



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Monalisa Azevedo Moreira Costa

Prospecção de inibidores da protease M^{pro} do SARS-CoV-2 a partir de compostos isolados de *Platonia insignis* e *Citrus sinensis*.

Florianópolis

2024

Monalisa Azevedo Moreira Costa

Prospecção de inibidores da protease M^{pro} do SARS-CoV-2 a partir de compostos isolados de *Platonia insignis* e *Citrus sinensis*.

Tese submetida ao Programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em química orgânica
Orientador: Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo

Florianópolis

2024

Moreira Costa, Monalisa Azevedo

Prospecção de inibidores da protease Mpro do SARS-CoV-2 a partir de compostos isolados de *Platonia insignis* e *Citrus sinensis*. / Monalisa Azevedo Moreira Costa ; orientador, Louis Pergaud Sandjo, 2024.

148 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Química. 2. Enzima Mpro. 3. Inibição Enzimática. 4. Estudos Fitoquímicos. 5. *Platonia insignis*. I. Sandjo, Louis Pergaud. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Monalisa Azevedo Moreira Costa

Prospecção de inibidores da protease M^{pro} do SARS-CoV-2 a partir de compostos isolados de *Platonia insignis* e *Citrus sinensis*.

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado em 07/2024; pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Professora Dra. Priscila de Souza,
Universidade do Vale do Itajaí (Univali)

Professora Dra. Tatiane de Andrade Maranhão
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Professor Dr. Daniel Lazaro Gallindo Borges
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de tese que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora pelo Programa de pós-graduação em química – UFSC.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Professor Dr. Louis Pergaud Sandjo

Orientador

Florianópolis, 202

AGRADECIMENTOS

Institucionalmente agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Departamento de Ciências Físicas e Matemática (CFM), ao Programa de pós-graduação em Química (PPGQ) que possibilitaram espaço físico para que esta pesquisa pudesse ser realizada, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (CAPES), agência de fomento que financiou este projeto de pesquisa.

Agradeço imensamente a equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), pessoas e lugar que compartilhei horas de trabalhos e momentos de aprendizagem. Ao meu orientador Professor Dr. Louis Pergaud Sandjo, que orientou esta pesquisa e também me ensinou a ser forte e resiliente.

Agradeço ao Professor Dr. Sérgio Scherrer Thomasi pelas aulas ministradas durante meu mestrado e seus quadros impecáveis, que me orientou e me possibilitou a descoberta do meu amor pela química orgânica de produtos naturais.

Agradeço ao coletivo de mães estudantes-UFSC, ao Núcleo de Educação Infantil Municipal Nossa Senhora Aparecida, ao Núcleo de desenvolvimento infantil (NDI), que foram minha rede de apoio, me deram segurança, suporte físico e emocional para conseguir realizar meu doutorado sendo mãe solo.

Agradeço a minha amada mãe, pelo dom da vida, pelos ensinamentos femininos e pela coragem que me proporcionou ao longo da minha vida. As minhas irmãs Marilua e Alice, que sempre estiveram ao meu lado sendo apoio. A distância física é apenas uma métrica, estamos juntas sempre, vocês são minhas copas frondosas. Este registro amoroso, neste momento de realização acadêmica, expõe uma parte intrínseca minha: não existe lugar certo para nada, não é possível abstrair meu ‘lado’ profissional do âmbito pessoal que inclui a ‘parte’ emocional.

Por último e mais importante, agradeço ao meu filho, Benjamín Seiva, capítulo sem fim da minha vida, aprendizado constante do que é amor e paciência, fonte de confiança e impulso para seguir. Obrigada B.

Agradeço a mim, esse ser mulher, mãe e cientista que eu sustento.

Muito Obrigada!

RESUMO

A mutação do SARS-CoV-2 e a escassez de medicamentos eficazes contra a COVID-19 continuam a representar desafios significativos para a comunidade científica. Isso gera um peso nos sistemas de saúde em todo o mundo, apesar da disponibilidade de vacinas para prevenir essa doença viral. Além disso, o medicamento aprovado para o tratamento da COVID-19 apresenta várias limitações terapêuticas e conseqüentemente aumenta a demanda na identificação de novos agentes antivirais. Para contribuir para a identificação de novas substâncias com potenciais antivirais, esta pesquisa concentra-se em produtos naturais provenientes de frutas comestíveis, especificamente *Platonia insignis* e *Citrus sinensis*, com potenciais efeitos inibitórios contra a protease principal do SARS-CoV-2, a M^{pro}. Inicialmente, realizou-se a análise LC-ESI-MS do fruto de *Platonia insignis*, que revelou a presença de biflavonóides na semente e benzofenonas na polpa. Posteriormente, por meio da extração por maceração e purificação cromatográfica, foram obtidos e identificados dois triglicerídeos (1 e 2), estigmasterol (3), chamaejasmine (4), volkensiflavona (5) na semente, isogarcinol (6) e cicloxantochimol (7) na polpa. As cascas de *Citrus sinensis*, submetidas a processos cromatográficos, resultaram na identificação de dois compostos: *O*-sinapoil-glucopiranosídeo (8), hesperidina (9) e obtenção da hesperitina (10) através de semi-síntese da hesperidina. Os isolados foram estudados para seus potenciais inibitórios contra a M^{pro} utilizando o método cromogênico e Ebselen como controle positivo. O composto isogarcinol (6) foi o mais potente, com o valor de CI₅₀ de 0,72 µM, superando o Ebselen CI₅₀ de 3,4 µM. Ele demonstrou ausência de citotoxicidade contra linhas celulares THP-1 (CC₅₀ de 116,2 µM) e Vero (CC₅₀ > 150 µM), respectivamente. Outros compostos ativos mostraram nenhuma citotoxicidade contra THP-1 e linhas celulares Vero. Estudos de docking molecular revelaram interações na bolsa catalítica entre o composto isogarcinol (6) e os resíduos de aminoácidos que compuseram as díades catalíticas (His 41 e Cys 145).

Palavras-chave: Enzima M^{pro}. *Platonia insignis*. *Citrus sinensis*. Estudos fitoquímicos. Produtos Naturais. Inibição Enzimática.

ABSTRACT

The mutation of SARS-CoV-2 and the scarcity of effective drugs against COVID-19 continue to pose significant challenges for the scientific community. This places a burden on health systems around the world, despite the availability of vaccines to prevent this viral disease. In addition, the drug approved for the treatment of COVID-19 has several therapeutic limitations and consequently increases the demand for the identification of new antiviral agents. To contribute to the identification of new substances with antiviral potential, this research focuses on natural products from edible fruits, specifically *Platonia insignis* and *Citrus sinensis*, with potential inhibitory effects against the main protease of SARS-CoV-2, M^{pro}. Initially, LC-ESI-MS analysis was carried out on the fruit of *Platonia insignis*, which revealed the presence of biflavonoids in the seed and benzophenones in the pulp. Subsequently, through maceration extraction and chromatographic purification, two triglycerides (1 and 2), stigmasterol (3), chamaejasmine (4), volkensiflavone (5) in the seed, isogarcinol (6) and cyclooxanthochimol (7) in the pulp were obtained and identified. The peels of *Citrus sinensis*, subjected to chromatographic processes, resulted in the identification of two compounds: O-sinapoyl-glucopyranoside (8), hesperidin (9) and obtaining hesperitin (10) through semi-synthesis of hesperidin. The isolates were studied for their inhibitory potential against M^{pro} using the chromogenic method and Ebselen as a positive control. The compound isogarcinol (6) was the most potent, with a CI₅₀ value of 0.72 μM, surpassing the Ebselen CI₅₀ of 3.4 μM. It showed no cytotoxicity against THP-1 (CC₅₀ of 116.2 μM) and Vero (CC₅₀ > 150 μM) cell lines, respectively. Other active compounds showed no cytotoxicity against THP-1 and Vero cell lines. Molecular docking studies revealed interactions in the catalytic pocket between the compound isogarcinol (6) and the amino acid residues that made up the catalytic dyads (His 41 and Cyst 145).

Keywords: M^{pro} enzyme. *Platonia insignis*. *Citrus sinensis*. Phytochemical studies. Natural products. Enzyme inhibition

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ritonavir (1) e Nirmatrelvir (2)	2
Figura 2. A potencial transmissão de SARS-CoV-2 entre hospedeiros e humanos; adaptado de (ZHAO; CUI; TIAN, 2020)	8
Figura 3. Estrutura da enzima 3CLpro/Mpro	10
Figura 4. Fruto de <i>Platonia insignis</i> “Bacuri”	14
Figura 5. Biossíntese de triglicerídeos. Adaptado (DEWICK, [s.d.])	17
Figura 6. Biossíntese de benzofenonas isopreniladas. Adaptado (DEWICK, [s.d.])	19
Figura 7. Biossíntese de flavonóides. Adaptado (DEWICK, [s.d.])	21
Figura 8. Fluxograma de fracionamento e purificação de compostos de <i>P. insignis</i>	27
Figura 9. Fluxograma de fracionamento e purificação de compostos de <i>C. sinensis</i>	29
Figura 10. Modos negativos e positivos de LC-ESI-QTOFMS das frações de n-butanol da semente e polpa, respectivamente da fruta <i>P. insignis</i>	32
Figura 11. Proposta de fragmentação do íon m/z 559,1245	33
Figura 12. Proposta de fragmentação do íon m/z 541,1125	34
Figura 13. Proposta de fragmentação do íon 543,1255	36
Figura 14. Proposta do padrão de fragmentação de m/z 603,3708, t _R 12,40 min.	38
Figura 15. Proposta do padrão de fragmentação de m/z 603,3708, t _R 14,08 min.	39
Figura 17. Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto Tripalmitina ..	41
Figura 18. ¹ H-RMN (200 MHz, CDCl ₃) espectro do composto Tripalmitina	42
Figura 23. Espectro infravermelho em pastilha de KBr do composto 1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol	47
Figura 24. ¹ H-RMN (200 MHz, CDCl ₃) espectro do composto 1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol	49
Figura 25. ¹³ C-RMN (50 MHz, CDCl ₃) espectro do composto 1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol	50
Figura 26. UPLC-ESI-MS do composto 1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol.	50
Figura 27. UPLC-ESI-MS do composto 1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol.	51
Figura 29. ¹ H-RMN (200 MHz, CDCl ₃) espectro do composto Estigmasterol.	53
Figura 30. UPLC-ESI-MS do composto Estigmasterol.	53

Figura 32. ^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) espectro do composto Chamaejasmine.....	55
Figura 33. ^{13}C -RMN (50 MHz, CD_3OD) do composto Chamaejasmine.	57
Figura 34. UPLC-ESI-MS do composto Chamaejasmine.....	57
Figura 36. ^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) espectro do composto Volkensiflavona.	60
Figura 37. ^{13}C -RMN (50 MHz, CD_3OD) espectro do composto Volkensiflavona.....	61
Figura 38. UPLC-ESI-MS do composto Volkensiflavona.....	62
Figura 40. ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) espectro do composto Isogarcinol.	65
Figura 41. ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) espectro do composto Isogarcinol.....	66
Figura 42. UPLC-ESI-MS do composto Isogarcinol.	66
Figura 44. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) espectro do composto cicloxantoquimol.	69
Figura 45. ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) espectro do composto cicloxantoquimol. ..	71
Figura 46. HSQC (200 MHz, CDCl_3) espectro do composto cicloxantoquimol.....	71
Figura 47. HMBC (200 MHz, CDCl_3) espectro do composto cicloxantoquimol.....	72
Figura 48. UPLC-ESI-MS do composto Cicloxantochimol.....	73
Figura 50. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) espectro do composto O-Sinapoil-glucopiranoside.	76
Figura 51. HSQC (400 MHz, CDCl_3) espectro do composto O-Sinapoil-glucopiranosideo.	77
Figura 52. HMBC (400 MHz, CDCl_3) espectro do composto O-Sinapoil-glucopiranosideo.	77
Figura 53. RMN 2D, NOESY (400 MHz, CDCl_3) espectro do composto O-Sinapoil-glucopiranosideo.	78
Figura 55. RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) espectro do composto Hesperidina.	79
Figura 57. HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto Hesperidina.....	81
Figura 60. RMN de ^1H (200 MHz, MeOD) espectro do composto Hesperitina.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil químico das frações n-butanólica da semente e polpa da fruta <i>Platonia insignis</i>	40
Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (CDCl_3).....	46
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (CDCl_3).....	51
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (CDCl_3).....	54
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (MeOD).	58
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (MeOD).	63
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100MHz) (CDCl_3).....	67
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100MHz) (CDCl_3).....	74
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100MHz) (MeOD).	78
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (MeOD).	82
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (MeOH).	85
Tabela 12. Efeito da inibição enzimática (IC50) , citotoxicidade (CC50) dos compostos.	89
Tabela 13. Valores de probabilidade de ligação dos compostos analisados sob a MPRO do SARS-CoV-2 (PDB: 5RG1).....	89
Tabela 14. Valores de probabilidade de ligação dos compostos analisados sob a M ^{PRO} do SARS-CoV-2 (PDB: 7NG3)	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CC – Coluna cromatográfica
- CCD – cromatografia em camada delgada
- COSY - Do inglês: “Homonuclear Correlation Spectroscopy”
- CI₅₀ – Constante de inibição mínima 50%
- d – Duplete
- dd – Duplo duplete
- DEPT - Do inglês: “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- HSQC - Do inglês: “Heteronuclear Single Quantum Coherence”
- GL – Do inglês: “Gay lussac”
- J - Constante de acoplamento
- HR-ESI-MS – Espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray
- Hz – Hertz
- IV- Infravermelho
- LC-MS – Do inglês: “ Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
- m – Multiplete
- p.f. – Ponto de fusão
- ppm - Partes por milhão
- Rf. – Função da fase estacionária usada e do eluente
- RMN - Ressonância Magnética Nuclear
- t – triplete
- UV- Ultravioleta
- TGEV- Virus Gastroenterite
- TMS – Tetrametilsilano
- δ - Deslocamento químico

SUMÁRIO

1.1	INTRODUÇÃO	51
1.1.1	Objetivo Geral.....	5
1.1.2	Objetivos Específicos	5
2	REFERENCIAL TEÓRICO	6
2.1	PANDEMIA	6
2.2	COVID-19.....	7
2.3	ENZIMA m ^{pro}	10
2.4	PLANTAS MEDICINAIS E USO POPULAR	12
2.5	PRODUTOS NATURAIS DERIVADOS DE PLANTAS.....	16
3	SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	24
3.1	ESTUDO FITOQUÍMICO	24
3.1.1	Coleta de Plantas.....	24
3.1.2	Materiais e equipamentos	25
3.1.3	Método de análise para cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. 25	
3.1.4	Extração do material vegetal de <i>Platonia insignis</i> e fracionamento líquido-líquido.....	26
	Purificação dos compostos.....	27
3.1.5	Extração do material vegetal de <i>Citrus sisnensis</i> e fracionamento líquido-líquido. 28	
3.2	ENSAIOS E ATIVIDADES M ^{pro}	29
3.2.1	Ensaio de Inibição da Enzima M ^{pro}	29
3.2.2	Ensaio de CI ₅₀ dos compostos para a Inibição da enzima M ^{pro}	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
4.1	ESTUDO FITOQUÍMICO	31
4.1.1	Caracterização dos constituintes químicos de <i>Platonia insignis</i>	31

4.1.2	Caracterização dos constituintes químicos de <i>Citrus sinensis</i>	75
4.2	Efeitos inibitórios dos compostos frente a Sars-cov-2 m ^{PRO}	86
5	CONCLUSÃO.....	93
6	REFERÊNCIAS.....	94
7	PUBLICAÇÕES	123

1 INTRODUÇÃO

A pandemia causada pelo vírus causados da Síndrome Aguda Respiratória por Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) teve início em 2019 e em 5 de maio de 2023, a Organização Mundial da saúde (OMS) declarou o fim da Emergência de Saúde Pública da pandemia da doença por coronavírus 2019 (Covid-19) em todo o planeta, deixando um rastro de mais de 6 milhões de vítimas fatais em todo o mundo (MSEMBURI et al., 2023). Durante esse período, várias variantes do vírus emergiram, desencadeando ciclos de infecção humana com diferentes níveis de gravidade. A pandemia resultou em um colapso generalizado na saúde global, desencadeando crises sociais e econômicas (WANG, *et al.*, 2022).

O sistema de saúde deteriorou-se de forma abrupta, devido à alta transmissibilidade do vírus, o que resultou em um aumento expressivo na taxa de mortalidade. Desde o momento em que a enfermidade foi declarada uma pandemia, cientistas de todas as partes do globo se uniram para compreender a fisiopatologia do SARS-CoV-2 (DE SOUZA NORONHA et al., 2020).

Entre as várias estratégias aplicadas para enfrentar esta crise global, a vacinação pública surge como a abordagem mais apropriada para controlar uma pandemia. Foi demonstrado que a utilização de vacinas atenuadas protegem uma vasta população contra doenças fatais (MOORE et al., 2022).

Embora os vírus atenuados em vacinas ainda mantenham a capacidade de se replicar *in vivo*, resultando em uma doença de intensidade reduzida, eles se mostram altamente eficazes na estimulação do sistema imunológico e na indução de uma memória imunológica robusta e duradoura, que desempenha um papel eficaz na prevenção de infecções (HASAN et al., 2022).

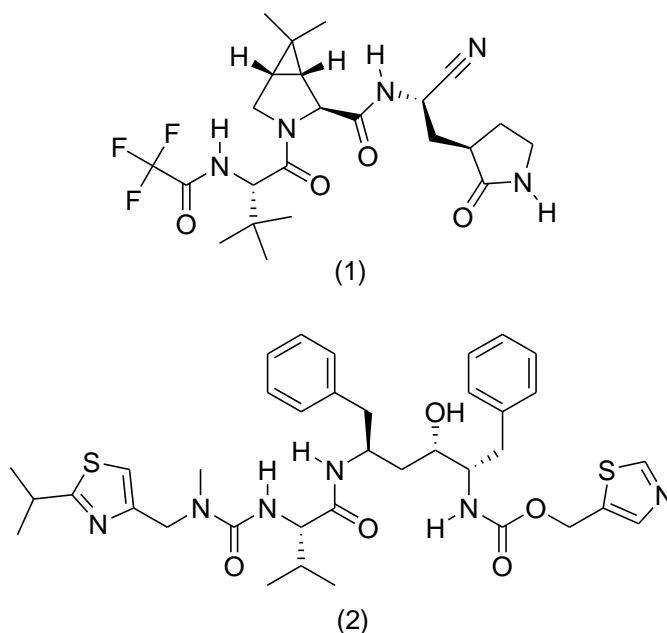
A obtenção de vacinas atenuadas pode envolver o cultivo rigoroso do vírus ou a produção de uma versão geneticamente enfraquecida do vírus. No entanto, vale destacar que a atenuação de inúmeros vírus é uma tarefa complexa e está associada a consideráveis riscos de biossegurança, a cadeia de abastecimento e a gestão de vacinas torna-se um desafio para os governos (VALIZADEH et al., 2023).

No início da pandemia foi adotada a estratégia de emergência conhecida como reposicionamento de medicamentos. Essa estratégia consiste em reutilizar medicamentos com propriedades farmacológicas já aprovadas para o tratamento de outras ou novas doenças. Essa abordagem é empregada em situações de extrema necessidade (TU et al., 2020).

Contudo, o plano de reposicionamento de medicamentos apresenta algumas limitações também, que incluem obstáculos devido a patentes, complexidade das regulamentações legais, possíveis conflitos de interesse da indústria farmacêutica, diversidade da população em novos ensaios clínicos e a ocorrência de efeitos colaterais (MAHMOUD; SHITU; MOSTAFA, 2020).

Um exemplo de medicamento autorizado pelo órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA) como uso emergencial que foi aprovado pela Anvisa e segue sendo utilizado atualmente é o Paxlovid. Este medicamento é a combinação de ritonavir (1) e nirmatrelvir (2) apresentado na Figura 1 (WEN et al., 2022).

Figura 1. Ritonavir (1) e Nirmatrelvir (2)



Nirmatrelvir (2) é um inibidor de protease enquanto Ritonavir (1) reduz o metabolismo do inibidor no organismo garantindo o aumento da eficácia (MOHAMMAD

et al., 2020). No entanto, estudos indicam que Paxlovid não é aconselhado para pacientes que apresentam insuficiência renal grave ou insuficiência hepática grave. Em casos de insuficiência renal moderada, é necessário administrar uma quantidade reduzida da Paxlovid; já o composto Ritonavir tem o potencial de causar danos ao fígado, portanto, deve-se ter precaução ao administrar Paxlovid a pacientes com condições hepáticas pré-existentes, anomalias nas enzimas hepáticas ou inflamações hepáticas. Devido ao elevado risco de interação medicamentosas, é recomendado que os sistemas de saúde e hospitalares realizem monitoramento e ofereçam suporte à tomada de decisões ao considerar o uso de Paxlovid (FISHBANE; HIRSCH; NAIR, 2022).

É crucial ponderar sobre a utilização de Paxlovid em pessoas com infecção não controlada ou não diagnosticada pelo vírus da imunodeficiência humana -1 (HIV-1), pois pode levar ao desenvolvimento de resistência do HIV-1 (PARUMS, 2022) (FDA, 2021).

Embora se tenha alcançado notáveis avanços na pesquisa sobre o COVID-19, as vacinas e o medicamento Paxlovid têm se destacado pelos seus eficazes efeitos terapêuticos contra a doença. Contudo, o vírus segue sofrendo mutações e as sequelas resultantes da infecção suscitam grande preocupação. Dessa forma, é imperativo continuar com ensaios clínicos e pesquisas para identificar terapias eficazes contra o SARS-CoV-2. Até o momento, não foi desenvolvido um medicamento com ampla abrangência, capaz de atuar como antiviral, imunomodulador e anti-inflamatório, sem causar efeitos colaterais, adequado para todos os perfis de pacientes (MEHTA; SILVEIRA, 2021).

O método empregado desde os primórdios para combater um largo espectro de doenças, é o estudo dos metabólitos secundários produzidos por plantas medicinais, sendo a principal base para o desenvolvimento de vários produtos utilizados na medicina tradicional (GASMI et al., 2022).

A natureza possui uma variedade e complexibilidade de metabólitos secundários biossintetizados por fungos, bactérias e pelas plantas (frutos, folhas, cascas, caules e raízes), estes metabólitos são produzidos devido aos mecanismos de defesas destes organismos as condições ambientais. Essa fonte valiosa de produtos naturais que geram alimento, suplementos dietéticos e medicamentos fitoterápicos demonstra ser

extremamente importante devido aos seus impactos para saúde humana, econômicos, sociais e climáticos positivos (KOSALEC; CVEK; TOMIĆ, 2009).

A fitoterapia é amplamente conhecida por sua baixa incidência de efeitos colaterais, conforme evidenciado na literatura. Um exemplo notável é o extrato de sementes de *Aesculus hippocastanum* conhecido como castanha-da-índia. Este extrato é rico em fitocompostos como flavonoides, polifenóis, glicosídeos saponínicos (escina), epicatequina, taninos, kaempferol, esculina, fraxina, carboidratos, ácidos graxos essenciais (ácido linoleico), ácido oleico e bases purinas (adenina e guanina). Devido a esses constituintes vitais, a castanha-da-índia é amplamente empregada na fitomedicina para a prevenção e tratamento de diversas condições, incluindo congestão venosa em úlceras de perna, contusões, artrite, reumatismo, diarreia, flebite e outros. Todos esses efeitos têm respaldo científico comprovado (IDRIS; MISHRA; KHUSHTAR, 2020).

Seguindo este raciocínio, existe um amplo espectro de compostos naturais que possuem atividades antivirais, anti-inflamatórios e imunomoduladoras que controlam doenças acometidas por microorganismos. Pesquisas demonstram que flavonoides (hesperitina, quercetina, luteonina e amentoflavona), terpenóides (iguesterina, celastrol e tingenona), algumas estruturas de alcaloides (licorina e emetina) possuem atividade inibitória frente a principal protease do SARS-CoV, a 3CL^{pro} (Protease semelhante a 3-quimi tripsina), trazendo novas possibilidades para a descoberta de promissores medicamentos antivirais para SARS-CoV-2 (BOOZARI, 2020).

Desta maneira, esse projeto pretende buscar compostos fitoquímicos que possuem mecanismos com ação polifarmacológicas em suas atividades biológicas, trazendo possibilidades promissoras contra SARS-CoV-2.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo realizar o estudo fitoquímico das frutas *Platonia insignis* “Bacuri” (semente e polpa) e *Citrus Sinensis* “Laranja” (cascas), avaliar as atividades inibitórias dos compostos isolados frente a protease M^{PRO} do SARS-CoV-2 (CI₅₀) e a citotoxicidade (CC₅₀) dos compostos ativos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- (i) Macerar e extrair separadamente polpa e sementes de *Platonia insignis* “Bacuri” e cascas de *Citrus Sinensis* “Laranja”;
- (ii) Caracterizar os extratos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas;
- (iii) Isolar e identificar os metabólitos secundários;
- (iv) Avaliar as atividades dos compostos obtidos frente a protease M^{PRO} do SARS-CoV-2;
- (v) Avaliar a citotoxicidade dos compostos obtidos frente as linhagens celulares THP-1 e Vero.
- (vi) Estudo das relações estruturas – atividades utilizando docking molecular.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PANDEMIA

O surgimento e a propagação de doenças infecciosas com potencial pandêmico tem sido uma ocorrência regular ao longo da história da humanidade. Epidemias e pandemias de grande escala, como a Peste Bubônica que matou em torno de um terço da Europa (25 milhões de pessoas), cólera, a gripe, Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) e Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) já apavoraram a humanidade (GLATTER; FINKELMAN, 2021).

Muitas doenças infecciosas, que levam a pandemias, são causadas por agentes patogênicos zoonóticos que foram transmitidos aos seres humanos devido ao aumento do contato com animais, através de atividades de reprodução, caça e comércio ilegal da vida selvagem. A compreensão dos mecanismos de transmissão de patógenos aos humanos tem permitido o estabelecimento de métodos de prevenção e controle de infecções (PIRET; BOIVIN, 2021).

Estudos científicos realizados antes do início da pandemia causada pela COVID-19 já indicavam a possibilidade de surgimento de novos vírus e ocorrência de surtos de doenças já existentes. Além disso, evidências substanciais destacam os impactos da crise climática no equilíbrio natural das espécies e na propagação de diversos vírus (BEYER; MANICA; MORA, 2021).

Ao longo dos séculos, a implementação de medidas de saúde pública, como distanciamento social, higiene e controle de fronteiras, tem ajudado a conter a propagação de doenças infecciosas, controlar e diminuir o número de casos e mortes e manter a estrutura da sociedade. Mesmo na ausência de intervenções farmacêuticas, esses métodos de contenção ainda são utilizados para controlar uma pandemia, e foram as primeiras tratativas possíveis no início da pandemia (DE OLIVEIRA; LUCAS; IQUIAPAZA, 2020).

Programas globais de vigilância de agentes patogênicos transmitidos pela água, doenças transmitidas por vetores e repercussões zoonóticas na interface animal-homem são de extrema importância para detectar rapidamente o surgimento de ameaças

infecciosas. Novas tecnologias para testes de diagnóstico rápido, rastreamento de contatos, reorientação de medicamentos, biomarcadores da gravidade da doença, bem como novas plataformas para o desenvolvimento e produção de vacinas, são necessárias para uma resposta eficaz em caso de pandemias (CÓRDOBA-AGUILAR et al., 2021).

2.2 COVID-19

A COVID-19 é uma doença causada por coronavírus de síndrome respiratória aguda grave 2, SARS-CoV-2. Os coronavírus são vírus de RNA de fita simples envelopados que podem infectar diversos hospedeiros, incluindo aves, mamíferos e humanos. Coronavírus são conhecidos por sofrer mutações rapidamente, alterar o tropismo do tecido, além de possuir uma excelente capacidade de adaptação (JIM, et al, 2020).

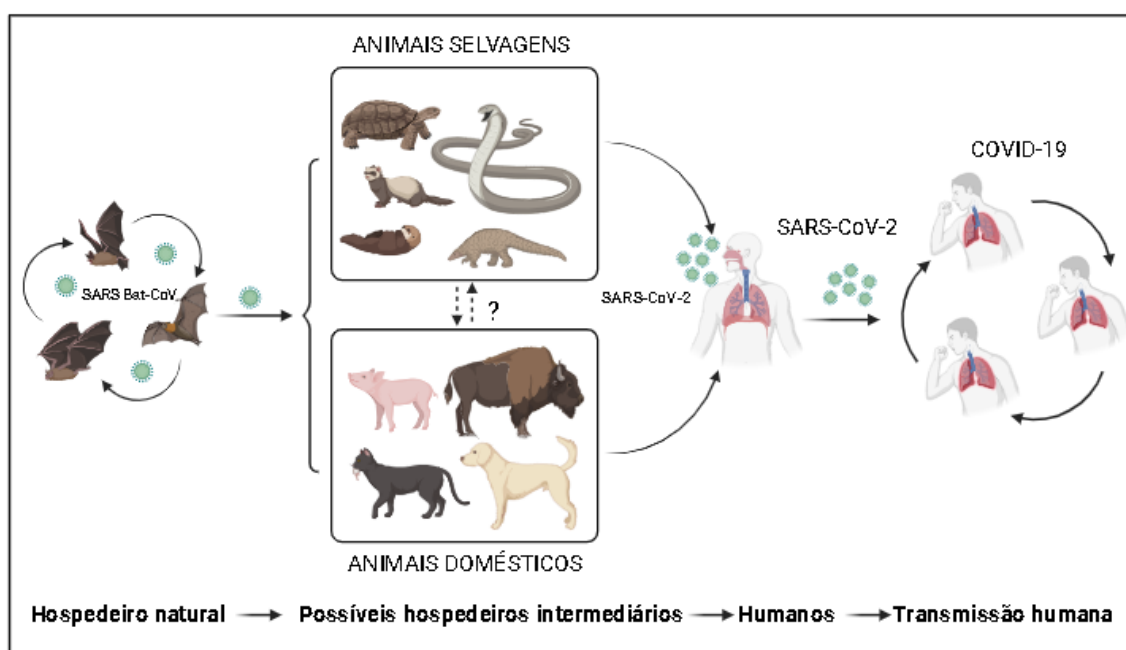
O coronavírus é uma família de vírus que causam infecções respiratórias, os mais comuns que infectam humanos são o alpha coronavírus 229E e NL63 e beta coronavírus OC43, HKU1; SARS-CoV (causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave ou SARS); MERS-CoV (causador da Síndrome Respiratória do Oriente Médio ou MERS) e nCoV-2019 (novo tipo de vírus do agente coronavírus, surgiu em 2019) (PIRET; BOIVIN, 2021).

O primeiro relato de vírus do tipo coronavírus nos seres humanos foi em 1960, porém já havia conhecimento destes através de recuperações de animais seguida pelo isolamento de doenças infecciosas como o vírus da bronquite (IBV) de galinhas em 1937, em 1946 descobriu-se que os porcos transmitiam um vírus gastroenterite (TGEV) (BEAUDETTE et al, 1937), já em 1949 foi relatado sobre o vírus da hepatite murina (MHV) por camundongos (CHEEVER, 1949).

Existem diferentes especulações sobre a origem do vírus que causou a pandemia de COVID-19. Um dos relatos é a disseminação de SARS-CoV-2 por meio de zoonose, apresentado na Figura 2, através da ingestão de morcego contaminado em um mercado popular, em Wuhan na província de Hubei (China), em dezembro de 2019 (LAM, 2020). A maioria das especulações se enquadram em cunho político.

A doença é transmitida por inalação ou contato com gotículas infectadas, produzidas por tosse, espirro, conversa, o toque ao próprio rosto após o contato com uma superfície contaminada, e o período de incubação varia de 2 a 14 dias (PEI et al., 2021). Os sintomas mais comuns são: febre, tosse, dor de garganta, falta de ar, fadiga, mal-estar, perda do olfato e paladar, falência de múltiplos órgãos, choque séptico, coágulos sanguíneos, entre outros (SINGHAL, 2020).

Figura 2. A potencial transmissão de SARS-CoV-2 entre hospedeiros e humanos; adaptado de (ZHAO;CUI; TIAN, 2020)



Pesquisas demonstram que análises de amostras salivares de dois pacientes revelaram resultados positivos para o vírus, mesmo que seus esfregaços respiratórios nasais tenham apresentado resultados negativos no mesmo dia. Há evidências de que o vírus pode migrar da nasofaringe, para a cavidade oral, uma vez que as células epiteliais da mucosa oral apresentam alta expressão de receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2). Além disso, estudos indicam que a urina de um paciente assintomático continha ácido nucleico viral, sugerindo a possibilidade de transmissão do vírus por meio desse fluido, e que a depender da situação de saneamento básico local, pode propiciar a magnitude da transmissibilidade (KARIA et al., 2020).

Exames de esfregaços conjuntivais em três pacientes com manifestações oculares, resultaram positivo para COVID-19. Contudo, apenas em um desses pacientes foi identificada a presença de RNA viral nas lágrimas. Adicionalmente, descobriu-se que o sêmen de seis casos testou positivo para SARS-CoV-2. Diante desses achados, os pesquisadores sugerem que a presença do vírus no sêmen pode suscitar preocupações sobre a possível transmissão sexual do vírus (LI et al., 2020).

Devido a forma de transmissão deste vírus, as medidas preventivas para COVID-19 incluem, lavagem das mãos com sabonetes, álcool 70°, uso de máscara adequada e distanciamento social (World health organization, 2021).

Os estudos até o momento sobre o vírus e suas transmissões, detalham em testes de triagem sobre três mutações na proteína SARS-CoV-2, chamadas de variantes: Delta, Alfa ou Omicron e Beta ou Gama (SOFONEA et al., 2022).

O melhor método de proteção utilizado até o momento são as vacinas, atualmente já disponibilizadas em vários países. Mesmo com as vacinações, a doença ainda causa efeitos que contribuem para quadros clínicos graves, gerando diferentes sequelas que ainda não são bem conhecidas, como por exemplo, casos excessivos de problemas cardiovasculares pós contaminação do vírus e o fato do vírus se alojar em tecido cerebral (AL-ALY; BOWE; XU, 2021).

Pesquisas relacionam uma combinação complexa entre exposições a vacinas e infecções por diferentes linhagens, gerando uma heterogeneidade de proteção imunológica, e o surgimento de novas variantes (SUZUKI, 2022).

Devido a complexibilidade e amplitude dos sintomas causados pela COVID-19, uma das estratégias para o desenvolvimento de fármacos contra esta doença é a procura por substâncias ativas e que possua atividades associadas, como: antiviral, anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora (OTHAMARI, 2019).

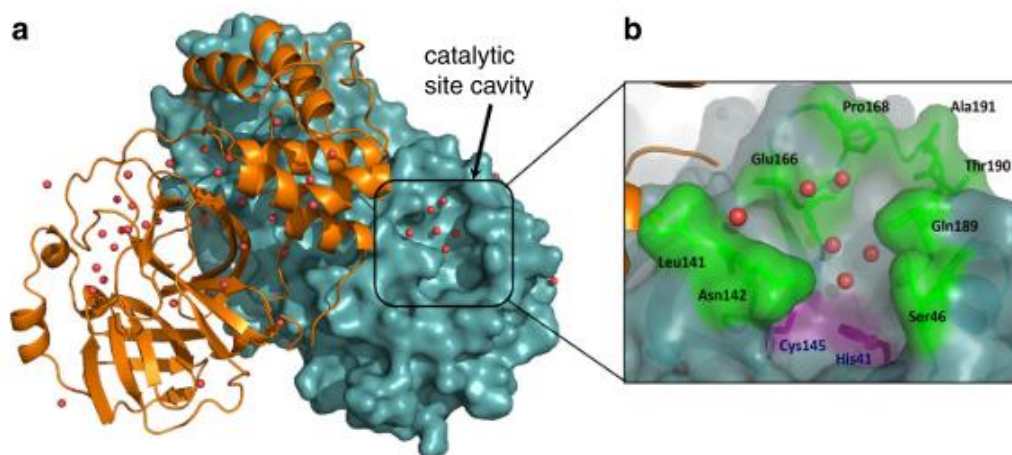
Estratégias de utilização de micro e macro nutrientes combinadas com drogas antivirais e extratos vegetais podem agir na prevenção e/ou diminuição do impacto da doença causada em diferentes tecidos do corpo humano, além de estudos aprofundados da enzima M^{PRO} do vírus, que possui o papel fundamental no processo de replicação e transcrição deste microorganismo (GASMI et al., 2022).

2.3 ENZIMA M^{PRO}

A principal protease (M^{PRO}) do SARS-CoV-2 é uma das enzimas chave do coronavírus, e possui um papel fundamental na mediação da replicação e transcrição viral, pois é responsável pela proteólise das poliproteínas. Durante este processo são liberadas proteínas virais funcionais para a replicação do vírus. Conhecendo esta enzima é possível identificar compostos que possuam mecanismos com atividade inibitória, através de estudo *in silico*, por simulação computacional (JIN, 2020).

A enzima M^{PRO} apresentada na Figura 3 é um homodímero composto por três domínios, regiões da sequência polipeptídica que apresentam aspectos estruturais e funcionais característico, domínios: I (resíduos 10-99), II (resíduos 100-182) e III (resíduos 198-303). Os domínios I e II são unidos por uma conexão flexível chamada loop (resíduos 183-197). A segmentação de sítios de ligação de substrato (SBSs) é uma estratégia comum para triagens virtuais (VSs), esta é a região que se faz o ancoramento dos compostos para análise de inibição. A M^{PRO} também pode ser inibida alostericamente, ou seja, por interações em regiões separadas ou diferentes do sítio ativo, na qual pequenas moléculas regulatórias podem ligar-se e atenuar a atividade catalítica desta enzima (JIMÉNEZ-AVALOS et al., 2021).

Figura 3. Estrutura da enzima 3CLpro/Mpro



Fonte – Adaptado de KNELLER et al., 2020.

A 3CL M^{pro} é uma enzima única por ter uma diversidade incomum de ter um resíduo catalítico de Cisteína (Cys), aminoácido componente da proteína. Ao contrário de outras enzimas semelhantes à quimiotripsina e muitas hidrolases de Serina (Ser) (ou Cys), ela possui um par catalítico Cisteína –Histidina (Cys-His) em vez de uma tríade canônica Serina((Cisteína-Histidina-Aspártico(Glutâmico))(Ser((Cys))-His-Asp(Glu). Os resíduos catalíticos Cys145 e His 41 na 3CL M^{pro} estão localizados em uma cavidade ativa na superfície da proteína. Essa cavidade pode acomodar quatro resíduos de substrato nas posições P1' a P4 e é cercada por resíduos de ambos domínios I e II (KNELLER et al., 2020).

Estudos demonstram o mecanismo catalítico da M^{pro} utilizando o modelo completo da enzima em uma simulação computacional. Cada etapa do processo catalítico foi detalhadamente caracterizada, incluindo a descrição dos reagentes produtos e estados de transição envolvidos. A etapa limitante da taxa no processo catalítico é a hidrólise do aduto tio éster-enzima, e a barreira energética calculada está em conformidade com os dados cinéticos disponíveis. Os cálculos realizados apoiam a hipótese de formação de um par iônico antes do ataque nucleofílico de Cys145 ao substrato, mecanismo sugerido por estudos anteriores. Observou-se que o grupo molecular não natural e volumoso na posição P1' do substrato não é responsável pelo ataque nucleofílico concomitante descrito em trabalhos anteriores, nem pelas maiores energias de ativação e reação. Além disso, os resultados elucidam o papel crucial dos resíduos Gly143, Ser144 e Cys na estabilização do buraco oxianion, contribuindo para a redução da barreira de ativação na etapa limitante da taxa (FERNANDES; SOUSA; CERQUEIRA, 2022).

Usualmente os inibidores devem possuir as seguintes características: (i) serem reconhecidos pelo sítio ativo e permitirem o alinhamento correto da Gln, ou uma estrutura molecular similar, em relação à tríade catalítica, e (ii) reagirem com os resíduos do sítio ativo, inibindo irreversivelmente a enzima. Para atender ao primeiro requisito, o inibidor deve imitar o padrão de interações intermoleculares observadas nos peptídeos do substrato original. Como o fármaco candidato competirá com os substratos naturais da M^{pro} pela ligação ao sítio ativo, é crucial que ele possua um grau de afinidade igual ou

superior ao desses substratos. Para inibir irreversivelmente a enzima, o composto deve reagir com a díade catalítica e formar um aduto tio éster-enzima semelhante ao gerado pelo substrato natural. Esse intermediário de reação deve ser estável, evitando hidrólise ou a reação reversa (FERNANDES; SOUSA; CERQUEIRA, 2022).

Utilizam-se técnicas, como docking molecular, simulações de dinâmica molecular (MD) e cálculo de energia livre de ligação para avaliar perfis de substâncias químicas em complexo com a enzima M^{pro}, estas são ferramentas de baixo custo que permitem analisar a interação de ligantes no local ativo da enzima, estabelecendo uma pré-análise de novos agentes antivirais contra COVID-19 (SILVA; KRUGER; MOLFETTA, 2021). Diversos estudos estão na procura de compostos que possuem ação inibitória sobre a protease M^{pro} de SARS-CoV-2. Os inibidores que estão sendo alvo dessas pesquisas são fármacos usados contra outras doenças humanas e produtos naturais presentes nas plantas, organismos marinhos, entre outros (FANI et al, 2020).

2.4 PLANTAS MEDICINAIS E USO POPULAR

O homem primitivo dependia essencialmente da natureza. Através das casualidades, observações, necessidades, intuições e todos os outros fatores empíricos o homem foi descobrindo a magnitude da natureza; os conhecimentos da humanidade sobre as virtudes das plantas confundem-se com sua própria história de existência (ALMEIDA, 2011).

A história da cura encontra-se intimamente ligada as plantas medicinais e aos recursos minerais. Acredita-se que o registro mais antigo sobre ervas e tratamentos é o Pen Ts'ao (A grande fitoterapia), de 2.800 a.C. escrito pelo chinês herborista Shen Nung, que descreve o uso de centenas de plantas medicinais no tratamento de várias doenças, catalogando mais de 360 ervas medicinais e venenos usados sob a inspiração taoísta de Pan Ki, considerado o Deus da criação (ELDIN *et al.*, 2001).

A natureza é rica em substâncias essenciais para o desenvolvimento dos seres, através da nutrição o organismo consegue gerar um equilíbrio e manter a imunidade necessária para proteger de agentes patogênicos (CALDER, 2020).

As plantas, organismos marinhos, fungos e bactérias produzem substâncias biologicamente ativas. Estas substâncias biologicamente ativas foram e continuam sendo importantes para o desenvolvimento de fármacos, sejam de origem natural ou prospecção de compostos sintéticos planejados a partir de produtos naturais (HOFFMANN et al., 2018).

Os medicamentos fitoterápicos curam doenças de gerações em gerações. Compostos que ocorrem naturalmente nas plantas exibem ações sinérgicas, como antivirais, antibacterianas, antiprotozoárias e antioxidantes, estudos científicos diagnosticaram casos relacionados de infecções virais, protozoários e bacterianos, pacientes com amebíase, *Escherichia coli*, infecção gastrointestinal, infecção de pele e do trato urinário foram tratados com medicamentos fitoterápicos. Estes tratamentos possuem uma relação de custo-eficácia e procura nos cuidados de saúde primários, com aceitabilidade cultural e efeitos secundários mínimos (CHAUGHULE; BARVE, 2024).

Uma família deste reino que possui grande potencial farmacológico são as plantas pertencentes a família Clusiaceae (nome alternativo válido Guttiferae Juss.), é amplamente utilizada na etnomedicina para o tratamento de uma série de doenças como câncer, diabetes, inflamações e infecções. Alguns gêneros como *Garcinia*, *Allanblackia*, *Clusia*, *Rheedia* e *Hypericum*, possuem atividades anti-inflamatórias significativas, estudos revelam a redução total de leucócitos, neutrófilos, concentração total de proteínas, inibição da atividade da MPO e mediadores inflamatórios como expressão de NF- κ B e iNOS, níveis de PGE2 e IL-1 β , além da diminuição da inflamação crônica em experimentos com animais (DE MELO et al., 2014). Extratos etanólicos de folhas e galhos de Clusiaceae demonstraram ser potentes inibidores de α -glicosidase com valores de CI₅₀ na faixa de 2,33-112,01 μ g/mL, comparados com o controle de arcabose (CI₅₀ 117,20 μ g/mL) (ELYA et al., 2012).

A família Clusiaceae possui três tribos, dentre estas, estão a tribo *Symphonieae*, que engloba 48 espécies acomodadas em 7 gêneros (*Lorostemon*, *Montrouzieria*, *Moronobea*, *Pentadesma*, *Symphonia* e *Thysanostemon*), partes dessa planta são utilizadas na medicina popular, além de serem espécies de grande importância econômica e cultural. Estudos químicos destes gêneros demonstram que são fontes de benzofenonas,

xantonas, biflavonóides, sesquiterpenóides, triterpenóides, flavonóides, ácidos graxos, entre outros também são relatados (DIEL; MARINHO; VON POSER, 2022).

Essa família tem diversas espécies, incluindo *Platonia insignis*, nativa da Amazônia e conhecida como 'Bacuri', na Figura 4. Ela é uma das frutas mais apreciadas pelos moradores locais devido ao seu sabor exótico e suas inúmeras aplicações, desde a culinária até a medicina tradicional. Todas as partes da fruta são aproveitadas, tanto a polpa quanto a semente. (ALVES TEIXEIRA DA ROCHA; HELENA MELLER DA SILVA; MANOEL DA CRUZ RODRIGUES, 2024).

Figura 4. Fruto de *Platonia insignis* “Bacuri”



Fonte:

A manteiga feita da semente de *P. insignis* é amplamente utilizada pela população local. Pesquisas recentes avaliaram os efeitos do tratamento com a manteiga da semente do bacuri em hamsters dislipidêmicos, incluindo peso corporal, crescimento, índice de massa corporal, perfil lipídico, índices ateroscleróticos e função hepática. Como resultados positivos, não foram observadas diferenças significativas nos triglicerídeos e no colesterol total dos hamsters, além dos bons resultados para o perfil lipídico, com aumento do HDL-c e redução do LDL-c, indicando menor risco de aterosclerose (LIMA et al., 2021).

Estudos de identificação por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC-DAD) revelaram que *P. insignis* contém biflavonóides, com destaque para a morelloflavona, que mostrou alto poder antioxidante in vitro com uma EC₅₀ variando de

8,0-10,5 µg/mL em diferentes protocolos. Além disso, esse composto apresentou atividade antiglicante (80%) e inibição moderada das atividades do óxido nítrico (1,56µg/mL para > 90% de viabilidade celular). O extrato de acetato de etila da casca de *P. insignis* demonstrou promissora atividade anti-inflamatória in vivo, avaliada pelo protocolo de edema de pata (RIBEIRO et al., 2021).

Essa fruta também possui atividade antifúngica, com destaque para um metabólito secundário, a ononina – glicosídeo de isoflavona, que apresentou eficácia em ensaios *in silico* e *in vitro* contra infecções por *Candida Albicans*. Portanto, o bacuri possui um grande potencial para o desenvolvimento de medicamentos de origem natural (DA SILVA et al., 2020).

Outra família reconhecida pelo seu grande potencial farmacológico é a família das Rutáceas, destacando-se por suas diversas atividades biológicas, como antioxidante, antibacteriana, antidiabética, antifúngica, antiosteoporótica, hipocolesterolêmica, antiobesidade, devido a presença de ácidos fenólicos, flavonóides e componentes de óleos essenciais (DONGRE et al., 2023).

Uma das espécies mais conhecidas dessa família é a *Citrus sinensis*, originária de uma região que abrange o sul da China, nordeste da Índia e Mianmar, conhecida popularmente como laranja ou laranja doce. Esses frutos possuem em sua composição química flavonoides, antocianinas, ácido ascórbico e ácidos hidroxicinâmicos. Estudos com extratos de cascas de *C. sinensis* demonstraram fortes atividades antioxidantes e antimicrobiana, sendo que certos compostos presentes na casca mostraram-se eficazes contra vários tipos de bactérias e fungos patogênicos (AJIRUL ABIQ; SUTRISNO; MARFUAH, 2024).

Um marcador taxonômico importante de *C. sinensis* é a hesperidina, que possui ação anti-inflamatória e antioxidante (TEJADA et al., 2017), essa molécula recentemente chamou a atenção dos pesquisadores devido a interação com a enzima M^{pro}, conforme demonstrado em ensaios *in silico* (BELLAVITE et al, 2020).

Estudos mostraram que a administração de hesperidina em animais diabéticos resulta em perda de peso corporal e melhora o conteúdo de glicogênio no tecido hepático, auxiliando do reestabelecimento das atividades da glicogênio sintase e glicogênio fosforilase (SUNDARAM; NANDHAKUMAR; HASEENA BANU, 2019).

2.5 PRODUTOS NATURAIS DERIVADOS DE PLANTAS

Para garantir sua sobrevivência, crescimento e reprodução, as plantas necessitam habilmente transformar e interconverter compostos orgânicos. Estes processos demandam energia para a síntese das moléculas essenciais, frequentemente referidas como blocos de construção. Essa intrincada dinâmica é orquestrada por uma série de reações químicas, mediadas por enzimas e meticulosamente reguladas, formando o que é conhecido como metabolismo intermediário. As múltiplas vias envolvidas nesse complexo processo são chamadas de vias metabólicas (DEWICK, [s.d.]).

Moléculas fundamentais para sustentação da vida, tais como carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos, são sintetizadas por meio da via metabólica primária, é destinado principalmente à manutenção da vida e à reprodução. Esta rota metabólica através de outras vias é capaz de gerar também os metabólitos secundários, os quais consistem em compostos com uma distribuição mais limitada na natureza e cujas composições variam entre as diferentes espécies de plantas (TWAIJ; HASAN, 2022).

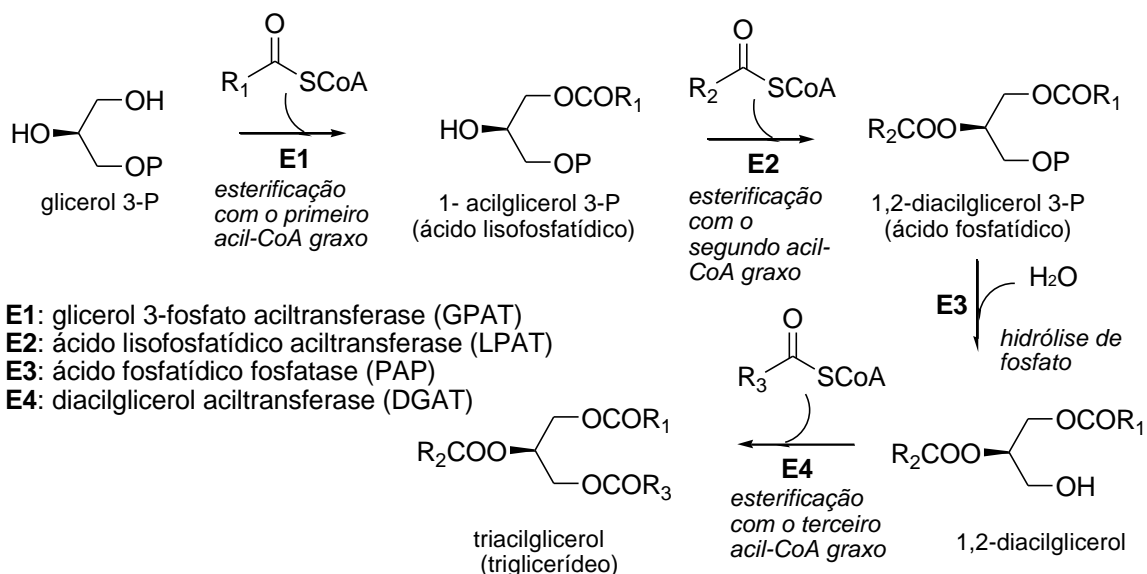
O metabolismo secundário inclui todas as substâncias e todos os processos que envolvam as inter-relações do indivíduo com seu meio ambiente, sendo os compostos produzidos dispensáveis para o crescimento e desenvolvimento de um indivíduo isolado, porém, estes metabólitos também chamados de especiais, são indispensáveis para a existência e sobrevivência de uma espécie em seu ambiente, onde ela interage com diversos outros microorganismos (SIMÕES, 2017.) Os metabólitos secundários não são necessariamente gerados sob todas as condições, e em muitos casos, suas funções e benefícios para os organismos ainda não foram completamente compreendidos pelas pesquisas científicas. No entanto, é sabido que esses metabólitos desempenham um papel indireto em diversos estágios do desenvolvimento das plantas, conferindo-lhes uma ampla gama de características que aumentam sua capacidade de sobrevivência. Entre essas características, estão incluídas a promoção da interação planta-polinizador, facilitar a formação de nódulos radiculares a partir de bactérias fixadoras de nitrogênio, produzir compostos tóxicos que oferecem proteção contra predadores, e até mesmo a emissão de atrativos voláteis que podem beneficiar tanto a planta quanto outras espécies. Além disso,

esses metabólitos também desempenham um papel crucial na proteção contra a radiação ultravioleta (BIRCHFIELD; MCINTOSH, 2020).

Os produtos naturais com atividade farmacológica são originados do metabolismo secundário. No entanto, é razoável supor que todos os metabólitos secundários desempenham algum papel vital para o bem-estar dos organismos que os produzem.(REGINA DE CARIDAD RODRÍGUEZ MUÑOZ et al., 2021). Os blocos de construção dos metabólitos secundários são derivados do metabolismo primário. É a partir do processo de fotossíntese, glicólise e ciclo de Krebs que geram energia para fornecer intermediários biossintéticos. Surpreendentemente, o número de blocos de construção básicos necessários para construir uma vasta gama de moléculas é definitivamente pequeno. Os blocos de construção mais importantes empregados na biossíntese de metabólitos secundários são derivados dos intermediários acetil coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e fosfato de metileritritol (DEWICK, [s.d.]).

