UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DAS FOLHAS DE *Onychopetalum periquino* (ANNONACEAE)

ANA PAULA ALFAIA CASTRO

MANAUS
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTIUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANA PAULA ALFAIA CASTRO

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DAS FOLHAS DE *Onychopetalum periquino* (ANNONACEAE)

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, na linha de pesquisa Produtos Naturais e Biomoléculas.

Orientador: Dr. Felipe Moura Araújo da Silva
Coorientadora: Dra. Bruna Ribeiro de Lima

MANAUS
2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C355i Castro, Ana Paula Alfaia
Investigação fotoquímica das folhas de Onychopetalum periquino (ANNONACEAE) / Ana Paula Alfaia Castro. - 2025.
199 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Felipe Moura Araújo da Silva.
Coorientador(a): Bruna Ribeiro de Lima.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Química, Manaus, 2025.

1. Desreplicação. 2. Espectrometria de massas. 3. Flavonoides glicosilados. 4. Flavonas. I. Silva, Felipe Moura Araújo da. II. Lima, Bruna Ribeiro de. III. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título

---

À minha mãe, Marília Alfaia Castro, e à minha tia, Ana Cristina Pereira Rodrigues, pelo amor, apoio e incentivo em todas as minhas escolhas ao longo desses anos.

A elas eu dedico.

AGRADECIMENTO

A jornada até a conclusão desta dissertação foi repleta de desafios, aprendizados e momentos inesquecíveis. Nada disso teria sido possível sem o apoio, a generosidade e o incentivo de pessoas (e cães) especiais, que me acompanharam ao longo deste percurso.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, fonte de toda força, sabedoria e resiliência, por me guiar nesta jornada e permitir que eu superasse cada desafio com fé e determinação.

À minha família, pelo amor incondicional e apoio constante. Em especial, à minha mãe, Marília Alfaia Castro, por ser meu alicerce, minha inspiração e minha maior incentivadora em todos os momentos. À minha tia do coração, Ana Cristina Pereira, por seu carinho e amor, pelas palavras de encorajamento e pelo suporte inestimável ao longo dessa caminhada.

Ao meu fiel companheiro de quatro patas, Tobias, que, mesmo à distância, esteve presente nos dias difíceis. Suas aparições nas videochamadas trouxeram conforto e alegria nos momentos de cansaço. Às minhas irmãs, Bianca Alfaia, Deidre Vitória Alfaia e Flávia Alfaia, minha eterna gratidão por cuidarem dele com tanto amor e responsabilidade sempre que minha ausência foi necessária. Obrigada também por cada palavra de incentivo e apoio.

À família Pereira Rodrigues, que me acolheu com tanto carinho e generosidade, tornando-se uma extensão do meu lar e oferecendo apoio nos momentos em que mais precisei. Meu sincero agradecimento a Ana Cristina, Juliana, Maitê Hadassa, Amanda e Maurício. Aos cães dessa família – Arturo, Gaia, Anubis, Kali, Hamster e Chicória –, que também me receberam com entusiasmo e afeto, obrigado por tornarem os dias mais leves com suas travessuras e companheirismo.

Ao meu orientador, Dr. Felipe Moura Araújo da Silva, expresso minha mais sincera gratidão por sua paciência, ensinamentos e dedicação, que foram fundamentais para o

desenvolvimento deste trabalho. Sua orientação e apoio foram essenciais para que eu pudesse evoluir acadêmica e profissionalmente.

À minha coorientadora, Bruna Lima, por toda a ajuda e apoio durante o mestrado.

Aos meus amigos, que compartilharam comigo desafios, alegrias, tristezas e momentos inesquecíveis: Rosangela Lobo, Brenda Reis, Antonio Geílson e Igor Ramón. Obrigada pelo apoio, pelas palavras encorajadoras e pela amizade sincera. Em especial, à Rosangela, que esteve comigo desde nossa segunda aula – obrigada por tanto, você é um ser incrível.

Aos colegas da Central Analítica, que tornaram essa caminhada mais leve, seja oferecendo palavras de incentivo, ombros amigos ou simples momentos de descontração durante os lanches, minha gratidão.

À minha parceira de shows, Michelli Faifa, por me acompanhar em tantas aventuras musicais ao longo desses anos, ajudando a aliviar o estresse e trazendo leveza à rotina intensa.

A professora Dominique Fernandes pelo apoio desde o início, e por ter feito muito por mim durante meu primeiro ano de mestrado.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por proporcionar o ambiente e os recursos necessários para a realização deste estudo, além de contribuir para a minha formação e crescimento intelectual.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante o período do mestrado.

À Central Analítica, pelo espaço e suporte para a realização deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa jornada, meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

O gênero *Onychopetalum*, pertencente à família Annonaceae, possui apenas duas espécies, *O. amazonicum* R.E. Fr e *O. periquino* (Rusbby) D.M. Johnson & N.A. Murray. Essas espécies são encontradas principalmente na Amazônia, em regiões de floresta tropical. A espécie *O. periquino* é caracterizada por suas árvores de médio a grande porte, que produzem frutos saborosos e flores de aroma marcante. Os estudos fitoquímicos anteriores sobre essa espécie focaram principalmente em alcaloides e óleos essenciais, deixando pouco explorados seus constituintes fenólicos, como os flavonoides. Essa lacuna sugere a necessidade de estudos complementares a fim de explorar o potencial químico dessa espécie. Assim, o objetivo do presente trabalho foi contribuir para o conhecimento fitoquímico do gênero por meio da desreplicação e isolamento de substâncias do extrato aquoso das folhas de *O. periquino*. Para isso, as folhas de *O. periquino* foram inicialmente submetidas à extração aquosa. O extrato aquoso foi filtrado em coluna aberta contendo Celite 545 e eluído com metanol. A fração metanólica foi analisada por DI-APCI-MS no modo de aquisição dependente de dados (DDA) com varreduras de perda neutra para reconhecimento de flavonoides glicosilados. Um conjunto de supostos isômeros de flavonoides glicosilados foi analisado por HPLC-APCI-MS/MS e desreplicado por meio de interpretação manual dos espectros de MS/MS. Paralelamente, a fração metanólica foi submetida a fracionamento em coluna aberta utilizando Sephadex LH-20. Suas subfrações foram submetidas a fracionamentos em HPLC semipreparativo utilizando colunas C18 e Phenyl-hexyl. A análise DI-APCI-MS revelou a presença de isômeros derivados principalmente de apigenina, luteolina e quercetina, sendo que 14 destes foram devidamente desreplicados através de análise HPLC-APCI-MS/MS. Por outro lado, o fracionamento cromatográfico resultou no isolamento de 9 flavonoides: apigenina 8-*C*-neohesperidosídeo, apigenina 6-*C*-neohesperidosídeo, apigenina 7-*O*-rutinosídeo, luteolina 7-*O*-glicosídeo, vitexina, isovitexina, crisoeriol 7-*O*-glicosídeo, isoorientina e quercetina 3-*O*-rutinosídeo. Todos os compostos foram identificados através da análise de dados espectroscópicos e espectrométricos (MS, MS/MS, RMN 1D e 2D) e comparação com dados da literatura. Os resultados revelaram flavonas e flavonóis *C* e *O*-glicosilados como as principais classes de flavonoides presentes nas folhas de *O. periquino*. Embora essas classes já tenham sido relatadas na família Annonaceae, este é o primeiro registro no gênero *Onychopetalum*. Este estudo também demonstrou que a espécie *O. periquino* é uma fonte promissora de flavonoides.

Palavras-Chave: Desreplicação, espectrometria de massas, flavonoides glicosilados, flavonas.

ABSTRACT

The *Onychopetalum* genus, belonging to the Annonaceae family, has only two species, O. *amazonicum* R.E. Fr and *O. periquino* (Rusbby) D.M. Johnson & N.A. Murray. These species are found mainly in the Amazon, in tropical forest regions. The species *O. periquino* is characterized by its medium to large trees that produce tasty fruits and flowers with a strong aroma. Previous phytochemical studies on this species have focused mainly on alkaloids and essential oils, leaving little explored its phenolic constituents, such as flavonoids. This gap suggests the need for complementary studies in order to explore the chemical potential of this species. Thus, the objective of the present work was to contribute to the phytochemical knowledge of the genus through the dereplication and isolation of substances from the aqueous extract of the leaves of *O. periquino*. To achieve this, the leaves of *O. periquino* were initially subjected to aqueous extraction. The aqueous extract was filtered through an open column containing Celite 545 and eluted with methanol. The methanol fraction was analyzed by DI-APCI-MS in data-dependent acquisition (DDA) mode with neutral loss scans for the identification of glycosylated flavonoids. A set of presumed glycosylated flavonoid isomers was analyzed by HPLC-APCI-MS/MS and dereplicated through manual interpretation of the MS/MS spectra. In parallel, the methanolic fraction underwent fractionation in an open column using Sephadex LH-20. Its subfractions were subjected to fractionation in semi-preparative HPLC using C18 and Phenylhexyl columns.. DI-APCI-MS analysis revealed the presence of isomers mainly derived from apigenin, luteolin, and quercetin, with 14 of them being successfully dereplicated through HPLC-APCI-MS/MS analysis. On the other hand, chromatographic fractionation resulted in the isolation of 9 flavonoids: apigenin 8-*C*-neohesperidoside, apigenin 6-*C*-neohesperidoside, apigenin 7-*O*-rutinoside, luteolin 7-*O*-glucoside, vitexin, isovitexin, chrysoeriol 7-*O*-glucoside, isoorientin and quercetin 3-*O*-rutinoside. All compounds were identified through spectroscopic/spectrometric data analysis (MS, MS/MS, 1D and 2D NMR) and comparison with literature data. The results revealed flavones and *C*- and *O*-glycosylated flavonols as the main classes of flavonoids present in the leaves of *O. periquino*. Although these classes have already been reported in the Annonaceae family, this is the first record in the *Onychopetalum* genus. This study also demonstrated the species *O. periquino* as a promising source of flavonoids.

Keywords: Dereplication, mass spectrometry, glycosylated flavonoids, flavones.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APCI	Ionização química à pressão atmosférica (do inglês, *atmospheric pressure chemical ionization)*
COSY	Espectroscopia de correlação (do inglês, *Correlation Spectrometry*)
CID	Dissociação induzida por colisão (do inglês, *Colision Induced Dissociation*)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DDA	Aquisição Dependente de Dados (do inglês, *Data dependent acquisition*)
dd	Duplo dupleto
d	Dupleto
dt	Duplo tripleto
FRS	Fração Reagrupada da Sephadex
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)
Hz	Hertz
HSQC	Correlação quântica única heteronuclear (do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Correlation*)
HMBC	Correlação de ligações múltiplas heteronucleares (do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)
DI	Injeção direta
J	Constante de acoplamento
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial (do inglês, *Tandem Mass Spectrometry*)
MS	Espectrometria de massas (do inglês, *Mass Spectrometry*)
MeOD	Metanol deuterados
MeOH	Metanol

m	Multipleto
m/z	Razão massa carga
ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
t	Tripleto
t_R	Tempo de retenção
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
δ	Deslocamento químico
1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da família Annonaceae. 28
Figura 2: Principais frutos comestíveis de Annonaceae: (A) *Annona muricata* (graviola); (B) *Annona squamosa* (pinha ou ata); (C) *Annona cherimola* (cherimóia). 30
Figura 3: Distribuição geográfica atual das espécies (A) *Onychopetalum periquino* (B) *Onychopetalum amazonicum*..... 33
Figura 4: Distribuição geográfica no Brasil das espécies (A) *O. periquino* e (B) *O. amazonicum.* 34
Figura 5: (A) Exsicata espécie *Onychopetalum periquino* (Rusby) D. M. Johnson & N. A. Murray; (B) Exsicata espécie *Onychopetalum amazonicum.*..... 35
Figura 6: Estrutura dos alcaloides nornuciferina, reticulina, estefolidina e anonaína. 36
Figura 7: *Onychopetalum periquino*: Fruto (a) maduro e (b) verde. 38
Figura 8: Estrutura básica dos flavonoides. 40
Figura 9: Rota biossintética dos flavonoides 41
Figura 10: Estrutura básica dos isoflavonoides. 42
Figura 11: Exemplos de flavonas (a) apigenina e (b) luteolina. 42
Figura 12: Exemplos de flavanonas (a) naringenina e (b) hesperetina. 43
Figura 13: Exemplos de flavanóis (a) flavan-3-óis, (b) flavan-4-óis, (c) isoflavan-4-óis, (d) flavan- 3,4-ols. 43
Figura 14: Estrutura básica dos flavonóis. 44
Figura 15: Estrutura básica do cátion flavílio. 44
Figura 16: Principais fontes de ionização, analisadores e detectores usados em MS 47
Figura 17: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) 48
Figura 18: Nomenclatura de fragmentos comumente aplicada para (A) *O*-glicosídeos e (B) *C,O*- e *C*-glicosídeos. 50
Figura 19: Estrutura e origem do fragmento $^{1,3}A^{+}$ no caso de (A) *O*-glicosídeos e (B) *C*-glicosídeos 51
Figura 20: Etapas do processo de preparo do extrato aquoso. 59
Figura 21: (A) Coluna filtrante (Celite); (B) Fração metanólica; (C) Eliminação do solvente em evaporador rotatório; (D) Secagem em N_2 gasoso. 60
Figura 22: (A) Fracionamento em coluna aberta (Sephadex); (B) Frações obtidas após fracionamento. 61
Figura 23: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para FRS-3. 63
Figura 24: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a FRS-5. 64
Figura 25: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a Fração FRS-8. 65
Figura 26: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a Fração FRS-11. 66
Figura 27: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a Fração FRS-12 66
Figura 28: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para FRS-12-F1, coluna Phenyl-Hexyl. ... 68
Figura 29: Espectro de APCI-MS no modo (A) positivo e (B) negativo do extrato aquoso das folhas de *O. periquino.* 70

Figura 30: Espectro de APCI-MS em modo negativo da fração metanólica resultante da coluna filtrante (Celite) das folhas de *O. periquino.* 71
Figura 31: Espectro de fragmentação dos íons de *m/z* 431, 447, 461, 577 e 609. 72
Figura 32: Cromatograma do íon com *m/z* 431 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus três isômeros: composto 1 com perdas de 90 e 120 Da; composto 2 com perdas de 18, 90 e 120 Da; composto 3 com perda de 162 Da. 75
Figura 33: Cromatograma do íon com *m/z* 447 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus três isômeros: composto 4 e 5 com perdas de 90 e 120 Da; composto 6 com perda de 162 Da. 76
Figura 34: Cromatograma em coluna Phenyl-hexyl do íon com *m/z* 447 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus dois isômeros: composto 4 e 5 com perdas de 18, 90 e 120 Da; 77
Figura 35: Cromatograma do íon com *m/z* 461 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus três isômeros: composto 7 com perdas de 18, 90 e 120 Da; Composto 8 e 9 com perdas de 15 e 162 Da. 78
Figura 36: Cromatograma do íon com *m/z* 577 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus três isômeros: composto 10 e 11 com perdas de 120 e 164 Da; Composto 12 com perda de 308 Da. 80
Figura 37: Cromatograma do íon com *m/z* 609 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus três isômeros: composto 13 com perdas de 146 e 162 Da; Composto 14 com perda de 308 Da. 81
Figura 38: Espectro de massas para FRS-3-F1, valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS. 84
Figura 39: Espectro de MS/MS para FRS-3-F1. 85
Figura 40: Estrutura básica da apigenina onde as posições C-6 e C-8 do anel A são as mais prováveis para *C*-glicosilação 85
Figura 41: Espectro ampliado de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F1. 86
Figura 42: Espectro ampliado de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) para o hidrogênio em δ 0,48 e seu acoplamento com o carbono em δ 18,2 (A) e suas correlações com os carbonos em δ 68,8 e 71,6 (B). 86
Figura 43: Algumas correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas por HSQC para os hidrogênios em δ 4,78, 4,99, 6,27, 6,79, 6,92 e 8,05. 87
Figura 44: Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 4,78 e 4,99. 88
Figura 45: Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 6,27 e 6,79. 89
Figura 46: Algumas correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 6,92 e 8,05. 90
Figura 47: Estrutura da apigenina 8-*C*-neohesperidosídeo 91
Figura 48: Espectro de massas para a fração FRS-3-F2, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS. 93
Figura 49: Espectro de MS/MS para FRS-3-F2. 94

Figura 50: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da região aromática da FRS-3-F2. 94
Figura 51: Mapa de contorno HSQC e HMBC da FRS-3-F2..... 96
Figura 52: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da região dos H anoméricos e mapa de contorno HSQC para os hidrogênios (a) em δ 5,02 / 5,09 com o carbono em δ 101,1 / 100,9, respectivamente, e (b) em δ 4,64 / 4,67 com o carbono em δ 71,7. 97
Figura 53: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios anoméricos (a) em δ 5,02 / 5,09 com o carbono em δ 68,7, 71,1 e 75,1 e (b) em δ 4,64 / 4,67 com o carbono em δ 75,1, 109,5, 161,6 e 163,9. 98
Figura 54: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, 25 °C) para a região da metila da ramnose e (A) mapa de contorno HSQC. 99
Figura 55: Correlações da metila da ramnose no HMBC da FRS-3-F2. 99
Figura 56: Espectros de RMN de ^{1}H do composto apigenina 6-*C*-*β*-glucopiranosil-2-α-ramnopiranósido registrados em função da temperatura (^{1}H: 400 MHz; DMSO-d_6; concentração da amostra: 48,0 mg/ml). Um fechamento do comportamento de troca de dupletos de ramnosil é mostrado em caixa alta.. 100
Figura 57: Modelos MM2 para os dois rotâmeros do composto 6-C-*β*-glucopiranosil-2-*α*-ramnopiranósido.. 101
Figura 58: Estrutura da apigenina 6-*C*-neohesperidosídeo..... 103
Figura 59: Espectro de massas para a fração FRS-3-F4, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS..... 104
Figura 60: Espectro de MS/MS para FRS-3-F4, com pico base em *m/z* 269. 105
Figura 61: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, 25 °C) da FRS-3-F4... 106
Figura 62: Mapa de contorno HSQC para os hidrogênios aromáticos da FRS-3-F4. 106
Figura 63: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios aromáticos. 107
Figura 64: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para os hidrogênios em (A) δ 5,06 e seu acoplamento com o carbono em δ 100,6 (HSQC) e em (B) δ 4,55 com o carbono em δ 101,2 (HSQC). 108
Figura 65: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para o hidrogênio em δ 1,08 e seu acoplamento com o carbono em δ 18,5 visto no HSQC..... 108
Figura 66: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios da metila.. 109
Figura 67: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios anoméricos. ... 110
Figura 68: Apigenina 7-*O*-rutinosídeo 110
Figura 69: Espectro de massas para a fração FRS-5-F3, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS..... 112
Figura 70: Espectro de MS/MS para FRS-5-F3, com pico base em *m/z* 311. 113
Figura 71: Perda de água observada para os isômeros flavonoides 6-*C*-glicosil. 113
Figura 72: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F3. 114
Figura 73: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC para os hidrogênios em δ 4,59, 6,52, 6,79, 6,93, 7,94. 115
Figura 74: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 6,52 e 6,79. 115

Figura 75: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 6,93 e 7,04. 116
Figura 76: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para o hidrogênio anomérico em δ 4,59. 116
Figura 77: Isovitexina 118
Figura 78: Espectro de massas para a fração FRS-5-F4, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS. 119
Figura 79: Espectro de MS/MS para FRS-5-F4, com pico base em *m/z* 301. 120
Figura 80: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F4. 120
Figura 81**:** Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas no HSQC para os hidrogênios em δ 6,19, 6,38, 6,84, 7,52, 7,54. 121
Figura 82: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 6,19, 6,38 e 6,84. 122
Figura 83: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 7,52 e 7,54. 122
Figura 84: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) dos hidrogênios anoméricos. 123
Figura 85: Principais correlações observadas no mapa de correlações HSQC e HMBC para os hidrogênios anoméricos. 123
Figura 86: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para os hidrogênios em δ 1,01 ppm e seus mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B). 124
Figura 87: Quercetina 3-*O*-rutinosídeo 125
Figura 88: Espectro de massas para a fração FRS-5-F5, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS. 126
Figura 89: Espectro de MS/MS para FRS-5-F5, com pico base em *m/z* 299. 127
Figura 90: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, 25 °C) da FRS-5-F5. 127
Figura 91: Mapa de contorno HSQC para os hidrogênios aromáticos da FRS-5-F5. 128
Figura 92: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios aromáticos. 129
Figura 93: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para o hidrogênio em δ 5,06 e seu acoplamento visto no HSQC com o carbono em δ 100,6 (A) e sua correlação no HMBC com o carbono em δ 163,5 (B). 130
Figura 94: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para o hidrogênio em δ 3,90 e seu acoplamento visto no HSQC com o carbono em δ 56,5 (A) e sua correlação no HMBC com o carbono em δ 148,6 (B). 131
Figura 95: Crisoeriol 7-*O*-glicosídeo 131
Figura 96: Espectro de massas para a fração FRS-8-F3, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS. 133
Figura 97: Espectro de MS/MS para FRS-8-F3. 134
Figura 98: Perda de água observada para o flavonoide 8-*C*-glicosil. 134
Figura 99: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da região aromática da FRS-8-F3. 135

Figura 100: Mapa de contorno HSQC e HMBC dos hidrogênios aromáticos e anomérico da FRS-8-F3. 136
Figura 101: Vitexina 137
Figura 102: Espectro de massas para FRS-11-F2, valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS. 138
Figura 103: Espectro de massas para a fração FRS-11-F2, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS. 139
Figura 104: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-11-F2. 140
Figura 105: Mapa de contorno HSQC para os hidrogênios aromáticos da FRS-11-F2. 140
Figura 106: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios aromáticos. 142
Figura 107: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para o hidrogênio em δ 5,08 e seu acoplamento visto no HSQC com o carbono em δ 100,2 (A) e sua correlação no HMBC com o carbono em δ 163,6 (B). 143
Figura 108: Luteolina 7-*O*-glicosídeo 144
Figura 109: Espectro de massas para a fração FRS-12-F1, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS. 145
Figura 110: Espectro de MS/MS para FRS-12-F1, com pico base em *m/z* 327. 146
Figura 111: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-12-F1. 146
Figura 112: Espectro de massas para FRS-12-F1-A, valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS. 147
Figura 113: : Espectro de MS/MS para FRS-12-F1-A. 147
Figura 114: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-12-F1-A. 148
Figura 115: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC para os hidrogênios em δ 6,48, δ 6,65, δ 6,88, δ 7,40 e δ 7,42. 148
Figura 116: Correlações heteronucleares ^{1}H - 13C observadas por HMBC para os hidrogênios aromáticos. 149
Figura 117: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC e HMBC para o hidrogênio em δ 4,59. 150
Figura 118: Isoorientina. 151

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Alcaloides derivados de isoquinolina isolados das folhas de *O. amazonicum*... 36
Quadro 2: Frações reagrupadas após análises de APCI-MS 62
Quadro 3: Rendimentos dos extratos aquosos obtidos por infusão e decocção das folhas de *O. periquino*..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fragmentação dos íons (*m/z*) majoritários da fração metanólica das folhas de *O. periquino* em modo negativo. 73
Tabela 2: Dados de HPLC-APCI-MS/MS dos flavonoides glicosilados presentes nas folhas de *O. periquino*. 82
Tabela 3: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F1 e suas correlações no HMBC. 91
Tabela 4: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F2 e suas correlações no HMBC. 102
Tabela 5: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) dos açúcares da FRS-3-F2. 102
Tabela 6: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F4 e suas correlações no HMBC. 111
Tabela 7: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F3 e suas correlações no HMBC. 117
Tabela 8: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F4 e suas correlações no HMBC. 125
Tabela 9: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F5 e suas correlações no HMBC. 132
Tabela 10: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-8-F3 e suas correlações no HMBC. 137
Tabela 11: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-11-F2 e suas correlações no HMBC. 144
Tabela 12: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-12-F1-A e suas correlações no HMBC 151

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1: Frações resultantes do HPLC em coluna C18 da FRS-3. 64
Fluxograma 2: Frações resultantes do HPLC em coluna C18 da FRS-5. 64
Fluxograma 3: Frações resultantes do HPLC em coluna C18 da FRS-8. 65
Fluxograma 4: Frações resultantes do HPLC em coluna C18 da FRS-11. 66
Fluxograma 5: Frações resultantes do HPLC em coluna C18 da FRS-12. 67
Fluxograma 6: Frações obtidas da FRS-12-F1 após isolamento por HPLC, coluna Phenyl-hexyl. 68

ANEXOS

Figura A 1: Mapa de correlação COSY da substância FRS-3-F1. 174
Figura A 2: Mapa de correlação COSY da substância FRS-3-F2. 174
Figura A 3: Mapa de correlação COSY da substância FRS-3-F4. 175
Figura A 4: Mapa de correlação COSY da substância FRS-5-F3. 175
Figura A 5: Mapa de correlação COSY da substância FRS-5-F4. 176
Figura A 6: Mapa de correlação COSY da substância FRS-5-F5. 176
Figura A 7: Mapa de correlação COSY da substância FRS-8-F3. 177
Figura A 8: Mapa de correlação COSY da substância FRS-11-F2. 177
Figura A 9: Mapa de correlação COSY da substância FRS-12-F1-A. 178
Figura A 10: Cromatograma LC-APCI-MS da fração metanólica em coluna C18. 179
Figura A 11: Cromatograma de LC-APCI-MS da fração metanólica em coluna Phenyl-hexyl. 180
Figura A 12: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F1. 181
Figura A 13: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-3-F1. 181
Figura A 14: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-3-F1. 182
Figura A 15: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F2. 183
Figura A 16: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-3-F2. 183
Figura A 17: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-3-F2. 184
Figura A 18: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F4. 185
Figura A 19: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-3-F4. 185
Figura A 20: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-3-F4. 186
Figura A 21: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F3. 187
Figura A 22: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-5-F3. 187
Figura A 23: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-5-F3. 188
Figura A 24: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F4. 189
Figura A 25: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-5-F4. 189
Figura A 26: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-5-F4. 190
Figura A 27: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F5. 191
Figura A 28: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-5-F5 191
Figura A 29: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-5-F5. 192
Figura A 30: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-8-F3. 193
Figura A 31: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-8-F3. 193
Figura A 32: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-8-F3. 194
Figura A 33: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-11-F2. 195
Figura A 34: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-11-F2. ... 195
Figura A 35: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-11-F2. .. 196
Figura A 36: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-12-F1. 197
Figura A 37: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-12-F1-A. 198
Figura A 38: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-12-F1-A. 198

Figura A 39: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-12-F1-A. 199

SUMÁRIO

RESUMO ..... **VII**

ABSTRACT ..... **VIII**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS ..... **IX**

LISTA DE FIGURAS ..... **XI**

LISTA DE QUADROS ..... **XVI**

LISTA DE TABELAS ..... **XVII**

LISTA DE FLUXOGRAMA ..... **XVIII**

ANEXOS ..... **XIX**

1. INTRODUÇÃO **25**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **28**

2.1 A família Annonaceae *28*
2.1.1 Etnobotânica da família Annonaceae 29
2.1.2 Constituintes químicos da família Annonaceae 31

2.2 O gênero Onychopetalum *33*
2.2.1 O gênero *Onychopetalum* no Brasil 34
2.2.2 A química do gênero *Onychopetalum* 35

2.3 Espécie O. periquino (Rusbby) D.M. Johnson & N.A. Murray *37*
2.3.1 Aspectos etnobotânicos e química da espécie *O. periquino* 38

2.4 A Biossíntese dos Flavonoides *39*
2.4.1 Espectrometria de massas aplicada ao estudo de flavonoides em matrizes vegetais 46
2.4.2 Vias de fragmentação dos Flavonoides 49

3. OBJETIVOS **54**

3.1. Geral *54*

3.2. Específicos *54*

4. MATERIAIS E MÉTODOS **56**

4.1 Análises cromatográficas *56*
4.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (HPLC) 56
4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) semi-preparativa 56

4.2 Solventes *56*

4.3 Métodos espectroscópicos e espectrométricos *57*
4.3.1 Análises por Espectrometria de Massas 57
4.3.2 Análises por Ressonância Magnética Nuclear 57

4.4 Coleta e identificação do material botânico *58*

4.5 Obtenção do extrato aquoso das folhas de O. periquino *58*

4.6 Análise do perfil químico dos extratos aquosos O. periquino por DI-APCI-MS *60*

4.7 Coluna filtrante (Celite) *60*
4.8 Screening de flavonoides glicosilados de O. periquino por DI-APCI-MS *61*
4.9 Fracionamento em coluna aberta (Sephadex) *61*
4.10 Análises por LC-APCI-MS e LC-APCI-MS/MS *62*
4.11 Fracionamento cromatográfico *63*
4.11.1 Coluna C18 63
4.11.2 Coluna Phenyl-hexyl 67

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 70

5.1 Análise das folhas de O. periquino por DI-APCI-MS *70*
5.2 Análise das folhas de O. periquino por HPLC-APCI-MS/MS *73*
5.2.1. Análise HPLC-APCI-MS/MS do íon de *m/z* 431 74
5.2.2. Análise HPLC-APCI-MS/MS do íon de *m/z* 447 75
5.2.3. Análise HPLC-APCI-MS/MS do íon de *m/z* 461 77
5.2.4. Análise HPLC-APCI-MS/MS do íon de *m/z* 577 78
5.2.5. Análise HPLC-APCI-MS/MS do íon de *m/z* 609 80
5.3 Elucidação estrutural dos flavonoides isolados das folhas de O. periquino *84*
5.3.1 Elucidação estrutural da substância FRS-3-F1 84
5.3.2 Elucidação estrutural da substância FRS-3-F2 93
5.3.3 Elucidação estrutural da substância FRS-3-F4 103
5.3.4 Elucidação estrutural da substância FRS-5-F3 112
5.3.5 Elucidação estrutural da substância FRS-5-F4 119
5.3.6 Elucidação estrutural da substância FRS-5-F5 126
5.3.7 Elucidação estrutural da substância FRS-8-F3 133
5.3.8 Elucidação estrutural da substância FRS-11-F2 138
5.3.9 Elucidação estrutural da substância FRS-12-F1 145
5.3.9.1 Elucidação estrutural da substância FRS-12-F1-A 147

6. CONCLUSÃO 154

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 156

8. ANEXOS 174

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia, o maior bioma tropical do mundo, abriga uma biodiversidade única e incomparável, com milhares de espécies de plantas, muitas das quais são utilizadas na medicina tradicional pelas comunidades locais. Algumas dessas plantas têm desempenhado um papel crucial na saúde, oferecendo remédios naturais para várias doenças. Outras, se destacam devido a sua grande variedade de gêneros e espécies (GIULIETTI *et al*., 2005; IBGE, 2022; GUAYASAMIN *et al*., 2021; JOLY *et al*., 2011; PRESTES *et al*., 2023; MONTEIRO *et al*., 2024; ATTIQ *et al*., 2017).

Neste contexto, espécies da família Annonaceae continuam sendo foco de pesquisas científicas, especialmente em estudos fitoquímicos e etnofarmacológicos, uma vez que é uma das mais importantes da flora amazônica em termos de número de espécies e abundância, já que está presente em diversos habitats, desde as florestas de terra firme até as florestas inundáveis e várzeas (LOPES & SILVA, 2014; AL KAZMAN *et al*., 2022; SANTOS & SALATINO, 2000; ZAPPI *et al*., 2015; CARDOSO *et al*., 2017).

As espécies dessa família produzem frutos que servem como importante fonte de alimento para uma ampla variedade de fauna, incluindo aves, mamíferos e insetos (PAULINO NETO, 2009; PALEARI, 2017; LORENZI, 1992). Muitos desses frutos também têm valor econômico local (GAYOSO & CHANG, 2017; ADAB, 2012). Além disso, as plantas dessa família são utilizadas na medicina tradicional devido as propriedades terapêuticas dos seus produtos naturais (TSABANG *et al*., 2012; QUÍLEZ *et al*., 2018).

Embora alguns gêneros da família Annonaceae tenham sido amplamente explorados do ponto de vista fitoquímico, outros, como o gênero *Onychopetalum*, permanecem apenas parcialmente estudados. Este gênero é composto por duas espécies reconhecidas: *O. amazonicum* R.E. Fr e *O. periquino* (Rusbby) D.M. Johnson & N.A. Murray, cujas

sinonímias botânicas incluem *O. krukofii*, *O. lanceolatum* e *O. lucidum* (MAAS *et al*., 2007; MOBOT, 2025; FLORA DO BRASIL, 2020)

A espécie *O. periquino*, conhecida popularmente na Amazônia brasileira como envira-cajú, produz frutos em forma de baga com polpa amarelada e sabor doce, que são altamente valorizados pelas comunidades tradicionais da região. A literatura aponta que a maioria das investigações fitoquímicas sobre as espécies *O. amazonicum* e *O. periquino* concentrou-se em alcaloides e óleos essenciais, deixando lacunas significativas na exploração dos compostos fenólicos, especialmente os flavonoides (LIMA *et al*., 2019; SILVA *et al*., 2015; BARROS *et al*., 2022; MENDES-SILVA *et al*., 2021).

A identificação desses compostos em extratos vegetais envolve uma combinação de métodos químicos e espectroscópicos/espectrométricos. Técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), muitas vezes acoplada à espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*), são amplamente utilizadas para sua separação, detecção e caracterização. A espectrometria de massas, em particular, desempenha um papel importante no estudo de diversos produtos naturais, como alcaloides e flavonoides, permitindo a determinação precisa de suas massas moleculares e a análise dos padrões de fragmentação, o que facilita a elucidação estrutural desses compostos (PEREIRA & VEGA, 2022; CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al*., 2016; LIGA *et al*., 2023).

Visando contribuir para o conhecimento fitoquímico do gênero *Onychopetalum*, o presente trabalho teve como objetivo a investigação do extrato aquoso das folhas de *O. periquino* através da combinação de análises instrumentais, tais como espectrometria de massas (MS), cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC) e ressonância magnética nuclear (RMN), bem como o isolamento de substâncias ainda não descritas no gênero *Onychopetalum*.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A família Annonaceae

A família Annonaceae, catalogada em 1789 pelo botânico francês Antoine Laurent de Jussieu, é uma das maiores e mais diversa das famílias de plantas com flores, pertencendo à ordem Magnoliales (STEVENS 2001 onward; LÚCIO *et al*., 2015; KESSLER, 1993; CHATROU *et al*., 2012; COUVREUR *et al*., 2012; LOBÃO *et al*., 2020). Com cerca de 120 gêneros e mais de 2.400 espécies, essa família é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo encontrada nas florestas tropicais da América do Sul (particularmente na Amazônia), América Central, Sudeste Asiático, África e Austrália (Figura 1) (Stevens 2001 onward; MAJRASHI *et al*., 2021; LOPES & SILVA, 2014; LÚCIO *et al*., 2015). O único gênero que se estende até regiões temperadas é o *Asimina*, encontrado na América do Norte (LÚCIO *et al*., 2015; STEVENS 2001 onward; POMPER *et al*., 2003). A diversidade de habitats em que essa família ocorre contribui para a sua variedade morfológica e funcional (KESSLER,1993; CHATROU *et al*., 2012; LOBÃO *et al*., 2020).

Figura 1: Distribuição geográfica da família Annonaceae (AUBRÉVILLE, 1974a, Angiosperm Phylogeny Website, Verson 14. Disponível em:<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>**.** Acesso em 15 de abril de 2024).

A família Annonaceae desempenha um papel importante na composição da vegetação brasileira, contando com mais de 385 espécies distribuídas em 32 gêneros

(LOPES & SILVA, 2014; FLORA DO BRASIL, 2020). Essa família é uma das mais importantes da flora amazônica, tanto em termos de número de espécies quanto em abundância (MAAS *et al*., 2015; LOPES & SILVA, 2014; CARDOSO *et al*., 2017). A vasta extensão da floresta tropical proporciona um habitat ideal para essas plantas, que se adaptam bem aos ambientes úmidos e ricos em nutrientes da região (CARDOSO *et al*., 2017). Além da Amazônia, outras regiões com alta diversidade de Annonaceae incluem o Cerrado, a Mata Atlântica, e as florestas tropicais da África e do Sudeste Asiático (LEBOEUF *et al*., 1982; SÃO JOSÉ *et al*., 2014).

As espécies da Annonaceae podem se apresentar como árvores, arbustos ou trepadeiras. Suas folhas são simples, alternadas e dísticas, geralmente com textura coriáceas e variando de formato oval a elíptico. As flores, geralmente grandes, vistosas e frequentemente perfumadas, desempenha um papel importante na sua polinização, atraindo principalmente insetos como besouros. Essas plantas também possuem raízes robustas, que facilitam sua fixação em solos tropicais e subtropicais. Essas características conferem à família Annonaceae uma diversidade e importância ecológica, com várias adaptações que garantem sua sobrevivência e dispersão nos ecossistemas tropicais (LOBÃO *et al*., 2020; Stevens 2001 onward; LEBOEUF *et al*., 1982; HEUSDE, 1992; KESSLER, 1993).

2.1.1 Etnobotânica da família Annonaceae

A família Annonaceae possui significativa importância econômica e cultural, com diversas espécies valorizadas principalmente por seus frutos comestíveis, como a *Annona muricata* (graviola), *Annona squamosa* (pinha ou ata) e *Annona cherimola* (cherimóia) (Figura 2), amplamente cultivados e comercializados em mercados locais e internacionais (NUNES *et al*., 2012; SÃO JOSÉ *et al*., 2014; GAYOSO & CHANG, 2017; LORENZI, 1992). Além do uso alimentar, essas plantas também se destacam na produção de óleos

essenciais, amplamente aplicados nas indústrias de perfumes, cosméticos e aromaterapia (NUNES *et al*., 2012; VIKAS *et al*., 2014; QUÍLEZ *et al*., 2018; CASCAES *et al*., 2021).

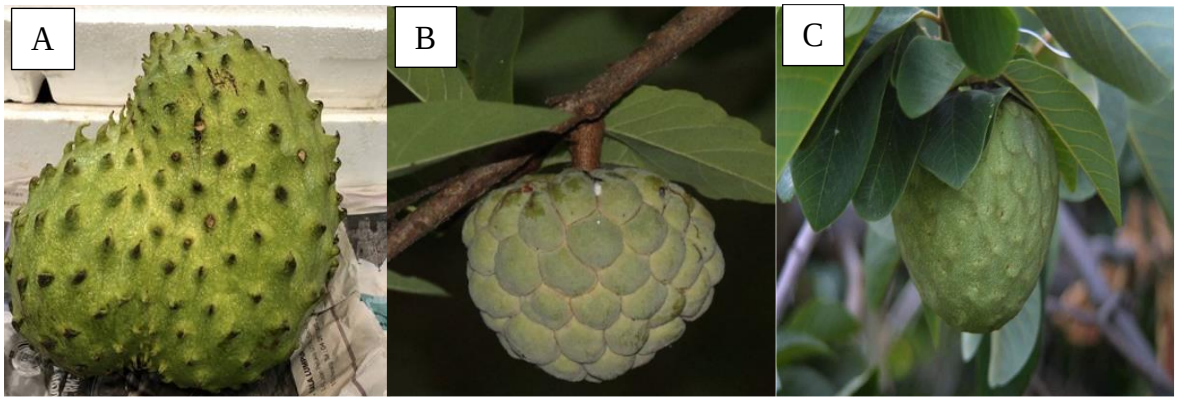


Figura 2: Principais frutos comestíveis de Annonaceae: (A) *Annona muricata* (graviola); (B) *Annona squamosa* (pinha ou ata); (C) *Annona cherimola* (cherimóia). **(**Disponível em: https://powo.science.kew.org/. Acesso em 15 de abril de 2024)

A Annonaceae também desempenha um papel importante na etnofarmacologia, sendo amplamente utilizada por diversas culturas tradicionais para tratar uma variedade de condições. As folhas, cascas, frutos, sementes e raízes de várias espécies são utilizados tradicionalmente em diversas regiões para combater infecções, aliviar dores, tratar problemas digestivos, entre outros (AL KAZMAN *et al*., 2022; ATTIQ *et al*., 2017).

Diversas espécies do gênero *Unonopsis* têm sido amplamente utilizadas por comunidades indígenas e ribeirinhas para tratar uma variedade de condições de saúde (SILVA *et al*., 2015b; OLIVEIRA *et al*., 2023). A espécie *Unonopsis floribunda*, por exemplo, é conhecida pelo uso popular de suas cascas do tronco no tratamento de artrite, bronquite, reumatismo e diarreia, além de ser empregada no combate à malária por populações nativas do Peru (JOVEL *et al*., 1996; KVIST *et al*., 2006). O pó obtido das folhas de *U. stipitata* é tradicionalmente adicionado à alimentação de indígenas com dificuldades de fala. De modo semelhante, as folhas de *U. veneficiorum* são incorporadas à dieta com a finalidade de tratar casos de demência em idosos indígenas (ADAMS *et al*., 2007). Além dos usos medicinais, o tronco dessas plantas é aproveitado como esteio para a construção de

casas, enquanto a casca é utilizada para fazer amarrações, as frutas como iscas para caça, e a madeira serve como lenha (BALÉE, 2023).

Sua presença significativa na Amazônia e em outras regiões tropicais sublinha a importância de conservar esses ecossistemas para manter a biodiversidade e os recursos naturais que essas plantas oferecem (CARDOSO *et al*., 2017; MENDES-SILVA *et al*., 2021).

2.1.2 Constituintes químicos da família Annonaceae

Diversos produtos naturais, como acetogeninas, terpenos, flavonoides e alcaloides, têm sido amplamente relatados na literatura em espécies de Annonaceae (AMINIMOGHADAMFAROUJ *et al*., 2011; LEBOEUF *et al*., 1982; Al KAZMAN *et al*., 2023). Esses constituintes fitoquímicos demonstram uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo efeitos imunossupressores, antineoplásicos, citotóxicos, anti-inflamatórios e antimicrobianos (Al KAZMAN *et al*., 2022; SILVA, 2016; VIKAS *et al*., 2014 ATTIQ *et al*., 2017; LUO *et al*., 2022; LORENZO *et al*., 2020). Esses metabólitos são comumente encontrados em diferentes partes da planta, como frutos, folhas, cascas, polpas e sementes (AL KAZMAN *et al*., 2022; LEBOEUF *et al*., 1982: ATTIQ *et al*., 2017).

As acetogeninas são um grupo de produtos naturais exclusivos das plantas da família Annonaceae, amplamente estudados por suas potentes atividades biológicas (CHANG *et al*., 1999; NASCIMENTO *et al.,* 2003). Quimicamente, as acetogeninas são compostos derivados de ácidos graxos, geralmente caracterizados por uma longa cadeia de carbonos e várias hidroxilas, além de anéis de lactona (CUNHA *et al*., 2009; PEÑA *et al*., 2016).

Os terpenos são formados a partir da condensação de unidades de isopreno e podem ser classificados em diferentes grupos, como monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, dependendo do número de unidades de isopreno presentes (MUKHERJEE, 2019; PEÑA *et*

al., 2016; MOREIRA *et al.,* 2013). Os terpenos são responsáveis por uma variedade de aromas e sabores, contribuindo para a atração de polinizadores e a defesa contra herbívoros (FOREZI *et al*., 2022; VIZZOTO *et al*., 2010).

Os alcaloides são compostos nitrogenados biossintetizados a partir de aminoácidos, conhecidos por seus efeitos potentes no sistema nervoso central e em outras partes do organismo (AMINIMOGHADAMFAROUJ *et al*., 2011; LÚCIO *et al*., 2015; SANTOS, 2020; LORENZO *et al*., 2020). Nas espécies da família Annonaceae, os alcaloides desempenham um papel crucial na defesa contra predadores e patógenos, graças às suas propriedades tóxicas e sabor amargo (LÚCIO *et al*., 2015). Esses compostos são classificados em diversas classes, incluindo berberinas, aporfínicos, oxoaporfínicos, fenantrenos, cularinas, morfinandienonas, isoquinolonas e bisbenzilisoquinolínicos (SILVA *et al*., 2012; MUKHERJEE, 2019; SILVA, 2016; JOURJINE *et al.,* 2022).

Os flavonoides são uma classe diversificada e significativa de compostos fenólicos, presentes em várias espécies da família Annonaceae (AMINIMOGHADAMFAROUJ *et al*., 2011; SANTOS & SALATINO, 2000). Com mais de 9.000 derivados identificados em diversas plantas, esses compostos são encontrados em todas as partes da planta e são amplamente presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal, como frutas, vegetais, chás e vinhos (KUMAR & PANDEY, 2013; FERRER *et al*., 2008; KHAN *et al*., 2021; ZHUANG *et al*., 2023). Nas plantas, os flavonoides desempenham funções essenciais no desenvolvimento e na defesa, sendo responsáveis pelas cores e aromas das flores, o que é crucial para a atração de polinizadores e, consequentemente, para a dispersão dos frutos. Além disso, atuam como filtros naturais que absorvem a radiação UV, contribuindo para a proteção das plantas contra danos causados pela exposição ao sol (KUMAR & PANDEY, 2013; PANCHE *et al*., 2016).

2.2 O gênero *Onychopetalum*

O gênero *Onychopetalum* é relativamente pouco conhecido e estudado, consistindo em apenas duas espécies: *Onychopetalum amazonicum* R.E. Fr. e *Onychopetalum periquino* (Rusbby) D.M. Johnson & N.A. Murray, sendo um dos menores gêneros da família Annonaceae (MAAS *et al*., 2007; KESSLER, 1993). Suas árvores, que variam entre 8 e 30 metros de altura, possuem folhas coriáceas e flores que exalam aromas marcantes. Sua distribuição é restrita à região amazônica da América do Sul, abrangendo países como Peru, Brasil e Bolívia (Figura 3) (MAAS *et al*., 2007). No entanto, *O. amazonicum* atualmente é relatada apenas no Brasil e na Venezuela (MENDES-SILVA *et al* 2021; FLORA DO BRASIL, 2020). As informações químicas disponíveis sobre essas espécies ainda são limitadas, com a maioria das pesquisas focadas nos óleos essenciais e alcaloides (SILVA *et al*., 2015; LIMA *et al.*, 2019, 2020).

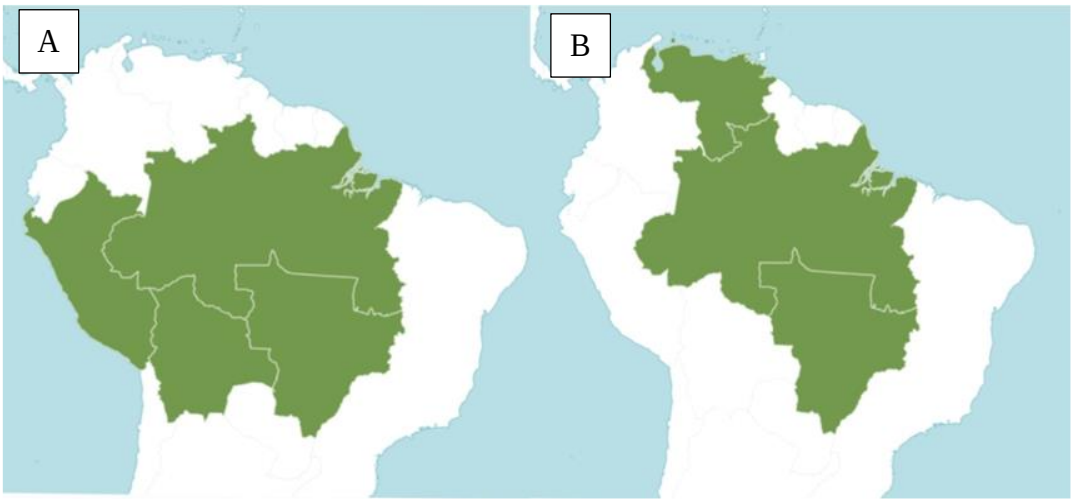


Figura 3: Distribuição geográfica atual das espécies (A) *Onychopetalum periquino* (B) *Onychopetalum amazonicum (*Adaptado de Plants of the World Online. Facilitado pelo Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: https://powo.science.kew.org/. Acesso em 15 de abril de 2024).

Este gênero foi incorporado, desde 1959, ao informal "Grupo-Unonopsis", que inclui também os gêneros *Bocageopsis* e *Unonopsis*, os quais apresentam grande semelhança entre si. A distinção entre esses gêneros ocorre principalmente pelas características de suas flores e frutos. Enquanto *Bocageopsis* e *Unonopsis* apresentam pétalas dispostas em duas séries e

frutos com bagas contendo múltiplos carpelos, *Onychopetalum* possui pétalas mais espessas e em formato de garra, e seus frutos são mais simples, contendo poucas sementes. Todos esses gêneros são encontrados predominantemente na região amazônica, onde habitam áreas de floresta tropical úmida (MAAS *et al*., 2007; CHATROU *et al*., 2012). Esses gêneros compartilham a produção de importantes produtos naturais, como alcaloides, terpenos e flavonoides (MAAS *et al*., 2007; SANTOS *et al*., 2023). O gênero *Unonopsis* é o mais estudado, principalmente com relação à prospecção de alcaloides, especialmente os do tipo aporfínicos e derivados. Embora menos estudados, os flavonoides em *Unonopsis* têm sido identificados (SANTOS *et al*., 2023).

2.2.1 O gênero *Onychopetalum* no Brasil

O gênero em questão não é endêmico do Brasil, suas duas espécies estão distribuídas na Amazônia brasileira, nas regiões Norte e Centro-Oeste. A espécie *O. periquino* é encontrada nos estados do Acre, Amazonas, Mato Grosso, Pará e Rondônia (Figura 4A), enquanto *O. amazonicum* ocorre nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia e Mato Grosso (Figura 4B) (MAAS *et al*., 2007; FLORA DO BRASIL, 2020).

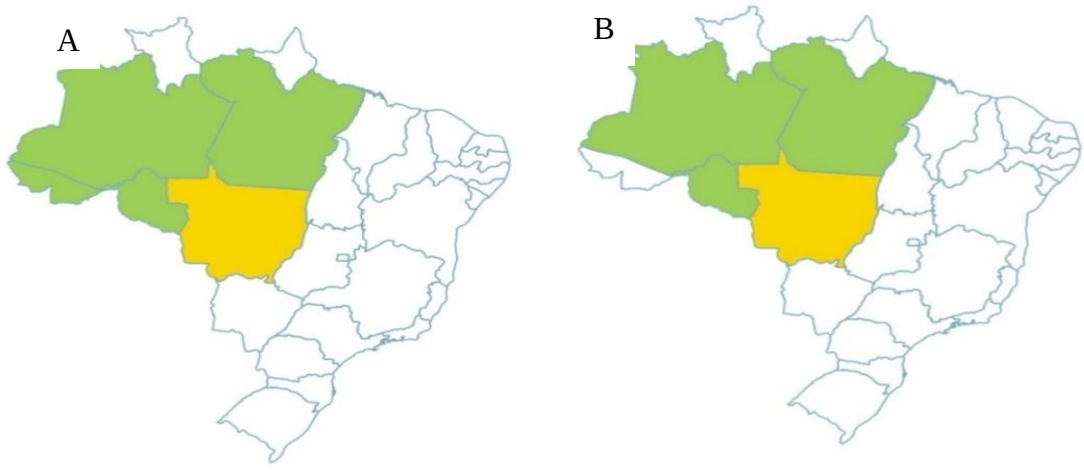


Figura 4: Distribuição geográfica no Brasil das espécies (A) *O. periquino* e (B) *O. amazonicum.* (Adaptado de Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB110488. Acesso em 15 de abril de 2024)**.**

Em relação às espécies, *O. periquino* distingue-se de *O. amazonicum* por suas folhas (Figura 5). O primeiro apresenta folhas mais estreitas e um pouco menores, sendo glabras em ambos os lados e com menos nervuras secundárias. Em contraste, o segundo possui folhas densamente cobertas de tricomas adpressos na face abaxial, medindo de 3 a 11 cm de largura e com nervuras secundárias mais pronunciadas (MAAS *et al*., 2007).

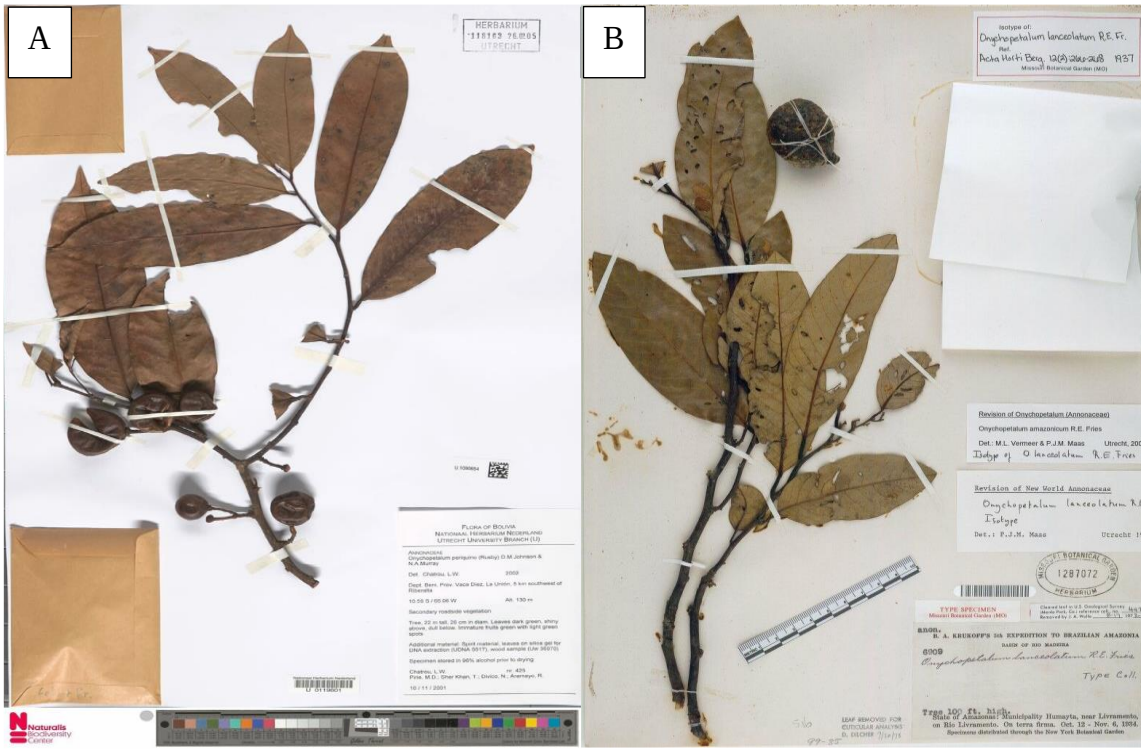


Figura 5: (A) Exsicata espécie *Onychopetalum periquino* (Rusby) D. M. Johnson & N. A. Murray; (B) Exsicata espécie *Onychopetalum amazonicum.* (Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB110488. Acesso em 20 de abril de 2024).

2.2.2 A química do gênero *Onychopetalum*

A revisão da literatura confirma a ocorrência de alcaloides no gênero *Onychopetalum*. Lima e colaboradores (2020) realizaram uma caracterização abrangente dos alcaloides derivados de isoquinolina presentes nas folhas de *O. amazonicum*, resultando no isolamento dos compostos listados no Quadro 1:

Quadro 1: Alcaloides derivados de isoquinolina isolados das folhas de *O. amazonicum*.

Classe	Aporfínicos	Anonaína; *N*-metilassimilobina; Assimilobina; Norushinsunine; Nuciferina; *N*-metilanonaína; *N*-metilisofilina; Nornuciferina; Isopilina; *N*-metil-*O*-metilisofilina; *O*-metilisofilina
	Tetraidroprotoberberínicos	Isocoriplamina; Estefolidina
	Benziltetraidroisoquinolínico	Norjuzifina
	Oxoaporfínicos	Liriodenina; Lisicamina

Fonte: Lima *et al*., 2020

Lima (2019), ao comparar o perfil químico das folhas de *O. amazonicum* com as de *O. periquino*, observou que as folhas de *O. periquino* apresentavam um perfil químico mais complexo, além da ausência de sinais majoritários de *m/z* par, o que indica uma menor abundância de alcaloides. Neste trabalho, a autora relata pela primeira vez a presença de alcaloides como estefolidina, reticulina, nornuciferina e anonaína (Figura 6) nas folhas dessa espécie. Esses resultados reforçam o significado quimiotaxonômico tanto para o gênero *Onychopetalum* quanto para a família Annonaceae.

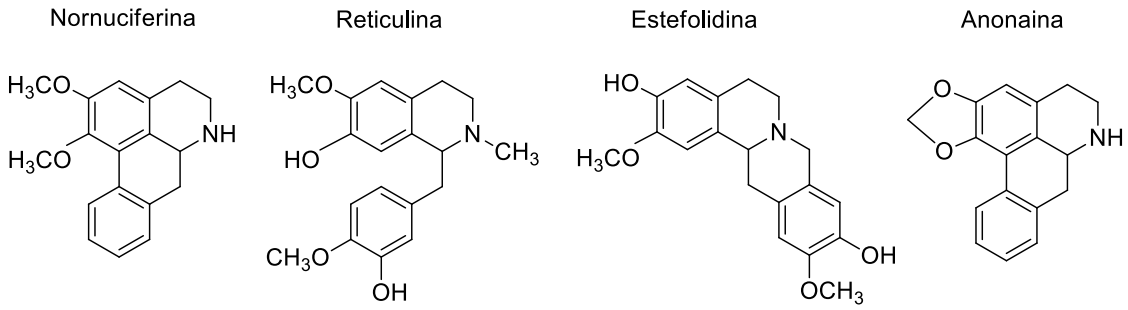


Figura 6: Estrutura dos alcaloides nornuciferina, reticulina, estefolidina e anonaína.

Além disso, a literatura também documenta a presença de esteroides, sitosterol e estigmasterol, assim como do alcaloide onichina nas cascas do tronco de *O. amazonicum* (ALMEIDA *et al*., 1976 apud LIMA, 2019).

Segundo Silva e colaboradores (2015), a presença do triterpeno tetracíclico policarpol, um derivado lanostano, nas partes aéreas (galhos e cascas do tronco) de diversas espécies, incluindo *Unonopsis duckei* R.E. Fr., *U. floribunda* Diels, *U. rufescens* (Baill.) R.E. Fr., *U. stipitata* Diels, *O. amazonicum* R.E. Fr. e *Bocageopsis pleiosperma*, constitui uma evidência química que sugere a proximidade botânica entre esses gêneros.

Os óleos essenciais (OE) das folhas de Annonaceae são predominantemente compostos por sesquiterpenos (FOURNIER *et al*. 1999). Lima e colaboradores (2019) relataram a composição química do OE das folhas de *O. periquino*, identificando um total de treze compostos que representam 91,31% da composição do óleo. Os constituintes majoritários foram *β*-elemeno (53,16%), espatulenol (11,94%) e *β*-selineno (9,25%). Esses compostos já haviam sido relatados anteriormente em *O. amazonicum* por Lima *et al*., 2016.

2.3 Espécie *O. periquino* (Rusbby) D.M. Johnson & N.A. Murray

As árvores da espécie *O. periquino* apresentam alturas que variam de 10 a 25 metros e diâmetros de 10,6 a 31,2 cm. Seus caules e ramos exsudam uma substância avermelhada, e os galhos jovens são glabros. O tronco é cilíndrico, com a casca externa de coloração cinza-esverdeada, espessa e fissurada, enquanto a parte interna é amarelada e fibrosa. Essas árvores são típicas de florestas não inundadas ou que são inundadas periodicamente, preferindo solos arenosos ou argilosos. A floração ocorre de julho a outubro, enquanto a frutificação acontece de agosto a fevereiro e em maio. As folhas possuem pecíolo com comprimento de 4 a 7 mm e diâmetro de 1,5 a 2,5 mm, com base aguda, raramente obtusa, e ápice acuminado, medindo entre 5 a 20 mm de comprimento (MAAS *et al*., 2007; FARIAS *et al.*, 2011; MENDES-SILVA *et al*., 2021; KESSLER, 1993).

Durante o amadurecimento, os frutos apresentam uma variedade de colorações: são verdes quando imaturos, laranjas na maturação fisiológica e roxos quando plenamente

maduros (Figura 7). Contêm 70,4% de polpa doce, com 11,7% de sólidos solúveis e 0,16% de acidez. Os frutos da envira cajú caem ao chão quando maduros e são apreciados por animais silvestres. Além disso, a população local utiliza esses frutos para consumo próprio e como iscas para atrair animais (FARIAS *et al*., 2011).

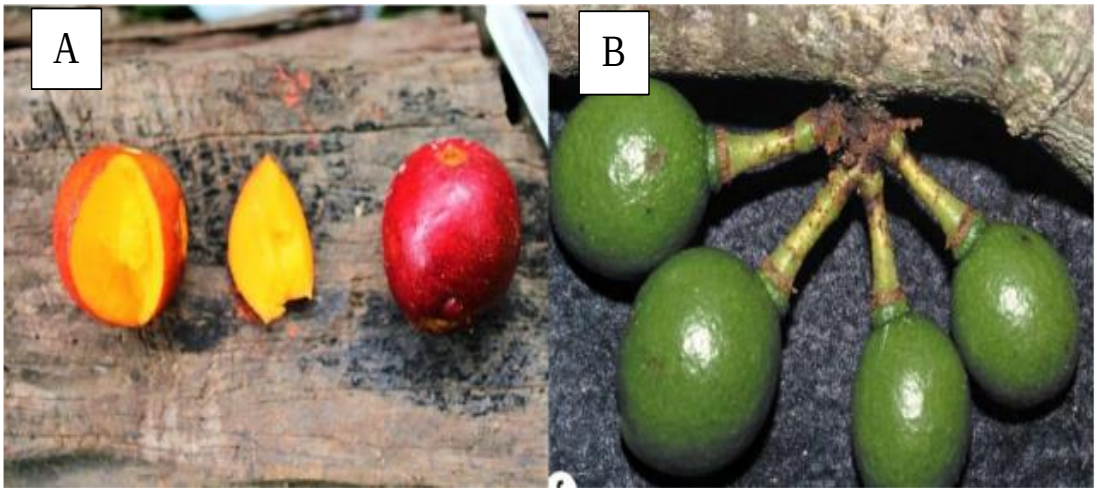


Figura 7: *Onychopetalum periquino*: Fruto (a) maduro e (b) verde (Adaptado de Plants of the World Online. Facilitado pelo Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: https://powo.science.kew.org/. Acesso em 26 de abril de 2024).

É comum que uma mesma espécie receba diferentes nomes, dependendo da região e do país em que é encontrada, especialmente em países de línguas distintas. Na Bolívia, por exemplo, a espécie é conhecida como Cotibi, Piraquina e Xahuisi; no Brasil, é chamada de envira-cajú ou inuira cajú; e no Peru, é referida como Carahuasca, Marañon del monte e Schisohsiom (MAAS *et al*., 2007).

2.3.1 Aspectos etnobotânicos e química da espécie *O. periquino*

O Brasil é um grande produtor de frutas, como banana, abacaxi, mamão, laranja e maçã, algumas das quais têm um considerável valor de exportação (IBGE, 2016). No entanto, existem frutas regionais, tanto exóticas quanto nativas, que também apresentam potencial de mercado, mas que ainda são pouco conhecidas, até mesmo dentro do próprio país. Um estudo realizado por Farias e colaboradores (2011) aborda o ponto de colheita, os

índices de maturação e a qualidade dos frutos da envireira-caju. Pesquisas como essa são essenciais, especialmente para pequenos produtores rurais, pois a valorização e a divulgação dessas frutas podem transformá-las em fontes de renda e emprego para aqueles que as cultivam.

Na literatura, destacam-se estudos relacionados principalmente a óleos essenciais e alcaloides para a espécie *O. periquino*. O trabalho publicado por Lima e colaboradores (2019) investigou a composição química do óleo essencial das folhas de *O. periquino* por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), além de avaliar sua atividade larvicida contra larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti*. Neste estudo, foram identificados treze compostos, sendo que os hidrocarbonetos sesquiterpênicos apresentaram a maior proporção (78,86%), seguidos pelos sesquiterpenos oxigenados (12,45%). Segundo os autores, o óleo demonstrou alta atividade contra as larvas de *A. aegypti*, uma descoberta significativa, considerando que atualmente não existem tratamentos ou vacinas eficazes contra a dengue (BRASIL, Ministério da Saúde).

2.4 A Biossíntese dos Flavonoides

Esses compostos são caracterizados por uma estrutura formada por três anéis fenólicos, com um esqueleto de quinze carbonos que consiste em dois anéis de benzeno, A (6 carbonos) e B (6 carbonos), conectados por um anel heterocíclico de pirano, C (3 carbonos) (Figura 8) (PANCHE *et al*., 2016; DEWICK, 2009; HARBORNE *et al*., 1975). Eles são divididos em diferentes subclasses com base em fatores como o carbono do anel C ao qual o anel B está ligado, o grau de insaturação e oxidação do anel C, e a posição dos substituintes nos anéis A e B (PANCHE *et al*., 2016; HARBORNE *et al*., 1975). Essas modificações podem ocorrer por meio de reações de hidroxilação, esterificação, amidação,

metilação e glicosilação, que podem alterar a polaridade, toxicidade e solubilidade das moléculas (PANCHE *et al.*, 2016; WEN *et al*., 2017; MORAES *et al*., 2022).

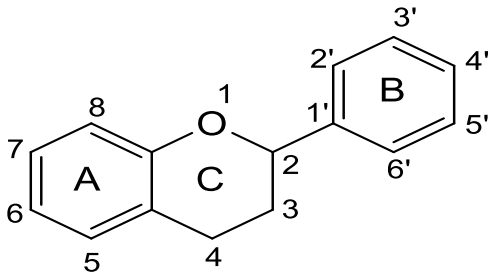


Figura 8: Estrutura básica dos flavonoides.

Os flavonoides são produtos naturais sintetizados por duas vias biossintéticas principais: a via do chiquimato, responsável pela geração dos precursores fenólicos e a via do acetato-malonato, que contribui para a formação do esqueleto de carbono dos flavonoides (DEWICK, 2009; NABAVI *et al.*, 2020). O processo inicia-se com a formação do 4-hidroxicinamoil-CoA (Figura 9A), um intermediário chave derivado do ácido chiquímico por meio da via do chiquimato. O 4-hidroxicinamoil-CoA é então condensado com três unidades de malonil-CoA (Figura 9B), que são produtos da via do acetato-malonato. Essa reação, catalisada pela enzima chalcona sintase, resulta na formação de um intermediário policetídeo, que sofre ciclização enzimática, levando à formação de chalcona (Figura 9C), o primeiro composto da classe dos flavonoides. A chalcona pode então ser isomerizada pela enzima chalcona isomerase, dando origem às flavanonas (Figura 9D). Dependendo das enzimas envolvidas e do tipo de ciclização, o intermediário biossintético pode seguir diferentes rotas, resultando não apenas em flavonoides, mas também em outros compostos fenólicos, como os estilbenoides (DEWICK, 2009; NABAVI *et al.*, 2020). Os flavonoides são sintetizados principalmente no citosol, em complexos multienzimáticos associados às membranas do retículo endoplasmático (RE), de onde são posteriormente transportados para seus destinos subcelulares (SANTOS, 2020).

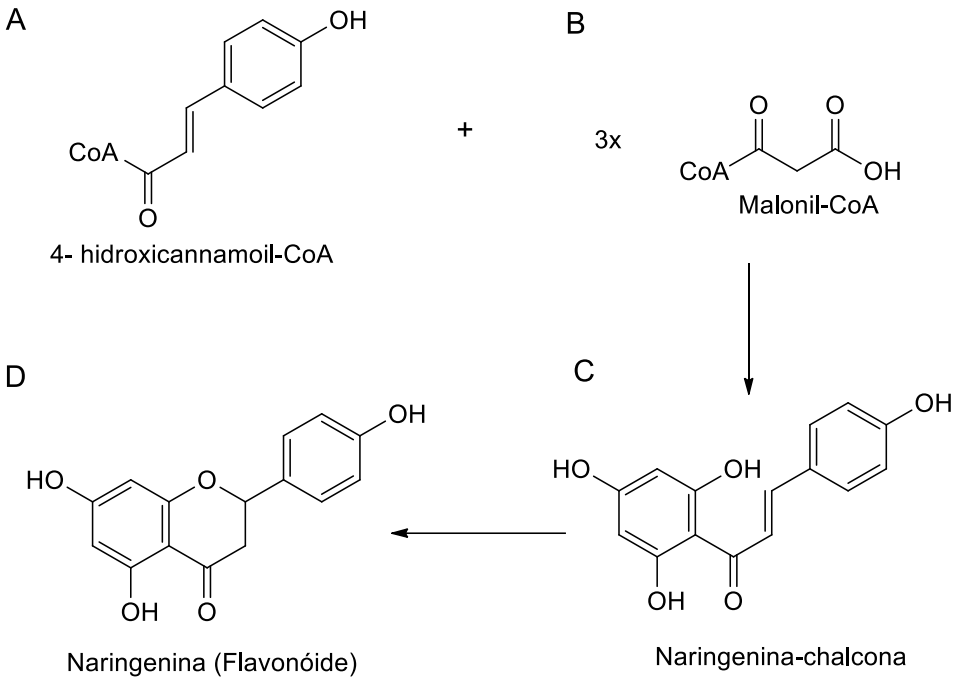


Figura 9: Rota biossintética dos flavonoides (Adaptado de DEWICK, 2009)

Estudos mostram que os flavonoides possuem atividades biológicas importantes e um significativo potencial terapêutico, graças à sua capacidade de doar elétrons do grupo hidroxila fenólico e à sua estrutura, que favorece a interação e eliminação de radicais livres. (YEN *et al*., 2021; MORAES *et al*., 2022; BAKER, 2022 PÉREZ-TORRES *et al*., 2021; LUO *et al*., 2022; ROY *et al*., 2022).

Dependendo do tipo de ciclização, do grau de insaturação e da oxidação do segmento de três carbonos, os flavonoides podem ser classificados em diversas subclasses (DEWICK, 2009; PANCHE *et al*., 2016). As principais incluem flavanonas, flavonóis, isoflavonóides, flavonas, flavanóis e antocianinas (SANTOS, 2020; DEWICK, 2009; SANTOS & SALATINO, 2000; HARBORNE *et al*., 1975).

Os compostos em que o anel B está ligado à posição 3 do anel C são denominados isoflavonóides (Figura 10) (AOKI *et al*., 2000; HARBORNE *et al*., 1975). Eles são encontrados principalmente em leguminosas, onde desempenham papéis cruciais na sinalização microbiana e na indução de nódulos (AOKI *et al*., 2000). Para os seres humanos,

os isoflavonóides oferecem diversos benefícios à saúde, incluindo a prevenção de doenças como o câncer e as doenças cardiovasculares (ZHUANG *et al*., 2023; CHU *et al*., 2017).

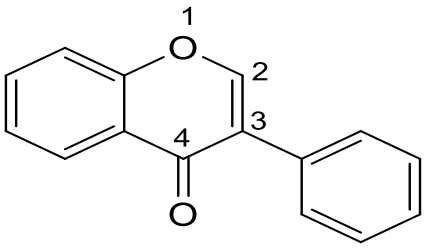


Figura 10: Estrutura básica dos isoflavonóides.

As flavonas são amplamente distribuídas em folhas, frutos e flores de plantas como pimenta vermelha, camomila, hortelã, salsa e cenoura, entre outras. As principais flavonas são a apigenina e a luteolina (Figura 11). Essa subclasse de compostos é caracterizada pela presença de uma ligação dupla entre as posições C-2 e C-3 e uma cetona na posição C-4 do anel central. A hidroxilação ocorre geralmente nas posições C-3′ e C-4′ do anel B, assim como nas posições C-5 e C-7 do anel A. Além disso, em outros sítios ativos, podem ocorrer substituições, como glicosilação, metilação e acilação. Dependendo dessas substituições, a molécula pode se tornar mais hidrofílica ou lipofílica (BOSE *et al*., 2018; BERIM & GANG, 2016; PANCHE *et al*., 2016; MUKHERJEE, 2019; HARBORNE *et al*., 1975).

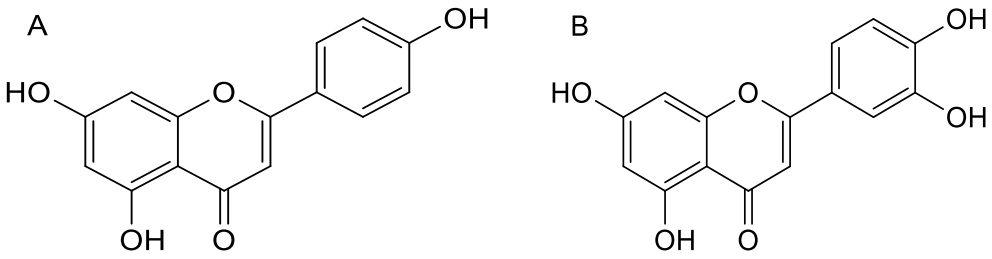


Figura 11: Exemplos de flavonas (a) apigenina e (b) luteolina.

As flavanonas possuem um anel C saturado e oxidado na posição C-4, sendo comumente encontradas em frutas cítricas. Os principais representantes dessa classe de

flavonoides são a naringenina e a hesperetina (Figura 12) (MUKHERJEE, 2019; BARRECA *et al*., 2017; SHAH & SMITH, 2020; HARBORNE *et al*., 1975).

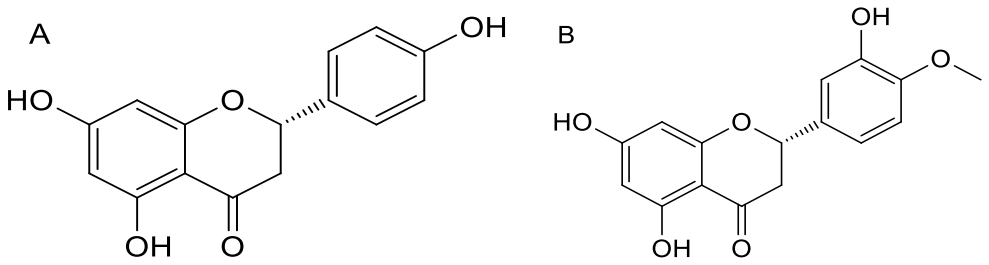


Figura 12: Exemplos de flavanonas (a) naringenina e (b) hesperetina.

