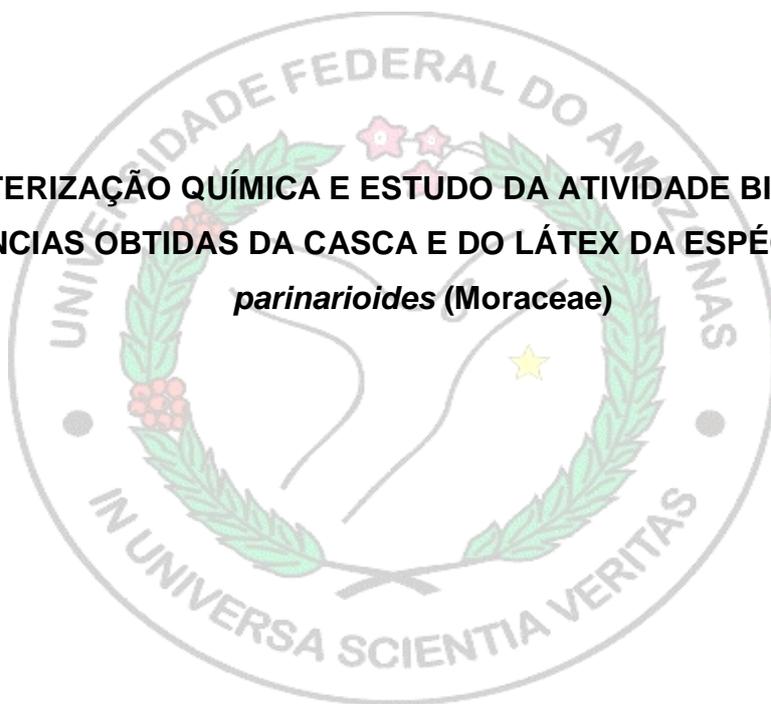


UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DA CASCA E DO LÁTEX DA ESPÉCIE *Brosimum
parinarioides* (Moraceae)**



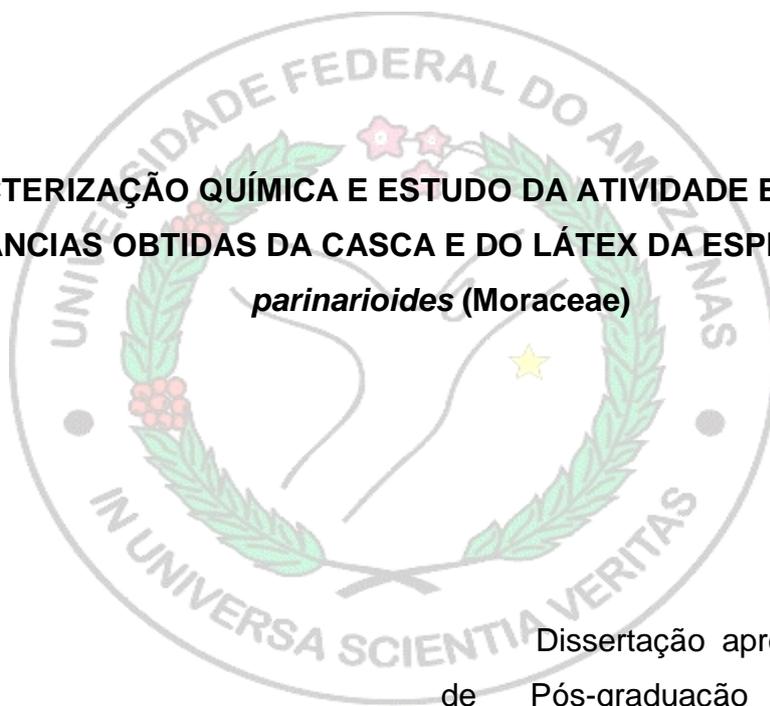
INGRITY SUELEN COSTA SÁ

MANAUS – AM
2018

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

INGRITY SUELEN COSTA SÁ

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DA CASCA E DO LÁTEX DA ESPÉCIE *Brosimum
parinarioides* (Moraceae)**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

MANAUS – AM
2018

Ficha Catalográfica

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

C837c Costa Sa, Ingridy Suelen
Caracterização química e estudo da atividade biológica de substâncias obtidas da casca e do látex da espécie *Brosimum parinarioides* (Moraceae) / Ingridy Suelen Costa Sa. 2018
161 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Dissertação (Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. B. parinarioides. 2. flavonoides. 3. terpenoides. 4. citotóxico. 5. anti-inflamatório. I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**"CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDO
DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS
OBTIDOS DA CASCA E DO LÁTEX DA
ESPÉCIE *Brosimum parinarioides* (Moraceae)"**

Ingrity Suelen Costa Sá

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 14 de maio de 2018.

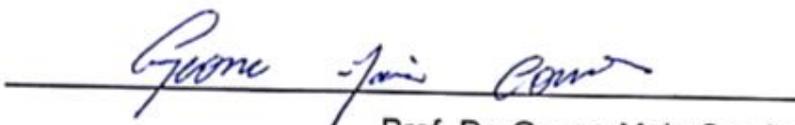
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof.^a Dr.^a Cecilia Veronica Nunez
Membro UFAM



Prof. Dr. Geone Maia Corrêa
Membro Externo/ICET

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 14 de maio de 2018.

“Dedico este trabalho primeiramente à Deus, por ser essencial em minha vida, ao meu pai Antônio Soares Sá, minha mãe M^aCélia Santos Costa que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida”

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me sustentado, me dado coragem e sabedoria todos os dias durante a realização deste sonho. Ao curso de Química da Universidade Federal do Amazonas e as pessoas que convivi nesses espaços ao longo desses anos, pois me proporcionaram a experiência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos e professores nesses espaços que foram a melhor experiência da minha formação acadêmica.

Ao INPA e a Central Analítica da UFAM (CA) em especial os laboratórios: LAEQ, LABCEM e NMRLAB, por serem minha segunda casa e me proporcionar condições para realização do meu mestrado em química de produtos naturais.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química por terem contribuído com a minha formação acadêmica. A CAPES pela concessão da bolsa. À minha orientadora Prof.^a Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura. À minha família por todo apoio dado durante essa etapa da minha vida.

Aos amigos da UFAM e Professores: Kidney Gomes, Bruna Ribeiro, Airi de Souza, Felipe Moura, Maiara Lopes, Rochelly Mesquita, Liliam Bastos, Marcos Túlio, André Correia, Yasmin da Cunha, Isadora da Silva, Elzalina, Lidia Procópio, Dra. M^{re} Lúcia Belém, Dr. Marcos B. Machado, Dr. Afonso Duarte, Dra. Teresa Cristina e Dr. Emmanoel Vilaça, pelos grandes ensinamentos profissionais e pessoais, por terem contribuído para o meu crescimento enquanto pessoa e pesquisadora além momentos difíceis e alegres vividos juntos, pelas boas risadas na CA. Ao Wanison Pessoa pelo apoio, carinho, cuidado e pela força que sempre me deu nos momentos difíceis. E todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

RESUMO

As plantas sempre foram utilizadas pelo homem como fonte de agentes terapêuticos, muitas vezes empregadas a partir do conhecimento popular. Na Amazônia apesar da sua grande biodiversidade de plantas medicinais, existem muitas espécies vegetais que não possuem estudos com relação à composição química e atividade biológica. Dessa forma o presente trabalho vem destacar a espécie conhecida como *Brosimum parinarioides* (Huber) Ducke, pertencente à família Moraceae, que se caracteriza por ser uma árvore de grande porte que produz um látex comestível, popularmente conhecido como leite do amapá. Nesse contexto, este projeto buscou o estudo inédito da caracterização da composição química das diferentes partes (casca e látex) da espécie *B. parinarioides*, por serem muito comercializadas e utilizadas pela população, devido às suas diversas propriedades fitoterápicas além de avaliar a inibição da enzima acetilcolinesterase e a atividade antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória. Para atingir esses objetivos, foram preparados três extratos para a amostra da casca (Hexânico, Acetato de etila e Metanólico) e um para o látex (metanólico) visando à caracterização química e/ou isolamento dos metabólitos secundários. Desta forma, foram empregadas técnicas cromatográficas clássicas como CCD, CCDP, CC e modernas CG-EM e CLAE-DAD-EM além do uso de técnicas espectrométricas e espectroscópicas EM Q-TOF, RMN 1D e 2D. Para as frações proveniente do extrato metanólico do látex, foi possível identificar por APCI-MS² no modo negativo à presença das substâncias fenólicas: *ácido clorogênico* e *ácido quínico*. No extrato hexânico da casca foram identificados por CG-EM a presença de substâncias terpenicas: *lanosterol*, *noroleano*, *acetato de α -amirina*, *acetato β -amirina*, *acetato de cicloartenol* e *ursa-12-eno*. O fracionamento do extrato de acetato de etila e metanólico auxiliado pelo uso de técnicas como CC e CLAE levou ao isolamento da substância fenólica modificada majoritária **H-S1** (*m/z*- 527,1708; FM:C₃₁H₂₇O₈). Foram identificados no extrato metanólico da casca por CG-EM seis terpenoides: *acetato de lanosterol*, *α -amirina*, *β -amirina*, *lupeol* e *acetato de lupeol*. O fracionamento do mesmo utilizando métodos clássicos como CC e CCDP, resultou no isolamento de três substâncias: *4',6-dihidroxi-5'-prefenil-flavana* (**P-S1**: *m/z*- 309,1486; FM:C₂₀H₂₂O₃), *2,4,4'-trihidroxi-3'-prenil-chalcona* (**P-S2**: *m/z*- 323,1293; FM:C₂₀H₂₀O₄) e *2,4,4'-trihidroxi-5'-(2"-hidroxi-3"-metil-3"-butenil)-chalcona* (**P-S3**: *m/z*- 339,1247; FM:C₂₀H₁₉O₅). Sendo inéditas as substâncias *4',6-dihidroxi-5'-prefenil-flavana* e a *2,4,4'-trihidroxi-5'-(2"-hidroxi-3"-metil-3"-butenil)-chalcona*, já a *2,4,4'-trihidroxi-3'-prenil-chalcona* foi isolada pela primeira vez neste gênero. Visando a análise do potencial citotóxico dos extratos realizou-se o estudo de citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células tumorais, onde foi possível observar atividade citotóxica promissora para alguns extratos com valores de IC₅₀ < 30µg/mL. Os extratos e as substâncias não apresentaram potencial de inibição sobre a enzima acetilcolinesterase para a concentração de 90 µg/mL. Também foram realizados ensaios de avaliação de atividade antioxidante tanto para os extratos quanto para as substâncias obtidas sendo possível obter alta atividade antioxidante frente ao radical DPPH e ABTS. Por fim, na avaliação da inibição da enzima lipoxigenase, observou-se resultado significativo quando comparados ao padrão NDGA, corroborando para o uso popular contra doenças anti-inflamatórias.

Palavras-chave: *B. parinarioides*, flavonoides, terpenoides, citotóxico, acetilcolinesterase, antioxidante, anti-inflamatório.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da 1,2 benzopirona.....	23
Figura 2. Rota biossintética da cumarina.....	23
Figura 3. Estrutura básica de um flavonoide.....	24
Figura 4. Rota biossintética de flavonoides.....	25
Figura 5. Rota biossintética de derivados de flavonoides.....	26
Figura 6. Esquema proposto para a biossíntese de adição de segmento prenila.....	26
Figura 7. Estrutura química do ácido 3β-hidroxi-urs-12-en-28-óico.....	27
Figura 8. Biossíntese de triterpenos.....	28
Figura 9. Compostos químicos descritos para espécie a <i>B. rubescens</i>	30
Figura 10. Compostos químicos descritos para espécie a <i>B. rubescens</i>	31
Figura 11. Cumarinas da espécie <i>B. gaudichaudii</i>	32
Figura 12. Flavana isolada de <i>B. acutifolium</i>	33
Figura 13. Flavanas da espécie a <i>B. acutifolium</i>	33
Figura 14. Compostos químicos descritos para espécie a <i>B. acutifolium</i>	34
Figura 15. Compostos químicos descritos para espécie a <i>B. acutifolium</i>	35
Figura 16. Flavonoides e Bufotenina descritos para espécie a <i>B. acutifolium</i>	36
Figura 17. Terpenos da espécie a <i>B. potable</i>	37
Figura 18. Tronco e folhas da espécie <i>B. parinarioides</i>	40
Figura 19. <i>B. parinarioides</i> : utensílio para sangria, látex.....	41
Figura 20. Terpenos isolados do <i>B. parinarioides</i>	44
Figura 21. Espécie <i>B. parinarioides</i> coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke.....	46
Figura 22. Reação redox do ensaio alamar blue com mudança da cor do meio na presença de células viáveis ou não.....	62
Figura 23. Reação de captura do radical livre e mecanismo do DPPH na presença de um composto antioxidante.....	63
Figura 24. Reação de captura do radical livre ABTS na presença de um antioxidante.....	64
Figura 25. Fracionamento do extrato metanólico do látex por partição líquido-líquido e surgimento de precipitado polimérico.....	69

Figura 26. Espectro APCI-MS no modo negativo para as frações: Fr.AcoEt (A), Fr.Clor (B) e Fr.Hidro (C) do látex de <i>B. parinariodes</i>	70
Figura 27. Espectro de Massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 191 [M-H] ⁻	71
Figura 28. Espectro de Massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 352 [M-H] ⁻	72
Figura 29. CCD obtida das substâncias: 06.1, 06.2, 07.1 e 07.2 reveladas com anisaldeído.....	73
Figura 30. Cromatograma da substância 06.1.....	74
Figura 31. Espectro de massas das substâncias 06.1 a) MS do pico 8 ^a e b) MS do pico 6 ^a	74
Figura 32. Fragmentações das substâncias do a) pico 8 e b) pico 6.....	75
Figura 33. Cromatograma da substância 06.2.....	76
Figura 34. Espectro de massas da substância 06.2.....	76
Figura 35. Proposta de Fragmentação do β-sitosterol.....	76
Figura 36. Cromatograma da substância 07.1.....	77
Figura 37. Espectro de massas da substância 07.1: a) MS do pico 1, b) MS do pico 2.....	77
Figura 38. Proposta de Fragmentação da α, β-amirina.....	78
Figura 39. Cromatograma da substância 07.2.....	79
Figura 40. Espectro de massas de EHCBP-07.2: a) MS do pico 7 b) MS do pico 9.....	79
Figura 41. Proposta de Fragmentação do acetato de lanosterol.....	80
Figura 42. CCD obtida das frações MGF01 e MGF02.....	81
Figura 43. Cromatograma da mistura de terpenos das frações MGF01 e MGF02.....	82
Figura 44. Triterpenos identificados nas frações MGF01 e MGF02.....	83
Figura 45. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância P-S1	84
Figura 46. Correlações homonucleares ¹ H- ¹ H observadas no experimento de COSY para a substância P-S1	86
Figura 47. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância P-S1	87

Figura 48. Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observados no espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) para a substância P-S1	88
Figura 49. Correlação heteronucleares ^1H - ^{13}C observados no experimento de HMBC (500 MHz, CDCl_3) para a substância P-S1	89
Figura 50. Estrutura da flavana- P-S1	91
Figura 51. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância P-S1	92
Figura 52. Espectro de ms^2 para o íon m/z 309 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e proposta de fragmentação para a substância P-S1	93
Figura 53. Esqueleto proposto para a substância P-S2	94
Figura 54. Segmento de grupo prenila da estrutura P-S2	95
Figura 55. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância P-S2	95
Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância P-S2	96
Figura 57. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) da substância P-S2	97
Figura 58. Correlação heteronucleares ^1H - ^{13}C observados no experimento de HMBC (500 MHz, CDCl_3) para a substância P-S2	98
Figura 59. Correlações homonucleares observados no experimento de COSY (500 MHz, CDCl_3) para a substância P-S2	101
Figura 60. Estrutura da chalcona- P-S2	101
Figura 61. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância P-S2 ...103	
Figura 62. Espectro de MS^2 para o íon 323 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e proposta de fragmentação para a substância P-S1	104
Figura 63. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância P-S3	106
Figura 64. Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observados no espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) para a substância P-S3	108
Figura 65. Correlação heteronucleares observados no experimento de HMBC (500 MHz, CDCl_3) da substância P-S3	109
Figura 66. Espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) da substância P-S3	112

Figura 67. Estrutura da chalcona P-S3	112
Figura 68. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância P-S3	114
Figura 69. Espectro de ms^2 para o íon 339 [M-H] ⁻ e proposta de fragmentação.....	115
Figura 70. Cromatograma registrado em 200-400 nm obtidos a partir da análise por CLAE-DAD-MS para a fração AGF 04 proveniente da casca do <i>B. parinarioides</i>	116
Figura 71. Espectro de massas obtido do pico de t_R 24,42 (substância H-S1).....	117
Figura 72. Cromatograma registrado em 200-400 nm obtidos a partir da análise por CLAE-DAD-MS para as frações M5-CC1-05-B e M5-CC1-05-A da casca do <i>B. parinarioides</i>	118
Figura 73. Espectro de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância H-S1	120
Figura 74. Correlações homonucleares ¹ H- ¹ H visualizadas no experimento de COSY para a substância H-S1	121
Figura 75. Espectro de ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) da substância H-S1	122
Figura 76. Correlações heteronucleares ¹ H- ¹³ C visualizado no espectro de HSQC para a substância H-S1	123
Figura 77. Correlações heteronucleares ¹ H- ¹³ C visualizado no espectro de HMBC para a substância H-S1	124
Figura 78. Proposta estrutural mais próxima para a substância H-S1	127
Figura 79. Espectro de massas de alta resolução da substância H-S1	128
Figura 80. Curva padrão do Trolox em função da concentração em 734 nm.....	132
Figura 81. Reações envolvidas no método de Ellman (1961).....	132
Figura 82. Placa de 96 poços com produto da reação da tiocolina com o 5-tio-2nitrobenzoato para a avaliação da atividade inibitória para as amostras e padrão além da curva resposta da avaliação quantitativa da atividade inibidora da enzima ACHE da neostigmina.....	135
Figura 83. Aspecto da solução do controle positivo (NDGA) e controle negativo após ser adicionado o reagente FOX.....	137
Figura 84. Espectro de absorção do NDGA em 200-600 nm após ser adicionado o reagente FOX, resultando na absorção do complexo em 590nm com passar do tempo.....	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nome popular das espécies de <i>Brosimum</i>	29
Tabela 2. Substâncias isoladas de diferentes espécies gênero <i>Brosimum</i>	38
Tabela 3. Valores de cinzas, cálcio, fósforo, magnésio e proteínas do leite do amapá doce, comparado com o leite de vaca tipo C e o extrato de soja, relacionados com a dose diária recomendada.....	43
Tabela 4. Dados do <i>B. parinarioides</i> coletado.....	46
Tabela 5. Relação entre grupos de frações do extrato hexânico das cascas do <i>B. parinarioides</i>	50
Tabela 6. Relação entre grupos de frações do extrato acetato da casca.....	53
Tabela 7. Relação entre grupos de frações do extrato metanólico da casca.....	56
Tabela 8. Relação entre grupos de frações do MGF03 e próximas análises realizadas...58	
Tabela 9. Rendimento em percentual dos extratos obtidos.....	68
Tabela 10. Rendimento em percentual das frações da partição líquido-líquido.....	69
Tabela 11. Relação de terpenos entre grupos de frações MGF01 e MGF02.....	82
Tabela 12. Dados de RMN (CDCl ₃ , 500 MHz) da flavana P-S1 em comparação com os dados da literatura.....	91
Tabela 13. Dados de RMN (CDCl ₃ , 500 MHz) da chalcona P-S2 em comparação com os dados da literatura.....	102
Tabela 14. Dados de RMN (CDCl ₃ , 500 MHz) da chalcona P-S3 em comparação com os dados da literatura.....	103
Tabela 15. Informações relevantes para as substâncias isoladas por CLAE semipreparativo.....	117
Tabela 16. Dados de RMN (MeOD, 500 MHz) da substância H-S1	126
Tabela 17. Valores de IC ₅₀ em µg/mL para a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais <i>versus</i> não tumorais.....	129
Tabela 18. Resultados da atividade antioxidante pelo radical DPPH.....	131
Tabela 19. Resultados da atividade antioxidante pelos Valores de TEAC (Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox) pelo método ABTS.....	133
Tabela 20. Atividade Inibitória remanescente da enzima AChE.....	136

Tabela 21. Resultados do ensaio anti-inflamatório <i>in vitro</i> da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para o extrato (EMCBP).....	139
Tabela 22. Resultados do ensaio anti-inflamatório <i>in vitro</i> da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (P-S1).....	139
Tabela 23. Resultados do ensaio anti-inflamatório <i>in vitro</i> da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (P-S2).....	140
Tabela 24. Resultados do ensaio anti-inflamatório <i>in vitro</i> da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (P-S3).....	140
Tabela 25. Resultados do ensaio anti-inflamatório <i>in vitro</i> da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (H-S1).....	141
Tabela 26. Resultados do ensaio anti-inflamatório <i>in vitro</i> da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para o controle positivo (NDGA).....	141

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Procedimento utilizado para a obtenção de extratos metanólicos do látex extraído da espécie <i>B. parinarioides</i>	47
Fluxograma 2. Extração líquido-líquido ou partição em ordem crescente de polaridade...47	
Fluxograma 3. Metodologia de extração da casca.....	48
Fluxograma 4. Fracionamento cromatográfico do EHCBP.....	49
Fluxograma 5. Isolamento das substâncias presentes na fração HGF06.....	50
Fluxograma 6. Isolamento das substâncias presentes na fração HGF07.....	51
Fluxograma 7. Fracionamento cromatográfico do EACBP.....	52
Fluxograma 8. Isolamento da substância presentes na fração AGF04.....	54
Fluxograma 9. Fracionamento cromatográfico do EMCBP.....	55
Fluxograma 10. Fracionamento cromatográfico do MGF03.....	57
Fluxograma 11. Isolamento de substâncias presentes na fração MGF03 por CCDP.....	59
Fluxograma 12. Isolamento de substâncias presentes na fração MGF03 por CLAE.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- EHCBP**- Extrato Hexânico da Casca do *Brosimum parinarioides*.
EACBP- Extrato Acetato de etila da Casca do *Brosimum parinarioides*.
EMCBP- Extrato Metanólico da Casca do *Brosimum parinarioides*.
EMLBP- Extrato Metanólico do Látex do *Brosimum parinarioides*.
HGF- Hexano Grupo de Frações
AGF- Acetato de Etila Grupo de Frações
MGF- Metanol Grupo de Frações
Fr- Fração
Hex- Hexano
Clor- Clorofórmio
DCM- Diclorometano
AcoEt- Acetato de Etila
MeOH- Metanol
Hidro- Hidroalcolico
CC- Cromatografia em Coluna
CCD- Cromatografia em Camada Delgada
CCDC- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP- Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG- Cromatografia Gasosa
EM- Espectrometria de Massas
CG-EM- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MS- Mass Spectrometry
MS/MS ou MS²- Espectrometria de massa em tandem
APCI- Atmospheric Pressure Chemical Ionization
m/z- Relação massa/carga
HPLC- High Performance Liquid Chromatography
DAD-Diode Array Detector
min- Minutos
nm- Nanômetro
RMN- Ressonância Magnética Nuclear

HSQC- Heteronuclear Single-Quantum Correlation

HMBC- Heteronuclear Multiple Bond Correlation

TMS- Tetrametilsilano

d- deuterado

s- singleto

d- dubleto

dd- duplo debleto

t- tripleto

δ_H – deslocamento químico de hidrogênio

δ_C – deslocamento químico de carbono

DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ABTS- 2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

AChE- Atividade Inibidora da enzima Acetilcolinesterase

UV– Ultravioleta

UV vis– Ultravioleta visível

FOX– ferrous oxidation-xylene orange

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivo específico.....	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 A família Moraceae.....	23
3.2 O Gênero <i>Brosimum</i>	30
3.2.1 Aspectos químicos e biológicos do <i>Brosimum</i>	30
3.3 A espécie <i>Brosimum parinarioides</i> (Huber) Ducke	41
3.3.1 Uso popular do leite do amapá.....	43
3.3.2 Estudos encontrados na literatura de <i>B. parinarioides</i>	43
4, PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	47
4.1. Coleta do material vegetal.....	47
4.2. Estudo fitoquímico do látex do <i>B. parinarioides</i>	47
4.2.1. Método de extração.....	47
4.2.2. Fracionamento do extrato.....	48
4.2.3. Análises por APCI-MS ⁿ das frações da partição do látex do <i>B. parinarioides</i>	48
4.3. Estudo fitoquímico da casca do <i>B. parinarioides</i>	49
4.3.1. Método de extração.....	49
4.3.2. Fracionamento cromatográfico do Extrato Hexânico.....	50
4.3.2.1- Estudo Cromatográfico do Grupo de Frações HGF06.....	51
4.3.2.2- Estudo Cromatográfico do Grupo de Frações HGF07	52
4.3.2.3- Estudo por CG-EM das substâncias obtidas das frações HGF06 e HGF07...52	
4.3.3. Fracionamento cromatográfico do Extrato de Acetato de Etila	53
4.3.3.1 Condições para isolamento por CLAE- semipreparativo em modo reverso da fração AGF 04.....	54

4.3.4. Fracionamento cromatográfico do Extrato Metanólico	56
4.3.4.1- Estudo por CG-EM do grupo de frações MGF01 e MGF02	57
4.3.4.2- Estudo Cromatográfico do Grupo de Frações MGF03	58
4.3.4.3- Condições para isolamento por CLAE em modo reverso.....	60
4.4. Elucidação estrutural das substâncias isoladas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EM Q-TOF)	61
4.5. Estudo da atividade biológica	62
4.5.1 Ensaio citotóxico em linhagens de células tumorais in vitro	62
4.5.2 Determinação in vitro da atividade antioxidante	64
4.5.2.1 Capacidade de sequestro do radical livre DPPH	64
4.5.2.2 Capacidade de sequestro do radical ABTS	65
4.5.3 Atividade Inibidora da enzima Acetilcolinesterase (AChE) in vitro	66
4.5.4 Determinação da atividade anti-inflamatória pelo ensaio in vitro da inibição da enzima 5-LOX pelo método do ensaio da FOX.....	67
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	69
5.1. Rendimento dos Extratos	69
5.2 LÁTEX	69
5.2.1 Particionamento líquido-líquido.....	69
5.2.2 Caracterização dos constituintes orgânicos identificados nas frações da partição do látex do B. parinarioides por meio de espectrometria de massas com ionização por APCI-MS ²	70
5.3 CASCA	74
5.3.1 Caracterização de triterpenos por CG-EM em frações do extrato hexânico da casca.....	74
5.3.1.1 Substâncias 06.1	75
5.3.1.2 Substâncias 06.2	77
5.3.1.3 Substâncias 07.1	78
5.3.1.4 Substâncias 07.2	80
5.3.2 Caracterização química de compostos do extrato metanólico das cascas por CG-EM	82
5.3.3 Determinação estrutural das substâncias isoladas das cascas do B. parinarioides	86

5.3.3.1 Determinação estrutural da substância P-S1	86
5.3.3.2 Determinação estrutural da substância- P-S2.....	96
5.3.3.3 Determinação estrutural da substância P-S3	107
5.3.4 Análise por CLAE-DAD-EM.....	117
5.3.4.1 Determinação estrutural da substância H-S1	120
5.4 ENSAIO BIOLÓGICO DA CASCA E DO LÁTEX DO <i>B. parinarioides</i>	130
5.4.1 Ensaio citotóxico	130
5.4.2 Avaliação in vitro da atividade antioxidante	132
5.4.2.1 Estudo da capacidade de sequestro do radical livre DPPH	132
5.4.2.2 Estudo da capacidade de sequestro do radical ABTS	133
5.4.3 Ensaio de inibição da enzima AChE <i>in vitro</i>	135
5.4.4 Inibição da enzima Lipooxigenase (LOX) pelo método da oxidação do íon Ferroso/laranja de xilenol (FOX)	138
6. CONCLUSÃO.....	144
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas na prevenção e cura de doenças é um hábito que sempre existiu na história da humanidade, onde as plantas medicinais correspondem às mais antigas armas empregadas pelo homem no tratamento de enfermidades de diferentes tipos. Em geral, exercem alguma ação terapêutica e são muito utilizadas em comunidades tradicionais como remédios caseiros e como matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos (FIRMO et al., 2011).

Observa-se nas últimas décadas, o interesse crescente em terapias alternativas de produtos naturais, especialmente vegetais com finalidade terapêutica, esta expansão é devido à ineficiência de fármacos sintéticos para várias patologias, além dos efeitos colaterais e elevado custo de tratamento farmacológico. Aliados a estes fatores, encontra-se o dito popular que “o natural não faz mal” aumentando assim a busca por plantas medicinais e suas propriedades de cura (CAPASSO et al., 2000; RATES, 2001; NIERO, et al., 2003).

Dessa forma, a pesquisa por compostos bioativos à partir de plantas medicinais continua sendo considerada como uma abordagem promissora para a procura de novas drogas. A partir das plantas medicinais podem ser obtidos medicamentos fitoterápicos, fitofármacos, cosméticos e agroquímicos, oriundos obtidos de pesquisas científicas para serem introduzidos no mercado (RATES, 2001; YUNES, et al., 2001).

As potencialidades de uso das plantas medicinais encontram-se longe de serem esgotados, visto que novos conhecimentos e novas necessidades certamente encontrarão no reino vegetal, soluções por meio da descoberta e do desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou com aplicações no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação (SCHENKEL, et al., 2003).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo assim subdivididos em 25% de plantas, 12% de micro-organismos e 3% de

animais (CALIXTO, et al., 2001). Das 252 drogas que são consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11 % são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001).

Entretanto, o sucesso dessas pesquisas depende inicialmente da seleção adequada da planta, que muitas vezes são feitas pela observação do uso popular em diferentes culturas (RATES, 2001; YUNES, et al., 2001). Relatos da literatura comprovam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso, ainda, é muito importante levar em consideração as informações botânico-taxônomicas e químico-taxonômicas (PINTO, et al., 2002; NIERO, et al., 2003).

O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, pois detém a maior e mais rica biodiversidade com 15% a 20% do total mundial, possuindo destaque as plantas superiores das quais possui cerca de 24% da biodiversidade, distribuídos em seis biomas distintos. Grande parte desta flora ainda é quimicamente desconhecida, principalmente os que possuem florestas extensas como é o caso da Amazônia, portadora de cerca de 40 mil espécies (YUNES, et al., 2001; BRASIL, 2016)

Na região Amazônica, ainda há muitas espécies de plantas que não possuem estudos com relação a sua composição química ou mesmo estudo da sua atividade biológica. Várias são as espécies que têm sido largamente utilizadas na medicina popular como remédios caseiros, empregadas a partir do conhecimento medicinal tradicional das populações locais onde muitas vezes é a única opção de tratamento (BORRÁS, 2003; BRASIL, 2016).

Constatou-se, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), que grande parte da população recorre á pratica não convencional de saúde, pela pratica da medicina popular, muita das vezes devido o seu fácil acesso e baixo custo ao invés das terapias medicamentosas alopáticas que são consideradas agressivas ao organismo e mais caras. Com isso, considera-se um fator de grande incentivo o estudo químico e da atividade biológica dessas espécies para validar o uso popular (AKERELE, 1988; DI STASI, 1996, OMS, 2008).

Neste contexto, dentre a vasta diversidade de espécies nativas encontradas na Amazônia pouco explorada quimicamente, o presente trabalho vem destacar a espécie vegetal *Brosimum parinarioides* (HUBER) Ducke, pertencente à família Moraceae, conhecida popularmente como amapá ou amapá- doce (CALVALCANTE, 1996).

A espécie *B. parinarioides* é um dos produtos florestais de grande importância regional em função do valor medicinal, nutricional e comestível. A partir do látex é considerado na região como um líquido de sabor adocicado comumente consumido *in natura* ou com o leite de vaca, fazendo parte da alimentação em comunidades rurais na Amazônia. É amplamente utilizado como um valioso remédio para asma, bronquite, tuberculose, traumatismo no tórax, cicatrizante, anti-inflamatório, contra fraquezas em geral e doenças intestinais (CAVALCANTE, 1996; MATTA, 2003; GALUPPO, 2004).

Partindo dessa premissa, tem-se por objetivo estudar quimicamente os compostos bioativos da espécie vegetal *B. parinarioides* presente nas cascas cuja composição química nunca foi estudada e no látex, contribuindo assim com estudos que comprovem sua eficácia como produto medicinal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a composição química das cascas e do látex de *B. parinarioides* assim como avaliar a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral.

2.2 Objetivo específico

- ✓ Obter perfis cromatográficos dos extratos e frações de por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando luz ultravioleta e diferentes reveladores químicos;
- ✓ Obter, perfis cromatográficos de frações e substâncias obtidas, por cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG) e Espectrometria de Massas (EM);
- ✓ Isolar substâncias por meio de métodos clássicos e modernos de cromatografia;
- ✓ Identificar e/ou elucidar as estruturas das substâncias isoladas, através de análises de Ressonância Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, DEPT 135°, NOESY) e Espectrometria de Massas (EM);
- ✓ Avaliar as atividades antitumorais, acetilcolinesterase, antioxidante e anti-inflamatória dos extratos e substâncias isoladas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A família Moraceae

A família Moraceae pertence a ordem Urticales sendo representada no Brasil por cerca de 38 gêneros (CARAUTA, 1998). É responsável pela ocorrência expressiva de diferentes tipos flavonoides e triterpenos. Apresentando ampla distribuição geográfica, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo composto por cerca de 1050 espécies distribuídas em 37 gêneros na reserva florestal Adolpho Ducke, a família é representada por 44 espécies (RIBEIRO, 1999).

No Brasil, destacam-se apenas os gêneros *Ficus*, *Brosimum*, *Dorstenia* e *Cecropia* sendo *Ficus* o maior gênero desta família. Seus representantes incluem árvores, arbustos ou ervas, com laticíferos abundantemente distribuídos em todas as partes da planta e quase todos sem exceção têm látex leitoso (RIBEIRO, 1999; DALL' STELLA, 2008).

Esta família possui muitas espécies que são comercialmente exploradas pela indústria de madeira, papel, borracha e na alimentação, como exemplo a amora (*Morus*), figo (*Ficus*) e jaca (*Artocarpus heterophyllus*) (TEXEIRA, 1999). O crescente interesse em estudos de plantas pertencentes a essa família, é motivado pela busca de novos tipos estruturais de substâncias, além da busca por novos tipos estruturais de cumarinas cuja participação em vários sistemas biológicos tem sido amplamente esclarecida. Possuem grandes variedades de atividades biológicas: antioxidante, antitumoral, anti-HIV, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, além do uso terapêutico associado à radiação ultravioleta na região de 300-387nm, para o tratamento da psoríase e do vitiligo (DUBERTRET, 1990; BECKER, 1993; RIBEIRO, 2002; SOUSA 2005).

Essas cumarinas são amplamente encontradas em diferentes partes das plantas tanto nas raízes, caule, como nas flores e frutos, ou mesmo em diversas famílias, como Apiceae, Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae, Oleaceae, Thymeleaceae e Moraceae (RIBEIRO, 2002).

A cumarina conhecida como 1,2-benzopirona (Figura 1), foi a primeira representante isolada, em 1820 da espécie *Coumarona adorata*. Por ser a estrutura mais simples este composto tornou-se o esqueleto básico para todos os outros derivados cumarínicos (pertencentes à classe dos flavonoides), (MURRY, 1978).

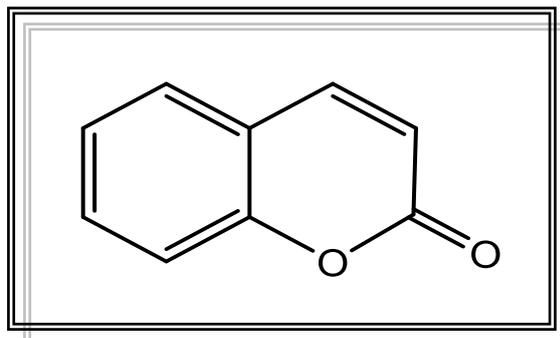


Figura 1. Estrutura química da 1,2 benzopirona.

As substâncias dessa subclasse são classificadas em cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas com substituintes de grupos epóxis, hidroxilas, anéis heterocíclicos, cadeias glicosídicas e etc. São definidas quimicamente como lactonas aromáticas, sendo esse termo empregado ao grupo de substâncias naturais que possuem o núcleo benzopirânico e biossinteticamente são derivadas do ácido hidroxicinâmico, que envolvem uma isomerização *trans-cis* do ácido cumárico, seguida de uma lactonização, Figura 2, (DEWICK, 2002).

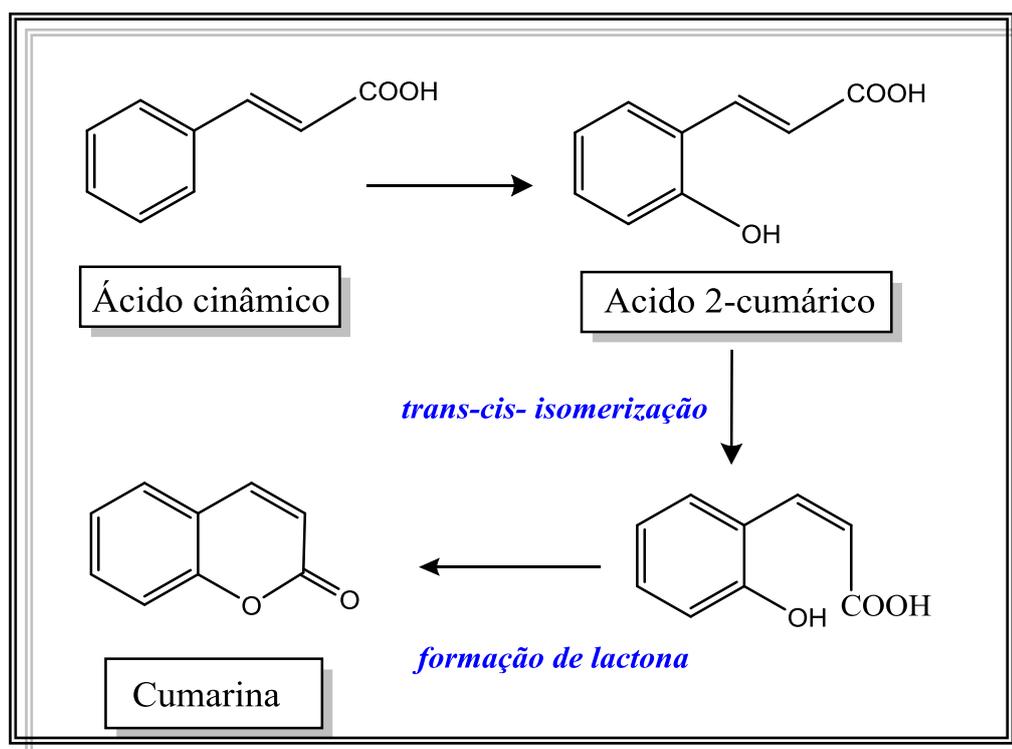


Figura 2. Rota biossintética da cumarina

Os flavonoides existem sob diferentes formas estruturais, normalmente são compostos fenólicos constituídos por unidades $C_6-C_3-C_6$, que possuem dois anéis C_6 necessariamente aromáticos, que são identificados como anéis *A* e *B*, conectados por uma ponte de três átomos de carbonos que contém geralmente um átomo de oxigênio localizado no anel *C*. Possuem cerca de quinze átomos de carbono no seu esqueleto básico (DEWICK, 2002).

De forma geral, todas as classes de flavonoides estão correlacionadas pelas vias biossintéticas comuns que possuem como produtos resultantes tanto da via do acetato quanto da via do chiquimato. A subestrutura resultante do ácido chiquímico está destacado em preto e a proveniente da via do acetato está em azul, Figura 3.

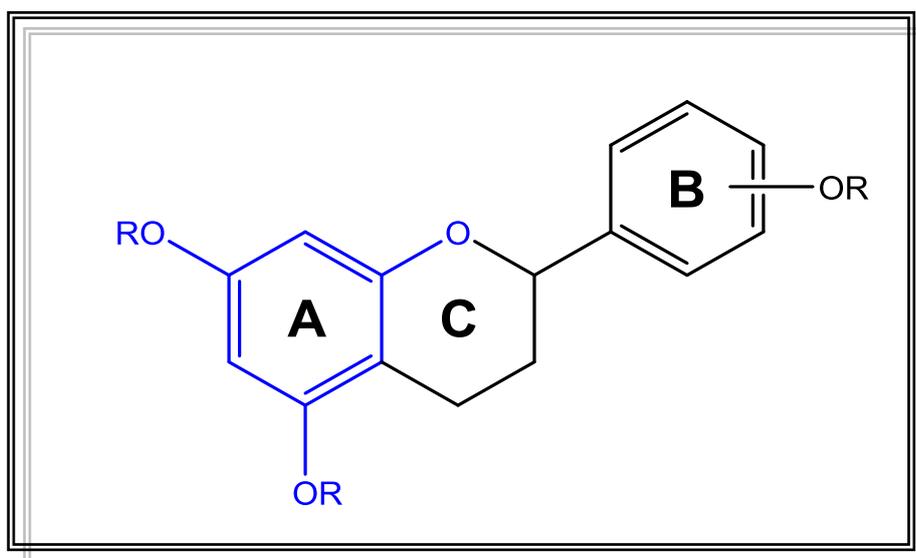


Figura 3. Estrutura básica de um flavonoide.

Variações no anel *C* originam as diferentes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonoides e outros (Figura 4 e 5). Pode-se dizer que há varias possibilidades de substituições de grupos como hidroxilas fenólicas, açucares, grupos de metoxilas, prenilas entre outras nos anéis benzênicos *A* e *B*. No que se refere a adição de segmentos prenilados do ponto de vista biossintético é geralmente mais provável que o esqueleto básico das diferentes classes de flavonoides seja formado antes da introdução de grupos, Figura 6. O fato de prenilação enzimática é confirmada pela especificidade das preniltransferases para as distintas classes de flavonoides (DEWICK, 2002; BARRON, 1996).

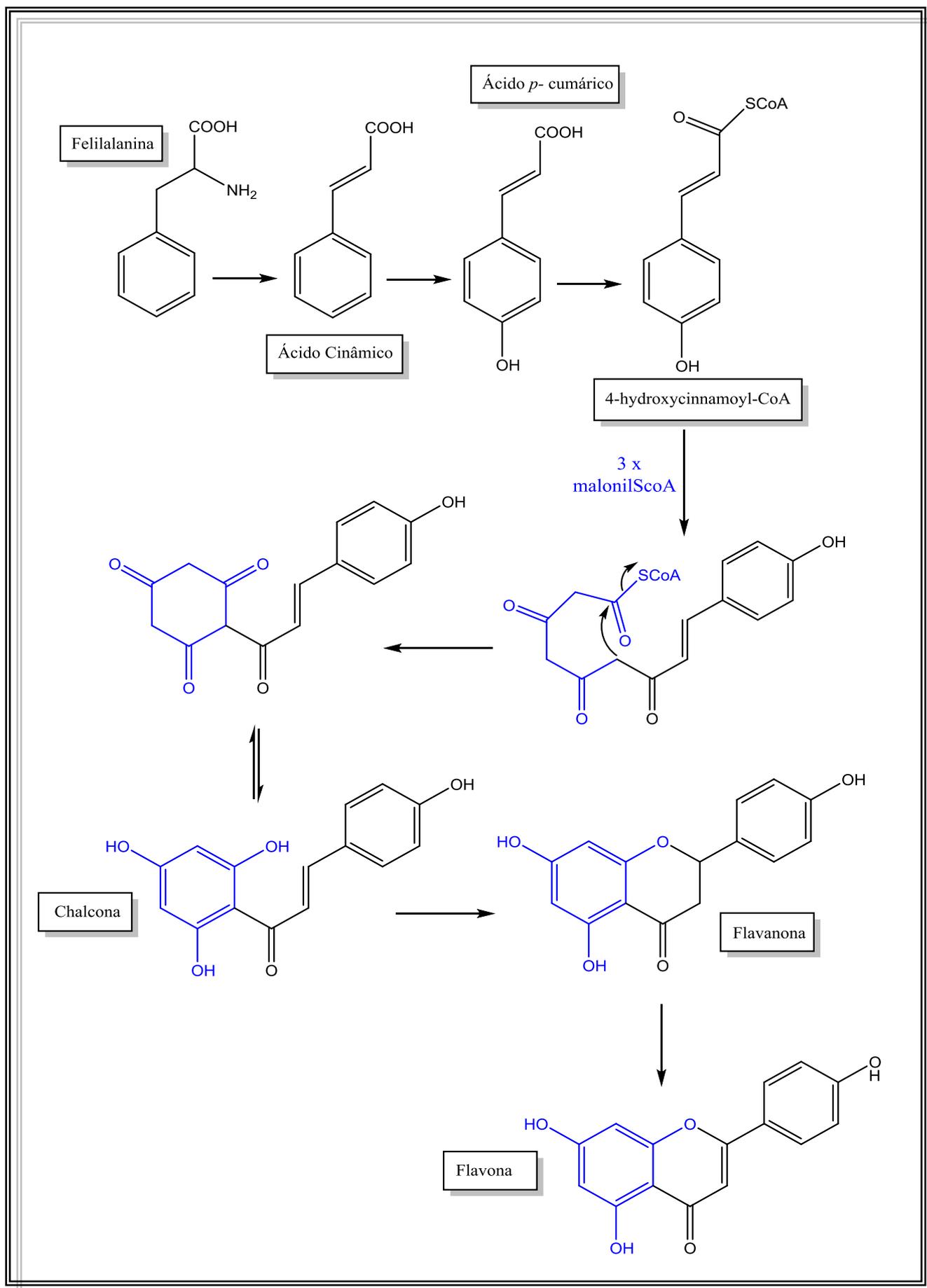


Figura 4. Rota biossintética de flavonoides.

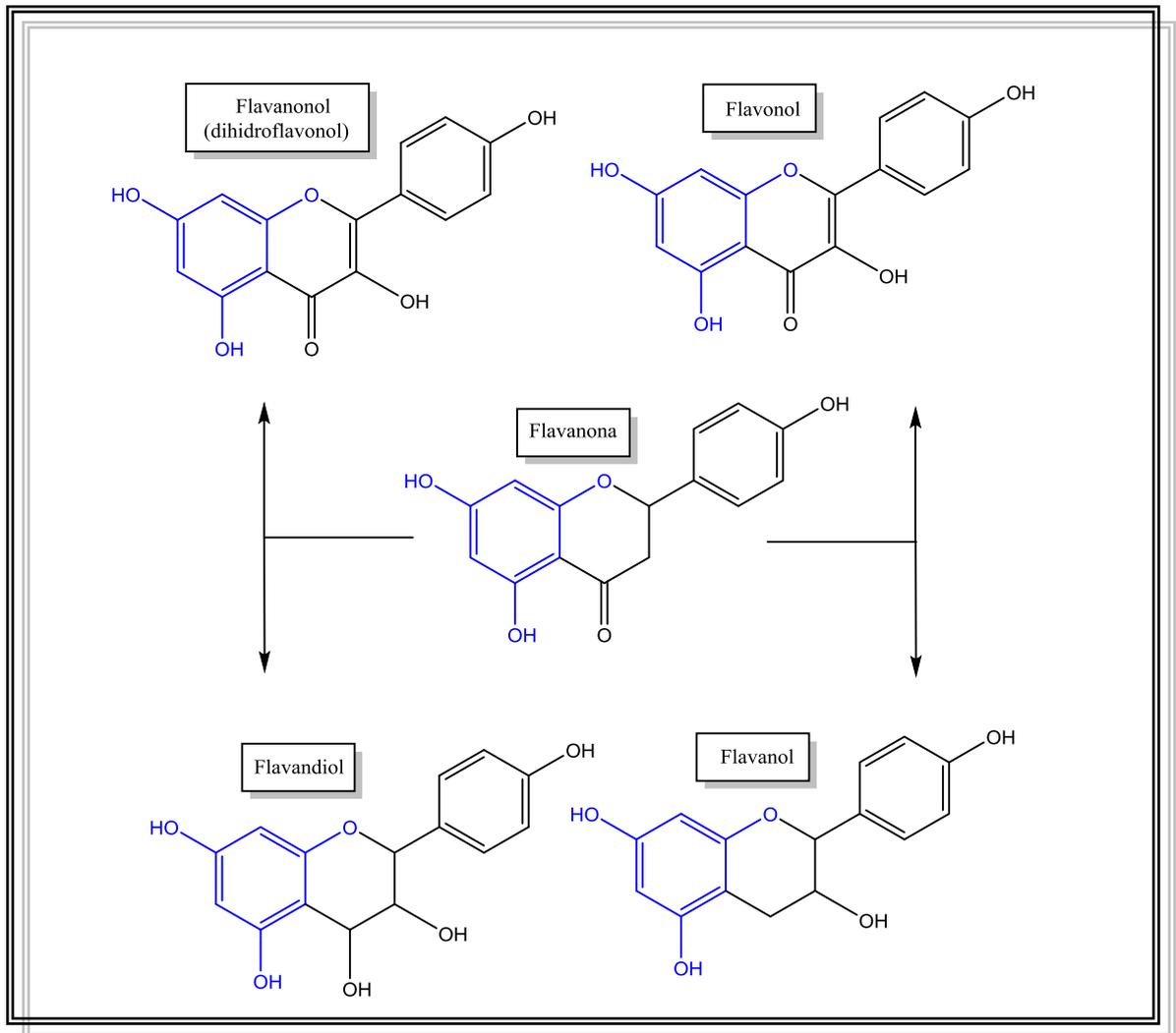


Figura 5. Rota biossintética de derivados de flavonoides.

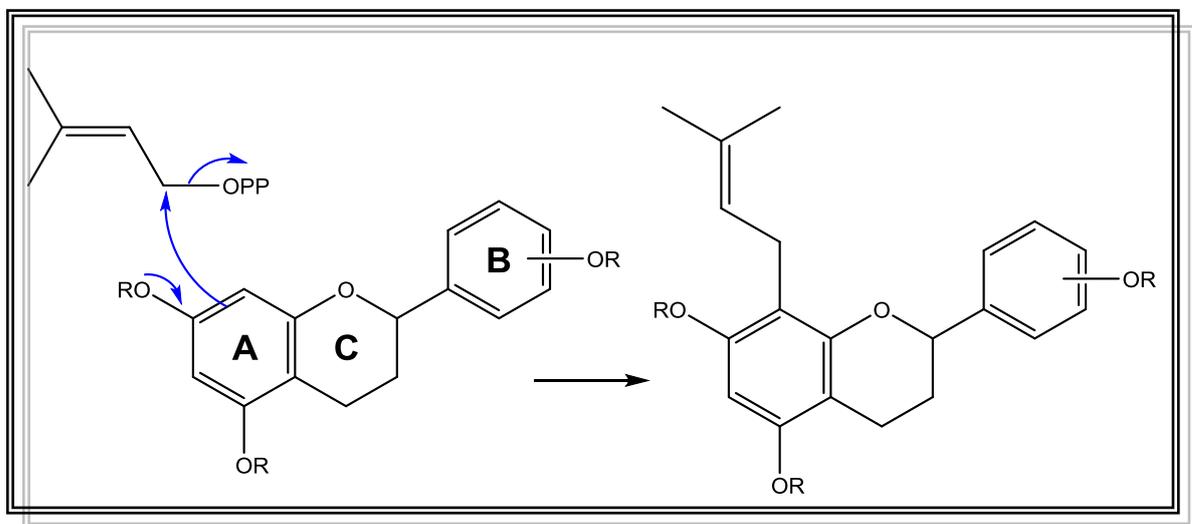


Figura 6. Esquema proposto para a biossintese de adição de segmento prenila.

Além das cumarinas, os triterpenoides representam uma importante subclasse de metabólitos secundários na flora e fauna terrestre (MAHATO, 1992). De forma geral, podem-se dizer que são substâncias predominantes encontradas nas plantas pertencentes à família Moraceae e também tornaram-se objetivos de estudo, por apresentarem interessantes atividades biológicas e farmacológicas comprovadas, tais como, atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, analgésica, cardiovascular, anti-HIV, antitumoral e anticancerígenas (PATROCKA, 2003; MANOHARAN, 2007; YI., 2015).

O ácido ursólico (ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-óico), Figura 7, por exemplo, é um triterpeno de ampla ocorrência em vários vegetais de diferentes famílias, possuindo considerável interesse devido suas propriedades biológicas como quimioterápico, quimiopreventivo e anti-inflamatório. Derivados desse ácido especialmente os dicarboxílicos, exibem atividade frente ao Vírus HIV, também exibem atividade citotóxica inibindo o crescimento de células tumorais, além de ser ativo contra linhagens de células leucêmicas (DZUBACK, *et al.*, 2006).

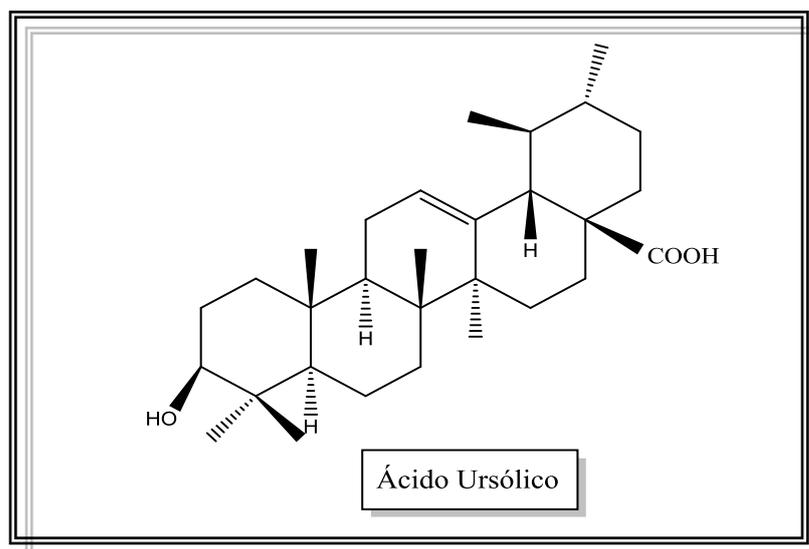


Figura 7. Estrutura química do ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-óico.

Os triterpenoides são produtos naturais pertencentes à classe dos terpenos na qual apresentam uma grande diversidade no seu esqueleto e funcionalização, quanto sua constituição são normalmente policíclica mais especificamente tetracíclica ou pentacíclica, que contém no máximo duas ou uma ligação dupla (DEWICK, 2002).

Na sua biossíntese, são precursores do eufol e o lanosterol, formados através da epoxidação em uma das extremidades do squaleno, que por sua vez é ciclizado

formando vários confôrmeros quando associados a algumas reações de rearranjo de metila ou de hidreto, geram cadeias carbônicas específicas comuns aos triterpenos (tetra ou pentacíclicos), Figura 8, (DEWICK, 2002; PATROCKA, 2003).

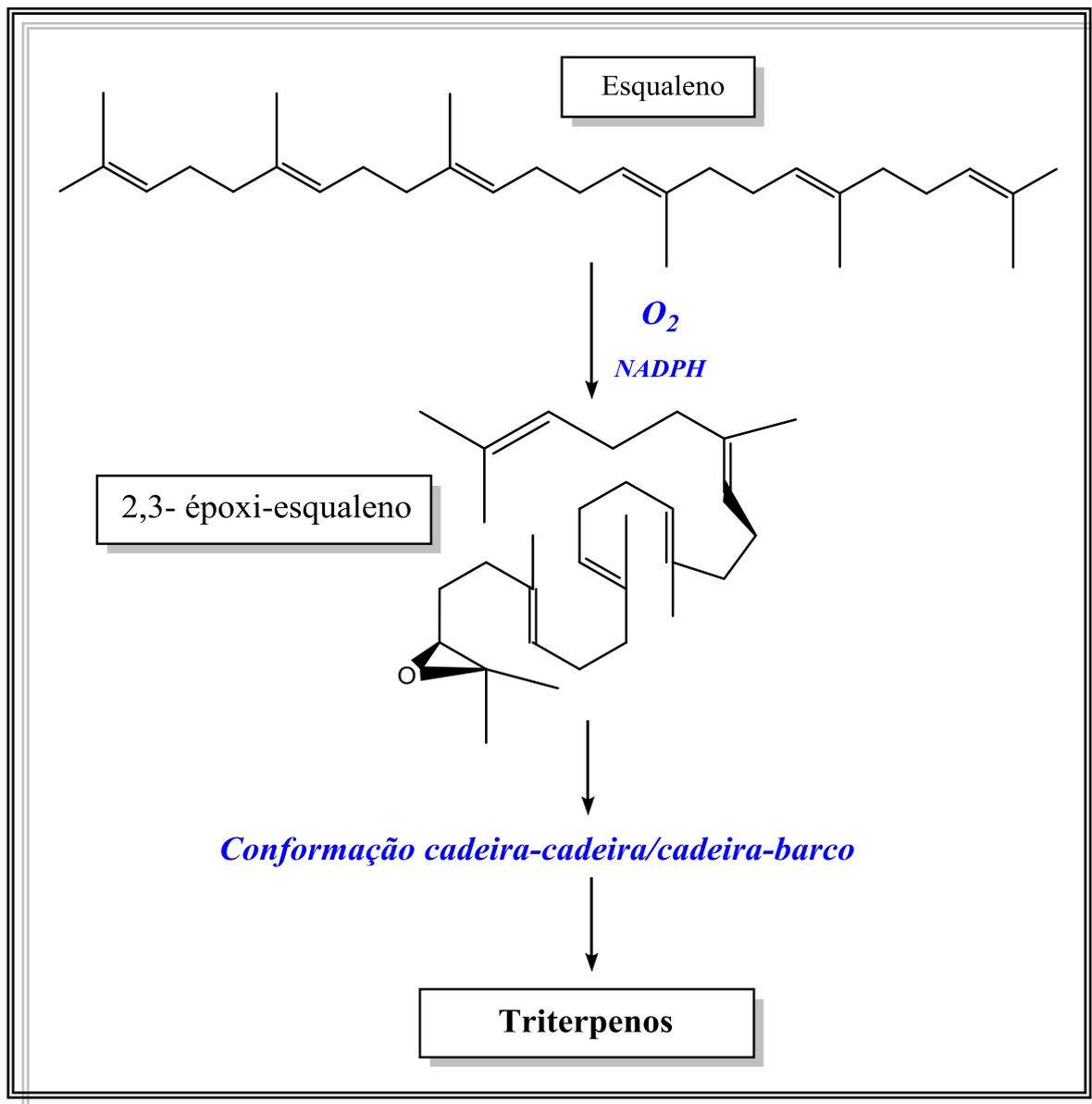


Figura 8. Biossíntese de triterpenos

Com isso uma grande quantidade de compostos de triterpenos puderam ser gerados por meio dessas diferentes reações químicas, cujas conformações dos esqueletos carbônicos das estruturas desses compostos definem sua estereoquímica (DEWICK, 2002).

