



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
Centro de Ciências da Natureza
Programa de Pós-Graduação em Química



ADONIAS ALMEIDA CARVALHO

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE *Machaerium*
acutifolium VOGEL**

Tese de Doutorado

TERESINA - PI
2021

ADONIAS ALMEIDA CARVALHO

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE *Machaerium
acutifolium* VOGEL**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Helena Chaves

**TERESINA - PI
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Sistema de Bibliotecas da UFPI – SIBi/UFPI
Biblioteca Setorial do CCN

C331e Carvalho, Adonias Almeida.
Estudo químico e biológico da espécie *Machaerium acutifolium* Vogel / Adonias Almeida Carvalho. – 2021.
308 f.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em Química, Teresina, 2022.

“Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariana Helena Chaves”.

1. Flavonoides. 2. Atividades Biológicas. 3. *Machaerium acutifolium* Vogel. 4. Composição Química. I. Chaves, Mariana Helena. II. Título.

CDD 547


ADONIAS ALMEIDA CARVALHO

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE *Machaerium acutifolium* VOGEL

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química - Área: Química Orgânica.

Data de Aprovação: **14/10/2021**

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Mariana Helena Chaves
Universidade Federal do Piauí - UFPI
(Orientadora e Presidente)




Prof. Dr. Luis Octávio Regasini
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp São José do Rio Preto
(Membro Externo)



Prof. Dra. Cláudia Quintino da Rocha
Universidade Federal do Maranhão - UFMA
(Membro Externo)



Prof. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó
Universidade Federal do Piauí - UFPI
(Membro Interno)



Prof. Dr. Gerardo Magela Vieira Junior
Universidade Federal do Piauí - UFPI
(Membro Interno)

**TERESINA - PI
2021**

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome: Adonias Almeida Carvalho

E-mail: adoniasac@hotmail.com/adonias.carvalho@ifpi.edu.br

Formação acadêmica

2017-2021

Doutorado em Química

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Título: Estudo químico e biológico da espécie *Machaerium acutifolium* Vogel

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Helena Chaves

2011-2013

Mestrado em Química

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Título: Documentação química e biológica de extratos das folhas das espécies *Bauhinia pulchella* e *Senna acuruensis* (Fabaceae-Caesalpinioideae).

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Helena Chaves

2005-2009

Graduação em Química – Bacharelado em Química com atribuições tecnológicas

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Título: Controle de qualidade no processo produtivo de cerveja

Orientador: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

2006-2009

Graduação em Química – Licenciatura Plena em Química

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Título: Relatório de Estágio Supervisionado da Prática de Ensino II

Orientador: Prof. Dr. Nilson Fonseca de Miranda

Publicações de Artigos

- **CARVALHO, A. A.**; SANTOS, L. R.; FREITAS, J. S.; SOUSA, R. P.; FARIAS, R. R. S.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; RAI, M.; CHAVES, M. H. First report of flavonoids from leaves of *Machaerium acutifolium* by DI-ESI-MS/MS. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, 103765, 2022
- LIMA, R. P.; NUNES, P. I. G. VIANA, A. F. S. C.; OLIVEIRA, F. T. B.; SILVA, R. A. C.; ALVES, A. P. N. N.; VIANA, D. A.; FONSECA, S. G. C.; **CARVALHO, A. A.**; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. α,β -Amyrin prevents steatosis and insulin resistance in a high-fat diet-induced mouse model of NAFLD via the AMPK-mTORC1-SREBP1 signaling mechanism. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, n. 10, e11391, 2021.
- **CARVALHO, A. A.**; SILVA, L. F. F.; FREITAS, J. S.; SANTIAGO, R. F.; CHAVES, M. H. Análise Prospectiva com Ênfase Científica e Tecnológica do Gênero *Erythrina* (Fabaceae). **Cadernos de Prospecção**, v. 13, p.759 - 768, 2020.
- **CARVALHO, A. A.**; SANTOS, L. R.; FREITAS, J. S.; CHAVES, M. H. Isoflavonoides da tribo Dalbergieae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília Papilionoideae. **Química Nova**, v. 43, p.1294 - 1311, 2020.
- CÔVRE, L. M.; DEBORTOLI, C. V. L.; AMARAL, M. F.; **CARVALHO, A. A.**; FREITAS, J. S.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; CASATTI, C. A.; BRANDINI, D. A. Uso da mistura de α - e β -amirina como meio de conservação em reimplante dentário. **Research, Society and Development**, v. 9, p.e948998134, 2020.
- SILVA, A. V. L.; OLIVEIRA, F. T. B.; VIANA, A. F. S. C.; LIMA, R. P.; SILVA, R. A. C.; **CARVALHO, A. A.**; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Alpha, beta-Amyrin Ameliorates Glucose Uptake in Palmitate-induced Insulin Resistance in C2C12 Cell. **FASEB Journal**, v. 33, p.514.13 - 514.13, 2019.
- DE MELO, K. M.; DE OLIVEIRA, F. T. B.; COSTA SILVA, R. A.; GOMES QUINDERÉ, A. L.; MARINHO FILHO, J. D. B.; ARAÚJO, A. J.; BARROS PEREIRA, E. D.; **CARVALHO, A. A.**; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. α -, β -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p.1860 - 1866, 2019.
- **CARVALHO, A. A.**; SANTOS, L. R.; FARIAS, R. R. S.; CHAVES, M. H.; FEITOSA, C. M.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; ARAÚJO, M. R. S.; FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C. O. Phenolic derivatives and antioxidant activity of polar extracts from *Bauhinia pulchella*. **Química Nova**, v. 41, p.405 - 411, 2018.

- COSTA, J. C.; PEDROSA, G. L. A.; LIMA, J. S.; PIAULINO, C. A.; **CARVALHO, A. A.**; CHAVES, M. H.; BRITO, S. M. R. C. Avaliação dos efeitos de *Bauhinia pulchella* BENTH. em animais diabéticos. **Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde - RICS**, v. 4, p.31 - 35, 2017.
- LIMA, U. P.; ANDRADE, C. S.; COSTA, J. C.; ALMEIDA, B. C.; **CARVALHO, A. A.**; CHAVES, M. H.; BRITO, S. M. R. C. Efeito do extrato etanólico de *Bauhinia pulchella* BENTH e do carnaubadiol na glicação protéica in vitro. **Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde - RICS**, v. 4, p.36 - 40, 2017.
- DE ALMEIDA, B. C.; ARAÚJO, B. Q.; **CARVALHO, A. A.**; FREITAS, S. D. L.; MACIEL, D. S. ALVES; FERREIRA, A. J. S.; TEMPONE, A. G.; MARTINS, L. F.; ALEXANDRE, T. R.; CHAVES, M. H.; LAGO, J. H. G. Antiprotozoal activity of extracts and isolated triterpenoids of 'carnauba' (*Copernicia prunifera*) wax from Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, p.3280 - 3284, 2016.
- UCHÔA, V. T.; SOUSA, C. M. M.; **CARVALHO, A. A.**; SANT'ANA, A. E. G.; CHAVES, M. H. Free radical scavenging ability of *Ximenia americana* L. stem bark and leaf extracts. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, p.091 - 096, 2016.
- MOBIN, M.; DE LIMA, S. G.; ALMEIDA, L. T. G.; TAKAHASHI, J. P.; TELES, J. B.; SZESZS, M. W.; MARTINS, M. A.; **CARVALHO, A. A.**; MELHEM, M. S. C. MDGC-MS analysis of essential oils from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) and their antifungal activity against *Candida* specie. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p.531 - 538, 2016.
- SANTOS, P. M. A.; **CARVALHO, A. A.**; SANTOS, W. C. Prospecção Tecnológica de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista GEINTEC: Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 6, p.3109 - 3120, 2016.
- LIMA, A. M. C.; SANTOS, P. M. A.; **CARVALHO, A. A.**; SANTOS, W. C. Uso do Δ^9 -tetraidrocannabinol: um estudo de prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC: Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 6, p.3367 - 3376, 2016.
- AMARAL, M. P. M.; BRAGA, F. A. V.; PASSOS, F. F. B.; ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, R. C. M.; **CARVALHO, A. A.**; CHAVES, M. H.; OLIVEIRA, F. A. Additional Evidence for the Anti-inflammatory Properties of the Essential Oil of *Protium heptaphyllum* Resin in Mice and Rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p.775 - 782, 2009.
- VIEIRA-JR, G. M.; **CARVALHO, A. A.**; GONZAGA, W. A.; CHAVES, M. H. Cromatografando em coluna com resina de almécega: um projeto para química orgânica experimental. **Química Nova**, v. 30, p.491 - 493, 2007.

Publicações Capítulos de Livros

- **CARVALHO, A. A.**; FREITAS, J. S.; SANTOS, L. R.; ARAÚJO, B. Q.; CHAVES, M. H. Identificação de isoprenoides na fração hexânica das folhas de *Machaerium acutifolium* por CG-EM. *In*: FRANCISCO, A. L. O. (org.). **Avanços Científicos, Tecnológicos e de Inovação na Botânica**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020, v.1, p. 24-34.
- VERAS, M. D. A.; SANTOS, L. R.; **CARVALHO, A. A.**; CHAVES, M. H. Prospecção tecnológica da carboplatina: um fármaco usado no tratamento de câncer. *In*: TESCAROLLO, I. L. (org.). **Farmácia e Promoção da Saúde 2**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020, v.2, p. 100-108.
- **CARVALHO, A. A.**; SOUSA, R. B.; COSTA, J. C. S.; CHAVES, M. H.; SILVA FILHO, E. C. Prospecção tecnológica de biocompósitos à base de quitosana e hidroxiapatita para aplicações na engenharia tecidual óssea. *In*: VOIGT, C. L. (org.). **Atividades de Ensino e de Pesquisa em Química 2**. 1 ed. Ponta Grossa - PR: Atena Editora, 2020, p. 140-150.
- SANTOS, L. R.; **CARVALHO, A. A.**; SANTIAGO, R. F.; CHAVES, M. H. Alcaloides do gênero *Senna* e potencial farmacológico. *In*: FARIA, A. N. (org.). **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019, p. 1-13.
- OLIVEIRA, J. S. S. M.; SANTOS, L. R.; **CARVALHO, A. A.**; SOUSA, R. P.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; FARIAS, R. R. S.; CHAVES, M. H. Composição química, fenóis totais e atividade antioxidante das folhas de *Simaba ferrugínea*. *In*: SANTOS, C. C. (org.). **Estudos Interdisciplinares nas Ciências Exatas e da Terra e Engenharias 4**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019, v.4, p. 144-156.
- **CARVALHO, A. A.**; SANTOS, L. R.; SOUSA, R. P.; FREITAS, J. S.; ARAÚJO, B. Q.; CHAVES, M. H. Identificação de flavonoides das folhas de *Machaerium acutifolium* (Papilionoideae-Fabaceae) por espectrometria de massas. *In*: FREITAS, R. M. (org.). **Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 2**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019, p. 118-129.
- **CARVALHO, A. A.**; SANTOS, L. R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H. Tocoferóis e isoprenoides do extrato hexânico das folhas de *Bauhinia pulchella*. *In*: FREITAS, J. C. R.; FREITAS, P. S. R. (orgs.). **Atividades de Ensino e de Pesquisa em Química**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019, p. 252-264.
- SANTOS, L. F.; SANTOS, L. R.; **CARVALHO, A. A.**; SOUSA, R. P.; NERIS, M. L.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; FREITAS, S. D. L.; CHAVES, M. H. Triterpenoides, esteroides e atividade antioxidante das cascas do caule de *Luehea divaricata*. *In*: FREITAS, J. C. R.; FREITAS, P. S. R. (orgs.). **Atividades de Ensino e de Pesquisa em Química**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019, p. 241-251.

- SANTOS, L. R.; CARVALHO, A. A.; SILVA, L. F. F.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; FARIAS, R. R. S.; CHAVES, M. H. Validação de metodologia para quantificação de rutina e quercetina nas folhas de *Senna acuruensis*. In: SANTOS, C. C. (org.). **Estudos Interdisciplinares nas Ciências Exatas e da Terra e Engenharias 2**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019, v.2, p. 144-156.

Dedico este trabalho a minha esposa Kelly Maciel, aos meus filhos Isabelle e Asafe, aos meus pais Anivaldo e Conceição e a minha irmã Tamires pelo amor, carinho, compreensão, motivação e apoio.

“Os que semeiam em lágrimas segarão com alegria”

(Salmos 126.5)

AGRADECIMENTOS

- Ao meu soberano e eterno Deus pelas suas misericórdias e graça abundante
- Aos meus pais, Anivaldo Carvalho e Conceição Carvalho, pelo exemplo, amor, orações e ensinamentos preciosos. E a minha irmã, Tamires Carvalho, pela amizade, compreensão e apoio em todas as horas
- A minha amada esposa, Kelly Maciel, pelo carinho, cuidado, incentivo, companheirismo e compreensão. E aos meus filhos, Isabelle e Asafe, meus amores e razão da minha vida
- A Profa. Dra. Mariana Helena Chaves, pela oportunidade, ensinamentos, paciência, exemplo de dedicação e compromisso em tudo que faz
- A minha amiga-irmã Lucivania Rodrigues, pelo apoio, orientações e amizade sincera. E a minha aluna de iniciação científica e amiga, Jurema Freitas, pela parceria e companheirismo que abrilhantaram este trabalho
- A Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó e ao Prof. Dr. Gerardo Magela, pelas contribuições no exame de qualificação e por comporem a banca examinadora da tese
- Aos Professores Dr. Luis Octávio Regasini e Dra. Cláudia Quintino da Rocha por terem aceitado o convite para compor a banca examinadora da tese e pelas valiosas contribuições
- Aos Professores Milton e Edivan, pelo excelente trabalho à frente da coordenação do PPGQ-UFPI
- A professora Dra. Ruth Raquel Soares de Farias, pela coleta do material vegetal
- Ao amigo-irmão, Elcio Daniel, pela parceria, amizade, respeito, conselhos e prestabilidade. E aos colegas de doutorado da turma 2017.1, especialmente, Jardel, Tiago, Ricardo, Ronaldo, Jacira, Fábio e Mateus pelo incentivo, força e determinação
- Aos colegas do LPN, Elcilene, Márcia, Rodrigo, João Paulo, Andreia, Lildes, Yara, Mariane, Renato, Evaldo, Rodrigo Araújo e Leonardo pelas palavras amigas e momentos de descontração
- Ao IFPI - Campus Piripiri, pela liberação para o desenvolvimento deste trabalho. E aos colegas de instituição e alunos, pela compreensão e amizade
- Por fim, agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização deste trabalho e sempre estiveram ao meu lado nessa árdua jornada até aqui.

Muito Obrigado

RESUMO

CARVALHO, A. A. (2021). **Estudo químico e biológico da espécie *Machaerium acutifolium* Vogel**. Teresina, 308p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Piauí.

A espécie *Machaerium acutifolium* Vogel (Fabaceae-Papilionoideae), sin. *M. muticum* Benth, conhecida popularmente por jacarandá do campo e jacarandá bico de pato, é utilizada tradicionalmente como anticoncepcional, para tratar menstruação dolorosa e dor de estômago. Folhas e galhos desta espécie foram submetidos a maceração com etanol, fornecendo os extratos etanólico das folhas (EEFMa) e galhos (EEGMa). O EEFMa, após partição, forneceu as frações hexânica (FHFMa), acetato de etila (FAEFMa) e aquosa (FAFMa), enquanto o EEGMa, após filtração em coluna filtrante de gel de sílica, forneceu as frações hexânica (FHGMa), clorofórmica (FCGMa), acetato de etila (FAEGMa), metanólica (FMGMa) e metanol-água (FMAGMa). A FHFMa contém o α -tocoferol (**1**), colesterol (**2**), campesterol (**3**), sitosterol (**4**), estigmasterol (**5**), os triterpenoides lupeol (**6**), os isômeros *E/Z* do 3-*O-p*-cumaroil- β -amirina (**7** e **8**), 3-*O-p*-cumaroilgermanicol (**9** e **10**) e 3-*O-p*-cumaroillupeol (**11** e **12**). A FAEFMa, após desreplicação por inserção direta em espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* (DI-ESI-MS/MS), resultou na identificação dos flavonoides quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**13**), quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**14**), quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosídeo (**15**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 3)-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**16**), canferol-3-ramnosil-7-[6-feruloil]-hexosil-(1 \rightarrow 3)-ramnosídeo (**17**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**18**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**19**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosídeo (**20**), canferol-3-*O*-hexosídeo (**21**). A desreplicação, por DI-ESI-MS/MS, da FAFMa, resultou na identificação dos flavonoides **13-16** e **18-21**, isoflavonoides genisteína (**25**) e daidzeína-8-*C*-glicosídeo (**26**) e biflavonoide morelloflavona (**27**). Adicionalmente, foram isolados e identificados da FAFMa os flavonoides: **16**, 3',4'-dimetoxi-3-*O*- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosídeo-7-*O*- α -L-ramnopiranosilflavonol (**22**), robinina (**23**) e astrasikokiosídeo I (**24**). Este é o primeiro relato do flavonoide **22**. As FHGMa e FCGMa contém o esqualeno (**28**) e a mistura de esteroides **4** e **5**, respectivamente. A FAEGMa, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, resultou na identificação de escopoletina (**29**), (epi)catequina (**30**), dímero de procianidina A (PAC A) (**31**), trímeros de PAC A (**32-34**) e tetrâmero de PAC A (**35**). A FMGMa, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, permitiu a identificação de **18, 30, 32, 33, 35**, ácido quínico (**36**), biochanina A (**37**) e dímeros isoméricos de procianidina B1 e/ou B2 (**38**). Os compostos isolados foram identificados por RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D), CG-EM e DI-ESI-MS/MS. O EEGMa (CE_{50} 56,76 \pm 1,54) apresentou atividade antioxidante (AA) superior ao EEFMa, ácido gálico (CE_{50} 13,37 \pm 1,65) e BHT (CE_{50} 69,34 \pm 5,53), e similar a rutina (CE_{50} 47,06 \pm 4,65), no ensaio com o DPPH. Com ABTS, o EEGMa (4,37 \pm 0,21) foi mais ativo que o EEFMa (1,18 \pm 0,16) e os controles positivos BHT (2,49 \pm 0,12) e rutina (1,34 \pm 0,4). Os teores de fenóis totais apresentaram correlação positiva com a AA. O teor de flavonoides totais e o fator de proteção solar de EEFMa (66,25 \pm 2,94 e 8,2 \pm 0,3) foram superiores aos do EEGMa (386,33 \pm 0,78 e 4,5 \pm 0,2), respectivamente. Apenas o EEGMa apresentou atividade inibidora da acetilcolinesterase. EEFMa e EEGMa não são letais contra as larvas de *Aedes aegypti*. Os flavonoides **23** e **24** foram quantificados por HPLC-DAD (λ 265 e 348 nm) no EEFMa (66,8 \pm 2,0 e 93,8 \pm 3,7), FAFMa (127,1 \pm 7,9 e 192,2 \pm 15,7) e FAEFMa (nd e 3,4 \pm 0,3), no entanto, não foram detectados EEGMa, mostrando que a composição química é diferente do EEFMa. Este é o primeiro relato de quantificação dos flavonoides **23** e **24**. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da composição química de *M. acutifolium*.

Palavras-chave: Fabaceae, atividades biológicas, flavonoides, quantificação, triterpenoides

ABSTRACT

CARVALHO, A.A. (2021). **Chemical and biological study of *Machaerium acutifolium* Vogel**. Teresina, 308p. Thesis (Doctoral) - Postgraduate Program in Chemistry. Federal University of Piauí.

The species *Machaerium acutifolium* Vogel (Fabaceae-Papilionoideae), sin. *M. muticum* Benth, popularly known as wild rosewood and duck bill rosewood, is traditionally used as a contraceptive to treat painful menstruation and stomach pain. Leaves and branches of this species were subjected to maceration with ethanol, providing the ethanolic extracts of leaves (EEFMa) and branches (EEGMa). The EEFMa, after partition, provided the hexane (FHFMa), ethyl acetate (FAEFMa) and aqueous (FAFMa) fractions, while the EEGMa, after filtration through a silica gel filter column, provided the hexane (FHGMa), chloroform (FCGMa), ethyl acetate (FAEGMa), methanol (FMGMa) and methanol-water (FMAGMa). FHFMa contains α -tocopherol (**1**), cholesterol (**2**), campesterol (**3**), sitosterol (**4**), stigmasterol (**5**), the triterpenoids lupeol (**6**), the *E/Z* isomers of 3-*O-p*-coumaroyl- β -amyryn (**7** and **8**), 3-*O-p*-coumaroylgermanicol (**9** and **10**) and 3-*O-p*-coumaroilupeol (**11** and **12**). FAEFMa, after dereplication by direct insertion in a mass spectrometer with an electrospray ionization source (DI-ESI-MS/MS), resulted in the identification of the flavonoids quercetin-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-[rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)]-hexosyl-7-*O*-rhamnoside (**13**), quercetin-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)-hexosyl-7-*O*-rhamnosyl (**14**), quercetin-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)-hexoside (**15**), kaempferol-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 3)-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-[rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)]-hexosyl-7-*O*-rhamnoside (**16**), kaempferol-3-rhamnosyl-7-[6-feruloyl]-hexosyl-(1 \rightarrow 3)-rhamnoside (**17**), kaempferol-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-[rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)]-hexosyl-7-*O*-rhamnoside (**18**), kaempferol-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)-hexosyl-7-*O*-rhamnoside (**19**), kaempferol-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)-hexoside (**20**), kaempferol-3-*O*-hexoside (**21**). Dereplication of FAFMa by DI-ESI-MS/MS resulted in the identification of flavonoids **13-16** and **18-21**, isoflavonoids genistein (**25**) and daidzein-8-*C*-glycoside (**26**) and biflavonoid morelloflavone (**27**). Additionally, the following flavonoids were isolated and identified from FAFMa: **16**, 3',4'-dimethoxy-3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -L-rhamnopyranoside-7-*O*- α -L-rhamnopyranosylflavonol (**22**), robinin (**23**) and astrasikokioside I (**24**). This is the first report of flavonoid **22**. FHGMa and FCGMa contain squalene (**28**) and a mixture of steroids **4** and **5**, respectively. FAEGMa, after dereplication by DI-ESI-MS/MS, resulted in the identification of scopoletin (**29**), (epi)catechin (**30**), procyanidin A dimer (PAC A) (**31**), PAC A trimers (**32-34**) and PAC A tetramer (**35**). FMGMa, after dereplication by DI-ESI-MS/MS, allowed the identification of **18**, **30**, **32**, **33**, **35**, quinic acid (**36**), biochanin A (**37**) and isomeric dimers of procyanidin B1 and/or B2 (**38**). Isolated compounds were identified by ^1H and ^{13}C NMR (1D and 2D), GC-MS and DI-ESI-MS/MS. EEGMa (EC₅₀ 56.76 \pm 1.54) showed antioxidant activity (AA) superior to EEFMa, gallic acid (EC₅₀ 13.37 \pm 1.65) and BHT (EC₅₀ 69.34 \pm 5.53), and similar to rutin (EC₅₀ 47.06 \pm 4.65), in the DPPH assay. With ABTS, EEGMa (4.37 \pm 0.21) was more active than EEFMa (1.18 \pm 0.16) and positive controls BHT (2.49 \pm 0.12) and rutin (1.34 \pm 0.4). The levels of total phenols showed a positive correlation with AA. The total flavonoid content and the sun protection factor of EEFMa (66.25 \pm 2.94 and 8.2 \pm 0.3) were higher than those of EEGMa (386.33 \pm 0.78 and 4.5 \pm 0.2), respectively. Only EEGMa showed acetylcholinesterase inhibitory activity. EEFMa and EEGMa are not lethal against *Aedes aegypti* larvae. Flavonoids **23** and **24** were quantified by HPLC-DAD (λ 265 and 348 nm) in EEFMa (66.8 \pm 2.0 and 93.8 \pm 3.7), FAFMa (127.1 \pm 7.9 and 192, 2 \pm 15.7) and FAEFMa (nd e 3.4 \pm 0.3), however, EEGMa were not detected, showing that the chemical composition is different from EEFMa. This is the first report on the quantification of flavonoids **23** and **24**. The results obtained contribute to the knowledge of the chemical composition of *M. acutifolium*.

Keywords: Fabaceae, biological activities, flavonoids, quantification, triterpenoids

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1 - Biossíntese de isoflavonoides. Adaptada de DEWICK, 2009.....	13
Figura 2 - Gráfico com as principais classes de flavonoides encontrados na revisão...	15
Figura 3 - Fórmulas estruturais dos rotenoides de 183-194	32
Figura 4 - Fórmulas estruturais de isoflavana (220), isoflavanquinonas (221-223) e isoflavan-4-ols (224-225).....	35
Figura 5 - Fórmulas estruturais de outros isoflavonoides (226-240).....	36

CAPÍTULO II

Figura 1 - Folhas, galhos e tronco da espécie <i>M. acutifolium</i>	55
Figura 2 - Cromatoplasmas dos extratos etanólico das folhas (EEFMa) e galhos (EEGMa). Revelador: solução de $Ce(SO_4)_2$	62
Figura 3 - Cromatogramas dos extratos etanólico das folhas (A) e galhos (B). Fase Móvel: MeOH/H ₂ O-AcOH (0,2%, v/v), gradiente: 0-40 min (5-100% MeOH), 40-50 min (100% MeOH), vazão 1,0 mL min ⁻¹ e coluna C18.....	63
Figura 4 - Fator de proteção solar (FPS) dos extratos etanólico das folhas (EEFMa) e galhos (EEGMa).....	66

CAPÍTULO III

Esquema 1 - Partição do extrato etanólico das folhas de <i>M. acutifolium</i>	78
Figura 1 - Cromatoplasmas do extrato etanólico das folhas (A) e das frações hexânica (B), acetato de etila (C), precipitado da fração acetato de etila (D) e aquosa (E). Revelador: solução de $Ce(SO_4)_2$	79
Figura 2 - Cromatograma do extrato etanólico das folhas (EEFMa) e das frações acetato de etila (FAEFMa) e aquosa (FAFMa). Fase Móvel: MeOH/H ₂ O (0,2%), gradiente: 0-40 min (5-100% MeOH), 40-50 min (100% MeOH), vazão 1,0 mL min ⁻¹ , $\lambda = 254$ nm e coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m).....	79
Esquema 2 - Fracionamento cromatográfico da fração hexânica do extrato etanólico das folhas.....	83
Figura 3 - Cromatograma das subfrações aquosa, metanol-água (1:1) e metanólica obtidas por C-18 da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de <i>M.</i>	

<i>acutifolium</i> . Fase móvel: MeOH/H ₂ O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 26-30 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-38 min, 100%, 38-41 min, 100-30% MeOH, 41-46 min, 30%, vazão 1,0 mL min ⁻¹ , coluna C-18 250 x 4,6 mm, 5 μm) e λ=254 nm.....	84
Figura 4 - Cromatograma do extrato etanólico (EEFMa) e da fração aquosa (FAFMa) das folhas de <i>M. acutifolium</i> . Fase móvel: MeOH/H ₂ O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min ⁻¹ , coluna C18 e λ=348 nm.....	86
Esquema 3 - Extração em fase sólida da fração aquosa das folhas de <i>M. acutifolium</i> .	87
Figura 5 - Cromatoplas das subfrações R1 a R4 da fração aquosa da partição do extrato etanólico. Revelador: solução de Ce(SO ₄) ₂	87
Figura 6 - Cromatograma da subfração F, proveniente da fração aquosa da partição do extrato etanólico. Fase móvel: MeOH/H ₂ O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min ⁻¹ , coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) e λ=254 nm.	88
Esquema 4 - Fracionamento cromatográfico da subfração F resultante da fração aquosa do extrato etanólico das folhas	89
Figura 7 - Espectro de RMN ¹ H de 1 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	92
Figura 8 - Espectro de RMN ¹³ C-DEPTQ 135° de 1 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	92
Figura 9 - Expansão da região de δ 10-41 do espectro de RMN ¹³ C-DEPTQ 135° de 1 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	93
Figura 10 - Cromatograma de íons totais dos derivados sililados de M1-d.....	94
Figura 11 - Proposta de fragmentação de esteroides sililados sitosterolTMS (4) e estigmasterolTMS (5). Adaptado de Diekman; Djerassi, 1967.....	95
Figura 12 - Cromatograma de íons totais de M1 sem derivatização.....	96
Figura 13 - Proposta de fragmentação de esteroides sitosterol (4) e estigmasterol (5). Adaptado de Wyllie, 1977.....	97

Figura 14 - Proposta de fragmentação para o lupeol (6). Adaptado de Assimopoulou; Papageorgiou, 2005.....	97
Figura 15 - Espectro de RMN ¹ H de C-5 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	100
Figura 16 - Expansão da região de δ 3,3-5,6 do espectro de RMN ¹ H de C-5 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	100
Figura 17 - Espectro de RMN ¹ H de M2 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	104
Figura 18 - Expansão da região de δ 5,8-7,7 do espectro de RMN ¹ H de M2 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	104
Figura 19 - Expansão da região de δ 4,4-5,25 de espectro de RMN ¹ H de M2 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	105
Figura 20 - Expansão da região de δ 0,7-2,3 do espectro de RMN ¹ H de M2 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	105
Figura 21 - Espectro de RMN ¹³ C-DEPTQ 135° de M2 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	106
Figura 22 - Expansão da região de δ 142-168 do espectro de RMN ¹³ C-DEPTQ 135° de M2 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	106
Figura 23 - Expansão da região de δ 114-133 do espectro de RMN ¹³ C-DEPTQ 135° de M2 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	107
Figura 24 - Expansão da região de δ 56-110 do espectro de RMN ¹³ C-DEPTQ 135° de M2 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	107
Figura 25 - Expansão da região de δ 37-51 do espectro de RMN ¹³ C-DEPTQ 135° de M2 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	108
Figura 26 - Expansão da região de δ 25-36 do espectro de RMN ¹³ C-DEPTQ 135° de M2 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	108
Figura 27 - Expansão da região de δ 14-24 do espectro de RMN ¹³ C-DEPTQ 135° de M2 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	109
Figura 28 - <i>Fingerprint</i> da subfração aquosa oriunda da FAEFMa do EEFMa obtido por DI-ESI-MS/MS no modo. Expansão: <i>m/z</i> 250-600 (A) e <i>m/z</i> 600 a 1500 (B).....	110
Figura 29 - Constituintes químicos identificados da subfração aquosa da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas	111
Figura 30 - Espectros de massas MS ² (A) e MS ³ (B) dos íons <i>m/z</i> 609 e 301 referentes a rutina (15).....	113
Figura 31 - Proposta de fragmentação para o flavonol rutina (15 , <i>m/z</i> 609).....	114

Figura 32 - Espectros de massas MS ² dos íon <i>m/z</i> 901 (A) e 755 (B) referente a quercetina-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-glicosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (13) e quercetina-3- <i>O</i> -rutinosil-7- <i>O</i> -ramosídeo (14).....	115
Figura 33 - Espectros de massas MS ² (A), MS ³ (B) e MS ⁴ (C) dos íons <i>m/z</i> 915, 769 e 593 referentes ao canferol 3-ramnosídeo-7- <i>O</i> -[6-feruloil-glicosídeo-(1→3)-ramnosídeo] (17).....	116
Figura 34 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 1031 referentes ao canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→3)-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-glucosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (16)....	117
Figura 35 - Espectro de massas MS ² (A) e MS ³ (B) dos íons <i>m/z</i> 447 e 285 referente ao canferol-3- <i>O</i> -glicosídeo (21).....	118
Figura 36 - <i>Fingerprint</i> da subfração metanol-água (1:1) da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas obtido por DI-ESI-MS/MS, no modo negativo.....	119
Figura 37 - <i>Fingerprint</i> da subfração metanólica da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas obtido por DI-ESI-MS/MS, no modo negativo.....	121
Figura 38 - <i>Fingerprint</i> da fração aquosa obtido por DI-ESI-MS [M-H] ⁻ , expansão <i>m/z</i> 600 a 1100 (A) e <i>m/z</i> 200 a 600 (B).....	122
Figura 39 - Constituintes químicos identificados da fração aquosa do extrato etanólico das folhas.....	123
Figura 40 - Proposta de fragmentação para o isoflavonoide genisteína (25 , <i>m/z</i> 269) (Adaptado de Zhao et al., 2018).....	125
Figura 41 - Proposta de fragmentação para daidzeína-8- <i>C</i> -glicosídeo (26) (Adaptado de Zhao et al., 2018).....	125
Figura 42 - Proposta de fragmentação para o biflavonoide moreloflavona (27).....	126
Figura 43 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD (A) e espectro UV-Vis (B) do composto 22 . Fase móvel: MeOH/H ₂ O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min ⁻¹ , coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) e λ=348 nm.....	127
Figura 44 - Espectro de RMN ¹ H de 22 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).....	130
Figura 45 - Expansão da região de δ 6,2-7,7 do espectro de RMN ¹ H de 22 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).....	130

Figura 46 - Expansão da região de δ 2,9-5,5 do espectro de RMN ^1H de 22 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	131
Figura 47 - Expansão da região de δ 0,6-2,6 do espectro de RMN ^1H de 22 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	131
Figura 48 - Espectro de RMN ^{13}C de 22 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	132
Figura 49 - Expansão da região de δ 115-180 do espectro de RMN ^{13}C de 22 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	132
Figura 50 - Expansão da região de δ 64-106 do espectro de RMN ^{13}C de 22 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	133
Figura 51 - Expansão da região de δ 54-74 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de 22 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	133
Figura 52 - Mapa de contornos gHSQC de 22 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	134
Figura 53 - Expansão da região de δ 6,0-7,9 do mapa de contornos gHSQC de 22 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	134
Figura 54 - Expansão da região de δ 3,4-5,4 do mapa de contornos gHSQC de 22 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	135
Figura 55 - Mapa de contornos gHMBC de 22 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	135
Figura 56 - Expansão da região de δ 6,3-7,6 do mapa de contornos gHMBC de 22 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	136
Figura 57 - Expansão da região de δ 4,2-5,5 do mapa de contornos gHMBC de 22 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	136
Figura 58 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD (A) e espectro UV-Vis (B) do composto 23 . Fase móvel: MeOH/H ₂ O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min ⁻¹ coluna C18 e $\lambda=348$ nm.	137
Figura 59 - Espectro de massas de alta resolução do composto 23 .	138
Figura 60 - Proposta de fragmentação do composto 23 . Adaptada de Veitch; Kite; Lewis (2008) e March; Miao (2004).....	140
Figura 61 - Espectro de RMN ^1H de 23 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	142
Figura 62 - Expansão da região de δ 4,2-8,2 do espectro de RMN ^1H de 23 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	142

Figura 63 - Expansão da região de δ 0,9-3,9 do espectro de RMN ^1H de 23 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	143
Figura 64 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de 23 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	143
Figura 65 - Expansão da região de δ 95-180 de espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de 23 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	144
Figura 66 - Expansão da região de δ 64-78 de espectro de RMN ^{13}C de 23 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	144
Figura 67 - Mapa de contorno gHSQC de 23 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	145
Figura 68 - Expansão da região de δ 4,0-8,5 do mapa de contorno gHSQC de 23 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	145
Figura 69 - Mapa de contorno gHMBC de 23 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	146
Figura 70 - Expansão da região de δ 4,0-8,5 do mapa de contorno gHMBC de 23 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	146
Figura 71 - Expansão da região de δ 4,3-5,7 do mapa de contorno gHMBC de 23 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	147
Figura 72 - Espectro de massas do composto 23 : MS 2 [739] (A), MS 3 [739] (B) e MS 4 [739] (C).....	148
Figura 73 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD (A) e espectro de absorção molecular (B) do composto 24 . Fase móvel: MeOH/H $_2$ O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min $^{-1}$, coluna C18, $\lambda=348$ nm.....	149
Figura 74 - Espectro de massas de alta resolução do composto 24	150
Figura 75 - Proposta de fragmentação do composto 24 . Adaptada de Veitch; Kite; Lewis (2008) e March; Miao (2004).....	152
Figura 76 - Espectro de RMN ^1H de 24 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	154
Figura 77 - Expansão da região de δ 4,0-8,2 do espectro de RMN ^1H de 24 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	154
Figura 78 - Expansão da região de δ 0,5-2,7 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de 24 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	155
Figura 79 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de 24 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	155

Figura 80 - Expansão da região de δ 90-180 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de 24 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	156
Figura 81 - Expansão da região de δ 63-75,5 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de 24 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	156
Figura 82 - Expansão da região de δ 18-52 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de 24 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	157
Figura 83 - Mapa de contornos gHSQC de 24 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	157
Figura 84 - Expansão da região de δ 6,1-8,3 do mapa de contornos gHSQC de 24 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	158
Figura 85 - Expansão da região de δ 4,0-5,8 do mapa de contornos gHSQC de 24 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	158
Figura 86 - Mapa de contornos gHMBC de 24 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	159
Figura 87 - Expansão da região de δ 4,0-8,2 do mapa de contornos gHMBC de 24 (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).....	159
Figura 88 - Espectro de massas do composto 25 : MS^2 [739] (A), MS^3 [593] (B) and MS^4 [447] (C).....	160
Figura 89 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD (A) e espectro UV-Vis (B) do composto 25 . Fase móvel: MeOH/ H_2O -AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, coluna C18, $\lambda = 348 \text{ nm}$	161
Figura 90 - Espectro de massas de alta resolução do composto 16	162
Figura 91 - Proposta de fragmentação do composto 16 . Adaptada de Veitch; Kite; Lewis (2008) e March; Miao (2004).....	164
Figura 92 - Espectro de RMN ^1H de 16 (CD_3OD , 600 MHz).....	165
Figura 93 - Expansão da região de δ 3,8-8,4 do espectro de RMN ^1H de 16 (CD_3OD , 600 MHz).....	165
Figura 94 - Expansão da região de δ 0,1-3,9 de espectro de RMN ^1H de 16 (CD_3OD , 600 MHz).....	166
Figura 95 - Espectro de massas do composto 16 (A); MS^2 [M-H-292] $^-$ (B); MS^3 [M-H-292] $^-$ (C); MS^3 [M-H-146] $^-$ (D); MS^4 [M-H-292] $^-$ (E).....	167

CAPÍTULO IV

- Figura 1** - Estruturas dos flavonoides robinina e astrasikokiosideo I..... 180
- Figura 2** - Cromatogramas e estruturas dos flavonoides robinina (a) e astrasikokiosideo I (b). Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2% v/v), gradiente: 0-5min, 30-40% MeOH; 5-7min, 40% MeOH; 7-12min, 40-50% MeOH; 12-14min, 50% MeOH; 14-19min, 50-60% MeOH; 19-23min, 60-100% MeOH, vazão de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 10 µL, coluna de fase reversa C18 e λ = 265 e 348 nm. 181
- Figura 3** - Cromatogramas do extrato (EEF) e frações acetato de etila (FAEF) e aquosa das folhas (FAF) nos comprimentos 265 nm (a) e 348 nm (b). Fase Móvel: MeOH-H₂O/AcOH (0,2%), coluna C18, gradiente: 0-5min, 30-40% MeOH; 5-7min, 40% MeOH; 7-12min, 40- 50% MeOH; 12-14min, 50% MeOH; 14-19min, 50-60% MeOH; 19-23min, 60-100% MeOH; vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹..... 186

CAPÍTULO V

- Esquema 1** - Fracionamento do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*..... 206
- Figura 1** - Cromatoplasmas das frações obtidas do fracionamento do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*. Revelador: solução de Ce(SO₄)₂..... 207
- Figura 2** - Cromatogramas do extrato etanólico dos galhos (EEG_{Ma}) e das frações acetato de etila (FAEG_{Ma}), metanólica (FMG_{Ma}) e metanol-água (FMAG_{Ma}). Fase Móvel: MeOH/H₂O (0,2%), gradiente: 0-40 min (5-100% MeOH), 40-50 min (100% MeOH), vazão 1,0 mL min⁻¹ e λ = 254 nm. Coluna C-18 (250 x 4,6 mm, partícula de 5,0 µm)..... 208
- Figura 3** - Cromatograma das subfrações metanol-água (1:1) e metanólica obtidas por C-18 da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos. Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 26-30 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-38 min, 100%, 38-41 min, 100-30% MeOH, 41-46 min, 30%, vazão 1,0 mL min⁻¹, coluna C-18 (250 x 4,6 mm, partícula de 5,0 µm) e λ=254 nm..... 210
- Figura 4** - Cromatograma das subfrações H₂O, MeOH/H₂O (1:1), MeOH obtidas por C-18 da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas. Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH;

7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 26-30 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-38 min, 100%, 38-41 min, 100-30% MeOH, 41-46 min, 30%, vazão 1,0 mL min ⁻¹ , coluna C-18 (250 x 4,6 mm, partícula de 5,0 µm) e λ=254 nm.....	212
Figura 5 - Cromatoplaça do grupo FHG-4 e o padrão esqualeno (P). Revelador: solução de Ce(SO ₄) ₂	214
Figura 6 - Cromatoplaça do grupo FCG-28-8 (4 e 5) e o padrão autêntico da mistura de esteroides sitosterol e estigmasterol (P). Revelador: solução de Ce(SO ₄) ₂	215
Figura 7 - <i>Fingerprint</i> da subfração MeOH/H ₂ O (1:1) da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos obtido por DI-ESI-MS/MS no modo negativo. Expansão: <i>m/z</i> 100-600 (A) e <i>m/z</i> 600-1500 (B).....	217
Figura 8 - Constituintes químicos identificados da subfração MeOH/H ₂ O (1:1) da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos.....	218
Figura 9 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 191 referente a escopoletina (29).....	219
Figura 10 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 289 referente a (epi)catequina (30)....	219
Figura 11 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 575 referente ao dímero de procianidina tipo A, (epi)catequina→A→(epi)catequina [(1)2→A→(1)2] (31).....	220
Figura 12 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 861 (A) e MS ³ do íon <i>m/z</i> 735 (B) referente a trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)→A→(1)2] (32).....	220
Figura 13 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 863 referente ao trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (33).....	221
Figura 14 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 877 referente ao trímero de proantocianidina tipo A, com uma (epi)galocatequina (34).....	221
Figura 15 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 1151 referente ao tetrâmero de procianidina tipo A [(epi)catequina→B→(epi)catequina→A→(epi)catequina→B→(epi) catequina] (35).....	222
Figura 16 - <i>Fingerprint</i> da subfração metanólica da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos obtido por DI-ESI-MS/MS no modo negativo. Expansão: <i>m/z</i> 100-600 (A) e <i>m/z</i> 600-1500 (B).....	223
Figura 17 - <i>Fingerprint</i> da subfração H ₂ O da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos obtido por DI-ESI-MS/MS no modo negativo. Expansão: <i>m/z</i> 100-600 (A) e <i>m/z</i> 600-1500 (B).....	223

Figura 18 - Constituintes químicos identificados da subfração H ₂ O da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos.....	226
Figura 19 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 191 referente a ácido quínico (36)..	226
Figura 20 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 283 referente a biochanina A (37)..	227
Figura 21 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 885 (A) e MS ³ do íon <i>m/z</i> 739 (B) referente a canferol-3- <i>O</i> -rutinosil-7- <i>O</i> -diramnosídeo (18).....	228
Figura 22 - <i>Fingerprint</i> da subfração MeOH/H ₂ O (1:1) da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos obtido por DI-ESI-MS/MS no modo negativo. Expansão: <i>m/z</i> 100-600 (A) e <i>m/z</i> 600-1500 (B).....	230
Figura 23 - Constituintes químicos identificados da subfração MeOH/H ₂ O (1:1) da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos.....	231
Figura 24 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 861 referente ao trímico de procianidina [(1)2→A→(1)2→A→(1)2] (32).....	231
Figura 25 - Via de fragmentações das proantocianidinas: metileno de quinona (QM), fissão Retro Diels-Alder (RDA) e fissão de anel heterocíclico (HRF) proposta por GU et al. (2003).....	232
Figura 26 - <i>Fingerprint</i> da subfração MeOH da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos obtido por DI-ESI-MS/MS no modo negativo. Expansão: <i>m/z</i> 100-600 (A) e <i>m/z</i> 600- 1500 (B).....	234
Figura 27 - Constituintes químicos identificados da subfração MeOH da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos.....	234
Figura 28 - Espectros de massas MS ² do íon <i>m/z</i> 577 referentes a dímeros isoméricos de procianidina B1 e/ou procianidina B2 (38).....	234

CAPÍTULO VI

Figura 1 - Estruturas dos principais constituintes da resina de almecega.....	240
--	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Isoflavonoides de espécies da tribo Dalbergieae.....	16
Tabela 2 - Estruturas das isoflavonas de 1-125	24
Tabela 3 - Estruturas das isoflavanonas de 126-155	29
Tabela 4 - Estruturas dos pterocarpanos de 156-182	31
Tabela 5 - Estruturas das isoflavananas de 195 – 219	34

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Ponderação empregada no cálculo do fator de proteção solar por espectrofotometria (SAYRE <i>et al.</i> , 1979).....	60
Tabela 2 - Fenóis totais (FT), flavonoides totais (FLAT), atividade sequestradora de radicais livres (DPPH, CE ₅₀ e ABTS) dos extratos etanólico das folhas (EEFMa) e galhos (EEGMa)	64
Tabela 3 - Fenóis totais (FT) e atividade sequestradora de radicais livres (DPPH e CE ₅₀) das frações dos extratos etanólico das folhas (EEFMa) e galhos (EEGMa).....	65

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Grupos obtidos do fracionamento em coluna de gel de sílica de FHFMa...	80
Tabela 2 - Rendimento da extração em fase sólida (C-18) da fração acetato de etila das folhas.....	83
Tabela 3 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (600 e 150 MHz, δ/ppm, CDCl ₃) de 1	91
Tabela 4 - Compostos identificados como derivados sililados em M1-d por CG-EM...	94
Tabela 5 - Compostos identificados em M1 sem derivatização por CG-EM.....	96
Tabela 6 - Dados de RMN ¹³ C-DEPTQ 135° para a mistura M2 (compostos 7-12) (CDCl ₃ , 150 MHz).....	103
Tabela 7 - Constituintes químicos identificados na subfração H ₂ O oriunda da fração acetato de etila por DI-ESI-MS/MS.....	112
Tabela 8 - Constituintes químicos identificados na subfração MeOH/H ₂ O (1:1) oriunda da fração acetato de etila por DI-ESI-MS/MS.....	120
Tabela 9 - Constituintes químicos identificados na fração aquosa da partição do extrato etanólico por DI-ESI-MS/MS.....	124

Tabela 10 - Dados de RMN ¹ H, ¹³ C, gHSQC e gHMBC (600 e 150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 22	129
Tabela 11 - Dados de RMN ¹ H, ¹³ C, gHSQC e gHMBC (600 e 150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 23	141
Tabela 12 - Dados de RMN ¹ H, ¹³ C, gHSQC e gHMBC (600 e 150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 24	153

CAPÍTULO IV

Tabela 1 - Parâmetros de regressão das curvas analíticas dos flavonoides robinina e astrasikokiosideo I.....	187
Tabela 2 - Teores de robinina e astrasikokiosideo I no extrato e frações das folhas de <i>M. acutifolium</i>	189

CAPÍTULO V

Tabela 1 - Grupos obtidos do fracionamento em coluna de gel de sílica da FCGMa..	209
Tabela 2 - Rendimento da extração em fase sólida (C-18) da fração acetato de etila dos galhos de <i>M. acutifolium</i>	210
Tabela 3 - Rendimento da extração em fase sólida (C-18) da fração metanólica dos galhos de <i>M. acutifolium</i>	211
Tabela 4 - Identificação de compostos subfração MeOH/H ₂ O (1:1) da fração acetato de etila dos galhos de <i>M. acutifolium</i>	216
Tabela 5 - Identificação dos compostos da subfração H ₂ O da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos de <i>M. acutifolium</i>	224
Tabela 6 - Identificação dos compostos da subfração MeOH/H ₂ O (1:1) da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos de <i>M. acutifolium</i>	229
Tabela 7 - Identificação dos compostos da subfração MeOH da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos de <i>M. acutifolium</i>	233

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
AAPH	2,2'-azobis-2-amidinopropano
Abs	Absorbância
ABTS ⁺	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
AchE	Enzima Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de Variância
ATCI	Iodeto de Acetilcolina
BHT	butilhidroxitolueno
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CC	Cromatografia em Coluna
CE ₅₀	Concentração Eficiente
d	Dupleto
dd	Dupleto de dupleto
DI	<i>Direct Insertion</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DEPTQ	<i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer including the detection of Quaternary nuclei</i>
DP	Desvio Padrão
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]
EE	Efeito Eritematógeno
EEFMa	Extrato Etanólico das Folhas de <i>Machaerium acutifolium</i>
EEGMa	Extrato Etanólico dos Galhos de <i>Machaerium acutifolium</i>
ER	Equivalente de Rutina
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
ESI	<i>Electrospray Source Ionization</i>
EA	Equação da Amostra
ET	Equação do Trolox
FAFMa	Fração Aquosa das Folhas de <i>Machaerium acutifolium</i>
FEAFMa	Fração Acetato de Etila das Folhas de <i>Machaerium acutifolium</i>
FHFMa	Fração Hexânica das Folhas de <i>Machaerium acutifolium</i>
FHGMa	Fração Hexânica dos Galhos de <i>Machaerium acutifolium</i>
FCGMa	Fração Clorofórmica dos Galhos de <i>Machaerium acutifolium</i>
FEAGMa	Fração Acetato de Etila dos Galhos de <i>Machaerium acutifolium</i>
FMGMa	Fração Metanólica dos Galhos de <i>Machaerium acutifolium</i>
FMAGMa	Fração Metanol-Água dos Galhos de <i>Machaerium acutifolium</i>
FC	fator de correção

FLAT	Flavonoides Totais
FT	Fenóis Totais
FPS	Fator de proteção solar
Gal	Galactosil/Galactosídeo
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HRF	Fissão de Anel Heterocíclico
HRMS	Espectro de Massa de Alta Resolução
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
I(λ)	Intensidade da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);
J	Constante de acoplamento
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MHz	Mega Hertz
MQm	Média Quadrática do modelo de regressão
MQr	Média Quadrática residual
MS ⁿ	Espectro de Massa a n
MeOH	Metanol ou Álcool Metílico
OMS	Organização Mundial da Saúde
QM	Quinona Metídeo
R	Coefficiente de Correlação Linear
Rha	Ramnose/Ramnosil/Ramnosídeo
RDA	Retro Diels-Alder
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Desvio Padrão da Resposta
S	Inclinação da Curva Analítica
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
SPE	Extração em Fase Sólida
TMS	Trimetil Silano
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
Referências.....	4
2 OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo Geral.....	7
2.2 Objetivos Específicos.....	7
3 CAPÍTULO 1: Isoflavonoides da tribo Dalbergieae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília Papilionoideae.....	8
Resumo.....	8
Abstract.....	8
1 Introdução.....	9
1.1 O táxon Fabaceae.....	10
1.2 Subfamília Papilionoideae - Tribo Dalbergieae.....	11
1.3 Isoflavonoides.....	11
2 Isoflavonoides da Tribo Dalbergieae.....	14
2.1 Isoflavonas.....	21
2.2 Isoflavanonas.....	27
2.3 Pterocarpanos.....	30
2.4 Rotenoides.....	32
2.5 Isoflavanas.....	33
2.6 Outros isoflavonoides.....	35
2.7 Considerações sobre as atividades biológicas da tribo Dalbergieae.....	37
3 Considerações finais.....	38
Referências.....	39
4 CAPÍTULO 2: Perfil químico e atividades biológicas dos extratos etanólico das folhas e galhos de <i>Machaerium acutifolium</i>.....	52
Resumo.....	52
Abstract.....	52
1. Introdução.....	53
2. Parte Experimental.....	54
3. Resultados e Discussão.....	62

4. Conclusões.....	68
Referências.....	72
5 CAPÍTULO 3: Estudo fitoquímico e desreplicação do extrato etanólico das folhas de <i>Machaerium acutifolium</i> Vogel.....	73
Resumo	73
Abstract.....	74
1. Introdução.....	75
2. Parte Experimental.....	76
3. Resultados e Discussão.....	90
4. Conclusões.....	168
Referências.....	169
6 CAPÍTULO 4: Quantificação dos flavonoides robinina e astrasikokiosideo I em <i>Machaerium acutifolium</i>.....	175
Resumo	175
Abstract.....	175
1. Introdução.....	176
2. Parte Experimental.....	178
3. Resultados e Discussão.....	185
4. Conclusões.....	190
Referências.....	191
Material Suplementar.....	194
7 CAPÍTULO 5: Fracionamento e desreplicação do extrato etanólico dos galhos de <i>Machaerium acutifolium</i> Vogel.....	202
Resumo	202
Abstract.....	203
1. Introdução.....	204
2. Parte Experimental.....	205
3. Resultados e Discussão.....	214
4. Conclusões.....	236
Referências.....	237
8 CAPÍTULO 6: Outras Atividades Desenvolvidas.....	239

1 Estudo colaborativo com a resina de <i>Protium heptaphyllum</i>	239
2 Trabalhos produzidos a partir das disciplinas obrigatórias.....	242
3 Colaboração em outros trabalhos.....	243
Referências.....	245
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	248
ANEXOS.....	251
APÊNDICE.....	258

Introdução

INTRODUÇÃO

Espécies vegetais são essenciais para manutenção da vida neste planeta, pois estão diretamente relacionadas ao suprimento das necessidades básicas, como alimentos, roupas, remédios e moradia. Elas fornecem uma base viável e renovável para vida na terra (AHMAD et al., 2010; NASAB; KHOSRAVI, 2014). O uso de plantas como fonte medicinal alternativa é um costume antigo comum e faz parte da tradição de muitas comunidades no Brasil e no mundo. Esta prática tem contribuído para direcionar o estudo de espécies com fins medicinais, contribuindo para descoberta e desenvolvimento de novos fitofármacos e medicamentos (BÔAS; GADELHA, 2007; NASAB; KHOSRAVI, 2014).

