

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

JULIA MIHO TANAKA

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE *HUMIRIA BALSAMIFERA* ST. (AUBL.) HILL.
UTILIZANDO REDES MOLECULARES E PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE
CITOTÓXICA**



JULIA MIHO TANAKA

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE *HUMIRIA BALSAMIFERA* ST. (AUBL.) HILL.
UTILIZANDO REDES MOLECULARES E PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE
CITOTÓXICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP),
Instituto de Química, Araraquara, para
obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro Gamboa

Coorientadora: Dra. Ana Letícia Pires dos
Santos

T161i

Tanaka, Julia Miho

Investigação fitoquímica de *Humiria balsamifera* St. (Aubl.) Hill. utilizando redes moleculares e prospecção de atividade citotóxica / Julia Miho Tanaka. -- Araraquara, 2026

72 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Química) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Ian Castro Gamboa

Coorientadora: Ana Letícia Pires dos Santos

1. Produtos naturais. 2. Fitoquímica. 3. Metabolômica. 4. Citotoxicidade. 5. Câncer colorretal. I. Título.

JULIA MIHO TANAKA

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE *HUMIRIA BALSAMIFERA* ST. (AUBL.) HILL.
UTILIZANDO REDES MOLECULARES E PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE
CITOTÓXICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” (UNESP) Instituto de Química,
Araraquara, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em Química.

Data da defesa: 19/06/2026

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ANA LETICIA PIRES DOS SANTOS
Data: 26/06/2026 13:16:09-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr^a Ana Letícia Pires dos Santos

Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Documento assinado digitalmente
 JOAO LUIZ BRONZEL JUNIOR
Data: 26/06/2026 12:55:32-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr João Luiz Bronzel Júnior

Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Documento assinado digitalmente
 JULIANA RODRIGUES
Data: 26/06/2026 13:12:00-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr^a Juliana Rodrigues

Instituto de Química – UNESP, Araraquara

*Àqueles que caminharam ao meu lado durante esta jornada, pelo
apoio, pela paciência e pelo carinho.*

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho marca o encerramento de um ciclo muito importante da minha formação como química. Ao longo dessa trajetória, com desafios e aprendizados, contei com o apoio de várias pessoas, às quais expresso minha gratidão.

Primeiramente, agradeço à Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani, pela confiança e orientação de todos os projetos desenvolvidos em conjunto. Agradeço por ser uma inspiração para tantas mulheres cientistas, demonstrando sua dedicação e paixão pela pesquisa que confere à biodiversidade brasileira sua devida importância.

Ao Professor Dr. Ian Castro Gamboa, expresso minha sincera gratidão por ter aceitado contribuir com a orientação deste trabalho em sua etapa final. Seu apoio foi essencial para a continuidade e a conclusão desta pesquisa. Agradeço a generosidade e comprometimento dedicados a este processo.

Especialmente à Dra. Ana Letícia Pires dos Santos, agradeço por todos os anos trabalhando juntas em projetos e congressos. Sua generosidade, competência e comprometimento em ajudar tornaram essa trajetória muito mais enriquecedora e foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos colegas de grupo de pesquisa NuBBE e aos técnicos João, Juliana, Uenifer, Lidiane e Nivaldo, pelo companheirismo, dedicação e comprometimento com as atividades de pesquisa.

À minha família que mesmo a quase 300 km de distância nunca deixou de me apoiar, de estar presente, de ser minha base e de acreditarem nos meus sonhos. Muito obrigada por tanto.

Aos meus amigos, que ao longo dessa jornada se tornaram minha segunda família. Obrigada pelas experiências, parcerias, risadas, conselhos e pelas memórias construídas juntos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da minha bolsa de pesquisa.

Reconheço que palavras não são capazes de expressar completamente toda a gratidão que sinto por todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, mas espero que ela possa ser percebida, ao menos em parte, nestes agradecimentos.

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less."

— Marie Curie

RESUMO

Humiria balsamifera St. (Aubl.) Hill. é uma espécie da família Humiriaceae utilizada na medicina popular no manejo de condições inflamatórias, metabólicas e degenerativas. Este trabalho investigou o perfil químico de extratos de folhas e caule obtidos em diferentes etapas extrativas, utilizando UHPLC-QTOF-MS, redes moleculares e análises multivariadas, além de avaliar a atividade citotóxica dos extratos e compostos isolados. A análise química permitiu a anotação preliminar de 18 metabólitos em modo positivo, com predominância de flavonoides O- e C-glicosilados, agliconas flavonoídicas e compostos relacionados à bergenina. As redes moleculares e as análises estatísticas indicaram que o órgão vegetal e a etapa extrativa considerada estiveram associados a diferenças na composição das amostras, com maior diversidade de flavonoides nos extratos foliares e maior destaque relativo da bergenina e de compostos relacionados no caule obtido na etapa com acetato de etila. A partir dessa amostra, a bergenina foi isolada e caracterizada por espectrometria de massas de alta resolução e RMN a 600 MHz, em concordância com dados da literatura. Embora o isolamento da bergenina a partir de *H. balsamifera* já tenha sido previamente descrito, o presente trabalho amplia esse conhecimento ao obtê-la a partir do caule e ao empregar metodologias analíticas de maior resolução para sua caracterização. Compostos compatíveis com galoilbergenina e hidroxibenzoilbergenina também foram detectados, sem confirmação estrutural por limitação de material. Na triagem citotóxica frente à linhagem HCT-116, os extratos brutos apresentaram atividade limitada, enquanto os compostos isolados exibiram efeito antiproliferativo mais pronunciado nas condições avaliadas, com a bergenina atingindo inibição superior a 97% a 50 µg.mL⁻¹. A bergenina apresentou resposta dependente do modelo celular, com efeito moderado em MCF-7, ausência de inibição expressiva em MDA-MB-231 e baixa citotoxicidade em células não tumorais RPE-1. Em conjunto, os resultados demonstram que *H. balsamifera* apresenta composição química diversificada e potencial como fonte de metabólitos bioativos, destacando a bergenina como marcador químico relevante e composto de interesse para investigações futuras.

Palavras-chave: *Humiria balsamifera*; produtos naturais; redes moleculares; bergenina; citotoxicidade.

ABSTRACT

Humiria balsamifera St. (Aubl.) Hill. is a species of the Humiriaceae family used in traditional medicine for the management of inflammatory, metabolic, and degenerative conditions. This study investigated the chemical profile of leaf and stem extracts obtained at different extraction stages using UHPLC-QTOF-MS, molecular networking, and multivariate analyses, in addition to evaluating the cytotoxic activity of the extracts and isolated compounds. Chemical analysis enabled the preliminary annotation of 18 metabolites in positive ion mode, predominantly O- and C-glycosylated flavonoids, flavonoid aglycones, and compounds related to bergenin. Molecular networking and statistical analyses indicated that the plant organ and the extraction stage considered were associated with differences in sample composition, with greater flavonoid diversity in leaf extracts and a higher relative prominence of bergenin and related compounds in the stem sample obtained at the ethyl acetate stage. From this sample, bergenin was isolated and characterized by high-resolution mass spectrometry and 600 MHz NMR, in agreement with literature data. Although the isolation of bergenin from *H. balsamifera* has been previously reported, the present study expands this knowledge by obtaining the compound from the stem and by employing higher-resolution analytical methodologies for its characterization. Compounds compatible with galloylbergenin and hydroxybenzoylbergenin were also detected, although structural confirmation was not possible due to limited material. In cytotoxic screening against HCT-116 cells, crude extracts showed limited activity, whereas isolated compounds exhibited more pronounced antiproliferative effects under the tested conditions, with bergenin achieving inhibition greater than 97% at 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Bergenin displayed a cell model-dependent response, with moderate effect in MCF-7, no expressive inhibition in MDA-MB-231, and low cytotoxicity toward non-tumor RPE-1 cells. Overall, the results demonstrate that *H. balsamifera* presents a diverse chemical composition and potential as a source of bioactive metabolites, highlighting bergenin as a relevant chemical marker and a compound of interest for future investigations.

Keywords: *Humiria balsamifera*; natural products; molecular networking; bergenin; cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ramos de *Humiria balsamifera* St. (Aubl.) Hill. com folhas, inflorescências e frutos imaturos..... 16
- Figura 2** - Estrutura química da bergenina. Numeração segundo a IUPAC..... 17
- Figura 3** - Esquema do perfil biológico descrito para a bergenina na literatura. 18
- Figura 4** - Fluxo analítico empregado para a investigação química de extratos vegetais, integrando LC-MS/MS, molecular networking, análises multivariadas, priorização de compostos e etapas subsequentes de isolamento e avaliação biológica. 20
- Figura 5** - *Molecular networking* por GNPS2 dos extratos de *H. balsamifera*. *C: caule; F: folhas..... 36
- Figura 6** - Gráficos das análises multivariadas dos extratos de folhas e caule de *H. balsamifera*: **(A)** Análise de Componentes Principais (PCA); **(B)** Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA); **(C)** Importância das Variáveis na Projeção (VIP). *C: caule; F: folhas. 39
- Figura 7** - Percentual de inibição do crescimento celular da linhagem HCT-116 frente aos extratos de *H. balsamifera* (*C: caule; F: folhas) e ao controle positivo (doxorrubicina), testados nas concentrações de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A CI_{50} da doxorrubicina calculada para a linhagem HCT-116 foi de 0,16 μM (IC 95%: 0,06–0,39). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo funcional para confirmar a responsividade do ensaio, em concentração capaz de induzir efeito citotóxico robusto. Valores expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). 44
- Figura 8** - Gráfico de inibição do crescimento celular (%) dos compostos isolados de *H. balsamifera* contra células HCT-116 tratadas com bergenina, P3, P4 e o controle positivo doxorrubicina. A CI_{50} da doxorrubicina calculada para a linhagem HCT-116 foi de 0,16 μM (IC 95%: 0,06–0,39). Os tratamentos foram realizados na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. *C: caule; F: folhas. 45
- Figura 9** - Gráfico de inibição do crescimento celular (%) dos compostos isolados de *H. balsamifera* contra células RPE-1 tratadas com bergenina e o controle positivo

doxorubicina. A CI_{50} da doxorubicina calculada para a linhagem RPE-1 foi de 0,35 μM (IC 95%: 0,11–0,98). Os tratamentos foram realizados nas concentrações de 5 e 50 $\mu g.mL^{-1}$. Os dados são apresentados em box *plots*, indicando a mediana, o intervalo interquartil e os valores individuais. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo funcional para validar a responsividade do ensaio e não se destina a comparações quantitativas diretas com os compostos testados. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). *C: caule; F: folhas.47

Figura 10 - Perfil cromatográfico do extrato de caule obtido com AcOEt no modo preparativo.57

Figura 11 - Perfil cromatográfico do extrato de folhas obtido com AcOEt no modo preparativo.57

Figura 12 – Branco no modo analítico a 254 nm.58

Figura 13 - Perfil cromatográfico do Extrato Metanólico do Caule no modo analítico a 254 nm (C_MeOH).58

Figura 14 - Perfil cromatográfico do Extrato Etanólico do Caule no modo analítico a 254 nm (C_EtOH).59

Figura 15 - Perfil cromatográfico do Extrato de Acetato de Etila do Caule no modo analítico a 254 nm (C_AcOEt).59

Figura 16 - Perfil cromatográfico do Extrato Metanólico de Folha no modo analítico a 254 nm (F_MeOH).60

Figura 17 - Perfil cromatográfico do Extrato Etanólico de Folha no modo analítico a 254 nm (F_EtOH).60

Figura 18 - Perfil cromatográfico do Extrato de Acetato de Etila de Folha no modo analítico a 254 nm (F_AcOEt)61

Figura 19 - Perfil do extrato C_AcOEt obtido por UHPLC-Q TOF-MS.61

Figura 20 - Perfil do extrato EtOH obtido por UHPLC-Q TOF-MS.62

Figura 21 - Perfil do extrato F_AcOEt obtido por UHPLC-Q TOF-MS.62

Figura 22 - Perfil do extrato F_EtOH obtido por UHPLC-Q TOF-MS.63

Figura 23 - Perfil do extrato C_MeOH obtido por UHPLC-Q TOF-MS.....	63
Figura 24 - Perfil do extrato F_MeOH obtido por UHPLC-Q TOF-MS.	64
Figura 25 - Perfil do branco obtido por UHPLC-Q TOF-MS.....	64
Figura 26 - Perfil da amostra P1 (1,6 min) obtido por UHPLC-Q TOF-MS.	65
Figura 27 - Perfil de fragmentação do pico 329,11 (<i>m/z</i>) presente na amostra P1 obtido por UHPLC-Q TOF-MS/MS.	65
Figura 28 - Perfil da amostra P2 (1,9 min) obtido por UHPLC-Q TOF-MS.	66
Figura 29 - Perfil de fragmentação do pico 481,10 (<i>m/z</i>) presente na amostra P2 obtido por UHPLC-Q TOF-MS/MS.	66
Figura 30 - Perfil da amostra P3 (2,2 min) obtido por UHPLC-Q TOF-MS.	67
Figura 31 - Perfil de fragmentação do pico 465,11 (<i>m/z</i>) presente na amostra P3 obtido por UHPLC-Q TOF-MS/MS.	67
Figura 32 - Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) da bergenina (1).	68
Figura 33 - Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) da bergenina (1) ampliado.	69
Figura 34 - Espectro de RMN ¹³ C (150 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) da bergenina (1) ampliado.	70
Figura 35 - Espectro COSY (600 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) da bergenina (1).	71
Figura 36 - Espectro HSQC (600 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) da bergenina (1).	72
Figura 37 - Espectro HMBC (600 MHz, CD ₃ OD- <i>d</i> ₄) da bergenina (1).	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da análise pela Plataforma GNPS2 dos padrões de fragmentação MS/MS. *C:Caule; F:Folhas.	31
Tabela 2 - Dados experimentais e da literatura de RMN de ^1H e ^{13}C da bergenina (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, J em Hz).	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

AcOEt – Acetato de Etila

DAD – Detector por Arranjo de Diodos

DMEM/F-12 – *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EPM – Erro Padrão da Média

GNPS – *Global Natural Products Social Molecular Networking*

HCT-116 – Linhagem Celular de Carcinoma Colorretal Humano

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

IC₅₀ – Concentração Inibitória Média

MCF-7 – Linhagem Celular de Adenocarcinoma Mamário Humano

MDA-MB-231 – Linhagem Celular de Adenocarcinoma Mamário Humano

MS – Espectrometria de Massas

MS/MS – Espectrometria de Massas sequencial

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PCA – Análise de Componentes Principais

PLS-DA – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

RPE-1 – Linhagem Celular de Epitélio Pigmentar da Retina Humana

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TR – Tempo de Retenção

UHPLC-QTOF-MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas com analisador Quadrupolo-Tempo de Voo

VIP – Importância das Variáveis na Projeção

¹H RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

¹³C RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Produtos naturais	15
1.2 Família Humiriaceae e a espécie <i>Humiria balsamifera</i>	15
1.3 Bergenina	17
1.4 Redes moleculares em química de produtos naturais	19
1.5 Atividade citotóxica e câncer colorretal	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Material vegetal	25
3.2 Obtenção dos extratos	25
3.3 Fracionamento, purificação e isolamento	25
3.4 Análises cromatográficas e espectrométricas	26
3.5 Processamento dos dados e construção das redes moleculares	27
3.6 Análise multivariada	28
3.7 Elucidação estrutural da substância isolada	29
3.8 Avaliação da atividade citotóxica	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Perfil químico dos extratos de <i>H. balsamifera</i>	31
4.2 <i>Molecular networking</i> e anotação preliminar dos metabólitos	35
4.3 Influência do órgão vegetal e do solvente de extração sobre a composição química	38
4.4 Isolamento e identificação da bergenina	41
4.5 Avaliação citotóxica dos extratos e compostos isolados	44
4.6 Resposta biológica da bergenina e considerações sobre seletividade	47
5 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE A – PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS E ESPECTROS DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO	57
APÊNDICE B – ESPECTROS DOS EXPERIMENTOS DE RMN ¹H E ¹³C DA BERGENINA	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais

Produtos naturais são compostos biossintetizados por diferentes grupos de organismos vivos, como plantas, fungos e bactérias, e desempenharam papel fundamental no desenvolvimento da civilização humana ao longo da história (SOROKINA; STEINBECK, 2020). Substâncias obtidas de fontes naturais foram amplamente empregadas no tratamento de enfermidades e continuam a exercer influência decisiva sobre a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Mesmo em contextos mais recentes, como o da pandemia de COVID-19, compostos de origem natural demonstraram relevância farmacológica, com relatos de atividade antiviral em estratégias preventivas e terapêuticas (BOOZARI; HOSSEINZADEH, 2021). Nesse cenário, destacam-se também estudos desenvolvidos no Brasil envolvendo peptídeos análogos derivados de veneno de serpente com atividade inibitória frente ao SARS-CoV-2 e à protease viral PLpro, evidenciando o potencial de biomoléculas naturais na prospecção de agentes antivirais (NOGUEIRA *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a biodiversidade assume papel central na prospecção de moléculas bioativas. O Brasil destaca-se como um dos principais centros de biodiversidade do planeta, abrigando cerca de 20% das espécies conhecidas, com expressiva diversidade de fauna, flora e microrganismos (MMA, 2024). Essa riqueza biológica constitui um reservatório de substâncias quimicamente diversas e biologicamente relevantes, muitas das quais permanecem pouco exploradas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico. Assim, o estudo de espécies nativas brasileiras representa uma abordagem promissora para a identificação de metabólitos secundários com potencial aplicação biotecnológica e terapêutica (MANNOCHIO-RUSSO *et al.*, 2023).

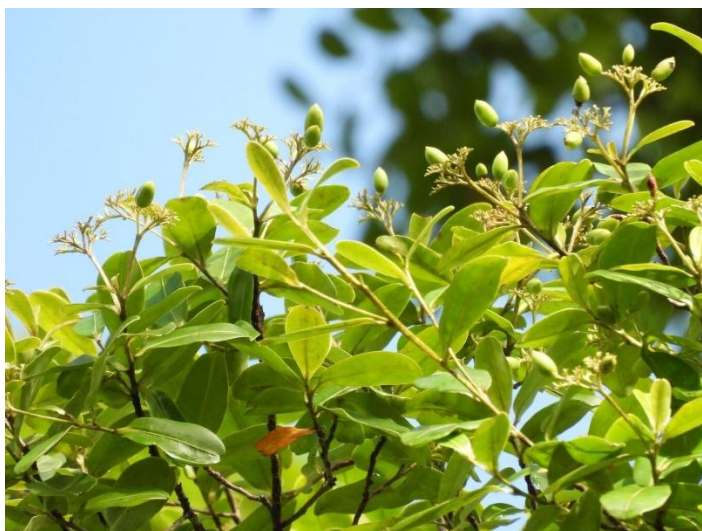
1.2 Família Humiriaceae e a espécie *Humiria balsamifera*

A família Humiriaceae é constituída por oito gêneros: *Duckesia*, *Endopleura*, *Humiria*, *Humirastrum*, *Hylocara*, *Sacoglottis*, *Schistostemon* e *Vantanea* (MARQUES, 2019). Entre eles, o gênero *Humiria* reúne espécies de interesse

botânico e etnofarmacológico, cujos representantes são reconhecidos, entre outras características, pela resistência e durabilidade de sua madeira (MARQUES, 2019).

Dentre as espécies pertencentes a esse gênero, destaca-se *Humiria balsamifera* St. (Aubl.) Hill. (**Figura 1**), conhecida popularmente como mirim ou umiri. A espécie é utilizada na medicina popular e tem sido associada ao manejo de enfermidades crônicas, como diabetes, obesidade e distúrbios degenerativos (DIAS *et al.*, 2021). Esse uso tradicional tem despertado interesse científico e motivado investigações voltadas à caracterização de sua composição química e de seu potencial biológico.

Figura 1 - Ramos de *Humiria balsamifera* St. (Aubl.) Hill. com folhas, inflorescências e frutos imaturos.



Fonte: PLOUVIER, 2025.

Estudos anteriores demonstraram que *H. balsamifera* apresenta diferentes atividades biológicas, incluindo propriedades antifúngica (MARQUES, 2019), antimalárica (DA SILVA *et al.*, 2004), anti-inflamatória (CARNEIRO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2009), antioxidante (DUTRA *et al.*, 2013) e antimicrobiana (DIAS *et al.*, 2021). Em conjunto, esses resultados reforçam a relevância da espécie como fonte de compostos bioativos e justificam a continuidade de investigações químicas e farmacológicas mais aprofundadas.