3.2 O Gênero *Brosimum*

O gênero *Brosimum* compreende 15 espécies que possuem variedades morfológicas. São arbustos ou árvores que podem atingir até 40 m de altura, caracterizados pela produção de látex ou leite do amapá (CASTRO 2006).

Na Amazônia além das aplicações medicinais, algumas espécies do gênero *Brosimum* sp. são muito conhecidas, devido o seu uso nas indústrias madeireiras como o *B. rubescens* e *B. guianense* e principalmente pela produção do seu látex. Suas espécies são conhecidas por diferentes nomes, Tabela 1, (LIMA, *et al.*, 2013).

Tabela 1. Nome popular das espécies de *Brosimum*

Espécie	Nome popular
<i>B. parinarioides</i>	Amapá doce
<i>B. potabile</i>	Amapá doce e amapá leiteira
<i>B. utile</i>	Palo de vaca
<i>B. rubescens</i>	Pau-rainha e muirapiranga
<i>B. gaudichaudii</i>	Mamica-de-cadela e mama-cadela
<i>B. acutifolium</i>	Mururé e muirapiranga

Fonte: LIMA, *et al.*, 2013.

A espécies como *B. utile*, *B. potabile*, *B. alicastrum*, *B. parinarioides* e *B. longifolium*, possuem um látex que é considerado potável, e estas duas últimas espécies, o látex é aplicado contra doenças pulmonares (BERG, 1973; CORRÊA, 1978; ABREU, 2010; SCHOLZ, 2007).

3.2.1 Aspectos químicos e biológicos do *Brosimum*

Apenas três espécies do gênero vêm sendo mais estudadas quimicamente, que são o *B. rubescens*, *B. gaudichaudii* e o *B. acutifolium*. Da espécie *Brosimum rubescens* foram isolados diversas substâncias como, os triterpenos 3 β -acetoxi-olean-12-eno-28-al e β -sitosterol, Figura 9, (HAYASIDA, *et al.*, 2008) e um alto teor da cumarina xantiletina (HAYASIDA, *et al.*, 2011), que apresenta um potencial biológico, reportada pelas atividades antiplaquetária, antifúngica, herbicida e alguns de seus derivados possuem atividade em linhagens de células leucêmicas.

Apresentam ainda em sua constituição a brosiparina, 7-desmetilsuberosina, luvagentina e brosiprenina (BRAZ, *et al.*, 1971) Figura 9. Também foram isoladas substâncias modificadas por meio da cicloadição do tipo Diels-Alder de chalconas e cumarinas, conhecidas como palodesangretinas 1 e 2 (SHIROTA, *et al.*, 1998) e palodesagrenos de A-E, essas últimas substâncias C,D e E apresentam relatos de inibição para a produção de hormônios masculinos (SHIROTA, *et al.*, 1997) Figura 10.

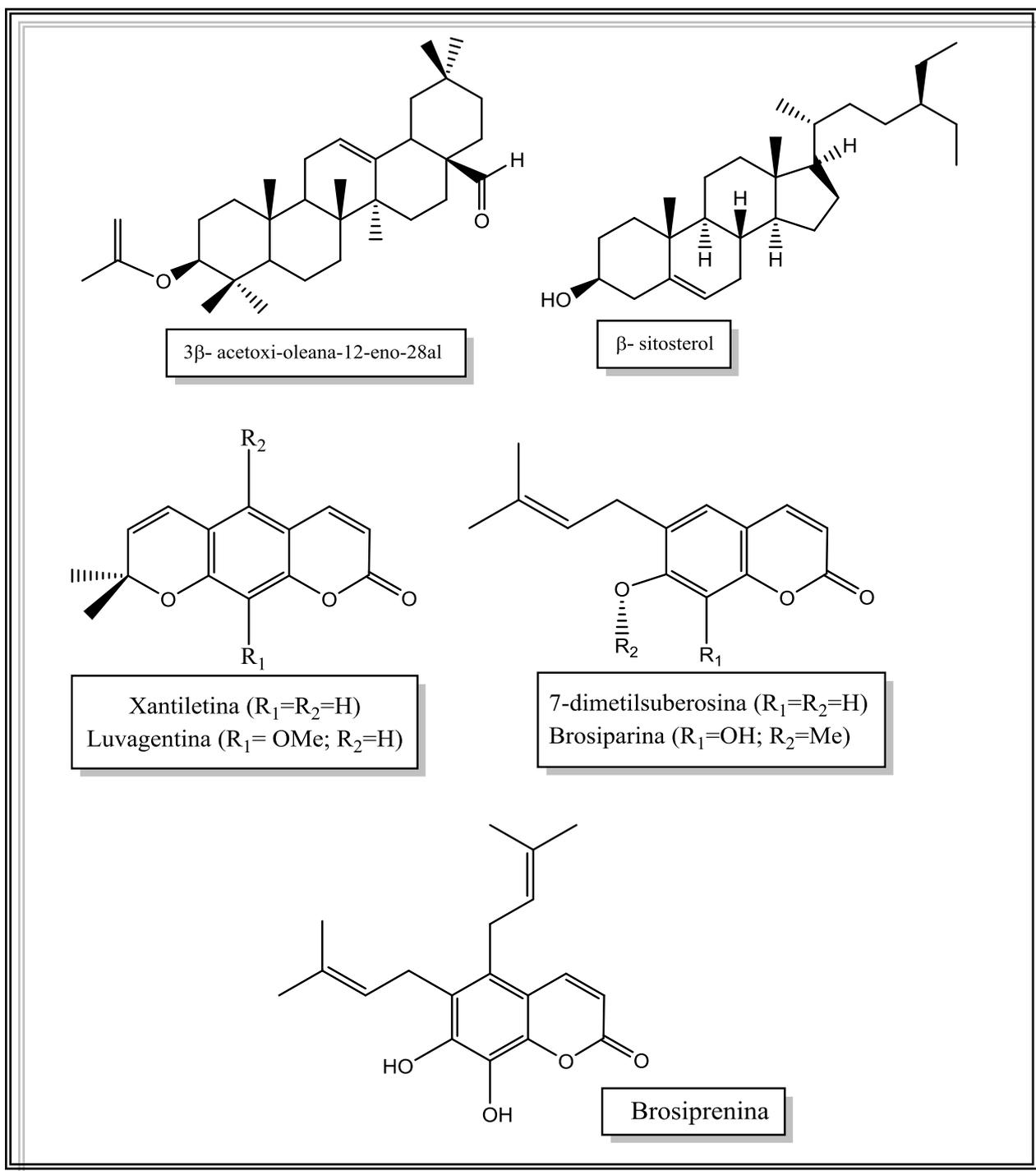


Figura 9. Compostos químicos descritos para espécie a *B. rubescens*

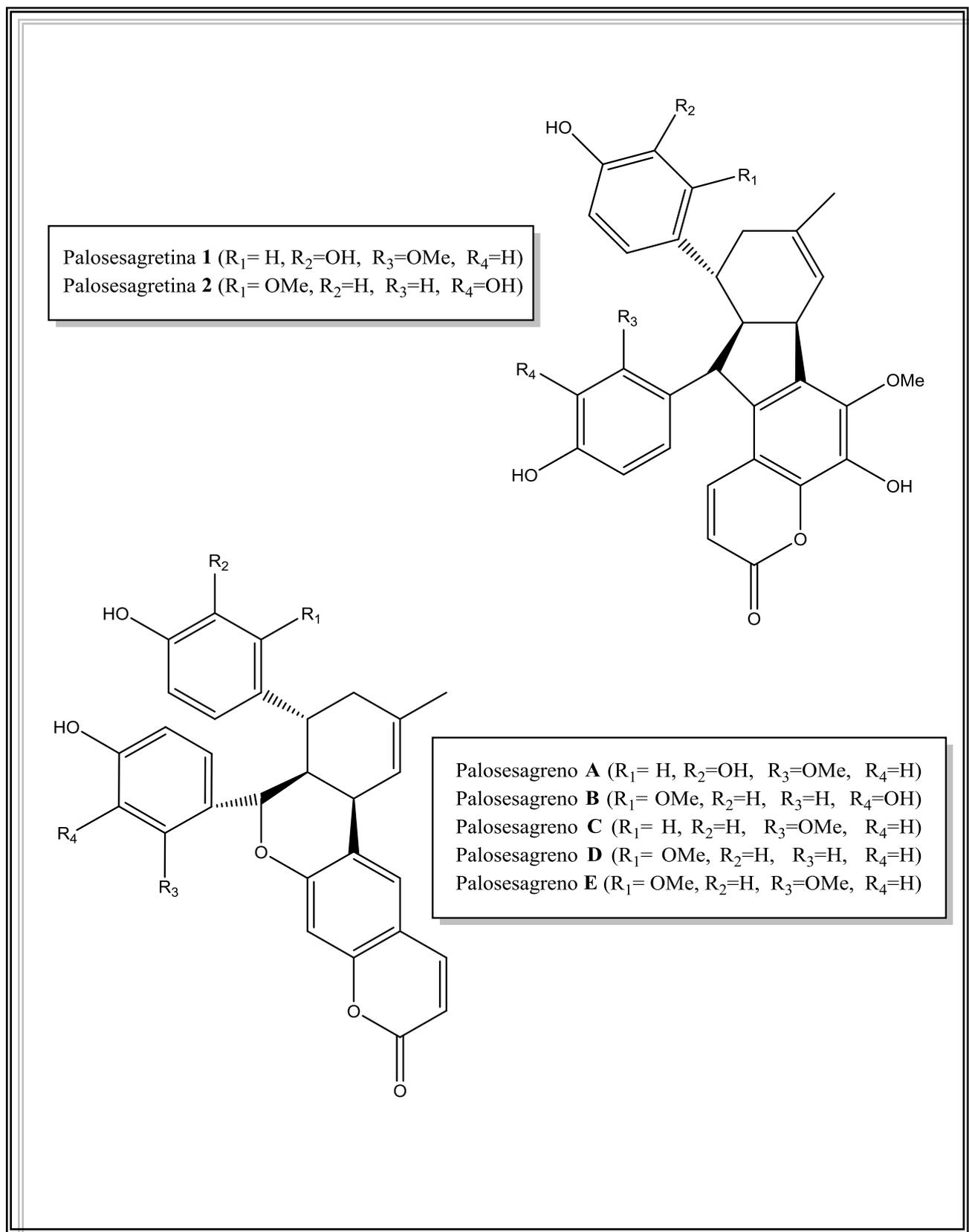


Figura 10. Compostos químicos descritos para espécie a *B. rubescens*

A espécie *B. gaudichaudii* nativa do cerrado brasileiro com ampla distribuição por todo o Brasil central, segundo estudos demonstram que os principais

componentes são duas furanocumarinas, psoraleno e bergapteno (Figura 11), substâncias responsáveis pela ação contra o vitiligo (POZETTI, 1969; MCKEON, 1981). Também já foram isolados compostos como, hidroximarmesina, xantiletina, luvangetina (VIEIRA, 1999).

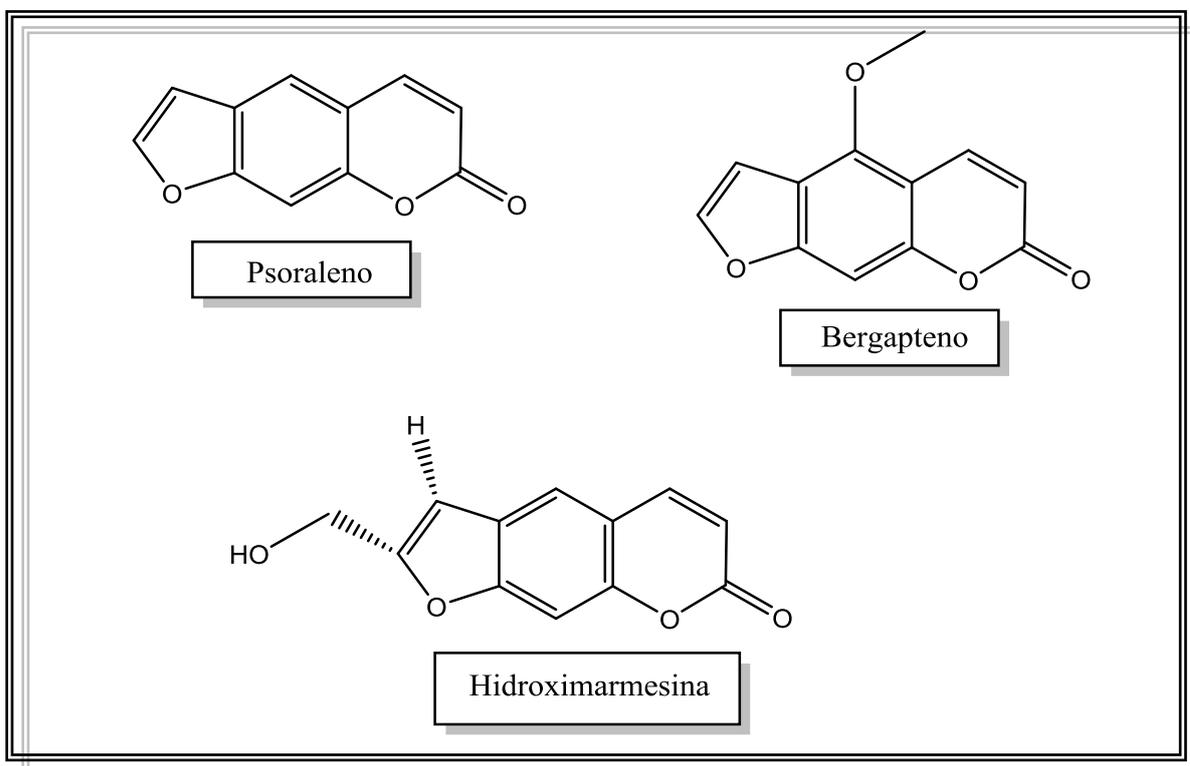


Figura 11. Cumarinas da espécie *B. gaudichaudii*

As cascas do caule de *B. acutifolium* são utilizadas na medicina popular na região Amazônica como agente anti-inflamatório e antireumático. Apresentaram em sua constituição química o 4',7'-di-hidroxi-8-prefenil-flavana (Figura 12), denominada anaflavana, fitoconstituente então inédito das frações diclorometano do extrato alcoólico, cuja toxicidade foi determinada utilizando-se camundongos. Posteriormente foram realizados testes clínicos com o extrato hidroalcoólico das cascas do caule, que indicaram uma melhora significativa dos pacientes portadores de artrite reumatoide (TEIXEIRA, *et al.*, 2000).

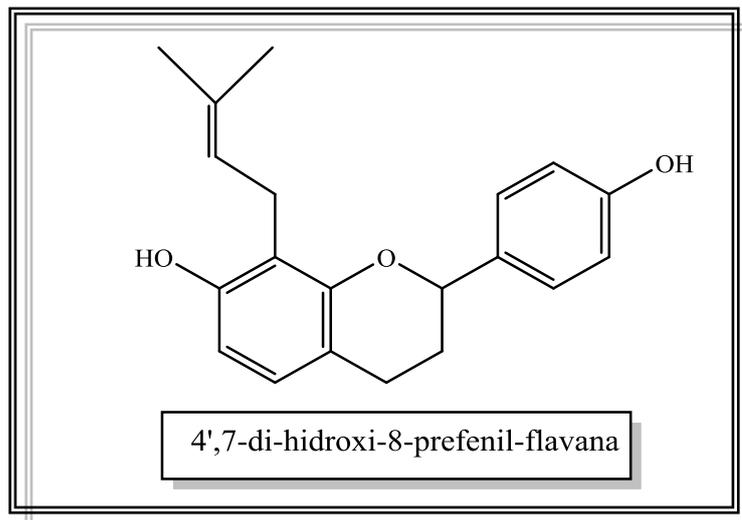


Figura 12. Flavana isolada de *B. acutifolium*

Foram isoladas também, flavanas dessa espécie como 4'-hidroxi- 7,8 (2'',2''-dimetilpirano) flavana e 4'-hidroxi- 7,8 (3''-hidroxi-2'',2''- dimetilpirano) flavana, (TORRES, *et al.*, 1997). Ainda, Torres e colaboradores (2000), identificaram doze substâncias, dentre elas encontraram duas flavanas inéditas e em homenagem ao gênero foram denominadas de brosimina A e B (Figura 13).

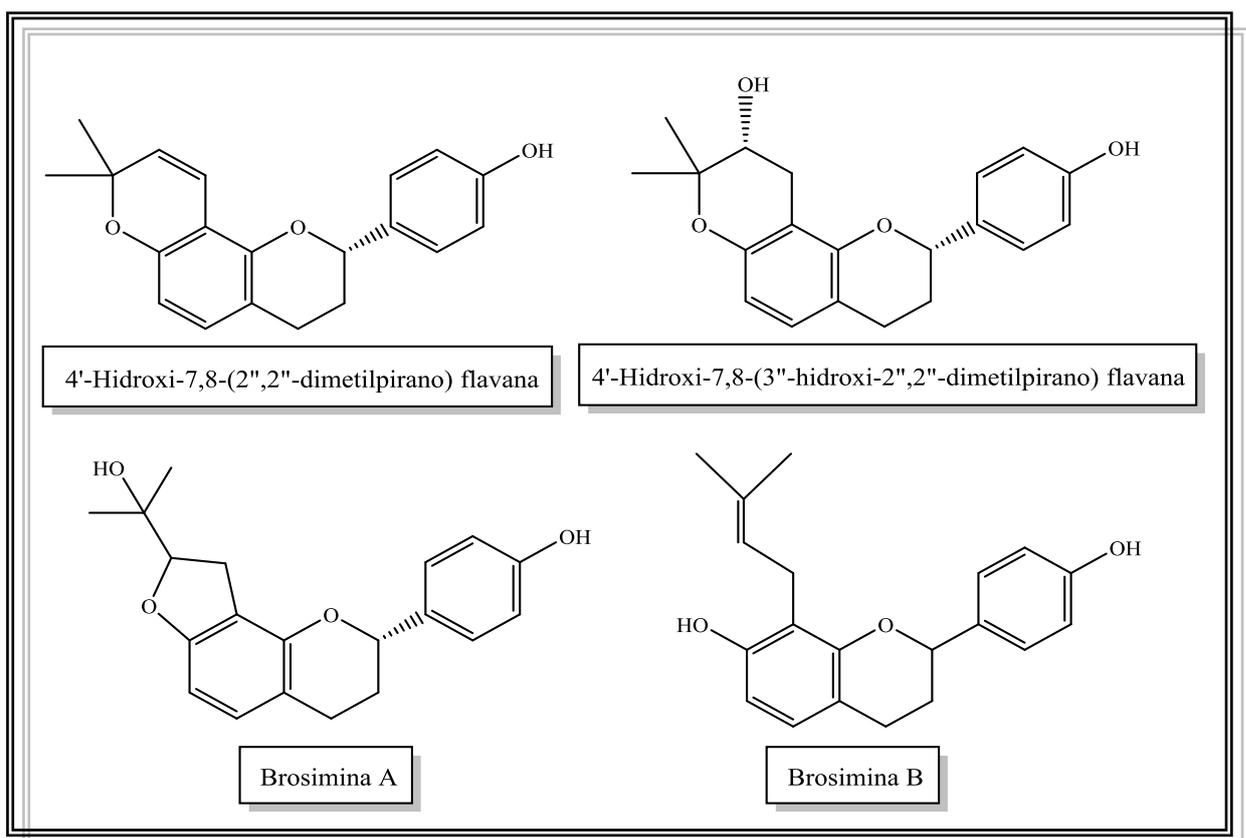


Figura 13. Flavanos da espécie a *B. acutifolium*

Posteriormente, Takashima e Ohsaki (2001) isolaram seis novas flavanas com pequenas variações estruturais do extrato metanólico da casca de *B. acutifolium*, que foram descritas como acutifolina A, B, C, D, E e F, dentre as quais, as acutifolinas D e E são diastereoisômeros (Figura 14).

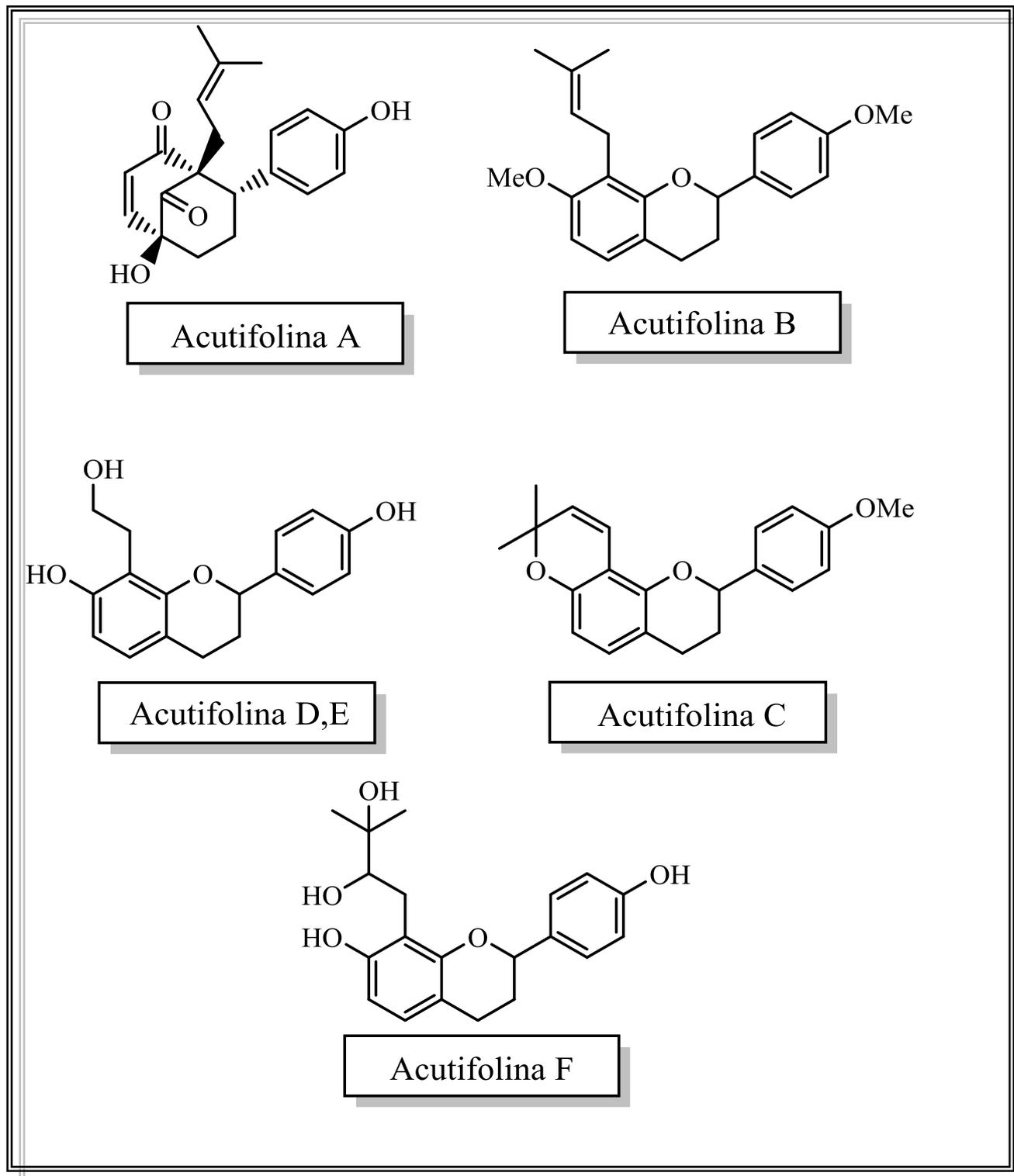


Figura 14. Compostos químicos descritos para espécie a *B. acutifolium*

Além das flavanas, Takashima e Ohsaki (2002), isolaram nove flavonoides inéditos provenientes dos extratos metanólicos das cascas do *B. acutifolium*, onde foram denominados como brosimacutina A, B, C, D, E, F, G, H, I e posteriormente quatro novos flavonoides brosimacutinas J, K, L e M (TAKASHIMA, *et all*, 2005). No látex desta espécie foi identificado um alcaloide indólico o 5-hidroxi-triptamina (bufoteína), caracterizado segundo Moretti (2006) por apresentar propriedades alucinóginas (figura 15 e 16).

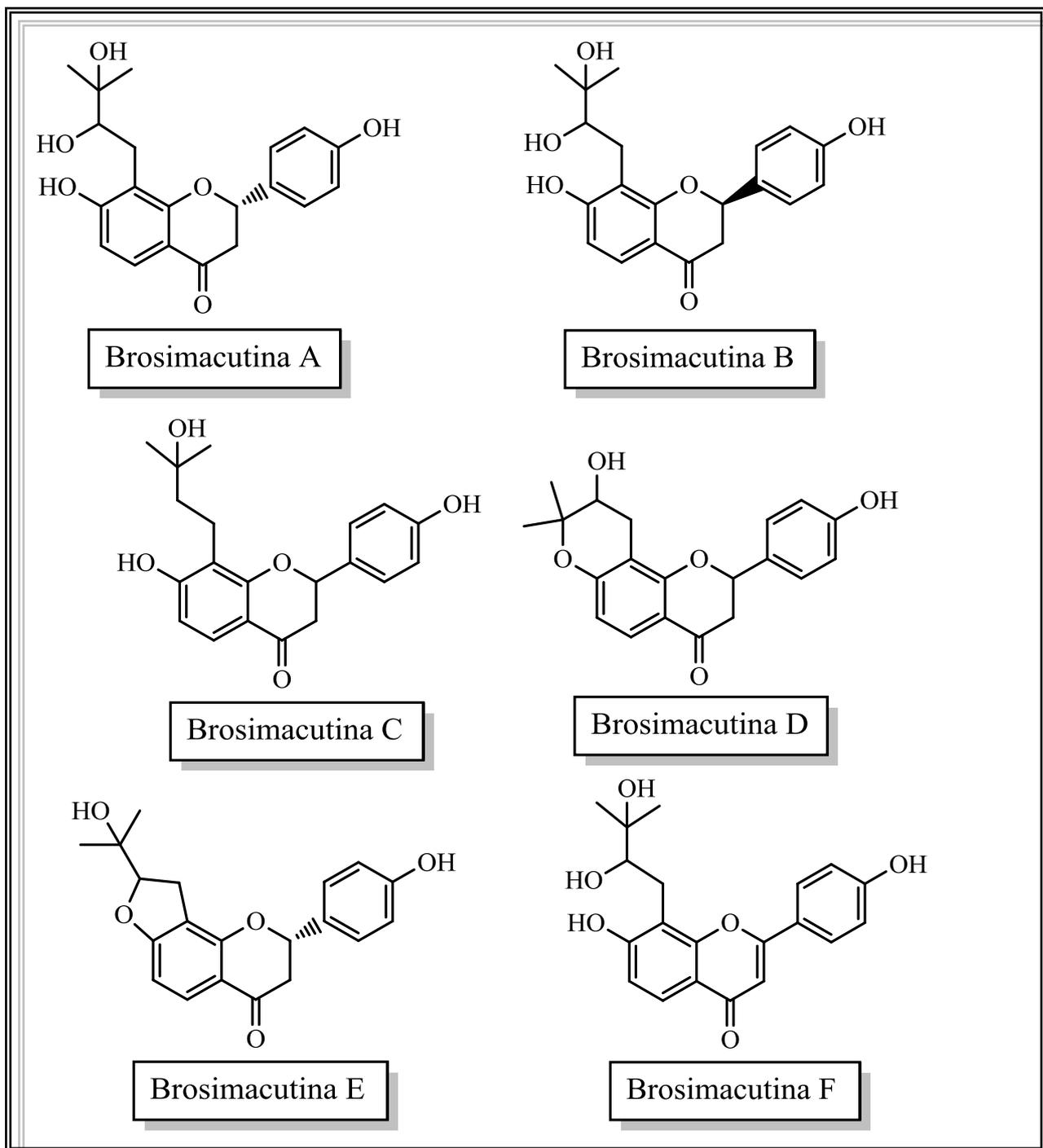


Figura 15. Compostos químicos descritos para espécie a *B. acutifolium*

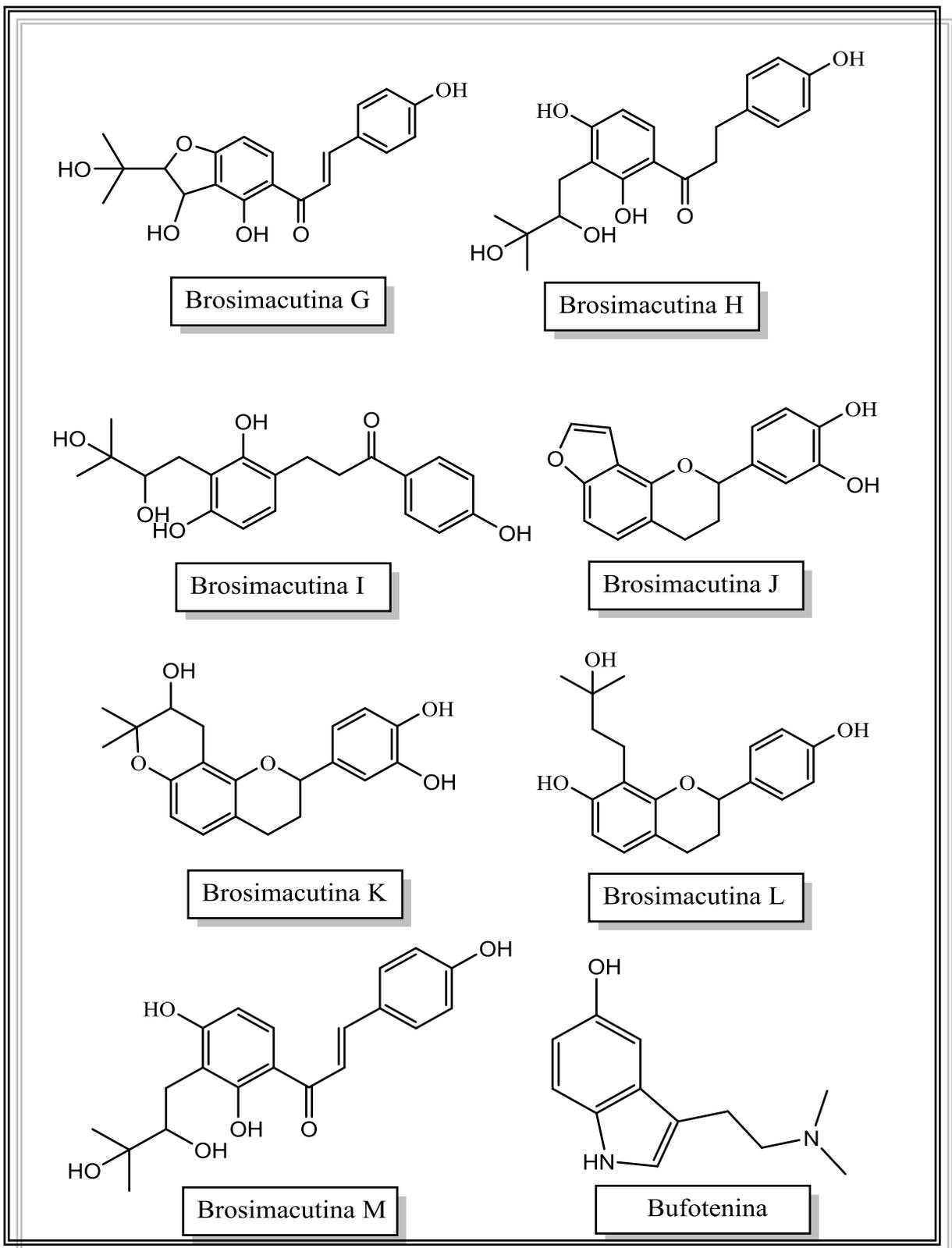


Figura 16. Flavonoides e Bufotenina descritos para espécie a *B. acutifolium*

Da espécie *B. potabile*, já foram isoladas três cumarinas como a 5-metoxipsoraleno, xantiletina e marmesina do extrato etanólico do cerne da planta. Da casca foram isoladas também substâncias como urs-12-eno, 3 β -acetóxi-oleana-12-eno, 3 β -acetóxi-ursa-12-eno, 3 β -acetóxi-lupa-12,20 (29)-diene e esteróis como o estigmasterol e β -sistosterol (Figura 17), (ALCÂNTARA, 2000; ABREU, *et al.*, 2010).

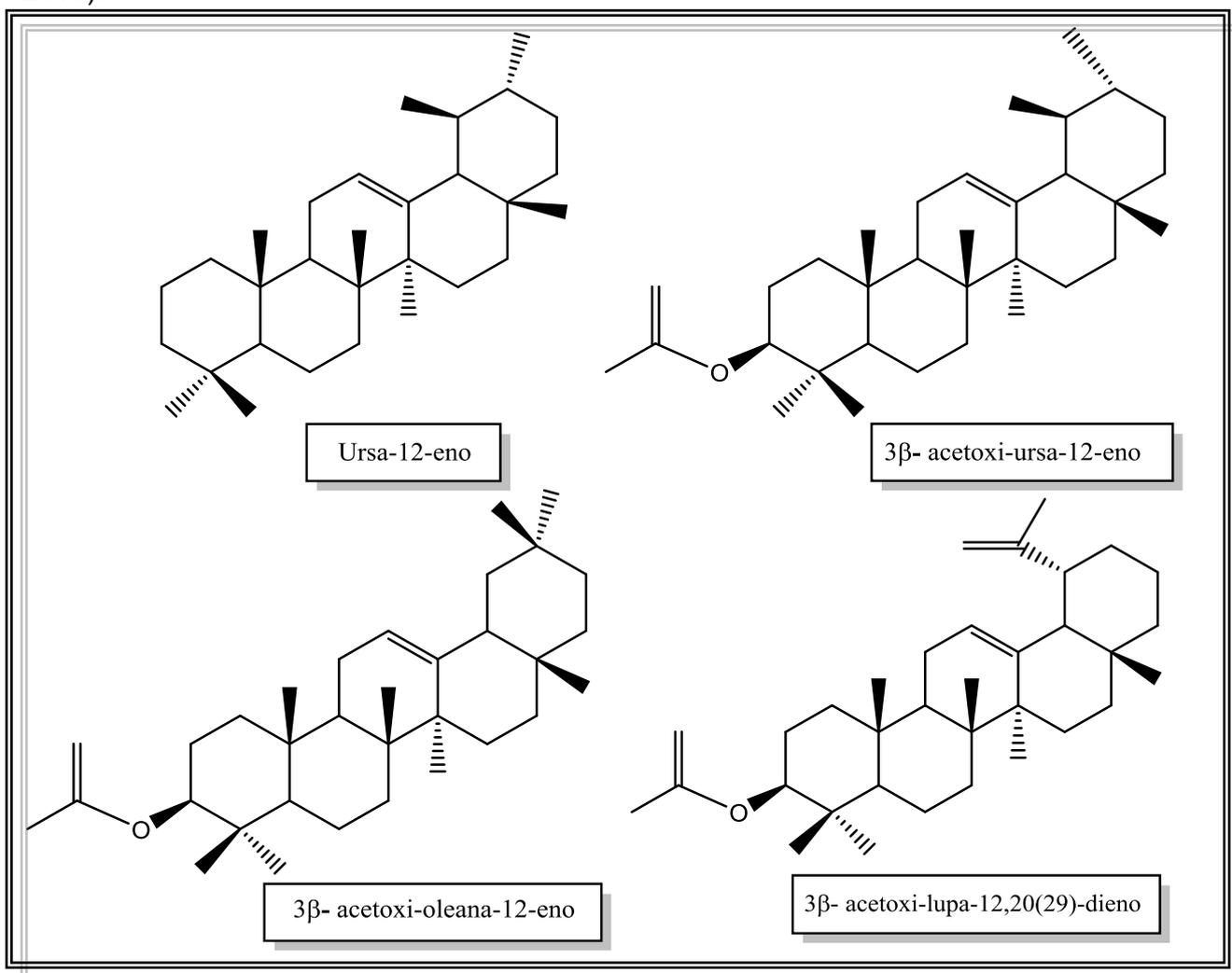


Figura 17. Terpenos da espécie a *B. potabile*

Dessa forma, o gênero *brosimum* é característico de espécies bem diversificadas na floresta amazônica e de diversos usos medicinais. Onde, suas cascas são utilizadas como anti-inflamatórias, antireumáticas e no tratamento de diversas infecções na pele. Os representantes do gênero são caracterizados pela presença acentuada de cumarinas e triterpenos além de outras classes, como flavanas, flavonoides, e alcaloides (LIMA, *et al.*, 2013). A Tabela 2, apresenta algumas substâncias isoladas das diferentes espécies pertencentes ao gênero *Brosimum*.

Tabela 2. Substâncias isoladas de diferentes espécies do gênero *Brosimum*.

Espécie	Parte estudada	Constituintes químicos	Classe	Referência
<i>B. gaudichaudii</i>	Raíz e fruto	<i>Psoraleno</i>	Cumarinas	POZZETI (1969, 1971)
		<i>Bergapteno</i>		
		<i>Hidroximarmesina</i>		
	Raíz	<i>Xantiletina</i>		VIEIRA (1999)
		<i>Luvangentina</i>		
<i>B. rubescens</i>	Cerne	<i>Xantiletina</i>	Cumarinas	BRAZ, <i>et al.</i> , (1972); HAYASIDA, <i>et al.</i> , (2008)
		<i>7-dimetilsuberosina</i>		
		<i>Brosiparina</i>		
		<i>Luvangetina</i>		
		<i>Brosiprenina</i>		
	-	<i>3β-acetoxi-oleana-12-eno-28-al</i>	Triterpeno	HAYASIDA, <i>et al.</i> , (2011)
	-	<i>β-sitosterol</i>	Esteróide	
		<i>Palodesangretinas 1-2</i>	Chalconas cumarinas	
	<i>Palodesangrenos A-E</i>	SHIROTA, <i>et al.</i> , (1998) SHIROTA, <i>et al.</i> , (1997)		
<i>B. potabile</i>	Caule	<i>β-sitosterol</i>	Esteróides	ALCÂNTARA (2000)
		<i>Stigmasterol</i>		
	Casca	<i>Xantiletina</i>	Cumarinas	ABREU, <i>et al.</i> , (2010)
		<i>Marmesina</i>		
		<i>5-metoxipsoraleno</i>		
		<i>3β-Acetoxi-oleana-12-eno</i>	Triterpenos	
		<i>Ursa-12-eno</i>		
		<i>3β-Acetóxi-ursa-12-eno</i>		
		<i>3β-Acetóxi-lupa-12,20 (29)-dieno</i>		

<i>B. acutifolium</i>	Casca	<i>Brosiminas A</i>	Flavanas	TORRES, <i>et al.</i> , (1997)
		<i>Brosiminas B</i>		
	Látex	<i>5-hidroxitriptamina (Bufoteina)</i>	Alcaloide	
		<i>4',7'-di-hidroxi-8-prefenil-flavana</i>	Flavana	TEIXEIRA, <i>et al.</i> , (2000)
	Casca	<i>4'-hidróxi-7,8-(2",2"-dimetilpirano)flavana</i>	Flavanas	TORRES, <i>et al.</i> , (2000)
		<i>4'-hidróxi-7,8-(3"-hidroxi-2",2"-dimetilpirano)flavana</i>		
	Casca	<i>Acutifolina A</i>	Flavanas	TAKASHIMA E OHSAKI (2001)
		<i>Acutifolina B</i>		
		<i>Acutifolina C</i>		
		<i>Acutifolina D,E</i>		
		<i>Acutifolina F</i>		
	Casca	<i>Brosimacutina A</i>	Flavonoides	TAKASHIMA E OHSAKI (2002)
		<i>Brosimacutina B</i>		
		<i>Brosimacutina C</i>		
<i>Brosimacutina D-E</i>				
<i>Brosimacutina F</i>				
<i>Brosimacutina G</i>				
<i>Brosimacutina H</i>				
<i>Brosimacutina I</i>				
<i>Brosimacutina J</i>				
<i>Brosimacutina K</i>		Flavonoides	TAKASHIMA, <i>et al.</i> , (2005)	
<i>Brosimacutina L</i>				
<i>Brosimacutina M</i>				

3.3 A espécie *Brosimum parinarioides* (Huber) Ducke

O *B. parinarioides* tem como nome popular o amapá, amapá-doce, amapá-roxo, amaparana, murerana, amapazeiro (BORRÁS, 2003).

Possui ocorrência nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e também na Guiana Francesa, habita frequentemente as matas de terra firme alta em solos sílico-argiloso (LOUREIRO, *et al.*, 2000). É uma árvore de grande porte, muito comum nas matas da Amazônia, sendo possível encontrar de 3 a 5 indivíduos por hectare. Atinge até 40 m de altura, suas folhas são de tamanho variáveis com no máximo 22 cm por 10 cm de largura, duras e com base levemente arredondada (Figura 18), possui uma entrecasca avermelhada e uma madeira interna amarela clara, seu tronco é cilíndrico e bem reto (CORREA, 1978; REVILLA, 2002).



Figura 18. Tronco e folhas da espécie *B. parinarioides*. Fonte: autoria própria e SALLES, 2013.

O Tronco ao ser cortado libera um aroma agradável e libera um leite (látex), Figura 19. O amapá doce é somente encontrado em terra firme, uma vez que o mesmo não resiste à cheia do rio (SOUZA, 2003). O látex desta espécie é um produto muito utilizado pela população, apresentando um gosto doce e agradável, possui aspecto branco quando fresco, ou rosa claro depois do contato com o ar, sendo bastante viscoso muito semelhante à cola (RIBEIRO, 1999).

Normalmente a produção do látex é artesanal e devido a não existência de uma organização empresarial sobre esse produto, corre o perigo de ter adulterações por outra espécie parecida (REVILLA, 2002; SHANLEY, *et al.*, 2005).



Figura 19. *B. parinarioides*: utensílio para sangria, látex. Fonte: autoria própria

3.3.1 Uso popular do leite do amapá

O leite do amapá é um medicamento de uso popular amazônico usado por populações rurais e urbanas por centenas de anos. É extraído através de cortes no tronco sendo usado como um ótimo cicatrizante de feridas, e também, é empregado por sua atividade antitussígena e anti-inflamatória (SHANLEY, *et al.*, 2005; BORRÁS, 2003). Em emplastos e contusões é utilizado diretamente nas áreas afetadas, sendo ainda indicado com a finalidade de cura de doenças respiratórias, tônico, fortificante ou energizante, onde se recomenda ingerir diariamente meio copo do látex (REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003).

Devido ao seu alto potencial medicinal, esse látex é muito apreciado pelas comunidades rurais, sendo substituinte muitas vezes do leite bovino na alimentação humana (GALUPPO, 2004). Segundo experiências populares o leite de amapá é consumido há muitos anos pelas populações amazônicas, por administração oral, sendo ingerido *in natura*, diluído em leite ou em água e muitas vezes agitado ou batido no copo manualmente ou mecanicamente com o auxílio de liquidificador, onde a espuma formada, abundante e densa, é retirada (BORRÁS, 2003).

3.3.2 Estudos encontrados na literatura de *B. parinarioides*

No que se refere, aos estudos realizados a partir de *B. parinarioides* na literatura, são encontrados apenas estudos voltados para a caracterização preliminar das classes de substâncias através de testes fitoquímicos e não por isolamento ou por identificação por meio de métodos cromatográficos e/ou espectrométricos.

Segundo Galuppo (2004), evidenciou a presença de compostos derivados de cumarinas, esteroides, triterpenoides, alcaloides e antraquinonas nas frações testadas de látex liofilizado. No trabalho desenvolvido por Galuppo, também foi realizado testes físicos e químicos para avaliar o valor nutricional do leite de amapá comparado com o leite de vaca e o leite de soja, todos relacionados com a dose diária recomendada, (tabela 3).

Tabela 3. Valores de cinzas, cálcio, fósforo, magnésio e proteínas do leite do amapá doce, comparado com o leite de vaca tipo C e o extrato de soja, relacionados com a dose diária recomendada.

	Leite do Amapá Doce	Leite de Vaca (Tipo C- Líquido)	Leite de Soja	Dose Diária Recomendada (DDR)
Cinzas (%)	0,4	0,7 ¹	0,5 ³	-
Cálcio (mg/100g)	120	114 ²	40 ²	39 ²
Fósforo (mg/100g)	70	102 ²	105 ²	77 ²
Magnésio (mg/100g)	60	-	0,22-0,24 ²	66 ²
Proteínas (%)	5,35-7,13	3,6 ¹	3,4 ²	14

Fonte: GALUPO, 2004.

Como resultado, foi possível observar que o leite do amapá apresenta um elevado potencial nutricional, e pode ser usado como reforço alimentar, apresentando 58% de umidade e boa quantidade de alguns minerais em sua composição e à presença proteínas também esta próxima com a DDR. No que se refere, ao cálcio presente, foi superior ao do leite da vaca e leite de soja, assim como também a dosagem diária que é recomendada, apresenta menor quantidade de fósforo quando comparado ao leite de vaca e soja, embora, o valor é bastante significativos relacionado com a DDR (GALUPO, 2004).

Estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa LAPAAM (Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia), SALLES (2013), descreveu o estudo fitoquímico do extrato diclorometânico do látex do leite de amapá extraído de *B. parinarioides* possibilitando o isolamento de cinco triterpenos conhecidos como butirospermol, e seu epímero tirucalla-7,24-dien-3 β -ol, o cicloartenol, cicloeucalenol e obtusifoliol, que são descritos ocorrer pela primeira vez na espécie (Figura 20).

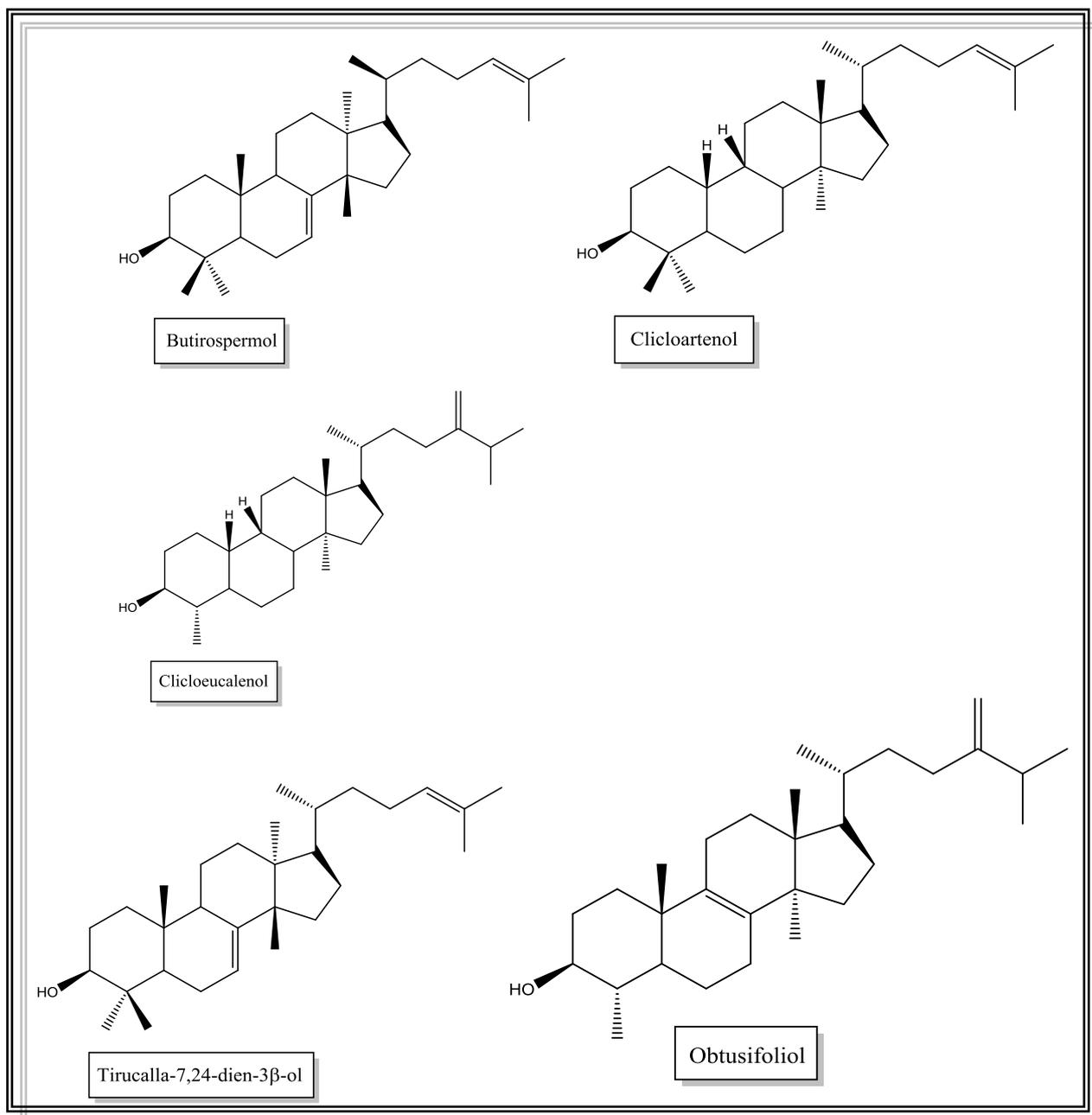


Figura 20. Terpenos isolados do *B. parinarioides*. Fonte: SALLES (2013).

Nesse trabalho também foi desenvolvida uma metodologia de análise por CLAE, em fase normal, para obtenção dos perfis cromatográficos do extrato diclorometânico de *B. parinarioides*. Os resultados obtidos mostraram que os extratos apresentaram constituintes como os acetatos de α e β -amirina e de lupeol, cicloeucaalenol e o obtusifoliol em sua composição.

No que se refere, ao estudo do uso terapêutico da espécie também foi verificado pela determinação do efeito cicatrizante que foi avaliado pelo efeito coagulante de alguns desses constituintes isolados e dos extratos da espécie pelo Teste de Protrombina (TP), utilizando a heparina como controle positivo de anticoagulante, e também pela inibição da enzima lipoxigenase (LOX). Como resultado, não foi possível verificar um resultado positivo utilizando o teste de Protrombina que avalia a via extrínseca de coagulação, porém mais estudos precisam ser feitos para que possa ser descartada o seu uso como cicatrizante.

Quanto à avaliação de atividade anti-inflamatória indicada, foi possível confirmar a inibição da enzima lipooxigenase para a mistura de triterpenos acetilados (acetato de α e β -amirina e de lupeol) e também no extrato, comparáveis ao padrão de quercetina utilizado, que corrobora para o uso popular contra asma e doenças pulmonares, uma vez que a enzima lipooxigenase está envolvida em processos inflamatórios relacionados a essas doenças anteriormente citadas.

4, PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Coleta do material vegetal

A casca e o látex do *B. parinarioides* foram coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Figura 21), localizada no Km 26 da estrada AM 010 (Manaus/Itacoatiara-AM) em março de 2016 [coordenadas 02° 54' 26" e 03° 00' 22" S, 59° 52' 40" e 59° 58' 40" W]. Os dados de localização e suas exsiccatas encontram-se depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no Projeto Flora da Reserva Ducke (Tabela, 4).



Figura 21. Espécie *B. parinarioides* coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke. Fonte: autoria própria

Tabela 4. Dados do *B. parinarioides* coletado

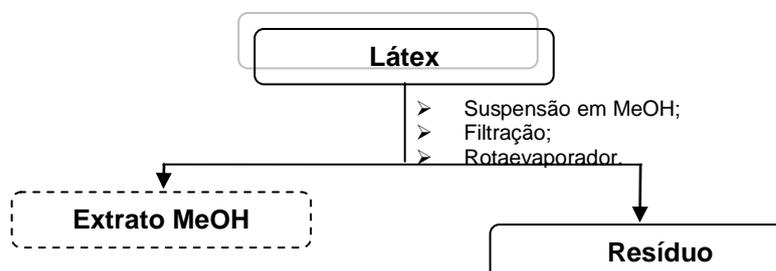
Parte da planta	Local	Nº da planta	Marco	Ângulo	Distância
Látex e casca	4	1136	M513	360	10m
Látex e casca	4	1131	M512	28	15m

4.2. Estudo fitoquímico do látex do *B. parinarioides*

4.2.1. Método de extração

O látex foi submetido à extração em aparelho ultrassônico com metanol por cerca de 20 min, em seguida esse material foi deixado em repouso com o solvente

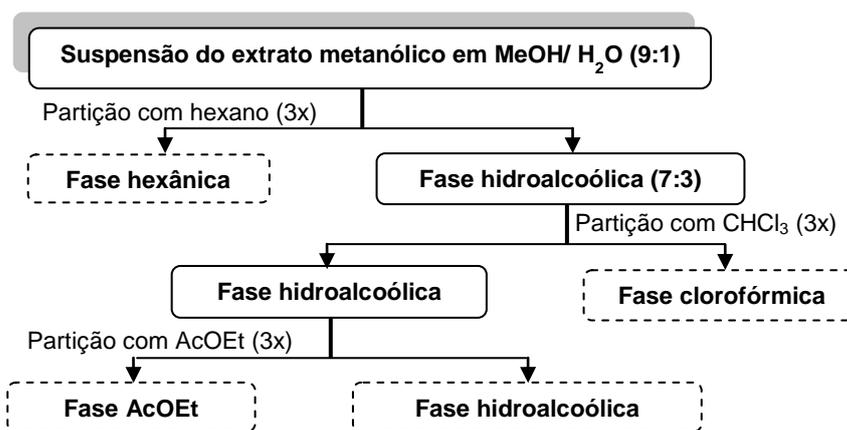
extrator por cerca de 48 h em um processo conhecido como maceração, por fim foi realizada a filtração à vácuo do material em um funil de Büchner. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador para o posterior cálculo do teor extrativo, conforme o fluxograma 1, abaixo:



Fluxograma 1. Procedimento utilizado para a obtenção de extratos metanólicos do látex extraído da espécie *B. parinarioides*.

4.2.2. Fracionamento do extrato

Foi realizado o fracionamento do extrato metanólico do látex por partição líquido-líquido, conforme o fluxograma 2.



Fluxograma 2. Extração líquido-líquido em ordem crescente de polaridade.

4.2.3. Análises por APCI-MSⁿ das frações da partição do látex do *B. parinarioides*.

Utilizou-se 1,0 mg das frações separadamente para o preparo da solução estoque (1,0 mg/mL). A partir da solução estoque foram preparadas soluções a 10 ppm em metanol grau HPLC e analisadas por injeção direta em espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (LCQ Fleet da Thermo scientific) equipado com fonte de ionização à pressão atmosférica (APCI), operando em modo negativo de aquisição

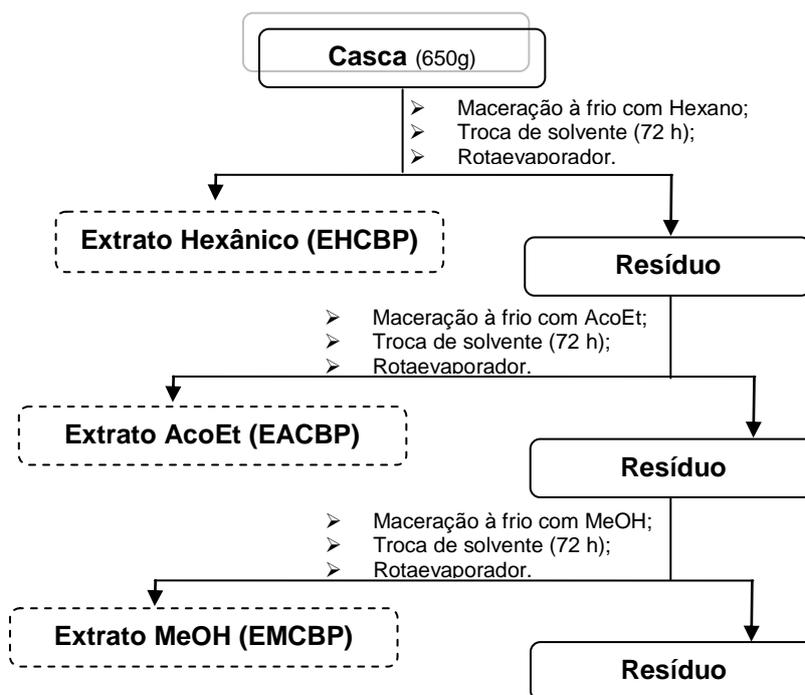
do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas- LABCEM da Central Analítica/UFAM. Para a obtenção dos espectros MSⁿ foram utilizadas energias de colisão entre 20-30 eV. A faixa de *m/z* analisada foi de 100-1000 Da. Os dados das injeções foram processados através do programa *Xcalibur 2.0.7*.

4.3. Estudo fitoquímico da casca do *B. parinarioides*

4.3.1. Método de extração

Para a obtenção de extratos da casca, inicialmente o material foi seco em estufa de circulação de ar, e após isso, foi moído em moinho de facas e pesado. Este material foi submetido à extração por maceração exaustiva sequencial utilizando-se diferentes solventes extratores que foram: hexano, acetato de etila e metanol. A troca de solvente foi realizada a cada 72 h, após o término da extração o solvente foi rota-evaporado e reutilizado (Fluxograma 3).

