast-5-en-3-ol, têm sido identificadas como agentes capazes de modular a frequência dos batimentos cardíacos, ampliando o espectro de aplicações farmacológicas atribuídas a esse grupo de plantas. (Figura 13).

Figura 13. Compostos identificados no gênero *Aspidosperma* com atividade biológica



2.2 Métodos de caracterização e análise fitoquímica

A complexidade da matriz vegetal exige o emprego de técnicas analíticas de alta resolução para a separação e identificação dos compostos presentes nos extratos obtidos.

2.2.1 **A importância da espectrofotometria UV-VIS na prospecção de extratos vegetais**

A prospecção fitoquímica de extratos vegetais constitui uma etapa essencial na investigação de compostos bioativos presentes em matrizes naturais, permitindo direcionar estudos posteriores de isolamento, identificação estrutural e avaliação biológica. Esse processo visa compreender a diversidade metabólica das espécies, sendo particularmente relevante em pesquisas farmacológicas, químicas e biotecnológicas (CORREIA *et al.*, 2023). De fato, etapas como a quantificação de metabólitos secundários representa uma etapa determinante para relacionar a composição química de um extrato com seus potenciais efeitos biológicos, contribuindo para a seleção de espécies promissoras e para o avanço da química de produtos naturais.

Nesse sentido, a espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) destaca-se como uma técnica analítica amplamente empregada em estudos fitoquímicos, especialmente por sua simplicidade operacional, rapidez e baixo custo. Diferentemente de métodos cromatográficos mais complexos, a espectrofotometria UV-VIS permite análises eficientes mesmo em laboratórios com infraestrutura limitada, oferecendo sensibilidade adequada para diversas classes de metabólitos (SILVA, et al., 2009). Por essas razões, a técnica permanece como ferramenta de rotina em pesquisas envolvendo triagem química preliminar e quantificações globais.

A aplicabilidade da espectrofotometria UV-VIS está diretamente relacionada à presença de grupos cromóforos nas estruturas moleculares dos compostos, os quais são capazes de absorver radiação em comprimentos de onda específicos. Assim, classes de metabólitos como fenóis totais, flavonoides, taninos e alcaloides apresentam perfis espectrais característicos que possibilitam sua determinação quantitativa por meio de metodologias padronizadas (MERA; FALCONÍ; CÓRDOVA, 2019). Essa característica torna o método especialmente útil para análises comparativas entre extratos, monitoramento de processos de extração e avaliação da influência de parâmetros experimentais sobre a composição química.

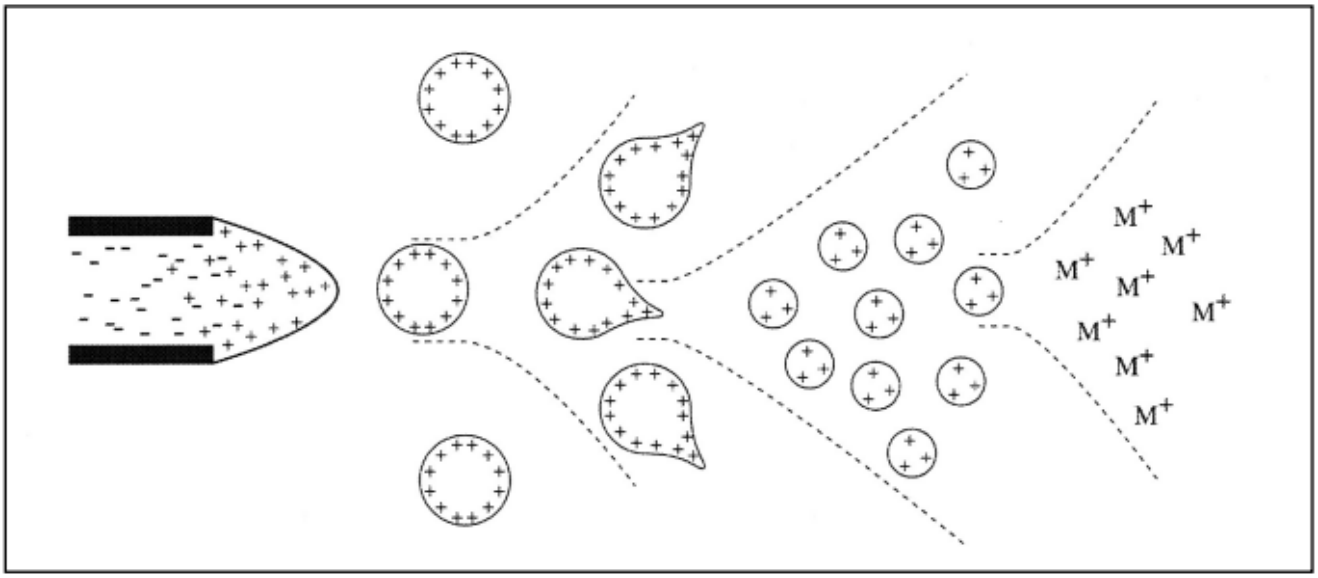
Além disso, a espectrofotometria UV-VIS desempenha papel estratégico na prospecção de extratos vegetais por permitir a realização de ensaios rápidos que auxiliam na tomada de decisões sobre quais amostras seguirão para etapas analíticas mais sofisticadas. A combinação de eficiência, acessibilidade e aplicabilidade a diversas classes de substâncias contribui para que a técnica permaneça como uma das

principais ferramentas na triagem química em produtos naturais, integrando-se de maneira consistente aos protocolos modernos de investigação fitoquímica (SANTOS, G. R. 2022).

2.2.2 Espectrometria de massas (HRMS-ESI)

O ESI utiliza energia para transferir íons para a amostra em fase gasosa antes de ir para o detector. A transferência de espécies iônicas acontece em três etapas: dispersão de um pequeno fio de gotículas carregadas, epavoração do solvente e ejeção de íons nas gotículas carregadas. (HO, 2003) (Figura 14).

Figura 14. Mecanismo de ionização por eletronspray



Um spray de gotículas altamente carregadas com a mesma polaridade do capilar de ionização é gerado e a amostra em forma de spray é carregada por um gás inerte, como por exemplo o N_2. As gotículas carregadas passam por um gradiente dede pressão e de potencial elétrico até chegar ao detector.

A espectrometria de massas de alta resolução (*HRMS*), especialmente quando acoplada à ionização por electrospray (ESI), é uma das principais ferramentas analíticas para a prospecção rápida de metabólitos em extratos complexos. Quando utilizada no modo de injeção direta, a amostra é introduzida diretamente no espectrômetro sem passar por separação cromatográfica prévia. Essa abordagem reduz significativamente o tempo de análise e permite um alto rendimento amostral, sendo

particularmente útil em estudos metabolômicos de triagem e caracterização preliminar de compostos bioativos (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

A ausência de etapa cromatográfica, contudo, torna essencial a escolha adequada do modo de ionização, visto que a eficiência da formação de íons depende diretamente da capacidade da molécula em aceitar ou doar prótons. Assim, o modo ESI deve ser selecionado de acordo com a natureza química dos analitos, fator que influencia não apenas a formação dos íons moleculares, mas também o padrão de fragmentação observado no espectro de massas (LIIGAND, P. *et al.*, 2017).

No modo positivo (ESI-POS), são favorecidos compostos com caráter básico ou que possuem maior facilidade em receber prótons. Alcaloides e diversos metabólitos com pares de elétrons disponíveis apresentam excelente resposta nessa condição, devido à sua tendência natural à protonação. Dessa forma, extratos contendo bases orgânicas, como alcaloides do tipo indólico ou isoquinolínico, apresentam espectros limpos e fragmentações consistentes no modo positivo, o que facilita a elucidação estrutural (NARDIN,2018).

Além dos alcaloides, outros grupos químicos também apresentam boa ionização em ESI-POS, como determinados fenóis e terpenos oxigenados. Embora nem todos esses compostos apresentem caráter básico pronunciado, muitos possuem sítios protonáveis suficientes para garantir intensidades de sinal adequadas. Essa versatilidade faz com que o modo positivo seja amplamente empregado em estudos de produtos naturais e análises de metabólitos secundários (ALVAREZ-RIVERA 2019).

O modo negativo (ESI-NEG), por sua vez, é indicado para compostos que apresentam maior propensão à desprotonação, geralmente moléculas com caráter ácido. Flavonoides, ácidos fenólicos, taninos e outros metabólitos polifenólicos são exemplos clássicos de analitos que exibem excelente resposta nesse modo. A presença de grupos hidroxila fenólicos e carbonilas conjugadas favorece a perda de prótons, permitindo espectros altamente reprodutíveis e padrões de fragmentação característicos (ORACZ; ŻYŻELEWICZ; PACHOLCZYK-SIENICKA, 2022).

Dessa forma, análises HRMS podem acelerar de maneira significativa o processo fitoquímico, uma vez que indicam em amostras complexas a composição do analito, deixando a cargo do pesquisador a decisão de realizar um fracionamento cromatográfico de acordo com o interesse nos metabólicos previamente identificados. De

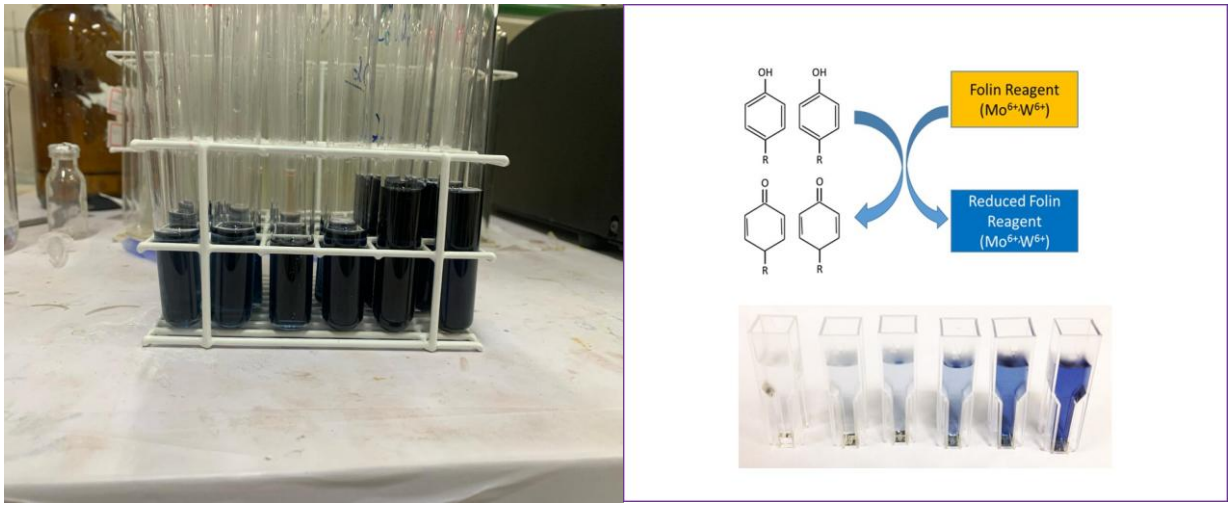
fato, sabe-se que o processo de fracionamento fitoquímico é oneroso, requerendo várias etapas, levando muitas vezes à compostos fitoquímicos de não interesse.

2.3 Atividades biológicas e antioxidante

Alterações redox desempenham papel fundamental na fisiopatologia de diversas doenças crônicas e degenerativas, incluindo câncer, distúrbios cardiovasculares e inflamação persistente. Nesse contexto, compostos antioxidantes atuam na neutralização de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, na quelação de metais de transição e na interrupção de reações de propagação radicalar, preservando estruturas biológicas como lipídeos, proteínas e DNA. Assim, a avaliação da atividade antioxidante de matrizes complexas como extratos fitoquímicos permite inferir sua capacidade de modular processos oxidativos, contribuindo para a compreensão de seu valor farmacológico. Métodos espectrofotométricos amplamente utilizados, como Folin–Ciocalteu, PFRAP e DPPH•, fornecem abordagens complementares para essa caracterização.

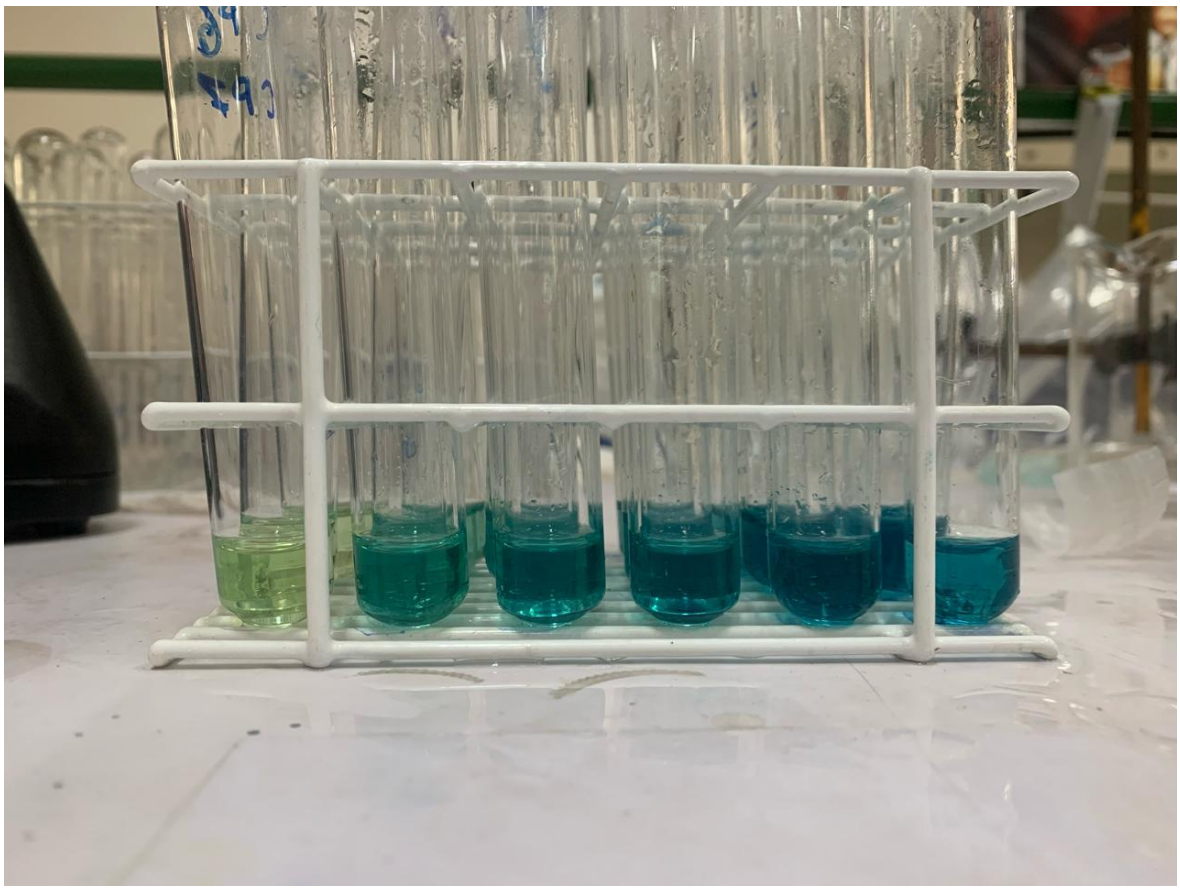
O método Folin–Ciocalteu é uma das principais estratégias para quantificar fenólicos em extratos vegetais onde seu princípio consiste na redução dos complexos fosfomolibdato e fosfotungstato por compostos fenólicos. Dessa forma, o mecanismo é baseado em transferência eletrônica, na qual moléculas antioxidantes doam elétrons ao reagente, reduzindo os íons metálicos e produzindo um complexo azul (Figura 15).