A via do acetato biossintetiza compostos como ácidos graxos e policetídeos. Os processos da biossíntese de ácidos graxos são bem estudados e conhecidos, a maioria dos ácidos graxos são, sem dúvida, metabólitos primários, e são encontrados principalmente em combinação de ésteres com glicerol na forma de triglicerídeos, apresentado na Figura 5. Esses materiais são chamados de gorduras ou óleos, dependendo se eles são sólidos ou líquidos à temperatura ambiente. Se todos os três ácidos esterificantes são iguais, então o triglicerídeo é denominado simples, enquanto um triglicerídeo misto é produzido se dois ou mais ácidos graxos forem diferentes. Naturalmente, a maior quantidade de triglicerídeos encontrados são mistos. Os triglicerídeos são produzidos predominantemente a partir de glicerol 3-fosfato por esterificação com resíduos graxos de acil-CoA, o fosfato é removido antes da última esterificação.

Figura 5. Biossíntese de triglicerídeos. Adaptado (DEWICK, [s.d.]).

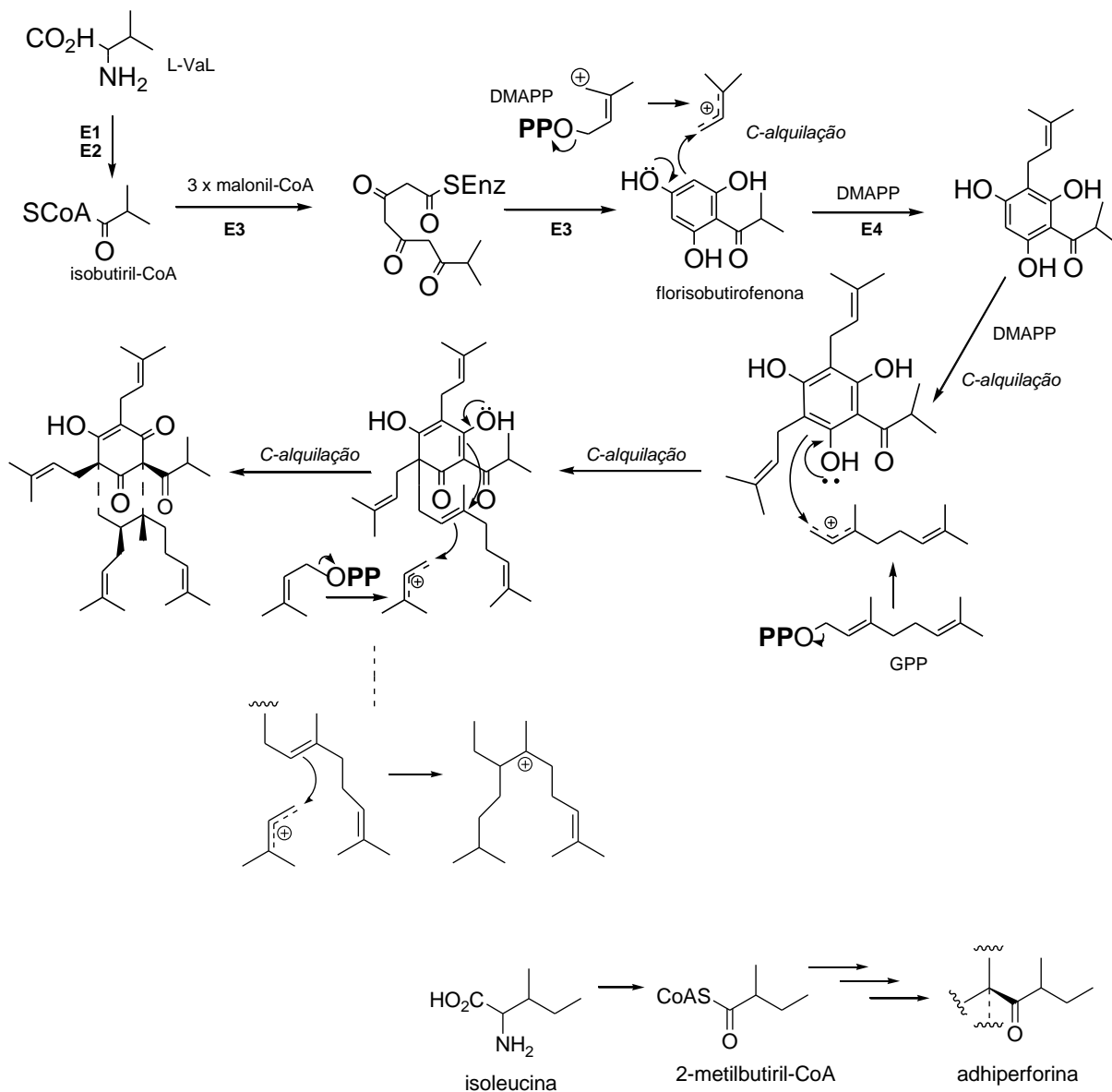


A partir de estudos fitoquímicos, os metabólitos secundários foram organizados conforme suas estruturas químicas. A organização pela semelhança estrutural é uma abordagem científica muito utilizada e leva em conta aspecto biogénéticos. Os dois princípios mais antigos utilizados para a organização dos metabólitos secundários são as regras do acetato e do isopreno. A regra dos aminoácidos auxilia na organização dos alcaloides, que apresentam estruturas químicas de alta complexidade. A regra do acetato preconiza que os produtos naturais com funções oxigenadas alternadas formam um grupo dos metabólitos secundários. A regra do isopreno estabelece que todos os terpenos podem dividir-se formalmente em unidades de isopreno (ERB; KLIEBENSTEIN, 2020).

Os policetídeos trata-se de um grupo muito diverso de produtos naturais, com inúmeras atividades biológicas e propriedades farmacológicas. Para todos os policetídeos, a regra do acetato é válida. Esses metabólitos incluem não somente derivados de menor complexibilidade, como resorcinol e floroglucinol, mas também aflatoxinas, os antranoides, os macrolídeos, as tetraciclinas e as xantonas, entre outros. As variações estruturais destes compostos não se resumem apenas em comprimento de cadeias, existem também diferentes ramificações de cadeia antes da condensação que podem formar compostos cíclicos, bem como variações nas etapas de redução, metilação, substituição por grupos isopentenila, glicosilações e rearranjos. Além disso, diferentes ácidos carboxílicos iniciadores, sob a forma dos seus ésteres de CoA, são utilizados para formar os policetídeos com estruturas variadas (SIMÕES, 2017).

A natureza policetídic da hiperforina, é quase totalmente obscurecida pelos fragmentos isoprenóides adicionado. O produto da reação catalisada por PKS tipo III (essas enzimas são proteínas homodiméricas, e utilizam ésteres de coenzima A além de empregarem um único sítio ativo para realizar uma série de descarboxilação, condensação, ciclização e reações de aromatização, o tipo PKS III são encontradas em plantas, bactérias e fungos) é a florisobutirofenona, análogo da floroacetofenona, porém iniciasse com isobutiril-CoA ao invés de acetil-CoA, como apresentado na Figura 6 esse start é formado a partir do aminoácido valina. Esta benzofenona isoplenilada é o agente antidepressivo predominante na erva de São João (*Hipericum perforatum*; Guttiferae/Hypericaceae).

Figura 6. Biossíntese de benzofenonas isopreniladas. Adaptado (DEWICK, [s.d.]).



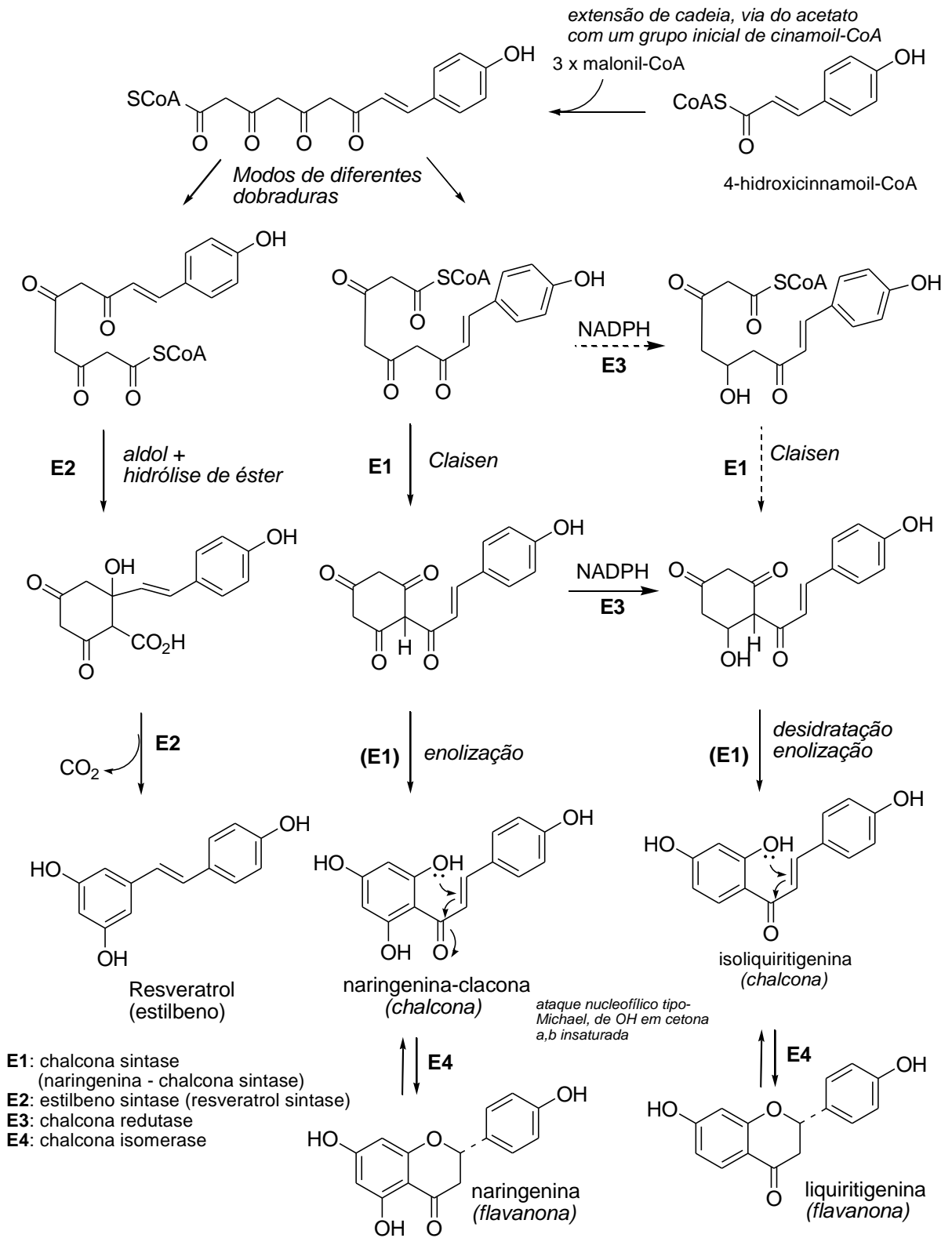
- E1: transaminase
- E2: ceto ácido desidrogenase de cadeia ramificada
- E3: sintase isobutirolone
- E4: florisobutirolone dimetilaliltransferase

Os fenilpropanóides e fenóis são formados pela via biossintética do ácido chiquímico. Para os vegetais, já foram descritas todas as vias biossintéticas dos compostos fenólicos. Uma enzima-chave do metabolismo secundário de plantas é a fenilalanina-amônia-liase, que catalisa a desaminação oxidativa da L-fenilalanina na biossintese do ácido cinâmico. O produto resultante C₆C₃ é um bloco de construção característico do grupo de fenilpropanóides, que inclui os próprios derivados do ácido cinâmico, as cumarinas e lignanas. A partir da degradação oxidativa da cadeia lateral dos ácidos

cinâmicos são formados os ácidos fenólicos e os fenóis simples (RAMAROSON et al., 2022).

Os flavonóides são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides como pode-se observar na Figura 7, constituem uma importante classe de polifenóis presentes em abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Uma substância que pertence a esta via, possui um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou derivados funcionais (ésteres, éteres, glicosídeos e outros). Porém, uma definição levando em conta somente a estrutura química não é apropriada, já que existem outros compostos contendo hidroxilas fenólicas que fazem parte de outras classes metabólicas. Por isso, deve-se empregar uma definição que também considera a origem biogenética (ULLAH et al., 2020). Essas classes de compostos estão amplamente distribuídas no reino vegetal, com mais de 4200 variedades de flavonoides (LISKOVA et al, 2021).

Figura 7. Biossíntese de flavonóides. Adaptado (DEWICK, [s.d.]).



Quimicamente, eles apresentam um esqueleto básico constituído por substâncias fenólicas, 15 átomos de carbono (C15) que consiste em dois anéis de benzeno, ligados por meio de um anel pirano heterocíclico (KUMAR et al, 2013).

Os flavonoides podem vir na forma livre (genina ou aglicona) ou ligados a moléculas glicosiladas (heterosídeos). Sua constituição química possui padrões de substituição do anel A, B e C e apresentam uma grande variedade, que são classificados dentro de suas subclasses (WANG et al, 2018).

Estes compostos possuem atividade antiviral, os flavonoides possuem um mecanismo de ação sobre a capacidade da interação do vírus desde a ligação até a sua entrada na célula hospedeira, isto acontece devido a ligação que ocorre com glicoproteínas do envelope viral e receptores celulares modificando sua estrutura química e bloqueando o sítio de ligação do vírus, agindo em diferentes estágios, como entrada viral, replicação e tradução de proteínas (BADSHAH et al., 2021).

Os flavonoides também possuem atividade anti-inflamatória, devido a inibição da síntese de prostaglandinas PGE1 e PGE2a e também inibem as vias de ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase, as quais desempenham um papel importante como mediadores inflamatórios (GINWALA et al., 2019).

Suas atividades antioxidantes se dão pelo fato de serem quelantes de metais, retiradores de radicais livres, além de neutralizarem espécies oxidantes como o ânion superóxido (O^{2-}) e atuarem em sinergismos com outros antioxidantes como as vitaminas C e E (DOS SANTOS; FARIAS RODRIGUES, 2017).

Os biflavonóides constituem uma classe de flavonoides diméricos, diferenciando-se de outros oligômeros, como as proantocianidinas, devido à sua origem biogenética comum. A maioria dos biflavonoides de ocorrência natural são dímeros de flavonas e flavanonas – raras vezes chalconas, apresentando substituintes nas posições dos carbonos 5, 7, 4' e, mais raramente, 5, 7,3',4'. A ligação interflavonóide pode existir entre as duas flavanonas ou unidades de flavona, ou uma flavanona e flavona ou flavonol, flavonol e flavonol, isoflavona e flavona ou duas unidade de isoflavana. Os biflavonóides flavanona-chalcona são formados pela abertura do anel C de uma das unidades durante a metilação das biflavanonas. As proantocianidinas possuem flavan-3-ol (catequina). Da mesma

forma, bi-isoflavanas e chalconas diméricas. Os heterosídeos são pouco frequentes (AGRAWAL, 1989).

Biflavonóides são numerados utilizando números ordinários para os núcleos A e C e números seguidos de linha (') para o núcleo B de um dos monômeros (como as flavonas e flavanonas), e para a segunda unidade monomérica são empregados números ordinários seguidos de duas linhas (") para os núcleos A e C e números ordinários seguidos de três linhas (''') para o núcleo B (SIMÕES, 2017).

Os biflavonóides são encontrados em grandes quantidades em diferentes plantas e muitos tecidos vegetais. Apesar disso, seu papel biológico não é claro. A função mais importante seria a de agir como antifúngico ou alimento dissuasivo para insetos. Outra seria a de proteger as folhas contra os raios ultravioletas, atribuição comum aos compostos fenólicos. Pesquisas relatam atividades anti-inflamatórias e cardioestimulantes (SIMÕES, 2017).

Compostos como flavonoides e biflavonóides são bons candidatos para o tratamento da doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 devido todas essas atividades biológicas. Estudos demonstram que flavonoides glicosilados foram analisados por docking. O resultado baseando na estrutura cristalina de 3CLpro e RdRp indicou a rutina e nicotiflorina e seus derivados glicuronídeos e sulfatos como potenciais inibidores para ambas as proteínas. A importância da ligação de hidrogênio e interações baseadas em ligações π foram evidenciadas para os supostos sítios ativos (MOURA et al., 2020).

3 SEÇÃO EXPERIMENTAL

3.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

3.1.1 Coleta de Plantas

As frutas de *Platonia insignis* (Clusaceae) (2,5 Kg) foram adquiridas em dezembro de 2018 no mercado local de Tucuruí, município brasileiro do estado do Pará (PA).

As frutas de *Citrus sinensis* (Rutaceae) (1,5 Kg) foram adquiridas em agosto de 2020 no mercado local de Florianópolis, capital do estado de Santa Catarina (SC).

3.1.2 Materiais e equipamentos

Todos os solventes utilizados nos métodos de separação foram de grau P.A., adquiridos de fontes comerciais (Servylab, representação da Merck no Brasil, São Paulo). Nas caracterizações por HPLC e HR-ESI-MS, os solventes utilizados foram de grau HPLC (Tedia) e LC-MS (Sigma). Nos fracionamentos e separações por cromatografia em coluna foram utilizadas diferentes granulometria de sílica gel MERK (0,015-0,040 mm), Macherey-Nagel (0,04-0,063 mm/ 230-400 mesh ASTM), (0,063-0,2 mm/ 70-230 mesh ASTM) e C₁₈; placas preparativas e para realização das análises por cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel Macherey-Nagel com espessura de 0,2 mm. Instrumento de purificação automático – Isolera Biotage One Flash. Condições otimizadas foram utilizadas para a revelação dos compostos nas placas cromatográficas, foi realizada por irradiação ultravioleta com comprimento de onda de 254 e 365 nm, e imersão em solução de vanilina sulfúrica (15g de vanilina dissolvidos em 250 mL de etanol a 0°C, e em seguida são adicionados lentamente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado) seguida de aquecimento a 110 °C, com soprador térmico. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram obtidos a 200 e 400 MHz em espectrômetros Bruker AC-200 F e Bruker Avance DRX 400, respectivamente, utilizando TMS como padrão interno e os solventes adequados para solubilizar cada amostra sendo os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais δ (ppm). Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN ¹³C) foram obtidos a 50MHz e 100 MHz. Os mesmos equipamentos foram utilizados na aquisição dos espectros de DEPT-135, COSY, HMBC e HSQC.

3.1.3 Método de análise para cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Um sistema Acquity UPLC classe H (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de matriz de fotodiodos (PDA), gerenciador de amostras e um gerenciador de solvente quaternário, coluna BEH C₁₈ (50 mm. 1,0 mm, tamanho de partícula 1,7 μ m

(Waters) identificação dos compostos. As temperaturas da coluna e bandeja das amostras foram mantidas a 40°C e 20°C, respectivamente. Um volume de amostra de 2 µL foi injetado em uma taxa de fluxo de 0,3mL/min. Os solventes foram filtrados e utilizados em condições gradiente: 90% de A (água/ácido fórmico, 99,9/0,1 (v/v)) e 10% de B (acetonitrila); 0-2 min, 90% de A; 2-10 min, 55% de A; 10-15 min, 10% de A; 15-20 min, 90% de A. Um espectrômetro de massa, Xevo G2-S QToF (Waters) com eletrospray sonda de ionização (ESI) operando em modos de ionização positiva e negativa, foram acoplados ao dispositivo UPLC empregado para detectar o produto dos componentes químicos do extrato. O nitrogênio foi usado como gás nebulizador; os cromatogramas foram adquiridos no modo de íon de pico base com o cone de fluxo de gás de 100L/h, o fluxo de gás de dessolvatação de 900L/h, a corrente do cone de amostragem de 40 Volts e a corrente de deslocamento da fonte de 80 V. A colisão do gás para produzir íons fragmentados foi argônio e o padrão interno de referência da amostra foi leucina e encefalina com valores de referência em m/z 554,2615 (ESI-) e 556,2771 (ESI+). A dessolvatação e a fonte de ionização foram mantidas durante as análises a 250°C e 90°C, respectivamente, enquanto a tensão capilar foi de 3kV. Os elétrons foram acelerados com uma faixa de energia de colisão de 30 a 35 eV. Os dados foram adquiridos em uma faixa de 100-1500 Da, com um tempo de varredura de 1,0 s durante 20 min e foram processados com MassLyns V4.1(Waters).

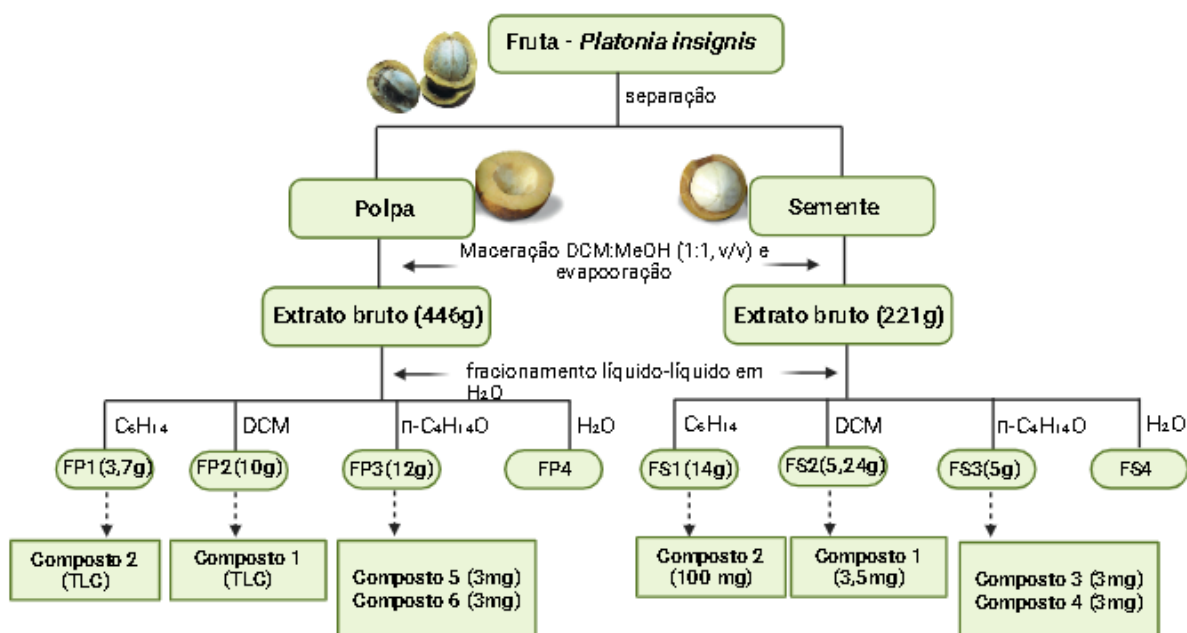
3.1.4 Extração do material vegetal de *Platonia insignis* e fracionamento líquido-líquido.

A fruta *P. insignis* (polpa e semente) foram separadas e picadas. As duas partes da fruta (polpa: 1,5 Kg e semente: 900g) foram submetidas a extração por maceração durante 15 dias em DCM:MeOH (1:1, v/v) à temperatura ambiente. Os extratos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida à temperatura de 40°C, proporcionando 446g e 221g de extrato bruto (polpa e semente, respectivamente). Os extratos brutos foram suspensos separadamente em água e particionados por um processo de extração líquido-líquido usando hexano (HEX), diclorometano (DCM) e n-butanol (n-BuOH). Os solventes foram

removidos por rotaevaporação sob pressão reduzida à temperatura de 40°C para produzir as respectivas frações: FP1 (3,7g, HEX), FP2 (10g, DCM) e FP3 (12g, n-BuOH) do extrato bruto da polpa; FS1 (14g, HEX), FS2 (5,24g, DCM) e FS3 (5g, n-BUOH) para o extrato bruto da semente, todas etapas representadas na figura 8. As demais frações aquosas eram ricas em açúcares e não foram estudadas.

Purificação dos compostos

Figura 8. Fluxograma de fracionamento e purificação de compostos de *P. insignis*.



Semente

FS2(5,2 g, DCM) foi submetido a colunas cromatográficas (CC) em sílica em gel e eluído com uma mistura binária de hexano/clorofórmio em condição de gradiente, obtendo-se 182 subfrações (50mL) cada. Composto 1 (3,5g) foi obtido a partir da fração eluída por HEX:CHCl₃ (1:9) por recristalização com etanol e filtração.

FS1 (13,5mg) foi submetido a uma purificação cromatográfica semelhante ao procedimento anterior, proporcionando 166 subfrações (50 mL) cada. O composto 2 (100 mg) foi obtido da subfração eluída com HEX:CHCl₃ (1:1) por recristalização com etanol. FS3 (4,9 mg) foi submetido a uma coluna cromatográfica de sílica gel usando um gradiente de DCM/MeOH, fornecendo 100 subfrações, as subfrações obtidas de DCM:MeOH (9:1) foram reunidas com base no perfil demonstrado na cromatografia em camada delgada (CCD) e depois purificado por uma coluna cromatográfica de sílica C₁₈ sob condição isocrática, utilizando como eluente H₂O/ACN (3:2). Esta purificação proporcionou os compostos 3 (3mg) e 4 (3mg).

Polpa

FP1 e FP2 eram ricas em ácidos graxos, as manchas demonstradas na TLC possuem o mesmo fator de retenção comparados aos compostos 1 e 2. Assim apenas FP3 foi submetida à purificação cromatográfica.

FP3 (11,9 g) foi cromatografada sob condições de gradiente com DCM/MeOH produzindo 103 subfrações. Com base no perfil da TLC, subfrações obtidas de DCM/MeOH (95:5) foram reunidas e purificadas em coluna cromatográfica de sílica C₁₈, utilizando um sistema de eluição isocrático com um sistema de mistura binária de H₂O/ACN (7:3) proporcionando os compostos 5 (3 mg) e composto 6 (3 mg).

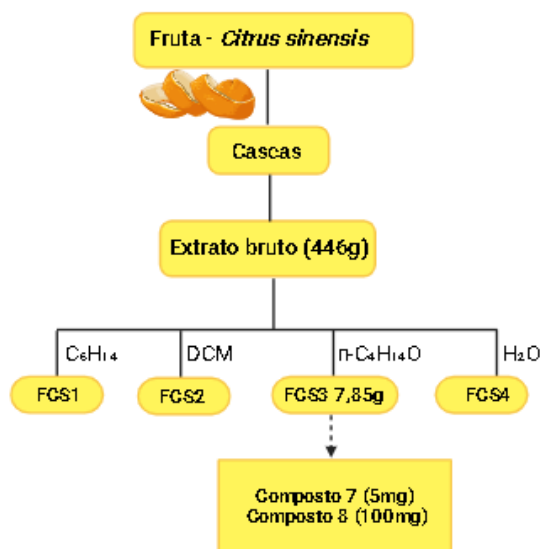
3.1.5 Extração do material vegetal de *Citrus sinensis* e fracionamento líquido-líquido.

As cascas (1,5 Kg) de *Citrus sinensis* foram separadas, picadas e submetidas a extração exaustiva por maceração durante 15 dias em DCM:MeOH (1:1, v/v) à temperatura ambiente. Os extratos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida à temperatura de 40°C, proporcionando 94,634g de extrato bruto. O extrato bruto foi suspenso em água e particionado por um processo de extração líquido-líquido usando hexano (HEX), diclorometano (DCM) e n-butanol (n-BuOH). Os solventes foram removidos por rotaevaporação sob pressão reduzida à temperatura de 40°C para produzir

as respectivas frações: FCS1 (HEX), FCS2 (DCM), FCS3(n-BuOH) e FCS4 (H₂O) do extrato bruto da casca. Apenas a fração FCS3(n-BuOH) foi estudada, afim de isolar o marcador taxonômico, hesperidina, presente na fração butanólica.

Purificação dos compostos

Figura 9. Fluxograma de fracionamento e purificação de compostos de *C. sinensis*.



FCS3 (7,852g) submetida a técnicas cromatográficas, utilizando como fase estacionária sílica em gel de fase normal e fase estacionária condições de gradiente DCM/MeOH produzindo 105 subfrações. Com base no perfil da TLC, subfrações obtidas de DCM/MeOH (83:17) foram reunidas e purificadas, proporcionando o composto 7 (5 mg); e subfrações obtidas de DCM/MeOH (60:40) foram reunidas, proporcionando o composto 8 (100 mg).

3.2 ENSAIOS E ATIVIDADES M^{PRO}

3.2.1 Ensaio de Inibição da Enzima M^{pro}

O ensaio de triagem dos compostos capazes de inibir a atividade da enzima M^{PRO} foi realizado conforme a recomendação do fabricante da proteína com algumas adaptações. Numa placa de 96 poços, em cada poço foi adicionado 10 µL dos compostos na concentração final de 200 µM, diluídos em DMSO, em triplicata, em seguida 30 µL da enzima M^{PRO} (Sigma-Aldrich) na concentração final de 10 µg/mL diluída em tampão contendo 25 mM HEPES (Sigma-Aldrich) e 0.2% Tween-20 (Sigma-Aldrich), a placa então foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período foi adicionado 10 µL do substrato em cada poço, um peptídeo cromogênico 3CL, *M^{pro} protease chromogenic substrate peptide* (Sigma-Aldrich) na concentração de 200 µg/mL final e incubado por mais 45 minutos à 37 °C, após o tempo de incubação foi adicionado 50 µL de ácido acético 4% (Merck). Em seguida a placa foi lida em espectrofotômetro Tecan® Modelo Infinite M200 na densidade óptica de 405 nm. Como controle positivo foi utilizado o composto Ebselen na concentração de 10 µM diluído em DMSO puro e como controle negativo foi utilizado DMSO na concentração final de 20%.

3.2.2 Ensaio de CI₅₀ dos compostos para a Inibição da enzima M^{PRO}

Para o ensaio de determinação da concentração inibitória mínima de 50% (CI₅₀) capaz de inibir a atividade da enzima M^{PRO} foi realizado conforme a recomendação do fabricante com algumas adaptações. Numa placa de 96 poços, a cada poço foi adicionado 10 µL das concentrações finais: 150 µM, 50 µM, 16,7 µM e 5,6 µM de cada composto, diluídos em DMSO, em triplicata, em seguida 30 µL da enzima M^{PRO} (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µg/mL final diluída em tampão contendo 25 mM HEPES (Sigma-Aldrich) e 0.2% Tween-20 (Sigma-Aldrich), estes foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período foi adicionado 10µL do substrato, um peptídeo cromogênico 3CL (Sigma-Aldrich) na concentração de 200 µg/mL final e incubado por mais 45 minutos à 37 °C, após o tempo de incubação foi adicionado 50 µl de ácido acético 4% (Merck). Em seguida a placa foi lida em espectrofotômetro Tecan® Modelo Infinite M200 na densidade ótica de 405.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

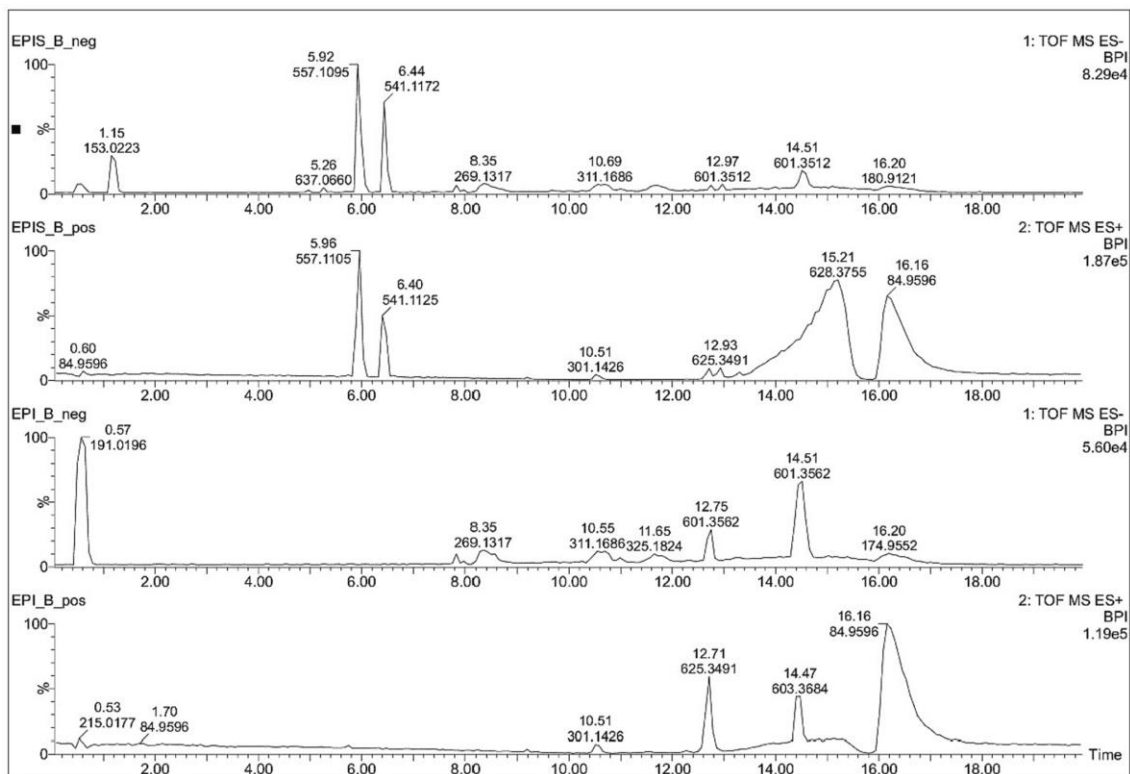
4.1.1 Caracterização dos constituintes químicos de *Platonia insignis*

O estudo fitoquímico da semente de *P. insignis*, demonstrou a presença dos compostos: tripalmitina, 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol, estigmasterol, chamaejasmine, volkensiflavona, isogarcinol e cicloxantochimol.

Análise LC-ESI-MS:

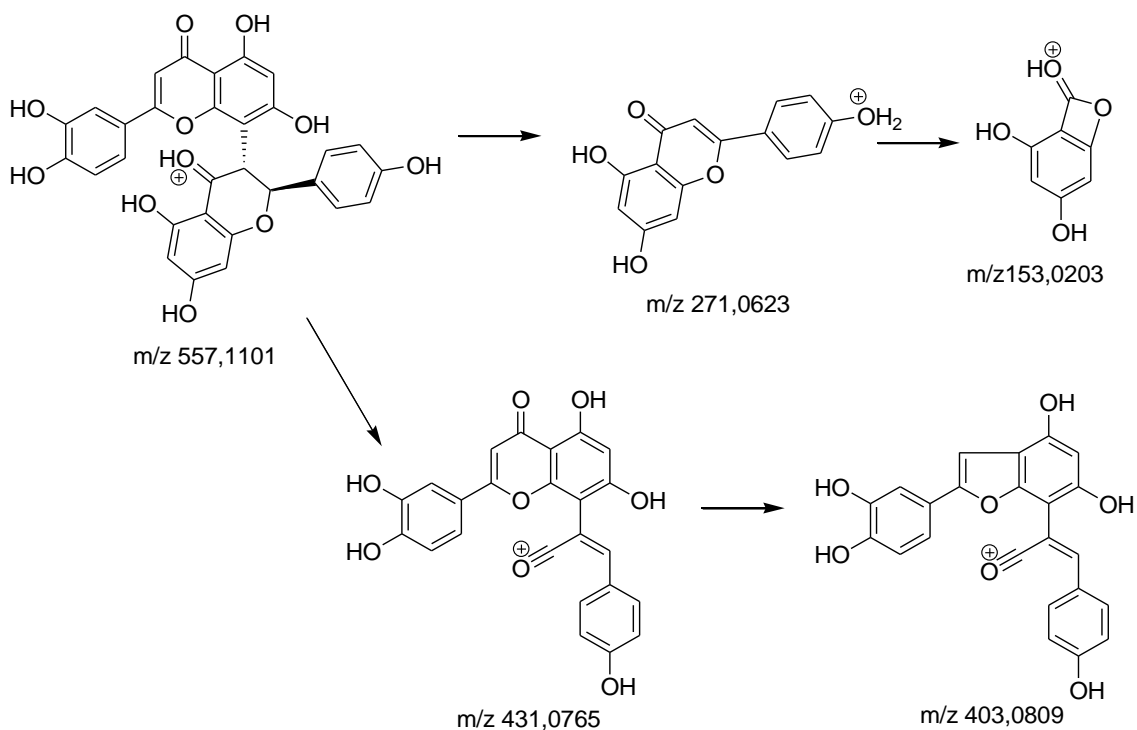
A lipofilicidade da fase móvel na TLC das frações hexânicas e de diclorometano dos frutos de *P. insignis*, sugeriu a presença de derivados de ácidos graxos. Esta conclusão foi determinada pelo estado físico oleoso destas frações. Assim, apenas as frações butanólicas das sementes e da polpa foram submetidas à análise LC-ESI-MS. Estas frações exibiram perfil químico semelhante em seus resultados positivos e ionizações negativas. Apenas dados espectrais da ionização em modo positivo de LC/MS foram utilizados para caracterizar seus perfis químicos, tabela 1. Dados de LC-ESI-MS das sementes mostraram a presença de 2 metabólitos secundários predominantes com m/z 557,1101 e 541,1165 correspondentes às fórmulas moleculares $[C_{30}H_{20}O_{11}+H]^+$ e $[C_{30}H_{20}O_{10}+H]^+$, perfis de compostos correspondentes a família dos biflavonoides, representados na figura 10.

Figura 10. Modos negativos e positivos de LC-ESI-QTOFMS das frações de n-butanol da semente e polpa, respectivamente da fruta *P. insignis*.



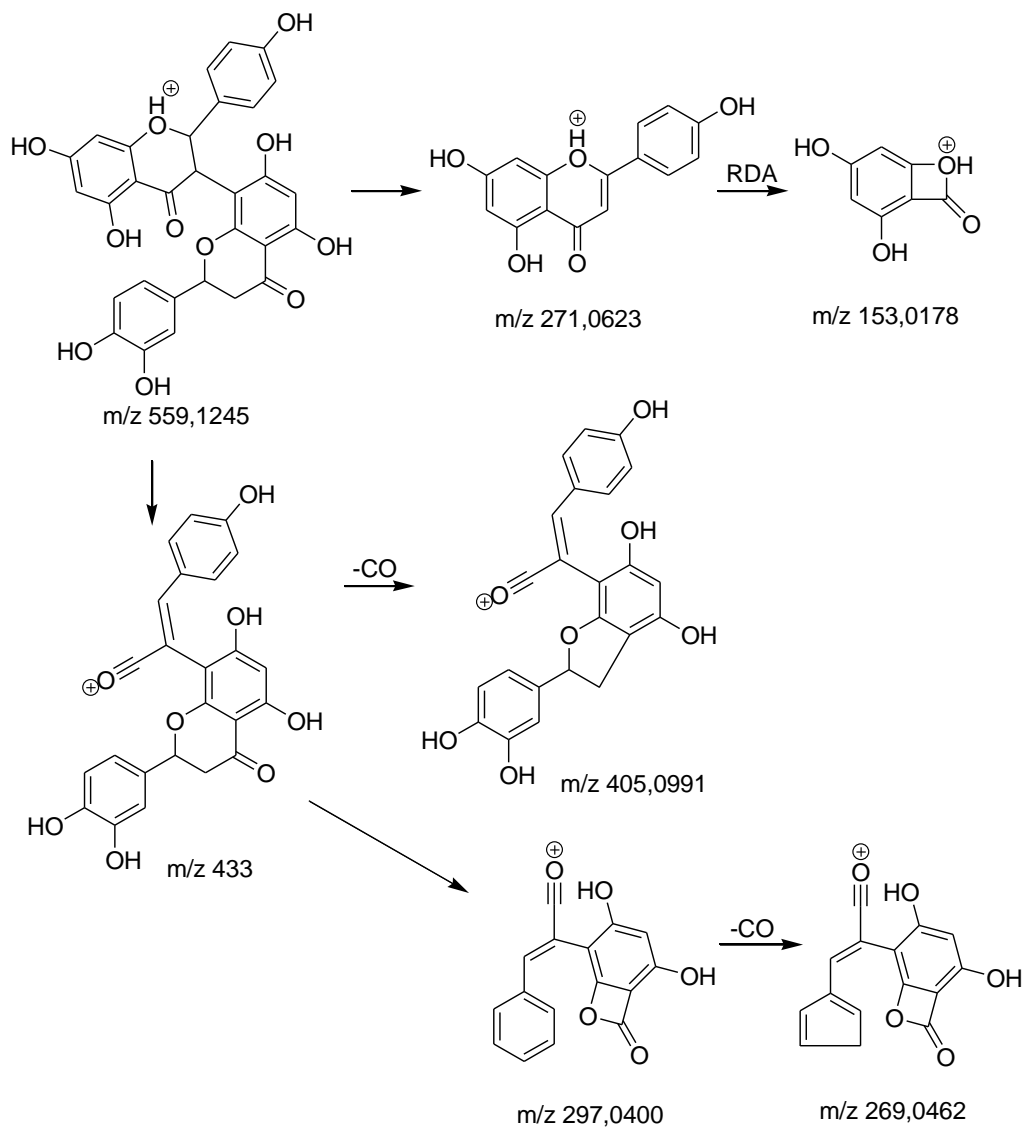
Os dados de MS e MS/MS revelaram uma coeluição de dois metabólitos com m/z 557,1101 e m/z 559,1245 $[C_{30}H_{22}O_{11}+H]^+$; o precursor m/z 557,1101 forneceu em seus dados MS/MS, um fragmento em m/z 431,0765 consistente com a perda de floroglucinol, representados na figura 10.

Figura 11. Proposta e fragmentação do íon m/z 557,1101.



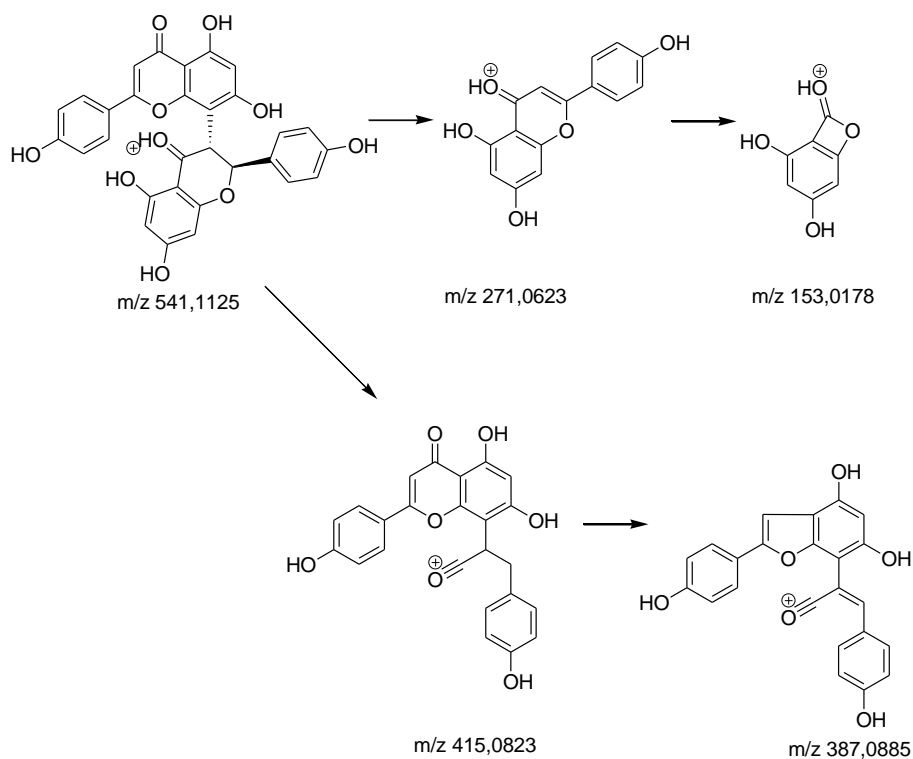
O íon m/z perdido, transformado em CO (28 Da) para fornecer m/z 403,0812; o íon correspondente a um dos monômeros encontrados em m/z 271,0601 foi designado como apigenina. Esses dados levaram a estrutura de Morelloflavone ou GB2a para m/z 557,1101. O precursor m/z 559.1245 também poderia produzir o monômero m/z 271,0623 correspondentes à apigenina e ao íon fragmentado m/z 153,0178. No entanto, o íon filho em m/z 405,0991, produzido por perda de floroglucinol seguido de descaboxilação (CO: 28 Da) foi consistente com a presença da porção molecular eriodictiol em m/z 559,1245, representado na figura 11.

Figura 11. Proposta de fragmentação do íon m/z 559,1245.



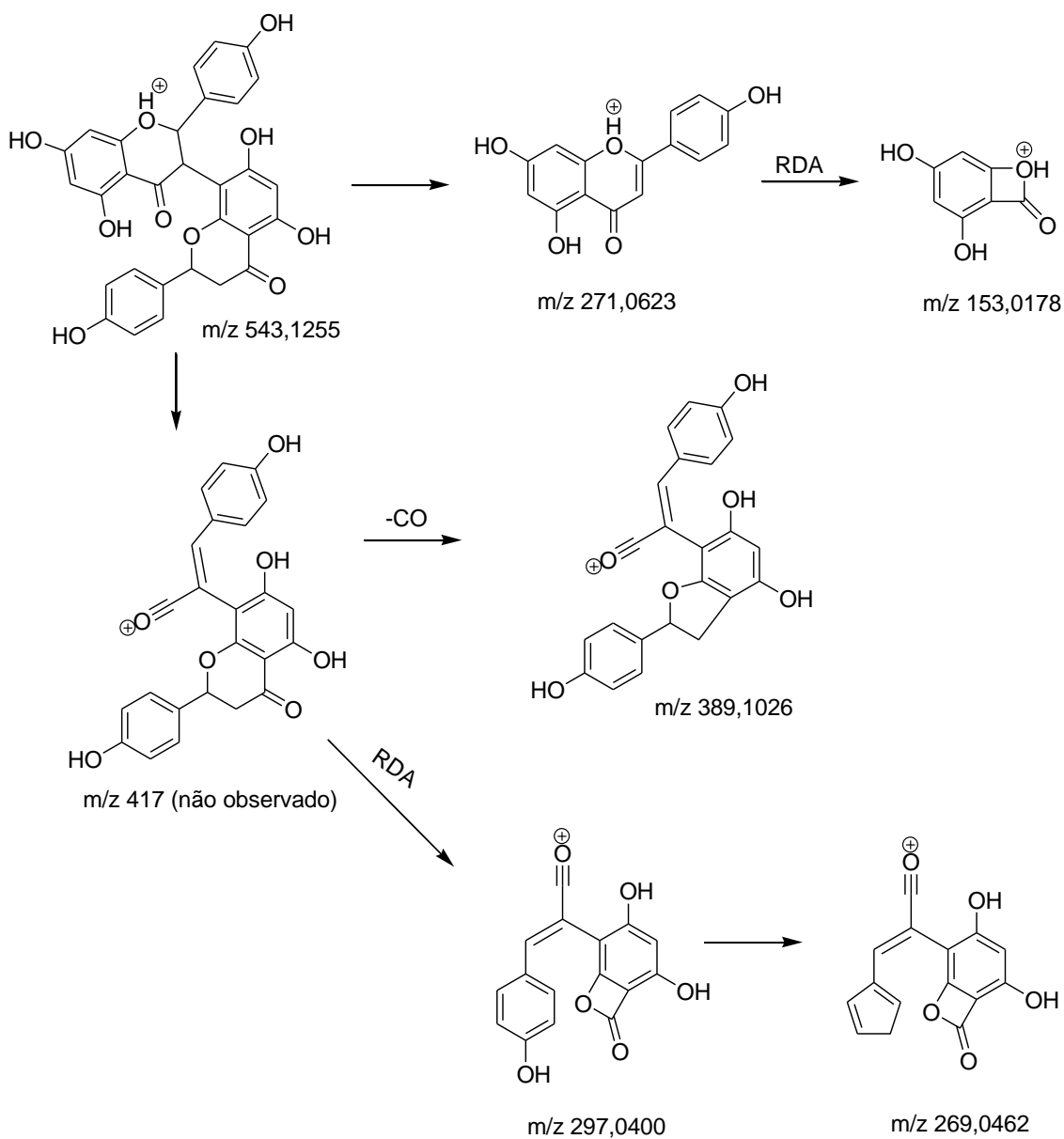
As informações acima nos levaram à estrutura do Fukugetin. Os metabólitos m/z 541,1165 e 543,1302 também coeluíram e suas fórmulas moleculares $[C_{30}H_{20}O_{10}+H]^+$ e $[C_{30}H_{22}O_{10}+H]^+$; respectivamente, indicaram outro par de biflavonóides. As massas apresentaram características de fragmentação semelhante aos biflavonóides precedentes. O precursor m/z 541,1165 perdeu o floroglucinol para produzir m/z 415,0823 que por sua vez perdeu CO para proporcionar m/z 387,0885, o monômero foi identificado como apigenina consistente com o íon fragmentado m/z 271,0623, representado na figura 12.

Figura 12. Proposta de fragmentação do íon m/z 541,1125.



As informações acima levaram as estruturas de apigeninil- (I-3, II-3) - naringenina e volkensiflavona para m/z 541,1165. Seu congênera m/z 543,1255 corresponde a uma fórmula molecular que tem 2 átomos de hidrogênio adicionais em comparação com m/z 541,1165, sugerindo um dímero de naringenina. A eliminação de m/z 543,1255 proporcionou uma apigenina protonada em m/z 271,0623. Após a etapa de eliminação, produziu-se o fragmento m/z 153,0178 pela retro abertura Diels-Alder do anel C, representado na figura 13.

Figura 13. Proposta de fragmentação do íon 543,1255.



Este precursor também produziu m/z 389,1026 após a eliminação de floroglucinol e CO. Verificou-se também que o precursor produziu m/z 297,0400 após perder o floroglucinol e anel B pela abertura do anel C (RDA) m/z 269,0462 diferiu m/z 297,0400 em 28 Da, correspondendo a perda de CO. Com base nas informações anteriores juntamente com os dados apresentados na literatura, foi possível realizar as atribuições estruturais dos compostos GB-1a e chamaejasmine. Observa-se na figura 9 também exibida no modo negativo de ionização da polpa da fruta, um pico em 0,57 min

com m/z 191,0196 $[C_6H_8O_7-H]^-$ identificada como ácido cítrico. Juntamente com este metabólito, dois isômeros predominantes com m/z 603,3708 e 603,3831 $[C_{38}H_{50}O_6+H]^+$ também foram detectados. Uma pesquisa bibliográfica desta composição elementar levou a estruturas de dois derivados de benzofenonas. Espectros de massas de ambos compostos exibiram um íon fragmentado para um carbocátion monoterpênico em m/z 137,133 sugerindo a presença de uma porção geranila. O íon precursor de ambos os compostos também forneceu o íon fragmentado m/z 465,2281 depois de perder 2 grupos prenilos. Outros íons fragmentados, nomeadamente m/z 411,1797 e 409,1671 corresponderam ao esqueleto da benzofenona sem o grupo geranil e uma parte dos grupos prenil. O íon m/z 343,1187 é consistente como esqueleto de benzofenona sem as porções terpênicas, representadas nas figuras 14 e figura 15.

Figura 14. Proposta do padrão de fragmentação de m/z 603,3708, t_R 12,40 min.