A estrutura básica dos flavanóis é composta por um anel C saturado e não oxidado, contendo um grupo hidroxila na posição C-3. Quando ocorre uma substituição neste carbono, formam-se dois centros quirais nas posições C-2 e C-3. Além disso, os flavanóis podem apresentar um grupo hidroxila na posição C-4, permitindo que sejam subdivididos em flavan-3-óis simples, flavan-3-óis oligoméricos, flavan-4-óis, isoflavan-4-óis e flavan-3,4-óis (Figura 13) (LUO *et al*., 2022; LIGA *et al*., 2023; SINGLA *et al*., 2019; HARBORNE *et al*., 1975).

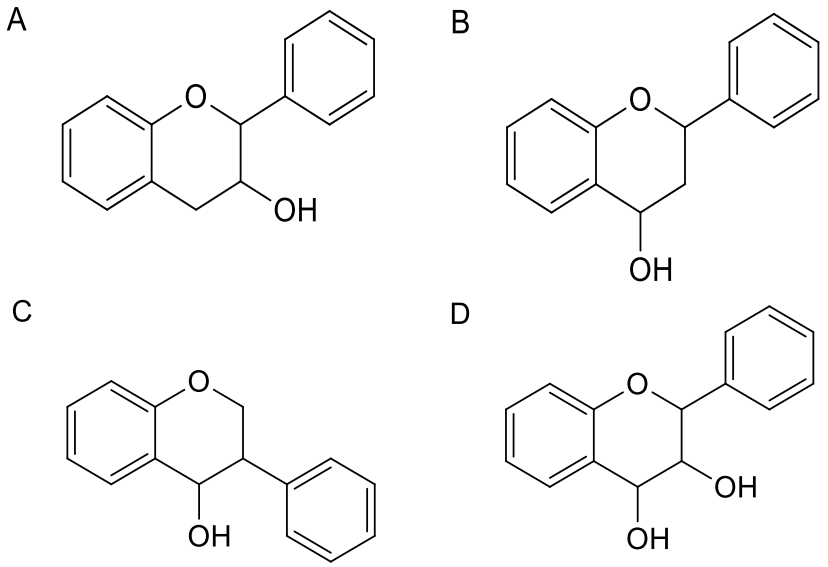


Figura 13: Exemplos de flavanóis (a) flavan-3-óis, (b) flavan-4-óis, (c) isoflavan-4-óis, (d) flavan- 3,4-ols.

Os flavonóis, por sua vez, possuem um anel C insaturado entre as posições C-2 e C-3, com o grupo hidroxila frequentemente localizado na posição C-3, enquanto a posição C-4 é oxidada (Figura 14). Esses compostos exibem diferentes padrões de metilação, hidroxilação e glicosilação, com as posições -OH sendo responsáveis por suas atividades biológicas. Entre os flavonóis mais estudados estão o kaempferol e a quercetina (PANCHE *et al*., 2016; SHAH & SMITH, 2020; SERUGA & TOMAC, 2017; CARRILLO-MARTINEZ *et al*., 2024).

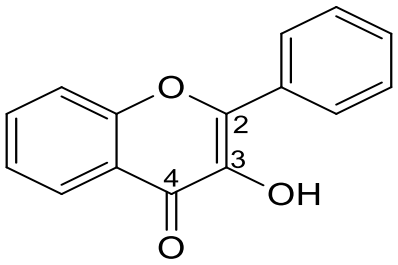


Figura 14: Estrutura básica dos flavonóis.

As antocianinas são uma subclasse de flavonoides solúveis em água, não oxidados e insaturados (Figura 15), responsáveis pela coloração das flores e frutos. A cor dessas moléculas varia conforme o pH e as modificações químicas, como metilação ou acilação dos grupos hidroxila nos anéis A e B. As antocianinas podem ser encontradas em todos os tecidos vegetais (PANCHE *et al*., 2016; LIGA *et al*., 2023; BOSE *et al*., 2018; SINGLA *et al*., 2019; HARBORNE *et al*., 1975).

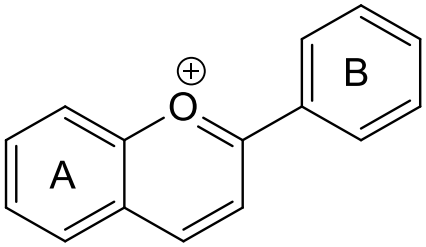


Figura 15: Estrutura básica do cátion flavílio.

Devido à sua capacidade de absorver radiação ultravioleta, todos os flavonoides podem ser detectados por detectores UV (FENG *et al*., 2017). Seu caráter aromático permite

a absorção em comprimentos de onda relativamente longos, proporcionando maior seletividade em métodos quantitativos e espectrofotométricos (PEREIRA & VEGA, 2022).

Vale destacar que cada subclasse de flavonoides apresenta um espectro UV-vis característico. O espectro UV-vis exibe dois máximos de absorção: a banda I, que absorve entre 300 e 550 nm e está relacionada ao anel B, e a banda II, que absorve entre 240 e 285 nm, associada ao anel A. Todos os flavonoides absorvem na faixa de 240-285 nm, o que torna a banda I particularmente importante, embora a absorção possa variar dependendo dos grupos funcionais ligados ao esqueleto dos flavonoides (KUMAR & PANDEY, 2013; FENG *et al*., 2017; PEREIRA & VEGA, 2022).

Os flavonoides podem existir como glicosídeos, com açúcares ligados, ou como agliconas, sem açúcares. A maioria dos flavonoides presentes em plantas são glicosídeos, com exceção da catequina (KOPUSTINSKIENE *et al*., 2020; PEREIRA & VEGA, 2022; KACHLICKI *et al*., 2016).

A reação de glicosilação pode gerar flavonoides *C*-glicosilados ou *O*-glicosilados. A *C*-glicosilação ocorre no estágio inicial da biossíntese, quando o açúcar se liga diretamente ao núcleo aglicona, geralmente no anel A, pois requer um carbono nucleofílico adequado, como em sistemas aromáticos ativados por grupos fenólicos. Por outro lado, a *O*-glicosilação, ocorre nas etapas finais da biossíntese, através por meio de uma reação de substituição nucleofílica simples do tipo S_N2, onde a unidade de açúcar se liga ao átomo de oxigênio presente no grupo hidroxila da aglicona (CAO *et al*., 2014; PEREIRA & VEGA, 2022; VASUDEVAN & LEE, 2020). Essas glicosilações geralmente envolvem hexoses (ex. glicose e ramnose) ou pentoses (ex. xilose e arabinose). A glicosilação é crucial para as propriedades estruturais e farmacológicas de produtos naturais e sintéticos, pois frequentemente melhora a bioatividade, solubilidade e estabilidade, ou até mesmo fornecer

propriedades distintas em relação à aglicona. A posição dos açúcares é fundamental para essas características (VASUDEVAN & LEE, 2020; JI *et al*., 2020; CAO *et al*., 2014; XIAO *et al*., 2015).

Um estudo de Santos & Salatino (2000) relatou a presença de 76 flavonoides foliares em gêneros e espécies de Annonaceae nativas do Brasil, dos quais 67 eram flavonóis e 9 eram flavonas. Os autores destacam a diversidade estrutural, que pode ser atribuída a fatores como a presença de mono-, di- e triglicosídeos de diferentes açúcares, glicosilação nas posições 3, 3/7 ou 3/7/3′, *O*-metilação dos anéis A ou B, e oxigenação na posição C-6.

2.4.1 Espectrometria de massas aplicada ao estudo de flavonoides em matrizes vegetais

Ao longo dos anos, os espectrômetros de massas passaram por vários avanços tecnológicos, com o objetivo de tornar essa ferramenta analítica mais acessível a uma ampla comunidade de cientistas. Esses avanços na metodologia e na instrumentação transformaram a espectrometria de massas em uma ferramenta indispensável para a identificação rápida e precisa de metabólitos (BOUSLIMANI *et al*., 2014; PENNA & CORRERA, 2020).

A espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) é definida como uma técnica analítica que mede a razão massa-carga de partículas carregadas, resultando em um espectro de massas (gráfico de *m/z* versus intensidade relativa). Esses espectros fornecem informações sobre a massa molecular e seus padrões de fragmentação, permitindo a determinação da fórmula molecular da substância analisada e a caracterização da presença e localização de certos grupos funcionais (PAVIA, 2010; SANTOS, 2020; PATEL *et al*., 2012, MCLAFFERTY & TURECEK, 1973; MCMURRY, 2016).

A técnica destaca-se por sua alta sensibilidade, seletividade e baixo limite de detecção, sendo composta por três partes fundamentais: uma fonte de ionização, onde as

moléculas da amostra são carregadas eletricamente e os íons são gerados; um analisador de massas, que separa os íons de acordo com sua razão massa/carga (*m/z*); e um detector, que observa e conta os íons separados (Figura 16) (MCMURRY, 2016; PAVIA, 2010).

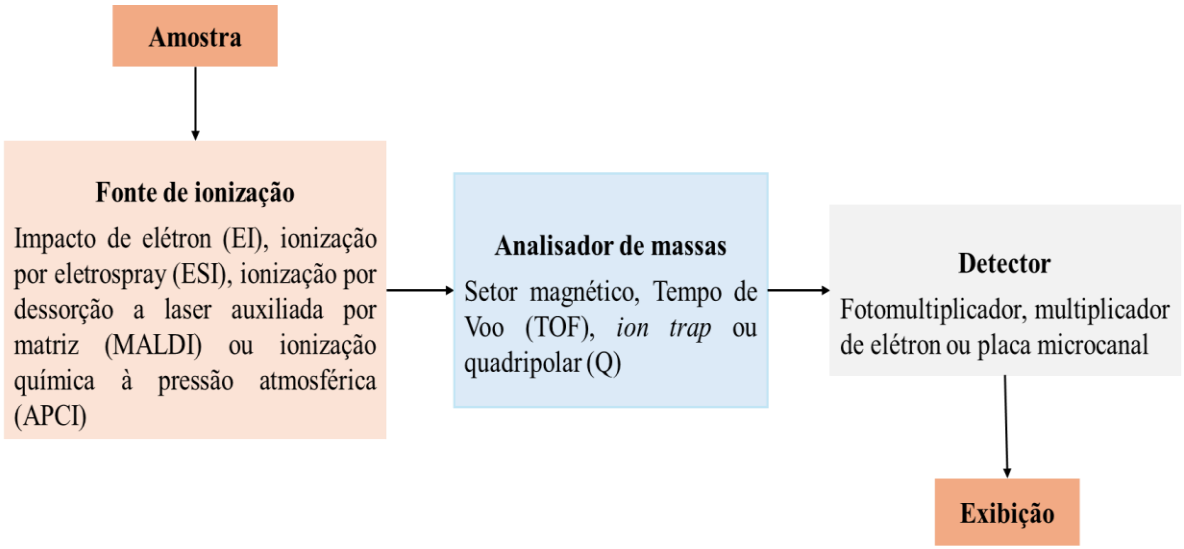


Figura 16: Principais fontes de ionização, analisadores e detectores usados em MS (Adaptado PAVIA *et al.*, 2010).

Segundo Patel e colaboradores (2012), a espectrometria de massas pode ser utilizada tanto para análises qualitativas quanto quantitativas, incluindo a identificação de moléculas desconhecidas, a determinação da composição isotópica dos elementos de uma molécula, e a quantificação de compostos em uma amostra. Os autores também ressaltam que muitos espectrômetros de massas operam em modos de íons positivos ou negativos, sendo crucial saber se os íons observados têm carga positiva ou negativa, pois isso revela características importantes sobre a natureza das moléculas.

Em matrizes complexas, como produtos naturais, a espectrometria de massas pode ser acoplada a outras técnicas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (PEREIRA & VEGA, 2022; KACHLICKI *et al.*, 2016). O HPLC é capaz de separar uma ampla variedade de substâncias com eficiência, em um curto espaço de tempo, gerando dados qualitativos e quantitativos. A técnica utiliza colunas preenchidas com materiais que atuam como fase estacionária,

geralmente C18, e uma fase móvel eluída sob alta pressão. A seleção da fase móvel depende do tipo de coluna e dos componentes químicos a serem analisados (LANÇAS, 2009; SANTOS, 2020).

A abordagem preferida para análises de misturas complexas de compostos com maior massa molecular, maior polaridade e menor volatilidade é o acoplamento entre cromatografia líquida e espectrometria de massas (LC-MS) (Figura 17) (LANÇAS, 2009; VILLIERS *et al*., 2015). Essa abordagem exige pequenas quantidades de amostra, oferece alta sensibilidade e permite uma avaliação rápida da pureza das bandas cromatográficas (NICULAU *et al*., 2016; BOUSLIMANI *et al*., 2014). As fontes de ionização que mostram melhor desempenho no acoplamento LC-MS operam à pressão atmosférica, sendo a ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) as mais utilizadas (LANÇAS, 2009; PEREIRA & VEGA, 2022).

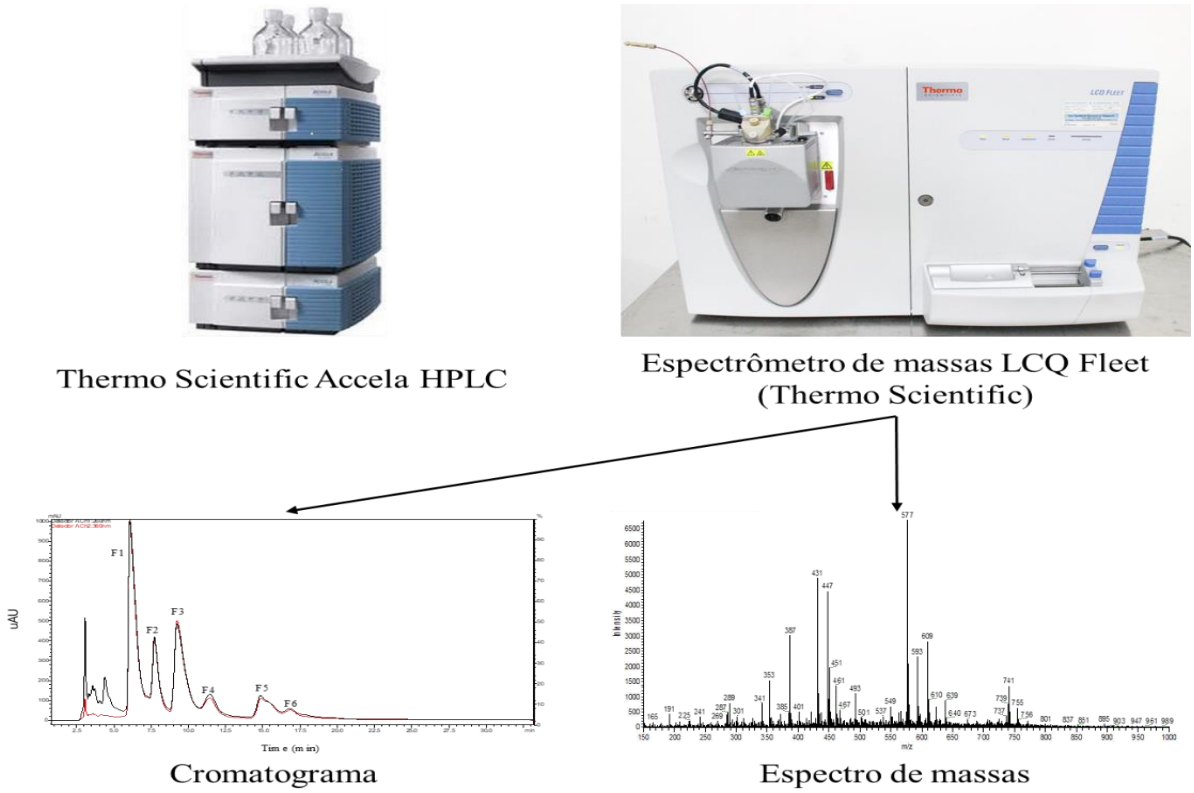


Figura 17: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) (Fonte: Autoria própria)

Com a técnica de LC-MS, é possível estudar o extrato vegetal bruto em um processo chamado desreplicação. A desreplicação consiste na identificação de compostos conhecidos em uma mistura complexa sem a necessidade de isolamento completo, economizando tempo e recursos ao evitar a identificação de substâncias já conhecidas (NICULAU *et al*., 2016; SILVA *et al*., 2012; BOUSLIMANI *et al*., 2014).

Quando essas técnicas são aplicadas em conjunto, proporcionam uma abordagem integrada e eficiente para o estudo de flavonoides, que são notoriamente difíceis de isolar devido à complexidade dos compostos presentes nos extratos (VILLIERS *et al*., 2015). A combinação de LC-MS/MS (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em *Tandem*) é particularmente eficaz na desreplicação, pois fragmenta os íons dos flavonoides, fornecendo informações detalhadas sobre sua estrutura, incluindo a presença e a localização de grupos funcionais (PEREIRA & VEGA, 2022; VILLIERS *et al*., 2015; KACHLICKI *et al*., 2016).

2.4.2 Vias de fragmentação dos Flavonoides

As vias de fragmentação dos flavonoides variam conforme o padrão de substituição e sua classe (VUKICS & GUTTMAN, 2010). O sistema de nomenclatura aceito para flavona, flavonol e agliconas de flavanonas, desenvolvido por Mabry, Markham e Thomas (1970) e posteriormente aprimorado por Ma e colaboradores (1997), é amplamente utilizado para designar os íons fragmentados por análise espectrométrica.

Nesse sistema, para as agliconas livres os rótulos $^{i,j}A_0$ e $^{i,j}B_0$ referem-se a fragmentos que contêm os anéis A e B intactos, com os superscritos *i* e *j* indicando as ligações do anel C que foram quebradas, respectivamente. Para os fragmentos de glicosídeos, as designações A_i, B_i e C_i são utilizadas para indicar fragmentos com cargas oriundas da porção de carboidrato, onde o índice *i* representa a unidade de açúcar que está sendo clivada, contadas

a partir da unidade terminal de açúcar. Os íons que contêm a aglicona são rotulados como X_j, Y_j e Z_j, onde *j* indica o número da ligação interglicosídica clivada, contando a partir da aglicona (Figura 18) (VUKICS & GUTTMAN, 2010; MA *et at*., 1997; DOMON & COSTELLO, 1988; MABRY *et al*., 1970; CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al*., 2016).

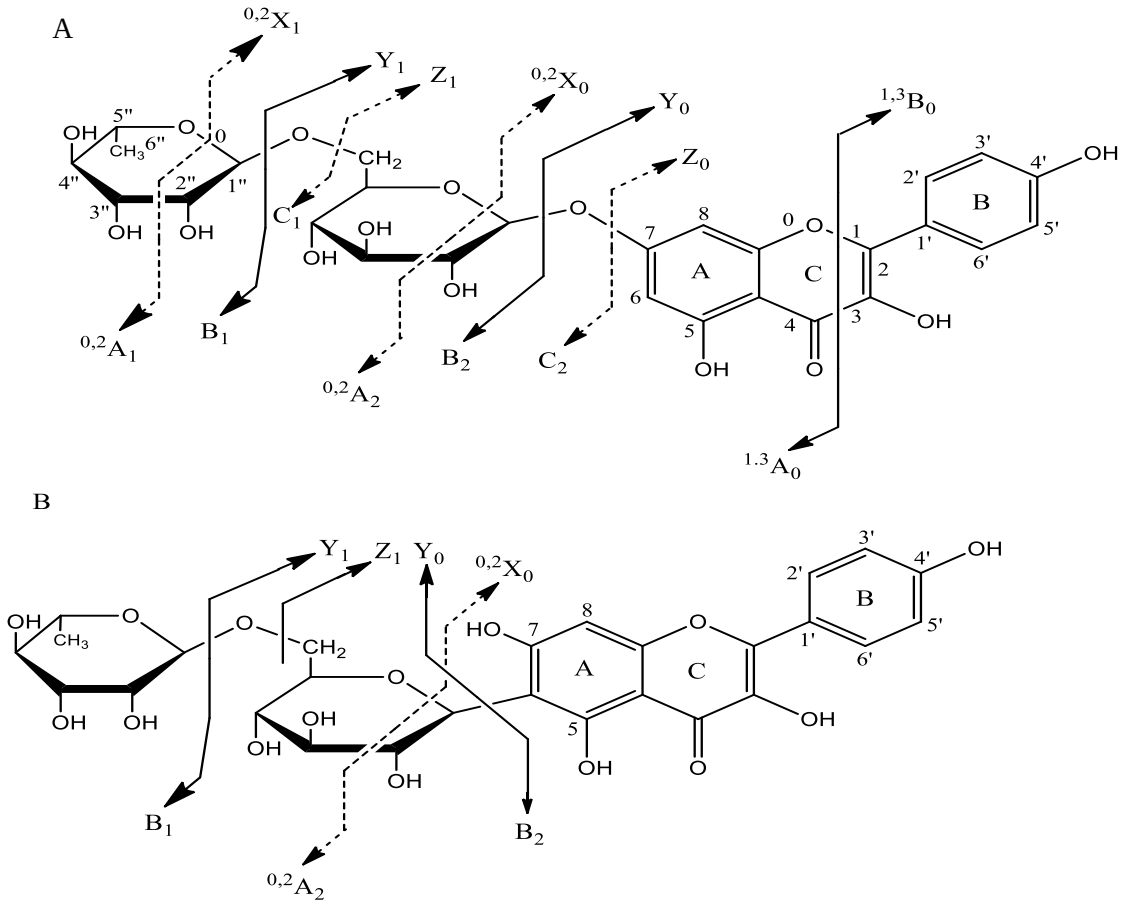


Figura 18: Nomenclatura de fragmentos comumente aplicada para (A) *O*-glicosídeos e (B) *C,O*- e *C*-glicosídeos (Adaptado DOMON & COSTELLO, 1988; VUKICS & GUTTMAN, 2010).

Para os *C,O*-glicosídeos, foi estabelecida uma numeração específica. Nos *O*-glicosilados, quando a primeira ligação glicosídica não se conecta diretamente à aglicona, a numeração inicia-se na porção *C*-glicosil. Para representar íons fragmentos resultantes da perda da porção *C*-glicosil em *C,O*-glicosídeos, são utilizados os rótulos Y_0 ou Z_0 (Figura 18B). A clivagem das ligações C-C do anel de açúcar gera íons produtos rotulados como

$^{k,l}A_i$ e $^{k,l}X_j$, onde os superscritos *k* e *l* indicam as ligações quebradas no anel de açúcar (Figura 18A-B). Em alguns casos, para especificar açúcares como hexose, desoxihexose ou pentose, são adicionados os subscritos *H*, *D* ou *P*, respectivamente, enquanto a perda de moléculas de água é indicada por E_i (VUKICS & GUTTMAN, 2010; MA *et at*., 1997; MABRY *et al*., 1970; CUYCKENS & CLAEYS, 2004).

Devido às diferentes vias de fragmentação das agliconas, que variam conforme o padrão de substituição das moléculas, é possível diferenciar preliminarmente alguns isômeros, especialmente no caso de *C*-glicosídeos e *O*-glicosídeos (VUKICS & GUTTMAN, 2010; CUYCKENS & CLAEYS, 2004). Este fenômeno é ilustrado na Figura 19, onde o fragmento $^{1,3}A^+$ exibe diferentes valores de *m/z* para *C*-glicosídeos e *O*-glicosídeos, sendo importante notar que os *C*-glicosídeos retêm uma parte da porção do açúcar (VUKICS & GUTTMAN, 2010).

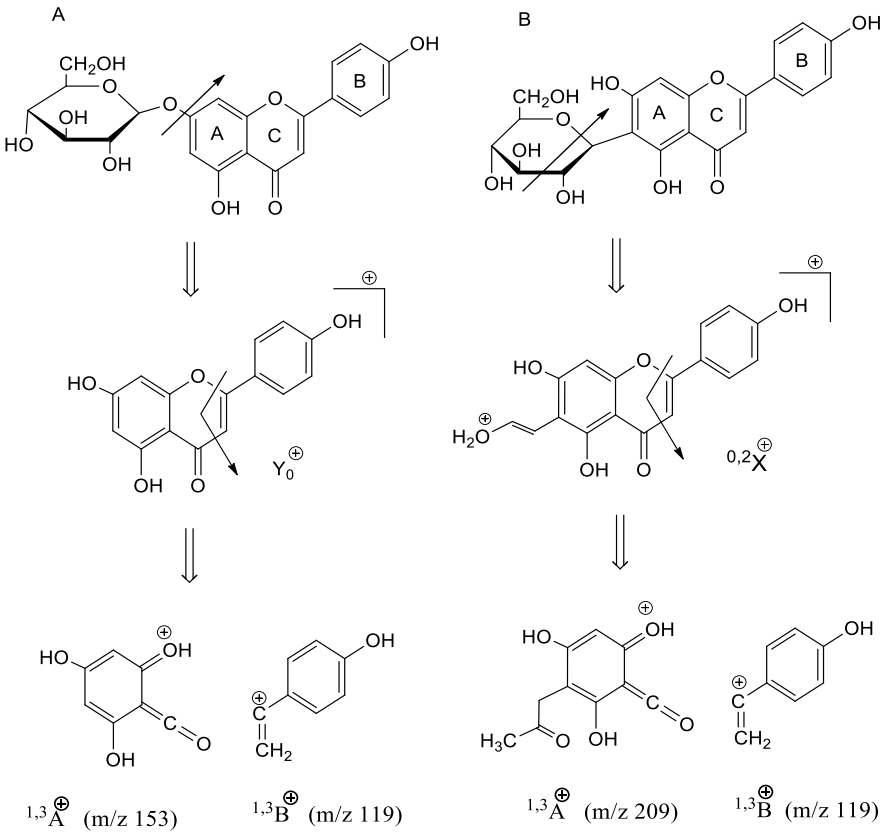


Figura 19: Estrutura e origem do fragmento $^{1,3}A^+$ no caso de (A) *O*-glicosídeos e (B) *C*-glicosídeos (Adaptado VUKICS & GUTTMAN, 2010).

São muitas vantagens que fazem da espectrometria de massas uma técnica ideal para diversas aplicações (KACHLICKI *et al*., 2016). Sua combinação com outras técnicas analíticas facilita a análise do perfil químico de uma espécie e direciona ao isolamento de novas substâncias potencialmente bioativas (SANTOS, 2020; VILLIERS *et al*., 2015; PENNA & CORRERA, 2020).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Contribuir com o conhecimento fitoquímico do gênero *Onychopetalum* da região Amazônica através da desreplicação e/ou isolamento de substâncias das folhas da espécie *O. periquino*.

3.2. Específicos

- Acessar o perfil químico das folhas de *O. periquino* através de análises de LC-APCI-MS.
- Caracterizar a composição química dos extratos aquosos das folhas de *O. periquino* baseado na interpretação manual de espectros de MS/MS;
- Isolar e caracterizar novos produtos naturais e/ou substâncias de interesse químico/farmacológico.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) da central analítica na Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

4.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (HPLC)

Utilizou-se um cromatógrafo modelo Acella® (Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific). Foram utilizadas as colunas Luna C18 (5µm, 150 x 4,60 mm) e Luna Phenyl-hexyl (5µm, 150 x 4,6 mm), ambas da Phenomenex. A fase móvel utilizada foi uma solução de metanol/água (MeOH/H_2O) a 1% ácido fórmico.

4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) semi-preparativa

As análises por HPLC em escala semi-preparativa foram realizadas utilizando cromatógrafo modelo UFLC® (Shimadzu) equipado com bomba LC-6AD (sistema binário) *looping* de 200µL, desgaseificador DGU-20A5, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV, módulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 µL) e colunas cromatográficas Luna C18 (5µm, 250 x 10 mm) e Luna Phenyl-hexyl, (5µm, 250 x 10 mm) Phenomenex. A fase móvel utilizada foi uma solução de MeOH/H_2O a 1% ácido fórmico.

4.2 Solventes

Solventes grau HPLC (Tedia®) e água ultrapura obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) foram utilizados para as análises cromatográficas em escala analítica e semi-preparativa, bem como para as análises por espectrometria de massas. Utilizou-se como solvente metanol (MeOH) e dimetilsulfóxido (DMSO) para o preparo dos

extratos. Solventes deuterados da marca Cambridge Isotope Laboratories (Scielab) foram utilizados para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).

4.3 Métodos espectroscópicos e espectrométricos

4.3.1 Análises por Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro *ion trap*, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific), operando com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI). Os modos positivo e negativo foram escolhidos para a obtenção dos espectros de massa em primeira ordem (MS) e segunda ordem (MS/MS). As fragmentações foram realizadas utilizando energias de colisão entre 15 e 25%. Os espectros foram adquiridos e processados através do software Xcalibur® versão 2.7 (Thermo Scientific®). Todas as amostras para análise por MS foram padronizadas a concentração de 10 ppm em metanol grau HPLC.

4.3.2 Análises por Ressonância Magnética Nuclear

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB) da central analítica, UFAM. Os espectros unidimensionais (^{1}H) e bidimensionais (COSY – *Correlation Spectroscopy*, HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation* e HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE III HD equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm (BBFO Plus SmartProbe^{TM}) com gradiente de campo na direção Z, operando a 11,75 tesla, observando o núcleo de ^{1}H a 500,13 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS) e as constantes de acoplamento (*J*) expressas em Hertz (Hz).

4.4 Coleta e identificação do material botânico

O material foliar da espécie *O. periquino* foi coletado foi coletado em maio de 2017 na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Acre (UFAC) em Rio Branco/Acre. A coleta foi realizada em parceria com Prof. Dr. Carromberth Fernandes – UFAC e sua identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Marcos Silveira do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza da UFAC, e sua exsicata foi depositada sob nº 7552 no Laboratório de Botânica e Ecologia Vegetal (LABEV-UFAC). O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código AE0F182.

4.5 Obtenção do extrato aquoso das folhas de *O. periquino*

As folhas foram secas a temperatura ambiente (25°C) e pulverizadas no moinho analítico modelo Q298A21, em seguida foram submetidas a dois diferentes métodos de extração: infusão e decocção (Figura 20), com o objetivo de avaliar qual método resultaria em maior rendimento e se haveria diferenças significativas no perfil químico dos extratos.

No procedimento de infusão, 50 g do material pulverizado foram extraídos com 500 mL de água destilada por 15 minutos. Após esse período, o extrato foi filtrado com algodão, congelado e, em seguida, liofilizado utilizando um liofilizador Alpha 1-2 Ldplus, Martin Christ, Germany. No método de decocção, 50 g do material pulverizado foram aquecidos e mantidos em fervura com 500 mL de água destilada. Após o resfriamento, o líquido foi filtrado, congelado e, posteriormente, liofilizado (Alpha 1-2 Ldplus, Martin Christ, Germny). Após a secagem completa, os extratos foram pesados em uma balança analítica (Ohaus Adventurer modelo AR2140). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. Seu rendimento foi calculado dividindo-se a massa extrato seco (g) pela massa do material inicial (g) e o resultado multiplicado por 100.

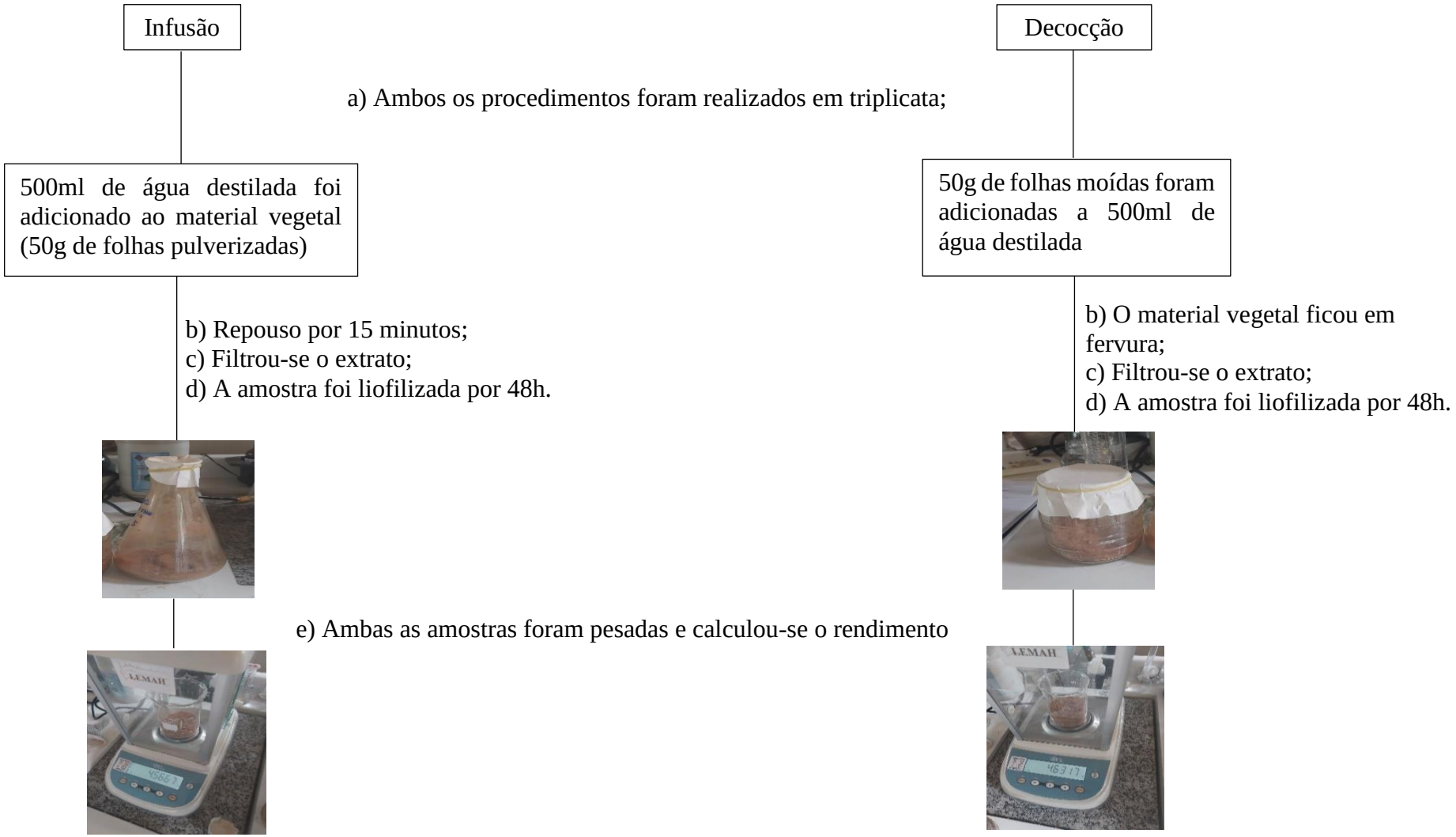


Figura 20: Etapas do processo de preparo do extrato aquoso.

4.6 Análise do perfil químico dos extratos aquosos *O. periquino* por DI-APCI-MS

A fim de comparar os perfis químicos entre os extratos obtidos por infusão e decocção, os extratos aquosos foram diluídos a uma concentração de 10 ppm em metanol grau HPLC, e os espectros foram obtidos em um espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (LCQ Fleet), equipado com fonte APCI e operando em modo negativo e positivo, com faixa de aquisição de 150-1000 *m/z*.

4.7 Coluna filtrante (Celite)

Um total de 9,2 g do extrato obtido por decocção foi submetido a uma filtração em coluna aberta (27 cm de altura e 5 cm de diâmetro) utilizando Celite 545 (TEDIA) como adsorvente e metanol (1,7 litros) como fase móvel (Figura 21A). Esse processo resultou na fração metanólica (1,6 litros) (Figura 21B). A fração metanólica foi obtida após a eliminação do solvente em um evaporador rotatório sob pressão reduzida a 40ºC (Figura 21C) e, N_2 gasoso (Figura 21D). Após a secagem completa, a fração foi pesada (5,50 g) em uma balança analítica Ohaus Adventurer modelo AR2140.

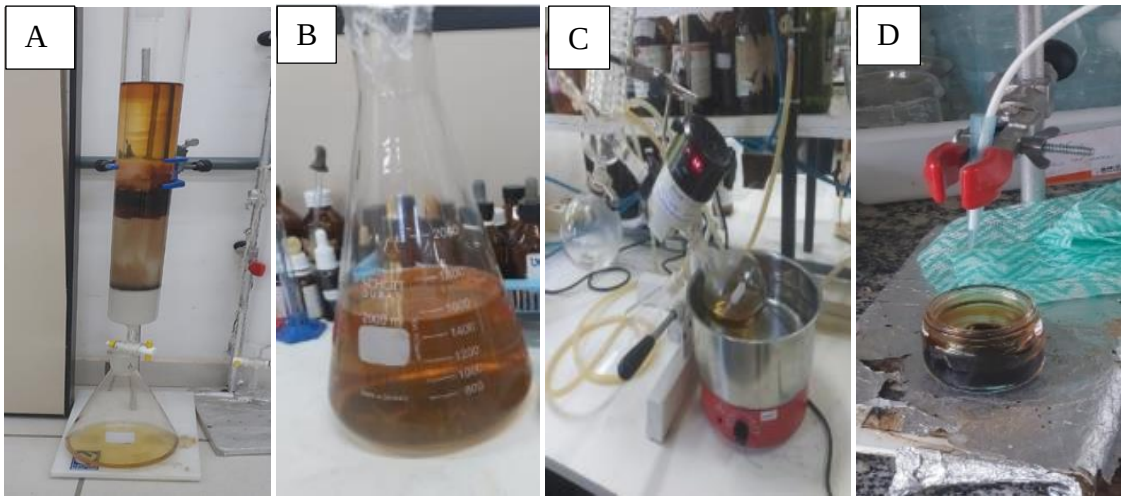


Figura 21: (A) Coluna filtrante (Celite)**;** (B) Fração metanólica; (C) Eliminação do solvente em evaporador rotatório; (D) Secagem em N_2 gasoso.

4.8 *Screening* de flavonoides glicosilados de *O. periquino* por DI-APCI-MS

Uma solução estoque (1 mg/mL) da fração metanólica foi preparada em MeOH de grau HPLC. Uma alíquota (10 µL) da solução estoque foi posteriormente transferida para frascos contendo 1 mL de MeOH. Finalmente, a solução diluída (10 ppm) foi analisada por injeção direta (DI) em um espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (LCQ Fleet), equipado com fonte APCI e operando em polaridade negativa e modo de aquisição dependente de dados (DDA) com varreduras de perda neutra (146 Da, 162 Da, 308 Da para *O*-glicosilado; 90 Da e 120 Da para *C*-glicosilado), para reconhecimento de isômeros de flavonoides glicosilados.

4.9 Fracionamento em coluna aberta (Sephadex)

Um total de 5,3 g da fração metanólica foi diluída em DMSO (50 ml) e fracionada em uma coluna aberta de 96 cm de altura e 4,2 cm de diâmetro, utilizando Sephadex LH-20 (Merck®) como fase estacionária e metanol (3 litros) como solvente orgânico (Figura 22A). Esse processo resultou em 60 novas subfrações (Figura 22B).

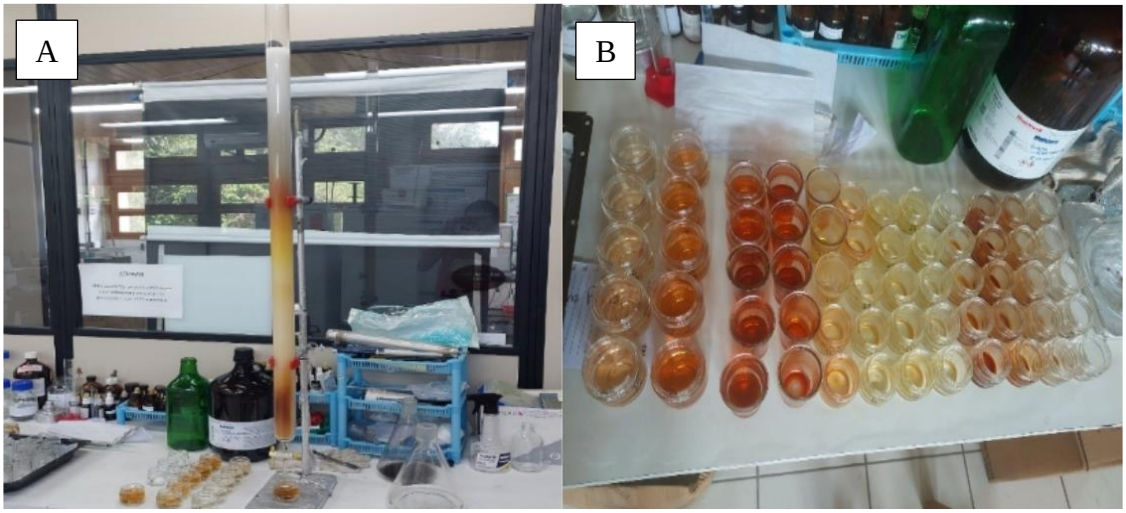


Figura 22: (A) Fracionamento em coluna aberta (Sephadex); (B) Frações obtidas após fracionamento.

Todas as amostras resultantes do fracionamento por Sephadex foram analisadas por APCI-MS, o que permitiu a agrupação das frações com base em suas similaridades químicas, resultando em 16 novas subfrações (Quadro 2).

Quadro 2: Frações reagrupadas após análises de APCI-MS

Frações	Código	Frações	Código
1 -17	FRS-1 (732 mg)	38-40	FRS-9 (321 mg)
18-19	FRS-2 (124 mg)	41	FRS-10 (115 mg)
20-27	FRS-3 (523 mg)	42	FRS-11 (167 mg)
28-29	FRS-4 (235 mg)	43-45	FRS-12 (198 mg)
30-32	FRS-5 (279 mg)	46-47	FRS-13 (226 mg)
33-34	FRS-6 (186 mg)	48-49	FRS-14 (141 mg)
35-36	FRS-7 (212 mg)	50-52	FRS-15 (231 mg)
37	FRS-8 (137 mg)	53-60	FRS-16 (524 mg)

4.10 Análises por LC-APCI-MS e LC-APCI-MS/MS

O conjunto de supostos flavonoides glicosilados identificados na fração metanólica por DI-APCI-MS/MS foi analisado por HPLC-APCI-MS/MS. A fração metanólica foi preparada em metanol de grau HPLC na concentração de 1 mg/mL e injetada (10 µL) em uma coluna Phenomenex Luna C18 (2) (5 µm, 150 mm x 4,6 mm id) (Torrance, CA, EUA) com 40% de eluição isocrática de B a uma vazão de 1 mL/min, onde A é água e B é metanol. Os parâmetros analíticos utilizados na espectrometria de massa foram os seguintes: *discharge current*: 5 µA; *vaporizer temperature*: 320 ºC; *capillary temperature*: 220 ºC; *sheath gas*: 35 psi; *auxiliary gas*: 15 arb; íons selecionados para MS/MS: *m/z* 431, 447, 461, 577, 609. Os espectros de MS/MS foram obtidos através de CID utilizando hélio como gás de colisão e energia de 20%.

As frações reagrupadas foram também analisadas por LC-APCI-MS. As análises de LC-MS das frações foram realizadas com fonte APCI operando no modo negativo e faixa de aquisição de 150-1000 *m/z*. Todas as amostras foram padronizadas a concentração de 10 ppm em metanol grau HPLC. Foram injetados 10 µL em colunas Luna C18 (5 µm, 150 x 4,60 mm) e Luna Phenyl-hexyl (5 µm, 150 x 4,6 mm), ambas da Phenomenex.

4.11 Fracionamento cromatográfico

O método cromatográfico utilizado em escala analítica foi ajustado para escala semi-preparativa, com base na avaliação do perfil cromatográfico por LC-MS das frações oriundas do fracionamento em coluna aberta Sephadex as frações FRS-3, FRS-5, FRS-8, FRS-11 e FRS-12 foram selecionadas para isolamento por HPLC.

4.11.1 Coluna C18

A fração FRS-3 foi solubilizada em DMSO grau HPLC (200 µL por injeção) e submetida a fracionamento em escala semi-preparativa em um cromatógrafo UFLC® (Shimadzu), equipado com detector UV (SPD-20A), desgaseificador (DGU-20As) e sistema binário de solventes (LC-6AD). Em cada injeção, foi utilizada uma carga máxima na coluna de 20 mg em um *looping* de 200 µL. A fração foi injetada em uma coluna Luna C18 (5 µm, 250 x 10,00 mm) da Phenomenex, com fluxo de 4,7 mL/min, sendo monitorados os comprimentos de onda de 260 e 360 nm. A fase móvel utilizada foi uma solução de MeOH/H_2O (40%) com 1% de ácido fórmico (B) em eluição isocrática (Figura 23).

Esse procedimento resultou em 5 novas frações, que foram posteriormente analisadas por espectrometria de massas. As frações F1, F2 e F4 foram então encaminhadas para análises de RMN 1D e 2D (Fluxograma 1).

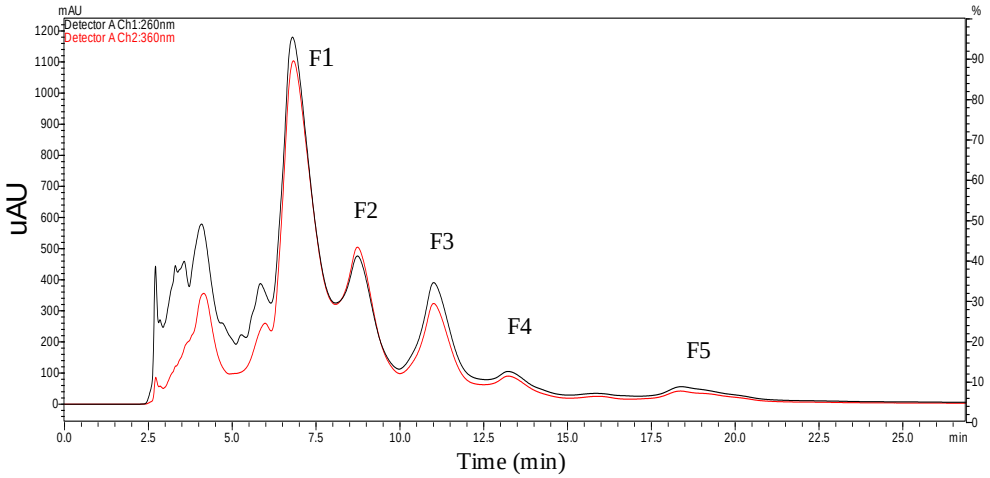
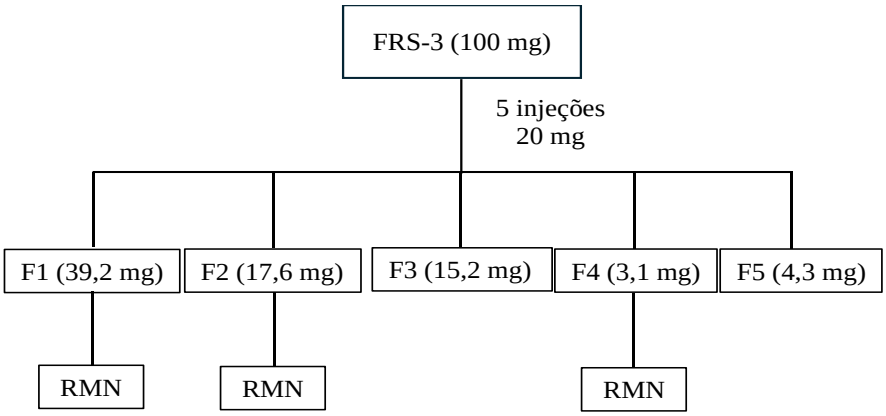


Figura 23: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para FRS-3.



Fluxograma 1: Frações resultantes do HPLC em coluna C18 da FRS-3.

A mesma metodologia descrita anteriormente foi aplicada ao fracionamento da fração FRS-5, resultando em 5 novas frações, conforme mostrado no cromatograma (Figura 24). As frações F3, F4 e F5 foram selecionadas para análises de RMN 1D e 2D (Fluxograma 2).

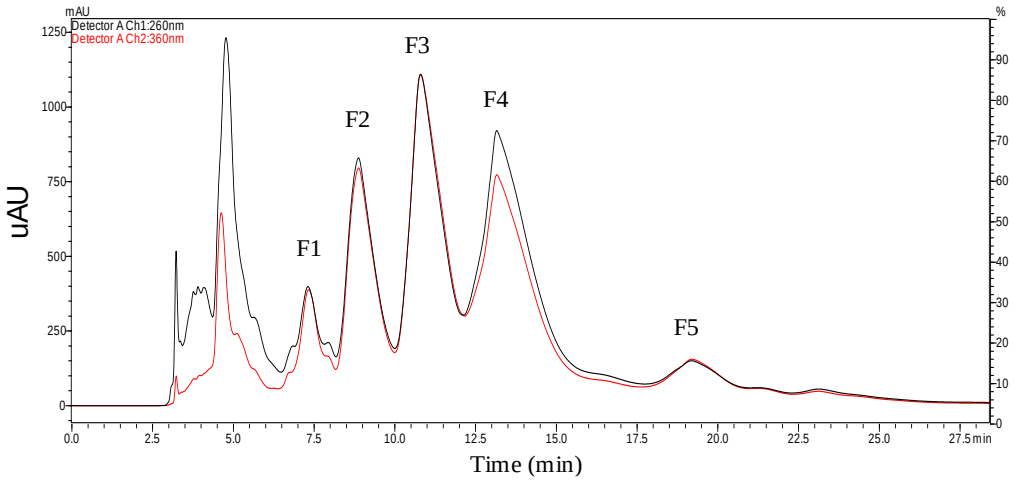
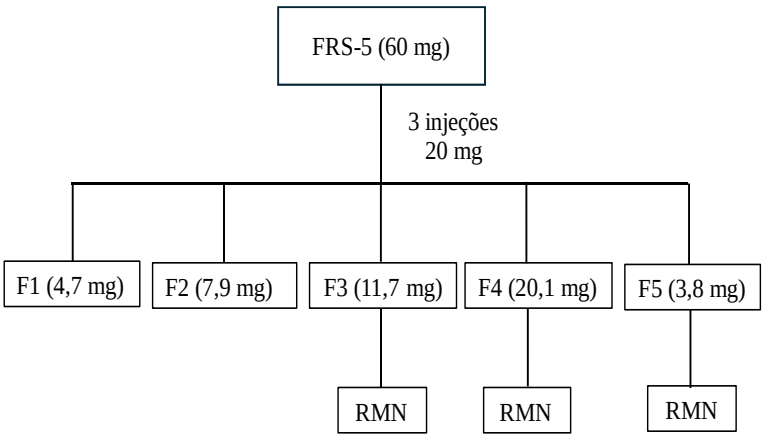


Figura 24: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a FRS-5.



Fluxograma 2: Frações resultantes do HPLC em coluna C18 da FRS-5.

Na fração FRS-8, a metodologia também foi seguida, gerando 6 novas frações (Figura 25), entretanto, neste primeiro momento, apenas as frações F3 e F4 foram encaminhadas para análises de RMN 1D e 2D (Fluxograma 3).

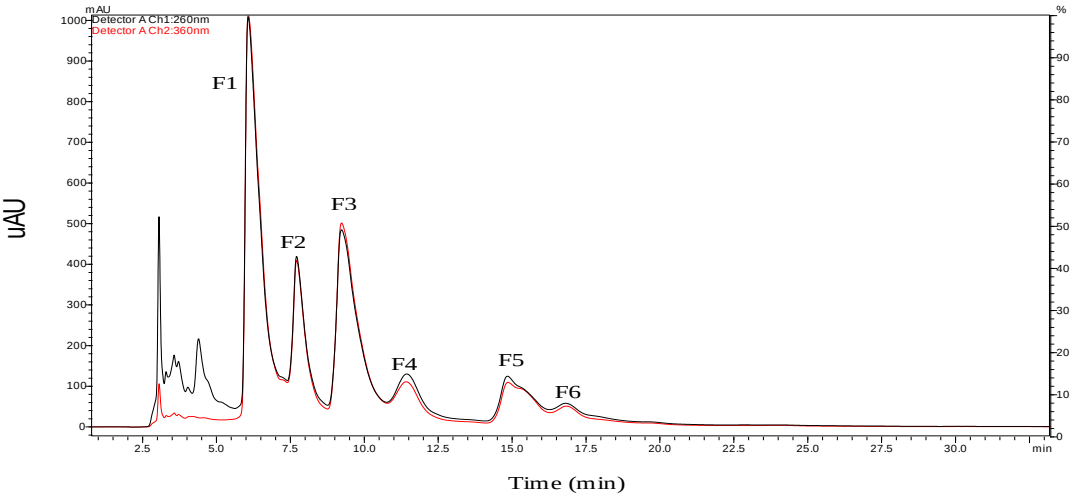
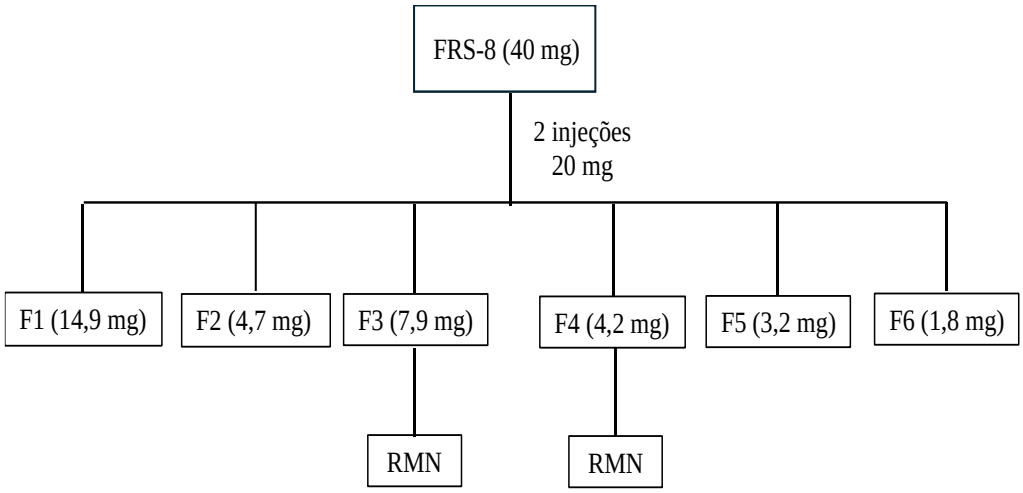


Figura 25: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a Fração FRS-8.



Fluxograma 3: Frações resultantes do HPLC em coluna C18 da FRS-8.

A fração FRS-11 foi submetida ao mesmo processo, resultando em duas novas frações, conforme observado no cromatograma (Figura 26). Destas, apenas a fração F2 foi encaminhada para análises de RMN 1D e 2D (Fluxograma 4).

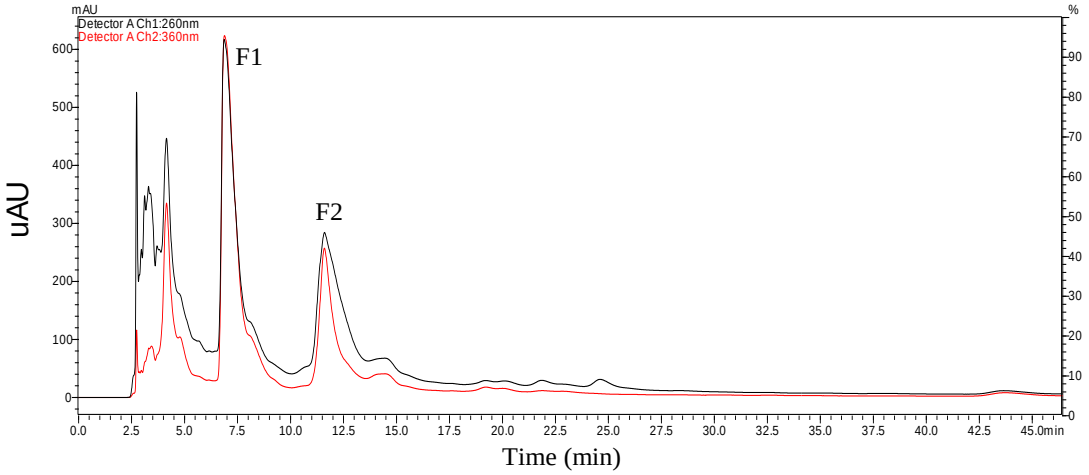
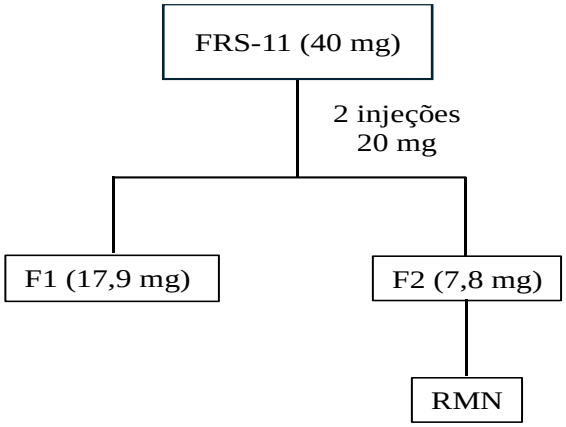


Figura 26: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a Fração FRS-11.



Fluxograma 4: Frações resultantes do HPLC em coluna C18 da FRS-11.

Por fim, a fração FRS-12 foi processada da mesma maneira, resultando em duas novas frações (Figura 27). No entanto, ao ser analisada por LC-MS/MS e RMN de ^{1}H, a fração F1 (Fluxograma 5) revelou a presença de duas substâncias coeluindo em uma proporção de 1:1.

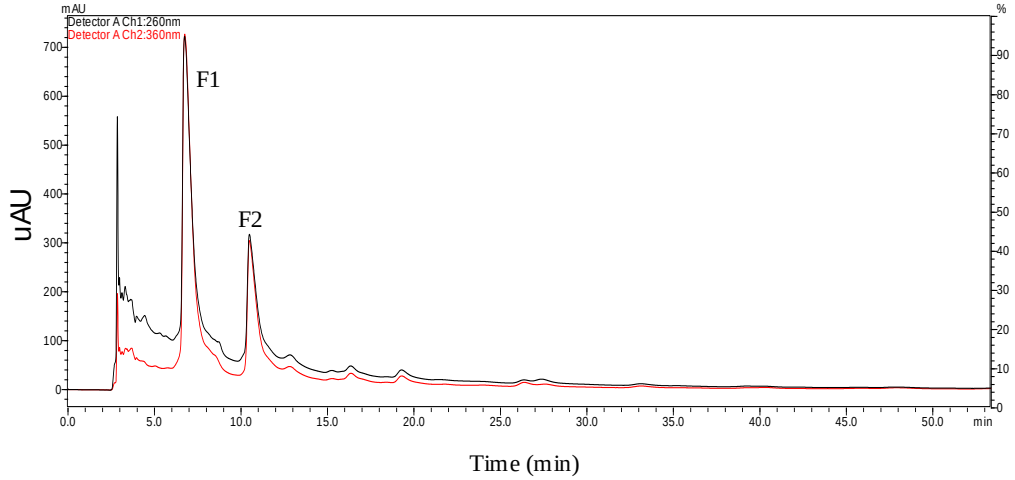
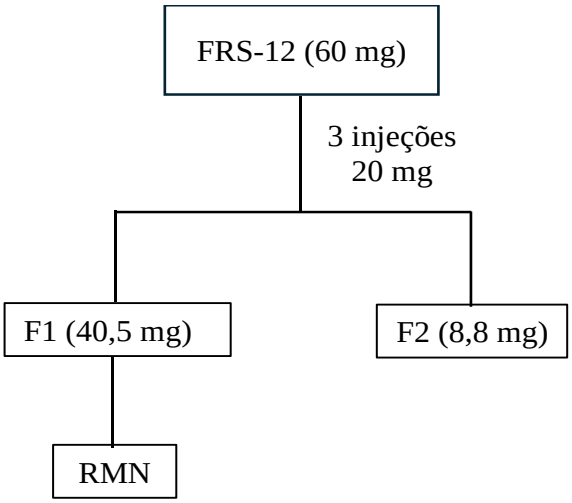


Figura 27: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a Fração FRS-12



Fluxograma 5: Frações resultantes do HPLC em coluna C18 da FRS-12.

4.11.2 Coluna Phenyl-hexyl

Para obter uma melhor separação dos picos cromatográficos da fração F1 da FRS-12, utilizou-se a mesma metodologia anteriormente descrita para a análise em escala analítica, com a diferença de que foi utilizada uma coluna Luna Phenyl-Hexyl (5 µm, 150 x 4,6 mm) da Phenomenex.

A fração FRS-12-F1 foi solubilizada em DMSO grau HPLC (200 µL por injeção) e submetida a fracionamento em escala semi-preparativa em um cromatógrafo UFLC® (Shimadzu), equipado com detector de UV (SPD-20A), desgaseificador (DGU-20A) e sistema binário de solventes (LC-6AD).

A amostra foi injetada em uma coluna Luna Phenyl-Hexyl (5 µm, 250 x 10 mm) da Phenomenex, com uma carga máxima de 20 mg em um *looping* de 200 µL, a um fluxo de 4,7 mL/min, monitorando os comprimentos de onda de 260 e 360 nm. A fase móvel utilizada foi uma solução de MeOH/H_2O (45%) contendo 1% de ácido fórmico (B) em modo de eluição isocrático. Este procedimento resultou em 2 novas frações (Figura 28), que foram posteriormente analisadas por espectrometria de massas e a F1-A foi encaminhada para análises de RMN 1D e 2D (Fluxograma 6).

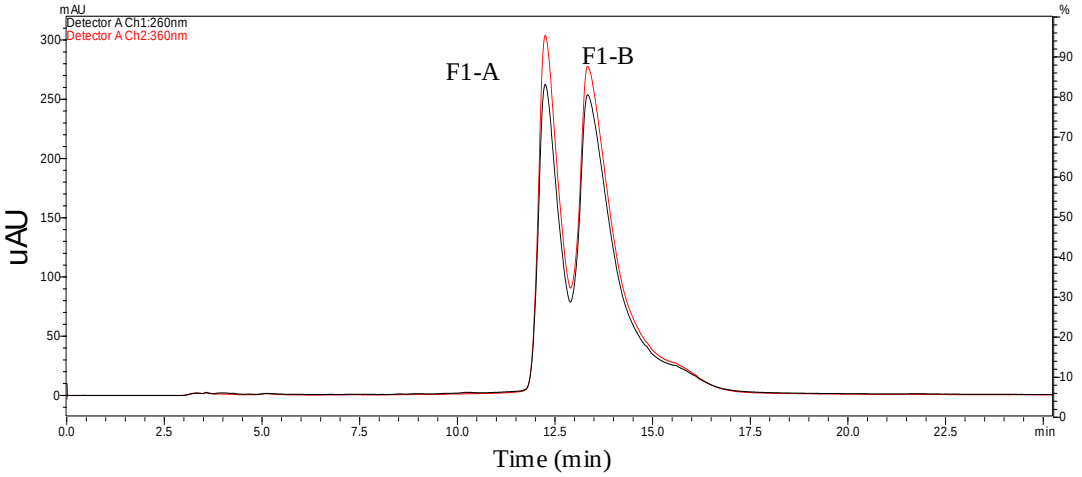
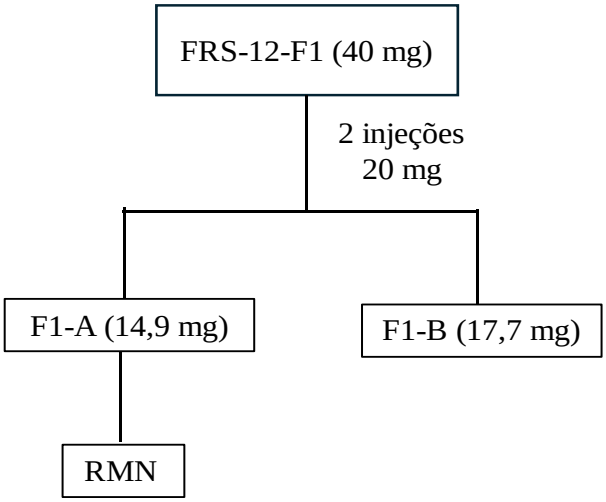


Figura 28: Cromatograma obtido por HPLC-DAD para FRS-12-F1, coluna Phenyl-Hexyl.



Fluxograma 6: Frações obtidas da FRS-12-F1 após isolamento por HPLC, coluna Phenyl-hexyl.

Resultados e discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos aquosos das folhas de *O. periquino* obtidos por infusão e decocção apresentaram perfis semelhantes no espectro de massas. Embora a diferença não tenha sido muito significativa, o extrato obtido por decocção apresentou melhor rendimento em relação ao método de infusão (Quadro 3).

Quadro 3: Rendimentos dos extratos aquosos obtidos por infusão e decocção das folhas de *O. periquino*.

Amostra	Rendimento (%)
Folhas - Infusão	9,13 %
Folhas - Decocção	9,26 %

5.1 Análise das folhas de *O. periquino* por DI-APCI-MS

A fim de investigar o perfil químico das folhas de *O. periquino,* o extrato obtido por decocção foi submetido a análise de *full scan* por injeção direta no espectrômetro de massas *íon trap*, em modo negativo e positivo, na faixa de *m/z* 150 -1000 (Figura 29). Ao analisar o espectro de massas, foram identificados vários íons na faixa elevada de massa molecular, sugerindo a presença de flavonoides glicosilados ou taninos.

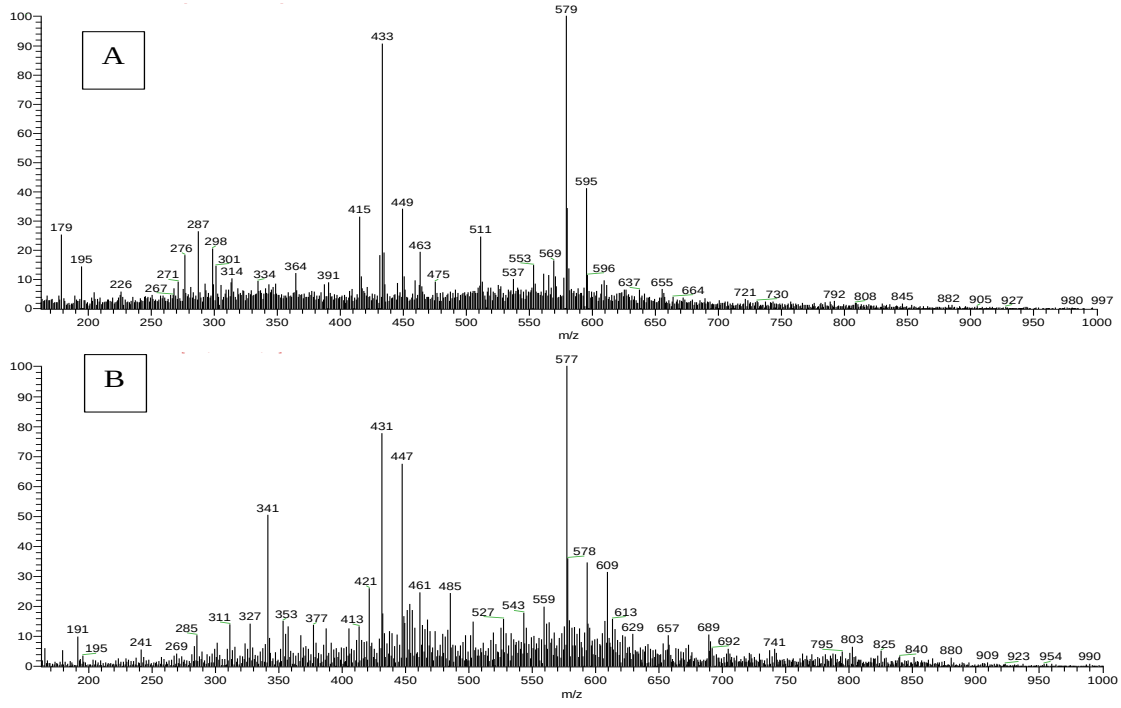


Figura 29: Espectro de APCI-MS no modo (A) positivo e (B) negativo do extrato aquoso das folhas de *O. periquino.*

O método de filtragem do extrato aquoso utilizando Celite revelou-se eficaz, pois contribuiu para uma melhora significativa da relação sinal/ruído do espectro de *full scan* (Figura 30). Isso pode ser atribuído à adsorção parcial de taninos e outros interferentes na Celite (ROSSO & MERCADANTE, 2007; COSTA *et al*., 2015b; FERNANDES *et al*., 1997).

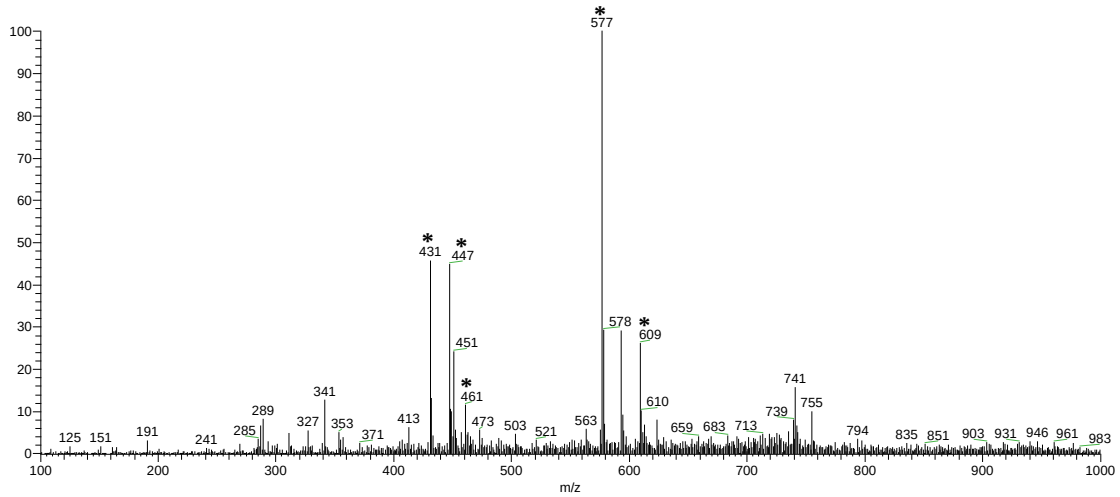


Figura 30: Espectro de APCI-MS em modo negativo da fração metanólica resultante da coluna filtrante (Celite) das folhas de *O. periquino*.

O espectro APCI-MS (Figura 30) da fração metanólica em modo negativo exibiu um pico de base em *m/z* 577, juntamente com outros íons intensos variando de *m/z* 430 a 610. O modo de aquisição dependente de dados (DDA) com varredura de perda neutra revelou os íons em *m/z* 431, 447, 461, 577 e 609 como possíveis flavonoides glicosilados devido a perdas neutras características associadas aos glicosídeos *C* e *O* (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al*., 2016). A análise manual de seus espectros MS/MS também sugeriu a presença de isômeros, pois as perdas neutras características ocorreram de maneira competitiva (Figura 31).

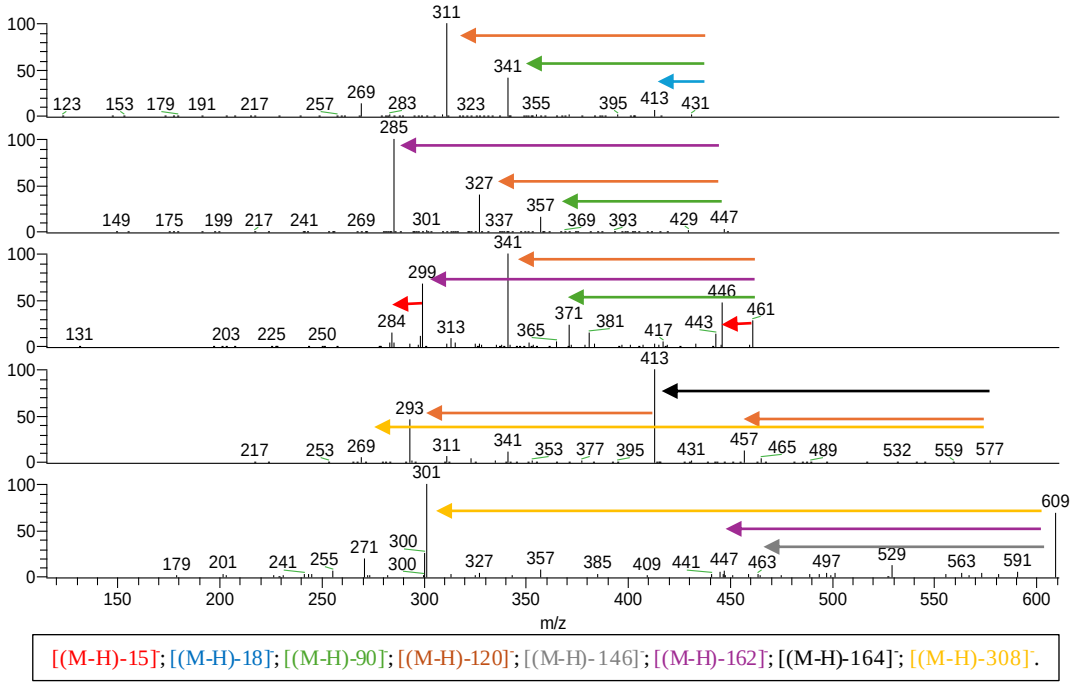


Figura 31: Espectro de fragmentação dos íons de *m/z* 431, 447, 461, 577 e 609.

As análises de perdas neutras são fundamentais para o reconhecimento e caracterização de flavonoides *C*- e *O*-glicosilados em análises MS/MS. Nos flavonoides *C*-glicosilados, as perdas características surgem da fragmentação do anel cruzado das moléculas de glicosídeos, resultando em uma série de fragmentos com valores *m/z*, como $[M-H-18]^-$, $[M-H-60]^-$, $[M-H-90]^-$ e $[M-H-120]^-$. Em contraste, os flavonoides *O*-glicosilados exibem padrões de fragmentação distintos, marcados pela liberação de toda a unidade de açúcar. Esses padrões incluem perdas típicas de glicose $[M-H-162]^-$, ramnose $[M-H-146]^-$ e xilose $[M-H-132]^-$, que são amplamente utilizadas para identificar a natureza dos açúcares ligados (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al.*, 2016). Nos casos de flavonoides mistos contendo *C*,*O*-glicosídeos, a primeira etapa de fragmentação envolve predominantemente a clivagem das ligações *O*-glicosídicas. Esse comportamento ocorre devido à maior estabilidade das ligações C–C, que permanecem intactas durante a dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *Collision Induced Dissociation*). Consequentemente, os fragmentos obtidos são gerados principalmente

pela quebra de ligações dentro da porção de açúcar (VUKICS & GUTTMAN, 2010; CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KACHLICKI *et al*., 2016).