O território brasileiro detém cerca de 20% da biodiversidade vegetal do planeta e é conhecido por ter uma das mais ricas floras do mundo (FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006; GARCEZ et al., 2016). O Brasil destaca-se pelo elevado número de espécies vegetais com potencial terapêutico e como fonte de novos agentes bioativos, embora a maioria das espécies ainda não tenha sido estudada do ponto de vista químico e biológico (BOLZANI et al., 2012; SANTOS et al., 2018).

A família Fabaceae é considerada a terceira maior família de Angiospermas em número de espécies ficando atrás apenas de Asteraceae e Orchidaceae. É constituída por aproximadamente 36 tribos, 770 gêneros, 19.500 espécies e está distribuída em quase todos os continentes, exceto na Antártida (LEWIS, 2005; LPWG, 2017). Esta família é a segunda em importância econômica, ficando atrás apenas da Poaceae. (LPWG, 2017; WOJCIECHOWSKI; LAVIN; SANDERSON, 2004). No Brasil, Fabaceae é constituída por 213 gêneros, 2.756 espécies, sendo 1.458 endêmicas, 53 subespécies e 731 variedades (FORZZA et al., 2010). Anteriormente esta família era dividida nas subfamílias Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae, no entanto, uma classificação mais recente baseada em estudos taxonômicos e moleculares foi desenvolvida pelo *Legume Phylogeny Working Group* (2017), no qual dividiu a família Fabaceae em seis subfamílias: Papilionoideae, Caesalpinioideae, Detarioideae, Dialioideae, Cercidoideae e Duparquetioideae (LPWG, 2017).

Plantas pertencentes a Fabaceae são ricas em flavonoides, porém acumulam também outros metabólitos como alcaloides, terpenoides e esteroides (AMEN et al., 2015; HEGNAUER; BARKMEIJER, 1993; VEITCH, 2013). A contribuição na alimentação humana e de outros animais permitem que diversas indústrias sejam beneficiadas pela matéria prima derivada de Fabaceae para produção de medicamentos, corantes, pesticidas, resinas, tintas, gomas e espessantes (JUDD et al, 2007; SOUZA; LORENZI, 2008).

O gênero *Machaerium* pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae e tribo Dalbergieae (FERREIRA et al., 2019). Plantas deste gênero são utilizadas tradicionalmente contra a tosse e a seiva é usada para tratamento de aftas da boca (AMEN et al., 2015). Na América do Sul, *M. floribundum* é utilizada pela população indígena para tratar diarreia (HEINRICH et al., 1992) e na Costa Rica suas raízes são usadas na forma de decocção contra cólicas menstruais (GINSBARG, 1977).

O gênero *Machaerium* é constituído por 262 espécies (AMEN et al., 2015), entretanto, somente dezesseis apresentam estudo químico (*M. acutifolium*, *M. aristulatum*, *M. eriocarpum*, *M. floribundum*, *M. hirtum*, *M. incorruptibile*, *M. kuhlmannii*, *M. mucronulatum*, *M. multiflorum*, *M. nictitans*, *M. opacum*, *M. pedicellatum*, *M. scleroxylon*, *M. secundiflorum*, *M. vestitum* e *M. villosum*). Para estas espécies são relatadas a presença de flavonoides, alcaloides, triterpenoides, esteroides, cinamoilfenóis, derivados de ácidos graxos, entre outros (AMEN et al., 2015; BENTO et al., 2018; CARVALHO et al., 2020). Algumas atividades biológicas são relatadas, tais como estrogênica, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, mutagênica e alelopática (AMEN et al., 2015; BENTO et al., 2018; CARVALHO et al., 2020).

A espécie *Machaerium acutifolium* Vogel (sin. *M. muticum* Benth) tem ocorrência da Amazônia até São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia, Piauí e Maranhão, principalmente na área de cerrado (LORENZI, 1998; POLIDO; SARTORI, 2007). Esta espécie é conhecida popularmente por jacarandá do campo, jacarandá caroba e jacarandá bico de pato, sendo utilizada tradicionalmente pela população indígena do sudeste do Pará como anticoncepcional, para tratar menstruação dolorosa e dor de estômago (BARBOSA; PINTO, 2003; POVH et al., 2007; ROSA et al., 2014). O estudo realizado por Ollis et al. (1978), com o extrato benzênico da madeira do tronco de *M. acutifolium*, resultou no isolamento e identificação dos polifenóis éter monometil de pinsilvina, (+)-medicarpina e petroestireno. Um estudo recente, realizado por Melo et al. (2021), revelou que o extrato acetato de etila do tronco de *M. acutifolium* apresenta em sua constituição um derivado de 3-arilcumarina, *trans*-estilbeno, indeno e dois flavonóides: (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-di-hidro-3-(2'-hidroxi-3',4'-dimetoxifenil) e (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-di-hidro-3-(2'-hidroxi-3',4'-dimetoxifenil)-8-metoxi. Este extrato e o indeno apresentaram atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (MELO et al., 2021).

Considerando o potencial químico e biológico de plantas da família Fabaceae, em especial do gênero *Machaerium*, o presente trabalho tem como objetivo isolar e identificar constituintes químicos dos extratos etanólico das folhas e dos galhos de *M. acutifolium*, bem como avaliar o potencial biológico dos extratos, frações e substâncias isoladas, além de quantificar os constituintes majoritários.

Desta forma, o trabalho de tese intitulado “**Estudo químico e biológico da espécie *Machaerium acutifolium* Vogel**” foi dividido em seis capítulos. O Capítulo I, **Isoflavonoides da tribo Dalbergieae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília Papilionoideae**, trata-se de uma revisão que descreve os isoflavonoides e atividades biológicas das espécies da tribo Dalbergieae (Fabaceae-Papilionoideae). Este artigo foi publicado no periódico Química Nova (vol. 43, n. 9, p. 1294-1311, 2020) sendo escolhido como capa da edição. O Capítulo II, **Perfil químico e atividades biológicas dos extratos etanólico das folhas e galhos de *Machaerium acutifolium* Vogel**, apresenta o perfil químico e a investigação da ação sequestradora de radicais livres, proteção solar, inibição de acetilcolinesterase e atividade larvicida dos extratos etanólico das folhas e galhos.

O Capítulo III, **Estudo fitoquímico e desreplicação do extrato etanólico das folhas de *Machaerium acutifolium* Vogel**, descreve o fracionamento cromatográfico do extrato e frações das folhas. O estudo com as folhas permitiu isolamento e identificação de constituintes químicos por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , bem como a identificação de constituintes a partir da análise por inserção direta em espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray*. O Capítulo IV, **Quantificação dos flavonoides robinina e astrasikokiosideo I em *Machaerium acutifolium* Vogel**, descreve o método cromatográfico desenvolvido para quantificação dos flavonoides majotários robinina e astrasikokiosideo I nos extratos e frações das folhas e galhos.

O Capítulo V, **Fracionamento e desreplicação do extrato etanólico dos galhos de *Machaerium acutifolium* Vogel**, descreve o isolamento e identificação de constituintes químicos do extrato etanólico dos galhos e frações a partir da análise por inserção direta em espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray*. Por fim, o Capítulo VI, **Outras Atividades Desenvolvidas**, descreve estudos colaborativos com a resina de *Protium heptaphyllum* fornecida pelo nosso grupo de pesquisa, bem como os trabalhos produzidos a partir de disciplinas obrigatórias e ainda colaboração em outros trabalhos desenvolvidos durante o doutoramento.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; KHAN, M. A.; ZAFAR, M.; ARSHAD, M.; SULTANA, S.; ABBASI, B. H.; SIRAJ-UD-DIN. Use of chemotaxonomic markers for misidentified medicinal plants used in traditional medicines. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 13, p. 1244-1252, 2010.
- AMEN, Y. M.; MARZOUK, A. M.; ZAGHLOUL, M. G.; AFIFI, M. S. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. **Natural Product Research**, v. 29, n. 15, p. 1388-1405, 2015.
- BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu - sudeste do Pará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 47-49, 2003.
- BENTO, C. C.; TANGERINA, M. M. P.; ZANATTA, A. C.; SARTORI, A. L. B.; FRANCO, D. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; ALMEIDA, L. F. R.; SANNOMIYA, M. Chemical constituents and allelopathic activity of *Machaerium eriocarpum* Benth. **Natural Product Research**. v. 34, n. 6, p. 884-888, 2018.
- BÔAS, G. K. V.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n.6, p.1463-1471, 2007.
- BOLZANI, V. S.; VALLI, M.; PIVATTO, M.; VIEGAS JR., C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.
- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; FREITAS, J. S.; CHAVES, M. H. Isoflavonoides da tribo Dalbergieae: uma contribuição quimiossistemática para a subfamília Papilionoideae. **Química Nova**, v. 43, n. 9, p. 1294-1311, 2020.
- FERREIRA, J. J. S.; OLIVEIRA, A. C. S.; QUEIROZ, R. T.; SILVA, J. S. A tribo Dalbergieae s.l. (Leguminosae-Papilionoideae) no município de Caetité, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, 70, e03502017, 2019.
- FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, v.13, n.3, p. 489-501, 2006.
- FORZZA, R. C; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CARVALHO JR, A. A.; COSTA, A.; COSTA. D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. v. 2. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 1699 p.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, N. C.; FIGUEIREDO, P. O. A Diversidade dos Constituintes Químicos da Flora de Mato Grosso do Sul e sua Relevância como Fonte de Substâncias Bioativas. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 97-129, 2016.

GINSBARG, S. Plantas medicinales de los indios Bribris y Cabécar. **Area Indígena/Aldeia Indígena** (Brasil), v. 37, p. 367-398, 1977.

HEGNAUER, R.; BARKMEIJER, R. J. G. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 3-16, 1993.

HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; BARRERA, N. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacologic evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 63-80, 1992.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, 2007.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. **Legumes of the World**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 577p.

LORENZI, H. **Arvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arboreas do Brasil**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998, v.2.

LPWG (Legume Phylogeny Working Group). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, p. 44-77, 2017.

MELO, S. J.; SOUSA, J. P. B.; SÁ, M. G.; MORAIS, L. S.; MAGALHÃES, N. M. G.; GOUVEIA, F. N.; ALBERNAZ, L. C.; ESPINDOLA, L. S. *Machaerium acutifolium* compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 77, n. 33, p. 1444–1451, 2021.

NASAB, F. K.; KHOSRAVI, A. R. Ethnobotanical study of medicinal plants of Sirjan in Kerman Province, Iran. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 1, p. 190-197, 2014.

OLLIS, W. D.; BRIAN, T.; REDMAN, B. T.; SUTHERLANDT, I. O.; GOTTLIEB, O. R. Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1379-1381, 1978.

POLIDO, C. A.; SARTORI, A. L. B. O gênero *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergieae) no pantanal brasileiro. **Rodriguésia**, v. 58, n. 2, p. 313-329, 2007.

POVH, J. A.; PINTO, D. D.; CORRÊA, M. O. G.; ONO, E. O. Atividade alelopática de *Machaerium acutifolium* Vog. na germinação de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 447-449, 2007.

ROSA, P. A. L.; ALVES, M. C.; VIDEIRA, L. M. L.; BONINI, C. B. S. Recuperação de um solo de cerrado após 19 anos: ocorrência espontânea de espécies arbóreas. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 1, n. 1, p. 44-57, 2014.

SANTOS, M. O.; RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; MACÊDO, M. J. F.; MACEDO, J. G. F.; LACERDA, M. N. S.; MACÊDO, M. S.; SOUZA, M. M. A. Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the caatinga area, Northeastern Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, 2018.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II**. Plantarum: Nova Od, 2008.

VEITCH, N. Isoflavonoids of the Leguminosae. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 988-1027, 2013.

WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M. J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid Matk gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1846-1862, 2004.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar constituintes químicos dos extratos etanólico das folhas e galhos de *Machaerium acutifolium*, bem como avaliar o potencial biológico dos extratos, frações e substâncias isoladas, além de quantificar os constituintes majoritários.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar os extratos etanólico das folhas (EEFMa) e galhos (EEFMa) de *M. acutifolium*
- Obter frações de diferentes polaridades dos extratos etanólico das folhas e galhos de *M. acutifolium*
- Obter os perfis químicos dos extratos e frações obtidas, por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do UV-Vis e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos e frações por meio do ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH) e cátion radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS)
- Determinar os teores de fenóis e flavonoides totais dos extratos e frações
- Investigar as atividades inibidora de acetilcolinesterase, larvicida frente a *Aedes aegypti* e fator de proteção solar dos extratos
- Identificar e/ou elucidar, por métodos espectroscópicos, os constituintes químicos isolados
- Identificar constituintes químicos dos extratos, frações e subfrações por desreplicação por inserção direta em espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* (DI-ESI-MS/MS)
- Quantificar constituintes majoritários nos extratos etanólico e frações das folhas e galhos por HPLC
- Contribuir para o conhecimento da composição química da espécie *Machaerium acutifolium*

Capítulo 1

Isoflavonoides da tribo Dalbergieae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília Papilionoideae

(Artigo escolhido com capa do volume 43 da Revista Química Nova, vol. 43, n. 9, p. 1294-1311, 2020)

ISOFLAVONOÍDES DA TRIBO DALBERGIEAE: UMA CONTRIBUIÇÃO QUIMIOSSISTEMÁTICA PARA A SUBFAMÍLIA PAPILIONOIDEAE

RESUMO

As plantas da família Fabaceae possuem diversos metabólitos secundários e alto potencial biológico. A subfamília Papilionoideae (Fabaceae) possui 28 tribos, das quais Dalbergieae compreende 49 gêneros e 1325 espécies. Os isoflavonóides são marcadores quimiotaxonômicos de Papilionoideae e possuem importantes propriedades biológicas. Esta revisão descreve os isoflavonóides e atividades biológicas da espécie da tribo Dalbergieae (Fabaceae-Papilionoideae), no período de 1945 a 2019. Um total de 240 isoflavonóides foram encontrados em 69 espécies e 15 gêneros. Formononetina, biochanina A e medicarpina foram os isoflavonóides mais frequentes nesta tribo. Os gêneros *Dalbergia*, *Machaerium*, *Andira* e *Pterocarpus* apresentaram elevado número de espécies com ocorrência de isoflavonóides. Um total de 81 isoflavanóides e 46 espécies apresentaram atividades biológicas. Isso sugere que mais trabalhos são necessários para avaliar o potencial desta tribo. O presente estudo contribui para a classificação taxonômica de gêneros ou espécies na família, subfamília ou tribo, uma vez que a correlação entre metabólitos secundários e dados morfológicos é uma ferramenta importante para a classificação, filogenia e evolução das espécies. Essa compilação também contribui para ampliar e atualizar o período pesquisado sobre a ocorrência de isoflavonóides em espécies da tribo Dalbergieae, descritas na literatura em outras revisões bibliográficas.

Palavras-chave: isoflavonóides; isoflavonas; Dalbergieae; Papilionoideae; Fabaceae.

ABSTRACT

Plants from Fabaceae family have several secondary metabolites and high biological potential. The subfamily Papilionoideae (Fabaceae) has 28 tribes, of which Dalbergieae comprises 49 genera and 1325 species. Isoflavonoids are chemotaxonomic markers of Papilionoideae and have important biological properties. This review describes the isoflavonoids and biological activities from the tribe Dalbergieae (Fabaceae-Papilionoideae) species, in the period of 1945 to 2019. A total of 240 isoflavonoids were found in 69 species and in 15 genera. Formononetin, biochanin A and medicarpin were the most frequent isoflavonoids in this tribe. *Dalbergia*, *Machaerium*, *Andira* and *Pterocarpus* genera had a high number of species with occurrence of isoflavonoids. A total of 81 isoflavanoids and 46 species showed biological activities. This suggests that more works are necessary to evaluate the potential of this tribe. The present study contributes to the taxonomic classification of genus or species in the family, subfamily or tribe, once the correlation between secondary metabolites and morphological data is an important tool for the classification, phylogeny and evolution of species. This compilation also contributes to extend and update the researched period on the occurrence of isoflavonoids in species of the tribe Dalbergieae, described in the literature in other bibliographic reviews.

Keywords: isoflavonoids; isoflavones; Dalbergieae; Papilionoideae; Fabaceae.

1 INTRODUÇÃO

Estudos quimiosistemáticos ou quimiotaxonômicos utilizam dados químicos provenientes do metabolismo especializado ou micromolecular das plantas e podem auxiliar na identificação e classificação de espécies de difícil caracterização com o uso somente de análises morfológicas. A quimiosistemática considera o fato dos metabólitos especializados e suas vias biossintéticas serem frequentemente específicas e restritas a organismos taxonomicamente relacionados (SINGH; GEETANJALI, 2018; SOUSA; CHAVES, 2019; WINK et al., 2010).

A grande variedade de constituintes químicos isolados de espécies vegetais em conjunto com a morfologia e dados citológicos permitem diagnosticar o histórico do organismo e as modificações sofridas em seu ambiente (REYNOLDS, 2007).

Recentemente, um novo termo denominado quimiofenética foi proposto para descrever estudos quimiosistemáticos que não visem somente elucidar relações filogenéticas, mas também descrever a variedade de produtos naturais micro e macromoleculares de um determinado táxon (SOUSA; CHAVES, 2019; WINK et al., 2010; ZIDORN, 2019). Dessa forma, além das abordagens anatômicas, morfológicas e cariológicas já reconhecidas como de grande importância para o estabelecimento de sistemas naturais, os estudos quimiofenéticos reúnem uma combinação de dados fitoquímicos e macromoleculares e até mesmo a busca sistemática de produtos naturais raros que podem ajudar na caracterização de clados, até agora suportados apenas por dados de sequência de DNA (ZIDORN, 2019).

Plantas da família Fabaceae Lind (Leguminosae) são conhecidas pela diversidade de metabólitos secundários e por seu elevado potencial biológico (PEREIRA et al., 2019; ROCHA E SILVA et al., 2007; ZARUCHI et al., 1994).

O modo de distribuição destes metabólitos pode ser usado para identificar a origem botânica e muitas vezes expressa a adaptação, regulação e evolução sofrida por um determinado táxon (LPWG, 2017; SHARMA; RAMAWAT, 2013; VEITCH, 2013, VEITCH, 2009; VEITCH, 2007).

Os isoflavonoides são metabólitos secundários ou micromoleculares quase que exclusivamente restritos a subfamília Papilionoideae (Fabaceae), sendo alvo de três revisões bibliográficas compreendendo o período de 1997 a 2011 (VEITCH, 2013, VEITCH, 2009; VEITCH, 2007). Entretanto, considerando a relevância dos metabólitos secundários como instrumentos de classificação taxonômica, que a tribo Dalbergieae (Fabaceae-Papilionoideae) passou por várias modificações, especialmente, após avanços na filogenia molecular (LAVIN et al., 2001; WOJCIECHOWSKI; LAVIN; SANDERSON, 2004), o presente trabalho teve

Carvalho, A. A.

como objetivo realizar uma revisão bibliográfica dos isoflavonoides e atividades biológicas de espécies desta tribo, no período de 1945 a 2019, contribuindo para ampliar e atualizar o período pesquisado sobre a ocorrência destes metabólitos nesta tribo, como também ajudar na caracterização de clados e fornecer subsídios para guiar futuras prospecções fitoquímicas que visem a descoberta de novos agentes terapêuticos.

1.1. O táxon Fabaceae

Fabaceae é considerada a terceira maior família de Angiospermas em número de espécies ficando atrás apenas de Asteraceae e Orchidaceae. É constituída por aproximadamente 36 tribos, 770 gêneros, 19.500 espécies e está distribuída em quase todos os continentes, exceto na Antártida (LEWIS, 2005; LPWG, 2017). Essa família é a segunda em importância econômica, ficando atrás apenas da Poaceae (LAVIN et al., 2001; LPWG, 2017; WOJCIECHOWSKI; LAVIN; SANDERSON, 2004).

No Brasil, Fabaceae é constituída por 213 gêneros, 2.756 espécies, sendo 1.458 endêmicas, 53 subespécies e 731 variedades (FORZZA et al., 2010). A classificação tradicional dividia a família Fabaceae em três subfamílias: Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae, as quais podem ser diferenciadas principalmente pela prefloração das pétalas (LEWIS, 2005). No entanto, uma classificação mais recente baseada em estudos taxonômicos e moleculares foi endossada pelo *Legume Phylogeny Working Group* (LPWG, 2017), no qual dividiu a família Fabaceae em seis subfamílias: Papilionoideae (503 gêneros, cerca 14.000 espécies), Caesalpinioideae (148 gêneros, cerca de 4.400 espécies; incluindo os gêneros do clado Mimosoideae), Detarioideae (84 gêneros, cerca de 760 espécies), Dialioideae (17 gêneros, cerca 85 espécies), Cercidoideae (12 gêneros, cerca de 335 espécies) e Duparquetioideae (1 gênero, 1 espécie) (LPWG, 2017).

Plantas pertencentes a Fabaceae são ricas em flavonoides, porém acumulam também outros metabólitos como alcaloides, terpenoides e esteroides (AMEN et al., 2015; HEGNAUER; BARKMEIJER, 1993; VEITCH, 2007, 2009 e 2013). Devido sua ampla distribuição global e sua inegável importância em diversos biomas, as espécies de Fabaceae estão presentes na vida humana há milênios e são extremamente importantes do ponto de vista econômico (JUDD et al., 2007). A contribuição na alimentação humana e de outros animais permitem que diversas indústrias sejam beneficiadas pelos produtos derivados de Fabaceae, como medicamentos, corantes, pesticidas, resinas, tintas, gomas e espessantes. Espécies dessa família também vêm sendo usadas para a melhoria de solos agrícolas, em função de sua grande capacidade de fixação de nitrogênio gerada pela atividade de bactérias simbiotes existentes

nos nódulos radiculares (JUDD et al., 2007; SOUZA; LORENZI, 2008). Muitas espécies são também utilizadas em ornamentação e paisagismo e outras são ainda organismos modelo para diversos tipos de estudo (LEWIS, 2005). No Brasil, é a principal família utilizada para a arborização urbana e várias de suas espécies são usadas na indústria madeireira, por fornecerem matéria prima de alta qualidade (SOUZA; LORENZI, 2008).

1.2 Subfamília Papilionoideae - Tribo Dalbergieae

Papilionoideae constitui a maior subfamília de Fabaceae, distinguindo-se das outras subfamílias vegetativamente e pelos caracteres florais e do fruto, sendo considerada monofilética (KLITGAARD; LAVIN, 2005; LPWG, 2017; WOJCIECHOWSKI, 2003). Essa subfamília atualmente está representada por 28 tribos, das quais Dalbergieae compreende 49 gêneros e cerca de 1.325 espécies, com cinco gêneros pantropicais, um anfiatlântico e dois transatlânticos (LEWIS, 2005). Essa tribo apresenta grande diversidade na América do Sul com 38 gêneros e, no Brasil, são relatados a ocorrência de 28 (KLITGAARD; LAVIN, 2005; WOJCIECHOWSKI, 2003). Estudos filogenéticos mostram os grandes clados em que a tribo Dalbergieae está dividida: clado Adesmia, composto por 6 gêneros e cerca de 360 espécies, de distribuição principalmente neotropical; clado Pterocarpus, incluindo 22 gêneros e cerca de 200 espécies, centrado na região neotropical, com alguns componentes se expandindo para a região Pantropical; clado Dalbergia, com 17 gêneros e cerca de 700 espécies, de distribuição pantropical, centrado principalmente na África e por fim os quatro gêneros isolados *Andira*, *Hymenolobium*, *Vatairea* e *Vataireopsis* que reúnem 58 espécies de distribuição majoritariamente neotropical. Desta forma, explica-se a interessante composição atual da tribo Dalbergieae *sensu lato*, com representantes diversos e aparentemente bastante distantes, porém intimamente relacionados (FERREIRA et al., 2019; KLITGAARD; LAVIN, 2005; LAVIN et al., 2001; WOJCIECHOWSKI; LAVIN; SANDERSON, 2004; WOJCIECHOWSKI, 2003).

1.3 Isoflavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários sintetizados por plantas e apresentam, de modo geral em sua estrutura, várias hidroxilas ligadas a anel aromático, por isso são chamados de compostos polifenólicos. O esqueleto básico de compostos dessa classe é oriundo de rota biossintética mista (Figura 1), sendo formado por 15 átomos de carbono dispostos em dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono C₆-C₃-C₆ (DEWICK, 2009; SHARMA; RAMAWAT, 2013). Estima-se a existência de cerca de 5.000 estruturas conhecidas de flavonoides que estão agrupadas, baseadas no estado oxidativo do anel C, em oito subclasses:

flavanois, flavandiois, flavanonas, di-hidroflavanois, flavonas, flavonois, antocianidinas e isoflavonoides (SHARMA; RAMAWAT, 2013).

A subclasse isoflavonoides possui cerca de 1.000 estruturas conhecidas, é encontrada em uma grande variedade de espécies de Papilionoideae, sendo considerada marcadores quimiotaxonômicos desta subfamília. Diferentemente de outros flavonoides, os isoflavonoides apresentam o anel B ligado na posição C-3 em vez de C-2, além de sofrer várias modificações estruturais que geram isoflavonoides simples, como isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanos e isoflavanois (isoflavan-4-ol), bem como estruturas mais complexas, incluindo rotenoides, pterocarpanos e cumestanos (Figura 1) (DEWICK, 2009; SHARMA; RAMAWAT, 2013).

Os estudos iniciais com isoflavonoides concentravam-se em suas propriedades como marcadores quimiosistemáticos. Com o passar do tempo tornaram-se conhecidos por suas propriedades antifúngicas, conforme relatado para medicarpina (**156**) e vestitol (**195**), em alguns casos por fazerem parte dos mecanismos de defesa da planta e inseticidas, como também por serem considerados fitoalexinas por fitofisiologistas (DEWICK, 2009; REYNAUD, 2005).

As isoflavonas estão associadas a muitas atividades biológicas, incluindo tratamento da osteoporose, doenças cardiovasculares, sintomas da menopausa e prevenção do câncer (AMEN et al., 2015). Estudos indicam que o efeito protetor dos isoflavonoides pode se estender além de suas atividades antioxidantes em níveis moleculares e celulares (DEWICK, 2009; SHARMA; RAMAWAT, 2013).

A estrutura química das isoflavonas é muito semelhante à do hormônio estrogênico animal (estradiol e testosterona), de modo que alguns compostos desta classe possuem atividade estrogênica (UMEHARA et al., 2008 e 2009).

O consumo de isoflavonoides é estimulado na dieta humana, visando a proteção contra cânceres dependentes de estrogênio (câncer de mama), quando a disponibilidade do hormônio natural é restrita. Dessa forma, são empregados como suplementos dietéticos de estrogênio para a redução dos sintomas da menopausa, de forma semelhante à terapia de reposição hormonal (DEWICK, 2009).

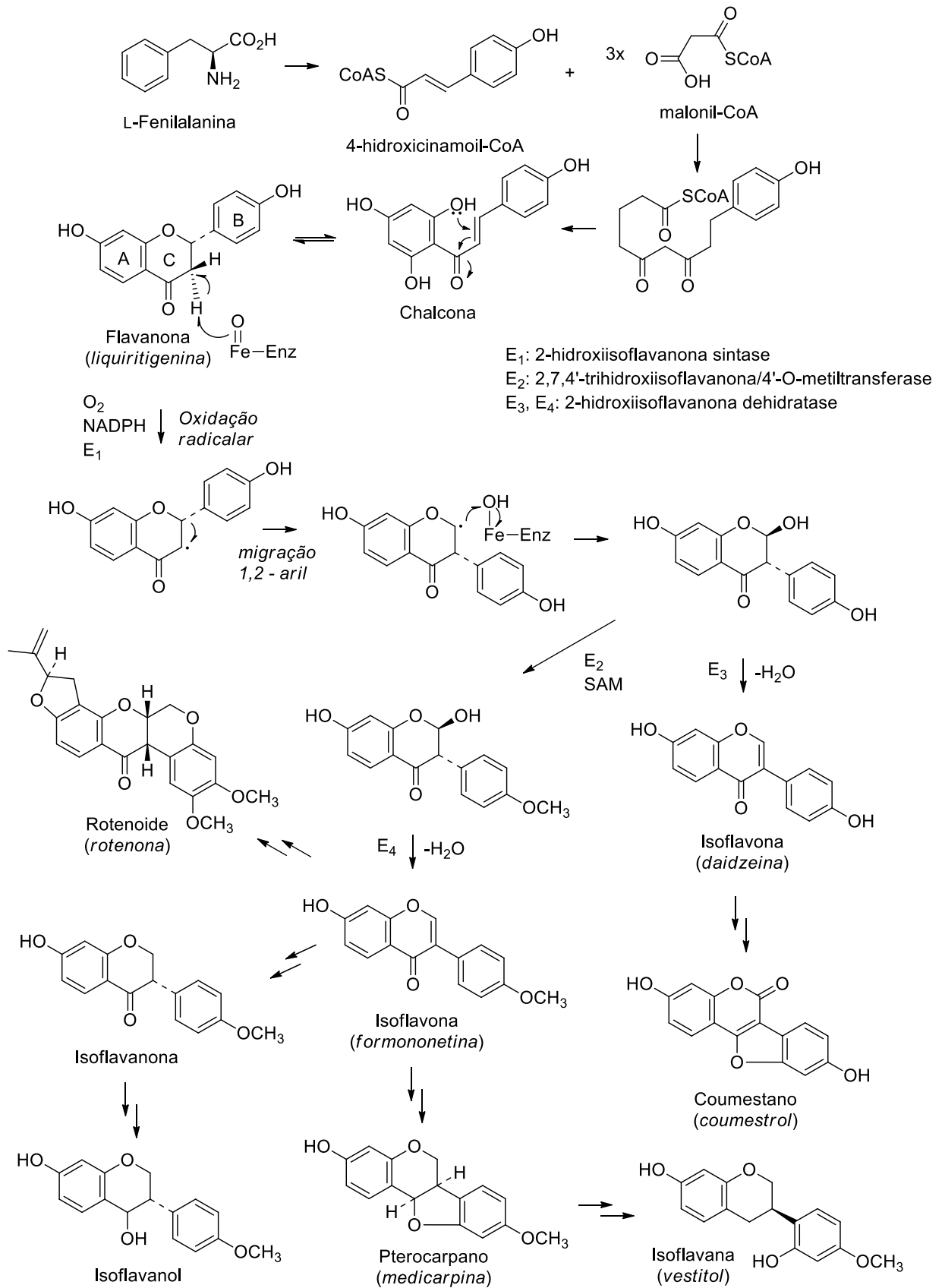


Figura 1 - Biossíntese de isoflavonoides. Adaptada de DEWICK, 2009

2. ISOFLAVONOIDES DA TRIBO DALBERGIEAE

A presente revisão bibliográfica consistiu na ampliação e atualização do período pesquisado em outras revisões (VEITCH, 2007, 2009 e 2013) sobre a ocorrência dos isoflavonoides e suas propriedades biológicas relatados em espécies da tribo Dalbergieae (Fabaceae-Papilionoideae), contribuindo para uma melhor compreensão do metabolismo micromolecular e sua ação no organismo animal, bem como ajudar na caracterização de clados e guiar futuros estudos fitoquímicos que visem a descoberta de novos agentes terapêuticos.

No período de 1945 a 2019 foram relatados 240 isoflavonoides na tribo Dalbergieae, distribuídos em 15 gêneros e 69 espécies. Os isoflavonoides foram relacionados por classes: isoflavonas (1 a 125, 52,1%), isoflavanonas (126 a 155, 12,5%), pterocarpanos (156 a 182, 11,2%), rotenoides (183 a 194, 5,0%), isoflavanas, isoflavanquinonas e isoflavan-4-óis (195 a 225, 13,0%) e outros isoflavonoides (226 a 240, 6,2%). Os isoflavonoides glicosilados totalizaram 48 (20%). Os compostos de maior ocorrência são as isoflavonas formononetina (2) e biochanina A (17) e o pterocarpano medicarpina (156) presentes em 20, 19 e 16 espécies, respectivamente. Os gêneros que apresentaram maior número de espécies com ocorrência de isoflavonoides foram *Dalbergia* (31 espécies), *Machaerium* (9 espécies), *Andira* (6 espécies) e *Pterocarpus* (5 espécies). A revisão bibliográfica mostrou ainda, três trabalhos que identificaram por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-MS) 35 isoflavonoides, dos quais 13 eram isoflavonas, 12 isoflavanonas, 8 isoflavanas e 2 pterocarpanos. Estes compostos foram previamente isolados e relatados em outros trabalhos (ARAÚJO et al., 2018; UMEHARA et al., 2008 e 2009; ZHAO et al., 2013).

Dalbergia parviflora apresentou o maior número de isoflavonoides, com 46 compostos isolados. Essa espécie é conhecida na Tailândia como “*sak kee*”, onde é utilizada na medicina tradicional como expectorante, estomacal, cardiotônico e para regular o ciclo menstrual (SONGSIANG et al., 2009; UMEHARA et al., 2008 e 2009). As folhas desta planta têm efeito afrodisíaco suave e o óleo do cerne (vermelho-escuro) é usado como antipirético e no tratamento de feridas crônicas (UMEHARA et al., 2008 e 2009). Devido a estas propriedades, essa espécie tem sido alvo de estudos químicos e biológicos (SONGSIANG et al., 2009).

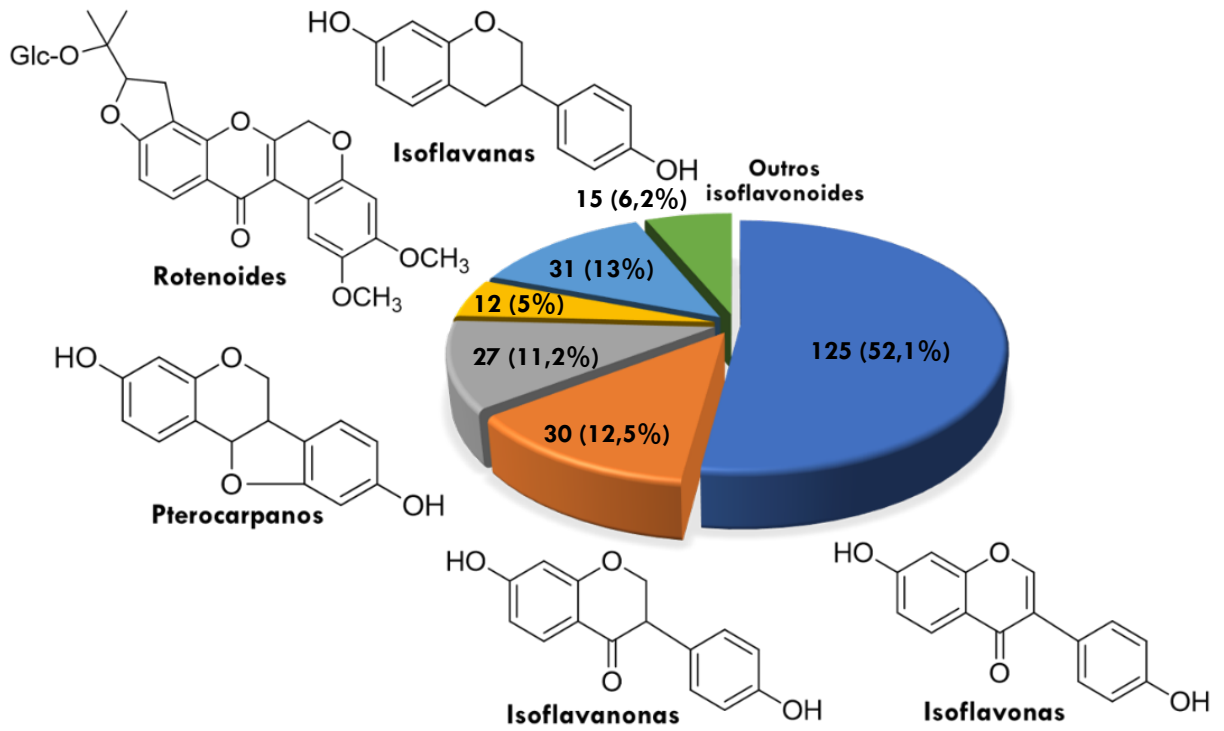


Figura 2 - Gráfico com principais classes dos flavonoides encontrados na revisão.

Tabela 1 - Isoflavonoides de espécies da tribo Dalbergieae.