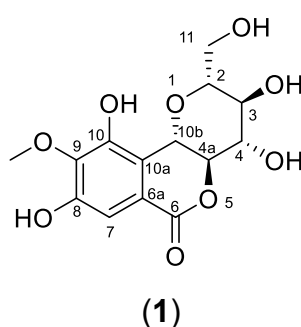
Do ponto de vista fitoquímico, trabalhos anteriores relataram a presença, em *H. balsamifera*, de diferentes classes de metabólitos secundários. Entre os compostos já descritos encontram-se triterpenos, como ácido arjunólico, friedelina, α -amirina, β -

amirina e lupeol; um diterpeno, o fitol; sesquiterpenoides, como óxido de cariofileno e trans-isolongifolenona; fitoesteróis, como sitosterol e estigmasterol; flavonóis, como quercetina e kaempferol; o flavano galocatequina; o isoflavonoide soforicosídeo; a flavona vitexina; além de isocumarinas, como bergenina, galoilbergenina e hidroxibenzoilbergenina (DA SILVA *et al.*, 2004; DIAS *et al.*, 2021). Entre esses metabólitos, a bergenina tem despertado interesse crescente em razão de seu amplo perfil biológico e de sua recorrência em estudos voltados à prospecção de compostos farmacologicamente promissores (SALIMO *et al.*, 2023).

1.3 Bergenina

A bergenina (**Figura 2**) é uma isocumarina de fórmula molecular $C_{14}H_{16}O_9$, massa molar de $328,27 \text{ g mol}^{-1}$ e relação massa/carga (m/z) relacionada à molécula protonada $[M+H]^+$ em 329,0863. Trata-se de um metabólito secundário amplamente distribuído no reino vegetal, já reportado em pelo menos 112 espécies pertencentes a 34 famílias botânicas, entre elas a Humiriaceae. Estruturalmente, a bergenina apresenta um núcleo isocumarínico ligado a uma unidade glicídica e múltiplos grupos hidroxila, características que estão associadas à sua elevada polaridade e influenciam seu comportamento em sistemas extrativos e analíticos (SALIMO *et al.*, 2023).

Figura 2 - Estrutura química da bergenina. Numeração segundo a IUPAC.

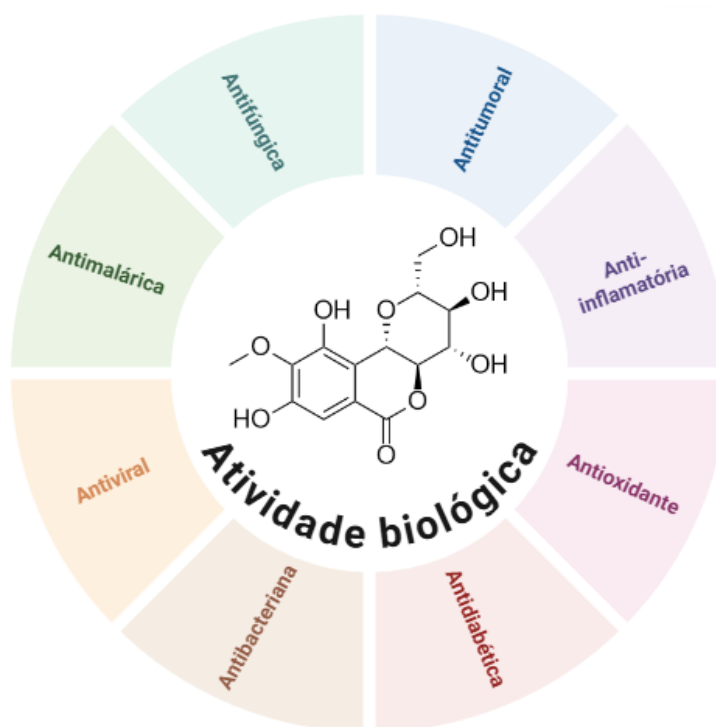


Fonte: Autoria própria.

Do ponto de vista farmacológico, a bergenina apresenta amplo espectro de atividades biológicas descritas na literatura, incluindo propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, antimalárica, antibacteriana, antiviral, antifúngica e anticâncer (BAJRACHARYA, 2015; SALIMO *et al.*, 2023), conforme sintetizado na

Figura 3. Esse conjunto de efeitos torna a substância particularmente relevante na prospecção de compostos bioativos em espécies medicinais.

Figura 3 - Esquema do perfil biológico descrito para a bergenina na literatura.



Fonte: Autoria própria com base em Bajracharya (2015) e Salimo *et al.* (2023).

No contexto oncológico, Gao *et al.* (2017) demonstraram que a bergenina foi capaz de suprimir o crescimento de células de adenocarcinoma colorretal humano HCT-116 por meio da modulação da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR. Embora a atividade antitumoral da bergenina possa variar de acordo com o modelo biológico avaliado, esse achado evidencia o interesse do composto como alvo de investigação em ensaios de citotoxicidade e seletividade celular.

No âmbito da família Humiriaceae, a presença de bergenina já havia sido relatada em *H. balsamifera* (DA SILVA *et al.*, 2004), *Endopleura uchi* e *Sacoglottis gabonensis* (NUNOMURA *et al.*, 2009; MADUKA *et al.*, 2002). O isolamento da bergenina a partir de *H. balsamifera* foi previamente descrito por Da Silva *et al.* (2004), que obtiveram o composto por cromatografia em gel de permeação e recristalização a partir de extratos de folhas. O presente trabalho complementa esse conhecimento ao caracterizar a bergenina por UHPLC-QTOF-MS e RMN de alta resolução (600

MHz, CD₃OD-*d*₄), e ao avaliar, pela primeira vez para a espécie, seu potencial citotóxico frente a linhagens tumorais e não tumorais.

1.4 Redes moleculares em química de produtos naturais

A investigação química de extratos vegetais envolve matrizes de alta complexidade constituídas por ampla diversidade de substâncias, o que torna a anotação de metabólitos um desafio analítico relevante. Nesse contexto, abordagens metabolômicas baseadas em espectrometria de massas de alta resolução têm assumido papel de destaque, especialmente quando associadas a ferramentas computacionais capazes de organizar e interpretar grandes volumes de dados (RAMOS *et al.*, 2019; PILON *et al.*, 2021; SOROKINA; STEINBECK, 2020).

Entre essas abordagens, as redes moleculares (*molecular networking*) têm se consolidado como estratégia para a química de produtos naturais por permitir organizar dados de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) com base na similaridade entre perfis de fragmentação, partindo do princípio de que compostos estruturalmente relacionados tendem a gerar espectros semelhantes. Como consequência, torna-se possível visualizar famílias moleculares, reconhecer padrões estruturais e ampliar a eficiência da anotação química em misturas complexas (WANG *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2019).

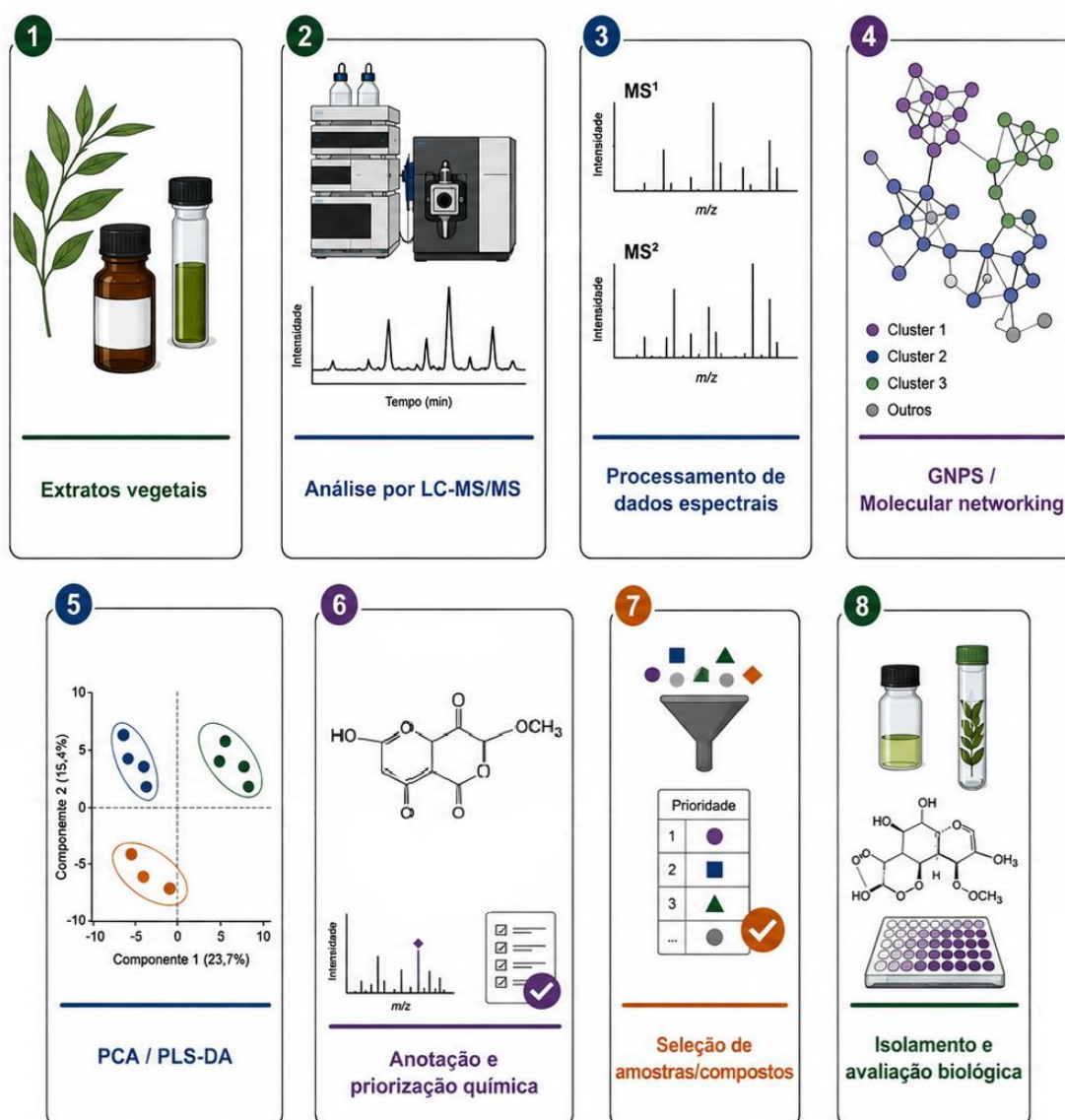
A plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) destaca-se entre as principais ferramentas utilizadas para essa finalidade (PILON *et al.*, 2021). Nessa plataforma, os nós da rede correspondem a espectros individuais, enquanto as conexões entre eles são estabelecidas de acordo com o grau de similaridade espectral, geralmente expresso pelo *cosine score*. Esse tipo de organização favorece a identificação de compostos conhecidos por comparação com bibliotecas espectrais e, adicionalmente, permite propor relações estruturais entre metabólitos ainda não confirmados (PILON *et al.*, 2021; NOTHIAS *et al.*, 2020).

No estudo de extratos vegetais, tal abordagem tem se mostrado relevante por possibilitar a visualização integrada do perfil químico, a identificação de marcadores metabólicos e a priorização de compostos para isolamento com base em critérios químicos e estatísticos (MANNOCHIO-RUSSO *et al.*, 2020). Quando associada a análises multivariadas, como Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), essa estratégia permite

correlacionar a composição química com variáveis experimentais, como órgão vegetal e solvente de extração, ampliando o poder interpretativo dos dados obtidos (RAMOS *et al.*, 2019; MANNOCHIO-RUSSO *et al.*, 2020).

De modo geral, essa abordagem integrada compreende: obtenção dos extratos, aquisição de dados por LC-MS/MS, processamento espectral, construção das redes moleculares, análise estatística multivariada e, por fim, seleção racional de alvos para isolamento e avaliação biológica, como ilustrado na **Figura 4**.

Figura 4 - Fluxo analítico empregado para a investigação química de extratos vegetais, integrando LC-MS/MS, molecular networking, análises multivariadas, priorização de compostos e etapas subsequentes de isolamento e avaliação biológica.



Fonte: Autoria própria com base em Ramos *et al.* (2019), Pilon *et al.* (2021) e Mannocho-Russo *et al.* (2020).

1.5 Atividade citotóxica e câncer colorretal

Os produtos naturais constituem uma fonte historicamente relevante de moléculas bioativas com potencial aplicação no desenvolvimento de agentes antitumorais. Diversos compostos de origem natural, bem como seus derivados semissintéticos, tiveram papel determinante na quimioterapia antineoplásica, o que justifica o contínuo interesse pela triagem farmacológica de extratos e substâncias isoladas provenientes de espécies vegetais (NEWMAN; CRAGG, 2020; MANNOCHIO-RUSSO *et al.*, 2023).

Entre os modelos celulares mais empregados em estudos preliminares de citotoxicidade, destaca-se a linhagem de carcinoma colorretal humano HCT-116, amplamente utilizada na avaliação do potencial anticâncer de extratos e metabólitos isolados (GAO *et al.*, 2017). O câncer colorretal, por sua vez, figura entre os tipos de câncer de maior incidência e mortalidade no Brasil e no mundo, constituindo importante problema de saúde pública (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2024). Nesse sentido, a busca por substâncias capazes de modular a viabilidade de células tumorais desse tipo apresenta elevada relevância biomédica.

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* é frequentemente realizada por meio do ensaio de redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], método colorimétrico amplamente validado para a quantificação da viabilidade celular *in vitro* (MOSMANN, 1983). A partir desse ensaio, é possível estimar a resposta celular frente a extratos e compostos isolados, fornecendo uma triagem inicial para a identificação de amostras com potencial biológico relevante (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Além da intensidade da resposta citotóxica, a seletividade é um parâmetro central na avaliação de compostos com potencial antitumoral. Essa característica corresponde à capacidade de inibir preferencialmente o crescimento de células tumorais, causando menor toxicidade a células não tumorais. Dessa forma, a investigação frente a linhagens saudáveis, como células epiteliais de pigmento retiniano humano (RPE-1), torna-se fundamental para a caracterização preliminar do perfil de segurança de substâncias bioativas e para a interpretação mais criteriosa de seu potencial farmacológico (NEWMAN; CRAGG, 2020; SALIMO *et al.*, 2023).

Considerando a biodiversidade brasileira, o potencial farmacológico já atribuído a *H. balsamifera* e a relevância da bergenina como marcador de interesse, o presente trabalho foi delineado para investigar o perfil químico dos extratos da espécie, empregar redes moleculares e análises estatísticas na anotação dos metabólitos, isolar a bergenina e avaliar, preliminarmente, a atividade citotóxica em modelos tumorais e não tumorais.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo investigar a composição química dos extratos de *Humiria balsamifera* St. (Aubl.) Hill. obtidos a partir de diferentes solventes por meio de UHPLC-QTOF-MS, empregando redes moleculares como ferramenta de análise e organização dos dados obtidos por espectrometria de massas de alta resolução. Paralelamente, buscou-se avaliar, de maneira preliminar, o potencial citotóxico desses extratos e do composto isolado.

2.1 Objetivos específicos

Para atender ao objetivo geral proposto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Preparar extratos de folhas e caule de *Humiria balsamifera* utilizando solventes de diferentes polaridades;
- Caracterizar o perfil químico dos extratos por UHPLC-QTOF-MS;
- Processar os dados de MS/MS e construir redes moleculares na plataforma GNPS2;
- Realizar a anotação preliminar dos metabólitos com base em massa exata, fragmentação e comparação com bibliotecas espectrais;
- Aplicar análises multivariadas para avaliar a influência do órgão vegetal e do solvente de extração sobre a composição química das amostras;
- Selecionar o extrato prioritário para as etapas de fracionamento, purificação e isolamento;
- Isolar a bergenina e realizar sua determinação estrutural por espectrometria de massas de alta resolução e RMN;
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos frente à linhagem de carcinoma colorretal humano HCT-116;
- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos isolados frente à linhagem HCT-116;

- Investigar a resposta biológica da bergenina frente às linhagens de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 e MDA-MB-231;
- Avaliar a citotoxicidade da bergenina em células não tumorais RPE-1.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Folhas e caule de *Humiria balsamifera* St. (Aubl.) Hill. foram coletados durante o período chuvoso na Vila Contrato, município de Morros, Maranhão. A identificação botânica do material foi realizada e depositada no Herbário Rosa Mochel (SLUI), da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), número de registro 4769.

3.2 Obtenção dos extratos

As folhas (250,0 g) e os caules (251,3 g) foram secos em estufa a 40 °C por 72 horas. Após a secagem, cada órgão vegetal foi triturado separadamente em moinho analítico de facas. O material vegetal seco foi submetido à extração por maceração com solventes de polaridade crescente, na sequência hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt), etanol (EtOH) e metanol (MeOH), na proporção de 1:10 (m/v). Todos os solventes utilizados na etapa de extração eram grau P.A. da marca Labsynth®.

As macerações foram realizadas em triplicata, com intervalos de 24 h entre cada repetição, utilizando-se o mesmo lote de material vegetal seco. Ao término de cada etapa, os extratos foram filtrados por gravidade em papel de filtro qualitativo e concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Embora a sequência extrativa tenha incluído o emprego de hexano, as etapas analíticas e de isolamento descritas neste trabalho tiveram enfoque nos extratos obtidos com AcOEt, EtOH e MeOH, que corresponderam às amostras priorizadas para o estudo químico e biológico.

3.3 Fracionamento, purificação e isolamento

Para o fracionamento preliminar, alíquotas de 50 mg dos extratos orgânicos de AcOEt, EtOH e MeOH foram solubilizadas separadamente em MeOH (3,0 mL) e submetidas à extração em fase sólida utilizando cartucho C18 (Strata® C18, Phenomenex, 500,0 mg). As eluições foram realizadas com água (solvente A) e metanol (solvente B), variando-se a proporção de B em A entre 95% e 100%. As frações 95% foram coletadas em frascos de penicilina, concentradas em evaporador

rotativo e liofilizadas. As amostras secas foram pesadas, ressuspendidas e centrifugadas para posterior análise.

As figuras referentes aos cromatogramas dos extratos estão presentes no **Apêndice A**.

As frações obtidas foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em sistema Shimadzu® Prominence equipado com detector SPD-M20A, bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20A, controlador CBM-20A, forno CTO-20A e degaseificador DGU-20 A5R. Utilizou-se coluna Phenomenex® Luna® C18 (250 mm × 4,6 mm, 100 Å, 5 µm), com gradiente exploratório de 5 a 100% de solvente B [metanol com 0,1% de HCO₂H] em solvente A [água ultrapura com 0,1% de HCO₂H] ao longo de 45 min, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Adicionalmente, as frações foram analisadas por UHPLC-QTOF-MS, permitindo a seleção do extrato de maior interesse químico para a etapa de isolamento.

A purificação do metabólito priorizado foi realizada por HPLC preparativo (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) composto por detector PDA 2998, bombas 1525 e injetor manual, empregando gradiente de 5 a 100% de solvente B em solvente A, ambos acidificados com 0,1% de HCO₂H, ao longo de 45 min, com fluxo de 10 mL.min⁻¹. Para essa etapa, foi utilizada coluna Phenomenex® Luna® C18 (150 mm × 21,2 mm, 100 Å, 5 µm). Ao final da coleta, foram obtidos 5,0 mg de bergenina. O sistema foi operado por meio do software Breeze™ 2 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA).

3.4 Análises cromatográficas e espectrométricas

As análises cromatográficas e espectrométricas foram realizadas em sistema UHPLC-QTOF-MS da Waters Corporation (Milford, MA, EUA), cromatógrafo líquido modular de ultra eficiência, composto por uma bomba quaternária Acquity® H-Class, um amostrador automático Acquity® FTN e um detector de arranjo de diodos Acquity® PDA eλ, acoplado a um espectrômetro de massas XEVO® G2-XS QTOF (Waters, Milford, EUA). Foi utilizada uma coluna Acquity® UPLC® HSS T3 (2,1 × 100 mm, 1,8 µm). A separação cromatográfica foi conduzida em modo gradiente, de 5% a 100% de fase B ao longo de 15 min. A fase A foi composta por água ultrapura acidificada com 0,1% de HCO₂H, enquanto a fase B foi composta por acetonitrila acidificada com 0,1% de HCO₂H.

O fluxo empregado foi de 0,350 mL.min⁻¹, com volume de injeção de 2 µL. As aquisições foram realizadas nos modos de ionização positivo e negativo. O detector DAD foi ajustado para a faixa de varredura de 200 a 800 nm, e a temperatura da coluna foi mantida a 35 °C.

No espectrômetro de massas, os dados foram adquiridos em modo auto MS/MS, na faixa de m/z 50–1500. A voltagem do capilar por *electrospray* foi ajustada para 2,5 kV, a temperatura da fonte de ionização foi mantida a 120 °C e a temperatura do gás de dessolvatação (N₂) foi de 350 °C, com fluxo de 800 L.h⁻¹. Os espectros de fragmentação foram obtidos com emprego de rampa de energia de colisão variável com a massa, entre 6 e 9 eV para massas baixas (m/z 50) e 60 e 80 eV para massas altas (m/z 1500). O sistema foi controlado pelo software MassLynx™ v.4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA).

3.5 Processamento dos dados e construção das redes moleculares

Os arquivos brutos gerados pelo equipamento, em formato (.raw), foram convertidos para o formato (.mzML) com o auxílio do software MSConvert. Em seguida, os arquivos convertidos foram processados no software MZmine 4, com a finalidade de realizar a extração de *features*, o alinhamento dos sinais cromatográficos e a exportação dos arquivos necessários às análises subsequentes.