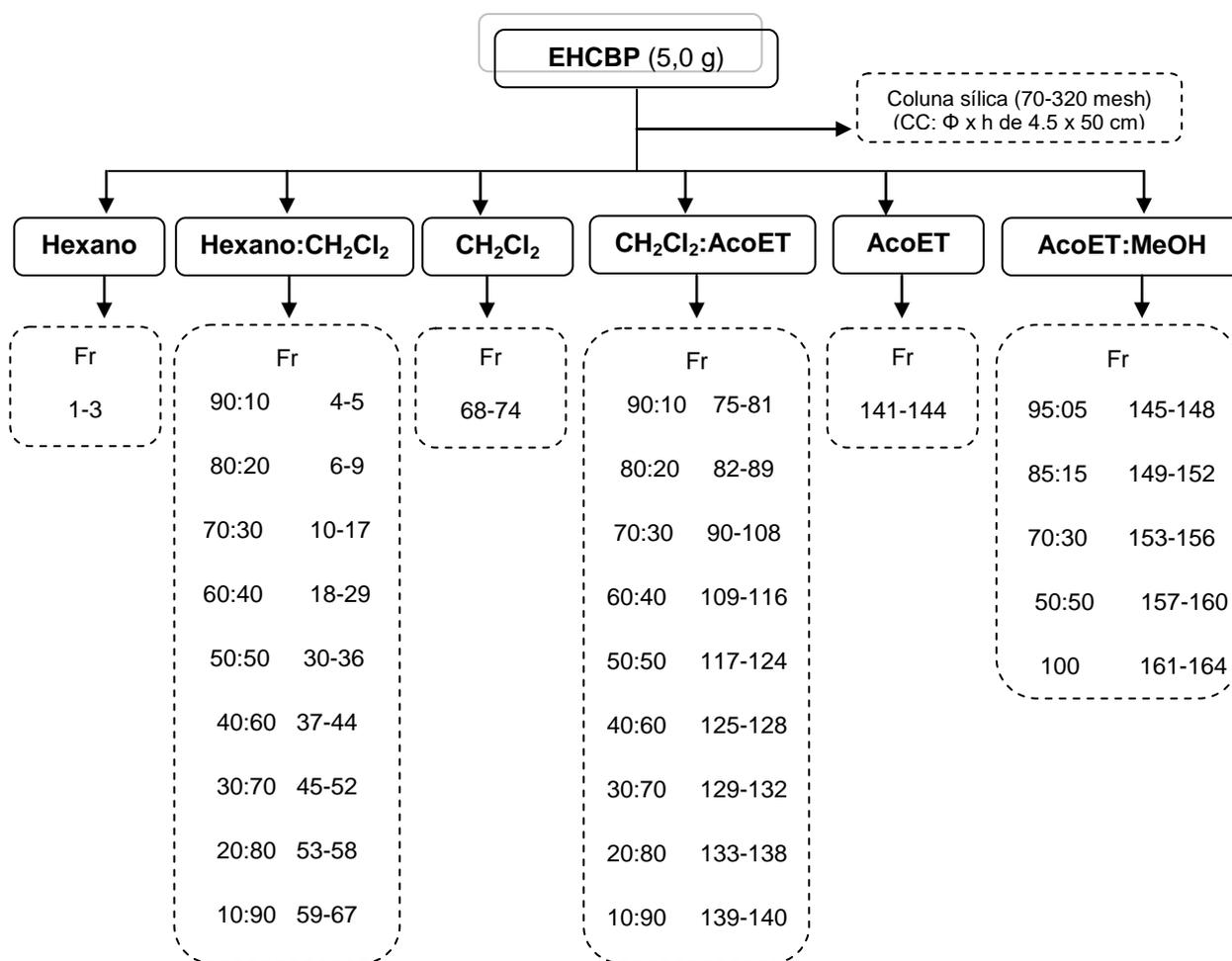
Os rendimentos dos extratos obtidos foram calculados e em seguida foram armazenados em freezer para posterior estudo.



Fluxograma 3. Metodologia de extração da casca.

4.3.2. Fracionamento cromatográfico do Extrato Hexânico

Uma parte do extrato hexânico (**EHCBP**) foi inicialmente submetido ao fracionamento cromatográfico em coluna cromatográfica (CC: Φ x h de 4,5 x 50 cm) de sílica gel (70-230 mesh) eluída com hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcoEt) e metanol (MeOH) em mistura de polaridades crescente resultando em 164 frações (20 mL cada) conforme o Fluxograma 4. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e as que apresentaram o mesmo R_f foram reunidas, obtendo-se 15 grupos de frações (**HGF**), segue na tabela 5.



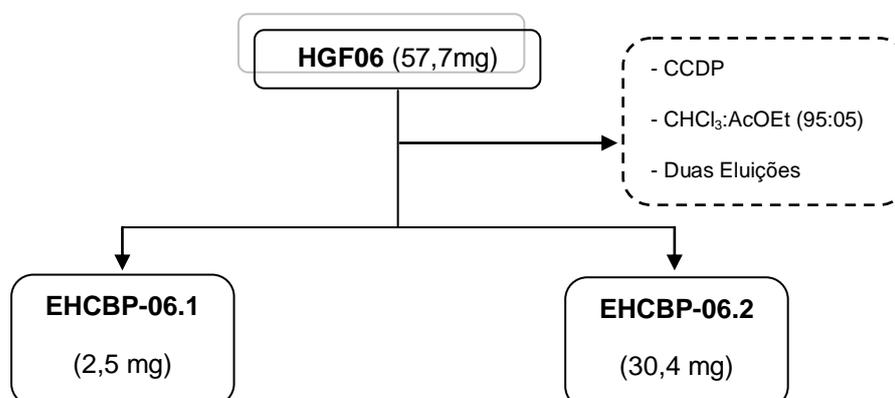
Fluxograma 4. Fracionamento cromatográfico do EHCBP.

Tabela 5. Agrupamento de frações do extrato hexânico das cascas do *B. parinarioides* após análise de CCDC e respectivas massas.

Grupo de Frações	Frações	Massa (mg)	Grupo de Frações	Frações	Massa (mg)
HGF 01	1–15	25,6	HGF 09	66–77	237,3
HGF 02	16–25	55,2	HGF 10	78–88	265,5
HGF 03	26–31	125,5	HGF 11	89	193,2
HGF 04	32–37	196,6	HGF 12	90–108	135,3
HGF 05	38–49	215,7	HGF 13	109–115	751,8
HGF 06	50–54	67,7	HGF 14	116–123	297,3
HGF 07	55–64	587,1	HGF 15	124–164	195,0
HGF 08	65	12,3			

4.3.2.1- Estudo Cromatográfico do Grupo de Frações HGF06

O grupo de frações **HGF06** (67,7 mg) após análise de CCDC foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) com sílica gel. Após duas eluições da fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ (95:05) resultando em duas frações (Fluxograma 5).

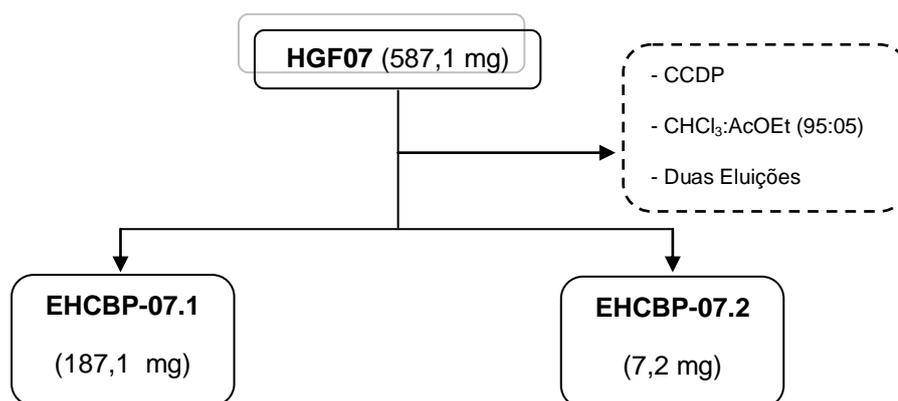


Fluxograma 5. Isolamento das substâncias presentes na fração HGF06

As frações codificadas como EHCBP-06.1 (2,6 mg) e EHCBP-06.2 (30,4 mg) apresentaram-se como sólidos brancos amorfos. Estas frações foram submetidas à análise por CCD e reveladas com solução de anisaldeído. Posteriormente, foram submetidas à análise por CG-EM.

4.3.2.2- Estudo Cromatográfico do Grupo de Frações HGF07

O grupo de frações GF07 (587,1 mg) foram submetidos à CCDP utilizando como eluente uma mistura binária de CHCl_3 :AcOEt (95:05) duas eluições, resultando em duas frações (Fluxograma 6).



Fluxograma 6. Isolamento das substâncias presentes na fração HGF07

A frações codificadas como EHCBP-07.1 (187,6 mg) e EHCBP-07.2 (7,2 mg) revelaram-se como sólidos brancos amorfos. Essas frações foram encaminhadas à análise por CCD e reveladas com solução de anisaldeído. Posteriormente, foram submetidas também às análises por CG-EM.

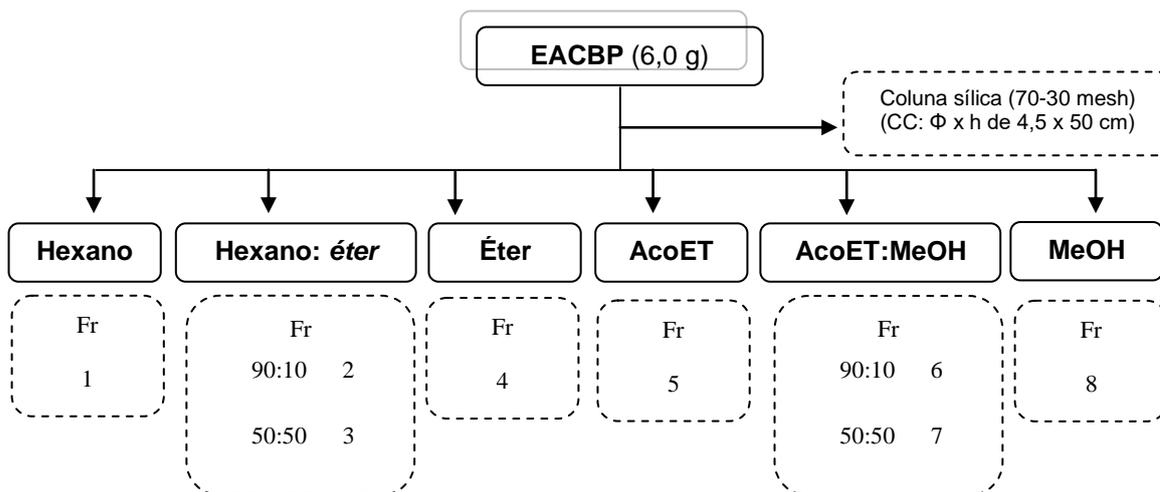
4.3.2.3- Estudo por CG-EM das substâncias obtidas das frações HGF06 e HGF07

As análises cromatográficas por CG-EM modelo QP2010MS foram realizadas no equipamento Shimadzu no laboratório de análises multidisciplinares da Escola Superior de Saúde- ESA/UEA. Utilizando hélio como gás de arraste, uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5% de difenil e 95% dimetilsiloxano), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 μm . As condições cromatográficas foram: a temperatura do injetor 280 °C, iniciando-se com 150 °C por

2 min e um gradiente de 5 °C/min a 240 °C (0 min), e 10 °C a 300 °C (66 min). O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons em 70 eV e a varredura foi de 50 a 500 Da. As amostras foram solubilizadas em DCM tendo como concentração final 1mg/mL e diluídas no ato de injeção. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas do banco de dados do aparelho NIST 2.0, Wiley e com dados obtidos da literatura.

4.3.3. Fracionamento cromatográfico do Extrato em Acetato de Etila

O extrato em acetato de etila (**EACBP**) foi fracionado em coluna filtrante de sílica gel (70-230 mesh), eluída com hexano, éter de petróleo, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade, fornecendo 8 frações (250 mL), Fluxograma 7. As frações foram concentradas em rotaevaporador rotativo e comparadas por CCD de sílica gel de fase normal e reversa. A análise de CCDC permitiu a reunião de frações em 5 grupos, como representado na tabela 6.



Fluxograma 7. Fracionamento cromatográfico do EACBP.

Tabela 6. Relação entre grupos de frações do extrato acetato da casca.

Grupo de Frações	Frações	Massa (g)
AGF 01	1	0,001
AGF 02	2	0,002
AGF 03	3-4	1,49
AGF 04	5	2,15
AGF 05	6-8	1,48

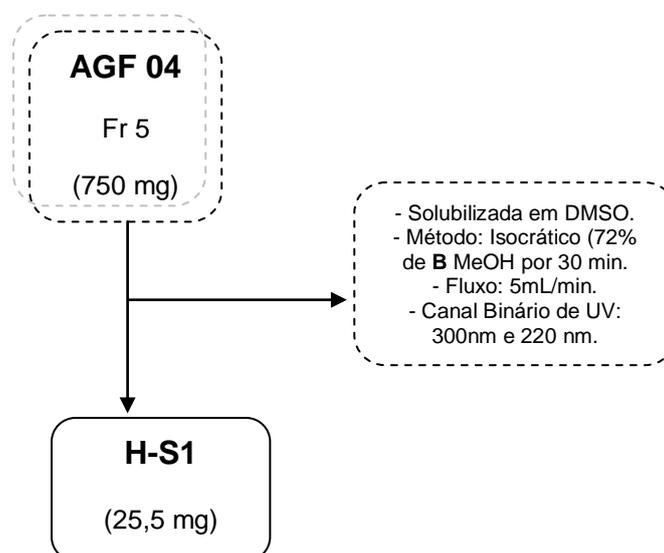
4.3.3.1 Condições para isolamento por CLAE- semipreparativo em modo reverso da fração AGF 04

Inicialmente foi realizado o “*clean up*” da amostra por extração em fase sólida (EFS) em um cartucho de sílica de fase reversa C18, sendo utilizado apenas MeOH 100% como fase móvel. Em seguida foi realizado o estudo de otimização do método de separação em cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica. Utilizou-se um sistema de CLAE, modelo Acella® (Thermo Scientific), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access (Thermo Scientific), fonte de ionização APCI monitorando-se no intervalo de m/z 100-1000 Da.

Foi utilizada uma coluna analítica Luna C18 (5 μ m, 150 x 460 mm) Phenomenex com fluxo de 1mL/min. A concentração da amostra (**AGF 04**) foi de 1,0 mg/mL solubilizada em metanol grau HPLC sendo realizada uma análise exploratória para verificar a complexidade da amostra no modo reverso de eluição, a fase móvel constituiu de solventes binários: água (**Solvente A**: acidificado com ácido fórmico a 0,005%) e MeOH (**Solvente B**) no modo gradiente na proporção 20%-100% de **B** durante de 30 min. O detector DAD foi ajustado para o monitoramento entre 200-600nm.

Após a otimização do método e os devidos cálculos de escalonamento, foi possível utilizar o método isocrático em 72 % de **B** por cerca de 30 min sendo necessário mais 10 min de limpeza da coluna com MeOH em escala semipreparativa em um cromatógrafo modelo Shimadzu® (CBM-20A), equipado com detector de UV (SPD-20A), desgaseificador (DGU-20A), sistema binário de solventes (LC-6AD) e *looping* de 500 µL. A análise foi monitorada com detector UV nos comprimentos de onda de 300 e 220 nm, utilizando uma coluna Luna C18 (5µm, 250 x 150 mm) Phenomenex com fluxo de 5 mL/min.

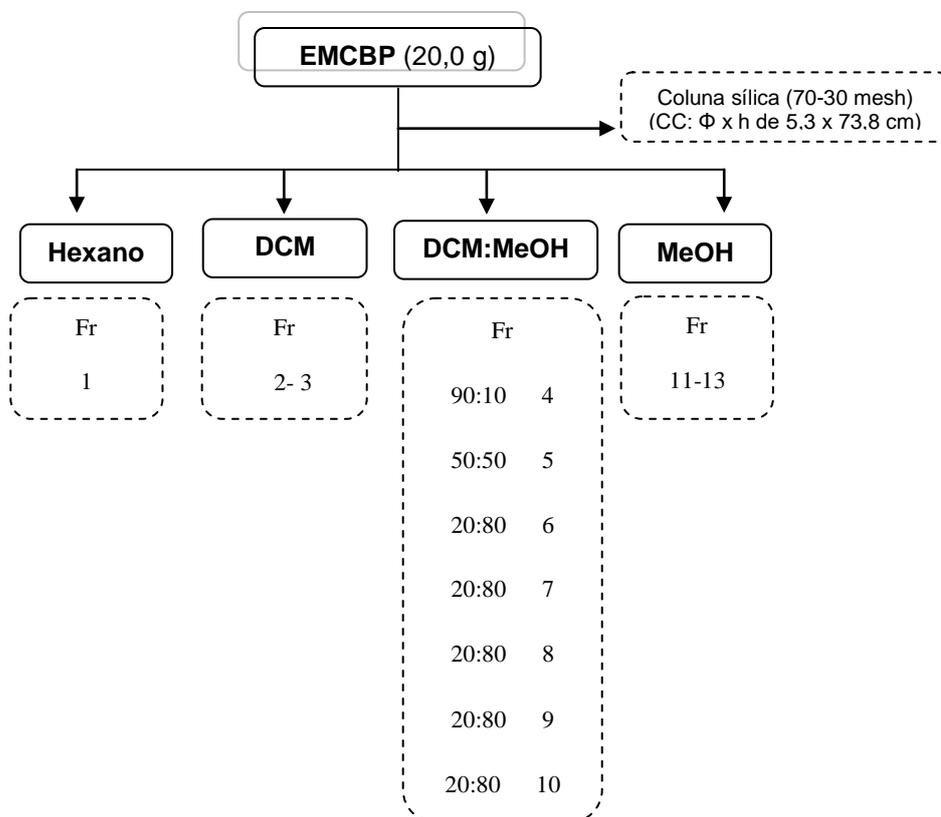
As frações coletadas foram analisadas por espectrometria de massas e CCD, sendo as mais promissoras encaminhadas para a análises de RMN 1D e se necessárias análises de RMN 2D. Ao final do procedimento foi possível obter a substância pura codificada como **H-S1**, fluxograma **8**.



Fluxograma 8. Isolamento da substância presente na fração AGF04.

4.3.4. Fracionamento cromatográfico do Extrato Metanólico

O extrato metanólico (**EMCBP**) foi submetido a um fracionamento em coluna cromatográfica aberta, empacotada com gel de sílica 70-230 mesh. Utilizou-se como eluentes inicialmente hexano e diclorometano ambos 100%, e em seguida, misturas de DCM:MeOH em gradiente crescente de polaridade até chegar em MeOH 100%. Obteve-se 13 frações, após a evaporação do solvente, todas as frações desta coluna foram submetidas à análise de CCDC e com base nos dados de CCD algumas frações foram reunidas e submetidas a outros fracionamentos cromatográficos como pode ser visto abaixo (Fluxograma 9).



Fluxograma 9. Fracionamento cromatográfico do EMCBP.

Tabela 7. Agrupamento entre grupos de frações do extrato metanólico da casca e respectivas massas.

Grupo de Frações	Frações	Massa (g)
MGF 01	1	0.001
MGF 02	2-4	0.002
MGF 03	5	2,19
MGF 04	6-9	11.05
MGF 05	10-13	5,82

4.3.4.1- Estudo por CG-EM do grupo de frações MGF01 e MGF02

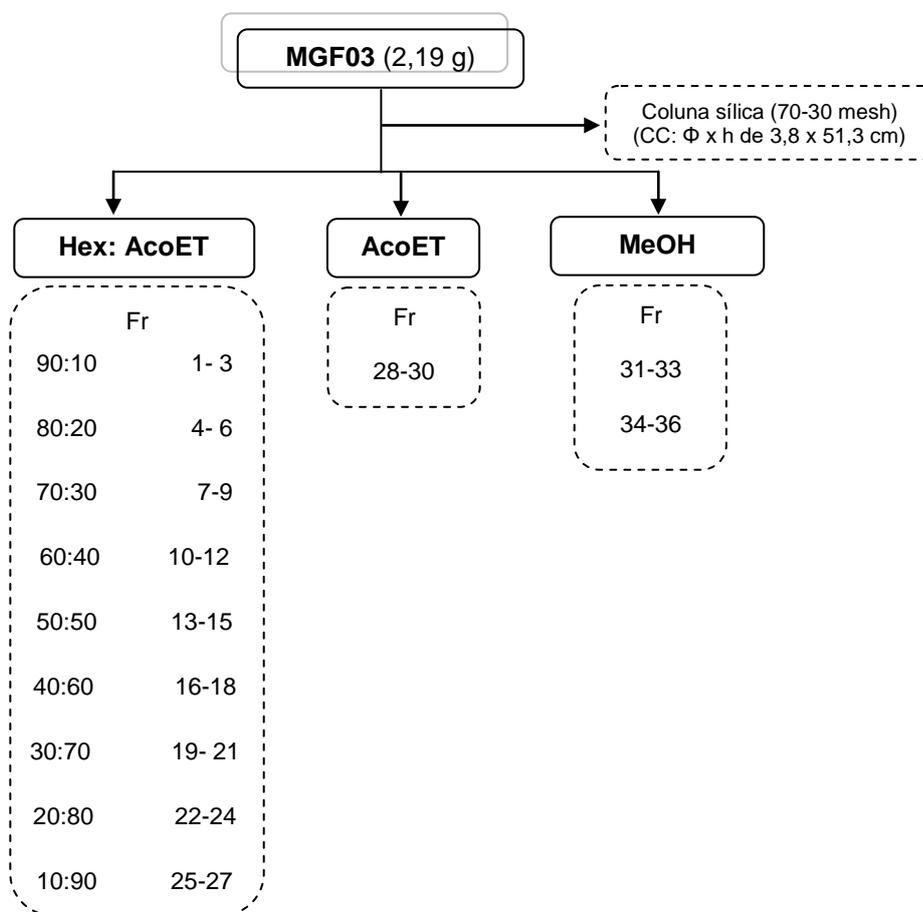
Os grupos de frações **MGF01** e **MGF02**, após análise de CCD com vanilina sulfúrica revelaram a presença de terpenos em sua composição. Portanto, as mesmas foram submetidas a análises cromatográficas por CG-EM para a caracterização dos mesmos.

As análises foram realizadas no aparelho GC-EM (PQ5050A), da marca Thermo Scientific do Laboratório de Cromatografia Gasosa- LABCG da Central Analítica/UFAM, utilizando coluna capilar de sílica fundida DB-5 (5% de difenil e 95% dimetilsiloxano), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 μm e hélio como gás de arraste. As condições cromatográficas foram: a temperatura do injetor foi de 290°C, iniciando com 60 °C por 10 minutos, aumentando de 60°C a 300°C na razão de 10°C/min. A temperatura final permaneceu em 300 °C, por 40 minutos. A temperatura do detector e da 74 interface do sistema CG-EM foi de 290 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons de 70 eV e varredura de massas de 50 a 500 m/z. As amostras foram solubilizadas em DCM tendo como concentração final 1 mg/mL e o volume de injeção foi no modo *splitless*. A identificação dos compostos foi feita por comparação

dos espectros de massas do banco de dados do aparelho NIST 2.0, Wiley e com dados obtidos da literatura.

4.3.4.2- Estudo Cromatográfico do Grupo de Frações MGF03

A fração **MGF03** (2,19 g) foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico em coluna de sílica (70-230 mesh). Utilizou-se os solventes hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade. Obtendo-se 36 frações (Fluxograma **10**), após a análise por CCDC, algumas frações foram reunidas (Tabela **8**).

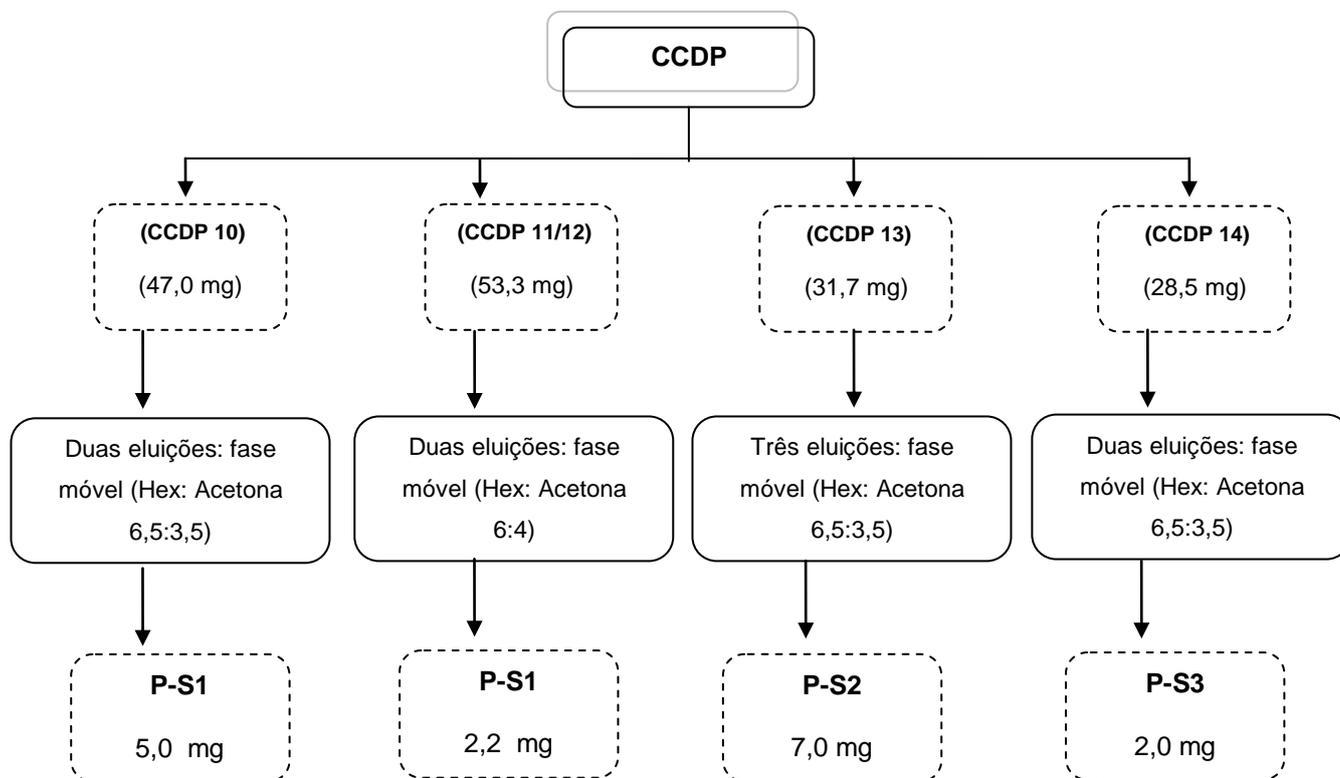


Fluxograma 10. Fracionamento cromatográfico do **MGF03**.

Tabela 8. Relação entre grupos de frações do **MGF03** e análises posteriores realizadas.

Fração	Grupo de Frações		Códigos Utilizados	Massa (mg)	Análise Realizada
	Frações	Frações			
MGF 03	MGF 03-1	1-3	-	5,0	-
	MGF 03-2	4-6	-	52	-
	MGF 03-3	7-8	-	48,9	-
	MGF 03-4	9	-	22,8	-
	MGF 03-5	10	(CCDP 10)	47,0	CCDP
	MGF 03-6	11-12	(CCDP 11/12)	53,3	CCDP
	MGF 03-7	13	(CCDP 13)	31,7	CCDP
	MGF 03-8	14	(CCDP 14)	28,5	CCDP
	MGF 03-9	15-17	(CCDP 15/17)	30,0	-
	MGF 03-10	18-19	M5-CC1-05-A	49,5	CLAE-DAD-EM
	MGF 03-11	20-21	M5-CC1-05-B	56,2	CLAE-DAD-EM
	MGF 03-12	22-24	M5-CC1-05-C	50,1	CLAE-DAD-EM
	MGF 03-13	25-29	M5-CC1-05-D	71,8	CLAE-DAD-EM
	MGF 03-14	30-33	M5-CC1-05-E	79,5	CLAE-DAD-EM
	MGF 03-15	34	M5-CC1-05-F	510,0	CLAE-DAD-EM
	MGF 03-16	35	M5-CC1-05-G	172,7	CLAE-DAD-EM
	MGF 03-17	36	M5-CC1-05-H	81,1	CLAE-DAD-EM

As frações codificadas como: **(CCDP 10)**, **(CCDP 11/12)**, **(CCDP 13)** e **(CCDP 14)** foram submetidas à análise de CCDP dando origem a novas substâncias, conforme exemplificado no fluxograma 11, abaixo:



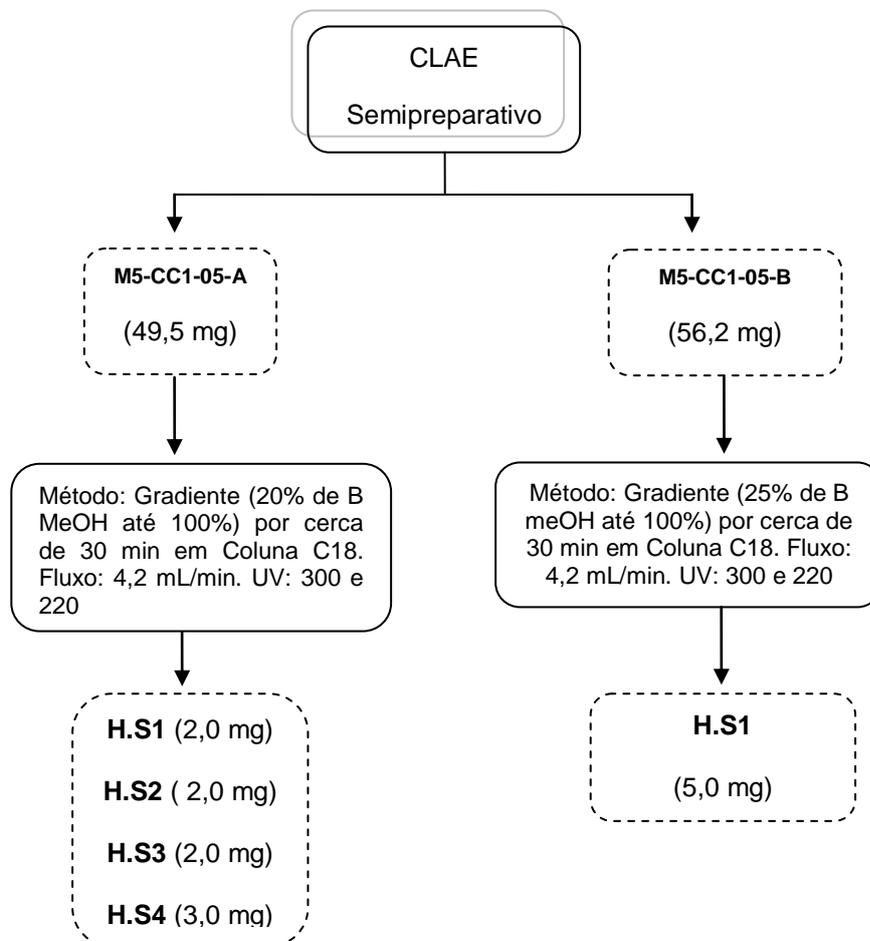
Fluxograma 11. Isolamento das substâncias presentes na fração MGF03 por CCDP

As substâncias obtidas foram então submetidas à análise por espectrometria de massas e análise por espectroscopia de RMN 1D e 2D.

4.3.4.3- Condições para isolamento por CLAE em modo reverso.

Com base nas análises de CCD das frações provenientes do **MGF 03**, as amostras codificadas como: **(M5-CC1-05-A, M5-CC1-05-B, M5-CC1-05-C, M5-CC1-05-D, M5-CC1-05-E, M5-CC1-05-F, M5-CC1-05-G e M5-CC1-05-H)** foram selecionadas para serem analisadas por CLAE-DAD-EM. Sendo então realizadas

inicialmente o desenvolvimento e otimização do método de separação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica sendo posteriormente encaminhadas as mais promissoras para análises em CLAE semipreparativo, como exemplifica o fluxograma 12.



Fluxograma 12. Isolamento de substâncias presentes na fração **MGF03** por CLAE.

Todas as substâncias obtidas foram submetidas à análise por espectrometria de massas e análise por espectroscopia de RMN 1D e 2D.

4.4. Elucidação estrutural das substâncias isoladas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EM Q-TOF)

Os espectros de RMN 1D e 2D foram obtidos no equipamento modelo Bruker modelo Advance 500 (500 MHz) do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear NMRLAB da Central Analítica/UFAM. As substâncias foram solubilizadas em

clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado (MeOD), a referência interna utilizada foi o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz). Os dados espectrais obtidos foram devidamente calibrados e processados nos softwares de processamento TopSpin auxiliados também pelo programa ACDLAB 12.0, onde todos os dados obtidos foram comparados com os da literatura para auxiliar na elucidação estrutural.

As análises de espectrometria de alta resolução foram realizadas, na central analítica no laboratório temático de química de produtos naturais (CA-LTQPN) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no equipamento da (Brucker Daltonics, modelo Micro TOF-QII) através de fonte APCI, para determinar a massa molecular exata das substâncias.

4.5. Estudo da atividade biológica

4.5.1 Ensaio citotóxico em linhagens de células tumorais *in vitro*

Os ensaios antitumorais foram realizados em parceria com o prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa com a colaboração do Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra da FIOCRUZ/Bahia. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 10 mg/mL para extratos e frações. As amostras foram testadas no intervalo de concentração entre 0,38-50 $\mu\text{g/mL}$. No que se refere ao preparo das células tumorais (ATCC) foram utilizadas:

- MCF7 (adenocarcinoma de mama humano);
- HCT116 (carcinoma de cólon humano);
- HepG2 (carcinoma hepatocelular humano);
- HL-60 (leucemia promielocítica humana);
- MRC5 (fibroblastos de pulmão humano);

As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm^3 , volume de 250 mL), com o meio RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO_2 a 37 °C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização

de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células se despregassem das paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para microplasma, conforme avaliado pela colocação com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

Para avaliar a citotoxicidade dos extratos e/ou frações pelo ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com as amostras teste. O alamar blue, identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como com os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável) como pode ser visto abaixo:

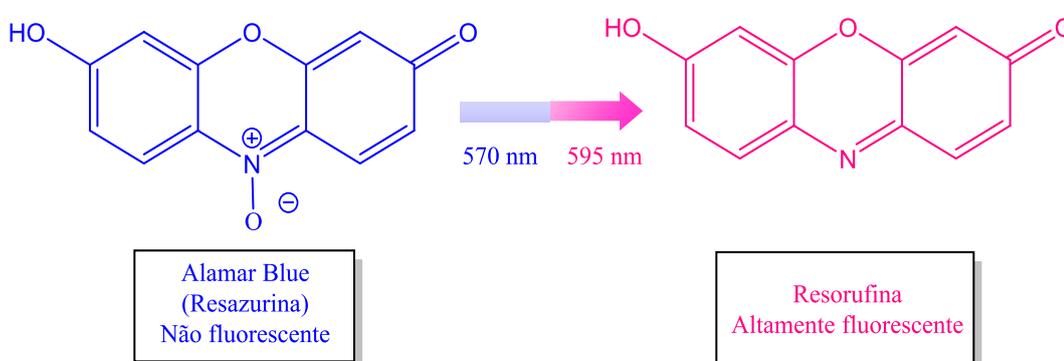


Figura 22. Reação redox do ensaio alamar blue com mudança da cor do meio na presença de células viáveis ou não.

A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al.*, 1994) onde atualmente apresenta várias aplicações. Inicialmente, as células foram adicionadas nas cavidades da placa de Elisa de 96 poços (100 μ L/poço de uma solução de $0,3 \times 10^6$ células/mL para células em suspensão e $0,7 \times 10^5$ células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, as amostras testes dissolvidas em DMSO foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 horas. O controle positivo utilizado foi a doxorubicina, já o

controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas (vinte e quatro horas para o PBMC) antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (AHMED *et al.*, 1994).

A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração sendo determinado os valores de IC₅₀ a partir da regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

4.5.2 Determinação *in vitro* da atividade antioxidante

4.5.2.1 Capacidade de sequestro do radical livre DPPH

A determinação da capacidade de sequestro de radicais livres foi feita utilizando o método descrito por CHOI, *et al* (2002) e RUFINO *et al* (2007) com modificações, que utiliza o radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-picril-hidraxina). Esse radical apresenta coloração roxa quando em solução e é caracterizado por ser estável devido ao deslocamento de um elétron não compartilhado sobre toda a molécula. A caracterização da atividade antioxidante frente a este método é observada pela captura dos radicais livres de DPPH na presença do composto antioxidante, o que é evidenciado pela mudança da coloração do meio (Figura 23).

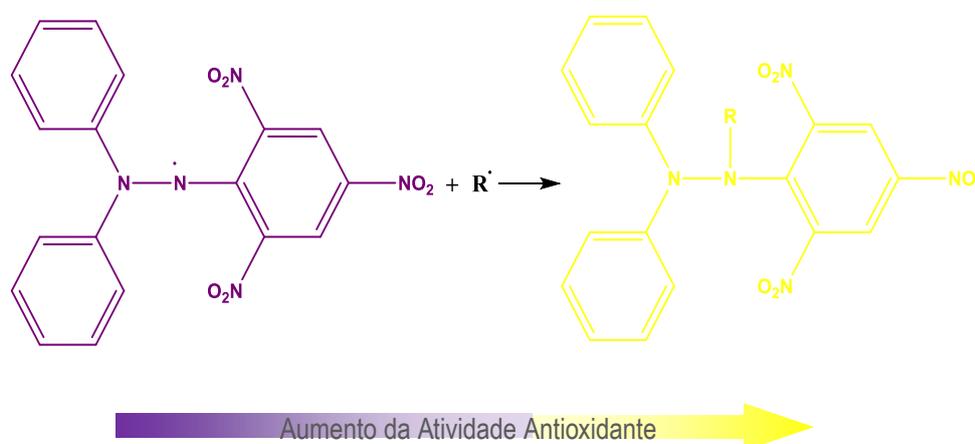


Figura 23. Reação de captura do radical livre e mecanismo do DPPH na presença de um composto antioxidante.

Os resultados são expressos comumente como a concentração de substrato que causa 50 % de perda da atividade do radical DPPH, (% CS₅₀, em µg/mL). Foi realizado um ensaio preliminar para determinar a faixa de concentração (0,1 e 0,01 mg/mL) de cada amostra a fim de se obter o valor real de %CS₅₀. Com os valores da absorbância estimou-se a faixa de trabalho, que consistiu em uma série de diluições (seis diluições) para cada extrato, fração e/ou substância, em placa de Elisa de 96 poços, utilizando-se a quercetina como controle positivo. A absorbância foi medida em um leitor de multiplaca da BioTek, modelo Elx800, em 515 nm.

4.5.2.2 Capacidade de sequestro do radical ABTS

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre ABTS também é um método colorimétrico, baseia-se na capacidade de substâncias antioxidantes em capturar o radical livre ABTS. A avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS é feito por meio de um método espectrofotométrico no comprimento de onda de 734 nm (RE, et al., 1999) caracterizada pela descoloração da solução azul esverdeada, diminuindo os valores de absorção por meio do tempo de reação (RUFINO et al., 2007).

A reação de estabilização do radical ABTS pode ser observada na Figura 24.

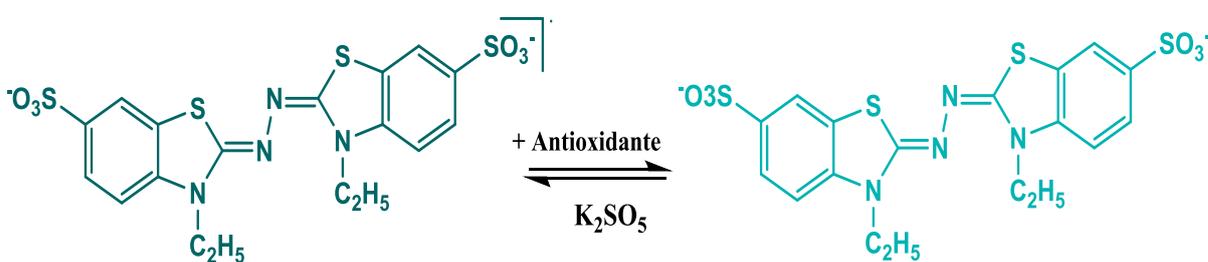


Figura 24. Reação de captura do radical livre ABTS na presença de um antioxidante.

Os resultados são apresentados em µM da capacidade antioxidante por equivalente ao Trolox (TEAC), visto que o Trolox foi utilizado como controle positivo no ensaio (RUFINO et al., 2007).

4.5.3 Atividade Inibidora da enzima Acetilcolinesterase (AChE) *in vitro*

Os inibidores de AChE são utilizados para tratar pacientes com a doença de Alzheimer. Pacientes com essa doença apresentam uma diminuição nos níveis de acetilcolina no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical, ou seja, disfunções cognitivas, funcionais e comportamentais associadas com a doença de Alzheimer. O principal papel das substâncias que atuam como inibidores da enzima AChE é promover o aumento da concentração da acetilcolina, que são alvos para o tratamento da doença de Alzheimer (ADERSEN, 2006; HEINRICH, 2004).

A atividade inibidora da acetilcolinesterase foi avaliada quantitativamente usando um leitor de Elisa da BioTek, modelo Elx800, tendo como base o método de ELLMAN (1961). Inicialmente foram adicionados nas cavidades da placa de Elisa a amostra em seis diferentes concentrações juntamente com tampão fosfato 0,2 M e DTNB em seguida foram misturados com a enzima AChE.

A mistura foi incubada por 15 min a 25°C. Foi adicionado iodeto de acetilcolina (ACHI) em todos os poços e em seguida, a microplaca foi levada ao espectrofotômetro em 405 nm e então mensurada cineticamente durante 30 minutos.

Ressalta-se que todas as amostras foram analisadas em triplicada. O ensaio teve como controle negativo o tampão fosfato. O padrão utilizado como controle positivo foi a neostigmina [100 µg/mL]. Foi utilizado o software Excel para determinação da % de inibição da enzima acetilcolinesterase e o software GraphPad Prism 7.0 para determinação do CI_{50} somente para as amostras com % de inibição superiores a 50%.

A curva de inibição foi obtida construindo-se um gráfico com a % de inibição versus o logaritmo da concentração do inibidor (extrato, substância isolada ou controle positivo), os parâmetros de regressão não-linear foram determinados para a curva e os valores de IC_{50} foram obtidos utilizando-se o GraphPad Prism 7.0.

A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada com o auxílio da equação:

$$\% \text{ Inibição} = [(C-A) \times 100] / C$$

Onde **C** representa a absorbância do controle da enzima, subtraída do branco do substrato e **A** corresponde a absorbância da amostra subtraída do branco. Os resultados são então expressos como o percentual de atividade enzimática remanescente (ELLMAN, 1961).

4.5.4 Determinação da atividade anti-inflamatória pelo ensaio *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método do ensaio da FOX

A cascata do ácido araquidônico (CAA) é responsável pela bioformação dos eicosanoides, como por exemplo as prostaglandinas (PG's) que são importantes mediadores celulares que regulam diversas funções do funcionamento do organismo. Estas estão envolvidas em diversos processos fisiopatológicos incluindo os processos de inflamação.

As lipoxigenases (LOX) são enzimas responsáveis pela produção de hidrácidos e leucotrienos a partir da CAA. A inibição seletiva das enzimas lipoxigenases (LOX), ciclooxigenases (COX) da CAA reduz a produção de prostaglandinas e leucotrienos que representam um atraente alvo terapêutico para o tratamento de doenças como o caso da inflamação. A enzima 5-LOX é responsável pela catálise da oxidação dos ácidos graxos que contenham o dieno 1-4 e a modificação do ácido linoleico (dieno 1-4 para dieno 1-3) o qual pode ser detectado em 234nm (PINTO et al., 2007).

Um método de determinação da atividade da enzima 5-LOX é através do ensaio colorimétrico baseado na hidroperoxidação lipídica denominado de FOX (Ferrous oxidations in xylenol orange). Este ensaio é baseado na oxidação do íon Fe^{2+} a Fe^{3+} pelo hidroperóxido em meio ácido. Na presença deste forma-se um complexo químico entre o íon ferro e a substância laranja de xilenol, resultando em

uma cor azul púrpura que é identificado no espectrofotômetro na região entre 500 a 600 nm (PINTO et al., 2007).

Para a avaliação do ensaio da inibição da enzima 5-LOX pelo método adaptado da FOX (FERNANDES, 2012 e PINTO et al., 2007). Foram utilizados os seguintes reagentes: água Mili-Q, metanol, etanol, Tween®20, Cloreto de cálcio (CaCl_2), adenosina trifosfato (ATP), ácido linoleico, ácido sulfúrico, sulfato de ferro e Tris-HCl. Foram também utilizados o laranja xilenol e a fosfatidilcolina da Sigma-Aldrich, enzima 5-LOX humana e o ácido nordihidroguaiarético (NDGA) ambos da Caymman Chemical.

Inicialmente foram preparadas as soluções das amostras na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ em etanol e Tween®20, assim como o controle negativo de inibição da enzima 5-LOX e o padrão NDGA [100 $\mu\text{g/mL}$]. Para a realização do ensaio foram adicionados na cubeta cerca de 10 μL de amostra, 20 μL de solução de enzima [1000 $\mu\text{g/mL}$] e 250 μL de tampão Tris-HCl (50mM, pH= 7,4) que continha CaCl_2 (0,4 mM), ATP(0,2 mM) e 24 $\mu\text{g/mL}$ de fosfatidicolina (PC) incubados por cerca de 4 min.

Após os 4 min, foram adicionados 10 μL de ácido linoleico, esperou-se novamente a incubação por cerca de mais 6 min. Ao término da reação adicionou-se 500 μL do reagente FOX “coloração laranja” composto por solução de ácido sulfúrico (25 mM), solução de laranja xilenol (100 μM), solução de sulfato de ferro II (100 μM) e metanol:água (9:1). Em seguida, foi realizada a leitura no espectrofotômetro de UV-Visível para monitoramento da formação do complexo e verificou-se que ocorreria em 500-600 nm. Posteriormente, através de várias leituras concluiu-se que o complexo estabilizava em 10 min. Desse modo, os ensaios foram realizados em modo cinético pelo tempo de estabilização. Foram realizadas também as leituras em modo de varredura no comprimento de 200-650 nm para monitorar a reação, pois tratava-se de um ensaio espectrofotométrico/ colorimétrico. Onde a cor amarela do laranja de xilenol acidificado é convertido em azul devido à hidroperoxidação lipídica que atua na oxidação dos íons de Fe^{2+} que é resultante no complexo Fe^{3+} / xilenol laranja com aumento da absorção em 500 a 600 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Rendimento dos Extratos

Os diferentes extratos da planta geraram os rendimentos apresentados em percentual conforme pode ser visualizado na tabela a seguir:

Tabela 9. Rendimento em percentual dos extratos obtidos

Amostras		Extratos	Massa (g)	Rendimento (%)
Casca	650 g	EHCBP	6,32	1,0
		EACBP	10,39	1,6
		EMCBP	25,03	3,85
Látex	430 g	EMLBP	6,82	1,58

A partir da avaliação da tabela de rendimentos, percebe-se que o extrato metanólico (EMCBP: 25,03 g) das cascas apresentou maior rendimento, seguido dos extratos de acetato de etila (EACBP: 10,39 g), metanólico do látex (EMLBP: 6,82 g) e hexânico (EHCBP: 6,32 g).

5.2 LÁTEX

5.2.1 Particionamento líquido-líquido

Durante o fracionamento por partição líquido-líquido do extrato **EMLBP**, encontrou-se problemas na solubilidade do mesmo, com surgimento de precipitação de um material polimérico que também está presente nessa matriz orgânica (Figura 25).

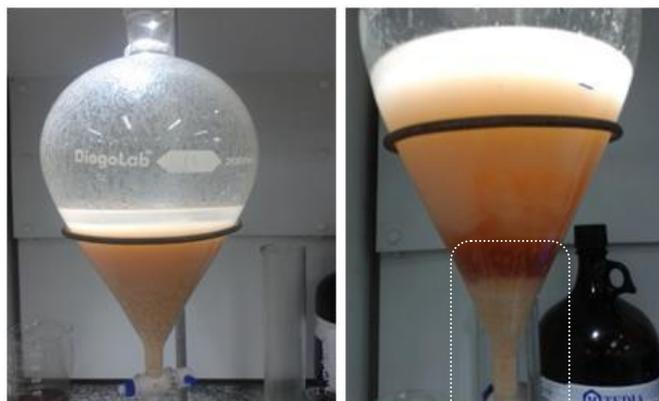


Figura 25. Fracionamento do extrato metanólico do látex por partição líquido-líquido e surgimento de precipitado polimérico.

Este material ocasionou grande dificuldade no manuseio da amostra tendo influência no rendimento das frações, como pode ser observado na Tabela 10.

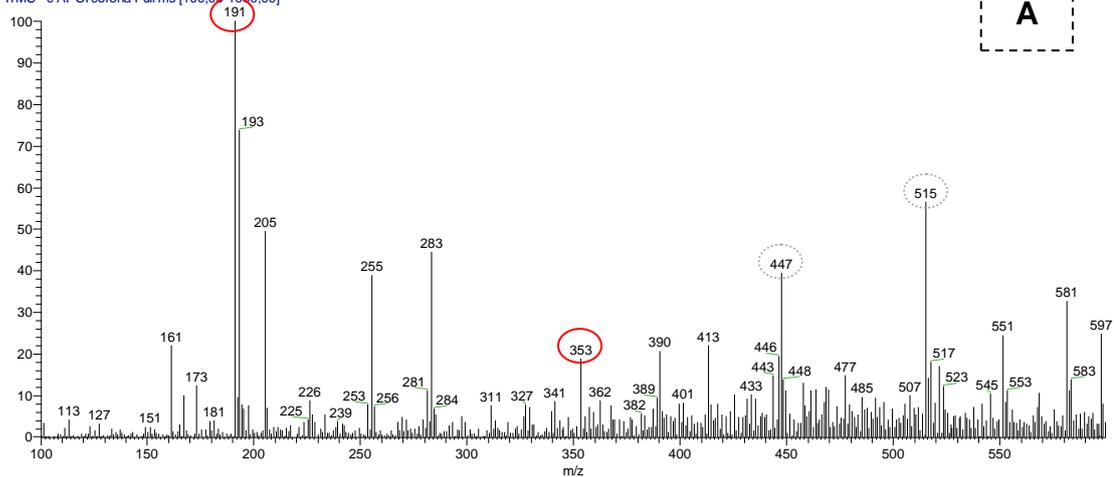
Tabela 10. Rendimento em percentual das frações da partição líquido-líquido

Amostra		Frações	Massa (mg)	Rendimento (%)
EMLBP	6,82 g	Fr.Hex	8,0	0,11
		Fr.Clor	22,8	0,32
		Fr.Acoet	32,2	0,47
		Fr.Hidro	72,0	1,05

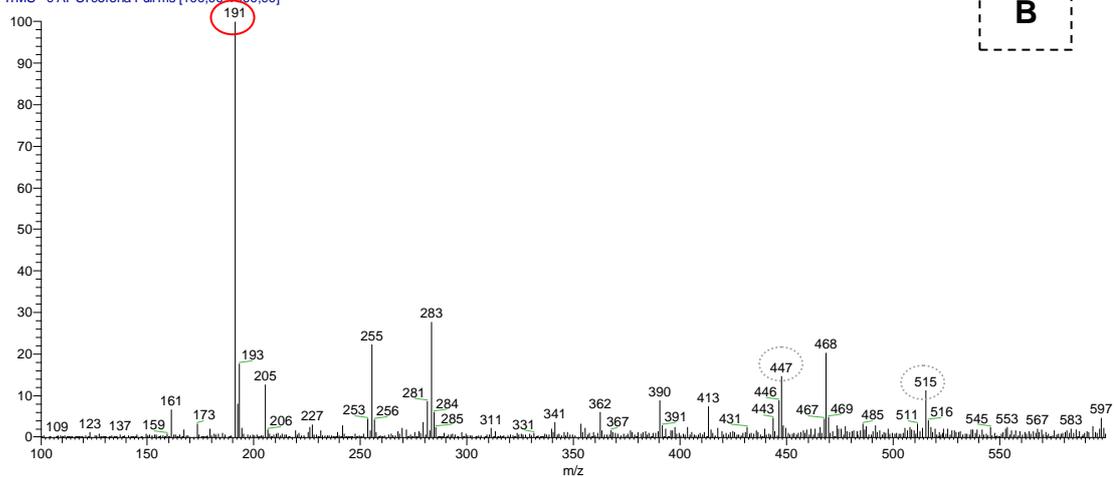
5.2.2 Caracterização dos constituintes orgânicos identificados nas frações da partição do látex do *B. parinarioides* por meio de espectrometria de massas com ionização por APCI-MS²

Os resultados sugerem que muitos dos componentes presentes nas frações são fenólicos, pois apresentaram melhores ionizações no modo negativo. Portanto, eles foram facilmente desprotonados no modo negativo, destacando-se os de m/z 191 $[M - H]^-$ e m/z 353 $[M - H]^-$ (Figura 26).

latex_1_5_negativo_apci #163-176 RT: 2,91-3,12 AV: 14 SB: 119 3.14-4.09 , 1,79-2,91 NL: 1,12E2
T: ITMS - c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]



latex_1_5_negativo_apci #234-244 RT: 4,15-4,32 AV: 11 SB: 124 4.39-5.61 , 3,21-4,15 NL: 2,32E2
T: ITMS - c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]



latex_1_5_negativo_apci #327-334 RT: 5,79-5,91 AV: 8 SB: 141 5.95-7.06 , 4,43-5,77 NL: 4,97E2
T: ITMS - c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]

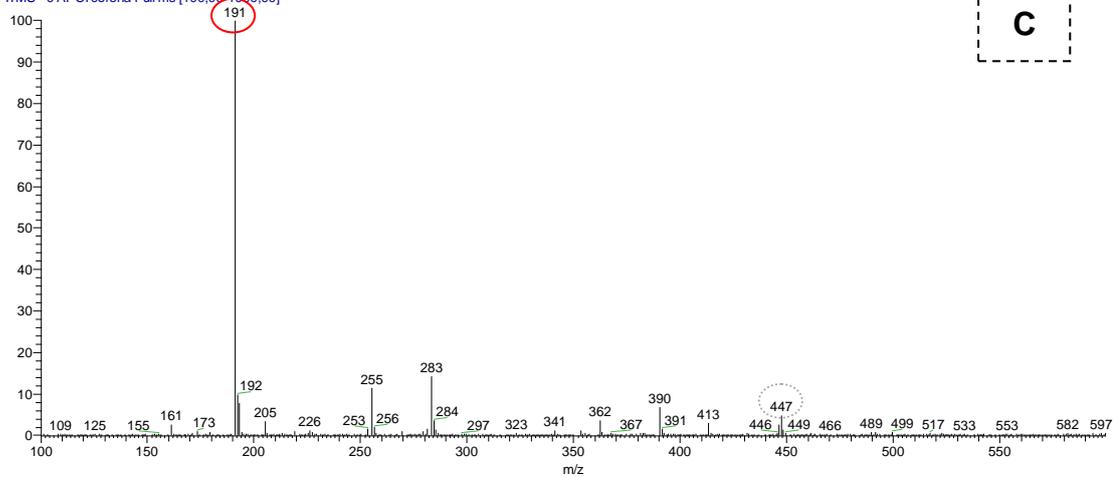


Figura 26. Espectro APCI-MS no modo negativo para as frações: Fr.AcoEt (A), Fr.Clor (B) e Fr.Hidro (C) do látex de *B. parinarioides*.

Estes íons em destaques foram submetidos ao processo de fragmentação (MS^2), sendo os íons m/z 191 $[M - H]^-$ e o m/z 323 $[M - H]^-$ conhecidos como padrões de fragmentação característicos a ácidos orgânicos, conforme pode ser visto abaixo:

latex_09_1_frag #193-234 RT: 4,25-4,78 AV: 34 NL: 1,24E1
F: ITMS - c ESI Full ms3 353,00@cid20,00 191,00@

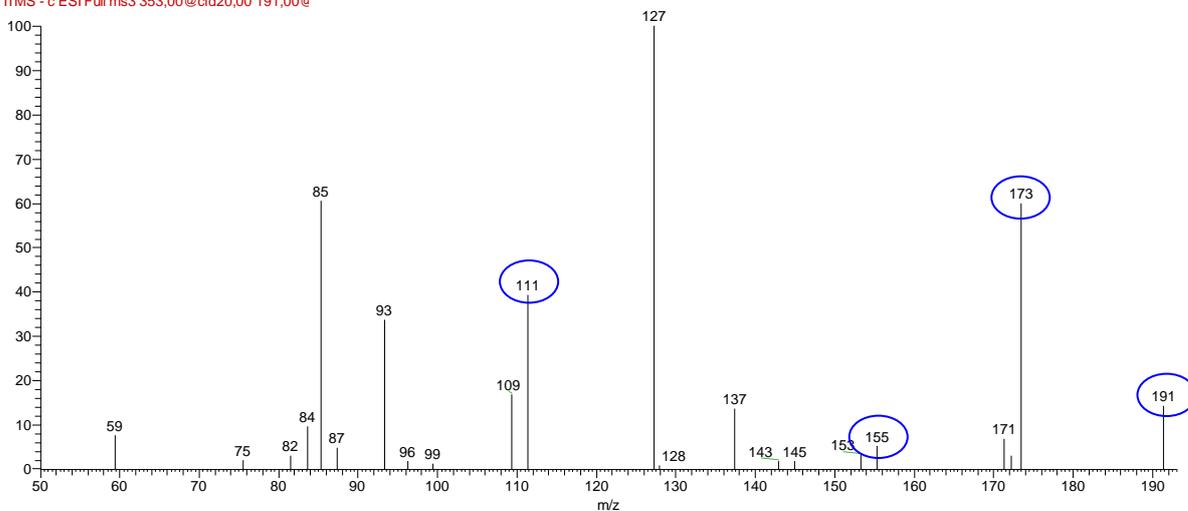
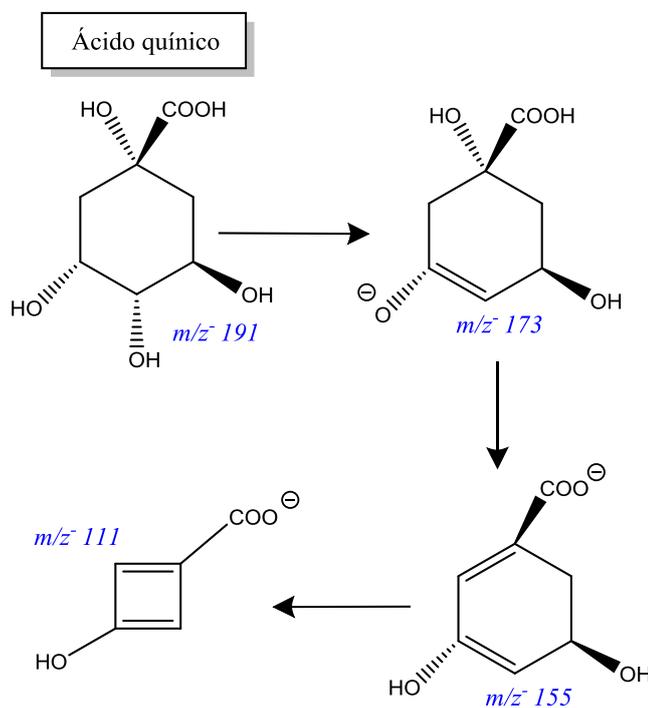


Figura 27. Espectro de Massas em MS^2 do íon de m/z 191 $[M-H]^-$

Nos espectros de MS^2 para o íon m/z 191 $[M-H]^-$, foram feitas as proposta de fragmentações para os íons como (m/z 191 \rightarrow m/z 173 \rightarrow m/z 155 \rightarrow m/z 111, respectivamente).