Gênero	Espécie	Parte da planta	Compostos	Ref.
<i>Aeschynomene</i>	<i>A. fascicularis</i>	casca das raízes	Isoflavona: 217	Caamal-Fuentes et al., 2015
		casca das raízes	Pterocarpanos: 168 e 182	Caamal-Fuentes et al., 2013
	<i>A. fluminensis</i>	folhas e galhos	Isoflavona: 1	Ignoato et al., 2012
	<i>A. sensitiva</i>	partes aéreas e sementes	Isoflavona: 47 ; Rotenoide: 183	Arruda et al., 2018
<i>Andira</i>	<i>A. anthelmia</i>	raízes	Isoflavonas: 16, 17, 22, 27 e 28	Silva et al., 2008
	<i>A. fraxinifolia</i>	raízes	Isoflavonas: 17 e 50	Silva et al., 2006
	<i>A. humilis</i>	raízes	Isoflavonas: 16, 17, 22, 25, 26, 27 e 50 ; Isoflavanona: 126	Garcez et al., 2010
	<i>A. inermis</i>	folhas	Isoflavonas: 2, 10, 18 e 32 ; 2-Arilbenzofurano-3-carbaldeídos: 236, 237 e 238	Kraft et al., 2001
		casca do caule e sementes	Isoflavonas: 2, 10, 16, 17, 18 e 50	Kraft et al., 2000
		raízes	Isoflavonas: 21, 26 e 27	Silva; Velozo; Parente, 2000
	<i>A. parviflora</i>	cerne	Isoflavonas: 16 e 17 ; Isoflavona: 202	Garcia et al., 2018
<i>A. surinamensis</i>	casca dos galhos	Isoflavonas: 10, 17, 18 e 50	Almeida; Silveira; Pessoa, 2008	
<i>Arachis</i>	<i>A. hypogaea</i>	sementes	Pterocarpanos: 174 e 178	Sobolev et al., 2010
<i>Brya</i>	<i>B. ebenus</i>	madeira de cocus	Isoflavanas: 203, 204, 205 e 212 ; Pterocarpenos: 228, 229, 230, 231 e 232	Hausen; Bruhn; Koenig, 1991; Ferreira; Moir; Thomson, 1974; 1975
<i>Centrolobium</i>	<i>C. sclerophyllum</i>	cerne	Isoflavona: 10	Araújo; Alegrio; Leon, 1998
	<i>C. sclerophyllum</i> ; <i>C. paraense</i> ; <i>C. tomentosum</i> e <i>C. robustum</i>	cerne	Isoflavonas: 2 e 10 ; Isoflavanona: 139 ; Pterocarpano: 156 ; Isoflavanas: 195, 198 e 200 ; Isoflaveno: 226	Alegrio; Braz-Filho; Gottlieb, 1989
<i>Dalbergia</i>	<i>D. boehmii</i>	cerne	Isoflavonas: 14, 16, 17 e 44 ; Pterocarpanos: 156, 157 e 158 ; Coumestano: 233 ; Coumaronocromona: 239 ;	Abdou et al., 2017
	<i>D. candenatensis</i>	cerne	Isoflavonas: 2 e 107 ; Isoflavanas: 195 e 200 ; Isoflavanquinona: 222	Hamburger; Cordell, 1987
		cerne	Pterocarpanos: 179 e 180 ; Isoflavona: 199	Cheenpracha et al., 2009
<i>D. cochinchinensis</i>	sementes	Rotenoides: 184, 186 e 187	Svasti et al., 1999	

<i>D. congesta</i>	raízes	Isoflavonas: 85 e 116	Rao et al., 2006
<i>D. coromandeliana</i>	folhas	Isoflavona: 20	Ramesh; Yuvahajan, 1995
<i>D. ecastaphyllum</i>	casca do caule	^a Isoflavonas: 1, 2 e 17	Araújo et al., 2018
	cerne	Isoflavonas: 2, 13 e 17 ; Pterocarpanos: 156, 157, 160, 162, 163 e 165 ; Isoflavanas: 195, 196, 197 e 200	Piccinelli et al., 2011
	cerne	Isoflavona: 2 ; Isoflavanas: 200 e 205	Donnelly; Keenan; Prendergast, 1973
<i>D. frutescens</i>	casca do caule	Isoflavonas: 1, 2, 7, 16, 17, 32, 33, 34, 35 e 69	Khan et al., 2000
<i>D. horrida</i>	raízes	Isoflavonas: 85 e 95 ; Isoflavanonas: 140 e 152	Narayanan et al., 2007
<i>D. lanceolaria</i>	casca das raízes	Isoflavona: 26	Malhotra; Murti; Seshadri, 1966
<i>D. melanoxyton</i>	casca do caule	Isoflavona: 2 ; Isoflavononas: 151 e 153	Mutai et al., 2013
<i>D. monetaria</i>	casca do caule	Isoflavonas: 49, 103, 106, 111, 112, 116 e 121	Nunes; Haag; Bestmann, 1989
	sementes	Isoflavonas: 45 e 46 ; Rotenoides: 184, 187, 188, 189, 190, 191 e 192	Abe et al., 1985
<i>D. nigra</i>	folhas secas	Isoflavona: 67	Mathias et al., 1998
<i>D. nitidula</i>	cerne	Isoflavona: 42	Bekker et al., 2002
	cerne	Pterocarpanos: 164, 171 e 172	Ferreira et al., 1995
<i>D. odorifera</i>	folhas	Isoflavonas: 16, 17, 18 e 64	Li et al., 2016
	cerne	Isoflavononas: 128, 129 e 141 ; Isoflavona: 195	Zhao et al., 2011
	cerne	Isoflavonas: 1, 2, 49, 91 e 106 ; Isoflavononas: 85, 129, 132, 133, 136 e 141 ; Pterocarpano: 156	Lee et al., 2013
	folhas	Isoflavonas: 16 e 17	Zhang et al., 2011
	cerne	^a Isoflavonas: 2, 13, 15, 70 e 95 ; Isoflavanonas: 128, 129, 133, 135 e 141 ; Pterocarpanos: 156 e 166 ; Isoflavanquinona: 222	Zhao et al., 2013
	cerne	Isoflavonas: 2 e 64 ; Pterocarpano: 156 ; Isoflavanas: 200 e 201 ; Isoflavanquinona: 222	Choi et al., 2010
	cerne	Isoflavona: 2 ; Pterocarpano: 156 ; Isoflavanquinona: 222	Islam, 2008
	cerne	Isoflavonas: 2, 9, 15, 18, 44 e 70 ; Isoflavononas: 128, 129, 133, 135 e 141 ; Pterocarpano: 156	Liu et al., 2005 e 2005

	cerne	Isoflavona: 2 ; Pterocarpanos: 156, 166, 175, 176 e 177 ; Isoflavanas: 195, 200, 208 e 209 ; Isoflavena: 227	Goda et al., 1985
	cerne	Isoflavonas: 2 e 11 ; Isoflavanas: 195 e 201 ; Isoflavanquinona: 222	Yahara et al., 1985
	cerne	Isoflavonas: 2, 11 e 48 ; Isoflavanona: 141 ; Pterocarpano: 156 ; Isoflavanas: 195, 201 e 206 ; Isoflavanquinona: 222	Yahara et al., 1989
	cerne	Isoflavona: 2 ; Isoflavonona: 133 ; Pterocarpano: 156	Pluempanupat et a., 2013
	cerne	Isoflavona: 60 ; Isoflavonona: 133 ; Isoflavanas: 200	Deesamer et al., 2007
	casca do caule	Isoflavonas: 2, 16, 17, 75 e 91	Ito et al., 2003
	cerne	Isoflavanona: 133 ; Pterocarpano: 156 ; Isoflavona: 200 ; Coumestonas: 234 e 235	Donnelly; Kavanach, 1974
	casca	Pterocarpano: 160 ; Isoflavona: 210 ; Isoflavanquinona: 223	Park et al., 2017
<i>D. paniculata</i>	casca	Isoflavonas: 6, 17 e 77	Parthasarathy; Seshadri; Varma, 1976
	casca	Isoflavonas: 2, 17, 88, 110, 111 e 122 ; Rotenoide: 194	Adinarayana; Rao, 1972
	casca do caule	Isoflavonas: 2, 17 e 111	Parthasarathy; Seshadri; Varma, 1974
	sementes	Isoflavonas: 87 e 122 ; Rotenoide: 193	Radhakiushniah, 1973
	raízes	Isoflavonas: 17, 75 e 76 ; Rotenoide: 185	Ibrahim et al., 2007
	<i>D. parviflora</i>	cerne	Isoflavonas: 2, 10, 16, 17, 51, 57, 98 e 99 ; Isoflavanonas: 129, 131, 133, 134, 135 e 142 ; Isoflavanas: 195, 200 e 205
galhos e cerne		Isoflavonas: 49, 55, 107 e 108 ; Isoflavononas: 135 e 142 ; Pterocarpanos: 160 e 179	Songsiang; Hahnvajjanawong; Yenjai, 2011
cerne		Isoflavonas: 2, 10, 11, 14, 16, 17, 43, 48, 50, 54, 56, 60, 64, 89, 92, 98 e 99 ; Isoflavononas: 127, 128, 129, 131, 133, 134, 135, 142 e 143 ; Isoflavanas: 195, 200 e 210	Umehara et al., 2008 e 2009
galhos		Isoflavonas: 2, 17 e 94 ; Isoflavononas: 129 e 133 ; Isoflavanas: 200 e 208	Songsiang et al., 2009
cerne		Isoflavona: 57 ; Isoflavononas: 130, 137, 138, 144 e 145	Umehara et al., 2008 e 2009
cerne		Isoflavonas: 2, 14, 16, 17, 10, 43, 48, 50, 54, 60, 64, 89, 92, 98, 99 e 102	Monthakantirat et al., 2007
<i>D. riparia</i>	madeira	Isoflavonas: 32, 34, 64 e 122	Braz Filho; Almeida; Gottlieb, 1973
<i>D. rubiginosa</i>	raízes	Isoflavona: 81 ; Pterocarpano: 181	Charles; Gandhidasan, 2006
<i>D. sissoo</i>	folhas	Isoflavonas: 7, 16, 17, 26, 27, 50, 74, 122, 123 e 124	Dixit et al., 2012

	casca das raízes	Isoflavonas: 17 e 24 ; Rotenoide: 184	Reddy et al., 2008	
	folhas e casca do caule	Isoflavonas: 11, 20, 26, 30, 66, 67 e 74	Farag et al., 2001	
	partes aéreas	Isoflavonas: 16, 17, 18, 22, 29, 61, 63 e 64	Sarg et al., 1999	
<i>D. sissoides</i>	flores	Isoflavona: 17	Kavimani et al., 1997	
	sementes	Isoflavonas: 85 e 95	Kumar; Steiner; Subramanian 1999	
<i>D. spinosa</i>	folhas e casca do caule	Isoflavonas: 29 e 68	Narayanan; Nagarajan, 1988	
	raízes	Isoflavonas: 85, 86, 95 e 122	Radha; Vasantha; Pitchumani, 2015	
<i>D. spruceana</i>	cerne	Isoflavonas: 2, 7, 17 e 122 ; Pterocarpanos: 156 e 177	Cook et al., 1978	
<i>D. sympathetica</i>	folhas	Isoflavonas: 18 e 31	Nagarajan et al., 2006	
<i>D. tonkinensis</i>	folhas e raízes	Isoflavonas: 1, 5, 9, 21, 26, 49, 64, 124, 125 ; Pterocarpanos: 156 e 175 ; Isoflavona: 195	Son et al., 2019	
	cerne	Isoflavona: 17	Son et al., 2018	
<i>D. vacciniifolia</i>	cerne	Isoflavonas: 58, 59, 104 e 105	Innocent et al., 2010	
<i>D. variabilis</i>	casca e madeira	Isoflavonas: 2 e 38 ; Pterocarpanos: 156 e 169 ; Isoflavanas: 195 e 200 ;	Kurosawa et al., 1978	
	caule	Isoflavonas: 2, 7, 11, 17, 32, 38, 41, 51, 71, 72, 89 e 91	Kaennakam et al., 2019	
<i>D. velutina</i>	raízes	Isoflavanas: 207, 213, 214, 215 e 216	Kaennakam; Siripong; Tip-Pyang, 2017	
	raízes	Isoflavonas: 74, 90, 91, 93, 109, 110 e 124	Kaennakam; Siripong; Tip-Pyang, 2015	
<i>D. vietnamensis</i>	caule	Isoflavonas: 88, 96, 122 e 124	Loan et al., 2014	
<i>D. volubilis</i>	flores	Isoflavonas: 17 e 39	Chawla; Chibber; Seshadri, 1974	
<i>D. cearensis, D. ecastophyllum e D. variabilis</i>	cerne	Isoflavanas: 195, 197 e 200	Kurosawa et al., 1978	
<i>D. retusa</i>	cerne	Isoflavonas: 36 e 38	Jurd; Stevens; Manners, 1972	
<i>Diphysa</i>	<i>D. robinoides</i>	cerne	Isoflavanas: 210 e 211	Castro; Lopez; Vergara, 1986

<i>Geoffroea</i>	<i>G. decorticans</i>	casca do caule	Isoflavanonas: 146, 154 e 155	Vila et al., 1998
<i>Kotschya</i>	<i>K. strigosa</i>	frutos	Isoflavanol: 232	Awouafack et al., 2016
		caule	Isoflavona: 2 ; Pterocarpanos: 156 e 177	Seo et al., 2001
	<i>M. aristulatum</i>	casca do caule	Isoflavonas: 2 e 10	Elsoghly; Joshi; Nimrod, 1999
	<i>M. acutifolium</i>	folhas	^b Isoflavonas: 16 e 24	Carvalho et al., 2019
	<i>M. kuhlmannii e M. nictitans</i>	tronco	Isoflavona: 2 ; Pterocarpano: 156	Ollis et al., 1978
<i>Machaerium</i>	<i>M. mucronulatum</i>	cerne	Isoflavona: 10 ; Pterocarpano: 173 ; Isoflavanas: 200 e 208 ; Isoflavanquinona: 221	Kurosawa et al., 1978
	<i>M. opacum</i>	cerne	Isoflavanas: 200 e 208	Ollis et al., 1978
	<i>M. pedicellatum</i>	cerne	Isoflavanas: 218 e 219	Ollis et al., 1978
	<i>M. vestitum</i>	cerne	Isoflavona: 2 ; Pterocarpanos: 156 e 165 ; Isoflavanas: 195 e 200	Ogiyama; Yasue, 1973
	<i>M. villosum</i>	madeira	Isoflavonas: 1, 3, 9 e 10 ; Isoflavanas: 200 e 208 ; Pterocarpanos: 157 e 173	Kurosawa et al., 1978
		casca do caule e raízes	Isoflavonas: 84 e 120	Adem et al., 2019
<i>Ormocarpum</i>	<i>O. kirkii</i>	raízes	Isoflavanonas: 147, 148 e 149	Xu et al., 2012
		raízes	Isoflavanona: 147	Dhooghe et al., 2010
			Pterocarpano: 156	Selvam et al., 2017
		cerne	Pterocarpanos: 156, 157, 163, 165 e 170	Militão et al., 2014
	<i>P. floribundum</i>	tronco	Pterocarpanos: 156, 157, 163, 165, 170	Militão et al., 2005
<i>Platymiscium</i>		tronco	Isoflavona: 100 ; Pterocarpanos: 156, 157, 163, 165 e 170	Falcão et al., 2005
	<i>P. gracile</i>	serragem	Isoflavona: 10 ; Pterocarpano: 157	Martinez; García; Durango, 2017
	<i>P. yucatanum</i>	tronco	Pterocarpanos: 156 e 157	Reyes-Chilpa, 1998
		casca dos galhos	Isoflavonas: 10 ; Isoflavonoide benzofurano: 240	Toukam et al., 2018
	<i>P. erinaceus</i>	casca dos galhos	Pterocarpano: 157	Olaleye et al., 2013
<i>Pterocarpus</i>		raízes	Isoflavonas: 2, 10, 17, 19, 32 e 38 ; Pterocarpano: 156 e 160	Tip-Pyang; Aree; Sichaem, 2019
	<i>P. indicus</i>	cerne	Isoflavona: 2 ; Pterocarpano: 159	Cooke; Rae, 1964
	<i>P. macrocarpus</i>	cerne	Isoflavanona: 150	Verma et al., 1986

		planta	Isoflavona: 23	Anandharajan et al., 2005	
		cerne	Isoflavonas: 8, 40 e 62	Mitra; Joshi, 1983	
		cerne	Isoflavona: 73	Mitra; Joshi, 1982	
	<i>P. santalinus</i>	cerne	Isoflavona: 53	Krishnaveni; Rao, 2000	
		cerne	Isoflavona: 97	Krishnaveni; Rao, 2000	
		cerne	Isoflavona: 52	Krishnaveni; Rao, 2000	
	<i>P. soyauxii</i>	cerne	Isoflavanas: 200, 201, 218 e 220 ; Isoflavanquinona: 222	Su et al., 2014	
		cerne	Isoflavonas: 10, 12, 13, 37, 43, 78, 98, 99, 101, 102, 113, 114 e 115 ; Pterocarpanos: 157, 159, 160, 161 e 167	Su et al., 2013	
	<i>Vatairea</i>	folhas	Isoflavonas: 11, 79 e 118	Souza et al., 2017	
		<i>V. guianensis</i>	alburno	Isoflavona: 2 ; Isoflavonol: 233	Souza et al., 2015
			folhas	Isoflavonas: 80, 82, 83 e 117	Souza et al., 2013
<i>Zornia</i>	<i>Z. brasiliensis</i>	partes aéreas	Isoflavonas: 4 e 5 ; Pterocarpano: 156	Nascimento et al., 2018	

^aCompostos identificados por HPLC-MS; ^bCompostos identificados por DI-ESI-MS/MS

2.1 Isoflavonas

Isoflavonas estão presentes na natureza predominantemente como β -glicosídeos, acetil- β -glicosídeos e malonil- β -glicosídeos, todos solúveis em água. Pequenas modificações estruturais produzem significativas alterações em suas propriedades biológicas e bioquímicas. Uma das propriedades químicas mais importantes das isoflavonas é a capacidade de participar de processos redox (MARIANA; MARINELA, 2007; SHARMA; RAMAWAT, 2013).

As isoflavonas dietéticas podem ser classificadas em quatro categorias: (I) agliconas (sem ligação com açúcar): daidzeína (**1**), formononetina (**2**), genisteína (**16**), biochanina A (**17**) e gliciteína (**33**); (II) glicosídeos ou gliconas: daidzina, genistina, glicitina, ononina (**5**) e sissotrina; (III) acetilglicosídeos ou acetilgliconas: 6"-acetildaldazina, 6"-acetilgenistina e 6"-acetilglicitina; (IV) malonilglicosídeos ou malonilgliconas: 6"-malonilaldazina, 6"-malonilgenistina e 6"-malonilglicitina (SHARMA; RAMAWAT, 2013).

O número de isoflavonas encontrado na literatura excede o de qualquer outra subclasse de isoflavonoides (SHARMA; RAMAWAT, 2013). Na tribo Dalbergieae as isoflavonas são a subclasse de isoflavonoides mais frequentes com um total de 125 (52,1%). As isoflavonas (**1 a 125**) foram agrupadas com base em padrões simples de substituição no oxigênio, sendo 66

compostos com grupos metoxi e metilenodioxi, 12 com substituintes prenila e 42 derivados glicosilados (VEITCH, 2007, 2009 e 2013).

As isoflavonas têm 3-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona (3-fenilcromona) como um sistema de anel principal (AMEN et al., 2015) e possuem em sua estrutura uma ligação dupla no carbono 2 do anel C (Tabela 2) e as que possuem substituição em C-8 (hidroxi, metoxi ou derivados glicosilados) no anel A são relativamente incomuns, contudo, 19 compostos com este padrão de substituição foram relatados (Tabela 2).

Um total de 35 isoflavonas da tribo Dalbergieae (28,0%) são biologicamente ativas. As atividades biológicas mais frequentes em isoflavonas são estrogênica, citotóxica, antioxidante, antimicrobiana e antifúngica.

A atividade estrogênica foi relatada para 15 isoflavonas (**2, 11, 14, 16, 17, 48, 50, 54, 57, 60, 64, 89, 92, 98 e 124**) com ocorrência em 11 espécies, sendo a maioria encontrada na madeira de *D. parviflora*, o que indica o potencial estrogênico desta espécie.

Formononetina (**2**), genisteína (**16**), biochanina A (**17**), cajanina (**57**) e khrinona C (**98**) apresentaram ainda atividade antioxidante nos métodos Xantina/Xantina Oxidase (X/XO), capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) e DPPH (PROMDEN et al., 2014). Essa atividade também foi relatada para daidzeína (**1**), isoformononetina (**3**) e 3'-hidroxidaidzeína (**9**), calicosina (**10**), 3'-*O*-metilrobof (**51**) e khrinona B (**99**) (AMEN et al., 2015; PROMDEN et al., 2014; TOUKAM et al., 2018).

Orobof (**49**), obtida de *D. parviflora*, apresentou atividade citotóxica frente as linhagens de células de carcinoma epidemoide de cavidade oral (KB), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e câncer de pulmão de pequenas células (NCI-H187) (SONGSIANG; HAHNVAJANAWONG; YENJAI, 2011). A citotoxicidade frente às linhagens de células KB e NCI-H187 também foi exibida por 5,7,5'-trihidroxi-2',4'-dimetoxi-isoflavona (**94**), obtida de *D. parviflora* (KAENNAKAM et al., 2019; YAHARA et al., 1989). Enquanto 3'-metoxidaidzeína (**11**), obtida de *D. odorifera* e *D. velutina*, e pseudobaptigenina (**7**), isolada de *D. velutina*, foram ativas frente à linhagem de células KB (KAENNAKAM et al., 2019; SONGSIANG et al., 2009). 6,2'-Dimetoxi-7,4'-dihidroxi-isoflavona (**58**), isolada de *D. vacciniifolia* e 5,7-dihidroxi-4'-metoxi-6,8-diprenilisoflavona (**120**), obtida de *O. kirkii*, demonstraram citotoxicidade frente a larvas de camarão e à linhagem de célula de leucemia (CCRF-CEM), respectivamente (ADEM et al., 2019; INNOCENT et al., 2010).

A isoflavona biochanina A (**17**) apresentou atividade anti-inflamatória e antimicrobiana (COOK et al., 1978; KAENNAKAM; SIRIPONG; TIP-PYANG, 2017). Formononetina (**2**) e calicosina (**10**) demonstraram potencial antimicrobiano, antiparasitário e antigidiário contra

Carvalho, A. A. Capítulo 1

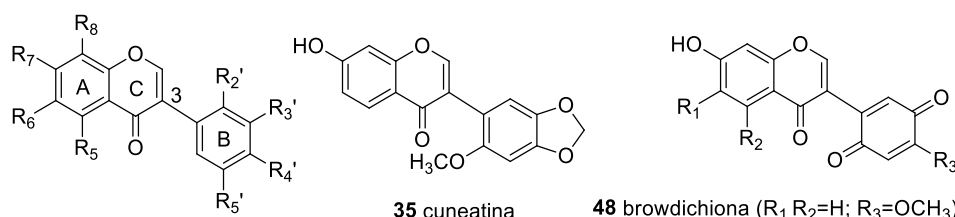
Giardia intestinalis (AMEN et al., 2015; ELSOHLI; JOSHI; NIMROD, 1999; KHAN et al., 2000). O composto **2** possui ainda atividade larvicida frente a *Aedes aegypti*, repelente contra zoósporo e inibidora de agregação plaquetária (GODA et al., 1985; ISLAM, 2008; PLUEMPANUPAT et al., 2013).

A atividade antimalárica frente a *Plasmodium falciparum* é relatada para calicosina (**10**), genisteína (**16**) e 5,7,5'-trihidroxi-2',4'-dimetoxi-isoflavona (**94**) (SONGSIANG et al., 2009; KRAFT et al., 2000). Calicosina (**10**), obtida de *C. sclerophyllum*, apresentou também atividade leishmanicida (ARAÚJO; ALEGRIO; LEON, 1998). 5-Hidroxibowdichiona (**107**), obtida de *D. candenatensis*, e 5,7,5'-trihidroxi-2',4'-dimetoxiisoflavona (**94**) apresentaram atividade antimicrobiana (HAMBURGER; CORDELL, 1987; SONGSIANG et al., 2009). Enquanto calicosina (**10**) e 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxi-8-prenilisoflavona (**119**), isolada de *V. guianensis*, exibiram potencial antifúngico frente a cepas de *Candida* (MARTINEZ; GARCÍA; DURANGO, 2017; SOUZA et al., 2017).

Biochanina A 7-O- β -D-glicopiranosídeo (**22**), obtida de *A. anthelmia* e *D. sissoo*, biochanina A 7-O- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo (**27**) e biochanina A 7-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo (**28**), isoladas de *A. anthelmia*, apresentaram atividade anti-helmíntica contra *Aspiculuris tetráptera* (SILVA et al., 2008). A atividade inibitória da ativação do antígeno do vírus Epstein Barr foi relatada para formononetina (**2**), genisteína (**16**), biochanina A (**17**), olibergina B (**75**) e olibergina A (**91**), obtidas de *D. olivari* (ITO et al., 2003).

A partir do extrato metanólico da madeira de *D. odorifera* foi obtida uma fração que apresentou atividade anti-hipercolesterêmica e desta foram isoladas as isoflavonas formononetina (**2**) e 3'-metoxidaidzeína (**11**) (YAHARA et al., 1985). A atividade inibitória de α -glicosidase foi apresentada pela tectorigenina (**64**), obtida de *D. odorifera* e *D. parviflora*, pterosonina E (**13**), isolada de *D. parviflora*, e pelo composto **2** (CHOI et al., 2010; ZHAO et al., 2013). Finalmente, a isoflavona 7-O- α -L-ramnopiranosiloxi-4-metoxi-5-hidroxi-isoflavona (**23**), obtida de *P. marsupium*, exibiu atividade reguladora de Glut-4 e PPAR (ANANDHARAJAN et al., 2005).

Tabela 2 - Estruturas das isoflavonas de 1-125



35 cuneatina

48 browdichiona (R₁, R₂=H; R₃=OCH₃)100 7- hidroxi-6,4'-dimetoxi-isoflavonoquina
(R₁=OCH₃; R₂=H; R₃=CH₃)107 5-hidrobrowdichiona (R₁=H; R₂=OH; R₃=OCH₃)

Nº	R ₈	R ₇	R ₆	R ₅	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	Nome
1	H	OH	H	H	H	H	OH	H	daidzeína
2	H	OH	H	H	H	H	OCH ₃	H	formononetina
3	H	OCH ₃	H	H	H	H	OH	H	isoformononetina
4	H	OCH ₃	H	H	H	H	OCH ₃	H	7,4'-dimetoxi-isoflavona
5	H	<i>O</i> -β-D-glc	H	H	H	H	OCH ₃	H	ononina
6	H	<i>O</i> -β-L-rha-(1→6)-β-D-glc	H	H	H	H	OCH ₃	H	formononetina 7-rutinosídeo
7	H	OH	H	H	H	O-CH ₂ -O	H	H	pseudobaptigenina
8	H	<i>O</i> -α-L-rha	OCH ₃	OH	H	H	H	H	5,7-dihidroxi-6-metoxi-isoflavona 7-rha
9	H	OH	H	H	H	OH	OH	H	3'-hidroxidaidzeína
10	H	OH	H	H	H	OH	OCH ₃	H	calicosina
11	H	OH	H	H	H	OCH ₃	OH	H	3'-metoxidaidzeína
12	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OH	H	saianedina
13	H	OH	H	H	H	OH	H	OCH ₃	pterasonina E
14	H	OH	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	2'-metoxiformononetina
15	H	OH	H	H	OH	H	OCH ₃	H	2'-hidroxiformononetina
16	H	OH	H	OH	H	H	OH	H	genisteína
17	H	OH	H	OH	H	H	OCH ₃	H	biochanina A
18	H	OCH ₃	H	OH	H	H	OH	H	prunetina
19	H	OH	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	5- <i>O</i> -metilbiochanina A
20	H	OCH ₃	H	OH	H	H	<i>O</i> -β-D-apio-(1→6)-β-D-glc	H	coromandelina
21	H	<i>O</i> -β-D-apio-(1→6)-β-D-glc	H	OH	H	H	OH	H	ambocina
22	H	<i>O</i> -β-D-glc	H	OH	H	H	OCH ₃	H	biochanina A 7- <i>O</i> -β-D-glc
23	H	<i>O</i> -α-L-rha	H	OH	H	H	OCH ₃	H	7- <i>O</i> -α-L-rha-4-metoxi-5-hidroxi-isoflavona
24	H	γ,γ-dimetilalliloxi	H	OH	H	H	OCH ₃	H	7-γ,γ-dimetilalliloxi-5-hidroxi-4'-metoxi-isoflavona
25	H	<i>O</i> -xil(1→6)-glc	H	OH	H	H	OCH ₃	H	biochanina A 7- <i>O</i> -β-D-xil-(1→6)-β-D-glc
26	H	<i>O</i> -β-D-apio-(1→6)-β-D-glc	H	OH	H	H	OCH ₃	H	lanceolarina
27	H	<i>O</i> -β-D-apio-(1→5)-β-D-apio-(1→6)-β-D-glc	H	OH	H	H	OCH ₃	H	biochanina A 7- <i>O</i> -β-D-apio-(1→5)-β-D-apio-(1→6)-β-D-glc
28	H	<i>O</i> -α-L-rha-(1→6)-β-D-glc	H	OH	H	H	OCH ₃	H	biochanina A 7- <i>O</i> -α-L-rha-(1→6)-β-D-glc

29	H	OCH ₃	H	OH	H	H	<i>O</i> -β-D-gal	H	prunetina 4'- <i>O</i> -β-D-gal
30	H	OCH ₃	H	OH	H	H	<i>O</i> -β-D-glc	H	prunetina 4'- <i>O</i> -β-D-glc
31	H	OCH ₃	H	OH	H	H	<i>O</i> -β-D-gen	H	dalsimpatetina
32	H	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	afrormosina
33	H	OH	OCH ₃	H	H	H	OH	H	gliciteina
34	H	OH	OCH ₃	H	H		<i>O</i> -CH ₂ - <i>O</i>	H	fujikinetina
36	OH	OH	H	H	H	H	OCH ₃	H	retusina
37	OH	OCH ₃	H	H	H	H	OCH ₃	H	8-hidroxi-4',7-dimetoxi-isoflavona
38	OCH ₃	OH	H	H	H	H	OCH ₃	H	8- <i>O</i> -metilretusina
39	rha	OCH ₃	H	H	H	H	OCH ₃	H	volubilina
40	OH	<i>O</i> -β-D-glc	H	H	H	H	OCH ₃	H	retusina 7- <i>O</i> -β-D-glc
41	H	OH	H	OH	H		<i>O</i> -CH ₂ - <i>O</i>	H	3',4'-metilenodioxiorobol
42	H	OH	H	H	OCH ₃	H	OH	OH	4',5',7-trihidroxi-2'-metoxi-isoflavona
43	H	OH	H	H	OH	H	OCH ₃	OH	khronona A
44	H	OH	H	H	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	2',7-dihidroxi-4',5'-dimetoxi-isoflavona
45	H	OH	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxi-isoflavona
46	H	<i>O</i> -β-D-glc	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	7-β-D-glc-2',4',5'-trimetoxi-isoflavona
47	H	<i>O</i> -β-D-glc	H	H	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	daidzeína 7- <i>O</i> -β-D-glc
49	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	orobol
50	H	OH	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	pratenseína
51	H	OH	H	OH	H	OCH ₃	OH	H	3'- <i>O</i> -metilorobol
52	H	OCH ₃	H	OH	H		<i>O</i> -β-D-glc	OH	4',5-dihidroxi-7- <i>O</i> -metilisoflavona 3'- <i>O</i> -β-D-glc
53	H	OCH ₃	H	OH	H		<i>O</i> -β-D-(3"- <i>E</i> -cinamoil)-glc	OH	4',5-dihidroxi-7- <i>O</i> -metilisoflavona 3'- <i>O</i> -β-D-(3"- <i>E</i> -cinamoil)-glc
54	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	OH	H	teralina
55	H	OH	H	OH	OH	H	OCH ₃	H	2'-hidroxibiochanina A
56	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	H	2'-metoxibiochanina A
57	H	OCH ₃	H	OH	OH	H	OH	H	cajanina
58	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	6,2'-dimetoxi-7,4'-dihidroxi-isoflavona
59	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	6,2',4'-trimetoxi-7-hidroxi-isoflavona
60	H	OH	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	khronona E
61	H	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	irisolidona
62	H	<i>O</i> -α-L-rha	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃	H	irisolidona 7- <i>O</i> -α-L-rha
63	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	H	OH	H	muningina
64	H	OH	OCH ₃	OH	H	H	OH	H	tectorigenina
65	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H	OH	H	7- <i>O</i> -metiltectorigenina
66	H	<i>O</i> -β-D-apio-(1→6)-β-D-glc	OCH ₃	OH	H	H	OH	H	tectorigenina 7- <i>O</i> -β-D-apio-(1→6)-β-D-glc
67	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H	<i>O</i> -6- <i>O</i> -β-D-	H	5-hidroxi-6,7-dimetoxi-4'- <i>O</i> -6- <i>O</i> -β-D-apio-β-D-glc isoflavona

68	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H	apio-β-D-glc O-β-D-gal	H	7-metilctorigenina 4'- O-β-D-galactosideo
69	H	OH	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃	H	odoratina
70	H	OH	H	H	OH	OH	OCH ₃	H	koparina
71	H	OH	H	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	veluisoflavona A
72	OCH ₃	OH	H	H	H	H	OH	OCH ₃	veluisoflavona B
73	CH ₃	<i>O</i> -α-L-rha	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	metilisoflavona 7- <i>O</i> -α-L-rha
74	β-D-glc	OH	H	OH	H	H	OH	H	genisteína-8- <i>C</i> -β-D-glc
75	geranila	OH	H	OH	H	H	OCH ₃	H	olibergina B
76	geranila	OCH ₃	H	OH	H	H	OCH ₃	H	8- <i>C</i> -geranil-7- <i>O</i> - metilbiochanina A
77	glc	OCH ₃	H	OH	H	H	OH	H	prunetina 8- <i>C</i> -glc
78	OH	OCH ₃	H	H	H	OH	H	OCH ₃	pterasonina D
79	prenila	OH	H	OH	H	H	OH	H	lupiwighteona
80	prenila	OH	H	OH	H		O-CH ₂ -O	H	5,7-dihidroxi-3',4'- metilenodioxi-8- prenilisoflavona
81	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H		O-CH ₂ -O	H	5-didroxi-6,7-dimetoxi- 3',4'-metilodioxi- isoflavona
82		2'',2''-dimetilpirano- (5'',6'':8,7)	H	OH	H		OCH ₃	H	5,3'-dihidroxi-4'-metoxi- 2'',2''-dimetilpirano- (5'',6'':8,7)-isoflavona
83		2'',2''-dimetilpirano- (5'',6'':8,7)	H	OH	H		OH	H	derrona
84		2',2'-dimetilpirano- (5'',6'':8,7)	prenila	OH	H		OH	H	osajina
85	H	OH	OCH ₃	OH	H		O-CH ₂ -O	H	dalspinina
86	H	<i>O</i> -β-D-apio (1 →6)-glc	OCH ₃	OH	H		O-CH ₂ -O	H	dalspinina-7- <i>O</i> -β-D- apio-(1→6)-glc
87	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃		O-CH ₂ -O		dalpatiena
88	H	<i>O</i> -β-D-glc	OCH ₃	H	OCH ₃	H	O-CH ₂ -O		dalpatina
89	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	O-CH ₂ -O		khrinona D
90	H	<i>O</i> -β-D-glc	H	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	dalvelutinosídeo
91	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	olibergina A
92	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	7-demetilrobustigenina
93	H	<i>O</i> -β-D-apio- (1'''→6'')- <i>O</i> -β- D-glc	H	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	2',5'-dimetoxi-genisteína- 7- <i>O</i> -β-D-apio-(1'''→6'')- <i>O</i> -β-D-glc
94	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	5,7,5'-trihidroxi-2',4'- dimetoxi-isoflavona
95	H	OH	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	dalspinosina
96	H	<i>O</i> -β-D-apio- (1→6)-β-D-glc	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	dalspinosina 7- <i>O</i> -β-D- apio-(1→6)-β-D-glc
97	H	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	6-hidroxi-7,2',4',5'- tetrametoxi-isoflavona
98	H	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	khrinona C
99	H	OH	H	OH	OH	H	OCH ₃	OH	khrinona B
101	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	pterasonina C
102	H	OH	OH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	2',4'-dimetoxi-3',6,7- trihidroxi-isoflavona
103	H	OH	<i>O</i> - acetil-	OH	H	OH	OH	H	6-(<i>O</i> -acetil-β-D- glc)orobol

104	H	OH	β -D-glc OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	6,2',4',5'-tetrametoxi-7-hidroxi-isoflavona
105	H	<i>O</i> - β -D-apio-(1 \rightarrow 6)- β -D-glc	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	6,2',4',5'-tetrametoxi-7- <i>O</i> - β -D-apio-(1 \rightarrow 6)- β -D-glc isoflavona
106	H	OH	β -D-glc	OH	H	OH	OH	H	6-(β -D-glc) orobol
108	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	OH	OH	dalparvona B
109	β -D-glc	OH	H	OH	H	H	OH	OH	orobol-8- <i>C</i> - β -D-glc
110	β -D-glc	OH	H	OH	H	H	OH	OCH ₃	dalpanitina
111	β -D-glc	OH	β -D-glc	OH	H	H	OH	H	paniculatina
112	β -D-glc	OH	H	OH	H	OH	OH	H	mono- <i>C</i> -glc 8-(β -D-glc)orobol
113	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	7,3'-dihidroxi-8,2',4'-trimetoxi-isoflavona
114	OH	OH	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	pterasonina A
115	OH	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	pterasonina B
116	6"- <i>O</i> -acetil- β -D-glc	OH	H	OH	H	OH	OH	H	8-(6"- <i>O</i> -acetil- β -D-glc)orobol
117	prenila	<i>O</i> - β -D-glc	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	5,3'-dihidroxi-4'-metoxi-7- <i>O</i> - β -glc-8-prenilisoflavona
118	prenila	OH	H	OH	H	OCH ₃	OH	H	5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxi-8-prenilisoflavona
119	prenila	OH	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxi-8-prenilisoflavona
120	prenila	OH	prenila	OH	H	H	OCH ₃	H	5,7-dihidroxi-4'-metoxi-6,8-diprenilisoflavona
121	β -D-glc	OH	<i>O</i> - β -D-glc	OH	H	OH	OH	H	di- <i>C</i> -glicosidena-6,8-bis(β -D-glc)orobol
122	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	caviunina
123	H	<i>O</i> - β -D-glc	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	caviunina 7- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo
124	H	<i>O</i> - β -D-apio-(1" \rightarrow 6")- <i>O</i> - β -D-glc	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	dalsissoosídeo
125	OCH ₃	<i>O</i> - β -D-apio-(1 \rightarrow 6)- β -D-glc	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	isocaviunina-7- <i>O</i> - β -D-apio-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo

glc=glicosídeo; apio=apiofuranosídeo; rha=ramnopiranosídeo; gal=galactosídeo; xil=xilopiranosídeo; gen=gentiobiosídeo

2.2 Isoflavanonas

As isoflavanonas (126 a 155, 12,5%) foram a segunda maior subclasse de isoflavonoides relatados em espécies da tribo Dalbergieae. Estes metabólitos também podem ser divididos em três grupos que compreendem compostos com padrões simples de substituição em oxigênios (Tabela 3), sendo 19 contendo hidroxil, metoxil e metileno-dioxi, oito com substituinte prenilar, um derivado glicosilado e dois compostos mistos (prenilados e glicosilados). A estrutura das

isoflavanonas é caracterizada pela ausência de ligação dupla em C-2 do anel C, presentes nas isoflavanonas (Tabela 3) (DEWICK, 2009; VEITCH, 2007, 2009 e 2013).

Um total de 14 isoflavanonas (46,6%) da tribo Dalbergieae são biologicamente ativas. Destas, 12 foram isoladas na espécie *D. parviflora* e as atividades mais frequentes são estrogênica, antioxidante, citotóxica e antibacteriana.

A atividade antioxidante nos ensaios X/XO, ORAC e DPPH é relatada para as isoflavanonas violanona (**133**), isolada de *D. oliveri* e *D. parviflora*, sativanona (**129**) e 3'-*O*-metilviolanona (**135**), obtidas de *D. parviflora* e *D. odorifera*, 7,3'-dihidroxi-4'-metoxi-isoflavanona (**127**), onogenina (**131**), dalparvina (**134**), dalparvina B (**137**), kenusanona G (**138**), secundiflorol H (**142**) e dalparvina C (**145**), isoladas apenas de *D. parviflora* (JUDD et al., 2007). Os compostos **129**, **133**, **137**, **138** e **145** apresentaram também atividade estrogênia, assim como soforol (**130**), obtido de *D. parviflora* (UMEHARA et al., 2008 e 2009).

As isoflavanonas 3,5-dihidroxi-2',7-dimetoxi-2'',2''-dimetilpirano[5'',6'':3',4'] isoflavanona (**151**) e 3,4',5-trihidroxi-2',7-dimetoxi-3'-prenilisoflavanona (**153**), obtidas de *D. melanoxyton*, possuem elevada atividade antimicobacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* (MUTAI et al., 2013). O composto **153** apresentou 96% de inibição em ensaio *in vitro* e o estudo de docagem molecular demonstrou que ambos apresentam sítios ativos que favorecem esta atividade (MUTAI et al., 2013). Vestitona (**128**), isolada de *D. odorifera*, foi ativa frente a *Ralstonia solanacearum*, bactéria responsável pela murcha bacteriana (ZHAO et al., 2011). Este composto apresentou ainda atividades antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* e larvicida contra *Aedes aegypti*. (DEESAMER et al., 2007; PLUEMPANUPAT et al., 2013).

Secundiflorol H (**142**), isolado de *D. parviflora*, e 3'-*O*-metilviolanona (**135**) apresentaram citotoxicidade frente às linhagens de células de carcinoma epidemoide de cavidade oral (KB), adenocarcinoide de mama (MCF-7) e câncer de pulmão de pequenas células (NCI-H187) e foram inativos frente a células não cancerígenas (SONGSIANG; HAHNVAJANAWONG; YENJAI, 2011). A atividade inibitória da α -glicosidase das isoflavanonas 3'-*O*-metilviolanona (**135**) e sativanona (**129**) também é relatada (ZHAO et al., 2013).

Tabela 3 - Estruturas das isoflavanonas de 126-155

Nº	R ₇	R ₆	R ₅	R ₃	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	Nome
126	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	dihidrogenisteína
127	OH	H	H	H	H	OH	OCH ₃	H	7,3'-dihidroxi-4'-metoxi-isoflavanona
128	OH	H	H	H	OH	H	OCH ₃	H	vestitona
129	OH	H	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	sativanona
130	OH	H	H	H	OH	H	O-CH ₂ -O		soforol
131	OH	H	H	H	OCH ₃	H	O-CH ₂ -O		onogenina
132	OH	H	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	H	2',4'-dimetoxi-3,7-dihidroxi-isoflavanona
133	OH	H	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	violanona
134	OH	H	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	dalparvina
135	OH	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	3'-O-metilviolanona
136	OH	H	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	2',4',5'-trimetoxi-7-hidroxi-isoflavanona
137	OH	H	H	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	dalparvina B
138	OH	H	OH	H	H	OH	OCH ₃	H	kenusanona G
139	OH	H	H	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	7,4'-dihidroxi-3',5'-dimetoxi-isoflavanona
141	OCH ₃	H	OH	OH	OH	H	OCH ₃	H	2',3',7-trihidroxi-4'-metoxi-isoflavanona
142	OH	H	OH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	secundiflorol H
143	OH	H	H	OH	OH	OH	OCH ₃	H	isodarpardinol B
144	OH	H	OH	H	OCH ₃	H	OH	OH	dalparvina A
145	OH	H	H	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	dalparvina C
146	OH	H	H	H	OH	OH	OCH ₃	prenila	7,2',3'-trihidroxi-4'-metoxi-5'-prenilisoindanona
147	OH	4"-hidroxiprenila	OH	H	OH	H	OH	H	4"-hidroxidifisolona
148	O-glc	prenila	OH	H	OH	H	OH	H	7-O-glicosildifisolona
149	O-glc	prenila	OH	H	OH	H	O-glc	H	7,4'-di-O-glicosildifisolona
150	OH	C-glc	OH	H	OH	H	OH	H	macrocarposideo
151	OCH ₃	H	OH	OH	OCH ₃	2",2"-dimetilpirano [5",6":3',4']		H	3,5-dihidroxi-2',7-dimetoxi-2",2"-dimetilpirano [5",6":3',4'] isoflavanona
153	OCH ₃	H	OH	OH	OCH ₃	prenila	OH	H	3,4',5'-trihidroxi-2',7-dimetoxi-3'-prenilisoiflavanona
154	OH	H	OH	H	OH	OH	OCH ₃	prenila	5,7,2',3'-tetrahidroxi-4'-metoxi-5'-prenilisoiflavanona
155	OH	H	H	OH	OH	OH	OCH ₃	prenila	3,7,2',3'-tetrahidroxi-4'-metoxi-5'-prenilisoiflavanona

glc=glicosídeo

2.3 Pterocarpanos

Os pterocarpanos constituem uma das maiores subclasses de isoflavonoides de Fabaceae, presentes em muitas espécies, além de serem reconhecidos como o segundo maior grupo de isoflavonoides naturais (JIMENEZ et al., 2008). Os pterocarpanos podem ser descritos como benzo-pirano-furano-benzenos que podem ser formados a partir de isoflavonas por acoplamento intramolecular na posição 4-cetona do anel B (Tabela 4) (PISTELLI et al., 2003; VEITCH, 2007, 2009 e 2013).

Os pterocarpanos são reconhecidos como fitoalexinas, compostos químicos de biossíntese induzida, que se acumulam em plantas, sob condições de estresse após infecção por microorganismos como bactérias e fungos (VEITCH, 2007, 2009 e 2013). Os pterocarpanos são a terceira maior subclasse de compostos relatados na tribo Dalbergieae, representando 11,2% (**156 a 182**, Tabela 4). Esses metabólitos apresentam uma gama de atividades biológicas (VEITCH, 2007, 2009 e 2013). Um total de 11 pterocarpanos (40,7%) da tribo Dalbergieae são biologicamente ativos. As atividades mais frequentes são citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana.

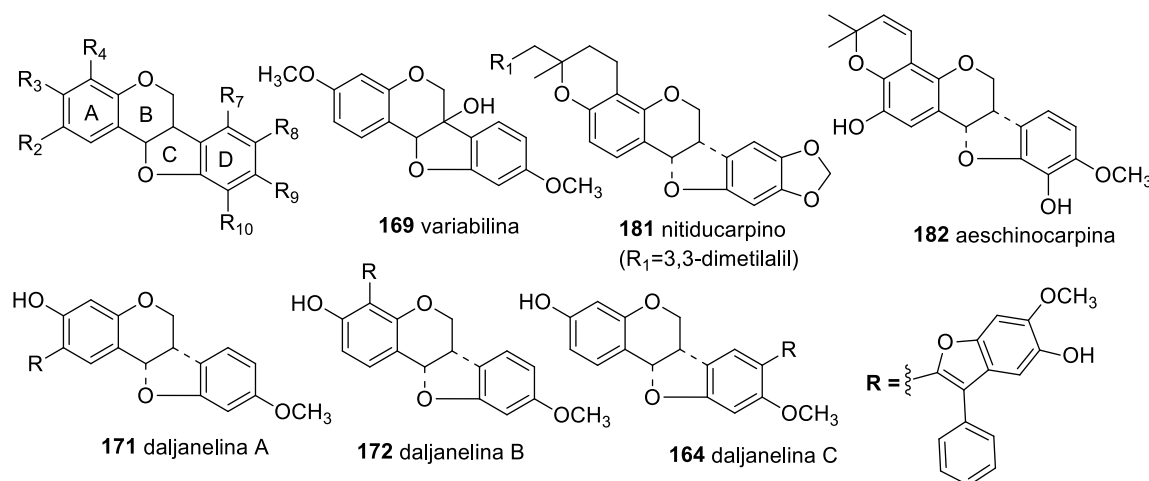
O pterocarpano aracarpeno 2 (**178**), obtido de *A. hypogaea*, apresentou atividade antibacteriana (SOBOLEV et al., 2010). 3,8-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**168**), obtido de *D. oliveri* e de *D. parviflora*, apresentou atividade proliferativa de pelos e citotóxica frente às linhagens de células de carcinoma epidemoide de cavidade oral (KB), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e câncer de pulmão de pequenas células (NCI-H187) (PARK et al., 2017; SONGSIANG; HAHNVAJANAWONG; YENJAI, 2011).

Maackiaina (**177**), homopterocarpano (**157**), medicarpina (**156**), vesticarpano (**165**) e mucronucarpano (**173**) apresentaram atividades citotóxica frente a linhagens de células de câncer de mama (MCF7, T47d e HS578T), antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória, antioxidante e antimitótica (AMEN et al., 2015; FALCÃO et al., 2005; MILITÃO et al., 2014; MILITÃO et al., 2005; SEO et al., 2001).

Homopterocarpano (**157**) exibiu ainda citotoxicidade em células de melanoma, cólon humano, mama e leucemia, atividade antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* e antiulcerogênica (FALCÃO et al., 2005; MARTINEZ; GARCÍA; DURANGO, 2017; OLALEYE et al., 2013; REYES-CHILPA et al., 1998). Medicarpina (**156**) apresentou também atividades antifúngica, repelente contra zoósporo, larvicida contra *Aedes aegypti* e inibidora de agregação plaquetária (GODA et al., 1985; ISLAM, 2008; PLUEMPANUPAT et al., 2013).

4-Hidroxi-3-metoxi-8,9-metilenodioxipterocarpano (**179**), obtido de *D. parviflora*, foi ativo frente às linhagens de células de carcinoma epidemoide de cavidade oral (KB), adenocarcinoide de mama (MCF-7) e câncer de pulmão de pequenas células (NCI-H187) (SONGSIANG; HAHNVAJANAWONG; YENJAI, 2011). Enquanto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**170**), homopterocarpano (**157**) e vesticarpano (**165**), isolados *P. floribundum*, apresentaram atividade citotóxica contra câncer de mama (MILITÃO et al., 2014; FALCÃO et al., 2005). Os pterocarpanos **165** e **170** também apresentaram atividade antimitótica (MILITÃO et al., 2005). Metilnissolina (**166**), obtida de *D. odorifera*, apresentou atividade inibitória de agregação plaquetária, enquanto aeschinocarpina (**182**) e 2-metoximediacarpina (**168**), obtidos de *A. fascicularis*, apresentaram atividades citotóxica moderada e antiproliferativa frente às linhagens de células de carcinoma de próstata (DU-145) e adenocarcinoma de próstata (PC-3) (CAAMAL-FUENTES et al., 2013; GODA et al., 1985).

Tabela 4 - Estruturas dos pterocarpanos de **156-182**.



Nº	R ₄	R ₃	R ₂	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀	Nome
156	H	OH	H	H	H	OCH ₃	H	medicarpina
157	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	homopterocarpano
158	H	OH	H	H	O-CH ₂ -O	H	H	macckiaina
159	H	OCH ₃	H	H	O-CH ₂ -O	H	H	pterocarpano
160	H	OH	H	H	OH	OCH ₃	H	3,8-dihidroxi-9-metoxipterocarpano
161	H	OH	H	H	OCH ₃	OH	H	kushenina
162	H	OH	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano
163	OH	OH	H	H	H	OCH ₃	H	3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano
165	H	OH	H	H	H	OCH ₃	OH	vesticarpano
166	H	OH	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	metilnissolina
167	H	OCH ₃	H	H	H	OH	OH	8,9-dihidroxi-3-metoxipterocarpano
168	H	OH	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	2-metoximediacarpina
170	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	2,3,9-trimetoxipterocarpano
173	H	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃	OH	mucronucarpano

174	OH	OH	H	H	H	OCH ₃	OH	aracarpeno 1
175	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OH	melilotocarpano D
176	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	melilotocarpano C
177	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OH	odoricarpana
178	OH	OH	H	OH	H	OCH ₃	H	aracarpeno 2
179	OH	OCH ₃	H	H	O-CH ₂ -O		H	4-hidroxi-3-metoxi-8,9- metilenodioxipterocarpano
180	geranila	OCH ₃	H	H	O-CH ₂ -O		H	nutiducol

2.4 Rotenoides

Os rotenoides da tribo Dalbergieae totalizaram 12 compostos. Estes metabólitos (**183** a **194**, 5,0%) constituem uma das subclasses de isoflavonoides mais importantes devido às suas propriedades inseticidas. São considerados derivados de isoflavonas pela incorporação de um átomo de carbono adicional, resultado da 2'-hidroxilação e subsequente metilação (2'-OMe) de uma isoflavona para formação do anel B do esqueleto rotenoide (Figura 2). Os rotenoides podem ser divididos em três subgrupos: desidrorotenoides (**183-185**), rotenoides (**186**, **187**, **189**, **191-194**) e 12a-hidroxirotenoides (**188** e **190**) (VEITCH, 2007, 2009 e 2013). Dentre os rotenoides da tribo Dalbergieae, somente três, amorfigenina (**187**), dalbinol (**188**) e amorfigenina- β -D-glicose (**189**), obtidos das sementes de *D. monetaria*, são biologicamente ativos apresentando atividade larvicida (ABE et al., 1985).

