



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



ANAUARA LIMA E SILVA

**Múltiplas abordagens usando espectrometria de massas, estudos de desreplicação,
e métodos quimiométricos suportadas no desenvolvimento de estratégias para
distinção, agrupamento e descoberta de compostos bioativos de espécies de
Solanum subg. *Leptostemonum* (Solanaceae)**

Orientador: Prof. Josean Fachine Tavares

Coorientadora: Profa. Maria de Fátima Agra

JOÃO PESSOA, PB

2025

ANAUARA LIMA E SILVA

**Múltiplas abordagens usando espectrometria de massas, estudos de desreplicação,
e métodos quimiométricos suportadas no desenvolvimento de estratégias para
distinção, agrupamento e descoberta de compostos bioativos de espécies de
Solanum subg. *Leptostemonum* (Solanaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do
Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências
para obtenção do título de Doutora em
Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos.

Orientador: Prof. Josean Fechine Tavares

Coorientadora: Profa. Maria de Fátima Agra

JOÃO PESSOA, PB

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586m Silva, Anauara Lima e.

Múltiplas abordagens usando espectrometria de massas, estudos de desreplicação, e métodos quimiométricos suportadas no desenvolvimento de estratégias para distinção, agrupamento e descoberta de compostos bioativos de espécies de Solanum subg. Leptostemonum (Solanaceae) / Anauara Lima e Silva. - João Pessoa, 2025.

222 f. : il.

Orientação: Josean Fachine Tavares.

Coorientação: Maria de Fátima Agra.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

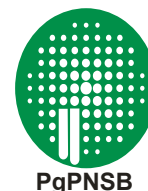
1. Compostos bioativos. 2. Solanaceae. 3. Jurubebas.
4. Clado Leptostemonum. I. Tavares, Josean Fachine. II. Agra, Maria de Fátima. III. Título.

UFPB/BC

CDU 582.930(043)



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos



Ata da 385ª (trecentésima octogésima quinta) Tese de Doutorado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Anauara Lima e Silva**, candidato(a) ao Título de “Doutor(a)” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica.

Às quatorze horas (14h00) do dia vinte e quatro de fevereiro do ano dois mil e vinte e cinco (24/02/2025), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/ujm-uyxx-ofa>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Anauara Lima e Silva**, candidato(a) ao Título de “DOUTOR(A)” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica. Foram componentes da Banca Examinadora os pesquisadores Hector Henrique Ferreira Koolen, Ph.D em Química, Lucas Silva Abreu, Ph.D em Farmacoquímica, Luciana Scotti, Ph.D em Cosmetologia e Modelagem Molecular, Yuri Manguiera do Nascimento, Ph.D em Farmacoquímica, Maria de Fátima Agra, Ph.D em Botânica, e Josean Fachine Tavares, Ph.D em Farmacoquímica. Sendo o primeiro, integrante do corpo docente da Universidade Estadual do Amazonas; o segundo, integrante do corpo docente da Universidade Federal Fluminense e os demais, integrantes do corpo de pesquisadores da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Banca, professor(a) Josean Fachine Tavares, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Anauara Lima e Silva**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “**Múltiplas abordagens usando espectrometria de massas, estudos de dereplicação, e métodos quimiométricos no desenvolvimento de estratégias para distinção, agrupamento e descoberta de compostos bioativos de espécies de *Solanum* subg. *Leptostemonum* (Solanaceae)**”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos Examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO(A)**. Em face da aprovação, declarou o Presidente, achar-se o(a) examinado(a) **Anauara Lima e Silva**, legalmente habilitado(a) a receber o Título de “DOUTOR(A)” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacoquímica, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof. Dr. Josean Fachine Tavares (Orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSEAN FACHINE TAVARES
Data: 17/03/2025 23:20:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Agra (Coorientadora)

Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen (Examinador)

Prof. Dr. Lucas Silva Abreu (Examinador)

Prof.^a Dr.^a Luciana Scotti (Examinadora)

Prof. Dr. Yuri Manguiera do Nascimento (Examinador)

Documento assinado digitalmente
gov.br YURI MANGUEIRA DO NASCIMENTO
Data: 18/03/2025 08:09:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Anauara Lima e Silva (Discente)

Documento assinado digitalmente
gov.br ANAUARA LIMA E SILVA
Data: 17/03/2025 20:01:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Aos meus pais Roberto Carlos e Elisângela Alves
Minhas irmãs Arauana Lima, Isadora Lima e Isabela Lima
Meus sobrinhos Arthur, Maria Alice e Bernardo
E meu namorado Hemílio Fernandes
Por todo amor, apoio, cuidado, incentivo e paciência;
Dedico

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Prof^o. Josean Fechine Tavares pela confiança na condução e realização deste trabalho, pela orientação, amizade, apoio, paciência, além de todo incentivo e atenção. A minha coorientadora, Prof^a. Maria de Fátima Agra, quem primeiro me aceitou como orientanda, confiou e acreditou em mim, permitiu que tudo isso acontecesse, desde a iniciação científica, quem me ensinou a fazer ciência, e que além de uma grande pesquisadora e mestre, tornou-se também uma grande amiga e por vezes “quase” mãe. Ao Professor Marcelo Sobral, por todo conhecimento, auxílio, amizade, pelas boas histórias, conversas e risadas. Aos três, devo todo meu carinho e imensurável gratidão. VOCÊS ME INSPIRAM!

A Universidade Federal da Paraíba, ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises e ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela oportunidade de fazer o Doutorado e realizar o sonho de ser Doutora.

A minha família por sempre acreditarem em mim, me auxiliando com todo amor e paciência, estando comigo nos momentos mais difíceis dessa longa jornada. Em especial meu pai Roberto Carlos da Silva e minha mãe Elisangela Alves Lima que mesmo em meio as saudades devido à distância e as dificuldades do percurso, nunca desistiram e nem me deixaram desistir, as grandes referências da minha vida. Minhas irmãs Arauana Lima, Isadora Lima e Isabela Lima, pela cumplicidade, amizade e amor. E meus tios Franciso Wilker e Ferlândia Alves que mesmo à distância nunca deixaram de me apoiar e acreditar que era possível. Eu amo vocês, vocês fazem parte dessa conquista.

Ao meu namorado Hemílio Fernandes Campos Coêlho que sempre me incentivou, me deu força, amor, carinho, me ajudou a suportar dias ruins e difíceis, dividindo comigo todos momentos, sempre com toda sua calma, paciência e atenção.

Agradeço a todos os meus professores por proporcionarem o conhecimento não apenas profissionalizante como também a manifestação de caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional.

Ao meu amigo e colega de Laboratório de Taxonomia e Farmacobotânica (TaxFar), Flávio Sousa Souto, pelos bons trabalhos, almoços, conversas e fofocas.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA), que por vezes me auxiliaram e me apoiaram no desenvolvimento desse trabalho, por toda atenção e amizade, em especial aos meus amigos Evandro Ferreira, Yuri Manguiera, Thiago Brito, Rodrigo Andrade, Eloíza Neném, Edileuza Bezerra, Jociano Lins, Nikole Durand e Thalisson Amorim.

A todos os funcionários da equipe de limpeza, a quem eu carinhosamente chamo de “meninos e meninas”, que sempre proporcionaram um ambiente agradável e estavam à disposição quando preciso, Mônica, Anderson, Júnior, seu Josué, Carlos e Patrícia.

A todos os Técnicos, Professores, e alunos que conheci durante a jornada e que de alguma maneira compartilharam ciência, conhecimento e auxiliaram na minha formação profissional.

E aos professores José Maria Barbosa, Lucas Abreu, Hector Koolen, Yanna Teles e Luciana Scotti por aceitarem compor a banca avaliadora desse trabalho. Pra mim é um grande prazer poder tê-los como avaliadores desse momento tão importante e especial.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu **MUITO OBRIGADO!**

RESUMO

Estudos morfológicos e filogenéticos não tem sido suficiente para esclarecer as relações entre as espécies de *Solanum* e definir limites entre os grupos subordinados, como os clados do subgênero *Leptostemonum*. Desta maneira, observa-se a necessidade do uso de novas abordagens, como a análise de metabólitos secundários, baseadas em metodologias e técnicas analíticas modernas, que possam fornecer subsídios para elucidar as relações e definir limites interespecíficos e infragenéricos, principalmente com relação as espécies Brasileiras. O Brasil apesar ser reconhecido como um dos centros de diversidade e endemismo do subgênero, as informações sobre sua diversidade são pouco conhecidas, com a ocorrência de espécies endêmicas que nunca foram estudadas ou incluídas em tratamentos morfológicos, filogenéticos e quimiosistemáticos já realizados. Muitas delas também possuem sua composição química e potencial biológico totalmente inexplorado. No presente estudo, são estabelecidas diversas abordagens suportadas no desenvolvimento de metodologias e estratégias para triagem e identificação de metabólitos (desreplicação) de espécimes secos de herbário, do extrato e frações da planta fresca, baseadas em estudos de perfil químico por CLAE-EM e auxiliadas por métodos estatísticos. Além de utilizar de dados de CLAE-EM para o isolamento de novos compostos com potencial bioativo. Desta forma, este trabalho está dividido em 4 capítulos: No capítulo um foram analisados metabólitos das partes aéreas de *Solanum jabrense* Agra e Nee, com auxílio de redes moleculares, com o objetivo de comprovar a hipótese de que estudos utilizando CLAE-EM e espécimes de herbário são capazes de determinar o perfil químico da espécie e identificar a presença de metabólitos que podem ser utilizados como metabólitos distintivos e ou marcadores quimiosistemáticos. Essa planta foi escolhida como modelo devido ao seu endemismo e disponibilidade de material em nosso laboratório, além de ser pouco explorada quanto ao potencial bioativo. O segundo capítulo descreve o desenvolvimento e implementação da metodologia baseada em CLAE-EM para a análise do perfil químico de 72 espécimes de herbário de *Solanum* subgênero *Leptostemonum* verificando se esta abordagem juntamente com métodos estatísticos, podem ser úteis para distinguir e classificar as espécies utilizadas, auxiliando na quimiotaxonomia do subgênero *Leptostemonum*, comparando os agrupamentos obtidos nas análises estatísticas às classificações taxonômicas existentes. No capítulo três, o material vegetal de *S. jabrense* foi coletado e reproduzida a mesma metodologia de extração, em escala proporcional, realizada para os espécimes de herbário para o preparo do extrato hidroalcólico bruto. O extrato bruto e a fração rica em alcaloides obtida por precipitação do extrato bruto, foram analisados por CLAE-EM para conhecimento do conteúdo químico e comparação com os espécimes de herbário, e testados quanto a atividade larvívica e repelente contra o *Aedes aegypti*. No capítulo quatro, foram isoladas do extrato hidroalcólico de *S. jabrense* três moléculas químicas com potencial bioativo, uma nova e duas já previamente conhecidas. Sendo o primeiro relato das três estruturas para a espécie. Essas substâncias isoladas serão posteriormente utilizadas como sementes em estudos de desreplicação.

Palavras-chave: Solanaceae, Flora Brasileira, “Jurubebas”, Clado *Lepstotemonum*, “solanos espinhosos”.

ABSTRACT

Morphological and phylogenetic studies have not been sufficient to clarify the relationships between *Solanum* species and define limits between subordinate groups, such as the clades of the subgenus *Leptostemonum*. Thus, there is a need to use new approaches, such as the analysis of secondary metabolites, based on modern analytical methodologies and techniques, which can provide support to elucidate relationships and define interspecific and infrageneric limits, especially in relation to Brazilian species. Despite Brazil being recognized as one of the centers of diversity and endemism of the subgenus, information about its diversity is little known, with the occurrence of endemic species that have never been studied or included in morphological, phylogenetic and chemosystematic treatments already carried out. Many of them also have their chemical composition and biological potential completely unexplored. In the present study, several approaches are established, supported by the development of methodologies and strategies for screening and identification of metabolites (dereplication) of dried herbarium specimens, extract and fractions of the fresh plant, based on chemical profile studies by HPLC-MS and aided by statistical methods. In addition to using HPLC-MS data for the guided isolation of new compounds with bioactive potential. Thus, this work is divided into 4 chapters: In chapter one, metabolites from the aerial parts of *Solanum jabrense* Agra and Nee were analyzed, with the aid of molecular networks, with the aim of proving the hypothesis that studies using HPLC-MS and herbarium specimens are capable of determining the chemical profile of the species and identifying the presence of metabolites that can be used as distinctive metabolites and/or chemosystematic markers. This plant was chosen as a model due to its endemism and availability of material in our laboratory, in addition to being little explored regarding its bioactive potential. The second chapter describes the development and implementation of the HPLC-MS-based methodology for the analysis of the chemical profile of 72 herbarium specimens of *Solanum* subgenus *Leptostemonum*, verifying whether this approach, together with statistical methods, can be useful to distinguish and classify the species used, assisting in the chemotaxonomy of the subgenus *Leptostemonum*, comparing the groupings obtained in the statistical analyses to the existing taxonomic classifications. In chapter three, the plant material of *S. jabrense* was collected and the same extraction methodology was reproduced, on a proportional scale, carried out for the herbarium specimens to prepare the crude hydroalcoholic extract. The crude extract and the alkaloid-rich fraction obtained by precipitation of the crude extract were analyzed by HPLC-MS to determine the chemical content and compare it with herbarium specimens, and tested for larvicidal and repellent activity against *Aedes aegypti*. In chapter four, three chemical molecules with bioactive potential were isolated from the hydroalcoholic extract of *S. jabrense*, one new and two previously known. This is the first report of the three structures for the species. These isolated substances will later be used as seeds in dereplication studies.

Keywords: Solanaceae, Brazilian Flora, “Jurubebas”, *Leptostemonum* Clade, “spiny solans”.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ocorrência de espécies de <i>Solanum</i> L. no Brasil	24
Figura 2. Diversidade Morfológica do gênero <i>Solanum</i> L.	25
Figura 3. Sinapomorfias que distinguem <i>Solanum</i> subg. <i>Leptostemonum</i> (Dunal) Bitter	27
Figura 4. <i>Solanum jabrense</i> Agra e M. Nee	29
Figura 5. Constituintes químicos isolados em espécies de <i>Solanum</i> L.....	30
Figura 6. Visão geral da biossíntese e diversidade de alcaloides e saponinas esteroidais de.....	33
Figura 7. Estrutura das cadeias glicosídicas mais comuns em glicoalcalóides de <i>Solanum</i> L.....	34
Figura 8. Estrutura das alcalinas esteroidais (solanidano e espirosolano) e as estruturas típicas das unidades agliconas dos glicoalcalóides de <i>Solanum</i> L.....	34
Figura 9. Sapogeninas mais comuns encontradas em <i>Solanum</i> L.	36
Figura 10. Estrutura das cadeias glicosídicas mais comuns em saponinas de <i>Solanum</i> L.	36
Figura 11. Exemplos selecionados de relação estrutura-atividade de alcaloides de <i>Solanum</i> L.....	37
Figura 12. Esquema para a identificação putativa de saponinas e alcalóides esteróides através da interpretação de padrões característicos de fragmentação de massa	40
Figura 13. Esquema geral de funcionamento e organização das redes moleculares do GNPs.....	42
Figura 14. Uso de redes moleculares como estratégia de desreplicação.....	43
Figura 15. Cladograma modificado do APG IV (2016) demonstrando a utilização de metabólitos secundários em sistemas de classificações.	44
Figura 16. Fluxo de trabalho para extração e aquisição dos dados de CLAE-EM/EM de espécimes de herbário.	48
Figura 17. Processamento de espectros de RMN de ^1H	54
Figura 18. Classe de metabólitos anotados pelo GNPS e MolNetEnhancer presentes nas amostras.	62
Figura 19. Rede molecular de dados MS/MS de amostras de <i>Solanum jabrense</i> Agra e M. Nee.	63
Figura 20. Cromatograma de pico base de extratos hidroalcoólicos brutos de amostras de herbário.....	64
Figura 21. Previsão da estrutura química das cadeias glicosídicas dos alcaloides esteroidais anotados.	69
Figura 22. Fluxo de trabalho usado para análises de espécimes de herbário de <i>Solanum jabrense</i>	70
Figura 23. Espécimes de <i>S. jabrense</i> Agra e M. Nee usadas neste estudo	79
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H do extrato hidroalcoólico (MeOH + H ₂ O) do material fresco e de três espécimes de <i>S. jabrense</i>	80
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H do padrão Solasodina (CDCl ₃ ; Bruker Ascend 500 MHz).....	81
Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C do padrão Solasodina (CDCl ₃ ; Bruker Ascend 125 MHz).....	81

Figura 27. Cromatogramas de pico base (BPC) dos três extratos dos três espécimes de <i>S. jabrense</i>	82
Figura 28. Análise da razão isotópica de dois compostos principais.....	83
Figura 29. Espectro de MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 740 [M+H] ⁺	84
Figura 30. Espectro de MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 608 [M+H] ⁺	84
Figura 31. Espectro de MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 916 [M+H] ⁺	84
Figura 32. Espectro de MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 902 [M+H] ⁺	84
Figura 33. Espectro de MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 900 [M+H] ⁺	85
Figura 34. Espectro de MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 738 [M+H] ⁺	85
Figura 35. Espectro de MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 884 [M+H] ⁺	85
Figura 36. Espectro de MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 754 [M+H] ⁺	85
Figura 37. Espectro MS ² da aglicona Solasodina, <i>m/z</i> 414 [M+H] ⁺	86
Figura 38. Espectro de MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 868 [M+H] ⁺	86
Figura 39. Espectro MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 854 [M+H] ⁺	86
Figura 40. Espectro de MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 576 [M+H] ⁺	87
Figura 41. Espectro MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 722 [M+H] ⁺	87
Figura 42. Espectro MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 446 [M+H] ⁺	87
Figura 43. Espectro de MS ² do glicoalcaloide <i>m/z</i> 428 [M+H] ⁺	87
Figura 44. Padrão de fragmentação da aglicona solasodina	89
Figura 45. Espectro de MS ² da aglicona <i>m/z</i> 414 [M+H] ⁺	90
Figura 46. Espectro de MS ² da aglicona <i>m/z</i> 446 [M+H] ⁺	90
Figura 47. Espectro MS ² da aglicona <i>m/z</i> 430 [M+H] ⁺	91
Figura 48. Espectro MS ² da aglicona <i>m/z</i> 428 [M+H] ⁺	92
Figura 49. Espectro MS ² da aglicona <i>m/z</i> 412 [M+H] ⁺	92
Figura 50. Espectro MS ² da aglicona <i>m/z</i> 410 [M+H] ⁺	93
Figura 51. Comparação dos cromatogramas de pico base (BPC) dos extratos hidroalcoólicos de três espécimes de <i>S. jabrense</i> e padrão de solasodina.....	94
Figura 52. Amostras analisadas discriminadas por grupo.....	107
Figura 53. Distribuição das intensidades das amostras analisadas discriminadas por grupo	108
Figura 54. Cromatogramas de pico base (BPCs) dos espécimes analisados discriminados por cores.	108
Figura 55. Inspeção visual de diferentes intervalos de tempos de retenção antes do alinhamento.....	109
Figura 56. Inspeção visual de diferentes intervalos de tempos de retenção depois do alinhamento.....	110
Figura 57. Cromatogramas do íon extraído (EICs) no intervalo de tempos de retenção de 1290-1330 segundos pós alinhamento.....	110
Figura 58. Análise de componente principal (PCA) das amostras e suas réplicas analisadas.	112
Figura 59. Análise hierárquica (HCA) das amostras e suas réplicas analisadas.....	112
Figura 60. Análise de componente principal (PCA) das amostras <i>S. jabrense</i> , <i>S. megalonyx</i> e <i>S. cordifolium</i> e suas réplicas analisadas.....	113
Figura 61. Análise de componente principal (PCA) das amostras <i>S. hexandrum</i> e <i>S. megalonyx</i> e suas réplicas analisadas.....	114

Figura 62. Mortalidade de larvas de <i>Ae. aegypti</i> expostas a diferentes concentrações de extrato bruto e da fração rica em alcaloides de <i>S. jabrense</i> . NC - Controle negativo.....	151
Figura 63. Curvas dose-resposta para a morte de larvas <i>Ae. aegypti</i> expostas ao extrato bruto e a fração rica em alcaloides de <i>S. jabrense</i>	152
Figura 64. Mortalidade média de larvas de <i>Ae. aegypti</i> expostas a diferentes concentrações de extrato bruto e da fração rica em alcaloides de <i>S. jabrense</i>	152
Figura 65. Produção de NO em larvas de <i>Ae. aegypti</i> expostas ao extrato bruto e a fração rica em alcaloide de <i>S. jabrense</i>	153
Figura 66. Cromatogramas do pico base (BPC) e Rede Molecular Clássica gerada com dados de CLAE-EM/EM do extrato bruto e da fração rica em alcaloides.....	155
Figura 67. Rede Molecular clássica reanalizada com a ferramenta MolNetEnhancer.	156
Figura 68. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 884 [M+H] ⁺ (r.t. 4.2 min).	162
Figura 69. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 900 [M+H] ⁺ (r.t. 4.4 min).	162
Figura 70. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 902 [M+H] ⁺ (r.t. 4.5 min).	163
Figura 71. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 610 [M+H] ⁺ (r.t. 4.6 min).	163
Figura 72. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 738 [M+H] ⁺ (r.t. 4.7 min).	164
Figura 73. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 592 [M+H] ⁺ (r.t. 4.8 min).	164
Figura 74. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 898 [M+H] ⁺ (r.t. 4.9 min).	165
Figura 75. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 590 [M+H] ⁺ (r.t. 4.9 min).	165
Figura 76. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 916 [M+H] ⁺ (r.t. 5.0 min).	166
Figura 77. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 608 [M+H] ⁺ (r.t. 5.2 min).	166
Figura 78. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 868 [M+H] ⁺ (r.t. 5.3 min).	167
Figura 79. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 1000 [M+H] ⁺ (r.t. 5.4 min).	167
Figura 80. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 576 [M+H] ⁺ (r.t. 5.4 min).	168
Figura 81. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 722 [M+H] ⁺ (r.t. 5.7 min).	168
Figura 82. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 430 [M+H] ⁺ (r.t. 6.0 min).	169
Figura 83. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 428 [M+H] ⁺ (r.t. 6.1 min).	169
Figura 84. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 410 [M+H] ⁺ (r.t. 6.7 min).	170
Figura 85. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 414 [M+H] ⁺ (r.t. 6.9 min).	170
Figura 86. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 412 [M+H] ⁺ (r.t. 7.0 min).	171
Figura 87. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 416 [M+H] ⁺ (r.t. 7.7 min).	171
Figura 88. Espectro MS ² do composto de <i>m/z</i> 426 [M+H] ⁺ (r.t. 11.2 min).	172
Figura 89. Correlações nos espectros de HMBC e ¹ H- ¹ H COSY dos compostos 1, 2 e 3	180
Figura 90. Estrutura do composto isolado 1.	189
Figura 91. Espectro de Infravermelho (ATR) do composto 1.	189
Figura 92. Espectro EMAR do composto 1 obtido no modo positivo (M+H) ⁺	190
Figura 93. Espectro de RMN ¹ H do composto 1 (400 MHz, MeOD)	191
Figura 94. Espectro de RMN ¹³ C BB do composto 1 (100 MHz, MeOD).	192
Figura 95. Espectro de RMN ¹³ C DEPT-135 do composto 1 (100 MHz, MeOD).	193
Figura 96. Espectro de RMN ¹ H- ¹ H COSY da estrutura 1 (400 MHz, MeOD).	194
Figura 97. Espectro de RMN HMBC do composto 1 (400 MHz, MeOD).	195
Figura 98. Espectro de RMN HSQC do composto 1 (400 MHz, MeOD).	196
Figura 99. Estrutura do composto isolado 2.	197
Figura 100. Espectro de Infravermelho (ATR) do composto 2.	197

Figura 101. Espectro EMAR do composto 2 obtido no modo positivo (M+H) ⁺	197
Figura 102. Espectro de RMN ¹ H do composto 2 (400 MHz, MeOD)	198
Figura 103. Espectro de RMN ¹³ C BB do composto 2 (100 MHz, MeOD).....	199
Figura 104. Espectro de RMN ¹³ C DEPT-135 do composto 2 (100 MHz, MeOD).....	200
Figura 105. Espectro de RMN ¹ H- ¹ H COSY do composto 2 (400 MHz, MeOD).	201
Figura 106. Espectro de RMN HSQC do composto 2 (400 MHz, MeOD).....	202
Figura 107. Espectro de RMN HMBC do composto 2 (400 MHz, MeOD).....	203
Figura 108. Estrutura do composto isolado 3.	204
Figura 109. Espectro de Infravermelho (ATR) do composto 3.....	204
Figura 110. Espectro EMAR do composto 3 obtido no modo positivo (M+H) ⁺	205
Figura 111. Espectro de RMN ¹ H do composto 3 (500 MHz, MeOD)	206
Figura 112. Espectro de RMN ¹³ C BB do composto 3 (125 MHz, MeOD).....	207
Figura 113. Espectro de RMN ¹³ C DEPT-135 do composto 3 (125 MHz, MeOD).....	208
Figura 114. Espectro de RMN HMBC do composto 3 (500 MHz, MeOD).....	219
Figura 115. Espectro de RMN HSQC do composto 3 (500 MHz, MeOD).....	210
Figura 116. Espectro de ¹ H- ¹ H COSY do composto 3 (400 MHz, MeOD).	211

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Volumes, quantidades e concentrações testadas para padronização da metodologia de extração.	47
Tabela 2. Alcaloides esteroidais identificados em extratos de espécimes de <i>Solanum jabrense</i> Agra & M. Nee por CLAE-IES-EM ⁿ	68
Tabela 3. Aglicona encontradas em amostras de herbário de <i>Solanum jabrense</i> analisadas.	70
Tabela 4. Atividade biológica dos compostos anotados de <i>Solanum</i> L.....	72
Tabela 5. Espécimes de <i>Solanum</i> subg. <i>Leptostemonum</i> usadas neste estudo.....	80
Tabela 6. Análises realizadas pela Global Natural Products (GNPS).....	82
Tabela 7. Agliconas encontradas em amostras de <i>S. jabrense</i>	88
Tabela 8. Lista de espécies analisadas por CLAE-EM para a obtenção do perfil químico (chemical profile) de espécimes de herbário de <i>Solanum</i> subg. <i>Leptostemonum</i>	101
Tabela 9. Compostos identificados no extrato bruto e na fração rica em alcaloides. ..	157
Tabela 10. Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H para os compostos 1 , 2 e 3 em MeOD.	179

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01. Fluxograma do método utilizado para o preparo dos extratos.....	47
Esquema 02. Fluxograma da obtenção dos extratos, fases e frações das partes aéreas de <i>S. jabrense</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

ACN - Acetonitrila

BB - *Broad band*

BDO – *Biochemical Oxygen Demand*

CC - Cromatografia em coluna

CCDA - Cromatografia em camada delgada analítica

CE - *collision energy*

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-EM/EM - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a espectrômetro de massas em *tandem*

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos

COSY - *Correlation Spectroscopy*

d - Dubleto

dd - Duplo dubleto

dl - Dubleto largo

IC50 - Concentração Inibitória Média

EB - Extrato Etanólico Bruto

EM - Espectrometria de massas

EMAR – Espectrometria de Massas de Alta Resolução

ESI - *Electrospray Ionization*

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

IV - *Infravermelho*

J - *Constante de acoplamento*

MEOD – *Metanol deuterado*

MeOH – *Metanol*

M - *Multiplete*

MHz - *Mega-hertz*

MN – *molecular networking*

NOESY - *Nuclear Overhauser Spectroscopy*

ppm - *Partes por milhão*

RMN de ^{13}C - *Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13*

RMN de ^1H - *Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio*

s - *Singleto*

sl - *Singleto largo*

tr - *Tempo de retenção*

δ - *Deslocamento químico em ppm*

QTOF - *quadruplo-time off light*

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
3.1 O gênero <i>Solanum</i> L.	24
3.2 <i>Solanum</i> subg. <i>Leptostemonum</i> (Dunal) Bitter	26
3.3 <i>Solanum jabrense</i> Agra e M. Nee	28
3.4 Composição química e metabólitos especiais do gênero <i>Solanum</i> L.....	29
3.5 Alcaloides esteroidais.....	31
3.6 Saponinas esteroidais	35
3.7 Relação estrutura-atividade de alcaloides e saponinas de <i>Solanum</i> L.	37
3.8 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) e sua eficiência na identificação de alcaloides e saponinas de <i>Solanum</i> L.	38
3.9 <i>Molecular Networking</i> (Redes Moleculares) como estratégia de desreplicação e ferramenta quimiotaxômica	40
3.10 O uso de exsicatas em química de Produtos Naturais.....	41
4. PARTE EXPERIMENTAL	46
4.1 Material botânico	46
4.2 Reagentes e padrões	46
4.3 Preparo de amostras para as análises químicas	46
4.4 Extração e obtenção do extrato hidroalcólico bruto e da fração concentrada em alcaloides.....	48
4.5 Isolamento e purificação dos constituintes químicos do extrato hidroalcólico de <i>Solanum jabrense</i> Agra e M. Nee	49
4.6 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM).....	51
4.7 Processamento de dados EM/EM e geração de redes moleculares no GNPS (<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>)	52
4.8 Processamento de dados EM/EM para as análises estatísticas.....	53
4.9 Aquisição e Processamento de dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	54
4.10 Ensaios da atividade Larvicida contra <i>Aedes aegypti</i>	54
4.11 Avaliação da produção do óxido nítrico (NO).....	55
4.12 Análise estatística das atividades avaliadas	55

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
Capítulo 1: “Redes moleculares como estratégia para a desreplicação de alcalóides esteroidais de amostras de herbário de <i>Solanum jabrense</i> Agra e M. Nee, uma espécie endêmica e inexplorada” publicado no periódico <i>Chemistry and Biodiversity</i>	58
Capítulo 2: “Espectrometria de massas (ESI-QTOF-MS) e Métodos Estatísticos aplicados a Quimiosistemática de <i>Solanum</i> subg. <i>Leptostemonum</i> ” a ser submetido ao periódico <i>Biochemical Systematics and Ecology</i>	95
Capítulo 3: “Combination of Molecular Network and Larvicidal Activity against <i>Aedes aegypti</i> for Discovery of Bioactive compounds from <i>Solanum jabrense</i> Agra & M. Nee” a ser submetido ao periódico <i>South African Journal of Botany</i>	145
Capítulo 4: “Glicosídeos Esteroidais de <i>Solanum jabrense</i> Agra & M. Nee” submetido ao periódico <i>Química Nova</i>	173
6. CONCLUSÕES.....	212
7. REFERÊNCIAS.....	214

1. INTRODUÇÃO

Solanum L. é o maior e mais complexo gênero de Solanaceae, com cerca de 1.400 espécies (Aubriot et al. 2016) e 5.000 epítetos descritos (Nee, 1999). Apresenta ampla distribuição em todo o mundo, com aproximadamente 289 espécies ocorrendo no Brasil, das quais 173 são endêmicas (Flora Do Brasil 2020). Esse grupo é de grande interesse econômico por apresentar espécies amplamente utilizadas na alimentação como a berinjela (*Solanum melongena* L.), a batata (*Solanum tuberosum* L.), o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), e o pimentão (*Capsicum* spp.), além de apresentar espécies de interesse na indústria farmacêutica devido à presença de alcaloides (Barbosa-Filho et al. 1991), flavonoides (Silva et al. 2009), compostos fenólicos (Silva et al. 2003; Resende et al. 2020) entre outros metabólitos secundários (Kuanda e Zhang, 2019).

Nos últimos anos intensificaram-se as pesquisas moleculares baseadas em sequências de DNA, com o objetivo de estudar as relações filogenéticas para o gênero (Bohs, 2005; Weese & Bohs, 2007). Os resultados têm contribuído com o maior conhecimento dos táxons infragenéricos e do gênero como um todo, além de identificar grupos monofiléticos em *Solanum*, como o subgênero *Leptostemonum* (Bohs, 2005; Stern et al., 2011).

O trabalho mais atual para o subgênero divide *Solanum* subg. *Leptostemonum* em 14 grandes Clados (Stern al. 2011), muitos destes são novos agrupamentos de espécies que, anteriormente, pertenciam a grupos e seções distintas. Esses novos Clados são difíceis de definir morfológicamente devido a ampla variação dos caracteres, a similaridade e o compartilhamento de tais caracteres entre espécies de grupos distintos (Stern et al. 2011). As análises morfológicas e filogenéticas não têm sido suficientes para esclarecer as relações interespecíficas e infragenéricas em *Solanum* e seus subgrupos.

Os metabólitos secundários produzidas pelas espécies de *Solanum* não só apresentam diversas bioatividades, como podem ser utilizados na discriminação e agrupamento das espécies, no entendimento da evolução química e como marcadores quimiotaxonômicos como demonstrado por Whalen (1978), Anderson et al. (1979), Steinharter et al. (1986), Basílio et al. (2012), Ramos et al. (2017 e 2019).

De um modo geral, estudos sistemáticos em *Solanum* têm negligenciado os dados químicos, que podem constituir uma importante fonte de informações para a separação

de espécies afins e, consequentemente, a proposição de homologia de caracteres e desses fitoquímicos.

Neste contexto, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) tem sido utilizada para aumentar a rápida identificação dos constituintes químicos em mistura de drogas vegetais (Yang et al., 2021). Essa técnica analítica, tem demonstrado sua eficiência na separação, identificação e caracterização de compostos bioativos, incluindo alcaloides e saponinas do gênero *Solanum*, que em razão da ausência de grupos cromóforos em suas estruturas tornam difíceis sua identificação e isolamento apenas utilizando metodologias clássicas. A CLAE-EM combina a alta resolução da cromatografia líquida com a sensibilidade e seletividade da espectrometria de massas, permitindo a detecção desses compostos em baixas concentrações e em matrizes complexas (Sarkar et al., 2025).

Protocolos publicados usando CLAE-EM para análise de perfil de espécimes de herbário de *Solanum* e do subgênero *Leptostemonum* também têm sido utilizados em estudos de desreplicação e geração de redes moleculares, com objetivo de identificar esses compostos, já que são marcadores químicos, e utiliza-los como discriminantes para espécies ou subgrupos complexos dentro do gênero (Resende et al., 2020; Silva et al., 2024).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi realizar múltiplas abordagens utilizando análises do perfil químico e espectrometria de massas (CLAE-EM) de amostras de herbário de *Solanum* subgênero *Leptostemonum*, verificando se esta abordagem juntamente com métodos estatísticos pode ser útil para a quimiofenética e auxiliar nas classificações infragenéricas do grupo e do subgrupo, além de facilitarem a descoberta e isolamento de novos compostos bioativos.

O desenvolvimento desse trabalho representa uma importante contribuição ao conhecimento químico do gênero *Solanum* e principalmente de *Solanum* subg. *Leptostemonum*, que poderá subsidiar estudos sistemáticos, de bioprospecção, conservação, etnobotânica, entre outros.

Objetivos

Objetivo geral e específicos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Realizar análises do perfil químico de espécimes de herbário utilizando usando espectrometria de massas (CLAE-EM), estudos de desreplicação, e métodos quimiométricos, verificando se estas abordagens podem ser úteis para a quimiofenética e auxiliar nas classificações infragenéricas de *Solanum* e do subgênero *Leptostemonum*, além de facilitarem a descoberta e isolamento de novos compostos bioativos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar levantamento bibliográfico para a construção de uma biblioteca de dados de alcaloides e saponinas presentes nas espécies do gênero *Solanum*;
- Obter amostras de folhas de espécimes de herbário de espécies do gênero *Solanum* subg. *Leptostemonum*;
- Adaptar, para esse grupo de plantas, a metodologia de extração e análise em uso no nosso grupo de pesquisa;
- Obter o perfil químico (*chemical profile*) por CLAE-EM para cada uma das amostras vegetais;
- Realizar estatísticas utilizando os dados brutos e pré-processados dos perfis químicos (*chemical profiles*), obtidos no modo de ionização positivo;
- Verificar se os perfis químicos (*chemical profiles*) podem ser utilizados como ferramenta taxonômica;
- Comparar os agrupamentos obtidos nas análises estatísticas às classificações taxonômicas propostas por Agra, 2007, Stern et al., 2012 e Hilgenhof et al. 2023;
- Realizar o isolamento de compostos que possam ser utilizados como semente para a geração de redes moleculares e/ou que possuam potencial bioativo;
- Gerar redes moleculares e verificar se esta pode auxiliar na descoberta de novos compostos bioativos e utilizada com uma abordagem quimiofenética.

Fundamentação Teórica

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 O gênero *Solanum* L.

Solanum L. um dos maiores gêneros da família Solanaceae, apresenta ampla distribuição em todo o mundo, e inclui cerca de 1.245 espécies (Hillgenhof et al., 2023), com aproximadamente 289 espécies ocorrendo no Brasil, das quais 143 são endêmicas e muitas com ocorrência restrita a estados Brasileiros (Figura 01).

As plantas desse gênero podem ser ervas, arbustos, lianas ou árvores, às vezes epífitas, anuais ou perenes, com inflorescências pauci ou plurifloras, andromonoicas ou monoicas, com flores articuladas ou não, se articuladas geralmente na base, cálice tubuloso ou campanulado, corola rotada ou estrelada, androceu com 5 estames, anteras basifixas, ventrifixas ou dorsifixas, de deiscência poricida; fruto baga, globosa ou alongada, recoberta pelo cálice acrescente ou não, com número variável de sementes, estas achatadas a leve intumescidas, discoides ou reniformes, aladas ou não, com embrião curvo (Flora Do Brasil 2025) (Figura 02).

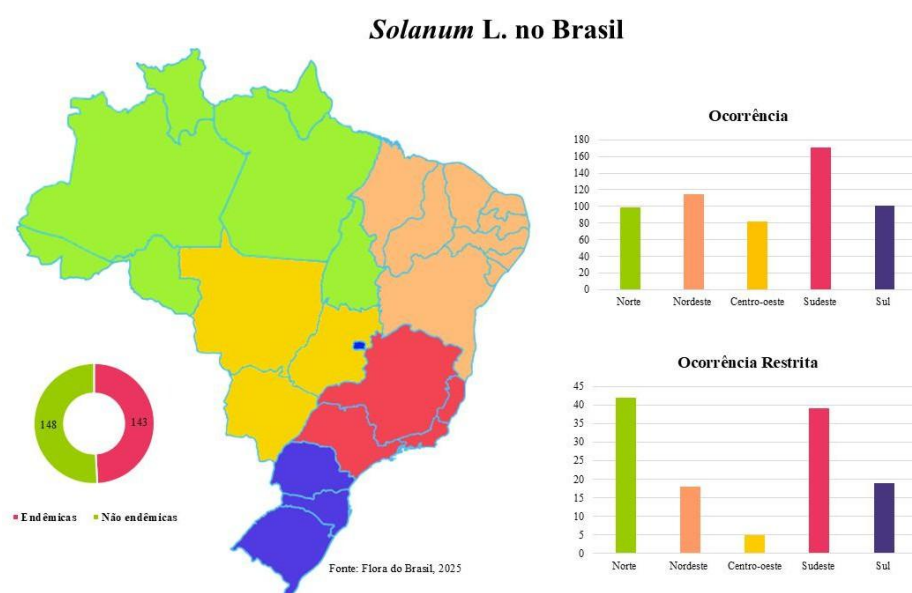


Figura 1 Ocorrência de espécies de *Solanum* L. no Brasil. Fonte: Flora do Brasil, 2025 e Silva, 2025.

As espécies desse grupo, conhecidas popularmente como “Jurubebas” são de grande interesse econômico, não só por apresentarem cultivares utilizadas na alimentação humana em todo o mundo, como a berinjela (*Solanum melongena* L.), a batata (*Solanum tuberosum* L.), o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), o pepino (*Solanum muricatum* Aiton)



Figura 2. Diversidade Morfológica do gênero *Solanum* L. A. Erva anual (clado Morelloide, *S. weddellii* Phil.). B. Videira herbácea (clado Herpystichum, *S. brevifolium* Dunal). C. Videira lenhosa (clado do tomateiro, *S. juglandifolium* Dunal). D. Arbusto de caule único (clado Pterioidea, *S. mite* Ruiz & Pav.). E. Arbusto (clado Torva, *S. glutinosum* Dunal). F. Árvore (clado Crinitum, *S. sycophanta* Dunal). G. Tricomas glandulares simples (clado Tomato, *S. habrochaites* S.Knapp & D.M.Spooner). H. Tricomas glandulares estrelados (clado Torva, *S. asperolanatum* Ruiz & Pav.). I. Mistura de tricomas glandulosos simples (curtos) e eglandulosos (longos) (clado Tomato, *S. arcanum* Peralta). J. Tricomas glandulares estrelados (clado Erythrotrichum, *S. aciculare* Sw.). K. Espinhos em forma de agulha no cálice (clado EHS, *S. dasyphyllum* Schumach. & Thonn.). L. Espinhos de base larga no tronco (clado Crinitum, *S. kioniotrichum* Bitter ex J.F.Macbr.). M. Estames homomórficos, estado mais comum em *Solanum* (clado Anarrhichomenum, *S. appendiculatum* Dunal). N. modificações nas anteras apicais e basais (i.e., projeções semelhantes a cornos; clado Normania, *S. trisectum* Dunal). O. Modificações da antera apical (i.e. apêndices; clado do tomate, *S. corneliomulleri* J.F.Macbr.). P. Conectivos alargados das anteras (clado Pachyphylla, *S. betaceum* Cav.). Q. Corolas roxas profundamente estreladas (clado Pachyphylla, *S. sycocarpum* Mart. & Sendtn.). R. Corolas roxas largamente estreladas (clado EHS, *S. linnaeanum* Hepper).

& P.-M.L.Jaeger). S. Corolas roxas rotativas com tecido interpetalar abundante (clado *Herpystichum*, *S. trifolium* Dunal). T. Corolas amarelo-esverdeadas profundamente estreladas sem tecido interpetalar (clado *Pteroidea*, *S. anceps* Ruiz & Pav.). U. Corolas campanuladas lilases claras (clado *Morelloid*; *S. fiebrigii* Bitter). V. Corolas branco-púrpura urceoladas (clado *Pachyphylla*, *S. diversifolium* Dunal). W. Corolas bilateralmente simétricas com anteras heteromórficas (clado *Normandia*, *S. trisectum* Dunal). X. Corolas bilateralmente simétricas com anteras heteromórficas (clado *Androceras*; *S. grayi* Rose var. *grandiflorum* Whalen). Y. bagas carnudas obovóides, apicalmente pontiagudas (clado *Thelopodium*, *S. thelopodium* Sendtn.). Z. Bagas carnudas globosas com variação de cor ao longo da maturação, do amarelo (verde) ao vermelho (totalmente maduro; clado *Cyphomandropsis*, *S. amotapense* Svenson); AA, Bagas laranja globosas (clado *Reductum*, *S. reductum* C.V.Morton). AB, Amoras negras globosas (clado *Morelloid*, *S. longifilamentum* Särkinen & P.Gonzáles). AC, bagas castanhas obovóides, apicalmente pontiagudas (clado *Herpystichum*, *S. limoncochaense* Tepe). AD, Bagas azuis globosas (clado *Dulcamaroid*, *S. flaccidum* Vell.). Fonte: Hilgenhof et al., 2023.

O gênero foi descrito por Linnaeus (1753) e subdividido em seções com base em caracteres morfológicos como a presença ou ausência de acúleos, tipos de inflorescências e morfologia das anteras. Estes caracteres são de extrema importância em *Solanum* e foram utilizados em diversos sistemas de classificação posteriores (Dunal, 1813, 1816 e 1852; Seithe, 1962; D'arcy, 1972 e 1991; Nee, 1999; Child e Lester, 2001; Hunziker, 2001; Aubriot e Knapp., 2022).

Nos últimos anos intensificaram-se as pesquisas moleculares baseadas em sequências de DNA, com o objetivo de estudar as relações filogenéticas para o gênero substituindo os tratamentos anteriores por um sistema informal de classificação denominado de clados (Bohs, 2005; Weese & Bohs, 2007; Sarkinen et al., 2013; e Gagnon et al. 2022). Os resultados têm contribuído com o maior conhecimento dos táxons infragenéricos e do grupo como um todo, além de identificar grupos monofiléticos em *Solanum*, como o subgênero *Leptostemonum* (Bohs, 2005; Stern et al., 2011; Aubriot et al., 2016).

3.2 *Solanum* subg. *Leptostemonum* (Dunal) Bitter

A seção *Leptostemonum* foi proposta por Dunal (1852) e reconhecida como subgênero por Bitter (1919). *Solanum* subg. *Leptostemonum* é o segundo maior de *Solanum*, com cerca de 580 espécies e distribuição cosmopolita (Gagnon et al., 2022). As sinapomorfias que distinguem o subgênero dos demais, compreendem as anteras

atenuadas para o ápice, a presença de acúleos e o indumento composto de tricomas estrelados (Whalen, 1984) (Figura 03). O Brasil é considerado centro de endemismo do subgênero, representado por cerca de 110 espécies, dentre as quais 58 são endêmicas (Agra, 2007).

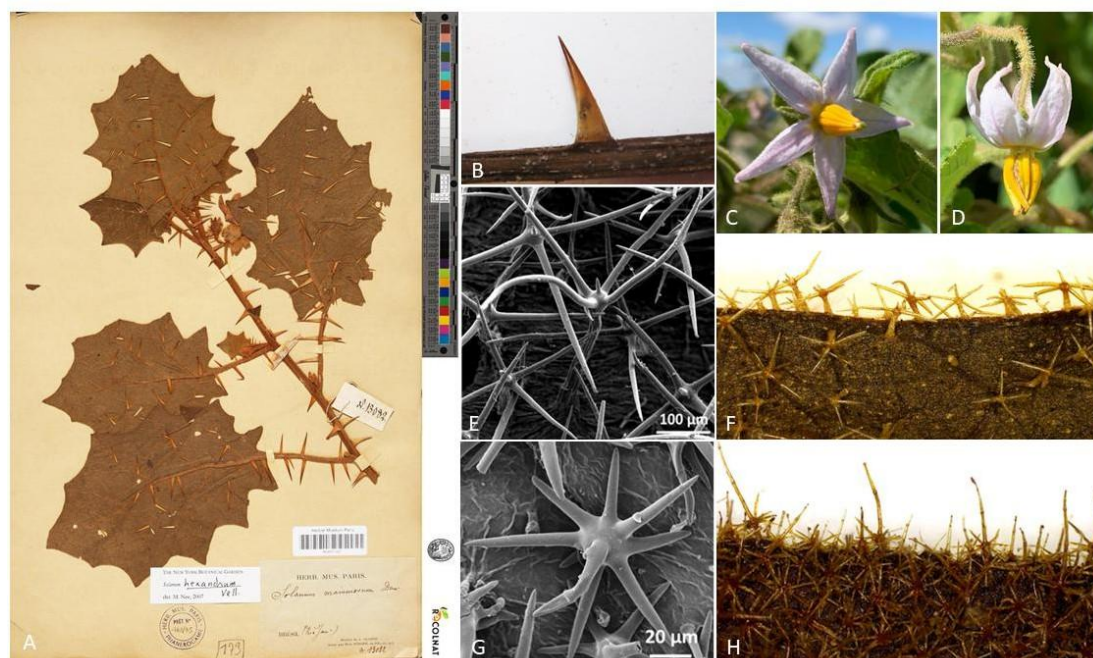


Figura 3. Sinapomorfias que distinguem *Solanum* subg. *Leptostemonum* (Dunal) Bitter. **A.** Exsicata de *Solanum hexandrum* Vell. **B.** Detalhe de um acúleo. **C e D.** Flor de *Solanum jabrense* Agra e Nee. **E e F.** Tricoma estrelado longo-estipitado com raio central curto. **G e H.** Tricoma estrelado sésil com raio central longo e glandular. Fonte: Silva, 2025.

O tratamento mais relevante para o grupo foi proposto por Whalen (1984) que utilizando de dados da morfologia e da biogeografia propôs uma filogenia hipotética classificando as espécies em 33 grupos difíceis de estabelecer com clareza e precisão os limites entre eles, já que os caracteres morfológicos utilizados são muito similares entre as espécies estudadas.

O trabalho mais atual para o subgênero divide *Solanum* subg. *Leptostemonum* em 14 clados menores, muitos destes sendo novos agrupamentos de espécies que anteriormente pertenciam a grupos e seções distintas. Esses novos clados são difíceis de definir morfológicamente devido ao grande número de sinapomorfias, a similaridade e o compartilhamento de tais caracteres entre espécies de grupos distintos (Stern et al., 2011).

Stern et al. (2011) mesmo tendo agrupado os principais clados internos ao clado *Leptostemonum*, acreditam que uma nova amostragem de espécies Brasileiras identifique novos clados e esclareçam as relações em diversos clados. Os autores reforçam a necessidade de mais estudos para clarificar as relações entre as espécies e entres os clados.

Apesar do uso de dados das sequências de DNA está mudando a circunscrição do gênero e do subgênero, muitos dos seus clados ainda possuem caracterização morfológica e relações filogenéticas complexas (Hilgenhof et al., 2023).

3.3 *Solanum jabrense* Agra e M. Nee

Solanum jabrense é uma espécie endêmica do Brasil, com ocorrência restrita a Caatinga e Mata Atlântica, encontrada principalmente em ambientes rochosos e regiões de altitude de estados do Nordeste Brasileiro. A espécie foi descrita em 1997, e seu primeiro registro foi para o Parque Nacional do Pico do Jabre, Maturéia, Paraíba, por isso epíteto específico é um substantivo genitivo que se refere ao local.

A espécie pertence à família Solanaceae, gênero *Solanum*, subg. *Leptostemonum*, e em tratamentos taxonômicos anteriores baseados em caracteres morfológicos a espécie foi inserida na seção *Erythrothrichum* se mantendo no Clado *Erythrothrichum* em tratamentos filogenéticos recentes (Agra e Nee, 1997; Stern et al. 2011; Hilgenhof et al., 2023).

Solanum jabrense é caracterizada pela sua morfologia arbustiva podendo ocorrer como arbusto ou subarbusto ereto, e atingindo cerca de 1,5 a 2 metros de altura. O caule é cilíndrico, lenhoso na base, revestido por tricomas estrelados e frequentemente armado com espinhos retos ou levemente curvados, um pouco aumentado na base e esparsamente glandulosos. As folhas simples, alternas, pecioladas com lâmina foliar ovada a elíptica ou cordada, e margem inteira ou levemente lobada. A superfície adaxial glabra a pubescente, enquanto a abaxial apresenta tricomas estrelados densos e ambas as faces fortemente armadas de espinhos amarelos aciculares. A inflorescência pode ser racemosa ou cimosas, extra-axilar, com 5 a 10 flores com pedicelos delgados e pubescentes e as flores hermafroditas e actinomorfas, com cálice lobado quase na base, recoberto por tricomas estrelados e lobos lanceolados e acuminados. A corola rotácea, de coloração lilás a arroxeadas, com lóbulos reflexos. Estames curtos e anteras alongadas, de deiscência poricida. Os frutos se apresentam na forma de baga globosa, indeiscente, inicialmente

esverdeada e tornando-se amarela ou alaranjada quando madura. Superfície glabra ou levemente pubescente. Polpa succulenta com numerosas sementes reniformes, castanho-claras (Agra, 1997) (Figura 04).



Figura 4. *Solanum jabrense* Agra e M. Nee. **A.** Hábito. **B.** Detalhe da folha e galhos com acúleos. **C.** Flor. **D.** Detalhe da corola reflexa e anteras atenuadas. **E.** Botão floral fechado e cálice reflexo. **F.** Fruto do tipo baga. Fonte: Silva, 2025.

Embora seu potencial medicinal ainda seja pouco explorado, estudos relatam sua ação espasmolítica (Cavalcante et al., 2013) e molluscicidal (Silva et al., 2005) e compreender sua composição química pode auxiliar no entendimento de suas interações ecológicas, distribuição geográfica e principalmente de suas propriedades biológicas, sendo fundamental para embasar ações de conservação e estimular o aproveitamento sustentável de seus recursos, contribuindo também para a valorização e a preservação da biodiversidade regional e nacional.

3.4 Composição química e metabólitos especiais do gênero *Solanum* L.

Metabólitos secundários (ou especiais) de plantas são produzidos como parte do crescimento, defesa e de processos reprodutivos, sendo uma das fontes mais importantes de produtos terapêuticos. A descoberta e entendimento desses compostos químicos pode criar novas oportunidades para atender a demanda global em nutrição, qualidade da alimentação e medicinal (Yang et al., 2013; Wu et al., 2013). No reino vegetal a produção desses metabólitos biologicamente ativos é difundida, e tem sido usado a séculos pelos humanos (Chowański et al., 2015).

O gênero *Solanum* é bastante conhecido pela presença de compostos bioativos, como compostos fenólicos, flavanoides, carotenóides, esteróides, alcaloides de tropano e principalmente os alcaloides esteroidais (Resende et al., 2020). Recentemente, Kuanda e Zhang (2019) realizaram uma grande revisão para o gênero onde apresentam 66 espécies medicinais, seus usos tradicionais e 670 constituintes químicos isolados, incluindo 134 saponinas esteroidais, 63 alcalóides esteroidais, 13 glicosídeos pregnano, 128 terpenos, 75 favonoides, 31 lignanas, 31 outros tipos de alcalóides, 66 esteróis, 52 compostos fenólicos, 20 cumarinas e coumestanas, 4 cumarinolignóides, 23 ácidos graxos e ésteres e 30 outros compostos (Figura 05).

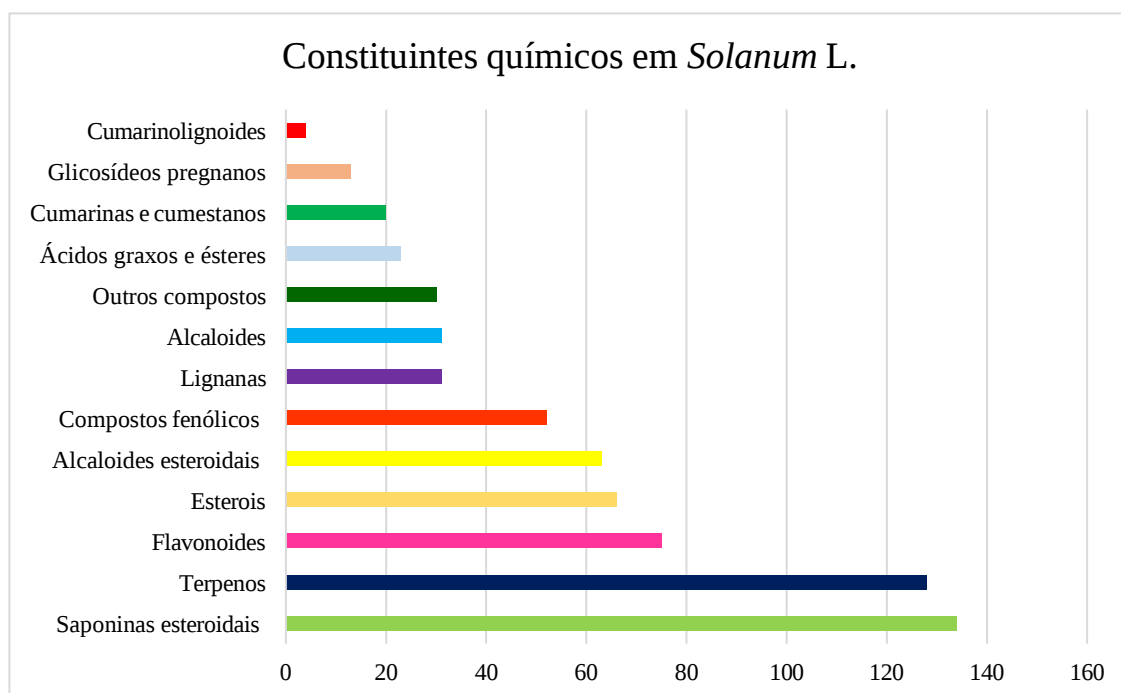


Figura 5. Constituintes químicos isolados em espécies de *Solanum* L. Fonte: Silva, 2025

Esses compostos são responsáveis pelos usos na medicina tradicional das plantas desse gênero. Diversos estudos têm sido realizados para verificar e validar essas aplicações. As atividades farmacológicas estudadas incluem analgésica, anti-helmíntica, antialérgica, antianêmica, antiasmática, antibacteriana, anticâncer, anticonvulsivante, antidepressiva, antidiabética, antifúngica, anti-histamínica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antileishmania, antimelanogénica, antinoluscida, antinociceptiva, antipsoriática, antiplasmodial, antiprotozoária, antitripanossomal, antiurolitíase, antiviral, cardiovascular, diurética, hepatoprotetora, hipolipidêmica, larvicida, nefrotóxica, espasmolítica, esquistossomicida e atividades vasorelaxantes (Kaunda e Zhang et al., 2019).

As plantas desse grupo possuem grande potencial medicinal, no entanto a maioria das espécies permanecem desconhecidas ou escassamente estudadas quanto aos constituintes químicos. São necessários estudos que explorem e investiguem mais as suas espécies, atividades farmacológicas, determinação de seus locais-alvo exatos, relações estrutura-atividade e outras aplicações medicinais (Kuanda e Zhang, 2019).

3.5 Alcaloides esteroidais

Os alcaloides esteroidais são compostos nitrogenados secundários frequentemente tóxicos e desempenham papéis importantes na defesa das plantas contra herbívoros e patógenos. Em particular *Solanum* produz uma grande variedade desses alcaloides e estes têm sido amplamente estudados devido ao potencial anticâncer, antiolesterol, antimicrobiano, antiinflamatório, antinociceptivo, antipirético, tóxicos, entre outros (Milner et al., 2011, Kaunda e Zhang et al., 2019).

A estrutura dessas moléculas consiste de um esqueleto esteroidal com um átomo de nitrogênio incorporado no anel F ou na cadeia lateral como parte integral da molécula (Xiang et al., 2022). Esses compostos nitrogenados, derivados de esteroides naturais, são os de maior interesse no gênero, e são conhecidos como alcalinas esteroidais com esqueleto C-27 de colestano e os mais comuns se apresentam formados por uma cadeia carbônica hidrofóbica, a aglicona, composta por 27 carbonos e um carboidrato hidrofílico ligado na posição C-3 (Milner et al., 2011, Friedman et al., 2016, Hameed et al., 2017, Xiang et al., 2022). Além da cadeia de açúcares, e as metilas nas posições C-18, C-19, C-

21 e C-27 oriundas da biossíntese, outros grupos podem estar ligados aos seus anéis, sendo as maiores ocorrências de hidroxilas, carbonilas e metoxilas (Figura 06).

As agliconas desses alcaloides, podem ser classificadas em três tipos estruturais dependendo da sua composição: (1) solanidano, (2) espirosolanos e (3) 22, 26-epiminocolestanos, quando ligadas a uma unidade glicosídica esta pode ser compreendida por 2-4 pentoses ou hexoses, sendo a chacotriose, solatriose, licotetraose e commertetraose as mais encontradas (Friedman et al. 1997; Milner et al. 2011; Morillo et al. 2020; Zhao et al., 2021) (Figura 07). Os tipos solanidanos e espirosolanos de aglicona também são os de maiores ocorrências relatadas na literatura, encontrados em diversas espécies e considerados marcadores químicos para o grupo (Zhao et al., 2021) (Figura 08).

Eles são sintetizados a partir do acetil-CoA, que entra no ciclo do mevalonato (MVA) para formação de moléculas de farnesildifosfato ou pirofosfato de farnesila (FPP) que por sua vez, são condensados e dão origem ao pirofosfato de pré-esqualeno, que posteriormente é reduzido a esqualeno. O esqualeno formado é então ciclizado em 2,3-oxidosqualeno, convertido em cicloartenol e subsequentemente o cicloartenol em colesterol, que é o precursor central dos esteroides vegetais (Figura 06).

O colesterol é então modificado por uma série de reações de hidroxilação, oxidação e transaminação, introduzindo assim um átomo de nitrogênio para formação de alcalinas esteroidais. Esses compostos nitrogenados são conhecidos como pseudoalcaloides já que possuem uma incorporação tardia do nitrogênio em sua biossíntese e diferentemente dos alcaloides verdadeiros, não são derivados de um precursor inicial de aminoácidos (Figura 06).

Depois da incorporação do nitrogênio, grupo azoto, esses alcaloides são glicosilados, por um conjunto de glicosiltransferases (UGTs), para produção do que chamamos de glicoalcaloides e estes são então armazenados nos vacúolos ou apoplastos das células vegetais (Figura 06).

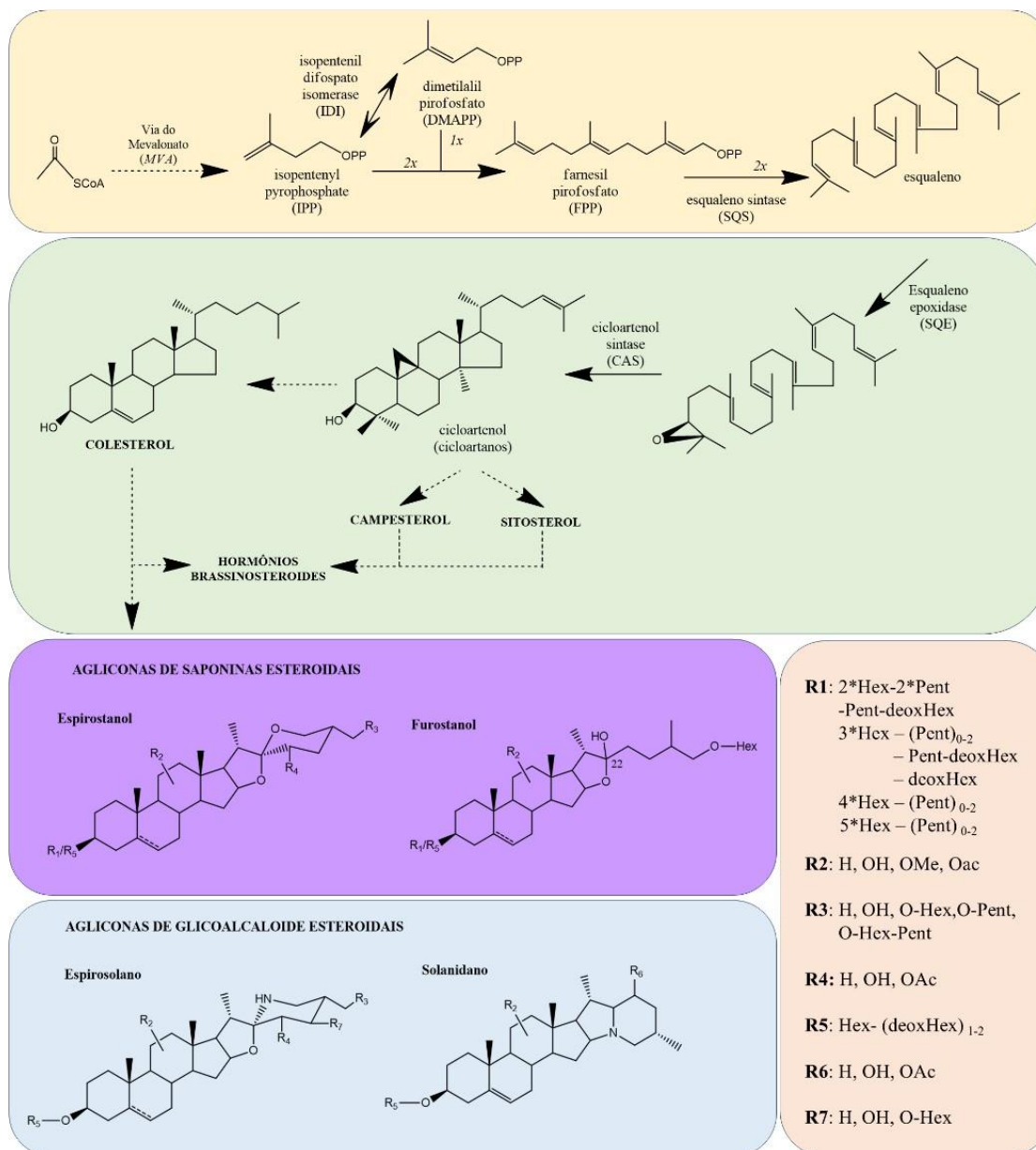


Figura 6. Visão geral da biossíntese e diversidade de alcaloides e saponinas esteroidais de *Solanum L.*

Fonte: Adaptado de Moses et al., 2014 e Heining e Aharoni, 2014.

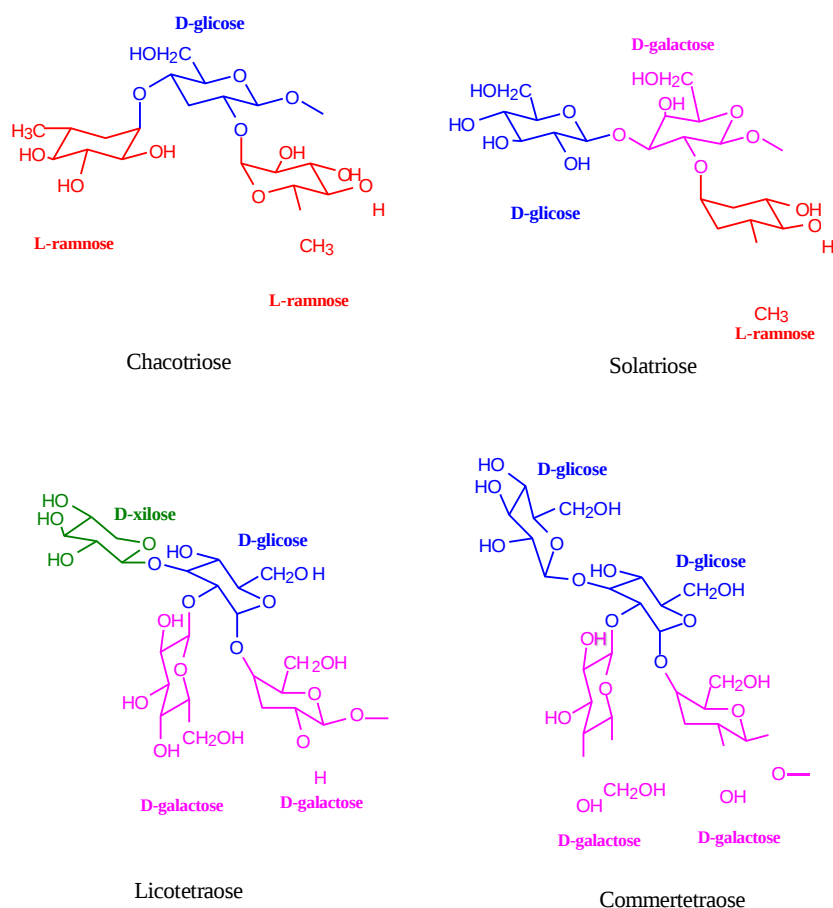


Figura 7. Estrutura das cadeias glicosídicas mais comuns em glicoalcalóides de *Solanum* L. Fonte: Silva, 2025.

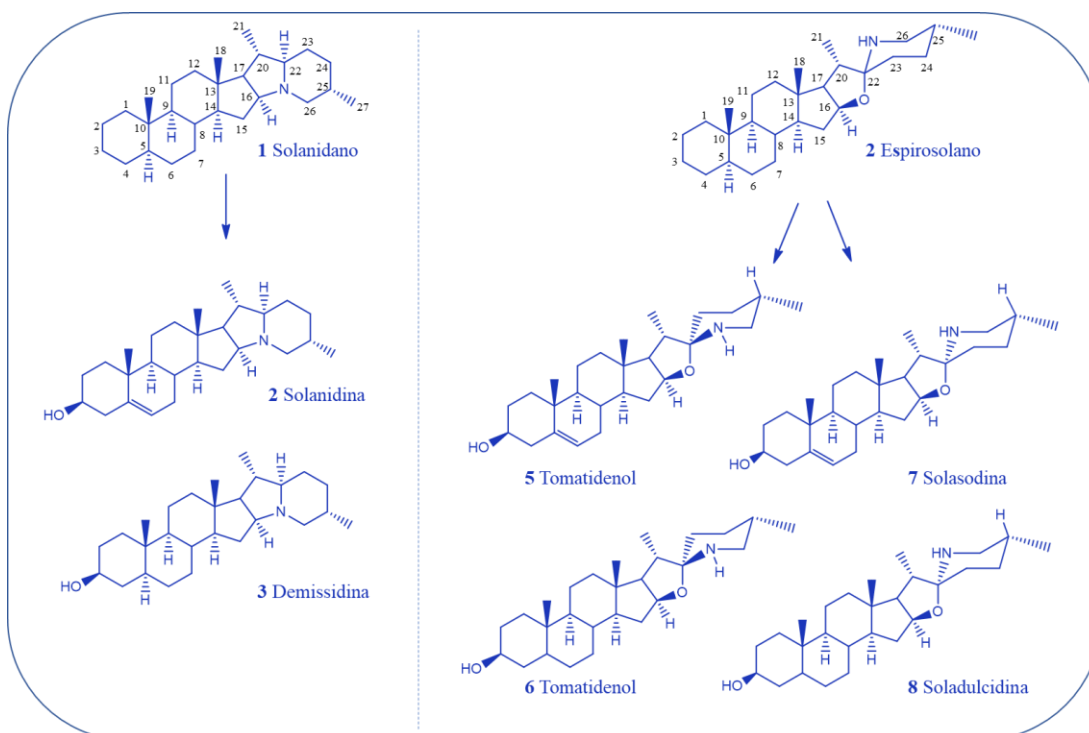


Figura 8. Estrutura das alcalinas esteroidais (solanidano e espirosolano) e as estruturas típicas das unidades agliconas dos glicoalcalóides de *Solanum* L. Fonte: Adaptado de Zhao et al., 2021.