Nos espectros de MS² para o íons m/z 353 [M-H]⁻ (Figura, 28); foram feitas as propostas de fragmentações para os íons (m/z 353 → m/z 191 → m/z 179 → m/z 173 → m/z 135, respectivamente).

latex_09_1_frag #121-233 RT: 3,83-4,08 AV: 22 NL: 2,76E4
F: ITMS - c ESI Full ms2 353,00@cid20,00 [95,00-3

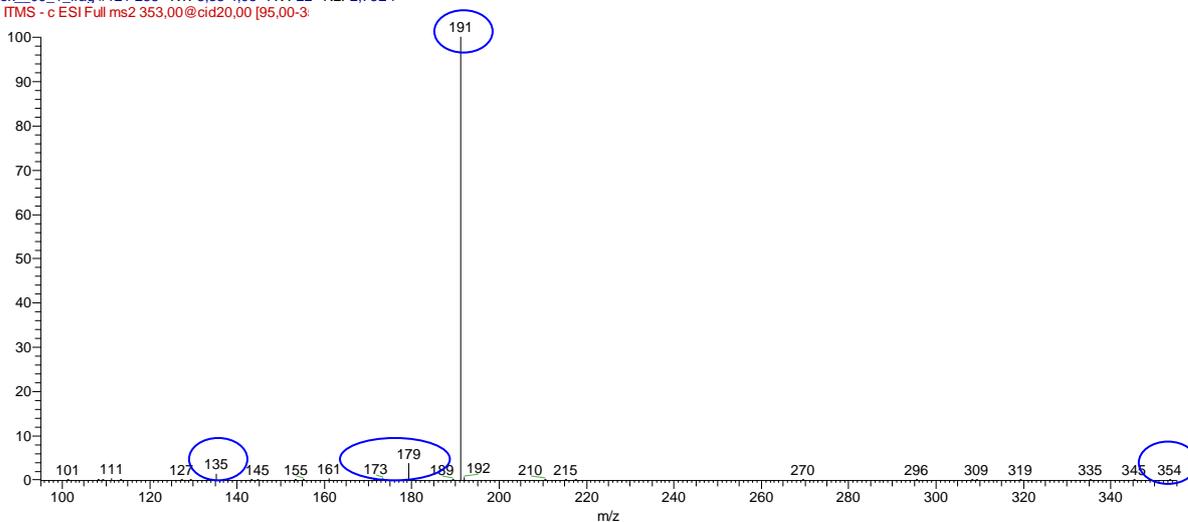
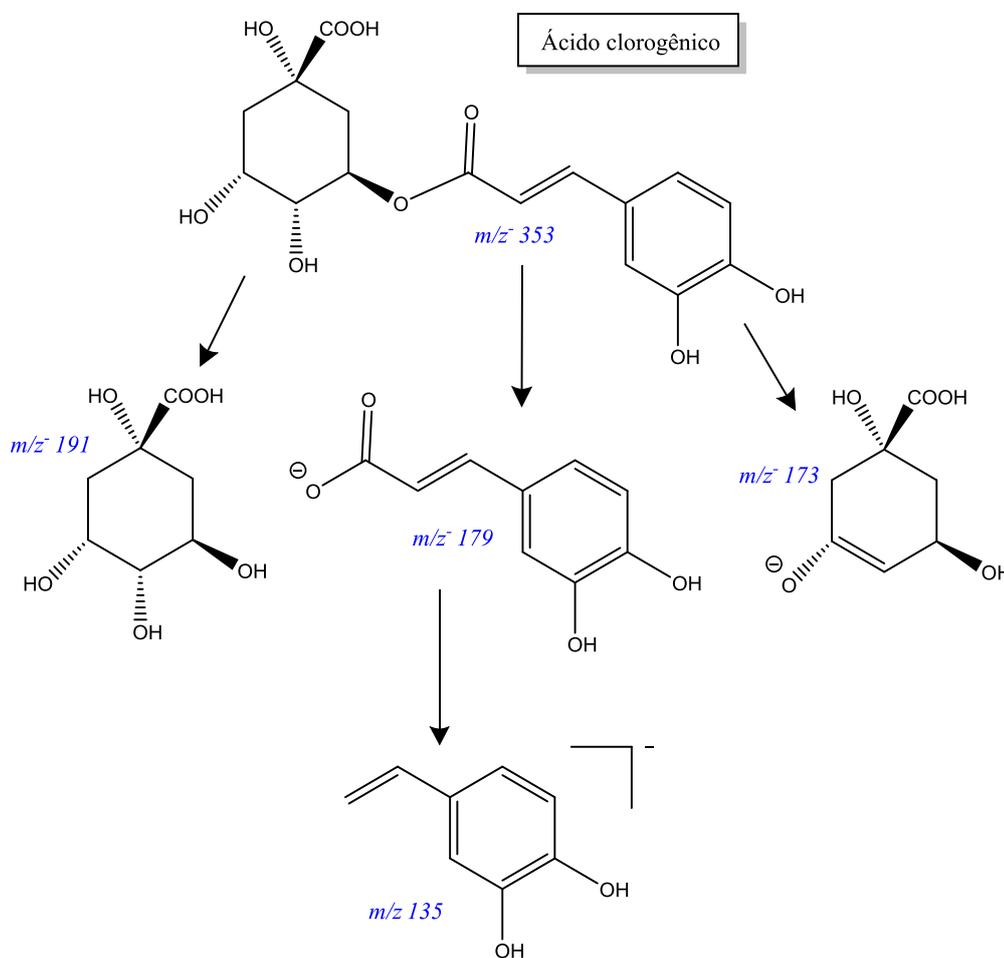


Figura 28. Espectro de Massas em MS² do íon de m/z 352 [M-H]⁻



Os espectros de massas sugerem, com base nas fragmentações e literatura, apenas duas substâncias conhecidas presentes. Foram identificados o ácido clorogênico m/z 353 $[M-H]^-$ e o ácido quínico m/z 191 $[M-H]^-$, contribuindo assim com o conhecimento da química do látex para essa espécie. Assim, a técnica de APCI-MS² com inserção direta da amostra mostrou-se uma ferramenta rápida e eficiente para a tentativa de identificação da composição química de frações de plantas quando se têm compostos de natureza conhecida.

5.3 CASCA

5.3.1 Caracterização de triterpenos por CG-EM em frações do extrato hexânico da casca

A realização do fracionamento em coluna cromatográfica do extrato hexânico das cascas de *B. parinarioides*, resultou em 08 grupos de frações finais, sendo que o estudo foi direcionado para às frações **GF06** e **GF07**. Dessa maneira, tanto a fração GF06 quanto a GF07 foram refracionadas por meio de CCDP, na qual foram obtidas quatro substâncias: **06.1**; **06.2**; **07.1** e **07.2**, que demonstraram características de terpenos frente a análises de CG-EM e ao revelador anisaldeído produzindo coloração azul em algumas zonas do cromatograma em CCD de fase normal (Hex:AcoET 9,5: 0,5) (Figura 29).

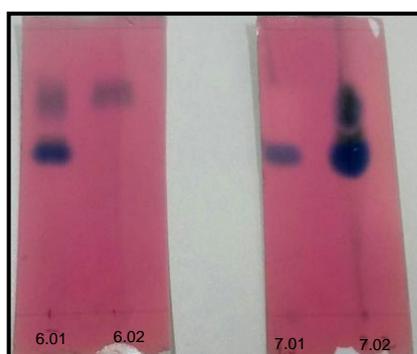


Figura 29. CCD obtida das substâncias: 06.1, 06.2, 07.1 e 07.2 reveladas com anisaldeído.

5.3.1.1 Substâncias 06.1

O cromatograma da Figura 30, evidenciou uma mistura de componentes, sendo dois componentes majoritários, cujo tempo de retenção foi de 47,715 minutos e área de 47,42% (pico 8) e o componente com tempo de retenção de 34,583 minutos e área de 27,21% (pico 6)

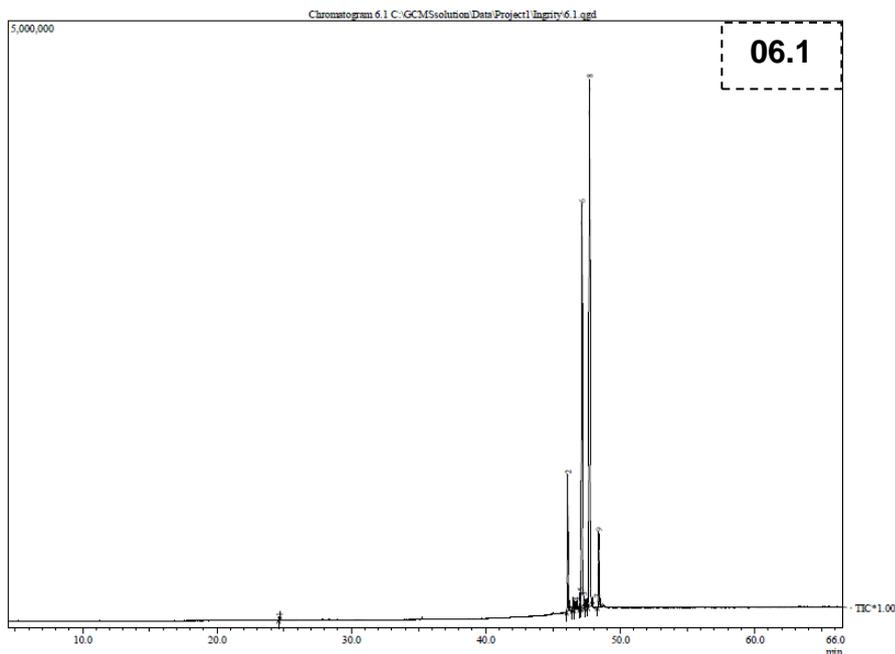
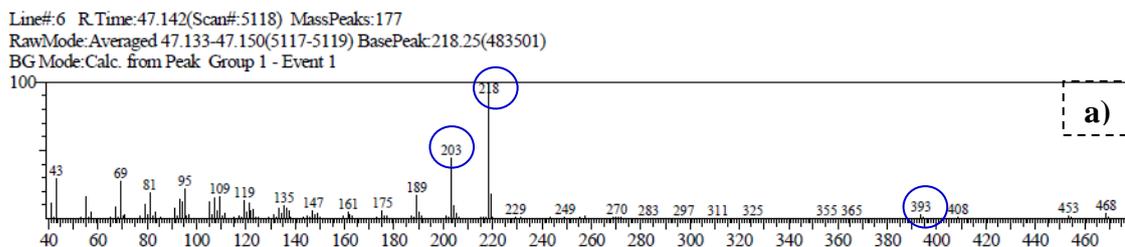


Figura 30. Cromatograma da substâncias 06.1

Assim, pela análise dos espectros de massas obtidos para EHCBP-06.1 e a consulta às bibliotecas de espectros disponíveis no equipamento (NIST, Wiley229.LIB), visualizou-se uma mistura de triterpenos, com picos majoritários de IS 84% para o pico 8 e IS 86 % para o pico 6 (Figura 31).



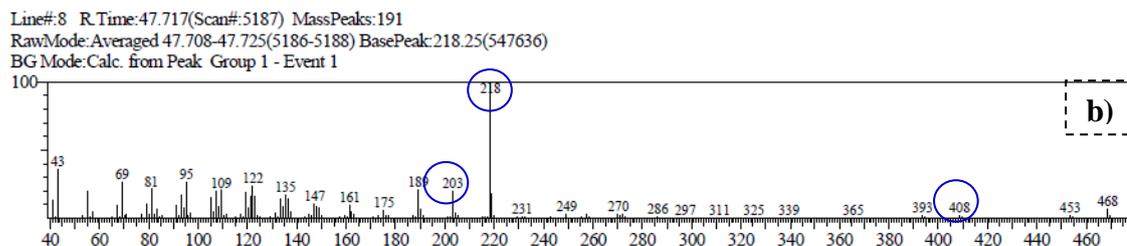


Figura 31. Espectro de massas das substâncias **06.1** a) MS do pico 8^a e b) MS do pico 6^a

Os espectros de massas para o picos 8 e 6 evidenciaram o mesmos padrões de fragmentações com picos mais abundantes em m/z 218 e m/z 203, que são compatíveis com fragmentações características dos triterpenos pentacíclicos com uma instauração na posição C-12. Para o pico 8, o composto apresentou o íon precursor m/z 410, equivalente à massa calculada para o triterpeno urs-12-eno (410,72 Da) e, para o pico 6, o composto apresentou o íon precursor m/z 396, equivalente à massa calculada para o triterpeno norolean-12-eno (396,69 Da). Tal fragmentação ocorre via uma reação Retro-Diels-Alder no *anel* C (Figura 32), padrão para as séries ursano e oleanano (MATHÉ & CULIOLI, 2004).

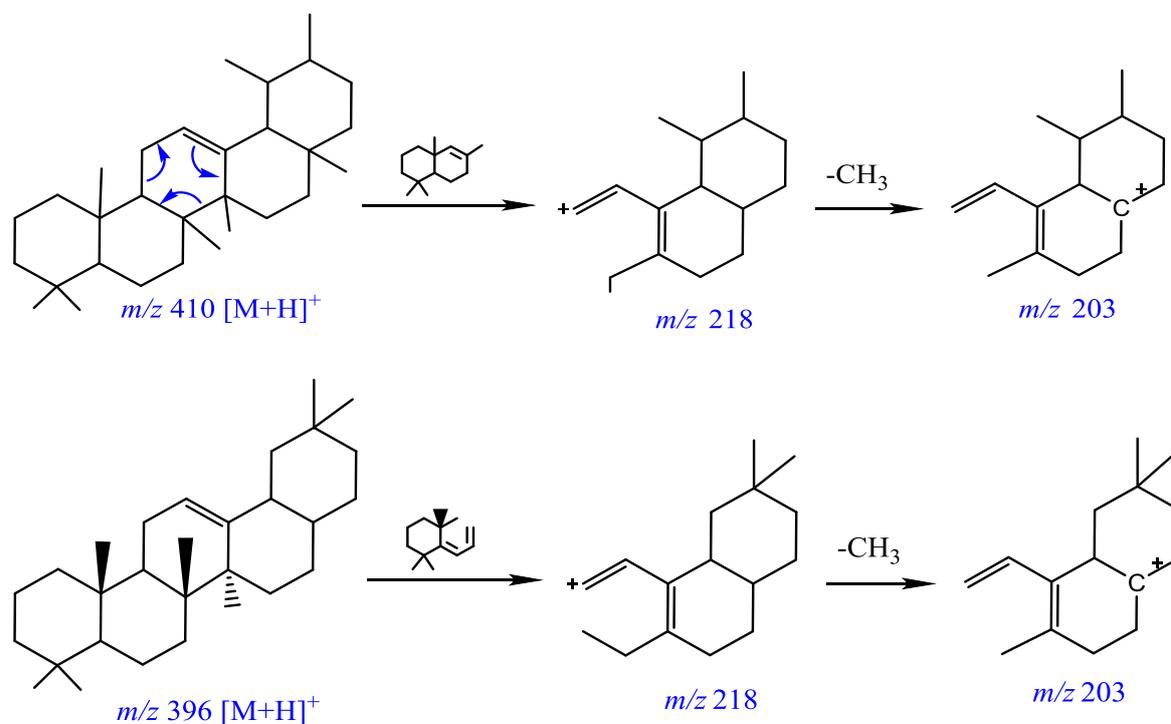


Figura 32. Fragmentações das substâncias do a) pico 8 e b) pico 6

5.3.1.2 Substâncias 06.2

A análise do perfil mostrou a presença de um (1) componente majoritário na mistura, com tempo de retenção de 47,721 minutos e área de 100% com IS 90% (Figura 33).

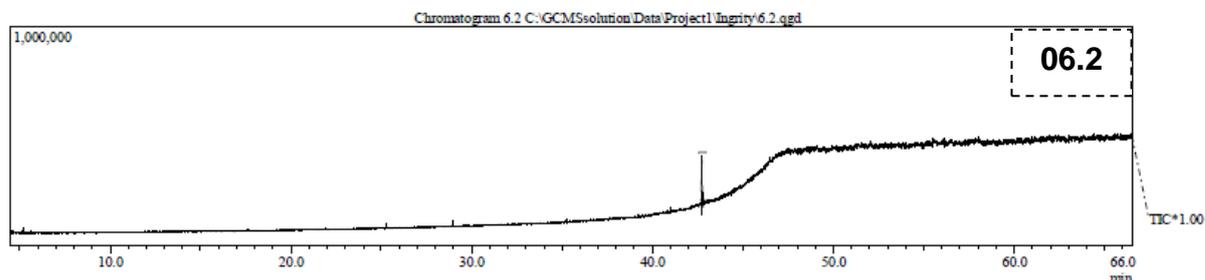


Figura 33. Cromatograma do composto 06.2

Por meio do espectro de massas do pico 1 foi possível visualizar um padrão de fragmentos com picos mais abundantes em m/z 396, m/z 381 e m/z 255 (Figura 34), que são compatíveis com fragmentações características do esteroide β -Sitosterol. A Figura 35, traz uma proposta de fragmentação substância 06.2.

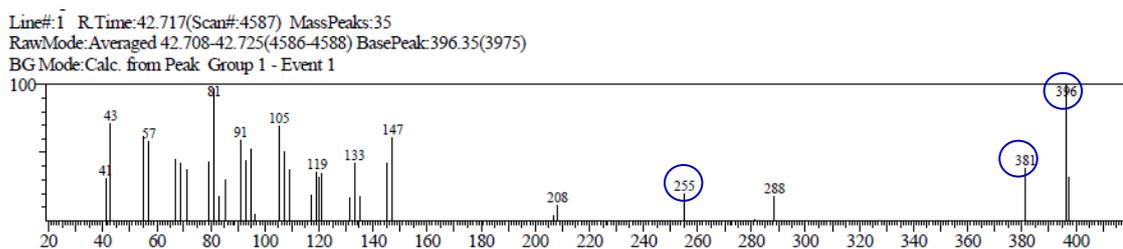


Figura 34. Espectro de massas da substância 06.2

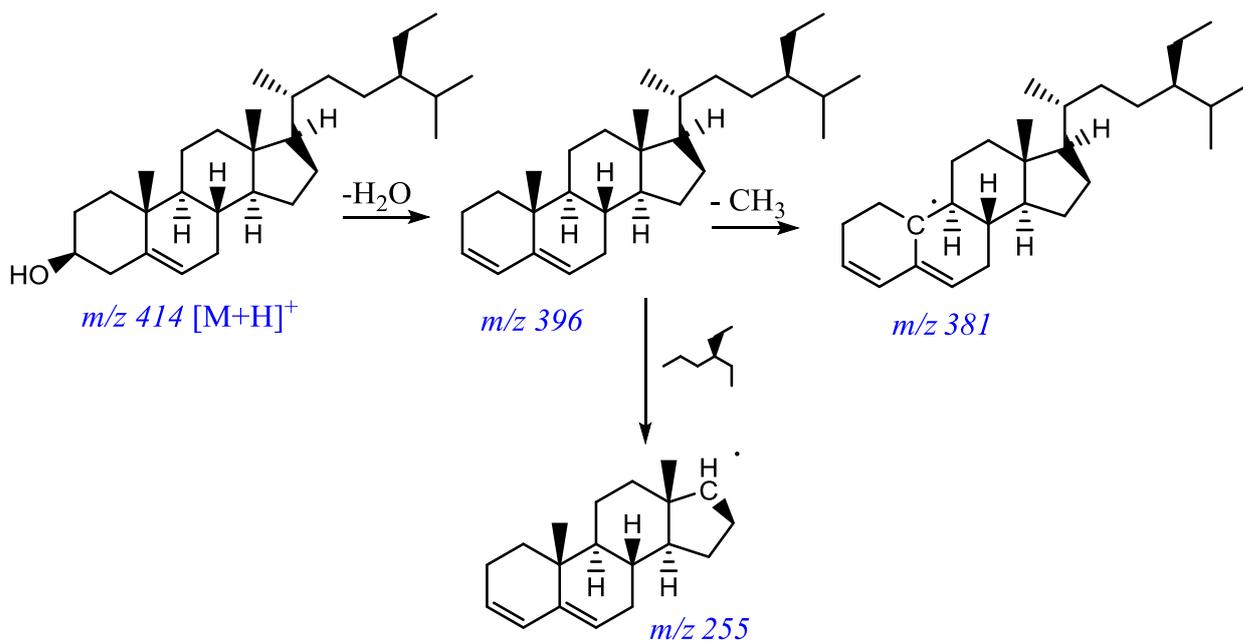


Figura 35. Proposta de Fragmentação do β -sitosterol.

5.3.1.3 Substâncias 07.1

A análise do cromatograma (Figura 36) mostrou a presença de dois componentes majoritários na mistura, o componente com tempo de retenção de 47,662 minutos e área de 48,85% (pico 2), e o componente com tempo de retenção de 47,073 minutos e área de 41,50% (pico 1). A Figura 37, apresenta os espectros de massas dos componentes da substância 07.1.

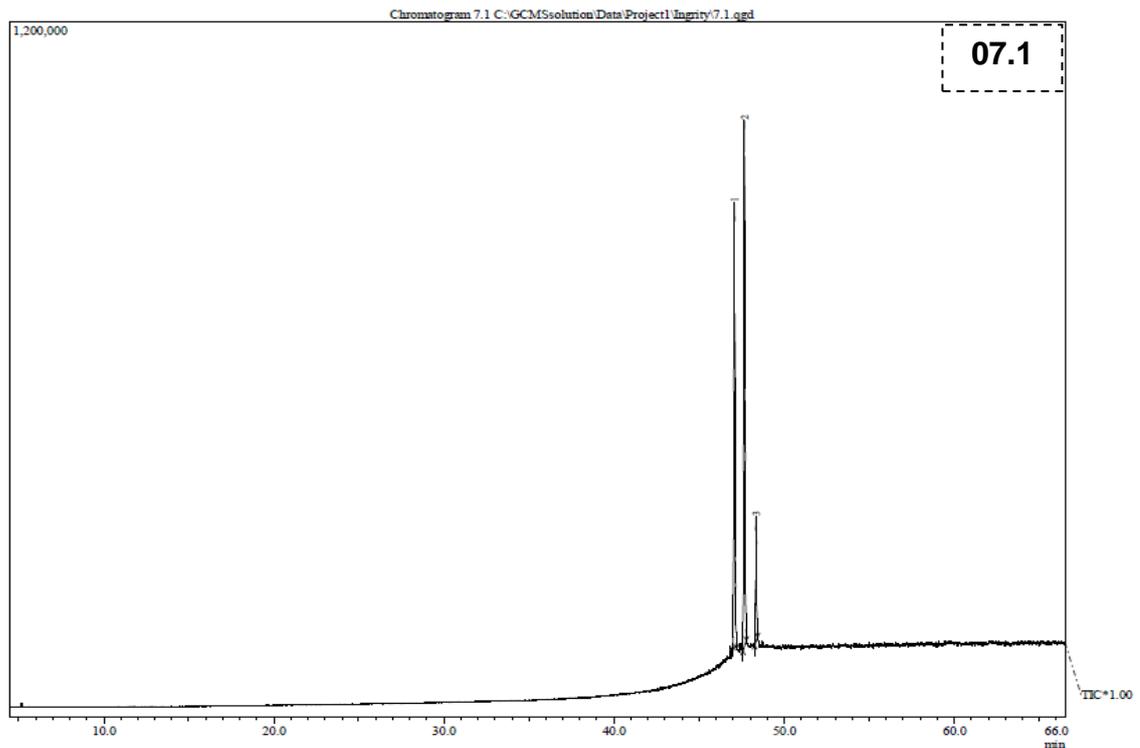
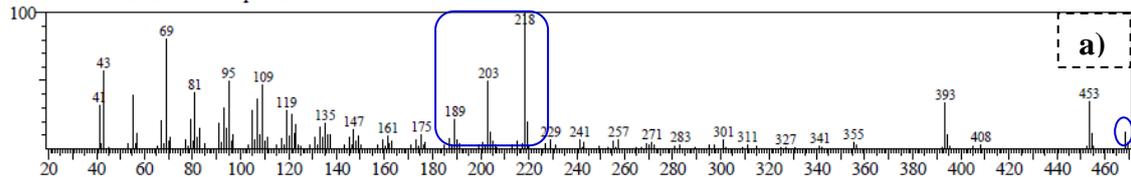


Figura 36. Cromatograma da substância 07.1

Line# 1 R.Time:47.075(Scan#:5110) MassPeaks:142
 RawMode:Averaged 47.067-47.083(5109-5111) BasePeak:218.15(55092)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Line# 2 R.Time:47.658(Scan#:5180) MassPeaks:146
 RawMode:Averaged 47.650-47.667(5179-5181) BasePeak:218.15(52501)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

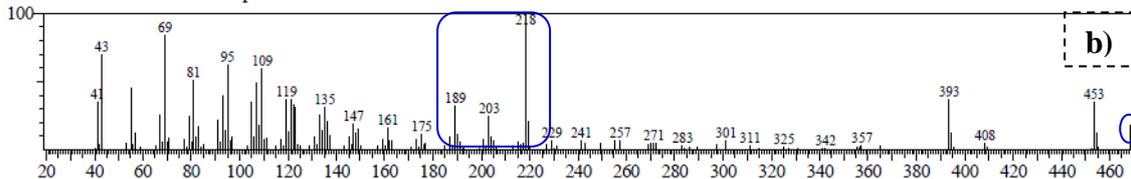


Figura 37. Espectro de massas da substância 07.1: a) MS do pico 1, b) MS do pico 2
 FINGOLO *et al.*, 2013

No espectro de massas referente ao pico 1 e 2 comparando-se os dados a literatura, pode-se observar sinais mais abundantes em m/z 468; m/z 218; m/z 203 e m/z 189 sinais compatíveis com os triterpenos pentacíclicos como os acetato de α , β -amirina. A diferenciação entre a α , β -amirina segundo os relatos da literatura pode ser observada pelas intensidades relativas dos picos m/z 189 e m/z 203, onde a β -amirina possui o pico m/z 203 mais intenso do que o m/z 189, enquanto que a α -amirina mostra ambos os sinais com intensidades semelhantes a fragmentação mais

características desses compostos ocorre via retro- Diels-Alder no anel C, padrão para esses tipos de triterpenos com sinal mais intenso em m/z 218.

Portanto, os dados fornecidos pela análise de CG-MS, bem como a comparação com dados da literatura (FINGOLO *et al.*, 2013), permitiu inferir a presença dos triterpenos acetilados α , β -amirina, Figura 38, abaixo:

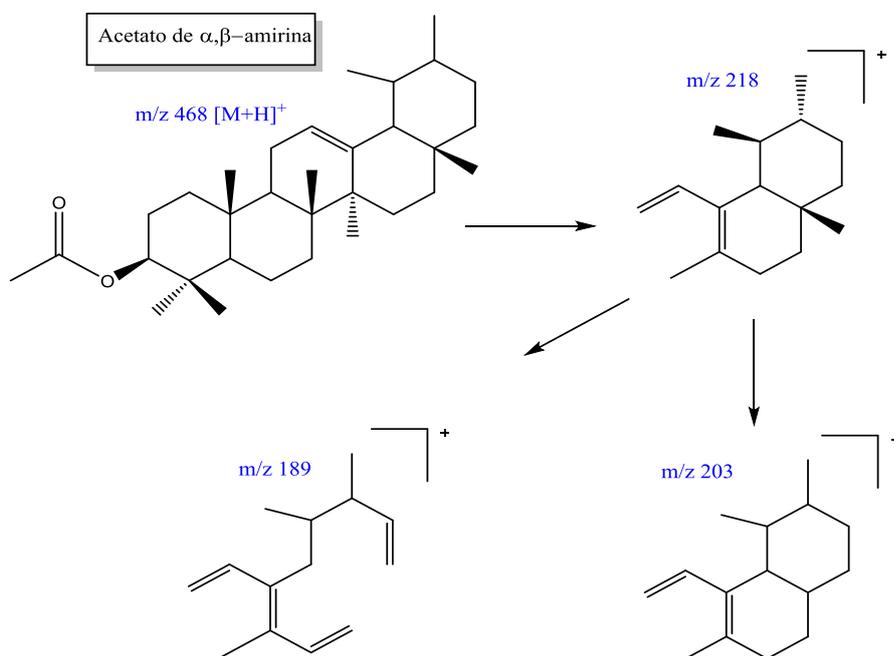


Figura 38. Proposta de Fragmentação da α , β -amirina.

5.3.1.4 Substâncias 07.2

A análise do perfil (Figura 39) mostrou a presença de mistura de substâncias, sendo três (3) componentes majoritários, o componente com tempo de retenção de 47,085 min e área de 47,15% (pico 7), o componente com tempo de retenção de 47,666 min e área de 27,29% (pico 9) e o componente com tempo de retenção de 46,054 min e área de 19,66 % (pico 3).

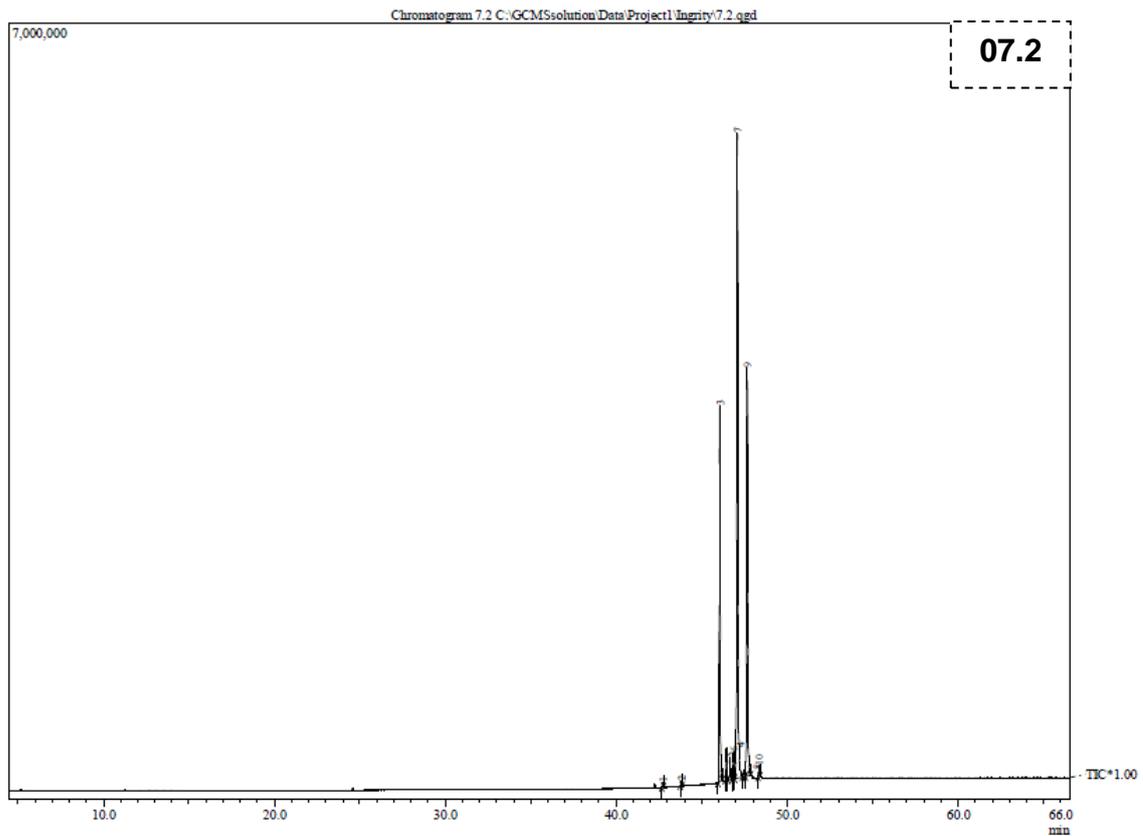


Figura 39. Cromatograma da substância 07.2

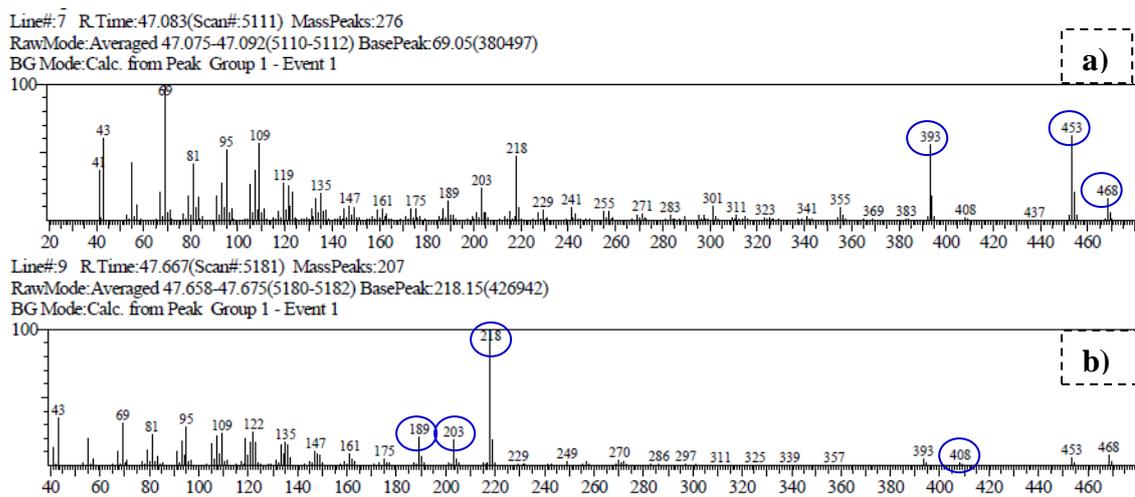


Figura 40. Espectro de massas de EHCBP-07.2: a) MS do pico 7 b) MS do pico 9

Por meio da análise do espectro de massas para o pico 7 foi possível a verificação dos mesmos padrões de fragmentações, com picos mais abundantes em m/z 393 e m/z 453 que são compatíveis com fragmentações características do esteroide acetilado Lanosterol (NASCIMENTO, 2014). A Figura 41, traz uma

proposta de fragmentação do pico 7 da fração 07.2. Através do espectro de massas para o pico 9 observou-se o padrão de fragmentação, com picos mais abundantes em m/z 218 e m/z 203, que são compatíveis com fragmentações características do triterpeno pentacíclico insaturado Urs-12-eno (MATHÉ & CULIOLI, 2004).

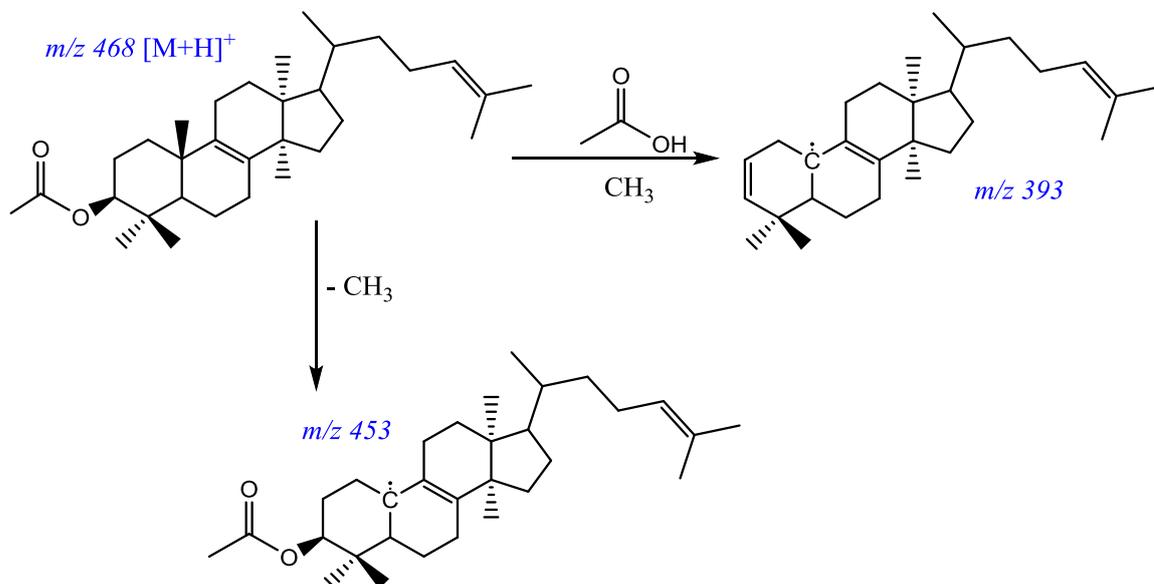


Figura 41. Proposta de Fragmentação do acetato de lanosterol.

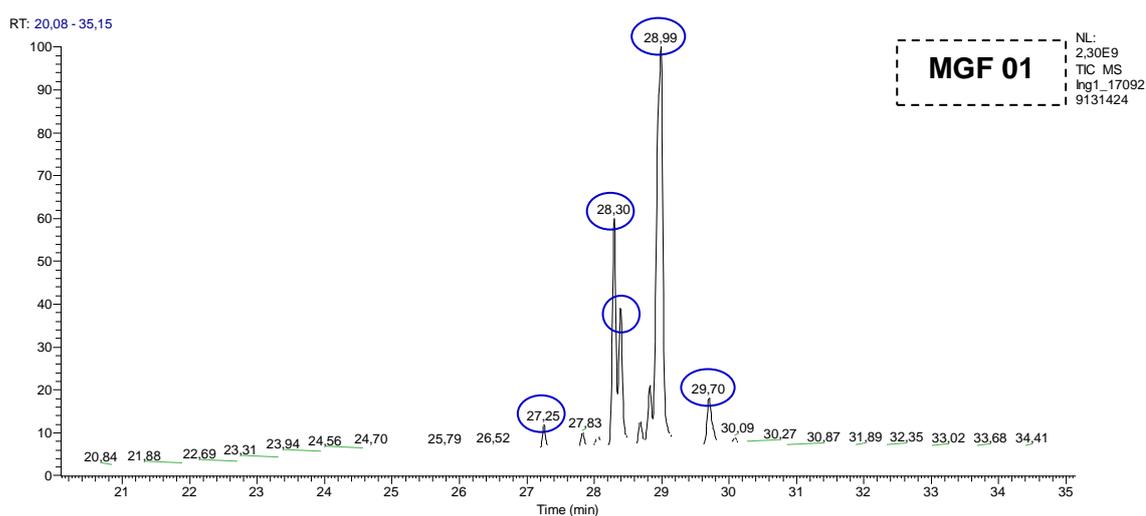
5.3.2 Caracterização química de compostos do extrato metanólico das cascas por CG-EM

A mistura de compostos denominada **MGF 01** e **MGF 02** foram obtidas do fracionamento do EMCBP (Fluxograma 9, Página 55) onde indicaram a presença de terpenos em sua composição quando realizadas a análise por CCD em fase normal (Hex:AcoET 9,5: 0,5) reveladas com vanilina sulfúrica, como pode ser visto na Figura 42.



Figura 42. CCD obtida das frações MGF01 e MGF02.

As amostras de MGF 01 e MGF 02, também foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A análise do cromatograma apresentado na Figura 43, demonstrou a presença de uma mistura de terpenoides como o acetato de lanosterol, acetato de lupeol, acetato de cicloartenol, lupeol e α,β - amirina (Figura 44).



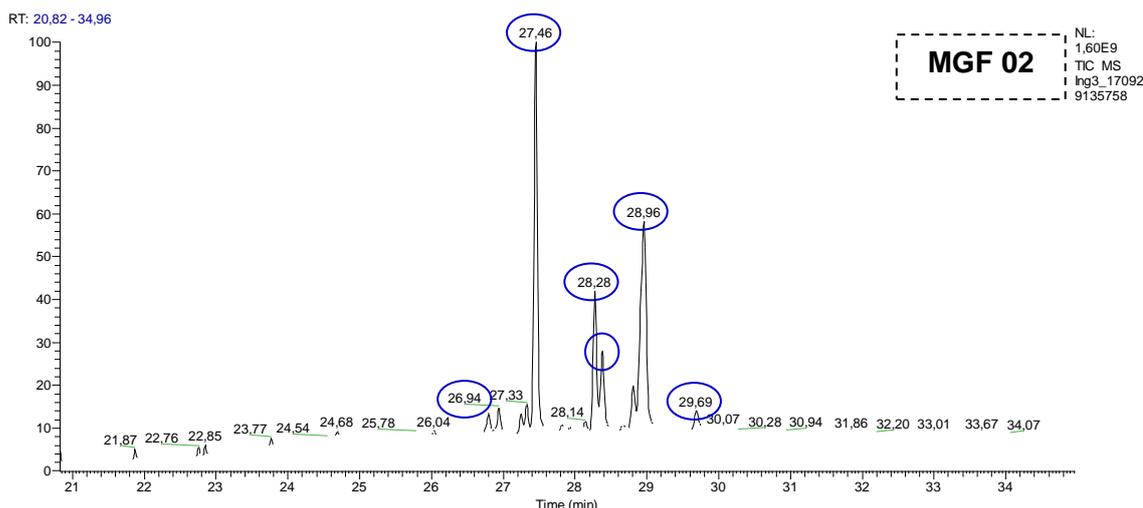


Figura 43. Cromatograma da mistura de terpenos das frações MGF01 e MGF02.

A análise de CG-EM permitiu a identificação de seis terpenos (Figura 44), apresentando tempos de retenção acima de 20 minutos como pode ser visto na tabela 11. As fragmentações apresentadas na Tabela encontram-se no anexo. Essas análises permitiram observar fragmentações característicos de triterpenos, para os triterpenos do tipo oleanano e ursano que possuem a insaturação na posição C-12 a fragmentação mais característica ocorre via reação Retro- Diels-Alder no anel C (VILEGASA, *et al.*, 1997; SALLES, 2013).

Tabela 11. Relação de terpenos entre grupos de frações MGF01 e MGF02.

	T_R (min)	Composto	Fragmentação (MS/MS)
MGF 01	28,30	<i>Acetato de Lanosterol</i>	468 (M+), 453, 393, 109, 69 (100%), 55
	28,39	β - <i>amirina</i>	426 (M+), 218 (100%), 203, 189
	28,99	<i>Acetato de lupeol</i>	468 (M+), 408,365, 218, 189 (100%)
	29,70	<i>Acetato de cicloartenol</i>	468 (M+), 453, 408,393, 365, 69(100%) 43
MGF 02	26,94	α - <i>amirina</i>	426 (M+), 218 (100%), 203, 189
	27,46	<i>lupeol</i>	426 (M+), 218, 207, 189, 135, 121, 107
	28,28	<i>Acetato de Lanosterol</i>	468 (M+), 453, 393, 109, 69 (100%), 55
	28,38	β - <i>amirina</i>	426 (M+), 218 (100%), 203, 189
	28,96	<i>Acetato de lupeol</i>	468 (M+), 408,365, 218, 189 (100%)
	29,69	<i>Acetato de cicloartenol</i>	468 (M+), 453, 408,393, 365, 69(100%) 43

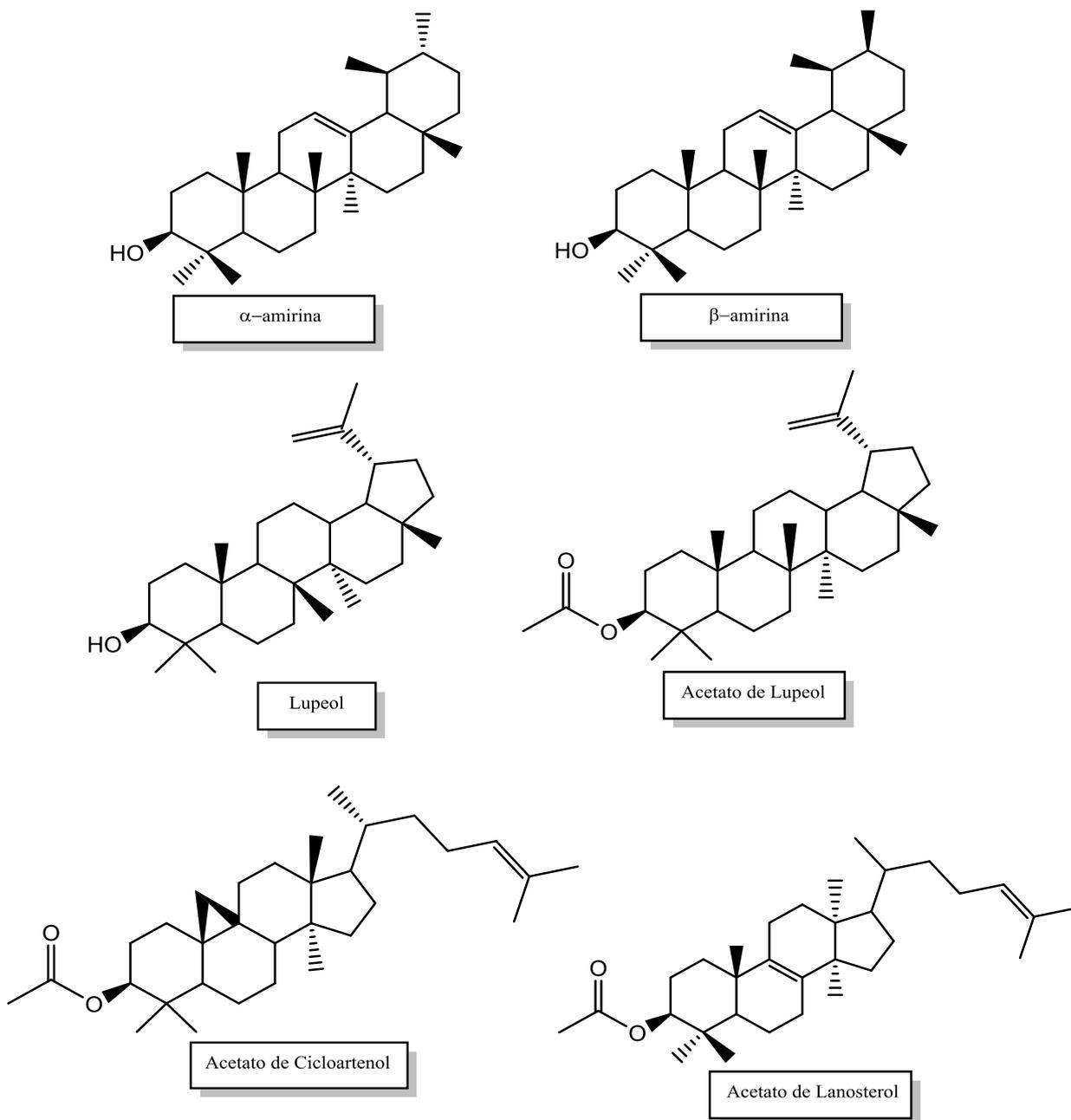


Figura 44. Triterpenos identificados nas frações MGF01 e MGF02.

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

5.3.3.1 Determinação estrutural da substância P-S1

A substância P-S1 (5,0 mg) foi isolada do fracionamento (Fluxograma 11, página 59), apresentou-se como sólido amorfo solúvel em clorofórmio. A determinação estrutural foi feita com base nos dados de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY. Analisando-se o espectro de RMN de ^1H a 500 MHz em CDCl_3 da Figura 45, abaixo:

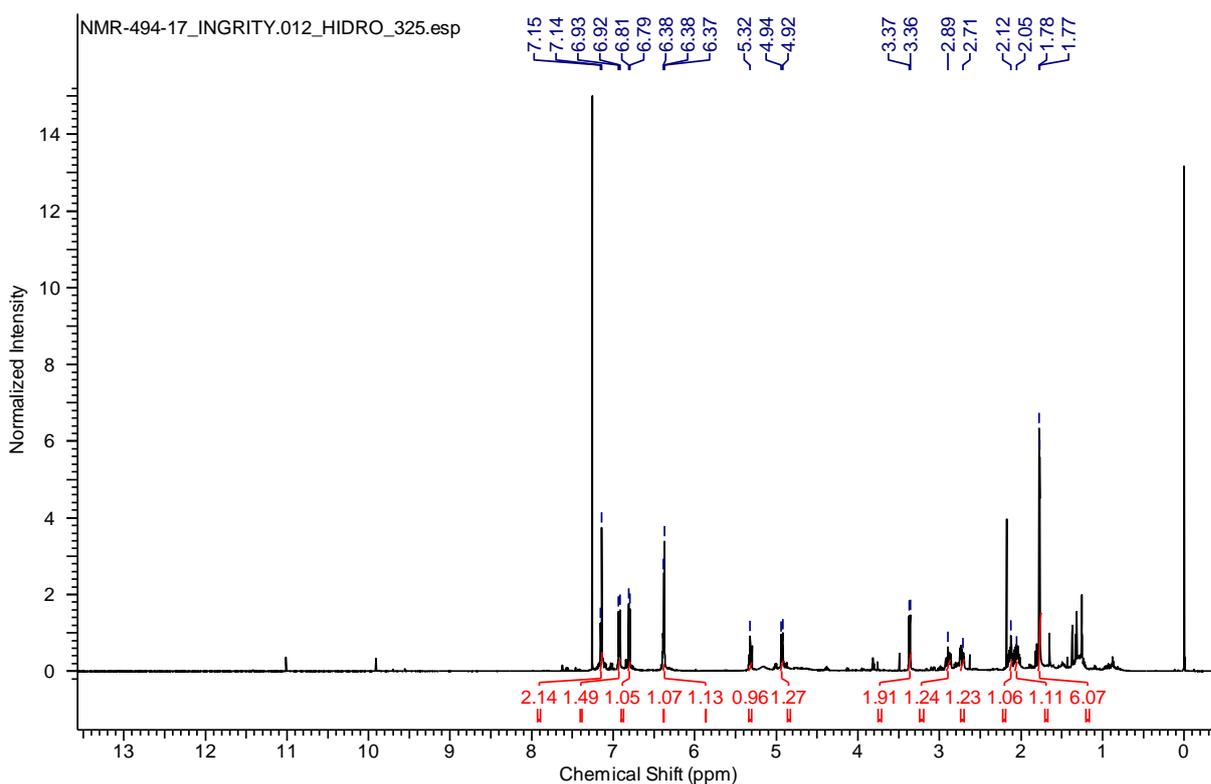
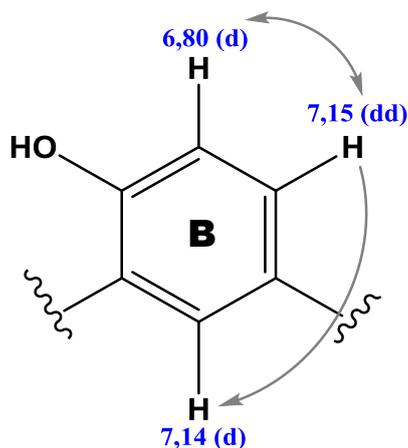


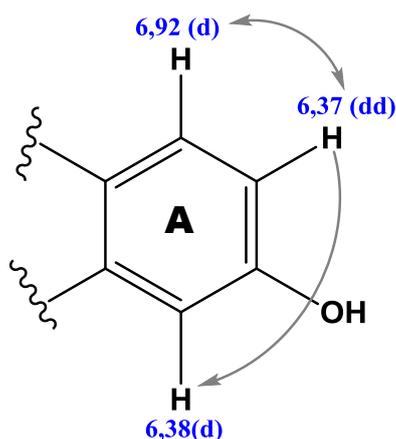
Figura 45. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **P-S1**

Pode-se perceber sinais característicos de átomos de hidrogênio aromáticos com deslocamentos químicos correspondentes a dois dubletos, com integração para um hidrogênio, em δ_{H} 7,14 ppm ($J= 2,13$ Hz); δ_{H} 6,80 ppm ($J= 8,89$ Hz) e um duplo dubleto em δ_{H} 7,15 ppm ($J= 8,89$ e 2,13 Hz) onde os valores da constante de

acoplamento evidenciaram o acoplamento dos hidrogênios aromáticos na posição “orto” e “meta”.



Nesta mesma região notou-se ainda dois sinais, com integração para um hidrogênio cada em δ_H 6,37 ppm (dd, $J= 8,83$ e $2,36$ Hz); δ_H 6,92 ppm (d, $J= 8,83$ Hz) e um dubleto em δ_H 6,38 ppm ($J=2,36$ Hz). Sugeriu-se então a existência de dois diferentes anéis aromáticos do núcleo de algum composto fenólico.



Na região dos hidrogênios alifáticos observou-se um tripleto com δ_H 5,32 ppm ($J= 7,13$ Hz; 1H), acoplado com δ_H 3,36 ppm ($J= 7,13$ Hz; 2H); assim como dois singletos que possuem três hidrogênios cada, δ_H 1,76 e δ_H 1,77 ppm; que foram atribuídos a dois grupos metila. O espectro do COSY (Figura 46) consolidou os acoplamentos dos hidrogênio propostos, uma vez que nesse experimento são observadas as correlações homonucleares (^1H - ^1H) da substância, como pode ser visto abaixo:

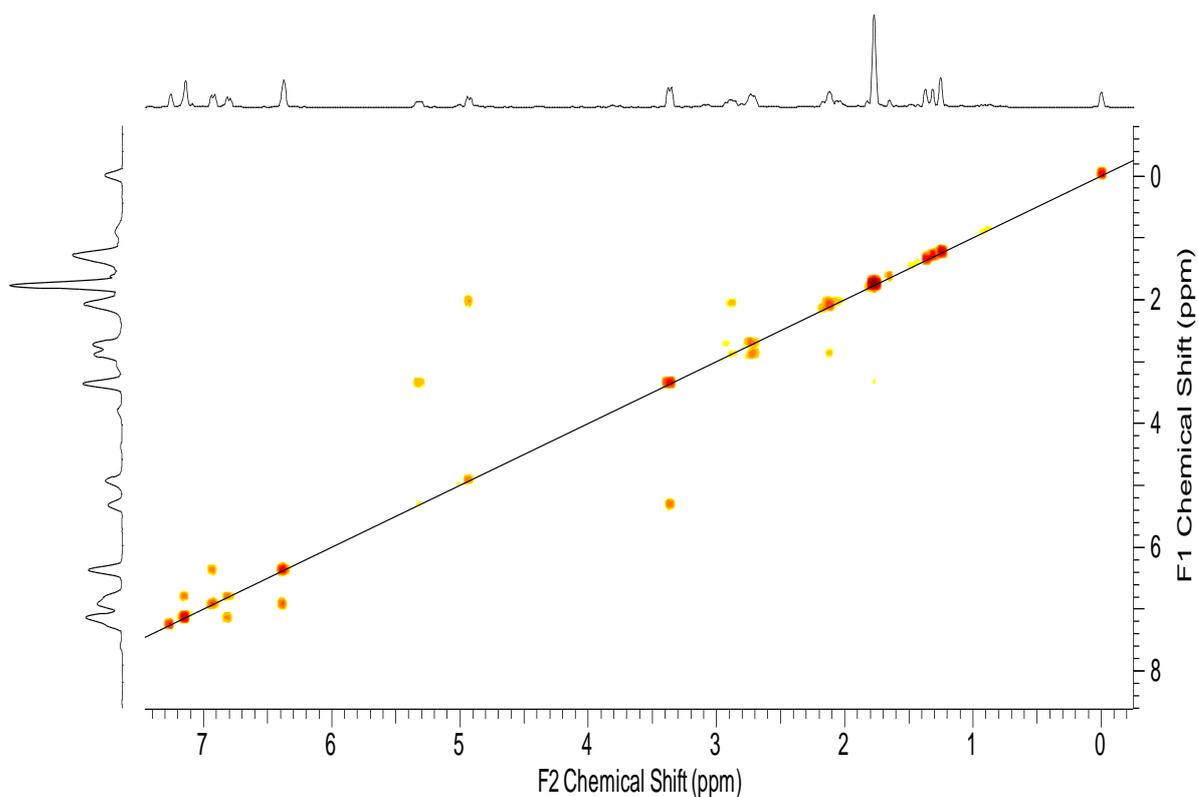
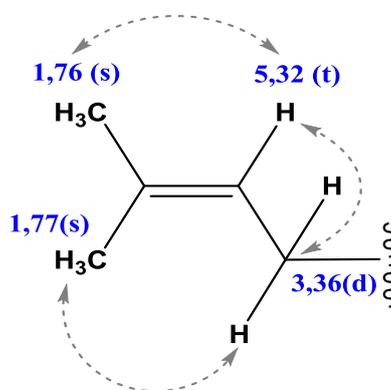


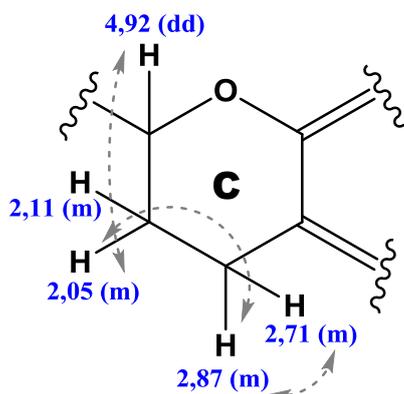
Figura 46. Correlações homonucleares ^1H - ^1H observadas no experimento de COSY para a substância **P-S1**

Analisando-se os dados, pode-se deduzir que existe um segmento de um grupo prenila na estrutura, pois além das correlações das constantes de acoplamentos dos (J) constatou-se as correlações pelo COSY:



Foram também verificados há presença de um duplo dubleto em δ_{H} 4,92 ($J=$ 10,29 e 2,4 Hz; 1H); na qual foi atribuído a um hidrogênio oximetínico de um anel C

existente na estrutura, além de quatro multipletos em δ_H 2,11/ 2,05 e 2,87/ 2,71 atribuídos aos hidrogênios metilênicos:



O espectro de RMN de ^{13}C da substância P-S1 evidenciou a existência de vinte carbono na estrutura, sendo eles aromáticos, metilênicos, metílicos e vinílicos (Figura 47).