Os parâmetros empregados incluíram:

- Detecção de massas: modo centróide, com limiares de 3,0E2 para MS1 e 1,0E2 para MS2;
- Construção cromatográfica por ADAP: mínimo de três varreduras por grupo, *threshold* de intensidade de grupo de 1,0E3, intensidade máxima mínima de 1,0E3 e tolerância de m/z de 20 ppm;
- Deconvolução cromatográfica: busca de mínimo local, com *threshold* cromatográfico de 70%, altura absoluta mínima de 1,0E3, intervalo de duração de pico de 0,01 a 1,5 min e razão mínima topo/borda de 2,00;
- Agrupamento de picos isotópicos: tolerância de 20 ppm, tolerância de tempo de retenção de 0,1 min, carga máxima de 2 e seleção do isótopo mais intenso como representativo;
- Alinhamento das amostras: tolerância de m/z de 20 ppm e tolerância de tempo de retenção de 0,1 min, com pesos de 3 para m/z e 1 para tempo de retenção;

- Aplicou-se filtro com exigência mínima de dois picos por linha e dois picos por padrão isotópico.

A partir dessa etapa, foram exportados uma tabela de quantificação de *features* em formato (.csv) e um resumo espectral de MS/MS em formato (.mgf). Esses arquivos foram submetidos à plataforma GNPS2 para a construção de redes moleculares baseadas em *features* (*feature-based molecular networking*).

Para a geração da rede, foram adotados os seguintes parâmetros: tolerância de massa para íons precursores de 0,02 Da, tolerância de massa para íons fragmento de 0,02 Da e valor mínimo de *cosine score* de 0,7.

A anotação dos metabólitos foi conduzida em nível preliminar, por comparação com bibliotecas espectrais da plataforma GNPS2 e por interpretação manual dos espectros de fragmentação. Dessa forma, para os compostos não isolados, as atribuições estruturais foram tratadas como propostas compatíveis com os dados de massas exatas, fragmentação e relações espectrais observadas na rede molecular, não correspondendo, portanto, a confirmações estruturais inequívocas. As redes geradas foram visualizadas no software Cytoscape, e podem ser acessadas pelo link <https://gnps2.org/status?task=982d37ee2dbc4d25a8151e43a4d5acb5#> (SHANNON *et al.*, 2003).

3.6 Análise multivariada

A análise estatística multivariada foi conduzida na plataforma MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>), empregando-se Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).

Previamente às análises, o conjunto de dados foi submetido à centragem pela média e ao escalonamento de Pareto, com o objetivo de reduzir a influência de variáveis excessivamente intensas e preservar a contribuição de sinais de intensidade intermediária.

Essas abordagens foram utilizadas para explorar tendências de agrupamento entre as amostras, considerando o órgão vegetal e o solvente de extração como variáveis experimentais de interesse. A PCA foi empregada como ferramenta não supervisionada para visualização global dos dados, enquanto a PLS-DA foi utilizada de forma complementar, com finalidade exploratória, para evidenciar padrões de discriminação entre os grupos. A relevância das variáveis para a separação observada

foi avaliada por meio dos valores de importância na projeção (VIP, *Variable Importance in Projection*).

3.7 Elucidação estrutural da substância isolada

A substância isolada foi caracterizada por espectrometria de massas de alta resolução e por experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de RMN foram obtidos em equipamento Bruker® Avance III 600 MHz (14,1 T). Foram adquiridos espectros de ^1H e ^{13}C , bem como experimentos DEPTq, COSY, HSQC e HMBC, empregando-se $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ (Sigma-Aldrich®) como solvente.

Os espectros foram referenciados com base nos sinais residuais do solvente em δH 3,31 e δC 49,0, sem uso de padrão interno. Os dados foram obtidos em temperatura ambiente. A atribuição estrutural da bergenina foi realizada a partir da interpretação integrada dos dados espectrais e da comparação com valores descritos na literatura.

3.8 Avaliação da atividade citotóxica

A atividade citotóxica dos extratos e compostos isolados foi avaliada em ensaios *in vitro*, em parceria com o laboratório da Prof.^a Dr.^a Letícia Costa-Lotufo (Universidade de São Paulo). Para isso, foram semeadas $0,6 \times 10^4$ células por poço em placas de 96 poços (Sarstedt®), correspondendo a densidade celular de 3×10^4 células.mL⁻¹, em volume final de 200 μL de meio por poço. Após 24 horas de incubação, os compostos em teste foram adicionados em duplicata nas concentrações de 50 ou 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, permanecendo em incubação por 72 horas.

A doxorubicina (0,00064–10 μM ; Merck®) foi utilizada como controle positivo, enquanto dimetilsulfóxido (DMSO, 0,05%; Synth®) foi empregado como controle negativo. O meio de cultura consistiu em DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina (5.000 U.mL⁻¹) (Gibco™).

Após 72 horas, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo MTT na concentração de 0,5 mg.mL^{-1} [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo, Invitrogen™]. Após 3 horas de incubação, o sobrenadante foi removido, as placas foram secas e o precipitado de formazana resultante da redução do MTT foi

solubilizado em 150 μL de DMSO. A absorbância foi medida em 570 nm, conforme descrito por Mosmann (1983).

A porcentagem de inibição do crescimento celular em concentração única foi calculada no software GraphPad Prism, e os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Foram realizados quatro experimentos independentes empregando-se as linhagens celulares de carcinoma colorretal humano (HCT-116), adenocarcinoma mamário humano (MCF-7 e MDA-MB-231) e células não tumorais do epitélio pigmentar da retina humana (RPE-1).

Amostras que apresentaram inibição superior a 75% a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram consideradas de elevado efeito biológico nas condições testadas. Ressalta-se, entretanto, que esse critério foi empregado exclusivamente para fins de triagem e não deve ser interpretado, isoladamente, como indicativo de potência farmacológica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil químico dos extratos de *H. balsamifera*

A investigação química dos extratos de folhas e caule de *H. balsamifera* por UHPLC-QTOF-MS, associada à construção de redes moleculares na plataforma GNPS2, permitiu a caracterização comparativa do perfil metabólico das amostras obtidas com diferentes solventes.

As análises foram realizadas em modos de ionização positivo e negativo; entretanto, a discussão dos metabólitos anotados teve como foco os dados obtidos em modo positivo, condição na qual foi detectado maior número de picos. Em contrapartida, o modo negativo apresentou um número reduzido de picos para os compostos de interesse, sendo, por isso, excluído da discussão principal.

A análise em modo positivo permitiu a anotação de 18 metabólitos, com base em dados de espectrometria de massas e fragmentação, distribuídos entre os extratos de folhas e caule obtidos com AcOEt, EtOH e MeOH (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Resultados da análise pela Plataforma GNPS2 dos padrões de fragmentação MS/MS.
*C:Caule; F:Folhas.

#	TR (min)	Metabólito	Fração	Fórmula Molecular	[M+H] ⁺ Precursor Observado	Precursor calculado	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS
1	2.8	Bergenina	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt, C_EtOH, C_MeOH, C_AcOEt	C ₁₄ H ₁₇ O ₉	329.0869	329.0867	0.6	293.0647; 263.0545; 233.0437; 205.0487; 181.0447; 150.0304; 131.0483; 103.0531
2	2.5	Epigallocatequina	F_AcOEt, C_EtOH, C_MeOH	C ₁₄ H ₁₅ O ₇	307.0812	307.0812	0.0	163.0383; 139.0388
3	3.1	Epicatequina	F_AcOEt, F_MeOH, C_MeOH	C ₁₅ H ₁₅ O ₆	291.0862	291.0863	-0.3	207.0648; 165.0531; 147.0491; 139.0387; 123.0436

								397.1035; 379.0780; 367.0794; 349.0664; 337.0697; 323.0817; 313.0693; 283.0560
4	3.4	Saponarina	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595.1657	595.1657	0.0	263.0546; 233.0435; 191.0335; 153.0176; 125.0217
5	3.6	Galoilbergenin a	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt, C_EtOH, C_MeOH, C_AcOEt	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₃	481.0973	481.0987	-2.9	431.0958; 413.0853; 383.0742; 353.0648; 329.0643; 299.0544
6	3.7	Luteolina-C- hexose	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.1074	449.1078	-0.9	303.0497
7	3.8	Rutina	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611.1613	611.1606	1.1	397.0918; 349.0705; 313.0706; 283.0601; 165.0179
8	3.9	Isovitexina	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.1130	433.1129	0.2	303.0497
9	3.9	Quercetina-O- hexose	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465.1029	465.1027	0.4	153.0171
10	4.1	Kaempferol	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.0546	287.0550	-1.4	293.0687; 263.0541; 251.0573; 233.0446; 221.0420; 205.0591;
11	4.1	Hidroxibenzoil bergenina	C_EtOH, C_MeOH, C_AcOEt, F_AcOEt	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465.1024	465.1027	-0.6	

									191.0334; 163.0375; 153.0393; 137.0222
12	4.2	Apigenina-O-desoxi-hexosil-desoxi-hexose	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	579.1707	579.1708	-0.1	271.0597	
13	4.2	Quercetina-O-pentosídeo	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₁	435.0920	435.0921	-0.2	303.0493	
14	4.4	Kaempferol-O-pentosídeo	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	419.0967	419.0972	-1.2	287.0544	
15	4.3	Quercetina-O-desoxi-hexosídeo	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.1076	449.1078	-0.4	303.0491	
16	4.6	Kaempferol-O-desoxi-hexosídeo	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.1125	433.1129	-0.9	287.0546	
									459.1067; 415.1067; 367.0803; 337.0693; 313.0693; 283.0594; 147.0434; 119.0477
17	4.9	Vitexina-O-cumarato	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₂	579.1497	579.1496	-0.2	229.0477;	
18	5.2	Quercetina	F_EtOH, F_MeOH, F_AcOEt	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303.0493	303.0499	-1.9	153.0176; 137.0282	

Fonte: Autoria própria.

De modo geral, observou-se predominância de flavonoides glicosilados e de suas agliconas, além da presença de bergenina e de compostos relacionados a esse núcleo estrutural. Esse perfil é coerente com relatos da literatura para a espécie e com o padrão químico esperado para matrizes vegetais ricas em compostos fenólicos, especialmente flavonoides e derivados policetídicos oxigenados.

Os metabólitos anotados compreenderam, majoritariamente, flavonoides O-glicosilados e C-glicosilados, bem como agliconas flavonoídicas. Entre os compostos supostamente atribuídos encontram-se epigallocatequina, epicatequina, saponarina, luteolina-C-hexose, rutina, isovitexina, derivados glicosilados de quercetina e kaempferol, vitexina-O-cumarato, quercetina e kaempferol, além da bergenina. Deve-se ressaltar que essas atribuições foram realizadas em nível preliminar, com base em massa exata, padrões de fragmentação em MS/MS, comparação com bibliotecas espectrais e inspeção manual dos espectros, não correspondendo, portanto, à identificação estrutural definitiva de todos os compostos anotados.

Do ponto de vista da distribuição dos metabólitos entre os extratos, foi possível observar tendência na ocorrência de flavonoides em amostras de folhas, especialmente nos extratos etanólico, metanólico e em acetato de etila. Esse padrão é compatível com a função fisiológica das folhas, que, por serem órgãos fotossintetizantes diretamente expostos à radiação, frequentemente acumulam flavonoides relacionados à fotoproteção e à resposta antioxidante frente ao estresse oxidativo (AGATI *et al.*, 2012; AGATI *et al.*, 2013).

Em contrapartida, a bergenina foi detectada em todos os extratos avaliados, com maior abundância relativa no extrato em acetato de etila do caule, o que se mostrou particularmente relevante para a priorização dessa amostra nas etapas de fracionamento e isolamento.

Esse resultado evidencia que o perfil químico de *H. balsamifera* varia não apenas entre os diferentes órgãos vegetais, mas também entre os diferentes sistemas extrativos empregados. A combinação entre parte vegetal e solvente de extração influenciou de maneira significativa a composição observada, indicando que a escolha dessas variáveis experimentais exerce papel fundamental na obtenção de extratos enriquecidos em classes específicas de metabólitos. Sob essa perspectiva, o uso integrado de abordagens metabolômicas mostrou-se especialmente útil, uma vez que permitiu comparar, de forma simultânea, múltiplas amostras complexas e reconhecer tendências químicas relevantes para o delineamento do estudo.

Além disso, a presença de bergenina em todas as amostras analisadas, ainda que em intensidades distintas, sugere que esse metabólito constitui um componente recorrente do metabolismo secundário da espécie. No entanto, sua maior representatividade no extrato do caule em acetato de etila — evidenciada pelo perfil cromatográfico desta fração (**Figura 15**) — indica que a abundância relativa do

composto varia em função do órgão vegetal e da etapa extrativa. Ressalta-se, entretanto, que as extrações foram realizadas de forma sequencial no mesmo lote de material vegetal; dessa forma, a composição de cada extrato reflete não apenas a afinidade do composto pelo solvente, mas também o esgotamento progressivo dos constituintes nas etapas anteriores. Uma comparação estritamente baseada na polaridade do solvente demandaria extrações independentes a partir de porções separadas do material vegetal.

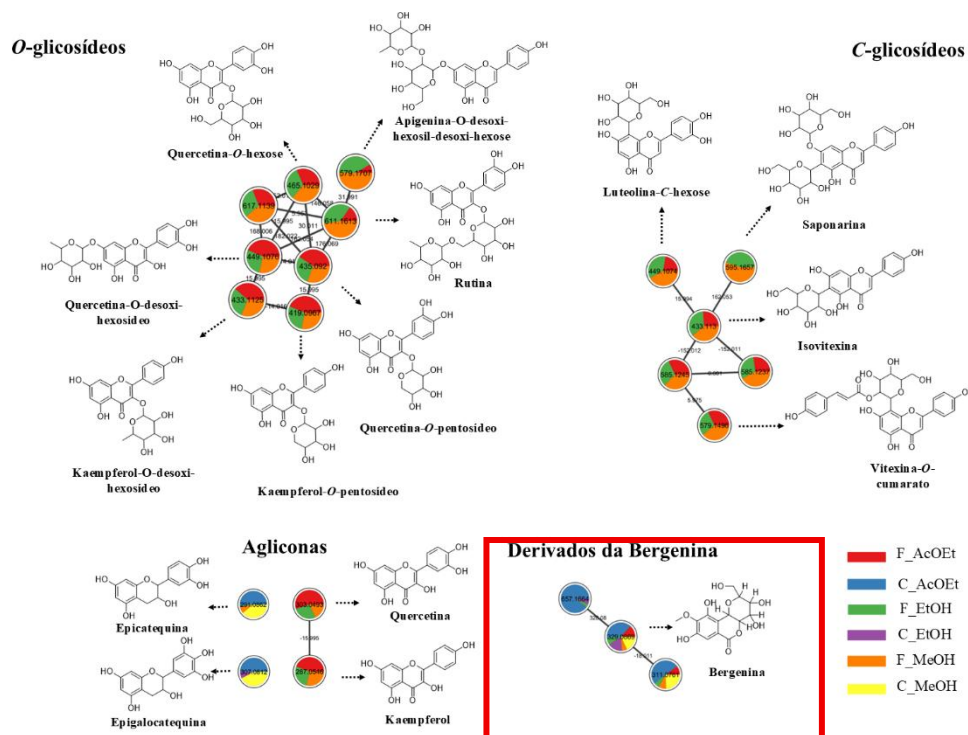
De maneira geral, os dados obtidos demonstram que *H. balsamifera* apresenta perfil químico diversificado, marcado pela predominância de compostos fenólicos e pela ocorrência de um metabólito de interesse particular, a bergenina. Esse conjunto de resultados fornece base consistente para a interpretação das redes moleculares, das análises estatísticas multivariadas e da seleção de alvos químicos para investigação aprofundada, discutidas nas seções subsequentes.

4.2 Molecular networking e anotação preliminar dos metabólitos

A construção da rede molecular a partir dos dados de UHPLC-QTOF-MS/MS permitiu organizar os sinais detectados segundo a similaridade de seus padrões de fragmentação, favorecendo a visualização de famílias moleculares e a anotação preliminar dos metabólitos presentes nos extratos de *H. balsamifera* (**Figura 5**).

Figura 5 - Molecular networking por GNPS2 dos extratos de *H. balsamifera*. *C: caule; F: folhas.

** O nó correspondente à bergenina e seus derivados está destacado em vermelho.



Fonte: Autoria própria.

A composição química representada nos gráficos foi baseada nas anotações putativas obtidas no GNPS. O número de compostos identificados em cada extrato variou em função da quantidade de correspondências espectrais obtidas durante a análise dos dados de espectrometria de massas. Não foi utilizado padrão interno nas análises.

Essa abordagem mostrou-se útil para a análise de uma matriz vegetal complexa, uma vez que viabilizou a interpretação integrada dos dados espectrométricos e a observação de relações estruturais entre compostos detectados em diferentes amostras.

Entre os principais agrupamentos observados, destacou-se uma família molecular composta por flavonoides O-glicosilados. A atribuição dessa classe foi sustentada pela presença de perdas neutras características em MS/MS, especialmente 162, 146 e 132 Da, correspondentes a unidades de hexose, deoxi-hexose e pentose, respectivamente. Esse comportamento foi compatível com a anotação preliminar de derivados glicosilados de quercetina, apigenina e kaempferol. A recorrência desses íons fragmento, aliada à organização dos nós em uma mesma

família molecular, fortaleceu a interpretação de que os extratos de folhas concentram um conjunto relevante de flavonoides O-glicosilados.

Outro agrupamento importante correspondeu aos flavonoides C-glicosilados, cuja anotação foi apoiada pela observação de perdas características de 90 e 120 Da, frequentemente associadas à quebra cruzada da unidade hexosídica ligada diretamente ao esqueleto flavonoídico. Nessa família, foram incluídas, de forma preliminar, substâncias como saponarina, luteolina-C-hexose, isovitexina e vitexina-O-cumarato. Embora a diferenciação exata entre alguns isômeros estruturais dependa de confirmação adicional, o padrão global de fragmentação observado foi compatível com essa subclassificação.

Além das formas glicosiladas, a rede molecular também reuniu flavonoides aglicônicos, como quercetina, kaempferol, epigallocatequina e epicatequina. Nesses casos, a interpretação foi baseada em massas exatas compatíveis e em fragmentações típicas, incluindo padrões associados a clivagens do tipo retro Diels-Alder, frequentemente reportadas para compostos flavonoídicos. A observação desses compostos em uma família molecular própria contribuiu para reforçar a consistência da anotação química obtida.

Um ponto de especial interesse na rede foi a presença de um pequeno *cluster* associado à bergenina, detectada em todos os extratos analisados. A anotação desse composto foi inicialmente sustentada pelo íon protonado em m/z 329,0869 e por seu padrão de fragmentação, compatível com o relatado na literatura. Embora a presença da bergenina em *H. balsamifera* já tivesse sido anteriormente mencionada em estudos baseados em dados de massas, a estratégia empregada neste trabalho permitiu não apenas sua detecção em múltiplos extratos, mas também a priorização da amostra em que o composto se mostrou mais abundante, orientando sua posterior etapa de isolamento.

A rede molecular mostrou-se ainda útil para a exclusão de sinais associados ao branco experimental, contribuindo para maior confiabilidade na interpretação dos *clusters* observados. Esse aspecto é metodologicamente relevante, já que reduz a interferência de sinais não atribuíveis ao material vegetal e melhora a visualização das relações entre os metabólitos efetivamente presentes nas amostras.