Figura 15. Complexo formado do reagente Folin com ácido tânico



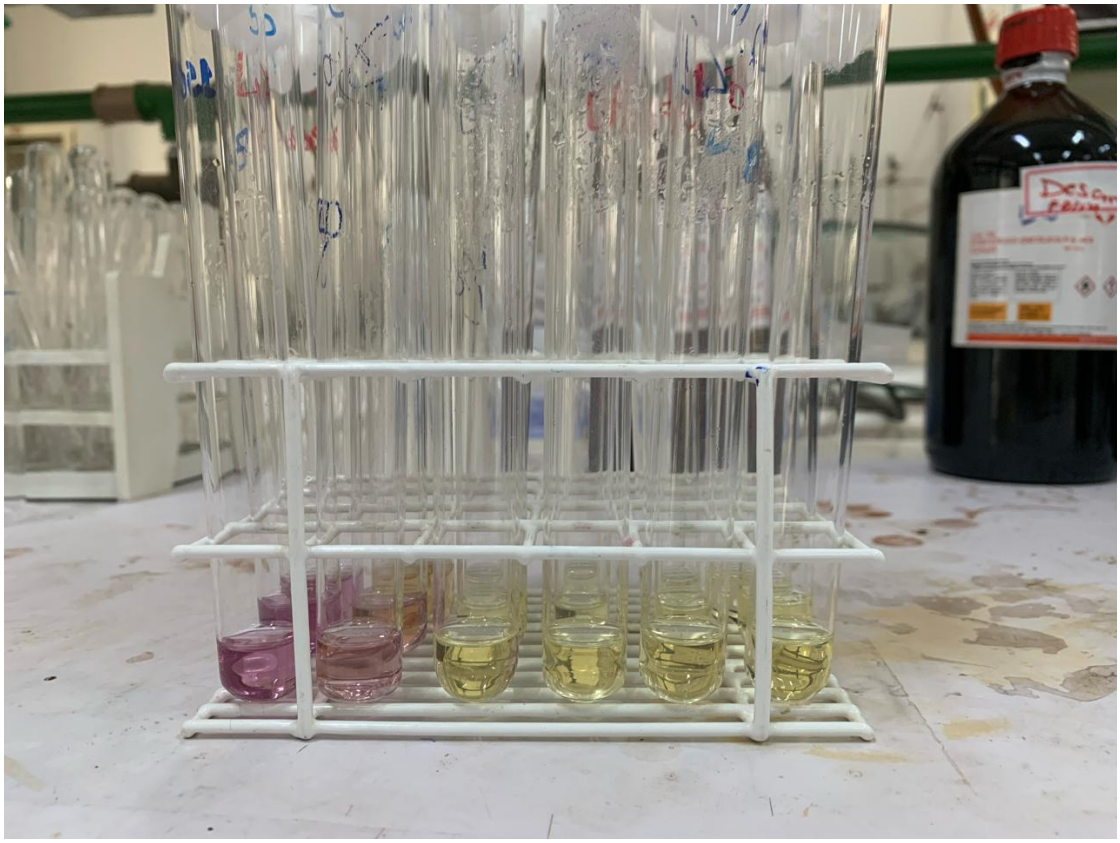
Já os ensaios antioxidantes apresentam-se variados, com diferenças significativas de mecanismo de atividade, como mecanismo de transferência de átomos de Hidrogênio e de transferências de elétrons. De fato, os mecanismos de neutralização podem ocorrer por diferentes vias: HAT (Hydrogen Atom Transfer), SET (Single Electron Transfer), SET-PT (Single Electron Transfer–Proton Transfer) e SPLET (Sequential Proton Loss–Electron Transfer), dependendo da natureza dos grupos funcionais do antioxidante e da polaridade do meio reacional. Assim, o ensaio PFRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) baseia-se na redução do complexo Fe^{3+}–TPTZ para Fe^{2+}–TPTZ. Esse processo ocorre principalmente via mecanismos transferência de elétrons (SET), podendo envolver transferências acopladas de prótons em moléculas estabilizadas por conjugação (NASCIMENTO, M. S. DO *et al.*, 2019). A intensidade da coloração azul formada (Figura 16) é proporcional ao poder redutor dos compostos presentes, incluindo fenólicos, alcaloides e outros metabólitos com capacidade antioxidante.

Figura 16. Variação da absorção dos extratos a partir da redução do complexo Fe^{3+}–TPTZ para Fe^{2+}–TPTZ



Por sua vez, o ensaio DPPH• fundamenta-se na neutralização do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. Nesse mecanismo, o DPPH• é convertido em sua forma reduzida (DPPH-H), resultando em redução da absorbância característica do radical, saindo do roxo e indo para o amarelo (Figura 17).

Figura 17. Queda da absorbância do DPPH• na presença do ácido tânico.



3. Justificativa

O potencial farmacológico da *A. spruceanum* é fortemente associado por estudos nos quais correlacionam os alcaloides presentes em seus extratos com atividades biológicas, validando assim o uso tradicional da planta (PEREIRA, A. G. *et al.*, 2023).A atividade antiparasitária é a mais comum na pesquisa farmacológica desta planta, mostrando alta atividade *in vitro* contra a *Leishimania amazonensis* e o *Plasmodium falciparum* (malária), nos quais os alcaloides aspidofilina e aspidospermidina demonstraram um significativo efeito (DOLABELA *et al.*, 2015).

Além do potencial contra parasitas, outro alcaloide como aspidocarpina demonstra um alto potencial anti-hipertensivo. Estudos em ratos mostraram que esse alcaloide é capaz de reduzir a pressão arterial, sugerindo um mecanismo de ação que pode envolver a modulação do sistema nervoso autônomo ou a vasodilatação .(MONTEIRO. et al., 2022). Outros potenciais biológicos aferidos a partir de estudos realizados com extratos obtidos da *A. spruceanum* foram atividade antitumoral (SANTOS, et al., 2021) e atividade antioxidante (GAN *et al.*, 2017).

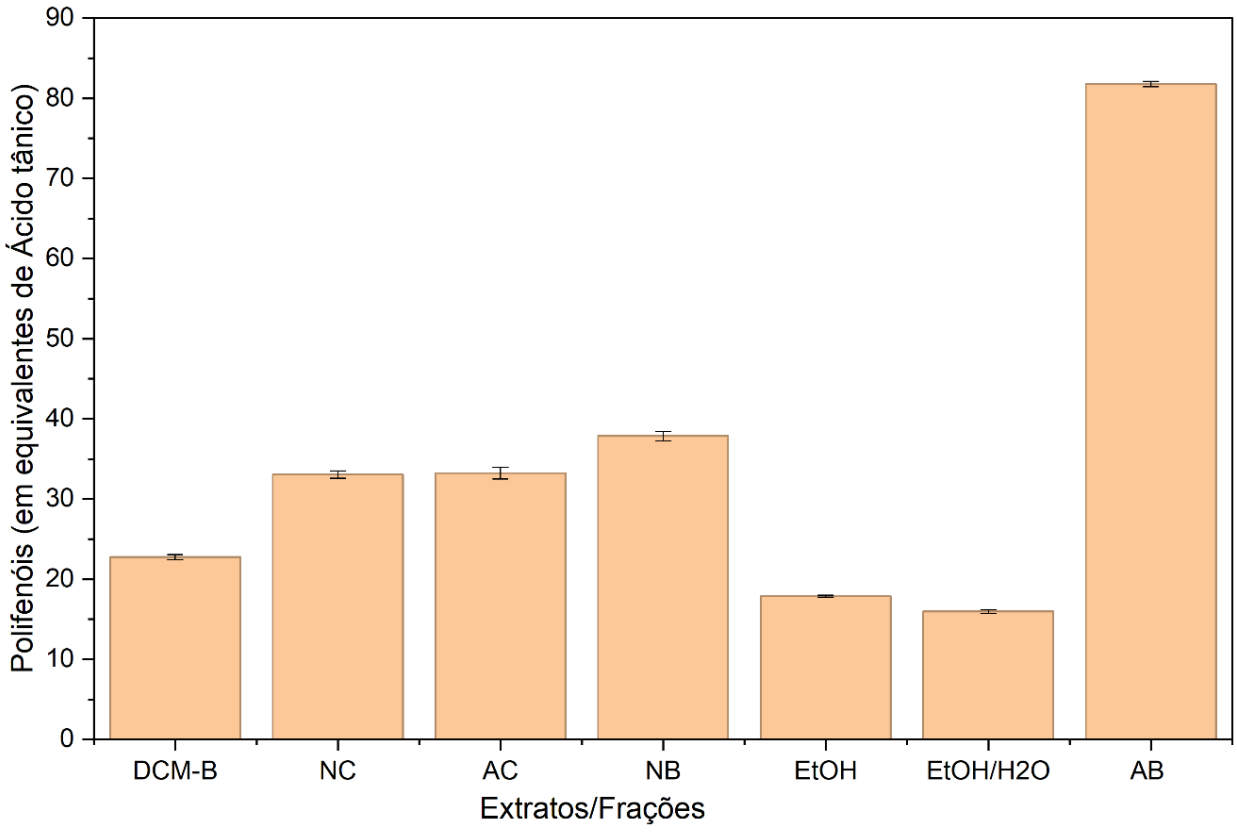
No trabalho realizado na disciplina Técnicas de Pesquisa 2, foi realizado quantificações de fenólicos totais e dois ensaios antioxidante de sete extrações diferentes da casca da *A. spruceanum.* (Tabela 1).

Tabela 1. Métodos de extração e seus respectivos códigos

Tipo de extração	Código
Extração por percolação realizada com diclorometano	DCM
Extração por percolação realizada com etanol	EtOH
Extração por percolação realizada com 70% etanol e 30% água	EtOH/H_2O
Extração por percolação com ácido sulfúrico e a fração orgânica solubilizada com diclorometano	NC
Extração por percolação com ácido sulfúrico, basificado com hidróxido de amônio e a fração orgânica solubilizada com diclorometano	AC
Extração por percolação com hidróxido de amônio e a fração orgânica solubilizada com diclorometano	NB
Extração por percolação com hidróxido de amônio, acidificado com ácido sulfúrico, e a fração orgânica solubilizada com diclorometano	AB

Na qual detectada a presença de uma grande quantidade de fenólicos no extrato alcaloídico intitulado AB (Figura 18), fato até então não era esperado, uma vez que o processo extrativo básico-ácido visou o enriquecimento em alcaloides de *A. spruceanum,* sobretudo na estrutura básica dos alcaloides do tipo aspidosperma (Figura 12). Importante ressaltar que o extrato AC, que apresentou teor de fenólicos significativamente menor do que em AB, também foi obtido por processo extrativo visando enriquecimento em alcaloides, através de marcha fitoquímica ácido-base. Assim, a diferença no processo extrativo de AB e AC foi a ordem da adição de ácido e base nas drogas vegetais das cascas de *A. spruceanum*.

Figura 18. Quantificação de polifenóis em diferentes extratos das cascas de *A. spruceanum*.



A partir dessa observação, foi realizado também os ensaios antioxidantes PFRAP (Figura 19) e DPPH• (Figura 20) dos diferentes extratos de A. spruceanum, objetivando avaliar o potencial antioxidante dos extratos, sobretudo, aqueles frutos de marcha fitoquímica ácido-base (extratos AB e AC). Assim, observou-se que o extrato

AB, com maior teor de fenólicos, obteve também maior potencial em dois mecanismos antioxidantes destintos, corroborando com o caráter dos polifenóis em ser um agente redutor.

Figura 19. Quantificação do poder redutor (PFRAP) dos diferentes extratos de *A. spruceanum*

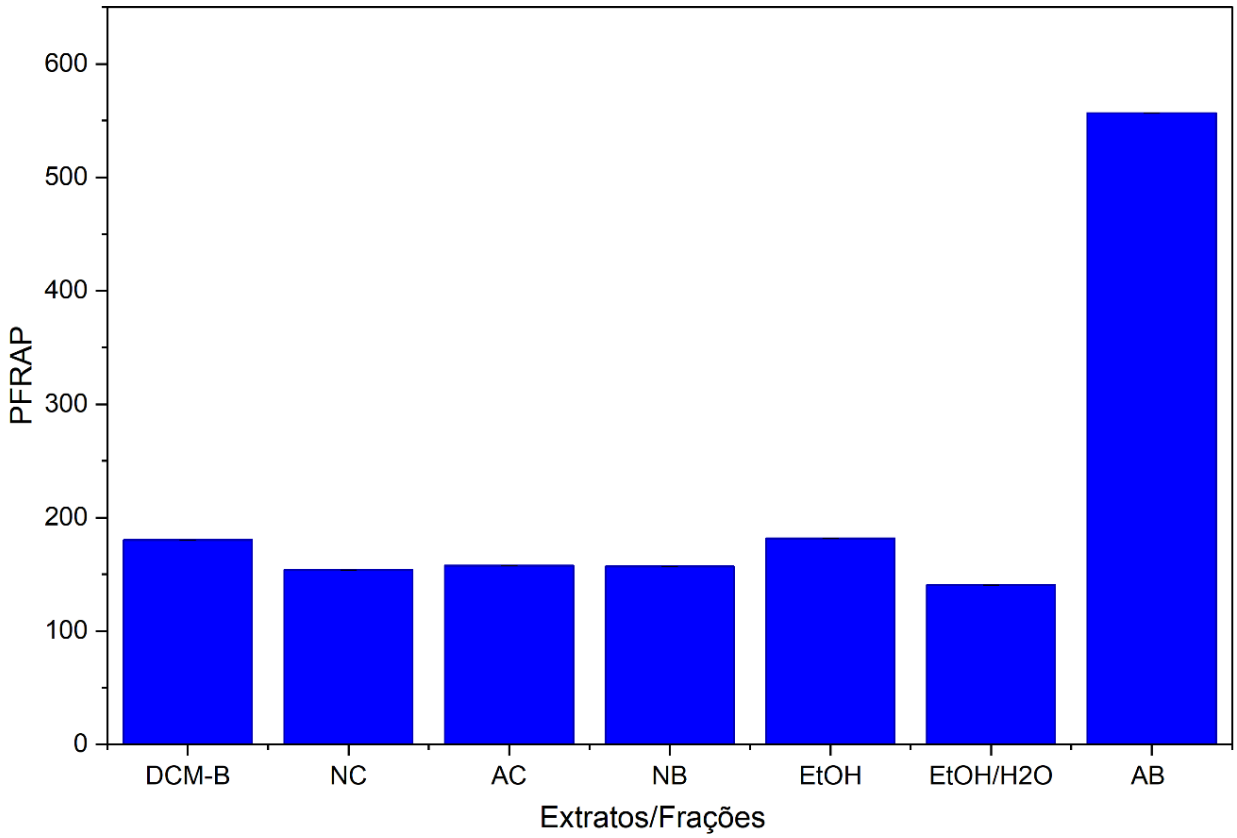
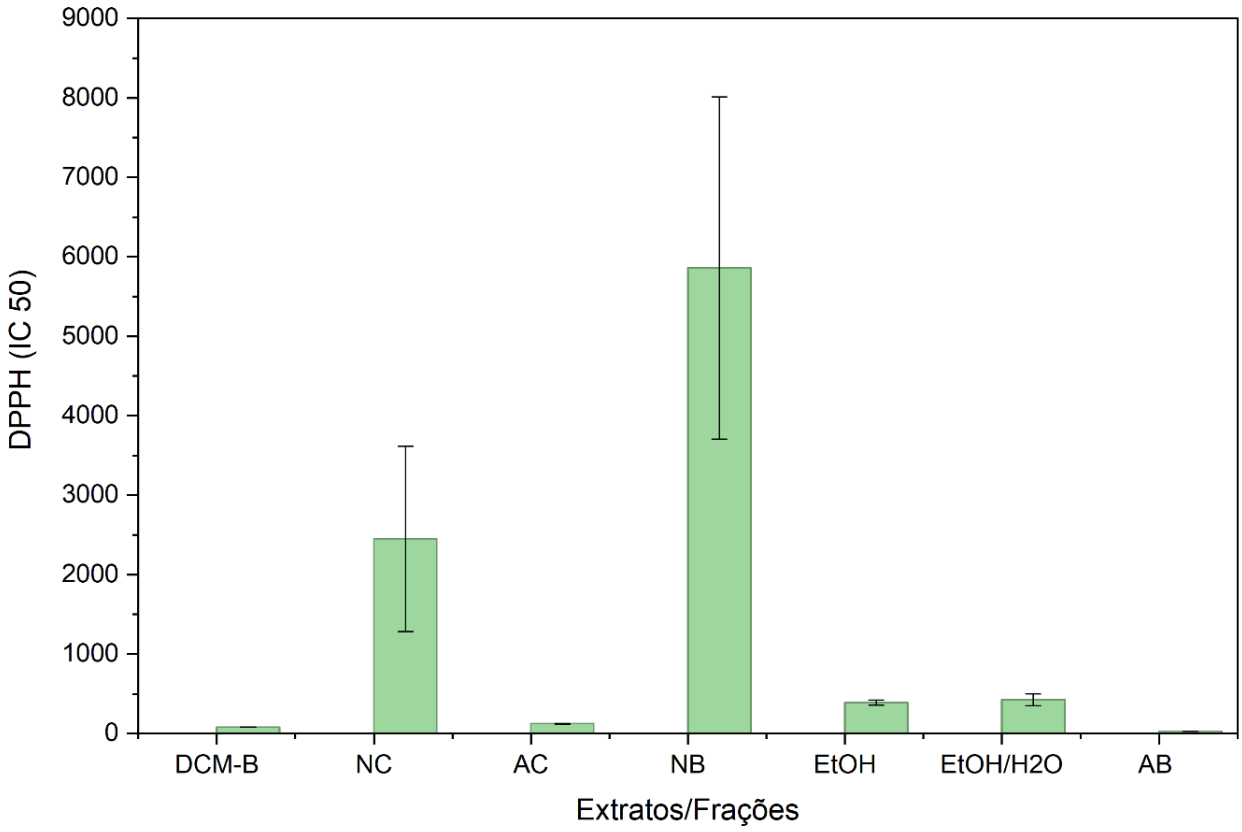


Figura 20. Cálculo do IC_{50} a partir do mecanismo DPPH• dos diferentes extratos de *A. sprucenaum.*



4. Objetivos gerais

Dado o significativo teor de compostos fenólicos e alto potencial antioxidate por diferentes métodos do extrato AB, este trabalho tem como objetivo estudar a composição fitoquímica deste extrato obtido a partir da extração ácido-base das cascas de *Aspidosperma spruceanum* realizando ampla caracterização fitoquímica por HRMS e fracionamento cromatográfico, visando isolamento de metabólitos de AB.