3.6 Saponinas esteroidais

As saponinas são metabolitos secundários naturais, estruturais e funcionalmente diversos, amplamente distribuídas nos vegetais. A estrutura de uma aglicona hidrofóbica e moléculas de açúcares hidrofílicas, tornam as saponinas altamente anfipáticas e confere a elas propriedades espumantes e emulsionantes. Estas moléculas tensoativas possuem um papel importante na ecologia vegetal e também são exploradas para uma vasta gama de aplicações comerciais nos setores alimentares, cosméticos e farmacêuticos (Moses et al. 2014; Chen et al. 2021).

As saponinas esteroidais de *Solanum* são glicosídeos esteroidais ou triterpenoides que possuem propriedades surfactantes e de defesa, são ótimos agentes permeabilizantes de membrana além de immunoestimuladores, hipocolesterolêmicos, anti-carcinogênicos, anti-inflamatório, antimicrobiano, antifúngica, molluscicidal e possuem propriedades antioxidantes (Kaunda e Zhang, 2019).

Estes compostos no gênero são derivados do mesmo precursor central que os alcaloides esteroidais, o colesterol. Entretanto, o colesterol sofrerá uma série de rearranjos para formação de sapogeninas esteroidais, como a diosgenina, e essas sapogeninas são glicosiladas por glicosiltransferases para formar as saponinas esteroidais, que também são armazenadas nos vacúolos das células vegetais (Li et al., 2025) (Figura 06).

Esses derivados de esteroides normalmente consistem de um esqueleto C-27 hidrofóbico de colestano com um oxigênio fundido no anel F, sendo mais comum ocorrerem na forma de espirostanol, furostanol e colestano. No entanto, saponinas esteroidais C-21 também já foram relatadas em espécies de *Solanum* (Zhao et al., 2022) (Figura 09).

Igualmente nos alcaloides esteroidais a unidade da aglicona hidrofílica restante de uma saponina esteroideal tem sido frequentemente relatada como substituída na posição C-3 da sapogenina. Entretanto, diferentemente dos alcaloides, esses compostos podem ter de um a cinco monossacarídeos ligados linearmente, ou com uma ou mais cadeias ramificadas. Os monossacarídeos mais comuns são a D-Glc, D-Gal, D-Xyl, L-Rha e L-arabinose (L-Ara) (Zhao et al., 2022) (Figura 10).

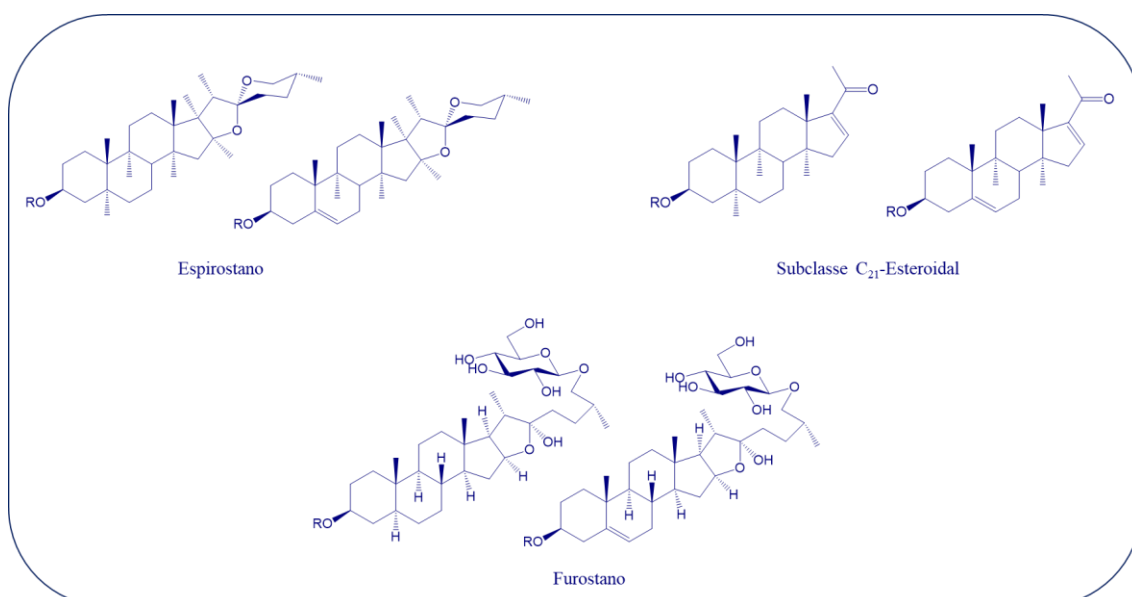


Figura 9. Sapogeninas mais comuns encontradas em *Solanum* L. Fonte: Adaptado de Zhao et al., 2022

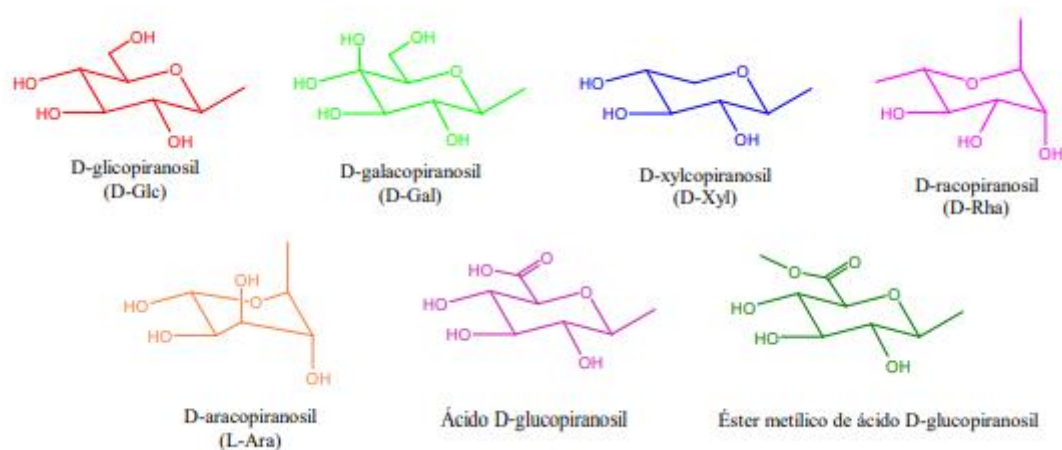


Figura 10. Estrutura das cadeias glicosídicas mais comuns em saponinas de *Solanum* L. Fonte: Adaptado de Zhao et al., 2022.

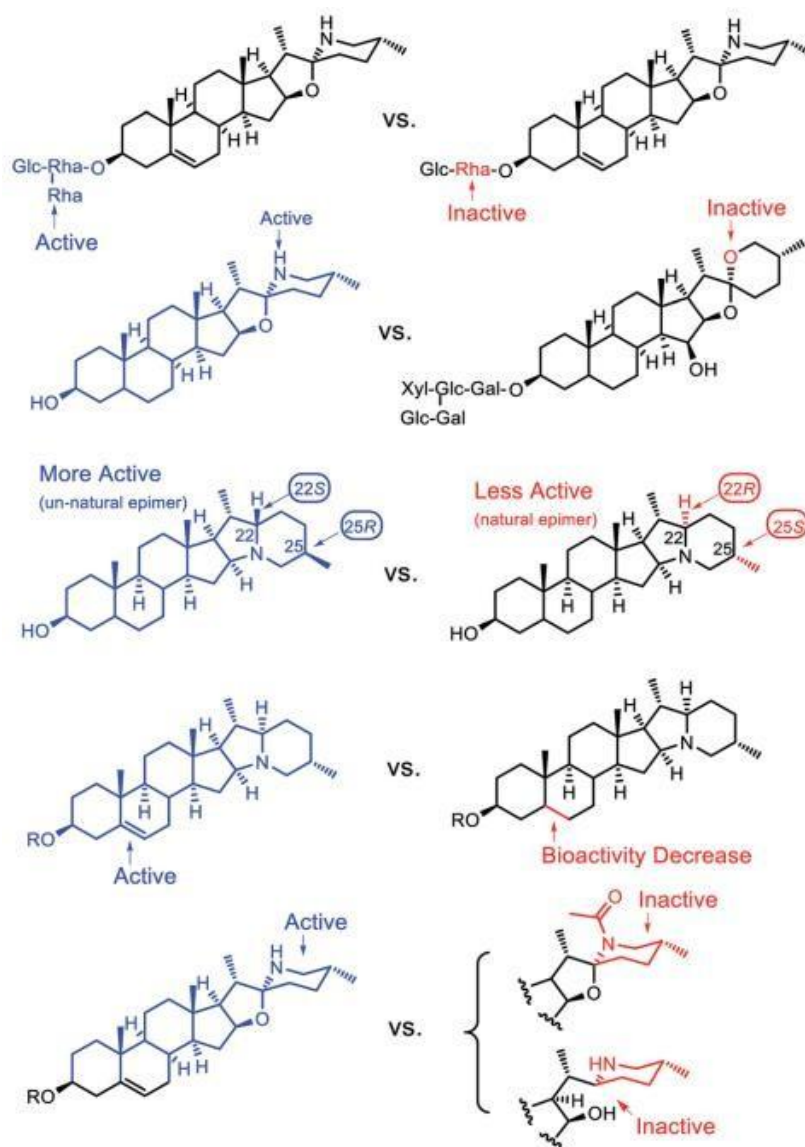


Figura 11. Exemplos selecionados de relação estrutura-atividade de alcaloides de *Solanum* L. Fonte: Zhao et al., 2021

3.7 Relação estrutura-atividade de alcaloides e saponinas de *Solanum* L.

A composição das estruturas dos alcaloides e saponinas de *Solanum* influenciam em sua atividade biológica. Diversos estudos têm demonstrado que tanto a fração aglicona quanto as unidades glicosídicas são de vital importância para a bioatividade dessas estruturas. A comparação nas variações das estruturas dentro de um sistema biológico específico auxilia na construção de uma relação estrutura-atividade abrangente. Até o momento, muitos grupos funcionais nas agliconas foram identificados como cruciais para a bioatividade (Milner et al., 2011).

A Figura 11 resume os principais grupos funcionais nas agliconas e suas relações estrutura-atividade. A ligação dupla entre C-5 e C-6 no anel B das agliconas de alcaloides esteroidais é necessária para a atividade lítica. No entanto, para esqueletos solanidanos, em comparação com os esteroidais, a saturação entre C-5 e C-6 é mais relevante. Se o

anel E for quebrado, a bioatividade diminui. Na maioria dos casos, a modificação do anel F de qualquer uma das frações da aglicona leva a uma perda de bioatividade, como na substituição do átomo de nitrogênio por oxigênio ou na adição de um grupo acetil ao nitrogênio (Milner et al., 2011).

Uma cadeia lateral de carboidrato é um requisito para as propriedades biológicas desses derivados de esteroides (Roddick, 1979). Também foi relatado que o grupo hidroxila livre na cadeia lateral de chacotriose da α -chaconina é fundamental para determinadas atividades dos alcaloides (Chen et al. 2010). Portanto, a remoção ou modificação das unidades de carboidrato, bem como a modificação da aglicona, especialmente no anel F, pode alterar a bioatividade desses metabolitos de *Solanum* (Zhao et al., 2021).

Encontrar e identificar os principais genes associados à biossíntese dessas frações funcionais é fundamental. Por exemplo, genes envolvidos na modificação da estrutura da aglicona podem influenciar diretamente a atividade biológica dessas estruturas, determinando suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. A identificação e caracterização desses genes permitem a manipulação racional das vias biossintéticas para potencializar efeitos desejáveis ou minimizar efeitos adversos. Além disso, a engenharia metabólica pode ser aplicada para produzir análogos estruturais com propriedades otimizadas, ampliando as possibilidades de aplicação terapêutica desses compostos Iijima et. al, 2013, Sánchez-Mata et al., 2010).

3.8 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) e sua eficiência na identificação de alcaloides e saponinas de *Solanum L.*

O perfil químico de extratos brutos usando da espectrometria de massas (EM) tem sido bem implementado na rotina de laboratórios de produtos naturais (PN), e vantagens como alta sensibilidade e alta seletividade possibilitam a identificação de diversos compostos entre centenas detectados (Resende et al., 2020). Dessa maneira, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) tem sido utilizada para aumentar a rápida identificação dos constituintes químicos em mistura de drogas vegetais (Yang et al., 2021).

Essa técnica analítica poderosa na identificação e quantificação de metabólitos secundários em plantas, tem demonstrado sua eficiência na separação, identificação e caracterização de compostos bioativos, incluindo alcaloides e saponinas do gênero

Solanum, que em razão da ausência de grupos cromóforos em suas estruturas tornam difíceis sua identificação e isolamento apenas utilizando da cromatografia clássica, ou cromatografia líquida acoplada a detectores de UV-VIS ou Infravermelho (IF), por exemplo. A CLAE-EM combina a alta resolução da cromatografia líquida com a sensibilidade e seletividade da espectrometria de massas, permitindo a detecção desses compostos em baixas concentrações e em matrizes complexas (Sarkar et al., 2025).

Essa técnica permite a separação dos compostos presentes em uma mistura complexa, enquanto a EM fornece informações estruturais detalhadas, como massa molecular e padrão de fragmentação, essenciais para a identificação e quantificação dos metabólitos (Yuan et al., 2020). A interface mais comum para acoplamento é a ionização por eletronebulização (ESI), que permite a ionização suave de compostos polares e não voláteis, como os alcaloides e as saponinas, e tem sido desenvolvidos protocolos para utilização da tecnologia do qTOF (Quadrupole Time-of-Flight) e criação de perfil de fragmentação destas duas grandes classes de metabólitos semipolares (Heining e Aharoni, 2014) (Figura 12)

Estudos recentes têm demonstrado a eficácia da CLAE-EM para caracterizar alcaloides e saponinas em espécies comestíveis de *Solanum*, permitindo a detecção destes em níveis traço, fornecendo informações sobre seus padrões de fragmentação e facilitando a diferenciação entre isômeros estruturais (Yuan et al. 2020; Friedman, 2006). Além disso, permite a identificação de uma ampla gama de glicoalcaloides de solasodina e seus derivados hidroxilados e metilados incomuns ou potencialmente novos (Yuan et al., 2019). Também foi possível realizar estudo de bioprospecção de espécies subexploradas do grupo para explorar glicoalcalóides bioativos e outros compostos com potenciais atividades pesticidas para o desenvolvimento de bioformulações verde (Popova et al. 2022).

Protocolos aplicados usando CLAE-EM para análise de perfil de espécimes de herbário de *Solanum* também têm sido utilizados em estudos de desreplicação e geração de redes moleculares, com objetivo de identificar esses compostos, já que são marcadores químicos, e utiliza-los como discriminantes para espécies ou subgrupos complexos dentro do gênero (Resende et al., 2020; Silva et al., 2024).

Para o desenvolvimento de estudos de desreplicação utilizando CLAE-EM, não são necessárias grandes quantidades de amostras, possibilitando assim que mesmo em extratos produzidos em escala miniaturizada sejam identificadas e/ou anotadas diversas moléculas, ainda que ocorram em quantidades traço, como observado na literatura em

diversos estudos e protocolos publicados (Perez de Souza et al., 2019; Kim e Verpoorte, 2019; Pilon et al. 2020; Silva et al., 2024).

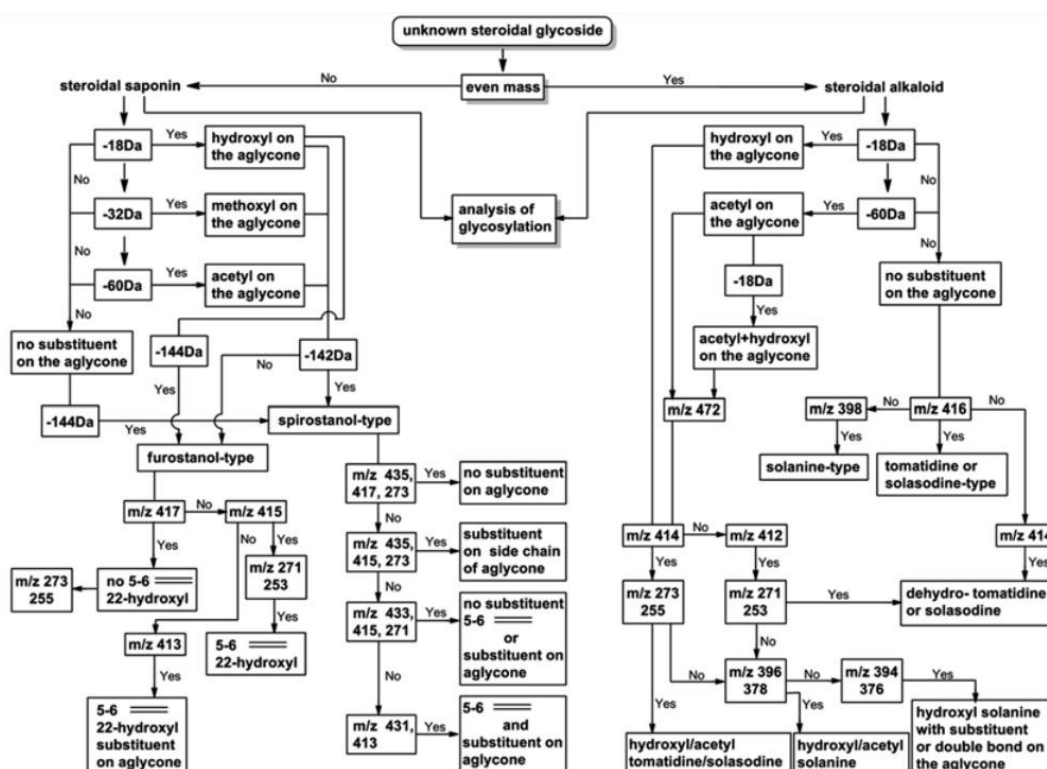


Figura 12. Esquema para a identificação putativa de saponinas e alcalóides esteróides através da interpretação de padrões característicos de fragmentação de massa. Os alcalóides e as saponinas podem ser primeiramente diferenciados de acordo com a ocorrência de massas iônicas moleculares pares ou ímpares (compostos contendo um azoto). Para além da análise do padrão de glicosilação (principalmente de C3), as substituições de hidroxila, acetila e metoxila levam a perdas neutras específicas de 18, 32, e 60 Da (substituintes agliconas mais comuns, em casos raros podem também ocorrer outros grupos, por exemplo, carboxilo). A discriminação entre diferentes estruturas de agliconas pode ser feita de acordo com perdas neutras específicas (por exemplo, -144 Da para saponinas do tipo furostanol, -142 Da para saponinas do tipo espirostanol) ou pela análise da massa da aglicona e das massas de produtos de fragmentação destas agliconas. m/z massa para carga, Da Dalton, = ligação dupla. Fonte: Heining e Aharoni, 2014.

3.9 *Molecular Networking* (Redes Moleculares) como estratégia de desreplcação e ferramenta quimiotaxômica

As redes moleculares têm sido fundamentais nesse processo de desreplificação, e refletem a diversidade molecular obtida em experimentos de espectrometria de massa em tandem, estabelecendo relações de espectros de fragmentação de compostos a partir de suas similaridades e criando *clusters* de compostos com perfis espectrais semelhantes. Elas são a principal ferramenta utilizada em plataformas online, baseada em nuvem, como o *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS), e fornecem uma análise e curadoria de dados de MS² (Aron et al., 2020).

De forma simplificada, as redes moleculares baseada em espectrometria de massa, como as do GNPS, possibilitam a observação de que moléculas da mesma classe química, compartilham padrões de fragmentação EM/EM semelhantes baseado em uma escala de vetores resultante para cada um dos espectros de fragmentação obtidos, e assim a partir da proximidade desses vetores, é calculado um valor de cosseno que quanto mais próximo de um, maior a similaridade das estruturas químicas e quanto mais distante de um, menor a similaridade (Yang et al., 2013) (Figura 13).

A utilização de redes moleculares como estratégia de desreplicação e para estudos de metabolômica tem se multiplicado nos últimos anos, não só para anotação e identificação de compostos já conhecidos, como também levando ao isolamento guiado de novos compostos com potencial atividade biológica, como neolignanas de dicoumaroil e liganas de espécies de *Sageretia* (Rhamnaceae) (Kang et al., 2018), saponinas 18-norspirostanol do gênero *Trillium* (Melanthiaceae) (Li et al., 2019), e picrotoxanos de espécies do gênero *Austrobuxus* (Euphorbiaceae) (Olivon et al., 2020).

Além disso, as redes moleculares também têm sido utilizadas com uma abordagem quimiotaxonômica e diversos trabalhos têm sido publicados usando essa ferramenta como forma de organizar os dados e observar as semelhanças e diferenças químicas do universo de compostos contidos em amostras biológicas do mesmo gênero de plantas, como em *Salvia* L. (Lamiaceae) (Kharazian et al. 2024), *Viscum* (Santalaceae) (Moyo et al., 2023), *Ficus* (Moraceae) (Bakry et al. 2023) e *Mormodica* (Cucurbitaceae) (Ramabulana et al., 2021), de fungos como em *Aspergillus* (Wang et al., 2021) e *Cortinarius* (Hammerle et al., 2021), entre outros organismos (Figura 14).

3.10 O uso de exsiccatas em química de Produtos Naturais

A pesquisa sobre produtos naturais derivados de plantas é realizada utilizando uma ampla gama de materiais de diversas origens. O material vegetal é comumente coletado diretamente da natureza, vindo de plantas nativas ou cultivadas, e pode ser adquirido em sua forma bruta ou já processada. No campo da ciência vegetal, um exemplar de referência geralmente é um espécime de herbário, prensado e seco, com informações detalhadas sobre a coleta, funcionando como um registro de uma planta específica no tempo e no espaço (Eisenman et al., 2012).

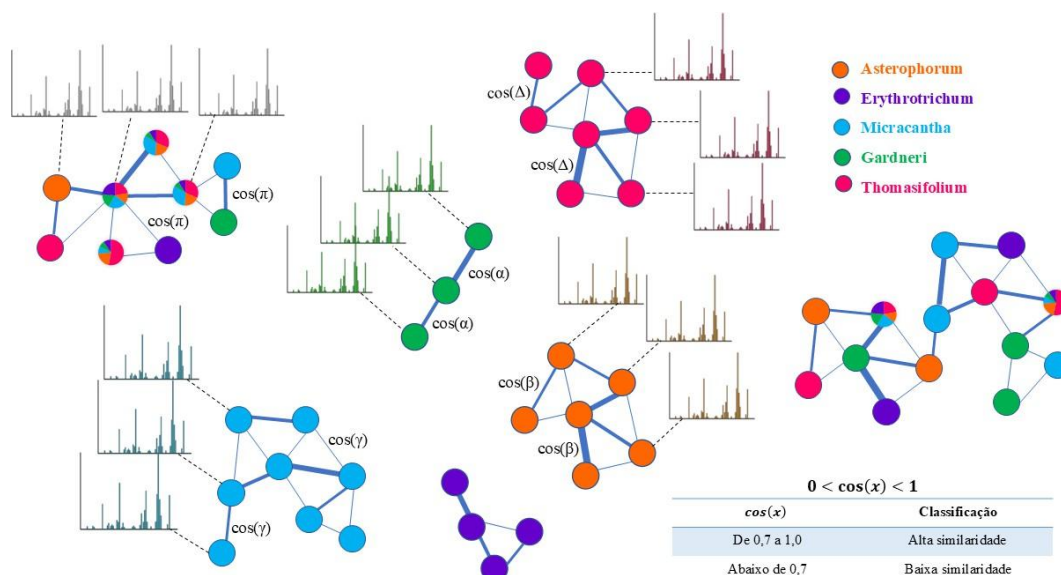


Figura 13. Esquema geral de funcionamento e organização das redes moleculares do GNPs. Fonte: Silva, 2025.

Se um espécime não for depositado em herbários ou não for disponibilizado a outros, a verdadeira identidade dos materiais vegetais utilizados em um estudo ou pesquisa pode ser questionada (Miller e Nyberg, 1995).

Desta maneira, espécimes de herbário são uma fonte essencial para dados de características de plantas, incluindo metabólitos secundários, entretanto, esses recursos globais, devem ser minimamente modificados no processo de amostragem para preservá-los para as gerações futuras (Tasca et al., 2018).

Entretanto, o advento de ferramentas analíticas modernas, que dispensam a necessidade de grandes volumes de amostra possibilita que amostras secas de herbários (exsicatas) sejam utilizadas como fontes de amostras para estudos em química de produtos naturais como já demonstrado por Tasca et al., 2018; Kao et al., 2018; Foutami et al., 2018; Cook et al., 2021; e Resende et al., 2020.

O uso de material de herbário pode constituir um primeiro passo útil na triagem de plantas com componentes biologicamente ativos estáveis ou para uma maior compreensão científica do uso de plantas popularmente utilizada na medicina tradicional (Eloff, 1999; Cook et al., 2021). Apesar da utilização de amostras de herbário para análises químicas ainda serem pouco explorada, estas podem responder a uma grande quantidade de questões em pesquisa e tem sido cada vez mais reconhecido seu potencial (Foutami et al., 2018; Barny et al., 2021).

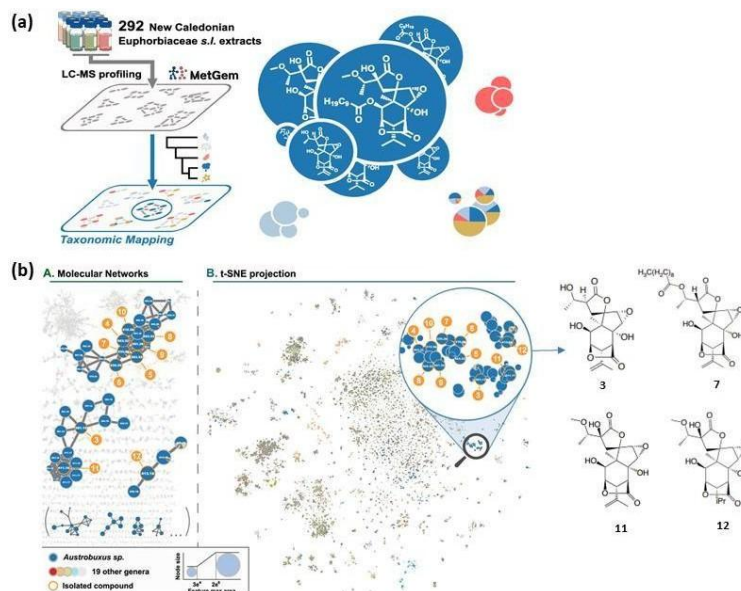


Figura 14. Uso de redes moleculares como estratégia de desreplicação. **(a)** Fluxo de trabalho para análise de perfil por LC-MS² de extratos de Euphorbiaceae, organizando o conteúdo metabólito e mapeando os dados taxonômicos em redes moleculares para detecção de agrupamentos específicos da família e seus gêneros. **(b)** Rede molecular representando 20 gêneros em nodos distintamente coloridos, e evidenciando famílias moleculares específicas do gênero *Austrobuxus* detectadas em aglomerados de cor azul que levaram ao isolamento guiado de novos compostos. Fonte: Adaptado de Olivon et al., 2021.

De um modo geral, estudos sistemáticos têm negligenciado os dados químicos de espécimes de herbário, que podem constituir uma importante fonte de informações adicionais para a distinção interespecífica e, conseqüentemente, proposição de homologia de caracteres e metabólitos secundários, estes últimos já são até incluídos em classificações de plantas como no APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016) (Figura 15).

APG IV

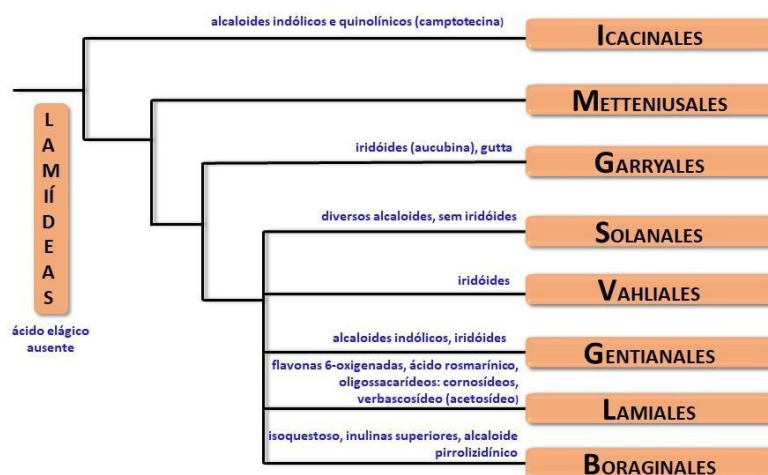


Figura 15. Cladograma modificado do APG IV (2016) demonstrando a utilização de metabólitos secundários em sistemas de classificações. Fonte: APG IV: Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants.

Parte Experimental

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material botânico

Três folhas de 26 espécies de *Solanum* subg. *Leptostemonum* (75 espécimes) foram coletadas da coleção de referência da Professora Dra. Maria de Fátima Agra localizada no Centro de Biotecnologia (CBiotec), do Herbário Lauro Pires Xavier (JPB) e do Herbário Jayme Coelho de Moraes (EAN) ambos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I e Campus II, respectivamente.

Partes aéreas (folhas e galhos) de *S. jabrense* também foram coletados na cidade de Maturéia, Paraíba, Brasil, e na Cidade de Buíque, Pernambuco, Brasil, e uma exsiccata depositada no Herbário Lauro Pires Xavier (JPB) (JPB 42267) e no Herbário Jayme Coelho de Moraes (EAN) (EAN 30483), respectivamente, localizados na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), e identificada pela Professora Dra. Maria de Fátima Agra. O acesso ao patrimônio genético registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob os códigos A2B19D6 E AD609FD. O material fresco coletado foi seco em estufa (cerca de 40 °C) por 10 dias e triturado, para obtenção do pó.

4.2 Reagentes e padrões

A água ultrapura utilizada foi obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore®) e os solventes orgânicos, Metanol (MeOH), Hexano (n-Hex), n-Butanol (n-BuOH), Clorofórmio (CHCl₃) e Acetato de Etila (EtOAc) grau CLAE foram adquiridos da Biograde® (Bio Scie Indústria e Comércio LTDA), Acetonitrila (ACN) da Supelco® e ácido fórmico grau CLAE da J.T. Baker® (Avantor®) ou grau CLAE-EM da Sigma-Aldrich®. Hidróxido de amônio da ACS (Tedia Company, INC) e ácido acético glacial diluído (P.A. ACS, 99,7%, Quimex, F. Maia Indústria e Comércio LTDA). Os solventes deuterados, Metanol-d₄ (CD₃OD 99%D) e H₂O-d₂ (D₂O) também foram comprados da Sigma-Aldrich®. E o padrão solasodina cedido pelo Professor Dr. José Maria Barbosa Filho do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

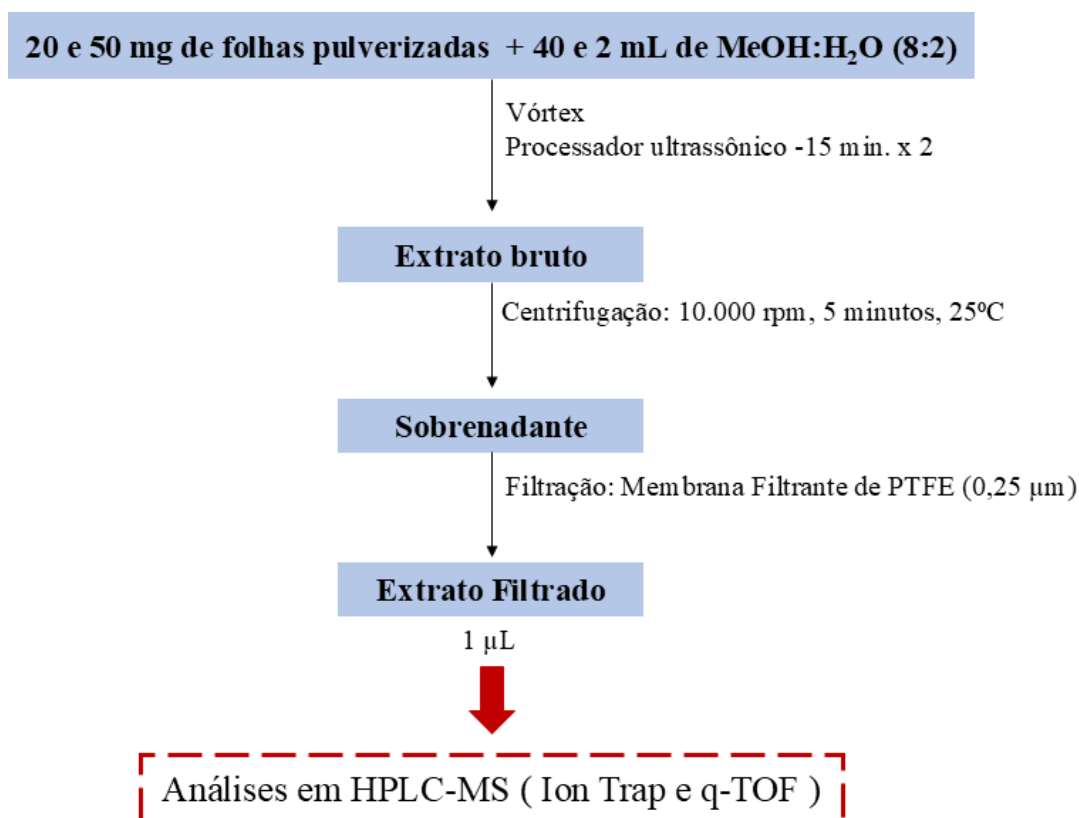
4.3 Preparo de amostras para as análises químicas

Para a adaptação e padronização da metodologia de extração, duas soluções

extrativas foram testadas, dois volumes de solução e duas quantidades de amostra (50 e 20 mg) (Tabela 01, Esquema 01). Entretanto, a solução escolhida para o desenvolvimento do trabalho foi a MeOH:H₂O/ 80:20.

Tabela 1. Volumes, quantidades e concentrações testadas para padronização da metodologia de extração.

Volumes (mL)	Quantidade de amostra (mg)	Concentrações (v/v)
40 mL	50 mg	MeOH:H ₂ O/ 80:20
2 mL	20 mg	MeOH:H ₂ O:CH ₂ O ₂ / 70:30:0.1



Esquema 01. Fluxograma do método utilizado para o preparo dos extratos.

Para o desenvolvimento do primeiro capítulo cerca de 50 mg de cada amostra seca de herbário foi pesada em balança de precisão (0.0001-220 g, Shimadzu®), pulverizada, extraída com 80% de MeOH (8:2, MeOH:H₂O, v/v, 32 mL) e sonicada em banho de ultrassom (Eco-Sonics, 3 L, 40 kHz) por 15 min. à temperatura ambiente (25 °C). A mistura extraída foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 min. a 25 °C (Hermle Labor Technik, Z326 K), este procedimento foi repetido por duas vezes, e o sobrenadante concentrado em evaporador rotativo sob vácuo (Rotavapor® R-100, Buchi). Após essa

etapa, cerca de 1 mg do extrato foi solubilizado em 50% de ACN (1:1, ACN:H₂O, v/v, 0,500 µl) e filtrados em *vials* de vidro (2000 µl, Alwsci Technologies®) com filtro de seringa (Membrana de Nylon, 0.22 µm - tamanho do poro, 22 mm - diâmetro, Whatman Uniflo™) para aquisição de dados de espectrometria de massas (Figura 16).

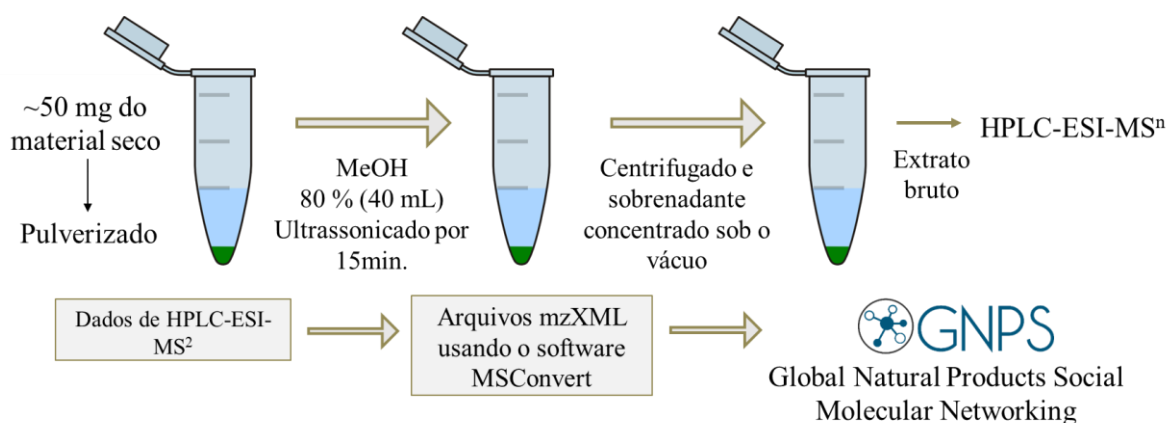


Figura 16. Fluxo de trabalho para extração e aquisição dos dados de CLAE-EM/EM de espécimes de herbário.

Já para o desenvolvimento do segundo capítulo foram utilizadas extrações em escalas menores, devido ao grande número de amostras e replicatas biológicas, como também para evitar uma etapa de secagem das soluções extrativas. Desta forma, cerca de 20 mg de amostras foram extraídos com 80% de MeOH (8:2, MeOH:H₂O, v/v, 1.6 mL) e sonificado em banho de ultrassônico (por 15 min. à temperatura ambiente, 25 °C). A mistura extraída foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 min. a 25 °C e este procedimento foi repetido por 2 vezes. Posteriormente, 1000 µl do sobrenadante foi alíquotado e filtrado em *vials* (2000 µl) com filtro de seringa (Membrana de Nylon, 0.22 µm - tamanho do poro, 22mm – diâmetro) para assim ser analisado por CLAE-EM.

4.4 Extração e obtenção do extrato hidroalcolólico bruto e da fração concentrada em alcaloides

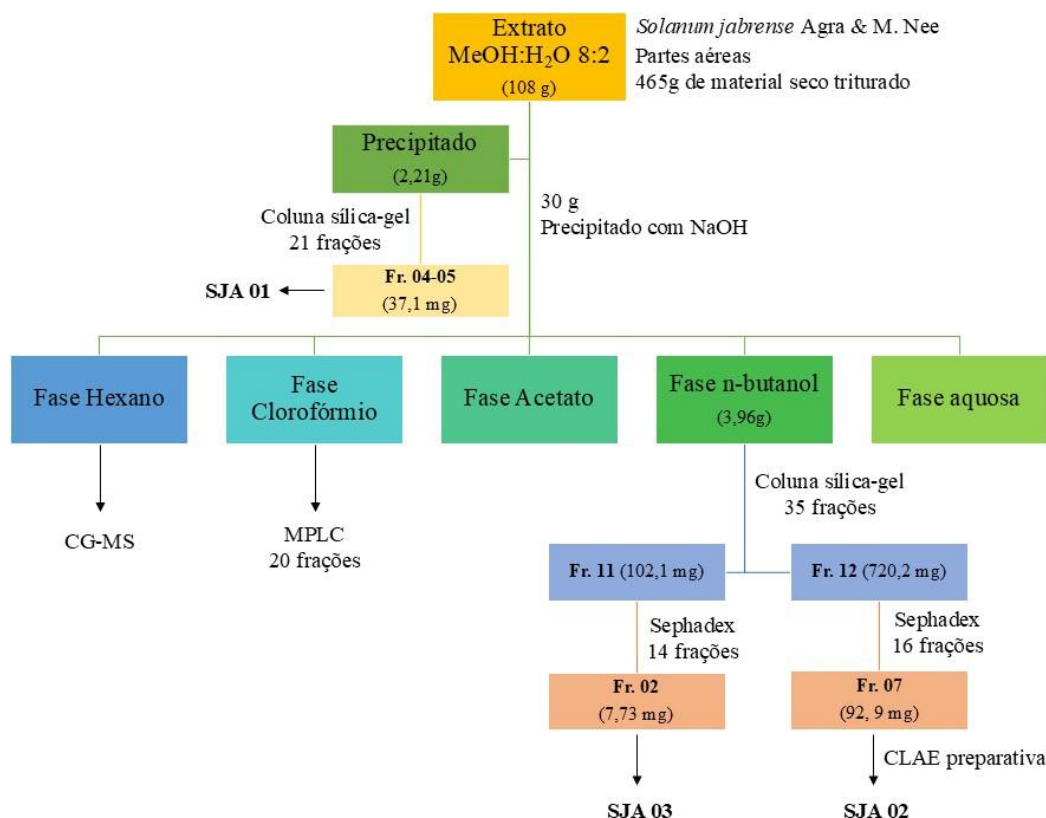
Para o desenvolvimento do terceiro e quarto capítulo, aproximadamente 500g do pó da planta seca foram extraídos com 80% de MeOH (8:2, MeOH:H₂O, v/v) em banho ultrassônico por 1 h à temperatura ambiente (~25 °C). Esse procedimento de extração foi repetido por duas vezes. O sobrenadante, líquido extrativo (4 L), foi concentrado em evaporador rotativo sob vácuo (Rotavapor® R-100, Buchi) a cerca de 40°C, e assim obtido o extrato bruto seco (108 g).

Para obtenção da fração concentrada em alcaloides, 30g do extrato bruto hidroalcólico foi solubilizado em água ultrapura e alcalinizado, com hidróxido de amônio até atingir o pH 9, aproximadamente, medido com tiras universal de pH 0-14 (KASVI). Essa mistura foi submetida a refrigeração, onde permaneceu por 24 h. Após esse período, obtivemos um precipitado com aspecto gelatinoso que foi filtrado até completa separação por filtração sob vácuo. O precipitado foi ressuspenso em água, neutralizado com ácido acético glacial diluído e refrigerado por 24 h. Por fim, o conteúdo foi centrifugado (Hermle Labor Technik, Z326 K) e concentrado em evaporador rotativo sob vácuo (Rotavapor® R-100, Buchi) a cerca de 40°C.

4.5 Isolamento e purificação dos constituintes químicos do extrato hidroalcólico de *Solanum jabrense* Agra e M. Nee

O extrato bruto concentrado foi submetido a partição líquido-líquido, em funil de separação Squibb com rolha e torniquete em teflon, utilizando os solventes n-Hex, CHCl₃, EtOH e n-But (Esquema 02). A fase n-Butanol foi submetida à cromatografia em coluna de adsorção, utilizando sílica gel (ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,060 – 0,200 mm e 70 - 230 mesh), como fase estacionária, hexano (n-Hex:EtOAc 10:0 a 0:10), acetato de etila (EtOAc:MeOH 9:1 a 3:6) e metanol (MeOH:EtOAc 3:6 a 10:0) como fase móvel, obtendo-se 35 frações e estas foram analisadas por CCDA (Cromatografia em camada delgada analítica) utilizando diferentes sistemas de eluição reveladas na luz UV sob os comprimentos de onda de 254 e 366 nm, em aparelho BOITTON (modelo BOIT-LUB01).

As frações semelhantes quanto ao fator de retenção (R_f) foram reunidas e as potencialmente promissoras foram preparadas e analisadas por CLAE-DAD em escala analítica da Shimadzu® (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AT, autoinjeter SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU20A, detector SPD-M20A diode array e CBM-20 como unidade de controle. A coluna utilizada foi Kromasil C-18 (5 µm, 250 x 4,6 mm, Kromasil, Bohus, Suécia), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (5 µm, 4 mm x 3 mm). As análises, foram realizadas utilizando os solventes orgânicos acetonitrila grau CLAE, água ultrapura e ácido fórmico grau CLAE.



Esquema 02. Fluxograma da obtenção dos extratos, fases e frações das partes aéreas de *S. jabrense*.

As frações 11 (102,1 mg) e 12 (720,2 mg) obtidas da fase n-Butanol foram submetidas à cromatografia por exclusão, utilizando uma coluna de vidro com válvula de dosagem, sephadex (Sigma- Aldrich, Merck) e MeOH (10-100%) como eluente, obtendo-se 14 e 16 frações, respectivamente.

A fração 07 (92,9 mg) obtida do fracionamento da fração 12 foi analisada por CLAE-DAD analítico e submetida a análises de CLAE preparativa realizadas utilizando um sistema da Shimadzu® equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-6AD, injetor Rheodyne, detector SPD-M10A diode array e SCL-10 como unidade de controle. As análises foram realizadas em coluna preparada com octadesilsilano (ACE C-18 250,0 mm X 21,2 mm e 5 µm de tamanho de partícula), e como fase móvel ACN e água ultrapura acidificada com ácido fórmico 0,1% grau CLAE, obtendo-se assim a substância codificada como SJA 02 (6,5 mg). A fração 02 obtida do fracionamento da fração 11 em sephadex foi analisada por RMN ¹H e ¹³C e observada a presença da substância codificada como SJA 03 (7,73 mg).

A fração rica em alcaloides (2,40 g) também foi submetida a fracionamento em coluna de sephadex e MeOH como eluente, obtendo-se 21 frações que foram analisadas

por CLAE-DAD em escala analítica e reunidas por semelhança do fator de retenção. Das frações 4-5 analisadas e reunidas foi obtido o composto codificado como SJA 01 (37,1 mg).

4.6 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

As análises dessa tese obtidas por CLAE-EM foram realizadas utilizando três plataformas diferentes, sendo na primeira plataforma necessário que as análises fossem realizadas em duas etapas, em um Ion trap, para realizar análises de ESI-MSⁿ e em um micrOTOF, para realizar análises de EMAR. Já na segunda e terceira as análises foram realizadas em sistema de alta resolução, um espectrômetro de massa quadrupolo-tempo de voo (QTOF).

As análises do primeiro capítulo foram realizadas utilizando a primeira plataforma, em um Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Shimadzu® (Kyoto, Japão), acoplado a um Ion trap Amazon X ou micrOTOF II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) com uma fonte de íons de eletrospray (ESI) para realizar análises de ESI-MSⁿ e HRESIMS, respectivamente. O Sistema CLAE consistia em uma unidade de bomba de solvente CLAE-20AD; um degaseificador online DGU-20A5; um controlador de sistema CBM-20A e um detector de arranjo de diodos SPD-M20A (190 – 800 nm). A separação por CLAE foi realizada em uma coluna analítica Kromasil C-18 5mm 100Å, 250 x 4,6 µm (Kromasil, Bohus, Suécia). As injeções foram realizadas usando um amostrador automático (SIL-20A). A fase móvel da CLAE consistia em água com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila (solvente B). Gradiente linear exploratório (5-100% B) foi realizado para eluição em 105 minutos. Os parâmetros de análise são: capilar 4,5 kV, ESI em modo positivo, placa final offset 500 V, nebulizador 4,0 bar, gás seco (N₂) com vazão de 8 mL/min e temperatura de 200 °C. A fragmentação CID foi obtida no modo MS/MS automático usando o modo de resolução avançada para o modo MS e MSⁿ. Os espectros (*m/z* 50–1500) foram registrados a cada dois segundos.

Já as análises do segundo capítulo foram realizadas em um Sistema de Cromatografia Líquida de Ultra desempenho (Nexera X3, Shimadzu® Kyoto, Japão), acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo-tempo de voo (LCMS-9050 Shimadzu®, Kyoto, Japão), com uma fonte de íons de eletrospray (ESI). O Sistema CLAE consistia em uma unidade de bomba de solvente LC-40D, um degaseificador online DGU-405 e um controlador de sistema CBM-40. As injeções foram realizadas usando um amostrador automático (SIL-40C). A separação por CLAE foi realizada em uma coluna

analítica Kromasil C-18 5 mm 100Å, 250 x 4,6 µm (Kromasil, Bohus, Suécia). A fase móvel da CLAE consistia em acetonitrila (Solvente B) e água acidificada com ácido fórmico 0.1% (Solvente A) (v/v) com fluxo de 0.6 mL.min⁻¹ em gradiente linear exploratório (5-100% B) em 105 min. Os parâmetros de análise foram fixados em energia do capilar de -3.0 kV, temperatura do gás de dessolvatação à 300 °C e fluxo de 10.0 L.min⁻¹ e gás nebulizador N₂, com vazão de 3,0 L.min⁻¹. Os espectros de massa foram adquiridos no q-TOF no modo positivo de ionização em uma faixa de 100 a 1200 Da, com CE (energia de colisão) fixa em 60 e a voltagem da interface 3.5 Kv.

E as análises do terceiro capítulo foram obtidas utilizando um Sistema de Cromatografia Líquida de Ultra desempenho (Nexera X2, Shimadzu® Kyoto, Japão), acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo-tempo de voo (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics, MA, EUA), com uma fonte de íons de eletrospray (ESI). O Sistema CLAE consistia em uma unidade de bomba de solvente LC-40D, um degaseificador online DGU-405 e um controlador de sistema CBM-40. As injeções foram realizadas usando um amostrador automático (SIL-40C). A separação por CLAE foi realizada em uma coluna analítica Luna C-18 5 mm 150Å, 250 x 4,6 µm (Phenomenex, EUA). A fase móvel da CLAE consistia em acetonitrila (Solvente A) e água (Solvente B) ambos acidificados com ácido fórmico 20 mM (v/v) com fluxo de 350 mL.min⁻¹. O método se deu de 0 a 2 min em modo isocrático (15:85) seguido de gradiente linear até 95 % de ACN de 2-12 min. Após isso, a taxa de 95 % foi mantida por 5 min, retornando a 15% de B e mantendo-se por 4 min antes da próxima injeção. Por fim, as configurações da fonte de ionização Eletrospray foram fixadas em energia do capilar de 4.500 V, temperatura do gás de dessolvatação à 200 °C, fluxo de 9 mL.min⁻¹, e pressão de 4 bar. Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo de ionização em uma faixa de 50 a 1200 Da. O instrumento Q-ToF foi operado em modo de varredura e MS/MS automático, e experimentos MS2 topk5 para os cinco íons mais intensos de cada varredura MS1. Os dados foram visualizados usando o software Data Analysis 4.2 (Bruker Daltonics®).

4.7 Processamento de dados EM/EM e geração de redes moleculares no GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking)

Para geração da rede molecular do capítulo q os dados CLAE-ESI-EM² adquiridos no AmazonX foram convertidos para arquivos mzXML usando o software MSConvert (ProteoWizard, disponível em <https://proteowizard.sourceforge.io/>). Os arquivos

mzXML foram carregados no GPNS online (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>), através do WinSCP (<https://winscp.net/eng/download.php>), e então a rede molecular (MN) foi gerada. Os parâmetros utilizados para gerar as redes foram: tolerância da massa do íon precursor 1.0 Da; tolerância de massa de íons de fragmentos 0.5 Da e pontuação mínima de cosseno 0.6. A rede molecular foi plotada no Cytoscape 3.8.2 (<http://www.cytoscape.org>). Para facilitar a desreplicação e anotação de compostos, e evitar erros na interpretação de contaminantes ou ruídos de CLAE, foram incluídas na rede como grupos distintos de amostras espectros do padrão solasodine (usado como “seed” ou iniciador) e injeções da fase móvel como branco, realizadas sob as mesmas condições das amostras, e identificados em nodos de cores distantes no Cytoscape. Posteriormente nodos correspondentes ao branco foram deletados. A rede molecular clássica foi reanalisada com a ferramenta MolNetEnhancer.

Já as redes do capítulo 3 foram geradas usando os dados de CLAE-ESI-EM² convertidos para arquivos mzXML usando o software MSConvert (ProteoWizard, disponível em <https://proteowizard.sourceforge.io/>). Os arquivos mzXML foram carregados no GPNS online (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>), através do WinSCP (<https://winscp.net/eng/download.php>), e então a rede molecular (MN) foi gerada. Os parâmetros utilizados para gerar as redes foram: tolerância da massa do íon precursor 1.0 Da; tolerância de massa de íons de fragmentos 0.5 Da e pontuação mínima de cosseno 0.6. A rede molecular foi plotada no Cytoscape 3.8.2 (<http://www.cytoscape.org>). Para facilitar a desreplicação e classificação da estrutura química dos compostos a rede molecular clássica foi reanalisada utilizando a ferramenta MolNetEnhancer.

4.8 Processamento de dados EM/EM para as análises estatísticas

Os dados adquiridos no Q-ToF foram convertidos para arquivos mzXML usando o software MSConvert (ProteoWizard, disponível em <https://proteowizard.sourceforge.io/>). Os arquivos foram abertos, visualizados e analisados utilizando o software MS-DIAL, e o processamento dos dados foi realizado no software estatístico R por meio do pacote XCMS, e utilizando a interface de funcionalidades do software RStudio. Para garantir a reprodutibilidade dos resultados obtidos na análise, será disponibilizado um script contendo todas as etapas do

processamento e a menção aos demais pacotes utilizados na análise dos dados.

4.9 Aquisição e Processamento de dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram adquiridos em um espectrômetro Bruker AVANCE NEO 500 MHz (Bruker, Coventry, Reino Unido), operando a 500 MHz para RMN ^1H e 125 MHz para RMN ^{13}C e Bruker ASCEND 400 MHz, operando a 400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para RMN ^{13}C . Os espectros foram registrados em Metanol- d_4 (CD_3OD 99%D) e Piridina- d_5 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 99%D), quando necessário.

O processamento dos espectros foi realizado usando o software MestReNova® (MNova) versão 14.2.0. Os espectros de RMN foram submetidos a um processamento sendo realizados os procedimentos de correção de linha de base (b), correção de fase (*auto phase correction*), referenciamento pelo sinal do solvente (l), *peak picking* usando o *manual threshold* (k) ou o *peak by peak* (Ctrl + K) e integração manual (i). Este último apenas para dados de RMN ^1H (Figura 17).

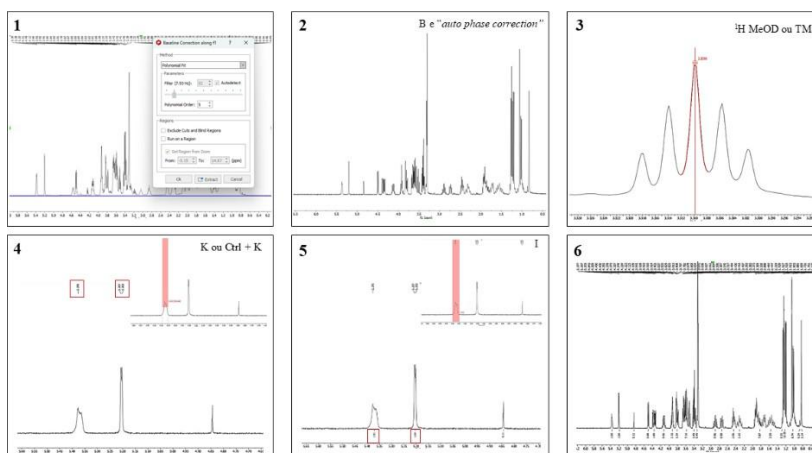


Figura 17. Processamento de espectros de RMN de ^1H . 1. correção de linha de base (b), 2. correção de fase (auto phase correction), 3. referenciamento pelo sinal do solvente (l), 4. peak picking usando o manual threshold (k) ou o peak by peak (Ctrl + K), 5. integração manual (i), 6. Espectro processado. Fonte: Silva, 2025

4.10 Ensaios da atividade Larvicida contra *Aedes aegypti*

A atividade larvicida do extrato e da fração rica em alcaloide de *S. jabrense* foi

avaliada de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (1970) (WHO- World Health Organization, 1970). As larvas de *A. aegypti* no terceiro estágio (L3) (Cepa Rockefeller, João Pessoa) foram obtidas do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba).

As amostras do ensaio foram diluídas em água desclorada, Tween 80 a 1% e Tween 20 também a 1%, em diferentes concentrações. Trinta larvas do terceiro estágio (L3) foram transferidas para tubos Falcon contendo as soluções de teste. O grupo controle negativo foi preparado com água desclorada, Tween 80 a 1% e Tween 20 também a 1%.

Para avaliação da atividade larvicida foram utilizadas larvas de *A. aegypti* mantidas em câmaras climatizadas (BOD, Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 28°C com variação de $\pm 2^\circ\text{C}$, e umidade relativa de $75\% \pm 5\%$ e fotoperíodo 12 h claro, 12h escuro. Os ensaios foram realizados com 30 larvas em estágio L3 para cada tratamento, e utilizadas sete concentrações sendo uma concentração controle, para o extrato hidroalcolico bruto (0, 80, 100, 200, 400, 600, 800 ppm) e cinco concentrações para a fração rica em alcaloides com uma também sendo controle (0, 80, 100, 200, 400 ppm). Os ensaios foram realizados em triplicata e a mortalidade das larvas avaliadas após 24 h.

4.11 Avaliação da produção do óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada pelo reagente de Griess em um pool de hemolinfa de 30 cepas L3, em um volume final de 400 μL em tampão PBS (Green et al. 1981). As larvas foram expostas ao extrato bruto de *S. jabrense* (0,4895 mg/mL) e a fração rica em alcaloides (0,1957 mg/mL) durante um período de tempo de 24 h, e o grupo controle foram expostos apenas à água da torneira pelos mesmos períodos de tempo. Os ensaios foram realizados em triplicata. A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas com filtro de 548 nm, e o NO (óxido nítrico) foi quantificado usando uma curva padrão de NaNO_2 (Nitrito de sódio) como referência..

4.12 Análise estatística das atividades avaliadas

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism para Windows versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Diferenças significativas entre os grupos foram analisadas por ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey quando apropriado ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Capítulo 1: “Redes moleculares como estratégia para a desreplicação de alcalóides esteroidais de amostras de herbário de *Solanum jabrense* Agra e M. Nee, uma espécie endêmica e inexplorada” publicado no periódico *Chemistry and Biodiversity*

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Redes moleculares como estratégia para a desreplicação de alcalóides esteroidais de amostras de herbário de *Solanum jabrense* Agra e M. Nee, uma espécie endêmica e inexplorada

Anauara Lima e Silva,^a Thiago Araújo de Medeiros Brito,^a Maria de Fátima Agra,^b Marcelo Sobral da Silva,^a Josean Fechine Tavares^{*a}

^a Programa de Pós-Graduação em Produtos Bioativos Naturais e Sintéticos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil; ^b Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Autor para correspondência: josean@lft.ufpb.br

Resumo

Solanum jabrense é uma espécie endêmica do Brasil, distribuída pelos domínios fitogeográficos da Caatinga e Mata Atlântica, nos estados do Nordeste. As espécies de *Solanum* L. apresentam grande importância econômica não somente por serem utilizadas na alimentação humana, mas também por apresentarem diversos metabolitos secundários, principalmente alcaloides esteroidais glicosilados, o que lhes confere propriedades medicinais. Recentemente, espécimes secos de herbário têm sido utilizados para identificar metabolitos de interesse preservados mesmo após anos de armazenamento, utilizando um método simples e rápido de extração e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Foram utilizadas técnicas de desreplicação auxiliadas por redes moleculares para analisar a composição química de amostras de espécimes de herbário de *S. jabrense* e para identificar marcadores químicos e moléculas bioativas com potencial utilização medicinal. A partir do conjunto de dados CLAE-EM/EM dos extratos brutos e de um padrão (solasodina), foi gerada uma rede molecular que resultou na desreplicação de 19 alcaloides do tipo espirosolano. Os nossos resultados sugerem que a desreplicação utilizando fragmentos de espécimes secos de *Solanum* é uma ferramenta rápida para identificar potenciais metabolitos conservados, sendo útil não só para a quimiotaxonomia e metabolômica, mas também para a descoberta de novas moléculas em produtos naturais.

Palavras-chave: Solanaceae, Clado Lepstostemonum, Amostras de herbário, Produtos Naturais, Glicoalcaloides.

Introdução

O avanço das técnicas analíticas e a utilização de ferramentas computacionais, como as redes moleculares (MN) baseadas em espectrometria de massas em tandem (EM/EM), impedem a redescoberta de compostos conhecidos e facilitam a descoberta de compostos desconhecidos a partir de misturas naturais complexas, agilizando assim o processo de desreplicação (Quin et al., 2022).

Uma das vantagens dos estudos de desreplicação utilizando LC-MS/MS é a necessidade de pequenas quantidades de amostra, permitindo a identificação e/ou anotação de diversas moléculas, mesmo em extratos produzidos em escala miniaturizada, embora possam ocorrer em concentrações vestigiais, como observado em vários estudos e protocolos publicados (Kim, 2010; Perez et al., 2019; Pilon et al., 2020)

Esta particularidade permite que os espécimes secos de herbário sejam utilizados como fonte de amostra para estudos em química de produtos naturais (Tasca et al., 2018; Kao et al., 2018; Foutami et al., 2018; Resende et al., 2020; Cook et al., 2021; Barny et al., 2021), servindo potencialmente como um primeiro passo útil na triagem de plantas com componentes biologicamente ativos estáveis ou para uma maior compreensão científica da utilização de organismos vegetais comumente empregados na medicina tradicional (Eloff et al., 1999; Cook et al. 2021). A utilização de amostras de herbário para análises químicas é ainda pouco explorada, apesar de poder responder a um grande número de questões de investigação e de ter o seu potencial cada vez mais reconhecido (Foutmami et al., 2018; Cook et al. 2021).

Os exemplares de herbário secos têm sido utilizados mesmo após anos de secagem e armazenamento, empregando métodos de extração simples e rápidos e análises utilizando a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM) (Moraes et al., 2009; Resende et al., 2020; Nothias et al., 2018).

As espécies de *Solanum* L. (Solanaceae), vulgarmente conhecidas por ‘jurubebas’, destacam-se na economia mundial, não só por incluírem espécies cultivadas para consumo humano e uso ornamental, mas também porque os seus indivíduos apresentam um elevado potencial farmacológico e toxicológico devido à presença de diversos metabolitos secundários, como alcaloides, alcaloides esteroides, saponinas, flavonoides, terpenoides, lignanas, esteróis, fenóis, cumarinas, ácidos gordos, ésteres, entre outros (Kaunda et al., 2019).

Em particular, este gênero produz uma grande variedade de alcaloides, conhecidos como alcaloides esteroidais, tipicamente ligados a uma cadeia glicosilada e amplamente estudados pelas suas propriedades anticancerígenas (Winkiel et al., 2022), antiolesterol, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antinociceptivas, antipiréticas, tóxicas e outras (Milner et al., 2011; Zhao et al., 2021). Estes compostos são de grande interesse em *Solanum* e são também considerados marcadores quimiofenéticos, ocorrendo em todos os seus grupos infragenéricos (Ramos et al., 2021).

No entanto, existe uma grande dificuldade em isolar estes compostos devido à natureza da sua estrutura química e à sua ocorrência, na maioria das vezes em concentrações traço (Friedman et al., 1997). A utilização da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas pode auxiliar na compreensão da composição deste grupo químico, bem como otimizar o procedimento de análise e extração (Popova e Morra, 2021).

Solanum jabrense Agra e M. Nee (SJA), utilizada neste trabalho como espécie modelo, foi descrita pela primeira vez no Parque Estadual do Pico do Jabre, sendo uma espécie endêmica do Brasil, encontrada nos domínios fitogeográficos da Caatinga e Mata Atlântica, em estados do Nordeste (Agra et al. 1997; Flora do Brasil, 2025). É reconhecido pelo seu uso anticancerígeno e moluscicida (Esteves-Souza, et al. 2002; Silva et al., 2007; Andrade et al., 2013); no entanto, o potencial químico e farmacológico desta espécie é ainda pouco explorado.

Com base no conjunto de dados de CLAE-EM e EM/EM de espécimes de herbário *Solanum*, foi gerada uma rede molecular, resultando na desreplicação de 19 alcaloides do tipo espirosolano, sendo que apenas um deles foi anteriormente reportado na literatura para a espécie.

Resultados e Discussão

Os extratos hidroalcoólicos obtidos a partir de espécimes de herbário e o extrato bruto obtido a partir de plantas frescas de *S. jabrense* foram submetidos a análises de CLAE-EM/EM para confirmar a presença de metabolitos conservados nas amostras através da observação dos íons protonados $[M+H]^+$ e da criação de redes moleculares na *Global Natural Product Social Molecular Network* (GNPS) para auxiliar os estudos de

desreplicação, com ênfase nos alcaloides esteroidais, que são os marcadores químicos do grupo (Ramos et al., 2021).

Com base no conjunto de dados CLAE-EM/EM dos extratos brutos e do composto puro (solasodina) (Figuras 23, 24, 25, 35), foi gerada uma rede molecular com 388 nodos, resultando na desreplicação de 19 alcaloides do tipo espirosolano. Estes alcaloides, incluídos no mesmo ‘agrupamento’ molecular, foram observados a partir do nodo da ‘semente’ e representam aproximadamente 17% de todos os nós da rede molecular (Figuras 18, 19).

Os alcaloides esteroidais anotados e/ou identificados manualmente estão resumidos na Tabela 03, juntamente com o seu tempo de retenção, fórmula molecular, erro (ppm) e principais íons fragmentos. Embora os glicoalcaloides sejam marcadores em *Solanum*, ainda estão pouco documentados e catalogados em bases de dados, o que explica o baixo número de anotações fornecidas pelas redes moleculares (Resende et al., 2020).

Os cromatogramas de pico base (BPCs) dos espécimes mostraram-se visualmente semelhantes, apenas com diferenças nas intensidades (área) de alguns picos, indicando a presença de metabólitos estáveis, mesmo após secagem e muitos anos de armazenamento do material (Figura 20 e Figura 27).

Esta observação foi também confirmada nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , com sinais predominantemente na região dos 4,5 ppm indicativos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, sinais na região entre os 4,5-5,5 ppm característicos dos hidrogênios anoméricos, e também sinais intensos entre os 0,7-2,5 ppm indicando a presença de hidrogênios alifáticos (Figura 25 e Figura 26).

Os glicoalcaloides esteroidais de *Solanum* são facilmente reconhecidos como alcaloides contendo nitrogênio devido à massa par do pico do íon protonado, bem como seu padrão isotópico (Figura 28) e padrão de fragmentação semelhante. Os íons fragmentos são frequentemente formados por perdas neutras de -18 Da (H_2O), apresentando desidratações intensas devido a reações de rearranjo remoto de hidrogênio, como consequência da presença de grupos hidroxilo ligados às agliconas, além de perdas neutras de -146 Da (6-Deoxy-Hexose), -162 Da (Hex) e -132 Da (Pent), uma vez que estes compostos ocorrem tipicamente como glicosídeos (Xiang et al., 2022; Popova et al., 2022), juntamente com íons fragmentos de -125 Da resultantes da eliminação de $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}$, ou - 143 Da resultantes da eliminação de $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}$ e H_2O (Figuras 37 e 44).

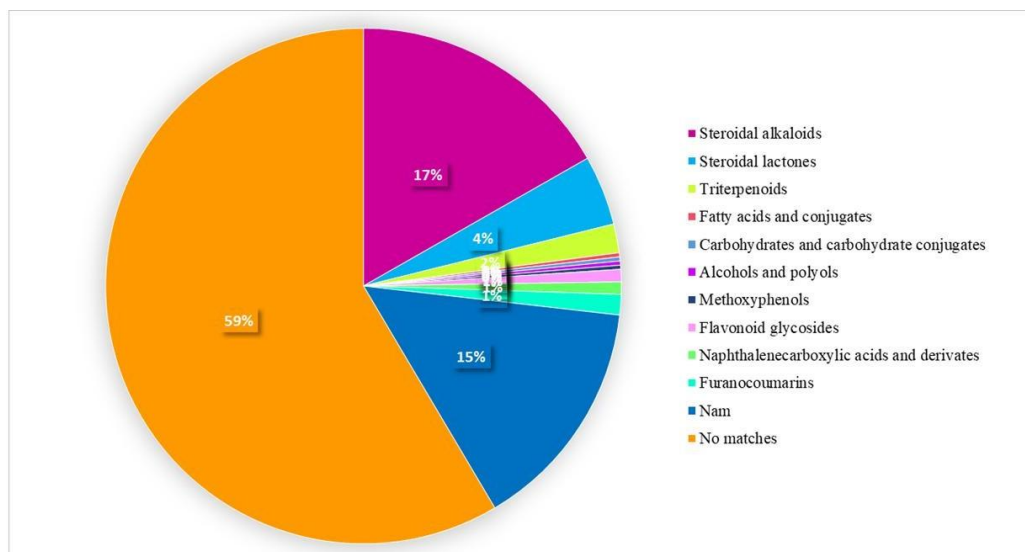


Figura 18. Classe de metabólitos anotados pelo GNPS e MolNetEnhancer presentes nas amostras.

Embora seja impossível afirmar a configuração exata dos substituintes, podemos prever que as moléculas são formadas por uma aglicona ligada a outros grupos funcionais que podem ocupar posições específicas, além de cadeias glicosídicas tipicamente ligadas na posição C-3. Com base nas perdas de massa neutra, podemos sugerir que estes glicosídeos podem ser monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos (Zhao et al., 2021) (Figura 21). As substituições de hidroxilas nestas estruturas são também bastante comuns e são geralmente encontradas na literatura nas posições C-6, C-7, C-12, C-16, C-23 ou C-26 (Zhao et al., 2021; Heinig e Aharoni, 2014).

O composto anotado pelo GNPS, reconhecido como solasodina, Sol (9), é um nodo com uma massa precursora de m/z 414, identificado a partir dos íons fragmentos, m/z 396 $[M+H-H_2O]^+$ resultantes da perda neutra de água, e íons formados devido à fragmentação do anel E, m/z 271 $[M+H-C_8H_{15}N]^+$ e 253 $[M+H-C_8H_{15}N-H_2O]^+$. Os íons fragmentos de m/z 175 e 157 podem também ser formados a partir dos fragmentos m/z 271 e 253, respetivamente, com origem na fragmentação do anel B. Quando o íon fragmento m/z 414 é observado como dominante no espectro de fragmentação, juntamente com os íons m/z 271 e 253 ou apenas o íon m/z 396, os compostos podem ser identificados como glicoalcaloides que possuem a aglicona do tipo solasodina ou solanidina (Figuras 36, 43, 44) (Popova et al., 2022, Heinig e Aharoni et al., 2014). Foram também observadas cinco outras agliconas com m/z 446, m/z 430, m/z 428, m/z 412 e m/z 410 nas amostras e podem ser reconhecidas com base nos seus padrões de fragmentação (Figuras 46-49) (Tabela 02, 03).