De modo geral, os resultados obtidos por redes moleculares demonstram a utilidade dessa abordagem como ferramenta de apoio à química de produtos naturais, especialmente em estudos envolvendo extratos complexos e múltiplas condições

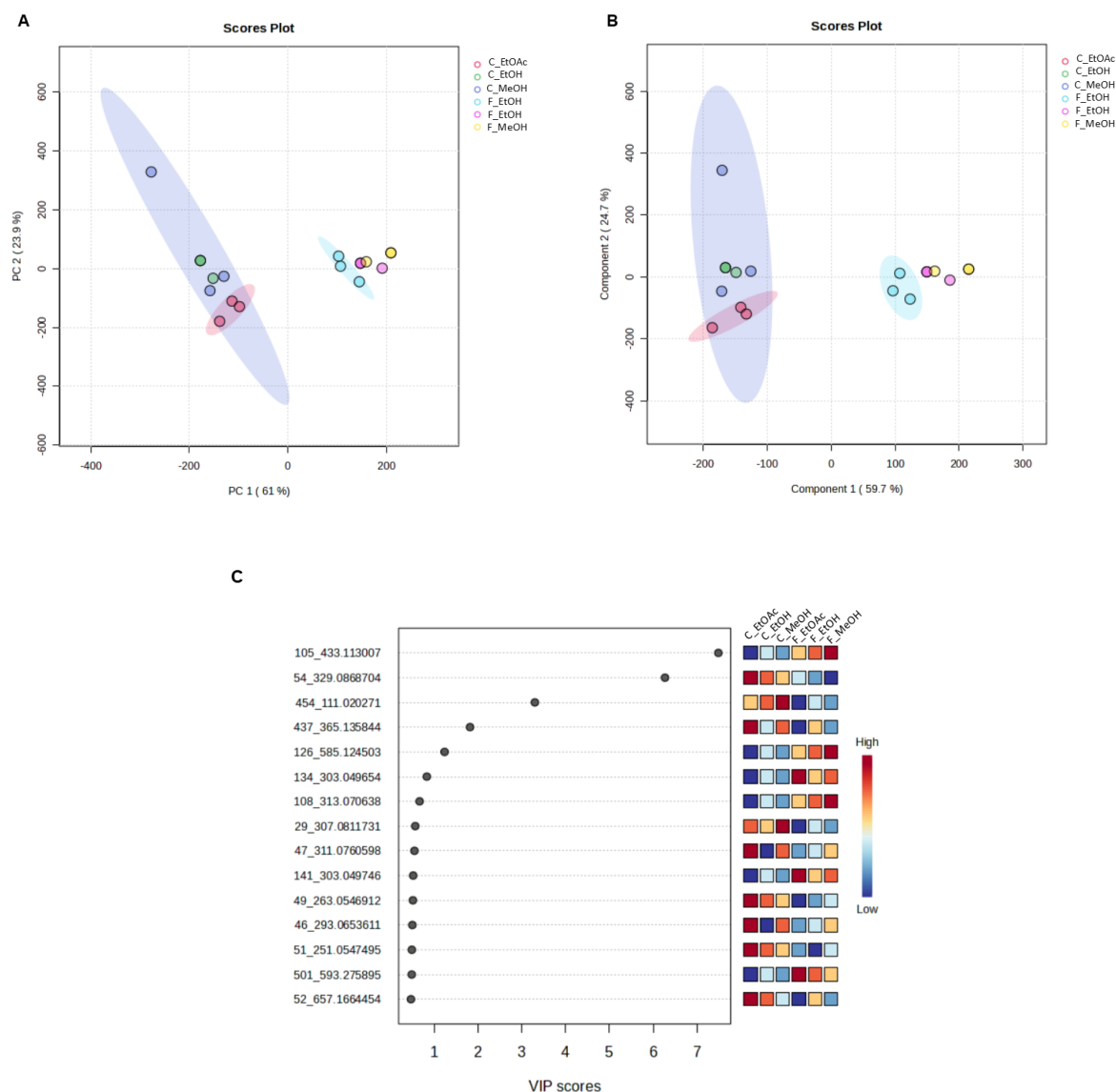
experimentais. A organização dos dados em famílias moleculares favoreceu a anotação preliminar dos metabólitos, a identificação de padrões químicos recorrentes e a priorização de alvos para isolamento. Mais do que uma ferramenta de visualização, a rede molecular funcionou, neste trabalho, como elemento integrador entre os dados cromatográficos, espectrométricos e estatísticos.

4.3 Influência do órgão vegetal e do solvente de extração sobre a composição química

Com o objetivo de explorar a variabilidade química entre as amostras analisadas, os dados obtidos por UHPLC-QTOF-MS foram submetidos a análises multivariadas.

A Análise de Componentes Principais (PCA) verificou tendência de separação entre os extratos por dois fatores principais: o órgão vegetal utilizado e a etapa extrativa em que as amostras foram obtidas. Os dois primeiros componentes principais explicaram 84,9% da variância total dos dados, indicando que uma parcela expressiva da variação química entre as amostras pôde ser representada nesse espaço multivariado (**Figura 6**).

Figura 6 - Gráficos das análises multivariadas dos extratos de folhas e caule de *H. balsamifera*: **(A)** Análise de Componentes Principais (PCA); **(B)** Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA); **(C)** Importância das Variáveis na Projeção (VIP). *C: caule; F: folhas.



Fonte: Autoria própria.

A distribuição das amostras no gráfico de PCA indicou separação clara entre extratos de folhas e de caule, sugerindo que a natureza do órgão vegetal exerceu influência marcante sobre o perfil metabólico. Esse resultado é coerente com a observação qualitativa obtida nas redes moleculares, nas quais os extratos foliares mostraram maior associação com flavonoides glicosilados e agliconas flavonídicas, enquanto a amostra de caule obtida na etapa com acetato de etila apresentou maior destaque relativo para a bergenina.

A análise por PLS-DA foi consistente com a separação observada na PCA, sugerindo tendência de discriminação entre os grupos — resultado que deve ser interpretado com cautela dado o caráter supervisionado do método e a ausência de validação formal. O componente 1 foi responsável por 59,7% da variância e mostrou associação mais evidente com a separação entre folhas e caule, enquanto o componente 2, responsável por 24,7%, contribuiu para a diferenciação relacionada às etapas de obtenção dos extratos.

A proximidade entre as réplicas de um mesmo grupo amostral indicou boa reprodutibilidade experimental no conjunto de dados analisado, o que favorece a interpretação das tendências observadas. Ainda assim, é importante ressaltar que as análises estatísticas não substituem a interpretação química individual dos sinais, mas atuam como ferramentas complementares para reconhecer padrões de agrupamento e orientar a priorização de variáveis relevantes.

A análise de importância das variáveis na projeção (VIP) destacou o íon em m/z 329,0869 como uma das variáveis mais relevantes para a discriminação das amostras. Esse íon, posteriormente associado à bergenina, apresentou maior contribuição para a distinção do extrato do caule em acetato de etila, corroborando os dados obtidos por redes moleculares e justificando a seleção dessa amostra para o isolamento do composto. Dessa forma, a integração entre análise estatística e interpretação química mostrou-se particularmente eficiente para a identificação de um marcador metabólico com relevância analítica e biológica no conjunto amostral.

Os resultados das análises multivariadas confirmam, portanto, que a composição química de *H. balsamifera* variou de acordo com o órgão vegetal e com a etapa extrativa considerada. Esse comportamento reforça a importância do planejamento experimental em estudos metabolômicos e fitoquímicos, uma vez que essas variáveis condicionam, em conjunto com a estratégia de extração adotada, quais classes de metabólitos serão mais representadas nos extratos analisados. No contexto experimental adotado deste trabalho, a amostra de caule obtida na etapa com acetato de etila mostrou-se particularmente relevante para a detecção e o posterior isolamento da bergenina, enquanto os extratos foliares se destacaram pela maior diversidade de flavonoides anotados.

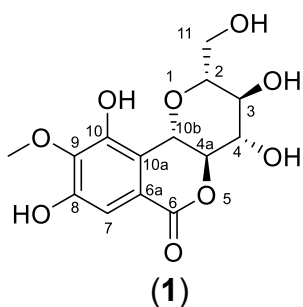
4.4 Isolamento e identificação da bergenina

A seleção do extrato em acetato de etila do caule para a etapa de isolamento foi fundamentada na integração entre os dados de redes moleculares, análise multivariada e observação do perfil cromatográfico das amostras. Além de apresentar maior abundância relativa dos íons associados à bergenina e a seus derivados, esse extrato exibiu perfil cromatográfico menos complexo em comparação aos demais, o que favoreceu sua priorização para o isolamento do composto de interesse.

Após o processo de fracionamento e purificação por HPLC preparativo, foi obtida uma substância cuja fórmula molecular foi atribuída como $C_{14}H_{16}O_9$ com base nos dados de espectrometria de massas de alta resolução (**Apêndice A**). O composto apresentou íon protonado em m/z 329,0863 $[M+H]^+$ com um erro de 0,6 ppm em relação à massa da fórmula molecular atribuída, valor compatível com aquele esperado para a bergenina. A confirmação estrutural foi sustentada adicionalmente pelos dados de RMN de 1H e ^{13}C (**Apêndice B**), bem como pelos experimentos bidimensionais realizados, cuja interpretação mostrou concordância com os valores descritos na literatura para esse metabólito.

Os dados espectrais obtidos para a substância isolada mostraram-se compatíveis com aqueles descritos na literatura para a bergenina (**Tabela 2**), revelando um padrão compatível com uma isocumarina C-glicosilada metoxilada, incluindo a presença de um sinal aromático singlete em região característica, sinais de carbonos oxigenados associados ao sistema glicídico e sinal correspondente ao grupo metoxila.

Tabela 2 – Dados experimentais e da literatura de RMN de 1H e ^{13}C da bergenina (600 MHz, CD_3OD-d_4 , J em Hz).



Estrutura da bergenina com numeração adotada para a atribuição dos sinais de RMN apresentados na **Tabela 2**.

Dados Experimentais			Agber <i>et al.</i> , 2020 (DMSO- <i>d</i> ₆)		Nunomura <i>et al.</i> , 2009 (CD ₃ OD- <i>d</i> ₄)	
Posição	¹ H (δ)	¹³ C (δ)	¹ H (δ)	¹³ C (δ)	¹ H (δ)	¹³ C (δ)
2	3.68 (m, 1H)	83.2	3.57 (ddd; 9.7, 7.5, 2.1, 1H)	82.3	3.68 (m, 1H)	81.9
3	3.43 (t, 8.8, 1H)	72.1	3.57 (ddd; 9.7, 7.5, 2.1, 1H)	71.2	3.43 (dd, 9.5; 8.5, 1H)	70.7
4	3.81 (t, 8.8, 1H)	75.8	3.65 (d, 9.0, 1H)	74.2	3.81 (dd, 9.5; 8.5, 1H)	74.4
4a	4.05 (m, 1H)	81.6	4.02 (dd; 10.5, 9.5, 1H)	80.3	4.07 (dd, 9.5; 10.0, 1H)	80.2
6	-	165.9	-	164.3	-	164.6
6a	-	119.7	-	118.6	-	118.2
7	7.09 (s, 1H)	111.2	6.99 (s 1H)	110.2	7.09 (s, 1H)	109.9
8	-	152.6	-	151.9	-	151.1
9	-	142.4	-	141.3	-	141.1
10	-	149.6	-	148.6	-	148.2
10a	-	117.5	-	116.6	-	116.1
10b	4.96 (d, 10.6, 1H)	74.4	4.98 (d, 10.5, 1H)	72.6	4.94 (d, 10, 1H)	73.1
11	4.05 (m, 1H); 3.68 (m, 1H)	62.8	3.85 (dd; 11.7, 2.1, 1H); 3.44 (dd; 11.9, 7.5, 1H)	61.7	4.03 (dd, 10.7; 2.5, 1H); 3.68 (m, 1H)	61.5
9-OCH ₃	3.91 (s, 3H)	61.1	3.78 (s, 1H)	60.3	3.91 (s, 3H)	59.8

Fonte: Autoria própria.

A comparação com dados previamente publicados permitiu atribuir a substância isolada como bergenina (**1**). Considerando o conjunto das evidências espectrométricas e espectroscópicas, a identidade da substância foi considerada consistente com essa estrutura.

A bergenina já havia sido isolada anteriormente de *H. balsamifera* por Da Silva *et al.* (2004), por meio de cromatografia em gel de permeação (Sephadex LH-20, MeOH) e recristalização, bem como de outras espécies da família Humiriaceae, como *Endopleura uchi* e *Sacoglottis gabonensis* (DA SILVA *et al.*, 2004; NUNOMURA *et al.*, 2009; MADUKA *et al.*, 2002). O presente trabalho confirma e complementa esse registro ao isolar o composto a partir do extrato em acetato de etila do caule, utilizando

HPLC preparativo, e ao caracterizá-lo por espectrometria de massas de alta resolução e RMN a 600 MHz — metodologias não empregadas no estudo anterior. Adicionalmente, a avaliação do potencial citotóxico da bergenina frente às linhagens HCT-116, MCF-7, MDA-MB-231 e RPE-1 representa uma contribuição inédita para o conhecimento biológico do composto no contexto desta espécie.

Durante o processo de isolamento, outros dois compostos, denominados P3 e P4, apresentaram íons em m/z 481,0967 e 465,1035, respectivamente, como pode ser visto na **Figura 28** e **Figura 30** presentes no **Apêndice A**. Esses valores são compatíveis com derivados da bergenina já descritos na literatura relacionados a galoilbergenina e hidroxibenzoilbergenina, o que reforça a hipótese de que tais sinais correspondam a análogos estruturais desse metabólito (SALIMO *et al.*, 2023). Além disso, compostos relacionados a esses derivados também foram observados na rede molecular gerada no GNPS, em agrupamento associado ao núcleo estrutural da bergenina, o que reforça a interpretação de que tais substâncias integram uma pequena família química presente na espécie.

A atribuição preliminar desses compostos foi sustentada não apenas pelas massas exatas observadas, mas também pelos padrões de fragmentação diagnósticos, que incluíram íons compatíveis com grupos galoil e hidroxibenzoil, além de fragmentos associados ao esqueleto da bergenina. Entretanto, tais atribuições devem ser interpretadas com cautela, uma vez que a quantidade de material obtida durante o isolamento não permitiu a confirmação estrutural por RMN. Dessa forma, esses compostos são tratados neste trabalho como derivados preliminarmente anotados, compatíveis com a literatura e com os dados espectrométricos obtidos.

A presença simultânea da bergenina e de derivados relacionados sugere que *H. balsamifera* apresenta uma diversidade estrutural associada a esse núcleo isocumarínico superior àquela evidenciada apenas pelo isolamento da substância majoritária. Esse resultado amplia o interesse fitoquímico sobre a espécie, uma vez que indica a possibilidade de ocorrência de uma família de metabólitos estruturalmente próximos, com potencial relevância química e biológica.

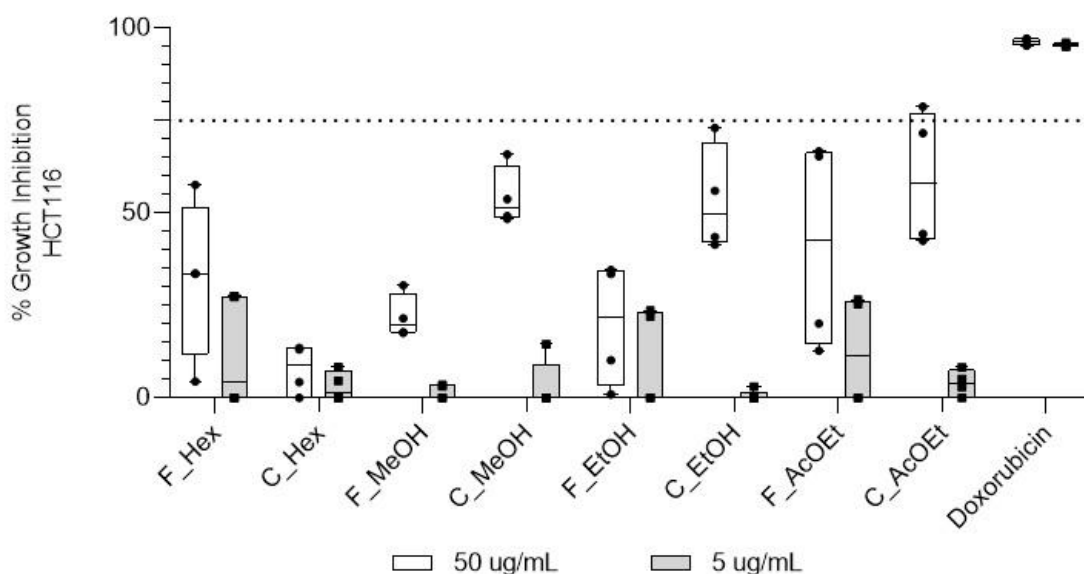
Em conjunto, os resultados de isolamento e identificação da bergenina e de seus derivados demonstram a eficiência da estratégia analítica empregada neste estudo, na qual a integração entre perfil químico, análise estatística e redes moleculares permitiu direcionar racionalmente a seleção do alvo para purificação. A bergenina, além de constituir um marcador químico relevante em *H. balsamifera*,

mostrou-se um composto central para a discussão fitoquímica e biológica desenvolvida neste trabalho, enquanto a evidência da presença de seus derivados reforça o potencial da espécie como fonte de metabólitos bioativos a serem explorados em investigações futuras.

4.5 Avaliação citotóxica dos extratos e compostos isolados

A atividade citotóxica das amostras foi inicialmente investigada por meio de triagem *in vitro* frente à linhagem de carcinoma colorretal humano HCT-116. Nessa etapa, os extratos brutos de folhas e caule de *H. balsamifera* apresentaram efeito inibitório modesto, sem atingir o critério de atividade adotado neste trabalho, estabelecido como inibição superior a 75% a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Figura 7**). Os valores de inibição variaram de $6,4 \pm 4,5\%$ para o extrato C_Hex a $59,3 \pm 9,3\%$ para o extrato C_AcOEt, indicando que, nas condições de triagem empregadas, os extratos não exibiram efeito antiproliferativo expressivo sobre a linhagem HCT-116.

Figura 7 - Percentual de inibição do crescimento celular da linhagem HCT-116 frente aos extratos de *H. balsamifera* (*C: caule; F: folhas) e ao controle positivo (doxorubicina), testados nas concentrações de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A CI_{50} da doxorubicina calculada para a linhagem HCT-116 foi de 0,16 μM (IC 95%: 0,06–0,39). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo funcional para confirmar a responsividade do ensaio, em concentração capaz de induzir efeito citotóxico robusto. Valores expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média).

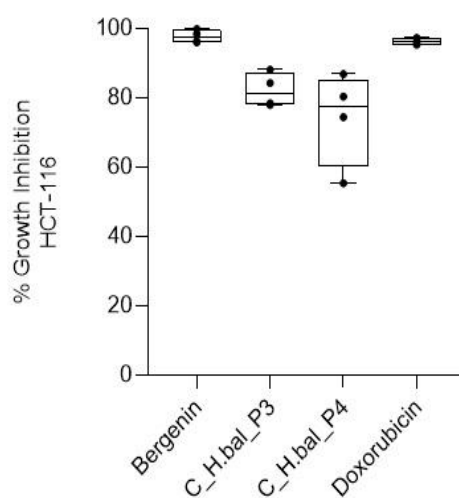


Fonte: Autoria própria.

Esse comportamento sugere que, embora os extratos apresentem composição química diversificada, os constituintes biologicamente mais ativos podem estar presentes em baixa abundância relativa, ou ainda ter sua atividade parcialmente mascarada pela complexidade da matriz extrativa. Em estudos com produtos naturais, esse tipo de resposta é relativamente comum, uma vez que a atividade observada em extratos brutos depende não apenas da presença de metabólitos bioativos, mas também de sua abundância relativa, de interações sinérgicas ou antagônicas entre constituintes e de fatores que afetam a disponibilidade dos compostos no sistema biológico avaliado (CAESAR; CECH, 2019; ATANASOV *et al.*, 2015).

Diferente dos extratos brutos, os compostos isolados apresentaram resposta citotóxica significativamente maior frente à linhagem HCT-116. Na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a bergenina exibiu $97,6 \pm 0,9\%$ de inibição, enquanto os compostos P3 e P4 apresentaram $82,1 \pm 2,4\%$ e $74,2 \pm 6,7\%$ de inibição, respectivamente (**Figura 8**). Considerando o critério de triagem adotado, os resultados obtidos para bergenina e P3 indicam elevado efeito biológico nas condições testadas, enquanto P4 apresentou inibição próxima ao critério de atividade adotado, ainda assim compatível com atividade citotóxica relevante no contexto da triagem preliminar.

Figura 8 - Gráfico de inibição do crescimento celular (%) dos compostos isolados de *H. balsamifera* contra células HCT-116 tratadas com bergenina, P3, P4 e o controle positivo doxorrubicina. A CI_{50} da doxorrubicina calculada para a linhagem HCT-116 foi de 0,16 μM (IC 95%: 0,06–0,39). Os tratamentos foram realizados na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. *C: caule; F: folhas.



Fonte: Autoria própria.

Esses resultados reforçam a importância do fracionamento e do isolamento de metabólitos em estudos de prospecção biológica, uma vez que a atividade de substâncias específicas pode não ser claramente observada quando estas se encontram diluídas em misturas complexas. A diferença entre o desempenho dos extratos brutos e dos compostos isolados sugere que a purificação foi eficiente para enriquecer os componentes responsáveis pelo efeito citotóxico observado, evidenciando a utilidade de abordagens orientadas por dados químicos e bioatividade.

Ainda que os compostos isolados tenham apresentado inibição expressiva frente à linhagem HCT-116, é importante ressaltar que os dados discutidos neste trabalho derivam de ensaios de triagem em concentração fixa. Dessa forma, o critério de inibição superior a 75% foi empregado exclusivamente para fins de seleção de amostras com efeito biológico mais evidente e não deve ser interpretado, isoladamente, como indicativo de potência farmacológica. A caracterização mais robusta da atividade antiproliferativa dessas substâncias dependerá, portanto, da realização de ensaios concentração-resposta e da determinação de parâmetros quantitativos, como IC_{50} .