4.1 Objetivos específicos

- ✓ Ampla caracterização dos extratos AB, AC e etanoico da casca de A. spruceanum via análises HRMS, com ionização ESI em modo positivo e negativo;
- ✓ Análises por cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector de ultravioleta dos diferentes extratos AB, AC e etanoico;

- ✓ Fracionamento monitorado por HRMS, via colunas cromatográficas de sílica gel e resinas de sephadex LH-20 e cromatografia líquida de alta eficiência preparativa do extrato AB.

5. Resultados Esperados

Espera-se a putativa identificação dos compostos majoritários dos extratos AB, AC e etanoico, assim como o isolamento dos principais compostos de AB, que poderão posteriormente serem avaliados, em caso de isolamento, em ensaios antioxidantes e enzimáticos que se encontram disponíveis no Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica (LaQuiMeT), do Instituto de Química, onde está trabalho está em desenvolvimento.

6. Metodologia

6.1 Separação cromatográfica

6.1.1 Sephadex

A separação por sephadex foi realizada com a fração AB, onde ela foi solubilizada totalmente com aproximadamente 5 mL de metanol e levada ao banho ultrassônico por 10 minutos. Após garantir a solubilização total, a solução foi levada para centrifugação por 7 minutos à 7000 rpm para separar a parte pouco solúvel e o sobrenadante foi colocado na coluna cromatográfica.

Com uma fase móvel isocrática de 100% metanol, a solução foi colunada e no total foram coletadas 101 frações. Para reunir as frações similares foi realizado o método de cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando o revelador anisaldeído sulfúrico e ao final foi obtido 5 frações. O cálculo do rendimento obtido é correspondente a fração AB total.

Tabela 2. Massa (g) e rendimento das frações obtidas a partir da separação por Sephadex da fração AB.

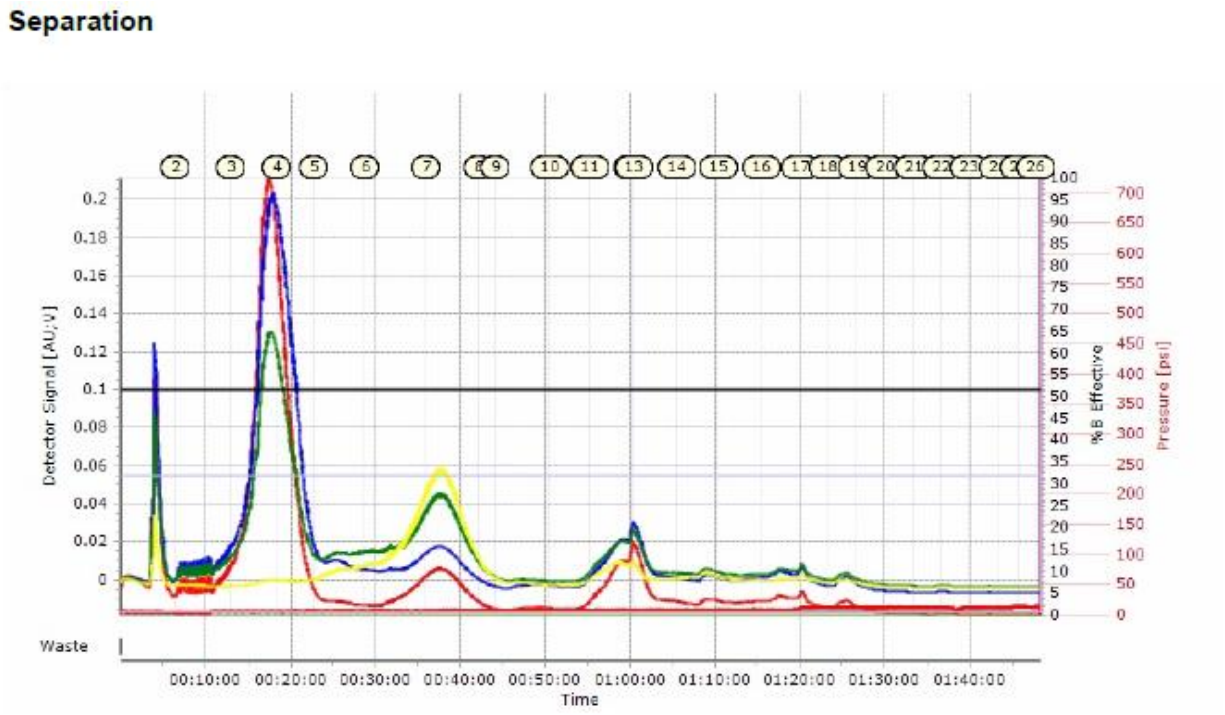
Fração	Massa obtida (mg)	Rendimento (%)
1	15,3	4,22
2	83,3	23,46
3	52,6	14,81
4	8,5	2,40
5	9,4	2,65
Precipitado	186,6	52,46

6.1.2 Separação da fração AB3 e AB4 utilizando HPLC preparativo

Após a prospecção inicial realizada por meio de HPLC-DAD, verificou-se que as frações AB3 e AB4 apresentavam perfis cromatográficos bastante semelhantes. Diante desse resultado, ambas foram encaminhadas ao sistema de HPLC preparativo do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT), com orientação do professor Omar Estrada da Faculdade de Farmácia da Universidade de Brasília (UnB), com o objetivo de aprimorar a separação de seus constituintes.

Para garantir maior resolução e evitar a coeluição dos compostos presentes nas amostras, foram selecionados quatro comprimentos de onda para monitoramento no HPLC-DAD: 254, 280, 300 e 330 nm. A escolha desses comprimentos de onda permitiu uma detecção mais abrangente e sensível dos analitos, favorecendo a identificação de picos sobrepostos e contribuindo para uma separação cromatográfica mais eficiente no sistema preparativo. Foi realizada uma corrida cromatográfica em gradiente (H_2O/ACN + 0,1% ácido fórmico) onde o gradiente variou de 85/15 a 50/50 em um tempo total de 105 minutos. Ao total foram coletadas 26 frações (Figura 21).

Figura 21. Cromatograma de separação utilizando HPLC preparativo



Ao final da corrida cromatográfica de separação foi possível separar 3 frações (Tabela 3) nas quais ambas foram corridas no HPLC-DAD em um método gradiente período de eluição linear (95% H_2O/ 5% ACN) por 5 minutos, logo em seguida foi feita uma rampa de gradiente até atingir 95% de ACN e 5% H_2O em um período de 10 minutos onde se manteve nessa proporção por mais 5 minutos e logo em seguida o gradiente voltou para a condição inicial (95% H_2O/ 5% ACN) totalizando assim o tempo de corrida em 25 minutos.

Tabela 3. Massa (g) e rendimento das frações obtidas a partir da separação por HPLC preparativo das frações AB3 e AB4.

Fração	Massa obtida (mg)	Rendimento (%)
1	15,2	24,87
2	6,6	10,80
3	7,8	12,76

6.2 Perfil cromatográfico dos extratos por cromatografia liquida de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD)

6.2.1 Preparo das amostras

Para o preparo dos extratos e frações obtidas para análise no HPLC-DAD foram pesados cerca de 5 mg de cada amostra que foram solubilizados em 1 mL de metanol grau LC-MS em frascos *Eppendorf* e após isso foram levados ao banho ultrassónico por 15 minutos. Após isso, as soluções foram centrifugadas a 7000 rpm por 7 minutos e filtradas em seguida em membranas de 22 µm.

6.2.2 Parâmetros cromatográficos

Para a obtenção dos cromatogramas no HPLC-DAD foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu LC-2050 3D, coluna de fase ver

ersa (Column Shim-pack GIST C18, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm) com fluxo de 1 mL/min e o formo da coluna se manteve a 40 °C. O volume de injeção foi 10 µL, sendo a eluição em gradiente com água e acetonitrila (ACN) ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico.

Os parâmetros cromatográficos compreenderam período de eluição linear (95% H_2O/ 5% ACN) por 5 minutos, logo em seguida foi feita uma rampa de gradiente até atingir 95% de ACN e 5% H_2O em um período de 30 minutos onde se manteve nessa proporção por mais 5 minutos e logo em seguida o gradiente voltou para a condição inicial (95% H_2O/ 5% ACN) totalizando assim o tempo de corrida em 45 minutos. Todos os cromatogramas foram registados em 280 nm.

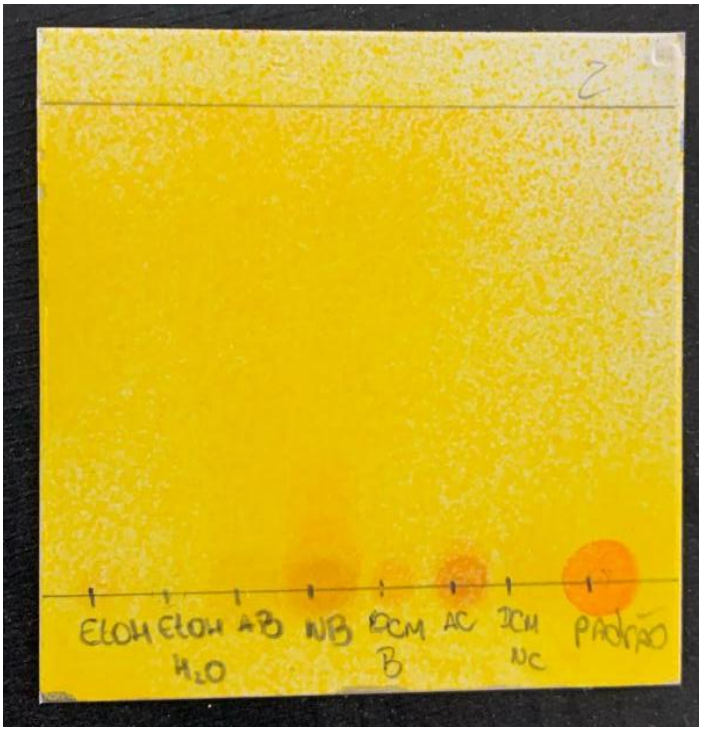
6.3 Obtenção dos espectros de massas por ESI-MS/MS

As amostras foram solubilizadas em metanol grau LC-MS e em seguida injetadas em um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC) de modelo Agilent 1260 Infinity II acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Q-TOF de modelo AB Sciex TripleTOF 5600+. A corrida no HPLC foi realizada sem coluna, de modo que o HPLC é utilizado como um injetor ao HRMS. As moléculas ionizadas foram ordenadas pelo triplo quadrupolo do espectrômetro de massas. O espectrômetro de alta resolução pode ser utilizado para obtenção de informações de massa acurada (< 1 ppm) e para fragmentação de íons em modo positivo e negativo, o que possibilita a realização de análises qualitativas e quantitativas. Os resultados referentes à análise foram obtidos em arquivos de extensão .wiff, de modo que foi utilizado o software PeakView para a obtenção dos dados de MS1 e MS2.

7. Discussões e resultados

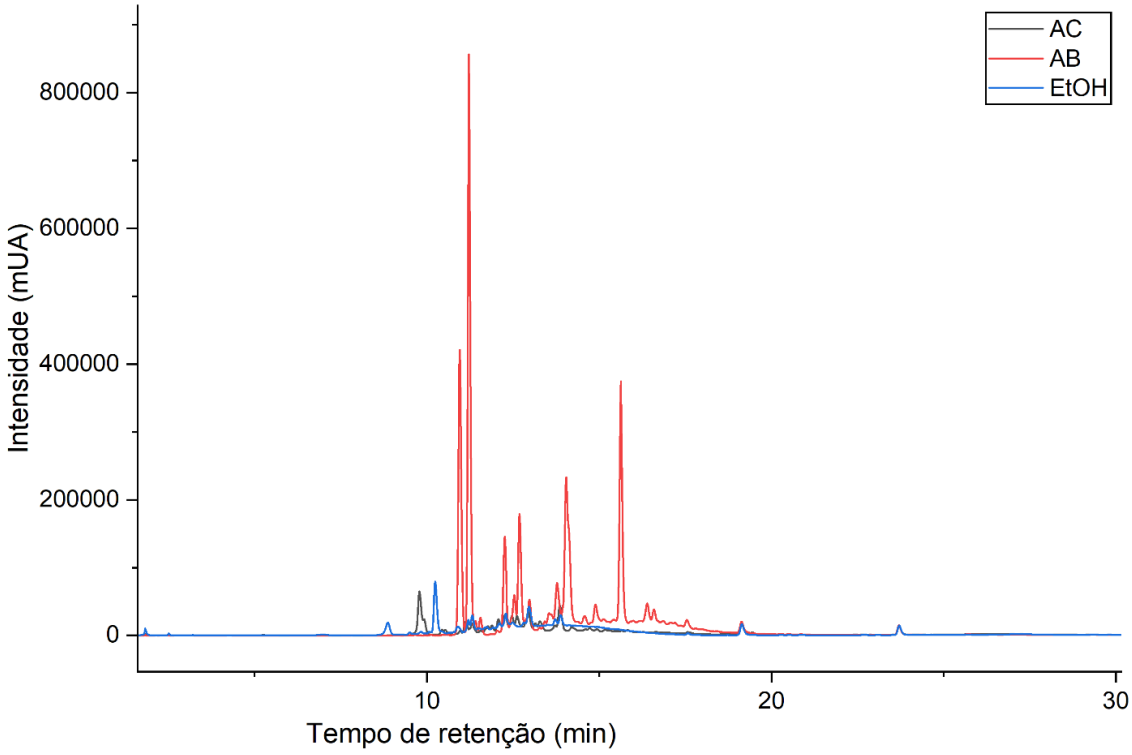
A partir da prospecção fitoquímica realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 22), foi possível identificar a presença de alcaloides nas frações **AB, AC e EtOH**, utilizando o reagente revelador de Dragendorff. Como padrão positivo, empregou-se a cloroquina, um alcaloide do tipo quinolínico, a fim de confirmar a resposta cromatográfica característica para essa classe de metabólitos secundários.

Figura 22. Cromatografia de camada delgada dos extratos/frações obtidos da casca da *Aspidosperma spruceanum* revelada com Dragendorff



Comparando os cromatogramas dos extratos **AB, AC e EtOH** (Figura 23) é possível observar a diferença dos metabólitos extraídos nesses diferentes métodos. A diferença nos perfis cromatográficos corrobora com os dados obtidos no trabalho “técnicas de pesquisa 2” onde a quantificação de fenólicos totais (Figura 18) e os ensaios antioxidante **PFRAP** (Figura 19) e **DPPH•** (Figura 20).