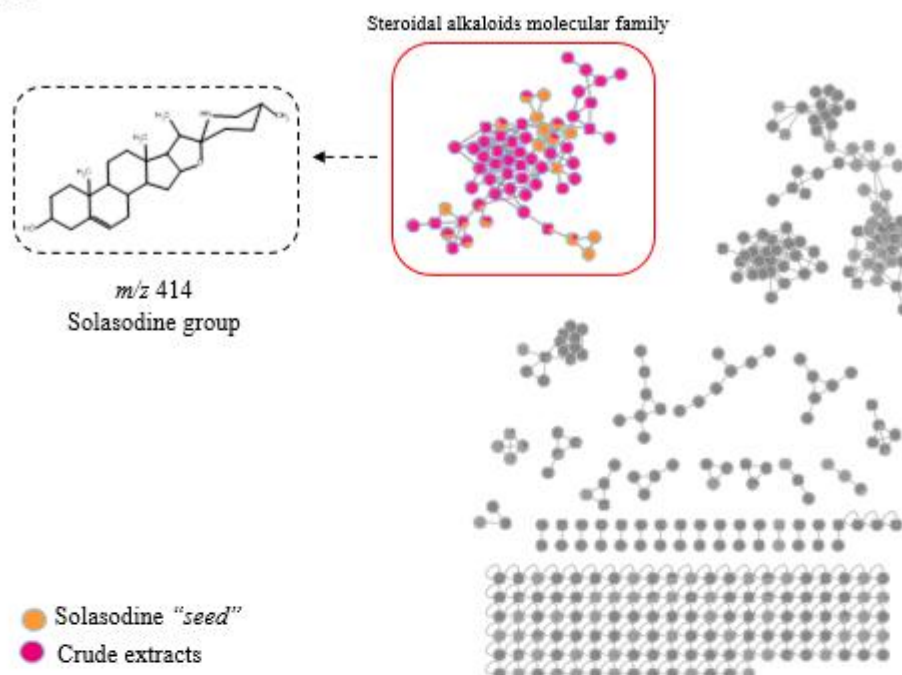
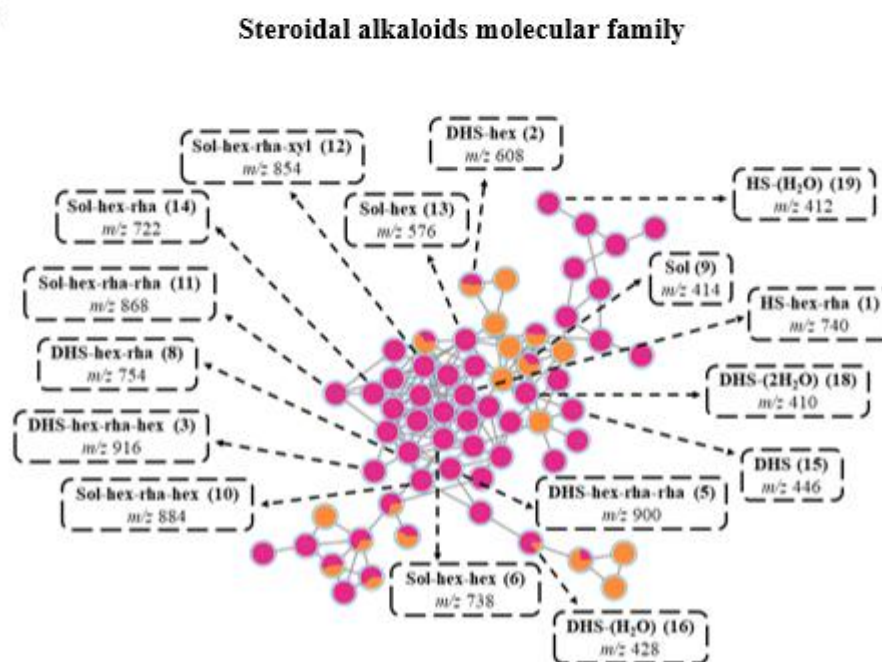
A**B**

Figura 19. Rede molecular de dados MS/MS de amostras de *Solanum jabrense* Agra e M. Nee. DHS, di-hidroxisolasodina; HS, hidroxisolasodina; S, solasodina. (A) Visão geral da rede molecular gerada. (B) Destacando o agrupamento de alcaloides esteroidais.

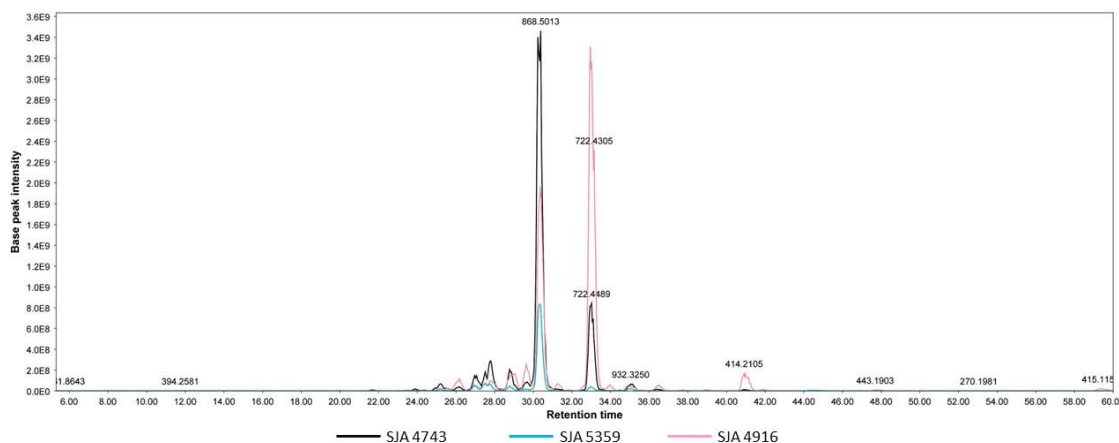


Figura 20. Cromatograma de pico base de extratos hidroalcoólicos brutos de amostras de herbário, SJA 4743 (black), SJA 5359 (light blue) e SJA 4916 (pink) de *Solanum jabrense* Agra & M. Nee.

Os compostos DHS (15), HS (17) e DHS-2 H₂O (18) apresentam o mesmo padrão de fragmentação, apresentando perdas de -18 Da (H₂O) e -125 Da (C₈H₁₅N) correspondentes às desidratações e à clivagem do anel E das agliconas.

A aglicona *m/z* 446 (15) é 16 Da maior que a aglicona *m/z* 430 (17), que corresponde à solasodina com adição de um grupo hidroxila, e 32 Da maior que a aglicona *m/z* 414 (9), sugerindo que esta aglicona tem adição de dois grupos hidroxilas e pode sofrer uma etapa de desidratação e clivagem do anel E-F com adição de um grupo hidroxila, gerando os íons produtos *m/z* 428 e *m/z* 285. Este composto pode ser uma di-hidroxisolasodina. Os íons fragmentos gerados em *m/z* 285 e *m/z* 269 são 32 Da e 16 Da mais elevados que os íons correspondentes aos anéis ABCD⁺ da solasodina (*m/z* 253) após a clivagem do anel E-F, sugerindo que uma hidroxila pode estar ligada ao anel A-B-C-D e outra ao anel espiro E-F. Além disso, a desidratação do íon *m/z* 285 gerando o íon fragmento *m/z* 267 fornece evidências adicionais da existência de uma hidroxila no anel A-B-C-D⁺. Outra observação que poderá indicar a presença de uma hidroxila ligada à aglicona nesta porção do anel é a diferença de 18 Da entre *m/z* 175 e *m/z* 157, resultante da fragmentação do anel A-B em di-hidroxisolasodina e solasodina, respectivamente (Cahill et al., 2010; Zhao et al., 2023) (Figuras 46-48).

O íon de *m/z* 412 HS-(H₂O) (19) não é apenas a aglicona solasodina desaturada com íons fragmentos de *m/z* 394 [M+H-H₂O]⁺, *m/z* 269 [M+H-H₂O-125 Da]⁺ e *m/z* 173 [M+H-H₂O-125 Da-96 Da]⁺, mas também pode ser um produto da desidratação da aglicona [M +H]⁺ *m/z* 430 (17), como resultado de um substituinte hidroxila, sendo potencialmente uma (25S)-22βN-espirosol-4-en-3-ona ou 4-tomatiden-3-ona (Yuan et

al., 2019) (Figura 49).

O composto principal, com uma massa precursora de m/z 868, Sol-hex-desoxihexosil-desoxihexosil (11), atribuído à solamargina, pode ser reconhecido pela formação de íons fragmentos característicos m/z 850 $[M+H-H_2O]^+$, m/z 704 $[M+H-Pent-H_2O]^+$ e m/z 378 $[M+H-2Pent-Hex-2H_2O]^+$, resultantes de desidratações, eliminação da cadeia de açúcar e fragmentação da aglicona (Figura 38) (Popova et al., 2022; Wu et al., 2013; Lelario et al., 2019; Yang et al., 2021). Este composto foi isolado das raízes, caules e frutos de muitas espécies do género, com propriedades biológicas descritas como leishmanicida, antidiabética, esquistossomicida, tripanocida, antibacteriana, moluscicida e anticancerígena (Kaunda et al., 2019).

O nodo com massa precursora m/z 884 Sol-hex-desoxihexosil-hex (10), apresentou íons com valores característicos m/z 866 $[M+H-H_2O]^+$, 704 $[M+H-Hex-H_2O]^+$, 558 $[M+H-Pent-Hex-H_2O]^+$, 396 $[M+H-Pent-2Hex-H_2O]^+$, devido à perda de resíduos de açúcar solasonina. O íon em m/z 704, resultante da clivagem glicosídica, leva à perda de -146 Da (pent), ligado à aglicona. Os íons m/z 558 e m/z 396 resultaram da perda de -162 Da, correspondente a uma hexose (hex) (Figura 35). O composto (7) apresentou também um nodo com uma massa precursora m/z 884 e um padrão de fragmentação semelhante, sugerindo que pode ser um isômero de (10) (Yang et al., 2021). O composto solasonina foi isolado de várias espécies de *Solanum* e demonstrou atividade leishmanicida, antidiabética e esquistossomicida (Kaunda et al., 2019).

O nodo com massa precursora m/z 722 Sol-hex-desoxihexosil (14), pode ser identificado como β 1-solasonina ou β 2-solamargina, reconhecido pelos íons fragmentos 704 $[M+H-H_2O]^+$, 558 $[M+H-H_2O-Pent]^+$, 396 $[M+H-H_2O-Hex-Pent]^+$ (Figura 41). Estes glicoalcaloides do tipo β são compostos que têm a aglicona ligada não a um trissacarídeo, mas a uma cadeia lateral de carboidratos constituída por apenas dois açúcares (Figura 21) (Zhao et al., 2021; Friedman et al., 1997; El-HawaryMohammed et al. 2016). O nodo com massa precursora m/z 740 HS-hex-desoxihexosil (1), segue a mesma estrutura, composto por apenas dois açúcares ligados à aglicona, e é reconhecido como Solanigrosídeo P, pelos íons fragmentos m/z 722 $[M+H-H_2O]^+$, 576 $[M+H-H_2O-Hex]^+$, e 414 $[M+H-H_2O-Hex-Pent]^+$ (Yang et al., 2021).

O nodo com m/z 754 DHS-hex-desoxihexosil (8) segue o mesmo padrão de fragmentação que (2), pois a partir da observação dos íons fragmentos formados, é possível prever que a única diferença entre (2) e (8) é a presença de um açúcar adicional, uma pentose na cadeia lateral do hidrato de carbono, observada por uma perda de -146

Da (Figura 36) (Yang et al. 2021).

O composto DHS-hex-desoxihexosil-desoxihexosil ou DHS-hex-hex-desoxihexosil (5) apresentou o íon protonado $[M+H]^+$ com m/z 900, e os íons produtos m/z 882 $[M+H-H_2O]^+$, 754 $[M+H-Pent]^+$, 590 $[M+H-Pent-Hex]^+$ e 428 $[M+H-Pent-Pent-Hex]^+$, e apresentou também um íon fragmento de baixa intensidade m/z 410 formado pela eliminação de mais uma H_2O (-18 Da) (Figura 33). Os fragmentos MS^n observados forneceram evidências para a substituição de dois grupos hidroxila e três unidades de açúcar na aglicona, sugerindo assim que se trata de uma di-hidroxi-solasodina-pent-hex-pent ou hidroxi-solasonina-hex-pent-hex (Yuan et al. 2019; Wu et al., 2013; Lelario et al., 2019; Yang et al., 2021).

O nodo com massa precursora m/z 854 Sol-hex-desoxihexosil-xil (12) apresentou uma perda de -132 Da, o que é uma característica distintiva em relação ao restante, indicando a presença de uma xilose na cadeia glicosídica, sendo por isso compatível com os alcaloides esteroidais Anguivina ou Isoanguivina isolados de *Solanum anguivi* Lam. (Ripperger, 1998) e reconhecido pelos íons fragmentos m/z 836 $[M+H-H_2O]^+$, m/z 704 $[M+H-H_2O-Xyl]^+$, m/z 558 $[M+H-H_2O-Xyl-Pent]^+$ e m/z 396 $[M+H-H_2O-Xyl-Pent-Hex]^+$ (Figura 39). A cadeia lateral de hidratos de carbono composta por estes três açúcares pode ser D-Xil-(1-3)-[L-Rha(1-2)]-D-Glc- ou D-Xil-(1-3)-[L-Rha(1-2)]-D-Gal- (Zhao et al., 2021).

O nodo da mesma família molecular (*cluster*), com massa precursora m/z 902 (4), não foi identificado. No entanto, este íon apresenta fragmentos relacionados com a perda de H_2O (-18 Da), duas pentoses (-146 Da) e uma hexose (-162 Da), resultando na aglicona com m/z 430 (17) (Figura 31). As mesmas perdas são observadas para o íon m/z 916 (3), no entanto, este íon apresenta um fragmento em m/z 428 (16), dihidroxisolasodina desidratada (Figura 31).

De todos os glicoalcaloides identificados neste estudo, apenas a aglicona solasodina foi isolada dos frutos de *S. jabrense* (Silva et al., 2005). A complexidade do isolamento destes compostos deve-se à presença de azoto na sua estrutura e ao fato de serem frequentemente encontrados em baixas concentrações nos extratos (Friedman et al. 1997), para além da dificuldade de recolha de grandes volumes de material vegetal, uma vez que muitas espécies de *Solanum* se encontram em populações com poucos indivíduos ou são de difícil recolha. No entanto, estes compostos podem ser facilmente identificados por CLAE-EM/EM, uma vez que é uma ferramenta sensível (Heinig et al., 2014; Cahill et al.,

2010; Yuan et al., 2019, Wu et al., 2013, Lelario et al., 2019).

Este fluxo de trabalho (Figura 22) pode ser expandido utilizando extratos de várias espécies de *Solanum*, de diferentes grupos (subgênero, seções, clados), na tentativa de classificar estas plantas com base no seu perfil químico e padrões de fragmentação. Isto poderá ajudar a identificar marcadores químicos relacionados com os grupos ou auxiliar na separação interespecífica, apoiando tratamentos taxonômicos morfológicos e/ou filogenéticos e proporcionando uma maior compreensão das relações dentro do grupo, que não estão bem resolvidas.

Além disso, com foco em estudos quimiofenéticos, a utilização de extratos de espécimes de herbário pode ser uma boa estratégia para aumentar a amostragem e o número de réplicas biológicas, mesmo para espécies difíceis de recolher ou em risco de extinção.

Tabela 2. Alcaloides esteroidais identificados em extratos de espécimes de *Solanum jabrense* Agra & M. Nee por CLAE-IES-EM^a. (S) Solasodina, (DHS) Dihidroxisolasodina, (HS) Hidroxisolasodina, (hex) Hexose, (xil) Xilose.

No.	R.T (min.)	[M+H] ⁺	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Principais Fragmentos	Tentativa de identificação	Referências
1	21.8	740.4236	C ₃₉ H ₆₃ NO ₁₂	-2.7	MS ² [740]: 722, 576, 414	HS-hex-deoxyhexosyl Solanigrósido P or isomer	Yang et al. 2021
2	24.0	608.3793	C ₃₃ H ₅₃ NO ₉	3.8	MS ² [608]: 590, 495, 410, 267	DHS-hex Solasodine-2OH-hex or isomer	Yang et al. 2021
3	24.6	916.4900	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₈	1.9	MS ² [916]: 898, 752, 608, 428	DHS-hex-deoxyhexosyl-hex (3β,12β,22α,25R,-3,12-dihidroxi-espirosol-5-em-27-oic alcoól-12-O-beta-D- lucopiranoside- (1-2)-O-alfa-L- ramnopiranosil	Yang et al. 2021
4	24.9	902.5064	-8		MS ² [902]: 884, 738, 394	not identified	-
5	25.8	900.4951	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₇	3.8	MS ² [900]: 882, 754, 394	DHS-hex- deoxyhexosyl-deoxyhexosyl ou DHS-hex-hex- deoxyhexosyl Robeneoside A or B	Yang et al. 2021 Morais et al. 2020 Yoshikawa et al. 2007
6	26.1	738.4423	C ₃₉ H ₆₃ NO ₁₂	2.1	MS ² [738]: 720, 558, 394	Sol-hex-hex Solasodine-hex-hex or isomer	Yang et al. 2021
7	27.6	884.5002	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₆	1.3	MS ² [884]: 864, 736, 590, 428	Sol-hex-deoxyhexosyl -hex Solasonine ou isomer	Yang et al. 2021
8	29.1	754.4372	C ₃₉ H ₆₃ NO ₁₃	2.5	MS ² [754]: 736, 608, 428, 285	DHS-hex-deoxyhexosyl Solasodine-2OH-hex-rha or isomer	Yang et al. 2021
9	29.8	414.3367	C ₂₇ H ₄₃ NO ₂	0.3	MS ² [414]: 369, 253, 157	Sol Solasodine	Cahill et al. 2010
10	30.3	884.5002	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₆	3.2	MS ² [884]: 866, 720, 396	Sol-hex-deoxyhexosyl-hex Solasonine or isomer	Yang et al. 2021
11	31.0	868.5053	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₅	3.0	MS ² [868]: 850, 704, 378	Sol-hex- deoxyhexosyl-deoxyhexosyl Solamargine	Yang et al. 2021 Lelario et al. 2019 Wu et al. 2013
12	32.5	854.4896	C ₄₄ H ₇₁ NO ₁₅	-1.8	MS ² [854]: 836, 704, 558, 396	Sol-hex-deoxyhexosyl-xyl Anguivine, Isoanguivine or isomer	Ripperger e Himmelreich et al. 1994

13	33.2	576.3895	C ₃₃ H ₅₃ NO ₇	-0.5	MS ² [576]: 558, 396, 253	Sol-hex γ-solamargine or isomer	Yang et al. 2021
14	33.2	722.4474	C ₃₉ H ₆₃ NO ₁₁	2.9	MS ² [722]: 704, 558, 396	Sol-hex-deoxyhexosyl β ₁ -solasonine or β ₂ -solamargine	Yuan et al. 2019 Yang et al. 2021
15	33.9	446.3265	C ₂₇ H ₄₃ NO ₄	1.6	MS ² [446]: 428, 410, 285, 267, 175	DHS (3β,12β,25R)-3,12-dihydroxy-siprosol-5-en-27-oic-alcohol or isomer	Yang et al. 2021
16	34.2	428.3159	C ₂₇ H ₄₁ NO ₃	2.5	MS ² [428]: 410, 285	DHS-(H₂O) 22α,23α-Epoxy-solasodine or isomer	Yang et al. 2021
17	34.9	430.3316	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	1.4	MS ² [430]: 412, 267	HS Hydroxysolasodine or 12β-OH Solasodine	Popova e Morra, 2021 Lyu et al. 2020
18	40.8	410.3054	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂	-2.6	MS ² [410]: 392, 267, 173	DHS-(2H₂O) 22α, 23α- Epoxy-solanida-4-en-3-one or isomer	Torres et al. 2011; Yang et al. 2021.
19	41.8	412.3210	C ₂₇ H ₄₁ NO ₂	2.8	MS ² [412]: 394, 269, 173	HS-(H₂O) desaturated solasodine, dehydration of hydroxysolasodine, hydroxysolasodine or isomer	-

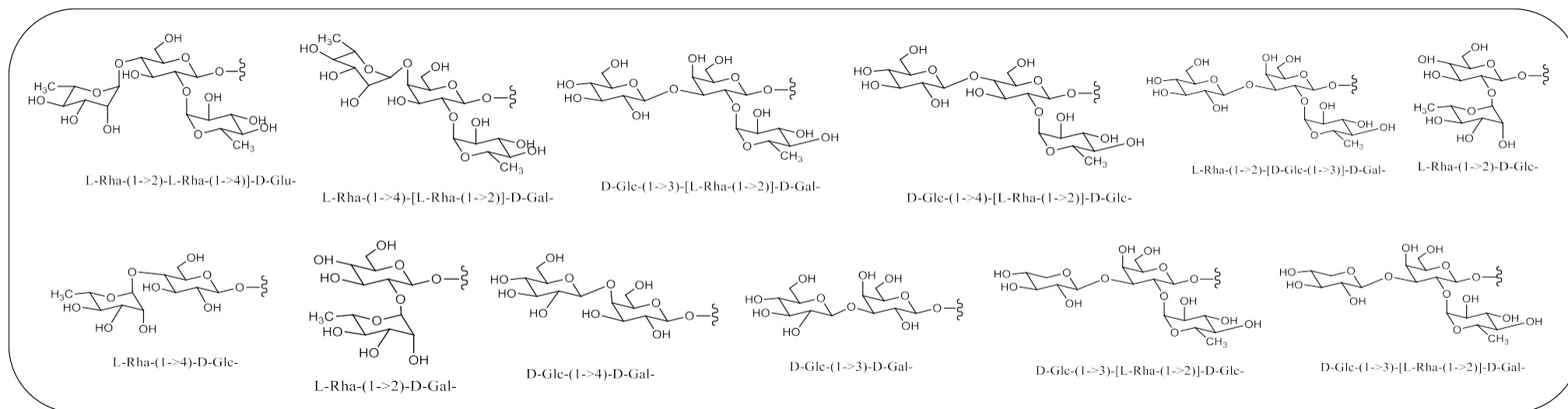


Figura 21. Previsão da estrutura química das cadeias glicosídicas dos alcaloides esteroidais anotados.

Tabela 3. Aglicona encontradas em amostras de herbário de *Solanum jabrense* analisadas.

Aglicona	[M+H] ⁺	Íons Fragmentos
Solasodina (S)	m/z 414	m/z 396, m/z 253, m/z 157
Dihidroxi-solasodina (DHS)	m/z 446	m/z 428, m/z 285, m/z 175
Hydroxi-solasodina (HS)	m/z 430	m/z 412, m/z 267
Fragmento de Dihidroxi-solasodina (DHS-H ₂ O)	m/z 428	m/z 410, m/z 285
Fragmento de Hydroxi-solasodine (HS-H ₂ O)	m/z 412	m/z 394, m/z 269, m/z 173
Fragmento de Dihidroxi-solasodine (DHS-2H ₂ O)	m/z 410	m/z 392, m/z 267, m/z 173

Esta abordagem pode também ser uma boa estratégia para reduzir custos, uma vez que não existe a obrigação de recolher grandes volumes de material botânico da natureza para obter amostras e as suas réplicas. Além disso, pode também servir como um primeiro passo para decidir se deve recolher grandes quantidades de material botânico com a finalidade de isolar e obter novos compostos bioativos.

**Figura 22.** Fluxo de trabalho usado para análises de espécimes de herbário de *Solanum jabrense* Agra & M. Nee.

O isolamento e a identificação destes compostos, alcaloides esteroidais, como os aqui observados, são atrativos para as comunidades de química de produtos naturais e química medicinal devido ao seu elevado potencial terapêutico, uma vez que muitos destes foram isolados de outras espécies do género com diversas atividades biológicas já reportadas, destacando-se as atividades citotóxica e anticancerígena, mas também foram reportadas atividades antidiabética, antifúngica, antiparasitária, anti-infecciosa, anti-inflamatória, antibacteriana, neurogênica, antifúngica, entre outras (Tabela 04).

Com base nos resultados apresentados, este trabalho demonstra que é possível obter extratos de espécimes de herbário para desreplicação e anotação de compostos com um nível de confiança de 3 (Sumner et al, 2007), como demonstrado neste estudo, para além de gerar dados que podem ser utilizados em estudos quimiofenéticos, triagem e identificação de novos compostos, facilitando assim a descoberta e o isolamento de novos compostos biologicamente ativos.

Conclusões

A utilização de espécimes de herbário permitiu a desreplicação de 19 alcaloides esteroides, demonstrando que estes quimiomarcadores são estáveis à secagem e longos anos de armazenamento, mantendo-se preservados neste tipo de material. Os nossos resultados sugerem que a desreplicação utilizando fragmentos de espécimes de herbário secos é uma ferramenta simples e rápida para a triagem, anotação, identificação de marcadores químicos e potenciais metabolitos conservados. Esta abordagem é útil tanto para perfis químicos como para estudos quimiofenéticos, que normalmente requerem um grande número de réplicas biológicas, bem como para o rastreio e descoberta de novas moléculas com potencial biológico.

Seção Experimental

Solventes e Padrão

Todos os solventes utilizados para a extração e análise por CLAE-EM/EM foram de qualidade HPLC (Biograde – Bio Scie Industria E Comercio). O composto isolado Solasodina foi cedido pelo Professor Dr. José Maria Barbosa Filho do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. Para a obtenção dos espectros de RMN foi utilizado o solvente Metanol (MeOH-d₄, 99,8 átomos % D, adquirido da Sigma (Sigma Co., St Louis, MO).

Material Botânico

Foram retiradas três folhas de três exemplares de *Solanum jabrense* Agra & M. Nee (números de prova 5359, 4743, 4916) (09 amostras) de exsicatas pertencentes à

coleção de referência da Professora Doutora Maria de Fátima Agra, localizada no Centro de Biotecnologia (CBIotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (Figura 22 e Tabela 05).

Tabela 4. Atividade biológica dos compostos anotados de *Solanum* L.

Compostos	Espécies	Atividade Biológica	Referência
Solanigroside P	<i>S. nigrum</i> L.	Anticâncer	Ding et al., 2013
Robeneoside A	<i>S. lycocarpum</i> St.-Hil.	Antidiabetogênico	Yoshikawa et al., 2007
Robeneoside B	<i>S. lycocarpum</i> St.-Hil.	Antidiabetogênico	Yoshikawa et al., 2007
Solasonine	<i>S. lycocarpum</i> St.-Hil. <i>S. melongena</i> L.	Antiparasitário Anticâncer Andiabético Anti-Infeccioso Neurogênese	Kaunda e Zhang, 2019, Borsoi et al., 2024, Sucha e Tomsik, 2016, Jin et al., 2020
Solasodine	<i>S. aculeastrum</i> Dunal <i>S. surattense</i> Burm.f. <i>S. torvum</i> Schltdl. <i>S. xanthocarpum</i> Schrad. & J.C.Wendl.	Anticâncer Depressor do CNS Anti-inflamatório Antibactericida	Koduru et al., 2007, Patil, 2012, Packia et al., 2013, Singh e Singh, 2010
Solamargine	<i>S. lycocarpum</i> St.-Hil.	Antiparasitário Anticâncer Antigenotóxico	Borsoi, 2024
Anguivine	<i>S. anguivi</i> Lam.	Anti-inflamatório	Mathew et al., 2012
Isoanguivine	<i>S. anguivi</i> Lam. <i>S. indicum</i> L.	Anti-inflamatório	Mathew et al., 2012, Yahara et al., 1996
γ -solamargine	<i>S. nigrum</i> L.	Anticâncer Antifúngico	Ding et al., 2013, Sun et al., 2012
22 α ,23 α -Epoxy-solasodine	<i>S. campaniforme</i> Roem. & Schult.	Antiofídico	Torres et al., 2013
22 α , 23 α - Epoxy-solanida-4-en-3-one	<i>S. campaniforme</i> Roem. & Schult.	Antiofídico	Torres et al., 2013

Foram também recolhidas partes aéreas (folhas e ramos) da planta no município do Parque Nacional do Catimbau, Buíque, Pernambuco, Brasil, e identificadas pela Professora Doutora Maria de Fátima Agra, com um exemplar depositado no Herbário Jayme Coelho de Moraes (EAN) (comprovativo número 30483). O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do

Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código AD609FD. O material recém-recolhido foi seco em estufa (aproximadamente 60°C) durante 5 dias.

Extração e prepare de amostra

Aproximadamente 50 mg de cada amostra de herbário seco foram macerados, extraídos com 80% de MeOH (32 mL) e sonicados em banho de ultrassons durante 15 minutos (três vezes) à temperatura ambiente. As misturas extraídas foram centrifugadas a ± 5000 rpm durante 5 minutos a 25°C, tendo este procedimento sido repetido duas vezes. Os sobrenadantes foram depois concentrados utilizando um evaporador rotativo sob vácuo. Cerca de 1 mg dos extratos hidroalcoólicos foi então solubilizados em 50% de acetonitrila (0,5 mL) para aquisição dos dados de espectrometria de massas, enquanto o restante foi submetido a análises de RMN para observar o perfil e a presença de sinais indicadores da presença dos metabolitos desejados (Figura 24).

O material recém-recolhido foi seco, moído e também submetido a extração em banho ultrassônico durante 1 hora (2 vezes) com uma mistura de MeOH (80:20). A mistura extraída foi filtrada, separada e concentrada com recurso a um evaporador rotativo. Posteriormente, cerca de 1 mg do extrato hidroalcoólico foi pesado, solubilizado em acetonitrila a 50% e submetido a análise por espectrometria de massas.

Análises de CLAE-EM/EM

As análises de cromatografia líquida foram realizadas utilizando um Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Shimadzu® (Kyoto, Japão), acoplado a um AmazonX ou micrOTOF II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), equipado com uma fonte de ionização por Eletrospray (IES) para as análises CLAE-EMⁿ e EMAR, respetivamente. O sistema CLAE era constituído por uma unidade de bomba de solvente (LC-20AD), um degaseificador on-line (DGU-20A5), um controlador de sistema (CBM-20A) e um detetor DAD (SPD-M20A) operando de 190 a 800 nm. A separação por CLAE foi realizada numa coluna analítica Kromasil C-18 (5 mm, 100 Å, 250 x 4,6 µm) (Kromasil, Bohus, Suécia), e as injeções foram realizadas utilizando um amostrador automático (SIL-20A).

A fase móvel da CLAE era constituída por água com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila (solvente B). Foi realizado um gradiente linear exploratório (5-100% B) para eluição durante 105 minutos. Os parâmetros de análise foram: tensão capilar de 4,5 kV, ESI em modo positivo, deslocamento final da placa a 500 V, pressão do nebulizador a 4,0 bar, caudal de gás seco (N_2) de 8 mL/min e temperatura de 200 °C. A fragmentação do CID foi obtida no modo automático EM/EM utilizando a resolução avançada para o modo EMⁿ. Os espectros (m/z 50–1500) foram registados a cada dois segundos. Todas as amostras (incluindo os extratos brutos e o composto puro) foram analisadas utilizando as condições de gradiente descritas anteriormente.

Processamento de dados CLAE-EM/EM e geração de redes moleculares

Os dados CLAE-IES-EM² adquiridos foram convertidos em ficheiros mzXML, utilizando o software MSConvert (ProteoWizard, disponível em <https://proteowizard.sourceforge.io/>). Os ficheiros mzXML foram analisados utilizando o software Mzmine 4.1.0 e carregados para o GPNS online (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>) através do WinSCP (<https://winscp.net/eng/download.php>), onde foi gerada a rede molecular (MN) (Tabela S2). Os parâmetros utilizados para gerar as redes foram: tolerância de massa do íon precursor de 1,0 Da; tolerância de massa do íon fragmento de 0,5 Da; e uma pontuação mínima de cosseno de 0,70. A rede molecular foi traçada no Cytoscape 3.8.2 (<http://www.cytoscape.org>). Para facilitar a desreplicação e anotação dos compostos, e para evitar erros de interpretação, foram incluídos na rede espectros do alcaloide esteroidal solasodina (usado como semente) (Figuras 24, 25), juntamente com uma amostra designada como branco, que foi processada nas mesmas condições que as amostras e identificada como um grupo em cores distintas no Cytoscape. Os nodos pertencentes a amostra do branco foram removidos da rede. A rede molecular clássica do GNPS foi reanalisada através da ferramenta MolNetEnhancer.

Análises de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) foram realizados num espectrómetro Bruker AVANCE NEO 500 MHz. (Bruker, Coventry, Reino Unido) (dados disponíveis no material suplementar).

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001, pelo apoio financeiro concedido à primeira autora, Anauara Lima e Silva; CNPq pelas bolsas atribuídas a Thiago Medeiros de Araújo Brito, Josean Fachine Tavares e Marcelo Sobral da Silva; Professor José Maria Barbosa Filho pela disponibilização do composto padrão utilizado neste trabalho; Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises; e a Universidade Federal da Paraíba.

Declaração de contribuição dos autores

Anauara Lima e Silva: Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia, Redação do rascunho original e Edição. Thiago Araújo de Medeiros Brito: Metodologia. Marcelo Sobral da Silva: Obtenção de financiamento, Administração do projeto, Recursos e Revisão. Josean Fachine Tavares: Supervisão, Escrita e Revisão.

Referências

- A. Esteves-Souza, T. Silva, C. Alves, M. Carvalho, R. Braz-Filho, A. Echevarria, *Journal of the Brazilian, Chemical Society*. **2002**, 13, 838-842. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532002000600017>
- A. Pilon, D. Selegato, R. Fernandes, P. Bueno, D. Pinho, F. Carnevale Neto, R. Freire, I. Castro-Gamboa, V. Bolzani, N. Lopes, *Química Nova*. **2020**, 43, 329-354. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170499>
- B. Mathew, G. Mathew, S. George, M. Shamnas, V. Raj, *Chemical Sciences Journal*. **2012**.
- B. Yuan, D. Byrnes, F. Dinssa, J. Simon, Q. Wu, *Journal of food science*. **2019**, 84, 235-243. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14424>

- C. Ramos, A. de Sousa, C. de Almeida, R. de Oliveira, *Biochemical Systematics and Ecology*. **2021**, 98, 104318. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104318>
- D. Cook, S. Lee, D. Gardner, R. Molyneux, R. Johnson, C. Taylor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2021**, 69, 4037-4047. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00708>
- D. Kao, J. Henkin, D. Soejarto, A. Kinghorn, N. Oberlies, *Phytochemistry letters*. **2018**, 28, 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.10.001> [Get rights and content](#)
- D. Zhao, Y. Zhao, S. Chen, E. Kennelly, *Natural product reports*. **2021**, 38, 1423-1444. <https://doi.org/10.1039/D1NP00001B>
- F. Andrade Cavalcante, J. da Silva, A. Medeiros, F. de Sousa Claudino, *Journal of Medicinal Plants Research*. **2013**, 7, 772-776.
- F. Borsoi, G. Pastore, H. Arruda, *Plants*. **2024**, 13, 1396. <https://doi.org/10.3390/plants13101396>
- F. Lelario, S. de Maria, A. Rivelli, D. Russo, L. Milella, S. Bufo, L. Scrano, *Toxins*. **2019**, 11, 230. <https://doi.org/10.3390/toxins11040230>
- F. Yang, H. Wang, G. Feng, S. Zhang, J. Wang, L. Cui, *Journal of Food Quality*. **2021**, 1, 5560626. <https://doi.org/10.1155/2021/5560626>
- G. Qin, X. Zhang, F. Zhu, Z. Huo, Q. Yao, Q. Feng, Z. Liu, G. Zhang, J. Yao, H. Liang, *Molecules*. **2022**, 28, 157. <https://doi.org/10.3390/molecules28010157>
- H. Kim, R. Verpoorte, *Phytochemical Analysis*. **2010**, 21, 4-13. <https://doi.org/10.1002/pca.1188>
- H. Ripperger, *Alkaloids: chemical and biological perspectives*. **1998**, 12, 103-185.
- I. Foutami, T. Mariager, R. Rinnan, C. Barnes, N. Rønsted, *Frontiers in Plant Science*. **2018**, 9, 426325. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01877>
- I. Popova, M. Morra, *Chromatographia*. **2021**, 84, 135-145. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03989-7>
- I. Popova, B. Sell, S. Pillai, J. Kuhl, L. Dandurand, *Plants*. **2022**, 11, 269. <https://doi.org/10.3390/plants11030269>
- J. Eloff, *Journal of Ethnopharmacology*. **1999**, 67, 355-360. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00053-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00053-7)
- J. Kaunda, Y. Zhang, *Natural products and bioprospecting*. **2019**, 9, 77-137. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0201-6>
- J. Resende, N. de Sá, M. de Oliveira, R. Lopes, R. Garrett, R. Borges, *Phytochemistry letters*. **2020**, 36, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.01.021>
- J. Tasca, C. Smith, E. Burzynski, B. Sundberg, A. Lagalante, T. Livshultz, K. Minbiole, *Applications in plant sciences*. **2018**, 6, 1143. <https://doi.org/10.1002/aps3.1143>

- L. Barny, J. Tasca, H. Sanchez, C. Smith, S. Koptur, T. Livshultz, K. Minbiole, *Phytochemistry*. **2021**, 185, 112662. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112662>
- L. Nothias, M. Ballero, A. Maxia, F. Pollastro, P. Dorrestein, J. Paolini, M. Litaudon, G. Appendino, *ISTE OpenSci*. **2018**, 1, 1-9.
- L. Packia, B. Bharath, M. Anita, B. Raja, S. Jeeva, *International Journal of Inventions in Pharmaceutical Sciences*. **2013**, 1, 433-437.
- L. Perez de Souza, S. Alseekh, T. Naake, A. Fernie, *Current protocols in plant biology*. **2019**, 4, 20100. <https://doi.org/10.1002/cppb.20100>
- L. Sucha, P. Tomsik, *Planta medica*. **2016**, 82, 379-387. <https://doi.org/10.1055/s-0042-100810>
- L. Sumner, A. Amberg, D. Barrett, M. Beale, R. Beger, C. Daykin, T. Fan, O. Fiehn, R. Goodacre, J. Griffin, T. Hankemeier, N. Hardy, J. Harnly, R. Higashi, J. Kopka, A. Lane, J. Lindon, P. Marriott, A. Nicholls, M. Reyli, J. Thaden, M. Viant, *Metabolomics*. **2007**, 3, 211-221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- M. Agra, M. Nee, *Brittonia*. **1997**, 49, 350-353.
- M. Cahill, G. Caprioli, S. Vittori, K. James, *Journal of mass spectrometry*. **2010**, 45, 1019-1025. <https://doi.org/10.1002/jms.1785>
- M. Friedman, G. McDonald, M. Filadelfi-Keszi, *Critical reviews in plant sciences*. **1997**, 16, 55-132. <https://doi.org/10.1080/07352689709701946>
- M. Jin, C. Shi, T. Li, Y. Wu, C. Hu, G. Huang, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2020**, 129, 110282. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110282>
- M. Morais, A. Saldanha, J. Rodrigues, I. Mendes, L. Ferreira, P. Amado, K. Farias, V. Zancuncio, F. Pinto, A. Soares, L. Lima, *Journal of Ethnopharmacology*. **2020**, 262, 113125. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113125>
- M. Torres, R. Jorge, R. Ximenes, N. Alves, J. Santos, A. Marinho, H. Monteiro, T. Marcos, B.F. Raimundo, E. Silveira, O. Pessoa, *Phytochemistry*. **2013**, 96, 457-464. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.09.007>
- M. Winkiel, S. Chowański, M. Słocińska, *Frontiers in Pharmacology*. **2022**, 13, 979451. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.979451>
- M. Xiang, B. Hu, Z. Qi, X. Wang, T. Xie, Z. Wang, D. Ma, Q. Zeng & X. Luo, *Natural Products and Bioprospecting*. **2022**, 12, 23. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00345-0>
- M. Yoshikawa, S., Nakamura, K. Ozaki, A. Kumahara, T. Morikawa, H. Matsuda, *Journal of natural products*. **2007**, 70, 210-214. <https://doi.org/10.1021/np0680580>
- O. Singh, T. Singh, *Journal of Scientific & Industrial Research*. **2010**, 69, 732-740.
- S. El-HawaryMohammed, S. AbouZid, W. Bakeer, R. Ebel, A. Sayed, M. Rateb, *Journal of applied Microbiology*. **2016**, 120, 900-911. <https://doi.org/10.1111/jam.13077>

- S. Koduru, D. Grierson, M. Van de Venter, A. Afolayan, *Pharmaceutical Biology*. **2007**, 45, 613-618. <https://doi.org/10.1080/13880200701538690>
- S. Milner, N. Brunton, P. Jones, N. O'Brien, S. Collins, A. Maguire, *Journal of agricultural and food chemistry*. **2011**, 59, 3454-3484. <https://doi.org/10.1021/jf200439q>
- S. Moraes, L. Gregório, J. Tomaz, N. Lopes, *Chromatographia*. **2009**, 69, 157-165 <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1036-9>
- S. Patil, S. Sambrekar, *International Journal Of Pharmaceutical And Bio-Medical Science*. **2012**, 3,1559-1566.
- Solanum* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14716>>. Acesso em: 29 mai. 2024.
- S. Wu, R. Meyer, B. Whitaker, A. Litt, E. Kennelly, *Journal of Chromatography A*. **2013**, 1314, 154-172. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.01>
- S. Yahara, T. Yamashita, N. Nozawa, T. Nohara, *Phytochemistry*. **1996**, 43, 1069-1074. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00396-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00396-2)
- T. Silva, M. Agra, J. Bhattacharyya, *Revista brasileira de farmacognosia*. **2005**, 15, 292-293. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400005>
- T. Silva, R. Nascimento, M. Batista, M. Agra, C. Camara, *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2007**, 17, 35-38. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100008>
- U. Heinig, A. Aharoni, *Plant Isoprenoids: Methods and Protocols*. **2014**, 171-185. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0606-2_12
- W. Zhao, T. Yan, X. Huang, Y. Zhang, *Journal of Separation Science*, **2023**, 46, 2200804. <https://doi.org/10.1002/jssc.202200804>
- Y. Sun, Y. Zhao, L. Wang, H. Lou, A. Cheng, *Drug Discoveries & Therapeutics*. **2012**, 6, 242-248. <https://doi.org/10.5582/ddt.2012.v6.5.242>

Material Suplementar

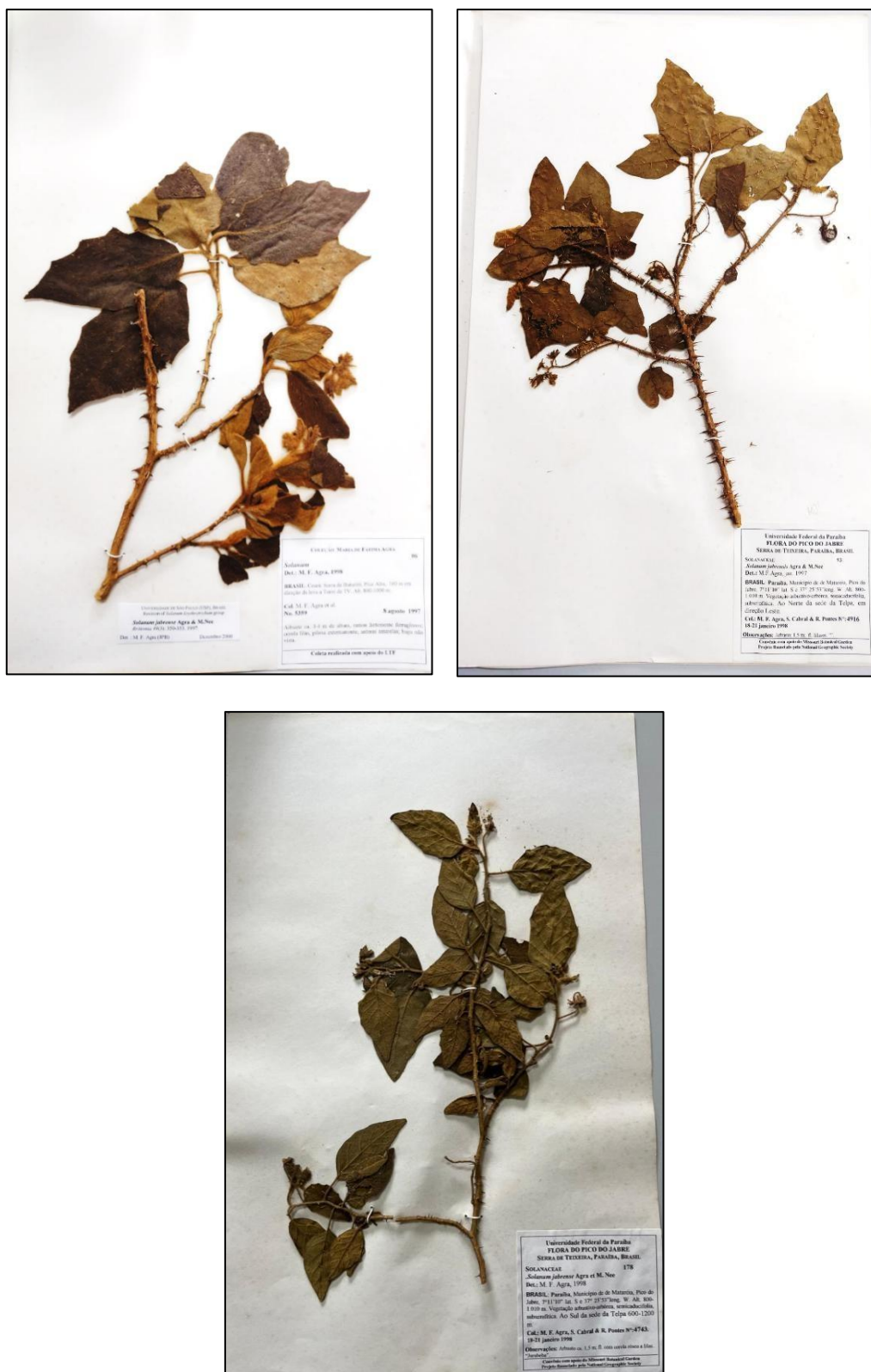


Figura 23. Espécimes de *S. jabrense* Agra & M. Nee usadas neste estudo.

Tabela 5. Espécimes usadas neste estudo.

Collection Location	Date	Collectors	Location	Registration nº
Brasil, Paraíba, Maturéia, Pico do Jabre	18/01/1998	M.F. Agra, S. Cabral and R. Pontes 4743	Lauro Pires Xavier Herbarium (JPB)	JPB 33763
Brasil, Paraíba, Maturéia, Pico do Jabre	21/01/1998	M.F. Agra, S. Cabral and R. Pontes 4916	Lauro Pires Xavier Herbarium (JPB)	JPB 33760
Brasil, Ceará, Serra de Baturité	08/08/1997	M.F. Agra et al. 5359	Reference collection (CBiotec)	JPB 24868

• Espectros de ^1H NMR

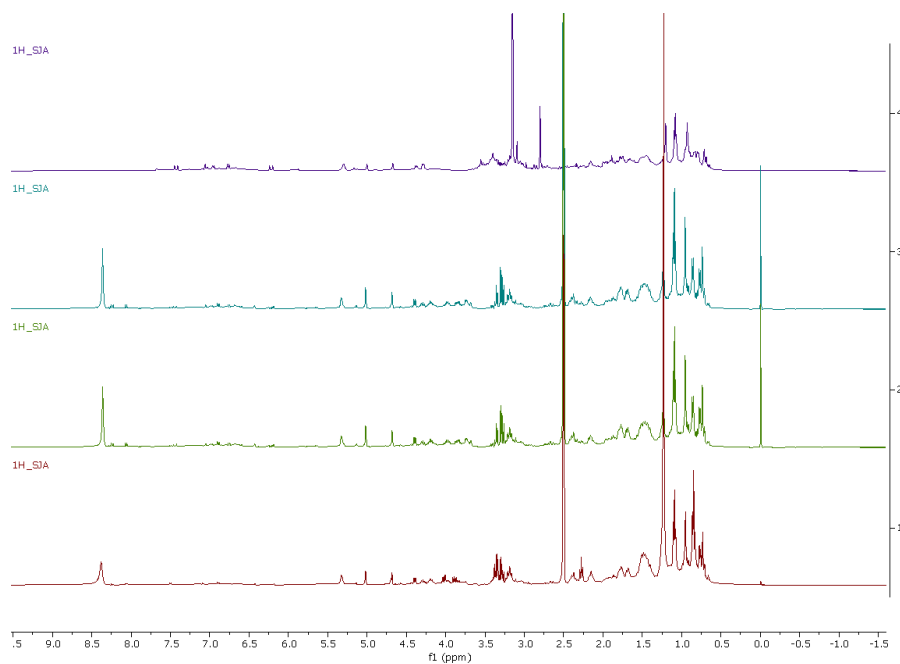


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H do extrato hidroalcólico (MeOH + H_2O) do material fresco e de três espécimes de *S. jabrense*. **a.** Extrato hidroalcólico da planta fresca. **b.** Extrato hidroalcólico do espécime nº 4743. **c.** Extrato hidroalcólico do espécime nº 5359. **d.** Extrato hidroalcólico do espécime nº 4916.

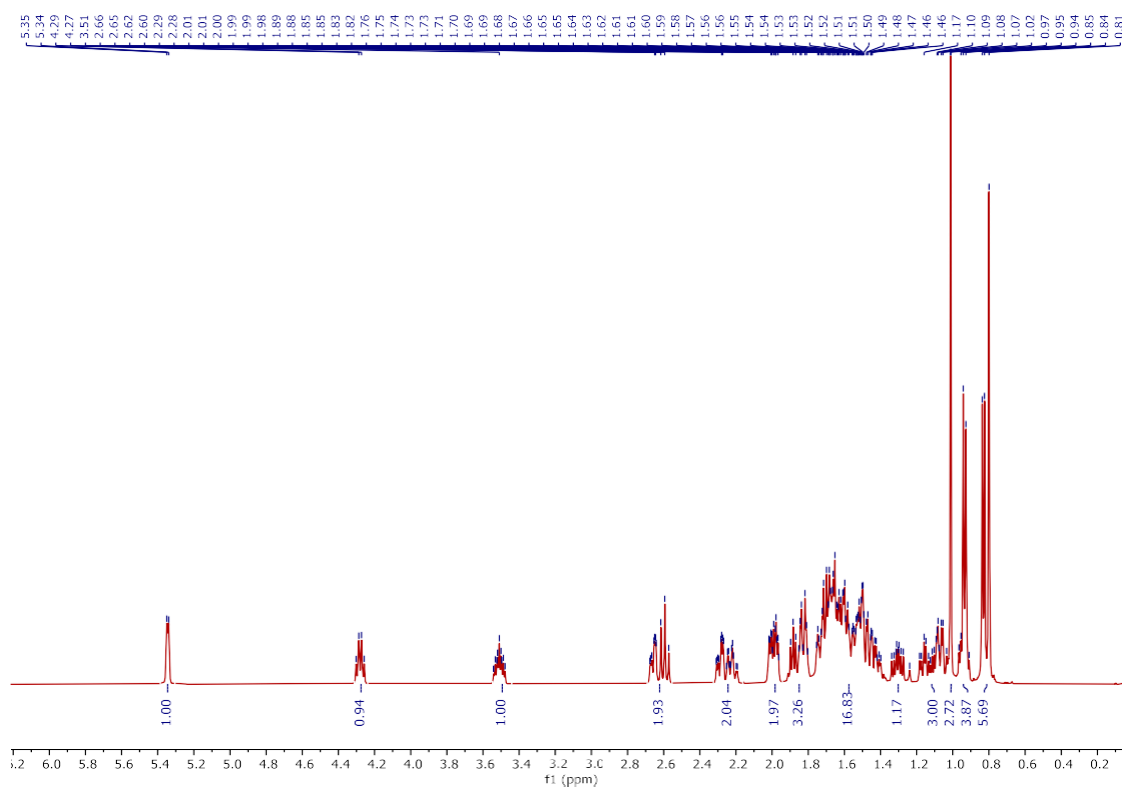


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H do padrão Solasodina (CDCl_3 ; Bruker Ascend 500 MHz).

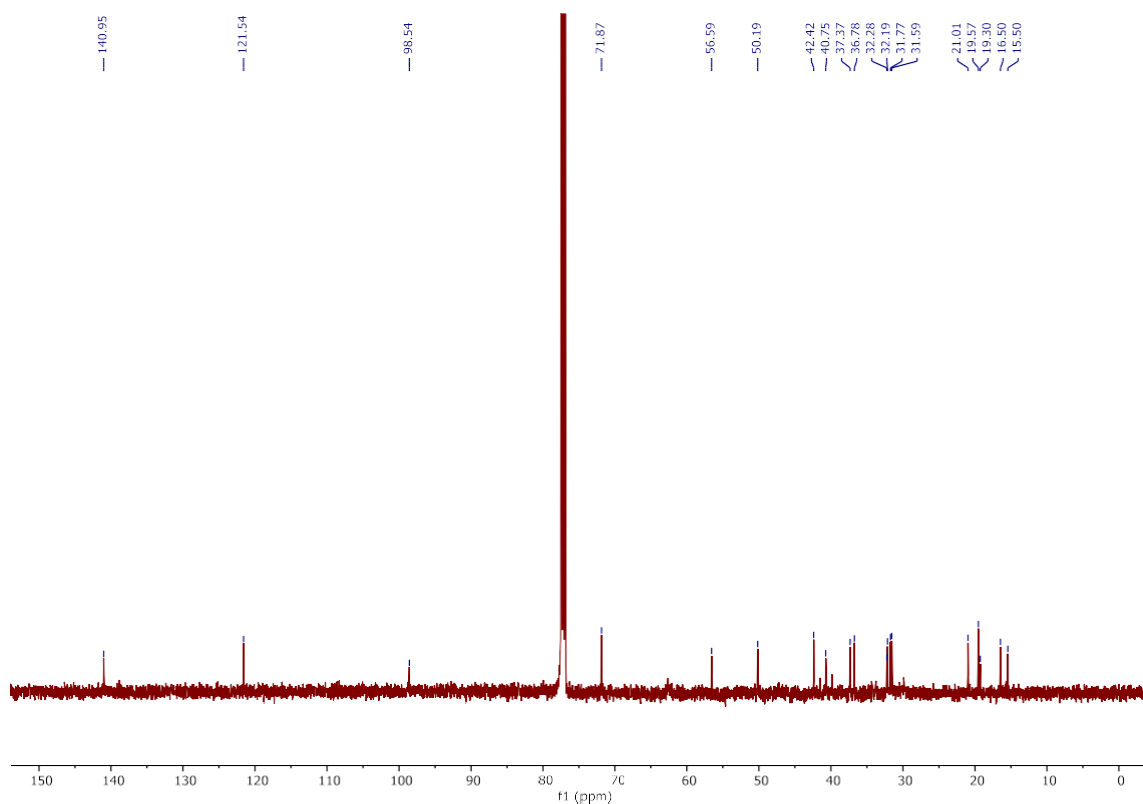


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C do padrão Solasodina (CDCl_3 ; Bruker Ascend 125 MHz).

- **Análises do GNPS**

Tabela 6. Análises realizadas pela Global Natural Products (GNPS).

Descrição/ Fluxo de trabalho	ID da Rede Molecular	Endereço Eletrônico
Classic Molecular Networking	1816654fd3cc4a19b992e9a60274eb36.graphml	https://cytoscape.gnps2.org/process?task=1816654fd3cc4a19b992e9a60274eb36
Molnetenhancer of Classic Molecular Networking	21e3bc914da140a0956f190cfe39f5e7.graphml	https://cytoscape.gnps2.org/process?task=21e3bc914da140a0956f190cfe39f5e7

- **Base Peak Chromatograms (BPCs) íons moleculares relativos aos nodos**

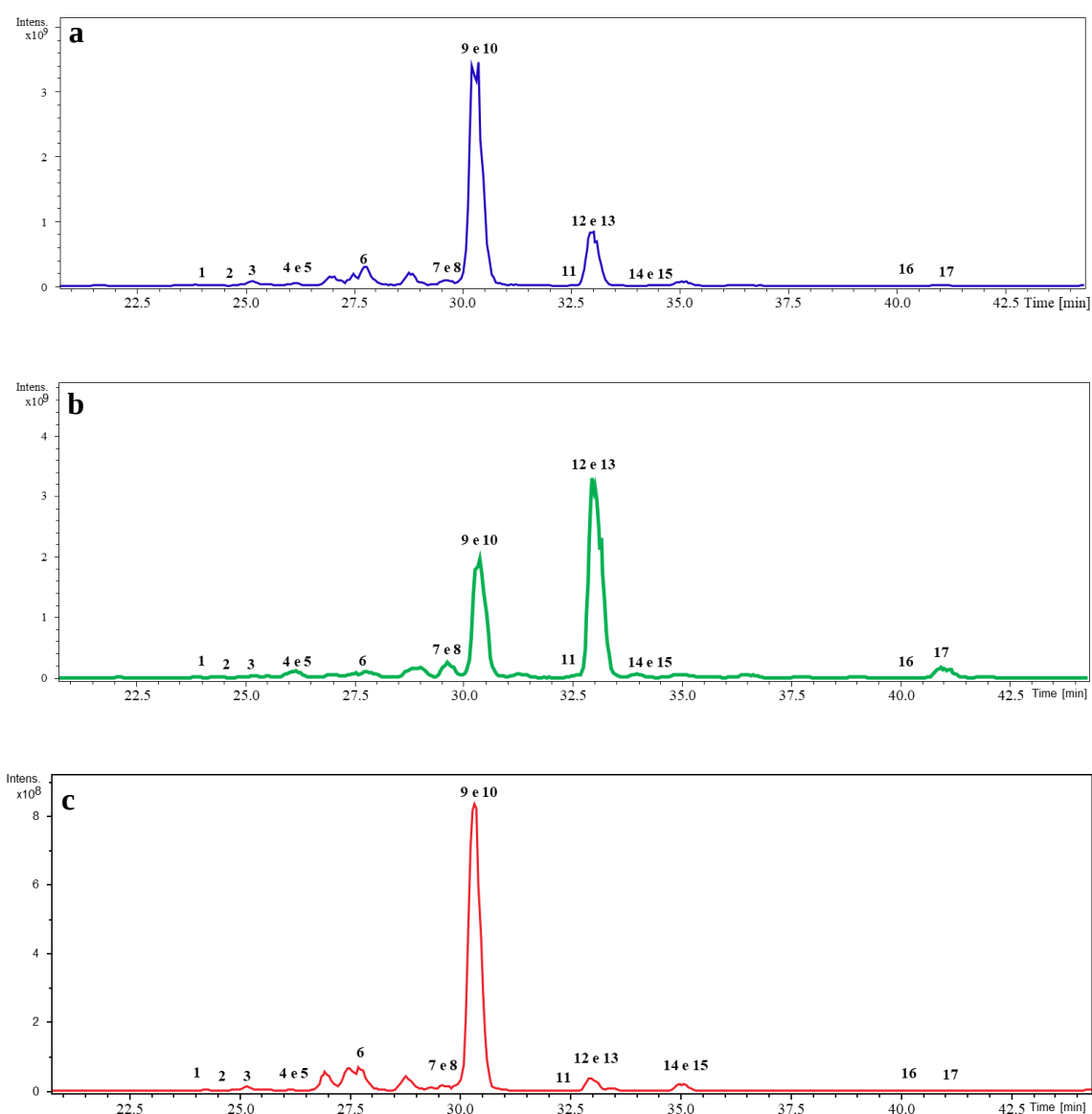


Figura 27. Cromatogramas de pico base (BPC) dos três extratos dos três espécimes SJA4743 (a), SJA4916 (b), SJA5359 (c) de *S. jabrense*.

• Padrão isotópico dos maiores compostos anotados

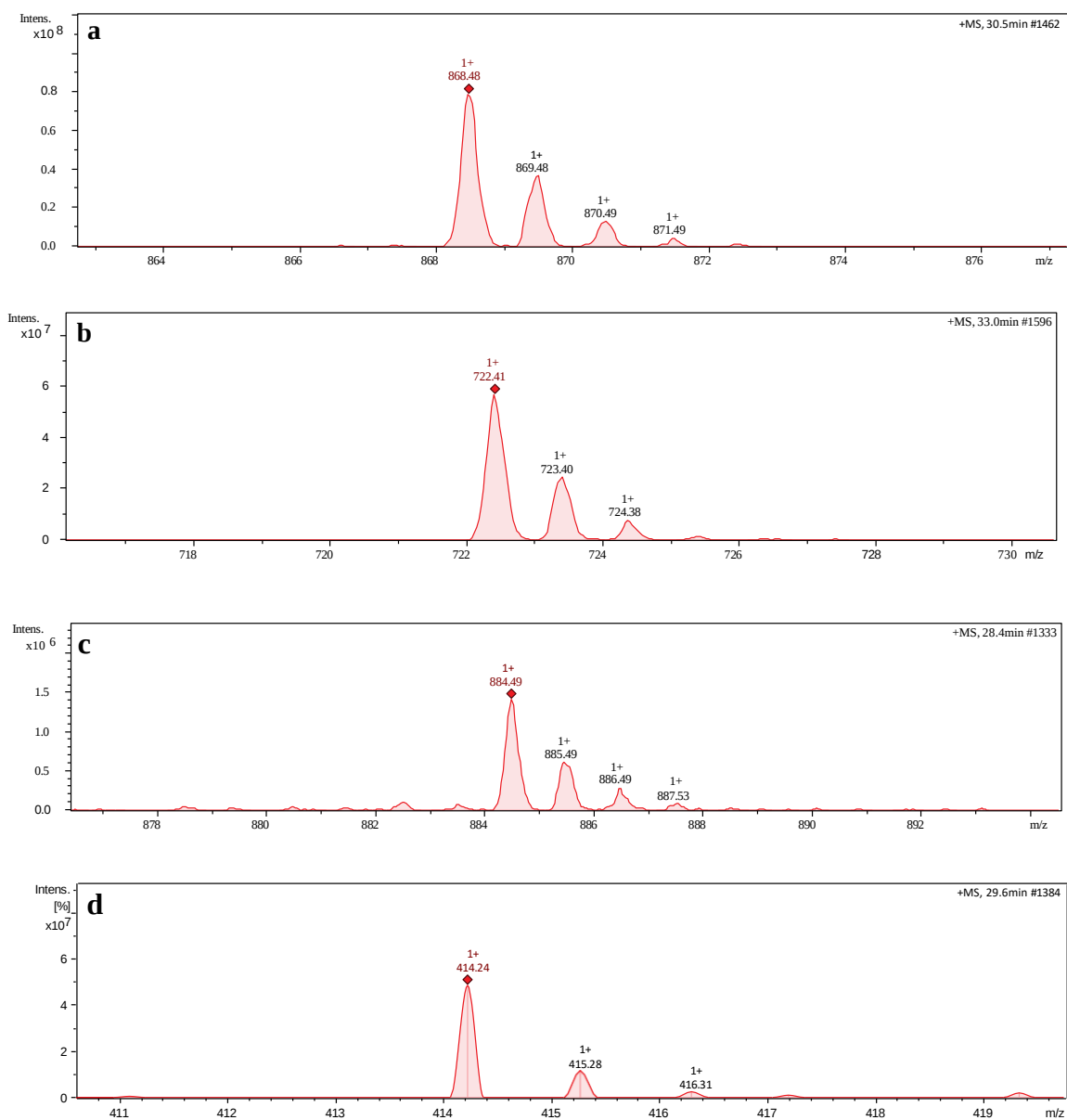


Figura 28. Análise da razão isotópica de dois compostos principais **a.** Solamargine, m/z 868; **b.** β 1-solasonina ou β 2- solamargina, m/z 722; **c.** Solasonina ou isómero, m/z 884; **e.** Aglicona solasodina, m/z 414.

- Espectros de MS² dos íons moleculares relativos aos nodos

HS-hex-pent

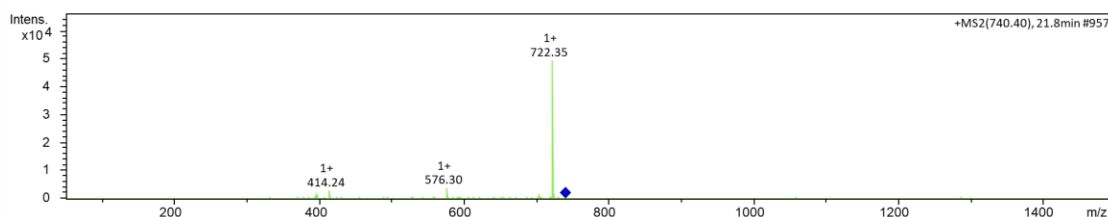


Figura 29. Espectro de MS² do glicoalcaloide m/z 740 [M+H]⁺. (Mecanismo de fragmentação com perda de água m/z 18 e fragmentos de açúcar para a formação de agliconas m/z 414).

DHS-hex

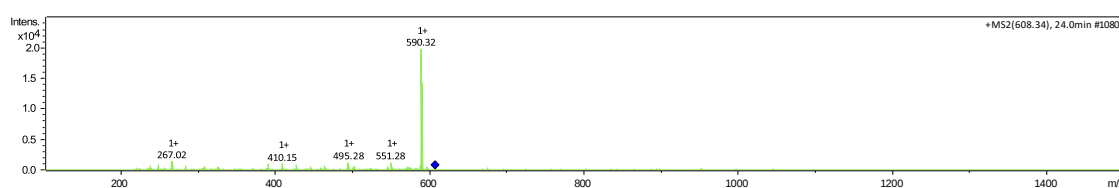


Figura 30. Espectro de MS² do glicoalcaloide m/z 608 [M+H]⁺. (Mecanismo de fragmentação com perda de água m/z 18 e fragmento de açúcar para a formação de aglicona m/z 410).

DHS-hex-pent-hex

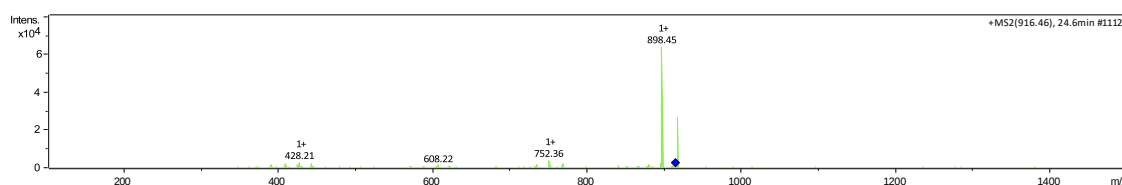


Figura 31. Espectro de MS² do glicoalcaloide m/z 916 [M+H]⁺. (Mecanismo de fragmentação com perda de água m/z 18 e fragmentos de açúcar para a formação de agliconas m/z 428).

Not identified

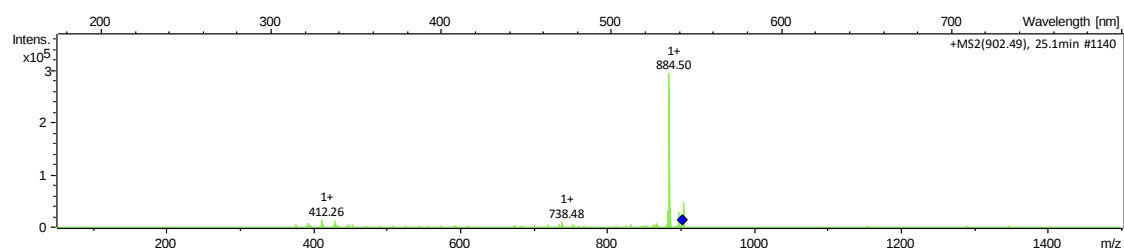


Figura 32. Espectro de MS² do glicoalcaloide m/z 902 [M+H]⁺. (Mecanismo de fragmentação com perda de água m/z 18 e fragmentos de açúcares para a formação de agliconas m/z 412).

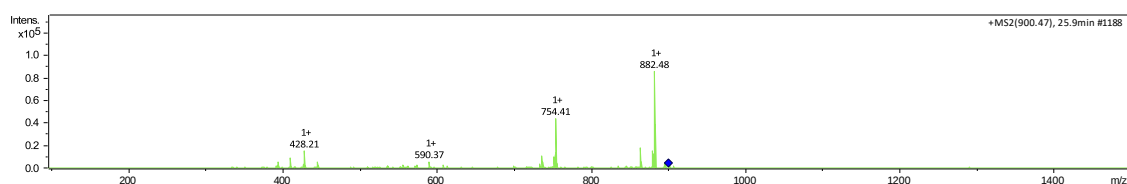
DHS-hex-pent

Figura 33. Espectro de MS² do glicoalcaloide m/z 900 [M+H]⁺. (Mecanismo de fragmentação com perda de água m/z 18 e fragmentos de açúcar levando à formação da aglicona m/z 428).

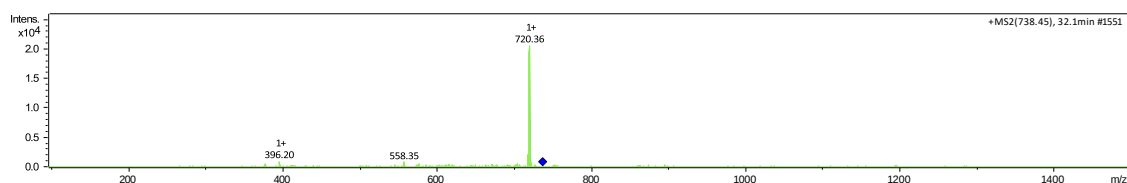
Sol-hex-hex

Figura 34. Espectro de MS² do glicoalcaloide m/z 738 [M+H]⁺. (Mecanismo de fragmentação com perda de água m/z 18 e fragmentos de açúcar levando à formação da aglicona desidratada m/z 414).