Do ponto de vista integrado, os resultados obtidos indicam que *H. balsamifera* contém metabólitos com capacidade de interferir de maneira significativa na viabilidade de células tumorais, embora esse efeito se torne mais evidente após a etapa de isolamento. Esse comportamento é compatível com a abordagem clássica da química de produtos naturais orientada por bioatividade, na qual a atividade de interesse pode tornar-se mais evidente após etapas de fracionamento e isolamento, que permitem a individualização e a priorização dos metabólitos biologicamente mais relevantes (COS *et al.*, 2006; ATANASOV *et al.*, 2015).

Além disso, a expressiva atividade observada para a bergenina e para o composto P3 torna esses metabólitos particularmente relevantes para a continuidade da investigação biológica. No caso específico da bergenina, o resultado obtido em HCT-116 também dialoga com relatos prévios da literatura que associam esse composto à inibição da proliferação de células colorretais, fornecendo sustentação adicional para seu interesse farmacológico.

Os resultados observados para P3 e P4 contribuem com a ampliação do potencial biológico associado à família de derivados da bergenina identificada na espécie, ainda que a elucidação estrutural completa desses compostos permaneça pendente.

4.6 Resposta biológica da bergenina e considerações sobre seletividade

Em razão da limitação de rendimento dos compostos isolados, apenas a bergenina pôde ser avaliada em modelos celulares adicionais, incluindo as linhagens de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 e MDA-MB-231, bem como células não tumorais RPE-1. Essa etapa teve como objetivo explorar, de forma preliminar, a amplitude de resposta biológica do composto e obter informações iniciais sobre seu perfil de segurança em células não transformadas.

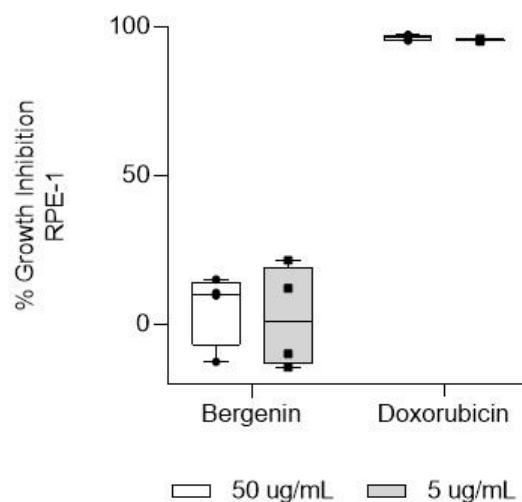
Nos ensaios realizados, a bergenina apresentou comportamento dependente do modelo celular. Frente à linhagem MCF-7, foi observado efeito inibitório moderado, com $46,4 \pm 15,4\%$ de inibição na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em contraste, não foi detectada inibição expressiva do crescimento celular na linhagem MDA-MB-231 na mesma condição experimental. Esses resultados indicam que a atividade antiproliferativa da bergenina não se manifesta de maneira uniforme entre as linhagens tumorais avaliadas, sugerindo que sua resposta biológica pode estar relacionada a características específicas do fenótipo tumoral.

A diferença observada entre MCF-7 e MDA-MB-231 é particularmente relevante, uma vez que essas linhagens apresentam perfis biológicos distintos. Assim, a atividade moderada em MCF-7, associada à ausência de efeito expressivo em MDA-MB-231, sugere que a bergenina pode atuar de maneira mais favorável em contextos celulares específicos, o que reforça a necessidade de interpretar seu potencial biológico de forma contextualizada, e não generalizada para diferentes tipos de câncer de mama.

Em relação às células não tumorais RPE-1, a bergenina apresentou baixa citotoxicidade nas concentrações testadas. Os valores de inibição observados foram de $5,6 \pm 6,2\%$ a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2,24 \pm 8,66\%$ a $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Figura 9**), indicando que, nas condições empregadas, o composto exerceu efeito mínimo sobre uma linhagem não transformada. Esse resultado é relevante do ponto de vista biológico, pois sugere, de maneira preliminar, um perfil de segurança favorável nas concentrações avaliadas.

Figura 9 - Gráfico de inibição do crescimento celular (%) dos compostos isolados de *H. balsamifera* contra células RPE-1 tratadas com bergenina e o controle positivo doxorrubicina. A CI_{50} da doxorrubicina calculada para a linhagem RPE-1 foi de $0,35 \mu\text{M}$ (IC 95%: 0,11–0,98). Os tratamentos foram realizados nas concentrações de 5 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os dados são apresentados em box plots, indicando a mediana, o intervalo interquartil e os valores individuais. A doxorrubicina foi utilizada

como controle positivo funcional para validar a responsividade do ensaio e não se destina a comparações quantitativas diretas com os compostos testados. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). *C: caule; F: folhas.



Fonte: Autoria própria.

É importante ressaltar que os dados atualmente disponíveis não permitem estabelecer formalmente um índice de seletividade, uma vez que as avaliações foram conduzidas em concentrações fixas, sem curvas completas de dose-resposta. Assim, os resultados obtidos constituem evidência inicial de que a bergenina apresenta baixa citotoxicidade em células não tumorais RPE-1 e atividade dependente do fenótipo tumoral, com efeito moderado em MCF-7 e ausência de inibição expressiva em MDA-MB-231, configurando um perfil biológico promissor que justifica investigações futuras, mas que não deve ser interpretado, isoladamente, como indicativo de seletividade farmacológica estabelecida.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos permitem estabelecer uma aproximação entre o uso popular de *H. balsamifera*, mencionado anteriormente, e sua composição química. A detecção de flavonoides nos extratos foliares e o isolamento de bergenina conferem plausibilidade química aos usos tradicionais atribuídos à espécie, uma vez que esses metabólitos apresentam atividades biológicas amplamente descritas na literatura. Ainda assim, essa relação deve ser interpretada com cautela, pois a validação etnofarmacológica de uma espécie requer a integração de evidências químicas, farmacológicas e toxicológicas mais específicas (MARQUES, 2019; AGATI *et al.*, 2012; SALIMO *et al.*, 2023; ATANASOV *et al.*, 2015).

Sendo assim, os dados de citotoxicidade obtidos neste trabalho ampliam a perspectiva biológica da espécie para além do uso etnofarmacológico estabelecido, ao demonstrar que a bergenina exerce efeito antiproliferativo expressivo em células de carcinoma colorretal e moderado em adenocarcinoma mamário, com baixa toxicidade em células não tumorais. Embora estudos mecanísticos e ensaios concentração-resposta sejam necessários para consolidar esse potencial, os resultados indicam que a investigação fitoquímica orientada por dados metabolômicos é uma abordagem eficiente para traduzir o conhecimento etnobotânico em evidências químicas e biológicas, valorizando a biodiversidade brasileira como fonte de moléculas de interesse farmacológico.

5 CONCLUSÃO

A investigação fitoquímica de *Humiria balsamifera* permitiu caracterizar um perfil químico diversificado, com a anotação de 18 metabólitos em modo positivo, entre os quais se destacaram flavonoides O- e C-glicosilados, agliconas flavonoídicas e compostos relacionados à bergenina. A integração entre UHPLC-QTOF-MS, redes moleculares e análise multivariada mostrou-se eficiente para a organização e interpretação dos dados, evidenciando que o órgão vegetal e a etapa extrativa considerada estiveram associados a composição química das amostras de forma marcante. Nesse contexto, os extratos de folhas apresentaram maior diversidade de flavonoides, enquanto o extrato do caule em acetato de etila se destacou pela maior abundância de bergenina e de seus derivados.

A bergenina foi isolada do extrato em acetato de etila do caule e sua atribuição estrutural foi sustentada por espectrometria de massas de alta resolução e ressonância magnética nuclear a 600 MHz, em concordância com a literatura. Embora o isolamento da bergenina a partir de *H. balsamifera* já tenha sido previamente descrito por Da Silva *et al.* (2004), o presente trabalho amplia esse registro ao obter o composto a partir de um órgão vegetal distinto e ao empregar metodologias analíticas mais avançadas para sua caracterização estrutural, contribuindo com dados espectrométricos de maior resolução e detalhamento para a espécie. Adicionalmente, compostos compatíveis com galoilbergenina e hidroxibenzoilbergenina foram detectados nos dados de massas e na rede molecular, sugerindo a ocorrência de uma pequena família de derivados da bergenina na espécie. Embora a confirmação estrutural desses compostos não tenha sido possível em razão da limitação de material isolado, sua presença amplia o interesse fitoquímico sobre a espécie.

Na triagem citotóxica, os extratos brutos apresentaram atividade limitada frente à linhagem HCT-116, enquanto os compostos isolados exibiram efeito antiproliferativo mais pronunciado nas condições avaliadas. A bergenina apresentou inibição superior a 97% em HCT-116 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, superando o critério de triagem adotado neste trabalho (inibição > 75%). O composto P3 também atingiu esse critério, com 82,1% de inibição. O composto P4, por sua vez, apresentou inibição de 74,2%, valor próximo ao limiar estabelecido, compatível com atividade citotóxica relevante no contexto da triagem preliminar, porém insuficiente para ser classificado como de elevado efeito biológico segundo o critério adotado. Esses resultados indicam que a etapa de

isolamento foi fundamental para evidenciar de forma mais clara o potencial biológico dos metabólitos presentes na espécie.

A avaliação complementar da bergenina em outros modelos celulares revelou resposta dependente do sistema analisado, com efeito moderado em MCF-7, ausência de atividade expressiva em MDA-MB-231 e baixa citotoxicidade em células não tumorais RPE-1 nas concentrações testadas. Esses dados sugerem um perfil biológico promissor e indicam a necessidade de estudos adicionais para melhor definição de sua seletividade e segurança.

Considerados em conjunto, os resultados indicam uma relação plausível entre a composição química de *H. balsamifera* e seu uso popular. A presença de flavonoides, metabólitos amplamente associados a atividades antioxidante e anti-inflamatória, é coerente com o emprego tradicional da espécie em condições inflamatórias e metabólicas, enquanto a bergenina amplia essa discussão ao apresentar efeito antiproliferativo em modelos tumorais, com baixa toxicidade em células não transformadas. Embora esses achados forneçam suporte químico e biológico inicial para os usos tradicionalmente atribuídos à espécie, sua interpretação deve permanecer cautelosa, uma vez que a validação etnofarmacológica exige evidências adicionais. Em conjunto, os resultados também apontam para um potencial farmacológico promissor, possivelmente mais amplo do que aquele descrito no uso popular.

Em geral, os resultados demonstram que *H. balsamifera* constitui uma espécie promissora para estudos fitoquímicos e biológicos, tanto pela diversidade de metabólitos anotados quanto pela relevância da bergenina como marcador químico e composto bioativo. Como perspectivas futuras, destacam-se o isolamento e a confirmação estrutural de outros metabólitos sugeridos pelas redes moleculares, especialmente os derivados da bergenina, bem como a ampliação da avaliação biológica por meio de ensaios concentração-resposta, determinação de IC₅₀, cálculo de índice de seletividade e estudos mecanísticos. Dessa forma, este trabalho fornece base consistente para o aprofundamento das investigações sobre a espécie e para a valorização da biodiversidade brasileira como fonte de moléculas de interesse científico e farmacológico.

REFERÊNCIAS

AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, Limerick, v. 196, p. 67-76, 2012. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014.

AGATI, G.; BRUNETTI, C.; DI FERDINANDO, M.; FERRINI, F.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, Paris, v. 72, p. 35-45, 2013. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.03.014.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.-M.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.

BAJRACHARYA, G. B. Bergenin: a bioactive secondary metabolite with multiple pharmacological activities. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 20-24, 2015.

BOOZARI, M.; HOSSEINZADEH, H. Natural products for COVID-19 prevention and treatment regarding to previous coronavirus infections and novel studies. *Phytotherapy Research*, Chichester, v. 35, n. 2, p. 864-876, 2021. DOI: 10.1002/ptr.6873.

CAESAR, L. K.; CECH, N. B. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*, Cambridge, v. 36, n. 6, p. 869-888, 2019. DOI: 10.1039/C9NP00011A.

CARNEIRO, D. B.; BARBOZA, M. S. L.; MENEZES, M. P. Plantas nativas úteis na Vila dos Pescadores da Reserva Extrativista Marinha Caeté-Taperaçu, Pará, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, Feira de Santana, v. 24, n. 4, p. 1027-1033, 2010. DOI: 10.1590/S0102-33062010000400017.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006. DOI: 10.1016/j.jep.2006.04.003.

DA SILVA, T. B. C.; ALVES, V. L.; MENDONÇA, L. V. H.; CONSERVA, L. M.; DA ROCHA, E. M. M.; ANDRADE, E. H. A.; LEMOS, R. P. L. Chemical constituents and preliminary antimalarial activity of *Humiria balsamifera*. *Pharmaceutical Biology*, Lisse, v. 42, n. 2, p. 94-97, 2004. DOI: 10.1080/13880200490510702.

DIAS, E. J. S.; CANTANHEDE FILHO, A. J.; CARNEIRO, F. J. C.; DA ROCHA, C. Q.; DA SILVA, L. C. N.; SANTOS, J. C. B.; BARROS, T. F.; SANTOS, D. M. Antimicrobial activity of extracts from *Humiria balsamifera* (Aubl.). *Plants*, Basel, v. 10, p. 1479, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10071479>.

DUTRA, A. R.; SUTILI, F. K.; MUZITANO, M. F.; GUIMARÃES, D. O.; DE SOUZA, R. O.; LEAL, I. C. Microwave-assisted extraction of metabolites from *Humiria balsamifera* leaves: a rapid and efficient methodology for antioxidant constituents obtainment. *Planta Medica*, Stuttgart, v. 79, n. 13, p. PI62, 2013. DOI: 10.1055/s-0033-1352151.

GAO, X.; WANG, Y.; ZHANG, J.; LIN, L.; YAO, Q.; XIANG, G. Bergenin suppresses the growth of colorectal cancer cells by inhibiting PI3K/AKT/MTOR signaling pathway. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, Benin City, v. 16, n. 10, p. 2307-2313, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v16i10.1>.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon: IARC, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today/>. Acesso em: 15 dez. 2024

MADUKA, H. C. C.; OKOYE, Z. S. C.; EJE, A. The influence of *Sacoglottis gabonensis* stem bark extract and its isolate bergenin, Nigerian alcoholic beverage additives, on the metabolic and haematological side effects of 2,4-dinitrophenyl hydrazine-induced tissue damage. *Vascular Pharmacology*, Amsterdam, v. 39, p. 317-324, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(03\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(03)00042-9).

MANNOCHIO-RUSSO, H.; BUENO, P. C. P.; BAUERMEISTER, A.; DE ALMEIDA, R. F.; DORRESTEIN, P. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Can statistical evaluation tools for chromatographic method development assist in the natural products workflow? A case study on selected species of the plant family Malpighiaceae. *Journal of Natural Products*, Washington, v. 83, n. 11, p. 3239-3249, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00495>.

MANNOCHIO-RUSSO, H.; SANTOS, A. L. P.; BUENO, P. C. P.; VIEIRA, R.; PINTO, M. E. F.; QUEIROZ, S. A. S.; DUTRA, L. A.; FELIPPE, L. G.; BATISTA, A. N. L.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; VALLI, M.; MEDINA, R. P.; ARAÚJO, A. R.; PILON, A. C.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Twenty-five years of natural products research in NuBBE. *Frontiers in Natural Products*, [s. l.], v. 2, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fntpr.2023.1252092>.

MARQUES, G. E. C. *Mirim (Humiria balsamifera (Aubl.)): riqueza da biodiversidade maranhense*. 1. ed. São Luís: IFMA, 2019. v. 1. 118 p. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/349899785>. Acesso em: 29 abr. 2025.

MMA. Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima. Biodiversidade brasileira. Brasília, DF, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/>. Acesso em: 9 nov. 2024.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NOGUEIRA, R. S.; SALU, B. R.; NARDELLI, V. G.; BONTURI, C. R.; PEREIRA, M. R.; MAFFEI, F. H. A.; CILLI, E. M.; OLIVA, M. L. V. A snake venom-analog peptide that inhibits SARS-CoV-2 and papain-like protease displays antithrombotic activity in mice arterial thrombosis model, without interfering with bleeding time. *Thrombosis Journal*, London, v. 21, p. 1, 2023. DOI: 10.1186/s12959-022-00436-5.

NOTHIAS, L.-F.; PETRAS, D.; SCHMID, R.; DUHRKOP, K.; RAINA, A.; SARVEPAILI, A.; PROTSENKO, D.; ERNST, M.; TSUGAWA, H.; FLEURIET, C. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*, New York, v. 17, p. 905-908, 2020. DOI: 10.1038/s41592-020-0933-6.

NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; DA SILVA, S. L.; NUNOMURA, S. M. Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 1060-1064, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000600009>.

PILON, A. C.; VIEIRA, N. C.; AMARAL, J. G.; MONTEIRO, A. F.; SILVA, R. R. D.; SPÍNDOLA, L. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; LOPES, N. P. Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. *Química Nova*, São Paulo, v. 44, p. 1168-1179, 2021.

PLOUVIER, D. *Humiria balsamifera* Aubl. [fotografia]. 19 jun. 2025. Disponível em: <https://identify.plantnet.org/pt-br/k-world-flora/species/Humiria%20balsamifera%20Aubl./data/galleries>. Acesso em: 16 mai. 2026

RAMOS, A. E. F.; EVANNO, L.; POUPON, E.; CHAMPY, P.; BENIDDIR, M. A. Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Natural Product Reports*, Cambridge, v. 36, n. 7, p. 960-980, 2019.

SALIMO, Z. M.; YAKUBU, M. N.; DA SILVA, E. L.; DE ALMEIDA, A. C. G.; CHAVES, Y. O.; COSTA, E. V.; DA SILVA, F. M. A.; TAVARES, J. F.; MONTEIRO, W. M.; DE MELO, G. C. *et al.* Chemistry and pharmacology of bergenin or its derivatives: a promising molecule. *Biomolecules*, Basel, v. 13, n. 3, p. 403, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13030403>.

SANTOS, M. G.; FEVEREIRO, P. C. A.; REIS, G. L.; BARCELOS, J. I. Recursos vegetais da Restinga de Carapebus, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Biologia Neotropical*, Goiânia, v. 6, n. 1, p. 35-54, 2009. DOI: <https://doi.org/10.5216/rbn.v6i1.12628>.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, v. 13, p. 2498-2504, 2003. DOI: 10.1101/gr.1239303.

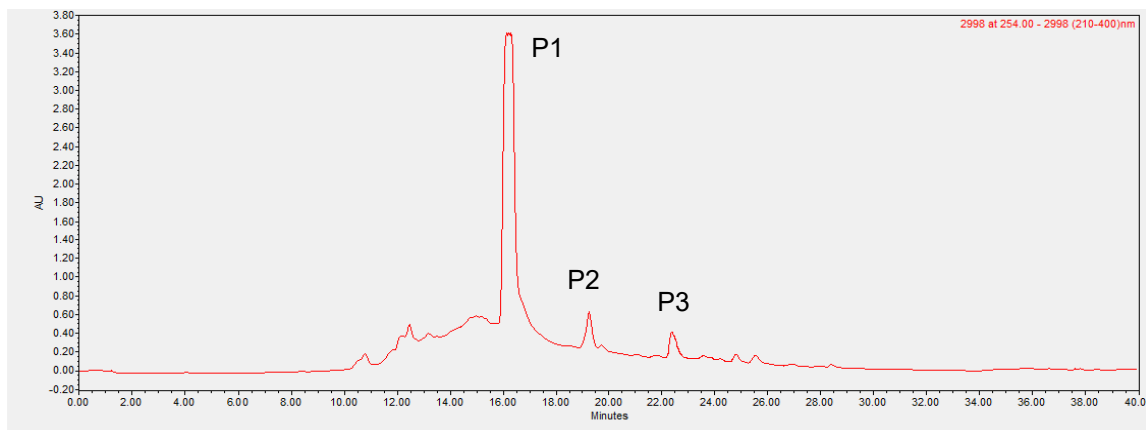
SOROKINA, M.; STEINBECK, C. *Review on natural products databases: where to find data in 2020*. *Journal of Cheminformatics*, London, v. 12, 2020. DOI: 10.1186/s13321-020-00424-9.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; WATROUS, J.; KAPONO, C. A.; LUZZATTO-KNOPP, T. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products

Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, New York, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016. DOI: 10.1038/nbt.3597.