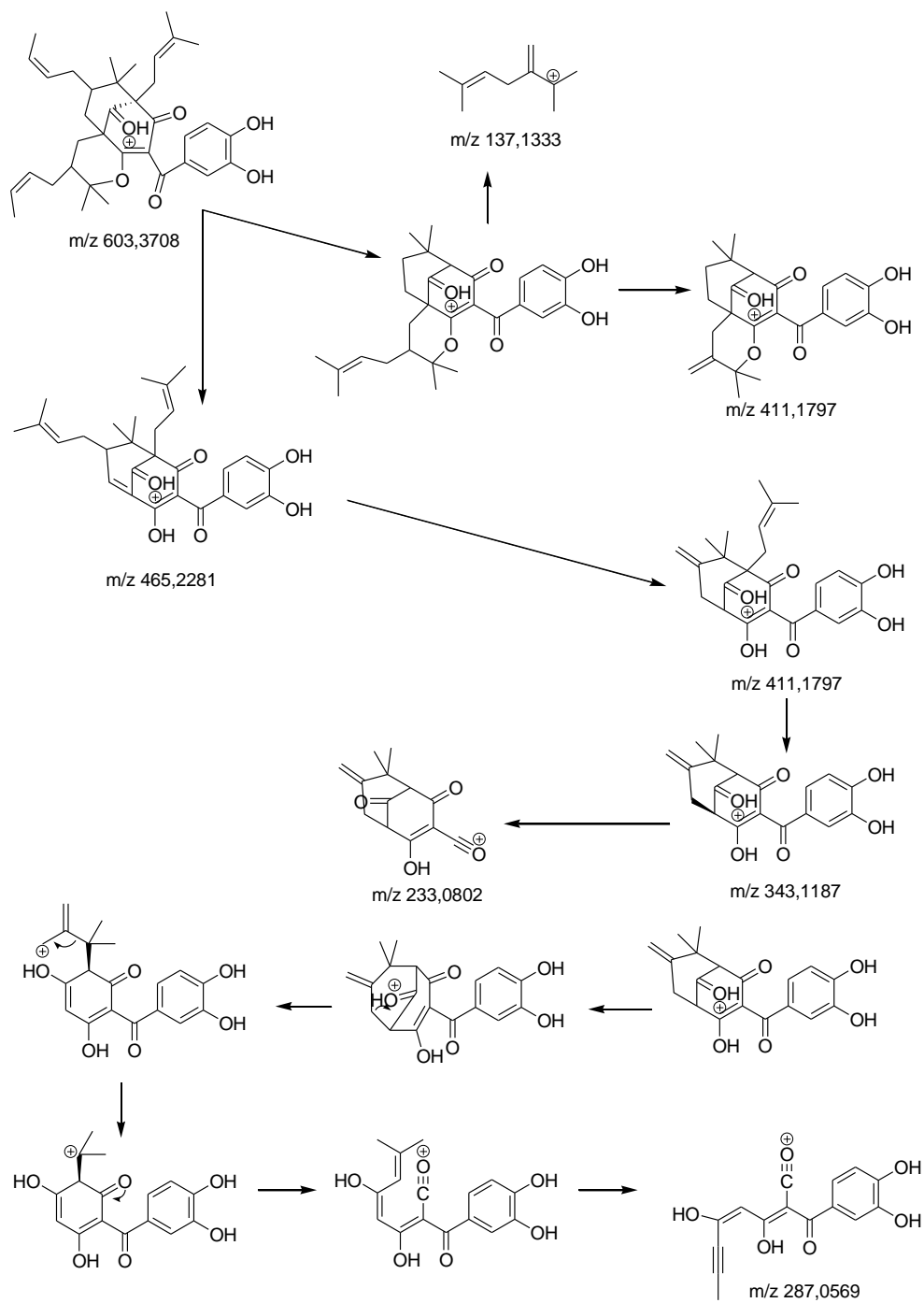
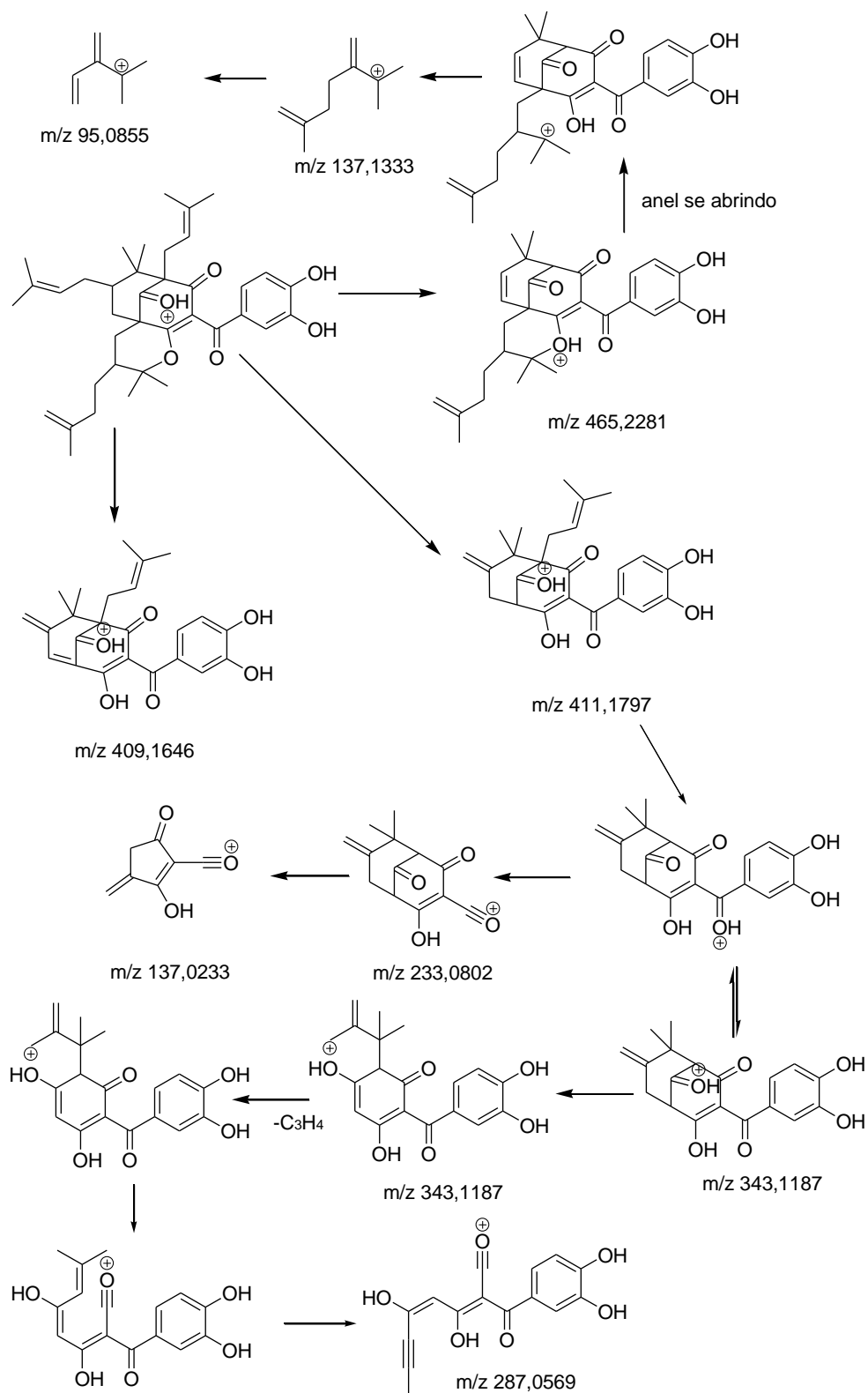


Figura 15. Proposta do padrão de fragmentação de m/z 603,3708, t_R 14,08 min.



Com base nesses dados, as estruturas de ambos compostos isoméricos foram atribuídas relacionadas a isoxantoquimol, isogarcinol, cicloxantoquimol e cambolina, a partir do perfil químico obtido nos dados LCMS.

Tabela 1. Perfil químico das frações n-butanólica da semente e polpa da fruta *Platonia insignis*.

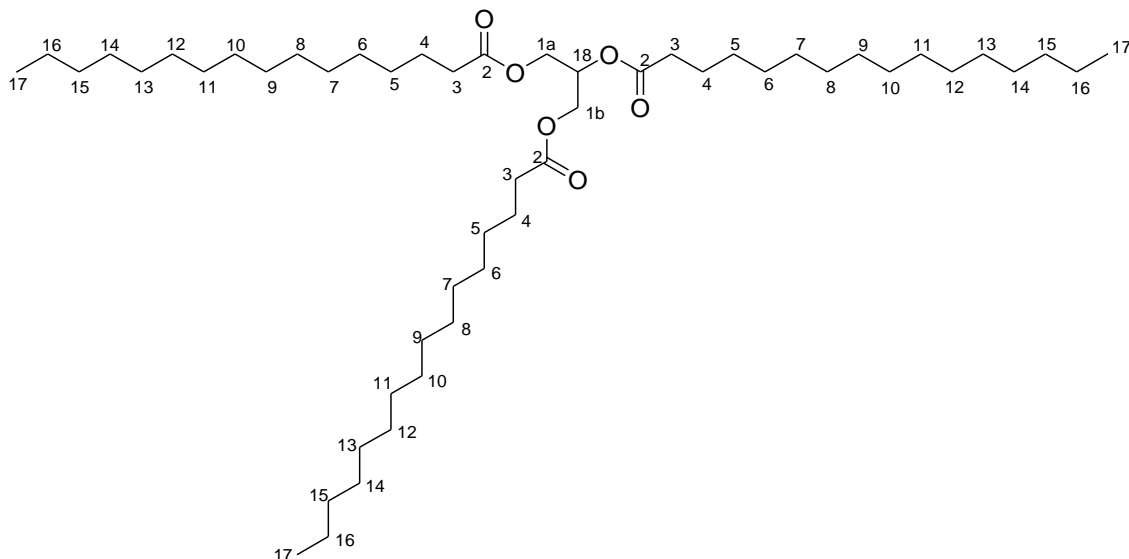
t_R (min)	Formula Molecular	m/z	Fragmento (m/z)	Estrutura Proposta
Semente				
5.92	[C ₃₀ H ₂₀ O ₁₁ +H] ⁺	557.1105	431.0765; 403.0809; 297.0400; 271.0623; 269.0462; 153.0203.	GB2a ou Moreloflavona.
	[C ₃₀ H ₂₂ O ₁₁ +H] ⁺	559.1255	405.0991; 297.0400; 269.0462; 153.0203.	Fukugentina
6.44	[C ₃₀ H ₂₀ O ₁₀ +H] ⁺	541.1125	415.0823; 387.0885; 297.0400; 271.0623; 231.0648; 153.0178.	Apigeninil-(I- 3,II-3)- naringenina ou volkensiflavona.
	[C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀ +H] ⁺	543.1317	389.1026; 297.0400; 271.0623; 269.0462; 153.0178	GB-1a ou Chamaejasmine.
Polpa				
0.27	[C ₃₀ H ₂₀ O ₁₁ -H] ⁻	191.0196	173.0078;	Ácido cítrico
12.71	[C ₃₈ H ₅₀ O ₆ +Na] ⁺	625.3491/ 603.3694	465.2281; 411.1797; 343.1187; 287.0569; 233.0802; 177.0178; 137.1333.	Isoxantochimol ou Isogarcinol, cicloxantochimol e cambogina.
	[C ₃₈ H ₅₀ O ₆ +H] ⁺		465.2281; 433.2742; 411.1797; 409.1646; 343.1187; 287.0569; 233.0802; 137.1333;	Isoxantochimol ou Isogarcinol, cicloxantochimol e cambogina.
14.47	[C ₃₈ H ₅₀ O ₆ +H] ⁺	603.3684	137.0233; 95.0855.	

O perfil químico obtido a partir dos dados LC-MS possibilitou a melhor escolha para a purificação das frações, com sucessivas colunas cromatográficas. As frações de hexânica e diclometano da semente e polpa levou ao isolamento e identificação de tripalmitina (1) – composto predominante e 1,3-dipalmitoil-2-oleiolioglicerol (2), respectivamente. A purificação das frações n-butanólica da semente e polpa proporcionaram 5 compostos conhecidos. Dados espectrais comparados com os dados

da literatura permitiram atribuir suas estruturas e identificação de estigmasterol (3), chamaejasmine (4), volkensiflavona (5), isogarcinol (6) e cicloxantochimol (7).

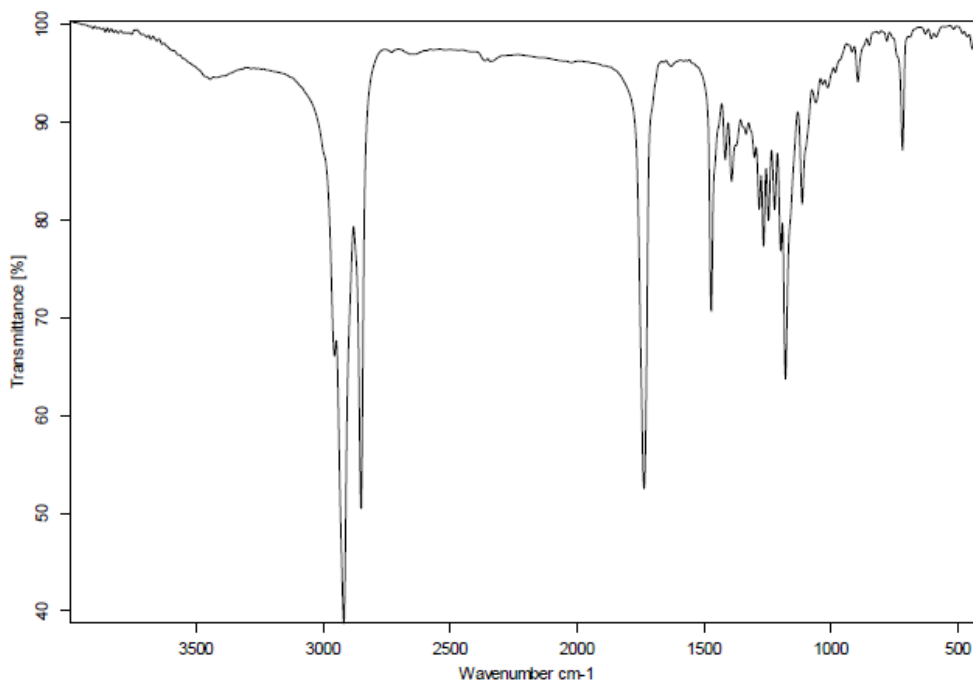
Tripalmitina (**1**): – 2,3-di(hexadecanoiloxi)propil hexadecanoato é um sólido branco cujo P.F. é 66°C, estrutura representada na figura 16. ¹H RMN (CDCl₃; 200 MHz): δ 5.30 (1H, m), δ 4.26 (2H, dd, *J*= 4,3 Hz, 12 Hz), δ 4.15 (2H, dd, *J*= 4,3 Hz, 12 Hz), δ 2.30 (6H, t, *J*= 7,4 Hz), δ 1.60 (6H, s), δ 1.20 – 1,36 (sl), δ 0,87 (9H, t, *J*= 7,4 Hz). ¹³C (CDCl₃; 50 MHz): δ 173.0, δ 69.0, δ 62.2, δ 34.4, δ 25.0, δ 22.8-34.3, δ 14.3. Calculado para (C₅₁H₉₈O₆ + Na⁺) *m/z* [M+Na]⁺ = 829.7256.

Figura 16. Estrutura da Tripalmitina.



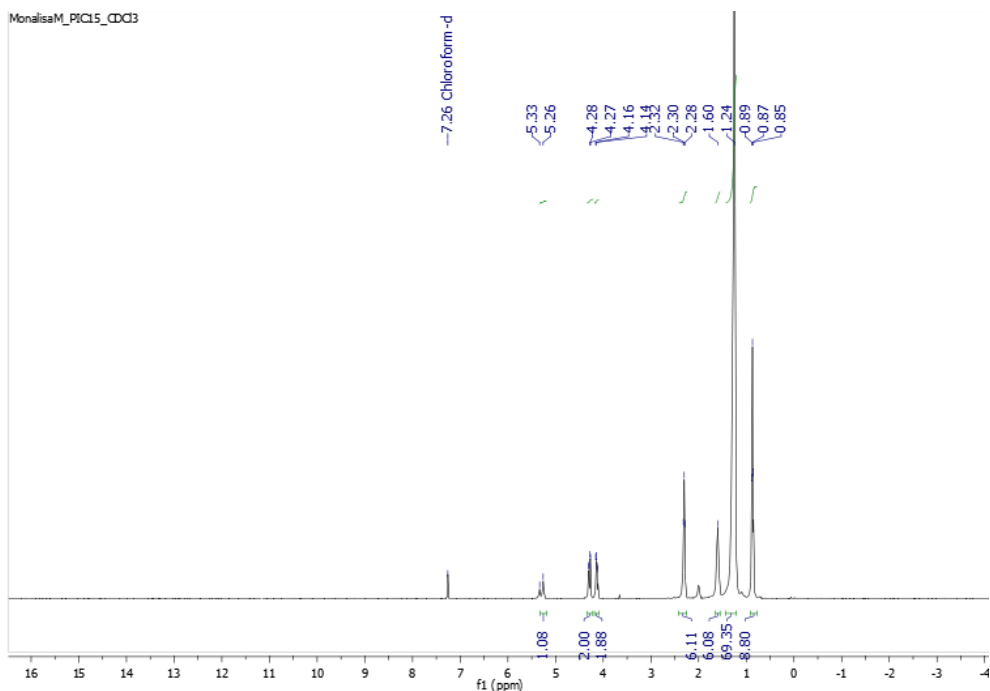
No espectro de infravermelho (figura 17) obtido em pastilha de KBr, foram observadas bandas atribuídas a carbonos primários e secundários pertencentes a cadeias alifáticas em 2916 cm⁻¹ e 2853 cm⁻¹, bandas de carbonilas de ésteres em 1745 cm⁻¹.

Figura 16. Espectro de infravermelho em pastilha de KBr do composto Tripalmitina



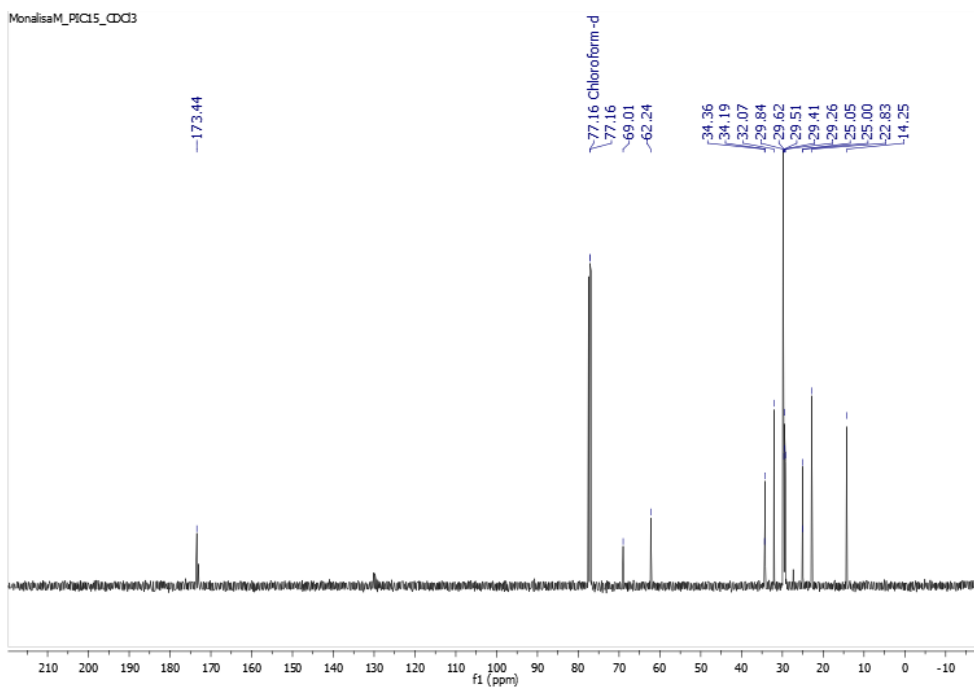
O Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) representado na figura 18, mostra a presença de sinais referentes a triglicerídeos: um multiplete que integra para um hidrogênio em δ 5,20 – 5,40 ppm (1H, m, H-18); dois carbinóis em δ 4,30 ppm (2H, dd, $J=4,3$ Hz, $J=12,5$ Hz H-1) e δ 4,15 ppm (2H, dd, $J=4,3$ Hz, $J=12,5$ Hz, H-1), correspondendo a unidade glicerol. Em seguida foram observados sinais de ácido carboxílico de cadeia longa. Em δ 2,31 (6H, t, $J=7,4$ Hz, H-3), este deslocamento químico representa os hidrogênios que estão ligados aos três carbonos alfas. δ 1,26 ppm observa-se um simpleto largo, que representa a sequência de hidrogênios metilênicos da cadeia alifática longa. Em δ 0,88 (9H, t, $J=6,2$ Hz, H-17) pode-se observar um tripleto representando hidrogênios dos grupos metilas terminais. A estrutura foi identificada como tripalmitina utilizando os fragmentos diagnósticos observados no espectro de massas e comparando com os dados da literatura (IKEDA et al., 2009).

Figura 17. ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) espectro do composto Tripalmitina.



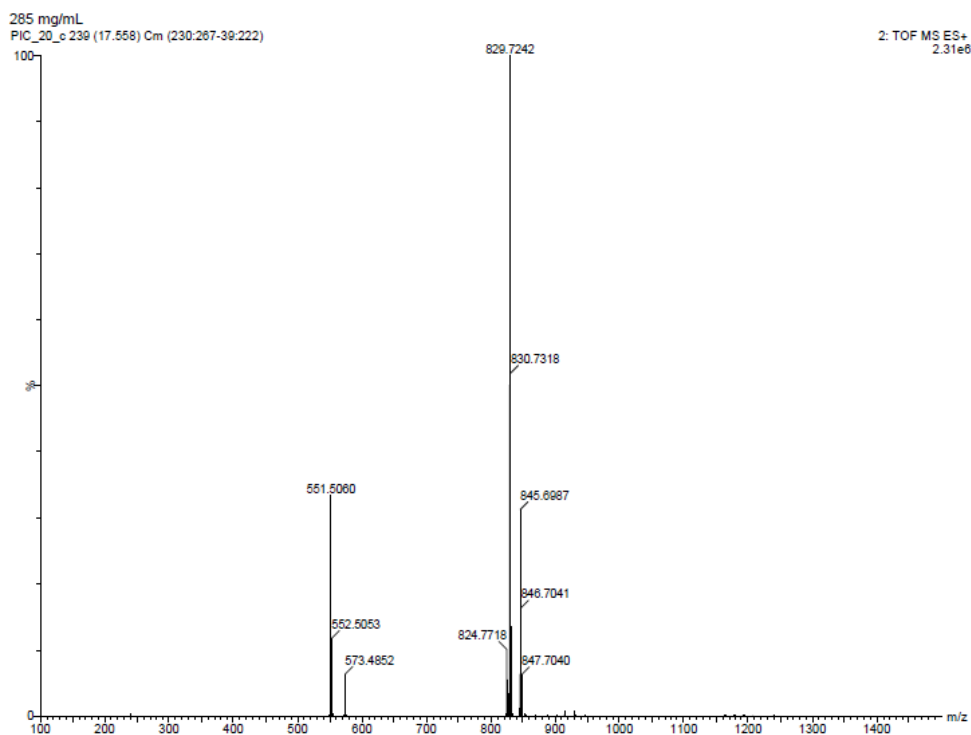
No espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3), representado na figura 19, foi possível observar na região desblindada do espectro sinais de carbonilas de ésteres (δC 173,4 ppm, C-2, C-2, C-2), em (δC 69 ppm, δC 62,2 ppm e δC 62,2 ppm C-18, C-1 e C-1) observa-se os sinais dos carbinóis; em (δC 34,4 ppm, C-3, C-3 e C-3) os sinais dos três carbonos alfas, estes estão diretamente ligados nas funções ésteres da molécula; em (δC 25,0 ppm C-5, C-5 e C-5) os sinais dos três carbonos betas, em relação as funções ésteres da molécula; em (δC 14,3 ppm C-17, C-17 e C-17) os sinais três metilas terminais das cadeias alifáticas do composto.

Figura 19. ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) espectro do composto Tripalmitina.



A estrutura foi identificada como tripalmitina utilizando os fragmentos diagnósticos observados no espectro de massas. Pode-se observar na figura 26, o precursor m/z 813.6846.

Figura 20. Figura 32. UPLC-ESI-MS do composto Tripalmitina.



O espectro de massa obtido da ionização por nebulização de alta resolução (HR-ESI-MS) do composto isolado mostrou um íon catiônico a m/z 829,7242. Esse valor de massas corresponde a fórmula molecular $[C_{51}H_{98}O_6 + Na]^+$ (Calculado m/z 829,7256). A fórmula molecular indica que o composto possui três insaturações. O precursor m/z 829,7256 formou dois fragmentos m/z 551,5060 e m/z 573,4852 após a perda do palmitato de sódio e do ácido palmítico, respectivamente, demonstrado na figura 21.

Figura 21. Esquema de fragmentos diagnósticos coletados no espectro de massas.

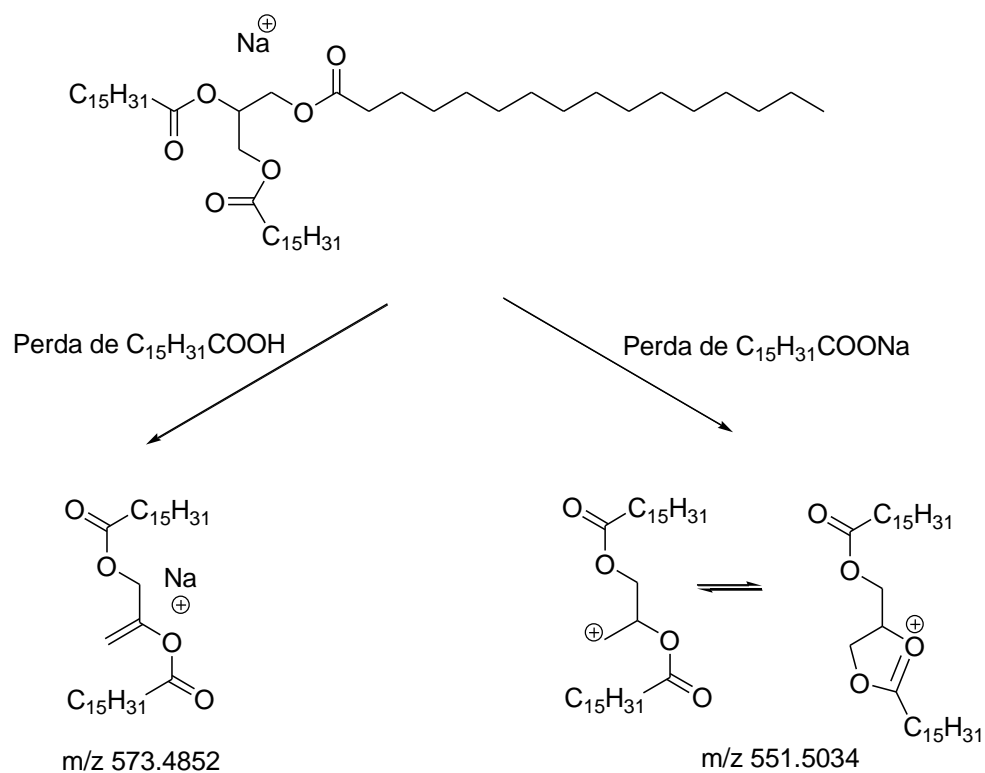


Tabela 2. Dados de RMN de 1H e ^{13}C (200 e 50MHz) ($CDCl_3$).

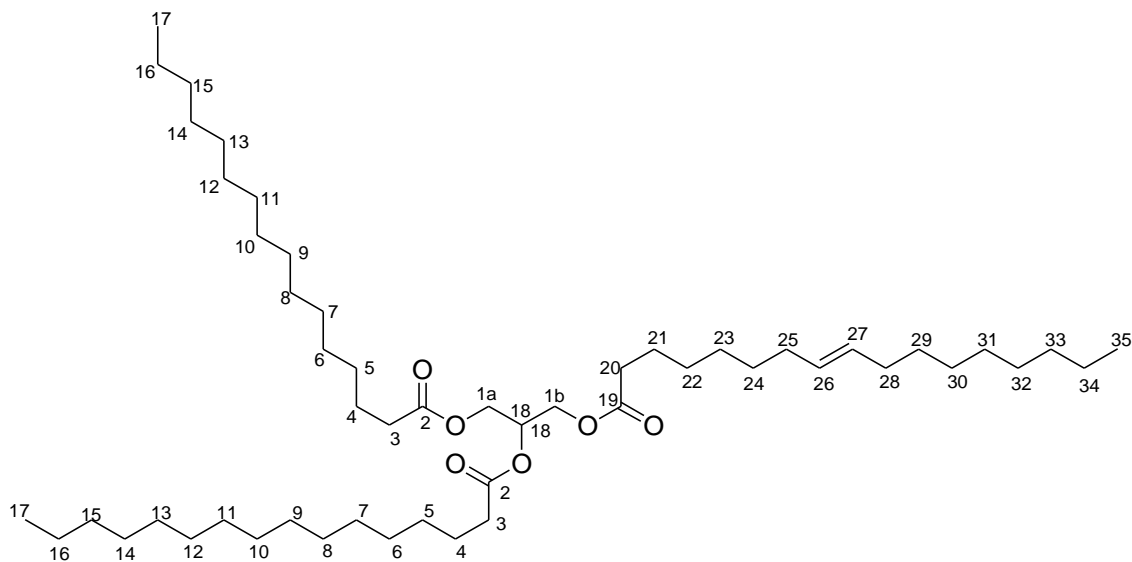
Tripalmitina

LITERATURA – Tripalmitina
<https://www.nmrdb.org/13c/index.shtml?v=v2.138.0>

Posição	δH (ppm); $J(Hz)$	δC (ppm)	δH (ppm); $J(Hz)$	δC (ppm)
C2-C2-C2	-	173.0		173.0
C18	5.30 (m, 1H)	69.0	5.08 (m, 1H)	69.1
C1 ^a	4.26 (dd, $J=4.3;12.0$, 2H)	62.2	4.46(d, $J=7.22$, 2H)	62.4
C1b	4.15 (dd, $J=4.3;12.0$, 2H)	62.2	4.46(d, $J=7.22$, 2H)	62.4
C3-C3-C3	2.30 (t, $J=7.4$, 6H)	34.4	.2.26 (t, $J=7.4$; 6H)	33.9
C5-C5-C5	1.60 (s, 6H)	25.0	1.55 (t, $J=7.7$; 6H)	24.8
-	1.20 – 1.36 (sl)	22.8-34.3	1.22 -1.27 (sl)	22.6-31.7
C17-C17-C17	0.87(t, $J=7.4$, 9H)	14.3	0.86 (t, $J=0.86$, 9H)	14.0

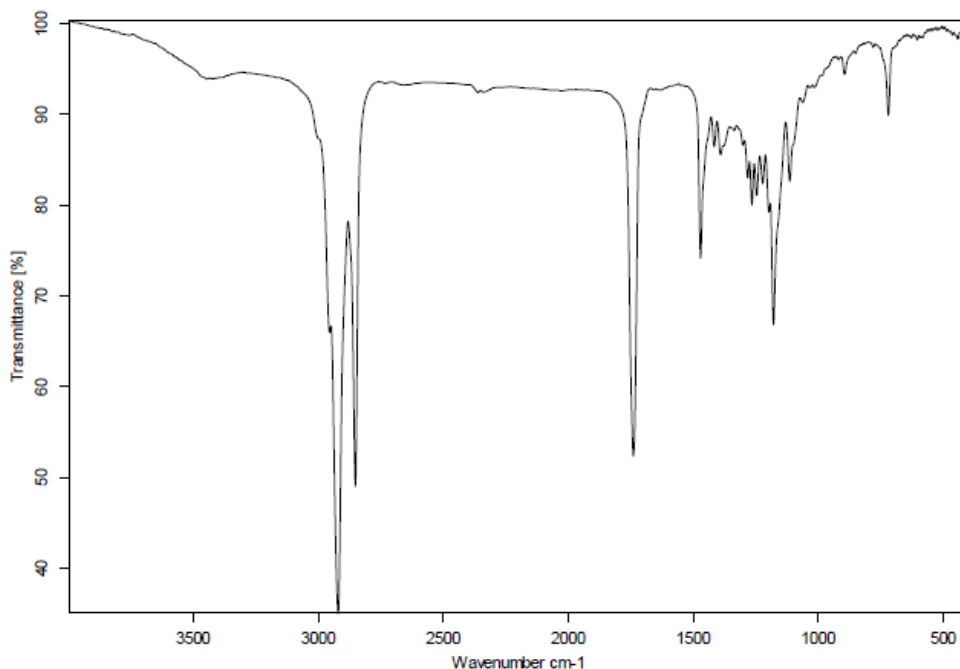
1,3-dipalmitoil-2-oleioliçlerol (**2**) o composto é um sólido branco com P.F. 26°C, cuja fórmula estrutural está representada na figura 22. ¹H RMN (CDCl₃; 200 MHz): δ 5.32 (2H, m), δ 5.26 (1H, m), δ 4.28 (2H, dd, *J*= 5,5 Hz, 12,7 Hz), δ 4.12 (2H, dd, *J*= 5,5 Hz, 12,7 Hz), δ 2.30 (6H, t, *J*= 7,2 Hz), δ 2.00 (4H, m), δ 1.59 (6H, s), δ 1.20 – 1,36 (sl), δ 0,88 (9H, t, *J*= 7,7 Hz). ¹³C (CDCl₃; 50 MHz): δ 173.0, δ 173.4, δ 130, δ 129.8, δ 68.7, δ 62, δ 34.2, δ 27.0, δ 24, δ 22.8-34.3, δ 14.3.

Figura 22. Estrutura do 1,3-dipalmitoil-2-oleioliçlerol.



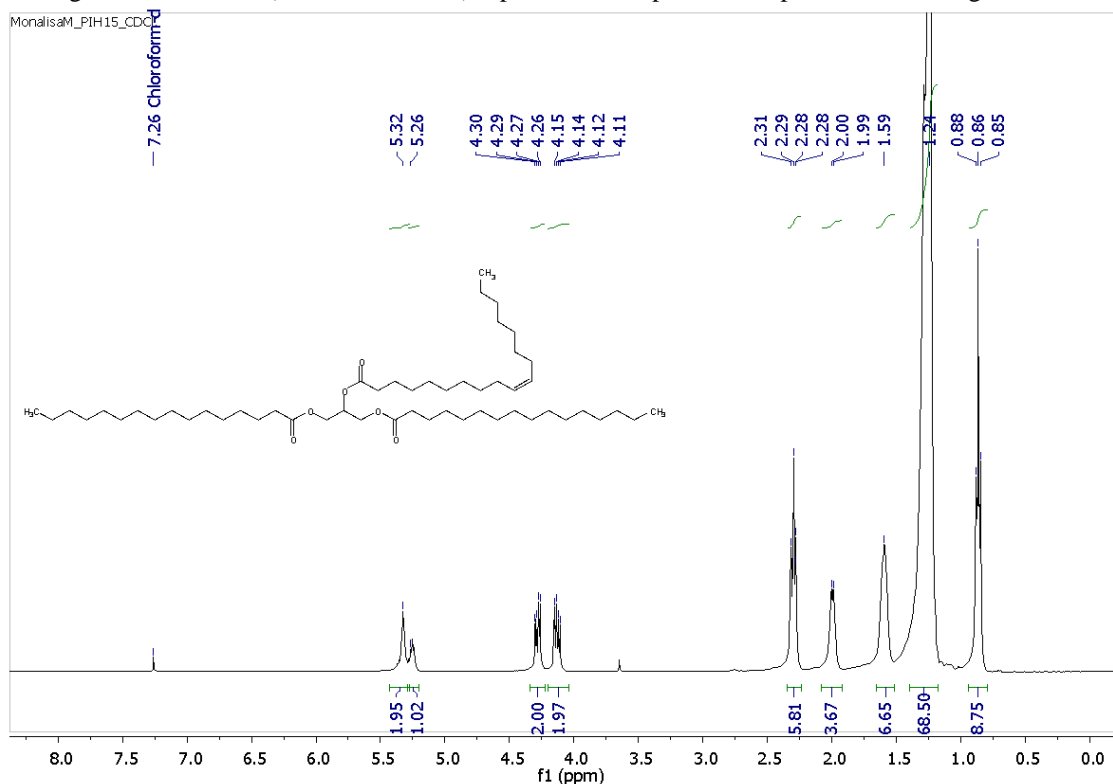
No espectro de infravermelho representado na figura 23 obtido em pastilha de KBr, foram observadas bandas atribuídas a carbonos primários e secundários pertencentes a cadeias alifáticas em 2916 cm⁻¹ e 2853 cm⁻¹, bandas de carbonilas de ésteres em 1745 cm⁻¹.

Figura 18. Espectro infravermelho em pastilha de KBr do composto 1,3-dipalmitoil-2-oleioliçlerol.



Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) – figura 24 demonstra em $\delta 5,30$ ppm (3H, m, $J=15,2$, H-18, H-27, H-28) que integra para três hidrogênio, dois destes hidrogênios representa hidrogênios de instauração, com constante de acoplamento indicando ser *trans*. Em $\delta 4,26$ ppm (2H, dd, $J=5,5$ Hz, H-1) e $\delta 4,17$ ppm (2H, dd, $J=5,5$ Hz, H-1) representam dois duplos dupletos, integrando para dois hidrogênios cada um, respectivamente, acomplando para *cis*. $\delta 2,28$ (6H, t, $J=7,2$ Hz, H-3, H-3, H-20), este deslocamento químico integra para seis hidrogênios que estão ligados aos três carbonos alfas, estes estão diretamente ligados nas funções éster da molécula, os hidrogênios acoplam de maneira *cis*. Em $\delta 2,01$ ppm (4H, s, H-25, H-28) integra para quatro hidrogênios, estes que estão ligados aos carbonos sp^3 vizinhos aos carbonos sp^2 na cadeia alifática da molécula, ou seja, a uma ligação e distancia da instauração encontrada na molécula. $\delta 1,24$ ppm observa-se um simpleto largo, que representa os hidrogênios de uma cadeia alifática longa, onde não é possível definir o número de hidrogênios apenas com esta análise. Em $\delta 0,89$ (9H, t, H-17, H-17, H-35) pode-se observar um tripleto representando os últimos átomos de hidrogênios das três cadeias alifáticas, totalizando 9 hidrogênios.

Figura 19. ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) espectro do composto 1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol.

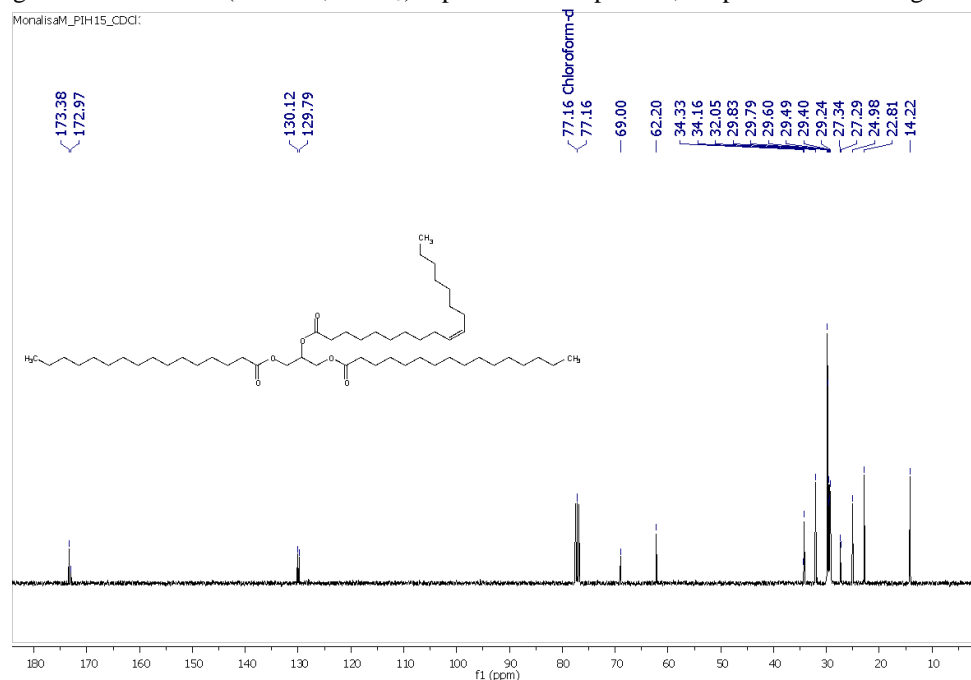


No espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3) representado na figura 25, foi possível observar na região desblindada do espectro sinais de carbonilas de ésteres ($\delta\text{ C } 173,4$ ppm, C-2, C-2) ($\delta\text{ C } 173$ ppm, C-19) respectivamente, dois sinais de carbonos olefínicos ($\delta\text{ C } 130$ ppm e $\delta\text{ C } 129,8$ ppm, C-28 e C-27 respectivamente), em ($\delta\text{ C } 68,7$ ppm e $\delta\text{ C } 62$ ppm, C-18, C-1 e C-1) observa-se os sinais dos carbinóis; em ($\delta\text{ C } 34,2$ ppm, C-3, C-3 e C-20) os sinais dos três carbonos alfas, estes estão diretamente ligados nas funções ésteres da molécula; em ($\delta\text{ C } 24,0$ ppm C-5, C-5 e C-21) os sinais dos três carbonos betas, em relação as funções ésteres da molécula; em ($\delta\text{ C } 14,3$ ppm C-17, C-17 e C-36) os sinais três metilas terminais das cadeias alifáticas do composto.

É possível definir este composto como um triacilglicerídeo, pode-se comparar o composto tripalmitina e 1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol, a única diferença é a ligação dupla em uma das cadeias alifáticas do composto 1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol, essa instauração não se encontra no composto tripalmitina. O composto 1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol apresentou dados de ressonância relacionados ao 2-oleil-1,3-dipalmitoil-

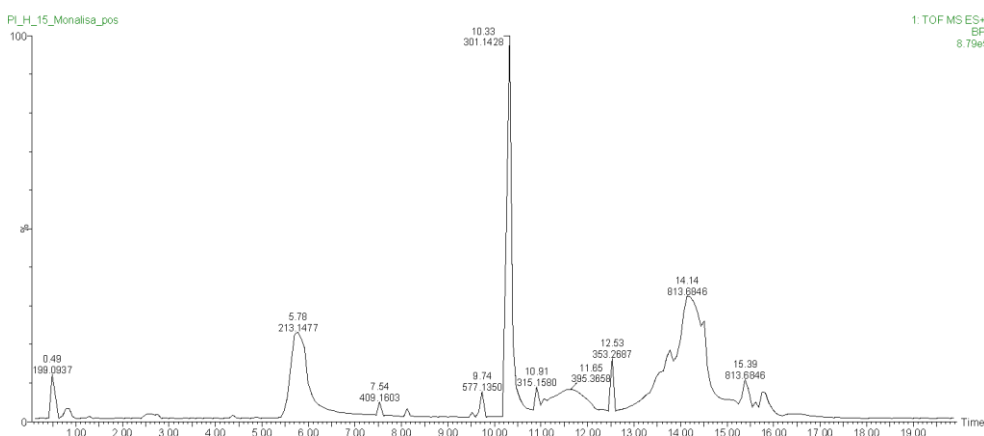
glicerol, previamente isolado da semente da mesma planta (DO NASCIMENTO CAVALCANTE *et al.*, 2020).

Figura 20. ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) espectro do composto 1,3-dipalmitoil-2-oleioldglicerol.



A estrutura foi identificada como 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol utilizando os fragmentos diagnósticos observados no espectro de massas. Pode-se observar na figura 26, o precursor m/z 813,6846.

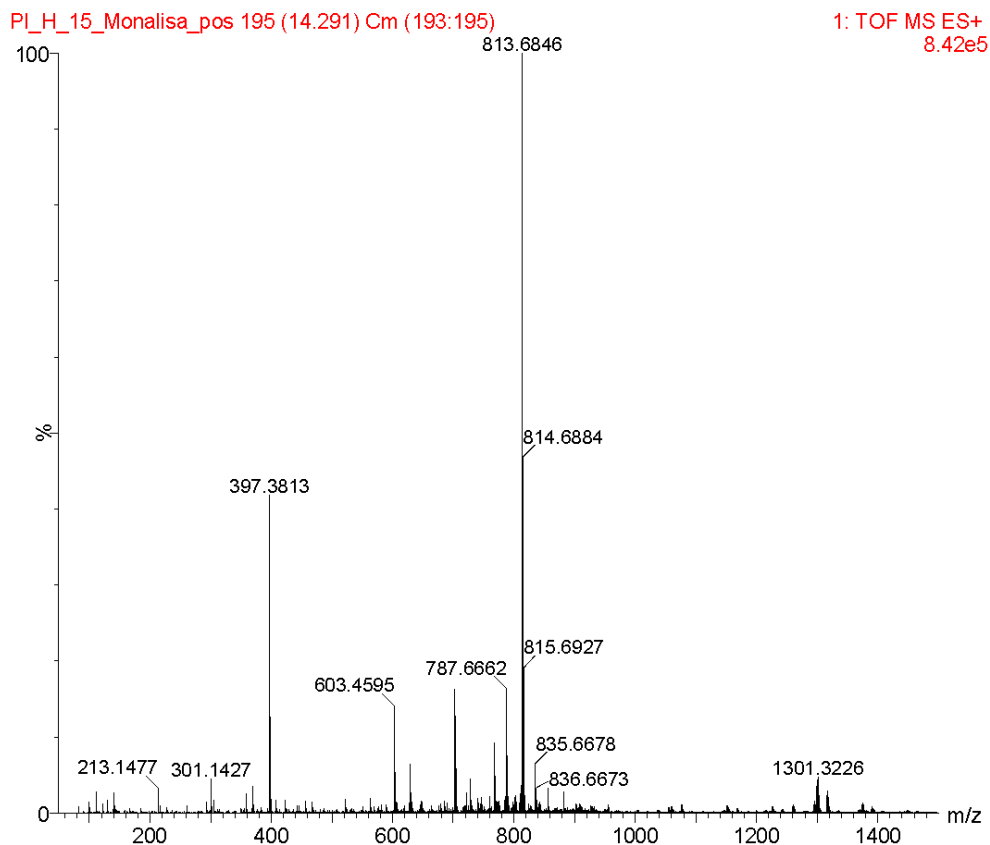
Figura 21. UPLC-ESI-MS do composto 1,3-dipalmitoil-2-oleioldglicerol.



O espectro de massa obtido da ionização por nebulização de alta resolução (HR-ESI-MS) – figura 27 do composto isolado mostrou um íon catiônico a m/z 813,6846. Esse

valor de massas corresponde a fórmula molecular $[C_{51}H_{96}O_6 + H]^+$ (Calculado m/z 813,6846).

Figura 22. UPLC-ESI-MS do composto 1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol.



Na tabela 3 pode-se observar a descrição de todas posições dos carbonos e hidrogênios obtidos nos espectros de RMN.

Tabela 3. Dados de RMN de 1H e ^{13}C (200 e 50MHz) ($CDCl_3$).

1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol.

Literatura -1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol.

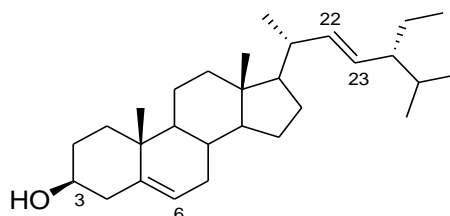
<https://www.nmrdb.org/13c/index.shtml?v=v2.138.0>

Posição	δH (ppm); $J(Hz)$	δC (ppm)	δH (ppm); $J(Hz)$	δC (ppm)
---------	---------------------------	------------------	---------------------------	------------------

C2-C2 C19 C26-C27	-- 5.32 (m, 2H)	173.0 173.4 130 – 129.8	5.37 (m, 2H)	172.9 173.1 132.5-132.7
C18	5.26 (m, 1H)	68.7	5.03 (m, 1H)	69.0
C1 ^a	4.28 (dd, J= 5.5; 12.7 Hz, 2H)	62.0	4.46 (d, J=7.22, 2H)	62.4
C1b	4.12 (dd, J= 5.5;12.7, 2H)	62.0	4.46 (d, J=7.22, 2H)	62.4
C3-C3-C20	2.30 (t, J=7,2, 6H)	34.2	2.26(t, J=7.4, 6H)	33.9
C25-C29	2.00 (m, 4H)	27.0	1.96(m, 4H)	32.5
C4-C4-C21	1.59 (s, 6H)	24.0	2.26(m, 6H)	24.8
-	1.20 – 1.36 (sl)	22.8-34.3	1.15-1.56(sl)	22.6-29.4
C17-C17-C35	0.88(t, J= 7,7, 9H)	14.3	0.86(t, J=7.0, 9H)	14.0

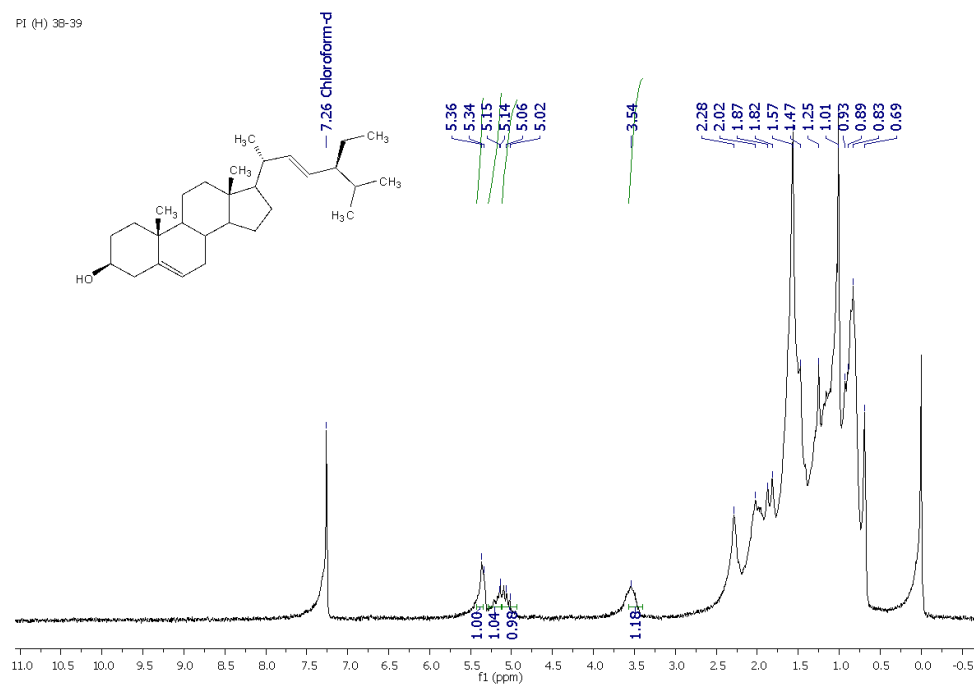
Estigmasterol (**3**) o composto estigmasterol é um sólido branco de P.F. 166 °C, cuja fórmula estrutural está representada na figura 28. ¹H RMN (CDCl₃; 200 MHz): δ 5.34 (1H, m), δ 5.14 (1H, m), δ 5.03 (1H, m), δ 3.54 (1H, m), δ 2.28-0,68 (esqueleto de fitoesteróis). HR-ESI-MS calculado para o modo positivo, (C₂₉H₄₈O + H⁺) m/z= 413.2661, encontrado na literatura para o modo positivo 413.6986 (Bakrim et al., 2022).

Figura 28. Estrutura do Estigmasterol.



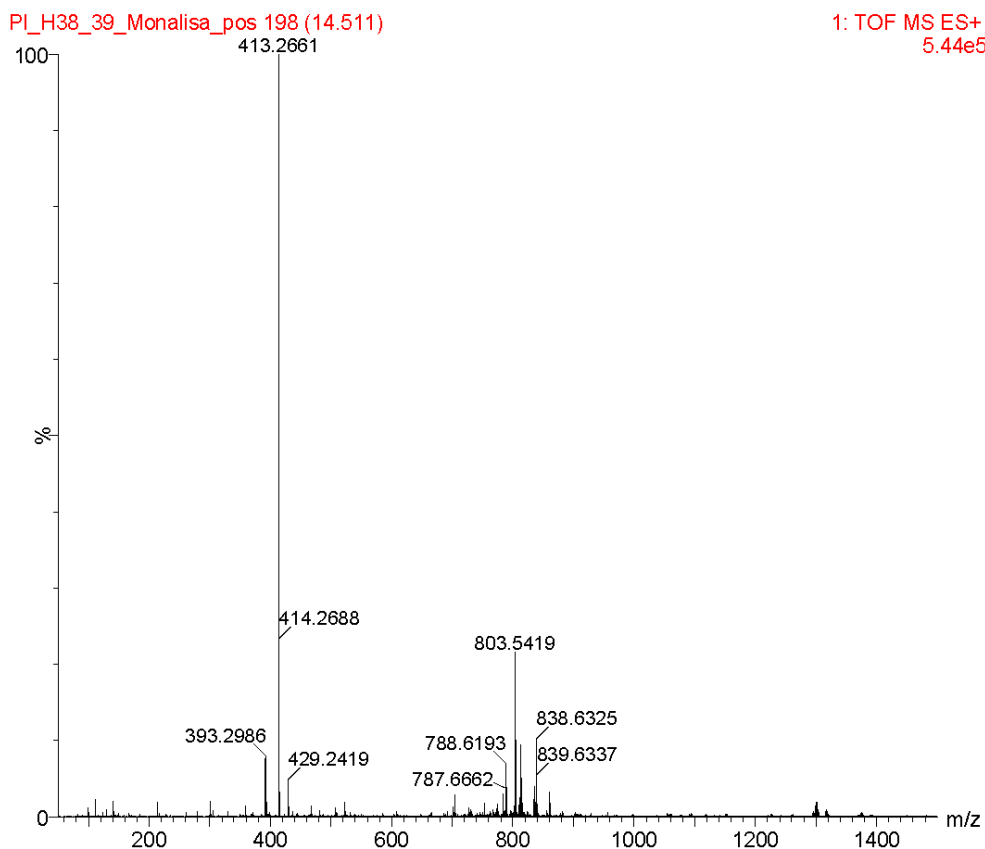
O espectro de RMN ¹H (CDCl₃) representado na figura 29, apresenta sinais característicos de estruturas esteroidais. Observa-se em δ 5,34 (1H, m, H-6) multiplete que integra para um hidrogênio que representam ser de instauração. δ 5,03 e δ 5,14 (2H, m, H-22 e H-23) esse deslocamento químico apresenta integral para dois hidrogênios, característicos de olefínicos da cadeia lateral do estigmasterol. Em δ 3,54 (1H, m, H-3) multiplete referente ao hidrogênio oximetínico. Na região δ 2,28 a δ 0,68 há acúmulo de sinais, que são atribuídos aos hidrogênios dos grupos metílicos, metilênicos e metínicos de estruturas esteroidais.

Figura 23. ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) espectro do composto Estigmasterol.



O espectro de massas obtido (HRESI-MS), figura 30, mostrou um íon m/z 413,2661. Esse valor de massas corresponde a fórmula molecular $[\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O} + \text{H}]^+$ (Calculado m/z 412,4).

Figura 24. UPLC-ESI-MS do composto Estigmasterol.



Na tabela 4 estão todas descrições dos espectros de RMN:

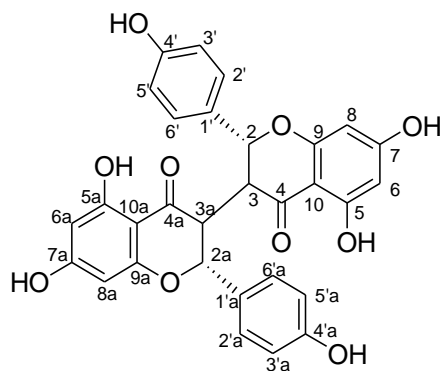
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (CDCl_3).

Posição	Literatura – Estigmasterol (BAKRIM et al., 2022)	
	Estigmasterol δH (ppm) J(Hz)	δH (ppm) J(Hz) / Literatura
C6	5,34 (m, 1H)	5,36 (dl, 8,8 Hz, 1H),
C22	5,14 (m, 1H)	5,15 (dd, 1H, 15,2 Hz e 8,4
C23	5,03 (m, 1H)	5,02 (dd, 1H, 15,2 Hz e 8,4
C3	3,54 (m, 1H)	3,53 (m, 1H)
Esqueleto fitoesteroide	0,68-2,28	1,04 - 2,26

Chamaejasmine (**4**) o composto isolado se apresenta na forma sólida amarela; cuja fórmula estrutural está representada na figura 31. ^1H RMN (CD_3OD ; 200 MHz): δ 7.15

(4H, m), δ 7,07-6,75 (4H, m), δ 5.88 (4H, m), δ 4.57 (2H, m), δ 3,40 (2H, m). ^{13}C (CD_3OD ; 50 MHz): δ 196.3, δ 167, δ 164.3, δ 163.5, δ 157.4, δ 128.6, δ 115,0, δ 114.3, δ 96.0, δ 95.0, δ 79.2, δ 45.7. HR-ESI-MS calculado para o modo positivo ($\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_{10}^+$) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ = 543.1314$, encontrado na literatura para o modo positivo 543.1² (Hou et al., 2019).