Os espectros de MS/MS dos principais íons detectados nas folhas de *O. periquino* (Figura 31) apresentaram padrões de fragmentação compatíveis com derivados glicosilados de apigenina, quercetina e luteolina (Tabela 1).

Tabela 1: Fragmentação dos íons (*m/z*) majoritários da fração metanólica das folhas de *O. periquino* em modo negativo.

Íons $[M-H]^-$	**MS/MS[a]** APCI (-)	**Aglicona**	**Ref.**
431	341 / 311 / 269	Apigenina	Attiq *et al*., 2021; Gayathri *et al.*, 2023.
447	357 / 327 / 285	Luteolina	Attiq *et al*., 2021; Santos & Salatino, 2000.
461	446 / 371 / 341 / 299 / 284	Luteolina	Barreiros, 2000; Dall'Acqua et al., 2017.
577	457 / 413 / 293 / 269	Apigenina	Coria-Téllez *et al*., 2018; Aderogba *et al*., 2011; Kurkin *et al*., 2020.
609	301 / 300	Quercetina	Carvalho *et al.*, 2022; Rangel *et al*., 2024.

[a]principais fragmentos observados através de experimento MS/MS.

5.2 Análise das folhas de *O. periquino* por HPLC-APCI-MS/MS

Embora o uso de diferentes fontes de íons e analisadores possa resultar em variações nos padrões de fragmentação e nas intensidades relativas dos íons produtos, algumas regras gerais, como os padrões de fragmentação de derivados de flavonoides, são comuns e permitem sua identificação preliminar (KACHLICKI *et al*., 2016). Os íons em *m/z* 431, 447, 461, 577 e 609 apontados pela análise DI-APCI-MS como isômeros, sendo possíveis flavonoides glicosilados, foram analisados por HPLC-APCI-MS/MS. A análise por LC-MS/MS ampliou significativamente essa investigação, ao possibilitar a determinação preliminar do tamanho e da estrutura do glicano ligado. Essa abordagem analítica, permitiu diferenciar preliminarmente alguns isômeros presentes nas folhas de *O. periquino*.

5.2.1. Análise HPLC-APCI-MS/MS do íon de *m/z* 431

A análise HPLC-APCI-MS/MS da fração metanólica, realizada em uma coluna C18, revelou a presença de três isômeros para o íon em *m/z* 431, os quais foram identificados como dois flavonoides *C*-glicosilados e um flavonoide *O*-glicosilado, com base nas perdas neutras observadas (Figura 32). Para o composto 1, a clivagem do anel de açúcar *C*-glicosilado resultou na perda de 90 e 120 Da, gerando os íons em *m/z* 341 ($^{0,3}X_0^-$) e 311 ($^{0,2}X_0^-$), respectivamente. A maior abundância relativa do íon em *m/z* 311 em comparação com o íon em *m/z* 341 indicou que a ligação C2–C3 no anel de açúcar *C*-glicosilado é preferencialmente clivada no modo de íon negativo, em comparação com a ligação C3-C4 (KACHLICKI *et al*., 2016).

O composto 2 apresentou diferenças quando comparado ao composto 1, como a maior intensidade relativa do íon em *m/z* 341 ($^{0,3}X_0^-$). Além disso, a intensidade relativa dos íons em *m/z* 413, correspondente à perda de uma molécula de H_2O, foi significativamente maior no composto 2 do que no composto 1. O íon em *m/z* 413 $[M-H-18]^-$ é significativamente mais intenso para flavonoides 6-*C*-glicosilados do que para 8-*C*-glicosilados. Esse comportamento ocorre porque, nos flavonoides 6-*C*-glicosilados, a eliminação de água é facilitada pela formação de uma ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio do açúcar e os grupos 5 ou 7-hidroxila da aglicona, estabilizando a rotação do resíduo de açúcar e permitindo a geração de dois isômeros. Em contraste, no composto 1, essa eliminação de água ocorre exclusivamente entre o grupo 2"-hidroxila do açúcar e o grupo 7-hidroxila da aglicona, limitando a formação de isômeros (KACHLICKI *et al*., 2016; LIN *et al*., 2010). Assim, esses dados sugerem que a glicose está ligada à posição C-8 da aglicona no composto 1 e à posição C-6 no composto 2, sendo esses compostos provisoriamente identificados como as flavonas vitexina (1) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004) e isovitexina (2) (PEREIRA *et al*., 2005) (Tabela 2), respectivamente, ambas

relatadas anteriormente em espécies de Annonaceae (SANTOS & SALATINO, 2000). Por outro lado, o composto 3 teve sua ligação *O*-glicosídica confirmada pela remoção completa da unidade de açúcar durante a fragmentação, com a observação do íon *m/z* 269 (Y_0^-), resultante da perda de 162 Da, o que é consistente com a estrutura da apigenina 7-*O*-glicosídeo (3) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; MARCH *et al*., 2006), previamente relatada em espécies de Annonaceae (SANTOS & SALATINO, 2000).

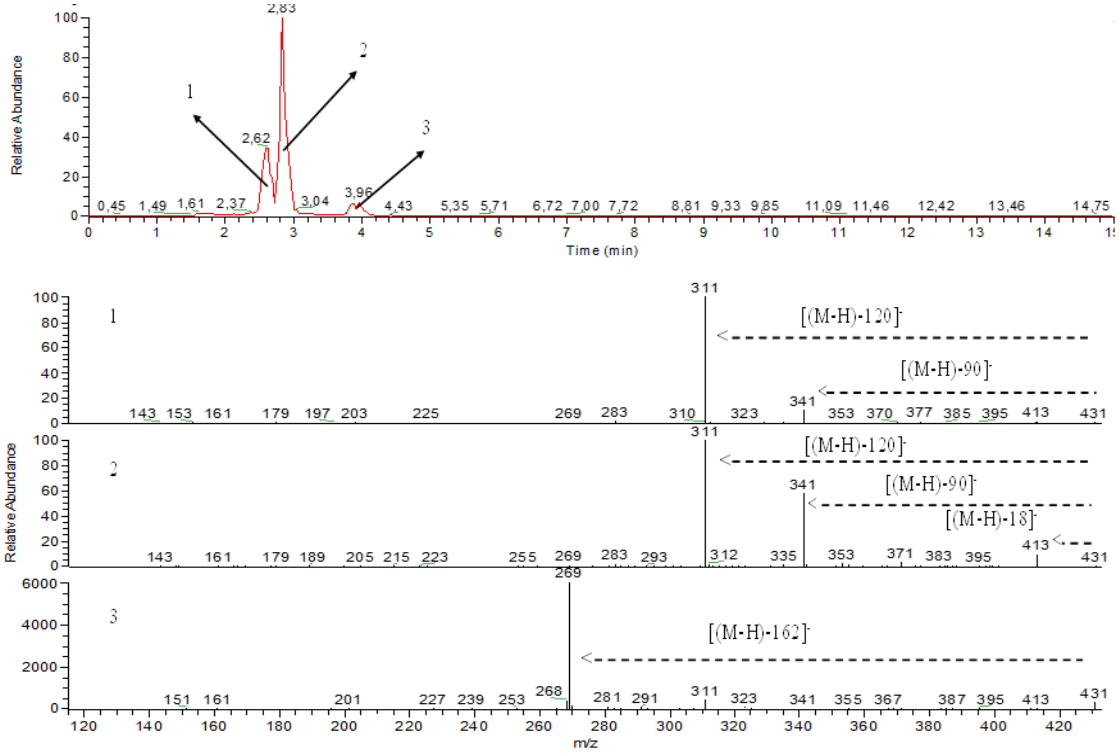


Figura 32: Cromatograma do íon com *m/z* 431 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus três isômeros: composto 1 com perdas de 90 e 120 Da; composto 2 com perdas de 18, 90 e 120 Da; composto 3 com perda de 162 Da.

5.2.2. Análise HPLC-APCI-MS/MS do íon de *m/z* 447

A análise de HPLC-APCI-MS/MS, realizada com uma coluna C18 para a fração metanólica, revelou a presença de dois possíveis isômeros para o íon em *m/z* 447, um *C*-glicosilado e um *O*-glicosilado, com base nas perdas neutras observadas (Figura 33). No entanto, devido à possibilidade de flavonoides glicosilados nos carbonos C-6 e C-8 nesta amostra, como observado para o íon em *m/z* 431, uma análise complementar foi realizada utilizando uma coluna de Phenyl-hexyl (Figura 34). Surpreendentemente, dois isômeros

C-glicosilados foram observados, ambos apresentando perdas características de resíduos de glicose, resultando nos íons em *m/z* 357 ($^{0,3}X_0^-$) e 327 ($^{0,2}X_0^-$). No entanto, a diferença na intensidade relativa da perda de uma molécula de água entre esses isômeros permitiu a diferenciação das posições de ligação do açúcar. No composto 4, a maior intensidade do íon em *m/z* 429 indica que o glicosídeo provavelmente está ligado na posição C-6. Consequentemente, no composto 5, a unidade de açúcar deve estar na posição C-8. Portanto, esses compostos foram provisoriamente identificados como luteolina 6-*C*-glicosídeo (4) (PENG *et al*., 2005) e luteolina 8-*C*-glicosídeo (5) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004) (Tabela 2) respectivamente, ambos relatados anteriormente em espécies de Annonaceae (SANTOS & SALATINO, 2000). Essa observação alerta para estudos de desreplicação baseados em uma única fase estacionária, pois mesmo isômeros posicionais com espectros MS/MS praticamente idênticos podem coeluír, levando a interpretações errôneas sobre a composição química da amostra investigada. Além disso, o terceiro isômero, composto 6, apresentou pico de base em *m/z* 285 (Y_0^-), correspondendo à aglicona luteolina, indicando a perda total da unidade de açúcar, o que é consistente com um composto *O*-glicosilado. Este padrão de fragmentação está de acordo com a luteolina 7-*O*-glicosídeo (6) (Tabela 2) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004), previamente relatada em espécies de Annonaceae (SANTOS & SALATINO, 2000).

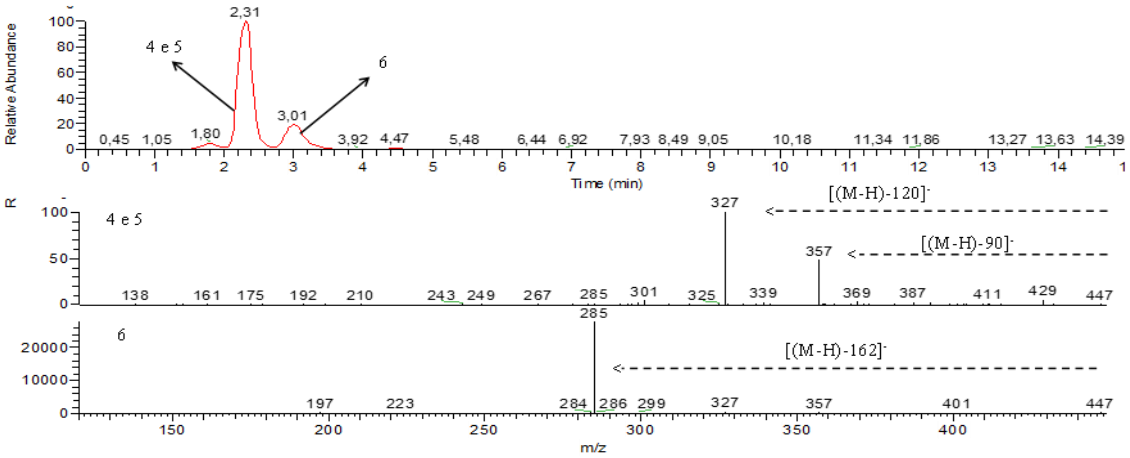


Figura 33: Cromatograma do íon com *m/z* 447 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus três isômeros: composto 4 e 5 com perdas de 90 e 120 Da; composto 6 com perda de 162 Da.

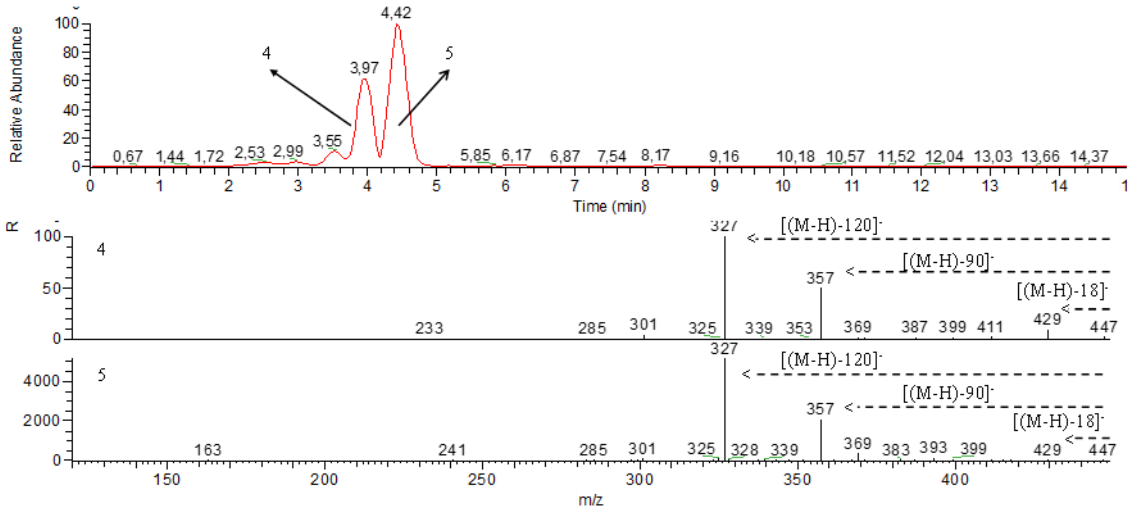


Figura 34: Cromatograma em coluna Phenyl-hexyl do íon com *m/z* 447 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus dois isômeros: composto 4 e 5 com perdas de 18, 90 e 120 Da;

5.2.3. Análise HPLC-APCI-MS/MS do íon de *m/z* 461

A análise de HPLC-APCI-MS/MS da fração metanólica, realizada em uma coluna C18, revelou a presença de três isômeros para o íon em *m/z* 461, um flavonoide *C*-glicosilado e dois flavonoides *O*-glicosilados com base em perdas neutras observadas (Figura 35). Nenhum isômero flavonoide *C*-glicosilado adicional foi detectado na análise da coluna Phenyl-hexyl. Para o composto 7, os íons do produto *m/z* 371 ($^{0,3}X_0^-$) e 341 ($^{0,2}X_0^-$) indicam a presença de um flavonoide *C*-glicosilado. Além disso, o espectro MS/MS revelou a formação de um fragmento associado à perda de uma molécula de água, sugerindo que a unidade de açúcar está ligada à aglicona na posição C-6 (KACHLICKI *et al.*, 2016). Portanto, o composto 7 foi provisoriamente identificado como isoscoparina (7) (Tabela 2) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; DENG *et al.*, 2008). Por outro lado, o composto 8 exibiu íons produto em *m/z* 446 e 299 (Y_0^-), compatíveis com perdas competitivas de um grupo metil (-CH_3) e uma molécula de glicose (-$C_6H_{12}O_6$), respectivamente. O fragmento em *m/z* 299 revelou que um dos grupos hidroxila no esqueleto da luteolina foi substituído por um grupo metoxila no anel B. Além disso, a perda de 162 Da confirmou a presença de uma molécula de glicose ligada a um dos grupos hidroxila no anel A da aglicona. Com base nessa análise, sugeriu-se que o composto 8 é

um flavonoide *O*-glicosilado, no qual a glicose está ligada ao grupo 7-hidroxila (CUYCKENS & CLAEYS, 2004), propondo, portanto, a estrutura do crisoeriol-7-*O*-glicosídeo (8) (Tabela 2) (SHRESTHA *et al*., 2012). Além disso, o composto 9 apresentou a perda completa da unidade de açúcar, caracterizando-o como outro flavonoide *O*-glicosilado. Um aspecto relevante no espectro MS/MS foi a baixa intensidade relativa do íon em *m/z* 446, associada à perda de um grupo metil. Esses dados sugerem que o grupo metil está ligado ao anel B, possivelmente na posição C-4'. Assim, o composto 9 foi provisoriamente identificado como diosmetina 7-*O*-glicosídeo (9) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; ZHAO *et al*., 2014; WANG *et al*., 2013).

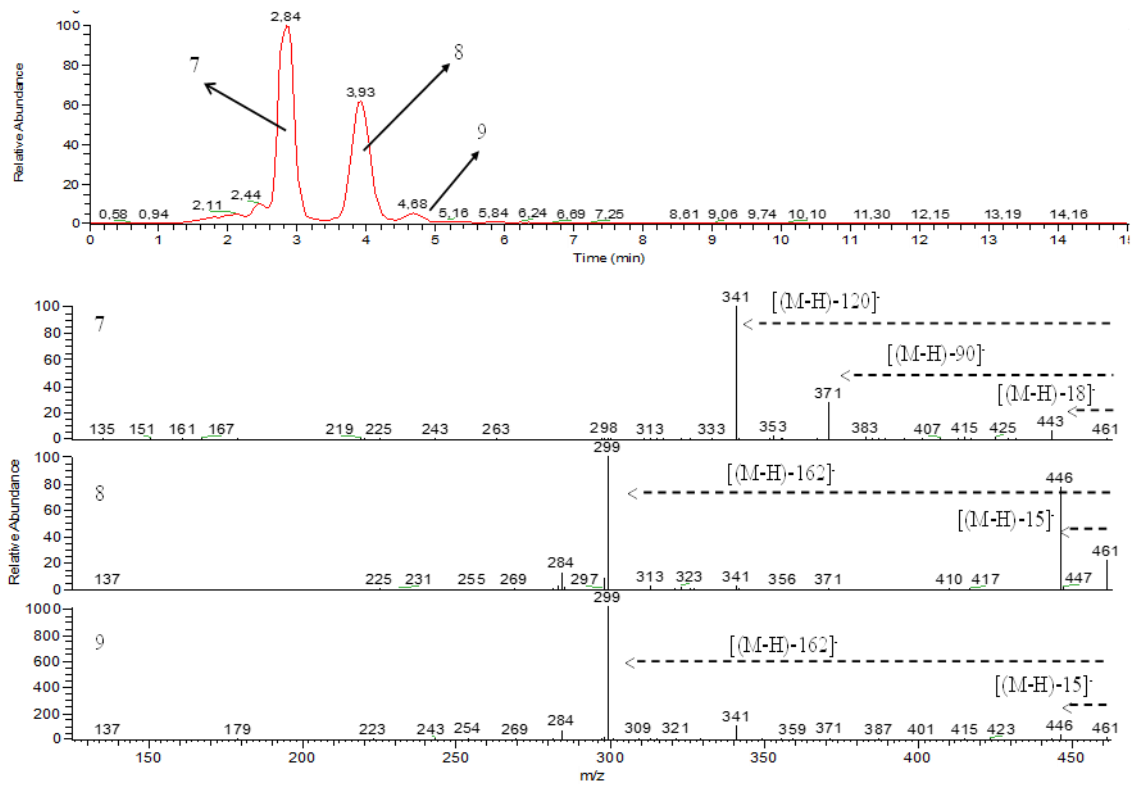


Figura 35: Cromatograma do íon com *m/z* 461 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus três isômeros: composto 7 com perdas de 18, 90 e 120 Da; Composto 8 e 9 com perdas de 15 e 162 Da.

5.2.4. Análise HPLC-APCI-MS/MS do íon de *m/z* 577

A análise HPLC-APCI-MS/MS da fração metanólica, realizada em uma coluna C18, revelou a presença de três possíveis isômeros para o íon em *m/z* 577, dois *C*-glicosilados e um *O*-glicosilado, com base nas perdas neutras observadas (Figura 36). Os

compostos 10 e 11 exibiram perdas importantes semelhantes: a clivagem inicial da ligação *O*-glicosídica, seguida pela fragmentação do anel de açúcar diretamente conectado à aglicona, resultando em íons de produto em *m/z* 413 (Y_0^-) e 293 ($^{0,2}X_0^-$), respectivamente. A partir das perdas sequenciais de 164 e 120 Da, concluiu-se que esses compostos são *C,O*-glicosídeos. De acordo com a literatura, a ligação de dissacarídeos na posição C-6 pode levar à formação de rotâmeros (CAMARGO *et al*., 2012), o que aumenta a intensidade relativa do íon em *m/z* 457, associado à perda de 120 Da ($^{0,2}X_0^-$). Com base nesse comportamento, propõe-se que no composto 10, o dissacarídeo esteja ligado na posição C-8, enquanto no composto 11, ele esteja ligado na posição C-6, correspondendo às estruturas da apigenina 8-*C*-neohesperidosídeo (10) (ADEROGBA *et al*., 2011) e apigenina 6-*C*-neohesperidosídeo (11) (CAMARGO *et al*., 2012) (Tabela 2), respectivamente.

Por outro lado, o padrão de fragmentação observado para o composto 12 diferiu significativamente de seus isômeros, sugerindo que é um flavonoide *O*-dissacarídeo. A identificação foi reforçada pela observação do íon produto $[M-308-H]^-$ (Y_0^-), indicando a presença de um ramnosil glicosídeo (1→6). A literatura destaca que o modo negativo permite a diferenciação entre as ligações glicosídicas 1→2 (neohesperidose) e 1→6 (rutinose) em flavonoides *O*-dissacarídeos. Essa diferenciação é evidenciada pelos íons $[M-164-H]^-$ (Z_1^-) e $[M-308-H]^-$ (Y_0^-) observados em *O*-neohesperidosídeos, enquanto apenas o íon $[M-308-H]^-$ (Y_0^-) é característico dos derivados de rutinose (KACHLICKI *et al*., 2016). Assim, o composto 12 foi provisoriamente identificado como apigenina 7-*O*-rutinosídeo (12) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; KURKIN *et al*., 2020; WANG *et al*., 2003).

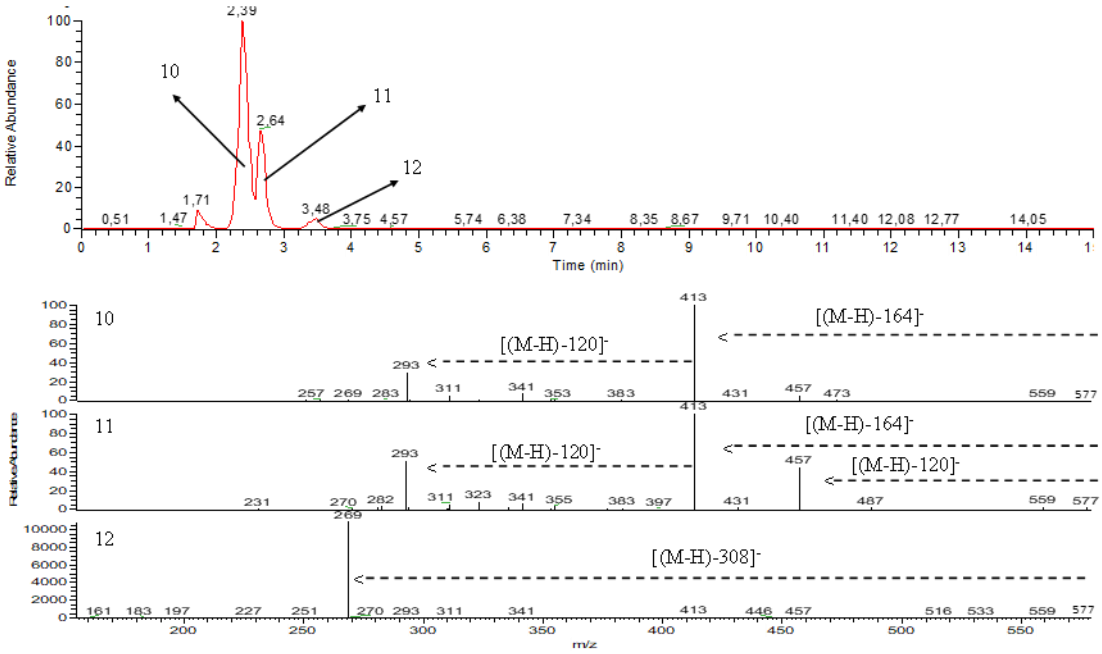


Figura 36: Cromatograma do íon com *m/z* 577 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus três isômeros: composto 10 e 11 com perdas de 120 e 164 Da; Composto 12 com perda de 308 Da.

5.2.5. Análise HPLC-APCI-MS/MS do íon de *m/z* 609

A análise HPLC-APCI-MS/MS da fração metanólica, realizada em uma coluna C18, revelou a presença de dois possíveis isômeros para o íon em *m/z* 609, um *O*-glicosilado e um *O,O*-glicosilado com base nas perdas neutras observadas (Figura 37). O composto 14 exibiu, no espectro MS/MS, um pico de base em *m/z* 301 $[M\text{-}H\text{-}308]^-$ (Y_0^-), característico da perda do dissacarídeo rutinose (KACHLICKI *et al*., 2016). Esse padrão de fragmentação é semelhante ao observado no composto 12, no entanto, no caso do composto 14, a aglicona foi identificada como quercetina. Por outro lado, o composto 13 também exibiu o mesmo pico de base em *m/z* 301, confirmando a presença da mesma aglicona. No entanto, fragmentos adicionais em *m/z* 447 (Y_0^-) e 463 (Y_0^-), associados às perdas de 162 e 146 Da, respectivamente, indicaram a liberação competitiva dos açúcares glicose e ramnose. Esses resultados sugerem que os açúcares podem estar ligados às posições 3-hidroxila e 7-hidroxila da aglicona (CUYCKENS & CLAEYS, 2004). Portanto, os isômeros do íon em *m/z* 609 foram provisoriamente identificados como quercetina 3-*O*-glicosídeo-7-*O*-ramnosídeo (13) (WAHYUNI *et al*., 2011; LIN *et al*.,

2014) e quercetina 3-O-rutinosídeo (14) (Tabela 2) (RAMOS, *et al*., 2022), ambos relatados anteriormente em espécies de Annonaceae (SANTOS & SALATINO, 2000).

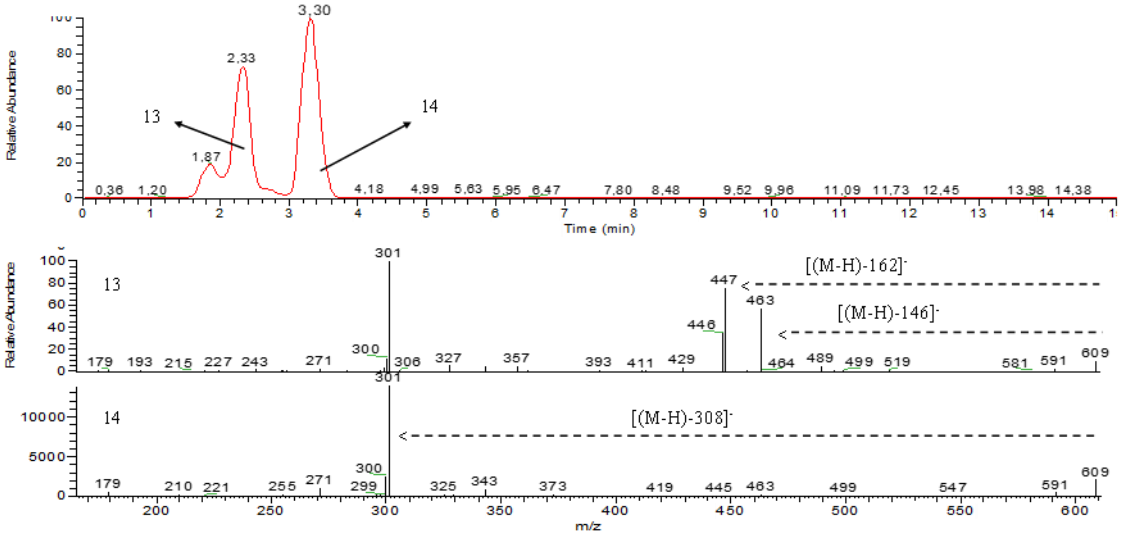
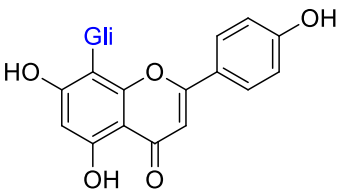


Figura 37: Cromatograma do íon com *m/z* 609 (fração metanólica) e os espectros de APCI-MS^2 dos seus três isômeros: composto 13 com perdas de 146 e 162 Da; Composto 14 com perda de 308 Da.

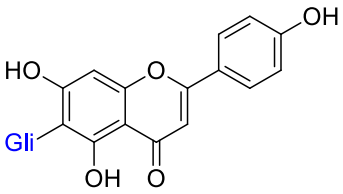
Tabela 2: Dados de HPLC-APCI-MS/MS dos flavonoides glicosilados presentes nas folhas de *O. periquino*.

Composto	Tempo de retenção (min)		$[M–H]^-$	MS/MS[a]	Tipo de glicosilação	Composto	Ref.
	Coluna C18	Coluna Phenyl-Hexyl					
1	2,62	-	431	341 / 311	*C*-glicosilado	Vitexina	Cuyckens & Claeys, 2004.
2	2,83	-	431	341 / 311	*C*-glicosilado	Isovitexina	Pereira *et al*., 2005.
3	3,96	-	431	269	*O*-glicosilado	Apigenina 7-*O*-glicosídeo	Cuyckens & Claeys, 2004; March *et al*., 2006.
-	2,28	-	447	357 / 327	*C*-glicosilado	-	-
4	-	3,97	447	429/357/327	*C*-glicosilado	Luteolina 6-*C*-glicosídeo	Peng *et al*., 2005.
5	-	4,42	447	429/357/327	*C*-glicosilado	Luteolina 8-*C*-glicosídeo	Cuyckens & Claeys, 2004; March *et al*., 2006.
6	2,97	-	447	285	*O*-glicosilado	Luteolina 7-*O*-glicosídeo	March *et al*., 2006; Lin *et al*., 2015.
7	2,84	-	461	371 / 341	*C*-glicosilado	Isoscoparin	Deng *et al*., 2008.
8	3,93	-	461	446 / 299	*O*-glicosilado	Crisoeriol 7-*O*-glicosídeo	Shrestha *et al*., 2012.
9	4,68	-	461	299	*O*-glicosilado	Diosmetina *O*-glicosilada	Zhao *et al*., 2014; Wang *et al*., 2013.
10	2,39	-	577	457 / 413 / 293	*C*,*O*-glicosilado	Apigenina 8-*C*-neohesperidosídeo	Aderogba *et al*., 2011.
11	2,64	-	577	457 / 413 / 293	*C*,*O*-glicosilado	Apigenina 6-*C*-neohesperidosídeo	Camargo *et al*., 2012.
12	3,48	-	577	269	*O*-glicosilado	Apigenina 7-*O*-rutinosídeo	Kurkin *et al*., 2020; Wang *et al*., 2003.
13	2,33	-	609	463 / 447 / 301	*C*,*O*-glicosilado	Quercetina 3-*O*-glucopiranosídeo-7-*O*-ramnopiranosídeo	Wahyuni *et al*., 2011; Lin *et al*., 2014.
14	3,30	-	609	301 / 300	*O*-glicosilado	Quercetina 3-*O*-rutinosídeo	Ramos, *et al*., 2022.

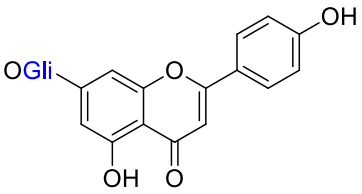
[a]principais fragmentos observados através de experimento MS/MS (Fração metanólica).



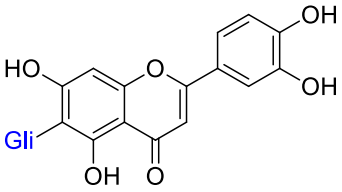
Vitexina (**1**)



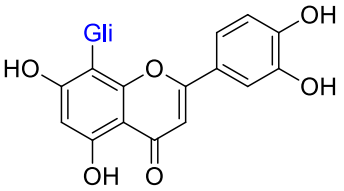
Isovitexina (**2**)



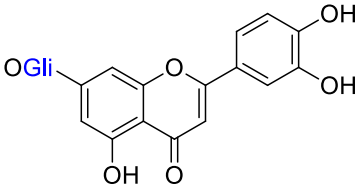
Apigenina 7-*O*-glicosideo (**3**)



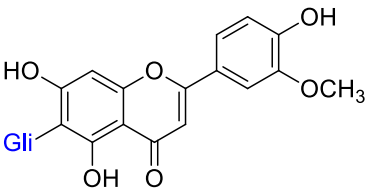
Luteolina 6-*C*-glicosideo (**4**)



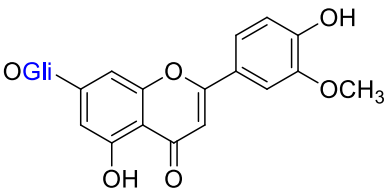
Luteolina 8-*C*-glicosideo (**5**)



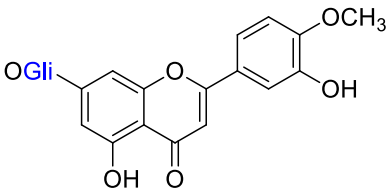
Luteolina 7-*O*-glicosideo(**6**)



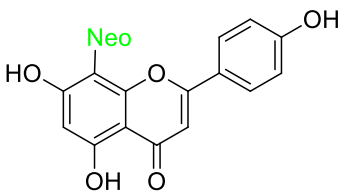
Isoscoparina (**7**)



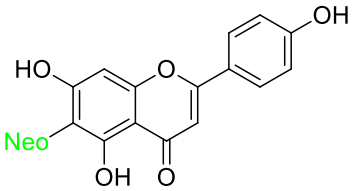
Crisoeriol 7-*O*-glicosideo (**8**)



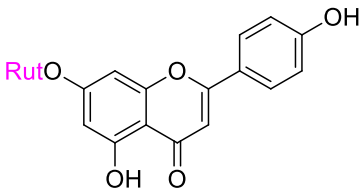
Diosmetina 7-*O*-glicosideo (**9**)



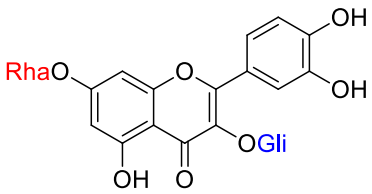
Apigenina 8-*C*-neohesperidosídeo (**10**)



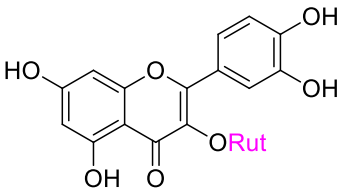
Apigenina 6-*C*-neohesperidosídeo(**11**)



Apigenina 7-*O*-rutinosídeo(**12**)



Quercetina 3-*O*-glicosideo-7-*O*-ramnopiranosídeo (**13**)



Quercetina 3-*O*-rutinosídeo (14)

Gli - glicose Neo - neohesperidose Rut - rutinose Rha - rhamnose

5.3 Elucidação estrutural dos flavonoides isolados das folhas de *O. periquino*

5.3.1 Elucidação estrutural da substância FRS-3-F1

A substância codificada como FRS-3-F1 (39,2 mg) apresentou-se como um sólido laranja-amarelo. No espectro de massas observou-se um pico base de *m/z* 577 ($[M-H]^-$) (Figura 38).

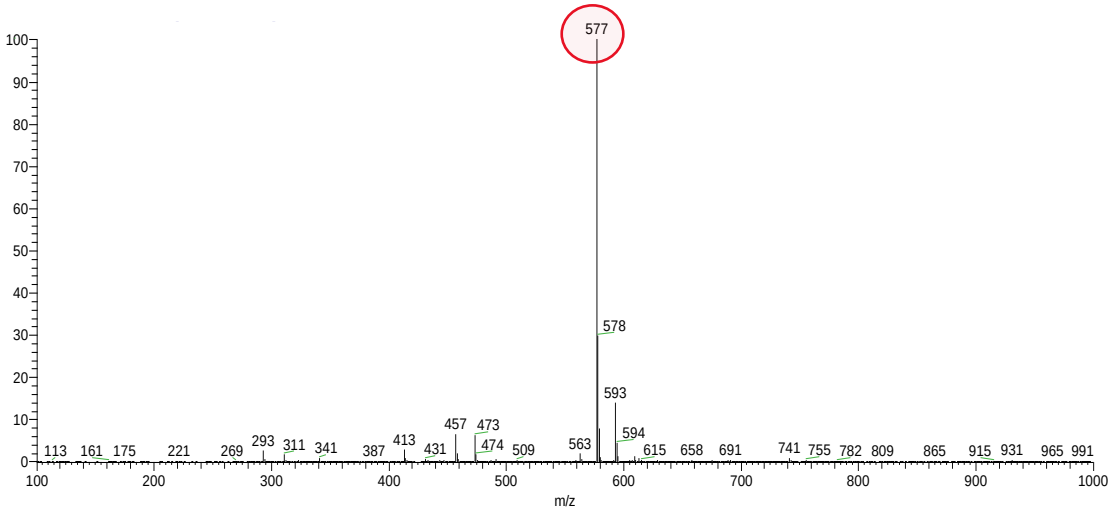


Figura 38: Espectro de massas para FRS-3-F1, valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS.

Os dados de MS/MS (Figura 39) mostraram um sinal de fragmento iônico em *m/z* 457 $[(M-H)-120]^-$, com baixa intensidade relativa, e outro sinal em *m/z* 413 $[(M-H)-164]^-$ (Z_1^-), com alta intensidade relativa (pico base), resultante da perda de uma unidade de ramnose pela clivagem da ligação interglicosídica (BENAYAD *et al.*, 2014; KACHLICKI *et al.*, 2016). Além disso, foi identificado um sinal de íon fragmento em *m/z* 293 $[(M-H)-120]^-$ ($^{0,2}X_0^-$), indicando a perda do resíduo de glicose. O fragmento da aglicona apigenina foi observado em *m/z* 269. Esses dados sugerem tratar-se, possivelmente, de um flavonoide dissacarídeo contendo uma ramnose e uma glicose (neohesperidose).

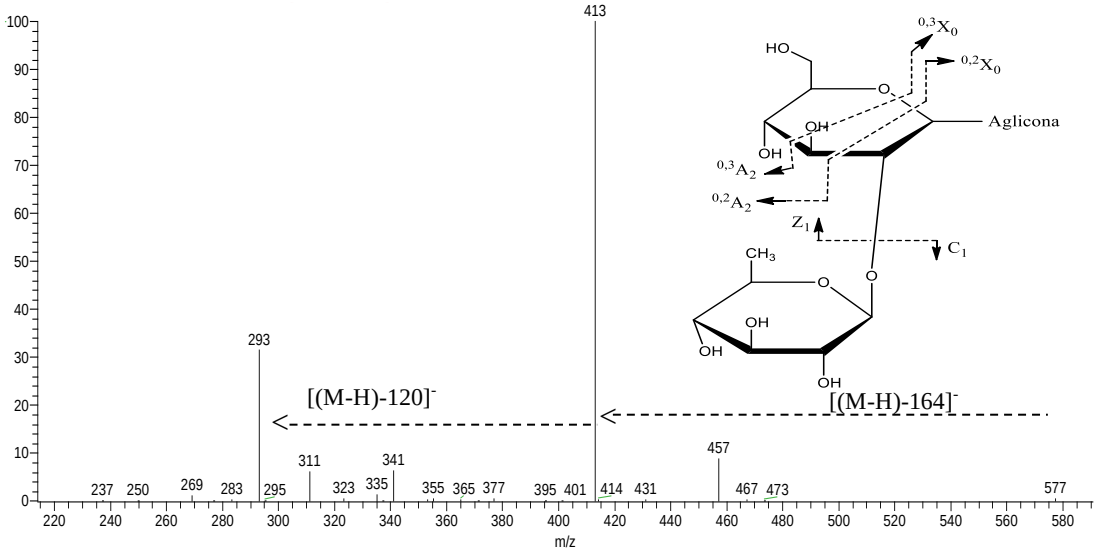


Figura 39: Espectro de MS/MS para FRS-3-F1.

A massa molecular e o padrão de fragmentação da substância isolada indicaram tratar-se de uma glicosilflavona com núcleo de apigenina. Na literatura, os íons fragmentos em *m/z* 413, 457 e 293 $[M-H]^-$ são característicos de derivados de apigenina *C,O*-ramnosídeo, nos quais um dos açúcares está ligado à aglicona por uma ligação *C*-*C*. As posições C-6 e C-8 do anel A são apontadas como as mais prováveis para a *C*-glicosilação (Figura 40) (KARAR & KUHNERT, 2015; FENG *et al*., 2017).

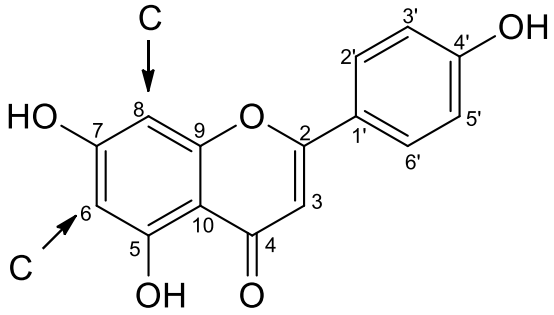


Figura 40: Estrutura básica da apigenina onde as posições C-6 e C-8 do anel A são as mais prováveis para *C*-glicosilação (FENG *et al*., 2017).

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 41), foram observados quatro sinais na região aromática: dois simpletos em δ 6,27 (1H) e 6,79 (1H), possivelmente correspondentes ao hidrogênio no anel A (C-6 ou C-8) e ao hidrogênio olefínico no anel C. Os outros dois sinais, em δ 6,92 (d, *J = 8,8* Hz, 2H) e δ 8,05 (d, *J = 8,8* Hz, 2H), foram atribuídos ao anel B, caracterizando um sistema aromático para-substituído do tipo A_2B_2, com

acoplamento *orto* entre esses hidrogênios, como indicado pela constante de acoplamento. Além disso, na região de carboidratos foi observado um simpleto em δ 4,99 (1H), característico de hidrogênios anoméricos *α*-glicosídeos, e um dupleto em δ 4,78 (*J = 10,3* Hz, 1H), típico de hidrogênios anoméricos *β*-glicosilados.

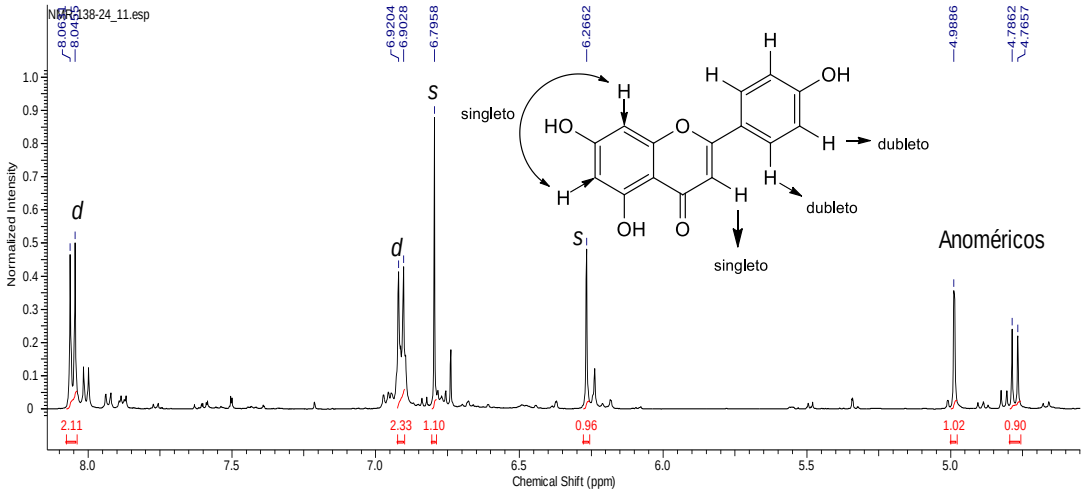


Figura 41: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d$_6$) da FRS-3-F1.

No espectro de RMN de ^{1}H, também foi observado um dupleto em δ 0,48 (3H), indicando a presença de uma ramnose como um dos açúcares (Figura 42). No experimento de HSQC, verificou-se que esses hidrogênios estão acoplados ao carbono em δ 18,2 (Figura 42A), enquanto no experimento de HMBC, observou-se a correlação desses hidrogênios com os carbonos em δ 68,8 e 71,6 (Figura 42B).

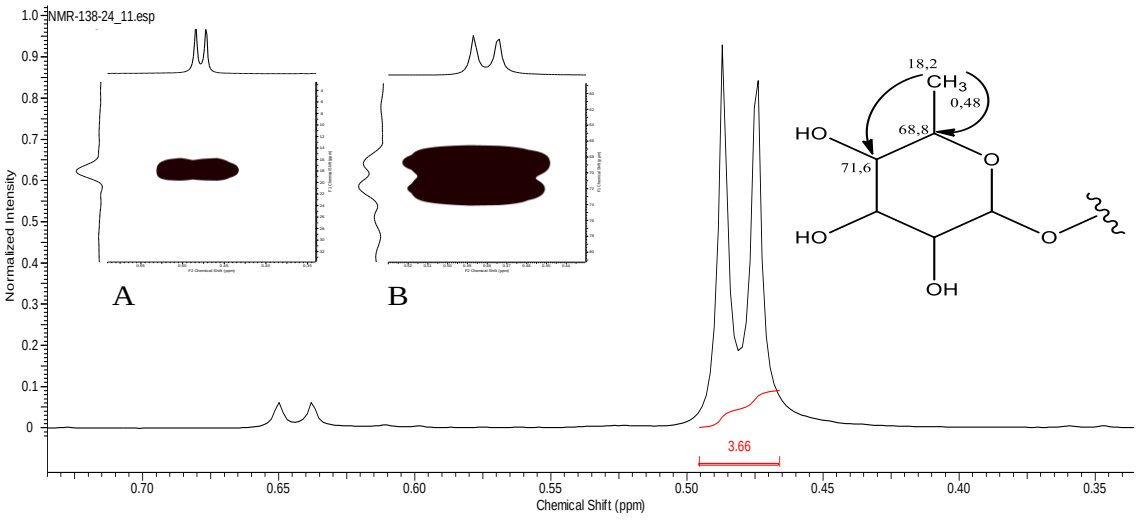


Figura 42: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d$_6$) para o hidrogênio em δ 0,48 e seu acoplamento com o carbono em δ 18,2 (A) e suas correlações com os carbonos em δ 68,8 e 71,6 (B).

Por meio do espectro de HSQC, foi possível confirmar a natureza dos hidrogênios da região aromática. Para os hidrogênios do anel A é visto o acoplamento dos hidrogênios em δ 6,27 (H-6) e 6,79 (H-3) de modo respectivo com os carbonos em δ 99,2 e 102,7. Os hidrogênios do anel B, correspondentes aos dupletos em δ 6,92 (H-3'/5') e 8,05 (H-2'/6'), acoplam-se com os carbonos em δ 116,2 e 129,4, respectivamente. A equivalência dos hidrogênios neste caso é decorrente da livre rotação deste anel. Também foi possível confirmar a natureza dos hidrogênios anoméricos, observou-se que os hidrogênios em δ 4,78 (H-1") e 4,99 (H-1'") acoplam-se com os carbonos em δ 72,3 e 100,7, respectivamente (Figura 43).

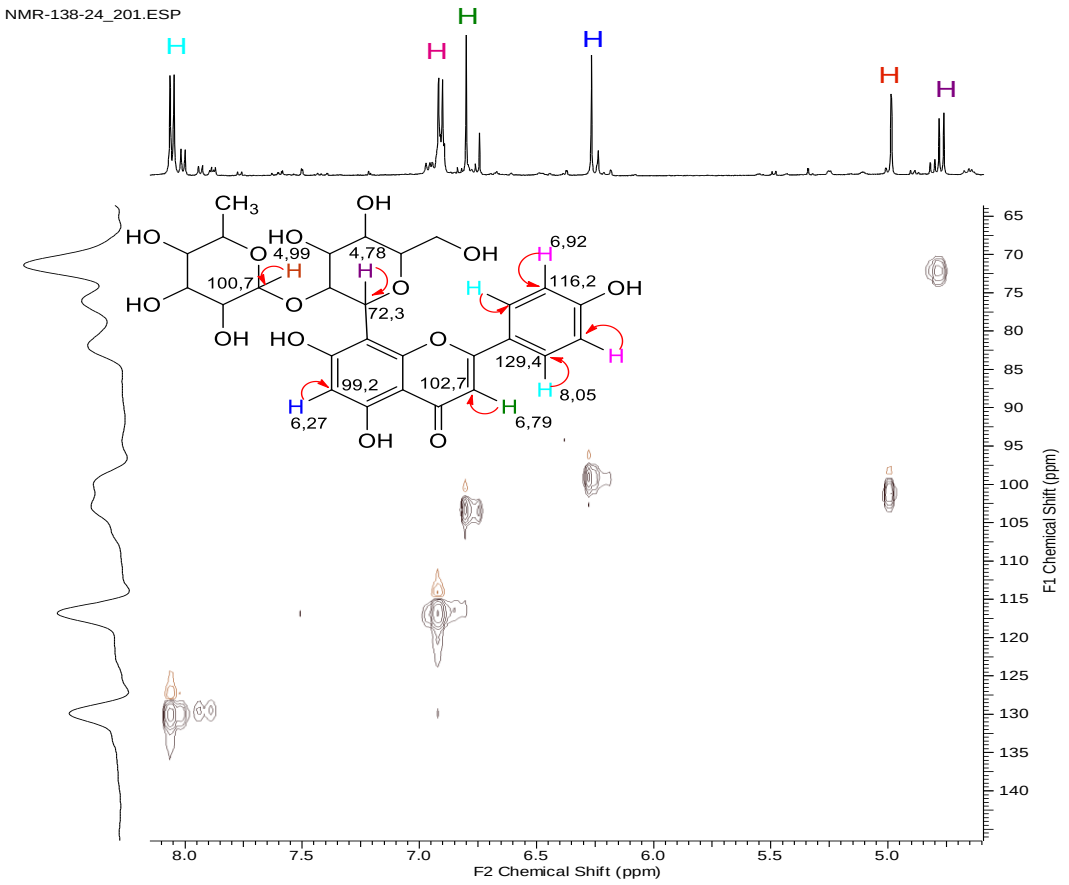


Figura 43: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC para os hidrogênios em δ 4,78, 4,99, 6,27, 6,79, 6,92 e 8,05.

No experimento de HMBC (Figura 44), observou-se a correlação do hidrogênio anomérico em δ 4,78 com os carbonos em δ 75,5, 80,5, 104,2, 156,4 e 163,4. Como foi observado no espectro de RMN de ^{1}H, a grande constante de acoplamento de H-1" (*J* =

10,3 Hz) entre H-1" e H-2" confirma que este hidrogênio possui configuração *β*. Já o outro hidrogênio anomérico em δ 4,99 correlaciona-se com os carbonos em δ 68,8, 71,3 e 75,5, sem apresentar correlações com os carbonos da aglicona. Além disso, a baixa constante de acoplamento observada no espectro de RMN de ^{1}H para este hidrogênio confirma a sua configuração *α*.

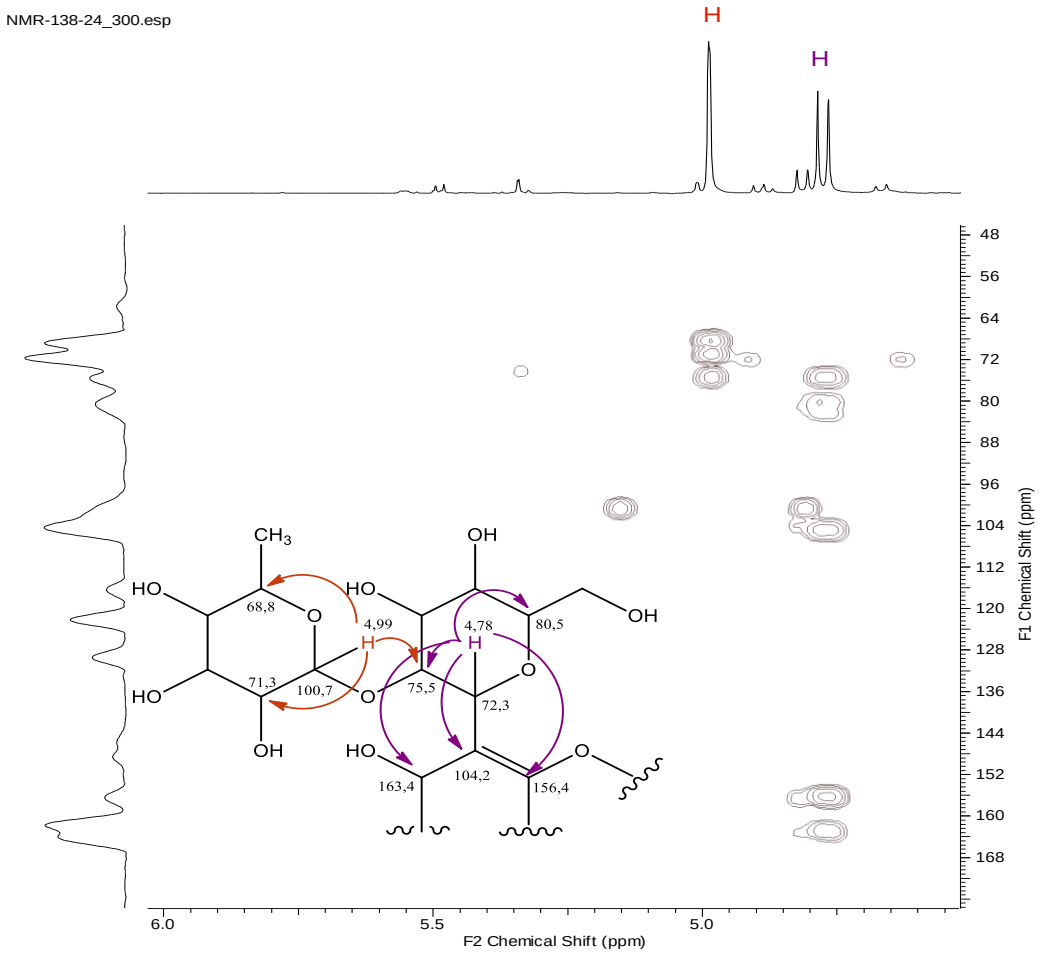


Figura 44: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 4,78 e 4,99.

As correlações heteronucleares observadas pelo HMBC foram cruciais para a atribuição das unidades de açúcar, indicando um glicopiranosídeo ligado ao C-8 e um ramnosídeo ligado ao C-2". Além disso, o HMBC revelou a correlação do hidrogênio em δ 6,27 com os carbonos em δ 104,3 e 161,6, enquanto o hidrogênio em δ 6,79 mostrou correlação com os carbonos em δ 104,3, 122,1, 164,3 e 182,4. Assim, o primeiro sinal foi atribuído ao carbono C-6 do anel A, e o segundo ao hidrogênio olefínico do anel C. Essas

correlações estão em concordância com a proposta estrutural sugerida pela análise de fragmentação, confirmando a estrutura dos anéis A e C (Figura 45). Portanto, tratava-se de um derivado da apigenina contendo um *α,β*-dissacarídeo ligado ao anel A na posição C-8.

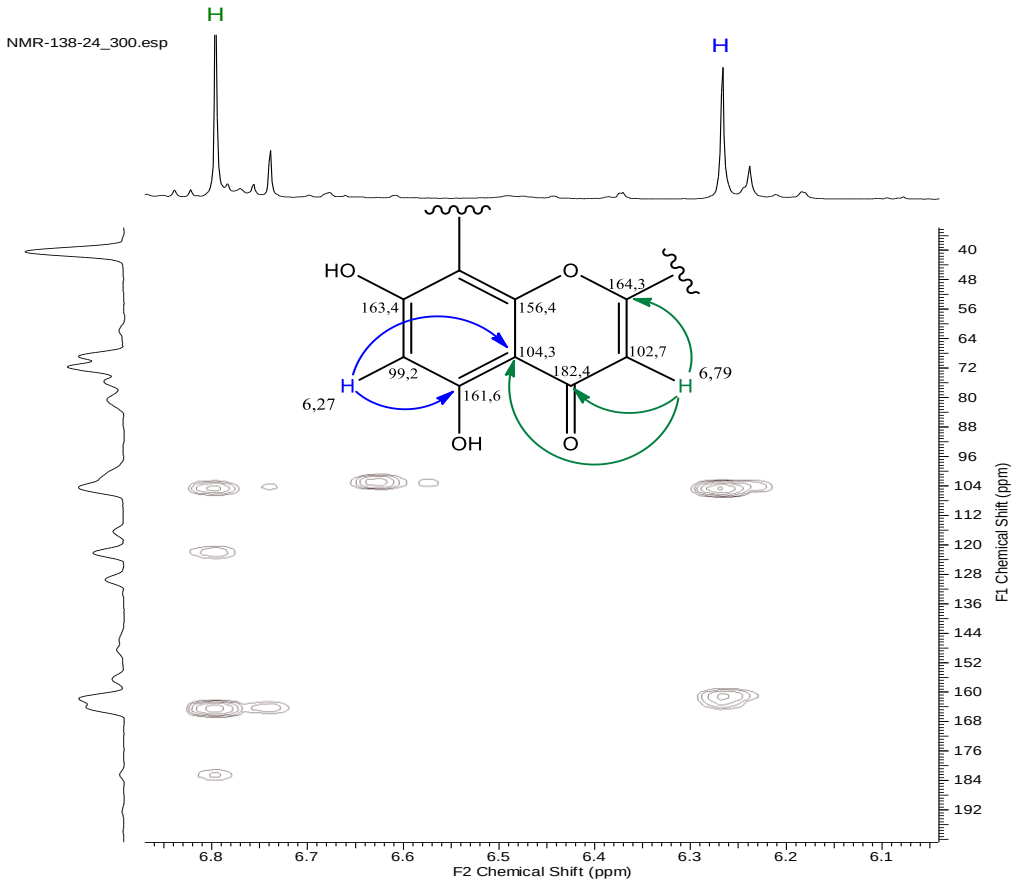


Figura 45: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 6,27 e 6,79.

Ao analisar o mapa de correlação HMBC (Figura 46), ainda na região dos sinais aromáticos, observou-se que os hidrogênios em δ 6,92 (d, *J = 8,8* Hz, 2H) correlacionam-se com os carbonos em δ 116,2, 122,1 e 161,8, enquanto os hidrogênios em δ 8,05 (d, *J = 8,8* Hz, 2H) apresentam correlação com os carbonos em δ 116,2, 129,4 e 161,8. O dupleto em δ 6,92, correspondente a H-3' e H-5', aparece mais protegido em comparação ao dupleto em δ 8,05, referente a H-2' e H-6', devido ao efeito de proteção do substituinte em C-4'. A análise do espectro de COSY confirmou o acoplamento *orto* entre esses hidrogênios (Figura A1).

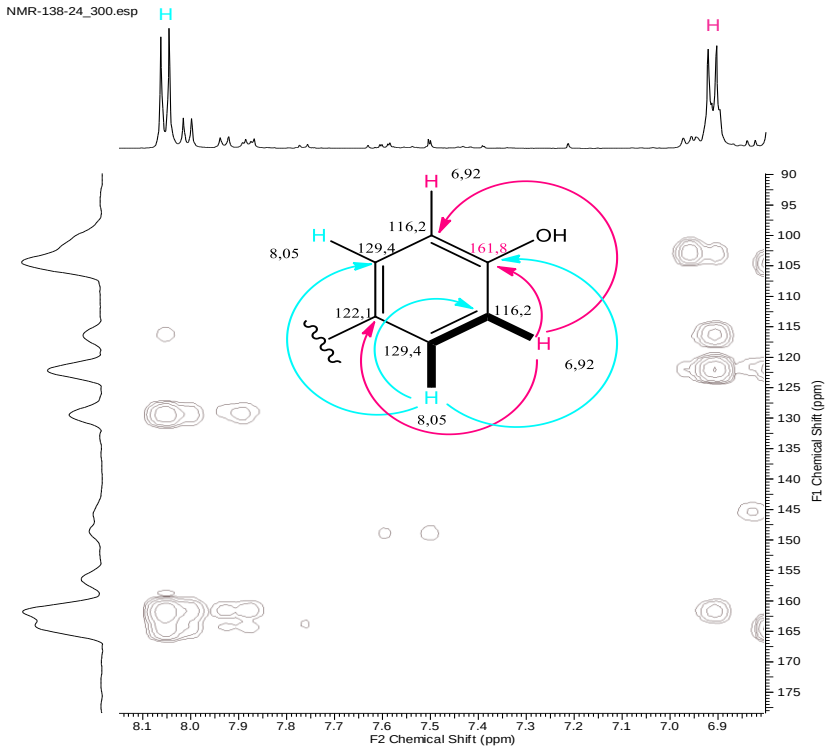


Figura 46: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 6,92 e 8,05**.**

Com base nos dados obtidos, conclui-se que a substância isolada é um flavonoide da subclasse das flavonas e um derivado da apigenina, conhecido como apigenina-8-*C*-(2″-*O*-*α*-ramnopiranosil-*β*-glucopiranosídeo), vitexina-2″-*O*-ramnosídeo, apigenina-8-*C*-glicosídeo-2'-ramnosídeo, ramnosilvitexina ou apigenina 8-*C*-neohesperidosídeo (ADEROGBA *et al*., 2011; CAMARGO *et al*., 2012). Este é o primeiro relato de seu isolamento no gênero *Onychopetalum*. No entanto, a substância já foi identificada na família Annonaceae, especificamente na espécie *Dennettia tripetala* G. Baker (ADEROGBA *et al*., 2011), e em outras famílias, como Rosaceae, em *Crataegus monogyna* e *C. laevigata* (NIKOLOV *et al*., 1982; KIRAKOSYAN *et al*., 2003; WEI *et al*., 2014), Leguminosae, em *Mimosa xanthocentra* Mart. (CAMARGO *et al*., 2012), e Fabaceae, em *Acacia polyphylla* (CESARINO *et al*., 2020).

Os dados de RMN de ^{1}H da substância, apresentados na Tabela 3, estão em concordância com os descritos na literatura, confirmando o isolamento da apigenina 8-*C*-neohesperidosídeo (Figura 47).

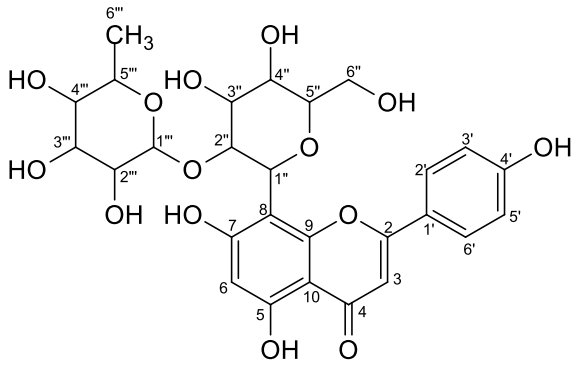


Figura 47: Estrutura da apigenina 8-*C*-neohesperidosídeo

Tabela 3: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F1 e suas correlações no HMBC.

Posição	**δ_C** [a]	**δ_C** [b]	**δ_H** (J *Hz)*	**HMBC**
1	-	-	-	-
2	164,3	166,8	-	-
3	102,8	103,7	6,79 (s, 1H)	104,3 / 122,1 / 164,3 / 182,4
4	182,4	184,2	-	-
5	161,6	164,3	-	-
6	99,2	99,6	6,27 (s, 1H)	104,3 / 161,6
7	163,4	166,2	-	-
8	104,2	106,1	-	-
9	156,4	158,0	-	-
10	104,3	105,8	-	-
1’	122,1	123,7	-	-
2’	129,4	130,2	8,05 (d*; J:8,8*, 1H)	116,2 / 129,4 / 161,8
3’	116,2	117,1	6,92 (d; *J: 8,8*, 1H)	116,2 / 122,1 / 161,8
4’	161,8	162,8	-	-
5’	116,2	117,1	6,92 (d*; J: 8,8*, 1H)	116,2 / 122,1 / 161,8
6’	129,4	130,2	8,05 (d*; J:8,8*, 1H)	116,2 / 129,4 / 161,8
8-*C*-Glicopiranosil				
1’’	72,3	72,3	4,78 (*β,* d*; J: 10,3*, 1H)	75,5/80,5/104,2/156,4/163,4
2’’	75,5	78,2	4,07 (m, 1H)	-
3’’	82,4	81,7	3,26 (m, 1H)	-
4’’	71,1	73,8	3,41 (m, 1H)	-
5’’	80,5	82,9	3,44 (m, 1H)	-
6’’	61,5	63,1	3,54 / 3,77 (m, 2H)	-
2’’-*O*- Ramnopiranosil				-
1’’’	100,7	102,6	4,99 (*α,* s, 1H)	68,8 / 71,3 / 75,5
2’’’	71,3	72,0	3,58 (m, 1H)	-
3’’’	70,9	72,1	3,11 (m, 1H)	-
4’’’	71,6	72,6	2,92 (m, 1H)	-
5’’’	68,8	70,0	2,12 (m, 1H)	-
6’’’	18,2	18,1	0,48 (m, 3H)	68,8 / 71,6

[a]Carbono atribuído com base nos experimentos de HSQC e HMBC; [b] ADEROGBA *et al*., 2011 (CD_3OD,50 MHz);

Aderogba e colaboradores (2011) isolaram esse composto do extrato de folhas de *Dennettia tripetala* G. Baker e observaram que, em ensaios qualitativos de atividade

antioxidante, ele demonstrou potencial como sequestrador de radicais livres, além de exibir atividade contra bactérias Gram-positivas. No entanto, o composto não foi capaz de inibir o crescimento da linhagem de fungos nas concentrações testadas.

Em outro estudo, Cesarino e colaboradores (2020) avaliaram a atividade antioxidante da fração em AcOEt de folhas de *Acacia polyphylla* (Fabaceae) e concluíram que a vitexina-2”-*O*-ramnosídeo (apigenina 8-*C*-neohesperidosídeo) apresenta atividade antioxidante tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*, sendo considerada uma fonte promissora de antioxidantes naturais.

Na literatura, esse flavonoide é frequentemente relatado em diversas espécies do gênero *Crataegus* (WEI *et al*., 2014; NIKOLOV *et al*., 1982; RAYYAN *et al*., 2005; LI *et al*., 2015; KIRAKOSYAN *et al*., 2003). Wei e colaboradores (2014) investigaram simultaneamente a influência da apigenina-8-*C*-glicosídeo-2"-ramnosídeo e da vitexina-4"-*O*-glicosídeo em lesões induzidas por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hADSCs), para caracterizar ainda mais suas atividades antioxidante e antiapoptótica. As substâncias foram estudadas individualmente, e os pesquisadores verificaram que nenhuma delas apresentou efeito citotóxico em hADSCs, mesmo em uma ampla faixa de concentrações. O estudo concluiu que o pré-tratamento das células com essas substâncias pode melhorar a sobrevivência e função das hADSCs *in vitro*, resultando em mais benefícios terapêuticos. Os autores sugerem que tanto a apigenina-8-*C*-glicosídeo-2"-ramnosídeo quanto a vitexina-4"-*O*-glicosídeo têm potencial para serem desenvolvidas como fármacos preventivos ou terapêuticos para doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Recentemente, Wang e colaboradores (2022) exploraram os efeitos da vitexina-2"-*O*-ramnosídeo na imunidade e capacidade antioxidante de camundongos. Os resultados indicaram que a vitexina-2"-*O*-ramnosídeo aumentou o peso corporal dos

camundongos imunossuprimidos, melhorou as lesões no baço e no timo, e estimulou a atividade de células NK (*natural killer*) e linfócitos T citotóxicos (CTL). Este estudo oferece uma base teórica e experimental relevante para pesquisas e o desenvolvimento de novos produtos na área da saúde.

5.3.2 Elucidação estrutural da substância FRS-3-F2

A substância FRS-3-F2 (17,6 mg) apresentou-se como um sólido laranja-amarelo. No espectro de massas observou-se um pico base de *m/z* 577 ($[M-H]^-$) (Figura 48), indicando ser um isômero da molécula FRS-3-F1.

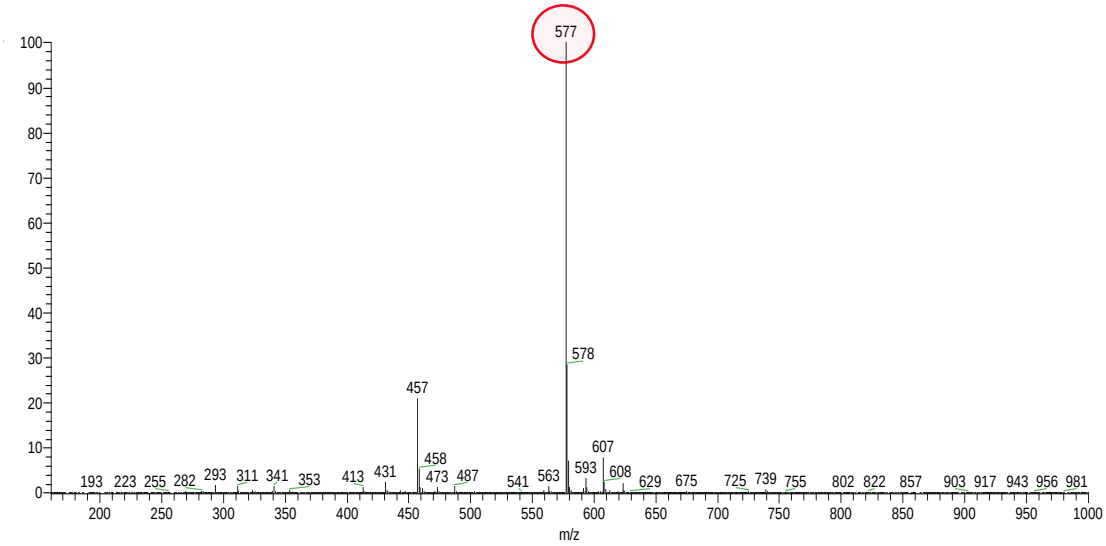


Figura 48: Espectro de massas para a fração FRS-3-F2, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS.

Como se trata de um isômero da molécula FRS-3-F1, a análise de fragmentação revelou os mesmos íons $[(M-H)^-120]^-$, $[(M-H)^-164]^-$ e $[(M-H)^-120]^-$ correspondentes aos sinais em *m/z* 457, 413 e 293, respectivamente (Figura 49), indicando também a presença dos açúcares ramnose e glicose (neohesperidose). Possivelmente, a neohesperidose está ligada na posição C-6 da aglicona.

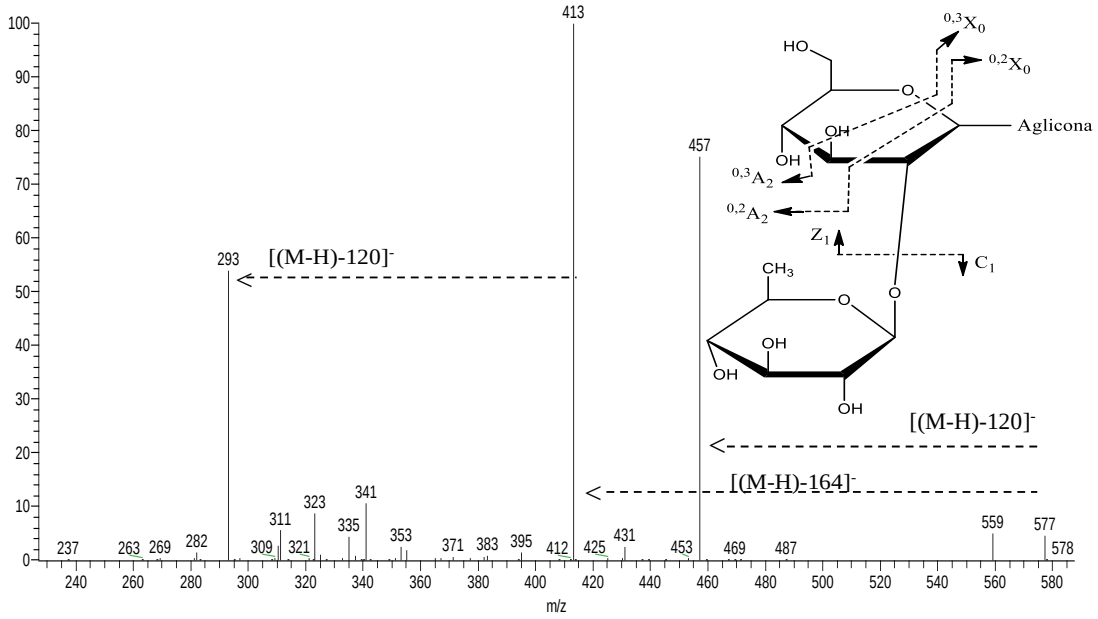


Figura 49: Espectro de MS/MS para FRS-3-F2.

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 50), foram observados quatro sinais na região aromática: dois simpletos em δ 6,51 ppm (1H) e δ 6,77 ppm (1H), possivelmente correspondentes aos hidrogênios nas posições C-8 e C-3; e dois dupletos em δ 6,93 (*J=8,8* Hz, 2H) e δ 7,93 (*J = 8,8* Hz, 2H), referentes ao anel B com um sistema aromático para-substituído do tipo A_2B_2.

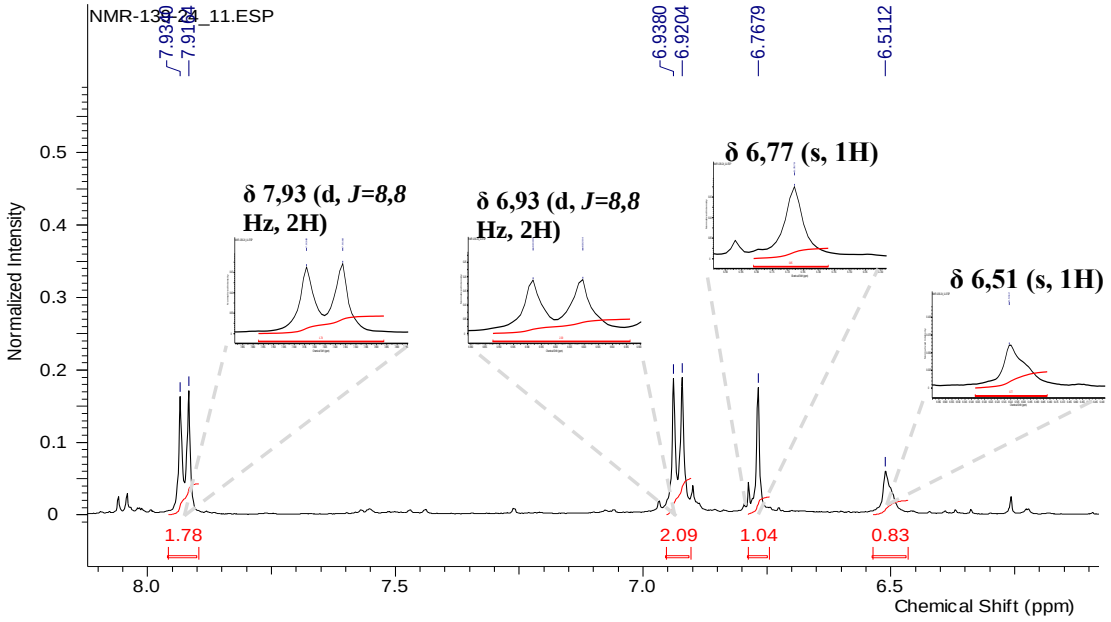


Figura 50: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da região aromática da FRS-3-F2.

