

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS - ICE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA- DQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQ



**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE
ESPÉCIES DE *BROSIMUM* DA REGIÃO AMAZÔNICA**

INGRITY SUELEN COSTA SÁ

Manaus-AM
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS - ICE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA- DQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQ

INGRITY SUELEN COSTA SÁ

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE
ESPÉCIES DE *BROSIMUM* DA REGIÃO AMAZÔNICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração em Química Orgânica, na linha de Pesquisa de Produtos Naturais e Biomoléculas.

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA
CO-ORIENTADOR: DR. FELIPE MOURA ARAÚJO DA SILVA

Manaus-AM
2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S111c Sá, Ingrity Suelen Costa
Contribuição ao estudo fitoquímico e biológico de espécies de
Brosimum da região Amazônica / Ingrity Suelen Costa Sá . 2022
197 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Coorientador: Felipe Moura Araújo da Silva
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.

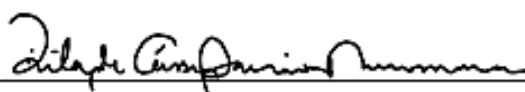
1. Moraceae. 2. Brosimum. 3. antioxidante. 4. flavonoides. 5.
tirosina quinase-3. I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

Contribuição ao Estudo Fitoquímico e Biológico de
espécies de *Brosimum* da Região Amazônica

INGRITY SUELEN COSTA SÁ

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como
requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor (a) em Química.

Aprovada em, 14 de setembro de 2022.



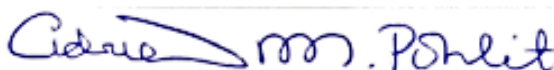
RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA (PPGQ/UFAM)

Presidente/Orientador



MARIA LÚCIA BELÉM PINHEIRO (PPGQ/UFAM)

Membro Interno



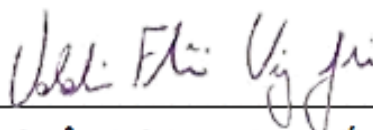
ADRIAN MARTIN POHLIT (PPGQ/UFAM)

Membro Interno



NORBERTO BEPORINE LOPES (USP-RIB. PRETO)

Membro Externo



VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA JÚNIOR (IME)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 14 de setembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me sustentado, por me dar coragem e sabedoria todos os dias e me ajudar a passar pelas adversidades durante a realização deste sonho.

A meus pais minha eterna gratidão, não só pela força nos momentos difíceis, mas por toda a ajuda na realização dos meus sonhos. Agradeço, também, aos meus familiares e amigos que estiveram ao meu lado ao longo deste trabalho de pesquisa, que passaram por todas as situações e momentos difíceis comigo, vocês tornaram tudo mais leve, pois eu sabia que poderia sempre contar com vocês.

À minha orientadora Dr^a Rita de Cássia Saraiva Nunomura pela comunhão, confiança em meu trabalho e troca de conhecimento científico ao longo de todos esses anos.

Ao meu coorientador Dr. Felipe Moura Araújo da Silva pela parceria, por todos os ensinamentos compartilhados, pela dedicação e tempo despendido em meu auxílio na realização da pesquisa.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA e a Central Analítica-UFAM em especial ao Laboratórios de Abertura de Amostra e Ensaio Químicos-LAEQ, Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas-LABCEM e ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear-NMRLAB, por serem minha segunda casa e me proporcionarem condições para a realização deste trabalho de doutorado.

A todos os professores do Departamento de Química-DQ da UFAM, que contribuíram com minha formação acadêmica.

À Universidade Federal do Amazonas-UFAM e ao Programa de Pós-graduação em Química-PPGQ pela oportunidade de cursar o curso de Doutorado. As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEAM pelo amparo à pesquisa e auxílios concedidos.

Agradeço a todos que estiveram presentes direta ou indiretamente nessa jornada de trabalho.

RESUMO

Apesar da grande variedade de plantas medicinais existentes na Região Amazônica, muitas não possuem estudos relativos à sua composição química e atividade biológica, destacando-se aquelas pertencentes ao gênero *Brosimum* (Moraceae), cujas espécies são amplamente utilizadas por populações locais. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo investigar o conteúdo químico das espécies *B. acutifolium* e *B. parinarioides* presentes na Região Amazônica, bem como avaliar os seus potenciais antioxidante (*in vitro*) e antitumoral (*in silico*). Para alcançar este objetivo foram preparados diferentes extratos baseados no planejamento de misturas envolvendo três diferentes solventes orgânicos (DCM, AcOEt e EtOH), sendo em seguida submetidos às análises por espectrometria de massas equimométricas. As frações provenientes dos extratos DCM, AcOEt de *B. acutifolium* e AcOEt de *B. parinarioides* foram submetidas às análises cromatográficas modernas e as substâncias resultantes foram elucidadas por EM e RMN 1D e 2D. No que se refere à atividade biológica, os extratos e substâncias isoladas foram analisados por meio dos ensaios de DPPH, FRAP, ABTS e inibição frente à proteína FLT3. Em adição, a determinação do teor de fenólicos totais dos extratos também foi mensurada. A partir do estudo químico do extrato DCM:AcOEt de *B. acutifolium* foram isolados 7,4'-dihidroxi-8-prenilflavona, 4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)flavona, isoliquiritigenina, isobavachalcona, kanzonol B, kanzonol C e corylifol B, sendo o kanzonol B-C relatados pela primeira vez na espécie e corylifol B na família Moraceae. Por outro lado, o estudo químico dos extratos AcOEt e MeOH de *B. parinarioides*, resultou no isolamento de 4',6-dihidroxi-5-prenil-flavona, 7,8-dimetoxi-2,2-dimetil-1-benzopirona-6-ácido propanoico, licoagrachalcona, isoliquiritigenina, 2,4,4'-trihidroxi-5'-(2''-hidroxi-3''-metil-butenil)-chalcona e kanzonol B, sendo inéditas as substâncias 4',6-dihidroxi-5-prenil-flavona, 2,4,4'-trihidroxi-5'-(2''-hidroxi-3''-metil-butenil)-chalcona, 7,8-dimetoxi-2,2-dimetil-1-benzopirona-6-ácido propanoico, denominadas de parinarioidinas A-C. O estudo do conteúdo de fenólicos totais demonstrou alto teor para os extratos de ambas as espécies, e o potencial antioxidante dos extratos e substâncias isoladas revelou atividade antioxidante frente os radicais DPPH, ABTS e FRAP. Por fim, visando a análise do potencial antitumoral das substâncias realizou-se o estudo de ancoragem molecular com a proteína FLT3, onde foi possível observar potenciais inibidores para kanzonol B, kanzonol C, licoagrachalcona A, corylifol B, isobavachalcona, 4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)flavona, isoliquiritigenina e brosimina B evidenciadas pelos superiores valores de energia livre de ligação (-10.3 a -9.8 kcal/mol) quando comparados com o controle positivo doxorrubicina (-8,1 kcal/mol), que foi explicado pelo estabelecimento de interações favoráveis entre o novo complexo ligante-FLT3.

Palavras-chave: *Moraceae*, *Brosimum*, antioxidante, flavonoides, tirosina quinase-3.

ABSTRACT

Despite the wide variety of medicinal plants existing in the Amazon region, many have not been studied regarding their chemical composition and biological activity, especially those belonging to the genus *Brosimum* (Moraceae), whose species are widely used by local populations. The present work investigated the chemical content of the species *B. acutifolium* and *B. parinarioides* present in the Amazon region, as well as evaluated their antioxidant (*in vitro*) and antitumor (*in silico*) potential. To achieve this objective, different extracts were prepared based on the design of mixtures with three different organic solvents (DCM, AcOEt, and EtOH), and then submitted for analysis by mass and chemometric spectrometry. Fractions from DCM, AcOEt of *B. acutifolium*, and AcOEt of *B. parinarioides* extracts were submitted to modern chromatographic analysis, and the resulting substances were identified by MS, 1D and 2D NMR spectra. The Biological activity of extracts and isolated substances were analyzed by DPPH, FRAP, ABTS, and inhibition assays against the FLT3 protein. In addition, the determination of the total phenolic content of the extracts was also measured. The chemical composition study of the extract DCM:AcOEt of *B. acutifolium*, showed 7,4'-dihydroxy-8-prenylflavan, 4'-hydroxy-7,8-(2'',2'-dimethylpyran)flavan, isoliquiritigenin, isobavachalcone, kanzonol B, kanzonol C and corylifol B, with kanzonol B-C reported for the first time in the species and corylifol B in the Moraceae family. On the other hand, the chemical study of the AcOEt and MeOH extracts of *B. parinarioides* resulted in the isolation of 4',6-dihydroxy-5-prenyl-flavan, 7,8-dimethoxy-2,2-dimethyl-1-benzopyrone-6-propanoic acid, licoagrachalcone, isoliquiritigenin, 2,4,4'-trihydroxy-5'-(2''-hydroxy-3''-methyl-butenyl)-chalcone and kanzonol B, being new compounds the 4',6-dihydroxy-5-prenyl-flavan, 2,4,4'-trihydroxy-5'-(2''-hydroxy-3''-methyl-butenyl)-chalcone, 7,8-dimethoxy-2,2-dimethyl-1-benzopyrone-6-propanoic acid, named parinarioidins A-C. The study of the total phenolic content showed a high content for the extracts of both species, and the antioxidant potential of the extracts and isolated substances revealed antioxidant activity by DPPH, ABTS, and FRAP radicals. Finally, to analyze the antitumor potential of the substances, a molecular docking study was carried out with the FLT3 protein, where it was possible to observe potential inhibitors for kanzonol B, kanzonol C, licoagrachalcone A, corylifol B, isobavachalcone, 4'-hydroxy-7,8-(2'',2''-dimethylpiano)flavan, isoliquiritigenin and brosimin B evidenced by higher binding free energy (-10.3 to -9.8 kcal/mol) when compared to the positive control doxorubicin (-8.1 kcal/mol), which was explained by the establishment of favorable interactions between the new ligand-FLT3 complex.

Keywords: *Moraceae*, *Brosimum*, antioxidants, flavonoids, tyrosine kinase-3.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ABTS**- 2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
APCI- Ionização química à pressão atmosférica (do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*)
C18 Octadecilsilano
CC- Cromatografia em coluna
CCD- Cromatografia em camada delgada
CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência
CS₅₀ Concentração capaz de sequestrar 50% dos radicais livres de DPPH
d- Dubleto
DAD- Detector de arranjo de diodos (do inglês *Diode-Array Detection*)
dd- duplo debleto
DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG Equivalente de ácido gálico
EM- Espectrometria de Massas
ESI- Ionização por electrospray
FI- Fase Inferior
Fr- Fração
FRAP Poder antioxidante redutor férrico (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*)
FS- Fase Superior
HCA- Análise de agrupamento hierárquico (do inglês *hierarchical cluster analysis*)
J-constante de acoplamento
m/z- Relação massa/carga
MS/MS ou MS²- Espectrometria de massa em tandem
PCA- Análise de componentes principais (do inglês *principal componente analysis*)
RMN- Ressonância magnética nuclear
s- Singleto
t- Tripleto
TMS- Tetrametilsilano
UV Vis- Ultravioleta visível
δ_c- deslocamento químico de carbono
δ_H- deslocamento químico de próton

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição geográfica da família Moraceae.	20
Figura 2. Algumas espécies frutíferas da família Moraceae. (A) <i>A. heterophyllus</i> (jaca), (B) <i>A. altilis</i> (fruta-pão), (C) <i>F. carica</i> (Figo) e (D) <i>M. alba</i> (amora).	21
Figura 3. Representação da distribuição de espécies de <i>Brosimum</i> por domínio fitogeográfico do Brasil. Fonte: Flora do Brasil, 2020.	23
Figura 4. Estrutura química do bergapteno e psolareno, presentes no fitoterápico Viticromim®	24
Figura 5. Estrutura química de flavonoides glicosilados de <i>B. gaudichaudii</i>	26
Figura 6. Estrutura química da centronbina e terpenos de <i>B. potabile</i>	27
Figura 7. Estrutura química de flavonoides <i>B. rubescens</i>	28
Figura 8. Estrutura química de isoflavonas <i>B. utile</i>	29
Figura 9. Árvore de <i>B. parinarioides</i> em seu habitat (A) e amostra de casca do caule (B).	30
Figura 10. Árvore de <i>B. acutifolium</i> em seu habitat (A) e amostra de casca do caule (B).	32
Figura 11. Flavonoides isolados da casca do caule de <i>B. acutifolium</i>	33
Figura 12. Flavonoides isolados da casca do caule da espécie de <i>B. acutifolium</i>	34
Figura 13. Rota biossintética de flavonoides e sistema de numeração dos flavonoides.	35
Figura 14. Estrutura dos principais subgrupos de flavonoides.	36
Figura 15. Reação de captura do radical livre DPPH na presença de um antioxidante.	38
Figura 16. Reação de captura do radical livre ABTS na presença de um antioxidante.	38
Figura 17. Reação de redução do FRAP na presença de um antioxidante.	38
Figura 18. Triângulo de seletividade de Snyder para grupos de solventes.	42
Figura 19. Planejamentos em rede simplex-centroide para misturas ternárias.	43
Figura 20. Os vouchers # 183522 (A) e #192478 (B) depositados no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).	48
Figura 21. Planejamento experimental do tipo centróide- com três componentes para o preparo dos diferentes extratos.	49
Figura 22. Espectros de ESI-EM obtidos dos sete diferentes extratos de <i>B. acutifolium</i>	62
Figura 23. Gráfico de PCA dos diferentes extratos de <i>B. acutifolium</i>	63
Figura 24. Gráfico biplot da análise de PC1 e PC2 dos extratos de <i>B. acutifolium</i>	64
Figura 25. Dendrograma dos diferentes extratos de <i>B. acutifolium</i> obtida pela Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA).	65
Figura 26. Substâncias identificadas na casca de <i>B. acutifolium</i>	66
Figura 27. Cromatograma da fração EBA4-FI em CLAE-DAD-EM.	67
Figura 28. Espectro de RMN de 1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-309.	68
Figura 29. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-309.	70
Figura 30. Mapa de contorno HMBC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-309.	70
Figura 31. Estrutura da flavana BAS-309.	72
Figura 32. Espectro de massas da substância BAS-309 isolada da casca de <i>B. acutifolium</i>	73
Figura 33. Espectro de MS ² para o íon 309 [M-H] ⁻ e proposta de fragmentação.	73
Figura 34. Espectro de RMN de 1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-307.	74
Figura 35. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-307.	76
Figura 36. Mapa de contorno HMBC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-307.	76
Figura 37. Estrutura da flavana BAS-307.	78
Figura 38. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-307 isolada da casca de <i>B. acutifolium</i>	79
Figura 39. Espectro de MS ² para o íon 307 [M-H] ⁻ e proposta de fragmentação.	79
Figura 40. Espectro de RMN de 1H (MeOD, 500 MHz) e ampliações da substância BAS-255.	80

Figura 41. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-255.....	82
Figura 42. Mapa de contorno HMBC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-255.....	82
Figura 43. Estrutura da chalcona BAS-255.....	84
Figura 44. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-255 isolada da casca de <i>B. acutifolium</i>	85
Figura 45. Espectro de MS ² para o íon 255 [M-H] ⁻ e proposta de fragmentação.....	85
Figura 46. Espectro de RMN de 1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-323.....	86
Figura 47. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-323.....	88
Figura 48. Mapa de contorno HMBC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-323.....	88
Figura 49. Estrutura da chalcona BAS-323.....	90
Figura 50. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-323 isolada da casca de <i>B. acutifolium</i>	91
Figura 51. Espectro de MS ² para o íon 323 [M-H] ⁻ e proposta de fragmentação.....	91
Figura 52. Espectro de RMN de 1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-321.....	92
Figura 53. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-321.....	94
Figura 54. Mapa de contorno HMBC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-321.....	94
Figura 55. Estrutura da chalcona BAS-321.....	96
Figura 56. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-321 isolada da casca de <i>B. acutifolium</i>	97
Figura 57. Espectro de MS ² para o íon 321 e proposta de fragmentação.....	97
Figura 58. Espectro de RMN de 1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-391.....	98
Figura 59. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-391.....	100
Figura 60. Mapa de contorno HMBC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-391.....	101
Figura 61. Estrutura da chalcona BAS-391.....	102
Figura 62. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-391 isolada da casca de <i>B. acutifolium</i>	104
Figura 63. Espectro de MS ² para o íon 391 [M-H] ⁻ e proposta de fragmentação.....	104
Figura 64. Espectro de RMN de 1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-339.....	105
Figura 65. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-339.....	107
Figura 66. Mapa de contorno HMBC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-339.....	107
Figura 67. Estrutura da chalcona BAS-339.....	109
Figura 68. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-339 isolada da casca de <i>B. acutifolium</i>	110
Figura 69. Espectro de MS ² para o íon 339 e proposta de fragmentação.....	110
Figura 70. Substâncias isolados das cascas do <i>B. acutifolium</i>	111
Figura 71. Espectros de massas no modo negativo e principais fragmentos obtidos dos sete diferentes extratos de <i>B. parinarioides</i> . * denota o pico base para cada amostra analisada.....	113
Figura 72. Gráfico de PCA dos diferentes extratos de <i>B. parinarioides</i>	114
Figura 73. Gráfico Biplots da análise de PC1 e PC2 dos extratos de <i>B. parinarioides</i>	114
Figura 74. Dendrograma dos diferentes extratos de <i>B. parinarioides</i> obtida pela Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA).....	115
Figura 75. Substâncias identificadas nas cascas de <i>B. parinarioides</i>	117
Figura 76. Cromatograma da fração EBP3-FI em CLAE-UV (280 e 350nm).....	118
Figura 77. Cromatograma registrado em CLAE-EM das frações (Fr.13-16) da casca de <i>B. parinarioides</i>	119
Figura 78. Espectro de RMN de 1H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-309.....	120
Figura 79. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-309.....	122
Figura 80. Mapa de contorno HMBC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-309.....	122

Figura 81. Estrutura da flavana BAS-309.	124
Figura 82. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BPS-309 isolada da casca de <i>B. parinarioides</i>	125
Figura 83. Espectro de MS ² para o íon 309 [M-H] ⁻ e proposta de fragmentação.	125
Figura 84. Espectro de RMN de ¹ H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-339.	126
Figura 85. Mapa de contorno HSQC (¹ H 500 e ¹³ C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-339.	128
Figura 86. Mapa de contorno HMBC (¹ H 500 e ¹³ C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-339.	128
Figura 87. Estrutura da flavana BPS-339.	130
Figura 88. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BPS-339 isolada da casca de <i>B. parinarioides</i>	131
Figura 89. Espectro de MS ² para o íon 339 [M-H] ⁻ e proposta de fragmentação.	132
Figura 90. Espectro de RMN de ¹ H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-323.	133
Figura 91. Mapa de contorno HSQC (¹ H 500 e ¹³ C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-323.	135
Figura 92. Mapa de contorno HMBC (¹ H 500 e ¹³ C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-323.	135
Figura 93. Estrutura da chalcona BPS-323.	137
Figura 94. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BPS-323 isolada da casca de <i>B. parinarioides</i>	138
Figura 95. Espectro de MS ² para o íon 323 [M-H] ⁻ e proposta de fragmentação.	138
Figura 96. Espectro de RMN de ¹ H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-291.	139
Figura 97. Mapa de contorno HSQC (¹ H 500 e ¹³ C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-291.	141
Figura 98. Mapa de contorno HMBC (¹ H 500 e ¹³ C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-291.	141
Figura 99. Estrutura derivada do ácido hidrocínâmico BPS-291.	143
Figura 100. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substancia BPS-291 isolada da casca de <i>B. parinarioides</i>	144
Figura 101. Espectro de MS ² para o íon 291 [M-H] ⁻ e proposta de fragmentação.	144
Figura 102. Espectro de RMN de ¹ H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-255.	145
Figura 103. Espectro de massas do isoliquiritigenina (BPS-255), isolado da casca de <i>B. parinarioides</i>	147
Figura 104. Espectro de RMN de ¹ H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-321.	148
Figura 105. Espectro de massas do kanzonol B (BPS-321), isolado da casca de <i>B. parinarioides</i>	150
Figura 106. Substâncias isolados das cascas do <i>B. parinarioides</i>	151
Figura 107. Principais interações observadas entre doxorubicina e tirosina quinase-3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.	157
Figura 108. Principais interações observadas entre kanzonol B (A) e kanzonol C (B) no sítio ativo de FLT3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.	157
Figura 109. Principais interações observadas entre licoagrachalcona A no sítio ativo de FLT3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.	158
Figura 110. Principais interações observadas entre corylifol B (A) e e isobavachalcona (B) no sítio ativo de FLT3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.	158
Figura 111. Principais interações observadas entre isoliquiritigenina no sítio ativo de FLT3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.	159
Figura 112. Principais interações observadas entre parinarioidina C no sítio ativo de FLT3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns exemplos de compostos bioativo isolados de espécies família Moraceae.	21
Tabela 2. Planejamento experimental com três componentes para o preparo dos extratos de <i>B. acutifolium</i> e <i>B. parinarioides</i>	50
Tabela 3. Rendimento em percentual dos diferentes extratos de <i>B. acutifolium</i>	61
Tabela 4. Principais fragmentos obtidos dos sete diferentes extratos de <i>B. acutifolium</i>	63
Tabela 5. Informações anotadas da fração BA4-FI em CLAE-DAD-EM de <i>B. acutifolium</i>	67
Tabela 6. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BAS-309.	72
Tabela 7. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BAS-307.	78
Tabela 8. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BAS-255.	84
Tabela 9. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BAS-323.	90
Tabela 10. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BAS-321.	96
Tabela 11. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BAS-391.	103
Tabela 12. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BAS-339.	109
Tabela 13. Rendimento em percentual dos diferentes extratos de <i>B. parinarioides</i>	112
Tabela 14. Principais fragmentos obtidos dos sete diferentes extratos de <i>B. parinarioides</i>	113
Tabela 15. Informações anotadas da fração EBP3-FI em CLAE-UV e EM de <i>B. parinarioides</i>	118
Tabela 16. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BPS-309.	124
Tabela 17. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BPS-339.	130
Tabela 18. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BPS-323.	137
Tabela 19. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BPS-291.	143
Tabela 20. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BPS-255.	146
Tabela 21. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância BPS-321.	149
Tabela 22. Conteúdo de fenólicos totais dos diferentes extratos de <i>B. acutifolium</i> e <i>B. parinarioides</i>	152
Tabela 23. Ensaio antioxidante de DPPH, ABTS e FRAP dos extratos de <i>B. acutifolium</i> e <i>B. parinarioides</i>	154
Tabela 24. Ensaio antioxidante de DPPH, ABTS e FRAP das substâncias de <i>B. acutifolium</i> e <i>B. parinarioides</i>	155
Tabela 25. Análise de ancoragem molecular com a proteína FLT3 e valores de energia livre de ligação para os ligantes e interações observadas com os resíduos de aminoácidos.	160

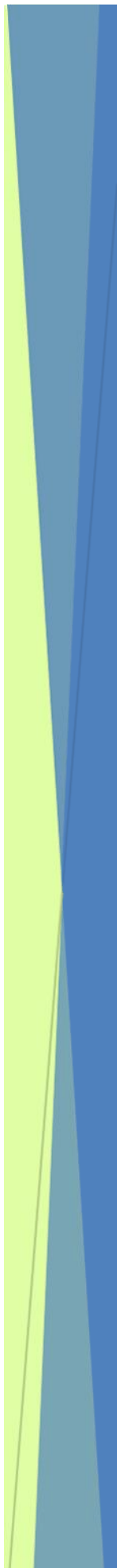
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 A família Moraceae	20
2.2. O gênero <i>Brosimum</i>	22
2.2.1. Aspectos botânicos e fitogeográficos	22
2.2.2. Aspectos etnobotânicos	23
2.2.3. Aspectos químicos e biológicos	24
2.3 A espécie <i>Brosimum parinarioides</i>	29
2.4 A espécie <i>Brosimum acutifolium</i>	31
2.5 Flavonoides	35
2.5.1 Flavonoides e atividade antioxidante	36
2.5.2 Flavonoides e potencial antitumoral	39
2.5.3 Flavonoides como inibidores de FLT3 para o tratamento potencial da leucemia mielóide aguda.	40
2.6. Instrumentação analítica de forma integrativa no estudo de produtos naturais	41
2.7. Planejamento de misturas	41
2.8. Quimiometria	43
3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo geral	46
3.2. Objetivos específicos	46
.....	47
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	48
4.1. Coleta e identificação do material vegetal	48
4.2. Secagem e processamento do material vegetal	49
4.3. Extração em escala analítica baseada no triângulo de seletividade de Snyder	49
4.4. Análise por espectrometria de massas (EM)	50
4.5 Análise quimiométrica dos dados	51
4.6. Preparo de extratos em larga escala e isolamento de constituintes químicos	51
4.6.1. Preparo e fracionamento cromatográfico do extrato EBA4 de <i>B. acutifolium</i>	51
4.6.1.1. Preparo do extrato EBA4	51
4.6.1.2. Fracionamento extrato EBA4	51
4.6.1.3. Análises por CLAE-DAD-EM e CLAE semipreparativo da fração EBP4-FI	52
4.6.2. Preparo e fracionamento cromatográfico do extrato EBA4 de <i>B. acutifolium</i>	53

4.6.2.1. Preparo do extrato EBP3	53
4.6.2.2. Fracionamento extrato EBP3.....	53
4.6.2.3. Análises por CLAE-DAD-EM e CLAE semipreparativo da fração EBP3-FI	54
4.7. Fracionamento cromatográfico do extrato EMCBP de <i>B. parinarioides</i>	55
4.8. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	56
4.9. Quantificação de fenólicos totais pelo método <i>Folin-Ciocalteu</i>	57
4.10. Determinação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante.....	57
4.10.1. Capacidade de sequestro do radical livre DPPH	57
4.10.2. Capacidade de sequestro do radical ABTS	57
4.14.3. Capacidade redutora do Ferro (FRAP).....	58
4.11. Análise por ancoragem molecular	58
.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
5.1. Espécie <i>B. acutifolium</i>	61
5.1.1. Rendimento dos extratos	61
5.1.2. Análise de perfil por ESI-EM e quimiométrica dos extratos de <i>B. acutifolium</i>	62
5.1.4. Determinação estrutural das substâncias isoladas das cascas do <i>B. acutifolium</i>	68
5.1.4.1. Determinação estrutural da substância BAS-309	68
5.1.4.2. Determinação estrutural da substância BAS-307	74
5.1.4.3. Determinação estrutural da substância BAS-255	80
5.1.4.4. Determinação estrutural da substância BAS-323	86
5.1.4.5. Determinação estrutural da substância BAS-321	92
5.1.4.5. Determinação estrutural da substância BAS-391	98
5.1.4.5. Determinação estrutural da substância BAS-339	105
5.1.5. Constituintes químicos isolados das cascas do <i>B. acutifolium</i>	111
5.2. Espécie <i>B. parinarioides</i>	112
5.2.1. Rendimento dos extratos	112
5.2.2. Perfil químico por ESI-EM e análise quimiométrica de <i>B. parinarioides</i>	112
5.2.3. Perfil químico e isolamento de substâncias de EBP3-FI.....	117
5.2.4. Perfil químico e isolamento de substâncias proveniente do estudo fitoquímico clássico de <i>B. parinarioides</i>	118
5.2.5. Determinação estrutural das substâncias isoladas das cascas do <i>B. parinarioides</i>	119
5.2.5.1. Determinação estrutural da substância BPS-309.....	119
5.2.5.2. Determinação estrutural da substância BPS-339.....	126

5.2.5.3. Determinação estrutural da substância BPS-323.....	133
5.2.5.4. Determinação estrutural da substância BPS-291.....	139
5.2.5.5. Determinação estrutural da substância BPS-255.....	145
5.2.5.6. Determinação estrutural da substância BPS-321.....	148
5.2.6. Constituintes químicos isolados das cascas do <i>B. parinarioides</i>	151
5.3. Estudo da Atividade Biológica.....	152
6. CONCLUSÃO	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
ANEXO	177

1. Introdução



1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a busca por terapias alternativas baseadas em produtos naturais, especialmente de origem vegetal, tem se intensificado em todo o mundo (SHAKYA, 2016; BARANITHARAN et al., 2019; TASNEEM et al., 2019; ANAND et al., 2019; NUNES et al., 2020). Isso se deve à ineficiência ou escassez de fármacos disponíveis para o tratamento das mais diversas doenças, tais como as inflamatórias crônicas, como câncer, aterosclerose, doença de Alzheimer e diabetes sendo estas responsáveis por uma parcela significativa de mortes em todo o mundo (AKIYAMA et al., 2000; COUSSENS & WERB, 2002; LIBBY et al., 2002; HOTAMISLIGIL, 2006; SHOELSON et al., 2006; TASNEEM et al., 2019; NUNES et al., 2020). Por outro lado, o uso indiscriminado de plantas medicinais sem qualquer comprovação científica pode ser perigoso, considerando que muitas podem apresentar toxicidade, além de não apresentar a atividade biológica desejada (BEGAA et al., 2019).

Dessa maneira, a pesquisa por compostos com propriedades terapêuticas a partir de plantas medicinais continua sendo considerada como uma abordagem promissora para a descoberta de novas drogas. Todavia, o sucesso dessas pesquisas depende inicialmente da seleção adequada da planta, que muitas vezes é feita pela observação do uso popular em diferentes culturas (RATES, 2001; YUNES, et al., 2001, SCHENKEL, et al., 2003). Relatos da literatura comprovam que é mais provável encontrar atividade biológica em plantas provenientes da medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso. Nesse sentido, é muito importante levar em consideração as informações botânico-taxonômicas e químico-taxonômicas (PINTO, et al., 2002; NIERO, et al., 2003).

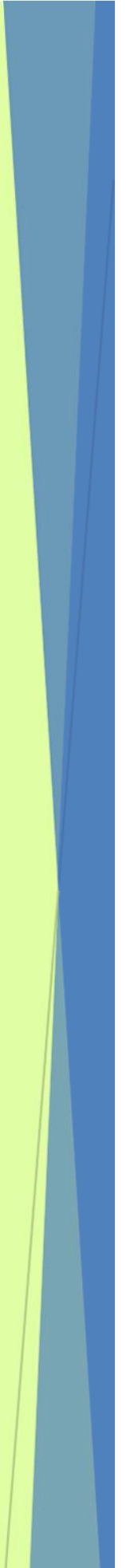
Na Região Amazônica, inúmeras espécies são utilizadas na medicina tradicional, muitas das quais sem qualquer comprovação científica (COELHO-FERREIRA, 2009; BREITBACH et al., 2013; PEDROLLO et al., 2016; CONEGUNDES et al., 2020). Em meio a esta grande biodiversidade, inúmeras espécies pertencentes ao gênero *Brosimum* (Moraceae) destacam-se devido ao seu uso no tratamento de diversas doenças, tais como, doenças de pele, doenças respiratórias, doenças inflamatórias além do câncer (LIMA et al., 2013; SÁ et al., 2020a, 2020b). A atividade citotóxica de flavonoides como brosimacutinas J-M, e brosimina A de espécies de *Brosimum* apresentam evidências de propriedades antitumorais (TAKASHIMA et al., 2005; MAUÉS et al., 2019). A atividade antioxidante recorrente em espécies da Amazônia pode estar associada à presença de flavonoides, classe

comumente encontradas no gênero *Brosimum* (SÁ et al., 2020a, 2020b) e previamente reportada como potenciais agentes antioxidantes e antitumorais (WILLIAMS et al, 2004; CHIN et al, 2013; YEN et al, 2021).

Algumas das ferramentas modernas mais versáteis para a investigação química de matrizes biológicas complexas são: a espectrometria de massas (EM), associada ou não a técnicas cromatográficas (ex. CLAE), e a ressonância magnética nuclear (RMN). De maneira integrativa, essas técnicas possibilitam inúmeras abordagens analíticas, seja no reconhecimento prévio de matrizes complexas, ou mesmo na busca por novas substâncias de valor farmacológico. Recentemente, o uso análises exploratórias e o planejamento de misturas têm permitido o reconhecimento prévio de matrizes diversas, podendo auxiliar nas etapas de seleção do material a ser investigado, permitindo o isolamento seletivo de compostos de interesse ou ainda não identificados, reduzindo o tempo e o custo da abordagem fitoquímica.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou investigar, a partir de técnicas instrumentais modernas, o conteúdo químico de espécies do gênero *Brosimum* presentes na Região Amazônica, além de avaliar a atividade antioxidante e antitumoral dos diversos extratos e substâncias isoladas.

2. Revisão Bibliográfica



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A família Moraceae

Moraceae é uma valiosa família dentro das Angiospermas, sendo constituída botanicamente por 38 gêneros e 1.150 espécies, com ampla distribuição nos trópicos, subtropicais e algumas regiões temperadas de ambos os hemisférios (BERG, 2001) (Figura 1). Anteriormente, a família fazia parte da extinta ordem Urticales, que após estudos de filogenia com dados moleculares (APG III, 2009), passou a fazer parte da ordem Rosales.

No Brasil ocorrem 19 gêneros e 201 espécies, das quais 65 são endêmicas (ex. *Brosimum*, *Cecropia* e *Dorstenia*) e introduzidas (ex. *Morus* e *Artocarpus*) (CARAUTA 1996; BERG 2001; ROMANIUC-NETO et al, 2015). Na floresta Amazônica apresentam ampla distribuição, sendo 44 espécies presentes na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RIBEIRO et al, 1999). As espécies da família Moraceae possuem hábito arbóreo, embora também sejam encontrados como arbustos, ervas e trepadeiras. Podem ser caracterizadas em geral pela presença de látex leitoso, distribuídos em toda parte da planta (CARAUTA 1978; BERG 2001).



Figura 1. Mapa da distribuição geográfica da família Moraceae.

Muitos representantes desta família são economicamente importantes, sendo espécies frutíferas de grande importância nutricional, tais como: *Artocarpus heterophyllus* (jaca), *Artocarpus altilis* (fruta-pão), *Ficus carica* (Figo), *Morus alba* (amora) (CASTRO, 2006; LEITE et al, 2018), (Figura 2). Outros são utilizados para fins ornamentais, arborização urbana e no setor madeireiro (ex. *Morus*). Esta família é considerada promissora no que se refere ao número de espécies com potencial fitoterápico, com destaque para o gênero *Brosimum* (POZETTI, 1969; VIEIRA et al., 1999).

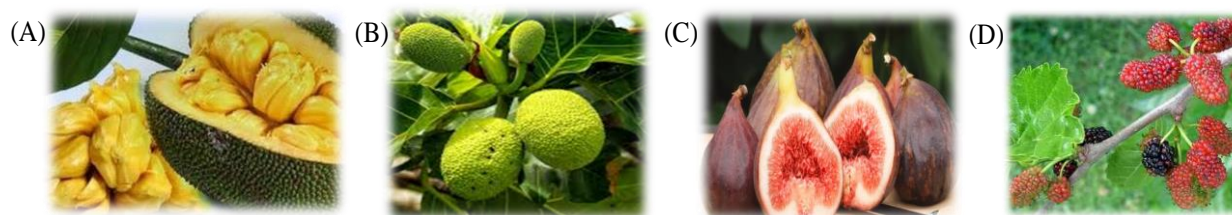


Figura 2. Algumas espécies frutíferas da família Moraceae. (A) *A. heterophyllus* (jaca), (B) *A. altilis* (fruta-pão), (C) *F. carica* (Figo) e (D) *M. alba* (amora).

As plantas da família Moraceae têm sido caracterizadas quimicamente como fontes ricas em substâncias fenólicas, abrangendo flavonoides, flavonoides prenilados, cromonas preniladas, cumarinas, chalconas, flavanas, além de estilbenos, triterpenos e novos derivados estruturais. Estas substâncias detêm diversas propriedades biológicas, tais como anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicos, antitumoral, antidiabéticos, antioxidantes, imunomoduladoras e contra doenças de pele (VENKATARAMAN 1972; NOMURA et al, 1998; NGADJUI et al, 2003; NGADJUI et al, 2005; PRAKASH et al, 2009; PEREIRA et al, 2013; WANG et al, 2014; YANG et al, 2014; TAVIANO et al, 2018; LIU et al, 2020; NGAMENI et al, 2020). Alguns exemplos de compostos bioativos relatados em distintas espécies da família Moraceae são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Alguns exemplos de compostos bioativo isolados de espécies família Moraceae.

Classe Química	Substância	Espécie	Parte da planta	Atividade Biológica	Referência
Cromonas preniladas	Artoheterofinos A e B	<i>A. heterophyllus</i>	Caulas e folhas	Anti-inflamatória e antiproliferativa	LIU et al, 2020
Derivados de chalcona	Moracalcona B e C	<i>M. alba</i> L.	Folhas	Atividade citotóxica	YANG et al, 2010
Fenólicos do tipo Diels-Alder	Morusalisinas A-F	<i>M. alba</i>	Folhas	Antidiabéticos	SU et al, 2020
Compostos fenólicos	-	<i>M. alba</i>	Folhas	Anticâncer	CHAN et al, 2020

Chalconas	Isobavachalcona; Kanzonol B	<i>D. barteri</i> var.	Galhos	Antimaláricos	NGAMENI et al, 2007
Chalconas	Isobavachalcona; Kanzonol C	<i>D. barteri</i>	Galhos	Antimicrobiana	MBAVENG et al, 2008.
Cumarinas	Psoraleno; Hidroximarmesina	<i>D. turbinata</i>	Galhos	Antimicrobiano	NGAMENI et al, 2009
Terpenos	β -Amirina; β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D- glucopiranosídeo	<i>F. chlammydocarpa</i> e <i>F. cordata</i>	Casca do caule	Antimicrobiana	KUETE et al, 2008
Compostos fenólicos	-	<i>F. carica</i>	Fruto	Antioxidante e Antidiabética	WOJDYŁO et al, 2016
Dihidrochalconas	Saqueninas Fe H	<i>A. altilis</i>	Folhas	Anticâncer	NGUYEN et al, 2014
Flavonoides prenilados	Artocarpina	<i>A. altilis</i>	Cerne e casca	Antioxidantes e Agentes de clareamento de pele	LAN et al, 2003

2.2. O gênero *Brosimum*

2.2.1. Aspectos botânicos e fitogeográficos

O gênero *Brosimum* compreende 13 espécies (*B. acutifolium* Huber; *B. alicastrum* Sw.; *B. gaudichaudii* Trécul; *B. glaucum* Taub.; *B. glaziovii* Taub.; *B. guianense* (Aubl.) Huber; *B. lactescens* (S. Moore) C.C. Berg; *B. longifolium* Ducke; *B. melanopotamicum* C.C. Berg; *B. parinarioides* Ducke; *B. potabile* Ducke; *B. rubescens* Taub.; e o *B. utile* (Kunth) Pittier). É um gênero pertencente à família Moraceae, distribuído em 5 tribos (Moreae, Artocarpeae, Castilleae, Dorstenieae e Ficeae), em sua maioria nas regiões tropicais (RIBEIRO & BERG 1999; DALL' STELLA, 2008; FLORA DO BRASIL, 2020).

As espécies de *Brosimum* são de origem nativa e apresentam grande representatividade na Amazônia, seguido da Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e pouco representada na região do pantanal (Figura 3). São arbustos ou árvores de grande porte podendo atingir até 40 m de altura onde todos sem exceção produzem látex (CASTRO 2006; FLORA DO BRASIL, 2020).

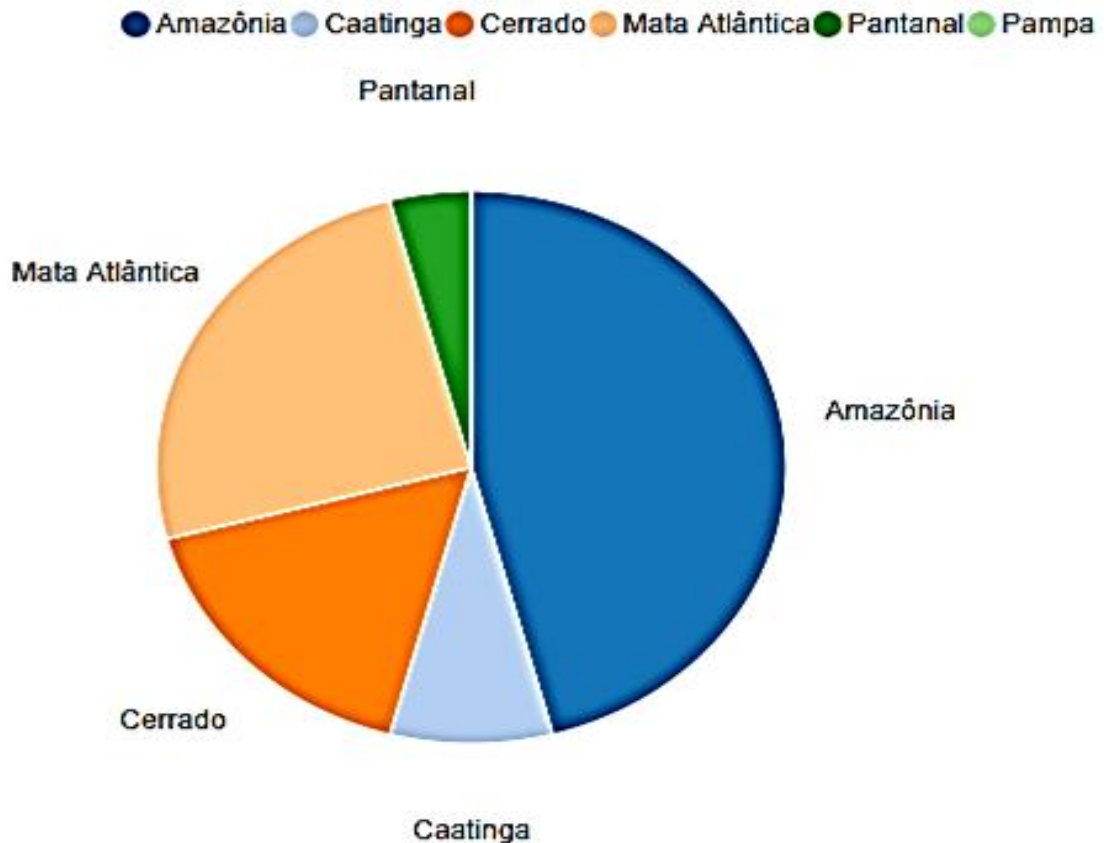


Figura 3. Representação da distribuição de espécies de *Brosimum* por domínio fitogeográfico do Brasil. Fonte: Flora do Brasil, 2020.

2.2.2. Aspectos etnobotânicos

A espécie *B. gaudichaudii* (nome popular: inharé, mama-cachorro e mama-cadela) é encontrada e amplamente estudada na vegetação do cerrado do Brasil. Estudos com a comunidade Araguaia do norte, no Mato Grosso, detectaram o uso de decocção, infusão, maceração das diferentes partes dessa espécie (ex. raízes, casca e látex) para tratar doenças cancerígenas, doenças venéreas, anemia, inflamação, reumatismo e doenças de pele, como micoses e vitiligo (RIBEIRO, et al., 2017). No Nordeste há relatos da utilização da casca e folha do *B. gaudichaudii* por meio do uso de chás ou banhos para tratar manchas de pele (AGRA, et al., 2008). Estudos demonstram que *B. gaudichaudii* é a espécie mais disseminada do gênero, sendo indicado principalmente no tratamento de doenças de pele como vitiligo e psoríase. Posteriormente, seu uso medicinal foi associado à presença dos compostos cumarínicos majoritários: bergapteno e psoraleno, que são princípios ativos do remédio fitoterápico Viticromim® (VIEIRA et al., 1999; POZETTI, 1969) (Figura 4)

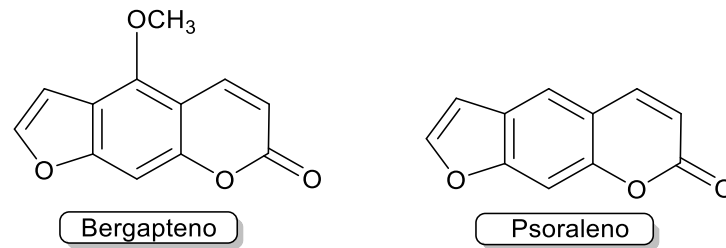


Figura 4. Estrutura química do bergapteno e psoraleno, presentes no fitoterápico Viticromim®

De acordo com o trabalho de revisão de Michel e colaboradores (2016) sobre a espécie *B. alicastrum* Swingle, as folhas e frutos são utilizadas frequentemente no tratamento de menopausa e osteoporose na América Central. O levantamento sobre o uso do látex com os indígenas do Juruá e vale chazuta, pertencentes à região do Equador e Peru Amazônico respectivamente, demonstrou o uso do látex contra doenças de disenteria, diarreia e como anti-inflamatório (GIOVANNI, 2015).

A espécie *B. parinarioides* Ducke (nome popular: amapá ou amapá-doce) é amplamente utilizada na Amazônia pelas populações rurais e urbanas há muitos anos, na forma do produto fitoterápico chamado leite do amapá (látex), coletado por meio da sangria do tronco da árvore. Esse látex é bastante utilizado pelas comunidades para o tratamento de doenças do pulmão, tosse, tuberculose, fortificante e estimulante sexual (PEDROLLO et al., 2016).

As espécies *B. utile*, *B. potabile*, *B. alicastrum* e *B. longifolium*, também possuem um látex que é considerado potável, sendo o látex de *B. longifolium* utilizado contra doenças pulmonares (BERG et al., 1973). Por outro lado, o principal uso fitoterápico das cascas do *B. acutifolium* (nome popular: muréré ou mercúrio vegetal) na Região Amazônica é no tratamento de doenças reumáticas e anti-inflamatórias (ELISABETSKY & CASTILHOS, 1990; MORRETI et al., 2006). Existe ainda, o relato na obra de Daniel (2004), intitulada “o tesouro descoberto no máximo rio Amazonas”, em que associam o uso desta espécie no tratamento da sífilis entre os indígenas e colonos da Amazônia (DUKE 2008; VIEIRA et al., 2019).

2.2.3. Aspectos químicos e biológicos

A análise da composição química das espécies do gênero *Brosimum* tem apontado a presença acentuada de flavonoides, flavonoides prenilados (SHIROTA et al., 1997, 1998; TORRES et al., 2000), cumarinas (BRAZ-FILHO et al., 1972; GOTTLIEB et al., 1972;

VILEGAS & POZETTI, 1993), terpenos (ABREU et al., 2010), chalconas e flavanas (TAKASHIMA & OHSAKI, 2001, 2002; TAKASHIMA et al., 2005).

De acordo com o estudo fitoquímico realizado com as cascas, folhas e raiz de *B. gaudichaudii*, foi revelado que os principais componentes são duas furanocumarinas, bergapteno e psoraleno (POZZETI 1969, GOTTLIEB et al., 1972). Já de acordo com Lourenço, (2001), para cada 1,0 g de material seco utilizado, são encontrados bergapteno (32 mg) e psoraleno (27,6 mg), que correspondem a 3,0% e 2,8% do total do material. Lourenço, 2001 também reportaram os flavonoides glicosilados 5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-C-glucopiranosilflavona e 5,7,3', 4'-tetrahidroxi-3-O- β -d-galactopiranosil-flavonol nos extratos metanólicos das folhas, galhos e cerne de *B. gaudichaudii* (Figura 5).

Segundo o estudo de Vieira (1999), obteve-se o isolamento de uma nova cumarina, denominada gaudichaudina, juntamente com as substâncias conhecidas: bergapteno, psoraleno, (+)-(2'S,3'R)-3'-hidroximarmesina, xantiletina e luvangetina, provenientes do extrato de diclorometano da casca da raiz de *B. gaudichaudii*, (Figura 5). Posteriormente, foi relatado o isolamento de onze substâncias pertencentes também à classe dos flavonoides, dentre eles quatro cumarinas conhecidas como marmesina, 1',2'-desidromarmesina, 8-metoximarmesina e 1'-hidroxi-3'-O-glucopiranosilmarmesina, e uma chalcona identificada como 2',4', 4-trihidroxi-3',3-diprenilchalcona. Ainda, dois esteroides como o β -sitosterol, daucosterol e o triterpeno β -amirina. Além de três novas substâncias derivados de ácido cinâmico 3-(7-metoxi-2,2-dimetil-ácido2H-6-cromenil)-(E)-propanoico, 3-(7-metoxi-ácido2,2-dimetil-2H-6-cromenil) propanoico e o 3-ácido (6-metoxibenzo- β -furan-5-il) propanoico (MONTEIRO et al., 2002), (Figura 5).

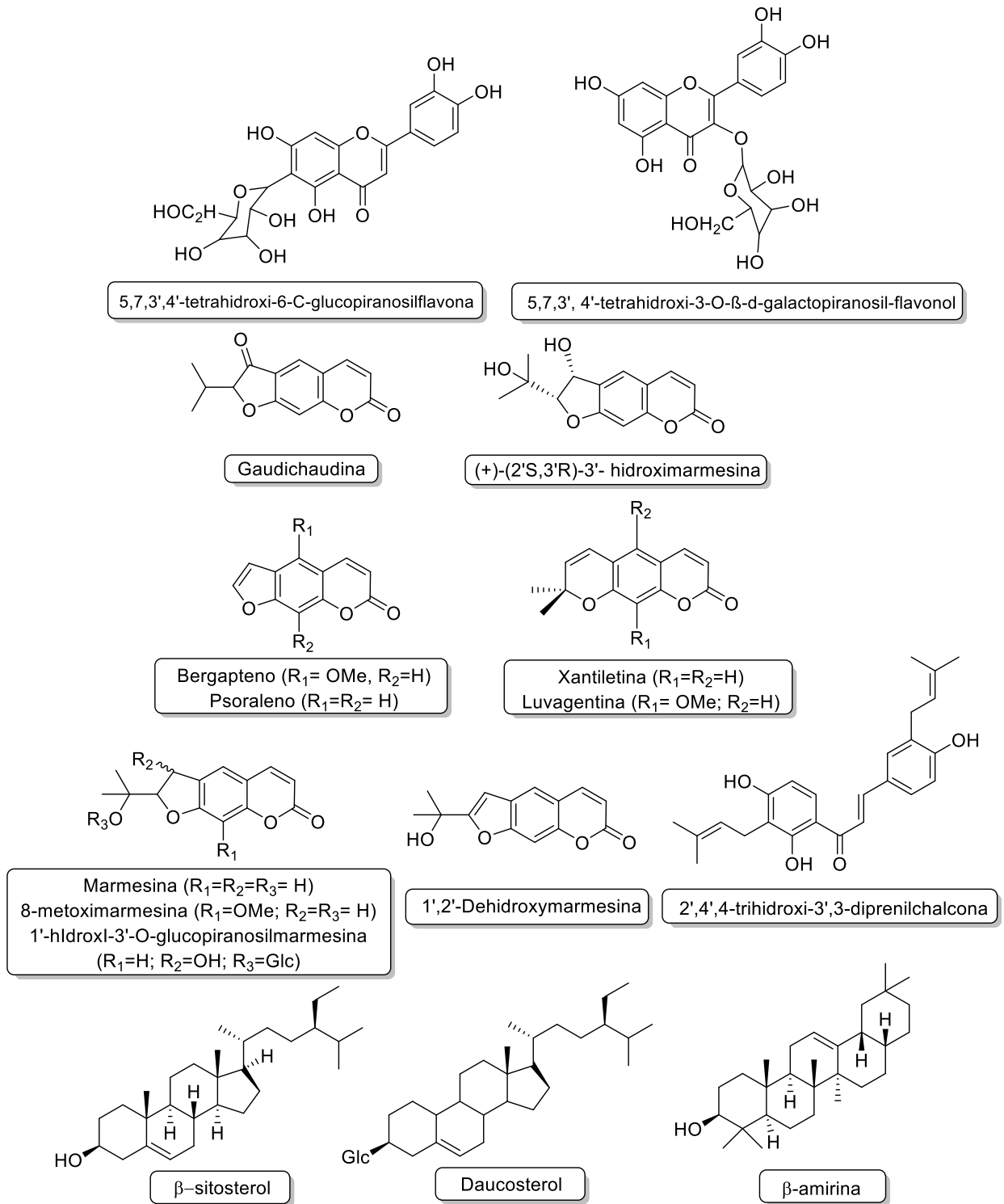


Figura 5. Estrutura química de flavonoides glicosilados de *B. gaudichaudii*.

O estudo químico realizado, a partir do extrato metanólico do cerne de *B. potable* resultou no isolamento de três cumarinas conhecidas como 5-metoxipsoraleno, xantiletina e marmesina. As análises das frações de hexano proveniente desse mesmo extrato, sugeriram a

identificação dos triterpenos urs-12-eno, 3β -acetóxi-oleana-12-eno, 3β -acetóxi-ursa-12-eno, 3β -acetóxi-lupa-12,20(29)-dieno e esteróis como o estigmasterol e β -sistosterol (Figura 6), (ALCÂNTARA, 2000; ABREU et al., 2010). A substância cetronbina foi isolado pela primeira vez do extrato etanólico do caule da espécie de *B. potabile* (ALCÂNTARA et al., 2000).

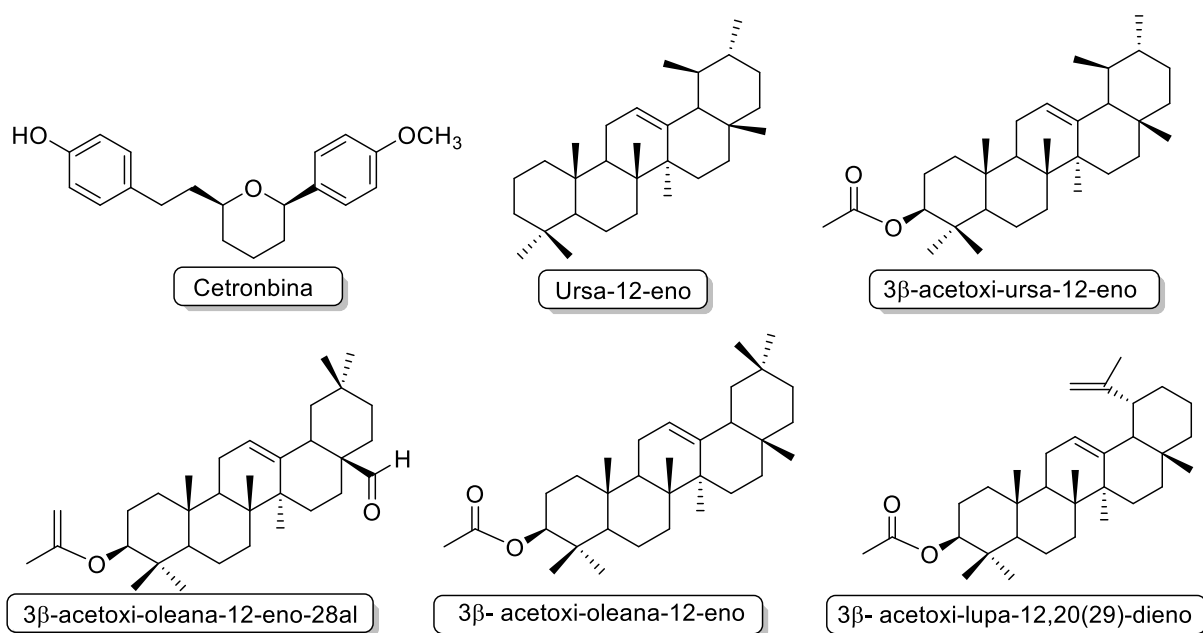


Figura 6. Estrutura química da cetronbina e terpenos de *B. potabile*.

A partir do aproveitamento de resíduos da espécie *B. rubescens* (Nome popular: Pau-rainha) descartados pelo setor madeireiro, foram obtidos os extratos metanólicos do cerne e alborno, onde foram isoladas as substâncias como, 7-desmetilsuberosina, brosiparina, luvagentina, brosiprenina, 3β -acetoxi-olean-12-eno-28-al, β -sitosterol e um alto teor da cumarina xantiletina, a qual apresenta atividades antiplaquetária, antifúngica, herbicida e alguns de seus derivados possuem atividade citotóxica em linhagens de células leucêmicas (BRAZ, et al., 1972; HAYASIDA, et al., 2008; HAYASIDA, et al., 2011). Ainda do extrato metanólico da casca dessa espécie, foram isoladas as substâncias modificadas por meio de ciclo-adição do tipo Diels-Alder de chalconas e prenilcumarinas, denominadas de palodesangretinas 1-2 (SHIROTA, et al., 1998), palodesagrenos A-E e as cumarinas conhecidas como xantiletina, aegelinol e 7-desmetilsuberosina. Os palodesagrenos D e E apresentam relatos de inibição contra a produção de hormônios masculinos (SHIROTA et al., 1997) (Figura 7).

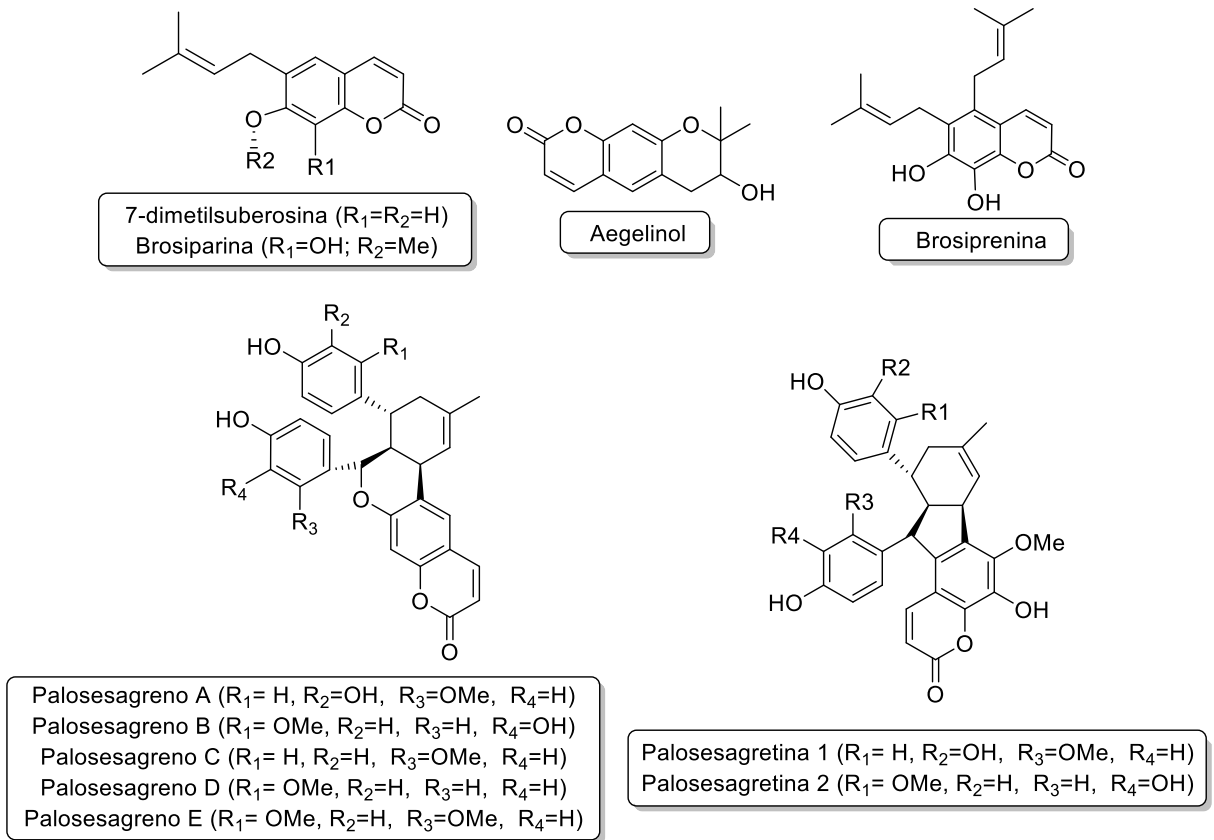


Figura 7. Estrutura química de flavonoides *B. rubescens*.

No trabalho realizado por Ferrari e colaboradores (2005), a partir do extrato da raiz da espécie de *B. utile* foi isolada uma nova isoflavona, denominada isowigtheona hidrato (5,7,4'-trihidroxi-3'-(3-hidroxi-3-metilbutil-isoflavona), além de seis isoflavonas conhecidas e uma epicatequina. O estudo de citotoxicidade *in vitro* da 5,7,4'-trihidroxi-3'-(3-hidroxi-3-metilbutil)isoflavona contra linhagem de células tumorais (MCF7-carcinoma de mama humano e PC3-carcinoma da próstata humana revelou boa atividade e uma baixa toxicidade para células normais (FERRARI et al., 2005) (Figura 8).

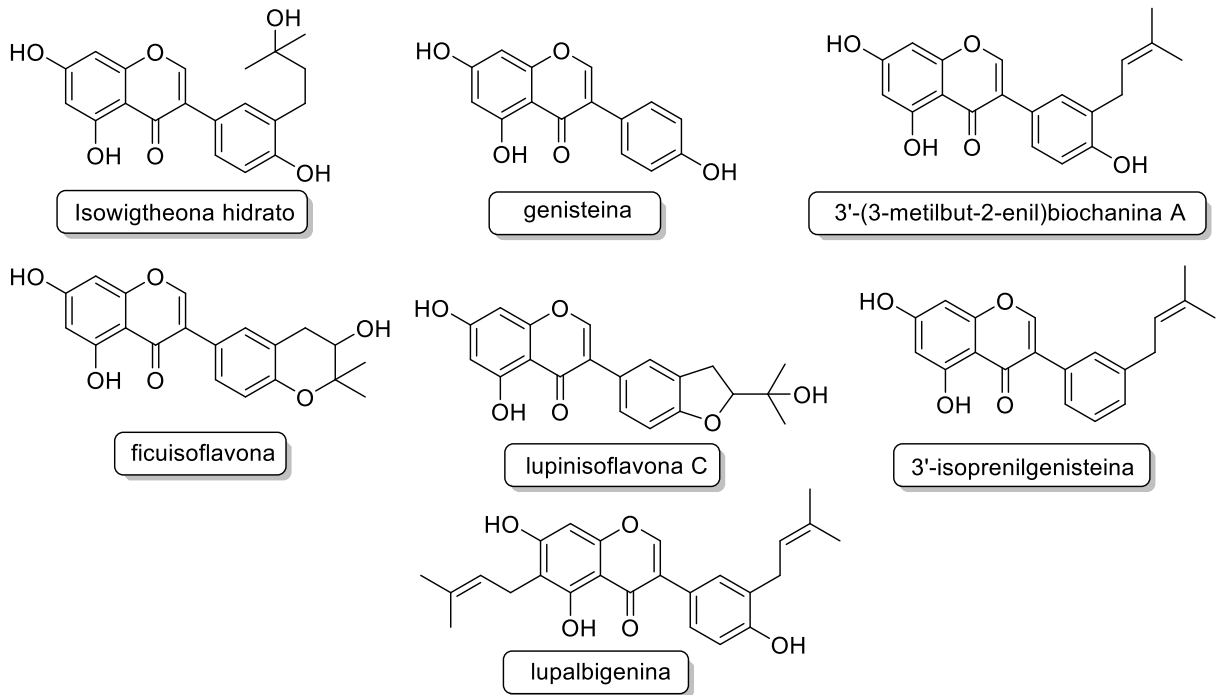


Figura 8. Estrutura química de isoflavonas *B. utile*.

2.3 A espécie *Brosimum parinarioides*

Brosimum parinarioides (Huber) Ducke, possui nome popular de amapazeiro, amapá-doce, amapá-roxo, amaparana e murerana. Ocorre principalmente nos estados do Amapá, Amazonas, Pará, e Rondônia e Roraima, também pode ser encontrado no Mato Grosso, Guiana Francesa, habita frequentemente as matas de terra firme alta em solos sílico-argiloso (LOUREIRO, et al., 2000; FLORA DO BRASIL, 2020). O amapá doce é somente encontrado em terra firme, uma vez que ele não resiste à cheia do rio (SOUZA, 2003). No que se refere à morfologia da planta é uma árvore lactescente, de grande porte podendo atingir até 40 m de altura com tronco é cilíndrico e bem reto e entrecasca avermelhada, cuja madeira interna amarela clara (Figura 9), (CORREA, 1978; REVILLA, 2002). Suas folhas possuem tamanhos variáveis com no máximo 22 cm por 10 cm de largura, duras e com base levemente arredondada.

O leite do amapá é um medicamento de uso popular amazônico muito utilizado pela população, por meio da sangria ou corte do tronco, como cicatrizante de feridas, e empregado por sua atividade antitussígena e anti-inflamatória (SHANLEY, et al., 2005; BORRÁS, 2003). O látex também é utilizado em emplastos e contusões diretamente nas áreas afetadas, acredita-

se ainda que é indicado no tratamento de doenças respiratórias, tônico, fortificante ou energizante (REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003).

O látex desta espécie é um produto muito utilizado pela população, apresentando um gosto doce e agradável, possui aspecto branco quando fresco, ou rosa claro depois do contato com o ar, sendo bastante viscoso muito semelhante à cola (RIBEIRO, 1999). Devido ao seu alto potencial medicinal, esse látex é muito apreciado pelas comunidades rurais, sendo substituinte muitas vezes do leite bovino na alimentação humana (GALUPPO, 2004). Segundo experiências populares o leite de amapá é consumido há muitos anos pelas populações amazônicas, por administração oral, ingerido *in natura*, diluído com leite ou água e muitas vezes agitado ou batido no copo manualmente ou mecanicamente com o auxílio de liquidificador, cuja espuma formada, é abundante e densa, sendo descartada (BORRÁS, 2003). Normalmente a produção do látex é artesanal e devido a não existência de uma organização empresarial sobre esse produto, corre o perigo de ter adulterações por outra espécie parecida (REVILLA, 2002; SHANLEY, et al., 2005).



Figura 9. Árvore de *B. parinarioides* em seu habitat (A) e amostra de casca do caule (B).

Estudos realizados anteriormente na dissertação de mestrado desenvolvido por Sá (2018), foi descrito o estudo inédito da caracterização química da casca e látex da espécie *B. parinarioides*. Onde foi possível identificar por tentativa através da análise por APCI-MS² no modo negativo à presença das substâncias fenólicas ácido clorogênico e ácido quínico do extrato metanólico do látex. No extrato hexânico da casca foram identificados por CG-EM as substâncias terpênicas lanosterol, noroleano, acetato de α -amirina, acetato β -amirina, acetato

de cicloartenol e urs-12-eno. Além destes, outros seis terpenoides conhecidos como acetato de lanosterol, α -amirina, β -amirina, lupeol e acetato de lupeol foram identificados também por CG-EM do extrato metanólico da casca desta espécie.

O fracionamento do extrato metanólico da casca de *B. parinarioides* resultou no isolamento de duas substâncias inéditas denominadas de 4',6-dihidroxi-5'-prefenil-flavana e 2,4,4'-trihidroxi-5'-(2''-hidroxi-3''-metil-3''-butenil)-chalcona, e uma terceira substância conhecida como 2,4,4'-trihidroxi-3'-prenil-chalcona isolada pela primeira vez no gênero *Brosimum*. Quanto, o estudo de citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células tumorais os extratos todos apresentaram atividade citotóxica promissora com valores de $IC_{50} < 30\mu\text{g/mL}$. Também foram avaliados o potencial antioxidante dos extratos e substâncias isoladas onde foi possível observar o alta atividade antioxidante quando avaliados pelos radicais DPPH e ABTS. Por fim, a avaliação da inibição da enzima lipoxigenase, demonstrou resultado positivo em comparação ao padrão NDGA, onde corroborou com o uso popular contra doenças anti-inflamatórias.

2.4 A espécie *Brosimum acutifolium*

Brosimum acutifolium (Huber) Ducke é uma espécie vegetal, denominada pelo nome popular de mercúrio vegetal, mururé e mureru. Pode ser encontrada no domínio fitogeográfico do Pantanal, embora com predominância em regiões de terra firme e de mata muito fechada da Região Amazônica. Sabe-se que ocorre no Norte (estados do Acre, Amazonas e Pará), Nordeste (estado do Maranhão) e Centro-Oeste (estado do Mato Grosso), (FLORA DO BRASIL, 2020). Quanto à descrição morfológica, a árvore lactescente, é descrita como de grande porte, podendo atingir até 35 m de altura, onde o tronco é duro e avermelhado com entrecasca de cor amarelada (Figura 10). As folhas são alongadas (3 a 18 cm) com terminações de ponta aguda. Prefere solos arenosos e argilo-arenosos com uma quantidade moderada de matéria orgânica (PINAGÉ 2011; FLORA DO BRASIL, 2020).

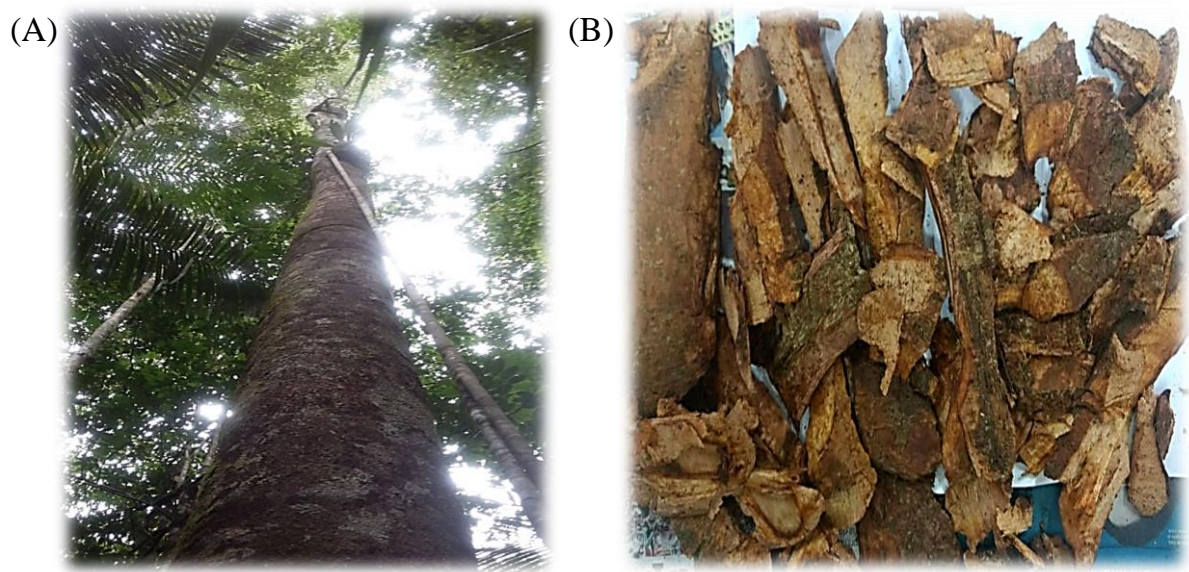


Figura 10. Árvore de *B. acutifolium* em seu habitat (A) e amostra de casca do caule (B).

O mururé é empregado principalmente para fins medicinais, pois sua casca, raiz e seiva são utilizadas na medicina popular por apresentar ação eficiente contra muitas doenças inflamatórias (ex. reumatismo e artrite), além de apresentar atividade depurativa e antissifilíticas (BERG 1992, PINAGÉ 2011).

De acordo com o trabalho de Torres e colaboradores (1997), foram encontradas as flavanas: 4'-hidroxi-7,8(2'',2''-dimetilpirano) flavana e 4'-hidroxi-7,8(3''-hidroxi-2'',2''-dimetilpirano) flavana, no extrato diclorometano desta espécie. Posteriormente, identificaram doze substâncias, dentre elas duas flavanas, que em homenagem ao gênero foram denominadas de brosiminas A e B (TORRES et al., 2000). Teixeira e colaboradores (2000), também descreveram uma nova flavana 4',7-di-hidroxi-8-prenjl-flavana (Figura 11), obtida das frações diclorometano do extrato alcoólico de *B. acutifolium*, cuja estrutura é igual a da Brosimina B, acima citada, relatada, paralelamente, por Torres et al (2000) .

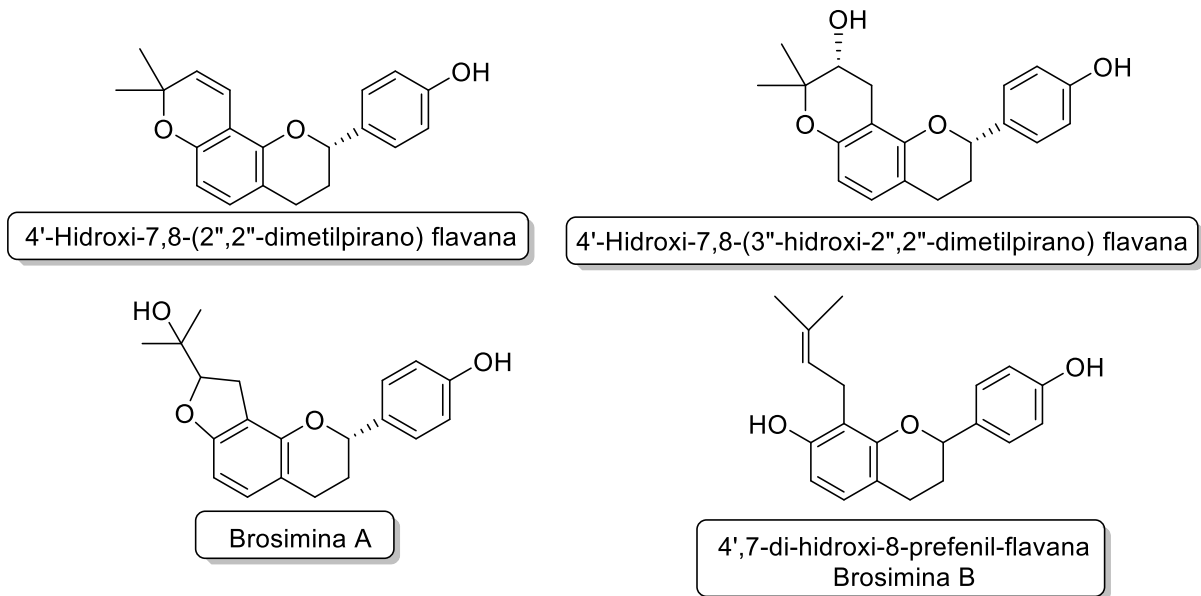


Figura 11. Flavonoides isolados da casca do caule de *B. acutifolium*.

Takashima e Ohsaki (2001), isolaram seis novas flavanas com pequenas variações estruturais do extrato metanólico da casca de *B. acutifolium*, que foram denominadas como acutifolinas A-F. Além disso, foram isolados treze novos flavonoides do extrato metanólico proveniente da casca denominadas brosimacutinas A-M (TAKASHIMA & OHSAKI 2002; TAKASHIMA et al., 2005) (Figura 12).

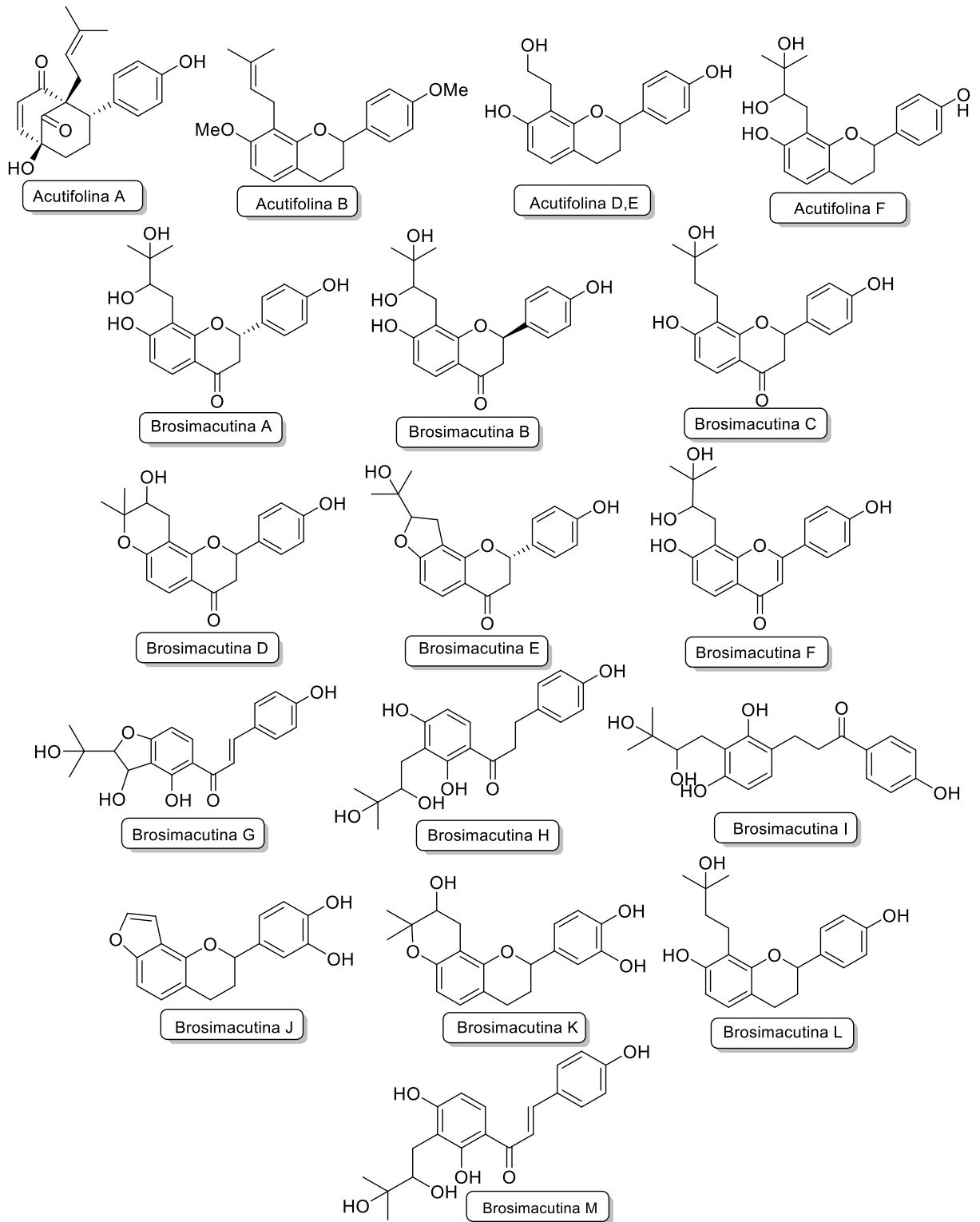


Figura 12. Flavonoides isolados da casca do caule da espécie de *B. acutifolium*.

2.5 Flavonoides

Os flavonoides são substâncias que compõem a classe de substâncias polifenólicas, que são amplamente distribuídos em fontes naturais e são reconhecidos como pigmentos naturais distribuídos em todas as angiospermas. Do ponto de vista biossintético, são constituintes químicos de via mista derivados da rota do acetato (ex. destaque em azul) e rota do chiquimato (ex. destaque em preto). Sua estrutura química é representada por um esqueleto que contém 15 átomos de carbono constituídos por unidades C₆-C₃-C₆, que apresentam em seu esqueleto básico um anel aromático (Anel A), conectados por uma cadeia linear de três carbonos (Anel C), que por sua vez é ligado a outro anel aromático (Anel B), (Figura 13).

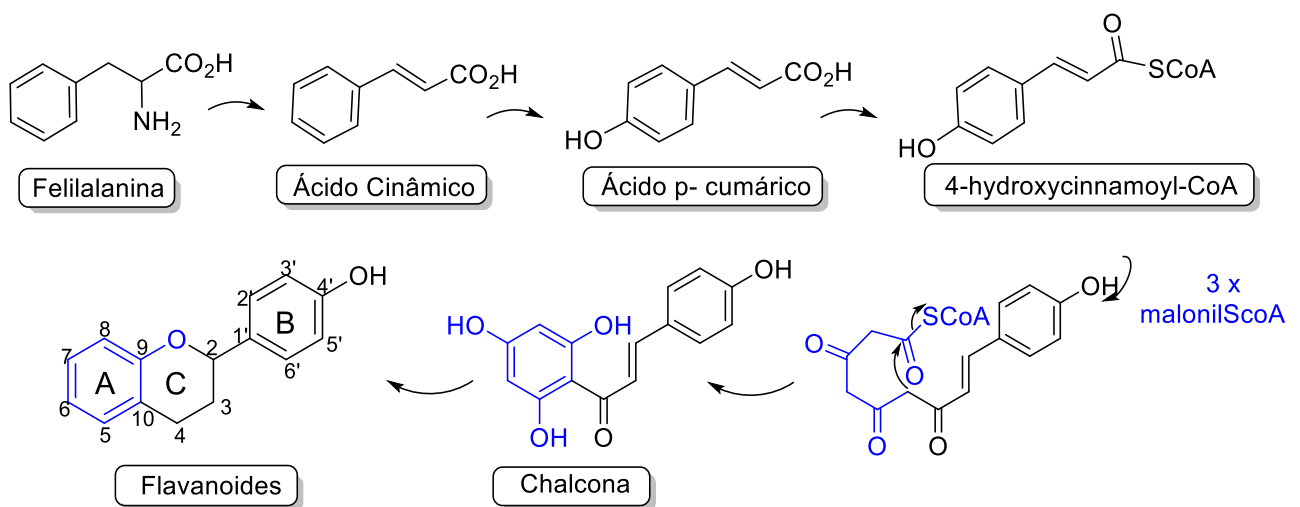


Figura 13. Rota biossintética de flavonoides e sistema de numeração dos flavonoides.