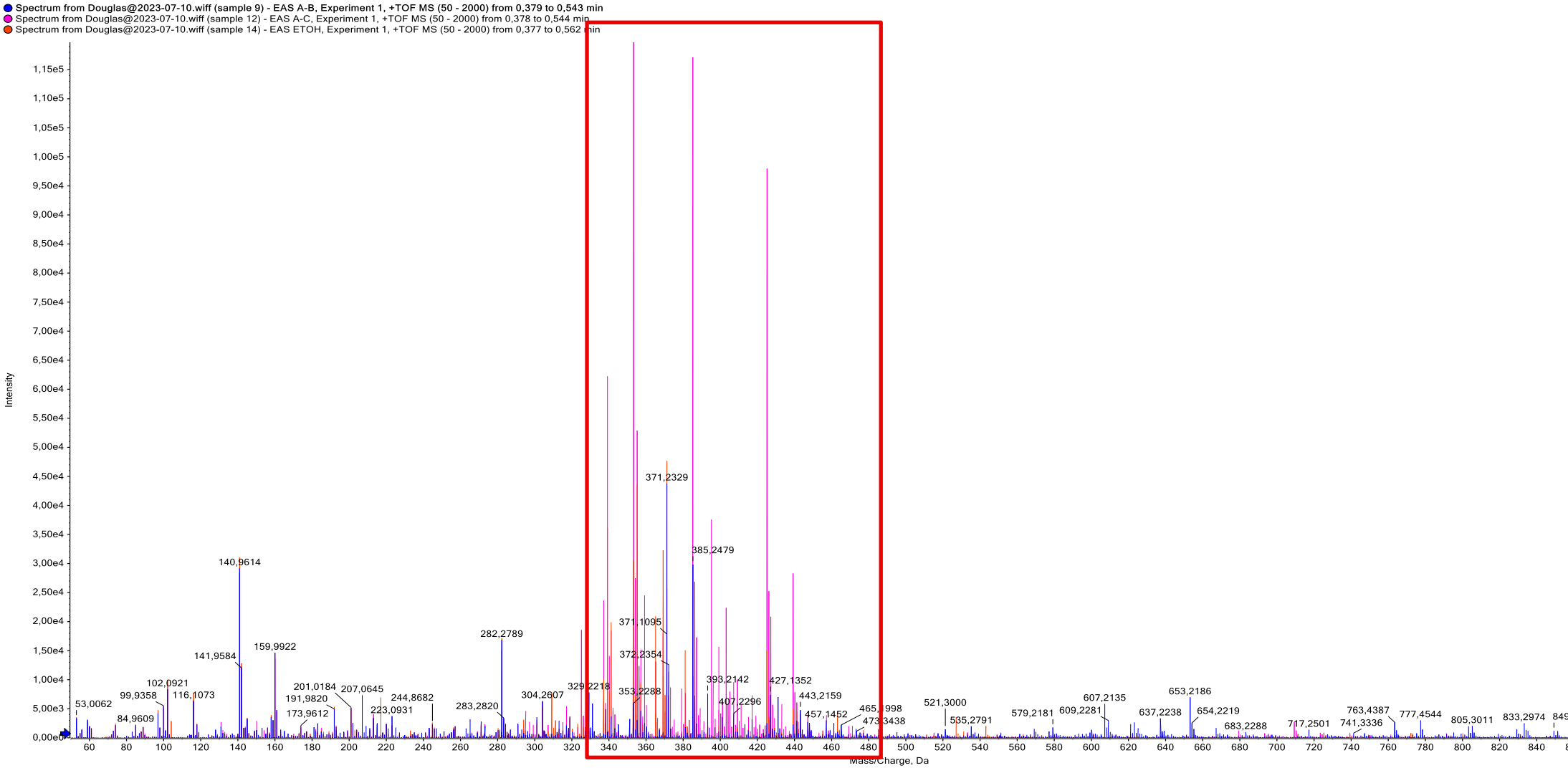
Figura 23. Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos AB, AC e EtOH



A partir da sobreposição dos espectros de massas das frações **AB, AC e EtOH** obtidos no modo positivo (Figura 24), foi possível observar um perfil químico semelhante entre as amostras analisadas, indicando a presença recorrente de metabólitos com comportamentos de ionização compatíveis. (AGUIAR *et al.*, 2010a)

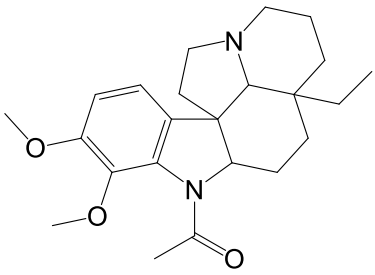
Nesse contexto, a maioria dos íons observados foi atribuída à classe dos alcaloides do tipo aspidosperma (Tabela 4), reforçando o predomínio desse grupo químico nas frações avaliadas. Esses resultados estão de acordo com a literatura, que descreve a família botânica em estudo como uma fonte expressiva desse tipo de alcaloide (BARBOSA et al., 2020).

Figura 24. Espectros no modo positivo dos extratos AB, AC e EtOH

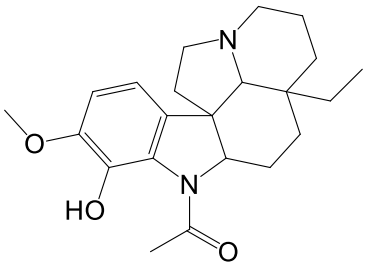


Legenda: Azul: espectro do extrato AB; Rosa: espectro do extrato AC; Vermelho: espectro do extrato EtOH. Região destacado em vermelho: Alcaloides do tipo aspidosperma identificados em ambos os extratos

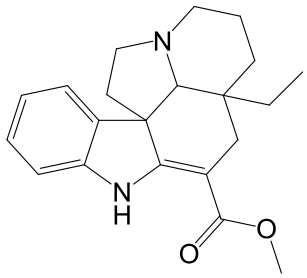
Figura 25. Alcaloides do tipo aspidosperma identificados nos extratos AB, AC e EtOH



Pirifodina



Aspidoscarpina

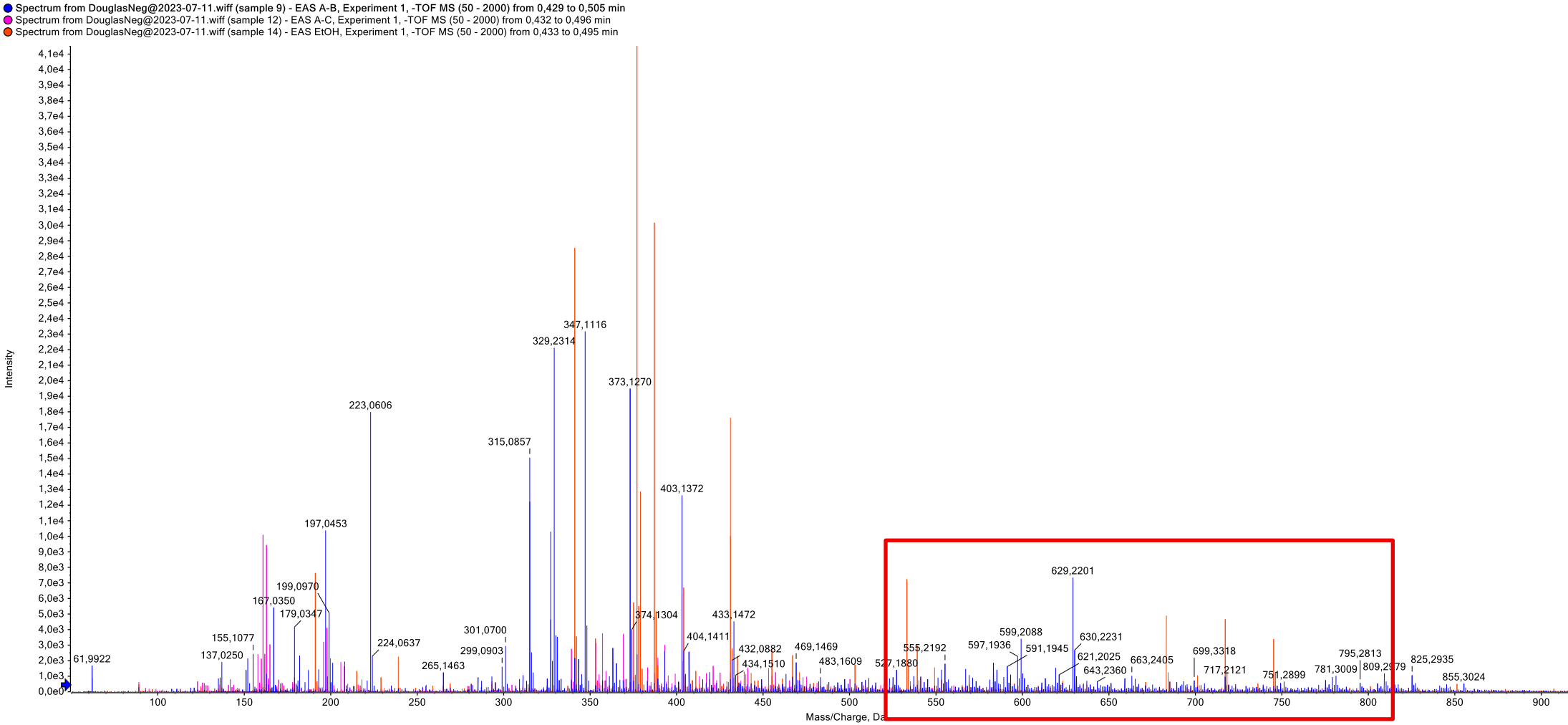


Aspidospermidina-3-ácido carboxilico, 2,3-didehidro-1-metil-, metil éster

Observando-se os espectros obtidos no modo negativo (Figura 26) dos extratos previamente mencionados, foi possível identificar, no extrato AB, a presença de lignanas (Figura 27). Esses metabólitos secundários não são descritos na literatura para a espécie *Aspidosperma spruceanum*, o que torna esse achado relevante do ponto de vista fitoquímico, indicando a possibilidade de ocorrência de compostos ainda pouco explorados nessa matriz vegetal.

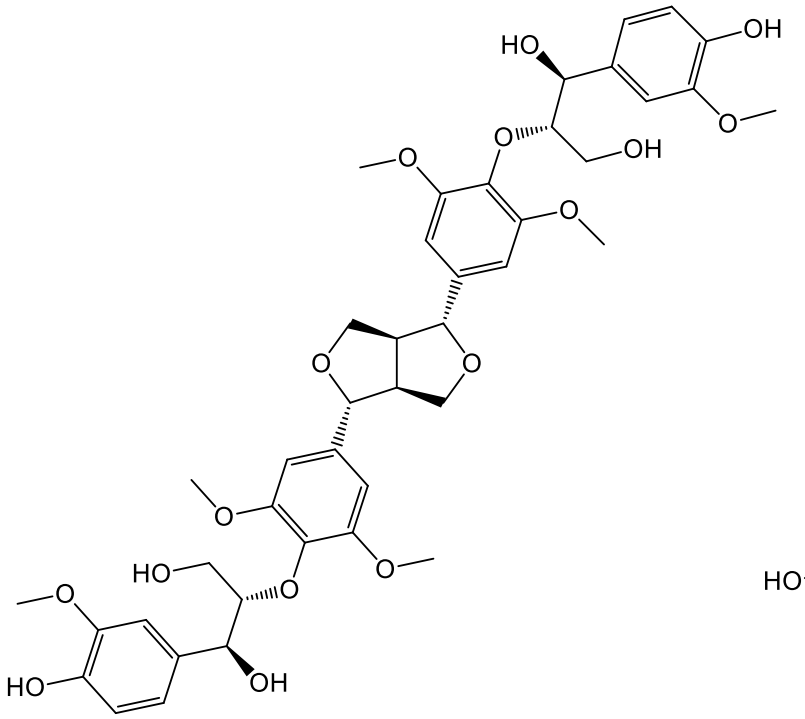
A detecção de lignanas no extrato AB corrobora os resultados relacionados à elevada concentração de fenólicos totais, previamente descrita nos resultados obtidos na disciplina de Técnicas de Pesquisa 2 (Figura 18). Tal associação reforça a consistência dos dados analíticos e sugere que o perfil fenólico observado pode estar diretamente relacionado à presença desses metabólitos, contribuindo para a compreensão do potencial químico da espécie estudada.

Figura 26. Espectros no modo negativo dos extratos AB, AC e EtOH

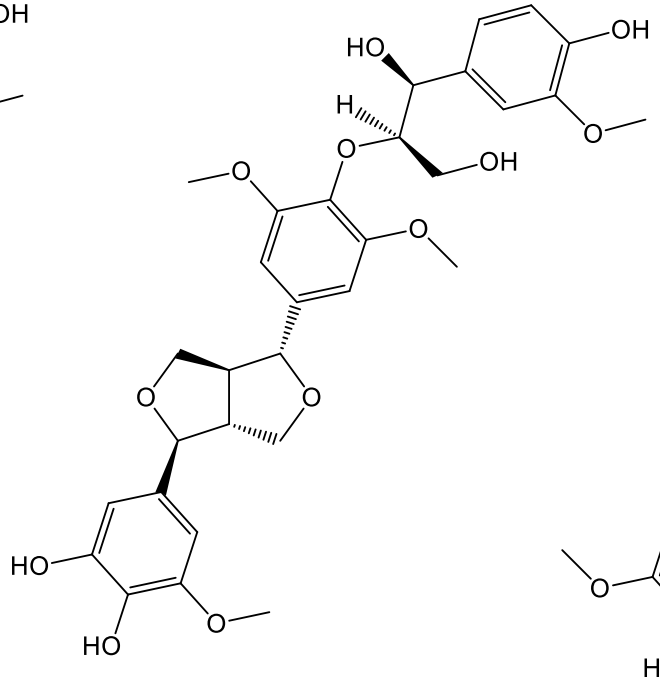


Legenda: Azul: espectro do extrato AB; Rosa: espectro do extrato AC; Vermelho: espectro do extrato EtOH. Região destacado em vermelho: Lignanas identificadas em ambos os extratos

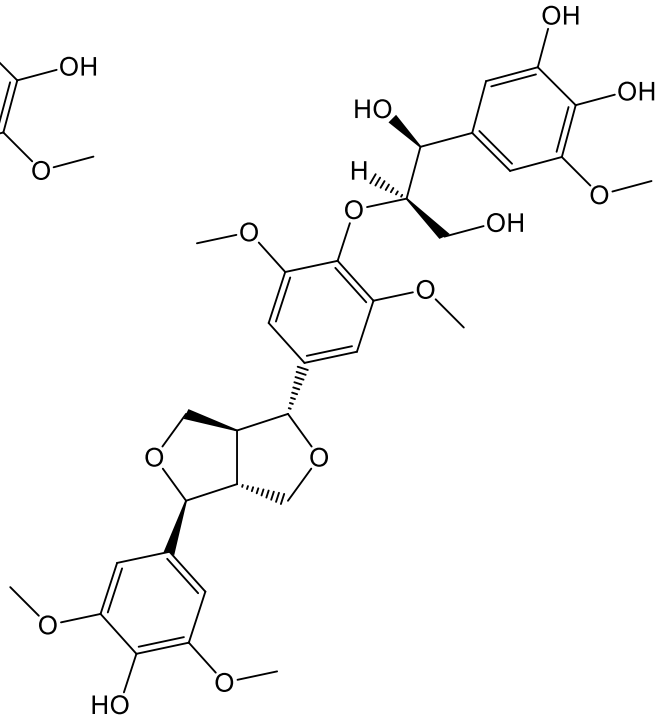
Figura 27. Lignanas identificadas no extrato **AB** da casca da *A. spruceanum*



Hedyotisol A



(1R,2S)-2-[4-[(3S,3aR,6R,6aS)-3a-hidroxi-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,4,6,6a-tetrahidro-1H-furo[3,4-c]furan-3-il]-2,6-dimetoxifenoxi]-1-(4-hydroxi-3-metoxife-nil)propano-1,3-diol



((1S,2R)-1,3-diidroxi-2-(4-((1R,3aR,4S,6aS)-4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxife-nil)hexahidrofuro[3,4-c]furano-1-il)-2,6-dimetoxifeno-xi)propil)-2-hidroxi-3-metoxifenolato

Tabela 4. Dados de massas-ESI-MS/MS dos extratos AB, AC e EtOH do caule de *Aspidosperma spruceanum*.