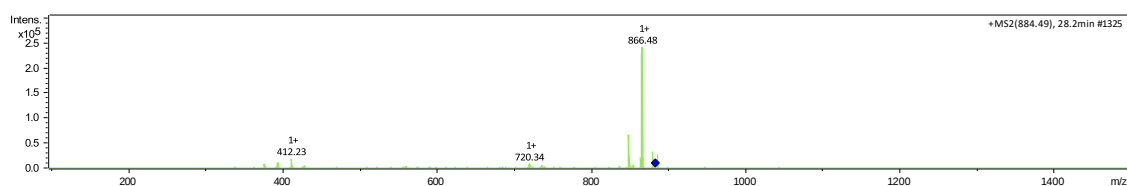
Sol-hex-pent-hex

Figura 35. Espectro de MS² do glicoalcaloide m/z 884 [M+H]⁺. (Mecanismo de fragmentação com perda de água m/z 18 e fragmentos de açúcar levando à formação da aglicona m/z 412).

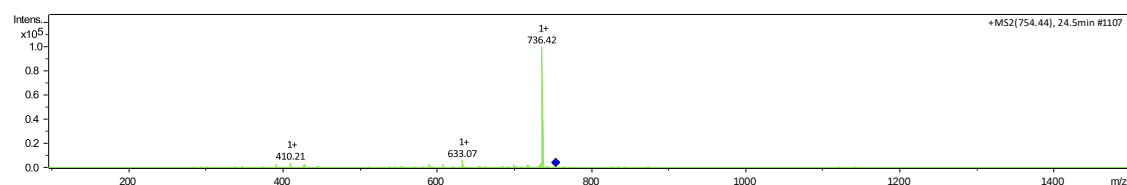
DHS-hex-pent

Figura 36. Espectro de MS² do glicoalcaloide m/z 754 [M+H]⁺. (Mecanismo de fragmentação com perda de água m/z 18 e fragmentos de açúcar levando à formação da aglicona m/z 410).

Solasodine (Sol)

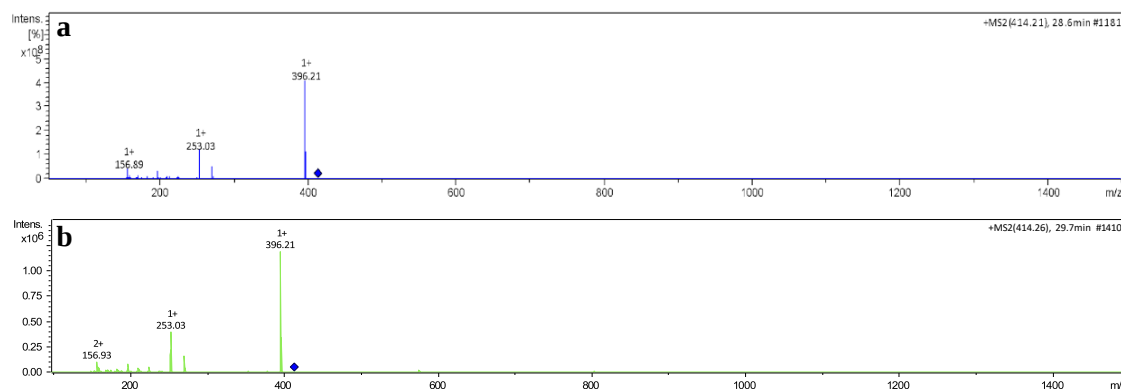


Figura 37. Espectro MS² da aglicona Solasodina, m/z 414 [M+H]⁺. **A.** Padrão. **B.** Solasodina presente nas amostras e anotada pelo GNPS (Mecanismo de fragmentação na figura 21).

Sol-hex-pent-pent

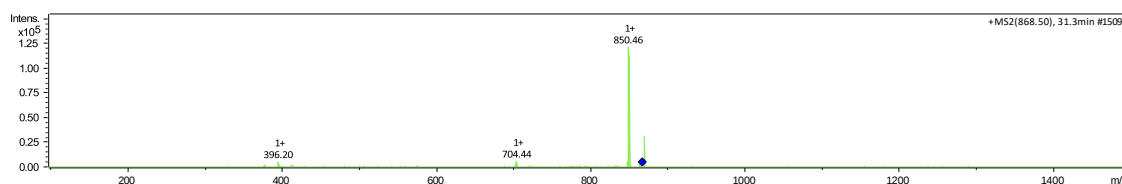


Figura 38. Espectro de MS² do glicoalcaloide m/z 868 [M+H]⁺. (Mecanismo de fragmentação com perda de água m/z 18 e fragmento de açúcar levando à formação de fragmentos correspondentes à aglicona desidratada m/z 414).

S-hex-pent-pent

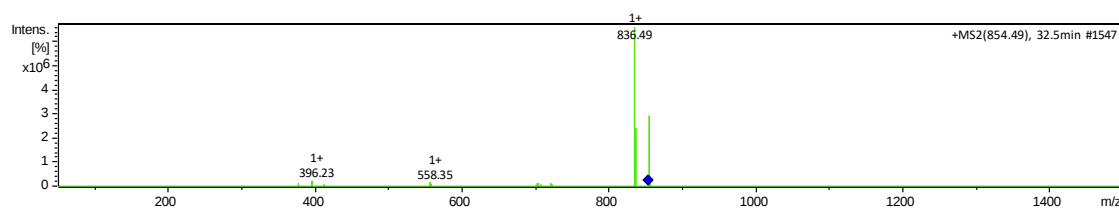


Figura 39. Espectro MS² do glicoalcaloide m/z 854 [M+H]⁺. (Mecanismo de fragmentação com perda de água m/z 18 e fragmento de açúcar levando à formação de fragmentos correspondentes à aglicona desidratada m/z 414).

Sol-hex

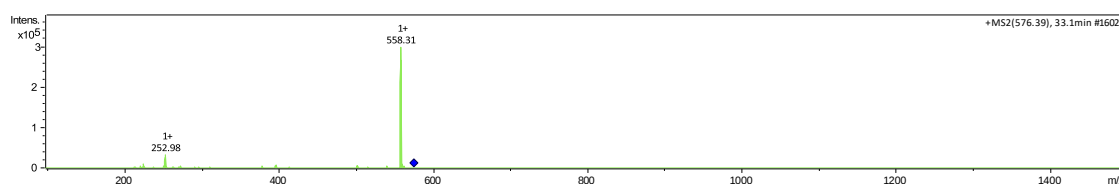


Figura 40. Espectro de MS^2 do glicoalcaloide m/z 576 $[M+H]^+$. (Mecanismo de fragmentação com perda de água m/z 18 e fragmento de açúcar levando à formação de fragmentos correspondentes à aglicona desidratada m/z 414 e clivagem do anel E-F, m/z 125).

Sol-hex-pent

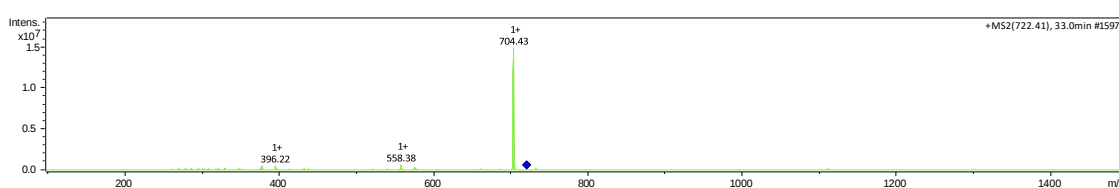


Figura 41. Espectro MS^2 do glicoalcaloide m/z 722 $[M+H]^+$. (Mecanismo de fragmentação com desidratação e perda de fragmentos de açúcar levando à formação da aglicona desidratada m/z 414).

DHS

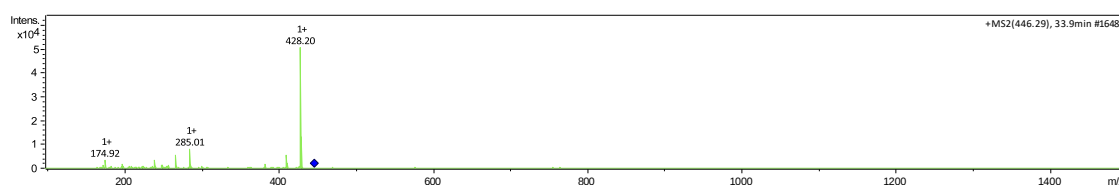


Figura 42. Espectro MS^2 do glicoalcaloide m/z 446 $[M+H]^+$. (Mecanismo de fragmentação com perda de um fragmento de água m/z 18 e do anel E-F m/z 125).

HSD

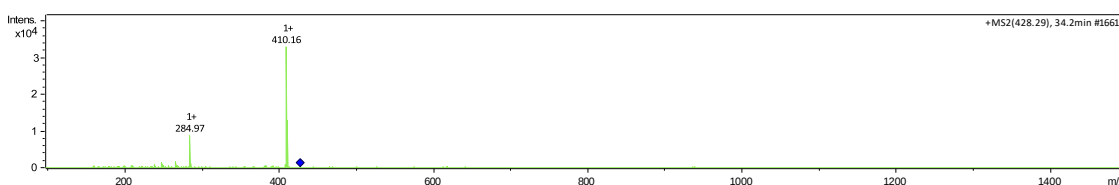


Figura 43. Espectro de MS^2 do glicoalcaloide m/z 428 $[M+H]^+$. (Mecanismo de fragmentação com perda de um fragmento de água m/z 18 e do anel E-F m/z 125).

Tabela 7. Agliconas encontradas em amostras de *S. jabrense*.

	Aglicona	[M+H]⁺	Íons fragmentos
Solasodina (S)	ABCDEF ⁺	<i>m/z</i> 414	<i>m/z</i> 396, <i>m/z</i> 253, <i>m/z</i> 157
Di-hidoxi-solasodina (DHS)	(OH)-ABCDEF-(OH) ⁺	<i>m/z</i> 446	<i>m/z</i> 428, <i>m/z</i> 285, <i>m/z</i> 175
hidroxi-solasodina (HS)	ABCDEF-(OH) ⁺	<i>m/z</i> 430	<i>m/z</i> 412, <i>m/z</i> 267
Fragmento de Di-hidoxi-solasodina	OH-ABCDEF-(OH) ⁺ - H ₂ O	<i>m/z</i> 428	<i>m/z</i> 410, <i>m/z</i> 285
Fragmento de hidrox-solasodina	ABCDEF-(OH) ⁺ - H ₂ O	<i>m/z</i> 412	<i>m/z</i> 394, <i>m/z</i> 269, <i>m/z</i> 173
Fragmento de Di-hidoxi-solasodina	OH-ABCDEF-(OH) ⁺ - 2H ₂ O	<i>m/z</i> 410	<i>m/z</i> 392, <i>m/z</i> 267, <i>m/z</i> 173

- Padrão de fragmentação da aglicona solasodina- m/z 414

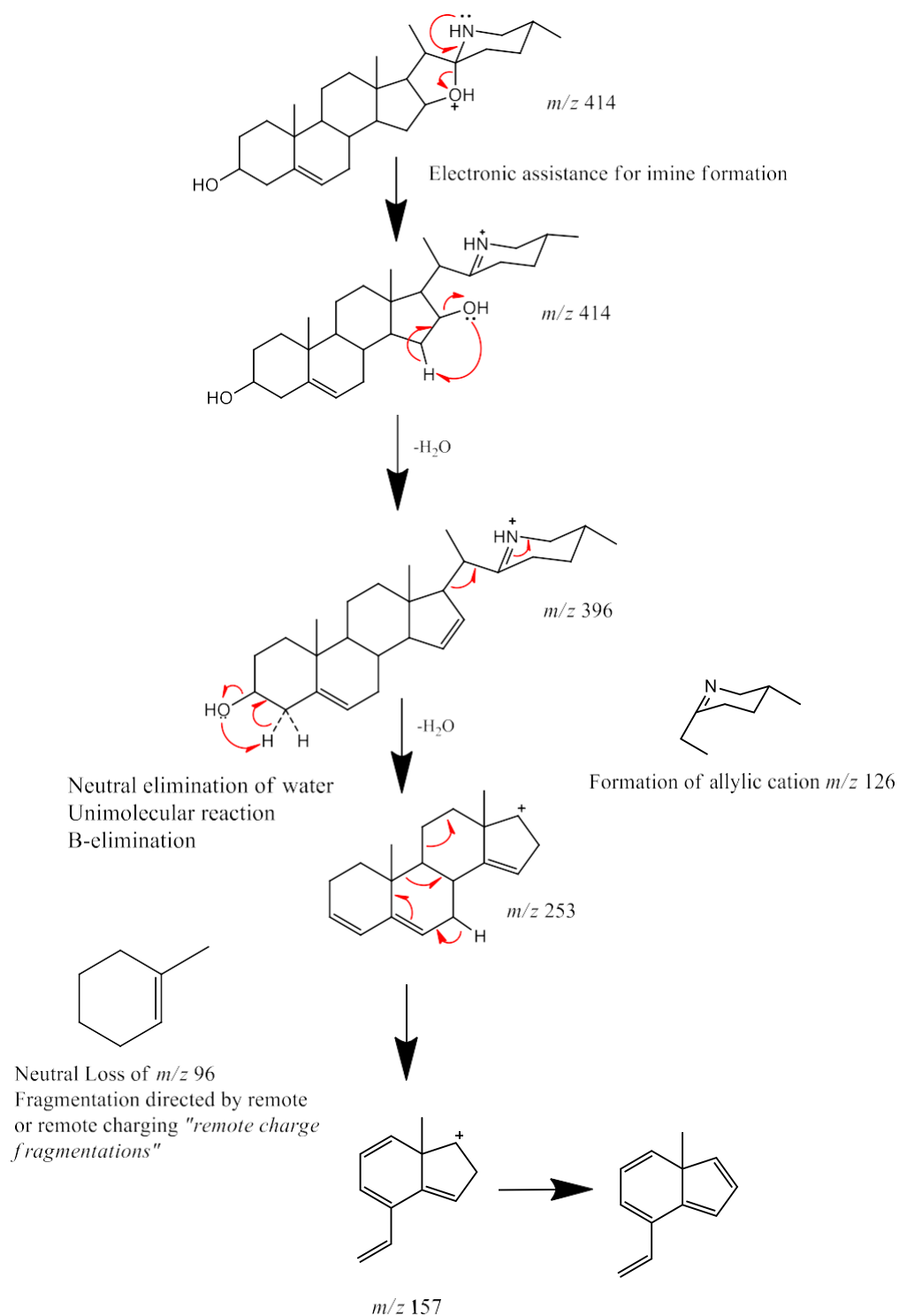


Figura 44. Padrão de fragmentação da aglicona solasodina.

- Espectro de MS² de íons moleculares relativos a agliconas

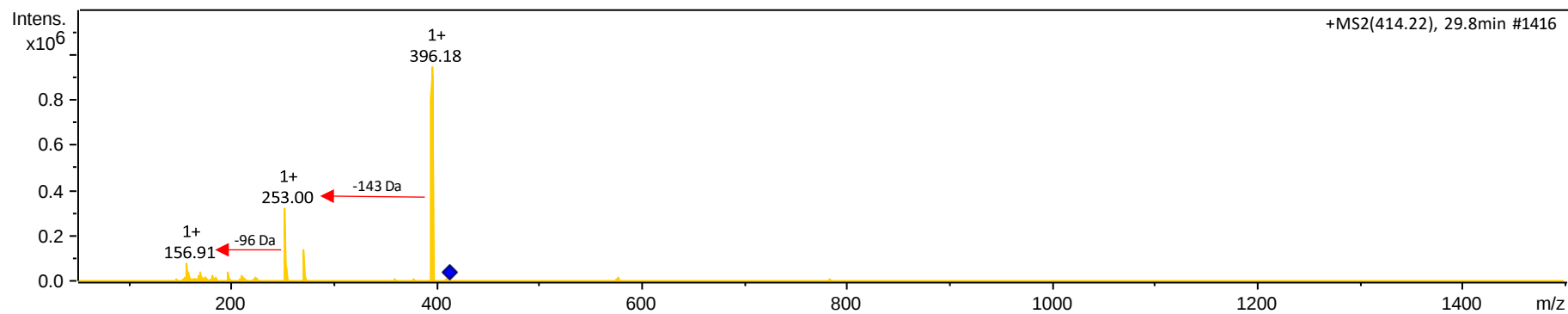


Figura 45. Espectro de MS² da aglicona m/z 414 $[M+H]^+$.

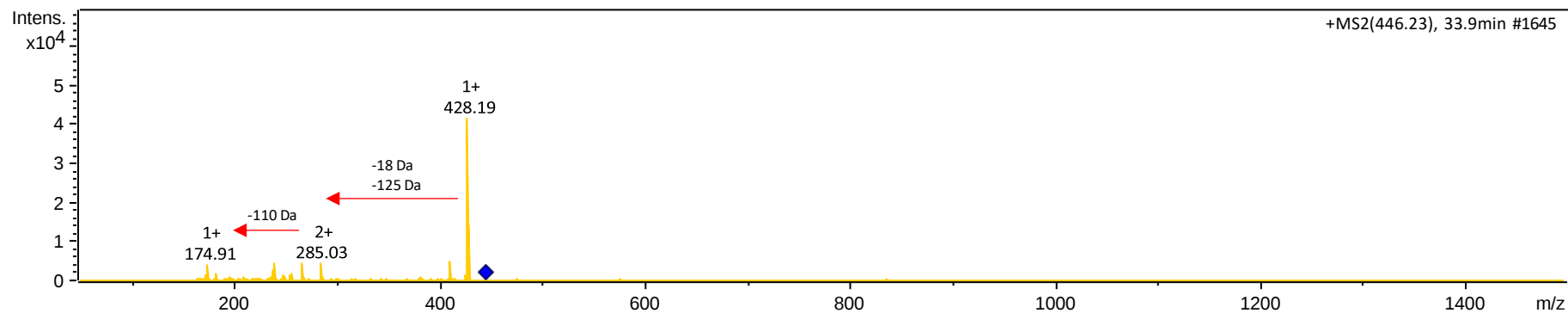


Figura 46. Espectro de MS² da aglicona m/z 446 $[M+H]^+$.

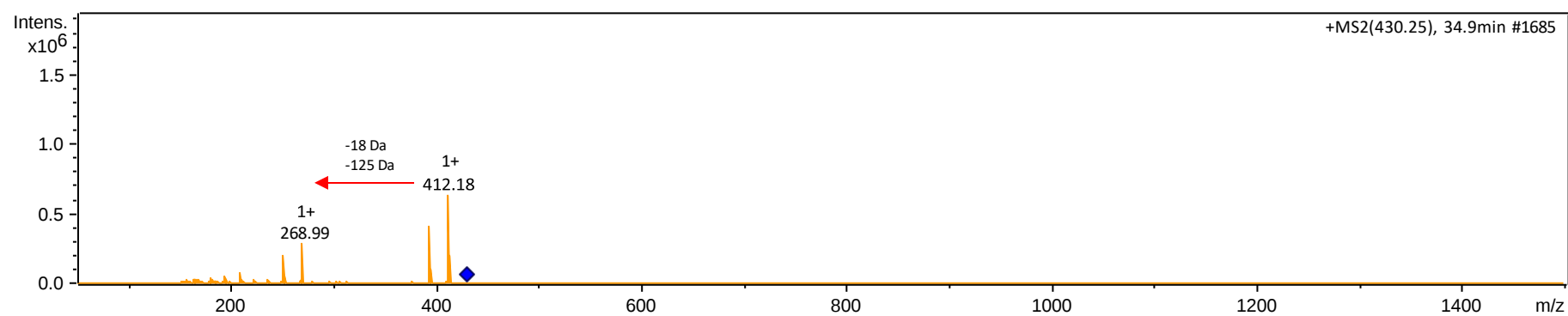


Figura 47. Espectro MS^2 da aglicona m/z 430 $[M+H]^+$.

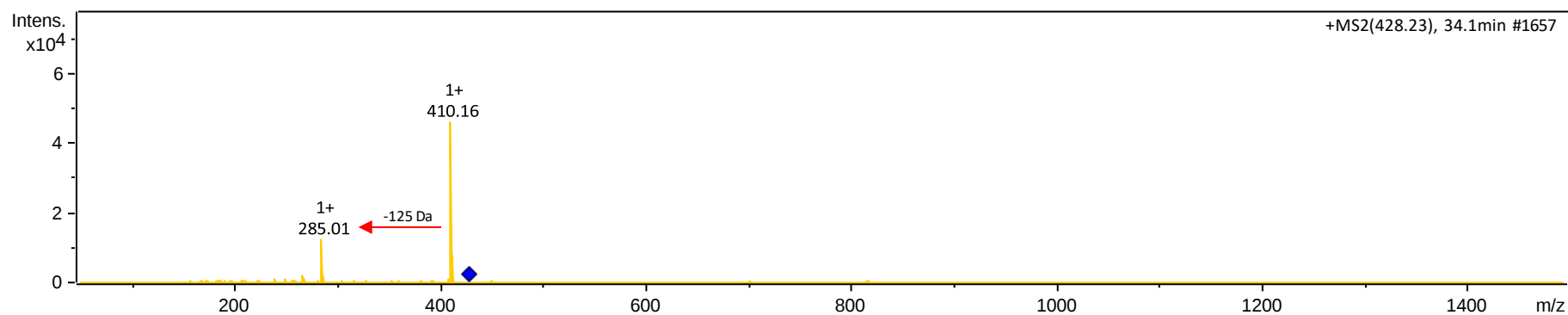


Figura 48. Espectro MS² da aglicona m/z 428 $[M+H]^+$.

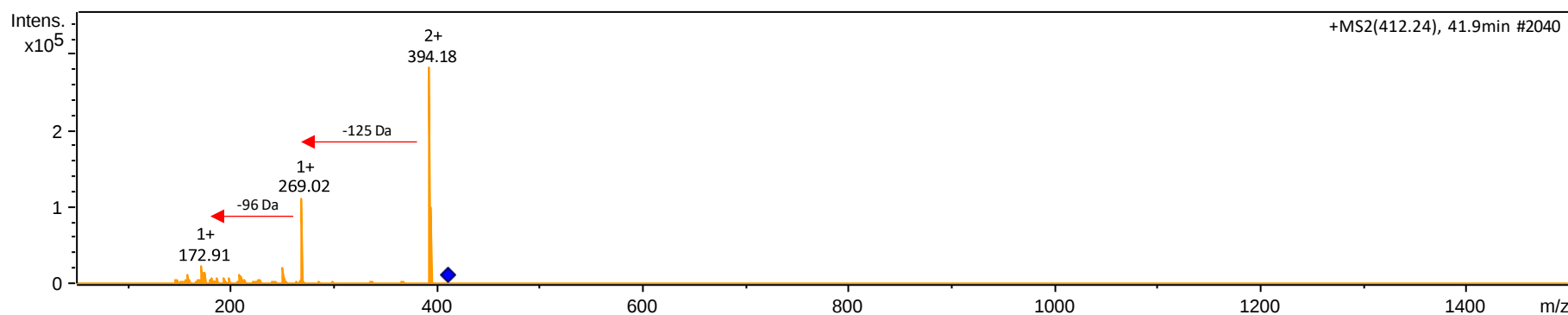


Figura 49. Espectro MS² da aglicona m/z 412 $[M+H]^+$.

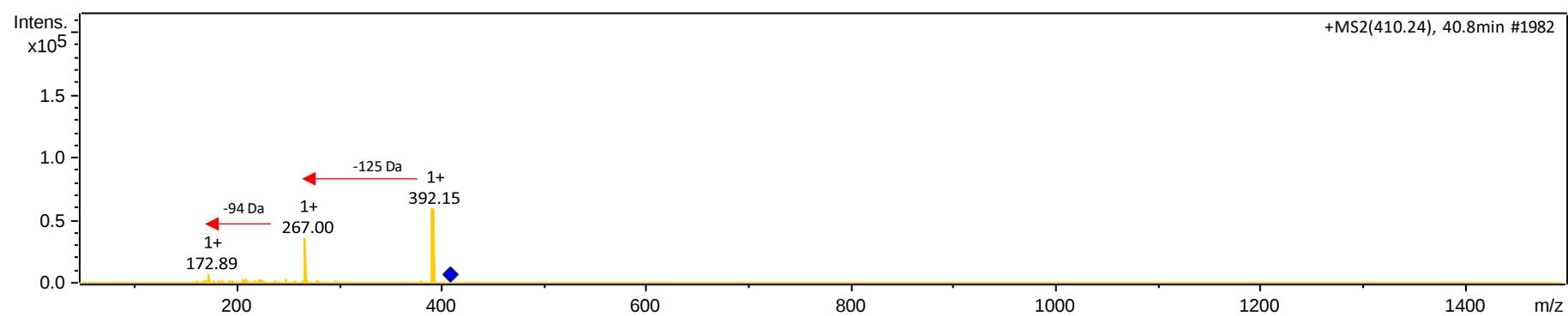


Figura 50. Espectro MS² da aglicona m/z 410 [M+H]⁺.

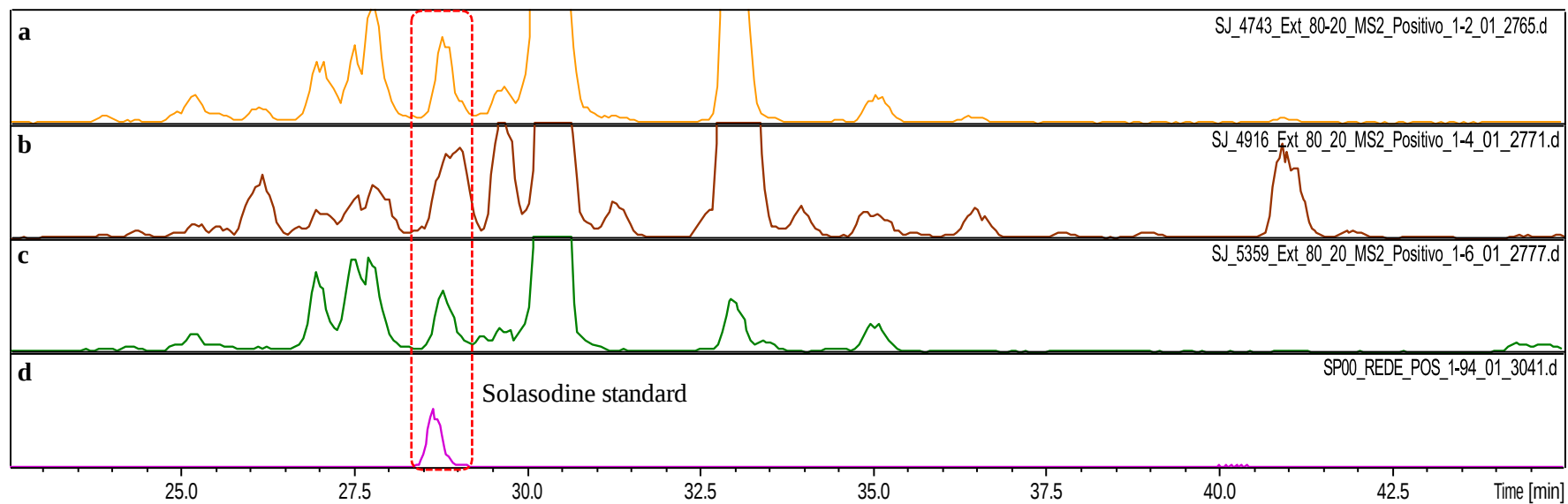


Figura 51. Comparação dos cromatogramas de pico base (BPC) dos extratos hidroalcoólicos de três espécimes SJA4743 (a), SJA4916 (b), SJA5359 (c) de *S. jabrense* e padrão de solasodina (d).

Capítulo 2: “Espectrometria de massas (ESI-QTOF-MS) e Métodos Estatísticos aplicados a Quimiossistemática de *Solanum* subg. *Leptostemonum*” a ser submetido ao periódico *Biochemical Systematics and Ecology*

Espectrometria de massas (ESI-QTOF-MS) e Métodos Estatísticos usando o RStudio e o pacote *xcms* aplicados a Quimiosistemática de *Solanum* subg. *Leptostemonum*

Anauara Lima e Silva^a, Thiago Araujo de Medeiros Brito^a, Hemílio Fernandes Campos Coêlho^c, Maria de Fátima Agra^b, Marcelo Sobral da Silva^a, Josean Fechine Tavares^{a*}

^a Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^b Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^c Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

* Autor para correspondência: josean@lft.ufpb.br

Resumo

Solanum é um dos dez maiores gêneros das Angiospermas e inclui cultivares amplamente utilizadas na alimentação humana em todo o mundo. O grupo destaca-se pelas atividades farmacológicas já estudadas em consequência da presença de diversos metabolitos secundários como alcaloides, saponinas e flavanoides. Os metabólitos secundários produzidos pelas espécies desse grupo não só apresentam diversas bioatividades como podem ser utilizados na discriminação e agrupamento das espécies, no entendimento da evolução química e como marcadores quimiofenéticos. Dados de CLAE-EM para análise de perfil de espécimes de herbário de *Solanum* e do subgênero *Leptostemonum* têm sido utilizados junto a análises estatísticas com o objetivo de clarificar as relações complexas dentro do grupo e do subgrupo. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi um estudo piloto com análises do perfil químico usando espectrometria de massas (CLAE-EM) de amostras de herbário de *Solanum* subgênero *Leptostemonum*, verificando que junto a aplicação de métodos estatísticos em software livre e gratuito (RStudio) estas ferramentas podem ser úteis para auxiliar nas classificações interespecíficas do subgrupo.

Palavras-chave: *Solanaceae*, Flora Brasileira, Clado *Leptostemonum*.

Introdução

Solanum L. é um dos dez maiores gêneros de plantas com flores (Frodin, 2004 e Stern et al., 2011) e um dos mais representativos da família Solanaceae, incluindo atualmente cerca de 1245 espécies aceitas (Hilgenhof et al. 2023; <http://solanaceaesource.org/>), ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais como a Ásia, África, Australia, Índia e América, distribuídas em diversos ecossistemas e muitas formas de vida (Knapp, Aubriot and Prohens, 2019).

O gênero destaca-se por incluir 24 espécies cultivadas mundialmente para consumo humano como o tomate (*S. lycopersicum* L.), a batata (*S. tuberosum* L.), a berinjela (*S. melongena* L.) (Stern et al. 2011), bem como espécies cultivadas menos conhecidas como o pepino (*S. muricatum* Aiton), lulo/naranjilla (*S. quitoense* Lam. E variedades), tomate arbóreo ou tamarillo (*S. betaceum* Cav.), cocona (*S. sessiliflorum* Dunal), berinjela escarlate (*S. aethiopicum* L.), berinjela Gboma (*S. macrocarpon* L.) e tomate do mato (*S. centrale* J.M.Black) (Hilgenhof et al. 2023).

O gênero também inclui diversas espécies com uso na medicina tradicional e com muitas atividades farmacológicas já estudadas, como analgésica, anti-helmíntica, antialérgica, antibacteriana, anticâncer, anti-inflamatória, antiviral, diurética, hepatoprotetora, larvicida, nefrotóxica, espasmolítica, e atividades vasorrelaxantes (Kaunda e Zhang, 2019).

Os metabólitos secundários produzidas pelas espécies de *Solanum* não só apresentam diversas bioatividades, como podem ser utilizados na discriminação e agrupamento das espécies, no entendimento da evolução química e como marcadores quimiofenéticos como demonstrado por Whalen (1978), Anderson et al. (1979), Steinharter et al. (1986), Basílio et al. (2012) e Ramos et al. (2017 e 2019).

De um modo geral, estudos sistemáticos em *Solanum* têm negligenciado os dados químicos, que podem constituir uma importante fonte de informações para a separação de espécies afins e, conseqüentemente, a proposição de homologia de caracteres e desses fitoquímicos. Estes dados do metabolismo secundário de plantas já são incluídos em grandes classificações de plantas como o APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016).

Protocolos publicados usando CLAE-EM para análise de perfil de espécimes de herbário de *Solanum* e do subgênero *Leptostemonum* também têm sido utilizados em estudos de

desreplicação e geração de redes moleculares, com objetivo de identificar esses compostos, já que são marcadores químicos, e utiliza-los como discriminantes para espécies ou subgrupos complexos dentro do gênero (Resende et al., 2020; Silva et al., 2024).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi um estudo piloto com análises do perfil químico (*chemical profile*) e espectrometria de massas (CLAE-EM) de amostras de herbário de *Solanum* subgênero *Leptostemonum*, verificando se esta abordagem juntamente com métodos estatísticos usando o RStudio e o pacote *xcms* podem ser úteis para a quimiosistemática e auxiliar nas classificações infragenéricas do subgrupo. Um script produzido como modelo também foi produzido e disponibilizado.

Parte Experimental

Material botânico

Três folhas de 26 espécies de *Solanum* subg. *Leptostemonum* (72 espécimes) foram coletadas da coleção de referência da Professora Dra. Maria de Fátima Agra localizada no Centro de Biotecnologia (Cbiotec), do Herbário Lauro Pires Xavier (JPB) e do Herbário Jayme Coelho de Moraes (EAN) ambos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I e Campus II, respectivamente (Tabela 08).

Partes aéreas (folhas e galhos) de *S. jabrense* também foram coletados na cidade de Maturéia, Paraíba, Brasil, e na Cidade de Buíque, Pernambuco, Brasil, e uma exsiccata depositada no Herbário Lauro Pires Xavier (JPB) (JPB 42267) e no Herbário Jayme Coelho de Moraes (EAN) (EAN 30483), respectivamente, localizados na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), e identificada pela Professora Dra. Maria de Fátima Agra. O acesso ao patrimônio genético registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob os códigos A2B19D6 E AD609FD. O material fresco coletado foi seco em estufa (cerca de 40 °C) por 10 dias e triturado, para obtenção do pó.

Reagentes e padrões

A água ultrapura utilizada foi obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore®) e os solventes orgânicos, Metanol (MeOH), Hexano (n-Hex), n-Butanol (n-BuOH), Clorofórmio (CHCl₃) e Acetato de Etila (EtOAc) grau CLAE foram adquiridos da Biograde® (Bio Scie Indústria e Comércio LTDA), Acetonitrila (ACN) da Supelco® e ácido fórmico grau CLAE da J.T. Baker® (Avantor®) ou grau CLAE-EM da Sigma-Aldrich®. Hidróxido de amônio da ACS (Tedia Company, INC) e ácido acético glacial diluído (P.A. ACS, 99,7%, Quimex, F. Maia Indústria e Comércio LTDA). Os solventes deuterados, Metanol-d₄ (CD₃OD 99%D) e H₂O-d₂ (D₂O) também foram comprados da Sigma-Aldrich®. E o padrão solasodina cedido pelo Professor Dr. José Maria Barbosa Filho do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Preparo de amostras para as análises químicas

Devido ao grande número de amostras e replicatas biológicas, foram realizadas microextrações, para evitar uma etapa de secagem das amostras e consequente chances de contaminação por manipulação. Desta forma, cerca de 20 mg de amostras foram extraídos com 80% de MeOH (1.6 mL) e sonicado em banho de ultrassônico (por 15 min. à temperatura ambiente, 25 °C). A mistura extraída foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 min. a 25 °C e este procedimento foi repetido por 2 vezes. Posteriormente, 1000 µl do sobrenadante foi alíquotado e filtrado em *vials* (2000 µl) com filtro de seringa (Membrana de Nylon, 0.22 µm - tamanho do poro, 22mm – diâmetro) para assim ser analisado por CLAE-EM.

Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

As análises foram realizadas em um Sistema de Cromatografia Líquida de Ultra desempenho (Nexera X3, Shimadzu® Kyoto, Japão), acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo-tempo de voo (LCMS-9050 Shimadzu®, Kyoto, Japão), com uma fonte de íons de eletrospray (ESI). O Sistema CLAE consistia em uma unidade de bomba de solvente LC-40D, um degaseificador online DGU-405 e um controlador de sistema CBM-40. As injeções foram realizadas usando um amostrador automático (SIL-40C). A separação por CLAE foi realizada em uma coluna analítica Kromasil C-18 5 mm 100Å,

250 x 4,6 μm (Kromasil, Bohus, Suécia). A fase móvel da CLAE consistia em acetonitrila (Solvente B) e água acidificada com ácido fórmico 0.1% (Solvente A) (v/v) com fluxo de 0.6 mL.min⁻¹ em gradiente linear exploratório (5-100% B) em 105 min. Os parâmetros de análise foram fixados em energia do capilar de -3.0 kV, temperatura do gás de dessolvatação à 300 °C e fluxo de 10.0 L.min⁻¹ e gás nebulizador N₂, com vazão de 3,0 L.min⁻¹. Os espectros de massa foram adquiridos no q-TOF no modo positivo de ionização em uma faixa de 100 a 1200 Da, com CE (energia de colisão) fixa em 60 e a voltagem da interface 3.5 Kv.

Processamento de dados EM/EM para as análises estatísticas

Os dados adquiridos foram convertidos para arquivos mzXML usando o software MSConvert (ProteoWizard, disponível em <https://proteowizard.sourceforge.io/>). Os arquivos foram abertos, visualizados e analisados utilizando o software MS-DIAL, e o processamento dos dados foi realizado no software estatístico R por meio do pacote *xcms*, e utilizando a interface de funcionalidades do software RStudio. Para garantir a reprodutibilidade dos resultados obtidos na análise, disponibilizamos um script contendo todas as etapas do processamento e a menção aos demais pacotes utilizados na análise dos dados.

Tabela 8. Lista de espécies analisadas por CLAE-EM para a obtenção do perfil químico (*chemical profile*) de espécimes de herbário de *Solanum* subg. *Leptostemonum*.

Código	Espécie	Clado	Coletor/nº de coleta	Local	Ano da coleta
*SAB01	<i>Solanum absconditum</i> Agra	Erythrotrichum	M. F. Agra et al. 7021	Brasil, Pernambuco, Araripina	25/05/1995
*SAB02	<i>Solanum absconditum</i> Agra	Erythrotrichum	A. E. da Silva 2088	Brasil, Maranhão, Grajaú	19/04/1976
*SAB03	<i>Solanum absconditum</i> Agra	Erythrotrichum	J. S. Sobrinho 632	Brasil, Ceará, Santana do Cariri	3/12/1965
*SHE01	<i>Solanum hexandrum</i> Vell.	Erythrotrichum	M. F. Agra, L. Bohs, L. Giacomini 7359	Brasil, São Paulo, Próximo a Serra da Bocaina	02/05/2011
*SHE02	<i>Solanum hexandrum</i> Vell.	Erythrotrichum	M. F. Agra et al. 7227	Brasil, Bahia Camacan	09/12/2009
*SHE03	<i>Solanum hexandrum</i> Vell.	Erythrotrichum	M. F. Agra, L. Bohs e L. Giacomini 7355	Brasil, São Paulo, Parque Nacional Serra da Bocaina	02/05/2011
*SRF01	<i>Solanum reflexiflorum</i> Moric. ex Dunal	Erythrotrichum	Carvalho e Gatti 751	Brasil, Bahia, Camamu	23/07/1981
*SRF02	<i>Solanum reflexiflorum</i> Moric. ex Dunal	Erythrotrichum	Sobral e Mattos Silva 5840	Brasil, Bahia, Itiruçu	01/1988
*SRF03	<i>Solanum reflexiflorum</i> Moric. ex Dunal	Erythrotrichum	J.G. Jardim et al. 5086	Brasil, Bahia, Wenceslau Guimarães	04/05/2007
SPA01	<i>Solanum paludosum</i> Moric.	Erythrotrichum	I.J.L.D. Basílio et al. 6734	Brasil, Bahia, Santa Rita	11/11/2005
SPA02	<i>Solanum paludosum</i> Moric.	Erythrotrichum	N.M. Porto et al. 29	Brasil, Pará, Melgaço	02/10/2012
SPA03	<i>Solanum paludosum</i> Moric.	Erythrotrichum	M.F. Agra 4147	Brasil, Paraíba, João Pessoa	20/09/1997
*SMG01	<i>Solanum megalonyx</i> Sendtn.	Erythrotrichum	R.P. Oliveira 386	Brasil, Bahia, Maracás, Fazenda Nova Esperança	27/02/2000

*SMG02	<i>Solanum megalonyx</i> Sendtn.	Erythrotrichum	M. F. Agra et al. 5487	Brasil, Bahia, Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina	1-7/12/2022
*SMG03	<i>Solanum megalonyx</i> Sendtn.	Erythrotrichum	E. Miranda-Silva, K. Leite e B.M. Silva	Brasil, Bahia, Gentio do Ouro	25/09/1999
*SJA01	<i>Solanum jabrense</i> Agra e M. Nee	Erythrotrichum	M. F. Agra, Cabral e Pontes 4916	Brasil, Paraíba, Maturéia, Pico do Jabre	21/01/1998
*SJA02	<i>Solanum jabrense</i> Agra e M. Nee	Erythrotrichum	M. F. Agra 5359	Brasil, Ceará, Serra de Baturité	08/08/1997
*SJA03	<i>Solanum jabrense</i> Agra e M. Nee	Erythrotrichum	M. F. Agra, Cabral e Pontes 4743	Brasil, Paraíba, Maturéia, Pico do Jabre	18/01/1998
*SRH01	<i>Solanum rhytidoandrum</i> Sendtn.	Erythrotrichum	M. F. Agra, K. Nurit, I.J.L.D Basílio 6493	Brasil, Paraíba, Marés	09/11/2005
*SRH02	<i>Solanum rhytidoandrum</i> Sendtn.	Erythrotrichum	M. F. Agra, K. Nurit e G. Goés 6001	Brasil, Paraíba, Areia, Mata-do-Pau-Ferro	17/06/2006
*SRH03	<i>Solanum rhytidoandrum</i> Sendtn.	Erythrotrichum	M.F. Agra et al. 6290	Brasil, Alagoas, Estação Ecológica de Murici	16/03/2001
SRB1	<i>Solanum robustum</i> H. Wendl.	Erythrotrichum	Agra et al. 5342	Brasil, Minas Gerais, Ouro Preto, Serra de Ouro Preto	13/08/1988
SRB2	<i>Solanum robustum</i> H. Wendl.	Erythrotrichum	J.R. Pirani et al. 966	São Paulo, Ribeira	06/09/1984
SRB3	<i>Solanum robustum</i> H. Wendl.	Erythrotrichum	M.F. Agra et al. 5329	Brasil, Bahia, Itacaré	09/08/1998
*SDE01	<i>Solanum decompositiflorum</i> Sendtn.	Erythrotrichum	M.F. Agra e Okano 5338	Brasil, Minas Gerais, Viçosa	11/08/1998
*SDE 02	<i>Solanum decompositiflorum</i> Sendtn.	Erythrotrichum	M.C. Tschä 836	Brasil, Minas Gerais, Bonito	30/06/1996
*SDE 03	<i>Solanum decompositiflorum</i> Sendtn.	Erythrotrichum	R.M. Harley et al. 27258	Brasil, Bahia, Rio de Contas	16/12/1998

*SDC01	<i>Solanum decorum</i> Sendtn.	Erythrotrichum	J.R. Pirani et al.11544	Brasil, Minas Gerais, Grão-Mogol	05/11/1998
*SBU01	<i>Solanum buddleiifolium</i> Sendtn.	Thomasiifolium	L. P. Felix 11.714	Brasil, Bahia, Morro do Chapéu	27/03/2007
*SBU02	<i>Solanum buddleiifolium</i> Sendtn.	Thomasiifolium	L. P. Felix 14.544	Brasil, Bahia, Ibicoara	24/01/2014
*SBU03	<i>Solanum buddleiifolium</i> Sendtn.	Thomasiifolium	L. P. Felix et al. 18.169	Brasil, Bahia, Estrada para Irecê	12/04/2019
*STH01	<i>Solanum thomasiifolium</i> Sendtn.	Thomasiifolium	R.M. Harley et al.	Brasil, Bahia, Piatã	14/11/1987
*STH02	<i>Solanum thomasiifolium</i> Sendtn.	Thomasiifolium	J. Hebert 023711	Brasil, Bahia, Camaçari	15/08/1992
*STH03	<i>Solanum thomasiifolium</i> Sendtn.	Thomasiifolium	Agra et al. 4003	Brasil, Bahia, Valença-Guaibim	29/04/1997
*SPB01	<i>Solanum paraibanum</i> Agra	Thomasiifolium	M.F. Agra et al. 7008	Brasil, João Pessoa, Paraíba	11/08/2008
*SPB02	<i>Solanum paraibanum</i> Agra	Thomasiifolium	M.F. Agra e K. Nurit 6757	Brasil, Paraíba, João Pessoa	20/10/2006
*SPB03	<i>Solanum paraibanum</i> Agra	Thomasiifolium	M.F. Agra 5551	Brasil, Paraíba, João Pessoa	-
*SRU01	<i>Solanum rupicola</i> Sendtn.	Thomasiifolium	M.F. Agra, D. Cardoso, B.M. Silva, L. Bohs 7186	Brasil, Bahia, Amargosa, Serra do Timbó	02/12/2009
*SRU02	<i>Solanum rupicola</i> Sendtn.	Thomasiifolium	A.M. Amorim, S.C. Santana, J.G. Jardim et al. 1088	Brasil, Bahia, Uma, Reserva Biológica do Mico Leão	08-12/03/1993
*SRU03	<i>Solanum rupicola</i> Sendtn.	Thomasiifolium	Carvalho e G. Hromley 280	Brasil, Bahia, Buerarema	21/07/1980
STO01	<i>Solanum torvum</i> Sw.	Torva	M.F. Agra 1247	Brasil, Br entre Paraíba-Recife	06/12/1989
STO02	<i>Solanum torvum</i> Sw.	Torva	M. F. Agra 6758	Brasil, Paraíba, João Pessoa	2006
STO03	<i>Solanum torvum</i> Sw.	Torva	M.F. Agra 1295	Brasil, Paraíba, João Pessoa	29/11/1990

SPN01	<i>Solanum paniculatum</i> L.	Torva	M.F. Agra, S.A.S. Silva, R.A. Pontes 6153	Brasil, Paraíba, Araruna, Pedra da Boca	29-31/08/2003
SPN02	<i>Solanum paniculatum</i> L.	Torva	M.F. Agra, D.A. Barbosa, N. Porto 6817	Brasil, Paraíba, Monteiro	13-15/03/2007
SPN03	<i>Solanum paniculatum</i> L.	Torva	L. P. Felix et al. 19571	Brasil, Pernambuco, Buíque, Parna Catimbaú	05/11/2022
*SAG01	<i>Solanum agrarium</i> Sendtn.	Gardneri	M.F. Agra et al. 6249	Brasil, Paraíba, Araruna, Pedra da Boca	04/2003
*SGA01	<i>Solanum gardneri</i> Sendtn.	Gardneri	E.M. Almeida et al. 1917		14/12/2016
*SGA02	<i>Solanum gardneri</i> Sendtn.	Gardneri	M.F. Agra, B.M. Silva, Bohs L. 7165	Brasil, Bahia, Itatim, Pedra Grande	03/12/2009
*SGA03	<i>Solanum gardneri</i> Sendtn.	Gardneri	M.F. Agra e Belo 778	Brasil, Paraíba, Parnamirim	01/05/1990
SCR01	<i>Solanum crinitum</i> Lam	Androceras/ Crinitum	L. P. Felix 13.173	Brasil, Paraíba, Goiana, BR- 101	27/07/2010
SCR02	<i>Solanum crinitum</i> Lam	Androceras/ Crinitum	L. P. Felix 4.887	Brasil, Bahia, Morro do Chapéu	17/04/1992
SCR03	<i>Solanum crinitum</i> Lam	Androceras/ Crinitum	A.Fernandes e Matos	Brasil, Ceará, Chapada da Ibipaba	29/10/1992
*SJU01	<i>Solanum jussiaei</i> Dunal	não amostrada	Logren 15411		17/10/91
*SJU02	<i>Solanum jussiaei</i> Dunal	não amostrada	V. F. Mansano et al. 07.530	Brasil, Espírito Santo, Santa Leopoldina	-
*SJU03	<i>Solanum jussiaei</i> Dunal	não amostrada	A.L. Silva et al. 001	Brasil, Paraíba, Areia	-
*SCH01	<i>Solanum schizandrum</i> Sendtn.	não amostrada	J.M.A. Braga et al. 2782	Brasil, Rio de Janeiro, Itatiaia	25/08/1995

*SCH02	<i>Solanum schizandrum</i> Sendtn	não amostrada	H.O. Boudet e W. Boone 2102054	Brasil, São Paulo, Santa Branca	17/10/1901
*SCH03	<i>Solanum schizandrum</i> Sendtn	não amostrada	W.W. Thomas et al. 370527	Brasil, Bahia, Município de Amaldina	-
*SEC01	<i>Solanum echidnaeforme</i> Dunal	não amostrada	E.M.A. Almeida et al. 1270	Brasil, Minas Gerais, Caparaó	05/11/2015
*SEC02	<i>Solanum echidnaeforme</i> Dunal	não amostrada	J.P.P. Carauta 2780	Brasil, Rio de Janeiro, Santa Maria Madalena	24/11/1997
*SEC03	<i>Solanum echidnaeforme</i> Dunal	não amostrada	M. Kuhlmann 2687	Brasil, Rio de Janeiro, Angra dos Reis	-
*SDI01	<i>Solanum diamantinense</i> Agra	não amostrada	E. Melo et al. 3145	Brasil, Bahia, Morro do Chapéu	17/11/1999
*SVE01	<i>Solanum velleum</i> Thunb.	não amostrada	J.R. Stehmann e L.L. Giacomini, 6584	Brasil, Minas Gerais, Brumadinho	04/01/2023
*SCO01	<i>Solanum cordifolium</i> Dunal	não amostrada	M.F. Agra 5349	Brasil, Espírito Santo, Vila Velha	18/08/1998
*SCO02	<i>Solanum cordifolium</i> Dunal	não amostrada	M.F. Agra 5349	Brasil, Espírito Santo, Vila Vitória	18/08/1998

*espécies endêmicas

Resultados e Discussão

Setenta e dois espécimes de 26 espécies, das quais 21 são endêmicas do Brasil, pertencentes a seis clados diferentes (segundo as classificações de Stern et al. 2011 e Hilgenhof et al., 2023) foram analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) (Figura 51). Esses clados estão intimamente relacionados e não são nem morfologicamente nem filogeneticamente bem definidos, sendo necessário estudos que possam auxiliar na compreensão dessas relações (Stern et al. 2011). Trabalhos com enfoque nos metabólitos especializados de plantas podem auxiliar nesse entendimento a partir da identificação, caracterização, agrupamento e diferenciação das espécies baseadas em suas micromoléculas em combinação com outras abordagens –ômicas, bioquímicas e ecológicas (Barney et al., 2021).

Nossos dados adquiridos em espectrômetro de massas do tipo ESI-QTOF foram processados no software estatístico R por meio do pacote XCMS, utilizando a interface de funcionalidades do software RStudio. O R é uma linguagem de programação e um ambiente de software livre amplamente utilizado para análises estatísticas, visualização de dados e aprendizagem de máquina, e pode ser obtido gratuitamente através do seguinte endereço eletrônico: <https://cran.r-project.org>. O R conta com uma extensa comunidade de usuários e desenvolvedores e suas principais vantagens incluem a flexibilidade para manipulação e modelagem de dados, a disponibilidade de milhares de pacotes especializados e a integração com diversas ferramentas de visualização gráfica. Já o RStudio é um ambiente de desenvolvimento integrado (IDE - Integrated Development Environment) para a linguagem R, projetado para facilitar a programação, análise de dados e visualização gráfica, e também pode ser obtido gratuitamente através do endereço eletrônico: <https://posit.co/download/rstudio-desktop/>.

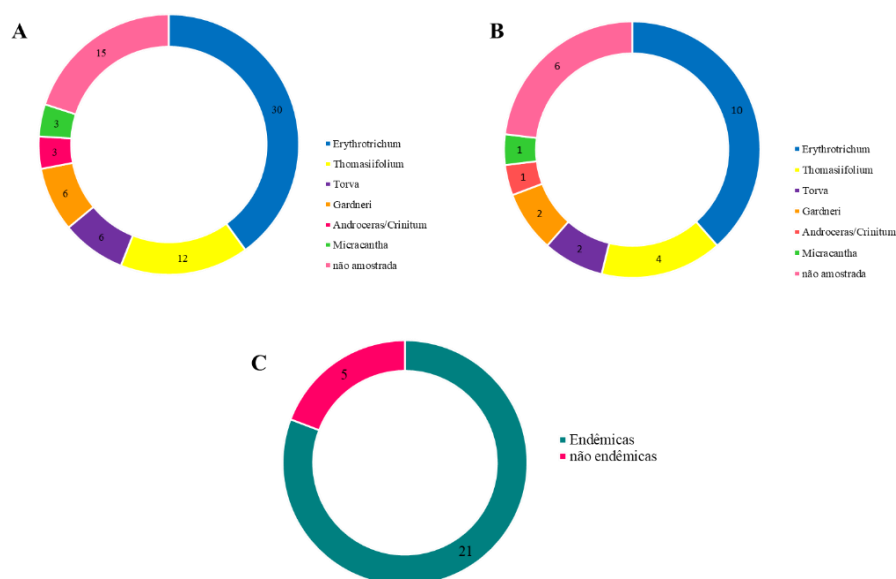


Figura 52. Amostras analisadas discriminadas por grupo. **A.** n° de espécimes analisados. **B.** n° espécies analisadas. **C.** endemismo das espécies analisadas.

Para garantir a reprodutibilidade dos resultados obtidos na análise, disponibilizamos um script contendo todas as etapas do processamento e menção aos demais pacotes utilizados na análise dos dados (Material Suplementar).

Inicialmente os dados obtidos no formato .lcd foram convertidos para arquivos mzXML, em seguida todos os arquivos de dados foram habilitados para uso do pacote *xcms*. Esses dados também foram abertos e analisados no software MS-DIAL para definição de parâmetros, quando necessários, para as etapas seguintes de processamento.

Uma análise exploratória foi realizada com os dados de cada grupos de espécies para avaliação da variação de intensidades entre as réplicas, observando que para alguns grupos houve uma grande variação, sugerindo a necessidade posterior de normalização dos dados, permitindo uma comparação mais precisa entre as amostras (Figura 53).

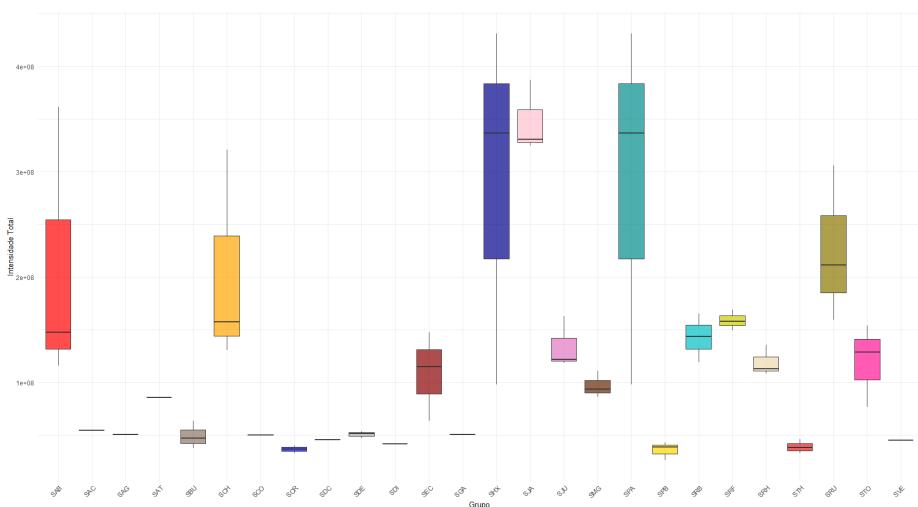


Figura 53. Distribuição das intensidades das amostras analisadas discriminadas por grupo.

Na sequência, foram plotados empilhados os cromatogramas de pico base (BPCs) das amostras dentro de um intervalo de tempo de 0- 3600 segundos. Os intervalos de tempos de retenção (t.r.) de 500-1000, 1000-1500, 1500-2000, 2000-2500, 2500-3000, 3000-3500 segundos foram definidos e plotados para avaliação da necessidade de alinhamento e posterior correção do tempo de retenção entre as réplicas e as amostras (Figura 54).

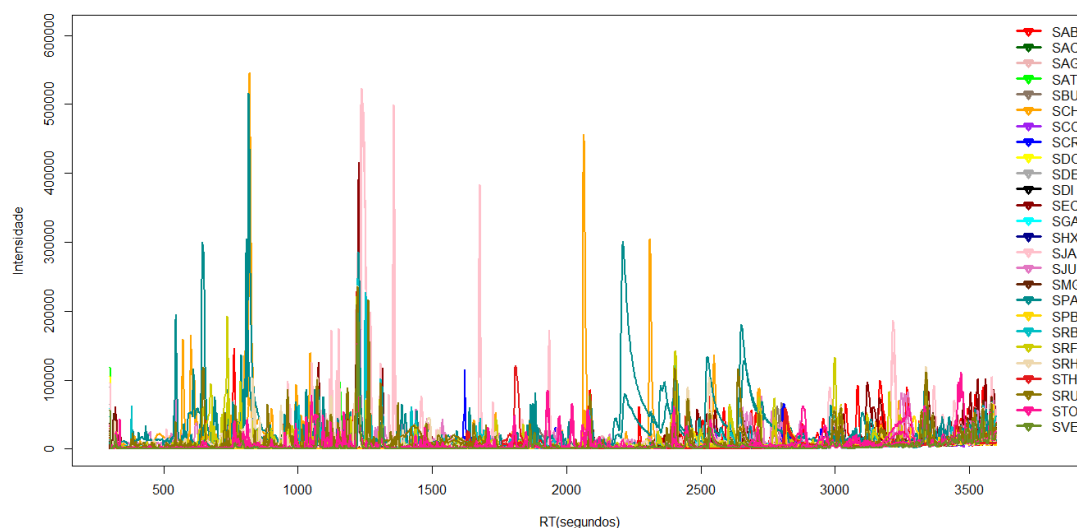


Figura 54. Cromatogramas de pico base (BPCs) dos espécimes analisados discriminados por cores.

A inspeção visual dos dados nos intervalos de tempos definidos para avaliação dos cromatogramas em tempos de retenção iniciais, médios e finais demonstrou a necessidade de alinhamento e correção do tempo de retenção para os dados. Os parâmetros utilizados amplitude do pico (*peak width*), tolerância de m/z (em ppm), diferença mínima entre as relações m/z (*mz diff*) e relação sinal ruído (*noise*) foram definidos com base nessa inspeção. Esses parâmetros também foram utilizados para a extração dos *features* (*peak picking*).

Todos intervalos foram plotados antes e pós alinhamento e correção do tempo de retenção, além disso, também foram plotados alguns EICs (cromatogramas de íons extraídos) para observação desses processos (Figuras 55, 56 e 57).

Após a extração, alinhamento e correção do tempo de retenção foi realizado o *fill peaks* para preenchimento de valores ausentes na matriz de picos cromatográficos detectados (*features*). Finalmente, a matriz gerada foi utilizada para análise de componente principal (PCA) e análise de agrupamentos (HCA- *hierarchical clustering analysis*).

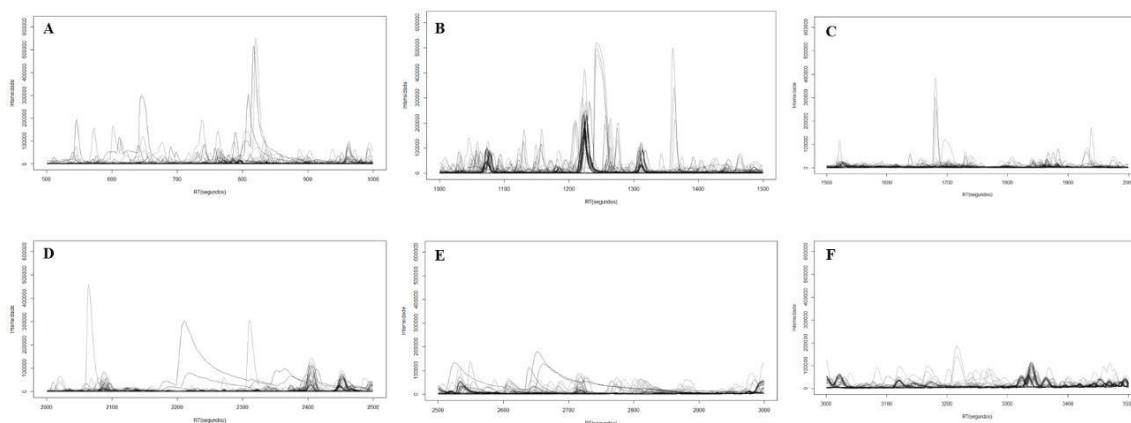


Figura 55. Inspeção visual de diferentes intervalos de tempos de retenção antes do alinhamento. **A.** 500-s. **B.** 1000-1500 s. **C.** 1500-2000 s. **D.** 2000-2500 s. **E.** 2500-3000 s. **F.** 3000-3500 s.

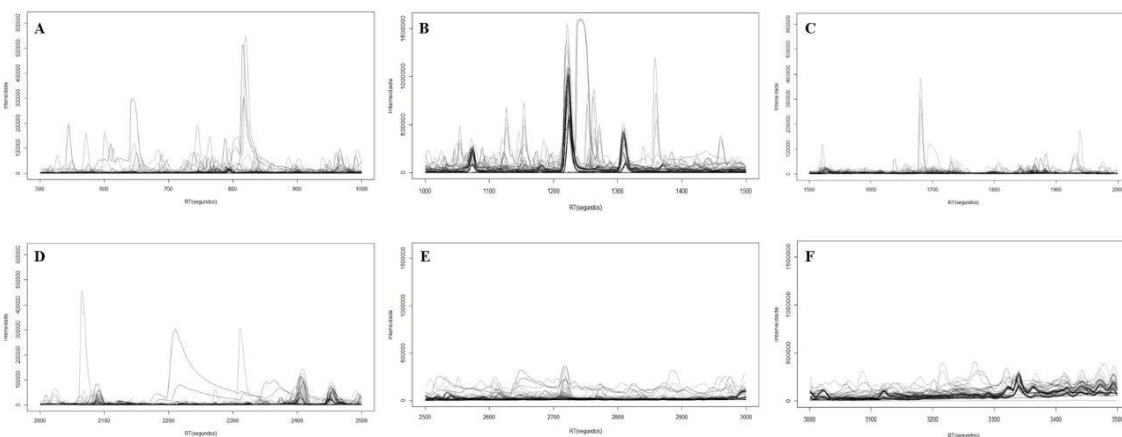


Figura 56. Inspeção visual de diferentes intervalos de tempos de retenção depois do alinhamento. A. 500-1000. B. 1000-1500. C. 1500-2000. D. 2000-2500. E. 2500-3000. F. 3000-3500.

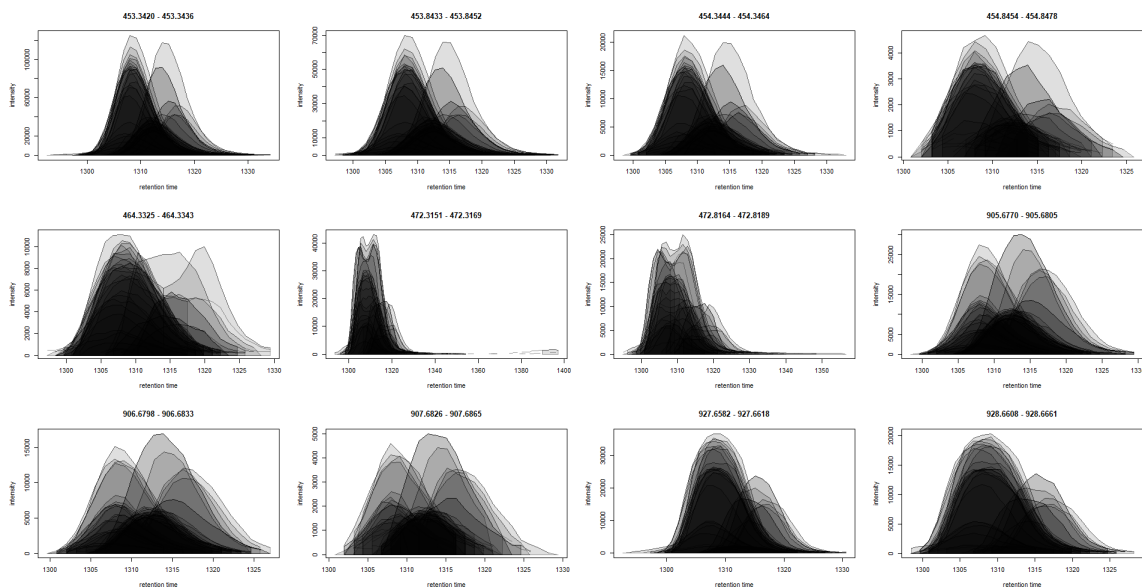


Figura 57. Cromatogramas do íon extraído (EICs) no intervalo de tempos de retenção de 1290-1330 segundos pós alinhamento.

As análises de PCA e HCA obtida para as 26 espécies (72 espécimes) demonstrou a similaridade do perfil químico e complexidade na diferenciação dessas espécies,

inclusive com relação ao uso dos metabólitos secundários. O método considerado para essas análises foi baseado na distância euclidiana e foi capaz de explicar a em 65% dimensionalidade dos dados nas duas primeiras componentes (PC1 e PC2) (Figura 58 e 59).

Essa ferramenta embora não tenha sido tão significativamente distintiva para as espécies de clados diferentes dentro de *Lepetostemonum*, ela foi capaz de agrupar espécimes diferentes de mesma espécie, e separar espécies morfológicamente semelhantes (Figuras 60 e 61).

Ainda assim, quando comparada a classificações filogenéticas e morfológicas existentes, como Stern et al., 2011 e Hilgenhof et al., 2023, os agrupamentos são em partes similares aos encontrados para clados *Erythrotrichum* como o agrupamento das espécies *S. jabrense*, *S. paludosum*, *S. megalonyx*, *S. hexandrum*, *S. decompositiflorum*, *S. decorum*, *S. reflexiflorum*, *S. rhytidoandrum*, *S. robustum*. E *Thomasiifolium* como *S. rupicola* e *S. thomasiifolium*.

Algumas espécies posicionadas pela filogenia no clado *Thomasiifolium*, como *S. paraibanum* e *S. gardneri* foram classificadas dentro do grupo de *Erythrotrichum* demonstrando que estes grupos assim como na filogenia e morfologia estão intimamente relacionados e suas relações são complexas de definir até mesmo pelo enfoque químico.

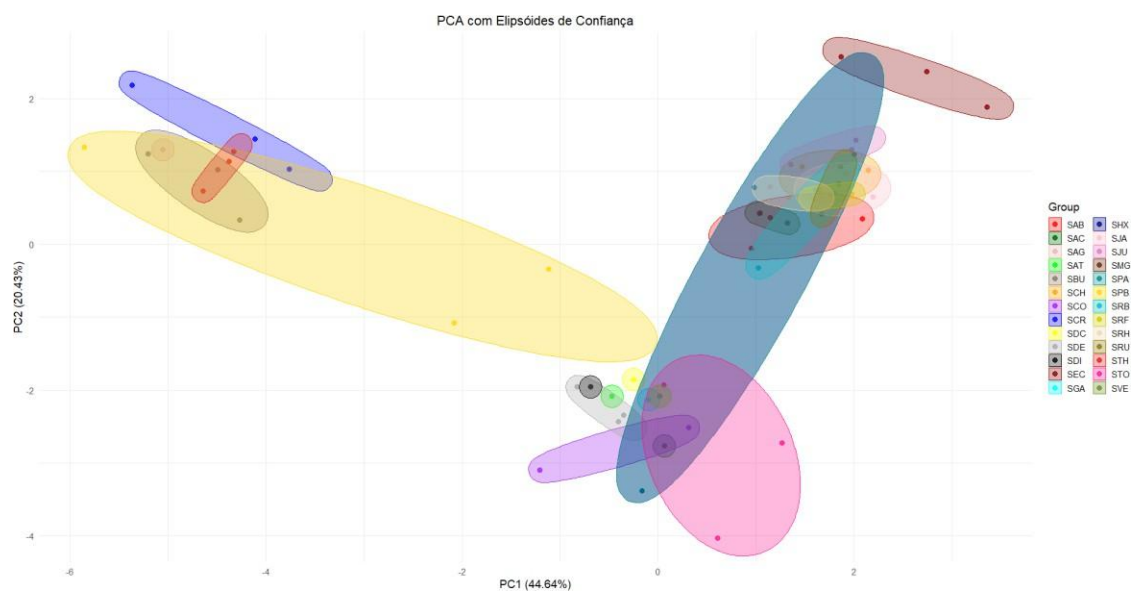


Figura 58. Análise de componente principal (PCA) das amostras e suas réplicas analisadas.

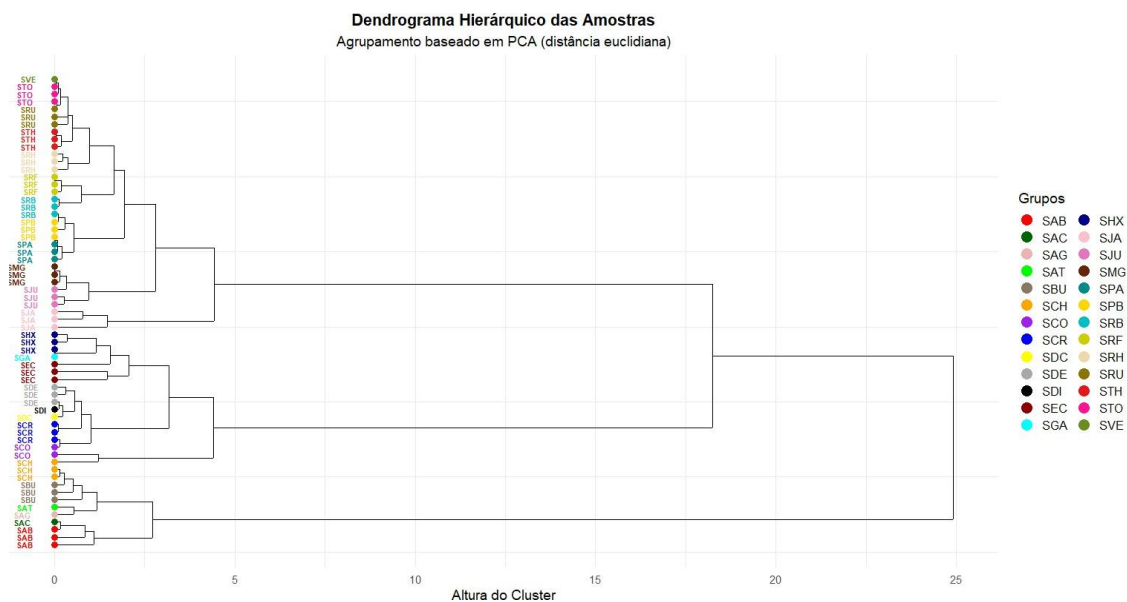


Figura 59. Análise hierárquica (HCA) das amostras e suas réplicas analisadas.