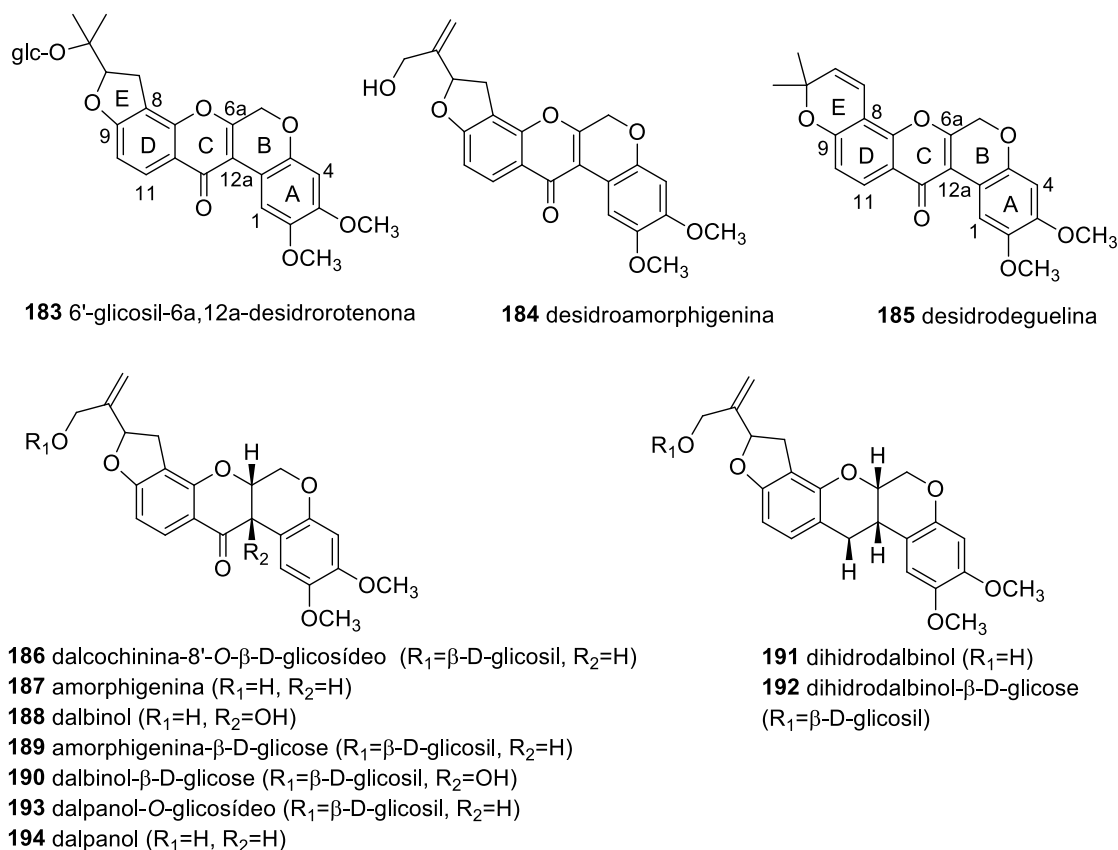


Figura 3 - Fórmulas estruturais dos rotenoides de **183-194**

2.5 Isoflavanas

As isoflavanas da tribo Dalbergieae somaram 31 compostos (**195-225**, 13,0%). Estes metabólitos compõem uma das menores subclasses de isoflavonoides nas quais incluem além de isoflavanas (**195-220**), isoflavanquinonas (**221-223**) e isoflavan-4-óis (**224-225**). As isoflavanas são reconhecidas como fitoalexinas e apresentam estruturas que diferem das isoflavononas pela ausência da carbonila no carbono 4 do anel C (Figura 3). As isoflavanquinonas diferem das isoflavanas pela presença de carbonilas nas posições 3' e 6' do anel B. Os isoflavan-4-óis se diferenciam das isoflavononas pela presença de hidroxila no carbono 4 do anel C ao invés de carbonila (Tabela 5). Um total de 26 isoflavanas (10,8%) foram relatadas na tribo Dalbergieae (Tabela 5), nas quais incluem um número significativo de estruturas com padrões simples de substituição no oxigênio (hidroxi, metoxi e metilenodioxi) (DEWICK, 2009; VEITCH, 2007, 2009 e 2013).

Um total de 14 isoflavanas (53,8%) da tribo Dalbergieae são biologicamente ativas. As atividades mais frequentes são antioxidante, antibacteriana, antifúngica, citotóxica e antimicrobiana.

As isoflavanas vestitol (**195**), obtida de *D. parviflora*, *D. odorifera*, *D. tonkinensis* e *Machaerium* ssp; sativano (**198**), 8-demetilduartina (**205**) e 3'-hidroxi-8-metoxivestitol (**207**), isoladas de *D. parviflora*, bem como duartina (**208**), obtida de *D. parviflora* e *Machaerium* ssp, apresentaram atividade antioxidante nos ensaios X/XO, ORAC e DPPH (PROMDEN et al., 2014; SON et al., 2019). Vestitol (**195**) também apresentou atividades antibacteriana contra *Ralstonia solanacearum*, inibidora de agregação plaquetária e anti-hipercolesterêmica (GODA et al., 1985; YAHARA et al., 1985; ZHAO et al., 2011). Kotstrigoisoflavanol (**224**), obtido de *K. strigosa*, apresentou potencial antioxidante (AWOUAFACK et al., 2016).

Mucronulatol (**200**), obtido de *D. oliveri*, *D. odorifera* e *D. parviflora*, exibiu atividades antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, citotóxica, antimalárica, antibacteriana, bem como anti-hipercolesterêmica e inibidora da α -glicosidase (CHOI et al., 2010; DEESAMER et al., 2007; SONGSIANG et al., 2009; YAHARA et al., 1985). 5'-Metoxivestitol (**221**), isolado de *D. odorifera* e *D. oliveri* e claussequinona (**222**), obtida de *D. odorifera* e *D. candenatensis*, apresentaram atividades anti-hipercolesterêmica, inibidora da α -glicosidase e proliferativa de pelos (CHOI et al., 2010; PARK et al., 2017; YAHARA et al., 1985). O composto **222** apresentou ainda atividades antibacteriana e repelente contra zoósporos (HAMBURGER; CORDELL, 1987; ISLAM, 2008). 3'-Hidroxi-8-metoxivestitol (**207**), dalvelutinano B (**214**) e nitidulina (**216**), obtidos de *D. velutina*, foram avaliados quanto a citotoxicidade frente às linhagens celulares de carcinoma cervical humano (HeLa), carcinoma hepatocelular (HepG-2),
Carvalho, A. A.

adenocarcinoma de cólon (HT-29), carcinoma epidermoide de cavidade oral (KB), adenocarcinoma de mama (MCF-7), sendo que os compostos **207** e **214** foram moderadamente ativos contra três linhagens, enquanto o **216** demonstrou citotoxicidade significativa frente às cinco linhagens (KAENNAKAM; SIRIPONG; TIP-PYANG, 2017).

Duartina (**208**) apresentou atividade citotóxica frente às linhagens de células carcinoma epidermoides de cavidade oral (KB) e câncer de pulmão de pequenas células (NCI-H187) (SONGSIANG et al., 2009). 4'-O-Metilpreglabridina (**210**) e 4'-O-metilglabridina (**211**), obtidos de *D. robinoides*, apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans* (VILA et al., 1998), enquanto o secundiflorol G (**217**), obtido de *A. fascicularis*, apresentou atividade anticâncer significativa frente às linhagens de células de carcinoma de laringe (Hep-2), carcinoma epidermoide de cavidade oral (KB) e carcinoma cervical humano (HeLa) (CAAMAL-FUENTES et al., 2015; CASTILLO-BAUTISTA et al., 2019).

Tabela 5 - Estruturas das isoflavanas de 195 - 219

Nº	R ₈	R ₇	R ₆	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	Nome
195	H	OH	H	OH	H	OCH ₃	H	vestitol
196	H	OH	H	OCH ₃	H	OH	H	neovestitol
197	H	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	H	7-O-metilvestitol
198	H	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	sativano
199	geranila	OH	H	H	H	OCH ₃	H	condanatenina F
200	H	OH	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	mucronulatol
201	H	OH	H	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	5'-metoxivestitol
202	H	OH	H	OH	OH	OCH ₃	H	7,2',3'-trihidroxi-4'-metoxi-isoflavana
203	OH	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	7,8-dihidroxi-2',4',5'-trimetoxi-isoflavana
204	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	7,8,2'-trihidroxi-3',4'-dimetoxi-isoflavana
205	OH	OH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	8-demetilduartina
206	OH	OH	H	OH	OH	OCH ₃	H	3',8-dihidroxi-vestitol
207	OCH ₃	OH	H	OH	OH	OCH ₃	H	3'-hidroxi-8-metoxivestitol
208	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	duartina
209	OCH ₃	OH	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	isoduartina

210	prenila	OH	H	OH	H	OCH ₃	H	4'- <i>O</i> -metilpreglabridina
212	H	OH	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	6,7,3'-trihidroxi-2',4'-dimetoxi-isoflavana
217	H	OH	H	OH	OH	OCH ₃	2-metilbut-3-en-2-ila	secundiflorol G
218	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	machaerol B
219	OH	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	machaerol C

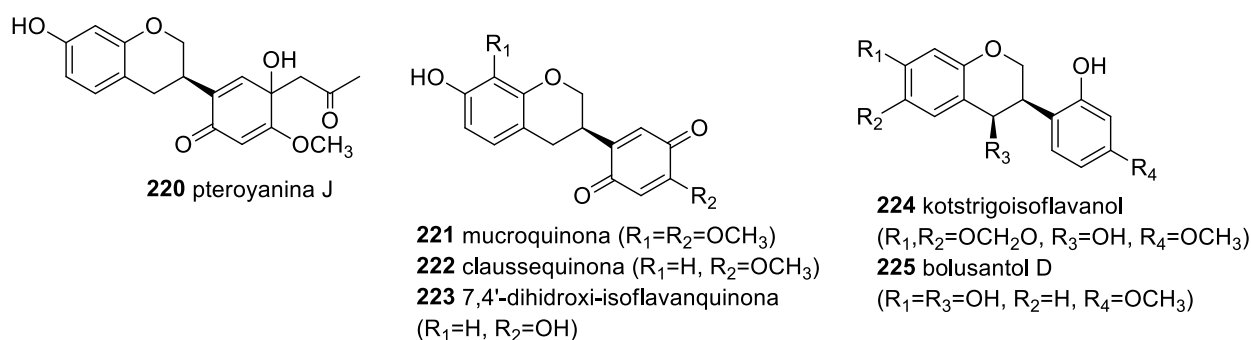


Figura 4 - Fórmulas estruturais de isoflavana (**220**), isoflavanquinonas (**221-223**) e isoflavan-4-ols (**224-225**)

2.6 Outros isoflavonoides

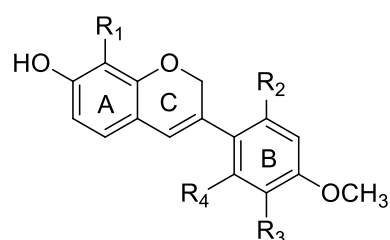
Um total de 15 compostos (**226-240**, 6,2%, Figura 4) não foram incluídos nas subclasses de isoflavonoides anteriormente discutidas e são classificados como isoflav-3-enos (**226** e **227**), pterocarpenos (**228-232**), cumestonas (**233-235**), arilbenzofurano-3-carbaldeído (**236-238**), cumaronocromona (**239**) e isoflavonoide benzofurano (**240**). Os isoflav-3-enos são similares às isoflavanas, acrescido de uma ligação dupla em C-3 do anel C (VEITCH, 2007, 2009 e 2013).

Os isoflav-3-enos tem um efeito promissor na inibição do NADH oxidase (tNOX) em células cancerígenas, o que por sua vez, leva à apoptose. Compostos desta subclasse têm sido investigados contra cânceres de ovário, próstata e cervical (DEWICK, 2009). Entretanto, não há relato de atividade biológica para os isoflav-3-enos (**226** e **227**) da tribo Dalbergieae.

Os pterocarpenos apresentam estrutura derivada dos pterocarpanos com a presença de uma ligação dupla entre os carbonos 6a e 11a. Cumestonas são consideradas derivadas de isoflavonas (DEWICK, 2009), porém alternativamente, também podem ser originadas de 2-hidroxi-3-arilcumarinas (VEITCH, 2007, 2009 e 2013). As cumaronocromonas constituem uma pequena subclasse de isoflavonoides e sua biossíntese, não é clara, embora seja sugerido que hidroxí-isoflavonas, que às vezes co-ocorrem com as cumaronocromonas, podem ser os seus precursores (DEWICK, 2009; VEITCH, 2007, 2009 e 2013). Não há um consenso sobre a origem biossintética de arilbenzofurano-3-carbaldeído. Macias et al. (1999) sugere que sejam derivados de cumestanos pela abertura de um anel, entretanto, uma análise dos padrões de

substituição indica que o anel A de 2-arilbenzofuranos é derivado do chiquimato, em vez do acetato, sugerindo uma via biossintética alternativa (VEITCH, 2007, 2009 e 2013).

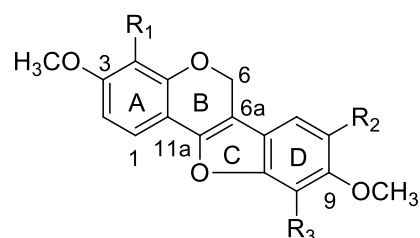
Não foram encontrados relatos de atividades biológicas para os pterocarpenos (**228-232**), cumestonas (**233-235**) e cumaronocromona (**239**) da tribo Dalbergieae. Os três arilbenzofurano-3-carbaldeído (**236-238**), obtidos das folhas de *A. inermis*, apresentaram atividade antiplasmódica contra *Plasmodium falciparum* (KRAFT et al., 2001). O isoflavonoide benzofurano (**240**), isolado da casca do caule de *P. erinaceus*, apresentou atividade antioxidante (TOUKAM et al., 2018).



226 7,2'-dihidroxi-8,4'-dimetoxi-isoflavena

($R_1=OCH_3$, $R_2=OH$, $R_3=R_4=H$)

227 odoriflavena ($R_1=R_2=H$, $R_3=OCH_3$, $R_4=OH$)



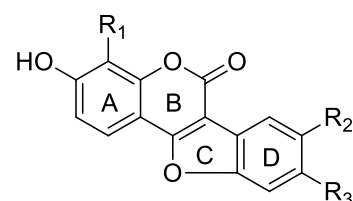
228 bryacarpene 1 ($R_1=R_3=OH$, $R_2=OCH_3$)

229 bryacarpene 2 ($R_1=H$, $R_2=OCH_3$, $R_3=OH$)

230 bryacarpene 3 ($R_1=H$, $R_2=R_3=OCH_3$)

231 bryacarpene 4 ($R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=OCH_3$)

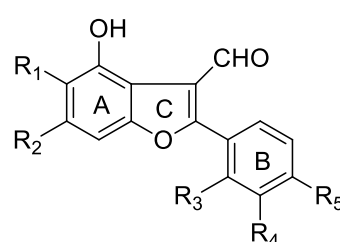
232 bryacarpene 5 ($R_1=R_2=H$, $R_3=OCH_3$)



233 dalbergestano ($R_1=OCH_3$, $R_2=R_3=OH$)

234 12-O-metilcomestrol ($R_1=R_2=H$, $R_3=OCH_3$)

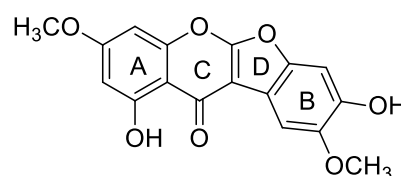
235 medicagol ($R_1=H$, $R_2,R_3=OCH_2O$)



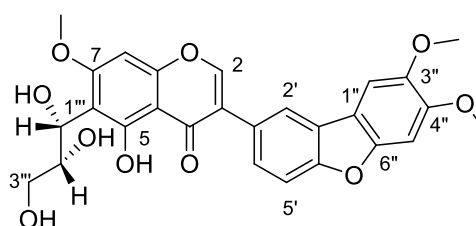
236 andinermal A ($R_1=H$, $R_2=R_3=R_5=OCH_3$, $R_4=OH$)

237 andinermal B ($R_1,R_2=OCH_2O$, $R_3=R_5=OCH_3$, $R_4=OH$)

238 andinermal C ($R_1=H$, $R_2=R_3=OCH_3$, $R_4=R_5=OH$)



239 dalbergicromona



240 3-(7,8-dimetoxi[b,d]furan-2-il)-5-hidroxi-7-metoxi-6-((1R,2R)-1,2,3-trihidroxiopropil)-4H-cromen-4-ona

Figura 5 - Fórmulas estruturais de outros isoflavonoides (**226-240**)

2.7 Considerações sobre as atividades biológicas da tribo Dalbergieae

Os resultados da revisão das atividades biológicas dos isoflavonoides da tribo Dalbergieae mostraram um total de 81 compostos ativos, em 46 espécies pertencentes a 12 gêneros. Os gêneros mais estudados, do ponto de vista biológico, são *Dalbergia*, *Machaerium*, *Andira* e *Pterocarpus* com 21, 6, 6 e 4 espécies, respectivamente. Ribeiro et al. (2007) afirmam que investigações filogenéticas baseadas em dados moleculares mostraram uma relação íntima entre os gêneros *Dalbergia* e *Machaerium* os quais pertencem ao mesmo clado (*Dalbergia*), o que pode explicar suas similaridades em composição química e atividades biológicas. Entretanto, estes estudos apontaram ainda, uma proximidade entre os gêneros *Machaerium* e *Aeschynomene* seção *Ochopodium* (LAVIN et al., 2001; RIBEIRO et al., 2007; WOJCIECHOWSKI; LAVIN; SANDERSON, 2004), no entanto, os resultados não são conclusivos e não há indicativo de similaridade a partir dos dados quimiosistemáticos. Os isoflavonoides de duas espécies do gênero *Dalbergia* (*D. parviflora* e *D. odorifera*) apresentaram uma grande variedade de atividades biológicas, com destaque para atividade estrogênica, sobretudo atribuída às isoflavonas, relatadas em *D. parviflora*.

A maioria dos resultados de atividades biológicas foi obtida a partir de ensaios com compostos isolados. Dentre as 46 espécies com atividades biológicas apenas *A. sensitiva*, *A. fluminensis*, *D. odorifera* e *V. guianensis* apresentaram resultados exclusivamente com extrato bruto ou frações (ARRUDA et al., 2018; IGNOATO et al., 2012; SOUZA et al., 2017; SOUZA et al., 2015; SOUZA et al., 2013; YAHARA et al., 1985). As atividades predominantes nos isoflavonoides foram antimicrobiana (13 espécies), estrogênica (11 espécies), citotóxica (11 espécies) e antioxidante (9 espécies). As isoflavonas (**1-125**, 52,1%) compõem a subclasse de isoflavonoides com maior número e variedade de atividades biológicas, seguidas pelas isoflavanonas (**126-155**, 12,5%), pterocarpanos (**156-182**, 11,2%) e isoflavanos (**195-220**, 10,8%). As atividades biológicas mais frequentes entre as isoflavonas foram citotóxica, estrogênica, antioxidante, osteogênica e anti-helmíntica. Estes resultados demonstram o potencial biológico da tribo Dalbergieae, bem como sugerem a necessidade de mais estudos visando a descoberta de princípios ativos, uma vez que apenas 33,75% dos compostos relatados apresentaram alguma atividade biológica.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão bibliográfica dos isoflavonoides da tribo Dalbergieae (Fabaceae-Papilionoideae), no período de 1945 a 2019, mostrou a ocorrência de 240 compostos distribuídos em 69 espécies pertencentes a 15 gêneros. Os isoflavonoides glicosilados totalizaram 48 compostos que corresponde a 20%. Formononetina (**2**), biochanina A (**17**) e medicarpina (**156**) são os isoflavonoides que ocorrem com maior frequência na tribo. Os gêneros que apresentaram maior número de espécies com ocorrência de isoflavonoides foram *Dalbergia*, *Machaerium*, *Andira* e *Pterocarpus*, com 31, 9, 6 e 5, respectivamente.

A tribo Dalbergieae demonstrou possuir um importante potencial biológico com 46 espécies e 81 isoflavonoides bioativos, no entanto, representa apenas 33,75% dos compostos isolados e identificados, sugerindo a necessidade de mais estudos para verificar o potencial biológico dos demais compostos e espécies.

REFERÊNCIAS

- ABDOU, J. P.; MOMENI, J.; ADHIKARI, A.; TSABANG, N.; TCHINDA, A. T.; CHOUDHARY, M. I.; NKENGFACK, A. E. New coumestan and coumaronochromone derivatives from *Dalbergia boehmii* Taub. (Fabaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 21, p. 109-113, 2017.
- ABE, F.; DONNELLY, D. M X.; MORETT, C.; POLONSKY, J. Isoflavanoid constituents from *Dalbergia monetária*. **Phymchemistry**, v. 24, n. 5, p. 1071-1076, 1985.
- ADEM, F. A.; MBAVENG, A. T.; KUETE, V.; HEYDENREICH, M.; NDAKALA, A.; IRUNGU, B.; YENESEW, A.; EFFERTH, T. Cytotoxicity of isoflavones and biflavonoids from *Ormocarpum kirkii* towards multi-factorial drug resistant cancer. **Phytomedicine**, v. 58, 152853, 2019.
- ADINARAYANA, D.; RAO, J. R. Isoflavonoid glycosides of *Dalbergia paniculata*. **Tetrahedron**, v. 28, p. 5377-5384, 1972.
- ALEGRIO, L. V.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. Diarylheptanoids and isoflavonoids from *Centrolobium* species. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2359-2362, 1989.
- ALMEIDA, J. G. L.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. NMR spectral assignments of a new [C–O–C] isoflavone dimer from *Andira surinamensis*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, p. 103-106, 2008.
- AMEN, Y. M.; MARZOUK, A. M.; ZAGHLOUL, M. G.; AFIFI, M. S. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. **Natural Product Research**, v. 29, n. 15, p. 1388-1405, 2015.
- ANANDHARAJAN, R.; PATHMANATHAN, K.; SHANKERNARAYANAN, N. P.; VISHWAKARMA, R. A.; BALAKRISHNAN, A. Upregulation of Glut-4 and PPAR γ by an isoflavone from *Pterocarpus marsupium* on L6 myotubes: a possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 253-260, 2005.
- ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; LEON, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, 751-754, 1998.
- ARAÚJO, J. M. E.; MELO, L. S. M.; ARAÚJO, E. D.; FERNANDES, R. P. M.; SCHER, R. Phenolic Composition and Leishmanicidal Activity of Red Propolis and *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub (Fabaceae) Extracts from Sergipe, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. e18160461, 2018.
- ARRUDA, R. F.; ALVES-OLHER, V. G.; VANDRESEN, F.; SCHUQUEL, I. T. A.; BERSANI-AMADO, C. A.; NAKAMURA, C. V.; SILVA, C. C. Estudo Químico e Avaliação das Atividades Anti-Inflamatória, Antitumoral e Antioxidante das Partes Aéreas de *Aeschynomene sensitive*. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 3, p. 698-708, 2018.

- AWOUAFACK, M. D.; TCHUENGUEM, R. T.; ITO, T.; DZOYEM, J. P.; TANE, P.; MORITA, H. A New Isoflavanol from the Fruits of *Kotschyia strigosa* (Fabaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 99, p. 321 - 324, 2016.
- BEKKER, M.; MALAN, E.; STEENKAMP, J. A.; BRANDT, E. V. An isoflavanoid–neoflavonoid and an O-methylated isoflavone from the heartwood of *Dalbergia nitidula*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 415-418, 2002.
- BRAZ FILHO, R.; DE ALMEIDA, M. E. L.; GOTTLIEB, O. R. Iso- and neo-flavonoids from *Dalbergia riparia*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 1187-1188, 1973.
- CAAMAL-FUENTES, E. E; PERAZA-SÁNCHEZ, S. R.; TORRES-TAPIA, L. W.; MOO-PUC, R. E. Isolation and Identification of Cytotoxic Compounds from *Aeschynomene fascicularis*, a Mayan Medicinal Plant. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 13563-13574, 2015.
- CAAMAL-FUENTES, E.; MOO-PUC, R.; TORRES-TAPIA, L. W.; PERAZA-SANCHEZ, S. R. Pterocarpanes from the Root Bark of *Aeschynomene fascicularis*. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 10, p. 1421-1422, 2013.
- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; SOUSA, R. P.; FREITAS, J. S.; ARAÚJO, B. Q.; CHAVES, M. H. Identificação de flavonoides das folhas de *Machaerium acutifolium* (Papilionoideae -Fabaceae) por espectrometria de massas. *In*: FREITAS, R. M. **Ciências Biológicas Campo Promissor em Pesquisa 2**. 1. ed. Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. cap. 13, p. 118-129.
- CASTELLANO, G.; TORRENS, F. Quantitative Structure-Antioxidant Activity Models of Isoflavonoids: A Theoretical Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 12891-12906, 2015.
- CASTRO, O.; LOPEZ, J.; VERGARA, A. Isoflavans and a stilbene from wood of the decayresistant tropical tree *diphysa robinoides*. **Journal Natural Products**, v. 49, n. 4, p. 680-683, 1986.
- CHARLES, J. A.; GANDHIDASAN, R. A New Isoflavone from *Dalbergia rubiginosa* (Roxb). **Indian Journal Chemistry**, v. 45B, p. 1282-1284, 2006.
- CHAWLA, H.; CHIBBER, S. S.; SESHADRI, T. R. Volubilin, a new isoflavone-C-glycoside from *Dalbergia volubilis* flowers. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2301-2304, 1974.
- CHEENPRACHA, S.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; KANJANA-OPAS, A. Candenatenins A-F, phenolic compounds from the heartwood of *Dalbergia candenatensis*. **Journal Natural Products**, v. 72, p. 1395-1398, 2009.
- CHOI, C. W.; CHOI, Y. H.; CHA, M. R.; YOO, D. S.; KIM, Y. S.; YON, G. H.; KYUNG SIK HONG, K. S.; YOUNG HO KIM, SHI YONG RYU. Yeast α -glucosidase Inhibition by Isoflavones from Plants of Leguminosae as an in Vitro Alternative to Acarbose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9988–9993, 2010.
- COOK, J. T.; OLLI, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. Pterocarpanes from *Dalbergia spruceana*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1419-1422, 1978.

COOKE, R. G.; RAE, I. D. Some new constituents of *Pterocarpus indicus* heartwood. **Australian Journal of Chemistry**, v. 17, p. 379-384, 1964.

DEESAMER, S.; KOKPOL, U.; CHAVASIRI, W.; DOUILLARD, S.; PEYROT, V.; VIDAL, N.; COMBES, S.; FINET, J. Synthesis and biological evaluation of isoflavone analogues from *Dalbergia oliveri*. **Tetrahedron**, v. 63, p. 12986-12993, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2009, 539 p.

DHOOGHE, L.; MAREGESI, S.; MINCHEVA, I.; FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J.; LEMIÈRE, F.; MATHEEUSSEN, A.; COS, P.; MAES, L.; VLIETINCK, A.; APERS, S.; PIETERS, L. Antiplasmodial activity of (I-3, II-3)-biflavonoids and other constituents from *Ormocarpum kirkii*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 785-791, 2010.

DIXIT, P.; CHILLARA, R.; KHEDGIKAR, V.; GAUTAM, J.; KUSHWAHA, P.; KUMAR, A.; SINGH, D.; TRIVEDI, R.; MAURYA, R. Constituents of *Dalbergia sissoo* Roxb. leaves with osteogenic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 890-897, 2012.

DONNELLY, D. M. X.; KEENAN, P. J.; PRENDERGAST, J. P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 1157-1161, 1973.

DONNELLY, D. M. X.; KAVANACH, P. J. Isoflavanoids of *Dalbergia oliveri*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2587-2590, 1974.

ELSOHLY, H. N.; JOSHI A. S., NIMROD, A. C. Antigiardial Isoflavones from *Machaerium aristulatum*. **Planta Medica**, v. 65, p. 490, 1999.

FALCÃO, M. J. C.; POULIQUEM, Y. B. M.; LIMA, M. A. S.; GRAMOSA, N. V.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MILITÃO, G. C. G.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R. Cytotoxic Flavonoids from *Platymiscium floribundum*. **Journal Natural Products**, v. 68, p. 423-426, 2005.

FARAG, S. F.; AHMED, A. S.; TERASHIMA, K.; TAKAYA, Y.; NIWA, M. Isoflavonoid glycosides from *Dalbergia sissoo*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1263-1268, 2001.

FERREIRA, J. J. S.; OLIVEIRA, A. C. S.; QUEIROZ, R. T.; SILVA, J. S. A tribo Dalbergieae s.l. (Leguminosae-Papilionoideae) no município de Caetité, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, 70, e03502017, 2019.

FERREIRA, J. A.; NEL, J. W.; VINCENT BRANDT, E.; BEZUIDENHOUDT, B. C. B.; FERREIRA, D. Oligomeric isoflavonoids. Part 3.T Daljanelins A-D, the first pterocarpan- and isoflavanoid-neoflavonoid analogues. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 26, n. 33, p. 1049-1056, 1995.

FERREIRA, M. A.; MOIR, M.; THOMSON, R. H. Naturally occurring quinones. Part. XXV. Pterocarpenequinones (6J-Benzofuro(3,2-e)(1)benzopyraquinones from *Brya ebenus*. **Journal of Chemical Society**, v. 1, p. 1113-1115, 1975.

FERREIRA, M. A.; MOIR, M.; THOMSON, R. H. New pterocarpenes from *Brya ebenus*. **Journal of Chemical Society**, v. 1, p. 2429-2435, 1974.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CARVALHO JR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. v. 2. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 1699 p.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; TIEPPO, C.; DE FREITAS, O. N.; HAMERSKI, L. Isoflavones and flavonols from *Andira humilis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1242-1245, 2010.

GARCIA, M. G.; NASCIMENTO, C. C.; FERREIRA, A. G.; LIMA, M. P. Identification of isoflavonoids in wood residue from *Swartzia laevicarpa*, *Dipteryx odorata*, and *Andira parviflora*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 54, n. 5, p. 856-859, 2018.

GODA, Y., KATAYAMA, M., ICHIKAWA, K., SHIBUYA, M., KIUCHI, F., SANKAWA, U. Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from *Dalbergia odorifera*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 12, p. 5606-5609, 1985.

HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A. Isoflavonoids of *Dalbergia candenatensis*. **Journal of Natural Products**. v. 50, n. 4, p. 696-699, 1987.

HAUSEN, B. M.; BRUHN G.; KOENIG, W. A. New hydroxyisoflavans as contact sensitizers in cocus wood *Brya ebenus* DC (Fabaceae). **Contact Dermatitis**, v. 25, n. 3, p. 149-55, 1991.

HEGNAUER, R.; BARKMEIJER, R. J. G. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 3-16, 1993.

IBRAHIM, S. BANDI, A. K. R.; GUNASEKAR, D.; MURTHY, M. M.; RAO, T. P.; BLOND, A.; BODO, B. A New C-geranylated Isoflavone from *Dalbergia paniculata*. **Natural Product Communications**, v. 2, p. 1109-1111, 2007.

IGNOATO, M. C.; FABRÃO, R. M.; SCHUQUEL, I. T. A.; BOTELHO, M. F. P.; SANTIN, S. M. O. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anti-inflamatória de *Aeschynomene fluminensis* Vell. (Fabaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2241-2244, 2012.

INNOCENT, E.; MAGADULA, J. J.; KIHAMPA, C.; HEYDENREICH, M. Bioactive isoflavones from *Dalbergia vacciniifolia* (Fabaceae). **Natural Product Communications**, v. 5, n. 6, p. 903-906, 2010.

ISLAM, T. M. Secondary Metabolites from Nonhost Plants Affect the Motility and Viability of Phytopathogenic *Aphanomyces cochlioides* Zoospores. **Zeitschrift für Naturforschung**. v. 63c, p. 233-240, 2008.

ITO, C; ITOIGAWA, M.; KANEMATSU, T.; RUANGRUNGSI, N.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Isoflavonoids from *Dalbergia olivari*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1265-1268, 2003.

JIMENEZ, L.; ALVAREZ, M.; MUNOZ, M.; RODRIGUEZ, R. Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 125-154, 2008.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, 2007.

JURD, L.; STEVENS, K.; MANNERS, G. Isoflavones of the heartwood of *Dalbergia retusa*. **Phytochemistry**, v.11, p. 2535-2540, 1972.

KAENNAKAM, S.; SUKANDAR, E. R.; RASSAMEE, K.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. Cytotoxic chalcones and isoflavones from the stems of *Dalbergia velutina*. **Phytochemistry Letters**, v. 31, p. 187-191, 2019.

KAENNAKAM, S.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. Cytotoxicities of two new isoflavanes from the roots of *Dalbergia velutina*. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, p. 310–314, 2017.

KAENNAKAM, S.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. Dalvelutinoside, a new isoflavone glycoside from the methanol extract of *Dalbergia velutina* roots. **Natural Product Research**, v. 30, n. 13, p. 1493-1498, 2015.

KAVIMANI, S.; ILANGO, R.; KRISHNAMOORTHY, G.; TAMIZHMOZHI, M.; JAYKAR, B.; NAGARAJAN, N. S.; MANOJ, C. Antiinflammatory activity of biochanin-a isolated from *Dalbergia sissooides*. **Indian Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 6, p. 235-236, 1997.

KHAN, I. A.; AVERY, M. A.; BURANDT, C. L.; GOINS, D. K.; MIKELL, J. R.; NASH, T. E.; AZADEGAN, A.; WALKER, L. A. Antigiardial Activity of Isoflavones from *Dalbergia frutescens* Bark. **J. Nat. Prod.**, v. 63, 1414-1416, 2000.

KLITGAARD, B. B.; LAVIN, M. **Tribe Dalbergieae sensu lato**. In: Lewis, G. P, Schirire, B., Mackinder, B. & Lock, M. (eds.) Legumes of the World. p. 307-335. The Royal Botanical Gardens, Kew, 2005

KRAFT, C.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; SOLIS, P. N.; GUPTA, M. P.; BIENZLE, U.; EICH, E. Andinermals A–C, antiplasmodial constituents from *Andira inermis*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 769-774, 2001.

KRAFT, C.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; GUPTA, M. P.; BIENZLE, U.; EICH, E. Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 131–135, 2000.

KRISHNAVENI, K. S.; SRINIVASA RAO, J. V. A new acylated isoflavone glucoside from *Pterocarpus santalinus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 48, n. 9, p. 1373-1374, 2000a.

KRISHNAVENI, K. S.; SRINIVASA RAO, J. V. An isoflavone from *Pterocarpus santalinus*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 605-606, 2000b.

KRISHNAVENI, K. S.; SRINIVASA RAO, J. V. A new isoflavone glucoside from *Pterocarpus santalinus*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 2, n. 3, p. 219-223, 2000c.

KUMAR, S.; STEINER, T.; SUBRAMANIAN, K. Dalspinin, an isoflavone from *Dalbergia spinosa* roots. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 29, n. 1, p. 99-102, 1999.

KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; SUTHERLAND, I. O.; ALVES, H. M.; GOTTLIEB, O. R. Absolute configurations of isoflavans. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1423-1426, 1978.

KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. Vestitol and vesticarpan, isoflavonoids from *Machaerium vestitum*. **Phytochemistry**, v.17, p. 1413-1415, 1978.

KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. Variabilin, a 6a-hydroxypterocarpan from *Dalbergia variabilis*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1417-1418, 1978.

KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R.; DE OLIVEIRA, A. B. Mucronulatol, mucroquinone and mucronucarpan, isoflavonoids from *Machaerium mucronulatum* and *M. villosum*. **Phytochemistry**, v.17, p. 1405-1411, 1978.

LAVIN, M.; PENNINGTON, R. T.; KLITGAARD, B. B.; SPRENT, J. I.; LIMA, H. C. DE GASSON, P. E. The Dalbergioid legumes (Fabaceae): delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 503-533, 2001.

LEE, C.; LEE, J. W.; JIN, Q.; JANG, D. S.; LEE, S. J.; LEE, D.; HONG, J. T.; KIM, Y.; LEE, M. K.; HWANG, B. Y. Inhibitory constituents of the heartwood of *Dalbergia odorifera* on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 4263-4266, 2013.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. **Legumes of the World**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 577p.

LI, L.; LIU, J. Z.; LUO, M. WANG, W.; HUANG, Y. Y.; EFFERTH, T.; WANG, H. M.; FU, Y. J. Efficient extraction and preparative separation of four mainisoflavonoids from *Dalbergia odorifera* T. Chen leaves by deep eutecticsolvents-based negative pressure cavitation extraction followed by macroporous resin column chromatography. **Journal of Chromatography B**, 1033-1034, p. 40-48, 2016.

LIU, R. X.; WANG, Q.; GUO, H. Z.; LI, L.; BI, K. S.; GUO, D. A. Simultaneous determination of 10 major flavonoids in *Dalbergia odorifera* by high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 469-476, 2005.

LIU, R. X.; YE, M.; GUO, H. Z.; BI, K. S.; GUO, D. A. Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of twenty-three flavonoids in the extract of *Dalbergia odorifera*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 1557-1565, 2005.

LOAN, P. T.; LE ANH, H. T.; CUC, N. T.; YEN, D.T.; HANG, D. T.; HA, T. M.; NHIEM, N. X.; VAN DU, N.; THAI, T. H.; VAN MINH, C.; VAN KIEM, P. New isoflavone glycosides from the stems of *Dalbergia vietnamensis*. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 6, p. 809-810, 2014.

LPWG (Legume Phylogeny Working Group). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, p. 44-77, 2017.

MACIAS, F. A.; SIMONET, A. M.; GALINDO, J. C. G.; CASTELLANO, D. Bioactive phenolics and polar compounds from *Melilotus messanensis*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 1, p. 35-46, 1999.

MALHOTRA, A.; MURTI, V. V. S.; SESHADRI, T. R. Lanceolarin, a new isoflavone glycoside of *Dalbergia lanceolaria*. **Tetrahedron**, v. 23, p. 405-409, 1966.

MARIANA, A.; MARINELA, P. Isoflavon- biochemistry, pharmacology and therapeutic use. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 52, p. 537-550, 2007.

MARTINEZ, J.; GARCÍA, C.; DURANGO, D. Antifungal activity against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* of the major constituents from wood sawdust of *Platymiscium gracile* Benth. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, n. 1, p. 14-25, 2017.

MATHIAS, L.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; RODRIGUES-FILHO, E. A New Isoflavone Glycoside from *Dalbergia nigra*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1158-1161, 1998.

MILITÃO, G. C. G.; PRADO, M. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; VELOSO, P. A.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Pterocarpan induce tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase. **Biochimie**, v. 104, p. 147-155, 2014.

MILITÃO, G. C.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; PESSOA, C.; FALCÃO, M. J.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antimitotic properties of pterocarpan isolated from *Platymiscium floribundum* on sea urchin eggs. **Planta Medica.**, v. 71, n. 7, p. 683-685, 2005.

MITRA, J.; JOSHI, T. Isoflavonoids from the heartwood of *Pterocarpus marsupium*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 10, p. 2326-2327, 1983.

MITRA, J.; JOSHI, T. An isoflavone glycoside from the heartwood of *Pterocarpus marsupium*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 9, p. 2429-2430, 1982.

- MONTHAKANTIRAT, O.; UMEHARA, K.; MATSUSHITA, A.; TERADA, E.; DE - EKNAMKUL, W.; MIYASE, T.; WARASHINA, T.; NOGUCHI, H. Isoflavones with estrogenic activity from *Dalbergia parviflora* Roxb. **Planta Medica**, v. 73, n. 09, p. 379-381, 2007.
- MUTAI, P.; HEYDENREICH, M.; THOITHI, G.; MUGUMBATE, G.; CHIBALE, K.; YENESEW, A. 3-Hydroxyisoflavanones from the stem bark of *Dalbergia melanoxylon*: Isolation, antimycobacterial evaluation and molecular docking studies. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 671-675, 2013.
- NAGARAJAN, N. S.; SETHURAMAN, M. G.; MANOJ, C. N.; RAO, R. P. Dalsympathetin – a new isoflavone gentiobioside from *Dalbergia sympathetica* (Dennst.). **Natural Product Research**, v. 20, n. 2, p. 195-200, 2006.
- NARAYANAN, M. C.; RAO, P. R.; SHANMUGAM, N. N.; GOPALAKRISHNAN, S. M.; DEVI, K. Isolation and characterisation of bioactive isoflavonoids from the roots of *Dalbergia horrida*. **Natural Product Research**, v. 21, n. 10, p. 903-909, 2007.
- NARAYANAN, V.; NAGARAJAN, N. S. Two isoflavone galactosides from *Dalbergia spinosa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2364-2365, 1988.
- NASCIMENTO, Y. M.; ABREU, L. S.; LIMA, R. L.; SILVA, A. D. S.; COSTA, V. C. O.; MELO, J. I. M.; SCOTTI, M. T.; SOBRAL, M. V.; ARAÚJO, S. S.; FILHO, M. A. G.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. Zornioside, a dihydrochalcone C-glycoside, and other compounds from *Zornia brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 28, p. 192–197, 2018.
- NUNES, D. S.; HAAG, A.; BESTMANN, H. J. Inhaltsstoffe der rinde von *Dalbergia monetaria* L. Drei neue isoflavon-C-glucoside. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 4, p. 331-335, 1989.
- OGIYAMA, K.; YASUE, M. Constituents of *Machaerium pedicellatum* heartwood. **Phytochemistry**, v. 12, p. 2544-2545, 1973.
- OLALEYE, M. T.; AKINMOLADUN, A. C.; CROWN, O. O.; AHONSI, K. E.; ADETUYI, A. O. Homopterocarpin contributes to the restoration of gastric homeostasis by *Pterocarpus erinaceus* following indomethacin intoxication in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 200-204, 2013.
- OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; ALVES, H. M.; GOTTLIEB, O. R. Duartin, an isoflavan from *Machaerium opacum*. **Phytochemistry**, v.17, p. 1401-1403, 1978.
- PARK, S. J., NHIEM, N. X., TAI, B. H., ANH, H. L. T., OH, S. H., SUNG, J. H., VAN KIEM, P. Proliferation effects on hair growth of compounds isolated from the bark of *Dalbergia oliveri*. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 11, p. 1729-1730, 2017.
- PARTHASARATHY, M. R.; SESHADRI, T. R.; VARMA, R. S. New isoflavonoid glycosides from *Dalbergia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1025-1027, 1976.

- PARTHASARATHY, M. R.; SESHADRI, T. R.; VARMA, R. S. Minor isoflavonoid glycosides of stem bark of *Dalbergia paniculata* isolation of a new C-glycoside. **Letteres to the Editor**, v. 43, n. 3, p. 74-75, 1974.
- PEREIRA, R.; SOUZA, E. B.; FONTENELLE, R. O. S.; VASCONCELOS, M. A.; SANTOS, H. S.; TEIXEIRA, E. H. Diversidade estrutural e potencial biológico dos metabólitos secundários de espécies do gênero *Myroxylon* L. f. (Fabaceae): uma revisão da literatura. **Hoehnea**, v. 46, n. 1, e582017, 2019.
- PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M. C.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection/ Electro spray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6484–6491, 2011.
- PISTELLI, L.; NOCCIOLI, C.; APPENDINO, G.; BIANCHI, F.; STERNER, O.; BALLERO, M. Pterocarpanes from *Bituminaria morisiana* and *Bituminaria bituminosa*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 595-598, 2003.
- PLUEMPANUPAT, S.; KUMRUNGSEE, N.; PLUEMPANUPAT, W.; NGAMKITPINYO, K.; CHAVASIRI, W.; BULLANGPOTI, V.; KOUL, O. Laboratory evaluation of *Dalbergia oliveri* (Fabaceae: Fabales) extracts and isolated isoflavonoids on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 653- 658, 2013.
- PROMDEN, W.; MONTHAKANTIRAT, O.; UMEHARA, K.; NOGUCHI, H.; DE-EKNAMKUL, W. Structure and Antioxidant Activity Relationships of Isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*. **Molecules**, v. 19, p. 2226-2237, 2014.
- RADHA, R.; VASANTHA, V. S.; PITCHUMANI, K. A New Isoflavone Apioglucoside from the Roots of *Dalbergia spinosa*. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 11, p. 1959-1960, 2015.
- RADHAKIUSHNIAH, M. Isoflavonoids of *Dalbergia paniculata* seeds. **Phytochemistry**, v.12, p. 3003-3004, 1973.
- RAMESH, P.; YUVAHAJAN, C. R. Coromandelin, a new isoflavone apioglucoside from the leaves of *Dalbergia coromandeliana*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 8, p. 1240-1241, 1995.
- RAO, P. R.; NARAYANAN, M. C.; GOPALAKRISHNAN, S. M.; SHANMUGAM, N. N. Two new isoflavonoids from the roots of *Dalbergia congesta* (Grah). **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 8, n. 1–2, p. 143-148, 2006.
- REDDY, R. V. N.; REDDY, N. P.; KHALIVULLA, S. I.; REDDY, M. V. B.; GUNASEKAR, D.; BLOND, A.; BODO, B. O-Prenylated flavonoids from *Dalbergia sissoo*. **Phytochemistry Letters 1**, v. 1, p. 23-26, 2008.

- REYES-CHILPA, R.; GÓMEZ-GARIBAY, F.; MORENO-TORRES, G.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; QUIROZ-VÁSQUEZ, R. I. Flavonoids and Isoflavonoids with Antifungal Properties from *Platymiscium yucatanum* Heartwood. **Holzforschung**, v. 52, n. 5, p. 459-462, 1998.
- REYNAUD, J., GUILLET, D.; TERREUX, R.; LUSSIGNOL, M.; WALCHSHOFER, N. Isoflavonoids in nonleguminous families: an update. **Natural Product Reports**, v. 22, 504-515, 2005.
- REYNOLDS, T. The evolution of chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 68, 2887-2895, 2007.
- RIBEIRO, R. A.; LAVIN, M.; LEMOS-FILHO, J. P.; MENDONÇA FILHO, C. V.; SANTOS, F. R.; LOVATO, M. B. The Genus *Machaerium* (Leguminosae) is More Closely Related to *Aeschynomene* Sect. *Ochopodium* than to *Dalbergia*: Inferences From Combined Sequence Data. **Systematic Botany**, v. 34, n. 4, p.762-771, 2007
- ROCHA E SILVA, H.; SILVA, C. C. M.; CALAND-NETO, L. B.; LOPES, J. A. D.; CITÓ, A. M. G. L.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Química Nova**, v. 30, n. 8, 1877-1881, 2007.
- SARG, T.; ATEYA, A. M.; GHANI, A. A.; BADR, W.; HAMS, G. Phytochemical and Pharmacological Studies of *Dalbergia sissoo* Growing in Egypt. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 1, p. 54-62, 1999.
- SELVAM, C.; JORDAN, B. C.; PRAKASH, S.; MUTISYA, D.; THILAGAVATHI, R. Pterocarpan scaffold: A natural lead molecule with diverse pharmacological properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p. 219-236, 2017.
- SEO, E. K.; KIM, N. C.; MI, Q.; CHAI, H.; WALL, M. E.; WANI, M. C.; NAVARRO, H. A.; BURGESS, J. P.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; TAN, G. T.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Macharistol, a New Cytotoxic Cinnamylphenol from the Stems of *Machaerium aristulatum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1483-1485, 2001.
- SHARMA, V.; RAMAWAT, K.G. **Isoflavonoids**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013
- SILVA, V. C.; CARVALHO, M. G.; BORBA, H. R.; SILVA, S. L. C. Atividade anti-helmíntica dos flavonóides isolados das raízes de *Andira anthelmia* (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n.4, p. 573-576, 2008.
- SILVA, V. C.; ALVES, A. N.; SANTANA, A.; CARVALHO, M. G. Constituintes fenólicos e terpenóides isolados das raízes de *Andira fraxinifolia* (Fabaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1184-1186, 2006.
- SILVA, B. P.; VELOZO, L. S. M.; PARENTE, J. P. Biochanin A triglycoside from *Andira inermis*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 663-667, 2000.