Através dos dados de HSQC e HMBC, foi possível determinar as posições dos hidrogênios aromáticos nos anéis A e B, bem como do hidrogênio olefínico no anel C.

Os sinais em δ 6,51 e 6,77 estão acoplados aos seus respectivos carbonos em δ 93,9 e 103,2, sendo atribuídos às posições C-8 e C-3, respectivamente (Figura 51). Essa atribuição foi confirmada pelas correlações de longa distância, como a observada entre o hidrogênio em δ 6,51 (H-8) com os carbonos em δ 104,5, 109,05, 156,8 e 163,4 (Figura 51A), e entre o hidrogênio em δ 6,77 (H-3) com os carbonos em δ 104,5, 122,1, 163,9 e 182,6 (Figura 51B). Essa mudança de carbono do hidrogênio do anel A foi fundamental para a atribuição correta das unidades de açúcar, indicando a presença de um dissacarídeo ligado na posição C-6.

Os dupletos na região aromática são referentes ao anel B para-substituído. Os hidrogênios em δ 6,93 (d, *J = 8,8* Hz, 2H) e δ 7,93 (d, *J = 8,8* Hz, 2H), acoplados aos carbonos em δ 116,2 e 128,9, são atribuídos às posições C-3'/C-5' e C-2'/C-6', respectivamente. No espectro de COSY, o acoplamento orto entre esses hidrogênios é confirmado (Figura A2). No espectro de HMBC, o hidrogênio em δ 6,93 (H-3'/H-5') apresenta correlações com os carbonos em δ 116,2, 122,1 e 161,7 (Figura 51C), enquanto o hidrogênio em δ 7,93 (H-2'/C-6') se correlaciona com os carbonos em δ 128,9, 161,7 e 163,9 (Figura 51D).

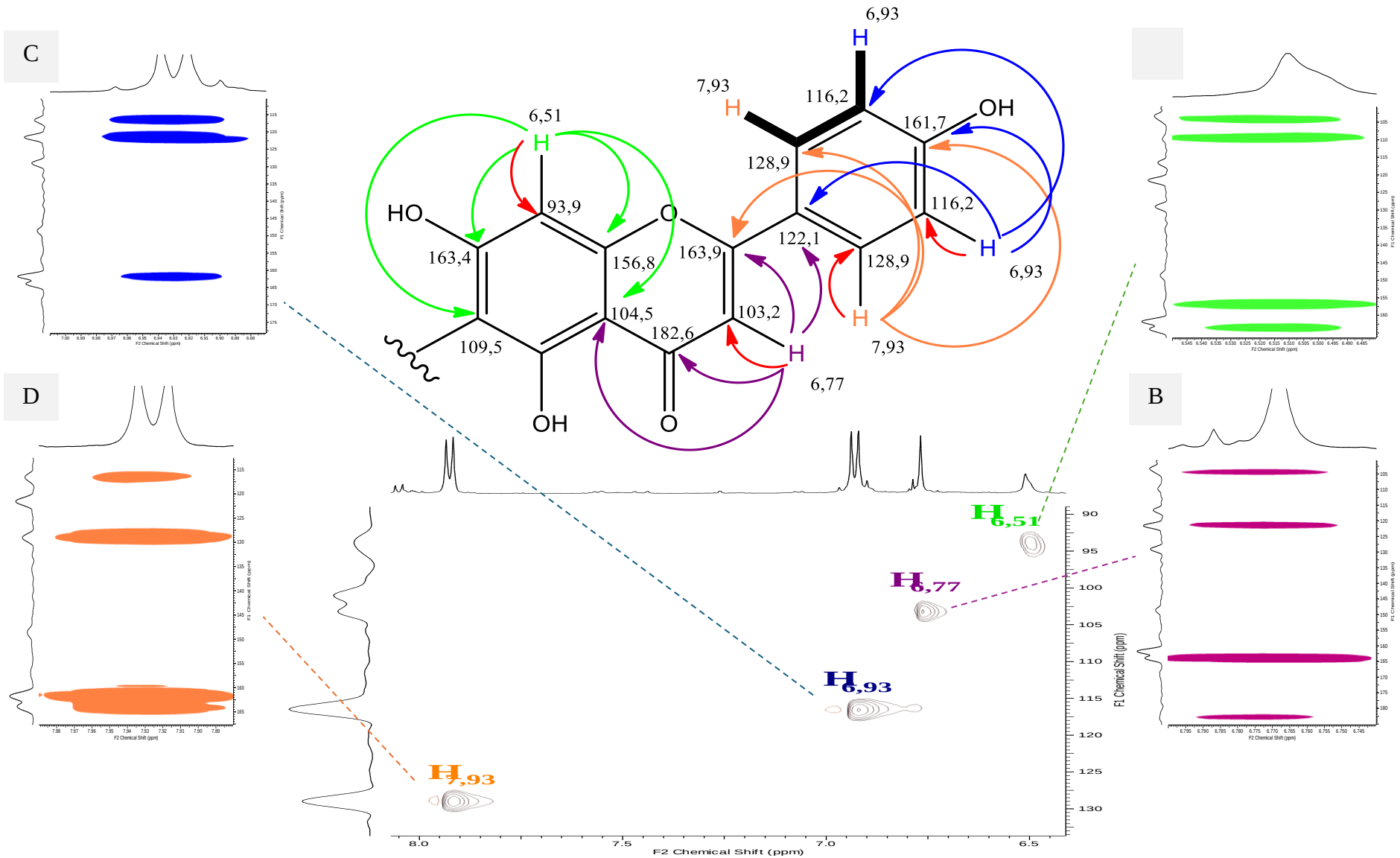


Figura 51: Mapa de contorno HSQC e HMBC da FRS-3-F2.

Neste composto, os espectros de RMN de ^{1}H realizados a 25°C foram particularmente interessantes devido à presença de sinais duplicados na região dos hidrogênios anoméricos e do grupo metil da ramnose.

O espectro de RMN de ^{1}H na região dos carboidratos exibiu sinais anoméricos de prótons duplicados em δ 5,02 / 5,09 (s, 1H) e δ 4,64 / 6,67 (d, 1H), correspondentes às duas unidades de açúcar (Figura 52). No HSQC, foi observado que esses hidrogênios estão acoplados aos carbonos em δ 101,1 / 100,9 e δ 71,7, respectivamente (Figuras 52A e 52B).

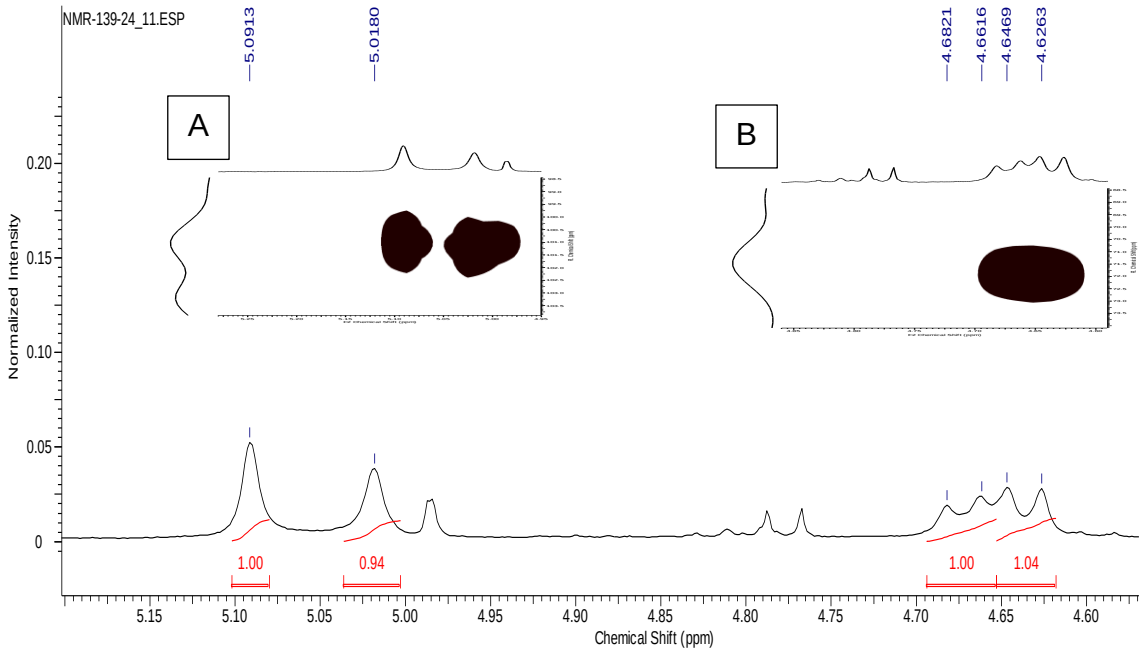


Figura 52: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da região dos H anoméricos e mapa de contorno HSQC para os hidrogênios (a) em δ 5,02 / 5,09 com o carbono em δ 101,1 / 100,9, respectivamente, e (b) em δ 4,64 / 4,67 com o carbono em δ 71,7.

As correlações observados no HMBC confirmaram a conexão do dissacarídeo. O hidrogênio em δ 5,02 / 5,09 (H-1’”) mostrou correlações com os carbonos em δ 68,9, 71,1 e 75,1 (Figura 53A), enquanto o hidrogênio em δ 4,64 / 4,67 (H-1”) apresentou correlações com os carbonos em δ 75,1, 109,5, 161,6 e 163,9 (Figura 53B).

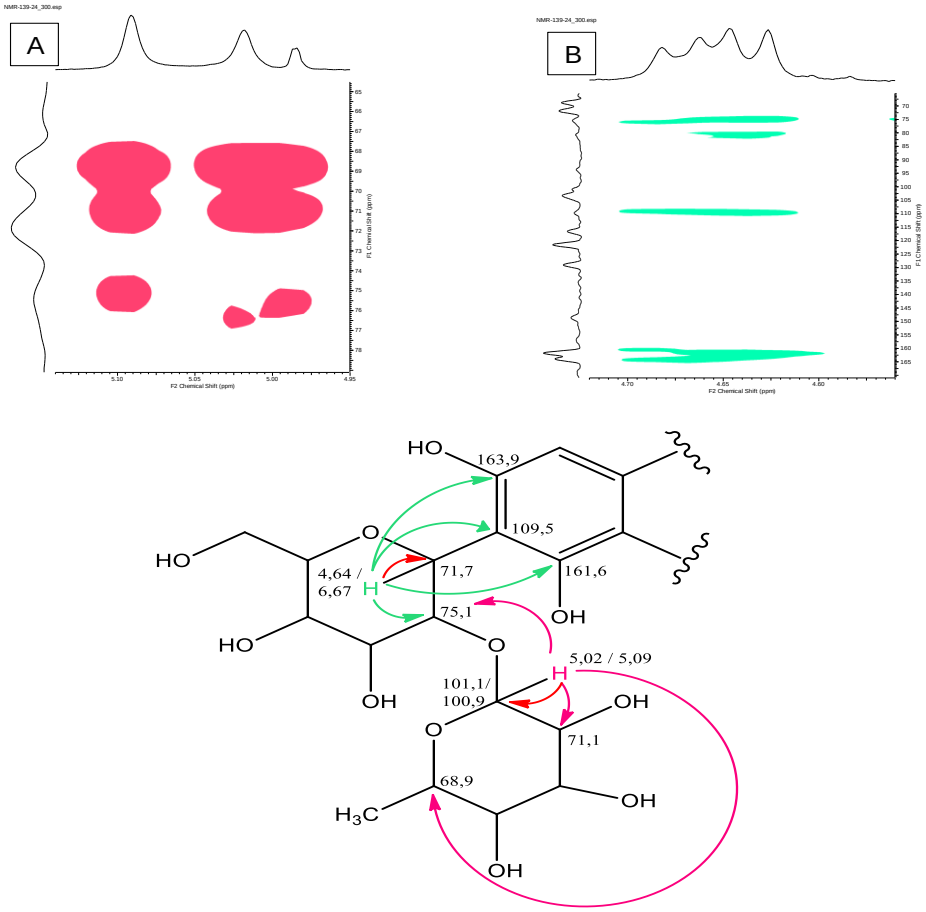


Figura 53: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios anoméricos (a) em δ 5,02 / 5,09 com o carbono em δ 68,7, 71,1 e 75,1 e (b) em δ 4,64 / 4,67 com o carbono em δ 75,1, 109,5, 161,6 e 163,9.

A duplicidade de sinais nessa região é comum em glicosilflavonas substituídas por um grupo metoxila ou *O*-*β*-glicosil na posição 7. Esse fenômeno ocorre devido ao impedimento estérico gerado por esses substituintes, resultando em estereoisômeros conhecidos como rotâmeros, que surgem da rotação restrita em torno de ligações simples (CHENG *et al*., 2000). A barreira rotacional elevada permite que essa isomeria seja observada, levando à duplicação dos sinais no espectro de RMN à temperatura ambiente (25 °C) (RAYYAN *et al*., 2005; CAMARGO *et al*., 2012).

Embora a molécula isolada não possua substituições 7-metoxila ou 7-*O*-glicosil, também apresentou sinais duplicados. Acredita-se que a rotação livre na ligação C (sp^3) - C (sp^2) da glicosilflavona seja impedida pela presença de substituintes glicosil volumosos, sugerindo a existência de dois conformadores rotaméricos (CAMARGO *et al*., 2012;

RAYYAN *et al*., 2005). Vale ressaltar que esses confórmeros são variações estruturais da mesma molécula, e não compostos distintos.

Outro sinal duplicado na proporção de 1:1 foi observado no espectro de RMN de ^{1}H. Trata-se de dois sinais bem definidos que puderam ser integrados separadamente, correspondendo a dois dupletos em δ 0,61 (*J* = 5,9 Hz, 3H) e δ 0,53 (*J* = 5,9 Hz, 3H) (Figura 54). No HSQC, verificou-se que esses hidrogênios estão acoplados aos carbonos em δ 18,3 e δ 18,2, respectivamente (Figura 54A).

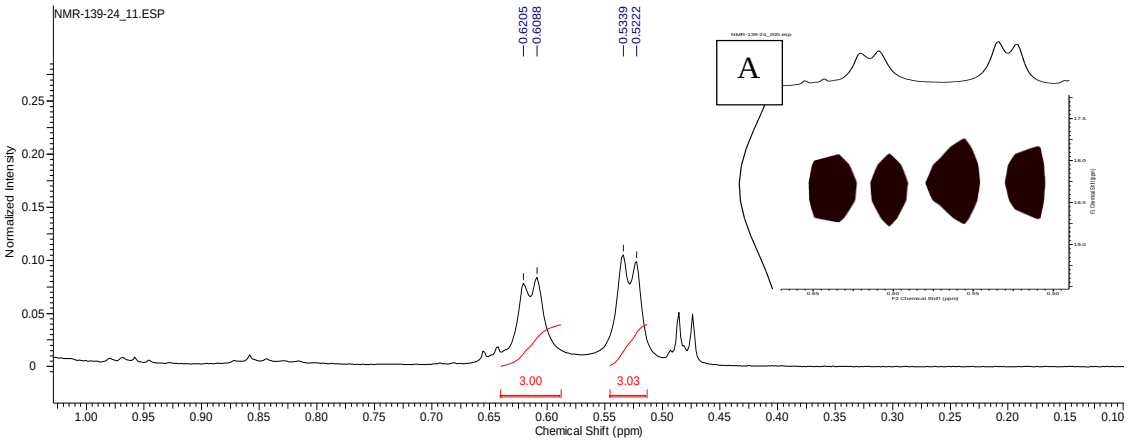


Figura 54: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, 25 °C) para a região da metila da ramnose e (A) mapa de contorno HSQC**.**

No experimento de HMBC, observou-se a correlação desses hidrogênios com os carbonos em δ 68,9 e δ 72,1 (Figura 55). Esses sinais no RMN de ^{1}H foram atribuídos ao grupo metila da ramnose.

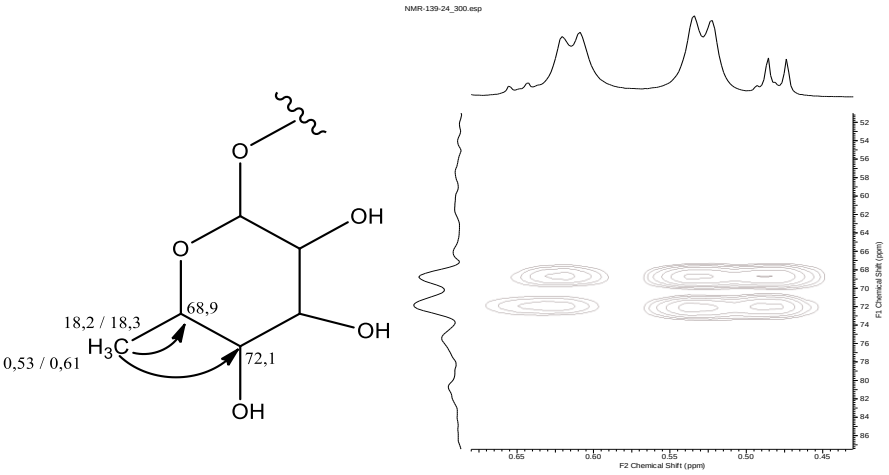


Figura 55: Correlações da metila da ramnose no HMBC da FRS-3-F2.

Camargo e colaboradores (2012) relataram a duplicidade dos sinais do grupo metila da ramnose ao realizar experimentos de RMN com temperatura variável para esse mesmo composto. Quando as medições de RMN foram realizadas a 60 °C em DMS0-d_6, observou-se a coalescência dos sinais, indicando que, a essa temperatura, a barreira de rotação em torno da ligação *C*-glicosil foi cruzada, resultando em um equilíbrio rápido na escala de RMN entre os dois confórmeros rotacionais. Esse rápido processo de interconversão gerou apenas um conjunto de sinais médios. No entanto, quando o experimento foi realizado a temperaturas mais baixas (21 °C em DMSO-d_6), o espectro de RMN de ^{1}H revelou sinais bem definidos correspondentes ao grupo metila da ramnose para ambos os rotâmeros, que puderam ser integrados separadamente (Figura 56).

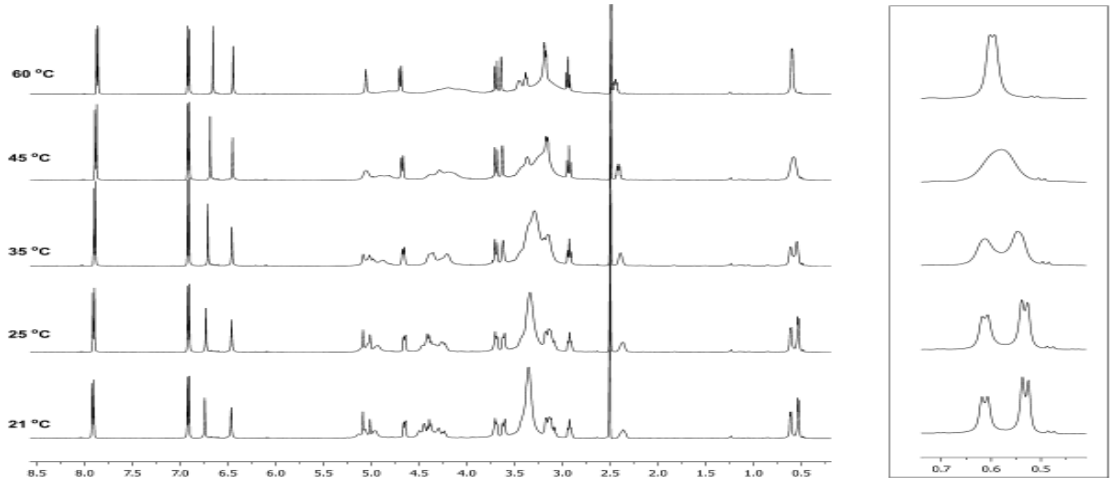


Figura 56: Espectros de RMN de ^{1}H do composto apigenina 6-*C*-*β*-glucopiranosil-2-α-ramnopiranósido registrados em função da temperatura (^{1}H: 400 MHz; DMSO-d_6; concentração da amostra: 48,0 mg/ml). Um fechamento do comportamento de troca de dupletos de ramnosil é mostrado em caixa alta. Fonte: Camargo *et al*., 2012.

Como os experimentos de RMN foram realizados à 25 °C, uma temperatura que permite a observação dos dois confórmeros rotaméricos, os resultados obtidos neste trabalho, que indicam a presença de rotâmeros (Figura 52; Figura 54), estão em concordância com as conclusões de Camargo *et al*. (2012) para o mesmo composto em DMSO-d_6 a 25 °C (Figura 56).

Camargo e colaboradores (2012) também utilizaram modelos de mecânica molecular (MM2) para propor duas possíveis estruturas tridimensionais dos rotâmeros deste composto. Neste modelo, apenas os átomos de hidrogênio polares são exibidos para maior clareza, e as linhas pontilhadas representam as ligações de hidrogênio (Figura 57). As estruturas diferem no arranjo espacial da subunidade dissacarídica, que adota uma conformação dobrada em relação ao núcleo flavonoide.

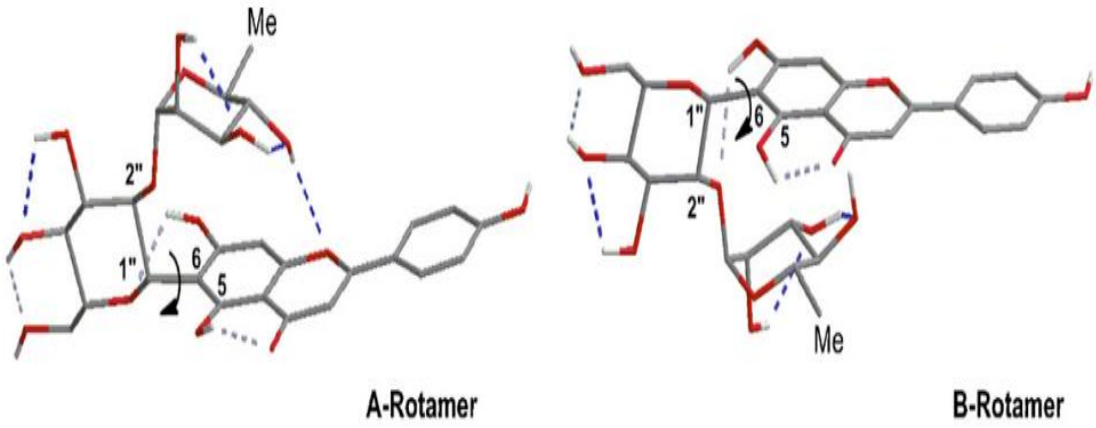


Figura 57: Modelos MM2 para os dois rotâmeros do composto 6-C-*β*-glucopiranosil-2-*α*-ramnopiranósido. Fonte: Camargo *et al*., 2012.

A Tabela 4 e 5 apresentam os dados completos de RMN de ^{1}H, juntamente com os experimentos de mapas de contorno HSQC e HMBC. Comparando os dados obtidos com os descritos na literatura, foi possível identificar a amostra FRS-3-F2 como apigenina 6-*C*-*β*-glucopiranosil (1→2) α-ramnopiranósido, também conhecida como isovitexina-2"-*O*-*β*-glicopiranosídeo, isovitexina-2"-ramnosídeo ou apigenina 6-*C*-neohesperidosídeo (Figura 58) (CHENG *et al*., 2000; CAMARGO *et al*., 2012; COSTA *et al*., 2015). Esse flavonoide já foi relatado em diversas famílias, como Annonaceae, em *Annona marucata* (CORIA-TÉLLEZ *et al*., 2018), Oxalidaceae, em *Averrhoa carambola L.* (MORESCO *et al*., 2012) e *Oxalis triangularis* (RAYYAN *et al*., 2005), e Leguminosae, em *Mimosa xanthocentra* (CAMARGO *et al*., 2012). No entanto, é o primeiro relato desse composto no gênero *Onychopetalum*.

Tabela 4: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F2 e suas correlações no HMBC.

Posição	δ_C[a]	δ_C[b]	δ_H (J Hz)	HMBC
1	-	-	-	-
2	163,9	163,9	-	-
3	103,2	103,2	6,77 (s, 1H)	104,5/ 122,1 / 163,9 / 182,6
4	182,6	182,7	-	-
5	161,6	161,8	-	-
6	109,5	109,6	-	-
7	163,4	163,4	-	-
8	93,9	93,6	6,51 (s, 1H)	104,5/ 109,5 / 156,8 / 163,4
9	156,8	156,8	-	-
10	104,5	103,3	-	-
1’	122,1	121,6	-	-
2’	128,9	129,0	7,93 (d, *J: 8,8*, 1H)	128,9 / 161,7 / 163,9
3’	116,2	116,6	6,93 (d, *J: 8,8*, 1H)	116,2 / 122,1 / 161,7
4’	161,7	160,5	-	-
5’	116,2	116,6	6,93 (d, *J: 8,8*, 1H)	116,2 / 122,1 / 161,7
6’	128,9	129,0	7,93 (d, *J: 8,8*, 1H)	128,9 / 161,7 / 163,9

[a]Carbonos atribuídos com base nos experimentos de HSQC e HMBC; [b] CAMARGO *et al.*, 2012 (75 MHz; DMSO-d_6).

Tabela 5: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) dos açúcares da FRS-3-F2.

Posição	A – Rotâmero			B – Rotâmero			HMBC
	δ_H (J Hz)	δ_C[a]	δ_C[b]	δ_H (J Hz)	δ_C[a]	δ_C[b]	
6-*C*-Glucopiranosil							
1’’	4,64 (d, *β, J:10,3*, 1H)	71,7	71,9	4,67 (d, *β, J:10,3*, 1H)	71,7	71,5	75,1/109,5 /161,6 /163,9
2’’	4,39 (t, *J:9,2*, 1H)	75,1	75,6	-	-	76,4	-
3’’	3,35 (m, 1H)	80,5	80,6	-	-	80,2	-
4’’	3,13 (m, 1H)	70,9	70,9	-	-	-	-
5’’	3,17 (m, 1H)	81,9	82,0	-	-	-	-
6’’	3,71 (m, 2H)	62,0	62,3	3,40 (m, 2H)	62,2	61,8	-
2’’-*O*- Ramnopiranosil							-
1’’’	5,09 (s, *α*, 1H)	100,9	100,9	5,02 (s, α, 1H)	101,1	101,3	68,9/ 71,1/ 75,1
2’’’	3,62 (m, 1H)	71,1	71,2	-	-		-
3’’’	3,12 (m, 1H)	71,2	70,9	-	-		-
4’’’	2,93 (m, 1H)	72,1	72,1	-	-		-
5’’’	2,34 (m, 1H)	68,9	68,8	-	-		-
6’’’	0,53 (d, *J:5,9*, 3H)	18,2	18,1	0,61 (d; *J:5,9*, 3H)	18,3	18,3	68,9/ 72,1

[a]Carbonos atribuídos com base nos experimentos de HSQC e HMBC; [b] CAMARGO *et al.*, 2012 (75 MHz; DMSO-d_6).

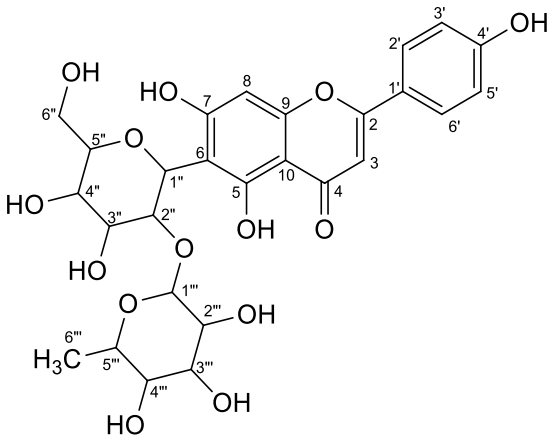


Figura 58: Estrutura da apigenina 6-*C*-neohesperidosídeo

A apigenina 6-C-neohesperidosídeo foi isolada pela primeira vez nas folhas de *Averrhoa carambola* (carambola) no estudo de Moresco *et al*. (2011), sendo inédita para essa espécie, embora já tenha sido relatada anteriormente em *Oxalis triangularis*, outra planta pertencente à família Oxalidaceae. No referido estudo, o composto apresentou valores de IC_{50} superiores a 200 µg/mL no ensaio de sequestro de radicais DPPH, o que indica uma baixa capacidade antioxidante, especialmente em comparação aos padrões ácido ascórbico e ácido gálico. Além disso, considerando a baixa concentração desse flavonoide na fração n-butanólica (n-BuOH), os autores sugerem que ele provavelmente não é o principal responsável pela atividade antioxidante observada nessa fração.

5.3.3 Elucidação estrutural da substância FRS-3-F4

A substância FRS-3-F4 (3,1 mg) apresentou-se como um sólido laranja-amarelo. No espectro de massas observou-se um pico base de *m/z* 577 ($[M-H]^-$) (Figura 59), indicando ser um isômero das moléculas FRS-3-F1 e FRS-3-F2.

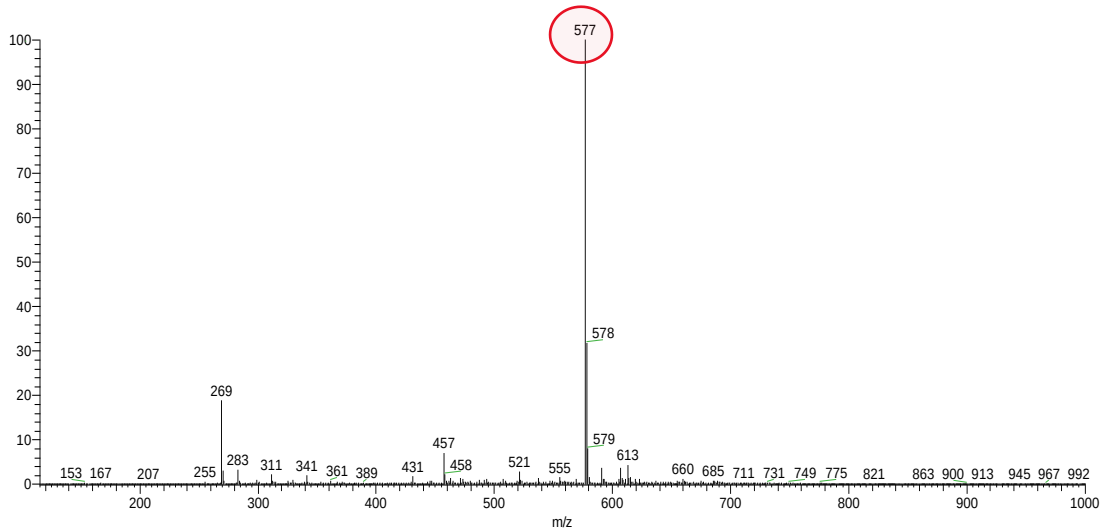


Figura 59: Espectro de massas para a fração FRS-3-F4, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS.

O sinal do fragmento da aglicona apigenina foi detectado no espectro de MS/MS em *m/z* 269 (Figura 60), indicando perdas simultâneas de 146 e 162 Da, correspondentes à perda de ramnose e glicose, respectivamente, o que sugere a presença de outro dissacarídeo. No entanto, o padrão de fragmentação diferiu de seus isômeros, sugerindo tratar-se de um flavonoide *O*-dissacarídeo. A fragmentação desses flavonoides geralmente envolve a clivagem das ligações O-C, resultando nos íons Y_0^- ou Y_0^+ como principais produtos, o que indica a ligação glicosídica a um grupo hidroxila fenólico (KACHLICKI *et al*., 2016).

Acredita-se que a substância FRS-3-F4 seja um glicosídeo ramnosil (1→6), com base na observação do íon produto $[M-308-H]^-$ (Y_0^-) no espectro de MS/MS em modo negativo (Figura 60). Esse padrão de fragmentação é característico de flavonoides *O*-glicosilados, que são os tipos mais frequentes e amplamente encontrados na natureza (JI *et al*., 2020).

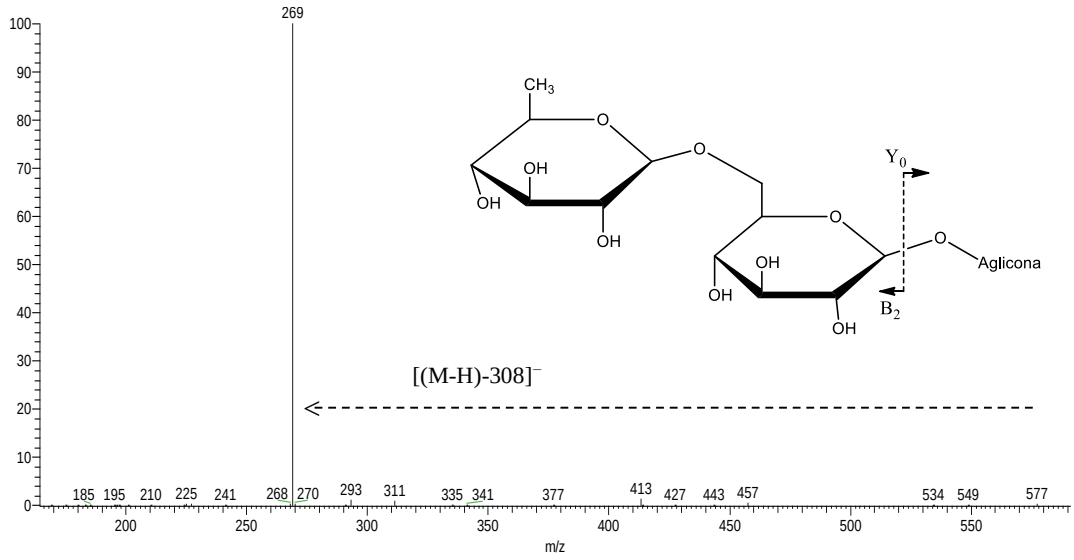


Figura 60: Espectro de MS/MS para FRS-3-F4, com pico base em *m/z* 269.

Segundo a literatura, o modo negativo permite distinguir claramente entre as ligações glicosídicas 1→2 (neohesperidose) e 1→6 (rutinose) em flavonoides *O*-dissacarídeos (VUKICS & GUTTMAN, 2010). Isso é exemplificado pela presença dos íons $[M-164-H]^-$ (Z_1^-) e $[M-308-H]^-$ (Y_0^-) para os *O*-neohesperidosídeos, enquanto apenas o íon $[M-308-H]^-$ (Y_0^-) é observado para os rutinosídeos (KACHLICKI *et al*., 2016; CUYCKENS *et al*., 2001). No entanto, é importante considerar que parâmetros específicos do espectrômetro, como a energia de colisão, podem influenciar a abundância relativa dos íons, impactando a possibilidade de comparação dos resultados (KACHLICKI *et al*., 2016; VUKICS & GUTTMAN, 2010; CUYCKENS & CLAEYS, 2004; FERRERES *et al*., 2004).

Os padrões característicos de um núcleo de apigenina foram identificados no espectro de RMN de ^{1}H. Observou-se um próton olefínico em δ 6,86 (s, C-3, 1H), um anel aromático tetra-substituído (anel A) com sinais em δ 6,46 (s, 1H) e 6,78 (s, 1H). Além de sinais de um anel aromático para-dissubstituído (anel B) em δ 6,96 (d, *J = 8,8* Hz, 2H) e 7,95 (d, *J = 8,8* Hz, 2H), a equivalência desses sinais é explicada pela livre rotação do anel B (Figura 61).

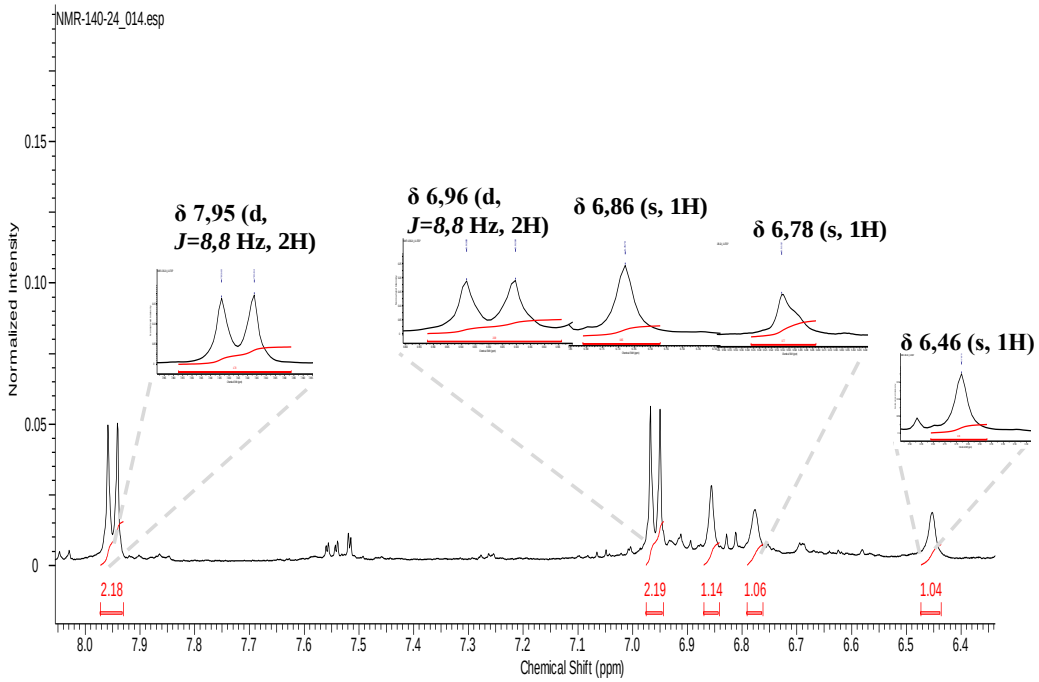


Figura 61: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, 25 °C) da FRS-3-F4.

A natureza desses hidrogênios foi confirmada por meio do espectro de HSQC (Figura 62). O hidrogênio olefínico em δ 6,86 (H-3) apresentou acoplamento com o carbono em δ 103,8. Já os hidrogênios aromáticos do anel A, em δ 6,46 (H-6) e 6,78 (H-8), acoplaram-se com os carbonos em δ 100,2 e 95,3, respectivamente. Os hidrogênios do anel B, com deslocamentos em δ 6,96 (H-3'/H-5') e 7,95 (H-2'/H-6'), mostraram acoplamento com os carbonos em δ 116,7 e 129,4, respectivamente.

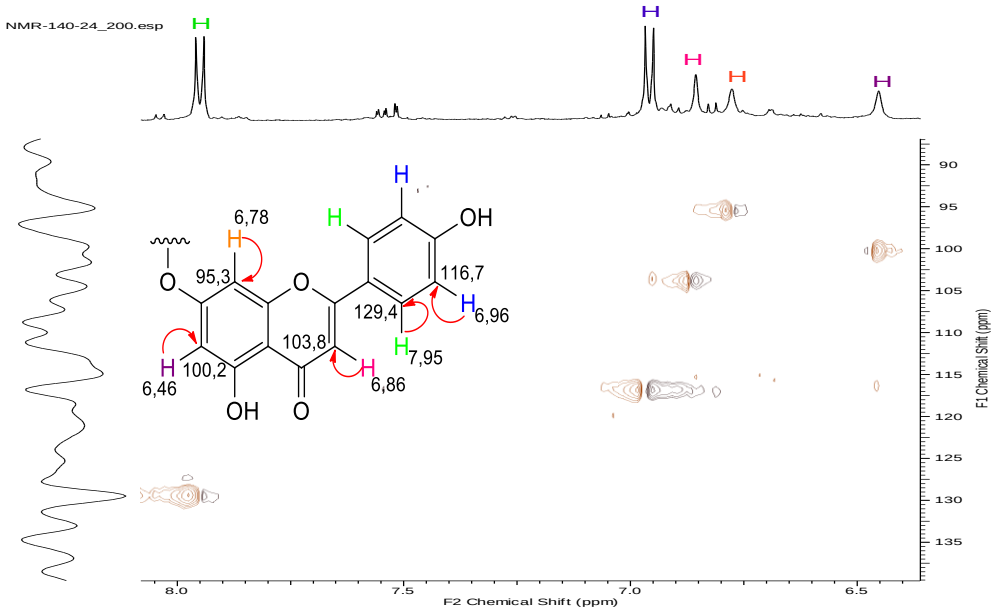


Figura 62: Mapa de contorno HSQC para os hidrogênios aromáticos da FRS-3-F4.

O espectro de HMBC (Figura 63) mostrou as correlações apenas de três hidrogênios aromáticos: os dois do anel B e o olefínico do anel C. Os hidrogênios em δ 7,95 mostraram correlação com os carbonos em δ 129,4, 162,1 e 164,9, enquanto os hidrogênios em δ 6,96 se correlacionaram com os carbonos em δ 116,7, 121,3 e 162,1, para esses hidrogênios é confirmado o acoplamento *orto* no espectro de COSY (Figura A3). O hidrogênio olefínico em δ 6,86 apresentou correlação com os carbonos em δ 105,9, 121,3 e 164,9. As correlações dos hidrogênios do anel A não foram observadas neste experimento e foram atribuídas com base no HSQC, concordando com os dados da literatura.

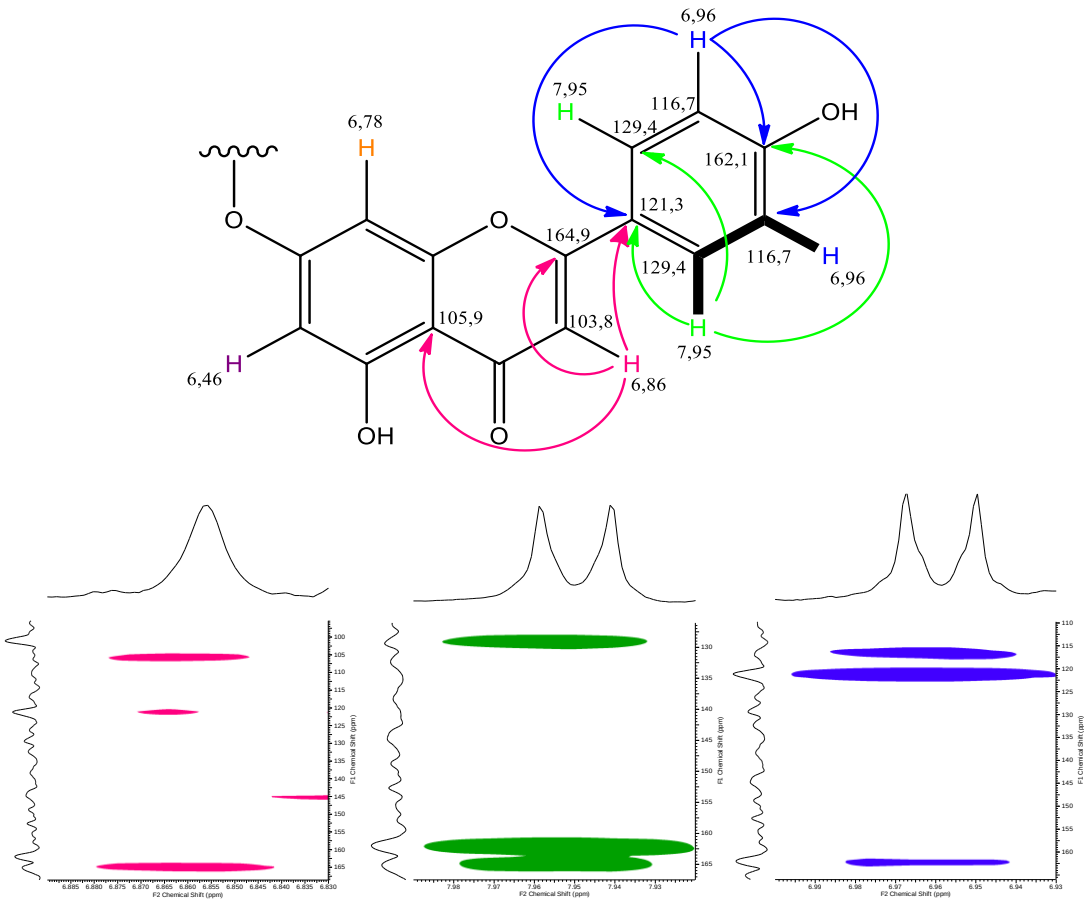


Figura 63: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios aromáticos.

A presença de sinais na região entre δ_H 3 e 5 ppm no espectro de RMN de ^1H sugerem a presença de unidades de açúcar. Essa indicação foi confirmada pela presença

de um dupleto em δ 5,06 (*J = 7,3* Hz) e um simpleto em δ 4,55, que correspondem aos hidrogênios anoméricos ligados aos carbonos em δ 100,6 e 101,2, respectivamente. Os acoplamentos observados no HSQC foram essenciais para determinar os carbonos associados a cada hidrogênio anomérico das unidades de açúcar (Figura 64).

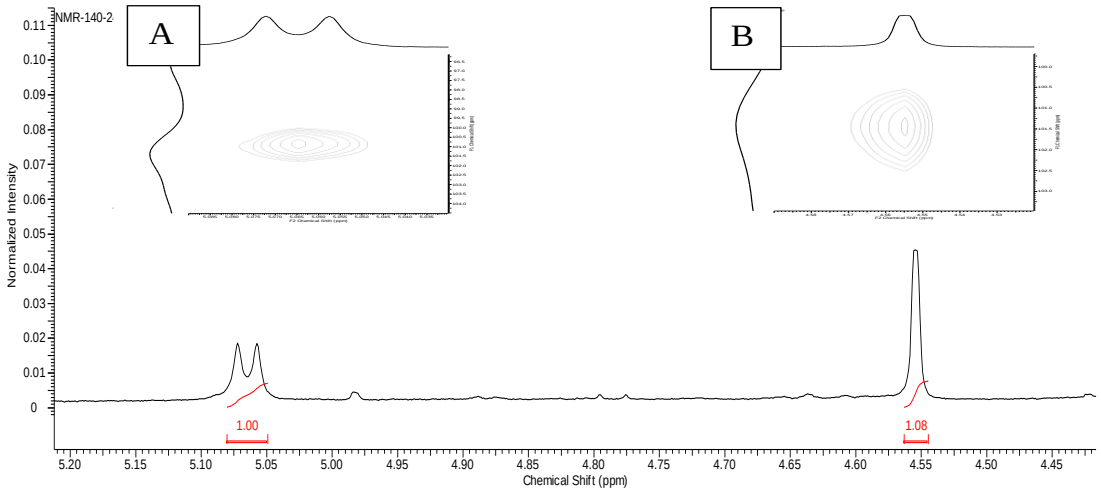


Figura 64: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para os hidrogênios em (A) δ 5,06 e seu acoplamento com o carbono em δ 100,6 (HSQC) e em (B) δ 4,55 com o carbono em δ 101,2 (HSQC).

A metila da ramnose é observada no espectro de RMN de ^{1}H como um sinal em δ 1,08 ppm. No HSQC, observa-se o acoplamento desses hidrogênios com o carbono em δ 18,5 (Figura 65).

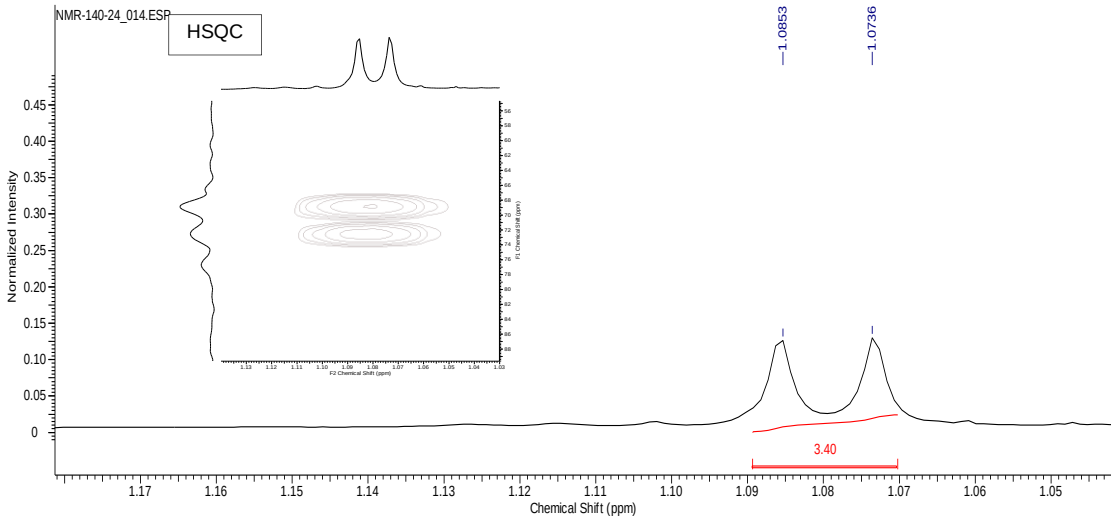


Figura 65: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para o hidrogênio em δ 1,08 e seu acoplamento com o carbono em δ 18,5 visto no HSQC.

No espectro de HMBC foi possível ver as correlações desses hidrogênios em δ 1,08 com os carbonos em δ 68,8 e 72,6 (Figura 66). Essas correlações foram fundamentais para confirmar a posição dos açúcares.

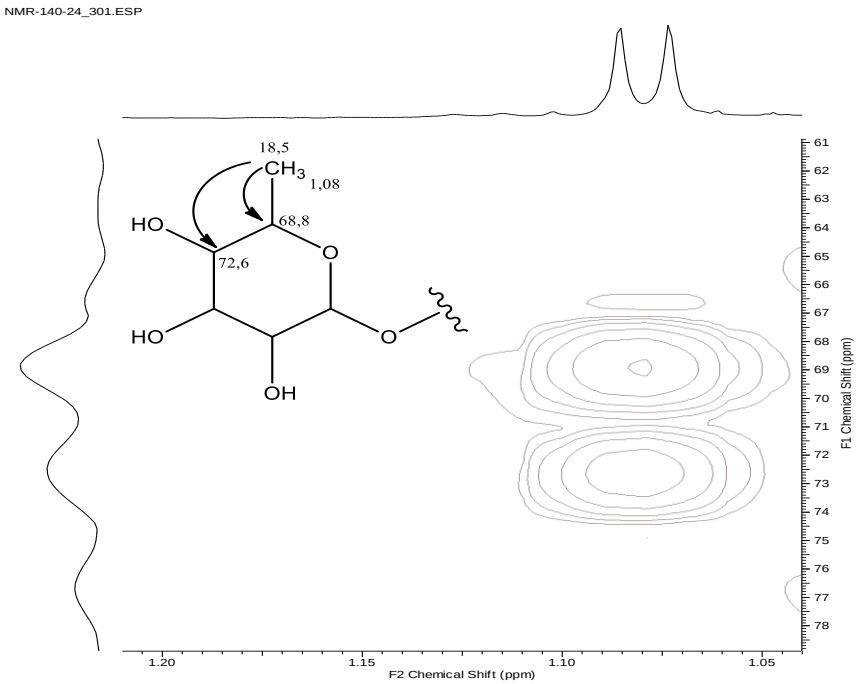


Figura 66: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios da metila.

O espectro HMBC (Figura 67) permitiu identificar a ligação entre a aglicona e a unidade de açúcar, evidenciada pelo acoplamento do hidrogênio glicosídico em δ 5,06 com o carbono em δ 163,4. A posição do segundo açúcar foi determinada pelo acoplamento do hidrogênio em δ 4,55 com os carbonos em δ 66,6, 68,8 e 71,3, confirmando a presença de um glicosídeo ramnosil (1→6). A configuração das unidades glicosídicas foi estabelecida com base nas constantes de acoplamento, sendo uma *β*-glicose *(J = 7,3* Hz) e outro uma *α*-ramnose, devido à baixa constante de acoplamento entre o próton anomérico e o H-2’’’.

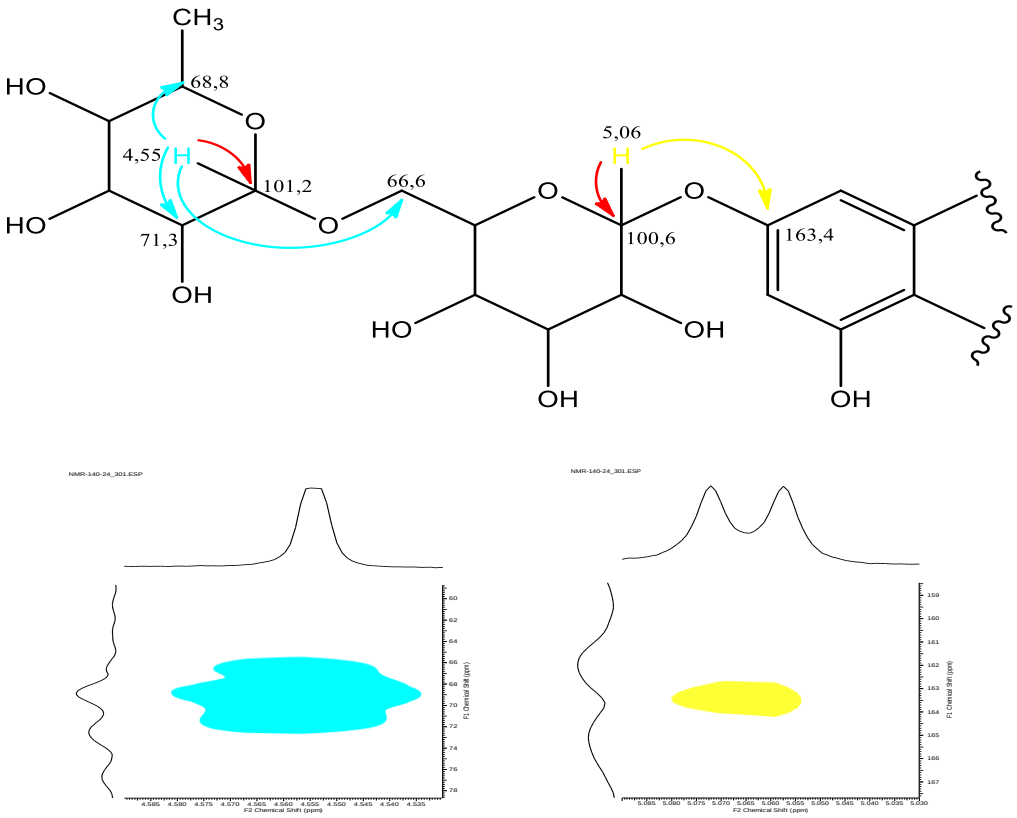


Figura 67: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios anoméricos.

Os dados obtidos confirmam que este isômero é a apigenina 7-*O*-rutinosídeo, também conhecida como isorhoifolina (Figura 68). Esta substância já foi descrita na literatura em várias famílias, incluindo Lamiaceae em *Monarda fistulosa* (KURKIN *et al*., 2020), Rosaceae, em *Crataegus monogyna* (NIKOLOV *et al*., 1982), Asteraceae em *Cynara scolymus* L. (WANG *et al*., 2003) e Verbenaceae em *Gmelina asiatica* L. (ANDARGHISKE *et al*., 2023). É importante ressaltar que a presença da apigenina 7-*O*-rutinosídeo no gênero *Onychopetalum* é o primeiro relato.

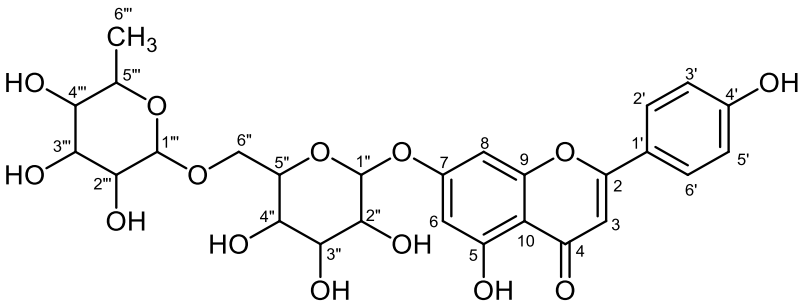


Figura 68: Apigenina 7-*O*-rutinosídeo

Todos os dados de RMN de ^{1}H estão listados na Tabela 6 juntamente com suas correlações. Esses dados estão em conformidade com as informações descritas na literatura.

Tabela 6: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F4 e suas correlações no HMBC.

Posição	**δ_C[a]**	**δ_C[b]**	**δ_H** (J Hz)	**HMBC**
1	-	-	-	-
2	164,9	164,4	-	-
3	103,8	103,1	6,86 (s, 1H)	105,9 / 121,3 / 164,9
4	-	182,1	-	-
5	-	161,2	-	-
6	100,2	99,9	6,46 (s, 1H)	-
7	163,4	162,9	-	-
8	95,3	94,8	6,78 (s, 1H)	-
9	-	156,9	-	-
10	105,9	105,4	-	-
1’	121,3	121,3	-	-
2’	129,4	128,7	7,95 (d; *J: 8,8*, 1H)	129,4 / 162,1 / 164,9
3’	116,7	116,1	6,96 (d, *J: 8,8*, 1H)	116,7 / 121,3 / 162,1
4’	162,1	161,4	-	-
5’	116,7	116,1	6,96 (d; *J: 8,8*, 1H)	116,7 / 121,3 / 162,1
6’	129,4	128,7	7,95 (d; *J: 8,8*, 1H)	129,4 / 162,1 / 164,9
7-*O*-Glucopiranosil				
1’’	100,6	99,5	5,06 (d; *β, J:7,3*, 1H)	163,4
2’’	73,7	73,1	3,29 (t, 1H)	100,6 / 76,28
3’’	77,0	76,3	3,31(m, 1H)	-
4’’	71,0	69,5	3,66 (m, 1H)	-
5’’	76,2	75,6	3,61 (m, 1H)	-
6’’	66,6	66,0	3,85 / 3,46 (m, 2H)	-
6”-*O*- Ramnopiranosil				-
1’’’	101,2	100,6	4,55 (s, *α*, 1H)	66,6 / 68,8 / 71,3
2’’’	70,2	70,3	3,17 (t, 1H)	-
3’’’	71,3	70,7	3,47 (m, 1H)	-
4’’’	72,6	72,0	3,15 (m, 1H)	-
5’’’	68,8	68,4	3,43 (m, 1H)	-
6’’’	18,5	17,9	1,08 (d, *J:5,9*, 3H)	68,8 / 72,6

[a]Carbono atribuído com base nos experimentos de HSQC e HMBC; [b]KURKIN *et al*., 2020 (126 MHz, DMSO-d_6).

Em um estudo publicado por Wang e colaboradores (2003), a apigenina 7-O-rutinosídeo foi identificada como um dos compostos fenólicos antioxidantes presentes nas inflorescências (cabeças) da alcachofra, mas não foi detectada nas folhas. Este foi o primeiro relato da presença desse composto no tecido comestível da planta. Entre os

compostos purificados, a apigenina 7-*O*-rutinosídeo apresentou atividade antioxidante relativamente baixa no ensaio de eliminação do radical DPPH. Essa baixa atividade é atribuída à presença de apenas dois grupos hidroxila localizados em anéis aromáticos distintos, o que compromete sua eficácia antioxidante quando comparada a compostos com maior número de grupos hidroxila ou com hidroxilas em posições adjacentes (orto ou para), que favorecem a estabilização do radical livre.

5.3.4 Elucidação estrutural da substância FRS-5-F3

A substância FRS-5-F3 (11,7 mg) apresentou-se na forma de um sólido amarelo. No espectro de massas, foi observado um pico base em *m/z* 431 ([M-H]$^-$) (Figura 69).

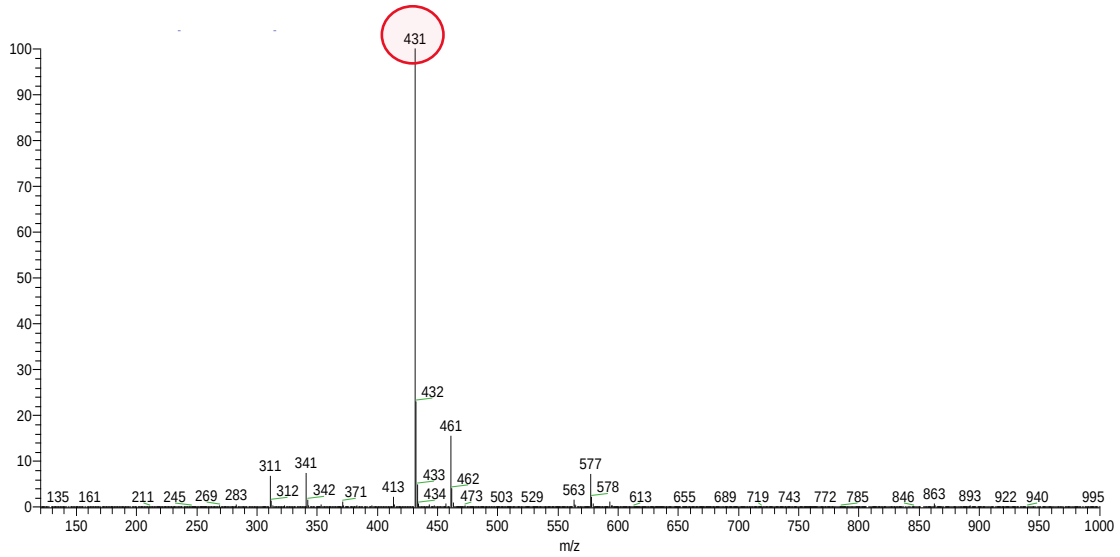


Figura 69: Espectro de massas para a fração FRS-5-F3, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS.

Os dados de MS/MS (Figura 70) revelaram um sinal de fragmento iônico em *m/z* 413 [(M-H)-18]$^-$, com baixa intensidade relativa, indicando a perda de uma molécula de água. Observou-se também um sinal em *m/z* 341 [(M-H)-90]$^-$ ($^{0,3}X_0^-$) e um sinal com alta intensidade relativa (pico base) em *m/z* 311 [(M-H)-120]$^-$ ($^{0,2}X_0^-$), sugerindo a perda de resíduo de glicose. O fragmento da aglicona apigenina foi observado em *m/z* 269. Esses dados indicam que a substância analisada é, possivelmente, um flavonoide monossacarídeo contendo uma glicose diretamente ligada à aglicona.

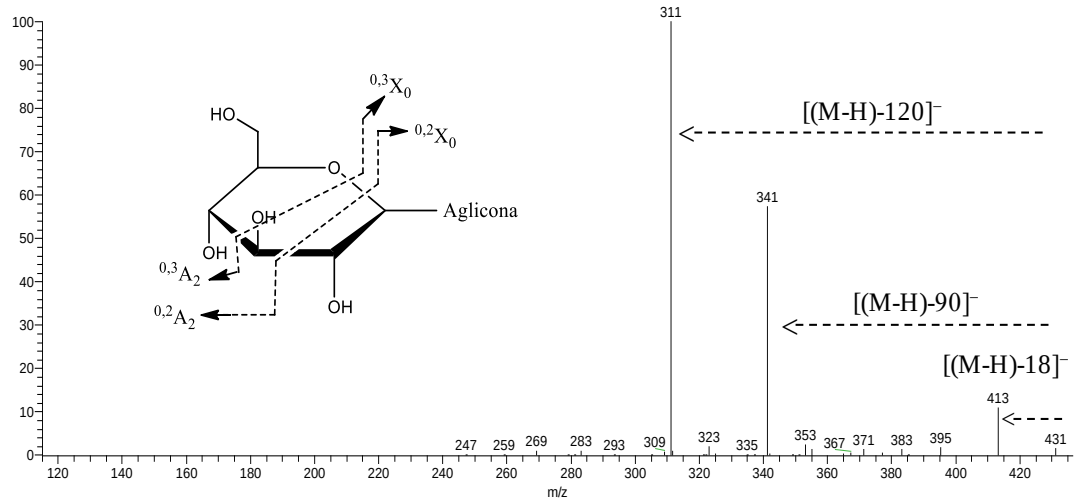


Figura 70: Espectro de MS/MS para FRS-5-F3, com pico base em *m/z* 311.

Nos flavonoides *C*-glicosilados, as principais vias de fragmentação envolvem clivagens cruzadas do anel sacarídeo e a perda de moléculas de água. As principais posições de glicosilação ocorrem nos carbonos C-6 e/ou C-8 do núcleo flavonoide, o que torna a diferenciação entre flavonoides 6-C e 8-C-glicosil um desafio analítico (PEREIRA & VEGA, 2022).

O íon em *m/z* 413 $[(M-H)-18]^-$ observado no espectro de MS/MS é significativamente mais intenso para flavonoides 6-C-glicosilados do que para 8-C-glicosilados, uma vez que pode formar dois isômeros. Essa eliminação de água ocorre entre o grupo 2"-hidroxila do açúcar e os grupos 5- ou 7-hidroxila da aglicona, facilitada pela ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio do açúcar e o grupo 5- ou 7-hidroxila da aglicona, o que controla a rotação do resíduo de açúcar (LIN *et al*., 2010) (Figura 71).

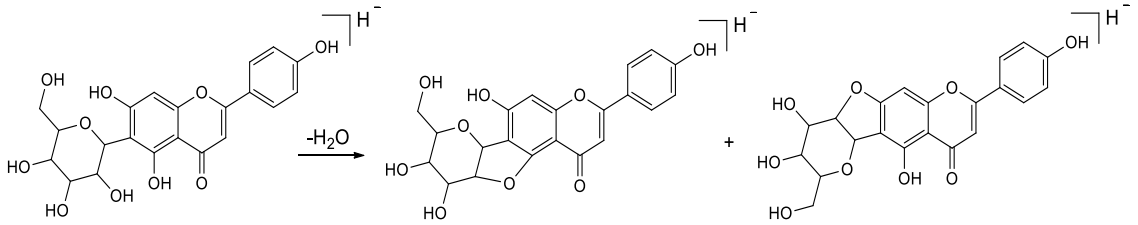


Figura 71: Perda de água observada para os isômeros flavonoides 6-*C*-glicosil.

A massa molecular e o padrão de fragmentação da substância isolada indicam que se trata de uma flavona de núcleo de apigenina *C*-glicosilada na posição C-6.

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 72), foram observados quatro sinais na região aromática: dois simpletos em δ 6,52 (1H) e δ 6,79 (1H), possivelmente correspondentes aos hidrogênios dos anéis A e C; e dois dupletos em δ 6,93 (*J = 8,8* Hz, 2H) e δ 7,04 (*J = 8,8* Hz, 2H), que podem ser atribuídos aos hidrogênios do anel B, caracterizando um sistema aromático para-substituído confirmado pela constante de acoplamento. Na região de carboidratos, também foi identificado um dupleto em δ 4,59 (*J = 10,3* Hz; 1H), referente ao hidrogênio anomérico.

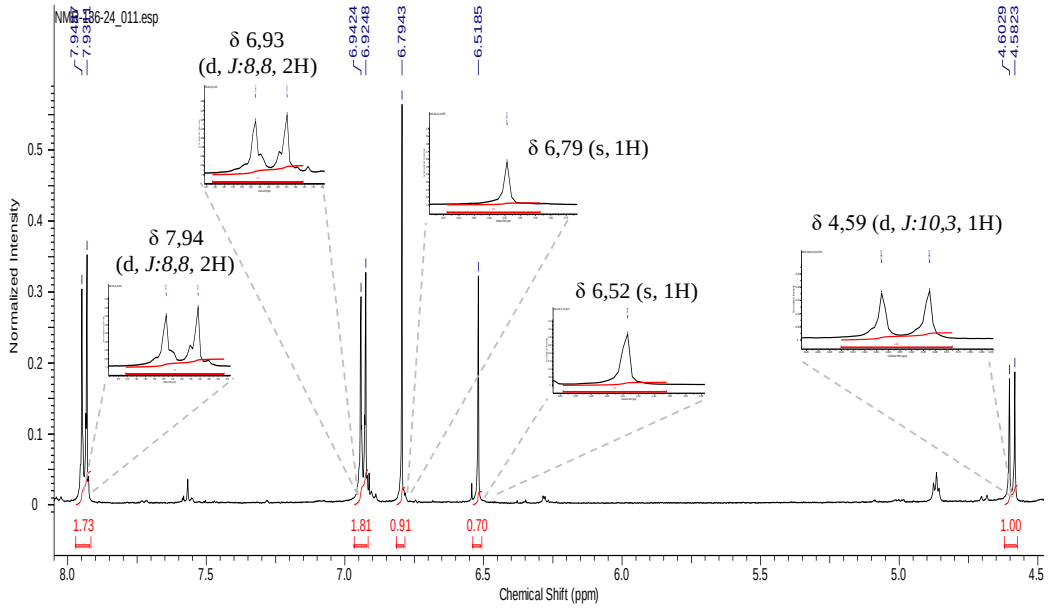


Figura 72: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F3.

A natureza desses hidrogênios foi confirmada por meio do mapa de correlações HSQC (Figura 73). Os simpletos em δ 6,52 (H-8) e δ 6,79 (H-3) mostraram acoplamento com carbonos em δ 94,1 e δ 103,2, respectivamente. Enquanto os dupletos em δ 6,93 (H-3'/H-5') e δ 7,94 (H-2'/H-6') acoplam-se com os carbonos em δ 116,5 e δ 128,9, respectivamente, sendo a equivalência dos hidrogênios atribuída à livre rotação deste anel. Para o hidrogênio anomérico em δ 4,59 (H-1"), observou-se acoplamento com o carbono em δ 73,6, e sua configuração *β* foi determinada pela alta constante de acoplamento (*J = 10,3* Hz), calculada no espectro de RMN de ^{1}H.

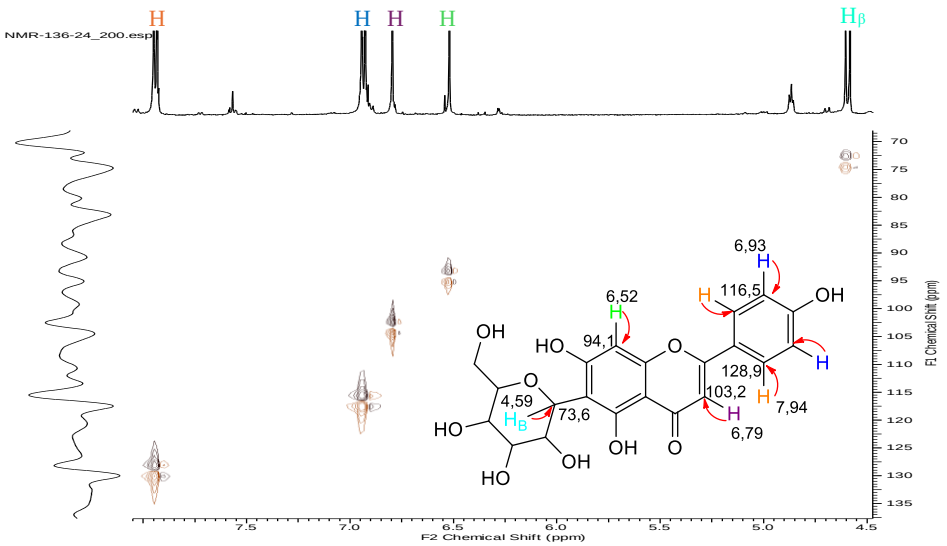


Figura 73: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC para os hidrogênios em δ 4,59, 6,52, 6,79, 6,93, 7,94.

O mapa de correlações HMBC confirmou a posição desses hidrogênios. O simpleto em δ 6,52 correlacionou-se com os carbonos em δ 103,9, 109,4, 156,7, 163,9 e 182,9, o que confirma sua posição no C-8 do anel A. O hidrogênio em δ 6,79 apresentou correlações com os carbonos em δ 103,9, 121,6, 164,1 e 182,9, confirmando ser o hidrogênio olefínico do anel C (Figura 74).

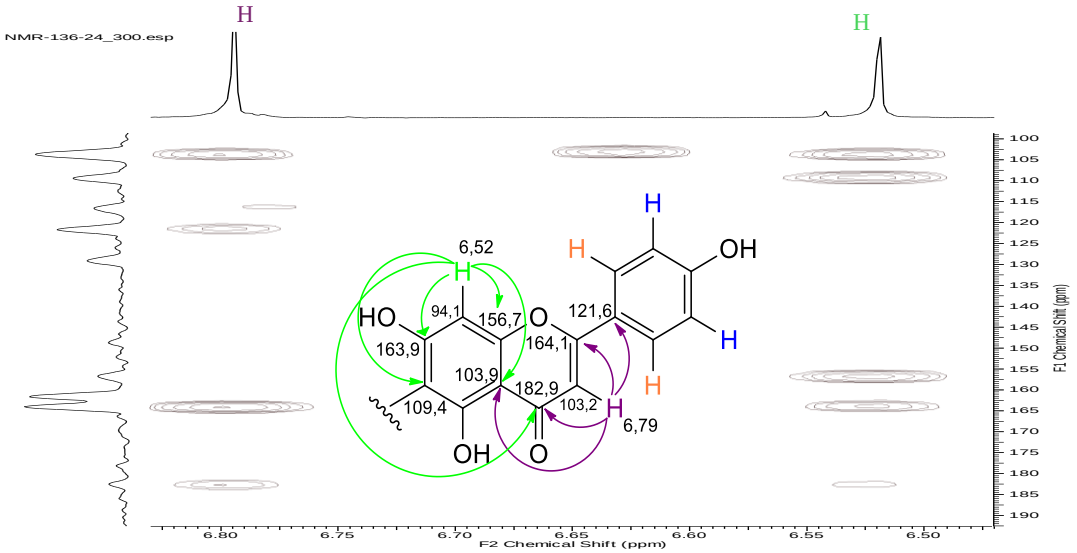


Figura 74: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 6,52 e 6,79.