Espécies morfológicamente próximas com número de replicatas analisadas igual a três como *S. cordifolium*, *S. jabrense* e *S. megalonyx* foram plotadas para avaliar a eficiência dessa ferramenta para diferenciação entre espécies (Figura 60). Foi possível observar que ela se mostrou útil e que pode sim ser utilizada para auxiliar separação de espécies similares. O mesmo foi observado para e *S. hexandrum* e *S. echidnaeforme* que são espécies endêmicas, morfológicamente similares e têm sido sinonimizadas em herbários Brasileiros (Figura 60).

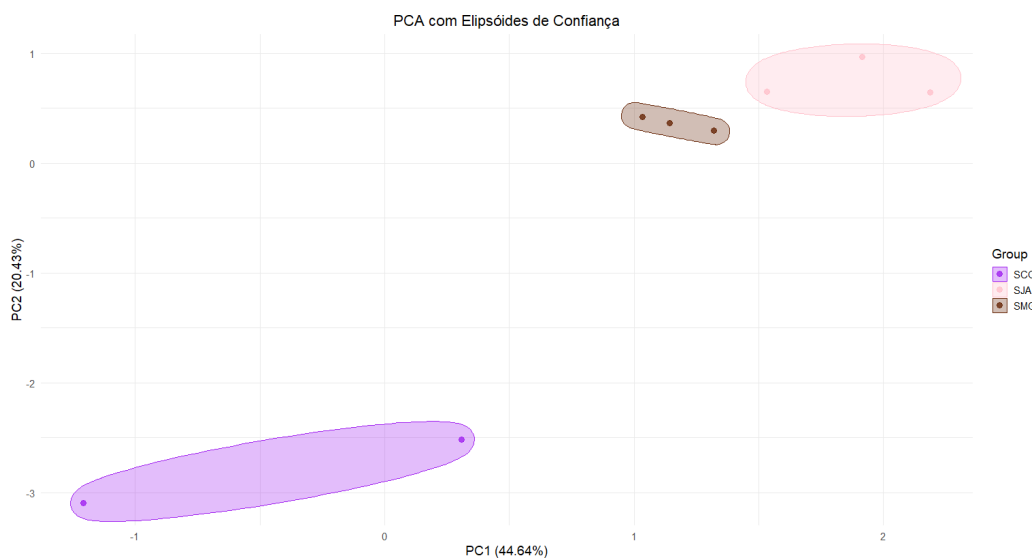


Figura 60. Análise de componente principal (PCA) das amostras *S. jabrense*, *S. megalonyx* e *S. cordifolium* e suas réplicas analisadas.

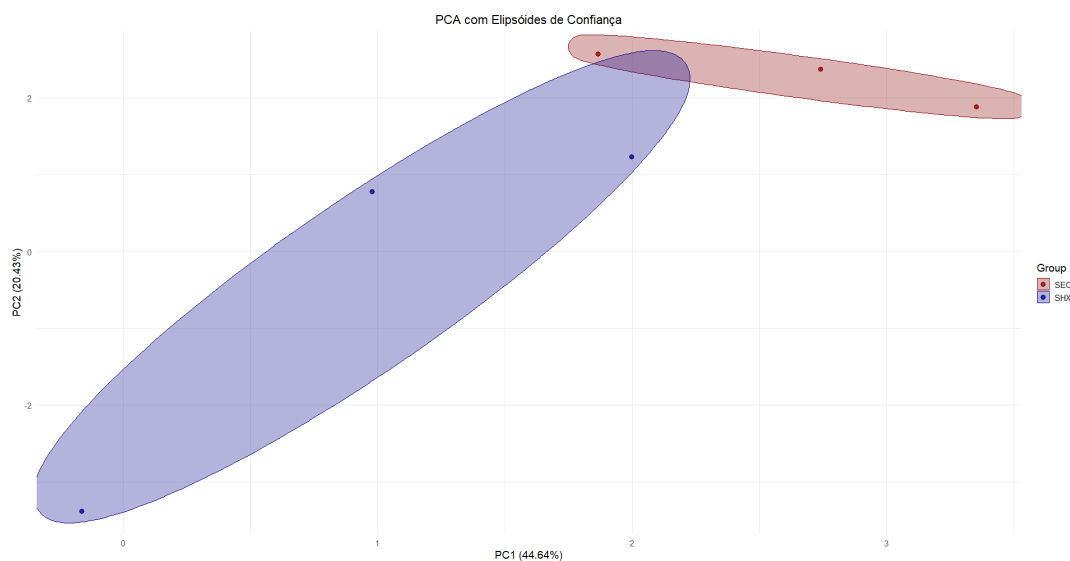


Figura 61. Análise de componente Principal (PCA) das amostras *S. hexandrum* e *S. megalonyx* e suas réplicas analisadas.

Conclusões

Um estudo piloto com análises do perfil químico (*chemical profile*) e espectrometria de massas (CLAE-EM) de 72 espécimes de herbário de *Solanum* subgênero *Leptostemonum*, verificando que esta abordagem juntamente com métodos estatísticos usando o RStudio e o pacote *xcms* podem ser úteis para a separação de espécies do subgênero. A maior parte das espécies estudadas são endêmicas e nunca foram estudadas do ponto de vista químico. Embora estudos com maior número de amostras e replicatas se faz necessário para entendimento e melhoramento desses resultados, os dados apresentados mostram que essas ferramentas podem considerados e relevantes para apoiar estudos quimiossistemáticos. Além disso, foi produzido um script produzido como modelo e disponibilizado, podendo este ser adaptado e aplicado a diversas análises de *metabolite fingerprint* e *chemical profile* de outras espécies, grupos e tipos de amostras.

Referências

- Anderson, G. J. (1979). Dioecious *Solanum* species of hermaphroditic origin is an example of a broad convergence. *Nature*, 282(5741), 836-838. <https://doi.org/10.1038/282836a0>
- Angiosperm Phylogeny Group, Chase, M. W., Christenhusz, M. J., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., Mabberley, D. J., Sennikov, A.N., Soltis, P.S., & Stevens, P. F. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical journal of the Linnean Society*, 181(1), 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Barny, L. A., Tasca, J. A., Sanchez, H. A., Smith, C. R., Koptur, S., Livshultz, T., & Minbiole, K. P. (2021). Chemotaxonomic investigation of Apocynaceae for retronecine-type pyrrolizidine alkaloids using HPLC-MS/MS. *Phytochemistry*, 185, 112662. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112662>
- Basílio, I. J. L., Moura, R. K., Bhattacharyya, J., & de Fátima Agra, M. (2012). Application of UV/VIS spectrophotometry and multivariate analysis to characterization of the species of *Solanum* sect. *Erythrotrichum* Child. *Chemistry & Biodiversity*, 9(6), 1114-1124. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100302>
- Frodin, D. G. (2004). History and concepts of big plant genera. *Taxon*, 53(3), 753-776. <https://doi.org/10.2307/4135449>
- Hilgenhof, R., Gagnon, E., Knapp, S., Aubriot, X., Tepe, E. J., Bohs, L., [Giacomin](#), L. L., [Gouvêa](#), Y.F., [Martine](#), C. T., [Orejuela](#) A., [Orozco](#), C. I., [Peralta](#), I. E., & Särkinen, T. (2023). Morphological trait evolution in *Solanum* (Solanaceae): Evolutionary lability of key taxonomic characters. *Taxon*, 72(4), 811-847. <https://doi.org/10.1002/tax.12990>
- Kaunda, J. S., & Zhang, Y. J. (2019). The genus *solanum*: an ethnopharmacological, phytochemical and biological properties review. *Natural products and bioprospecting*, 9(2), 77-137. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0201-6>
- Knapp, S., Aubriot, X., Prohens, J., & Chapman, M. A. (2019). The Eggplant Genome.
- Ramos, A. C., & de Oliveira, R. R. (2017). A new alkaloid and flavonoids isolated from *Solanum cernuum* leaves by high-performance countercurrent chromatography. *Natural product research*, 31(20), 2405-2412. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1311889>
- Ramos, C. C., Sousa, A. L., de Almeida, C. M., & Oliveira, R. R. (2019). Análise quimiosistemática dos alcaloides esteroidais do gênero *Solanum*. *Revista Virtual de Química*, 11(5). [10.21577/1984-6835.20190102](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190102)
- Resende, J. V. M., de Sá, N. M., de Oliveira, M. T. L., Lopes, R. C., Garrett, R., & Borges, R. M. (2020). Chemical profiling of herbarium samples of *solanum* (Solanaceae) using mass spectrometry. *Phytochemistry Letters*, 36, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.01.021>

Silva, A. L., Brito, T. A. M., Agra, M. D. F., Silva, M. S., & Tavares, J. F. Molecular networks as strategy for dereplication of steroidal alkaloids of herbarium samples of *Solanum jabrense* Agra and M. Nee, an endemic and unexplored species. *Chemistry & Biodiversity*, e202402513. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202402513>

Steinharter, T. P., Cooper-Driver, G. A., & Anderson, G. J. (1986). The phylogenetic relationship of *Solanum* flavonols. *Biochemical systematics and ecology*, 14(3), 299-305.

Stern, S., Agra, M. D. F., & Bohs, L. (2011). Molecular delimitation of clades within New World species of the "spiny solanums" (*Solanum* subg. *Leptostemonum*). *Taxon*, 60(5), 1429-1441. <https://doi.org/10.1002/tax.605018>

Whalen, M. D. (1978). Foliar flavonoids of *Solanum* section *Androceras*: a systematic survey. *Systematic Botany*, 257-276. <https://doi.org/10.2307/2418297>

MATERIAL SUPLEMENTAR

Espectrometria de massas (ESI-QTOF-MS) e Métodos Estatísticos usando o RStudio e o pacote *xcms* aplicados a Quimiossistemática de *Solanum* subg. *Leptostemonum*

Anauara Lima e Silva^a, Thiago Araujo de Medeiros Brito^a, Hemílio Fernandes Campos Coêlho^c, Maria de Fátima Agra^b, Marcelo Sobral da Silva^a, Josean Fachine Tavares^{a*}

^a Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^b Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^c Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

* Autor para correspondência: josean@lft.ufpb.br

Explicação Linha por Linha do Script em R para Análise de Cromatografia com XCMS

1. Instalação e Carregamento dos Pacotes

```
# Verifica se o pacote 'BiocManager' está instalado e, caso contrário, instala-o
if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE)) {
  install.packages("BiocManager")
}

# Instala os pacotes necessários para análise cromatográfica
```

```
BiocManager::install("xcms")
```

```
BiocManager::install("msdata")
```

```
BiocManager::install("CAMERA")
```

Esses pacotes são utilizados para a manipulação e análise de dados de espectrometria de massas.

Carregando os pacotes para análise de cromatografia

```
library(xcms)      # Processamento e análise cromatográfica
```

```
library(RColorBrewer) # Gera paletas de cores para visualização gráfica
```

```
library(pander)     # Formata saídas de dados
```

```
library(magrittr)    # Operador %>% para pipeline
```

```
library(ggforce)     # Funções adicionais para visualização
```

Os pacotes abaixo são utilizados para criação de visualizações e dendrogramas:

```
library(ggplot2)     # Visualização de dados
```

```
library(dplyr)       # Manipulação de dados
```

```
library(ggdendro)    # Gera dendrogramas a partir de clusters
```

```
library(ggtree)      # Representação de árvores filogenéticas
```

```
library(ggrepel)     # Evita sobreposição de rótulos nos gráficos
```

```
library(ggnewscale)  # Permite uso de múltiplas escalas de cores no ggplot
```

```
library(ape)         # Análise de filogenia
```

2. Configuração do Diretório e Carregamento de Arquivos

Define o diretório de trabalho onde estão armazenados os arquivos de análise:

```
setwd("C:\\Users\\Elucir Gir\\Desktop\\EXEMPLO AMOR\\ANALISES")
```

Lista os arquivos com extensão .mzML dentro do diretório:

```
mzML <- list.files(pattern=".mzML", recursive=TRUE, all.files=TRUE)
```

Cria um data.frame com os nomes das amostras e seus respectivos grupos:

```
pd <- data.frame(
```

```
  sample_name = sub(basename(mzML), pattern = ".mzML", replacement = "", fixed = FALSE),
```

```
sample_group = c(rep("SAB",3), rep("SAC",1), rep("SAG",1), ...),
stringsAsFactors = FALSE
)
```

Os arquivos são carregados como um objeto `xcmsRaw`, pronto para processamento:

```
raw_data <- readMSData(files = mzML, pdata = new("NAnnotatedDataFrame", pd),
mode = "onDisk")
```

3. Visualização dos Dados

Define as cores para cada grupo de amostras:

```
group_colors <- c("SAB" = "red", "SAC" = "darkgreen", "SAG" = "#EEB4B4", ...)
```

Cria um boxplot para visualizar a distribuição das intensidades:

```
ggplot(tc_summary, aes(x = factor(Group, levels = names(group_colors)), y = TIC, fill
= Group)) +
  geom_boxplot(outlier.shape = NA, alpha = 0.7) +
  scale_fill_manual(values = group_colors) +
  theme_minimal() +
  labs(title = "Distribuição das Intensidades por Grupo", x = "Grupo", y = "Intensidade
Total") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1))
```

4. Extração e Processamento de Picos

Gera cromatogramas baseados no tempo de retenção:

```
bpis <- chromatogram(raw_data, aggregationFun = "max", rt = c(0,3600))
```

Define os parâmetros para detecção de picos cromatográficos:

```
cwp <- CentWaveParam(peakwidth = c(3, 100), ppm = 25, mzdiff = 0.002, prefilter =
c(2, 500), noise = 1000, snthresh = 3, fitgauss = TRUE, integrate = 2)
```

```
data <- findChromPeaks(raw_data, param = cwp)
```

Agrupa os picos detectados:

```
pdp <- PeakDensityParam(sampleGroups = rep(1, length(fileNames(raw_data))),
minSamples = max(1, floor(length(fileNames(raw_data)) * 0.3)), bw = 40, binSize =
0.01)
```

```
group1 <- groupChromPeaks(data, param = pdp)
```

5. Correção do Tempo de Retenção

Corrige o tempo de retenção para melhor alinhamento das amostras:

```
adjRT <- PeakGroupsParam(minFraction = 0.5, family = "symmetric", smooth =  
"loess")
```

```
retcor <- adjustRtime(group1, param = adjRT)
```

6. Análise de Componentes Principais (PCA)

Executa a análise PCA para visualizar a variação dos dados:

```
ft_ints <- log2(featureValues(fillpeaks, value = "into"))
```

```
pc <- prcomp(t(na.omit(ft_ints)), center = TRUE, scale. = TRUE)
```

Gera visualizações do PCA com elipses representando os grupos:

```
ggplot(pca_plot_data, aes(x = PC1, y = PC2, color = Group)) +  
geom_point(size = 3, alpha = 0.8) +  
  stat_ellipse(aes(fill = Group), type = "t", geom = "polygon", alpha = 0.3, level = 0.95)  
+  
  scale_color_manual(values = group_colors) +  
  theme_minimal()
```

7. Construção de Dendrograma

Gera um dendrograma baseado em distâncias euclidianas:

```
dist_matrix <- dist(pca_matrix, method = "euclidean")
```

```
hc <- hclust(dist_matrix, method = "ward.D2")
```

```
dendro_data <- dendro_data(hc)
```

8. Exportação dos Resultados

Os resultados são salvos para uso posterior:

```
write.table(dataTable, "tabela_analise.txt", sep = "\t", quote = FALSE, row.names =  
FALSE)
```

```
exportMetaboAnalyst(fillpeaks, file = "resultado.csv", value = "into")
```

Este documento agora fornece uma explicação detalhada para cada linha do script, garantindo total compreensão do fluxo de trabalho.

SCRIPT COMPLETO:

```
#if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE)) {  
#install.packages("BiocManager")  
#}  
#BiocManager::install("xcms")  
#BiocManager::install("msdata")  
#BiocManager::install("CAMERA")  
  
#Carregando pacotes  
library(xcms)  
library(RColorBrewer)  
library(pander)  
library(magrittr)  
library(ggforce)  
  
#Gráficos  
library(ggplot2)  
library(dplyr)  
  
#####PARA GERAR DENDROGRAMAS  
library(ggdendro)  
library(ggtree)  
library(ggrepel) #Para evitar sobreposição dos rótulos  
library(ggnewscale) # Novo pacote para múltiplas escalas de cor  
library(ape)  
  
#Habilitando o diretório aonde estão as pastas com os  
#grupos da análise  
setwd("C:\\Users\\Elucir Gir\\Desktop\\EXEMPLO AMOR\\ANALISES")  
  
#HABILITANDO OS ARQUIVOS PARA USO DO PACOTE xcms  
#Ou seja, para o pacote xcms funcionar  
  
mzML<-list.files(pattern=".mzML",recursive="TRUE", all.files = "TRUE")
```

```

pd<-data.frame(sample_name = sub(basename(mzML),
  pattern = ".mzML",
  replacement = "",
  fixed = F),
  sample_group = c(rep("SAB",3),
    rep("SAC",1),
    rep("SAG",1),
    rep("SAT",1),
    rep("SBU",3),
    rep("SCH",3),
    rep("SCO",2),
    rep("SCR",3),
    rep("SDC",1),
    rep("SDI",1),
    rep("SDE",3),
    rep("SEC",3),
    rep("SGA",1),
    rep("SHX",3),
    rep("SJA",3),
    rep("SJU",3),
    rep("SMG",3),
    rep("SPA",3),
    rep("SPB",3),
    rep("SRB",3),
    rep("SRF",3),
    rep("SRH",3),
    rep("STH",3),
    rep("SRU",3),
    rep("STO",3),
    rep("SVE",1)),
  stringsAsFactors = FALSE)

```

#Transformar dados num objeto apropriado para
#o processamento de dados

```

raw_data<-readMSData(files = mzML,
  pdata = new("NAnnotatedDataFrame",pd),
  mode = "onDisk")

```

```

#Boxplots
## Get the total ion current by file
#tc <- split(tic(raw_data), f = fromFile(raw_data))

group_colors <- c("SAB" = "red",
                  "SAC" = "darkgreen",
                  "SAG" = "#EEB4B4",
                  "SAT" = "green",
                  "SBU" = "#8B7765",
                  "SCH" = "orange",
                  "SCO" = "purple",
                  "SCR" = "blue",
                  "SDC" = "yellow",
                  "SDE" = "darkgray",
                  "SDI" = "black",
                  "SEC" = "darkred",
                  "SGA" = "cyan",
                  "SHX" = "darkblue",
                  "SJA" = "pink",
                  "SJU" = "#E377C2",
                  "SMG" = "#662506",
                  "SPA" = "darkcyan",
                  "SPB" = "#FFD700",
                  "SRB" = "#00BFC4",
                  "SRF" = "yellow3",
                  "SRH" = "wheat2",
                  "STH" = "#E31A1C",
                  "SRU" = "#8B7500",
                  "STO" = "deeppink",
                  "SVE" = "olivedrab"
)

# Obter a lista de amostras únicas
samples <- unique(fromFile(raw_data))

# Criar um dataframe associando corretamente amostras, TIC e grupo
tc_summary <- data.frame(
  Sample = pd$sample_name, # Pegamos diretamente da tabela de metadados
  TIC = sapply(samples, function(i) sum(tic(raw_data)[fromFile(raw_data) == i], na.rm
= TRUE)), # Soma TIC por amostra

```

```

Group = pd$sample_group # Associando ao grupo correto
)

#Criar o boxplot por grupo
ggplot(tc_summary, aes(x = factor(Group, levels = names(group_colors)), y = TIC, fill
= Group)) +
  geom_boxplot(outlier.shape = NA, alpha = 0.7) +
  scale_fill_manual(values = group_colors) +
  theme_minimal() +
  labs(title = "Distribuição das Intensidades por Grupo",
       x = "Grupo",
       y = "Intensidade Total") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1))

#Extração de picos
#Plotar um base peak (Cromatograma)

#Biblioteca para permitir processamento
#com melhor alocação de memória
library(BiocParallel)
register(SerialParam())

bpis <- chromatogram(raw_data,
                     aggregationFun = "max",
                     rt = c(0,3600))

#Plotagem dos BPC

#Função para não termos números apresentados com notação científica
options(scipen=99)

#Plotar os cromatogramas
plot(bpis,
     col = group_colors[raw_data$sample_group],
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",
     lwd = 2,xlim=c(300,3800),
     ylim=c(0,620000))

```

```

#Legenda
legend("topright",
      names(group_colors),
      col = group_colors,
      pch = 25,
      bty = "n",
      lwd = 3,
      cex = 1,
      xpd = TRUE)

#Visualizar
#View(pd)

#Plotar um Extracted Ion Chromatogram
rtr1<-c(500,1000) #Tempo de retenção (em segundos no xcms)
rtr2<-c(1000,1500) #Tempo de retenção (em segundos no xcms)
rtr3<-c(1500,2000) #Tempo de retenção (em segundos no xcms)
rtr4<-c(2000,2500) #Tempo de retenção (em segundos no xcms)
rtr5<-c(2500,3000) #Tempo de retenção (em segundos no xcms)
rtr6<-c(3000,3500) #Tempo de retenção (em segundos no xcms)
mzr<-c(50,1200) #Range de massa

chr_raw1<-chromatogram(raw_data,
                        aggregationFun = "max",
                        mz = mzr,
                        rt = rtr1,
                        missing = 0)
plot(chr_raw1,
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",
     ylim=c(0,620000))

chr_raw2<-chromatogram(raw_data,
                        aggregationFun = "max",
                        mz = mzr,
                        rt = c(1660,1690),
                        missing = 0)

```

```

plot(chr_raw2,
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",
     ylim=c(0,620000))

chr_raw3<-chromatogram(raw_data,
                        aggregationFun = "max",
                        mz = mzs,
                        rt = rtr3,
                        missing = 0)

plot(chr_raw3,
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",
     ylim=c(0,620000))

chr_raw4<-chromatogram(raw_data,
                        aggregationFun = "max",
                        mz = mzs,
                        rt = rtr4,
                        missing = 0)

plot(chr_raw4,
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",
     ylim=c(0,620000))

chr_raw5<-chromatogram(raw_data,
                        aggregationFun = "max",
                        mz = mzs,
                        rt = rtr5,
                        missing = 0)

plot(chr_raw5,

```

```

    main = "",
    xlab = "RT(segundos)",
    ylab = "Intensidade",
    ylim=c(0,620000))

chr_raw6<-chromatogram(raw_data,
                        aggregationFun = "max",
                        mz = mzs,
                        rt = rtr6,
                        missing = 0)

plot(chr_raw6,
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",
     ylim=c(0,620000))

#Plotar análises de cada amostra

raw_data %>%
  filterRt(rt = rtr6) %>%
  filterMz(mz = mzs) %>%
  plot(type = "XIC")

#Filtragem e identificação de picos
# Parâmetros ajustados para detectar picos com intervalos maiores

cwp <- CentWaveParam(
  peakwidth = c(3, 100), # Detecta picos de 3 a 100 segundos
  ppm = 25,             # Aumenta a tolerância de variação de m/z para 20 ppm
  mzdif = 0.002,        # Permite sobreposição de picos
  prefilter = c(2, 500), # Exige no mínimo 2 picos consecutivos com intensidade ≥ 500
  noise = 1000,         # Reduz o limite mínimo de intensidade do pico
  snthresh = 3,         # Permite detectar picos com relação sinal/ruído mínima de 3
  fitgauss = TRUE,      # Ajuste Gaussiano para melhorar a detecção de picos
  integrate = 2         # Melhor método de cálculo de área do pico

```

)

Re-executar a detecção de picos

```
data <- findChromPeaks(raw_data, param = cwp)
```

```
pdp<-PeakDensityParam(
```

```
  sampleGroups = rep(1, length(fileNames(raw_data))),
```

```
  minSamples = max(1, floor(length(fileNames(raw_data)) * 0.3)), # Permitir grupos  
menores
```

```
  bw = 40,      # Largura de banda maior para RT
```

```
  binSize = 0.01 # Aumentar o tamanho da faixa de m/z
```

```
)
```

Re-executar o agrupamento

```
group1 <- groupChromPeaks(data, param = pdp)
```

```
SampleGroups <- sampleNames(raw_data)
```

```
SampleGroups <- as.factor(pData(raw_data)$sample_group)
```

```
sampleGroups <- as.factor(pData(raw_data)$sample_group)
```

```
peak_count <- length(featureDefinitions(group1))
```

```
print(peak_count)
```

#Número de picos

```
n_groups <- length(chromPeaks(group1))
```

```
print(paste("Número de picos detectados:", n_groups))
```

#Correção do tempo de retenção

#Picos bem comportados para corrigir o tempo de retenção

#Primeiro método: Não linear. Ou seja, cada região de RT corrige

#de maneira diferente

```
adjRT<-PeakGroupsParam(minFraction = 0.5,
```

```
  family = "symmetric",
```

```
  smooth = "loess")
```

#Método que permite a remoção de outliers

```

#(Observações atípicas que atrapalham a análise e o ajuste de
#métodos)

```

```

retcor<-adjustRtime(group1,
                    param = adjRT)

```

```

#Gráficos após alinhamento

```

```

#2

```

```

chr_retcor1<-chromatogram(retcor,
                          aggregationFun = "max",
                          mz = mzs,
                          rt = rtr1,
                          missing = 0)

```

```

options(scipen=99)

```

```

plot(chr_retcor1,
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",
     ylim=c(0,620000))

```

```

chr_retcor2<-chromatogram(retcor,

```

```

                          aggregationFun = "max",
                          mz = mzs,
                          rt = rtr2,
                          missing = 0)

```

```

plot(chr_retcor2,
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",
     ylim=c(0,620000))

```

```

chr_retcor3<-chromatogram(retcor,
                          aggregationFun = "max",
                          mz = mzs,
                          rt = rtr3,
                          missing = 0)

```

```

plot(chr_retcor3,
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",

```

```

ylim=c(0,620000))

chr_retcor4<-chromatogram(retcor,
                           aggregationFun = "max",
                           mz = mzt,
                           rt = rtr4,
                           missing = 0)
plot(chr_retcor4,
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",
     ylim=c(0,620000))

```

```

chr_retcor5<-chromatogram(retcor,
                           aggregationFun = "max",
                           mz = mzt,
                           rt = rtr5,
                           missing = 0)
plot(chr_retcor5,
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",
     ylim=c(0,620000))

```

```

chr_retcor6<-chromatogram(retcor,
                           aggregationFun = "max",
                           mz = mzt,
                           rt = rtr6,
                           missing = 0)
plot(chr_retcor6,
     main = "",
     xlab = "RT(segundos)",
     ylab = "Intensidade",
     ylim=c(0,620000))

```

```

#Fillpeaks - Ajuste dos picos - Preenchimento de Missing Value
#Integração de picos na região do molecular feature
fillpeaks<-fillChromPeaks(group1)

```

```

#Gerar e salvar tabela de dados processados
featuresDef<-featureDefinitions(fillpeaks)
featuresIntensities<-featureValues(fillpeaks,
                                   value="into")
#Se quiser usar intensidade do pixo ao invés da área, utilizar
#value = max

dataTable<-merge(featuresDef,
                 featuresIntensities,
                 by=0,
                 all=TRUE)

dataTable<-dataTable[,!(names(dataTable) %in% c("peakidx"))]

#Salvar dados
write.table(dataTable,
            "tabela_analise_anauara_semSDE_STO_13022025.txt",
            sep = "\t",
            quote = FALSE,
            row.names = FALSE)

#Gerar e salvar tabela de dados processados para o MetaboAnalyst
exportMetaboAnalyst(fillpeaks,
                    file = "teste_semSDE_STO_13022025.csv",
                    label = c(rep("SAB",3),
                              rep("SAC",1),
                              rep("SAG",1),
                              rep("SAT",1),
                              rep("SBU",3),
                              rep("SCH",3),
                              rep("SCO",2),
                              rep("SCR",3),
                              rep("SDC",1),
                              rep("SDI",1),
                              rep("SDE",3),
                              rep("SEC",3),
                              rep("SGA",1),
                              rep("SHX",3),
                              rep("SJA",3),
                              rep("SJU",3),

```

```

        rep("SMG",3),
        rep("SPA",3),
        rep("SPB",3),
        rep("SRB",3),
        rep("SRF",3),
        rep("SRH",3),
        rep("STH",3),
        rep("SRU",3),
        rep("STO",3),
        rep("SVE",1)),
value = "into",
digits = NULL,
groupnames = FALSE)

```

#Verificação de Grupos de picos

```

filtered_features1 <- rownames(featureDefinitions(fillpeaks))[
featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed >= 620 & featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed <=
670
]

```

```

filtered_features2 <- rownames(featureDefinitions(fillpeaks))[
featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed >= 800 & featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed <=
850
]

```

```

filtered_features3 <- rownames(featureDefinitions(fillpeaks))[
featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed >= 1060 & featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed <=
1090
]

```

```

filtered_features4 <- rownames(featureDefinitions(fillpeaks))[
featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed >= 1200 & featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed <=
1250
]

```

```

filtered_features5 <- rownames(featureDefinitions(fillpeaks))[
featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed >= 1290 & featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed <=
1330
]

```

```

filtered_features6 <- rownames(featureDefinitions(fillpeaks))[
featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed >= 1340 & featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed <=
1380
]

```

```

filtered_features7 <- rownames(featureDefinitions(fillpeaks))[
featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed >= 1670 & featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed <=
1690
]

```

```

filtered_features8 <- rownames(featureDefinitions(fillpeaks))[
featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed >= 2380 & featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed <=
2430
]

```

```

filtered_features9 <- rownames(featureDefinitions(fillpeaks))[
featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed >= 3300 & featureDefinitions(fillpeaks)$rtmed <=
3380
]

```

#Visualização - Processamento de dados

```

feature_chroms1<-featureChromatograms(fillpeaks,features = filtered_features1)
feature_chroms2<-featureChromatograms(fillpeaks,features = filtered_features2)
feature_chroms3<-featureChromatograms(fillpeaks,features = filtered_features3)
feature_chroms4<-featureChromatograms(fillpeaks,features = filtered_features4)
feature_chroms5<-featureChromatograms(fillpeaks,features = filtered_features5)
feature_chroms6<-featureChromatograms(fillpeaks,features = filtered_features6)
feature_chroms7<-featureChromatograms(fillpeaks,features = filtered_features7)
feature_chroms8<-featureChromatograms(fillpeaks,features = filtered_features8)
feature_chroms9<-featureChromatograms(fillpeaks,features = filtered_features9)

```

```

par(mar = c(3, 3, 2, 1))
plot(feature_chroms1)
plot(feature_chroms2)
plot(feature_chroms3)
plot(feature_chroms4)
plot(feature_chroms5)
plot(feature_chroms6)
plot(feature_chroms7)
plot(feature_chroms8)

```

```

plot(feature_chroms9)

feature_chroms<-featureChromatograms(group1,
                                     features = 101:115)
plot(feature_chroms)

# --- Análise de Componentes Principais (PCA) --- #

plotChromPeakImage(fillpeaks)

## Extract the features and log2 transform them
ft_ints <- log2(featureValues(fillpeaks, value = "into"))
## Perform the PCA omitting all features with an NA in any of the
## samples. Also, the intensities are mean centered.
pc <- prcomp(t(na.omit(ft_ints)), center = TRUE)
## Plot the PCA
cols <- group_colors[fillpeaks$sample_group]
pcSummary <- summary(pc)
plot(pc$x[, 1], pc$x[,2], pch = 21, main = "",
     xlab = paste0("PC1: ", format(pcSummary$importance[2, 1] * 100,
                                   digits = 3), " % variance"),
     ylab = paste0("PC2: ", format(pcSummary$importance[2, 2] * 100,
                                   digits = 3), " % variance"),
     col = "darkgrey", bg = cols, cex = 2)
grid()

text(pc$x[, 1], pc$x[,2], labels = fillpeaks$sample_name, col = "darkgrey",
     pos = 4, cex = 1)

# Ajustar PCA
# Extrair e transformar intensidades
ft_ints <- log2(featureValues(fillpeaks, value = "into"))

# Remover amostras ou features com valores ausentes
ft_ints <- na.omit(ft_ints)

# Criar um data frame para o PCA
pca_data <- t(ft_ints) # Transpor para que as colunas sejam as features

```

```

# Ajustar PCA
pc <- prcomp(pca_data, center = TRUE, scale. = TRUE)

# Resumo do PCA
pc_summary <- summary(pc)

# Criar data frame para plotagem
pca_plot_data <- as.data.frame(pc$x[, 1:2]) # Usar PC1 e PC2
colnames(pca_plot_data) <- c("PC1", "PC2") # Renomear colunas

#Adicionar informações do agrupamento
pca_plot_data$Group <- fillpeaks$sample_group
pca_plot_data$Sample <- fillpeaks$sample_name

#library(ggplot2)
print(dim(pca_data)) # Verifique o número de linhas (amostras) e colunas
(componentes)

# Verificar correspondência entre amostras e agrupamentos
print(unique(pca_plot_data$Group)) # Deve mostrar os grupos definidos em
`fillpeaks$sample_group`
print(table(pca_plot_data$Group))

# Filtrar grupos com pelo menos 1 amostras
valid_groups <- names(table(pca_plot_data$Group)[table(pca_plot_data$Group) >= 1])
pca_plot_data <- pca_plot_data %>% filter(Group %in% valid_groups)

# Verifique se há NAs nos dados transpostos
print(any(is.na(pca_data)))

# Confirme se todas as amostras estão incluídas
print(rownames(pca_data))
print(pca_plot_data$Sample)

# Filtrar grupos com pelo menos 3 amostras
#valid_groups <- names(table(pca_plot_data$Group)[table(pca_plot_data$Group) >=

```

```

1))
#pca_plot_data <- pca_plot_data %>% filter(Group %in% valid_groups)

# Garantir que grupos com poucos pontos sejam exibidos com elipses
# Usando "t" para elipses baseadas em distribuição t
pca_ellipse_plot <- ggplot(pca_plot_data, aes(x = PC1, y = PC2, color = Group)) +
  geom_point(size = 3, alpha = 0.8) + # Pontos das amostras
  stat_ellipse(
    aes(fill = Group),
    type = "t", # Tipo "norm" é mais robusto para poucos pontos
    geom = "polygon",
    alpha = 0.3,
    level = 0.95, # Intervalo de confiança de 95%
    na.rm = TRUE
  ) +
  scale_color_manual(values = group_colors) +
  scale_fill_manual(values = group_colors) +
  labs(
    title = "PCA com Elipsóides de Confiança",
    x = paste0("PC1 (", round(pc_summary$Importance[2, 1] * 100, 2), "%)"),
    y = paste0("PC2 (", round(pc_summary$Importance[2, 2] * 100, 2), "%)"),
  ) +
  theme_minimal(base_size = 14) +
  theme(
    legend.position = "right",
    plot.title = element_text(hjust = 0.5)
  )

# Exibir o gráfico
print(pca_ellipse_plot)

```

#####OUTRA FORMA

```

pca_ellipse_plot
<- ggplot(pca_plot_data, aes(x = PC1, y = PC2, color = Group)) +
  geom_point(size = 3, alpha = 0.8) + # Pontos das amostras
  geom_mark_ellipse(
    aes(fill = Group),
    alpha = 0.3
  ) +
  scale_color_manual(values = group_colors) +

```

```

scale_fill_manual(values = group_colors) +
labs(
  title = "PCA com Elipsóides de Confiança",
  x = paste0("PC1 (", round(pc_summary$importance[2, 1] * 100, 2), "%)"),
  y = paste0("PC2 (", round(pc_summary$importance[2, 2] * 100, 2), "%)"),
) +
theme_minimal(base_size = 14) +
theme(
  legend.position = "right",
  plot.title = element_text(hjust = 0.5)
)

# Exibir o gráfico
print(pca_ellipse_plot)

#####

#####MAIS OUTRA FORMA

# Contar o número de pontos por grupo
group_counts <- pca_plot_data %>%
group_by(Group) %>%
summarise(count = n())

# Verificar a contagem antes de continuar
print(group_counts)

# Criar o gráfico de PCA
pca_ellipse_plot <- ggplot(pca_plot_data, aes(x = PC1, y = PC2, color = Group)) +
  geom_point(size = 3, alpha = 0.8) + # Adicionar pontos

# Adicionar convex hull para todos os grupos
geom_polygon(
  data = pca_plot_data %>%
    group_by(Group) %>%
    slice(chull(PC1, PC2)),
  aes(fill = Group, group = Group),
  alpha = 0.3,
  linetype = "dashed"
)

```

```

) +

scale_color_manual(values = group_colors) +
scale_fill_manual(values = group_colors) +

labs(
  title = "PCA com Contornos (Convex Hull)",
  x = paste0("PC1 (", round(pc_summary$importance[2, 1] * 100, 2), "%)"),
  y = paste0("PC2 (", round(pc_summary$importance[2, 2] * 100, 2), "%)"),
) +

theme_minimal(base_size = 14) +
theme(
  legend.position = "right",
  plot.title = element_text(hjust = 0.5)
)

# Exibir o gráfico
print(pca_ellipse_plot)

#####

####DENDROGRAMA

# Criar matriz de distância e hierarquia de clusters
pca_matrix <- pca_plot_data %>%
  select(PC1, PC2) %>%
  as.matrix()

dist_matrix <- dist(pca_matrix, method = "euclidean")
hc <- hclust(dist_matrix, method = "ward.D2")

# Converter para formato dendrograma
dendro_data <- dendro_data(hc)

# Filtrar apenas os grupos presentes no dendrograma
unique_groups <- unique(pca_plot_data$Group) # ● Filtrar grupos existentes
filtered_colors <- group_colors[names(group_colors) %in% unique_groups] # ●
Ajustar cores para os grupos existentes

```

```

# Criar o dendrograma com nomes das amostras e grupos coloridos
ggplot() +
  # ● Ajuste do segmento para eixo horizontal
  geom_segment(data = dendro_data$segments,
    aes(x = y, y = x, xend = yend, yend = xend),
    color = "black") +

  # ● Ajustar a posição dos nomes dos grupos para evitar sobreposição
  geom_text(data = dendro_data$labels,
    aes(x = y, y = x, label = pca_plot_data$Group, color = pca_plot_data$Group),
    hjust = 4.5, nudge_x = 1, size = 3, fontface = "bold") +

  # ● Garantir que os pontos fiquem na mesma cor dos grupos
  geom_point(data = dendro_data$labels,
    aes(x = y, y = x, color = pca_plot_data$Group),
    size = 3) +

  # ● Escala de cores respeitando os grupos
  scale_color_manual(values = filtered_colors, name = "Grupos") +

  # ● Ajuste correto da legenda para mostrar apenas bolinhas coloridas
  guides(color = guide_legend(
    override.aes = list(size = 5, shape = 16, fill = filtered_colors, label = "")
  )) +

  labs(title = "Dendrograma Hierárquico das Amostras",
    subtitle = "Agrupamento baseado em PCA (distância euclidiana)",
    x = "Altura do Cluster", y = NULL) +

  theme_minimal(base_size = 14) +
  theme(legend.position = "right",
    legend.key = element_blank(),
    legend.text = element_text(size = 12),
    plot.title = element_text(hjust = 0.5, face = "bold"),
    plot.subtitle = element_text(hjust = 0.5),
    axis.text.y = element_blank(),
    axis.ticks.y = element_blank())

```

```
#####
#### DENDROGRAMA PARA "SJA", "SCO" e "SMG"

#Todos os grupos
selected_groups<-c("SAB","SAC","SAG","SAT","SBU","SCH",
                  "SCO","SCR","SDC","SDI","SDE","SEC",
                  "SGA","SHX","SJA","SJU","SMG","SPA",
                  "SPB","SRB","SRF","SRH","STH","SRU",
                  "STO","SVE")

# ● Filtrar apenas os grupos desejados
#selected_groups <- c("SJA", "SCO", "SMG","SHX", "SEC")
filtered_pca_data <- pca_plot_data %>% filter(Group %in% selected_groups)

# Criar matriz de distância e hierarquia de clusters com os grupos filtrados
pca_matrix <- filtered_pca_data %>%
  select(PC1, PC2) %>%
  as.matrix()

dist_matrix <- dist(pca_matrix, method = "euclidean")
hc <- hclust(dist_matrix, method = "ward.D2")

# Converter para formato dendrograma
dendro_data <- dendro_data(hc)

# ● Filtrar as cores para os grupos selecionados
filtered_colors <- group_colors[names(group_colors) %in% selected_groups]

# Criar o dendrograma com nomes das amostras e grupos coloridos
ggplot() +
  # ● Ajuste do segmento para eixo horizontal
  geom_segment(data = dendro_data$segments,
              aes(x = y, y = x, xend = yend, yend = xend),
              color = "black") +

  # ● Ajustar a posição dos nomes dos grupos para evitar sobreposição
  geom_text(data = dendro_data$labels,
            aes(x = y, y = x, label = filtered_pca_data$Group, color =
filtered_pca_data$Group),
            hjust = 5, nudge_x = 1, size = 4, fontface = "bold") +
```

```

# ● Garantir que os pontos fiquem na mesma cor dos grupos
geom_point(data = dendro_data$labels,
            aes(x = y, y = x, color = filtered_pca_data$Group),
            size = 3) +

# ● Escala de cores respeitando os grupos selecionados
scale_color_manual(values = filtered_colors, name = "Grupos") +

# ● Ajuste correto da legenda para **remover a letra "a"**
guides(color = guide_legend(
  override.aes = list(size = 5, shape = 16, label = rep("", length(filtered_colors)))
)) +

labs(title = "Dendrograma Hierárquico das Amostras",
      subtitle = "Agrupamento baseado em PCA (distância euclidiana)",
      x = "Altura do Cluster", y = NULL) +

theme_minimal(base_size = 14) +
theme(legend.position = "right",
      legend.key = element_blank(),
      legend.text = element_text(size = 12),
      plot.title = element_text(hjust = 0.5, face = "bold"),
      plot.subtitle = element_text(hjust = 0.5),
      axis.text.y = element_blank(),
      axis.ticks.y = element_blank())

#####
#PCA PARA OS GRUPOS DESEJADOS

# Contar o número de pontos por grupo
group_counts <- filtered_pca_data %>%
group_by(Group) %>%
summarise(count = n())

# Verificar a contagem antes de continuar
print(group_counts)

# Criar o gráfico de PCA
pca_ellipse_plot <- ggplot(filtered_pca_data, aes(x = PC1, y = PC2, color = Group)) +

```

```

geom_point(size = 3, alpha = 0.8) + # ● Adicionar pontos

# ● Adicionar convex hull para cada grupo
geom_polygon(
  data = filtered_pca_data %>%
    group_by(Group) %>%
    slice(chull(PC1, PC2)),
  aes(fill = Group, group = Group),
  alpha = 0.3,
  linetype = "dashed"
) +

# ● Garantir que as cores estão corretas
scale_color_manual(values = group_colors[names(group_colors) %in%
selected_groups]) +
scale_fill_manual(values = group_colors[names(group_colors) %in%
selected_groups]) +

# ● Ajustar os rótulos dos eixos
labs(
  title = "PCA com Contornos (Convex Hull)",
  x = paste0("PC1 (", round(pc_summary$importance[2, 1] * 100, 2), "%)"),
  y = paste0("PC2 (", round(pc_summary$importance[2, 2] * 100, 2), "%)")
) +

theme_minimal(base_size = 14) +
theme(
  legend.position = "right",
  plot.title = element_text(hjust = 0.5)
)

# ● Exibir o gráfico
print(pca_ellipse_plot)

#####
#ELIPSÓIDES PARA OS 5 GRUPOS

# Criar o gráfico de PCA com elipsóides de confiança
pca_ellipse_plot <- ggplot(filtered_pca_data, aes(x = PC1, y = PC2, color = Group)) +

```

```

geom_point(size = 3, alpha = 0.8) + # ● Adicionar pontos das amostras

# ● Adicionar elipsóides de confiança para cada grupo
geom_mark_ellipse(
  aes(fill = Group),
  alpha = 0.3
) +

# ● Garantir que as cores estão corretas
scale_color_manual(values = group_colors[names(group_colors) %in%
selected_groups]) +
scale_fill_manual(values = group_colors[names(group_colors) %in%
selected_groups]) +

# ● Ajustar os rótulos dos eixos
labs(
  title = "PCA com Elipsóides de Confiança",
  x = paste0("PC1 (", round(pc_summary$importance[2, 1] * 100, 2), "%)"),
  y = paste0("PC2 (", round(pc_summary$importance[2, 2] * 100, 2), "%)"),
) +

theme_minimal(base_size = 14) +
theme(
  legend.position = "right",
  plot.title = element_text(hjust = 0.5)
)

# ● Exibir o gráfico
print(pca_ellipse_plot)

#####

# Instalar pacotes necessários (caso não estejam instalados)
# install.packages("dendextend")
# install.packages("circlize")

# Carregar pacotes
library(dendextend)

```

```

library(circlize)

# Criar matriz de distância com os dados filtrados (já usados no PCA e dendrograma)
dist_matrix <- dist(pca_matrix, method = "euclidean")

# Criar dendrograma com clustering hierárquico
hc <- as.dendrogram(hclust(dist_matrix, method = "ward.D2"))

# Aplicar cores aos ramos do dendrograma, respeitando os grupos
hc <- hc %>%
  set("branches_k_color", k = length(selected_groups)) %>% # Define cores para k
  grupos
  set("branches_lwd", 3) %>% # ● Deixa as linhas mais grossas (ajuste o valor
  conforme necessário)
  set("labels", selected_groups) # Substituir rótulos pelos nomes dos grupos

# Criar o gráfico radial
circlize_dendrogram(hc,
  labels_track_height = NA, # Remove a trilha das labels
  dend_track_height
= 0.5) # Define a altura do dendrograma

```

Capítulo 3: “Combination of Molecular Network and Larvicidal Activity against *Aedes aegypti* for Discovery of Bioactive compounds from *Solanum jabrense* Agra & M. Nee” a ser submetido ao periódico *South African Journal of Botany*

Combinação de Rede Molecular, Atividade Larvícida contra *Aedes aegypti* para descoberta de substâncias bioativas de *Solanum jabrense* Agra e M. Nee

Anauara Lima e Silva ^A, Renan T. Leite ^C, Thiago Araújo de Medeiros Brito ^A, Jheison Marcos Claudino Francelino ^C, Fabíola da Cruz Nunes ^B, Maria de Fátima Agra ^B, Marcelo Sobral da Silva ^A, Josean Fechine Tavares ^{*A}

^A Programa de Pós-Graduação em Produtos Bioativos Naturais e Sintéticos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, Brasil; ^B Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, Brasil; ^C Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, Brasil.

Autor para correspondência: josean@lft.ufpb.br

Resumo

Aedes aegypti é o transmissor de arboviroses como a dengue, chikungunya, zika e febre amarela, e a prevenção depende do controle do vetor. Uma estratégia é o uso de larvicidas à base de produtos naturais, sem agredir o meio ambiente, o ser humano e os animais por resíduos tóxicos. *Solanum jabrense*, espécie endêmica do Brasil, ocorre na Caatinga e Mata Atlântica e possui seu potencial bioativo pouco explorado. Combinar a abordagem de rede molecular com ensaios larvicidas e repelente para a descoberta de potenciais substâncias bioativas do extrato bruto e da fração rica em alcaloides de *S. jabrense* no combate ao *A. aegypti* e suas arboviroses. Os ensaios demonstraram que concentrações maiores que 195 ppm da fração rica em alcaloides e 489 ppm do extrato bruto são capazes de causar 100% de mortalidade das larvas em 24 h, reduzindo o número total de células e os níveis de NO. A partir da rede molecular foram anotados glicosídeos esteroidais e derivados da aglicona solasodina, sugerindo que esses compostos podem estar envolvidos no efeito larvícida das amostras. O extrato bruto e a fração alcaloídica de *S. jabrense* podem ser considerados eficazes no controle contra os vetores responsáveis pela transmissão de arboviroses sendo estes produtos naturais, reduzindo o uso de substâncias químicas e sintéticas que causam resistência e agredem o meio ambiente e os seres humanos.

Palavras-chave: Solanaceae, doenças tropicais, molecular networking.

Introdução

A família botânica Solanaceae, inclui gêneros com grande interesse econômico como o gênero *Solanum L.*, é de grande interesse na pesquisa de metabólitos secundários devido às suas diversas propriedades bioativas (Kaunda et al., 2019). Cerca de 60-70% das espécies do grupo possuem alcaloides com atividade inseticida e esses metabólitos têm mostrado potencial significativo como pesticidas naturais, oferecendo uma alternativa sustentável aos inseticidas sintéticos (Bharathi et al. 2024).

Essas substâncias atuam através de mecanismos que incluem a interferência em processos celulares vitais dos organismos-alvo, como a inibição da acetilcolinesterase e a desrupção das membranas celulares do inseto que ocorrem devido à alta concentração, principalmente dos glicoalcaloides, substâncias formadas por uma aglicona derivada do colesterol e uma cadeia lateral glicosilada, normalmente ligada na posição C-3 da aglicona (Ahmed et al., 2024). Esses fitocompostos tem sido relatado como larvicidas, adulticidas e repelentes contra uma variedade de pragas de insetos, contra vetores de doenças humanas importantes (dengue, filária e malária) (Chidambaram et al., 2022).

O uso de extratos de *Solanum* como pesticidas tem sido avaliado em diversos estudos, demonstrando maior eficácia que compostos isolados contra insetos-praga e patógenos de plantas (Afroz et al., 2020, e Meyer et al., 2014. Além disso, o impacto ambiental reduzido e a menor resistência das pragas aos compostos naturais, em comparação com os pesticidas convencionais, reforçam a importância dessa abordagem (Ghosh et al. 2012; Isaman, 2000).

Solanum jabrense Agra e M. Nee uma endêmica brasileira que ocorre nos biomas da Caatinga e Mata Atlântica do Nordeste, demonstrou atividade molluscicidal (Silva et al., 2006) e espamolítica (Andrade et al., 2013) em estudos anteriores, entretanto, seu potencial inseticida e repelente e a compreensão de conteúdo químico ainda permanecem inexplorados. Estudos como este visam demonstrar a importância da rica biodiversidade e flora brasileira, além de estimular a preservação e aproveitamento sustentável de recursos naturais.

Neste trabalho, a atividade larvicida e repelente do extrato bruto e da fração rica em alcaloides de *S. jabrense* foram testadas, com objetivo de desenvolver uma alternativa larvicidas e ou repelente à base de produto natural. Além disso, foram geradas redes

moleculares utilizando dados de CLAE-EM para facilitar o conhecimento do conteúdo químico das amostras testadas.

Materiais e Métodos

Material Vegetal

Partes aéreas (folhas e galhos) de *S. jabrense* foram coletados na cidade de Maturéia, Paraíba, Brasil e uma exsicata depositada no Herbário Lauro Pires Xavier (JPB), JPB 42267, localizados na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) Campus I, e identificada pela Professora Dra. Maria de Fátima Agra. O acesso ao patrimônio genético registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o nº A2B19D6. O material fresco coletado foi seco em estufa (cerca de 45°C) por 10 dias e triturado, para obtenção do pó.

Extração e obtenção do extrato hidroalcólico bruto e da fração concentrada em alcaloides

Aproximadamente 500g do pó da planta seca foram extraídos com 80% de MeOH (8:2, MeOH:H₂O, v/v) em banho ultrassônico por 1 h à temperatura ambiente (~25°C). Esse procedimento de extração foi repetido por duas vezes. O sobrenadante, líquido extrativo (4 L), foi concentrado em evaporador rotativo sob vácuo (Rotavapor® R-100, Buchi) a cerca de 40°C, e assim obtido o extrato bruto seco (108 g).

Para obtenção do precipitado gelatinoso, fração concentrada em alcaloides, 30g do extrato bruto hidroalcólico foi solubilizado em água ultrapura e alcalinizado, com hidróxido de amônio (ACS, Tedia Company, INC) até atingir o pH 9, aproximadamente, medido com tiras universal de pH 0-14 (KASVI). Essa mistura foi submetida a refrigeração, onde permaneceu por 24 h. Após esse período, obtivemos um precipitado com aspecto gelatinoso que foi separado até completa separação por filtração sob vácuo. O precipitado foi ressuspenso em água, neutralizado com ácido acético glacial diluído

(P.A. ACS, 99,7%, Quimex, F. Maia Indústria e Comércio LTDA) e refrigerado por 24 h. Por fim, o conteúdo foi centrifugado.

Ensaio da atividade Larvica contra *Aedes aegypti*

A atividade larvica do extrato e da fração rica em alcaloide de *S. jabrense* foi avaliada de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (1970) (WHO- World Health Organization, 1970). As larvas de *A. aegypti* no terceiro estágio (L3) (Cepa Rockefeller, João Pessoa) foram obtidas do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba).

As amostras do ensaio foram diluídas em água desclorada, Tween 80 a 1% e Tween 20 também a 1%, em diferentes concentrações. Trinta larvas do terceiro estágio (L3) foram transferidas para tubos Falcon contendo as soluções de teste. O grupo controle negativo foi preparado com água desclorada, Tween 80 a 1% e Tween 20 também a 1%.

Para avaliação da atividade larvica foram utilizadas larvas de *A. aegypti* mantidas em câmaras climatizadas (BOD, Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 28°C com variação de $\pm 2^\circ\text{C}$, e umidade relativa de $75\% \pm 5\%$ e fotoperíodo 12 h claro, 12h escuro. Os ensaios foram realizados com 30 larvas em estágio L3 para cada tratamento, e utilizadas sete concentrações sendo uma concentração controle, para o extrato hidroalcólico bruto (0, 80, 100, 200, 400, 600, 800 ppm) e cinco concentrações para a fração rica em alcaloides com uma também sendo controle (0, 80, 100, 200, 400 ppm). Os ensaios foram realizados em triplicata e a mortalidade das larvas avaliadas após 24 h.

Avaliação da produção do óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada pelo reagente de Griess em um pool de hemolinfa de 30 cepas L3, em um volume final de 400 μL em tampão PBS (Green et al. 1981). As larvas foram expostas ao extrato bruto de *S. jabrense* (0,4895 mg/mL) e a fração rica em alcaloides (0,1957 mg/mL) durante um período de tempo de 24 h, e o grupo controle foram expostos apenas à água da torneira pelos mesmos períodos de tempo. Os ensaios foram realizados em triplicata. A absorbância foi medida usando um

leitor de microplacas com filtro de 548 nm, e o NO (óxido nítrico) foi quantificado usando uma curva padrão de NaNO₂ (Nitrito de sódio) como referência.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism para Windows versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Diferenças significativas entre os grupos foram analisadas por ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey quando apropriado ($P < 0,05$).

Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

E as análises foram obtidas utilizando um Sistema de Cromatografia Líquida de Ultra desempenho (Nexera X2, Shimadzu® Kyoto, Japão), acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo-tempo de voo (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics, MA, EUA), com uma fonte de íons de eletrospray (ESI). O Sistema CLAE consistia em uma unidade de bomba de solvente LC-40D, um degaseificador online DGU-405 e um controlador de sistema CBM-40. As injeções foram realizadas usando um amostrador automático (SIL-40C). A separação por CLAE foi realizada em uma coluna analítica Luna C-18 5 mm 150Å, 250 x 4,6 µm (Phenomenex, EUA). A fase móvel da CLAE consistia em acetonitrila (Solvente A) e água (Solvente B) ambos acidificados com ácido fórmico 20 mM (v/v) com fluxo de 350 mL.min⁻¹. O método se deu de 0 a 2 min em modo isocrático (15:85) seguido de gradiente linear até 95 % de ACN de 2-12 min. Após isso, a taxa de 95 % foi mantida por 5 min, retornando a 15% de B e mantendo-se por 4 min antes da próxima injeção. Por fim, as configurações da fonte de ionização Eletrospray foram fixadas em energia do capilar de 4.500 V, temperatura do gás de dessolvatação à 200 °C, fluxo de 9 mL.min⁻¹, e pressão de 4 bar. Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo de ionização em uma faixa de 50 a 1200 Da. O instrumento Q-Tof foi operado em modo de varredura e MS/MS automático, e experimentos MS2 topk5 para os cinco íons mais intensos de cada varredura MS1. Os dados foram visualizados usando o software Data Analysis 4.2 (Bruker Daltonics ®).

Processamento de dados EM/EM e geração de redes moleculares no GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*)

Os dados CLAE-ESI-EM² adquiridos foram convertidos para arquivos mzXML usando o software MSConvert (ProteoWizard, disponível em <https://proteowizard.sourceforge.io/>). Os arquivos mzXML foram carregados no GPNS online (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>), através do WinSCP (<https://winscp.net/eng/download.php>), e então a rede molecular (MN) foi gerada. Os parâmetros utilizados para gerar as redes foram: tolerância da massa do íon precursor 1.0 Da; tolerância de massa de íons de fragmentos 0.5 Da e pontuação mínima de cosseno 0.6. A rede molecular foi plotada no Cytoscape 3.8.2 (<http://www.cytoscape.org>). Para facilitar a desreplicação e classificação da estrutura química dos compostos a rede molecular clássica foi reanalisada utilizando a ferramenta MolNetEnhancer.

Resultados e Discussão

Diferentes concentrações de extrato hidroalcóolico bruto e da fração rica em alcaloides de *S. jabrense* foram testadas conforme mostrado na Fig. 62. Concentrações maiores que 0,7 mg/mL do extrato bruto e 0,4 mg/mL da fração rica em alcaloides foram capazes de matar 100% das larvas. A CL₅₀ determinada para o extrato bruto de *S. jabrense* foi de 0,4895 mg/mL e para a fração rica em alcaloides de 0,1957 mg/ml (Figura 63).

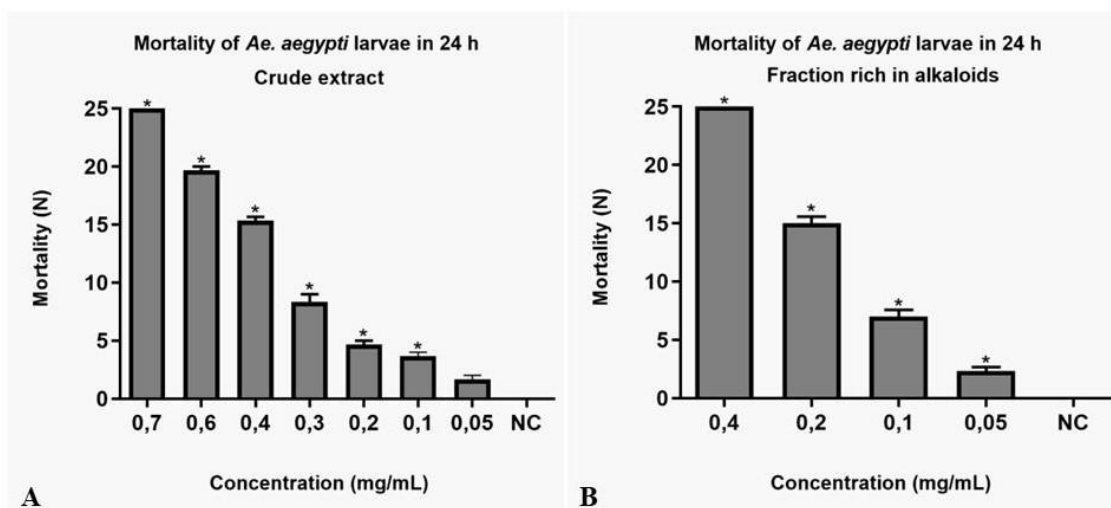


Figura 62. Mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* expostas a diferentes concentrações de extrato bruto (A) e da fração rica em alcaloides (B) de *S. jabrense*. NC - Controle negativo.

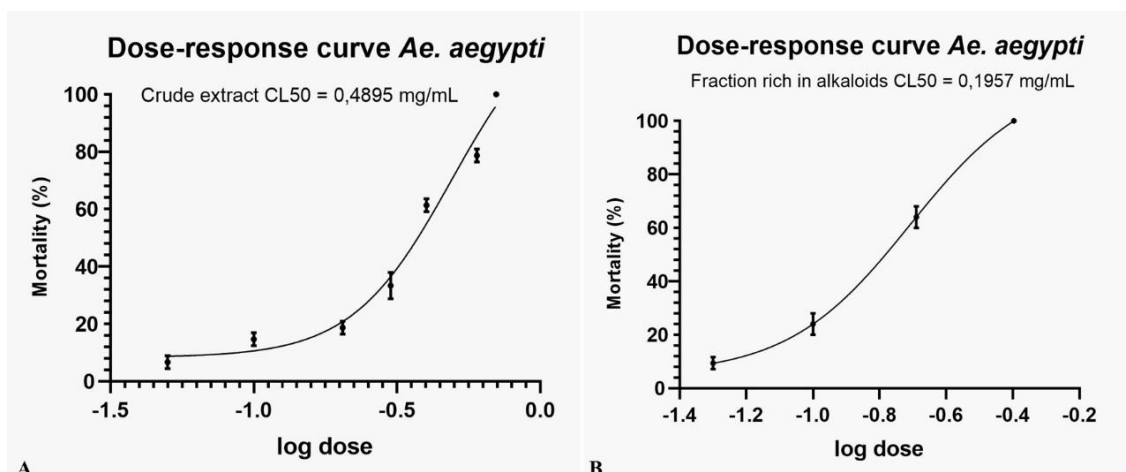


Figura 63. Curvas dose-resposta para a morte de larvas *Ae. aegypti* expostas ao extrato bruto (A) e a fração rica em alcaloides (B) de *S. jabrense*.

A partir da contagem do número de células após a exposição das larvas a concentração da CL50 do extrato bruto e da fração rica em alcaloides foi observado que o extrato bruto foi capaz de reduzir 45,23% do células (225,6 para 123,6) e a fração alcaloidica foi capaz de reduzir 52,42% (225,6 para 107,3) quando comparadas com o grupo controle (NC) (Figura 64).

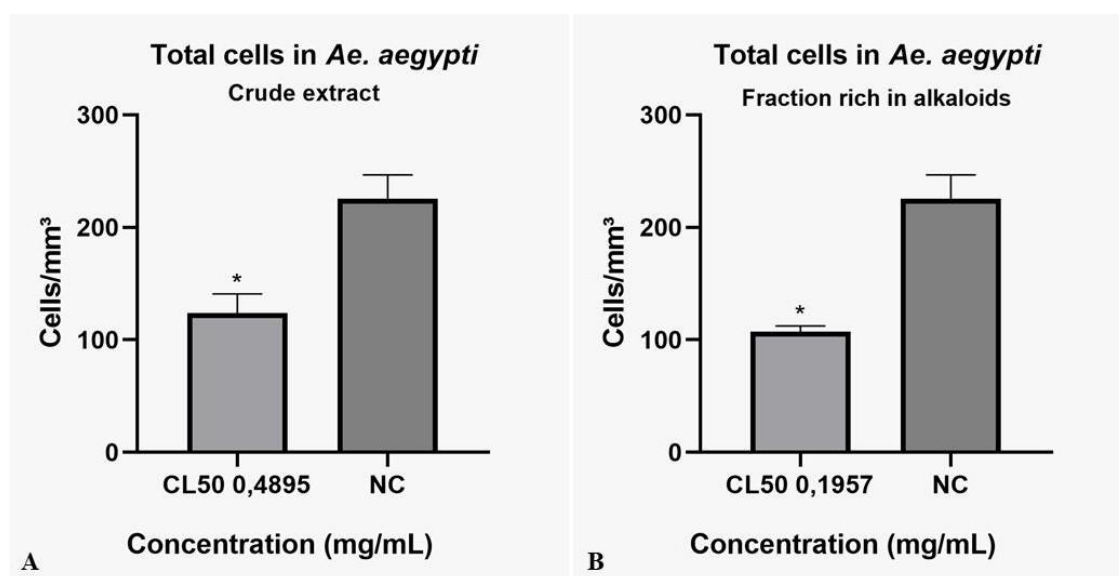


Figura 64. Mortalidade média de larvas de *Ae. aegypti* expostas a diferentes concentrações de extrato bruto (A) e da fração rica em alcaloides (B) de *S. jabrense*. NC - Controle negativo.

Já para o óxido nítrico, como ele está relacionado à imunidade inata em invertebrados, foram investigadas possíveis variações em sua produção por hemócitos de

larvas expostas ao extrato bruto e a fração rica em alcaloides. Nossos resultados mostram que a concentração de NO na hemolinfa das larvas expostas ao extrato bruto e a fração rica em alcaloides de *S. jabrense* foi menor que nas larvas do grupo controle. Após 24 hr de exposição a concentração de NO reduziu 46,20 % (0,0005111 mg/mL para 0,000275 mg/mL) para o extrato bruto e 55,79 % (0,0005111 mg/mL para 0,000226 mg/mL) para a fração rica em alcaloides (Figura 65).

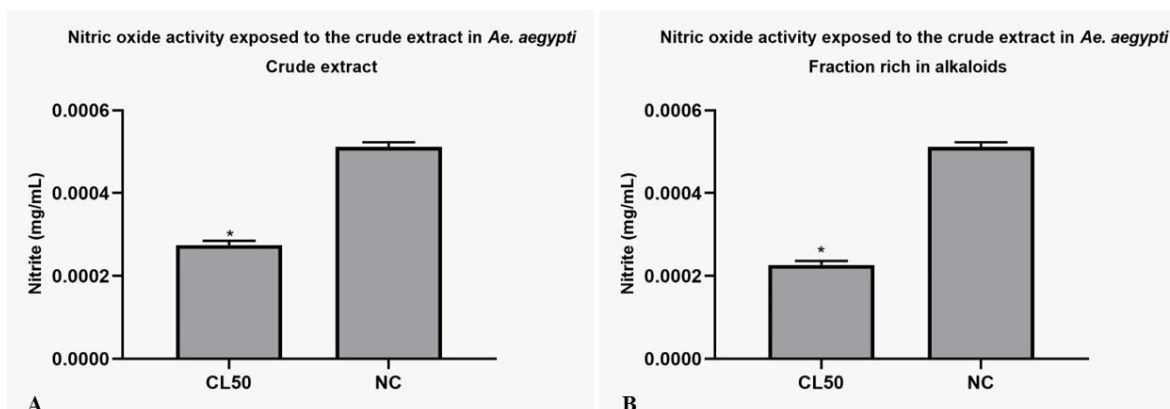


Figura 65. Produção de NO em larvas de *Ae. aegypti* expostas ao extrato bruto (A) e a fração rica em alcaloide de *S. jabrense* (B) * $P < 0,05$ quando comparado ao seu controle.

Para compreensão do perfil químico, as amostras testadas foram analisadas por CLAE-EM e os dados foram utilizados para geração de redes moleculares usando o GNPs para facilitar a organização e conhecimento dos metabólitos secundários presentes nas amostras. Desta forma, a rede molecular gerada a partir de um conjunto de dados CLAE-EM/EM do extrato bruto, e da fração rica em alcaloides podemos observar a presença de um “cluster” com 22 nodos sendo o mais representativo dentro do conjunto de dados e apresentou a relação m/z do íon percussor relativas a compostos presentes em ambas as amostras, tanto no extrato bruto, quanto na fração rica em alcaloides (Figura 66).

E para uma compreensão melhor de quem eram esses compostos e quais as semelhanças que guardavam entre si, a rede molecular clássica gerada foi reanalisada com a ferramenta MolNetEnhancer do GNPS, que possibilita a observação da rede molecular com informações da classe química dos compostos mapeadas, sendo confirmado então que esses compostos pertenciam a classe dos glicosídeos esteroidais, e estes foram identificados como moglicosídeos, diglicosídeos, triglicosídeos e tetraglicosídeos sendo os triglicosídeos de maior ocorrência (Figura 67).

Dos 22 nodos, quatro foram anotados pelo GNPS e outros 17 foram identificados manualmente. Os dados de r.t., íon protonado $[M+H]^+$, fórmula molecular, m/z dos íons

fragmentos e tentativa de identificação estão disponíveis na tabela 09.

Dados de CLAE-EM confirmaram a presença de glicosídeos esteroidais nas amostras de *S. jabrense* testadas para a atividade larvicida e repelente. Esses dados corroboram com diversos estudos apresentados na revisão realizada por Chidambaram et al., 2022. A eficácia de saponinas, esteróides, isoflavonóides e taninos derivados de plantas, já é bem documentada quanto à sua atividade larvicida (Singha et al. 2011). Esteroides também foram responsáveis pela toxicidade larval elevada do extrato dos frutos verdes de *S. villosum* (Chowdhury et al. 2008).

A fração alcaloidica de *S. sisymbriifolium* também já foi testada para atividade larvicida, apresentando melhores resultados que substâncias isoladas e extrato bruto de *S. laxum* (Soule et al. 2000; Bagalwa et al. 2010), e esses resultados foram similares aos encontrados neste trabalho.

Estudos que relacionam a atividade larvicida dos extratos e o solvente extrator, demonstram que solventes e misturas extrativas de alta polaridade, como o extrato hidroalcólico, apresentam melhor atividade larvicida, em razão dos compostos químicos extraídos (Rawani et al., 2010).

O efeito larvicida letal das plantas de Solanaceae parece estar atribuído aos alcaloides, incluindo alcaloides tropanicos, glicoalcaloides, pirrolizidínicos e alcaloides indólicos, que são produzidos como um mecanismo de defesa natural contra insetos, predadores e agentes infecciosos (Jerzykiewicz, 2007). Glicoalcaloides, como α -tomatina, α -chaconina e α -solanina, já foram relatados como exibindo atividade inseticida (Pilaquinga et al. 2019).