SINGH, R.; GEETANJALI. Em **Natural Products and Drug Discovery: An Integrated Approach**; Mandal, S. C.; Mandal, V.; Konishi, T., eds.; Elsevier-Copyright: Amsterdam, 2018, cap. 6.

SOBOLEV, V. S.; NEFF, S. A.; GLOER, J. B.; SHABANA I. KHAN, S. I.; TABANCA, N.; DE LUCCA, A. J.; WEDGE, D. E. Pterocarpenes elicited by *Aspergillus caelatus* in peanut (*Arachis hypogaea*) seeds. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2099 – 2107, 2010.

SONGSIANG, U.; HAHNVAJANAWONG, C.; YENJAI, C. Cytotoxicity of chemical constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1169-1174, 2011.
SONGSIANG, U.; WANICH, S.; PITCHUANCHOM, S.; NETSOPA, S.; UANPORN, K.; YENJAI, C. Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 427- 431, 2009.

SON, N. T.; KAMIJI, M.; HUONG, T. T.; KUBO, M.; CUONG, N. M.; FUKUYAMA, Y. Chemical constituents of the Vietnamese plants *Dalbergia tonkinensis* Prain and *Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer in Hook and their DPPH radical scavenging activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, n. 9, p. 1441–1447, 2019.

SON, N. T.; ODA, M.; HAYASHI, N.; YAMAGUCHI, D.; KAWAGISHI, Y.; TAKAHASHI, F.; HARADA, K.; CUONG, N.; FUKUYAMA, Y. Antimicrobial activity of the constituents of *Dalbergia tonkinensis* and structural-bioactive highlights. **Natural Product Communications**. v. 13, p. 157-161, 2018.

SOUSA, E. A.; CHAVES, M. H. Iridoides e Atividades Biológicas de Espécies da Tribo Gardenieae: Uma Contribuição Quimiotaxonômica para a Família Rubiaceae. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 6, p. 1767-1801, 2019.

SOUZA, R. F.; SILVA, G. A.; ARRUDA, A. C.; DA SILVA, M. N.; SANTOS, A. S.; GRISÓLIA, D. P. A.; SILVA, M. B.; SALGADO, C. G.; ARRUDA, M. S. P. A New Prenylisoflavone from the Antifungal Extract of Leaves of *Vatairea guianensis* Aubl. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 6, p. 1132-1136, 2017.

SOUZA, R. F.; SILVA, J. K. R.; SILVA, G. A.; ARRUDA, A. C.; SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. P. Estudo Químico e Avaliação do Potencial Antioxidante do Alburno de *Vatairea guianensis* Aubl. Rev. **Virtual Química**, v.7, n. 5, p. 1893-1906, 2015.

SOUZA, R. F.; MARINHO, V. H. S.; SILVA, G. A.; COSTA-JR., L. M.; SILVA, J. K. R.; BASTOS, G. N. T.; ARRUDA, A. C.; SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. P. New Isoflavones from the Leaves of *Vatairea guianensis* Aublé. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 11, p. 1857-1863, 2013.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II**. Plantarum: Nova Od, 2008.

SU, Z.; WANG, P.; YUAN, W.; LI, S. Chemical Constituents from *Pterocarpus soyauxii*. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 10, p. 1483-1486, 2014.

SU, Z.; WANG, P.; YUAN, W.; LI, S. Flavonoids and 3-Arylcoumarin from *Pterocarpus soyauxii*. **Planta Medica**, v. 79, p. 487-491, 2013.

SVASTI, J.; SRISOMSAP, C.; TECHASAKUL, S.; SURARIT, R. Dalcochinin-8'-O- β -D-glucoside and its β -glucosidase enzyme from *Dalbergia cochinchinensis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 739-743, 1999.

TIP-PYANG, S.; AREE, T.; SICHAEM, J. Pterocarpan and isoflavones from the heartwood of *Pterocarpus indicus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 55, n. 1, p. 121-123, 2019.

TOUKAM, P. D.; TAGATSING, M. F.; LAUVE RACHEL TCHOKOUAHA YAMTHE, L. R. T.; BAISHYA, G.; BARUA, N. C.; TCHINDA, A. T.; MBAFOR, J. T. Novel saponin and benzofuran isoflavonoid with in vitro anti-inflammatory and free radical scavenging activities from the stem bark of *Pterocarpus erinaceus* (Poir). **Phytochemistry Letters**, v. 28, p. 69-75, 2018.

UMEHARA, K.; NEMOTO, K.; MATSUSHITA, A.; TERADA, E.; MONTHAKANTIRAT, O.; EKNAMKUL, W.; MIYASE, T.; WARASHINA, T.; DEGAWA, M.; NOGUCHI, H. Flavonoids from the Heartwood of the Thai Medicinal Plant *Dalbergia parviflora* and Their Effects on Estrogenic-Responsive Human Breast Cancer Cells. **Journal of Natural Products**, v. 72, 2163-2168, 2009.

UMEHARA, K.; NEMOTO, K.; KIMIJIMA, K.; MATSUSHITA, A.; TERADA, E.; MONTHAKANTIRAT, O.; DE-EKNAMKUL, W.; MIYASE, T.; WARASHINA, T.; DEGAWA, M.; NOGUCHI, H. Estrogenic constituents of the heartwood of *Dalbergia parviflora*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 546-552, 2008.

VEITCH, N. C. Isoflavonoids of the Leguminosae. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 988-1027, 2013.

VEITCH, N. C. Isoflavonoids of the Leguminosae. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 776-802, 2009.

VEITCH, N. C. Isoflavonoids of the Leguminosae. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 417-464, 2007.

VERMA, K. S.; JAM, A. K.; NAGAR, A.; GUPTA, S. R. Macrocarposide, a New Isoflavanone C-Glucoside from *Pterocarpus macrocarpus* Heart Wood. **Planta Medica**, v. 4, p. 315-317, 1986.

VILA, J.; BALDERRAMA, L.; BRAVO, J. L.; ALMANZA, G.; CODINA, C.; BASTIDA, CONNOLLY, J. Prenylisoflavanones from *Geoffroea decorticans*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2525-2528, 1998.

WINK, M.; BOTSCHEN, F.; CHRISTINA GOSMANN, C.; G HOLGER SCHAFER, H.; WATERMAN, P. G. Chemotaxonomy seen from a phylogenetic perspective and evolution of secondary metabolism. **Annual Plant Reviews**, v. 40, p. 364-433, 2010.

- WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M. J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid Matk gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1846-1862, 2004.
- WOJCIECHOWSKI, M. F. Em *Advances in Legume Systematics*; Klitgaard, B. B.; Bruneau, A. eds., London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2003
- XU, Y. J.; FOUBERT, K.; DHOOGHE, L.; LEMIÈRE, F.; MAREGESI, S.; COLEMAN, C. M.; ZOU, Y.; FERREIRA, D.; APERS, S.; PIETERS, L. Rapid isolation and identification of minor natural products by LC-MS, LC-SPE-NMR and ECD: Isoflavanones, biflavanones and bisdihydrocoumarins from *Ormocarpum kirkii*. **Phytochemistry**, v. 79, p. 121-128, 2012.
- YAHARA, S.; OGATA, T.; SAIJO, R.; KONISHI, R.; YAMAHARA, J.; MIYAHARA, K.; NOHARA, T. Isoflavan and Related Compounds from *Dalbergia odorifera*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 4, p. 979-987, 1989.
- YAHARA, S.; SAIJO, R.; NOHARA, T.; KONISHI, R.; YAMAHARA, J.; KAWASAKI, T.; MIYAHARA, K. Novel bi-isoflavonoids from *Dalbergia odorifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 11, p. 5130-5133, 1985.
- ZARUCHI, J. L.; *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, Chapman & Hall: London, 1994.
- ZIDORN, C. Plant chemophenetics - A new term for plant chemosystematics/plant chemotaxonomy in the macro-molecular era. **Phytochemistry**, 163, p. 147-148, 2019.
- ZHANG, D. Y.; ZU, Y. G.; FU, Y. J.; LUO, M.; GU, C. B.; WANG, W.; YAO, X. H. Negative pressure cavitation extraction and antioxidant activity of biochanin A and genistein from the leaves of *Dalbergia odorifera* T. Chen. **Separation and Purification Technology**, v. 83, p. 91-99, 2011.
- ZHAO, C.; LIU, Y.; CONG, D.; ZHANG, H.; YU, J.; JIANG, Y.; CUI, X.; JIANG SUN. Screening and determination for potential α -glucosidase inhibitory constituents from *Dalbergia odorifera* T. Chen using ultrafiltration-LC/ESI-MSn. **Biomedical Chromatography**, v. 27, p. 1621-1629, 2013.
- ZHAO, X.; MEI, W.; GONG, M.; ZUO, W.; BAI, H.; DAI, H. Antibacterial Activity of the Flavonoids from *Dalbergia odorifera* on *Ralstonia solanacearum*. **Molecules**, v. 16, p. 9775-9782, 2011.

Capítulo 2

Perfil metabolômico e atividades biológicas dos extratos etanólico das folhas e galhos de *Machaerium acutifolium*

PERFIL METABOLÔMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS ETANÓLICO DAS FOLHAS E GALHOS DE *Machaerium acutifolium*

RESUMO

As folhas e galhos de *Machaerium acutifolium* Vogel (Fabaceae-Papilionoideae) foram submetidos a maceração com etanol, fornecendo os extratos etanólico das folhas (EEFMa) e galhos (EEGMa). A análise preliminar dos extratos por CCD e HPLC-DAD sugeriram a presença de compostos de natureza isoprênica, bem como flavonoides livres e glicosilados. O EEGMa (CE_{50} 56,76±1,54) apresentou ação sequestradora de radicais livres superior ao EEFMa (CE_{50} não detectada) e ao controle positivo BHT (CE_{50} 69,34±5,53) e ácido gálico (CE_{50} 13,37±1,37), e similar a rutina (CE_{50} 47,06±4,65), no ensaio com o DPPH. No ensaio com ABTS, o EEGMa (4,37±0,21) foi mais ativo que o EEFMa (1,18±0,16) e os controles positivos, BHT (2,49±0,12) e rutina (1,34±0,4). Os teores de fenóis totais para EEGMa (359,96±11,91) e EEFMa (138,42±6,82) apresentaram correlação positiva com a atividade antioxidante, nos ensaios com DPPH e ABTS. O EEFMa (386,33±0,78) mostrou elevado teor de flavonoides totais quando comparado com EEGMa (66,25±2,94). O fator de proteção solar do EEFMa (8,2±0,3) foi maior que o do EEGMa (4,5±0,2) e controle positivo benzofenona (2,2±0,1). O EEGMa apresentou baixa atividade inibidora da acetilcolinesterase, enquanto EEFMa não evidenciou atividade. O EEFMa e EEGMa não apresentaram toxicidade contra as larvas de *Aedes aegypti*. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento do perfil metabólico e biológico das folhas e galhos da espécie *M. acutifolium*.

Palavra-chave: Fabaceae, Fator de Proteção Solar, DPPH, flavonoides totais

ABSTRACT

The leaves and branches of *Machaerium acutifolium* Vogel (Fabaceae-Papilionoideae) were subjected to ethanol maceration, providing the ethanolic extracts of leaves (EEFMa) and branches (EEGMa). Preliminary analysis of the extracts by CCD and HPLC-DAD suggested the presence of isoprene compounds, as well as free and glycosylated flavonoids. The EEGMa (EC_{50} 56.76±1.54) presented free radical scavenging action superior to the EEFMa (EC_{50} not detected) and the positive control BHT (EC_{50} 69.34±5.53) and gallic acid (EC_{50} 13.37± 1.37), and similar to rutin (EC_{50} 47.06±4.65), in the DPPH assay. In the ABTS assay, EEGMa (4.37±0.21) was more active than EEFMa (1.18±0.16) and positive controls, BHT (2.49±0.12) and rutin (1.34±0.4). The levels of total phenols for EEGMa (359.96±11.91) and EEFMa (138.42±6.82) showed a positive correlation with the antioxidant activity, in the assays with DPPH and ABTS. EEFMa (386.33±0.78) showed a high content of total flavonoids when compared to EEGMa (66.25±2.94). The sun protection factor of EEFMa (8.2±0.3) was higher than that of EEGMa (4.5±0.2) and positive control benzophenone (2.2±0.1). EEGMa showed low acetylcholinesterase inhibitory activity, while EEFMa showed no activity. EEFMa and EEGMa did not show toxicity against *Aedes aegypti* larvae. The results obtained contribute to the knowledge of the metabolomic and biological profile of the leaves and branches of the *M. acutifolium* specie.

Keywords: Fabaceae, Sun Protection Factor, DPPH, total flavonoids

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Machaerium* pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae e tribo Dalbergieae (FERREIRA et al., 2019; LAVIN et al., 2001). O gênero *Machaerium* é constituído por 262 espécies (AMEN et al., 2015), entretanto, somente dezesseis apresentam estudo químico (*M. acutifolium*, *M. aristulatum*, *M. eriocarpum*, *M. floribundum*, *M. hirtum*, *M. incorruptibile*, *M. kuhlmannii*, *M. mucronulatum*, *M. multiflorum*, *M. nictitans*, *M. opacum*, *M. pedicellatum*, *M. scleroxylon*, *M. secundiflorum*, *M. vestitum* e *M. villosum*). Para estas espécies são relatadas algumas atividades biológicas, tais como estrogênica, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, mutagênica e alelopática (AMEN et al., 2015; BENTO et al., 2018; CARVALHO et al., 2020; RIBEIRO et al., 2016).

A espécie *Machaerium acutifolium* Vogel ocorre da Amazônia até São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia, Piauí e Maranhão, principalmente na área de cerrado (LORENZI, 1998; POLIDO; SARTORI, 2007). É conhecida popularmente por jacarandá do campo, jacarandá caroba e jacarandá bico de pato (BARBOSA; PINTO, 2003; ROSA et al., 2014). Existem dois estudos com o tronco desta espécie, o primeiro, resultou no isolamento e identificação dos polifenóis éter monometil de pinsilvina, (+)-medicarpina e petroestireno (OLLIS et al., 1978). O segundo, revelou a presença de um derivado de 3-arilcumarina, *trans*-estilbeno, indeno e dois flavonoides: (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-dihidro-3-(2'-hidroxi-3', 4'-dimetoxifenil) e (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-di-hidro-3-(2'-hidroxi-3', 4'-dimetoxifenil)-8-metoxi, (MELO et al., 2021). O extrato acetato de etila do tronco e o indeno apresentaram atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* (MELO et al., 2021).

Considerando o potencial químico e biológico de plantas do gênero *Machaerium*, sobretudo da espécie *M. acutifolium*, este estudo tem como objetivo obter o perfil químico e biológico dos extratos etanólico das folhas e galhos de *M. acutifolium*.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais e equipamentos

A obtenção dos extratos, partição, cromatografia em coluna (CC) e em camada delgada (CCD) foram feitas com solventes de padrão analítico (PA) adquiridos da Synth. Nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizados solventes grau HPLC da J. T. Backer e água ultrapura (18 Ω) obtida em sistema Milli-Q Plus e em ultrapurificador Master All da Gehaka.

O material vegetal foi moído em moinho de facas da Marconi e os extratos, frações e subfrações concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida Laborota 4000 Heidolph e a água residual removida em liofilizador Modulyod Freeze Dryer da Thermo Electron Corporation. A dissolução dos extratos e frações foi realizada com auxílio de banho de ultrassom modelo Q3.0/40 da Ultranique e conservados em refrigerador modelo Zyrium Frostfree 430 da Brastemp. As massas obtidas em balanças modelos KN 4000 da Digimed e AUY220 da Shimadzu.

O fracionamento cromatográfico em coluna foi feito usando gel de sílica (0,060-0,200 mm) da Acros Organics e Sephadex LH-20 da Sigma. As placas para cromatografia em camada delgada foram preparadas por aplicação manual da suspensão de gel de sílica 60 G (Fluka) em água destilada (1:2) sobre lâminas de vidro (9,5 x 5,9 cm) e a ativação foi realizada a 110 °C por 1h em estufa EL-1.3 da Odontobras.

As substâncias foram reveladas nas cromatoplasmas por nebulização com solução de sulfato cérico, preparada por dissolução de 2,1 g de sulfato cérico ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) da Vetec em 15 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) da Chemco e posteriormente diluído com 800 mL de água destilada, seguida de aquecimento em placa aquecedora 509T da Fisaton.

As medidas de absorção molecular foram feitas utilizando espectrofotômetro UV-Vis PerkinElmer (Lambda 25) e cubetas de quartz com 1,0 cm de caminho ótico.

As análises por HPLC foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu® equipado com bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector de arranjo de fotodiodo SPD-M20A, forno para coluna CTO-20A, pré-coluna C18 Shim-pack 6-SIL, coluna C-18Shim-pack VP-ODS (250 x 4,6 mm, partícula de 5,0 μm).

2.2 Material Vegetal

As folhas e galhos de *M. acutifolium* foram coletados em março de 2017, no município de Jatobá do Piauí, nas coordenadas S 04° 51 006" e W 42° 05 057", a 90 m de altitude. A Carvalho, A. A.

espécie foi identificada pela bióloga Dra. Ruth Raquel Soares de Farias e a exsicata foi depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí-UFPI, na cidade de Teresina com o número de registro TEPB 31568 e cadastro de acesso SisGen nº AAB530D.

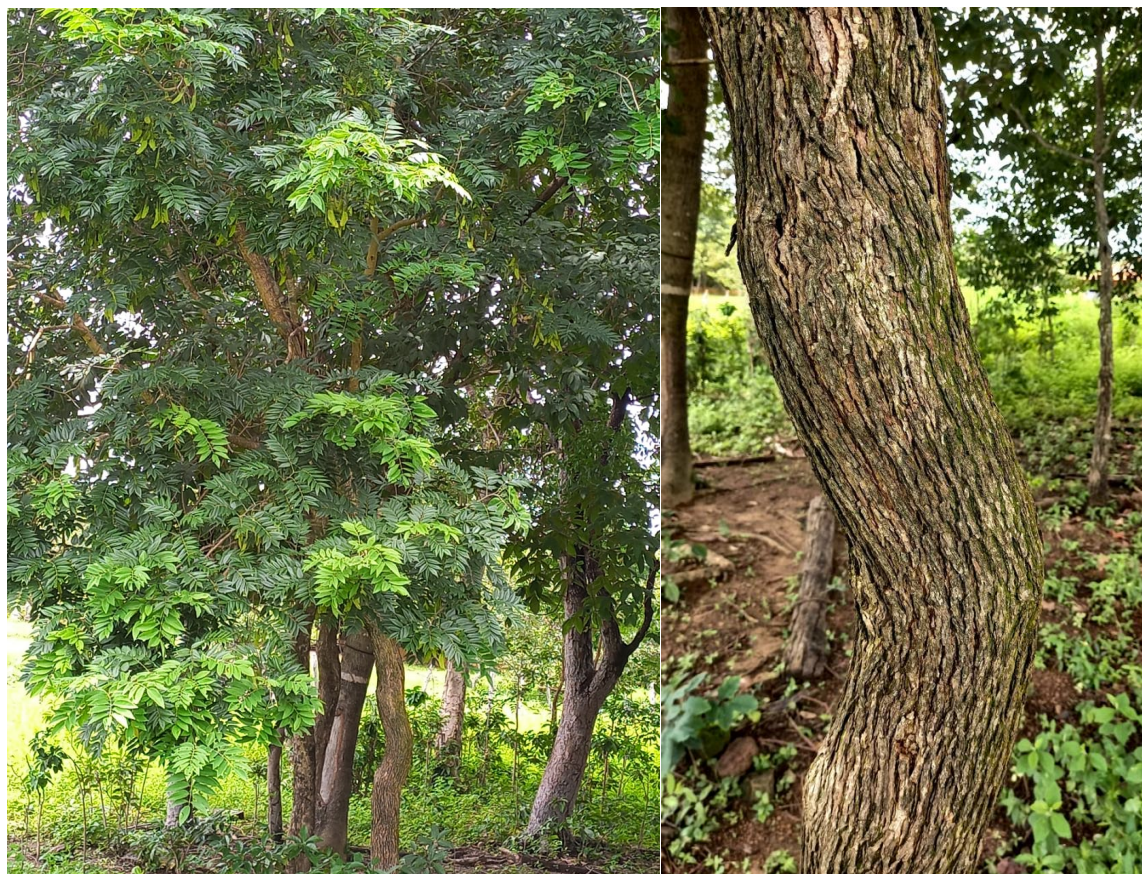


Figura 1 - Folhas, galhos e tronco da espécie *M. acutifolium*

Fotos: Farias, R. R. S

2.3 Preparação e análise dos extratos

O material vegetal (folhas e galhos) foi seco à temperatura ambiente e moído em moinho de facas, obtendo-se 1,4 kg do pó das folhas e 2,0 kg dos galhos. Estes foram submetidos separadamente à maceração exaustiva (6 vezes por 72 horas) com etanol (95%). As soluções dos extratos foram concentradas em evaporador rotativo à pressão reduzida e a água residual removida por liofilização, fornecendo os extratos etanólico das folhas (EEF_{Ma}, 74,4 g, 5,3%) e galhos (EEG_{Ma}, 41,7 g, 2,1%).

Os extratos das folhas e galhos foram dissolvidos em metanol (10 mg mL⁻¹) e analisados em cromatografia em camada delgada. Aliquotas de 30 µL das soluções foram aplicadas em placas cromatográficas e as substâncias eluídas em três sistemas de solventes: hexano/AcOEt

(8:2), $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1), $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5). A revelação das cromatoplasmas foi feita por pulverização com solução de sulfato cérico.

Os extratos também foram submetidos a um pré-tratamento (*clean up*) em cartucho de extração em fase sólida (SPE) Strata™ C18-E (1000 mg/6 mL, 55 μm , 70Å) da Phenomenex, filtrados em membrana filtrante da Phenomenex (30 mm e poro 0,45 μm) e analisados em HPLC-DAD equipado com coluna C-18 (Shim-pack VP-ODS, 250 x 4,6 mm, 5,0 μm), como fase móvel $\text{H}_2\text{O}-\text{AcOH}$ (0,2% v/v) (Solvente A) e MeOH (Solvente B) na seguinte programação: gradiente, 0-40 min (5-100% MeOH), 40-50 min (100% MeOH), vazão 1,0 mL min^{-1} . Para análise por espectrofotometria na região do UV-Vis foram preparadas solução estoque em metanol de cada extrato na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os espectros das amostras foram obtidos por varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm, usando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico.

2.4 Fracionamento preliminar dos extratos

Uma alíquota de 64 g do extrato etanólico das folhas (EEFMa) foi suspensa em 1,2 L de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:2, v/v) e submetida a partição, resultando nas frações hexânica (FHFMa, 33,5 g, 52,3%), acetato de etila (FAEFMa, 5 g, 7,8%) e aquosa (FAFMa, 25,5 g, 39,8%).

O extrato etanólico dos galhos (EEGMa, 31,0 g) foi submetido à cromatografia em coluna filtrante de gel de sílica (33 x 5,5 cm; 148 g), utilizando diferentes eluentes, em ordem crescente de polaridade, fornecendo as frações hexânica (FHGMa, 0,5 g), clorofórmica (FCGMa, 3,7 g), acetato de etila (FAEGMa, 3,8 g), metanólica (FMGMa, 22,0 g) e metanol-água (FMAGMa, 1,0 g).

2.5 Atividades biológicas dos extratos etanólico das folhas e galhos de *M. acutifolium*

2.5.1 Ensaio com DPPH

A avaliação da atividade antioxidante (AA) do extrato etanólico e frações acetato de etila e aquosa das folhas, extrato etanólico, frações clorofórmica, acetato de etila, metanólica e metanol-água dos galhos foi feita pelo método espectrofotométrico baseado no sequestro do radical livre DPPH (SOUSA et al., 2007). Uma solução estoque de DPPH, com concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada e mantida sob refrigeração e protegida da luz. Para o controle positivo foi utilizado o ácido gálico, o flavonoide rutina e o composto sintético butilhidroxitolueno (BHT). As soluções das amostras foram preparadas dissolvendo 12,5 mg de cada extrato ou fração em metanol, obtendo soluções estoques a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ que foram diluídas nas concentrações de 200, 150, 100, 50 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra e 2,7 mL da solução estoque de DPPH, na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), foram feitas a 516 nm, em triplicata, no 1º, 5º e 10º minuto de análise, a cada 10 min até completar 30 min. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução metanólica do extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco.

A equação da curva analítica empregada para determinar a concentração do DPPH foi $A = 33,227c + 1,0607$, com coeficiente de correlação linear $R = 0,9997$, onde “c” equivale à concentração do DPPH no meio reacional e “A” é a absorbância obtida no comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) de 516 nm. A partir da equação da curva analítica do DPPH e dos valores de absorbância no tempo de 30 min para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (%DPPHrem) e a porcentagem de AA.

O percentual de atividade antioxidante (%AA) dos extratos foi determinado a partir dos valores de absorbância das amostras medidos nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no tempo de 30 minutos, utilizando a Equação 1. onde: Abs_{DPPH} é a absorbância inicial da solução de DPPH, $Abs_{amostra}$ é a absorbância da mistura reacional e Abs_{branco} é a absorbância do branco.

$$\%AA = \frac{[Abs_{DPPH} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})]}{Abs_{DPPH}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Para a determinação do percentual de DPPH remanescente ou residual (%DPPHrem) empregou-se a Equação 2.

$$\%DPPHrem = \frac{DPPH_{t=30}}{DPPH_{t=0}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

A concentração eficiente do extrato capaz de reduzir a concentração do radical livre DPPH em 50% (CE_{50}), em $\mu\text{g mL}^{-1}$ também foi determinada a partir da curva exponencial de primeira ordem do %DPPHrem versus as concentrações da amostra (SOUSA et al, 2007).

2.5.2 Ensaio com ABTS

O cátion radical $ABTS^{\bullet+}$, de coloração azul esverdeado, foi obtido através da reação que se estende de 12-16 horas, na ausência de luz e em temperatura ambiente, entre a solução aquosa de persulfato de potássio (2,45 mmol L^{-1}) e a solução aquosa do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico (ABTS) com concentração de 7 mmol L^{-1} . Após transcorrido o tempo, a solução de $ABTS^{\bullet+}$ (estável por dois dias) foi diluída com água destilada até atingir a absorbância $0,70 \pm 0,05$ em 734 nm (CARVALHO et al., 2018; RUFINO et al., 2007). Transferiu-se uma alíquota de 30 μL da amostra para um tubo de ensaio contendo 3 mL da

solução de ABTS•+, no sexto minuto de agitação da mistura reacional em vortex, fez-se a leitura da absorbância que deve estar no intervalo de 20 a 80% da absorbância inicial do cátion radical ABTS•+ ($0,7 \pm 0,05$), portanto entre 0,14 e 0,56 respectivamente, tendo 0,7 de absorbância como 100% (CARVALHO et al., 2018). O procedimento descrito foi repetido usando 30 μL dos controles positivos: flavonoide rutina e o composto sintético butilhidroxitolueno (BHT). Foram testadas pelo menos quatro diferentes concentrações, em triplicata, da mesma amostra para obter, por meio de regressão linear, uma equação da amostra (EA) de ordem 1 ($y = -ax + b$), que descreve o decaimento da absorbância do cátion radical em solução para cada amostra analisada, onde “y” é a absorbância, “a” o coeficiente angular da reta, “x” a concentração em mg L^{-1} da amostra analisada e “b” o valor em que a reta cruza o eixo das ordenadas.

Os resultados da atividade antioxidante das amostras são revelados por meio da equivalência em mmol de trolox por grama de amostra analisada (AAET g^{-1}). Utilizando o mesmo procedimento aplicado para as amostras foi obtida uma equação construída para o padrão trolox (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mmol L^{-1}), ao reagir com o ABTS•+ e monitorado o decaimento da absorbância a 734 nm, em 6 minuto de reação. A equação do trolox (ET) foi $A = 0,6816 - 0,2849C$ com coeficiente de correlação ($R = 0,9991$), onde “A” é a absorbância e “C” a concentração do trolox em mmol L^{-1} . A equação geral que descreve a atividade antioxidante pelo método do ABTS é $AA_{ABTS} = 103 a / (b - 0,3967)$ e foi obtida por interpolação das equações EA e ET, onde “ AA_{ABTS} ” é a atividade antioxidante equivalente em mmol de trolox por grama de amostra; 0,3967 é a absorbância remanescente (A) do ABTS obtida da equação do trolox quando a concentração deste padrão é 1 mmol L^{-1} ; “a” é o valor absoluto do coeficiente angular e “b” é valor em que a reta cruza o eixo das ordenadas, ambos obtidos na equação da amostra em análise.

2.5.3 Determinação de Fenóis Totais

O teor de fenóis totais (FT) dos extratos e das frações foi determinado por espectrometria na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu como descrito por Sousa et al. (2007), sendo as análises realizadas em triplicata. Soluções aquosa de carbonato de sódio 15% e metanólica dos extratos e frações das folhas, na concentração de 1,0 mg L^{-1} , foram preparadas e reservadas. A uma alíquota de 100 μL da solução das amostras foi adicionado 500 μL do reagente Folin-Ciocalteu, seguido de 5,0 mL de água destilada e agitou-se por um minuto. Em seguida adicionou-se à mistura reacional, 2,0 mL da solução de carbonato de sódio 15% agitando-se por 30 segundos, completou-se o volume de 10 mL com água destilada, deixou-se reagir por duas horas, e fez-se a leitura da absorbância, no comprimento de onda de 750 nm.

Para o branco realizou-se o mesmo procedimento substituindo-se a solução do extrato ou fração por 100 μL de metanol.

A determinação dos teores de FT foi feita por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com padrão de ácido gálico (10 a 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e expressa por $A = 0,1185c - 0,0453$, com coeficiente de correlação linear igual a 0,999, onde “*c*” é a concentração do ácido gálico e “*A*” é absorbância. O teor de FT foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG g^{-1}).

2.5.4 Determinação de Flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais (FLAT) dos extratos etanólico das folhas e galhos foi determinado por espectrometria na região do visível utilizando o método colorimétrico, baseado na reação de redução dos constituintes flavonoídicos na presença de cloreto de alumínio (FERREIRA et al., 2014).

Soluções metanólicas de piridina (20%), cloreto de alumínio (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e dos extratos, na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram preparadas e reservadas. Uma alíquota de 300 μL da solução dos extratos foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, em seguida adicionou-se 240 μL de ácido acético glacial, 4,0 mL de solução de piridina (20%) e 1,0 mL da solução de cloreto de alumínio. Completou-se o volume com água destilada, deixou-se reagir por trinta minutos e fez-se a leitura da absorbância, no comprimento de onda de 420 nm. Para o branco realizou-se o mesmo procedimento substituindo-se a solução do extrato por 300 μL de metanol.

A determinação dos teores de FLAT foi realizada por meio da interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com o padrão rutina dissolvida em MeOH/H₂O (7:3) nas concentrações de 3,0 a 21 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A curva analítica é expressa por $A = 0,02618c - 0,00717$, onde “*A*” é a absorbância da amostra e “*c*” a concentração da rutina, com um coeficiente de correlação linear igual a 0,999. As análises foram realizadas em triplicata e o teor FLAT expressos como miligramas de equivalente de rutina por grama de extrato (mg de ER g^{-1} de extrato).

2.5.5 Fator de proteção solar

A determinação do fator de proteção solar (FPS) nos extratos etanólico das folhas e galhos foram avaliados segundo metodologia descrita por Almeida et al. (2019). Nesta metodologia as soluções contendo os extratos foram preparadas nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg mL^{-1} , em etanol. As absorbâncias dos extratos foram determinadas em um espectrofotômetro (UV-Vis da PerkinElmer, modelo Lambda 25) nos comprimentos de onda

de 200 a 400 nm, utilizando cubetas de quartzo. Em seguida, foram substituídos os valores de absorvância obtidos, na equação adaptada por Mansur et al. (1986) (Equação 3), que relaciona produto entre o efeito eritematogênico (EE) e a intensidade da radiação (I) (Tabela 1). Os testes foram realizados em triplicatas (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013). O FPS das amostras foi determinado usando a equação adaptada por Mansur et al. (1986) (Equação 3).

$$\text{FPS} = \text{FC} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda) \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

FC = fator de correção igual a 10;

EE(λ) = efeito eritematogênico da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

I(λ) = intensidade da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

Abs(λ) = leitura da absorvância obtida da amostra em cada comprimento de onda (λ).

Tabela 1 - Ponderação empregada no cálculo do fator de proteção solar por espectrofotometria (SAYRE *et al.*, 1979).

Comprimento de onda (nm)	EE x I (normalizado) Valores relativos
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

2.5.6 Atividade anticolinesterásica

A detecção da inibição qualitativa da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi realizada com os extratos etanólico das folhas e galhos dissolvidos em metanol para se obter uma concentração de 10 mg mL⁻¹. Alíquotas de 2,5 μ L de cada amostra foram aplicadas em placa cromatográfica de gel de sílica, eluída em clorofórmio-metanol (9:1). Após o desenvolvimento da amostra a atividade inibitória foi detectada utilizando revelador baseado no método de Ellman (ELLMAN, et al., 1961) e modificado por Rhee et al. (2001). A placa foi pulverizada com 1 mM DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico) e 1 mM ATCI (iodeto de acetiltiocolina) em tampão A (50 mM Tris -HCl, pH 8). Depois de seca por 3-5 minutos pulverizou-se a placa com 5 units mL⁻¹ da enzima. O teste positivo foi observado na cromatoplaça que se apresentou amarela com manchas brancas depois de 5 minutos, indicativo de inibição. O padrão de

comparação utilizado foi a cafeína (ELLMAN, et al., 1961; INGKANINAN et al., 2003; RHEE et al.; 2001). Estas atividades foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental (LAPNNEX - UFPI) sob a supervisão do Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa.

2.5.7 Atividade Larvicida

O extrato etanólico, frações acetato de etila e aquosa das folhas, extrato etanólico, frações acetato de etila e metanólica dos galhos e os flavonoides robinina e astrasikokiosideo I obtidos do extrato etanólico das folhas foram testados quanto o potencial larvicida. Foram utilizadas larvas de terceiro e quarto estágio de *Aedes aegypti*, adquiridas no Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária, a $28\pm 1^\circ\text{C}$ e 70 ± 10 UR (LAPES-UFPI), de acordo com o método preconizado pela Organização Mundial da Saúde, com pequenas alterações (OMS, 2005). Os insetos adultos foram nutridos com solução açucarada concentrada e as fêmeas realizaram o repasto sanguíneo em camundongos *swiss* adultos semanalmente (obtidos do biotério central por meio da aprovação do processo nº 500/18 pelo comitê de ética animal da UFPI). No estágio larval, as larvas foram alimentadas com ração de peixe triturada.

As amostras foram adicionadas em ambientes contendo larvas de *A. aegypti* nas concentrações de 333,3, 166,7, 83,3 e 41,67 ppm em solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% (v/v) diretamente em tubos *falcon* de 15 mL sem tampa com o intuito de verificar a eficiência de mortalidade. Em cada tubo foram inseridas 10 larvas de *A. aegypti*. A avaliação da mortalidade foi verificada em 24h e 48h após a realização do ensaio (ABBOTT, 1925). O controle negativo consistiu em 5 mL de uma solução de DMSO a 1% (v/v). Os ensaios foram realizados em triplicata no Departamento de Parasitologia e Microbiologia - UFPI sob a supervisão do Profa. Dra. Veruska Cavalcanti Barros.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil metabolômico dos extratos

Os extratos etanólico das folhas e galhos ao serem analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) mostraram perfis cromatográficos distintos (Figura 2). No eluente hexano/AcOEt (8:2) os dois extratos apresentaram manchas de coloração roxas, róseas e alaranjadas, no entanto, com fatores de retenção diferentes, indicativas de compostos de natureza isoprênica, sobretudo o EEFMa (CARVALHO et al., 2019a; CHAVES, 1997). A cromatoplaça desenvolvida no sistema de solvente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5), sugeriu a ocorrência de compostos pertencentes a classe dos flavonoides, evidenciada pela presença de manchas amarelas, principalmente para o EEFMa (CARVALHO et al., 2019b; CHAVES, 1997).

A análise por HPLC-DAD confirmou que os extratos apresentam perfis distintos com picos cromatográficos com diferentes intensidades e tempos de retenção (Figura 3). No entanto, os dois extratos apresentaram picos cromatográficos com espectros de absorção molecular mostrando máximo de absorções nas regiões de 240 a 280 e 300 a 380 nm, características dos sistemas benzoila e cinamoila em flavonoides (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

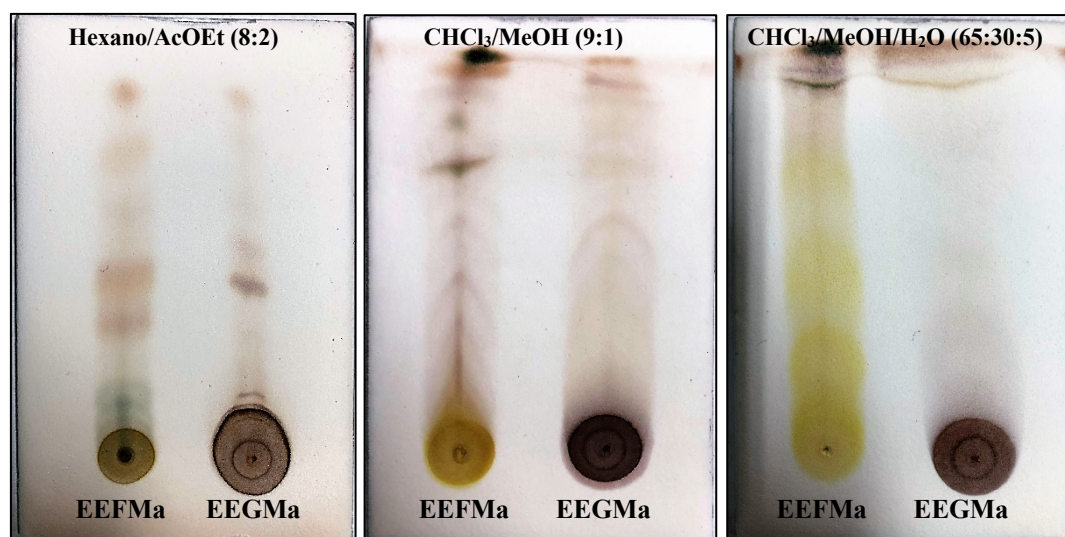


Figura 2 - Cromatoplaças dos extratos etanólico das folhas (EEFMa) e galhos (EEGMa). Revelador: solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$.

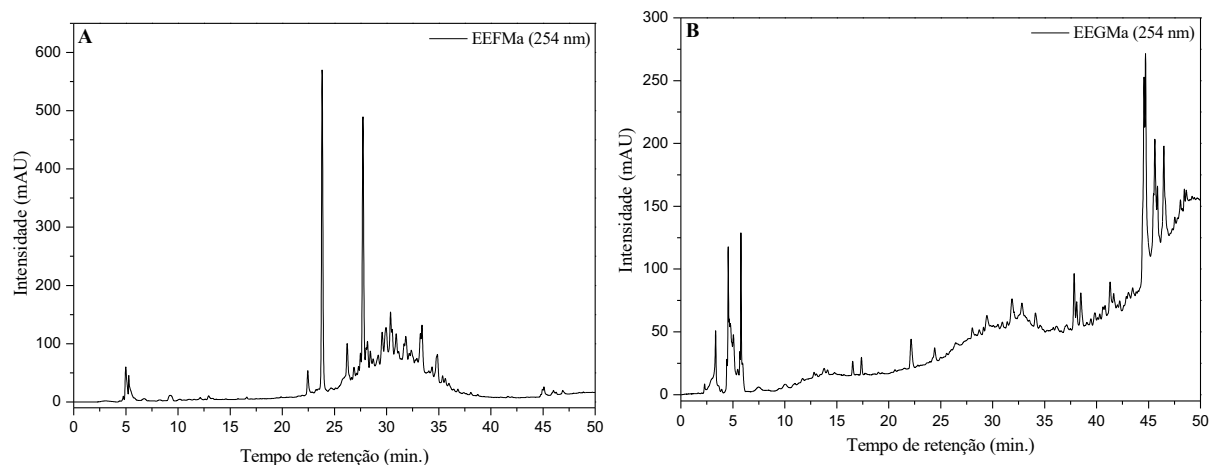


Figura 3 - Cromatogramas dos extratos etanólico das folhas (A) e galhos (B). Fase Móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%, v/v), gradiente: 0-40 min (5-100% MeOH), 40-50 min (100% MeOH), vazão 1,0 mL min⁻¹ e coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm).

3.1 Potencial antirradicalar

O EEGMa apresentou ação sequestradora de radicais livres superior ao EEFMa e ao controle positivo BHT, no entanto, foi menos ativo que a rutina e ácido gálico, como mostram os valores de percentual de atividade sequestradora de radicais livres e CE₅₀ obtidos no ensaio com o DPPH. No método de sequestro do cátion radical ABTS o EEGMa foi mais ativo que o EEFMa e os controles positivos (Tabela 2).

Os teores de fenóis totais (FT) apresentaram correlação positiva com a atividade antioxidante. O EEFMa mostrou elevado teor de flavonoides totais quando comparado com EEGMa (Tabela 2). Estes resultados são concordantes com o perfil químico dos extratos que indicou a presença de flavonoides. A disponibilidade de hidroxilas livres limita a capacidade redutora destes constituintes e pode justificar o menor teor de fenóis totais para o EEFMa. Para EEGMa espera-se a presença de taninos, além de flavonoides livres e/ou com poucas unidades de açúcares, explicando o teor elevado de fenóis totais e o baixo conteúdo de flavonoides totais, quando comparado ao EEFMa.

Tabela 2 - Fenóis totais (FT), flavonoides totais (FLAT), atividade sequestradora de radicais livres (DPPH, CE₅₀ e ABTS) dos extratos etanólico das folhas (EEFMa) e galhos (EEGMa).

Amostra	FT	FLAT	DPPH*		ABTS ⁺
	mg EAG g ⁻¹ de amostra±DP	mg ER g ⁻¹ da amostra±DP	AA%±DP	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)	mM AAET g ⁻¹ da amostra±DP
EEFMa	138,42±6,82	386,33±0,78	26,91±0,95	nd	1,18±0,16
EEGMa	359,96±11,91	66,25±2,94	94,06±0,72	56,76±1,54	4,37±0,21
BHT	nt	nt	89,88±0,83	69,34±5,53	2,49±0,12
Rutina	nt	nt	94,14±0,22	47,06±4,65	1,34±0,4
Ác. gálico	nt	nt	93,14±0,31	13,37±1,37	nt

EAG: equivalente de ácido gálico; ER: equivalente de rutina; DP: desvio padrão; AA%: percentual de atividade antioxidante; AAET: atividade antioxidante equivalente ao trolox; nt: não testado; nd: não determinado; CE₅₀: concentração eficiente. *concentração da amostra: 250 µg mL⁻¹ com 30 min. de reação.

Os extratos etanólico das folhas e galhos apresentaram significativa atividade antirradicalar. Esta atividade foi relatada para outras espécies do gênero *Machaerium*, como por exemplo, para extrato etanólico das folhas de *M. villosum* (SANTOS et al., 2009) e *M. floribundum* (DÍAZ et al., 2011). Os extratos destas espécies mostraram elevada atividade antioxidante no ensaio com o DPPH.

As frações oriundas da partição do extrato etanólico das folhas e da coluna filtrante do extrato etanólico dos galhos, foram submetidas a avaliação da atividade sequestradora de radicais livres e fenóis totais (Tabela 3).

Os resultados de FT e AA das frações foram consistentes com os resultados obtidos para os extratos brutos de *M. acutifolium* (Tabela 2). A FMGMA oriunda do fracionamento do extrato etanólico dos galhos apresentou o maior teor de fenóis totais e o maior percentual de ação antioxidante, indicando que as substâncias com potencial antirradicalar do extrato ficaram concentradas nesta fração. As frações oriundas do extrato etanólico das folhas apresentaram baixos valores de FT e AA, consistente com o obtido para o EEFMa (Tabela 2).

Tabela 3 - Fenóis totais (FT) e atividade sequestradora de radicais livres (DPPH e CE₅₀) das frações dos extratos etanólico das folhas (EEFMa) e galhos (EEGMa).

Amostra	FT	DPPH ⁺	CE ₅₀
	mg EAG g ⁻¹ de amostra±DP	AA%±DP	µg mL ⁻¹
FHFMa	74,96±3,13	21,16±0,35	1269,5±17,87
FAEFMa	185,36±7,01	40,62±1,14	409,37±111,30
FAFMa	151,70±9,44	28,37±0,94	655,63±143,17
FCGMa	41,02±1,36	19,84±0,94	nd
FAEGMa	167,22±4,80	73,35±1,68	154,89±1,37
FMGMa	336,24±3,57	93,99±0,55	39,25±1,75
FMAGMa	27,07±0,20	40,43±2,01	nd
BHT	nt	89,88±0,83	69,34±5,53
Rutina	nt	94,14±0,22	47,06±4,65
Ác. gálico	nt	93,14±0,31	13,37±1,65

FHFMa: Fração Hexânica das Folhas; FAEFMa: Fração Acetato de Etila das Folhas; FAFMa: Fração Aquosa das Folhas; FCGMa: Fração Clorofórmica dos Galhos; FAEGMa: Fração Acetato de Etila dos Galhos; FMGMa: Fração Metanólica dos Galhos; FMAGMa: Fração Metanol-Água dos Galhos; EAG: equivalente de ácido gálico; ER: equivalente de rutina; DP: desvio padrão; AA%: percentual de atividade antioxidante; AAET: atividade antioxidante equivalente ao trolox; nt: não testado; nd: não determinado; CE₅₀: concentração eficiente. *concentração da amostra: 250 µg mL⁻¹ com 30 min. de reação.

3.2 Fator de proteção solar

O fator de proteção solar (FPS) dos extratos mostrou-se dependente da concentração, o EEFMa (FPS=8,2±0,3) foi mais ativo que o EEGMa (FPS=4,5±0,2) e o controle positivo benzofenona (FPS=2,2±0,1), na maior concentração testada, 100 µg mL⁻¹ (Figura 4). Segundo Violante et al. (2009), uma espécie com potencial fotoprotetor deve possuir valores de FPS≥2.

O elevado potencial fotoprotetor do EEFMa pode ser atribuído a presença dos flavonoides, uma vez que estes compostos além de antioxidantes, também são reconhecidos como fotoprotetores (SOUZA et al., 2005). Não há relato de atividade fotoprotetora para outras espécies do gênero *Machaerium* na literatura.

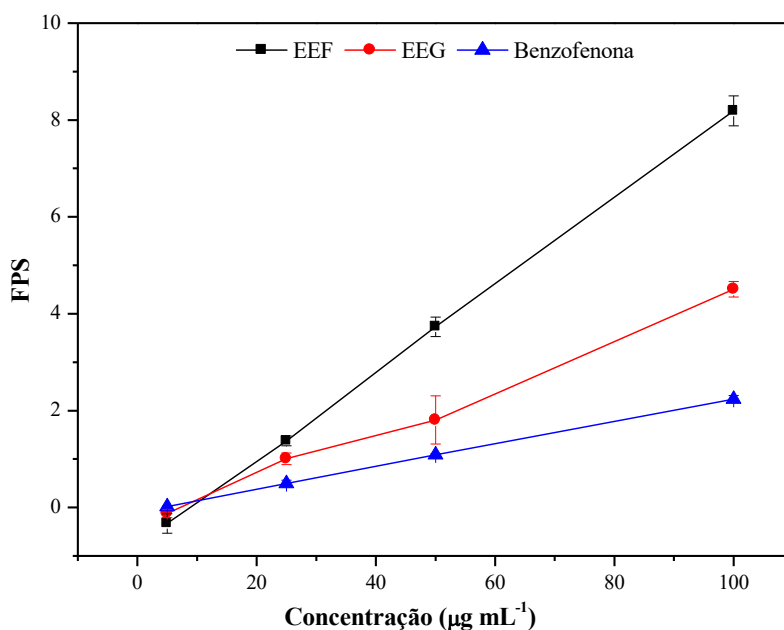


Figura 4 - Fator de proteção solar (FPS) dos extratos etanólico das folhas (EEF_{Ma}) e galhos (EEG_{Ma}).