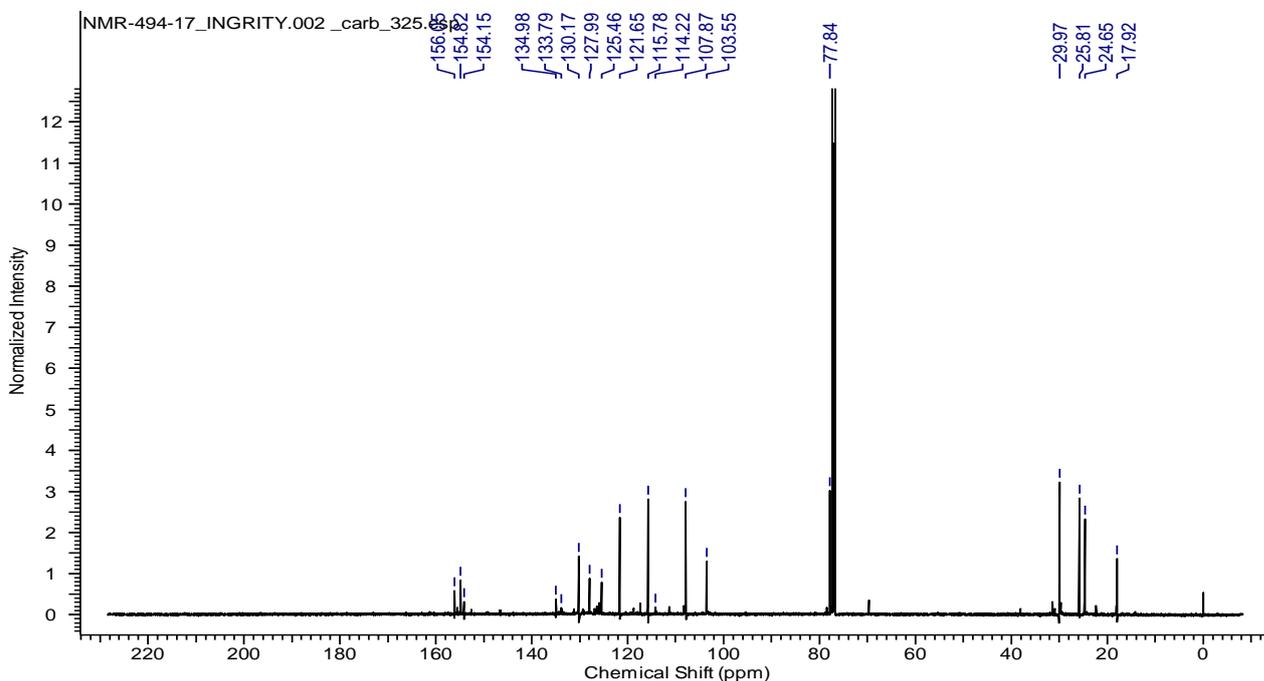


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **P-S1**

O espectro de HSQC (Figura 48) mostrou as correlações heteronucleares dos carbonos ligados diretamente aos hidrogênios (J_1), sendo possível então posicionar todos os hidrogênios aos seus devidos carbonos (^1H - ^{13}C) ao longo da estrutura.

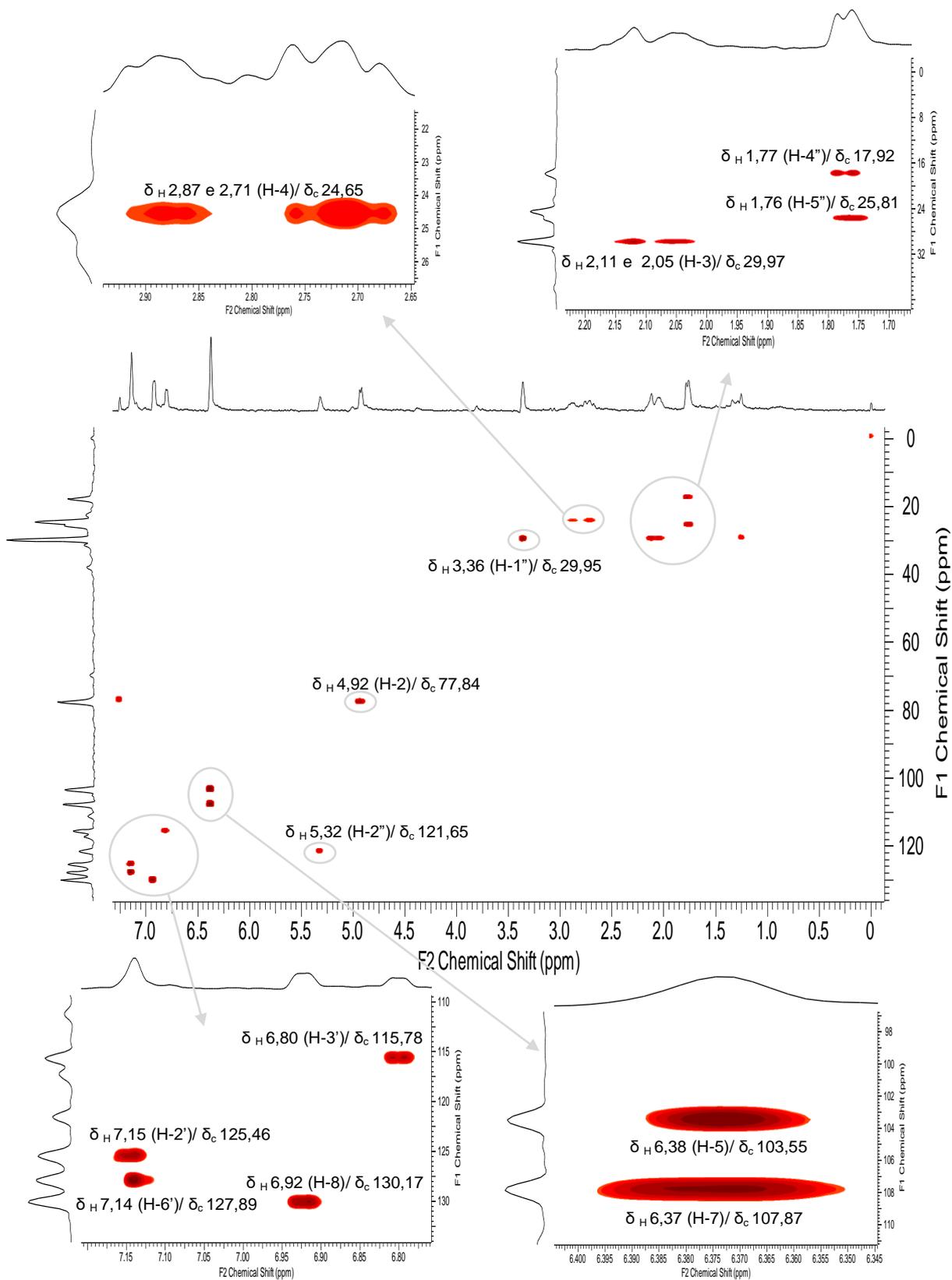


Figura 48. Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observados no espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) para a substância **P-S1**.

O experimento de HMBC foi útil para determinar as correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C a longa distância (J_2 , J_3 , J_4 e J_5), Figura 49. Sendo possível confirmar os dados obtidos nos espectros anteriores e corroborar com a localização dos carbonos quaternários.

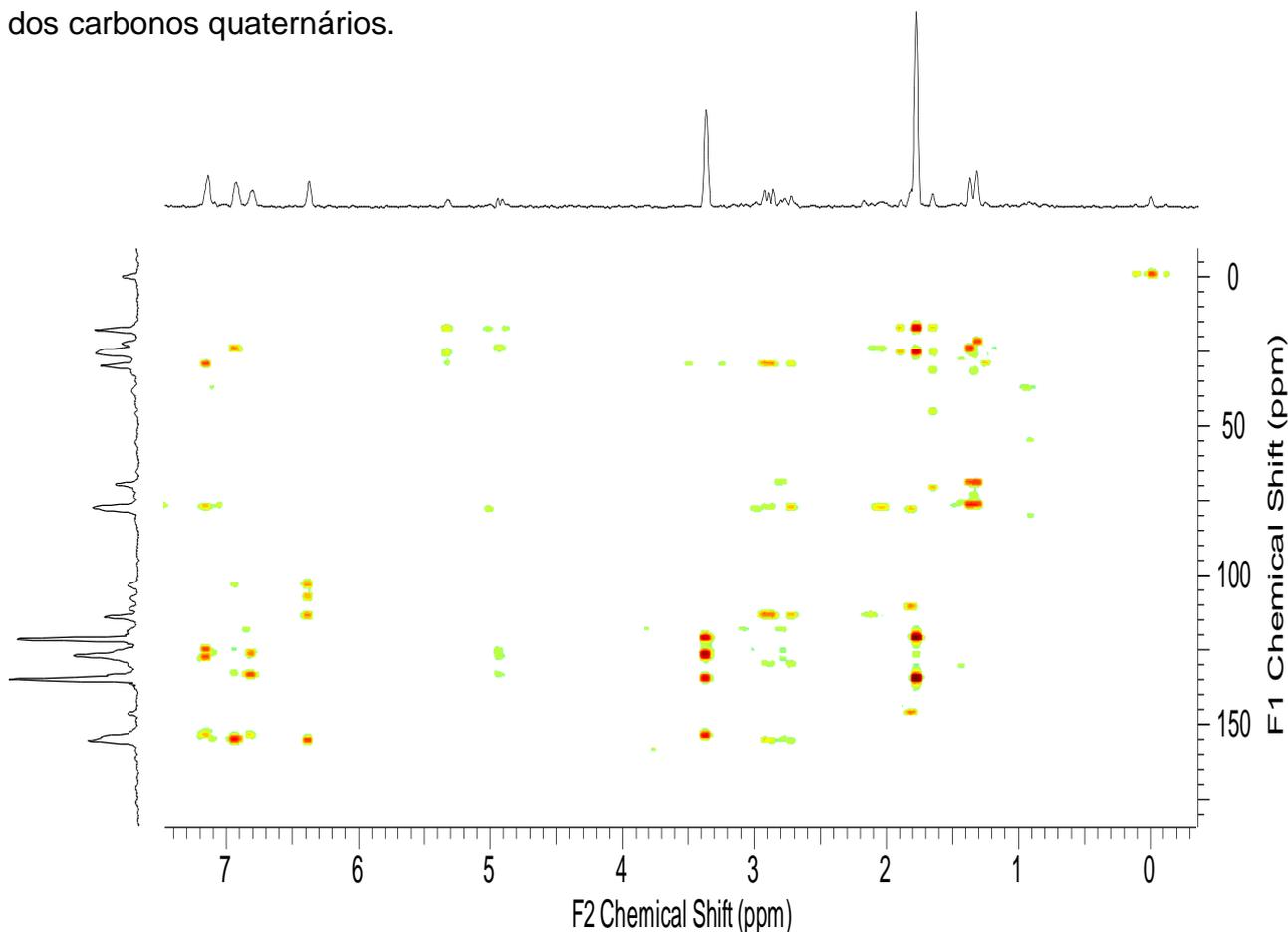
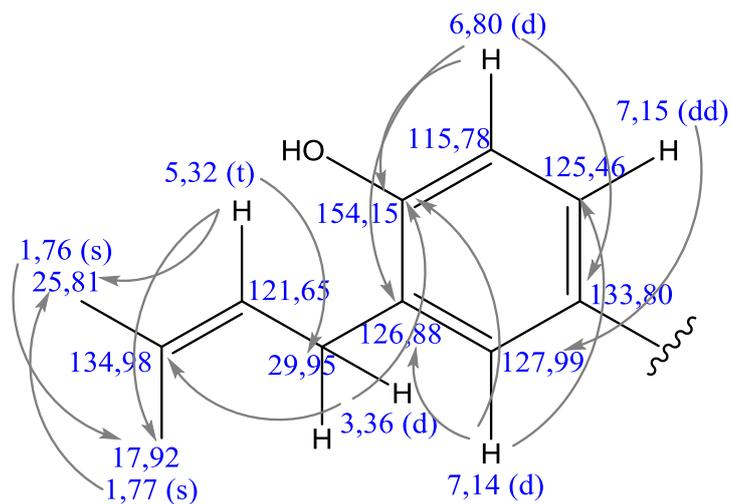
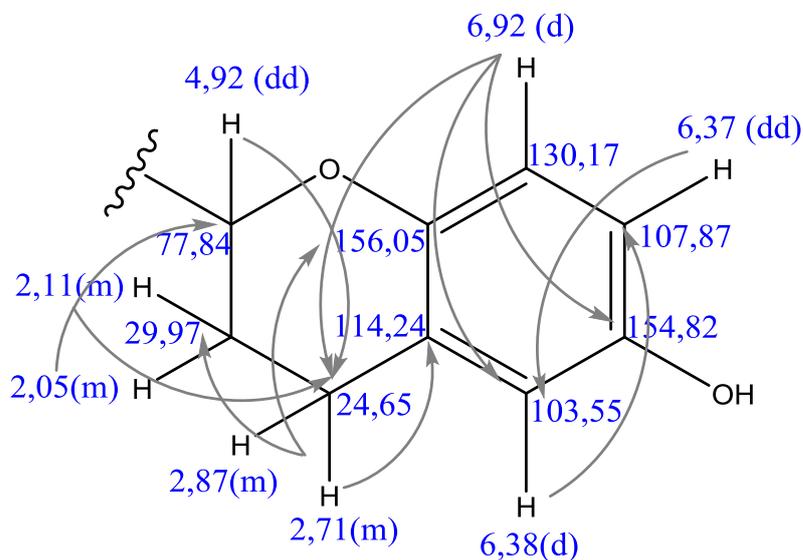


Figura 49. Correlação heteronucleares ^1H - ^{13}C observados no experimento de HMBC (500 MHz, CDCl_3) para a substância **P-S1**.

No espectro de HMBC acima foram observados as correlações entre o hidrogênio δ_{H} 6,80 com os carbonos δ_{C} 133,80; 126,88; 154,15; δ_{H} 7,15 com δ_{C} 127,99; 77,84; δ_{H} 7,14 com δ_{C} 125,46; 154,15; 126,88; δ_{H} 3,36 com δ_{C} 154,15; 126,88; 121,65; 134,98; δ_{H} 5,32 com δ_{C} 17,92; 25,81; 29,95; δ_{H} 1,77 com δ_{C} 25,81; δ_{H} 1,76 com δ_{C} 17,92; 121,65 e 134,98 confirmando a existência do grupo prenila ao longo do anel *B* da estrutura:



Podem-se visualizar as correlações em δ_H 4,92 com os carbonos δ_C 127,99; 133,80; 24,65; δ_H 2,11/ 2,05 com δ_C 77,84; 24,65; δ_H 2,87/ 2,71 com δ_C 77,84; 29,97; 114,24; 156,05; δ_H 6,37 com δ_C 114,24; 103,55; δ_H 6,92 com δ_C 154,82; 103,55; δ_H 6,38 com δ_C 107,87; 156,1.



Com isso, de acordo com os dados espectrais analisados, auxiliados com a comparação de relatos da literatura têm-se a dedução de que a estrutura proposta tratava-se de uma flavana (Figura 50), sinais de RMN 1D e 2D (Tabela 12).

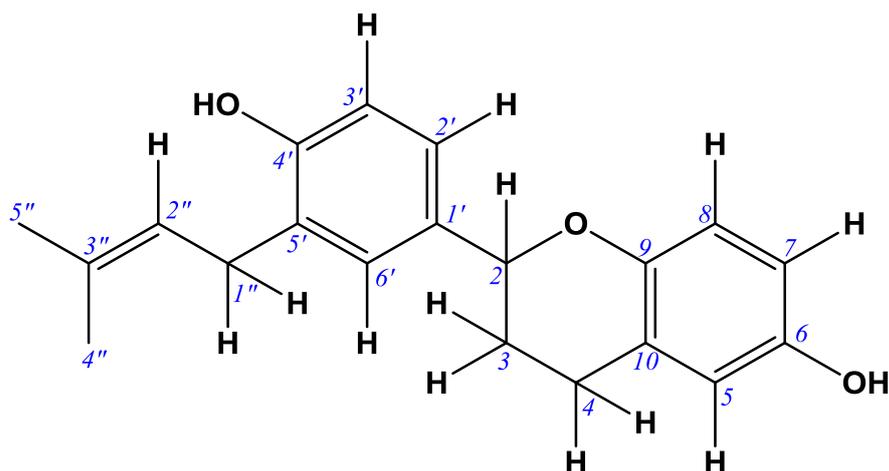


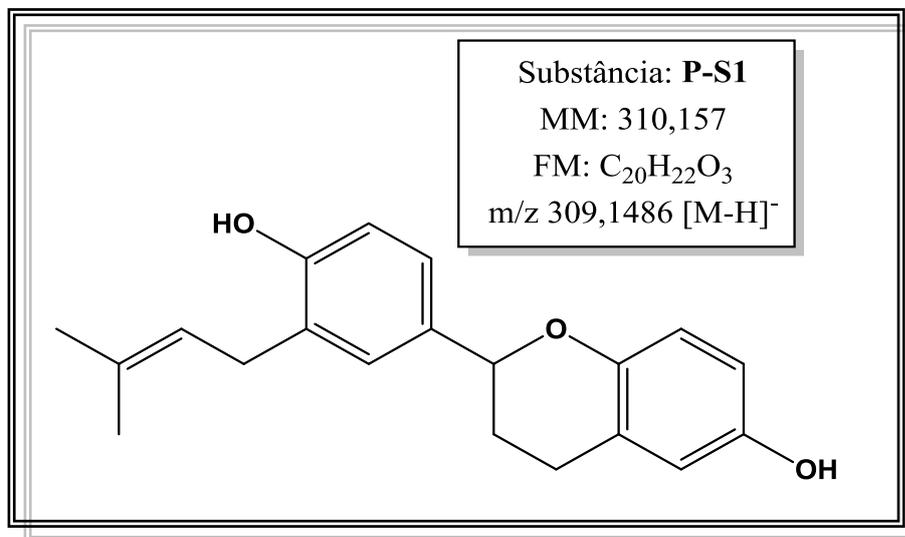
Figura 50. Estrutura da flavana- **P-S1**

Tabela 12. Dados de RMN (CDCl_3 , 500 MHz) da flavana **P-S1** em comparação com os dados da literatura.

N ^o	δ ¹ H (mult.; J em Hz)	δ ¹³ C	** δ ¹ H mult. (J em Hz)	** δ ¹³ C	COSY	HMBC
1'	-	133,80	-	134,3	-	-
2'	7,15 (dd; 8,89 e 2,13), 1H	125,46	7,33 (d; 8,7)	127,9	-	127,99; 77,84
3'	6,80 (d; 8,89), 1H	115,78	6,85 (d; 8,7)	115,8	-	133,80; 126,88; 154,15
4'	-	154,15	-	157,7	-	-
5'	-	126,88	6,85 (d; 8,7)	115,9	-	-
6'	7,14 (d; 2,13), 1H	127,89	-	127,9	-	125,46; 154,15; 126,88
2	4,92 (dd; 10,29 e 2,4), 1H	77,84	4,98 (dd; 10,3)	78,0	2,11	127,99; 133,80; 24,65
3	2,11 (m) e 2,05 (m), 2H	29,97	1,90 (m) e 2,16 (m)	31,1	4,92	77,84; 24,65
4	2,87(m) e 2,71 (m), 2H	24,65	2,67 (m) e 2,88 (m)	25,6	-	77,84; 29,97; 114,24; 156,05
5	6,38 (d; 2,36), 1H	103,55	6,71 (d; 8,2)	127,3	-	107,87; 156,05
6	-	154,82	6,38 (d; 8,2)	108,6	-	-
7	6,37 (dd; 8,83 e 2,36), 1H	107,87	-	154,8	-	114,24; 103,55
8	6,92 (d; 8,83), 1H	130,17	-	117,7	-	154,82; 103,55
9	-	156,05	-	154,3	-	-
10	-	114,24	-	113,7	-	-
1''	3,36 (d; 7,13), 2H	29,95	3,41 (d; 7,2), 1H	22,4	1,77	154,15; 126,88; 121,65; 134,98
2''	5,32 (t; 7,13), 1H	121,65	5,27 (t; 7,2), 1H	122,2	3,36	17,92; 25,81; 29,95
3''	-	134,98	-	134,0	-	-
4''	1,77 (s), 3H	17,92	1,72 (s), 3H	17,8	3,36	25,81
5''	1,76 (s), 3H	25,81	1,74 (s), 3H	25,8	5,32	17,92; 121,65; 134,98

Legenda: * Comparação com dados da literatura: TORRES, 2000 (H; 300 MHz CDCl_3) e TAKASHIMA, 2005 (H; 500 MHz, Acetona, d_6). (δ) Deslocamento químico em ppm.

A análise de massas de alta resolução no modo negativo de **P-S1** demonstrou a presença do pico de maior intensidade em m/z 309,1486, referente a um íon $[M-H]^-$, cuja fórmula molecular mais provável é $C_{20}H_{21}O_3$ e erro 3,4 ppm dentro do limite de erro aceitável (Figura 51).



Meas. m/z	#	Adduct	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma
309.1486	1	M-H	$C_{20}H_{21}O_3$	309.1496	3.4	10.5

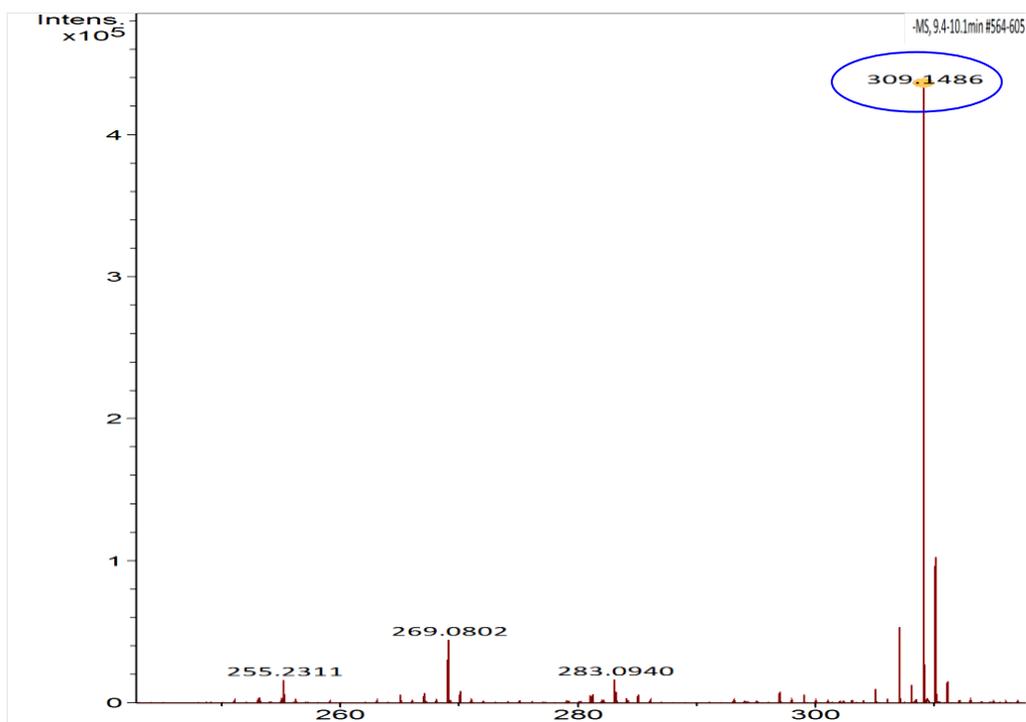


Figura 51. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância **P-S1**

No espectro de massas da substância **P-S1**, observou-se majoritariamente o íon m/z 309,1486 $[M-H]^-$, onde este foi submetido ao processo de fragmentação (MS^2), Figura 52, abaixo.

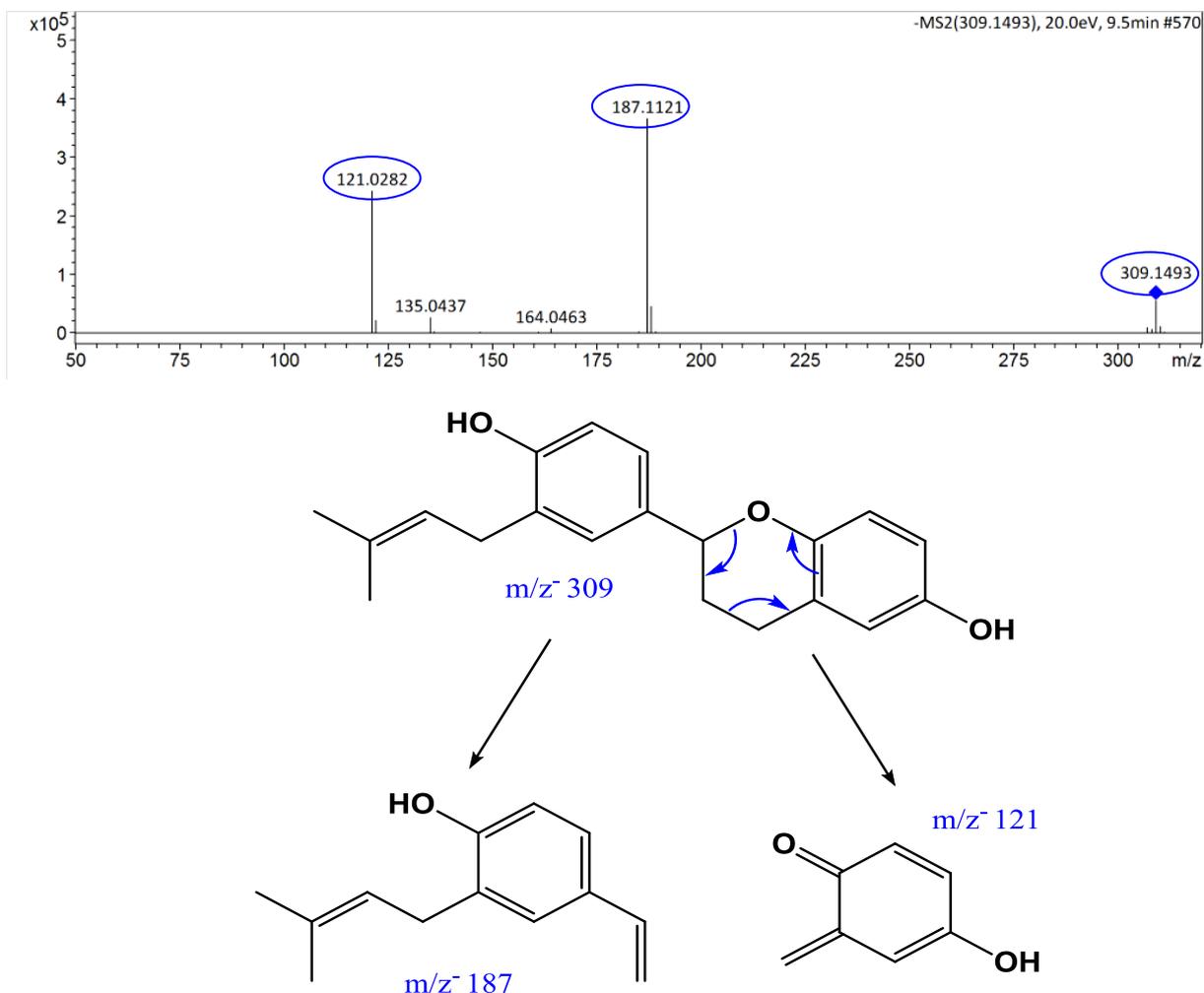


Figura 52. Espectro de MS^2 para o íon m/z 309 $[M-H]^-$ e proposta de fragmentação para a substância **P-S1**.

Portanto, a partir dos dados obtidos de RMN 1D e 2D, auxiliados com dados de massas de alta resolução e MS^2 evidenciaram que a substância **P-S1** é uma flavana, classe de substância comumente encontrada no gênero *Brosimum* de acordo com relatos da literatura (TORRES, 2000; TEIXEIRA, 2000 e TAKASHIMA, 2005) e busca no Scfinder. Entretanto verificou-se que esta flavana em questão não apresenta relatos na literatura, mas mostra que a estrutura possui mesmo esqueleto básicas encontradas no gênero. Com isso, sugeriu-se como sendo *4',6-dihidroxi-5'prenil-flavana* utilizando as recomendações da IUPAC.

5.3.3.2 Determinação estrutural da substância- P-S2

A substância **P-S2** (7,0 mg) foi obtida como sólido amorfo de coloração amarela e solúvel em clorofórmio, foi isolada do fracionamento (Fluxograma 11, Página 59) . A determinação estrutural foi realizada com base nos dados de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY e pela comparação com dados relatados na literatura (TORRES, 2000; TAKASHIMA, 2002 e TAKASHIMA, 2005).

A partir do espectro de RMN de ^1H (Figura 55) da substância P-S2, pode-se notar grupos de sinais referentes a hidrogênios aromáticos com deslocamento químico de hidrogênio em δ_{H} 6,42 ppm (d, $J= 8,58$); δ_{H} 7,81 ppm (dd; $J= 8,58$ e $J= 2,45$ Hz) e δ_{H} 6,40 ppm (s) ppm com constantes de acoplamento “*orto*” e “*meta*” correlacionando entre si referentes aos hidrogênios H-5, H-6 e H-3 respectivamente atribuídos ao anel A. Foram observados ainda, sinais com δ_{H} em 6,82 ppm (d, $J= 8,25$ Hz) e δ_{H} 7,42 ppm (d, $J= 8,25$ Hz) dentre os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-3'/5', H-6' e δ_{H} 7,40 ppm ($J= 2,1$ Hz) H-2' sendo proveniente do anel aromático B.

O singlete em δ_{H} 13,56 (s) foi atribuído ao deslocamento químico do grupo hidroxila ligada ao carbono C-2 do anel A, além de dubletos típicos referentes a hidrogênios olefínicos próximos a carbono carbonílico, em δ_{H} 7,82 ppm (d) e δ_{H} 7,41 ppm (d), exibindo uma configuração *trans* entre si, ambos com (J) igual a 15,37 Hz, que baseados em dados obtidos da literatura pode-se inferir como sendo característicos aos hidrogênios α e β do esqueleto de uma chalcona (Figura 53).

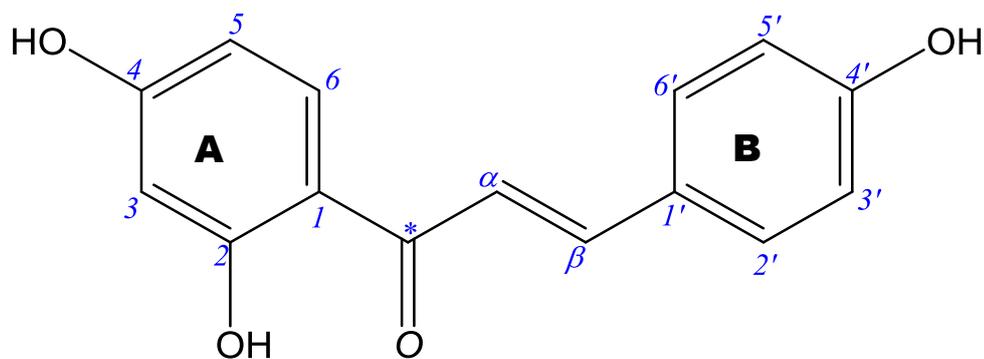


Figura 53. Esqueleto proposto para a substância **P-S2**

Também foram constatados a ocorrência de sinais em ambiente químico de campo alto, cujos prótons encontram-se mais blindados sendo característicos de hidrogênios alifáticos, como os singletos δ_H 1,79 e 1,78 ppm (s, H-4"/5"), integrando 3H cada, que foram atribuídos a duas metilas. Um dubleto em δ_H 3,38 ppm correspondente a H-1" (d, $J= 7,03\text{Hz}$, 2H) e δ_H 5,34 ppm (t, $J= 7,03\text{Hz}$, 1H) H-2", que baseados em relatos da literatura indicam a presença de segmento de grupo prenila ligada na molécula (Figura 54).

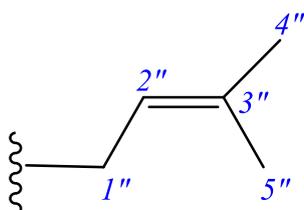


Figura 54. Segmento de grupo prenila da estrutura P-S2.

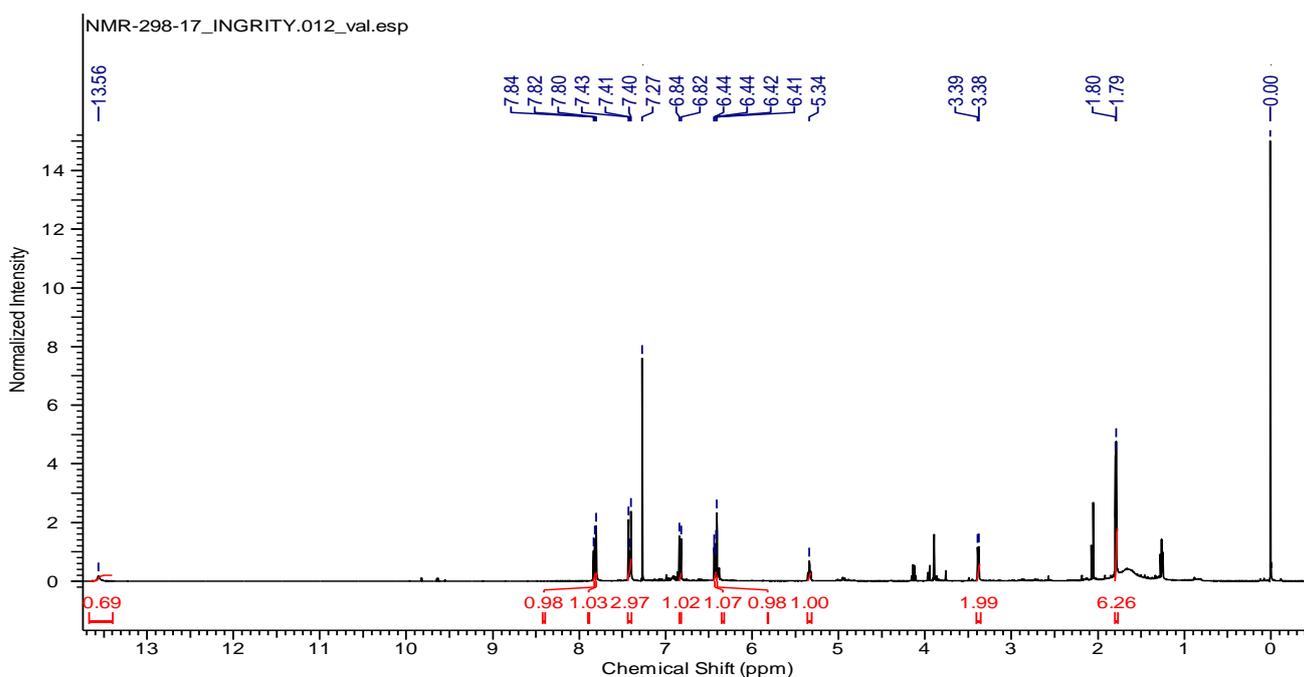


Figura 55. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância P-S2

Tanto nos espectros de RMN ^1H quanto o de ^{13}C , é notório a presença de pequenas impurezas na amostra e por tal fato, alguns sinais não foram levados em consideração, contudo não impossibilitou que houvesse uma boa correlação e coerência nos dados de RMN ^1H e ^{13}C .

Diante do exposto acima, tem-se que, o espectro de ^{13}C (Figura 56), apresenta 20 sinais referentes aos carbonos que consolidam a presença do esqueleto da chalcona mencionado acima, como por exemplo, o sinal em δ_{C} 192,0* referente à carbonila conjugada com os sinais em δ_{C} 144,7 e 117,4 ppm característicos aos carbonos olefínicos α e β da chalcona. Podem-se perceber a ocorrência de sinais aromáticos em δ_{C} 131,84 (C-6); 128,27 (C-6'); 127,95 (C-2'); 127,42 (C-1'); 116,13 (C-3'); 114,11(C-1); 107,99 (C-5); 103,52 (C-3) e sinais em δ_{C} 166,37(C-2); 163,69 (C-4); 157,16 (C-4') referentes aos carbonos aromáticos oxidados.

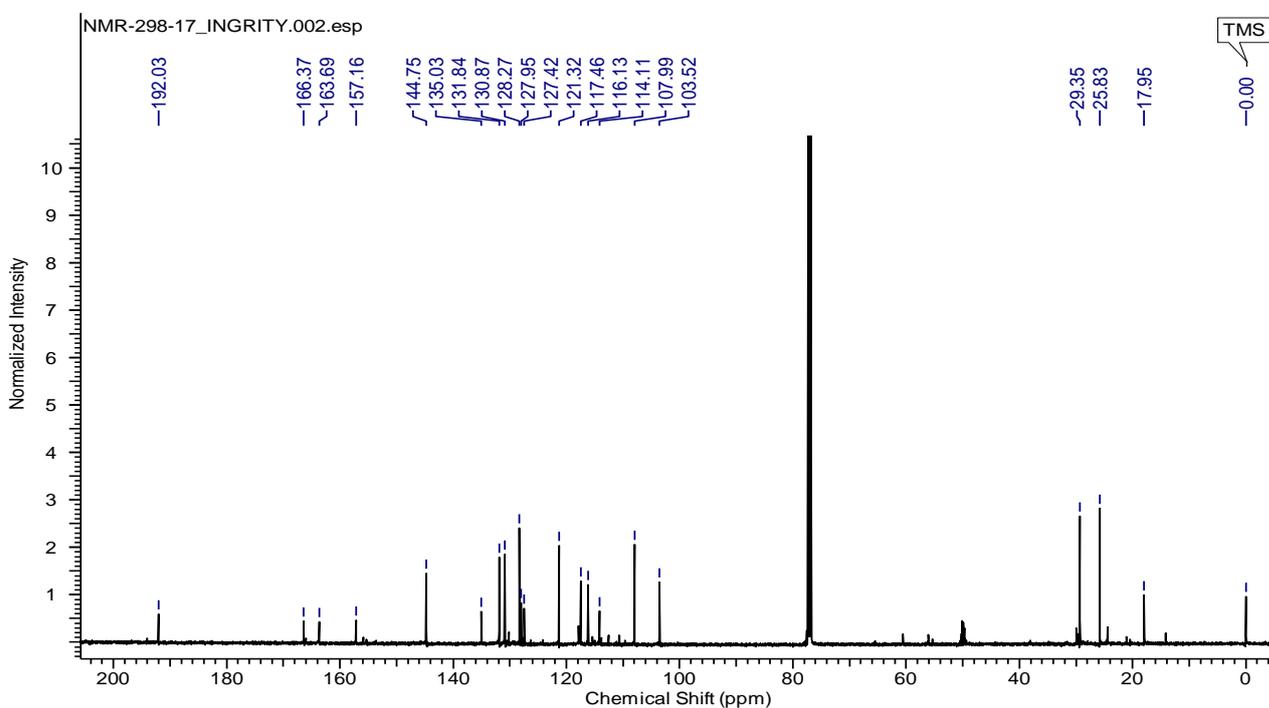


Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **P-S2**

Visando a confirmação da estrutura foram realizados os experimentos de RMN 2D: HMBC, HSQC e COSY. O espectro de HSQC (Figura 57) revelou os deslocamentos químicos dos carbonos ligados diretamente aos hidrogênios (J_1),

com isso, foi possível fazer a determinação de todos os valores de ^1H - ^{13}C na estrutura.

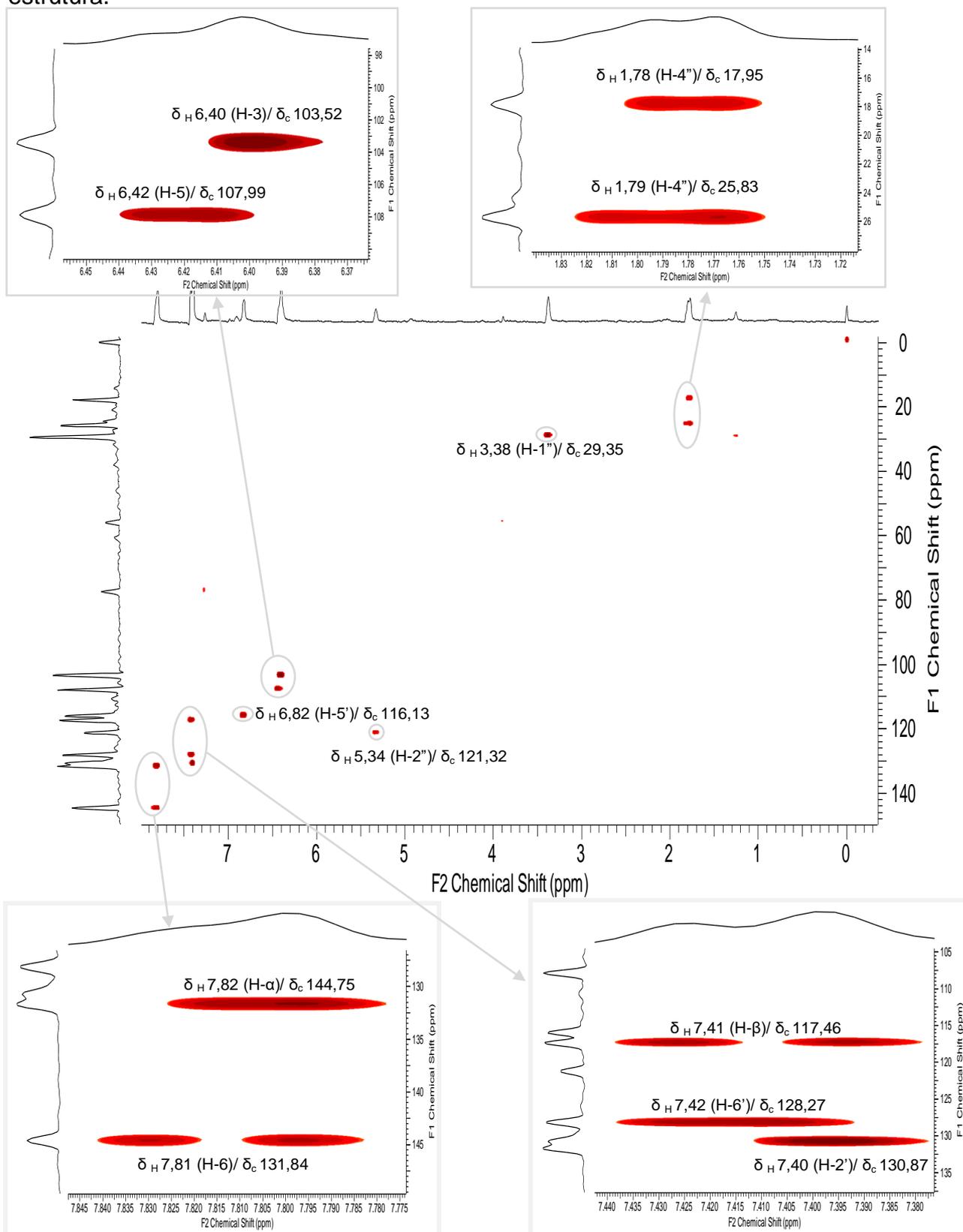


Figura 57. Espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) da substância P-S2

Auxiliados com dados do mapa de contorno HMBC que mostra a correlação entre os deslocamentos dos carbonos ligados a longa distância dos hidrogênios (J_2 , J_3 , J_4 e J_5), Figura 58.

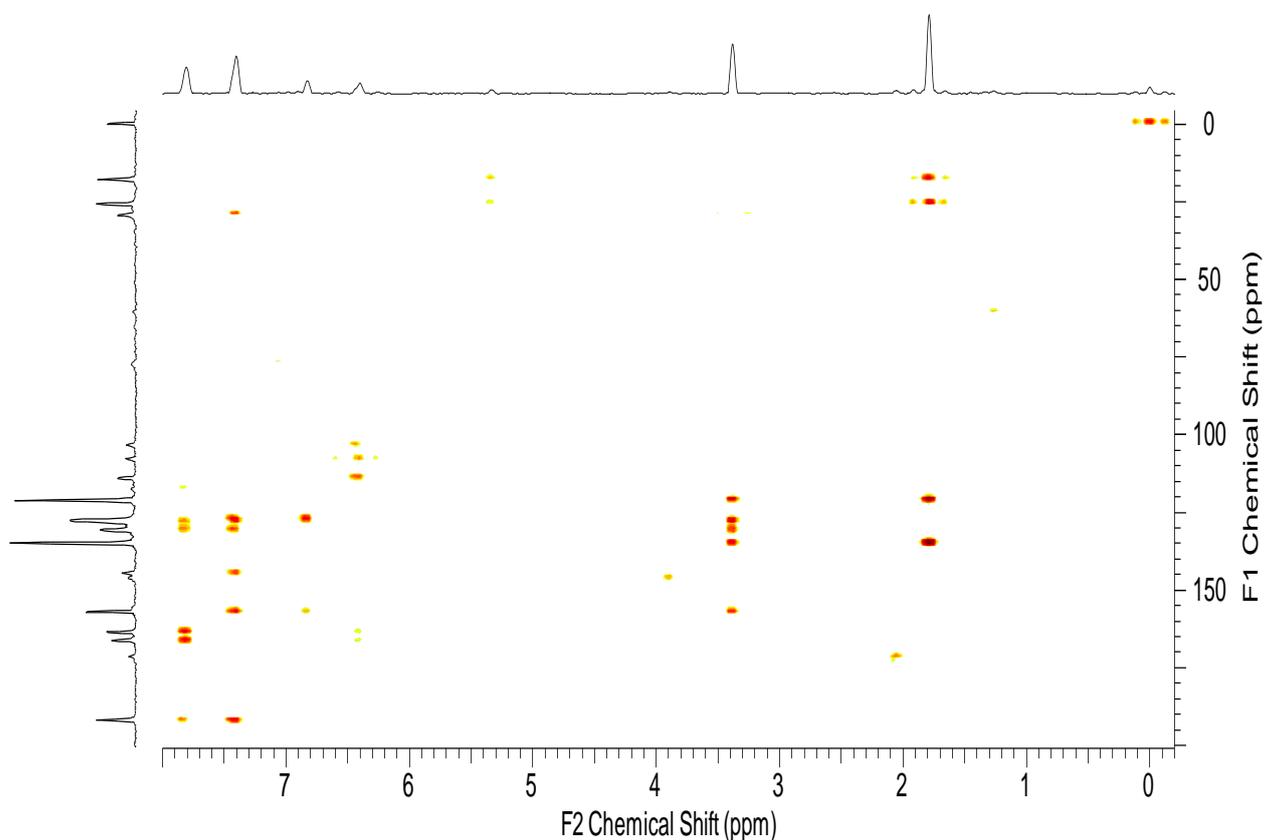
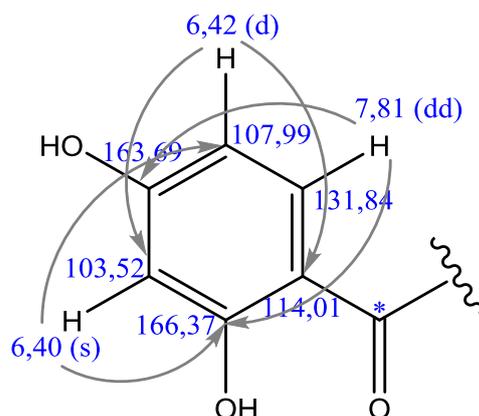
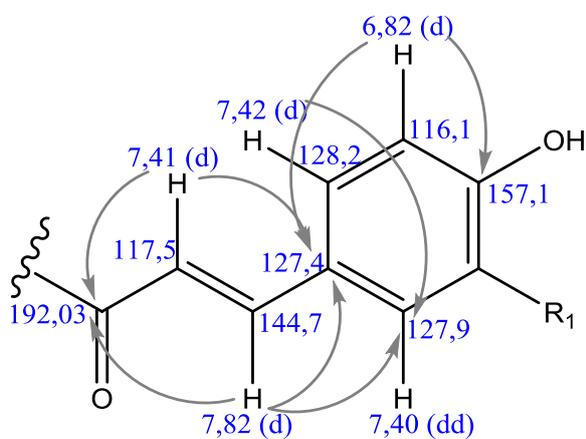


Figura 58. Correlação heteronucleares ^1H - ^{13}C observados no experimento de HMBC (500 MHz, CDCl_3) para a substância **P-S2**.

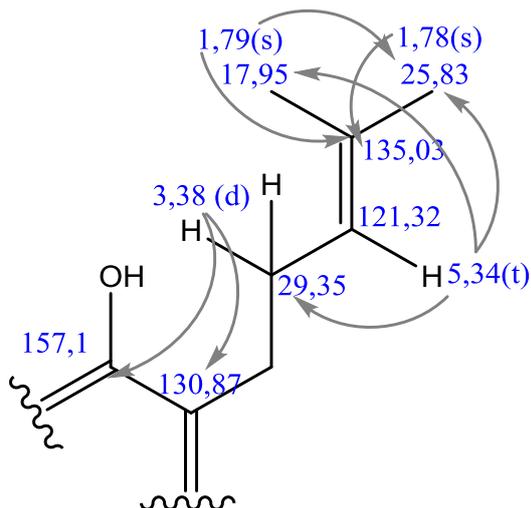
No espectro de HMBC mostrado acima, constatou-se a correlação entre os hidrogênios e os carbonos ao longo do anel A para a substância **P-S2**. Onde ao longo de duas ligações houve a correlação em δ_{H} 7,81 (H-6) com os δ_{C} 163,69 e 166,37. O δ_{H} 6,42 (H-5) correlacionou-se δ_{C} 114,01 e 103,52 ainda δ_{H} 6,40 (H-3) apresentou correlação com δ_{C} 114,01; 107,99; 163,69 e 166,37 conforme pode ser visto abaixo:



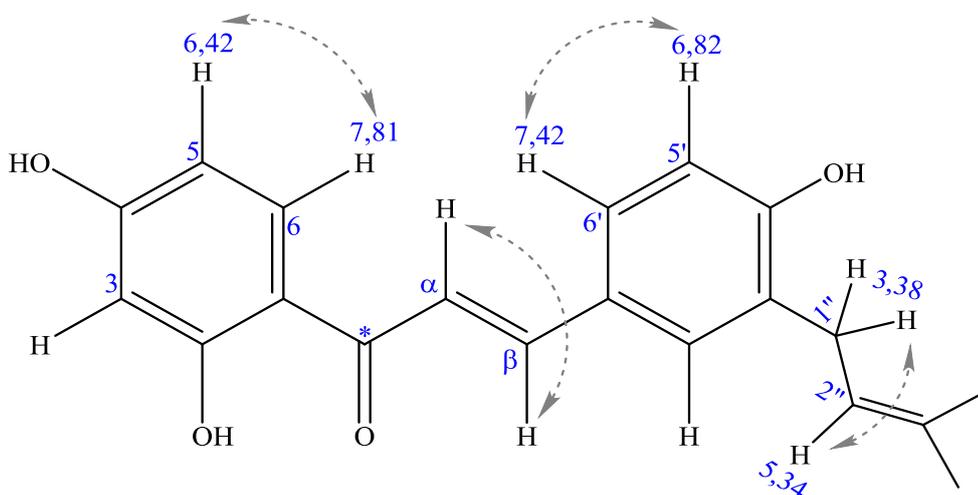
Observou-se também a correlação entre o δ_H 7,82 (H- β) com os δ_C 192,03, 157,16 e 127,95; o δ_H em 7,41 (H- α) correlacionou-se com δ_C 192,03, 127,95 e 127,42. Tem-se ainda a correlação do δ_H 7,40 (H-2') com δ_C 144,75 e 128, 27; além dessas correlações o δ_H 6,82 (H-5') mostrou correlação com δ_C 157,16 e 127,42 e o δ_H 7,42 (H-6') com δ_C 127,95.



Foi possível identificar a localização do grupo prenila na estrutura com o auxílio dos dados de HMBC. Podendo-se perceber a correlação do δ_H 3,38 com δ_C 157,16, 121,32, 135,03 e 130,87; o em δ_H 5,34 com δ_C 29,35, 25,83 e 17,95; δ_H 1,78 com δ_C 25,83 e δ_H 1,79 com δ_C 135,03, 121,32 e 25,83.



O experimento do COSY (Figura 60) mostrou as correlações do δ_H 7,81 (H-6) com δ_H 6,42 (H-5); δ_H 7,82 (H- α) com 7,41 (H- β); δ_H 7,42 (H-6') com 6,82 (H-5') e δ_H 3,38 (H-1'') com 5,34 (H-2''). As correlações observadas são plausíveis para a estrutura em questão:



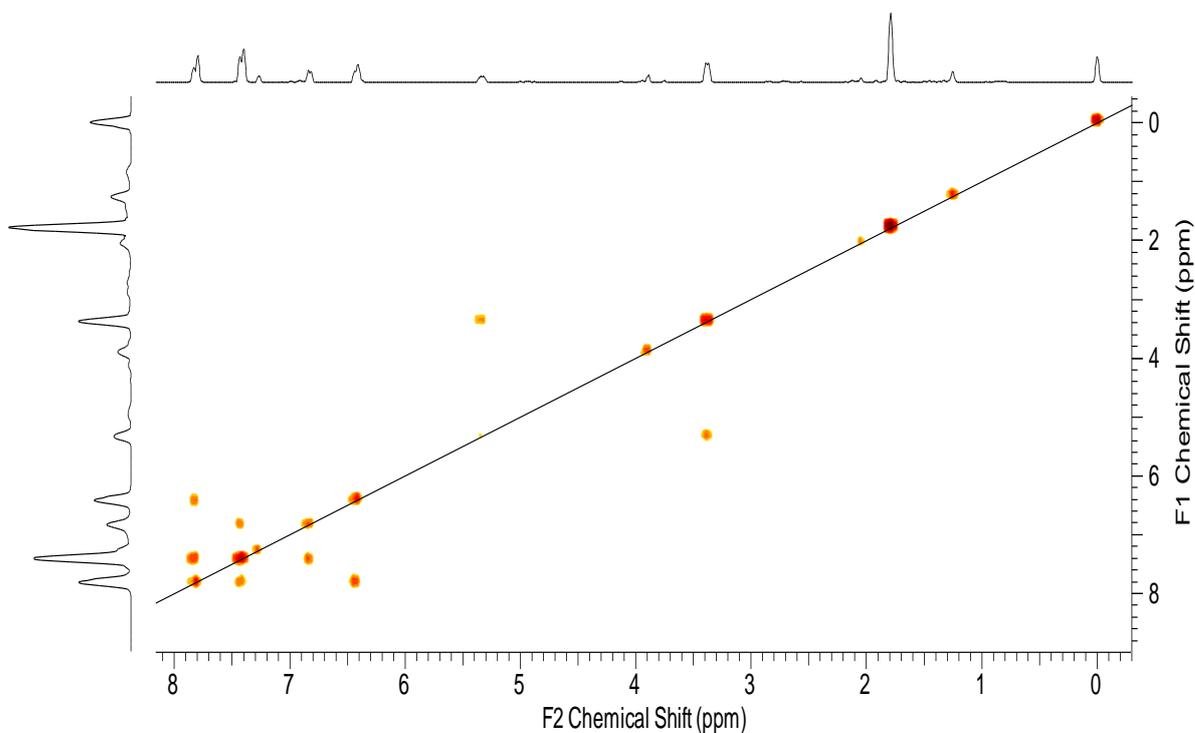


Figura 59. Correlações homonucleares observados no experimento de COSY (500 MHz, CDCl_3) para a substância **P-S2**

De acordo com a comparação entre todos os dados espectrais apresentados acima auxiliados com dados espectroscópicos da literatura, têm-se a proposta da estrutura na Figura 60, com seus respectivos sinais observados nos espectros de RMN 1D e 2D (Tabela 13).

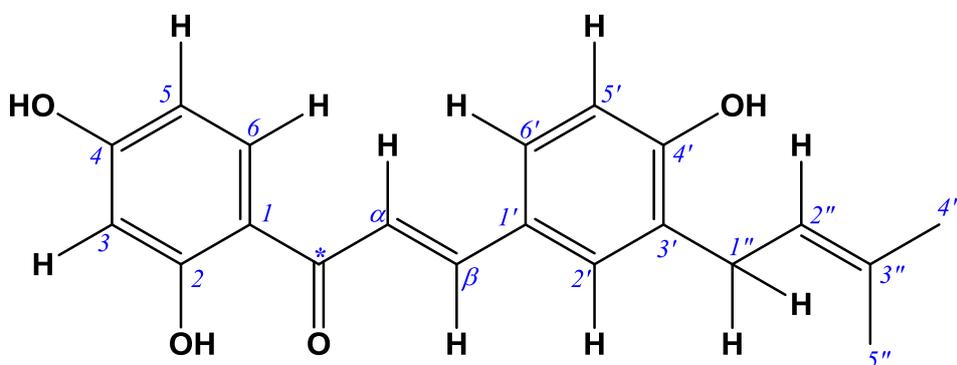


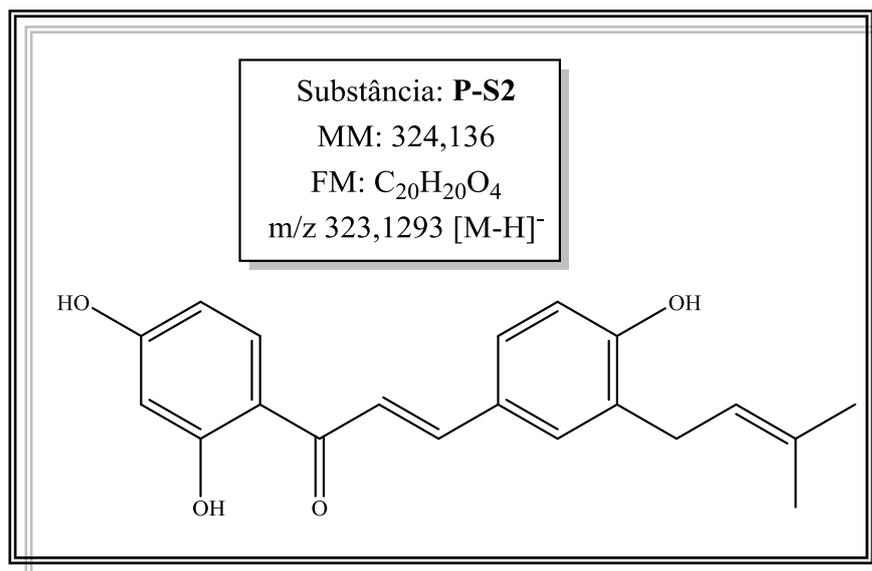
Figura 60. Estrutura da chalcona- **P-S2**

Tabela 13. Dados de RMN (CDCl₃, 500 MHz) da chalcona P-S2 em comparação com os dados da literatura.