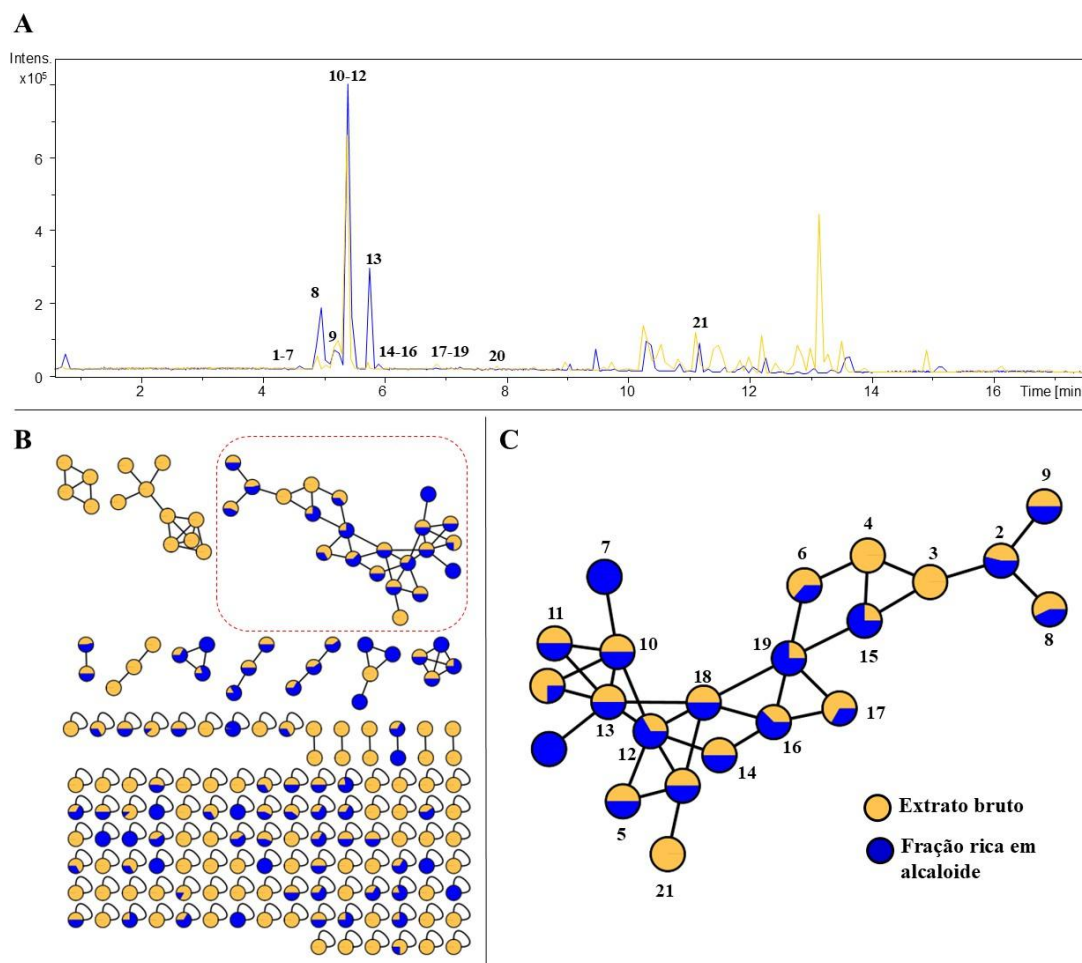


Figura 66. Cromatogramas do pico base (BPC) (A) e Rede Molecular Clássica gerada com dados de CLAE-EM/EM do extrato bruto e da fração rica em alcaloides (B e C).

Os nodos na rede molecular anotados como agliconas, tretaglicosídeos, triglicosídeos, diglicosídeos e monoglicosídeos. As agliconas foram identificadas como solasodina (S, m/z 414 $[M+H]^+$) e derivados de solasodina hidroxilados (HS, m/z 430 $[M+H]^+$ (15)), poliinsaturados (DS - m/z 412 $[M+H]^+$ (19), DDS - m/z 410 $[M+H]^+$ (17)), ou hidrogenados (SH - m/z 416 $[M+H]^+$ (16)).

Os compostos identificados como triglicosídeos apresentaram maior número de ocorrência nas amostras, inclusive o nodo de m/z 868 $[M+H]^+$ (11), composto majoritário, de maior intensidade no cromatograma, possuindo uma glicose e duas pentoses ligada a aglicona esteroidal de solasodina. Essa composição formada por uma aglicona insaturada entre a posição C5 e C6 e uma cadeia composta por monossacarídeos ligados, parece ser de extrema importância para atividade bioinseticida (Chen et al., 2010).

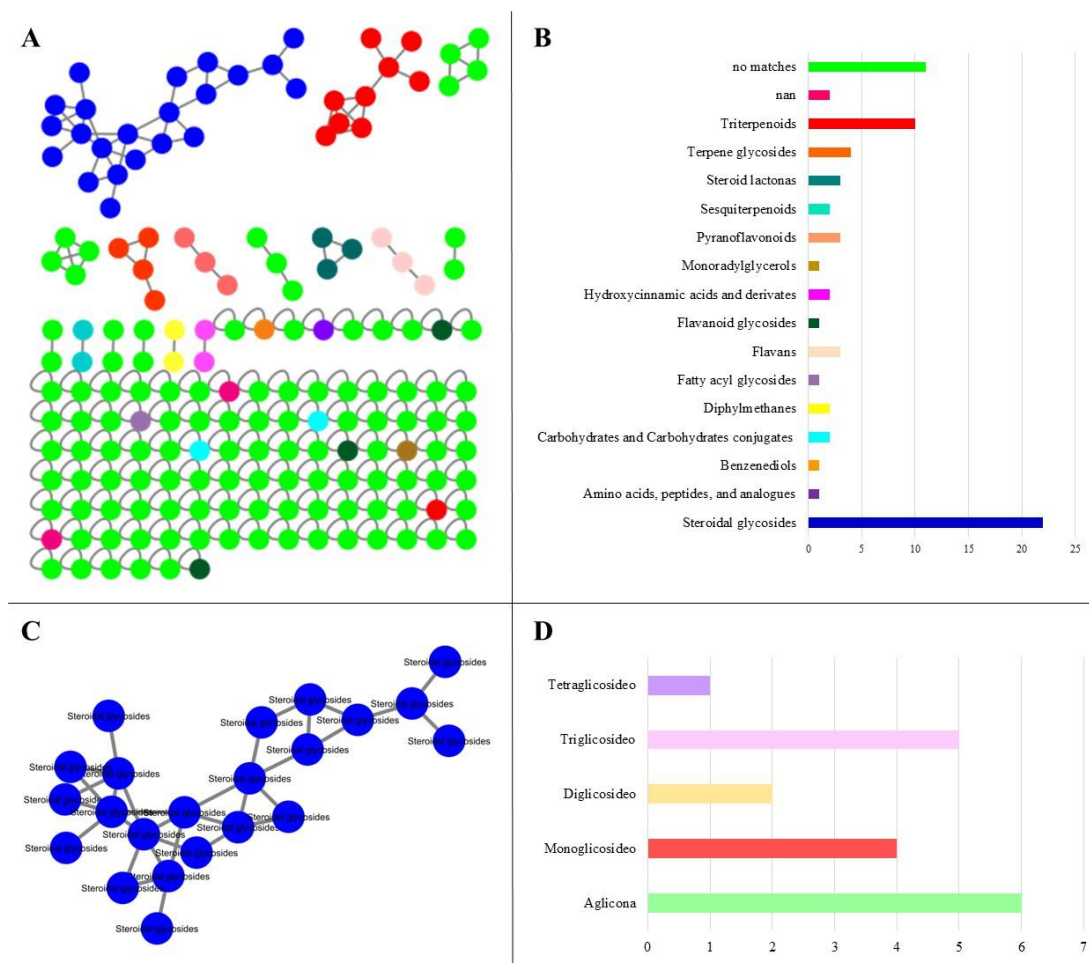


Figura 67. Rede Molecular clássica reanalizada com a ferramenta MolNetEnhancer (A). Estruturas químicas anotadas (B). Família molecular dos glicosídeos esteroidais (C). Classificação dos glicosídeos anotados.

Conclusões

Nossos dados mostram que o extrato bruto e a fração rica em alcaloides de *S. jabrense* constitui um agente larvicida eficaz contra larvas de *Ae. aegypti*. O extrato bruto e a fração alcaloidica inibiram a produção de NO na hemolinfa de larvas expostas por 24 h. *Solanum jabrense* é uma espécie nativa e endêmica brasileira, portanto, uma matéria-prima natural de baixo custo, embora sejam necessários estudos para produção da espécie e seus metabólitos em larga escala. Portanto, a utilização de espécies de *Solanum* para a produção inseticidas naturais contra *Ae. aegypti* constitui uma forma sustentável de utilização deste recurso natural na flora Brasileira.

Tabela 9. Compostos identificados no extrato bruto e na fração rica em alcaloides.

No.	R.T (min.)	[M+H] ⁺	Formula Molecular	MS ⁿ m/z	Tentativa de identificação	Classificação	Referências
1	4.2	884.4847	C ₄₅ H ₇₄ NO ₁₆	MS ² [884]: 866, 394, 253, 157, 129	HS-hex-rha-rha	triglicosídeo	Yang et al. 2021
2	4.4	900.642	C ₄₅ H ₇₄ NO ₁₇	MS ² [900]: 882, 740, 410, 285, 267, 129, 144	DHS-hex-rha-rha	triglicosídeo	Yang et al. 2021 Yuan et al. 2019 Lelario et al. 2019 Wu et al. 2013
3	4.5	902.4908	-	MS ² [902]: 884, 430, 269, 251, 129	Não identificado	-	-
4	4.6	610.3802	-	MS ² [610]: 430, 356, 269, 251	Não identificado	-	-
5	4.7	738.739	C ₃₉ H ₆₄ NO ₁₂	MS ² [738]: 720, 412, 269, 251, 129	HS-hex-rha	diglicosídeo	Yang et al. 2021
6	4.8	592.3707	C ₃₃ H ₅₄ NO ₈	MS ² [592]: 574, 433, 267, 253, 157	HS-hex	monoglicosídeo	Yang et al. 2021
7	4.9	898.4581	C ₄₅ H ₇₂ NO ₁₇	MS ² [898]: 880, 590, 428, 267, 129, 114	HSD-hex-hex-rha	triglicosídeo	Yang et al. 2021
8	5.9	590.3566	C ₃₃ H ₅₂ NO ₈	MS ² [590]: 572, 447, 285, 267, 133	S-GlcA	monoglicosídeo	
9	5.0	916.46	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₈	MS ² [916]: 770, 608, 446, 428, 285, 175	DHS-hex-rha-hex	triglicosídeo	Yang et al. 2021
10	5.2	608.755	C ₃₃ H ₅₃ NO ₉	MS ² [608]: 428, 412, 384, 251, 125	DHS-hex	monoglicosídeo	Yang et al. 2021
11	5.3	868.5122	C ₄₅ H ₇₄ NO ₁₅	MS ² [868]: 850, 396, 253, 157, 129	S-hex-rha-rha	triglicosídeo	Yang et al. 2021 Lelario et al. 2019 Wu et al. 2013
12	5.4	1000.5371	C ₅₀ H ₈₂ NO ₁₉	MS ² [1000]: 868, 722, 558, 396, 253, 129	S-hex-rha-rha-xyl	tetraglicosídeo	
13	5.4	576.3839	C ₃₃ H ₅₄ NO ₇	MS ² [576]: 558, 271, 253, 157, 114	S-hex	monoglicosídeo	Yang et al. 2021
14	5.7	722.4395	C ₃₉ H ₆₄ NO ₁₁	MS ² [722]: 704, 396, 253, 157, 129	S-hex-rha	diglicosídeo	Yuan et al. 2019 Yang et al. 2021
15	6.0	430.3243	C ₂₇ H ₄₄ NO ₃	MS ² [430]: 412, 394, 269, 251, 126	HS	aglicona	
16	6.1	428.3054	C ₂₇ H ₄₂ NO ₃	MS ² [428]: 410, 285, 267, 175	SHD	aglicona	Yang et al. 2021
17	6.7	410.2959	C ₂₇ H ₄₀ NO ₂	MS ² [410]: 392, 267, 171	DDS	aglicona	Torres et al. 2011; Yang et al. 2021.

18	6.9	414.3278	C ₂₇ H ₄₄ NO ₂	MS ² [414]: 369, 271, 253, 157	S	aglicona	Cahill et al. 2010
19	7.0	412.3105	C ₂₇ H ₄₂ NO ₂	MS ² [412]: 394, 269, 145	DS	aglicona	Yang et al. 2021
20	7.7	416.3442	C ₂₇ H ₄₆ NO ₂	MS ² [416]: 398, 273, 255	SH	aglicona	Yang et al. 2021
21	11.2	426.2061	-	MS ² [426]: 365, 281, 207, 109	-	aglicona	

Legenda: DDS, poliinsaturação da solasodina; DS, insaturação da solasodina; HS, hidroxisolasodina ou isômero; SH, hidrogenação da solasodina; S, solasodina; GlcA, glicose ácida; SHD, insaturação da hidroxisolasodina; hex, hexose; rha, ramnose; xyl, xilose; DHS, dihidroxisolasodina ou isômero.

Referências

- Afroz, M., Akter, S., Ahmed, A., Rouf, R., Shilpi, J. A., Tiralongo, E., Sarker, S.D., Göransson, U. & Uddin, S. J. (2020). Ethnobotany and antimicrobial peptides from plants of the solanaceae family: an update and future prospects. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 565. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00565>
- Ahmed, M. S., & Akter, I. (2024). Pharmacological and Therapeutic Insights of *Solanum nigrum* Linn.
- Andrade Cavalcante, F., da Silva, J. L. V., Medeiros, A. F. D., & de Sousa Claudino, F. (2013) *Solanum jabrense* Agra & M. Nee (Solanaceae) exhibits spasmolytic activity on guinea-pig ileum.
- Bharathi, J. D., & Suseem, S. R. (2024). Larvicidal activity of CuO and ZnO nanoparticles against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* mosquito vectors-a greener approach by *Phaseolus vulgaris* L. aqueous extract as bio-reductant. *Results in Chemistry*, 7, 101408. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2024.101408>
- Chen, Y., Li, S., Sun, F., Han, H., Zhang, X., Fan, Y., ... & Zhou, Y. (2010). In vivo antimalarial activities of glycoalkaloids isolated from Solanaceae plants. *Pharmaceutical Biology*, 48(9), 1018-1024. <https://doi.org/10.3109/13880200903440211>
- Chidambaram, K., Alqahtani, T., Alghazwani, Y., Aldahish, A., Annadurai, S., Venkatesan, K., ... & Kandasamy, G. (2022). Medicinal Plants of *Solanum* Species: The Promising Sources of Phyto-Insecticidal Compounds. *Journal of Tropical Medicine*, 2022(1), 4952221. <https://doi.org/10.1155/2022/4952221>
- Chowdhury, N., Ghosh, A., & Chandra, G. (2008). Mosquito larvicidal activities of *Solanum villosum* berry extract against the dengue vector *Stegomyia aegypti*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2022/4952221>
- Ghosh, A., Chowdhury, N., & Chandra, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian journal of medical research*, 135(5), 581-598.
- Green, L. C., Ruiz de Luzuriaga, K., Wagner, D. A., Rand, W., Istfan, N., Young, V. R., & Tannenbaum, S. R. (1981). Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7764-7768. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7764>
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8-10), 603-608. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X)

Jerzykiewicz, J. (2007). Alkaloids of Solanaceae (nightshade plants). *Postepy Biochemii*, 53(3), 280-286.

Kaunda, J. S., & Zhang, Y. J. (2019). The genus *solanum*: an ethnopharmacological, phytochemical and biological properties review. *Natural products and bioprospecting*, 9(2), 77-137. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0201-6>

Meyer, R. S., Bamshad, M., Fuller, D. Q., & Litt, A. (2014). Comparing medicinal uses of eggplant and related Solanaceae in China, India, and the Philippines suggests the independent development of uses, cultural diffusion, and recent species substitutions. *Economic botany*, 68, 137-152. <https://doi.org/10.1007/s12231-014-9267-6>

Pilaquinga, F., Morejón, B., Ganchala, D., Morey, J., Piña, N., Debut, A., & Neira, M. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using *Solanum mammosum* L.(Solanaceae) fruit extract and their larvicidal activity against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). *Plos one*, 14(10), e0224109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224109>

Silva, T. M. S., Câmara, C. A., de Fátima Agra, M., de Carvalho, M. G., Frana, M. T., Brandoline, S. V. P. B., Paschoal, L.S., & Braz-Filho, R. (2006). Molluscicidal activity of *Solanum* species of the Northeast of Brazil on *Biomphalaria glabrata*. *Fitoterapia*, 77(6), 449-452. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.05.00>

Singha, S., & Chandra, G. (2011). Mosquito larvicidal activity of some common spices and vegetable waste on *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(4), 288-293. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60088-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60088-6)

MATERIAL SUPLEMENTAR

Combinação de Rede Molecular, Atividade Larvícida e Repelente contra *Aedes aegypti* para descoberta de substâncias bioativas de *Solanum jabrense* Agra e M. Nee

Anauara Lima e Silva ^A, Renan T. Leite ^C, Thiago Araújo de Medeiros Brito ^A, Jheison Marcos Claudino Francelino ^C, Fabíola da Cruz Nunes ^B, Maria de Fátima Agra ^B, Marcelo Sobral da Silva ^A, Josean Fachine Tavares ^{*A}

^A Programa de Pós-Graduação em Produtos Bioativos Naturais e Sintéticos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, Brasil; ^B Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, Brasil; ^C Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, Brasil.

josean@lft.ufpb.br*

- Espectros das substâncias identificadas

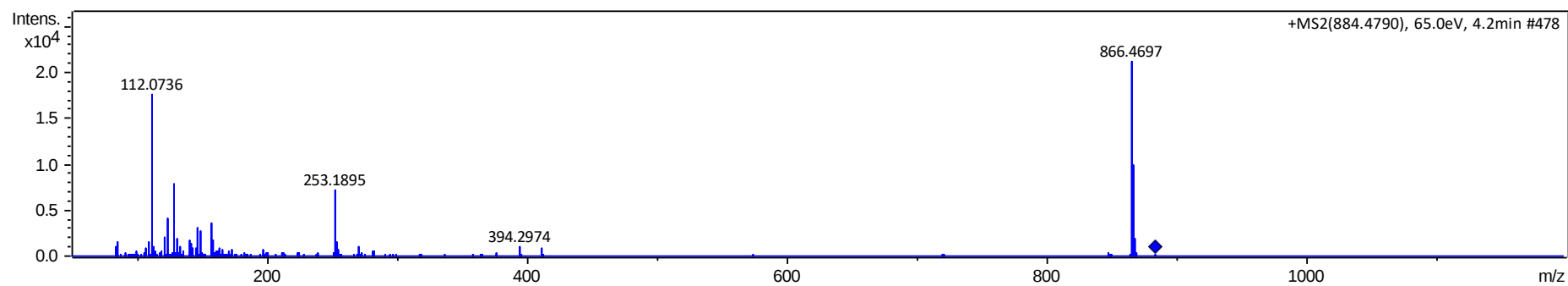


Figura 68. Espectro MS² do composto de m/z 884 $[M+H]^+$ (r.t. 4.2 min).

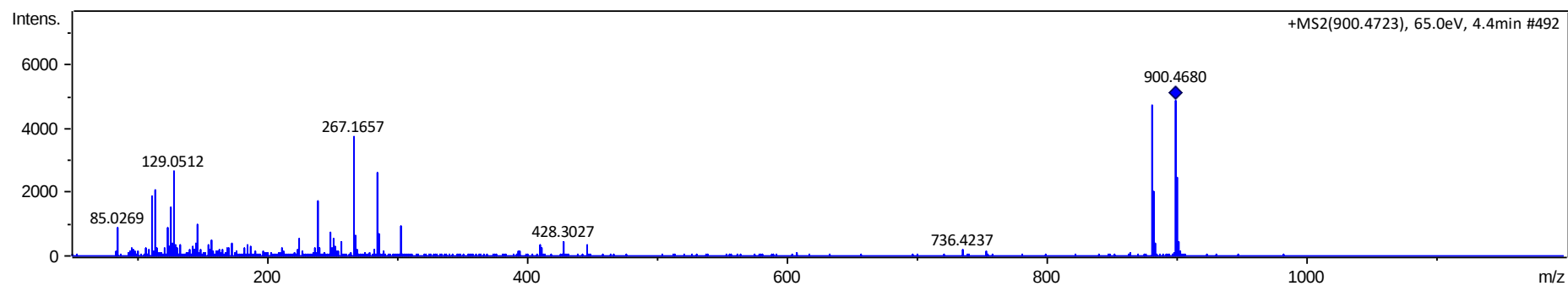


Figura 69. Espectro MS² do composto de m/z 900 $[M+H]^+$ (r.t. 4.4 min).

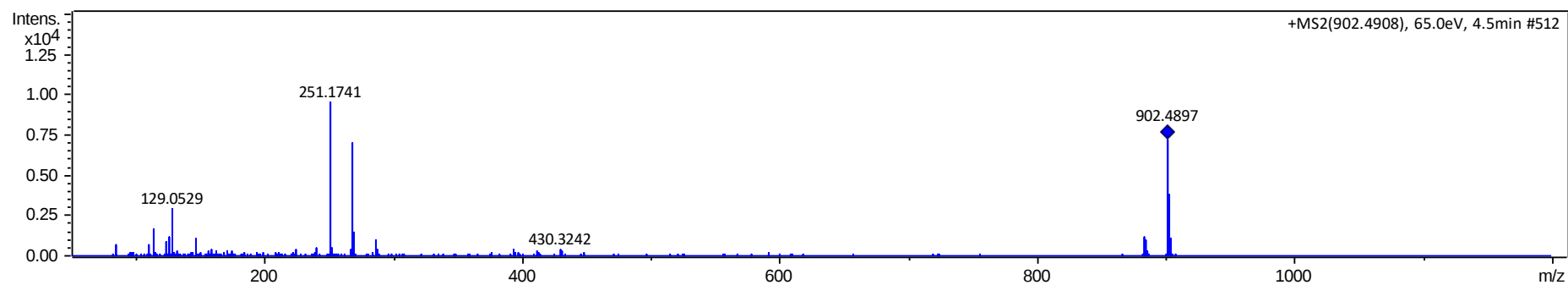


Figura 70. Espectro MS² do composto de m/z 902 [M+H]⁺ (r.t. 4.5 min).

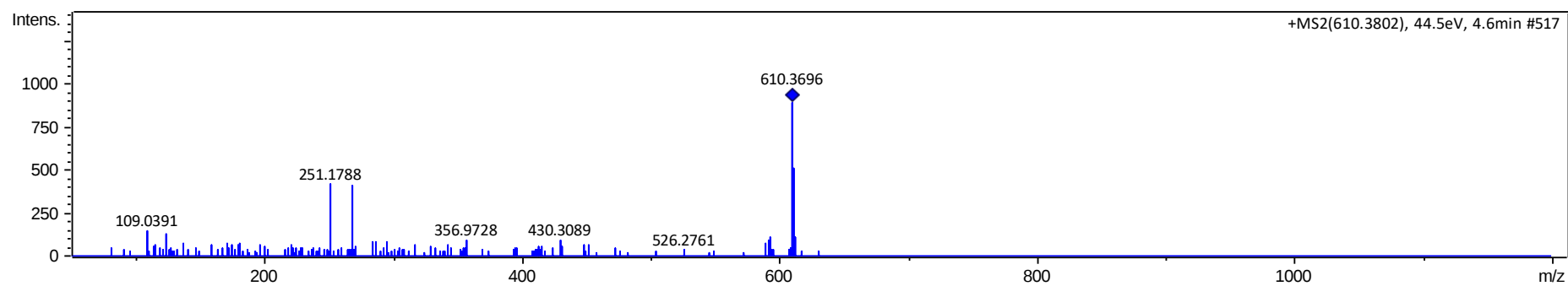


Figura 71. Espectro MS² do composto de m/z 610 [M+H]⁺ (r.t. 4.6 min).

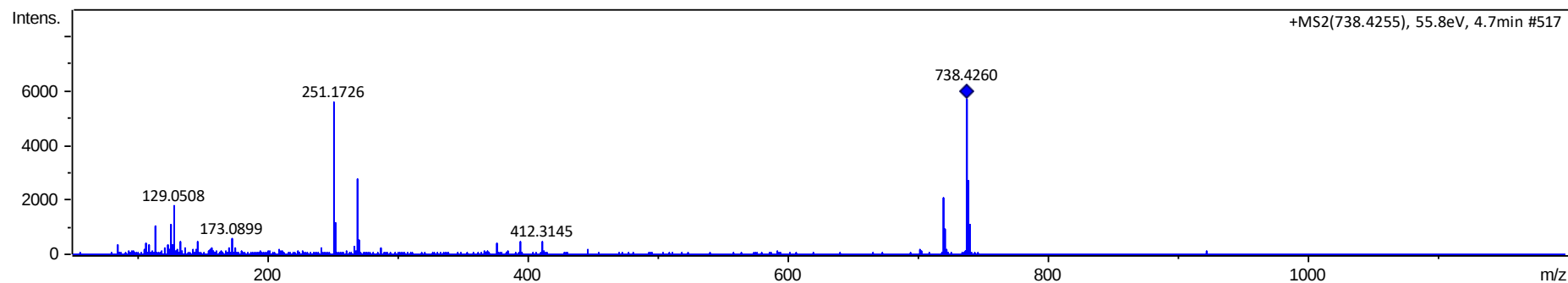


Figura 72. Espectro MS² do composto de m/z 738 $[M+H]^+$ (r.t. 4.7 min).

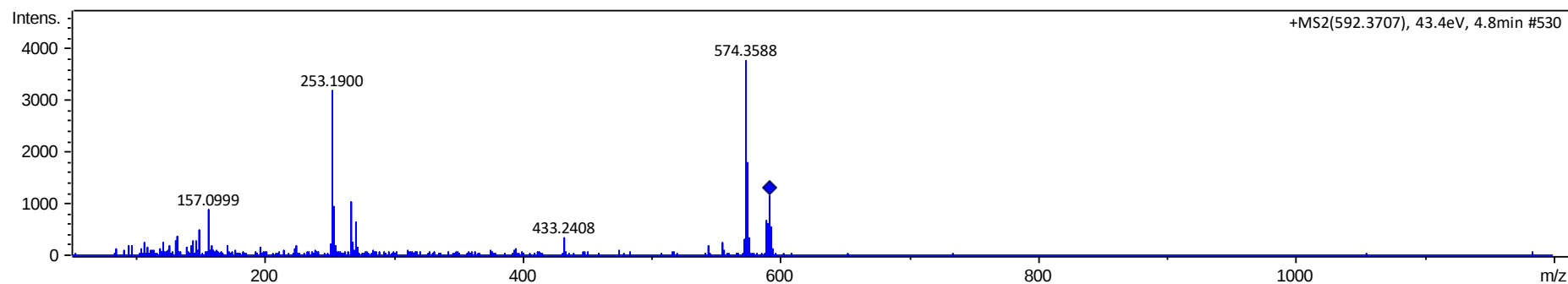


Figura 73. Espectro MS² do composto de m/z 592 $[M+H]^+$ (r.t. 4.8 min).

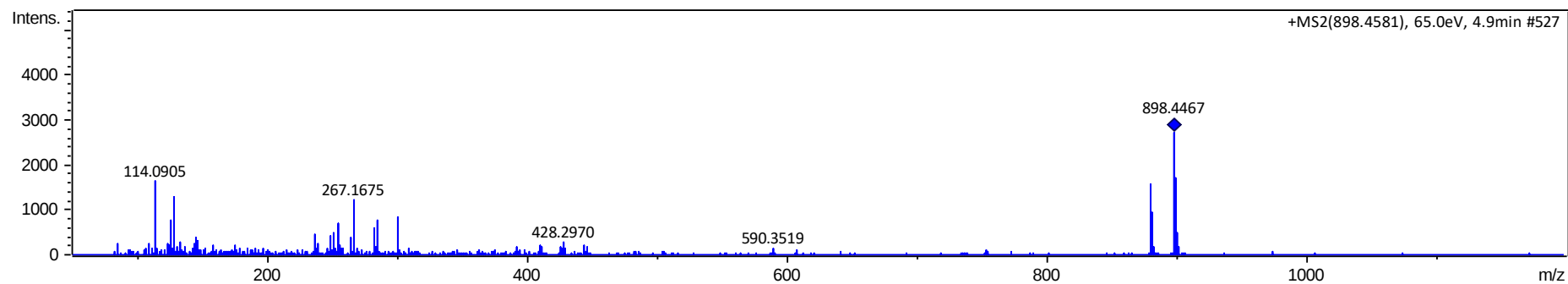


Figura 74. Espectro MS² do composto de m/z 898 [M+H]⁺ (r.t. 4.9 min).

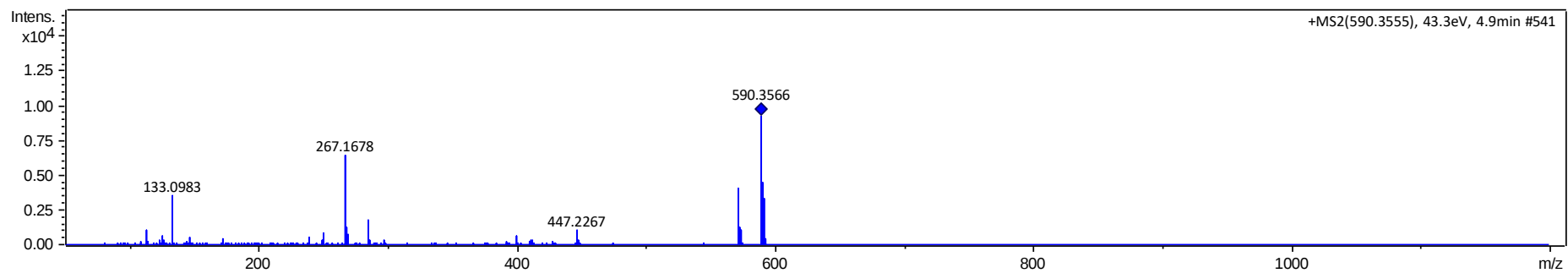


Figura 75. Espectro MS² do composto de m/z 590 [M+H]⁺ (r.t. 4.9 min).

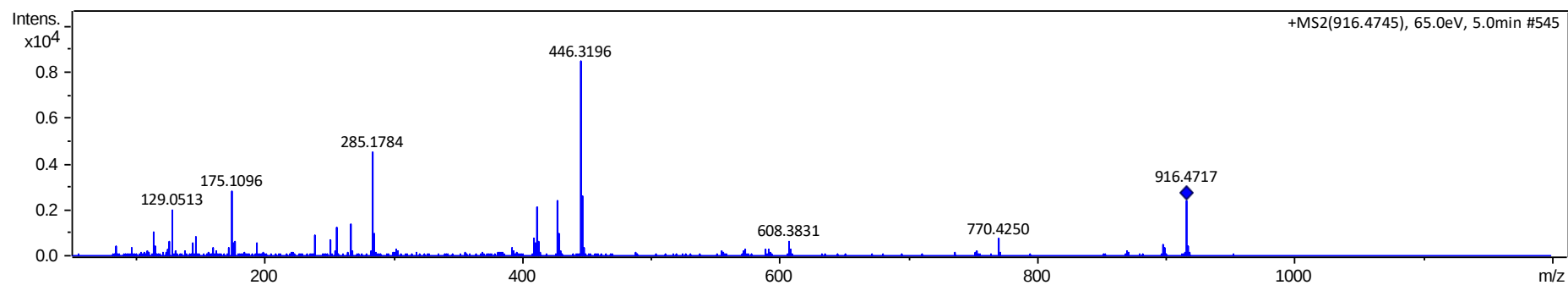


Figura 76. Espectro MS² do composto de m/z 916 [M+H]⁺ (r.t. 5.0 min).

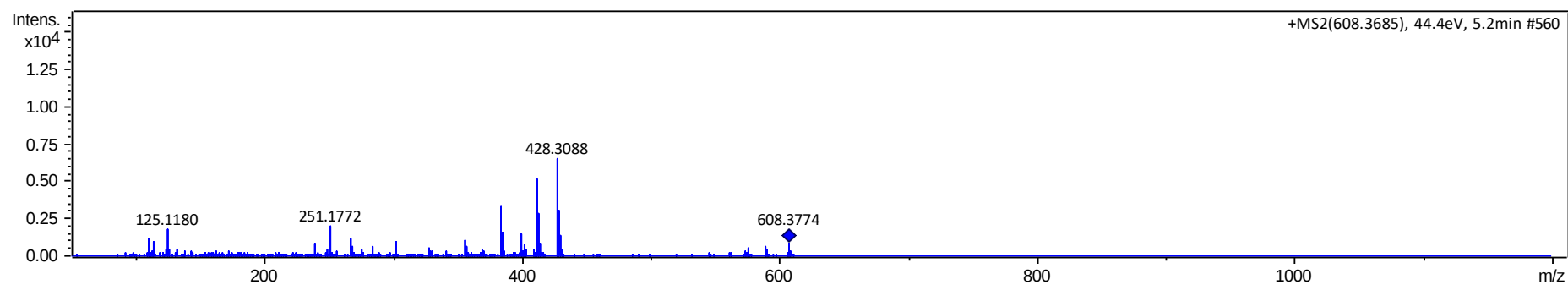


Figura 77. Espectro MS² do composto de m/z 608 [M+H]⁺ (r.t. 5.2 min).

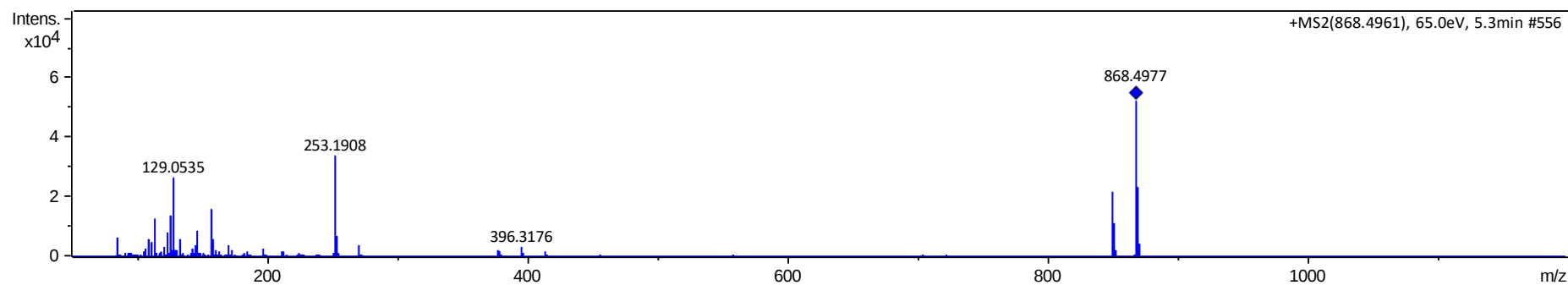


Figura 78. Espectro MS² do composto de m/z 868 [M+H]⁺ (r.t. 5.3 min).

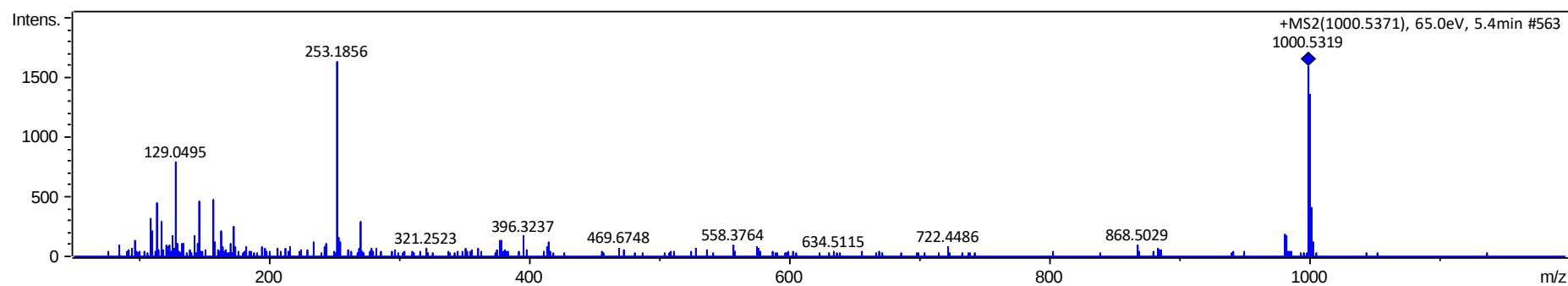


Figura 79. Espectro MS² do composto de m/z 1000 [M+H]⁺ (r.t. 5.4 min).

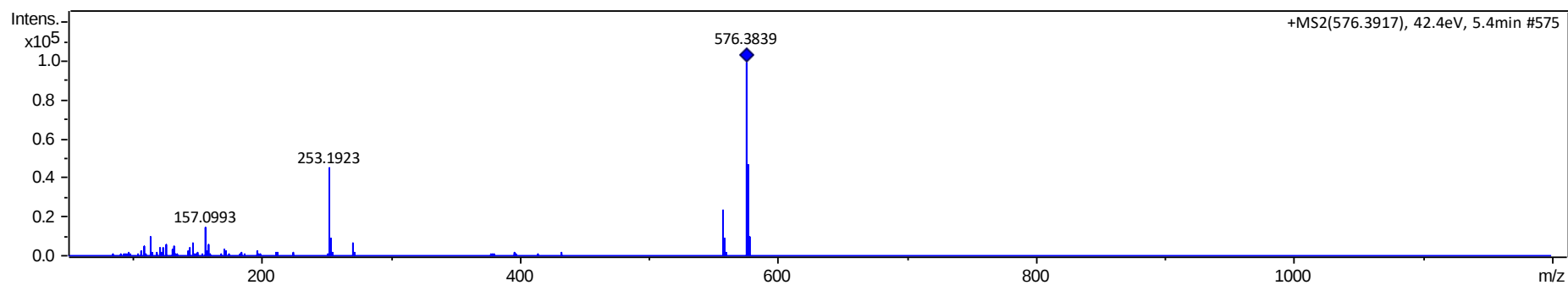


Figura 80. Espectro MS² do composto de m/z 576 $[M+H]^+$ (r.t. 5.4 min).

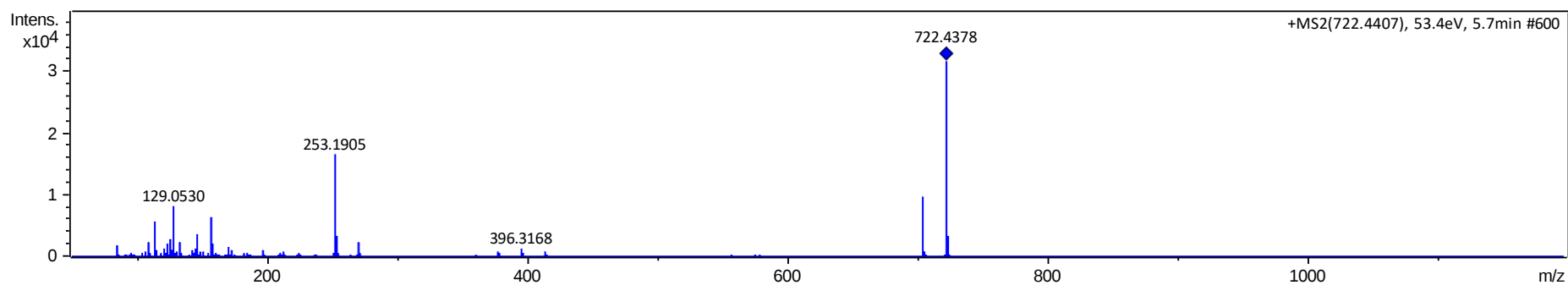


Figura 81. Espectro MS² do composto de m/z 722 $[M+H]^+$ (r.t. 5.7 min).

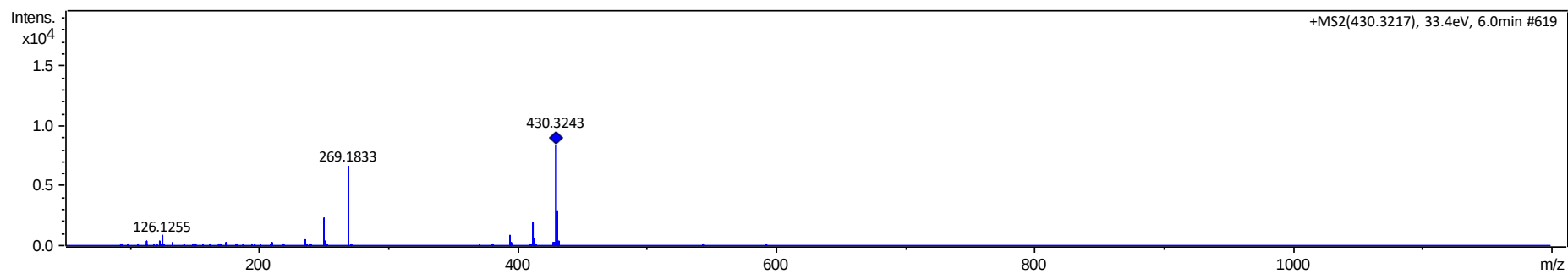


Figura 82. Espectro MS² do composto de m/z 430 [M+H]⁺ (r.t. 6.0 min).

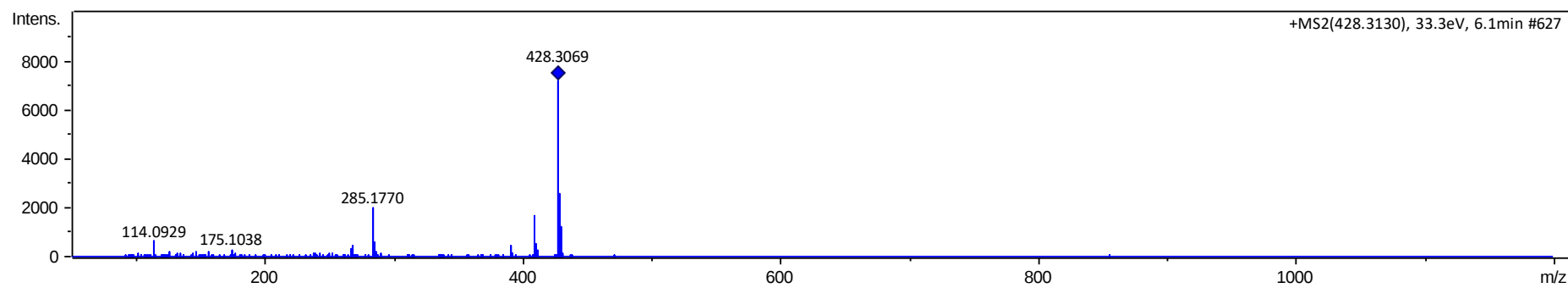


Figura 83. Espectro MS² do composto de m/z 428 [M+H]⁺ (r.t. 6.1 min).

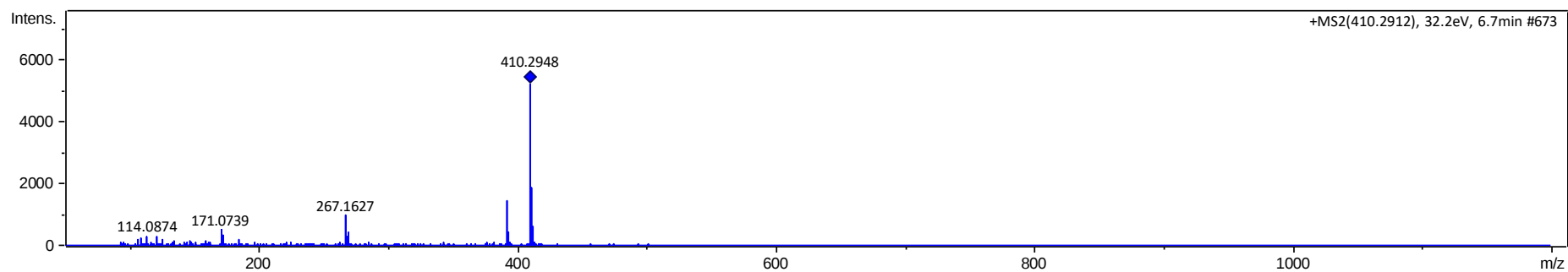


Figura 84. Espectro MS² do composto de m/z 410 [M+H]⁺ (r.t. 6.7 min).

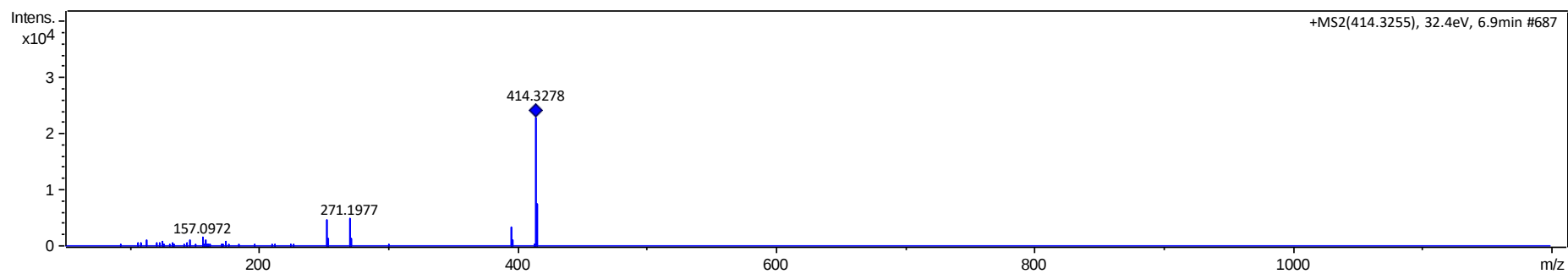


Figura 85. Espectro MS² do composto de m/z 414 [M+H]⁺ (r.t. 6.9 min).

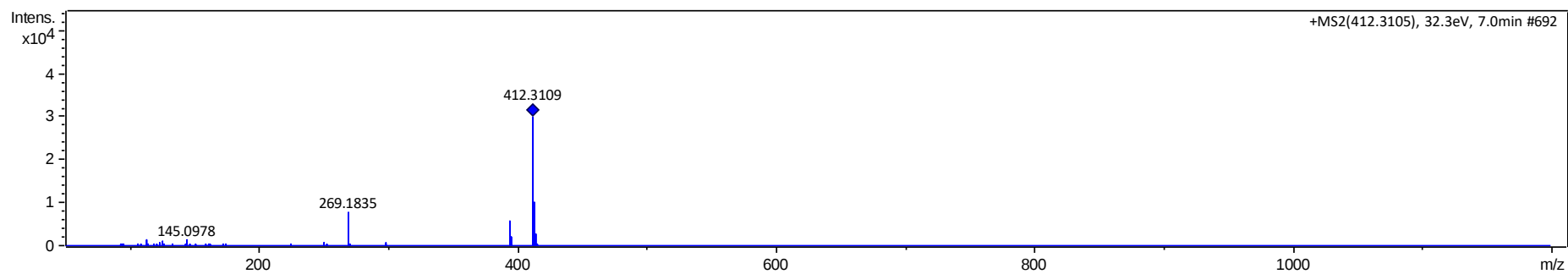


Figura 86. Espectro MS² do composto de m/z 412 $[M+H]^+$ (r.t. 7.0 min).

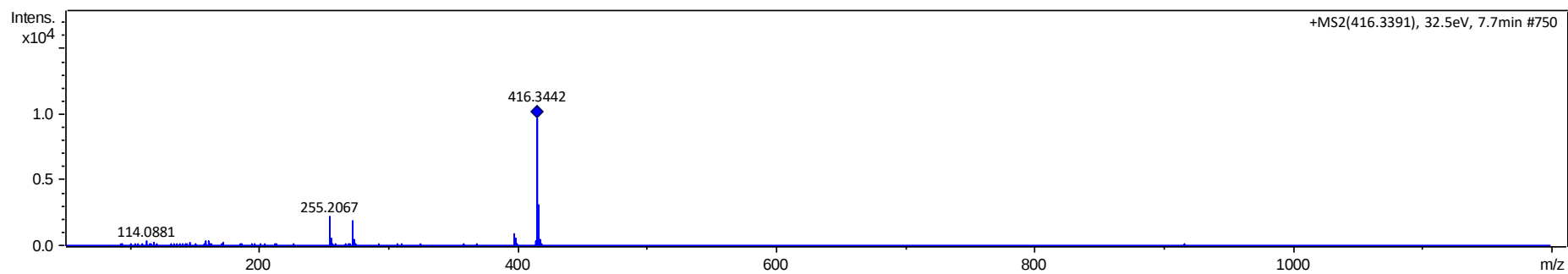


Figura 87. Espectro MS² do composto de m/z 416 $[M+H]^+$ (r.t. 7.7 min).

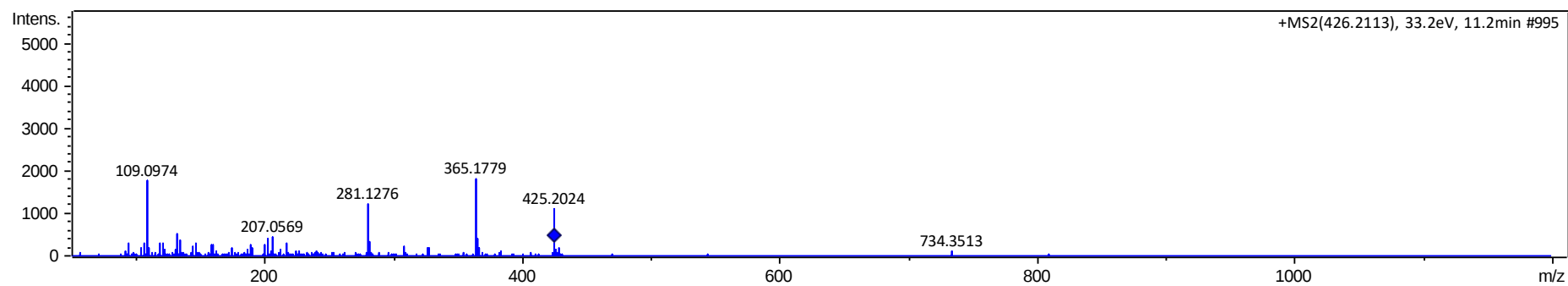


Figura 88. Espectro MS² do composto de m/z 426 [M+H]⁺ (r.t. 11.2 min).

**Capítulo 4: “Glicosídeos Esteroidais de *Solanum jabrense* Agra & M. Nee”
submetido ao periódico Química Nova**

GLICOSÍDEOS ESTEROIDAIS DE *SOLANUM JABRENSE* AGRA E M. NEE

Anauara Lima e Silva^a, Thiago Araújo de Medeiros Brito^a, Maria de Fátima Agra^b, Marcelo Sobral da Silva, ^a Josean Fechine Tavares^{*a}

^a Programa de Pós-Graduação em Produtos Bioativos Naturais e Sintéticos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, Brasil; ^b Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, Brasil.

Autor para correspondência: josean@lft.ufpb.br

Resumo

Solanum jabrense é uma espécie endêmica do Brasil, que ocorre em pântanos de altitude no Nordeste, associada a ambientes rochosos, exclusivamente nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Bahia. Em estudos anteriores, o seu potencial farmacológico foi demonstrado dada a presença de flavonoides e glicosídeos esteroides. Neste trabalho foram isolados três glicosídeos esteroidais das partes aéreas de *S. jabrense*, sendo um deles uma saponina rara e um novo, para além de um alcaloide já conhecido, a Solamargina, sendo todos os primeiros registos para a espécie. Todas as estruturas foram elucidadas por análise de dados espectroscópicos (RMN 1D, 2D e HRMS) combinada com polarímetro e infravermelho.

Palavras-chave: Saponinas, Alcaloides, Flora do Brasil, Solanaceae.

Introdução

Solanum L. é o e mais relevante economicamente e o maior gênero de plantas do mundo, incluindo espécies amplamente utilizados na dieta humana diária como o tomate (*S. lycopersicum*), a batata (*S. tuberosum*) e a berinjela (*S. melongena*) além de ser um dos mais diversos e amplamente distribuídos dentro da família Solanaceae, abrangendo atualmente cerca de 1245 espécies aceitas, que ocupam uma variedade de habitats, desde florestas tropicais até ambientes áridos (Hilgenhof et al., 2023; Panda et al., 2024).

As espécies desse grupo, conhecidas como “Jurubebas”, destacam-se do ponto de vista etnobotânico, já que são utilizadas para diversos fins por diversas populações humanas em diferentes regiões do mundo. Muitas de suas espécies são reconhecidas na medicina tradicional por suas propriedades antitumoral (Manoharan et al., 2024, anti-inflamatórias (Liu et al., 2024), antimicrobianas (Wanyonyi et al. 2003, Zhou et al. 2016), antifúngicas (Pinto et al., 2011; Sitapha et al., 2024), antioxidantes (Silva et al., 2024), antidiabética (Kadima et al., 2016; Silva et al., 2017), antileishmanicida (Núñez-Mojica et al., 2021), entre outras, as quais estão frequentemente associadas à presença de compostos bioativos, como alcaloides, saponinas e flavonoides (Kaunda e Zhang et al., 2019).

Dentre as espécies de *Solanum*, destaca-se *S. jabrense*, uma espécie endêmica do Brasil, com ocorrência restrita a Caatinga e Mata Atlântica, encontrada principalmente em ambientes rochosos e regiões de altitude de estados do Nordeste Brasileiro (Agra e Nee, 1997; Flora do Brasil, 2025). Embora seu potencial medicinal ainda seja pouco explorado, estudos relatam sua ação espasmolítica (Cvalcante et al., 2013) e molluscicidal (Silva et al., 2006). Compreender sua composição química pode auxiliar no entendimento de suas interações ecológicas, distribuição geográfica e principalmente de suas propriedades biológicas, sendo fundamental para embasar ações de conservação e estimular o aproveitamento sustentável de seus recursos, contribuindo também para a valorização e a preservação da biodiversidade regional e nacional.

A partir do estudo fitoquímico de partes aéreas de *S. jabrense*, foi possível identificar e isolar uma rara e uma nova saponina, além de um alcaloide já conhecido, sendo este o primeiro registro dessas estruturas na espécie.

Resultados e Discussão

Do extrato hidroalcóolico das partes aéreas de *S. jabrense* foram isolados três glicosídeos esteroidais, **(1)**, **(2)** e **(3)** (Figura 89). As estruturas foram elucidadas com base na análise de dados de infravermelho (IF), rotação óptica (RO), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), além da comparação com dados disponíveis na literatura.

O composto **(1)** foi isolado como um pó branco, $[\alpha]_D^{21} -58,071$ (c. 0,1, MeOH). Sua fórmula molecular foi determinada como $C_{45}H_{73}NO_{15}$ por EMAR, com m/z 868,5053 $[M+H]^+$ (calcd. para 868,5021, $\Delta = 3,7$ ppm). O espectro de infravermelho mostrou bandas de absorção em 3371 cm^{-1} referente a presença dos grupos OH, e 1651 cm^{-1} referente a N-H de amina. A análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **1** permitiram identificar sinais característicos do alcaloide esteroide do tipo espirosolano ligado a uma cadeia glicosilada. O espectro de RMN de ^1H exibiu sinais de um hidrogênio olefínico δ_H 5,38 (1H, sl), três sinais de hidrogênio anoméricos δ_H 5,20 (1H, d), δ_H 4,85 (1H), δ_H 4,49 (1H, d), e quatro sinais de metilas, sendo duas singletos δ_H 1,05 (3H, s), δ_H 0,85 (3H, s) e duas dubletos δ_H 1,13 (3H, d), δ_H 0,93 (3H, d). No espectro de RMN de ^{13}C foram observados 45 sinais ressonantes, sendo quatro carbonos não hidrogenados, δ_c 42,08 (C-13), δ_c 37,99 (C-10), incluindo um ligado a átomo de oxigênio e nitrogênio, δ_c 100,04 (C-22), e um sp^2 em δ_c 141,93 (C-5). Nove carbonos metínicos, incluindo dois oxigenados δ_c 79,94 (C-3) e δ_c 84,28 (C-16), δ_c 122,4 (C-6), δ_c 32,75 (C-8), δ_c 51,53 (C-9), δ_c 57,62 (C-14), δ_c 63,05 (C-17), δ_c 42,78 (C-20), δ_c 29,48 (C-25), dez metilênicos δ_c 46,79 (C-26), δ_c 30,69 (C-24), δ_c 33,08 (C-23), δ_c 28,87 (C-15), δ_c 40,40 (C-12), δ_c 21,87 (C-11), δ_c 33,04 (C-7), δ_c 39,45 (C-4), δ_c 30,69 (C-2), δ_c 38,50 (C-1), e quatro metílicos δ_c 18,74 (C-27), δ_c 14,82 (C-21), δ_c 16,53 (C-18), δ_c 19,81 (C-19), considerando a presença de uma função éter. A estrutura da aglicona foi confirmada por correlações chave nos espectros de RMN de ^1H - ^1H COSY e HMBC (Figura 89). A posição das metilas Me-18, Me-19, Me-21 e Me-27 foram confirmadas por correlações no espectro de RMN de HMBC (Figura 89). A estrutura da aglicona foi consistente com a mesma apresentada pelo composto (3 β ,22 α ,25R)-espirosol-5-en-3-ol conhecido como Solasodina (Puri et al., 1993). O trissacarídeo ligado em C-3 da aglicona composto por duas L-ramnose e uma D-glicose foi identificado como O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-

(1→2)-O-[6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1→4)]- β -D-glicopiranosídeo, uma chacotrise (El-Hawary et al., 2016) (Tabela 9). A conectividade dos açúcares foi confirmada pelas correlações no espectro de HMBC H-1' (δ 4,49) / C-3 (δ 79,94), H-1'' (δ 4,85) / C-2' (δ 79,38) e H-1''' (δ 5,20) / C-4' (δ 76,57) (Figura 90). Todos os dados obtidos e analisados foram condizentes para identificação de **1** em (25*R*)(20*S*)(16*S*)-3 β -{O- α -L-ramnopiranosil-(1→2)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1→4)]- β -D-glicopiranosil}-22 α N-espirosol-5-en ou Solamargina (El-Hawary, 2016). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão dispostos na Tabela 10 e os espectros no material suplementar (Figura 90-98).

O composto (**2**) foi obtido como um sólido incolor, $[\alpha]_{\text{D}}^{21} -86,557$ (c. 0,1, MeOH). O EMAR mostrou um íon protonado com m/z 915,4584 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. 915,4466, $\Delta = 1,8$ ppm) e sua fórmula molecular determinada como $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{O}_{19}$. O espectro de infravermelho mostrou duas bandas de absorção em 1757 cm^{-1} e uma banda intensa em 3392 cm^{-1} referentes a presença de C=O (éster) e grupos OH, respectivamente. Os sinais no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C mostraram que a estrutura do composto **2** é formada por uma aglicona e um trissacarídeo ligado em C-3, similar quando comparado os dados com o composto **1**. Entretanto, a estrutura da aglicona **2** apresentou deslocamentos semelhantes a aglicona de Foliumin (Ferreira et al., 1994). Assim como em Foliumin, no espectro de RMN de ^{13}C o composto isolado demonstrou a presença de uma insaturação devido aos sinais referentes aos carbonos olefínicos δ_{C} 123,12 (C-6) e δ_{C} 141,13 (C-5), e a observação de um hidrogênio olefínico δ_{H} 5,36 (H-6) no espectro de RMN de ^1H . A estrutura da aglicona foi confirmada por correlações chave nos espectros de RMN de ^1H - ^1H COSY e HMBC (Figura 89). Diferente de Foliumin onde só foram observados dois sinais relativos a carbonos anoméricos aqui temos três sinais relativos a carbonos anoméricos, δ_{C} 100,42 (C-1'), δ_{C} 103,01 (C-1''), δ_{C} 102,03 (C-1''') indicando que o composto é Δ^5 -espirosteno, substituído com um trissacarídeo. Esqueletos espirostenos são comuns em espécies de *Solanum* e muitas dessas estruturas, glicosiladas na posição C-3 já foram isoladas (Xiang et al., 2022). A posição da dupla ligação foi confirmada por correlações no espectro de HMBC de H-19 (δ_{H} 1,05) / C-5 (δ_{C} 141,13), H-19 (δ_{H} 1,05) / C-10 (δ_{C} 37,93), além da comparação com dados da literatura. Já a conectividade dos açúcares foi confirmada pelas correlações no espectro de HMBC H-1' (δ_{H} 4,49) / C-3 (δ_{C} 79,31), H-1'' (δ_{H} 4,84) / C-2' (δ_{C} 80,01) e H-1''' (δ_{H} 5,20) / C-4' (δ_{C} 79,27). O espectro de RMN de ^1H também exibiu quatro sinais relativos a duas metilas singletos δ_{H} 1,05 (3H, s), δ_{H} 0,83 (3H, s) e duas metilas dubletos δ_{H} 1,19 (3H, d), δ_{H} 1,01 (3H, d) assim

como em Solamargina (Cornelius et al., 2010), condizentes com a biossíntese dessas estruturas. A principal diferença entre **1** e **2** está no carbono não oxigenado δ_c 110,54 (C-22) que nesta estrutura não mais está ligado a um nitrogênio e a um oxigênio e sim a dois oxigênios, deixando de ser então um alcaloide esteroideal e passando a ser uma saponina esteroideal. Também foi possível observar no espectro de RMN de ^{13}C a presença de um outro carbono não oxigenado conectado a um grupo carbonila δ_c 183,24 (C-26), e duas hidroxilas, evidentes pelos sinais de dois carbonos ligados a oxigênio, δ_c 78,68 (C-23) e δ_c 80,46 (C-15), além dos dois hidrogênios hidroximetínicos δ_H 3,82 (H-15, 1H, m) e δ_H 4,38 (H-23, 1H, dd) no espectro de RMN de ^1H . A posição desses grupos foi confirmada pelas correlações no espectro de HMBC H-27 (δ_H 1,19) / C-26 (δ_c 183,24), H-21 (δ_H 1,01) / C-22 (δ_c 110,54), H-23 (δ_H 4,38) / C-16 (δ_c 91,64), H-15 (δ_H 3,82) / C-16 (δ_c 91,64). O trissacarídeo ligado na posição C-3 da aglicona também apresentou deslocamentos referentes a duas L-ramnose e uma D-glicose, assim como em Solamargina (Cornellius et al. 2010). Todos os dados obtidos foram condizentes para identificação dessa estrutura como (22*S*,23*R*,25*R*)-3 β ,15 α ,23-Triidroxiespirost-5-en-26-ona 3-*O*-{ α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-glicopiranosídeo}. Apenas um registro desse composto foi encontrado na literatura (Vázquez et al., 1999), podendo este então ser considerado raro, entretanto, não foi possível encontrar dados do seu completo assinalamento, disponíveis agora neste trabalho. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C foram apresentados na Tabela 10 e no material suplementar (Figura 99-107).

O composto (**3**), um sólido incolor, $[\alpha]_D^{21}$ -113,414 (c. 0.1, MeOH), teve sua fórmula molecular determinada como $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{NaO}_{18}$ por EMAR, com m/z 921,4479 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. 921,4422, $\Delta = 2,6$ ppm). O espectro de infravermelho mostrou uma banda de absorção em 1757 e 3371 cm^{-1} relativos à presença de C=O (éster) e grupos OH, respectivamente. O espectro de RMN de ^1H exibiu três sinais relativos a hidrogênios anoméricos de açúcares δ_H 5,20 (1H, d), δ_H 4,84 (1H, d), δ_H 4,49 (1H, d), duas metilas singletos δ_H 1,04 (3H, s), δ_H 0,81 (3H, s) e duas metilas dubletos δ_H 1,19 (3H, d), δ_H 1,02 (3H, d). No espectro de RMN de ^{13}C , sinais relativos de C-1 a C-13 e C-19 a C-27 mostraram deslocamentos químicos similares a estrutura de **2**, mas sinais relativos a C-15, C-16 e C-17 foram similares a Solamargina (Cornellius et al., 2010) sugerindo que a aglicona de **3** é um derivado 15-desidroxilado de **2**. Entretanto, sinais relativos ao trissacarídeo no espectro de RMN de ^{13}C de **3** foram iguais a Solamargina e ao composto **2**, uma 3-*O*- β -chacotriose. A estrutura da aglicona e seus trissacarídeos foram

confirmadas por correlações chave nos espectros de RMN de ^1H - ^1H COSY e HMBC (Figura 89). Após uma ampla revisão da literatura não foi encontrado nenhum relato do isolamento desse composto anteriormente, sendo um novo Δ^5 -espirosteno, substituído com um trissacarídeo, identificado como (22S,23R,25R)-3 β ,23-Diidroxiespirost-5-en-26-ona 3-O- $\{\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-glicopiranosídeo}. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C também estão dispostos na Tabela 10 e os espectros no material suplementar (Figura 108-116).

Tabela 10. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H para os compostos **1**, **2** e **3** em MeOD.

Posição	Composto 1 ^a		Composto 2 ^a		Composto 3 ^b	
	dc / ppm	d _H / ppm	dc / ppm	d _H / ppm	dc / ppm	d _H / ppm
1	38,50	1,09 (s), 1,91 (m)	38,70	1,05 (s), 1,88 (m)	38,06	1,06 (m), 1,86 (m)
2	30,69	1,71 (m), 1,93 (m)	30,76	1,60 (m), 1,90 (m)	30,75	1,60 (m), 1,91 (m)
3	79,94	3,53 (m)	79,31	3,39 (m)	79,98	3,51 (m)
4	39,45	2,45 (m), 2,30 (m)	39,41	2,42 (m), 2,28 (m)	39,48	2,44 (m), 2,29 (m)
5	141,93	—	141,13	—	141,90	—
6	122,44	5,38 (br s)	123,12	5,36 (br s)	122,62	5,37 (br s)
7	33,04	1,41 (m), 2,00 (m)	31,48	2,73 (m), 1,90 (m)	31,50	2,70 (m), 1,94 (m)
8	32,75	1,71 (m)	33,02	1,82 (m)	32,68	1,64 (m)
9	51,53	0,98 (br s)	51,53	1,01 (s)	51,72	0,96 (s)
10	37,99	—	37,93	—	37,82	—
11	21,87	1,56 (m)	21,71	1,53 (m)	21,91	1,52 (m)
12	40,40	1,81 (m), 1,22 (m)	41,47	1,26 (s), 1,71 (m)	40,98	1,20 (s), 1,78 (m)
13	42,08	—	41,81	—	42,06	—
14	57,62	1,23 (s)	61,19	1,23 (s)	57,68	1,23 (s)
15	28,87	1,72 (m), 1,49 (m)	80,46	3,82 (m)	32,68	1,96 (m), 1,52 (m)
16	84,28	4,57 (br s)	91,64	4,34 (dd, <i>J</i> 9,2, 4,2 Hz)	83,15	4,58 (m)
17	63,05	1,90 (m)	60,55	1,91 (m)	63,40	1,79 (m)
18	16,53	0,85 (s)	17,92	0,83 (s)	16,37	0,81 (s)
19	19,81	1,05 (s)	19,80	1,05 (s)	19,83	1,04 (s)
20	42,78	2,31 (m)	41,83	2,46 (m)	37,80	2,47 (m)
21	14,82	1,13 (d)	15,12	1,02 (d, <i>J</i> 7,0 Hz)	15,19	1,02 (d, <i>J</i> 7,0 Hz)
22	100,04	—	110,54	—	110,45	—
23	33,08	1,96, 1,51	78,68	4,38 (dd, <i>J</i> 8,9, 2,1 Hz)	78,83	4,38 (dd, <i>J</i> 8,9, 2,1 Hz)
24	30,69	1,91 (m), 1,60 (m)	31,48	2,72 (m), 1,91 (m)	31,48	2,70 (m), 1,59 (m)
25	29,48	1,85 (m)	35,12	2,90 (m)	35,15	2,82 (m)
26	46,79	2,36	183,24	—	183,24	—
27	18,74	0,93 (d)	16,30	1,19 (d, <i>J</i> 7,3 Hz)	16,38	1,19 (d, <i>J</i> 7,3 Hz)
1'	100,44	4,49 (d, <i>J</i> 7,8 Hz)	100,42	4,49 (d, <i>J</i> 7,8 Hz)	100,48	4,49 (d, <i>J</i> 7,9 Hz)
2'	79,38	3,41	80,01	3,51 (m)	79,30	3,40 (m)
3'	77,96	3,60	78,06	3,58 (m)	78,05	3,58 (m)
4'	76,57	3,33 (m)	79,27	3,41 (m)	76,57	3,32 (m)
5'	79,28	3,60	78,68	3,60 (m)	78,84	3,58 (m)
6'	61,95	3,66 (m)	61,90	3,65 (m), 3,89 (m)	61,95	3,65 (m), 3,80 (m)
1''	102,95	4,85 (s)	103,01	4,84 (s)	103,01	4,84 (s)
2''	72,17	3,92 (m)	72,19	3,91 (m)	72,19	3,92 (m)

3''	72,37	3,61 (m)	72,19	3,60 (m)	72,19	3,66 (m)
4''	73,71	3,43 (m)	73,74	3,40 (m)	73,74	3,39 (m)
5''	70,65	3,94 (m)	70,68	3,92 (m)	69,78	3,92 (m)
6''	17,86	1,26 (s)	17,86	1,28 (s)	17,86	1,28 (s)
1'''	102,32	5,20 (d, <i>J</i> 1,8 Hz)	102,03	5,20 (d, <i>J</i> 1,7 Hz)	102,31	5,20 (d, <i>J</i> 1,7 Hz)
2'''	72,40	3,94 (m)	72,45	3,83 (m)	72,44	3,88 (m)
3'''	72,36	3,85 (m)	72,37	3,65 (m)	72,36	3,65 (m)
4'''	73,90	3,42 (m)	73,94	3,39 (m)	73,94	3,39 (m)
5'''	69,78	4,12 (m)	69,79	4,13 (m)	69,81	4,12 (m)
6'''	17,97	1,25 (d, <i>J</i> 6,2 Hz)	17,97	1,25 (d, <i>J</i> 6,2 Hz)	17,98	1,26 (d, <i>J</i> 6,3 Hz)

^aAdquirido em 400 MHz, CD₃OD; ^badquirido em 500 MHz, CD₃OD.