Vários subgrupos dos flavonoides são classificados de acordo com os padrões de substituição do anel C, tanto no que se refere ao estado de oxidação do anel heterocíclico quanto na alteração de grupos substituintes no anel B. Como exemplo tem-se as chalconas, flavanas, flavanol, flavandiol, flavanona, flavonas, flavonol, isoflavanas, catequinas, antocianidinas, auronas e outros (HARBORNE et al., 2000; DEWICK, 2002; MACHADO et al., 2008; SIMÕES et al., 2016) (Figura 14).

Os flavonoides podem apresentar vários grupos substituintes com uma ou mais hidroxilas ou metoxilas localizadas preferencialmente nas posições 5, 7, 3' e 4'. A diversificação estrutural de substituintes nessas estruturas também pode ocorrer por prenilações, acetilações, dimerizações, glicosilações dentre outros. Diante das grandes variações do arranjo estrutural são inúmeras as propriedades biológicas atribuídas para esses

flavonoides, dentre as quais têm se destacado ação antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, e inibidores de enzimas (HARBORNE et al., 2000; DEWICK, 2002).

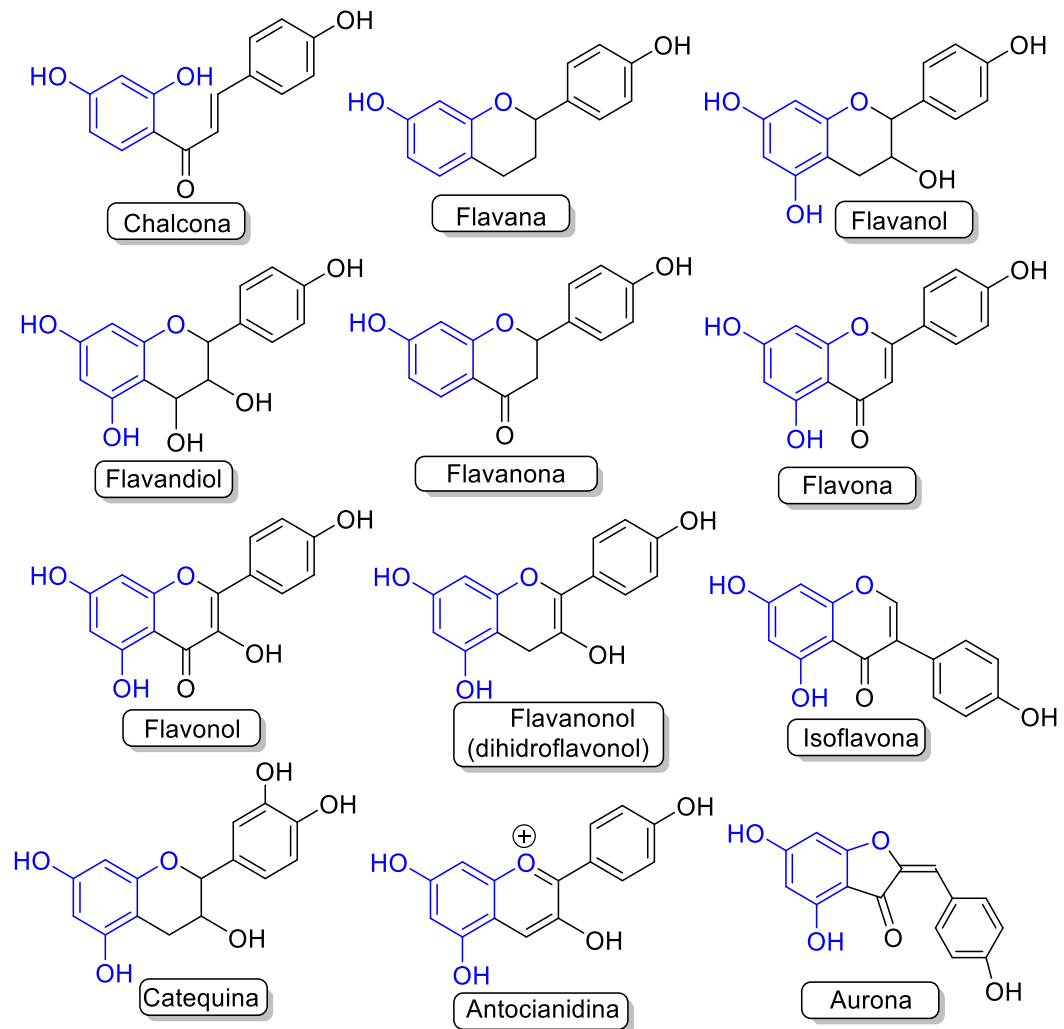


Figura 14. Estrutura dos principais subgrupos de flavonoides.

2.5.1 Flavonoides e atividade antioxidante

Os flavonoides têm despertado grande interesse por atuarem como captadores de radicais livres, regular o metabolismo celular e prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Dessa forma, vários trabalhos da literatura demonstram, que uma dieta balanceada, rica em flavonoides provenientes de alimentos (ex. frutas e verduras) ou vegetais (ex. infusão e chás), estão associadas com uma maior qualidade de vida e com menos incidência em desenvolver doenças. Tal fato, está relacionado à capacidade antioxidante de certas substâncias, como o ácido cafeico (ex. café e kiwi), ácidos hidroxibenzóicos e antocianinas (ex. amora), resveratrol

(ex. vinho tinto), curcumina (ex. curry), ácido gálico (ex. groselha) e flavonoides como quercetina (ex. couve crespa), kaempferol (ex. alho-poró) e miricetina (ex. tomate cereja e brócolis), que possuem altas capacidades antioxidantes devido a propriedade de oxidação-redução, conferindo-lhes uma neutralização desses radicais livres. Estudos recentes mostraram que muitos desses constituintes polifenólicos derivados de plantas são antioxidantes mais eficazes *in vitro* do que as vitaminas C e E (RICE-EVANS et al., 1997; MANACH et al., 2004; SINGH et al., 2004; VALKO et al., 2006; SEN et al., 2010).

Antioxidantes são substâncias capazes de reduzir ou impedir os danos oxidativos causados pelos radicais livres, inibindo então a oxidação de sistemas biológicos no organismo. Radicais livres contêm um ou mais elétrons isolados, que se encontram disponíveis para se ligar a qualquer outro elétron, por essa razão, são muito reativos. As fontes de geração desses radicais livres podem ocorrer por fontes exógenas (ex. poluição ambiental, aditivos químicos, estresse, radiação etc.) ou endógenas (ex. processos biológicos naturais dos organismos como processos respiratórios etc.). Nos processos biológicos do metabolismo celular resultam em uma variedade de espécies reativas de oxigênio (ERO), dentre eles os mais conhecidos são: radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila (HO^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SINGH et al., 2004; ZULAIKHAH 2017; ENGWA et al., 2018; LOBO, et al., 2018).

As ERO podem causar alterações dos componentes celulares, podendo atacar biomoléculas como proteínas, lipídeos ou mesmo reagir com ácidos nucleicos do DNA (VAN BREUSEGEM & DAT, 2006). O desequilíbrio na relação entre os níveis celulares de oxidantes e antioxidantes, vai determinar como o processo ocorrerá no organismo, visto que, se o sistema de defesa antioxidante agir de forma eficiente a produção de ERO vai se manter em equilíbrio, ou seja, em níveis fisiológicos controláveis (ex. homeostase). Em contrapartida, se houver uma alta produção de ERO, a reação do sistema de defesa do organismo agirá de forma ineficiente ocorrendo o estresse oxidativo, causando danos oxidativos às células, em que favorecem o desenvolvimento de muitas doenças como artrite, arteriosclerose, inflamações, Alzheimer, Parkinson, além do câncer (VALKO et al., 2006; SEN et al., 2010; ZULAIKHAH 2017).

Alguns dos mecanismos de ação antioxidante como capturar radicais livres, reduzir espécies, quelar metais de transição são utilizados em ensaios de prospecção de antioxidantes naturais. Dentre estes, cita-se o método colorimétrico de captura de radical livre de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), este radical apresenta coloração roxa quando em solução, e na presença do antioxidante é estabilizado transformando-se na espécie DPPHH (2,2-difenil-

picril-hidrazina) de coloração amarela, Figura 15, (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; MOLYNEUX 2004).

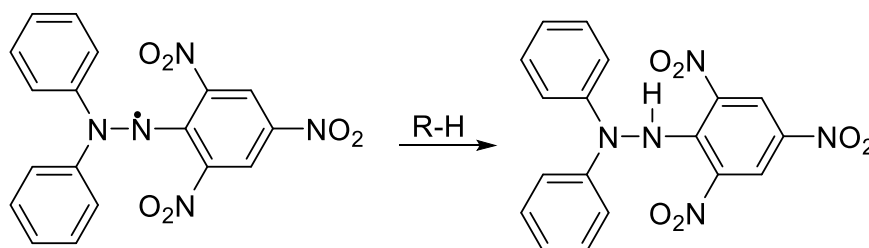


Figura 15. Reação de captura do radical livre DPPH na presença de um antioxidante.

Outro exemplo de método antioxidante é caracterizado pelo do sequestro do radical livre ABTS, que também é um método colorimétrico, caracterizado pela descoloração da solução azul esverdeada. Baseia-se na capacidade de substâncias antioxidantes em sequestrarem o radical $ABTS^{\cdot+}$ (3-estilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico), e estabiliza-lo (Figura 16) (RUFINO et al., 2007).

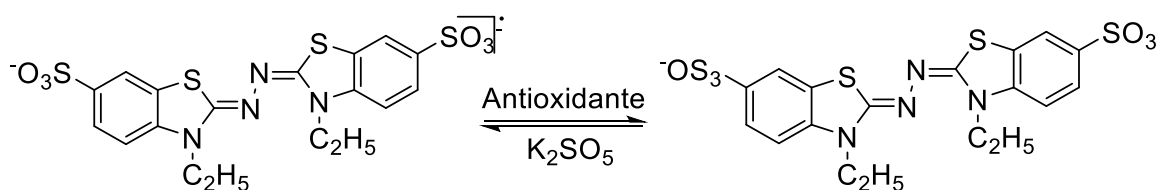


Figura 16. Reação de captura do radical livre ABTS na presença de um antioxidante.

O poder antioxidante de redução do ferro ou mecanismo do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay), avalia a capacidade redutora de Fe^{3+} a Fe^{2+} por meio das substâncias antioxidantes, via avaliação da redução do complexo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ (ferritripiridiltriazina) a ferroso-tripiridiltriazina $[(Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$, observada por meio da reação colorimétrica de azul clara para azul escuro, Figura 17, (LUXIMON-RAMMA et al., 2002).

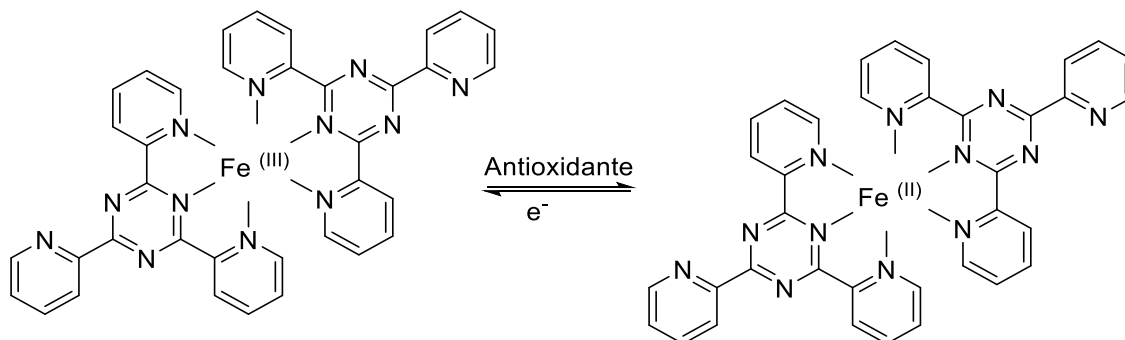


Figura 17. Reação de redução do FRAP na presença de um antioxidante.

2.5.2 Flavonoides e potencial antitumoral

Há muitas evidências de que muitos flavonoides exercem atividade antitumoral, no entanto, os mecanismos responsáveis por este efeito ainda não foram totalmente elucidados quando comparados com os seus mecanismos antioxidantes. Estudos demonstram que uma das causas internas do organismo em desenvolver câncer têm sido associadas com o estresse oxidativo, assim como hipóxia, mutações genéticas e falta de função apoptótica, enquanto as causas externas estão relacionadas ao aumento da exposição ao estresse, poluição, fumo, radiação, raios ultravioletas etc. (WILLIAMS et al, 2004; VALKO et al, 2006).

Flavonoides como 4-hidroxiionocarpina, isobavachalcona, brosimina A, brosimacutinas A-M e acutifolinas A-F, foram isolados de diferentes espécies da família Moraceae e tem demonstrado possuir ação citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais (MAUÉS et al, 2019). Como exemplo, a estrutura da isobavachalcona teve sua citotoxicidade avaliada em quatro linhagens de células tumorais como carcinoma ovariano-OVCAR-8 ($IC_{50}= 7,92 \mu M$), carcinoma de próstata-PC3 ($IC_{50}= 15,06 \mu M$), carcinoma de mama-MCF-7 ($IC_{50}= 28,29 \mu M$), e carcinoma de pulmão-A549 ($IC_{50}= 32,20 \mu M$), demonstrando potencial citotóxico (JING et al, 2010).

No estudo de Kuete e colaboradores (2011), foram examinados a capacidade citotóxica de quatro outros flavonoides do gênero *Dorstenia* (Moraceae), como gancaonina Q, 6-prenilapigenina, 6,8-diprenileriodictiol e 4-hidroxiionocarpina, em inibir a proliferação de catorze linhagens de células cancerosas. Dentre os melhores resultados citotóxicos encontrados no trabalho para as diferentes linhagens de células testadas, estão as citotoxicidades da gancaonina Q avaliado para as células T de leucemia humana-PF-382 ($IC_{50}= 15,2 \mu M$), leucemia promielocítica-HL-60 ($IC_{50}= 15,3 \mu M$), adenocarcinoma pancreático-MiaPaCa-2 ($IC_{50}= 3,4 \mu M$) e adenocarcinoma de mama-MCF-7 ($IC_{50}= 2,6 \mu M$). O composto 6-prenilapigenina destacou-se frente as células PF-382 ($IC_{50}= 11,2 \mu M$) e MCF-7 ($IC_{50}= 1,7 \mu M$), e 6,8-diprenileriodictiol destacou-se frente as células leucemia linfoblástica aguda-CCRF-CEM ($IC_{50}= 4,9 \mu M$), MiaPaCa-2 ($IC_{50}= 10,3 \mu M$) e MCF-7 ($IC_{50}= 1,4 \mu M$). Já os melhores resultados observados para 4-hidroxiionocarpina foram para as células CCRF-CEM ($IC_{50}= 4,8 \mu M$), leucemia linfoblástica aguda multirresistente CEM/ADR5000 ($IC_{50}= 10,8 \mu M$), MiaPaCa-2 ($IC_{50}= 11,3 \mu M$) e MCF-7 ($IC_{50}= 4,2 \mu M$). Como resultado geral do estudo verifica-se que esses compostos podem ser candidatos a novas drogas anticancerígenas.

2.5.3 Flavonoides como inibidores de FLT3 para o tratamento potencial da leucemia mielóide aguda.

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença agressiva que leva à proliferação e diferenciação aberrantes de células mieloides. É a leucemia mais comum em adultos que possuem prognóstico ruim e alto grau de recidiva observada nos pacientes (CHIN et al, 2013). A terapia atual de primeira linha para pacientes com LMA tipicamente inclui uma alta dose de agentes citotóxicos tradicionais (ex. antraciclina e citarabina), em um esquema de tratamento chamado “3+7”, porque consiste em administrar citarabina continuamente por 7 dias, junto com infusões de antraciclina nos 3 primeiros dias. No entanto, o uso desses agentes citotóxicos muitas vezes leva a toxicidades indesejadas (BURNETT 2012). Além disso, o transplante de células-tronco hematopoiéticas para pacientes com LMA, uma importante estratégia terapêutica que pode prevenir a recorrência, geralmente resulta em maior morbidade e mortalidade relacionadas ao tratamento, especialmente em pacientes idosos. Apesar de alguns avanços no tratamento da LMA entre pacientes mais jovens, pacientes idosos continuam sendo atormentados com uma alta taxa de recaída (BURNETT 2012; Dombret & Gardin, 2016). Portanto, desenvolver novos medicamentos são necessários para o tratamento da LMA

A superexpressão da tirosina quinase 3 do tipo FMS (FLT3) está associada a até 70% dos pacientes com LMA. O FLT3 do tipo selvagem induz a proliferação e inibe a apoptose nas células AML, enquanto a proliferação descontrolada da atividade da FLT3 quinase também está associada a mutações da FLT3. Portanto, inibir a atividade de FLT3 é uma terapia promissora de LMA. Os flavonoides são um grupo de fitoquímicos que podem ter como alvo proteínas quinases, sugerindo seus potenciais antitumorais (CHIN et al, 2013; YEN et al, 2021).

Estudos demonstraram que os flavonoides podem modular a expressão ou atividade de FLT3. Flavonoides como apigenina e luteonina, foram avaliados quanto à atividade citotóxica contra a LMA através da inibição *in vitro* da enzima FLT3, onde apresentaram valores de IC_{50} 1,45 e 0,83 μ M, respectivamente. Além disso, kaempferol (IC_{50} = 2,32 μ M), quercetina (IC_{50} = 0,59 μ M) e miricitina (IC_{50} = 1,68 μ M), também demonstraram atividades inibitórias contra a enzima FLT3 (CHIN et al, 2013).

No estudo de Yen e colaboradores (2021) vários flavonoides derivados de plantas apresentaram atividade inibitória contra FLT3. Entre esses a flavana (5,7,4'-trihidroxi-6-metoxiflavona) exibiu a inibição mais potente de FLT3 (IC_{50} = 0,44 μ M), além do mais suprimiu a proliferação de células mutantes como FLT3-D835Y e FLT3-ITD (IC_{50} = 0,23 e 0,39 μ M, respectivamente). Coletivamente, esses flavonoides indicam o potencial para o tratamento da

LMA. Portanto, mais investigações acerca de flavonoides como inibidores de FLT3 são necessárias para desenvolver novos inibidores de FLT3 e fornecer informações químicas valiosas para o desenvolvimento de novos medicamentos para LMA. Atualmente, abordagens baseadas em química computacional, tal como ancoragem molecular, também têm contribuído para o sucesso na descoberta de inibidores de FLT3, reduzindo o custo e o tempo gasto no laboratório.

2.6. Instrumentação analítica de forma integrativa no estudo de produtos naturais

A espectrometria de massas (EM) tornou-se uma poderosa ferramenta analítica e bioanalítica bem estabelecida, permitindo que um grande número de amostragem de moléculas de origem química ou mesmo biológica sejam identificadas em uma distribuição espacial em matrizes complexas. Esse sucesso resultou principalmente devido ao grande número moléculas com variedades de massas e polaridades poderem ser ionizadas com facilidade além da excelente combinação da velocidade, seletividade e sensibilidade de detecção (HUANG, et al., 2010; LIU et al., 2011).

A possibilidade de integração entre a espectrometria de massas e técnicas cromatográficas diversas (ex. CLAE) tem permitido potencializar a investigação de produtos naturais, e somados à ressonância magnética nuclear (RMN), são extremamente benéficas em termos de desreplicação de substâncias ou mesmo na identificação de novas substâncias de interesse. Todas as técnicas mencionadas acima, não requerem o uso de grandes quantidades de amostras e solventes orgânicos, além do pequeno consumo de tempo quando comparados com preparo de extratos convencionais com grandes quantidades de solventes orgânicos (O'CONOR & GIBBONS, 2013; SEGER et al., 2013). De maneira integrativa, a combinação de todas essas técnicas pode fornecer um poderoso arsenal para a descoberta de novas substâncias em matrizes complexas corroborando como uma das pesquisas mais vividas no campo da fitoquímica moderna.

2.7. Planejamento de misturas

O planejamento de misturas também conhecido como planejamento simplex-centroide proposta por Snyder é uma técnica que pode ser empregada na otimização da capacidade extratora utilizando-se grupo de solventes com propriedades distintas (ex. polaridade,

solubilidade etc.), quando combinados proporcionalmente entre si, fornecem a melhores capacidades extratoras para uma determinada finalidade (FERREIRA et al., 2007; NOVAES et al 2017).

A classificação da propriedade do solvente por Snyder pode ser definida em termos de polaridade e interações químicas específicas e outros três parâmetros experimentais que são basicidade (x_e), acidez (x_d) e o momento dipolar (x_n) (Figura 18). A vantagem do planejamento de Snyder é o agrupamento de solventes de acordo com o tipo de interação que eles possuem, uma vez que, solventes com propriedades químicas que possuem parâmetros semelhantes de seletividade tendem a agrupar-se de forma semelhantes, mesmo apresentando distintos valores de polaridade (SNYDER1974; SNYDER 1978).

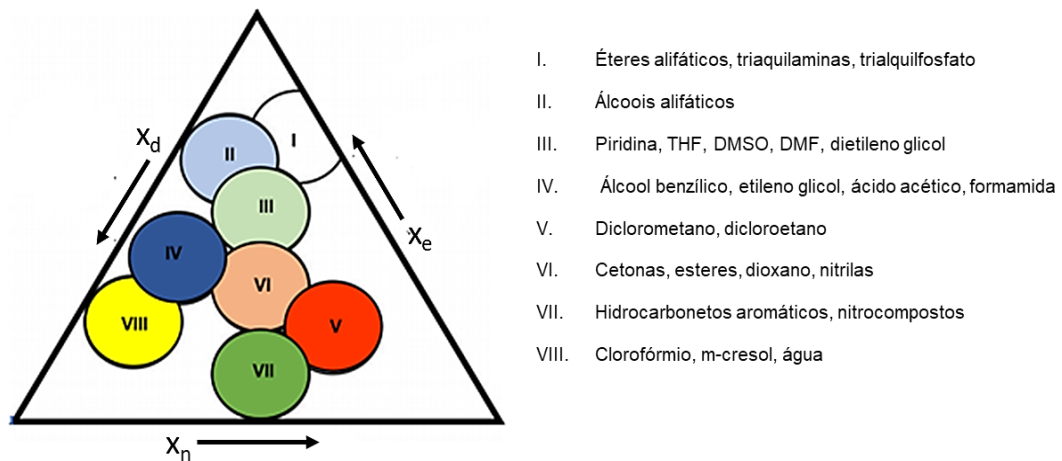


Figura 18. Triângulo de seletividade de Snyder para grupos de solventes.

O planejamento de misturas do tipo simplex-centroide com três componentes, pode ser representado por um triângulo equilátero, onde cada vértice do triângulo representa os componentes puros, os pontos laterais representam as misturas binárias (1:1) dos componentes ou misturas e seus pontos de vértices vizinhos e o ponto central do triângulo corresponde a mistura ternária (1:1:1) da combinação igual dos três componentes da mistura (FERREIRA et al., 2007) (Figura 19).

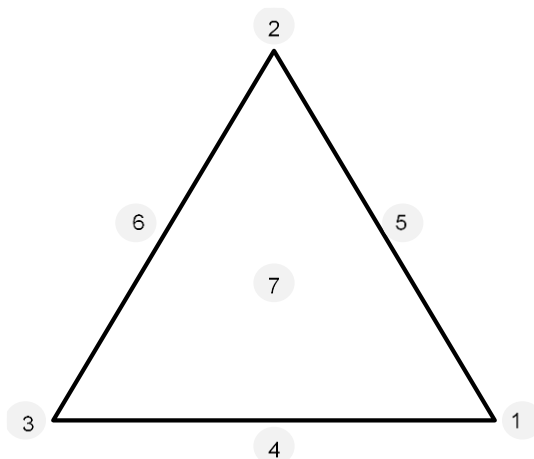


Figura 19. Planejamentos em rede simplex-centroide para misturas ternárias.

Dessa forma, para o experimento com três componentes ($n=3$), tem-se sete pontos distintos ($2^3-1=7$). Tendo-se três pontos que correspondem aos solventes puros, três com as misturas binárias e um ponto central com a misturas dos três solventes com proporções iguais, cujo planejamento permite otimizar e reduzir o número de pontos experimentais e permitindo na economia de reagentes e tempo (ALMEIDA et al., 2007).

2.8. Quimiometria

A quimiometria é uma ferramenta muito utilizada na área da química que visa a investigação e a resolução de problemas de interesse originados na química por meio de ferramentas estatísticas, matemática que auxiliem na extração e/ou interpretação da informação dos dados gerados de forma otimizada (GELADI et al., 1990; CASS & CASSIANO, 2015). Isso ocorre, devido a evolução dos computadores e a capacidade dos instrumentos analíticos em gerar aquisição de dados cada vez mais complexos e com maior rapidez (BARROS NETO et al., 2006).

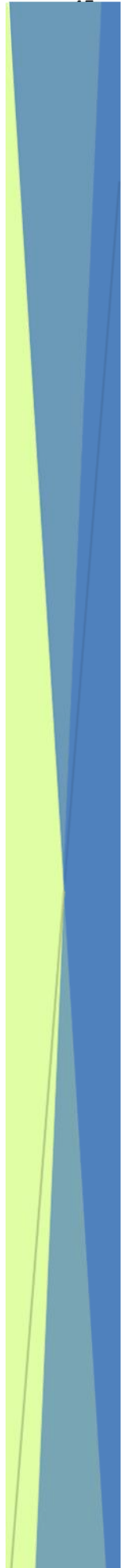
Atualmente, a quimiometria está organizada em três áreas fundamentais: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões que é sinônimo de uma análise exploratória e a calibração multivariada. O planejamento de experimentos na qual são avaliados os efeitos de variáveis e quais delas são mais significativas sobre respostas analíticas é a área

mais disseminada. Ainda, ressalta-se a importância de um bom planejamento experimental evitando a realização de muitos experimentos e o desperdício de reagentes.

No Brasil a técnica de reconhecimento de padrões é muito pouco difundida, nessa técnica são analisados grandes conjuntos de medidas (ex. químicas, espectrais, cromatogramas etc.), de um conjunto de amostras para a identificação das quais apresentam maiores similaridades para posterior agrupamento e identificação de possíveis tendências. A calibração multivariada consiste na correlação de modelos matemáticos que permitem determinar alguma propriedade do sistema de interesse correlacionado com sinais instrumentais medidos (BARROS NETO et al., 2006; SOARES et al 2008; PEREIRA et al 2014; CASS & CASSIANO, 2015).

Nesse contexto, a análise de componentes principais (PCA- Principal Components Analysis) e análise de agrupamentos hierárquica (HCA- Hierarchical Cluster Analysis) encontram-se entre as mais importantes ferramentas contempladas na quimiometria. A PCA como uma ferramenta de análise exploratória permite revelar a existência ou não de amostras anômalas dentre as variáveis medidas, visualizar a estrutura dos dados e correlacionar o agrupamento entre as amostras. O HCA é responsável pela reunião das amostras com base na sua semelhança, reduzindo a dimensionalidade dos dados e sendo representado graficamente por um dendograma. O dendograma é uma representação gráfica bidimensional ou “árvore hierárquica” na qual os comprimentos dos ramos da árvore representam o grau de similaridade entre os dados (PIROUETTE 2008).

3. Objetivos



3. OBJETIVOS

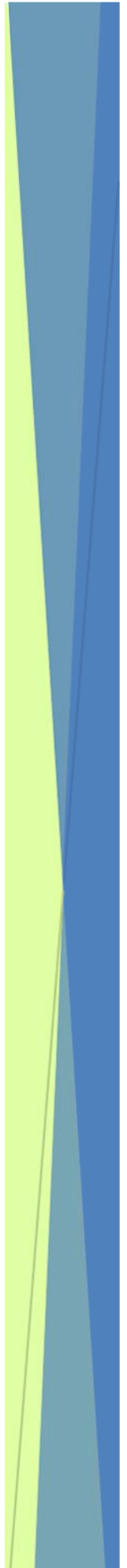
3.1. Objetivo geral

Investigar, a partir de técnicas instrumentais modernas, o conteúdo químico de *Brosimum acutifolium* e *Brosimum parinarioides* presentes na Região Amazônica, além de contribuir com a investigação de seu potencial biológico.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver um planejamento experimental do tipo simplex-centroide com três componentes na otimização do solvente extrator para as cascas de *B. acutifolium* e *B. parinarioides*;
- ✓ Analisar por espectrometria de massas (EM) os extratos obtidos e realizar análises multivariadas (PCA e HCA) dos dados;
- ✓ Desenvolver métodos analíticos para separação de metabólitos secundários das diferentes espécies por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM);
- ✓ Isolar substâncias por meio de métodos modernos de cromatografia;
- ✓ Determinar as estruturas das substâncias isoladas, através das análises de ressonância magnética nuclear (RMN 1D e 2D) e espectrometria de massas;
- ✓ Avaliar o potencial antioxidante (*in vitro*) dos extratos e substâncias isoladas e o potencial antitumoral (*in silico*) das substâncias isoladas.

4. Procedimento Experimental



4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Coleta e identificação do material vegetal

As cascas do caule das espécies *B. acutifolium* e *B. parinarioides*, foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no Km 26 da estrada AM 010 em março de 2019, sob as coordenadas 02° 54' 26" S e 59° 52' 40" W, de indivíduos previamente identificados durante a execução do Projeto Flora da Reserva Ducke (RIBEIRO, 1999), cujas exsicatas encontram-se depositadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com número de registro #183522 e #192478, respectivamente para cada espécie (Figura 20).

O acesso ao patrimônio genético de ambas as espécies foi devidamente cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob os números de cadastro A9B45F9 (*B. acutifolium*) e AA718DB (*B. parinarioides*).



Figura 20. Os vouchers # 183522 (A) e #192478 (B) depositados no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

4.2. Secagem e processamento do material vegetal

As cascas foram submetidas à desidratação em estufa (40°C) por 72 horas, e logo após o material foi pulverizado em um moinho de quatro facas, identificado e acondicionados em recipientes apropriados.

4.3. Extração em escala analítica baseada no triângulo de seletividade de Snyder

O preparo dos extratos foi realizado de acordo com a natureza química das amostras com base no planejamento de misturas do tipo simplex-centroide por meio do triângulo de seletividade proposto por Snyder e colaboradores (1978 e 1993). Foram preparados utilizando-se o triângulo de seletividade, com misturas de 3 solventes, sendo selecionados: diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e etanol (EtOH) (BASTOS et al, 2020) (Figura 21).

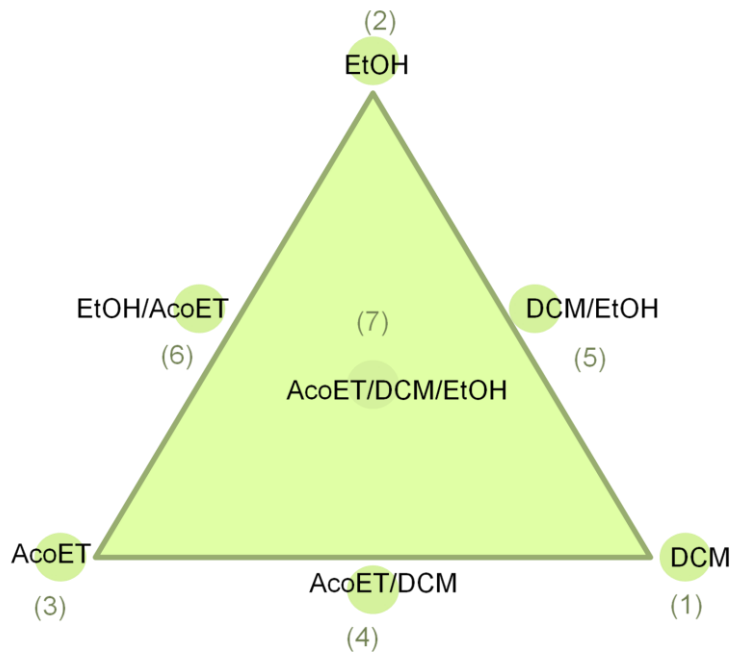


Figura 21. Planejamento experimental do tipo centróide- com três componentes para o preparo dos diferentes extratos.

Esse planejamento de mistura resultou em um sistema de 7 componentes, onde cada vértice do triângulo corresponde aos solventes puros, o centro das arestas compõe às misturas com os dois componentes em proporções iguais e o ponto central contém os três solventes com proporções iguais, fornecendo assim 7 sistemas extratores para cada espécie. Já que todos os extratos foram preparados em triplicata, o resultado foi: 42 extratos preparados, sendo 21 para a espécie *B. acutifolium* e 21 de *B. parinarioides*.

Para o preparo dos extratos em escala analítica, foi pesado 1,0 g de material vegetal pulverizado de cada espécie, sendo em seguida transferido para tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 10,0 mL do solvente extrator. Em seguida, os sistemas foram mantidos em ultrassom (25° C) por 25 minutos. Posteriormente, os extratos foram filtrados com auxílio de papel filtro e adicionados em frascos para a total secagem sob corrente de nitrogênio gasoso. Posteriormente, foi realizado o cálculo do rendimento e codificação das amostras conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Planejamento experimental com três componentes para o preparo dos extratos de *B. acutifolium* e *B. parinarioides*.

Espécie	Solventes utilizados no preparo dos extratos	Códigos
<i>B. acutifolium</i>	Extrato 1 – DCM 100%	EBA1
	Extrato 2 – EtOH 100%	EBA2
	Extrato 3 – AcOEt 100%	EBA3
	Extrato 4 – AcOEt/DCM 1:1	EBA4
	Extrato 5 – DCM/EtOH 1:1	EBA5
	Extrato 6 – EtOH/AcOEt 1:1	EBA6
	Extrato 7 – DCM/AcOEt/EtOH 1:1:1	EBA7
<i>B. parinarioides</i>	Extrato 1 – DCM 100%	EBP1
	Extrato 2 – EtOH 100%	EBP2
	Extrato 3 – AcOEt 100%	EBP3
	Extrato 4 – AcOEt/DCM 1:1	EBP4
	Extrato 5 – DCM/EtOH 1:1	EBP5
	Extrato 6 – EtOH/AcOEt 1:1	EBP6
	Extrato 7 – DCM/AcOEt/EtOH 1:1:1	EBP7

4.4. Análise por espectrometria de massas (EM)

Os diferentes extratos (**EBA1-7** e **EBP1-7**), de forma randomizada, foram submetidos à análise de perfil químico por espectrometria de massas por inserção direta em espectrômetro do tipo *íon-trap*, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific), operando com fonte de ionização por electrospray (ESI) com faixa de detecção de 100-1000 Da.

Soluções estoque (1,0 mg/mL) dos extratos foram preparadas em MeOH grau HPLC e diluídas até a concentração de 10 ppm para análise. Os dados obtidos nas análises foram

processados no software *Xcalibur* 2.0.7, sendo estes utilizados no tratamento quimiométrico. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) da Central Analítica da UFAM.

4.5 Análise quimiométrica dos dados

A quimiometria dos dados foi realizada por meio de análises multivariadas do conjunto de dados obtidos a partir das análises por inserção direta de ESI-EM, utilizando-se o *software* Chemoface[®] versão 1.61. As análises de componentes principais (PCA) foram calculadas por meio da variação dos íons registrados (variáveis), sendo a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) calculada através da distância euclidiana e média de ligação das quatro principais componentes.

4.6. Preparo de extratos em larga escala e isolamento de constituintes químicos

Após as análises por ESI-EM e quimiométricas, os extratos promissores foram selecionados para a etapa de extração em larga escala e identificação e/ou isolamento dos constituintes químicos alvos das cascas de *B. acutifolium* e *B. parinarioides*.

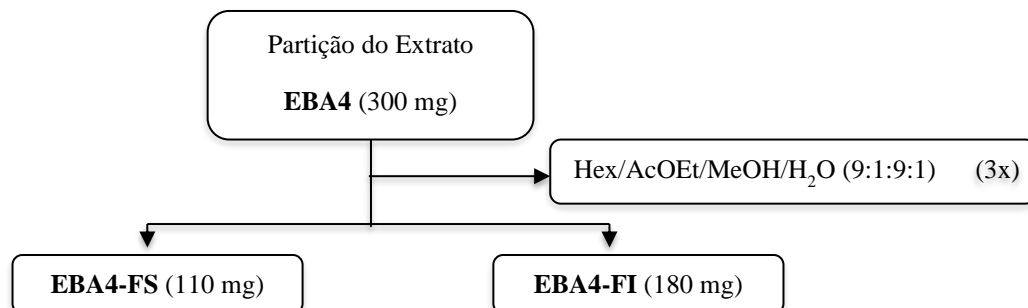
4.6.1. Preparo e fracionamento cromatográfico do extrato EBA4 de *B. acutifolium*

4.6.1.1. Preparo do extrato EBA4

O extrato **EBA4** foi preparado pesando-se 100 g do material vegetal (casca) e adicionando-se 500 mL da mistura de DCM:AcOEt (1:1 v/v), levado ao ultrassom por 25 minutos e macerado por 72h. Após o término da extração o extrato foi filtrado com o auxílio de papel filtro e seco com auxílio de rota evaporador (40 °C) e N₂.

4.6.1.2. Fracionamento extrato EBA4

A partir de 300 mg do extrato **EBA4** foi realizado o fracionamento por partição líquido-líquido com o sistema de eluentes: Hex/AcOEt/MeOH/H₂O (9:1:9:1 v/v/v/v), fornecendo assim duas fases imiscíveis (fase superior– FS, fase inferior– FI) que foram codificadas como **EBA4-FS** e **EBA4-FI**, conforme o fluxograma 1.

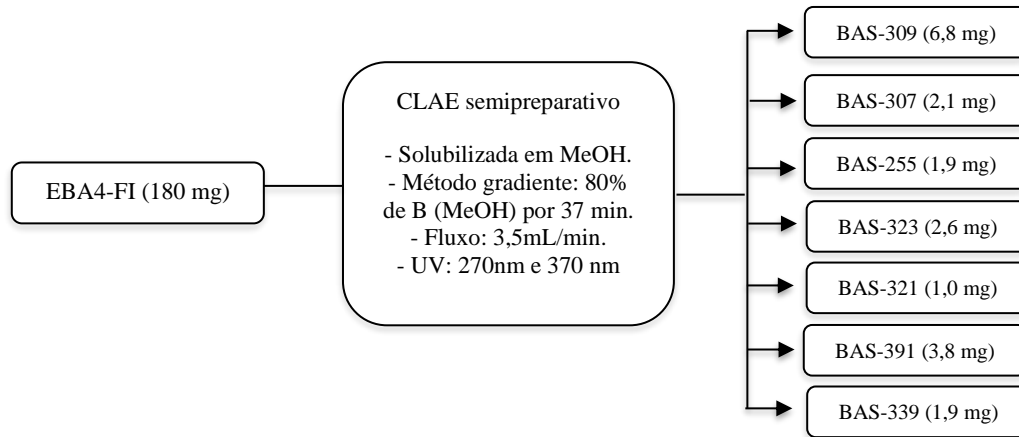


Fluxograma 1. Esquema de fracionamento do extrato EBA4 por partição líquido-líquido.

4.6.1.3. Análises por CLAE-DAD-EM e CLAE semipreparativo da fração EBP4-FI

A fração **EBA4-FI** (1,0 mg/mL em metanol grau HPLC) foi analisada em um cromatógrafo Surveyor Plus® (Thermo Scientific), equipado com bomba Surveyor LC Pump Plus, autoamostrador Surveyor Autosampler Plus, válvula de injeção Rheodyne (25 µL) e operando simultaneamente com detector de arranjo de diodos Surveyor PDA Plus Detector e de espectrometria de massas. Foi utilizada eluição gradiente 80%-100% de **B** (MeOH), durante 0-30 min, monitorado a 200-600 nm, com fluxo de 1mL/min em uma coluna analítica do tipo C18 (5µm, 150 x 460 mm). Após a análise, os devidos cálculos de escalonamento foram realizados e seguiu-se com a etapa de isolamento das substâncias de interesse em CLAE semipreparativo.

O isolamento das substâncias foi realizado por CLAE semipreparativo em um cromatógrafo modelo UFLC® (Shimadzu) equipado com bomba LC-6AD (sistema binário), degaseificador DGU-20A5, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV, modulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 ou 500 µL). Sendo realizadas 6 injeções da amostra (100µL) solubilizadas em MeOH, o método analisado foi gradiente na proporção 80%-100% de **B** por 0-35 min mais 12 min de limpeza, monitorada nos comprimentos de 270 e 370, em uma coluna Luna C18 (5µm, 250 x 150 mm) Phenomenex com fluxo de 3,5 mL/min. As frações coletadas foram analisadas por espectrometria de massas, onde as promissoras (Fluxograma 2) foram encaminhadas as análises de RMN 1D e 2D.



Fluxograma 2. Condições para isolamento de substâncias de EBA4-FI.

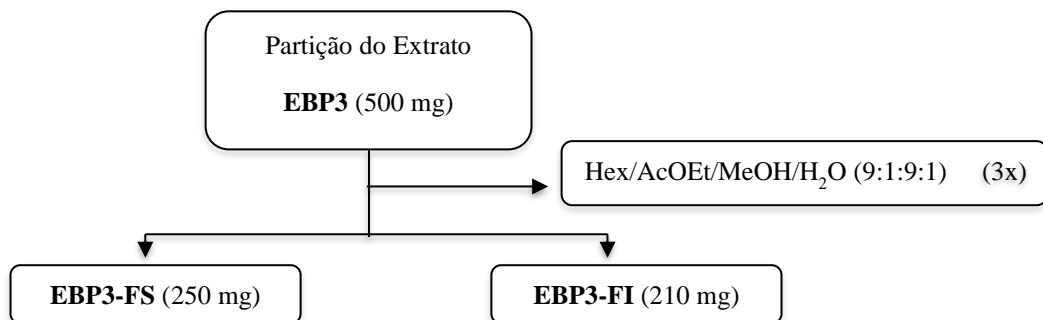
4.6.2. Preparo e fracionamento cromatográfico do extrato EBA4 de *B. acutifolium*

4.6.2.1. Preparo do extrato EBP3

O extrato **EBP3** foi preparado pesando-se 250 g do material vegetal (casca) e adicionando-se 500 mL de AcOEt 100%, seguido de ultrassom por 25 minutos levado ao ultrassom por 25 minutos e macerado por 72h. Por fim, foi realizado a filtragem do extrato e secagem em rota evaporador (40 °C) e N₂.

4.6.2.2. Fracionamento extrato EBP3

A partir de 500 mg do extrato **EBP3** foi realizado o fracionamento por partição líquido-líquido com o sistema de eluentes: Hex/AcOEt/MeOH/H₂O (9:1:9:1 v/v/v/v), originado duas fases imiscíveis na qual foram codificadas como **EBP3-FS** e **EBP3-FI**, conforme o fluxograma 3.

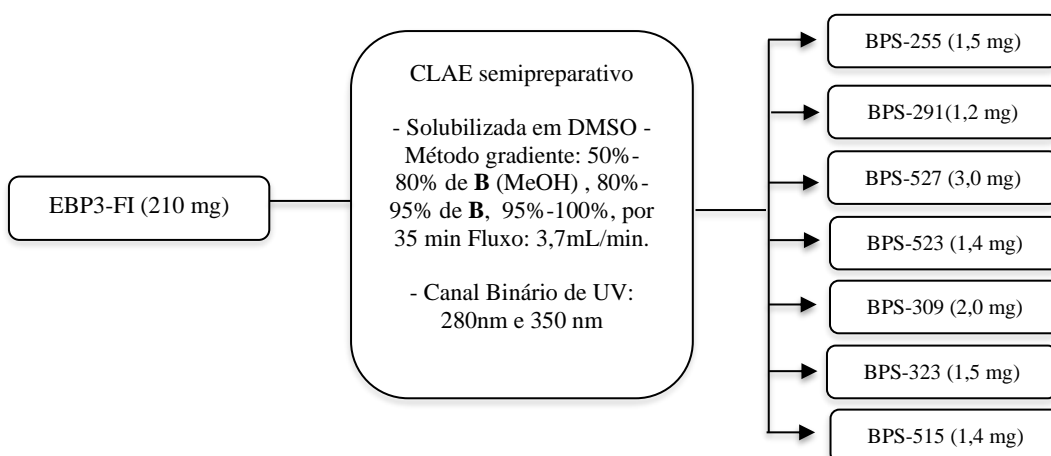


Fluxograma 3. Esquema de fracionamento do extrato EBP3 por partição líquido-líquido.

4.6.2.3. Análises por CLAE-DAD-EM e CLAE semipreparativo da fração EBP3-FI

A fração **EBP3-FI** (1,0 mg/mL em metanol grau HPLC) foi analisada por CLAE-EM (Thermo Scientific) com eluição gradiente 50%-80% de **B** por 0-15 min, 80%-95% de **B** por 15,0-25,0 min e 95%-100% por mais 10 min, monitorado a 200-600 nm, com fluxo de 1mL/min em uma coluna analítica do tipo C18 (5µm, 150 x 460 mm). Após a análise, os devidos cálculos de escalonamento foram realizados e seguiu-se com a etapa de isolamento das substâncias de interesse em CLAE semipreparativo.

O método escalonado em CLAE semipreparativo de **EBP3-FI**, consistiu no método gradiente na proporção 50%-80% de **B** por 0-15 min, 80%-95% de **B** por 15,0-25,0 min e 95%-100% por mais 10 min, monitorado nos canais de UV de 280 e 350, em uma coluna Luna C18 (5µm, 250 x 15,0 mm) Phenomenex com fluxo de 3,7 mL/min. Foram realizadas 7 injeções da amostra (100µL), solubilizadas em DMSO. As frações coletadas foram analisadas por espectrometria de massas, onde as promissoras (Fluxograma 4) foram encaminhadas as análises de RMN 1D e 2D.

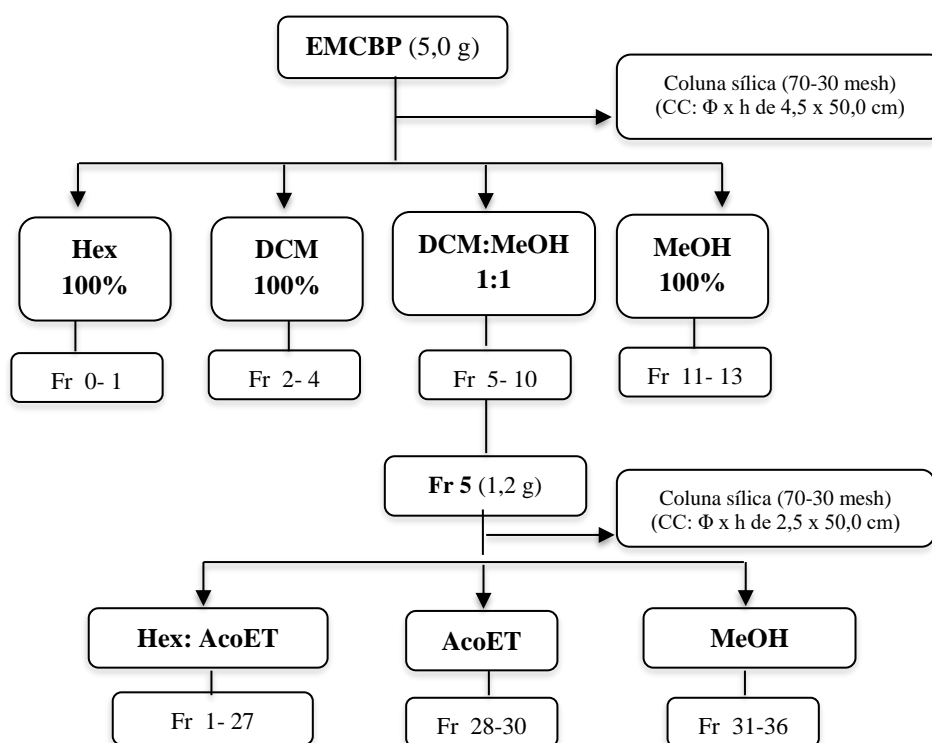


Fluxograma 4. Condições para isolamento de substâncias de E.BP3-FI.

4.7. Fracionamento cromatográfico do extrato EMCBP de *B. parinarioides*

Paralelamente à abordagem baseada no planejamento simplex-centroide, espectrometria de massas e quimiometria, foi conduzido o fracionamento cromatográfico do extrato metanólico das cascas de *B. parinarioides* (EMCBP), o qual se mostrou promissor como fonte de substâncias ainda não descritas na espécie (SÁ 2018).

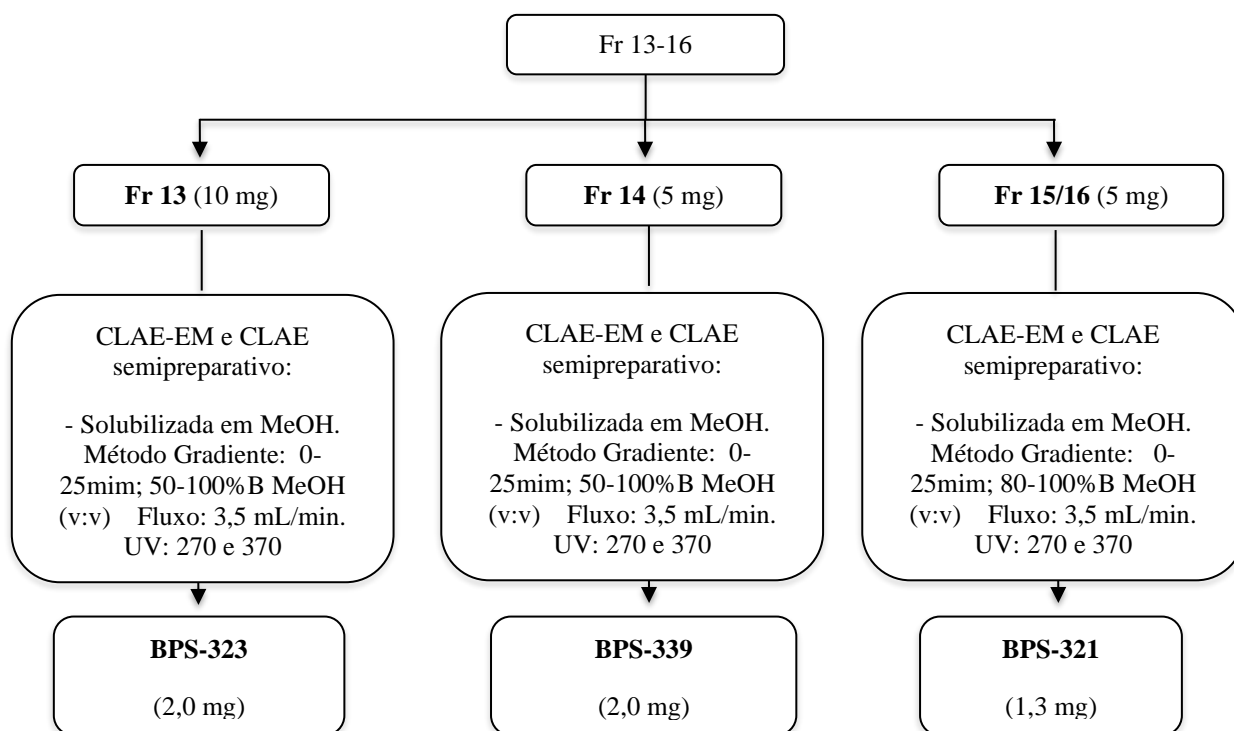
Inicialmente, 650 g do material vegetal foi submetido à maceração de forma exaustiva sequencial com os diferentes solventes extratores: hexano (EHCBP), acetato de etila (EACBP) e metanol (EMCBP). A troca de cada solvente foi realizada a cada 72 h, ao término de cada extração, os extratos obtidos foram concentrados sob baixa pressão e após secos foram determinados os rendimentos. Posteriormente, 5,0 g do extrato **EMCBP** foi fracionado por meio de cromatografia em coluna aberta (CC), empacotada com gel de sílica 70-230 mesh (Fluxograma 5).



Fluxograma 5. Fracionamento cromatográfico clássico do extrato metanólico- EMCBP de *B. parinarioides*.

Como eluentes foram utilizados Hex, DCM e MeOH em ordem crescente de polaridade, com diferentes proporções, obtendo-se 13 frações. A **fração 5** (1,2 g) foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico em coluna de sílica (70-230 mesh), tendo como eluentes: Hex, AcoEt e MeOH em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 36 frações. As frações 13-16

codificadas como **Fr.13**, **Fr.14** e **Fr.15/16**, foram selecionadas e submetidas a análises preliminares exploratórias por CLAE-EM cujo método de eluição gradiente foi o seguinte: 20%-100% de **B**, durante 0-13 min, monitorado de 100-1000 Da, com fluxo de 1 mL/min em uma coluna analítica do tipo C18 (5 μ m, 150 x 4,60 mm). As frações coletadas foram analisadas por espectrometria de massas, onde as promissoras (Fluxograma **6**) foram encaminhadas as análises de RMN 1D e 2D.



Fluxograma 6. Esquema de isolamento de substâncias das frações Fr. 13-16 de *B. parinarioides*.

4.8. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises por RMN 1D e 2D foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB da Central Analítica UFAM), coordenado pelo Prof. Dr. Marcos Batista Machado. O equipamento utilizado foi o modelo Bruker modelo Advance III HD 500 operando a 11,75 Tesla (T), observando a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . As substâncias foram solubilizadas com metanol deuterado (CD_3OD) e referência interna de tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) registradas em Hertz (Hz). Os dados espectrais obtidos foram devidamente calibrados e processados nos softwares ACD NMR Processor e Top Spin.

4.9. Quantificação de fenólicos totais pelo método *Folin-Ciocalteu*

A determinação do teor de fenólicos totais foi avaliada pela metodologia espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu (VELIOGLU et al., 1998), utilizando-se ácido gálico como padrão de referência. Resumidamente, os extratos EBA1-7 e EBP1-7 foram diluídos sucessivamente na faixa de 500 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$. Após isso, foram adicionados 150 μL de solução *Folin Ciocalteu* 10%. Passados 5 minutos, adicionou-se ao meio 150 μL de solução NaHCO_3 6%. Aguardando-se 90 minutos para a leitura do meio no comprimento de onda de 750 nm em leitor de multiplacas de absorvância ELX 808 Reader (Biotek, Burlington, VT). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por gramas de peso fresco (mg EAG/1g). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.10. Determinação *in vitro* da atividade antioxidante

4.10.1. Capacidade de sequestro do radical livre DPPH

Os ensaios da atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaio Químicos (LAEQ) da Central Analítica da UFAM, coordenado pela Prof. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura. A determinação da capacidade de sequestro de radicais livres foi realizada pelo método descrito por CHOI et al., 2002 e RUFINO et al., 2007, com modificações. A caracterização da atividade antioxidante por este método é observada pela captura dos radicais livres de DPPH na presença do composto antioxidante, que é evidenciada pela mudança da coloração do meio.

Os resultados foram expressos comumente com a concentração de substrato que causa 50% de perda da atividade do radical DPPH, (% CS_{50} , em $\mu\text{g/mL}$). Preliminarmente, realizou-se um ensaio para determinar a faixa de concentração (1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$) de cada amostra a fim de se obter o valor real de % CS_{50} . Com os valores da absorvância estimou-se a faixa de trabalho, em uma série de seis diluições para cada extrato e/ou substâncias isoladas, em placa de Elisa de 96 poços, utilizando-se o ácido gálico como controle positivo. A absorvância foi medida em um leitor de multiplaca da BioTek, modelo Elx800, em 515 nm.

4.10.2. Capacidade de sequestro do radical ABTS

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS foi feito por meio do método espectrofotométrico no comprimento de onda de 734 nm (RE et al., 1999), baseado na capacidade de substâncias antioxidantes em capturar o radical livre ABTS, caracterizado pela descoloração da solução azul esverdeada do meio, diminuindo-se os valores

de absorvância pelo tempo de reação (RUFINO et al., 2007). Os resultados são apresentados em μM da capacidade antioxidante por equivalente ao Trolox (TEAC), uma vez que o Trolox é utilizado como controle positivo no ensaio.

4.14.3. Capacidade redutora do Ferro (FRAP)

A capacidade da amostra em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} na presença do antioxidante através do ensaio do FRAP foi realizada de acordo com o método colorimétrico formada com um máximo de absorção em 595 nm (BENZIE et al., 1996; LUXIMON-RAMMAN 2002). Onde o reagente FRAP foi preparado adicionando-se o tampão de acetato (0,3 M, pH = 3,6), solução TPTZ (10 mM) e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) (10: 1: 1). A amostra (100 μL , 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) misturando-se com 300 μL de água ultrapura e 3000 μL do reagente FRAP. Após incubação por 4 min a 37 °C, a leitura foi medida a 595 nm em um espectrofotômetro UV-vis (Thermo Scientific, Evolution 220). Todos os resultados foram obtidos pela curva de calibração do sulfato ferroso (250-1500 μM) e expressos como $\mu\text{M Fe}^{2+}$ por g de peso seco ($\mu\text{MFe}^{+2} / \text{g}$) da amostra. O ensaio foi realizado em triplicada. Utilizando-se o padrão ácido gálico.

4.11. Análise por ancoragem molecular

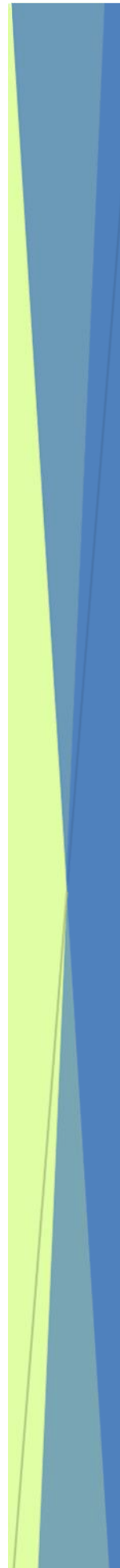
Inicialmente, as estruturas tridimensionais (3D) de 4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpiano)flavana, brosimina B, corylifol B, isobavachalcona, isoliquiritigenina, kanzonol B, kanzonol C, licoagrachalcona A e parinarioidina C foram baixadas do banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) no formato de arquivo de dados espaciais (SDF). As moléculas inéditas foram projetadas a partir do software Sketch. Os ligantes foram preparados de acordo com metodologias previamente relatadas (SILVA et al., 2020). Resumidamente, todas as estruturas foram submetidas à otimização geométrica pelo método semiempírico PM7 utilizando o software MOPAC2016 (STEWART 2016), sendo os resultados salvos em formato de banco de dados de proteínas (PDB). No AutoDock Tools (MORRIS et al., 2009), cargas de Gasteiger foram adicionadas para cada composto e prótons apolares foram mesclados, sendo os resultados salvos em banco de dados de proteínas, carga parcial (Q) e Tipo de átomo (T) (formato PDBQT).

A estrutura cristalina 3D da tirosina quinase-3 semelhante a FMS (FLT3) (PDB ID: 4RT7), foi recuperada do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) (<http://www.rcsb.org>) em PDB formato. Nas ferramentas AutoDock, as

moléculas de água e os ligantes ligados foram removidos, os prótons polares e as cargas de Kollman foram adicionados e os prótons não polares foram mesclados. Por fim, os resultados foram salvos no formato PDBQT.

As interações ligante-enzima, bem como a afinidade de ligação, foram previstas usando Autodock Vina (TROT & OLSON 2010). Uma caixa de grade de $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$ nas direções x, y, z foi criada com um espaçamento de $1,00 \text{ \AA}$ e centrada em $x = -40,526$, $y = 11,236$, $z = -14,574$ para 4RT7. As interações visuais ligante-enzima foram exibidas usando o Discovery Studio Visualizer. A enzima FLT3 foi testada para redocking (RMSD 1.5 \AA).

5. Resultados e Discussões



5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Espécie *B. acutifolium*

5.1.1. Rendimento dos extratos

Os extratos da casca da espécie *B. acutifolium*, provenientes do triângulo misturas de três componentes (DCM, AcOEt e EtOH), item **4.3.1.**, correspondentes aos solventes puros, misturas de dois componentes e três componentes com proporções iguais, apresentaram os seguintes rendimentos, em percentual, como pode ser visualizado na tabela **3**.

Tabela 3. Rendimento em percentual dos diferentes extratos de *B. acutifolium*.

Espécie	Solventes utilizados no preparo dos extratos	Códigos dos extratos	Média do rendimento (%) \pm desv.pad
<i>B. acutifolium</i>	DCM 100%	EBA1	1,5 \pm 0,16
	EtOH 100%	EBA2	2,2 \pm 0,05
	AcOEt 100%	EBA3	1,0 \pm 0,02
	AcOEt / DCM 1:1	EBA4	1,9 \pm 0,04
	DCM/ EtOH 1:1	EBA5	1,6 \pm 0,50
	EtOH/ AcOEt 1:1	EBA6	1,5 \pm 0,30
	DCM / AcOEt /EtOH 1:1:1	EBA7	1,3 \pm 0,03

Com base nos dados apresentados na tabela de rendimentos, pode-se observar maiores rendimentos para os extratos EBA2 (2,2%) e EBA4 (1,9%), seguidos dos extratos EBA5 (1,6%), BA1(1,5%), EBA6 (1,5%), EBA7 (1,3%), e EBA3 (1,0%).

5.1.2. Análise de perfil por ESI-EM e quimiométrica dos extratos de *B. acutifolium*

O fingerprint no modo negativo por inserção direta no ESI-EM dos extratos (E BA1-7) obtidos da casca de *B. acutifolium* revelou vários picos bases desprotonados entre m/z 200-800 (Figura 22), onde se destacaram os principais íons majoritários de m/z 255, e 323 e 281 [M-H]⁻. Foi possível observar o pico base correspondente ao íon de m/z 255 nos extratos DCM e AcOEt, já o pico base de m/z 323 apresentou-se nos extratos EtOH, AcOEt/DCM, DCM/EtOH e EtOH/AcOEt (Figuras 22A-F). Para o extrato DCM/ AcOEt/ EtOH, observou-se o pico base em m/z 281 (Figura 22G). Além destes, vários outros íons com alta intensidade relativa foram observados e então submetidos à análise de fragmentação (Tabela 4), na tentativa de identificação destas substâncias a partir da comparação dos dados obtidos com aqueles disponíveis na literatura.

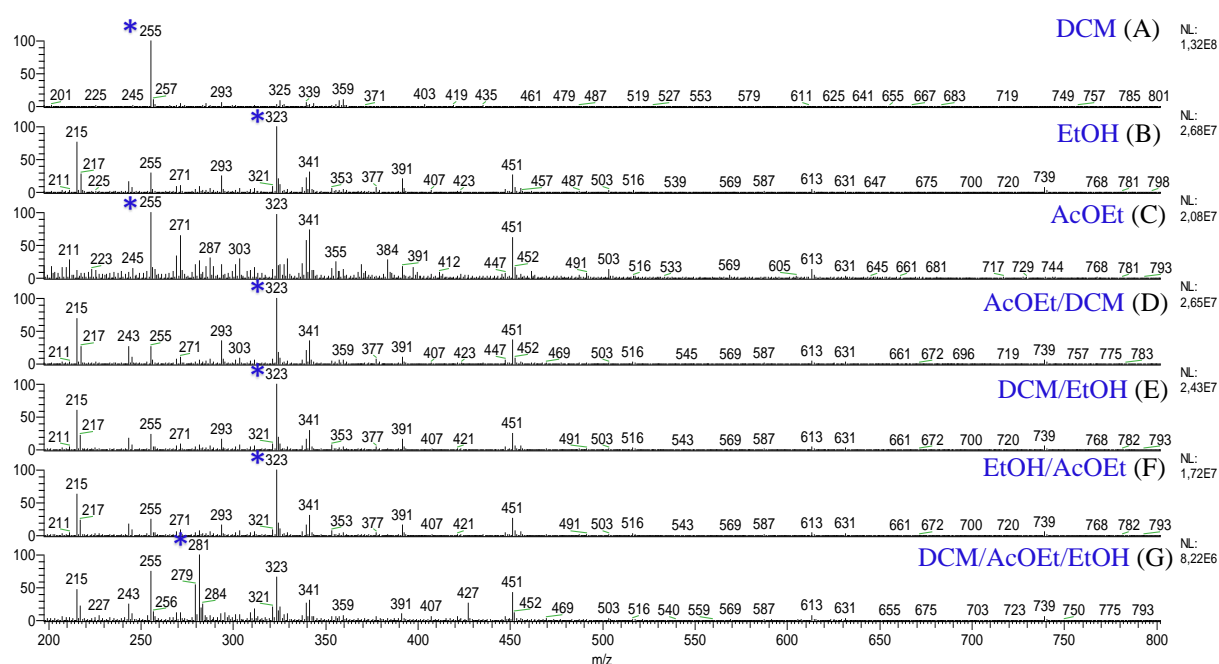


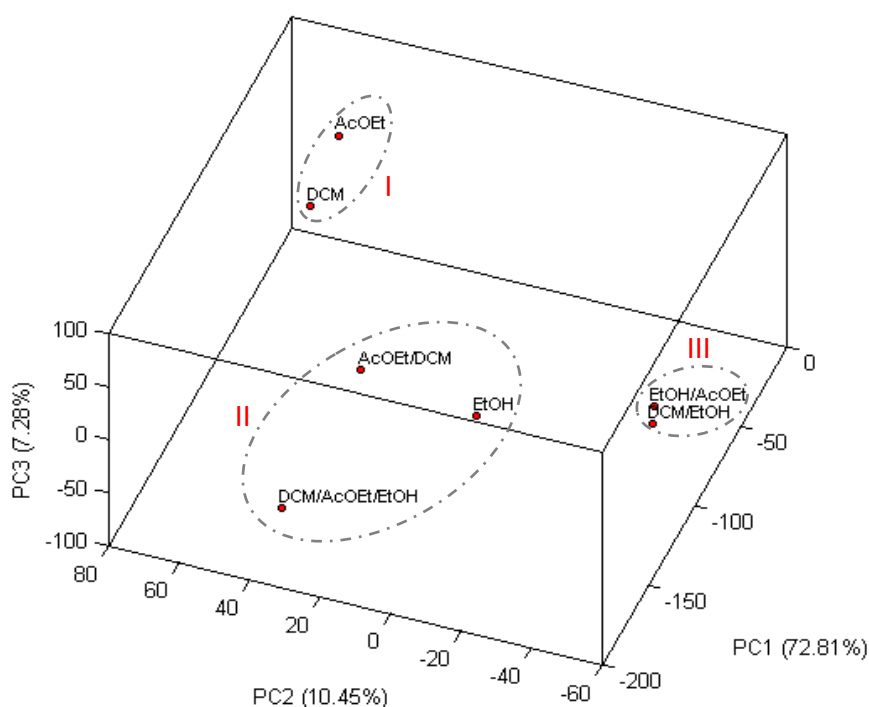
Figura 22. Espectros de ESI-EM obtidos dos sete diferentes extratos de *B. acutifolium*.

Através da variação de íons e suas intensidades relativas registradas em ESI-EM de cada extrato, foi possível realizar as análises quimiométricas de PCA e HCA, onde as três primeiras componentes principais (PC1, PC2 e PC3) para esta espécie explicam 90,54% da variância total contida nos dados. A Figura 23 representa o gráfico dos scores das três componentes principais.

Tabela 4. Principais fragmentos obtidos dos sete diferentes extratos de *B. acutifolium*.

<i>m/z</i>	MS ²	Substância
[M-H] ⁻	[M-H] ⁻	
255	135, 119	isoliquiritigenina
281	-	-
309	189, 203	brosimina B
321	285, 201, 119	kanzonol B
323	187, 159, 135, 119	isobavachalcona
339	321, 203, 135, 119	corylifol B
391	355, 203, 187, 159	kanzonol C
451	341	(epi)catequina glicosídeo
613	503, 451, 341	cinchonaina hexosídeo

Nos gráficos de PCA dos extratos da casca de *B. acutifolium* foi possível observar a formação de 3 grupos distintos: Grupo **I** (extratos de DCM e AcOEt), Grupo **II** (extratos de EtOH, AcOEt /DCM e DCM/ AcOEt /EtOH) e Grupo **III** (extratos de EtOH/ AcOEt e DCM/EtOH).

**Figura 23.** Gráfico de PCA dos diferentes extratos de *B. acutifolium*.

Analisando os gráficos biplot (PC1 e PC2 - 93,23% da variância total) foi possível observar que os íons de *m/z* 255 e 323 [M-H]⁻ foram os principais responsáveis pela

segregação dos grupos I e III, a partir dos sete diferentes extratos analisados para essa espécie, como apresentado na Figura 24. Assim, de acordo com os dois extremos formados no gráfico, o íon de m/z 255 apresentou-se como a variável de maior peso para os extratos de DCM e AcOEt, enquanto o íon de m/z 323 revelou-se nos extratos EtOH/AcOEt e DCM/EtOH.

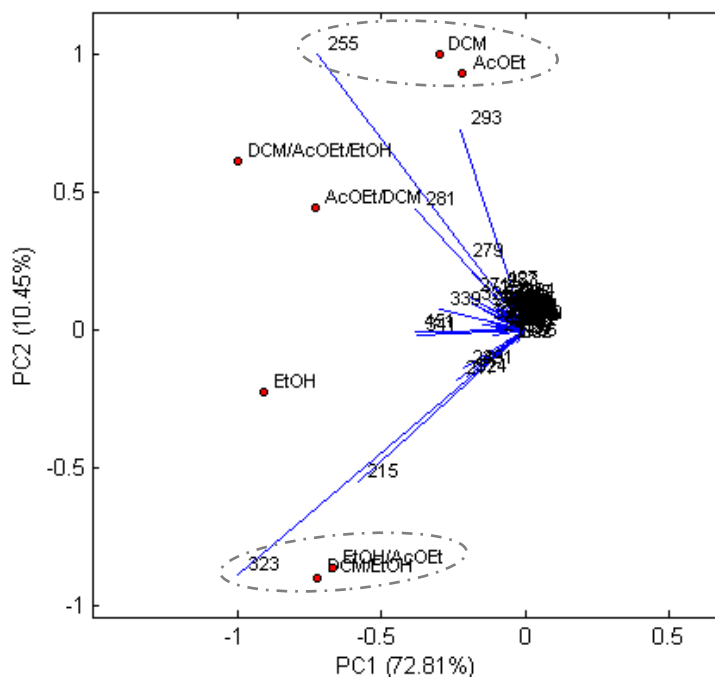


Figura 24. Gráfico biplot da análise de PC1 e PC2 dos extratos de *B. acutifolium*.

De acordo com o dendrograma de HCA obtido (Figura 25), pode-se confirmar a separação dos três grupos formados. Onde, o grupo I apresentou menor similaridade quando comparado com os demais grupos de solventes extratores, devido a maior distância Euclidiana, enquanto os grupo II e III apresentaram maior similaridade entre si. Por outro lado, o grupo III apresentou maior similaridade entre amostras, quando comparados com o grupo II.

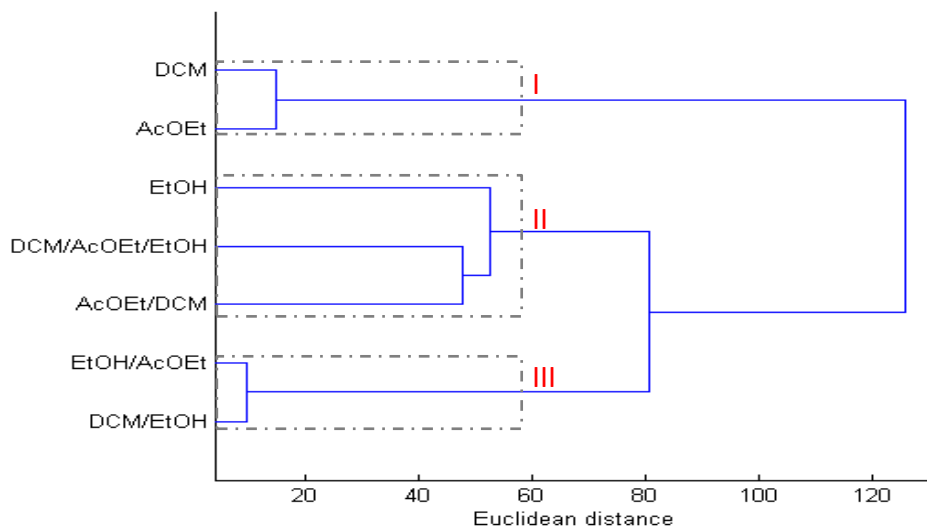


Figura 25. Dendrograma dos diferentes extratos de *B. acutifolium* obtida pela Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA).

O espectro de MS/MS do íon de m/z 255 (Figura A1) apresentou o pico base de m/z 135 e outro menos intenso de m/z 119, sendo consistente com a estrutura da chalcona conhecida como **isoliquiritigenina** (SÁ et al, 2020b). Por outro lado, o espectro de fragmentação obtido para o íon de m/z 323 (Figura A2), apresentou o pico de maior intensidade de m/z 203 e em menores intensidades de m/z 119 e 159, que estão de acordo com a estrutura da **isobavachalcona** (SÁ et al, 2020b).

Além destes, outros íons de intensidade relevante foram observados nos extratos EBA1-7 (Figura 22A-G), onde tiveram sua identificação aferida por meio da análise do padrão de fragmentação e comparação dos dados da literatura. O espectro de MS/MS do íon de m/z 309 (Figura A3), apresentou o pico de maior intensidade de m/z 119 e outros com menores intensidades de m/z 189 e 203, sendo estes consistentes com a flavana conhecida como **brosimina B** (SÁ et al, 2020a). Para o íon de m/z 321 (Figura A4), o espectro de MS/MS exibiu o pico base de m/z 201 e outro menores de m/z 119, sendo denominado como a estrutura do **kanzonol B** (SÁ et al, 2020b). Ainda, o espectro de MS/MS do íon de m/z 391 (Figura A5), apresentou fragmentos estáveis de m/z 187 e 203, sendo consistente com a estrutura do **kanzonol C** (SÁ et al, 2020b). O íon de m/z 339 (Figura A6), apresentou fragmentos de maior intensidade em m/z 119 e outros menos intensos de m/z 135 e 203, o qual foram atribuídos a estrutura do **corylifol B** (SÁ et al, 2020b). O íon de m/z 451 (Figura A7), revelou o pico base de m/z 341 e outros menores de m/z 301 e 289, sendo atribuída com

a estrutura da **(epi)catequina glicosídeo** (ZERBIB et al., 2018). Finalmente, o espectro de MS/MS do íon de m/z 613 (Figura A8) indicou presença de um pico base de m/z 503 e outros menos intensos de m/z 451 e 341, sendo denominado como a estrutura da **cinchonaina hexosídeo** (SOBEH et al., 2017). Na Figura 26 estão ilustradas as estruturas.

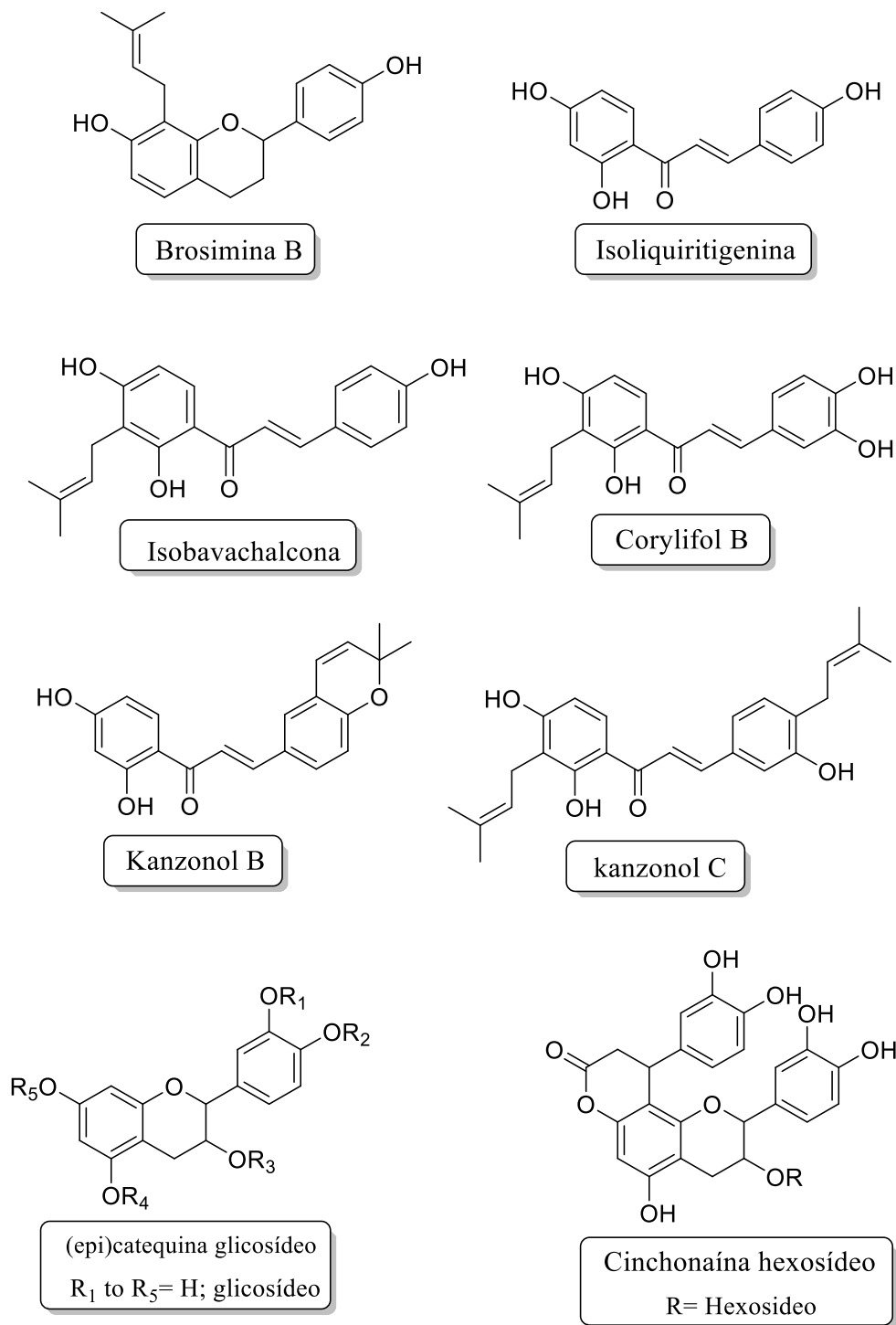


Figura 26. Substâncias identificadas na casca de *B. acutifolium*.

5.1.3. Análise por CLAE-DAD-EM e isolamento de substâncias de EBA4-FI

A partir da análise por CLAE-DAD-EM foi possível observar diversos picos na fração EBA4-FI (Figura 27). Baseado no perfil de DAD e EM foram anotados 7 picos (Tabela 5), com tempo de retenção variando entre 14,4 e 20,8. Os picos cromatográficos majoritários com tempo de retenção em t_R 14,4 (m/z^- 255), 18,6 (m/z^- 309) e 20,8 min (m/z^- 391), bem como os minoritários com t_R 16,8 (m/z^- 309), 17,8 (m/z^- 339), 18,9 (m/z^- 307) e 19,7 (m/z^- 321), foram isolados após os devidos escalonamentos em CLAE-UV semipreparativo e então submetidos a análises por EM e por RMN 1D e 2D.

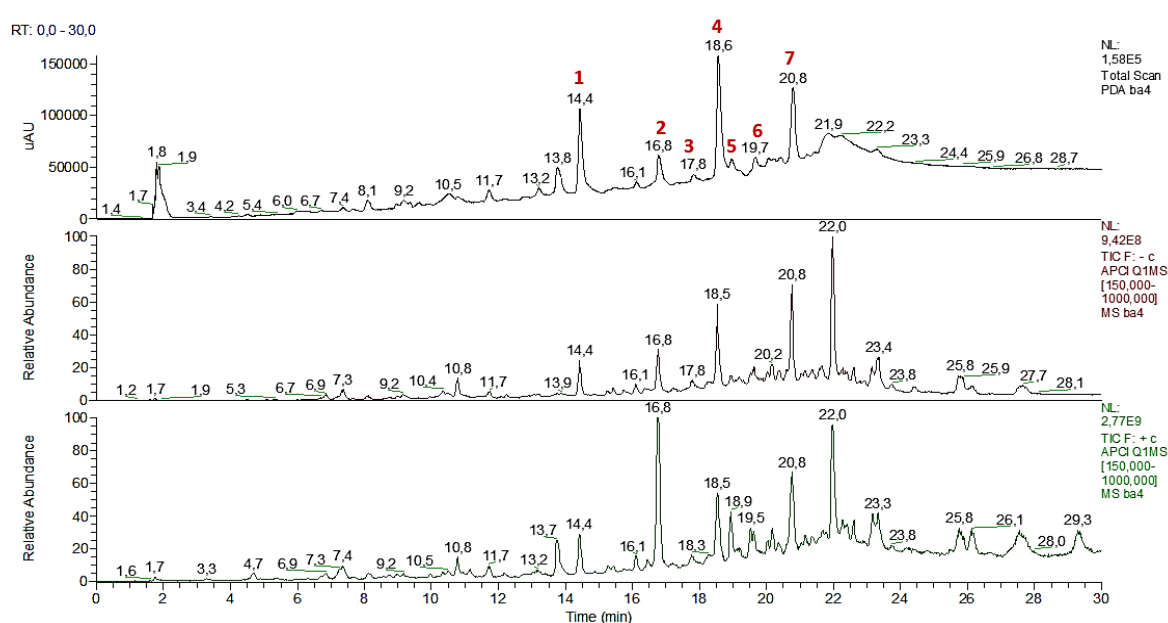


Figura 27. Cromatograma da fração EBA4-FI em CLAE-DAD-EM.