N ^o	δ ¹ H (mult. J, Hz)	δ ¹³ C	** δ ¹ H (mult. J, Hz)	** δ ¹³ C	COSY	HMBC
1	-	114,01	-	114,2	-	-
2	-	166,37	-	165,2	-	-
3	6,40 (s), 1H	103,52	-	-	-	114,01; 107,99;163,69; 166,37
4	-	163,69	-	-	-	-
5	6,42 (d, 8,58), 1H	107,99	6,49 (d, 8,8)	109,3	7,81	114,01; 103,52
6	7,81 (d, 8,58), 1H	131,84	8,02 (d, 8,8)	130,8	6,42	163,69; 166,37
*	-	192,03	-	193,0	-	-
α	7,41(d, 15,37), 1H	117,5	7,77 (d, 15,0)	118,3	-	192,03; 127,95; 127,42
β	7,82 (d, 15,37), 1H	144,75	7,85 (d, 15,0)	145,0	7,41	192,03; 127,95
1'	-	127,95	-	127,5	-	-
2'	7,40 (dd, 8,25 e 2,1), 1H	127,95	7,73 (d, 8,8)	131,7	-	144,75; 128,27
3'	-	130,87	-	-	-	-
4'	-	157,01	-	-	-	-
5'	6,82 (d, 8,5), 2H	116,13	6,93 (d, 8,8)	116,7	7,42	157,16; 127,42
6'	7,42 (d, 8,25), 1H	128,27	7,73 (d, 8,8)	131,7	7,81	127,95
1''	3,38 (d, 7,03), 1H	29,35	3,41 (d, 7,2)	22,4	5,34	157,16; 121,32; 135,03
2''	5,34 (m, 7,03), 1H	121,32	5,27 (t, 7,2)	122,2	3,38	29,35; 25,83; 17,95
3''	-	135,03	-	134,0	-	-
4''	1,79 (s), 3H	17,95	1,72 (s)	17,8	-	135,03; 121,32; 25,83
5''	1,78 (s), 1H	25,83	1,74 (s)	25,8	-	25,83

Legenda:**Comparação com dados da literatura: TORRES, 2000(H; 300 MHz CDCl₃) e TAKASHIMA, 2005 (H; 500 MHz, Acetona, d₆). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

A análise de massas de alta resolução no modo negativo de **P-S2** evidenciou a presença do pico de maior intensidade em m/z 323,1293, referente a um íon [M-H]⁻, cuja fórmula molecular mais provável é C₂₀H₁₉O₄ (Figura 61). Com isso somando-se as informações já obtidos pelos dados de RMN 1D e 2D, pode-se consolidar a estrutura.



Meas. m/z	#	Adduct	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma
323.1293	1	M-H	C ₂₀ H ₁₉ O ₄	323.1289	-1.2	14.5

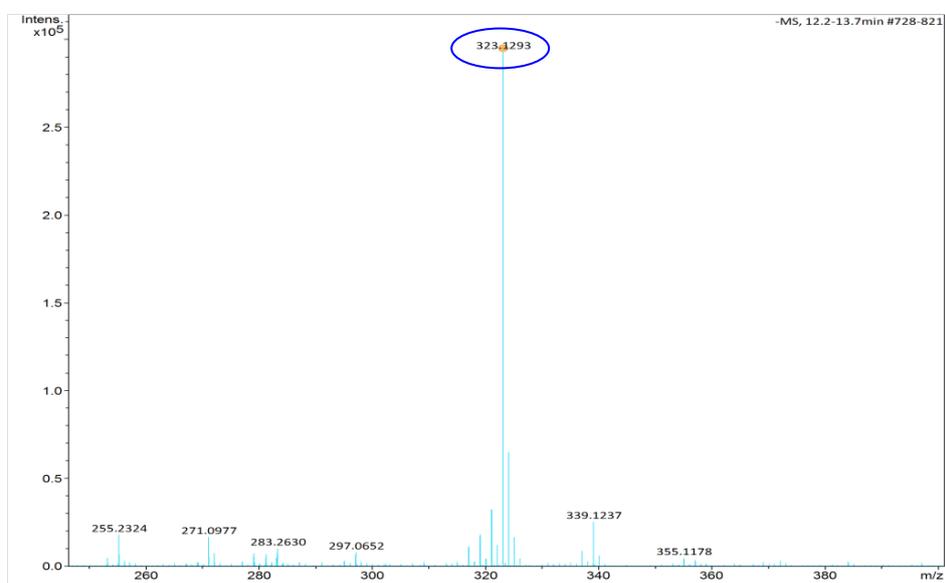


Figura 61. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância **P-S2**

Este íon foi submetido à análise de fragmentação MS² (Figura 62), resultando no pico de m/z 187 [M-H]⁻, como um dos mais intensos assim como o pico de m/z 135 [M-H]⁻. Foi então realizada a proposta de fragmentação para essa substância.

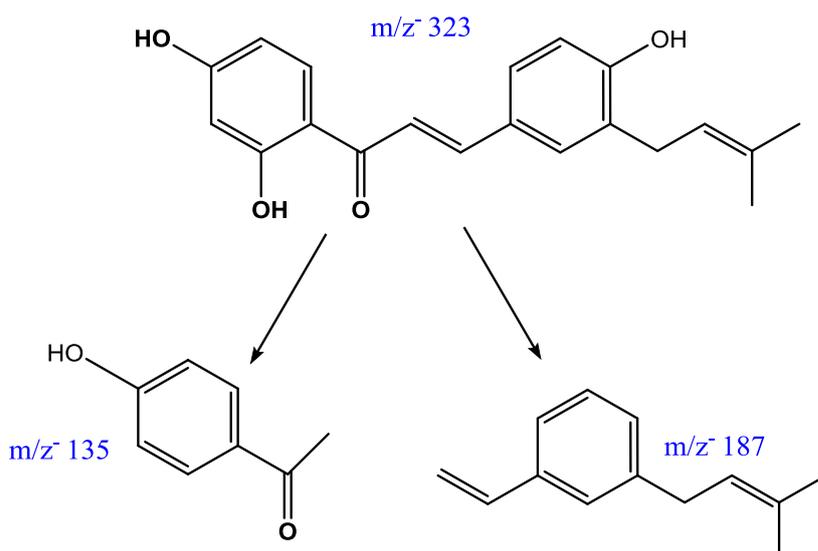
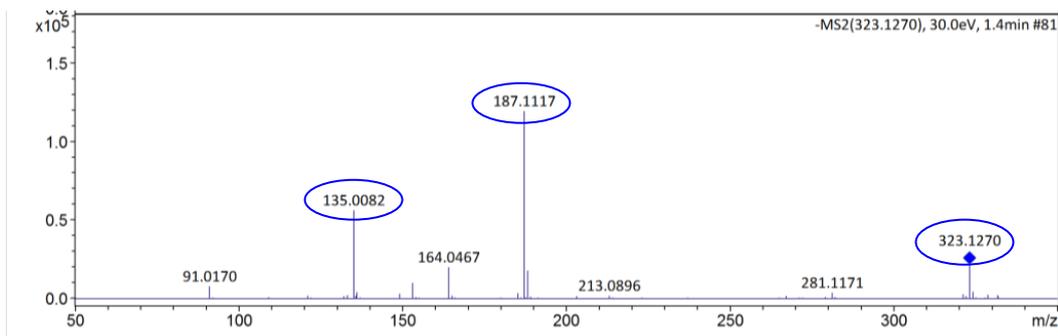


Figura 62. Espectro de MS^2 para o íon 323 $[M-H]^-$ e proposta de fragmentação para a substância **P-S1**.

Após ter sido feita a determinação estrutural da substância, a mesma foi desenhada no Scfinder e revelou que esta substância 2,4,4'-trihidroxi-3'-prenil-chalcona já possui relatos porém a mesma é inédita nessa espécie.

5.3.3.3 Determinação estrutural da substância P-S3

A substância **P-S3** (2,0 mg), apresentou-se como um sólido amorfo com coloração amarela e solubilidade em clorofórmio, foi isolada conforme mostrado no (Fluxograma 11, Página 59). A determinação estrutural foi realizada com base nos dados de RMN unidimensional de ^1H e bidimensional HSQC, HMBC e COSY sendo auxiliados com dados existentes na literatura, os dados de ^{13}C foram obtidos por meio da projeção dos dados bidimensionais.

Na substância **P-S2** foram visualizados sinais característicos a hidrogênios olefínicos. Na estrutura **P-S3** foram observados também sinais desta natureza: δ_{H} 7,41 ppm (H- α ; $J=15,42$) e δ_{H} 7,82 ppm (H- β ; $J=15,42$), indicando a presença do esqueleto característico de uma chalcona.

Baseados nos dados de RMN de ^1H da amostra **P-S3** (Figura 63), pode-se notar sinais característicos a hidrogênios aromáticos com deslocamentos químicos em δ_{H} 7,83 (s); δ_{H} 6,43 (d) e δ_{H} 6,41 (d), assim como os δ_{H} 7,51 (d, $J=8,25$; 2,07); δ_{H} 6,97 (d, $J=8,25$) e δ_{H} 7,32 (d, $J=2,07$); onde foram atribuídos a dois anéis aromáticos existente na estrutura, o anel *A* e *B* respectivamente.

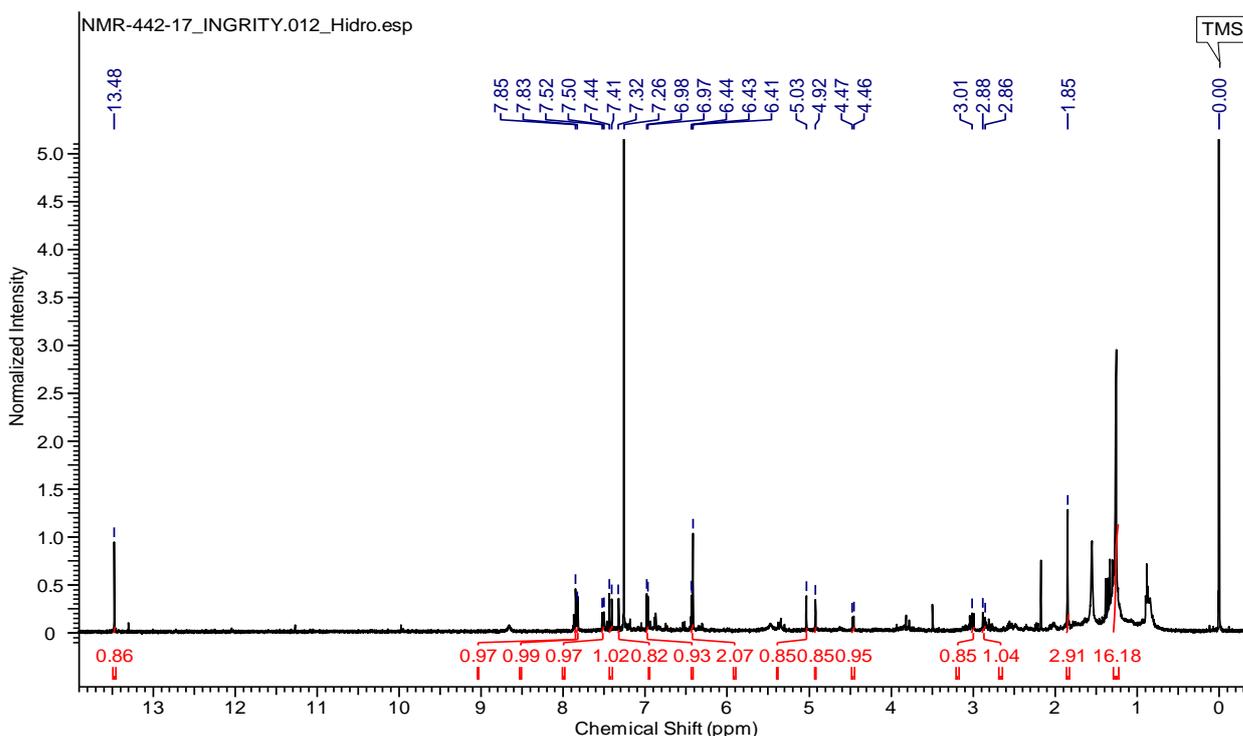


Figura 63. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **P-S3**

Também foi possível observar sinais com deslocamento químicos na região dos compostos alifáticos como os sinais em δ_H 3,01; 2,88 (H-1"), 4,46 (H-2"), 5,03; 4,92 (H-5") e um singlete em 1,84 (H-3") integrando para 3H, indicando a presença de uma metila. Foi realizada a análise de HSQC para a substância **P-S3**, visando a determinação dos carbonos ligados aos hidrogênios da estrutura, como pode ser visto na Figura 64.

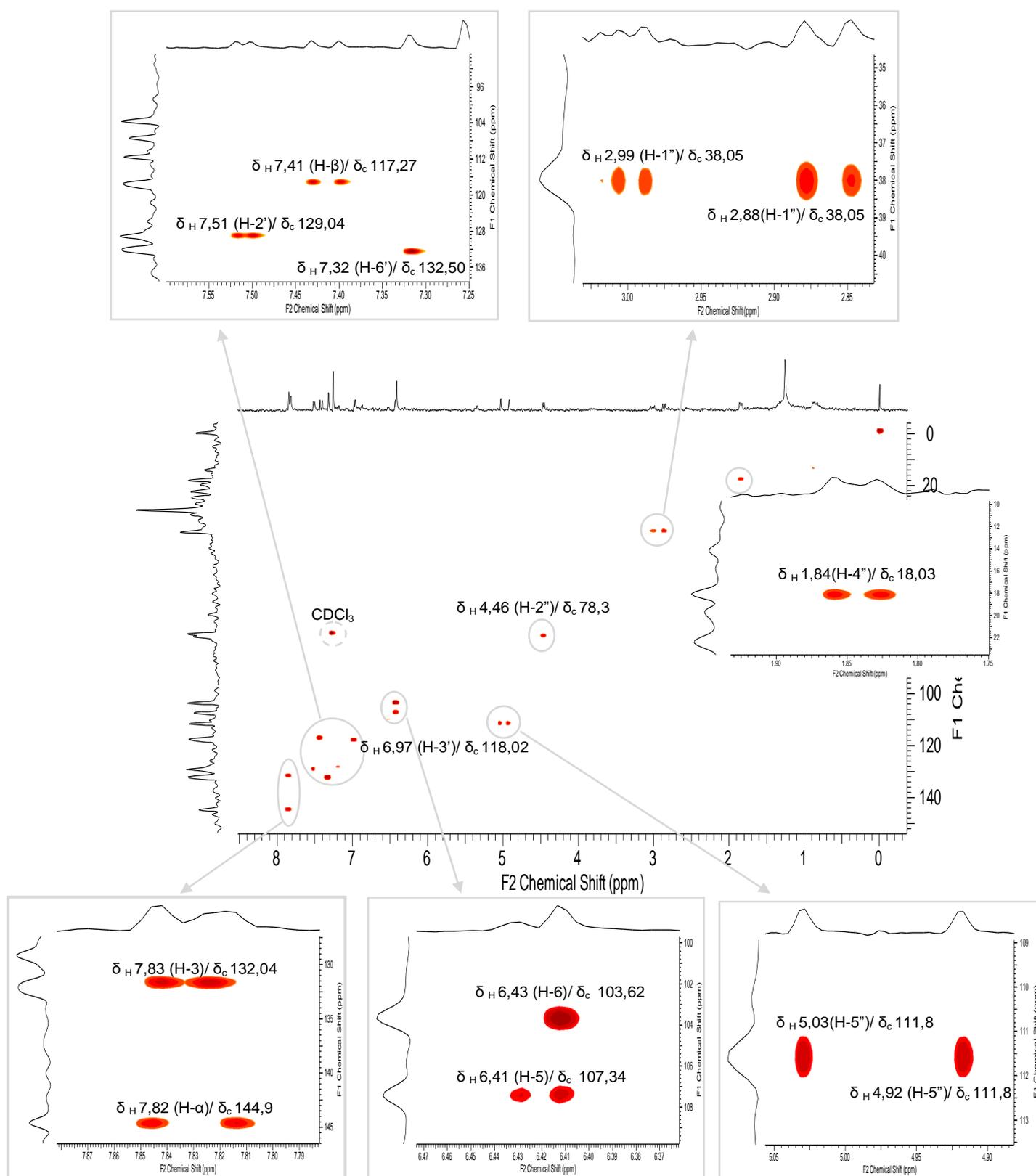


Figura 64. Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observados no espectro de HSQC (500 MHz, CDCl_3) para a substância **P-S3**

Com os dados de HMBC (Figura 65), foi possível visualizar as correlações a longa distância dos hidrogênios com os carbonos ao longo da estrutura e assim consolidar a estrutura proposta:

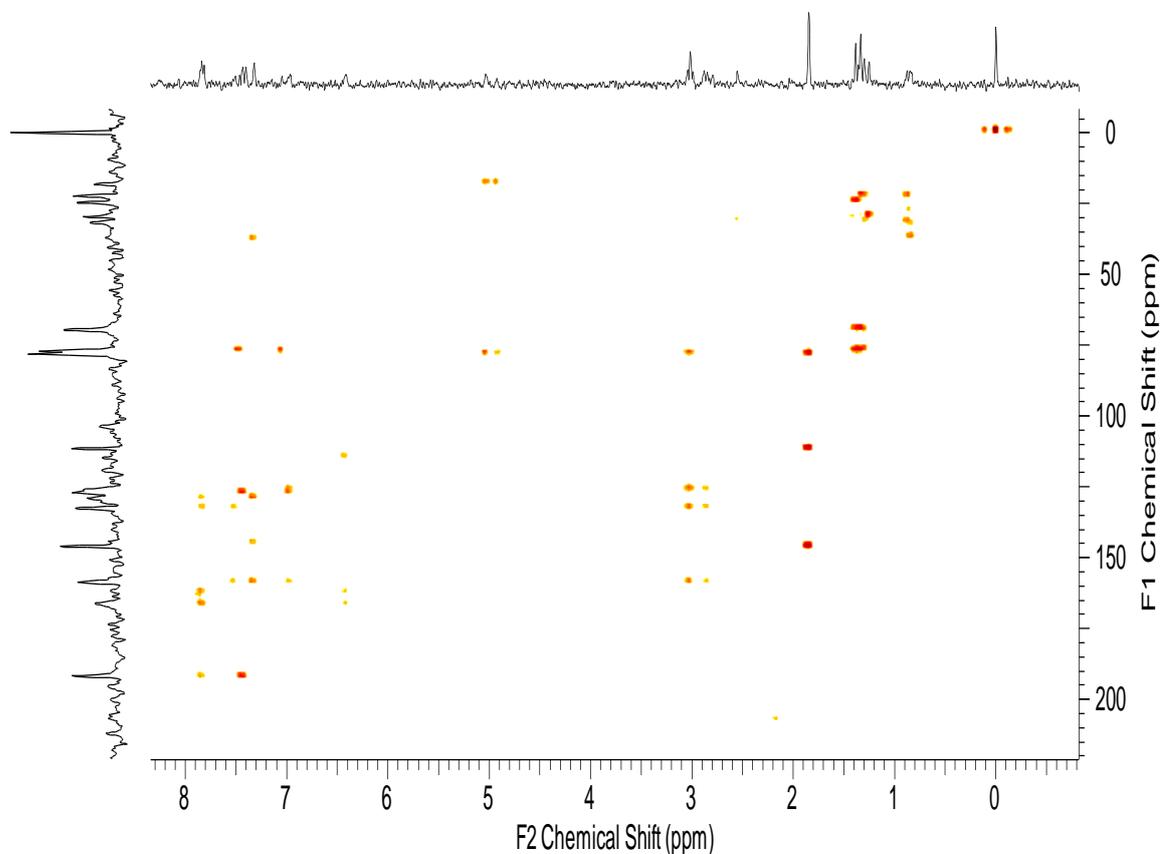
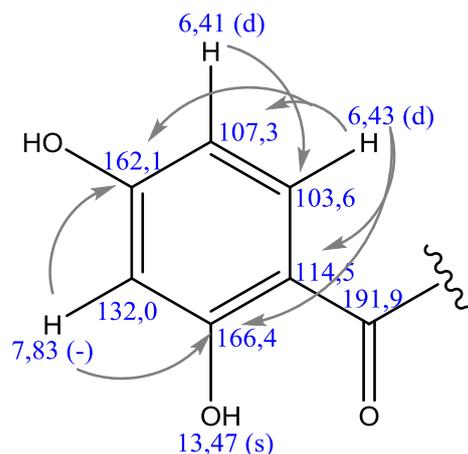
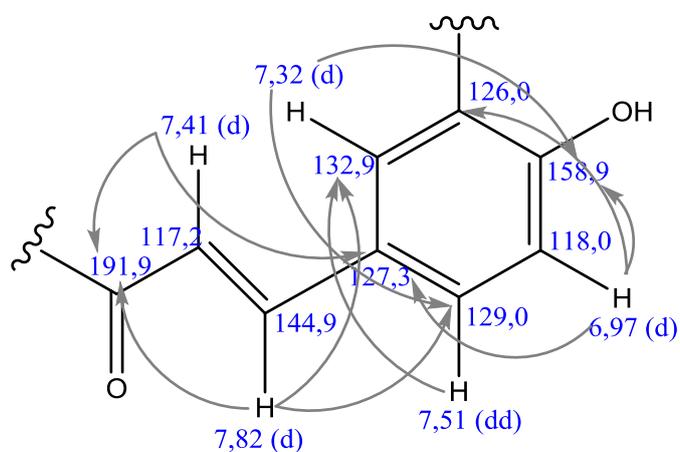


Figura 65. Correlação heteronucleares observados no experimento de HMBC (500 MHz, CDCl_3) da substância **P-S3**.

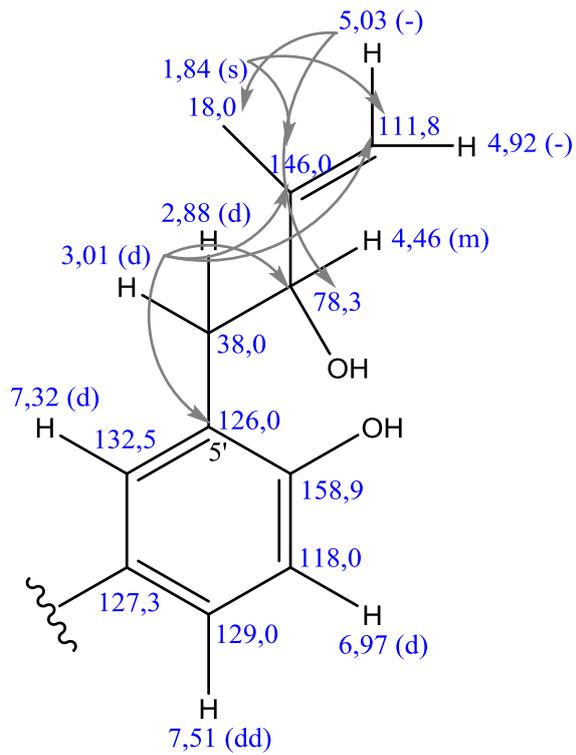
As correlações observadas permitiram posicionar os substituintes no anel A. Pode-se atribuir a correlação do hidrogênio δ_{H} 7,83 com os carbonos δ_{C} 166,4 e 162,1; δ_{H} 6,43 com δ_{C} 114,5; 166,4; 162,1 e 107,5; δ_{H} 6,41 com 103,6. O deslocamento químico em δ_{H} 13,47 oriundo de alguma hidroxila correlacionando-se com δ_{C} 166,4; 114,5 e 103,6.



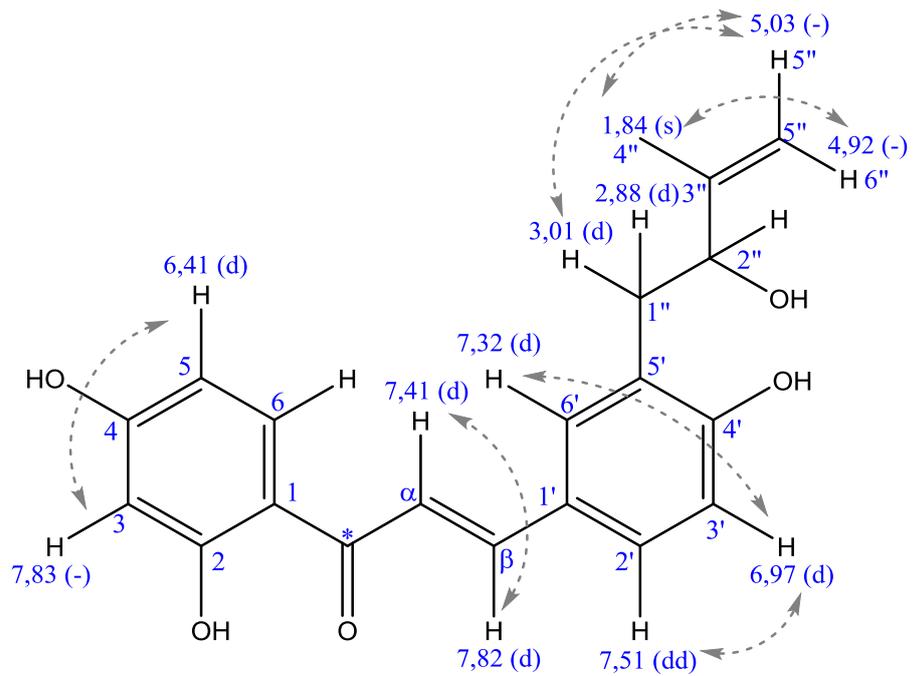
Outras correlações foram verificadas, como o δ_H 7,41 com δ_C 191,8; 127,3; o δ_H em 7,82 com δ_C 191,8; 129,4; 132,9; δ_H 7,51 com δ_C 132,9; δ_H 6,97 com δ_C 127,3; 158,9; 126,0; δ_H 7,32 com δ_C 158,9; 129,4 e 144,6.



Para o posicionamento do grupo alifático (2"-hidroxi-3"metil-3"-butenil) ligado ao anel *B*, sugeriu-se na posição 5'. Uma vez que, foram observados as correlações dos deslocamentos químicos em δ_H 3,01/ 2,88 com δ_C 126,0; 78,2; 158,9; 132,5; δ_H 1,84 com δ_C 111,6; 146,0; 78,2; δ_H 4,92/ 5,03 com δ_C 18,3; 78,2.



Baseados no experimento do COSY (Figura 66), foi possível observar as correlações:



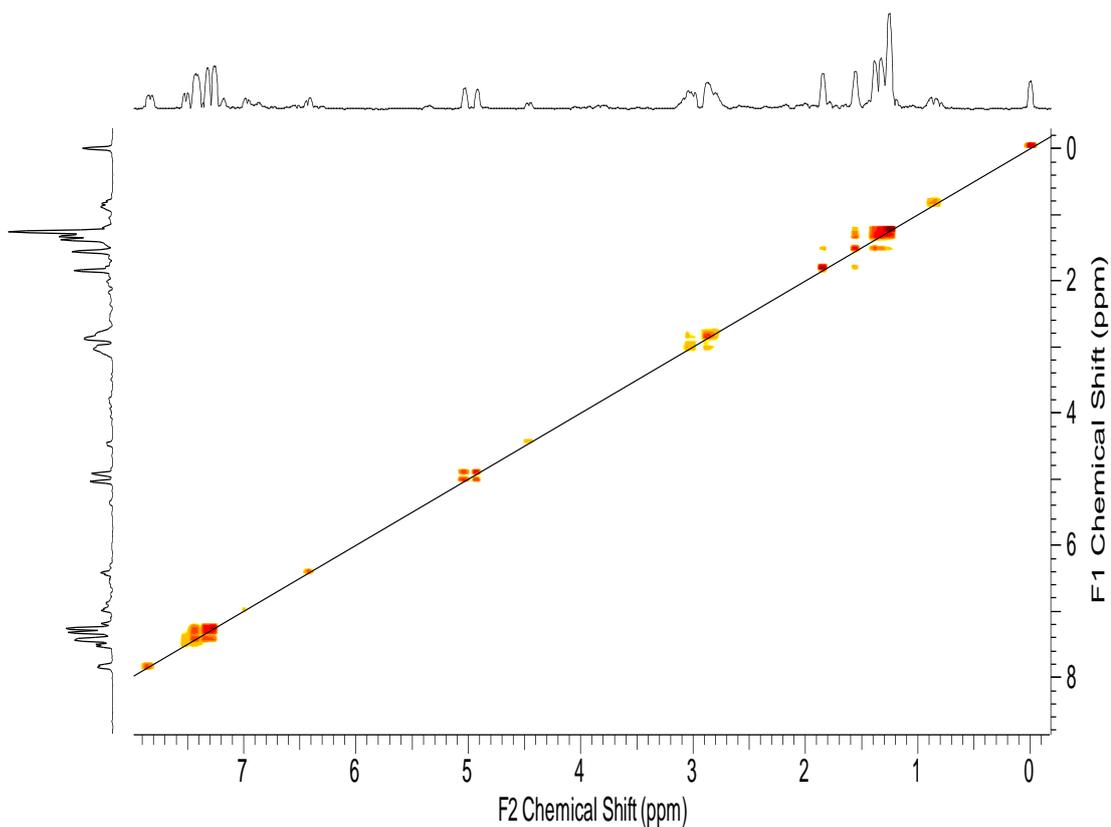


Figura 66. Espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) da substância **P-S3**

Portanto, com base nos dados espectrais de RMN 1D e 2D mencionados acima e descritos na tabela 14, auxiliados por relatos da literatura tem-se a proposta da estrutura (Figura, 67) abaixo:

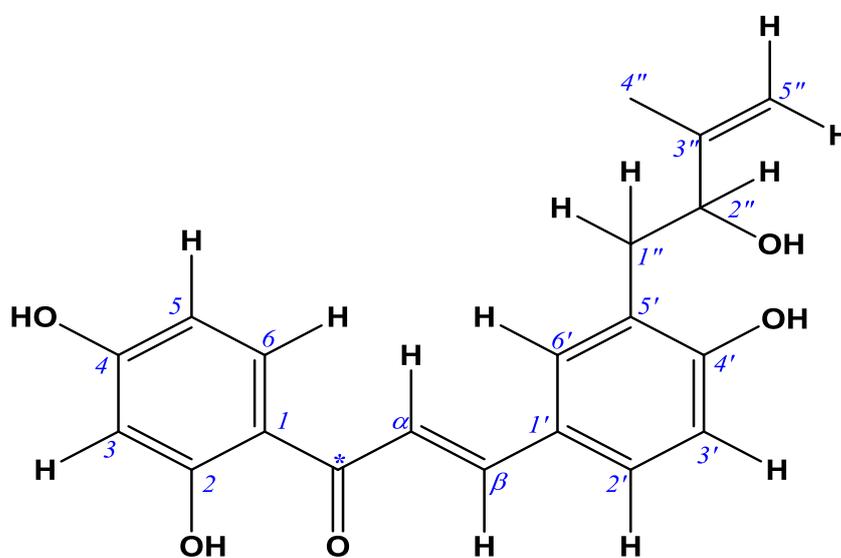


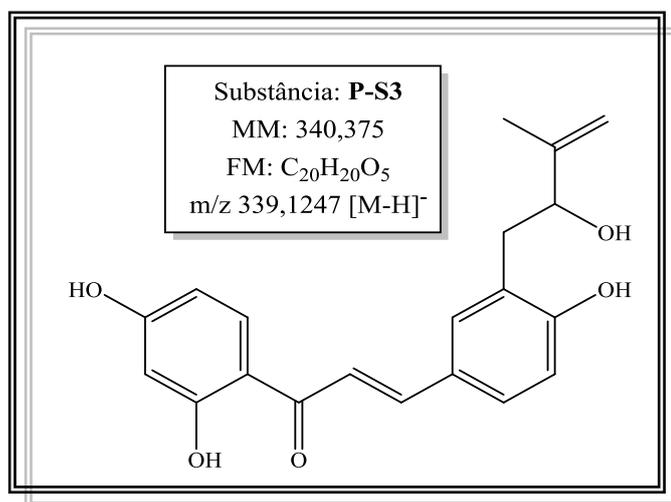
Figura 67. Estrutura da chalcona **P-S3**

Tabela 14. Dados de RMN (CDCl₃, 500 MHz) da chalcona **P-S3** em comparação com os dados da literatura.

N ^o	δ ¹ H (mult. J, Hz)	δ ¹³ C	** δ ¹ H (mult. J, Hz)	** δ ¹³ C	COSY	HMBC
OH	13,47 (s)	-	-	-	-	166,4; 114,5; 103,6
1	-	114,5	-	114,2	-	-
2	-	166,4	-	-	-	-
3	7,83 (-)	132,0	-	165,2	6,41	166,4; 162,1
4	-	162,1	8,02 (d, 8,8)	130,8	-	-
5	6,41 (d, -)	107,3	-	-	-	103,6
6	6,43 (d, -)	103,6	6,49 (d, 8,8)	109,3	-	114,5; 166,4; 162,1; 107,3
*	-	191,9	-	193,0	-	-
α	7,41 (d, 15,42)	117,2	7,77 (d, 15,0)	118,3	7,82	191,9; 127,3
β	7,82 (d, 15,42)	144,9	7,85 (d, 15,0)	145,0	7,41	191,9; 129,0; 132,9
1'	-	127,3	-	127,5	-	-
2'	7,51 (dd, 8,25; 2,07)	129,0	7,73 (d, 8,8)	131,7	6,97	132,9
3'	6,97 (d, 8,25)	118,0	6,93 (d, 8,8)	116,7	-	127,3; 158,9; 126,0
4'	-	158,9	-	-	-	-
5'	-	126,0	-	-	-	-
6'	7,32 (d, 2,07)	132,9	7,73 (d, 8,8)	131,7	6,97	158,9; 129,0; 144,6
1''	3,01 (m), 2,88(m)	38,0	2,92 (m)	38,9	5,03	126,0; 78,3; 158,9; 132,5
2''	4,46 (m)	78,3	4,30 (m)	77,1	-	-
3''	-	146,0	-	148,5	-	-
4''	1,84 (s)	18,0	1,82 (s)	18,3	5,03	111,8; 146,0; 78,3
5''	5,03 (m), 4,92 (m)	111,8	4,79, 4,99 (m)	110,7	1,84	18,3; 78,3

Legenda:**Comparação com dados da literatura: TAKASHIMA, 2005 (H; 500 MHz, Acetona, d₆) e LI, 2002(Acetona, d₆). (δ) Deslocamento químico em ppm.

Com base na análise de massas de alta resolução no modo negativo de **P-S3** revelou a presença do pico de maior intensidade em m/z 339,1247 [M-H]⁻, referente a um íon desprotonado, cuja formula molecular mais provável é C₂₀H₁₉O₅ (Figura 68). Com isso somando-se as informações já obtidos pelos dados de RMN 1D e 2D, pode-se consolidar a estrutura da substância proposta:



Meas. m/z	#	Adduct	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma
339.1247	1	M-H	C ₂₀ H ₁₉ O ₅	339.1238	-2.8	12.0

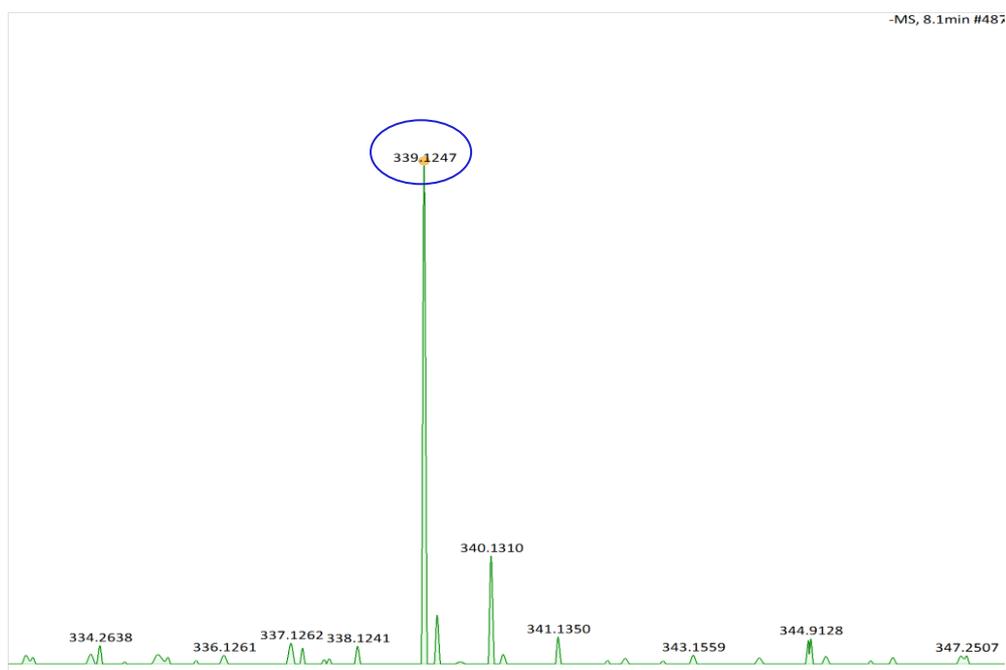


Figura 68. Espectro de massas no modo negativo de ionização da substância **P-S3**

Este íon foi submetido à análise de fragmentação MS² (Figura 69), onde foi possível observar uma elevada perda de 136Da, resultando no pico de m/z 203 [M – H]⁻ e um dos picos mais intensos em m/z 137 [M – H]⁻. Abaixo podem-se observar a proposta de fragmentação para esses íons.

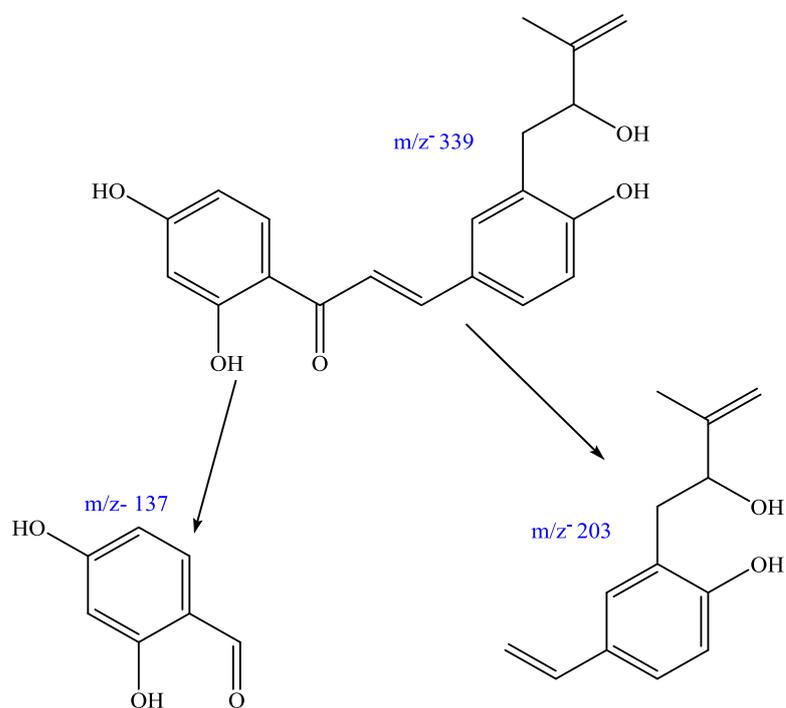
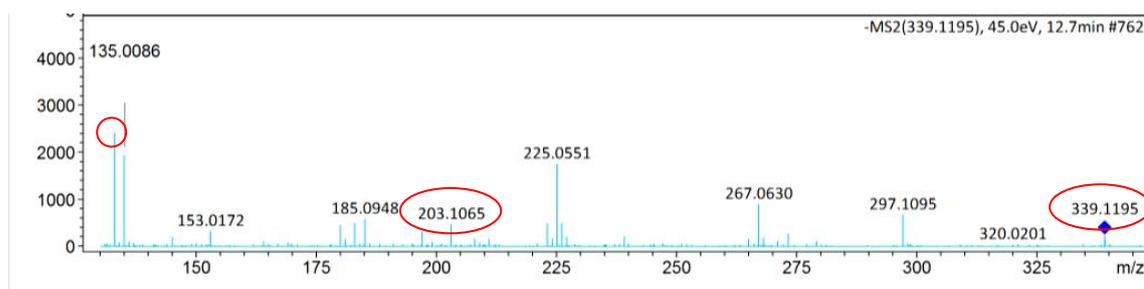


Figura 69. Espectro de ms^2 para o íon 339 [M-H] e proposta de fragmentação.

Por meio dos dados obtidos de RMN 1D e 2D, auxiliados com dados de massas de alta resolução e MS^2 evidenciou que a substância **P-S3** é uma chalcona. Baseados nos levantamentos bibliográficos da literatura e nas bases de dados do Scfinder evidenciou que a substância não possui relatos, em contra partida mostrou que já há relatos de chalconas no gênero *brosimum*. Portanto, sugere-se como nome segundo regras da IUPAC como sendo a *2,4,4'-trihidroxi-5'-(2"-hidroxi-3"-betil-butenil)-chalcona*.

5.3.4 Análise por CLAE-DAD-EM

A análise das frações **AGF 04** (Fluxograma 8, Página 54) foi realizada por CLAE-DAD-EM, onde foi possível obter o cromatograma com resolução, após inúmeras modificações no método de separação tais como gradiente, concentração das fases móveis e/ou aditivos ácidos, colunas cromatográficas ou mesmo tempo de análise cromatográfica.

Com isso, foi conseguido o cromatograma da Figura 70. O pico cromatográfico majoritário com t_R 24,42 min foi isolado em escala semipreparativa e apresentou espectro de UV com absorção máxima em ≈ 260 e ≈ 301 nm, que é característico a cromóforos provenientes de substâncias fenólicas. O pico apresentou o íon m/z 527 $[M-H]^-$ e 529 $[M-H]^+$ pela análise do massas de baixa resolução (Figura 71), que foi codificado como **H-S1**, sendo submetido a identificação estrutural pela análise de RMN.

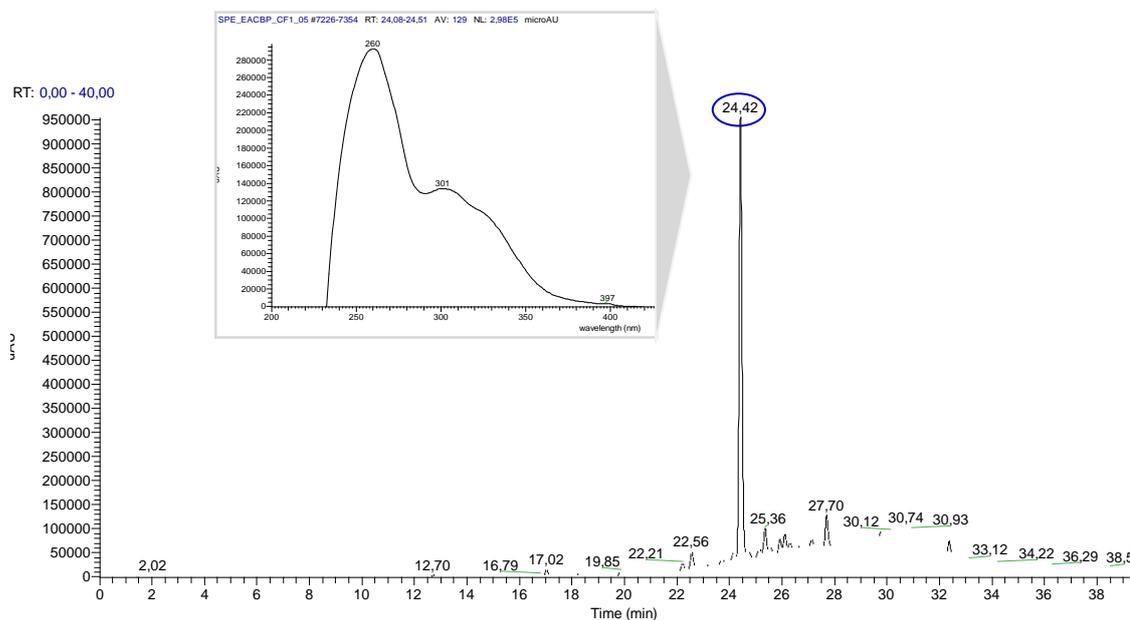


Figura 70. Cromatograma registrado em 200-400 nm obtidos a partir da análise por CLAE-DAD-MS para a fração AGF 04 proveniente da casca do *B. parinarioides*.

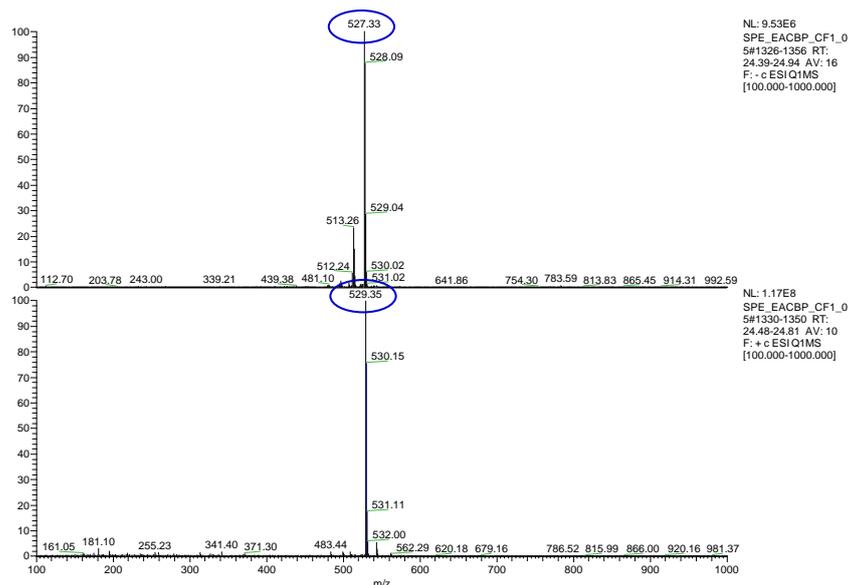


Figura 71. Espectro de massas obtido do pico de t_R 24,42 (substância H-S1)

Foram desenvolvidas metodologias de separação para as frações **M5-CC1-05-B** e **M5-CC1-05-A**, provenientes do **MGF 03** (Fluxograma 12, Página 60). As análises destas frações foram realizadas por CLAE-DAD-EM, obtendo-se os cromatogramas da figura **72**.

Os picos cromatográficos com tempo de retenção igual a t_R 15,91; t_R 15,86; t_R 18, 87 e t_R 20,06 min, foram isolados em escala semipreparativa apresentando espectros de UV com absorção máxima em torno de \approx 260-400 nm que podem ser característicos de cromóforos de substâncias fenólicas (Tabela **15**).

Tabela 15. Informações relevantes para as substâncias isoladas por CLAE semipreparativo.

Fração	Código Substâncias	Pico t_R (min)	λ máx (nm)	m/z	m/z	m/z^-	MS ² [M-H] ⁻
				[M-H] ⁻	[M-H] ⁺	Q-TOF	
AGF 03	H-S1	15,91	260-301	527	529	527,1708	527, 512, 495, 411
	H-S2	13,52	318-393	447	449	447,0740	447, 429, 403, 323, 283
	H-S1	15,86	260-301	527	529	527,1708	527, 512, 495, 411
	H-S3	18, 87	261-302	511	513	511,1807	511,496, 466, 430, 331
	H-S4	20,06	261-307	515	517	515,1720	515, 477, 323, 297

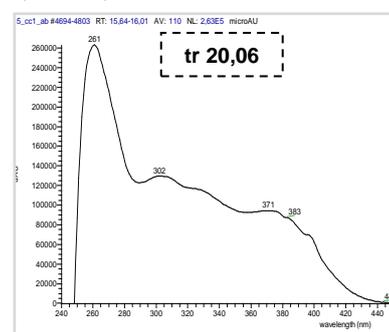
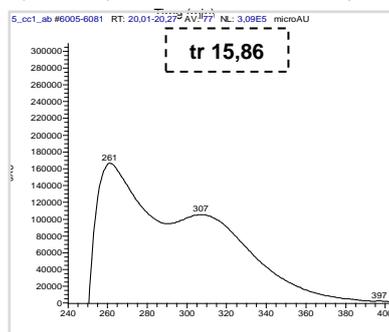
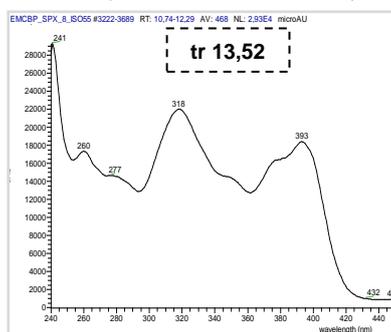
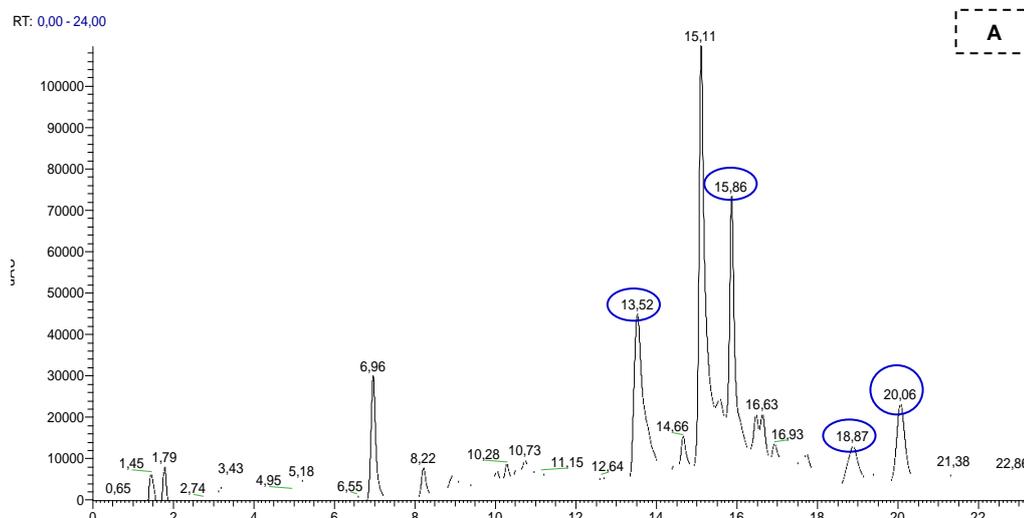
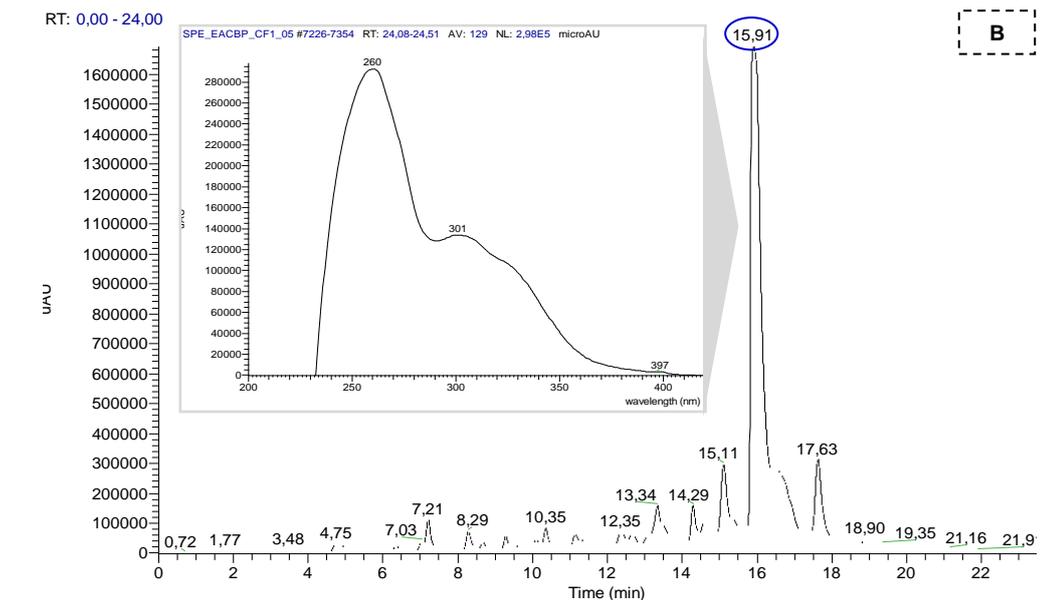


Figura 72. Cromatograma registrado em 200-400 nm obtidos a partir da análise por CLAE-DAD-MS para as frações M5-CC1-05-B e M5-CC1-05-A da casca do *B. parinarioides*.

Como pode ser observada acima, a substância codificada como **H-S1** apresentou-se de forma majoritária nas diferentes frações da casca de *B. parinarioides* assim como no extrato de acetato de etila (**EACBP**). Várias bases de

dados como Scfinder, MASSBANK, PubChem, ChemSpider foram consultadas para auxiliar na identificação estrutural dessas substâncias mencionadas acima (Tabela 15), porém não foi possível inferir como sendo nenhuma das substâncias já reportadas nesses sites de buscas estruturais. Com base nisso, prosseguiu-se com a análise de elucidação estrutural por meio da técnica de RMN 1D e 2D.

5.3.4.1 Determinação estrutural da substância H-S1

Foram isolados 30,5 mg da substância H-S1 das frações AGF 04 e MGF 03 (Fluxograma 8 e 12, páginas 54 e 60, respectivamente), a mesma apresentou-se de forma amorfa com coloração branca. Analisando-se o espectro de RMN ^1H (Figura 73), Observaram-se os sinais característicos de aromáticos, como a presença de dois dubletos com deslocamentos químicos em δ_{H} 7,19 ppm (d; $J= 8,56$ Hz; 2H) e δ_{H} 6,71 ppm (d; $J= 8,56$ Hz; 2H).

A presença de sinais em δ_{H} 6,47 ppm (d; $J= 15,8$ Hz; 1H) e δ_{H} 5,98 ppm (dd; $J= 15,8$ Hz e 7,80 Hz; 1H), que são característicos a átomos de hidrogênios olefínicos, próximos ao anel aromático. Pode-se dizer que estes hidrogênios estão próximos a um anel ciclizado biossinteticamente por grupos do tipo prenilas, devido à presença dos sinais δ_{H} 3,18 ppm (dd; $J=7,80$ Hz e 7,68 Hz; 1H) e δ_{H} 2,13 (d; $J=7,68$ Hz; 2H) que se encontram vizinhos a três singletos com δ_{H} 5,52 ppm (s, 1H); δ_{H} 3,80 ppm (s, 1H) e δ_{H} 1,73 ppm (s, 1H).

Foi constatado sinais característicos de cumarinas, como a presença de dois dubletos em δ_{H} 9,08 (d; $J= 10,0$ Hz; 1H) e δ_{H} 6,21 (d; $J= 10,0$ Hz; 1H), referentes a hidrogênios do tipo vicinal. O hidrogênio em δ_{H} 9,08 encontra-se menos blindado, devido à possibilidade de conjugação da ligação dupla com a carbonila da lactona.

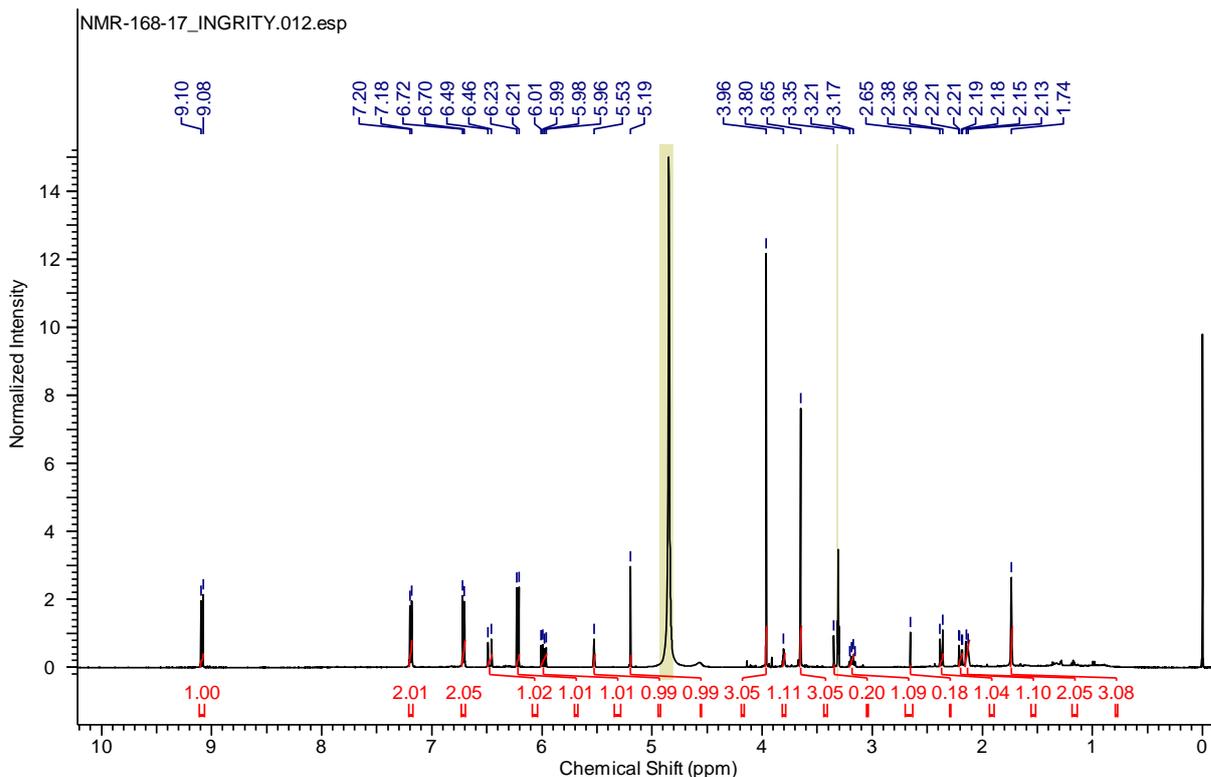
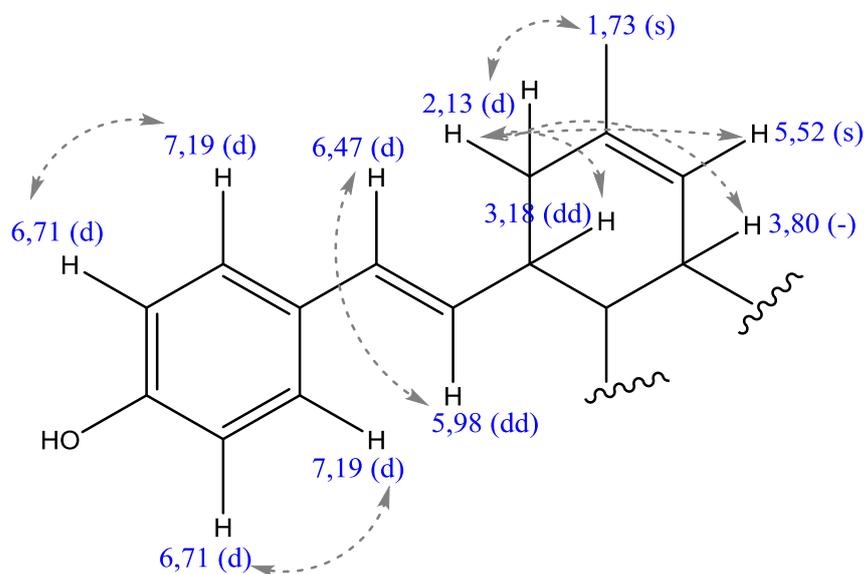


Figura 73. Espectro de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **H-S1**.