3.3 Atividade anticolinesterásica

A cromatoplaça com o extrato etanólico dos galhos apresentou uma mancha branca discreta sob fundo amarelo, no ponto de aplicação, depois de revelada com o reagente de Ellman, sugerindo resultado positivo da inibição da enzima acetilcolinesterase (INGKANINAN et al., 2003). No entanto, não apresentou resultado positivo para o extrato etanólico das folhas. Não há relato de atividade anticolinesterásica para outras espécies do gênero *Machaerium* na literatura.

3.4 Atividade Larvicida

O extrato etanólico e frações acetato de etila e aquosa das folhas, extrato etanólico, frações acetato de etila, metanólica dos galhos e os flavonoides robinina (**23**) e astrasikokiosideo I (**24**) obtidos do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium* não apresentaram toxicidade frente a larvas *Aedes aegypti* nas condições testadas.

Um estudo recente realizado por Melo et al. (2021), com troncos coletados em 2014, em Lagoa do Sítio, sul do estado do Piauí, mostrou que o extrato acetato de etila do tronco de *M. acutifolium* possui atividade larvicida. O estudo revelou ainda a presença de um indeno inédito com elevado potencial larvicida. Dois flavonoides: (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-dihidro-3-(2'-hidroxi-3',4'-dimetoxifenil) e (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-dihidro-3-(2'-hidroxi-3',4'-

dimetoxifenil)-8-metoxi e um *trans*-estilbeno isolados neste estudo também tiveram sua ação larvicida avaliada, mas foram considerados inativos.

A ausência de potencial larvicida demonstrada em nosso estudo pode ser explicada pela diferença na composição química observada entre os extratos etanólico das folhas e galhos e o extrato acetato de etila do tronco de *M. acutifolium*. Embora as plantas tenham sido coletadas no estado do Piauí, foram em regiões distintas, sendo uma ao norte e a outra ao sul, com distância de 300 km entre elas.

CONCLUSÃO

O perfil metabolômico dos extratos, obtidos por CCD, HPLC-DAD e UV-Vis, sugeriram a presença de compostos de natureza isoprênica, além de flavonoides. A investigação do potencial biológico dos extratos etanólico das folhas e galhos de *M. acutifolium* revelou que o EEGMa possui ação sequestradora de radicais livres superior ao EEFMa e ao controle positivo BHT, no entanto, foi menos ativo que a rutina e ácido gálico, no ensaio com o DPPH. O ensaio com ABTS mostrou que o EEGMa foi mais ativo que o EEFMa e que os controles positivos. Os teores de fenóis totais apresentaram correlação positiva com a atividade antioxidante, nos ensaios com DPPH e ABTS.

O EEFMa mostrou elevado teor de flavonoides totais quando comparado com EEGMa. O fator de proteção solar do EEFMa foi mais ativo que o EEGMa e o controle positivo benzofenona. O EEGMa apresentou indicativo de atividade inibidora da acetilcolinesterase, enquanto EEFMa não se mostrou ativo. O EEFMa e frações acetato de etila e aquosa das folhas, EEGMa, frações acetato de etila, metanólica dos galhos e os flavonoides robinina (**23**) e astrasikokiosideo I (**24**) obtidos do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium* não apresentaram toxicidade frente a larvas *Aedes aegypti* nas condições testadas.

Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento do perfil metabolômico e biológico das folhas e galhos da espécie *M. acutifolium*.

REFERÊNCIAS

- AMEN, Y. M.; MARZOUK, A. M.; ZAGHLOUL, M. G.; AFIFI, M. S. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. **Natural Product Research**, v. 29, n. 15, p. 1388-1405, 2015.
- ABBOTT, W. S. A method for computing the effectiveness of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, Maryland, v.18, n.15, p.265-267, 1925.
- ALMEIDA, W. A. S.; ANTUNES, A. S.; PENIDO, R. G.; CORREA, H. S. G.; NASCIMENTO, A. M.; ANDRADE, A. L.; SANTOS, V. R.; CAZATI, T.; AMPARO, T. R.; SOUZA, G. H. B.; FREITAS, K. M.; SANTOS, O. D. H.; SOUSA, L. R. D.; SANTOS, V. M. R. Photoprotective activity and increase of SPF in sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 373–380, 2019.
- BARROS, J. S.; FARIAS, R. R. S.; CASTRO, A. A. J. F. Compartimentação geoambiental no complexo de Campo Maior, Piauí: caracterização de mosaico de ecótonos. **Biodiversidade e Ecótonos da Região Setentrional do Piauí**, Teresina, v. 5, p. 25-43, 2010.
- BENTO, C. C.; TANGERINA, M. M. P.; ZANATTA, A. C.; SARTORI, A. L. B.; FRANCO, D. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; ALMEIDA, L. F. R.; SANNOMIYA, M. Chemical constituents and allelopathic activity of *Machaerium eriocarpum* Benth. **Natural Product Research**. v. 34, n. 6, p. 884-888, 2018.
- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; FREITAS, J. S.; CHAVES, M. H. Isoflavonoides da tribo Dalbergieae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília Papilionoideae. **Química Nova**, v. 43, n. 9, p. 1294-1311, 2020.
- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H. Tocoferóis e isoprenoides do extrato hexânico das folhas de *Bauhinia pulchella*. In: Freitas, J. C. R.; Ladjane Pereira da Silva Rufino de Freitas, L. P. S. R. (orgs.). **Atividades de ensino e de pesquisa em química**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 252-264.
- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; SOUSA, R. P.; FREITAS, J. S.; ARAÚJO, B. Q.; CHAVES, M. H. Identificação de flavonoides das folhas de *Machaerium acutifolium* (Papilionoideae - Fabaceae) por Espectrometria de Massas. In: Freitas, R. M. (org.). **Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 2**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019b. p. 118-129.
- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; FARIAS, R. R. S.; CHAVES, M. H.; FEITOSA, C. M.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; ARAÚJO, M. R. S.; FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C. O. Phenolic derivatives and antioxidant activity of polar extracts from *Bauhinia pulchella*. **Química Nova**, v. 41, n. 4, p. 405-411, 2018.
- CEPRO. Diagnóstico das Condições Ambientais do Estado Piauí. Teresina, 1996.
- CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina “Química orgânica”. **Química Nova**, v. 20, n.5, p. 560-562, 1997.

DÍAZ, L.; MONTIJO, S.; MEDINA, A. L.; MELÉNDEZ, P.; LAURENCE, V.; MARTI-MESTRES, G. Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. **Revista Peruana de Biología**, v. 18, n. 2, p. 153-158, 2011.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D. K.; ANDRES, V. JR.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FARIAS, R. R. S.; CASTRO, A. A. J. F. Fitossociologia de trechos da vegetação do Complexo de Campo Maior, Campo Maior, PI, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 4, p. 949-963, 2004.

FERREIRA, J. J. S.; OLIVEIRA, A. C. S.; QUEIROZ, R. T.; SILVA, J. S. A tribo Dalbergieae s.l. (Leguminosae-Papilionoideae) no município de Caetité, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, 70, e03502017, 2019.

FERREIRA, E. L. F.; MASCARENHAS, T. S.; OLIVEIRA, J. P. C.; CHAVES, M. H.; ARAUJO, B. Q.; CAVALHEIRO, A. B. Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythis pisonis* Camb. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 8, p. 353-360, 2014.

INGKANINAN, K. TEMKITTHAMWON, P. CHUENCHOM, K. YUYAEM, T. THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 261-264, 2003.

LAVIN, M.; PENNINGTON, R. T.; KLITGAARD, B. B.; SPRENT, J. I.; LIMA, H. C.; GASSON, P. E. The Dalbergioid legumes (Fabaceae): delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 503-533, 2001.

LORENZI, H. **Arvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arboreas do Brasil**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998, v.2.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Springer-Verlag: New York, 1970.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.

MELO, S. J.; SOUSA, J. P. B.; SÁ, M. G.; MORAIS, L. S.; MAGALHÃES, N. M. G.; GOUVEIA, F. N.; ALBERNAZ, L. C.; ESPINDOLA, L. S. *Machaerium acutifolium* compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 77, n. 33, p. 1444-1451, 2021.

OLIVEIRA JUNIOR, R. G.; ARAÚJO, C. S.; SOUZA, G. R.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; LIMA-SARAIVA, S. R. G.; MORAIS, A. C. S.; DOS SANTOS, J. S. R.; ALMEIDA, J. R. G. S. *In vitro* antioxidant and photoprotective activities of dried extracts

from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 1, p. 122-127, 2013.

OLLIS, W. D.; BRIAN, T.; REDMAN, B. T.; SUTHERLANDT, I. O.; GOTTLIEB, O. R.; Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1379-1381, 1978.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicidas. World health organization Communicable disease control, prevention and eradication WHO pesticide evaluation scheme**. WHO, Geneva, Switzerland, 2005.

POLIDO, C. A.; SARTORI, A. L. B. O gênero *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergieae) no pantanal brasileiro. **Rodriguésia**, v. 58, n. 2, p. 313-329, 2007.

RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n. 1/2, p. 217-223, 2001.

RIBEIRO, D. L.; CILIÃO, H. L.; SPECIAN, A. F.; SERPELONI, J. M.; SOUZA, M. F.; TANGERINA, M. M.; VILEGAS, W.; BOLDRIN, P. K.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; SANNOMIYA, M.; CÓLUS, I. M. Chemical and biological characterisation of *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld: absence of cytotoxicity and mutagenicity and possible chemopreventive potential. **Mutagenesis**, v. 31, n. 2, p. 147-160, 2016.

ROSA, P. A. L.; ALVES, M. C.; VIDEIRA, L. M. L.; BONINI, C. B. S. Recuperação de um solo de cerrado após 19 anos: ocorrência espontânea de espécies arbóreas. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 1, n. 1, p. 44-57, 2014.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado Técnico 128**, 2007

SANTOS, A. B.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, L. A.; SCHMIDTC, T. M.; BAFFAD, O. Antioxidant properties of plant extracts: an EPR and DFT comparative study of the reaction with DPPH, TEMPOL and Spin Trap DMPO. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p. 1483-1492, 2009.

SAYRE, R. M; AGIN, P. P; LEVEE, G. J; MARLOWE, E. Performance of Six Sunscreen Formulations on Human Skin: A Comparison. **Photochem Photobiol**, v.115, p.46-49, 1979.

SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; AYRES, C. C.; COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, T. M.; SANTOS, L. E.; MOREIRA, R. R. D.; RANGEL, V. L. B. I. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 36-38, 2005.

Capítulo 3

**Estudo fitoquímico e desreplicação do extrato etanólico das folhas
de *Machaerium acutifolium* Vogel**

ESTUDO FITOQUÍMICO E DESREPLICAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Machaerium acutifolium* VOGEL

RESUMO

Machaerium acutifolium Vogel (Fabaceae-Papilionoideae), sin. *M. muticum* Benth, é conhecida popularmente por jacarandá do campo e jacarandá bico de pato. As folhas de *M. acutifolium* foram submetidos a maceração com etanol, fornecendo o extrato etanólico das folhas (EEFMa). O EEFMa foi submetido a partição e forneceu as frações hexânica (FHFMa), acetato de etila (FAEFMa) e aquosa (FAFMa). O fracionamento de FHFMa forneceu o α -tocoferol (**1**), os esteroides: colesterol (**2**), campesterol (**3**), sitosterol (**4**), estigmasterol (**5**) e os triterpenoides lupeol (**6**), os isômeros *E/Z* do 3-*O-p*-cumaroil- β -amirina (**7** e **8**), 3-*O-p*-cumaroilgermanicol (**9** e **10**) e 3-*O-p*-cumaroillupeol (**11** e **12**). A FAEFMa, após desreplicação por inserção direta em espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* (DI-ESI-MS/MS), permitiu a identificação de nove flavonoides: quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**13**), quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**14**), quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosídeo (**15**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 3)-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**16**), canferol-3-ramnosil-7-[6-feruloil-hexosil-(1 \rightarrow 3)-ramnosídeo] (**17**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**18**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**19**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosídeo (**20**) e canferol-3-*O*-hexosídeo (**21**). A FAFMa, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, permitiu a identificação dos flavonoides **13-16** e **18-21**, isoflavonoides genisteína (**25**) e daidzeína-8-*C*-hexosídeo (**26**) e o biflavonoide morelloflavona (**27**). Adicionalmente, foram isolados e identificados da FAFMa os flavonoides: canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 3)-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-galactosil-7-*O*-ramnosídeo (**16**), 3',4'-dimetoxi-3-*O*- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosídeo-7-*O*- α -L-ramnopiranosilflavonol (**22**), robinina (**23**) e astrasikokiosídeo I (**24**). Este é o primeiro relato do flavonoide **22** sendo considerado inédito. Os compostos isolados foram identificados por RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D), CG-EM e DI-ESI-MS/MS. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da composição química das folhas da espécie *M. acutifolium*.

Palavras-chave: Fabaceae, robinina, flavonoides, isoflavonoides, DI-ESI-MS/MS.

ABSTRACT

Machaerium acutifolium Vogel (Fabaceae-Papilionoideae), syn. *M. muticum* Benth, is popularly known as jacaranda do campo and jacaranda do bisco de pato. The leaves of *M. acutifolium* were subjected to maceration with ethanol, providing the ethanolic extract of the leaves (EEFMa). The EEFMa was partitioned and yielded the hexane (FHFMa), ethyl acetate (FAEFMa) and aqueous (FAFMa) fractions. FHFMa fractionation provided α -tocopherol (**1**), the steroids: cholesterol (**2**), campesterol (**3**), sitosterol (**4**), stigmasterol (**5**) and the triterpenoids lupeol (**6**), the *E/Z* isomers of 3-*O-p*-coumaroyl- β -amyirin (**7** and **8**), 3-*O-p*-coumaroylgermanicol (**9** and **10**) and 3-*O-p*-coumaroilupeol (**11** and **12**). FAEFMa, after dereplication by direct insertion in a mass spectrometer with an *electrospray* ionization source (DI-ESI-MS/MS), allowed the identification of nine flavonoids: quercetin-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-[rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)]-hexosyl-7-*O*-rhamnoside (**13**), quercetin-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)-hexosyl-7-*O*-rhamnoside (**14**), quercetin-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)-hexoside (**15**), kaempferol-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 3)-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-[rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)]-hexosyl-7-*O*-rhamnoside (**16**), kaempferol-3-*O*-rhamnosyl-7-[6-feruloyl-hexosyl-(1 \rightarrow 3)-rhamnoside] (**17**), kaempferol-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-[rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)]-hexosyl-7-*O*-rhamnoside (**18**), kaempferol-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)-hexosyl-7-*O*-rhamnoside (**19**), kaempferol-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)-hexoside (**20**) and kaempferol-3-*O*-hexoside (**21**). FAFMa, after dereplication by DI-ESI-MS/MS, allowed the identification of flavonoids **13-16** and **18-21**, isoflavonoids genistein (**25**) and daidzein-8-*C*-hexoside (**26**) and the biflavonoid morelloflavone (**27**). Additionally, flavonoids were isolated and identified from FAFMa: kaempferol-3-*O*-rhamnosyl-(1 \rightarrow 3)-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-[rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)]-galactosyl-7-*O*-rhamnoside (**16**), 3',4'-dimethoxy-3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -L-rhamnopyranoside-7-*O*- α -L-rhamnopyranosylflavonol (**22**), robinin (**23**) and astrasikokioside I (**24**). This is the first report of flavonoid **22** being considered unpublished. Isolated compounds were identified by ^1H and ^{13}C NMR (1D and 2D), GC-MS and DI-ESI-MS/MS. The results obtained contribute to the knowledge of the chemical composition of the leaves of the species *M. acutifolium*.

Keywords: Fabaceae, robinin, flavonoids, isoflavonoids, DI-ESI-MS/MS.

1 INTRODUÇÃO

Espécies vegetais pertencentes a família Fabaceae são ricas em flavonoides, porém acumulam também alcaloides, terpenoides e esteroides. O gênero *Machaerium* pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae e tribo Dalbergieae. É constituído por 262 espécies, entretanto, somente dezesseis apresentam estudo químico, entres estas os principais estudos concentram-se em: *M. hirtum*, *M. opacum*, *M. secundiflorum*, *M. vestitum* e *M. villosum* (AMEN et al., 2015; CARVALHO et al., 2020; FERREIRA et al., 2019).

A espécie *Machaerium acutifolium* Vogel (sin. *M. muticum* Benth) é conhecida popularmente por jacarandá do campo, jacarandá caroba e jacarandá bico de pato. No Brasil, ocorre da Amazônia até São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia, Piauí e Maranhão, principalmente na área de cerrado (POLIDO; SARTORI, 2007; ROSA et al., 2014).

O estudo realizado por Ollis et al. (1978b) com o extrato benzênico da madeira do tronco de *M. acutifolium* resultou no isolamento e identificação dos polifenóis éter monometil de pinsilvina, (+)-medicarpina e petroestireno. Um estudo recente, realizado por Melo et al. (2021), revelou que o extrato acetato de etila do tronco de *M. acutifolium* contém um derivado de 3-arilcumarina, *trans*-estilbeno, indeno e dois flavonóides: (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-dihidro-3-(2'-hidroxi- 3', 4'-dimetoxifenil) e (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-dihidro-3- (2'-hidroxi-3', 4'-dimetoxifenil)-8-metoxi.

Considerando o potencial químico de plantas da família Fabaceae, em especial do gênero *Machaerium*, este estudo tem como objetivo desreplacar por DI-ESI-MS/MS, isolar e identificar constituintes químicos do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium*.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais e equipamentos

A obtenção dos extratos, partição, cromatografia em coluna (CC) e em camada delgada (CCD) foram feitas com solventes de padrão analítico (PA) adquiridos da Synth. Nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizados solventes grau HPLC da J. T. Backer e água ultrapura (18 Ω) obtida em sistema Milli-Q Plus e em ultrapurificador Master All da Gehaka.

O material vegetal foi moído em moinho de facas da Marconi e os extratos, frações e subfrações concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida Laborota 4000 Heidolph e a água residual removida em liofilizador Modulyod Freeze Dryer da Thermo Electron Corporation. A dissolução dos extratos e frações foi realizada com auxílio de banho de ultrassom modelo Q3.0/40 da Ultranique e conservados em refrigerador modelo Zyrium Frostfree 430 da Brastemp. As massas obtidas em balanças modelos KN 4000 da Digimed e AUY220 da Shimadzu.

O fracionamento cromatográfico em coluna foi feito usando gel de sílica (0,060-0,200 mm) da Acros Organics e Sephadex LH-20 da Sigma. As placas para cromatografia em camada delgada foram preparadas por aplicação manual da suspensão de gel de sílica 60 G (Fluka) em água destilada (1:2) sobre lâminas de vidro (9,5 x 5,9 cm) e a ativação foi realizada a 110 °C por 1h em estufa EL-1.3 da Odontobras.

As substâncias foram reveladas nas cromatoplasmas por nebulização com solução de sulfato cérico, preparada por dissolução de 2,1 g de sulfato cérico ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) da Vetec em 15 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) da Chemco e posteriormente diluído com 800 mL de água destilada, seguida de aquecimento em placa aquecedora 509T da Fisaton.

As amostras injetadas em HPLC-DAD foram submetidas a um pré-tratamento (*clean up*) em cartucho de extração em fase sólida (SPE) StrataTM C18-E (1000 mg/6 mL, 55 mm, 70Å) da Phenomenex. Todos os extratos e frações foram filtrados em membrana filtrante da Phenomenex (30 mm e poro 0,45 μm). As análises por HPLC foram realizadas em cromatógrafos: i) analítico, Shimadzu® equipado com bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector de arranjo de fotodiodo SPD-M20A, forno para coluna CTO-20A, pré-coluna C18 Shim-pack 6-SIL, coluna C-18Shim-pack VP-ODS (250 x 4,6 mm, partícula de 5,0 μm) e ii) semipreparativo, Shimadzu® *prominence system* equipado com sistema binário de

bombas LC-6AD, injetor manual, detector UV SPD-20A, coluna Phenomenex Luna (C18, 250 x 10 mm, 15 μ m).

Os espectros de massas foram adquiridos por inserção direta em espectrômetro de massas acoplado a fonte de ionização por *electrospray* (DI-ESI-MS/MS), AmaZon X, Bruker Daltonics. O tratamento dos dados de massas foi realizado em software Compass 1.3 Data Analysis (versão 4.0, Bruker Daltonics).

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em um UPLC-QTOF-HRMS com uma interface de eletrospray (ESI) acoplada ao sistema Acquity UPLC (Waters Corporation). Fase móvel: MeCN/HCO₂H (0,1%) em H₂O/HCO₂H (0,1%), gradiente: 0-6 min, 10-50% MeCN/HCO₂H (0,1%); 6-9 min, 50-98% MeCN/HCO₂H (0,1%), taxa de fluxo 0,5 mL min⁻¹, coluna BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m; Waters Corporation). A detecção foi realizada em modo negativo e centroide MSE por 10 min, faixa de massa de m/z 100-1500, tempo de varredura de 0,2 s.

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetro Bruker Ascend, modelo 600 da UNESP de Araraquara-SP operando a 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C, equipado com criosonda. Foram utilizados como solventes CDCl₃, CD₃OD, DMSO-*d*₆ (Cambridge Isotope Laboratories Inc) e TMS como referência interna.

2.2 Material Vegetal

As folhas de *M. acutifolium* foram coletados em março de 2017, no município de Jatobá do Piauí, nas coordenadas S 04° 51 006" e W 42° 05 057", a 90 m de altitude. A espécie foi identificada pela bióloga Dra. Ruth Raquel Soares de Farias e a exsicata foi depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí-UFPI, na cidade de Teresina com o número de registro TEPB 31568 e cadastro de acesso SisGen nº AAB530D.

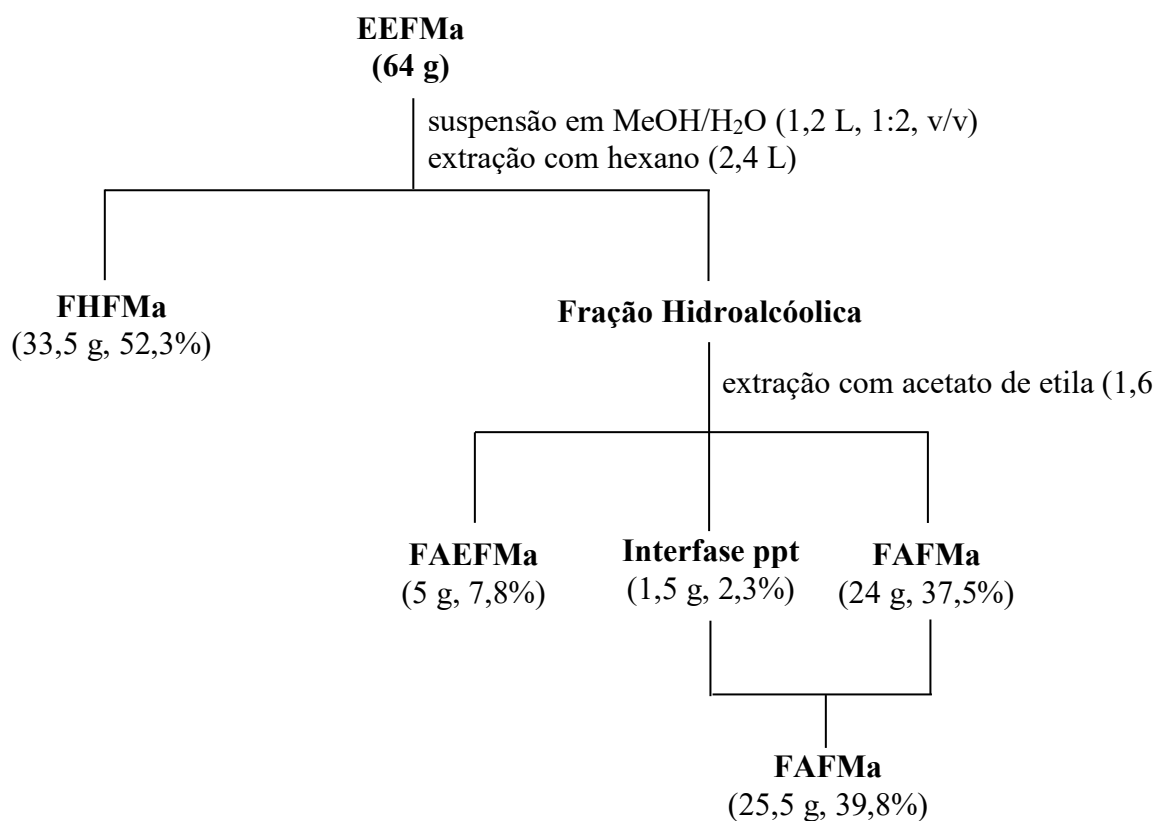
2.3 Preparação do extrato etanólico das folhas

As folhas foram secadas à temperatura ambiente e moídas em moinho de facas, obtendo-se 1,4 kg. O material vegetal foi submetido à maceração exaustiva com etanol (95%). A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo à pressão reduzida e a água residual removida por liofilização, fornecendo o extrato etanólico das folhas (EEFMa, 74,4 g, 5,3%).

2.4 Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas

Uma alíquota de 64 g do extrato etanólico das folhas foi suspensa em 1,2 L de MeOH/H₂O (1:2, v/v) e submetida a partição, resultando nas frações hexânica (FHFMa, 33,5 g, 52,3%), acetato de etila (FAEFMa, 5 g, 7,8%) e aquosa (FAFMa, 25,5 g, 39,8%), conforme apresentado no Esquema 1. Durante a extração com acetato de etila houve a formação de um precipitado amarelo na interfase, este foi separado por filtração e após análise por CCD, reunido com a fração aquosa, como apresentado na Figura 1.

Os perfis cromatográficos por CCD e HPLC-DAD do extrato etanólico e das frações acetato de etila (FAEFMa) e aquosa (FAFMa) das folhas de *M. acutifolium* são apresentados a seguir. As Figuras 1 e 2 mostram que a partição do EEFMa distribuiu os compostos polares nas frações acetato de etila (C) e aquosa (E).



Esquema 1 - Partição do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium*.

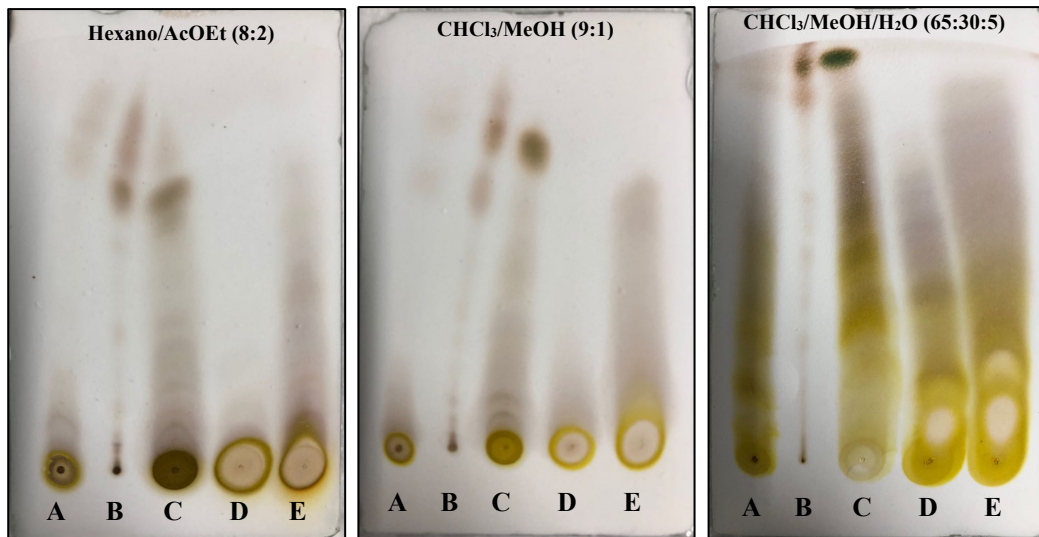


Figura 1 - Cromatoplasas do extrato etanólico das folhas (A), frações hexânica (B), acetato de etila (C), precipitado da fração acetato de etila (D) e aquosa (E). Revelador: solução de $Ce(SO_4)_2$.

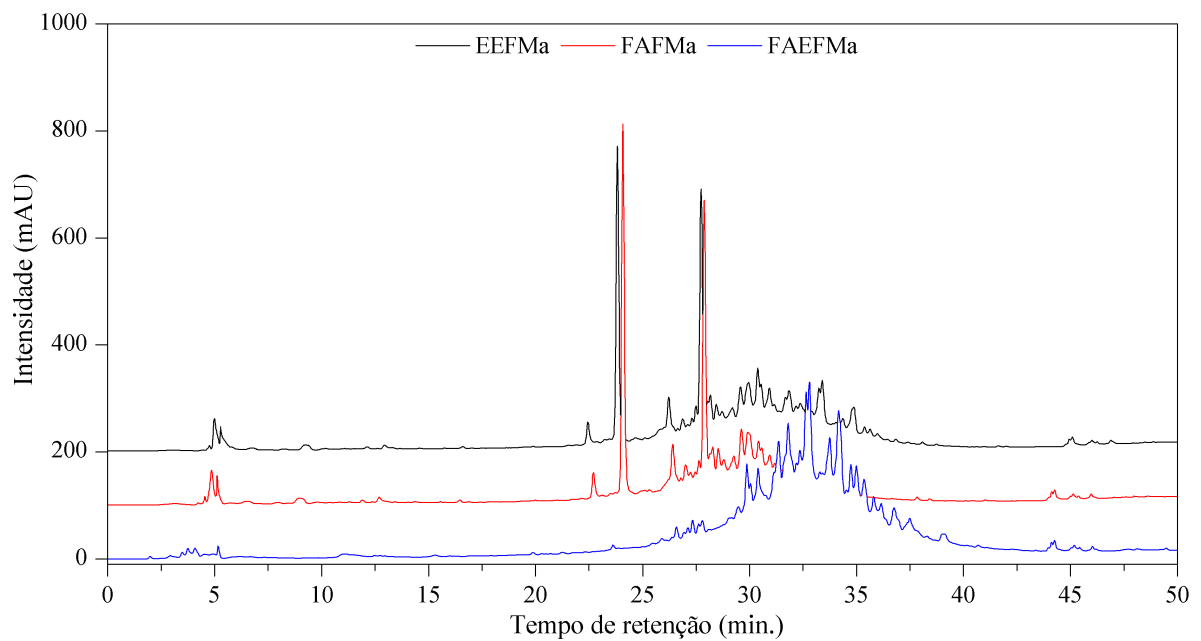


Figura 2 - Cromatograma do extrato etanólico das folhas (EEFMa) e das frações acetato de etila (FAEFMa) e aquosa (FAFMa). Fase Móvel: MeOH/H₂O (0,2%), gradiente: 0-40 min (5-100% MeOH), 40-50 min (100% MeOH), vazão 1,0 mL min⁻¹, $\lambda = 254$ nm e coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m).

2.5 Fracionamento da fração hexânica da partição do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium*

A fração hexânica das folhas, quando analisada em CCD utilizando hexano/AcOEt (8:2, v/v) e como revelador solução de $Ce(SO_4)_2$, apresentou manchas amarelas e azuis características de compostos de natureza isoprênicos (CHAVES, 1997).

FHFMa (10 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída com hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade, fornecendo 102 frações de 140 mL, que foram analisadas por CCD e reunidas em 19 grupos (Tabela 1). A cromatoplaça dos grupos FHF-14, FHF-32 e FHF-33 sugeriu a presença de compostos das classes dos tocoferóis (mancha amarela), triterpenóides (mancha alaranjada) e esteroides (mancha azul), respectivamente, sendo então selecionados para dar continuidade ao fracionamento.

Tabela 1 - Grupos obtidos do fracionamento em coluna de gel de sílica de FHFMa.

Grupo	Frações reunidas	Eluente	Massa (mg)
FHF-1	1-5	Hexano (100%)	345,7
FHF-6	6-10	Hexano/AcOEt (98:2)	168,1
FHF-11	11-13	Hexano/AcOEt (98:2)	176,5
FHF-14	14-21	Hexano/AcOEt (98:2)	72,8
FHF-22	22-28	Hexano/AcOEt (95:5)	520,5
FHF-29	29-31	Hexano/AcOEt (95:5)	88,0
FHF 32	32	Hexano/AcOEt (95:5)	476,9
FHF-33	33-35	Hexano/AcOEt (95:5)	300,5
FHF-36	36-38	Hexano/AcOEt (95:5)	237,8
FHF 39	39	Hexano/AcOEt (95:5)	52,7
FHF-40	40-46	Hexano/AcOEt (95:5)	382,2
FHF-47	47-67	Hexano/AcOEt (9:1)	1017,2
FHF-68	68-79	Hexano/AcOEt (8:2)	463,8
FHF-80	80-82	Hexano/AcOEt (7:3)	236,6
FHF-83	83-87	Hexano/AcOEt (6:4)	260,1
FHF-88	88-95	Hexano/AcOEt (1:1)	444,2
FHF-96	96-97	AcOEt (100%)	4000,6
FHF-98	98-99	AcOEt/MeOH	690,9
FHF-100	100-102	MeOH (100%)	125,0

2.5.1 Fracionamento do Grupo FHF-14

O grupo FHF-14 (72,8 mg) foi submetido a cromatografia em Sephadex LH-20 com eluição em hexano/CH₂Cl₂ (1:4). Foram coletadas 27 subfrações, analisadas por CCD, utilizando como eluente hexano/AcOEt (95:5) e como revelador solução de Ce(SO₄)₂. Após esta análise, as subfrações que apresentaram manchas de mesma coloração e fatores de retenção foram reunidas, obtendo-se oito subgrupos. O subgrupo FHF-14-14 (39,9 mg) apresentou duas manchas, uma amarela e uma roxa, e foi solubilizado em hexano, filtrado em coluna de gel de sílica, usando o eluente hexano/AcOEt (98:2). Após análise em CCD utilizando como eluente hexano/AcOEt (95:5) e como revelador solução de Ce(SO₄)₂, as frações coletadas foram reunidas nos subgrupos P-25 (31,8 mg) e P-45 (1,9 mg). O subgrupo P-25 apresentou uma única mancha amarelada e foi identificado por RMN ¹H e ¹³C como o composto **1**, conforme mostra o Esquema 2.

2.5.2 Fracionamento do Grupo FHF-32

O grupo FHF-32 (476,9 mg) foi submetido a cromatografia em Sephadex LH-20 com eluição em hexano/CH₂Cl₂ (1:4) fornecendo M1 (122,4 mg). A cromatoplaça de M1, eluída com hexano/AcOEt (8:2) e revelada com solução de Ce(SO₄)₂, apresentou uma mancha azul que muda para roxo com a continuação do aquecimento. Este perfil em CCD é característico de compostos de natureza esteroideal (CHAVES, 1997).

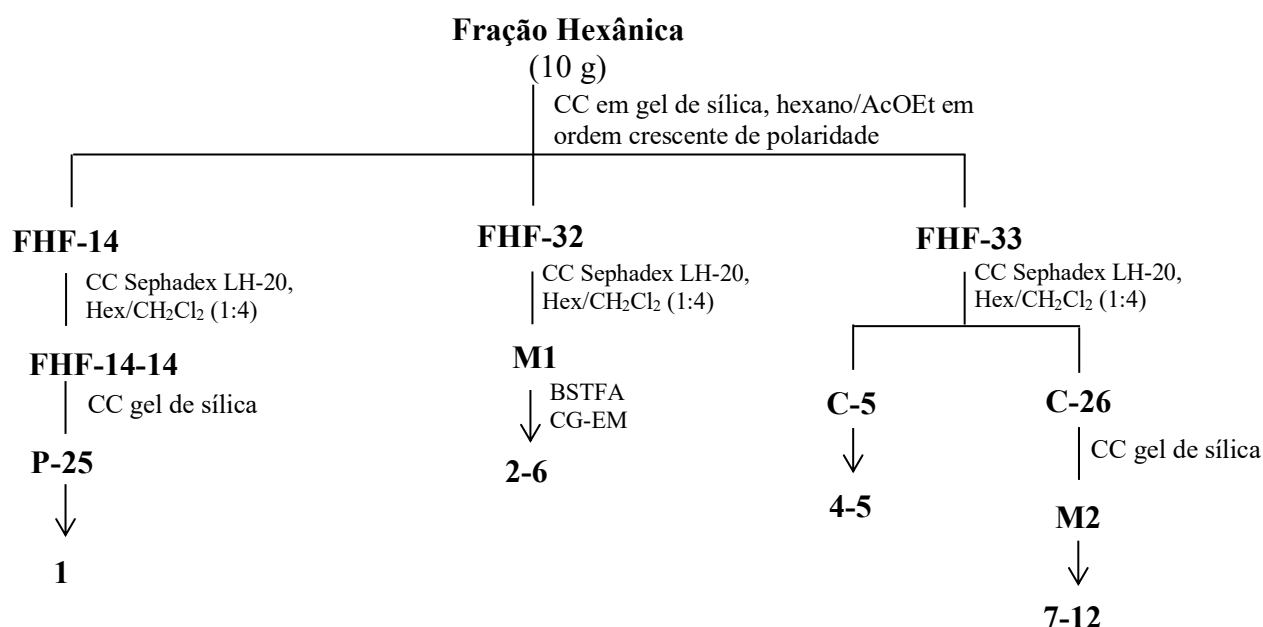
M1 foi derivatizada com *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) de acordo com Prytyk et al. (2003). A uma alíquota de 1,0 mg da amostra foi adicionado 250 µL de piridina tratada e 50 µL de BSTFA. A mistura reacional foi aquecida por 1 hora a 55 °C. Após o término da reação, adicionou-se 1,0 mL de acetato de etila e a fase orgânica com os derivados sililados foi analisada em cromatógrafo GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 auto injetor da Shimadzu, coluna SLB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,10 µm), fase estacionária difenildimetilpolissiloxano (5% de difenil e 95% de dimetilpolissiloxano) e hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹). O detector de massas operou com ionização por elétrons (EI) 70 eV, modo *scan* no intervalo de *m/z* 50 a 600 Da (Daltons). Para análise foi usada a seguinte programação: temperatura inicial de 71 °C por 2 min, com taxa de aquecimento de 6 °C min⁻¹ até 315 °C, mantido por 30 min. As temperaturas do injetor e interface foram 290 °C e 310 °C, respectivamente. A identificação dos constituintes de M1-d foi realizada por comparação com dados da literatura, permitindo identificar os compostos **2-5** (DIEKMAN; DJERASSI, 1967).

M1 também foi analisada sem derivatização em um sistema GC-MS 7890/MSD (Agilent Technologies) equipado com coluna capilar DB5 (J&W, 30 m x 320 μm x 0,25 μm) e amostrador automático. Injeção de 1 μL de amostra (5 mg mL^{-1} em CH_2Cl_2) no modo split 1:40 e temperatura do injetor a 250 $^\circ\text{C}$. O gás de arraste foi hélio com fluxo de 1 mL min^{-1} . A programação de temperatura da coluna foi temperatura inicial de 200 $^\circ\text{C}$ permanecendo por 4 min, taxa de aquecimento de 6 $^\circ\text{C min}^{-1}$ até 290 $^\circ\text{C}$ permanecendo por 15 min. A temperatura da interface foi de 280 $^\circ\text{C}$. O espectrômetro de massas no modo varredura (scan) com energia de 70 eV e faixa de massas de 50 a 500 Da. A identificação dos compostos **3-6** foi realizada por comparação do tempo de retenção e espectros de massas da literatura e biblioteca computacional (NIST08) (ASSIMOPOULOU; PAPAGEOORGIOU, 2005; WYLLIE, 1977).

2.5.3 Fracionamento do Grupo FHF-33

O grupo FHF-33 (300,5 mg) foi submetido a cromatografia em Sephadex LH-20 com eluição em hexano/ CH_2Cl_2 (1:4). As frações coletadas, após analisadas por CCD, utilizando como eluente hexano/AcOEt (8:2) e como revelador solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, foram reunidas em dois subgrupos.

No subgrupo C-5 (108,8 mg), após análise por RMN ^1H , foi possível identificar a mistura dos compostos **4** e **5**. Enquanto, o subgrupo C-26 (66,9 mg) foi submetido a coluna filtrante em gel de sílica utilizando [$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (99:1)/hexano (1:1)] e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (99:1). Este fracionamento forneceu a subfração M2 (26,8 mg) que apresentou na cromatoplaça uma mancha de coloração alaranjada, quando eluída com hexano/AcOEt (8:2) e revelada com solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. A subfração M2 (26,8 mg) foi analisada por RMN ^1H e ^{13}C e revelou tratar-se de uma mistura dos compostos **7-12**.



Esquema 2 - Fracionamento cromatográfico da fração hexânica do extrato etanólico das folhas.

2.6 Fracionamento e análise da fração acetato de etila da partição do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium*

A fração acetato de etila da partição do extrato etanólico das folhas, quando analisada em CCD utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5, v/v/v) e como revelador solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, apresentou machas amarelas características de flavonoides (CHAVES, 1997).

Uma alíquota de 500 mg da fração acetato de etila, foi aplicada em cartucho de fase reversa C18-E (SPE, 10 g/60 mL, 55 μm , 70 Å, Strata™), previamente equilibrado com H_2O e eluído sucessivamente com H_2O (50 mL), $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (50 mL), MeOH (50 mL) e CHCl_3 (50 mL), fornecendo as subfrações aquosa, metanol/água (1:1), metanólica e clorofórmica. O solvente orgânico foi retirado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e a água removida por liofilização (Tabela 2).

Tabela 2 - Rendimento da extração em fase sólida (C-18) da fração acetato de etila das folhas.

Amostra	Massa (mg)	Rendimento (%)
subfração aquosa	71,6	14,3
subfração metanol/água (1:1)	166,0	33,2
subfração metanólica	26,1	5,2
subfração clorofórmica	230,0	47,3

2.6.1 Análise por HPLC-DAD das subfrações oriundas da fração acetato de etila

As subfrações aquosa, metanol-água (1:1) e metanólica obtidas do pré-tratamento (*clean up*) em cartucho de extração em fase sólida (SPE) foram filtradas em membrana filtrante (30 mm e poro 0,45 μm) e tiveram seus perfis obtidos em HPLC-DAD.

A análise por HPLC-DAD no comprimento de onda em 254 nm mostrou cromatogramas das subfrações aquosa e metanol-água (1:1) com perfis semelhantes e sem diferenças significativas dos picos cromatográficos. Estas subfrações apresentaram grande quantidade de picos cromatográficos, o que não foi observado para a subfração metanólica (Figura 3).

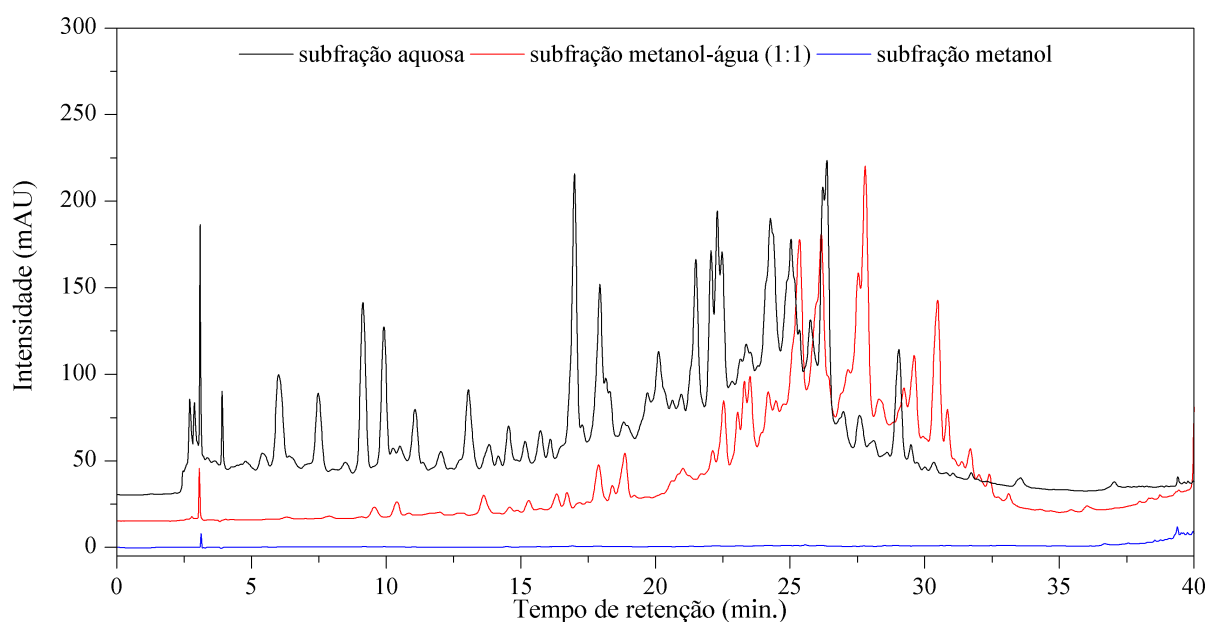


Figura 3 - Cromatograma das subfrações aquosa, metanol-água (1:1) e metanólica obtidas por C-18 da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas. Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 26-30 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-38 min, 100%, 38-41 min, 100-30% MeOH, 41-46 min, 30%, vazão 1,0 mL min⁻¹, coluna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) e $\lambda=254$ nm.

2.6.2 Análise por DI-ESI-MS/MS das subfrações oriundas da fração acetato de etila

Aliquotas (2 mg) das subfrações aquosa, metanol-água (1:1) e metanólica obtidas por extração em fase sólida (SPE, C-18-E) da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas foram dissolvidas em metanol, na concentração de 50 ppm e filtradas em membrana de nylon (Chromafil® Xtra, diâmetro de 47 mm e poro de 0,22 μm).

As condições utilizadas para a análise de DI-ESI-MS/MS da subfração aquosa foram: fonte de ionização ESI no modo negativo, [ESI(-)], faixa de massa m/z 100-1500 Da, fluxo da

seringa 3,0 $\mu\text{L min}^{-1}$, voltagem do capilar 4,5 kV, fluxo do gás de secagem (N_2) 5,0 L min^{-1} , pressão de nebulização 20,0 psi e temperatura da fonte de 250 °C. A análise da subfração metanol/água (1:1) foi realizada nas mesmas condições da subfração aquosa, exceto o fluxo da seringa (5,0 $\mu\text{L min}^{-1}$) e a temperatura da fonte (300 °C). A subfração metanólica não se mostrou promissora para o prosseguimento da análise, nas condições testadas, por HPLC-DAD e DI-ESI-MS/MS, portanto, não foram obtidos os espectros de MS/MS para esta amostra.

Para as análises em MS/MS, os parâmetros energia de colisão, amplitude do sinal, tempo de aquisição de dados e radiofrequência foram ajustados para cada sinal, a fim de obter informações estruturais máximas a partir do íon precursor. Estas análises permitiram identificar os compostos **13-22**.

2.7 Fracionamento e análise da fração aquosa da partição do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium*

2.7.1 Análise da fração aquosa por CCD e HPLC-DAD

A fração aquosa quando analisada em CCD utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5, v/v/v) e como revelador solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ apresentou machas amarelas características de flavonoides (CHAVES, 1997).

A amostra foi submetida a pré-tratamento (*clean-up*), utilizando cartucho de extração em fase sólida (1,0 x 3,5 cm - Bakerbondspe 7020-03, C-18, 25-40 μm , J. T. Baker) e membrana filtrante de 0,45 μm . Uma alíquota de 2 mg foi dissolvida em 1 mL de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) e aplicada no cartucho, ambientado com o mesmo solvente e eluído com 1 mL de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v), em seguida 20 μL do eluato foi analisado por HPLC-DAD.