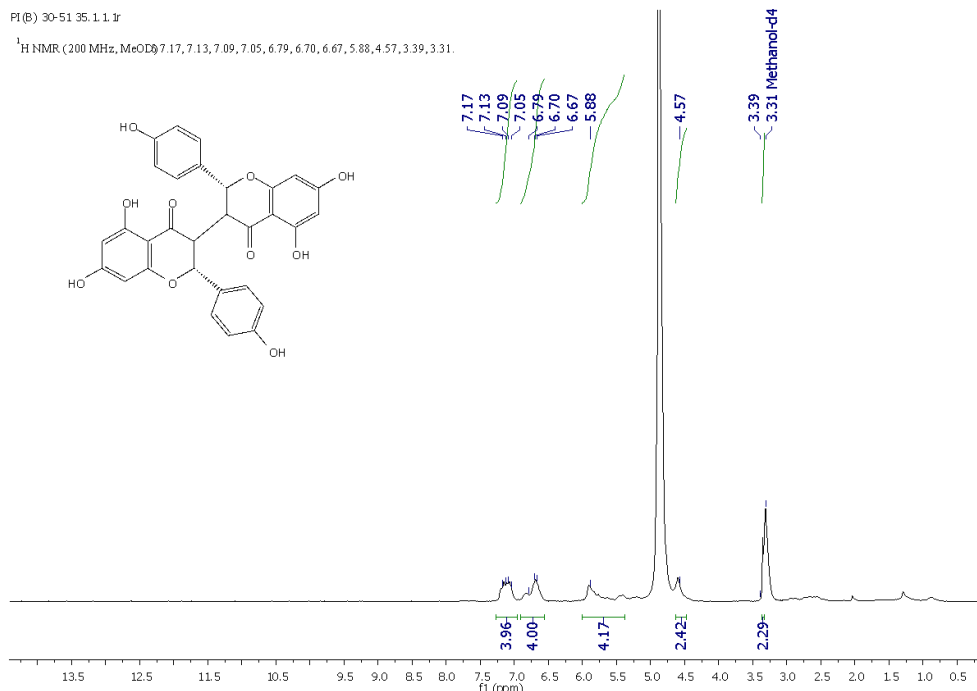
Figura 31. Estrutura do Chamaejasmina.



O espectro de hidrogênio e carbono apresentado na figura 32 e 33, demonstram deslocamentos químicos atribuídos a estruturas de biflavonóides, estes compostos são duas porções de flavonóides, cada porção é formada por um núcleo fundamental, com 15 átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (anéis A e B) e um anel C.

Observa-se no espectro de $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CD_3OD) apresentado na figura 32, o δ 7.15 ppm (4H, m), multipletto que integra para quatro hidrogênios e δ 7.07 ppm (4H, m) que também integra para mais quatro hidrogênios, correspondem aos hidrogênios conectados aos carbonos de hibridização sp^2 pertencentes aos anéis B. Em δ 6.67-6.70 (4H, m) demonstra um multipletto que integra para quatro hidrogênios de anéis aromáticos, estes demonstram simetria e fazem parte dos dois anéis A. Em δ 4.57 ppm (2H, m) um multipletto que integra para dois hidrogênios pertencentes aos carbonos C2 e C2 dos anéis C. E o δ 3.39 ppm (2H, m) multipletto que integra para dois hidrogênios presentes no C3 e C3 dos anéis C, hidrogênios α .

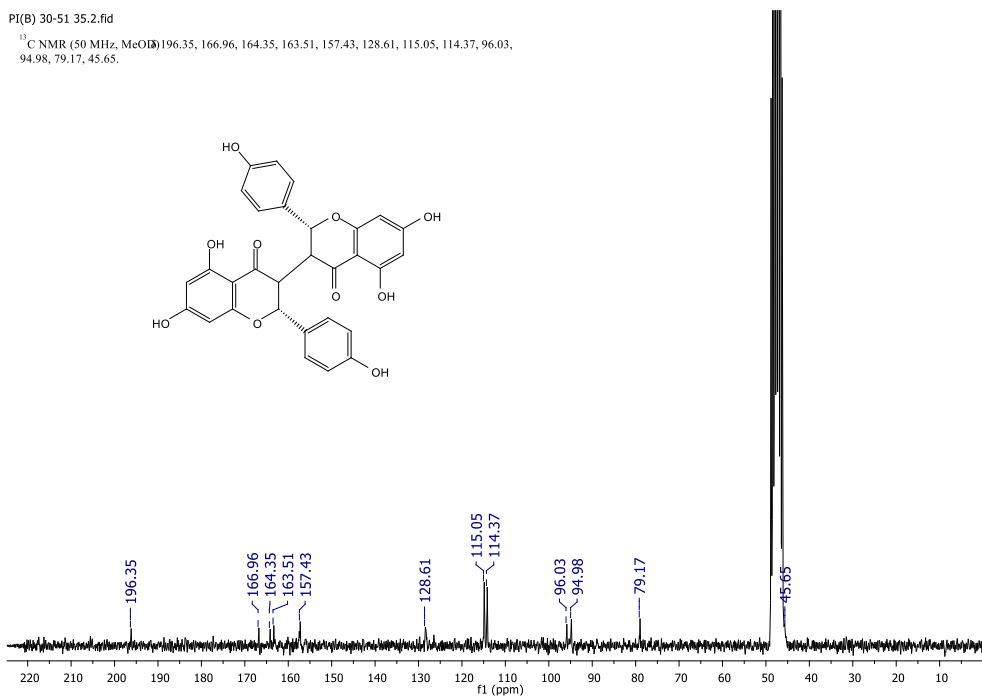
Figura 25. $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CD_3OD) espectro do composto Chamaejasmine.



No ¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD) representado na figura 33, é possível caracterizar o composto em sua perfeita simetria, ambas as porções flavanonas são iguais, todos deslocamentos do espectro integram para dois átomos de carbono ou quatro. Em δ 196.3 ppm podemos observar carbonos de ambas carbonilas presentes nos anéis C (C4 e C4'). Em δ 167 ppm observamos os sinais dos carbonos (C7 e C7') pertencentes aos anéis A, estes estão ligados a hidroxilas. Em δ 164.3 ppm são sinais dos carbonos (C5 e C5') também pertencentes aos anéis A e estão ligados a hidroxilas. Em δ 163.5 são sinais dos carbonos (C9 e C9'), estes carbonos de hibridização sp^2 fazem parte da conexão dos anéis A e C. Em δ 157.4 ppm observamos os sinais dos carbonos (C4' e C4') pertencentes aos anéis B, que possuem ligação com hidroxila. Em δ 128.6 são referentes aos carbonos (C1' e C1') estes carbonos de hibridização sp^2 fazem parte dos anéis B, carbonos que estão diretamente ligados aos anéis C. Em δ 115.0 ppm podemos observar uma integral para quatro átomos de carbono, são referentes aos dois carbonos C2' e aos dois carbonos C6' dos anéis B, todos com hibridização sp^2 . Em δ 114.4 ppm observamos também um deslocamento que integra para quatro átomos de carbono, referentes aos dois carbonos C3' e aos dois carbonos C5' dos anéis B, também com hibridização sp^2 . Em

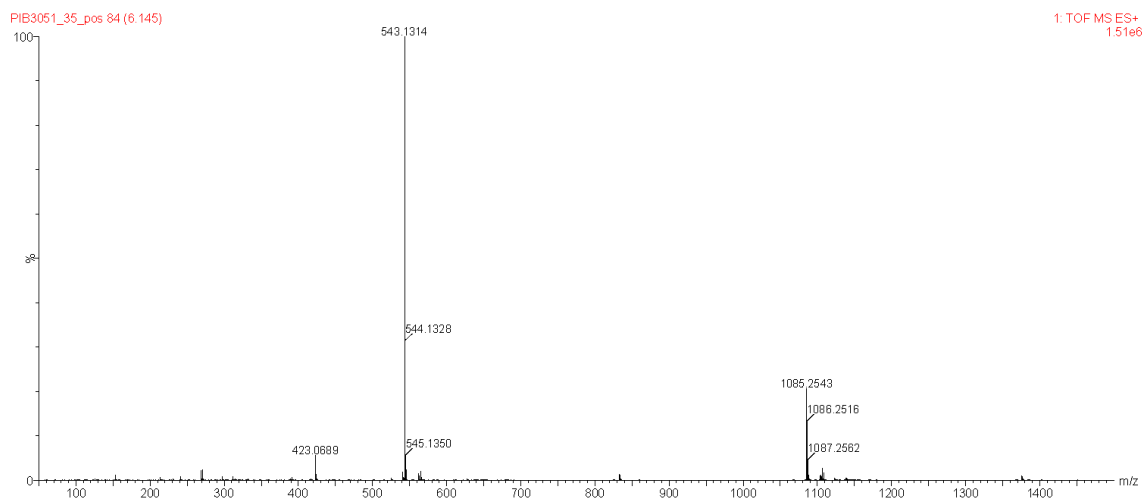
δ 96.0 ppm observamos sinais de dois carbonos (C6 e C6) pertencentes aos anéis A, hibridização sp^2 . Em δ 95 ppm observamos sinais de dois carbonos (C8 e C8) pertencentes aos anéis A, hibridização sp^2 . No δ 79.2 observamos sinais de dois carbonos (C2 e C2) pertencentes aos anéis C, ambos com hibridização sp^3 . Em δ 45.6 observamos sinais de dois carbonos (C3 e C3) pertencentes aos anéis C, também possuem hibridização sp^3 .

Figura 26. ^{13}C -RMN (50 MHz, CD $_3$ OD) do composto Chamaejasmine.



O espectro de massas, figura 34, obtido em ionização por nebulização de alta resolução (HR-ESI-MS) no modo positivo do composto isolado mostrou um íon m/z 543.1314. Esse valor de massas corresponde a fórmula molecular $[C_{30}H_{22}O_{10}+H]^+$ que juntamente com os dados de RMN encontrados na literatura (AGRAWAL, P.K; 1989) contribuiram para a caracterização do composto chamaejasmina, cuja fórmula molecular é $C_{30}H_{22}O_{10}$ e sua massa é 542.12 g/mol.

Figura 27. UPLC-ESI-MS do composto Chamaejasmine.



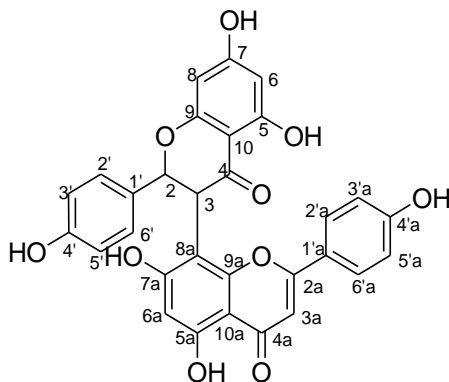
Pode-se observar os dados de RMN do compostos chamaejasmina na tabela 5:

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (MeOD).

Posição	δ_{H} (ppm); J (Hz)	δ_{C} (ppm)	LITERATURA (Chamaejasmina) https://www.nmrdb.org/	
			δ_{H} (ppm); J (Hz)	δ_{C} (ppm)
C2	5,91 (2H, m)	79	5.33-5.44 (2H, 5.38 (d, $J = 2.5$ Hz), 5.39 (d, $J = 2.5$ Hz)	80,2
C3	5,42 (2H, m)	45,75	3.55-3.67 (2H, 3.61 (dd, $J = 2.5, 2.3$ Hz), 3.61 (dd, $J = 2.5\text{Hz}$) 2.3 Hz	49,4
C4	-	196,2	-	195,9
C5	-	166,8	-	163,5
C6	6,70 (4H, m)	126,5	6.62-6.75 (4H, 6.68 (ddd, $J = 8.2, 1.5, 0.6$ Hz),	96,2
C7	-	164,2	-	165,6
C8	6,70 (4H, m)	94,8	6.62-6.75 (4H, 6.68 (ddd, $J = 8.2, 1.5, 0.6$ Hz),	94,6
C9	-	163,35	-	162,4
C10	-	95,85	-	102,2
C1'	-	128,45	-	127,3
C2'	7,17 (4H, dd, $J=8,4$)	114,2	6.93-7.05 (4H, 6.99 (ddd, $J = 8.2, 1.1, 0.6$ Hz)	128,8
C3'	7,09 (4H, dd, $J=8,4$)	114,9	6.17-6.27 (4H, 6.22 (d, $J = 1.6$ Hz), 6.22 (d, $J = 1.6$ Hz)	115,3
C4'	-	157,25	-	157,9
C5'	7,09 (4H, dd, $J=8,4$)	114,9	6.17-6.27 (4H, 6.22 (d, $J = 1.6$ Hz), 6.22 (d, $J = 1.6$ Hz)	115,3
C6'	7,17 (4H, dd, $J=8,4$)	114,2	6.93-7.05 (4H, 6.99 (ddd, $J = 8.2, 1.1, 0.6$ Hz)	128,8
C2a	5,91 (2H, m)	79	5.33-5.44 (2H, 5.38 (d, $J = 2.5$ Hz), 5.39 (d, $J = 2.5$ Hz)	80,2
C3a	5,42 (2H, m)	45,75	3.55-3.67 (2H, 3.61 (dd, $J = 2.5, 2.3$ Hz), 3.61 (dd, $J = 2.5\text{Hz}$) 2.3 Hz	49,4
C4a	-	196,2	-	195,9
C5a	-	166,8	-	163,5
C6a	6,70 (4H, m)	126,5	6.62-6.75 (4H, 6.68 (ddd, $J = 8.2, 1.5, 0.6$ Hz),	96,2
C7a	-	164,2	-	165,6
C8a	6,70 (4H, m)	94,8	6.62-6.75 (4H, 6.68 (ddd, $J = 8.2, 1.5, 0.6$ Hz),	94,6
C9a	-	163,35	-	162,4
C10a	-	95,85	-	102,2
C1'a	-	128,45	-	127,3
C2'a	7,17 (4H, dd, $J=8,4$)	114,2	6.93-7.05 (4H, 6.99 (ddd, $J = 8.2, 1.1, 0.6$ Hz)	128,8
C3'a	7,09 (4H, dd, $J=8,4$)	114,9	6.17-6.27 (4H, 6.22 (d, $J = 1.6$ Hz), 6.22 (d, $J = 1.6$ Hz)	115,3
C4'a	-	157,25	-	157,9
C5'a	7,09 (4H, dd, $J=8,4$)	114,9	6.17-6.27 (4H, 6.22 (d, $J = 1.6$ Hz), 6.22 (d, $J = 1.6$ Hz)	115,3
C6'a	7,17 (4H, dd, $J=8,4$)	114,2	6.93-7.05 (4H, 6.99 (ddd, $J = 8.2, 1.1, 0.6$ Hz)	128,8

Volkensiflavone (**5**) o composto isolado se apresenta na forma sólida; cuja fórmula estrutural está representada na figura 35. δ 7.70 (2H, dd, $J = 8.3$ Hz, 1,8 Hz), δ 7.06 (2H, dd, $J = 8,4$ Hz), δ 6.95 (2H, m), δ 6.65 (2H, m), δ 6,43 (1H, s), δ 6.06 (1H, m), δ 6.01 (1H.s), δ 6.00 (1H, m), δ 5.98 (1H, m), δ 5.04 (1H, m). ^{13}C (CD_3OD ; 50 MHz): δ 197.9, δ 183.9, δ 168.8, δ 168.0, δ 165.8, δ 164.8, δ 164.4, δ 162.7, δ 162.3, δ 158.7, δ 158.6, δ 130.5, δ 129.8, δ 129.6, δ 129.4, δ 129.15, δ 123.1, δ 117.0, δ 116.3, δ 116.3, δ 115.6, δ 115.6, δ 104.1, δ 103.5, δ 99.9, δ 99.30, δ 97.6, δ 96.65, δ 80.5, δ 50.85. HR-ESI-MS calculado para o modo positivo ($\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{O}_{10}^+$) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ = 541.1165$, encontrado na literatura para o modo negativo 539.0980 (STARK et al., 2015).

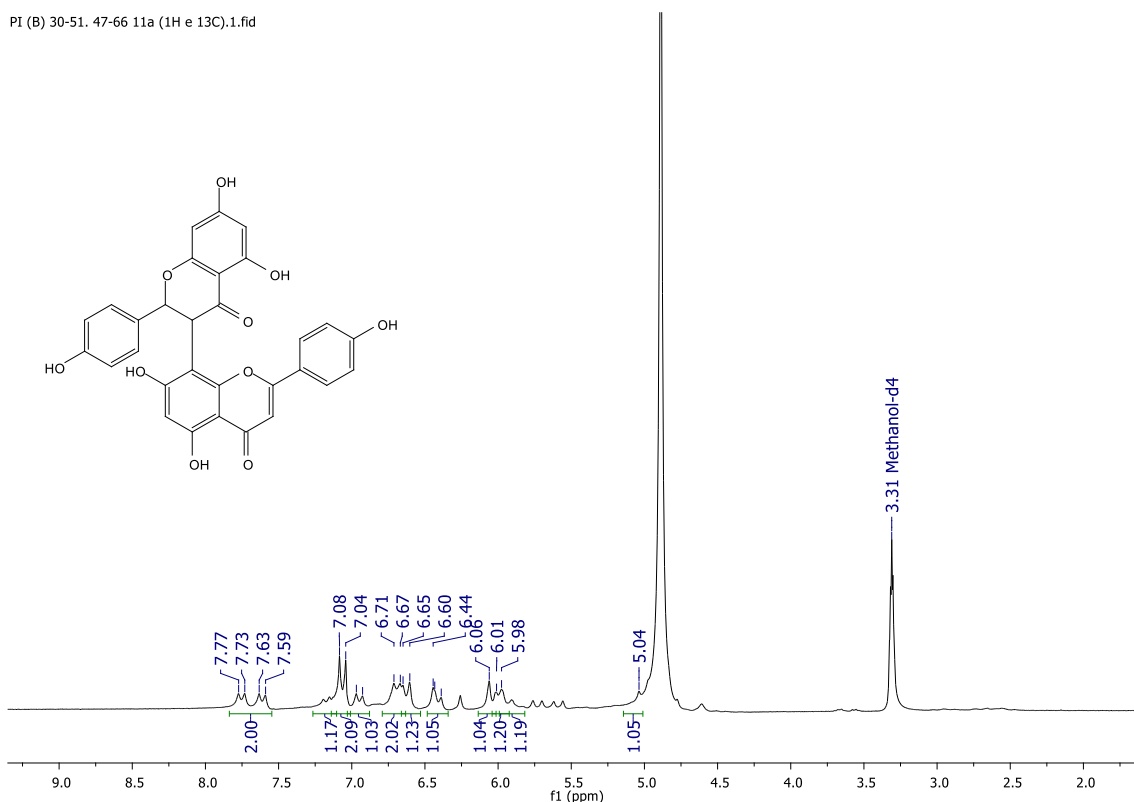
Figura 35. Estrutura do Volkensiflavona.



O espectro de hidrogênio e carbono apresentados na figura 36 e 37, demonstram deslocamentos químicos atribuídos a estruturas de biflavonóides. Observa-se no ^1H RMN (CD_3OD ; 200 MHz) apresentado na figura 36, deslocamento em δ 7.70 (2H, dd, $J = 8.3$ Hz), duplete que integra para dois hidrogênios que pela constante de acoplamento podemos indica-los como hidrogênios mais desblindados pertencentes ao anel aromático B ligados aos carbonos ($\text{C}2'$ e $\text{C}6'$) da porção flavona. Observamos que o deslocamento δ 7.06 (2H, d, $J = 8.3$ Hz) duplete que integra para dois hidrogênios pertencentes ao anel aromático B ligados aos carbonos ($\text{C}2'$ e $\text{C}6'$) da porção flavanona. Em δ 6.95 (2H, m) observamos hidrogênios pertencentes ao anel aromático B ligados aos carbonos ($\text{C}3'$ e $\text{C}5'$) da porção flavanona. δ 6.65 (2H, m) observamos hidrogênios pertencentes ao anel aromático B ligados aos carbonos ($\text{C}3'$ e $\text{C}5'$) da porção flavona. Em δ 6,43 (1H, s) um simpleto que integra para um hidrogênio que está ligado ao carbono ($\text{C}3$) da porção flavona, por conta da hibridização deste carbono, o hidrogênio aparece em uma região

mais desblindada. Em $\delta 6.06$ (1H, m) observamos um multipeto que integra para um hidrogênio que está ligado ao carbono (C6) pertencente ao anel A da porção flavona. Em $\delta 6.01$ (1H, s) e $\delta 6.00$ (1H, m) observamos hidrogênios que estão ligados aos carbonos (C8 e C6) do anel aromático A da porção flavanona. Em $\delta 5.98$ (1H, m) um multipeto que integra para para um hidrogênio que está ligado ao carbono (C2) do anel C da flavanona. Em $\delta 5.04$ (1H, m) um m multipeto que integra para um hidrogênio que está ligado ao carbono (C3) do anel C da flavanona.

Figura 28. ^1H -RMN (200 MHz, CD_3OD) espectro do composto Volkensiflavona.



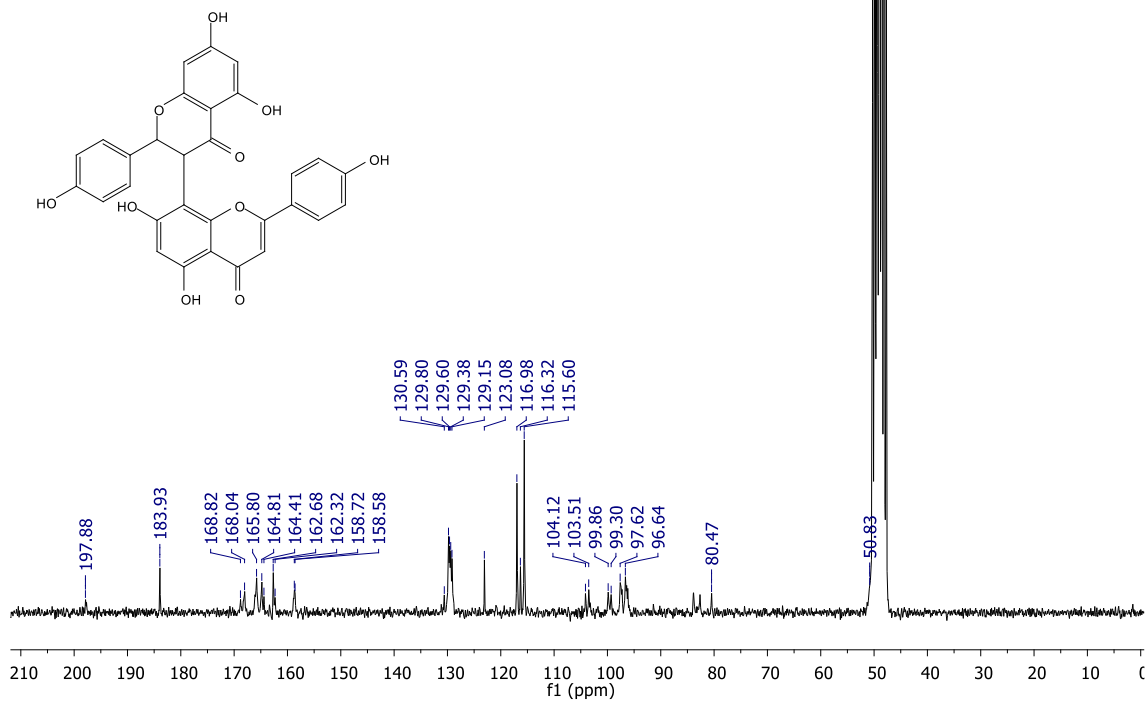
No ^{13}C -NMR (50 MHz, CD_3OD) representado na figura 37, em $\delta 197.9$ ppm e $\delta 183.9$ ppm observamos carbonos pertencentes as carbonilas presentes nos anéis C (C4 e C4) das porções flavanona e flavona, respectivamente. Em $\delta 168.8$ ppm e $\delta 168.0$ ppm podemos observar os carbonos (C7 e C5) pertencentes ao anel A da flavanona. Em $\delta 165.8$ ppm observamos o carbono de hibridização sp^2 (C9) que faz parte da junção nos anéis A e C da flavanona. Em $\delta 164.8$ ppm temos o carbono (C2) de hibridização sp^2 pertencente ao anel C da flavona. Em $\delta 164.4$ ppm observamos o carbono (C7) pertencente ao anel A

da flavona. Em $\delta 162.7$ ppm representa o carbono (C4') ligado a uma hidroxila, pertencente ao anel B da flavanona. Em $\delta 162.3$ ppm observamos o carbono (C4') ligado a uma hidroxila, pertencente ao anel B da flavona. Em $\delta 158.7$ ppm o deslocamento refere-se ao carbono (C5) ligado a uma hidroxila, pertencente ao anel A da flavona. Em $\delta 158.6$ ppm observamos o sinal do (C9) pertencente ao anel A da porção flavona. Em $\delta 130.5$ refere-se ao sinal do carbono (C1') do anel B, este carbono faz ligação com o anel C, na flavanona. Os deslocamentos $\delta 129.8$ ppm e $\delta 129.6$ ppm observamos os carbonos (C2' e C6') também do anel B da flavanona. Os deslocamentos $\delta 129.4$ ppm e $\delta 129.15$ ppm são referentes aos carbonos (C2' e C6') do anel B da porção flavona. Em $\delta 123.1$ ppm observamos o carbono (C1') do anel B, este carbono faz ligação com o anel C, na flavona. Em $\delta 117.0$ ppm observamos o carbono (C3) de hibridização sp^2 do anel C que caracteriza a porção flavona. Em $\delta 116.3$ ppm e $\delta 116.3$ ppm observamos os carbonos simétricos (C5' e C3') do anel B da flavanona. Em $\delta 115.6$ ppm e $\delta 115.6$ ppm observamos os carbonos simétricos (C5' e C3') do anel B da flavona. Em $\delta 104.1$ observamos o sinal do (C10) que faz ligação entre o anel A e anel C da porção flavanona. Em $\delta 103.5$ ppm observamos o sinal do (C10) que faz ligação entre o anel A e anel C da porção flavona. Em $\delta 99.9$ ppm observamos o sinal do carbono (C8) pertencente ao anel A da porção flavona, este carbono está realizando a ligação entre a porção flavona e flavanona. Em $\delta 99.30$ ppm e $\delta 97.6$ ppm refere-se aos carbonos (C8 e C6) pertencentes ao anel A da flavanona. Em $\delta 96.65$ ppm observamos o carbono (C6) pertencente ao anel A da porção flavona. Em $\delta 80.5$ ppm podemos observar o carbono (C2) pertencente ao anel C da flavanona. Em $\delta 50.85$ ppm observamos o carbono (C3) pertencente ao anel C da flavanona, este se liga a porção flavona.

Figura 29. ^{13}C -RMN (50 MHz, CD_3OD) espectro do composto Volkensiflavona.

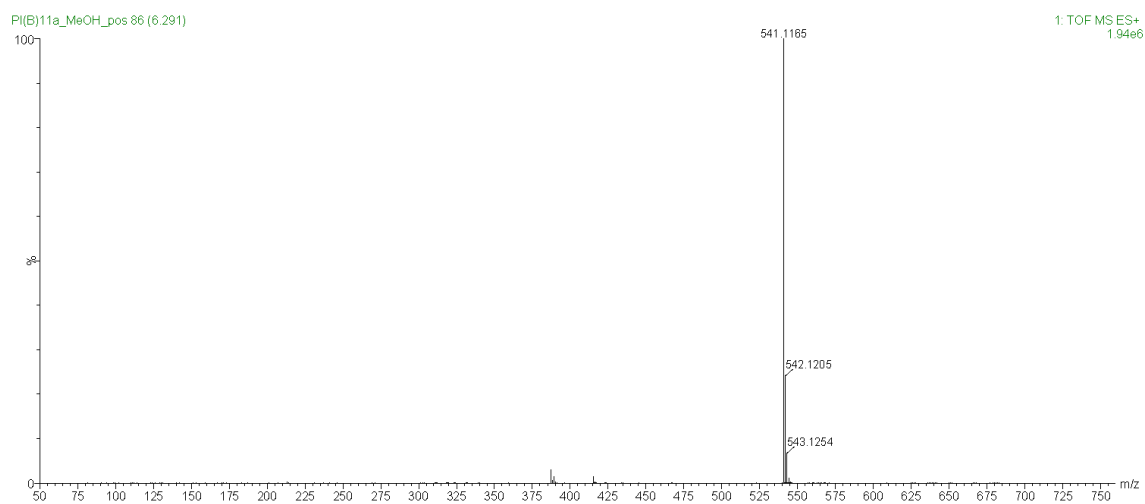
PI (B) 30-51. 47-66 11a (1H e 13C).2.fid

¹³C NMR (50 MHz, MeOD) 197.88, 183.93, 168.82, 168.04, 165.80, 164.81, 164.41, 162.68, 162.32, 158.72, 158.58, 130.59, 129.80, 129.60, 129.38, 129.15, 123.08, 116.98, 116.32, 115.60, 104.12, 103.51, 99.86, 99.30, 97.62, 96.64, 80.47, 50.83.



O espectro de massas, figura 38, obtido em ionização por nebulização de alta resolução (HR-ESI-MS) do composto isolado mostrou um íon m/z 541.1165.

Figura 30. UPLC-ESI-MS do composto Volkensiflavona.



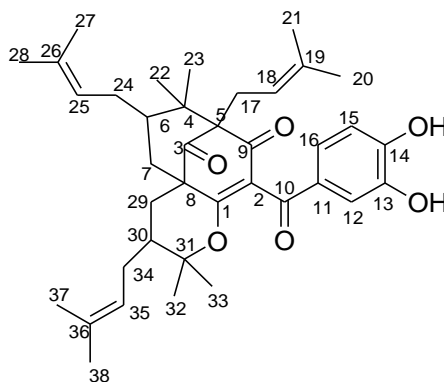
Esse valor de massas corresponde a fórmula molecular $[C_{30}H_{20}O_{10} + H]^+$ que juntamente com os dados de RMN encontrados na literatura (AGRAWAL, P.K; 1989) contribuíram para a caracterização do composto volkensiflavona cuja fórmula molecular é $C_{30}H_{20}O_{10}$ e sua massa é 540.10 g/mol. Pode-se observar os dados de RMN demonstrando as posições dos átomos de hidrogênio e carbono na tabela 6 a seguir:

Tabela 6. Dados de RMN de 1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (MeOD).

Volkensiflavanone		Literatura (Volkensiflavanone) https://www.nmrdb.org/		
Posição	δ_H (ppm); J (Hz)	δ_C (ppm); J (Hz)	δ_H (ppm); J (Hz)	δ_C (ppm); J (Hz)
C2	5.98 (m, 1H)	80.4	5.98 (d, J=3,19 Hz; 1H)	81.4
C3	5.04 (m, 1H)	50.8	4,95 (d, J=3,19 Hz; 1H)	48.2
C4	-	197.9	-	196
C5	-	168.1	-	163.7
C6	6.06 (m, 1H)	96.6	6.21 (d, J=1,57 Hz; 1H)	96.4
C7	-	168.8	-	166.6
C8	6.01 (m, 1H)	97.6	6.22 (d, J=1,57 Hz; 1H)	95.3
C9	-	165.8	-	163.7
C10	-	103.5	-	101.7
C1'	-	130.5	-	128.1
C2'	7.06 (d, J=8,4 1H)	129.6	6.99 (dd, J=8,19; 1,10 Hz; 1H)	128.1
C3'	6.95 (m, 1H)	116.9	6.68 (dd, J=8,19; 1,53 Hz; 1H)	114.6
C4'	-	164.4	-	162
C5'	6.95 (m, 1H)	116.3	6.68 (dd, J=8,19; 1,53 Hz; 1H)	114,6
C6'	7.06 (d, J=8,4 Hz, 1H)	129.4	6.99 (dd, J=8,19; 1,10 Hz; 1H)	128.1
C2a	-	162.7	-	163.7
C3a	6.43 (m, 1H)	117	6.42 (s, 1H)	120.8
C4a	-	183.9	-	181.6
C5a	-	158.7	-	160.4
C6a	6.00 (m, 1H)	99.3	6.20 (s, 1H)	98.4
C7a	-	164.8	-	162.8
C8a	-	99.8	-	100.6
C9a	-	158.6	-	157.3
C10a	-	104.1	-	103.7
C1'a	-	123.1	-	121.3
C2'a	7.70 (dd, J=8,4; 1,8 Hz, 1H)	129.1	7.53 (dd, J=8,28; 1,81 Hz, 1H)	128.1
C3'a	6.65 (m, 1H)	115.6	6.84 (dd, J=8,28; 1,08 Hz, 1H)	115.9
C4'a	-	162.3	-	161
C5'a	6.65 (m, 1H)	115.6	6.84 (dd, J=8,28; 1,08 Hz, 1H)	115.9
C6'a	7.70 (dd, J= 8,4 Hz, 1,8 Hz 1H)	129.8	7.53 (dd, J=8,28; 1,81 Hz, 1H)	128.1

Isogarcinol (**6**): é um sólido amarelo; cuja fórmula estrutural está na figura 39. ^1H RMN (CDCl_3 ; 400 MHz): δ 7.40 (1H, s), δ 7.08 (1H, d, $J= 8.3$ Hz.), δ 6.68 (1H, d, $J= 8.2$ Hz), δ 5.08 (2H, m), δ 4.82 (1H, m), δ 3.05 (1H, dd, $J= 2.7$, $J= 13.8$), δ 2.67 (1H, m), δ 2.46 (1H, m), δ 2.16 (2H, m), δ 2.02 (4H, d, $J= 12\text{Hz}$), δ 1.70 (9H, d, $J= 10\text{Hz}$), δ 1.58 (14H, s), δ 1.20 (2H, s), δ 1.11 (2H, s), δ 0.97 (3H, s), δ 0.75 (3H, s). ^{13}C (CDCl_3 ; 100 MHz): δ 206.8, δ 194.8, δ 193.5, δ 171.8, δ 150.2, δ 144.2, δ 134.4, δ 134.5, δ 133.8, δ 133.6, δ 133.8, δ 133.6, δ 130, δ 124.2, δ 122.5, δ 120.5, δ 120.2, δ 115.3, δ 114.6, δ 87.4, δ 70.7, δ 53.0, δ 46.4, δ 43.1, δ 42.7, δ 40.9, δ 40.9, δ 29.8, δ 28.8, δ 27.8, δ 26.2, δ 26.2, δ 25.9, δ 24.9, δ 22.4, δ 21.4, δ 18.2, δ 18.2, δ 16.3, δ 16.2. HR-ESI-MS calculado para o modo positivo ($\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_6^+$) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ = 603.3831$, encontrado na literatura para o modo positivo 603.3607 (Bharate et al., 2014).

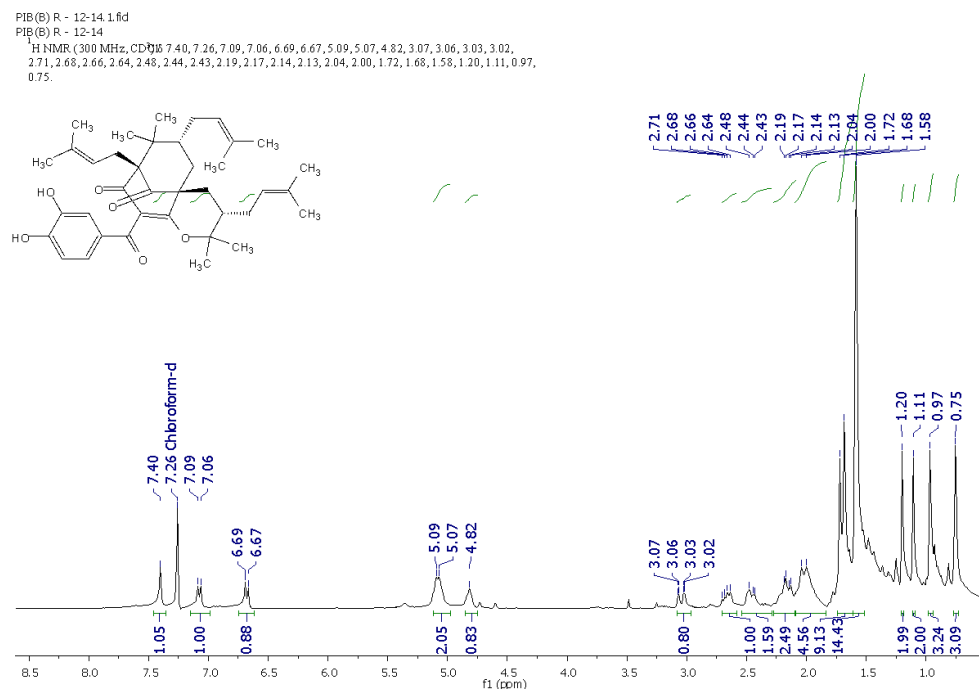
Figura 39. Estrutura do Isogarcinol.



No espectro de ^1H RMN (CDCl_3 ; 400 MHz) representado na figura 40, observamos um deslocamento em δ 7.40 (1H, s), simpleto que integra para um hidrogênio, em δ 7.08 (1H, d, $J= 8.3$ Hz,) um duplete que integra para um hidrogênio e em δ 6.68 (1H, d, $J= 8.2$ Hz), outro duplete que integra para mais um hidrogênio, os três átomos identificados pertencem ao anel aromático da estrutura. Nos deslocamentos δ 5.08 (2H, m) e δ 4.82 (1H, m) observamos os três hidrogênios olefínicos dos grupos prenilos. No δ 3.03 (1H, dd, $J= 2.7$, $J= 13.8$) observamos um duplo duplete que integra para um hidrogênio, este está conectado a um carbono terciário de hibridização sp^3 (C6). Os deslocamentos δ 2.67 (2H, m), δ 2.46 (2H, m), δ 2.02 (2H, d, $J= 12\text{Hz}$) são hidrogênios ligados aos carbonos metilênicos dos grupos prenilos. Em δ 2.16 (2H, m) observamos um multiplete que integra para dois hidrogênios, que estão ligados ao carbono C29. Em δ 2.02 (2H, m) observamos um multiplete que integra para dois hidrogênios, que estão ligados

ao carbono C7. Em δ 1.48 (1H, m) um multipeto que integra para um hidrogênio, pertencente ao carbono C30. Nos deslocamentos mais blindados δ 1.72 (3H, d, J= 10Hz), δ 1.69 (3H, s) δ 1.58 (12H, sl), δ 1.20 (3H, s), δ 1.11(3H, s), δ 0.97 (3H, s), δ 0.76 (3H, s) observamos trinta hidrogênios que estão ligados aos carbonos metílicos da estrutura.

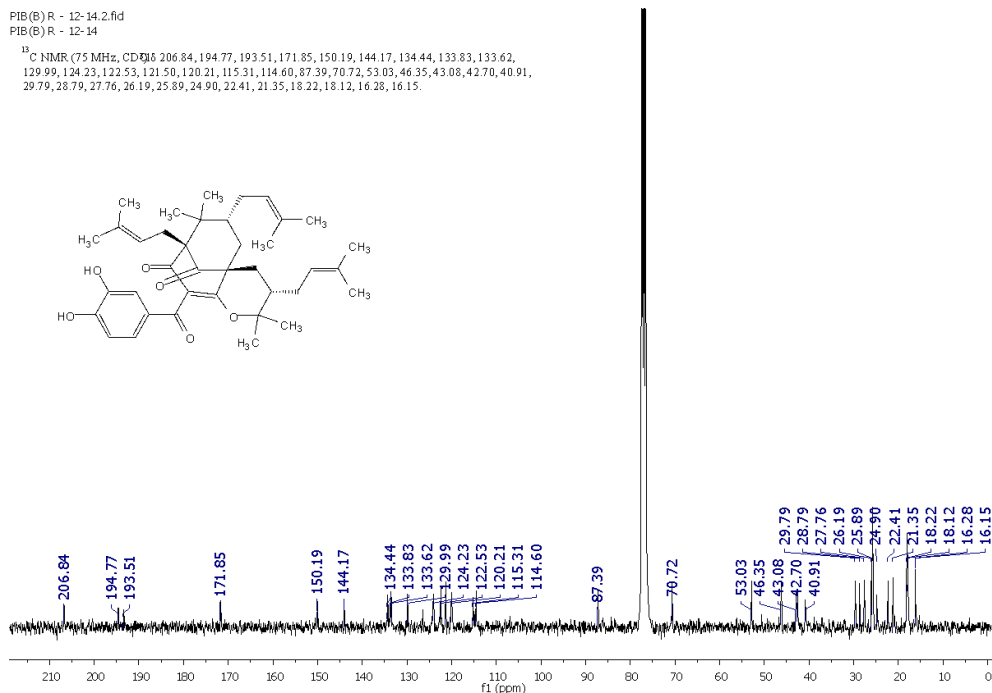
Figura 31. ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) espectro do composto Isogarcinol.



No ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) representado na figura 41, podemos observar deslocamento químico de 38 átomos de carbonos. Nos deslocamentos químicos δ 206.8 ppm, δ 194.8 ppm, δ 193.5 ppm, localizados na região mais desblindada do espectro, observamos três carbonilas representadas pelos carbonos (C3, C9 e C10). Em δ 171.8 ppm observamos o sinal do carbono (C1) de hibridização sp^2 , que faz a ligação entre os dois anéis contidos na molécula. Nos deslocamentos δ 150.2 ppm e δ 144.2 ppm observamos dois carbonos que se ligam a hidroxilas, eles pertencem há um anel aromático. Na molécula representada na figura 22 observamos três grupos prenilos (radial alifático insaturado ramificado), essas insaturações são representadas pelos deslocamentos químicas δ 134.5 ppm, δ 134.4 ppm, δ 133.6 ppm, respectivamente se referem aos carbonos (C19, C26 e C36). Em δ 133.8 ppm, é possível observar o carbono (C11) que faz parte do anel aromático e também faz a ligação com carbonila. Em δ 130.0 ppm podemos observar o carbono (C2) de hibridização sp^2 que faz parte do anel. Em δ 124.2 ppm observamos o

carbono (C16) do anel aromático. Nos deslocamentos $\delta 122.5$ ppm, $\delta 120.5$ ppm, $\delta 120.2$ ppm, respectivamente se referem aos carbonos de hibridização sp^2 (C18, C25 e C35) dos grupos prenilos. Em $\delta 115.30$ ppm e $\delta 114.6$ ppm são deslocamentos de carbonos pertencentes ao anel aromático (C12 e C15). Em $\delta 87.4$ ppm e $\delta 70.7$ ppm observamos os carbonos de hibridização sp^3 (C31 e C5) pertencentes ao anel central, o carbono (C31) faz ligação com um oxigênio e o carbono (C5) faz ligação com carbonila, por isso estão mais desblindados. Nos deslocamentos químicos $\delta 53.0$ ppm, $\delta 46.4$ ppm, $\delta 43.1$ ppm, $\delta 42.7$ ppm, $\delta 40.9$ ppm, $\delta 40.9$ ppm observamos sinais de carbonos de hibridização sp^3 (C8, C6, C30, C7, C29 e C4) que fazem parte dos anéis centrais. Os deslocamentos $\delta 29.8$ ppm, $\delta 26.2$ ppm, $\delta 26.2$ ppm são referentes aos carbonos metilênicos (C34, C24, C17) dos grupos prenilos e os deslocamentos químicos $\delta 28.8$ ppm, $\delta 27.8$ ppm, $\delta 25.9$ ppm, $\delta 24.9$ ppm, $\delta 22.4$ ppm, $\delta 21.4$ ppm, $\delta 18.2$ ppm, $\delta 18.2$ ppm, $\delta 16.3$ ppm, $\delta 16.2$ ppm são referentes aos carbonos metílicos da molécula (C33, C21, C38, C28, C20, C32, C27, C23 e C22).

Figura 32. ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) espectro do composto Isogarcinol



O espectro de massas, figura 42, obtido em ionização por nebulização de alta resolução (HR-ESI-MS) no modo positivo do composto isolado mostrou um íon m/z 603.3831.

Figura 33. UPLC-ESI-MS do composto Isogarcinol.



Esse valor de massas corresponde a fórmula molecular $[C_{38}H_{50}O_6+H]^+$ que juntamente com os dados da literatura que confirmou a m/z 603.3607 (BHARATE et al., 2014), e os dados de RMN encontrados na literatura (SOCOLSKY; PLIETKER, 2015) contribuíram para a caracterização do composto isogarcinol, cuja formula molecular é $C_{38}H_{50}O_6$ e sua massa é 602.36 g/mol, pode-se observar os dados dos espectros de RMN na tabela 7 a seguir:

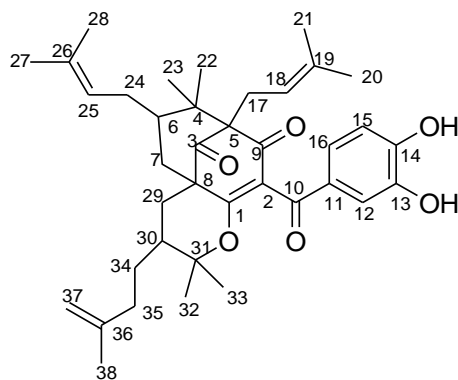
Tabela 7. Dados de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100MHz) ($CDCl_3$).

Literatura –Isogarcinol (Socolsky, 2015)			Isogarcinol					
Posição C	δH (ppm); J (Hz)	δC (ppm)	δH (ppm); J (Hz)	δC (ppm)	δC (ppm) – 1J_H HMBC	δC (ppm) – 2J HMBC	δC (pp m) – 3J HMBC	δC (ppm) – 4J HMBC
C1		171,7		171,85				
C2		119,6		130				
C3		194,6		194,8				
C4		46,2		40,9				
C5		68,2		70,7				
C6	3,05 (dd, $J=14,3$; 3,7 Hz, 1H)	46,1	3,03 (dd, $J=14,0$; 2,4 Hz, 1H)	46,35				
C7	2,29-2,20 (m, 2H)	39,6	2,02 (m, 2H)	42,7				
C8		51,2		53,3				
C9		207,2		206,8				
C10		193,2		193,5				
C11		129,1		133,85				
C12	7,45 (d, $J=1,8$ Hz, 1H)	114,4	7,42 (s, 1H)	115,3	193,95	150,2	114,6	
C13		144,6		144,2				
C14		150,6		150,2				
C15	6,68 (d, $J=8,2$ Hz, 1H)	114,3	6,68 (d, $J=8,11$ Hz, 1H)	114,6	150,2	133,85		

C16	7,03 (dd, $J=8,2$; 1,8 Hz, 1H)	121,3	7,1 (d, $J=8,1$ Hz, 1H)	121,5	193,95	150,2	144,2	
C17	2,46 (m, 2H)	28,2	2,46 (m, 2H)	26,2				
C18	5,11 (d, $J=6,3$ Hz, 1H)	123,8	5,08 (d, $J=6,8$ Hz, 1H)	122,5	26,2			
C19		133,6		133,65				
C20	1,67 (s, 3 H)	21,1	1,69 (s, 3H)	22,4	133,85	122,2		
C21	1,71 (s, 3 H)	25,9	1,72 (s, 3H)	27,8	133,85	122,2		
C22	1,16 (s, 3 H)	25,6	1,11 (s, 3H)	16,3	70,7	46,3	42,7	15,5
C23	0,92 (s, 3 H)	17,9	0,76 (s, 3H)	16,3	70,7	46,3	42,7	22,5
C24	1,64 (m, 2H)	28,5	2,02 (m, 2H)	26,2				
C25	4,87 (d, $J=6,2$ Hz, 1 H)	124,8	5,08 (d, $J=6,8$ Hz, 1H)	121,5				
C26		133,0		134,4				
C27	1,58 (sl, 3 H)	17,83	1,58 (sl, 3H)	18,2	133,85	121,5	24,9	19,2
C28	1,58 (sl, 3 H)	25,7	1,58 (sl, 3H)	24,9	133,85	121,5	18,2	
C29	2,05-1,94 (m, 2H)	39,3	2,16 (m, 2H)	40,9				
C30	1,77 (m, 1 H)	42,8	1,48 (m, 1H)	43,1				
C31		86,7		87,4				
C32	1,24 (s, 3H)	25,4	1,20 (s, 3H)	21,3	87,4	43,1	21,6	
C33	0,99 (s, 3 H)	26,6	0,97 (s, 3H)	28,5	87,4	43,1	28,5	
C34	2,71 – 2,59 (m, 2H)	29,2	2,67 (m, 2H)	29,8	87,4	43,1	22,4	
C35	4,92 (d, $J=7,2$ Hz, 1H)	125,1	4,82 (s, 1H)	120,2	25,9	18,2		
C36		134,6		134,4				
C37	1,58 (s, 3 H)	17,8	1,58 (sl, 3H)	18,2	134,4	120,2		
C38	1,49-1,36 (s, 3 H)	22,3	1,58 (sl, 3H)	25,9	134,4	120,2		

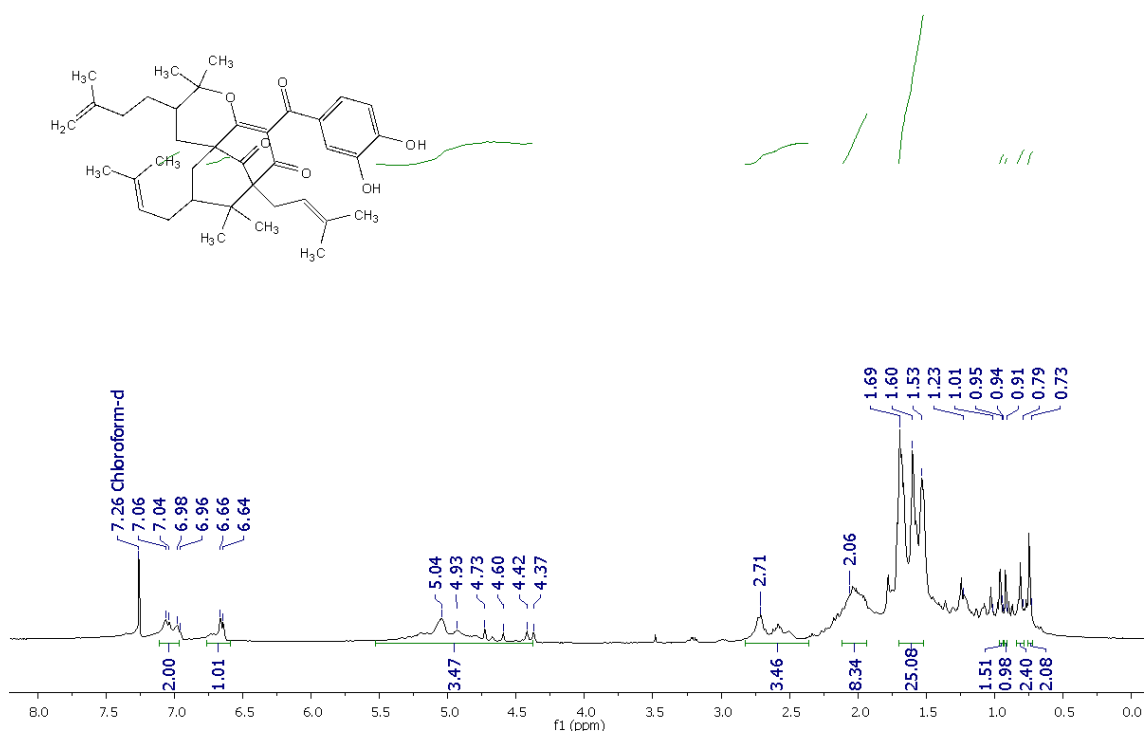
Cicloxantochimol (**7**): é um sólido amarelo; cuja fórmula estrutural está representada na figura 43. ^1H RMN (CDCl_3 ; 400 MHz): δ 7.04 (2H, m), δ 6.65 (1H, d, $J=8.2$ Hz), δ 5.04-4.37 (3H, m), δ 2.71 (3H, m), δ 2.06 (8H, m), δ 1.69-1.53 (25H, m), δ 1.23-0.73 (6H, m). ^{13}C (CDCl_3 ; 100 MHz): δ 208.5, δ 195.0, δ 194.9, δ 183.3, δ 150.6, δ 149.5, δ 143.6, δ 135.1, δ 133.6, δ 124.3, δ 124.0, δ 122.4, δ 120.5, δ 116.5, δ 114.5, δ 112.9, δ 109.8, δ 79.3, δ 72.0, δ 55.5, δ 49.4, δ 47.0, δ 42.6, δ 40.1, δ 39.0, δ 30.7, δ 29.8, δ 28.1, δ 25.9, δ 25.8, δ 19.5, δ 18.4, δ 18.3, δ 18.1, δ 17.8, δ 16.2. HR-ESI-MS calculado para o modo positivo ($\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_6^+$) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+=603.3831$, encontrado na literatura para o modo negativo ($\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_6^-$) m/z $[\text{M}-\text{H}]^-=601$ (BAGGETT et al., 2005).

Figura 43. Estrutura do Cicloxantochimol.



No espectro de ^1H RMN (CDCl_3 ; 400 MHz) observamos deslocamentos em $\delta 7.04$ (2H, m) e $\delta 6.65$ (1H, d, $J = 8.2$ Hz) que integram no total para três átomos de hidrogênio que pertencem ao anel aromático da estrutura. Em $\delta 5.04$ - 4.37 (3H, m), multiplete que integra para três hidrogênios, estes são referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos de hibridização sp^2 (C18, C25 e C37) dos grupos prenilos. Em $\delta 2.71$ (3H, m) também um multiplete que integra para três hidrogênios, onde um destes hidrogênios está localizado no carbono (C37) e os outros dois pertencem ao carbono de hibridização sp^3 , indicado como (C17). Em $\delta 2.06$ (8H, m) multiplete que integra para oito hidrogênios, estes estão realizando ligação com os carbonos metínicos (C6, C30) e aos carbonos metilênicos (C7, C29 e C35). Em $\delta 1.69$ - 1.53 (25H, m) multiplete que integra para vinte cinco hidrogênios, estes são hidrogênios que estão ligados aos carbonos metílicos da molécula (C20, C21, C27, C28, C32, C33, C38) e ao carbono metilênico (C24). Em $\delta 1.23$ - 0.73 (6H, m), multiplete que integra para seis hidrogênios, que estão ligados aos carbonos metílicos (C22 e C23).

Figura 34. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) espectro do composto cicloxantoquimol.



No ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) representado na figura 45, 46 e 47, podemos observar deslocamento químico de 38 átomos de carbonos. Nos deslocamentos químicos δ 208.5 ppm, δ 195.0 ppm e δ 194.9 localizados na região mais desblindada do espectro, observamos três carbonilas representadas pelos carbonos (C3, C9 e C10). Em δ 183.3 ppm observamos o sinal do carbono (C1) de hibridização sp^2 , que faz a ligação entre os dois anéis contidos na molécula. No deslocamento químico δ 150.6 ppm, observamos o sinal do carbono de hibridização sp^2 (C36). Nos deslocamentos δ 149.5 ppm e δ 143.5 ppm observamos dois carbonos que se ligam a hidroxilas, eles pertencem ao anel aromático. Na molécula representada na figura 23 observamos dois grupos prenilos idênticos (radial alifático insaturado ramificado), essas insaturações são representadas pelos deslocamentos químicos δ 135.1 ppm e δ 133.6 ppm. Também há outro deslocamento em δ 133.6 ppm, referente ao (C11) que faz parte do anel aromático e também faz ligação com carbonila. Nos deslocamentos δ 124.3 ppm, δ 122.4 ppm, respectivamente se referem aos carbonos de hibridização sp^2 (C18, C25) dos dois grupos prenilos idênticos. Em δ 124 ppm, δ 116.5 ppm e δ 114.5 ppm são deslocamentos de carbonos pertencentes ao anel aromático (C16, C12, C15). Em δ 112.9 ppm observamos o deslocamento químico que se

refere ao carbono (C2) da molécula. Em $\delta 109.8$ ppm é possível ver o carbono terminal de hibridização sp^2 (C37). Em $\delta 79.3$ ppm e $\delta 72$ ppm observamos os carbonos de hibridização sp^3 (C31 e C5) pertencentes ao anel central, o carbono (C31) faz ligação com um oxigênio e o carbono (C5) faz ligação com carbonila, por isso estão mais desblindados. Nos deslocamentos químicos $\delta 55.5$ ppm, $\delta 49.4$ ppm, $\delta 42.6$ ppm, $\delta 40$ ppm, $\delta 40.8$ ppm e $\delta 39.0$ ppm observamos sinais de carbonos de hibridização sp^3 (C8, C4, C6, C7, C29, C30 e C4) que fazem parte dos anéis centrais. Os deslocamentos $\delta 32.3$, $\delta 30.7$ ppm, $\delta 29.8$ ppm, $\delta 28.1$ ppm são referentes aos carbonos metilênicos (C35, C17, C24 e C34) dos grupos prenilos e os deslocamentos químicos $\delta 25.9$ ppm, $\delta 25.8$ ppm, $\delta 21$ ppm $\delta 19.5$ ppm, $\delta 18.4$ ppm, $\delta 18.3$ ppm, $\delta 17.8$ ppm, $\delta 16.2$ ppm, $\delta 14.8$ ppm, são referentes aos carbonos metílicos da molécula (C33, C32, C27, C20, C22, C23, C38, C28 e C21).

Figura 35. ^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$) espectro do composto cicloxantoquimol.

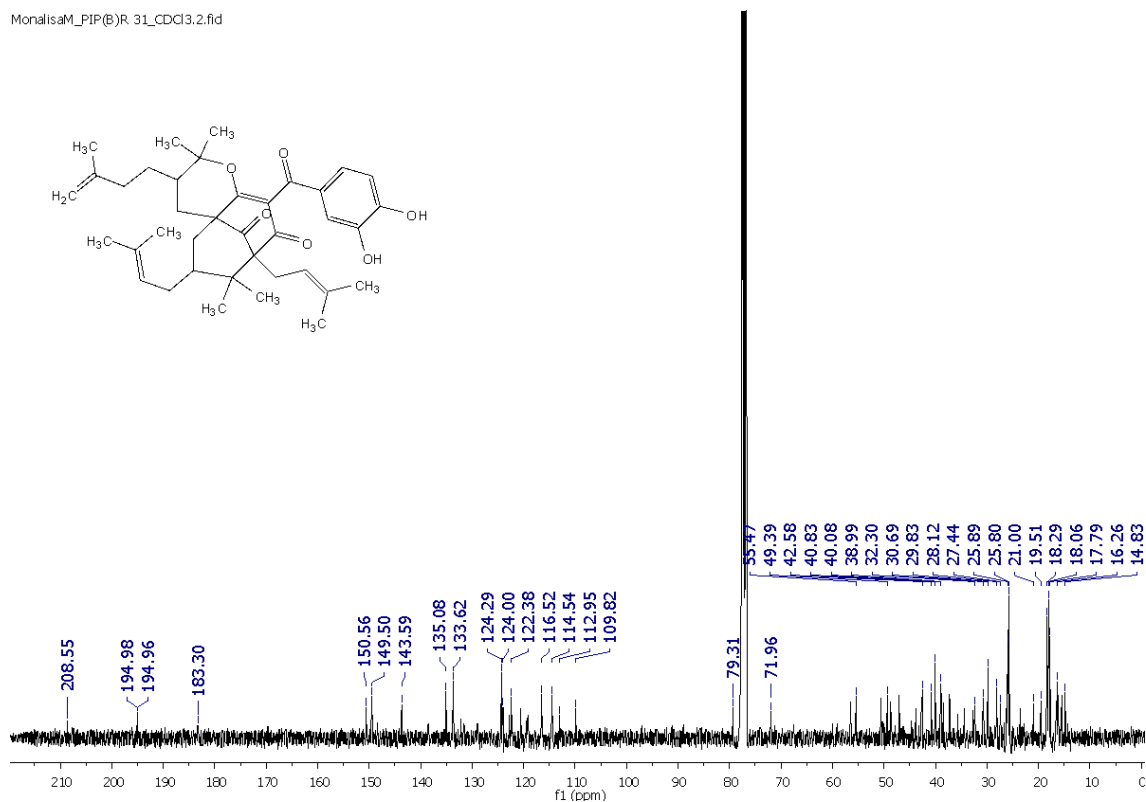


Figura 36. HSQC (200 MHz, $CDCl_3$) espectro do composto cicloxantoquimol.

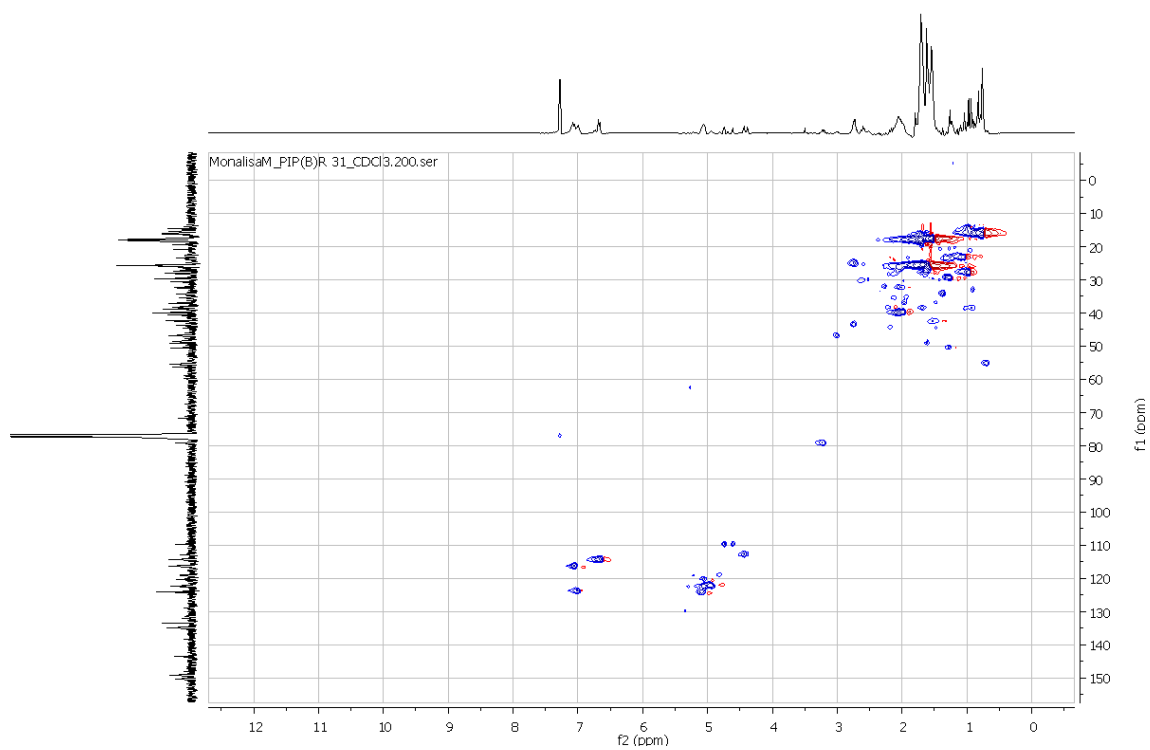
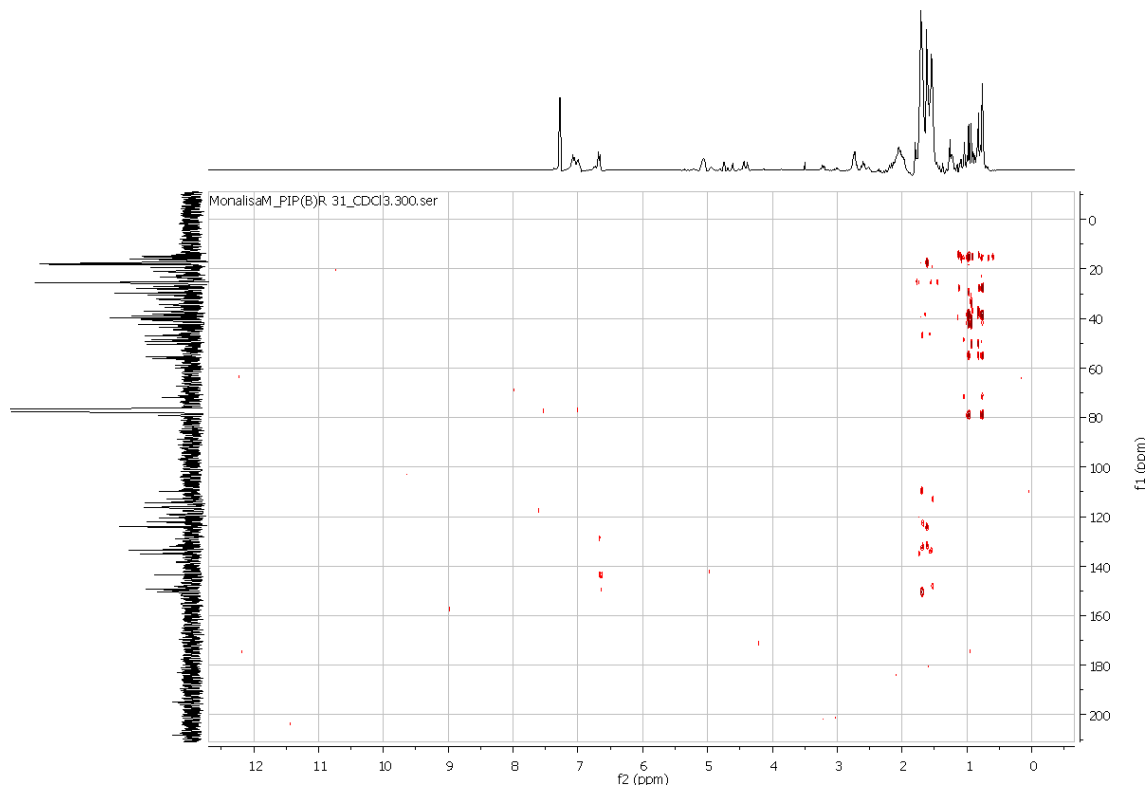
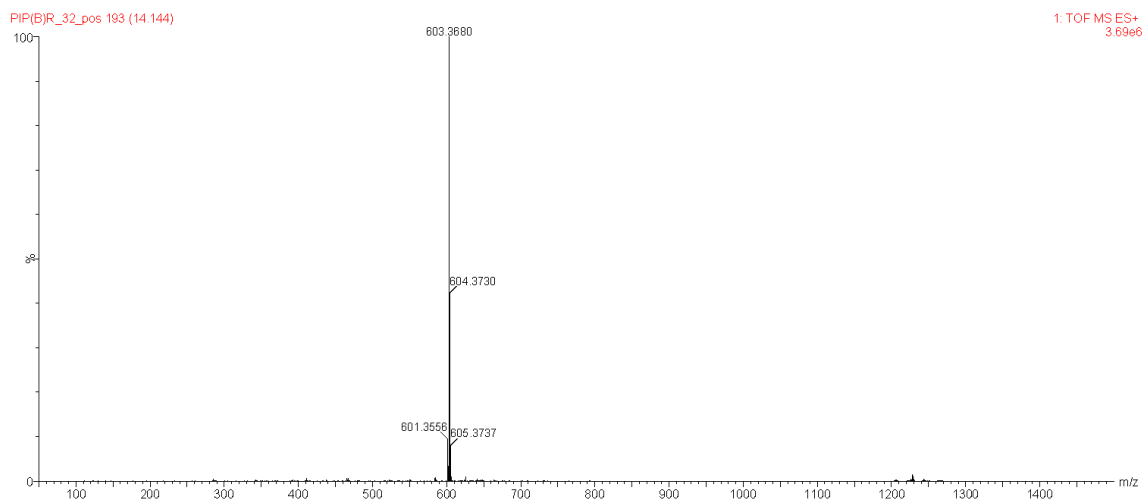


Figura 37. HMBC (200 MHz, CDCl₃) espectro do composto cicloxyantoquimol.



O espectro de massas, figura 48, obtido em ionização por nebulização de alta resolução (HR-ESI-MS) no modo positivo do composto isolado mostrou um íon m/z 603.3880. Esse valor de massas corresponde a fórmula molecular $[C_{38}H_{50}O_6+H]^+$ que juntamente com os dados da literatura que confirmou a m/z 603.3831 (BAGGETT et al., 2005).

Figura 38. UPLC-ESI-MS do composto Cicloxantochimol.



Os dados de RMN encontrados na literatura descritos na tabela 8 contribuíram para a caracterização do composto cicloxantochimol, cuja formula molecular é $C_{38}H_{50}O_6$ e sua massa é 602.36 g/mol,.

Tabela 8. Dados de RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100MHz) ($CDCl_3$).

Posição	Literatura –Cicloxantochimol (J. LIN, 2002) – DMSO			Cicloxantochimol			
	δH (ppm); J (Hz)	δC (ppm)	δH (ppm); J (Hz)	δC (ppm)	δC (ppm) – 1J_H HMBC	δC (ppm) – 2J HMBC	δC (pp m) – 3J HMBC
C1		170.4		183.3			
C2		124.8		112.9			
C3		193.2		208.5			
C4		45.6		49.4			
C5		67.5		72			
C6	1.46 (m, 1H)	45.2	2.06 (m, 1H)	42.6			
C7	1.97(m, 1H) – 2.90(dd, J=14.2, 1H)	38.9	2.06 (m, 2H)	40			
C8		50.9		55.5			
C9		206.3		195			
C10		191.3		194.9			
C11		128.9		133.6			
C12	7.17(d, J=2.0, 1H)	114.7	7.04 (m, 1H)	114.5	194.9	149.5	124
C13		145.2		143.5			
C14		150.8		149.5			
C15	6.68 (d, J=6.8, 1H)	144.6	7.04 (m, 1H)	116.5	194.9	149.5	114.5
C16	6.84(dd, J=8.3;2.0, 1H)	122.2	6.65 (d, J=8.2 Hz, 1H)	124	143.5	133.6	
C17	2.49 (m, 1H)	24.9	2.71 (m, 2H)	30.7			
C18	4.78 (m, 1H)	120.3	5.04 – 4.37 (m, 1H)	124.3			
C19		131.8		135			
C20	1.60 (s, 3H)	25.6	1.69-1.53 (m, 3H)	19.5			
C21	1.52 (s, 3H)	17.8	1.69-1.53 (m, 3H)	14.8			
C22	1.05 (s, 3H)	21.9	1.23-0.73 (m, 3H)	18.3			
C23	0.91 (s, 3H)	26.1	1.23-0.73 (m, 3H)	18			
C24	2.13 (m, 2H)	28.8	1.69-1.53 (m, 2H)	29.8	136.6	122.4	
C25	4.90 (m, 1H)	125.1	5.04–4.37 (m, 1H)	122.4			
C26		132.7		133.6			
C27	1.65 (s, 3H)	25.7	1.69-1.53 (m, 3H)	21			
C28	1.60 (s, 3H)	17.8	1.69-1.53 (m, 3H)	16.3			
C29	2.90 (dd, J=14.2;3.4, 1H) 1.01 (d, J=13.1, 1H)	27.0	2.06 (m,2H)	39			
C30	1.24 (m, 1H)	41.1	2.06 (m, 1H)	40.8			
C31		86.6		79.3			
C32	0.78 (s, 3H)	28.0	1.69-1.53 (m, 3H)	25.8			
C33	1.17 (s, 3H)	20.8	1.69-1.53 (m, 3H)	25.9			
C34		27.6		28.1			

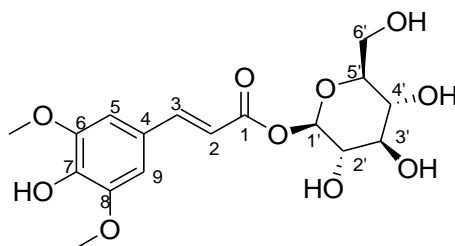
C35	2.06 (m, 2H)	34.8	2.06 (m, 2H)	32.3			
C36		144.5		150.5			
C37	4.73 (s, 2H)	110.7	5.04-4.37 (m, 1H) 2.71 (m, 1H)	109.8			
C38	1.68 (s, 3H)	21.9	1.69-1.53 (m, 3H)	17.8			

4.1.2 Caracterização dos constituintes químicos de *Citrus sinensis*

O estudo fitoquímico da fração n-BuOH de *C. sinensis* demonstrou a presença de dois compostos: 1-*O*-Sinapoyl- β -glucopyranosídeo e hesperidina.

1-*O*-Sinapoyl- β -glucopyranosídeo (**8**): composto sólido branco, cuja fórmula estrutural está representada na figura 49. ^1H RMN (CDCl_3 ; 200 MHz): δ 7, (1H, d, $J=15$ Hz, H-2), δ 6,43 (1H, d, $J=15$ Hz, H-3), δ 6,94 (2H, s, H-9 e H-5), δ 5,58 (1H, d, $J=7,6$ Hz, H-1'), δ 3,31- δ 3,71 indicam ser hidrogênios de glucopiranosídeo (porção heterosídea da molécula). δ 3,88 (6H, s, H-10, H-11). ^{13}C (CDCl_3 ; 50 MHz): δ 166, δ 147, δ 114, δ 14, δ 139, δ 105, δ 55,0, δ 94,8, δ 102, δ 104.

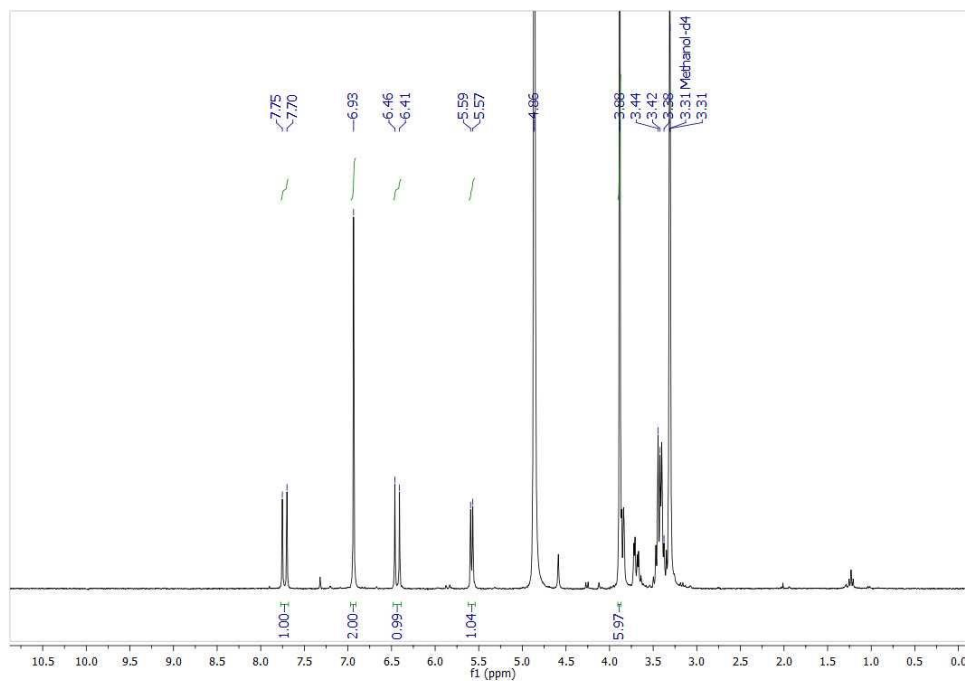
Figura 49. Estrutura do 1-*O*-Sinapoyl- β -glucopyranosídeo.



No espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) representado na figura 50, é possível observar dois dupletos na região de olefínicos (desblindada), centrados em δ 7,73 ppm (1H, d, $J=15$ Hz, H-2) e δ 6,43 ppm (1H, d, $J=15$ Hz, H-3), atribuídos a hidrogênio de uma ligação dupla de configuração *trans*. O sinal δ 6,94 ppm (2H, s, H-9 e H-5) deslocamento químico típico de átomos de hidrogênio aromáticos, não desdobram devido ao plano de simetria da molécula. Em δ 5,58 ppm (1H, d, $J=7,6$ Hz, H-1') indica ser um átomo de hidrogênio anomérico, que por sua vez, acopla com o hidrogênio vicinal 2' do glicosídeo. Os sinais entre δ 3,31 ppm a δ 3,71 ppm indicam ser hidrogênios de glucopiranosídeo (porção heterosídea da molécula). O sinal δ 3,88 ppm (6H, s, H-10, H-

11) representa seis átomos de hidrogênios pertencentes a duas metóxilas presentes no anel aromático, que por sua vez, o sinal não desdobra devido ao plano de simetria da molécula.

Figura 39. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) espectro do composto O-Sinapoil-glucopiranosídeo.



Através da análise de RMN ^{13}C (CDCl_3) bidimensional, figura 51, 42 e 53, foi possível observar sinais para 17 átomos de carbono, assim identificados: um carbonílico δC 166 ppm, C-1, dois representando carbonos de hibridização sp^2 pertencente a cadeia olefínica δC 147 ppm e δC 114 ppm, C-3 e C-2, respectivamente. Os sinais de carbonos aromáticos foram observados a δC 148 ppm, C-6 e C-8, δC 139 ppm, C-7 e δC 105 ppm, C-5 e C-9. Em δC 55,0 ppm, C-10 e C-11 encontra-se sinais de duas metóxilas, estas estão como ramificações do anel aromático, o sinal não desdobra devido ao plano de simetria da molécula. Um carbono quaternário (δC 94,8 ppm), sinal típico de carbono anomérico, que é membro do resíduo glucopiranosídeo. Esse composto foi identificado como um éster de glicosídeo devido ao deslocamento químico do carbono anomérico, que geralmente no caso de éter apresenta ressonância entre 102 ppm e 104 ppm.

Figura 40. HSQC (400 MHz, CDCl₃) espectro do composto O-Sinapoilglucopiranosideo.

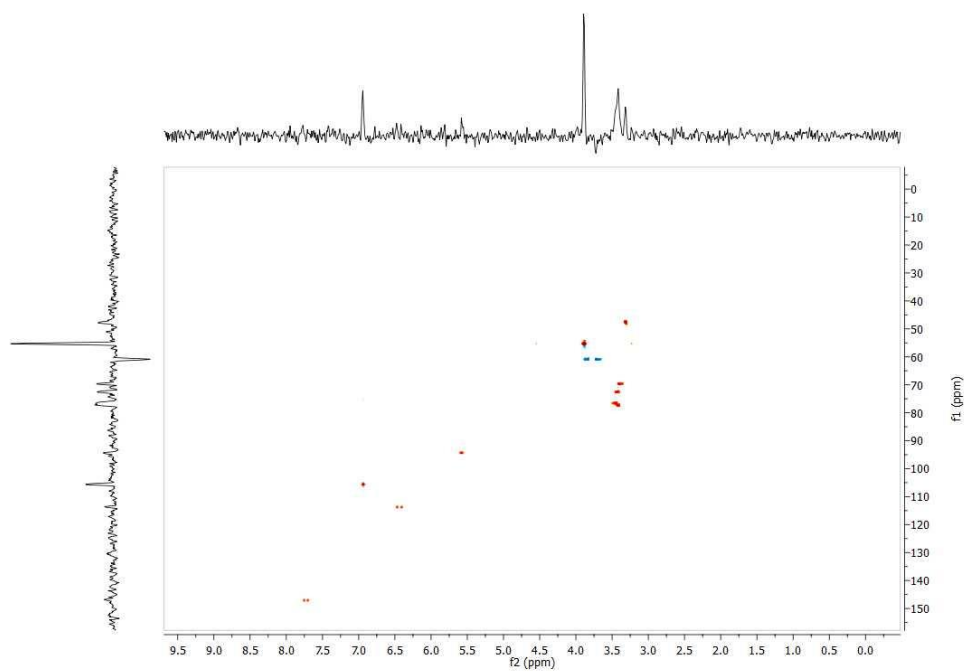


Figura 41. HMBC (400 MHz, CDCl₃) espectro do composto O-Sinapoilglucopiranosideo.

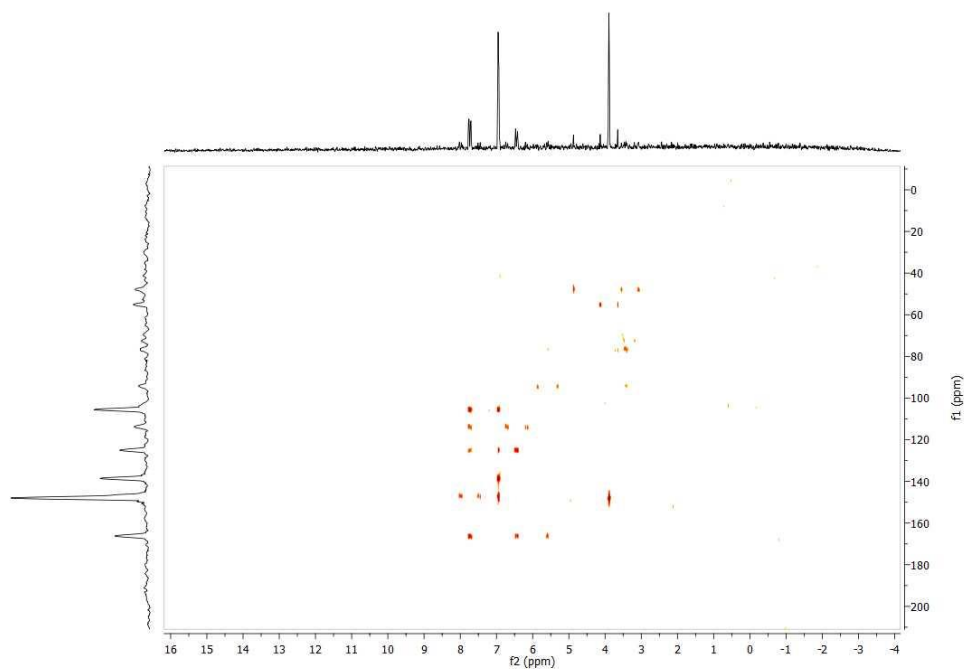
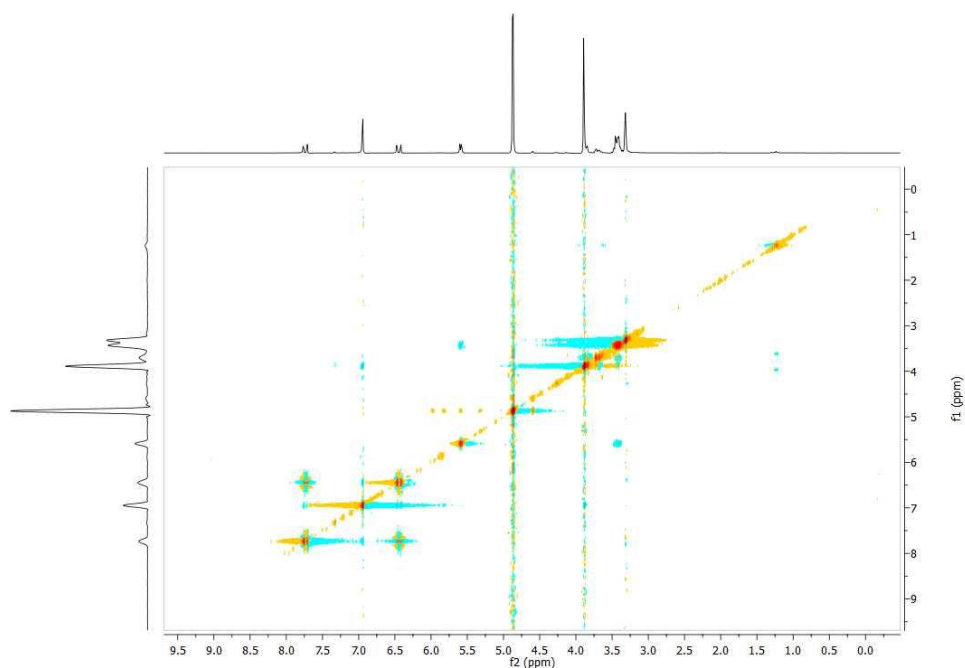


Figura 42. RMN 2D, NOESY (400 MHz, CDCl₃) espectro do composto O-Sinapoil-glucopiranosídeo.



Podemos observar os dados de ressonância compilados na tabela 9 a seguir,

Tabela 9. Dados de RMN de ¹H e ¹³C (400 e 100MHz) (MeOD).

1-O-Sinapoyl-β-glucopiranosídeo

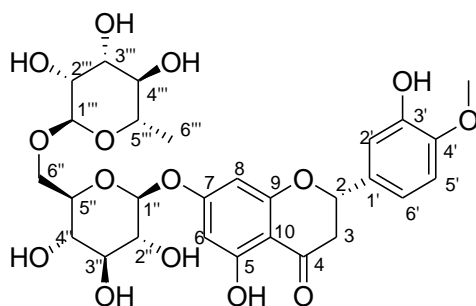
Literatura - 1-O-Sinapoyl-β-glucopiranosídeo -
<https://www.nmrdb.org/>

Posição	δH (ppm); J (Hz)	δC (ppm)	δC (ppm) – ¹ JH HMBC		
C1	-	166.0	-	-	167.8
C2	6.43 (d; 15Hz, 1H)	147.0	166.0, 105.0	6.48(d,J=15.7, 1H)	145.1
C3	7.73 (d,J=15, 1H)	114.0	166.0; 105.0	7.83 (d,J=15.7, 1H)	115.1
C4	-	105.0	-	132.9	-
C5	6.94 (s, 1H)	105.0	139.0; 148.0	7.08 (s, 1H)	108.4
C6	-	148.0	-	147.6	-
C7	-	139.0	-	145.6	137.0
C8	-	148.0	-	147.6	-
C9	6.94 (s, 1H)	105.0	105.0	7.08 (s, 1H)	108.4
C1'	5.58 (d; J=7,6)	94.8	166.0	5.96 (d, J=2.65)	95.9
C2'	3.84 (s, 1H)	61.0	-	3.11 (s, 1H)	74.6
C3'	3.45 (m, 1H)	76.7	-	3.41(m, 1H)	75.4
C4'	3.41 (m, 1H)	77.5	76.7	3.41(m, 1H)	71.2

C5'	3.31 (m, 1H)	47.8	94.8	3.24 (dd, J=10.26;6.47, 1H)	74.1
C6'	3.71 (s, 2H)	61.0	77.5	3.81 (d, J=6.47, 2H)	62.2
OMe	3.88 (s, 6H)	55.0	139.0	3.79(s, 6H)	56.0

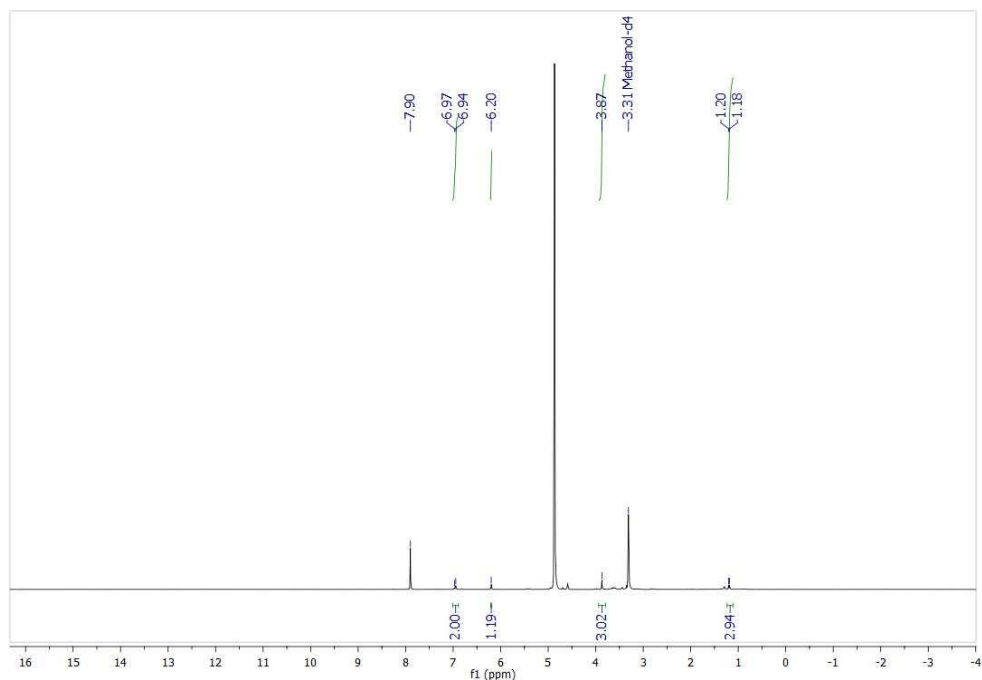
Hesperidina (**9**) composto sólido amarelo amorfo, cuja fórmula estrutural está representada na figura 54. ^1H RMN (MeOD ; 200 MHz): δ 7,91 (2H, s, H-6 e H-8); δ 6,95 (3H, d, $J=7,8$ Hz, H-2', H-6' e H-5'); δ 6,20 (1H, H-1''); δ 3,86 (3H, s, H-4'); δ 1,20 ppm (3H, d, $J=6,2$ Hz, H-6'''). ^{13}C (MeOD; 50 MHz): δ 197,33, δ 165,37, δ 162,8; δ 148,02; δ 146,96; δ 131,69; δ 115; δ 113; δ 111,3; δ 103,43; δ 103,29; δ 68,2.

Figura 54. Estrutura da Hesperidina.



No espectro de RMN ^1H (MeOD; 200MHz) representado na figura 55, foi possível observar um simpleto na região de aromáticos que integra para dois átomos de hidrogênio, centrados em δ 7,91 ppm (2H, s, H-6 e H-8). Um duplo duplete que integra para três átomos de hidrogênios δ 6,95 ppm (3H, d, $J=7,8$ Hz, H-2', H-6' e H-5') pertencentes a anel aromático, a constante de acoplamento mostra que o radical dirigente é orto. Em δ 6,20 ppm (1H, H-1'') indica ser um átomo de hidrogênio anomérico. Observa-se na região mais blindada, um sigleto que integra para três hidrogênios δ 3,86 ppm (3H, s, H-4') típico de metóxila. Um duplete que integra para três hidrogênios δ 1,20 ppm (3H, d, $J=6,2$ Hz, H-6'''), a constante de acoplamento indica metila de glicosídeo axial-axial em relação ao hidrogênio ligado ao átomo de C5''', esses últimos dados indicam ser o dissacarídeo rutinose presente na flavanona, como heterosídeo.

Figura 43. RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) espectro do composto Hesperidina.



No espectro de RMN de ^{13}C (MeOD; 50MHz) representado na figura 56 e 57, foi possível observar sinais para 28 átomos de carbono, assim identificados: na região desblindada do espectro temos um carbono carbonílico (δC 197,33 ppm, C-4), um sinal que desdobra para dois carbonos carbinólicos com hibridização sp^2 (δC 165,37 ppm, C-5 e C-7), carbono de hibridização sp^2 (δC 162,8 ppm, C-9) ligado a um hetero átomo, pertencente a anel aromático. (δC 148,02 ppm, C-4') pertencente a um carbono de metóxila e no deslocamento químico (δC 146,96 ppm, C-3') um carbono carbinólico. Observemos um carbono terciário de hibridização sp^2 em (δC 131,69 ppm, C-1'), e nos sinais (δC 115 ppm, C-6'), (δC 113 ppm, C-5'), (δC 111,3 ppm, C-2') pertencentes aos carbonos sem ramificações do anel aromático B. O (δC 103,43 ppm, C-10) carbono de hibridização sp^2 que faz a junção dos anéis A e C. O carbono anomérico da molécula foi identificado no deslocamento representado por (δC 103,29, C-1'') e em (δC 68,2 ppm, C-6''') carbono pertencente a metila glicosilada, indicando ser uma rutinose.

Figura 56. HSQC (400 MHz, CDCl_3) do composto Hesperidina

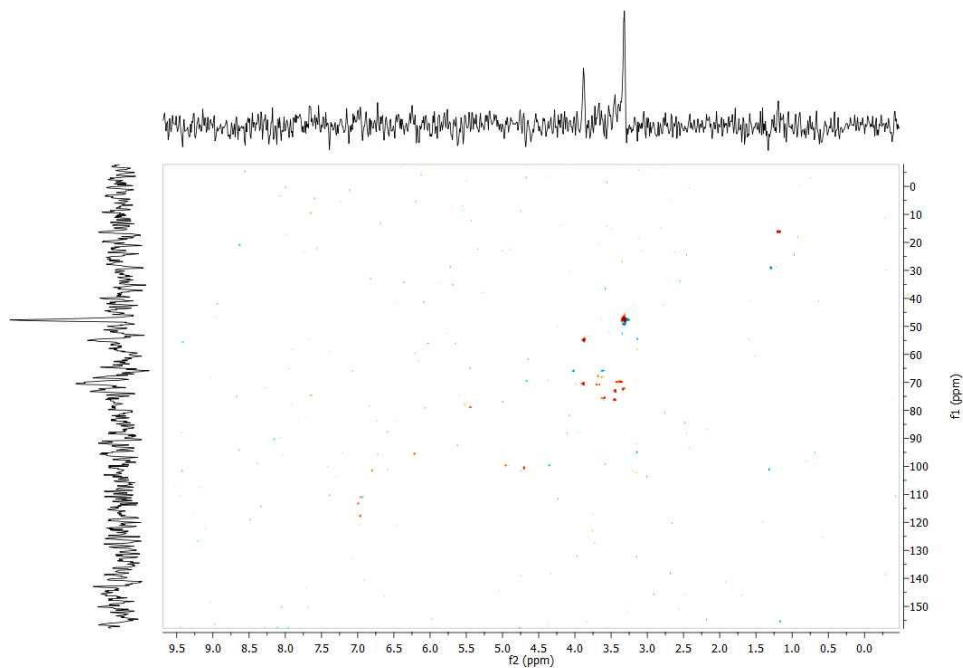
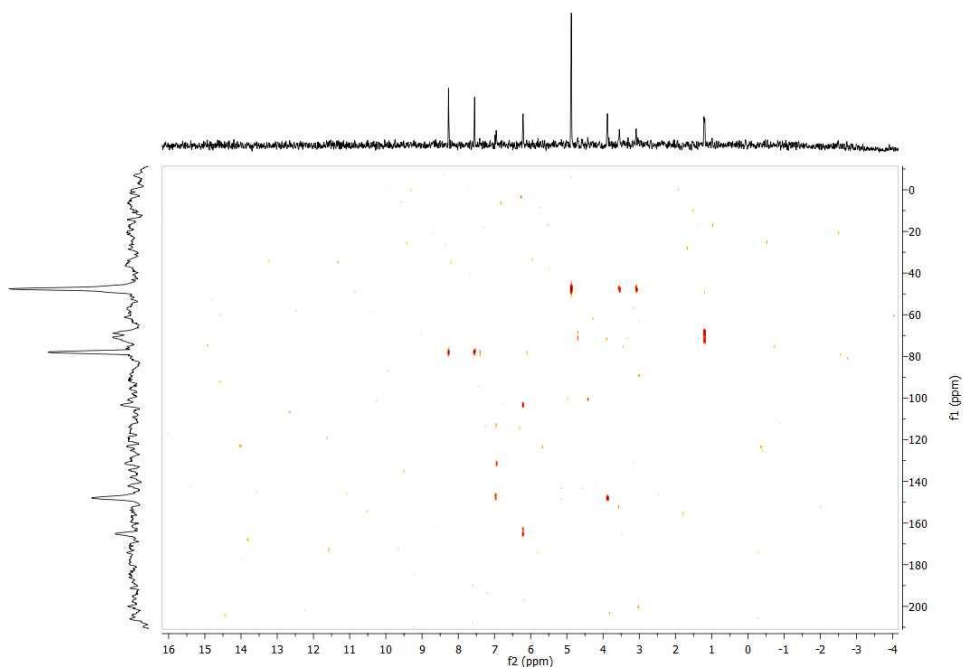


Figura 44. HMBC (400 MHz, CDCl₃) do composto Hesperidina.



Os dados compilados dos átomos de hidrogênio e carbono da hesperidina estão representados na tabela 10 a seguir:

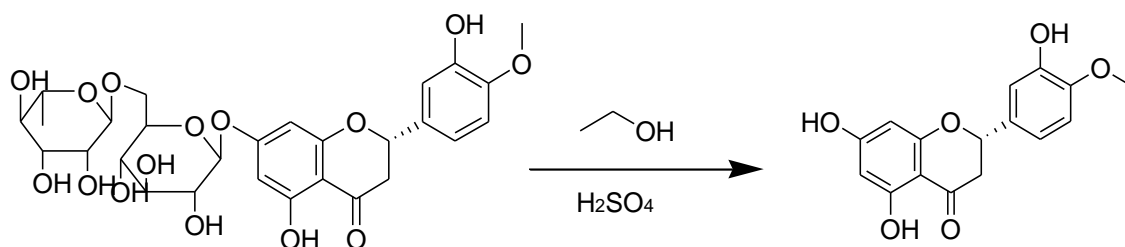
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (MeOD).

Posição	Hesperidina		Literatura – Hesperidina (LAHMER et al., 2015)	
	δH (ppm); J (Hz)	δC (ppm)	δH (ppm); J (Hz)	δC (ppm)
C1'	-	131,7	-	133,0
C2'	6,96 m	113,0	6,95 m	114,2
C3'	-	147,0	-	146,1
C4'	3,86 (s)	148,0	3,86 (s)	148,0
C5'	6,96 (d; 8,3 Hz)	113	6,95 m	112,0
C6'	6,96 (d; 8,3 Hz)	115	6,95 m	118
C2	5,40 (dd; 13 Hz)	78,1	5,38 (dd; 12,6 Hz)	78,8
C3	3,11 (m)	48,06	3,14 dd (14,0 – 12,6 Hz)	42,3
C4	-	197,3	-	197,4
C5	-	165,4	-	165,4
C6	6,19 (s)	96,5	6,05 (sl)	96,8
C7	-	165,4	-	163,3
C8	6,19 (s)	96,5	6,91 (sl)	95,9
C9	-	162,8	-	162,8
C10	-	103,4	-	103,6
C1''	4,95 (m)	103,3	4,98 (d; 8,1 Hz)	100,9
C2''	3,11-3,73 (m)	73,6	3,09-3,90 (m)	73,3
C3''	3,11-3,73 (m)	76,2	3,09-3,90 (m)	76,6
C4''	3,11-3,73 (m)	66,7	3,09-3,90 (m)	69,9
C5''	3,11-3,73 (m)	76,0	3,09-3,90 (m)	75,7
C6''	3,11-3,73 (m)	67,1	3,09-3,90 (m)	66,4
C1'''	4,01 (s)	101,4	4,50 s	99,8
C2'''	3,11-3,73 (m)	70,8	3,09-3,90 (m)	70,06
C3'''	3,11-3,73 (m) ²	71,2	3,09-3,90 (m)	71,1
C4'''	3,11-3,73 (m)	72,0	3,09-3,90 (m)	72,5
C5'''	3,11-3,73 (m)	70,0	3,09-3,90 (m)	68,7
C6'''	1,2 (d, 6,2 Hz)	68,2	0,96 (d, 6,0 Hz)	56,0

Foi possível isolar 100 mg da hesperidina. Dessa maneira realizou-se semi-síntese representada na figura 58, de retirada do glicosídeo de alguns miligramas do composto, para obter outro composto chamado hesperitina. A semi-síntese foi realizada com a mistura de hesperidina e metanol, adicionando ao poucos ácido sulfúrico, reação

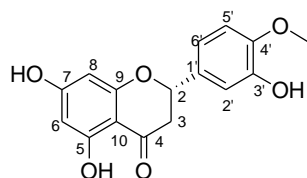
realizada com agitação, temperatura de refluxo durante 8 horas. A hesperitina foi purificada.

Figura 58. Semi-síntese - Hidrólise da hesperitina para obter hesperitina.



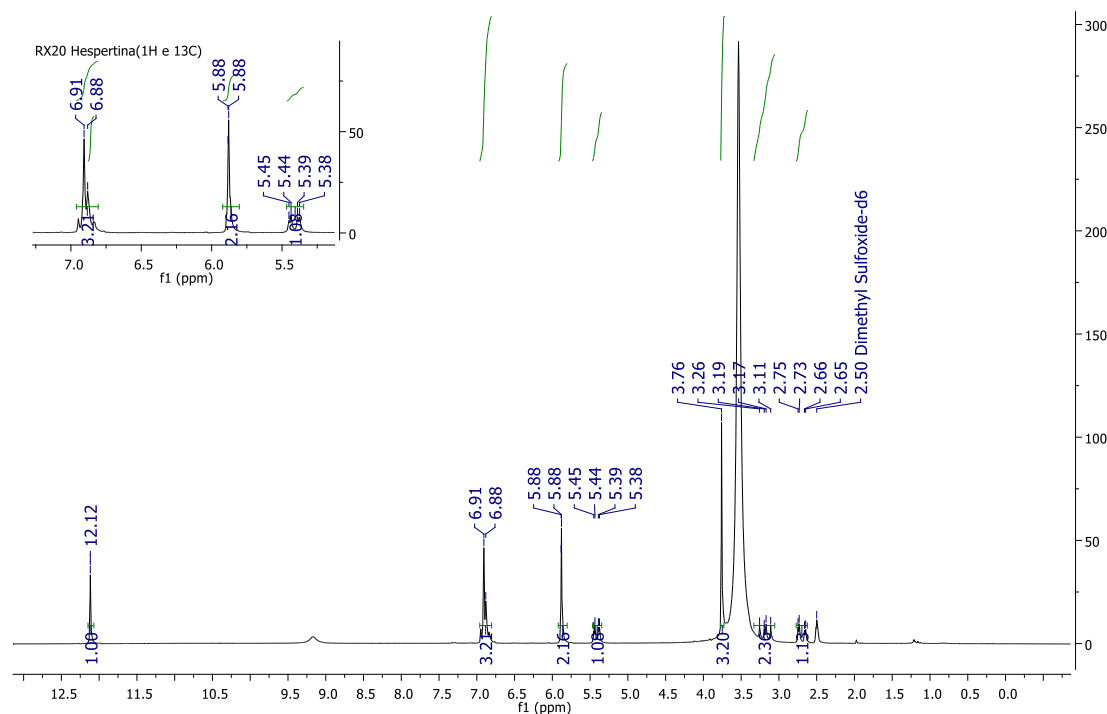
Hesperitina (**10**) composto sólido amarelo, cuja fórmula estrutural está representada na figura 59. P.F. 220-221°C. . ^1H RMN (MeOH; 200 MHz): δ 12.12, δ 6.91(3H, m), δ 5.88(2H, m), δ 5.40(1H, dd, $J=3,04$ Hz), δ 3.76(3H, s), δ 3.19-2.67(2H, dd, $J=2,17;12,7;17,7$ Hz). ^{13}C (MeOH; 50 MHz): δ 196.3, δ 166.8, δ 163.6, δ 162.9, δ 148.0, δ 146.6, δ 131.3, δ 117.9, δ 114.2, δ 112.1, δ 101.9, δ 96.0, δ 95.2, δ 78.4, δ 55.83, δ 42.2.

Figura 59. Estrutura da Hesperitina.

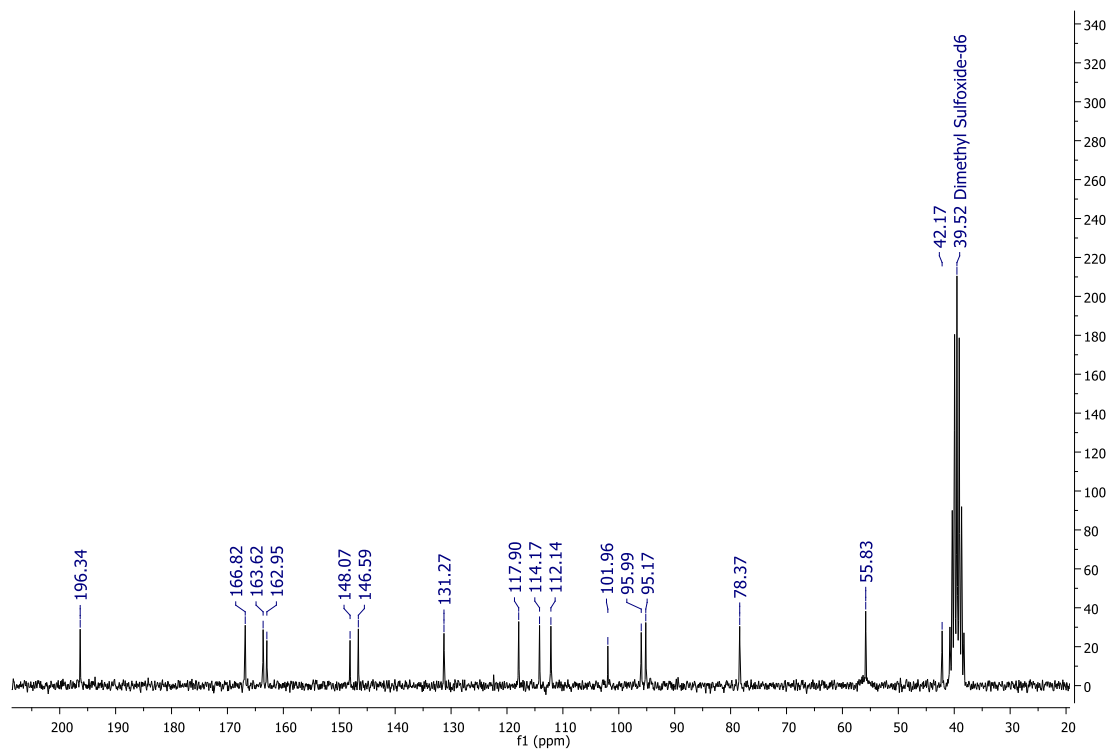


No espectro de RMN ^1H (MeOD) representado na figura 60, podemos observar deslocamentos em δ 12.12 que representa hidrogênios de hidroxilas. Em δ 6.91(3H, m) um multipeto que integra para três hidrogênios, representando os hidrogênios que estão ligados aos carbonos (C2', C5' e C6') do anel aromático B da flavanona. No deslocamento δ 5.88(2H, m) um multipeto que integra para dois hidrogênios que estão ligados aos carbonos (C8 e C6) do anel aromático A da flavanona. No deslocamento químico δ 5.40(1H, dd, $J=3,04$ Hz) observamos um duplo dupeto que integra para um hidrogênio, este represente o hidrogênio que está ligado ao carbono (C2) do anel C e em δ 3.76(3H, s) observamos um simpleto que integra para três hidrogênios, estes pertencentes a metoxila ligada ao carbono (C4') do anel aromático B. E nos deslocamentos δ 3.19-2.67(2H, dd, $J=2,17;12,7;17,7$ Hz) um duplo dupeto que integra para os dois hidrogênios que estão ligados ao carbono (C3) do anel C da flavanona.

Figura 45. RMN de ^1H (200 MHz, MeOD) espectro do composto Hesperitina.



No espectro de RMN de ^{13}C (MeOH; 50 MHz) representado na figura 61, observamos um deslocamento de carbonila em $\delta 196.3$ ppm representando o carbono (C4). Nos deslocamentos $\delta 166.8$ ppm e $\delta 163.6$ ppm representam os carbonos ligados a hidroxilas (C7 e C5) respectivamente, pertencentes ao anel aromático A da flavanona. Em $\delta 162.9$ ppm observamos deslocamento referente ao (C9) que liga os anéis A e C. Em $\delta 148.0$ ppm representa o carbono (C4') que possui uma metóxila ligada, (C4') pertence ao anel aromático B. Em $\delta 146.6$ ppm é possível observar o carbono (C3') que possui uma hidroxila ligada, este carbono também pertence ao anel B. Observamos o carbono (C1') em $\delta 131.3$ ppm que pertence ao anel B e faz ligação com o anel A. Em $\delta 117.9$ ppm, $\delta 114.2$ ppm, e $\delta 112.1$ ppm observamos os outros três carbonos do anel B, (C6', C2' e C5'), respectivamente. Em $\delta 101.9$ ppm observamos o carbono (C10) que faz a ligação entre os anéis A e C. Nos $\delta 98.2.0$ ppm e $\delta 96.0$ ppm observamos os carbonos (C6 e C8) do anel aromático A da flavanona. Observamos o carbono (C2) e (C3) pertencentes ao anel C nos deslocamentos $\delta 78.4$ ppm e $\delta 42.2$ ppm, respectivamente. Em $\delta 55.8$ ppm observamos o deslocamento referente ao carbono da metóxila presente na flavanona.



Os dados de RMN da hesperidina estão representados na tabela 11 a seguir:

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50MHz) (MeOH).