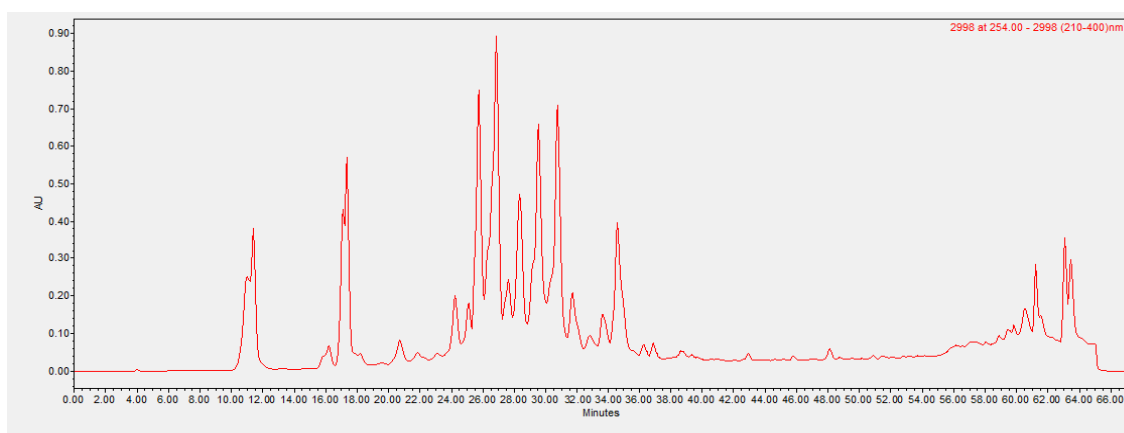
APÊNDICE A – PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS E ESPECTROS DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

Figura 10 - Perfil cromatográfico do extrato de caule obtido com AcOEt no modo preparativo.

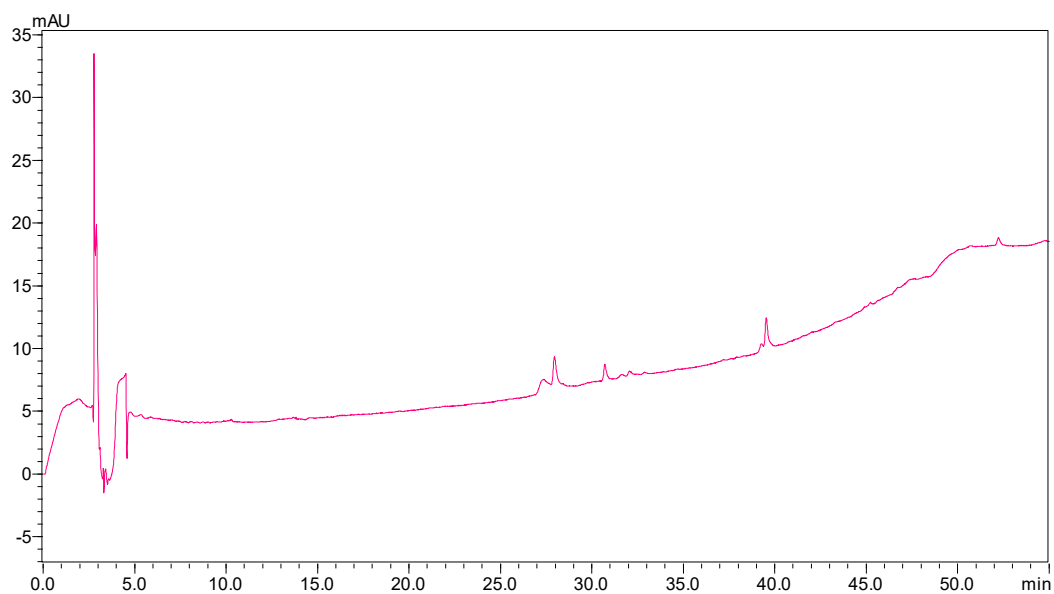


Fonte: Autoria própria.

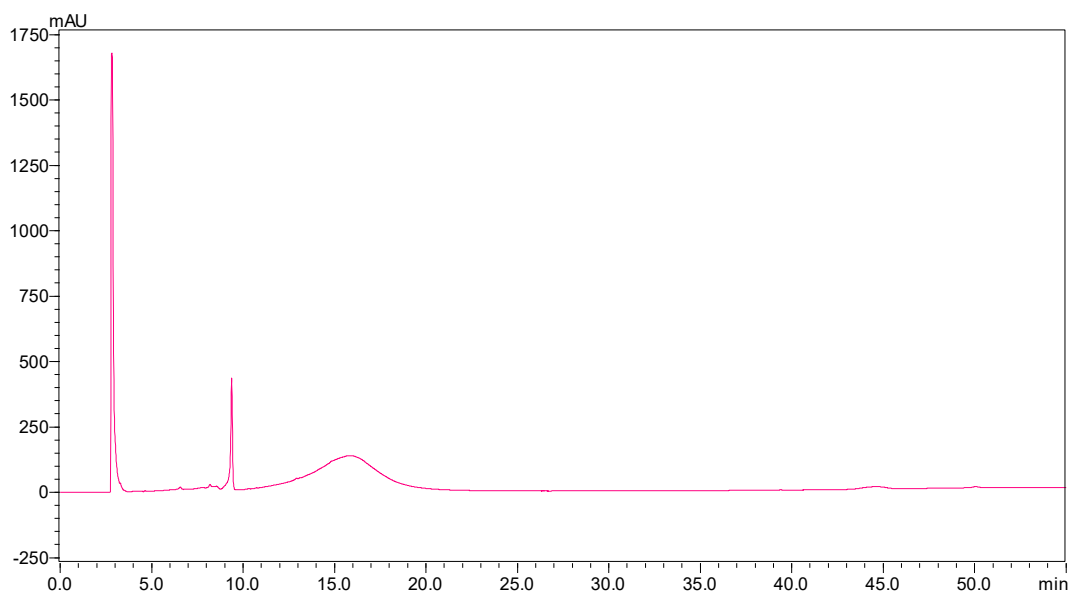
Figura 11 - Perfil cromatográfico do extrato de folhas obtido com AcOEt no modo preparativo.



Fonte: Autoria própria.

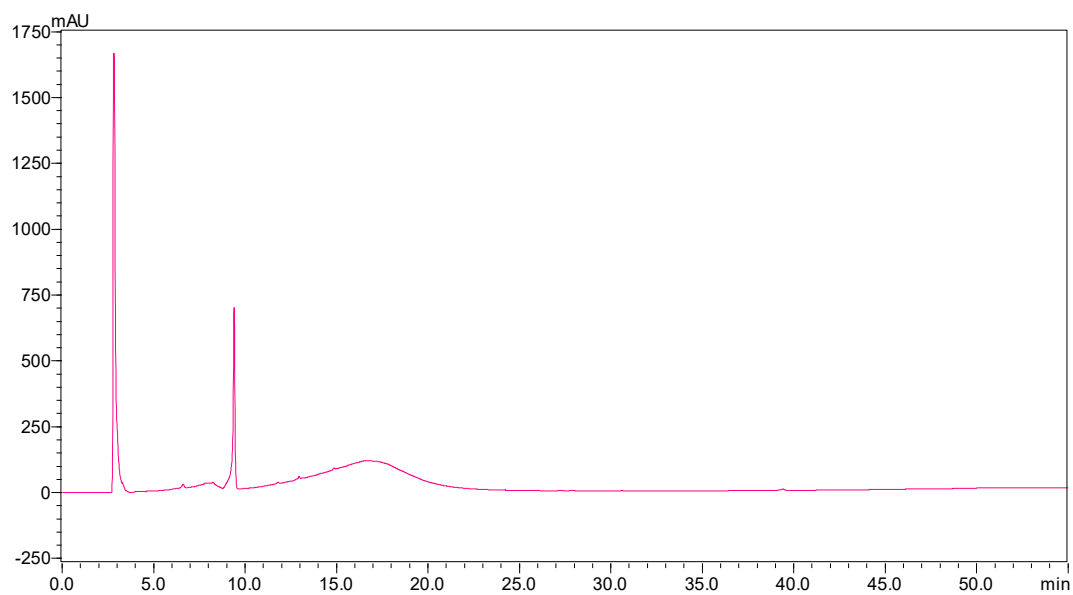
Figura 12 – Branco no modo analítico a 254 nm.

Fonte: Autoria própria.

Figura 13 - Perfil cromatográfico do Extrato Metanólico do Caule no modo analítico a 254 nm (C_MeOH).

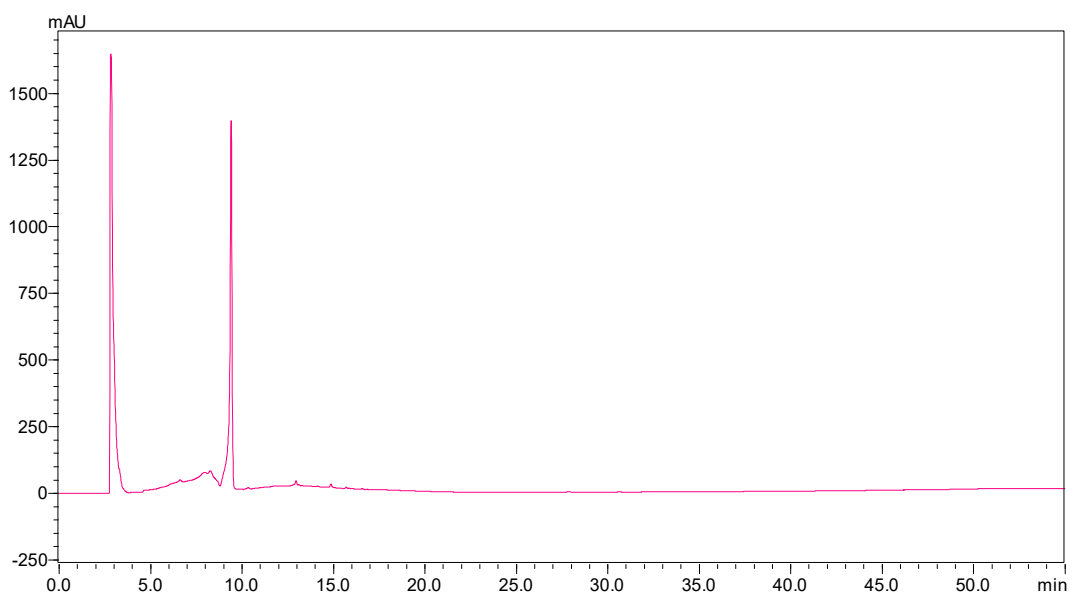
Fonte: Autoria própria.

Figura 14 - Perfil cromatográfico do Extrato Etanólico do Caule no modo analítico a 254 nm (C_EtOH).



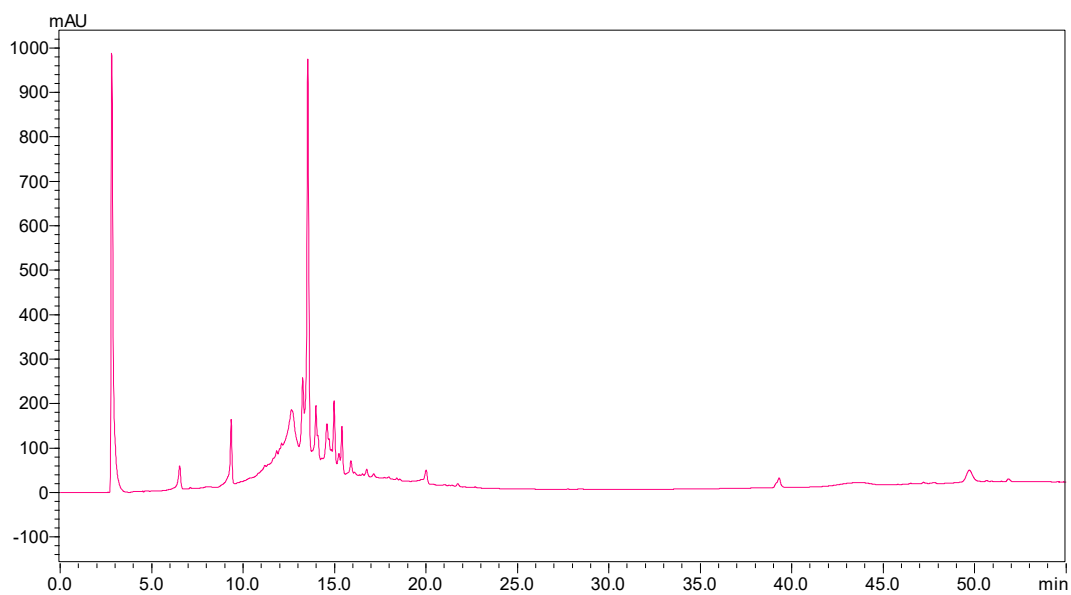
Fonte: Autoria própria.

Figura 15 - Perfil cromatográfico do Extrato de Acetato de Etila do Caule no modo analítico a 254 nm (C_AcOEt).



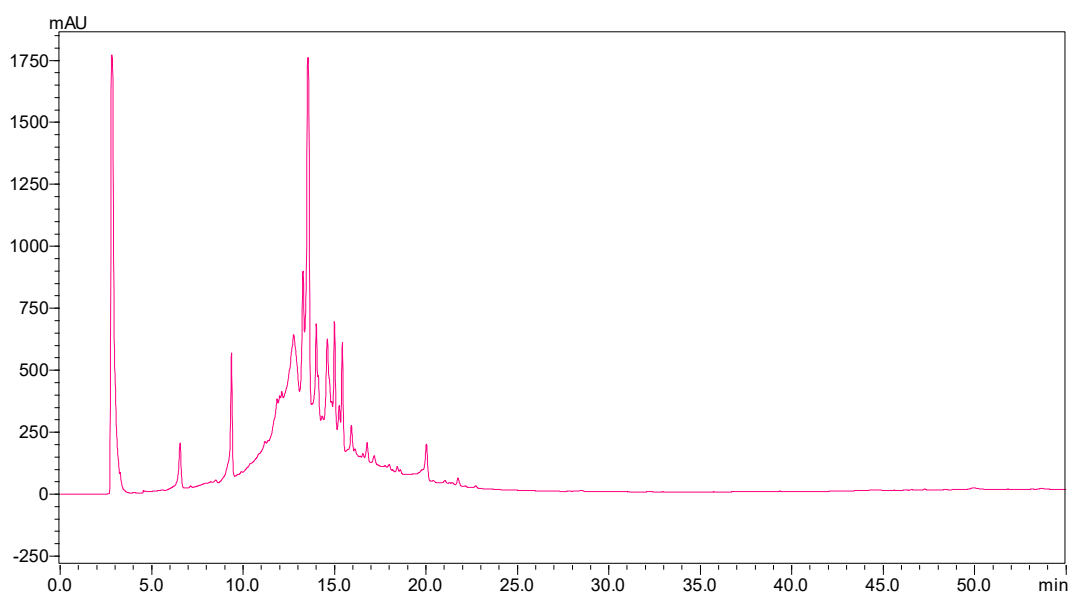
Fonte: Autoria própria.

Figura 16 - Perfil cromatográfico do Extrato Metanólico de Folha no modo analítico a 254 nm (F_MeOH).



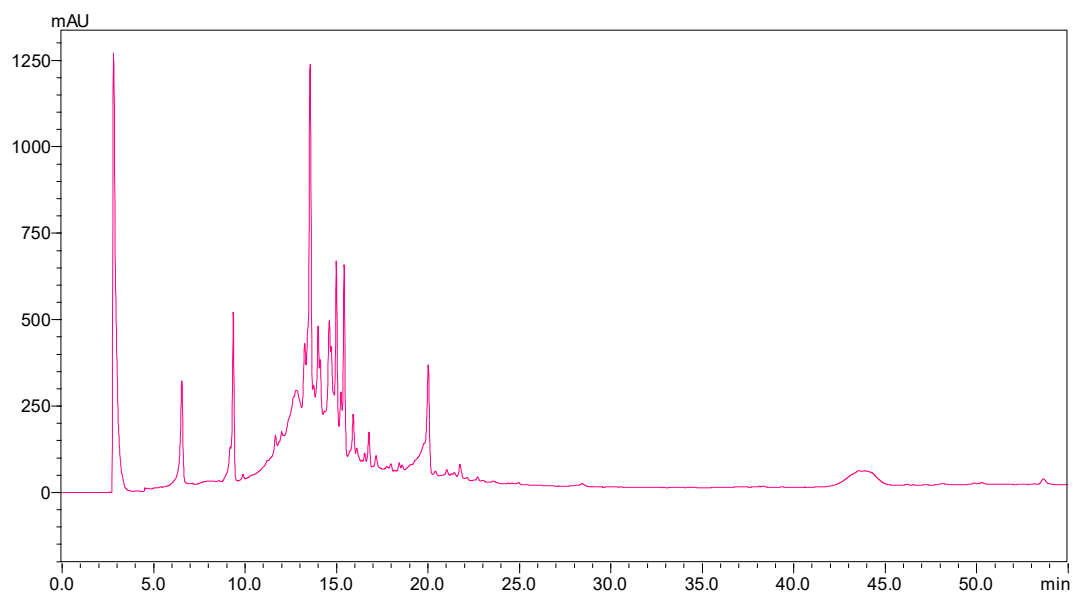
Fonte: Autoria própria.

Figura 17 - Perfil cromatográfico do Extrato Etanólico de Folha no modo analítico a 254 nm (F_EtOH).



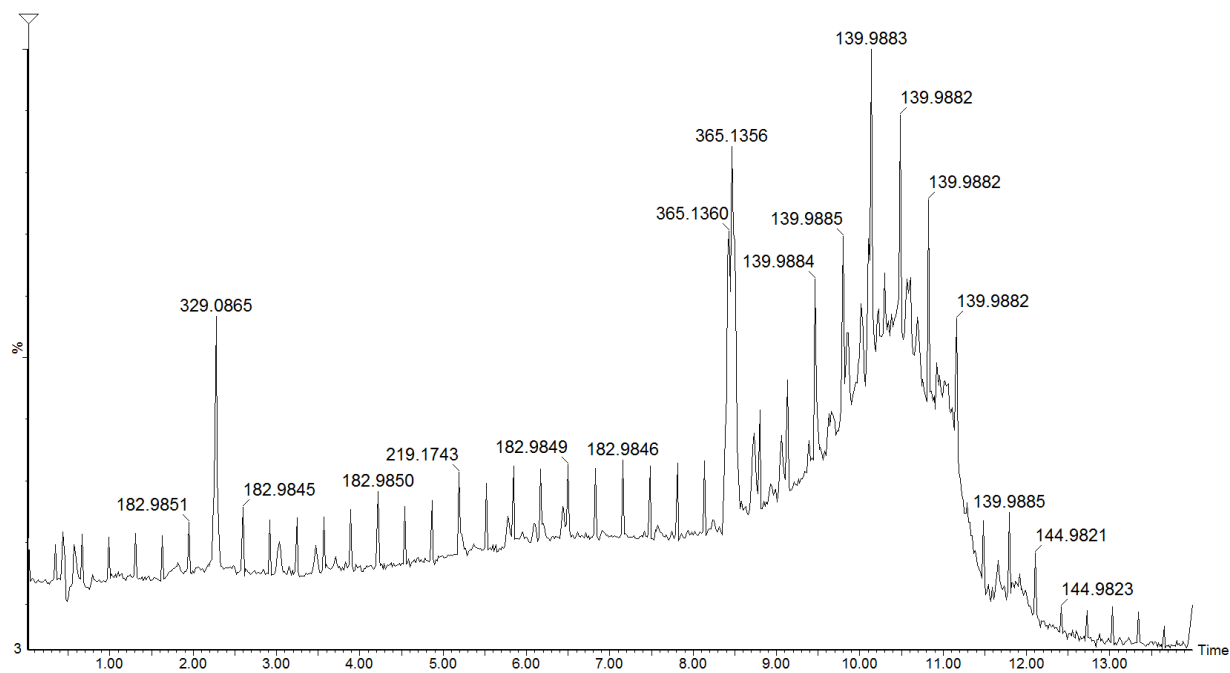
Fonte: Autoria própria.

Figura 18 - Perfil cromatográfico do Extrato de Acetato de Etila de Folha no modo analítico a 254 nm (F_AcOEt)

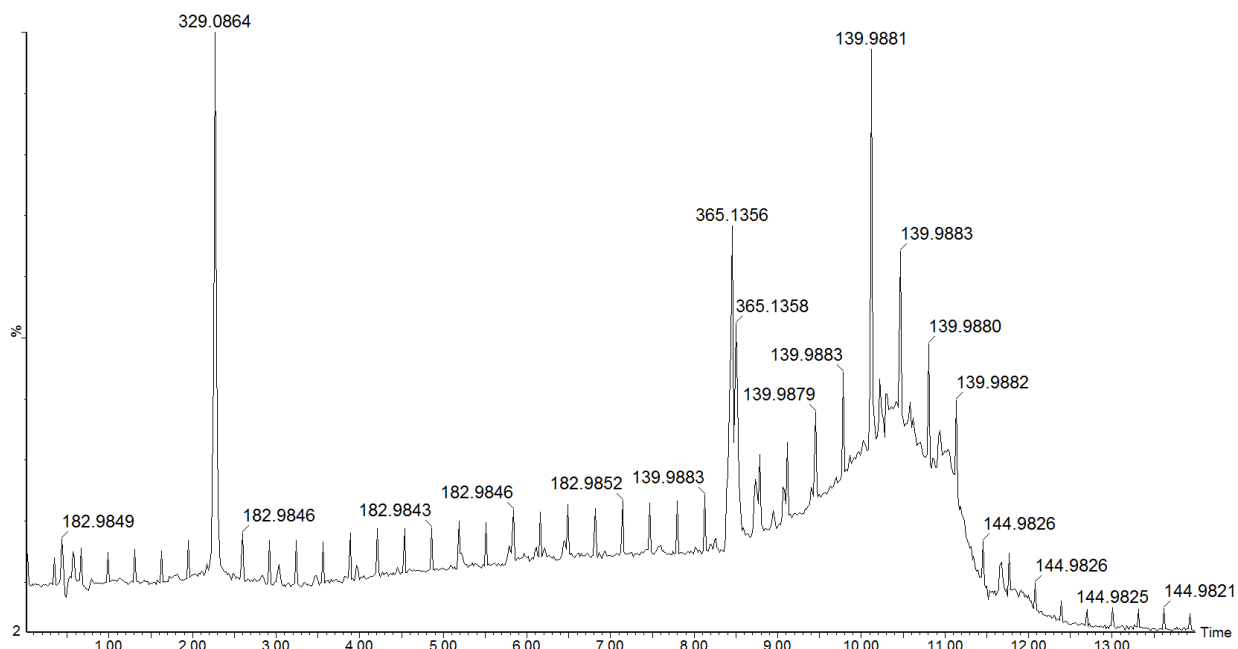


Fonte: Autoria própria.