Tabela 5. Informações anotadas da fração BA4-FI em CLAE-DAD-EM de *B. acutifolium*.

Fase	Substância	Substância	t_R (min)	λ máx (nm)	m/z [M-H] ⁻	m/z [M-H] ⁺	MS ² [M-H] ⁻
	Código	(Pico N ^o)					
E.BA4-FI	BAS-255	1	14,4	270-390	255	257	135, 119
	BAS-309	2	16,8	260-280	309	311	203, 189, 119
	BAS-339	3	17,8	270-390	339	341	203, 135, 119
	BAS-323	4	18,6	270-395	323	325	203, 187, 135, 119
	BAS-307	5	18,9	262-280	307	309	289, 271, 235, 206, 119
	BAS-321	6	19,7	270-395	321	323	285, 201, 119
	BAS-391	7	20,8	270-395	391	393	203, 187

5.1.4. Determinação estrutural das substâncias isoladas das cascas do *B. acutifolium*

5.1.4.1. Determinação estrutural da substância BAS-309

A substância **BAS-309** (6,8 mg), isolada do fracionamento (fluxograma 2, item 4.6.1.3), apresentou-se como sólido amorfo solúvel em metanol. A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 500 MHz em MeOD (Figura 28).

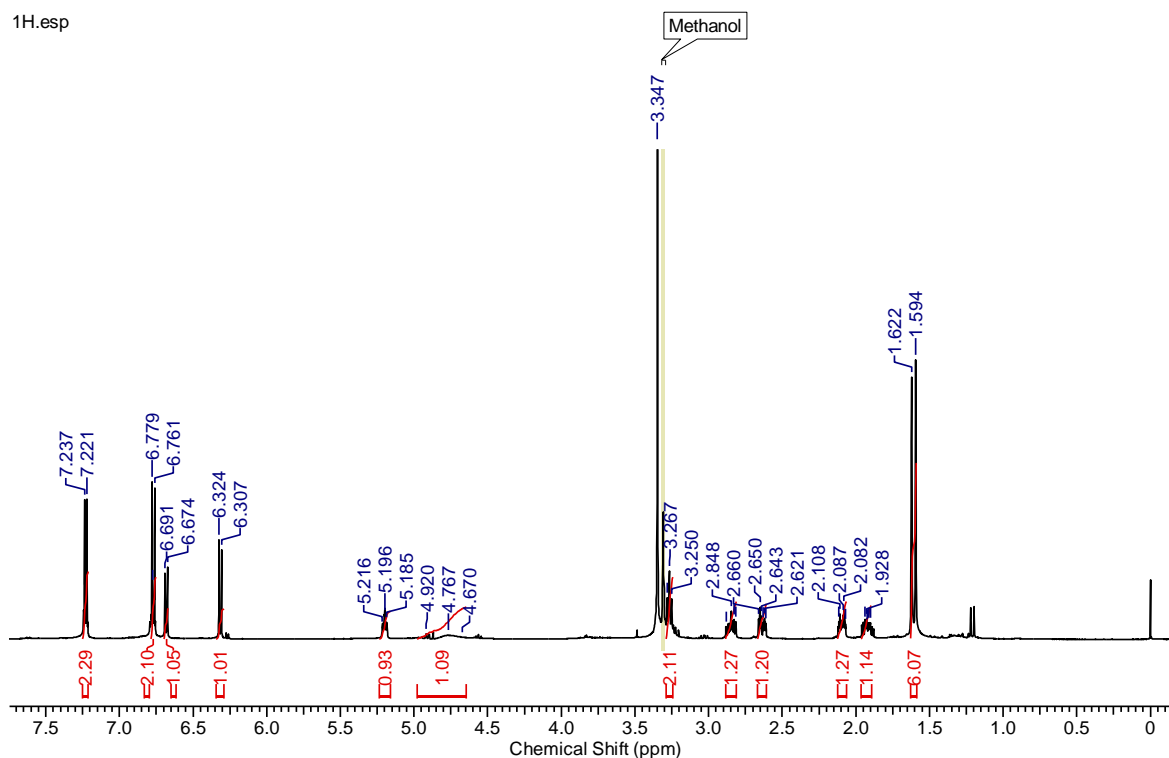
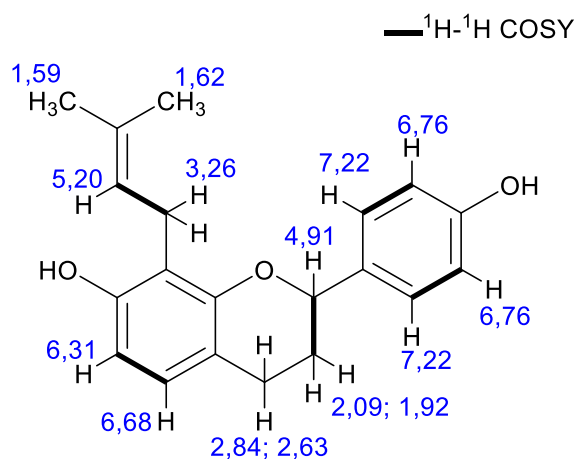


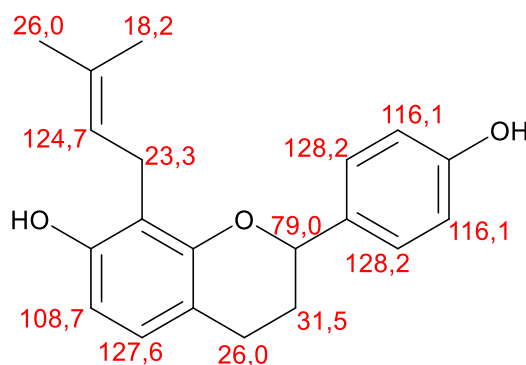
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-309.

No espectro de RMN ^1H foram observados quatro sinais de prótons aromáticos com deslocamentos químicos em δ_{H} 7,22 (*d*; $J = 8,55$ Hz; 2H), 6,68 (*d*; $J = 8,22$ Hz; 1H), 6,76 (*d*; $J = 8,55$ Hz; 2H) e δ_{H} 6,31 (*d*, $J = 8,22$ Hz, 1H), correspondentes a dubletos, cujos valores da constante de acoplamento (J) sugeriram um acoplamento do tipo “orto” em dois diferentes anéis aromáticos. Na região dos prótons alifáticos, pode-se constatar a presença de um próton oximetínico em δ_{H} 4,91 (*m*; 1H), característico de esqueleto do tipo flavana (TEIXEIRA et al., 2000; TORRES et al., 2000), além de um multipletto em δ_{H} 5,20 (*m*; 1H), seis prótons metilênicos em δ_{H} 3,26 (*m*; 2H), 2,84 (*m*; 1H), 2,63 (*m*; 1H), 2,09 (*m*; 1H) e 1,92 (*m*; 1H), e duas metilas em δ_{H} 1,62 (*s*; 3H) e 1,59 (*s*; 3H). Através do espectro do COSY (Anexo) foi

possível consolidar a estrutura do esqueleto do tipo flavana através dos acoplamentos dos prótons de δ_{H} 7,22 e 6,76, δ_{H} 6,68 e 6,31, δ_{H} 4,91 e 2,09/1,92.



No mapa de contorno HSQC (Figura 29) foram observadas as correlações em J_1 dos prótons aromáticos em δ_{H} 6,68 e 6,31 com os carbonos em δ_{C} 127,6 (C-5) e δ_{C} 108,7 (C-6), respectivamente, que foram atribuídos ao anel aromático A. O anel aromático B, demonstraram correlações entre os prótons em δ_{H} 7,22 e 6,76 com os carbonos em δ_{C} 128,2 (C-2'/6') e 116,1 (C-3'/5'), respectivamente. Na região alifática, o segmento prenila foi confirmado pelas correlações dos prótons em δ_{H} 5,20 com o carbono em δ_{C} 124,7 (C-2''), e dos prótons metilênicos em δ_{H} 3,26 com o carbono em δ_{C} 23,3 (C-1''), além da correlação das metilas em δ_{H} 1,62 e 1,59 com os carbonos em δ_{C} 18,2 (C-5'') e 26,0 (C-4''), respectivamente. O próton em δ_{H} 4,91 apresentou correlação com o carbono em δ_{C} 79,0 (C-2), e os prótons metilênicos em δ_{H} 2,84; 2,63 com o carbono em δ_{C} 26,0 (C-4), além dos prótons em δ_{H} 2,09; 1,92 com o carbono em δ_{C} 31,5 (C-3), confirmaram a existência do anel C na estrutura.



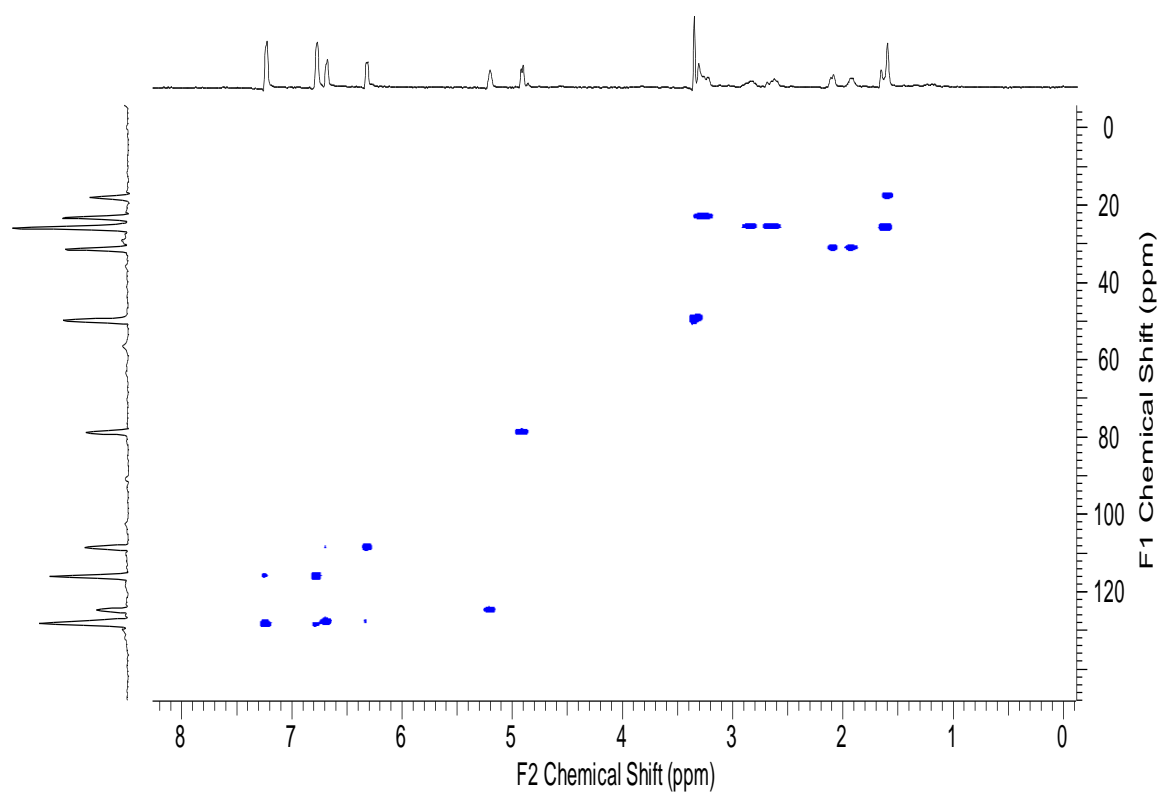


Figura 29. Mapa de contorno HSQC (¹H 500 e ¹³C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-309.

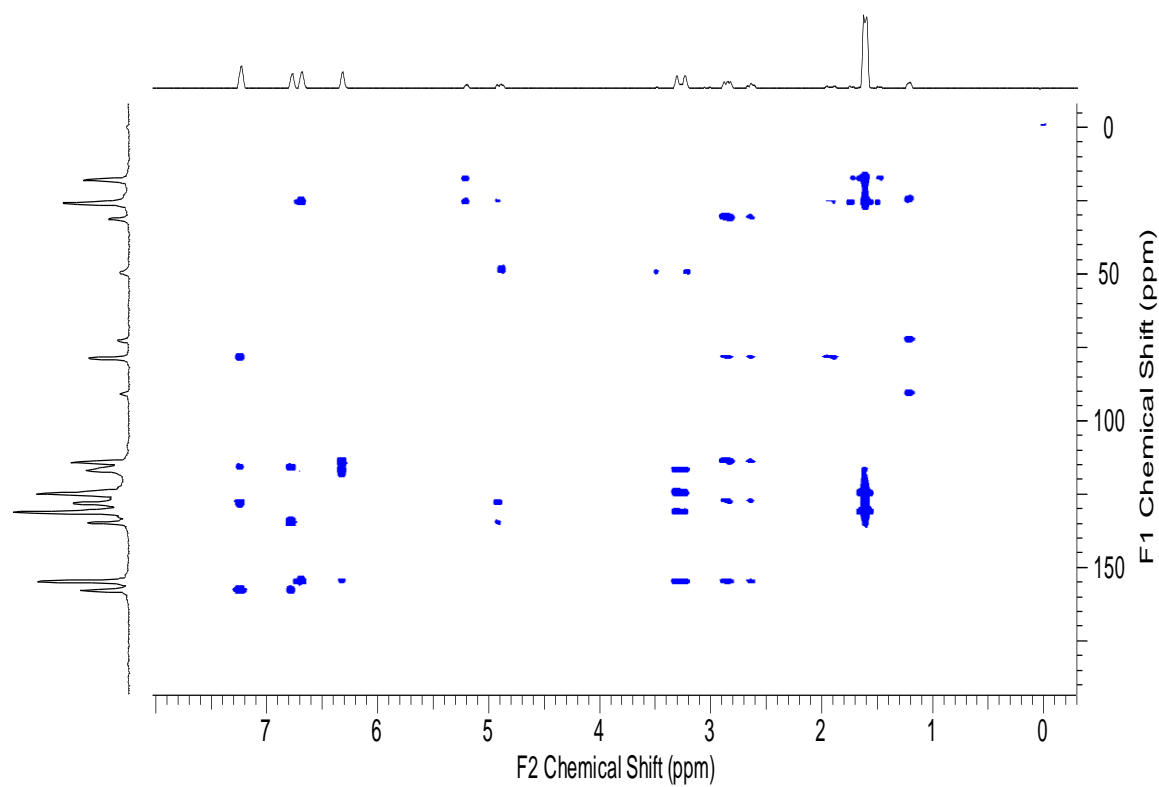
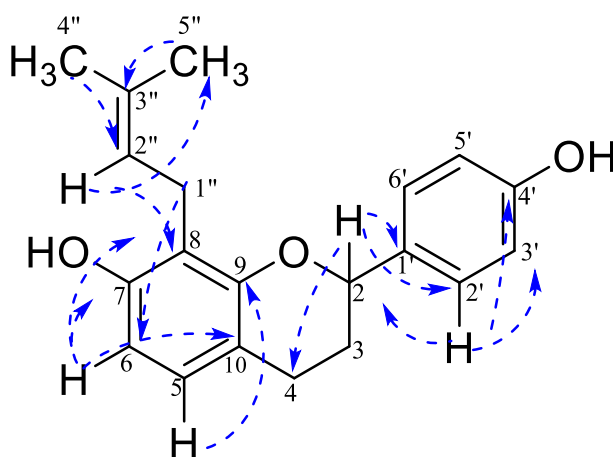


Figura 30. Mapa de contorno HMBC (¹H 500 e ¹³C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-309.

Por meio da análise do mapa de contorno HMBC (Figura 30) foi possível observar as principais correlações na parte aromática da estrutura, onde pode-se destacar o sinal do próton aromático em δ_H 7,22 (H-2') correlacionando com os carbonos em δ_C 158,0 (C-4'), δ_C 116,1 (C-3') e δ_C 79,0 (C-2), confirmando a presença da hidroxila ligada ao anel B e a conexão com o anel C. Ainda, o sinal em δ_H 6,76 (H-3') apresentou correlação em J_3 com o carbono em δ_C 134,9 (C-1'), confirmando assim a presença do carbono quaternário do anel aromático B.

O próton em δ_H 4,91 (H-2) característico do esqueleto das flavanas, apresentou correlação com os carbonos em δ_C 134,9 (C-1'), 128,2 (C-2') e com o carbono metilênico em δ_C 26,0 (C-4) do anel C. Além disso, os prótons aromáticos em δ_H 6,68 (H-5) apresentou correlação com o carbono quaternário em δ_C 154,9 (C-9) e δ_H 6,31 (H-6) apresentou correlação com os carbonos quaternários em δ_C 114,3 (C-8), 117,7 (C-10) e com a ligação hidroxila-carbono em δ_C 154,7 (C-7) confirmando a existência do anel aromático A.

Os grupos metila ligados no segmento da prenila foram confirmados pela correlação dos sinais em δ_H 1,62 (CH₃-5'') e 1,59 (CH₃-4'') com os carbonos em δ_C 18,2 (C-5'') e 131,7 (C-3''), e, 124,7 (C-2'') e 26,0 (C-4''), respectivamente. Além disso, o próton em δ_H 5,20 (H-2'') mostrou correlação com os carbonos em δ_C 18,0 (C-4''), 18,2 (C-5'') e 114,3 (C-8), confirmando assim a ligação do grupo prenila com o anel aromático A da estrutura.



Os dados espectrais de RMN 1D e 2D (Tabela 6), juntamente com a análise de espectrometria de massas (Figura 32), e comparação dos dados obtidos com aqueles disponíveis na literatura (TEIXEIRA et al., 2000; TORRES et al., 2000), confirmaram a

substância BAS-309 como sendo a **7,4'-dihidroxi-8-prenilflavana** (Figura 31). O 7,4'-dihidroxi-8-prenilflavano, também conhecida como brosimina B, já foi reportada outras espécies de Moraceae como *Morus alba* L. (YANG et al., 2014), *M. yunnanensis* Koidz (JI et al., 2015) e *Cudrania tricuspidata* (KWON et al., 2016).

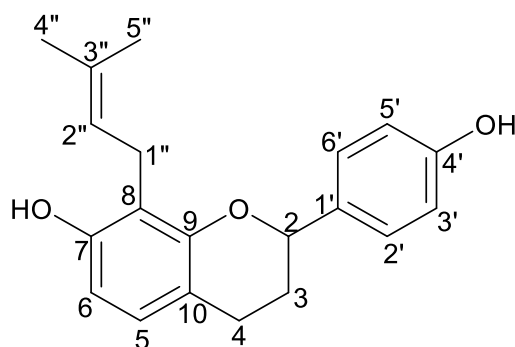


Figura 31. Estrutura da flavana BAS-309.

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BAS-309.

7,4'-dihidroxy-8-prenilflavana				
N ^o	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	δ_{H} (mult.; <i>J</i> em Hz) ^a	HMBC ^a
2	79,0	77,8	4,91 (<i>m</i>), 1H	128,2; 134,9; 26,0
3	31,5	30,4	1,92; 2,09 (<i>m</i>), 2H	26,0; 79,0; 127,6
4	26,0	25,3	2,63; 2,84 (<i>m</i>), 2H	114,3; 79,0; 31,5
5	127,6	127,7	6,68 (<i>d</i> ; 8,22), 1H	154,9
6	108,7	108,5	6,31 (<i>d</i> ; 8,22), 1H	114,3; 117,7; 154,9
7	154,7	153,9	-	-
8	114,3	114,4	-	-
9	154,9	153,9	-	-
10	117,7	115,0	-	-
1'	134,9	134,8	-	-
2'/6'	128,2	127,7	7,22 (<i>d</i> ; 8,55), 2H	158,0; 79,0; 116,1
3'/5'	116,1	115,6	6,76(<i>d</i> ; 8,55), 2H	134,9; 158,0
4'	158,0	155,5	-	-
1''	23,3	22,8	3,26 (<i>m</i>), 2H	
2''	124,7	122,6	5,20 (<i>m</i>), 1H	26,0; 18,2
3''	131,7	134,5	-	-
4''	26,0	26,2	1,59 (<i>s</i>), 3H	26,0; 124,7
5''	18,2	18,3	1,62 (<i>s</i>), 3H	18,0; 131,7

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS.

^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo com TEIXEIRA, et al, 2000 (CDCl_3 , 100 MHz).

A análise por espectrometria de massas de BAS-309 apresentou a presença do pico de maior intensidade em m/z 309 $[M-H]^-$ (Figura 33).

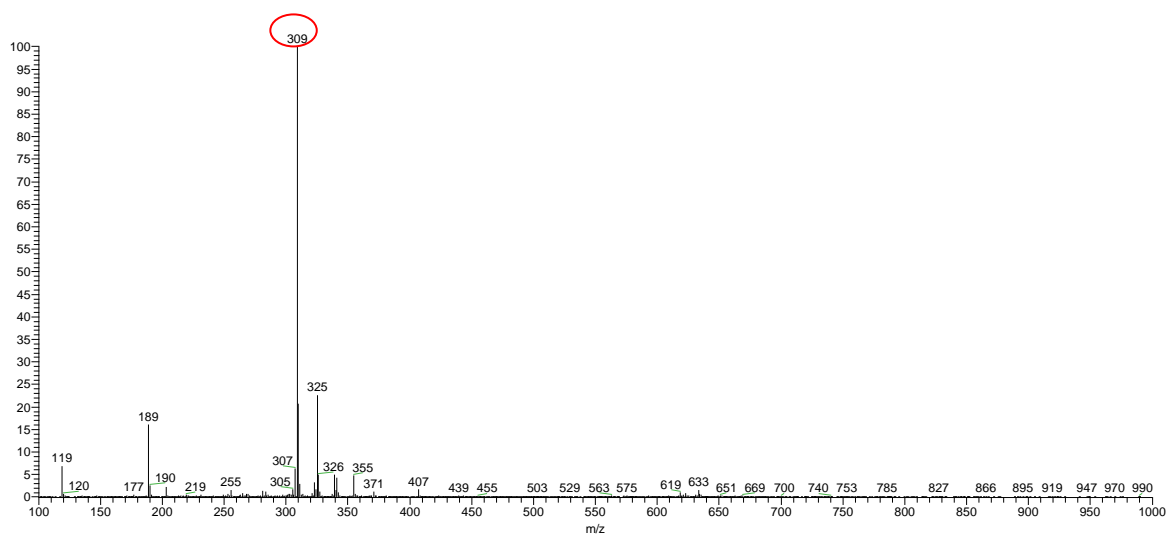


Figura 32. Espectro de massas da substância BAS-309 isolada da casca de *B. acutifolium*.

O íon de m/z 309 $[M-H]^-$ foi submetido à análise de fragmentação sequencial (MS^2) (Figura 33), onde observou-se uma elevada perda de 190 Da, resultando no pico de m/z 119 $[M-H]^-$ e o pico base de m/z 189 $[M - H]^-$. Abaixo pode-se observar uma proposta de fragmentação para esse íon.

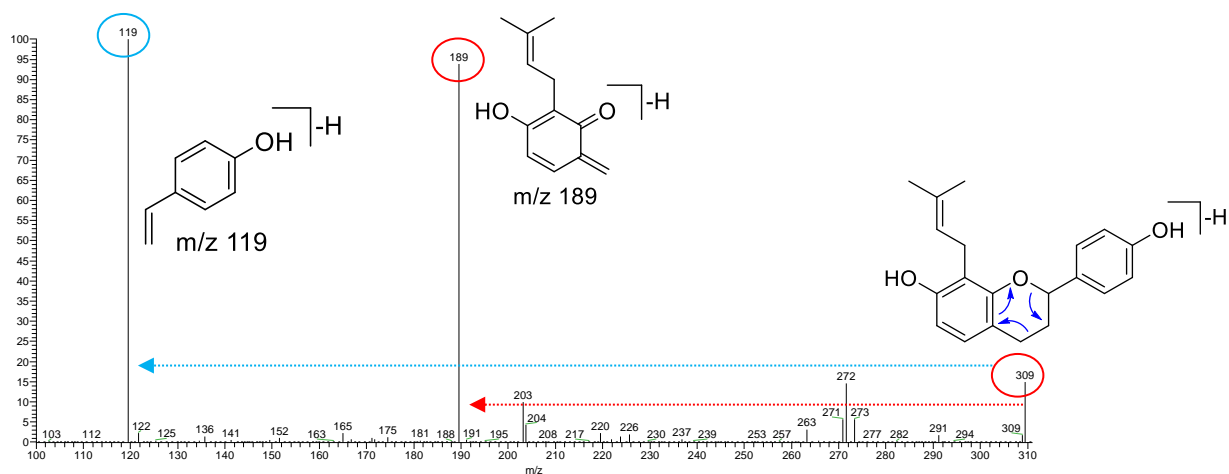


Figura 33. Espectro de MS^2 para o íon 309 $[M-H]^-$ e proposta de fragmentação.

5.1.4.2. Determinação estrutural da substância BAS-307

A substância **BAS-307** (2,1 mg), obtida como sólido amorfo solúvel em metanol, foi isolada do fracionamento (fluxograma 2, item 4.6.1.3). A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 500 MHz em MeOD, (Figura 34).

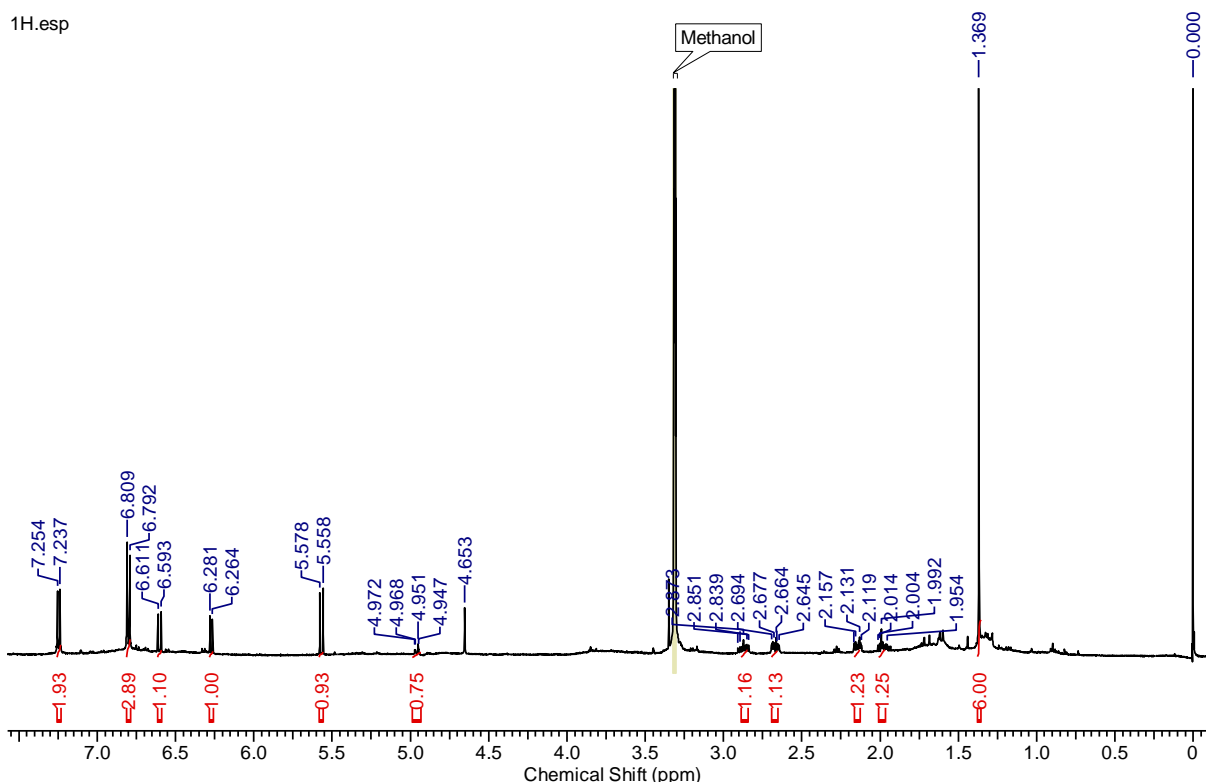
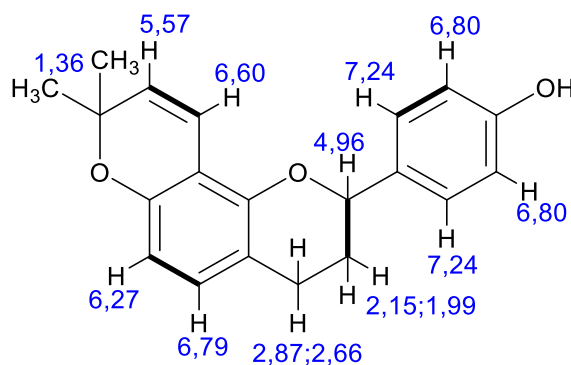


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-307.

Baseado no espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtido do mapa de correlação de HSQC foi possível notar, que a substância **BAS-307** possuía semelhança estrutural com a substância **BAS-309**. Contudo, a diferença foi observada com a presença dos prótons olefínicos do tipo vicinal em δ_{H} 6,60 (*d*; $J= 10,0$ Hz; 1H) e 5,57 (*d*; $J= 10,0$ Hz; 1H).

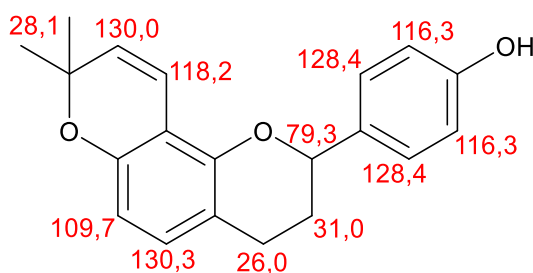
No espectro de RMN de ^1H foram observados quatro sinais característicos de prótons aromáticos em δ_{H} 7,24 (*d*; $J= 8,57$ Hz; 2H), 6,80 (*d*; $J= 8,30$ Hz; 2H), 6,79 (*d*; $J= 8,30$ Hz; 1H) e δ_{H} 6,27 (*d*, $J= 8,30$ Hz, 1H). Observou-se também o sinal característico ao próton oximetínico em δ_{H} 4,96 (*m*; 1H), quatro prótons metilênicos em δ_{H} 2,87 (*m*; 1H), 2,66 (*m*; 1H), 2,15 (*m*; 1H)

e 1,99 (*m*; 1H), além da presença do sinal de metila em δ_{H} 1,36 (*s*) integrando para seis prótons. No espectro de COSY (Anexo), foi possível confirmar os acoplamentos entre os prótons de δ_{H} 5,57 e 6,60, δ_{H} 6,79 e 6,27, δ_{H} 4,96 e 2,15/1,99, e δ_{H} 7,24 e 6,80, conforme a estrutura proposta abaixo:



No mapa de contorno HSQC (Figura 35) foram observadas as correlações entre os prótons aromáticos em δ_{H} 6,79 correlacionado com o carbono em δ_{C} 130,3 (C-5), δ_{H} 6,27 com δ_{C} 109,7 (C-6), δ_{H} 7,24 com δ_{C} 128,4 (C-2'/6'), e δ_{H} 6,80 com δ_{C} 116,3 (C-3'/5'), característicos dos anéis aromáticos A e B, respectivamente.

O próton oleofínico em δ_{H} 6,60 correlacionou com o carbono em δ_{C} 118,2 (C-1'') e δ_{H} 5,57 com δ_{C} 130,0 (C-2''), além destes a metila em δ_{H} 1,36 correlacionou com o carbono em δ_{C} 28,1 (C-3''). Os sinais dos prótons do anel C da estrutura foram confirmados pela correlação do sinal do próton oximetínico em δ_{H} 4,96 correlacionando com o carbono em δ_{C} 79,3 (C-2), e os prótons metilênicos em δ_{H} 2,87; 2,66 com δ_{C} 26,0 (C-4) e δ_{H} 2,15; 1,99 com δ_{C} 31,0 (C-3), como pode ser visualizado abaixo:



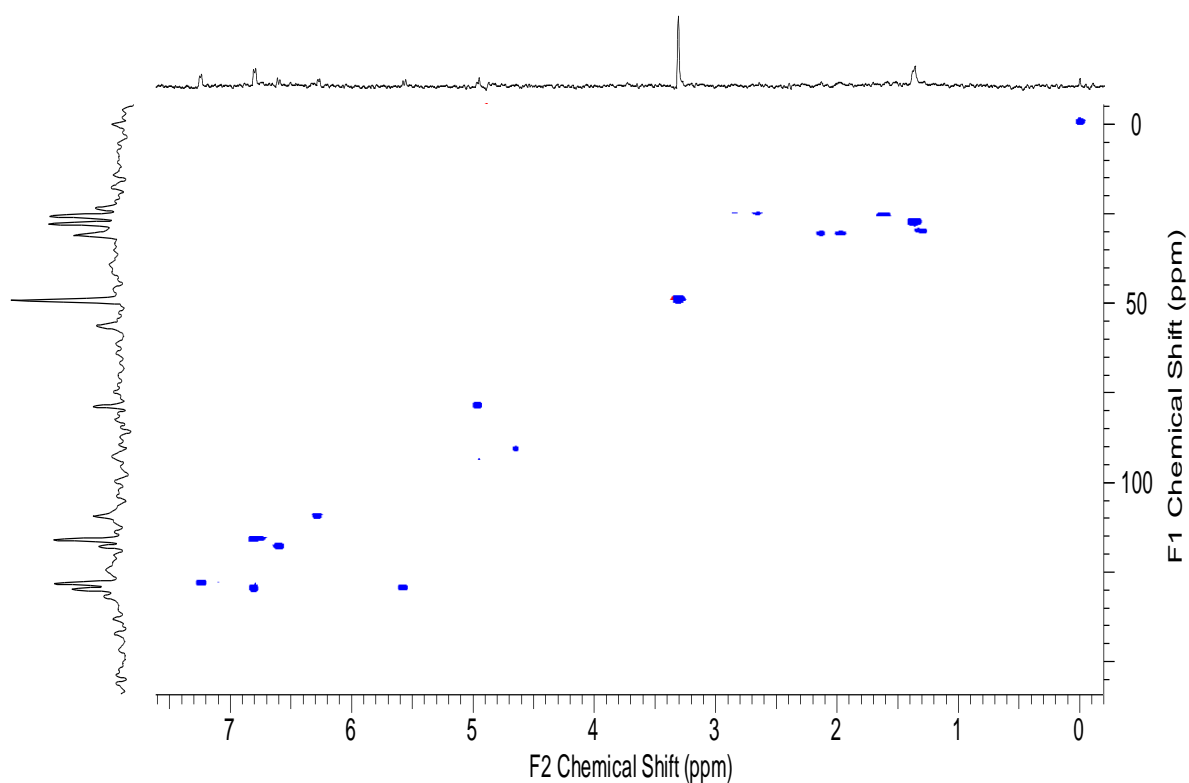


Figura 35. Mapa de contorno HSQC (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-307.

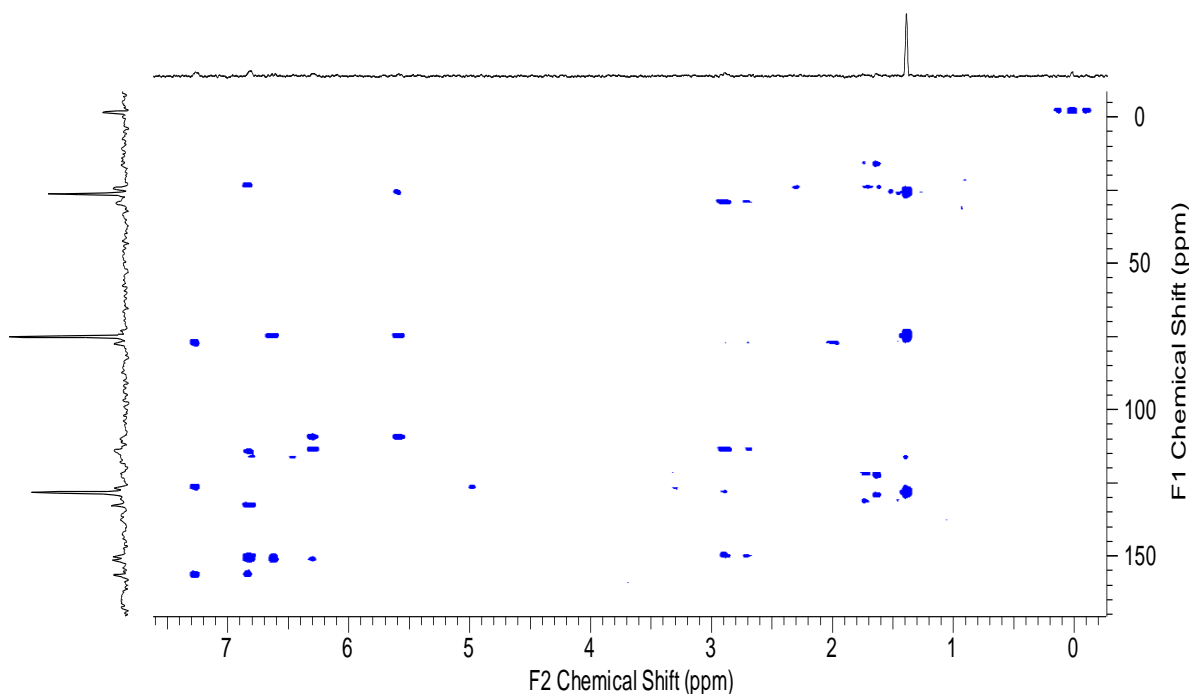
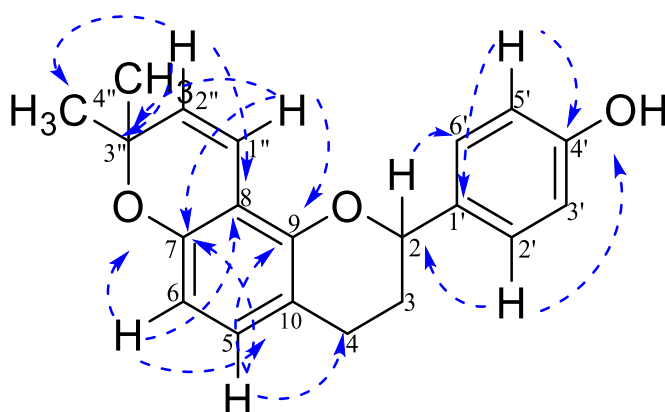


Figura 36. Mapa de contorno HMBC (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-307.

No mapa de contorno de HMBC (Figura 36) pode-se observar o sinal do próton aromático em $\delta_{\text{H}} 6,27$ (H-6) correlacionando com os carbonos em $\delta_{\text{C}} 111,2$ (C-8) e $\delta_{\text{C}} 153,0$ (C-

7), confirmando a presença de uma ligação carbono-oxigênio e grupo vinil na estrutura atribuídos ao grupo semelhante ao benzopirano da estrutura. Ainda, δ_{H} 6,27 (H-6) correlacionou como carbono em δ_{C} 115,6 (C-10), comprovando a presença do carbono quaternário e a ligação com o anel C da estrutura. O sinal dos prótons olefínicos em δ_{H} 6,60 (H-1'') e δ_{H} 5,57 (H-2'') pertencentes do segmento pirano apresentaram as principais correlações com os carbonos em δ_{C} 153,0 (C-7), 151,9 (C-9) e 111,2 (C-8), respectivamente, confirmando a presença do grupo benzopirano ligado no anel aromático A da estrutura.

O sinal do próton oximetínico em δ_{H} 4,96 (H-2) correlacionou com o carbono em δ_{C} 128,4 (C-6') do anel aromático B. Além disso, o próton aromático em δ_{H} 7,24 (H-2') correlacionou com os carbonos em δ_{C} 158,0 (C-4') e δ_{C} 79,3 (C-2), confirmando a presença da hidroxila no anel e a conexão com o anel C da estrutura. Ainda, o sinal do próton aromático em δ_{H} 6,80 (H-5') também correlacionou com o carbono ligado a hidroxila em δ_{C} 158,0 (C-4') e δ_{C} 134,3 (C-1'), confirmaram o sinal do carbono quaternário do anel aromático B.



Os dados espectrais de RMN 1D e 2D (Tabela 7), juntamente com a análise por espectrometria de massas (Figura 38), auxiliados com a comparação de dados encontrados na literatura (TORRES et al., 1997), permitiu na identificação da substância **BAS-307** como a **4'-hidroxi-7,8-(2'',2'')-dimetilpirano flavana**, Figura 37. Não há relato de 4'-hidroxi-7,8-(2'',2'')-dimetilpirano)flavana em qualquer outro gênero da família Moraceae.

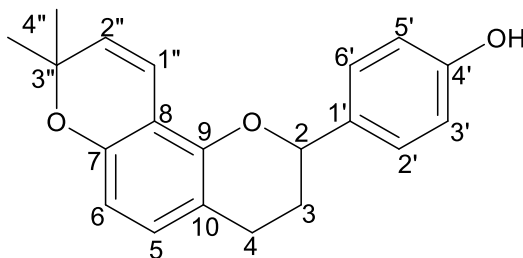


Figura 37. Estrutura da flavana BAS-307.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BAS-307.

4'-hidroxi-7,8-(2'',2'')-dimetilpirano)flavana				
N ^o	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	δ_{H} (mult.; J in Hz) ^a	HMBC ^a
2	79,3	77,2	4,96 (<i>m</i>), 1H	128,4
3	31,0	30,0	1,99; 2,15 (<i>m</i>), 2H	26,0
4	26,0	24,7	2,66; 2,87 (<i>m</i>), 2H	115,5; 151,9; 130,3
5	130,3	128,9	6,80 (<i>d</i> ; 8,57), 1H	151,9; 153,0; 26,0
6	109,7	108,7	6,27(<i>m</i>),1H	115,6; 111,2; 153,0
7	153,0	151,9	-	-
8	111,2	110,0	-	-
9	151,9	150,4	-	-
10	115,6	113,9	-	-
1'	134,3	134,3	-	-
2'/6'	128,4	127,4	7,24 (<i>d</i> ; 8,57), 2H	158,0; 79,3
3'/5'	116,3	115,3	6,80 (<i>d</i> , 8,30), 2H	134,3; 158,0
4'	158,0	155,1	-	-
1''	118,2	28,7	6,60 (<i>d</i> ; 10,0), 1H	153,0; 76,6; 151,9
2''	130,0	75,6	5,57 (<i>d</i> ; 10,0), 1H	111,2; 76,6; 28,1
3''	76,6	128,8	-	-
4''	28,1	117,0	1,36 (<i>s</i>), 6H	130,0; 76,6

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS.

^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo com TORRES, et al, 1997 (CDCl₃, 100 MHz).

A análise por espectrometria de massas de BAS-307, revelou a presença do pico de maior intensidade em m/z 307 $[\text{M}-\text{H}]^-$, Figura 38.

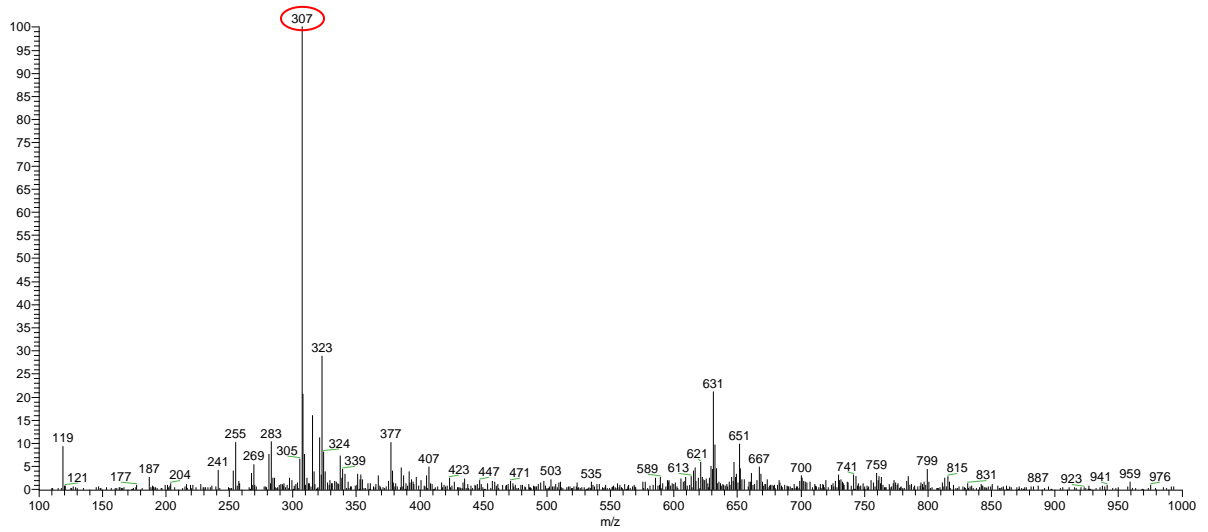


Figura 38. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-307 isolada da casca de *B. acutifolium*.

O íon m/z 307 $[M-H]^-$ foi submetido à análise de fragmentação MS^2 , apresentando uma perda de 188 Da, originando o pico de m/z 119 $[M-H]^-$ e um dos picos mais intensos em m/z 187 $[M-H]^-$, conforme a proposta de fragmentação abaixo, Figura 39.

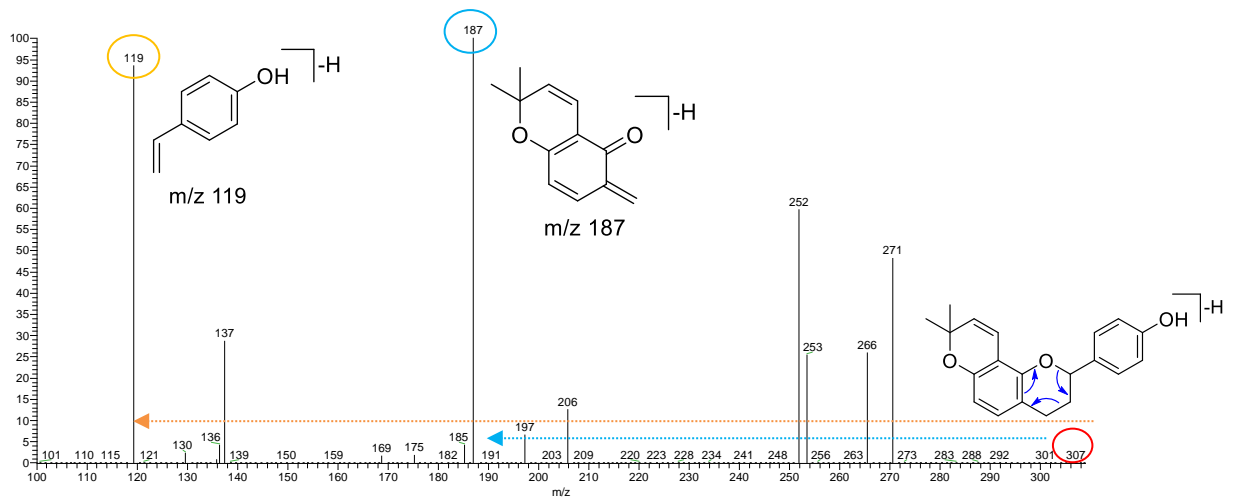


Figura 39. Espectro de MS^2 para o íon 307 $[M-H]^-$ e proposta de fragmentação.

5.1.4.3. Determinação estrutural da substância BAS-255

A substância **BAS-255** (1,9 mg), obtida como sólido amorfo solúvel em metanol, foi isolada do fracionamento (fluxograma 2, item 4.6.1.3). A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 500 MHz em MeOD (Figura 41).

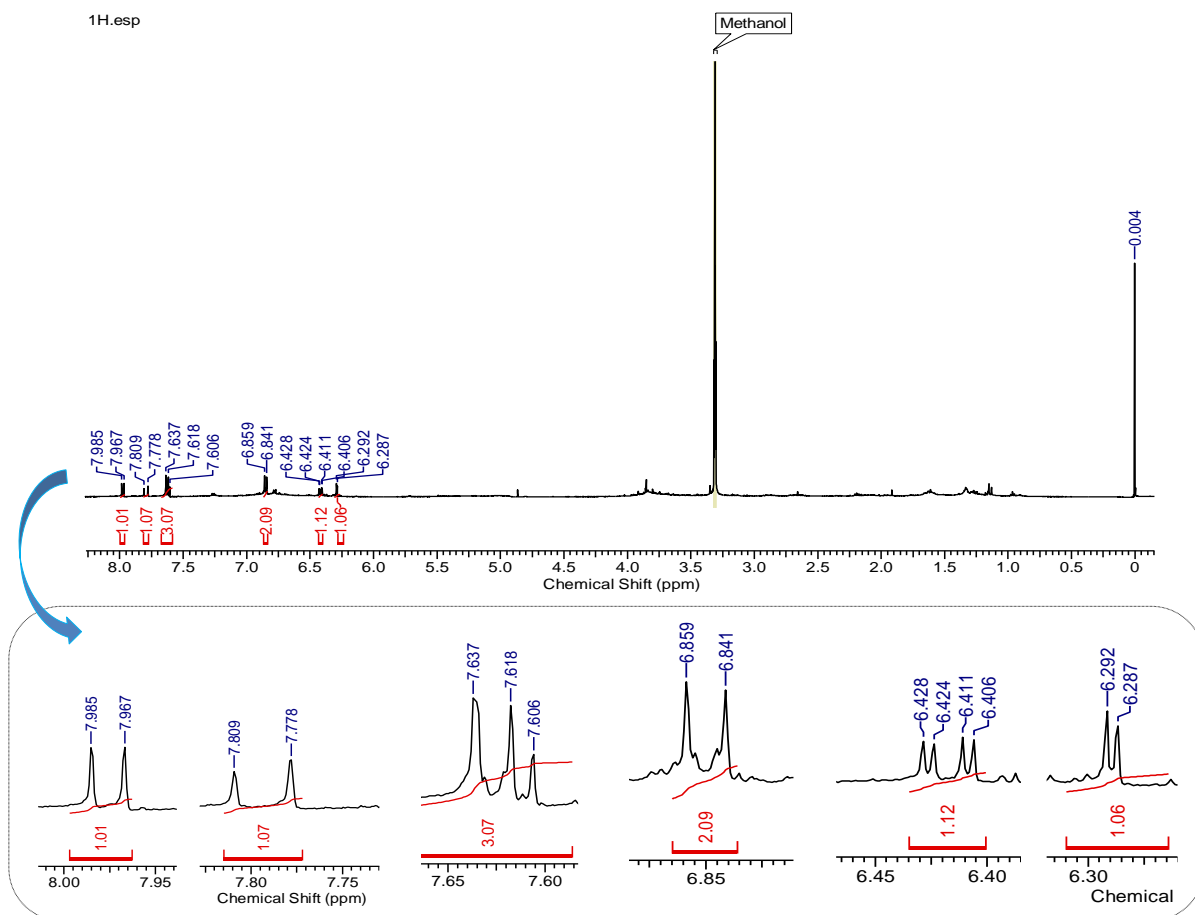
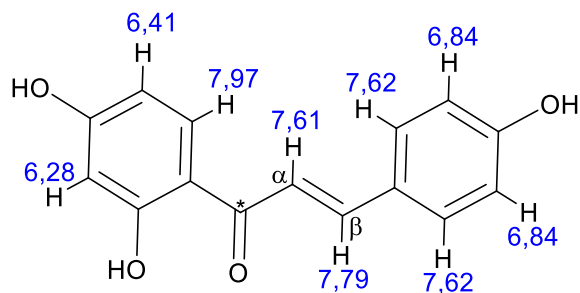


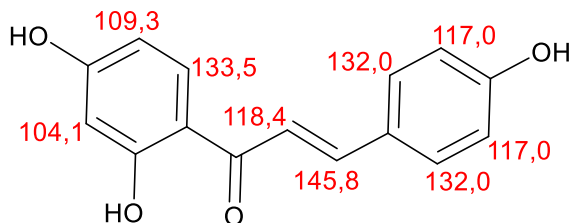
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) e ampliações da substância BAS-255.

No espectro de RMN de ^1H da substância **BAS-255**, pode-se verificar a presença de sinais referentes a prótons aromáticos com deslocamento químico em δ_{H} 7,97 (*d*; $J= 8,9$ Hz; 1H), δ_{H} 6,41 (*dd*, $J= 8,9$ e 2,5 Hz, 1H) e δ_{H} 6,28 (*d*, $J= 2,5$ Hz, 1H), cujas constantes de acoplamento são características a acoplamento do tipo “*orto*” e “*meta*” correlacionados entre si, caracterizando um típico sistema ABX, que foram atribuídos aos prótons H-6, H-5 e H-3 respectivamente de um anel aromático A.

Foram observados também, os sinais em $\delta_{\text{H}} 7,62$ (d ; $J= 8,5$ Hz; 2H) e $\delta_{\text{H}} 6,84$ (d ; $J= 8,5$ Hz; 2H), sendo adotados aos prótons H-2'/6' e H-3'/5', respectivamente, a outro anel aromático B. Os dubletos em $\delta_{\text{H}} 7,61$ (d ; 1H) e $\delta_{\text{H}} 7,79$ (d ; 1H), ambos com $J=15,0$ Hz segundo relatos obtidos na literatura são típicos exemplos de prótons oleofínicos α , β -insaturado com configuração E , próximos ao carbono carbonílico formado na última etapa de preparação de chalconas, como observado na estrutura proposta abaixo:



Através do mapa de contorno de HSQC (Figura 41) foi possível correlacionar os prótons aromáticos diretamente ligados aos seus respectivos carbonos (J_1), onde foram visualizadas as correlações dos prótons aromáticos em $\delta_{\text{H}} 6,28$ com o carbono em $\delta_{\text{C}} 104,1,0$ (C-3), $\delta_{\text{H}} 6,41$ com $\delta_{\text{C}} 109,3$ (C-5) e $\delta_{\text{H}} 7,97$ com $\delta_{\text{C}} 133,5$ (C-6) atribuídos ao anel aromático A. O sinal do próton aromático em $\delta_{\text{H}} 7,62$ correlacionou com o carbono em $\delta_{\text{C}} 132,0$ (C-2'/6') e $\delta_{\text{H}} 6,84$ com $\delta_{\text{C}} 117,0$ (C-3'/5') designando assim o anel aromático B. Os sinais atribuídos aos prótons das posições α e β do esqueleto da chalcona, foram observados com os deslocamentos dos prótons em $\delta_{\text{H}} 7,61$ e $7,79$ com o carbono em com $\delta_{\text{C}} 118,4$ (C- α) e $\delta_{\text{C}} 145,8$ (C- β), respectivamente, como representado abaixo:



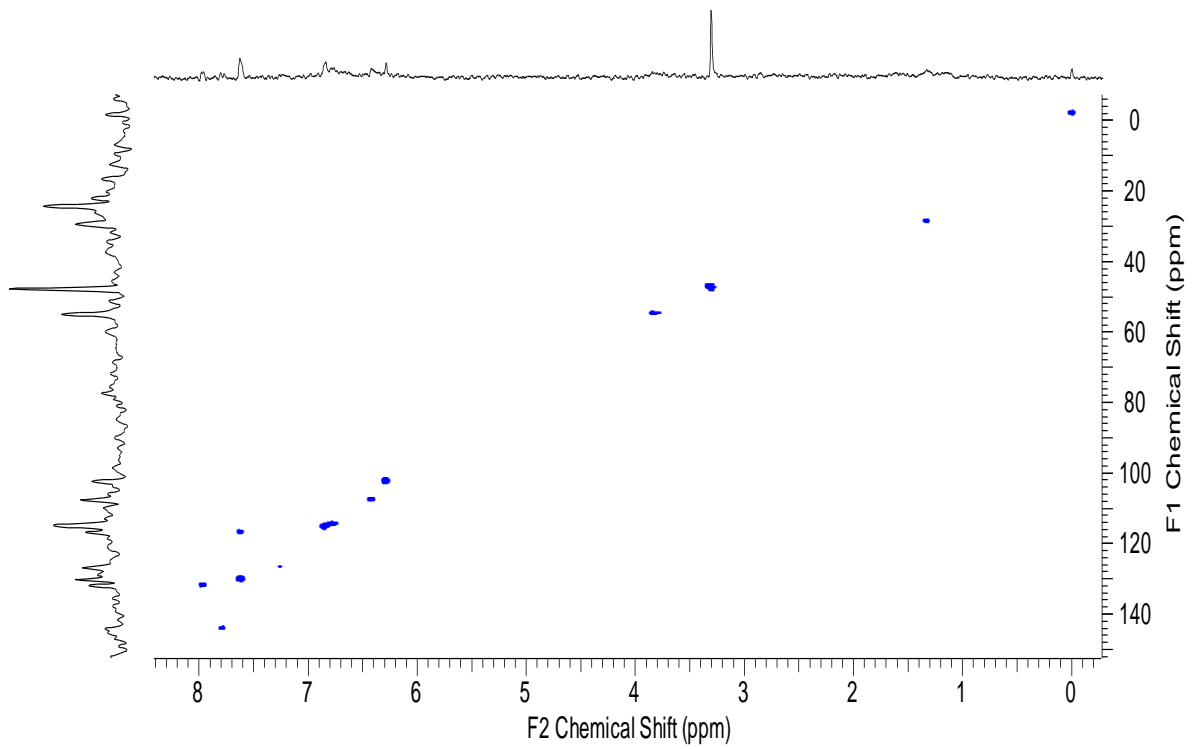


Figura 41. Mapa de contorno HSQC (¹H 500 e ¹³C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-255.

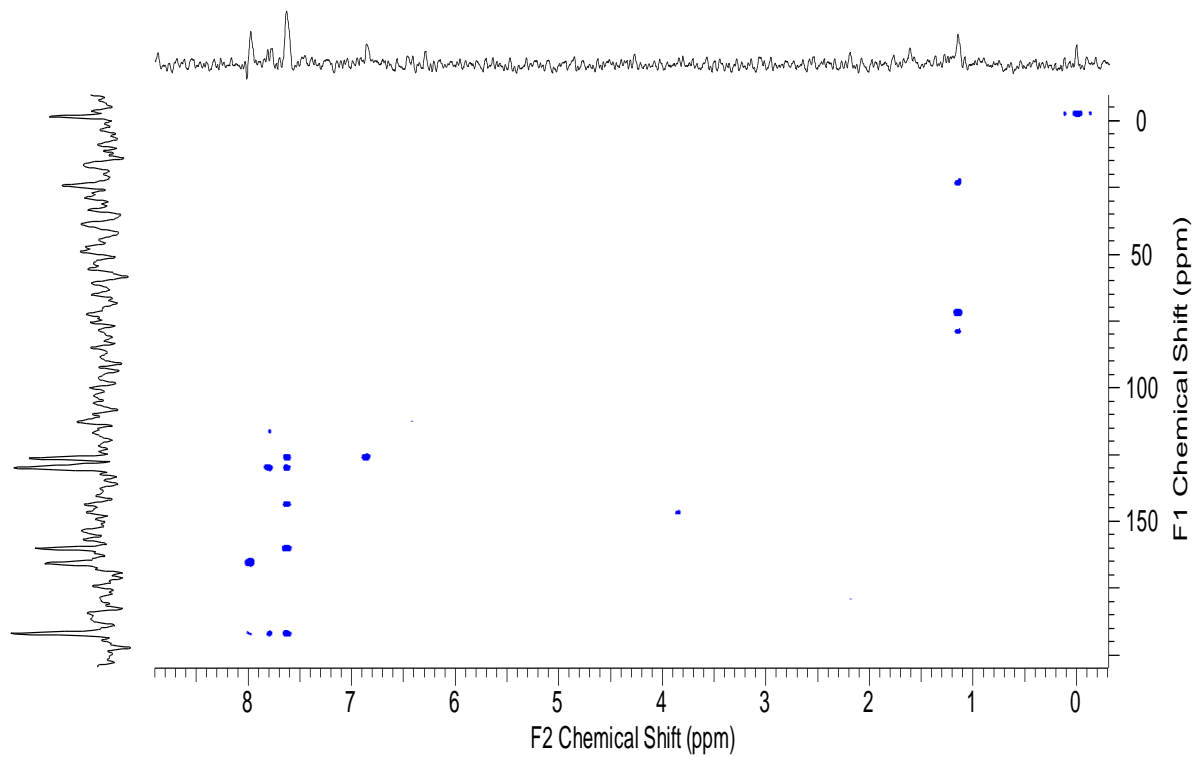
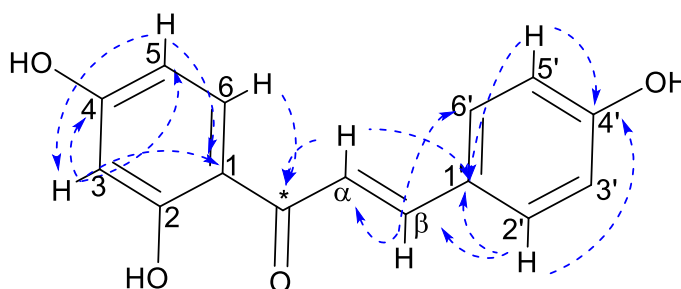


Figura 42. Mapa de contorno HMBC (¹H 500 e ¹³C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-255.

Através do mapa contorno de HMBC (Figura 42), pode-se observar a correlação dos prótons aromáticos em δ_H 6,28 (H-3) e 6,41 (H-5) correlacionando em J^3 com o carbono em δ_C 115,0 (C-1) indicando a presença do carbono quaternário no anel A da estrutura. O próton em δ_H 7,97 (H-6) revelou correlações com os carbonos em δ_C 167,0 (C-4) e 193,8 (C-*), indicando assim a localização do grupo hidroxila do anel aromático A e a conexão com o carbono carbonílico característico do esqueleto da chalconas.

As correlações observadas dos sinais dos prótons em δ_H 7,61 (H- α) e 6,84 (H-5') correlacionando em J^3 com o carbono em δ_C 128,0 (C-1) indicam a ligação do com carbono quaternário do anel B da estrutura. Ainda, o próton em δ 7,62 (H-6') mostrou correlação com os carbonos em δ_C 128,0 (C-1), 145,8 (C- β) e com o carbono oxidado em δ_C 161,9 (C-4'), indicando assim a localização do grupo hidroxila presente no anel aromático B, como apresentado abaixo:



Os dados espectrais de RMN 1D e 2D (Tabela 8), juntamente com a análise por espectrometria de massas (Figura 44), auxiliados com a comparação de dados encontrados na literatura (YAHARA et al, 1989; TORRES et al., 2000), permitiu na identificação da substância **BAS-255** como a **isoliquiritigenina**, Figura 43. A isoliquiritigenina já foi relatada em *Trilepisium madagascariense* DC (ANGO et al., 2012). e *Morus Alba* (TRAN et al., 2017). Além disso, a isoliquiritigenina um dos mais importantes compostos bioativos com estrutura de uma chalcona é derivada da raiz de alcaçuz, previamente relatada em espécies da família Fabaceae, como *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC., *G. glabra* L. e *G. inflata* Batalin (KAUR et al., 2013; MA et al., 2005; QUINTANA et al., 2020; RAMALINGAM et al., 2018).

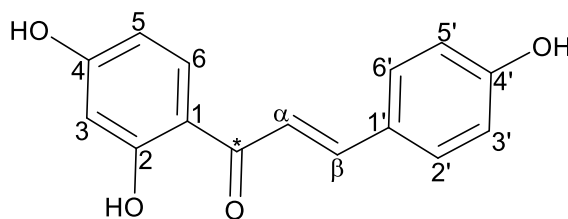


Figura 43. Estrutura da chalcona BAS-255.

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BAS-255.

Isoliquiritigenina				
N^o	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	δ_{H} (mult.; J in Hz)^a	HMBC^a
	115,0	113,2	-	-
2	167,2	164,6	-	-
3	104,1	102,6	6,28 (<i>d</i> , 2,5), 1H	115,0; 167,0; 109,3
4	167,0	165,4	-	-
5	109,3	107,9	6,41 (<i>dd</i> , 8,9; 2,5), 1H	115,0; 104,1
6	133,5	132,3	7,97 (<i>d</i> , 8,9), 1H	167,0; 193,8
*	193,8	191,4	-	-
α	118,4	117,8	7,61 (<i>d</i> , 15,0), 1H	193,8; 128,0
β	145,8	143,8	7,79 (<i>d</i> , 15,0), 1H	132,0; 193,8; 118,4
1'	128,0	125,8	-	-
2'/6'	132,0	130,6	7,62 (<i>d</i> , 8,5), 2H	161,9; 128,0; 145,8;
3'/5'	117,0	115,8	6,84 (<i>d</i> , 8,5), 2H	128,0; 161,9
4'	161,9	159,6	-	-

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS.

^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo com YAHARA et al, 1989 (DMSO-d, 50 MHz).

A análise por espectrometria de massas no modo negativo de BAS-255, demonstrou a presença do pico de maior intensidade em m/z 255 $[\text{M}-\text{H}]^-$, Figura 44.

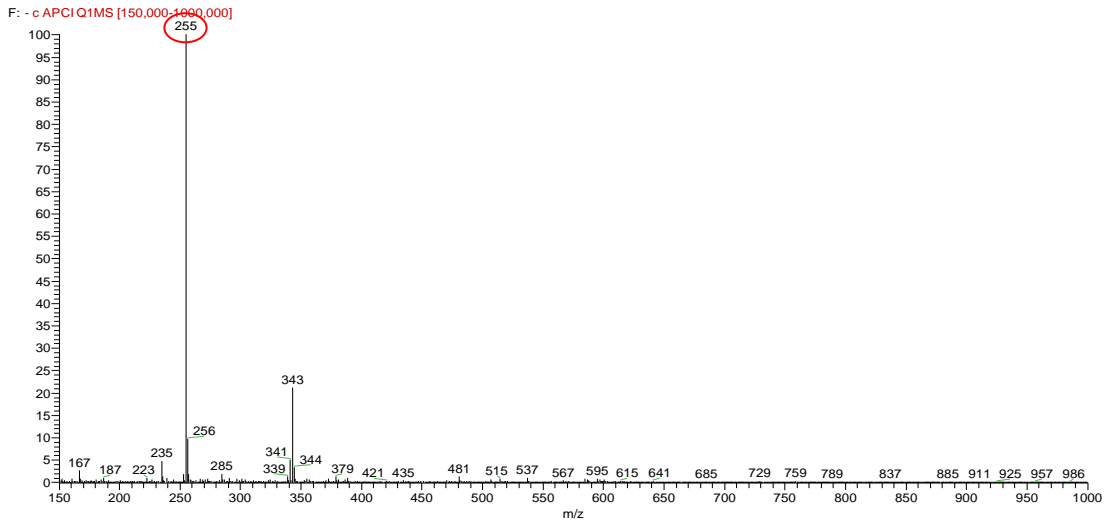


Figura 44. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-255 isolada da casca de *B. acutifolium*.

Este íon foi submetido à análise de fragmentação MS^2 , resultando no espectro com picos de m/z 135, 119 $[M-H]^-$, e então foi realizada à proposta de fragmentação para essa substância (Figura 45).

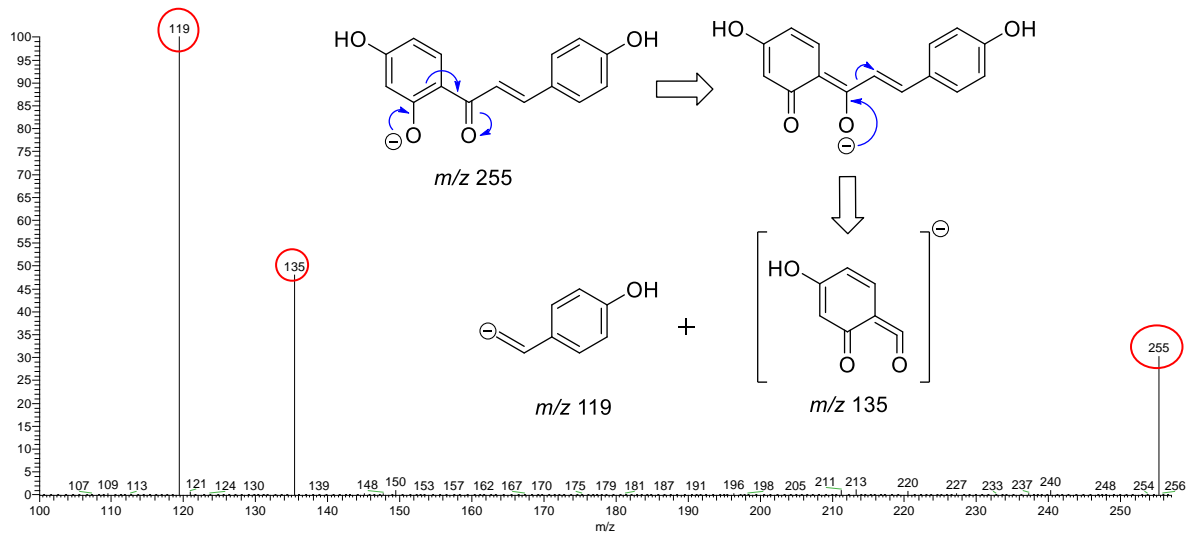


Figura 45. Espectro de MS^2 para o íon 255 $[M-H]^-$ e proposta de fragmentação.

5.1.4.4. Determinação estrutural da substância BAS-323

A substância **BAS-323** (2,6 mg), isolada do fracionamento (fluxograma 2, item 4.6.1.3), foi obtida como sólido amorfo solúvel em metanol. A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 500 MHz em MeOD (Figura 46).

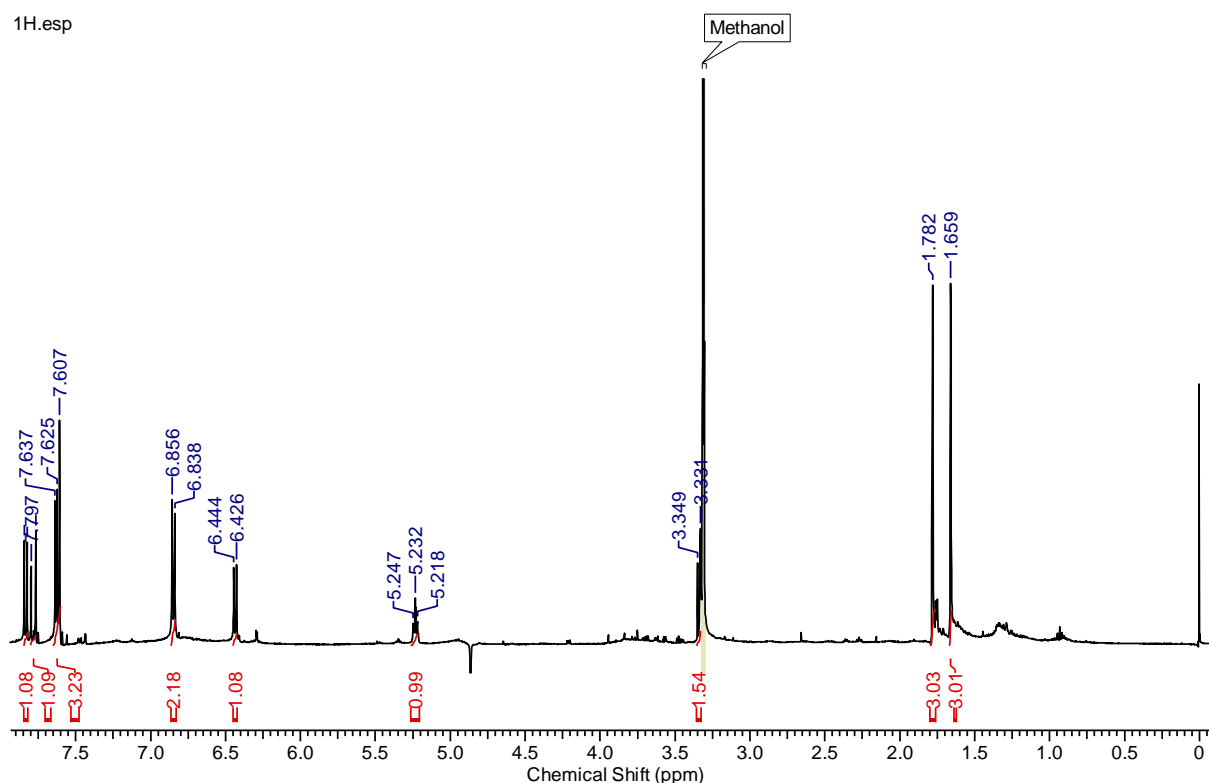
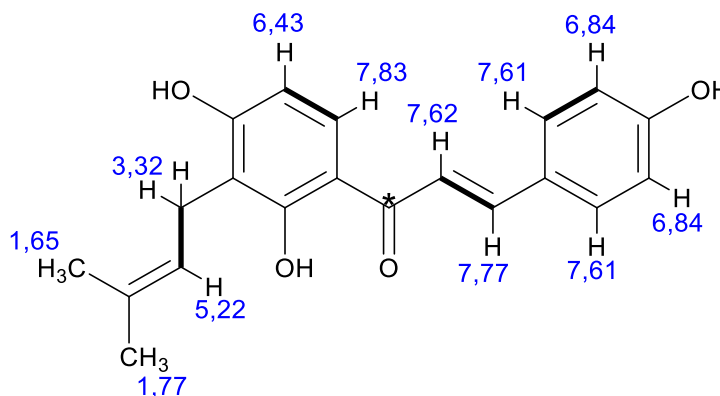


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-323.

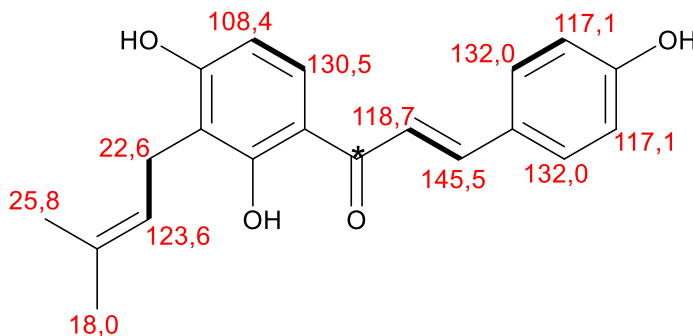
Por meio da análise do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C obtido do mapa de correlação de HSQC, percebeu-se uma semelhança estrutural da substância **BAS-323** com a substância **BAS-255**. Em contrapartida, a diferença foi observada na região dos prótons alifáticos em δ_{H} 5,22 (*m*; 1H), um próton metilênico em δ_{H} 3,32 (*m*; 2H) e duas metilas em δ_{H} 1,65 (*s*; 3H) e δ_{H} 1,77 (*s*; 3H), na qual foram atribuídos a um seguimento prenila presente na estrutura.

Também foram visualizados os sinais característicos aos prótons aromáticos em δ_{H} 7,83 (*d*; $J= 8,8$ Hz; 1H) e δ_{H} 6,43 (*d*, $J= 8,8$ Hz, 1H), com constantes de acoplamento em “*orto*” correlacionando entre si atribuídos aos prótons H-6 e H-5 respectivamente, de um anel aromático A. Observou-se também a presença dos prótons aromáticos em δ_{H} 7,61 (*d*; $J= 8,5$

Hz; 2H) e δ_{H} 6,84 (*d*; $J= 8,5$ Hz; 2H), que foram atribuídos aos prótons H-2'/6' e H-3'/5', respectivamente, a um anel aromático B. Ainda, o espectro apresentou a presença dos sinais característicos a prótons vicinais em δ_{H} 7,62 (*d*; 1H) e δ_{H} 7,77 (*d*; 1H), indicando o acoplamento trans com $J=15,0$ Hz característicos do esqueleto de uma chalcona. O espectro do COSY (Anexo) consolidou os acoplamentos dos prótons propostos para a substância, como δ_{H} 3,32 e 5,22, δ_{H} 6,43 e 7,83, δ_{H} 7,62 e 7,77, δ_{H} 7,61 e 6,84, conforme pode ser visto abaixo:



Por meio do mapa de contorno de HSQC (Figura 47) foi possível correlacionar os prótons aromáticos diretamente ligados aos seus respectivos carbonos, e observar as correlações dos prótons em δ_{H} 7,83 com δ_{C} 130,5 (C-6), δ_{H} 6,43 com δ_{C} 108,4 (C-5), δ_{H} 7,61 com δ_{C} 132,0 (C-2'/6') e δ_{H} 6,84 com δ_{C} 117,1 (C-3'/5'), que foram atribuídos aos anéis aromáticos A e B. O sinal em δ_{H} 7,77 correlacionou com o carbono em δ_{C} 145,5 (C- α) e δ_{H} 7,62 com δ_{C} 118,7(C- β), atribuídos aos prótons das posições α e β da chalcona. Os sinais característicos do segmento da prenila foram observados com os deslocamentos dos prótons em δ_{H} 3,22 com δ_{C} 26,1 (C-1''), δ_{H} 5,22 com δ_{C} 123,6 (C-2''), δ_{H} 1,77 com δ_{C} 18,0 (C-5''), e δ_{H} 1,65 com δ_{C} 25,8 (C-4''), como pode ser visualizado abaixo:



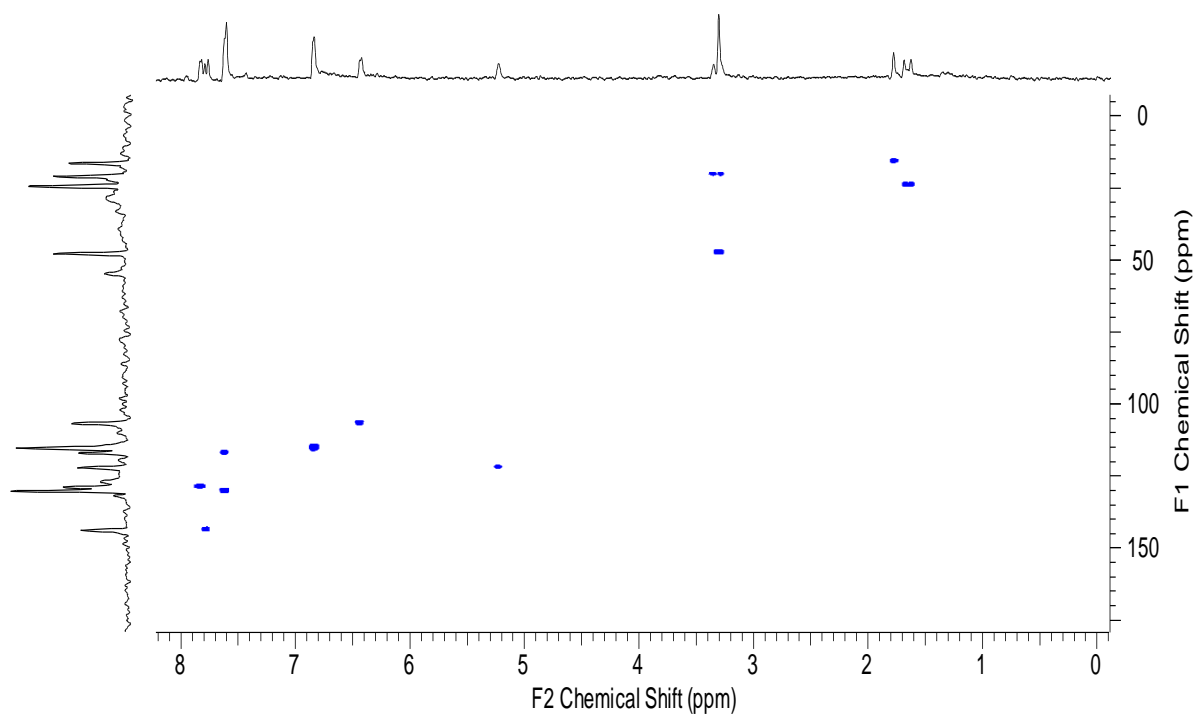


Figura 47. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-323.