Além disso, o espectro de HMBC (Figura 75) revelou correlações dos hidrogênios do anel B. Os hidrogênios em δ 6,93 mostraram correlação com os carbonos em δ 116,5,

121,6 e 161,6, enquanto os hidrogênios em δ 7,94 correlacionam-se com os carbonos em δ 128,9, 161,6 e 164,1, confirmando suas posições nos carbonos C-2'/C-6' para os hidrogênios mais desblindados e nos carbonos C-3'/C-5' para os hidrogênios mais blindados. A análise do espectro de COSY confirmou o acoplamento *orto* entre esses hidrogênios (Figura A4).

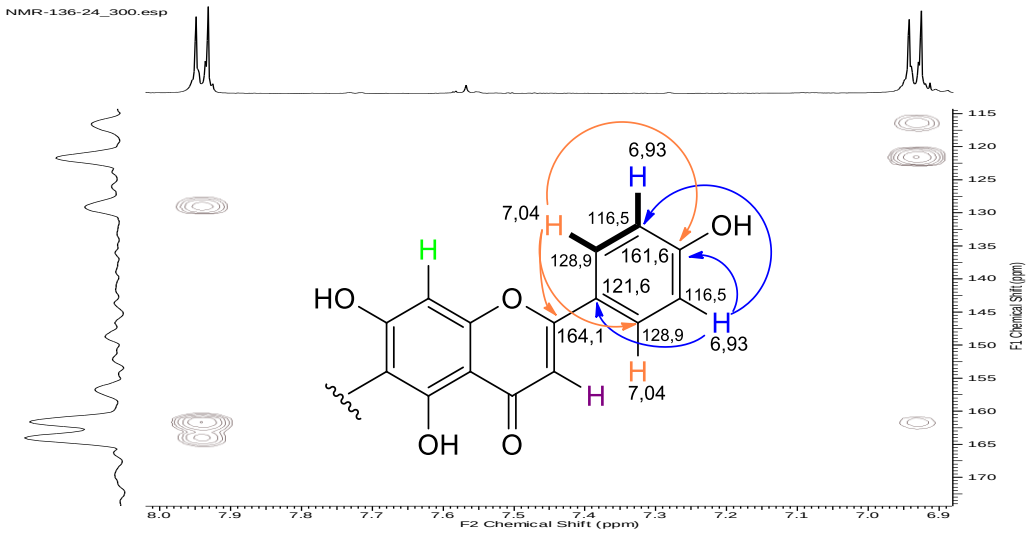


Figura 75: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 6,93 e 7,04.

As correlações heteronucleares observadas no HMBC foram essenciais para a atribuição da unidade de açúcar. As correlações de longa distância do hidrogênio anomérico em δ 4,59 (*J* = *1*0,3 Hz, 1H) com os carbonos em δ 70,6, 79,4, 82,2, 109,3, 161,2 e 163,9 confirmaram que a glicose está ligada ao C-6 do anel A (Figura 76).

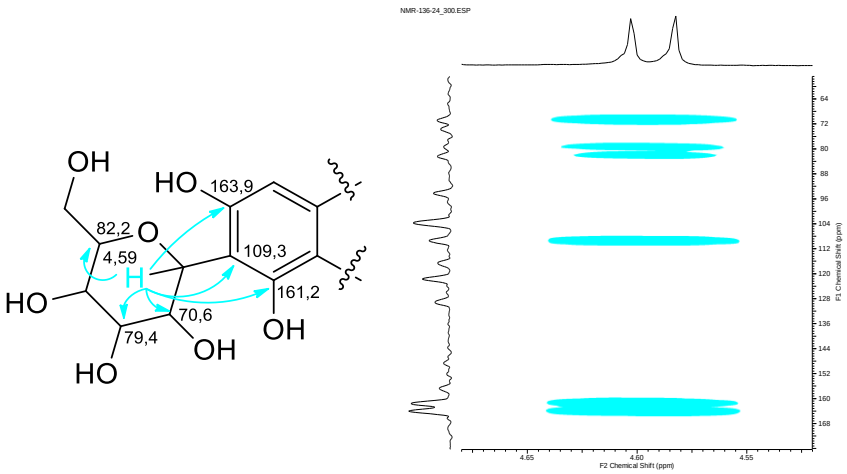


Figura 76: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para o hidrogênio anomérico em δ 4,59.

As correlações observadas estão de acordo com a estrutura proposta pela análise de fragmentação, indicando tratar-se de um derivado da apigenina com um *α*-glicosídeo ligado ao anel A na posição C-6. A substância isolada é um flavonoide da subclasse das flavonas, identificada como isovitexina ou apigenina 6-*C*-glicosídeo (Figura 77) (CHOO *et al*., 2012; ATTIQ *et al*., 2021). Este é o primeiro relato de seu isolamento no gênero *Onychopetalum*, no entanto, a isovitexina já foi identificada nas famílias Annonaceae (SANTOS & SALATINO, 2000), Rosaceae (HE *et al*., 2016), Sapindaceae (KIM *et al*., 2005) e Moraceae (CHOO *et al*., 2012).

Os dados de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da substância, apresentados na Tabela 7, estão em concordância com os descritos na literatura, confirmando o isolamento da isovitexina.

Tabela 7: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F3 e suas correlações no HMBC.

Posição	**δ_C[a]**	**δ_C[b]**	**δ_H** (J Hz)	**HMBC**
1	-	-	-	-
2	164,1	163,3	-	-
3	103,2	102,6	6,79 (s, 1H)	103,9 / 121,6 / 164,1 / 182,9
4	182,9	181,7	-	-
5	161,2	160,6	-	-
6	109,3	108,9	-	-
7	163,9	163,3	-	-
8	94,1	93,7	6,52 (s, 1H)	103,9 / 109,4/ 156,7/ 163,9/ 182,9
9	156,7	156,3	-	-
10	103,9	102,9	-	-
1’	121,6	121,0	-	-
2’	128,9	128,3	7,94 (d, *J: 8,8*, 1H)	128,9 / 161,6 / 164,1
3’	116,5	116,0	6,93 (d, *J: 8,8*, 1H)	116,5 / 121,6 / 161,6
4’	161,6	161,3	-	-
5’	116,5	116,0	6,93 (d, *J: 8,8*, 1H)	116,5 / 121,6 / 161,6
6’	128,9	128,3	7,94 (d, *J: 8,8*, 1H)	128,9 / 161,6 / 164,1
6-*C*-Glucopiranosil				
1’’	73,6	73,1	4,59 (d, *β, J:10,3*, 1H)	163,9/161,2/109,3/82,2/79,4/70,6
2’’	70,6	70,5	4,04 (t, 1H)	73,6 / 79,4
3’’	79,4	78,9	3,20 (m, 1H)	-
4’’	71,1	70,2	3,13 (m, 1H)	79,4 / 82,2
5’’	82,2	81,3	3,17 (m, 1H)	71,1 / 62,1
6’’	62,1	61,3	3,69 / 3,41 (m, 2H)	-

[a]Carbono atribuído com base nos experimentos de HSQC e HMBC; [b] Peng *et al*., 2005 (500MHz, DMSO-d_6).

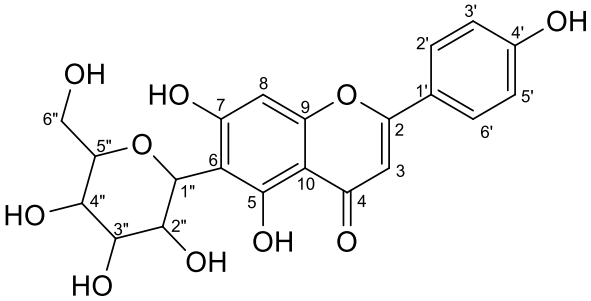


Figura 77: Isovitexina

Strada e colaboradores (2017) realizaram um estudo com onze extratos brutos brasileiros de *Echinodorus scaber* e *E. grandiflorus*, cujos resultados sugerem que a isovitexina, um flavonoide presente consistentemente em todas as amostras, desempenha um papel central na atividade antinociceptiva dessas plantas. Embora o teor dos outros flavonoides *C*-glicosídeos, vitexina, isoorientina e vitexina-2-O-ramnosídeo, varie entre os extratos, a presença constante de isovitexina, em sinergia ou não com outros compostos, indica sua importância como o principal agente responsável pela ação antinociceptiva observada. Dessa forma, a isovitexina é recomendada como um marcador químico confiável para investigar a atividade antinociceptiva dessas espécies, especialmente devido à sua presença em todas as amostras e aos resultados positivos em relação a redução das contorções.

Um estudo publicado por Choo *et al*. (2012) indica que a isovitexina, juntamente com a vitexina, apresenta significativa atividade inibitória da enzima α-glicosidase *in vivo*, auxiliando na redução dos níveis de glicose no sangue após a ingestão de carboidratos. Esse efeito antidiabético reforça o uso tradicional da planta *Ficus deltoidea* para o controle da glicemia em pacientes com diabetes. Além disso, a isovitexina demonstrou segurança em estudos de toxicidade, não apresentando sinais adversos em doses elevadas. Esses resultados destacam a isovitexina como um candidato promissor para o desenvolvimento de terapias alternativas para o controle da diabetes, oferecendo menores efeitos colaterais em comparação com os inibidores sintéticos de α-glicosidase.

5.3.5 Elucidação estrutural da substância FRS-5-F4

A substância codificada como FRS-5-F4 (20,1 mg) apresentou-se como um sólido laranja-amarelo. O espectro de massas apresentou um pico base em *m/z* 609 ([M-H]$^-$) (Figura 78).

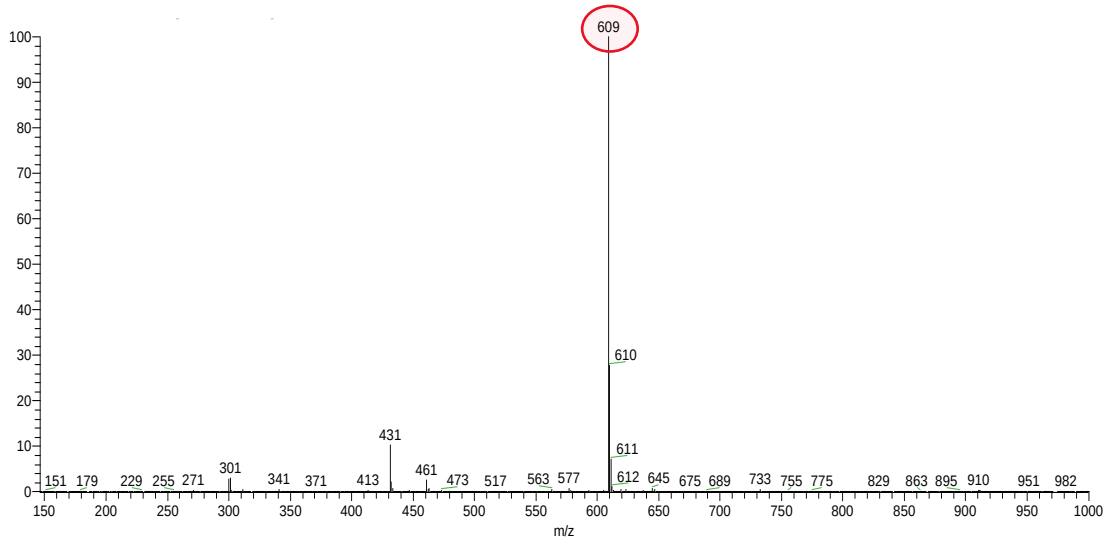


Figura 78: Espectro de massas para a fração FRS-5-F4, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS.

Os dados de MS/MS (Figura 79) revelaram um fragmento iônico em *m/z* 300 [(M-H)-309]$^-$ e outro em *m/z* 301 [(M-H)-308]$^-$ (Y_0^-), este último identificado como o pico base por conta da sua alta intensidade relativa. A presença do íon [M−308−H]$^-$ (Y_0^-) indica a perda de um dissacarídeo com ligação 1→ 6 (rutinosídeo) (KACHLICKI *et al*., 2016; CUYCKENS *et al*., 2001). O íon em *m/z* 301 corresponde à aglicona quercetina. Esses dados sugerem tratar-se, possivelmente, de um flavonoide dissacarídeo contendo ramnose e glicose (rutinosídeo), ligados a aglicona por uma ligação *O*-glicosídica.

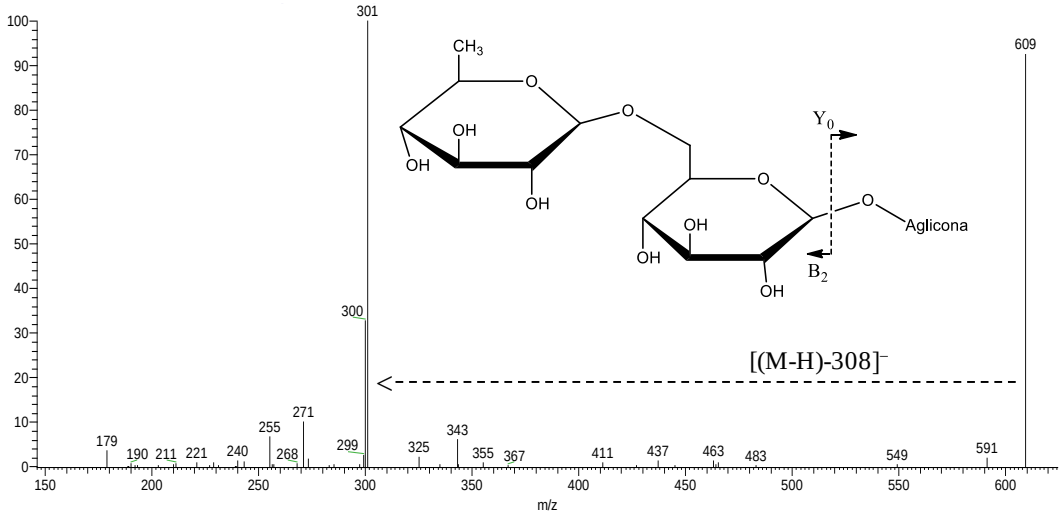


Figura 79: Espectro de MS/MS para FRS-5-F4, com pico base em *m/z* 301.

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 80), foram observados cinco sinais na região aromática, atribuídos aos hidrogênios dos anéis A e B, com os seguintes deslocamentos: δ 6,19 (d, *J = 1,8* Hz, 1H), δ 6,38 (d, *J = 1,8* Hz, 1H), δ 6,84 (d, *J = 8,2* Hz, 1H), δ 7,52 (m, 1H) e δ 7,54 (m, 1H).

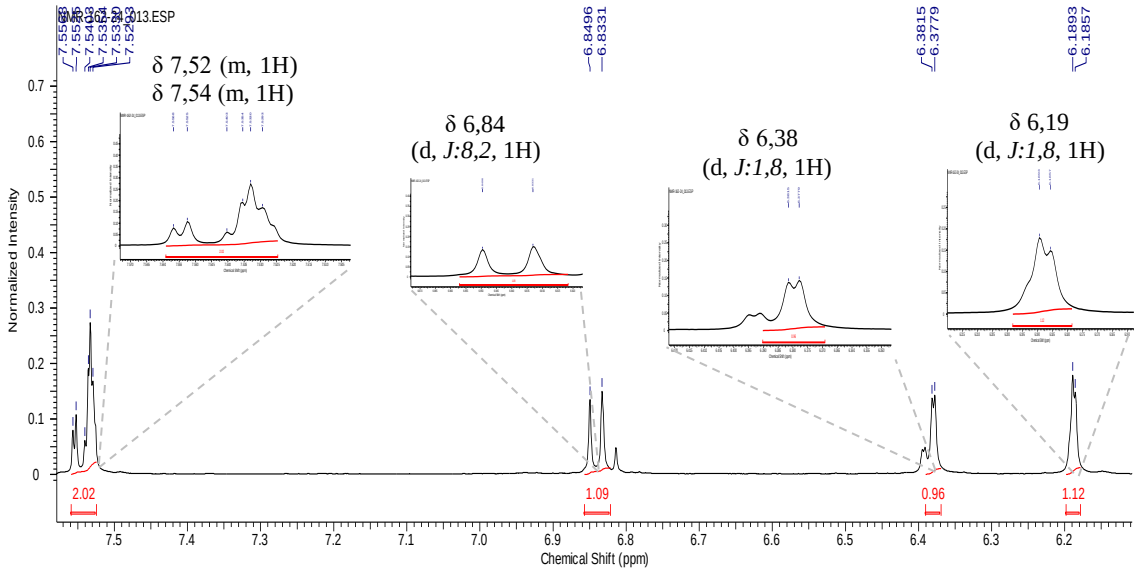


Figura 80: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F4**.**

No mapa de contorno HSQC (Figura 81), os hidrogênios em δ 6,19 (H-6), δ 6,38 (H-8), δ 6,84 (H-3'), δ 7,52 (H-6') e δ 7,54 (H-2') apresentaram correlações com os carbonos nos deslocamentos δ 100,4, δ 95,3, δ 116,8, δ 117,6 e δ 122,9, respectivamente.

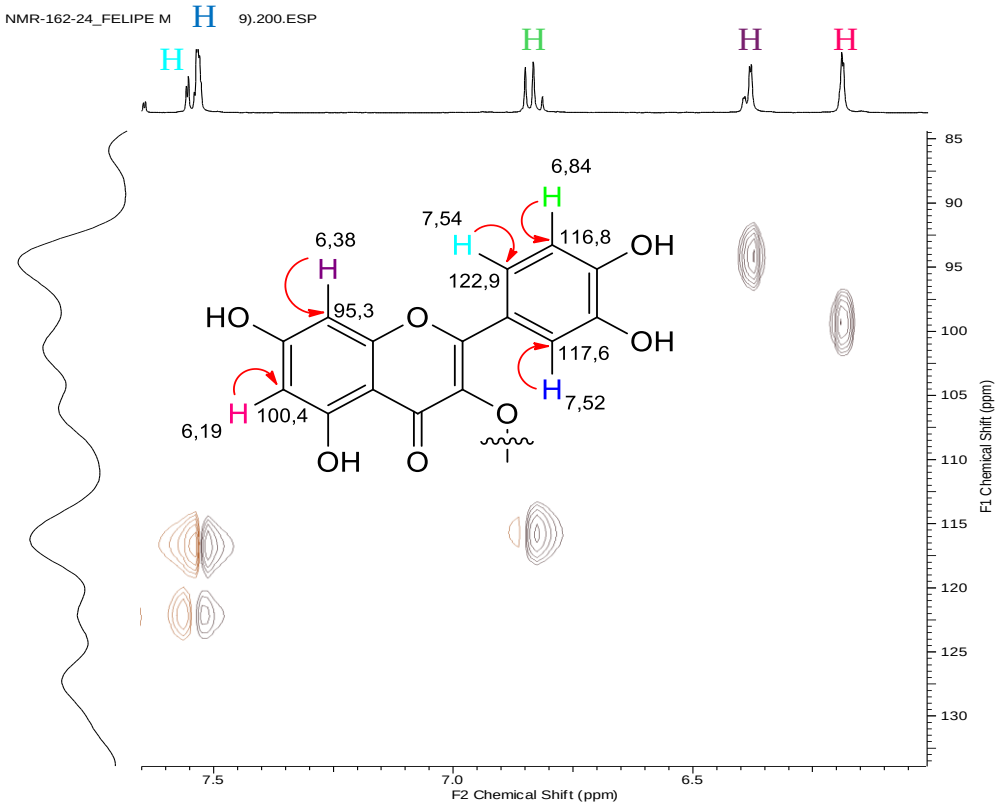


Figura 81: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas no HSQC para os hidrogênios em δ 6,19, 6,38, 6,84, 7,52, 7,54.

A análise do mapa de contorno HMBC (Figura 82) revelou correlações específicas para esses hidrogênios aromáticos. O sinal em δ 6,19 correlacionou-se com os carbonos em δ 95,3, δ 104,4, δ 161,6 e δ 164,9, enquanto o hidrogênio em δ 6,38 apresentou correlações com os carbonos em δ 100,4, δ 104,4, δ 157,0 e δ 164,9, confirmando a posição dos hidrogênios do anel A nos carbonos C-6 e C-8, respectivamente. Para o hidrogênio do anel B em δ 6,84 (d, *J* = *8,2* Hz, 1H), observou-se correlações com os carbonos em δ 121,6, δ 145,4 e δ 148,9, confirmando sua posição no carbono C-3'. O acoplamento *orto* desse hidrogênio foi confirmado pelo espectro de COSY (Figura A5).

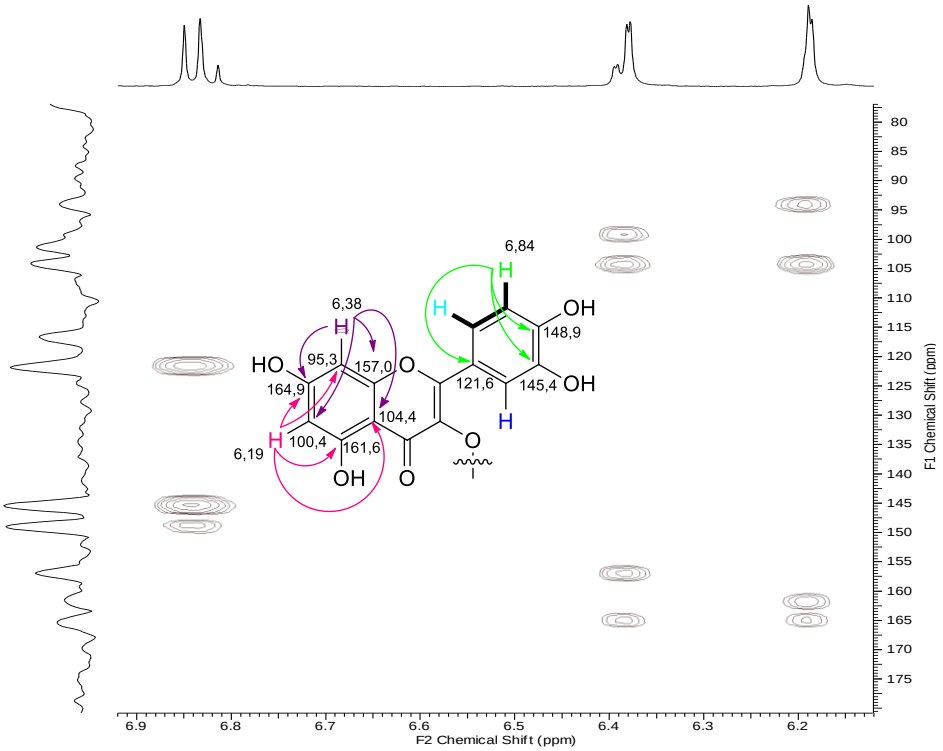


Figura 82: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 6,19, 6,38 e 6,84.

Os hidrogênios nas posições C-2’ e C-6’ do anel B apresentaram deslocamentos químicos muito próximos, com sinais sobrepostos. No mapa de contorno HMBC (Figura 83), foram observadas correlações do hidrogênio em δ 7,52 com os carbonos em δ 121,6, δ 145,4, δ 148,9 e δ 157,1, enquanto o hidrogênio em δ 7,54 apresentou correlações com os carbonos em δ 116,8, δ 148,9 e δ 157,1, confirmando suas posições

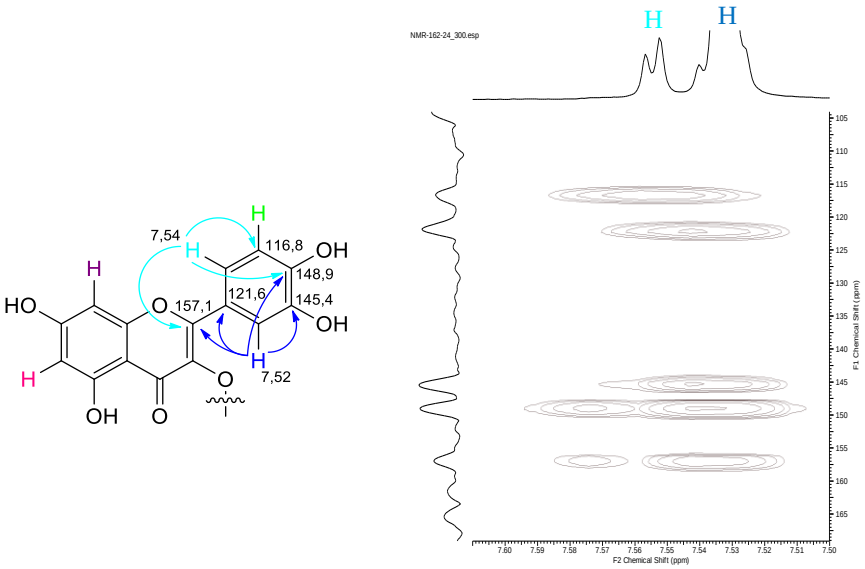


Figura 83: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 7,52 e 7,54.

Os sinais dos hidrogênios do dissacarídeo foram detectados no espectro de RMN de ^{1}H na região entre 3,0 e 5,5 ppm. Os sinais dos hidrogênios anoméricos apareceram em δ 4,39 (d, *J = 1,2* Hz, 1H) e δ 5,34 (d, *J = 7,3* Hz, 1H) (Figura 84). Com base na constante de acoplamento, a configurações destes hidrogênios foram atribuídas como *α* e *β*, respectivamente.

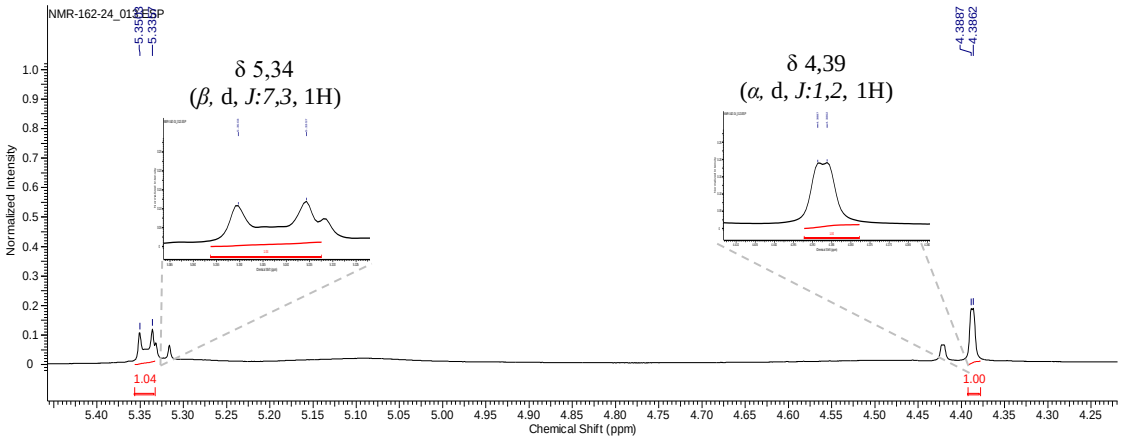


Figura 84: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) dos hidrogênios anoméricos.

Por meio do HSQC e HMBC (Figura 85), foi possível confirmar a posição de cada hidrogênio no dissacarídeo. O hidrogênio em δ 4,39 (H-1”’) mostrou acoplamento com o carbono em δ 101,9 e correlações de longa distância com os carbonos em δ 68,9 e δ 71,1. Já o hidrogênio em δ 5,34 (H-1”) apresentou acoplamento com o carbono em δ 102,9, além de uma correlação de longa distância com o carbono em δ 134,0.

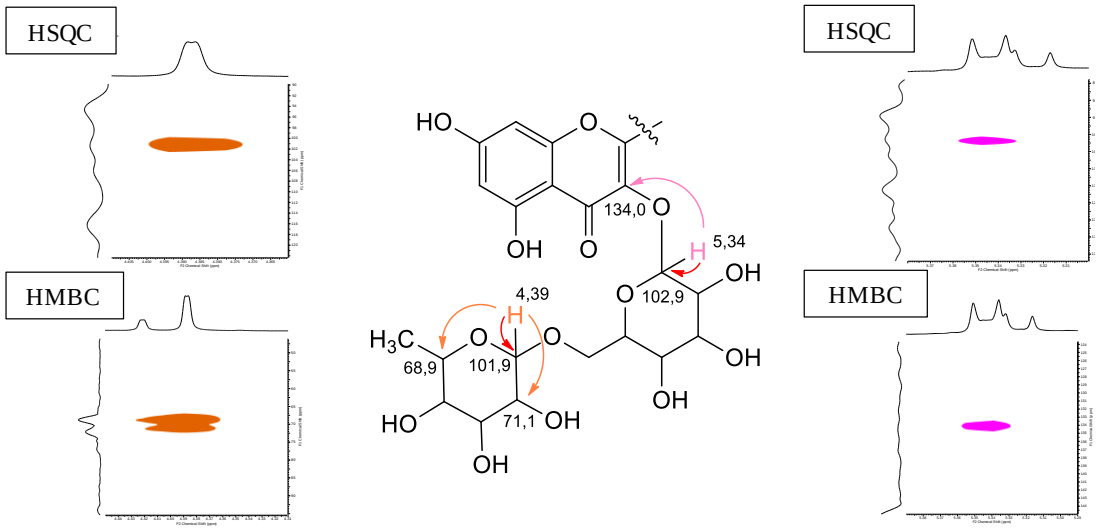


Figura 85: Principais correlações observadas no mapa de correlações HSQC e HMBC para os hidrogênios anoméricos**.**

A metila da ramnose foi observada no espectro de RMN de ^{1}H (Figura 86) como um sinal em δ 1,01 (d, *J* = *6,1* Hz, 3H). No espectro de HSQC (Figura 86A), esse sinal mostrou acoplamento com o carbono em δ 18,6 ppm, e sua posição foi confirmada por correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 86B) com os carbonos em δ 68,9 e δ 72,3.

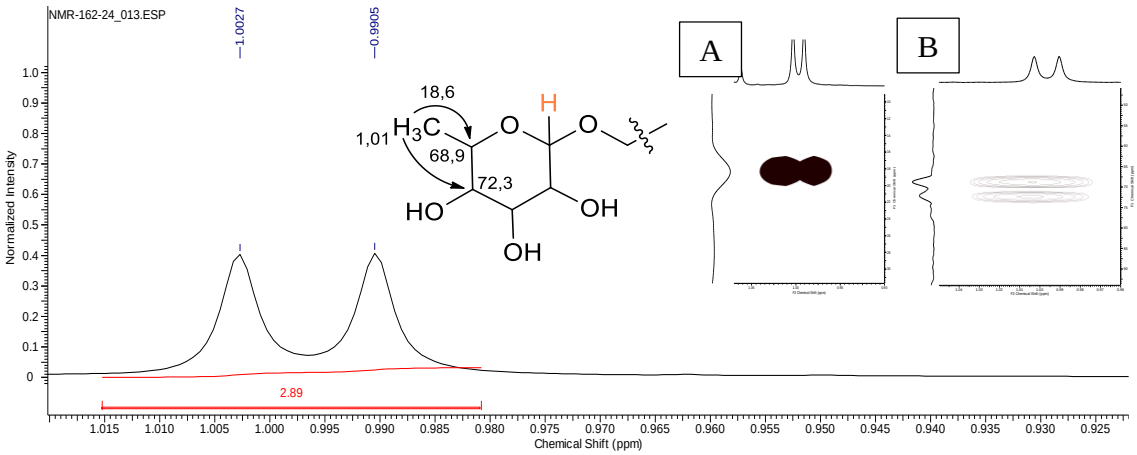


Figura 86: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para os hidrogênios em δ 1,01 ppm e seus mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B).

Todos os dados de RMN de ^{1}H estão listados na Tabela 8 e mostram concordância com os dados descritos na literatura, confirmando o isolamento de um flavonoide da subclasse dos flavonóis, identificado como quercetina 3-*O*-rutinosídeo, também conhecida como rutina (Figura 87). Essa substância já foi relatada na literatura para a família Annonaceae (CARVALHO *et al*., 2022; ARRUDA *et al*., 2023; RANGEL *et al*., 2024), entretanto, este é o primeiro registro de sua presença no gênero *Onychopetalum*.

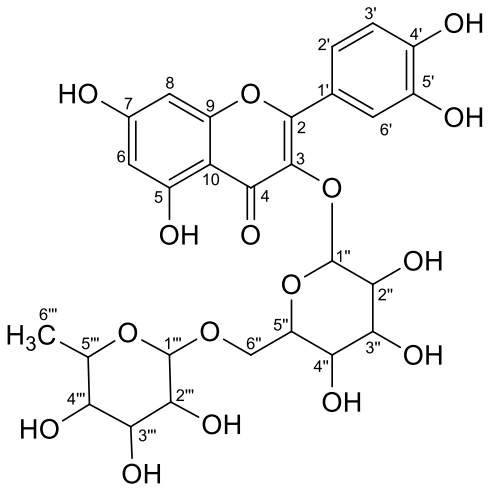


Figura 87: Quercetina 3-*O*-rutinosídeo

Tabela 8: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F4 e suas correlações no HMBC.

Posição	δ_C [a]	δ_C [b]	δ_H (J Hz)	HMBC
1	-	-	-	-
2	157,1	156,5	-	-
3	134,0	133,2	-	-
4	177,9	177,3	-	-
5	161,6	161,2	-	-
6	100,4	98,7	6,19 (d, *J:1,8*, 1H)	95,3/ 104,4/ 161,6/ 164,9
7	164,9	164,5	-	-
8	95,3	93,6	6,38 (d, *J:1,8*, 1H)	100,4/ 104,4/ 157,0/ 164,9
9	157,0	156,4	-	-
10	104,4	103,7	-	-
1’	121,6	121,5	-	-
2’	122,9	116,2	7,54 (m, 1H)	116,8/ 148,9/ 157,1
3’	116,8	115,2	6,84 (d, *J: 8,2*, 1H)	121,6/ 145,4/ 148,9
4’	148,9	148,5	-	-
5’	145,4	145,7	-	-
6’	117,6	121,0	7,52 (m, 1H)	121,6/ 145,4/ 148,9/ 157,1
3-*O*-Glucopiranosil				
1’’	102,9	101,2	5,33 (d*; β, J:7,3*, 1H)	134,0
2’’	69,2	75,8	3,21 (t, 1H)	-
3’’	76,8	74,0	3,22 (m, 1H)	-
4’’	67,8	69,9	3,71 (m, 1H)	-
5’’	71,4	76,4	3,58 (m, 1H)	-
6’’	67,5	66,9	3,71 (m, 2H)	-
6”-*O*- Ramnopiranosil				-
1’’’	101,9	100,7	4,39 (d, *α, J:1,2*, 1H)	71,1/ 68,9
2’’’	71,1	70,5	3,41 (m, 1H)	-
3’’’	72,3	70,3	3,01 (m, 1H)	-
4’’’	73,8	71,8	3,51 (m, 1H)	-
5’’’	68,9	68,2	3,30 (m, 1H)	-
6’’’	18,6	17,6	1,01 (d, *J:6,1*, 3H)	68,9/ 72,3

[a]Carbono atribuído com base nos experimentos de HSQC e HMBC; [b] Moura *et al*., 2011 (125 MHz, DMSO-d_6).

Enogieru e colaboradores (2018) reuniram o conhecimento atual sobre os mecanismos neuroprotetores da rutina em vários modelos experimentais de doenças neurodegenerativas (NDs), destacando seu potencial em condições como Alzheimer, Parkinson e outras doenças associadas ao estresse oxidativo. Observou-se que a rutina pode reduzir citocinas pró-inflamatórias, aumentar a atividade de enzimas antioxidantes e oferecer proteção contra danos oxidativos, um fator crucial na progressão dessas enfermidades. Segundo os autores, esses resultados sugerem que a rutina é um composto neuroprotetor promissor para o tratamento de NDs.

5.3.6 Elucidação estrutural da substância FRS-5-F5

A substância codificada como FRS-5-F5 (3,8 mg) apresentou-se como um sólido de coloração amarelo-alaranjado. No espectro de massas em modo negativo, observou-se um pico base em *m/z* 461 ($[M-H]^-$) (Figura 88).

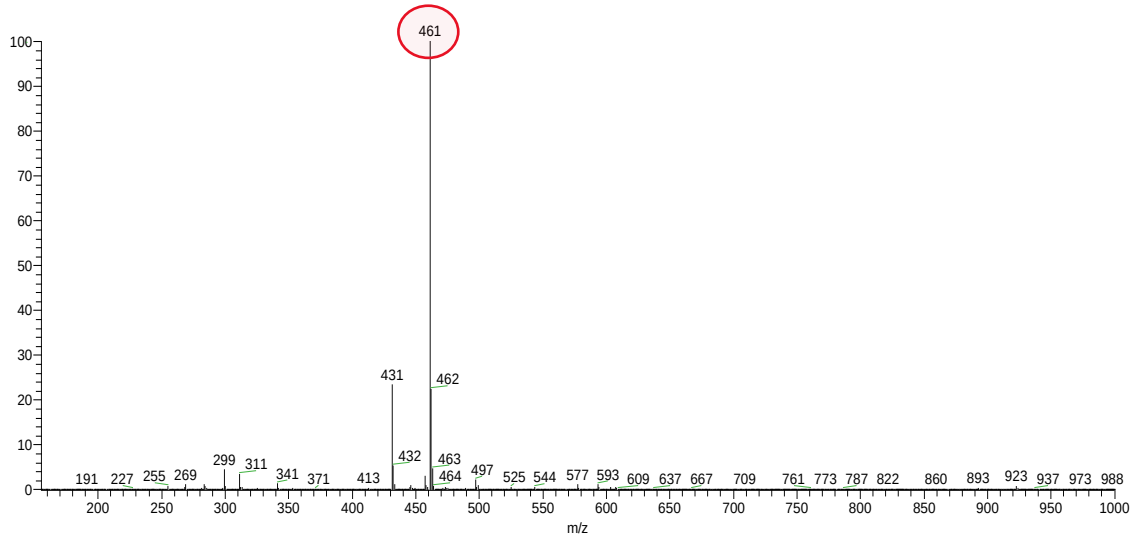


Figura 88: Espectro de massas para a fração FRS-5-F5, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS.

Os dados de MS/MS (Figura 89) revelaram um fragmento iônico em *m/z* 446 $[(M-H)-15]^-$, sugerindo a presença de pelo menos um grupo metoxila, e um fragmento em *m/z* 299 $[(M-H)-162]^-$ (Y_0^-), caracterizado como o pico base devido à sua alta intensidade relativa. A presença do íon Y_0^- indica que a unidade de açúcar está ligada a um grupo

hidroxila da aglicona, caracterizando a substância como um flavonoide *O*-glicosilado (KACHLICKI *et al*., 2016; CUYCKENS *et al*., 2001). O fragmento correspondente à aglicona luteolina foi observado em *m/z* 285.

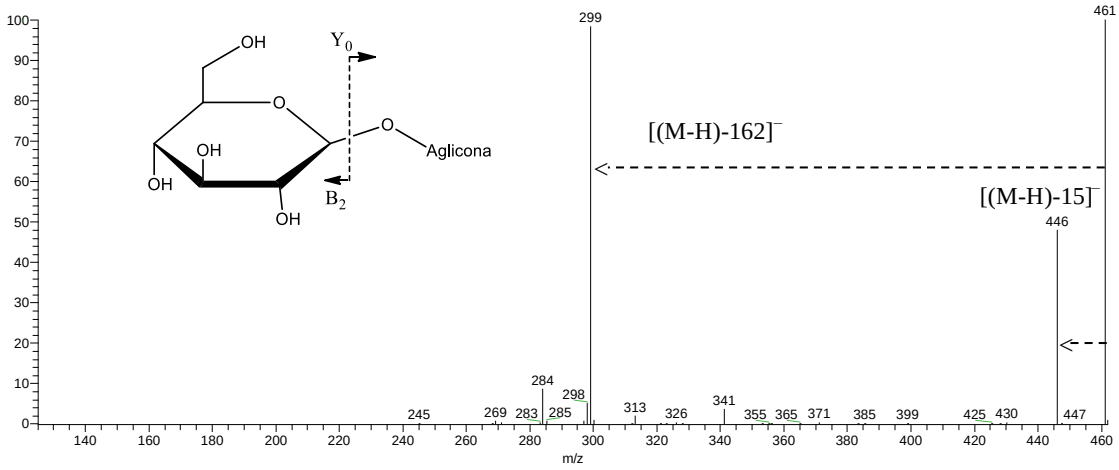


Figura 89: Espectro de MS/MS para FRS-5-F5, com pico base em *m/z* 299.

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 90) apresentou seis hidrogênios ligados a carbonos aromáticos na faixa de δ 6,40 a 7,70 ppm. O simpleto em δ 6,99 é característico do H-3 de flavona, enquanto os dois dupletos em δ 6,46 (*J* = *2,2* Hz, 1H) e δ 6,88 (*J* = *2,2* Hz, 1H) são típicos do anel A de flavonas com substituições em C-5 e C-7. Os sinais em δ 6,95 (d, *J* = *8,1* Hz, 1H), δ 7,60 (s, 1H) e δ 7,61 (m, 1H) indicaram a presença de um anel B de flavonoide com padrão de substituição AMX. O acoplamento *orto* entre os hidrogênios em δ 6,95 e δ 7,61 foi confirmado pelo espectro de COSY (Figura A6).

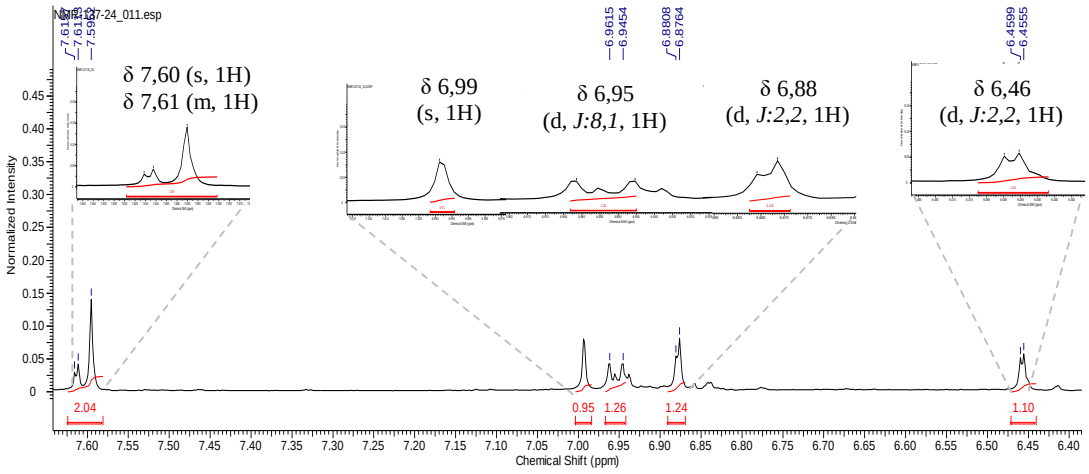


Figura 90: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, 25 °C) da FRS-5-F5.

A natureza desses hidrogênios foi confirmada pelo espectro de HSQC (Figura 91), onde os hidrogênios em δ 6,46 (H-6), δ 6,88 (H-8), δ 6,95 (H-3’), δ 6,99 (H-3), δ 7,60 (H-6’) e δ 7,61 (H-2’) apresentaram acoplamento com os carbonos em δ 100,1, δ 95,5, δ 116,6, δ 104,6, δ 110,9 e δ 121,8, respectivamente.

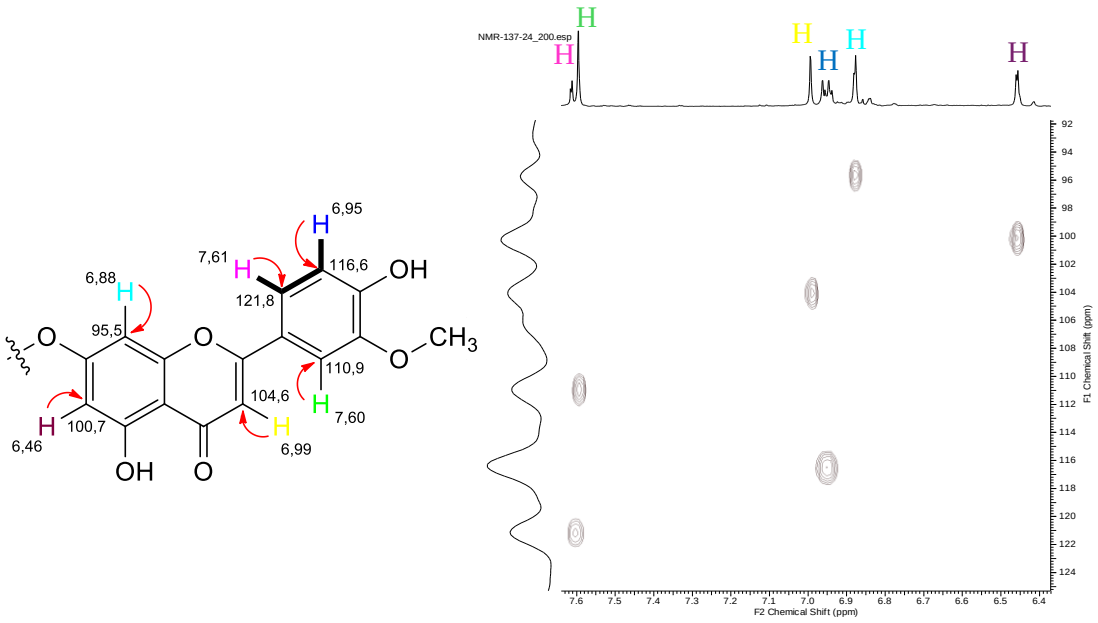


Figura 91: Mapa de contorno HSQC para os hidrogênios aromáticos da FRS-5-F5.

As posições dos hidrogênios aromáticos foram confirmadas com base nas correlações de longa distância observadas no espectro de HMBC (Figura 92). O hidrogênio em δ 6,46 apresentou correlações com os carbonos em δ 95,5, 105,8, 161,6 e 163,5, enquanto o hidrogênio em δ 6,88 correlacionou-se com os carbonos em δ 100,1, 105,8, 157,6 e 163,5, confirmando que ambos pertencem ao anel A. O simpleto em δ 6,99 apresentou correlações de longa distância com os carbonos em δ 105,8, 121,9, 164,7 e 182,6, confirmando sua atribuição como o hidrogênio olefínico do anel C. O dupleto em δ 6,95 correlacionou-se a longa distância com os carbonos em δ 121,9 e 148,6, confirmando sua posição em C-3’. O hidrogênio em δ 7,60 mostrou correlações com os carbonos em δ 121,8, 148,6, 151,5 e 164,7, enquanto o hidrogênio em δ 7,61 se correlacionou com os carbonos em δ 110,9, 151,5 e 164,7, confirmando suas posições em C-6’ e C-2’ do anel B, respectivamente.

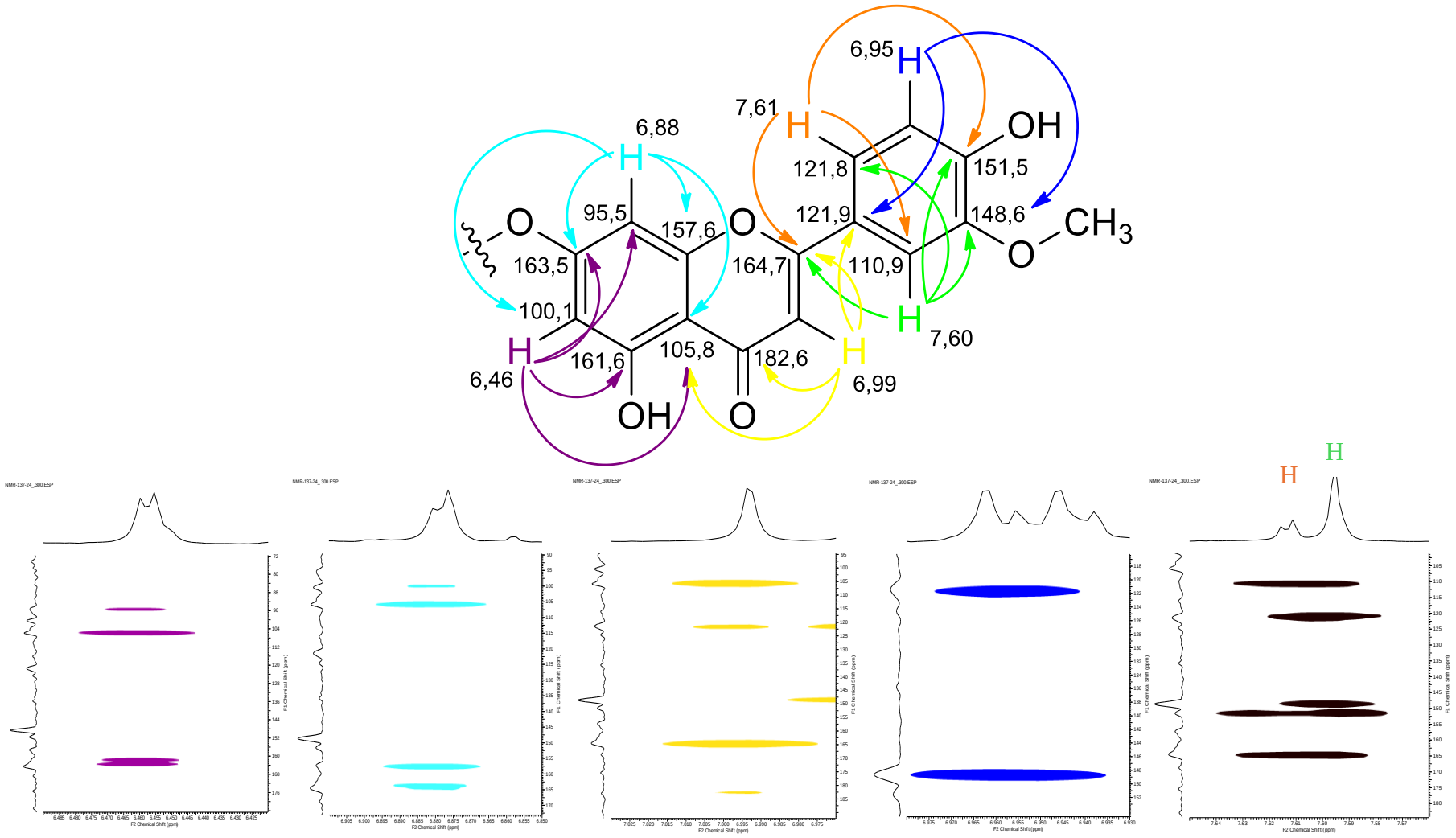


Figura 92: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios aromáticos.

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 93), observa-se um dupleto em δ 5,06 (H-1”, 1H), característico de hidrogênio anomérico de glicosídeo. A configuração *β* foi atribuída a esse hidrogênio com base em sua alta constante de acoplamento (*J* = *7,3* Hz). A natureza desse hidrogênio foi confirmada no espectro de HSQC (Figura 93A), onde ele apresentou acoplamento com o carbono em δ 100,6. A posição da unidade de açúcar foi determinada por meio do espectro de correlação HMBC (Figura 93B), no qual o hidrogênio anomérico mostrou correlação com o carbono em δ 163,5.

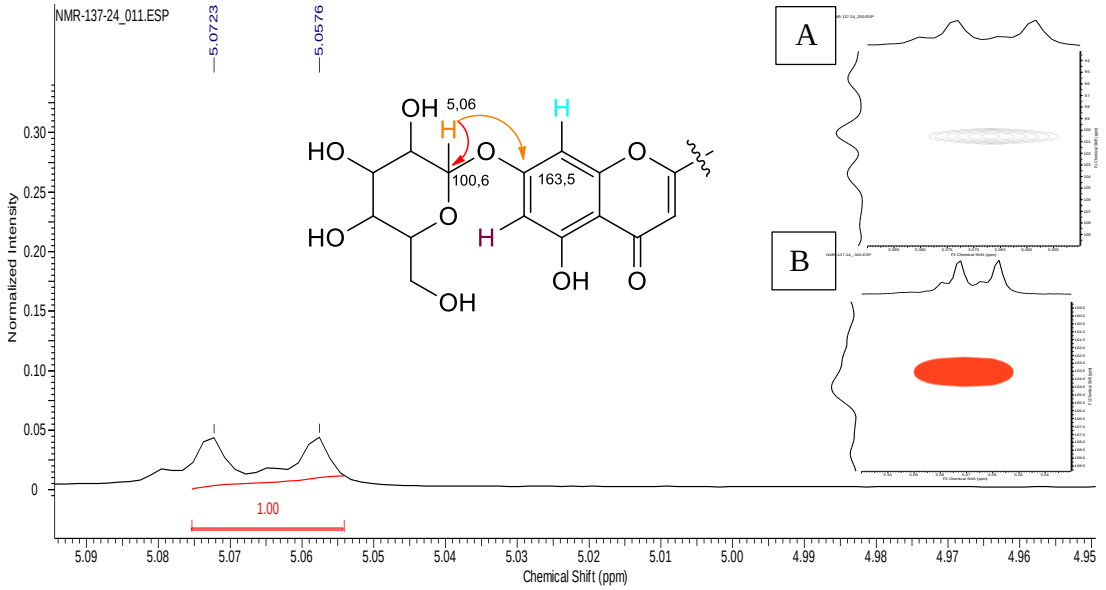


Figura 93: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para o hidrogênio em δ 5,06 e seu acoplamento visto no HSQC com o carbono em δ 100,6 (A) e sua correlação no HMBC com o carbono em δ 163,5 (B).

Além disso, o espectro de RMN de ^{1}H (Figura 94) exibiu um simpleto em δ 3,90 (H-5’, 3H), correspondente a um grupo metoxila. A presença desse grupo foi confirmada no espectro de HMBC, onde mostrou acoplamento com o carbono em δ 56,5 (Figura 94A). A posição da metoxila foi determinada a partir das correlações observadas no HMBC com o carbono em δ 148,6 (Figura 94B).

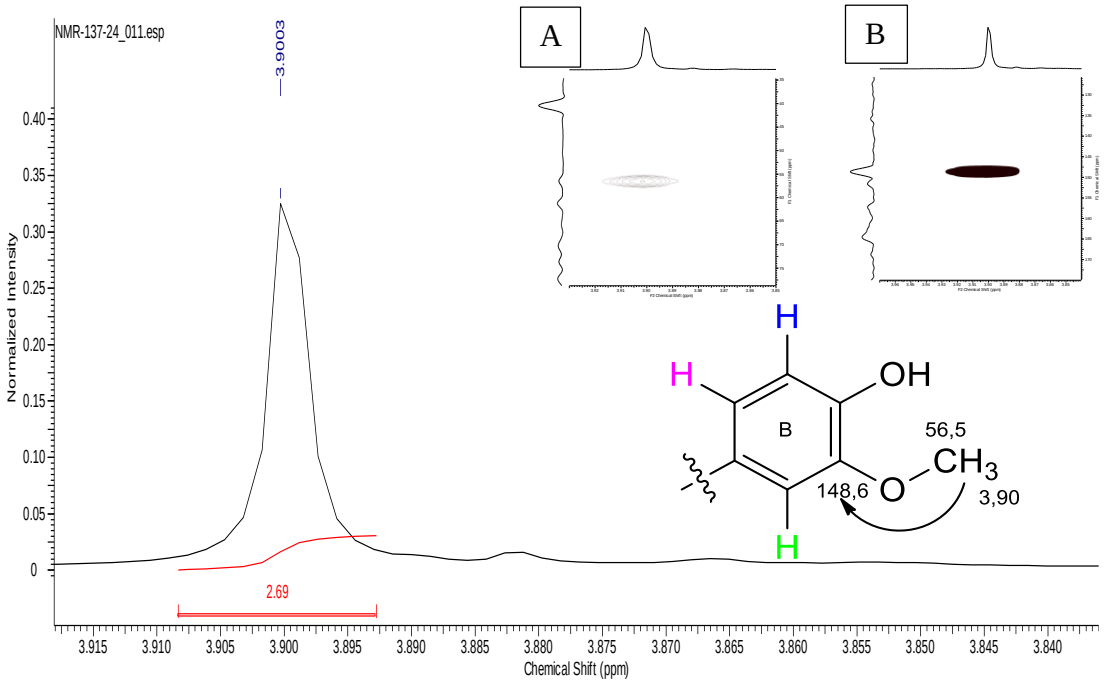


Figura 94: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para o hidrogênio em δ 3,90 e seu acoplamento visto no HSQC com o carbono em δ 56,5 (A) e sua correlação no HMBC com o carbono em δ 148,6 (B).

Todos os dados de RMN de ^{1}H estão apresentados na Tabela 9 e estão em concordância com as informações descritas na literatura, confirmando o isolamento da flavona crisoeriol 7-*O*-glicosídeo (Figura 95). Esta substância já foi relatada em famílias como Fabaceae (BARREIROS, 2000), Anacardiaceae (SHRESTHA *et al*., 2012), Araceae (AFIFI & ABU-DAHAB, 2012) Salicaceae (HAN *et al*., 2003), Melanthiaceae (HANAWA *et al*., 1992), Lamiaceae (DALL'ACQUA *et al*., 2017; DELAZAR *et al*., 2008; SAHPAZ *et al*., 2002), Dioscoreaceae (MA *et al*., 2005), no entanto, este é o primeiro registro para o gênero *Onychopetalum.*

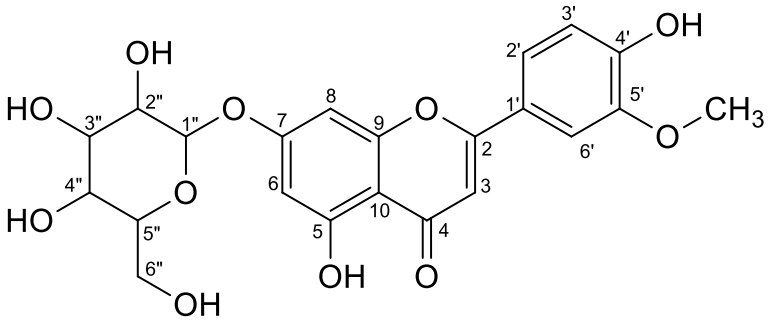


Figura 95: Crisoeriol 7-*O*-glicosídeo

Tabela 9: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F5 e suas correlações no HMBC.

Posição	δ_C[a]	δ_C[b]	δ_H (J Hz)	HMBC
1	-	-	-	-
2	164,7	164,7	-	-
3	104,6	104,0	6,99 (s, 1H)	105,8 /121,9 /164,7 /182,6
4	182,6	182,6	-	-
5	161,6	162,3	-	-
6	100,1	100,5	6,46 (d, *J:1,8*, 1H)	95,5/ 105,8/ 161,6/ 163,5
7	163,5	163,8	-	-
8	95,5	95,3	6,88 (d, *J:1,8*, 1H)	100,1/ 105,8/ 157,6/ 163,5
9	157,6	157,7	-	-
10	105,8	106,4	-	-
1’	121,9	121,2	-	-
2’	121,8	110,2	7,61 (m, 1H)	110,9 / 151,5 / 164,7
3’	116,6	116,8	6,95 (d, *J: 8,2*, 1H)	121,9 / 148,6
4’	151,5	152,4	-	-
5’	148,6	148,8	-	-
6’	110,9	122,1	7,60 (m, 1H)	121,8/ 148,6 / 151,5 / 164,7
7-*O*-Glucopiranosil				
1’’	100,6	101,6	5,06 (d; *β, J:7,3*, 1H)	163,5
2’’	73,6	74,6	3,27 (m, 1H)	76,8 / 100,6
3’’	77,6	78,2	3,45 (m, 1H)	-
4’’	76,8	70,9	3,31 (m, 1H)	-
5’’	70,1	78,97	3,20 (m, 1H)	-
6’’	61,1	62,1	3,46 / 3,71 (m, 2H)	-
OCH_3	56,5	56,4	3,90 (s, 3H)	148,6

[a]Carbono atribuído com base nos experimentos de HSQC e HMBC; [b] SHRESTHA *et al*., 2012 (100MHz, pyridine-d_5).

No estudo de Afifi & Abu-Dahab (2012), o composto crisoeriol-7-*O*-glicosídeo foi isolado das partes aéreas floridas da planta *Eminium spiculatum* e submetido a diferentes testes biológicos. O composto não apresentou atividade antibacteriana significativa contra as cepas testadas, o que foi atribuído, em parte, à ausência de um grupo hidroxila livre na posição C-3 do anel flavonoide, considerado essencial para essa ação. Em relação à atividade antiplaquetária, em ensaio pontual com concentração de 0,037 mg/mL, inibiu a agregação induzida por ADP em 63,8% e por colágeno em 39,5%, indicando efeito moderado nesse processo. No teste de citotoxicidade, o crisoeriol-7-*O*-glicosídeo demonstrou atividade antiproliferativa moderada contra células de câncer de mama, com valores de IC_{50} de 77,86 µg/mL (~168,5 µmol/L) para a linhagem MCF-7 e

67,61 µg/mL (~146,3 µmol/L) para T47D. Embora sua potência seja inferior à de compostos como luteolina ou drogas de referência como doxorrubicina, os resultados indicaram um potencial biológico relevante.

5.3.7 Elucidação estrutural da substância FRS-8-F3

A substância codificada como FRS-8-F3 (7,9 mg) apresentou-se como um sólido amarelo. No espectro de massas no modo negativo observou-se um pico base em *m/z* 431 ($[M-H]^-$), indicando ser um isômero da molécula Isovitexina (FRS-5-F3) (Figura 96).

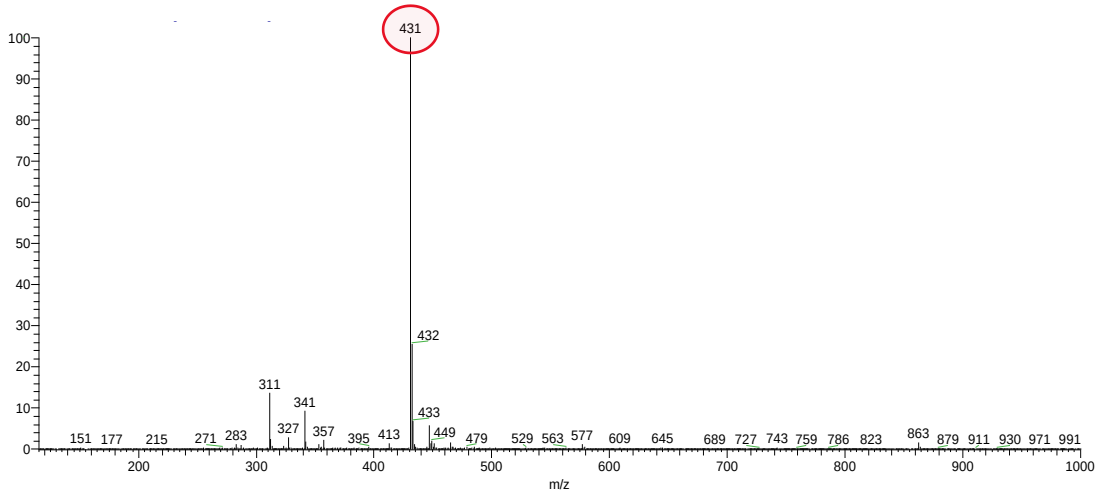


Figura 96: Espectro de massas para a fração FRS-8-F3, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS.

Por se tratar de um isômero da molécula FRS-5-F3, a análise de fragmentação revelou os mesmos sinais em *m/z* 341 $[(M-H)-90]^-$ ($^{0,3}X_0^-$) e 311 $[(M-H)-120]^-$ ($^{0,2}X_0^-$) (Figura 97) indicando a presença de um monossacarídeo devido às perdas de resíduos de glicose. O íon em *m/z* 311 ($^{0,2}X_0^-$) foi identificado como o pico base devido à sua alta intensidade relativa. O fragmento correspondente à aglicona apigenina foi observado em *m/z* 269.

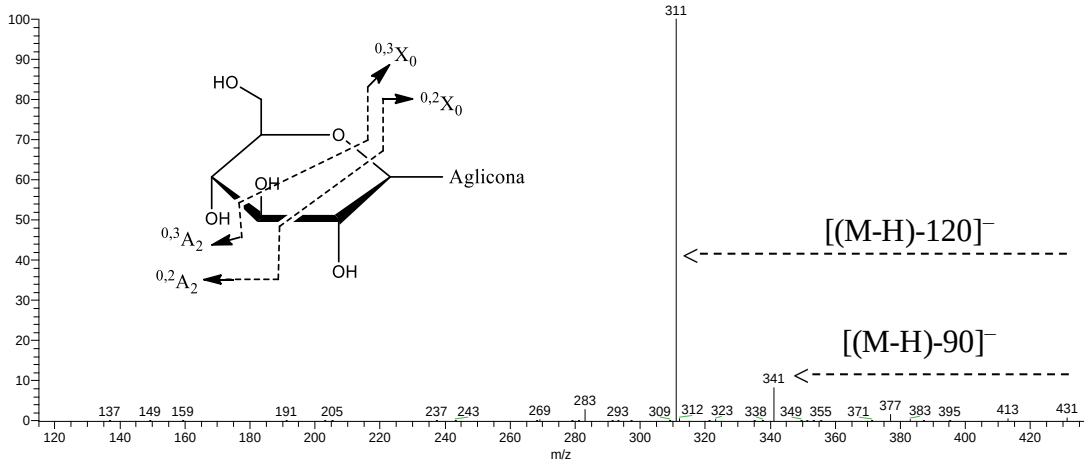


Figura 97: Espectro de MS/MS para FRS-8-F3.

Devido à baixa intensidade do íon fragmento em *m/z* 413 $[(M-H)-18]^-$, associada à perda de uma molécula de água, é provável que a unidade de açúcar esteja ligada à posição C-8 da aglicona (Figura 98) (LIN *et al*., 2010). Esses dados sugerem, portanto, que se trata possivelmente de outro flavonoide com núcleo apigenina do tipo *C*-glicosilado.

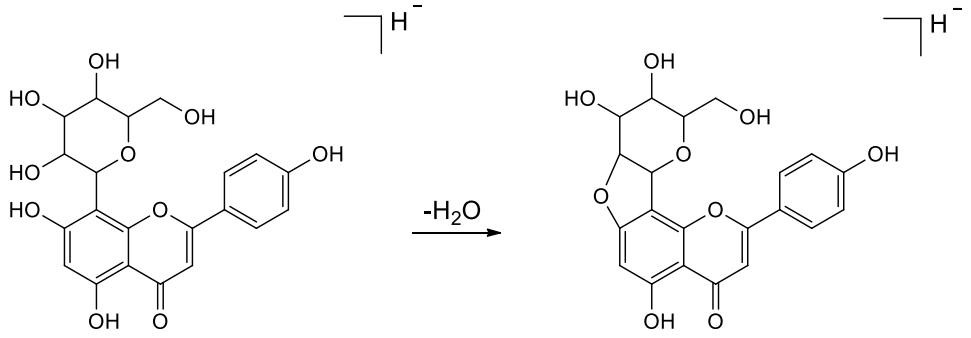


Figura 98: Perda de água observada para o flavonoide 8-*C*-glicosil.

Foram observados quatro sinais na região aromática no espectro de RMN de ^{1}H (Figura 99). Dois dupletos com deslocamento químico em δ 6,90 (*J = 8,1* Hz, 2H) e δ 8,03 (*J = 8,1* Hz, 2H) foram atribuídos aos hidrogênios do anel B em um sistema aromático para-substituído do tipo A_2B_2, com acoplamento *orto*, como indicado pela constante de acoplamento e confirmado pelo espectro COSY (Figura A7). Os outros dois sinais, ambos simpletos em δ 6,26 (1H) e δ 6,78 (1H), foram atribuídos aos hidrogênios

dos anéis A e C. Além disso, o espectro de RMN de ^{1}H apresentou um sinal em δ 4,71 (d, 1H) associado ao hidrogênio anomérico. Devido à sua alta constante de acoplamento (*J* = *8,8* Hz), a configuração deste hidrogênio foi definida como *β*.

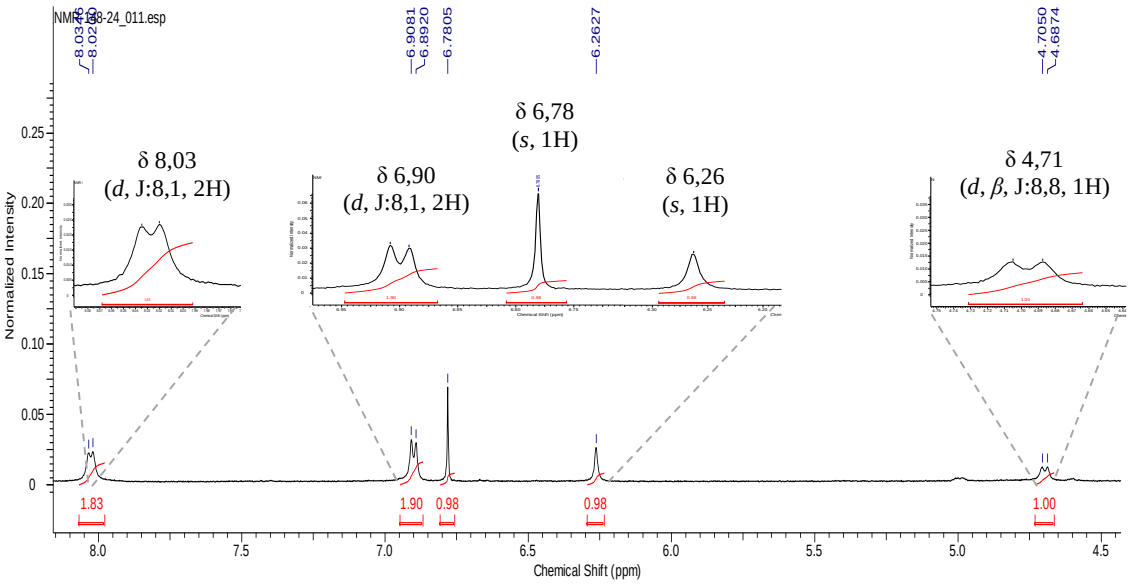


Figura 99: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da região aromática da FRS-8-F3.

Os dados de HSQC (Figura 100) permitiram confirmar a natureza dos hidrogênios aromáticos e do hidrogênio anomérico. Os dupletos em δ 6,90 (H-3'/H-5') e δ 8,03 (H-2'/H-6') apresentaram acoplamento com os carbonos em δ 116,4 e δ 129,4, respectivamente, enquanto os simpletos em δ 6,26 (H-6) e δ 6,78 (H-8) acoplaram-se com os carbonos em δ 98,9 e δ 102,7. O dupleto em δ 4,71 (H-1"), referente ao hidrogênio anomérico, apresentou acoplamento com o carbono em δ 73,8. Essas atribuições foram apoiadas pelas correlações de longa distância no espectro HMBC (Figura 100), como a correlação do hidrogênio em δ 6,78 com os carbonos em δ 104,5, δ 122,3, δ 164,4 e δ 182,7. Além disso, os dupletos em δ 6,90 e δ 8,03 mostraram correlações com os carbonos em δ 122,3 e δ 161,5, respectivamente.

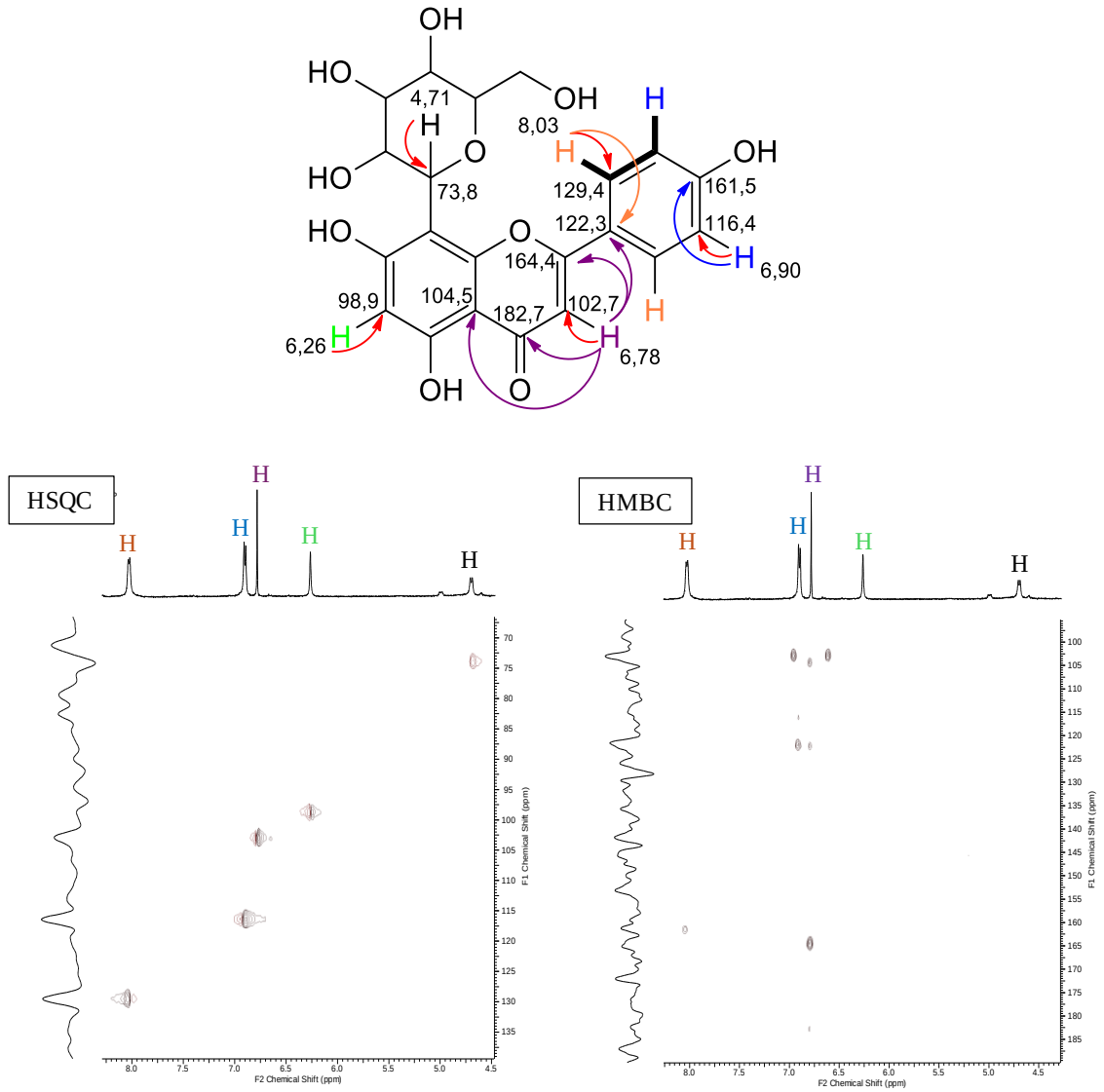


Figura 100: Mapa de contorno HSQC e HMBC dos hidrogênios aromáticos e anomérico da FRS-8-F3**.**

Todos os dados de RMN de ^{1}H estão listados na Tabela 10 e estão de acordo com as informações descritas na literatura, confirmando o isolamento de mais uma flavona derivada da apigenina, a apigenina 8-*C*-glicosídeo, também conhecida como vitexina (Figura 101). Esta molécula já foi relatada em diversas famílias, como Annonaceae (SANTOS & SALATINO, 2000), Acanthaceae (GAYATHRI *et al*., 2023), Rosaceae (HE *et al*., 2016) e Moraceae (CHOO *et al*., 2012). No entanto, este é o primeiro registro da presença da vitexina no gênero *Onychopetalum*.