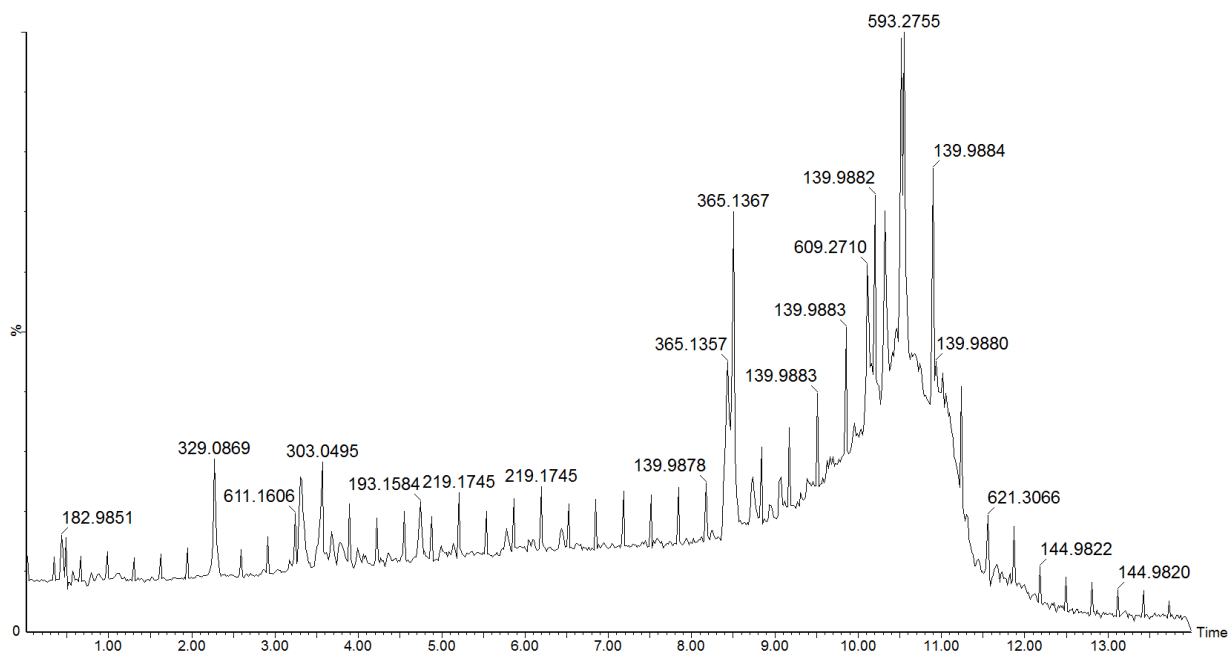
Figura 19 - Perfil do extrato C_AcOEt obtido por UHPLC-Q TOF-MS.



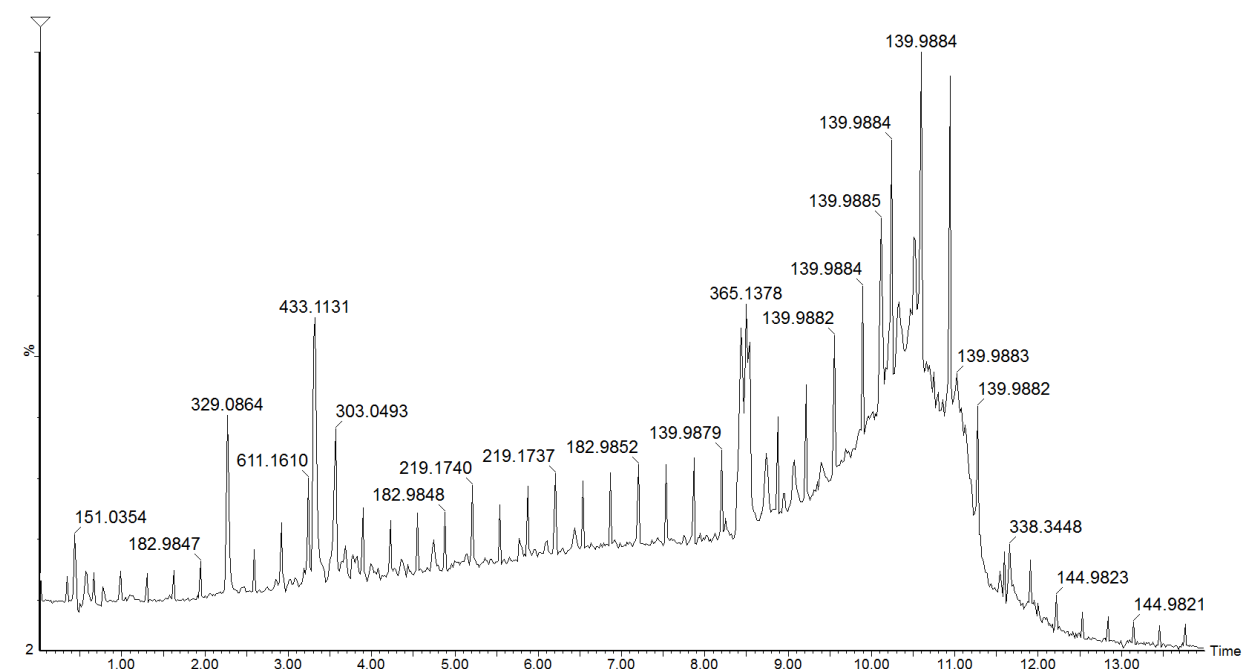
Fonte: Autoria própria.

Figura 20 - Perfil do extrato EtOH obtido por UHPLC-Q TOF-MS.

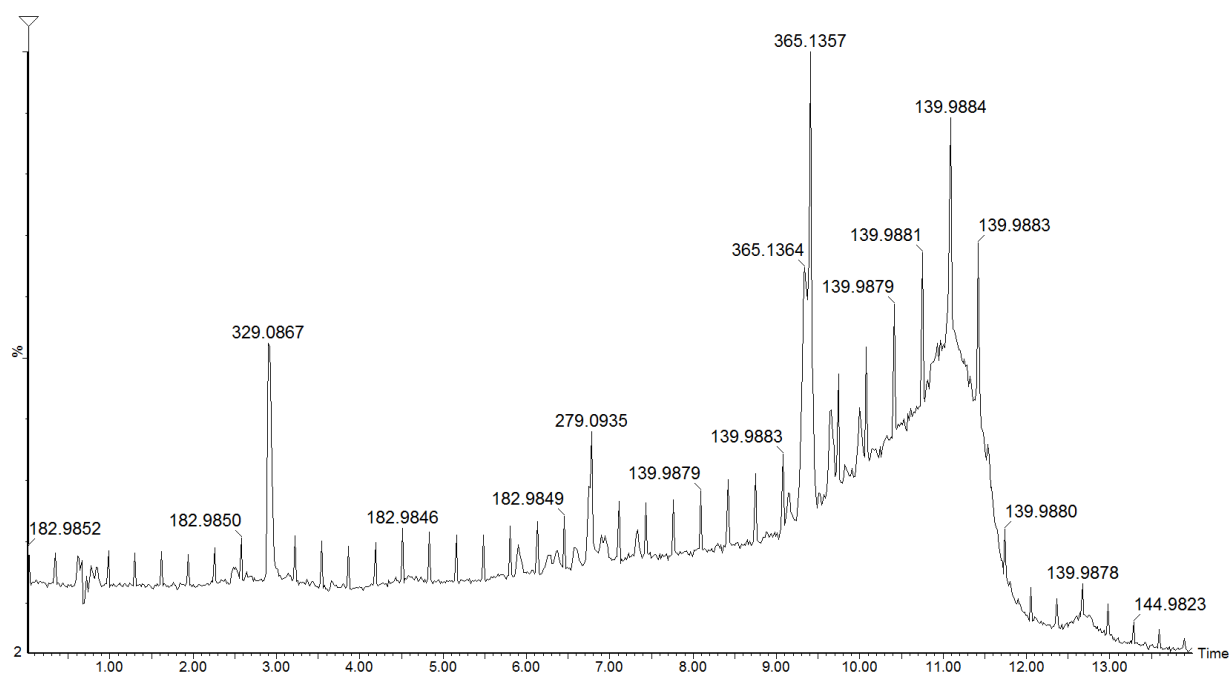
Fonte: Autoria própria.

Figura 21 - Perfil do extrato F_AcOEt obtido por UHPLC-Q TOF-MS.

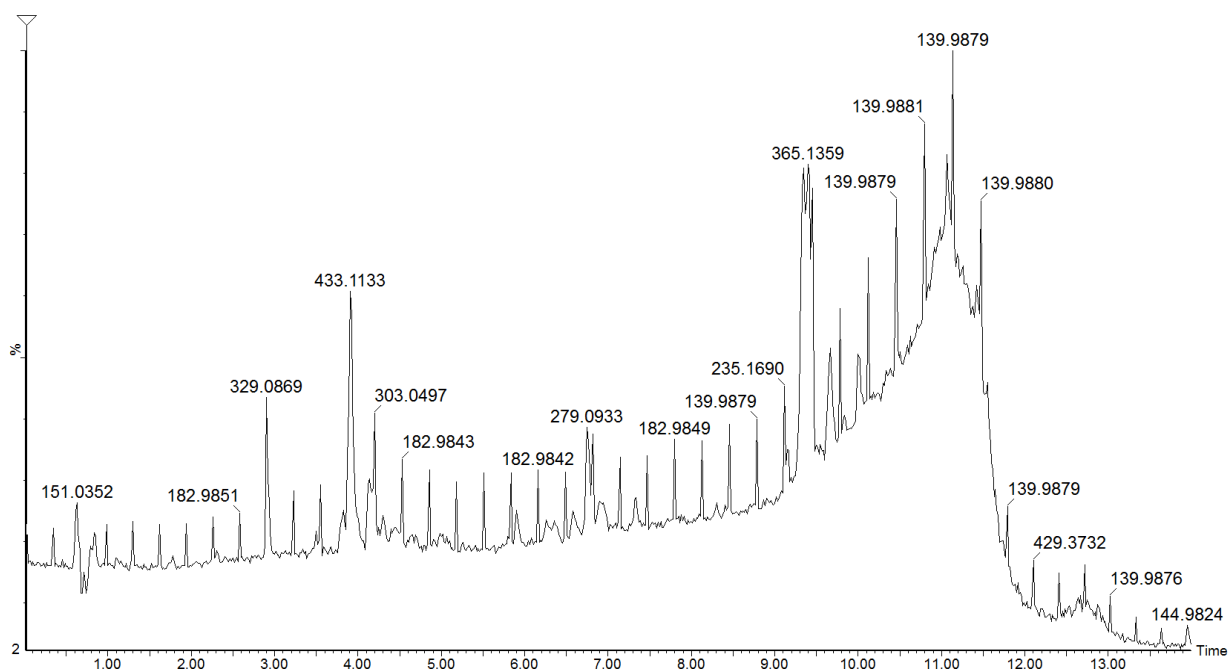
Fonte: Autoria própria.

Figura 22 - Perfil do extrato F_EtOH obtido por UHPLC-Q TOF-MS.

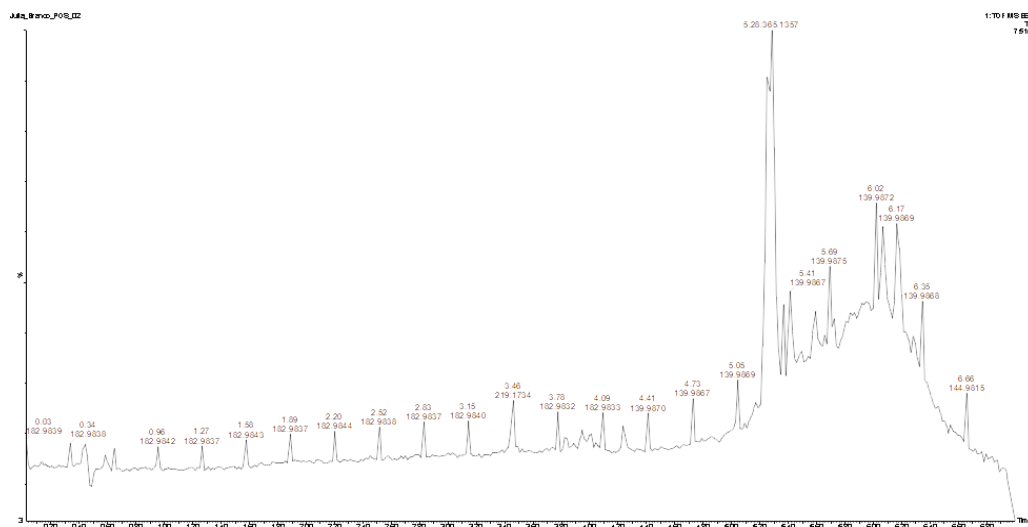
Fonte: Autoria própria.

Figura 23 - Perfil do extrato C_MeOH obtido por UHPLC-Q TOF-MS.

Fonte: Autoria própria.

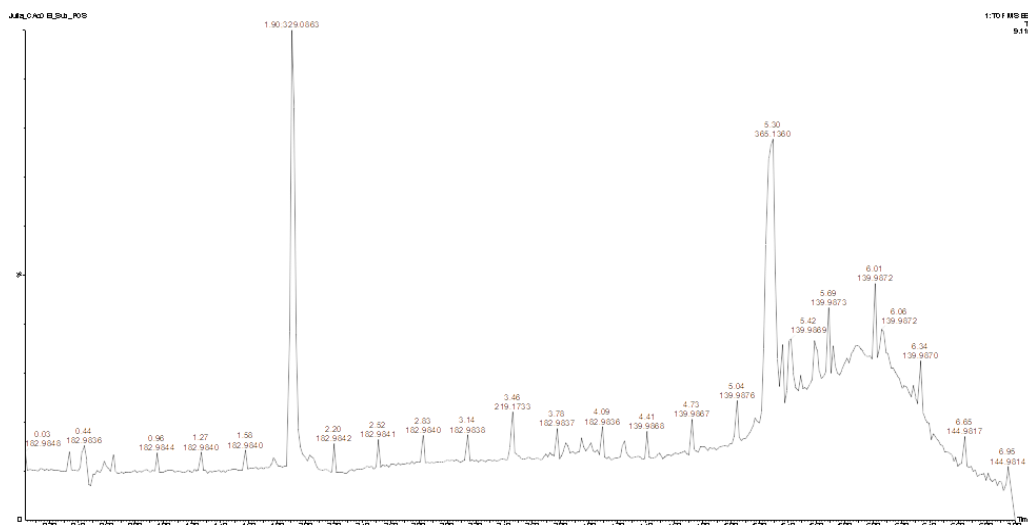
Figura 24 - Perfil do extrato F_MeOH obtido por UHPLC-Q TOF-MS.

Fonte: Autoria própria.

Figura 25 - Perfil do branco obtido por UHPLC-Q TOF-MS.

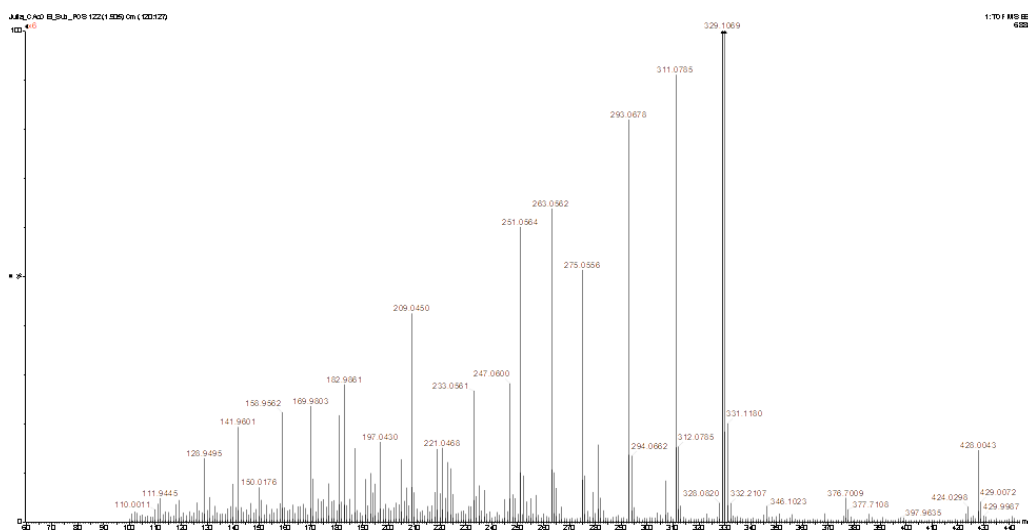
Fonte: Autoria própria.

Figura 26 - Perfil da amostra P1 (1,6 min) obtido por UHPLC-Q TOF-MS.



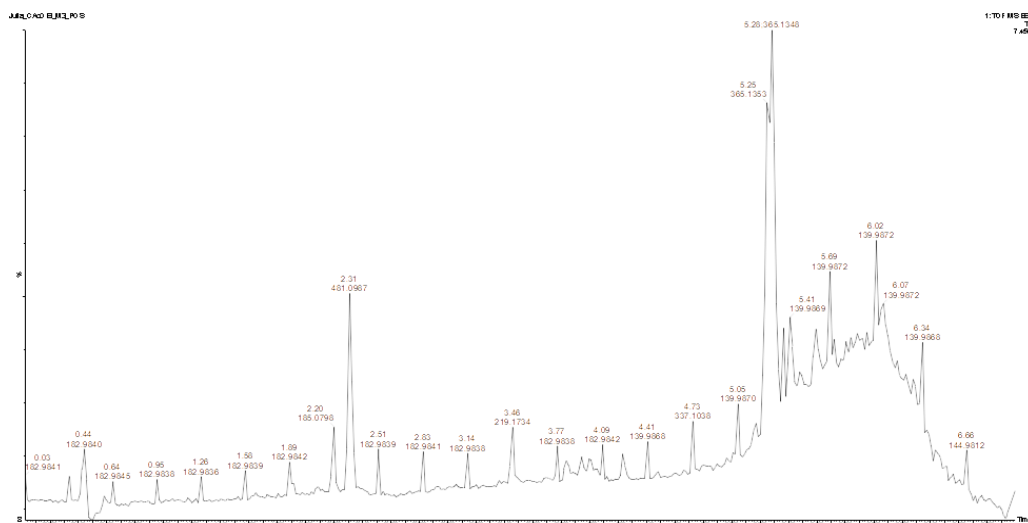
Fonte: Autoria própria.

Figura 27 - Perfil de fragmentação do pico 329,11 (m/z) presente na amostra P1 obtido por UHPLC-Q TOF-MS/MS.



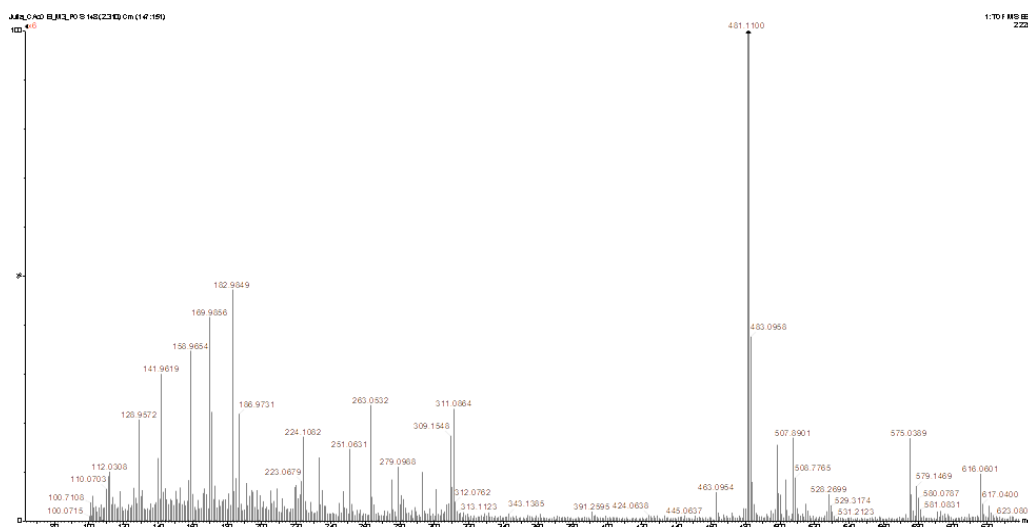
Fonte: Autoria própria.