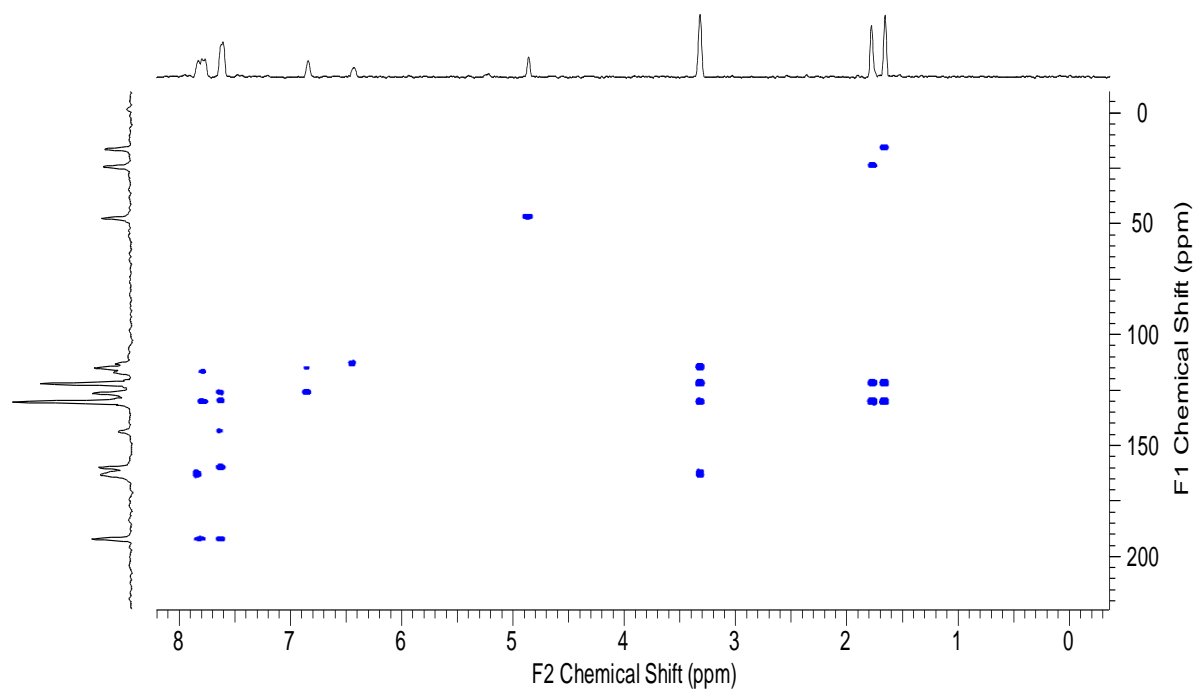
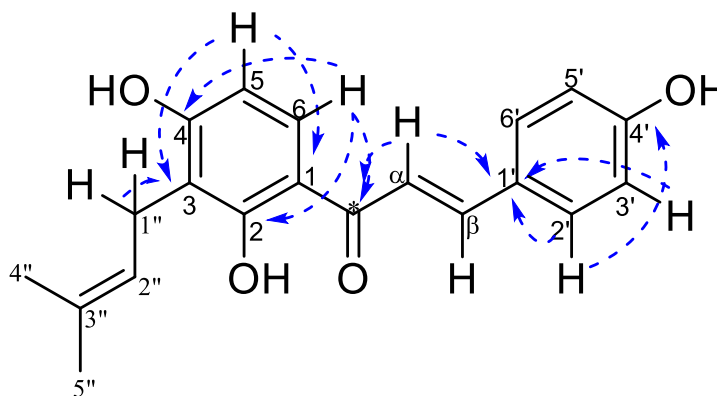


Figura 48. Mapa de contorno HMBC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-323.

Através do mapa de contorno de HMBC (Figura 48), as principais correlações em J^3 visualizadas no anel aromático A, foram atribuídas aos sinais dos prótons em δ_H 6,43 (H-5)

correlacionando com os carbonos quaternários em δ_c 114,0 (C-1), 117,0 (C-3) e em δ_H 7,83 (H-6) correlacionando com os carbonos oxidados em δ_c 164,5 (C-4) e 164,6 (C-2). Ainda, δ_H 7,83 (H-6) também demonstrou correlação em J^3 com o carbono carbonílico em δ_c 193,8 (C*) característico do esqueleto da chalcona.

O próton aromático do anel B em δ_H 6,84 (H-5') apresentou correlação com o carbono quaternário em δ_c 128,0 (C-1'). Já o próton em δ_H 7,61 (H-6') apresentou correlacionou em J^3 com o carbono oxidado em δ_c 161,6 (C-4'). O próton em δ_H 7,62 (H- α) também apresentou correlação em J^3 com o carbono quaternário em δ_c 128,0 (C-1'), além da correlação com o carbono carbonílico em δ_c 193,8 (C*). A localização dos segmentos prenila da estrutura foram confirmadas pela presença dos sinais em δ_H 3,32 (H-1'') correlacionando em J^2 com o carbono quaternário em δ_c 117,0 (C-3) do anel aromático A, abaixo:



Os dados espectrais de RMN 1D e 2D (Tabela 9), juntamente com a análise por espectrometria de massas (Figura 50), auxiliados com a comparação de dados encontrados na literatura (PISTELLI et al, 1996; TORRES et al., 2000), permitiu na identificação da substância **BAS-323** como a **isobavachalcona**, Figura 49. A isobavachalcona já foi relatada em várias espécies de Moraceae, como *Artocarpus heterophyllus* Lam. (DI et al., 2013), *A. anisophyllus* Miq., *A. lowii* King (LATHIFF et al., 2015; ABDULLAH et al., 2017), *Dorstenia barteri* var. *multiradiata* (Engl.) Hijman & C.C.Berg (DZOYEM et al., 2015; NGAMENI et al., 2017), *M. alba* (YANG et al., 2014), *Broussonetia papyrifera* (L.) (LEE et al., 2001), e *Fatoua villosa* Nakai (SU et al., 2017). Além disso, isobavachalcona possui relatos também em várias espécies da família Fabaceae, como *Psoralea corylifolia* L. (BHALLA et al., 1968), *G. inflata* (LIN et al., 2017b), e *G. glabra* (LI et al., 2017).

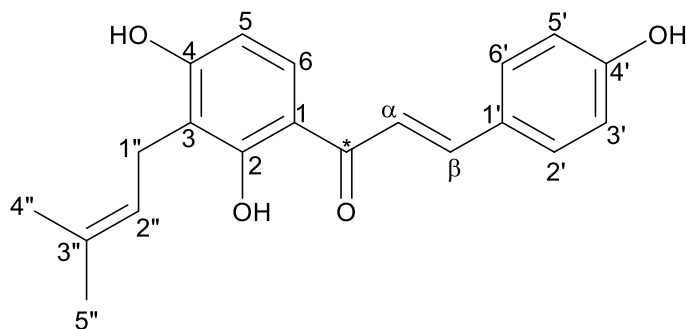


Figura 49. Estrutura da chalcona BAS-323.

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BAS-323.

Isobavachalcona				
N ^o	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	δ_{H} (mult.; J in Hz) ^a	HMBC ^a
	114,0	114,5	-	-
2	164,6	163,7	-	-
3	117,0	116,6	-	-
4	164,5	165,0	-	-
5	108,4	108,3	6,43 (<i>d</i> ; 8,8), 1H	114,0; 117,0
6	130,5	130,4	7,83 (<i>d</i> ; 8,8), 1H	193,8; 164,5; 164,6
*	193,8	193,7	-	-
α	118,7	118,6	7,62 (<i>d</i> ; 15,0), 1H	128,0; 193,8
β	145,5	145,3	7,77 (<i>d</i> ; 15,0), 1H	132,0; 118,7; 193,8
1'	128,0	-	-	-
2'/6'	132,0	131,7	7,61 (<i>d</i> ; 8,5), 2H	161,6; 128,0
3'/5'	117,1	117,0	6,84 (<i>d</i> ; 8,5), 2H	128,0; 161,6
4'	161,6	161,4	-	-
1''	26,1	22,5	3,32(<i>m</i>), 2H	117,0
2''	123,6	123,6	5,22 (<i>m</i>), 1H	26,1; 18,0
3''	131,8	131,9	-	-
4''	25,8	25,9	1,65 (<i>s</i>), 3H	123,6; 18,0; 131,8
5''	18,0	17,9	1,77 (<i>s</i>), 3H	123,6; 25,8; 131,8

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS.

^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo com PISTELLI et al, 1996 (MeOD, 50 MHz).

A análise por espectrometria de massas de BAS-323, demonstrou a presença do pico de maior intensidade em m/z 323 $[\text{M}-\text{H}]^-$, Figura 50.

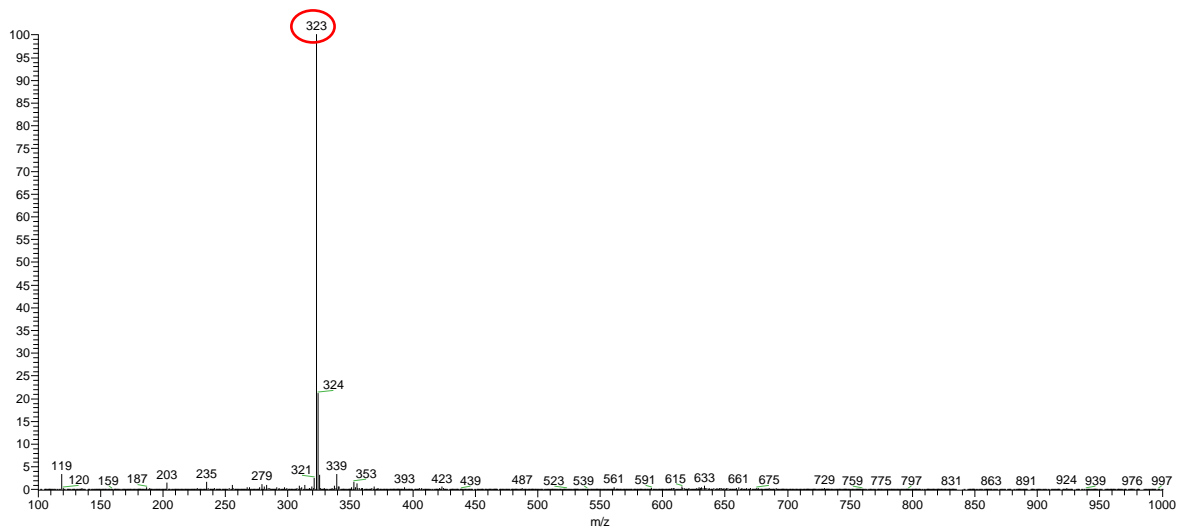


Figura 50. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-323 isolada da casca de *B. acutifolium*.

O íon m/z 323 $[M-H]^-$ foi submetido à análise de fragmentação MS^2 , resultando no espectro com picos de m/z 203, 177, 119 $[M-H]^-$, sendo realizada à proposta de fragmentação para essa substância (Figura 51).

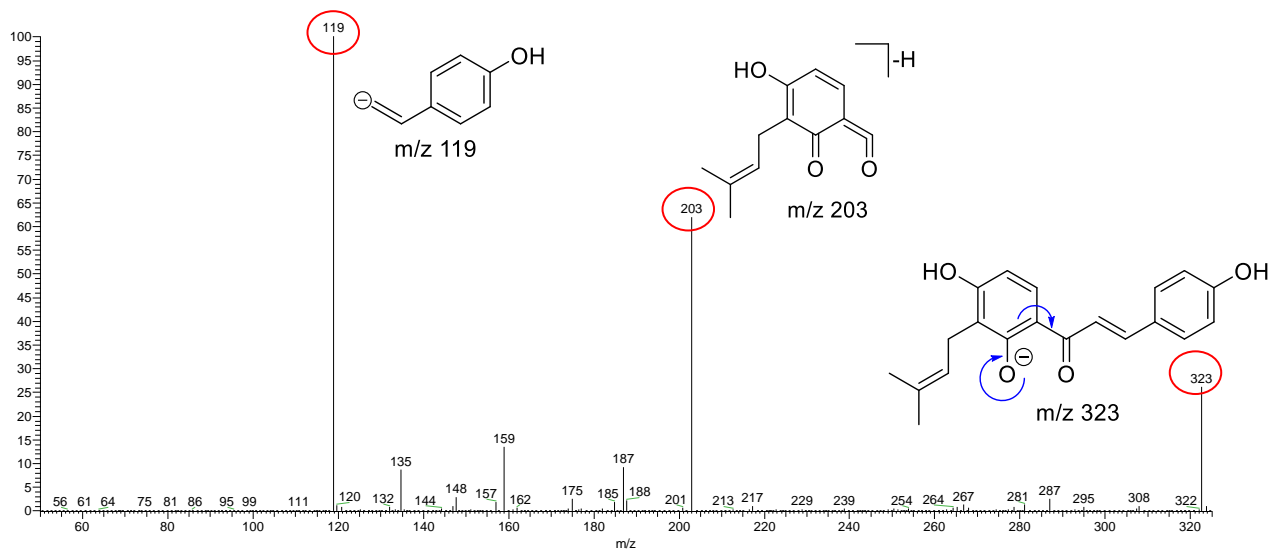


Figura 51. Espectro de MS^2 para o íon 323 $[M-H]^-$ e proposta de fragmentação.

5.1.4.5. Determinação estrutural da substância BAS-321

A substância **BAS-321** (1,0 mg), isolada do fracionamento (fluxograma 2, item 4.6.1.3) obtida como sólido amorfo solúvel em metanol. A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 500 MHz em MeOD (Figura 52).

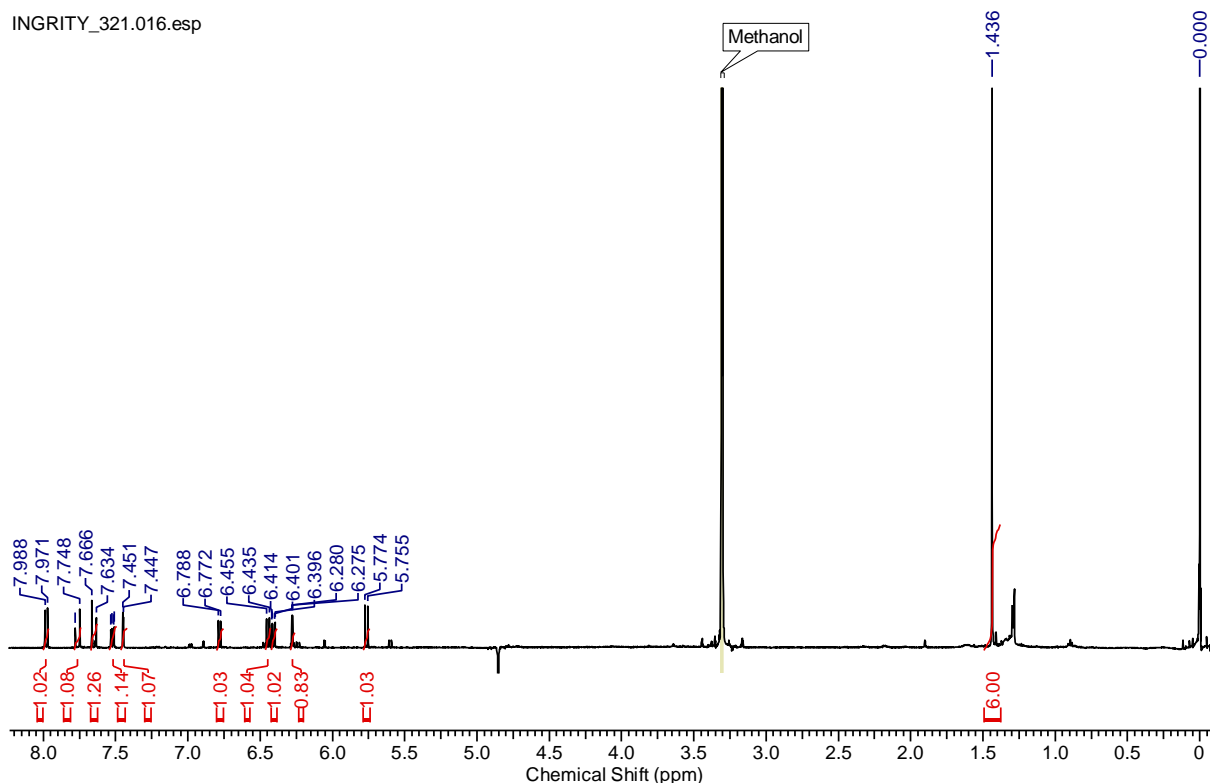
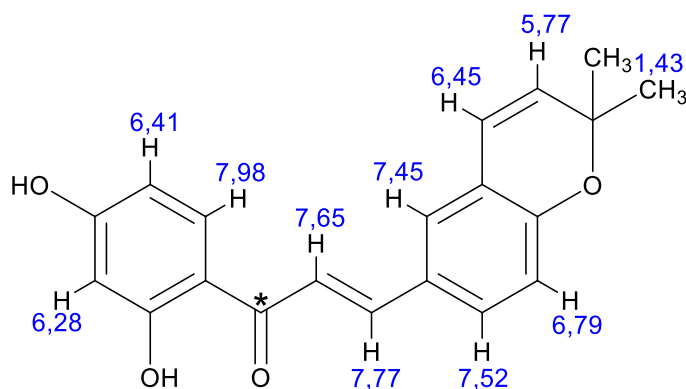


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-321.

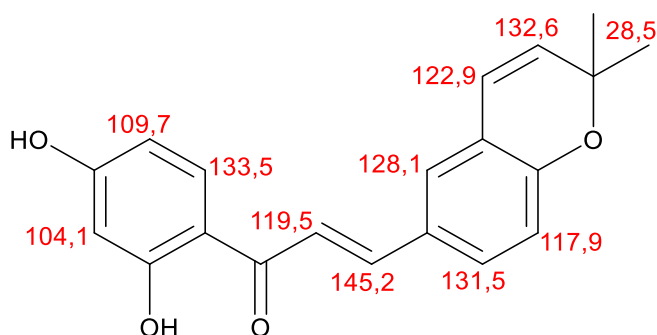
Baseados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtido do mapa de correlação de HSQC pode-se perceber uma semelhança estrutural entre as substâncias **BAS-255** e **BAS-323** com a substância **BAS-321**, devido a presença dos prótons em δ_{H} 7,65 (*d*; $J= 15,3$ Hz; 1H) e 7,77 (*d*; $J= 15,3$ Hz; 1H), característico do esqueleto de uma chalcona. A diferença observada refere-se à ausência do grupo prenila na estrutura e a presença dos prótons olefínicos do tipo vicinal em δ_{H} 6,45 (*d*; $J= 9,9$ Hz; 1H) e 5,77 (*d*; $J= 9,9$ Hz; 1H).

Os sinais característicos na região dos aromáticos atribuídos ao anel “A” foram para os prótons em δ_{H} 7,98 (*d*, $J= 8,8$ Hz, 1H), δ_{H} 6,41 (*dd*; $J= 8,8$ e 2,2 Hz; 1H) e δ_{H} 6,28 (*d*, $J= 2,2$ Hz, 1H), com constantes de acoplamento do tipo “*orto*” e “*meta*” atribuídos aos prótons H-6, H-5 e H-3, respectivamente. No anel aromático “B” foram observados os sinais em δ_{H} 7,52 (*dd*;

$J=8,3$ e $2,0$ Hz; 1H δ_{H} 6,79 (*d*, $J= 8,3$ Hz, 1H) e 7,45 (*d*; $J= 2,0$ Hz; 1H), atribuídos aos prótons H-2', H-3' e H-6', respectivamente. O espectro também apresentou um singleto em δ_{H} 1,43 integrando para seis prótons cada, atribuídos a presença de duas metilas na estrutura, como proposto abaixo:



Por meio da análise do mapa de contorno de HSQC (Figura 53) foi possível visualizar as correlações do próton em δ_{H} 7,98 com o carbono em δ_{C} 133,5 (C-6), δ_{H} 6,41 com o carbono em δ_{C} 109,7 (C-5), δ_{H} 6,28 com δ_{C} 104,1 (C-3), δ_{H} 6,79 com δ_{C} 117,9 (C-3'), δ_{H} 7,45 com δ_{C} 128,1 (C-6') e δ_{H} 7,52 com δ_{C} 131,5 (C-2'), característicos aos sinais dos anéis aromáticos “A e B”, respectivamente. Ainda, foram observadas as correlações dos prótons oleofínicos em δ_{H} 6,45 correlacionando com o carbono em δ_{C} 128,1 (C-1''), δ_{H} 5,77 com δ_{C} 132,6 (C-2''), δ_{H} 7,65 com δ_{C} 119,5 (C- α), δ_{H} 7,77 com δ_{C} 145,2 (C- β), por fim o sinal da metila em δ_{H} 1,43 correlacionando com δ_{C} 28,5 (C-4''/5''), conforme pode ser visualizado abaixo:



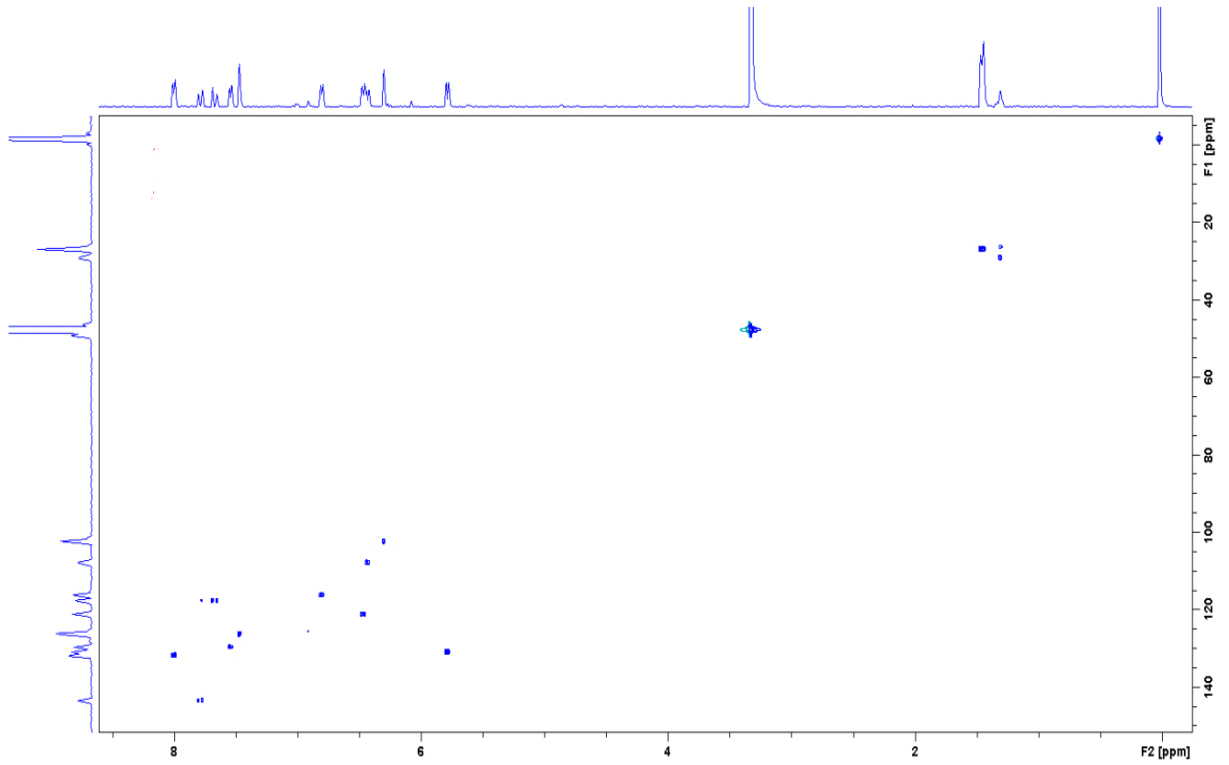


Figura 53. Mapa de contorno HSQC (¹H 500 e ¹³C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-321.

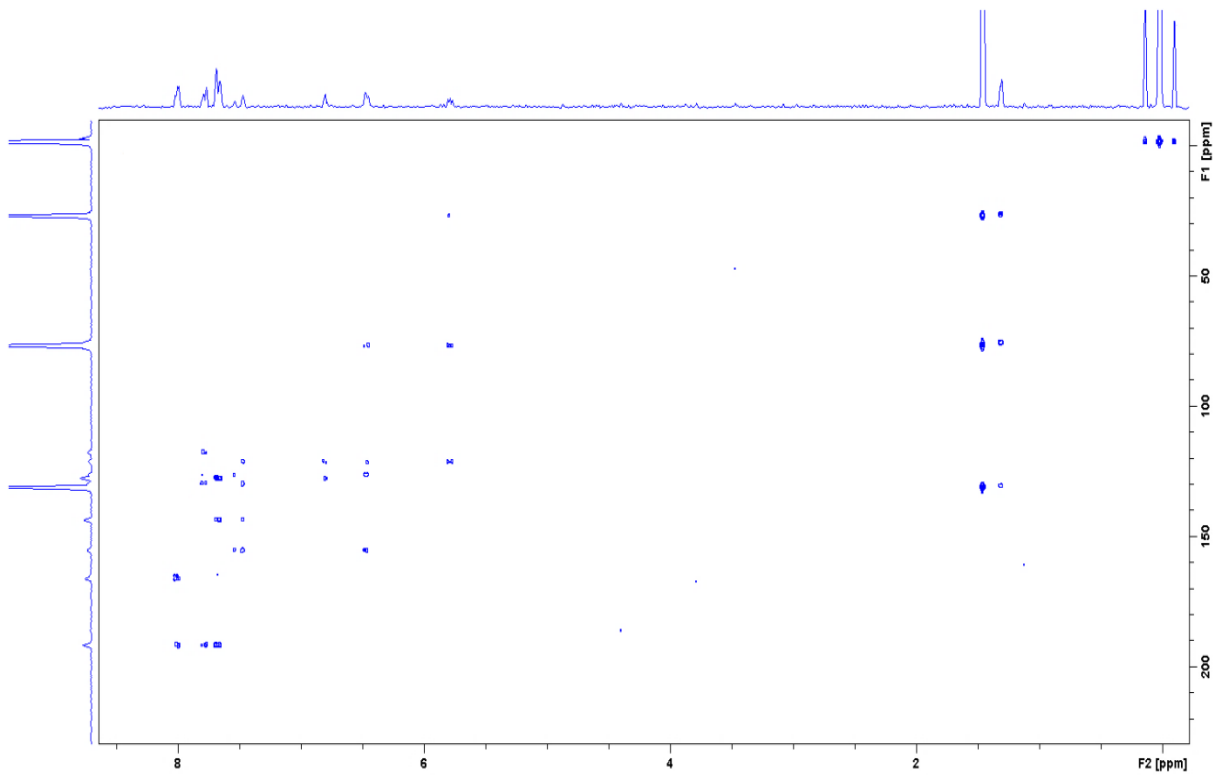
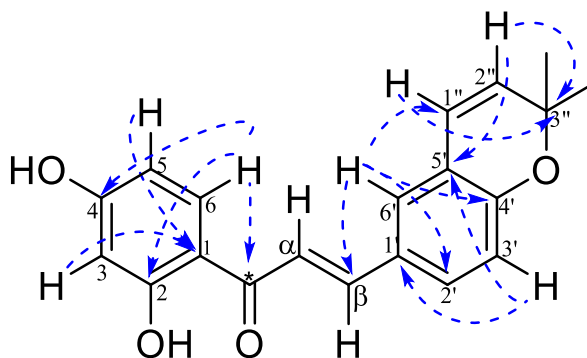


Figura 54. Mapa de contorno HMBC (¹H 500 e ¹³C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-321.

Através do mapa de contorno de HMBC (Figura 54) foi possível observar as correlações dos prótons aromáticos em δ_H 6,28 (H-3) e 6,41 (H-5) correlacionando em J^3 com o carbono em δ_C 114,6 (C-1) indicando a localização do carbono quaternário no anel A da estrutura. O próton em δ_H 7,98 (H-6) revelou correlações com os carbonos em δ_C 168,0 (C-4), 167,0 (C-2) e 193,2 (C-*), indicando a localização dos grupos hidroxilas do anel aromático A e a conexão com o carbono carbonílico do esqueleto da chalconas.

O sinal do próton aromático em δ_H 7,45 (H-6') correlacionou em J^3 com os carbonos em δ_C 156,8 (C-4'), 131,5 (C-2'), 145,2 (C- β) e 122,9 (C-1''). O próton em δ 6,79 (H-3') correlacionou em J^3 com os carbonos em δ 123,1 (C-5') e δ 129,5 (C-1') confirmaram os sinais dos carbonos quaternários do anel aromático B. Ainda, o sinal dos prótons do anel benzopirano em δ_H 5,77 (H-2'') e 6,45 (H-1'') também correlacionaram com os carbonos quaternários em δ_C 123,1 (C-5') e 156,8 (C-4'), indicando a conexão com o anel aromático B, como apresentado abaixo:



Os dados espectrais de RMN 1D e 2D (Tabela 10), e a análise por espectrometria de massas (Figura 56), auxiliados com a comparação de dados encontrados na literatura (FUKAI et al., 1994; KIM et al., 2018), permitiu na identificação da substância **BAS-321** como **kanzonol B**, Figura 55. Kanzonol B já foi relatado anteriormente de *D. barteri* var. *subtriangularis* (Engl.) Hijman & C.C.Berg (NGADJUI et al., 2005), e *F. villosa* (SU et al., 2016). Na família Fabaceae, esta substância já foi relatada de *G. eurycarpa* P.C.Li (FUKAI et al., 1994), *G. glabra* (ASADA et al., 1998; LI et al., 2017), e *G. inflata* (LIN et al., 2017b).

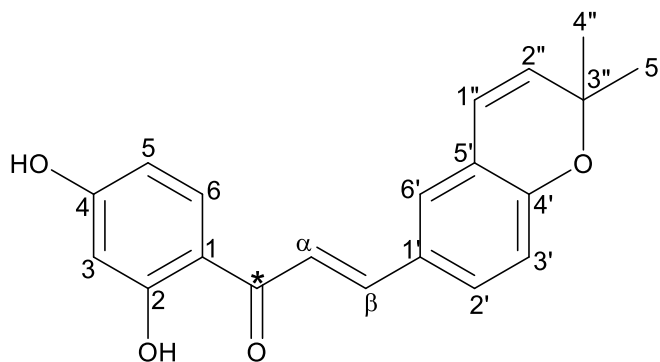


Figura 55. Estrutura da chalcona BAS-321.

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BAS-321.

Kanzonol B				
N ^o	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	δ_{H} (mult.; J in Hz) ^a	HMBC ^a
1	114,6	114,1	-	-
2	167,0	166,6	-	-
3	104,1	103,6	6,28 (<i>d</i> ; 2,2), 1H	114,6
4	168,0	165,5	-	-
5	109,7	108,8	6,41 (<i>dd</i> ; 8,8; 2,2), 1H	114,6
6	133,5	132,6	7,98 (<i>d</i> ; 8,8), 1H	193,2; 167,0; 168,0
*	193,2	192,7	-	-
α	119,5	118,4	7,65 (<i>d</i> ; 15,3), 1H	-
β	145,2	144,7	7,77 (<i>d</i> ; 15,3), 1H	-
1'	129,5	128,3	-	-
2'	131,5	130,7	7,52 (<i>dd</i> ; 8,3; 2,0), 1H	156,8; 145,2; 128,1
3'	117,9	117,5	6,79 (<i>d</i> ; 8,3), 1H	129,5; 123,1
4'	156,8	156,2	-	-
5'	123,1	122,1	-	-
6'	128,1	127,2	7,45 (<i>d</i> ; 2,0), 1H	156,8; 131,5; 122,9; 145,2
1''	122,9	122,2	6,45 (<i>d</i> ; 9,9), 1H	78,5; 123,1; 156,8; 128,1
2''	132,6	132,0	5,77 (<i>d</i> ; 9,9), 1H	123,1; 78,5
3''	78,5	77,8	-	-
4''/ 5''	28,5	28,4	1,43 (<i>s</i>), 6H	132,6; 78,5

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS.

^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo com KIM et al, 2018 (CDCl₃, 100 MHz).

A análise por espectrometria de massas de BAS-321, demonstrou a presença do pico de maior intensidade em m/z 321 $[\text{M}-\text{H}]^-$, Figura 56.

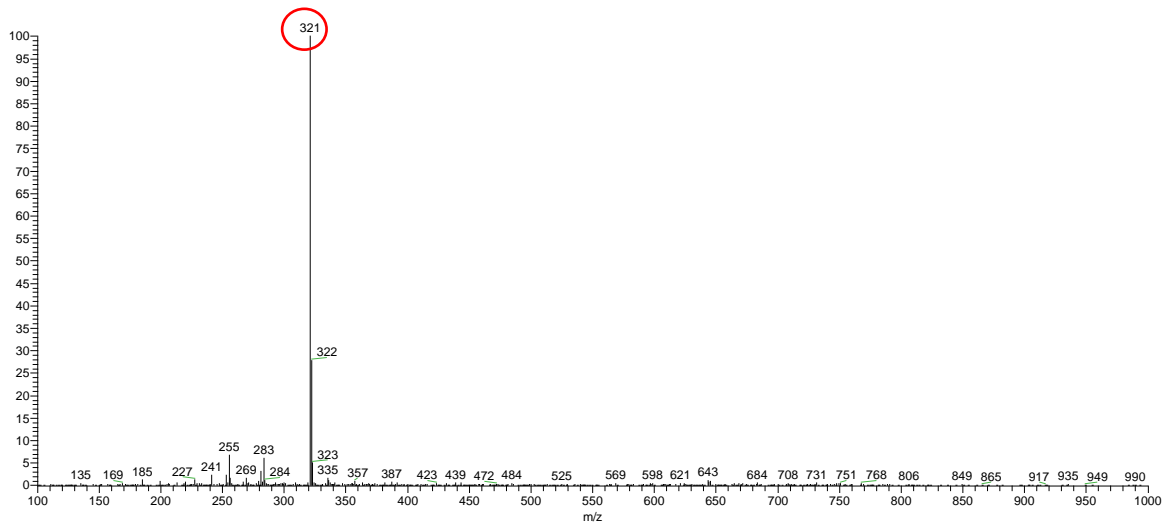


Figura 56. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-321 isolada da casca de *B. acutifolium*.

O íon m/z 321 $[M-H]^-$ foi submetido à análise de fragmentação MS^2 , resultando no espectro com picos de m/z 306, 159, 137 $[M-H]^-$, conforme à proposta de fragmentação da Figura 57.

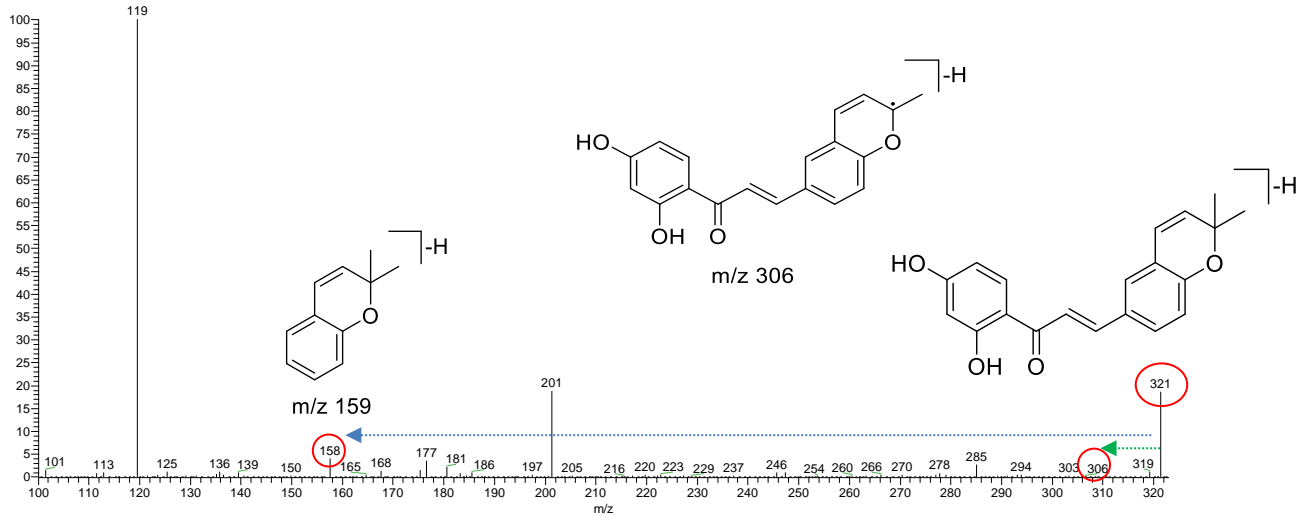


Figura 57. Espectro de MS^2 para o íon 321 e proposta de fragmentação.

5.1.4.5. Determinação estrutural da substância BAS-391

A substância **BAS-391** (3,8 mg) isolada do fracionamento (fluxograma 2, item 4.6.1.3) foi obtida como sólido amorfo solúvel em metanol. A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi realizado a 500 MHz em MeOD (Figura 58).

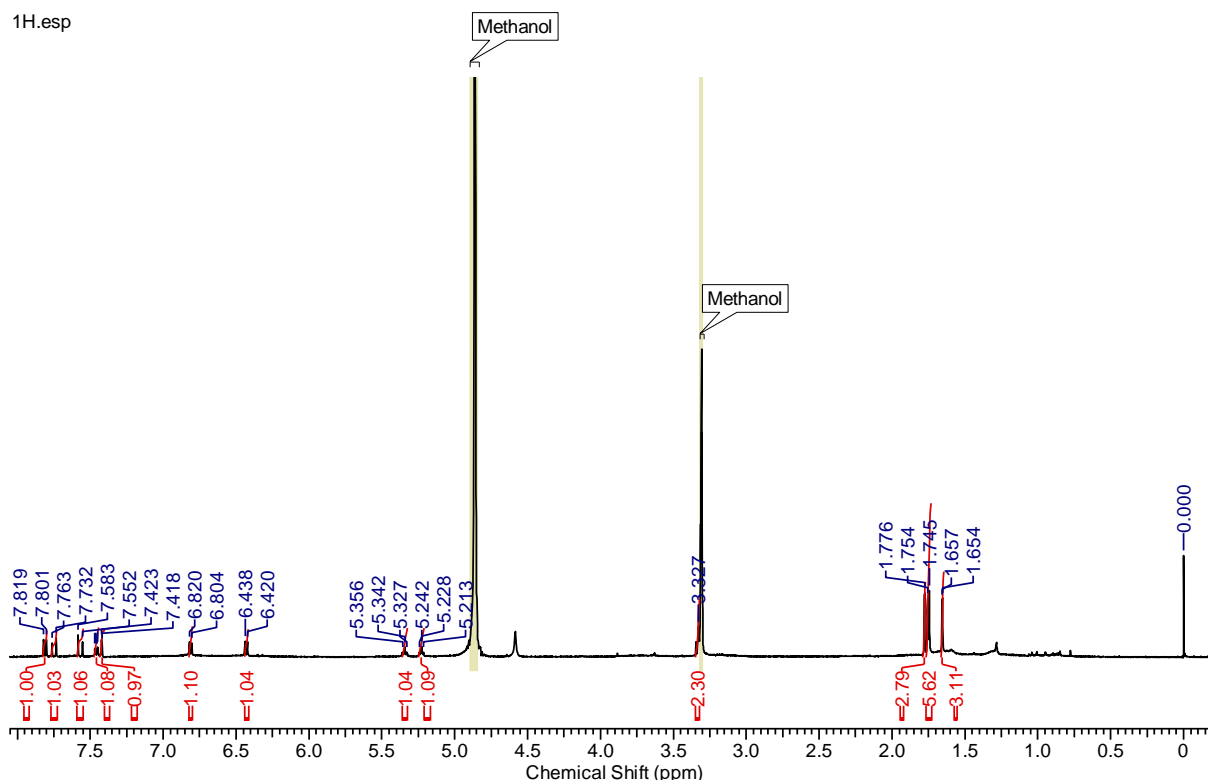
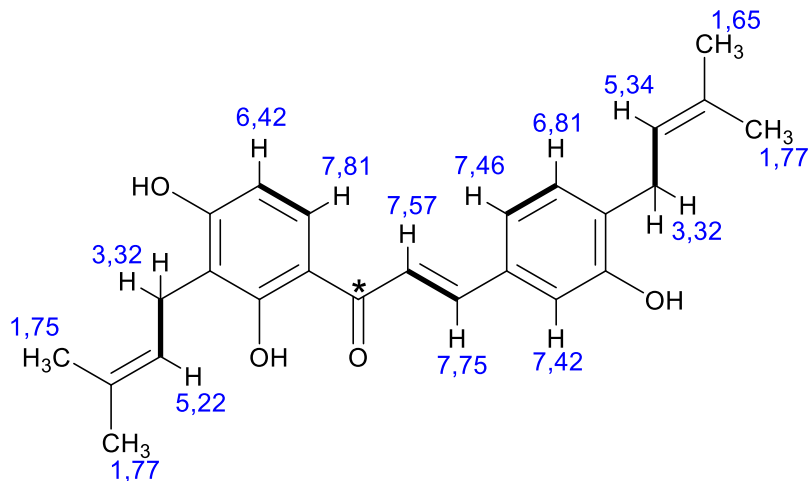


Figura 58. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-391.

Baseados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtido do mapa de correlação de HSQC pode-se perceber uma semelhança estrutural das substâncias **BAS-391** com as substâncias relacionadas anteriormente **BAS-255**, **BAS-323** e **BAS-321**. A diferença observada refere-se à presença de dois segmentos prenilas ligados a estrutura, tais como os prótons vinílicos em δ_{H} 5,22 (*m*; 1H) e δ_{H} 5,34 (*m*; 1H), prótons metilênicos em δ_{H} 3,32 (*m*; 2H); δ_{H} 3,32 (*m*; 2H) e quatro metilas em δ_{H} 1,75 (*s*; 3H); δ_{H} 1,77 (*s*; 3H); δ_{H} 1,65 (*s*; 3H) e δ_{H} 1,77 (*s*; 3H).

Na região dos prótons aromáticos foram atribuídos ao anel “A” os sinais em δ_{H} 6,42 (*d*, $J=8,9$ Hz, 1H) e δ_{H} 7,81 (*d*; $J=8,9$ Hz; 1H). No anel aromático “B” foram observados os sinais em δ_{H} 7,46 (*dd*; $J=8,3$ e 2,02Hz; 1H); δ_{H} 6,81 (*d*, $J=8,3$ Hz, 1H) e δ_{H} 7,42 (*s*; 1H). Pode-se perceber também os sinais característicos das chalconas em δ_{H} 7,75 (*d*; $J=15,1$ Hz; 1H) e δ_{H}

7,57 (*d*, $J= 15,1$ Hz, 1H). O espectro do COSY (Anexo) consolidou os acoplamentos dos prótons propostos para a substância, como δ_{H} 3,32 e 5,22, δ_{H} 6,42 e 7,81, δ_{H} 7,57 e 7,75, δ_{H} 7,46 e 6,81, δ_{H} 3,32 e 5,34 como pode ser visto abaixo:



A partir da análise do mapa de correlação HSQC (Figura 59) foi possível visualizar as correlações dos prótons em δ_{H} 7,81 e 6,42 correlacionando com os carbonos em δ_{C} 130,6 (C-6), e δ_{C} 108,4 (C-5), respectivamente atribuídos ao anel aromático A. O sinal do próton em δ_{H} 7,42 correlacionou com o carbono em δ_{C} 131,3 (C-2'), δ_{H} 7,46 com δ_{C} 129,3 (C-6') e δ_{H} 6,81 com δ_{C} 116,5 (C-5'), designando assim o anel aromático B.

Os sinais característicos dos prótons das posições α e β do esqueleto da chalcona, foram observados em δ_{H} 7,57 com o carbono em δ_{C} 118,4 (C- α) e δ_{H} 7,75 com δ_{C} 146,0 (C- β). Além disso, os segmentos prenila foram confirmados pelos sinais dos prótons alifáticos em δ_{H} 3,32 correlacionando com o carbono em δ_{C} 22,6 (C-1''), δ_{H} 5,22 com δ_{C} 123,7 (C-2''), δ_{H} 1,75 com δ_{C} 18,0 (C-4''), δ_{H} 1,77 com δ_{C} 26,0 (C-5''), δ_{H} 3,32 com δ_{C} 29,4 (C-1'''), δ_{H} 5,34 com δ_{C} 123,6 (C-2'''), δ_{H} 1,65 com δ_{C} 18,1 (C-4'''), e δ_{H} 1,77 com δ_{C} 26,0 (C-5'''), como pode ser visualizado abaixo:

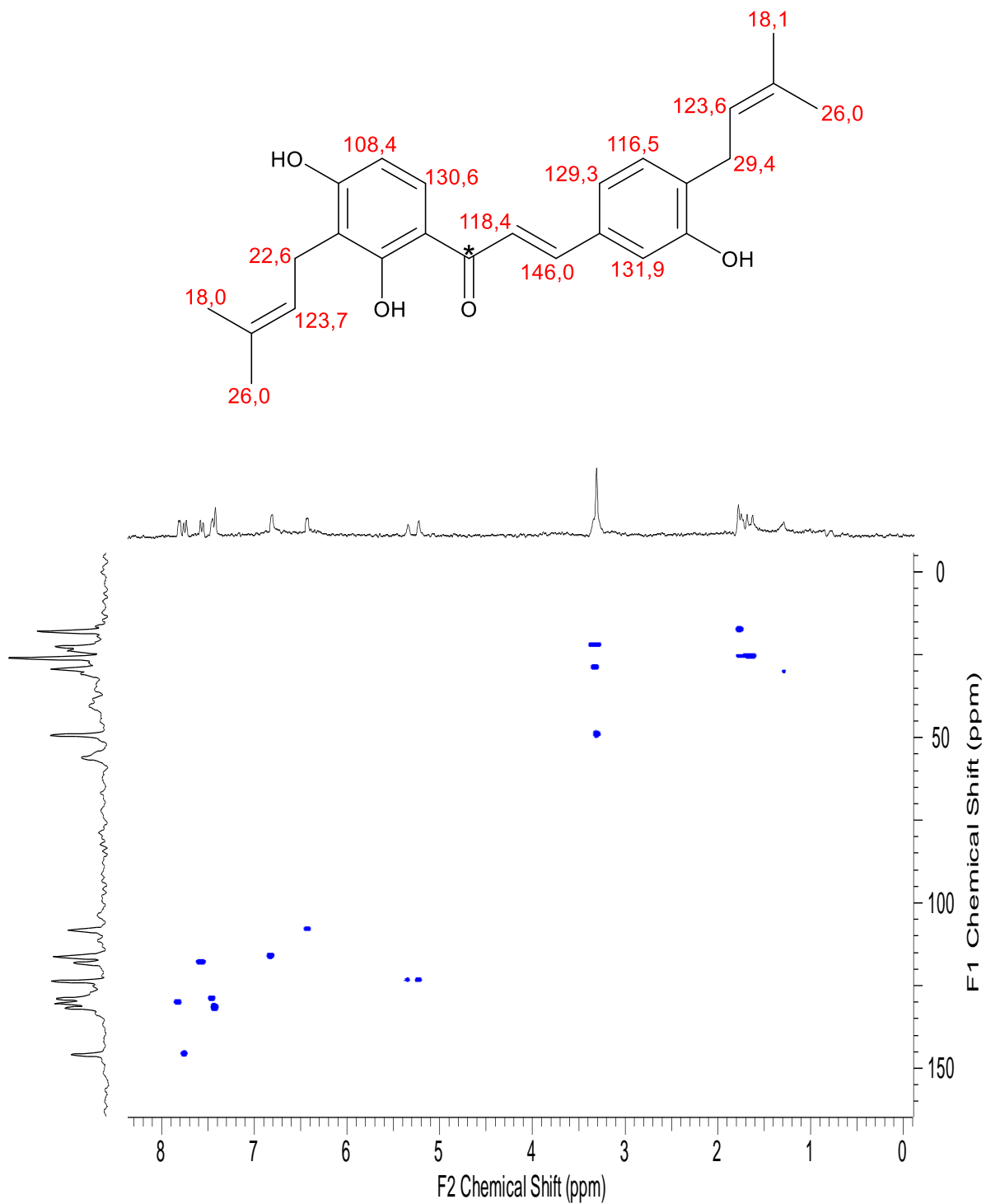


Figura 59. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-391.

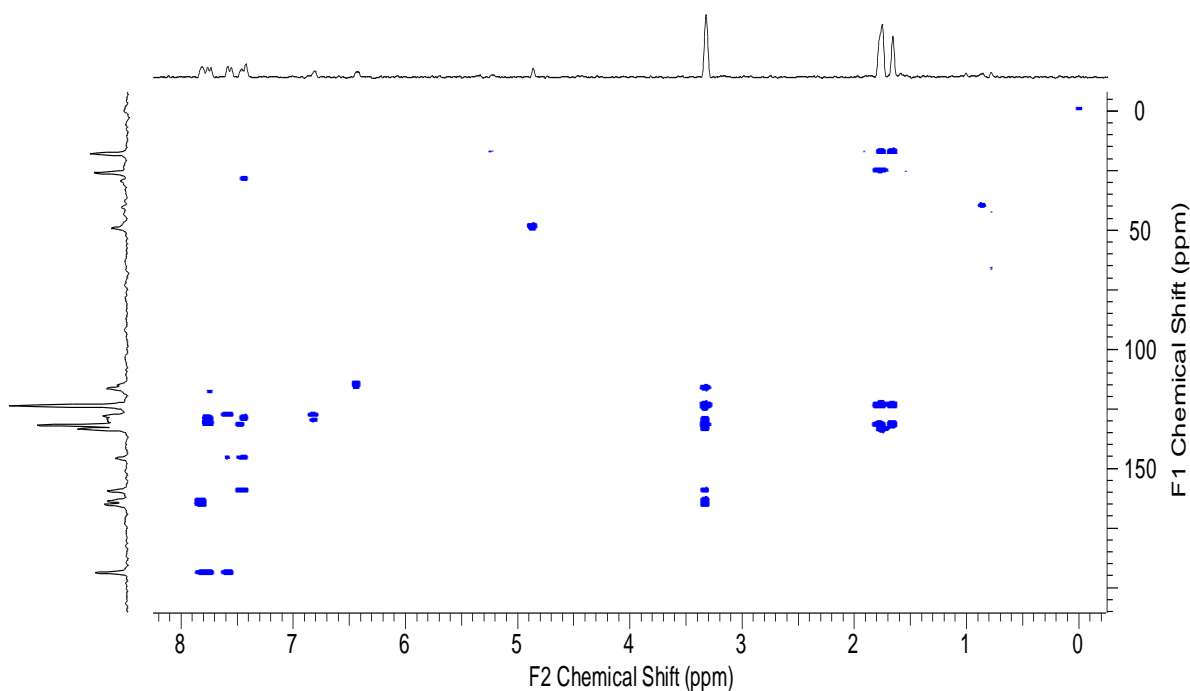
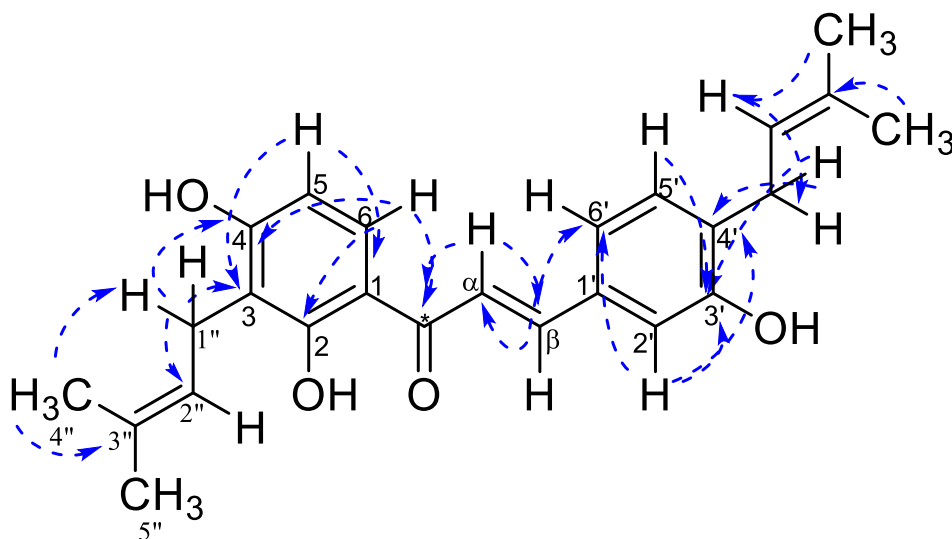


Figura 60. Mapa de contorno HMBC (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-391.

Através do mapa de contorno de HMBC (Figura 60), as principais correlações em J^3 visualizadas no anel aromático A foram para os sinais em δ_{H} 6,42 (H-5) correlacionando com os carbonos em δ_{C} 114,9 (C-1), 116,5 (C-3) e em δ_{H} 7,81 (H-6) correlacionando com os carbonos oxidados em δ_{C} 163,9 (C-4) e 165,2 (C-2). Ainda, o próton em δ_{H} 7,81 (H-6) também apresentou correlação em J^3 com o carbono carbonílico em δ 193,8 (C*) do esqueleto da chalcona.

O próton aromático em δ_{H} 6,81 (H-5') apresentou correlação com o carbono quaternário em δ_{C} 130,5 (C-1') e com o carbono oxidado em δ_{C} 159,7 (C-3'), já o próton em δ_{H} 7,46 (H-6') correlacionou em J^3 com os carbonos em δ_{C} 131,9 (C-2') e 146,1 (C- β). O próton em δ_{H} 7,42 (H-2') também apresentou correlação com o carbono oxidado em δ_{C} 159,7 (C-3') e com o carbono quaternário em δ_{C} 117,0 (C-4'), sendo estes pertencentes ao anel aromático B

A localização dos segmentos prenila da estrutura foi confirmada pela presença dos sinais em δ_{H} 3,32 (H-1'') correlacionando em J^3 com o carbono em δ_{C} 163,9 (C-4) e em J^2 com o carbono quaternário em δ_{C} 116,5 (C-3). Já o outro sinal em δ_{H} 3,32 (H-1''') correlacionou em J^3 com o carbono em δ_{C} 159,7 (C-3') e em J^2 com o carbono quaternário em δ_{C} 117,0 (C-4'). Por fim, foram então atribuídos aos anéis aromáticos A e B, respectivamente na estrutura, como pode ser visto abaixo:



Os dados espectrais de RMN 1D e 2D (Tabela 11), juntamente com a análise por espectrometria de massas (Figura 62), auxiliados com a comparação de dados encontrados na literatura (FUKAI et al., 1994; MONTEIRO et al., 2002), permitiu na identificação da substância **BAS-391** como **kanzonol C**, Figura 61. Kanzonol C já foi reportada na espécie de *B. gaudichaudii* Trécul (MONTEIRO et al., 2002), *D. turbinata* Engl. (NGAMENI et al., 2006), e *D. barteri* var. *multiradiata* (MBAVENG et al., 2008). Além disso, também possui relatos em espécies de Fabaceae como em *G. eurycarpa* (FUKAI et al., 1994), *G. inflata* (LIN et al., 2017b, 2017a), e *G. glabra* (LI et al., 2017).

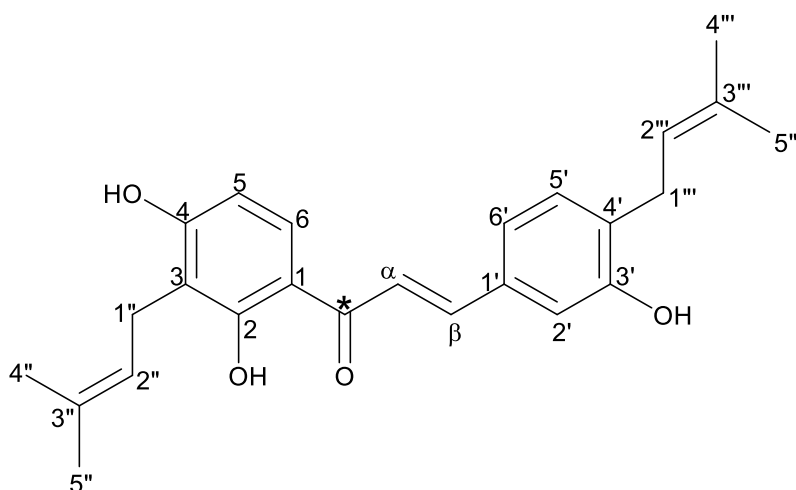


Figura 61. Estrutura da chalcona BAS-391.

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BAS-391.

Kanzonol C				
N ^o	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	δ_{H} (mult.; J in Hz) ^a	HMBC ^a
1	114,9	112,9	-	-
2	165,2	165,3	-	-
3	116,5	-	-	-
4	163,9	166,0	-	-
5	108,4	109,1	6,42 (<i>d</i> ; 8,9), 1H	114,9; 116,5
6	130,6	132,2	7,81 (<i>d</i> ; 8,9), 1H	163,9; 165,2; 193,8
*	193,8	194,9	-	-
α	118,4	-	7,57 (<i>d</i> ; 15,1), 1H	193,8; 146,0
β	146,0	-	7,75 (<i>d</i> ; 15,1), 1H	193,8; 131,5; 129,3; 118,4
1'	130,5	126,2	-	-
2'	131,9	129,7	7,42 (<i>s</i>), 1H	159,7; 129,3; 146,1; 117,0; 29,4
3'	159,7	-	-	-
4'	117,0	-	-	-
5'	116,5	116,0	6,81 (<i>d</i> ; 8,3), 1H	129,3; 130,5; 159,7
6'	129,3	132,2	7,46 (<i>dd</i> ; 8,3; 2,2), 1H	159,7; 131,9; 146,1
1''	22,6	29,2	3,32 (<i>m</i>), 2H	165,2; 163,9; 116,5
2''	123,7	123,2	5,22 (<i>m</i>), 1H	18,0; 26,0; 22,6
3''	131,9	133,3	-	-
4''	18,0	17,8	1,75 (<i>s</i>), 3H	26,0; 123,7; 131,9
5''	26,0	28,8	1,77 (<i>s</i>), 3H	18,0; 123,7; 131,9
1'''	29,4	-	3,32 (<i>m</i>), 2H	159,7; 117,0
2'''	123,6	-	5,34 (<i>m</i>), 1H	18,0; 26,0; 29,4
3'''	131,8	-	-	-
4'''	18,1	-	1,65 (<i>s</i>), 3H	26,0; 123,6; 131,8
5'''	26,0	-	1,77 (<i>s</i>), 3H	18,1; 123,6; 131,8

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS.
^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.
^cDados da literatura de acordo com FUKAI et al., 1994 (Acetona-d, 100 MHz).

A análise por espectrometria de massas de BAS-391, revelou a presença do pico de maior intensidade em m/z 391 $[\text{M}-\text{H}]^-$, Figura 62.

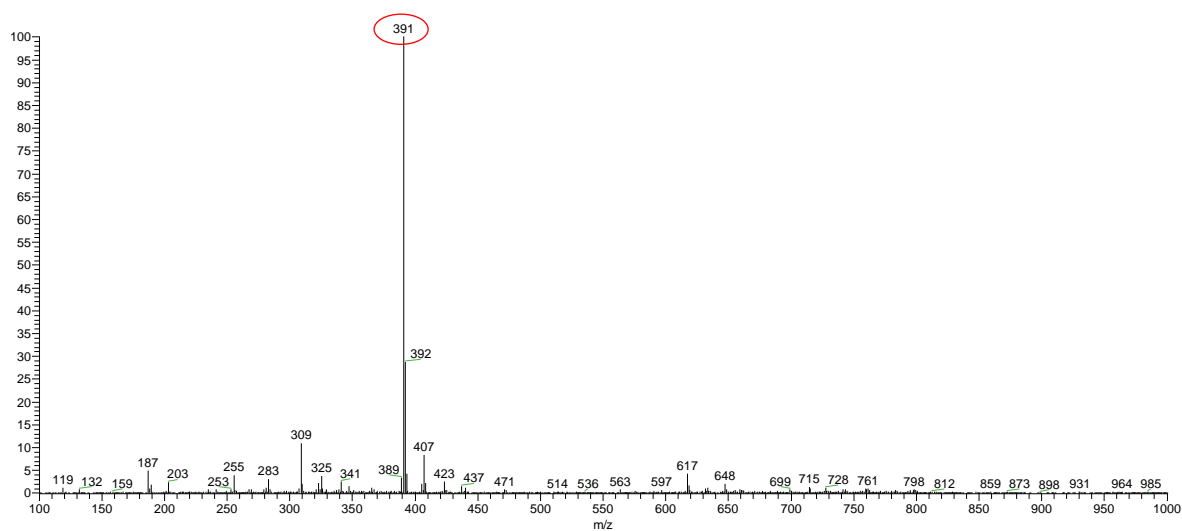


Figura 62. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-391 isolada da casca de *B. acutifolium*.

O íon 391 foi submetido à análise de fragmentação MS^2 , apresentando uma elevada perda de 204 Da, resultando no pico de m/z 187 $[M - H]^-$ e outra perda de 188 Da, originando o pico de m/z 203 $[M - H]^-$ cuja a proposta de fragmentação para esses íons são apresentados na Figura 63.

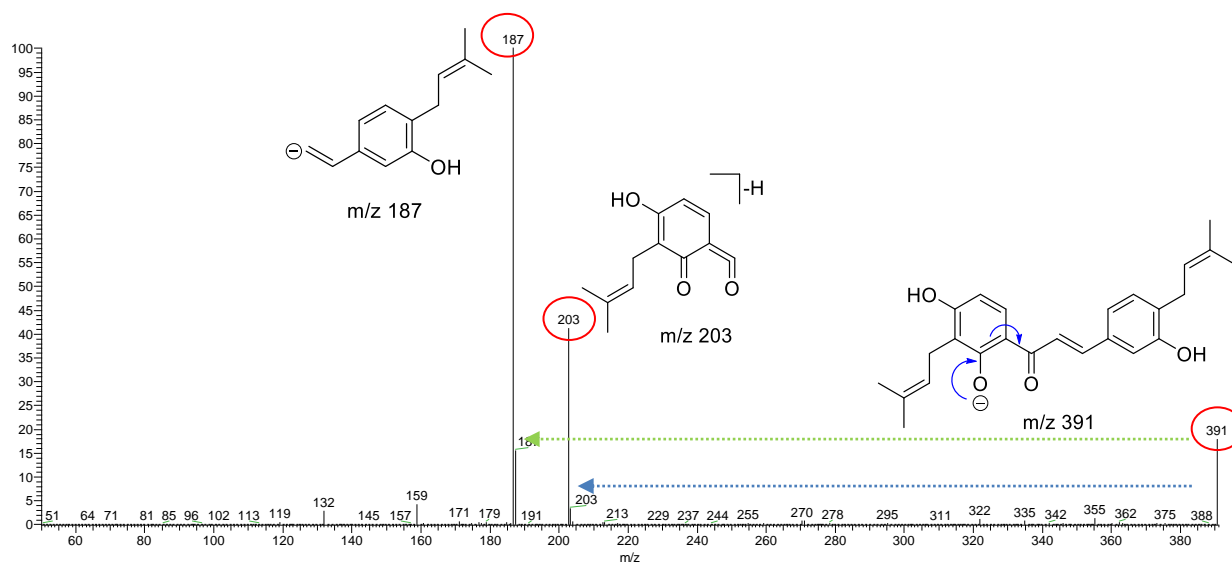


Figura 63. Espectro de MS^2 para o íon 391 $[M - H]^-$ e proposta de fragmentação.

5.1.4.5. Determinação estrutural da substância BAS-339

A substância **BAS-339** (1,9 mg) isolada do fracionamento (fluxograma 2, item 4.6.1.3) foi obtida como sólido amorfo solúvel em metanol e isolada do fracionamento. A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi realizado a 500 MHz em MeOD (Figura 64).

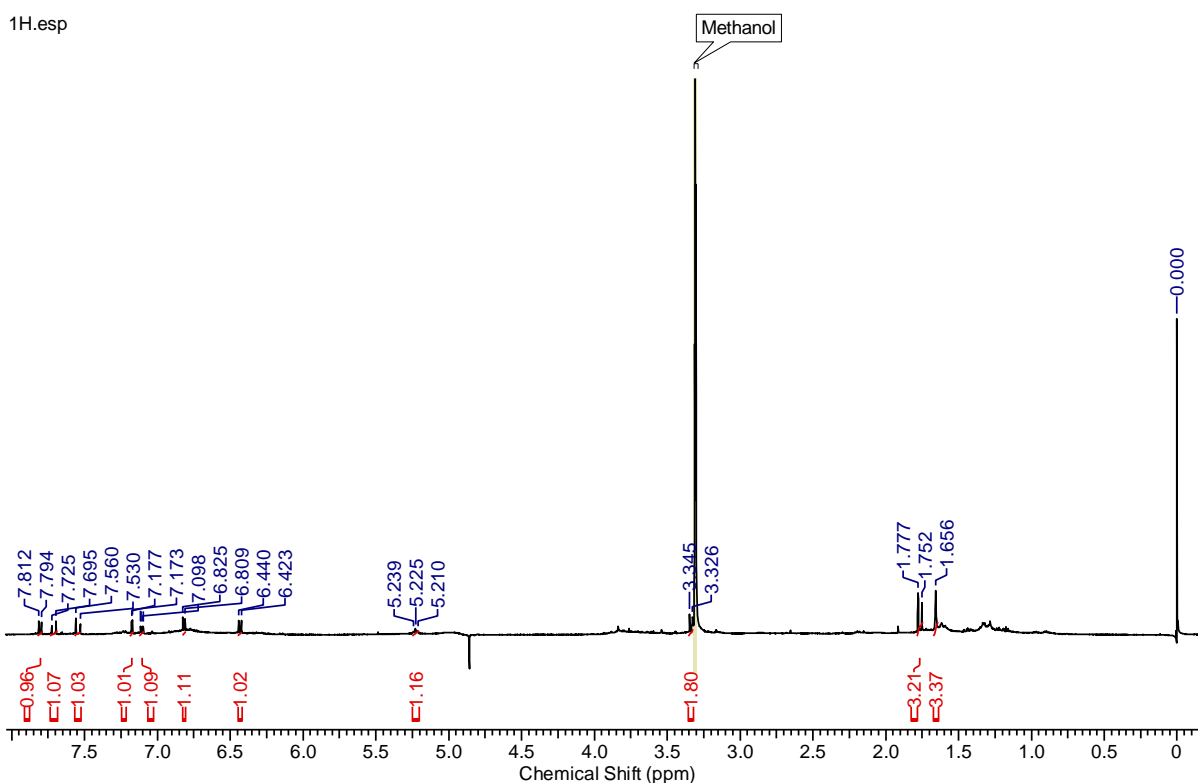
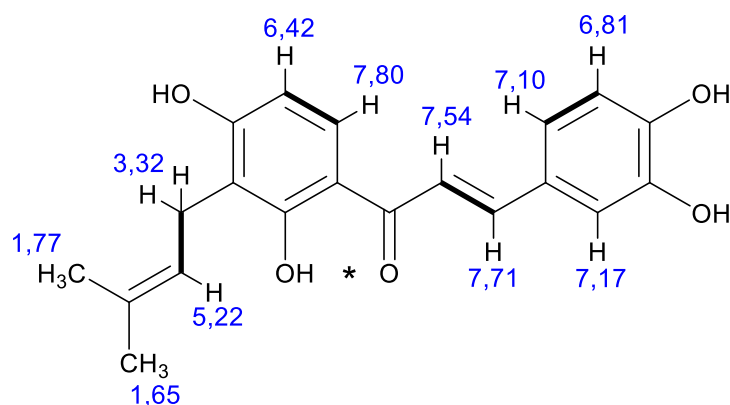


Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BAS-339.

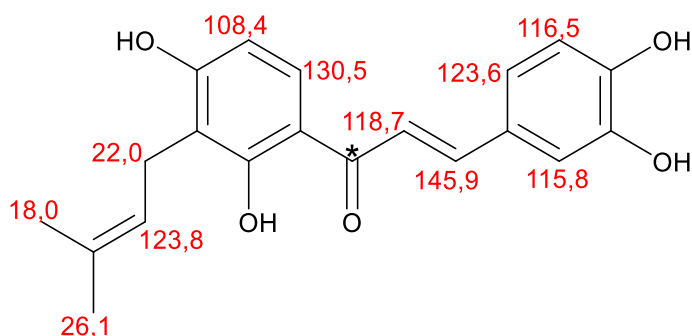
Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtido do mapa de correlação de HSQC também pode-se perceber uma semelhança estrutural das substâncias **BAS-339** com as quatro substâncias relatadas anteriormente **BAS-255**, **BAS-323**, **BAS-321** e **BAS-391**, devido à presença dos prótons vicinais em δ_{H} 7,71 (*d*; 1H) e δ_{H} 7,54 (*d*; 1H) com constante de acoplamento $J=15,2$ Hz característico do esqueleto de uma chalcona.

Na região dos aromáticos foram observados os prótons em δ_{H} 7,80 (*d*, $J= 8,8$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,42 (*d*; $J= 8,8$ Hz; 1H) atribuído ao anel aromático “A”. Assim como, os sinais em δ_{H} 7,10 (*dd*; $J=8,1$ e 2,0 Hz; 1H); δ_{H} 6,81 (*d*, $J= 8,1$ Hz, 1H) e δ_{H} 7,17 (*d*; 2,0 Hz; 1H) característicos aos acoplamentos “orto” e “meta” pertencentes ao anel aromático “B”. Pode-se perceber também os sinais característicos ao segmento da prenila como os prótons em δ_{H} 5,22 (*m*; 1H), δ_{H} 3,32 (*m*; 2H), δ_{H} 1,65 (*s*; 3H) e δ_{H} 1,77 (*s*; 3H). O espectro do COSY (Anexo) corroborou

com os prótons propostos para a substância como δ_H 3,32 e 5,22, δ_H 6,42 e 7,80, δ_H 7,54 e 7,71, δ_H 7,10 e 6,81, como pode ser visto abaixo:



No mapa de contorno de HSQC (Figura 65) foi possível visualizar as correlações dos prótons em δ_H 7,80 com o carbono em δ_C 130,5 (C-6), δ_H 6,42 com δ_C 108,4 (C-5), δ_H 7,54 com δ_C 118,7 (C- α), δ_H 7,71 com δ_C 145,9 (C- β), δ_H 7,10 com δ_C 123,6 (C-6'), δ_H 6,81 com δ_C 116,8 (C-5'), δ_H 7,17 com δ_C 115,8 (C-2'), δ_H 3,32 com δ_C 22,0 (C-1''), δ_H 5,22 com δ_C 123,8 (C-2''), δ_H 1,77 com δ_C 18,0 (C-4'') e δ_H 1,65 com δ_C 26,1 (C-5''), como apresentado abaixo:



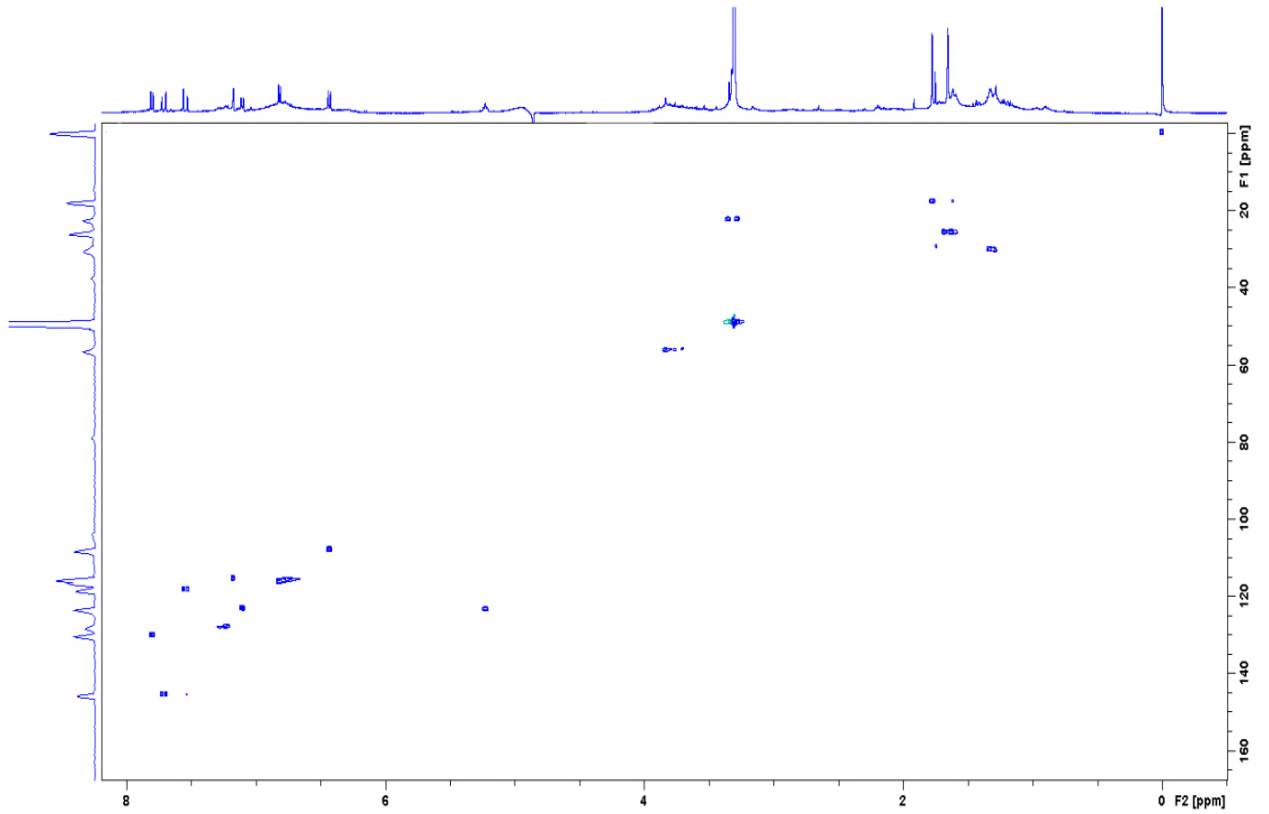


Figura 65. Mapa de contorno HSQC (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-339.

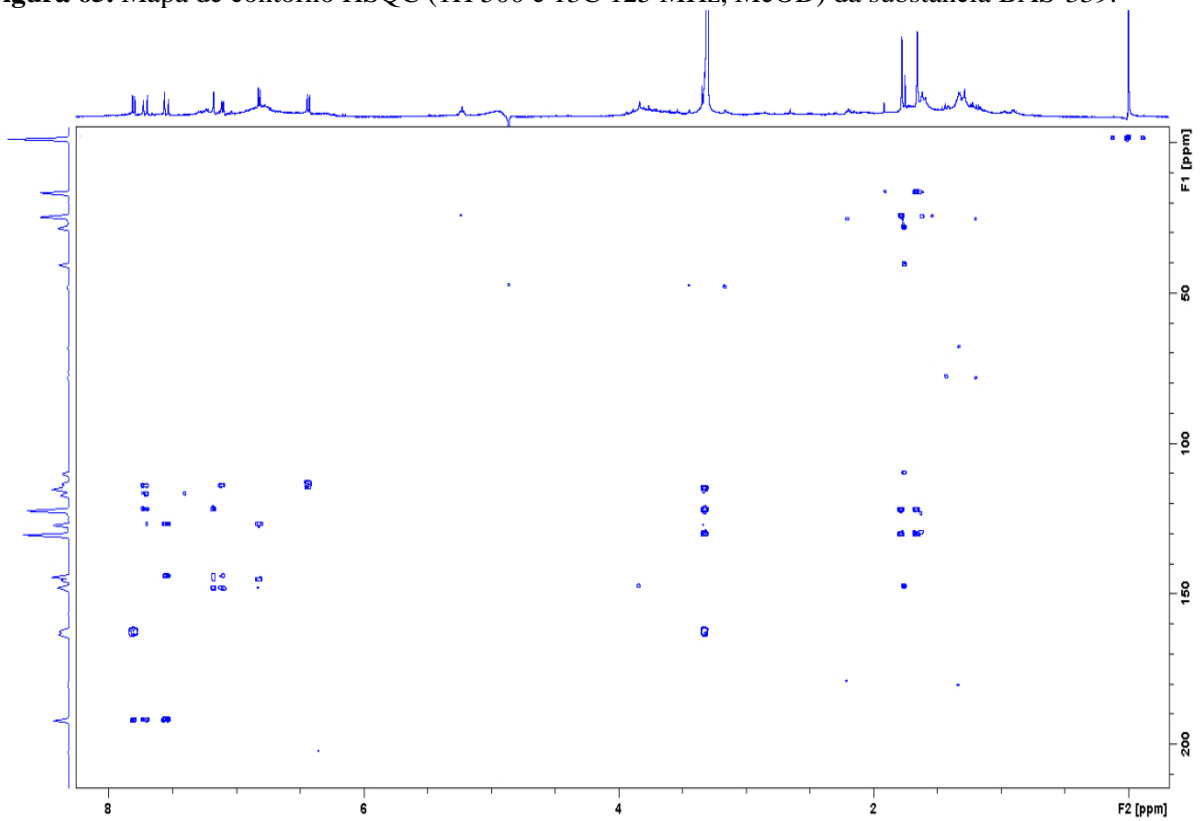
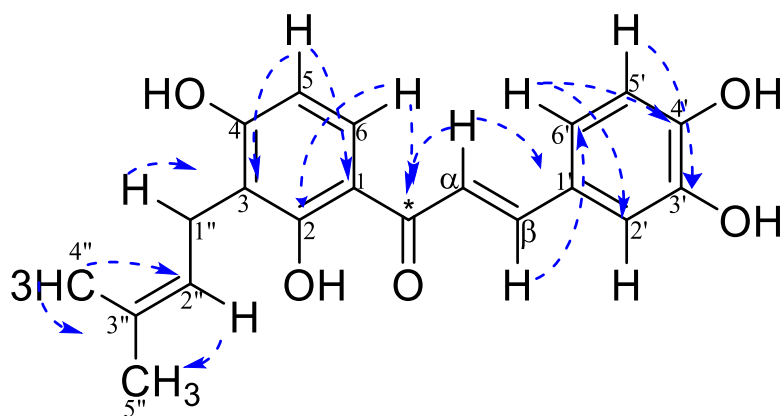


Figura 66. Mapa de contorno HMBC (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz, MeOD) da substância BAS-339.

As principais correlações do mapa de contorno de HMBC (Figura 66) em J^3 observadas no anel aromático A, foram referentes aos prótons em δ_H 6,42 (H-5) correlacionando com os carbonos quaternários em δ_C 114,0 (C-1) e 113,3 (C-3), além do próton em δ_H 7,80 (H-6) correlacionando com os carbonos oxidados em δ 163,8 (C-2) e 162,5 (C-4). Ainda, o próton em δ_H 7,80 (H-6) também mostrou correlação em J^3 com o carbono em δ 192,1 (C*) caracterizando a ligação do anel A com o carbono carbonílico do esqueleto da chalcona.

O próton aromático do anel B em δ_H 6,81 (H-5') apresentou correlação em J^3 com o carbono quaternário em δ_C 127,2 (C-1') e com o carbono oxidado em 148,4 (C-3'). Já o sinal do próton em δ_H 7,10 (H-6') confirmou a posição da outra hidroxila do anel B, uma vez que correlacionou em J^3 com o carbono em δ_C 144,3 (C-4'). Os prótons em δ_H 7,54 (H- α) e 7,71 (H- β) apresentaram correlações em J^3 com os carbonos do anel aromático B, através das correlações δ_C 127,2 (C-1') e δ_C 123,6 (C-6'), respectivamente.

A localização do segmento prenil do anel A da estrutura foi confirmada pela presença do sinal em δ_H 3,32 (H-1'') correlacionando em J^2 com o carbono quaternário em δ_C 113,3 (C-3). Já o sinal em δ_H 5,22 (H-2'') correlacionou em J^3 com os carbonos das metilas em δ 18,0 (C-4'') e δ 26,1 (C-5''). O sinal dos prótons das metilas em δ_H 1,77 (CH₃-4'') e 1,65 (CH₃-5'') também mostraram correlação com o carbono metilênico em δ_C 123,8 (C-2''), além de apresentar correlação com o carbono quaternário em δ_C 130,5 (C-3''), como pode ser visto abaixo:



Os dados espectrais de RMN 1D e 2D (Tabela 12), em conjunto com a análise por espectrometria de massas (Figura 68), auxiliados com a comparação de dados encontrados na literatura (YIN et al., 2004), permitiu na identificação da substância **BAS-339** como **corylifol B**, Figura 67. Corylifol B tem sido relatado em algumas espécies de Fabaceae, como *Psoralea corylifolia* L. (YIN et al., 2004) e *G. inflata* (LIN et al., 2017a).

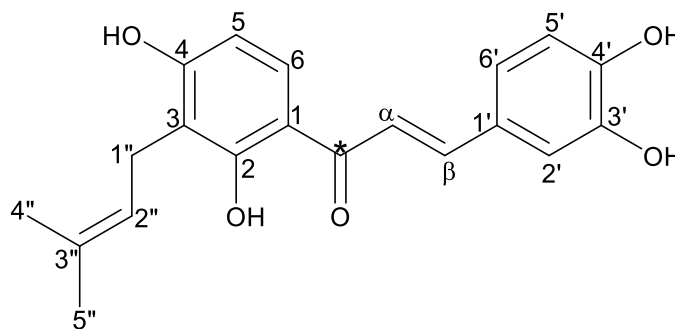


Figura 67. Estrutura da chalcona BAS-339.