Molécula	*m/z* observado $[M + H]^+$ MS/MS^+	*m/z* observado $[M - H]^-$ MS/MS^-	Massa teórica exata (*m/z*)	Precisão de massa (Δ ppm)	Identificação putativa (Fórmula molecular)	Classe de metabólitos
1	385,2500$[M+H]^+$; 357,2184($[M+H]^+$-28); 329,2242($[M+H]^+$-56);301,1901($[M+H]^+$-84);**284,1639**($[M+H]^+$-101);**190,0856**($[M+H]^+$-195)178,0856($[M+H]^+$-207);164,1429($[M+H]^+$-221)	-	POS: 385.2486 NEG: -	3,6 -	Pirifolidina ($C_{23}H_{33}N_2O_3$)	Alcaloide do tipo aspidosperma
2	371,2328$[M+H]^+$;356,2086($[M+H]^+$-15);353,2217($[M+H]^+$-18);343,2009($[M+H]^+$-28);329,2219($[M+H]^+$-42);314,1982($[M+H]^+$-28-15);**284,1640**($[M+H]^+$-15-57)**190,0856**($[M+H]^+$-15-	-	POS: 371,2350 NEG: -	5,4 -	Aspidoscarpina ($C_{22}H_{30}N_2O_3$)	Alcaloide do tipo aspidosperma

	166);178,0857([M+H]⁺-15-178);164,1429([M+H]⁺-221					
3	353,2247[M+H]⁺;321,1983([M+H]⁺-32);293,2031([M+H]⁺-60);250,1599([M+H]⁺-60-29);238,1436([M+H]⁺-60-29-15);180,0821([M+H]⁺-173);	-	POS: 353.2224 NEG: -	6,5 -	Aspidospermidina-3-ácido carboxilico, 2,3-didehidro-1-metil-, metil éster ($C_{22}H_{28}N_2O_2$)	Alcaloide do tipo aspidosperma
4	-	809,3039 [M – H]⁻;565,2124[(M –H)–244];**417,1564**[(M – H) –244-15-133];372,1192[(M – H) –244-15-133-45];**195,0656** [(M – H)	POS: – NEG: 809.3026	– 1,6	Hedyotisol A ($C_{42}H_{50}O_{16}$)	Lignana

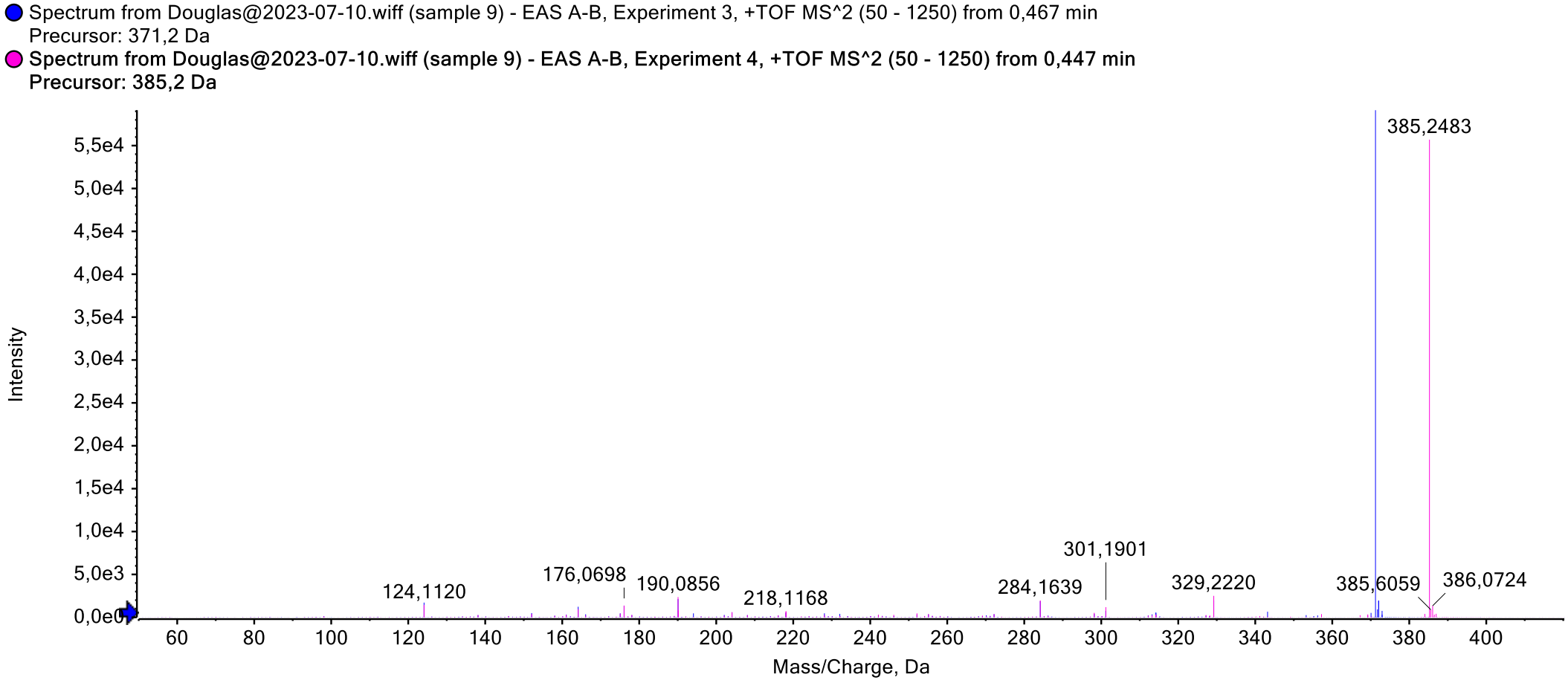
		–614]];**165,0547**[(M – H) –614-30]					
5	–	599,2152 [M – H]⁻ ;551,1957 [(M – H) – 18-30];403,1407[(M – H) – 196];343,1187[(M – H) – 196-30-30];**195,0660**[(M – H) – 404];**165,0548**[(M – H) – 404-30]	POS: – NEG: 599.2134	– 3,0	(1R,2S)-2-[4-[(3S,3aR,6R,6aS)-3a-hidroxi-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,4,6,6a-tetrahidro-1H-furo[3,4-c]furan-3-il]-2,6-dimetoxifenoxi]-1-(4-hidroxi-3-metoxife-nil)propano-1,3-diol ($C_{31}H_{36}O_{12}$)	Lignana

6	-	629,2289 [M – H]⁻; (42);581,2050 [(M – H) – 18-30] (34);417,1192 [(M – H) – 18-30-164](13);373,1286 [(M – H) – 18-30-164-30-14] (52);**195,0652** [(M – H) – 434] (23); **165,0545**[(M – H) – 434-30] (100)	POS: – NEG: 629,2239	-	2,1	5-((1S,2R)-1,3-diidroxi-2-(4-((1R,3aR,4S,6aS)-4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)hexahidrofuro[3,4-c]furano-1-il)-2,6-dimetoxifenoxi)propil)-2-hidroxi-3-metoxifenolato	Lignana

Sobrepondo os espectros de MS2 dos compostos identificados putativamente como Aspidoscarpina ($[M+H]^+$ 371,2328) e Pirifolidina ($[M+H]^+$ 385,2500) (Figuras 28 e 29), observa-se a presença de íons de fragmentação comuns a ambos os alcaloides, indicando similaridade nos padrões de dissociação. Essa sobreposição espectral reforça a proximidade estrutural entre os compostos, uma vez que ambos compartilham o esqueleto básico característico dos alcaloides indólicos do tipo aspidosperma, resultante de uma mesma via biossintética.

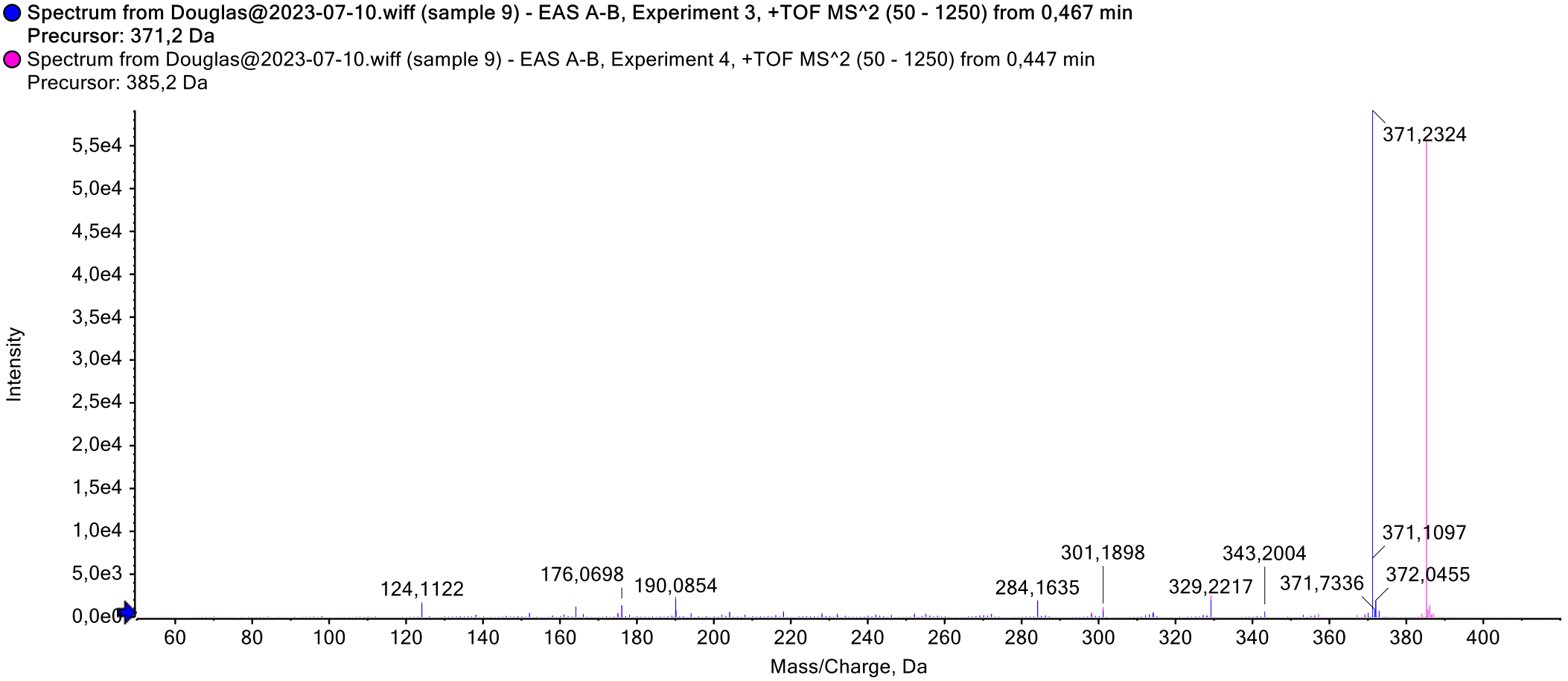
Conforme destacado na Tabela 4, os íons m/z 284 e 190 são atribuídos a fragmentações típicas do núcleo aspidosperma e são amplamente descritos na literatura como íons diagnósticos dessa classe de alcaloides (AGUIAR *et al.*, 2010b). A formação desses fragmentos decorre de clivagens específicas do esqueleto indólico–monoterpênico (Figura 30), refletindo a arquitetura estrutural consolidada ao longo da biossíntese, o que contribui de forma significativa para a elucidação estrutural por espectrometria de massas.

Figura 28. Sobreposição dos espectros correspondente a Pirifolidina



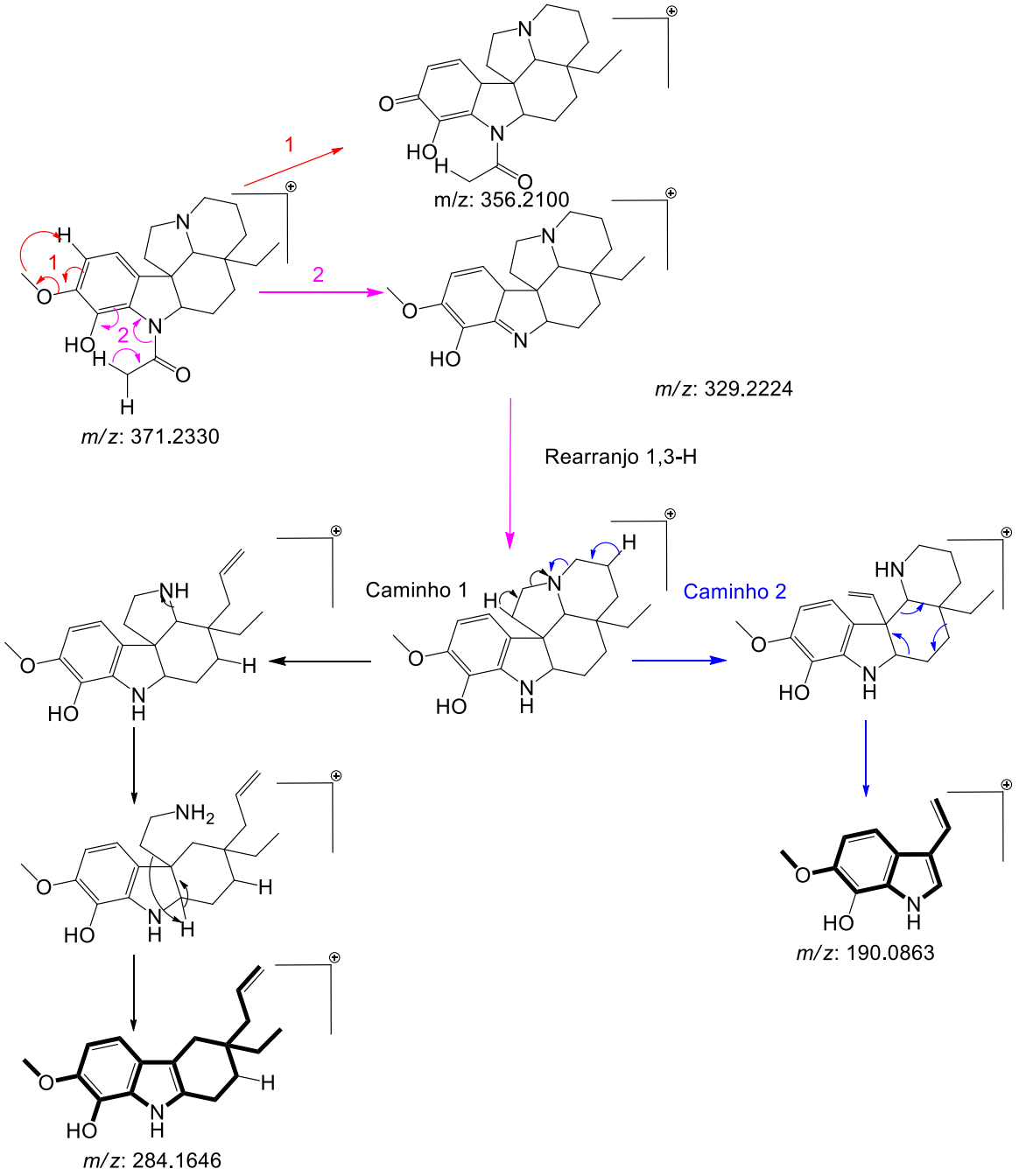
Legenda: Espectro em rosa correspondente a Pirifolidina e espectro em azul correspondente a Aspidoscarpina

Figura 29. Sobreposição dos espectros correspondente a Pirifolidina



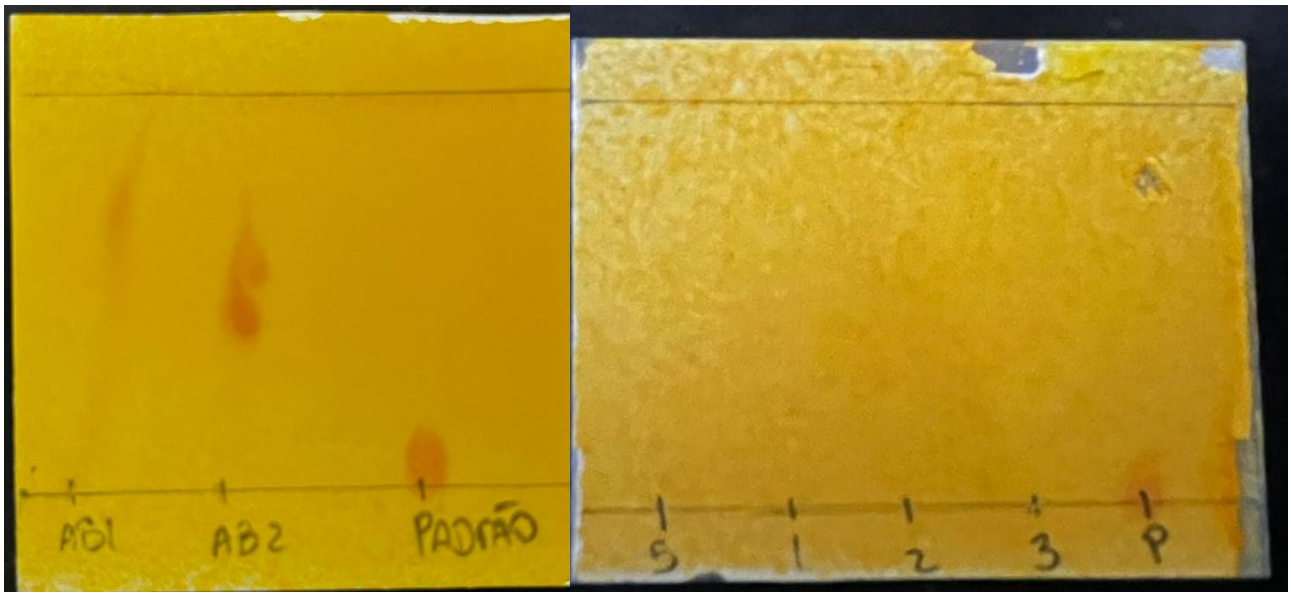
Legenda: Espectro em rosa correspondente a Pirifolidina e espectro em azul correspondente a Aspidoscarpina

Figura 30. Mecanismo de fragmentação da Aspidoscarpina



Ao realizar a separação cromatográfica por Sephadex, as 5 frações reunidas a partir da junção das 101 frações coletadas, foi realizada a cromatografia de camada delgada (CCD) (Figura 31) utilizando como controle positivo cloroquina e utilizando o revelador Dragendorff, é possível identificar que as frações AB1-F54 e AB2-F54 estão enriquecidas com alcaloides, já as frações AB3, AB4 e AB5-F54 não apresentaram a coloração característica de alcaloides utilizando esse revelador.