^a Adquiridos em 400 MHz. ^b Adquiridos em 500 MHz.

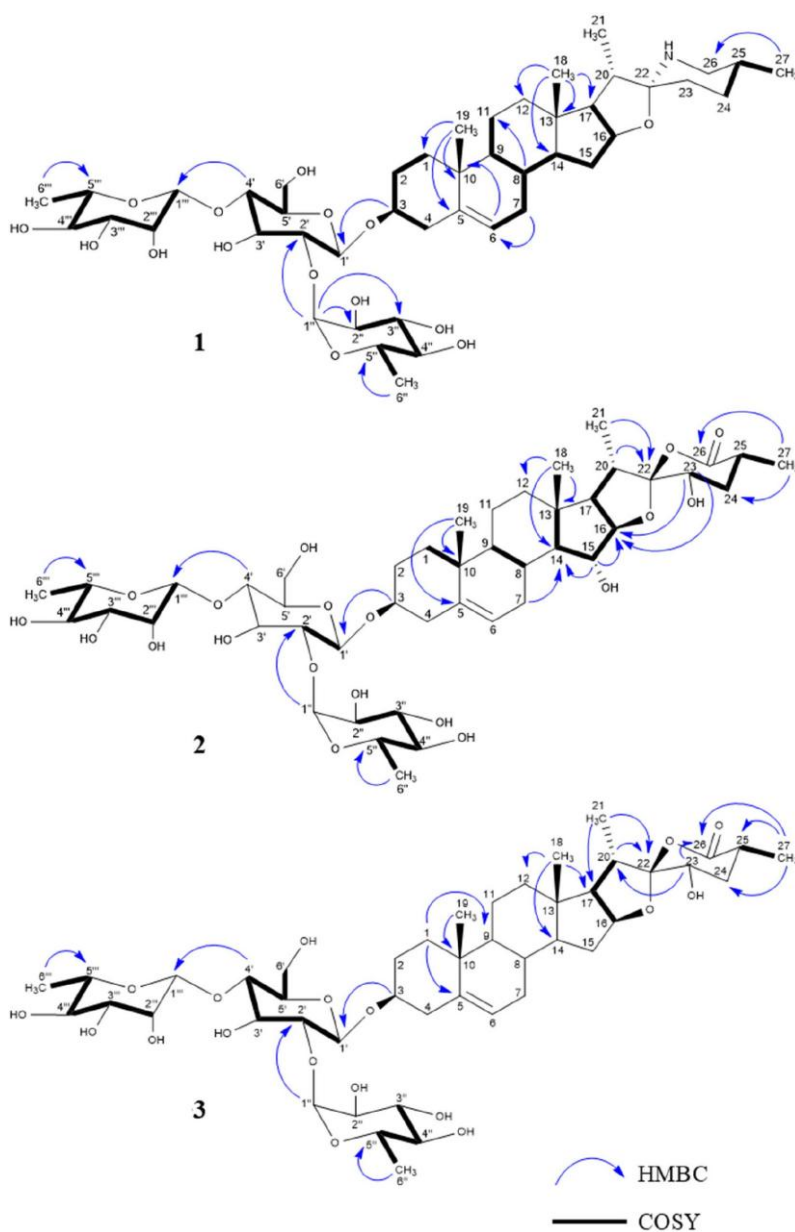


Figura 89. Correlações nos espectros de HMBC e ¹H-¹H COSY dos compostos 1, 2 e 3.

Conclusão

O (22*S*,23*R*,25*R*)-3 β ,23-Diidroxiespirost-5-en-26-ona 3-*O*-{ α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-glicopiranosídeo} (3) relatado aqui pela primeira vez, juntamente com dois glicosídeos esteroidais previamente conhecidos (1) e (2), foram isolados e identificados a partir do extrato hidroalcólico das folhas de *S. jabrense*. Todas essas estruturas foram documentadas pela primeira vez na espécie.

Parte Experimental

Material vegetal

O material botânico (partes aéreas) foi coletado na cidade de Maturéia, Paraíba, Brasil, e identificados pela Professora Dra. Maria de Fátima Agra. Parte do material foi destinado a produção de uma exsicata que foi depositada no Herbário Lauro Pires Xavier (JPB) (JPB 42267), localizado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), e o acesso ao patrimônio genético registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o nº A2B19D6. O material fresco coletado foi seco em estufa (cerca de 45 °C) por 10 dias, e triturado para obtenção do pó.

Extração e obtenção do extrato bruto e da fração rica em alcaloides

Aproximadamente 500 g do pó da planta seca foram extraídos com 80% de MeOH (80:20, MeOH:H₂O v/v) em banho ultrassônico por 1 h à temperatura ambiente (~25°C). Esse procedimento de extração foi repetido por duas vezes. O sobrenadante, líquido extrativo (4 L), foi concentrado em evaporador rotativo sob vácuo a cerca de 40°C, e assim obtido o extrato bruto seco (108 g).

Para obtenção do precipitado, fração rica em alcaloides, 30 g do extrato bruto hidroalcólico foi solubilizado em água deionizada e alcalinizado, com hidróxido de amônio, até atingir o pH 9, aproximadamente. Essa mistura foi submetida a refrigeração em geladeira, onde permaneceu por 24 h. Após esse período, obteve-se um precipitado que foi separado por filtração sob vácuo. O precipitado foi ressuspendido em água, neutralizado com ácido acético diluído, e refrigerado por 24 h. Esse processo foi repetido por três vezes e por fim centrifugado.

Isolamento dos constituintes químicos

O extrato bruto concentrado (35 g) foi suspenso em H₂O (1 L) e particionado sucessivamente com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. A fase n-Butanol (3,96 g) foi submetida à cromatografia em coluna, utilizando sílica gel, como fase estacionária (0,063-0,200 mm, 60 F₂₅₄, Merck), e hexano (n-Hex/EtOAc 10:0 a 0:10), acetato de etila (EtOAc/MeOH 9:1 a 3:6) e metanol (MeOH/EtOAc 3:6 a 10:0) como fase móvel, obtendo-se 35 frações e estas foram analisadas por CLAE-DAD em escala analítica da Shimadzu (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AT, autoinjeter SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU20A, detector SPD-M20A diode array e CBM-20A como unidade controladora. A coluna utilizada foi Kromasil, Bohus, Sweden C18 (250 mm x 4,6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4 mm x 3 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm).

As frações 11 (102,1 mg) e 12 (720,2 mg) obtidas da fase n-butanol foram submetidas à cromatografia por exclusão, utilizando Sephadex LH-20 (Sigma- Aldrich, Merck) e metanol 100% (MeOH) como eluente, obtendo-se 14 e 16 frações, respectivamente.

A fração 07 (92,9 mg) obtida do fracionamento da fração 12 foi analisada por CLAE-DAD analítico e submetida à análises de CLAE preparativa realizadas utilizando um sistema da Shimadzu equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-6AD, injetor Rheodyne, detector SPD-M10A diode array e SCL-10A. As análises foram realizadas em coluna preparada com octadesilsilano (ACE C18 250 mm X 21,2 mm e 5 µm de tamanho de partícula), e como fase móvel acetonitrila e água ultrapura acidificada com ácido fórmico 0,1% grau CLAE, obtendo-se assim a substância codificada como SJA 02 (6,5 mg). A fração 02 obtida do fracionamento da fração 11 em sephadex foi analisada por HPLC-DAD em escala analítica e observada a presença da substância codificada como SJA 03 (7,73 mg).

A fração rica em alcaloides (precipitado) (2,40 g) também foi submetida a fracionamento em coluna de Sephadex e MeOH como eluente, obtendo-se 21 frações que foram analisadas por CLAE-DAD em escala analítica e reunidas quando conveniente. Das frações 4-5 analisadas e reunidas foi obtido o composto codificado como SJA 1 (37,1 mg).

Solamargina (**1**): pó branco, $[\alpha]_D^{21} - 58,071$ (c. 0.1, MeOH), IV (ATR) $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 3371, 1651, 2938, 1045, EMAR modo positivo: m/z 868,5053 $[M+H]^+$ (calcd. para 868, 5021, $\Delta = 3,7$ ppm), ^1H RMN δ_{H} (MeOD, 400 MHz): 1,09 (1H, s, C-1), 1,91 (1H, m, C-1), 1,71 (1H, m, C-2), 1,93 (1H, m, C-2), 3,53 (1H, m, C-3), 2,45 (1H, m, C-4), 2,30 (1H, m, C-4), 5,38 (1H, br s, C-6), 1,41 (1H, m, C-7), 2,00 (1H, m, C-7), 1,71 (1H, m, C-8), 0,98 (1H, br s, C-9), 1,56 (1H, m, C-11), 1,81 (1H, m, C-12), 1,22 (1H, m, C-12), 1,23 (1H, s, C-14), 1,72 (1H, m, C-15), 1,49 (1H, m, C-15), 4,57 (1H, br s, C-16), 1,90 (1H, m, C-17), 0,85 (3H, s, C-18), 1,05 (3H, s, C-19), 2,31 (1H, m, C-20), 1,14 (3H, s, C-21), 1,96 (1H, m, C-23), 1,51 (1H, m, C-23), 1,91 (1H, m, C-24), 1,60 (1H, m, C-24), 1,85 (1H, m, C-25), 2,36 (1H, m, C-26), 1,05 (3H, d, C-27), Glucose: 4,49 (1H, d, C-1'), 3,41 (1H, m, C-2'), 3,60 (1H, m, C-3'), 3,33 (1H, m, C-4'), 3,60 (1H, m, C-5'), 3,66 (2H, m, C-6'), Ramnose: 4,85 (1H, d, C-1''), 3,92 (1H, m, C-2''), 3,61 (1H, m, C-3''), 3,43 (1H, m, C-4''), 3,94 (1H, m, C-5''), 1,26 (3H, s, C-2'), Ramnose: 5,20 (1H, d, C-1'''), 3,94 (1H, m, C-2'''), 3,85 (1H, m, C-3'''), 3,42 (1H, m, C-4'''), 4,12 (1H, m, C-5'''), 1,25 (3H, d, C-6'''), ^{13}C RMN δ_{C} (MeOD, 400 MHz): 38,50 (C-1), 30,69 (C-2), 79,94 (C-3), 39,45 (C-4), 141,9 (C-5), 122,4 (C-6), 33,04 (C-7), 32,75 (C-8), 51,53 (C-9), 37,99 (C-10), 21,87 (C-11), 40,40 (C-12), 42,08 (C-13), 57,62 (C-14), 28,87 (C-15), 84,28 (C-16), 63,05 (C-17), 16,53 (C-18), 19,81 (C-19), 42,78 (C-20), 14,81 (C-21), 100,04 (C-22), 33,08 (C-23), 30,69 (C-24), 29,48 (C-25), 46,79 (C-26), 18,75 (C-27), 100,44 (C-1'), 79,38 (C-2'), 77,96 (C-3'), 76,57 (C-4'), 79,28 (C-5'), 61,95 (C-6'), 102,95 (C-1''), 72,17 (C-2''), 72,14 (C-3''), 73,71 (C-4''), 70,65 (C-5''), 17,86 (C-6''), 102,32 (C-1'''), 72,40 (C-2'''), 72,36 (C-3'''), 73,90 (C-4'''), 69,78 (C-5'''), 17,97 (C-6''').

(2*2S,23R,25R*)-3 β ,15 α ,23-Triidroxiespirost-5-en-26-ona 3-O- $\{\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-glicopiranosídeo} (**2**): sólido incolor, $[\alpha]_D^{21} - 86,557$ (c. 0,1, MeOH), IV (ATR) $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 3392, 1757, 2932, 1042,

EMAR modo positivo: m/z 915,4584 $[M+H]^+$ (calc. $\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{O}_{19}$), ^1H RMN δ_{H} (MeOD, 400 MHz): 1,05 (1H, s, C-1), 1,88 (1H, m, C-1), 1,60 (1H, m, C-2), 1,90 (1H, m, C-2), 3,39 (1H, m, C-3), 2,42 (1H, m, C-4), 2,28 (1H, m, C-4), 5,36 (1H, br s, C-6), 2,73 (1H, m, C-7), 1,90 (1H, m, C-7), 1,82 (1H, m, C-8), 1,02 (1H, d, C-9), 1,53 (2H, m, C-11), 1,26 (1H, s, C-12), 1,71 (1H, m, C-12), 1,23 (1H, s, C-14), 3,82 (1H, m, C-15), 4,34 (1H, dd, C-16), 1,91 (1H, m, C-17), 0,83 (3H, s, C-18), 1,05 (3H, s, C-19), 2,46 (1H, m, C-20), 1,01 (3H, d, C-21), 4,38 (1H, dd, C-23), 2,72 (1H, m, C-24), 1,61 (1H, m, C-24), 2,90 (1H, m, C-25), 1,19 (3H, d, C-27), Glucose: 4,49 (1H, d, C-1'), 3,51 (1H, m, C-2'),

3,58 (1H, m, C-3'), 3,41 (1H, m, C-4'), 3,60 (1H, m, C-5'), 3,65 (2H, m, C-6'), 3,89 (1H, m, C-6'), Ramnose: 4,84 (1H, d, C-1''), 3,91 (1H, m, C-2''), 3,60 (1H, m, C-3''), 3,40 (1H, m, C-4''), 3,92 (1H, m, C-5''), 1,28 (3H, s, C-6''), Ramnose: 5,20 (1H, d, C-1'''), 3,83 (1H, m, C-2'''), 3,65 (1H, m, C-3'''), 3,39 (1H, m, C-4'''), 4,13 (1H, m, C-5'''), 1,25 (3H, d, C-6'''), ¹³C RMN δc (MeOD, 400 MHz): 38,70 (C-1), 30,76 (C-2), 79,31 (C-3), 39,41 (C-4), 141,13 (C-5), 123,12 (C-6), 31,48 (C-7), 33,02 (C-8), 51,53 (C-9), 37,93 (C-10), 21,71 (C-11), 41,47 (C-12), 41,81 (C-13), 61,19 (C-14), 80,46 (C-15), 91,64 (C-16), 60,55 (C-17), 17,92 (C-18), 19,80 (C-19), 41,83 (C-20), 15,12 (C-21), 110,54 (C-22), 78,68 (C-23), 31,48 (C-24), 35,12 (C-25), 183,24 (C-26), 16,30 (C-27), 100,42 (C-1'), 80,01 (C-2'), 78,06 (C-3'), 79,27 (C-4'), 8,68 (C-5'), 61,90 (C-6'), 103,01 (C-1''), 72,19 (C-2''), 72,19 (C-3''), 73,74 (C-4''), 70,68 (C-5''), 17,86 (C-6''), 102,03 (C-1'''), 72,45 (C-2'''), 72,37 (C-3'''), 73,94 (C-4'''), 69,79 (C-5'''), 17,97 (C-6''').

(22S,23R,25R)-3β,23-Diidroxiespirost-5-en-26-ona 3-O-{α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-β-D-glicopiranosídeo} (**3**): sólido incolor, [α]_D²¹-113,414 (c. 0,1, MeOH), IV (ATR) ν_{máx} cm⁻¹: 3371, 1757, 1378, 1453, 2932, 1033, EMAR modo positivo: m/z 921,4479 [M+Na]⁺ (calcd. 921,4422, Δ = 2,6 ppm), ¹H RMN δ_H (MeOD, 400 MHz): 1,06 (1H, m, C-1), 1,86 (1H, m, C-1), 1,60 (1H, m, C-2), 1,91 (1H, m, C-2), 3,51 (1H, m, C-3), 2,44 (1H, m, C-4), 2,29 (1H, m, C-4), 5,37 (1H, br s, C-6), 2,70 (1H, m, C-7), 1,94 (1H, m, C-7), 1,64 (1H, m, C-8), 1,02 (1H, d, C-9), 1,52 (1H, m, C-11), 1,20 (1H, s, C-12), 1,78 (1H, m, C-12), 1,23 (1H, s, C-14), 1,96 (1H, m, C-15), 1,52 (1H, m, C-15), 4,58 (1H, m, C-16), 1,79 (1H, m, C-17), 0,81 (3H, s, C-18), 1,04 (3H, s, C-19), 2,47 (1H, s, C-20), 1,02 (3H, d, C-21), 4,38 (1H, dd, C-23), 2,70 (1H, m, C-24), 1,59 (1H, m, C-24), 2,82 (1H, m, C-25), 1,19 (3H, d, C-27), Glucose: 4,49 (1H, d, C-1'), 3,40 (1H, m, C-2'), 3,58 (1H, m, C-3'), 3,32 (1H, m, C-4'), 3,58 (1H, m, C-5'), 3,65 (1H, m, C-6'), 3,80 (1H, m, C-6'), Ramnose: 4,84 (1H, m, C-1''), 3,92 (1H, m, C-2''), 3,66 (1H, m, C-3''), 3,39 (1H, m, C-4''), 3,92 (1H, m, C-5''), 1,28 (3H, s, C-6''), Ramnose: 5,20 (1H, d, C-1'''), 3,88 (1H, m, C-2'''), 3,65 (1H, m, C-3'''), 3,39 (1H, m, C-4'''), 4,12 (1H, m, C-5'''), 1,25 (3H, d, C-6'''), ¹³C RMN δc (MeOD, 400 MHz): 38,06 (C-1), 30,75 (C-2), 79,98 (C-3), 39,48 (C-4), 141,90 (C-5), 122,62 (C-6), 31,50 (C-7), 32,68 (C-8), 51,72 (C-9), 37,82 (C-10), 21,91 (C-11), 40,98 (C-12), 42,06 (C-13), 57,68 (C-14), 32,68 (C-15), 83,15 (C-16), 63,40 (C-17), 16,37 (C-19), 19,83 (C-19), 37,80 (C-20), 15,19 (C-21), 110,45 (C-22), 78,83 (C-23), 31,48 (C-24), 35,15 (C-25), 183,24 (C-26), 16,38 (C-27), 100,48 (C-1'), 79,30 (C-2'), 78,05 (C-3'), 76,57 (C-4'), 78,84 (C-5'), 61,95 (C-6'), 103,01 (C-1''), 72,19 (C-2''), 72,19 (C-3''), 73,74 (C-4''), 69,78 (C-5''), 17,86 (C-6''),

102,31 (C-1'''), 72,44 (C-2'''), 72,36 (C-3'''), 73,94 (C-4'''), 69,81 (C-5'''), 17,98 (C-6''').

Métodos espectroscópicos e espectrométricos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetros Bruker® Ascend, operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C), e 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C). As amostras para as análises foram solubilizadas em solvente deuterado (MeOD) e referenciadas pelo sinal do solvente (δ_{H} 3,30 ppm e δ_{C} 49 ppm).

Os espectros de massas das substâncias foram obtidos em modo de ionização positivo pela técnica de Ionização Eletrospray, no modo positivo, utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução (Bruker, MicroTOF II).

As rotações específicas das substâncias foram realizadas no polarímetro do modelo Polarimeter, série P-200 da JASCO, com a temperatura do ambiente estabelecida em 21,68 °C.

Os espectros de ATR-Infravermelho foram adquiridos em Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier, IRSpirit-X da Shimadzu. Para as aquisições 1 mg de cada amostra foi solubilizada em 200 μL de Metanol grau HPLC.

Material Suplementar

Espectros 1D, 2D RMN, Infravermelho e de EM para os compostos 1–3 estão disponíveis como material suplementar, Figuras 1S-27S.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pelas bolsas concedidas ao Prof. Josean Fachine Tavares, Marcelo Sobral da Silva e ao aluno Thiago Araújo de Medeiros Brito. Projeto INCT-RENNOFITO 465536/2014-0 e Projeto Universal 403382/2023-8. E a CAPES pela bolsa (código 001) concedida a aluna Anauara Lima e Silva.

Referências

- Agra, M. F., and Nee, M.. A new species of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* (Solanaceae) from northeastern Brazil. *Brittonia* **1997**, 49, 350-353. <https://doi.org/10.2307/2807835>
- Cavalcante, F.A., da Silva, J. L. V., Medeiros, A. F. D., & de Sousa Claudino, F. *Solanum jabrense* Agra & M. Nee (Solanaceae) exhibits spasmolytic activity on guinea-pig ileum. *Journal of Medicinal Plants Research* **2013**, 7 (13), 772-776. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.715>
- Cornelius, M. T., Carvalho, M. G. D., Silva, T., Alves, C. C., Siston, A. P., Alves, K. Z., Sant'Anna, C.M.R., Neto, M.B., Eberlin, M.N. & Braz-Filho, R. Other chemical constituents isolated from *Solanum crinitum* Lam. (Solanaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21, 2211-2219. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010001200007>
- El-Hawary, S. S., Mohammed, R., AbouZid, S. F., Bakeer, W., Ebel, R., Sayed, A. M., & Rateb, M. E. Solamargine production by a fungal endophyte of *Solanum nigrum*. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, 120(4), 900-911. <https://doi.org/10.1111/jam.13077>
- Ferreira, F., Vazquez, A., Moyna, P., & Kenne, L.. Foliumin, a spirosten lactone saponin from *Solanum amygdalifolium*. *Phytochemistry* **1994**, 36(6), 1473-1478. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89745-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89745-9)
- Hilgenhof, R., Gagnon, E., Knapp, S., Aubriot, X., Tepe, E. J., Bohs, L., Giacomini, L. L., Gouvêa, Y. F., Martine, C.T. Orejuela, A., Orozco, C. I., Peralta, I. E. and Särkinen, T.. Morphological trait evolution in *Solanum* (Solanaceae): Evolutionary lability of key taxonomic characters. *Taxon* **2023**, 72(4), 811-847. <https://doi.org/10.1002/tax.12990>
- Kadima, J. N., Kasali, F. M., Bavhure, B., Mahano, A. O., & Bwironde, F. M. Comparative antidiabetic potential and survival function of *Harungana madagascariensis*, *Physalis peruviana*, *Solanum americanum* and *Tithonia diversifolia* extracts on alloxan-induced diabetes in guinea-pigs. *Int J Pharm Pharm Res* **2016**, 5(3), 196-206.
- Kaunda, J.S., and Zhang, Y.J. (2019). O gênero *Solanum*: uma revisão etnofarmacológica, fitoquímica e de propriedades biológicas. *Produtos naturais e bioprospecção* **2019**, 9 (2), 77-137. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0201-614>

- Liu, Y., Ma, G. Q., Wu, J. T., Zhang, Y. Q., Xu, Z. P., Naseem, A., ... Yang, B. Y. Three new compounds from the fruits of *Solanum virginianum* L. and their anti-inflammatory activities. *Nat. Prod. Res.* **2024**, 1–11. <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2377309>
- Manoharan, R., Nair, CS, Eissa, N., Cheng, H., Ge, P., Ren, M., & Jaleel, A. Potencial terapêutico de alcalóides de *Solanum* com ênfase especial em câncer: uma revisão abrangente. *Drug Design, Development and Therapy* **2024**, 3063-3074. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S470925>
- Núñez-Mojica, G., Rivas-Galindo, V.M., Garza-González, E. et al. Antimicrobial and antileishmanial activities of extracts and some constituents from the leaves of *Solanum chrysotrichum* Schldl. *Med Chem Res* **30** **2021**, 152–162. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02648-8>
- Panda, T., Mishra, N., Rahimuddin, S., Pradhan, B. K., Apollo, M., & Mohanty, R. B. Diversity and Ethnobotanical Significance of Wild *Solanum* Species in Odisha, India. *Majalah Obat Tradisional* **2024**, 29(3), 344-356. <https://doi.org/10.22146/mot.89633>
- Pinto, F. D. C. L., Uchoa, D. E. D. A., Silveira, E. R., Pessoa, O. D. L., Braz-Filho, R., Silva, F. M., Theodoro, P.N.E.T. & Espíndola, L. S. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. *Quim. nova* **2011**, 34, 284-288. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000200021>
- Puri, R., Wong, T. C., & Puri, R. K.. Solasodine and diosgenin: ¹H and ¹³C assignments by two-dimensional NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, 31(3), 278-282. <https://doi.org/10.1002/mrc.1260310313>
- Silva, T.M.S., Câmara, C.A., Agra, M.F., Carvalho, M.G., Frana, M.T., Brandoline, S.V.P.B., Paschoal, L.S. e Braz-Filho, R.. Atividade moluscicida de espécies de *Solanum* do Nordeste do Brasil sobre *Biomphalaria glabrata*. *Fitoterapia* **2006**, 77 (6), 449-452. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.05.007>
- Silva, E. L., Almeida-Lafetá, R. C., Borges, R. M., & Staerk, D. Dual high-resolution inhibition profiling and HPLC-HRMS-SPE-NMR analysis for identification of α -glucosidase and radical scavenging inhibitors in *Solanum americanum* Mill. *Fitoterapia* **2017**, 118, 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.02.002>
- Silva, L. D. O., Rosado, C. P., Samary, M., Cruz, M. A. D. A. S., Montenegro, J., da Silva, G. R. P., & Nunes, J. C. Antioxidant capacity, antitumor activity and metabolomic profile of tamarillo (*Solanum betaceum*). *Int. J. Food Sci. Technol.* **2024**, 59(9), 6267-6276. <https://doi.org/10.1111/ijfs.17363>

- Sitapha, O., Elisée, K. K., Mathieu, K. A. K., Desire, A. F. H., Francis, Y. A., & Joseph, D. A. A Comparative Study of the Antifungal Activity of Fresh and Dried *Solanum anguivi* Fruits on *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum*. *Eur. J. Med. Plants* **2024**, 35(1), 26-34. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2024/v35i11176>
- Vázquez, A., Ferreira, F., Moyna, P., & Kenne, L.. Elucidación estructural de glicosídeos de *Solanum amygdalifolium*. *Phytochem. Anal.* **1999**, 10 (4), 194-197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199907/08\)10:4<194::AID-PCA455>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199907/08)10:4<194::AID-PCA455>3.0.CO;2-L)
- Solanum* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14716>. Acesso em: 03 fev. 2025
- Xiang, M. L., Hu, B. Y., Qi, Z. H., Wang, X. N., Xie, T. Z., Wang, Z. J., ... & Luo, X. D. Chemistry and bioactivities of natural steroidal alkaloids. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2022**, 12(1), 23. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00345-0>
- Wanyonyi, A.W., Chhabra, S.C., Mkoji, G., Njue, W., & Tarus, P.K. (2003). Atividade moluscicida e antimicrobiana de *Solanum aculeastrum*. *Fitoterapia*, 74 (3), 298-301. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00030-3](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00030-3)
- Winkiel, M.J., Chowański, S., and Słocińska, M.. Atividade anticâncer de glicoalcalóides de plantas *Solanum*: Uma revisão. *Frontiers in Pharmacology* **2022**, 13, 979451. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.979451>
- Zhou, Y., Deng, Z. S., Cheng, F., Dong, W. J., Guo, Z. Y., Wang, J. Z., & Zou, K. A new Wutaifuranol derivative from *Solanum cathayanum*. *Chem. Nat. Compd.* **2016**, 52, 920-921. <https://doi.org/10.1007/s10600-016-1816-z>

MATERIAL SUPLEMENTAR

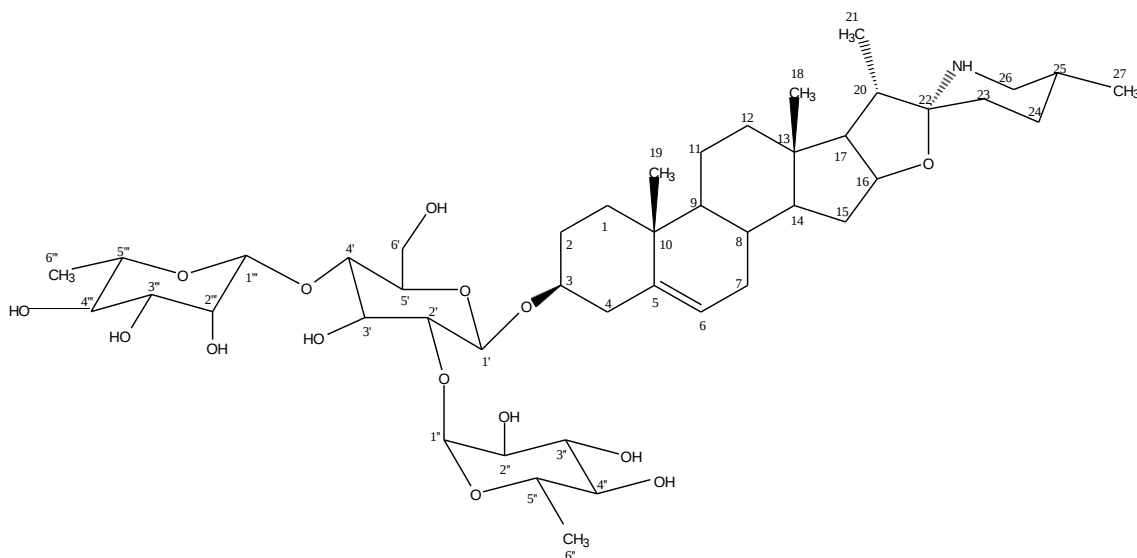


Figura 90. Estrutura do composto isolado 1.

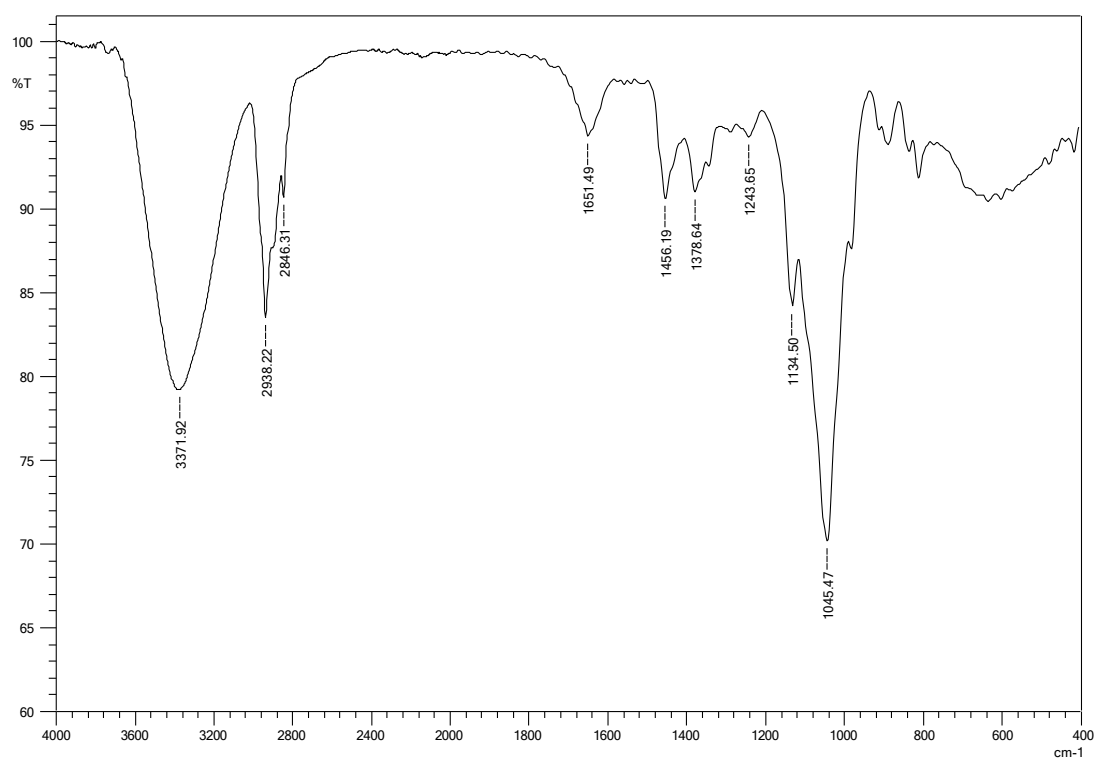


Figura 91. Espectro de Infravermelho (ATR) do composto 1.

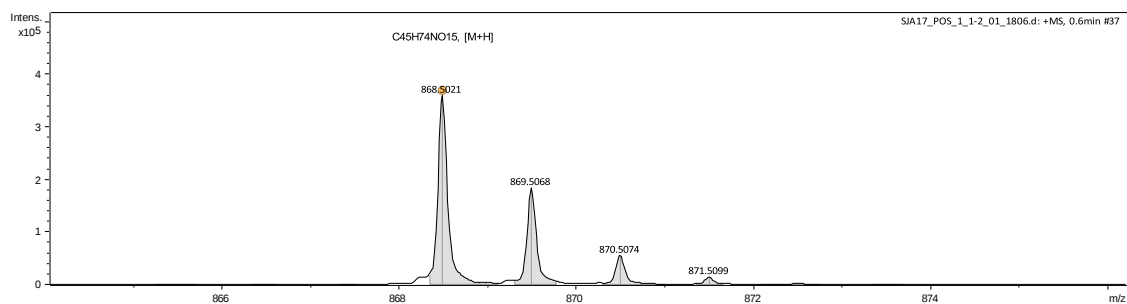
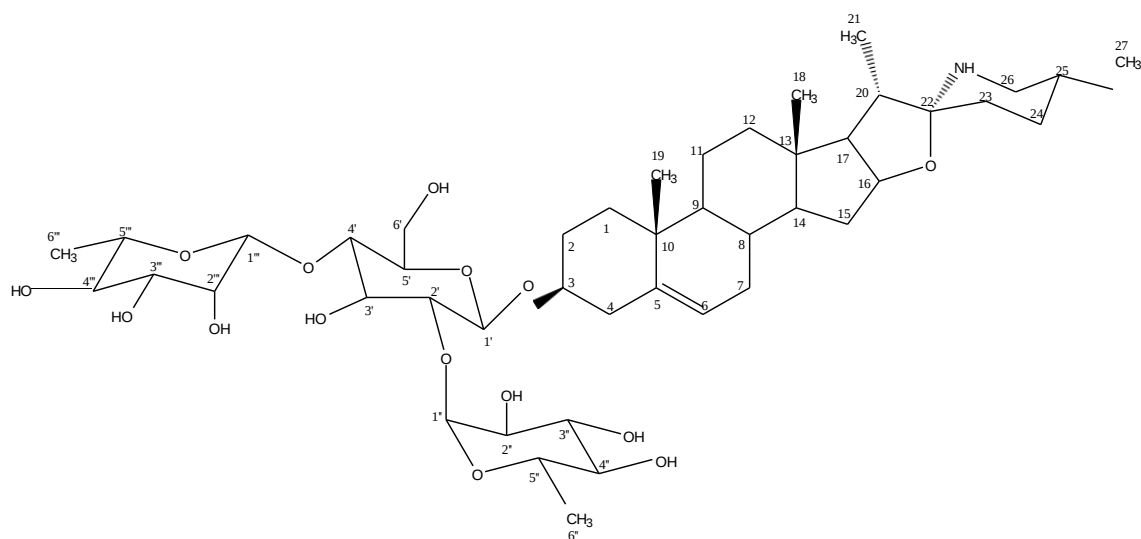


Figura 92. Espectro EMAR do composto 1 obtido no modo positivo $(M+H)^+$.

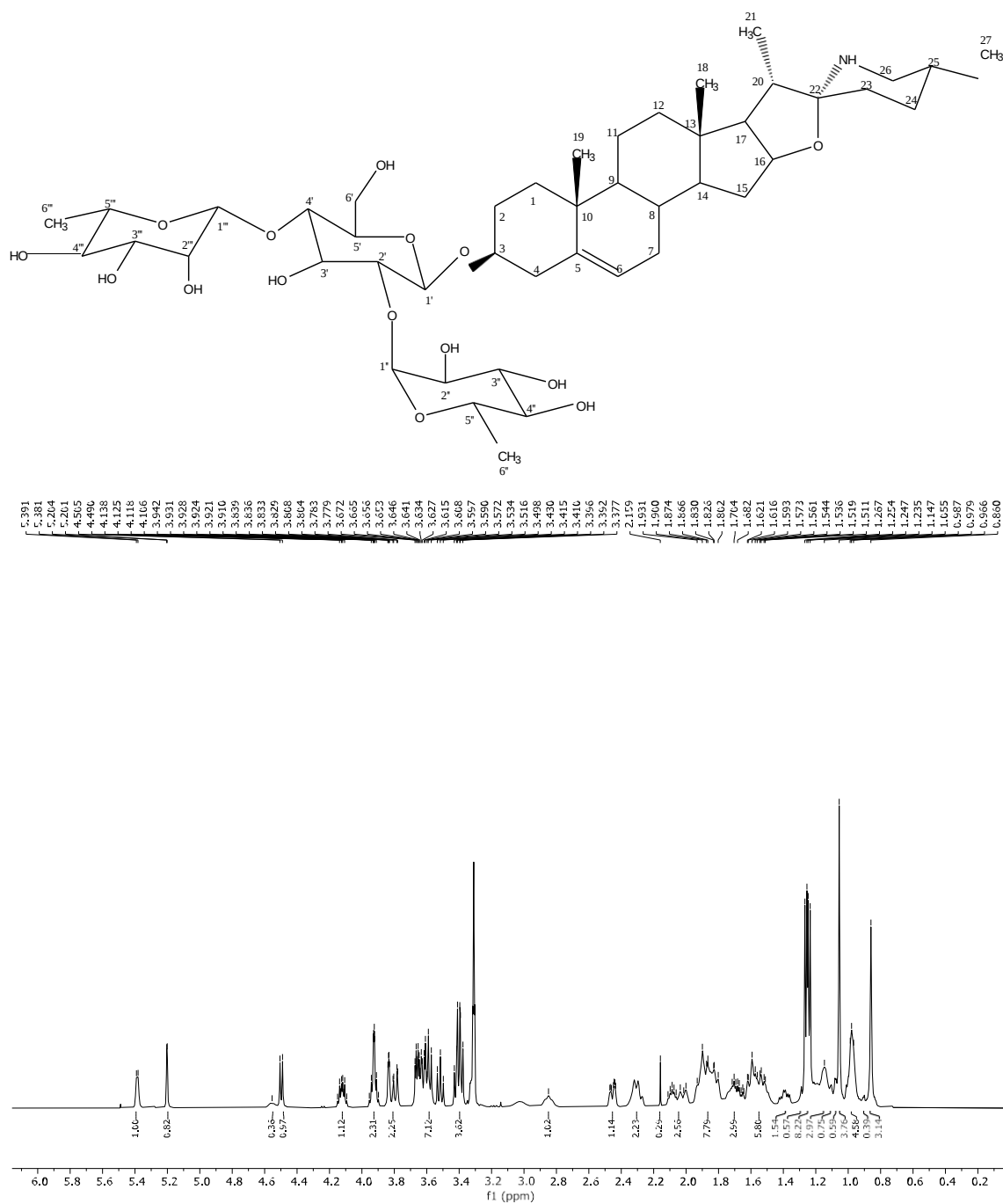


Figura 93. Espectro de RMN ^1H do composto 1 (400 MHz, MeOD).

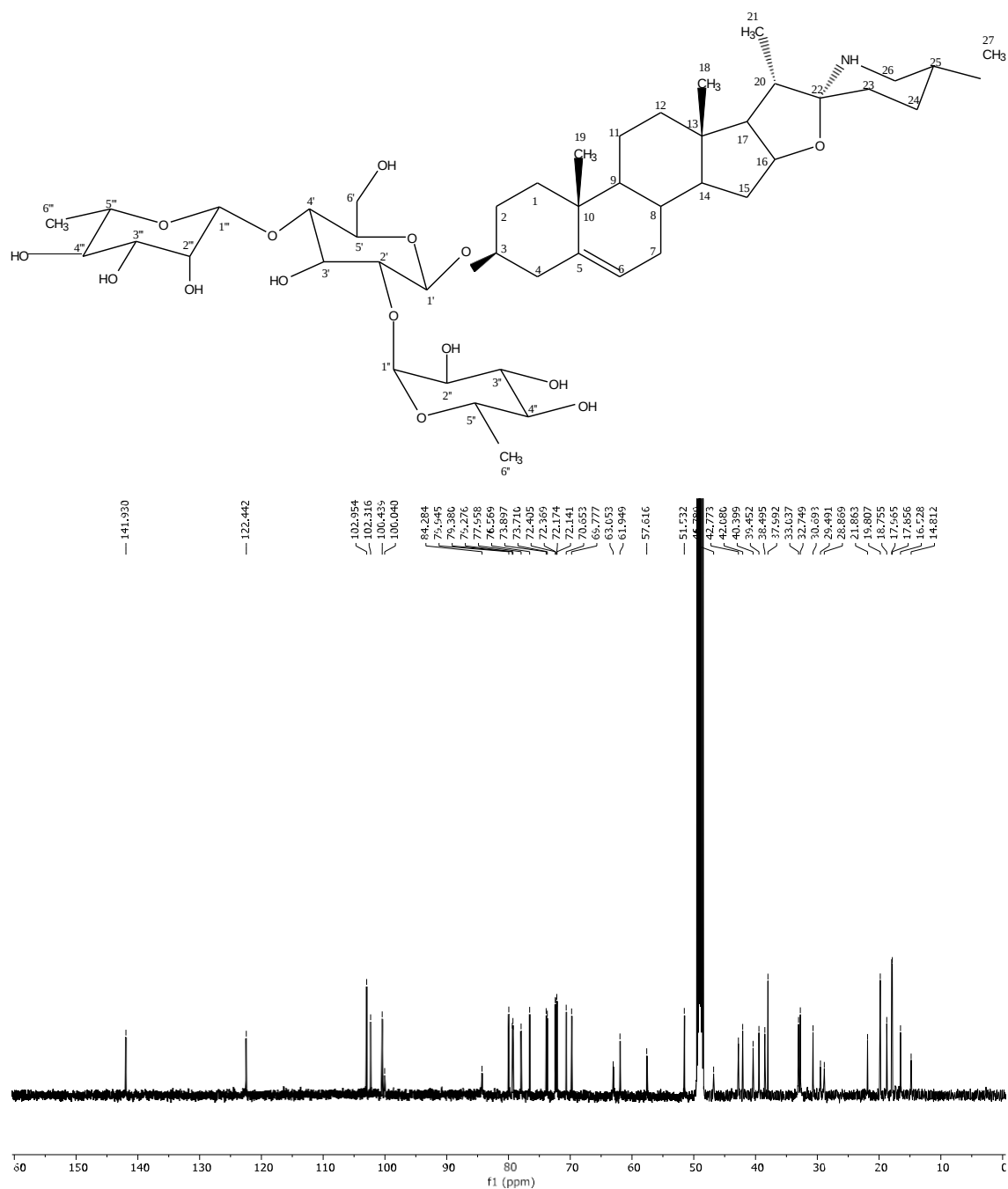


Figura 94. Espectro de RMN ^{13}C BB do composto 1 (100 MHz, MeOD).

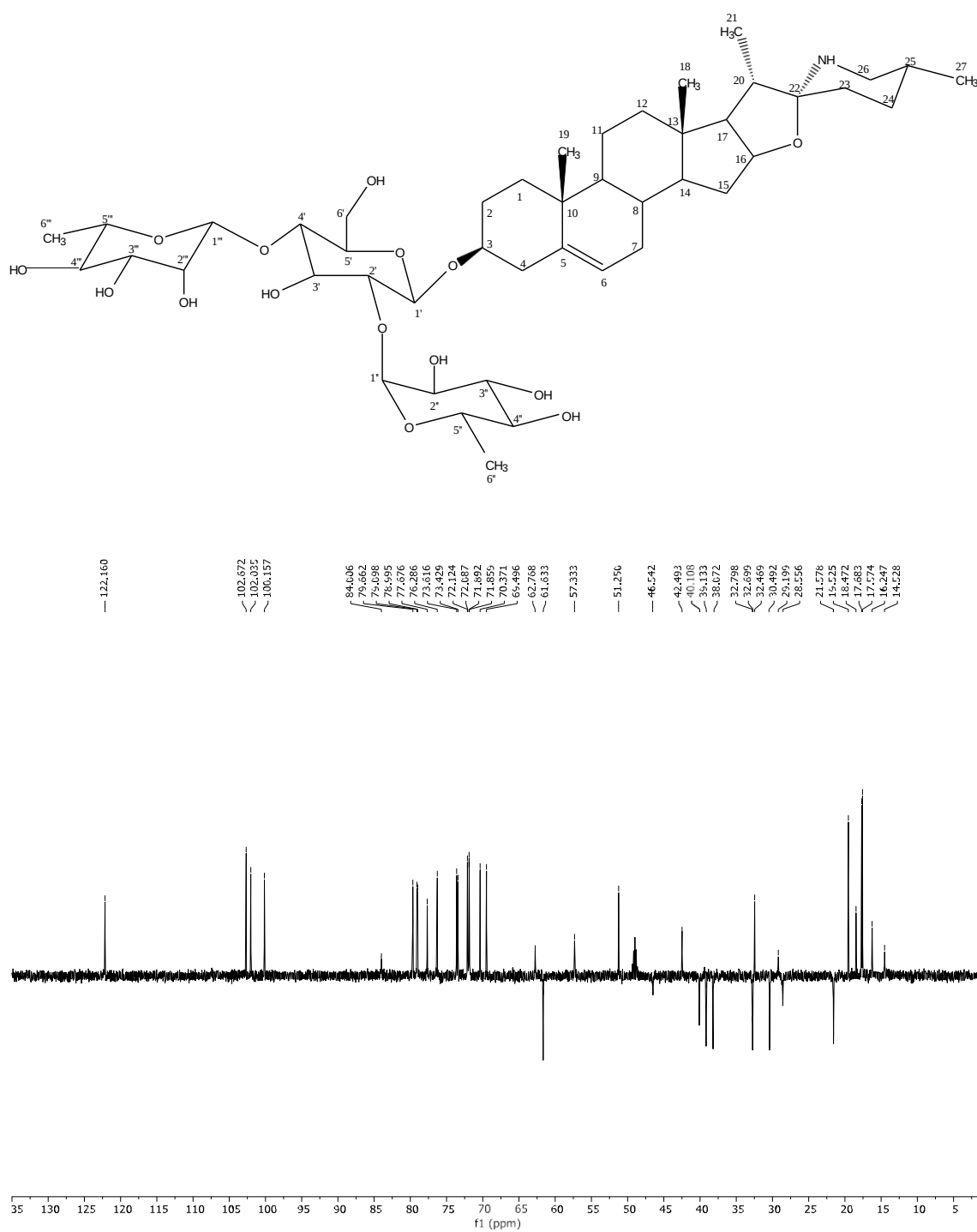


Figura 95. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 do composto 1 (100 MHz, MeOD).

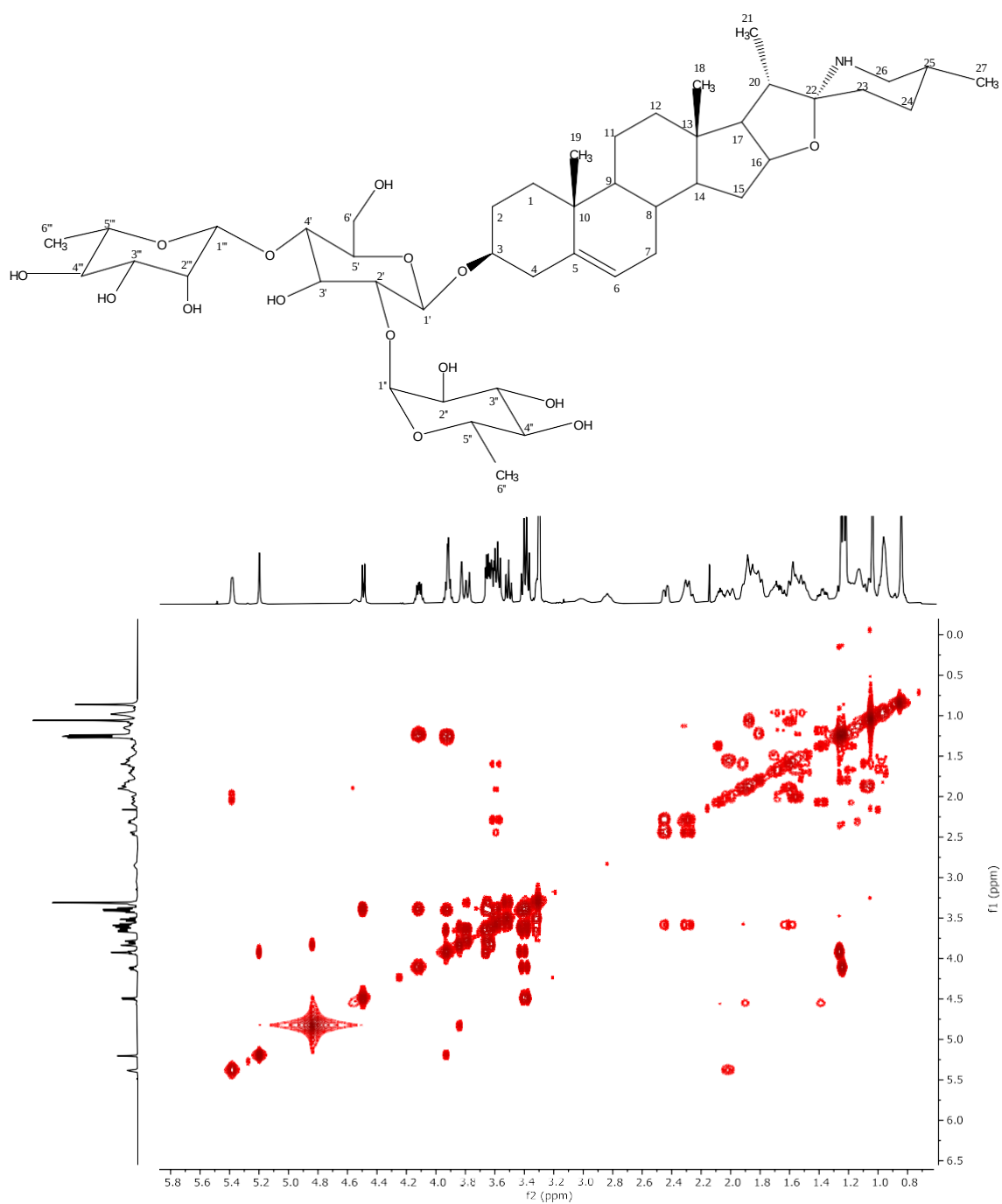


Figura 96. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY da estrutura 1 (400 MHz, MeOD).

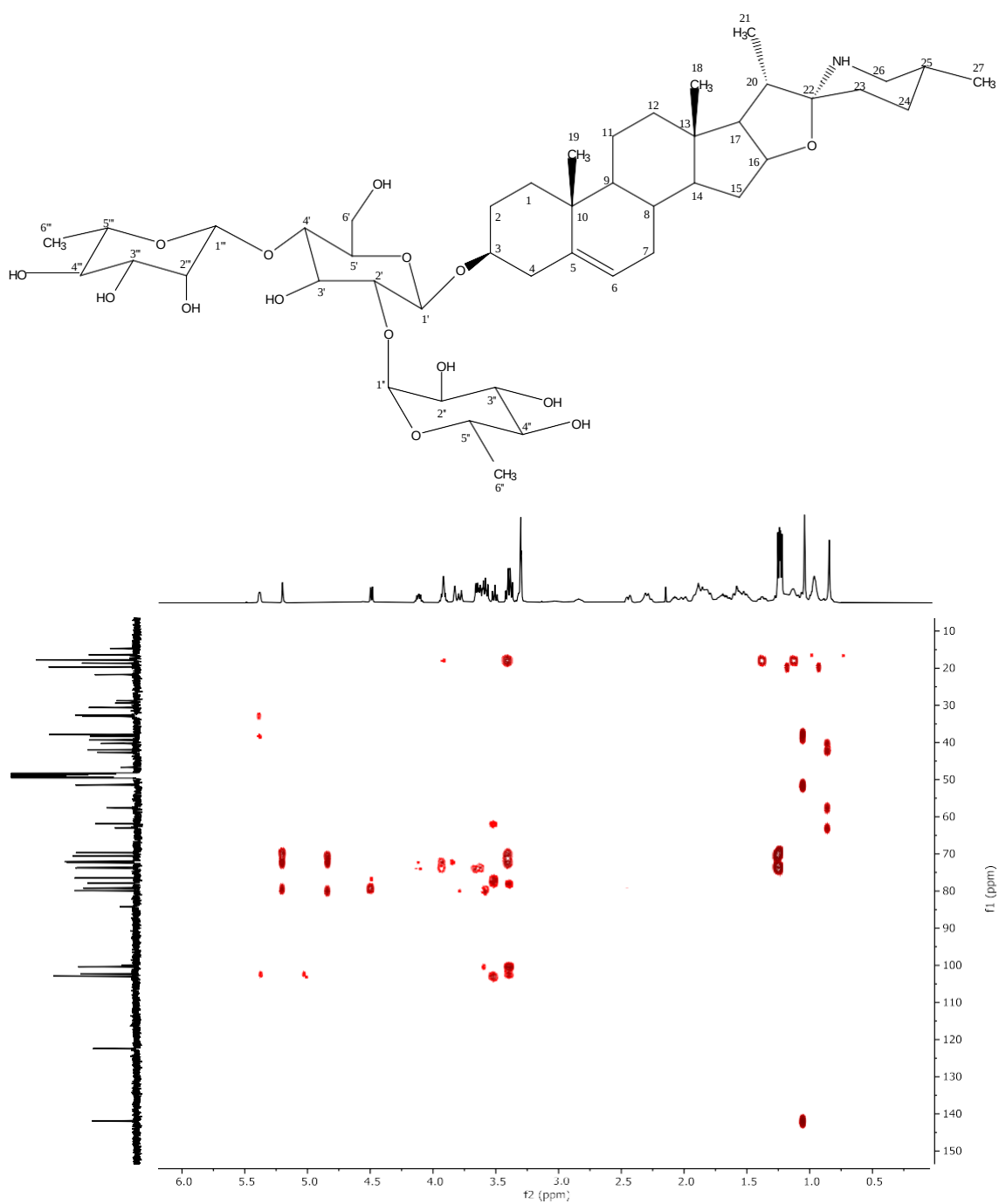


Figura 97. Espectro de RMN HMBC do composto 1 (400 MHz, MeOD).

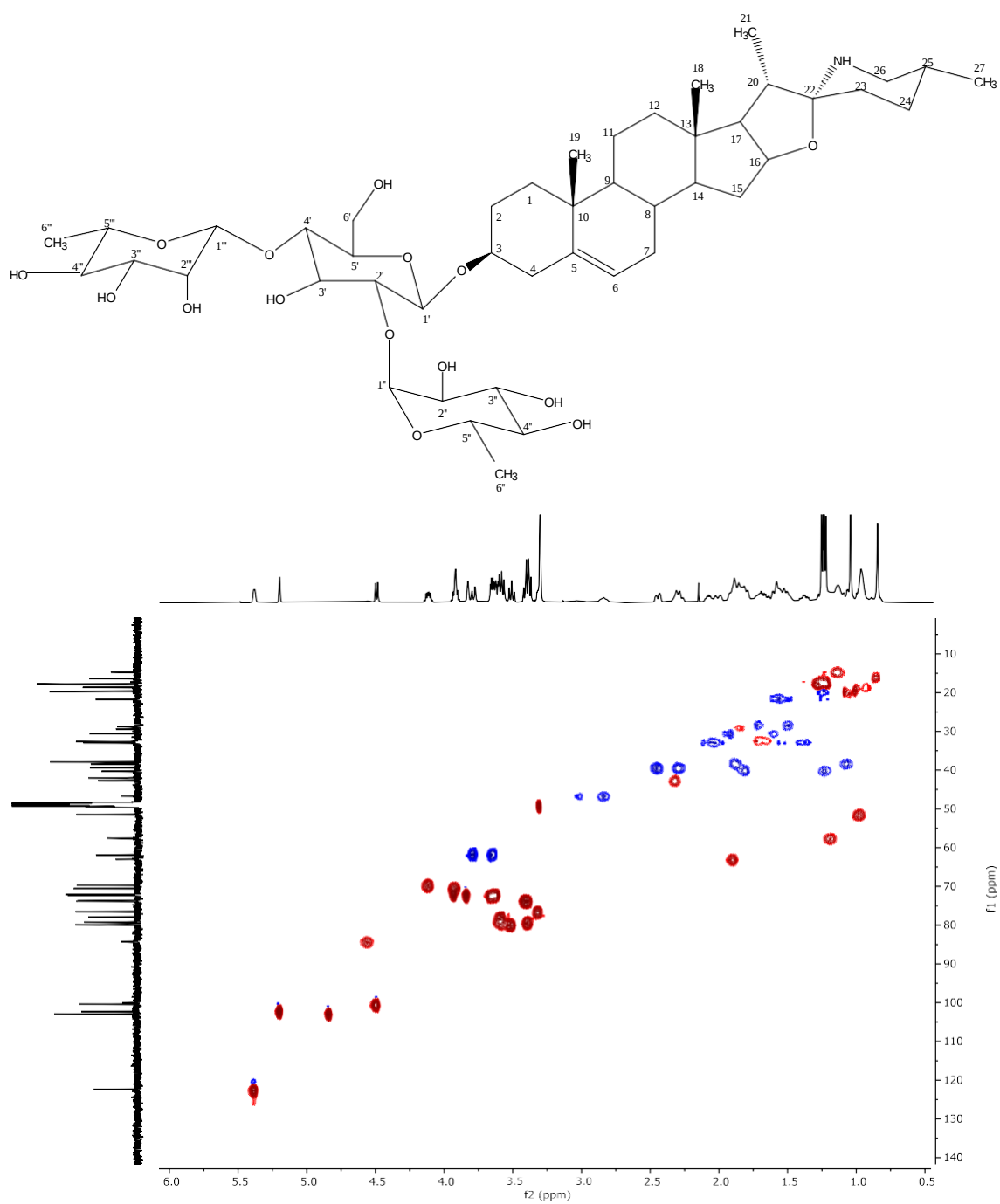


Figura 98. Espectro de RMN HSQC do composto 1 (400 MHz, MeOD).

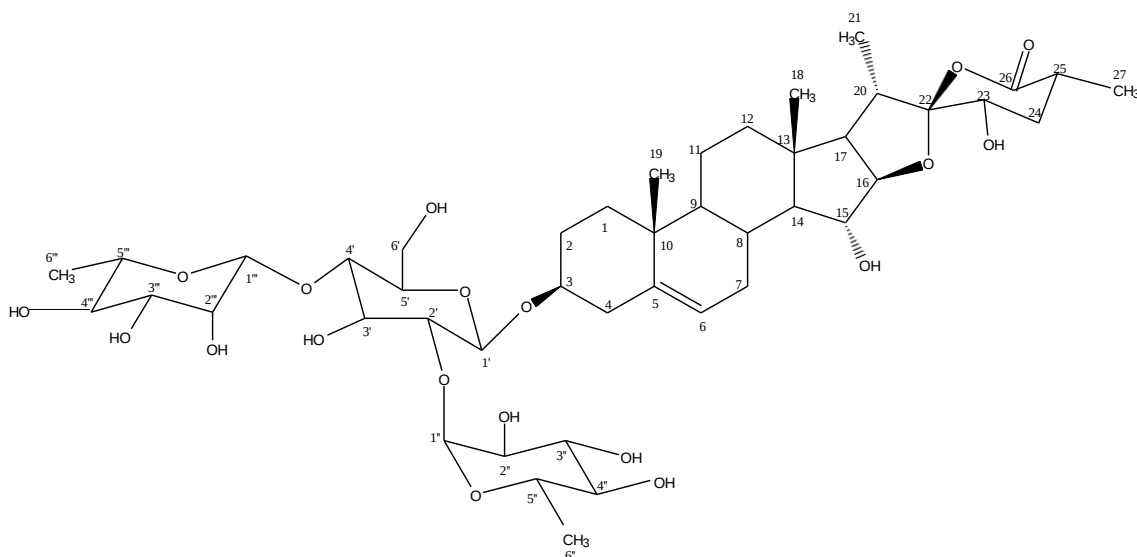


Figura 99. Estrutura do composto isolado 2.

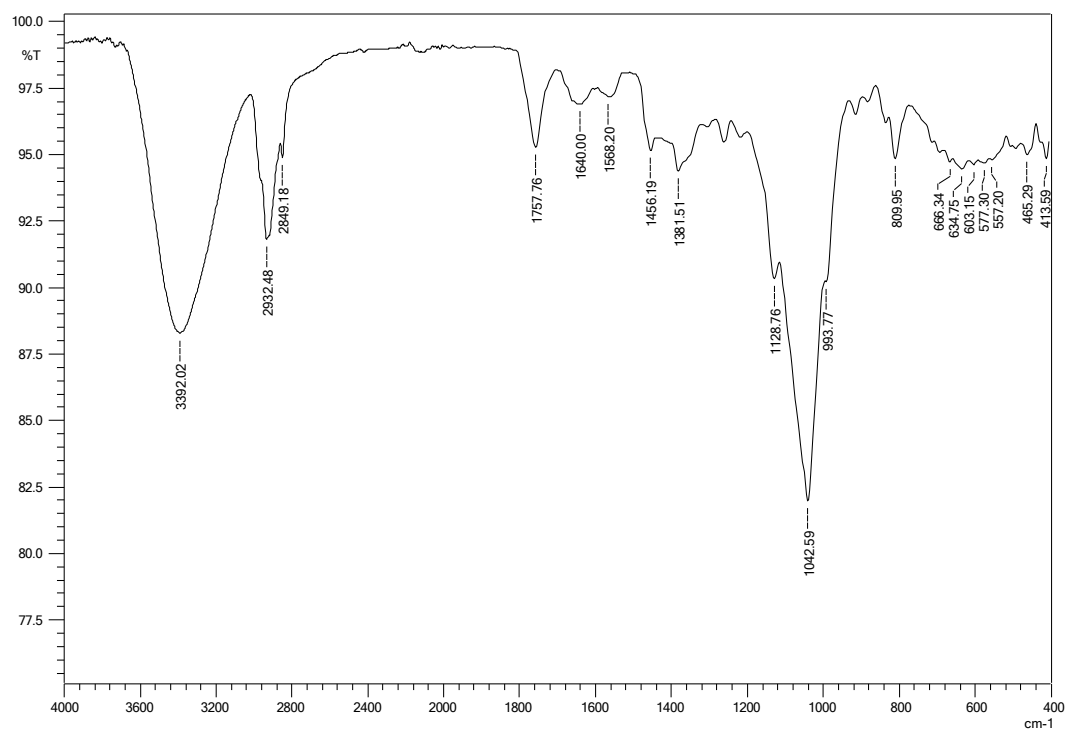


Figura 100. Espectro de Infravermelho (ATR) do composto 2.

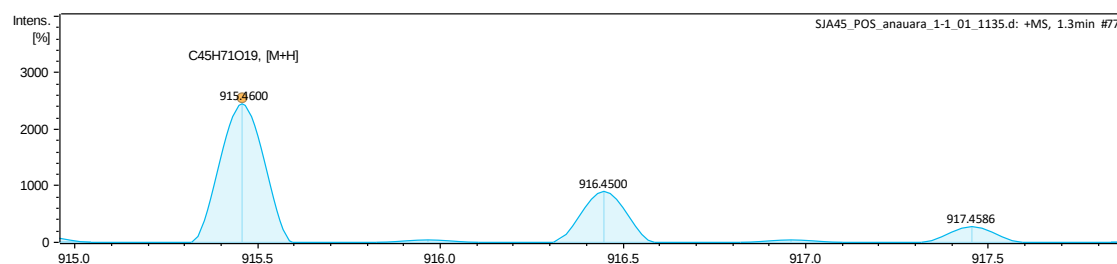


Figura 101. Espectro EMAR do composto 2 obtido no modo positivo ($M+H$)⁺.

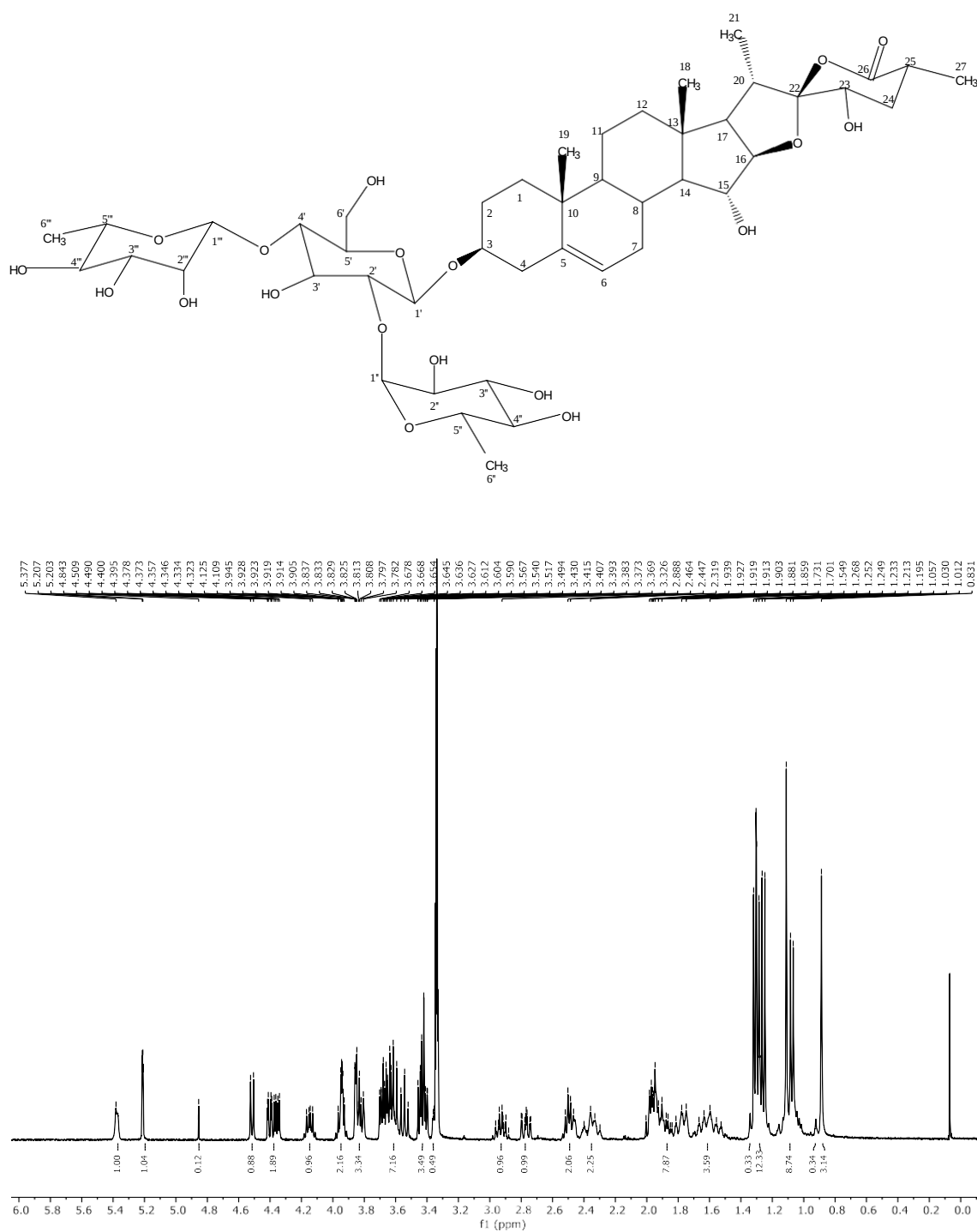


Figura 102. Espectro de RMN ^1H do composto 2 (400 MHz, MeOD).

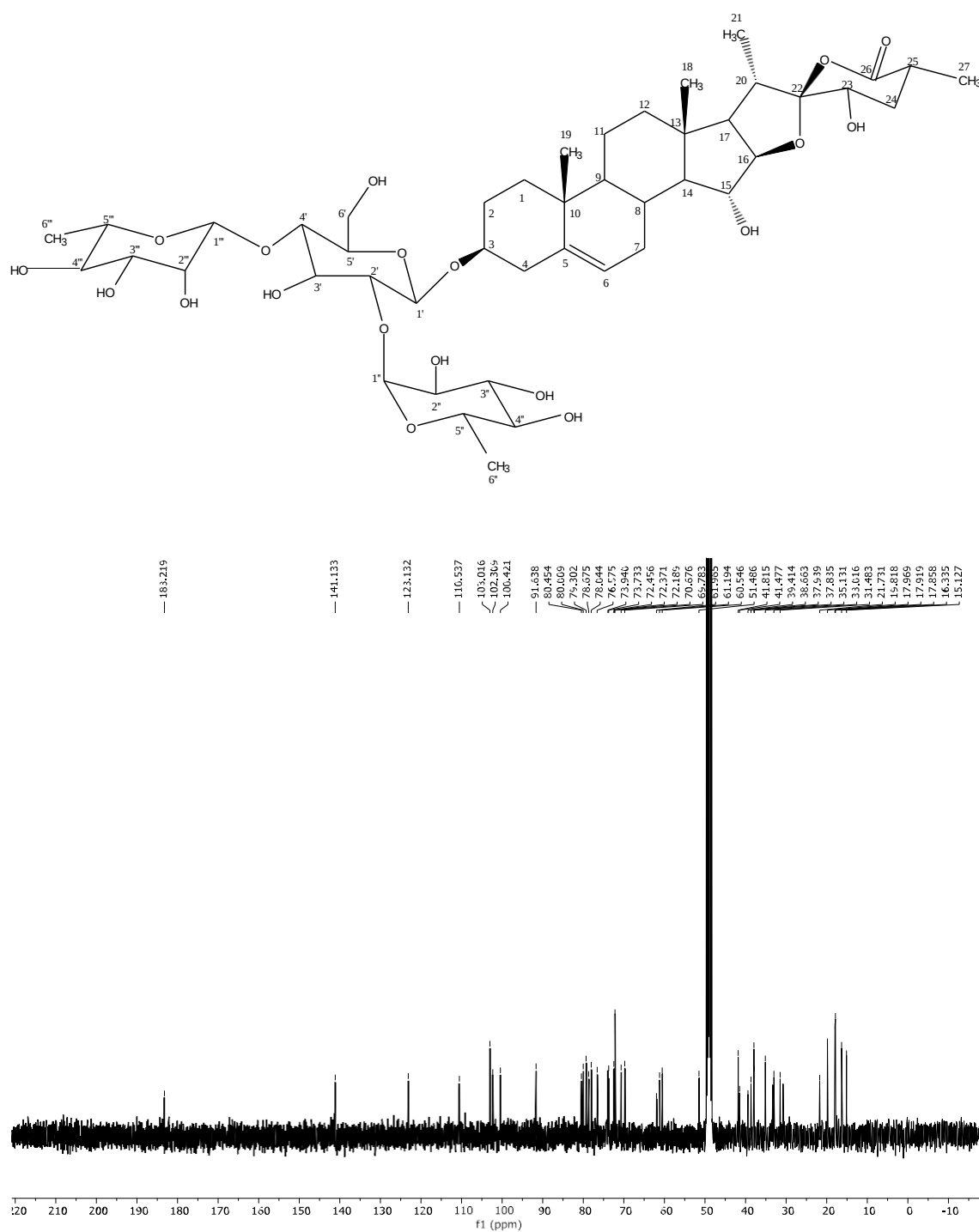


Figura 103. Espectro de RMN ^{13}C BB do composto 2 (100 MHz, MeOD).