Tabela 10: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-8-F3 e suas correlações no HMBC.

Posição	δ_C[a]	δ_C[b]	δ_H (J Hz)	HMBC
1	-	-	-	-
2	164,4	164,1	-	-
3	102,7	102,6	6,78 (s, 1H)	104,59 / 122,3/ 164,4 / 182,7
4	182,7	182,3	-	-
5	-	160,6	-	-
6	98,9	98,5	6,26 (s, 1H)	-
7	-	161,4	-	-
8	-	105,9	-	-
9	-	156,9	-	-
10	104,5	105,9	-	-
1’	122,3	121,8	-	-
2’	129,4	129,2	8,03 (d, *J:8,1*, 1H)	122,3
3’	116,4	116,1	6,90 (d, *J: 8,1*, 1H)	161,5
4’	161,5	161,4	-	-
5’	116,4	116,1	6,90 (d, *J: 8,1*, 1H)	161,5
6’	129,4	129,2	8,03 (d, *J:8,1*, 1H)	122,3
8-*C*-Glucopiranosil				
1’’	73,8	78,9	4,71 (d; *β, J:8,8*, 1H)	-
2’’	71,5	73,6	3,85 (t, 1H)	-
3’’	71,0	71,7	3,37 (m, 1H)	-
4’’	79,4	71,1	3,29 (m, 1H)	-
5’’	82,2	82,0	3,24 (m, 1H)	-
6’’	61,9	61,5	3,53 / 3,77 (m, 2H)	-

[a]Carbono atribuído com base nos experimentos de HSQC e HMBC; [b] ATTIQ *et al*., 2021 (150 MHz; DMSO-d_6).

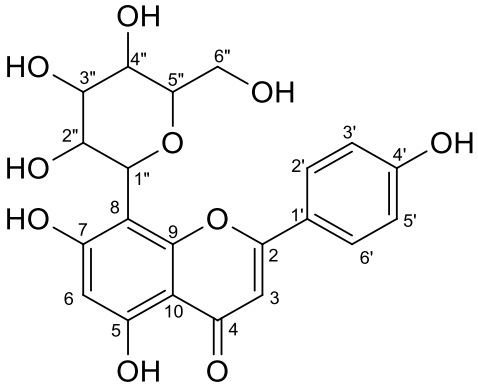


Figura 101: Vitexina

Kim e colaboradores (2005) publicaram um estudo sobre os efeitos antioxidantes da vitexina extraída de *Acer palmatum* e concluíram que essa substância apresenta potente atividade antioxidante, atuando como sequestradora de radicais livres e inibidora de espécies reativas de oxigênio (ROS). A vitexina demonstrou efetividade na redução de radicais superóxido e 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), bem como na proteção de

fibroblastos dérmicos humanos expostos à radiação UVB, reduzindo a produção intracelular de ROS. Com base nesses resultados, os autores sugerem que a vitexina pode ser utilizada como agente fotoprotetor para prevenir danos cutâneos induzidos por UV, como a formação de radicais livres e lesões nas células da pele.

Um estudo publicado por Gayathri *et al*. (2023) revela que a vitexina, extraída das folhas da planta *Acanthus ilicifolius L.*, demonstra um potencial significativo como agente antidiabético. A pesquisa demonstrou que a vitexina promove a translocação da proteína transportadora de glicose tipo 4 (GLUT-4) e aumenta a expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR-γ) em modelos de ratos diabéticos. Além disso, a vitexina reduziu de forma significativa os níveis de glicose no sangue e normalizou diversos parâmetros bioquímicos. Com base nesses resultados, os autores sugerem que a vitexina pode ser uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento do diabetes tipo II, especialmente por sua capacidade de regular a glicemia sem os efeitos colaterais frequentemente associados aos medicamentos sintéticos disponíveis.

5.3.8 Elucidação estrutural da substância FRS-11-F2

A substância codificada como FRS-11-F2 (7,8 mg) apresentou-se como um sólido vermelho. No espectro de massas, observou-se um pico base em *m/z* 477 ([M-H]$^-$) (Figura 102).

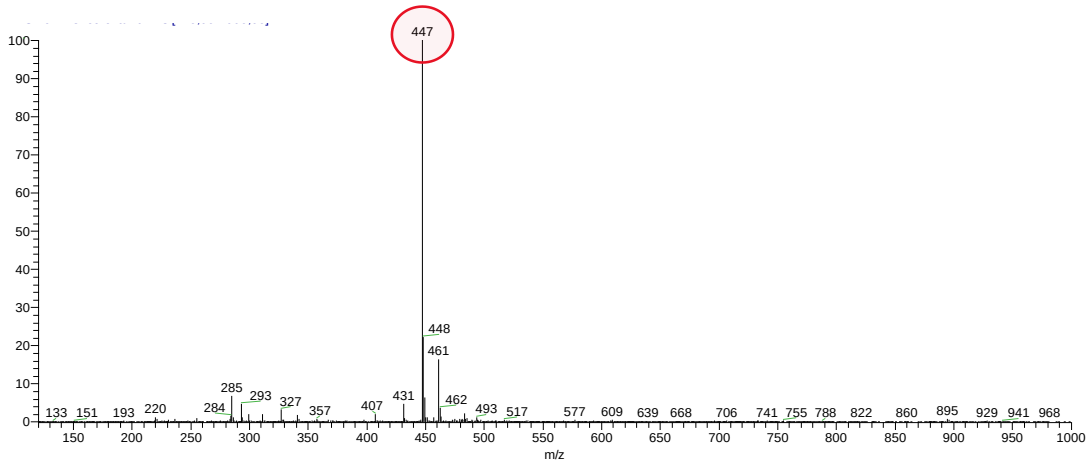


Figura 102: Espectro de massas para FRS-11-F2, valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS.

Os dados de MS/MS (Figura 103) revelaram um sinal de fragmento iônico em *m/z* 285 $[(M-H)-162]^-$ (Y_0^-), com alta intensidade relativa, representando o pico base e indicando a perda de uma unidade de açúcar (glicose). Esse íon também corresponde ao fragmento da aglicona luteolina, sugerindo um padrão de fragmentação característico de flavonoides *O*-glicosilados (FENG *et al.*, 2017; KARAR & KUHNERT, 2015; PEREIRA & VEGA, 2022). Assim, acredita-se que a substância FRS-11-F2 seja um flavonoide *O*-glicosilado derivado da luteolina.

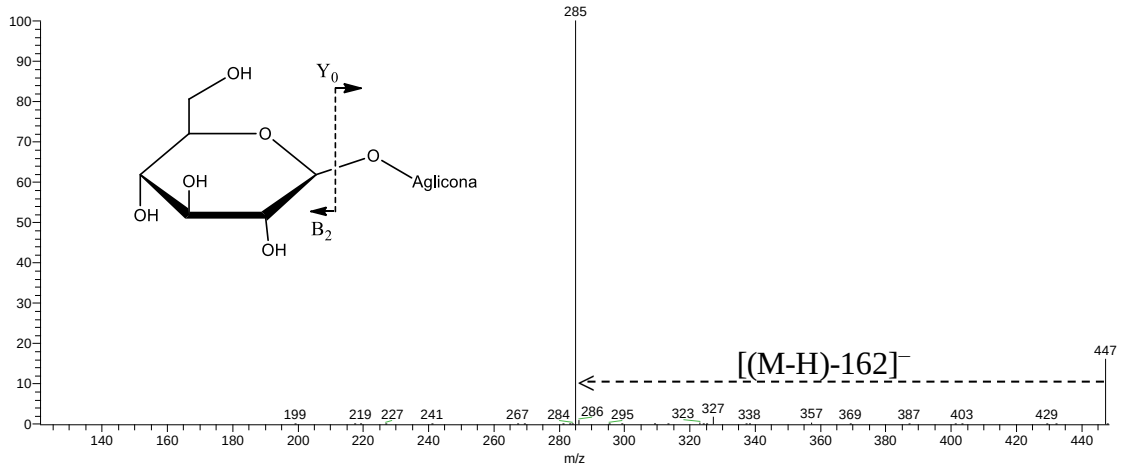


Figura 103: Espectro de massas para a fração FRS-11-F2, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS.

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 104), foram observados seis sinais na região aromática, integrados para seis hidrogênios, o que reforça a possibilidade de tratar-se de um derivado da luteolina. Destaca-se um simpleto em δ 6,75 (1H), possivelmente referente ao próton olefínico do anel C. Os dupletos em δ 6,45 (1H) e 6,80 (1H) com constante de acoplamento *J = 2,2* Hz são atribuídos ao anel aromático tetra-substituído (anel A). Adicionalmente, foram observados três sinais em δ 6,90 (d, *J = 8,4* Hz, 1H), δ 7,42 (s, 1H) e δ 7,45 (dd, *J = 8,4* e *1,8* Hz, 1H), característicos do anel B trissubstituído. O acoplamento *orto* entre os hidrogênios em δ 6,90 e δ 7,45 foi confirmado pelo experimento COSY (Figura A8).

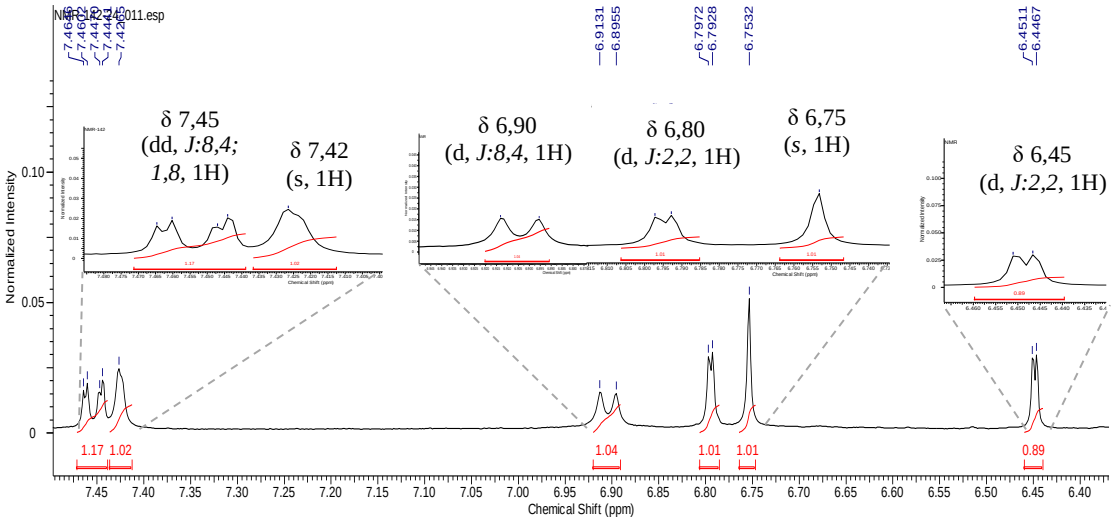


Figura 104: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6, 25 °C) da FRS-11-F2.

Por meio do espectro de HSQC (Figura 105), foi possível confirmar a natureza dos hidrogênios aromáticos. Os hidrogênios com deslocamentos em δ 6,45 (H-6), δ 6,75 (H-3), δ 6,80 (H-8), δ 6,90 (H-3'), δ 7,42 (H-6') e δ 7,45 (H-2') acoplam-se com os carbonos em δ 100,2, δ 103,4, δ 95,1, δ 116,1, δ 114,3 e δ 119,9, respectivamente.

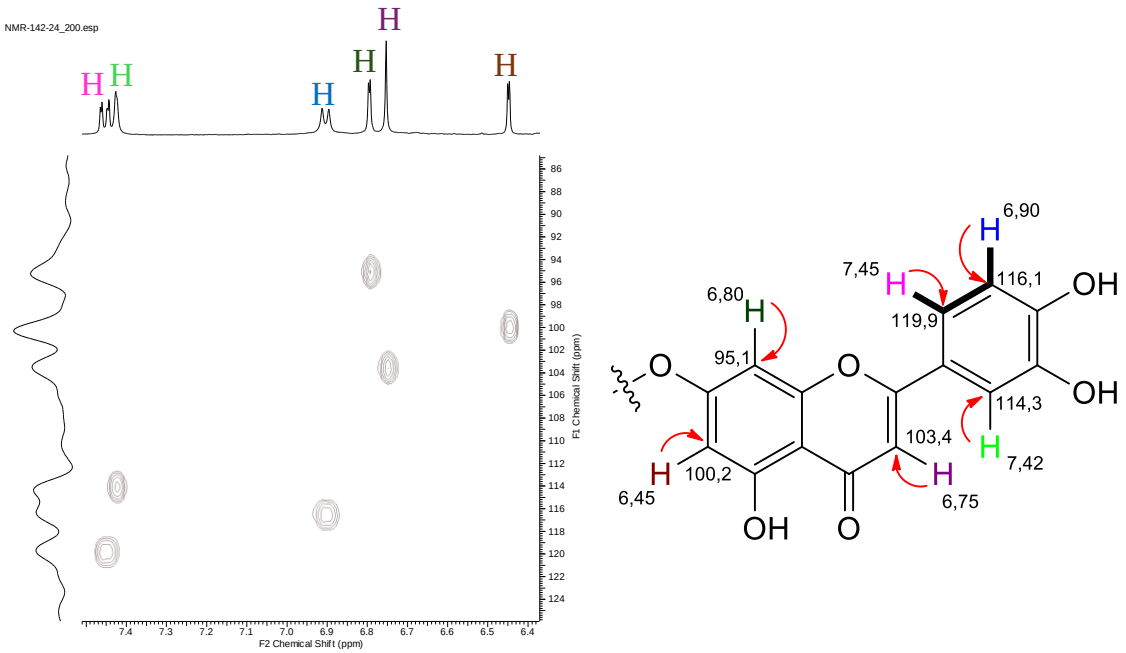


Figura 105: Mapa de contorno HSQC para os hidrogênios aromáticos da FRS-11-F2.

No espectro de HMBC (Figura 106), o hidrogênio em δ 6,45 mostrou correlações com os carbonos em δ 95,1, δ 105,8, δ 161,4 e δ 163,6, enquanto o hidrogênio em δ 6,80

correlacionou-se com os carbonos em δ 100,2, δ 105,8, δ 157,4 e δ 163,6, confirmando as posições dos hidrogênios no anel A. O hidrogênio olefínico em δ 6,75 foi confirmado por correlações com os carbonos em δ 105,8, δ 121,6, δ 164,9 e δ 182,5. O dupleto em δ 6,90 apresentou correlações com os carbonos em δ 121,6 e δ 146,3. O simpleto em δ 7,42 correlacionou-se com os carbonos em δ 119,9, δ 146,3, δ 150,7 e δ 164,9; e o duplo dupleto em δ 7,45 mostrou correlações com os carbonos em δ 114,3, δ 150,7 e δ 164,

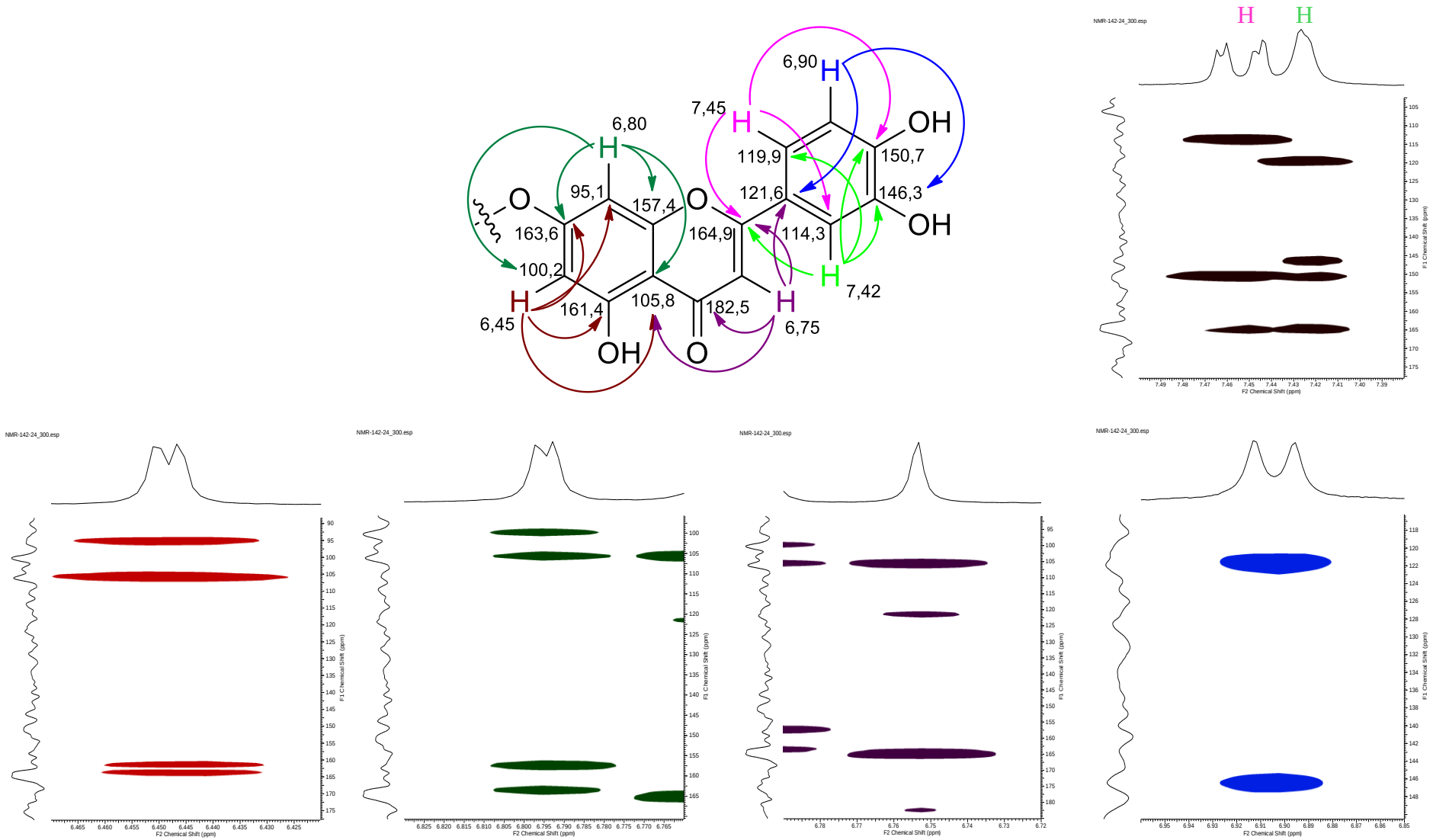


Figura 106: Principais correlações observadas no HMBC para os hidrogênios aromáticos**.**

A presença de sinais na região entre δ_H 3 e 5 ppm no espectro de RMN de ^{1}H (Figura 107) sugere a presença de uma unidade de açúcar, o que é corroborado pela observação de um dupleto em δ 5,08 (1H), atribuído ao hidrogênio anomérico do açúcar. No espectro de HSQC (Figura 107A), foi possível identificar o acoplamento desse hidrogênio com o carbono em δ 100,2. A posição do açúcar foi determinada a partir da correlação de longa distância com o carbono em δ 163,6, observada no espectro de HMBC (Figura 107B). A configuração do hidrogênio anomérico foi determinada como *β*, com base na alta constante de acoplamento (*J* = *7,3* Hz).

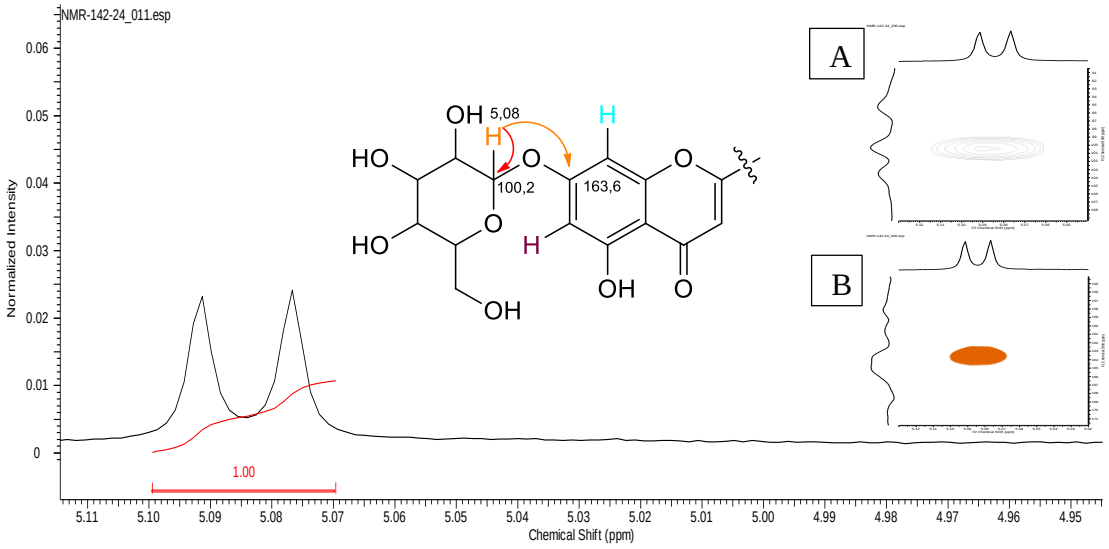


Figura 107: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) para o hidrogênio em δ 5,08 e seu acoplamento visto no HSQC com o carbono em δ 100,2 (A) e sua correlação no HMBC com o carbono em δ 163,6 (B).

Todos os dados de RMN de ^{1}H estão listados na Tabela 11 e estão em conformidade com as informações descritas na literatura, corroborando o isolamento da luteolina 7-*O*-glicosídeo (Figura 108). Embora já tenha sido relatada na família Annonaceae (SANTOS & SALATINO, 2000), esta é a primeira ocorrência registrada no gênero *Onychopetalum*.

Tabela 11: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-11-F2 e suas correlações no HMBC.

Posição	δ_C[a]	δ_C[b]	δ_H (J Hz)	HMBC
1	-	-	-	-
2	164,9	164,6	-	-
3	103,4	103,3	6,75 (s, 1H)	105,8 / 121,6 / 164,9 / 182,5
4	182,5	182,1	-	-
5	161,4	161,2	-	-
6	100,2	99,7	6,45 (d, *J:2,2*, 1H)	95,1/ 105,8/ 161,4/ 163,6
7	163,6	163,1	-	-
8	95,1	94,9	6,80 (d, *J:2,2*, 1H)	100,2/ 105,8/ 157,4/ 163,6
9	157,4	157,1	-	-
10	105,8	105,5	-	-
1’	121,6	121,5	-	-
2’	119,9	119,4	7,45 (dd, *J:8,4: 1,8* 1H)	114,3/ 150,7/ 164,9
3’	116,1	116,1	6,90 (d, *J: 8,4*, 1H)	121,6/ 146,3
4’	150,7	150,1	-	-
5’	146,3	145,9	-	-
6’	114,3	113,6	7,42 (s, 1H)	119,9/ 146,3/ 150,7/ 164,9
7-*O*-Glucopiranosil				
1’’	100,2	100,1	5,08 (d; *β*, *J:8,8*, 1H)	163,6
2’’	73,7	73,2	3,29 (t, 1H)	77,0 / 100,2
3’’	77,0	76,5	3,31 (m, 1H)	-
4’’	70,1	69,7	3,19 (m, 1H)	-
5’’	77,7	77,3	3,44 (m, 1H)	-
6’’	61,2	60,8	3,48 / 3,71 (m, 2H)	-

[a]Carbono atribuído com base nos experimentos de HSQC e HMBC; [b] Lin *et al*., 2015 (125 MHz, DMSO-d_6).

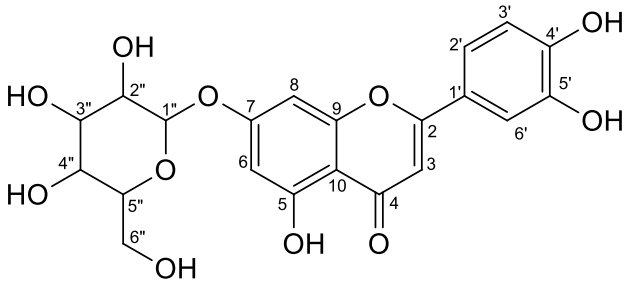


Figura 108: Luteolina 7-*O*-glicosídeo

Lin e colaboradores (2015) realizaram um estudo sobre a farmacocinética em ratos da luteolina e da luteolina-7-*O*-glicosídeo. O estudo aponta que a luteolina-7-*O*-glicosídeo, encontrada em *Dendranthema morifolium*, possui uma baixa biodisponibilidade oral em comparação com o luteolina aglicona. No organismo, a luteolina-7-*O*-glicosídeo é principalmente hidrolisada no trato gastrointestinal para

produzir luteolina, que é então absorvida na circulação sistêmica. Esse processo indica que os benefícios da luteolina-7-*O*-glicosídeo podem estar relacionados à sua conversão em luteolina, que possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e de proteção cardiovascular bem documentadas.

Outro estudo sobre a luteolina-7-*O*-glucosídeo revelou que essa substância possui baixa atividade citotóxica contra as linhagens celulares tumorais testadas (cólon humano e glioblastoma). Além disso, é conhecido que a luteolina-7-*O*-glucosídeo é frequentemente metabolizada no organismo para formar sua aglicona, a luteolina, que apresenta efeitos citotóxicos mais significativos. Esses resultados sugerem que, embora a luteolina-7-*O*-glucosídeo, isoladamente, não apresente alta citotoxicidade, sua conversão em luteolina pode ser relevante para atividades antitumorais em potencial (Lin *et al*., 2015; LÖHR *et al*., 2009; DAMASCENO *et al.*, 2019).

5.3.9 Elucidação estrutural da substância FRS-12-F1

A substância codificada como FRS-12-F1 (40,5 mg) apresentou-se como um sólido amarelo. No espectro de massas, observou-se o pico base em *m/z* 447 ([M-H]−) (Figura 109).

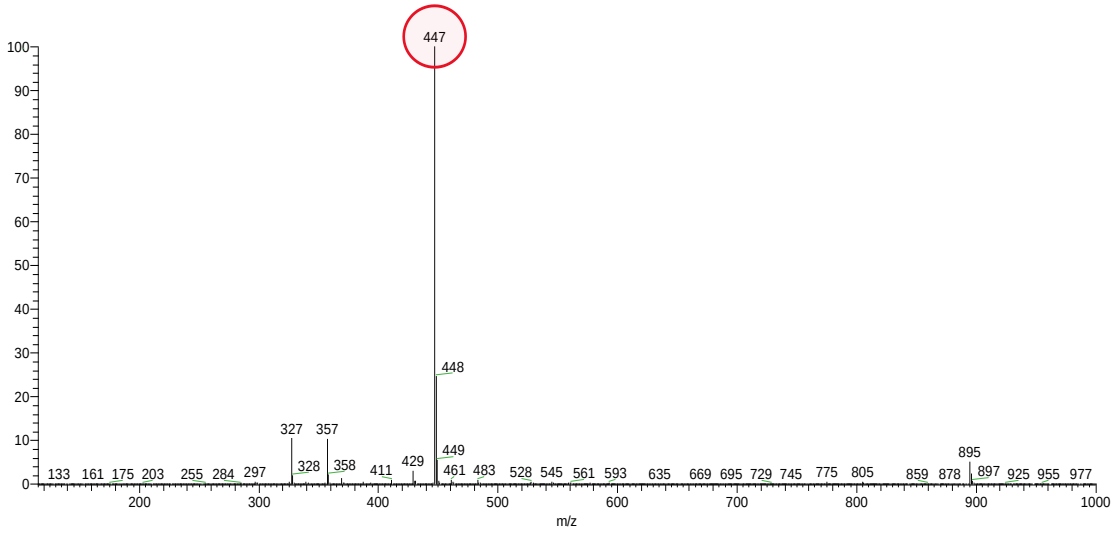


Figura 109: Espectro de massas para a fração FRS-12-F1, os valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS.

O espectro de MS/MS revelou fragmentos em *m/z* 357 $[(M-H)-90]^-$ ($^{0,3}X_0^-$) e 327 $[(M-H)-120]^-$ ($^{0,2}X_0^-$) (Figura 110), sugerindo tratar-se de um composto *C*-glicosilado isômero da luteolina 7-*O*-glicosídeo (FRS-11-F2).

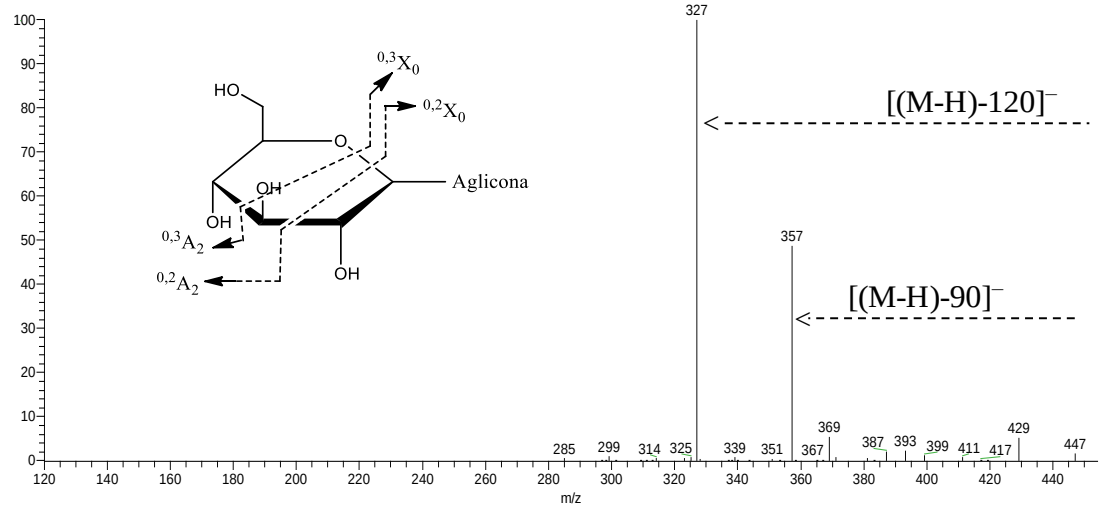


Figura 110: Espectro de MS/MS para FRS-12-F1, com pico base em *m/z* 327.

No entanto, o espectro de RMN de ^1H revelou doze sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos e anoméricos (Figura 111), sugerindo a presença de pelo menos duas substâncias em uma proporção de 1:1.

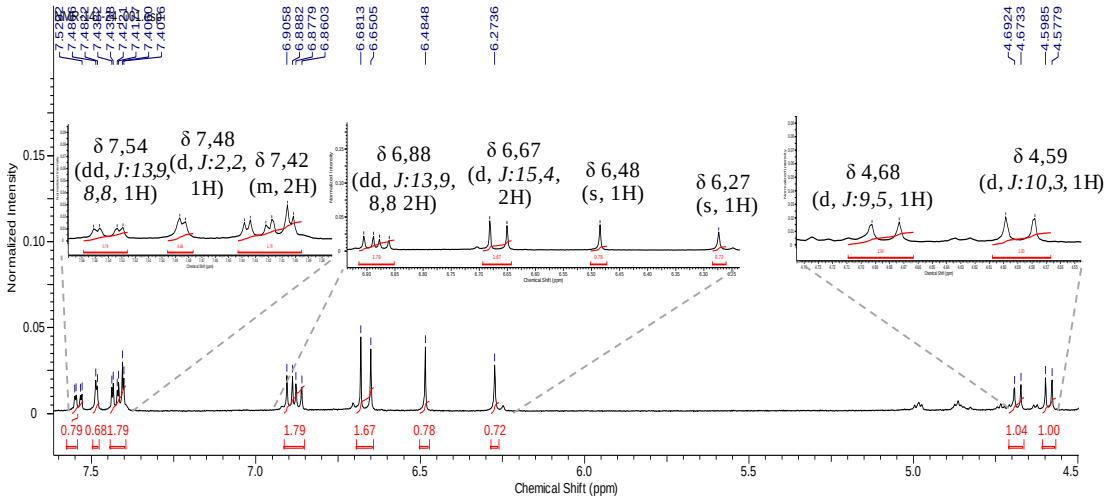


Figura 111: Espectro ampliado de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6, 25 °C) da FRS-12-F1.

Após confirmar a co-eluição dos isômeros *C*-glicosilados na coluna C18 (Figura 27), a subfração FRS-12-F1 foi refracionada em uma coluna Phenyl-hexyl, resultado na substância FRS-12-F1-A (Figura 28).

5.3.9.1 Elucidação estrutural da substância FRS-12-F1-A

A substância codificada como FRS-12-F1-A (14,9 mg) apresentou-se como um sólido amarelo. No espectro de massas observou-se um pico base de *m/z* 447 ($[M-H]^-$) (Figura 112).

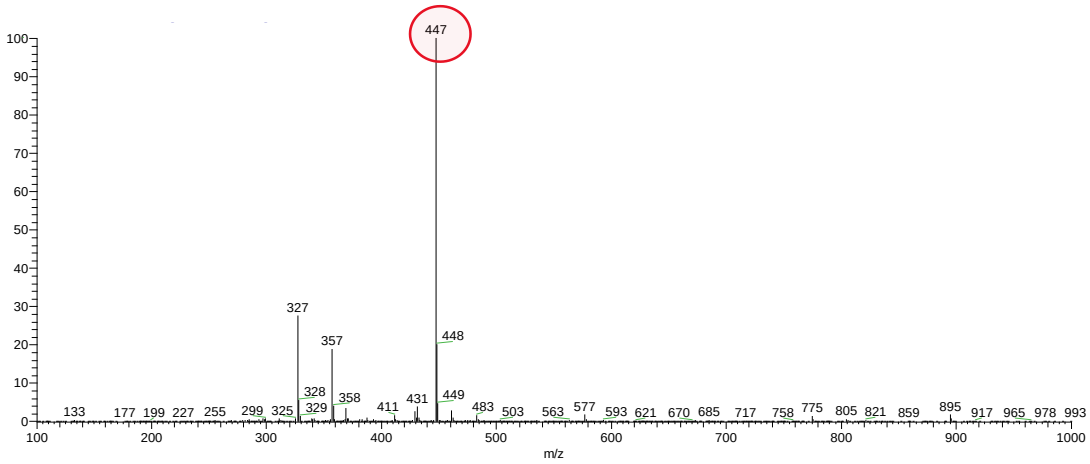


Figura 112: Espectro de massas para FRS-12-F1-A, valores de *m/z* foram obtidos a partir da análise de LC-MS.

A análise de fragmentação (Figura 113) revelou um sinal de fragmento iônico em *m/z* 345 $[(M-H)-90]^-$ ($^{0,3}X_0^-$) e outro fragmento intenso em *m/z* 327 $[(M-H)-120]^-$ ($^{0,2}X_0^-$), condizente com a perda de resíduos de glicose. O fragmento correspondente à aglicona luteolina foi observado em *m/z* 285. Esses dados sugerem que o composto seja um flavonoide com um monossacarídeo ligado diretamente ao núcleo da aglicona, provavelmente nas posições C-6 ou C-8 do anel A.

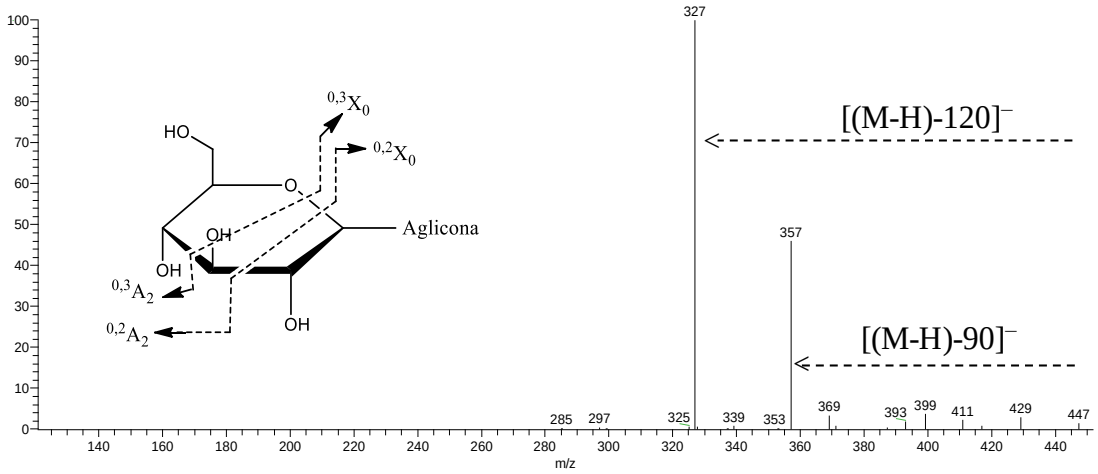


Figura 113: : Espectro de MS/MS para FRS-12-F1-A.

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 114), foram identificados cinco sinais na região aromática e um sinal de hidrogênio anomérico, diferentemente do que foi visto inicialmente no espectro de RMN de ^{1}H da FRS-12-F1 (Figura 111). Observou-se um dupleto em δ 4,59 (*J=9,8* Hz, 1H), referente ao hidrogênio anomérico com configuração *β*. Os dois simpletos em δ 6,48 (1H) e δ 6,65 (1H) foram atribuídos possivelmente aos anéis A e C. Os sinais em δ 6,88 (d, *J= 8,3* Hz, 1H), δ 7,40 (s, 1H) e δ 7,42 (d, *J= 8,3* Hz, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios do anel B.

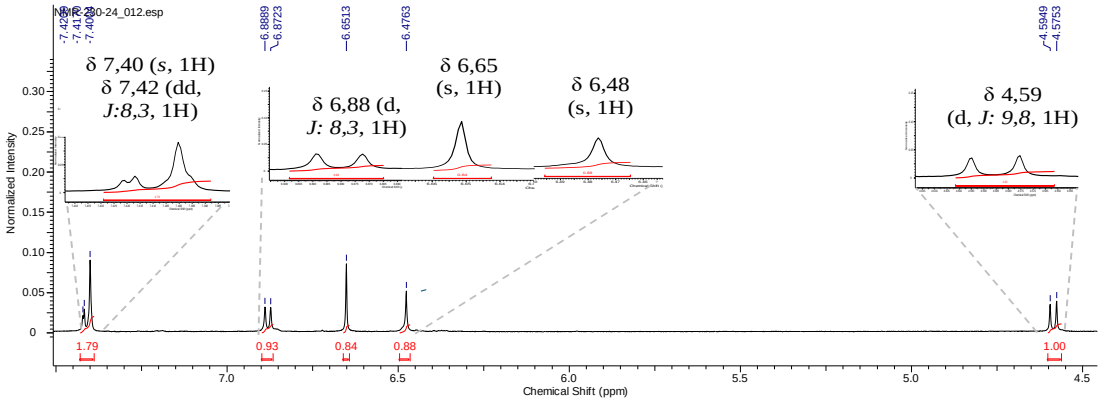


Figura 114: Espectro ampliado de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-12-F1-A.

Por meio do espectro de HSQC (Figura 115), foi possível confirmar a natureza destes hidrogênios aromáticos. Os sinais em δ 6,48 (H-8), δ 6,65 (H-3), δ 6,88 (H-3'), δ 7,40 (H-6') e δ 7,42 (H-2') acoplam-se com os carbonos em δ 93,7, δ 102,8, δ 116,2, δ 113,4 e δ 119,2, respectivamente.

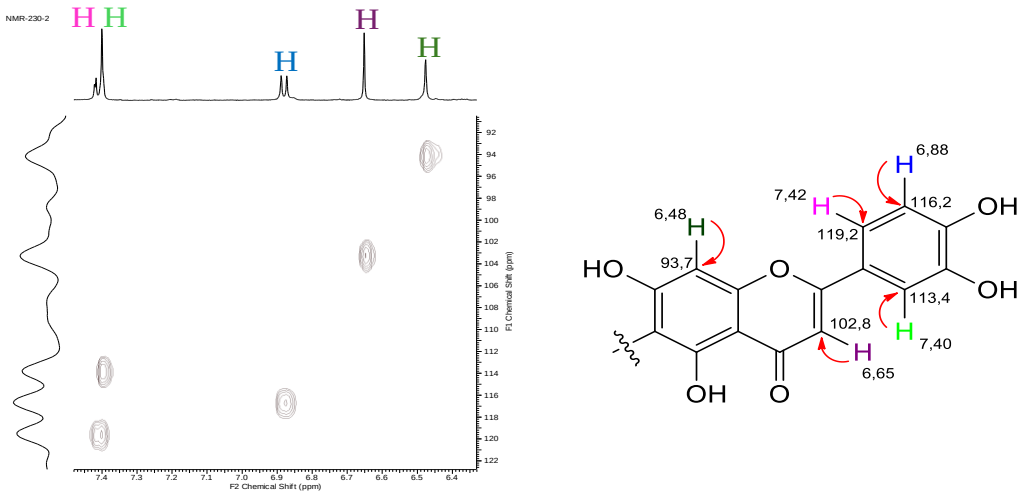


Figura 115: Algumas correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC para os hidrogênios em δ 6,48, δ 6,65, δ 6,88, δ 7,40 e δ 7,42.

No experimento de HMBC (Figura 116), observou-se a correlação do hidrogênio em δ 6,48 com os carbonos em δ 103,7, 109,5, 156,8, 164,3 e 182,3, confirmando tratar-se do hidrogênio do anel A. O simpleto em δ 6,65 apresentou correlações com os carbonos em δ 103,7, 121,7, 164,1 e 182,3, identificando-o como o hidrogênio olefínico. O dupleto em δ 6,88 (*J* = *8,3* Hz) revelou correlações com os carbonos em δ 121,7 e 146,4, adicionalmente, o experimento COSY (Figura A9) confirmou o acoplamento *orto* com o hidrogênio em δ 7,42, que por sua vez mostrou correlações com os carbonos em δ 113,4, 150,6 e 164,1. Por fim, o hidrogênio em δ 7,40 correlacionou-se com os carbonos em δ 119,2, 146,4, 150,6 e 164,1.

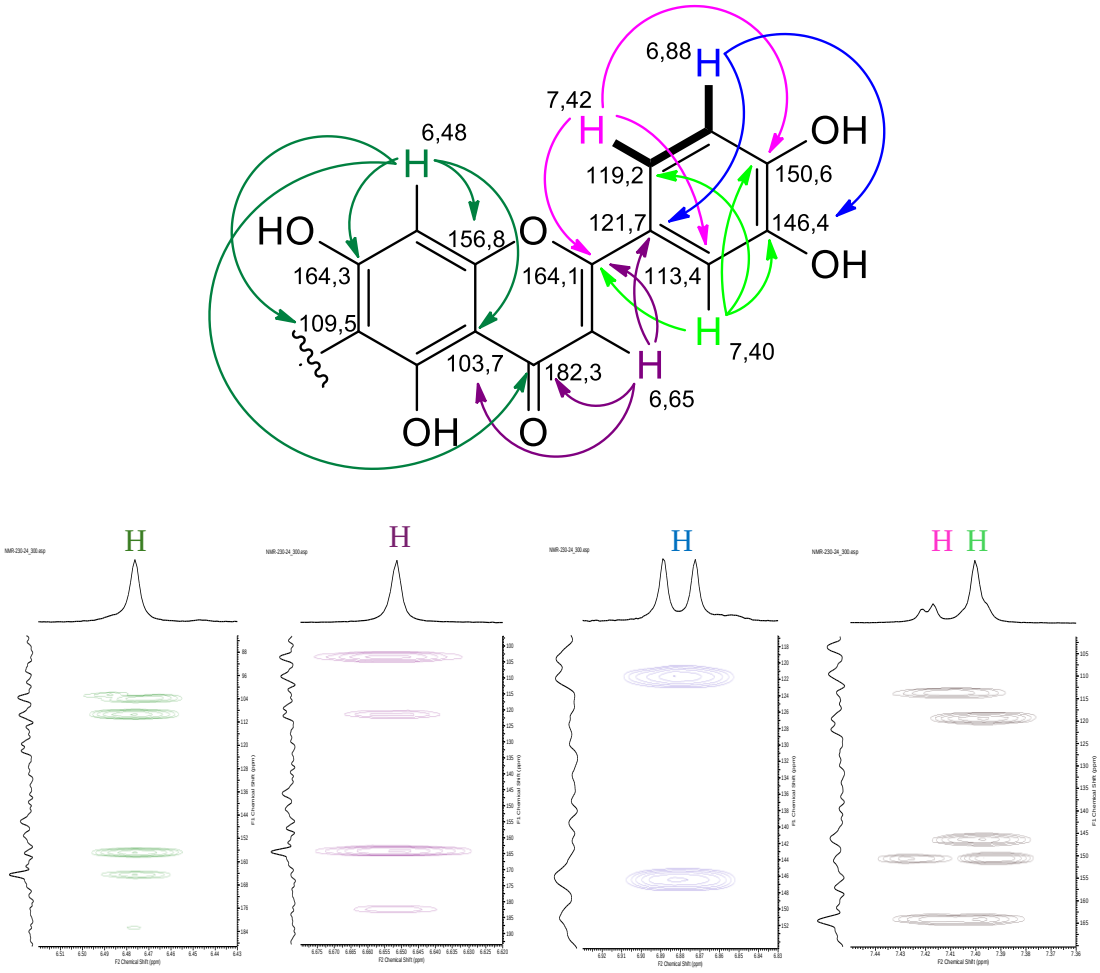


Figura 116: Correlações heteronucleares ^{1}H - 13C observadas por HMBC para os hidrogênios aromáticos.

A posição do monossacarídeo foi confirmada através das suas correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC (Figura 117). O dupleto em δ 4,59 (H-1”) apresentou acoplamento com o carbono em δ 73,7 e correlações de longa distância com os carbonos em δ 70,8, 79,5, 82,1, 109,5, 161,2 e 164,3.

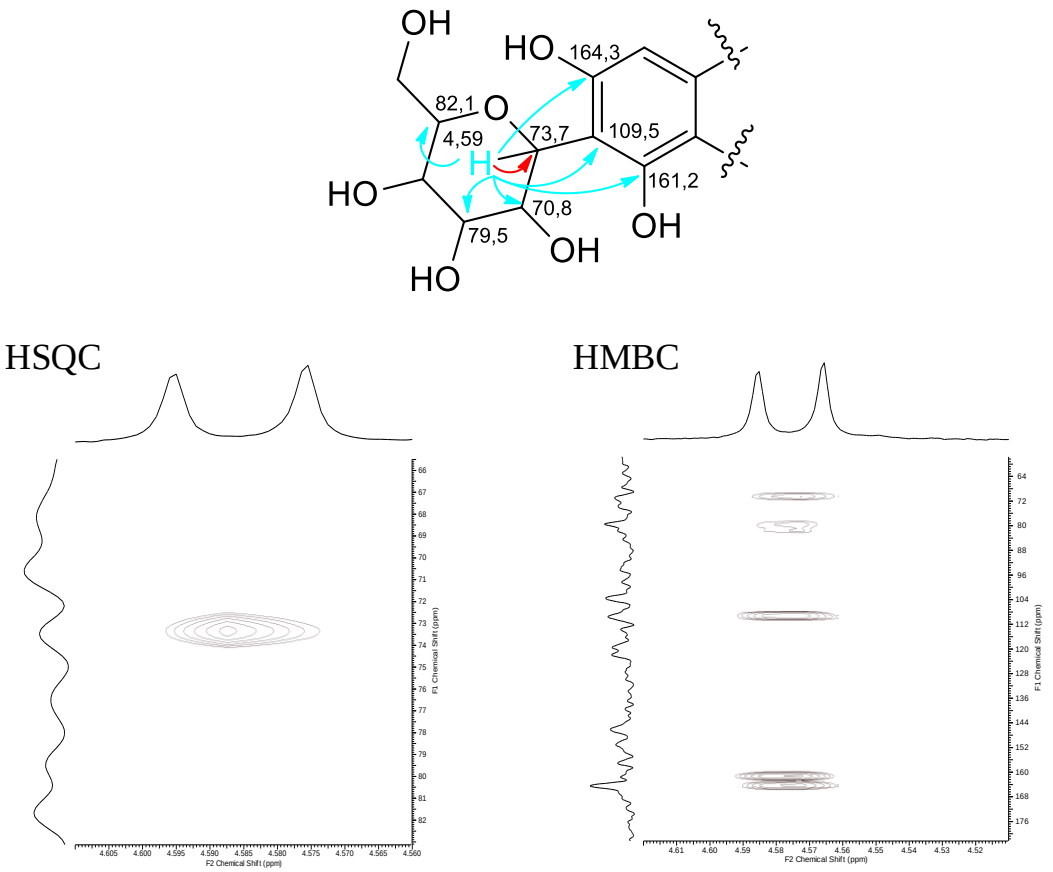


Figura 117: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC e HMBC para o hidrogênio em δ 4,59.

Com base nesses dados, concluiu-se que a substância isolada é um flavonoide da subclasse das flavonas, derivado da luteolina, sendo identificado como isoorientina ou luteolina 6-*C*-glicosídeo (Figura 118). Este é o primeiro relato de seu isolamento no gênero *Onychopetalum*, embora a substância já tenha sido identificada na família *Annonaceae* (ATTIQ *et al*., 2021). Todos os dados de RMN de ^{1}H estão disponíveis na Tabela 12 e estão em concordância com a literatura.

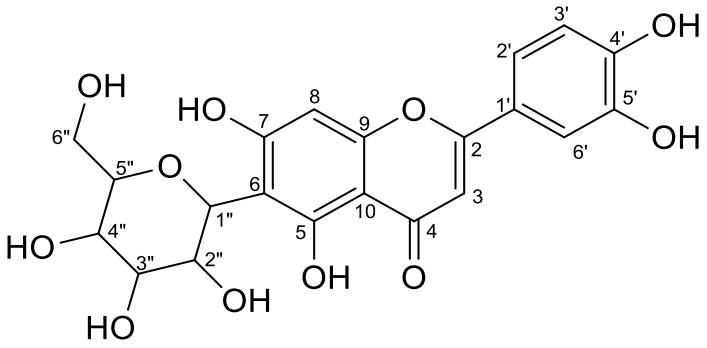


Figura 118: Isoorientina.

Tabela 12: Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-12-F1-A e suas correlações no HMBC.

Posição	**δ_C[a]**	**δ_C[b]**	**δ_H** (J Hz)	**HMBC**
1	-	-	-	-
2	164,1	164,9	-	-
3	102,8	103,8	6,65 (s, 1H)	103,7 / 121,7/ 164,1 / 182,3
4	182,3	182,6	-	-
5	161,2	159,1	-	-
6	109,5	110,0	-	-
7	164,3	165,9	-	-
8	93,7	96,4	6,48 (s, 1H)	103,7/ 109,5/ 156,8/ 164,3
9	156,8	157,0	-	-
10	103,7	103,3	-	-
1’	121,7	123,2	-	-
2’	119,2	120,3	7,42 (dd, *J:8,3*, 1H)	113,4/ 150,6/ 164,1
3’	116,2	117,0	6,88 (d, *J: 8,3*, 1H)	121,7 / 146,4
4’	150,6	152,1	-	-
5’	146,4	147,5	-	-
6’	113,4	113,4	7,40 (s, 1H)	119,2 /146,4 /150,6 /164,1
6-*C*-Glucopiranosil				
1’’	73,7	76,6	4,59 (d; *β*, *J:9,8*, 1H)	70,8/ 79,5/ 82,1/ 109,5/ 161,2/ 164,3
2’’	70,8	71,8	4,03 (t, 1H)	73,7 / 82,1
3’’	79,5	80,5	3,21 (m, 1H)	71,1
4’’	71,1	72,2	3,10 (m, 1H)	79,5 / 82,1
5’’	82,1	82,6	3,16 (m, 1H)	-
6’’	62,1	62,9	3,68 / 3,41 (m, 2H)	82,1

[a]Carbono atribuído com base nos experimentos de HSQC e HMBC; [b]Peng, *et al*., 2005 (500MHz, DMSO-d_6).

Um estudo revelou que a isoorientina, isolada das folhas de *Alphonsea elliptica*, apresenta uma potente atividade anti-inflamatória. Em conjunto com outros flavonoides, como orientina, isovitexina e vitexina, a isoorientina inibiu significativamente a produção de mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandina E2 (PGE2), ciclooxigenase-2

(COX-2) e citocinas (IL-1β e IL-6), em ensaios *in vitro*. Esses efeitos foram observados em concentrações não citotóxicas, destacando seu potencial como um agente anti-inflamatório seguro. Além disso, isoorientina, orientina, isovitexina e vitexina anularam as respostas inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) em plasma humano, sugerindo seu valor promissor para o desenvolvimento de novas terapias anti-inflamatórias (ATTIQ *et al*., 2021).

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Este trabalho destaca a importância das análises utilizando técnicas hifenadas, como LC-MS, na desreplicação de compostos bioativos em espécies pouco estudadas. As análises de desreplicação se mostraram especialmente valiosas, pois economizam tempo e reduzem o uso de solventes, contribuindo para a química verde e permitindo atingir metas de forma eficiente e econômica.

A abordagem integrativa baseada na análise do perfil químico por DI-APCI-MS no modo DDA e interpretação manual de dados de LC-APCI-MS/MS mostrou-se uma estratégia eficaz para a desreplicação de isômeros de flavonas e flavonóis, tanto *C*-glicosilados quanto *O*-glicosilados derivados da apigenina, luteolina e quercetina.

O fracionamento cromatográfico resultou no isolamento de 9 substâncias (apigenina 8-*C*-neohesperidosídeo, apigenina 6-*C*-neohesperidosídeo, apigenina 7-*O*-rutinosídeo, luteolina 7-*O*-glicosídeo, vitexina, isovitexina, crisoeriol 7-*O*-glicosídeo, isoorientina e quercetina 3-*O*-rutinosídeo) das folhas de *O. periquino*, sendo todas reportadas pela primeira vez no gênero *Onychopetalum.*

Esses resultados sugerem a espécie *O. periquino* como uma fonte promissora de flavonas e flavonóis, tanto *C*-glicosilados quanto *O*-glicosilados derivados da apigenina, luteolina e quercetina.

As informações obtidas neste estudo contribuem significativamente para o conhecimento químico do gênero *Onychopetalum* e ampliam o entendimento da química da família Annonaceae.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEROGBA, M. A; AKINKUNMI, E. O; MABUSELA, W. T. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Flavonoid Glycosides from *Dennettia Tripetala* G. Baker Leaf Extract. Nigerian Journal Of Natural Products And Medicine, v. 15, n. 1, p. 49-52, 2011. http://dx.doi.org/10.4314/njnpm.v15i1.3.

AMINIMOGHADAMFAROUJ, N.; NEMATOLLAHI, A.; WIART, C. Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery. Journal Of Asian Natural Products Research, v. 13, n. 5, p. 465-476, 2011. http://dx.doi.org/10.1080/10286020.2011.570265.

ADAB. Agência de Defesa Agropecuária do Estado da Bahia, 2011. Disponível em: http://www.adab.ba.gov.br/noticias/balanco-da-adab-2011/. Acesso em: 22/08/2024.

ADAMS, M.; GMUNDER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders - a survey of ethnobotanical literature, J. Ethnopharmacol. v. 113, p. 363-381, 2007.

ANDARGHISKE, K. R.; KANCHARLA, B.; SIVA, H. Neuroprotective upshot of isorhoifolin flavonoid of Gmelina asiatica for multitargeted approach in Alzheimer's disease: exploration through in-silico studies. Research Square, v. 1, p. 1-27, 2023. http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-3408123/v1.

Al KAZMAN, B. S. M. Al; HARNETT, J. E.; HANRAHAN, J. R. Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Activities of Annonacae. Molecules, v. 27, n. 11, p. 3462-3493, 2022. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/molecules27113462.

Al KAZMAN, B. S. M. Al; HARNETT, J. E.; HANRAHAN, J. R. Identification of Annonaceous Acetogenins and Alkaloids from the Leaves, Pulp, and Seeds of *Annona atemoya*. International Journal Of Molecular Sciences, v. 24, n. 3, p. 2294-2306, 2023. http://dx.doi.org/10.3390/ijms24032294.

AOKI, T.; AKASHI, T.; AYABE, S. Flavonoides de plantas leguminosas: estrutura, atividade biológica e biossíntese. J Plant Res, 113 , 475–488, 2000. https://doi.org/10.1007/PL00013958.

ARRUDA, H.S.; ANGOLINI, C.F.F.; EBERLIN, M.N.; PASTORE, G.M.; MAROSTICA JUNIOR, M.R. UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS Profiling of Phytochemicals from Araticum Fruit (Annona crassiflora Mart.) and Its Antioxidant Activity. Foods 2023, 12, 3456. https://doi.org/10.3390/ foods12183456

ATTIQ, A.; JALIL, J.; HUSAIN, K.; MOHAMAD, H. F.; AHMAD, A. Luteolin and apigenin derived glycosides from *Alphonsea elliptica* abrogate LPS-induced inflammatory responses in human plasma. Journal Of Ethnopharmacology, v. 275, 2021. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2021.114120.

ATTIQ, A.; JALIL, J.; HUSAIN, K. Annonaceae: breaking the wall of inflammation. Frontiers In Pharmacology, Review, v. 8, n. 752, 2017. http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2017.00752.

AUBRÉVILLE, 1974a, Angiosperm Phylogeny Website, Verson 14. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>**.** Acesso em 15 de abril de 2024.

BARRECA, D.; GATTUSO, G.; BELLOCCO, E.; CALDERARO, A.; TROMBETTA, D.; SMERIGLIO, A.; LAGANÀ, G.; DAGLIA, M.; MENEGHINI, S.; NABAVI, S. M. Flavanones: citrus phytochemical with health promoting properties. Biofactors, v. 43, n. 4, p. 495-506, 2017. http://dx.doi.org/10.1002/biof.1363.

BARROS, A. de L.; LIMA, E. J. S. P. de; FARIA, J. V.; ACHO, L. R. D.; LIMA, E. S.; BEZERRA, D. P.; SOARES, E. R.; LIMA, B. R. de; COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B. Cytotoxicity and Lipase Inhibition of Essential Oils from Amazon Annonaceae Species. Chemistry, v. 4, n. 4, p. 1208-1225, 2022. http://dx.doi.org/10.3390/chemistry4040081

BARREIROS, A. L. B. S. Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Dioclea Lasiophylla*. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós- Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2000.

BAKER, D. H. A. An ethnopharmacological review on the therapeutical properties of flavonoids and their mechanisms of actions: a comprehensive review based on up-to-date knowledge. Toxicology Reports, v. 9, p. 445-469, 2022. http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.011.

BALÉE, W. A cultura das florestas amazônicas. Revista Brasileira de Linguística Antropológica, v. 15, p. 363-404, 2023. Biblioteca Central da UNB. http://dx.doi.org/10.26512/rbla.v15i1.51982

BENAYAD, Z.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; ES-SAFI, N. E. Identification and quantification of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum)* germinated seeds by LC–DAD–ESI/MS analysis. Journal Of Food Composition And Analysis, v. 35, n. 1, p. 21-29, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2014.04.002.

BERIM, A.; GANG, D. R. Methoxylated flavones: occurrence, importance, biosynthesis. Phytochemistry Reviews, v. 15, n. 3, p. 363-390, 2015. http://dx.doi.org/10.1007/s11101-015-9426-0.

BEELDERS, T; SIGGE, G. O.; JOUBERT, E; BEER, D; VILLIERS, A. Kinetic optimisation of the reversed phase liquid chromatographic separation of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) phenolics on conventional high performance liquid chromatographic instrumentation. Journal Of Chromatography A, v. 1219, p. 128-139, 2012. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.012.

BOSE, S.; SARKAR, D.; BOSE, A.; MANDAL, S. C. Natural Flavonoids and Its Pharmaceutical Importance. The Pharma Review, p. 61-75, 2018.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Secondary Plant Metabolites. Revista Agrotecnologia, Ipameri-Go, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.

BOUSLIMANI, A.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. Royal Society Of Chemistry, v. 31, p. 718-729, 2014.

BRÍGIDO, H. P. C; SILVA, J. V. S; BASTOS, M. L. C; CORREA-BARBOSA, J; SARMENTO, R. M; COSTA, E. V. S; MARINHO, A. M. do R; COELHO-FERREIRA, M. R; SILVEIRA, F. T; DOLABELA, M. F. Atividade antileishmania de *Annona glabra* L. (Annonaceae). Revista Eletrônica Acervo Saúde, n. 57, 2020. http://dx.doi.org/10.25248/reas.e3701.2020.

CASCAES, M. M.; CARNEIRO, O. dos S.; NASCIMENTO, L. D. do; MORAES, Â. A. B. de; OLIVEIRA, M. S. de; CRUZ, J. N.; GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. de A. Essential Oils from Annonaceae Species from Brazil: a systematic review of their phytochemistry, and biological activities. International Journal Of Molecular Sciences, v. 22, n. 22, p. 12140-12162, 2021. http://dx.doi.org/10.3390/ijms222212140.

CAO, H.; CHEN, X.; JASSBI, A. R.; XIAO, J. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. Biotechnology Advances, v. 33, n. 1, p. 214-223, 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.012.

CAMARGO, L. M. de M.; FÉRÉZOU, J. P.; TINOCO, L. W.; KAISER, C. R.; COSTA, S. S. Flavonoids from *Mimosa xanthocentra* (Leguminosae: mimosoideae) and molecular modeling studies for isovitexin-2''-O-*α*-L-rhamnopyranoside rotamers. Phytochemistry Letters, v. 5, n. 3, p. 427-431, 2012. http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2012.03.015

CARDOSO, D.; SÄRKINEN, T.; ALEXANDER, S.; AMORIM, A. M.; BITTRICH, V.; CELIS, M.; DALY, D. C.; FIASCHI, P.; FUNK, V. A.; GIACOMIN, L. L. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, v. 114, n. 40, p. 10695-10700, 2017. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1706756114.

CARVALHO, N. C. C.; MONTEIRO, O. S.; ROCHA, C. Q. da; LONGATO, G. B.; SMITH, R. E.; SILVA, J. K. R. da; MAIA, J. G. S. Phytochemical Analysis of the Fruit Pulp Extracts from *Annona crassiflora* Mart. and Evaluation of Their Antioxidant and Antiproliferative Activities. Foods, v. 11, n. 14, p. 2079, 2022. http://dx.doi.org/10.3390/foods11142079.

CARRILLO-MARTINEZ, E.J.; FLORES-HERNÁNDEZ, F.Y.; SALAZAR-MONTES, A.M.; NARIO-CHAIDEZ, H.F.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, L.D. Quercetin, a Flavonoid with Great Pharmacological Capacity. Molecules, 2024, 29, 1000. https://doi.org/ 10.3390/molecules29051000

CESARINO, E. C.; GOMES, J. O. dos S.; LESSA, E. V.; CARVALHO JUNIOR, A. R. de; VIEIRA, I. J. C.; CARVALHO, M. G. de; SILVA, T. M. S. da; FERREIRA, R. O. Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Acacia Polyphylla* (Fabaceae). Revista Virtual de Química (SBQ), v. 12, n. 2, p. 424-432, 2020. http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20200034

CORIA-TÉLLEZ, A. V.; MONTALVO-GÓNZALEZ, E.; YAHIA, E. M.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N. *Annona muricata*: a comprehensive review on its traditional medicinal

uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. Arabian Journal Of Chemistry, v. 11, n. 5, p. 662-691, 2018. http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004.

COSTA, G. M.; CÁRDENAS, P. A.; GAZOLA, A. C.; ARAGÓN, D. M.; CASTELLANOS, L.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; SCHENKEL, E. P. Isolation of C-glycosylflavonoids with α-glucosidase inhibitory activity from *Passiflora bogotensis* Benth by gradient high-speed counter-current chromatography. Journal Of Chromatography B, v. 990, p. 104-110, 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03.015.

COSTA, F. I. B.; PORFIRIO, M. C. P.; OLIVEIRA, J. B.; SANTANA, G. A. Avaliação fitoquímica e *screening* da capacidade antioxidante de resíduos de umbu. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.17, n.4, p.341-348, 2015b.

COUVREUR,T. L. P.; MAAS, P. J. M.; MEINKE, S; DAVID, M. J.; KEBLER, P. J. A. Keys to the genera of Annonaceae. Botanical Journal of the Linnean Society, v.169, p. 74-83, 2012

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. Journal Of Mass Spectrometry, v. 39, n. 1, p. 1-15, 2004. http://dx.doi.org/10.1002/jms.585.

CUYCKENS, F.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E. de; CLAEYS, M. Structure characterization of flavonoid O-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Journal Of Mass Spectrometry, v. 36, n. 11, p. 1203-1210, 2001. http://dx.doi.org/10.1002/jms.224.

CUNHA, M.M., NASCIMENTO, F.C., SANTOS-PIMENTA, L.P., BOAVENTURA, M.A.D., SALAS, C.E., LOPES, M.T.P. Screening of cytotoxic activity in hexanic and ethanolic extracts of *Rollinia laurifolia*. Lat. Am. J. Pharm. 28, 234–240, 2009.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. Botanical Journal of the Linnean Society, v.169, p. 5-40, 2012.

CHANG, F. R; CHEN, J. L; LIN, C.Y; CHIU, H. F; WU, M. J; WU, Y. C. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. Phytochemistry, v. 51, n. 7, p. 883-889, 1999. http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(99)00142-9.

CHU, S; WANG, J.; ZHU, Y.; LIU, S.; ZHOU, X.; ZHANG, H.; WANG, C. E; YANG, W.; TIAN, Z.; CHENG, H. An R2R3-type MYB transcription factor, GmMYB29, regulates isoflavone biosynthesis in soybean. Plos Genetics, v. 13, n. 5, p. 1-26, 2017. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1006770.

CHENG, G.; BAI, Y.; ZHAO, Y.; TAO, J. Flavonoids from *Ziziphus jujuba Mill var*. *spinosa*. Tetrahedron, v. 56, n. 1, p. 8915-8920, 2000.

CHOO, C.; SULONG, N.; MAN, F.; WONG, T.W. Vitexin and isovitexin from the Leaves of Ficus deltoidea with in-vivo α-glucosidase inhibition. Journal Of Ethnopharmacology, v. 142, n. 3, p. 776-781, ago. 2012. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.062.

DALL'ACQUA, S.; PERON, G.; FERRARI, S.; GANDIN, V.; BRAMUCCI, M.; QUASSINTI, L.; MÁRTONFI, P.; MAGGI, Filippo. Phytochemical investigations and antiproliferative secondary metabolites from Thymus alternans growing in *Slovakia*. Pharmaceutical Biology, v. 55, n. 1, p. 1162-1170, 2017. http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1291689.

DAMASCENO, L. M.; SILVA, A. L.; SANTOS, R. F. D.; FEITOSA, T. A.; VIANA, L. G. F. C.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G. D.; Araújo CdS, A. E. Cytotoxic activity of chemical constituents and essential oil from the leaves of *Leonotis nepetifolia* (Lamiaceae). Rev Virtual Quim, *11*, 517-528. 2019.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 3. ed. John Wiley & Sons, 117 p. 2009.

DENG, X; GAO, G; ZHENG, S; LI, F. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in the leaves of Isatis indigatica Fort. by ultra-performance liquid chromatography with PDA and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection. Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, v. 48, n. 3, p. 562-567, 2008. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2008.05.020.

DESTA, K. T; KIM, G. S; EL-ATY, A.M. Abd; RAHA, S; KIM, M-B; JEONG, J. H; WARDA, M; HACđMÜFTÜOğLU, A; SHIN, H-C; SHIM, J-H. Flavone polyphenols dominate in *Thymus schimperi Ronniger*: LC-ESI-MS/MS characterization and study of anti-proliferative effects of plant extract on ags and hepg2 cancer cells. Journal Of Chromatography B, v. 1053, p. 1-8, 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.035.

DING, S.; DUDLEY, E.; PLUMMER, S.; TANG, J.; NEWTON, R.P.; BRENTON, A.G. Fingerprint profile of Ginkgo biloba nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS. Phytochemistry, v. 69, n. 7, p. 1555-1564, 2008. http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.01.026.

DOMON, B.; COSTELLO, C. A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates. Glycoconjugate J, v. 5, p. 397-409, 1988.

FARIAS, J. F. de; ARAÚJO NETO, S. E. de; ÁLVARES, V. de S.; FERRAZ, P. A.; FURTADO, D. T.; SOUZA, M. L. de. Maturação e Determinação do Ponto de Colheita de Frutos de Envira–Caju. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 730-736, 2011.

FENG, W.; HAO, Z.; LI, M. Isolation and Structure Identification of Flavonoids. Flavonoids - From Biosynthesis To Human Health, v. 2, n. 1, p. 18-43, 2017. http://dx.doi.org/10.5772/67810.

FENG, X.; LIU, Y.; WANG, X.; DI, X. Analysis of Linarin and Its Metabolites in Rat Urine by LC–MS/MS. Chromatographia, v. 77, n. 7-8, p. 571-579, 2014. http://dx.doi.org/10.1007/s10337-014-2641-9.

FERRER, J.-L.; AUSTIN, M.B.; STEWART, C.; NOEL, J.P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant Physiology And Biochemistry, v. 46, n. 3, p. 356-370, 2008. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.009.

FERNANDES, A. M. A. P.; PRADO, A. L.; BARATA, L. E. S.; PAULO, M. Q.; AZEVEDO, N. R.. A Method to Separate Lignoids from Virola Leaves. Phytochemical Analysis, Sl, v. 8, n. 1, p. 18-21, 1 fev. 1997.

FERRERES, F.; LLORACH, R.; GIL-IZQUIERDO, A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal Of Mass Spectrometry, v. 39, p. 312-321, 2004.

FERREIRA, R. O.; CARVALHO JUNIOR, A. R. de; SILVA, T. M.G. da; CASTRO, R. N.; SILVA, T. M.s. da; CARVALHO, M. G. de. Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 24, n. 6, p. 617-625, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2014.11.005.

FOREZI, L. S. M.; FERREIRA, P. G.; HÜTHER, C. M.; SILVA, F. de C. da; FERREIRA, V. F.. There is Chemistry Here: part iv. terpenes in perfumery. Revista Virtual de Química, v. 14, n. 6, p. 1005-1024, jan. 2022. Sociedade Brasileira de Quimica (SBQ). http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20220055

FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Annonaceae Essential Oils: A Review, Journal of Essential Oil Research, 11:2, 131-142, 1999. 10.1080/10412905.1999.9701092

FLORA DO BRASIL (2020) Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http:// reflora.jbrj.gov.br/>. Acesso em 15 de junho de 2024.

GAYOSO, G.; L. CHANG. *Annona cherimola* Mill. “chirimoya” (Annonaceae), una fruta utilizada como alimento en el Perú prehispánico. Arnaldoa 24(2): 619-634, 2017. http://doi. org/10.22497/arnaldoa.242.24213

GUAYASAMIN, J. M.; RIBAS, C. C; CARNAVAL, A. C.; CARRILLO, J. D; HOORN, C; LOHMANN, L. G; RIFF, D; ULLOA, C. U; ALBERT, J. Evolution of Amazonian biodiversity. Amazon Assessment Report 2021, cap. 2, 2021. UN Sustainable Development Solutions Network (SDSN). http://dx.doi.org/10.55161/czwn4679.

GAYATHRI, G. A.; KAVYA, P.; ASHWINI, D.; CHAKRABORTY, E.; AHMED, I. A.; MAHALINGAM, G. Vitexin isolated from *Acanthus ilicifolius* L. leaf enhances GLUT-4 translocation in experimental diabetic rats. Aquaculture International, v. 31, n. 6, p. 3159-3187, 2023. http://dx.doi.org/10.1007/s10499-023-01235-z.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. V. D. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. Conservation Biology, v. 19, n. 3, p. 632-639, 2005. http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00704.x.

HARBORNE, J. B.; MARBY, H; MARBY, T. J. The flavonoids. Chapman e Hall, Londres, 1975. 10.1007/978-1-4899-2909-9.

HE, M; MIN, J-W; KONG, W-L; HE, X-H; LI, J-X; PENG, B-W. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. Fitoterapia, v. 115, p. 74-85, dez. 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.011.

HEUSDE, E. C. H. V. Flowers of annonaceae: Morphology, classification, and Evolution. BLUMEA Supplement, v. 7, p. 1-218, 1992.

IBGE. Banco de Dados Agregados. Sistema IBGE de Recuperação Automática.SIDRA. Disponível em: ttp://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z=t&o=11.

JI, Y.; LI, B.; QIAO, M.; LI, J.; XU, H.; ZHANG, L.; ZHANG, X. Advances on the in vivo and in vitro Glycosylations of Flavonoids. Appl. Microbiol. Biotechnol, 104, 2020.

JOURJINE, I. A.P.; BAUERNSCHMIDT, C.; MÜLLER, C.; BRACHER, F. A GC-MS Protocol for the Identification of Polycyclic Aromatic Alkaloids from Annonaceae. Molecules, 2022. https://doi.org/10.3390/molecules27238217

JOLY CA, VERDADE M & BERLINCK RGS. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. Rev. Usp. 2011; 89:114–133.

JOVEL, E. M.; CABANILLAS, J.; TOWERS, G. H. N. An ethnobotanical study of the traditional medicine of the Mestizo people of Suri Miraño, Loreto, Peru, J. Ethnopharmacol. 1996, 53, 149-156.

KACHLICKI, P.; PIASECKA, A.; STOBIECKI, M.; MARCZAK, Ł. Structural Characterization of Flavonoid Glycoconjugates and Their Derivatives with Mass Spectrometric Techniques: review. Molecules, v. 21, p. 1494-1514, 2016.