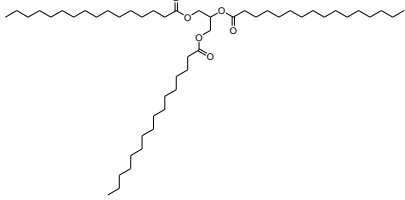
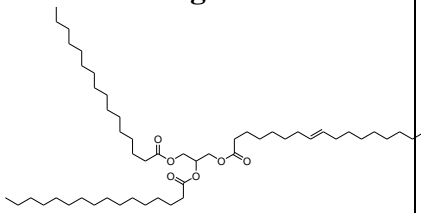
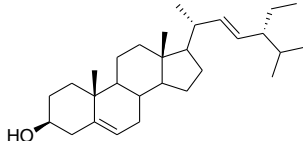
Hesperitina		Literatura – Hesperitina (LAHMER et al., 2015)		
Posição	δH (ppm); J (Hz)	δC (ppm)	δH (ppm); J (Hz)	δC (ppm)
C2	5.40 (dd, $J=3,04$, 1H)	78.4	5,29 (dd, $J=2,75$, 1H)	78.5
C3	3.19-2.67 (dd, $J=2.17/12.7$, 2H)	42.2	3.01-2.67 (dd; $J=2,84;12,67$, 2H)	42.1
C4	-	196.3	-	196.2
C5	-	163.6	5.88-6.95 (m, 5H)	163.8
C6	5.88 (m, 2H)	96.0	-	96.2
C7	-	166.8	5.88-6.95 (m, 5H)	166.9
C8	5.88 (m, 1H)	98.2	-	95.4
C9	-	162.9	-	163.0

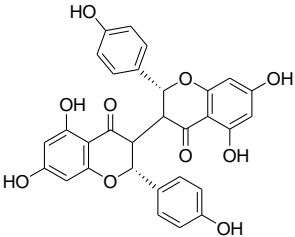
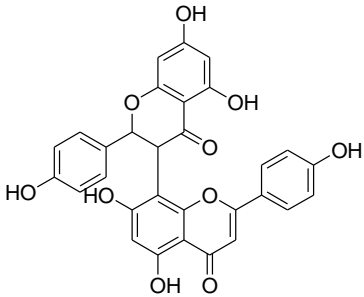
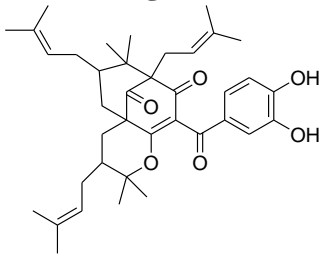
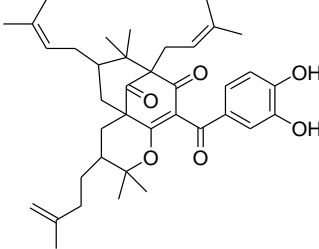
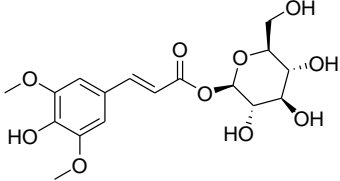
C10	-	101.9	-	102.1
C1'	-	131.3	-	131.4
C2'	6.91 (m, 1H)	114.2	5.88-6.95 (m, 5H)	114.3
C3'	-	146.6	-	146.7
C4'	-	148.0	-	148.1
C5'	6.91 (m, 1H)	112.1	5.88-6.95 (m, 5H)	112.1
C6'	6.91 (m, 1H)	117.9	5.88-6.95 (m, 5H)	118.0
OCH3	3.76 (s, 3H)	55.8	3.8 (s, 3H)	55.0

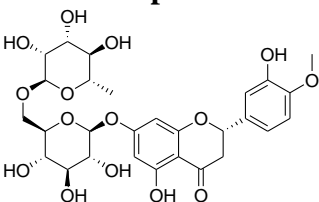
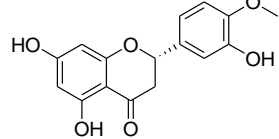
4.2 EFEITOS INIBITÓRIOS DOS COMPOSTOS FRENTE A SARS-COV-2 M^{PRO}

Os compostos 1 ao 10 foram avaliados quanto aos seus efeitos inibitórios contra SARS-CoV-2 M^{PRO} e sua citotoxicidade contra leucemia mielóide humana, THP- 1 e linhas de células Vero de rim de macaco africano, demonstrado na tabela 12. Os ensaios enzimáticos foram realizados nas concentrações de 200 µM para todos os compostos. Os compostos 3, 5 e 6 apresentaram porcentagens inibitórias contra M^{ro} de 59,64, 68,20 e 60,19%, respectivamente. O composto 4 foi fracamente ativo, enquanto 1, 2, 7 e 8 não exibiram nenhuma atividade. Os valores de concentração máxima (IC₅₀) no meio inibitório foram determinados para compostos que inibiram pelo menos 50% da M^{PRO} a 200 µM. O composto 5 foi o mais ativo apresentando IC₅₀ de 0,72±0,43 µM, enquanto os compostos 3 e 6 apresentaram IC₅₀ de 44,77±13,45 e 9,83±7,82 µM respectivamente. Isogarcinol foi mais potente que Ebselen (Valor IC₅₀: 3,4±0,995 µM) usado como controle positivo. Nos ensaios citotóxicos, os compostos 3 e 6 não foram citotóxicos para linhas celulares THP-1 e Vero até 150 µM, enquanto o composto 5 mostrou citotoxicidade falha contra linhas celulares THP-1 com CC₅₀ de 116,2±32 µM. Em contrapartida, não foi citotóxico para linhas celulares Vero até 150 µM.

Tabela 12. Efeito da inibição enzimática (IC₅₀) , citotoxicidade (CC₅₀) dos compostos.

Composto	M ^{PRO}	THP1	VERO
	(%) de Inibição para 200μM	IC ₅₀ ± SD (μM)	CC ₅₀ ± SD (μM)
1-Tripalmitina 	NI	NT	NT
2- 1,3-dipalmitoil-2-oleiologlicerol 	NI	NT	NT
3 – estigmasterol 	-	-	-

<p>4 - Chamejasmine</p> 	59,64	44,77 ± 13,45	>150	>150
<p>5 - Volkensiflavona</p> 	3,60	NT	NT	NT
<p>6- Isogarcinol</p> 	68,20	0,72 ± 0,43	116 ± 32	>150
<p>7- Cicloxantoquimol</p> 	60,19	9,83 ± 7,82	>150	>150
<p>8- O-Sinapoil-glucopiranosideo</p> 	2,2	NT	NT	NT

<p>9 - Hesperidina</p> 	NI	NT	NT	NT
<p>10 - Hesperitina</p> 	29,9	NT	NT	NT
<p>Ebselen (10 µM) (Controle Positivo)</p>	96	3,4 ± 0.995	NT	NT

Relação estrutura –atividade baseada no docking molecular

O composto isogarcinol foi o mais ativo, foi estudado por docking molecular em duas estruturas de proteínas M^{PRO} (entradas PDB 5RG1(DOUANGAMATH et al., 2020) e 7NG3(COSTANZI et al., 2021)) para demonstrar as possíveis interações com o alvo. Os dados estão compilados nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Valores de probabilidade de ligação dos compostos analisados sob a MPRO do SARS-CoV-2 (PDB: 5RG1)

Compostos	MolDock Score		Rerank Score		Score Plantas		P Total
	Score	(p)	Score	(p)	Score	(p)	
Isogarcinol	-163,569	1	-88,0758	1	-553,401	0,9462	0,9820
Nirmatrelvir	-153,294	0,9371	-85,2498	0,9679	-522,230	0,8929	0,9326
Lig PDB	-102,876	0,6289	-82,9804	0,9421	-555,301	0,9495	0,8401

Os compostos com maior valor de probabilidade para o algoritmo em estudo estão destacados em negrito.

Tabela 14. Valores de probabilidade de ligação dos compostos analisados sob a M^{PRO} do SARS-CoV-2 (PDB: 7NG3)

Compostos	MolDock Score		Rerank Score		Score Plantas		P Total
	Score	(p)	Score	(p)	Score	(p)	

	Score	(p)	Score	(p)	Score	(p)	
Isogarcinol	-144,942	0,7270	63,7221	0	-399,539	0,7376	0,4882
Nirmatrelvir	-130,007	0,8223	-67,5777	0,9750	-456,848	0,8434	0,8803
Lig PDB	-158,090	1	-69,3048	1	-541,624	1	1

Os compostos com maior valor de probabilidade para o algoritmo em estudo estão destacados em negrito.

O isogarcinol (6) não apresentou energia de ligação negativa para o algoritmo de pontuação de reclassificação em SARS-CoV-2 M^{PRO} (PDB: 7NG3). Para APD: 5RG1, apresentou a maior potência com probabilidade de 0,9820 comparada ao ligante PDB e ao controle Nirmatrelvir, que apresentaram probabilidade de 0,8401 e 0,9326, respectivamente. O ligante PDB apresentou a maior afinidade com PDB: 7NG3, com um segundo com maior afinidade apresentando valor de probabilidade de 0,8803 seguido pelo composto 5 com uma probabilidade de 0,4882. Com base nestes dados, o SARS-CoV-2 M^{PRO} (PDB:5RG1) reflete os resultados dos biosensaís. Portanto, interações moleculares representadas na figura 62 do isogarcinol (6) com o SARS-CoV-2 M^{PRO} (PDB:5RG1) foram avaliadas. Interações hidrofóbicas (linhas tracejadas índigo) foram observadas entre grupos -CH₃ e -CH₂ da porção piranogeranil e resíduos de aminoácidos Pro 168 (1 interação), Met 49 (2 interações), His 41 (2 interações) e Met 165 (2 interações). Além disso, interações de colisão desfavoráveis (linha tracejada em vermelho) foram percebidas entre átomos de hidrogênio do grupo -OH e Phe 140 (1 interação) e similarmente entre o grupo -CH₃ e Met 165. Uma amida-pi empilhada (linha tracejada rosa) e interações empilhadas enxofre-pi (linha tracejada amarela) também foram encontradas entre o pi aromático da porção catecol e Leu 141 e Cys 145, respectivamente. Um tipo de ligação de hidrogênio (linha tracejada verde) foi observada entre a funcionalidade cetônica da benzofenona e Cys 145. É importante notar que as interações do tipo pi-alquil indicam que há uma interação da nuvem de elétrons sobre um grupo aromático e um elétron no grupo de qualquer um dos grupos alquil gerando ligações do tipo hidrofóbica (SINGH; DAS, 2015)(ALENCAR et al., 2022).

É importante mencionar que as interações entre o resíduo His 41 (linha tracejada índigo) e os grupos -CH₃ do isogarcinol eram não covalentes e ocorreu com uma das

díades catalíticas do sítio ativo. Resíduos como Met 49 e Pro 168 envolvidos na plasticidade do sítio ativo também interagiu com isogarcinol. Outra interação importante corresponde a interações não covalentes estabelecidas pelo resíduo Met 165 na bolsa hidrofóbica (DOUANGAMATH et al., 2020).

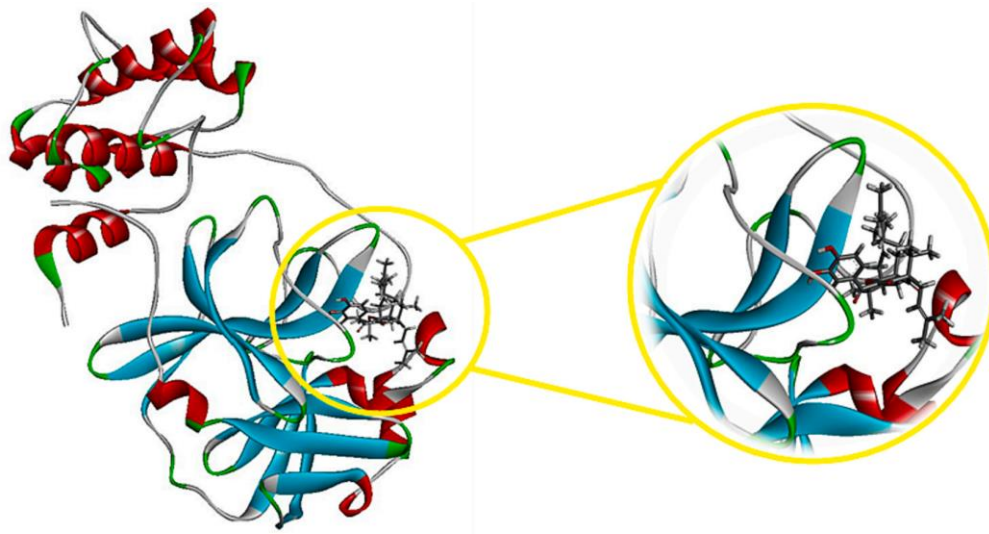
Além disso, é importante mencionar que o isogarcinol apresentou interações semelhantes às do controle Nirmatrelvir e o ligante PDB representados na figura 62. Nirmatrelvir exibiu interações do tipo pi-alquil (linha tracejada em índigo) entre os grupos $-CH_2$ e $-CH_3$ e His 163, His 172 e Met 49. Também interagiu através de ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde) com Cys 145 e Glu 166. Também interagiu com Met 165 usando interações pi-enxofre. O ligante PDB mostrou interações alquil e pi-alquil (linhas tracejadas em índigo) com His 41, Met 49 e Met 165 e interações pi-enxofre (linhas tracejadas em amarelo) com Cys 145 e Asn 142. Tipo de interações com ligação de hidrogênio (linha tracejada verde) também foram observadas entre o ligante e os resíduos de aminoácidos His 163 e Glu 166. Leu 141 e o ligante estavam interagindo pelo tipo de interação amida-pi-stacked (linha tracejada rosa). Vários compostos fenólicos foram relatados demonstrando inibir SARS-CoV-2 M^{PRO}.

Agathisflavona, uma biflavona isolada de *Anacardium occidentale*, mostrou uma inibição significativa em ensaios intracelulares de SARS-CoV-2. Este efeito foi relacionado à inibição significativa da M^{PRO} (CHAVES et al., 2022). Amentoflavona, outra biflavona da *Garcinia cambogia* apresentou uma inibição moderada para SARS-CoV-2 M^{PRO} (AATI et al., 2022). Uma comparação desses dados da literatura com aqueles relatados neste trabalho, revelou que, em relação a M^{PRO}, os esqueletos das biflavonas possuem maior potencial biológico comparado com biflavanonas e flavonilflavanonas (chamaejasmine e volkensiflavona).

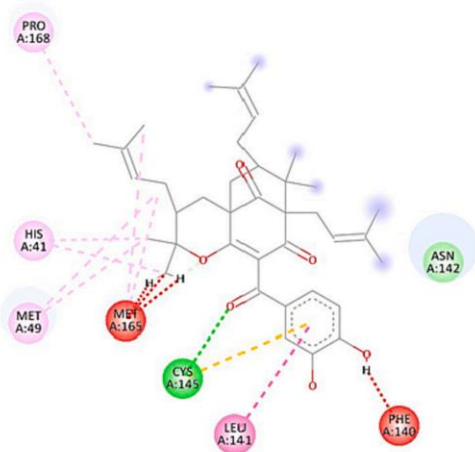
Duas benzofenonas, nomeadamente 3,4-didesmetil-5-desidrôxi-3-etoxiscleroína e 2,3,4-triidróxi-4-etoxibenzofenona, foram relatados anteriormente como inidores da M^{PRO} (COELHO et al., 2020). No entanto, seus efeitos inibitórios foram menos promissores do que os relatados para o Isogarcinol na presente pesquisa. Isogarcinol interagiu com a díade catalítica (His 41 e Cys 145) em PDB: 5RG1, sugerindo sua proximidade ao sítio catalítico. No entanto, é necessária uma investigação mais aprofundada para elucidar se existe uma ligação mais aprofundada para elucidar se

existe uma ligação covalente, já que o Hidrogenio da Cyst 145 foi ligado ao grupo certona do isogarcinol.

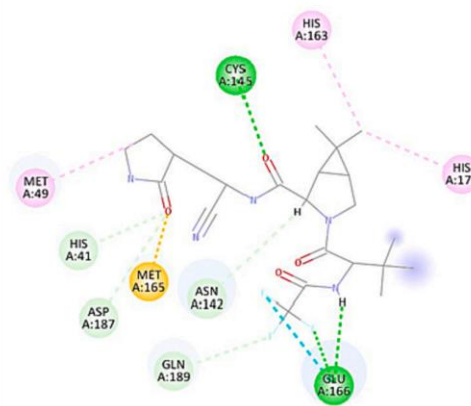
Figura 62 . Interações 2D e 3D dos compostos Isogarcinol (A), Nirmatrelvir (B) e Ligante PDB (C) com a M-Protease alvo (PDB: 5RG1). Índigo: Alquil, pialquil; Rosa: interações empilhadas com amida pi; Vermelho: interações de impacto desfavoráveis; Amarelo: intera



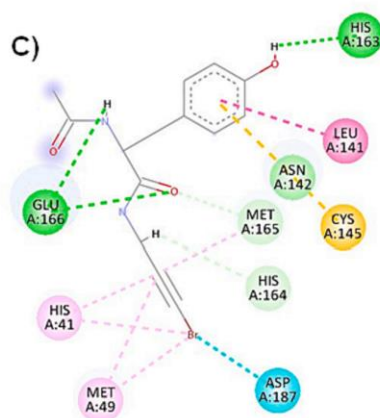
A)



B)



C)



5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstram metabólitos secundários biologicamente ativos do fruto de *P. insignis* obtidos a partir da orientação do perfil química LC-ESI-MS. Os estudos fitoquímicos das frutas comestíveis *P.insignis* proporcionaram os compostos: tripalmitina, 1,3-dipalmitoil-oleoilglicerol, estigmasterol, chamaejasmine, volkensiflavona, isogarcinol e cicloxantoquimol e de *C. sinensis*: O-Sinapoil-glucopiranoside, hesperidina e derivado semi-sintético hespiritina. Em seus ensaios enzimáticos contra Sars-CoV-2 M^{pro}, isogarcinol exibiu os melhores efeitos inibitórios com IC₅₀<1Um. Seu isômero cicloxantoquimol apresentou atividade moderada. Estudos de acoplamento demonstraram que o isogarcinol interagiu com a díade catalítica composta por His 41 e Cys 145, sugerindo sua proximidade com o sítio catalítico da M^{pro}.

https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/ng/7ng6/7ng6_full_validation.pdf

6 REFERÊNCIAS

AATI, Hanan Y.; ISMAIL, Ahmed; RATEB, Mostafa E.; ABOULMAGD, Asmaa M.;

HASSAN, Hossam M.; HETTA, Mona H. Garcinia cambogia Phenolics as Potent Anti-COVID-19 Agents: Phytochemical Profiling, Biological Activities, and Molecular Docking. **Plants**, [S. l.], v. 11, n. 19, 2022. DOI: 10.3390/plants11192521.

AJIRUL ABIQ, Moh; SUTRISNO; MARFUAH, Siti. Chemical Content and Pharmacology of Pomelo Orange (Citrus Maxima) Fruit Peel: A Review. **E3S Web of Conferences**, [S. l.], v. 481, 2024. DOI: 10.1051/e3sconf/202448106004.

AL-ALY, Ziyad; BOWE, Benjamin; XU, Evan. One-year Risks and Burdens of Incident Cardiovascular Disease in COVID-19 : Cardiovascular Manifestations of Long COVID. **Research Square**, [S. l.], n. October 5, p. 1–19, 2021.

ALENCAR, Wilson Luna Machado; DA SILVA AROUCHE, Tiago; NETO, Abel Ferreira Gomes; DE CASTRO RAMALHO, Teodorico; DE CARVALHO JÚNIOR, Raul Nunes; DE JESUS CHAVES NETO, Antonio Maia. Interactions of Co, Cu, and non-metal phthalocyanines with external structures of SARS-CoV-2 using docking and molecular dynamics. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–20, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-07396-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07396-w>.

ALMEIDA, Mara Zélia De. **Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea**. [s.l: s.n.].

ALVES TEIXEIRA DA ROCHA, Fátima; HELENA MELLER DA SILVA, Luiza; MANOEL DA CRUZ RODRIGUES, Antonio. Bacuri (Platonia insignis Mart.): Nutritional values, volatile compounds, rheological properties, health benefits, and potential products. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 436, n. September 2023, 2024. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137528.

BADSHAH, Syed Lal; FAISAL, Shah; MUHAMMAD, Akhtar; POULSON, Benjamin Gabriel; EMWAS, Abdul Hamid; JAREMKO, Mariusz. Antiviral activities of flavonoids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 140, n. June, p. 111596, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111596.

BAGGETT, Scott; PROTIVA, Petr; MAZZOLA, Eugene P.; YANG, Hui; RESSLER, Elizabeth T.; BASILE, Margaret J.; WEINSTEIN, I. Bernard; KENNELLY, Edward J. Bioactive benzophenones from Garcinia xanthochymus fruits. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 354–360, 2005. DOI: 10.1021/np0497595.

BAKRIM, Saad et al. Health Benefits and Pharmacological Properties of Stigmasterol. **Antioxidants**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 1–32, 2022. DOI: 10.3390/antiox11101912.

BEYER, Robert M.; MANICA, Andrea; MORA, Camilo. Shifts in global bat diversity suggest a possible role of climate change in the emergence of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 767, p. 145413, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145413. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145413>.

BIRCHFIELD, Aaron S.; MCINTOSH, Cecilia A. Metabolic engineering and synthetic biology of plant natural products – A minireview. **Current Plant Biology**, [S. l.], v. 24, n. July, p. 100163, 2020. DOI: 10.1016/j.cpb.2020.100163. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100163>.

BOOZARI, Motahareh. Natural products for COVID-19 prevention and treatment regarding to previous coronavirus infections and novel studies. [S. l.], n. August, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1002/ptr.6873.

CALDER, Philip C. Nutrition, immunity and COVID-19. **BMJ Nutrition, Prevention & Health**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 74–92, 2020. DOI: 10.1136/bmjnph-2020-000085.

CHAUGHULE, Ramesh S.; BARVE, Rajesh S. Role of herbal medicines in the treatment of infectious diseases. **Vegetos**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 41–51, 2024. DOI: 10.1007/s42535-022-00549-2. Disponible em: <https://doi.org/10.1007/s42535-022-00549-2>.

CHAVES, Otávio Augusto et al. Agathisflavone, a natural biflavonoid that inhibits SARS-CoV-2 replication by targeting its proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 222, n. August, p. 1015–1026, 2022. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.204.

COELHO, Camila; GALLO, Gloria; CAMPOS, Claudia B.; HARDY, Leon; WURTELE, Martin. Biochemical screening for SARS-CoV-2 main protease inhibitors. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 10 October, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0240079.

CÓRDOBA-AGUILAR, Alex; IBARRA-CERDEÑA, Carlos N.; CASTRO-ARELLANO, Iván; SUZAN, Gerardo. Tackling zoonoses in a crowded world: Lessons to be learned from the COVID-19 pandemic. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 214, n. November 2020, p. 10–13, 2021. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105780.

COSTANZI, Elisa et al. Structural and biochemical analysis of the dual inhibition of mg-132 against sars-cov-2 main protease (Mpro/3clpro) and human cathepsin-l. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 21, 2021. DOI: 10.3390/ijms222111779.

COVID-19 and Preparing Planetary Health for Future Ecological Crises: Hopes from Glycomics for Vaccine Innovation. [S. l.], v. 25, n. 4, p. 1165314, 2022.

DA SILVA, Anderson França et al. Antifungal and antivirulence activities of hydroalcoholic extract and fractions of platonias insignis leaves against vaginal isolates of candida species. **Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 2, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9020084.

DE MELO, Mônica Santos et al. A systematic review for anti-inflammatory property of clusiaceae family: A preclinical approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/960258.

DE OLIVEIRA, Adriana Cristina; LUCAS, Thabata Coaglio; IQUIAPAZA, Robert Aldo. What has the covid-19 pandemic taught us about adopting preventive measures? **Texto e Contexto Enfermagem**, [S. l.], v. 29, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1590/1980-265X-TCE-2020-0106.

DE SOUZA NORONHA, Kenya Valeria Micaela et al. The COVID-19 pandemic in Brazil: Analysis of supply and demand of hospital and ICU beds and mechanical ventilators under different scenarios. **Cadernos de Saude Publica**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1590/0102-311x00115320.

DEWICK, Paul M. **No Title**. [s.l: s.n.].

DIEL, Kriptsan Abdon Poletto; MARINHO, Lucas Cardoso; VON POSER, Gilsane Lino. The ethnobotanical relevance of the tribe Symphonieae (Clusiaceae) around the world. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 284, n. October 2021, p. 114745, 2022. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114745. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114745>.

DONGRE, Priti; DOIFODE, Chandrashekhar; CHOUDHARY, Shaily; SHARMA, Neeraj. “Botanical description, chemical composition, traditional uses and pharmacology of Citrus sinensis: An updated review”. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, [S. l.], v. 8, n. May, p. 100272, 2023. DOI: 10.1016/j.prmcm.2023.100272. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100272>.

DOS SANTOS, Daniel Sousa; FARIAS RODRIGUES, Mayara Mikelle. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 29, 2017. DOI: 10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35.

DOUANGAMATH, Alice et al. Crystallographic and electrophilic fragment screening of the SARS-CoV-2 main protease. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-18709-w. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18709-w>.

ELYA, Berna; BASAH, Katrin; MUN'IM, Abdul; YULIASTUTI, Wulan; BANGUN, Anastasia; SEPTIANA, Eva Kurnia. Screening of α -glucosidase inhibitory activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/281078.

ERB, Matthias; KLIEBENSTEIN, Daniel J. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy1[OPEN]. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 184, n. 1, p. 39–52, 2020. DOI: 10.1104/PP.20.00433.

FERNANDES, Henrique S.; SOUSA, Sérgio F.; CERQUEIRA, Nuno M. F. S. A. New insights into the catalytic mechanism of the SARS-CoV-2 main protease: an ONIOM QM/MM approach. **Molecular Diversity**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 1373–1381, 2022. DOI: 10.1007/s11030-021-10259-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10259-7>.

FISHBANE, Steven; HIRSCH, Jamie S.; NAIR, Vinay. Special Considerations for Paxlovid Treatment Among Transplant Recipients With SARS-CoV-2 Infection. **American Journal of Kidney Diseases**, [S. l.], v. 79, n. 4, p. 480–482, 2022. DOI: 10.1053/j.ajkd.2022.01.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2022.01.001>.

GASMI, Amin; CHIRUMBOLO, Salvatore; PEANA, Massimiliano; NOOR, Sadaf; MENZEL, Alain; DADAR, Maryam; BJØRKLUND, Geir. The Role of Diet and Supplementation of Natural Products in COVID-19 Prevention. **Biological Trace Element Research**, [S. l.], v. 200, n. 1, p. 27–30, 2022. DOI: 10.1007/s12011-021-02623-3.

GINWALA, Rashida; BHAVSAR, Raina; CHIGBU, De Gaulle I.; JAIN, Pooja; KHAN, Zafar K. Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. **Antioxidants**, [S. l.], v. 8, n.

2, p. 1–30, 2019. DOI: 10.3390/antiox8020035.

GLATTER, Kathryn A.; FINKELMAN, Paul. History of the Plague: An Ancient Pandemic for the Age of COVID-19. **American Journal of Medicine**, [S. l.], v. 134, n. 2, p. 176–181, 2021. DOI: 10.1016/j.amjmed.2020.08.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.08.019>.

HASAN, Saba; DWIVEDI, Manish; MUKHOPADHYAY, Sutanu; GUPTA, Nandini. Landscape Determinants of Infectivity and Insights into Vaccine Development and Effectiveness - Novel Coronavirus. **Letters in Drug Design & Discovery**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 119–143, 2022. DOI: 10.2174/1570180819666220628105636.

HOFFMANN, Thomas; KRUG, Daniel; BOZKURT, Nisa; DUDELA, Srikanth; JANSEN, Rolf; GARCIA, Ronald; GERTH, Klaus; STEINMETZ, Heinrich; MÜLLER, Rolf. Correlating chemical diversity with taxonomic distance for discovery of natural products in myxobacteria. **Nature Communications**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-03184-1.

IDRIS, Sahar; MISHRA, Anuradha; KHUSHTAR, Mohd. Phytochemical, ethanomedicinal and pharmacological applications of escin from *Aesculus hippocastanum* L. Towards future medicine. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 31, n. 5, 2020. DOI: 10.1515/jbcpp-2019-0115.

IKEDA, Kazutaka; OIKE, Yuichi; SHIMIZU, Takao; TAGUCHI, Ryo. Global analysis of triacylglycerols including oxidized molecular species by reverse-phase high resolution LC/ESI-QTOF MS/MSDO NASCIMENTO CAVALCANTE, Antonio; LIMA, Layana Karine Farias; ARAÚJO, Cristiany Marinho; DA SILVA SANTOS, Felipe Pereira; DO NASCIM. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [S. l.], v. 877, n. 25, p. 2639–2647, 2009. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.03.047.

J. LIN, M. Ishimatsu; T. Tanaka; G. Nonaka; I. Nishioka. NII-Electronic Library Service. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], n. 43, p. 2091, 2002. Disponível em: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>.

JIMÉNEZ-AVALOS, Gabriel et al. Comprehensive virtual screening of 4.8 k flavonoids reveals novel insights into allosteric inhibition of SARS-CoV-2 MPRO. **Scientific**

Reports, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–19, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-94951-6.

KARIA, Rutu; GUPTA, Ishita; KHANDAIT, Harshwardhan; YADAV, Ashima; YADAV, Anmol. COVID-19 and its Modes of Transmission. **SN Comprehensive Clinical Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. 1798–1801, 2020. DOI: 10.1007/s42399-020-00498-4.

KNELLER, Daniel W.; PHILLIPS, Gwyndalyn; O’NEILL, Hugh M.; JEDRZEJCZAK, Robert; STOLS, Lucy; LANGAN, Paul; JOACHIMIAK, Andrzej; COATES, Leighton; KOVALEVSKY, Andrey. Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL Mpro active site cavity revealed by room temperature X-ray crystallography. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 7–12, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-16954-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16954-7>.

KOSALEC, Ivan; CVEK, Josipa; TOMIĆ, Siniša. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 485–501, 2009. DOI: 10.2478/10004-1254-60-2009-2005.

LAHMER, N.; BELBOUKHARI, N.; CHERITI, A.; SEKKOUM, K. Hesperidin and hesperitin preparation and purification from Citrus sinensis peels. **Der Pharma Chemica**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 1–4, 2015.

LI, Yang et al. Lack of vertical transmission of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2, China. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 1335–1336, 2020. DOI: 10.3201/eid2606.200287.

LIMA, Geovanni De Moraes et al. Effects of “bacuri” Seed Butter (Platonia insignis Mart.) on Metabolic Parameters in Hamsters with Diet-Induced Hypercholesterolemia. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2021, 2021. DOI: 10.1155/2021/5584965.

MAHMOUD, Dina B.; SHITU, Zayyanu; MOSTAFA, Ahmed. Drug repurposing of nitazoxanide: can it be an effective therapy for COVID-19? **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s43141-020-00055-5.

MEHTA, Rajil B.; SILVEIRA, Fernanda P. COVID-19 after two doses of mRNA vaccines in kidney transplant recipients. **American Journal of Transplantation**, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 4102–4104, 2021. DOI: 10.1111/ajt.16778.

MOHAMMAD, Seyed; HASHEMIAN, Reza; SHEIDA, Amirhossein; TAGHIZADIEH, Mohammad. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information. [*S. l.*], n. January, 2020.

MOORE, Sam; HILL, Edward M.; DYSON, Louise; TILDESLEY, Michael J.; KEELING, Matt J. Retrospectively modeling the effects of increased global vaccine sharing on the COVID-19 pandemic. **Nature Medicine**, [*S. l.*], v. 28, n. 11, p. 2416–2423, 2022. DOI: 10.1038/s41591-022-02064-y.

MOURA, Felipe et al. Flavonoid glycosides and their putative human metabolites as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease (Mpro) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). [*S. l.*], v. 115, p. 4–11, 2020. DOI: 10.1590/0074-02760200207.

MSEMBURI, William; KARLINSKY, Ariel; KNUTSON, Victoria; ALESHINGUENDEL, Serge; CHATTERJI, Somnath; WAKEFIELD, Jon. The WHO estimates of excess mortality associated with the COVID-19 pandemic. **Nature**, [*S. l.*], v. 613, n. 7942, p. 130–137, 2023. DOI: 10.1038/s41586-022-05522-2.

PARUMS, Dinah V. Editorial: Rebound COVID-19 and Cessation of Antiviral Treatment for SARS-CoV-2 with Paxlovid and Molnupiravir. **Medical Science Monitor**, [*S. l.*], v. 28, p. 1–3, 2022. DOI: 10.12659/MSM.938532.

PEI, Lin; WANG, Xiaoxia; GUO, Bin; GUO, Hongjun; YU, Yan. Do air pollutants as well as meteorological factors impact Corona Virus Disease 2019 (COVID-19)? Evidence from China based on the geographical perspective. **Environmental Science and Pollution Research**, [*S. l.*], v. 28, n. 27, p. 35584–35596, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-12934-6.

PIRET, Jocelyne; BOIVIN, Guy. Pandemics Throughout History. **Frontiers in Microbiology**, [*S. l.*], v. 11, n. January, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2020.631736.

RAMAROSON, Marie-louisa; KOUTOUAN, Claude; HELESBEUX, Jean-jacques; HAMAMA, Latifa; GEOFFRIAU, Emmanuel; BRIARD, Mathilde. Fig Pests and Diseases. **Advances in Fig Research and Sustainable Production**, [*S. l.*], p. 257–258, 2022. DOI: 10.1079/9781789242492.0015.

REGINA DE CARIDAD RODRÍGUEZ MUÑOZ; ANA ELENA RODRÍGUEZ CADALSO; VIVIANA SILVIA RODRÍGUEZ JIMÉNEZ; GEUNY VÁZQUEZ BANDOMO; YOSIMY SEIJAS DELGADO; REYDILEXIS FORESTAL GONZÁLES. Those Responsible for the Pharmacological Actions of Plants are the Active Secondary Metabolites. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 107–114, 2021. DOI: 10.17265/2328-2150/2021.03.003.

RIBEIRO, Dayane C.; RUSSO, Helena M.; FRAIGE, Karina; ZERAIK, Maria L.; CODO, Ana C.; CALIXTO, Giovana M. F.; MEDEIROS, Alexandra I. De; CHORILLI, Marlus; BOLZANI, Vanderlan S. Bioactive Bioflavonoids from. [S. l.], v. 32, n. 4, p. 786–799, 2021.

SILVA, José Rogério A.; KRUGER, Hendrik G.; MOLFETTA, Fábio A. Drug repurposing and computational modeling for discovery of inhibitors of the main protease (Mpro) of SARS-CoV-2. **RSC Advances**, [S. l.], v. 11, n. 38, p. 23450–23458, 2021. DOI: 10.1039/d1ra03956c.

SINGH, Santosh K.; DAS, Aloke. The $n \rightarrow \pi^*$ interaction: A rapidly emerging non-covalent interaction. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [S. l.], v. 17, n. 15, p. 9596–9612, 2015. DOI: 10.1039/c4cp05536e.

SOCOLSKY, Cecilia; PLIETKER, Bernd. Total synthesis and absolute configuration assignment of MRSA active garcinol and isogarcinol. **Chemistry - A European Journal**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 3053–3061, 2015. DOI: 10.1002/chem.201406077.

SOFONEA, Mircea T.; FOULONGNE, Vincent; VERDURME, Laura; TROMBERT-, Sabine; ROUSSEL, Mathilde; ALIZON, Samuel. From Delta to Omicron : analysing the SARS-CoV-2 epidemic in France using variant-specific screening tests (September 1 to December 18 , 2021). [S. l.], p. 1–9, 2022.

STARK, Timo D.; LÖSCH, Sofie; WAKAMATSU, Junichiro; BALEMBA, Onesmo B.; FRANK, Oliver; HOFMANN, Thomas. UPLC-ESI-TOF MS-Based Metabolite Profiling of the Antioxidative Food Supplement *Garcinia buchananii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 32, p. 7169–7179, 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02544.

SUNDARAM, R.; NANDHAKUMAR, E.; HASEENA BANU, H. Hesperidin, a citrus flavonoid ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate

metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, [*S. l.*], v. 29, n. 9, p. 644–653, 2019. DOI: 10.1080/15376516.2019.1646370.

SUZUKI, Tadaki. Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants. [*S. l.*], 2022.

TEJADA, Silvia; PINYA, Samuel; MARTORELL, Miquel; CAPÓ, Xavier; TUR, Josep A.; PONS, Antoni; SUREDA, Antoni. Potential Anti-inflammatory Effects of Hesperidin from the Genus Citrus. **Current Medicinal Chemistry**, [*S. l.*], v. 25, n. 37, p. 4929–4945, 2017. DOI: 10.2174/0929867324666170718104412.

TWAIJ, Baan Munim; HASAN, Md Nazmul. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. **International Journal of Plant Biology**, [*S. l.*], v. 13, n. 1, p. 4–14, 2022. DOI: 10.3390/ijpb13010003.

ULLAH, Asad; MUNIR, Sidra; BADSHAH, Syed Lal; KHAN, Noreen; GHANI, Lubna; POULSON, Benjamin Gabriel; EMWAS, Abdul Hamid; JAREMKO, Mariusz. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. **Molecules**, [*S. l.*], v. 25, n. 22, p. 1–39, 2020. DOI: 10.3390/molecules25225243.

VALIZADEH, Jaber; BOLOUKIFAR, Shadi; SOLTANI, Sepehr; JABALBAREZI HOOKERD, Ehsan; FOULADI, Farzaneh; ANDREEVNA RUSHCHTC, Anastasia; DU, Bo; SHEN, Jun. Designing an optimization model for the vaccine supply chain during the COVID-19 pandemic. **Expert Systems with Applications**, [*S. l.*], v. 214, n. October 2022, 2023. DOI: 10.1016/j.eswa.2022.119009.

WEN, Wen et al. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. **Annals of Medicine**, [*S. l.*], v. 54, n. 1, p. 516–523, 2022. DOI: 10.1080/07853890.2022.2034936.

AATI, Hanan Y.; ISMAIL, Ahmed; RATEB, Mostafa E.; ABOULMAGD, Asmaa M.; HASSAN, Hossam M.; HETTA, Mona H. Garcinia cambogia Phenolics as Potent Anti-COVID-19 Agents: Phytochemical Profiling, Biological Activities, and Molecular Docking. **Plants**, [*S. l.*], v. 11, n. 19, 2022. DOI: 10.3390/plants11192521.

AJIRUL ABIQ, Moh; SUTRISNO; MARFUAH, Siti. Chemical Content and Pharmacology of Pomelo Orange (Citrus Maxima) Fruit Peel: A Review. **E3S Web of Conferences**, [*S. l.*], v. 481, 2024. DOI: 10.1051/e3sconf/202448106004.

AL-ALY, Ziyad; BOWE, Benjamin; XU, Evan. One-year Risks and Burdens of Incident Cardiovascular Disease in COVID-19 : Cardiovascular Manifestations of Long COVID. **Research Square**, [S. l.], n. October 5, p. 1–19, 2021.

ALENCAR, Wilson Luna Machado; DA SILVA AROUCHE, Tiago; NETO, Abel Ferreira Gomes; DE CASTRO RAMALHO, Teodorico; DE CARVALHO JÚNIOR, Raul Nunes; DE JESUS CHAVES NETO, Antonio Maia. Interactions of Co, Cu, and non-metal phthalocyanines with external structures of SARS-CoV-2 using docking and molecular dynamics. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–20, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-07396-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07396-w>.

ALMEIDA, Mara Zélia De. **Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea**. [s.l: s.n.].

ALVES TEIXEIRA DA ROCHA, Fátima; HELENA MELLER DA SILVA, Luiza; MANOEL DA CRUZ RODRIGUES, Antonio. Bacuri (*Platonia insignis* Mart.): Nutritional values, volatile compounds, rheological properties, health benefits, and potential products. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 436, n. September 2023, 2024. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137528.

BADSHAH, Syed Lal; FAISAL, Shah; MUHAMMAD, Akhtar; POULSON, Benjamin Gabriel; EMWAS, Abdul Hamid; JAREMKO, Mariusz. Antiviral activities of flavonoids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 140, n. June, p. 111596, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111596.

BAGGETT, Scott; PROTIVA, Petr; MAZZOLA, Eugene P.; YANG, Hui; RESSLER, Elizabeth T.; BASILE, Margaret J.; WEINSTEIN, I. Bernard; KENNELLY, Edward J. Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 354–360, 2005. DOI: 10.1021/np0497595.

BAKRIM, Saad et al. Health Benefits and Pharmacological Properties of Stigmasterol. **Antioxidants**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 1–32, 2022. DOI: 10.3390/antiox11101912.

BEYER, Robert M.; MANICA, Andrea; MORA, Camilo. Shifts in global bat diversity suggest a possible role of climate change in the emergence of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 767, p. 145413, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145413. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145413>.

BIRCHFIELD, Aaron S.; MCINTOSH, Cecilia A. Metabolic engineering and synthetic biology of plant natural products – A minireview. **Current Plant Biology**, [S. l.], v. 24, n. July, p. 100163, 2020. DOI: 10.1016/j.cpb.2020.100163. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100163>.

BOOZARI, Motahareh. Natural products for COVID-19 prevention and treatment regarding to previous coronavirus infections and novel studies. [S. l.], n. August, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1002/ptr.6873.

CALDER, Philip C. Nutrition, immunity and COVID-19. **BMJ Nutrition, Prevention & Health**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 74–92, 2020. DOI: 10.1136/bmjnph-2020-000085.

CHAUGHULE, Ramesh S.; BARVE, Rajesh S. Role of herbal medicines in the treatment of infectious diseases. **Vegetos**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 41–51, 2024. DOI: 10.1007/s42535-022-00549-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42535-022-00549-2>.

CHAVES, Otávio Augusto et al. Agathisflavone, a natural biflavonoid that inhibits SARS-CoV-2 replication by targeting its proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 222, n. August, p. 1015–1026, 2022. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.204.

COELHO, Camila; GALLO, Gloria; CAMPOS, Claudia B.; HARDY, Leon; WURTELE, Martin. Biochemical screening for SARS-CoV-2 main protease inhibitors. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 10 October, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0240079.

CÓRDOBA-AGUILAR, Alex; IBARRA-CERDEÑA, Carlos N.; CASTRO-ARELLANO, Iván; SUZAN, Gerardo. Tackling zoonoses in a crowded world: Lessons to be learned from the COVID-19 pandemic. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 214, n. November 2020, p. 10–13, 2021. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105780.

COSTANZI, Elisa et al. Structural and biochemical analysis of the dual inhibition of mg-132 against sars-cov-2 main protease (Mpro/3clpro) and human cathepsin-1. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 21, 2021. DOI: 10.3390/ijms222111779.

COVID-19 and Preparing Planetary Health for Future Ecological Crises: Hopes from Glycomics for Vaccine Innovation. [S. l.], v. 25, n. 4, p. 1165314, 2022.

DA SILVA, Anderson França et al. Antifungal and antivirulence activities of hydroalcoholic extract and fractions of *Platonia insignis* leaves against vaginal isolates of *Candida* species. **Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 2, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9020084.

DE MELO, Mônica Santos et al. A systematic review for anti-inflammatory property of *Clusiaceae* family: A preclinical approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/960258.

DE OLIVEIRA, Adriana Cristina; LUCAS, Thabata Coaglio; IQUIAPAZA, Robert Aldo. What has the covid-19 pandemic taught us about adopting preventive measures? **Texto e Contexto Enfermagem**, [S. l.], v. 29, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1590/1980-265X-TCE-2020-0106.

DE SOUZA NORONHA, Kenya Valeria Micaela et al. The COVID-19 pandemic in Brazil: Analysis of supply and demand of hospital and ICU beds and mechanical ventilators under different scenarios. **Cadernos de Saude Publica**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1590/0102-311x00115320.

DEWICK, Paul M. **No Title**. [s.l: s.n.].

DIEL, Kriptsan Abdon Poletto; MARINHO, Lucas Cardoso; VON POSER, Gilsane Lino. The ethnobotanical relevance of the tribe *Symphonieae* (*Clusiaceae*) around the world. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 284, n. October 2021, p. 114745, 2022. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114745. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114745>.

DONGRE, Priti; DOIFODE, Chandrashekhar; CHOUDHARY, Shaily; SHARMA, Neeraj. “Botanical description, chemical composition, traditional uses and pharmacology of *Citrus sinensis*: An updated review”. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, [S. l.], v. 8, n. May, p. 100272, 2023. DOI: 10.1016/j.prmcm.2023.100272. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100272>.

DOS SANTOS, Daniel Sousa; FARIAS RODRIGUES, Mayara Mikelle. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 29, 2017. DOI: 10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35.

DOUANGAMATH, Alice et al. Crystallographic and electrophilic fragment screening of the SARS-CoV-2 main protease. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-18709-w. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18709-w>.

ELYA, Berna; BASAH, Katrin; MUN'IM, Abdul; YULIASTUTI, Wulan; BANGUN, Anastasia; SEPTIANA, Eva Kurnia. Screening of α -glucosidase inhibitory activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/281078.

ERB, Matthias; KLIEBENSTEIN, Daniel J. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy1[OPEN]. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 184, n. 1, p. 39–52, 2020. DOI: 10.1104/PP.20.00433.

FERNANDES, Henrique S.; SOUSA, Sérgio F.; CERQUEIRA, Nuno M. F. S. A. New insights into the catalytic mechanism of the SARS-CoV-2 main protease: an ONIOM QM/MM approach. **Molecular Diversity**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 1373–1381, 2022. DOI: 10.1007/s11030-021-10259-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10259-7>.

FISHBANE, Steven; HIRSCH, Jamie S.; NAIR, Vinay. Special Considerations for Paxlovid Treatment Among Transplant Recipients With SARS-CoV-2 Infection. **American Journal of Kidney Diseases**, [S. l.], v. 79, n. 4, p. 480–482, 2022. DOI: 10.1053/j.ajkd.2022.01.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2022.01.001>.

GASMI, Amin; CHIRUMBOLO, Salvatore; PEANA, Massimiliano; NOOR, Sadaf; MENZEL, Alain; DADAR, Maryam; BJØRKLUND, Geir. The Role of Diet and Supplementation of Natural Products in COVID-19 Prevention. **Biological Trace Element Research**, [S. l.], v. 200, n. 1, p. 27–30, 2022. DOI: 10.1007/s12011-021-02623-3.

GINWALA, Rashida; BHAVSAR, Raina; CHIGBU, De Gaulle I.; JAIN, Pooja; KHAN, Zafar K. Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. **Antioxidants**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 1–30, 2019. DOI: 10.3390/antiox8020035.

GLATTER, Kathryn A.; FINKELMAN, Paul. History of the Plague: An Ancient Pandemic for the Age of COVID-19. **American Journal of Medicine**, [S. l.], v. 134, n. 2, p. 176–181, 2021. DOI: 10.1016/j.amjmed.2020.08.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.08.019>.

HASAN, Saba; DWIVEDI, Manish; MUKHOPADHYAY, Sutanu; GUPTA, Nandini.

Landscape Determinants of Infectivity and Insights into Vaccine Development and Effectiveness - Novel Coronavirus. **Letters in Drug Design & Discovery**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 119–143, 2022. DOI: 10.2174/1570180819666220628105636.

HOFFMANN, Thomas; KRUG, Daniel; BOZKURT, Nisa; DUDELA, Srikanth; JANSEN, Rolf; GARCIA, Ronald; GERTH, Klaus; STEINMETZ, Heinrich; MÜLLER, Rolf. Correlating chemical diversity with taxonomic distance for discovery of natural products in myxobacteria. **Nature Communications**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-03184-1.

IDRIS, Sahar; MISHRA, Anuradha; KHUSHTAR, Mohd. Phytochemical, ethanomedicinal and pharmacological applications of escin from *Aesculus hippocastanum* L. Towards future medicine. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 31, n. 5, 2020. DOI: 10.1515/jbcpp-2019-0115.

IKEDA, Kazutaka; OIKE, Yuichi; SHIMIZU, Takao; TAGUCHI, Ryo. Global analysis of triacylglycerols including oxidized molecular species by reverse-phase high resolution LC/ESI-QTOF MS/MSDO NASCIMENTO CAVALCANTE, Antonio; LIMA, Layana Karine Farias; ARAÚJO, Cristiany Marinho; DA SILVA SANTOS, Felipe Pereira; DO NASCIM. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [S. l.], v. 877, n. 25, p. 2639–2647, 2009. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.03.047.

J. LIN, M. Ishimatsu; T. Tanaka; G. Nonaka; I. Nishioka. NII-Electronic Library Service. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], n. 43, p. 2091, 2002. Disponível em: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>.

JIMÉNEZ-AVALOS, Gabriel et al. Comprehensive virtual screening of 4.8 k flavonoids reveals novel insights into allosteric inhibition of SARS-CoV-2 MPRO. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–19, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-94951-6.

KARIA, Rutu; GUPTA, Ishita; KHANDAIT, Harshwardhan; YADAV, Ashima; YADAV, Anmol. COVID-19 and its Modes of Transmission. **SN Comprehensive Clinical Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. 1798–1801, 2020. DOI: 10.1007/s42399-020-00498-4.

KNELLER, Daniel W.; PHILLIPS, Gwyndalyn; O'NEILL, Hugh M.; JEDRZEJCZAK,

Robert; STOLS, Lucy; LANGAN, Paul; JOACHIMIAK, Andrzej; COATES, Leighton; KOVALEVSKY, Andrey. Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL Mpro active site cavity revealed by room temperature X-ray crystallography. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 7–12, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-16954-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16954-7>.

KOSALEC, Ivan; CVEK, Josipa; TOMIĆ, Siniša. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 485–501, 2009. DOI: 10.2478/10004-1254-60-2009-2005.

LAHMER, N.; BELBOUKHARI, N.; CHERITI, A.; SEKKOUM, K. Hesperidin and hesperitin preparation and purification from Citrus sinensis peels. **Der Pharma Chemica**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 1–4, 2015.

LI, Yang et al. Lack of vertical transmission of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2, China. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 1335–1336, 2020. DOI: 10.3201/eid2606.200287.

LIMA, Geovanni De Moraes et al. Effects of “bacuri” Seed Butter (Platonia insignis Mart.) on Metabolic Parameters in Hamsters with Diet-Induced Hypercholesterolemia. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2021, 2021. DOI: 10.1155/2021/5584965.

MAHMOUD, Dina B.; SHITU, Zayyanu; MOSTAFA, Ahmed. Drug repurposing of nitazoxanide: can it be an effective therapy for COVID-19? **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s43141-020-00055-5.

MEHTA, Rajil B.; SILVEIRA, Fernanda P. COVID-19 after two doses of mRNA vaccines in kidney transplant recipients. **American Journal of Transplantation**, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 4102–4104, 2021. DOI: 10.1111/ajt.16778.

MOHAMMAD, Seyed; HASHEMIAN, Reza; SHEIDA, Amirhossein; TAGHIZADIEH, Mohammad. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information . [S. l.], n. January, 2020.

MOORE, Sam; HILL, Edward M.; DYSON, Louise; TILDESLEY, Michael J.;

KEELING, Matt J. Retrospectively modeling the effects of increased global vaccine sharing on the COVID-19 pandemic. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 28, n. 11, p. 2416–2423, 2022. DOI: 10.1038/s41591-022-02064-y.

MOURA, Felipe et al. Flavonoid glycosides and their putative human metabolites as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease (Mpro) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). [S. l.], v. 115, p. 4–11, 2020. DOI: 10.1590/0074-02760200207.

MSEMBURI, William; KARLINSKY, Ariel; KNUTSON, Victoria; ALESHINGUENDEL, Serge; CHATTERJI, Somnath; WAKEFIELD, Jon. The WHO estimates of excess mortality associated with the COVID-19 pandemic. **Nature**, [S. l.], v. 613, n. 7942, p. 130–137, 2023. DOI: 10.1038/s41586-022-05522-2.

PARUMS, Dinah V. Editorial: Rebound COVID-19 and Cessation of Antiviral Treatment for SARS-CoV-2 with Paxlovid and Molnupiravir. **Medical Science Monitor**, [S. l.], v. 28, p. 1–3, 2022. DOI: 10.12659/MSM.938532.

PEI, Lin; WANG, Xiaoxia; GUO, Bin; GUO, Hongjun; YU, Yan. Do air pollutants as well as meteorological factors impact Corona Virus Disease 2019 (COVID-19)? Evidence from China based on the geographical perspective. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 28, n. 27, p. 35584–35596, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-12934-6.

PIRET, Jocelyne; BOIVIN, Guy. Pandemics Throughout History. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, n. January, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2020.631736.

RAMAROSON, Marie-louisa; KOUTOUAN, Claude; HELESBEUX, Jean-jacques; HAMAMA, Latifa; GEOFFRIAU, Emmanuel; BRIARD, Mathilde. Fig Pests and Diseases. **Advances in Fig Research and Sustainable Production**, [S. l.], p. 257–258, 2022. DOI: 10.1079/9781789242492.0015.

REGINA DE CARIDAD RODRÍGUEZ MUÑOZ; ANA ELENA RODRÍGUEZ CADALSO; VIVIANA SILVIA RODRÍGUEZ JIMÉNEZ; GEUNY VÁZQUEZ BANDOMO; YOSIMY SEIJAS DELGADO; REYDILEXIS FORESTAL GONZÁLES. Those Responsible for the Pharmacological Actions of Plants are the Active Secondary Metabolites. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 107–114, 2021. DOI: 10.17265/2328-2150/2021.03.003.

RIBEIRO, Dayane C.; RUSSO, Helena M.; FRAIGE, Karina; ZERAIK, Maria L.; CODO, Ana C.; CALIXTO, Giovana M. F.; MEDEIROS, Alexandra I. De; CHORILLI, Marlus; BOLZANI, Vanderlan S. Bioactive Bioflavonoids from. *[S. l.]*, v. 32, n. 4, p. 786–799, 2021.

SILVA, José Rogério A.; KRUGER, Hendrik G.; MOLFETTA, Fábio A. Drug repurposing and computational modeling for discovery of inhibitors of the main protease (Mpro) of SARS-CoV-2. **RSC Advances**, *[S. l.]*, v. 11, n. 38, p. 23450–23458, 2021. DOI: 10.1039/d1ra03956c.

SINGH, Santosh K.; DAS, Alope. The $n \rightarrow \pi^*$ interaction: A rapidly emerging non-covalent interaction. **Physical Chemistry Chemical Physics**, *[S. l.]*, v. 17, n. 15, p. 9596–9612, 2015. DOI: 10.1039/c4cp05536e.

SOCOLSKY, Cecilia; PLIETKER, Bernd. Total synthesis and absolute configuration assignment of MRSA active garcinol and isogarcinol. **Chemistry - A European Journal**, *[S. l.]*, v. 21, n. 7, p. 3053–3061, 2015. DOI: 10.1002/chem.201406077.