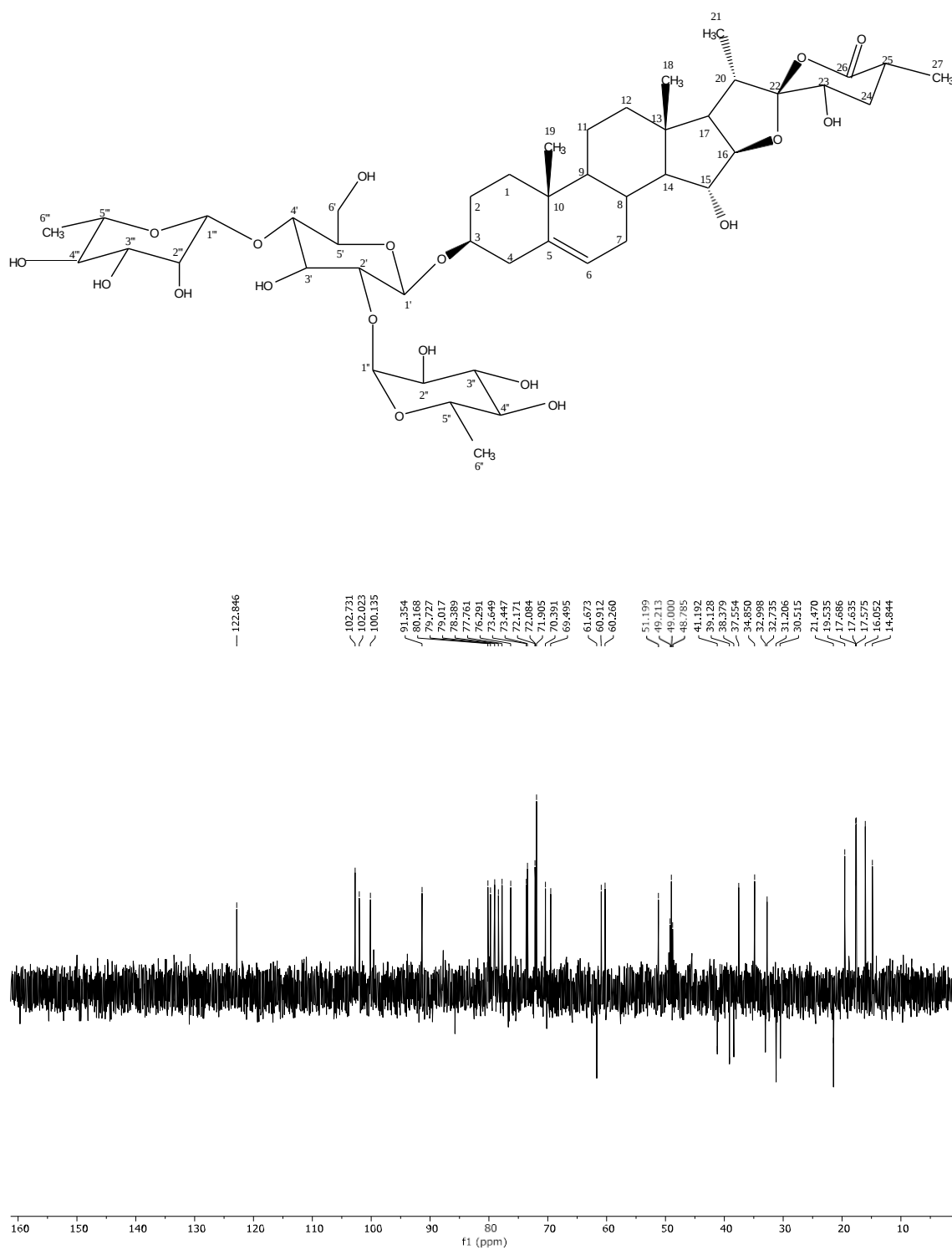


Figura 104. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 do composto 2 (100 MHz, MeOD).

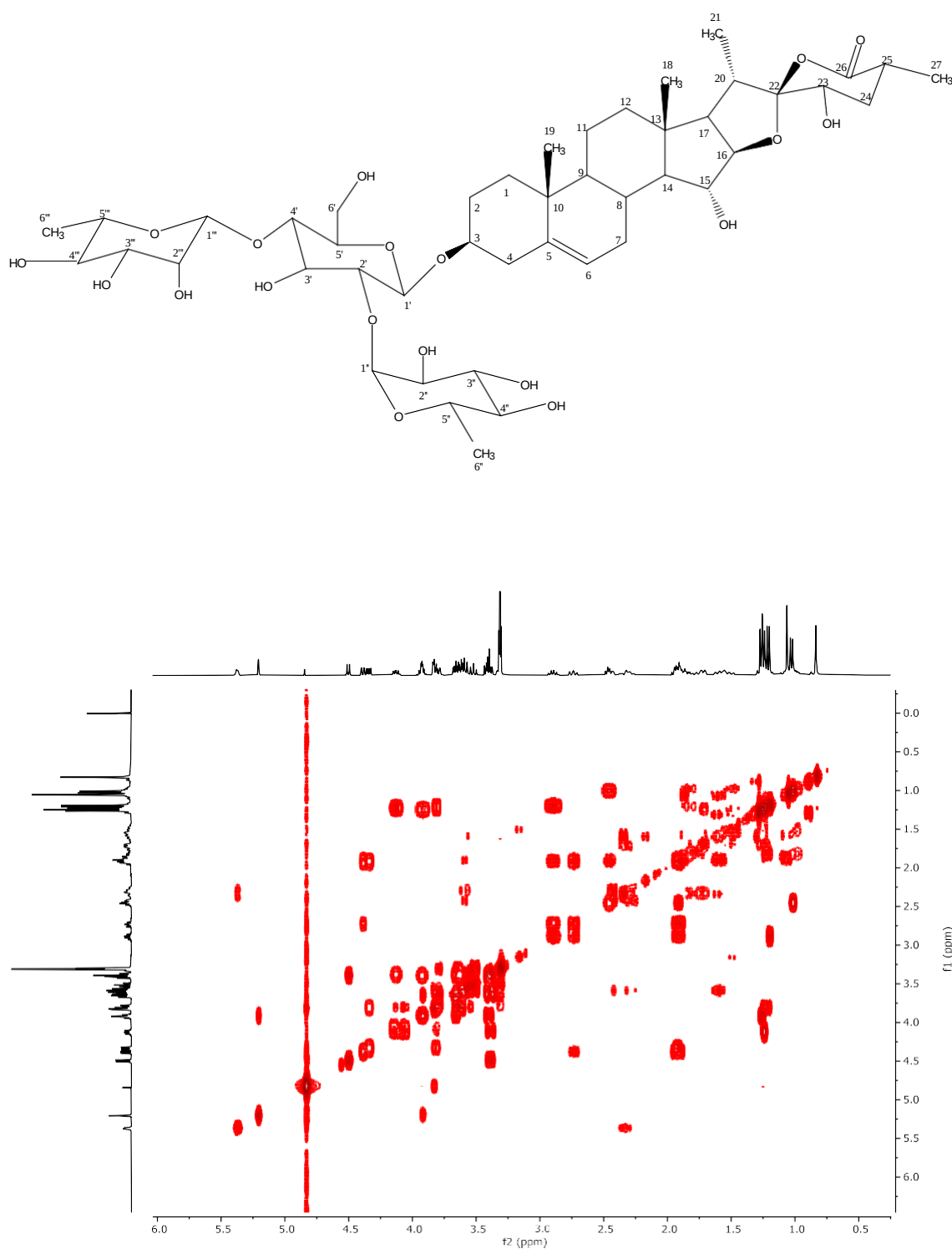


Figura 105. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY do composto 2 (400 MHz, MeOD).

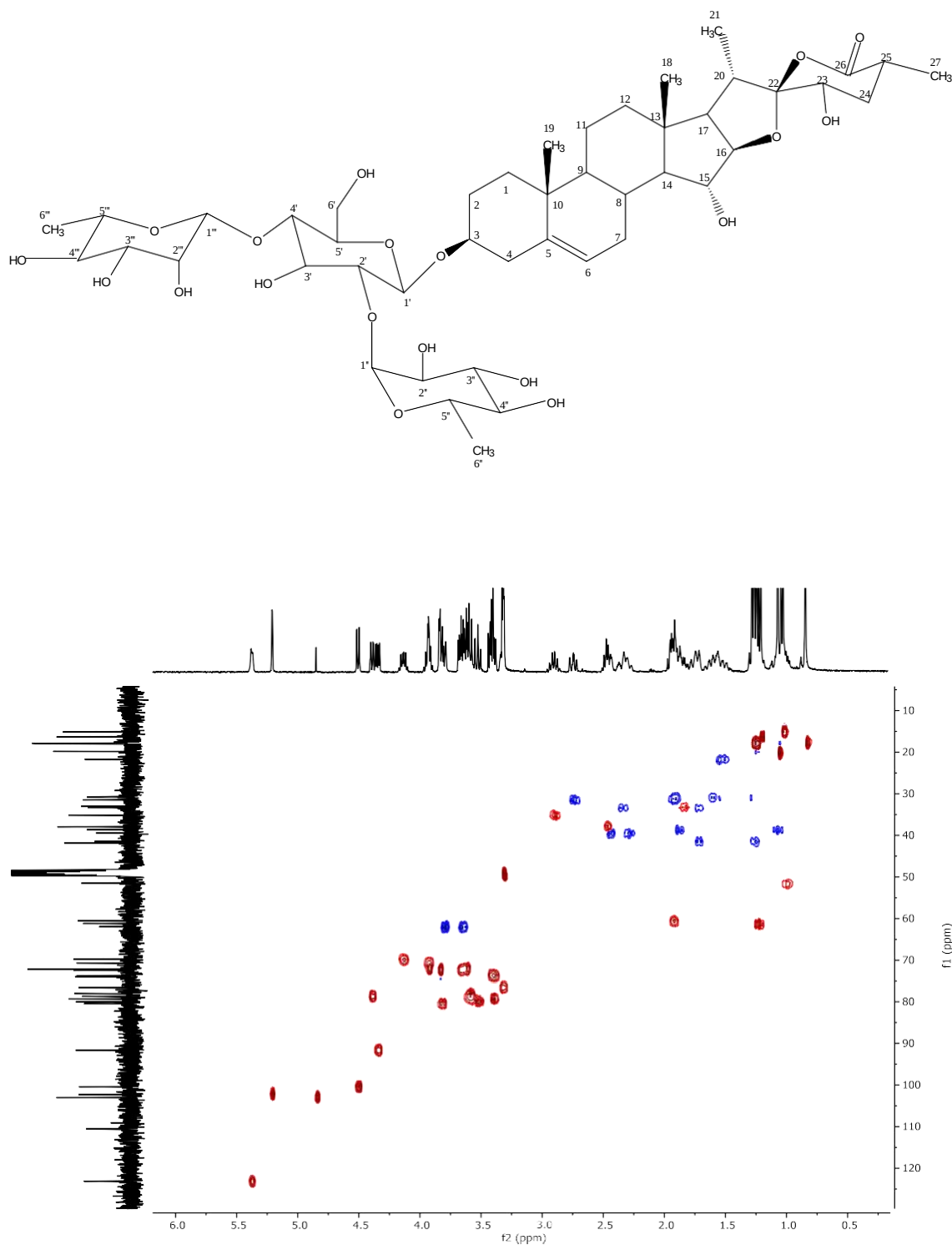


Figura 106. Espectro de RMN HSQC do composto 2 (400 MHz, MeOD).

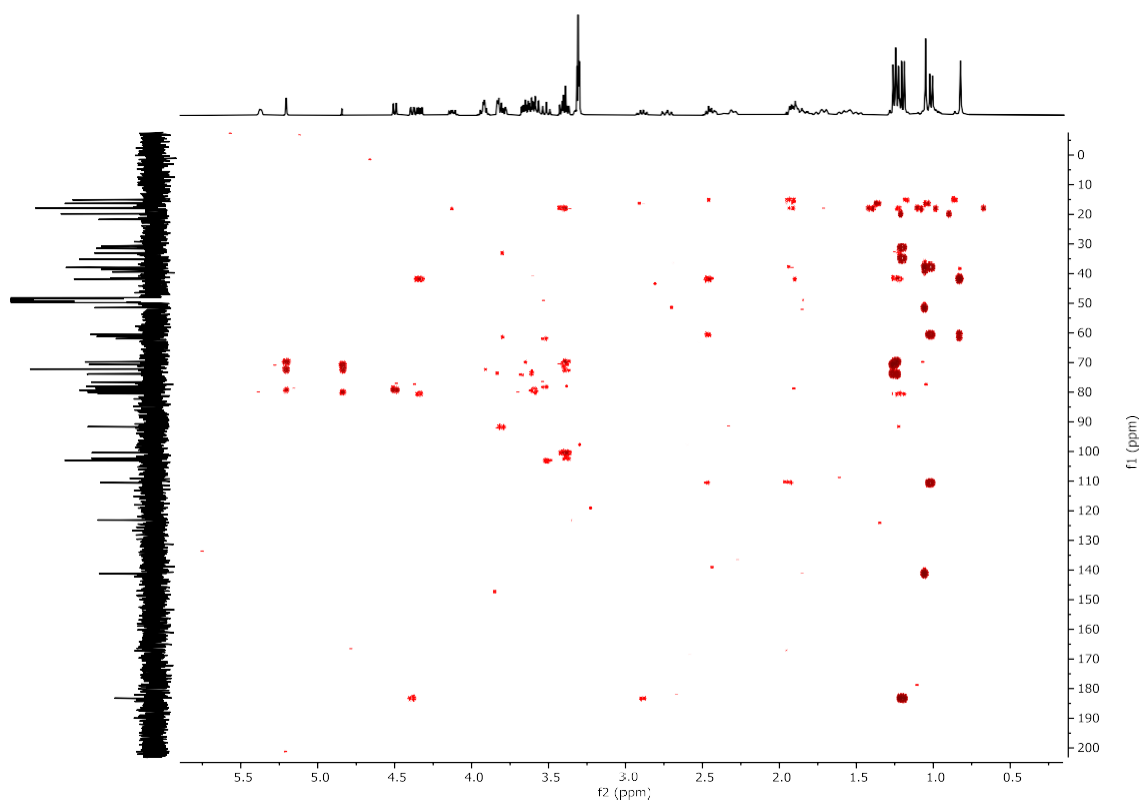


Figura 107. Espectro de RMN HMBC do composto 2 (400 MHz, MeOD).

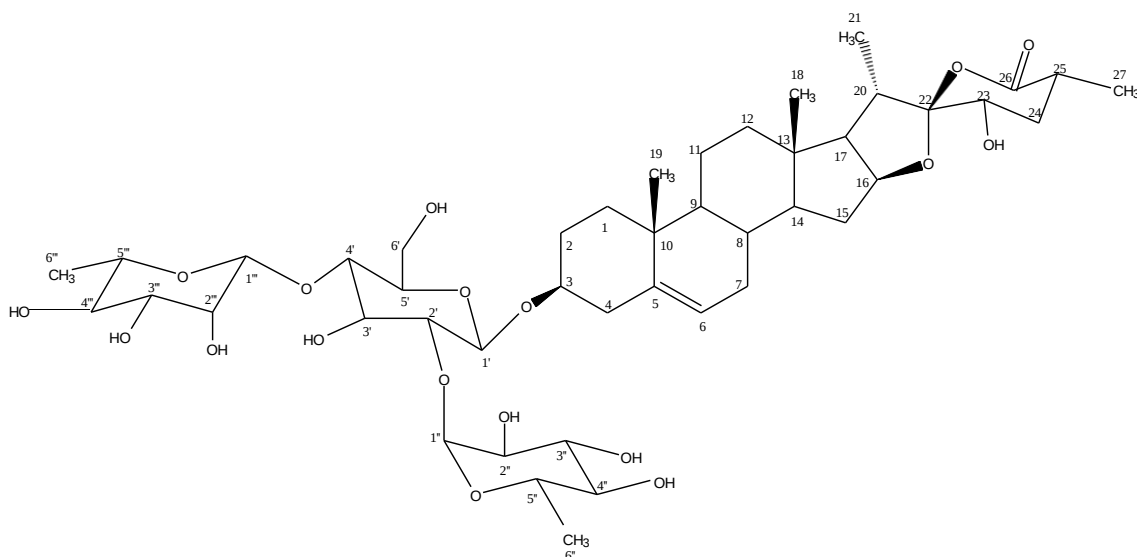


Figura 108. Estrutura do composto isolado 3.

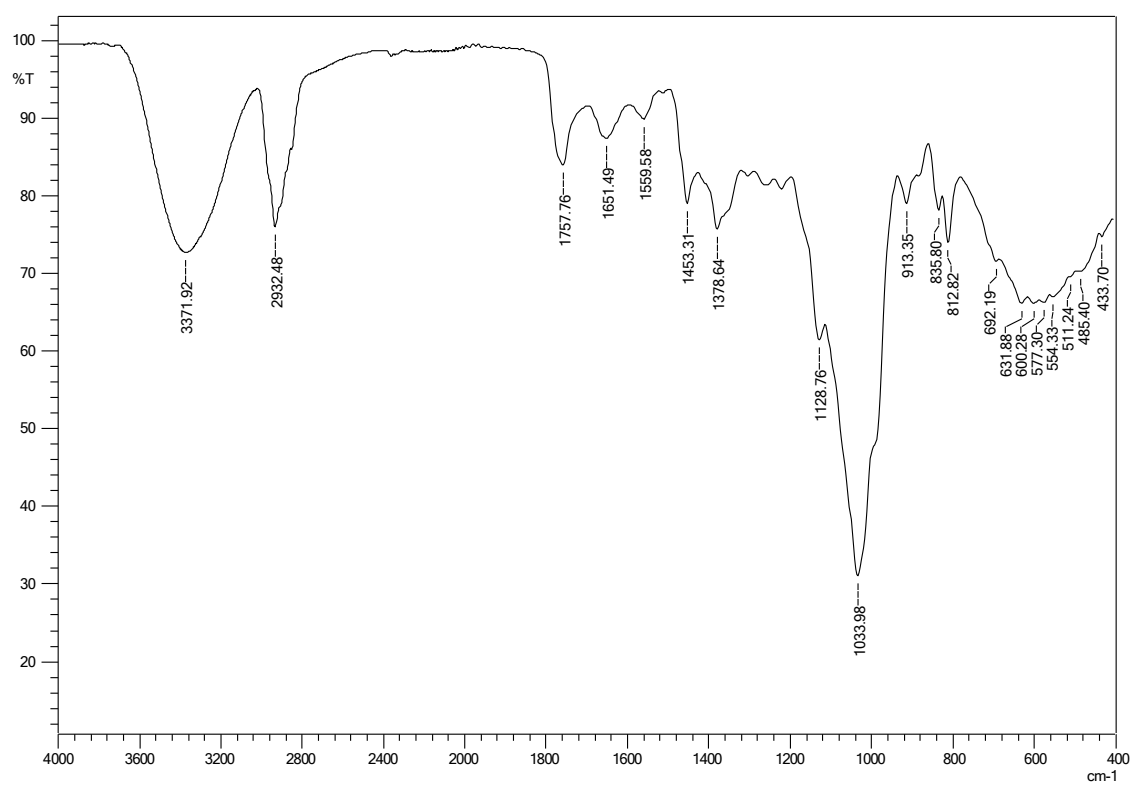


Figura 109. Espectro de Infravermelho (ATR) do composto 3.

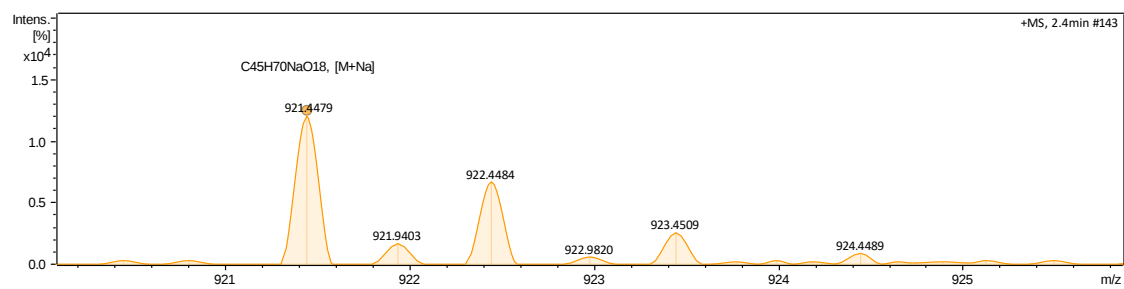
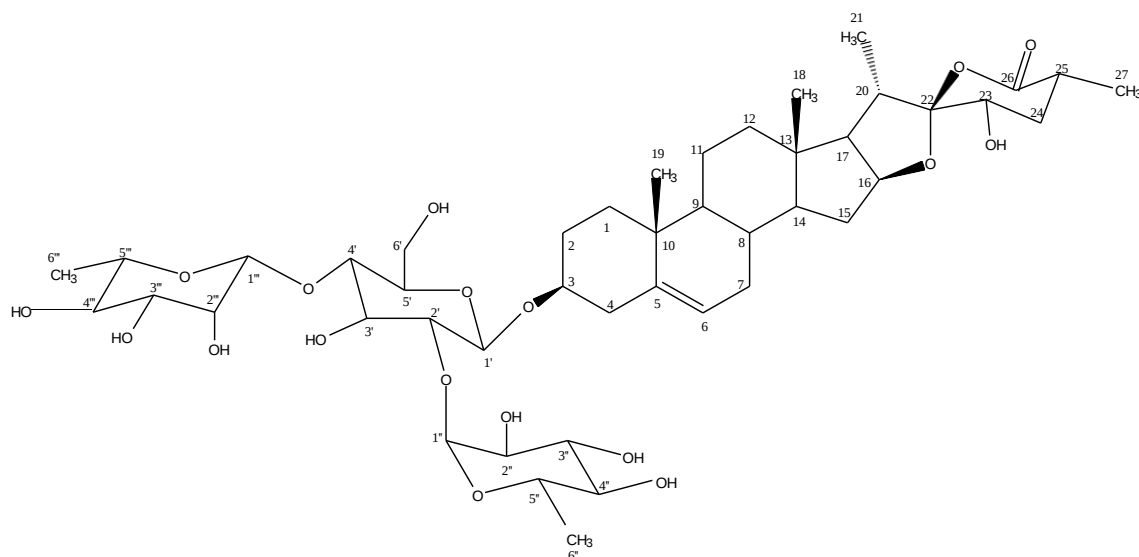


Figura 110. Espectro EMAR do composto 3 obtido no modo positivo $(M+H)^+$.

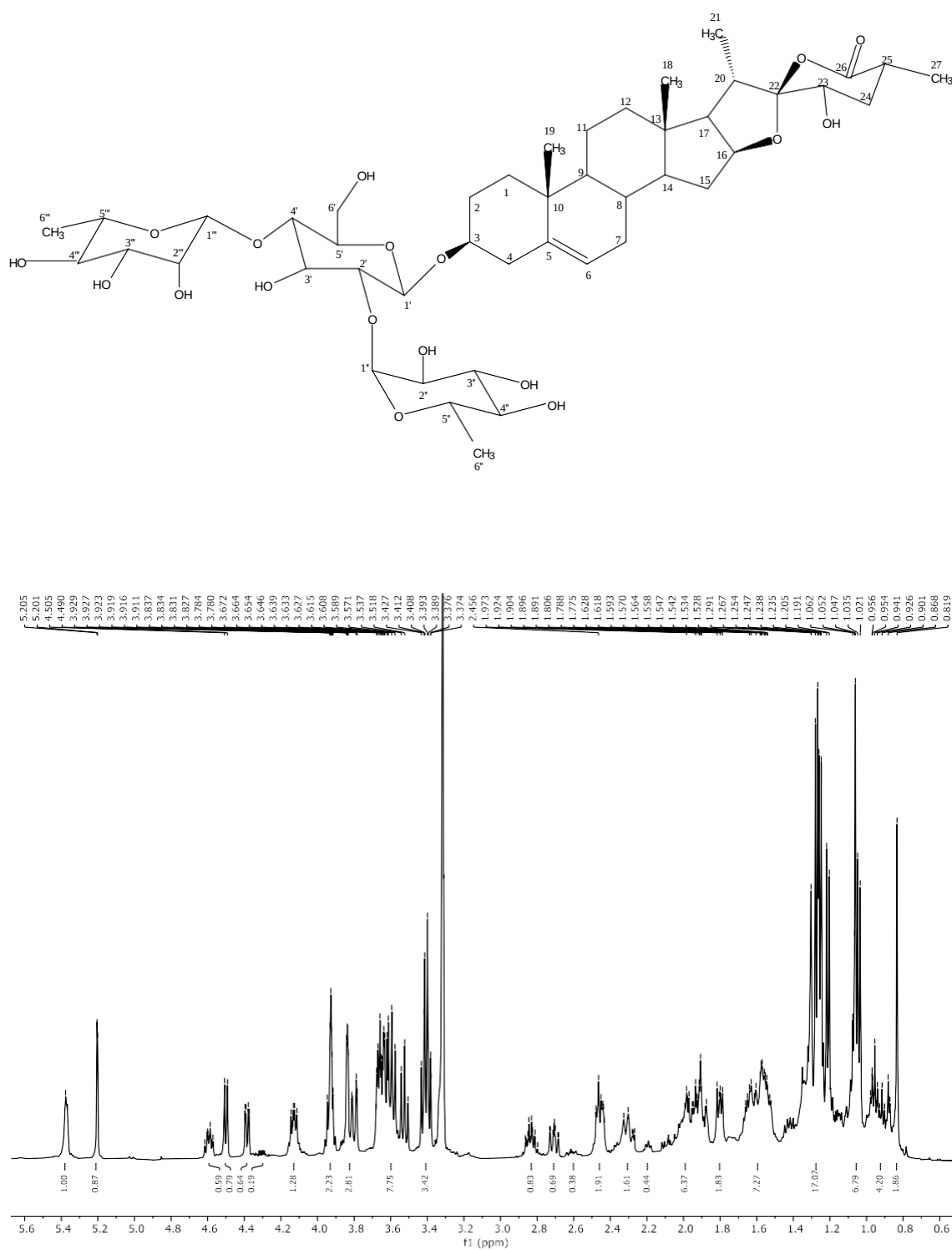


Figura 111. Espectro de RMN ^1H do composto 3 (500 MHz, MeOD).

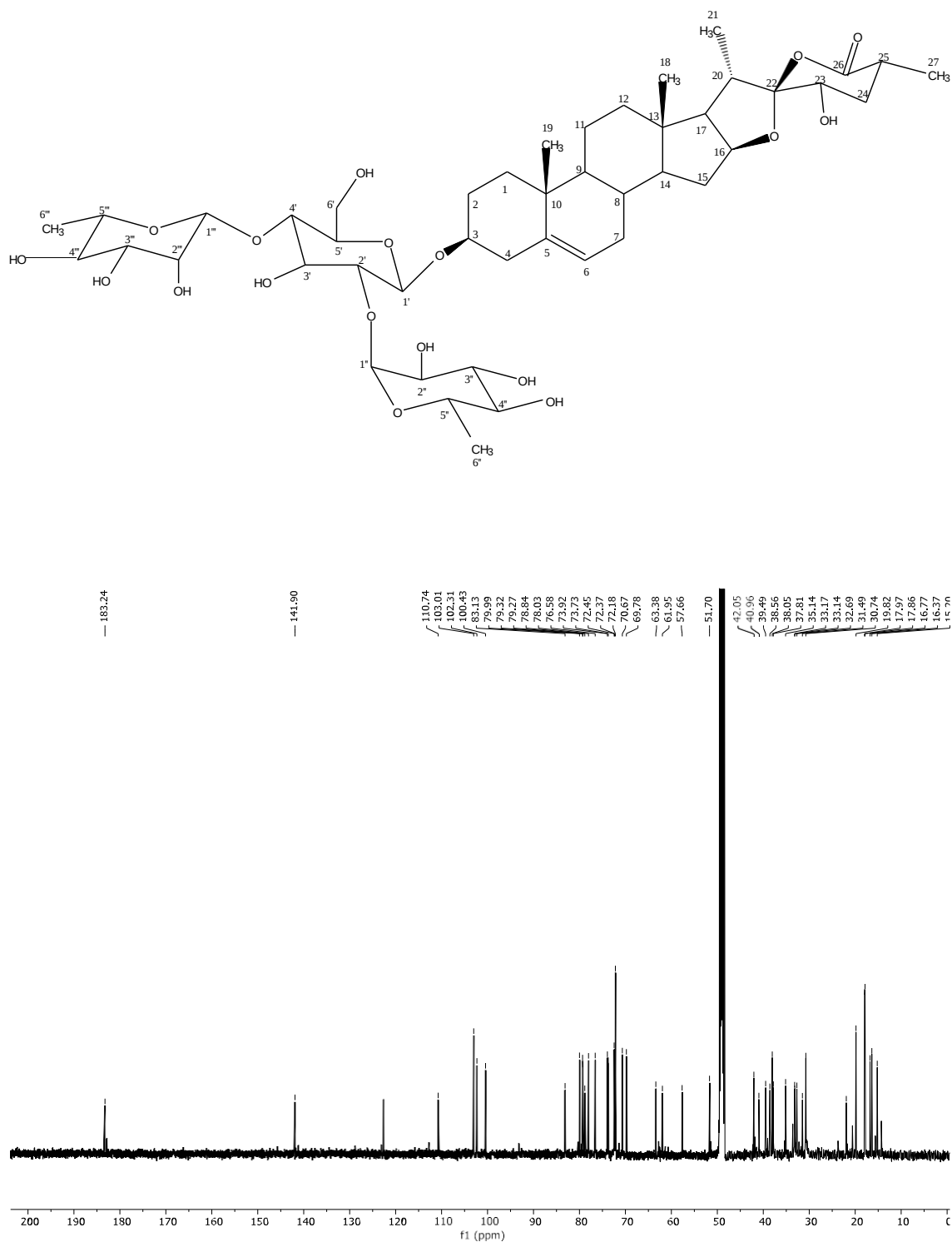


Figura 112. Espectro de RMN ^{13}C BB do composto 3 (125 MHz, MeOD).

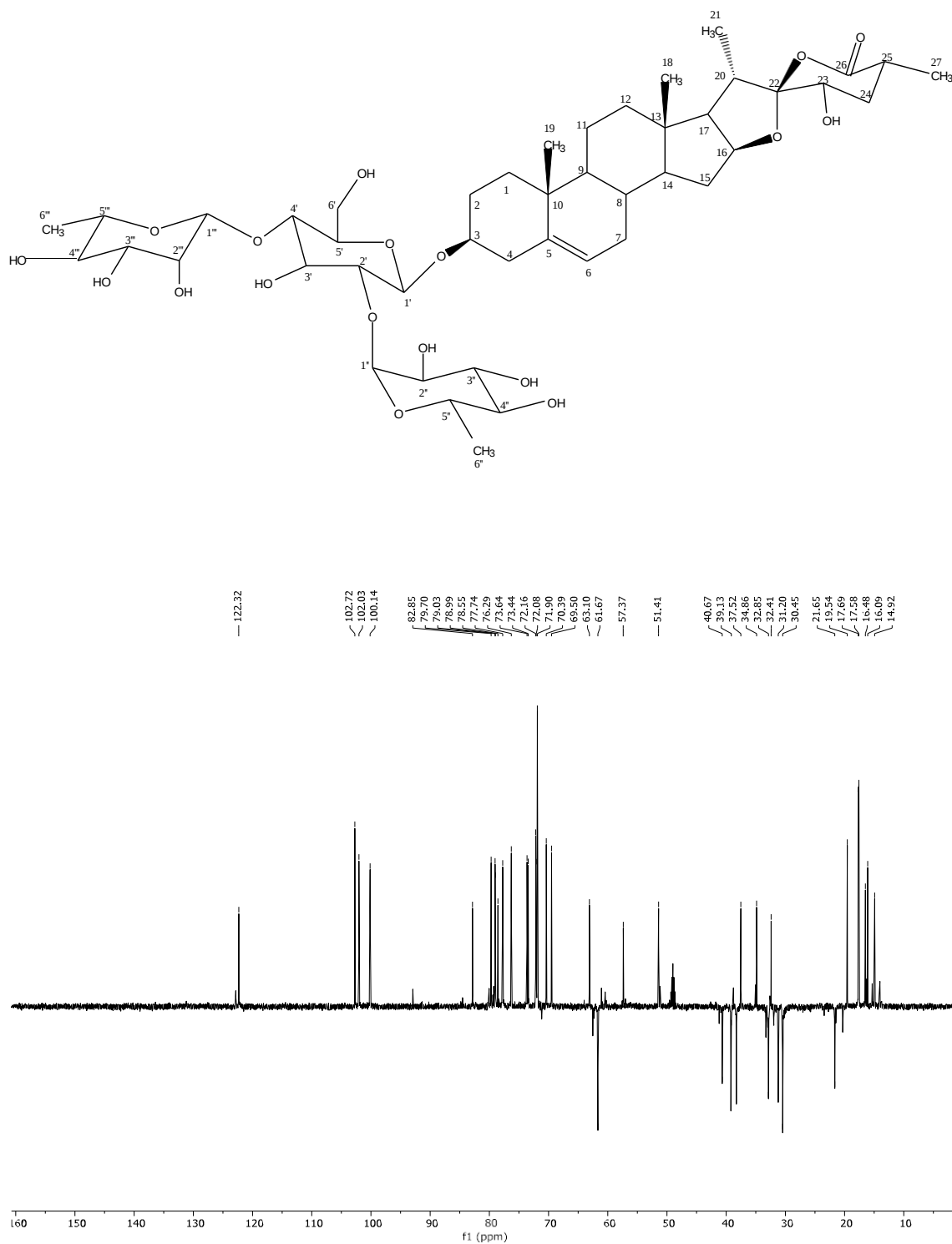


Figura 113. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 do composto 3 (125 MHz, MeOD).

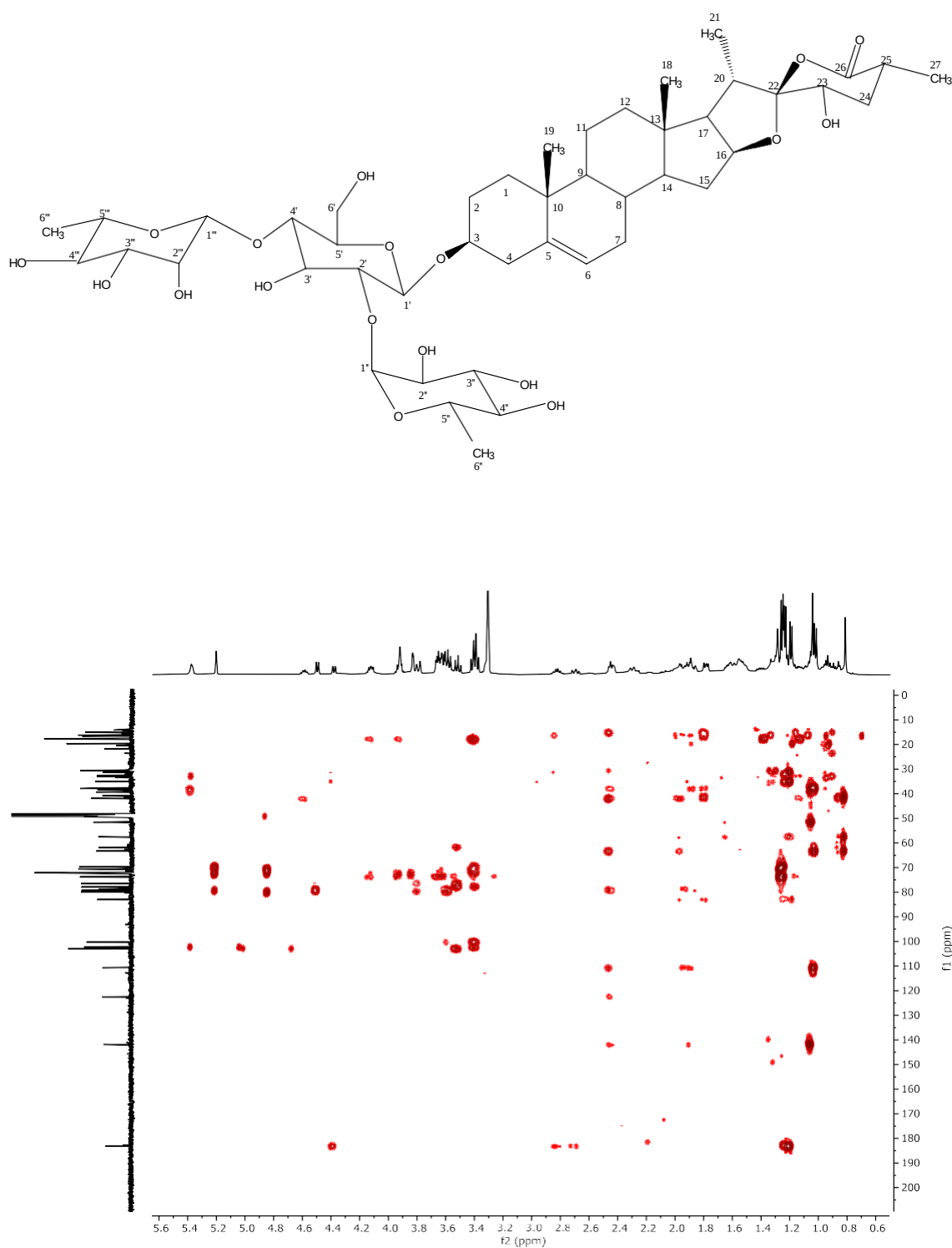


Figura 114. Espectro de RMN HMBC do composto 3 (500 MHz, MeOD).

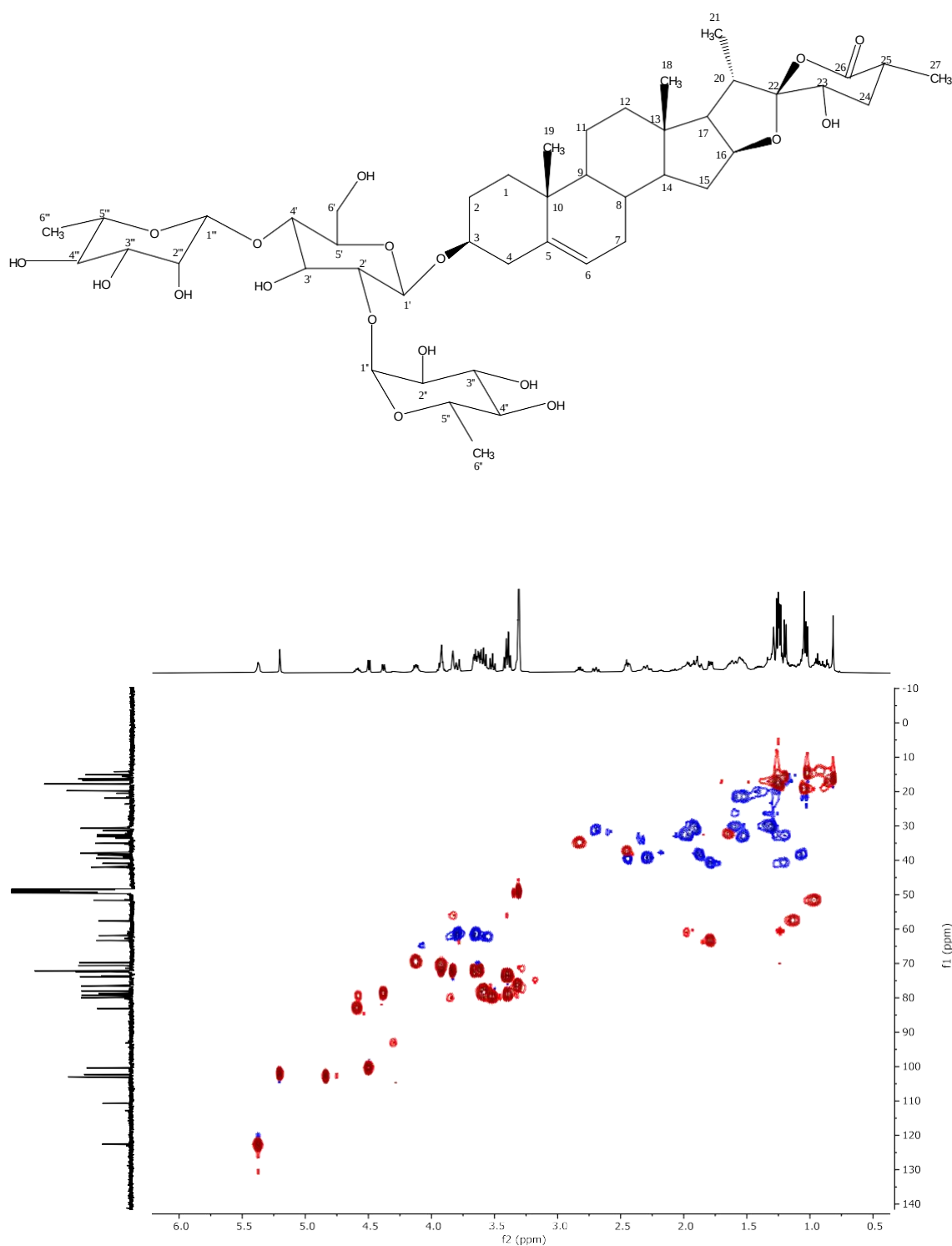


Figura 115. Espectro de RMN HSQC do composto 3 (500 MHz, MeOD).

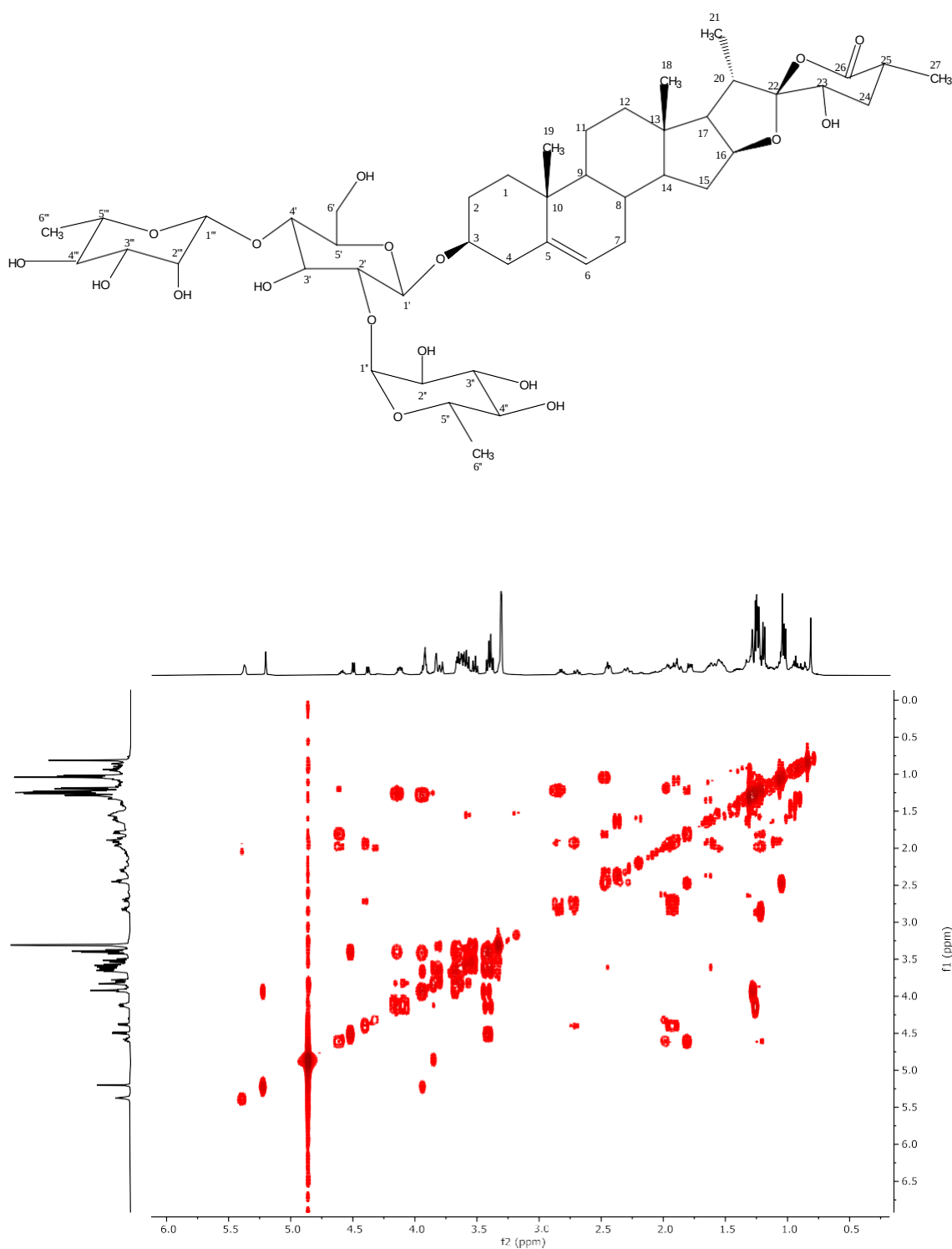


Figura 116. Espectro de ^1H - ^1H COSY do composto 3 (400 MHz, MeOD).

6. CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho demonstram que espécimes vegetais podem ser utilizados em química de produtos naturais não só para estudos quimiossistematicos, mas também podem ser úteis para triagem e descoberta de novos compostos bioativos. Dados de CLAE-EM para geração de redes moleculares foi possível a identificação de metabolitos secundários, especificamente glicoalcaloides de *Solanum* L., em espécimes vegetais e estes foram similares aos encontrados em extratos e frações da planta fresca que demonstraram alto potencial larvicida e repelente. Dados do perfil químico obtido por CLAE-EM de espécimes vegetais também foram explorados junto a métodos estatísticos demonstrando que esta abordagem pode oferecer subsídio para discriminação interespecífica e infragenérica de espécies de *Solanum* subg. *Leptostemonum*. Além disso, neste trabalho também foi possível o isolamento de um glicoalcaloide, uma rara e uma nova saponina esteroidal que serão utilizados como semente em estudos posteriores.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- Agra, M.F., & Nee, M. (1997). Uma nova espécie de *Solanum* subgênero *Leptostemonum* (Solanaceae) do nordeste do Brasil. *Brittonia*, 49, 350-353.
- Agra, M. F. (2007). Diversity and Distribution of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* in Brazil. Pp. 31-43. In: D.M. Spooner; L. Bohs; J. Giovannoni; R.G. Olmstead & D. Shibata. (org.). *Acta Horticulturae*, 745, 31-42.
- Anderson, G.J. (1979) A variação e evolução da seção *Basarthurum* de *Solanum*. *Brittonia*. 29:116–129. <https://doi.org/10.2307/2805750>
- Anderson G.J., Steinharter T.P., Cooper-Driver G. (1987) Flavonoides foliares e a sistemática de *Solanum* sect. *Basarthurum*. *System Bot* 12:534–540. <https://doi.org/10.2307/2418888>
- Aron, A.T., Gentry, E.C., McPhail, K.L., Nothias, L.F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., Petras, D., Gauglitz, J. M., Sikora, N., Vargas, F., van der Hooft, J.J.J., Ernst M., Kang K. B., Aceves C. M., Caraballo-Rodríguez A.M., Koester I., Weldon K.C., Bertrand S., Roullier C., Kunyang S., Tehan R. M., Boya C.A.P., Cristão M.H., Gutiérrez M., Ulloa A. M., Mora J. A. T., Mojica-Flores R., Lakey-Beitia J., Vásquez-Chaves, V., Zhang, Y., Calderón, A.I., Taylor – Ator, N., Keyzers, R.A., Tugizimana, F., Ndlovu, N., Aksenov, A.A., Jarmusch, A.K., Schmid R., Truman, A. W., Bandeira, N., Mingxun, W. & Dorrestein, P.C. (2020). Rede molecular reproduzível de dados de espectrometria de massa não direcionados usando GNPS. *Protocolos da natureza*, 15 (6), 1954-1991. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5>
- Aubriot, X., Singh, P., & Knapp, S. (2016). Tropical Asian species show that the Old World clade of ‘spiny solanums’ (*Solanum* subgenus *Leptostemonum* pro parte: Solanaceae) is not monophyletic. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181 (2), 199-223. <https://doi.org/10.1111/boj.12412>
- Aubriot, X., & Knapp, S. (2022). A revision of the “spiny solanums” of Tropical Asia (*Solanum*, the *Leptostemonum* Clade, Solanaceae). *PhytoKeys*, 198, 1. [10.3897/phytokeys.198.79514](https://doi.org/10.3897/phytokeys.198.79514)
- Basílio, I. J. L., Moura, R. K., Bhattacharyya, J., & de Fátima Agra, M. (2012). Application of UV/VIS spectrophotometry and multivariate analysis to characterization of the species of *Solanum* sect. *Erythrotrichum* Child. *Chemistry & Biodiversity*, 9 (6), 1114-1124. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100302>
- Bakry, S. M., Naser, A. F. A., El Negoumy, S. I., Kassem, M. E., Meselhy, M. R., & Abdel-Sattar, E. (2023). Comparative LC-MS/MS-based molecular networking, DNA fingerprinting, and in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of three Egyptian *Ficus* cultivars. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 235, 115620. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115620>
- Barney, L. A., Tasca, J. A., Sanchez, H. A., Smith, C. R., Koptur, S., Livshultz, T., & Minbiole, K. P. (2021). Chemotaxonomic investigation of Apocynaceae for retronecine-

type pyrrolizidine alkaloids using HPLC-MS/MS. *Phytochemistry*, 185, 112662. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112662>

Bohs, L. (2005). Principais clados em *Solanum* com base em dados de sequência *ndhF*. Pp. 27 – 49 em: RC Keating, VC Hollowell & TB Croat (eds.), *A Festschrift for William G. D'Arcy: The Legacy of a Taxonomist*. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, Missouri [*Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 104].

Cavalcante, F.A., Silva, J.L.V., Medeiros, A.F.D., Claudino, F.S., Agra, M.F., Silva, T.M.S., Carvalho, M.G., Filho, R.B. & Silva, B.D. (2013). *Solanum jabrense* Agra & M. Nee (Solanaceae) exibe atividade espasmolítica no óleo de cobaia.

Chen, Y., Li, S., Sun, F., Han, H., Zhang, X., Fan, Y., Tai, G., & Zhou, Y. (2010). In vivo antimalarial activities of glycoalkaloids isolated from Solanaceae plants. *Pharmaceutical Biology*, 48(9), 1018-1024. <https://doi.org/10.3109/13880200903440211>

Chen, Y., Wu, J., Yu, D., & Du, X. (2021). Avanços na biossíntese de saponinas esteroidais. *Planta*, 254, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03732-y>

Child, A., & Lester, R. N. (2001). Synopsis of the genus *Solanum* L. and its infrageneric taxa. *Solanaceae V: advances in taxonomy and utilization*. Nijmegen University Press, Nijmegen, 39-52.

Chowański, S., Adamski, Z., Marciniak, P., Rosiński, G., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Falabela, P., Scrano, L., Ventrella, E., Lelario, F., & Bufo, S. A. (2016). A review of bioinsecticidal activity of Solanaceae alkaloids. *Toxins*, 8 (3), 60. <https://doi.org/10.3390/toxins8030060>

Cook, D., Lee, S. T., Gardner, D. R., Molyneux, R. J., Johnson, R. L., & Taylor, C. M. (2021). Use of herbarium voucher specimens to investigate phytochemical composition in poisonous plant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69 (14), 4037-4047. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00708>

D'Arcy, W.G. (1972). Estudos de Solanaceae II: tipificação de subdivisões de *Solanum*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 59 (2), 262-278. <https://doi.org/10.2307/2394758>

D'arcy, W. G., Hawkes, J. G., Lester, R. N., Nee, M., & Estrada, N. (1991). *Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution*. London: Academic Press. pp. 75–137.

D'hoop, B.B., Paulo, M.J., Mank, R.A., Van Eck, H.J. e Van Eeuwijk, F.A. (2008). Mapeamento de associação de características de qualidade em batata (*Solanum tuberosum* L.). *Eufítica*, 161, 47-60. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9565-5>

D'hoop, B.B., Keizer, P.L., Paulo, M.J., Visser, R.G., van Eeuwijk, F.A., & van Eck, H.J. (2014). Identificação de QTL agronomicamente importantes em cultivares de batata tetraploide usando uma análise de associação marcador-característica. *Genética teórica e aplicada*, 127, 731-748. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2254-y>

Dunal, M. F. (1813). *Histoire naturelle, médicale et économique des Solanum, et des genres qui ont été confondus avec eux*. A. Koenig.

- Dunal, MF (1816). *Solanorum generumque affinium sinopse: seu, Solanorum historiae editionis secundae summarium, ad characteres diferenciales redactum, seriem naturalem, habitationes stationesque specierum breviter indicans* . apud Renaud.
- Dunal, M.F. (1852). Solanaceae. In: A.P. De Candolle (ed). *Prodromus Systematis Universalis Naturalis Regni Vegetabilis*. V. 13, n. 1, p. 1-690. Paris.
- Eisenman, S. W., Tucker, A. O., & Struwe, L. (2012). Voucher specimens are essential for documenting source material used in medicinal plant investigations. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1 (1). <https://doi.org/10.7275/R50K26HC>
- Friedman, M., McDonald, G. M., & Filadelfi-Keszi, M. (1997). Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16 (1), 55-132. <https://doi.org/10.1080/07352689709701946>
- Friedman, M. (2006). Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (23), 8655-8681. <https://doi.org/10.1021/jf061471t>
- Friedman, M., & Levin, C. E. (2016). Glycoalkaloids and calystegine alkaloids in potatoes. In *Advances in potato chemistry and technology* (pp. 167-194). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800002-1.00007-8>
- Gagnon, E., Hilgenhof, R., Orejuela, A., McDonnell, A., Sablok, G., Aubriot, X., Giacomini, L., Gouvêa, Y., Bragionis, T., Stehmann, J.R., Bohs, L., Dodsworth, S., Martine, C., Poczar, P., Knapp, S. & Särkinen, T. (2022). A discordância filogenômica sugere politomias ao longo da espinha dorsal do grande gênero *Solanum*. *American Journal of Botany*, 109 (4), 580-601. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1827>
- Hameed, A., Ijaz, S., Mohammad, I. S., Muhammad, K. S., Akhtar, N., & Khan, H.M. S. (2017). Aglycone solanidine and solasodine derivatives: A natural approach towards cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 446-457. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.147>
- Hammerle, F., Quirós-Guerrero, L., Rutz, A., Wolfender, J. L., Schöbel, H., Peintner, U., & Siewert, B. (2021). Feature-based molecular networking—An exciting tool to spot species of the genus *Cortinarius* with hidden photosensitizers. *Metabolites*, 11 (11), 791. <https://doi.org/10.3390/metabo11110791>
- Heinig, U., & Aharoni, A. (2014). Analysis of steroidal alkaloids and saponins in Solanaceae plant extracts using UPLC-qTOF mass spectrometry. In *Plant Isoprenoids* (pp. 171-185). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0606-2_12
- Hilgenhof, R., Gagnon, E., Knapp, S., Aubriot, X., Tepe, E.J., Bohs, L., Giacomini, L.L., Gouvêa, Y.F., Martine, C.T., Orejuela, A., Orozco, C.I. & Särkinen, T. (2023). Evolução de traços morfológicos em *Solanum* (Solanaceae): Labilidade evolutiva de caracteres taxonômicos chave. *Taxon*, 72 (4), 811-847. <https://doi.org/10.1002/tax.12990>
- Hunziker, A.T. (2001). *Gêneros Solanacearum: os gêneros de Solanaceae ilustrados, arranjados de acordo com um novo sistema*. ARG Gantner.

- Iijima, Y., Watanabe, B., Sasaki, R., Takenaka, M., Ono, H., Sakurai, N., Umemoto, N., Suzuki, H., Shibata, D., & Aoki, K. (2013). Steroidal glycoalkaloid profiling and structures of glycoalkaloids in wild tomato fruit. *Phytochemistry*, 95, 145-157 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.07.016>.
- Kang, K. B., Park, E. J., da Silva, R. R., Kim, H. W., Dorrestein, P. C., & Sung, S. H. (2018). Targeted isolation of neuroprotective dicoumaroyl neolignans and lignans from *Sageretia theezans* using in silico molecular network annotation propagation-based dereplication. *Journal of natural products*, 81 (8), 1819-1828. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00292>
- Kaunda, J.S., & Zhang, Y.J. (2019). O gênero *solanum*: uma revisão etnofarmacológica, fitoquímica e de propriedades biológicas. *Produtos naturais e bioprospecção*, 9 (2), 77-137. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0201-6>
- Kim, H. K., & Verpoorte, R. (2010). Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 21 (1), 4-13. <https://doi.org/10.1002/pca.1188>
- Kharazian, N., Dehkordi, F. J., & Lorigooini, Z. (2024). Untargeted metabolite profiling: A comprehensive study using data analysis workflow in *Salvia* L. species (Lamiaceae). *South African Journal of Botany*, 165, 101-125. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.12.019>
- Leão, T.F., Clark, C.M., Bauermeister, A., Elijah, E.O., Gentry, E.C., Husband, M., Oliveira, M.F., Bandeira, N., Wang M. & Dorrestein, PC (2021). Infraestrutura de início rápido para análise metabolômica não direcionada em GNPS. *Nature metabolic* , 3 (7), 880-882. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00429-0>
- Li, D., Liu, H., Ni, W., Xiao, W. L., He, L., Guo, Z. Y., Qin, X.U. & Liu, H. Y. (2019). Molecular networking-based strategy for the discovery of polyacetylated 18-norspirostanol saponins from *Trillium tschonoskii* Maxim. *Phytochemistry*, 168, 112125. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108569>
- Li, Y., & Luo, J. (2025). From steroidal glycoalkaloids to steroidal saponins: Biosynthesis and ecological role in the *Solanum* genus. *Molecular Plant*, 18 (1), 22-24. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2024.11.012>
- Miller, A. G., & Nyberg, J. A. (1995). Collecting herbarium vouchers. *Royal Botanic Garden, Edinburgh EH3 5LR, UK*, 561-573.
- Milner, S.E., Brunton, N.P., Jones, P.W., O'Brien, N.M., Collins, S.G., & Maguire, A.R. (2011). Bioatividades de glicoalcalóides e suas agliconas de espécies de *Solanum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (8), 3454-3484. <https://doi.org/10.1021/jf200439q>
- Morillo, M., Rojas, J., Lequart, V., Lamarti, A., & Martin, P. (2020). Derivados naturais e sintéticos dos glicoalcalóides esteroidais do gênero *Solanum* e atividade biológica. *Química e Pesquisa de Produtos Naturais*. <https://doi.org/10.35248/2329-6836.20.8.371>
- Moses, T., Papadopoulou, K. K., & Osbourn, A. (2014). Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical*

reviews in biochemistry and molecular biology, 49 (6), 439-462.
<https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953628>

Moyo, B., Tavengwa, N. T., & Madala, N. E. (2023). Application of the UHPLC-q-TOF-MS and molecular networking in revealing chemo-taxonomical markers of *Viscum combreticola* Engl. and *Viscum album* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 111, 104720. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2023.104720>

Nee, M. (1999). Synopsis of *Solanum* in the New World. In: Nee, M., Symon, D.E., Lester, R.N. & Jessop, J.P. *Solanaceae IV: Advances in Biology and Utilization*. Royal Botanic Gardens, Kew. p.285-333.

Olivon, F., Retailleau, P., Desrat, S., Touboul, D., Roussi, F., Apel, C., & Litaudon, M. (2020). Isolation of picrotoxanes from *Austrobuxus carunculatus* using taxonomy-based molecular networking. *Journal of Natural Products*, 83 (10), 3069-3079. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00636>

Perez de Souza, L., Alseekh, S., Naake, T., & Fernie, A. (2019). Mass spectrometry-based untargeted plant metabolomics. *Current protocols in plant biology*, 4 (4), e20100. <https://doi.org/10.1002/cppb.20100>

Pilon, A. C., Selegato, D. M., Fernandes, R. P., Bueno, P. C., Pinho, D. R., Carnevale, F., Freire, R. T., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V.S., & Lopes, N. P. (2020). Metabolômica de plantas: Métodos e desafios. *Química Nova*, 43, 329-354. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170499>

Popova, I., Sell, B., Pillai, S. S., Kuhl, J., & Dandurand, L. M. (2022). High-performance liquid chromatography–mass spectrometry analysis of glycoalkaloids from underexploited solanum species and their acetylcholinesterase inhibition activity. *Plants*, 11 (3), 269. <https://doi.org/10.3390/plants11030269>

Ramabulana, A. T., Petras, D., Madala, N. E., & Tugizimana, F. (2021). Metabolomics and molecular networking to characterize the chemical space of four *Momordica* plant species. *Metabolites*, 11 (11), 763. <https://doi.org/10.3390/metabo11110763>

Ramos, C.C., de Sousa, A.L., de Almeida, C.M.S., & de Oliveira, R.R. (2017). Aspectos quimiossistemáticos de *Solanum*: análise de metabólitos especiais da via mista (Acetato/Shikimato). *Int. J. Plant Res*, 7 (3), 75-82.

Ramos, C. C., Sousa, A. L., de Almeida, C. M., & Oliveira, R. R. (2019). Análise quimiossistemática dos alcaloides esteroidais do gênero *Solanum*. *Revista Virtual de Química*, 11 (5). <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190102>

Ramos, C.C., de Sousa, A.L., de Almeida, C.M.S., & de Oliveira, R.R. (2021). Quimiofenética de *Solanum* baseada em alcalóides esteróides. *Sistemática Bioquímica e Ecologia*, 98, 104318. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104318>

Resende, J. V. M., de Sá, N. M., de Oliveira, M. T. L., Lopes, R. C., Garrett, R., & Borges, R. M. (2020). Chemical profiling of herbarium samples of *Solanum* (Solanaceae) using mass spectrometry. *Phytochemistry Letters*, 36, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.01.021>

- Roddick, J. G. (1979). Complex formation between solanaceous steroidal glycoalkaloids and free sterols in vitro. *Phytochemistry*, 18(9), 1467-1470. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)98476-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)98476-0)
- Sánchez-Mata, M. C., Yokoyama, W. E., Hong, Y. J., & Prohens, J. (2010). α -Solasonine and α -solanine contents of gboma (*Solanum macrocarpon* L.) and scarlet (*Solanum aethiopicum* L.) eggplants. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 58(9), 5502-5508. <https://doi.org/10.1021/jf100709g>
- Sarkar, J., Singh, R., & Chandel, S. (2025). Understanding LC/MS-Based Metabolomics: A Detailed Reference for Natural Product Analysis. *PROTEOMICS–Clinical Applications*, 19 (1), e202400048. <https://doi.org/10.1002/prca.202400048>
- Särkinen, T., Bohs, L., Olmstead, R.G., & Knapp, S. (2013). Uma estrutura filogenética para o estudo evolutivo das solanáceas (Solanaceae): uma árvore datada de 1000 pontas. *BMC evolution biology*, 13, 1-15.
- Seithe, A. (1962). *Die Haararten der Gattung Solanum L. und ihre taxonomische Verwendung*.
- Silva, A. L., Brito, T. A. M., Agra, M. D. F., Sobral da Silva, M., & Tavares, J. F. (2024). Molecular networks as strategy for dereplication of steroidal alkaloids of herbarium samples of *Solanum jabrense* Agra and M. Nee, an endemic and unexplored species. *Chemistry & Biodiversity*, e202402513. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202402513>
- Silva, T.M.S., Nascimento, R.J.B., Câmara, C.A., Castro, R.N., Braz-Filho, R., Agra, M.F., & de Carvalho, M.G (2004). Distribuição de flavonóides e N-trans-cafeoil-tiramina em *Solanum* subg. *Leptostemonum*. *Sistemática bioquímica e ecologia*, 32 (5), 513-516.
- Silva, T. M. S., Batista, M. M., Camara, C. A., & Agra, M. F. (2005). Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 99 (4), 419-425. <https://doi.org/10.1179/136485905X36208>
- Silva, T.M.S.D., Carvalho, M.G.D., & Braz-Filho, R. (2009). Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. *Química Nova*, 32, 1119-1128. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500008>
- Silva, T.M.S., Camara, C.A., & de Fátima Agra, M. (2022). Agliconas flavonóides em espécies de *Solanum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 32 (2), 201-210.
- Solanum* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14716>>. Acesso em: 09 fev. 2025
- Stern, S., Agra, M.D.F., & Bohs, L. (2011). Delimitação molecular de clados dentro de espécies do Novo Mundo dos "solanos espinhosos" (*Solanum* subg. *Leptostemonum*). *Taxon*, 60 (5), 1429-1441. <https://doi.org/10.1002/tax.605018>
- Steinharter, T.P., Cooper-Driver, G.A., & Anderson, G.J. (1986). A relação filogenética dos flavonóis de *Solanum*. *Sistemática bioquímica e ecologia*, 14 (3), 299-305. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(86\)90105-5](https://doi.org/10.1016/0305-1978(86)90105-5)

- Tepe, E.J. & Bohs, L. (2009). Novas espécies de *Solanum* seção *Herpystichum* (Solanaceae) do Equador. *J. Bot. Res. Inst. Texas* 3 (2): 511 – 519.
- Wang, X., Subko, K., Kildgaard, S., Frisvad, J. C., & Larsen, T. O. (2021). Mass spectrometry-based network analysis reveals new insights into the chemodiversity of 28 species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Frontiers in Fungal Biology*, 2, 719420. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.719420>
- Weese, T.L., & Bohs, L. (2007). Uma filogenia de três genes do gênero *Solanum* (Solanaceae). *Botânica sistemática*, 32 (2), 445-463.
- Whalen, MD (1978). Flavonoides foliares de *Solanum* section *Androceras*: um levantamento sistemático. *Botânica Sistemática*, 257-276.
- Whalen, M.D. (1984). Conspectus of species of *Solanum* subgenus *Leptostemonum*. *Gentes Herbarum*, 12 (4), 179-282.
- Wu, SB, Meyer, RS, Whitaker, BD, Litt, A., & Kennelly, EJ (2013). Uma nova estratégia baseada em cromatografia líquida-espectrometria de massa para integrar química, morfologia e evolução de espécies de berinjela (*Solanum*). *Journal of Chromatography A*, 1314, 154-172. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.017>
- Xiang, M.L., Hu, B.Y., Qi, Z.H., Wang, X.N., Xie, T.Z., Wang, Z.J., Ma, D.Y., Zeng, Q., & Luo, XD (2022). Química e bioatividades de alcalóides esteroidais naturais. *Produtos naturais e bioprospecção*, 12 (1), 23. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00345-0>
- Yang, J. Y., Sanchez, L. M., Rath, C. M., Liu, X., Boudreau, P. D., Bruns, N., Glukhov E., Wodtke, A., Felicio, R., Fenner, A., Wong, W. R., Linington, R.G., Zhang, L., Debonis H. M., Gerwick, W.H. & Dorrestein, P. C. (2013). Molecular networking as a dereplication strategy. *Journal of natural products*, 76 (9), 1686-1699. <https://doi.org/10.1021/np400413s>
- Yang, F., Wang, H., Feng, G., Zhang, S., Wang, J., & Cui, L. (2021). Rapid identification of chemical constituents in *Hericium erinaceus* based on LC-MS/MS metabolomics. *Journal of Food Quality*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5560626>
- Yuan, B., Byrnes, D., Giurleo, D., Villani, T., Simon, J. E., & Wu, Q. (2018). Rapid screening of toxic glycoalkaloids and micronutrients in edible nightshades (*Solanum* spp.). *journal of food and drug analysis*, 26 (2), 751-760. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.10.005>
- Yuan, B., Dinssa, F. F., Simon, J. E., & Wu, Q. (2020). Simultaneous quantification of polyphenols, glycoalkaloids and saponins in African nightshade leaves using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with acid assisted hydrolysis and multivariate analysis. *Food chemistry*, 312, 126030. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126030>
- Zhao, DK, Zhao, Y., Chen, SY, & Kennelly, EJ (2021). Glicoalcalóides esteroidais de *Solanum*: diversidade estrutural, atividades biológicas e biossíntese. *Relatórios de produtos naturais*, 38 (8), 1423-1444. <https://doi.org/10.1039/D1NP00001B>

Zhao, Y., Gao, W. K., Wang, X. D., Zhang, L. H., Yu, H. Y., & Wu, H. H. (2022). Phytochemical and pharmacological studies on *Solanum lyratum*: a review. *Natural Products and Bioprospecting*, 12 (1), 39. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00361-0>