Figura 31. Cromatografia de camada delgada das frações obtidas por separação em Sephadex da fração AB da *Aspidosperma spruceanum* revelada com Dragendorff



Injetando as frações que deram resultado negativo na prospecção fitoquímica por CCD no HPLC-DAD, foram obtidos os perfis cromatográficos das frações AB3, AB4 e AB5-F54 a fim de identificar as classes de metabólitos presentes nessas frações. Sobrepondo os cromatogramas utilizando o software Origin® (Figura 32) e analisando os espectros de UV dos compostos majoritários das frações AB3 e AB4 (Figura 33), é possível observar uma semelhança entre essas frações justificando a junção delas para a realização da separação cromatográfica utilizando o HPLC preparativo.

Figura 32. Cromatogramas sobrepostos das frações AB3 e AB4-F54

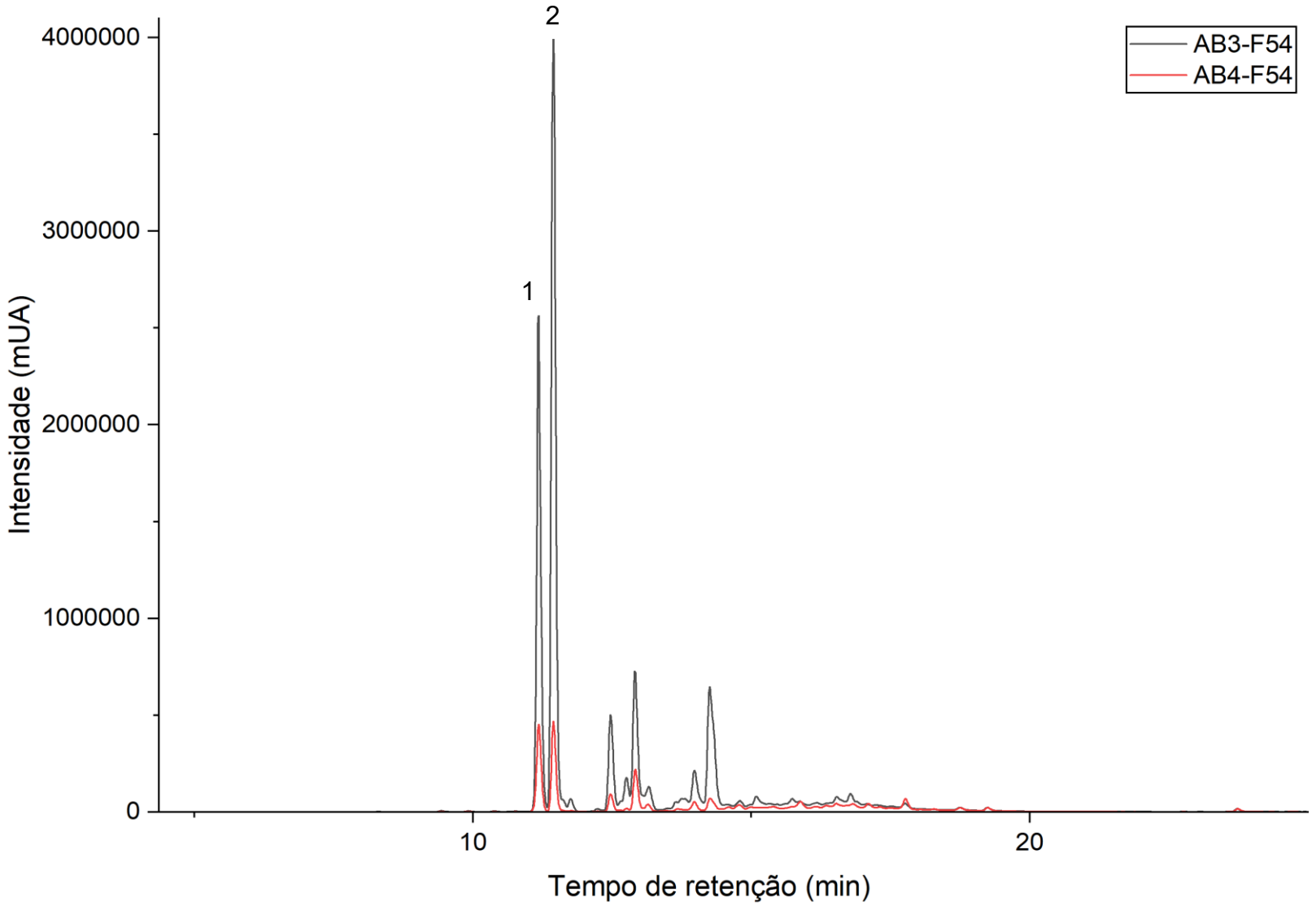
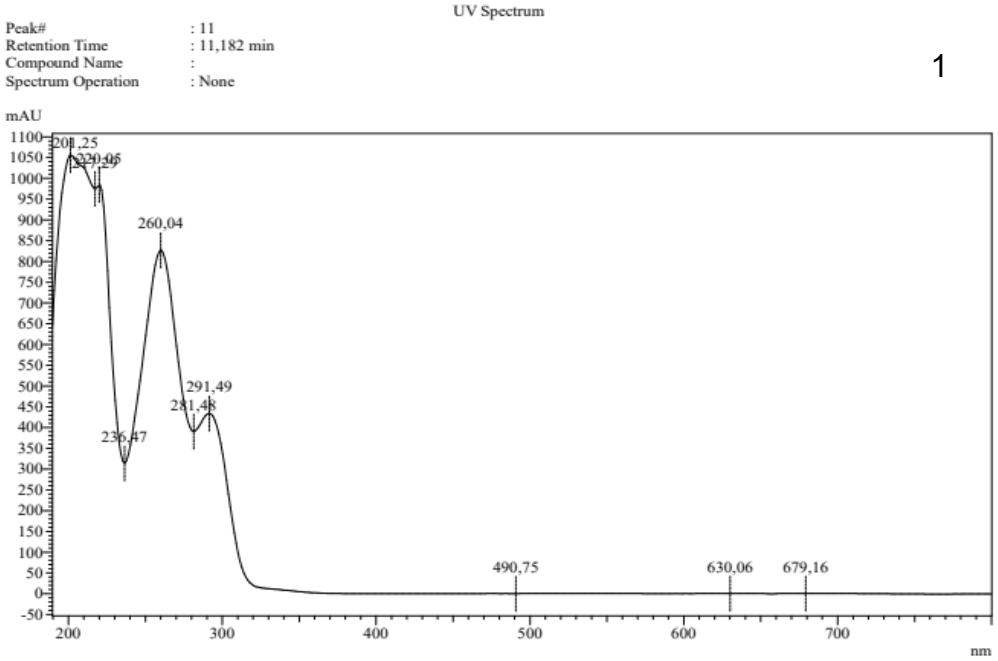
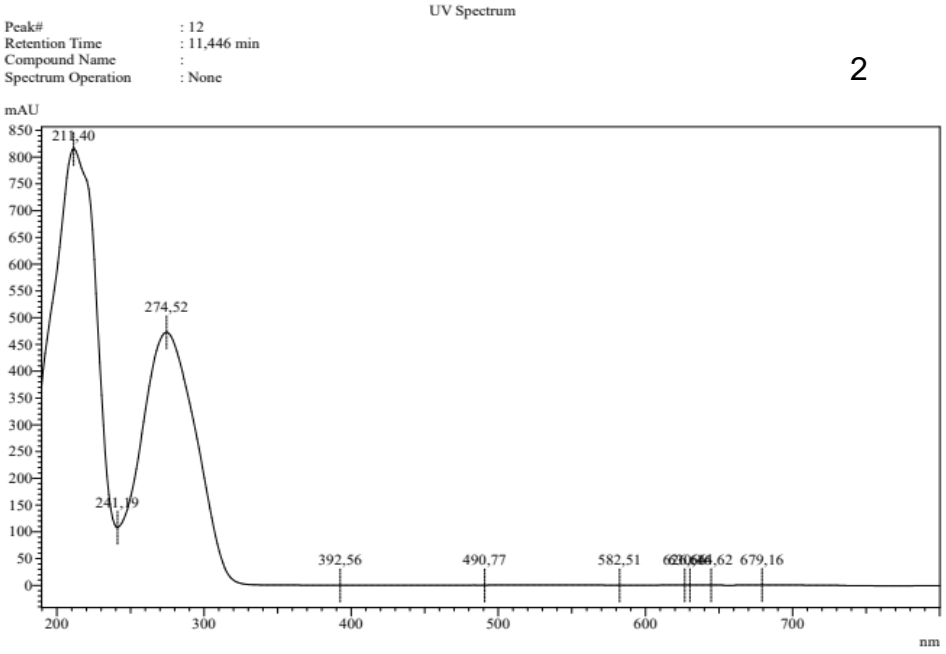


Figura 33. Espectros UV correspondentes aos compostos majoritários das frações AB3 e AB4-F54

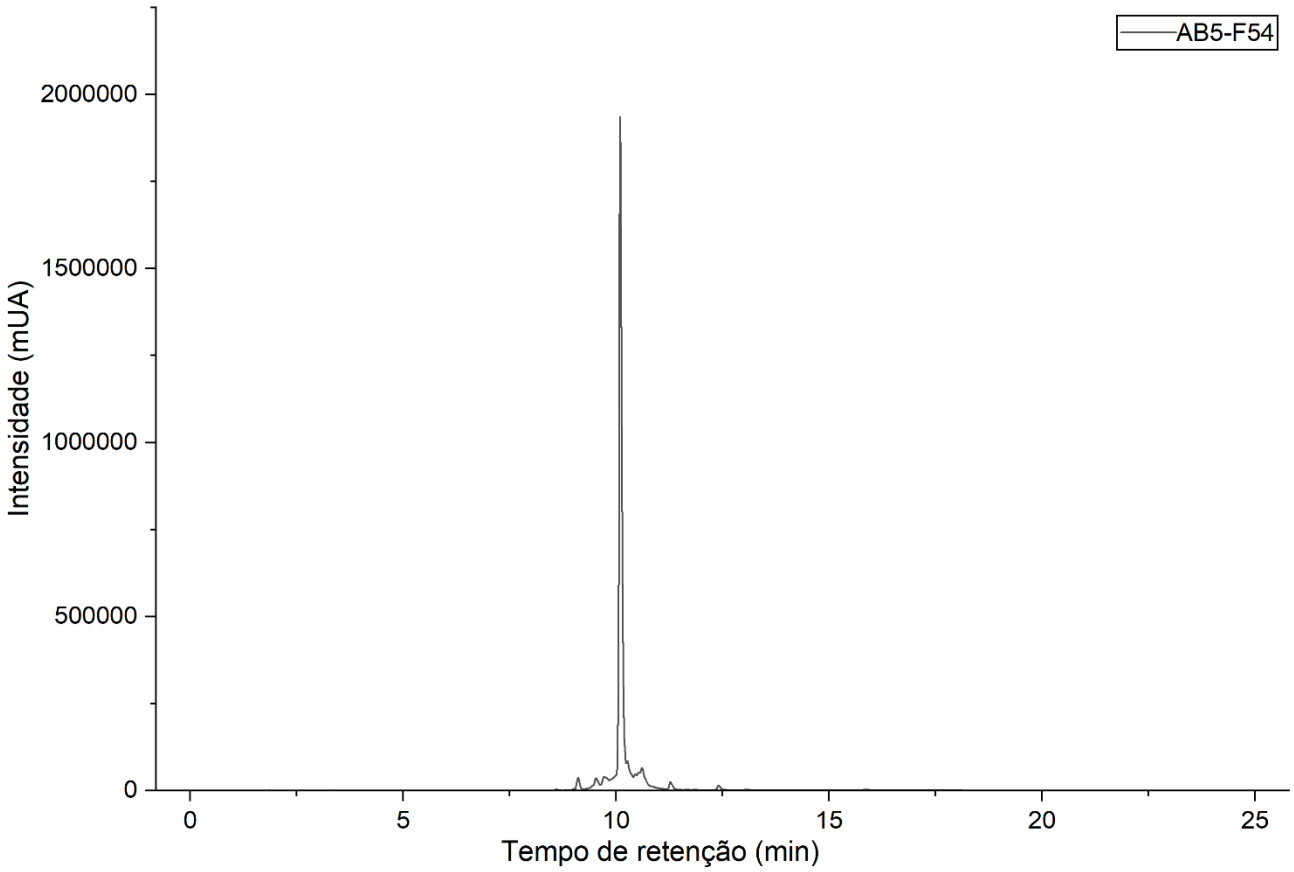




A partir da análise dos espectros de absorção no UV dos compostos majoritários, foi possível observar diferenças importantes entre os perfis obtidos. O espectro 1 apresentou características compatíveis com lignanas, evidenciadas por um máximo de absorção em 260 nm e pela presença de um *shoulder* em 280 nm. Esses dados estão de acordo com o padrão descrito na literatura para essa classe de compostos (GONTIJO *et al.*, 2021). Porém, o segundo espectro não apresentou sinais suficientes que permitissem sua classificação dessa forma, a caracterização desse composto não pôde ser realizada apenas com base nos dados de UV.

Quando injetado no HPLC a fração AB5-F54 e analisando seu respectivo perfil cromatográfico (Figura 34) foi identificado que havia sido isolado um dos compostos apresentes na fração originária AB.