SOFONEA, Mircea T.; FOULONGNE, Vincent; VERDURME, Laura; TROMBERT-, Sabine; ROUSSEL, Mathilde; ALIZON, Samuel. From Delta to Omicron : analysing the SARS-CoV-2 epidemic in France using variant-specific screening tests (September 1 to December 18 , 2021). *[S. l.]*, p. 1–9, 2022.

STARK, Timo D.; LÖSCH, Sofie; WAKAMATSU, Junichiro; BALEMBA, Onesmo B.; FRANK, Oliver; HOFMANN, Thomas. UPLC-ESI-TOF MS-Based Metabolite Profiling of the Antioxidative Food Supplement *Garcinia buchananii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *[S. l.]*, v. 63, n. 32, p. 7169–7179, 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02544.

SUNDARAM, R.; NANDHAKUMAR, E.; HASEENA BANU, H. Hesperidin, a citrus flavonoid ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, *[S. l.]*, v. 29, n. 9, p. 644–653, 2019. DOI: 10.1080/15376516.2019.1646370.

SUZUKI, Tadaki. Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants. *[S. l.]*, 2022.

TEJADA, Silvia; PINYA, Samuel; MARTORELL, Miquel; CAPÓ, Xavier; TUR, Josep A.; PONS, Antoni; SUREDA, Antoni. Potential Anti-inflammatory Effects of Hesperidin

from the Genus Citrus. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 25, n. 37, p. 4929–4945, 2017. DOI: 10.2174/0929867324666170718104412.

TWAIJ, Baan Munim; HASAN, Md Nazmul. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. **International Journal of Plant Biology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 4–14, 2022. DOI: 10.3390/ijpb13010003.

ULLAH, Asad; MUNIR, Sidra; BADSHAH, Syed Lal; KHAN, Noreen; GHANI, Lubna; POULSON, Benjamin Gabriel; EMWAS, Abdul Hamid; JAREMKO, Mariusz. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 22, p. 1–39, 2020. DOI: 10.3390/molecules25225243.

VALIZADEH, Jaber; BOLOUKIFAR, Shadi; SOLTANI, Sepehr; JABALBAREZI HOOKERD, Ehsan; FOULADI, Farzaneh; ANDREEVNA RUSHCHTC, Anastasia; DU, Bo; SHEN, Jun. Designing an optimization model for the vaccine supply chain during the COVID-19 pandemic. **Expert Systems with Applications**, [S. l.], v. 214, n. October 2022, 2023. DOI: 10.1016/j.eswa.2022.119009.

WEN, Wen et al. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, flvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. **Annals of Medicine**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 516–523, 2022. DOI: 10.1080/07853890.2022.2034936.

AATI, Hanan Y.; ISMAIL, Ahmed; RATEB, Mostafa E.; ABOULMAGD, Asmaa M.; HASSAN, Hossam M.; HETTA, Mona H. Garcinia cambogia Phenolics as Potent Anti-COVID-19 Agents: Phytochemical Profiling, Biological Activities, and Molecular Docking. **Plants**, [S. l.], v. 11, n. 19, 2022. DOI: 10.3390/plants11192521.

AJIRUL ABIQ, Moh; SUTRISNO; MARFUAH, Siti. Chemical Content and Pharmacology of Pomelo Orange (Citrus Maxima) Fruit Peel: A Review. **E3S Web of Conferences**, [S. l.], v. 481, 2024. DOI: 10.1051/e3sconf/202448106004.

AL-ALY, Ziyad; BOWE, Benjamin; XU, Evan. One-year Risks and Burdens of Incident Cardiovascular Disease in COVID-19 : Cardiovascular Manifestations of Long COVID. **Research Square**, [S. l.], n. October 5, p. 1–19, 2021.

ALENCAR, Wilson Luna Machado; DA SILVA AROUCHE, Tiago; NETO, Abel Ferreira Gomes; DE CASTRO RAMALHO, Teodorico; DE CARVALHO JÚNIOR, Raul Nunes; DE JESUS CHAVES NETO, Antonio Maia. Interactions of Co, Cu, and non-metal phthalocyanines with external structures of SARS-CoV-2 using docking and

molecular dynamics. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–20, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-07396-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07396-w>.

ALMEIDA, Mara Zélia De. **Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea**. [s.l: s.n.].

ALVES TEIXEIRA DA ROCHA, Fátima; HELENA MELLER DA SILVA, Luiza; MANOEL DA CRUZ RODRIGUES, Antonio. Bacuri (*Platonia insignis* Mart.): Nutritional values, volatile compounds, rheological properties, health benefits, and potential products. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 436, n. September 2023, 2024. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137528.

BADSHAH, Syed Lal; FAISAL, Shah; MUHAMMAD, Akhtar; POULSON, Benjamin Gabriel; EMWAS, Abdul Hamid; JAREMKO, Mariusz. Antiviral activities of flavonoids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 140, n. June, p. 111596, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111596.

BAGGETT, Scott; PROTIVA, Petr; MAZZOLA, Eugene P.; YANG, Hui; RESSLER, Elizabeth T.; BASILE, Margaret J.; WEINSTEIN, I. Bernard; KENNELLY, Edward J. Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 354–360, 2005. DOI: 10.1021/np0497595.

BAKRIM, Saad et al. Health Benefits and Pharmacological Properties of Stigmasterol. **Antioxidants**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 1–32, 2022. DOI: 10.3390/antiox11101912.

BEYER, Robert M.; MANICA, Andrea; MORA, Camilo. Shifts in global bat diversity suggest a possible role of climate change in the emergence of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 767, p. 145413, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145413. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145413>.

BIRCHFIELD, Aaron S.; MCINTOSH, Cecilia A. Metabolic engineering and synthetic biology of plant natural products – A minireview. **Current Plant Biology**, [S. l.], v. 24, n. July, p. 100163, 2020. DOI: 10.1016/j.cpb.2020.100163. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100163>.

BOOZARI, Motahareh. Natural products for COVID-19 prevention and treatment regarding to previous coronavirus infections and novel studies. [S. l.], n. August, p. 1–

13, 2020. DOI: 10.1002/ptr.6873.

CALDER, Philip C. Nutrition, immunity and COVID-19. **BMJ Nutrition, Prevention & Health**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 74–92, 2020. DOI: 10.1136/bmjnph-2020-000085.

CHAUGHULE, Ramesh S.; BARVE, Rajesh S. Role of herbal medicines in the treatment of infectious diseases. **Vegetos**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 41–51, 2024. DOI: 10.1007/s42535-022-00549-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42535-022-00549-2>.

CHAVES, Otávio Augusto et al. Agathisflavone, a natural biflavonoid that inhibits SARS-CoV-2 replication by targeting its proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 222, n. August, p. 1015–1026, 2022. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.204.

COELHO, Camila; GALLO, Gloria; CAMPOS, Claudia B.; HARDY, Leon; WURTELE, Martin. Biochemical screening for SARS-CoV-2 main protease inhibitors. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 10 October, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0240079.

CÓRDOBA-AGUILAR, Alex; IBARRA-CERDEÑA, Carlos N.; CASTRO-ARELLANO, Iván; SUZAN, Gerardo. Tackling zoonoses in a crowded world: Lessons to be learned from the COVID-19 pandemic. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 214, n. November 2020, p. 10–13, 2021. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105780.

COSTANZI, Elisa et al. Structural and biochemical analysis of the dual inhibition of mg-132 against sars-cov-2 main protease (Mpro/3clpro) and human cathepsin-l. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 21, 2021. DOI: 10.3390/ijms222111779.

COVID-19 and Preparing Planetary Health for Future Ecological Crises: Hopes from Glycomics for Vaccine Innovation. [S. l.], v. 25, n. 4, p. 1165314, 2022.

DA SILVA, Anderson França et al. Antifungal and antivirulence activities of hydroalcoholic extract and fractions of platonias insignis leaves against vaginal isolates of candida species. **Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 2, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9020084.

DE MELO, Mônica Santos et al. A systematic review for anti-inflammatory property of clusiaceae family: A preclinical approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/960258.

DE OLIVEIRA, Adriana Cristina; LUCAS, Thabata Coaglio; IQUIAPAZA, Robert

Aldo. What has the covid-19 pandemic taught us about adopting preventive measures? **Texto e Contexto Enfermagem**, [S. l.], v. 29, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1590/1980-265X-TCE-2020-0106.

DE SOUZA NORONHA, Kenya Valeria Micaela et al. The COVID-19 pandemic in Brazil: Analysis of supply and demand of hospital and ICU beds and mechanical ventilators under different scenarios. **Cadernos de Saude Publica**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1590/0102-311x00115320.

DEWICK, Paul M. **No Title**. [s.l: s.n.].

DIEL, Kriptsan Abdon Poletto; MARINHO, Lucas Cardoso; VON POSER, Gilsane Lino. The ethnobotanical relevance of the tribe Symphonieae (Clusiaceae) around the world. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 284, n. October 2021, p. 114745, 2022. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114745. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114745>.

DONGRE, Priti; DOIFODE, Chandrashekhar; CHOUDHARY, Shaily; SHARMA, Neeraj. “Botanical description, chemical composition, traditional uses and pharmacology of Citrus sinensis: An updated review”. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, [S. l.], v. 8, n. May, p. 100272, 2023. DOI: 10.1016/j.prmcm.2023.100272. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100272>.

DOS SANTOS, Daniel Sousa; FARIAS RODRIGUES, Mayara Mikelle. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 29, 2017. DOI: 10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35.

DOUANGAMATH, Alice et al. Crystallographic and electrophilic fragment screening of the SARS-CoV-2 main protease. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-18709-w. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18709-w>.

ELYA, Berna; BASAH, Katrin; MUN’IM, Abdul; YULIASTUTI, Wulan; BANGUN, Anastasia; SEPTIANA, Eva Kurnia. Screening of α -glucosidase inhibitory activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/281078.

ERB, Matthias; KLIEBENSTEIN, Daniel J. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy1[OPEN].

Plant Physiology, [S. l.], v. 184, n. 1, p. 39–52, 2020. DOI: 10.1104/PP.20.00433.

FERNANDES, Henrique S.; SOUSA, Sérgio F.; CERQUEIRA, Nuno M. F. S. A. New insights into the catalytic mechanism of the SARS-CoV-2 main protease: an ONIOM QM/MM approach. **Molecular Diversity**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 1373–1381, 2022. DOI: 10.1007/s11030-021-10259-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10259-7>.

FISHBANE, Steven; HIRSCH, Jamie S.; NAIR, Vinay. Special Considerations for Paxlovid Treatment Among Transplant Recipients With SARS-CoV-2 Infection. **American Journal of Kidney Diseases**, [S. l.], v. 79, n. 4, p. 480–482, 2022. DOI: 10.1053/j.ajkd.2022.01.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2022.01.001>.

GASMI, Amin; CHIRUMBOLO, Salvatore; PEANA, Massimiliano; NOOR, Sadaf; MENZEL, Alain; DADAR, Maryam; BJØRKLUND, Geir. The Role of Diet and Supplementation of Natural Products in COVID-19 Prevention. **Biological Trace Element Research**, [S. l.], v. 200, n. 1, p. 27–30, 2022. DOI: 10.1007/s12011-021-02623-3.

GINWALA, Rashida; BHAVSAR, Raina; CHIGBU, De Gaulle I.; JAIN, Pooja; KHAN, Zafar K. Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. **Antioxidants**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 1–30, 2019. DOI: 10.3390/antiox8020035.

GLATTER, Kathryn A.; FINKELMAN, Paul. History of the Plague: An Ancient Pandemic for the Age of COVID-19. **American Journal of Medicine**, [S. l.], v. 134, n. 2, p. 176–181, 2021. DOI: 10.1016/j.amjmed.2020.08.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.08.019>.

HASAN, Saba; DWIVEDI, Manish; MUKHOPADHYAY, Sutanu; GUPTA, Nandini. Landscape Determinants of Infectivity and Insights into Vaccine Development and Effectiveness - Novel Coronavirus. **Letters in Drug Design & Discovery**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 119–143, 2022. DOI: 10.2174/1570180819666220628105636.

HOFFMANN, Thomas; KRUG, Daniel; BOZKURT, Nisa; DUDELA, Srikanth; JANSEN, Rolf; GARCIA, Ronald; GERTH, Klaus; STEINMETZ, Heinrich; MÜLLER, Rolf. Correlating chemical diversity with taxonomic distance for discovery of natural products in myxobacteria. **Nature Communications**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018.

DOI: 10.1038/s41467-018-03184-1.

IDRIS, Sahar; MISHRA, Anuradha; KHUSHTAR, Mohd. Phytochemical, ethanomedicinal and pharmacological applications of escin from *Aesculus hippocastanum* L. Towards future medicine. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 31, n. 5, 2020. DOI: 10.1515/jbcpp-2019-0115.

IKEDA, Kazutaka; OIKE, Yuichi; SHIMIZU, Takao; TAGUCHI, Ryo. Global analysis of triacylglycerols including oxidized molecular species by reverse-phase high resolution LC/ESI-QTOF MS/MSDO NASCIMENTO CAVALCANTE, Antonio; LIMA, Layana Karine Farias; ARAÚJO, Cristiany Marinho; DA SILVA SANTOS, Felipe Pereira; DO NASCIM. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [S. l.], v. 877, n. 25, p. 2639–2647, 2009. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.03.047.

J. LIN, M. Ishimatsu; T. Tanaka; G. Nonaka; I. Nishioka. NII-Electronic Library Service. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], n. 43, p. 2091, 2002. Disponível em: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>.

JIMÉNEZ-AVALOS, Gabriel et al. Comprehensive virtual screening of 4.8 k flavonoids reveals novel insights into allosteric inhibition of SARS-CoV-2 MPRO. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–19, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-94951-6.

KARIA, Rutu; GUPTA, Ishita; KHANDAIT, Harshwardhan; YADAV, Ashima; YADAV, Anmol. COVID-19 and its Modes of Transmission. **SN Comprehensive Clinical Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. 1798–1801, 2020. DOI: 10.1007/s42399-020-00498-4.

KNELLER, Daniel W.; PHILLIPS, Gwyndalyn; O'NEILL, Hugh M.; JEDRZEJCZAK, Robert; STOLS, Lucy; LANGAN, Paul; JOACHIMIAK, Andrzej; COATES, Leighton; KOVALEVSKY, Andrey. Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL Mpro active site cavity revealed by room temperature X-ray crystallography. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 7–12, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-16954-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16954-7>.

KOSALEC, Ivan; CVEK, Josipa; TOMIĆ, Siniša. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 485–

501, 2009. DOI: 10.2478/10004-1254-60-2009-2005.

LAHMER, N.; BELBOUKHARI, N.; CHERITI, A.; SEKKOUM, K. Hesperidin and hesperitin preparation and purification from *Citrus sinensis* peels. **Der Pharma Chemica**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 1–4, 2015.

LI, Yang et al. Lack of vertical transmission of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2, China. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 1335–1336, 2020. DOI: 10.3201/eid2606.200287.

LIMA, Geovanni De Moraes et al. Effects of “bacuri” Seed Butter (*Platonia insignis* Mart.) on Metabolic Parameters in Hamsters with Diet-Induced Hypercholesterolemia. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2021, 2021. DOI: 10.1155/2021/5584965.

MAHMOUD, Dina B.; SHITU, Zayyanu; MOSTAFA, Ahmed. Drug repurposing of nitazoxanide: can it be an effective therapy for COVID-19? **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s43141-020-00055-5.

MEHTA, Rajil B.; SILVEIRA, Fernanda P. COVID-19 after two doses of mRNA vaccines in kidney transplant recipients. **American Journal of Transplantation**, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 4102–4104, 2021. DOI: 10.1111/ajt.16778.

MOHAMMAD, Seyed; HASHEMIAN, Reza; SHEIDA, Amirhossein; TAGHIZADIEH, Mohammad. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information . [S. l.], n. January, 2020.

MOORE, Sam; HILL, Edward M.; DYSON, Louise; TILDESLEY, Michael J.; KEELING, Matt J. Retrospectively modeling the effects of increased global vaccine sharing on the COVID-19 pandemic. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 28, n. 11, p. 2416–2423, 2022. DOI: 10.1038/s41591-022-02064-y.

MOURA, Felipe et al. Flavonoid glycosides and their putative human metabolites as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease (Mpro) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). [S. l.], v. 115, p. 4–11, 2020. DOI: 10.1590/0074-02760200207.

MSEMBURI, William; KARLINSKY, Ariel; KNUTSON, Victoria; ALESHINGUENDEL, Serge; CHATTERJI, Somnath; WAKEFIELD, Jon. The WHO estimates of excess mortality associated with the COVID-19 pandemic. **Nature**, [S. l.], v. 613, n. 7942, p. 130–137, 2023. DOI: 10.1038/s41586-022-05522-2.

PARUMS, Dinah V. Editorial: Rebound COVID-19 and Cessation of Antiviral Treatment for SARS-CoV-2 with Paxlovid and Molnupiravir. **Medical Science Monitor**, [S. l.], v. 28, p. 1–3, 2022. DOI: 10.12659/MSM.938532.

PEI, Lin; WANG, Xiaoxia; GUO, Bin; GUO, Hongjun; YU, Yan. Do air pollutants as well as meteorological factors impact Corona Virus Disease 2019 (COVID-19)? Evidence from China based on the geographical perspective. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 28, n. 27, p. 35584–35596, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-12934-6.

PIRET, Jocelyne; BOIVIN, Guy. Pandemics Throughout History. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, n. January, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2020.631736.

RAMAROSON, Marie-louisa; KOUTOUAN, Claude; HELESBEUX, Jean-jacques; HAMAMA, Latifa; GEOFFRIAU, Emmanuel; BRIARD, Mathilde. Fig Pests and Diseases. **Advances in Fig Research and Sustainable Production**, [S. l.], p. 257–258, 2022. DOI: 10.1079/9781789242492.0015.

REGINA DE CARIDAD RODRÍGUEZ MUÑOZ; ANA ELENA RODRÍGUEZ CADALSO; VIVIANA SILVIA RODRÍGUEZ JIMÉNEZ; GEUNY VÁZQUEZ BANDOMO; YOSIMY SEIJAS DELGADO; REYDILEXIS FORESTAL GONZÁLES. Those Responsible for the Pharmacological Actions of Plants are the Active Secondary Metabolites. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 107–114, 2021. DOI: 10.17265/2328-2150/2021.03.003.

RIBEIRO, Dayane C.; RUSSO, Helena M.; FRAIGE, Karina; ZERAIK, Maria L.; CODO, Ana C.; CALIXTO, Giovana M. F.; MEDEIROS, Alexandra I. De; CHORILLI, Marlus; BOLZANI, Vanderlan S. Bioactive Bioflavonoids from. [S. l.], v. 32, n. 4, p. 786–799, 2021.

SILVA, José Rogério A.; KRUGER, Hendrik G.; MOLFETTA, Fábio A. Drug repurposing and computational modeling for discovery of inhibitors of the main protease (Mpro) of SARS-CoV-2. **RSC Advances**, [S. l.], v. 11, n. 38, p. 23450–23458, 2021.

DOI: 10.1039/d1ra03956c.

SINGH, Santosh K.; DAS, Alope. The $n \rightarrow \pi^*$ interaction: A rapidly emerging non-covalent interaction. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [S. l.], v. 17, n. 15, p. 9596–9612, 2015. DOI: 10.1039/c4cp05536e.

SOCOLSKY, Cecilia; PLIETKER, Bernd. Total synthesis and absolute configuration assignment of MRSA active garcinol and isogarcinol. **Chemistry - A European Journal**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 3053–3061, 2015. DOI: 10.1002/chem.201406077.

SOFONEA, Mircea T.; FOULONGNE, Vincent; VERDURME, Laura; TROMBERT-, Sabine; ROUSSEL, Mathilde; ALIZON, Samuel. From Delta to Omicron : analysing the SARS-CoV-2 epidemic in France using variant-specific screening tests (September 1 to December 18 , 2021). [S. l.], p. 1–9, 2022.

STARK, Timo D.; LÖSCH, Sofie; WAKAMATSU, Junichiro; BALEMBA, Onesmo B.; FRANK, Oliver; HOFMANN, Thomas. UPLC-ESI-TOF MS-Based Metabolite Profiling of the Antioxidative Food Supplement *Garcinia buchananii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 32, p. 7169–7179, 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02544.

SUNDARAM, R.; NANDHAKUMAR, E.; HASEENA BANU, H. Hesperidin, a citrus flavonoid ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, [S. l.], v. 29, n. 9, p. 644–653, 2019. DOI: 10.1080/15376516.2019.1646370.

SUZUKI, Tadaki. Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants. [S. l.], 2022.

TEJADA, Silvia; PINYA, Samuel; MARTORELL, Miquel; CAPÓ, Xavier; TUR, Josep A.; PONS, Antoni; SUREDA, Antoni. Potential Anti-inflammatory Effects of Hesperidin from the Genus *Citrus*. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 25, n. 37, p. 4929–4945, 2017. DOI: 10.2174/0929867324666170718104412.

TWAIJ, Baan Munim; HASAN, Md Nazmul. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. **International Journal of Plant Biology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 4–14, 2022. DOI: 10.3390/ijpb13010003.

ULLAH, Asad; MUNIR, Sidra; BADSHAH, Syed Lal; KHAN, Noreen; GHANI, Lubna; POULSON, Benjamin Gabriel; EMWAS, Abdul Hamid; JAREMKO, Mariusz.

Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 22, p. 1–39, 2020. DOI: 10.3390/molecules25225243.

VALIZADEH, Jaber; BOLOUKIFAR, Shadi; SOLTANI, Sepehr; JABALBAREZI HOOKERD, Ehsan; FOULADI, Farzaneh; ANDREEVNA RUSHCHTC, Anastasia; DU, Bo; SHEN, Jun. Designing an optimization model for the vaccine supply chain during the COVID-19 pandemic. **Expert Systems with Applications**, [S. l.], v. 214, n. October 2022, 2023. DOI: 10.1016/j.eswa.2022.119009.

WEN, Wen et al. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. **Annals of Medicine**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 516–523, 2022. DOI: 10.1080/07853890.2022.2034936.

Hou, W., Xia, J., Liu, C., Li, S., Wu, T., & Huang, Y. (2019). Development of a method to screen and isolate bioactive constituents from *Stellera chamaejasme* by ultrafiltration and liquid chromatography combined with semi-preparative high-performance liquid chromatography and high-speed counter current chromatography. *Journal of Separation Science*, 42(22), 3421–3431. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900772>

Xu, Y. J., Capistrano, R., Dhooghe, L., Foubert, K., Lemièrre, F., Maregesi, S., Baldé, A., Apers, S., & Pieters, L. (2011). Herbal medicines and infectious diseases: Characterization by LC-SPE-NMR of some medicinal plant extracts used against malaria. *Planta Medica*, 77(11), 1139–1148. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270719>

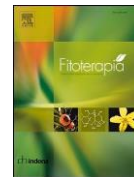
Al-Shagdari, A., Alarcón, A. B., Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2013). Biflavonoids, main constituents from *Garcinia bakeriana* leaves. *Natural Product Communications*, 8(9), 1237–1240. <https://doi.org/10.1177/1934578x1300800913>

Stark, T. D., Lösch, S., Wakamatsu, J., Balemba, O. B., Frank, O., & Hofmann, T. (2015). UPLC-ESI-TOF MS-Based Metabolite Profiling of the Antioxidative Food Supplement *Garcinia buchananii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(32), 7169–7179. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02544>

Bharate, J. B., Vishwakarma, R. A., Bharate, S. B., Kushwaha, M., & Gupta, A. P. (2014). Quantification of the polyisoprenylated benzophenones garcinol and isogarcinol using multiple reaction monitoring LC/electrospray ionization-MS/MS analysis of ultrasound-assisted extracts of *Garcinia indica* fruits. *Journal of AOAC International*, 97(5), 1317–1322. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-137>

Marti, G., Eparvier, V., Moretti, C., Susplugas, S., Prado, S., Grellier, P., Retailleau, P., Guéritte, F., & Litaudon, M. (2009). Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae). *Phytochemistry*, 70(1), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.10.005>

Baggett, S., Protiva, P., Mazzola, E. P., Yang, H., Ressler, E. T., Basile, M. J., Weinstein, I. B., & Kennelly, E. J. (2005). Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. *Journal of Natural Products*, 68(3), 354–360. <https://doi.org/10.1021/np0497595>



INHIBITORY EFFECTS AGAINST SARSCOV-2 MAIN PROTEASE (M^{PRO}) OF BIFLAVONOIDS AND BENZOPHENONES FROM THE FRUIT OF *PLATONIA INSIGNIS*

Monalisa A. Moreira Costa ^a, Natalia F. de Sousa ^b, Carime L. Mansur Pontes ^a, Marcus T. Scotti ^b, Francisco F. de Assis ^a, Antonio L. Braga ^a, Louis P. Sandjo ^{a,*}

^a Department of Chemistry, CFM, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitario-Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil ^b Department of Chemistry, Center for Exact and Natural Sciences, Universidade Federal de Paraíba, Campus I, Joao Pessoa, PB, Brazil ^{*}

ARTICLE INFO

Keywords:

Platonia insignis fruits
 Biflavonoids
 Benzophenones
 Main protease inhibition

ABSTRACT

The SARS-CoV-2 mutation and the limitation of the approved drug against COVID-19 are still a challenge in many country healthcare systems and need to be affronted despite the set of vaccines to prevent this viral infection. To contribute to the identification of new antiviral agents, the present study focused on natural products from an edible fruit with potential inhibitory effects against the SARS-CoV-2 main protease (M^{PRO}). First, LC-ESIMS analysis of *Platonia insignis* fruits was performed and showed the presence of biflavonoids and benzophenones in the seed and pulp, respectively. Then, maceration and chromatographic purification led to the identification of two triglycerides (**1** and **2**) alongside chamaejasmine (**3**) and volkensiflavone (**4**) from the seed and isogarcinol (**5**) and cycloanthochymol (**6**), from the pulp. Compounds **1–6** after evaluating their inhibitory against M^{PRO}, displayed from no to significant activity. Compound **5** was the most potent with an IC₅₀ value of 0.72 μM and was more active than the positive control, Ebselen (IC₅₀ of 3.4 μM). It displayed weak and no cytotoxicity against THP-1 (CC₅₀ of 116.2 μM) and Vero cell lines, respectively. Other active compounds showed no cytotoxicity against THP-1, and Vero cell lines. Molecular docking studies revealed interactions in the catalytic pocket between compound **5** and amino acid residues that composed the catalytic dyads (His 41 and Cyst 145).

1. Introduction Medicinal plants are rich sources of new bioactive substances. Their importance in drug discovery stems from the correlation between ethCOVID-19 is a respiratory disease caused by the virus SARS-CoV-2 nopharmacology knowledge and scientific evidence. Thus, this study that broke out in 2019 as a highly contagious infection. Its rapid was focused on bioactive secondary metabolites in the fruit of *Platonia* dissemination resulted in a pandemic and worldwide look-down as a *insignis*.

palliative solution [1]. In mid-2021, the vaccination campaign was *Platonia insignis* Mart is a Brazilian medicinal plant belonging to the important to release the burden on the healthcare system as the number Clusiaceae family and predominantly distributed in the

Amazon region of patients was far beyond their capacity [2]. The burden of COVID-19 in where it is known as “Bacuri”. In a primary forest, this species can reach conjunction with the lack of an efficient drug and the occurrence of 15 to 25 m in height with a trunk diameter of up to 120 cm. Its fruits are SARS-CoV-2 mutants prompted populations of many countries, espe- edible and contribute to the local economy with 2.0 to 2.5 k tons harcially in tropical areas, to use medicinal plants for prevention and cure vested per year for direct consumption or to produce ice cream, candy, [3]. This virus has a conserved protein known as main protease (M^{pro}) jelly, compote, liqueur, and dairy drinks [7]. Its leaves are used as which is a cysteine protease that plays a key role in its replication and traditional medicine for the treatment of diarrhoea, ear pain, and inlife cycle [4]. As impairment of this protein can impact the survival of flammatory diseases [8]. A biological study reported antifungal activthe virus, numerous studies have considered M^{pro} a suitable target for ities of its leaves crude extract against *Candida albicans* and *C. glabatra* the search for chemical agents with potential antiviral activity against [9]. This activity occurs through modification of the mitochondrial SARS-CoV-2 [4–6]. membrane potential of microorganisms. It was also shown that its flower

* Corresponding author at: Department of Chemistry, CFM, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitario-Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil.

E-mail address: p.l.sandjo@ufsc.br (L.P. Sandjo).

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2023.105784>

Received 5 October 2023; Received in revised form 7 December 2023; Accepted 14 December 2023 Available online 19 December 2023
0367-326X/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

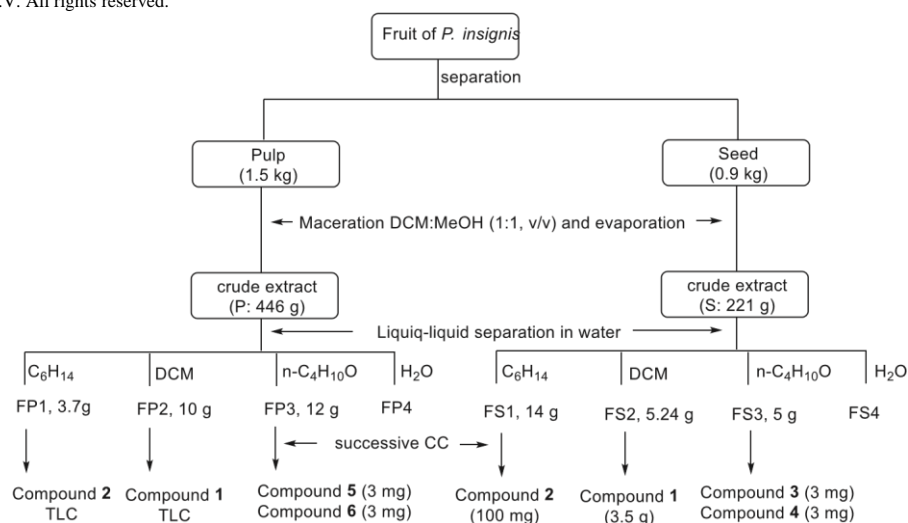


Fig. 1. Flow diagram of fractionation and purification of compounds.

hydroalcoholic extract inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* and *C. albicans* while its ethyl acetate fraction was bacteriostatic for *S. aureus* [9]. In addition, an enriched biflavonoid fraction containing Morelloflavone and Volkensiflavone attenuated the efflux function in *S. aureus* [10]. It is important to mention that the structures of these two biflavonoids were assigned by using mass fragmentation data [10]. Up to now, a unique isolation-based phytochemical study was performed on this species from which a benzophenone named Garcinielliptone FC was identified. Previous studies showed that this compound promotes vasorelaxant effects on the rat mesenteric artery and also possesses cytotoxic and antileishmanial activities [10,11].

During the coronavirus pandemic, herbal remedies, fruits, and spices were intensively used to prevent and alleviate respiratory symptoms [12]. As functional foods are natural foods or chemical components in food that have beneficial properties for human health, *P. insignis* fruits, represented an interesting organic material to be investigated. Therefore, the use of *P. insignis* as food and traditional remedy, the reported anti-infectious activities, and the reduced amount of data on its phytochemical profile prompted us to investigate the fruits of this species.

We hereby report on inhibitory effects against the SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}) and cytotoxicity of bioflavonoids and benzophenones obtained from

fruits of *Platonia insignis*. This study also presents the structure-activity relationship based on molecular docking interactions between M^{pro} and the most active compound. **2. Materials and methods**

7.1 2.1. CHEMICAL, REAGENTS, AND INSTRUMENTATION

LCMS and NMR Solvents were purchased from commercial manufacturers (Servylab, Merck representation in Brazil, Sao Paulo). Solvents ~ for chromatographic purification were purchased from Rauter (Gravataí, Rio Grande do Sul). Silica gel 70–230 mesh (0.063–0.2 mm), and C18 reversed phase silica were bought from Servylab. Thin layer chromatography (TLC) was carried out on 60F silica gel supported on aluminium foils with a fluorescent indicator UV 254–366 (Macherey- Nagel, Germany). Melting points (PF) were obtained using the Microquímica digital melting point device (MQAPF-302, Sao Paulo). Infrared ~ (IR) spectra were recorded on a Bruker Alpha model spectrometer using KBr pellets in the range of $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. ^1H NMR (400 MHz, 300 MHz, and 200 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz, 75 MHz, and 50 MHz) spectra were measured on a Bruker AVANCE DRX-400, AC-200, and Bruker Fourier 300 spectrometer (Bruker, Germany) using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. Mass spectrometry data were obtained from the mass spectrometer Xevo GS-2 QToF (purchased from Waters, USA) with an electrospray ionization (ESI) source, operating at both positive modes.

7.2 2.2. PLANT MATERIAL

Platonia insignis (Clusaceae) Fruits (2.5 kg) were purchased in December 2018 from the local market of Tucuruí, a city in Pará State of Brazil. The identity of the plant material was confirmed by comparing it with a specimen kept in the herbarium of the Goeldi Museum under the voucher # 62195.

7.3 2.3. EXTRACTION OF THE PLANT MATERIAL AND LIQUID-LIQUID FRACTIONATION

The fruit pulp was separated from the seed and yielded 1.5 and 0.9 kg, respectively. Both parts were extracted for fifteen days in DCM: MeOH (1:1, v/v) at room temperature. The extracts were filtered and concentrated under reduced pressure at a temperature of 40 °C to afford 446 g and 221 g of pulp and seed crude extracts, respectively. Then, the crude extracts were separately suspended in water, and partitioned by a liquid-liquid extraction process using hexane (hex), dichloromethane (DCM), and n-butanol (nBuOH). Solvents were removed by rotary evaporation under reduced pressure at 40 °C to produce the respective fractions: FP1 (3.7 g, hex), FP2 (10 g, DCM), and FP3 (12 g, nBuOH) from the pulp crude extract; FS1 (14 g, hex), FS2 (5.239 g, DCM) and FS3 (5 g, nBuOH) for the seed crude extract. The remaining aqueous fractions were rich in sugar and were not studied.

7.4 2.4. LC-ESI-MS ANALYSIS

7.4.1 2.4.1. Sample preparation

Based on TLC profiles of all the fractions that revealed the presence of lipophilic and non-polar substances in FS1, FS2, FP1 and FP2, only FS3 and FP3 were subjected to LCMS analysis. An aliquot of 1 mg, FS3 and FP3 was diluted with 2 mL of acetonitrile and methanol (1:1, v/v) to afford a solution with a concentration of 500 µg/mL, which was filtered using a 0.22 µm syringe filter.

7.4.2 2.4.2. Method for liquid chromatography coupled to mass spectrometry analysis

An Acquity UPLC system class H (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a photodiode array (PDA) detector, sample manager, and a quaternary solvent manager as well as a BEH C18 column (50 mm, 1.0 mm, particle size 1.7 µm (Waters)) was used for the chromatographic separation. The temperatures of the column and sample tray were kept at 40 °C and 20 °C, respectively. A sample volume of 2 µL was injected at a flow rate of 0.3 mL/min. The solvents were filtered and used in gradient conditions as follows: 90% A (water/formic acid, 99.9/0.1 (v/v)) and 10% B (acetonitrile); 0–2 min, 90% of A; 2–10 min, 55% of A; 10–15 min, 10% of A; 15–20 min, 90% of A.

A mass spectrometer, Xevo G2-S QToF (Waters) with an electrospray ionization (ESI) probe operating in positive and negative ionization modes coupled to the UPLC device was employed to detect the chemical components of the extract. Nitrogen

was used as nebulizer gas; The chromatograms were acquired in base peak ion mode with the cone gas flow of 100 L/h, the desolvation gas flow of 900 L/h, the sampling cone current of 40 Volts, and the source offset current of 80 V. The collision gas to produce fragment ions was argon and the lockspray reference sample was leucine enkephalin with reference mass values at m/z 554.2615 (ESI⁻) and 556.2771 (ESI⁺). The desolvation and the ionization source were maintained during the analyses at 250 °C and 90 °C, respectively, while the capillary voltage was 3 kV. Electrons were accelerated with a collision energy range of 30 to 35 eV. Data were acquired in a range of 100–1500 Da, at a scan time of 1.0 s over 20 min and were processed with MassLynx V4.1 (Waters).

7.5 2.5. PURIFICATION OF COMPOUNDS (FIG. 1)

FS2 (5.2 g, DCM) was subjected to chromatographic columns (CC) on silica gel and eluted with a binary mixture of hexane/chloroform in gradient condition to afford 182 subfractions (50 mL each). Compound **1** (3.5 g) was obtained from the fraction eluted by hex:CHCl₃ (1:9) by recrystallization with ethanol and filtration.

FS1 (13.5 mg) was subjected to a chromatographic purification similar to the precedent procedure, affording 166 subfractions (50 mL each). Compound **2** (100 mg) was obtained from subfraction eluted with hex:CHCl₃ (1:1) by recrystallization with ethanol.

FS3 (4.9 mg) was subjected to a silica gel chromatographic column using a gradient of

DCM/MeOH to provide 100 sub-fractions, sub-fractions obtained from DCM:MeOH (9:1) were pooled together based on the TLC profile and then purified by a C18 silica chromatographic column under isocratic condition using H₂O/acetonitrile (3:2). This purification afforded compounds **3** (3 mg) and **4** (3 mg).

FP1 and FP2 were rich in fatty acids, as their TLC profile showed spots with the same retention factor when compared to compounds **1** and **2**. Thus, only FP3 was subjected to chromatographic purification.

A quantity of 11.9 g was chromatographed under gradient conditions with DCM/MeOH yielding 103 sub-fractions. Based on the TLC profile, sub-fractions obtained from DCM/MeOH (95:5) were pooled together and purified on a C18 silica chromatographic column, using an isocratic mixture of H₂O/acetonitrile (7:3) affording compounds **5** (3 mg) and **6** (3 mg).

Tripalmitin (**1**): Colourless amorphous solid; ¹³C (CDCl₃; 50 MHz): δ 174.4, 173.0, 69.0, 62.2, 34.4, 34.2, 29.8–29.3, 25.1, 25.0, 22.8, 14.3; MS data: m/z 829.7242 [M + Na]⁺ ([C₅₁H₉₈O₆ + Na]⁺ calculated for m/z 829.7256).

1,3-dipalmitoyl-2-pentadecenoyl glycerol (**2**): colourless amorphous solid; ¹³C (CDCl₃; 50 MHz): δ 173.4, 173.0, 130.1, 129.8, 69.0, 62.2, 34.3, 34.2, 32.1, 29.8–24.2, 27.3, 25.0, 22.8, 14.2; Mass data: m/z

813.6842 [M + Na]⁺ (C₅₀H₉₄O₆Na calculated for m/z 813.6943). Chamaejasmine (**3**): Yellow solid;

^{13}C NMR (CD_3OD ; 50 MHz): δ 196.4, 167.0, 164.4, 163.5, 157.4, 128.6, 125.6, 115.0, 114.35, 96.0, 95.0, 79.2, 45.7. m/z 543.1302 $[\text{M} + \text{H}]^+$, ($[\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_{10} + \text{H}]^+$ calculated for m/z 543.1314) [13].
Volkensiflavone (**4**): Yellow solid; ^{13}C NMR (CD_3OD ; 50 MHz): δ 197.9, 183.9, 168.0, 165.8, 164.8, 164.5, 162.7, 162.4, 158.7, 158.6, 129.8, 129.6, 129.4, 129.2, 123.1, 117.0, 116.3, 115.6, 103.5, 99.9, 96.7, 94.6, 80.5, 50.9; MS data: m/z 541.1164 $[\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{O}_{10} + \text{H}]^+$ ($[\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{O}_{10} + \text{H}]^+$ calculated for m/z 541.1129) [14].

Isogarcinol (**5**): brown gummy solid; ^{13}C (CDCl_3 ; 50 MHz): δ 206.8, 194.8, 193.5, 171.8, 150.2, 144.2, 134.5, 133.8, 133.6, 130, 124.2, 122.5, 121.5, 120.2, 115.3, 114.6, 87.4, 70.7, 53.0, 46.4, 43.1, 42.7, 40.9, 29.8, 28.8, 27.8, 26.2, 25.9, 24.9, 22.4, 21.4, 18.2, 18.1, 16.3, 16.2. MS data: m/z 603.3708 $[\text{M} + \text{H}]^+$, ($[\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_6 + \text{H}]^+$ Calculated for m/z 603.3680) [15].

2.3.6 Cycloxanthochymol (**6**): Yellow amorphous solid; ^{13}C NMR (CDCl_3 ; 50 MHz): δ 208.5, 195.0, 194.9, 183.3, 150.6, 149.5, 143.6, 135.1, 133.6, 124.3, 124.0, 122.4, 120.5, 116.5, 114.5, 112.9, 109.8, 79.3, 72.0, 55.5, 49.4, 47.0, 42.6, 40.1, 39.0, 30.7, 29.8, 28.1, 25.9, 25.8, 19.5, 18.4, 18.3, 18.1, 17.8, 16.2; MS data: m/z 603.3708 $[\text{M} + \text{H}]^+$, ($[\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_6 + \text{H}]^+$ Calculated for m/z 603.3680) [16].

7.6 2.6. BIOLOGICAL ASSAYS

7.6.1 2.6.1. Inhibition assays against SARS-CoV-2 M^{pro}

Inhibition assays of the obtained compounds against the main protease were performed based on the

manufacturer's recommendation with some adaptations. We recently reported in detail this experimental procedure in the literature [17]. The screening was performed at a final concentration of 200 μM in triplicate. 10 μL of a chromogenic peptide substrate (Sigma-Aldrich) were used and incubation of the wells was carried out for another 45 min at 37 $^\circ\text{C}$. After the addition of 4% acetic acid (Merck), the microplate was read in a Tecan® Model Infinite M200 spectrophotometer at a wavelength of 405nm. Ebselen was used as a positive control was tested at a concentration of 10 μM for the screening assay.

To determine the minimum inhibitory concentration of 50% (IC_{50}), 10 μL of the final concentrations were added to each well with different dilutions of 150 μM , 50 μM , 16.7 μM and 5.6 μM for each compound. The dilution was also triplicate. After incubation, the reading of the microplate was carried out in a Tecan® Model Infinite M200 spectrophotometer at a wavelength of 405nm.

7.6.2 2.6.2. Cytotoxicity assays against THP-1 and Vero cell lines

THP-1 cells (12×10^4 cells/well), were seeded in a 96-well flat bottom microplate containing 180 μL of RPMI 1640 medium (Sigma- Aldrich) without phenol red supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich), 2 mM of L-glutamine (Gibco), 1 mM of sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), 10 U/mL of penicillin (Gibco) and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of streptomycin (Gibco) in the presence of 100 ng/mL of phorbol-12-myristate- 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich) and incubated at 37 $^\circ\text{C}$ under a 5% CO_2 atmosphere for

72 h. Vero cells (4×10^4 cells/well) were seeded in a volume of 180 μ L of RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% of FBS (Sigma-Aldrich) and 10 U/mL of penicillin (Gibco) and 10 μ g/mL of streptomycin (Gibco) and incubated at 37 $^{\circ}$ C under a 5% CO₂ atmosphere for 24 h. Both cell lines were treated with 20 μ L of each chalcone

(Sigma- Aldrich) was added and incubated for 5 h at 37 $^{\circ}$ C. The microplate was read at wavelengths of 530 and 590 nm in a Tecan® Model Infinite M200 spectrophotometer. All experiments were made in triplicate [17].

7.7 2.7. COMPUTATIONAL

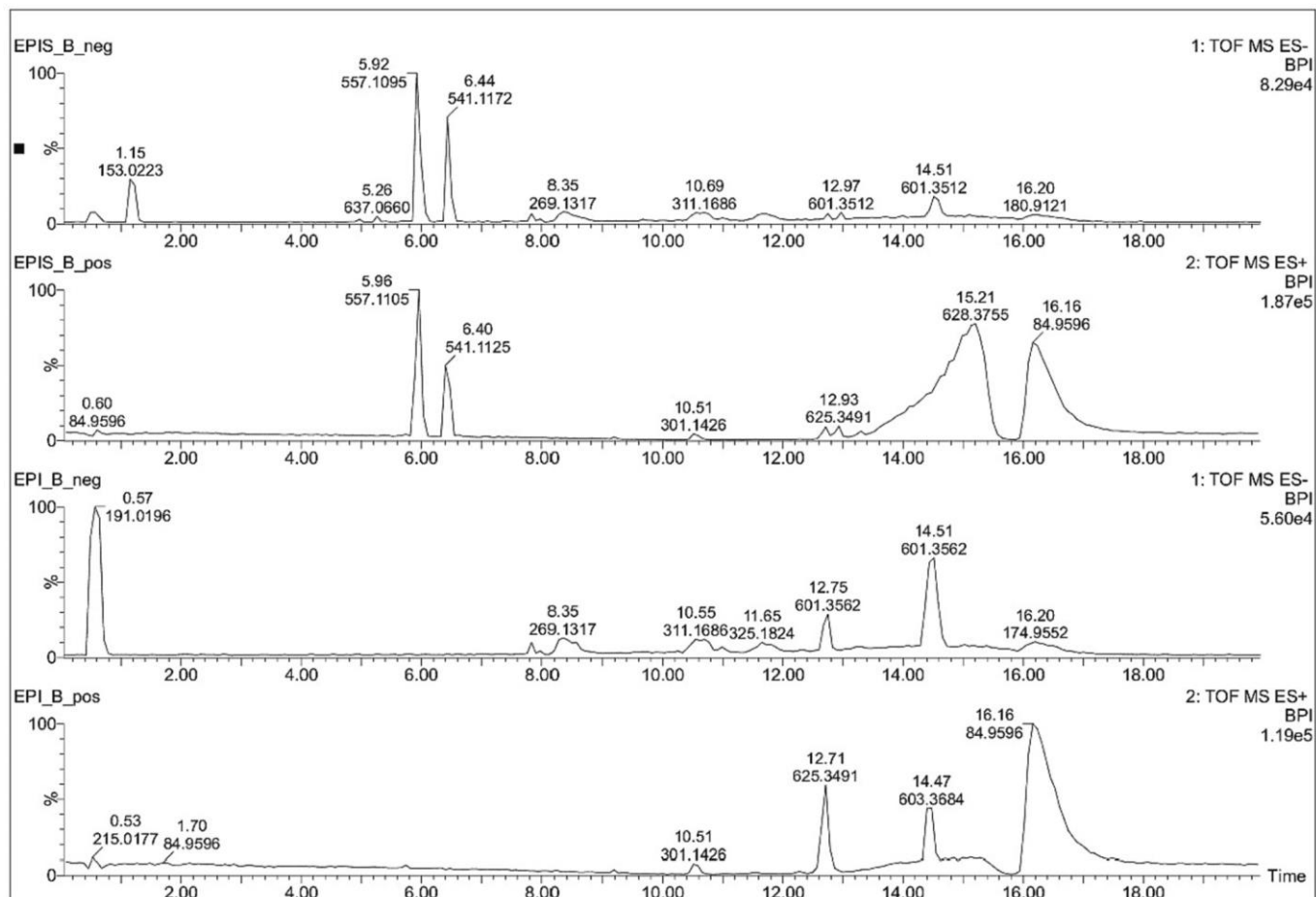


Fig. 2. Negative and positive modes LC-ESI-QTOFMS data of n-butanol fractions from pulp and seed of *Platonia insignis* fruit.

derivative at concentrations: 150.0, 50.0, 16.7, and 5.6 μ M diluted in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) without FBS. DMSO at 50% (Sigma-Aldrich) and 0.3% were used as positive and negative controls, respectively. The plates were incubated for 67 h at 37 $^{\circ}$ C, under a 5% CO₂ atmosphere. Then, 20 μ L of resazurin (250 μ g/mL)

METHODOLOGY

7.7.1 2.7.1. Molecular docking protocol

Three scoring functions namely the MolDock Score, the PLANTS Score, and the Rerank Score were used to calculate the interaction score. To validate the methodology under study, redocking was carried out to generate the RMSD value (ligand means square

deviation), since it is ideal for docking to have the RMSD value equal to or $<2.0 \text{ \AA}$. Therefore, an RMSD smaller than 2.0 \AA is widely accepted as a discriminant in reproducing a known binding mode, indicating whether the method was successful [18,19]. The RMSD value for the ligand and redocking by the MolDock Score algorithm corresponded to 0.2626 \AA for the ligand *N*- α -acetyl-*N*-(3-bromoprop-2-yn-1-yl)-*L*-tyrosinamide (T9J) co-crystallized with M^{pro} (PDB: 5RG1). This value was 0.7669 \AA for the ligand *N*-[(benzyloxy)carbonyl]-*L*-leucyl-*N*-[(2*S*)-1-hydroxy-4-methylpentan-2-yl]-*L*-leucinamide co-crystallized with the enzyme MG-132 covalently bound to the M^{pro} of SARS-CoV-2 in space group P1 (PDB: 7NG3). According to the RMSD values obtained, it is possible to see that these were below 2.0 \AA . The generated pose positioned the ligand correctly in the active site, indicating that the program provided values considered satisfactory for the docking validation.

Molecular docking was used to investigate the mechanism of action of the compounds that contribute to antiviral activity through the binding affinity of the compounds to M^{pro} . For this, a molecular docking simulation was carried out with M^{pro} PDB: 5RG1 and 7NG3 [20,21]. The 3D structures of the enzymes were obtained from the Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) [22,23] and co-correspond to M^{pro} in complex with *N*- α -acetyl-*N*-(3-bromoprop-2-yn-1-yl)-*L*-tyrosinamide

(PDB ID: 5RG1), Resolution: 1.65 \AA and method: X-Ray Diffraction [20]. The second 3D structure corresponded to the target MG-132 covalently bound to the main protease ($3\text{CL}^{\text{pro}}/M^{\text{pro}}$) of SARS-CoV-2 in space group P1 in complex with the ligand *N*-[(benzyloxy)carbonyl]-*L*-leucyl-*N*-[(2*S*)-1-hydroxy-4-methylpentan-2-yl]-*L*-leucinamide (PDB: 7NG3), Resolution: 1.80 \AA and method: X-Ray Diffraction [24]. Based on bibliographical research, the binding sites of the proteins under study were determined and included in the analyses. The active site was defined based on information reported in the Protein Data Bank (PDB) library [20,21]. The two selected enzymes present a co-crystallized ligand, so the active site was defined through the template established by the coordinates of the ligand in contact with the protein.

Initially, compound **5** was drawn in the Marvin Sketch v program. 19.18 (<https://chemaxon.com/marvin>) [25] and saved as SDF files. It was then standardized in the Standardizer v software. 21.2.0 ChemAxon (<https://chemaxon.com/standardizer>), where the addition of hydrogen atoms, standardization of the aromatic ring, removal of salts and structure conversion to 3D were carried out. After this step, this compound was subjected to molecular docking, with the water molecules removed and a “template” created between the macromolecule and the co-crystallized ligand, aiming to demarcate the active site of the enzyme. Before performing molecular docking, redocking was achieved, representing the

Table 1Chemical profile of the n-butanol fraction from seeds and pulp of *Platonia insignis* fruit.

Seeds				
tr (min)	Molecular formula	Detected mass (m/z)	Fragment (m/z)	Proposed structure
5.92	[C ₃₀ H ₂₀ O ₁₁ + H] ⁺	557.1105	431.0765; 403.0809; 297.0400; 271.0623; 269.0462; 153.0203.	GB2a or Morelloflavone ^a
6.44	[C ₃₀ H ₂₂ O ₁₁ + H] ⁺	559.1255	405.0991, 297.0400, 269.0462, 153.0203.	Fukugetin
	[C ₃₀ H ₂₀ O ₁₀ + H] ⁺	541.1125	415.0823; 387.0885; 297.0400; 271.0623; 231.0648; 153.0178.	apigeninyl-(I-3,II-3)-naringenin or volkensiflavone ^a
	[C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀ + H] ⁺	543.1317	389.1026, 297.0400, 271.0623, 269.0462, 153.0178	GB-1a or chamaejasmin ^a
Pulp				
0.57	[C ₆ H ₈ O ₇ -H] ⁻	191.0196	173.0078	Citric acid
12.71	[C ₃₈ H ₅₀ O ₆ + Na] ⁺ /	625.3491/	465.2281; 411.1797; 343.1187; 287.0569; 233.0802;	Related to isoxanthochymol or isogarcinol, cycloxanthochymol and cambogin.
	[C ₃₈ H ₅₀ O ₆ + H] ⁺	603.3684	177.0178; 137.1333	
14.47	[C ₃₈ H ₅₀ O ₆ + H] ⁺	603.3684	465.2281; 433.2742; 411.1797; 409.1646; 343.1187; 287.0569; 233.0802; 137.1333; 137.0233; 95.0855	Related to isoxanthochymol or isogarcinol, cycloxanthochymol and cambogin.

root mean square deviation (RMSD), which is considered successful if the value is <2.0 Å, aiming to identify whether the program was generating the poses appropriately.

Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) software was used with the default parameters [26]. The complex ligand was used to define the active site. Then, compound **5** was imported to analyze the stability of the system through the interactions identified with the active site of the enzyme, taking as a reference the energetic value of the MolDock Score and PLANTS Score algorithms [27,28]. The MolDock SE (Simplex Evolution) algorithm was used with the following parameters: A total of 30 runs with a maximum of 3000 interactions using a population of 50 individuals, 2000 minimization steps for each flexible residue, and 2000 global minimization steps per run. The MolDock Score (GRID), Rerank Score, and PLANTS Score (GRID) scoring functions were used to calculate docking energy values. A GRID was set at 0.3 Å and the search sphere was set at 15 Å radius. To analyze the ligand energy, internal electrostatic interactions,

internal hydrogen bonds and sp²-sp² torsions were evaluated.

To visualize the interactions and obtain the molecular docking

^aCoelution.

figures, the Discovery Studio Visualizer v20.1.0.19295 software was used - BIOVIA (2020) (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) [29].