KARAR, M. G. E.; KUHNERT, N. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of Phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) Leaves, Fruits and their Herbal Derived Drops (Crataegutt Tropfen). Journal Of Chemical Biology & Therapeutics, p. 102-125, 2015. http://dx.doi.org/10.4172/2572-0406.1000102.

KHAN, J.; DEB, P. K.; PRIYA, S.; MEDINA, K. D.; DEVI, R.; WALODE, S. G.; RUDRAPAL, M. Dietary Flavonoids: cardioprotective potential with antioxidant effects and their pharmacokinetic, toxicological and therapeutic concerns. Molecules, v. 26, n. 13, p. 4021, 2021. http://dx.doi.org/10.3390/molecules26134021.

KESSLER, P. J. A. Annonaceae. In: Flowering Plants· Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1993. p. 93-129.

KIRAKOSYAN, A.; SEYMOUR, E.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. Antioxidant Capacity of Polyphenolic Extracts from Leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) Subjected to Drought and Cold Stress. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, v. 51, p. 3973-3976, 2003.

KIM, J. H; LEC, B. C; KIM, J. H. The Isolation and Antioxidative Effects of Vitexin from *Acer palmatum*. Arch Pharm Res, v. 28, n. 2, p. 195-202, 2005.

KHALID, M; SAEED-UR-RAHMAN; BILAL, M; HUANG, Dan-Feng. Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens - A review. Journal Of Integrative Agriculture, v. 18, n. 1, p. 211-230, 2019. http://dx.doi.org/10.1016/s2095-3119(19)62555-4.

KOPUSTINSKIENE, D. M.; JAKSTAS, V; SAVICKAS, A; BERNATONIENE, J. Flavonoids as Anticancer Agents. Nutrients, v. 12, n. 2, p. 457-482, 2020. http://dx.doi.org/10.3390/nu12020457.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: an overview. The Scientific World Journal, v. 2013, p. 1-16, 2013. http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750.

KVIST, L. P.; CHRISTENSEN, S. B.; RASMUSSEN H. B.; MEJIA, K.; GONZALEZ, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and *leishmaniasi*s, J. Ethnopharmacol. v. 106, p. 390 402, 2006.

KURKIN, V. A.; LAPINA, A. S.; DAEVA, E. D.; KADENTSEV, V. I. Flavonoids from herb of *Monarda fistulosa*. Chemistry Of Natural Compounds, v. 56, n. 2, p. 242-245, 2020. http://dx.doi.org/10.1007/s10600-020-02997-1.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? Scientia Chromatographica, São Carlos (SP), v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LA FERLA, B.; AIROLDI, C.; ZONA, C.; ORSATO, A.; CARDONA, F.; MERLO, S.; SIRONI, E.; D'ORAZIO, G.; NICOTRA, F. Natural glycoconjugates with antitumor activity. Nat. Prod. Rep**.**, v. 28, n. 3, p. 630-648, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC). http://dx.doi.org/10.1039/c0np00055h.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the annonaceae. Phytochemistry, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LI, H.; LIU, Y.; JIN, H.; LIU, S.; FANG, S.; WANG, C.; XIA, C. Separation of vitexin-4″-O-glucoside and vitexin-2″-O-rhamnoside from hawthorn leaves extracts using macroporous resins. Journal Of Chromatography B, v. 1007, p. 23-29, 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.10.043.

LIGA, S.; PAUL, C.; PÉTER, F. Flavonoids: overview of biosynthesis, biological activity, and current extraction techniques. Plants, v. 12, n. 14, p. 2732-2756, 2023. http://dx.doi.org/10.3390/plants12142732.

LIMA, B. R. de; SILVA, F. M. A. da; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A. de; SILVA FILHO, F. A. da; PEREIRA JUNIOR, R. C.; TASCO, Á. J. H.; SALVADOR, M. J.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L. de. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Onychopetalum amazonicum* R.E.Fr. Natural Product Research, v. 30, n. 20, p. 2356-2359, 2016. http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1163691.

LIMA, B. R. de; SILVA, F. M. A. da; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A. de; MACIEL, J. B.; FERNANDES, C. C.; OLIVEIRA, A. C. de; TADEI, W. P.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L. de. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil from the leaves of *Onychopetalum periquino* (Rusby) D.M. Johnson & N.A. Murray. Natural Product Research, v. 35, n. 6, p. 1038-1041, 2019. http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2019.1613989.

LIMA, B.; SILVA, F.; SOARES, E.; ALMEIDA, R.; SILVA-FILHO, F.; BARISON, A.; COSTA, E.; KOOLEN, H.; SOUZA, A.; PINHEIRO, M. L. Integrative Approach Based on Leaf Spray Mass Spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for Comprehensive Characterization of Isoquinoline-Derived Alkaloids in Leaves of *Onychopetalum amazonicum* R. E. Fr. Journal Of The Brazilian Chemical Society, v. 31, n. 1, p. 79-89, 2020. http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190125.

LIMA, B. R. de. Prospecção de Inibidores da Enzima Acetilcolinesterase (Ache) em Espécies do Gênero *Onychopetalum* (ANNONACEAE) para o tratamento da doença de Alzheimer. 2019. 187 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

LIN, L-C; PAI, Y-F; TSAI, T-H. Isolation of Luteolin and Luteolin-7-O-glucoside from Dendranthema morifolium Ramat Tzvel and Their Pharmacokinetics in Rats. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, v. 63, n. 35, p. 7700-7706, 2015. http://dx.doi.org/10.1021/jf505848z.

LIN, Long-Ze; HARNLY, James M.. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium Ramat*). Food Chemistry, v. 120, n. 1, p. 319-326, 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.083

LIN, L-Z; SUN, J; CHEN, P; ZHANG, R-W; FAN, X-E; LI, L-W; HARNLY, J M. Profiling of Glucosinolates and Flavonoids in *Rorippa indica* (Linn.) Hiern. (Cruciferae) by UHPLC-PDA-ESI/HRMSn. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, v. 62, n. 26, p. 6118-6129, 2014. http://dx.doi.org/10.1021/jf405538d.

LOBÃO, A.Q., LOPES, J.C., ERKENS, R.H.J., MENDES-Silva, I., PONTES PIRES, A.F., SILVA, L.V., OLIVEIRA, M.L.B., JOHNSON, D., MELLO, S. R. (in memoriam) 2020. Annonaceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: http:// floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110219.

LOPES, J. de C.; SILVA, R. M. Diversidade e Caracterização das Annonaceae do Brasil. São Paulo, v. 36, n. 1, p. 125-131, 2014.

LORENZO, V. P.; SCOTTI, L.; ALMEIDA, J. R. G. da S.; SCOTTI, M. T. Annonaceae Family Alkaloids as Agents Against Leishmaniasis: a review and molecular docking

evaluation. Current Drug Metabolism, v. 21, n. 7, p. 482-492, 2020. http://dx.doi.org/10.2174/1389200221666200702124046.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP : Editora Plantarum, 1992.

LÖHR, G; DETERS, A; HENSEL, A. In vitro investigations of *Cynara scolymus* L. extract on cell physiology of HepG2 liver cells. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 45, p. 201-208, 2009.

LUO, Y.; JIAN, Y.; LIU, Y.; JIANG, S.; MUHAMMAD, D.; WANG, W. Flavanols from Nature: a phytochemistry and biological activity review. Molecules, v. 27, n. 3, p. 719-752, 2022. http://dx.doi.org/10.3390/molecules27030719.

LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. da S.; DA-CUNHA, E. V. L.; TAVARES, J. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Alkaloids of the Annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. The Alkaloids: Chemistry and Biology, p. 233-409, 2015. http://dx.doi.org/10.1016/bs.alkal.2014.09.002.

LV, Y.; LIU, Z.; JIA, H.; XIU, Y.; LIU, Z. Properties of flavonoids in the treatment of bladder cancer: (review). Experimental And Therapeutic Medicine, v. 24, p. 676-694, 2022.

MAAS, P. J.M.; WESTRA, L. Y. T.; VERMEER, M. Revision of the neotropical genera *Bocageopsis*, *Onychopetalum*, and *Unonopsis* (Annonaceae). Blumea - Biodiversity, Evolution And Biogeography Of Plants, v. 52, n. 3, p. 413-554, 2007. Naturalis Biodiversity Center. http://dx.doi.org/10.3767/000651907x608909

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>.

MCLAFFERTY, F. W; TURECEK, F. Interpretation of Mass Spectra. 4ª edição, 1993.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The Systematic Identification of Flavonoids. New York: Springer-Verlag, 1970. 362 p.

MAJRASHI, T. A.; ASHPOLE, N. M.; KHAN, S. I.; SANDERS, M.; FANTOUKH, O. I.; KHAN, I. A. In vitro cytotoxicity and neurotoxicity assessment of the alkaloidal constituents derived from *Asimina triloba twigs*. South African Journal Of Botany, v. 140, p. 204-209, 2021. http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.010.

MA, Y. L.; LI, Q. M.; HEUVEL, H. D; CLAEYS, M. Characterization of Flavone and Flavonol Aglycones by Collision-induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry. Rapid Communications In Mass Spectrometry, v. 11, p. 1357-1364, 1997.

MARCH, R. E.; LEWARS, E. G.; STADEY, C. J.; MIAO, X-S; ZHAO, X; METCALFE, C. D.. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. International Journal Of Mass Spectrometry, v. 248, n. 1-2, p. 61-85, 2006. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2005.09.011.

MENDES-SILVA, I.; LOBÃO, A. Q.; DALY, D.; PEIXOTO, A. L. Flora of Rondônia, Brazil: *malmeeae* (annonaceae). Rodriguésia, v. 72, p. 1-26, 2021. http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202172094.

MONTEIRO, A. S.; NASCIMENTO, H. B.; SEABRA, L.; BALDÉ, U.; BRAULE, G. P.; MAIA, A. A.; MASCARENHAS, S. A. N.; BRASILEIRO, T. S. A. Uso de plantas medicinais por povos milenares da Amazônia – Brasil (munduruku, karapãna, pupỹkary, tikuna e kokama), guiné bissau (fulas, gabu) e moçambique –tete (dema e nyungwe): uma perspectiva comparada. Revista EDUCAmazônia - Educação Sociedade e Meio Ambiente, Humaitá, 533 – 572, 2024.

MOREIRA, IC, ROQUE, NF, VILEGAS, W., ZALEWSKI, CA, LAGO, JHG E FUNASAKI, M. Gênero *Xylopia* (Annonaceae): Aspectos químicos e biológicos. Química & Biodiversidade, 10: 1921-1943, 2013.
https://doi.org/10.1002/cbdv.201100308

MORAES, G. V.; JORGE, G. M.; GONZAGA, R. V.; SANTOS, D. A. dos. Potencial antioxidante dos flavonoides e aplicações terapêuticas. Research, Society And Development, v. 11, n. 14, 2022. http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i14.36225.

MORESCO, H. H.; QUEIROZ, G. S.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical constituents and evaluation of the toxic and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 22, n. 2, p. 319-324, 2012. http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000217.

MOURA, A. C. da S; VILEGA, W; SANTOS, L. C. dos. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta Linn*. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. Química Nova, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000700006.

MOBOT - Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org>. Acesso em: 25 abril 2025.

MUKHERJEE, P. K. Bioactive Phytocomponents and Their Analysis. Quality Control And Evaluation Of Herbal Drugs, p. 237-328, 2019. http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-813374-3.00007-7.

NABAVI, S. M.; AMEC, D.; TOMCZYK, M.; MILELLA, L.; RUSSO, D.; HABTEMARIAM, S.; SUNTAR, I.; RASTRELLI, L.; DAGLIA, M.; XIAO, J. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: versatile targets for metabolic engineering. Biotechnology Advances, v. 38, p. 107316, 2020. http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.005.

NASCIMENTO, F. C.; BOAVENTURA, M. A D.; ASSUNÇÃO, A. C.; PIMENTA, L. P. S. ACETOGENINAS DE ANONÁCEAS ISOLADAS DE FOLHAS *DE Rollinia laurifólia*. Quim. Nova, Vol. 26, No. 3, 319-322, 2003.

NICULAU, E. S.; FREITAS, S. D. L. de; SÁ, I. C. G. de; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. da. Quantitative Analysis of Natural Products in Plants by LC-MS. Revista

Virtual de Química, v. 8, n. 1, p. 204-230, 2016. http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20160014.

NIKOLOV, N.; SELIGMANN, 0.; WAGNER, H. New Flavonoid-glycosides from *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna*. Journal Of Medicinal Plant Research, v. 44, n. 1, p. 50-53, 1982.

NUNES, C. dos R.; BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. de L.; OLIVEIRA, D. B. de. Flavonoids in Annonaceae: occurrence and biological properties. Vértices: REVIEW, Campos dos Goytacazes/ RJ, v. 14, n. 1, p. 39-57, 2012.

OLIVEIRA, A. K. M.; MATIAS, R.; PINA, J. C. *Unonopsis guatterioides*: morphological and chemical characteristics of its fruits and seeds, and germination processes under experimental conditions. Brazilian Journal Of Biology, v. 83, e269219, 2023. http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.269219

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. Journal Of Nutritional Science, v. 5, n. 47, p. 1-14, 2016. Cambridge University Press (CUP). http://dx.doi.org/10.1017/jns.2016.41.

PATEL, R. S.; Dutta R. M. Mass spectrometry - A review, Vet. World. 5(3):185-192, 2012. http://10.5455/ vetworld.2012.185-192.

PAULINO NETO, H. F. História Natural e Interação Flor- Besouros em espécies do Cerrado. 2009, 101 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Ecologia.

PAVIA, D.L. et al., Introdução à Espectroscopia, Ed. Cengage Learning, 2010.

PALEARI, L. M. Frutas e seus frugívoros. Botucatu : REDE Sans, FINEP, 2017. http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Educacao/frutas_e_seus_frugivoros.pdf

PENNA, T.; CORRERA, T. Técnicas Avançadas para a Diferenciação de Isômeros por Espectrometria de Massas. Química Nova (SBQ), v. 43, n. 8, p. 1125-1137, 2020. http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170582.

PENG, J; FAN, G; HONG, Z; CHAI, Y; WU, Y. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa Juss* by high-speed counter-current chromatography. Journal Of Chromatography A, v. 1074, n. 1-2, p. 111-115, 2005. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.067.

PÉREZ-TORRES, I.; CASTREJÓN-TÉLLEZ, V.; SOTO, M. E.; RUBIO-RUIZ, M. E.; MANZANO-PECH, L.; GUARNER-LANS, V. Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 4, p. 1786-1811, 2021. http://dx.doi.org/10.3390/ijms22041786.

PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; MCCULLAGH, M. Distinction of theC-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. Phytochemical Analysis, v. 16, n. 5, p. 295-301, 2005. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/pca.820.

PEREIRA, I. de S. P.; VEGA, M. R. Flavonoids in the *Annona* genus: chromatographic and spectral methods of analysis - a review. Revista Virtual de Química (SBQ), v. 14, n. 5, p. 778-789, 2022. http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20220032.

POWO (2024). "Plants of the World Online. Facilitado pelo Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: http://www.plantsoftheworldonline.org/. Acesso em 15 de abril de 2024.

POMPER, K. W.; CRABTREE, S. B.; BROWN, S. P.; JONES, S. C.; BONNEY, T. M. Assessment of Genetic Diversity of Pawpaw (*Asimina triloba)* Cultivars with Intersimple Sequence Repeat Markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128(4):521–525. 2003.

PRESTES, C. F.; BRAGA, M. N. S.; BRITO, D. S.; BATISTA, F. A.; SOUZA, F. G.; SILVA, G. A.; CRUZ, P. B.; LIMA, R. A. Plantas medicinais utilizadas pelos povos ribeirinhos em comunidades no município de Manicoré-Amazonas, Brasil. Revista Valore, Volta Redonda, 8, e-8056, 2023.

QUÍLEZ, A. M., FERNÁNDEZ-ARCHE, M. A., GARCÍA-GIMÉNEZ, M. D., DE LA PUERTA, R. Potential therapeutic applications of the genus *Annona* : Local and traditional uses and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology, 225, 244–270, 2018. http://dx.doi.10.1016/j.jep.2018.06.014

RANGEL, J.; LIBERAL, Â.; CATARINO, S.; COSTA, J. C.; ROMEIRAS, M. M.; FERNANDES, Â. Phytochemical and bioactive potentials of African Annonaceae species. Food Chemistry, v. 448, p. 139048, 2024. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139048.

RAYYAN, S.; FOSSEN, T.; NATELAND, H. Solheim. Isolation and Identification of Flavonoids, Including Flavone Rotamers, From The Herbal Drug 'Crataegi Folium Cum Flore' (Hawthorn). Phytochemical Analysis, v. 16, p. 334-341, 2005.

ROSSO, V. V; MERCADANTE, A. Z. Identificação e quantificação de carotenoides, por HPLC-PDA-MS/MS, de frutas Amazônicas. Revista de Química Agrícola e Alimentar. v. 55 (13), 5062-5072, 2007. DOI: 10.1021/jf0705421

PEÑA, M. H. [et al.]. VI Botânica no Inverno 2016. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016. 223p.

RAMOS, A. L. C. C.; MAZZINGHY, A. C. do C.; CORREIA, V. T. da V.; NUNES, B. V.; RIBEIRO, L. V.; SILVA, V. D. M; WEICHERT, R. F.; PAULA, A. C. C. F. F. de; SOUSA, I. M. N. de; FERREIRA, R. M. B. An Integrative Approach to the Flavonoid Profile in Some Plants' Parts of the *Annona* Genus. Plants, v. 11, n. 21, p. 2855, 2022. http://dx.doi.org/10.3390/plants11212855.

ROY, A.; KHAN, A.; AHMAD, I.; ALGHAMDI, S.; RAJAB, B. S.; BABALGHITH, A. O.; ALSHAHRANI, M. Y.; ISLAM, S. Rabiul. Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications. Biomed Research International, v. 2022, n. 1, p. 1-9, 2022. http://dx.doi.org/10.1155/2022/5445291.

SANTOS, D. Y. A. C. dos. Biossíntese, funções e aplicações dos metabólitos secundários de plantas. Curitiba: Appris Ltda, 2020. 401 p.

SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic signicance. Phytochemistry, v. 55, p. 567-573, 2000.

SANTOS, E. L.; SANTANA, A. C.; MICHELETTI, A. C.; FREIRE, T. V.; GUTERRES, Z. R.; YOSHIDA, N. C. Metabolomi cprofiling andassessment of antimicrobial, antioxidante and genotoxic potential of *Unonopsis guatterioides* R.E.Fr. (Annonaceae) fruits. Arabian Journal of Chemistry, v. 16, 2023.

SERUGA, M.; TOMAC, I. Influence of Chemical Structure of Some Flavonols on Their Electrochemical Behaviour. International Journal of Electrochemical Science, v. 12, n. 8, p. 7616-7637, 2017. http://dx.doi.org/10.20964/2017.08.79.

SILVA, F. M. A. da. Contribuição ao Estudo Fitoquímico e Quimiotaxonômico do Gênero *Unonopsis* da Região Amazônica. 2016. 160 f. Tese (Doutorado) - Química Orgânica, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

SILVA, F. M. A.; LIMA, B. R.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A.; SILVA-FILHO, F. A.; CORREA, W. R.; SALVADOR, M. J.; SOUZA, A. Q. L.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Polycarpol in *Unonopsis, Bocageopsis* and *Onychopetalum amazonian* species: cheymosystematical implications and antimicrobial evaluation. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.25, p.11-15, 2015.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; PEREIRA, J. L. SILVA.; FLACH, A.; COSTA, L. A. M. A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Chemotaxonomy of the Amazonian *Unonopsis* Species Based on GC-MS and Chemometric Analysis of the Leaf Essential Oils. Rec. Nat. Prod. v. 9:4, p. 530-537, 2015b.

SILVA, F. M. A. da; KOOLEN, H. H. F.; LIMA, J. P. S. de; SANTOS, D. M. F.; JARDIM, I. Silva; SOUZA, A. D. L. de; PINHEIRO, M. L. B. Leishmanicidal activity of fractions rich in aporphine alkaloids from *Amazonian Unonopsis* species. Revista Brasileira de Pharmacognosy, v. 22, n. 6, p. 1368-1371, 2012. http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2012005000103.

SILVA, F. M. A. da; KOOLEN, H. H. F.; ALMEIDA, R. A. de; SOUZA, A. D. L. Desreplicação de Alcalóides Aporfínicos e Oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. Quim. Nova, v. 35, n. 5, p. 944-947, 2012.

SILVA, F. M. A.; SILVA, K. P. A; OLIVEIRA, L. P. M.; COSTA, E. V.; KOOLEN, H. H. F.; 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). Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 115, 2020. doi: 10.1590/0074-02760200207

SINGLA, R. K.; DUBEY, A. K.; GARG, A.; SHARMA, R. K.; FIORINO, M.; AMEEN, S. M.; HADDAD, M. A.; AL-HIARY, M. Natural Polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. Journal Of Aoac International, v. 102, n. 5, p. 1397-1400, 2019. http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.19-0133.

SONIBARE, M. A.; AYOOLA, I. O.; GUEYE, B.; ABBERTON, M. T.; D'SOUZA, R.; KUHNERT, N. Leaves metabolomic profiling of Musa acuminata accessions using UPLC–QTOF–MS/MS and their antioxidant activity. Journal Of Food Measurement And Characterization, v. 12, n. 2, p. 1093-1106, 2018. http://dx.doi.org/10.1007/s11694-018-9725-4.

SHAH, A.; SMITH, D. L. Flavonoids in Agriculture: chemistry and roles in, biotic and abiotic stress responses, and microbial associations. Agronomy, v. 10, n. 8, p. 1209-1234, 2020. http://dx.doi.org/10.3390/agronomy10081209.

SHRESTHA, S; LEE, D-Y; PARK, J-H; CHO, J-G; SEO, W-D; KANG, H C; JEON, Y-J; YEON, S-W; BANG, M-Ho; BAEK, N-I. Flavonoid glycosides from the fruit of Rhus parviflora and inhibition of cyclin dependent kinases by hyperin. Journal Of The Korean Society For Applied Biological Chemistry, v. 55, n. 5, p. 689-693, 2012. http://dx.doi.org/10.1007/s13765-012-2133-2

SÃO JOSÉ, A. R.; PIRES, M. de M.; FREITAS, A. L. G. E.; RIBEIRO, D. P.; PEREZ, L. A. A. Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. São Paulo, v. 36, edição especial, e., p. 086-093, 2014.

Stevens, P.F. [2001 onwards], Angiosperm Phylogeny Website, Verson 14. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>**.** Acesso em 15 de abril de 2024.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 3rd ed, 2010.

STRADA, C. L; LIMA, K. da C.; SILVA, V. C. da; RIBEIRO, R. V.; DORES, E. F.G. de C.; DALL'OGLIO, E. L.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G; CAROLLO, C. A.; MARTINS, D. T.O.; SOUSA, P. T. de. Isovitexin as marker and bioactive compound in the antinociceptive activity of the Brazilian crude drug extracts of Echinodorus scaber and E. grandiflorus. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 27, n. 5, p. 619-626, set. 2017. http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.05.011.

TSABANG, N.; FOKOU, P. V. T; TCHOKOUAHA, L. R. Y; NOGUEM, B; BAKARNGA-VIA, I; NGUEPI, M. S. D; NKONGMENECK, B. A; BOYOM, F. F. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. Journal Of Ethnopharmacology, v. 139, n. 1, p. 171-180, 2012. http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.035.

VASUDEVAN, U. M.; LEE, E. Y. Flavonoids, terpenoids, and polyketide antibiotics: Role of glycosylation and biocatalytic tactics in engineering glycosylation. Biotechnology Advances, v. 41, 2020. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107550

VIKAS, B. S.; AMILY, A.; SANGEETHA S. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of annonaceae family. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 3, n. 3, p. 1595-1604, 2014.

VILLIERS, A.; VENTER, P.; PASCH, H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids. Journal Of Chromatography A, v. 1430, p. 16-78, 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.077.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p.(Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316).

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews, v. 29, n. 1, p. 1-16, 2010. http://dx.doi.org/10.1002/mas.20212.

WAHYUNI, Y; BALLESTER, A. R; SUDARMONOWATI, E; BINO, R. J.; BOVY, A. G.. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. Phytochemistry, v. 72, n. 11-12, p. 1358-1370, 2011. http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.03.016.

WANG, Y.; NI, W.; JIN, X.; LI, J.; YU, Y. Vitexin-2-O-rhamnoside improves immunosuppression, oxidative stress, and phosphorylation of PI3K/Akt signal pathway in cyclophosphamide treated mice. European Journal Of Pharmacology, v. 925, p. 174999, 2022. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174999.

WANG, M.; SIMON, J. E.; AVILES, I. F. Analysis of Antioxidative Phenolic Compounds in Artichoke (*Cynara scolymus* L). Journal Of Agricultural And Food Chemistry, v. 51, p. 601-608, 2003.

WANG, S-F; LENG, J; XU, Y-M; FENG, M-L. Identification and determination of major constituents in a traditional Chinese medicine compound recipe Xiongdankaiming tablet using HPLC-PDA/ESI-MS n and HPLC-UV/ELSD. Journal Of Zhejiang University Science B, v. 14, n. 7, p. 604-614, 2013. http://dx.doi.org/10.1631/jzus.b1200295.

WEN, L.; JIANG, Y.; YANG, J.; ZHAO, Y.; TIAN, M.; YANG, B. Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. Annals Of The New York Academy of Sciences, v. 1398, n. 1, p. 120-129, 2017. http://dx.doi.org/10.1111/nyas.13350

WEI, W.; YING, X.; ZHANG, W.; CHEN, Y. Effects of vitexin-2″-O-rhamnoside and vitexin-4″-O-glucoside on growth and oxidative stress-induced cell apoptosis of human adipose-derived stem cells. Journal Of Pharmacy And Pharmacology, v. 66, p. 988-997, 2014. doi: 10.1111/jphp.12225.

XIAO, J.; CAPANOGLU, E.; JASSBI, A. R.; MIRON, A. Advance on the Flavonoid *C*-glycosides and Health Benefits. Critical Reviews In Food Science And Nutrition, v. 56, n. 1, p. 29-45, 2015. http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1067595.

YEN, S. C.; CHEN, L. C.; HUANG, H. L; NGO, S. T.; WU, Y. W.; LIN, T. E. Investigation of Selected Flavonoid Derivatives as Potent FLT3 Inhibitors for the Potential Treatment of Acute Myeloid Leukemia. Journal Of Natural Products, v. 84, n. 1, p. 1-10, 2021. http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00589.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M.T.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, L. P.; CAVALCANTI, T. B.; MANSANO, V. F. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. Rodriguésia, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015. http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201566411.

ZHUANG, W. B.; LI, Y. H; SHU, X. C.; PU, Y. T.; WANG, X. J.; WANG, T.; WANG, Z. The Classification, Molecular Structure and Biological Biosynthesis of Flavonoids, and Their Roles in Biotic and Abiotic Stresses. Molecules, v. 28, n. 8, p. 3599-3624, 2023. http://dx.doi.org/10.3390/molecules28083599.

ZHAO, M; DU, Le; TAO, J; QIAN, D; SHANG, E-X; JIANG, S; GUO, J; LIU, P; SU, S-L; DUAN, J-A. Determination of Metabolites of Diosmetin-7-O-glucoside by a Newly Isolated Escherichia coli from Human Gut Using UPLC-Q-TOF/MS. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, v. 62, n. 47, p. 11441-11448, 2014. http://dx.doi.org/10.1021/jf502676j.

Anexos

8. ANEXOS

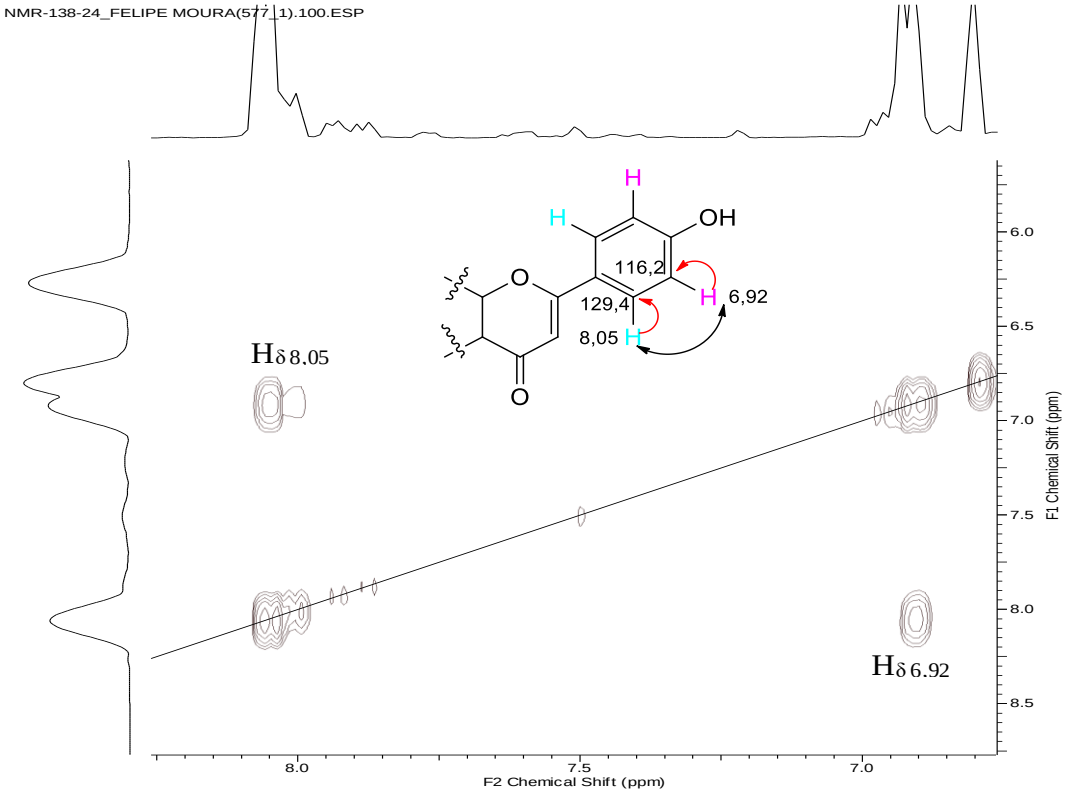


Figura A 1: Mapa de correlação COSY da substância FRS-3-F1.

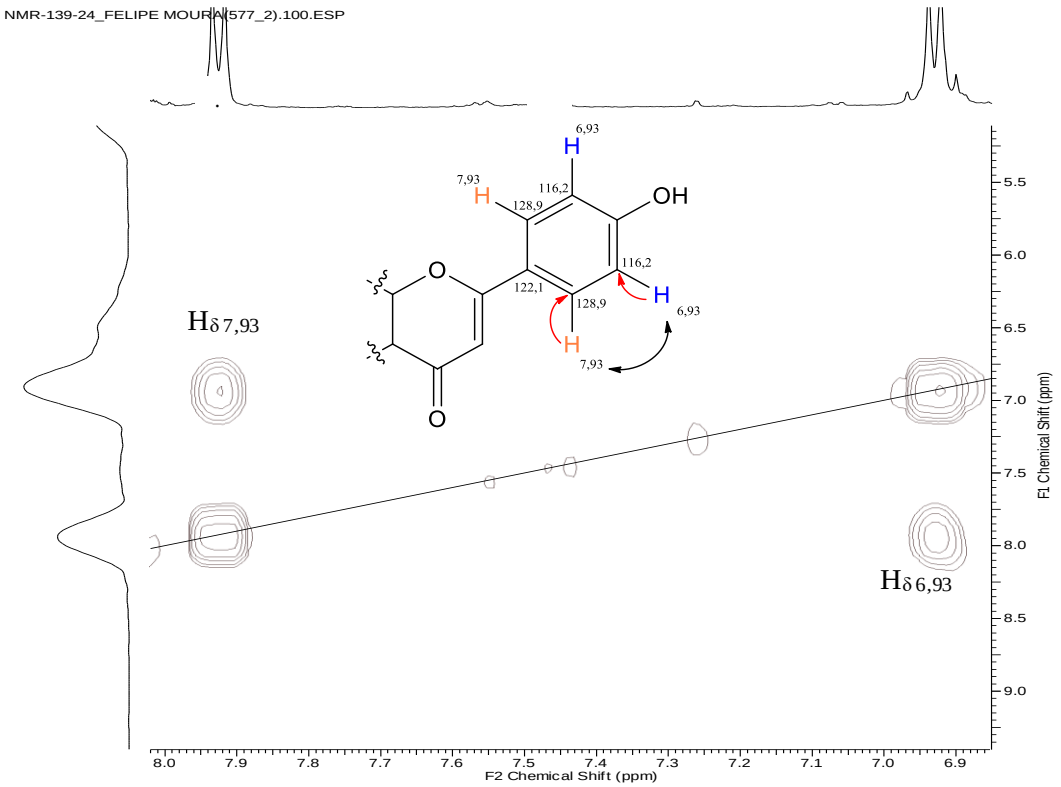


Figura A 2: Mapa de correlação COSY da substância FRS-3-F2.

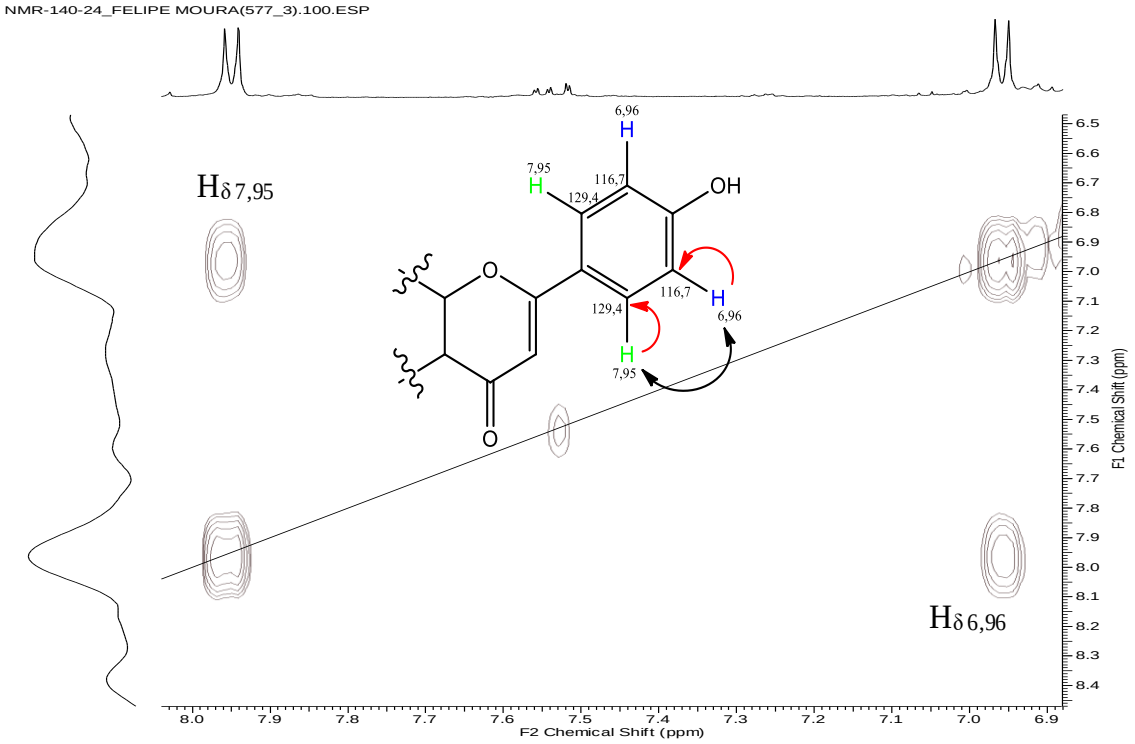


Figura A 3: Mapa de correlação COSY da substância FRS-3-F4.

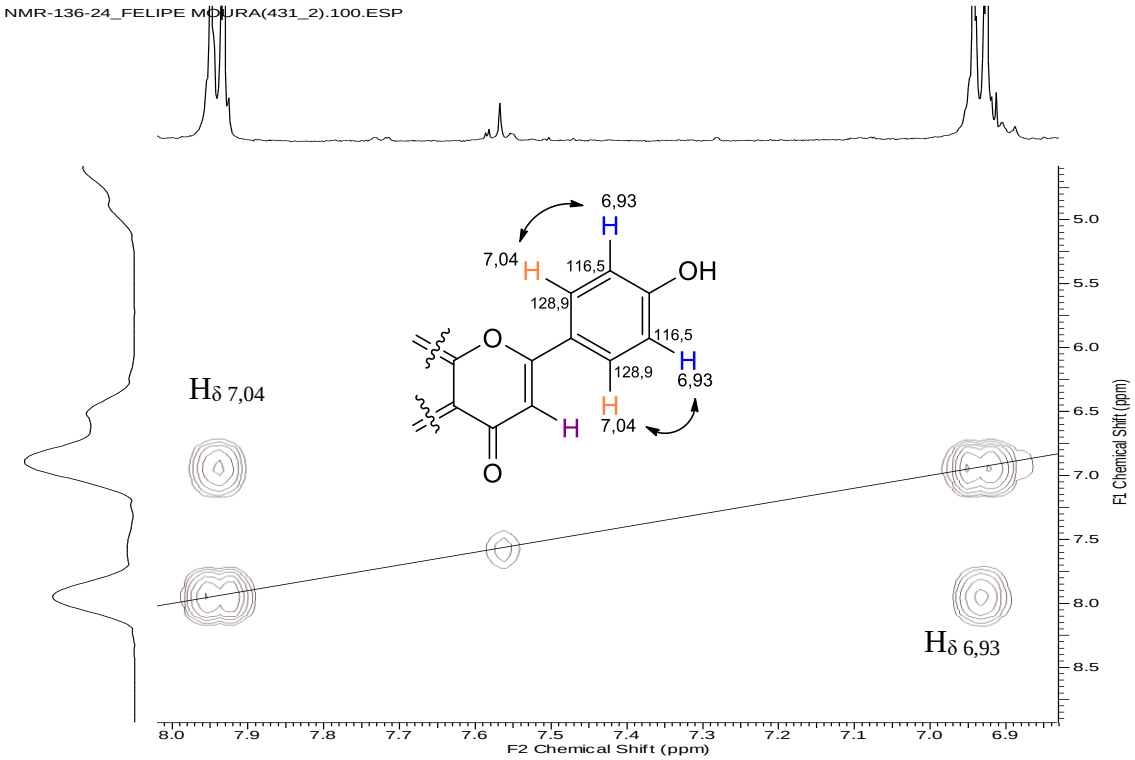


Figura A 4: Mapa de correlação COSY da substância FRS-5-F3.

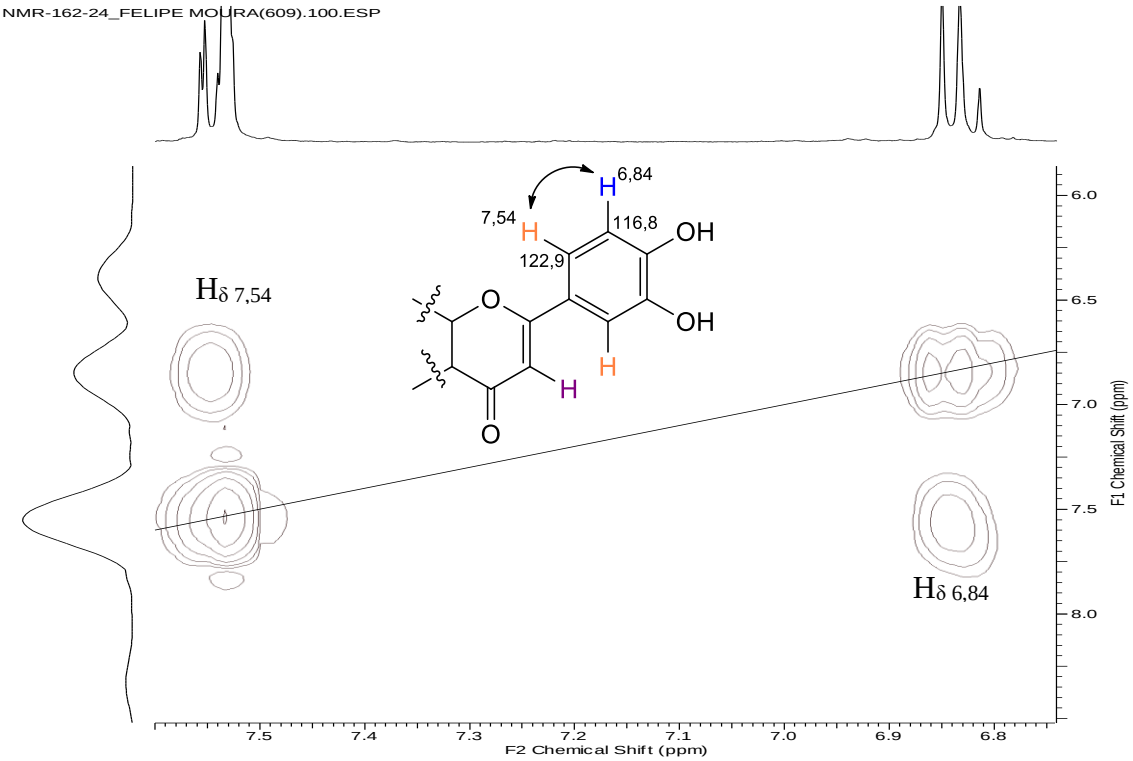


Figura A 5: Mapa de correlação COSY da substância FRS-5-F4.

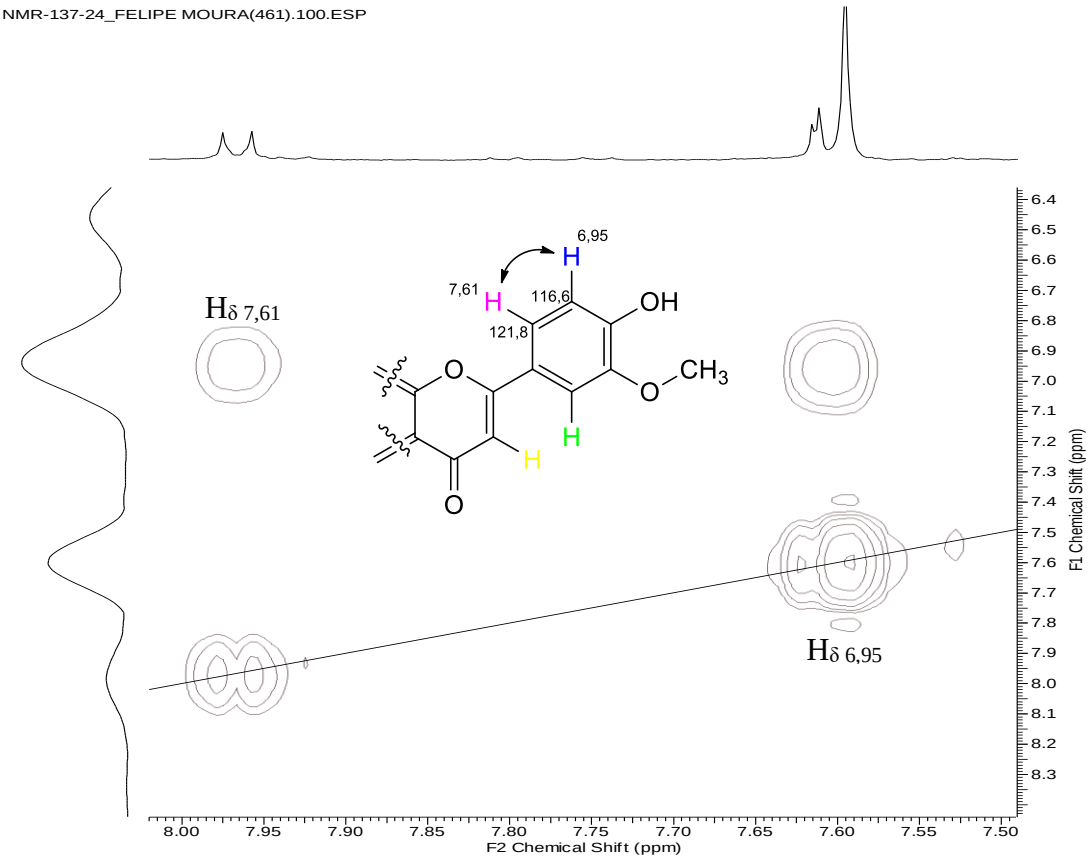


Figura A 6: Mapa de correlação COSY da substância FRS-5-F5.

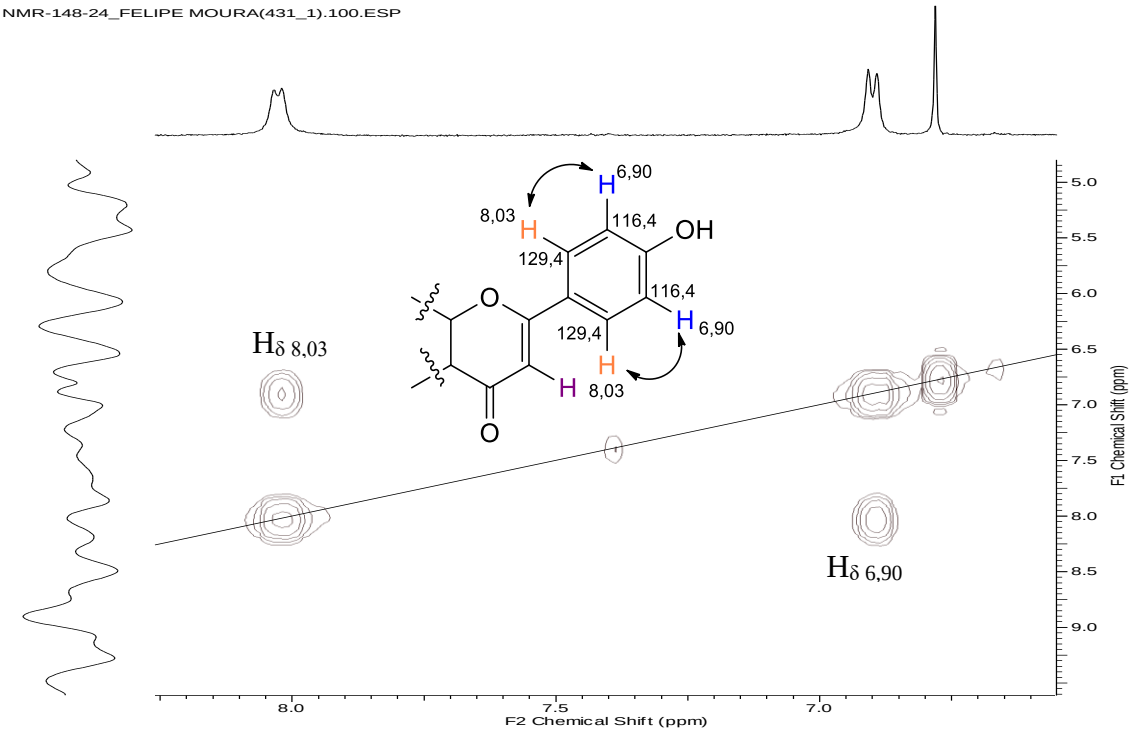


Figura A 7: Mapa de correlação COSY da substância FRS-8-F3.

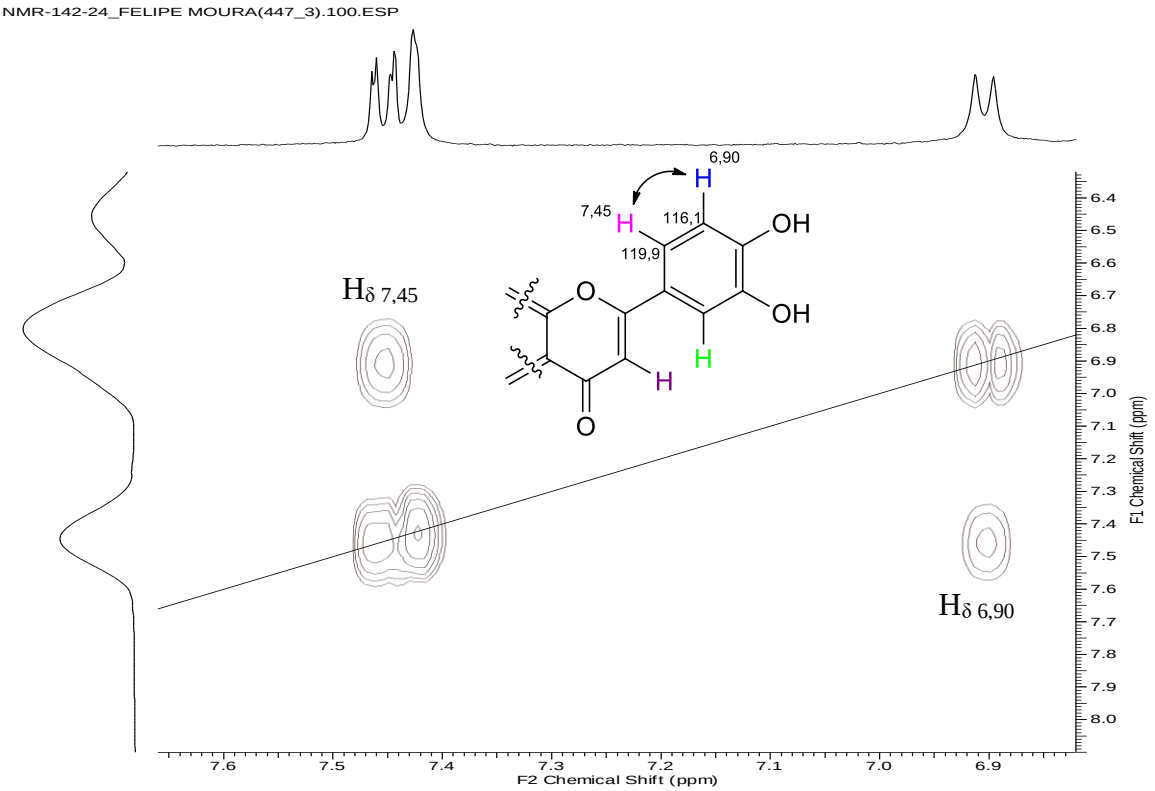


Figura A 8: Mapa de correlação COSY da substância FRS-11-F2.

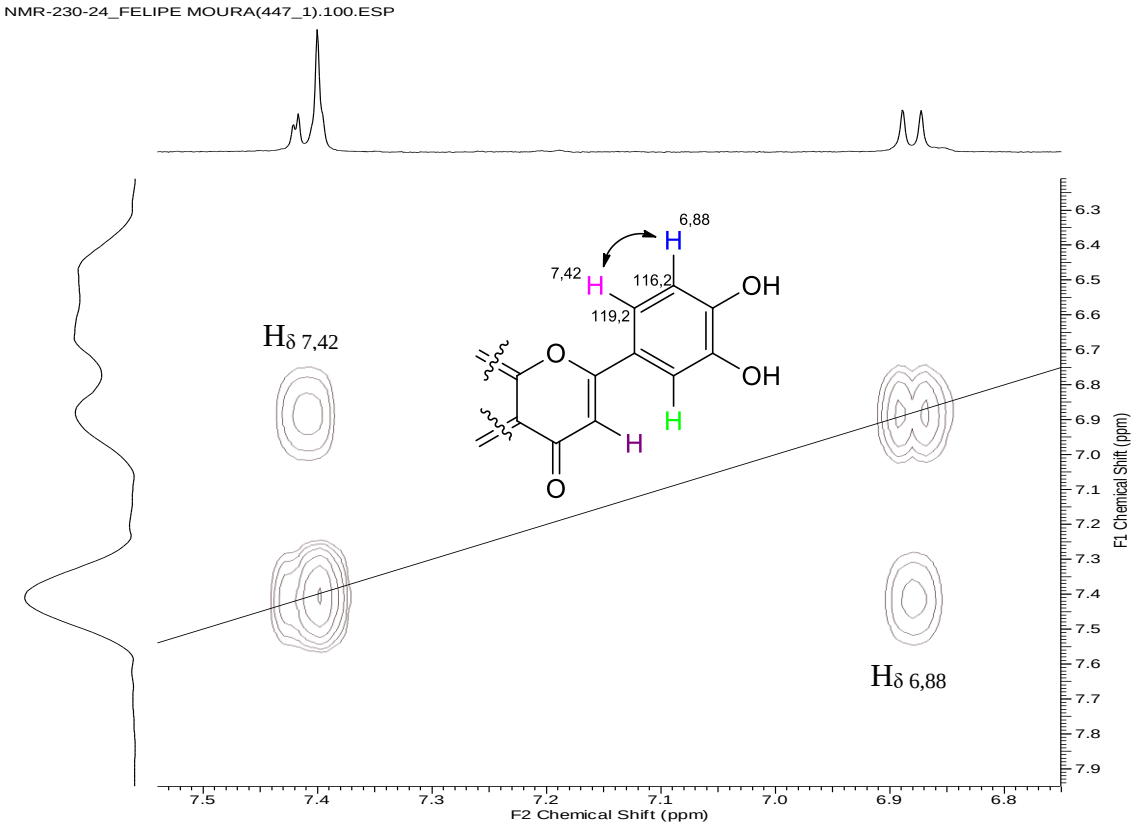


Figura A 9: Mapa de correlação COSY da substância FRS-12-F1-A.

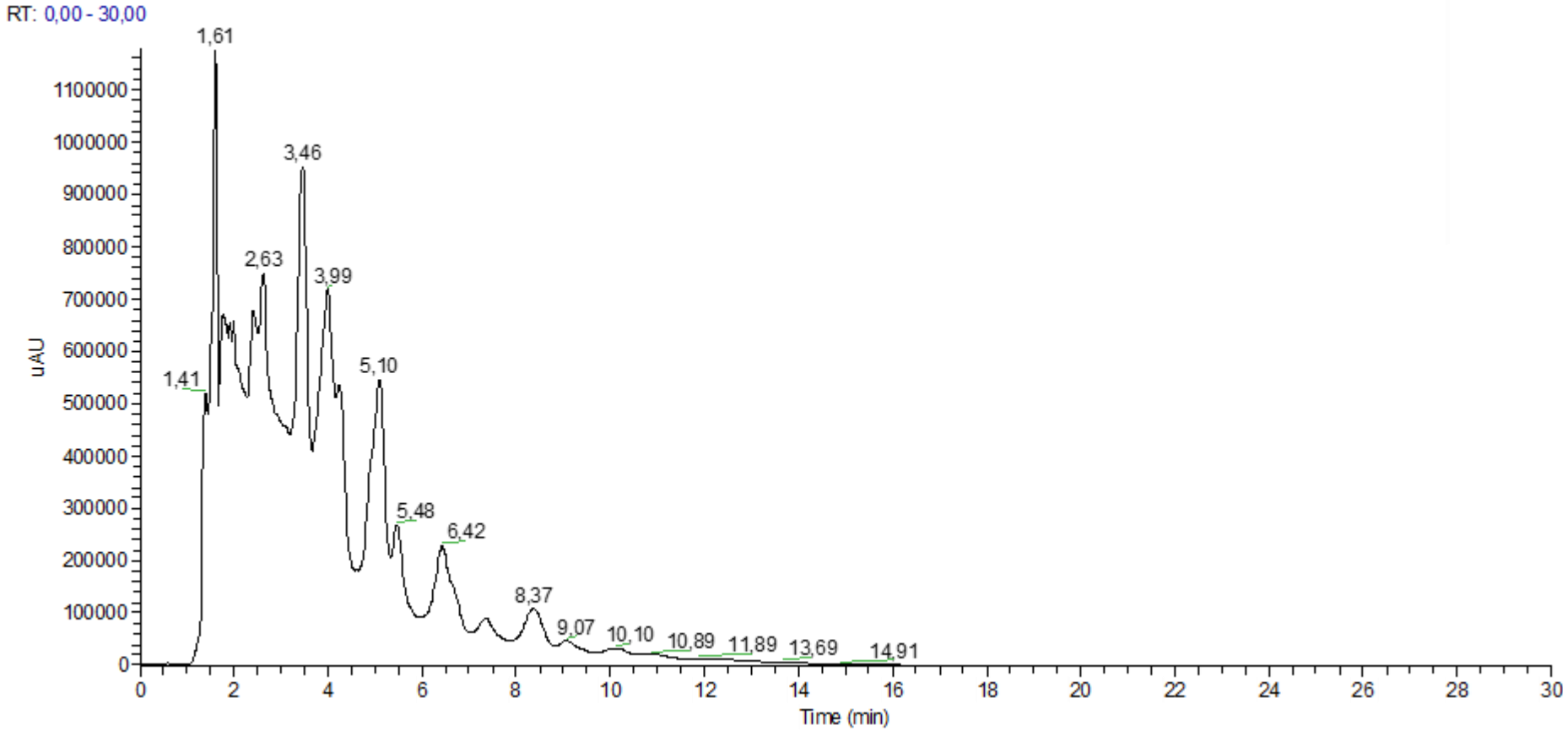


Figura A 10: Cromatograma LC-APCI-MS da fração metanólica em coluna C18.

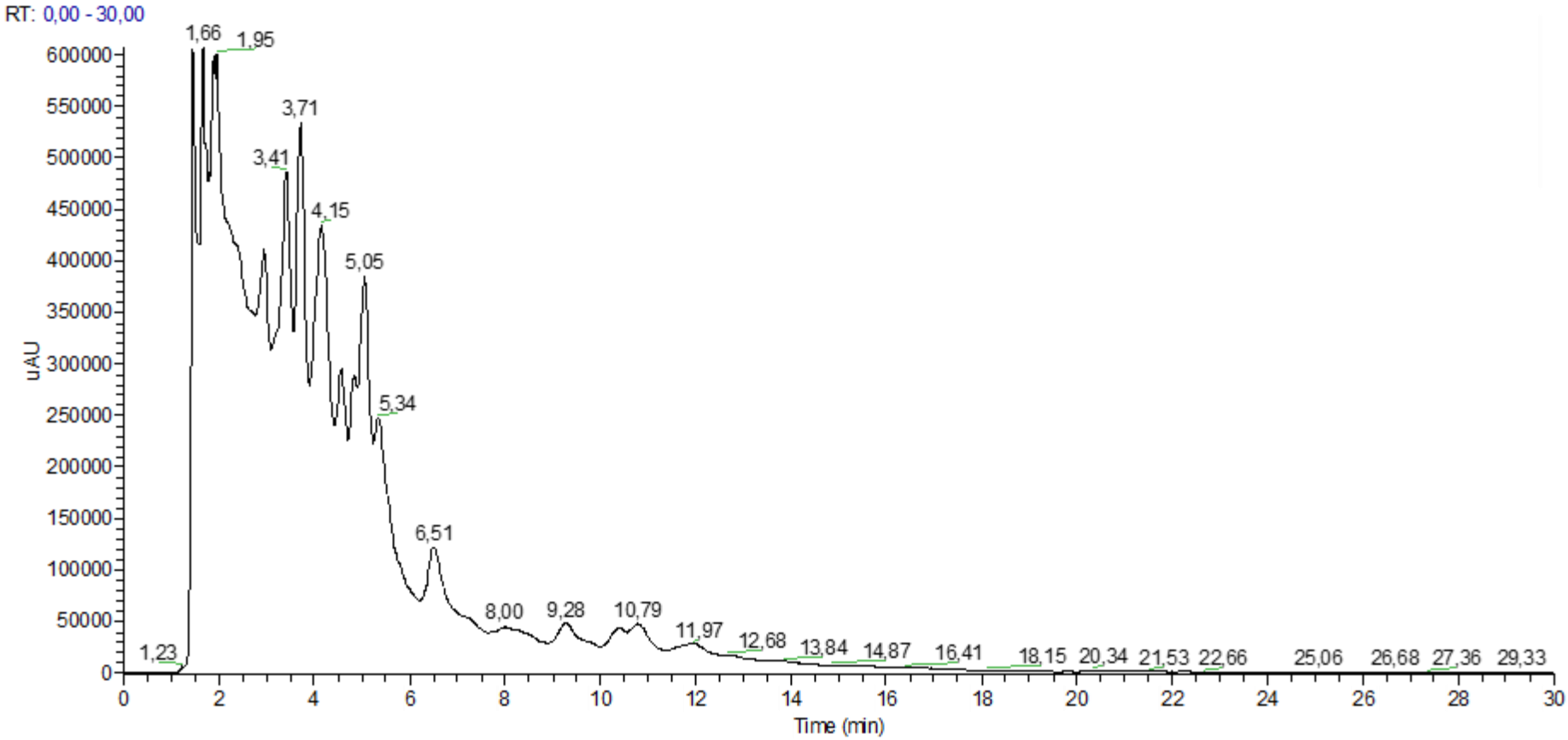


Figura A 11: Cromatograma de LC-APCI-MS da fração metanólica em coluna Phenyl-hexyl.

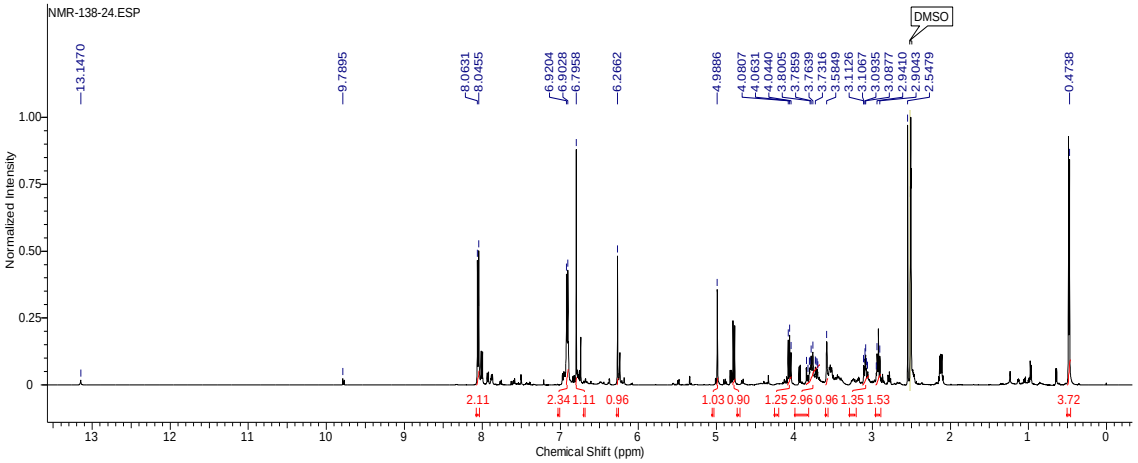


Figura A 12: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F1.

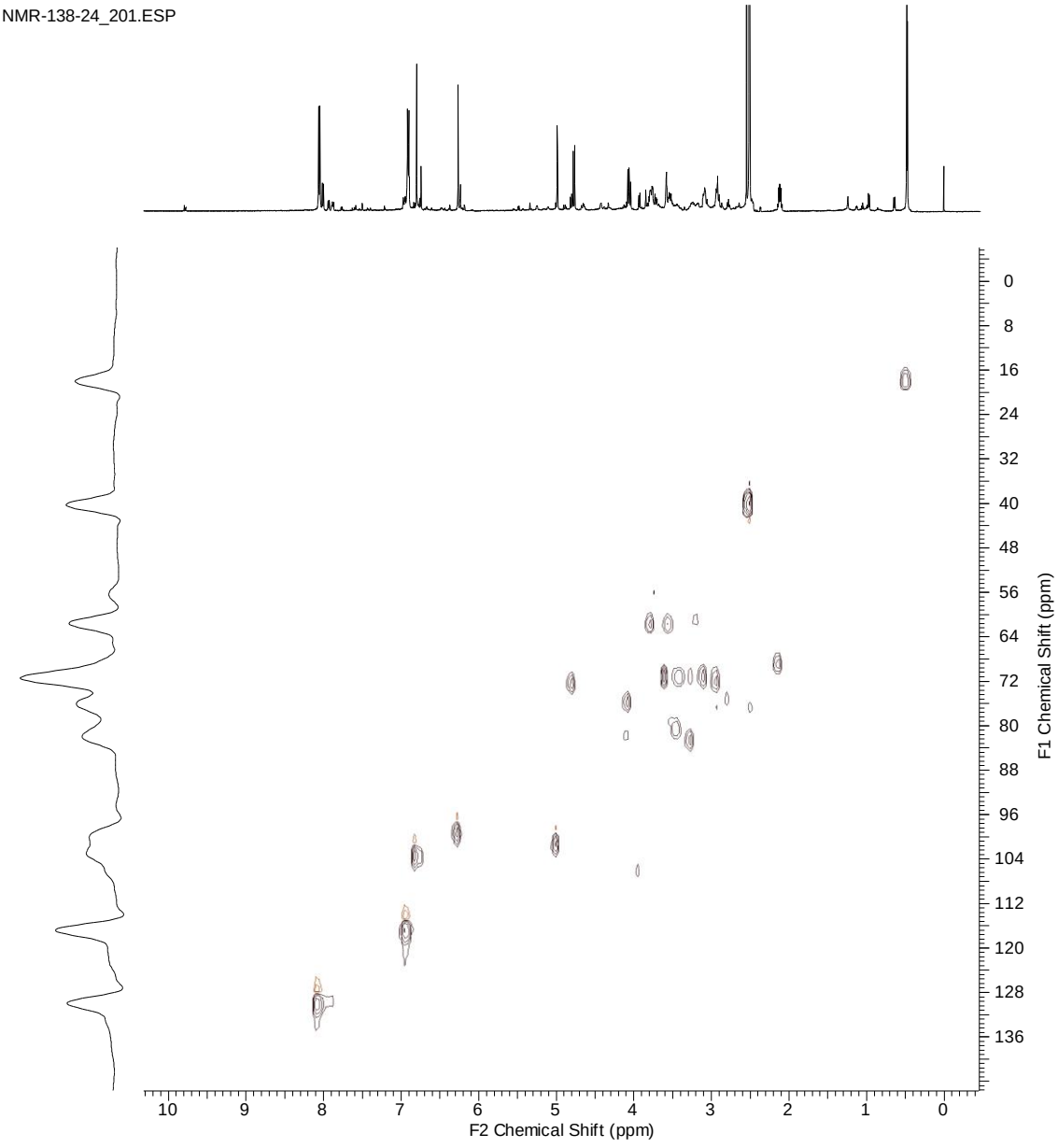


Figura A 13: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-3-F1.

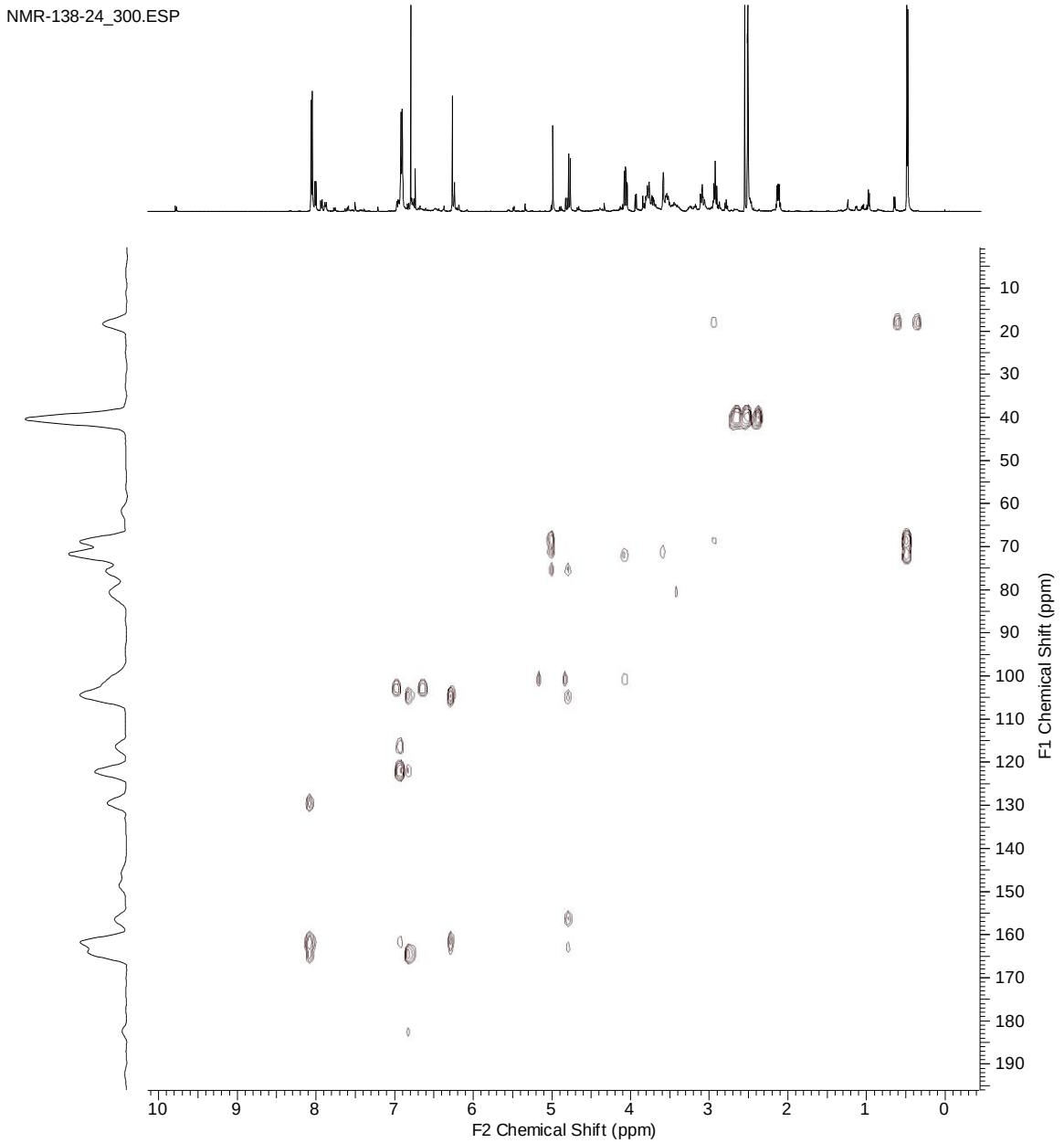


Figura A 14: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-3-F1.

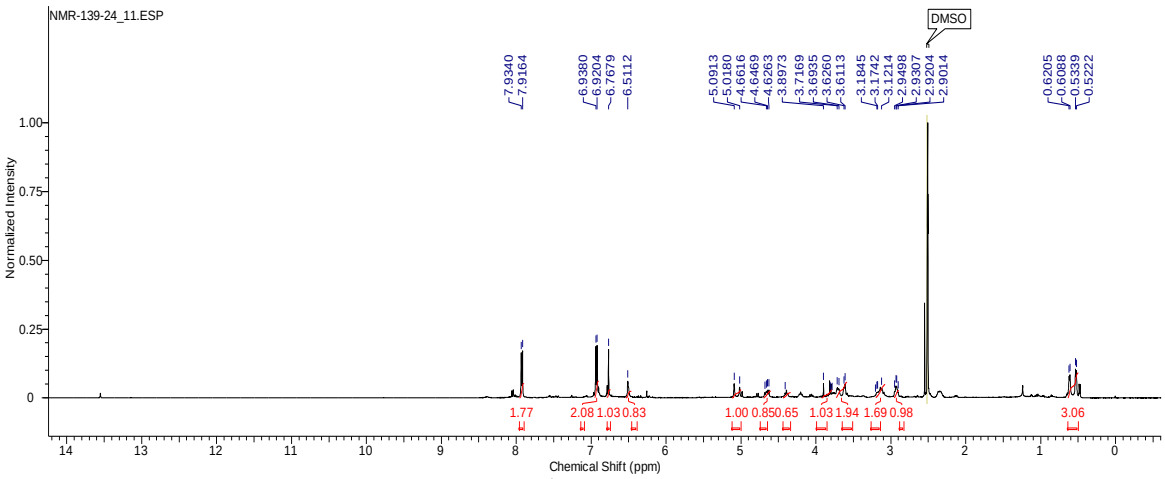


Figura A 15: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F2.

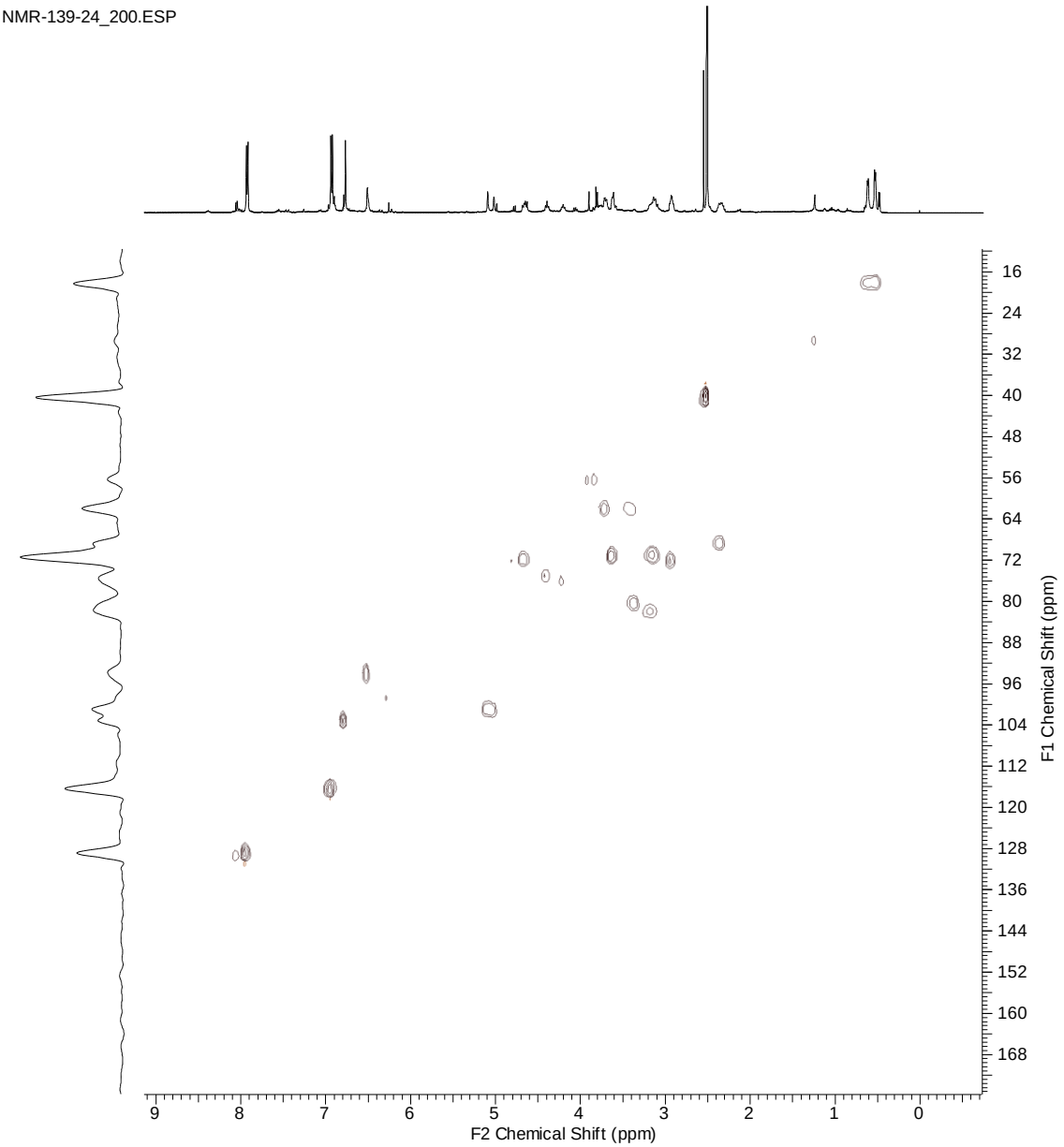


Figura A 16: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-3-F2.