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BAS-339.

Corylifol B				
N ^o	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	δ_{H} (mult.; <i>J</i> in Hz) ^a	HMBC ^a
1	114,0	113,5	-	-
2	163,8	162,1	-	-
3	113,3	115,2	-	-
4	162,5	163,8	-	-
5	108,4	107,4	6,42 (<i>d</i> , 8,8), 1H	113,3; 114,0
6	130,5	129,5	7,80 (<i>d</i> , 8,8), 1H	192,1; 163,8; 162,5
*	192,1	192,1	-	-
α	118,7	117,7	7,54 (<i>d</i> , 15,2), 1H	192,1; 127,2; 145,9
β	145,9	144,6	7,71 (<i>d</i> , 15,2), 1H	123,6; 127,2; 192,1
1'	127,2	127,3	-	-
2'	115,8	115,0	7,17 (<i>d</i> , 2,0), 1H	144,3; 148,4; 123,6
3'	148,4	148,5	-	-
4'	144,3	145,6	-	-
5'	116,8	115,6	6,81 (<i>d</i> , 8,1), 1H	127,2; 148,4; 144,3
6'	123,6	122,6	7,10 (<i>dd</i> , 8,1; 2,0), 1H	144,3; 115,8
1''	22,0	21,9	3,32 (<i>m</i>), 2H	113,3
2''	123,8	122,6	5,22 (<i>m</i>), 1H	26,1; 18,0
3''	130,5	130,7	-	-
4''	18,0	17,5	1,77 (<i>s</i>), 3H	130,5; 123,8; 26,1
5''	26,1	25,5	1,65 (<i>s</i>), 3H	130,5; 123,8; 18,0

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS.

^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo com YIN et al, 2004 (Acetona-d, 100 MHz).

A análise por espectrometria de massas de BAS-339, revelou a presença do pico de maior intensidade em m/z 339 $[\text{M}-\text{H}]^-$, Figura 68.

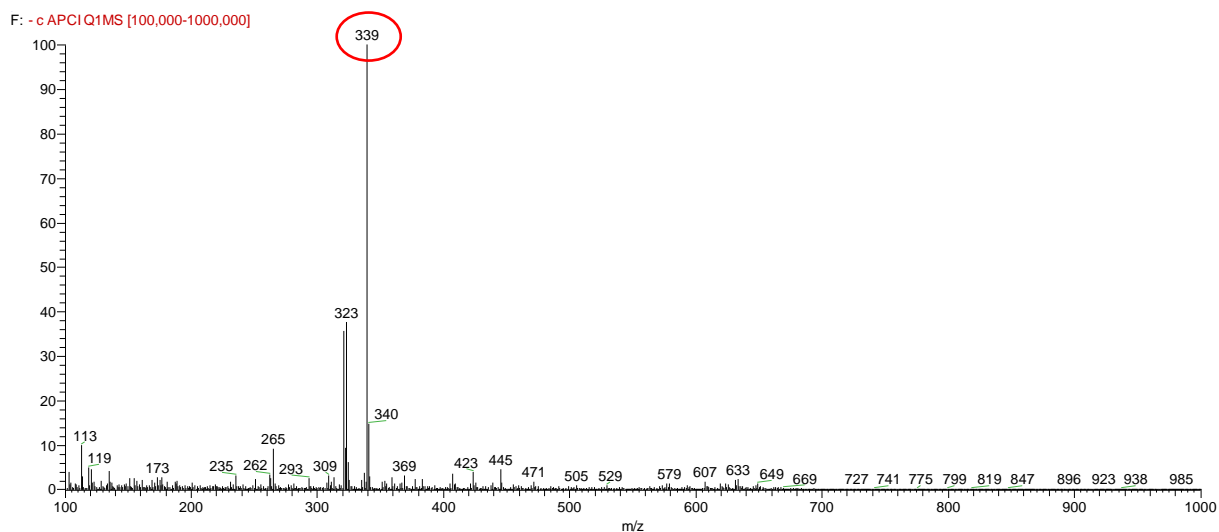


Figura 68. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BAS-339 isolada da casca de *B. acutifolium*.

Este íon foi submetido à análise de fragmentação MS^2 , dando origem ao espectro com íons de m/z 219, 203, 135, 119 $[M-H]^-$, cuja proposta de fragmentação estão representadas na Figura 69.

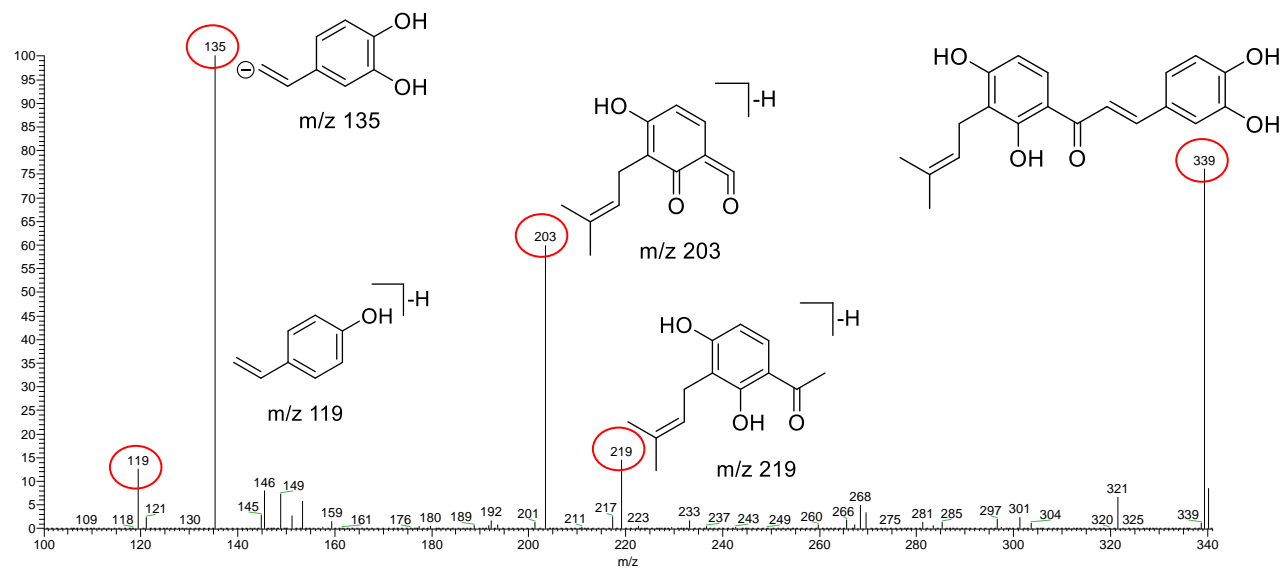


Figura 69. Espectro de MS^2 para o íon 339 e proposta de fragmentação.

5.1.5. Constituintes químicos isolados das cascas do *B. acutifolium*

Por meio do procedimento experimental com as cascas de *B. acutifolium*, mais precisamente com o estudo da amostra BA4-FI selecionada, descrito no item (4.9), um total de sete flavonoides foram isolados (Figura 70), onde é o primeiro relato das substâncias kanzonol B-C e colilifol B na espécie de *B. acutifolium*. Além disso, o corilifol B é descrito pela primeira vez da família Moraceae.

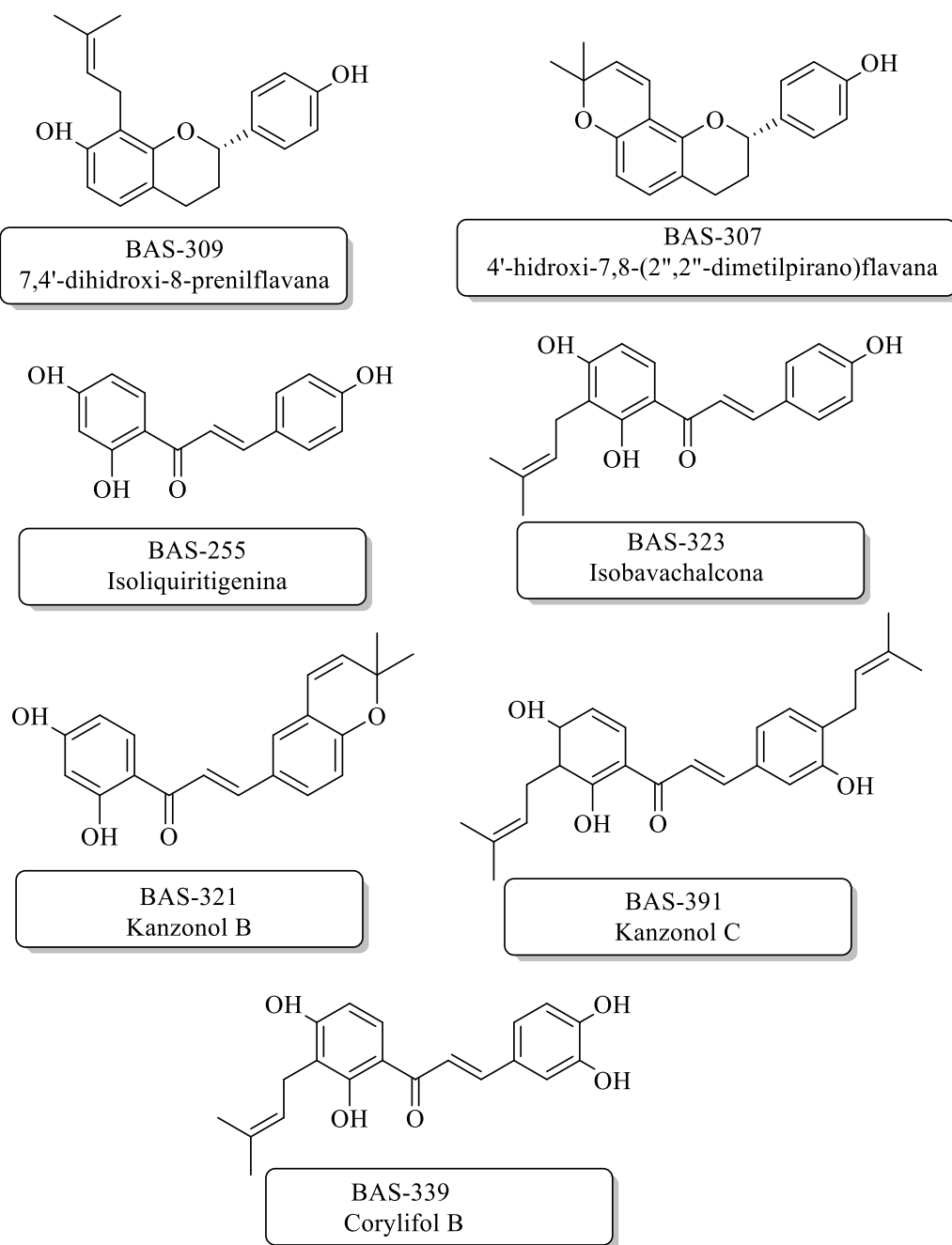


Figura 70. Substâncias isolados das cascas do *B. acutifolium*.

5.2. Espécie *B. parinarioides*

5.2.1. Rendimento dos extratos

Os diferentes extratos da casca da espécie *B. parinarioides* provenientes do triângulo misturas de três componentes (DCM, AcoET e EtOH), item 4.3.1., revelaram os seguintes rendimentos em percentual como apresentado Tabela 13.

Tabela 13. Rendimento em percentual dos diferentes extratos de *B. parinarioides*.

Espécie	Solventes utilizados no preparo dos extratos	Códigos dos extratos	Média Rendimento (%) ± Desv.Pad
<i>B. parinarioides</i>	DCM 100%	E.BP1	1,0% ± 0,30
	EtOH 100%	E.BP2	2,9% ± 0,05
	AcoET 100%	E.BP3	2,0% ± 0,06
	AcoET/ DCM 1:1	E.BP4	1,4% ± 0,10
	DCM/ EtOH 1:1	E.BP5	1,3% ± 0,25
	EtOH/ AcoET 1:1	E.BP6	1,9% ± 0,03
	DCM /AcOET/EtOH 1:1:1	E.BP7	1,5% ± 0,12

Portanto, segundo a tabela de rendimentos pode-se perceber os maiores rendimentos para os extratos E.BP2 (2,9%), E.BP3 (2,0%) e E.BP6 (1,9%), seguidos dos extratos E.BP7 (1,5%), E.BP4 (1,4%), E.BP5 (1,3%), e E.BP1 (1,0%).

5.2.2. Perfil químico por ESI-EM e análise quimiométrica de *B. parinarioides*

O fingerprint dos espectros de massas dos extratos (E.BP1-7) obtidos da casca de *B. parinarioides* no modo negativo, apresentaram vários picos bases desprotonados entre m/z 200-600 (Figura 71). O pico base correspondendo ao íon m/z 255 $[M-H]^-$ foi observado nos extratos DCM, EtOH e EtOH/AcoEt, enquanto para os extratos AcoEt e AcoEt/DCM foi observado o pico base em m/z 291 $[M-H]^-$. Além disso, o pico base m/z 451 $[M-H]^-$ apresentou-se nos extratos DCM/EtOH e DCM/AcoEt/EtOH (Figura 71 A-G). Além destes, vários outros íons com alta intensidade relativa foram observados e submetidos a análise de fragmentação (Tabela 14), em que podem estar relacionados com a presença de compostos fenólicos e/ou ácidos orgânicos, sugerindo esses extratos como matrizes complexas.

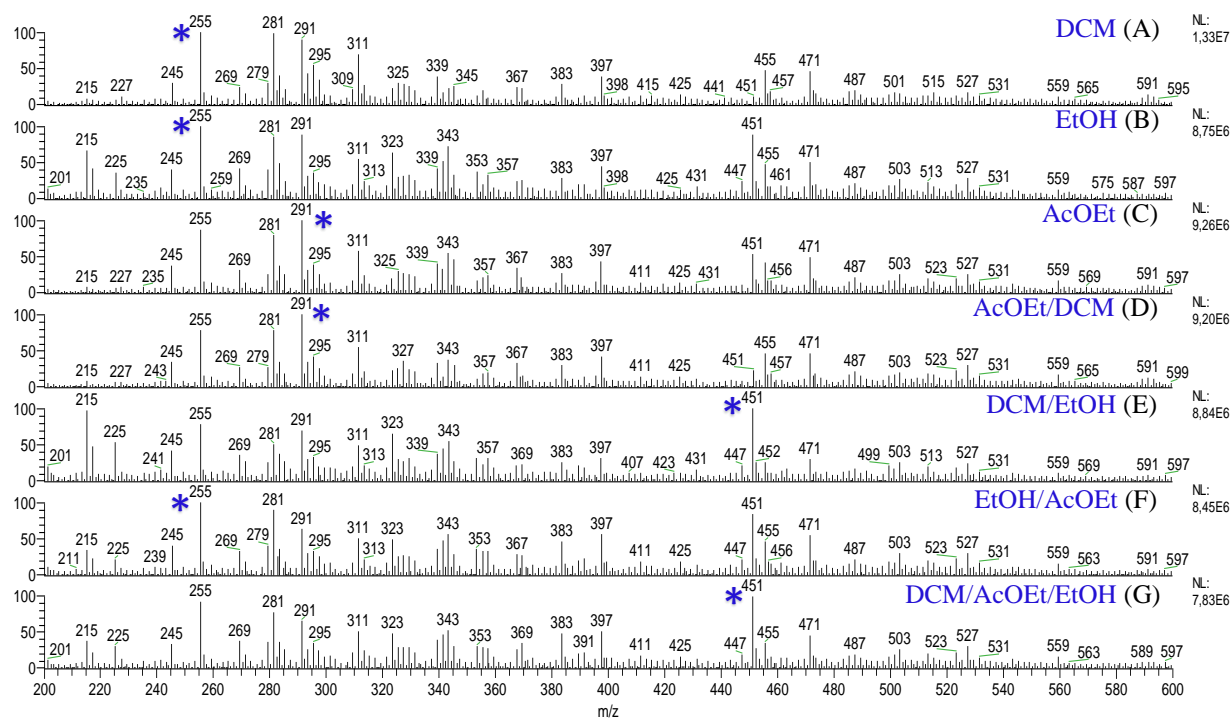


Figura 71. Espectros de massas no modo negativo e principais fragmentos obtidos dos sete diferentes extratos de *B. parinarioides*. * denota o pico base para cada amostra analisada.

Tabela 14. Principais fragmentos obtidos dos sete diferentes extratos de *B. parinarioides*.

m/z	MS ²	Identificação
[M-H] ⁻	[M-H] ⁻	
255	255, 240, 135, 119	isoliquiritigenina
309	187	parinarioidina A
291	276, 247, 232, 217	parinarioidina C
323	323, 297, 187, 135	licoagrachalcona
339	339, 321, 269, 203, 153, 135	parinarioidina B
391	203	kanzonol C
179	135	ácido cafeico
353	191, 173, 179	ácido 3- <i>o</i> -cafeoilquinico
341	191, 173, 167	ácido cafeico glicosídeo
451	341	(epi)catequina glicosídeo

De acordo com o gráfico obtido da variação de íons e suas intensidades relativas registrados em ESI-EM dos sete diferentes extratos de *B. parinarioides*, foi possível realizar as análises quimiométricas de PCA e HCA, onde as três primeiras componentes principais obtidas para esta espécie explicam 98,11% da variância total contida nos dados. A Figura 72, representa o gráfico dos scores das três componentes principais.

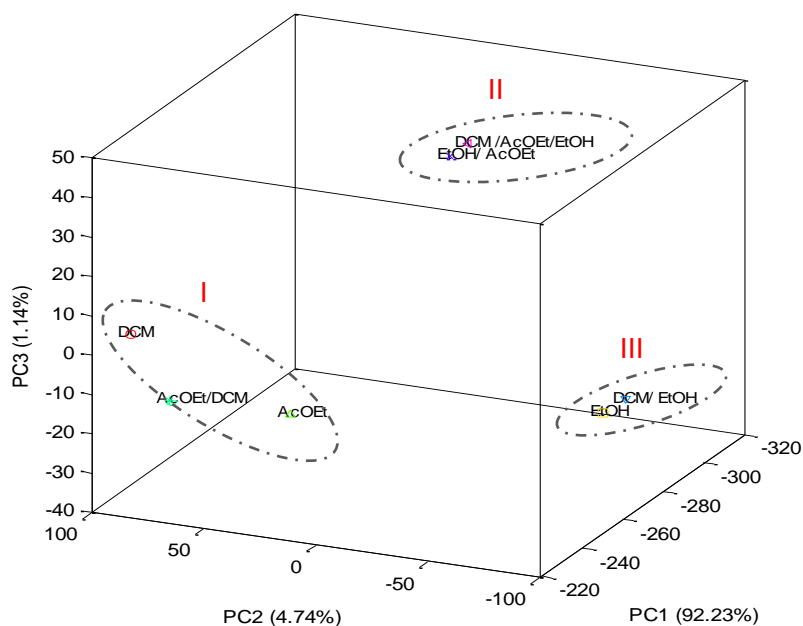


Figura 72. Gráfico de PCA dos diferentes extratos de *B. parinarioides*.

Com base no gráfico biplot (PC1 e PC2) explicam juntas 96,97% da variância total contida nos dados, onde os íons m/z 255, 281, 291, 323, 341 e 451 $[M-H]^-$ foram os principais responsáveis pela segregação dos grupos **I-III** nos diferentes extratos analisados (Figura 73). Contudo, o íon m/z 291, 281, 255 $[M-H]^-$ revelou-se como a variável de maior peso no extrato de AcOEt.

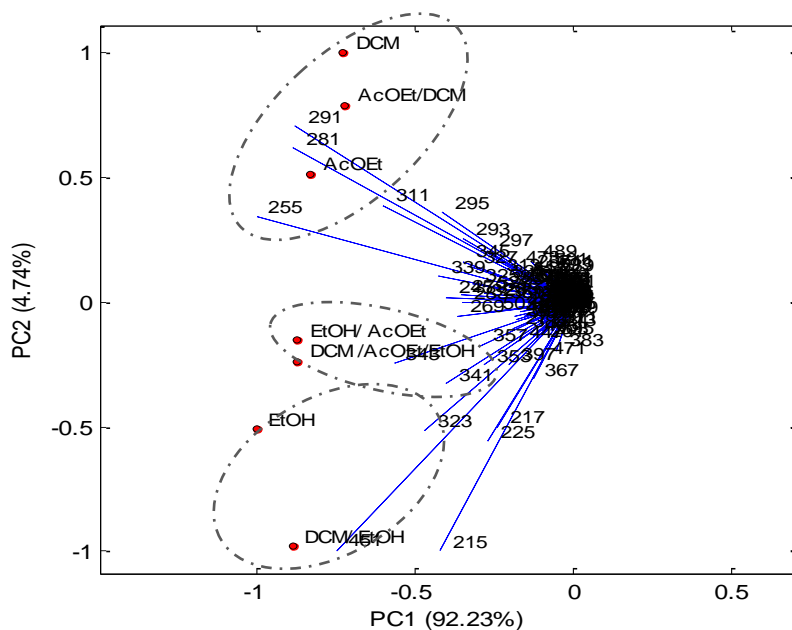


Figura 73. Gráfico Biplots da análise de PC1 e PC2 dos extratos de *B. parinarioides*.

O dendrograma de HCA (Figura 74) consolidou a separação observada nos três grupos formados do PCA. Onde, o Grupo I, apresentou menor similaridade dentre os demais grupos de solventes extratores, devido a maior distância Euclidiana quando comparado aos outros solventes extratores. O Grupos III e II apresentaram maior similaridade entre os metabólitos extraídos, apesar de que é possível separar o grupo I em subgrupos.

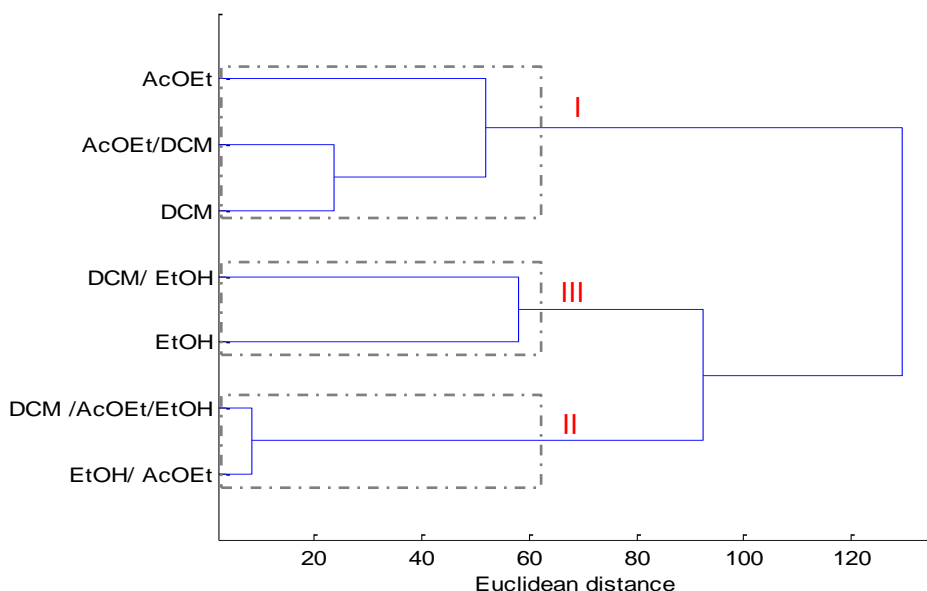


Figura 74. Dendrograma dos diferentes extratos de *B. parinarioides* obtida pela Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA).

O espectro de MS/MS do íon m/z 255 (Figura A14) revelou a presença do pico de maior intensidade em m/z 119 e outro menor em m/z 135, o qual é consistente com a estrutura da **isoliquiritigenina**, uma chalcona previamente reportada na espécie de *B. acutifolium* (SÁ et al., 2020b). O íon m/z 323 (Figura A15) apresentou o pico base em m/z 187 e outro de menor intensidade em m/z 135, consistente com a estrutura da chalcona conhecida como **licoagrachalcona** (SÁ et al., 2020a).

Além disso, o espectro de MS/MS do íon m/z 341 (Figura A16), apresentou um pico de maior intensidade em m/z 167 e íons com menores intensidade em m/z 173 e 191, que estão de acordo com a estrutura do **ácido cafeico glicosídeo** (JAISWAL et al., 2014). Ainda, o espectro de MS/MS do íon m/z 451 (Figura A17), apresentou um pico base em m/z 341, que por meio da comparação padrão dos fragmentos com dados da literatura, este íon foi denominado como sendo a estrutura da **(epi)catequina glicosídeo** (ZERBIB et al., 2018). Por outro lado, o espectro de fragmentação do íon m/z 215 não gerou fragmentos, mesmo aumentando a energia de colisão do mesmo. Tal fenômeno pode ser explicado pela presença recorrente de adutos de

íons moleculares, como exemplo o aduto de cloro, com isso, a massa de cloro foi levada em consideração e o íon correspondente desprotonado em m/z 179 foi submetido à análise de fragmentação. Assim, o MS/MS do íon m/z 179 (Figura **A18**) apresentou um pico de maior intensidade em m/z 135, sendo esta fragmentação consistente com o **ácido cafeico** (JAISWAL et al., 2014).

Por outro lado, o espectro MS/MS do íon em m/z 291 (Figura **A19**) exibiu uma perda inicial de dióxido de carbono 44 Da (-CO₂) (m/z 291 → 247), seguido por duas perdas de radicais metil 15 Da (-CH₃) (m/z 247 → 232 e m/z 232 → 217), sugerindo a presença de grupos carboxil e metoxil na substância denominada como **parinarioidina C** (SÁ et al., 2022).

Outros íons em m/z 309, 339, 353 e 391, presentes nos extratos (A-G), foram identificados tentativamente pela análise do padrão de fragmentação e comparação com a literatura. O espectro MS/MS do íon em m/z 309 (Figura **A20**), apresentou um pico de base em m/z 187, sendo esta fragmentação consistente com o composto denominado de **parinarioidina A** (SÁ et al., 2020a). Para o íon em m/z 339 (Figura **A21**), o espectro MS/MS exibiu a perda inicial de 18 Da (-H₂O) (m/z 339 → 321), bem como um pico de base em m/z 135 e dois fragmentos principais em m/z 203 e 269, sendo esta fragmentação consistente com a **parinarioidina B** (SÁ et al., 2020a). Além disso, o espectro MS/MS do íon em m/z 353 (Figura **A22**) mostrou um pico de base em m/z 191 e outros íons com menores intensidades em m/z 173 e 179, sendo este padrão de fragmentação consistente com a estrutura do **ácido 3-O-cafeoilquínico** (JAISWAL et al., 2014). Finalmente, o espectro MS/MS do íon em m/z 391 (Figura **A23**) indicou a presença de um pico de base em m/z 187 e um íon menos intenso em m/z 203, que está de acordo com a estrutura do **kanzonol C** (SÁ et al., 2020b). Na Figura **75** estão ilustradas as estruturas.

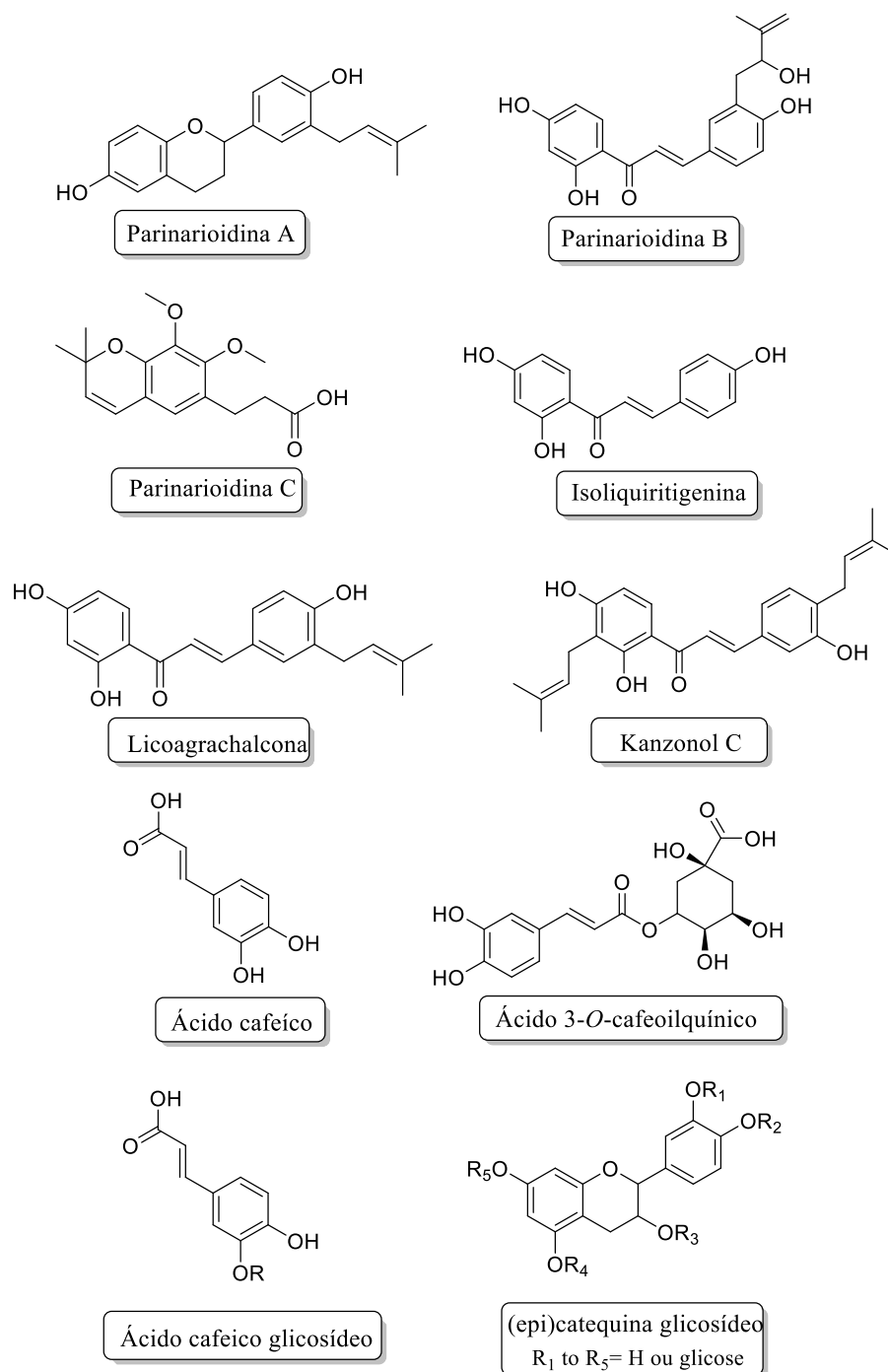


Figura 75. Substâncias identificadas nas cascas de *B. parinarioides*.

5.2.3. Perfil químico e isolamento de substâncias de EBP3-FI

Através do método de separação por CLAE-UV foi possível observar a presença de diversos picos na fração **EBP3-FI** (Figura 76). Baeado no perfil de UV e auxiliados pela análise de EM foram anotados sete picos cromatográficos majoritários com tempo de retenção variando entre 12,0 e 22,0 min (Tabela 15). Os picos com tempo de retenção em t_R 12,0 (m/z 255); 16,0 (m/z 291); 17,0 min (m/z 527); t_R 18,0 (m/z 523); 18,5 (m/z 309); 20,0 (m/z 323) e 22,0 (m/z

515) foram então selecionados e isolados em escala semipreparativa, onde estes apresentaram absorvidade máxima em 280 e 350 nm e foram então submetidos a análise por EM e RMN 1D e 2D.

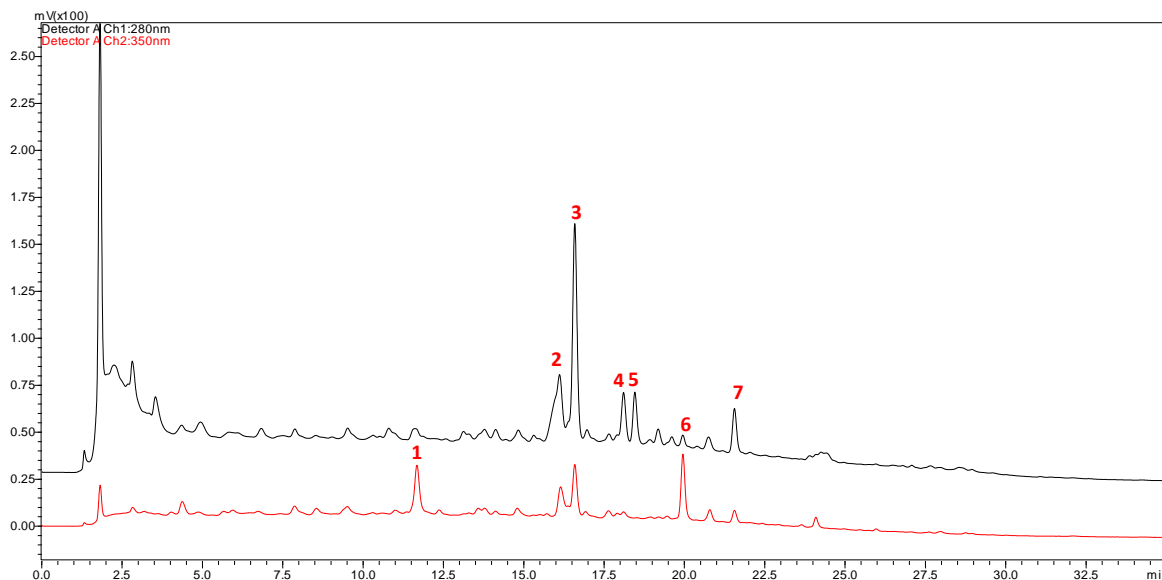


Figura 76. Cromatograma da fração EBP3-FI em CLAE-UV (280 e 350nm).

Tabela 15. Informações anotadas da fração EBP3-FI em CLAE-UV e EM de *B. parinarioides*.

Fase	Substância Código	Substância (Pico Nº)	t _R (min)	λ máx (nm)	m/z [M-H] ⁻	MS ² [M-H] ⁻
E.B3-FI	BPS-255	1	12,0	280-350	255	240,135, 119
	BPS-291	2	16,0		291	276, 247, 232, 217
	BPS-527	3	17,0		527	512, 497, 484
	BPS-523	4	18,0		523	508
	BPS-309	5	18,5		309	291, 187
	BPS-323	6	20,0		323	297, 187, 135
	BPS-515	7	22,0		515	500, 439, 244

5.2.4. Perfil químico e isolamento de substâncias proveniente do estudo fitoquímico clássico de *B. parinarioides*.

A partir do estudo fitoquímico de *B. parinarioides* chegou-se as frações **Fr.13-16** (item **4.11**), onde após estudos de CLAE-EM (Figura 77), auxiliados com CCD puderam-se verificar a necessidade de purificação por CLAE semipreparativo.

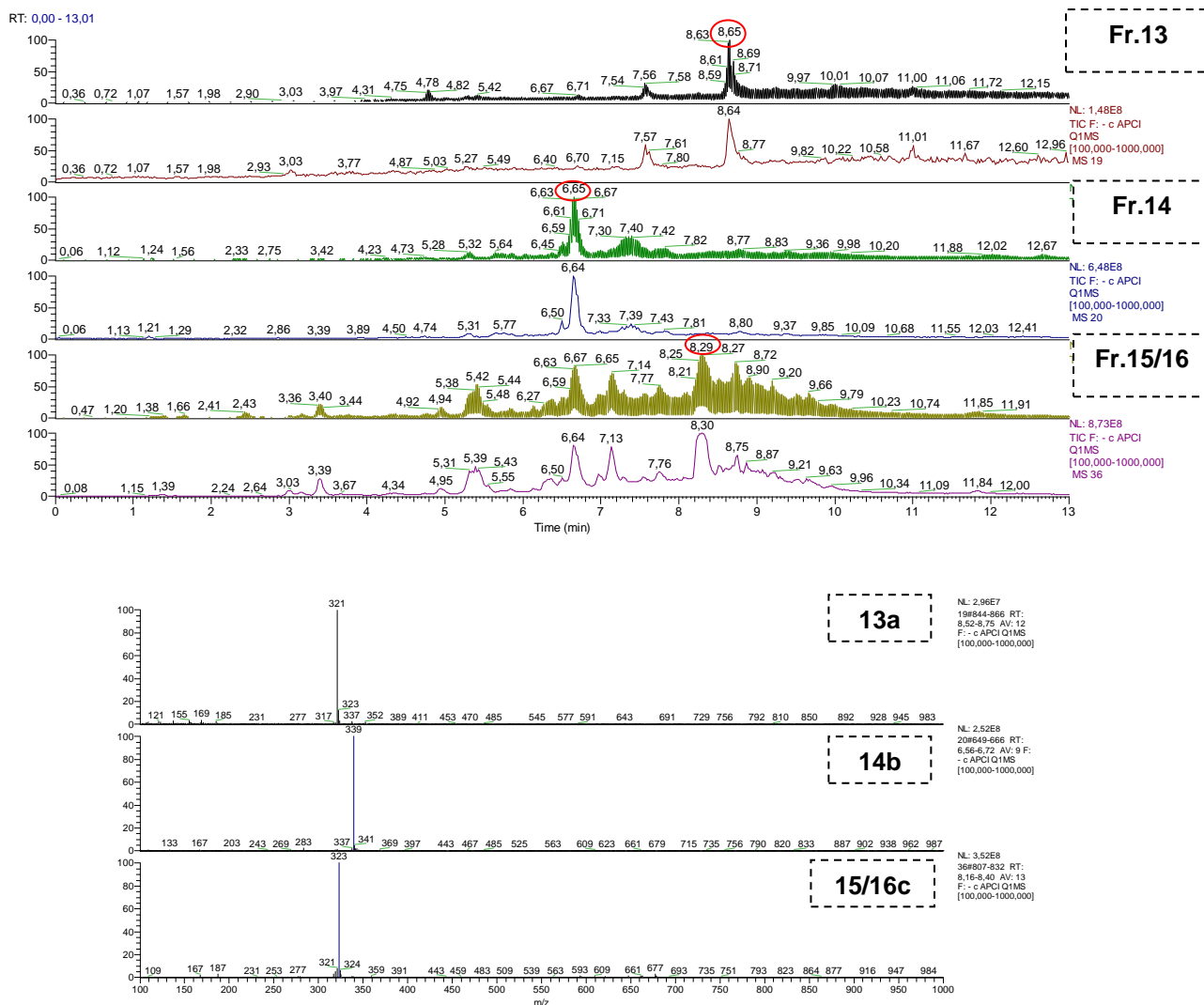


Figura 77. Cromatograma registrado em CLAE-EM das frações (Fr.13-16) da casca de *B. parinarioides*.

Os picos cromatográficos com tempo de retenção igual a t_R 8,65 (m/z 321; **BPS-321**); 6,65 (m/z 339; **BPS-339**) e t_R 8,29 (m/z 323; **BPS-323**) foram isolados em escala semipreparativa após otimização de análises e os devidos cálculos de escalonamentos, onde então foram submetidos a análise por espectrometria de massas e determinação estrutural por RMN 1D e 2D. As substâncias apresentaram absorvibilidade máxima em 280 e 350 nm.

5.2.5. Determinação estrutural das substâncias isoladas das cascas do *B. parinarioides*

5.2.5.1. Determinação estrutural da substância BPS-309

A substância **BPS-309** (2,0 mg) isolada do fracionamento (fluxograma 4, item 4.6.2.3), apresentou-se como sólido amorfo solúvel em metanol. A determinação estrutural foi realizada

com base nas análises de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi realizada a 500 MHz em MeOD (Figura 78).

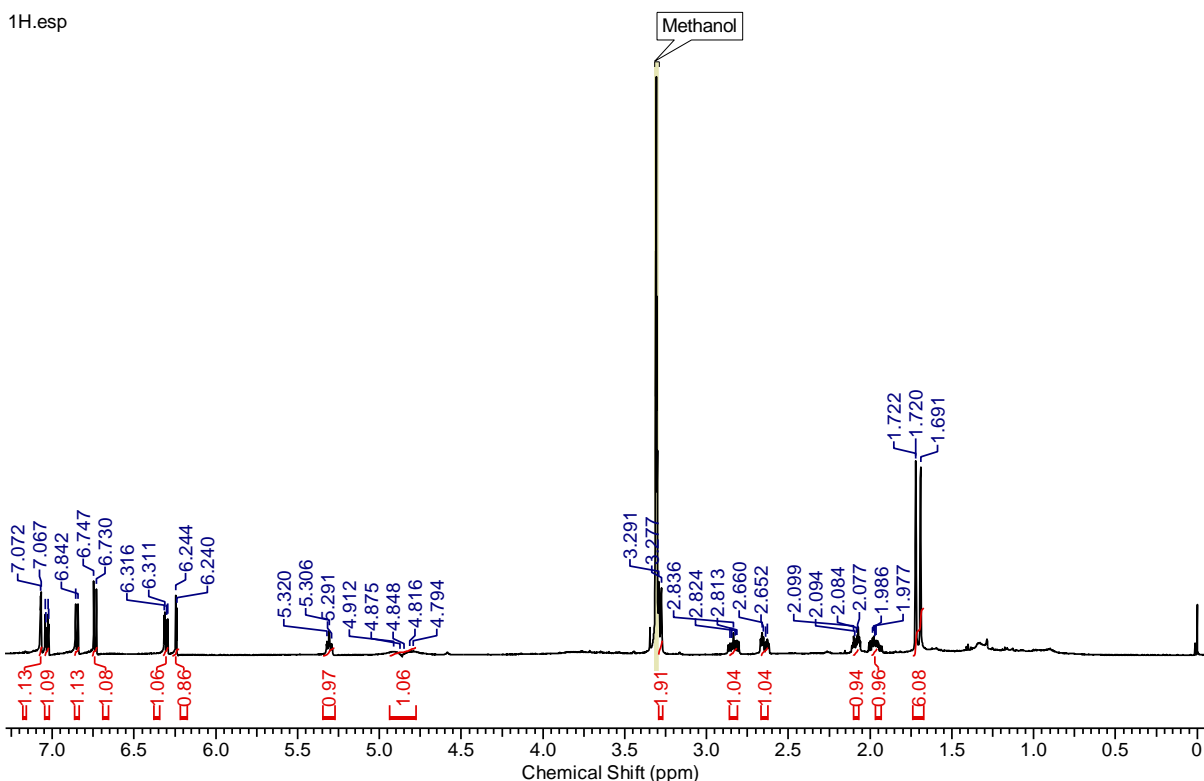
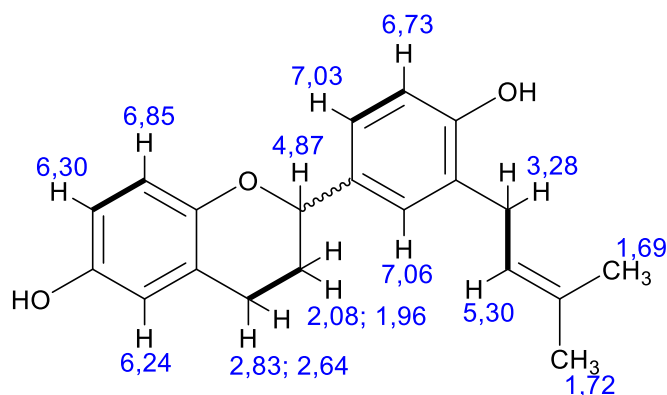


Figura 78. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-309.

De acordo com o espectro de RMN de ^1H da substância **BPS-309**, pode-se observar a presença de sinais na região dos prótons aromáticos com deslocamento químico em δ_{H} 6,24 (*d*, $J= 2,40$ Hz, 1H), δ_{H} 6,30 (*dd*, $J= 8,20$ e $2,40$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,85 (*d*, $J= 8,20$ Hz, 1H) atribuídos aos prótons H-5, H-7 e H-8 respectivamente atribuídos a um anel aromático A. Ainda, foram visualizados os sinais em δ_{H} 7,03 (*dd*, $J= 8,23$ e $2,20$ Hz, 1H), δ_{H} 6,73 (*d*, $J= 8,23$ Hz, 1H) e 7,06 (*d*; $J= 2,20$ Hz; 1H), atribuídos aos prótons H-2', H-3' e H-6' respectivamente atribuídos a um anel aromático B.

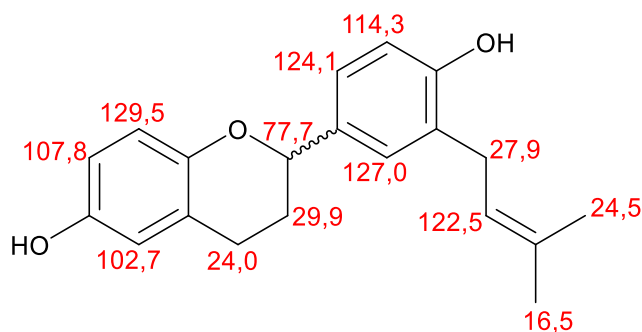
Na região dos prótons alifáticos, pode-se perceber a presença do próton oximetínico do anel C do esqueleto de uma flavana em δ_{H} 4,87 (*m*; 1H), além da presença dos prótons metilênicos em δ_{H} 2,83/2,64 (*m*; 2H) e δ_{H} 2,08/1,96 (*m*, 2H). Notou-se também no espectro a presença de um segmento prenila na estrutura com sinais característicos com deslocamento químico de prótons em δ_{H} 5,30 (*t*; 1H), um próton metilênico em δ_{H} 3,28 (*m*; 2H) e duas metilas em δ_{H} 1,69 (*s*; 3H) e δ_{H} 1,72 (*s*; 3H). O espectro do COSY (Anexo) consolidou os acoplamentos

dos prótons δ_H 6,30 e δ_H 6,85, δ_H 7,03 e δ_H 6,73, δ_H 2,83/2,64 e δ_H 2,08/1,96, δ_H 5,30 e δ_H 3,28 propostos para a substância, abaixo:



No mapa de contorno de HSQC (Figura 79) foi possível visualizar as correlações dos prótons aromáticos em δ_H 6,24 com o carbono em δ_C 102,7 (C-5), δ_H 6,30 com δ_C 107,8 (C-7) e δ_H 6,85 com δ_C 129,5 (C-8), atribuídos ao anel aromático A. Os prótons aromáticos do anel aromático B, apresentaram correlações em δ_H 7,03 com o carbono em δ_C 124,1 (C-2'), δ_H 6,73 com δ_C 114,3 (C-3') e δ_H 7,06 com δ_C 127,0 (C-2').

Na região dos alifáticos, o próton oximetínico em δ_H 4,87 apresentou correlação com o carbono em δ_C 77,7 (C-2) e os metilênicos em δ_H 2,83/2,64 e 2,08/1,96 correlacionaram com os carbonos em δ_C 24,0 (C-4) e δ_C 29,9 (C-1), respectivamente no anel C. Ainda, o segmento prenila foi confirmado pelas correlações dos prótons em δ_H 3,28 com o carbono em δ_C 27,9 (C-1''), δ_H 5,30 com δ_C 122,5 (C-2''), 1,69 com δ_C 24,5 (C-4'') e δ_H 1,72 com δ_C 16,5 (C-5''), abaixo:



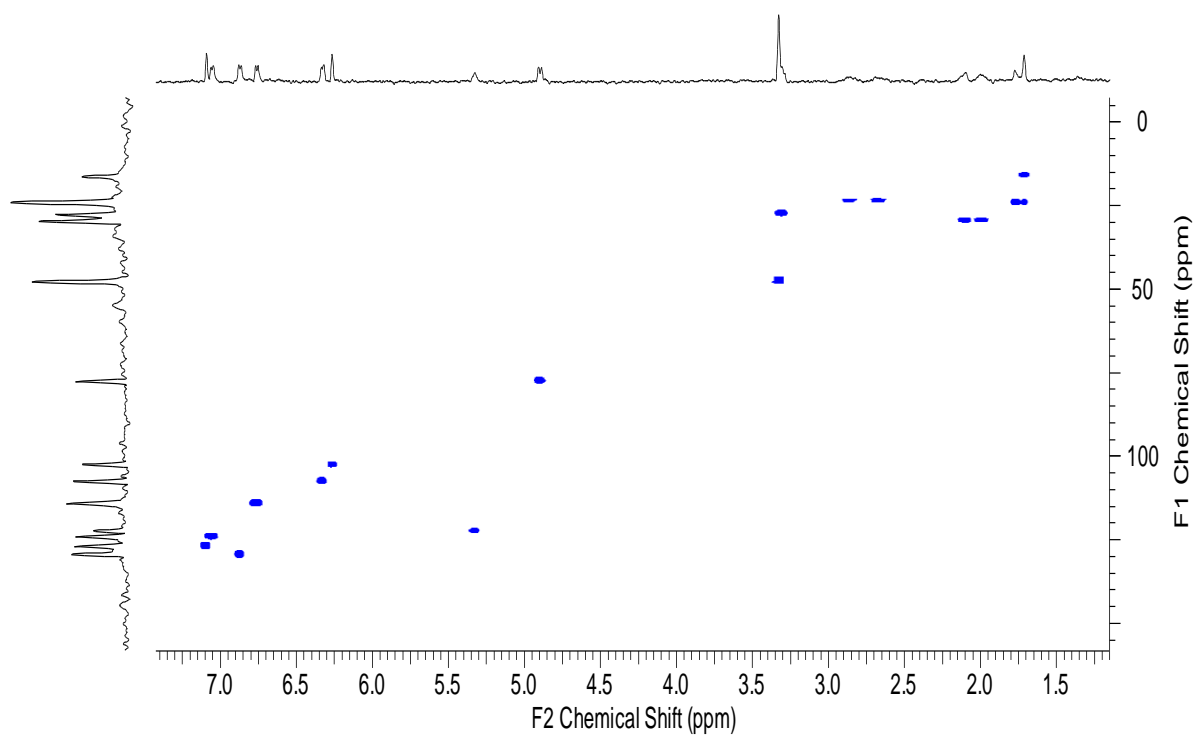


Figura 79. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-309.

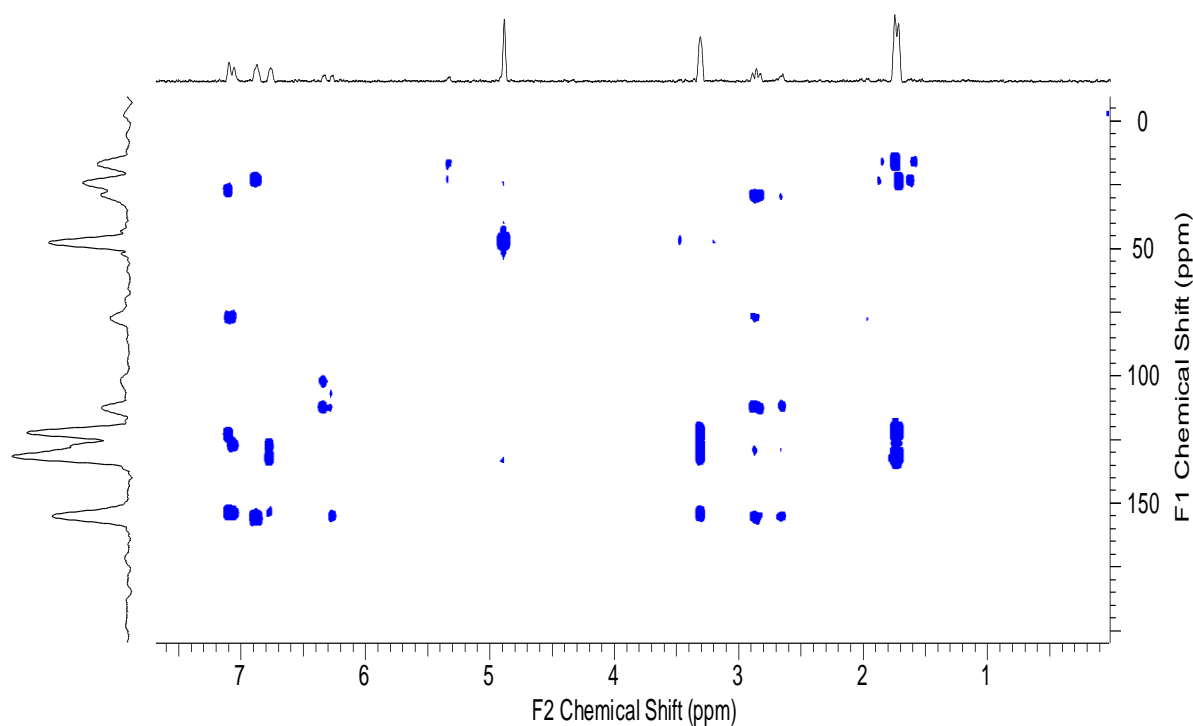
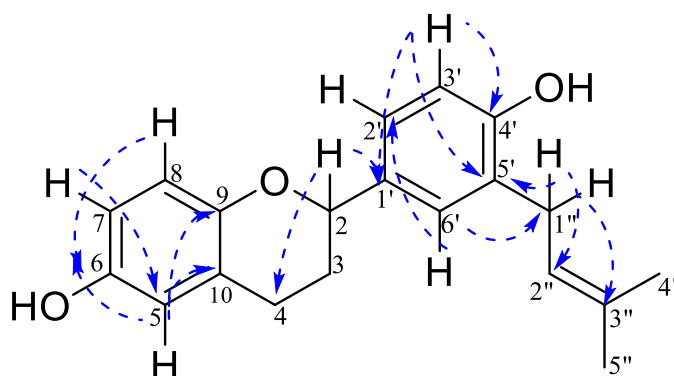


Figura 80. Mapa de contorno HMBC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-309.

Baseado nos dados do mapa de contorno HMBC (Figura 80) foi possível atribuir as principais correlações a longa distância em J^3 do próton aromático em δ_H 6,85 (H-8)

correlacionando com o carbono ligado a hidroxila em δ_c 156,4 (C-6). Ainda, o próton em δ_H 6,24 (H-5) correlacionou com os carbonos em δ_c 155,5 (C-9) e 113,1 (C-10), confirmando assim a presença dos carbonos quaternários do anel aromático A da estrutura. O próton aromático em δ_H 7,03 (H-2') correlacionou em J^3 com os carbonos em δ_c 153,8 (C-4') e 77,7 (C-2) confirmando a presença da hidroxila no anel e a conexão com o anel C da estrutura. O sinal do próton em δ_H 6,73 (H-3') demonstrou correlação com os carbonos em 132,5 (C-1') e 128,0 (C-5') comprovando a presença dos carbonos quaternários do anel aromático B. O sinal em δ_H 4,87 (H-2) apresentou correlação em J^3 com os carbonos em 24,0 (C-4) e 124,1 (C-2') além da correlação em J^2 com o carbono quaternário em 132,5 (C-1') do anel aromático B.

A confirmação da ligação do segmento prenil no anel aromático B, ocorreu pela ocorrência do sinal do próton em δ_H 3,28 (H-1'') correlacionando com o carbono quaternário em 128,0 (C-5'), este sinal de hidrogênio também apresentou correlações com os carbonos em 122,5 (C-2'') e 131,8 (C-3'').



Os dados espectrais de RMN 1D e 2D (Tabela 16), juntamente com a análise por espectrometria de massas (Figura 82), auxiliados com a comparação de dados encontrados na literatura (TORRES et al., 2000 e TAKASHIMA et al., 2005), permitiu na identificação da substância **BPS-309**, como a **4',6-dihidroxi-5-prenil-flavona**, uma substância inédita então denominada **parinarioidina A**, visto que foi isolada da espécie de *B. parinarioides*, Figura 81.

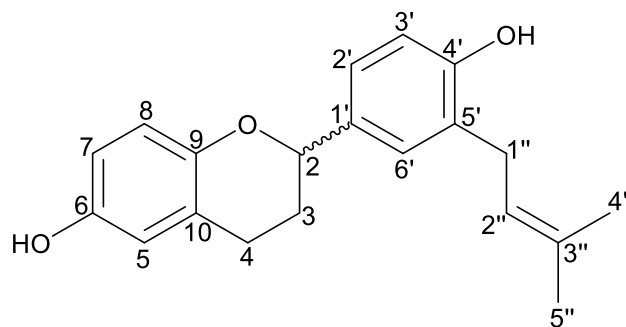


Figura 81. Estrutura da flavana BAS-309.

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BPS-309.

Parinarioidina A				
N ^o	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	δ_{H} (m.; <i>J</i>) ^a	HMBC ^a
1'	132,5	-	-	
2'	124,1	127,9	7,03 (<i>dd</i> ; 8,23 e 2,20), 1H	153,8; 127,0; 77,7
3'	114,3	115,8	6,73 (<i>d</i> ; 8,23), 1H	132,5; 128,0; 153,8
4'	153,8	157,7	-	
5'	128,0	-	-	
6'	127,0	127,9	7,06 (<i>d</i> ; 2,20), 1H	153,8; 124,1; 27,9; 77,7
2	77,7	78,0	4,87 (<i>m</i>), 1H	124,1; 132,5; 24,0
3	29,9	31,1	2,08 (<i>m</i>) e 1,96 (<i>m</i>), 2H	77,7; 24,0
4	24,0	25,6	2,83 (<i>m</i>) e 2,64 (<i>m</i>), 2H	155,5; 113,1; 29,9; 129,5; 77,7
5	102,7	127,3	6,24 (<i>d</i> ; 2,40), 1H	155,5; 107,8; 113,1
6	156,4	-	-	
7	107,8	-	6,30 (<i>dd</i> ; 8,20 e 2,40), 1H	113,1; 102,7
8	129,5	-	6,85 (<i>d</i> ; 8,20), 1H	156,4; 24,0
9	155,5	154,3	-	
10	113,1	113,7	-	
1''	27,9	22,4	3,28 (<i>d</i> ; 7,44), 2H	131,8; 128,0; 122,5
2''	122,5	122,2	5,30 (<i>t</i> ; 7,44), 1H	24,5; 16,5
3''	131,8	134,0	-	
4''	24,5	25,8	1,69 (<i>s</i>), 3H	131,8; 122,5; 16,5
5''	16,5	17,8	1,72 (<i>s</i>), 3H	131,8; 122,5; 24,5

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS.

^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo com TORRES, 2000 (CDCl₃, 75 MHz) e TAKASHIMA, 2005 (Acetona-d, 75 MHz).

A análise por espectrometria de massas de BPS-309, revelou a presença do pico de maior intensidade em m/z 309 $[\text{M}-\text{H}]^-$, Figura 82.

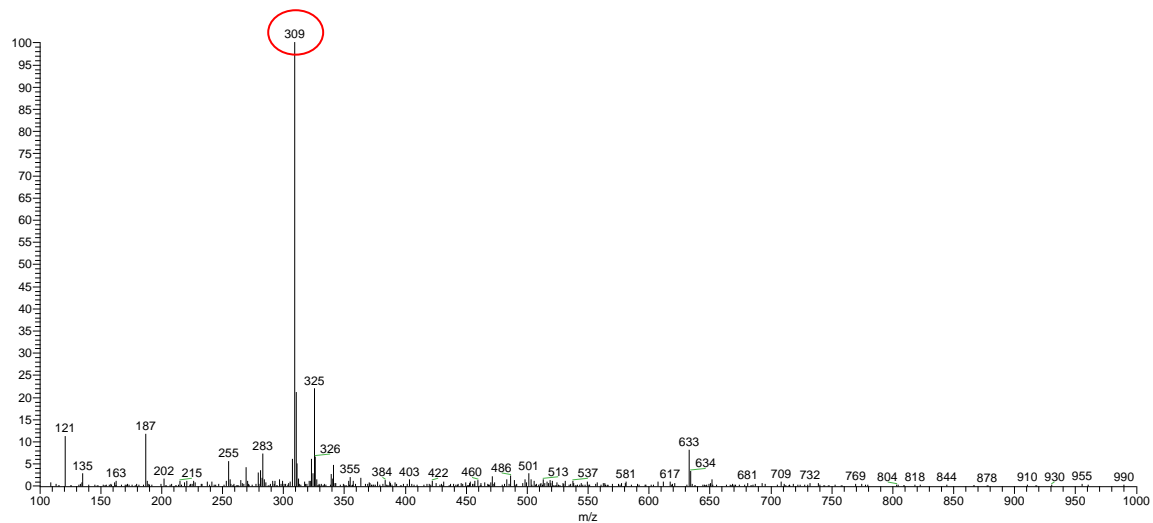


Figura 82. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BPS-309 isolada da casca de *B. parinarioides*.

O íon 309 foi submetido à análise de fragmentação MS^2 , apresentando uma perda de 122 Da, resultando no pico de m/z 187 $[M-H]^-$, com proposta de fragmentação apresentado na Figura 83.

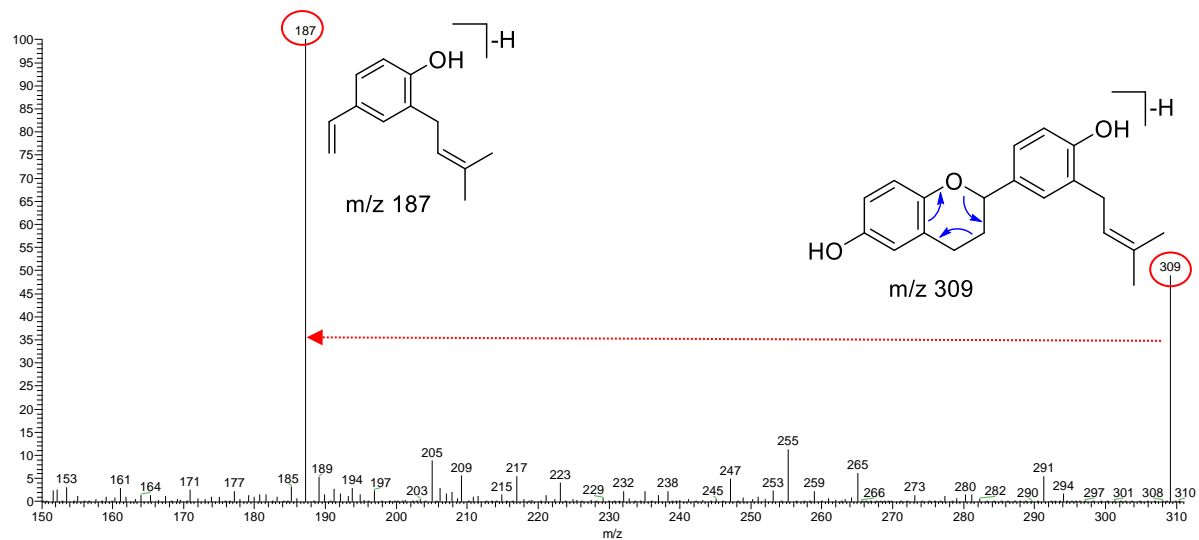


Figura 83. Espectro de MS^2 para o íon 309 $[M-H]^-$ e proposta de fragmentação.

5.2.5.2. Determinação estrutural da substância BPS-339

A substância **BPS-339** (2,0 mg) isolada do fracionamento (Fluxograma 6, item 4.7) apresentou-se como sólido amorfo solúvel em metanol. A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi realizado a 500 MHz em MeOD (Figura 84).

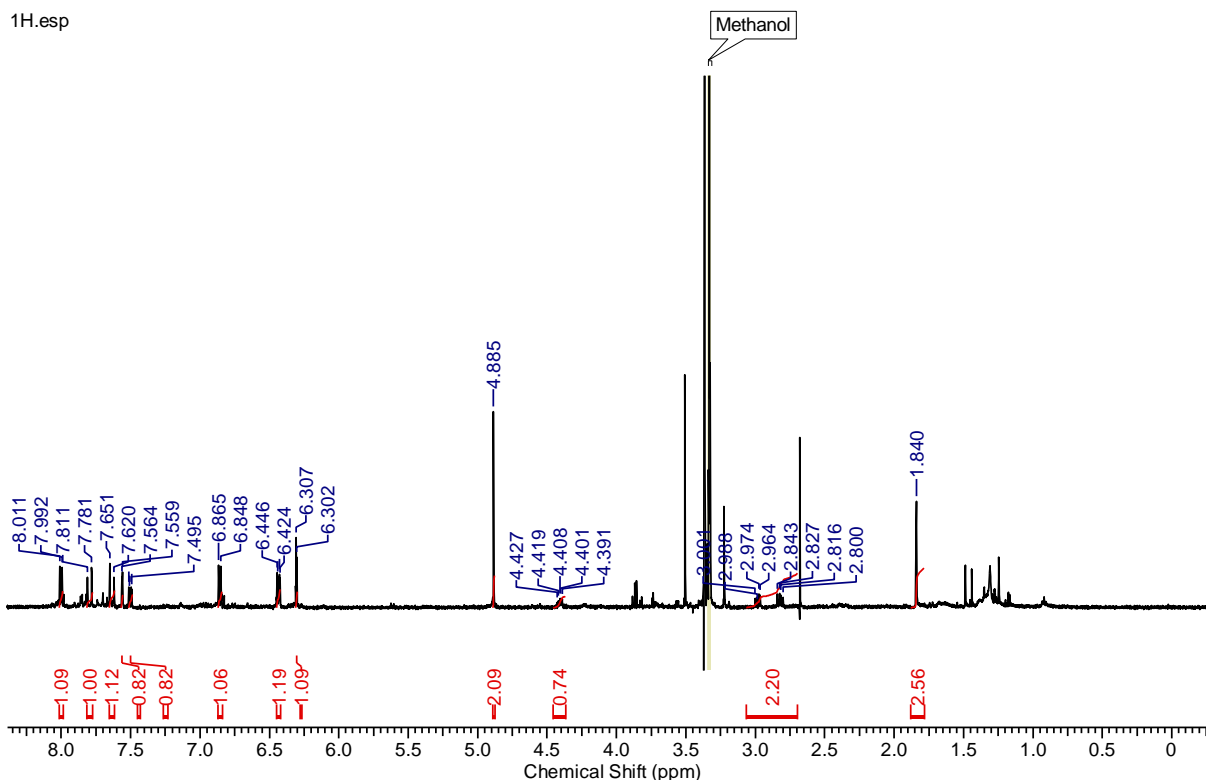


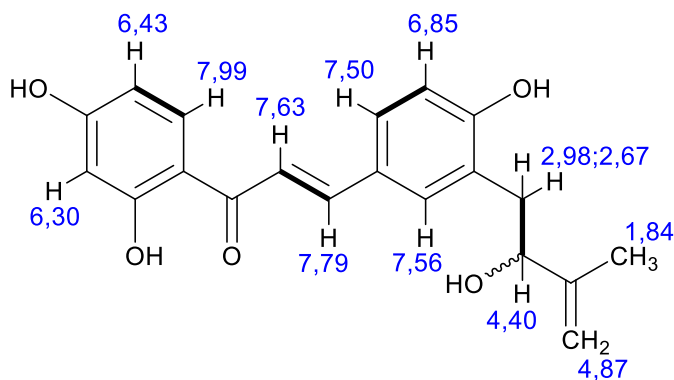
Figura 84. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-339.

No espectro de RMN de ^1H pode-se observar sinais característicos a prótons aromáticos com deslocamento químico em δ_{H} 7,99 (*d*; $J= 8,9$ Hz; 1H), δ_{H} 6,43 (dd, $J= 8,9$ e 2,3 Hz, 1H) e δ_{H} 6,30 (*d*, $J= 2,3$ Hz, 1H) atribuídos aos prótons H-6, H-5 e H-3, respectivamente, de um anel aromático A. Ainda, nessa mesma região foi possível observar os sinais em δ_{H} 7,50 (dd, $J= 8,3$ e 2,0 Hz, 1H), δ_{H} 6,85 (*d*, $J= 8,3$ Hz, 1H) e δ_{H} 7,56 (*d*, $J= 2,0$ Hz, 1H) atribuídos aos prótons H-6', H-5' e H-3', respectivamente, atribuídos a um anel aromático B.

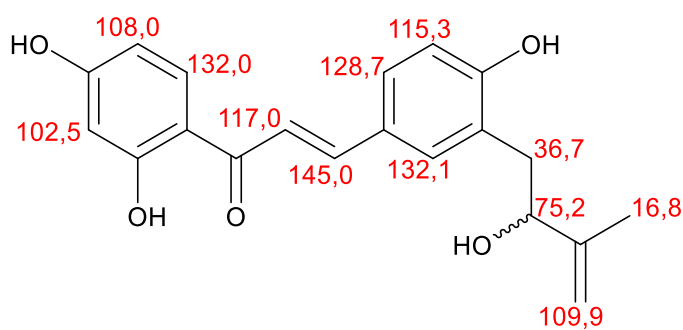
O espectro também apresentou os prótons com deslocamento químico em δ_{H} 7,79 (*d*; 1H) e δ_{H} 7,63 (*d*; 1H), cuja constante de acoplamento (J) igual a 15,0 Hz foi característica aos prótons α , β -insaturado com configuração *trans* característico do esqueleto de uma chalcona.

Na região de campo alto, cujos prótons encontram-se mais protegidos foi possível observar o singlete em δ_{H} 1,84 (*s*), integrando para 6H, atribuídos à presença de duas metilas.

Um multiplete em δ_H 2,98 e 2,67 (*m*; 2H) característicos a prótons geminais metilênicos, além dos prótons em δ_H 4,40 (*s*; 1H) e δ_H 4,88 (*s*; 2H). O espectro do COSY (Anexo) corroborou com os prótons propostos em δ_H 7,99 e 6,43, δ_H 7,79 e 7,63, δ_H 7,50 e 6,85, δ_H 2,98/2,67 e 4,40, conforme a substância, abaixo:



No mapa de contorno de HSQC (Figura 85) foi possível visualizar as correlações em J' dos hidrogênios aromáticos em δ_H 6,43 correlacionando com o carbono em δ_C 108,0 (C-5), δ_H 7,99 com δ_C 132,0 (C-6), δ_H 6,30 com δ_C 102,5 (C-3), δ_H 7,50 com δ_C 128,7 (C-6'), δ_H 6,85 com δ_C 115,3 (C-5'), δ_H 7,56 com δ_C 132,1 (C-2'). Os sinais característicos aos prótons α , β -insaturado em δ_H 7,63 e 7,79 correlacionaram com os carbonos em δ_C 117,0 e 145,0, respectivamente. Ainda, o segmento alifático da estrutura foi confirmado pelas correlações dos hidrogênios em δ_H 2,98 e 2,67 com o carbono em δ_C 36,7 (C-1''), δ_H 4,40 com δ_C 75,2 (C-2''), δ_H 4,88 com δ_C 109,9 (C-5'') e δ_H 1,84 com δ_C 16,8 (C-4''), abaixo:



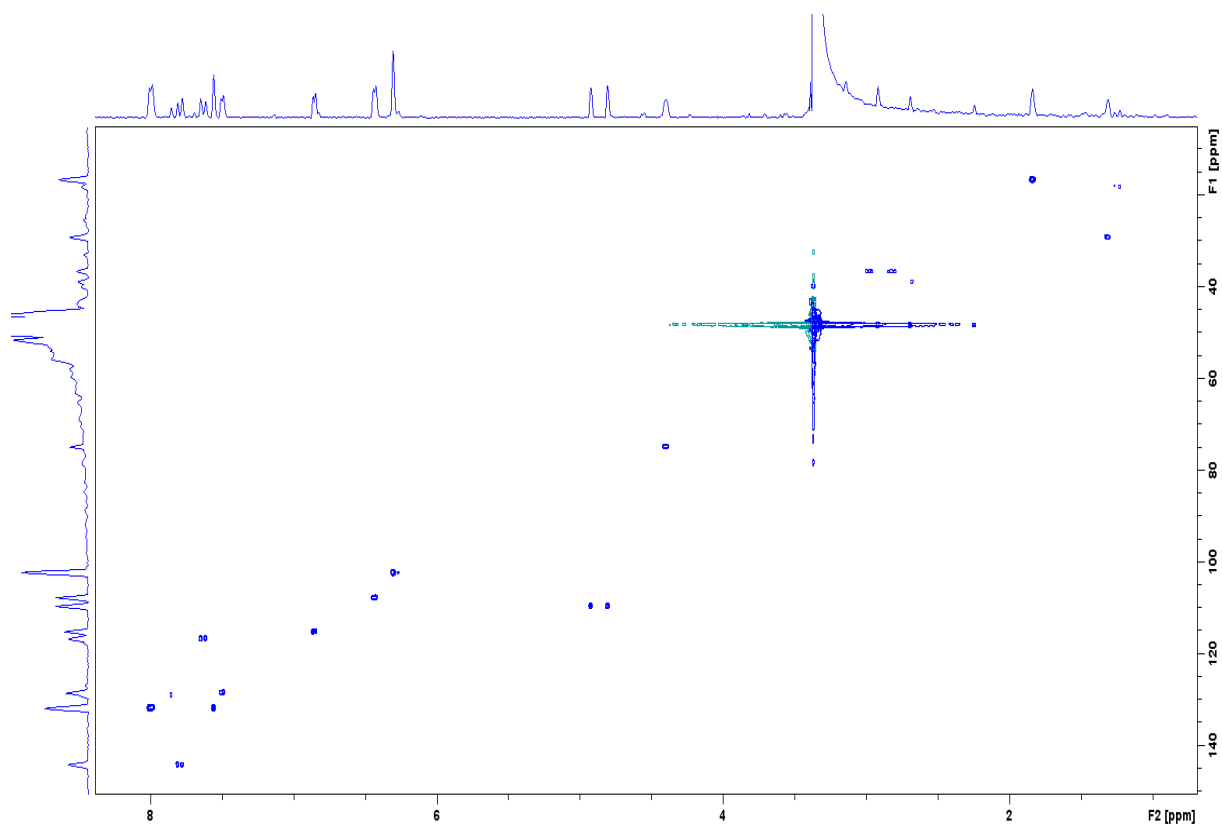


Figura 85. Mapa de contorno HSQC (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-339.

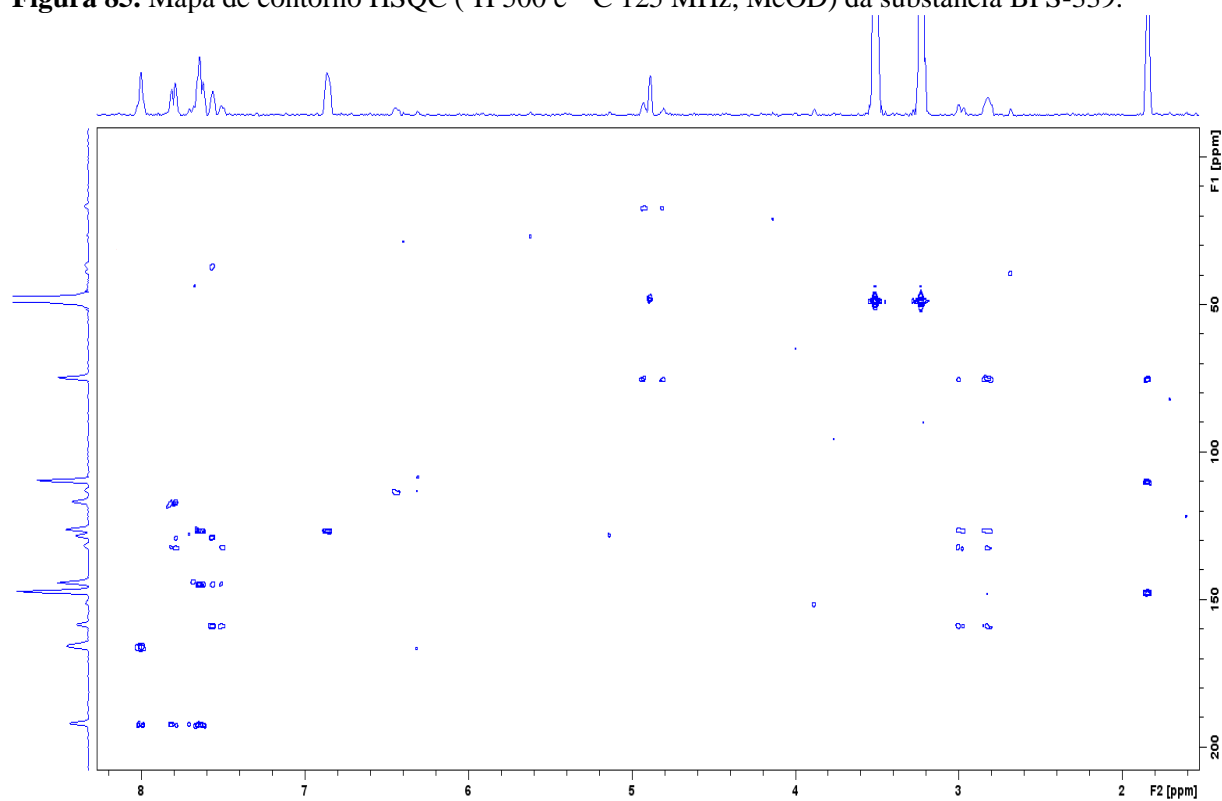
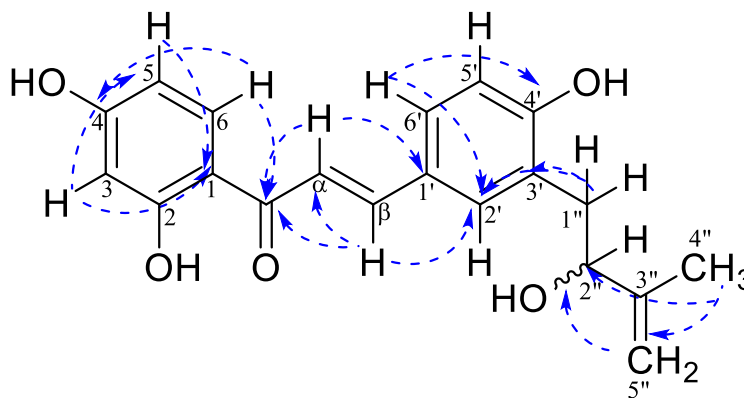


Figura 86. Mapa de contorno HMBC (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-339.

De acordo com o mapa de contorno HMBC (Figura 86) foi possível observar as principais correlações na parte aromática da estrutura, podendo-se destacar as correlações em J^3 dos prótons em δ_H 7,99 (H-6) correlacionando com os carbonos oxidados em δ_C 166,2 (C-4) e 192,2 (C-*), além do próton em δ_H 6,30 (H-3) correlacionando com os carbonos em δ_C 108,0 (C-2) e o carbono quaternário em δ_C 113,5 (C-1), confirmando assim os sinais atribuídos ao anel aromático A. O próton aromático do anel B em δ_H 7,50 (H-6') apresentou correlação em J^3 com o carbono em δ_C 132,1 (C-2') e com o carbono oxidado em δ_C 158,9 (C-4'). Os prótons em δ_H 7,63 (H- α) e 6,85 (H-5') confirmaram a posição do carbono quaternário do anel B, uma vez que correlacionou em J^3 com o carbono em δ_C 126,2 (C-1'). Já o sinal do próton em δ_H 7,56 apresentou correlação em J^3 com os carbonos em δ_C 128,7 (C-6''), δ_C 158,9 (C-4') e δ_C 145,0 (C- β).

A localização do segmento alifático do anel B da estrutura foi confirmada pela presença do sinal em δ_H 2,98/2,67 (H-1'') correlacionando em J^2 com o carbono quaternário em δ_C 126,4 (C-3') e em J^3 com o carbono aromático em 132,1 (C-2'). O sinal em δ_H 4,88 (H-5'') correlacionou em J^3 com o carbono da metila em δ_C 16,8 (C-4''), e os prótons da metila em δ_H 1,84 (CH₃-4'') mostraram correlação com os carbonos em δ_C 75,2 (C-2''), δ_C 147,4 (C-3'') e δ_C 109,9 (C-5'').



Os dados espectrais de RMN 1D e 2D (Tabela 17), juntamente com a análise por espectrometria de massas (Figura 88), auxiliados com a comparação de dados encontrados na literatura (TAKASHIMA et al., 2005; LI et al., 2002), permitiu na identificação da substância **BPS-339**, como **2,4,4'-trihidroxi-5'-(2''-hidroxi-3''-metil-butenil)-chalcona**, denominada **parinarioidina B**, visto que a substância encontrada é inédita e foi isolada da espécie de *B. parinarioides*, Figura 87.

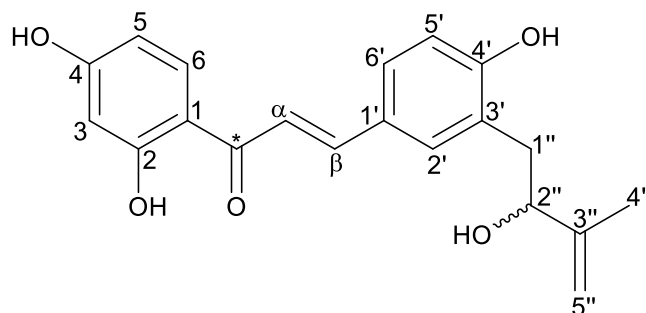


Figura 87. Estrutura da flavana BPS-339.