Figura 28 - Perfil da amostra P2 (1,9 min) obtido por UHPLC-Q TOF-MS.



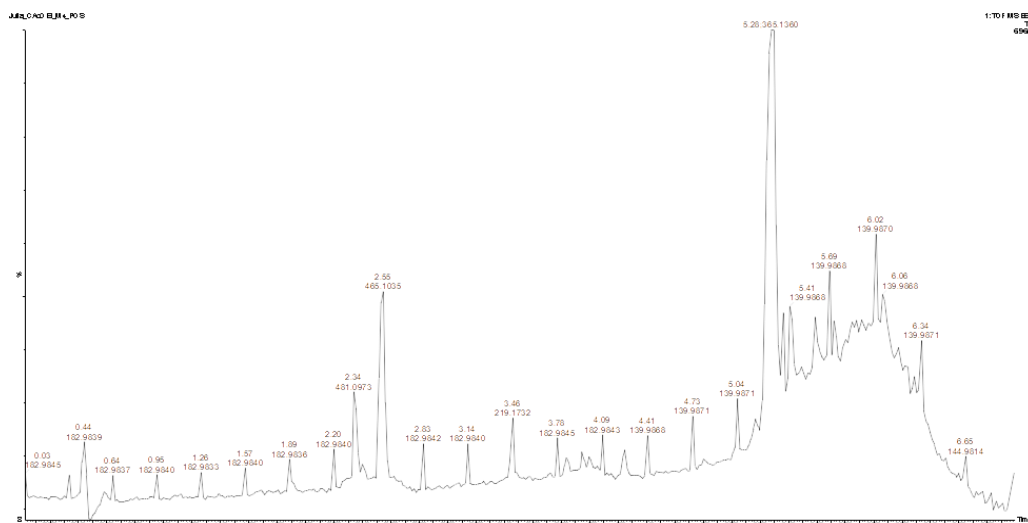
Fonte: Autoria própria.

Figura 29 - Perfil de fragmentação do pico 481,10 (m/z) presente na amostra P2 obtido por UHPLC-Q TOF-MS/MS.



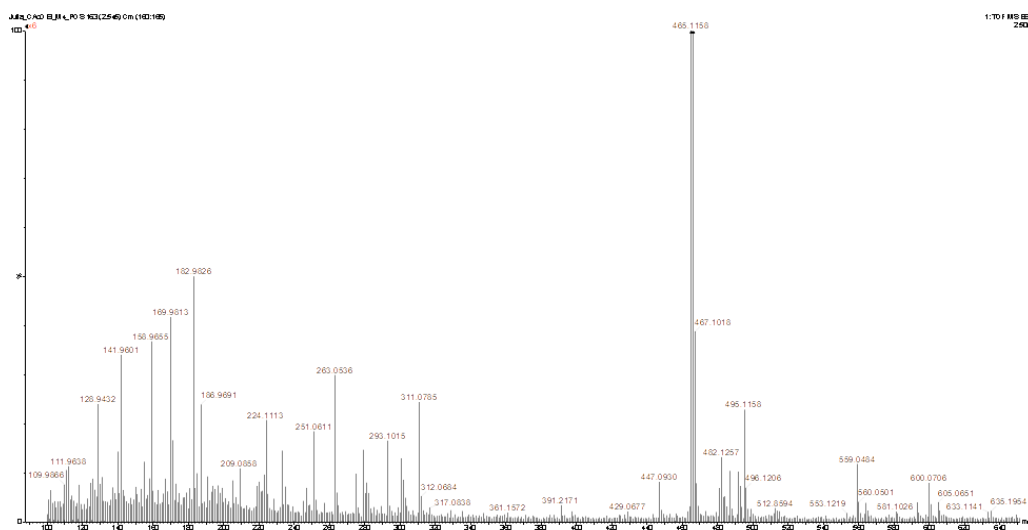
Fonte: Autoria própria.

Figura 30 - Perfil da amostra P3 (2,2 min) obtido por UHPLC-Q TOF-MS.



Fonte: Autoria própria.

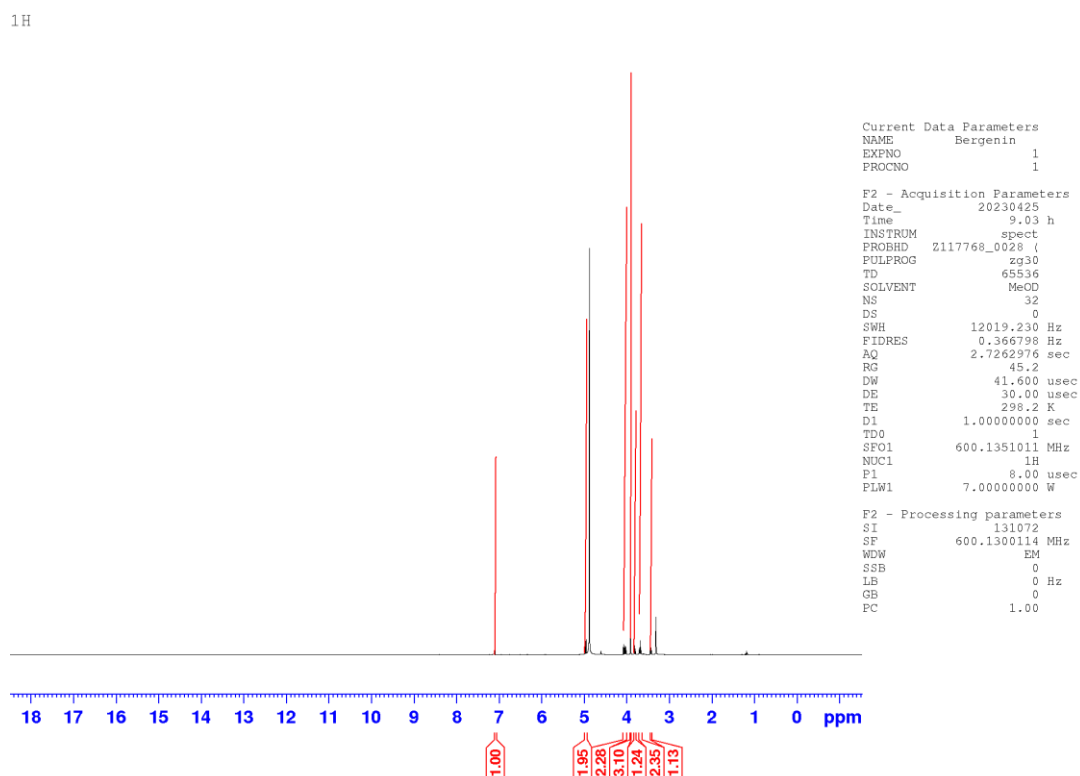
Figura 31 - Perfil de fragmentação do pico 465,11 (m/z) presente na amostra P3 obtido por UHPLC-Q TOF-MS/MS.



Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE B – ESPECTROS DOS EXPERIMENTOS DE RMN ^1H E ^{13}C DA BERGENINA

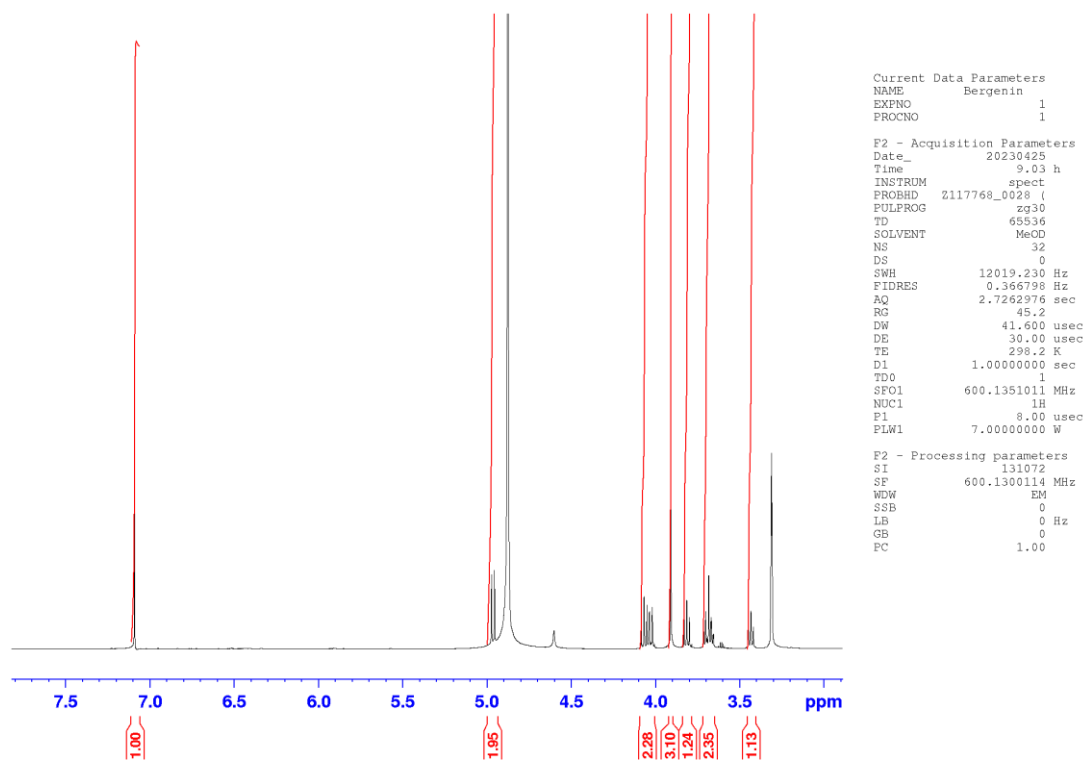
Figura 32 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) da bergenina (**1**).



Fonte: Autoria própria.

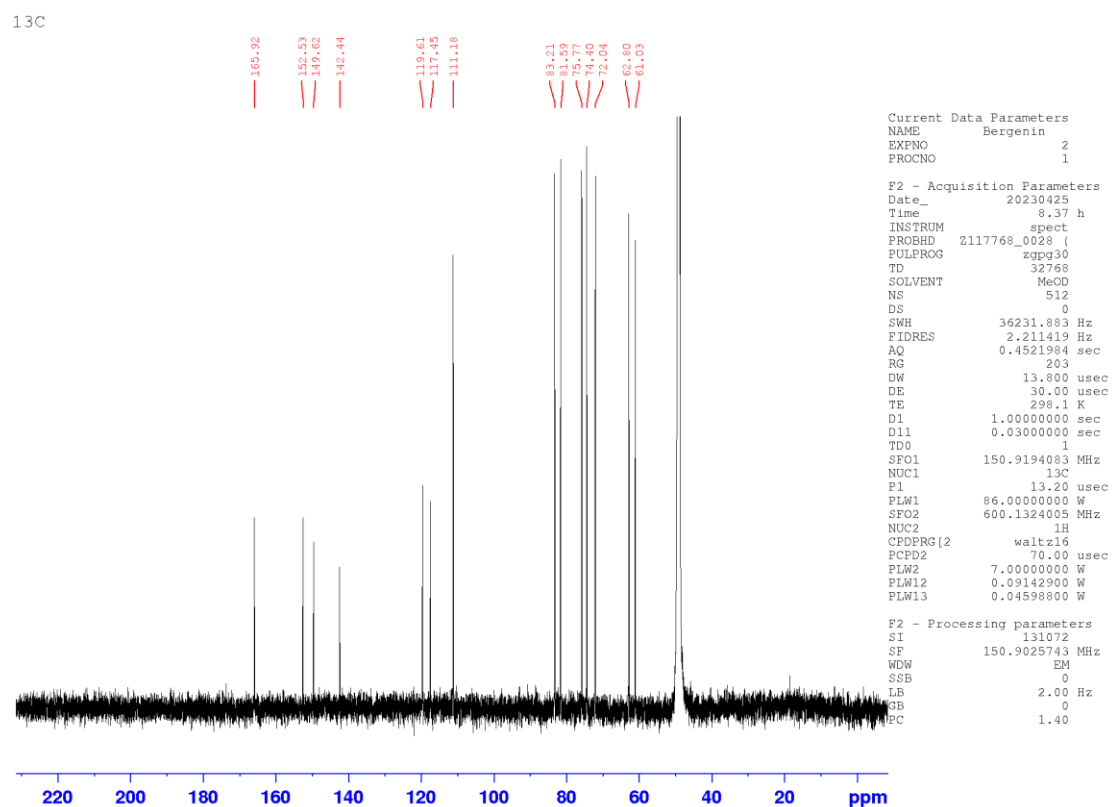
Figura 33 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) da bergenina (**1**) ampliado.

^1H



Fonte: Autoria própria.

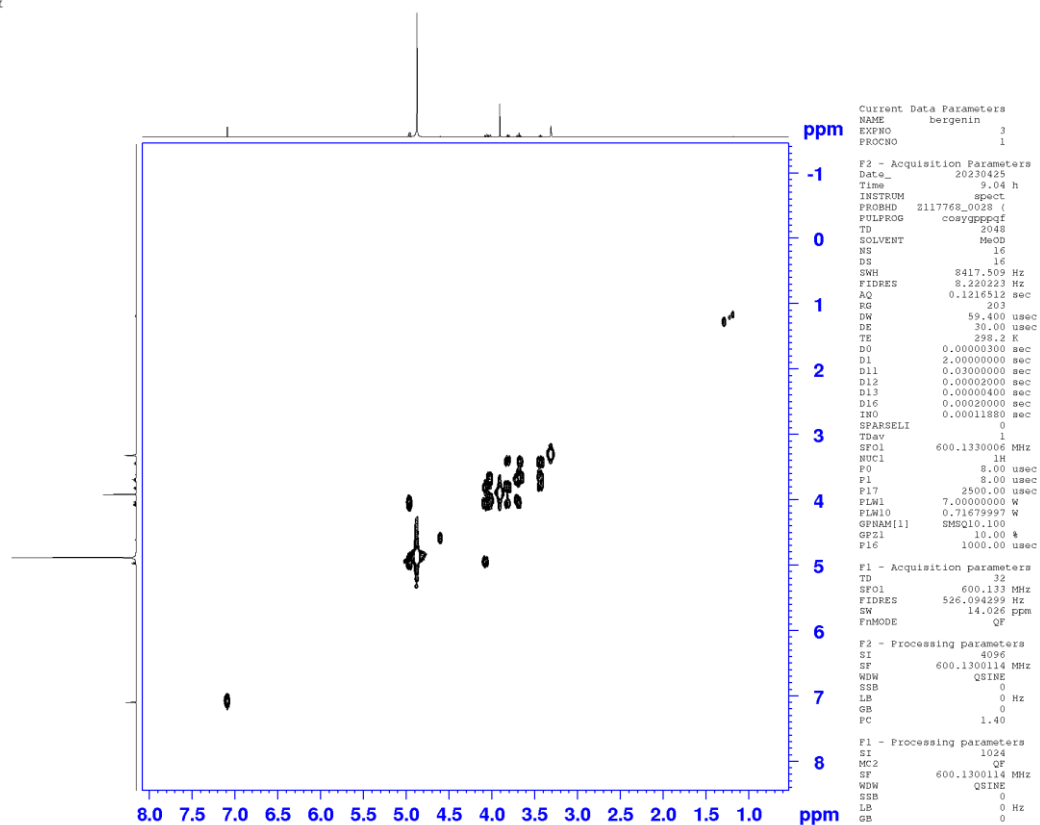
Figura 34 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) da bergenina (**1**) ampliado.



Fonte: Autoria própria.

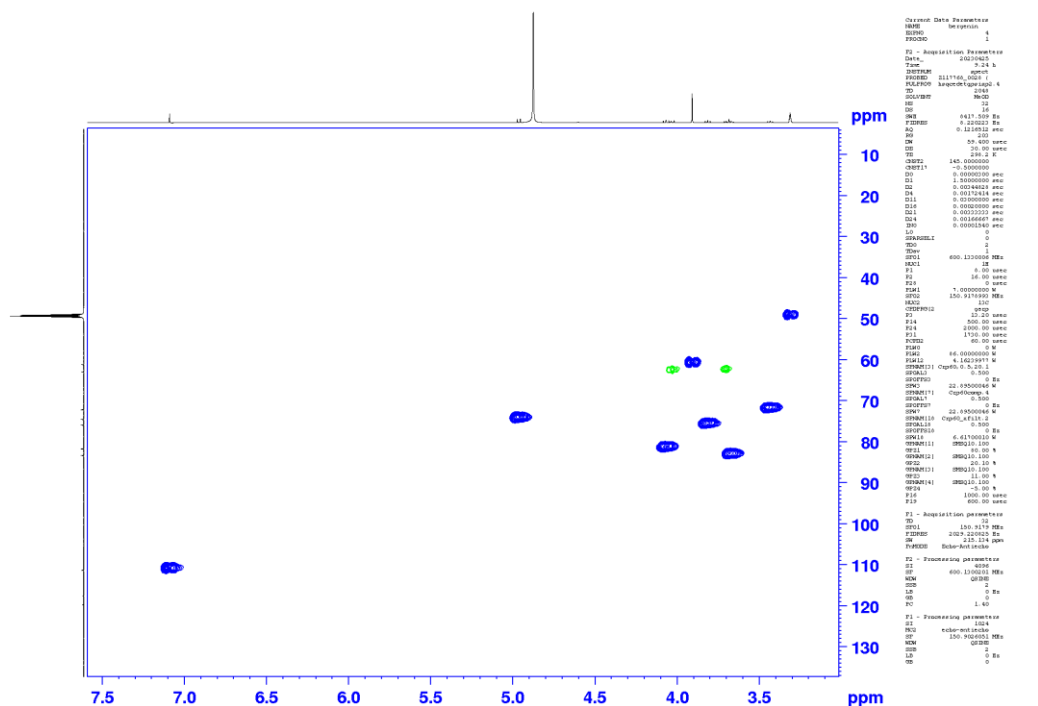
Figura 35 - Espectro COSY (600 MHz, CD₃OD-*d*₄) da bergenina (1).

COSY



Fonte: Autoria própria.

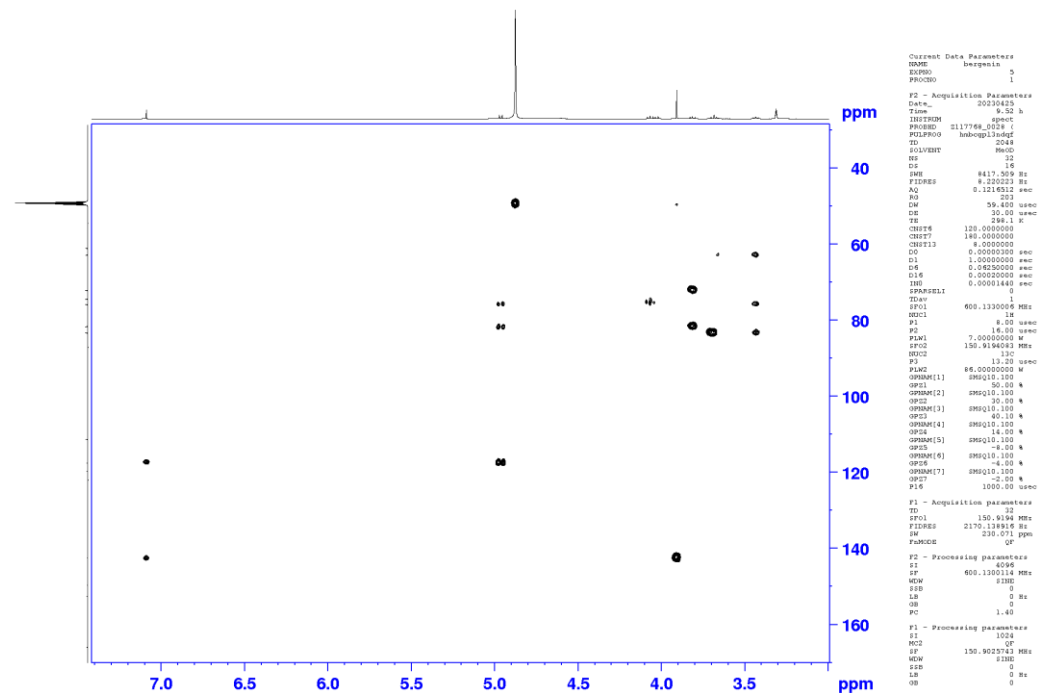
Figura 36 - Espectro HSQC (600 MHz, CD₃OD-*d*₄) da bergenina (**1**).



Fonte: Autoria própria.

Figura 37 - Espectro HMBC (600 MHz, CD₃OD-*d*₄) da bergenina (**1**).

HMBC



Fonte: Autoria própria.