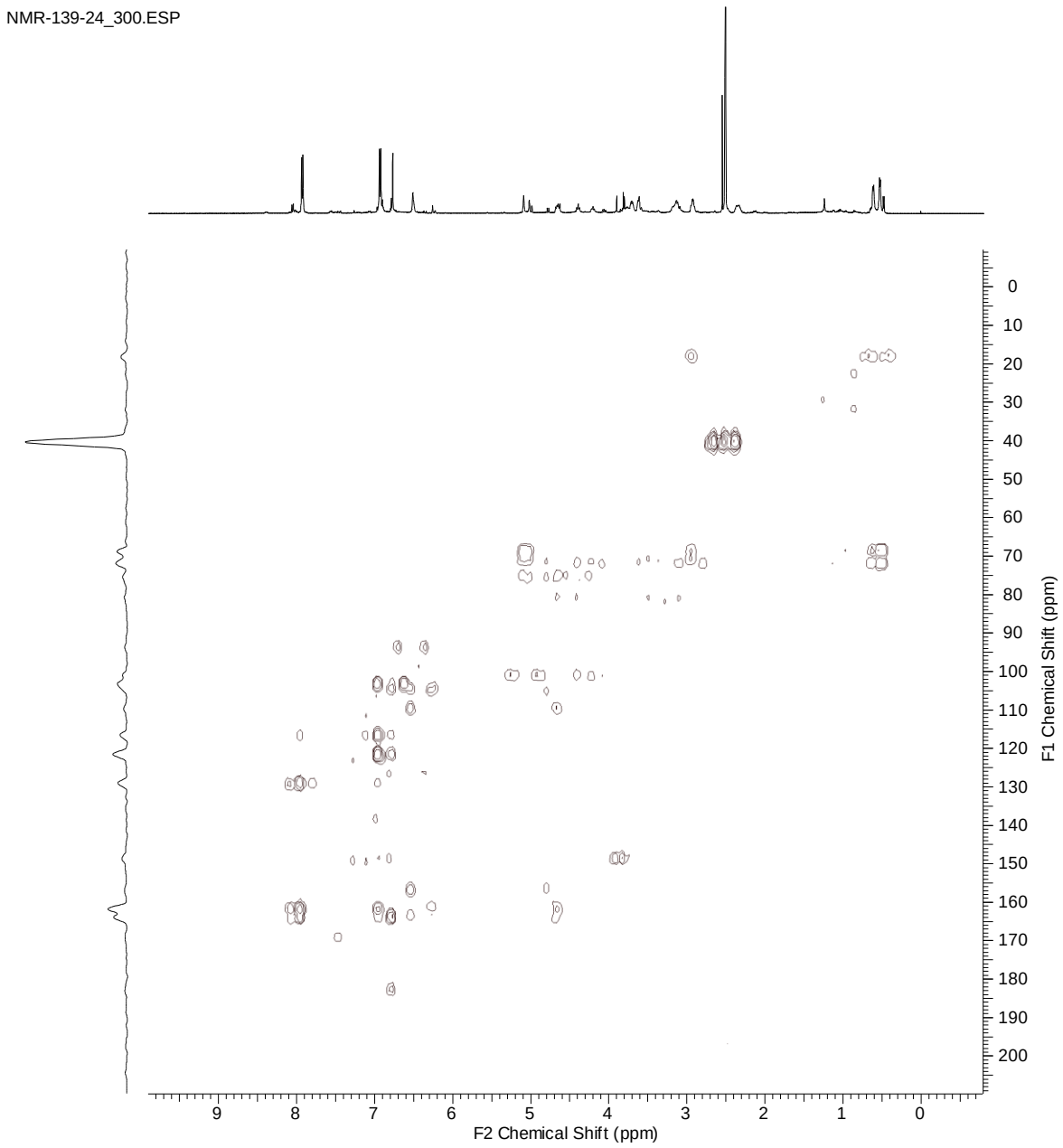


Figura A 17: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-3-F2.

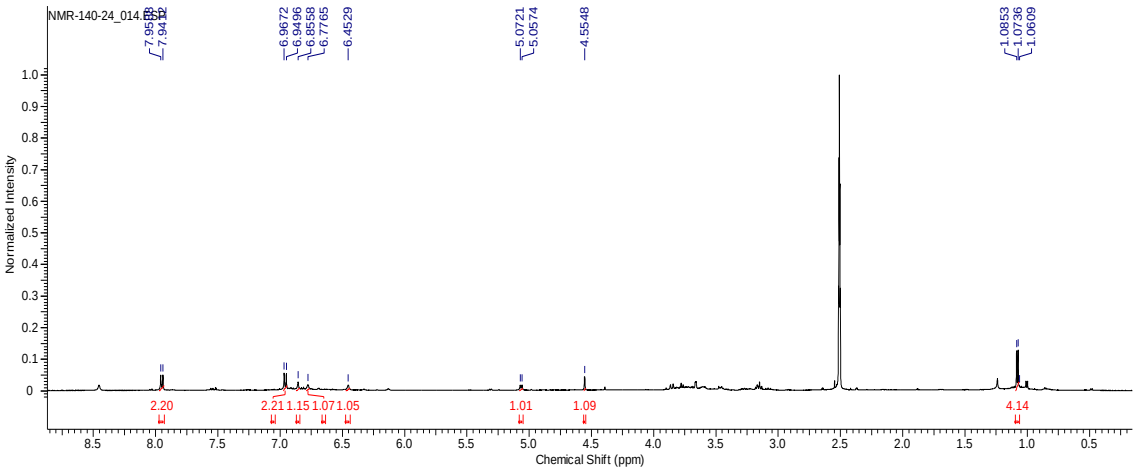


Figura A 18: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-3-F4.

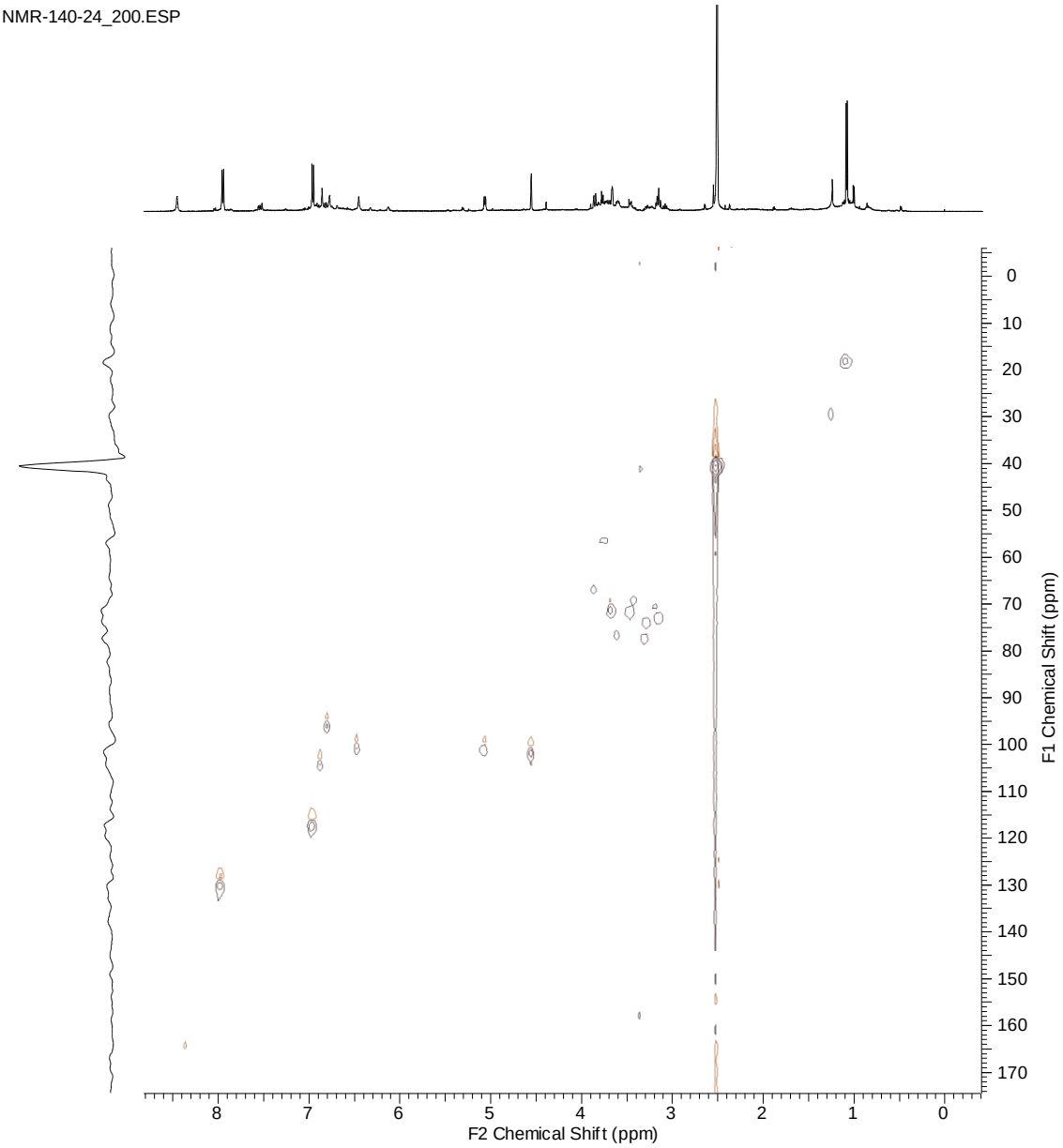


Figura A 19: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-3-F4.

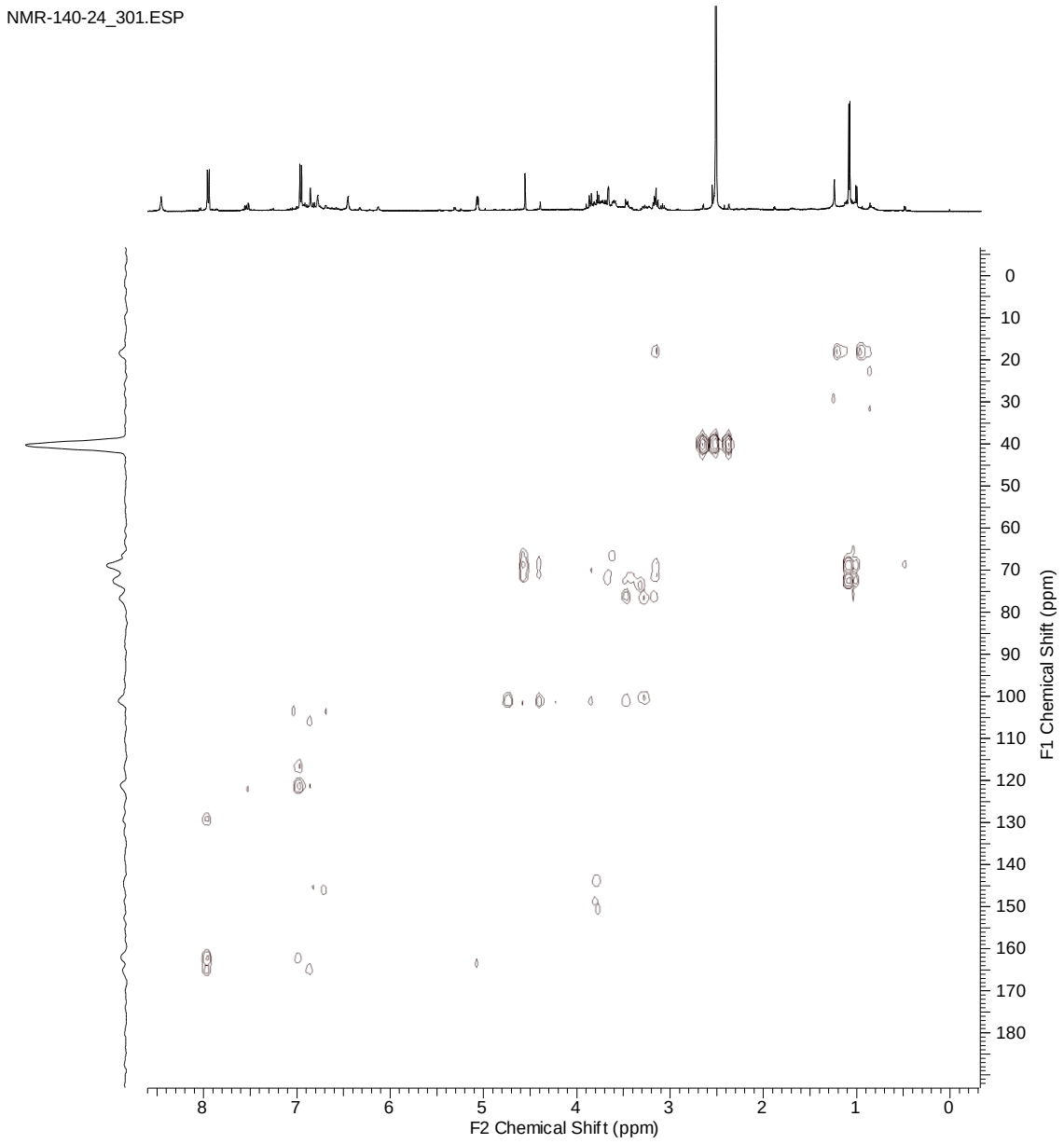


Figura A 20: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-3-F4.

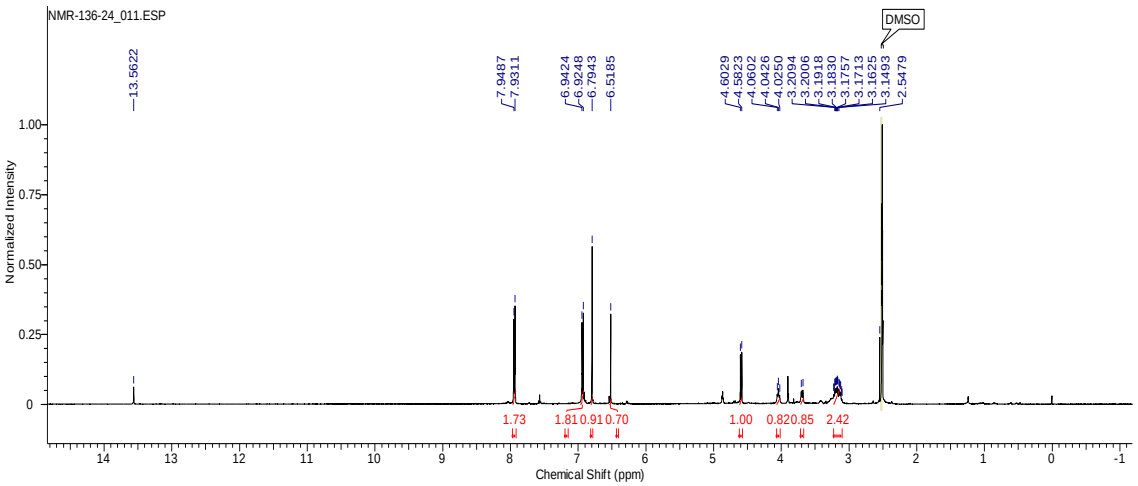


Figura A 21: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F3.

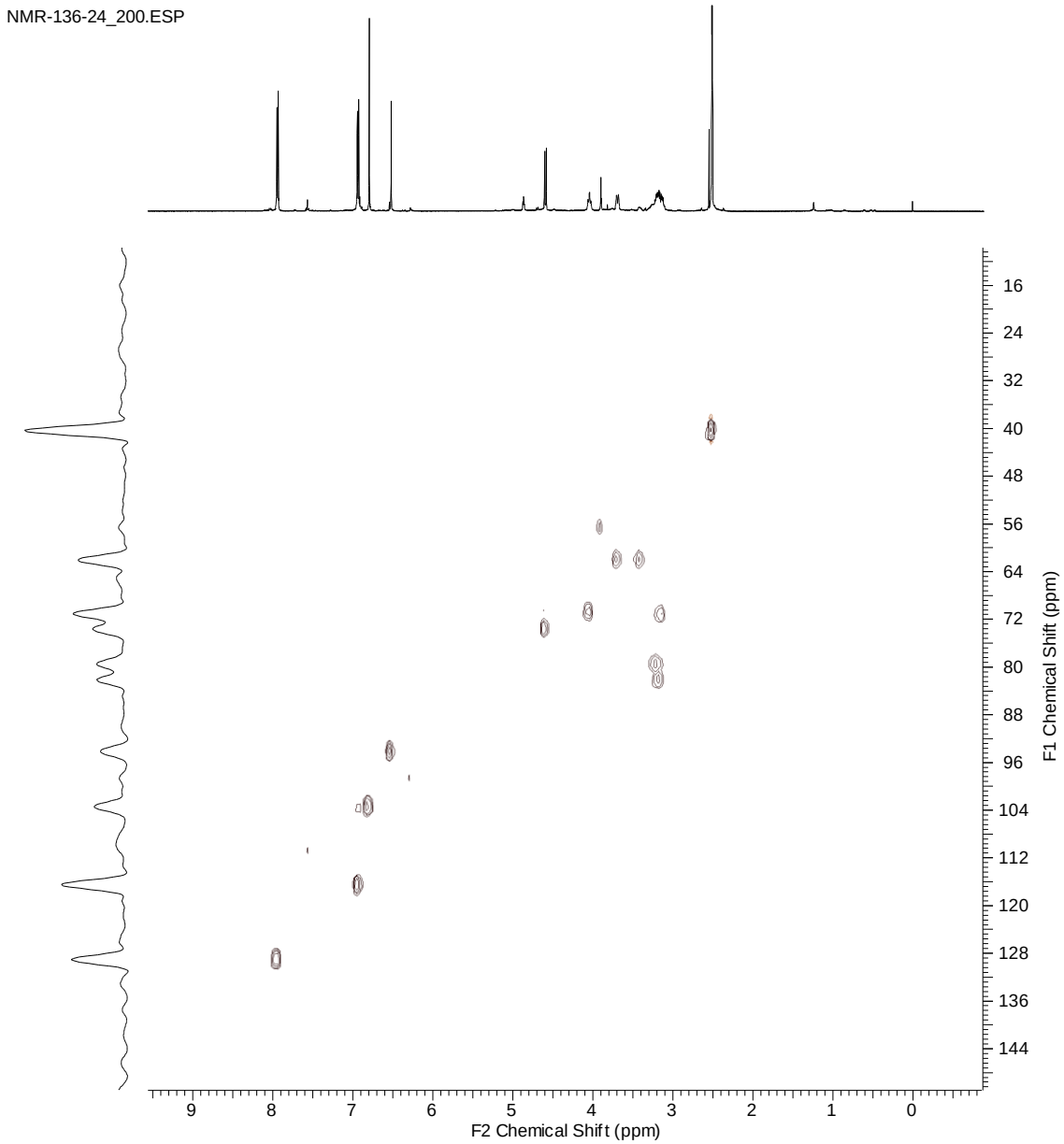


Figura A 22: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-5-F3.

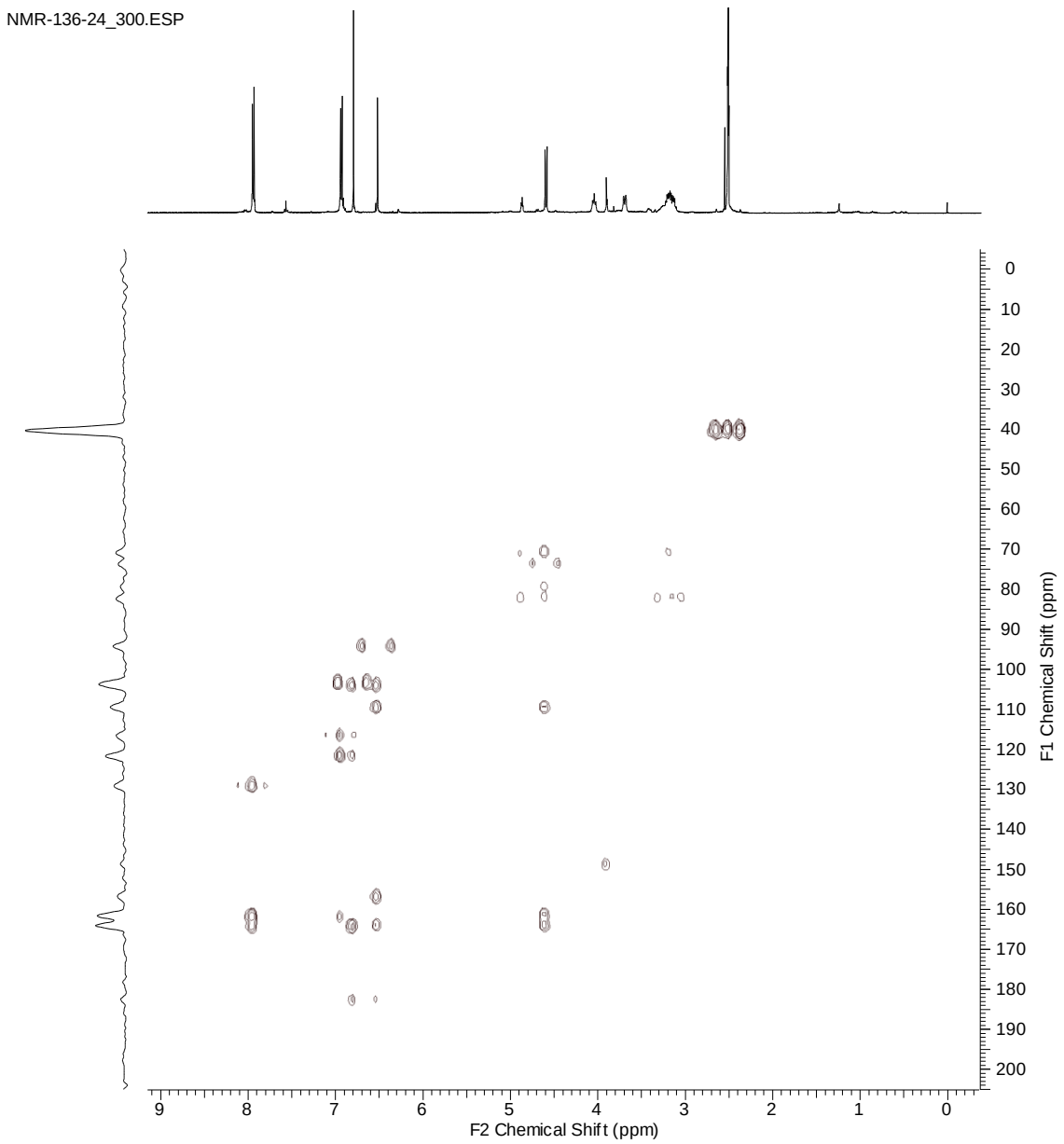


Figura A 23: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-5-F3.

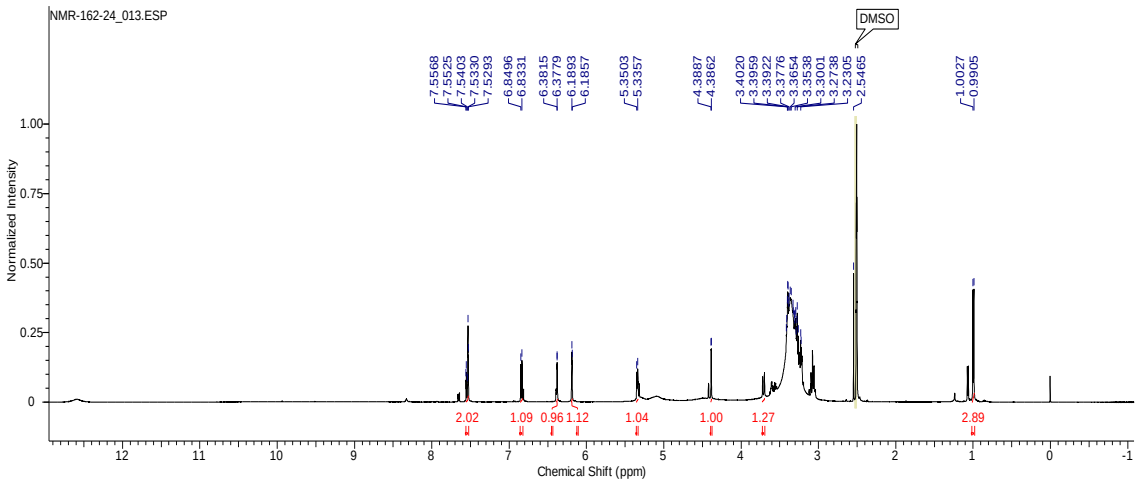


Figura A 24: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F4.

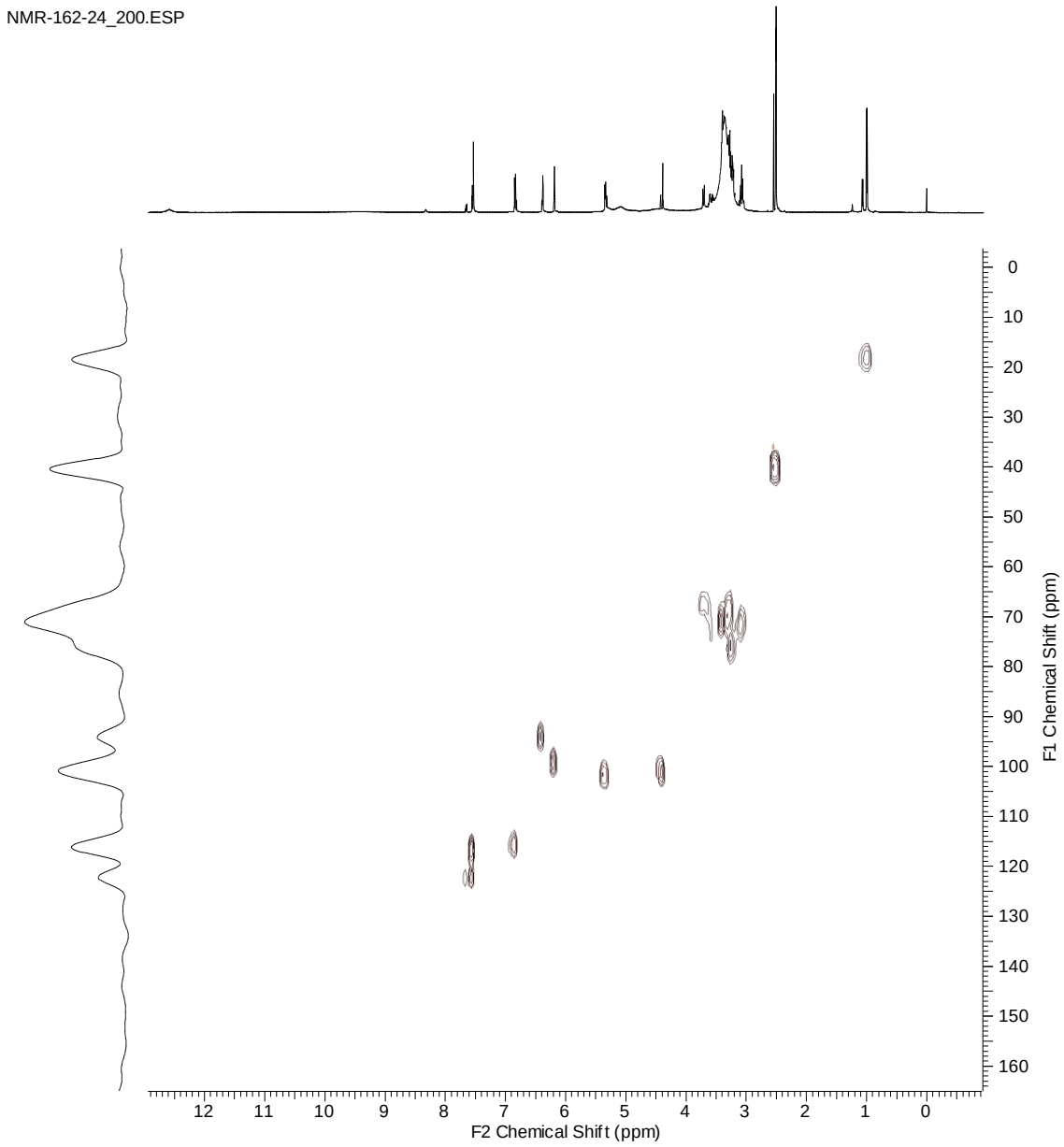


Figura A 25: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-5-F4.

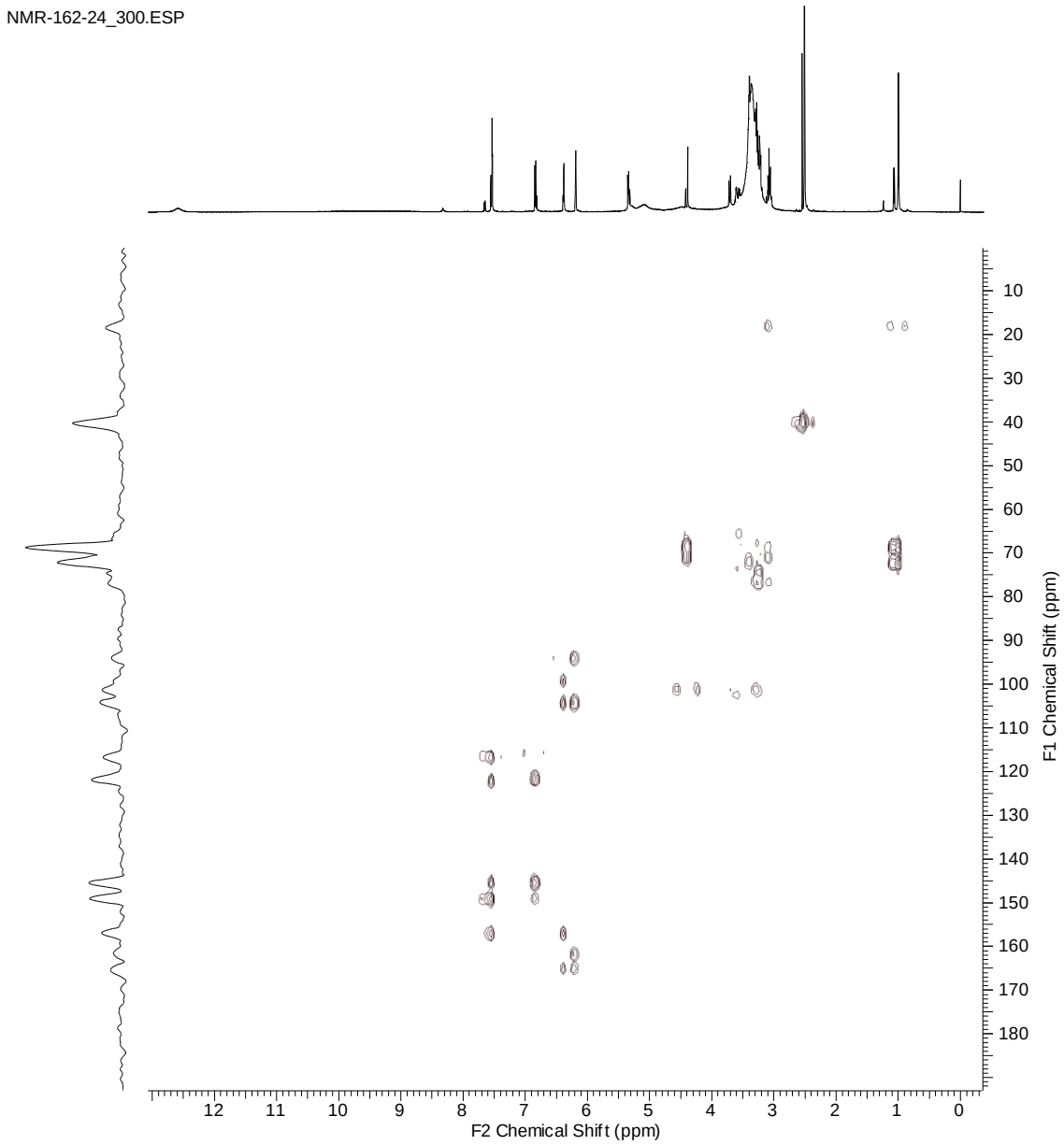


Figura A 26: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-5-F4.

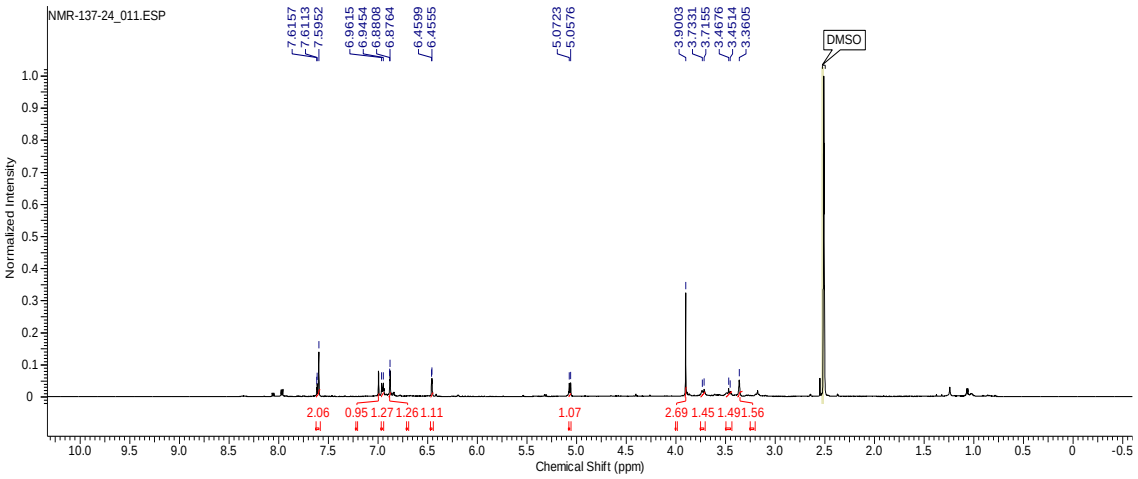


Figura A 27: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-5-F5.

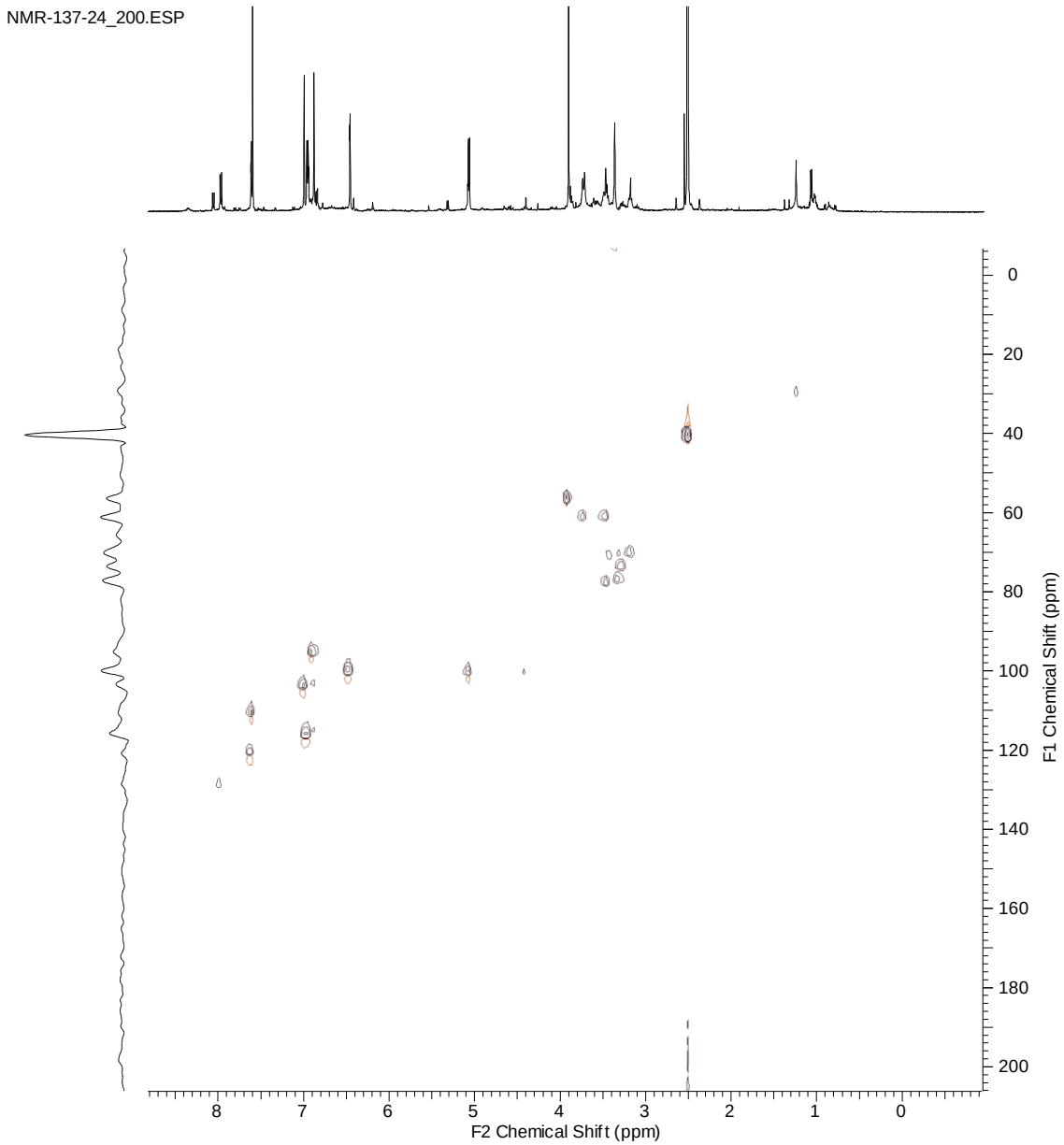


Figura A 28: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-5-F5

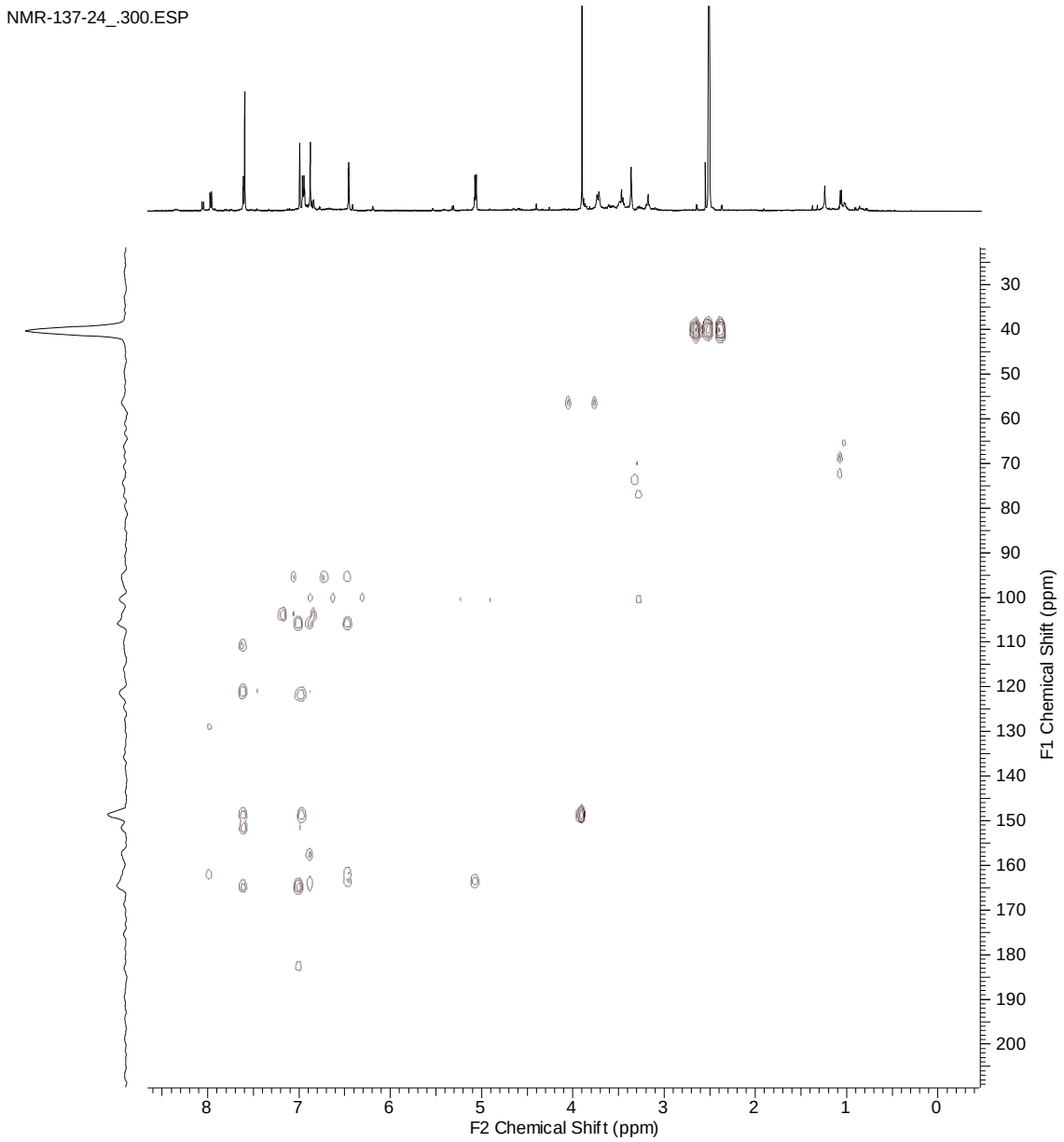


Figura A 29: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-5-F5.

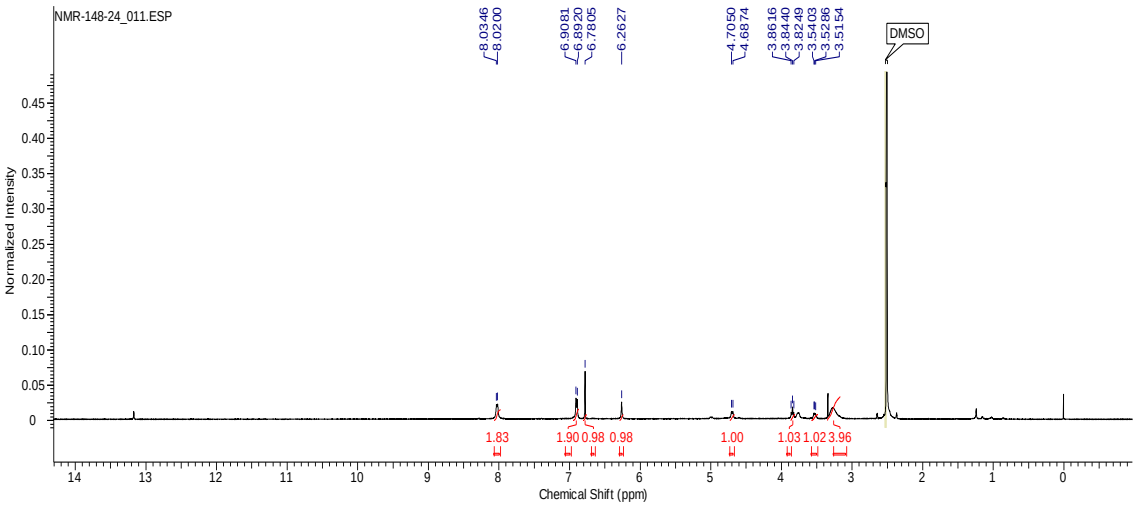


Figura A 30: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-8-F3.

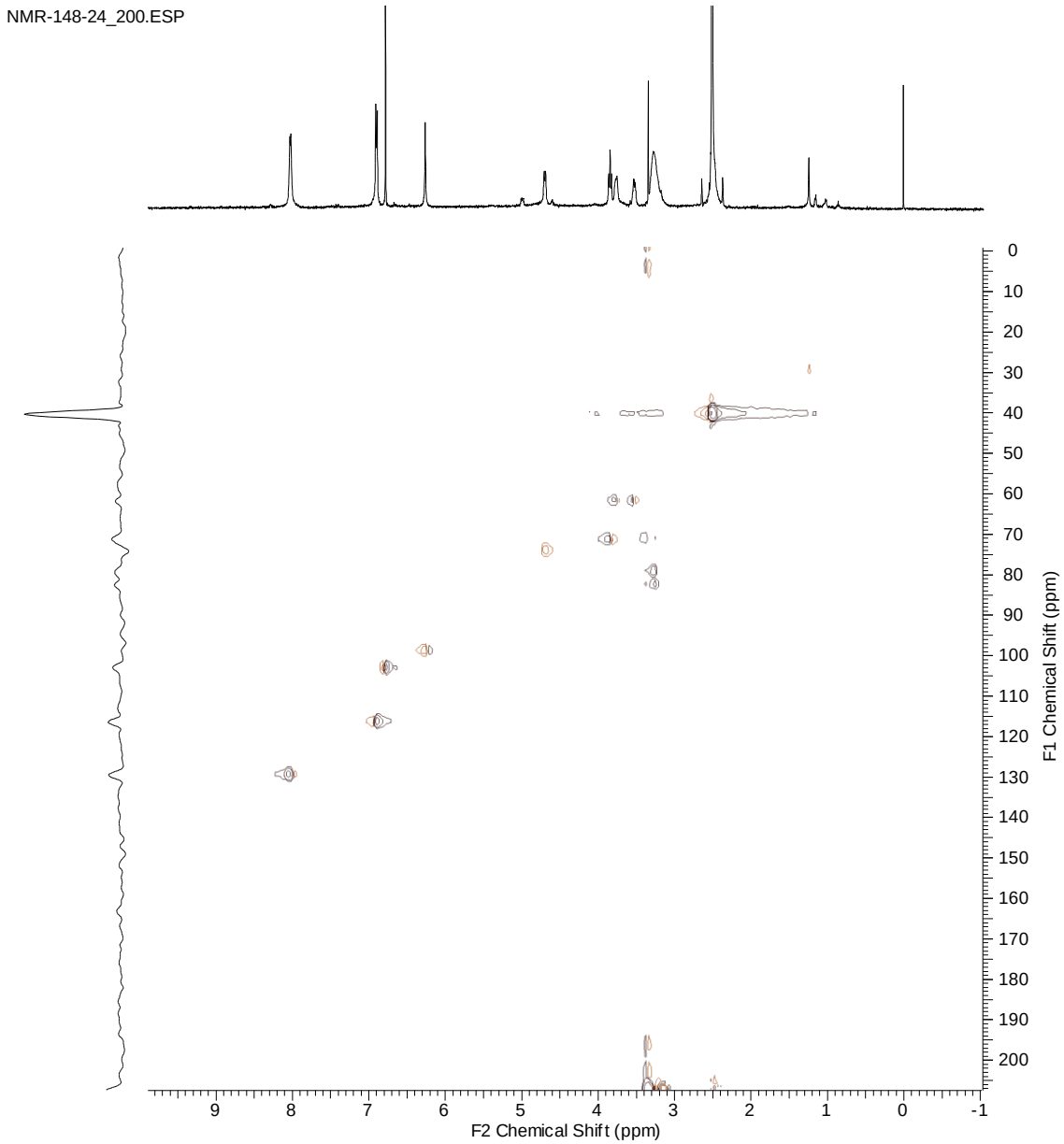


Figura A 31: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-8-F3.

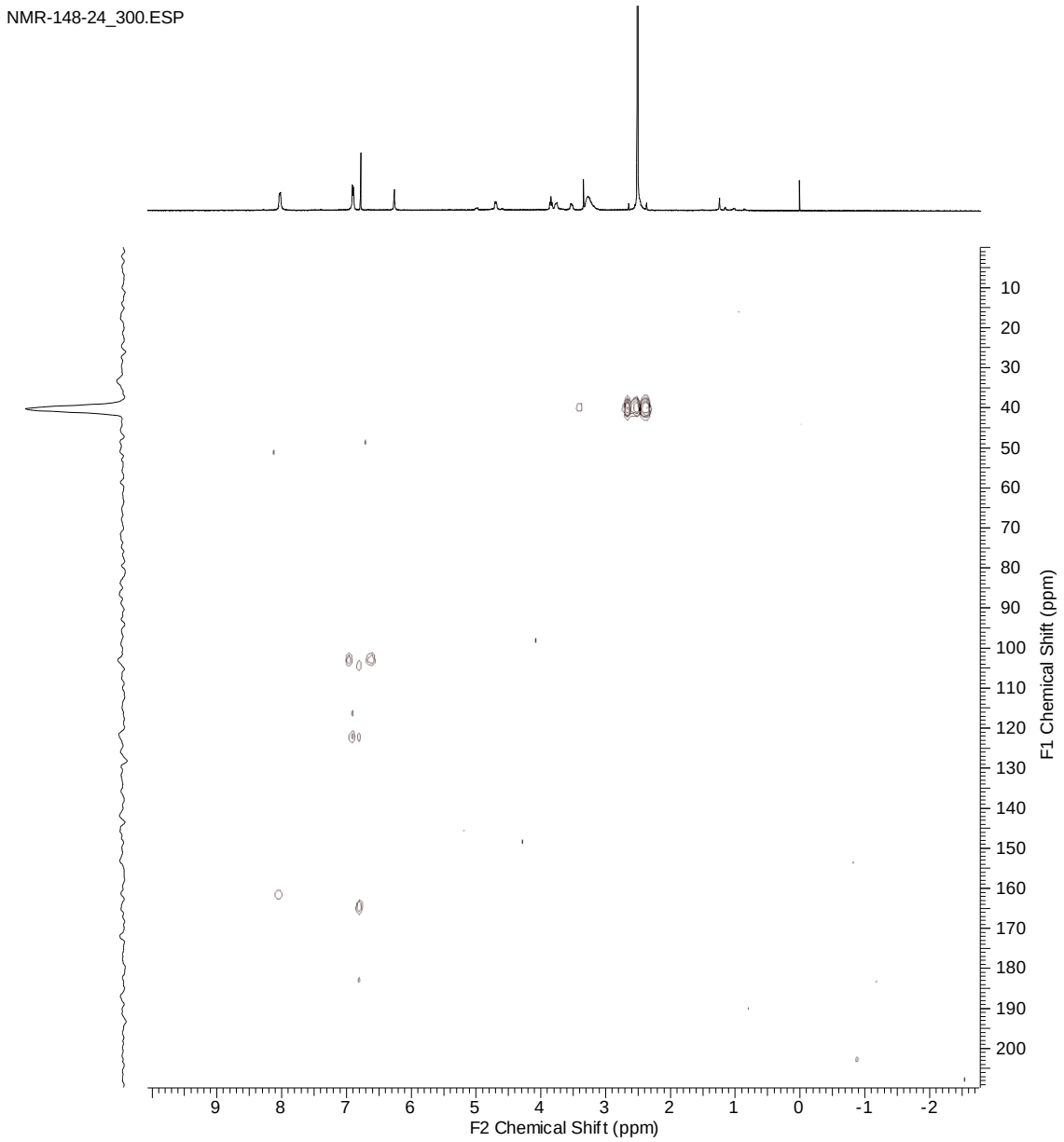


Figura A 32: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-8-F3.

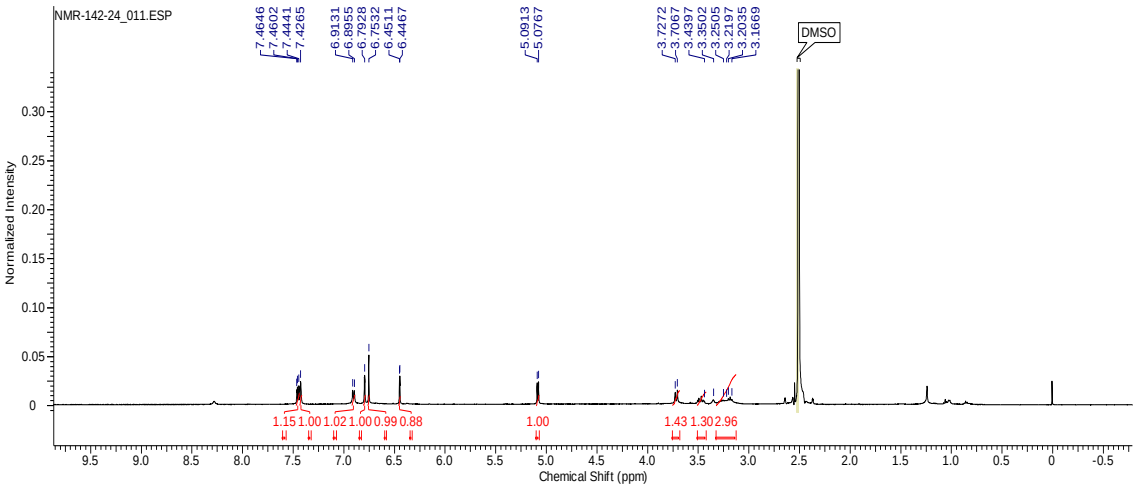


Figura A 33: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-11-F2.

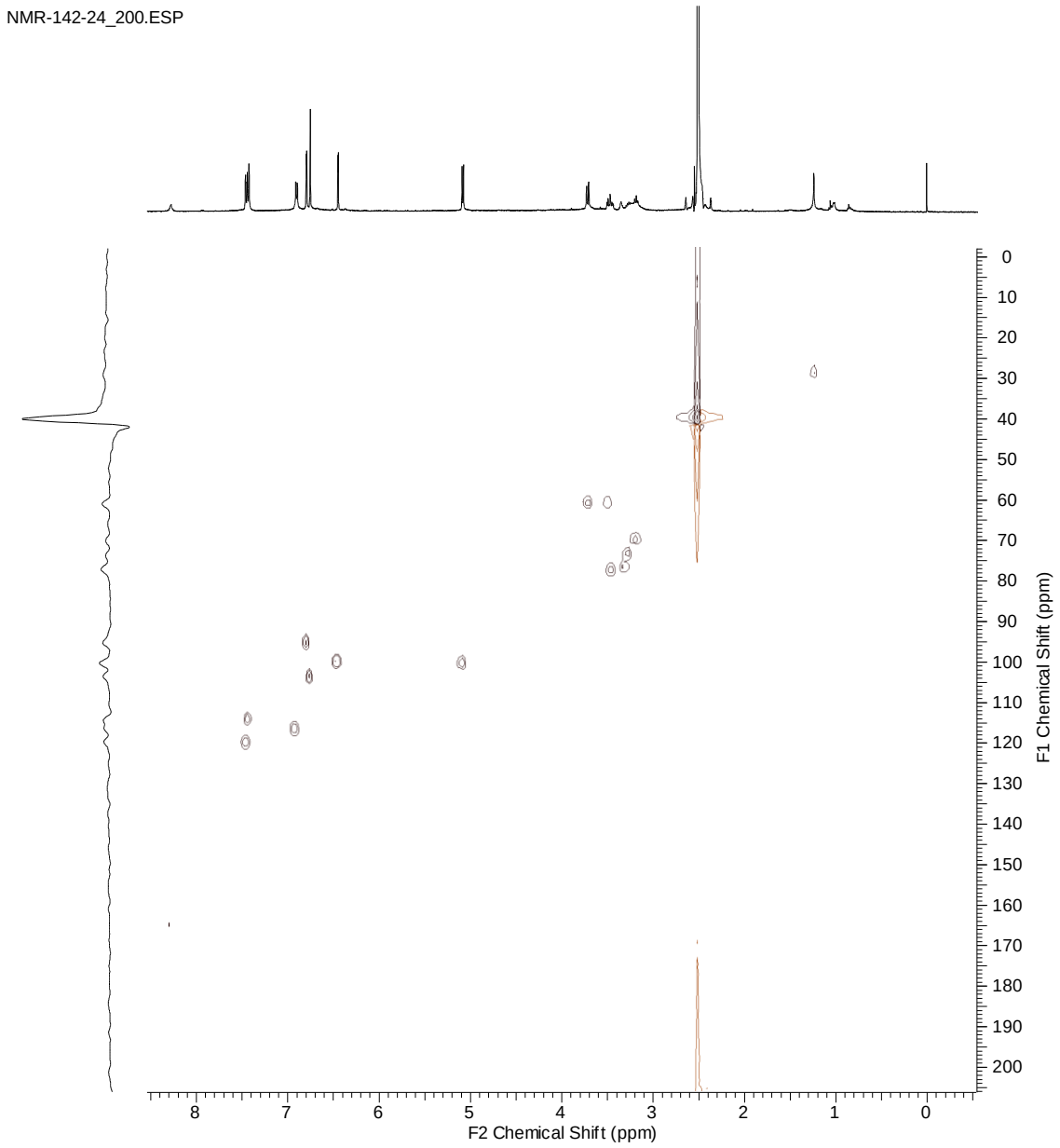


Figura A 34: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-11-F2.

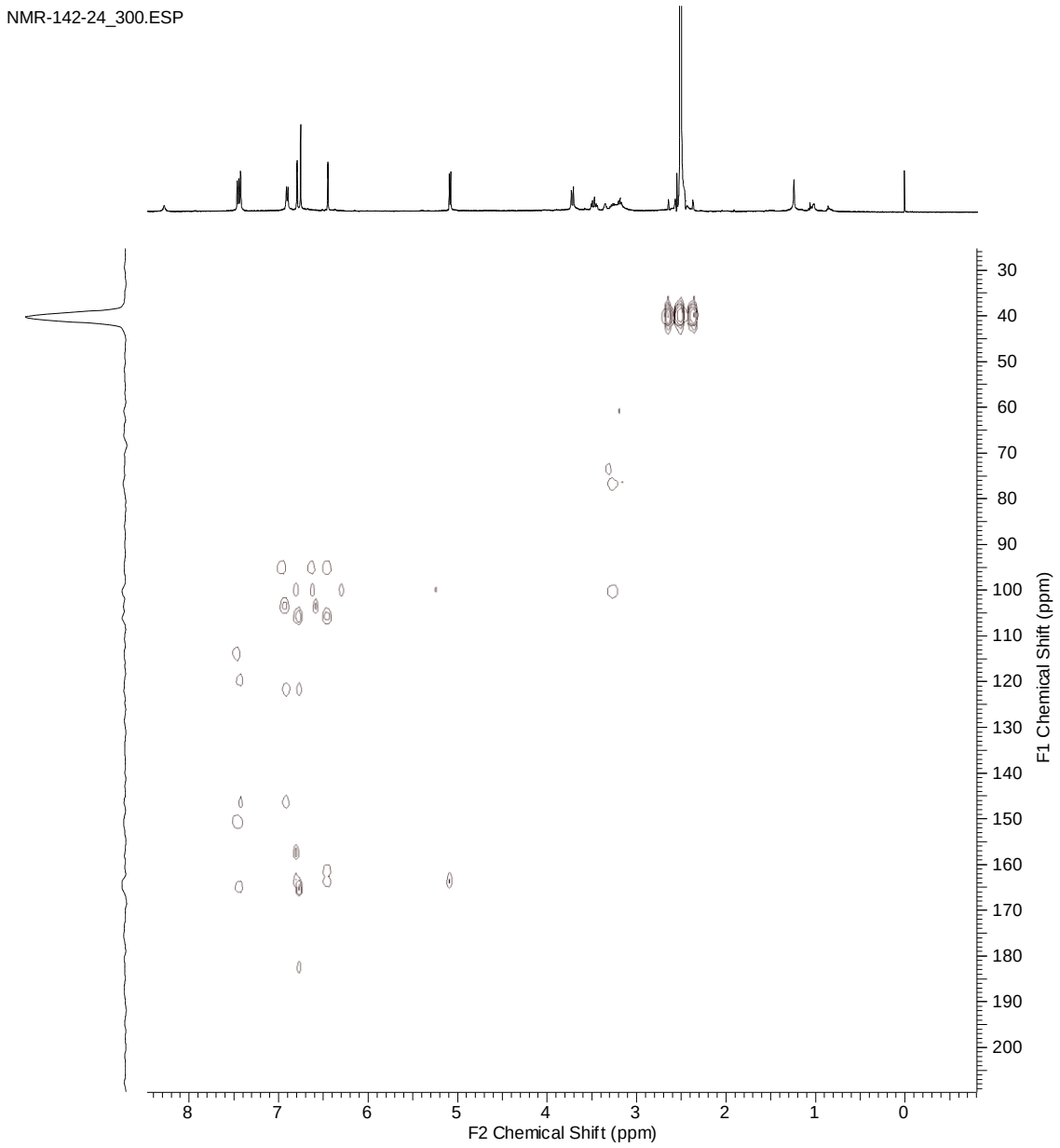


Figura A 35: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-11-F2.

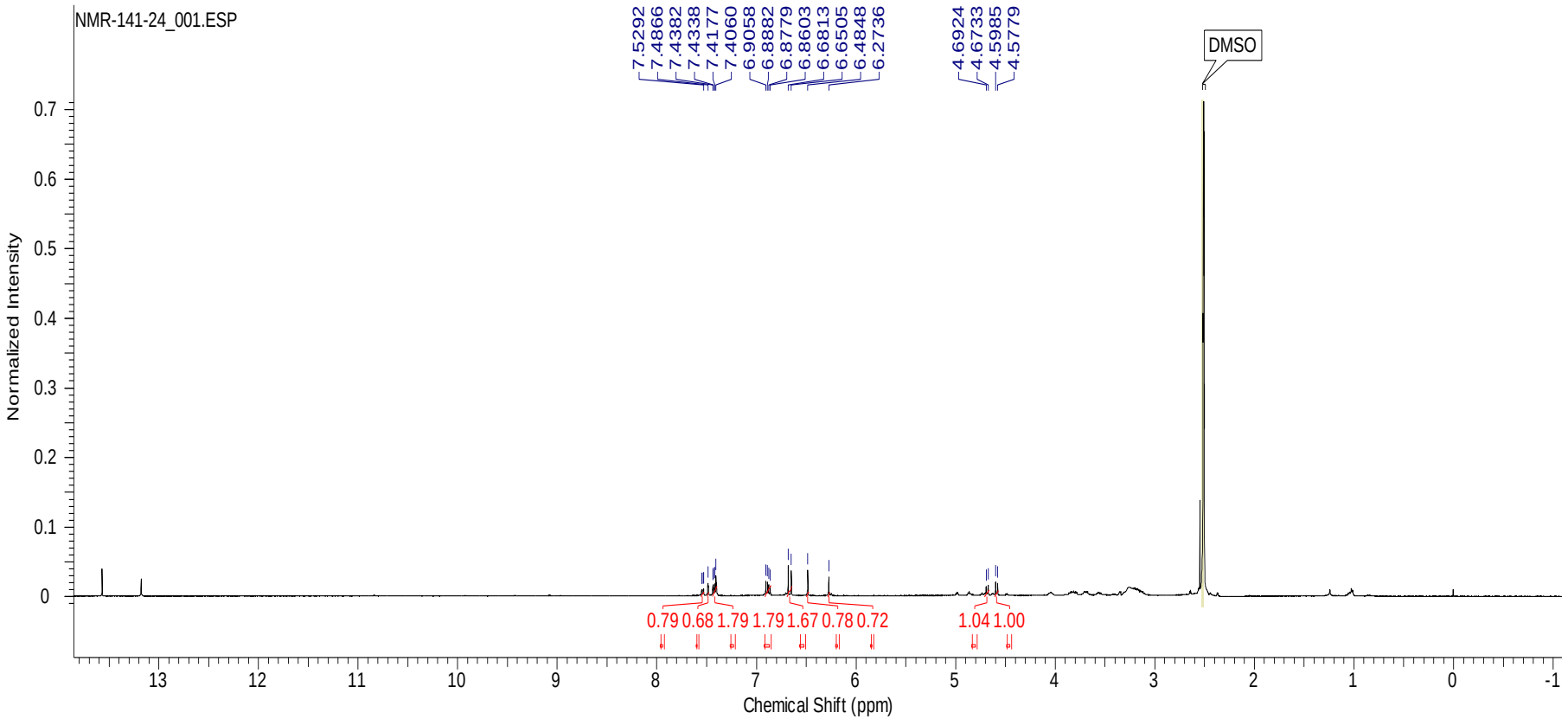


Figura A 36: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-12-F1.

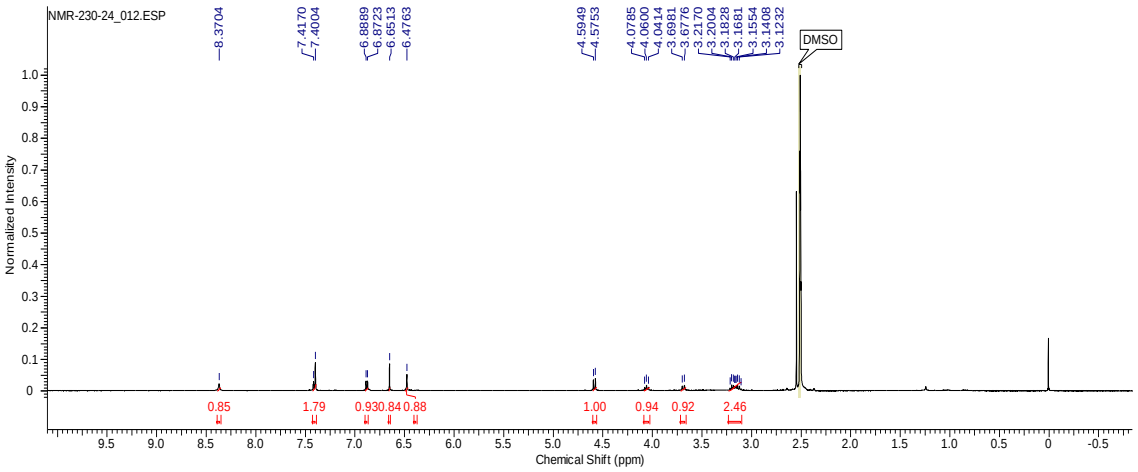


Figura A 37: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da FRS-12-F1-A.

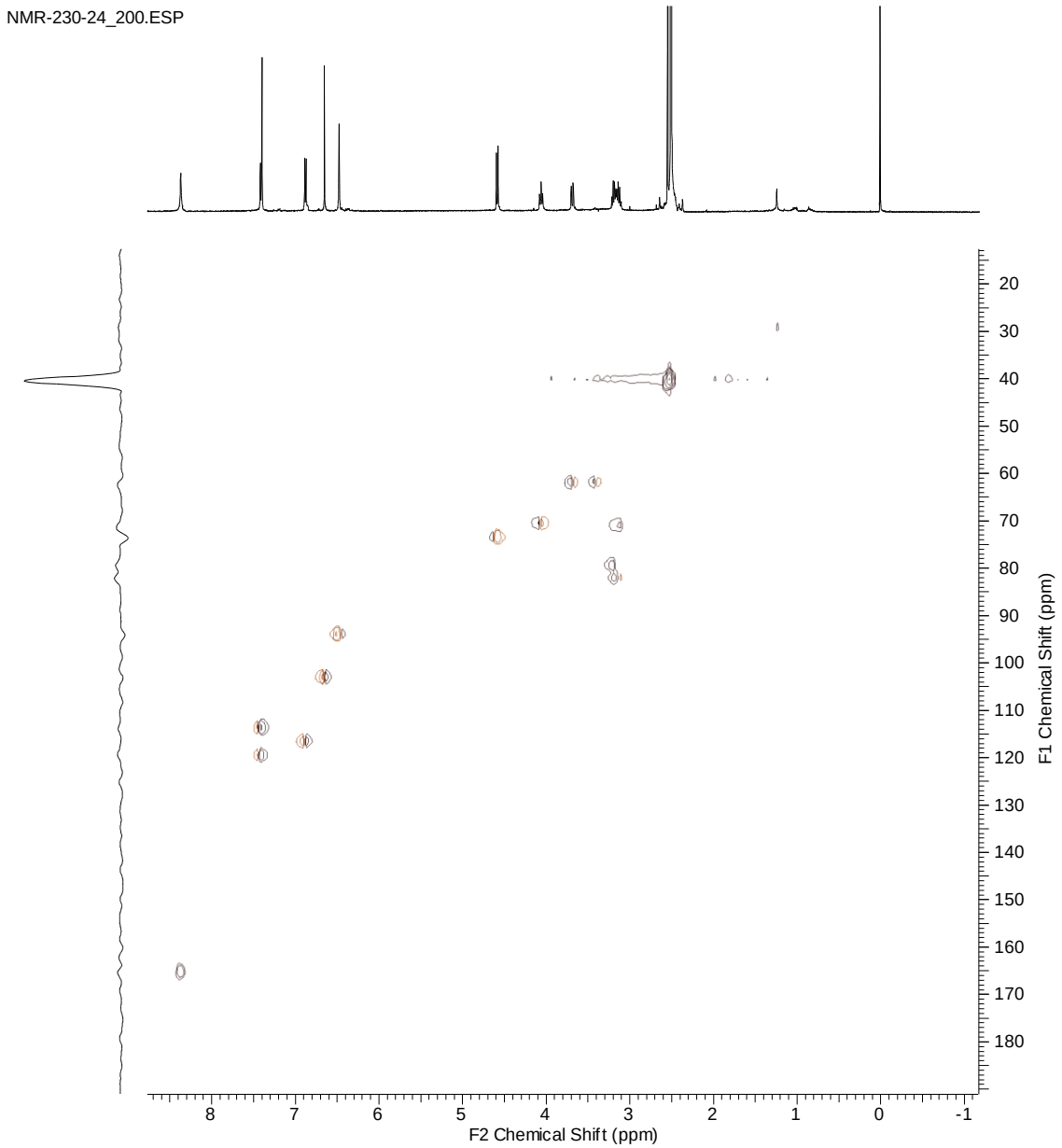


Figura A 38: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HSQC da FRS-12-F1-A.

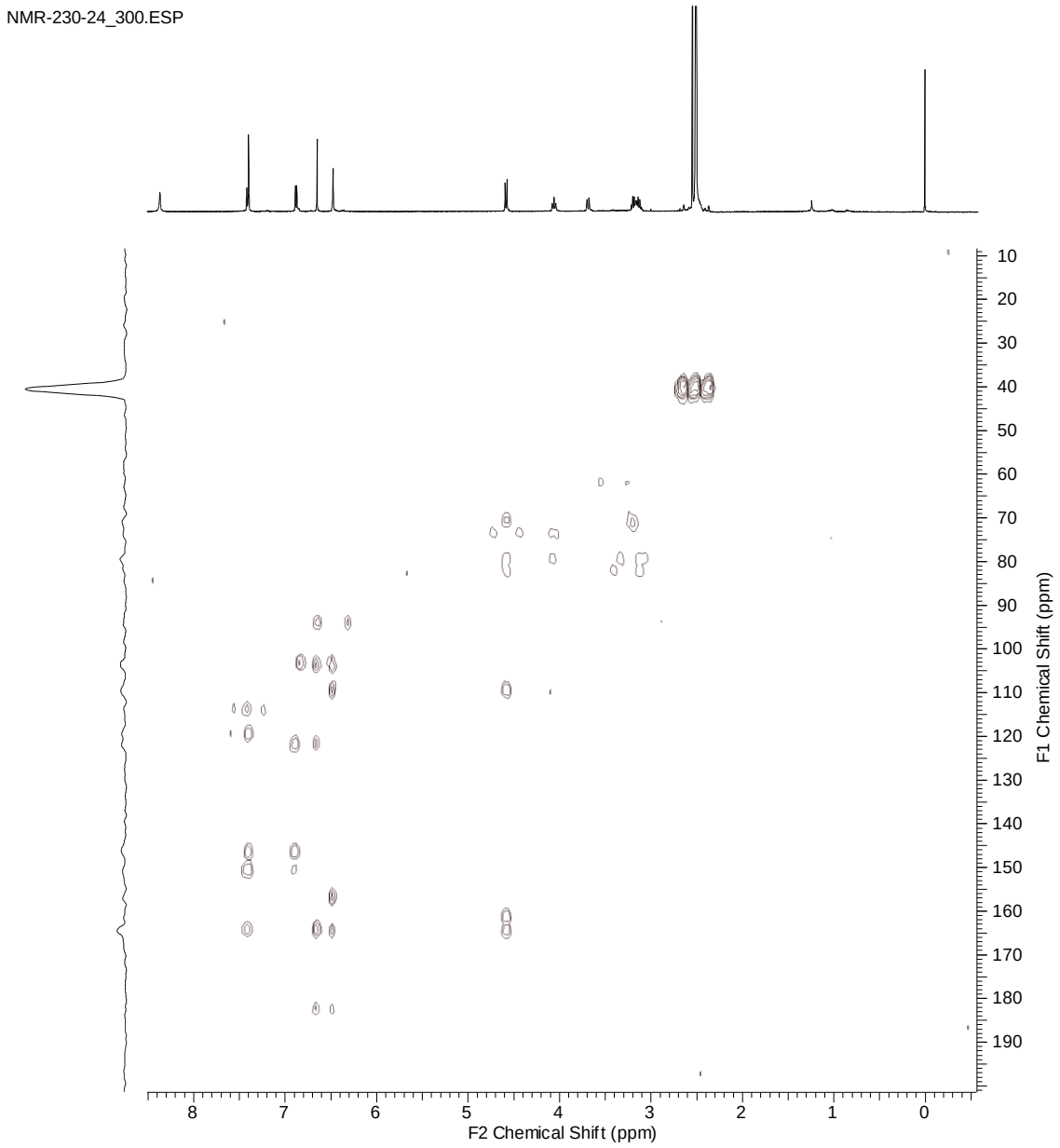


Figura A 39: Correlações heteronucleares ^{1}H - ^{13}C observadas por HMBC da FRS-12-F1-A.