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BPS-339.

Parinarioidina B				
N ^o	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	δ_{H} (m.; J) ^a	HMBC ^a
1	113,5	-	-	-
2	166,4	-	-	-
3	102,5	165,2	6,30 (<i>dd</i> ; 2,3), 1H	108,0; 113,5; 166,2
4	166,2	130,8	-	-
5	108,0	-	6,43 (<i>dd</i> ; 8,9 e 2,3), 1H	113,5
6	132,0	109,3	7,99 (<i>d</i> ; 8,9), 1H	192,2; 166,2
*	192,2	193,0	-	-
α	117,0	118,3	7,63 (<i>d</i> , 15,3), 1H	126,2; 145,0; 192,2
β	145,0	145,0	7,79 (<i>d</i> , 15,3), 1H	192,2; 117,0; 132,1; 128,7
1'	126,2	127,5	-	-
2'	132,1	131,7	7,56 (<i>d</i> ; 2,0), 1H	128,7; 158,9; 145,0; 36,7
3'	126,4	116,7	-	-
4'	158,9	-	-	-
5'	115,3	-	6,85 (<i>d</i> ; 8,3), 1H	126,4
6'	128,7	131,7	7,50 (<i>dd</i> ; 8,3 e 2,0), 1H	158,9; 132,1; 145,0
1''	36,7	38,9	2,98 (<i>m</i>), 2,67(<i>m</i>)	75,2; 132,1; 158,9; 126,4
2''	75,2	77,1	4,40 (<i>m</i>)	-
3''	147,4	148,5	-	-
4''	16,8	18,3	1,84 (<i>s</i>)	109,9; 147,4; 75,2
5''	109,9	110,7	4,88 (<i>s</i>)	75,2; 16,8

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS. ^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente. ^cDados da literatura de acordo com TAKASHIMA, 2005 (Acetona- d_6 , 75 MHz) e LI, 2002 (Acetona- d_6 , 75 MHz).

A análise por espectrometria de massas de BPS-339, revelou a presença do pico de maior intensidade em m/z 339 $[\text{M}-\text{H}]^-$, Figura 88.

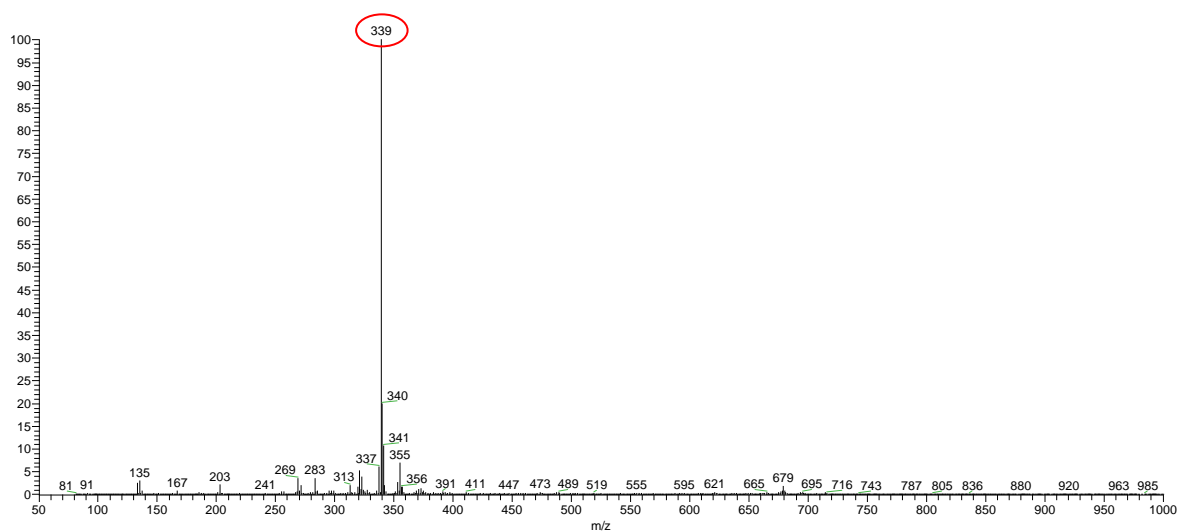
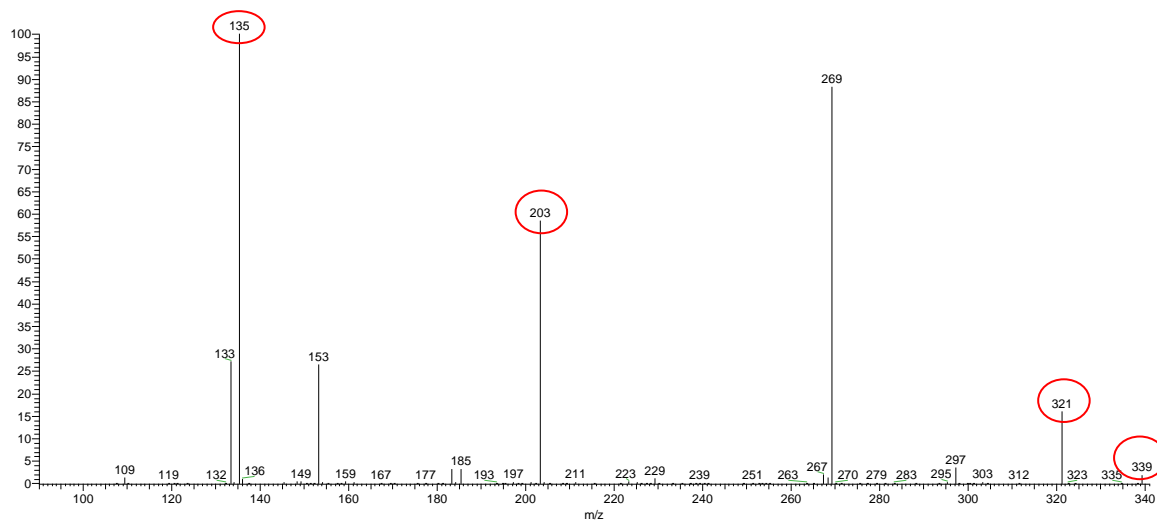


Figura 88. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BPS-339 isolada da casca de *B. parinarioides*.

Este íon foi submetido à análise de fragmentação MS^2 , resultando no espectro com picos de m/z 321, 203, 135 $[M-H]^-$, e então foi realizada a proposta de fragmentação para essa substância, conforme a Figura 89.



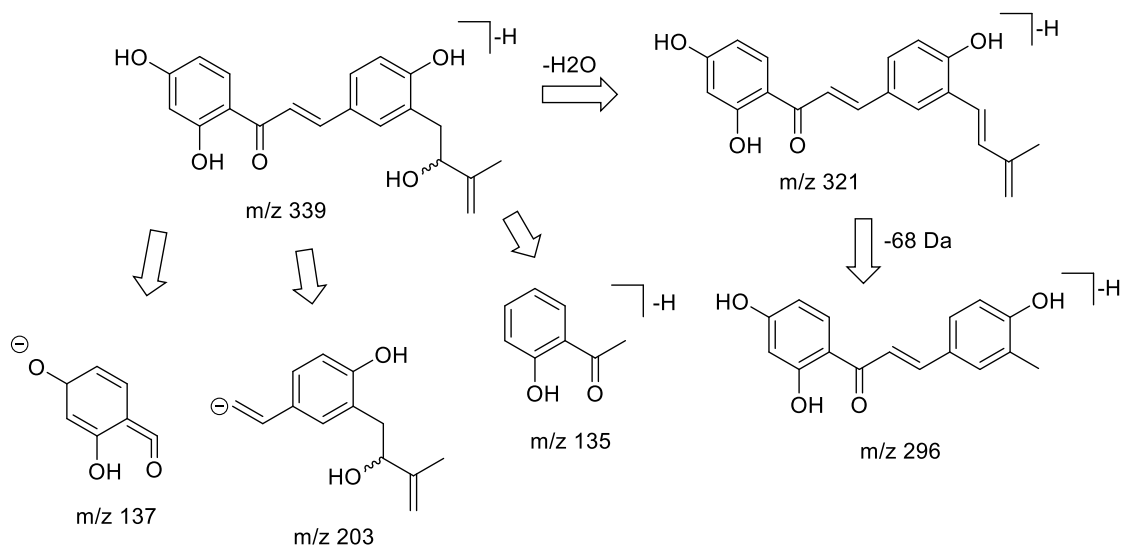


Figura 89. Espectro de MS^2 para o íon 339 $[M-H]^-$ e proposta de fragmentação.

5.2.5.3. Determinação estrutural da substância BPS-323

A substância **BPS-323** (3,5 mg), isolada do fracionamento (Fluxograma 4, item 4.6.2.3) e isolada também do estudo fitoquímico clássico (Fluxograma 6, item 4.7) apresentou-se como sólido amorfo solúvel em metanol. A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi realizado a 500 MHz em MeOD (Figura 90).

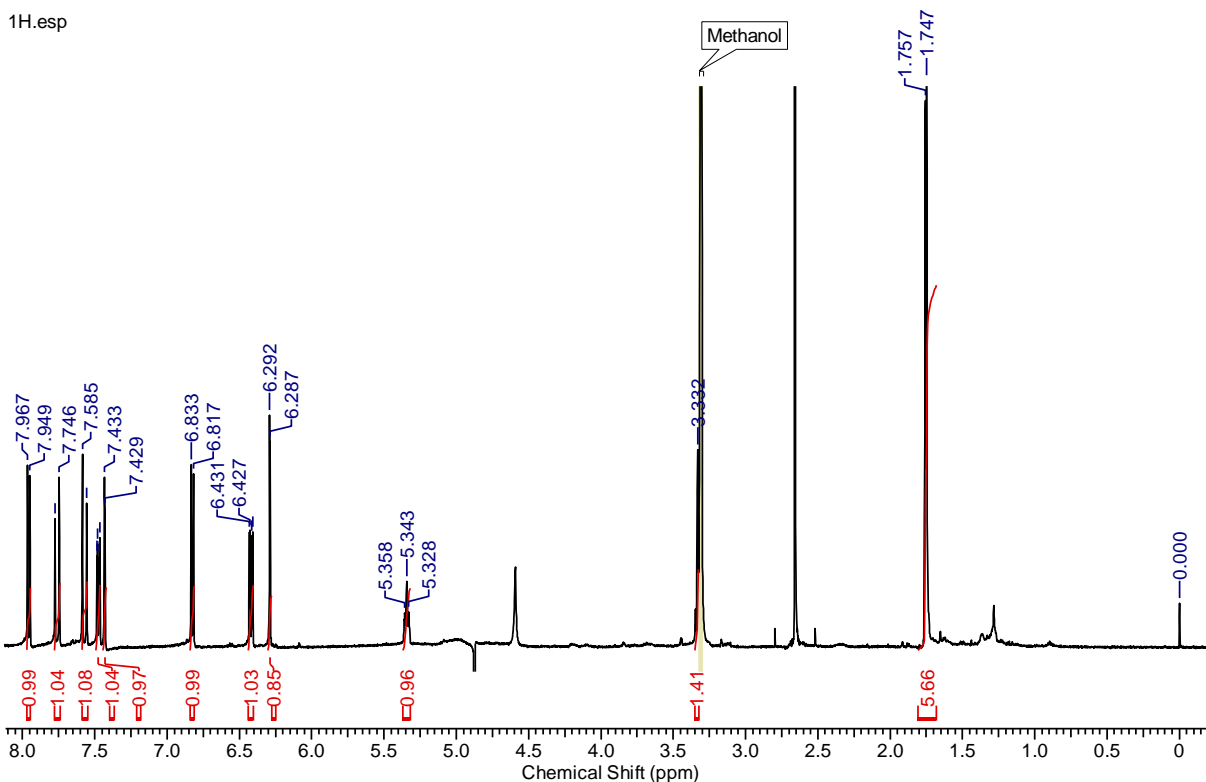
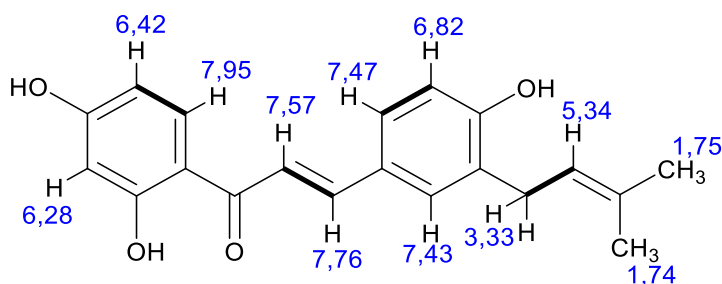


Figura 90. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-323.

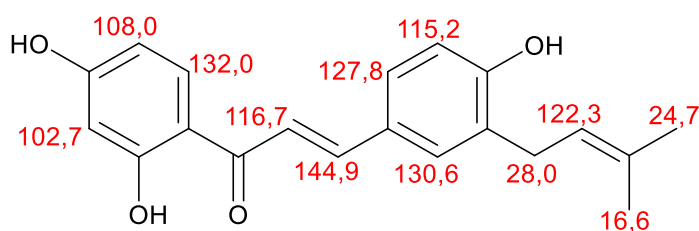
De acordo com a análise do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C obtido do mapa de correlação de HSQC para a substância **BPS-323**, pode-se perceber a semelhança estrutural com a substância **BPS-339**, cujos sinais referem-se ao deslocamento químico de prótons em δ_{H} 7,76 (*d*; 1H) e δ_{H} 7,57 (*d*; 1H) com constante de acoplamento em $J=15,3$ Hz característicos aos prótons α , β -insaturado de uma chalcona.

Observou-se no espectro a presença dos sinais característicos a prótons aromáticos em δ_{H} 7,95 (*d*; $J= 8,9$ Hz; 1H), δ_{H} 6,42 (*dd*, $J= 8,8$ e 2,4 Hz, 1H) e δ_{H} 6,28 (*d*, $J= 2,4$ Hz, 1H) atribuídos aos prótons H-6, H-5 e H-3, respectivamente, anotados a um anel aromático A. Verificou-se também, os sinais em δ_{H} 7,47 (*dd*, $J= 8,5$ e 2,0Hz, 1H), δ_{H} 6,82 (*d*, $J= 8,5$ Hz, 1H) e δ_{H} 7,43 (*d*, $J= 2,0$ Hz, 1H) atribuídos aos prótons H-6', H-5' e H-3', respectivamente anotados

ao anel aromático B. Ainda, na região dos prótons alifáticos foram observados sinais característicos ao segmento prenila com deslocamento químico em δ_H 5,34 (t; 1H), um próton metilênicos em δ_H 3,33 (*m*; 2H) e duas metilas em δ_H 1,74 (*s*; 3H) e δ_H 1,75 (*s*; 3H). O espectro do COSY (Anexo) corroborou com os acoplamentos dos prótons em δ_H 6,42 e 7,95, δ_H 7,57 e 7,76, δ_H 7,47 e 6,82, δ_H 5,34 e 3,33, proposto abaixo:



No mapa de contorno de HSQC (Figura 91) foi possível visualizar as correlações dos prótons aromáticos em δ_H 7,95 correlacionando com o carbono em δ_C 132,0 (C-6), δ_H 6,42 com δ_C 108,0 (C-6), δ_H 6,28 com δ_C 102,7 (C-3), δ_H 7,47 com δ_C 127,8 (C-6'), δ_H 6,82 com δ_C 115,2 (C-5') e δ_H 7,43 com δ_C 130,6 (C-2'), atribuídos ao anel aromático A e B. Os sinais de prótons α , β -insaturado em δ_H 7,76 e 7,57 correlacionaram com os carbonos em δ_C 144,9 e 116,7 respectivamente. Os sinais característicos do segmento prenila foram confirmados pelos deslocamentos em δ_H 3,33 correlacionando com o carbono em δ_C 28,0 (C-1''), δ_H 5,34 com δ_C 122,3 (C-2''), δ_H 1,75 com δ_C 24,7 (C-4'') e δ_H 1,74 (C-5''), com δ_C 16,6; abaixo:



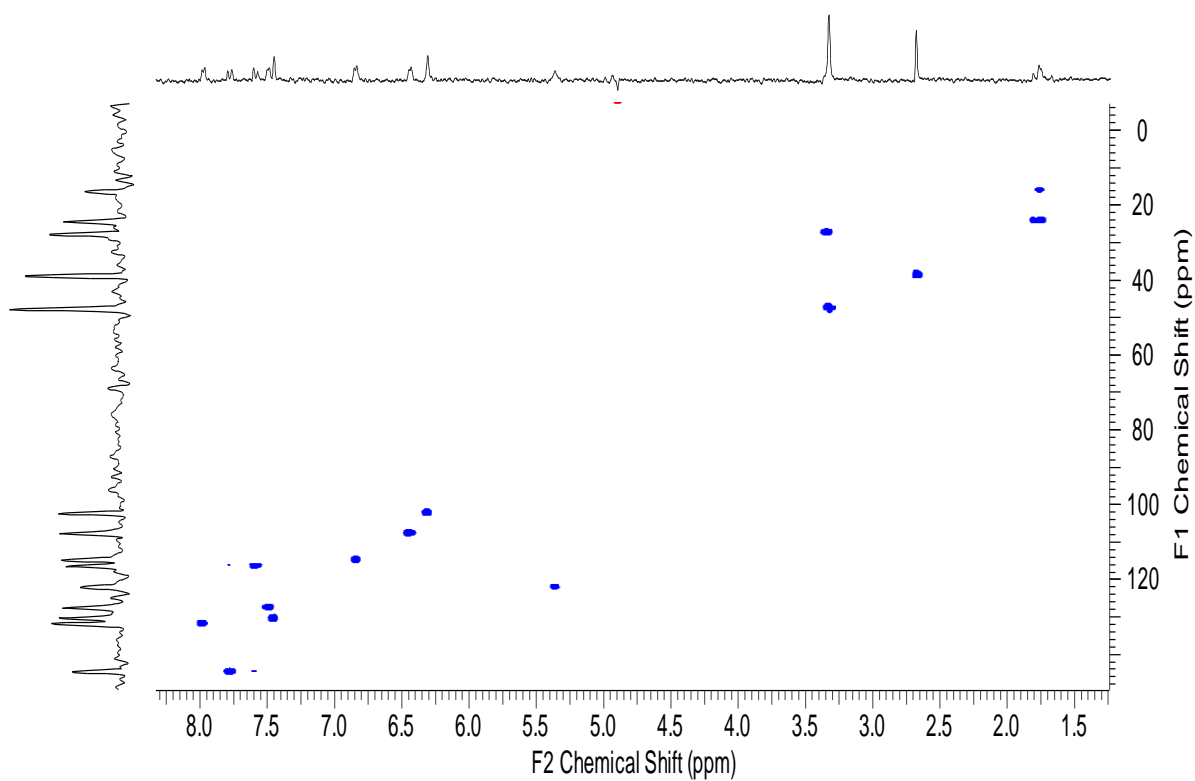


Figura 91. Mapa de contorno HSQC (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-323.

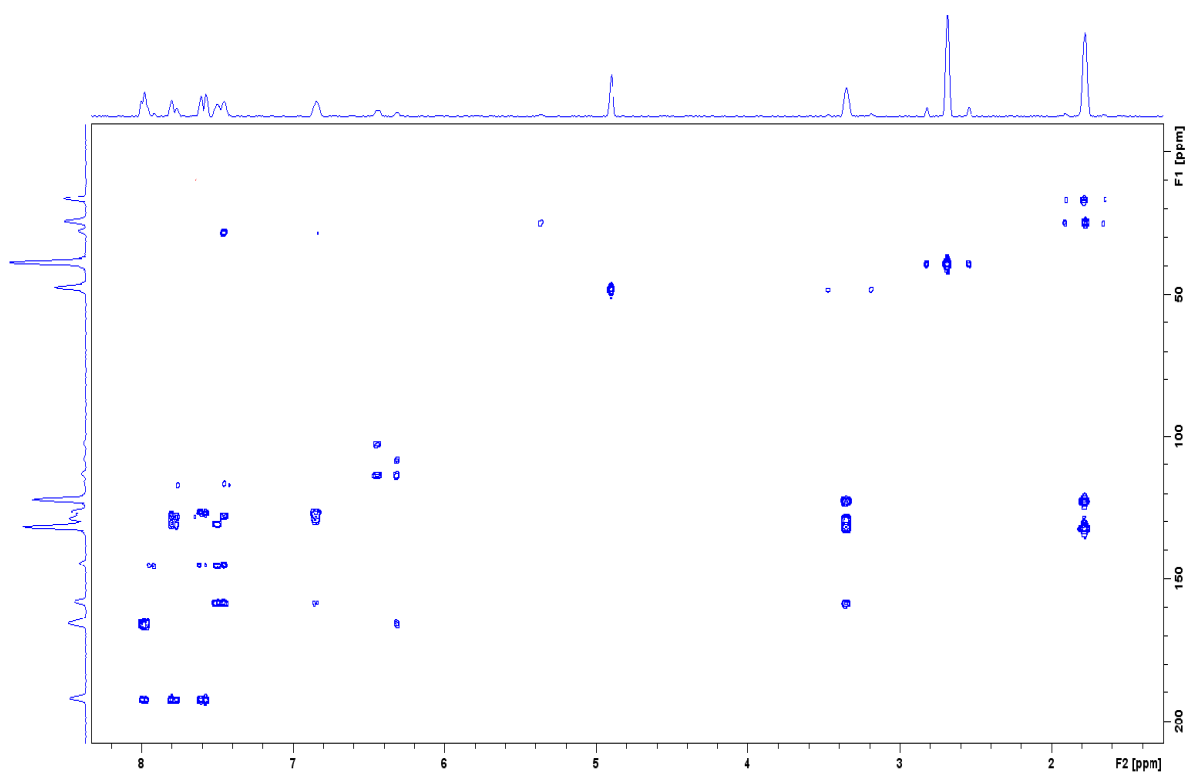
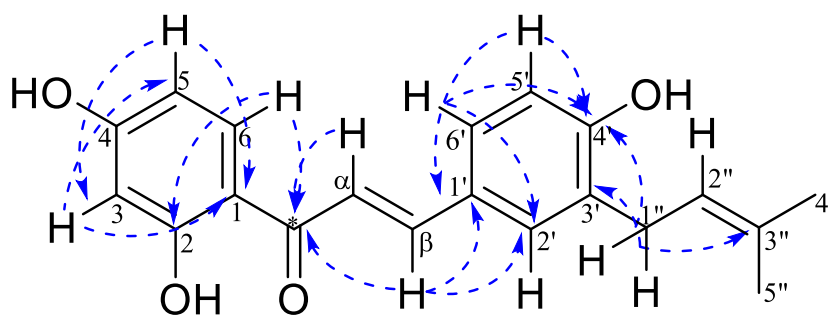


Figura 92. Mapa de contorno HMBC (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-323.

Atraves do mapa de contorno de HMBC (Figura 92) foi possível visualizar as correlações a longa distancia na estrutura, podendo-se destacar as correlações em J^3 dos prótons em δ_H 6,42 (H-5) correlacionando com o carbono em δ_C 102,7 (C-3) e com o carbono quaternário em 113,2 (C-1). Além disso, o próton em δ_H 7,95 (H-6) apresentou correlação J^3 com os carbonos oxidados em δ_C 166,2 (C-2) e δ_C 192,2 (C-*). O sinal do próton em δ_H 6,28 (H-3) mostrou correlação em J^3 com os carbonos em δ_C 108,0 (C-5), δ_C 113,2 (C-1) e em J^2 com o carbono oxidado em δ_C 165,6 (C-4), confirmando assim as correlações atribuídas no anel aromático A.

Na parte aromática atribuída ao anel B, foi possível visualizar as principais correlações em J^3 para o próton em δ_H 7,47 (H-6') correlacionando com os carbonos em δ_C 144,9 (C- β) e δ_C 130,6 (C-2'') e com o carbono da hidroxila em δ_C 158,0 (C-4'). O próton em δ_H 6,82 (H-5') demonstrou correlação com os carbonos quaternários em δ_C 128,0 (C-1') e δ_C 129,0 (C-3'). A localização da prenila no anel aromático B foi confirmada pela presença do sinal em δ_H 3,33 (H-1'') correlacionando em J^2 com o carbono quaternário em δ_C 129,0 (C-3') e em J^3 com o carbono ligado a hidroxila em 158,0 (C-2''). Ainda, os principais sinais observados na prenila referem-se ao sinal do próton em δ_H 5,34 (H-2'') em que correlacionam em J^3 com os carbonos das metilas em δ_C 24,7 (C-4'') e 16,6 (C-5''). Já, os prótons das metilas em δ_H 1,74 (CH₃-5'') e 1,75 (CH₃-4'') mostraram correlação com os carbonos em δ_C 122,4 (C-2'') e com o carbono quaternário em δ_C 132,0 (C-3'') como pode ser visto abaixo:



Os dados espectrais de RMN 1D e 2D (Tabela 18), em conjunto com a análise por espectrometria de massas (Figura 94), auxiliados com a comparação de dados encontrados na literatura (TORRES et al., 2000 e TAKASHIMA et al., 2005), permitiu na identificação da substância **BPS-323** como **2,4,4' trihidroxi-3'-prenil-chalcona**, denominada como **licoagrachalcona**, Figura 93.

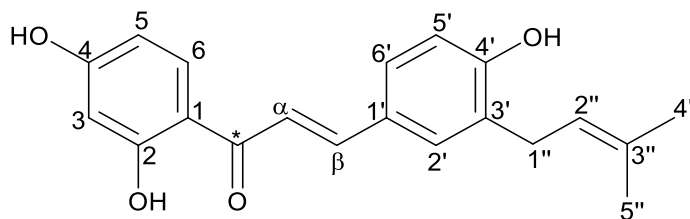


Figura 93. Estrutura da chalcona BPS-323.

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BPS-323.

Licoagrachalcona				
N ^o	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	δ_{H} (m.; <i>J</i>) ^a	HMBC ^a
1	113,2	114,0	-	
2	165,9	166,3	-	
3	102,7	103,5	6,28 (<i>d</i> ; 2,4), 1H	113,2; 108,0; 165,6
4	165,6	163,6	-	
5	108,0	107,9	6,42 (<i>dd</i> ; 8,9 e 2,4), 1H	113,2; 102,4
6	132,0	131,8	7,95 (<i>d</i> ; 8,9), 1H	165,6; 166,2; 192,2
*	192,2	192,0	-	
α	116,7	117,5	7,57 (<i>d</i> ; 15,3), 1H	192,2; 128,0
β	144,9	144,7	7,76 (<i>d</i> ; 15,3), 1H	192,2; 130,6; 127,8
1'	128,0	127,9	-	
2'	130,6	127,9	7,43 (<i>dd</i> ; 8,25 e 2,07), 1H	158,0; 127,8; 144,9
3'	129,0	130,8	-	
4'	158,0	157,0	-	
5'	115,2	116,1	6,82 (<i>d</i> ; 8,25), 1H	129,0; 128,0; 158,0
6'	127,8	128,2	7,47 (<i>d</i> ; 2,07), 1H	158,0; 144,9; 130,6; 128,0
1''	28,0	29,3	3,33 (<i>m</i>), 2H	158,0; 132,0; 122,3; 129,0
2''	122,3	121,3	5,34 (<i>t</i>), 1H	24,7; 16,6
3''	132,0	135,0	-	
4''	24,7	25,8	1,75 (<i>s</i>), 3H	24,7; 122,4
5''	16,6	17,9	1,74 (<i>s</i>), 3H	16,9; 132,0

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS.

^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo com TORRES, 2000 (CDCl_3 , 75 MHz) e TAKASHIMA, 2005 (Acetona-*d*, 75 MHz).

A análise por espectrometria de massas de BPS-323, revelou a presença do pico de maior intensidade em m/z 323 $[\text{M}-\text{H}]^-$, Figura 94.

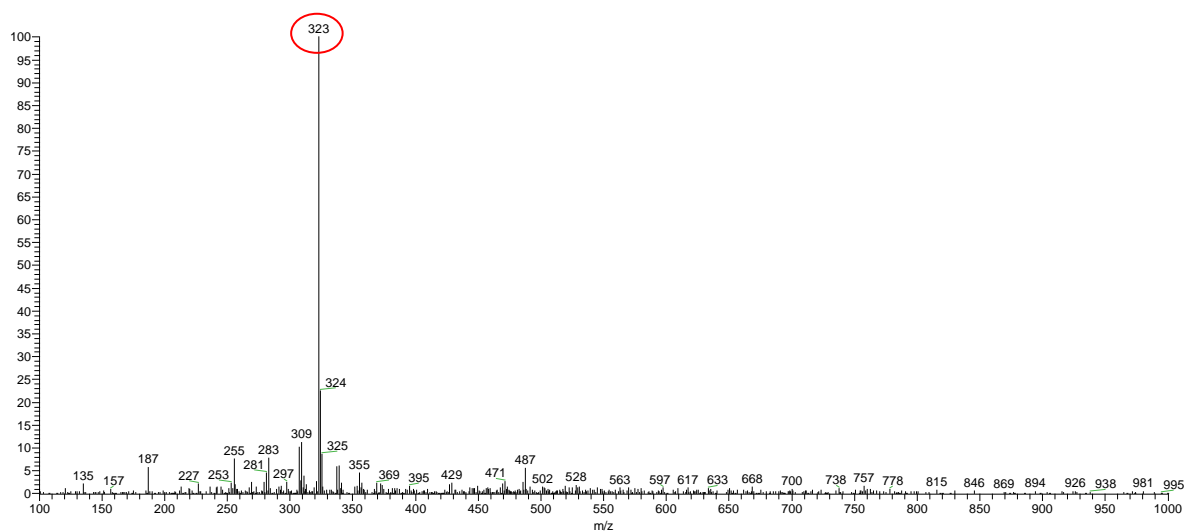


Figura 94. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BPS-323 isolada da casca de *B. parinarioides*.

O íon 323 foi submetido à análise de fragmentação MS^2 , revelando perda de 188 Da, resultando no pico de m/z 135 $[M-H]^-$ e perda de 136 Da, com pico de m/z 187 $[M-H]^-$ com proposta de fragmentação apresentado na Figura 95.

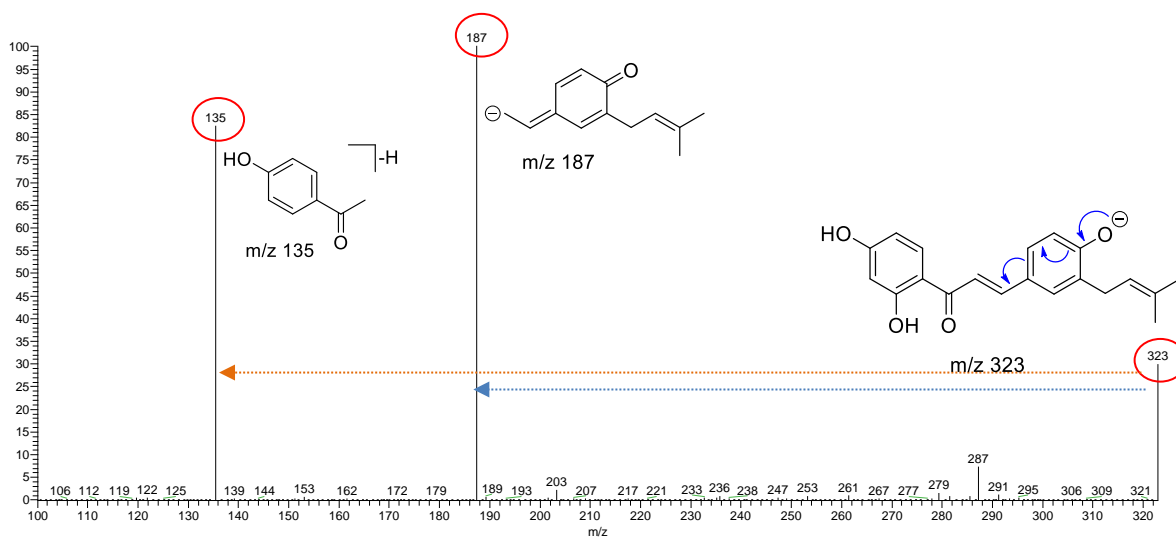


Figura 95. Espectro de MS^2 para o íon 323 $[M-H]^-$ e proposta de fragmentação.

5.2.5.4. Determinação estrutural da substância BPS-291

A substância **BPS-291** (1,2 mg) isolada do fracionamento (fluxograma 4, item 4.6.2.3) apresentou-se como sólido amorfo solúvel em metanol. A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi realizada a 500 MHz em MeOD (Figura 96).

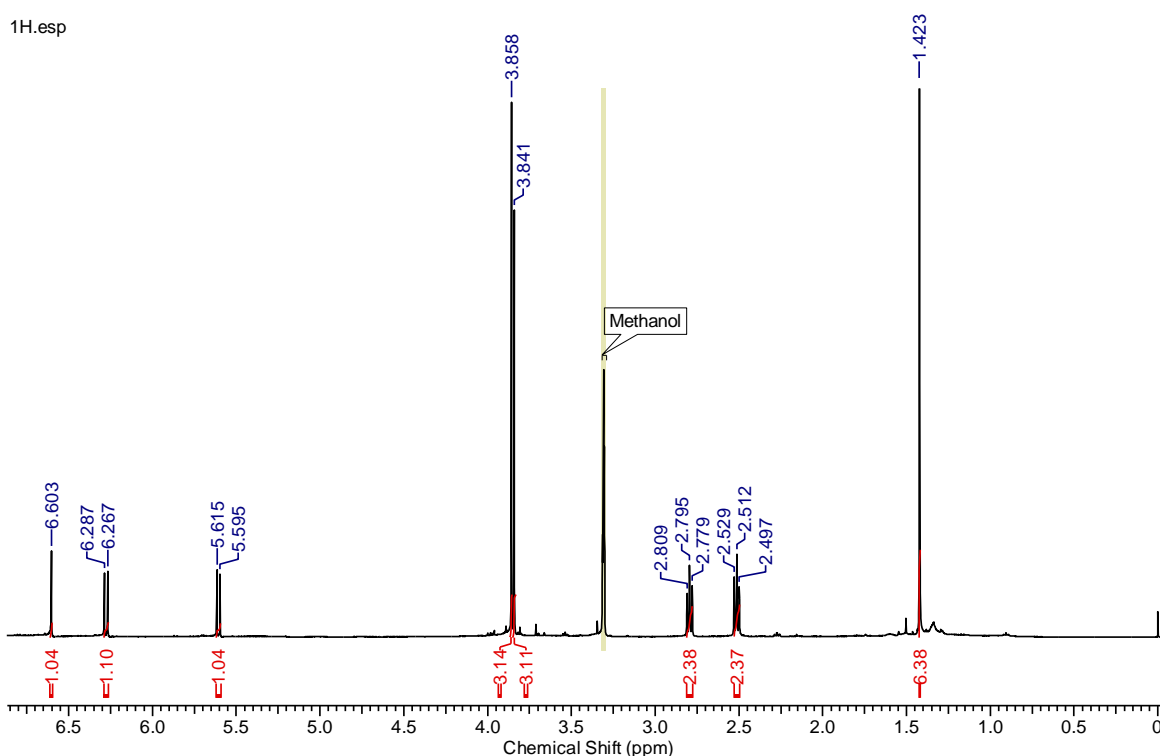
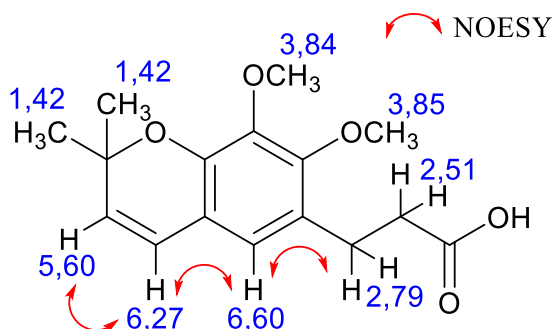


Figura 96. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-291.

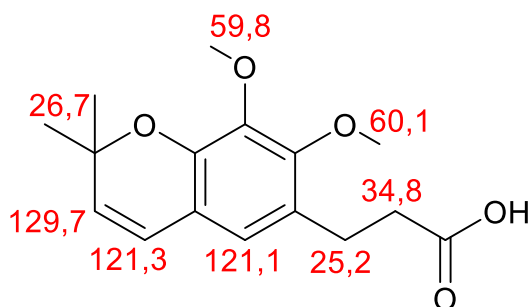
No espectro de RMN de ^1H para substância **BAS-291**, pode-se observar a presença de um sinal aromático referente ao próton com deslocamento químico em δ_{H} 6,60 (*s*; 1H). Assim como a presença dos prótons olefínicos do tipo vicinal em δ_{H} 6,27 (*d*; $J= 9,8$ Hz; 1H) e 5,60 (*d*; $J= 9,8$ Hz; 1H).

Na região dos prótons alifáticos, pode-se perceber a presença de dois singletos em δ_{H} 3,84 (*s*, 3H) e 3,84 (*s*, 3H), atribuídos a presença de duas metoxilas na estrutura, além de dois sinais característicos a prótons metilênicos em δ_{H} 2,79 (*t*, 2H) e 2,51 (*t*; 2H), além de duas metilas em δ_{H} 1,42 (*s*; 6H). O experimento de NOESY (Anexo) consolidou o acoplamento de alguns prótons chaves propostas na estrutura, como exemplo o sinal do próton irradiado seletivamente em δ_{H} 6,60 apresentou um efeito NOE positivo com os sinais em δ_{H} 6,27 e δ_{H}

2,79. Ainda, o próton irradiado em δ_H 6,27 apresentou o efeito NOE positivo com os sinais em δ_H 6,60 e δ_H 5,60, como proposto abaixo:



No mapa de contorno de HSQC (Figura 97) foi possível visualizar a correlação do próton aromático em δ_H 6,60 com o sinal do carbono em δ_C 121,1 (C-5). Observou-se a correlação dos prótons olefínicos em δ_H 6,27 e 5,60 com os carbonos em δ_C 121,3 (C-4) e 29,7 (C-3), respectivamente. O sinal da metoxila em δ_H 3,85 demonstrou correlação com o carbono em δ_C 60,1 (C-7-OCH₃) e a outra em δ_H 3,84 correlacionou com δ_C 59,8 (C-8-OCH₃). Ainda, próximo dessa região os sinais referentes aos prótons metilênicos em δ_H 2,79 e 2,51 correlacionaram com os carbonos em δ_C 25,2 (C-3') e 34,8 (C-2'), respectivamente, além disso, o sinal da metila em δ_H 1,42 apresentou correlação com o carbono em δ_C 26,7 (C-2), sugerindo os deslocamentos químicos de sinais de carbono propostos conforme abaixo:



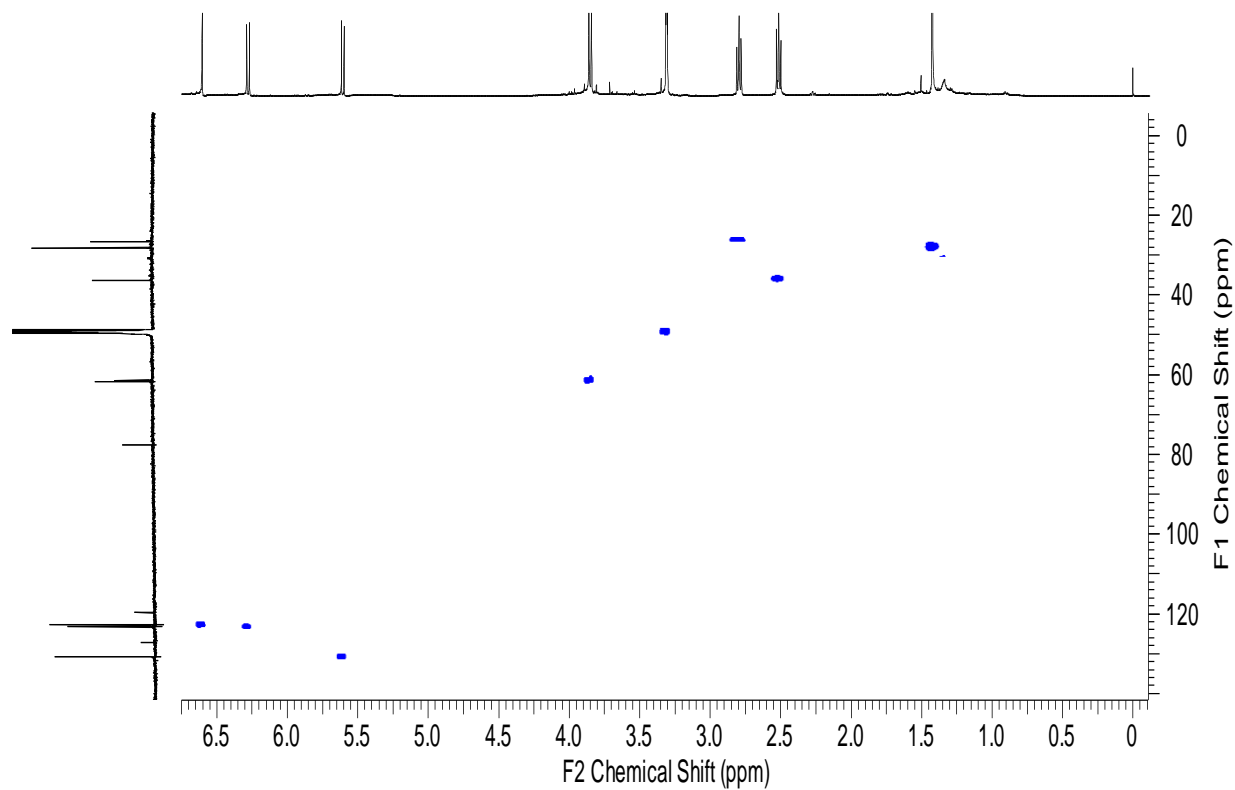


Figura 97. Mapa de contorno HSQC (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-291.

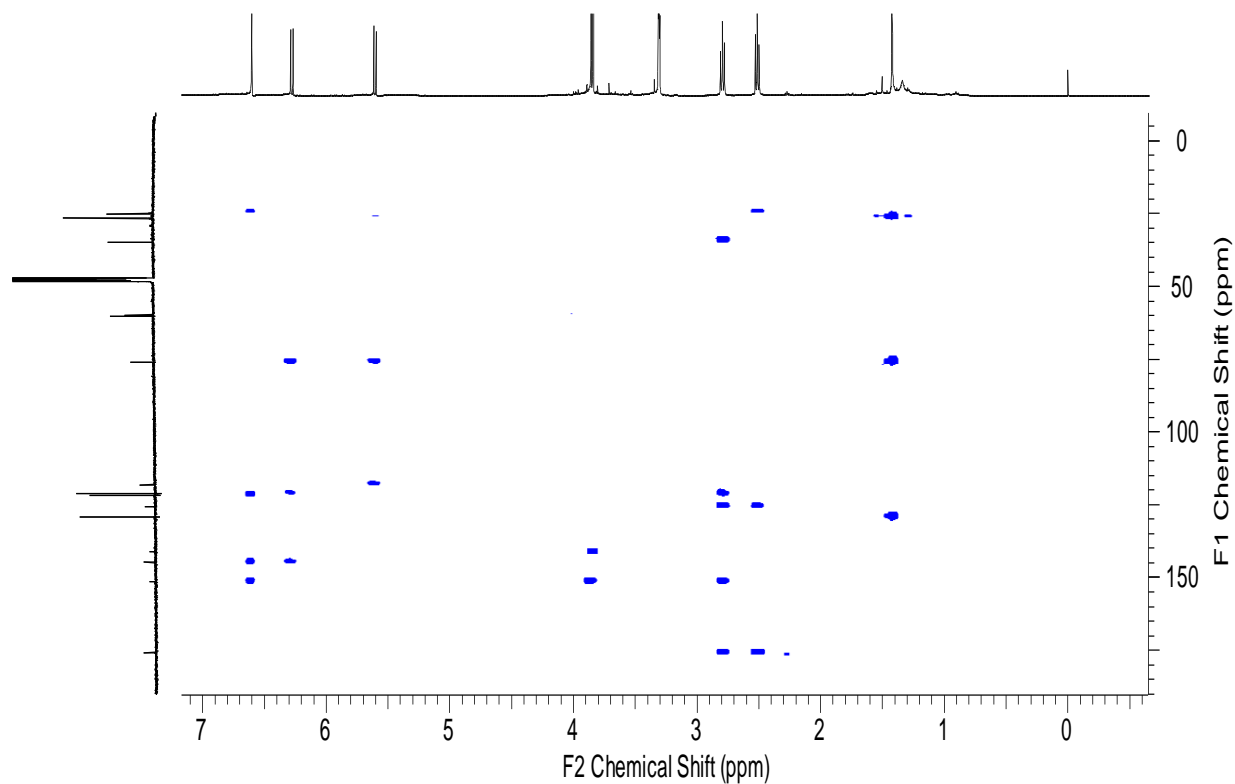
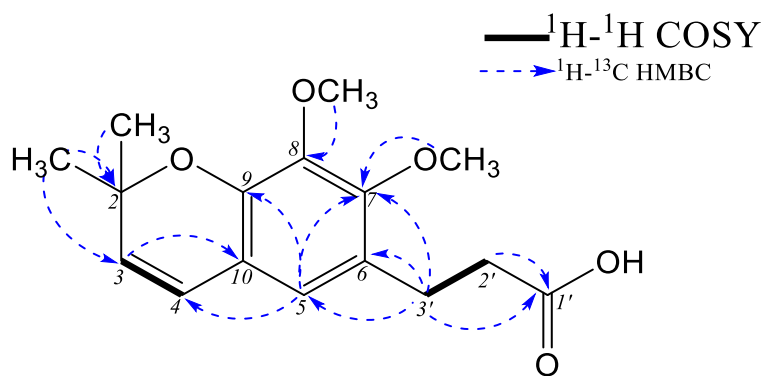


Figura 98. Mapa de contorno HMBC (^1H 500 e ^{13}C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-291.

No mapa de contorno de HMBC (Figura 98), pode-se observar as correlações dos prótons metileno em δ_H 2,51 (H-2') e 2,79 (H-3') com o carbono em δ_C 175,8 (C-1') confirmando a existência de uma unidade de ácido propanoico na estrutura. As correlações observadas do próton em δ_H 2,79 (H-3') correlacionou com os carbonos em δ_C 121,2 (C-5), 125,6 (C-6) e 151,3 (C-7) confirmando que a unidade do ácido propanoico estava ligada ao anel aromático em C-6.

Os sinais de metoxilas em δ_H 3,84 (OCH₃-8) e 3,85 (OCH₃-7) mostraram correlações com os carbonos em δ_C 141,2 (C-8) e 151,3 (C-7), respectivamente. Por outro lado, o sinal aromático em δ_H 6,60 (H-5) apresentou correlações com os carbonos δ_C 151,3 (C-7) e 141,4 (C-8) indicando que os grupos metoxilas estão localizados em C-8 e C-7 no anel aromático. Além disso, o próton em δ 6,60 (H-5) também apresentou correlações com os carbonos δ_C 144,8 (C-9) e 121,7 (C-4), sugerindo a presença de uma ligação carbono-oxigênio e grupo vinil na estrutura. O sinal dos prótons da metila em δ_H 1,42 (CH₃-2) exibiu correlação com os carbonos em δ_C 76,0 (C-2) e 129,2 (C-3), o que confirmou a presença de uma estrutura semelhante ao benzopirano. Finalmente, o próton em δ_C 5,60 (H-3) apresentou correlação com os carbonos em δ_C 144,8 (C-9) e 118,1 (C-10).



Os dados espectrais de RMN 1D e 2D (Tabela 19), em conjunto com a análise por espectrometria de massas (Figura 100), auxiliados com a comparação de dados encontrados na literatura (BRAGA, et al, 2012; CORRÊA, et al, 1975), permitiu na identificação da substância **BPS-291** como **7,8-dimetoxy-2,2-dimetil-1-benzopirona-6-ácido propanoico**, uma substância inédita, também denominada como **parinarioidina C**, por ter sido isolada da espécie de *B. parinarioides*, Figura 99.

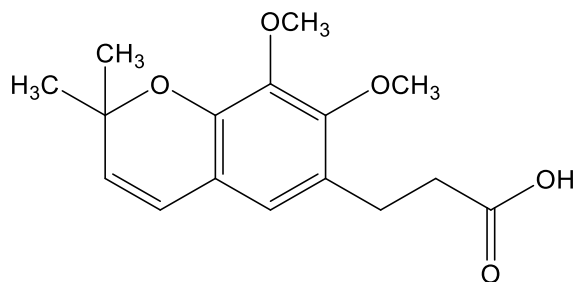


Figura 99. Estrutura derivada do ácido hidrocinâmico BPS-291.

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BPS-291.

Parinarioidina C			
N ^o	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	δ_{H} (m.; J) ^a	HMBC ^a
2	76,0	-	-
3	129,7	5,60 (<i>d</i> ; 9,8), 1H	118,2; 26,7; 76,0
4	121,3	6,27 (<i>d</i> ; 9,8), 1H	76,0; 144,8; 121,1
5	121,1	6,60 (<i>s</i>), 1H	121,3; 151,3; 144,8; 25,2
6	125,7	-	-
7	151,3	-	-
8	141,4	-	-
9	144,8	-	-
10	118,2	-	-
1'	175,8	-	-
2'	34,8	2,51 (<i>t</i> ;-), 2H	125,7; 175,8; 25,2
3'	25,2	2,79 (<i>t</i> ; -), 2H	121,1; 151,3; 125,7; 175,8; 34,8
CH₃	26,7	1,42 (<i>s</i>), 6H	76,0; 129,7
OCH₃	59,8	3,84 (<i>s</i>), 3H	141,4
OCH₃	60,1	3,85 (<i>s</i>), 3H	151,3

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS.

^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

A análise por espectrometria de massas de BPS-291, revelou a presença do pico de maior intensidade em m/z 291 $[\text{M}-\text{H}]^-$, Figura 100.

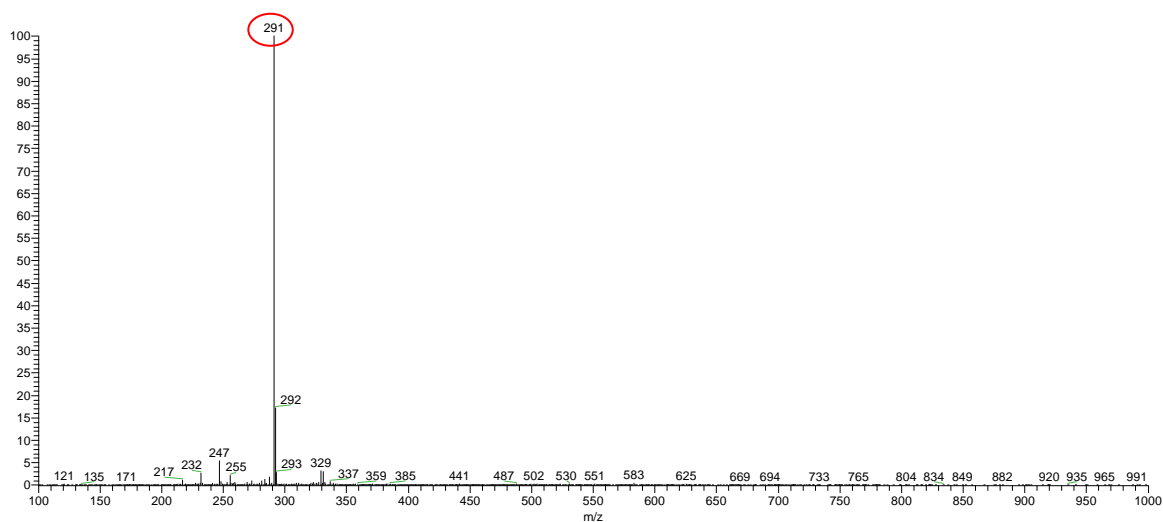


Figura 100. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância BPS-291 isolada da casca de *B. parinarioides*.

O íon 291 foi submetido à análise de fragmentação MS^2 , resultando no espectro com picos de m/z 247, 247, 232, 217 $[M-H]^-$, e então sendo realizada à proposta de fragmentação para essa substância, conforme a Figura 101.

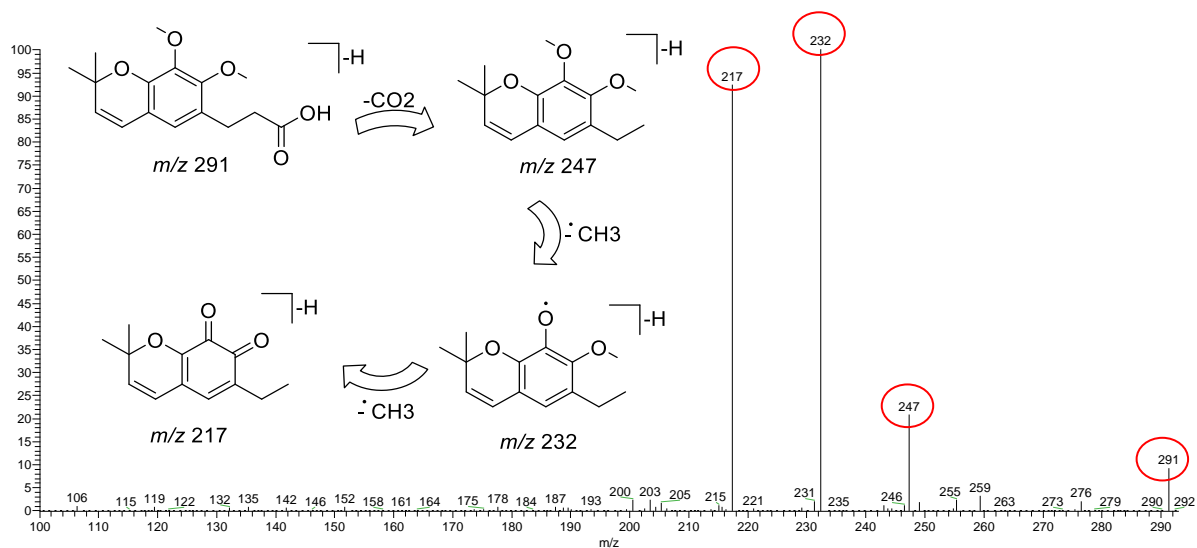


Figura 101. Espectro de MS^2 para o íon 291 $[M-H]^-$ e proposta de fragmentação.

5.2.5.5. Determinação estrutural da substância BPS-255

A substância **BPS-255** (1,5 mg) isolada do fracionamento (fluxograma 4, item 4.6.2.3), apresentou-se como sólido amorfo solúvel em metanol. A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi realizada a 500 MHz em MeOD (Figura 102).

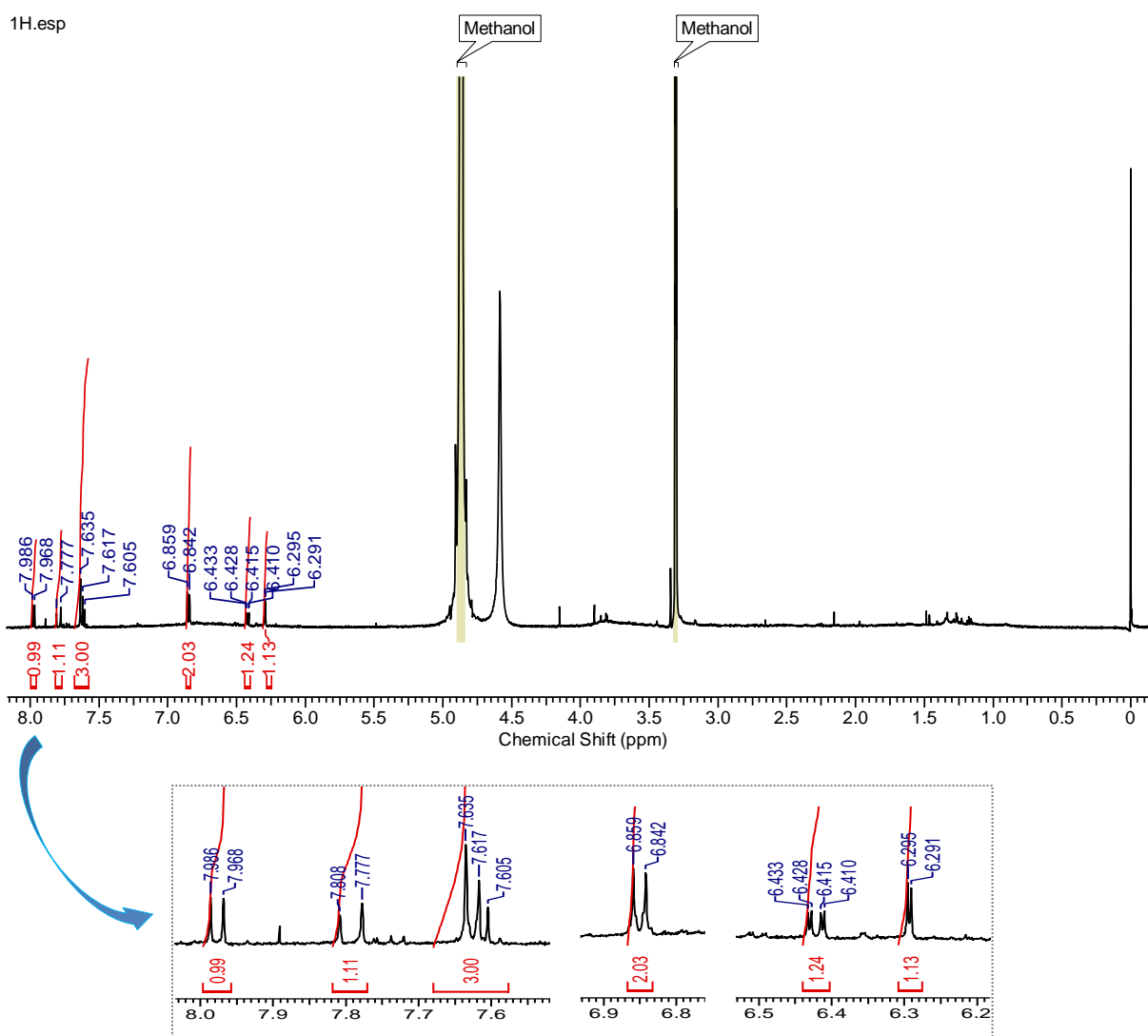
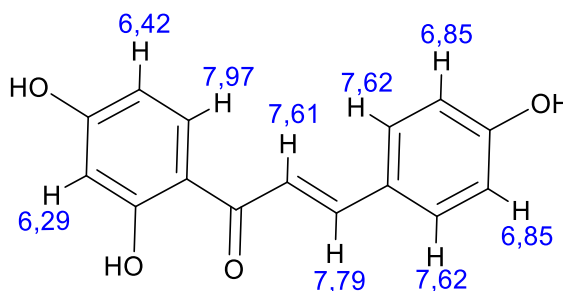


Figura 102. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-255.

O espectro de RMN de ^1H analisado para essa substância, demonstrou a presença dos sinais aromáticos em $\delta_{\text{H}} 7,97$ (d ; $J = 8,9$ Hz; 1H), $\delta_{\text{H}} 6,42$ (dd , $J = 8,9$ e $2,4$ Hz, 1H) e $\delta_{\text{H}} 6,29$ (d , $J = 2,4$ Hz, 1H), com constantes de acoplamento do tipo ABX correlacionados entre si, que foram atribuídos aos prótons H-6, H-5 e H-3, respectivamente a um anel aromático A.

Os sinais com deslocamento químico em δ_H 7,62 (*d*; $J= 8,6$ Hz; 2H) e δ_H 6,85 (*d*; $J= 8,6$ Hz; 2H), foram atribuídos aos prótons H-2'/6' e H-3'/5', respectivamente de outro anel aromático B. Os dubletos em δ_H 7,61 (*d*; 1H) e 7,79 (*d*; 1H), ambos com $J=15,3$ Hz característicos aos prótons olefínicos vicinais de uma chalcona também foram visualizados, como observados abaixo:



De acordo com a análise do espectro de RMN de 1D e 2D (Tabela 20) obtidos, pode-se verificar que a substância **BPS-255**, já havia sido identificada na espécie de *B. acutifolium*, cuja a elucidação mais detalhada encontra-se na amostra de código **BAS-255**, ambas as substâncias são chalconas conhecidas como **isoliquiritigenina**.

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância BPS-255.

Isoliquiritigenina			
N ^o	$\delta_C^{a,b}$	δ_H (mult.; J in Hz) ^a	HMBC ^a
1	114,8	-	-
2	167,5	-	-
3	102,4	6,29 (<i>d</i> , 2.4), 1H	114,8; 167,5
4	166,6	-	-
5	107,8	6,42 (<i>dd</i> , 8.9; 2.4), 1H	114,8; 102,4
6	132,0	7,97 (<i>d</i> , 8.9), 1H	167,5; 193,6
*	193,6	-	-
α	117,1	7,61 (<i>d</i> , 15.3), 1H	193,6; 128.0
β	144,4	7,79 (<i>d</i> , 15.3), 1H	130,8; 193,6
1'	128,0	-	-
2'/6'	130,6	7,62 (<i>d</i> , 8.6), 2H	161,6; 128.0; 144,4
3'/5'	115,5	6,85 (<i>d</i> , 8.6), 2H	128.0; 161,6
4'	161,6	-	-

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo como padrão interno TMS. ^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

O espectro de massas analisado para a substância **BPS-255**, demonstrou o íon em m/z 255 $[M-H]^-$, corroborando com a análise de RMN 1D e 2D para a substância **isoliquiritigenina**, Figura 103.

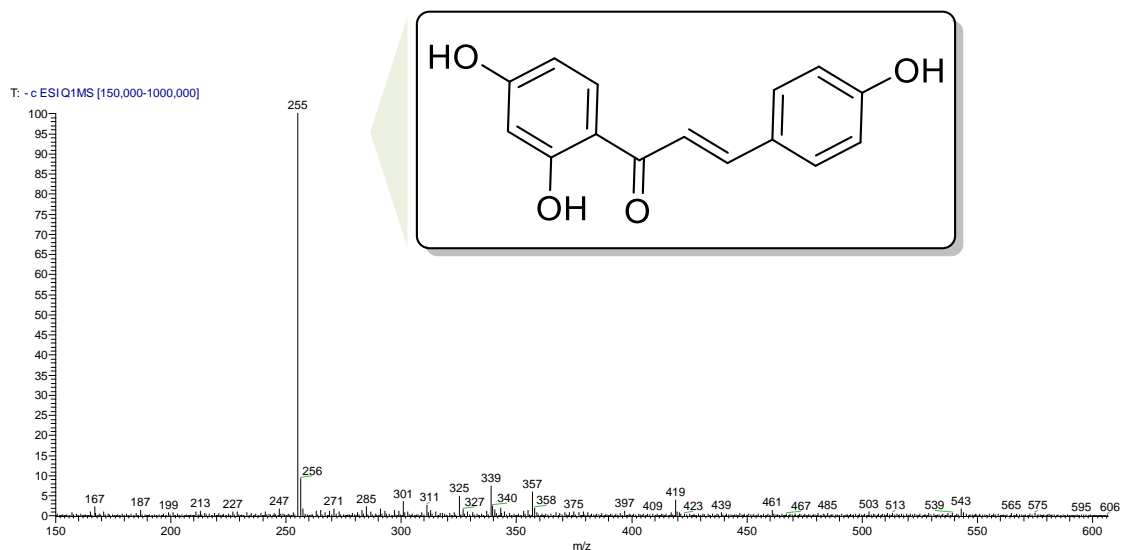


Figura 103. Espectro de massas do isoliquiritigenina (BPS-255), isolado da casca de *B. parinarioides*.

5.2.5.6. Determinação estrutural da substância BPS-321

A substância **BPS-321** (1,3 mg) isolada do fracionamento (fluxograma 6, item 4.7), apresentou-se como sólido amorfo solúvel em metanol. A determinação estrutural foi realizada com base nas análises de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H foi realizada a 500 MHz em MeOD (Figura 104).

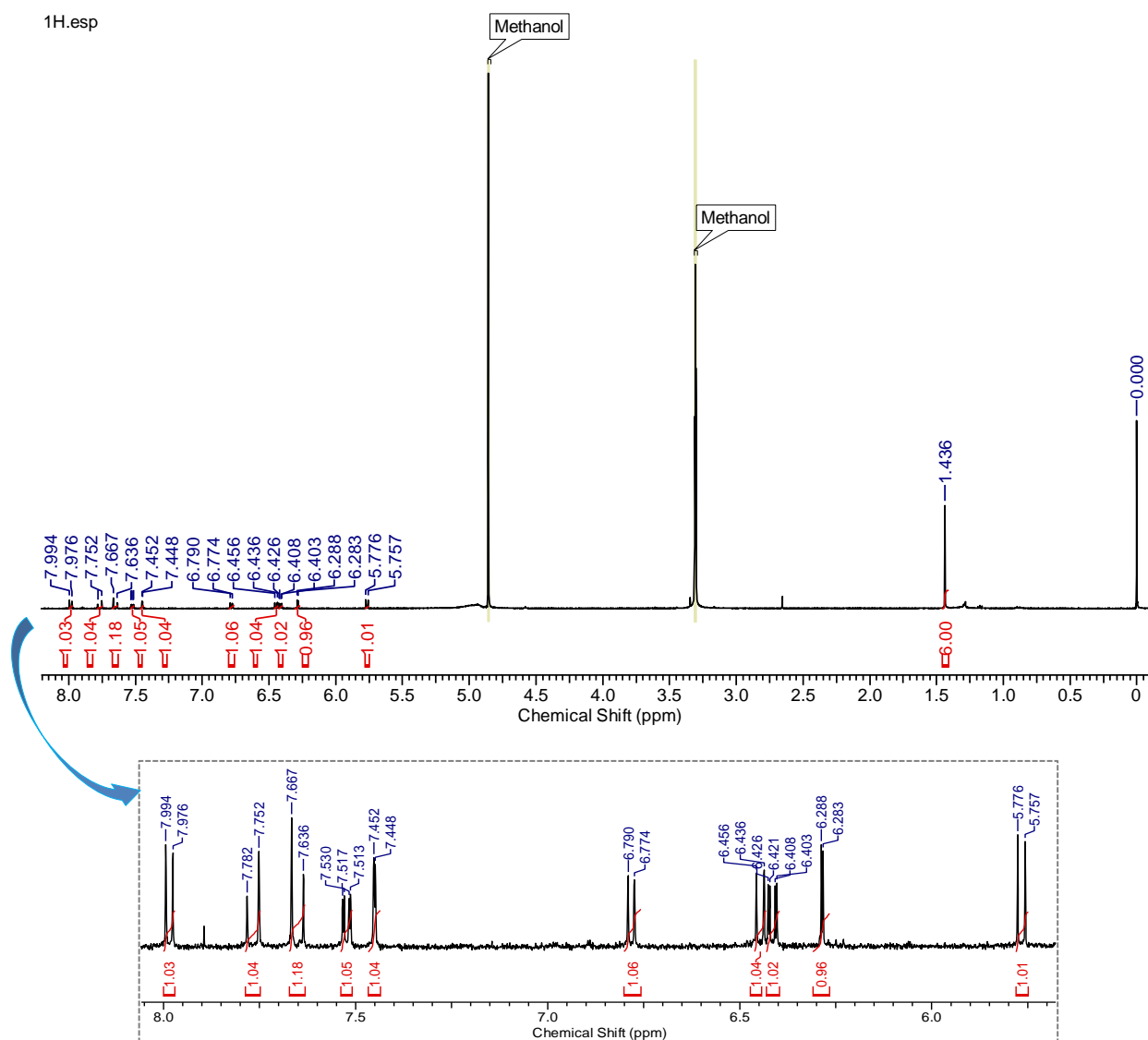
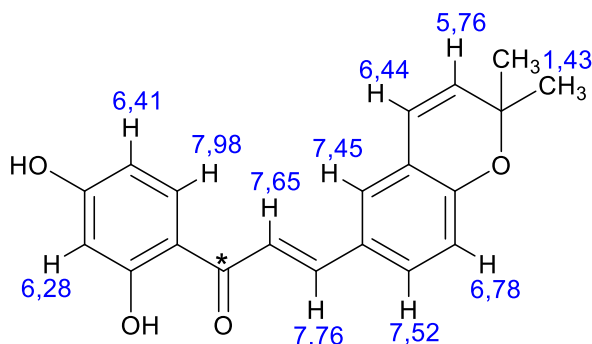


Figura 104. Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 500 MHz) da substância BPS-321.

O espectro de RMN de ^1H analisado para essa substância, revelou a presença dos sinais com deslocamento químico na região dos prótons aromáticos em δ_{H} 7,98 (*d*, $J= 8,9$ Hz, 1H), δ_{H} 6,41 (*dd*; $J= 8,9$ e 2,3 Hz; 1H) e δ_{H} 6,28 (*d*, $J= 2,3$ Hz, 1H), com constantes de acoplamentos

em “orto” e “meta” correlacionando entre si atribuídos aos prótons H-6, H-5 e H-3, respectivamente de um anel “A”. No anel aromático “B” foram observados os sinais em 7,52 (*dd*; *J*=8,4 e 2,0 Hz; 1H) δ_{H} 6,78 (*d*, *J*= 8,4 Hz, 1H) e 7,45 (*d*; *J*= 2,0 Hz; 1H), atribuídos aos prótons H-2’, H-3’ e H-6’, respectivamente. Observou-se também a presença dos prótons em δ_{H} 7,65 (*d*; *J*= 15,3 Hz; 1H) e 7,76 (*d*; *J*= 15,3 Hz; 1H), característico do esqueleto de uma chalcona. Ainda, a presença dos prótons olefínicos vicinais em δ_{H} 6,45 (*d*; *J*= 9,9 Hz; 1H) e 5,77 (*d*; *J*= 9,9 Hz; 1H), além do singlete em δ_{H} 1,43 integrando para seis prótons cada, atribuídos a presença de duas metilas na estrutura, como proposto abaixo:



Baseado na análise do espectro de RMN 1D e 2D (Tabela 21) obtido, pode-se perceber que a substância **BPS-321**, também já havia sido identificada na espécie de *B. acutifolium* e a elucidação mais detalhada encontra-se na amostra de código **BPS-321**, ambas substâncias são chalconas conhecidas como **kanzonol B**.

Tabela 21. Dados de RMN de 1H e 13C da substância BPS-321.

Kanzonol B			
Nº	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	δ_{H} (mult.; <i>J</i> in Hz) ^a	HMBC ^a
1	113,5	-	-
2	166,2	-	-
3	102,5	6,28 (<i>d</i> ; 2,3), 1H	113,5
4	166,3	-	-
5	108,0	6,41 (<i>dd</i> ; 8,9; 2,3), 1H	113,5
6	132,2	7,98 (<i>d</i> ; 8,9), 1H	193,2; 165,7; 166,3
*	192,4	-	-
α	117,9	7,65 (<i>d</i> ; 15,3), 1H	-
β	143,8	7,76 (<i>d</i> ; 15,3), 1H	-
1'	127,9	-	-
2'	129,9	7,52 (<i>dd</i> ; 8,4; 2,0), 1H	155,5; 143,8; 126,5
3'	116,4	6,78 (<i>d</i> ; 8,4), 1H	127,9; 121,4; 155,5
4'	155,5	-	-

5'	121,4	-	-
6'	126,5	7,45 (<i>d</i> ; 2.0), 1H	155,5; 129,9; 143,8; 121,3
1''	121,3	6,44 (<i>d</i> ; 9.8), 1H	77,1; 126,5; 155,8; 121,4
2''	131,1	5,76 (<i>d</i> ; 9.8), 1H	121,4; 77,1
3''	77,1	-	-
4''/5''	27,1	1,43 (<i>s</i>), 6H	131,1; 77,1

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C em MeOD, tendo como padrão interno TMS.

^bOs carbonos protonados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

O espectro de massas para a substância **BPS-321** analisada também apresentou o íon em m/z 321 [M-H]⁻, corroborando com a análise de RMN 1D e 2D para a substância isolada Kanzonol B, conforme a Figura 105.

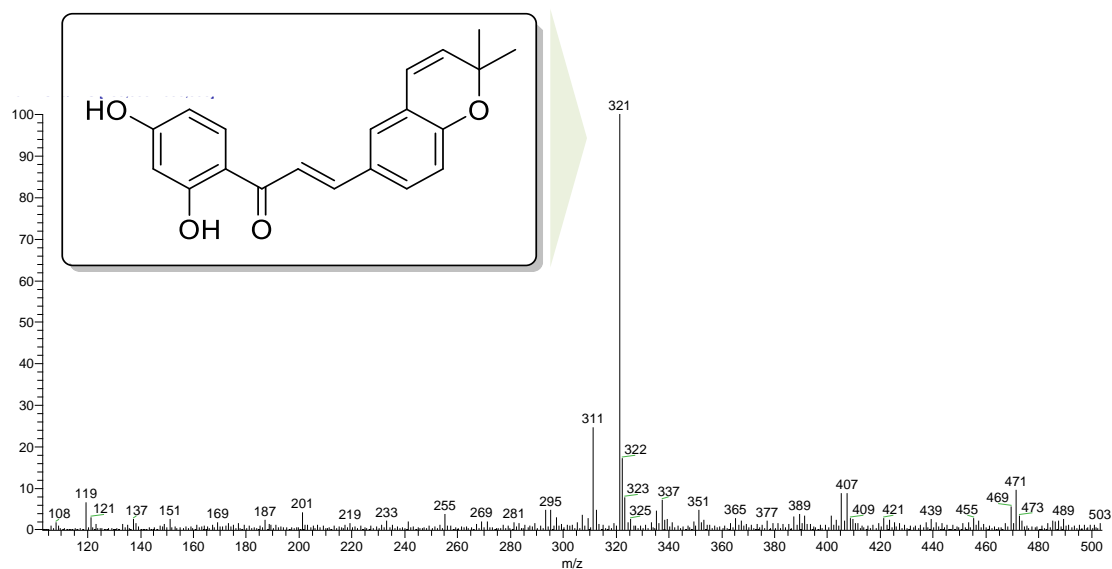


Figura 105. Espectro de massas do kanzonol B (BPS-321), isolado da casca de *B. parinarioides*.

5.2.6. Constituintes químicos isolados das cascas do *B. parinarioides*

Mediante o estudo com o desenvolvimento de métodos por CLAE com a fração BP3-FI e o estudo fitoquímico clássico com as cascas de *B. parinarioides* descritos nos itens (4.6.2.3 e 4.7), foi possível isolar seis substâncias (Figura 106), onde as substâncias denominadas como parinarioidinas A-C são inéditas, e as demais substâncias são descritas pela primeira vez da família na espécie *B. parinarioides*.

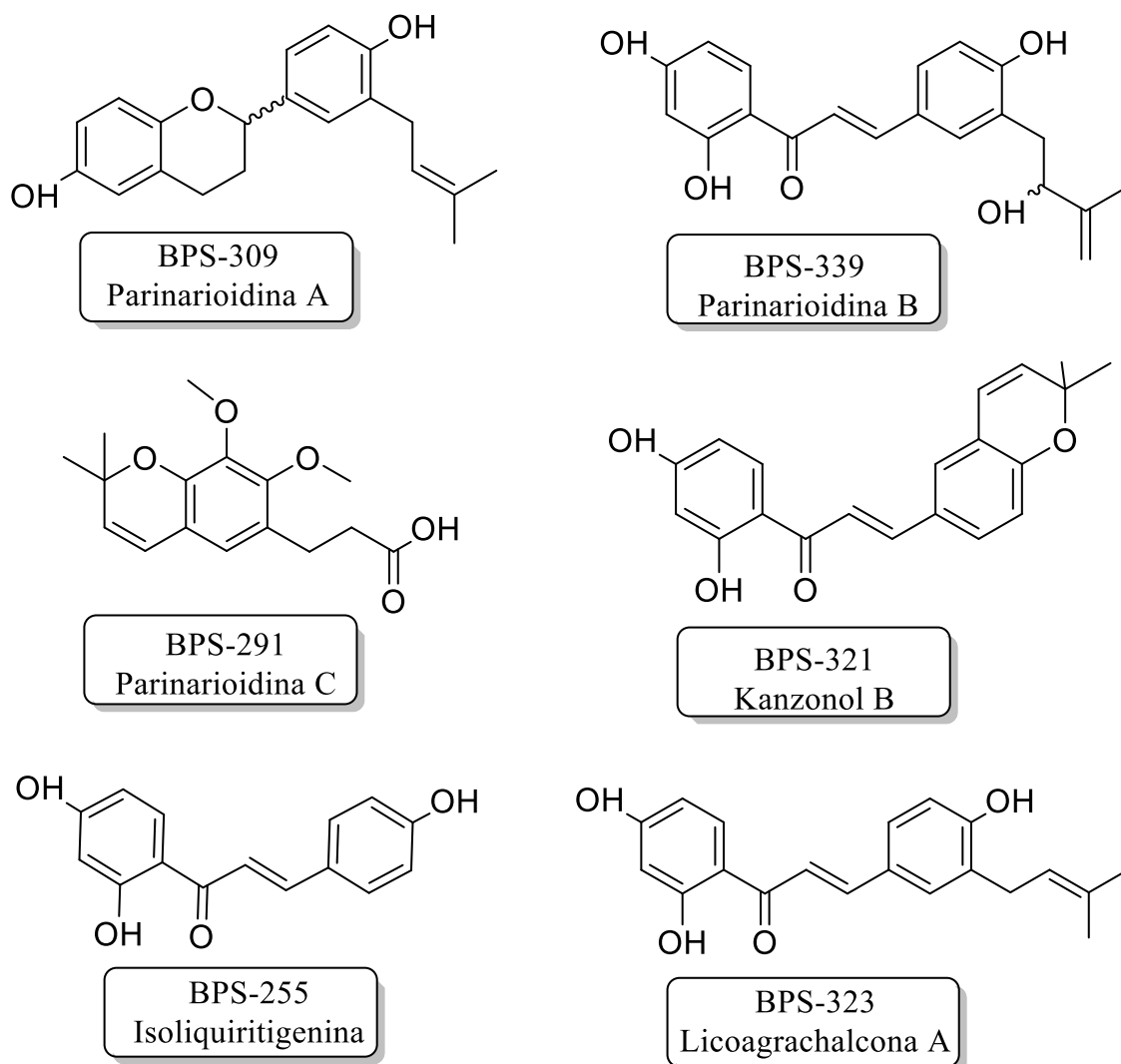


Figura 106. Substâncias isolados das cascas do *B. parinarioides*.

5.3. Estudo da Atividade Biológica

5.3.1. Conteúdo de fenólicos totais dos extratos de *B. acutifolium* e *B. parinarioides*.

Dentre todos os extratos estudados, pode-se verificar maiores teores de fenólicos nas amostras EBA2 ($275,41 \pm 0,22$ mg EAG/g) e EBP2 ($325,51 \pm 0,02$ mg EAG/g), seguidos dos extratos EBA6 ($215,59 \pm 0,51$ mg EAG/g) e EBP6 ($222,76 \pm 0,06$ mg EAG/g). Por outro lado, pode-se verificar os menores teores de fenólicos para os extratos EBA1 ($42,27 \pm 0,05$ mg EAG/g) e EBP1 ($39,91 \pm 0,31$ mg EAG/g). O resultado do conteúdo de fenólicos totais dos extratos encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22. Conteúdo de fenólicos totais dos diferentes extratos de *B. acutifolium* e *B. parinarioides*.

Espécie	Solventes utilizados no preparo dos extratos	Códigos dos extratos	Fenólicos Totais mg EAG/g
<i>B. acutifolium</i>	DCM 100%	EBA1	$42,27 \pm 0,05$
	EtOH 100%	EBA2	$275,41 \pm 0,22$
	AcOEt 100%	EBA3	$176,10 \pm 0,09$
	AcoET/ DCM 1:1	EBA4	$199,74 \pm 0,06$
	DCM/ EtOH 1:1	EBA5	$157,76 \pm 0,32$
	EtOH/ AcoET 1:1	EBA6	$215,59 \pm 0,51$
	DCM /AcOET/EtOH 1:1:1	EBA7	$200,11 \pm 0,27$
<i>B. parinarioides</i>	DCM 100%	EBP1	$39,91 \pm 0,31$
	EtOH 100%	EBP2	$325,51 \pm 0,02$
	AcoET 100%	EBP3	$198,77 \pm 0,05$
	AcoET/ DCM 1:1	EBP4	$84,39 \pm 0,13$
	DCM/ EtOH 1:1	EBP5	$82,71 \pm 0,04$
	EtOH/ AcoET 1:1	EBP6	$222,76 \pm 0,06$
	DCM /AcOET/EtOH 1:1:1	EBP7	$201,22 \pm 0,10$

Realizando-se uma análise comparativa entre amostras da mesma espécie, para os extratos de *B. acutifolium* que apresentaram maiores teores de fenólicos totais foram: EBA2 ($275,41 \pm 0,22$) > EBA6 ($215,59 \pm 0,51$) > EBA7 ($200,11 \pm 0,27$) > E.BA4 ($199,74 \pm 0,06$) > E.BA3 ($176,10 \pm 0,09$) > E.BA5 ($157,76 \pm 0,32$) > E.BA1 ($42,27 \pm 0,05$). Já na espécie de *B. parinarioides*, os maiores conteúdos de fenólicos foram observados nos extratos: E.BP2

(325,51± 0,02) > E.BP6 (222,76± 0,06) > E.BP7 (201,22± 0,10) > E.BP3 (198,77± 0,05) > E.BP4 (84,393± 0,13) > E.BP5 (82,71± 0,04) > E.BP1 (39,91± 0,31). Com base nos resultados obtidos, pode-se observar que os extratos preparados com EtOH 100% apresentaram maiores teores de fenólicos totais, enquanto os menores teores são obtidos pelos extratos preparados com DCM 100%, estando esse resultado de acordo com dados previamente reportados no trabalho de Bastos et al., 2020. Por outro lado, não foi possível correlacionar a concentração de fenólicos totais com os demais solventes utilizados, visto que as substâncias fenólicas, tais como os ácidos fenólicos e flavonoides, apresentam afinidade por solventes de média a alta polaridade, como os que foram utilizados no estudo.