No espectro de COSY (Figura 74), foi possível confirmar os acoplamentos entre os prótons de ^1H . Onde o sinal em δ_{H} 7,19 (d) acoplou com δ_{H} 6,71 (d), assim como os sinais em δ_{H} 6,47 (d) com δ_{H} 5,98 (dd); δ_{H} 3,18 (dd) com os hidrogênios δ_{H} 2,13 (d); δ_{H} 5,52 (s); δ_{H} 1,73 (s) e δ_{H} 3,80 (-), como podem ser visualizados abaixo:



Pode-se observar também a correlação dos hidrogênios da cumarina, δ_H 9,08 (d) (d) com δ_H 6,21 (d):

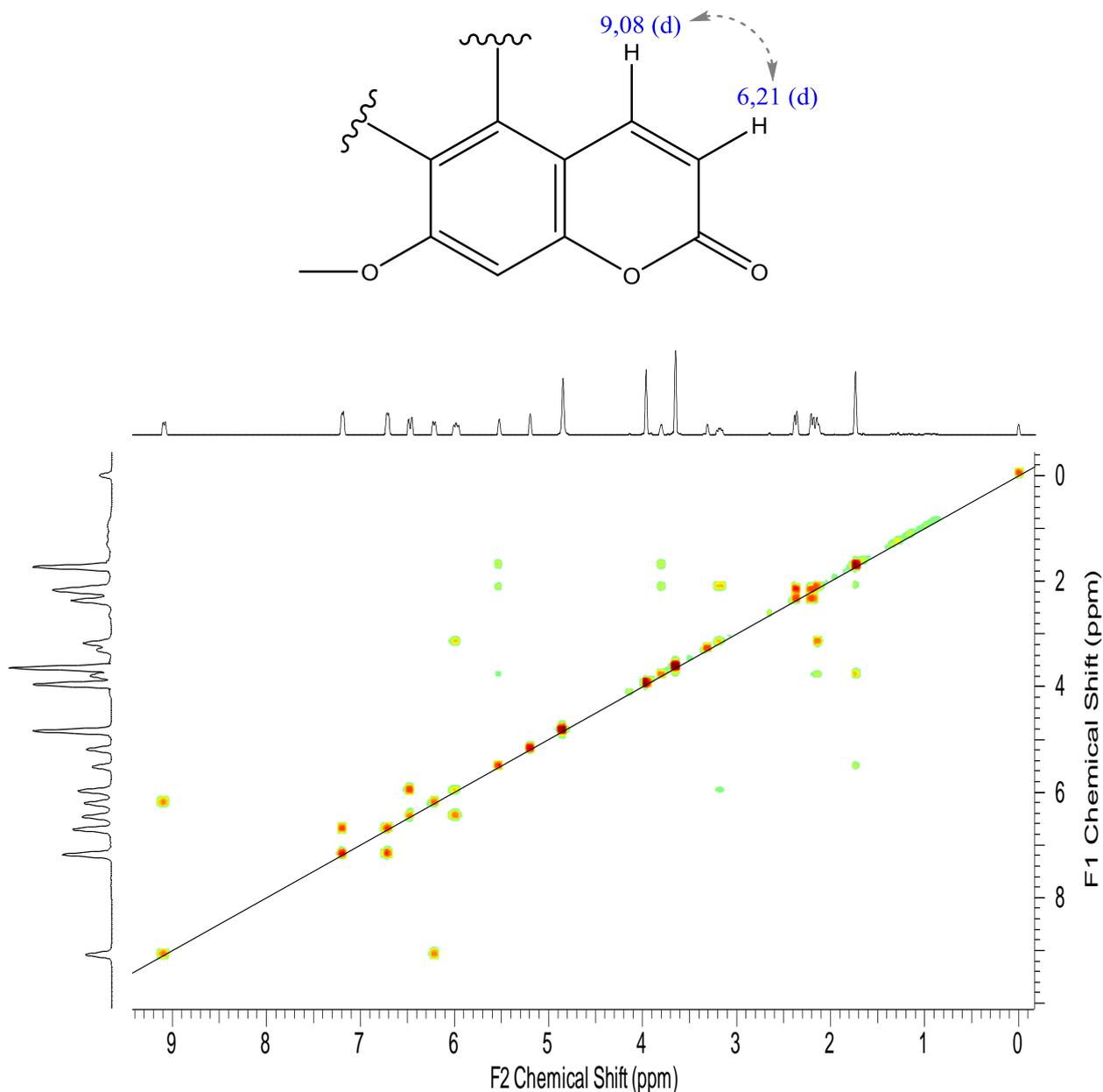


Figura 74. Correlações homonucleares ¹H-¹H visualizadas no experimento de COSY para a substância **H-S1**.

No experimento de carbono ¹³C para a substância H-S1 (Figura 75), foi possível notar a presença de vinte e nove sinais de carbono, portanto pode-se estimar que a estrutura H-S1 possui-a trinta e um átomos de carbono uma vez que

dois átomos de carbono estão duplicados, como foi observado nos dados acima. Dentre eles sinais característicos a carbonos carbonílicos, aromáticos, metilênicos, metínicos e metílicos .

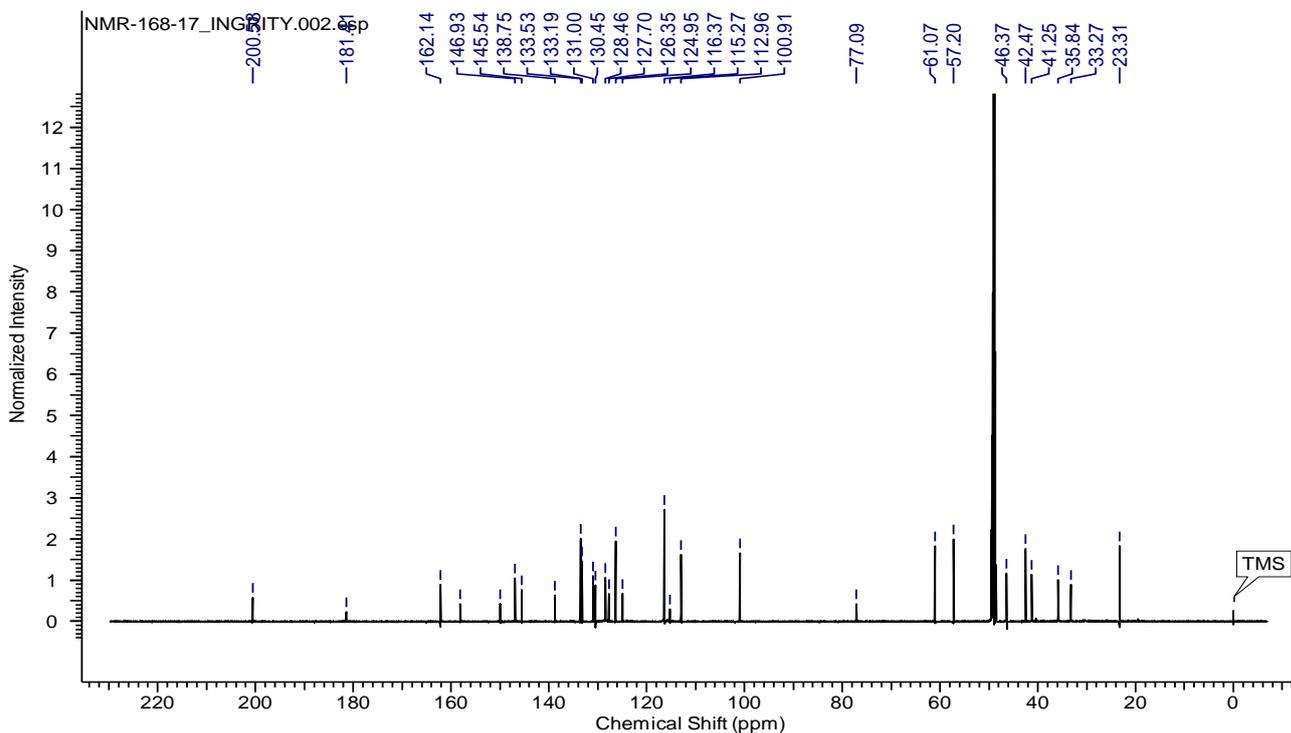


Figura 75. Espectro de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da substância **H-S1**.

No espectro de HSQC, foi possível atribuir à posição de cada hidrogênio correlacionando com o átomo de ^{13}C (J_1), conforme pode ser visualizado na Figura 76.

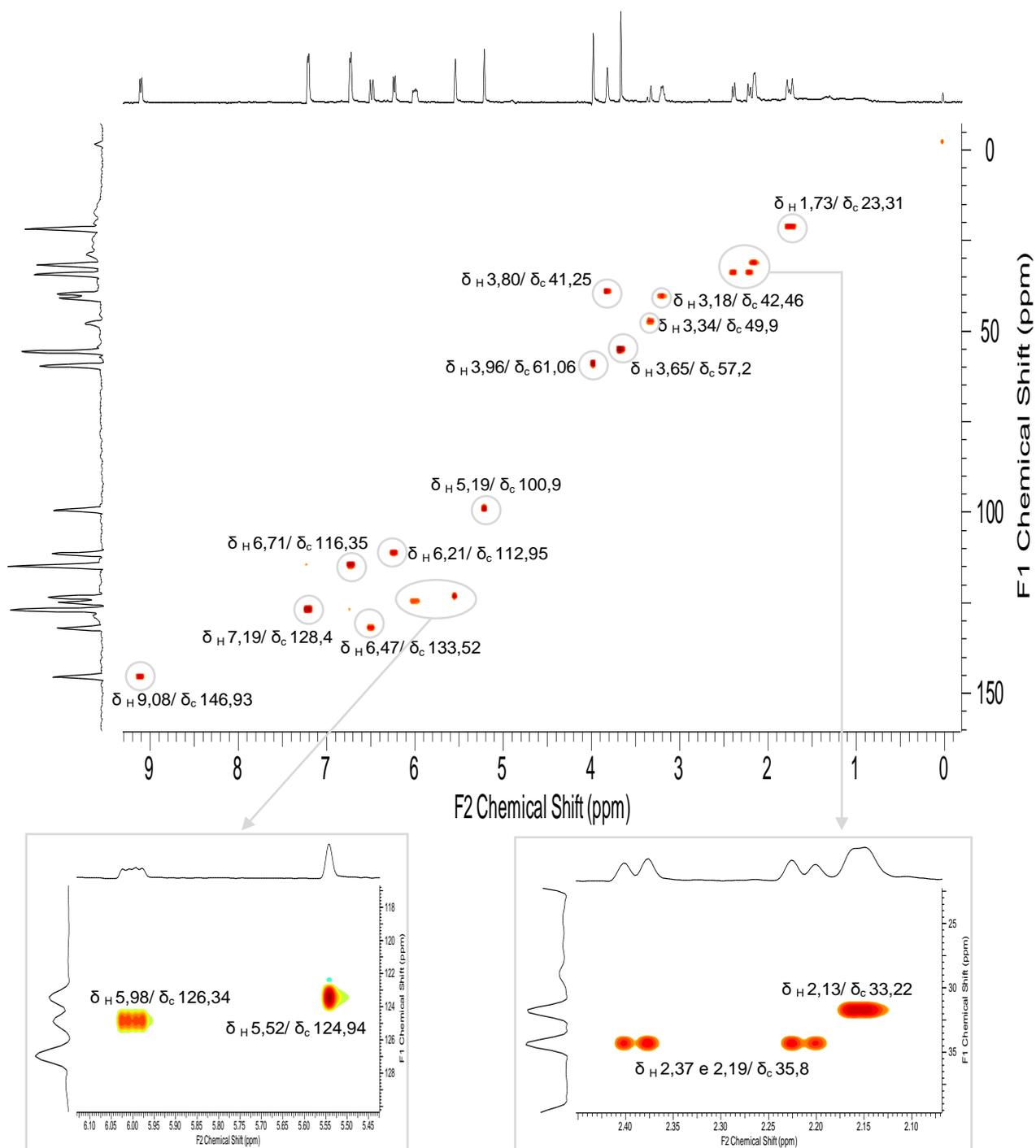


Figura 76. Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C visualizado no espectro de HSQC para a substância H-S1.

No mapa de HMBC (Figura 77), são observadas todas as correlações que corroboram para as propostas de localização de todos os hidrogênios e carbonos ao longo da estrutura.

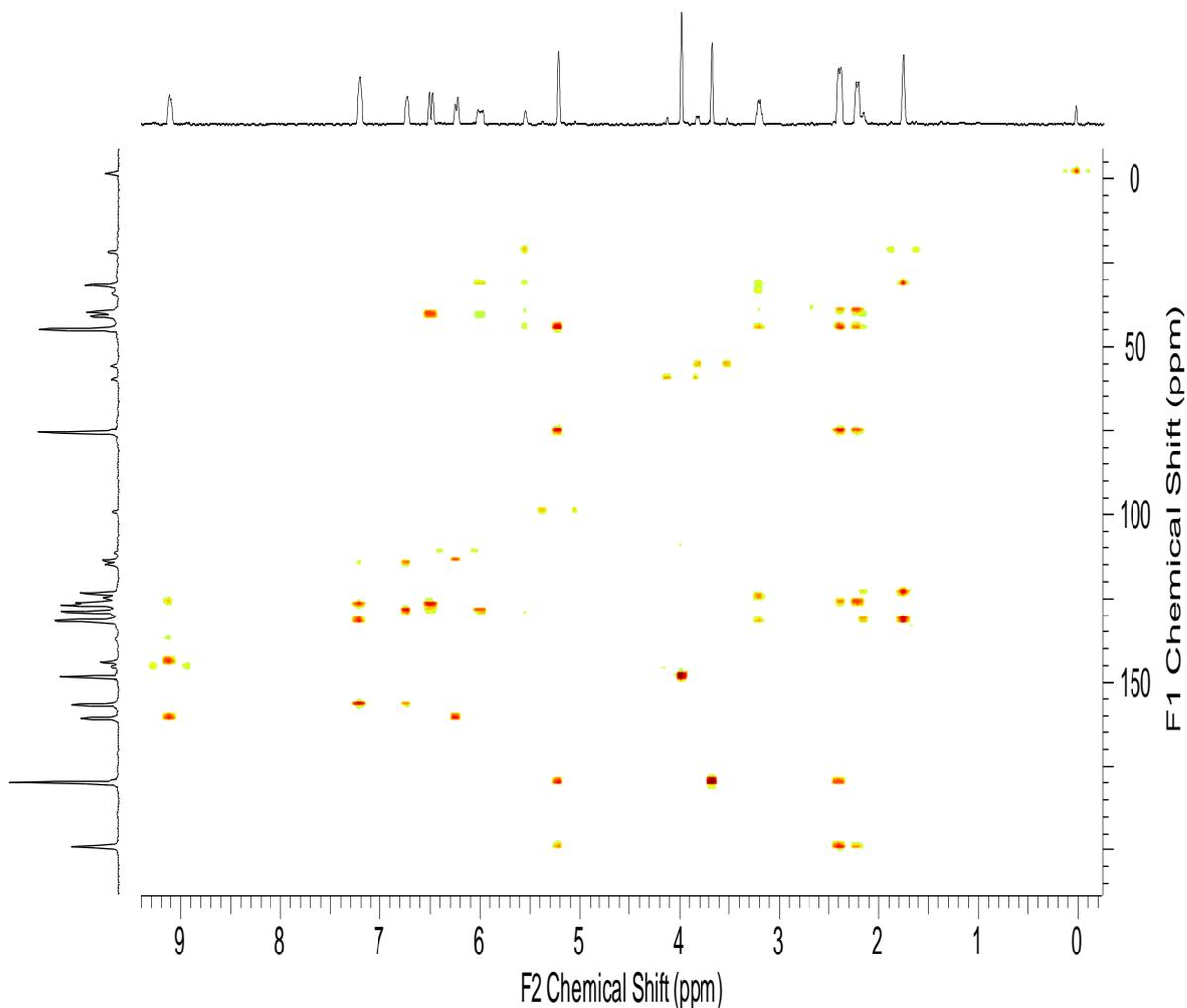
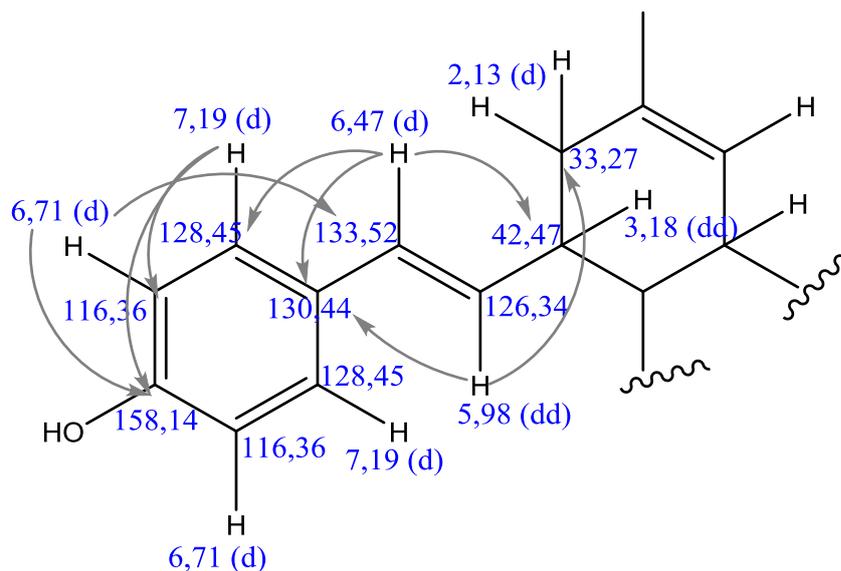
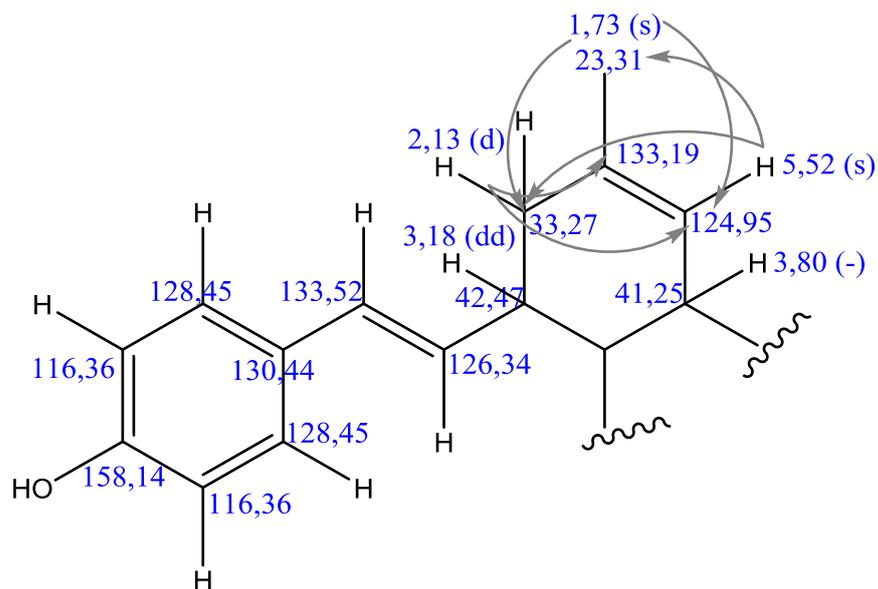


Figura 77. Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C visualizado no espectro de HMBC para a substância **H-S1**.

Com base nos dados de HMBC, acima foi possível consolidar a correlação de alguns sinais como o sinal do hidrogênio em δ_{H} 7,17 (d) que correlacionou com δ_{C} 133,5; 158,14 e 116,3; o δ_{H} 6,71 (d) com δ_{C} 130,44 e 158,14; δ_{H} 6,47 (d) com δ_{C} 133,52; 130,44 e 42,47; δ_{H} 6,71 (d) com δ_{C} 130,44 e 158,1; δ_{H} 5,98 (dd) com δ_{C} 33,27; 130,44, como podem ser visualizado abaixo:



O deslocamento químico de hidrogênio em δ_H 2,13 (d) correlacionou com os carbonos em δ_C 124,95 e 133,19; o sinal em δ_H 5,52 (s) com δ_C 23,31; 33,27 e 46,36; o δ_H 1,73 (s) com δ_C 124,95; 133,19 e 33,27:



O δ_H 9,08 (d) correlacionou com os carbonos em δ_C 162,4; 145,8; 138,9 e 127,7; o sinal em δ_H 6,21 (d) com δ_C 162,4 e 115,26; δ_H 3,96 (s) com δ_C 149,9:

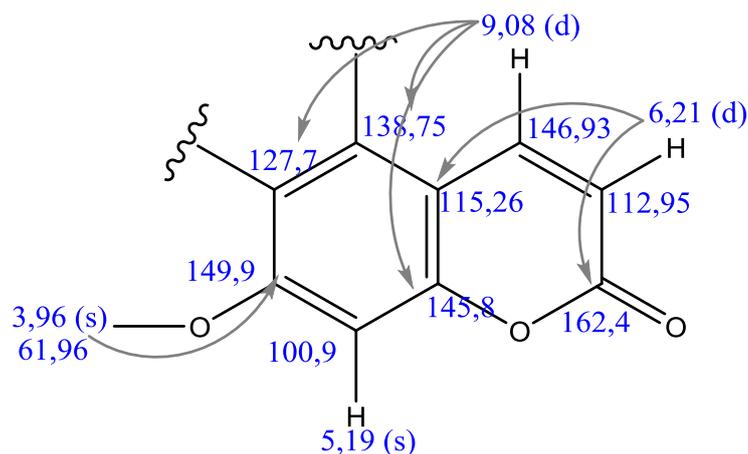


Tabela 16. Dados de RMN (MeOD, 500 MHz) da substância **H-S1**

δ ^1H (mult. J, Hz)	δ ^{13}C	COSY	HMBC
9,089 (d; 10,0) 1H	146,93	6,21	162,4; 145,8; 138,9; 127,7
7,19 (d; 8,56) 2H	128,4	6,71	128,44; 133,5; 158,14; 116,3
6,71 (d, 8,65) 2H	116,35	7,19	116,35; 130,44; 158,14
6,47 (d; 15,8) 1H	133,52	5,98	42,46; 128,44; 130,44*
6,21 (d, 10,0) 1H	112,95	9,08	115,27; 126,14
5,98 (dd; 7,80; 15,82) 1H	126,34	3,18; 6,46	33,27; 130,44
5,52 (s) 1H	124,95	1,73; 2,13; 3,80	23,31; 33,27, 46,36
5,19 (s) 1H	100,9	-	46,3; 77,09; 181,4; 200,05
3,96 (s) 3H	61,06	-	149,9
3,80 (s) 1H	41,25	5,52; 2,13; 1,73	57,20; 61,06
3,64 (s), 3H	57,2	-	181,4
3,34 (s), 1H	49,9	5,19	-
3,18 (dd, 7,80; 18) 1H	42,46	5,98; 2,13	33,27; 35,83; 46,36; 126,3; 133,52
2,37 (d; 12,4) 1H	35,8	2,19	41,25; 46,3; 77,09; 127,70; 200,05; 181,4
2,19 (dd; 1,5; 12,5) 1H	35,8	2,37; 3,80	41,25; 46,3; 77,09; 127,7; 200,5
2,13 (d; 7,68) 2H	33,22	5,52; 3,80; 3,18; 1,73	125,5; 133,5
1,73 (s) 3H	23,31	5,52; 3,80; 2,13	33,27; 125,5; 133,5

(δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

As informações acima (Tabela 16), possibilitaram chegar na estrutura mais próxima para a substância codificada como **H-S1**, cuja fórmula molecular é $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{O}_8$ (Figura 78). Esta substância vai requerer o auxílio de outras análises para que se possa confirmar como de fato estarão organizados os carbonos quaternários na qual foi realizada a proposta na (Figura 79).

Proposta 1-Substância: **H-S1**

MM: 528,178

FM: $C_{31}H_{27}O_8$

m/z 527,1708 $[M-H]^-$

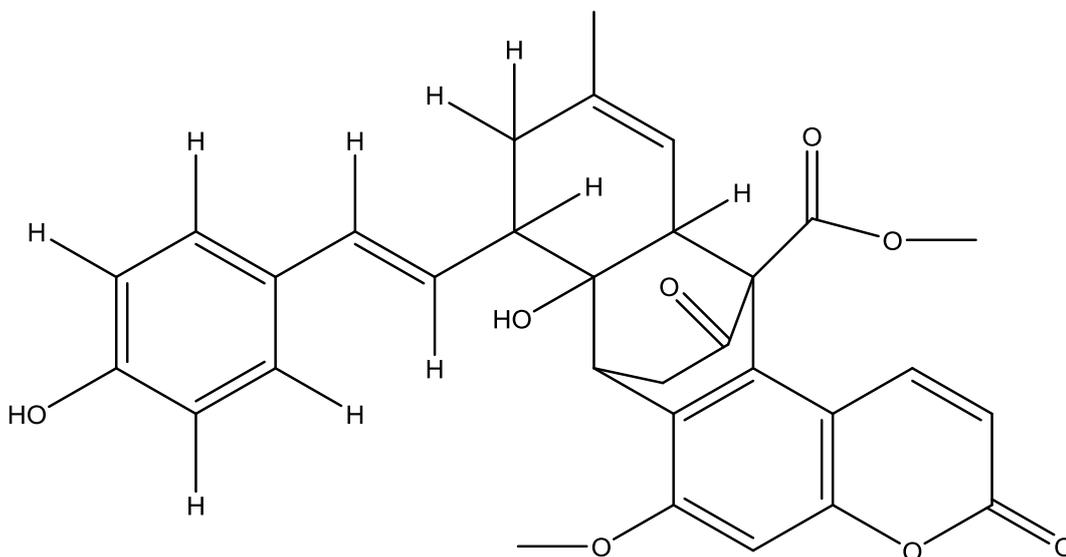


Figura 78. Proposta estrutural mais próxima para a substância **H-S1**.

Meas. m/z	#	Adduct	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma
527.1710	1	M-H	C ₃₁ H ₂₇ O ₈	527.1711	0.2	15.2

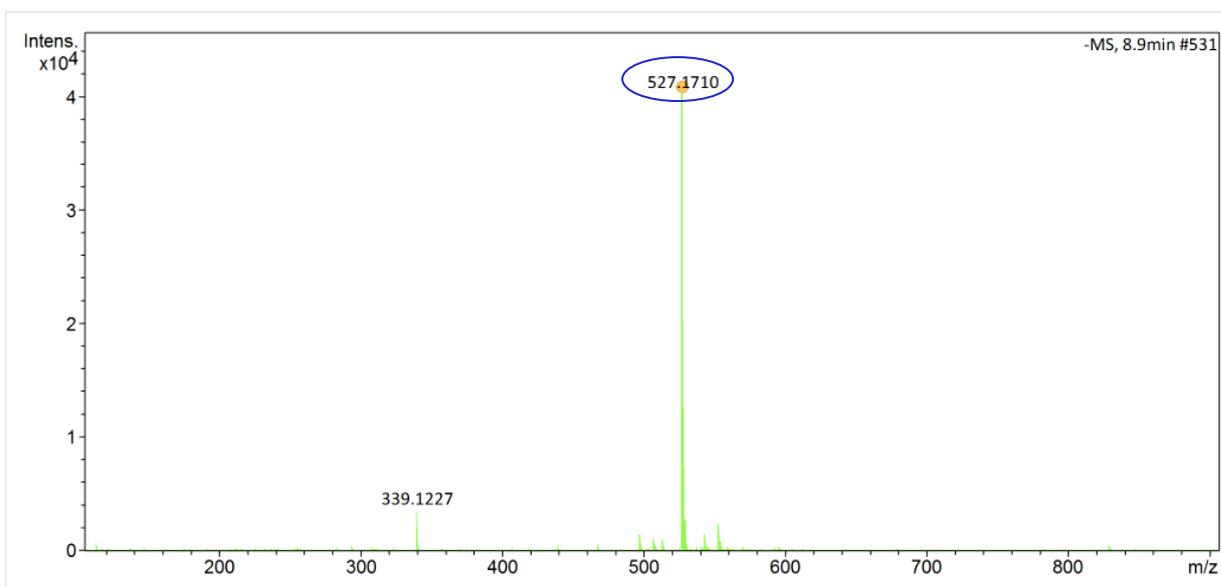


Figura 79. Espectro de massas de alta resolução da substância **H-S1**.

Visando ao máximo o número de informações que pudessem consolidar a verdadeira proposta da substância **H-S1**, foi realizada a análise de infravermelho. O espectro no IV (Anexo), evidenciou uma banda larga de absorção de estiramento entre 3.500 cm⁻¹ e 3200 cm⁻¹, que são estiramentos característicos de grupo hidroxila, uma banda de média intensidade em 1616 cm⁻¹ referentes a alcenos conjugados. Este espectro revelou três bandas em 1228 cm⁻¹, 1150 cm⁻¹ e 1067 cm⁻¹ que indicam há presença de ésteres. Por fim, foi visualizada uma banda em 1440 cm⁻¹ característicos a deformação angular de CH₂.

5.4 ENSAIO BIOLÓGICO DOS EXTRATOS DA CASCA E DO LÁTEX DO *B. parinarioides*

5.4.1 Ensaio citotóxico

A Tabela 17 apresenta os resultados para o teste antitumoral dos diferentes extratos da casca e do látex e as frações do látex. Foram obtidos os valores de IC₅₀ (concentração inibitória média) com respectivo intervalo de confiança de 95% obtido a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com as células **MCF7** (adenocarcinoma de mama humano), **HCT116** (carcinoma de cólon humano), **HepG2** (carcinoma hepatocelular humano), **HL-60** (leucemia promielocítica humana) e **MRC5** (fibroblastos de pulmão humano) obtidos por regressão não-linear com auxílio do programa GraphPad Prisma versão 5.0. A Doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo para o ensaio.

Tabela 17. Valores de IC₅₀ em µg/mL para a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais *versus* não tumorais.

Amostra	Código	IC ₅₀ µg/mL ± D.P				
		MCF7	HCT116	HepG2	HL-60	MRC5
Látex	EMLBP	>50	>50	>50	>50	>50
	Fr.Hex	>50	>50	>50	42,06 35,76 – 49,48	>50
	Fr.Clor	>50	>50	>50	>50	>50
	Fr.Acoet	>50	>50	>50	>50	>50
	Fr.Hidro	>50	>50	>50	>50	>50
Casca	EHCBP	33,37 27,88 – 39,93	30,88 26,36 – 36,19	33,78 29,18 – 39,12	20,89 17,55 – 24,85	>50
	EACBP	>50	>50	>50	28,51 22,84 – 35,58	>50
	EMCBP	>50	>50	>50	45,18 37,23 – 54,97	>50
Controle +	DOX	1,78 0,83 – 3,80	0,11 0,05 – 0,25	0,07 0,03 – 0,15	0,05 0,03 – 0,09	0,68 0,26 – 1,81

Baseado, nos dados de IC₅₀ obtidos, pode-se observar que as amostras que possuem IC₅₀ > 50 µg/mL não são consideradas promissoras. Já as amostras com IC₅₀ < 50 µg/mL revelam atividade antitumoral (SUFFNESS & PEZZUTO, 1990; BOIK, 2001).

Deste modo, todas as amostras testadas não foram tóxicas frente à célula normal **MRC5**, o que representa um resultado positivo para as amostras analisadas. A **Fr.Hex** (42,06 µg/mL) provenientes do látex quanto os extratos: **EACBP** (28,51 µg/mL) e **EMCBP** (45,18 µg/mL) ambos da casca revelaram-se ativas para a célula tumoral **HL-60**. O extrato hexânico da casca do *B. parinarioides* (**EHCBP**) destacou-se, apresentando atividade citotóxica promissora para as diferentes células tumorais: **MCF7**; **HCT116**; **HepG2** e **HL-60**. Tal fato pode ser explicado devido à elevada natureza de compostos terpênicos que estão presente nesse material, que baseados em relatos da literatura corroboram à pronunciada atividade antitumoral com os compostos terpênicos (CAI *et al.*, 2003).

5.4.2 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante

5.4.2.1 Estudo da capacidade de sequestro do radical livre DPPH

Por meio da equação da reta dos gráficos da porcentagem de capacidade de sequestro do radical DPPH em função da série de seis concentrações das amostras e do controle positivo (quercetina), foi estimado os valores de CS_{50} em $\mu\text{g/mL}$ para os extratos do látex e da casca e substâncias isoladas, Tabela 18.

Tabela 18. Resultados da atividade antioxidante pelo radical DPPH.

Amostra	Código	% Inibição	CS_{50} $\mu\text{g/mL} \pm \text{D.P}$
Látex	EMLBP	>50,0 %	$182,13 \pm 0,07$
	Fr.Acoet		$153,89 \pm 0,05$
	Fr.Hidro	<50,0 %	-
Casca	EACBP	>50,0 %	$135,32 \pm 0,08$
	EMCBP		$35,93 \pm 0,02$
	P-S1		$39,4 \pm 0,01$
	P-S2		$44,5 \pm 0,02$
	P-S3	$54,2 \pm 0,01$	
	H-S1	>50,0 %	$15,7 \pm 0,04$
	H-S2		$30,4 \pm 0,02$
	H-S3		$25,6 \pm 0,02$
	H-S4		$27,3 \pm 0,03$
Controle +	Quercetina	86,2 %	$6,05 \pm 0,01$

Com base nos dados obtidos, pode-se notar que as amostras oriundas da casca do *B. parinarioides* apresentam as maiores atividades antioxidantes do que as

amostras provenientes do látex. Já comparando-se as atividades dos extratos da casca: o **EMCBP** (35,93 µg/mL), demonstrou maior atividade do que o **EACBP** (135,32 µg/mL). No que se refere às substâncias isoladas pode-se perceber que todas exibem alta atividade antioxidante, onde a substância **H-S1** (15,7 µg/mL) apresentou maior atividade antioxidante seguido do **H-S3** (25,6 µg/mL) > **H-S4** (27,3 µg/mL) > **H-S2** (30,4 µg/mL) > **P-S1** (39,4 µg/mL) > **P-S3** (15,7 µg/mL) > **P-S2** (44,5 µg/mL).

A atividade antioxidante observada pode ser explicada pela natureza fenólica dos compostos isolados, pois já é descrito inúmeros trabalhos na literatura que relacionam o aumento da atividade antioxidante dos compostos fenólicos por serem moléculas doares de prótons e consequentemente estabilizando o radical DPPH.

5.4.2.2 Estudo da capacidade de sequestro do radical ABTS

Para a avaliação da atividade antioxidante pelo método do ABTS foi necessário construir uma curva padrão, utilizando-se o Trolox como controle positivo. Foi obtido por meio das leituras de absorvâncias em função da concentração (Figura 80).

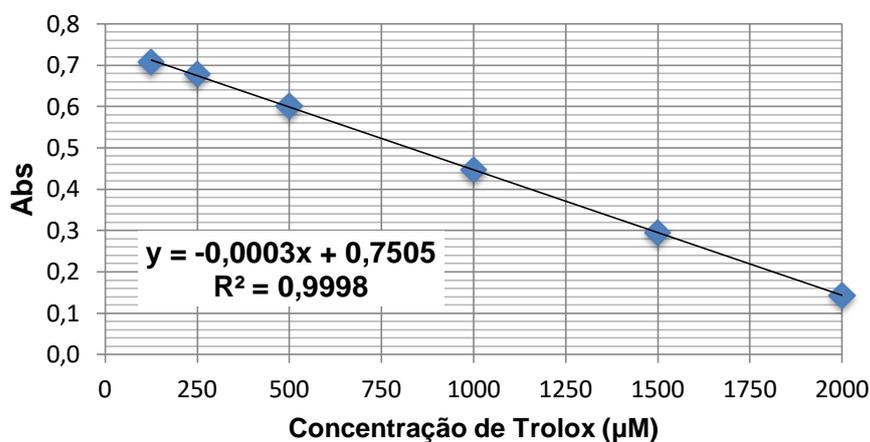


Figura 80. Curva padrão do Trolox em função da concentração em 734 nm.

Com auxílio do gráfico, foi possível determinar a equação da reta $y = -0,0003x + 0,7505$ e obter um bom coeficiente de correlação $R^2 = 0,9998$, ambos obtidos por meio da curva padrão do Trolox. A atividade antioxidante foi determinada e os

resultados dos extratos brutos frente a captura do radical ABTS encontram-se na tabela 19.

Tabela 19. Resultados da atividade antioxidante pelos Valores de **TEAC** (Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox) pelo método ABTS⁺

Amostra	Código	TEAC ($\mu\text{M/g}^{-1}$)	D.P
Látex	EMLBP	289,44	0,04
	Fr.Acoet	426,11	0,05
	Fr.Hidro	589,44	0,03
Casca	EACBP	906,11	0,01
	EMCBP	1920,00	0,02
	P-S1	1200,00	0,03
	P-S2	630,00	0,06
	P-S3	435,12	0,02
	H-S1	2111,44	0,01

Baseado nos dados obtidos revelam-se maiores capacidades antioxidantes os extratos: **EMCBP** (1920,00 $\mu\text{M TEAC g}^{-1}$), seguido do **EACBP** (906,11 $\mu\text{M TEAC g}^{-1}$)> **fr.hidro** (589,44 $\mu\text{M TEAC g}^{-1}$)> **fr.AcoEt** (426,11 $\mu\text{M TEAC g}^{-1}$)> **EMLBP** (289,44 $\mu\text{M TEAC g}^{-1}$). Quanto as substâncias isoladas, exibiram maiores atividades a **H-S1** (2111,44 $\mu\text{M TEAC g}^{-1}$)> **P-S1** (1200,00 $\mu\text{M TEAC g}^{-1}$)> **P-S2** (630,00 $\mu\text{M TEAC g}^{-1}$)> **P-S3** (435,12 $\mu\text{M TEAC g}^{-1}$). Ressalta-se que quanto maior for o valor da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) maior é o potencial antioxidante da amostra.

Com isso, a partir dos resultados antioxidantes obtidos para os diferentes extratos e substâncias tanto pelo método do DPPH quanto o método ABTS, pode-se observar uma boa correlação antioxidante entre os diferentes ensaios o que

corroborar com que essas amostras possuam de fato capacidades sequestrante de radicais livres.

5.4.3 Ensaio de inibição da enzima AChE *in vitro*

No ensaio *in vitro* de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase foi avaliado para os diferentes extratos e substâncias obtidas da casca. A neostigmina foi utilizada como controle positivo para avaliar a eficiência do método utilizado, uma vez que a mesma é utilizada na análise quantitativa da inibição da acetilcolinesterase realizado pelo método de ELLMAN *et al*, 1961. O método é baseado na reação de hidrólise da acetilcolina pela enzima (AChE), produzindo tiocolina a qual reage com o DTNB, para produzir o composto 5-tio-2-nitro-benzoato que possui uma coloração amarela que é característica do ensaio (Figura 82). As reações envolvidas neste ensaio são:

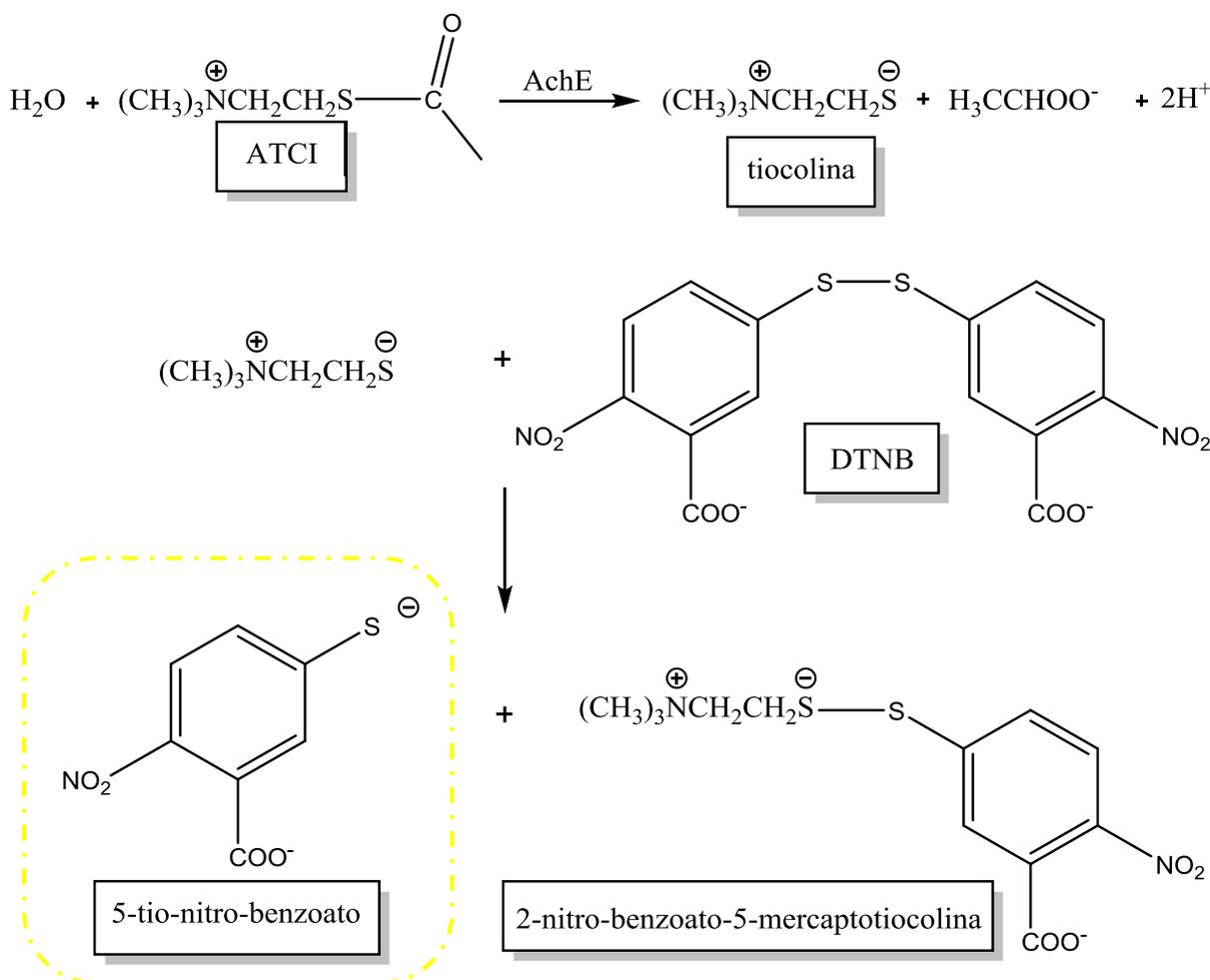


Figura 81. Reações envolvidas no método de Ellman (1961).

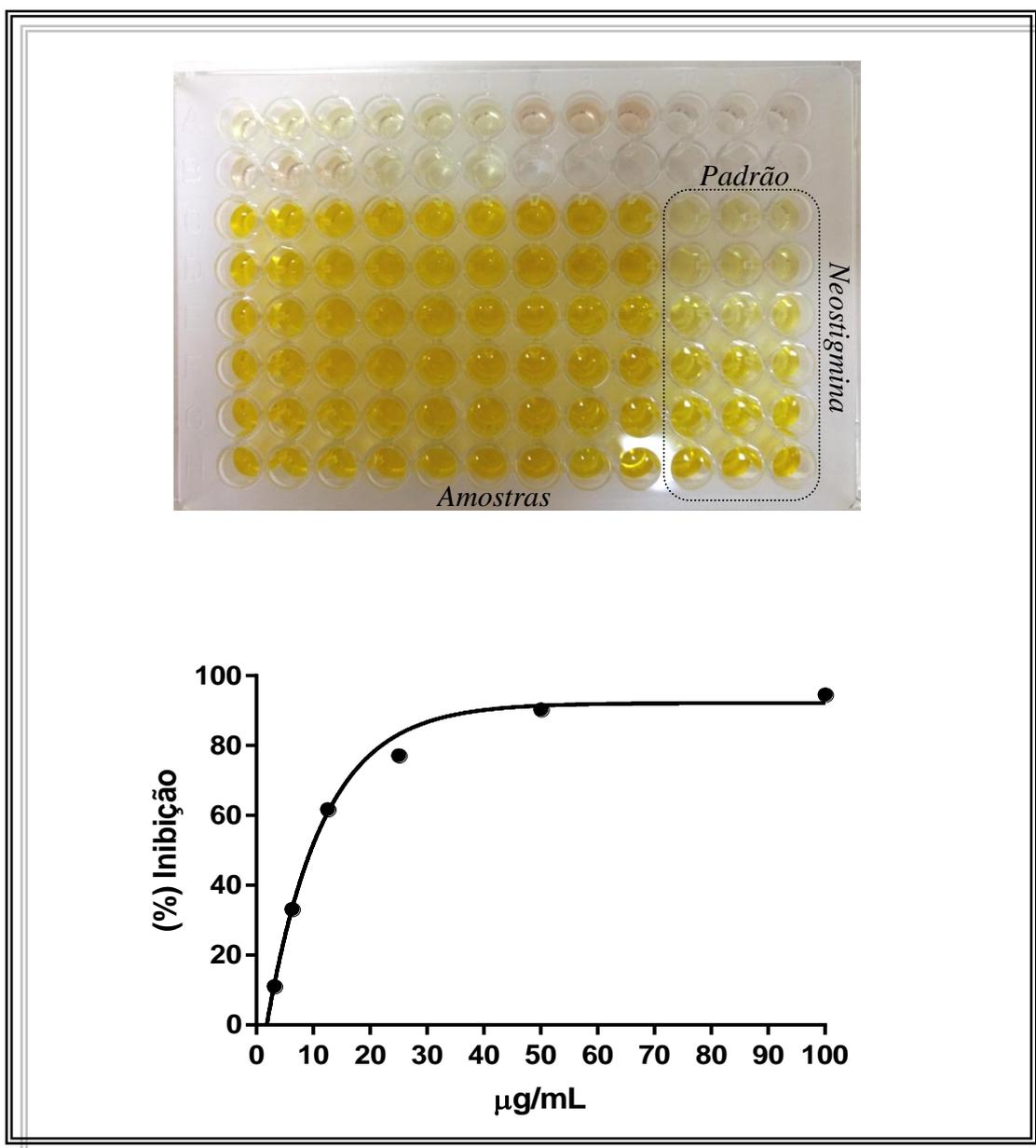


Figura 82. Placa de 96 poços com produto da reação da tiocolina com o 5-tio-2-nitrobenzoato para a avaliação da atividade inibitória para as amostras e padrão além da curva resposta da avaliação quantitativa da atividade inibidora da enzima ACHE da neostigmina.

Os resultados obtidos tanto para os extratos brutos quanto para as substâncias, não foram capazes de influenciar na atividade enzimática da acetilcolinesterase de forma relevante na concentração de 90 µg/mL. Todas as

amostras testadas foram realizadas em triplicata e os valores foram expressos como percentual de atividade enzimática remanescente mostraram-se inferiores a 15%, por isso não se prosseguiu com a avaliação quantitativa para a determinação do IC₅₀, como pode ser observado na Tabela 20.

Tabela 20. Atividade Inibitória remanescente da enzima AChE.

Amostra	Código	% Atividade Inibitória Remanescente
Casca	EACBP	<15,0 %
	EMCBP	<15,0 %
	H-S1	<15,0 %
	H-S2	<15,0 %
	H-S3	<15,0 %
	H-S4	<15,0 %
	P-S1	<15,0 %
	P-S2	<15,0 %
	P-S3	<15,0 %
	P-S4	<15,0 %
Controle +	Neostigmina	78,35 % IC ₅₀ 18,62 µg/mL ± 0,01

De acordo com relatos ELLMAN (1961), amostras com grande atividade de inibição compreendem um intervalo entre 70 a 100% e o intervalo de 15% a 50% são descritos como de baixa atividade a moderada.

5.4.4 Inibição da enzima Lipooxigenase (LOX) pelo método da oxidação do íon Ferroso/laranja de xilenol (FOX)

Avaliou-se a capacidade dos extratos e substâncias isoladas da casca do *B. parinarioides* de inibir a enzima 5-LOX humana, por meio do ensaio colorimétrico e espectrofotométrico da FOX na região do UV e no visível.

Na Figura 83 revela-se o aspecto da solução do controle positivo e controle negativo obtido no ensaio da FOX, como esperado de acordo com relatos da literatura para este ensaio, antes de se iniciar a leitura das absorvâncias no UV-vis (PINTO et al., 2007).

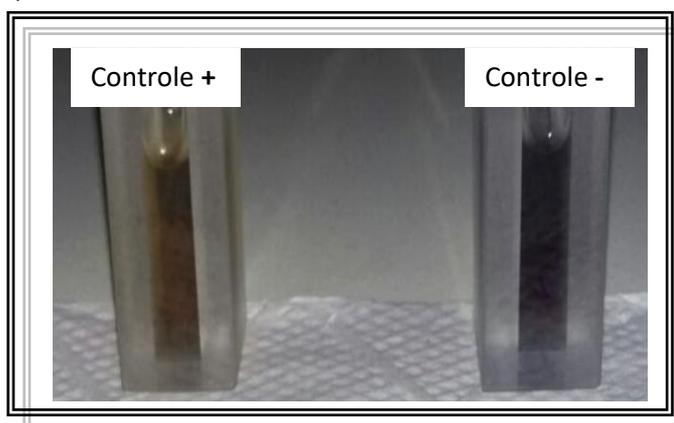


Figura 83. Aspecto da solução do controle positivo (NDGA) e controle negativo após ser adicionado o reagente FOX.

Com base nisso foi realizada o monitoramento do controle positivo (200-650 nm). Foi possível visualizar que a cor amarela do laranja de xilenol acidificado foi convertida em azul devido à hidroperoxidação lipídica em virtude da oxidação dos íons (Fe^{2+} a Fe^{3+}), resultando na formação do complexo que absorve em 590 nm como pode ser visto no espectro de absorção da Figura 84, abaixo:

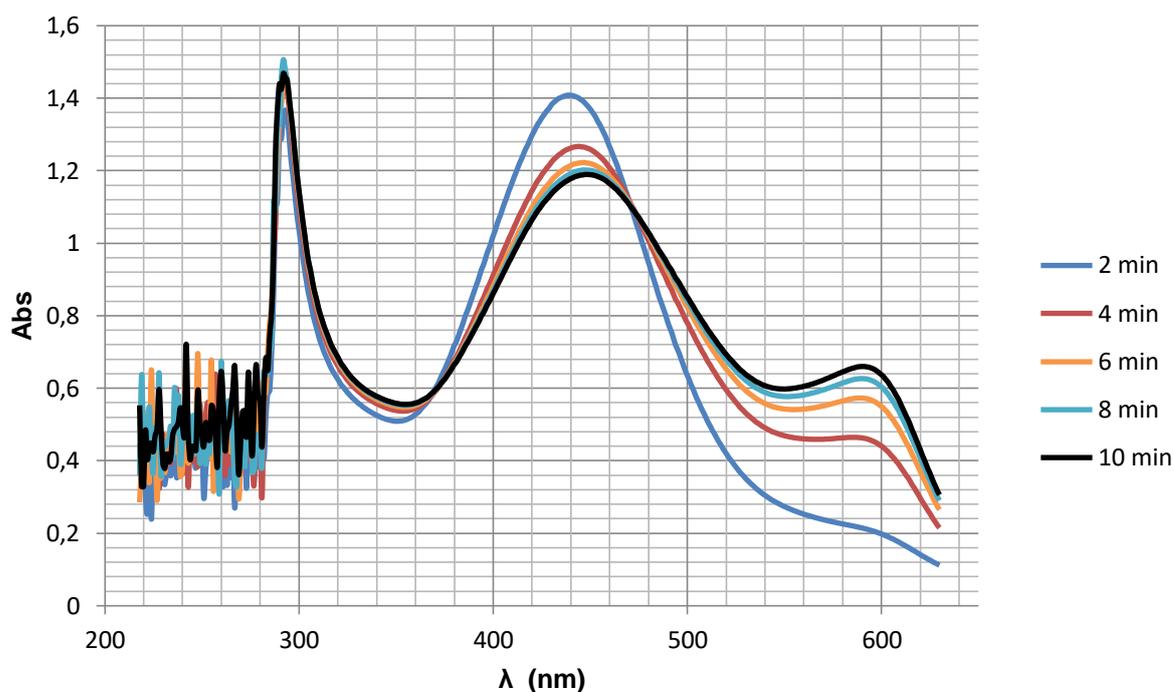


Figura 84. Espectro de absorção do NDGA em 200-600 nm após ser adicionado o reagente FOX, resultando na absorção do complexo em 590nm com passar do tempo.

O aspecto da amostra adicionando-se imediatamente o reagente FOX, antes de se dar início a leitura das absorbâncias e após os 10 min de leitura. Apresentaram-se da seguinte forma:

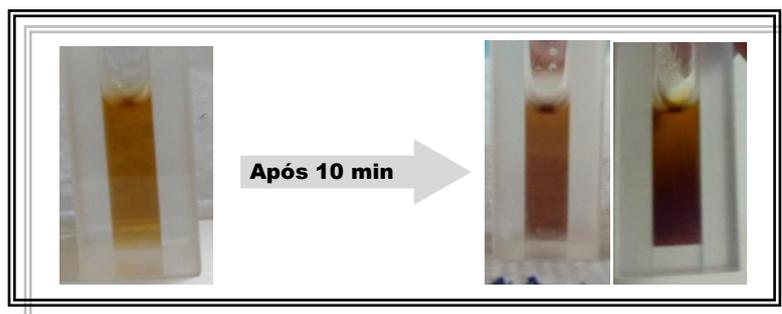


Figura 84. Aspecto da solução após ser adicionado o reagente FOX e após 10 min de leitura para uma amostra considerada ativa.

Foi possível então determinar a porcentagem de inibição enzimática por meio da equação apresentada abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Onde: A_0 – Absorbância do controle negativo; A_1 – Absorbância da amostra;

Uma vez que foram, determinados as absorvâncias do controle negativo e das amostras, foi possível então determinar a % de inibição enzimática para os diferentes tempos analisados das diferentes amostras. Nas tabelas seguintes estão descritos os valores em % obtidos da inibição enzimática da FOX para as diferentes amostras:

Tabela 21. Resultados do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para o extrato (EMCBP).

Amostra (Código)	Tempo (min)	ABS Média	% Inibição	% Variância	D.P
Casca (EMCBP)	1	0,424	39,7727	0,0018	0,2448
	2	0,5175	31,5023	0,01805	0,29883
	3	0,5755	26,3596	0,06845	0,33239
	4	0,613	23,4229	0,1352	0,35409
	5	0,639	21,5951	0,2048	0,36913
	6	0,6585	20,3267	0,28125	0,38041
	7	0,6735	19,486	0,34445	0,38908
	8	0,686	18,7685	0,405	0,39629
	9	0,6965	18,1551	0,47045	0,40234
	10	0,7065	17,6573	0,51005	0,40809

Tabela 22. Resultados do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (P-S1).

Amostra (Código)	Tempo (min)	ABS Média	% Inibição	% Variância	D.P
Casca (P-S1)	1	0,337	52,1307	0,0242	0,19474
	2	0,374	50,4964	0,0578	0,21626
	3	0,3995	48,8804	0,12005	0,23126
	4	0,4205	47,4703	0,22445	0,24379
	5	0,4385	46,1963	0,31205	0,25445
	6	0,456	44,8276	0,4232	0,26485
	7	0,4725	43,5146	0,53045	0,27461
	8	0,488	42,2143	0,6498	0,28378
	9	0,503	40,8931	0,7442	0,29254
	10	0,5165	39,8019	0,83205	0,3004

Tabela 23. Resultados do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (P-S2).

Amostra (Código)	Tempo (min)	ABS Média	% Inibição	% Variância	D.P
Casca (P-S2)	1	0,372	47,1591	0,0242	0,21492
	2	0,4135	45,268	0,01445	0,2388
	3	0,4335	44,5298	0,00845	0,25032
	4	0,4455	44,3473	0,00125	0,25721
	5	0,457	43,9264	0,0008	0,26385
	6	0,4655	43,6782	0,00005	0,26876
	7	0,4755	43,156	0,00045	0,27453
	8	0,485	42,5696	0,0018	0,28002
	9	0,4925	42,1269	0,00125	0,28435
	10	0,501	41,6084	0,005	0,28927

Tabela 24. Resultados do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (P-S3).

Amostra (Código)	Tempo (min)	ABS Média	% Inibição	% Variância	D.P
Casca (P-S3)	1	0,319	54,6875	0,1058	0,185
	2	0,372	50,7611	0,18	0,21583
	3	0,3985	49,0083	0,23805	0,23129
	4	0,4145	48,2199	0,26645	0,24056
	5	0,425	47,8528	0,3042	0,24672
	6	0,4335	47,5499	0,32805	0,25167
	7	0,441	47,2803	0,3528	0,25604
	8	0,4465	47,1285	0,36125	0,25921
	9	0,4535	46,7098	0,39605	0,26333
	10	0,46	46,3869	0,4232	0,26713

Tabela 25. Resultados do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (H-S1).

Amostra (Código)	Tempo (min)	ABS Média	% Inibição	% Variância	D.P
Casca (H-S1)	1	0,14	72,2406	0,0032	0,08091
	2	0,18	71,0611	0,005	0,10401
	3	0,2165	70	0,00845	0,12512
	4	0,2465	68,705	0,01125	0,14245
	5	0,2695	67,8145	0,02205	0,15582
	6	0,2895	66,9646	0,02645	0,16739
	7	0,306	66,3243	0,0288	0,17691
	8	0,319	65,9673	0,0338	0,18444
	9	0,33	65,7083	0,0392	0,19081
	10	0,3395	65,4629	0,04205	0,1963

Tabela 26. Resultados do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para o controle positivo (NDGA).

Padrão	Tempo (min)	ABS Média	% Inibição	% Variância	D.P
NDGA	1	0,291	58,6648	0,0128	0,16813
	2	0,322	57,3792	0,0162	0,18603
	3	0,3415	56,302	0,03125	0,19738
	4	0,3575	55,3404	0,06125	0,20679
	5	0,3725	54,2945	0,10125	0,21566
	6	0,385	53,418	0,1458	0,22308
	7	0,398	52,4208	0,2048	0,23083
	8	0,41	51,4506	0,2592	0,23796
	9	0,4215	50,47	0,31205	0,24476
	10	0,4325	49,5921	0,37845	0,25131

Com base nos dados de inibição da enzima 5-LOX obtidos pelo método da FOX, pode-se dizer preliminarmente que para a concentração das amostras de 1000 µg/mL os extratos **EACBP**, **EMCBP** (39,77%) e as substâncias **P-S1** (52,13%), **P-S2** (47,15 %) e **P-S3** (54,68 %) possuem capacidade inibitória da enzima relevante. Já a substância codificada como **H-S1** (72,24 %) possui capacidade inibitória elevada.

O padrão **NDGA** consolida a eficiência do método da FOX utilizado, uma vez que o mesmo apresentou inibição para a enzima 5-LOX na concentração de 100 µg/mL (58,66 %). Portanto, estes resultados indicam a existência que esses extratos e substâncias possuem propriedades anti-inflamatórias por via LOX, que está de acordo com dados reportados na literatura, uma vez que essa atividade esta sempre associada com substâncias de natureza fenólica que possuem atividade antioxidante (SILVA, et al, 2002).