O extrato etanólico (EEFMa) e a fração aquosa (FAFMa) foram submetidos a análises por HPLC-DAD usando a fase móvel $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ (0,2%), na seguinte programação: 0-5 min, 30-40% MeOH ; 5-7 min, 40% MeOH ; 7-12 min, 40-50% MeOH ; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH ; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH ; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH ; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min^{-1} , coluna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) e $\lambda=254$ nm.

EEFMa e FAFMa apresentaram perfis cromatográficos idênticos com 15 picos cromatográficos (Figura 4) e os espectros UV-Vis de cada pico mostraram máximo de absorções nas regiões de 240 a 280 e 300 a 380 nm, indicando que os constituintes pertencem a classe dos flavonoides (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

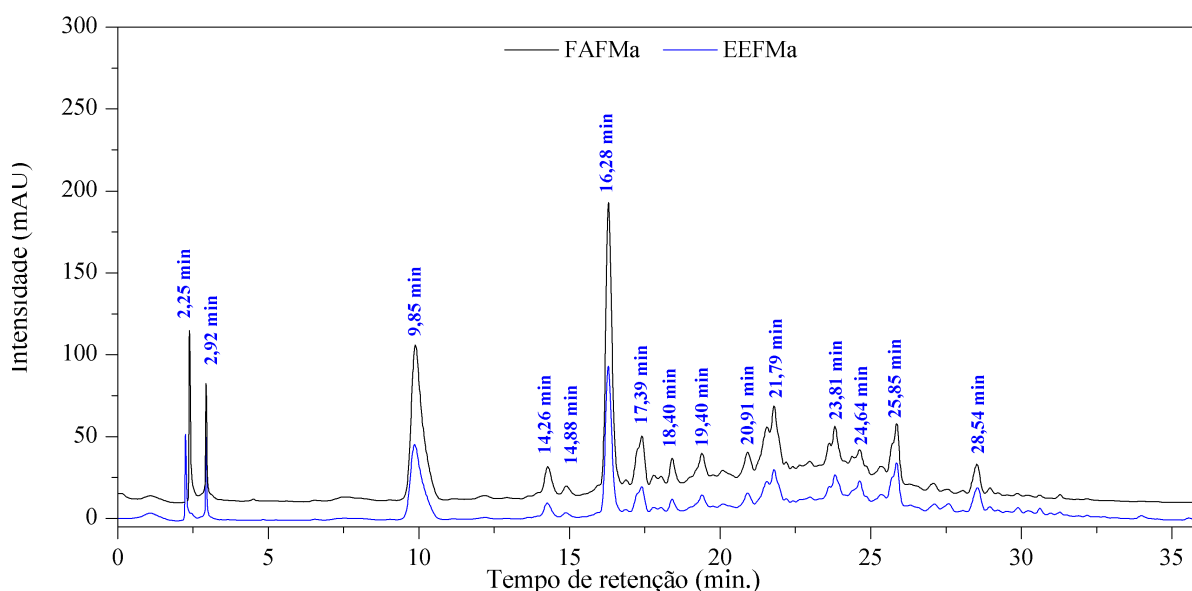


Figura 4 - Cromatograma do extrato etanólico (EEFMa) e da fração aquosa (FAFMa) das folhas. Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min⁻¹, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) e λ=254 nm.

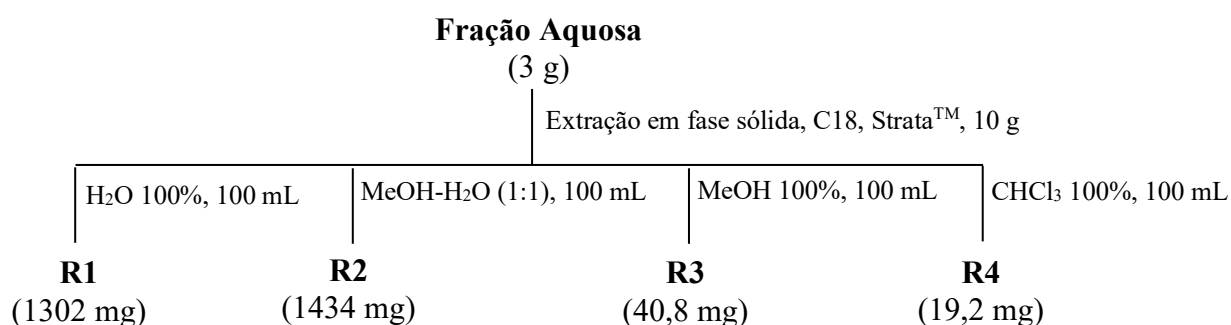
2.7.2 Análise da fração aquosa da partição do extrato etanólico por DI-ESI-MS/MS

A fração aquosa foi analisada por DI-ESI-MS/MS. As condições utilizadas para as análises foram: fonte de ionização ESI no modo íon negativo, [ESI(-)], faixa de m/z 100-1500, fluxo da seringa 3,0 μL min⁻¹, voltagem do capilar 4,5 kV, fluxo do gás de secagem (N₂) 9,0 L min⁻¹, pressão de nebulização 50 psi e temperatura da fonte 350 °C. Para as análises em MS/MS, os parâmetros energia de colisão, amplitude do sinal, tempo de aquisição de dados e radiofrequência foram ajustados para cada sinal, a fim de obter informações estruturais a partir do íon precursor. A análise por massas permitiu identificar os compostos: **13-16**, **18-21** e **25-27**.

2.7.3 Fracionamento da fração aquosa da partição do extrato etanólico

Seis alíquotas de 500 mg da fração aquosa, oriunda da partição do extrato etanólico, foram solubilizadas em água e aplicadas em cartucho de extração em fase sólida (C18, Strata™, 10 g), inicialmente ambientado com água, e eluídas sucessivamente com 100 mL de cada um dos seguintes eluentes: H₂O (100%), MeOH-H₂O (1:1), MeOH (100%) e CHCl₃ (100%). Os eluatos

correspondentes de cada extração foram reunidos fornecendo as subfrações R1, R2, R3 e R4, respectivamente (Tabela 3 e Esquema 3).



Esquema 3 - Extração em fase sólida da fração aquosa das folhas de *M. acutifolium*.

As subfrações R1 a R4 foram analisada por CCD usando diferentes eluentes e solução de Ce(SO₄)₂ como revelador (Figura 5). Manchas amarelas intensas e persistentes foram observadas para as subfrações R1 a R3 no eluente CHCl₃/MeOH/H₂O (60:35:5). As subfrações R1 e R2 mostraram-se semelhantes com base nos perfis em CCD e HPLC-DAD, portanto, foram reunidas. O cromatograma da subfração resultante desta reunião (F, 2,7 g) é apresentado na Figura 6.

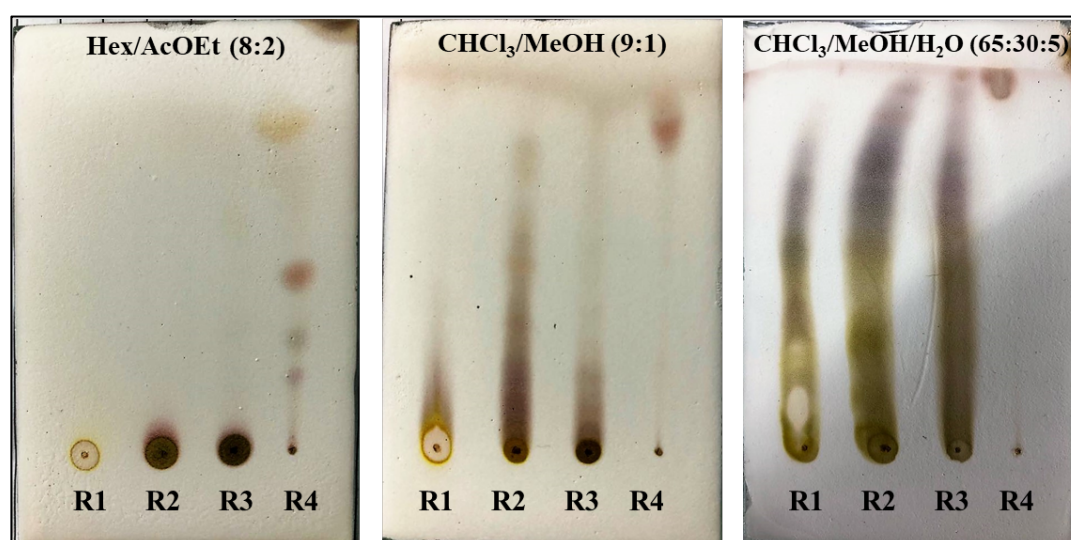


Figura 5 - Cromatoplas das subfrações R1 a R4 da fração aquosa da partição do extrato etanólico. Revelador: solução de Ce(SO₄)₂.

A subfração F (2,7 g) foi submetida a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 usando MeOH (100%) como eluente, fornecendo após reunião 11 grupos. A análise por HPLC-DAD, nas mesmas condições usadas para a obtenção do perfil de EEFMa e FAFMa, permitiu

selecionar os grupos SF-4, SF-18 e SF-27 para fracionamento em HPLC-UV semipreparativo, usando fase móvel MeOH/H₂O-AcOH 0,2% (1:1), isocrático, vazão 4 mL min⁻¹ e $\lambda=330$ nm. (Esquema 4).

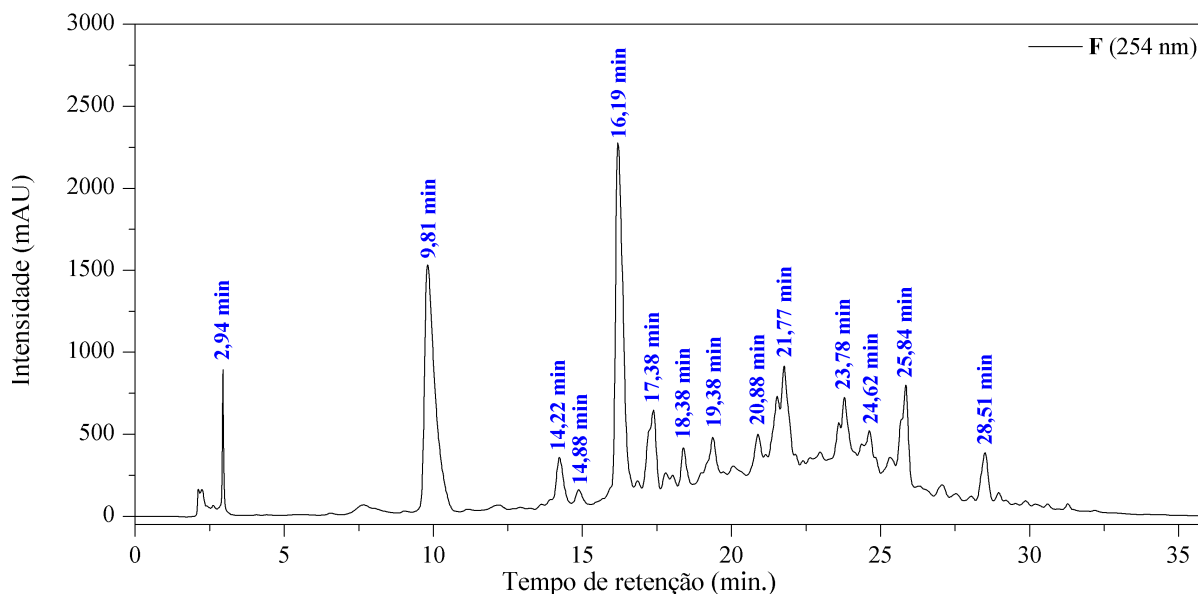
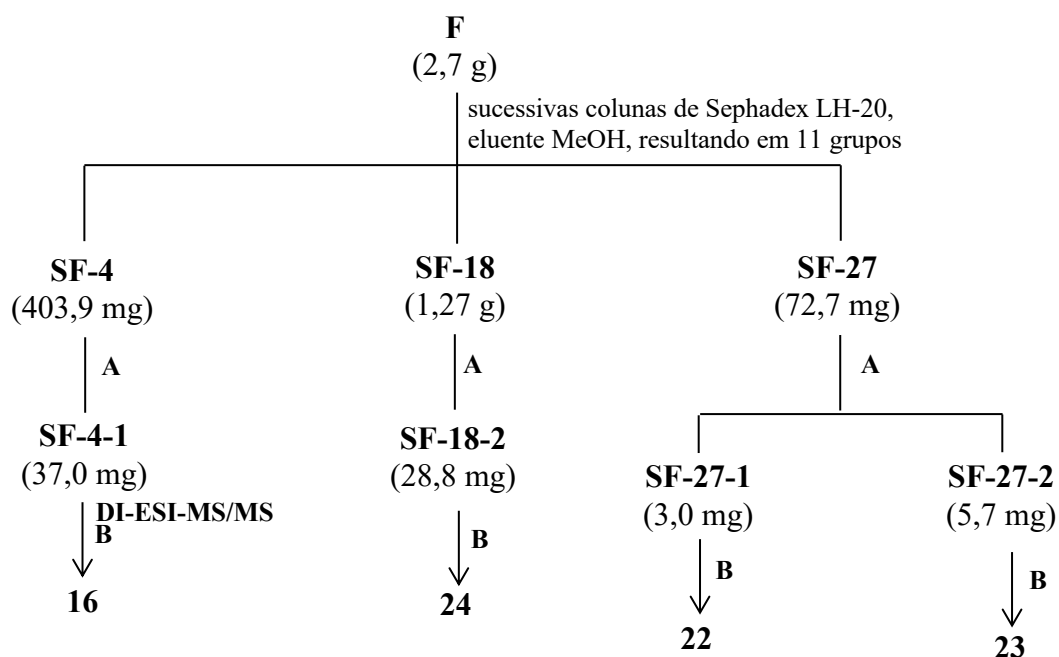


Figura 6 - Cromatograma da subfração F, proveniente da fração aquosa da partição do extrato etanólico. Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min⁻¹, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) e $\lambda=254$ nm.

Os subgrupos SF-27-1 ($t_R = 16,37$ min., $\lambda = 268$ e 350 , 5,7 g), SF-27-2 ($t_R = 14,28$ min., $\lambda = 255$ e 357 , 3,0 g), SF-18-2 ($t_R = 9,87$ min., $\lambda = 265$ e 349 , 28,8 g) e SF-4-1 ($t_R = 2,92$ min., $\lambda = 268$ e 350 , 37,0 g) foram analisados por RMN ¹H e ¹³C-DEPTQ 135° permitindo identificar os compostos **16** e **22-24**.



A: HPLC-UV, MeOH/H₂O-AcOH 0,2% (1:1), C18

B: RMN ¹H e ¹³C-DEPTQ 135°

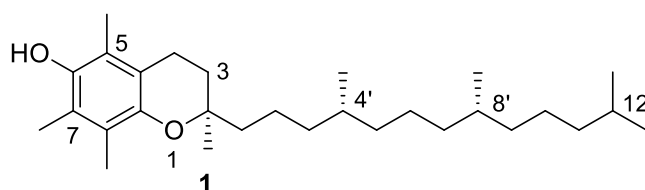
Esquema 4 - Fracionamento cromatográfico da subfração F resultante da fração aquosa do extrato etanólico das folhas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação dos constituintes químicos da fração hexânica da partição do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium*

A fração hexânica, oriunda da partição do extrato etanólico das folhas, depois de submetida a análises por CG-EM e RMN ^1H e ^{13}C , resultou na identificação de doze compostos: α -tocoferol (**1**), colesterol (**2**), campesterol (**3**), sitosterol (**4**), estigmasterol (**5**), lupeol (**6**), 3-*O*-(*E*)-*p*-cumaroil- β -amirina (**7**), 3-*O*-(*Z*)-*p*-cumaroil- β -amirina (**8**), 3-*O*-(*E*)-*p*-cumaroilgermanicol (**9**), 3-*O*-(*Z*)-*p*-cumaroilgermanicol (**10**), 3-*O*-(*E*)-*p*-cumaroillupeol (**11**) e 3-*O*-(*Z*)-*p*-cumaroil-lupeol (**12**).

3.1.1 Identificação estrutural do composto 1



O composto **1**, corresponde a subgrupo P-25 (31,8 mg), foi isolado como um óleo amarelo, solúvel em clorofórmio (Esquema 2, pág. 82). A análise de P-25 por CCD, eluída com hexano/AcOEt (8:2) e revelada com solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, originou uma única mancha amarela. Este composto foi identificado por meio da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e por comparação com dados da literatura (CARVALHO et al., 2019a; MATSUO; URANO, 1976).

O espectro de RMN ^1H (Figura 7) apresentou um perfil de substância pertencente à classe dos tocoferóis, exibindo sinais entre δ 0,84 e 0,87 característicos de hidrogênios dos grupos metílicos da cadeia isoprênica, dois simpletos em δ 2,11 e 2,16 são correspondentes a hidrogênios metílicos em anel aromáticos e um terceiro simpleto em δ 1,26 de metila em carbono carbinólico. Observou-se ainda, um tripleto em δ 2,60 ($J=6,8$ Hz) referente aos hidrogênios metilênicos alfa a anel aromático, porém, não apresentou sinais na região característica de hidrogênios aromáticos (δ 6-8) indicando um anel totalmente substituído.

O espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° (Figuras 8-9, Tabela 3) apresentou 28 sinais, sendo um deles (δ 37,6) correspondente a dois carbonos, permitindo identificar oito carbonos metílicos (CH_3), dez metilênicos (CH_2), três metínicos (CH) e sete carbonos não hidrogenados (C). O sinal em δ 74,7 foi atribuído ao carbono carbinólico (C-2) e seis sinais a carbonos aromáticos δ 117,5 (C-4a), 118,6 (C-5), 121,1 (C-7), 122,8 (C-8), 144,6 (C-6) e 145,7 (C-8a),

sendo que estes dois últimos se referem a carbonos ligados a oxigênio (CARVALHO et al., 2019).

A análise dos dados de RMN possibilitou atribuir a fórmula molecular $C_{29}H_{50}O_2$, com equivalente de instauração igual a cinco, referente a um anel aromático e um anel heterocíclico. Os dados de RMN em comparação com os relatados por Carvalho et al. (2019) e Matsuo e Urano (1976) permitiram identificar esta substância como sendo o α -tocoferol (**1**). Este é o primeiro relato de isolamento e identificação estrutural por RMN do α -tocoferol no gênero *Machaerium*.

Tabela 3 - Dados de RMN 1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, δ /ppm, $CDCl_3$) de **1**

C	1			δ_C do α -tocoferol*
	δ_C	Multip. ^a	δ_H	
2	74,7	C		74,3
3	31,7	CH ₂	1,78 (m)	31,6
4	20,9	CH ₂	2,60 (t)	20,8
4a	117,5	C	-	117
5	118,6	C	-	118,5
6	144,6	C	-	144,4
7	121,1	C	-	121
8	122,8	C	-	122,3
8a	145,7	C	-	145,4
1'	39,9	CH ₂	-	39,8
2'	21,2	CH ₂	-	21,0
3'	37,6 ^b	CH ₂	-	37,5
4'	32,9	CH	-	32,7
5'	37,6	CH ₂	-	37,5
6'	24,6	CH ₂	-	24,5
7'	37,4	CH ₂	-	37,5
8'	32,8	CH	-	32,7
9'	37,5	CH ₂	-	37,5
10'	24,9	CH ₂	-	24,8
11'	39,5	CH ₂	-	39,4
12'	28,1	CH	-	28,0
13'	22,8 ^c	CH ₃	-	22,6
Me-C2	23,9	CH ₃	1,26 (s)	23,8
Me-C4'	19,9	CH ₃	0,84 (d)	19,7
Me-C8'	19,8	CH ₃	0,85 (d)	19,7
Me-C12'	22,9 ^c	CH ₃	0,87 (d)	22,6
Me-C5	11,4	CH ₃	2,11 (s)	11,2
Me-C7	12,4	CH ₃	2,16 (s)	12,1
Me-C8	11,9	CH ₃	2,11 (s)	11,8

*Dados obtidos em $CDCl_3$, relatados por Matsuo e Urano (1976). ^aMultiplicidade obtida dos espectros DEPTQ 135°.

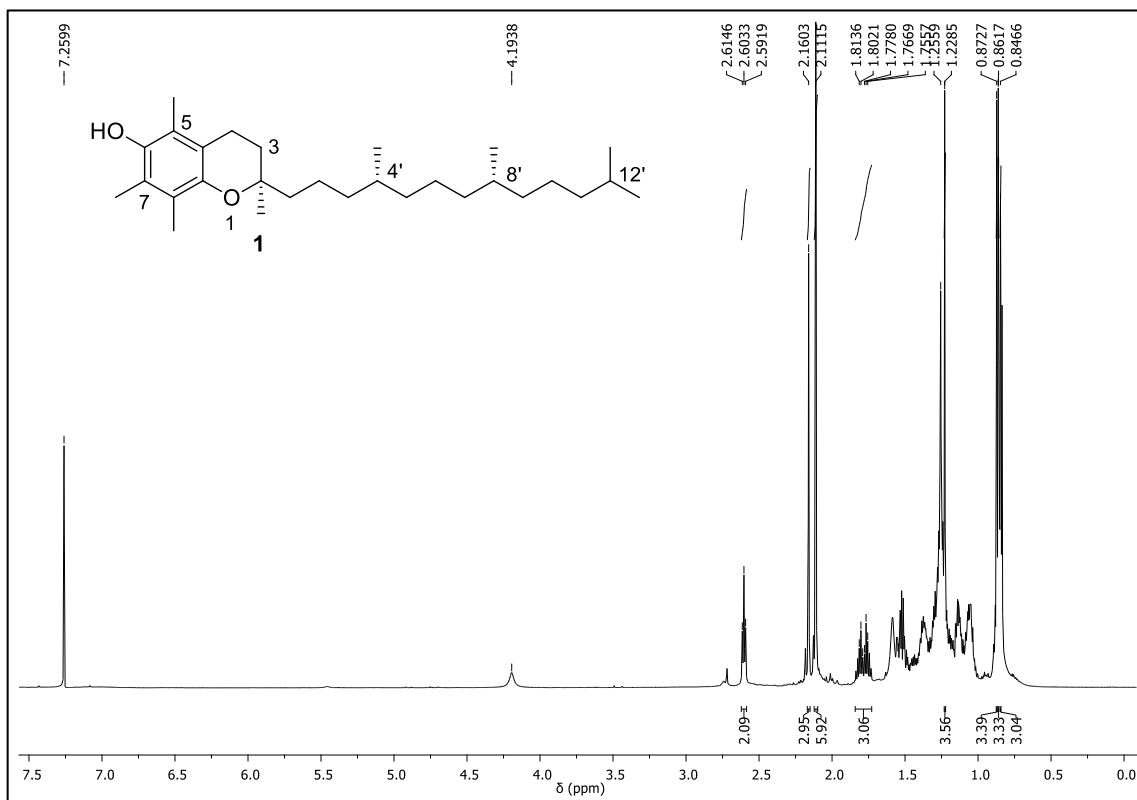


Figura 7 - Espectro de RMN ^1H de **1** (CDCl₃, 600 MHz).

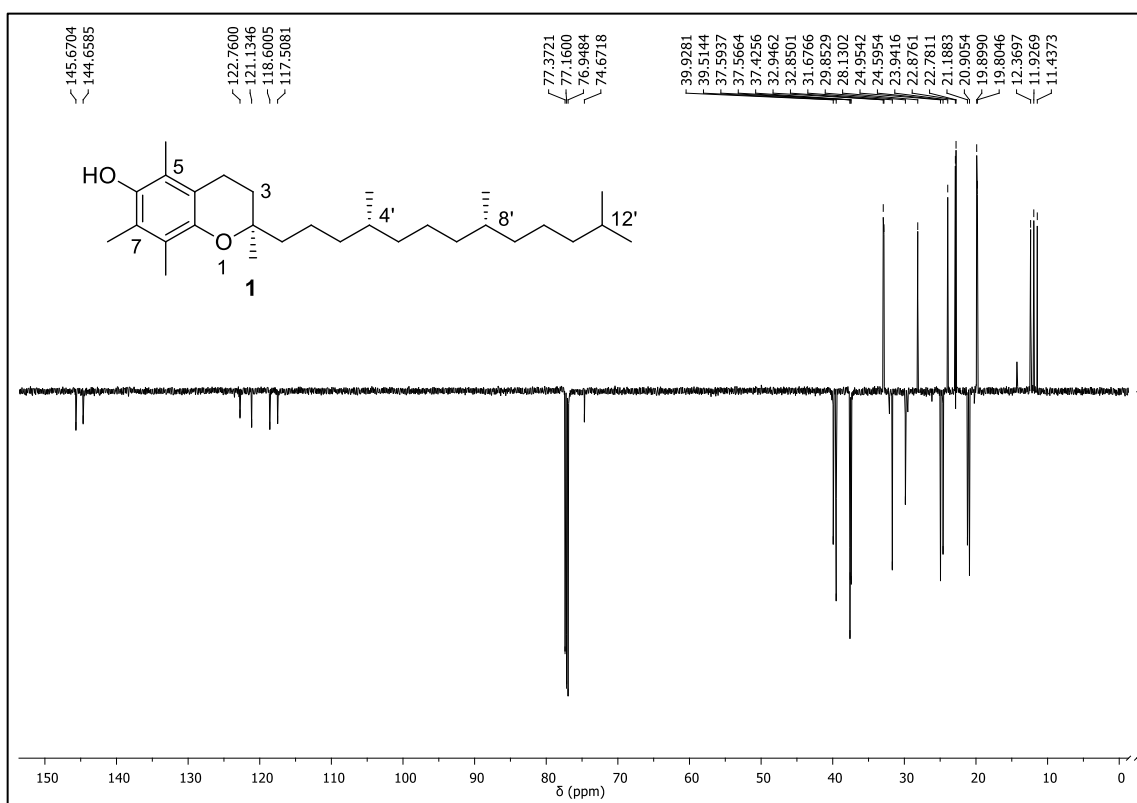


Figura 8 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de **1** (CDCl₃, 150 MHz).

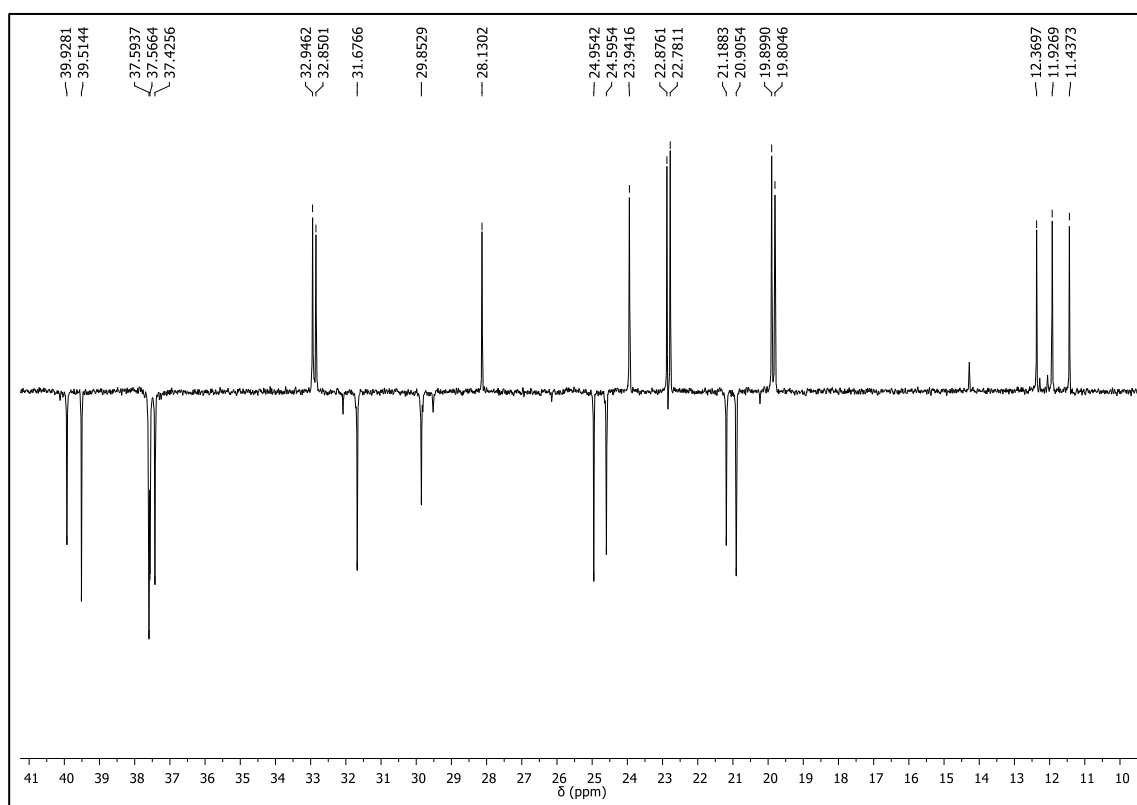


Figura 9 - Expansão da região de δ 10-41 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de **1** (CDCl_3 , 150 MHz).

3.1.2 Identificação estrutural de M1 (compostos 2-6)

O cromatograma de íons totais de M1 derivatizada (M1-d) apresentou quatro picos (Figura 10). A comparação dos espectros de massas correspondentes com os relatados na literatura, permitiu identificar quatro esteroides: colesterol (2), campesterol (3), sitosterol (4) e estigmasterol (5). O constituinte com maior abundância relativa é o estigmasterol com 90,13% (Tabela 4).

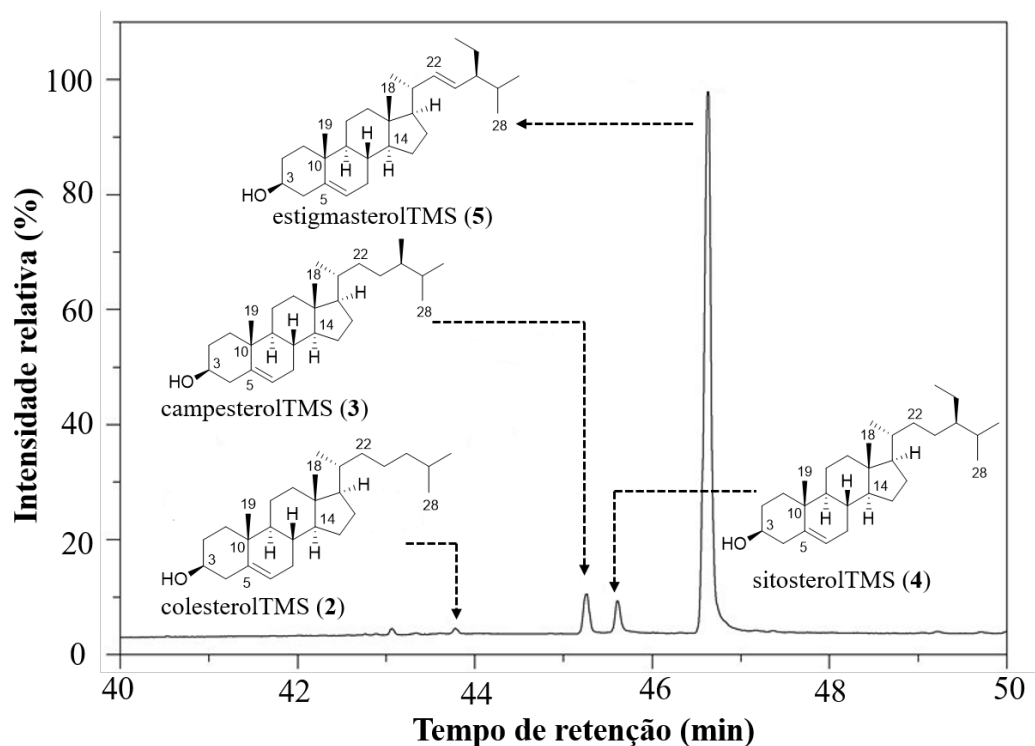


Figura 10 - Cromatograma de íons totais dos derivados sililados de M1-d.

Tabela 4 - Compostos identificados como derivados sililados em M1-d por CG-EM.

Composto	T _R (min)	Área (%)	M ⁺⁺	[M-G] ⁺⁺			
				CH ₃	TMSOH	TMSO-C ₃ H ₄	R
ColesterolTMS (2)	43,78	0,6	458	443	368	329	345
CampesterolTMS (3)	45,26	5,5	472	457	382	343	345
SitosterolTMS (4)	45,61	3,8	486	471	396	357	345
EstigmasterolTMS (5)	46,63	90,1	484	469	394	355	345

G: CH₃, TMSOH, TMSO-C₃H₄, cadeia lateral (R)

Os espectros de massas dos compostos sililados identificados em M1-d apresentam picos de íons moleculares acrescidos de 73 Da, referente a massa do TMS. Os picos *m/z* 471/469, 396/394, 357/355 e 345 são característicos de esteroides ligado a grupo TMS e correspondem

a perda de grupos metila (CH_3 , $[\text{M}-15]^+$), trimetilsilanol (TMSOH , $[\text{M}-90]^+$), propeniltrimetilsilil ($\text{TMS}-\text{C}_3\text{H}_4$, $[\text{M}-129]^+$) e da cadeia lateral respectivamente, enquanto o fragmento m/z 129 é característico da fragmentação no anel A, conforme Figura 11 (DIEKMAN; DJERASSI, 1967).

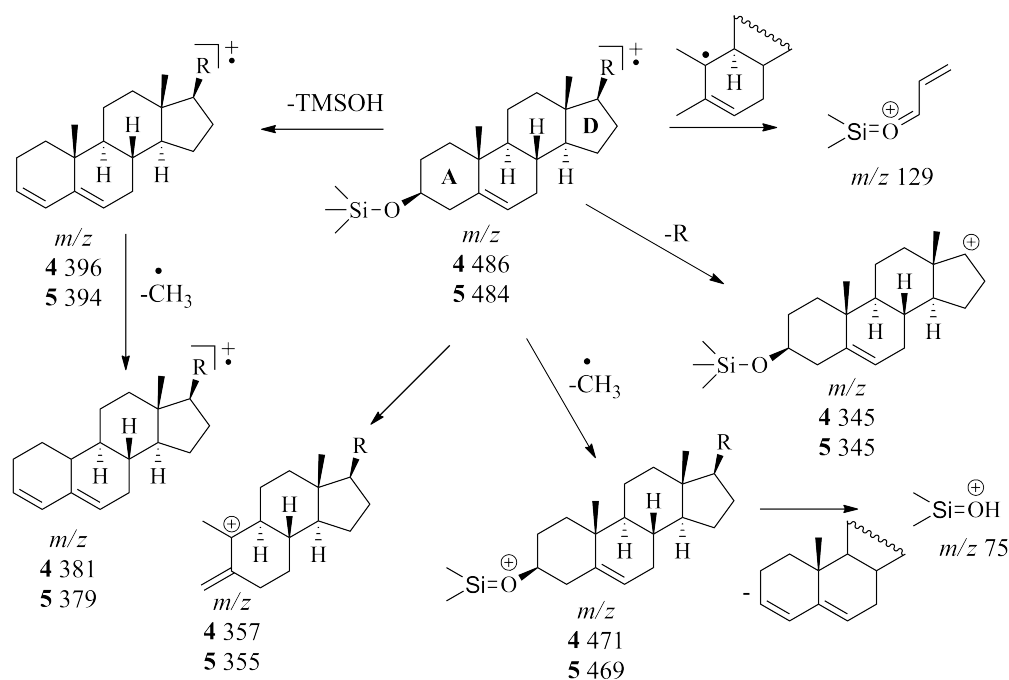


Figura 11 - Proposta de fragmentação de esteroides sililados sitosterolTMS (4) e estigmasterolTMS (5). Adaptado de Diekman; Djerassi, 1967.

O cromatograma de íons totais de M1 sem derivatização apresentou quatro picos (Figura 12), sendo possível identificar, por comparação dos espectros de massas correspondentes com os relatados na literatura e com os da biblioteca do aparelho (NIST08), os esteroides 2-4, previamente identificadas na amostra derivatizada e o triterpenoide lupeol (6) que ainda não havia sido identificado na análise anterior. Os tempos de retenção e área percentual dos picos cromatográficos de M1, sem derivatização, são apresentadas na Tabela 5.

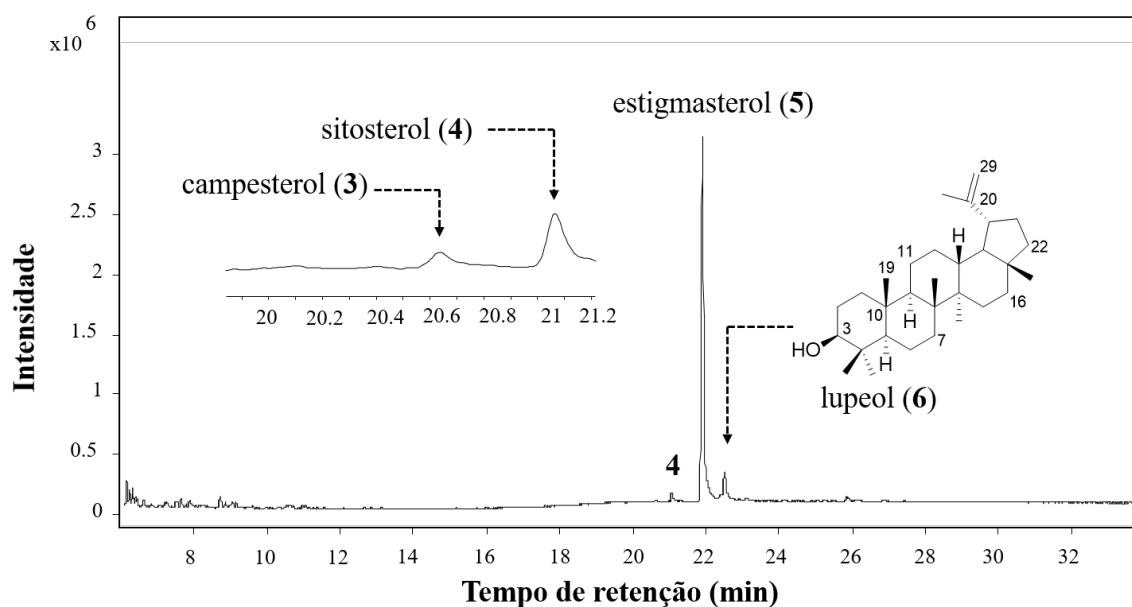


Figura 12 - Cromatograma de íons totais de M1 sem derivatização.

Tabela 5 - Compostos identificados em M1 sem derivatização por CG-EM.

Compostos	T _R (min)	Área (%)	Mach (NIST)	M ⁺	m/z
campesterol (3)	20,6	0,95	606	400	382(55), 367(92), 283(90), 255(98) e 145(100)
sitosterol (4)	21,9	91,38	919	414	396(100), 381(45), 273(25), 255(50) e 145(98)
estigmasterol (5)	21,1	1,83	766	412	394(80), 379(15), 273(60), 255(100) e 145(50)
lupeol (6)	22,5	5,84	713	426	207(100), 218(20), 203(90), 191(95) e 189(90)

Os esteroides possuem padrão de fragmentação semelhante, caracterizado pelas perdas consecutivas de água e metila, bem como da cadeia lateral seguida da perda de água e clivagem do anel C por Retro Diel-Alder, conforme Figura 13 (WYLLIE, 1977). A presença do lupeol (5) é sugerida pelos fragmentos *m/z* 207, 203 e 189, característicos de triterpenoides de esqueleto lupano, conforme mostrada na Figura 14 (ASSIMOPOULOU; PAPAGEOORGIOU, 2005).

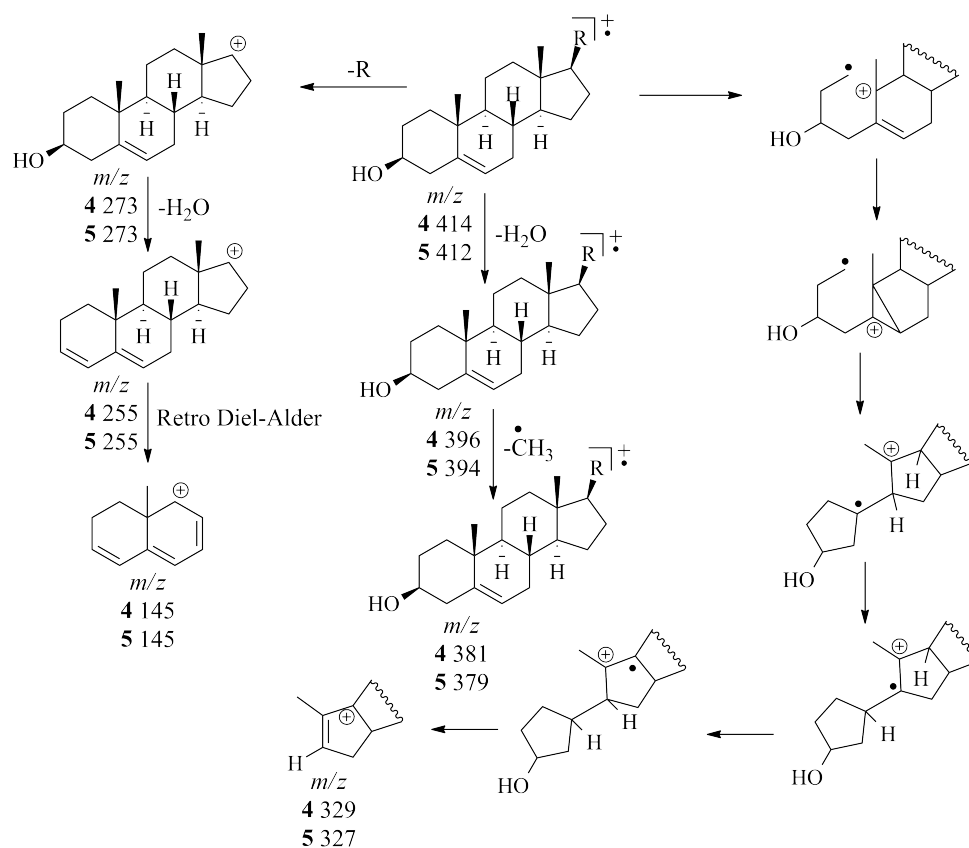


Figura 13 - Proposta de fragmentação de esteroides sitosterol (4) e estigmasterol (5). Adaptado de Wyllie, 1977.

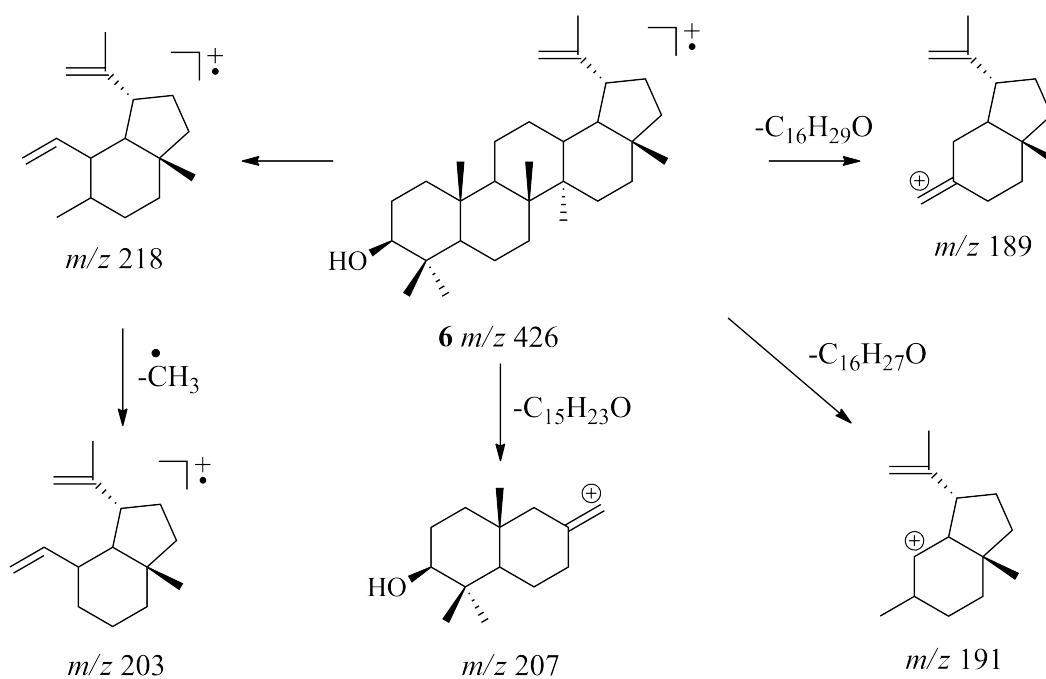
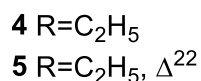
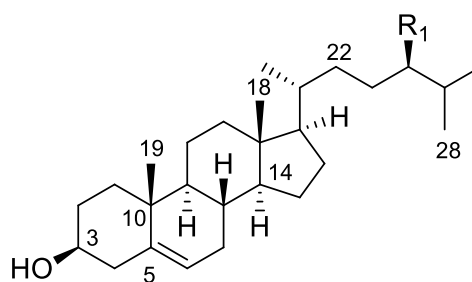


Figura 14 - Proposta de fragmentação para o lupeol (6). Adaptado de Assimopoulou; Papageorgiou, 2005.

A análise por CG-EM de M1 antes e depois da reação de sililação com BSTFA mostrou-se complementar, permitindo identificar um número maior de compostos. Após derivatização com N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (PRYTZYK et al., 2003) e análise por CG-EM revelou ser uma mistura constituída por quatro esteroides: colesterol (2), campesterol (3), sitosterol (4) e estigmasterol (5) e um triterpenoide: lupeol (6). A mistura de esteroides sitosterol (4) e estigmasterol (5) e o triterpenoide lupeol (6) foram relatados por Ignoato et al. (2013) no extrato metanólico das folhas e dos galhos de *M. hirtum*. O sitosterol (4) foi ainda isolado do alburno de *M. scleroxylon* (EYTON et al., 1965), do tronco de *M. secundiflorum* e *M. kuhlmannii* (FORMIGA et al., 1975; OLLIS et al., 1978a) e do cerne de *M. villosum* (KUROSAWA et al., 1978). Este é o primeiro relato de identificação dos esteroides colesterol (2) e campesterol (3) no gênero *Machaerium*.

3.1.3 Identificação estrutural da mistura de 4 e 5



A mistura de **4** e **5** (108,8 mg), correspondente ao subgrupo C-5, foi obtida como um sólido branco, solúvel em clorofórmio (Esquemas 1 e 2). A análise por CCD, eluída com hexano/AcOEt (8:2) e revelada com solução de Ce(SO₄)₂, originou uma única mancha de coloração azul, que com o prolongamento do aquecimento torna-se roxa.

Os compostos **4** e **5** foram identificados pela análise dos espectros de RMN ¹H (Figuras 15 e 16) e por comparação com dados da literatura (CARVALHO et al., 2019a; DE-EKNAMKUL; POTDUANG, 2003).

O espectro de RMN ¹H de **4+5** apresentou um perfil característico de esteroides Δ⁵ com dois simples em δ 0,67 e 1,00 correspondentes aos hidrogênios metílicos em carbonos não hidrogenados (H-18 e H-19); um multipletto em δ 3,52 atribuído ao hidrogênio oximetínico em C-3 e um dupletto largo em δ 5,35 (*J*=5,1 Hz) de hidrogênio olefínico ligado a C-6. Observou-se ainda dois duplos dupletos de baixa intensidade em δ 5,01 e 5,15 (*J*=8,7 e 15,1 Hz) que sugeriu tratar-se dos hidrogênios olefínicos (H-22 e H-23) da cadeia lateral da substância **5**, indicando uma mistura.