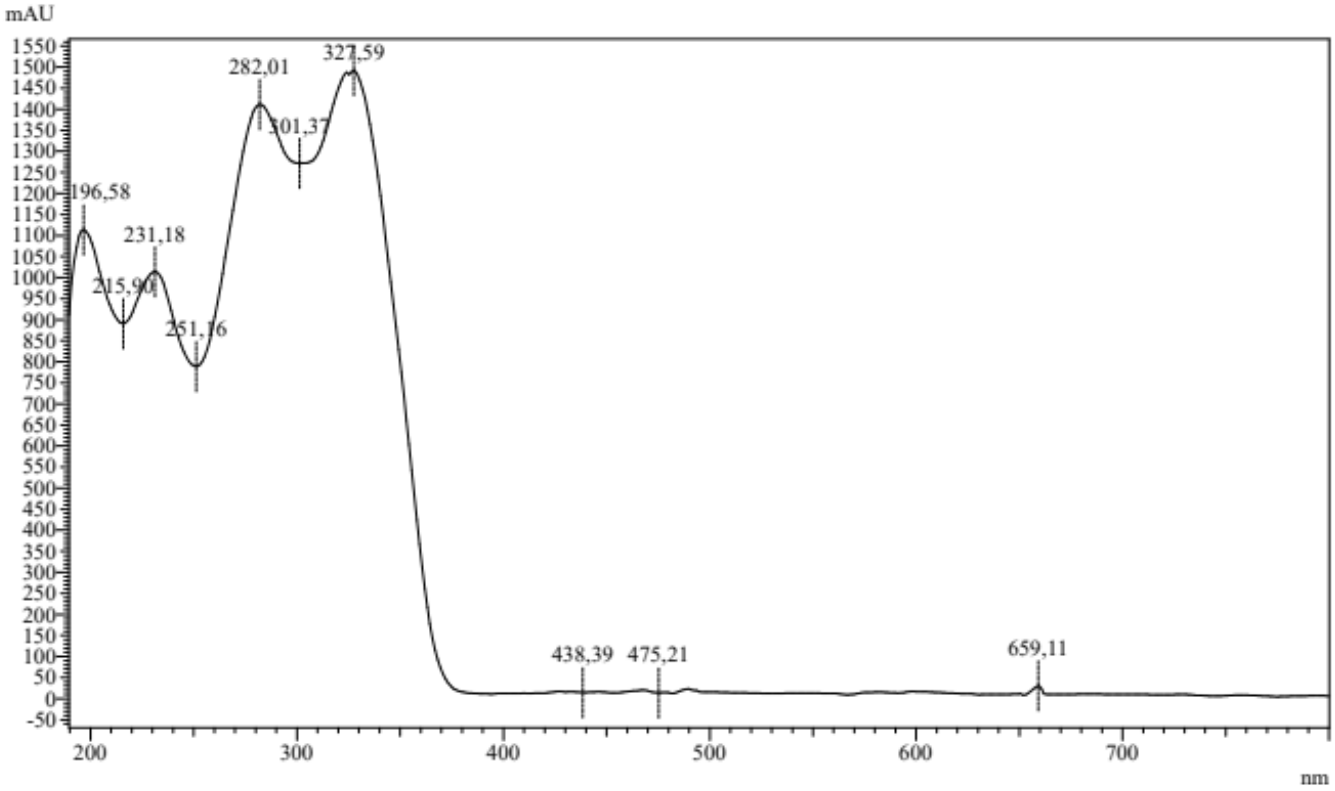
Figura 34. Cromatograma fração AB5-F54



Analisando o espectro correspondente ao composto isolado referente a fração AB5-F54 (Figura 35), é possível observar que o metabólito apresenta dois

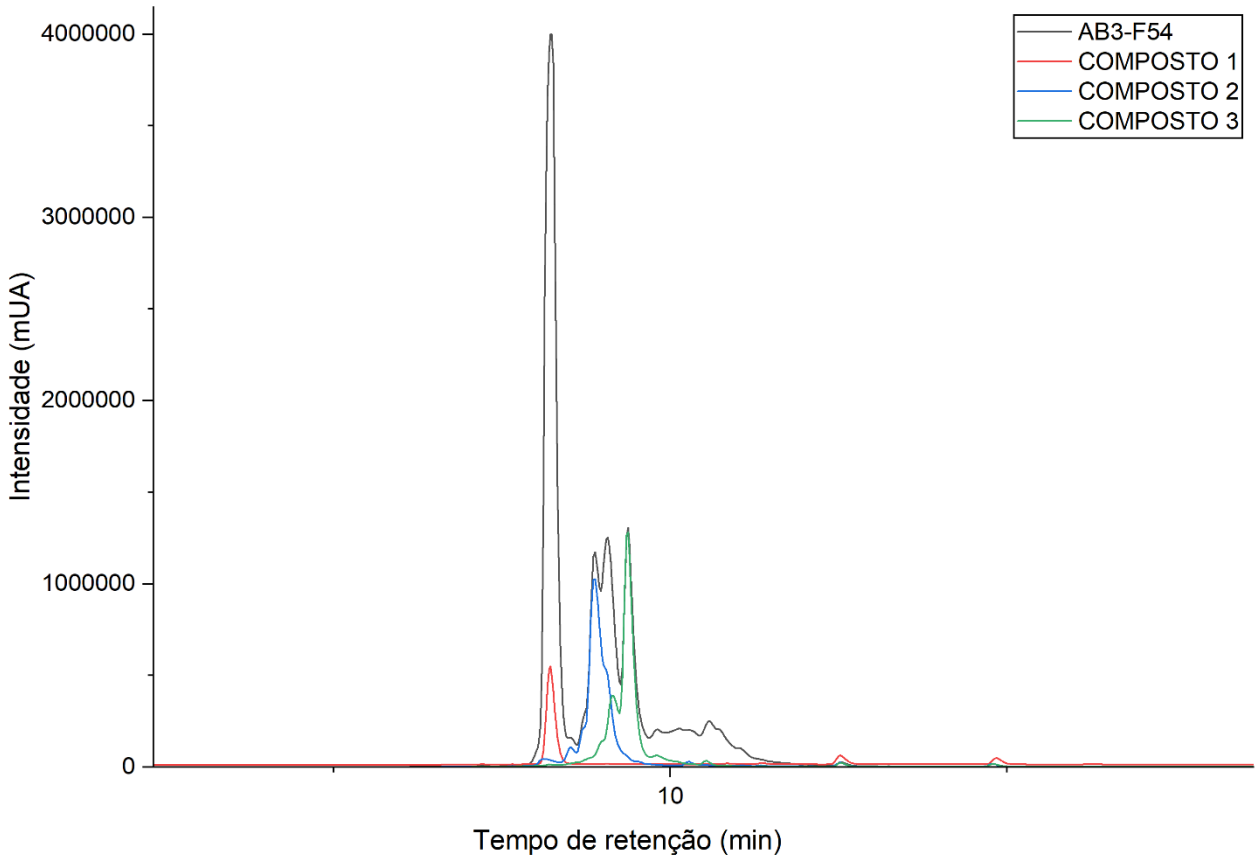
comprimentos de onda máximo 282 nm e 327 nm correspondentes a compostos nitrogenados (YU *et al.*, 2023).

Figura 35. Espectro UV correspondente ao composto isolado na fração AB5-F54



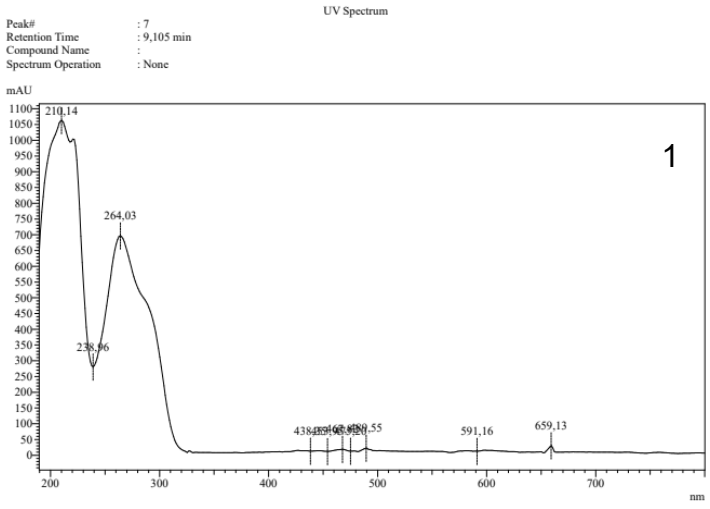
Com a reunião das frações AB3 e AB4-F54, obteve-se uma amostra com massa total de 61,1 mg. A partir dessa amostra, foi realizada a separação cromatográfica utilizando um sistema de HPLC preparativo onde com esse procedimento permitiu uma melhor resolução dos componentes presentes na amostra no qual ao final do processo, três metabólitos foram isolados (Figura 36)

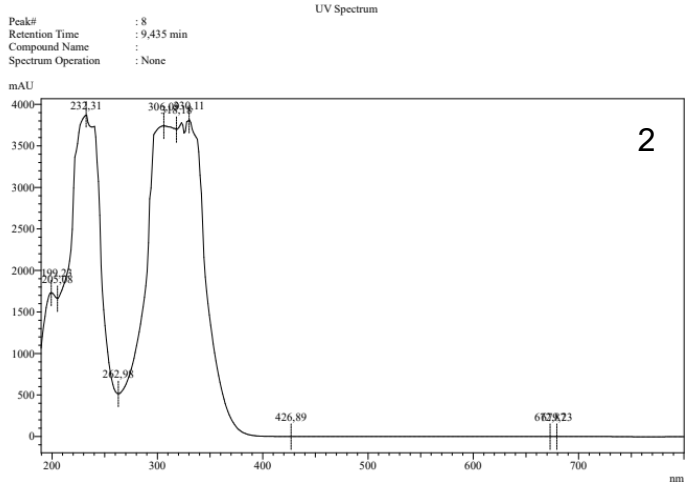
Figura 36. Cromatograma comparativo entre a fração AB3-F54 e os respectivos compostos isolados

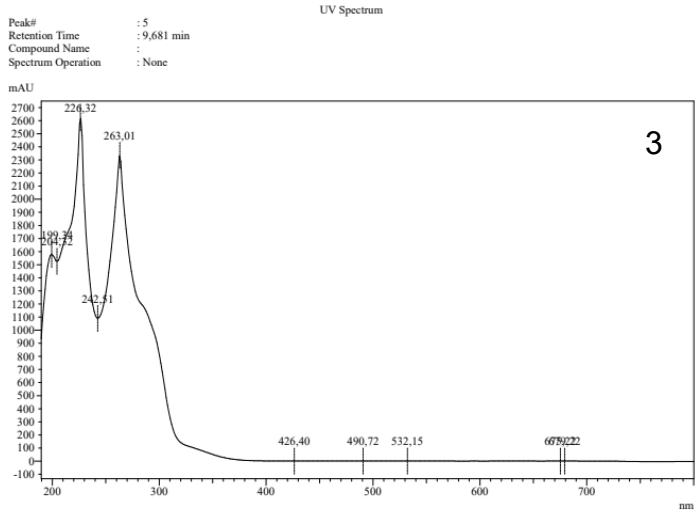


Analisando os espectros UV dos compostos isolados (Figura 37), é possível identificar que todos os três compostos são compatíveis com UV descritos como lignanas como já mencionando no trabalho de Gontijo, *et. al* 2021.

Figura 37. Espectros de UV correspondentes aos compostos isolados 1, 2 e 3



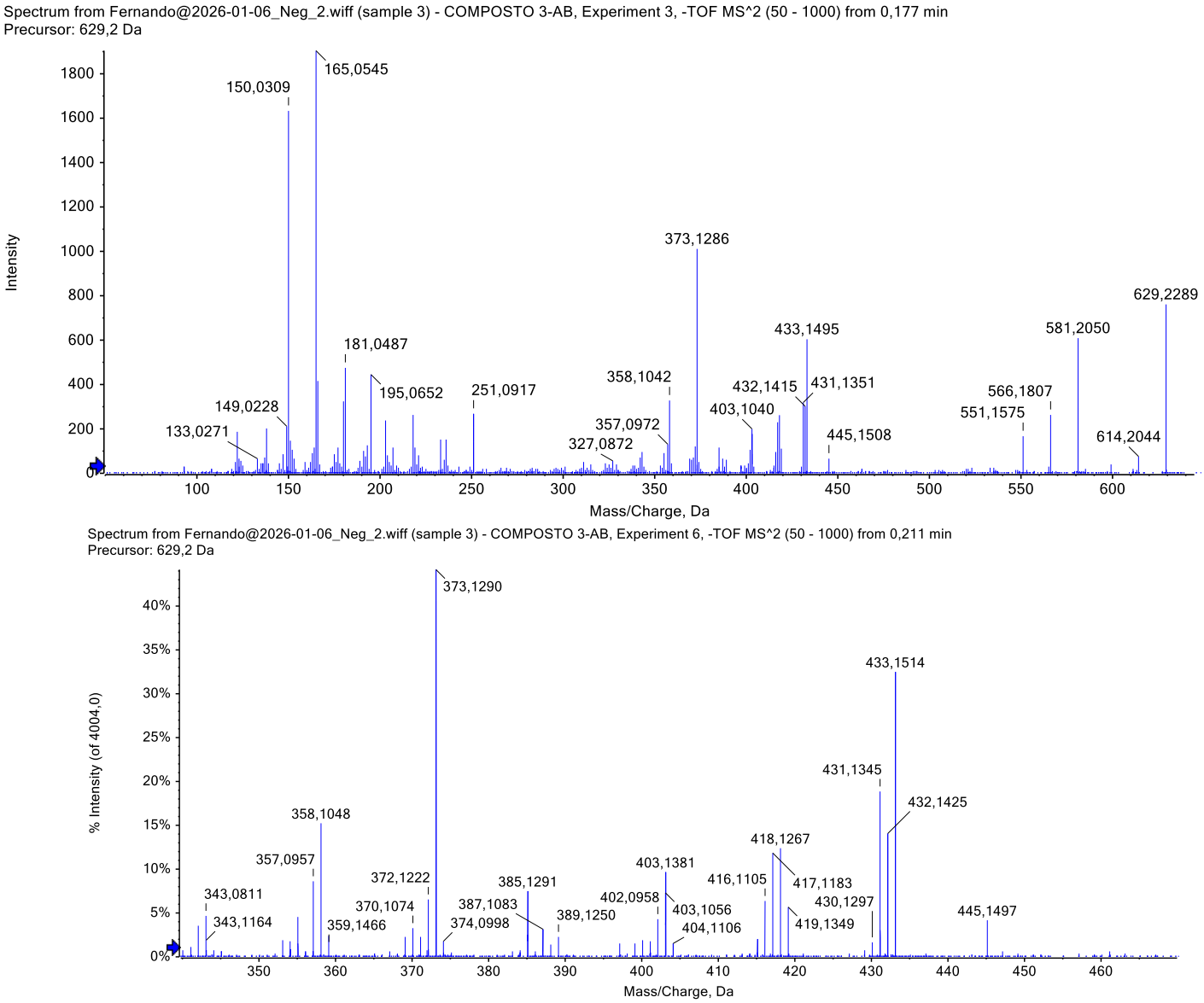




Legenda: espectro 1-correspondente ao composto isolado 1; espectro 2- correspondente ao composto isolado 2; espectro 3- correspondente ao composto isolado 3

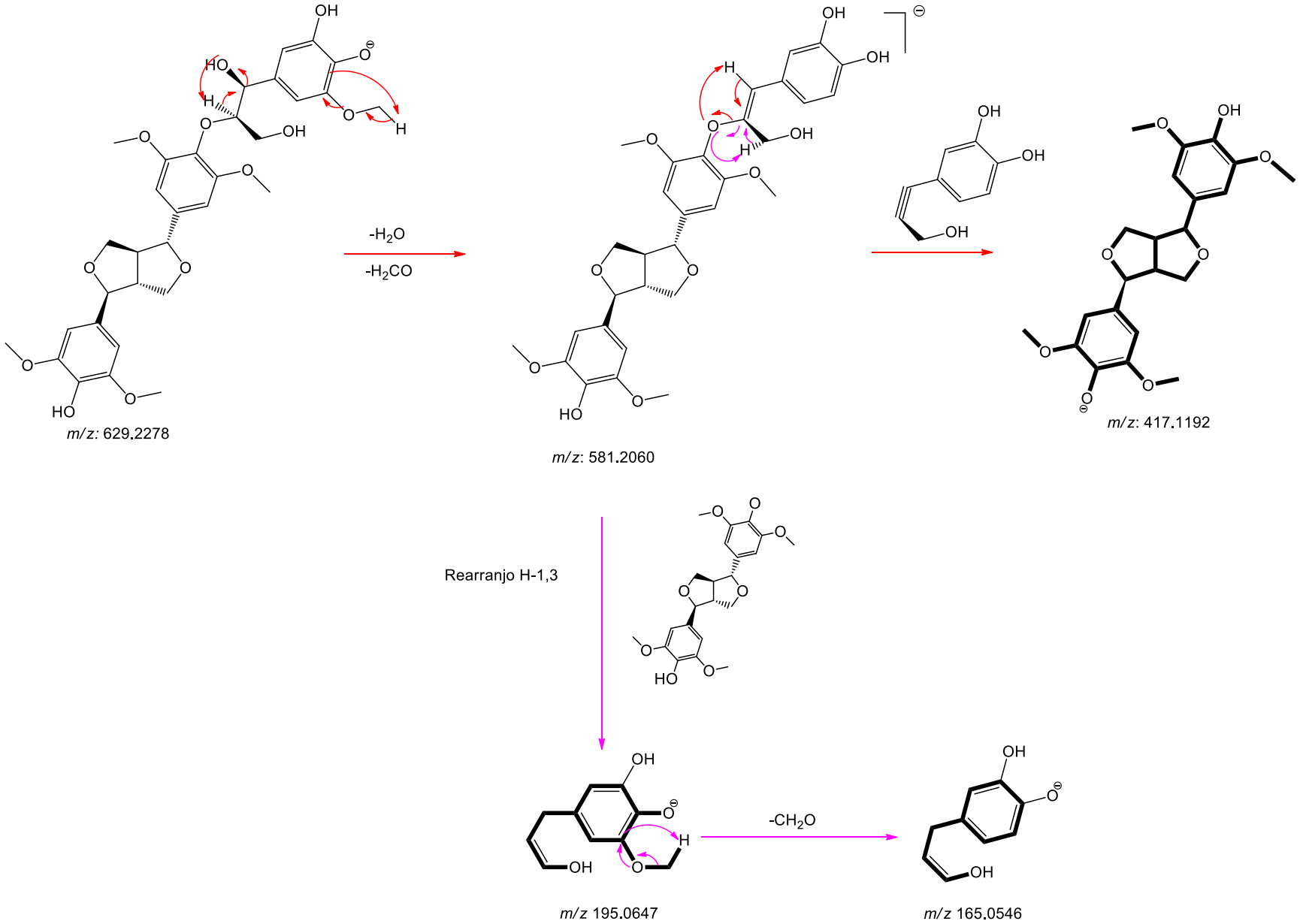
Analisando o espectro de massas do composto isolado 3 foi possível identificar putativamente que se trata realmente de uma lignana. Esse composto já havia sido visto previamente não extrato AB sem tratamento como mencionando na tabela 4, apresentando *m/z* 629,2289 (Figura 38).