6. CONCLUSÃO

Este trabalho visou contribuir com o estudo da composição química do látex e da casca do *B. parinarioides* uma vez que a casca não possui estudo à cerca da composição química. Portanto, foram analisados fitoquimicamente cerca de quatro extratos desta espécie, onde foi constatado que os maiores rendimentos obtidos foram nos extratos metanólicos (EMCBP), seguido do extrato de acetato de etila (EACBP), extrato metanólico do látex (EMLBP) e por fim o hexânico (EHCBP).

A análise cromatográfica por CG-EM das frações HGF06 e HGF07 provenientes do EHCBP evidenciaram a presença de triterpenos como o urs-12-eno, norolea-12-eno, β -sitosterol, acetato de α e β -amirina e acetato de lanosterol. A análise da fração MGF01 e MGF02 oriundas do extrato metanólico, também realizada por CG-EM revelou há presença de uma mistura de terpenoides como o acetato de lupeol, acetato de lanosterol, acetato de cicloartenol, lupeol e α e β -amirina todos esses compostos até o presente momento não foram descritos para a casca desta espécie.

A análise das fases da partição do látex por meio da caracterização por espectrometria de massas auxiliada, pela fragmentação indicou preliminarmente á presença do ácido quínico e ácido clorogênico em sua composição. Ambos os compostos não reportados para o látex do *B. parinarioides*.

O método por separação por CLAE-DAD-EM em fase reversa permitiu a obtenção da substância isolada **H-S1**, que se apresentou de forma majoritária tanto no EACBP quanto no EMCBP. Os resultados obtidos mostraram que nos diferentes extratos do *B. parinarioides* apresentam constituintes majoritariamente comuns.

Foram isoladas três substâncias do extrato metanólico da casca do *B. parinarioides*, sendo a *4',6-dihidroxi-5'-prefenil-flavana*, *2,4,4'-trihidroxi-3'-prenil-chalcona* e *2,4,4'-trihidroxi-5'-(2"-hidroxi-3"-metil-3"-butenil)-chalcona*. Sendo inéditas as substâncias *4',6-dihidroxi-5'-prefenil-flavana* e *2,4,4'-trihidroxi-5'-(2"-hidroxi-3"-metil-3"-butenil)-chalcona*. Já a *2,4,4'-trihidroxi-3'-prenil-chalcona* foi isolada pela primeira vez neste gênero.

A avaliação citotóxica dos extratos e frações frente a linhagens de células tumorais indicaram, que tanto a fase hexânica da partição do látex quanto os extratos de acetato de etila e metanol da casca, revelaram-se ativos para a célula tumoral HL-60 (leucemia promielocítica humana). Já o extrato hexânico da casca do *B. parinarioides* demonstrou pronunciada atividade antitumoral para as diferentes células tumorais que foram: MCF7 (adenocarcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (Leucemia promielocítica humana) e HL-60 (leucemia promielocítica humana). demonstrando então pronunciada atividade antitumoral.

Os ensaios de atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS evidenciaram que tanto os extratos de acetato de etila e metanólico da casca quanto todas as substâncias isoladas apresentaram maiores capacidade sequestrante de radicais livres. O ensaio de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase apresentou baixa percentagem de inibição para os diferentes extratos e substâncias isoladas.

Quanto à avaliação da atividade anti-inflamatória pela inibição da enzima 5-LOX obtida pelo método FOX, pode-se verificar alta inibição da atividade enzimática para os extratos e diferentes substâncias isoladas sendo possível então correlacionar tal atividade com a alta capacidade antioxidante dos compostos obtidos. Corroborando então para o seu uso popular com potencial nutracêutico uma vez que o mesmo é utilizado em processos anti-inflamatórios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, V. G. C.; SILVA, M. C. S.; MAGALHÃES, R. M.; PILÓ-VELOSO, D.; XAVIER, I. F. S.; OLIVEIRA, P. M.; ALCÂNTARA, A. F. C. Chemical constituents from the stem of *Brosimum potabile* (Moraceae). *Acta Amazonica*, v.40, p. 711-718, 2010
- AKERELE, O. Medicinal plants and primary health care. *Fitoterapia*, v.50, p.355-363, 1988.
- ALCÂNTARA, A. F. C.; SOUZA, M. R.; PILÓ-VELOSO, D. Constituents of *Brosimum potabile*. *Fitoterapia*, v. 71, p. 613-615, 2000.
- AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v.170, p.211 - 224, 1994.
- ADERSEN A., GAUGUIN B., GUDIENSEN L., JAGER AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol*. April 6; 104(3): 418-22, 2006.
- BOIK, J. Natural compounds in cancer therapy. Oregon Medical Press, Minnesota, USA, p. 25, 2001.
- BORRÁS, M. R. L. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas. Plantas comercializadas no Mercado municipal Adolpho Lisboa, Governo do Estado do Amazonas: Editora: Valer, 2003.
- BRASIL, Ministério da saúde. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2016.
- BRAZ-FILHO, R.; MAGALHÃES, A. F.; GOTTLIEB, O. R. Coumarins from *Brosimum rubescens*. *Phytochemistry*, v. 11, p. 3307-3310, 1972.
- CALIXTO, J. B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A. R. S. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opinion Emerging Drugs*. v. 2, p. 261-279, 2001.
- CAPASSO, R.; IZZO A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO. C.; MASCOLO N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*. v. 71, p.58-65, 2000.

CARAUTA, J.P.P. NETO, S.R.; SATRE, C. Moráceas do estado do Rio de Janeiro. *Albertoa*, p 77-96. 1996.

CAVALCANTE, P. B. Frutos comestíveis da Amazônia. 6ª Ed.- Belém: CNPQ / Museu Paraense Emílio Goeldi. (Coleção Adolpho Ducke), 1996.

CASTRO, R.M. Flora da Bahia – Moraceae. Dissertação de Mestrado em Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2006.

CORREA, P. M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1978.

CAI, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, v. 74, p. 2157–2184, 2003.

DALL'STELLA, D. S. G. Estudo fitoquímico aplicado da fração solúvel do extrato etanólico bruto da *dorstenia multiformis*. Miquel (MORACEAE). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach. West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.

DI STASI, L. Química de produtos naturais: Principais constituintes ativos: Plantas Medicinais: Arte e ciência um guia de estudo interdisciplinar, Ed. Unesp, São Paulo, 1996.

DUBERTRET, L; SERRAF-TIRCAZES, D. J. Of Photochem and Photobiol. *Biology*. p.251-259, 1990.

DZUBACK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMMAN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenes and their therapeutic implications. *Natural Products Reportes* p. 394-411, 2006.

ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES VJ, FEATHERSTONE RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* p.88-95, 1961.

FIRMO, W. C.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS C. E. C. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais, São Luís, v. 18, n.especial, dez. 2011.

GALUPPO, S.C. Utilização do amapá-doce (*Brosimum parinarioides* Ducke), na comunidade de Piquiatuba, Belterra-PA. CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 54.; REUNIÃO AMAZÔNICA DE BOTÂNICA, 3., 2003, Belém, PA. Resumos. Belém, PA: Sociedade Botânica do Brasil / UFRA: Museu Paraense Emílio Goeldi: Embrapa Amazônia Oriental, 2003

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

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

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

HEINRICH M., LEE TEOH H. Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J Ethnopharmacol.* Jun, 92(2-3): 147-62, 2004

LIMA M. C. F.; SILVA C. C.; JUNIOR V. F. V. *Brosimum* sp. da Amazônia: uma revisão, *Scientia Amazonia*, v. 2, n.1, p. 20-27, 2013.

LOUREIRO, A. A.; DE FREITAS, J.; ALVES, R.; LOUREIRO, K. B.; DE FREITAS, C. A. A. Essências Madeireiras da Amazônia. Manaus: MCT/INPA-CRPF, 2000.

REVILLA, J. Plantas da Amazônia- Oportunidades Econômicas e Sustentáveis. Manaus-AM: Ed.INPA, SEBRAE, 2002.

- MATTA, A. Flora Médica Brasileira. 3ª. Edição revista. Manaus: Editora Valer, 2003.
- MATHE, C.; CULIOLI, G. Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, v. 1023, p. 277-285, 2004.
- MAHATO, S. B.; NANDY, A. K.; ROY, G. *Phytochemistry* 31 (1992) 2199. Mandelbaum, Samuel Henrique; Di Santis, Érico Pampado; Mandelbaum, Maria Helena Sant'Ana. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares -Parte I. *An. bras Dermatol*, 78(4):393-410,2003.
- MANOHARAN, K. P. Triterpenoids from *Eugenia grandis*: structure elucidation by NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 45, p. 279-281, Mar 2007.
- MCKEON, J.J. PUVA for psoriasis. *American Pharmacy*, p. 530-532, 1981.
- MORETTI, C.; GAILLARD, Y.; GRENAND, P.; BÉVALOT, F.; PRÉVOSTO, J. Identification of 5- hydroxy-tryptamine (bufotenine) in takini (*Brosimum acutifolium* Huber subsp. *acutifolium* C.C. Berg, Moraceae), a shamanic potion used in the Guiana Plateau. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, p. 198–202, 2006.
- MURRY, R. D.H. Naturally occurring plant coumarins. New York: Springer verlag/wien, p. 200-209, 1978.
- NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S.N.; CHECHINEL FILHO V. ; Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e consideração sobre fitoterápicos. Ciências farmacêuticas. Contribuições ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editores: Bresolin, T. M.B. & Cechinel filho, p.10-56, Itajaí, 2003.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Traditional medicine: definitions, 2008.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry*, v.267, p.5421 - 5426, 2000.
- PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification, *Journal of Applied Biomedicine*, p. 7-12, 2003.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; PEPORINE, N. L.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Química Nova, São Paulo, v.25, supl.1, p.45-61, 2002.

POZETTI, G. L. Chemical study of *Brosimum gaudichaudii* trecul. Isolation and identification of bergapten, and psoralene from the roots of *Brosimum gaudichaudii* trecul. Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, v. 3, p. 215-223, 1969.

QUADROS, D. S; NUNOMURA, S. M.; NUNOMURA, R. de C. S. Atividade antioxidante da espécie *Brosimum parinarioides*. In: 31ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. Livro de resumos da 31ª .Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, v. 1. p 88-88, 2008.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. Toxicon. v. 39, p. 603-13, 2001.

RIBEIRO, C. V.C.; KAPLAN, M. A.C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em angiospermae. Química Nova, v. 25, p 533-538, 2002

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

REVILLA, J; Plantas da Amazônia oportunidades econômicas e sustentáveis. Ed. INPA e SEBRAE, Manaus-AM, pp. 89-90, 283-284; 2002.

RUFINO, M. D. S. M; ALVES, R. E; BRITO, E. S; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS.+; p 4. 2007.

RE, Roberta; PELLEGRINI, Nicolleta; PROTEGGENTE, Anna; PANNALA, Ananth; YANG, Min; RICE-EVANS, Catherine. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999..

SILVA RR; OLIVEIRA TT; NAGEM TJ & LEÃO MA. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico, Medicina Ribeirão Preto, 35: 127-133, abr./jun. 2002.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K. Editor. *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. London: Academic Press; 1990: 71–133.

SALLES. R. C.O. Estudo químico e de atividade biológica comparativo do látex do leite de amapá extraído de duas espécies botânicas distintas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2003.

SHANLEY, P.; MEDINA, G.; CORDEIRO, S.; IMBIRIBA, M. Frutíferas e Plantas Úteis Na Vida Amazônica. In: GAIA, G. *Amapá: o fortificante da Amazônia*; CIFOR; Imazon, Belém, pg.101-102; 2005.

SHIROTA, O.; SEKITA, S.; HIRAYAMA, Y.; HAKAMATA, Y.; HAYASHI, T.; YANAGAWA, T.; SATAKE, M. Two chalcone-prenylcoumarin diels-alder adducts from *Brosimum rubescens*. *Phytochemistry*, v. 47. n. 7. p. 1381-1385. 1998

SHIROTA, O.; TAKIZAWA, K.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; HIRAYAMA, Y.; HAKAMATA, Y.; YANAGAWA, T. Antiandrogenic natural Diels-Alder-type adducts from *Brosimum rubescens*. *Journal of Natural Products*, v. 60, n. 10, p. 997-1002, 1997.

SOUSA, S.M. Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados. Dissertação (Biotecnologia). Departamento de microbiologia e parasitologia, centro de ciências biológicas, Universidade federal de santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

SOUZA, M. C. L.; BARBOSA, R. G.; COUTO, L. B.; PEREIRA, P. S. Estudos da atividade antiálgica e antiedematogênica no fracionamento do látex de paraharcornia amapá Huber Ducke. XII anuais do congresso ítalo-americano de etnomedicina, Rio de janeiro, 2003.

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

TAKASHIMA, J.; OHSAKI, A. Brosimacutins A-I, Nine New Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. *Journal of Natural Products*, v. 65, n. 12, p. 1843 – 1847, 2002.

TAKASHIMA, J.; KOMIYAMA, K.; ISHIYAMA, H.; KOBAYASHI, J. I.; OHSAKI, A. Brosimacutins J-M, Four New Flavonoids from *Brosimum acutifolium* and their Cytotoxic Activity. *Planta Medica*, v. 71, n. 7, p. 654-658, 2005

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

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

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

VIEIRA, I. J. C. A new coumarins from *Brosimum gaudichaudii* Trecul. *Nat. Prod. Lett.*, v.13, n.1, p.47-52, 1999.

VILEGASA, J. H. Y., LANÇASA F. M., VILEGAS W., POZETTIB.G. L. Further Triterpenes, Steroids and Furocoumarins from Brazilian Medicinal Plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 8, No. 5, 529-535, 1997.

YI, J. Ameliorative effect of betulinic acid on oxidative damage and apoptosis in the splenocytes of dexamethasone treated mice. *International Immunopharmacology*, v. 27, n. 1, p. 85–94, 2015.

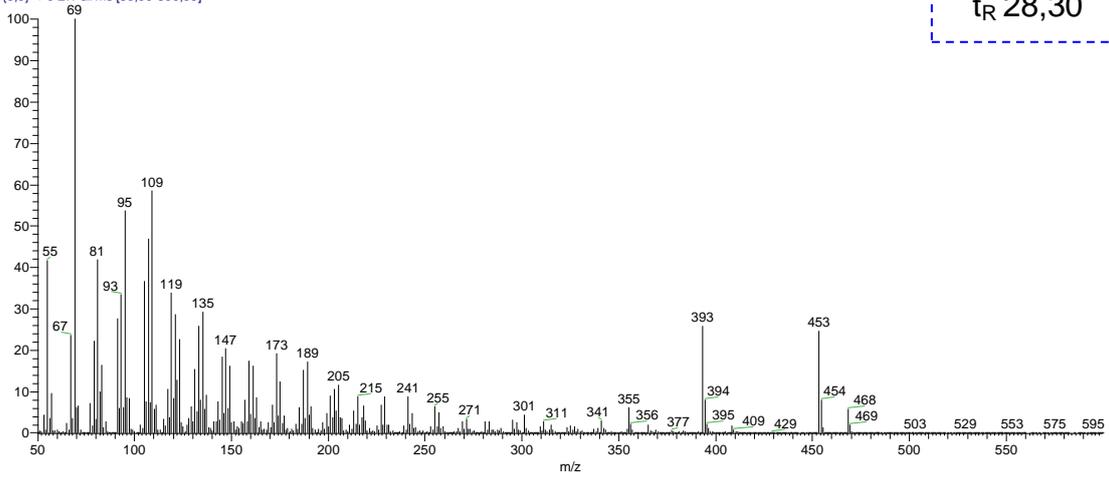
YUNES, R.A.; PEDROSA. R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v.24, n.1, p.147-152, 2001.

RAO, G.V., SWAMY, B. N., CHANDREGOWDA, V., REDDY, G. C. Synthesis of (±) Abyssinone I and related compounds: Their anti-oxidant and cytotoxic activities. *European journal of medicinal chemistry*. v. 44, 2009.

ANEXO

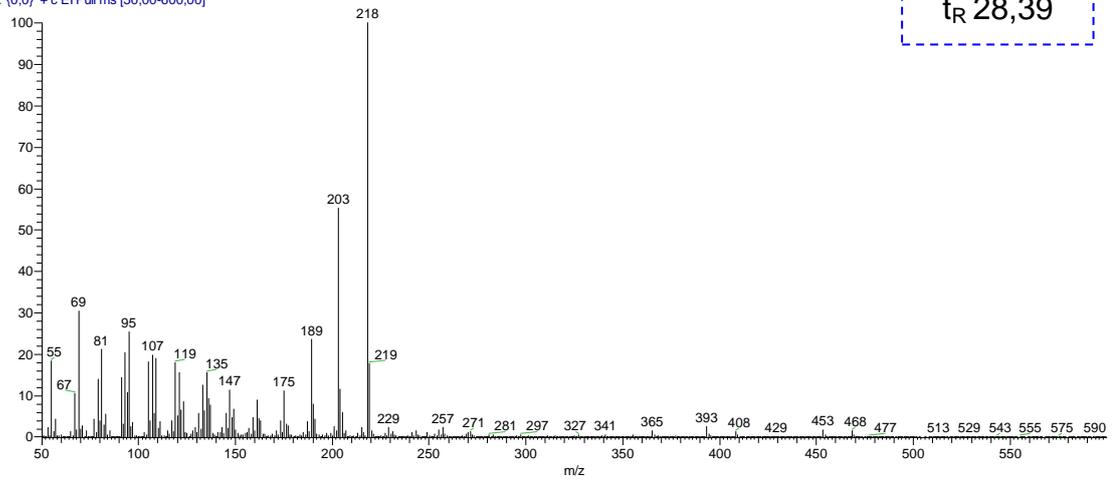
Ing1_170929131424 #2767-2779 RT: 28,24-28,34 AV: 13 SB: 109 27,60-28,21 , 28,47-28,76 NL: 4,38E7
T: (0,0) + c EI Full ms [50,00-600,00]

t_R 28,30



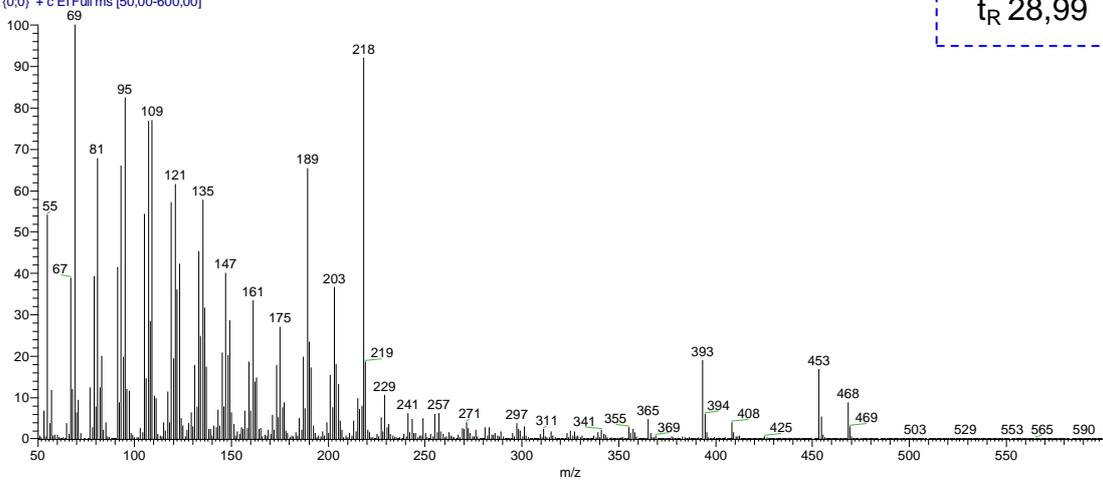
Ing1_170929131424 #2779-2789 RT: 28,34-28,42 AV: 11 SB: 108 28,46-28,64 , 27,46-28,17 NL: 5,97E7
T: (0,0) + c EI Full ms [50,00-600,00]

t_R 28,39



Ing1_170929131424 #2842-2865 RT: 28,87-29,06 AV: 24 SB: 92 28,57-28,87 , 29,10-29,56 NL: 4,46E7
T: (0,0) + c EI Full ms [50,00-600,00]

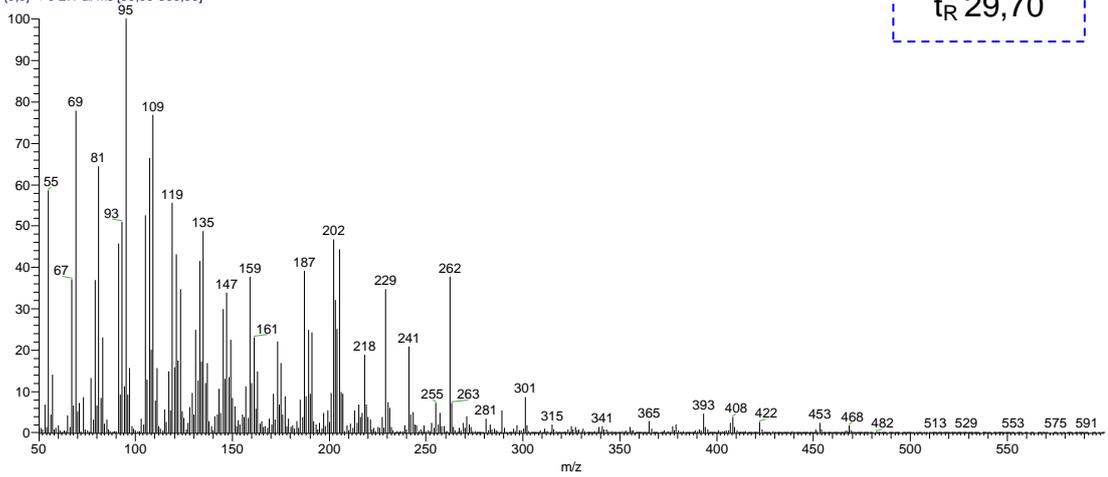
t_R 28,99



Espectros de massas da fração MGF 01

Ing1_170929131424 #2933-2957 RT: 29,63-29,83 AV: 25 SB: 161 29,21-29,62 ,29,84-30,77 NL: 4,36E6
T: (0,0) + c EI Full ms [50,00-600,00]

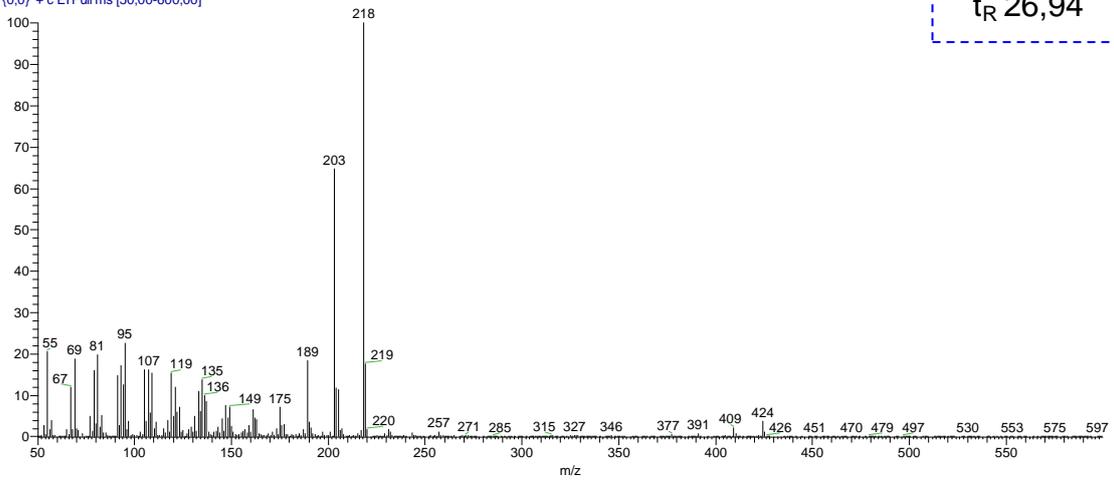
t_R 29,70



Espectro de massas da fração MGF 01

Ing3_170929135758 #2609-2616 RT: 26,91-26,97 AV: 8 SB: 32 27,04-27,23 ,26,84-26,90 NL: 7,85E6
T: (0,0) + c EI Full ms [50,00-600,00]

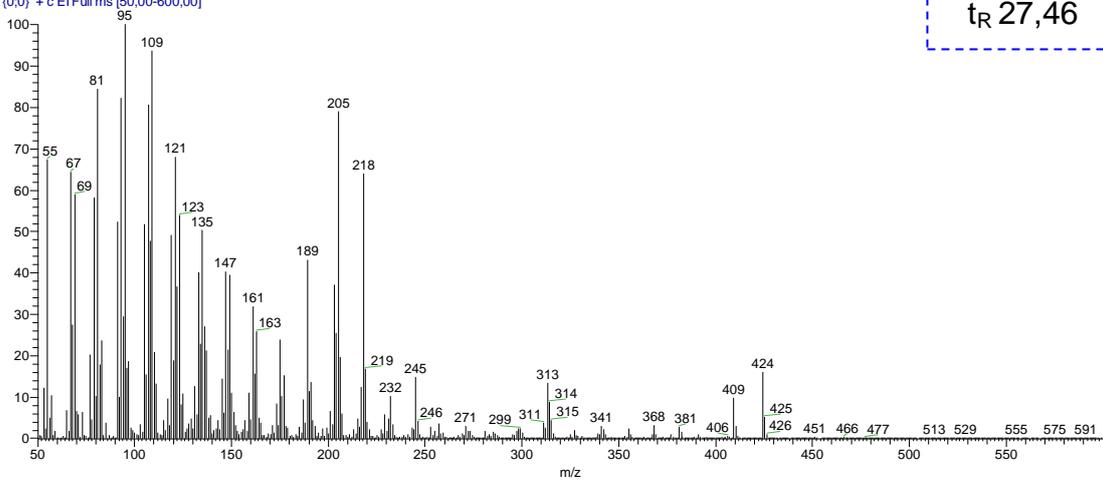
t_R 26,94



Espectros de massas da fração MGF 02

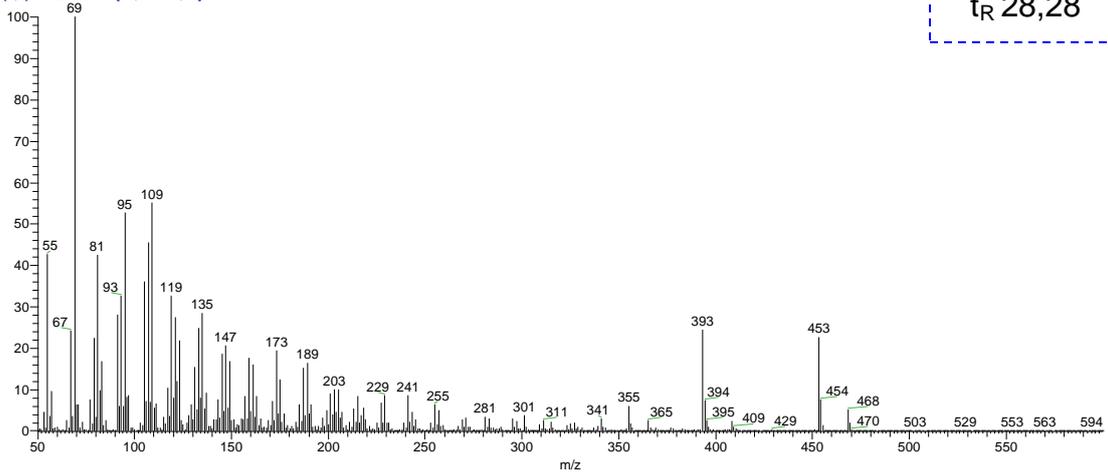
Ing3_170929135758 #2664-2689 RT: 27,37-27,58 AV: 26 SB: 368 24,85-27,37 ,27,61-28,16 NL: 1,48E7
T: (0,0) + c EI Full ms [50,00-600,00]

t_R 27,46



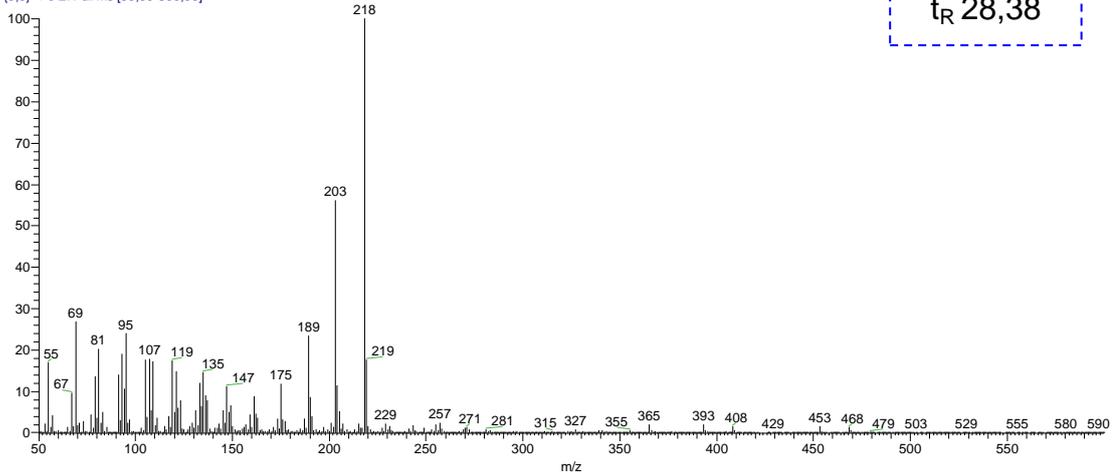
Ing3_170929135758 #2765-2778 RT: 28,22-28,33 AV: 14 SB: 113 27,57-28,21 , 28,45-28,74 NL: 1,71E7
T: (0;0) + c EI Full ms [50,00-600,00]

t_R 28,28



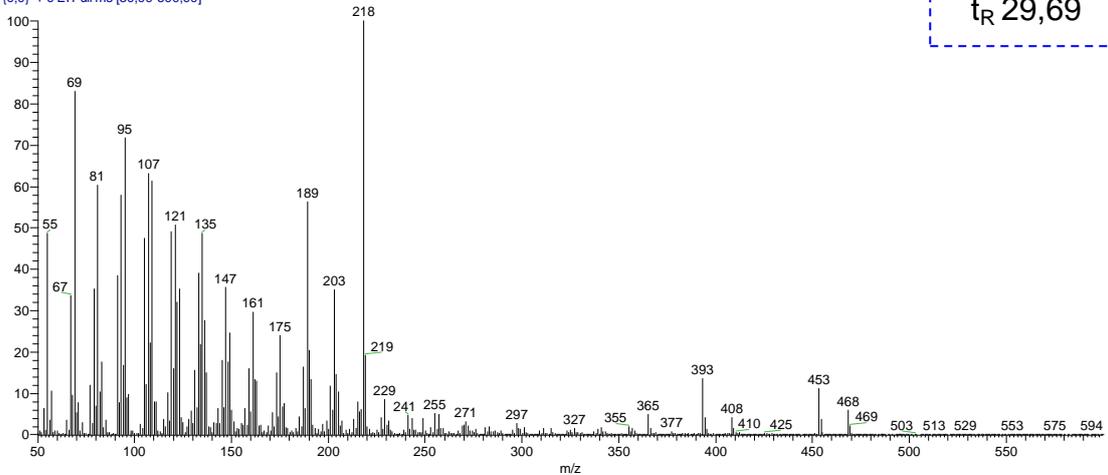
Ing3_170929135758 #2779-2789 RT: 28,34-28,42 AV: 11 SB: 108 27,58-28,20 , 28,45-28,72 NL: 2,31E7
T: (0;0) + c EI Full ms [50,00-600,00]

t_R 28,38



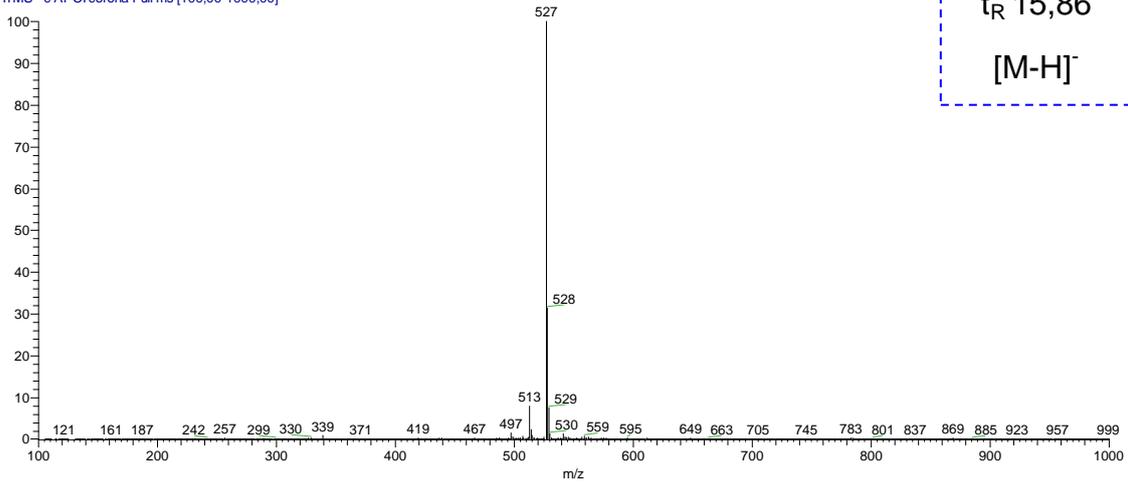
Ing3_170929135758 #2839-2868 RT: 28,84-29,09 AV: 30 SB: 106 29,08-29,67 , 28,56-28,84 NL: 1,39E7
T: (0;0) + c EI Full ms [50,00-600,00]

t_R 29,69



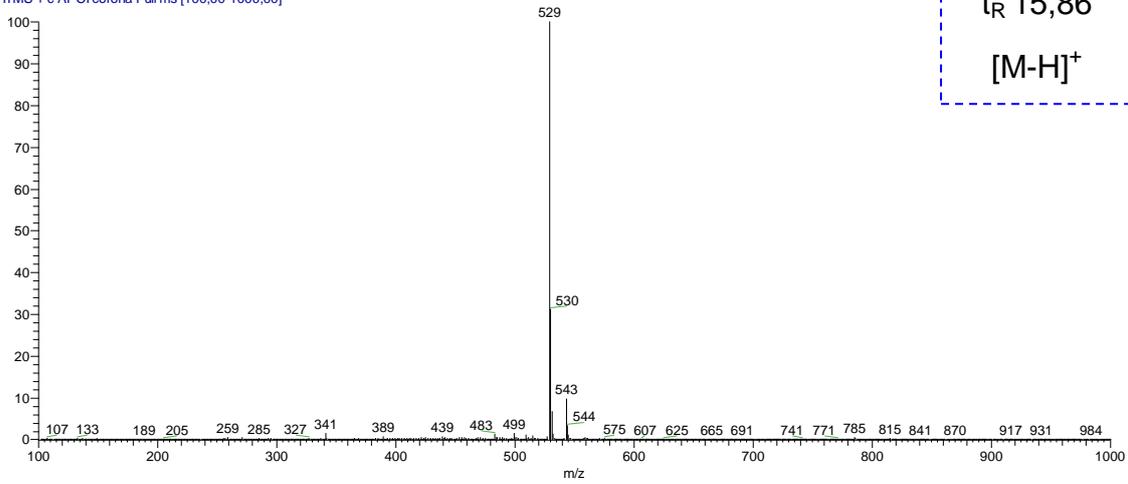
Espectro de massas da fração MGF 02

FULL_SCAN_SUBSTANCIAS #22-66 RT: 0,37-0,97 AV: 45 SB: 56 0,87-1,45, 0,00-0,35 NL: 1,15E5
T: ITMS - c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]



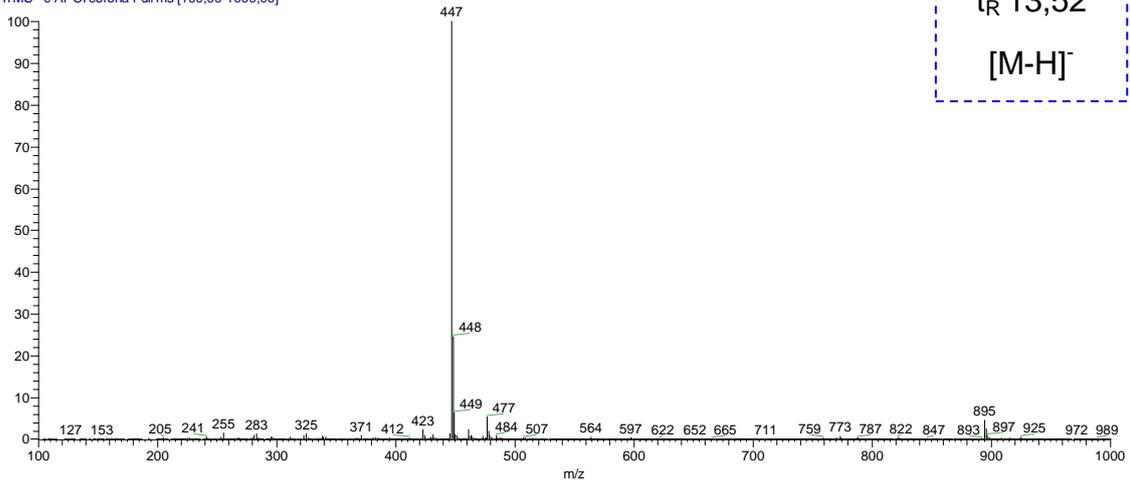
Espectro de massas no modo de ionização negativo da substância H-S1

FULL_SCAN_SUBSTANCIAS #983-1007 RT: 16,40-16,61 AV: 25 SB: 101 16,66-17,17, 15,63-16,34 NL: 1,74E5
T: ITMS + c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]



Espectro de massas no modo de ionização positivo da substância H-S1

FULL_SCAN_SUBSTANCIAS #94-109 RT: 1,45-1,65 AV: 16 SB: 68 1,72-2,22, 0,75-1,40 NL: 4,44E4
T: ITMS - c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]

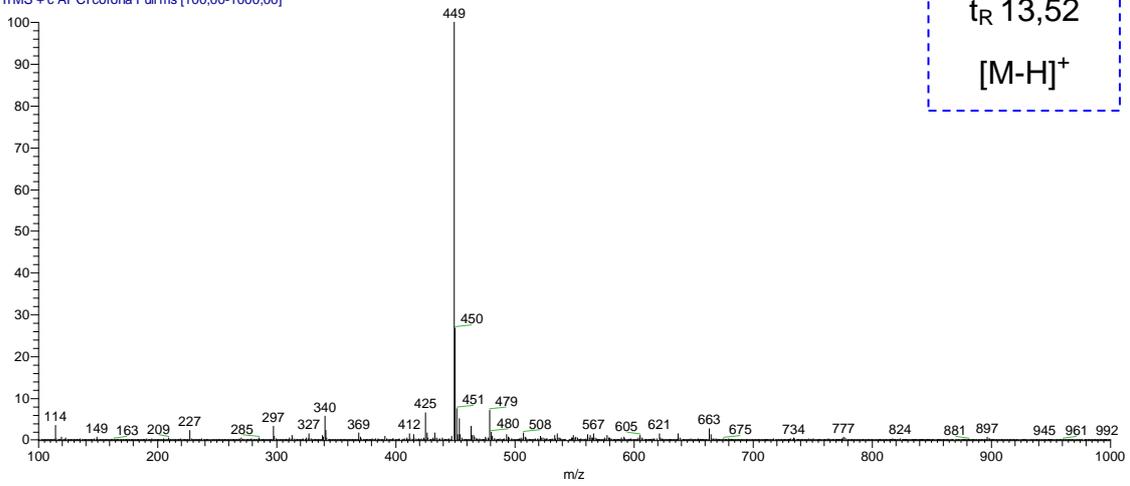


t_R 13,52

$[M-H]^-$

Espectro de massas no modo de ionização negativo da substância H-S2

FULL_SCAN_SUBSTANCIAS #1216-1236 RT: 19,04-19,26 AV: 21 SB: 159 19,24-20,07, 17,85-18,99 NL: 2,84E4
T: ITMS + c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]

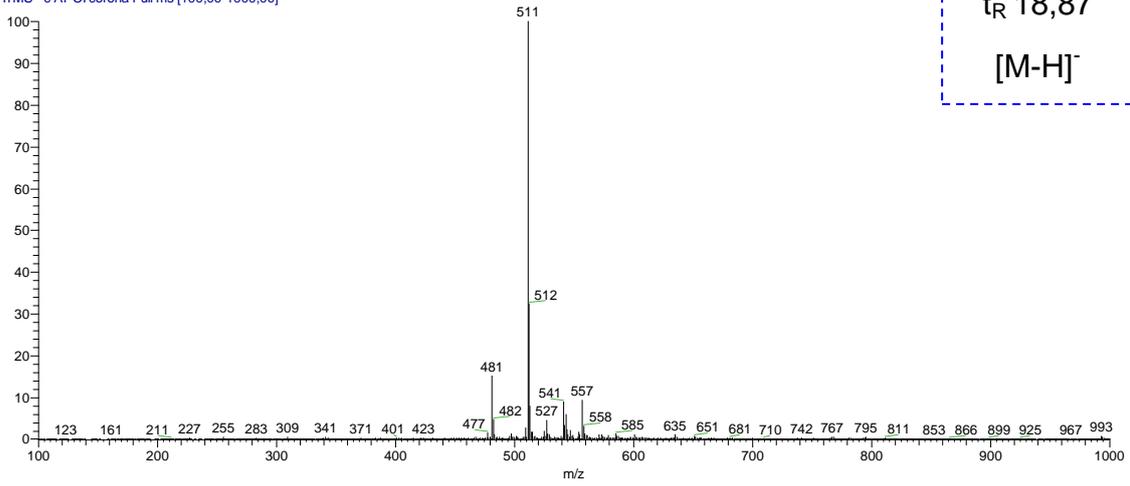


t_R 13,52

$[M-H]^+$

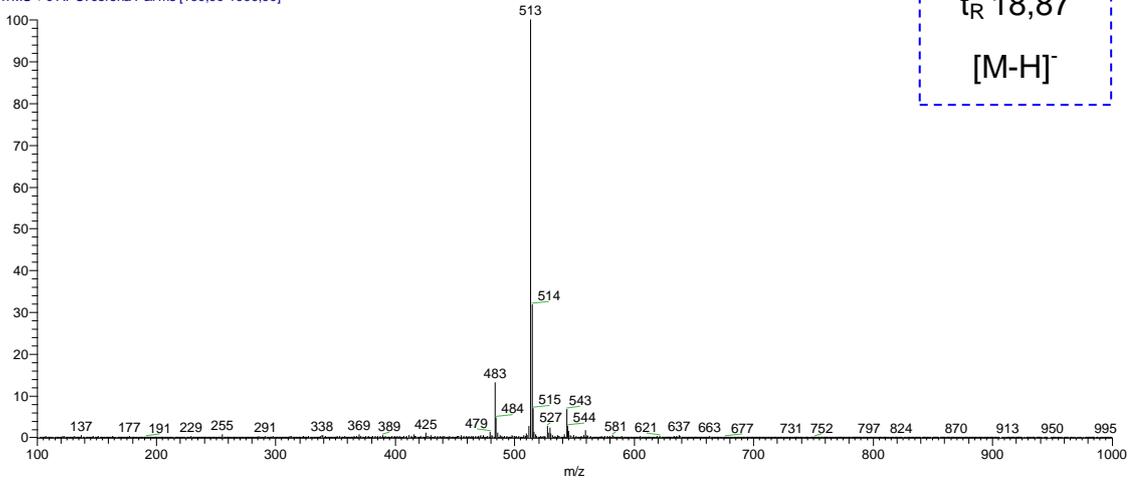
Espectro de massas no modo de ionização positivo da substância H-S2

FULL_SCAN_SUBSTANCIAS #189-207 RT: 3.01-3.26 AV: 19 SB: 49 3,37-3,77 , 2,60-3,03 NL: 2,97E4
T: ITMS - c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]



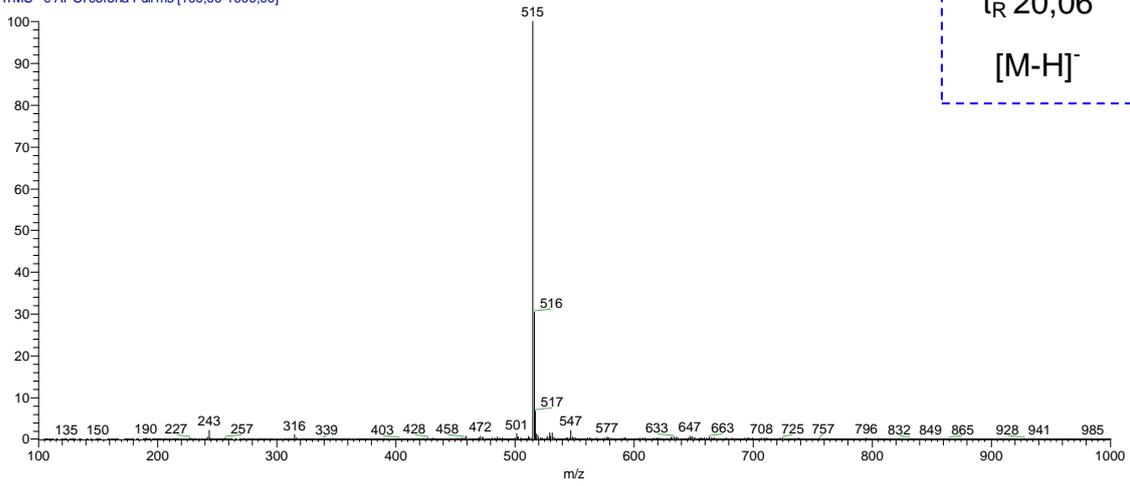
Espectro de massas no modo de ionização negativo da substância H-S3

FULL_SCAN_SUBSTANCIAS #1366-1387 RT: 20.88-21.11 AV: 22 SB: 71 19,43-20,02 , 20,70-20,98 NL: 3,43E4
T: ITMS + c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]



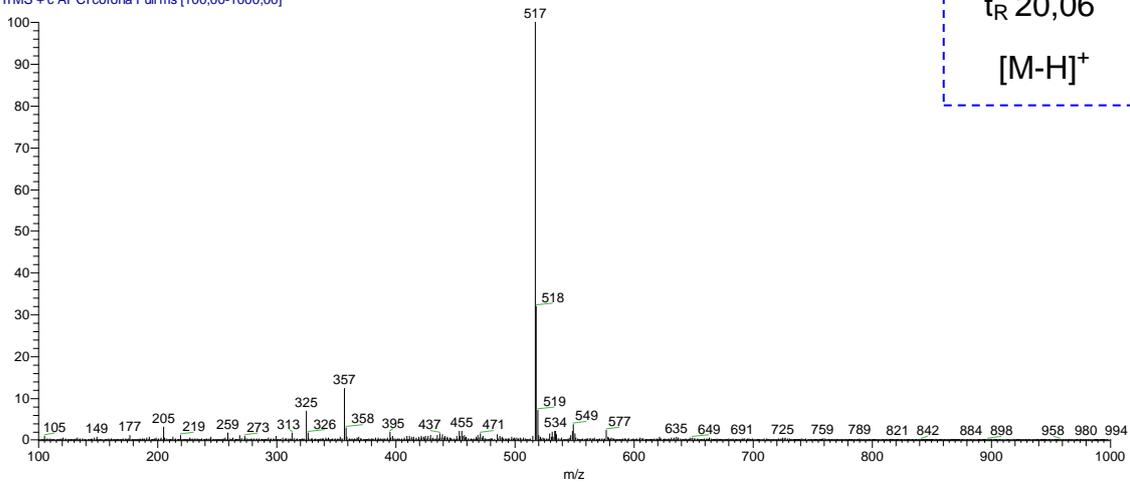
Espectro de massas no modo de ionização positivo da substância H-S3

FULL_SCAN_SUBSTANCIAS #138-163 RT: 2,16-2,55 AV: 26 SB: 63 2,43-2,99, 1,72-2,24 NL: 3,38E4
T: ITMS - c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]

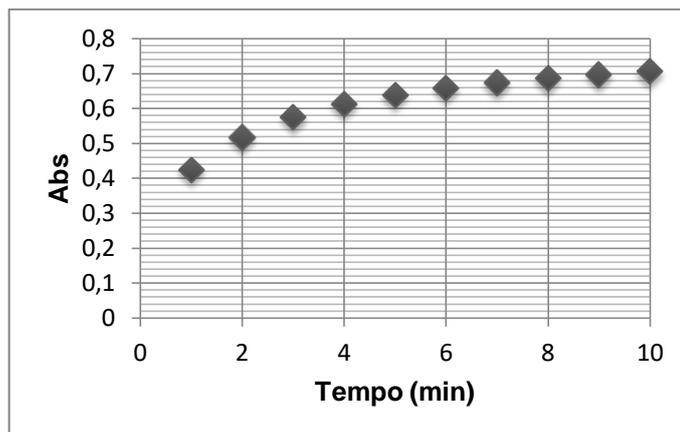


Espectro de massas no modo de ionização negativo da substância H-S4

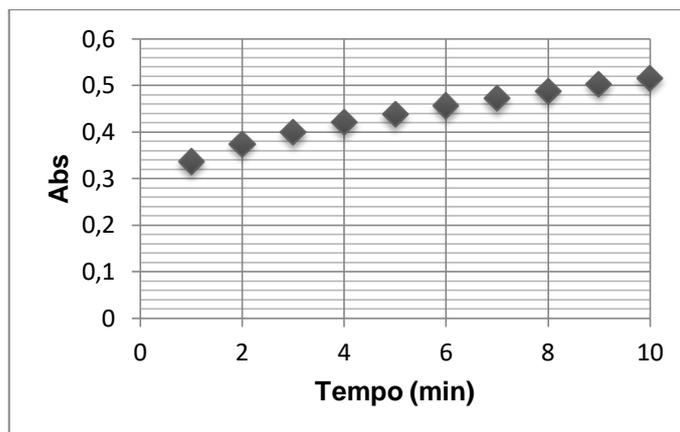
FULL_SCAN_SUBSTANCIAS #1307-1325 RT: 20,16-20,36 AV: 19 SB: 100 20,37-21,03, 19,59-20,18 NL: 3,46E4
T: ITMS + c APCI corona Full ms [100,00-1000,00]



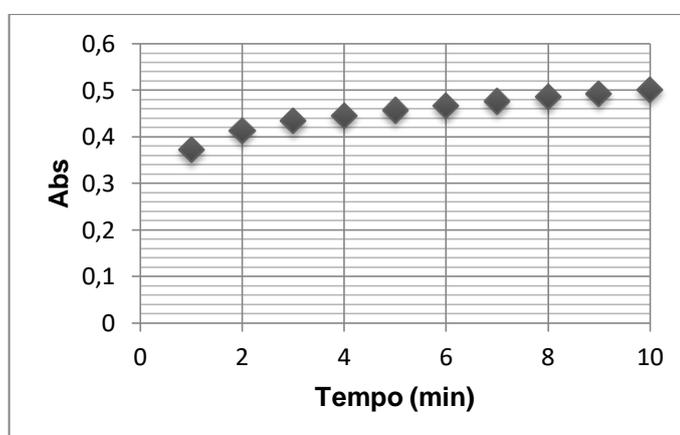
Espectro de massas no modo de ionização positivo da substância H-S4.



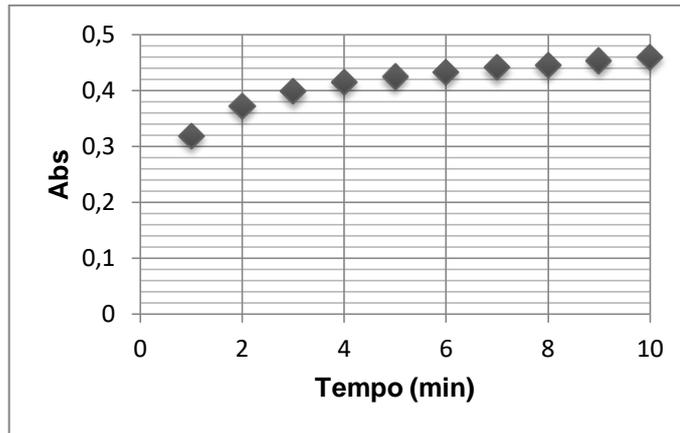
Absorbâncias registradas em função do tempo do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para o extrato (EMCBP).



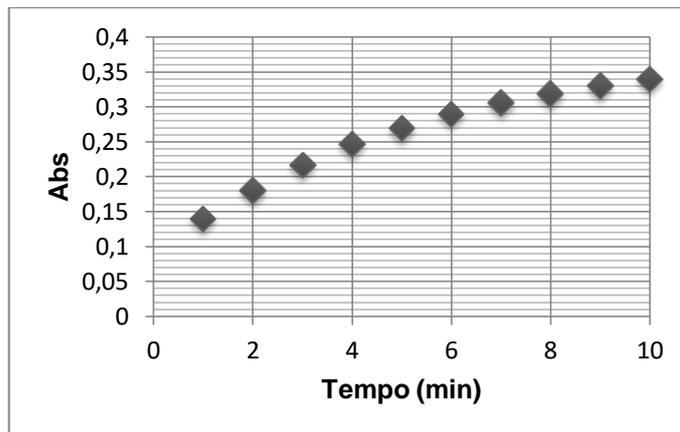
Absorbâncias registradas em função do tempo do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (P-S1).



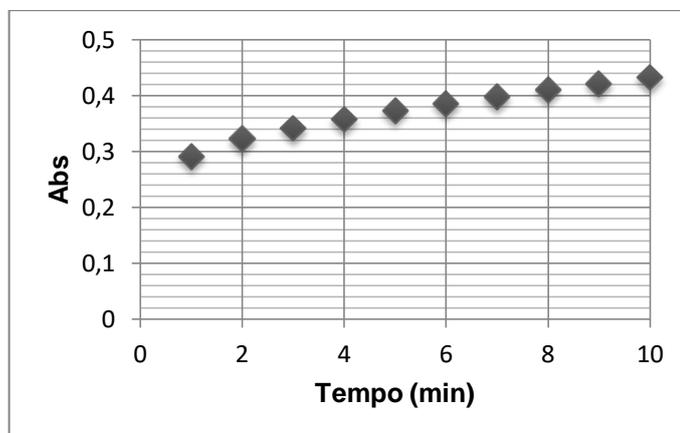
Absorbâncias registradas em função do tempo do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (P-S2).



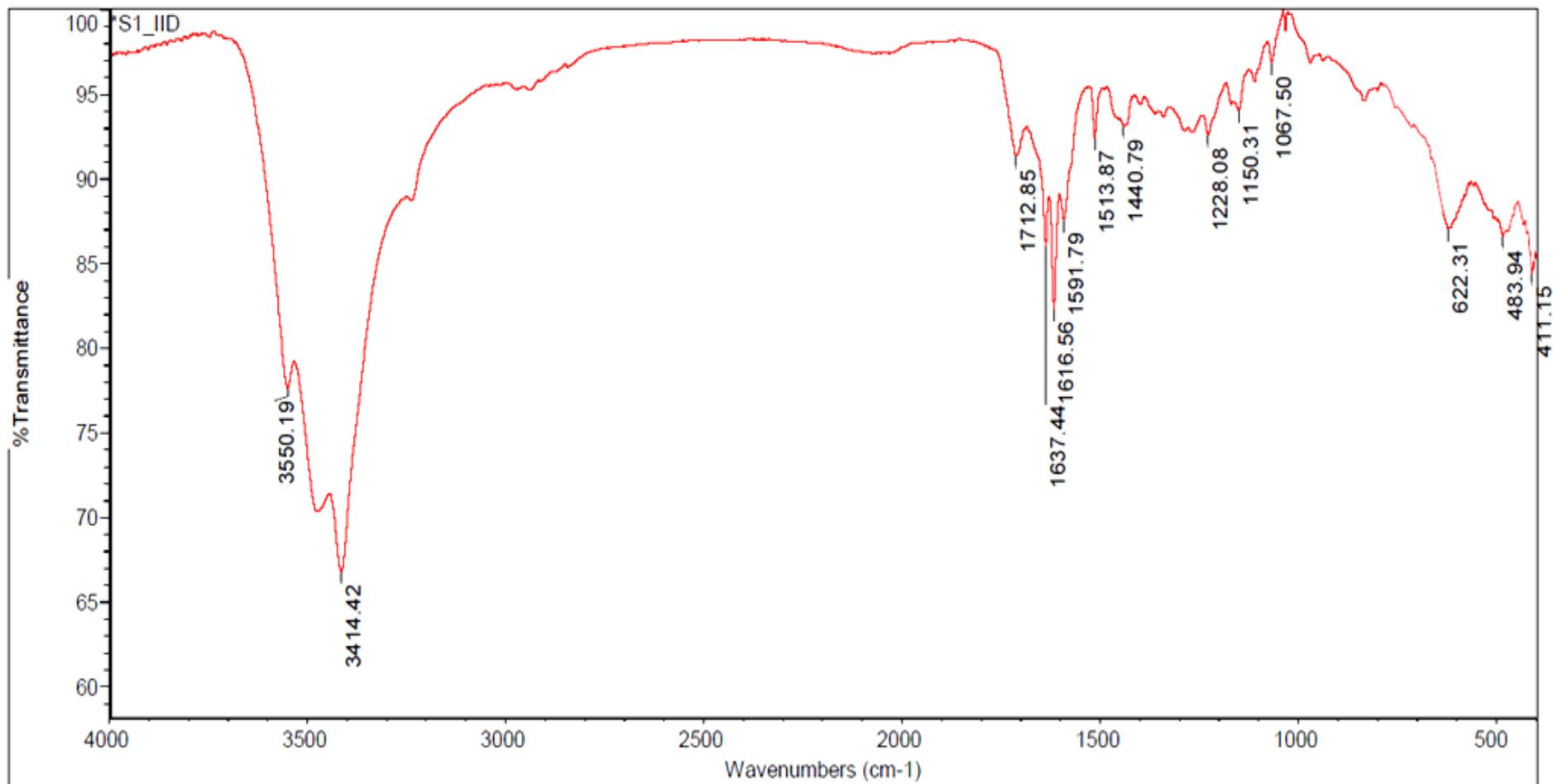
Absorbâncias registradas em função do tempo do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (P-S3).



Absorbâncias registradas em função do tempo do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para a substância (H-S1).



Absorbâncias registradas em função do tempo do ensaio anti-inflamatório *in vitro* da inibição da enzima 5-LOX pelo método da FOX para o padrão (NDGA).



Espectro de infravermelho da substância (H-S1).