5.3.2. Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante

Os extratos brutos e as substâncias isoladas das espécies de *B. acutifolium* e *B. parinarioides* tiveram suas atividades antioxidantes avaliadas frente aos ensaios de captura do radical DPPH e ABTS, bem como o poder de redução do ferro⁺³ pelo ensaio do FRAP para uma maior exploração de dados. Os resultados obtidos dos extratos e das substâncias isoladas são apresentados nas Tabelas **23** e **24**, respectivamente.

Com base nos dados analisados, os extratos de EtOH 100% apresentaram as maiores capacidades antioxidantes EBA2 (%CS₅₀ 24,50 ± 0,02 µg/mL, 896,68±0,02 µM TE e 2268,75 ± 0,09 µM Fe⁺²) e E.BP2 (%CS₅₀ 48,06 ± 0,02 µg/mL, 1164,73±0,04 µM TE e 1189,89 ± 0,09 µM Fe⁺²), bem os extratos de E.BA7 (%CS₅₀ 19,43 ± 0,10 µg/mL, 1026,67±0,04 µM TE e 1077,08 ± 0,01 µM Fe⁺²) e E.BP7 (%CS₅₀ 24,62 ± 0,09 µg/mL, 796,28±0,08 µM TE e 1085,21 ± 0,01 µM Fe⁺²), podendo-se então correlacionar a presença do maior conteúdo de fenólicos totais com maiores capacidades antioxidantes. Em contrapartida, os menores resultados antioxidantes também foram observados nos extratos de DCM 100% com E.BA1 (%CS₅₀ 81,01 ± 0,14 µg/mL, 403,10± 0,08 µM TE e 132,33 ± 0,01 µM Fe⁺²) e E.BP1 (%CS₅₀ 101,05 ± 0,04µg/mL, 301,02±0,08 µM TE e 125,05 ± 0,01 µM Fe⁺²), onde tais dados estão de acordo com os resultados encontrados no conteúdo de fenólico totais (Folin-Ciocalteu) para ambas as espécies.

Tabela 23. Ensaio antioxidante de DPPH, ABTS e FRAP dos extratos de *B. acutifolium* e *B. parinarioides*.

Espécie	Códigos dos extratos	DPPH	ABTS	FRAP
		%CS ₅₀ (µg/mL) ± Desv.Pad	µM TE* ± Desv.Pad	µM FeII ± Desv.Pad
<i>B. acutifolium</i>	E.BA1	81,01 ± 0,14	403,10± 0,08	132,33 ± 0,01
	E.BA2	24,50 ± 0,02	896,68±0,02	2268,75 ± 0,09
	E.BA3	27,11 ± 0,12	699,52±0,01	689,02 ± 0,02
	E.BA4	44,64 ± 0,02	567,60±0,05	1212,68 ± 0,01
	E.BA5	64,41 ± 0,03	389,82± 0,02	244,33 ± 0,04
	E.BA6	97,77 ± 0,04	301,55± 0,01	414,63 ± 0,03
	E.BA7	19,43 ± 0,10	1026,67±0,04	1077,08 ± 0,01
<i>B. parinarioides</i>	E.BP1	101,05 ± 0,04	301,02±0,08	125,05± 0,01
	E.BP2	48,06 ± 0,02	1164,73±0,04	1189,89 ± 0,09
	E.BP3	29,98± 0,10	597, 99±0,06	998,92 ± 0,03
	E.BP4	56,53 ± 0,02	322, 36±0,05	764,18 ± 0,01
	E.BP5	53,23 ± 0,01	387, 44±0,02	285,72 ± 0,03
	E.BP6	37,45 ± 0,02	556, 20±0,01	1064,38 ± 0,01
	E.BP7	24,62 ± 0,09	796,28±0,08	1085,21 ± 0,01
Ácido gálico	Padrão	8,50± 0,02	-	-

TE* equivalente ao Trolox

A partir das atividades antioxidantes obtidas para as substâncias de *B. acutifolium* pela captura do radical DPPH e ABTS (Tabela 24), foram observados maiores capacidades antioxidantes em ordem decrescente para: corylifol B (%CS₅₀ 10,35 µg/mL e 2271,68 µM TE) > kanzonol C (%CS₅₀ 18,26 µg/mL e 1187,38 µM TE) > isobavachalcona (%CS₅₀ 26,54 µg/mL e 879,52 µM TE) > isoliquiritigenina (%CS₅₀ 28,98 µg/mL e 820,30µM TE) > brosimina B (%CS₅₀ 64,22 µg/mL e 528,75 µM TE) > 4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpiano)flavana (%CS₅₀ 72,63 µg/mL e 543,18 µM TE) > kanzonol B (%CS₅₀ 85.26 µg/mL e 454,22 µM TE). Quanto ao poder de redução do Fe³⁺, os melhores resultados foram também para a substância do corylifol B (2085,703 µM Fe⁺²), seguidos em ordem decrescente pelo kanzonol C (1982,05µM Fe⁺²) > isoliquiritigenina (1189,03µM Fe⁺²) > isobavachalcona (1012,68µM Fe⁺²) > kanzonol B (325,69µM Fe⁺²) > brosimina B (268,25µM Fe⁺²) > 4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpiano)flavana (229,23µM Fe⁺²).

No que diz respeito á atividade antioxidante das substâncias de *B. parinarioides*, pela da captura dos radicais DPPH, ABTS e FRAP (Tabela 24), foram observados os maiores resultados para as substâncias: parinarioidina C (%CS₅₀ 19,02 µg/mL, 1528,41µM TE e 1359, 11 µM Fe⁺²) > parinarioidina B (%CS₅₀ 28,45 µg/mL, 908,01µM TE e 1992,02 µM Fe⁺²) > licoagrachalcona A (%CS₅₀ 30,38 µg/mL, 798,20µM TE e 1027,02 µM Fe⁺²). Enquanto, a substância parinarioidina A (%CS₅₀ 81,64 µg/mL, 443,81 µM TE e 199, 20 µM Fe⁺²), também se apresentou com resultado antioxidante expressivo, contudo inferiores as substâncias parinarioidina B-C e licoagrachalcona A.

Tabela 24. Ensaio antioxidante de DPPH, ABTS e FRAP das substâncias de *B. acutifolium* e *B. parinarioides*.

Nome da substância	Códigos das substâncias	DPPH	ABTS	FRAP
		%CS ₅₀ (µg/mL) ± Desv.Pad	µM TE* ± Desv.Pad	µM FeII ± Desv.Pad
4'-hidroxi-7,8-(2'',2'')-dimetilpiano)flavana	BAS-307	72,63± 0,08	543,18± 0,07	229,23± 0,02
Brosimina B	BAS-309	64,22± 0,02	528,75± 0,02	268,25± 0,07
Isoliquiritigenina	BAS-255	28,98± 0,08	820,30± 0,01	1189,03± 0,05
Kanzonol B	BAS-321	85,26± 0,01	454,22± 0,02	325,69± 0,01
Isobavachalcona	BAS-323	26,54± 0,07	879,52±0,01	1012,68± 0,01
Corylifol B	BAS-339	10,35± 0,12	2271,68±0,05	2085,70± 0,02
Kanzonol C	BAS-391	18,26± 0,06	1187,38± 0,01	1982,05± 0,02
Parinarioidina A	BPS-309	81,64 ± 0,01	443,81± 0,01	199, 20± 0,03
Parinarioidina B	BPS-339	28,45 ± 0,01	908,01±0,02	1992,02± 0,05
Parinarioidina C	BPS-291	19,02 ± 0,06	1528,41± 0,01	1359, 11± 0,04
Licoagrachalcona A	BPS-323	30,38 ±0,08	798,20±0,01	1027,02± 0,02
Ácido gálico	Padrão	8,50± 0,02	-	-

A partir da análise dos resultados antioxidantes pode-se observar uma boa correlação antioxidante entre os três diferentes métodos analisados, corroborando com o conhecimento do potencial antioxidante destas espécies (*B. acutifolium* e *B. parinarioides*), além do gênero e família como potenciais fontes naturais de antioxidantes.

5.3.3. Estudo de docking molecular com a enzima tirosina quinase-3

A tirosina quinase-3 (FLT3) está envolvida na proliferação do câncer, sendo particularmente relevante na leucemia mielóide aguda, e sua inibição representa uma abordagem racional para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer (AN et al., 2018; ZHONG et al., 2020). Portanto, um estudo preliminar de docking foi realizado com as substâncias isoladas de *B. acutifolium* e *B. parinarioides*, a fim de avaliar seus potenciais como inibidores de FLT3.

A análise de ancoragem molecular com a proteína FLT3 (Tabela 25) revelou valores relevantes de energia livre de ligação para as substâncias **kanzonol B** (-10,4 kcal/mol), **kanzonol C** (-10,3 kcal/mol), **licoagrachalcona A** (-9,9 kcal/mol), **corylifol B** (-9,8 kcal/mol), **isobavachalcona** (-9,8 kcal/mol), **4'-hidroxi-7,8-(2'',2'')-dimetilpiano)flavana** (-9,3 kcal/mol), **isoliquiritigenina** (-9,0 kcal/mol) e **brosimina B** (-8,3 kcal/mol). Surpreendentemente, essas energias livres de ligação foram melhores do que o controle positivo **doxorubicina** (-8,1 kcal/mol), o que pode ser explicado pelo possível estabelecimento de interações favoráveis entre o novo complexo ligante-FLT3. Em contrapartida, a energia de ligação para **parinarioidina C** (-6.8 kcal/mol) apresentou-se como a pior quando comparado com o controle positivo e todos os demais ligantes avaliados (-10.3 a -9.8 kcal/mol).

Em relação às interações observadas para a **doxorubicina** (Figura 107), foi possível visualizar interações π -alquil com o resíduo de aminoácido Ile836, π -amida com Gly831 e ligações de hidrogênio com Val808 e Asp829. Os resíduos Asp829, Phe830 e Gly831 juntamente com Val624, representam resíduos chave no sítio catalítico da FLT3 (YEN et al., 2021). No que diz respeito às interações observadas para as moléculas mais promissoras, estas se ligam ao sítio ativo do receptor por meio, principalmente, de ligação de hidrogênio (HB) e interações do tipo π -sigma (PSi), π -alquil (PAI), alquil (AI), π -amida (PAm) e π - π em forma de T (PPT), sugerindo que essas substâncias exibem interações favoráveis para inibir FLT3.

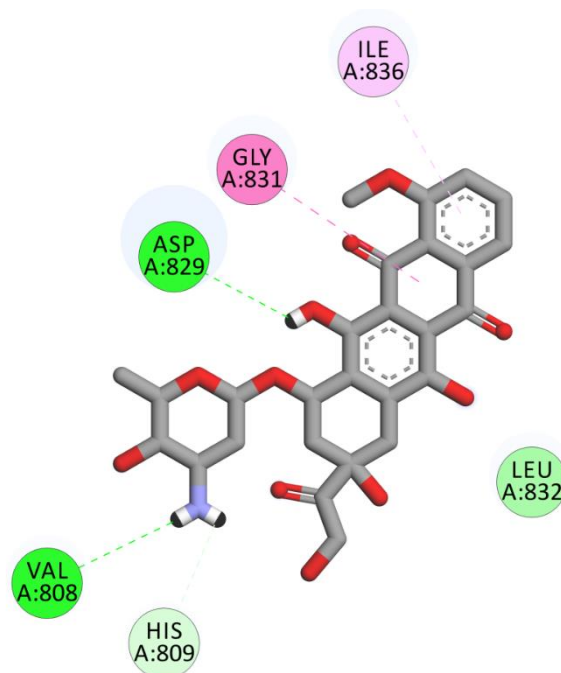


Figura 107. Principais interações observadas entre doxorubicina e tirosina quinase-3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.

Para o **kanzonol B** foram observadas as interações do tipo π -sigma com os resíduos Leu616, Phe830, uma interação alquil com Leu616 e π -alquil com Phe830, Val624, Ala642, Leu818 (Figura 108A). Por outro lado, **kanzonol C** apresentou uma interação π - π com o resíduo Phe691, alquil com Ala642, Leu832, Leu616, Leu818, Leu616 e Val624, e π -alquil com Phe830, Val624, Lys644, Val675 e Cys828 (Figura 108B). Destaca-se que para ambas as moléculas, interações promissoras com os resíduos chave Val624 e Phe830 do sítio catalítico foram observadas.

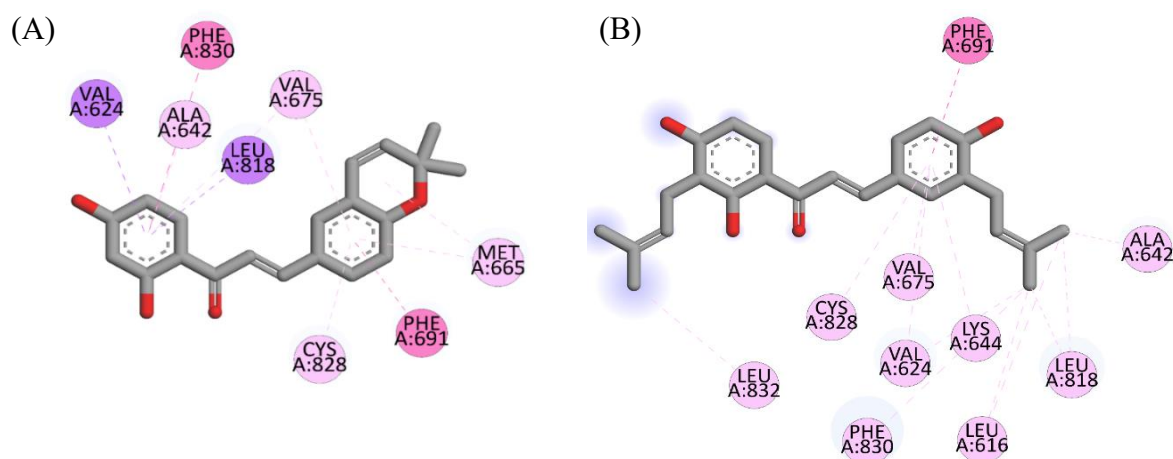


Figura 108. Principais interações observadas entre kanzonol B (A) e kanzonol C (B) no sítio ativo de FLT3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.

A **licoagrachalcona A**, terceira substância mais efetiva na inibição de FLT3, apresentou interações com os resíduos catalíticos chave do sítio ativo Asp829 por meio de ligação de hidrogênio e com o resíduo Phe830 e Val624 via interação π -alquil, além de outras interações com outros resíduos (Figura 109).

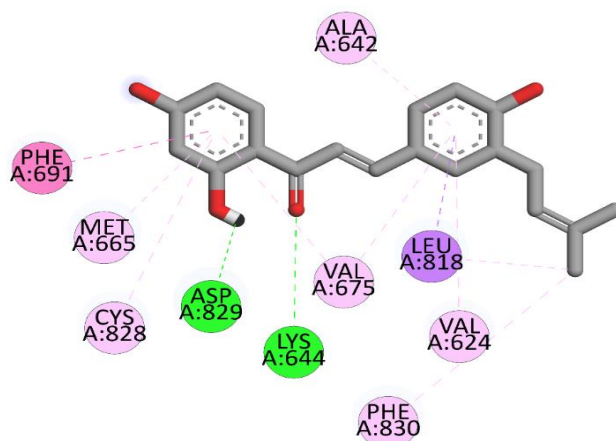


Figura 109. Principais interações observadas entre licoagrachalcona A no sítio ativo de FLT3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.

As substâncias **corylifol B** e **isobavachalcona** (Figura 110) apresentaram interações semelhantes com os resíduos catalítico Phe830 e Val624 através das interações π - π em forma de T e π -sigma, respectivamente. Além disso, apresentam ligações de hidrogênio com os resíduos Cys694 e Glu692, uma interação alquil com VAL675, π -sigma com Leu616, Val624, Leu818 e Phe691, e π -alquil com Phe691 e Ala642. A única diferença observada entre as duas substâncias refere-se à ligação de hidrogênio do **corylifol B** com os resíduos Lys614 e Leu616.

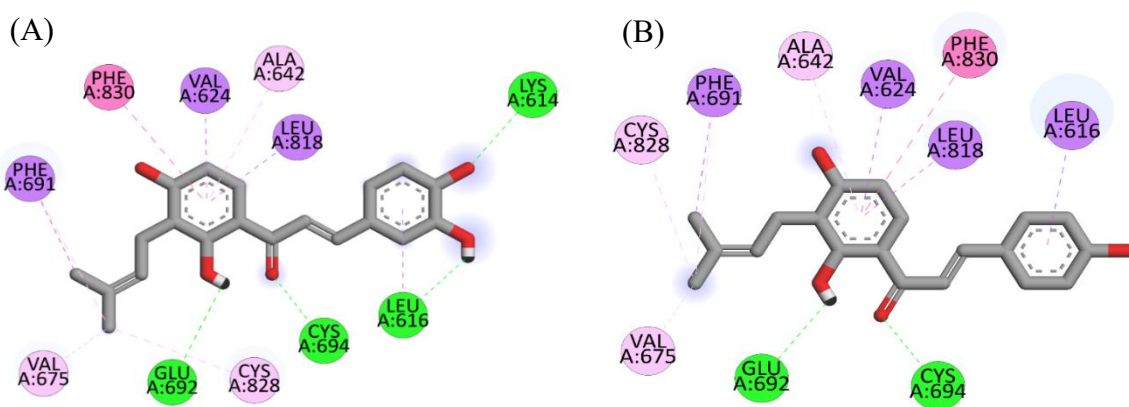


Figura 110. Principais interações observadas entre corylifol B (A) e e isobavachalcona (B) no sítio ativo de FLT3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.

No modelo de ligação, **isoliquiritigenina** apresentou ligação de hidrogênio com os resíduos Asp829 e Lys644, além de diferentes interações do tipo π com os resíduos Val624, Leu818, Phe691, Phe830, Met665, Val 675, Cys828, Ala642 e Val 675, sendo os resíduos Asp829, Val624 e Phe830 resíduos catalíticos do sítio ativo (Figura 111).

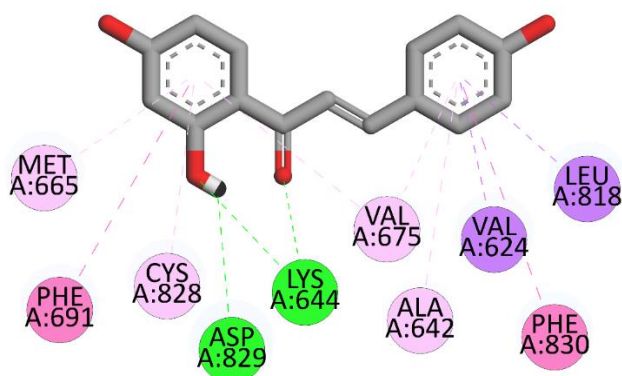


Figura 111. Principais interações observadas entre isoliquiritigenina no sítio ativo de FLT3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.

Dentre os ligantes testados, o que apresentou a menor energia de ligação (**parinarioidina C**), apresentou apenas uma interação com o resíduo Val808 via ligação de hidrogênio e também apresentou uma única interação chave com o resíduo catalítico do sitio ativo Asp829, através das interações π -anion e ligação de hidrogênio (Figura 112).

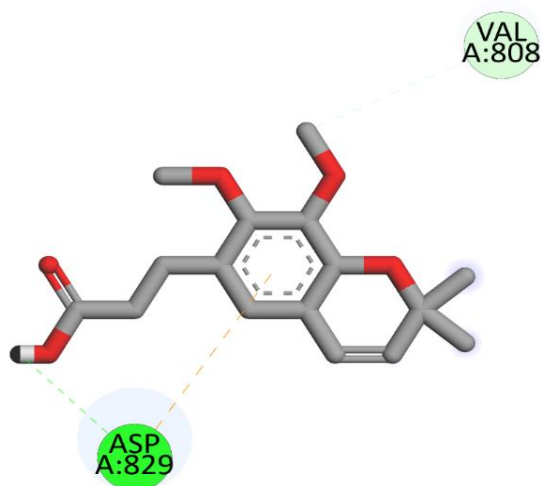


Figura 112. Principais interações observadas entre parinarioidina C no sítio ativo de FLT3 (PDB: 4RT7) por meio da análise de docking.

Tabela 25. Análise de ancoragem molecular com a proteína FLT3 e valores de energia livre de ligação para os ligantes e interações observadas com os resíduos de aminoácidos.

Ligantes	Enzima (PDB ID)	Energia de ligação (kcal/mol)	Principais interações com os resíduos de aminoácidos
Doxorubicina ^a	Tirosina quinase-3 do tipo FMS -FLT3 (4RT7)	-8.1	HB (Val808, Asp829), PAI (Ile836), PAm (Gly831)
Kanzonol B		-10.4	PSi (Val624, Leu818), PPT (Phe830), PP (Phe691), AI (VAL665), PAI (Met665, Val675, Cys828, Ala642, Val675);
Kanzonol C		-10.3	PP (Phe691), AI (Ala642, Leu832, Leu616, Leu818, Leu616, Val624), PAI (Phe830, Val624, Lys644, Val675, Cys828);
Licoagrachalcona A		-9.9	HB (Asp829, Lys644), PSi (Leu818), PP (Phe691), AI (Leu818), PAI (Phe830, Val624, Lys644, Val675, Cys828);
Corylifol B		-9.8	HB (Lys614, Cys694, Glu692, Leu616), PSi (Leu616, Val624, Leu818, Phe691), PPT (Phe830), AI (VAL675, CYS828), PAI (Phe691, Ala642);
Isobavachalcona		-9.8	HB (Glu692, Cys694), PSi (Phe691, Val624, Leu818, Leu616), PPT (Phe830), AI (VAL675, CYS828), PAI (Phe691, Ala642);
4'-hidroxi-7, 8-(2'',2''-dimetilpiano)flavana		-9.3	PS (Met665), PP (Phe691), AI (Val 675, Cys828, Met665), PAI (Phe691, Lys644, Val 675, Cys828);
Isoliquiritigenina		-9.0	HB (Asp829, Lys644), PSi (Val624, Leu818), PP (Phe691), PPT (Phe830), PAI (Met665, Val 675, Cys828, Ala642, Val 675);
Brosimina B		-8.3	PSi (Leu616, Phe830), AI (Leu616), PAI (Phe830, Val624, Ala642, Leu818);
Parinarioidina C		-6.8	HB (Asp829), CHB (Val808), PA (Asp829).

^aControle positivo, **HB** –ligação de hidrogênio, **PSi** – π -sigma, **PAI** – π -alquil, **AI** –alquil, **PA** – π -ânion, **PPT** – π - π em forma de T, **PP** – π - π empilhado, **PS** – π - enxofre, **CHB** –ligação carbono-hidrogênio.

Atualmente, flavonoides como chalconas e flavanas estão presentes em um grande numero de plantas medicinais e possuem potencial antitumoral (LIN et al, 2017; WANG et al., 2021). Takashima et al. (2005) avaliaram a atividade citotóxica dos flavonoides brosimacutinas J-M e brosimina A, contra células de leucemia murina (P388), onde observaram um efeito citotóxico promissor ($IC_{50} = 4,4$ a $19 \mu\text{g/mL}$) contra células resistentes à vincristina (controle positivo). Em outro estudo, morina (3,5,7,2',4'-pentahidroxi flavona), um flavonoide originalmente isolado da família Moraceae, foi avaliado contra várias linhagens de células leucêmicas humanas (ex. HL-60, K562, THP-1 e U937), sendo observado a supressão da viabilidade celular e indução do apoptose em células U937, enquanto as demais células apresentaram menores sensibilidade, fornecendo, portanto, evidências de propriedades antitumorais em células leucêmicas humanas (PARK et al, 2014). Na revisão farmacológica

realizada com a substância isobavachalcona (WANG et al., 2021), já existe relatos de múltiplas atividades biológicas incluindo as atividades anticancerígenas por meio de modelos *in vitro* e *in vivo*, apontando a inibição em linhagens de células tumorais incluindo leucemia, câncer colorretal, carcinoma de células escamosas de língua, câncer de fígado e mama, e células de câncer de próstata (KUETE et al., 2012; WANG et al., 2021). Em relação ao flavonoide Isoliquiritigenina tem-se o relato de inibição frente a enzima FLT3 ($IC_{50} = 115,1 \pm 4,2 \text{ Nm}$) sugerindo assim potenciais efeitos terapêuticos para o tratamento de LMA (CAO et al, 2019). Assim, estes relatos corroboram com as evidências observadas através dos cálculos de ancoragem molecular, os quais podem ser particularmente relevantes no desenvolvimento de novos inibidores de FLT3 e terapias antitumorais.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

De forma integrada o estudo do planejamento de misturas centroe, baseados em espectrometria de massas e abordagens quimiométricas, pode garantir de forma rápida e ampla o reconhecimento de substâncias características presentes em extratos vegetais, auxiliando nas etapas de seleção cromatográfica e permitindo o isolamento seletivo de substâncias, além de reduzir o tempo e o custo da abordagem fitoquímica.

A partir do extrato da mistura de diclorometano e acetato de etila de *B. acutifolium* foram isolados e identificados por RMN 1D e 2D sete flavonoides: **7,4' -dihidroxi-8-prenilflavana**, **4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)flavana**, **isoliquiritigenina**, **isobavachalcona**, **kanzonol B**, **kanzonol C** e **corylifol B**. Este é o primeiro relato das substâncias **kanzonol B-C** na espécie e o primeiro relato de **corylifol B** na família Moraceae.

O fracionamento do extrato de acetato de etila de *B. parinarioides* resultou no isolamento de quatro flavonoides, **4',6-dihidroxi-5-prenil-flavana**, **7,8-dimetoxi-2,2-dimetil-1-benzopirona-6-ácido propanoico**, **licoagrachalcona** e **isoliquiritigenina**. No estudo químico realizado com o extrato metanólico de *B. parinarioides*, foram isoladas outras três substâncias: **licoagrachalcona**, **2,4,4'-trihidroxi-5'-(2''-hidroxi-3''-metil-butenil)-chalcona** e **kanzonol B**, sendo inéditas as substâncias **4',6-dihidroxi-5-prenil-flavana**, **2,4,4'-trihidroxi-5'-(2''-hidroxi-3''-metil-butenil)-chalcona**, **7,8-dimetoxi-2,2-dimetil-1-benzopirona-6-ácido propanoico**, denominadas de **parinarioidinas A-C**. Todas as substâncias são descritas pela primeira vez em *B. parinarioides*.

O estudo do conteúdo de fenólicos totais com os extratos de *B. acutifolium* e *B. parinarioides* demonstraram maiores teores de fenólicos nos extratos etanólicos e menores teores de fenólicos para os extratos preparados em diclorometano. Quanto á atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS e FRAP, os extratos etanólicos também apresentaram as maiores capacidades antioxidantes, podendo-se então correlacionar a presença do maior conteúdo de fenólicos totais com maiores capacidades antioxidantes, no que se refere as substâncias isoladas todas apresentaram expressivas capacidade sequestrante de radicais livres frente aos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP. Com base na análise de docking, com a estrutura cristalina de FLT3, é razoável sugerir que kanzonol B, kanzonol C, licoagrachalcona A, corylifol B, isobavachalcona, 4'-hidroxi-7, 8-(2'',2''-dimetilpiano) flavana, isoliquiritigenina e brosimina B como potenciais inibidores para a proteína sendo relevantes no desenvolvimento de novos estudos antitumorais (*in vitro* e *in vivo*). Além disso, a importância da ligação de hidrogênio e interações alquil e π foram evidenciadas para o suposto sítio ativo.

Portanto, a investigação fitoquímica das cascas das espécies de *B. acutifolium* e *B. parinarioides* contribuiu com o conhecimento químico do gênero *Brosimum* da região Amazônica, revelando estas espécies como fonte promissoras de flavonoides com potencial antioxidante, e supostas propriedades antitumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, S.A., JAMIL, S., BASAR, N., LATHIFF, S.M.A., ARRIFFIN, N.M. Flavonoids from the leaves and heartwoods of *Artocarpus lowii* King and their bioactivities. *Nat. Prod. Res.*, v.31, p. 1113-1120, 2017.
- ABREU, V. G. C.; SILVA, M. C. S.; MAGALHÃES, R. M.; PILÓ-VELOSO, D.; XAVIER, I. F. S.; OLIVEIRA, P. M.; ALCÂNTARA, A. F. C. Chemical constituents from the stem of *Brosimum potable* (Moraceae). *Acta Amazonica*, v.40, p. 711-718, 2010
- AGRA, M. D. F., SILVA, K. N., BASÍLIO, I. J. L. D., FREITAS, P. F. D., BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista brasileira de farmacognosia*, v. 18, p. 472-508, 2008.
- AKIYAMA, H., BARGER, S., BARNUM, S., BRADT, B., BAUER, J., COLE, G. M., & WYSS-CORAY, T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, v. 21, p. 383-421, 2000.
- ALCÂNTARA, A. F. C.; SOUZA, M. R.; PILÓ-VELOSO, D. Constituents of *Brosimum potable*. *Fitoterapia*, v. 71, p. 613-615, 2000.
- ALVES DE ALMEIDA, ALINE; SPACINO SCARMINIO, IEDA. Statistical mixture design optimization of extraction media and mobile phase compositions for the characterization of green tea. *Journal of separation science*, v. 30, n. 3, p. 414-420, 2007.
- Angiosperm Phylogeny Group*. «An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III» (PDF). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 161 (2): 105–121, 2009.
- ANGO, P.Y., KAPCHE, D.W.F.G., KUETE, V., NGADJUI, B.T., BEZABIH, M., ABEGAZ, B.M. Chemical constituents of *Trilepisium madagascariense* (Moraceae) and their antimicrobial activity. *Phytochem. Lett.*, v. 5, p. 524-528, 2012.
- ASADA, Y., LI, W., YOSHIKAWA, T. Isoprenylated flavonoids from hairy root cultures of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry*, v. 47, p. 389-392, 1998.
- BARROS NETO, B. D., SCARMINIO, I. S., & BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.
- BASTOS, L. M., SILVA, F., SOUZA, L., SÁ, I. S., SILVA, R. M. D., DE SOUZA, A. D., & NUNOMURA, R. Integrative Approach Based on Simplex-Centroid Design, ESI-MS and Chemometric Analysis for Comprehensive Characterization of Phenolic Compounds from *Endopleura uchi* Bark. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, p. 351-356, 2020.
- BEGAA, S., & MESSAOUDI, M. Toxicological aspect of some selected medicinal plant samples collected from Djelfa, Algeria Region. *Biological trace element research*, v. 187, p. 301-306, 2019.
- BERG, CORNELIS C. Moreae, Artocarpeae, and *Dorstenia* (Moraceae): With introductions to the family and *Ficus* and with additions and corrections to *Flora Neotropica* Monograph 7. Organization for *Flora Neotropica*, 2001.
- BHALLA V.K., NAYAK U. RAMDAS, D.S. Some new flavonoids from *psoralea corylifolia*. *Tetrahedron Lett.* V. 20, p. 2401-2406, 1968.

- BORRÁS, M. R. L.; Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas. Plantas comercializadas no Mercado municipal Adolpho Lisboa, Governo do Estado do Amazonas: Editora: Valer, 2003.
- BRAGA, P. A., SEVERINO, V. G., DE FREITAS, S. D., DA SILVA, M. F. D. G., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., GROppo, M. Dihydrocinnamic acid derivatives from *Hortia* species and their chemotaxonomic value in the Rutaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 43, p. 142-151, 2012.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRAZ-FILHO, R.; MAGALHÃES, A. F.; GOTTLIEB, O. R. Coumarins from *Brosimum rubescens*. *Phytochemistry*, v. 11, p. 3307-3310, 1972.
- BREITBACH, U. B., NIEHUES, M., LOPES, N. P., FARIA, J. E., & BRANDÃO, M. G. Amazonian Brazilian medicinal plants described by CFP von Martius in the 19th century. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 147, p. 180-189, 2013.
- BURNETT, A. K. Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress. *Hematology 2010, the American Society of Hematology Education Program Book*, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- CAO, Z. X., WEN, Y., HE, J. L., HUANG, S. Z., GAO, F., GUO, C. J., & PENG, C. Isoliquiritigenin, an Orally Available Natural FLT3 Inhibitor from Licorice, Exhibits Selective Anti-Acute Myeloid Leukemia Efficacy In Vitro and In Vivo. *Molecular Pharmacology*, v. 96, p. 589-599, 2019.
- CAPASSO, R.; IZZO A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO. C.; MASCOLO N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*. v. 71, p.58-65, 2000.
- CARAUTA, J. P. P.; ROMANIUC NETO, S.; SASTRE, C. Índice das espécies de Moráceas do Brasil. *Albertoa*, v. 4, n. 7, p. 77-93, 1996.
- CARDENAS, Juan David Revilla. *Plantas da Amazônia: Oportunidades Econômicas e Sustentáveis*. 2001.
- CASS, QUEZIA; CASSIANO, NEILA. *Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações*. Elsevier Brasil, 2015.
- CASTRO, R.M. *Flora da Bahia – Moraceae*. Dissertação de Mestrado em Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2006.
- CHAN, E. W. C., WONG, S. K., TANGAH, J., INOUE, T., & CHAN, H. T. Phenolic constituents and anticancer properties of *Morus alba* (white mulberry) leaves. *Journal of integrative medicine*, v. 18, n. 3, p. 189-195, 2020.
- CHIN, Y. W., KONG, J. Y., & HAN, S. Y. Flavonoids as receptor tyrosine kinase FLT3 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 23, p. 1768-1770, 2013.
- CHOI, C. W., KIM, S. C., HWANG, S. S., CHOI, B. K., AHN, H. J., LEE, M. Y. & KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant science*, v. 163, p. 1161-1168, 2002.
- COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 126, p. 159-175, 2009.

- CONEGUNDES, J. L. M., DA SILVA, J. M., DE FREITAS MENDES, R., FERNANDES, M. F., PINTO, N. D. C. C., DE ALMEIDA, M. A., & SCIO, E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Siparuna guianensis* Aublet, an amazonian plant traditionally used by indigenous communities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 265, p. 113344, 2021.
- CORREA, P. M. Dicionário das plantas úteis do brasil e das exóticas cultivadas. Rio de janeiro, impressa nacional, 1978.
- COUSSENS, L. M., WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.
- DALL' STELLA, D. S. G. Estudo fitoquímico aplicado da fração solúvel do extrato etanólico bruto da *dorstenia multiformis*. Miquel (MORACEAE). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.
- DE BARROS CORRÊA, Dirceu De B.; GOTTLIEB, Otto R.; DE PÁDUA, Adolfo P. Dihydrocinnamyl alcohols from *Hortia badinii*. *Phytochemistry*, v. 18, n. 2, p. 351, 1979.
- DE BARROS CORRÊA, Dirceu; GOTTLIEB, Otto R.; DE PÁDUA, Adolfo Pimenta. Dihydrocinnamic acids from *Hortia badinii*. *Phytochemistry*, v. 14, n. 9, p. 2059-2060, 1975.
- DE SOUSA, D. F., FERNANDES, M. J. B., DE OLIVEIRA, R. A., CAMPOS FILHO, P. C., CARVALHO, L. D., & DA CONCEIÇÃO, A. O. In vitro cytotoxic and anti-herpesvirus properties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam., Moraceae) leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 14, n. 5, p. 225-231, 2020.
- DEWICK, PAUL M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons, 2002.
- DI, X., WANG, S., WANG, B., LIU, Y., YUAN, H., LOU, H., WANG, X. New phenolic compounds from the twigs of *Artocarpus Heterophyllus*. *Drug Discov. Ther.*, v. 7, p.24-28, 2013.
- DOMBRET, H., & GARDIN, C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 127, p. 53-61, 2016.
- DZOYEM, J.P., NKUETE, A.H.L., NGAMENI, B., ELOFF, J.N. Anti-inflammatory and anticholinesterase activity of six flavonoids isolated from *Polygonum* and *Dorstenia* species. *Arch. Pharm. Res.*, v. 40, p. 1129-1134, 2015.
- ENGWA, GODWILL AZEH. Free radicals and the role of plant phytochemicals as antioxidants against oxidative stress-related diseases. *Phytochemicals: Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention. BoD–Books on Demand*, v. 7, p. 49-74, 2018.
- FERRANDIZ, M. L., ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents and actions*, v. 32, p. 283-288, 1991.
- FERRARI, F., MONACHE, F. D., SUÁREZ, A. I., ARVELO, F., COMPAGNONE, R. S. New cytotoxic isoflavone from the root bark of *Brosimum utile*. *Natural product research*, v. 19, n. 4, p. 331-335, 2005.
- FERREIRA, S. L. C., BRUNS, R. E., DA SILVA, E. G. P., DOS SANTOS, W. N. L., QUINTELLA, C. M., DAVID, J. M., & NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of chromatography A*, v. 1158, n. 1-2, p. 2-14, 2007.
- FIRMO, W. C.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS C. E. C. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais, São Luís, v. 18, dez. 2011.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >.

FUKAI, T., NISHIZAWA, J., NOMURA, T. Five Isoprenoid-substituted flavonoids from *Glycyrrhiza eurycarpa*. *Phytochemistry*, v. 35, p. 515-519, 1994.

GALUPPO, S. C. Documentação do uso e valorização do óleo de piquiá (*Caryocar Villosum* (Aubl) Pers.) e do leite do amapá-doce (*Brosimum parinarioides* Ducke) para a comunidade de Piquiatuba, Floresta Nacional do Tapajós. Estudos Físicos, Químicos, Fitoquímicos e Farmacológicos. Dissertação de mestrado em Ciências Florestais, Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará. 2004.

GELADI, P., ESBENSEN, K. The start and early history of chemometrics: Selected interviews. Part 1. *Journal of Chemometrics*, v. 4, n. 5, p. 337-354, 1990.

GIOVANNINI, P. Medicinal plants of the Achuar (Jivaro) of Amazonian Ecuador: Ethnobotanical survey and comparison with other Amazonian pharmacopoeias. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015

GOTTLIEB, O. R., LEA, M., & MAIA, J. S. Distribution of coumarins in Amazonian *Brosimum* species. *Phytochemistry*, v. 11, n. 12, p. 3479-3480, 1972.

HARBORNE, JEFFREY B.; WILLIAMS, CHRISTINE A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HAYASIDA, W.; LIMA, M. P.; NASCIMENTO, C. C.; FERREIRA, A. G. Resíduos madeireiros do alburno de pau-rainha (*Brosimum rubescens*): Investigação de metabólitos secundários e alguns aspectos tecnológicos. *Acta Amazônica*, v. 41, p. 285-288, 2011.

HAYASIDA, W.; SOUSA, A. S.; LIMA, M. P.; NASCIMENTO, C. C.; FERREIRA, A. G. Proposta de aproveitamento em resíduos de pau-rainha (*Brosimum rubescens*) descartados pelo setor madeireiro. *Acta Amazônica*, v. 38, p. 749-752, 2008.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, v. 444, p. 860-867, 2006.

HUANG, M. Z.; YUAN, C. H.; CHENG, S.; CHO, Y.; SHIEA, J. Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 3:43-65, 2011

Jaiswal, R., Müller, H., Müller, A., Karar, M.G.E., Kuhnert, N., Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC-MSⁿ, 2014. *Phytochemistry* v.108, p. 252-263.

JI, J., ZHU, J., HU, X., WANG, T., ZHANG, X., HOU, A.J., WANG, H. (2S)-7,4'-Dihydroxy-8-prenylflavan stimulates adipogenesis and glucose uptake through p38MAPK pathway in 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 460, p. 578-582, 2015.

JING, H., ZHOU, X., DONG, X., CAO, J., ZHU, H., LOU, J. & YANG, B. Abrogation of Akt signaling by Isobavachalcone contributes to its anti-proliferative effects towards human cancer cells. *Cancer letters*, v. 294, p. 167-177, 2010.

KAUR, R., KAUR, H., DHINDSA, A.S. *Glycyrrhiza glabra*: a phytopharmacological review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, v. 4, p. 2470-2477, 2013.

- KIM, H. P., SON, K. H., CHANG, H. W., & KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, p. 0411110005-0411110005, 2004.
- KUETE, V., & SANDJO, L. P. Isobavachalcone: an overview. *Chinese journal of integrative medicine*, v. 18, p. 543-547, 2012.
- KUETE, V., NGAMENI, B., SIMO, C. F., TANKEU, R. K., NGADJUI, B. T., MEYER, J. J. M., & KUIATE, J. R. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *Journal of ethnopharmacology*, v. 120, n. 1, p. 17-24, 2008.
- KUETE, V., NGAMENI, B., WIENCH, B., KRUSCHE, B., HORWEDEL, C., NGADJUI, B. T., & EFFERTH, T. Cytotoxicity and mode of action of four naturally occurring flavonoids from the genus *Dorstenia*: gancaonin Q, 4-hydroxylyonchocarpin, 6-prenylapigenin, and 6, 8-diprenyleriodictyol. *Planta medica*, v. 77, p. 1984-1989, 2011.
- KWON, J., HIEP, N.T., KIM, D.W., HONG, S., GUO, Y., HWANG, B.Y., LEE, H.J., MAR, W., LEE, D. Chemical constituents isolated from the root bark of *Cudrania tricuspidata* and their potential neuroprotective effects. *J. Nat. Prod.*, v. 79, p. 1938-1951, 2016.
- LAN, W. C., TZENG, C. W., LIN, C. C., YEN, F. L., & KO, H. H. Prenylated flavonoids from *Artocarpus altilis*: antioxidant activities and inhibitory effects on melanin production. *Phytochemistry*, v. 89, p. 78-88, 2013.
- LATHIFF, S.M.A., JEMAON, N., ABDULLAH, S.A., JAMIL, S. Flavonoids from *Artocarpus anisophyllus* and their bioactivities. *Nat. Prod. Commun.*, v. 10, p. 393-396, 2015.
- LEE, D., BHAT, K.P.L., FONG, H.H.S., FARNSWORTH, N.R., PEZZUTO, J.M., KINGHORN, A.D. Aromatase Inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *J. Nat. Prod.*, v. 64, p. 1286-1293, 2001.
- LEITE, VIVIANE GONCALVES; MANSANO, VIDAL FREITAS; TEIXEIRA, SIMONE PADUA. Floral development of Moraceae species with emphasis on the perianth and androecium. *Flora*, v. 240, p. 116-132, 2018.
- LI, K., JI, S., SONG, W., KUANG, Y., LIN, Y., TANG, S., CUI, Z., QIAO, X., YU, S., YE, M. Glycybridins A-K, bioactive phenolic compounds from *Glycyrrhiza glabra*. *J. Nat. Prod.*, v. 80, p. 334-346, 2017.
- LIBBY, P., RIDKER, P. M., & MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, v. 105, p. 1135-1143, 2002.
- LIMA, M. C. F., SILVA, C. C., & JUNIOR, V. F. V. *Brosimum* sp. da Amazônia: uma revisão. *Scientia Amazonia*, v. 2, p. 20-27, 2013.
- LIN, Y., KUANG, Y., LI, K., WANG, S., JI, S., CHEN, K., SONG, W., QIAO, X., YE, M. Nrf2 activators from *Glycyrrhiza inflata* and their hepatoprotective activities against CCl₄-induced liver injury in mice. *Bioorganic Med. Chem.*, v. 25, p. 5522-5530, 2017a.
- LIN, Y., KUANG, Y., LI, K., WANG, S., SONG, W., QIAO, X., & YE, M. Screening for bioactive natural products from a 67-compound library of *Glycyrrhiza inflata*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 25, p. 3706-3713, 2017.
- LIN, Y., KUANG, Y., LI, K., WANG, S., SONG, W., QIAO, X., SABIR, G., YE, M. Screening for bioactive natural products from a 67-compound library of *Glycyrrhiza inflata*. *Bioorganic Med. Chem.*, v. 25, p. 3706-3713, 2017b.

- LIU, J.; WANG, H.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Leaf Spray: Direct Chemical Analysis of Plant Material and Living Plants by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 83, 7608–7613, 2011.
- LIU, Y. P., YU, X. M., ZHANG, W., WANG, T., JIANG, B., TANG, H. X., ... & FU, Y. H. Prenylated chromones and flavonoids from *Artocarpus heterophyllus* with their potential antiproliferative and anti-inflammatory activities. *Bioorganic Chemistry*, v. 101, 104030, 2020.
- LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A., & CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, v. 4, p. 118, 2010.
- LOURENÇO, Miriam Verginia. Estudo comparativo dos constituintes químicos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e do medicamento V. 2001.
- LUXIMON-RAMMA, A., BAHORUN, T., SOOBRAATTEE, M. A., & ARUOMA, O. I. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 50, p. 5042-5047, 2002.
- MA, C.J., LI, G.S., ZHANG, D.L., LIU, K., FAN, X. One step isolation and purification of liquiritigenin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza uralensis* Risch. using high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr.*, v. 1078, p. 188-192, 2005.
- MACHADO, H., NAGEM, T. J., PETERS, V. M., FONSECA, C. S., & DE OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução (Descontinuado)*, v. 27, n.1/2, 2008.
- MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., & JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, v. 79, p. 727-747, 2004.
- MAUÉS, L. A. L., ALVES, G. M., COUTO, N. M. G., DA SILVA, B. J. M., ARRUDA, M. S. P., MACCHI, B. M., & DO NASCIMENTO, J. L. M. Flavonoids from the Amazon plant *Brosimum acutifolium* induce C6 glioma cell line apoptosis by disrupting mitochondrial membrane potential and reducing AKT phosphorylation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 113, p. 108728, 2019.
- MBAVENG, A.T., NGAMENI, B., KUETE, V., SIMO, I.K., AMBASSA, P., ROY, R., BEZABIH, M., ETOA, F.X., NGADJUI, B.T., ABEGAZ, B.M., MEYER, J.J.M., LALL, N., BENG, V.P. Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *J. Ethnopharmacol.*, v. 116, p. 483-489, 2008.
- MICHEL, JOANNA L.; CACERES, ARMANDO; MAHADY, GAIL B. Ethnomedical research and review of Q'eqchi Maya women's reproductive health in the Lake Izabal region of Guatemala: Past, present and future prospects. *Journal of ethnopharmacology*, v. 178, p. 307-322, 2016.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, v. 26, p. 211-219, 2004.
- MONTEIRO, V. DE F.F., MATHIAS, L., VIEIRA, I.J.C., SCHRIPEMA, J., BRAZ-FILHO, R. Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.13, p. 281-287, 2002.
- MORETTI, C.; GAILLARD, Y.; GRELAND, P.; BÉVALOT, F.; PRÉVOSTO, J. Identification of 5- hydroxy-tryptamine (bufotenine) in takini (*Brosimum acutifolium* Huber

subsp. *acutifolium* C.C. Berg, Moraceae), a shamanic potion used in the Guiana Plateau. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, p. 198–202, 2006.

MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSELL, D. S., & OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

NGADJUI, B. T., WATCHUENG, J., KEUMEDJIO, F., NGAMENI, B., SIMO, I. K., & ABEGAZ, B. M. Prenylated chalcones, flavone and other constituents of the twigs of *Dorstenia angusticornis* and *Dorstenia barteri* var. *subtriangularis*. *Phytochemistry*, v. 66, n. 6, p. 687-692, 2005.

NGADJUI, B.T., WATCHUENG, J., KEUMEDJIO, F., NGAMENI, B., SIMO, I.K., ABEGAZ, B.M. Prenylated chalcones, flavone and other constituents of the twigs of *Dorstenia angusticornis* and *Dorstenia barteri* var. *subtriangularis*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 687-692, 2005.

NGADJUI, BONA VENTURE T.; ABEGAZ, BERHANU M. The chemistry and pharmacology of the genus *Dorstenia* (Moraceae). In: *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, 2003. p. 761-805.

NGAMENI, B., FOTSO, G.W., AMBASSA, P., KAMGA, J., DASTAN, A., NGADJUI, B.T. Hemisynthesis and spectroscopic characterization of three new chalcone derivatives from *Dorstenia barteri*. *Chem. Nat. Compd.*, v. 53, p. 241-247, 2017.

NGAMENI, B., KUETE, V., SIMO, I. K., MBAVENG, A. T., AWOUSSONG, P. K., PATNAM, R., & NGADJUI, B. T. Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *South African Journal of Botany*, v. 75, n. 2, p. 256-261, 2009.

NGAMENI, B., TOUAIBIA, M., PATNAM, R., BELKAID, A., SONNA, P., NGADJUI, B.T., ANNABI, B., ROY, R. Inhibition of MMP-2 secretion from brain tumor cells suggests chemopreventive properties of a furanocoumarin glycoside and of chalcones isolated from the twigs of *Dorstenia turbinata*. *Phytochemistry*, v. 67, p. 2573-2579, 2006.

NGAMENI, B., WATCHUENG, J., BOYOM, F. F., KEUMEDJIO, F., NGADJUI, B. T., GUT, J., & ROSENTHAL, P. J. Antimalarial prenylated chalcones from the twigs of *Dorstenia barteri* var. *subtriangularis*. *Arkivoc*, v. 13, p. 116-123, 2007.

NGAMENI, BATHELEMY et al. Bioactive chalcones from *Dorstenia* species (Moraceae) in Cameroon. *The Pharmaceutical and Chemical Journal*, v. 7, n 2, p. 91-105, 2020

NGUYEN, M. T. T., NGUYEN, N. T., NGUYEN, K. D. H., DAU, H. T. T., NGUYEN, H. X., DANG, P. H., & AWALE, S. Geranyl dihydrochalcones from *Artocarpus altilis* and their antiausteric activity. *Planta medica*, v. 80, n. 02/03, p. 193-200, 2014.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S.N.; CHECHINEL FILHO V. ; Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e consideração sobre fitoterápicos. *Ciências farmacêuticas. Contribuições ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*. Editores: Bresolin, T. M.B. & Cechinel filho, p.10-56, Itajaí, 2003.

- NOMURA, T., HANO, Y., & AIDA, M. Isoprenoid-substituted flavonoids from *Artocarpus* plants (Moraceae). *Heterocycles*, v. 2, n.47, p. 1179-1205, 1998.
- NOVAES, C. G., YAMAKI, R. T., DE PAULA, V. F., DO NASCIMENTO JÚNIOR, B. B., BARRETO, J. A., VALASQUES, G. S., & BEZERRA, M. A. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta-Parte I: variáveis de processo. *Revista Virtual Química*, v. 9, n. 3, p. 1284-1215, 2017.
- NUNES, C. D. R., BARRETO ARANTES, M., MENEZES DE FARIA PEREIRA, S., LEANDRO DA CRUZ, L., DE SOUZA PASSOS, M., PEREIRA DE MORAES, L., & BARROS DE OLIVEIRA, D. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*, v. 25, p. 3726, 2020.
- O'CONNOR, S.; GIBBONS, S. Editorial: Modern Methods in Plant Natural Products themed issue, *Nat. Prod. Rep.*, 30-483, 2013.
- PARK, C., LEE, W. S., GO, S. I., NAGAPPAN, A., HAN, M. H., HONG, S. H., & CHOI, Y. H. Morin, a flavonoid from moraceae, induces apoptosis by induction of BAD protein in human leukemic cells. *International journal of molecular sciences*, v. 16, p. 645-659, 2014.
- PEDROLLO, C. T., KINUPP, V. F., SHEPARD JR, G., & HEINRICH, M. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. *Journal of ethnopharmacology*, v. 186, p. 111-124, 2016.
- PEREIRA, P. C. D. S., FREITAS, C. F. D., CHAVES, C. S., ESTEVÃO, B. M., PELLOSI, D. S., TESSARO, A. L., & HIOKA, N. A quimiometria nos cursos de graduação em química: proposta do uso da análise multivariada na determinação de pK^a . *Química Nova*, v. 37, p. 1417-1425, 2014.
- PEREIRA, V. D. J., & KAPLAN, M. A. C. *Artocarpus*: um gênero exótico de grande bioatividade. *Floresta e Ambiente*, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2013.
- PINAGÉ GR. Moraceae. In: Rios MNS, Pastore Jr F. (orgs.) *Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral*. Brasília, Universidade de Brasília. p. 2391-2453., 2011.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; PEPORINE, N. L.; EPIFANIO, R. A. *Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas*. *Química Nova*, São Paulo, v.25, supl.1, p.45-61, 2002.
- PINTO, M.D.C. Determination of lipoxygenase activity in plant extracts using a modified ferrous oxidation-xylene orange assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 5, p. 5956-5959, 2007.
- PIROUETTE. *Multivariate Data Analysis. Version 4.0* Infometrix, Inc. 2008.
- POZETTI, G. L. Chemical study of *Brosimum gaudichaudii* trecul. Isolation and identification of bergapten, and psoralene from the roots of *Brosimum gaudichaudii* trecul. *Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara*, v. 3, p. 215-223, 1969.
- PRAKASH, O., KUMAR, R., MISHRA, A., & GUPTA, R. *Artocarpus heterophyllus* (Jackfruit): an overview. *Pharmacognosy Reviews*, v. 3, n. 6, p. 353, 2009.
- QUINTANA, S.E., HERNÁNDEZ, D.M., VILLANUEVA-BERMEJO, D., GARCÍA-RISCO, M.R., FORNARI, T. Fractionation and precipitation of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) phytochemicals by supercritical antisolvent (SAS) technique. *Lwt- Food Sci. Technol.*, v. 126, p. 109315-109319, 2020.

- RAMALINGAM, M., KIM, H., LEE, Y., LEE, Y.II. Phytochemical and pharmacological role of liquiritigenin and isoliquiritigenin from Radix Glycyrrhizae in human health and disease models. *Front. Aging Neurosci.*, v.10, p. 1-15, 2018.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*. v. 39, p. 603-13, 2001.
- REVILLA, J. Plantas da Amazônia Oportunidades Econômicas e Sustentáveis. Ed. INPA e SEBRAE, Manaus-AM, pp. 89-90, 283-284, 2002.
- RIBEIRO, J. E. L. da S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. da S.; DE BRITO, J. M.; DE SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P.; APÓSTOLO, C. L.; PEREIRA, E. da C.; DA SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia, Central/ José Eduardo L. Da S. Ribeiro; Manaus: INPA, 816 p, 1999.
- RIBEIRO, R. V.; BIESK I. G.; BALOGUN, S. O ; MARTINS, D. T. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, (16)32197-3, 2017
- RICE-EVANS, C., MILLER, N., & PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, v. 2, p. 152-159, 1997.
- ROMANIUC NETO, S., CARAUTA, J.P.P., VIANNA FILHO, M.D.M., PEREIRA, R.A.S., RIBEIRO, J.E.L. DA S., MACHADO, A.F.P., SANTOS, A. DOS, PELISSARI, G., PEDERNEIRAS, L.C. 2015. Moraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB120642>>. BFG.
- Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411)
- RUFINO, M. D. S. M., ALVES, R. E., DE BRITO, E. S., DE MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. D. G., PÉREZ-JIMENEZ, J., & SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico, 2007.
- RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS.+: p 4. 2007.
- SÁ, I. S. C. Caracterização química e estudo da atividade biológica de substâncias obtidas da casca e do látex da espécie *Brosimum parinarioides* (Moraceae). 2018. 163 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.
- SÁ, I. S., DA SILVA, F. M., & NUNOMURA, R. Simplex centroid mixture design, DI-ESI-MS, and chemometric analysis-guided isolation of parinarioidin C from bark of *Brosimum parinarioides* (Moraceae). *Phytochemistry Letters*, v. 50, p. 25-30, 2022.
- SÁ, I. S., NEVES, K. O., GUIMARAES, A. C., DA SILVA, F. M., & NUNOMURA, R. Chalcones and flavans from the bark of *Brosimum acutifolium* subsp. *interjectum* (Moraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 93, p. 104175, 2020b.
- SA, I. S., NEVES, K. O., MESQUITA, R. D. S., BASTOS, L. M., SALES, M. L., DA SILVA, F. M., & NUNOMURA, R. Parinarioidins A-B, unprecedented flavonoids from the bark of

- Brosimum parinarioides* Ducke. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 91, p. 104075, 2020a.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2003.
- SEGER C.; STURM, S.; STUPPNER, H. Mass spectrometry and NMR spectroscopy: modern high-end detectors for high resolution separation techniques – state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations, *Nat. Prod. Rep.*, 30-970, 2013.
- SEN, S., CHAKRABORTY, R., SRIDHAR, C., REDDY, Y. S. R., & DE, B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International journal of pharmaceutical sciences review and research*, v. 3, p. 91-100, 2010.
- SHANLEY, P.; MEDINA, G.; CORDEIRO, S.; IMBIRIBA, M. Frutíferas e Plantas Úteis Na Vida Amazônica. In: GAIA, G. *Amapá: o fortificante da Amazônia*; CIFOR; Imazon, Belém, pg.101-102; 2005.
- SHIROTA, O.; SEKITA, S.; HIRAYAMA, Y.; HAKAMATA, Y.; HAYASHI, T.; YANAGAWA, M. Two chalcone-prenylcoumarin diels-alder adducts from *Brosimum rubescens*. *Phytochemistry*, v. 47. n. 7. p. 1381-1385. 1998
- SHIROTA, O.; TAKIZAWA, K.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; HIRAYAMA, Y.; HAKAMATA, Y.; YANAGAWA, T. Antiandrogenic natural Diels-Alder-type adducts from *Brosimum rubescens*. *Journal of Natural Products*, v. 60, n. 10, p. 997-1002, 1997.
- SHOELSON, S. E., LEE, J., & GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, v. 116, p 1793-1801, 2006.
- Silva, F. M. A., Silva, K. P. A., Oliveira, L. P. M., Costa, E. V., Koolen, H. H., Pinheiro, M. L. B., Souza, A. Q. L., Souza, A. D. L. Flavonoid glycosides and their putative human metabolites as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease (Mpro) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 115, 2020.
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora, 2016.
- SINGH, R. P., SHARAD, S., & KAPUR, S. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. *J Indian Acad Clin Med*, v. 5, p. 218-225, 2004.
- SNYDER, L. R. Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatography A*, v. 92, n. 2, p. 223-230, 1974.
- SNYDER, L. R. Classification off the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatographic Science*, v. 16, n. 6, p. 223-234, 1978.
- SOARES, PATRICIA KAORI; SCARMINIO, IEDA SPACINO. Multivariate chromatographic fingerprint preparation and authentication of plant material from the genus *Bauhinia*. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, v. 19, n. 1, p. 78-85, 2008.
- SOBEH, M., MAHMOUD, M. F., SABRY, O. M., ADEL, R., DMIRIEH, M., EL-SHAZLY, A. M., & WINK, M. HPLC-PDA-MS/MS characterization of bioactive secondary metabolites

from *Turraea fischeri* bark extract and its antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. *Molecules*, v. 22, p. 2089, 2017.

STEWART, J. J. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA. <http://OpenMOPAC.net>, 2016.

SU, C., DUAN, Y., TIAN, J., LIU, J., XIE, K., CHEN, D., & DAI, J. Morusalisins AF, six new Diels-Alder type adducts, as potential PTP1B inhibitors from cell cultures of *Morus alba*. *Fitoterapia*, v. 146, p. 104682, 2020.

SU, S. Y., XUE, J. J., YANG, G. Y., LEI, C., HOU, A. J. New cytotoxic alkylated chalcones from *Fatoua villosa*. *Chem. Biodivers.*, v. 14, p. 6-11, 2017.

TAKASHIMA, J.; OHSAKI, A. Acutifolins A-F, a New Flavan-Derived Constituent and Five New Flavans from *Brosimum acutifolium*. *Journal of Natural Products*, v. 64, n. 12, p. 1493 – 1496, 2001.

Takashima, J., Asano, S., Ohsaki, A., Mururins A-C, three new lignoids from *Brosimum acutifolium* and their protein kinase inhibitory activity. *Planta Medica* 68, 621-625, 2002.

Takashima, J., Komiyama, K., Ishiyama, H., Kobayashi, J.I., Ohsaki, A., Brosimacutins J-M, four new flavonoids from *Brosimum acutifolium* and their cytotoxic activity. *Planta Medica* 71, 654-658, 2005.

TASNEEM, S., LIU, B., LI, B., CHOUDHARY, M. I., & WANG, W. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Pharmacological research*, v. 139, p. 126-140, 2019.

TAVIANO, M. F., RASHED, K., FILOCAMO, A., CACCIOLA, F., DUGO, P., MONDELLO, L., & MICELI, N. Phenolic profile and biological properties of the leaves of *Ficus vasta* Forssk. (Moraceae) growing in Egypt. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.

TEIXEIRA, A. F. Estudo Químico e Biológico das cascas do caule de *Brosimum acutifolium* (MURURÉ). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 2000.

TORRES, S. L.; ARRUDA, M.S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C.; SILVA, S. C. Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. *Phytochemistry*, v. 53, p. 1047–1050, 2000.

TORRES, S. L.; MONTEIRO, J. C. M.; ARRUDA, M.S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Two flavans from *brosimum acutifolium*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 02, p. 347–349, 1997.

TRAN, H.N.K., NGUYEN, V.T., KIM, J.A., RHO, S.S., WOO, M.H., CHOI, J.S., LEE, J.H., MIN, B.S. Anti-inflammatory activities of compounds from twigs of *Morus alba*. *Fitoterapia*, v. 120, p. 17-24, 2017.

TROTT, O., OLSON, A. J. AutoDockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, v. 31, p. 455-461, 2010.

VALKO, M., RHODES, C. J. B., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. M., & MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, v. 160, p. 1-40, 2006.

- VENKATARAMAN, K. Wood phenolics in the chemotaxonomy of the moraceae. *Phytochemistry*, v. 11, n. 5, p. 1571-1586, 1972.
- VIEIRA, I. J. C. A new coumarins from *Brosimum gaudichaudii* Trecul. *Nat. Prod. Lett.*, v.13, n.1, p.47-52, 1999.
- WANG, M., LIN, L., LU, J. J., & CHEN, X. Pharmacological review of isobavachalcone, a naturally occurring chalcone. *Pharmacological research*, v. 165, p. 105483, 2021.
- WANG, Y., LIANG, H., ZHANG, Q., CHENG, W., & YI, S. Phytochemical and chemotaxonomic study on *Ficus tsiangii* Merr. ex Corner. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 57, p. 210-215, 2014.
- WILLIAMS, R. J., SPENCER, J. P., & RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. *Free radical biology and medicine*, v. 36, p. 838-849, 2004.
- WOJDYŁO, A., NOWICKA, P., CARBONELL-BARRACHINA, Á. A., & HERNÁNDEZ, F. Phenolic compounds, antioxidant and antidiabetic activity of different cultivars of *Ficus carica* L. fruits. *Journal of Functional Foods*, v. 25, p. 421-432, 2016.
- YANG, Y., YANG, X., XU, B., ZENG, G., TAN, J., HE, X. & ZHOU, Y. Chemical constituents of *Morus alba* L. and their inhibitory effect on 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation. *Fitoterapia*, v. 98, p. 222-227, 2014.
- YANG, Y., ZHANG, T., XIAO, L., YANG, L., & CHEN, R. Two new chalcones from leaves of *Morus alba* L. *Fitoterapia*, v. 81, n. 6, p. 614-616, 2010.
- YAZBEK, P. B.; TEZOTO, J.; CASSAS, F.; RODRIGUES, E. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures, *Journal of Ethnopharmacology*, 2015.
- YEN, S. C., CHEN, L. C., HUANG, H. L., NGO, S. T., WU, Y. W., LIN, T. E., & HSU, K. C. Investigation of selected flavonoid derivatives as potent FLT3 inhibitors for the potential treatment of acute myeloid leukemia. *Journal of Natural Products*, v. 84, p. 1-10, 2021.
- YIN, S., FAN, C.Q., WANG, Y., DONG, L., YUE, J.M. Antibacterial prenylflavone derivatives from *Psoralea corylifolia*, and their structure-activity relationship study. *Bioorganic Med. Chem.*, v. 12, p. 4387-4392, 2004.
- YUNES, R.A.; PEDROSA. R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v.24, n.1, p.147-152, 2001.
- ZERBIB, M., CAZALS, G., ENJALBAL, C., SAUCIER, C. Identification and quantification of flavanol glycosides in *Vitis vinifera* grape seeds and skins during ripening. *Molecules* v. 23, p. 2745, 2018.
- ZULAIKHAH, S. T. The role of antioxidant to prevent free radicals in the body. *Sains Medika*, v. 8, p. 39-45, 2017.

ANEXO

Tabela A1. Matriz utilizada na análise quimiométrica de *B. acutifolium* baseado nas intensidades dos picos obtidos entre m/z 200 a 800.

	DCM	EtOH	AcOEt	AcOEt/DCM	DCM/EtOH	EtOH/AcOEt	DCM/AcOEt/EtOH
201	1.46	2.21	3.19	11.08	1.53	1.14	2.46
202	0.22	1.16	0.64	5.09	0.85	1.11	1.44
203	0.96	1.46	0.9	5.91	1.29	1.14	3.85
205	0.45	0.86	0.82	5.09	0.55	0.42	1.71
207	0.84	3.61	1.23	10.67	2.9	2.63	6.17
209	0.83	2.33	1.15	10.06	1.64	1.36	5.48
211	1.05	4.1	2.13	17.68	3.35	3.82	4.53
215	0.87	70.44	3.6	7.54	61.13	51.74	51.84
217	0.81	24.83	2.01	5.24	25.5	18.98	24.76
221	0.61	1.63	2.56	6.25	0.88	1.05	2.24
223	0.83	1.85	1.43	8.26	1.63	0.99	2.95
225	1.3	3.1	1.74	7.74	2.5	2.34	5.05
227	0.92	1.86	4.84	4.08	2.46	1.33	7.34
233	0.4	1.95	2.42	5.23	1.34	1.46	4.16
235	0.41	2.86	1.36	5.94	1.98	1.74	3.04
239	0.89	2.04	3.24	6.9	1.63	1.26	3.73
241	0.63	1.36	3.71	3.62	1.31	0.99	5.23
243	1.25	14.25	1.7	5.43	25.74	16.64	26.98
245	1.8	7.13	1.64	9.9	10.27	7.06	10.9
249	1.02	2.08	1.42	5.32	1.33	0	2.65
251	0.39	1.1	1.54	5.05	1.1	1.04	2.22
253	1.22	2.13	5.86	7.16	2.77	2.12	7.44
255	100	76.13	22.92	60.06	22.2	19.55	72.53
256	12.45	11.95	0	9.8	4.24	4.69	14.36
257	3.48	3.39	4.1	8.66	1.93	3.79	5.99
265	1.39	1.81	3.4	4.61	1.71	1.46	6.04
267	0.77	1.66	2.25	7.31	1.46	1.28	4.61
269	1.77	10.84	4.59	21.83	7.06	5.87	13.21
271	4.86	10.41	2.39	40.84	8.94	7.37	13.69
272	0.88	2.36	0.35	7.94	1.57	1.37	3.15
277	0.37	2.22	0.98	5.45	1.48	2.21	5.16
279	0.64	5.41	3.19	13.07	3.22	5.15	55.12
280	0.11	0.86	0.42	2.64	0.58	0.94	9.39
281	0.8	9.53	6.15	16.73	6.5	7.6	100
283	1.34	4.13	8.52	6.34	1.32	3.01	19.43
284	0.27	0.16	0.1	0.56	2.55	0.25	24.97
285	4.88	6.16	2.32	11.78	3.44	3.32	8.46
287	1.8	6.93	1.37	19.54	5.4	5.1	7.77
289	0.64	3.69	1.45	11.64	3.11	2.72	5.76
293	7.15	30.34	100	13.54	3.82	2.89	11.32
294	0	6.11	18.19	0	1.17	0.8	1.06
295	1.23	0	3.43	4.15	0	1.33	13.09
297	0.9	2.67	3.11	5.26	1.68	1.75	7.87
299	1.75	2.54	1.1	6.58	1.64	1.41	4.11
301	1.5	3.28	1.65	13.05	4.85	3.84	9.95

303	0.68	7.16	1.68	19.05	7.81	5.56	9.61
307	0.69	2.13	1.09	6.41	2.12	1.9	3.49
309	0.92	4.41	4.23	7.42	4.43	3.87	12.39
311	1.27	6.18	6.01	10.88	5.7	6.37	18.81
313	0.51	1.61	1.66	4.85	1.2	1.07	6.19
315	1.06	1.99	1.57	4.87	1.57	1.32	5.17
317	0.92	1.68	0.74	3.36	1.63	1.07	5.72
321	0.63	10.38	2.1	8.85	8.11	8.92	22.22
322	0.11	2.16	0.2	2.77	2.44	2.36	5.12
323	2.61	100	4.36	61.34	100	100	69.13
324	0.44	21.49	0	12.1	19.57	18.64	14.99
325	8.29	16.67	6.7	13.09	10.01	9.39	21.76
327	3.47	3.93	1.92	13.26	3.14	2.3	9.23
329	0.75	4.86	2.63	19.19	4.12	3.06	11.31
337	1.13	7.85	1.65	14.29	6.3	6.02	7.4
339	5.35	22.73	6.94	37.09	17.92	16.24	27.88
340	1.07	3.61	0.15	6	3.21	3.25	6.18
341	3.75	30.12	4.37	46.71	26.63	23.61	32.24
342	0.69	5.3	0.3	7.79	4.97	4.84	6.36
343	4.45	3.43	1.09	7.56	2.59	2.29	6.33
353	1.3	6.49	2.47	9.35	4.89	6.37	6.59
355	2.62	3.64	1.41	16.21	2.96	2.84	5.75
357	8.14	7.11	1.19	6.7	4.72	2.84	6.48
359	9.92	8.07	1.46	8.34	6.79	4.54	7.65
367	0.67	1.79	1.41	5.9	1.45	1.1	2.84
370	0.15	0.23	0.32	13.32	0	0.16	1.23
371	0.69	1.97	0.31	6.78	2.1	2.03	3.04
377	1.06	8.25	0.31	1.92	7.02	4.46	5.92
384	0.08	0.08	0.75	18.6	1.54	1.64	0.93
385	0.65	1.54	0.57	5.82	1.11	0.48	1.97
391	0.4	21.72	2.34	11.65	13.83	19.11	11.04
392	0.15	6.21	0.53	0	3.95	5.59	4.02
397	0.5	0.6	0.76	11.07	0	0.91	1.92
400	0.01	0.13	0.06	6.49	0.11	0.1	0.29
407	0.79	3.45	0.79	4.19	2.17	2.53	6.61
412	0.05	0.25	0.09	5.63	0	0.15	1.05
421	1.21	2.39	1.37	2.32	1.59	1.41	6.09
427	0.28	0.65	1.57	3.55	0.58	0.37	29.53
447	0.68	4.01	2.63	4.76	4.86	3.17	6.86
451	0.36	23.97	4.95	39.64	30.12	21.03	44.71
452	0.14	6.64	1.39	10.33	7.89	5.7	12.37
456	0.06	6.48	0.8	0	0	5.79	0
461	0.92	1.87	0.5	6.59	1.68	1.03	2.53
491	0.34	2.08	0.23	5.54	2.37	1.8	1.71
503	0.25	2.55	1.09	8.8	2.17	2.12	4.01
613	0.19	4.85	1.23	8.92	4.62	4.17	7.39
739	0.08	6.7	0.55	1.03	5.78	4.94	7.03

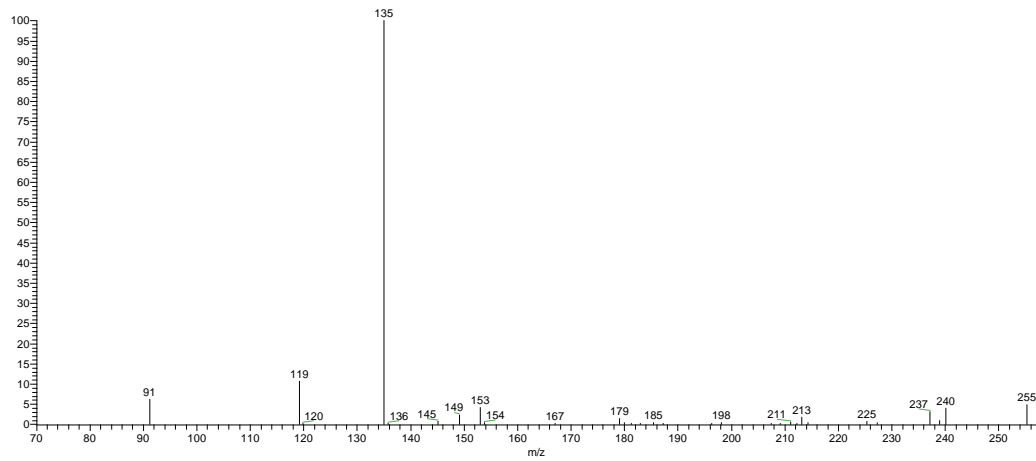


Figura A1. Espectro de MS/MS do íon em m/z 255 presente na casca de *B. acutifolium*.

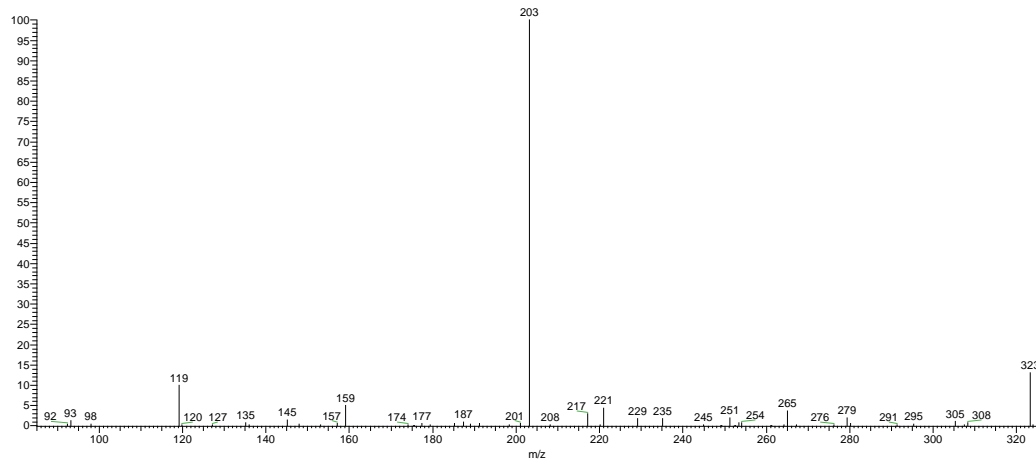


Figura A2. Espectro de MS/MS do íon em m/z 323 presente na casca de *B. acutifolium*.

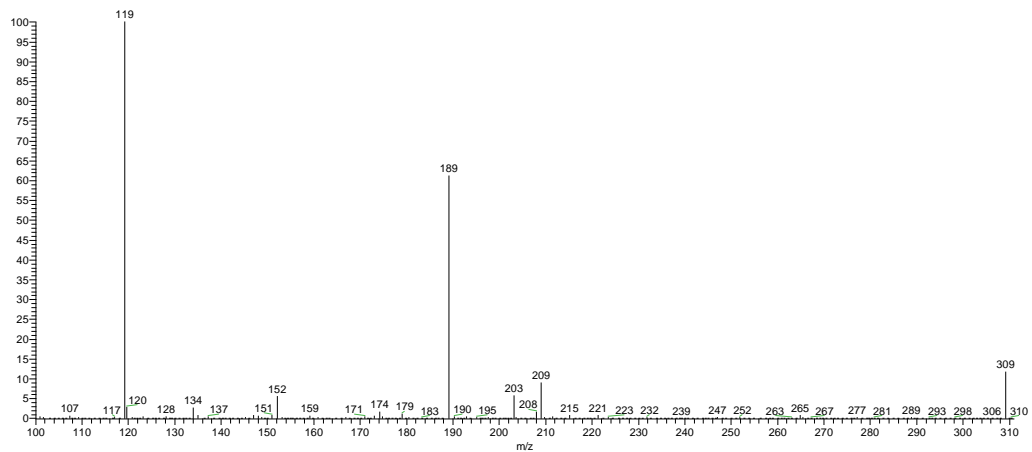


Figura A3. Espectro de MS/MS do íon em m/z 309 presente na casca de *B. acutifolium*.

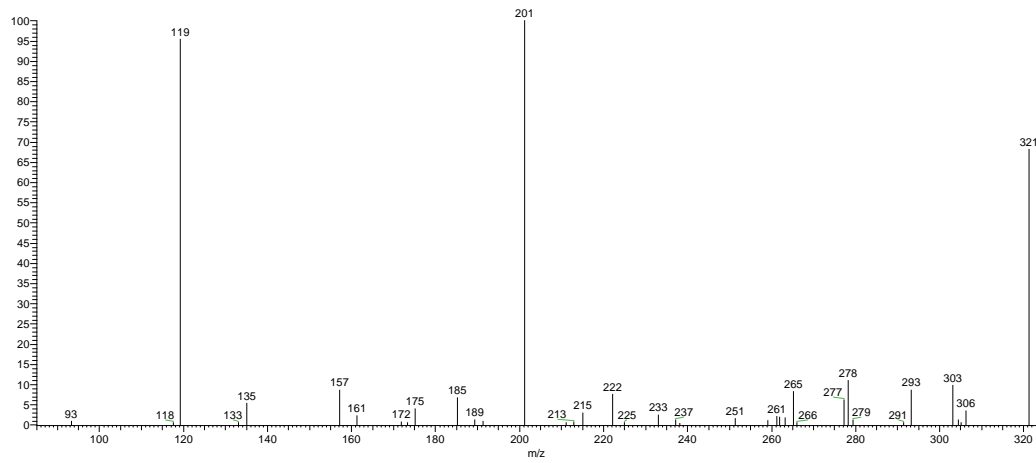


Figura A4. Espectro de MS/MS do íon em m/z 321 presente na casca de *B. acutifolium*.

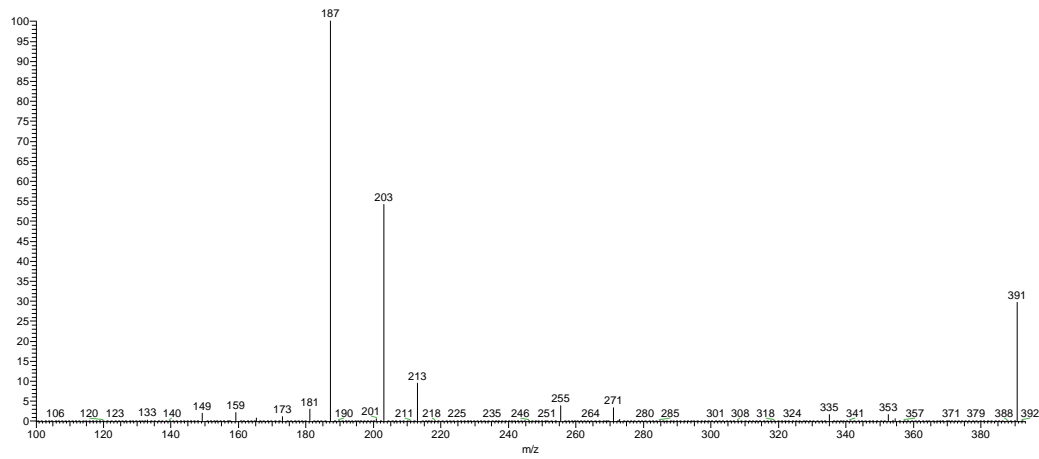


Figura A5. Espectro de MS/MS do íon em m/z 391 presente na casca de *B. acutifolium*.