7.7.2 2.7.2. Docking consensus

A consensus analysis using three different scoring functions was used to decrease the number of false positives [29]. The results of the affinity of the compounds studied by the MolDock Score, Rerank Score and PLANTS Score functions were considered in the consensus calculation. Initially, for each of the scoring functions under study, the value of (p) was calculated, which is equivalent to dividing the score obtained by each of the compounds by the compound that obtained the lowest energy, according to Eq. (1):

$$\text{Prob} = (E \text{ Lig}) / (E_{\text{Min Lig}}) \quad (1)$$

Where E Lig is the energy obtained by each ligand in the developed docking simulation. The EMinLig parameter corresponds to the lowest energy obtained among the ligands under study. The second consensus analysis refers to the calculation of the general average obtained in all biomarkers under study. In this way, the probability values for each of the compounds under study are calculated as a general average of the probability obtained for each of the biomarkers. After obtaining the probability values obtained for the compounds in each of the scoring functions under study, the total probability (P) was calculated, which corresponds to the sum of the probability values obtained for each of the scoring functions in the study, divided by the total number of observations, according to Eq. (2):

$$P \text{ Enzyme} = (P \text{ MolDock Score} + P \text{ Rerank Score} = P \text{ PLANTS Score})/n \quad (2)$$

7.8 3. RESULTS AND DISCUSSION

7.8.1 3.1. LC-ESI-MS analysis

The lipophilicity of the TLC mobile phase of hexane and DCM fractions of *P. insignis* fruits suggested the presence of fatty acid derivatives. This conclusion was supported by the oily physical state of these fractions. Thus, only butanol fractions of seeds and pulp were subjected to LC-ESI-MS analysis (Fig. 2). These fractions displayed similar chemical profile on their positive and negative ionizations. Only spectral data from the LCMS positive

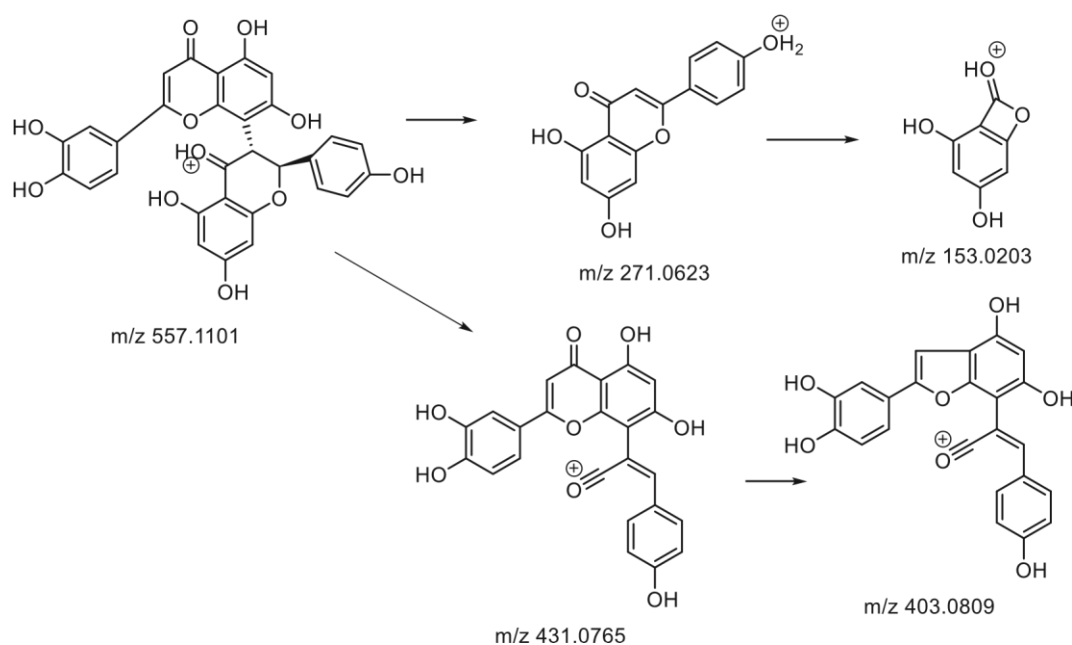


Fig. 3. Proposal of the fragmentation pattern of m/z 557.1101.

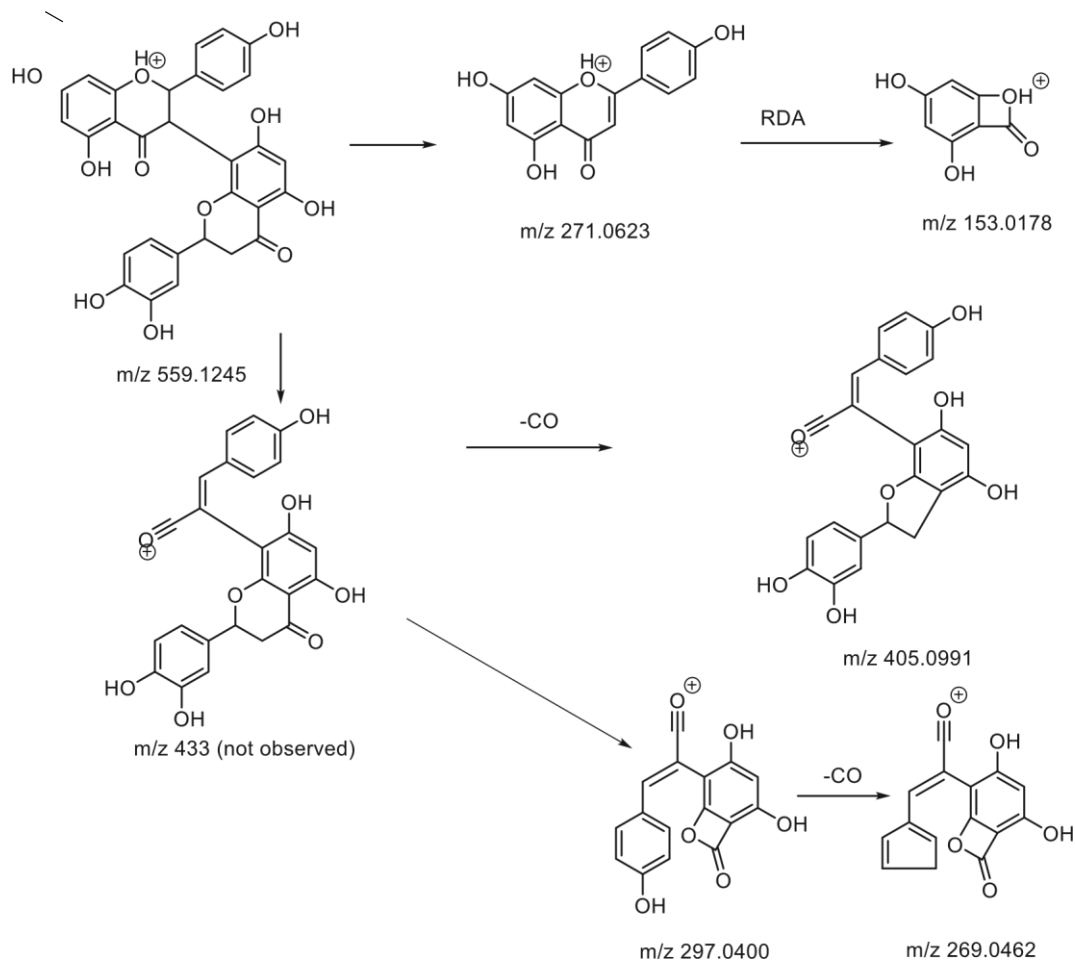


Fig. 4. Proposal of the fragmentation pattern of m/z 559.1245.

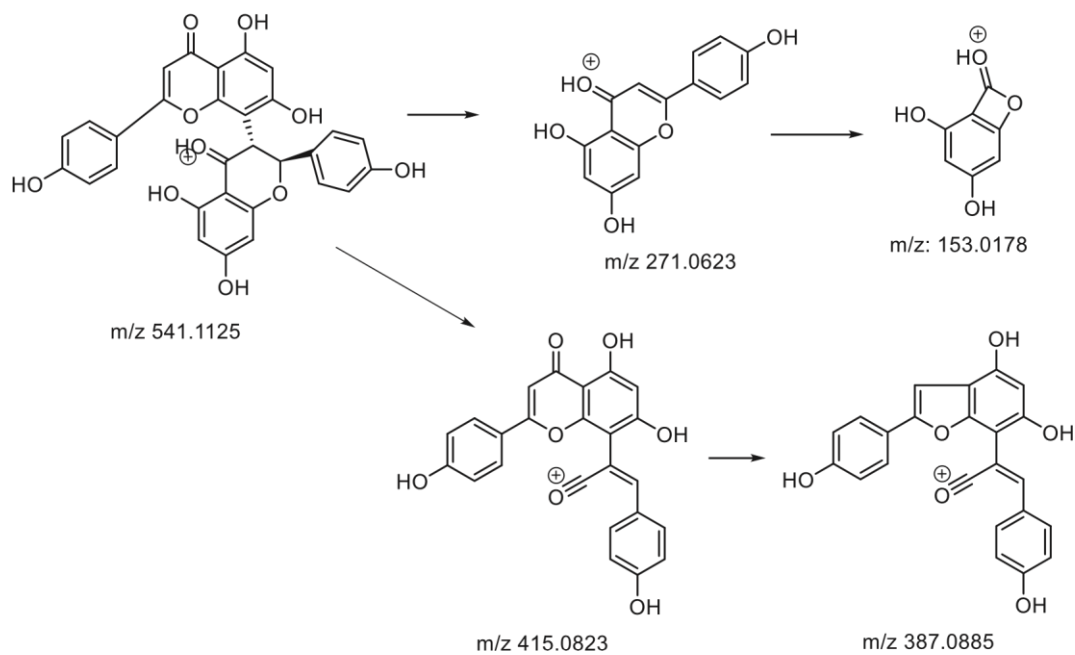


Fig. 5. Proposal of the fragmentation pattern of m/z 541.1165.

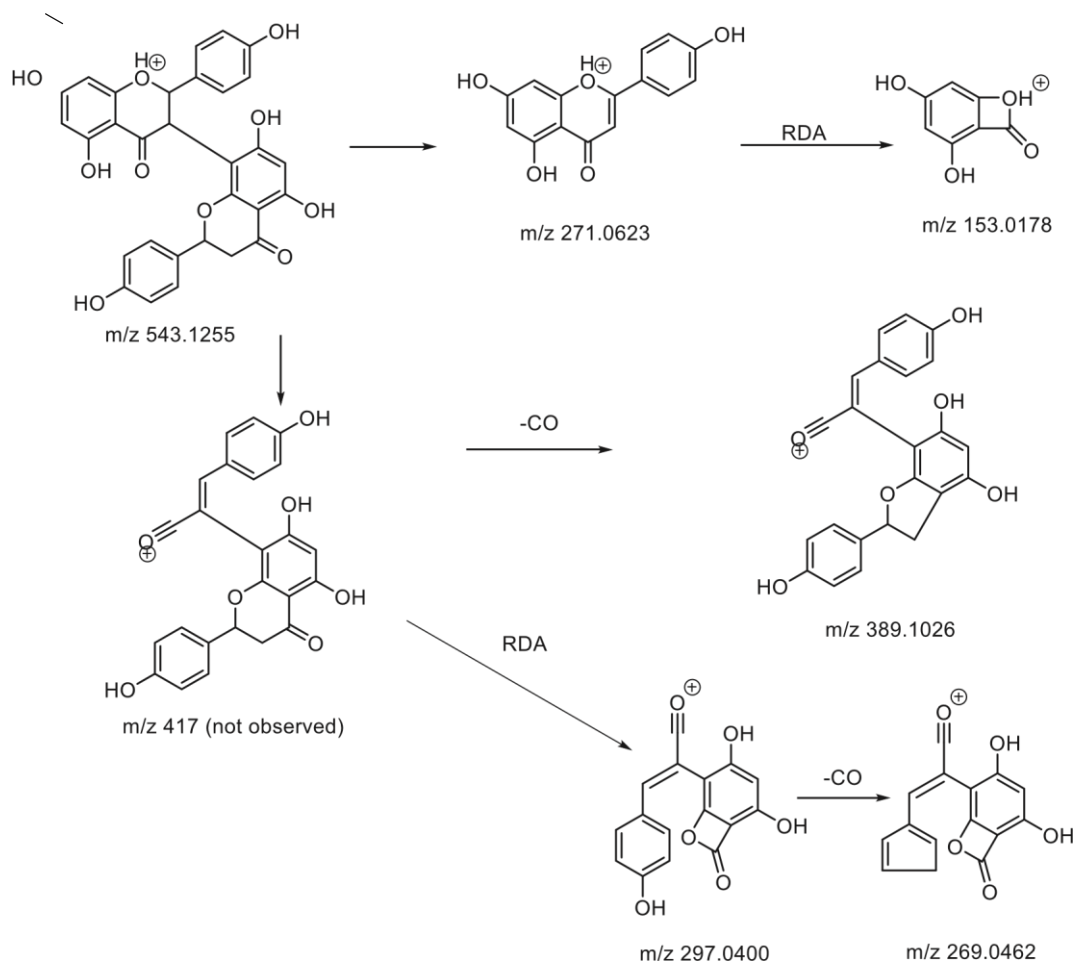


Fig. 6. Proposal of the fragmentation pattern of m/z 543.1255.

mode ionization were used to characterize their chemical profiles (Table 1).

LC-ESI-MS data of the seeds showed the presence of 2 predominant secondary metabolites with m/z 557.1101 and 541.1165 corresponding to the molecular formulas $[C_{30}H_{20}O_{11} + H]^+$ and $[C_{30}H_{20}O_{10} + H]^+$, respectively consistent with biflavonoids family (Fig. 2).

MS and MS/MS data revealed a coelution of two metabolites with m/z 557.1101 and m/z 559.1245 $[C_{30}H_{22}O_{11} + H]^+$; The precursor m/z 557.1101 gave in its MS/MS data, a fragment at m/z 431.0765 consistent with the loss of phloroglucinol (Fig. 3).

The ion m/z 431.0765 lost in turn CO (28 Da) to furnish m/z 403.0812; the ion corresponding to one of the monomers found at m/z 271.0601 was assigned as apigenin. These data led to the structure of Morelloflavone or GB2a for m/z 557.1101.

The precursor m/z 559.1245 could also produce the monomer m/z 271.0623 corresponding to apigenin and the fragment ion m/z 153.0178. However, the ion daughter at m/z 405.0991, produced by loss of phloroglucinol followed by decarboxylation (CO: 28 Da) was consistent with the presence of the eriodyctiol moiety in m/z 559.1245 (Fig. 4). The

above information led us to the structure of Fukugetin.

The metabolites m/z 541.1165 and 543.1302 also coeluted and their molecular formulas $[C_{30}H_{20}O_{10} + H]^+$ and $[C_{30}H_{22}O_{10} + H]^+$, respectively, indicated another pair of biflavonoids. Their tandem mass data presented fragmentation features similar to the precedent biflavonoids. The precursor m/z 541.1165 lost phloroglucinol to produce m/z 415.0823 which in turn lost CO to afford m/z 387.0885; The monomer was identified as apigenin consistent with the fragment ion m/z 271.0623 (Fig. 5). The afore information led to the structures of apigeninyl-(I-3,II-3)-naringenin and volkensiflavone for m/z 541.1165.

Its congener m/z 543.1255 corresponded to a molecular formula that has 2 additional hydrogen atoms compared to m/z 541.1165 suggesting a dimer of naringenin. The elimination from m/z 543.1255 afforded a protonated apigenin at m/z 271.0623. This later produced the fragment, m/z 153.0178 by the retro-Diels-Alder opening of ring C (Fig. 6). This precursor also produced m/z 389.1026 after the elimination of phloroglucinol and CO.

It was also found that the precursor produced m/z 297.0400 after losing phloroglucinol and ring B by RDA opening ring C. In addition, m/z 269.0462 differed from m/z 297.0400 by 28 Da corresponding to a loss of CO. Based on the afore information the structures of GB-1a and chamaejasmin were assigned.

Fig. 2 also displayed in the negative mode ionization of the fruit pulp, a peak at 0.57 min with m/z 191.0196 $[C_6H_8O_7-H]^-$ identified as citric acid. Alongside this metabolite, two predominant isomeric components with m/z 603.3708 $[C_{38}H_{50}O_6 + H]^+$ were also detected. A literature search of this elemental composition led to structures of two benzophenone derivatives. Tandem mass spectra of both compounds displayed a fragment ion for a monoterpene carbocation at m/z 137.1333 suggesting the presence of a geranyl moiety. The precursor ion of both compounds also furnished the fragment ion m/z 465.2281 after losing 2 prenyl groups. Other fragment ions namely m/z 411.1797 and 409.1671 corresponded to the benzophenone skeleton without the geranyl group and a part of the prenyl groups. The ion m/z 343.1187 was consistent with the benzophenone skeleton without the terpene moieties (Figs. 7 and 8). Based on these data, the structure of both isomeric compounds was assigned to be related to those of isoxanthochymol, isogarcinol, cycloxanthochymol, and cambogin. The chemical profile obtained from LCMS data (Table 1) prompted us to purify these fractions.

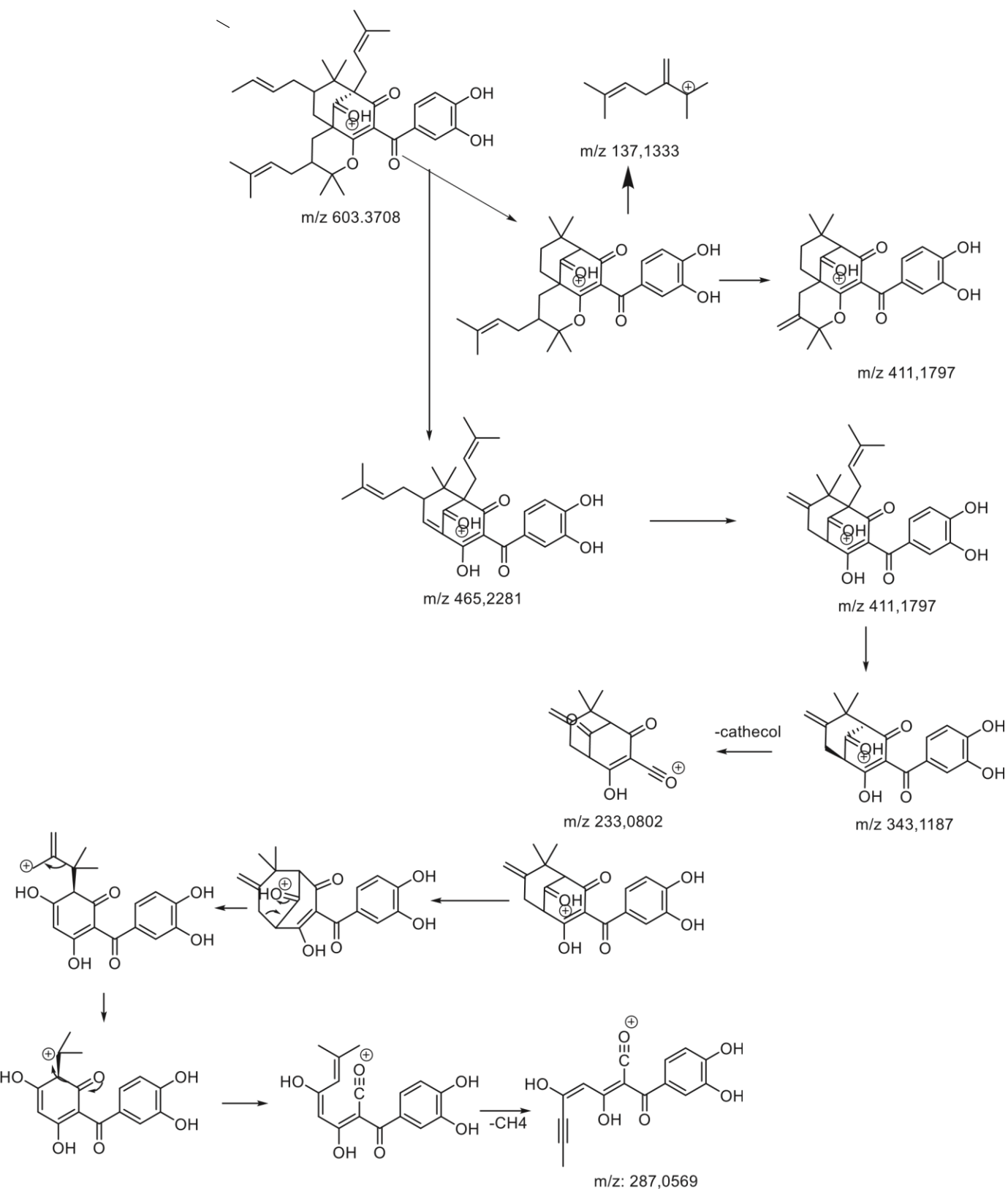


Fig. 7. Proposal of the fragmentation pattern of m/z 603.3708, t_R 12.40 min.

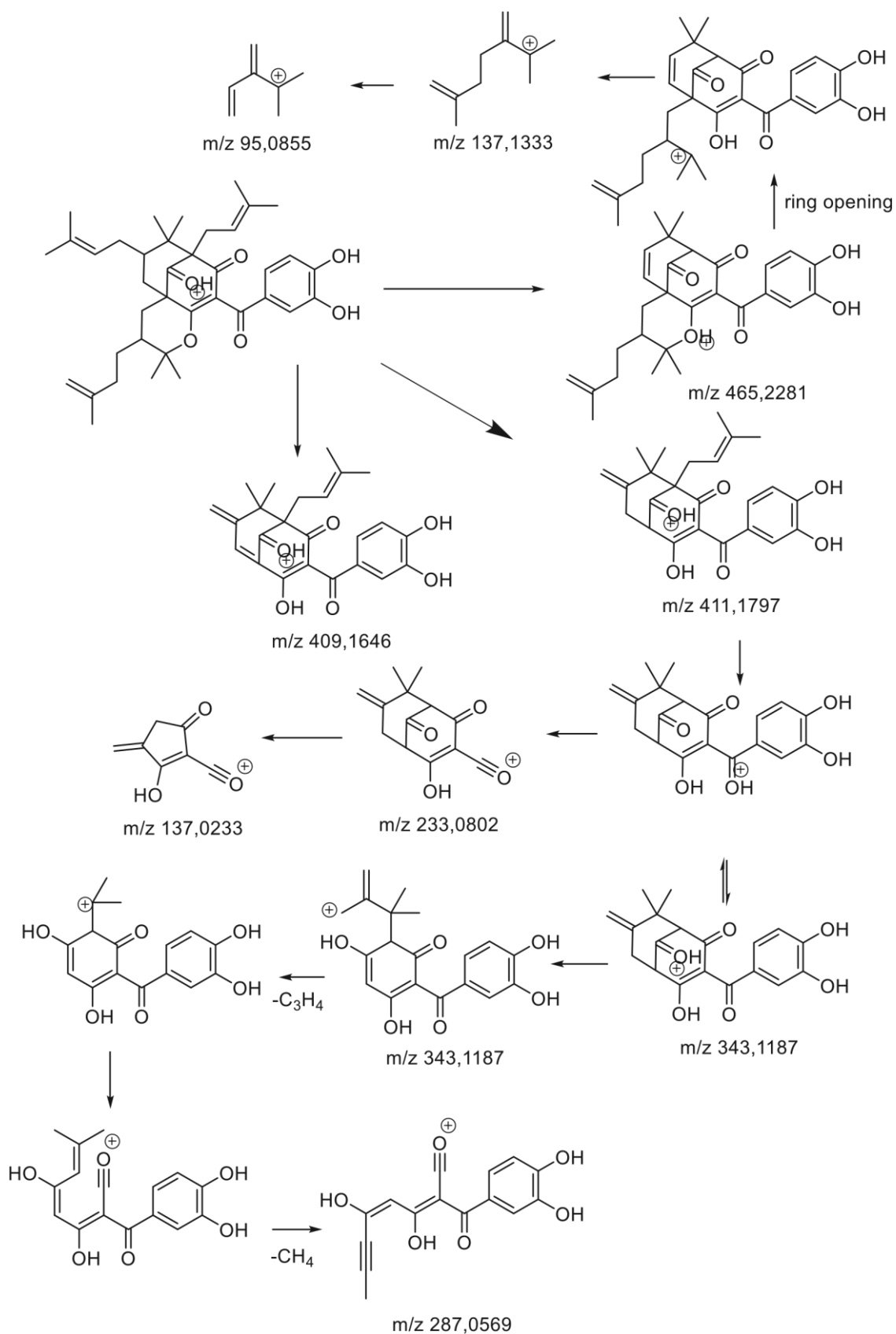


Fig. 8. Proposal of the fragmentation pattern of m/z 603.3708, t_R 14.08 min.

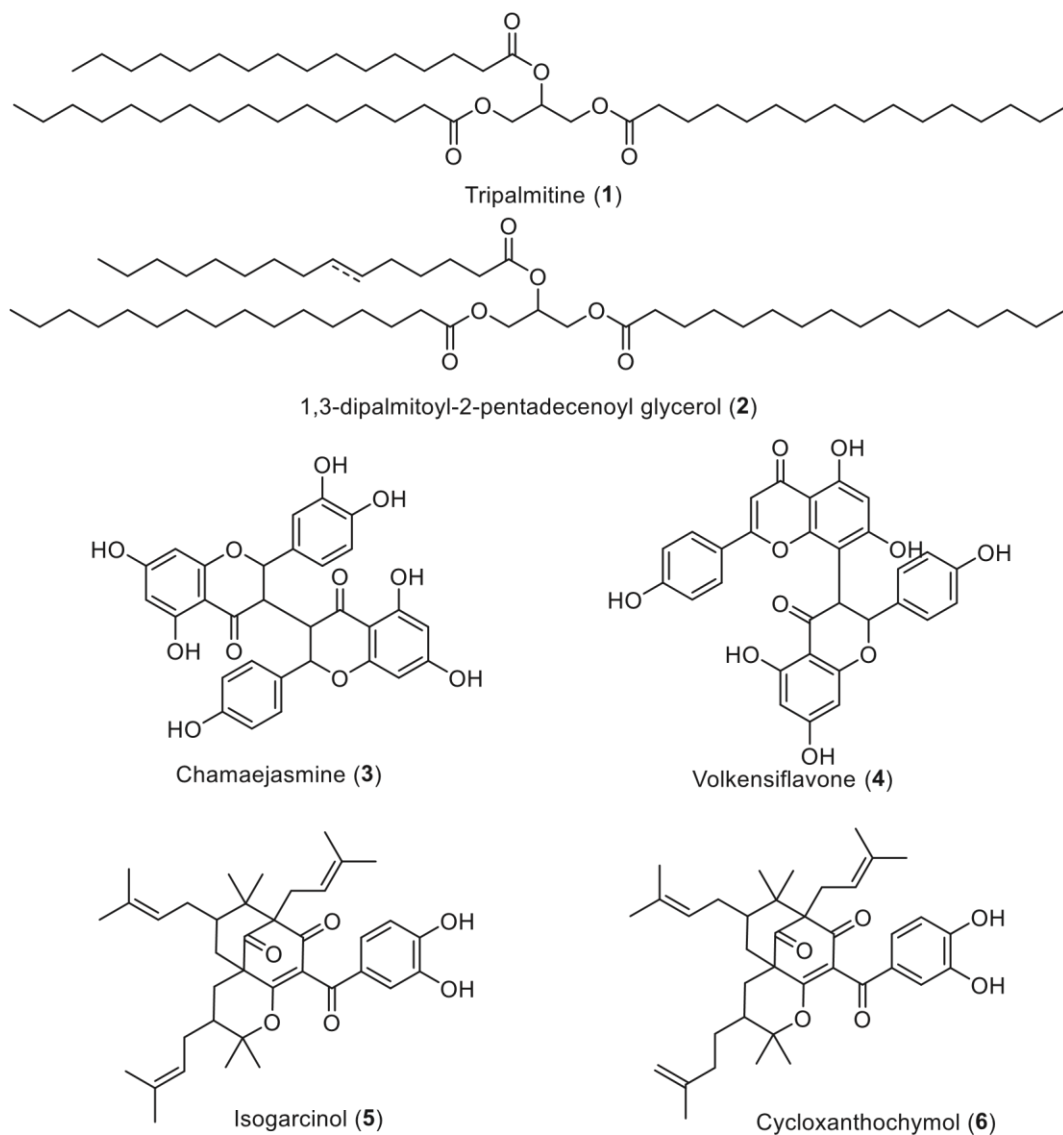


Fig. 9. Chemical structures of compounds obtained from *P. insignis*.

Table 2

Enzymatic inhibitory effect (IC₅₀) and Cytotoxicity (CC₅₀) of the active compounds.

Compounds	M ^{pro}		THP1	Vero
	Inhibition (%) at 200	IC ₅₀ ± SD (μM)	CC ₅₀ ± SD (μM)	
1	NI	NT	NT	NT
2	NI	NT	NT	NT
3	59.64	44.77 ± 13.45	>150	>150
4	3.60	NT	NT	NT
5	68.20	0.72 ± 0.43	116.2 ± 32	>150
6	60.19	9.83 ± 7.82	>150	>150
Ebselen (10	96	3.4 ± 0.995	NT	NT

NT: not tested. NI: no inhibition.

Successive chromatographic columns of hexane and DCM fractions of seeds and pulp led to the isolation and identification of tripalmitine (**1**) as the predominant compound and 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol

(**2**), respectively. Purification of both n-butanol fractions afforded 4 known compounds. Spectral data in conjunction with those reported in the literature allowed assigning their structures as

μM μM)

Table 3
Binding probability values of the compounds under study analyzed in the M^{PRO} of SARS-CoV-2 (PDB: 5RG1).

Compounds	MolDock Score		Rerank Score		PLANTS Score		P Total
	Score	(p)	Score	(p)	Score	(p)	
Isogarcinol	−163.569	1	−88.0758	1	−553.401	0.9462	0.9820
Nirmatrelvir	−153.294	0.9371	−85.2498	0.9679	−522.23	0.8929	0.9326
Lig PDB	−102.876	0.6289	−82.9804	0.9421	−555.301	0.9495	0.8401

Caption: Compounds with the highest probability value for the algorithm under study are highlighted in bold.

Table 4
Binding probability values of the compounds under study analyzed in the m-Protease of SARS-CoV-2 (PDB: 7NG3).

Compounds	MolDock Score		Rerank Score		PLANTS Score		P Total
	Score	(p)	Score	(p)	Score	(p)	
Isogarcinol	−114.942	0.7270	63.7221	0	−399.539	0.7376	0.4882
Nirmatrelvir	−130.007	0.8223	−67.5777	0.9750	−456.848	0.8434	0.8803
Lig PDB	−158.09	1	−69.3048	1	−541.624	1	1

Caption: compounds with the highest probability value for the algorithm under study are highlighted in bold.

Chamaejasmine (**3**) [13], Volkensiflavone (**4**) [14], isogarcinol (**5**) [15] and cycloxanthochymol (**6**) [16] (Fig. 9).

7.8.2 3.2. Biological part

Compounds **1–6** were evaluated for their inhibitory effects against SARS-CoV-2 M^{PRO} and their cytotoxicity against human leukaemia monocytic, THP-1 and the African Green Monkey kidney, Vero cell lines (Table 2). The enzymatic assays were performed at a concentration of 200 μ M for all compounds.

Compounds **3**, **5**, and **6** showed inhibitory percentages against M^{PRO} of 59.64, 68.20, and 60.19%, respectively. Compound **4** was weakly active while **1** and **2** displayed no activity. Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined for compounds that inhibited at least 50% of M^{PRO} at 200 μ M. Compound **5** was the most active with IC₅₀ of 0.72 ± 0.43 μ M, while compounds **3** and **6** showed IC₅₀ of 44.77 ± 13.45 and 9.83 ± 7.82 μ M, respectively. Isogarcinol (**5**) was more potent

than Ebselen (IC₅₀ value: 3.4 ± 0.995 μ M) used as the positive control. On their cytotoxic assays, compounds **3** and **6** were not cytotoxic to THP-1 and Vero cell lines up to 150 μ M whereas compound **5** showed weak cytotoxicity against THP-1 cell lines with CC₅₀ of 116.2 ± 32 μ M. In contrast, it was not cytotoxic to Vero cell lines up to 150 μ M.

7.8.3 3.3. Structure-activity relationship based on molecular docking

Compound **5**, the most active, was studied by molecular docking on two M^{PRO} protein structures (PDB entries 5RG1 [20] and 7NG3 [21]) to unveil possible interactions with the target. The data are compiled in Tables 3 and 4.

Isogarcinol (**5**) did not present negative binding energy for the Rerank Score algorithm on SARS-CoV-2 M^{PRO} (PDB: 7NG3). For PDB: 5RG1, it showed the highest potency with a probability of 0.9820 when compared to the PDB ligand and the control Nirmatrelvir, which presented a probability of 0.8401 and 0.9326, respectively.

The PDB Ligand displayed the highest affinity to PDB: 7NG3, with a probability of 1.0; Nirmatrelvir was the second highest affinity, with a probability value of 0.8803 followed by compound **5** with a probability of 0.4882. Based on these data, SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB: 5RG1) seems to reflect the results of the bioassays.

Therefore, molecular interactions (Fig. 10A) of Isogarcinol (**5**) with the SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB: 5RG1) were evaluated. Hydrophobic interactions (indigo dashed lines) were observed between CH₃ and CH₂ groups of the pyranogeranyl moiety and amino acids residues Pro 168 (1 interaction), Met 49 (2 interactions), His 41 (2 interactions), and Met 165 (2 interactions) [24]. Furthermore, unfavorable bump interactions (dashed line in red) were perceived between the hydrogen atom of the hydroxyl group (OH) and Phe 140 (1 interaction) and similarly between the CH₃ group and Met 165. An amide-pi-stacked (pink dashed line) and sulfur-pi-stacked interactions (yellow dashed line) were also found between the pi aromatic of the catechol moiety and Leu 141 and Cys 145, respectively. A hydrogen bond type (green dashed line) was observed between the ketone functionality of the benzophenone and Cys 145. It is worth noting that pi-alkyl type interactions indicate that there is an interaction of the electron cloud over an aromatic group and an electron group from any of the alkyl groups generating hydrophobic type bonds [30,31].

It is important to mention that interactions between His 41 residue (indigo dashed line) and CH₃ groups

of Isogarcinol were non-covalent and occurred with one of the catalytic dyads of the active site. Residues such as Met 49 and Pro 168 involved in the plasticity of the active site also interacted with Isogarcinol. Another important interaction corresponds to non-covalent interactions established by Met 165 residue in the hydrophobic pocket [20].

Furthermore, it is important to mention that Isogarcinol showed interactions similar to those of the control Nirmatrelvir (Fig. 10B) and the PDB ligand (Fig. 10C). Nirmatrelvir displayed pi-alkyl type interactions (dashed line in indigo) between CH₂ and CH₃ groups and His 163, His 172, and Met 49. It also interacted through hydrogen bonds (dashed lines in green) with Cys 145 and Glu 166. It also interacted with Met 165 by using pi-sulfur interactions.

The PDB ligand showed alkyl and pi-alkyl interactions (dashed lines in indigo) with His 41, Met 49, and Met 165 and pi-sulfur interactions (dashed lines in yellow) with Cys 145 and Asn 142. Hydrogen bond-type interactions (green dashed line) were also observed between the ligand and the amino acids residues His 163 and Glu 166. Leu 141 and the ligand were interacting by the amide-pi-stacked interaction type (pink dashed line).

Several phenolic compounds have been reported with inhibitory effects against SARS-CoV-2 M^{pro}. Agathisflavone, a biflavone isolated from *Anacardium occidentale*, showed a significant inhibition of SARS-CoV-2 on intracellular-based assays. This effect was related to the significant

inhibition of M^{pro} [32]. Amentoflavone, another biflavone from *Garcinia cambogia* displayed a moderate inhibition of SARS-CoV-2 M^{pro} [33]. A comparison of these literature data with those reported in this work revealed that, concerning M^{pro}, biflavone skeletons have more biological potential than biflavanones and flavonylflavanone (Chamaejasmine and Volkensiflavone). Two benzophenones namely 3,4-didesmethyl-5-deshydroxy-3'-ethoxyscleroïn and 2,3,4-trihydroxy-4'-ethoxybenzophenone, were previously reported as M^{pro} inhibitors [34]. However, their inhibitory effects were less promising than those reported for Isogarcinol in the present study. Isogarcinol interacted with the catalytic dyad (His 41 and Cyst 145) in PDB: 5RG1, suggesting its proximity to the catalytic site. However, further investigation is required to elucidate whether there is a covalent binding as Cyst 145 was hydrogen bonded to the ketone group of Isogarcinol.

7.9 4. CONCLUSION

The present study reports on biologically active secondary metabolites of the fruit of *P. insignis* obtained from the guidance of the LC-ESIMS chemical profile. Phytochemical studies of this edible fruit afforded alongside two fatty acid derivatives (tripalmitine and 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol), two bioflavonoids (Chamaejasmine and Volkensiflavone) and 2 benzophenones (isogarcinol and cycloxanthochymol). On their enzymatic assays against SARS-CoV-2 M^{pro}, Isogarcinol displayed the best inhibitory effects with $IC_{50} < 1 \mu M$. Its isomer, cycloxanthochymol displayed moderate activity. Docking studies revealed that compound **5** interacted with the catalytic dyad composed of His 41 and Cyst 145, suggesting its proximity with the catalytic site of M^{pro}.

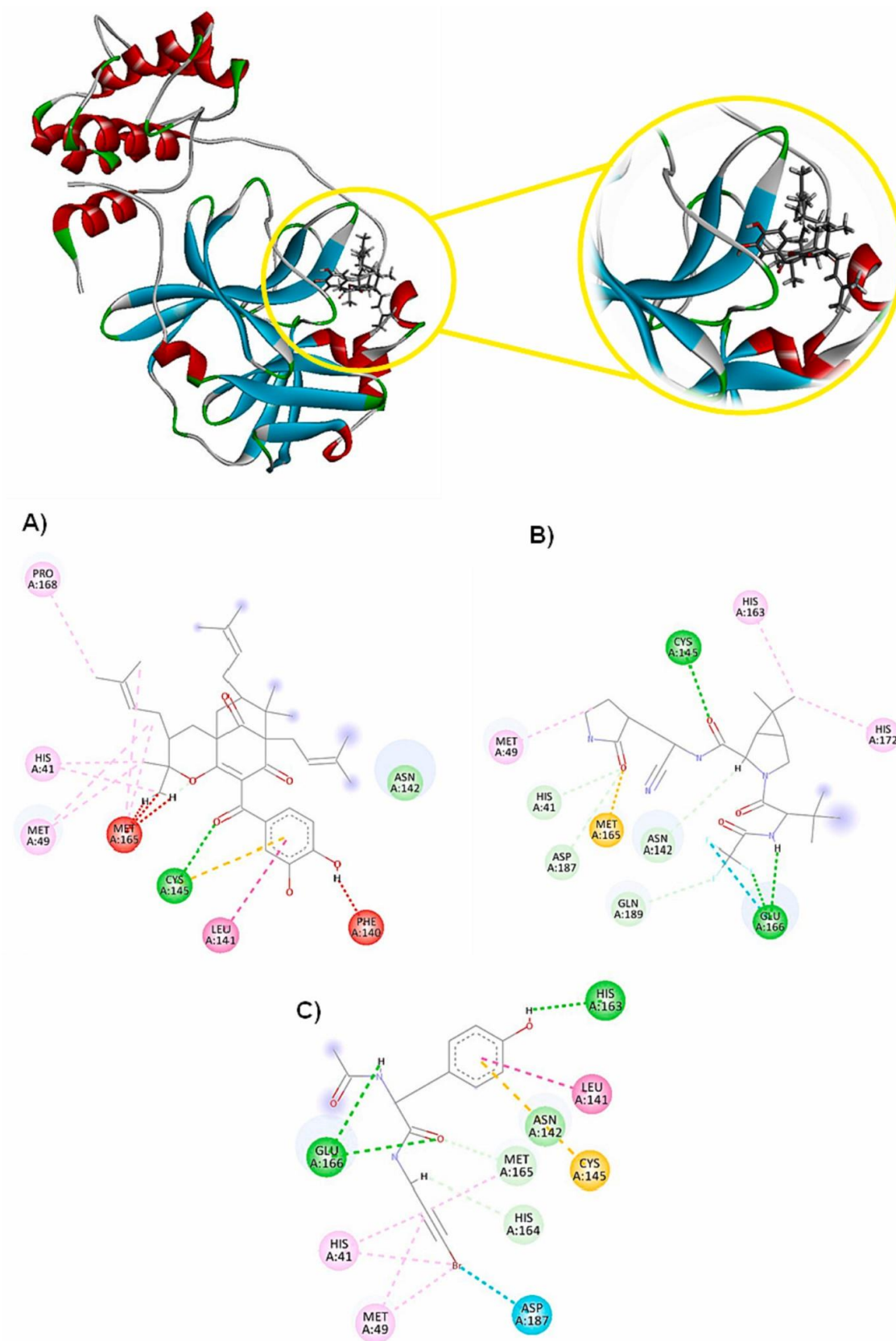


Fig. 10. 2D and 3D interactions of the compounds Isogarcinol (A), Nirmatrelvir (B) and PDB Ligand (C) with the target M-Protease (PDB: 5RG1). Indigo: Alkyl, pi-alkyl; Pink: amide pi-stacked interactions; Red: unfavorable bump interactions; Yellow: pi-sulfur interactions; blue: halogen interactions (Br, Cl and I). Residues: Pro (Proline), His (Histidine), Met (Methionine), Cys (Cysteine), Leu (Leucine), Phe (Phenylalanine), Asn (Asparagine), Asp (Aspartic Acid), Gln (Glutamine) and Glu

(glutamic acid). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

7.10 CREDIT AUTHORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Monalisa A. Moreira Costa: Investigation. **Natalia F. de Sousa:** Data curation. **Carime L. Mansur Pontes:** Data curation, Investigation. **Marcus T. Scotti:** Formal analysis, Software, Supervision. **Francisco F. de Assis:** Conceptualization, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Antonio L. Braga:** Conceptualization, Resources, Writing – review & editing. **Louis P. Sandjo:** Project administration, Supervision, Writing – original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

7.11 ACKNOWLEDGEMENTS

MAMC, CLMP, MTS, FFA, ALB, and LPS would like to thank CAPES, a research funding agency of the Brazilian Ministry of Education, for the financial support No 633/2020 from the call “CAPES- Farmacos e Imunologia Edital n° 011/2020”. LPS would also like to thank CNPq, another funding agency of the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation, for the productivity scholarship No 306653/2020-6.

7.12 REFERENCES

- [1] C. Wang, Z. Wang, G. Wang, Y.-N.L. Johnson, Z. Kang, L. Weimin, COVID-19 in early 2021: current status and looking forward, *Sig. Transduct. Target. Ther.* 6 (2021), <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00527-1>.
- [2] J.S. Tregoning, K.E. Flight, S.L. Higham, Z. Wang, B.F. Pierce, Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape, *Nat. Rev. Immunol.* 21 (2021) 626–636, <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00592-1>.
- [3] M. . Tahir ul Qamar, S.M. Alqahtani, M.A. Alamri, L.L. Chen, Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and Anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants, *J. Pharm. Anal.* 10 (2020) 313–319, <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.009>.
- [4] Q. Hu, Y. Xiong, G.H. Zhu, Y.N. Zhang, Y.W. Zhang, P. Huang, G.B. Ge, The SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}): structure, function, and emerging therapies for COVID-19, *Media Commun.* 3 (2020) e151, <https://doi.org/10.1002/mco2.151>.
- [5] S. Ullrich, C. Nitsche, The SARS-CoV-2 main protease as drug target, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 30 (2020) 127377, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127377>.
- [6] W. Zhang, S.-X. Lin, Search of novel small molecule inhibitors for the main protease of SARS-CoV-2, *Viruses* 15 (2023) 580, <https://doi.org/10.3390/v15020580>.
- [7] Portal EMBRAPA, *Platonia insignis*, in: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/184207/1/Bacuri-PROCISUR.pdf>.
- [8] K.K.L. Yamaguchi, C.V.L. Pereira, E.S. Lima, V.F. Veiga Junior, Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*), *Sci. Amazon.* 3 (2014) 39–46.
- [9] A.F. da Silva, C.Q. da Rocha, L.C.N. da Silva, A.R. Carvalho Júnior, I.N.F. V. Mendes, A.B. de Araruna, E.P. Motta, R.S. Silva, C.D.L. Campos, J.R. Farias, A.D. S. Oliveira, D.H.D.S. Silva, F.R.F. Nascimento, R.N.M. Guerra, C.A. Monteiro, Antifungal and antivirulence activities of hydroalcoholic extract and fractions of *Platonia insignis* leaves against vaginal isolates of *Candida* Species, *Pathogens* 9 (2020) 84, <https://doi.org/10.3390/pathogens9020084>.
- [10] D.D. Arcanjo, J.S. da Costa-Júnior, L.H. Moura, A.B. Ferraz, R.R. Rossatto, J. M. David, L.J. Quintans-Júnior, R. de Cassia Oliveira, A.M. Citó, A.P. de Oliveira, Garcinielliptone FC, a polyisoprenylated benzophenone from *Platonia insignis* Mart., promotes vasorelaxant effect on rat mesenteric artery, *Nat. Prod. Res.* 28 (2014) 923–927, <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.889136>.

- [11] J.S. Costa Júnior, A.A. de Almeida, A. de Barros Falcao Ferraz, R.R. Rossatto, T. G. Silva, P.B. Silva, G.C. Militao, A.M. das Graças Lopes Cito, L.C. Santana, F.A. de Amorim Carvalho, R.M. Freitas, Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinelliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*, *Nat. Prod. Res.* 27 (2013) 470–474, <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.695363>.
- [12] A.M. da Silva, A.L. Horsth, E. da Silva Timoteo, R. Faria, P.S. Bazoni, E.F. Meira, J. B.R. dos Santos, M.R.R. da Silva, Use of medicinal plants during COVID-19 pandemic in Brazil, *Sci. Rep.* 13 (2023) 16558, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43673-y>.
- [13] B. Feng, Y. Pei, H. Hua, T. Wang, Y. Zhang, Biflavonoids from *Stellera chamaejasme*, *Pharm. Biol.* 41 (2003) 59–61, <https://doi.org/10.1076/phbi.41.1.59.14701>.
- [14] V.M. Chari, M. Ilyas, H. Wagner, A. Neszemlyi, C. Fa-Ching, C. Li-Kuang, L. Yu-Meei, ¹³C-NMR spectroscopy of biflavonoids, *Phytochem.* 16 (1977) 1273–1278, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94373-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94373-5).
- [15] J. Cen, M. Shi, Y. Yang, Y. Fu, H. Zhou, M. Wang, Q. Wei, Isogarcinol is a new immunosuppressant, *PLoS One* 8 (2013) e66503, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066503>.
- [16] M. Iinuma, H. Tosa, T. Tanaka, S. Kanamaru, F. Asai, Y. Kobayashi, K. Miyauchi, R. Shimano, Antibacterial activity of some Garcinia benzophenone derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Biol. Pharm. Bull.* 19 (1996) 311–314, <https://doi.org/10.1248/bpb.19.311>.
- [17] O.L. Guterres Fernandes, T. Tizziani, B.P. Dambros, N. Ferreira de Sousa, C. L. Mansur Pontes, L.A.L. da Silva, L.A. Escorteganha Pollo, F.F. de Assis, M. T. Scotti, L. Scotti, A.L. Braga, M. Steindel, L.P. Sandjo, Studies of cytotoxicity effects, SARS-CoV-2 Main protease inhibition, and in silico interactions of synthetic Chalcones, *Chem. Biodivers.* 20 (2023) e202201151, <https://doi.org/10.1002/cbdv.202201151>.
- [18] D. Yusuf, A.M. Davis, G.J. Kleywegt, S. Schmitt, An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD, *J. Chem. Inf. Model.* 48 (2008) 1411–1422, <https://doi.org/10.1021/ci800084x>.
- [19] N. Schneider, S. Hindle, G. Lange, R. Klein, J. Albrecht, H. Briem, K. Beyer, H. Claußen, M. Gastreich, C. Lemmen, Substantial improvements in large-scale Redocking and screening using the novel HYDE scoring function, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 26 (2012) 701–723, <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9531-0>.
- [20] A. Douangamath, D. Fearon, P. Gehrtz, T. Krojer, P. Lukacik, C.D. Owen, E. Resnick, C. Strain-Damerell, A. Aimon, P. Abrany-Balogh, J. Brandao-Neto, A. Carbery, G. Davison, A. Dias, T.D. Downes, L. Dunnett, M. Fairhead, J.D. Firth, S.P. Jones, A. Keeley, G.M. Keserü, H.F. Klein, M.P. Martin, M.E.M. Noble, P. O'Brien, A. Powell, R.N. Reddi, R. Skyner, M. Snee, M.J. Waring, C. Wild, N. London, F. von Delft, M.A. Walsh, Crystallographic and electrophilic fragment screening of the SARS-CoV-2 main protease, *Nat. Commun.* 11 (2020) 5047, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18709-w>.
- [21] E. Costanzi, M. Kuzikov, F. Esposito, S. Albani, N. Demitri, B. Giabbai, M. Camasta, E. Tramontano, G. Rossetti, A. Zaliani, P. Storici, Structural and biochemical analysis of the dual inhibition of mg-132 against Sars-Cov-2 Main protease (Mpro/ 3CLpro) and human Cathepsin-L, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 11779, <https://doi.org/10.3390/ijms222111779>.
- [22] RCSB Protein Data Bank.
- [23] F.C. Bernstein, T.F. Koetzle, G.J.B. Williams, E.F. Meyer Jr., M.D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures, *Eur. J. Biochem.* 80 (1977) 319–324, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11885.x>.
- [24] N. Murshid, X. Wang, Hydrophobic effect of alkyl groups stabilizing self-assembled colloids in water, *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 6280–6285, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b04353>.
- [25] ChemAxon Marvin Sketch. <https://chemaxon.com/marvin>.
- [26] CLC Bio Company Mollegro Virtual Docker 6.0.
- [27] J. De Azevedo, F. Walter, MolDock applied to structure-based virtual screening, *Curr. Drug Targets* 11 (2010) 327–334, <https://doi.org/10.2174/138945010790711941>.
- [28] R. Thomsen, M.H. Christensen, MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3315–3321, <https://doi.org/10.1021/jm051197e>.
- [29] Biovia Accelrys Discovery Studio 3.5. <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>.
- [30] S.K. Singh, A. Das, The N→π* interaction: a rapidly emerging non-covalent interaction, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 9596–9612, <https://doi.org/10.1039/C4CP05536E>.
- [31] W.L.M. Alencar, T. da Silva Arouche, A.F.G. Neto, T. de Castro Ramalho, R.N. de Carvalho Júnior, A.M. de Jesus Chaves Neto, Interactions of co, cu, and non-metal Phthalocyanines with external structures of SARS-CoV-2 using docking and molecular dynamics, *Sci. Rep.* 12 (2022) 3316, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07396-w>.
- [32] O.A. Chaves, C.R. Lima, N. Fintelman-Rodrigues, C.Q. Sacramento, C.S. de Freitas, L. Vazquez, J.R. Temerozo, M.E.N. Rocha, S.S.G. Dias, N. Carels, P.T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, T.M.L. Souza, Agathisflavone, a natural biflavonoid that inhibits SARS-CoV-2 replication by targeting its proteases, *Int. J. Biol. Macromol.* 222 (2022) 1015–1026, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.204>.
- [33] H.Y. Aati, A. Ismail, M.E. Rateb, A.M. AboulMagd, H.M. Hassan, M.H. Hetta, *Garcinia cambogia* Phenolics as potent anti-COVID-19 agents: phytochemical profiling, biological activities, and molecular docking, *Plants (Basel)*. 11 (2022) 2521, <https://doi.org/10.3390/plants11192521>.
- [34] C. Coelho, G. Gallo, C.B. Campos, L. Hardy, M. Würtele, Biochemical screening for SARS-CoV-2 main protease inhibitors, *PLoS One* 15 (2020) e0240079, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240079>.



FULL PAPER

Inhibitory effects of 190 compounds against SARS-CoV-2 M^{Pro} protein: Molecular docking interactions

Gabriella B. Souza, Larissa Sens, Stefan J. Hammerschmidt, Natália F. de Sousa, Maryelle A. G. de Carvalho, Carlos V. D. Dos Santos, Tiago Tizziani, Monalisa A. Moreira, Luiz A. E. Pollo, Erlon F. Martin, José S. S. Neto, Maique W. Biavatti, Francisco F. de Assis, Bonaventure T. Ngadjui, Ingrid K. Simo, Pantaléon Ambassa, Marcus T. Scotti, Luciana Scotti, Antonio L. Braga, Tanja Schirmeister, Louis P. Sandjo ✉ ... See fewer authors ↗

First published: 31 May 2023 | <https://doi.org/10.1002/ardp.202300207> | Citations: 1

Journal of the
**Science of Food and
Agriculture**



Research Article

Anti-inflammatory and anti-aggregating effects of rangpur in the first trimester of growth: ultra-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry profile and quantification of hesperidin

Layzon A Lemos da Silva, Amanda E de Athayde, Monalisa A Moreira, Tiago Tizziani, Stephanie V Gkionis, Lucas V da Silva, Maique W Biavatti ... See all authors ↘

First published: 08 January 2022 | <https://doi.org/10.1002/jsfa.11764> | Citations: 1



Current Medicinal Chemistry

Editor-in-Chief >>

ISSN (Print): 0929-8673
ISSN (Online): 1875-533X

Back Journal ▾ Subscribe Translate in Chinese

Review Article

Natural Products with Tandem Anti-inflammatory, Immunomodulatory and Anti-SARS-CoV/2 Effects: A Drug Discovery Perspective against SARS-CoV-2

Author(s): Luana N.O. Leal da Cunha, Tiago Tizziani, Gabriella B. Souza, Monalisa A. Moreira, José S.S. Neto, Carlos V.D. dos Santos, Maryelle G. de Carvalho, Eduardo M. Dalmarco, Leonardo B. Turqueti, Marcus Tullius Scotti, Luciana Scotti, Francisco F. de Assis, Antonio Luiz Braga and Louis Pergaud Sandjo*

Volume 29, Issue 14, 2022

Page: [2530 - 2564]

Pages: 35

DOI: [10.2174/0929867328666210726094955](https://doi.org/10.2174/0929867328666210726094955)

Price: \$65

Purchase

PDF



Chapter

Poisonous Substances in Tropical Medicinal and Edible Plants: Traditional Uses, Toxicology, and Characterization by Hyphenated Mass Spectrometry Techniques

February 2022

DOI: [10.2174/9789815050059122020002](https://doi.org/10.2174/9789815050059122020002)

In book: Applications of Modern Mass Spectrometry: Volume 2 (pp.1-37)

Authors:



Amanda E. de Athayde



Monalisa A. Moreira



Gabriella B. Souza



Tiago Tizziani



Request full-text PDF

To read the full-text of this research, you can request a copy directly from the authors.