Figura 38. Espectro de massas do composto isolado 3 no modo negativo



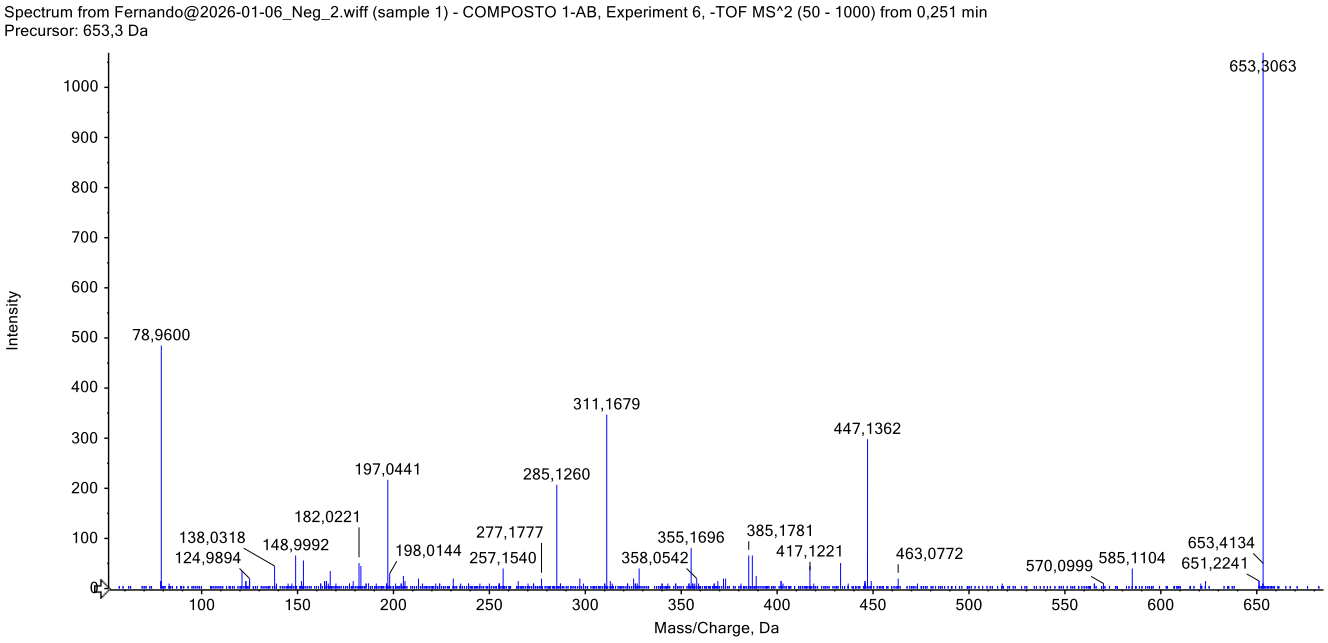
Propondo a fragmentação desse possível composto (Figura 39) é possível identificar fragmentos característicos de lignanas como o íon 417 onde é possível ver o acoplamento 7-7’ do sinapoil álcool e os íons *m/z* 195 e 165 sendo possível ver a fragmentação simples do sinapoil.

Figura 39. Proposta de fragmentação do composto isolado 3



Já o composto 1 foi possível determinar sua estrutura de forma putativa, com base na análise dos dados espectrométricos obtidos. Ao observar os espectros de MS2 (Figura 40), verificou-se a presença de um íon de *m/z* 417. Esse íon é comum à lignana previamente identificada no estudo, o que sugere similaridade estrutural entre os compostos onde a recorrência desse fragmento indica que ambos compartilham um mesmo esqueleto químico mencionado na figura 39.

Figura 40. Espectro de massas do composto isolado 1 no modo negativo



O composto isolado 2 não foi possível ser identificado devido sua má fragmentação tanto no modo positivo quanto no negativo, porém é possível identificar um íon majoritário e uma sequência de fragmentações conhecidas. Com isso será necessária a utilização da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) para definir qual é o metabólito.

Tabela 5. Dados de massas dos compostos 1 e 3 isolados a partir das frações AB3 e AB4

Molécula	*m/z* observado $[M + H]^+$ MS/MS^+	*m/z* observado $[M - H]^-$ MS/MS^-	Massa teórica exata (*m/z*)	Precisão de massa (Δ ppm)	Identificação putativa (Fórmula molecular)	Classe de metabólitos
Composto 1	-	653,3060 $[M - H]^-$(100); 585,1104 ($[M - H]^-$-68)(5); 447,1362 $[M - H]^-$- (30); **417,1221** $[M - H]^-$- (7); 311,16791221 $[M - H]^-$- (33); 285,12601221 $[M - H]^-$- (22); 197,04411221 $[M - H]^-$- (20)	POS: - NEG: -	- -	Não identificado	Possivel lignana

-

Composto 2	-	571,1125	POS: - NEG: -	-	Não identificado	Não identificado
Composto 3	-	629,2278 [M – H]⁻(38); 585,1104 ([M – H]⁻-18-30) (5);**417,1183**([M – H]⁻-18-30-164) (15);195,0667([M – H]⁻-18-30-386) (25); **165,0546**([M – H]⁻- 18-30-386-30)(100)	POS: - NEG: 629,2239	- 2,3	5-((1S,2R)-1,3-di-hydroxy-2-(4-((1R,3aR,4S,6aS)-4-(4-hydroxy-3,5-di-methoxyphenyl)he-xahydrofuro[3,4-c]fu-ran-1-yl)-2,6-di-methoxyphenoxy)pro-pyl)-3-methoxyben-zene-1,2-diol ($C_{32}H_{38}O_{13}$)	Lignana

8. Conclusão

Até onde sabemos, este é o terceiro trabalho desde 1967 (ARNDT et al., 1967); (TORRES-RÊGO *et al.*, 2024) a relatar presença de lignanas na família *Aspidosperma*, bem como as avaliações dos extratos oriundos da casca da *Aspidosperma spruceanum.* Nesse sentido o trabalho tem alto potencial devido a grande atividade antioxidante observado no extrato **AB** tendo em vista as quantificações apresentadas como resultados prévios obtidos no trabalho “Técnicas de pesquisa 2”. Assim, nossos resultados reforçam a importância da avaliação de métodos extrativos em estudos de produtos naturais, uma vez que os diferentes extratos avaliados apresentaram significativa diferença em sua constituição fitoquímica, que podem levar à variados resultados nos ensaios bioquímicos e biológicos em andamento. Além disso, os próximos passos a partir deste trabalho são elucidar estruturalmente por ressonância magnética nuclear (RMN) os quatro compostos isolados.

9. Bibliografia

AGUIAR, G. P. *et al.* Fragmentation of plumeran indole alkaloids from Aspidosperma spruceanum by electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010a. v. 24, n. 3, p. 295–308.

Fragmentation of plumeran indole alkaloids from Aspidosperma spruceanum by electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010b. v. 24, n. 3, p. 295–308.

ALVAREZ-RIVERA, G. *et al.* Recent applications of high resolution mass spectrometry for the characterization of plant natural products. TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.

ARNDT, R. R. *et al.* ALKALOID STUDIES-LVIII. THE ALKALOIDS OF SIX ASPIDOSPERMA SPECIES. [S.l: s.n., s.d.].

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. International Journal of Analytical Chemistry, 2012. v. 2012, p. 1–40.

BARBOSA, A. V. *et al.* BIOACTIVE PROFILE OF ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM MART. and ZUCC: AN INTEGRATIVE REVIEW / PERFIL BIOATIVO DE ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM MART. and ZUCC: UMA REVISÃO INTEGRATIVA. Brazilian Journal of Development, 2020. v. 6, n. 9, p. 67990–68008.

BARBOSA, V. *et al.* Antioxidant Activity and Determination of Phenolic Compounds, Total Flavonoids and Hispidulin in Baccharis erioclada DC. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2023. v. 66.

BHADANE, B. S. *et al.* Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. Phytotherapy Research. John Wiley and Sons Ltd.

BITWELL, C. *et al.* A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. Scientific African. Elsevier B.V.

BRAGAS OLIVEIRA, V. DE. ALCALÓIDES INDÓLICOS DE Aspidosperma spruceanum. CAMPOS DOS GOYTACAZES: [s.n.], 2008.

CHEN, R. *et al.* De novo biosynthesis of plant lignans by synthetic yeast consortia. Nature Chemical Biology, 1 out. 2025. v. 21, n. 10, p. 1487–1496.

CORREIA, D. C. C. *et al.* Métodos de extração de metabólitos secundários da planta jovem de capim limão (Cymbopogon citratus) para identificação por cromatografia líquida de alta eficiência. Brazilian Journal of Development, 18 jul. 2023. v. 9, n. 7, p. 22251–22266.

CRISTINA PILOTO FERREIRA, I. *et al.* 325 325 325 325 325 Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. [S.l.]: [s.n.], 2004.

DEWICK, P. M. . Medicinal natural products : a biosynthetic approach. [S.l.]: Wiley, A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, 2009.

DJILANI, A. *et al.* New extraction technique for alkaloids. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2006. v. 17, n. 3, p. 518–520.

DOLABELA, M. F. *et al.* Aspidosperma species as sources of anti-malarials: uleine is the major anti-malarial indole alkaloid from Aspidosperma parvifolium (Apocynaceae). Malaria Journal, 10 dez. 2015. v. 14, n. 1.

FOLQUITTO, D. G. *et al.* Biological activity, phytochemistry and traditional uses of genus Lobelia (Campanulaceae): A systematic review. Fitoterapia. Elsevier B.V.

GAN, J. *et al.* Correlations between Antioxidant Activity and Alkaloids and Phenols of Maca (Lepidium meyenii). Journal of Food Quality, 2017. v. 2017.

GONTIJO, D. C. *et al.* In vitro antiplasmodial activity, targeted LC–MS metabolite profiling, and identification of major natural products in the bioactive extracts of Palicourea and Psychotria species from the Amazonia and Atlantic Forest biomes, Brazil. Metabolomics, 1 set. 2021. v. 17, n. 9.

HO. Figure 1. Mechanism of electrospray ionisation. Clin Biochem Rev. [S.l.]: [s.n.], 2003.

HUGHES, E. H.; SHANKS, J. V. Metabolic engineering of plants for alkaloid production. Metabolic Engineering, 2002. v. 4, n. 1, p. 41–48.

ISLAM, Md. S.; LUCKY, R. A. A STUDY ON DIFFERENT PLANTS OF APOCYNACEAE FAMILY AND THEIR MEDICINAL USES. Universal Journal of Pharmaceutical Research, 7 mar. 2019.

LIIGAND, P. *et al.* Think Negative: Finding the Best Electrospray Ionization/MS Mode for Your Analyte. Analytical Chemistry, 6 jun. 2017. v. 89, n. 11, p. 5665–5668.

MACHADO, I. R. *et al.* Ethnobotanical and Pharmacological Study of Aspidosperma nitidum Benth (Apocynaceae)-a Review. 2022. v. 12, n. 1, p. 1–10.

MAO, Y.; LUO, J.; CAI, Z. Biosynthesis and Regulatory Mechanisms of Plant Flavonoids: A Review. Plants. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).

MARQUES, L. G. A. *et al.* O impacto da bioprospecção para o descobrimento de novas moléculas terapêuticas. Revista Fitos, 4 mar. 2022. v. 16, n. Supl. 2, p. 293–314.

MERA, I. F. G.; FALCONÍ, D. E. G.; CÓRDOVA, V. M. Secondary metabolites in plants: Main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. Bionatura. Centro de Biotecnologia y Biomedicina, Clinical Biotec. Universidad Católica del Oriente (UCO), Univesidad Yachay Tech.

MONTEIRO, N. O. *et al.* Antihypertensive Activity of the Alkaloid Aspidocarpine in Normotensive Wistar Rats. Molecules, 1 out. 2022. v. 27, n. 20.

MORALES-JADÁN, D. *et al.* Three alkaloids from an apocynaceae species, aspidosperma spruceanum as antileishmaniasis agents by in silico demo-case studies. Plants, 1 ago. 2020. v. 9, n. 8, p. 1–19.

NARDIN, T. *et al.* Alkaloid profiling of herbal drugs using high resolution mass spectrometry. Drug Testing and Analysis, 1 mar. 2018. v. 10, n. 3, p. 423–448.

NASCIMENTO, M. S. DO *et al.* In vitro antiplasmodial activity and identification, using tandem LC-MS, of alkaloids from Aspidosperma excelsum, a plant used to treat malaria in Amazonia. Journal of Ethnopharmacology, 10 jan. 2019. v. 228, p. 99–109.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. Journal of Natural Products. American Chemical Society.

ORACZ, J.; ŻYŻELEWICZ, D.; PACHOLCZYK-SIENICKA, B. UHPLC-DAD-ESI-HRMS/MS profile of phenolic compounds in northern red oak (Quercus rubra L., syn. Q. borealis F. Michx) seeds and its transformation during thermal processing. Industrial Crops and Products, 1 dez. 2022. v. 189.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. Journal of Nutritional Science. Cambridge University Press.

PAULA, R. C. DE; DOLABELA, M. F.; OLIVEIRA, A. B. DE. Aspidosperma species as sources of antimalarials. Part III. A review of traditional use and antimalarial activity. Planta Medica, 2014. v. 80, n. 5, p. 378–386.

PEREIRA, A. G. *et al.* Plant alkaloids: Production, extraction, and potential therapeutic properties. Natural Secondary Metabolites: From Nature, Through Science, to Industry. [S.l.]: Springer International Publishing, 2023, p. 157–200.

REINA, M. *et al.* Antiparasitic Indole Alkaloids from Aspidosperma desmanthum and A. spruceanum from the Peruvian Amazonia. madrid: [s.n.], 2014.

SANTOS, A. F. *et al.* The toxicity of Aspidosperma subincanum to MCF7 cells is related to modulation of oxidative status and proinflammatory pathways. Journal of Ethnopharmacology, 5 dez. 2021. v. 281.

SANTOS, G. R. *et al.* ANALYTICAL ADVANCES BASED ON FIRST-ORDER CALIBRATION MODELS AND UV-VIS SPECTROSCOPY FOR THE ASSESSMENT OF WATER QUALITY: A REVIEW – PART 1. Quimica Nova. Sociedade Brasileira de Quimica.

SANTOS-MIRANDA, A. Where are We Going with Natural Products? Exploring the True Potential of New Plant-Based Drugs in the Cardiovascular Field. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Sociedade Brasileira de Cardiologia.

SHENDE, V. V.; BAUMAN, K. D.; MOORE, B. S. The shikimate pathway: gateway to metabolic diversity. Natural Product Reports. Royal Society of Chemistry.

SILVA, R. M. F. * *et al.* Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia de Peperomia pellucida L. (H. B. K.). Campinas: [s.n.], 2009.

SINGH, R. *et al.* Lignan Enhancement: An Updated Review on the Significance of Lignan and Its Improved Production in Crop Plants. Phyton-International Journal of Experimental Botany. Tech Science Press.

TORRES-RÊGO, M. *et al.* Isolation of indole alkaloids and a new norneolignan of hydroethanol extract from the stem barks of Aspidosperma nitidum Benth: Preclinical evaluation of safety and anti-inflammatory and healing properties. Journal of Ethnopharmacology, 30 jan. 2024. v. 319.

WOLFENDER, J. L. *et al.* Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. Journal of Chromatography A. Elsevier B.V.

YU, Y. *et al.* Diverse aspidosperma-type alkaloids from the leaves of Tabernaemontana bovina with anti-hepatoma activity. Fitoterapia, 1 set. 2023. v. 169.

ZHANG, J. *et al.* REVIEW New Lignans and Their Biological Activities. [S.l: s.n., s.d.].

ZHANG, M. *et al.* Alkaloid biosynthesis in medicinal crop kratom (Mitragyna speciosa) varies with postharvest, genetic, and seasonal factors. Frontiers in Plant Science, 29 set. 2025. v. 16.

ZHANG, Y.; NAEBE, M. Lignin: A Review on Structure, Properties, and Applications as a Light-Colored UV Absorber. ACS Sustainable Chemistry and Engineering. American Chemical Society.