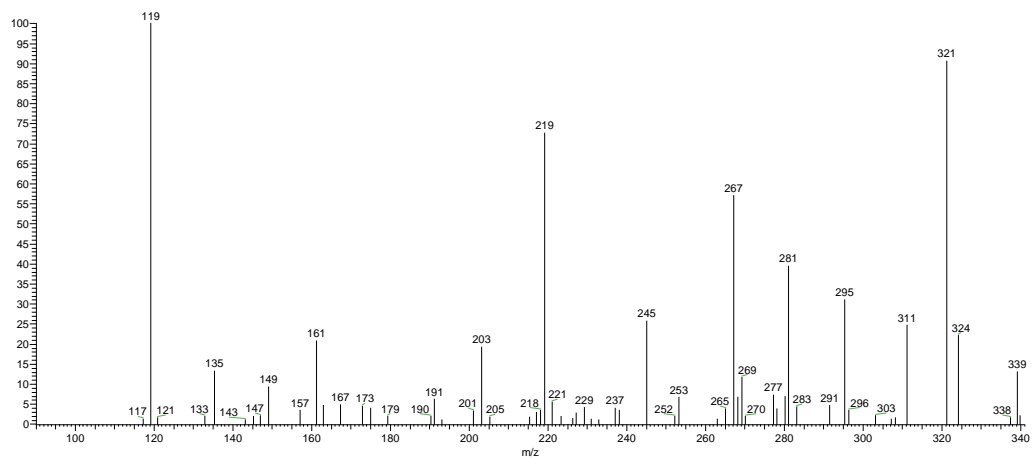


Figura A6. Espectro de MS/MS do íon em m/z 339 presente na casca de *B. acutifolium*.

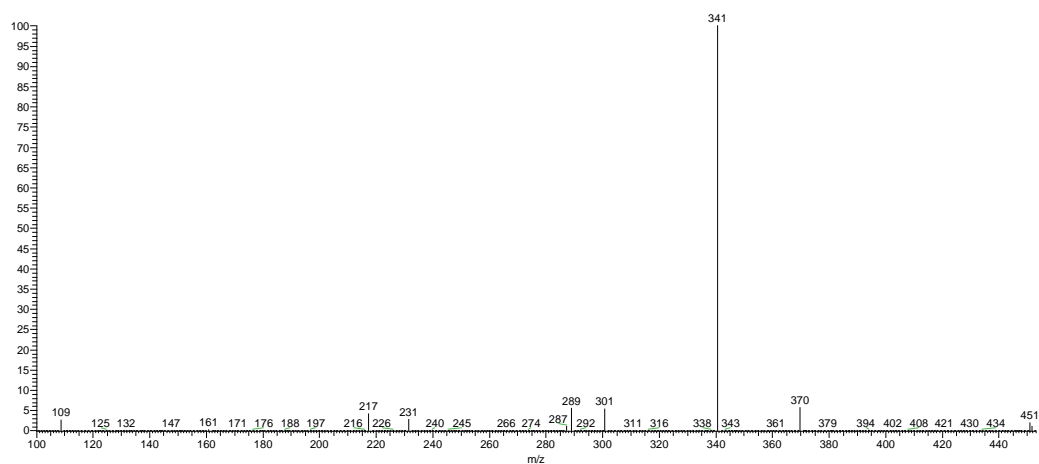


Figure A7. Espectro de MS/MS do íon em m/z 451 presente na casca de *B. acutifoium*.

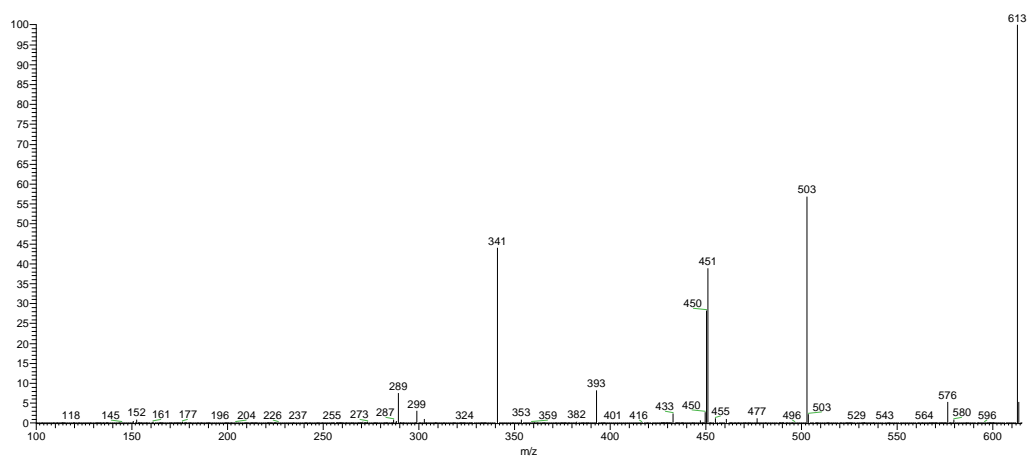


Figure A8. Espectro de MS/MS do íon em m/z 613 presente na casca de *B. acutifoium*.

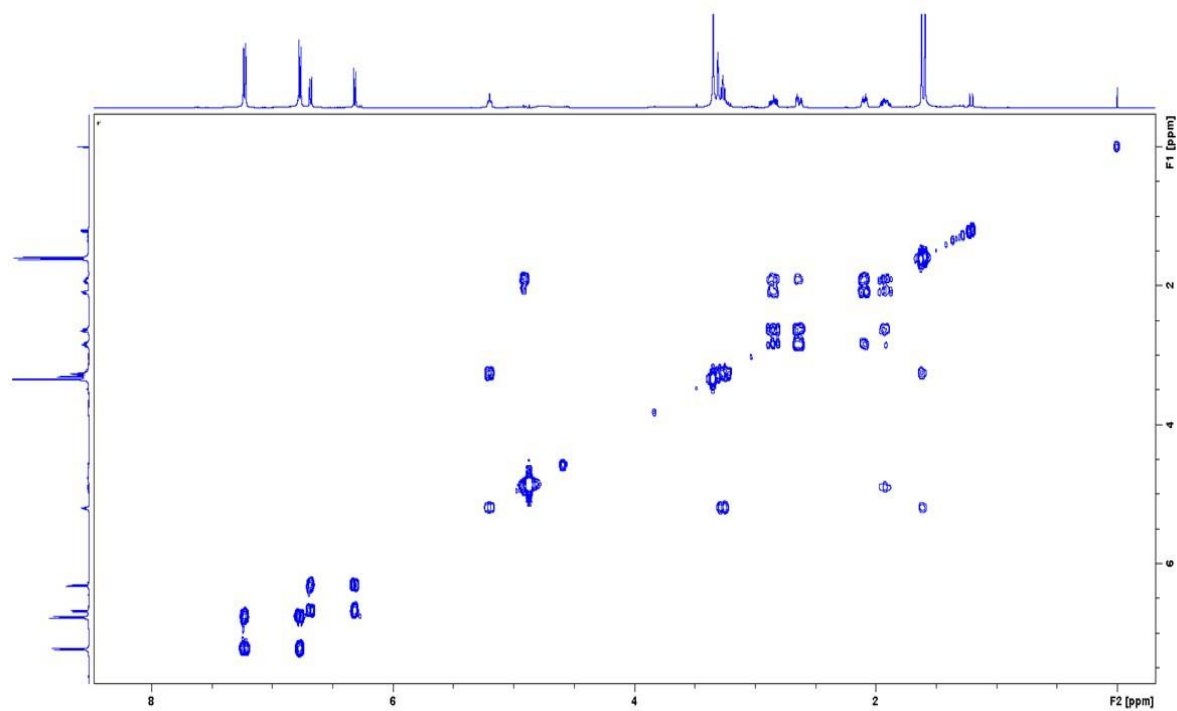


Figure A9. Mapa de correlação homonuclear COSY (¹H-¹H, MeOD, 500 MHz) da substância BAS-309.

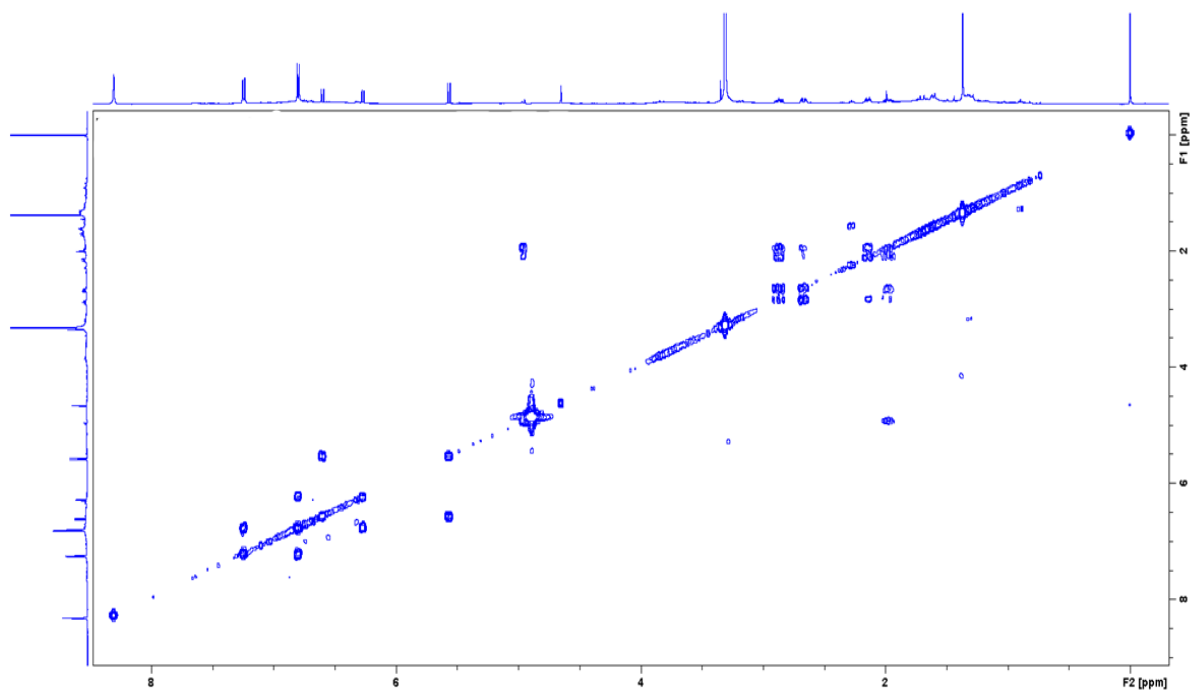


Figura A10. Mapa de correlação homonuclear COSY (¹H-¹H, MeOD, 500 MHz) da substância BAS-307.

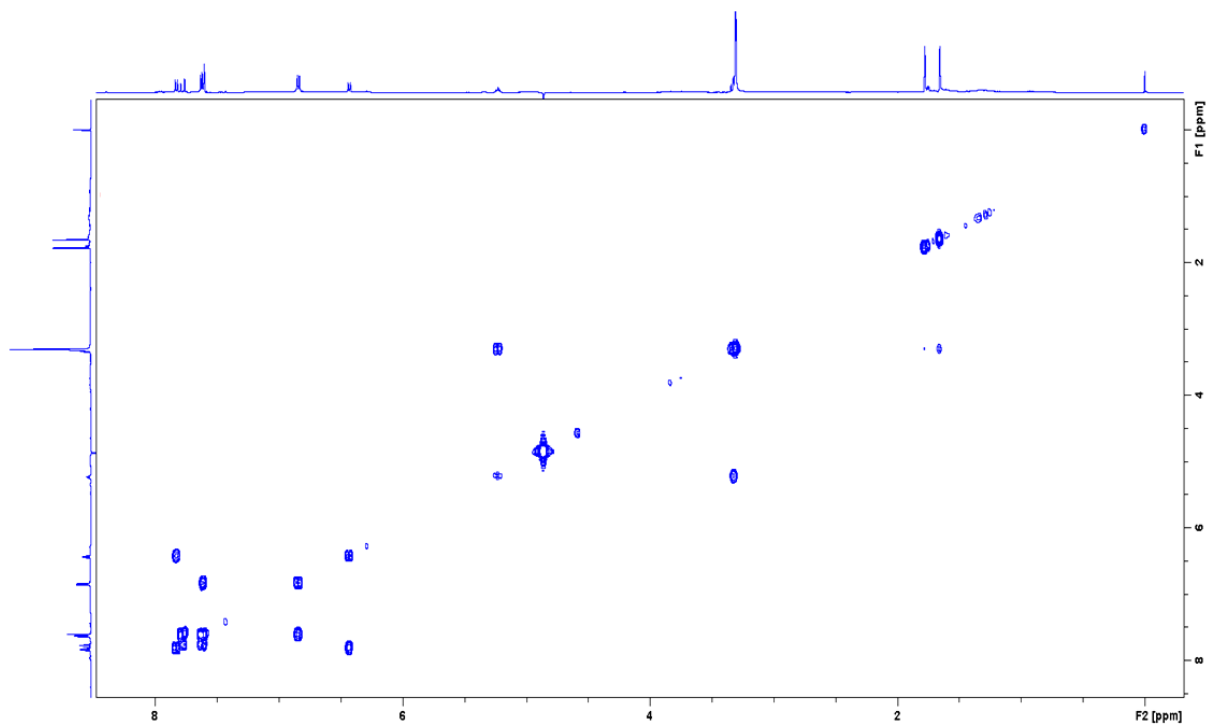


Figura A11. Mapa de correlação homonuclear COSY (^1H - ^1H , MeOD, 500 MHz) da substância BAS-323.

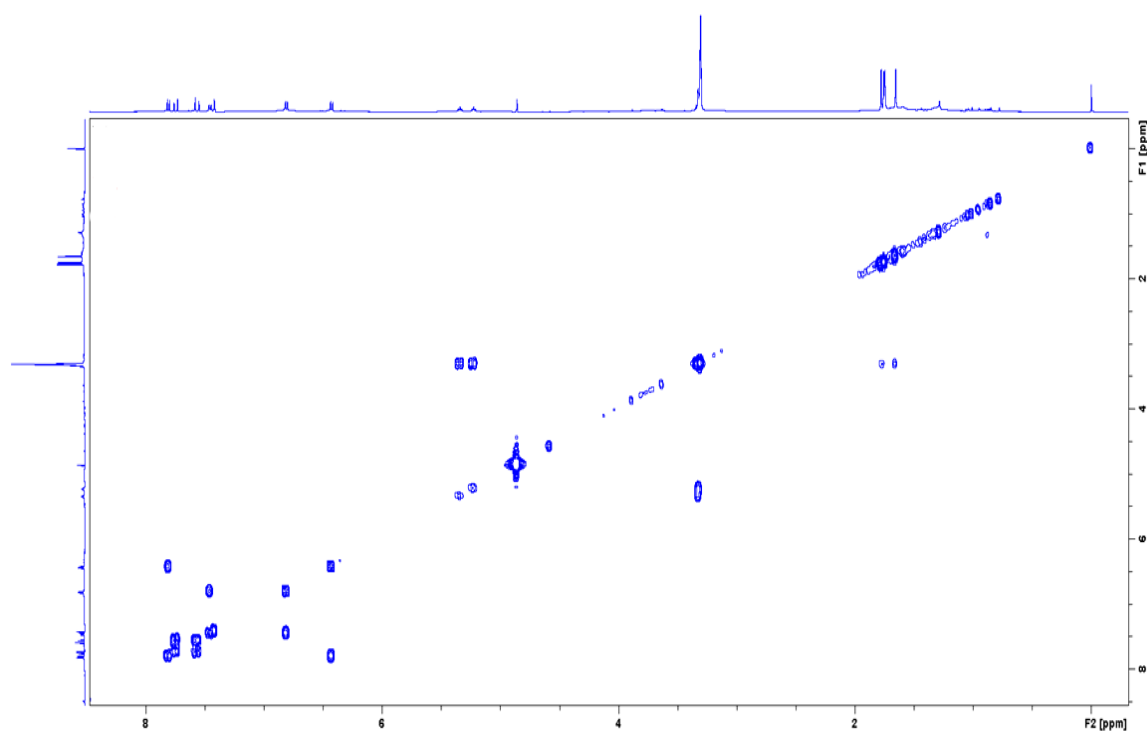


Figura A12. Mapa de correlação homonuclear COSY (^1H - ^1H , MeOD, 500 MHz) da substância BAS-391.

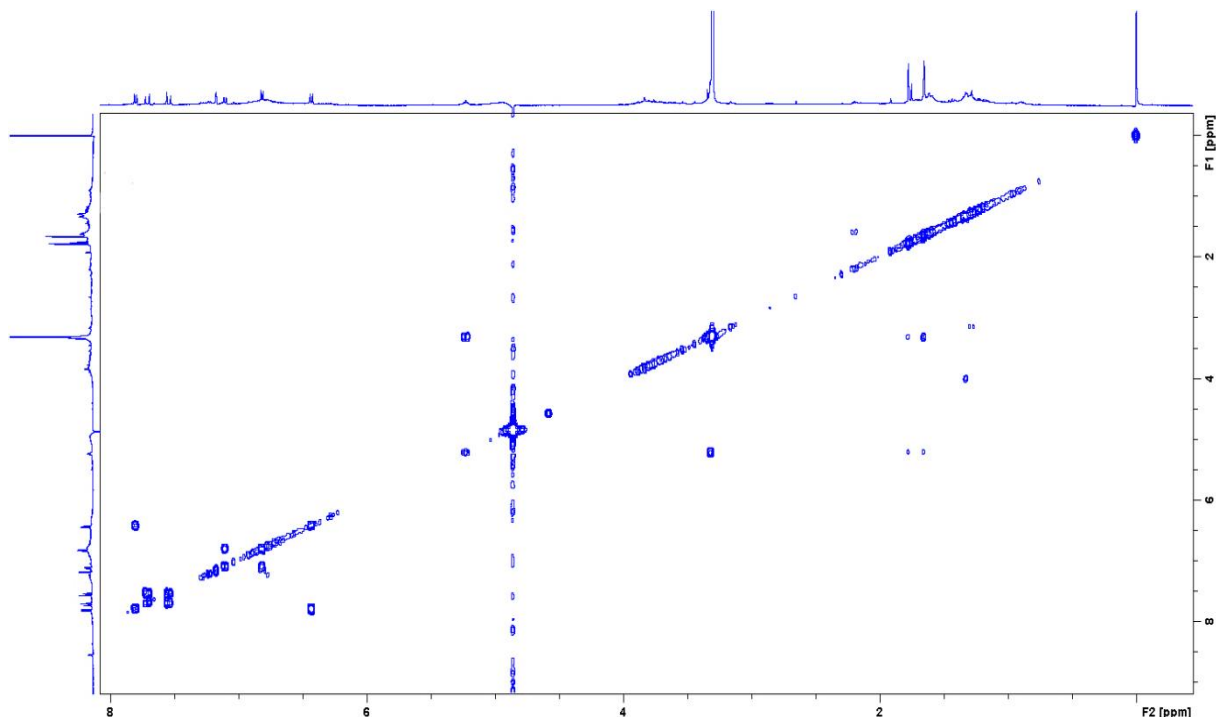


Figura A13. Mapa de correlação homonuclear COSY (^1H - ^1H , MeOD, 500 MHz) da substância BAS-339.

TABELA A2. Matriz utilizada na análise quimiométrica de *B. parinarioides* baseado nas intensidades dos picos obtidos entre m/z 200 a 600.

	DCM	EtOH	AcOEt	AcOEt/DCM	DCM/EtOH	EtOH/AcOEt	DCM/AcOEt/EtOH
201	5.46	13.44	4.8	4.71	20.04	10.58	10.63
211	3.91	9.04	2.55	2.56	11.93	7.43	7.32
213	4.52	9.28	3.83	0	12.69	6.27	8.97
215	7.49	66.24	8.27	7.66	95.28	31.65	35.38
217	6.1	41.35	5.66	4.18	45.49	20.77	20.14
219	4.63	12.05	4.03	4.37	9.05	4.73	6.61
225	6.48	36.62	7.09	5.87	54.65	21.98	32.72
227	12.06	12.58	8.66	7.12	12.13	10.12	11.94
235	6.46	7.88	7.23	5.37	11.1	8.8	8.76
239	8.1	10.43	6.73	6.24	11.69	10.85	9.56
241	8.17	14.83	6.54	6.06	14.76	9.3	11.41
243	5.26	9.46	6.57	8.03	11.12	9.74	8.55
245	30.21	39.81	38.36	35.11	41.95	39.88	32.38
249	7.7	12.34	8.75	8.61	12.11	10.3	7.58
255	100	100	88.89	78.41	78.26	100	95.34
257	16.99	17.51	16.55	15.55	8.2	8.41	17.07
259	13.32	13.07	14.39	13.51	11.99	13.61	9.77
261	10.38	8.7	9.91	9.14	8.66	6.11	5.37
263	4.8	10.65	7.85	6.53	13.98	9.18	8.47
265	7.75	10.35	7.42	7.59	11.14	7.96	10.65
267	6.94	11.5	5.91	5.16	8.39	10.09	7.67

269	25	41.11	32.2	27.57	35.97	32.91	37.31
271	14.7	18.23	14.09	11.3	28.16	17.48	18.28
273	5.66	12.1	6.68	5.45	8.11	6.99	10.1
277	9.08	11.66	7.64	6.65	9.56	10.46	10.85
279	29.58	39.74	26.56	27.76	27.22	39.76	36.93
281	98.87	86.97	82.75	78.95	51.76	90.48	79.83
283	20.58	49.7	38.64	35.33	36.27	24.57	16.44
285	22.25	24.81	26.9	18.13	27.08	19.79	26.75
287	5.5	9.42	7.04	5.91	16.78	9.5	11.98
291	91.33	88.98	100	100	67	60.96	61.11
293	43.73	30.94	32.13	34.65	30.64	28.99	26.27
295	53.89	35.76	40.34	41.96	32.4	31.52	35.45
297	33.3	22.77	25.98	25.03	19.88	24.87	25.75
299	13.31	19.45	12.53	15.42	18.7	15.67	16.82
301	12.23	16.46	14.75	11.52	19.11	15.97	17.25
303	3.53	12.74	5.38	4.58	17.12	7.56	11.99
305	6.49	8.57	5.55	4.64	11	5.64	7.34
307	9.77	12.27	8.73	10.01	14.5	8.32	10.28
309	21.48	20.2	16.96	19.19	19.58	17.14	20.77
311	68.71	53.73	59.25	55.84	49.11	49.72	51.7
313	25	23.77	24.75	21.68	20.67	20.98	24.11
315	11.52	17.91	12.82	8.27	16.43	12.58	17.78
317	9.98	10.03	8.61	10.09	11.72	11.16	14.01
321	10.67	18.47	11.1	10.03	17.81	17.12	15.12
323	22.77	63.91	20.61	22.84	64.63	48.68	47.54
324	5.04	13.24	5.37	2.1	12.3	11.42	11.59
325	29.29	30	31.1	26.23	30.96	26.28	30.71
327	27.72	32.11	28.78	36.63	27.46	27.54	28.16
329	25.34	32.1	25.64	24.56	30.49	24.88	28.63
331	19.72	23.65	24.75	21.49	19.1	19.04	21.92
333	9.72	10.6	6.44	5.72	8.84	8.41	5.78
335	5.44	10.78	7.18	5.9	12.32	9.16	9.29
337	11.13	14.08	11.92	11.89	15.9	12.64	13.27
339	38.87	41.64	43.28	32.89	38.18	36.86	41.11
341	16.48	50.92	34.64	13.26	42.18	46.83	45.19
343	22.31	72.39	58.23	37.32	54.98	56.45	53.42
345	26.11	32.81	48.13	30.96	27.49	28.91	29.73
347	7.31	13.51	10.24	7.52	16.92	13.13	11.54
353	12.3	37.38	17.51	11.68	30.72	35.94	29.51
355	19.92	9.84	21.85	17.92	21.71	31.88	30.48
357	10.79	33.4	25.65	19.49	32.43	34.15	29.04
359	8.67	15.43	11.4	12.16	17.09	14.04	15.83
361	7.5	13.06	8.09	6.42	9.48	8.28	7.34
365	7.04	9.46	6.29	7.69	11.15	7.3	8.36
367	0	24.87	0.78	0	21.77	28.87	0

369	22.88	22.37	22.24	13.69	23.31	10.55	37.02
371	5.92	14.76	7.54	8.11	9.6	9.97	10.87
373	7.6	15.97	8.64	9.96	13.01	13.66	13.58
375	5.27	10.11	7.83	6.16	8.2	9.19	6.89
377	6.06	13.55	6.61	6.22	12.69	10.12	7.42
379	5.91	10.3	6.25	6.27	12.69	8.79	7.46
381	10.92	11.73	13.87	10.9	10.71	12.33	10.61
383	0	0	3.57	0	25.81	2.87	0
385	9.21	10.86	10.2	11.34	15.59	15.12	16.34
387	6.03	12.2	10.76	10.31	9.53	12.38	11.59
389	9.25	18.21	10.61	9.65	20.74	19.04	18.87
391	11.45	19.1	9.7	13.3	17.81	22.18	22.12
395	1.93	12.8	0	0.36	8.28	12.58	12.84
397	0	44.96	45.66	0	31.74	0	0
399	12.17	14.56	11.81	11.89	11.51	16.57	14.75
401	9.26	11.71	9.04	9.26	10.33	9.74	14.1
407	10.53	12.45	10.15	8.42	10.87	11.2	11.41
409	3.33	10.21	7.55	7.47	8.48	11.13	10.41
411	12.03	12.64	0.33	14.03	11.64	0	0
413	7.91	12.15	8.57	8.41	7.17	12.36	4.42
415	12.91	11.67	10.22	10.14	8.54	12.13	11.54
419	9.29	10.89	12.33	9.35	9.1	9.92	10.58
423	6.52	8.9	9.47	9.16	11.41	9.74	11.53
425	0	13.17	14.4	13.98	11.35	0	0
427	11.69	6.07	8.57	7.97	8.75	9.63	10.63
431	7.25	16.6	12.04	10.29	15.4	13.44	13.14
439	6.94	9.6	8.75	7.2	8.23	10.02	8.31
441	8.87	9.33	10.51	7.9	2.91	9.02	8.85
443	9.26	12.33	9.97	10.1	11.77	14.29	11.31
445	2.16	9.94	9.16	8.25	10.87	10.97	7.31
447	8.3	23.51	10.39	8.15	20.69	20.85	17.81
451	10.06	87.14	56.21	22.63	100	83.72	100
453	9.41	14.1	12.25	10.13	11.62	14.74	12.87
457	15.24	15.48	17.56	16.6	10.96	17.8	13.33
459	7.35	7.32	12.31	5.79	9.77	9.66	6.95
461	9.43	18.18	12	9.14	14.33	16.27	13
463	5.5	16.11	7.83	6.26	17.46	13.09	14.01
467	7.22	9.55	9.71	8.99	9.44	11.51	10.73
469	0.34	16.27	11.86	11.55	9.22	12.04	14.11
471	0	51.1	0	0	0	2.97	3.7
473	18.78	17.38	20.2	18.84	11.03	20.29	18.4
475	9.91	11.99	6.87	12.81	9.74	6.76	5.53
477	7.96	13.66	9.84	8.8	11.76	13.13	12.15
479	6.47	10.37	8.09	6.73	8.19	9.16	7.27
483	9.14	14.22	9.66	9.46	12.81	12.35	13.16

485	17.61	18.49	15.57	16.44	13.53	15.01	17.03
487	0	21.08	21.25	20.73	16.19	20.58	19.24
489	12.68	14.69	14.48	16.52	0	15.42	13.81
491	6.6	12.68	3.93	11.47	4.15	14.66	11.28
493	9.63	9.05	8.84	9.94	5.39	10.13	10.29
497	9.57	11.96	11.4	10	8.87	11.79	9.5
499	13.18	18	16.78	14.89	21.9	17.48	15.49
501	17.52	17.77	17.6	17.15	16.67	7.88	18.89
503	14.75	26.62	25.21	20.42	24.95	31.08	25.28
505	11.18	14.02	12.67	10.55	10.1	13.94	10.99
507	3.28	11.77	8.29	10.5	9.88	10.14	11.05
509	9.7	10.81	0	12.13	9.89	12.22	9.92
511	12.03	2.76	5.96	10.89	3.07	10.69	9.51
513	11.67	21.96	19.73	18.31	17.44	20.11	19.57
515	16.33	15.48	15.71	17.11	12.32	17.13	13.65
517	11.14	13.39	11.46	12.72	8.94	10.55	10.75
519	9.68	9.35	8.2	9.46	9.12	10.59	10.09
521	0.46	10.88	9.92	10.05	10.69	11.74	10.17
523	12.21	19.64	19.82	21.71	17.37	22.21	21.39
525	9.5	10.19	9.7	10.14	8.54	9.98	1.65
527	17.24	28.58	25.47	28.74	22.74	28.87	29.39
529	0	12.14	12.67	12.01	10.13	10.66	11.89
531	12.67	13.91	16.04	15.71	12.35	16.3	14.57
533	8.13	11.14	9.31	9.96	5.63	9.75	5.78
543	8.57	11.39	12.16	10.79	10.88	11.12	12.25
545	5.51	10.52	9.2	10.81	8.85	10.03	8.84
559	10.52	11.55	16.86	16.41	11.34	15.97	15.62
589	9.84	5.68	10.54	11.27	5.66	4.37	8.22
591	13.83	6.43	11.56	13.03	7.09	7.3	8.34
593	10.3	6.76	10.36	11.51	4.93	5.46	7.79

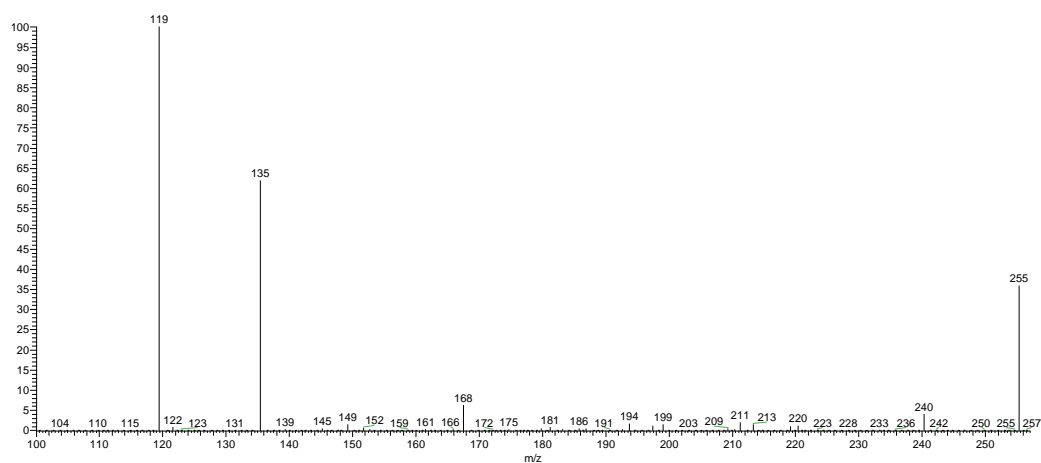


Figura A14. Espectro de MS/MS do íon em m/z 255 presente na casca de *B. parinarioides*.

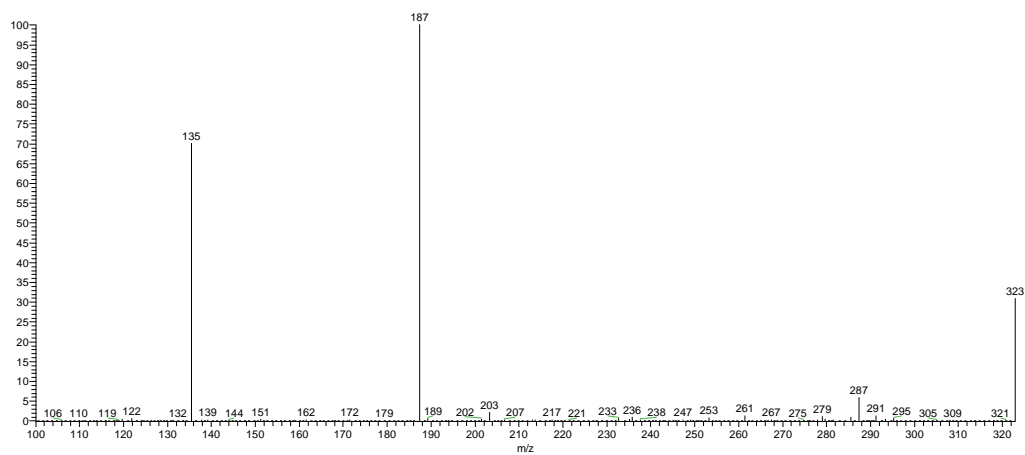


Figura A15. Espectro de MS/MS do íon em m/z 323 presente na casca de *B. parinarioides*.

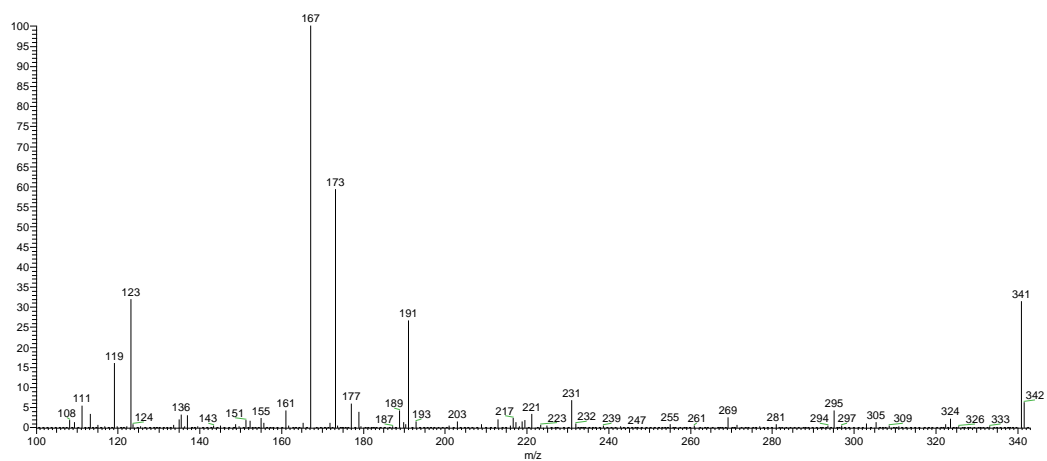


Figura A16. Espectro de MS/MS do íon em m/z 341 presente na casca de *B. parinarioides*.

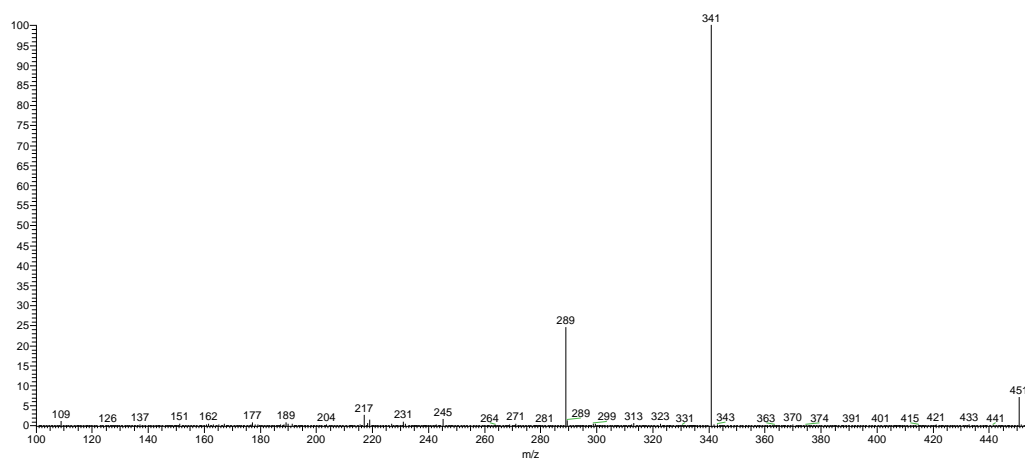


Figura A17. Espectro de MS/MS do íon em m/z 451 presente na casca de *B. parinarioides*.

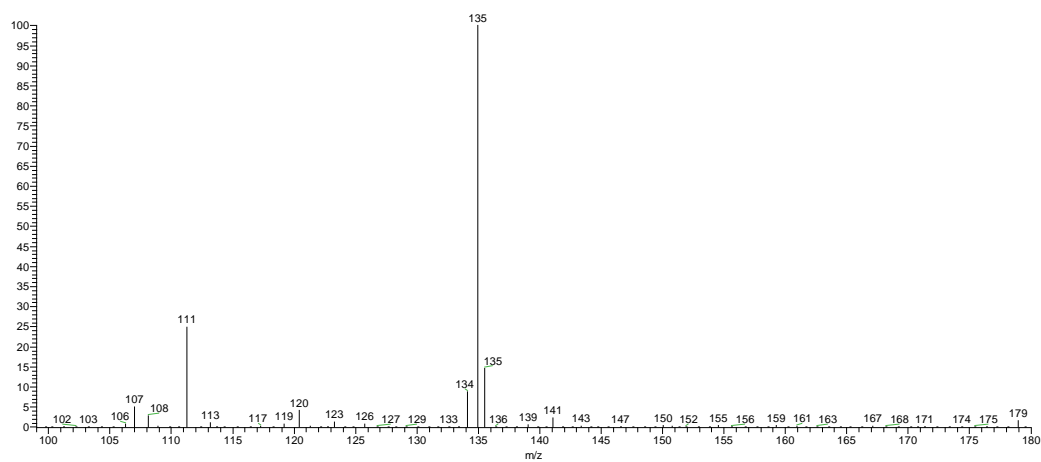


Figura A18. Espectro de MS/MS do íon em m/z 179 presente na casca de *B. parinarioides*.

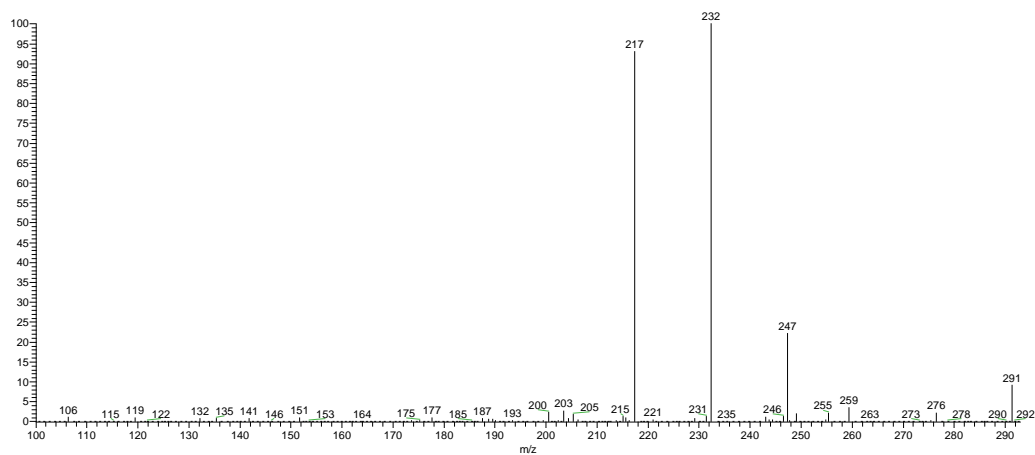


Figura A19. Espectro de MS/MS do íon em m/z 291 presente na casca de *B. parinarioides*.

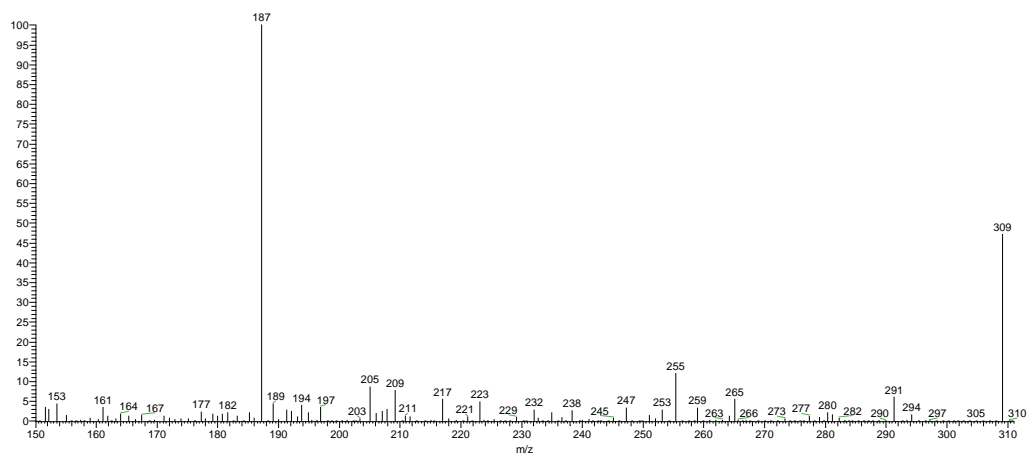


Figura A20. Espectro de MS/MS do íon em m/z 309 presente na casca de *B. parinarioides*.

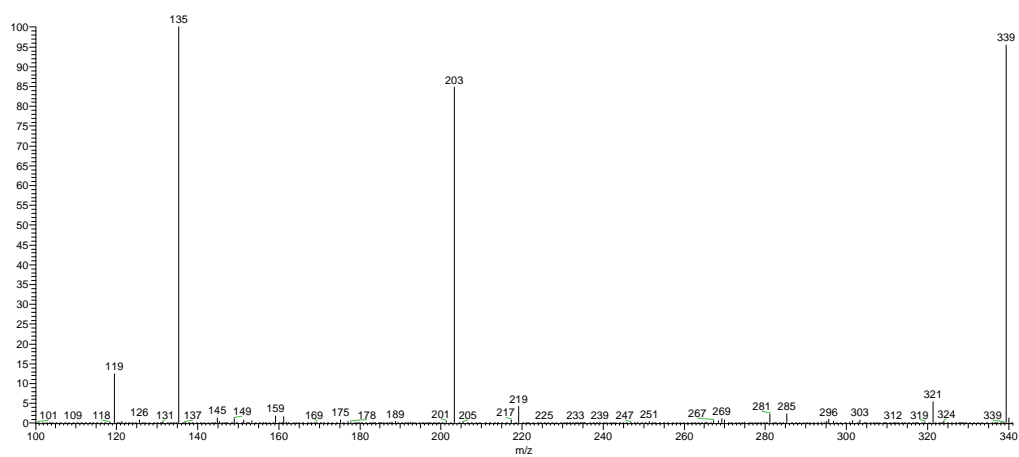


Figura A21. Espectro de MS/MS do íon em m/z 339 presente na casca de *B. parinarioides*.

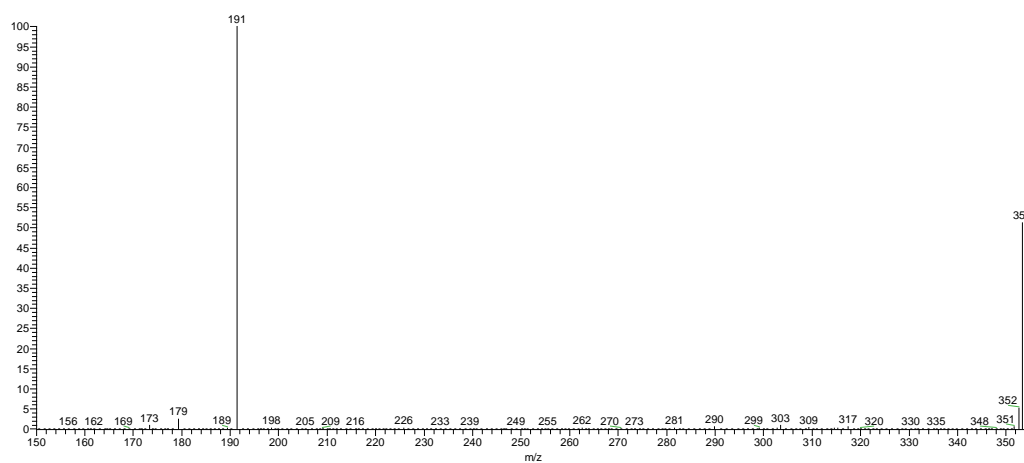


Figura A22. Espectro de MS/MS do íon em m/z 353 presente na casca de *B. parinarioides*.

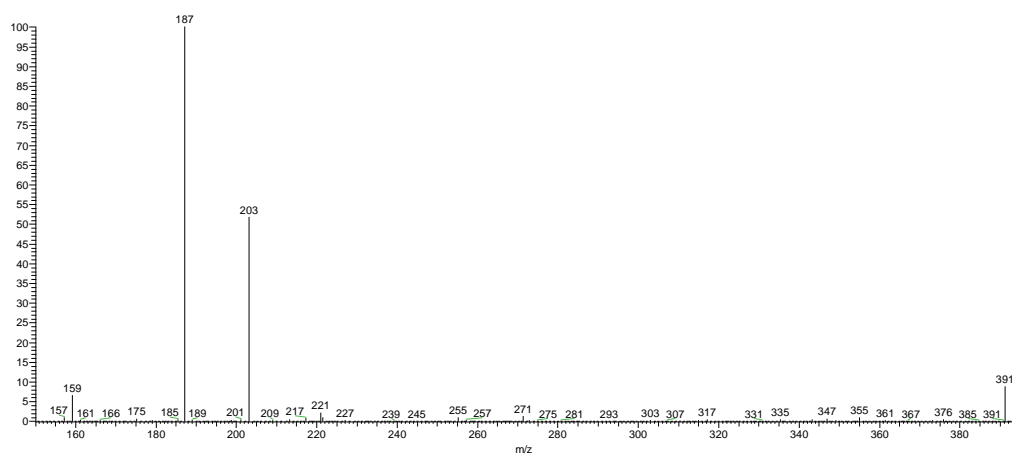


Figura A23. Espectro de MS/MS do íon em m/z 391 presente na casca de *B. parinarioides*.

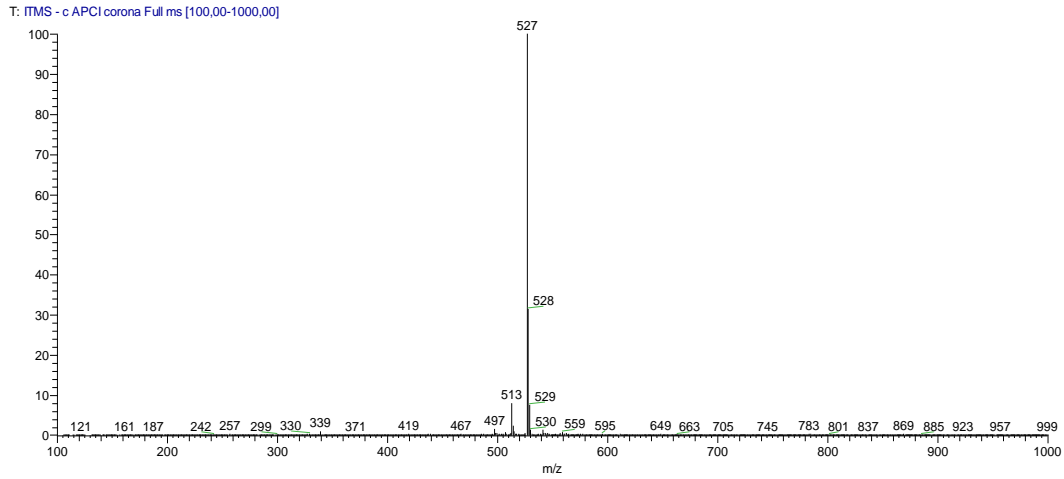


Figura A24. Espectro de massas no modo de ionização negativo da substância BPS-527.

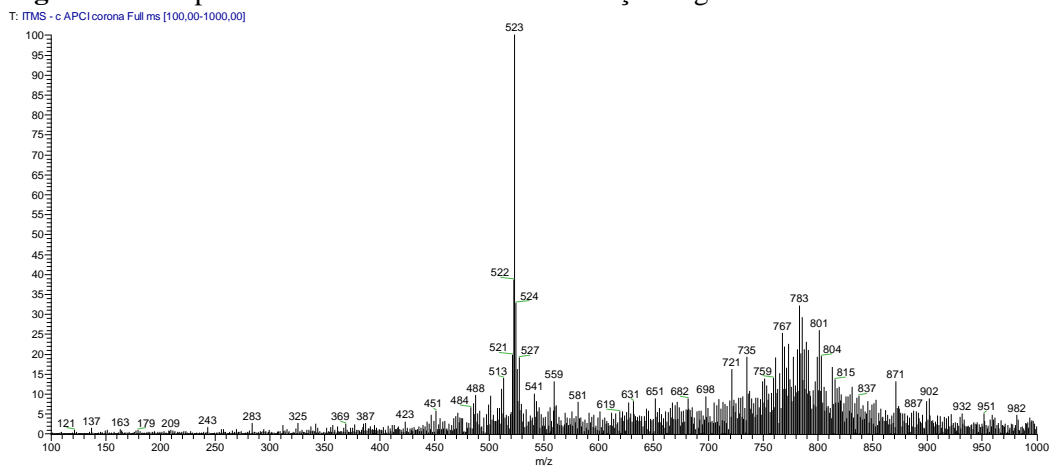


Figura A25. Espectro de massas no modo de ionização negativo da substância BPS-523.

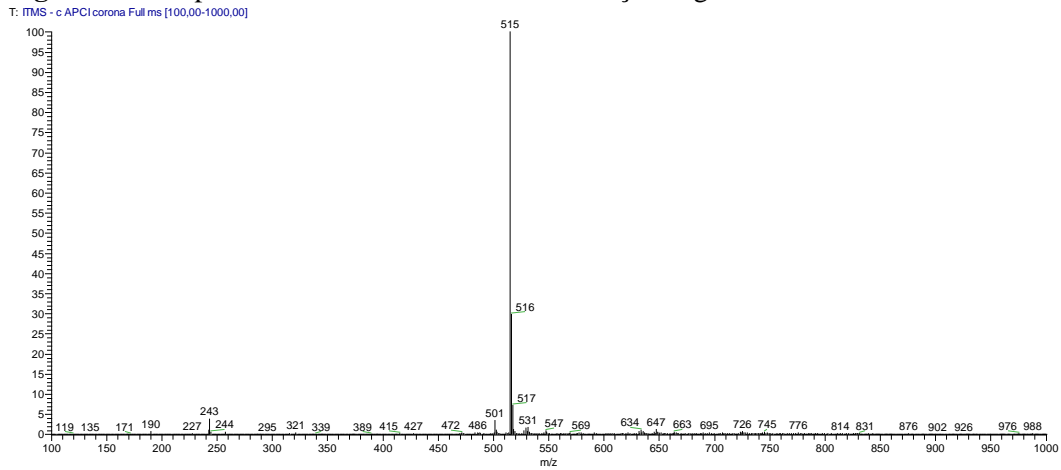


Figura A26. Espectro de massas no modo de ionização negativo da substância BPS-515.

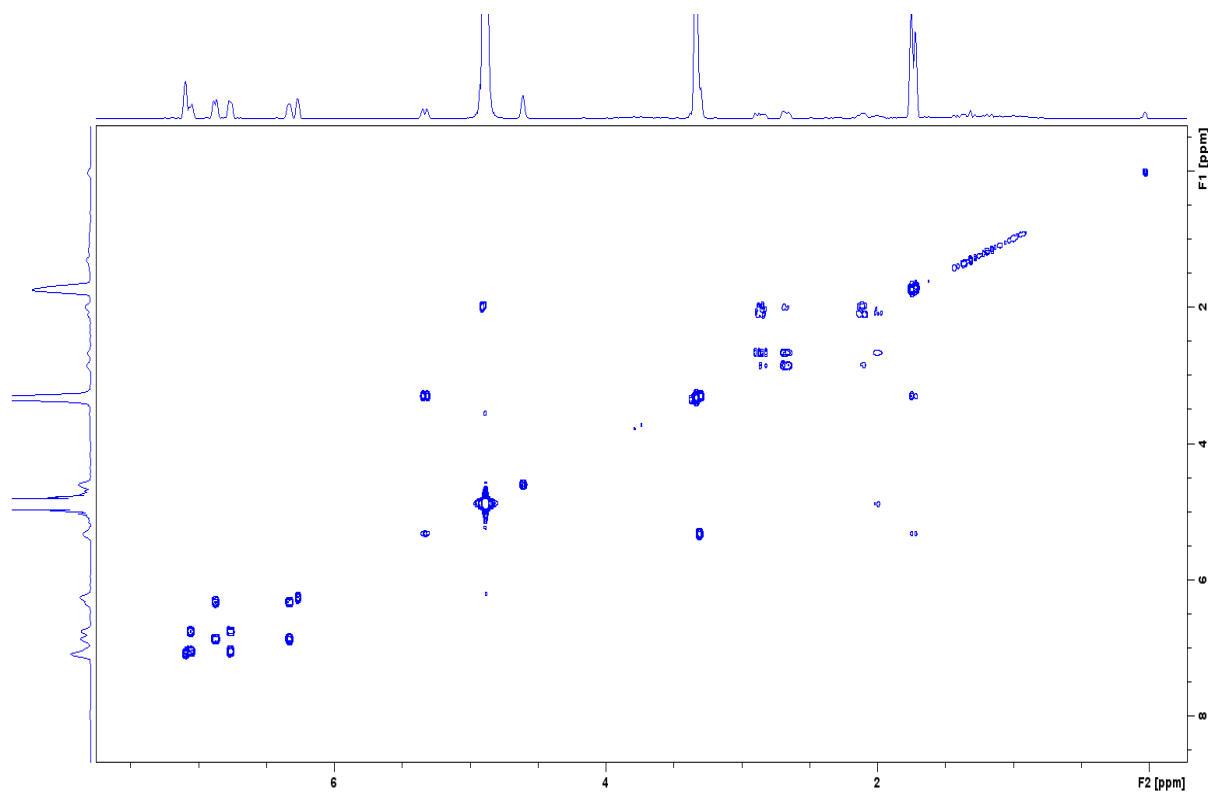


Figura A27. Mapa de correlação homonuclear COSY (¹H-¹H, MeOD, 500 MHz) da substância BPS-309.

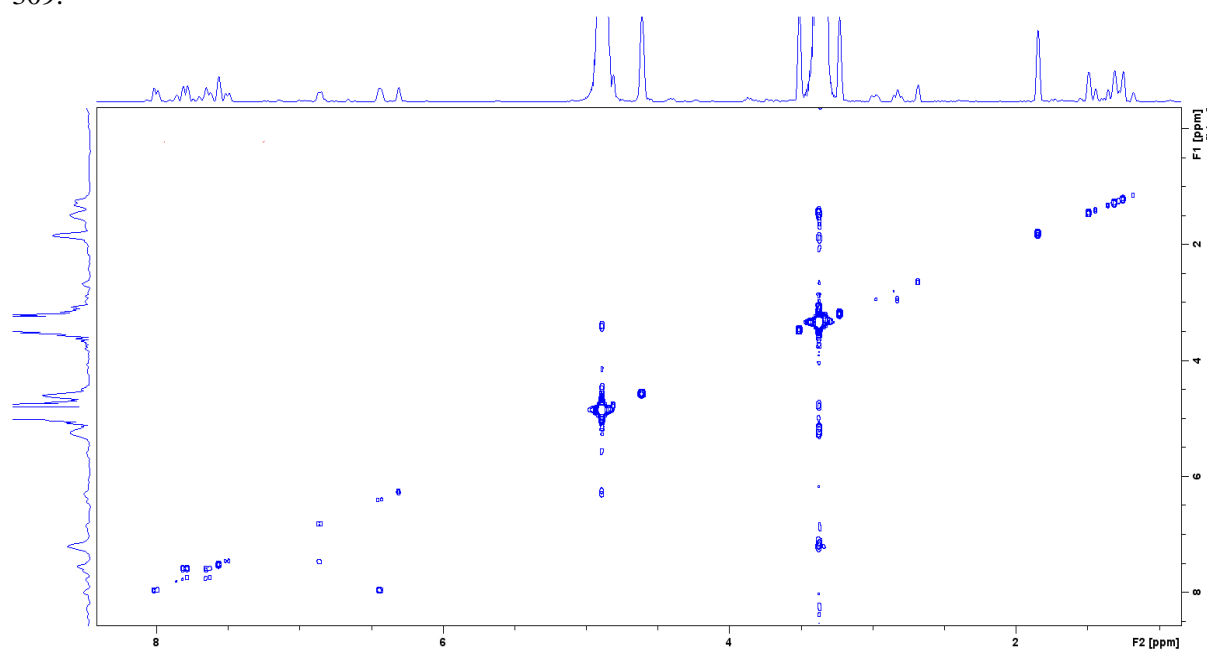


Figura A28. Mapa de correlação homonuclear COSY (¹H-¹H, MeOD, 500 MHz) da substância BPS-339.

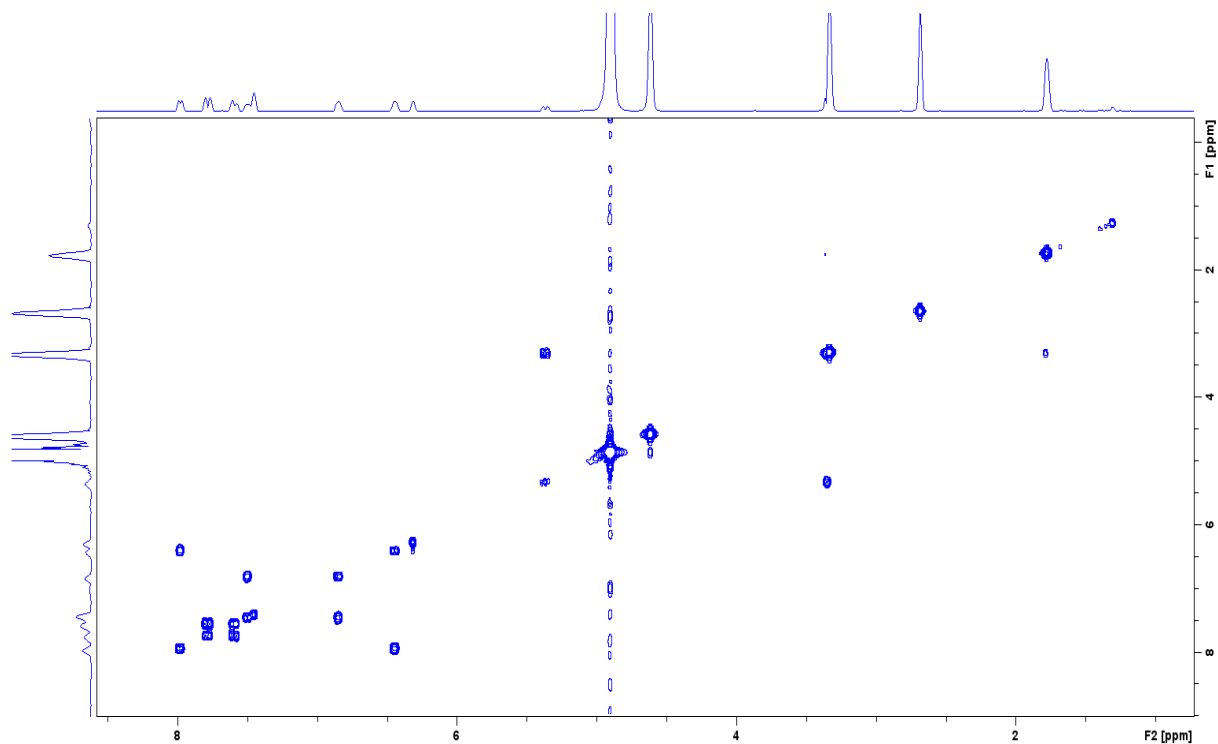


Figura A29. Mapa de correlação homonuclear COSY (^1H - ^1H , MeOD, 500 MHz) da substância BPS-323.

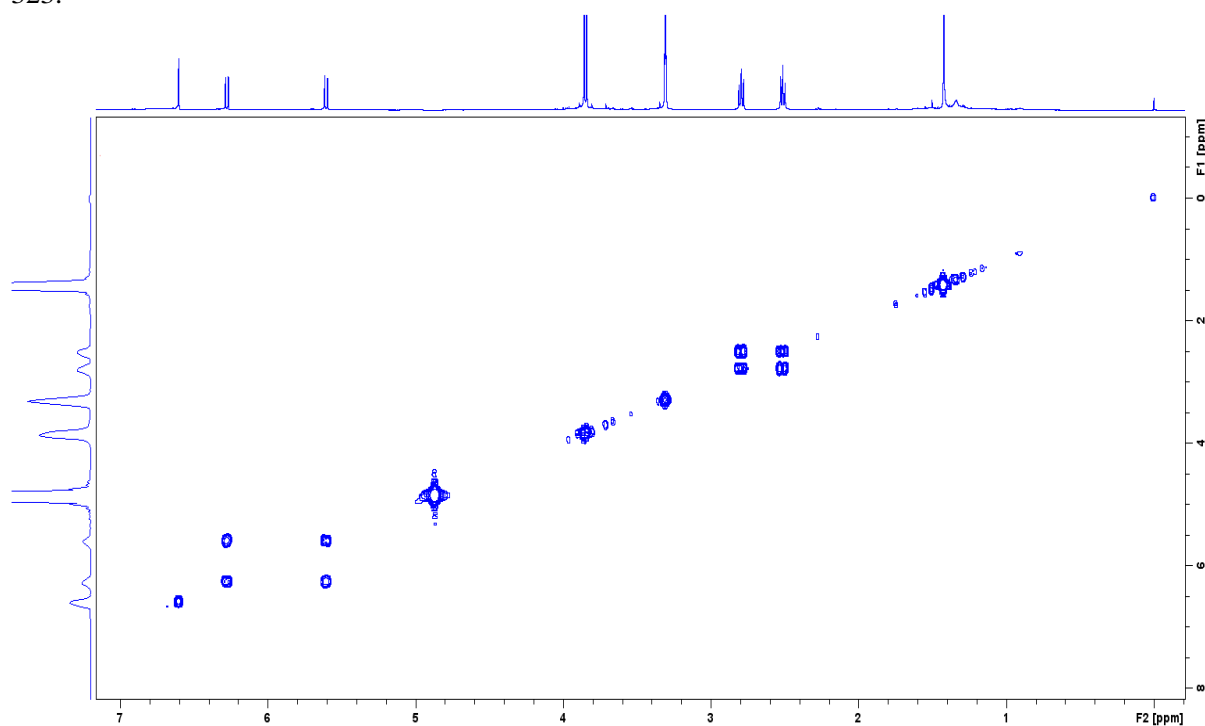


Figura A30. Mapa de correlação homonuclear COSY (^1H - ^1H , MeOD, 500 MHz) da substância BPS-291.

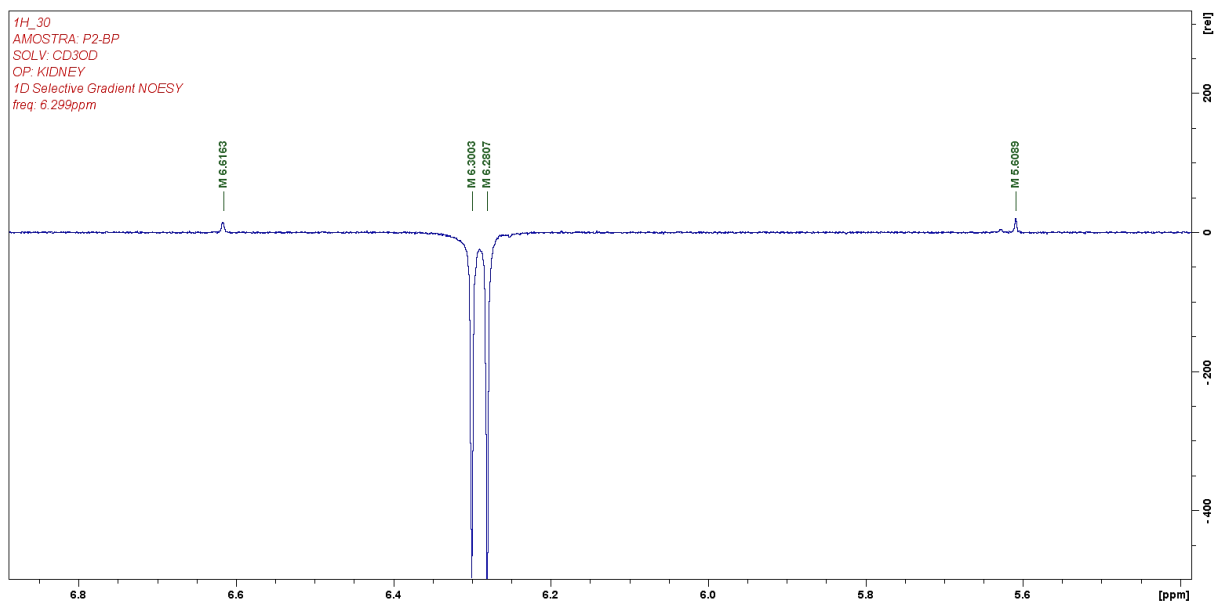


Figura A31. Espectro de NOESY da da substância BPS-291: irradiação do sinal de hidrogênio em 6,27 ppm.

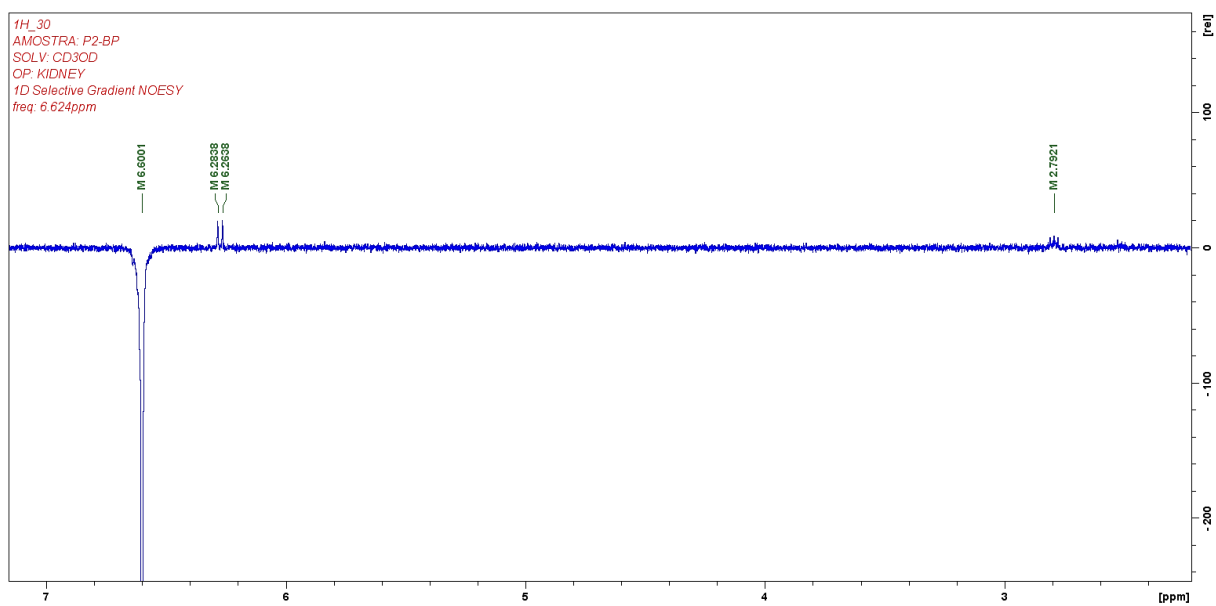


Figura A32. Espectro de NOESY da da substância BPS-291: irradiação do sinal de hidrogênio em 6,60 ppm.

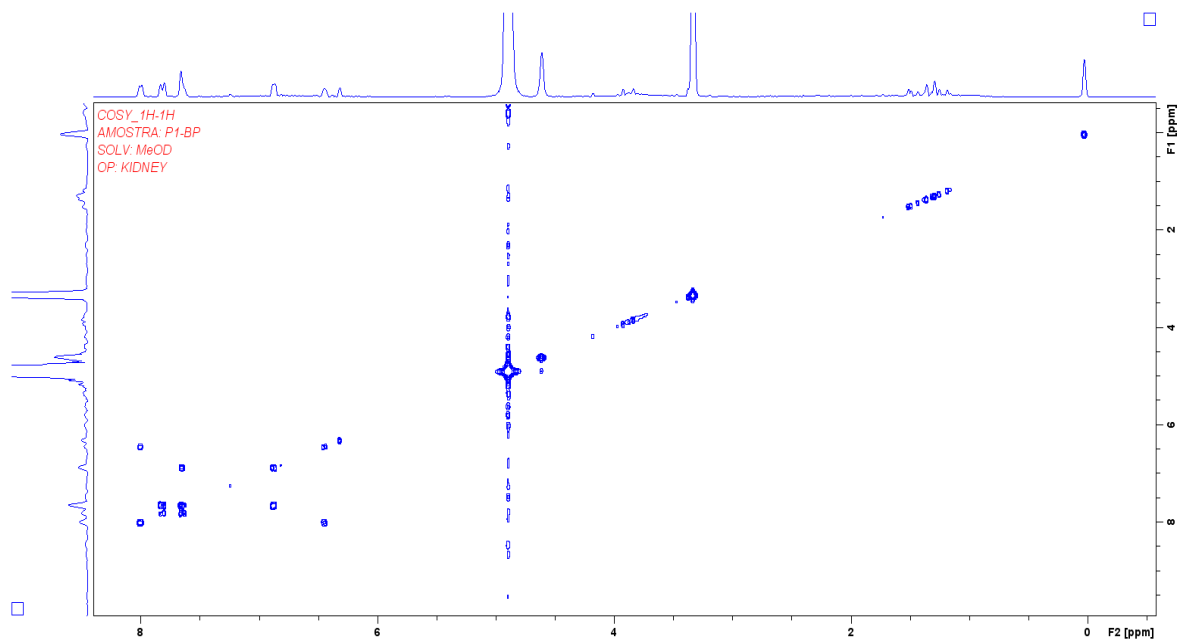


Figura A33. Mapa de correlação homonuclear COSY (¹H-¹H, MeOD, 500 MHz) da substância BPS-255.

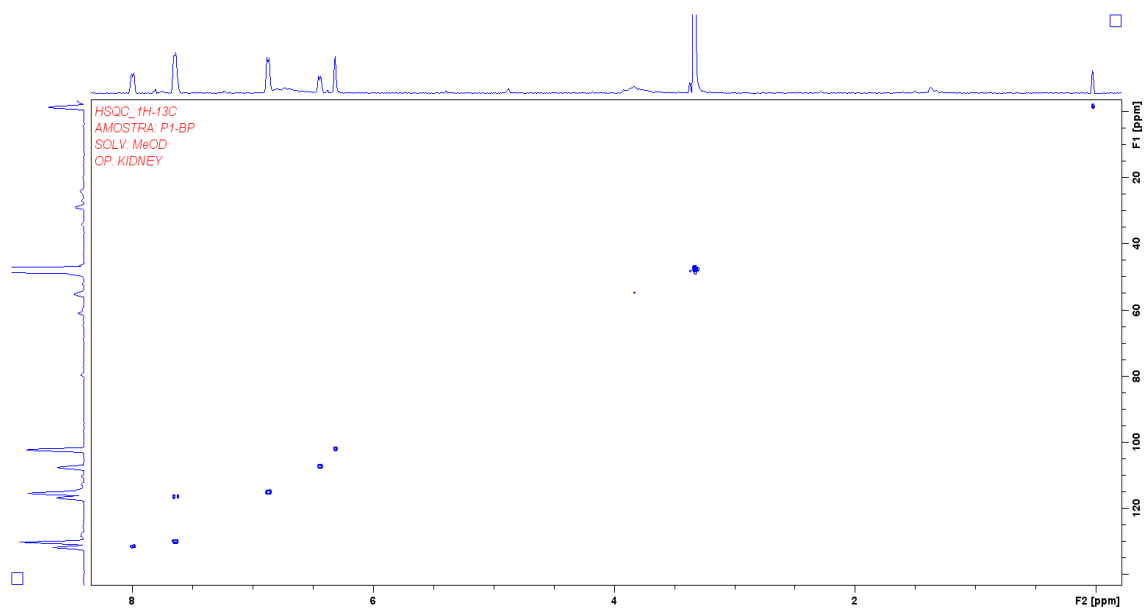


Figura A34. Mapa de contorno HSQC (¹H 500 e ¹³C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-255.

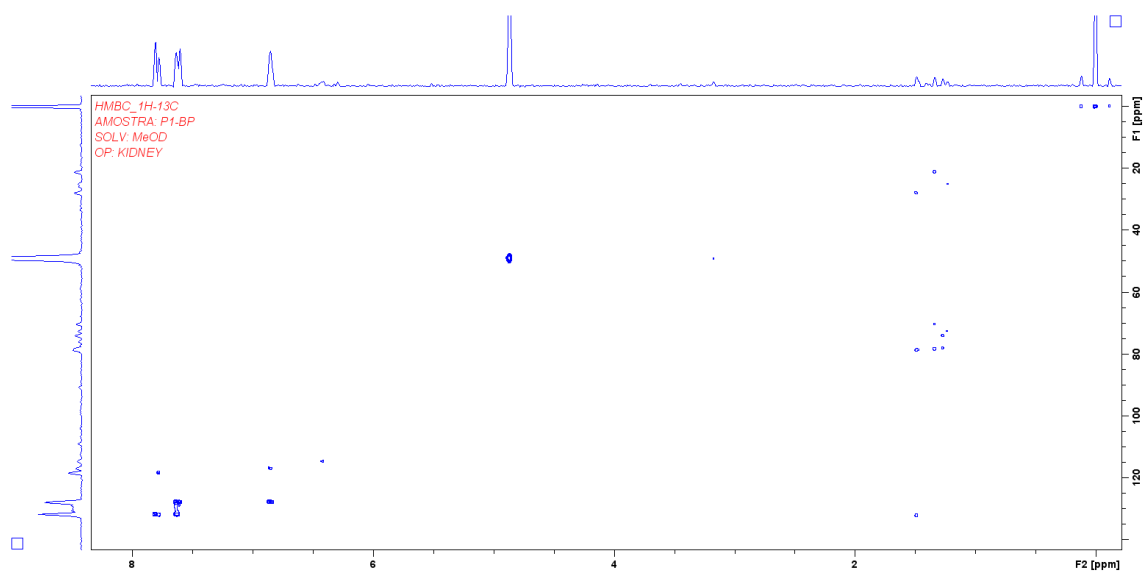


Figura A35. Mapa de contorno HMBC (¹H 500 e ¹³C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-255.

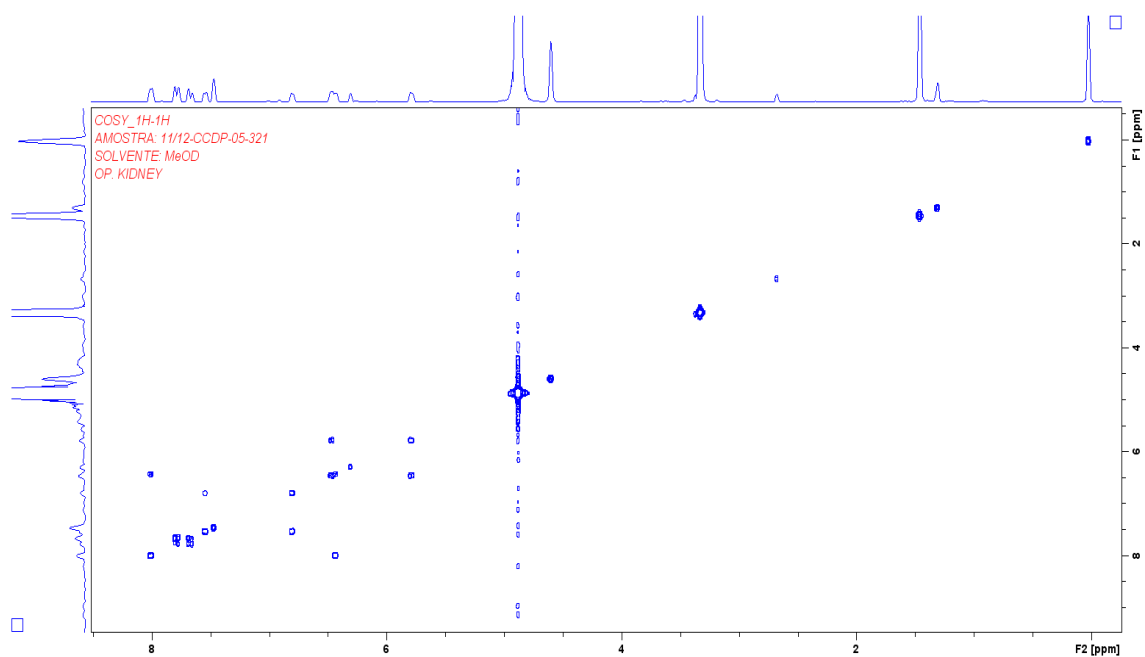


Figura A36. Mapa de correlação homonuclear COSY (¹H-¹H, MeOD, 500 MHz) da substância BPS-321.

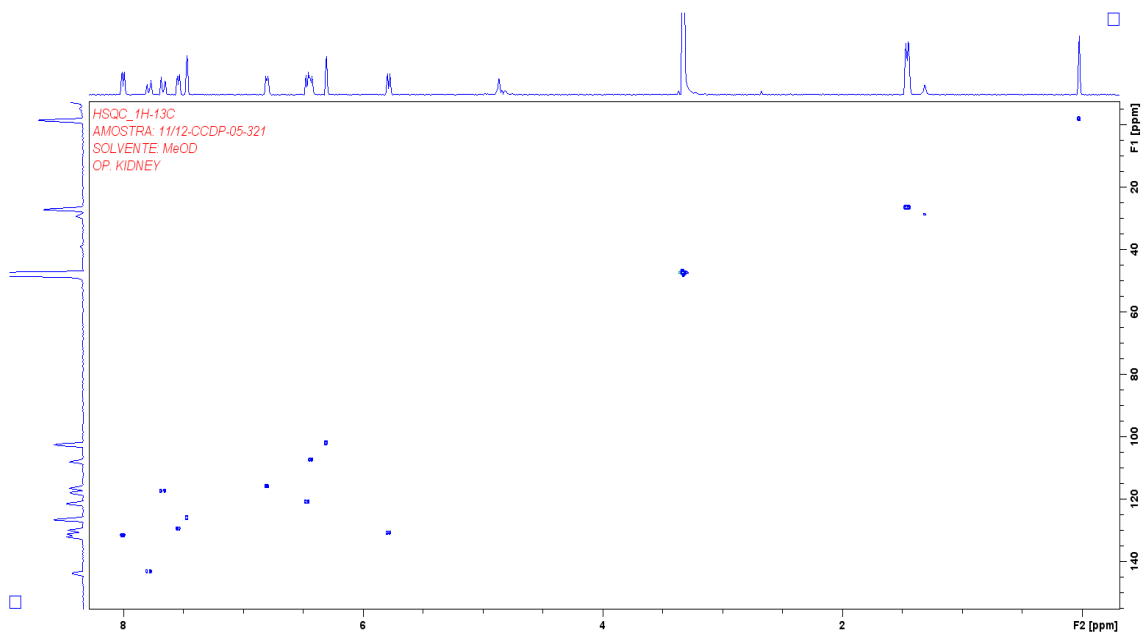


Figura A37. Mapa de contorno HSQC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-321.

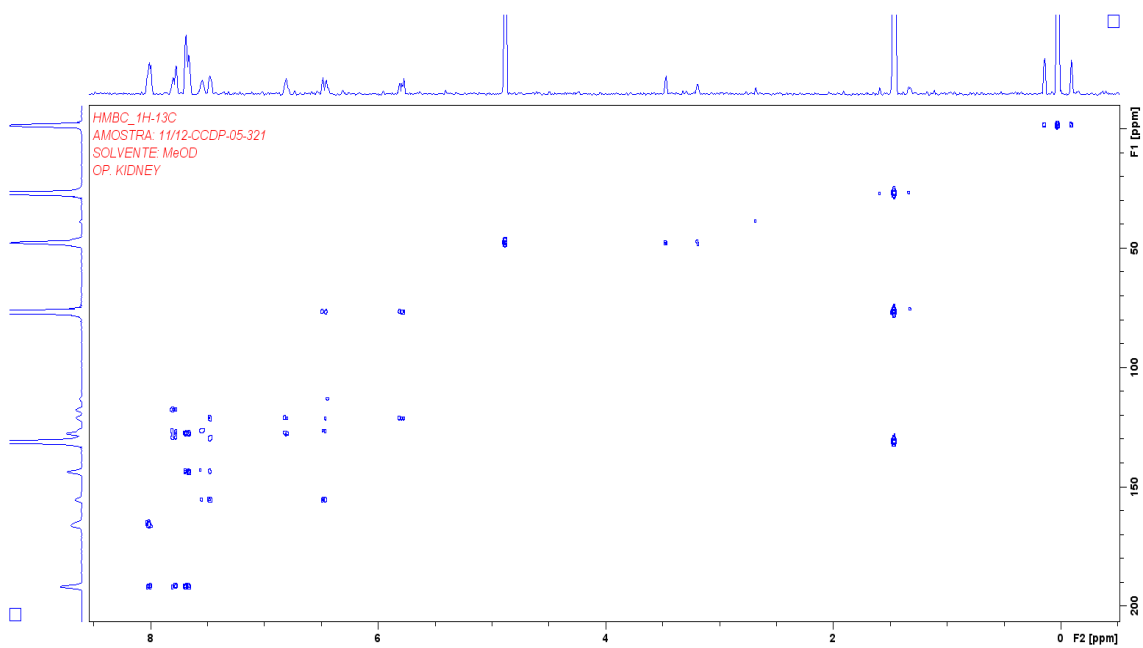


Figura A38. Mapa de contorno HMBC (1H 500 e 13C 125 MHz, MeOD) da substância BPS-321.