A comparação dos dados de RMN ¹H obtidos com os relatados por De-Eknamkul e Potduang (2003) e Ferreira et al. (2014) permitiu identificar C-5 como sendo uma mistura dos esteroides sitosterol (**4**) e estigmasterol (**5**) na proporção de 80:20, sendo a porcentagem de estigmasterol (**5**) determinada pela expressão: %(**5**) = (A×100)/B, onde A é a integração do sinal em δ 5,02 atribuído a H-23 do estigmasterol (**5**) e B é integração do sinal do hidrogênio olefínico (H-6, δ 5,35), correspondente aos dois esteroides (**4** e **5**). A porcentagem do sitosterol na mistura é, portanto, 100 – % do estigmasterol (**5**) (VIEIRA JÚNIOR et al., 2007).

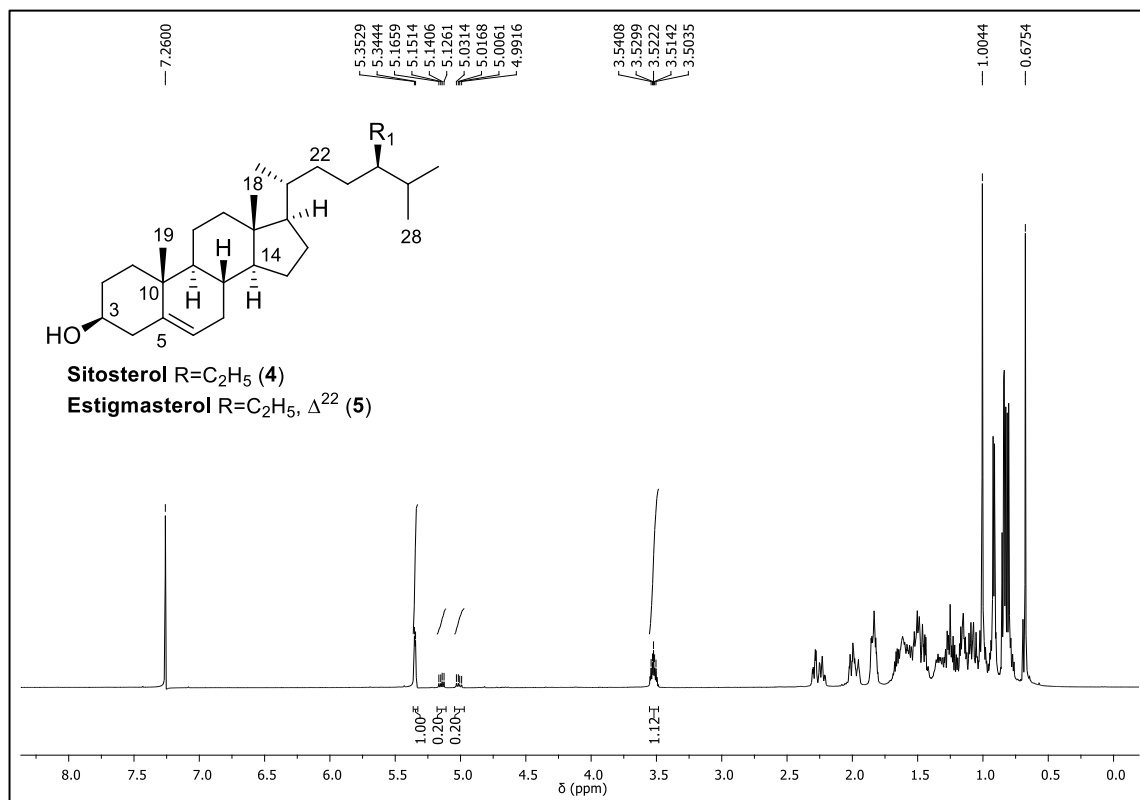


Figura 15 - Espectro de RMN 1H de C-5 ($CDCl_3$, 600 MHz).

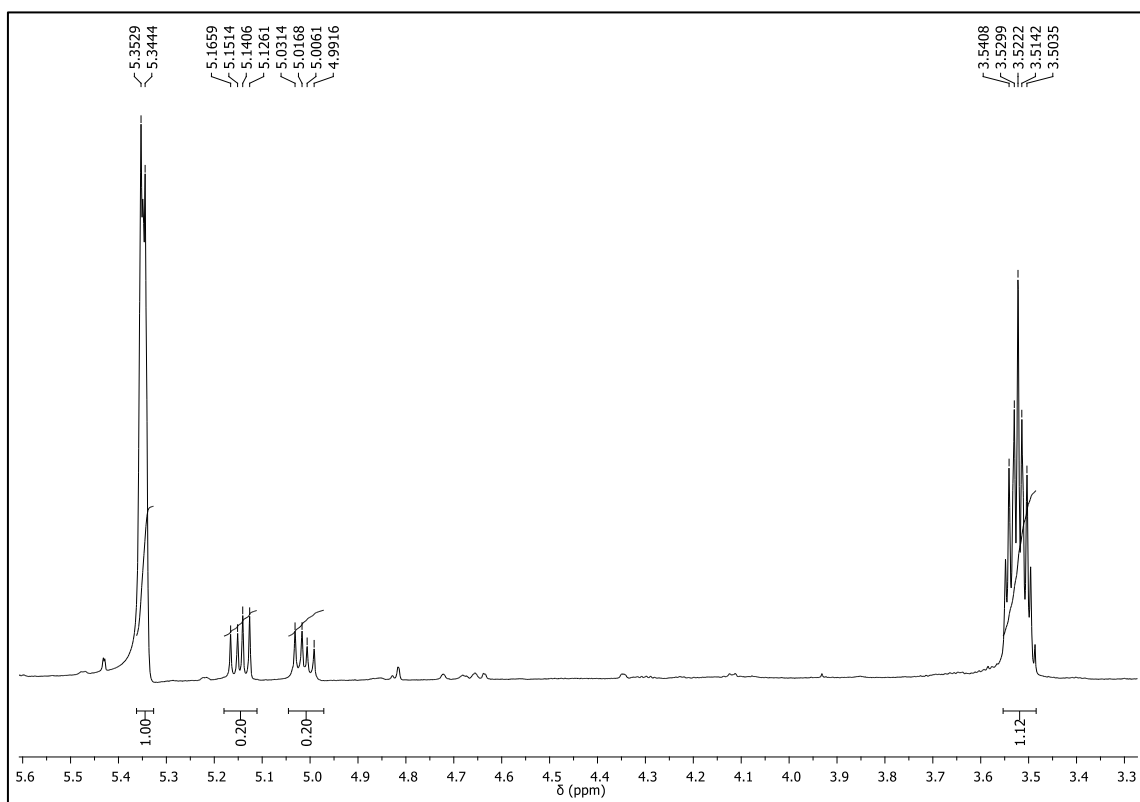
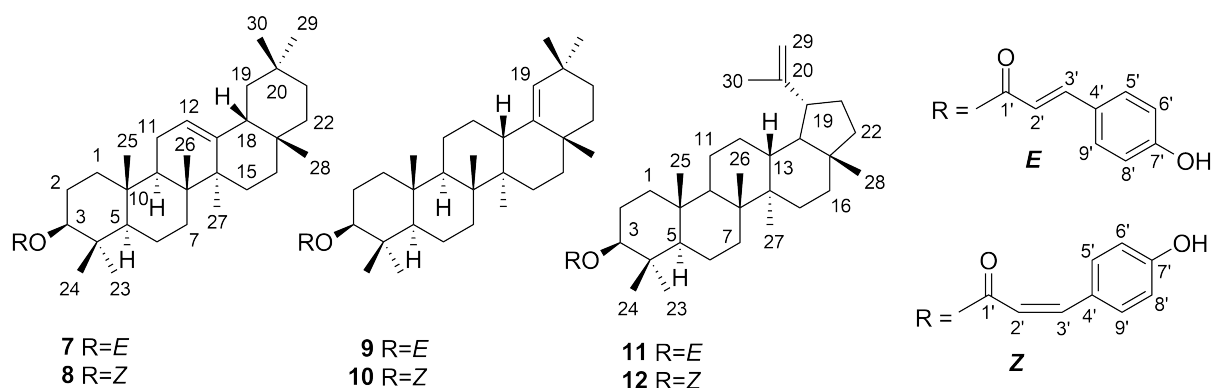


Figura 16 - Expansão da região de δ 3,3-5,6 do espectro de RMN 1H de C-5 ($CDCl_3$, 600 MHz).

3.1.4 Identificação estrutural da mistura M2 (compostos 7 - 12)



A mistura de **7-12** (26,8 mg), correspondente ao subfração M2, foi obtida como um sólido amarelado, solúvel em clorofórmio (Esquemas 1 e 2). A análise por CCD, eluída com hexano/AcOEt (8:2) e revelada com solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, originou uma única mancha de coloração alaranjada.

O espectro de RMN ^1H (Figuras 17-20) apresentou um perfil característico de compostos pertencentes à classe dos triterpenoides, evidenciado pela presença de um duplo duplete em δ 4,54 ($J=4,6$ e $11,5$ Hz) referente ao hidrogênio oximetínico em C-3, típico de hidrogênio 3α -axial em triterpenoides esterificado em C-3 (ARAÚJO; CHAVES, 2005; DAVID; DAVID; GUEDES, 2004). Adicionalmente mostrou um conjunto de simpletos entre δ 0,73 e 1,25 correspondentes a hidrogênios metílicos ligados a átomos de carbono saturados e não hidrogenados (ARAÚJO; CHAVES, 2005).

Os sinais na região das olefinas sugeriram a ocorrência de uma mistura. O tripleto em δ 5,19 ($J=3,4$ Hz, H-12) refere-se ao hidrogênio de ligação dupla trissubstituída de triterpenoide com esqueleto olean-12-eno (SOUZA et al., 2001). O duplete em δ 4,86 ($J=5,2$ Hz) foi atribuído a H-19 da ligação dupla trissubstituída de triterpenoide com esqueleto olean-18-eno (AWAN; YASIN; MINHAS, 2013). Os simpletos largos em 4,56 e 4,68, característico de hidrogênios em ligação dupla *gem*-dissubstituída, foram atribuídos a H-29a e H-29b do esqueleto lup-20(29)-eno (AWAN; YASIN; MINHAS, 2013).

O espectro de RMN ^1H apresentou também dupletos em δ 5,83 (1H, $J=12,7$ Hz, H-2') e 6,83 (1H, $J=12,9$ Hz, H-3') característicos de sistema carbonílico α,β -insaturado com configuração *Z*. Adicionalmente observou-se dois dubletos em δ 6,79 ($J=8,6$ Hz) e 7,63 ($J=8,5$ Hz) indicativos de anel aromático *para*-dissubstituído possibilitando sugerir a esterificação das unidades triterpênicas com o grupo *Z*-*p*-cumaroila. Observou-se ainda, dois dupletos de menor intensidade em δ 6,30 (1H, $J=15,9$ Hz, H-2') e 7,61 (1H, $J=17,8$ Hz, H-3'), indicativos de

sistema carbonílico α,β -insaturado com configuração *E*, e um par de dubletos em δ 6,82 ($J=8,6$ Hz) e 7,43 ($J=8,5$ Hz) indicativos de anel aromático *para*-substituído, sugerindo a esterificação das unidades triterpênicas também com o grupo *E-p*-cumaroila (ULUBELEN et al., 1994; DAVID; DAVID; GUEDES, 2004).

O espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ 135° (Figuras 21-27) apresentou sinais que confirmam o grupo *p*-cumaroila. O isômero *Z* apresentou os sinais em δ 166,5 (C-1'), 115,8 (C-2'), 143,1 (C-3'), 127,6 (C-4'), 132,3 (C-5'/C-9'), 114,9 (C-6'/C-8') e 156,6 (C-7'), enquanto δ 167,3 (C-1'), 116,4 (C-2'), 143,9 (C-3'), 127,4 (C-4'), 132,3 (C-5'/C-9'), 114,9 (C-6'/C-8') e 158,5 (C-7') foram atribuídos ao isômero *E* (YANG et al., 2006).

As unidades triterpênicas da mistura foram confirmadas pelos pares de sinais de carbono olefinicos em δ 151,1/109,5; 145,3/121,9; 142,8/129,8 característicos de esqueletos do tipo lup-20(29)-eno, olean-12-eno e olean-18-eno, respectivamente (OLEA; ROQUE, 1990).

Os dados de RMN ^{13}C (Tabela 6) obtidos para a mistura empregando como modelos os dados de RMN da β -amirina (MAHATO; KUNDU, 1994) e o dos isômeros (*E/Z*)-*p*-cumaroil (YANG et al., 2006) permitiu propor a estrutura dos compostos **7** e **8** como sendo 3-*O*-(*E*)-*p*-cumaroil- β -amirina (**7**), 3-*O*-(*Z*)-*p*-cumaroil- β -amirina (**8**). Os compostos **9** e **10** tiveram suas estruturas propostas como 3-*O*-(*E*)-*p*-cumaroilgermanicol (**9**) e 3-*O*-(*Z*)-*p*-cumaroilgermanicol (**10**) por comparação dos dados de RMN obtidos (Tabela 6) com os relatados por Yang et al. (2006). A comparação dos dados de RMN (Tabela 6) dos compostos **11** e **12** com os modelos acetato de lupeol (PERFEITO et al., 2005) e isômeros (*E/Z*)-*p*-cumaroil (YANG et al., 2006) permitiu propor a estrutura 3-*O*-(*E*)-*p*-cumaroillupeol (**11**) e 3-*O*-(*Z*)-*p*-cumaroillupeol (**12**). Este é o primeiro relato dos compostos **7-12** na família Fabaceae.

Tabela 6 - Dados de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° para a mistura M2 (compostos **7-12**) (CDCl_3 , 150 MHz)

C	δ_c (ppm)											
	7	8	B1	B2	B3	9	G1	10	G2	11	12	L1
1	38,6	38,6	38,7	-	-	38,6	38,7	38,6	38,7	38,6	38,6	38,4
2	27,5	27,5	27,3	-	-	27,5	23,6	27,5	23,7	27,5	27,5	23,6
3	80,9	80,9	79,0	-	-	81,00	81,0	81,00	81,0	81,00	81,00	80,9
4	38,6	38,6	38,8	-	-	38,6	38,1	38,6	37,9	38,6	38,6	37,7
5	55,6	55,6	55,3	-	-	55,3	55,6	55,3	55,7	55,3	55,3	55,3
6	18,15	18,15	18,5	-	-	18,3	18,2	18,3	18,2	18,2	18,2	18,1
7	32,9	32,9	32,8	-	-	34,7	34,6	34,7	34,5	34,3	34,3	34,3
8	38,6	38,6	38,8	-	-	40,0	40,8	40,0	40,8	40,8	40,8	40,9
9	47,5	47,5	47,7	-	-	51,1	51,1	51,1	51,1	50,3	50,3	50,3
10	37,9	37,9	37,6	-	-	37,1	37,2	37,1	37,2	37,1	37,1	37,1
11	23,7	23,7	23,6	-	-	21,1	21,2	21,1	21,1	21,1	21,1	20,9
12	121,6	121,6	121,8	-	-	26,3	26,2	26,3	26,2	25,3	25,3	25,0
13	145,2	145,2	145,1	-	-	38,40	38,4	38,40	38,4	38,3	38,3	38,0
14	41,38	41,38	41,8	-	-	43,3	43,4	43,3	43,3	43,3	43,3	42,9
15	26,2	26,2	26,2	-	-	27,52	27,5	27,52	27,5	27,5	27,5	27,5
16	26,9	26,9	27,0	-	-	38,0	37,4	38,0	37,4	35,6	35,6	35,5
17	32,4	32,4	32,5	-	-	34,5	34,4	34,5	34,4	43,6	43,6	43,0
18	47,2	47,2	47,4	-	-	142,7	142,7	142,7	142,7	48,3	48,3	48,2
19	46,8	46,8	46,9	-	-	129,9	129,8	129,9	129,8	48,0	48,0	48,0
20	31,4	31,4	31,1	-	-	32,6	32,4	32,6	32,4	151,0	151,0	150,9
21	34,2	34,2	34,8	-	-	33,2	33,4	33,2	33,4	29,8	29,8	29,8
22	37,4	37,4	37,2	-	-	37,6	37,7	37,6	37,7	40,4	40,4	40,0
23	28,2	28,2	28,2	-	-	28,0	28,0	28,0	28,0	28,2	28,2	28,0
24	15,9	15,9	15,5	-	-	15,6	15,5	15,6	16,1	15,6	15,6	16,5
25	15,6	15,6	15,6	-	-	16,1	16,1	16,1	16,5	16,2	16,2	16,1
26	16,8	16,8	16,9	-	-	16,8	16,7	16,8	16,8	15,9	15,9	16,0
27	25,9	25,9	26,0	-	-	14,6	14,6	14,6	14,6	14,5	14,5	14,4
28	28,4	28,4	28,4	-	-	25,5	25,3	25,5	25,3	18,0	18,0	18,1
29	33,3	33,3	33,3	-	-	31,1	31,4	31,1	31,4	109,4	109,4	109,3
30	23,8	23,8	23,7	-	-	29,2	29,2	29,2	29,2	19,5	19,5	19,2
1'	167,3	166,5	-	167,3	166,5	167,3	167,3	166,5	166,5	167,3	166,5	-
2'	116,4	115,8	-	116,4	118,0	116,4	116,4	115,8	118,0	116,4	115,8	-
3'	143,9	143,1	-	144,0	143,0	143,9	144,0	143,1	143,0	143,9	143,1	-
4'	127,4	127,6	-	127,4	127,7	127,4	127,4	127,6	127,7	127,4	127,6	-
5'	132,3	132,3	-	129,9	132,3	132,3	129,9	132,3	132,3	132,3	132,3	-
6'	114,9	114,9	-	115,8	114,9	114,9	115,8	114,9	114,9	114,9	114,9	-
7'	158,5	156,6	-	157,6	156,5	158,5	157,6	156,6	156,5	158,5	156,6	-
8'	114,9	114,9	-	115,8	114,9	114,9	115,8	114,9	114,9	114,9	114,9	-
9'	132,3	132,3	-	129,9	132,3	132,3	129,9	132,3	132,3	132,3	132,3	-

B1 = modelo β -amirina (Mahato e Kundu, 1994); **B2** = (*E*)-*p*-cumaroil (Yang et al., 2006); **B3** = (*Z*)-*p*-cumaroil (Yang et al., 2006); **G1** = 3-*O*-(*E*)-*p*-cumaroilgermanicol; **G2** = 3-*O*-(*Z*)-*p*-cumaroilgermanicol (Yang et al., 2006); **L1** = modelo acetato de lupeol (Perfeito et al., 2005).

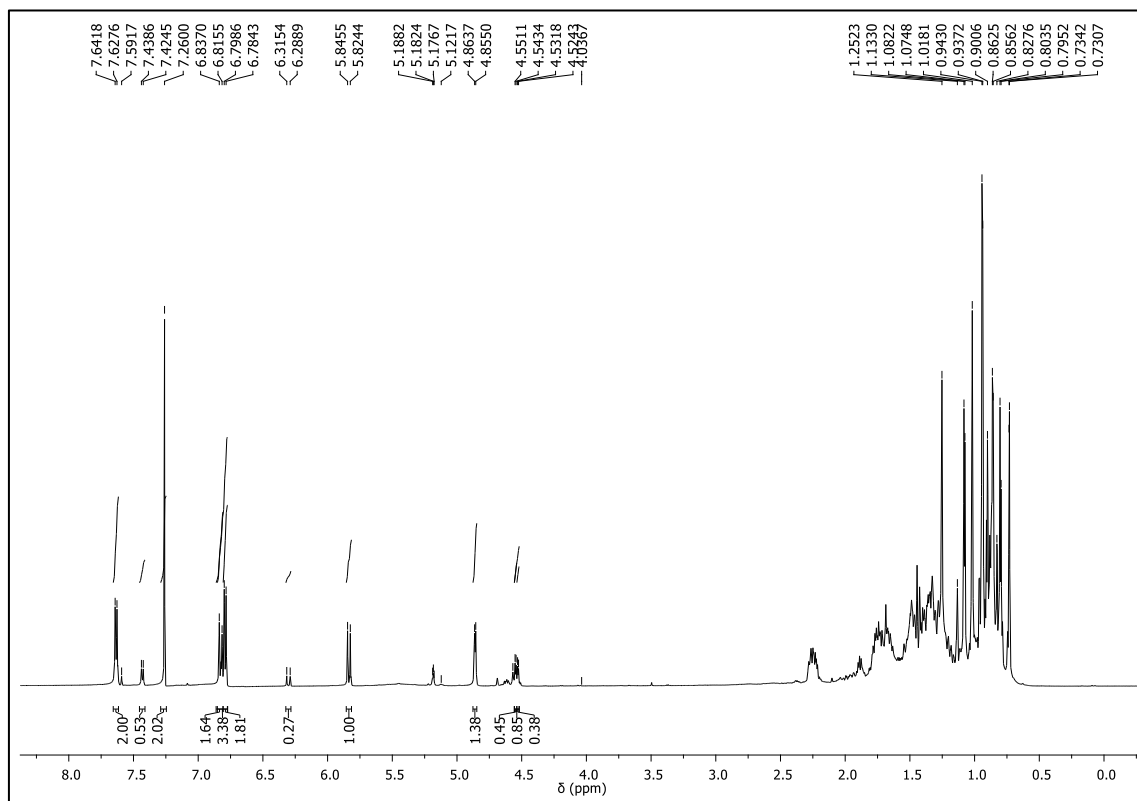


Figura 17 - Espectro de RMN ^1H de M2 (CDCl_3 , 600 MHz).

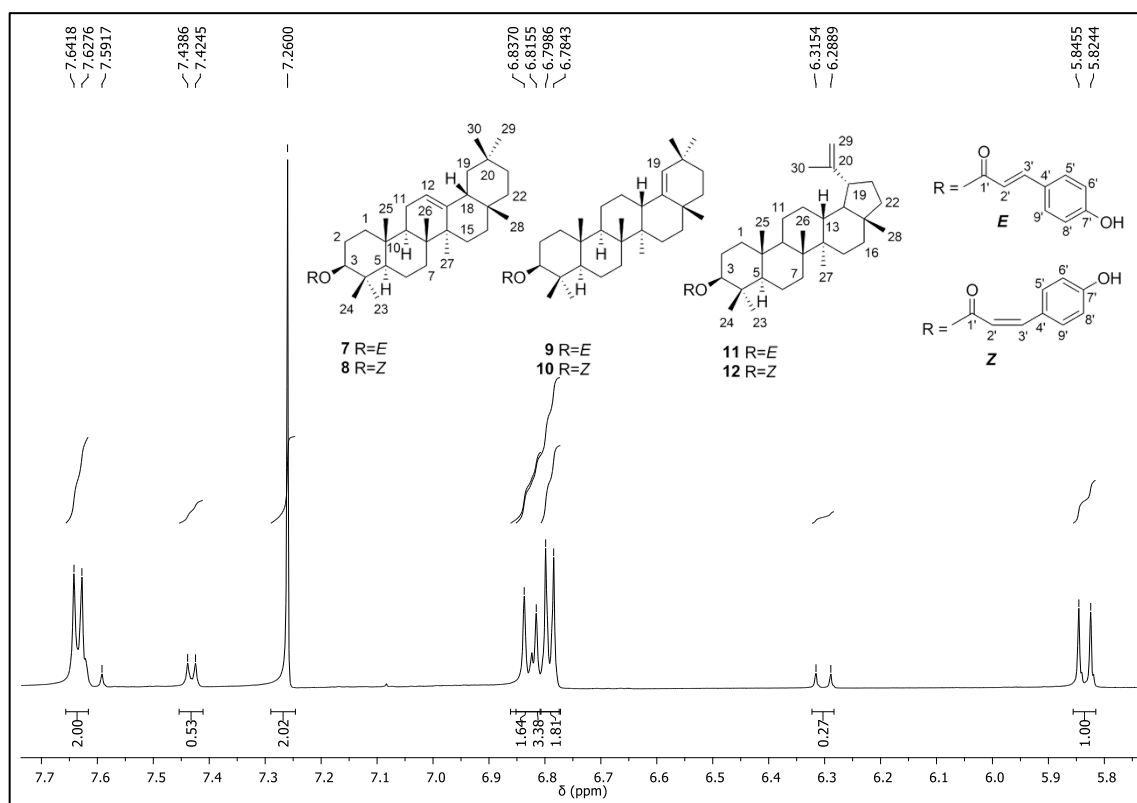


Figura 18 - Expansão da região de δ 5,8-7,7 do espectro de RMN ^1H de M2 (CDCl_3 , 600 MHz).

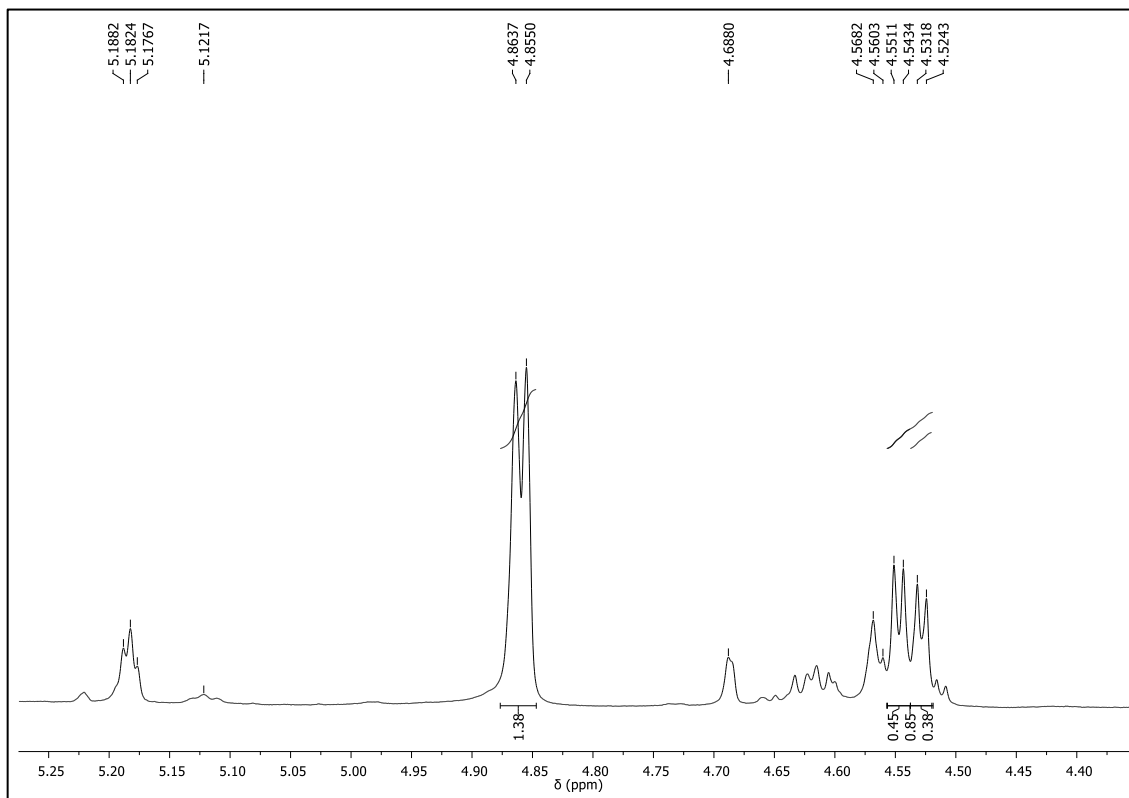


Figura 19 - Expansão da região de δ 4,4-5,25 de espectro de RMN ^1H de M2 (CDCl_3 , 600 MHz).

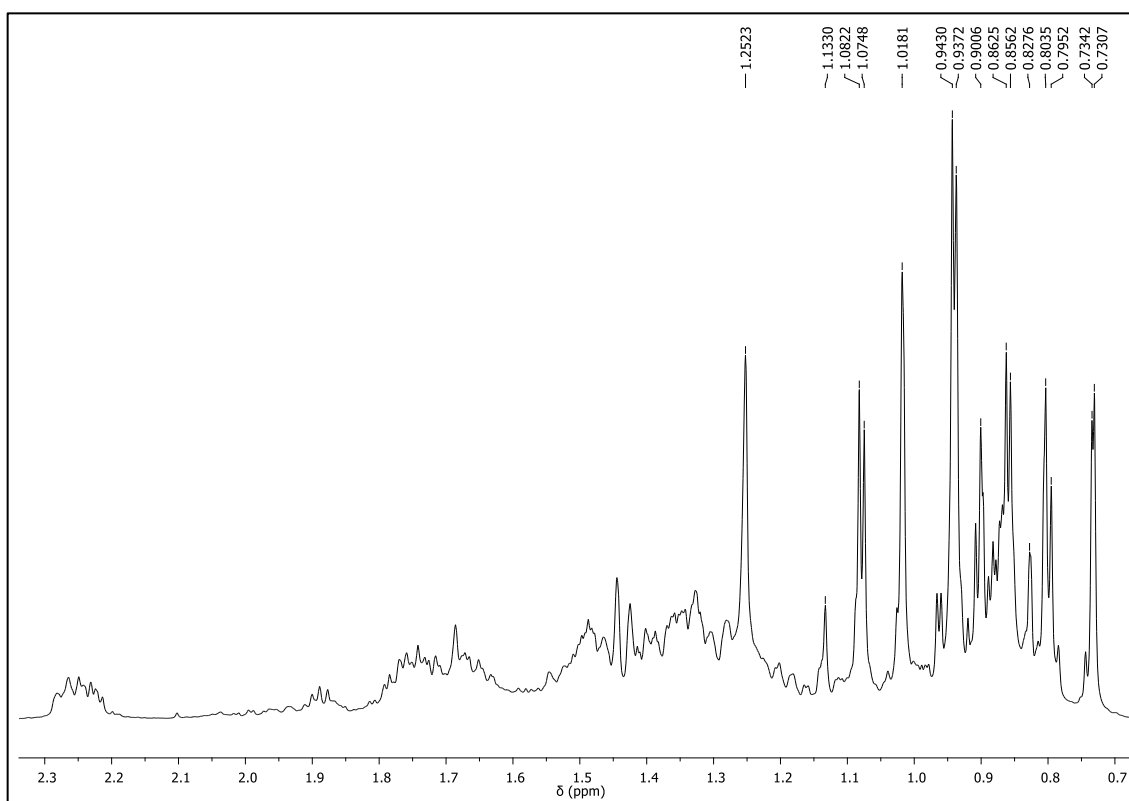


Figura 20 - Expansão da região de δ 0,7-2,3 do espectro de RMN ^1H de M2 (CDCl_3 , 600 MHz).

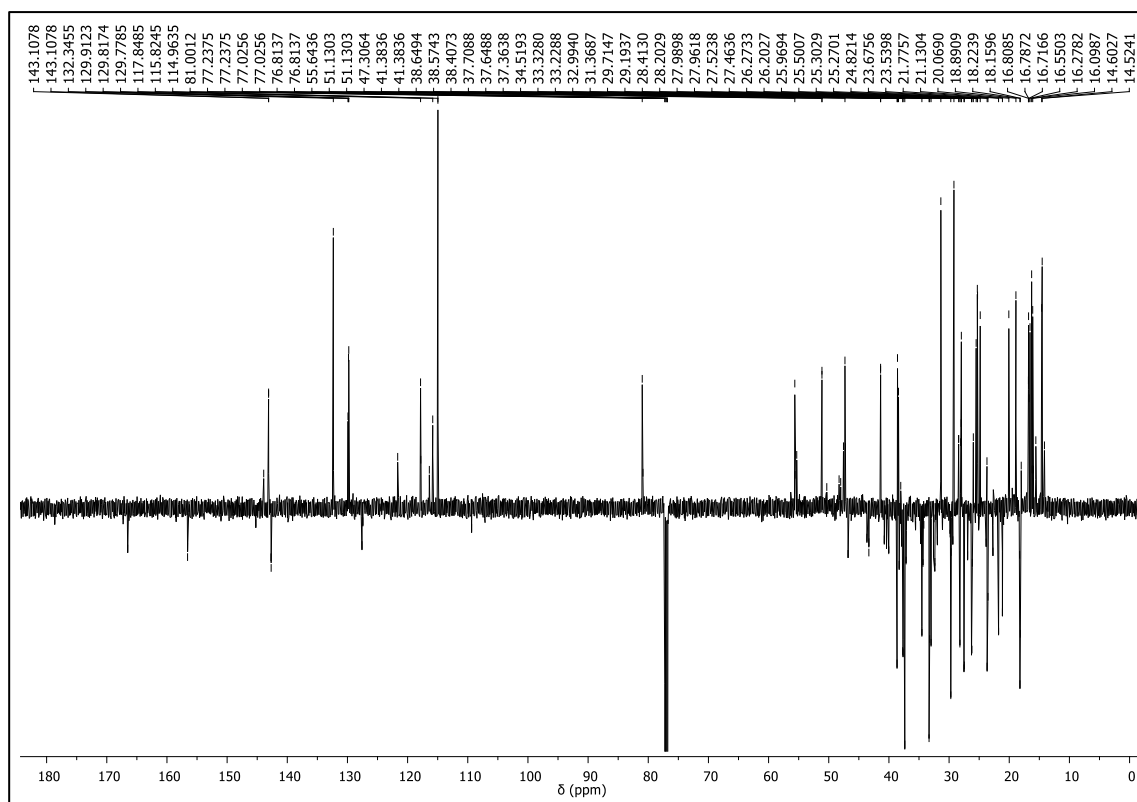


Figura 21 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de M2 (CDCl_3 , 150 MHz).

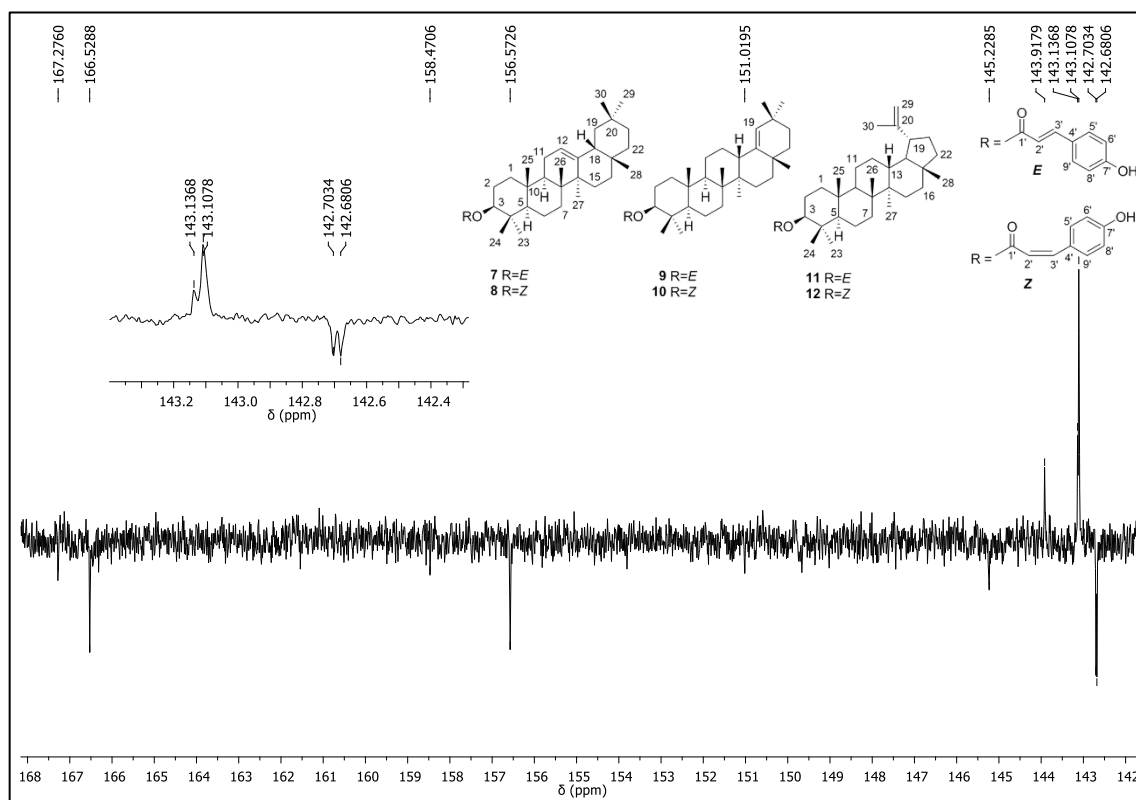


Figura 22 - Expansão da região de δ 142-168 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de M2 (CDCl_3 , 150 MHz).

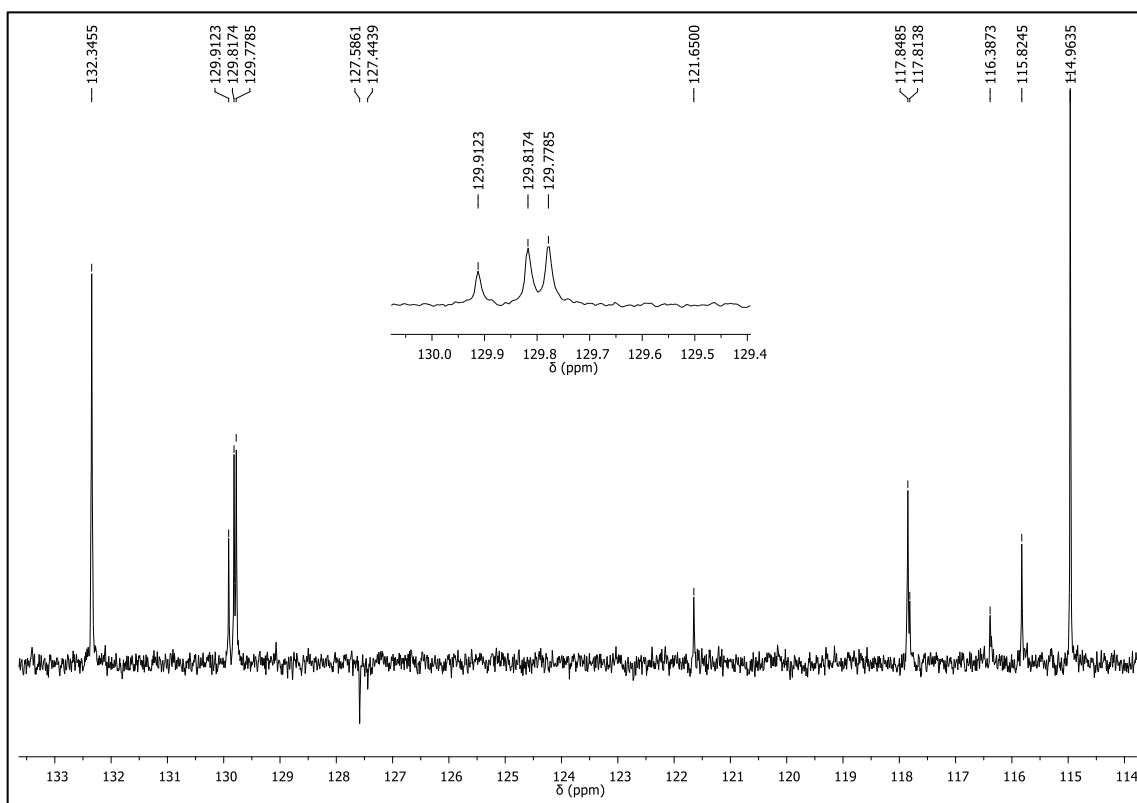


Figura 23 - Expansão da região de δ 114-133 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de M2 (CDCl_3 , 150 MHz).

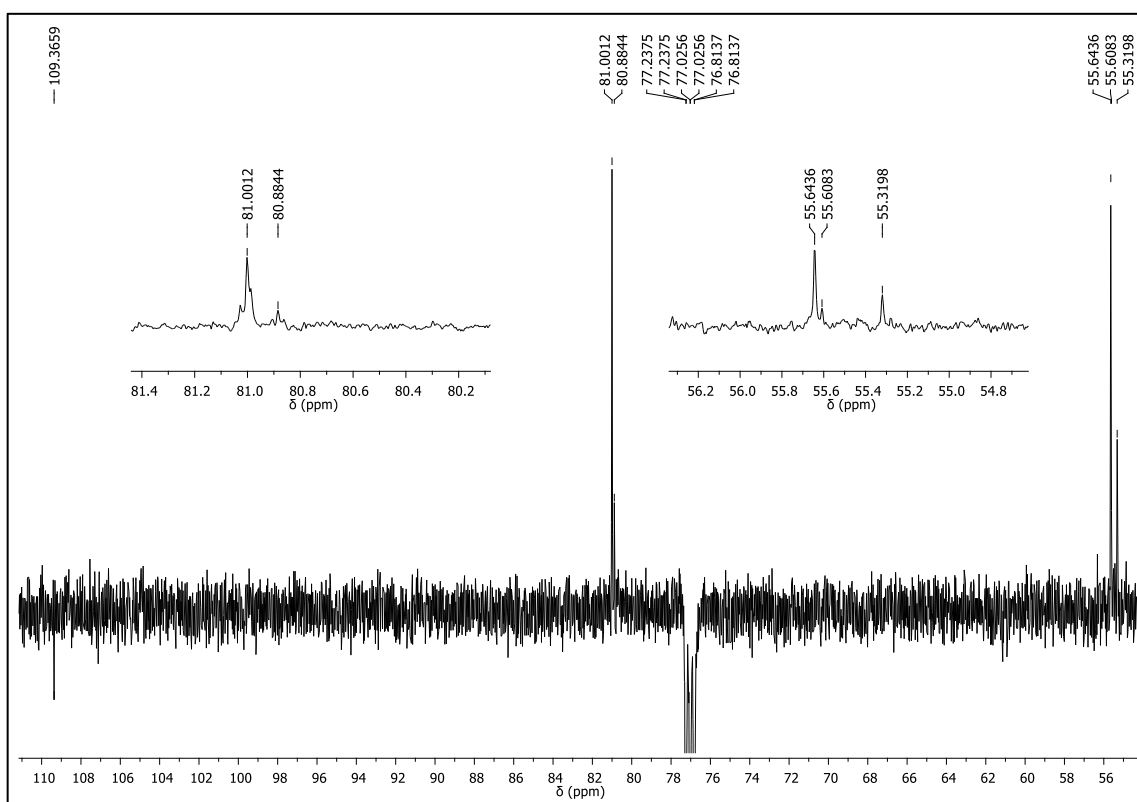


Figura 24 - Expansão da região de δ 56-110 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de M2 (CDCl_3 , 150 MHz).

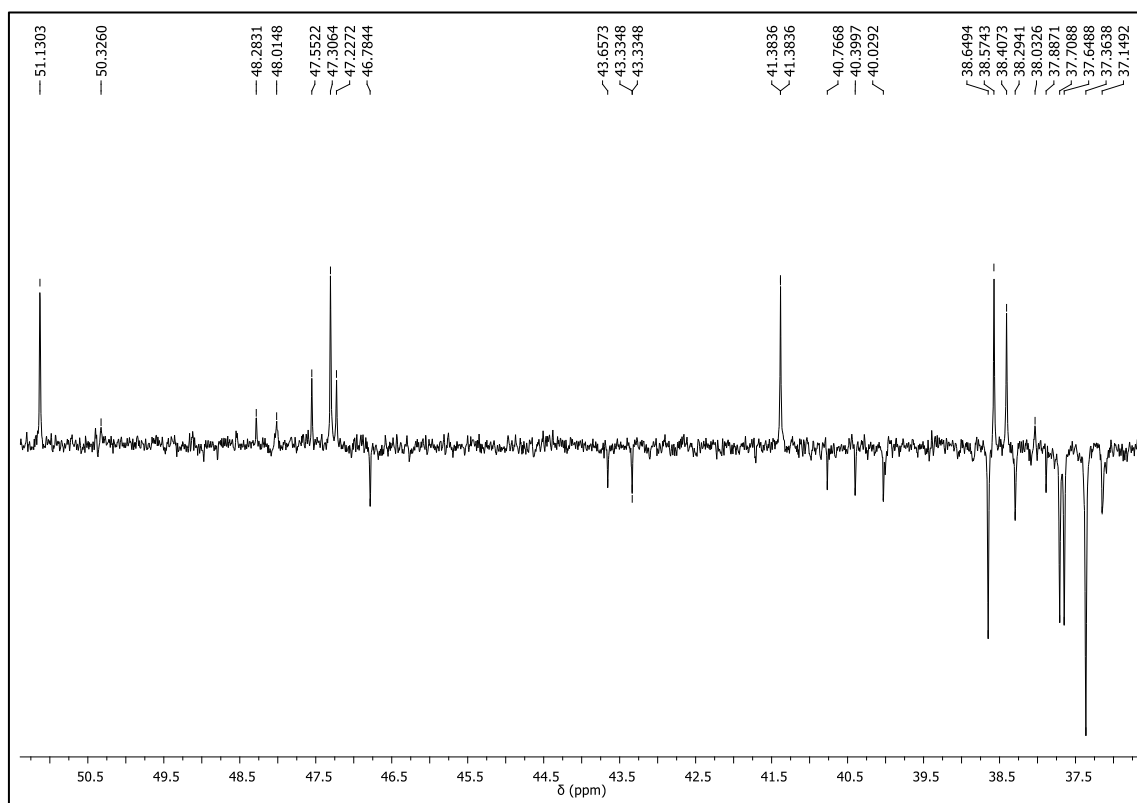


Figura 25 - Expansão da região de δ 37-51 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de M2 (CDCl_3 , 150 MHz).

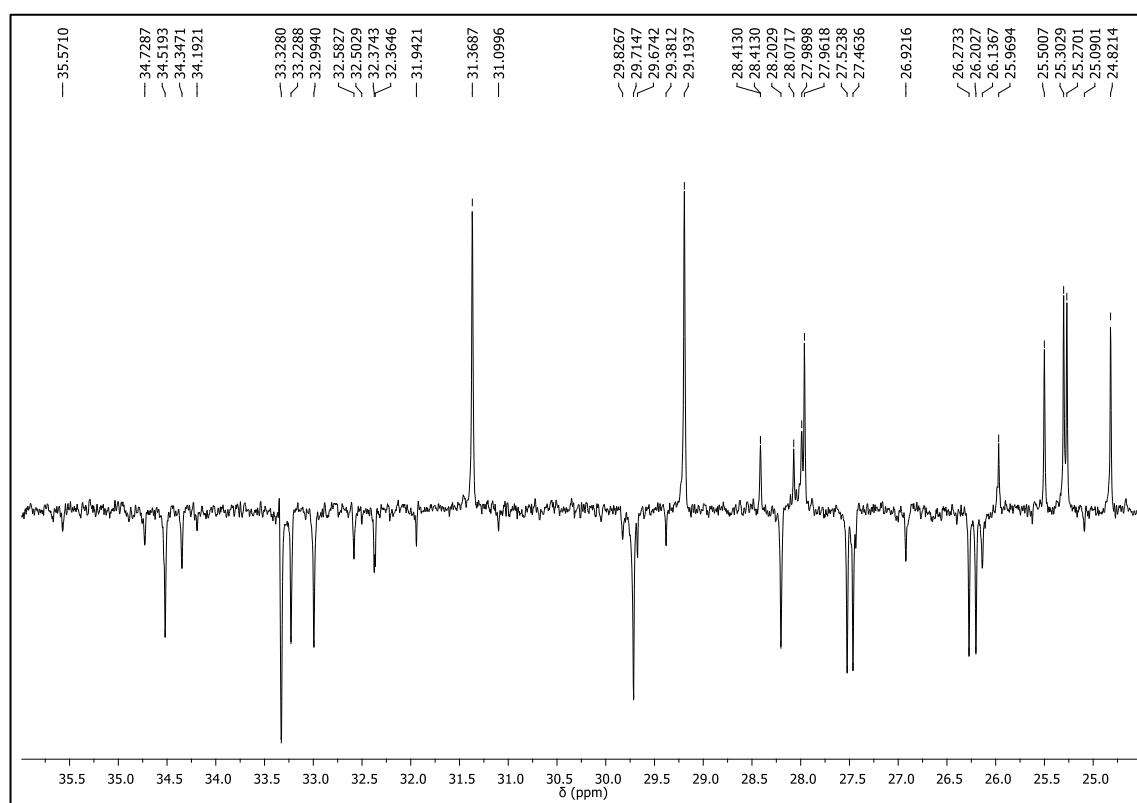


Figura 26 - Expansão da região de δ 25-36 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de M2 (CDCl_3 , 150 MHz).

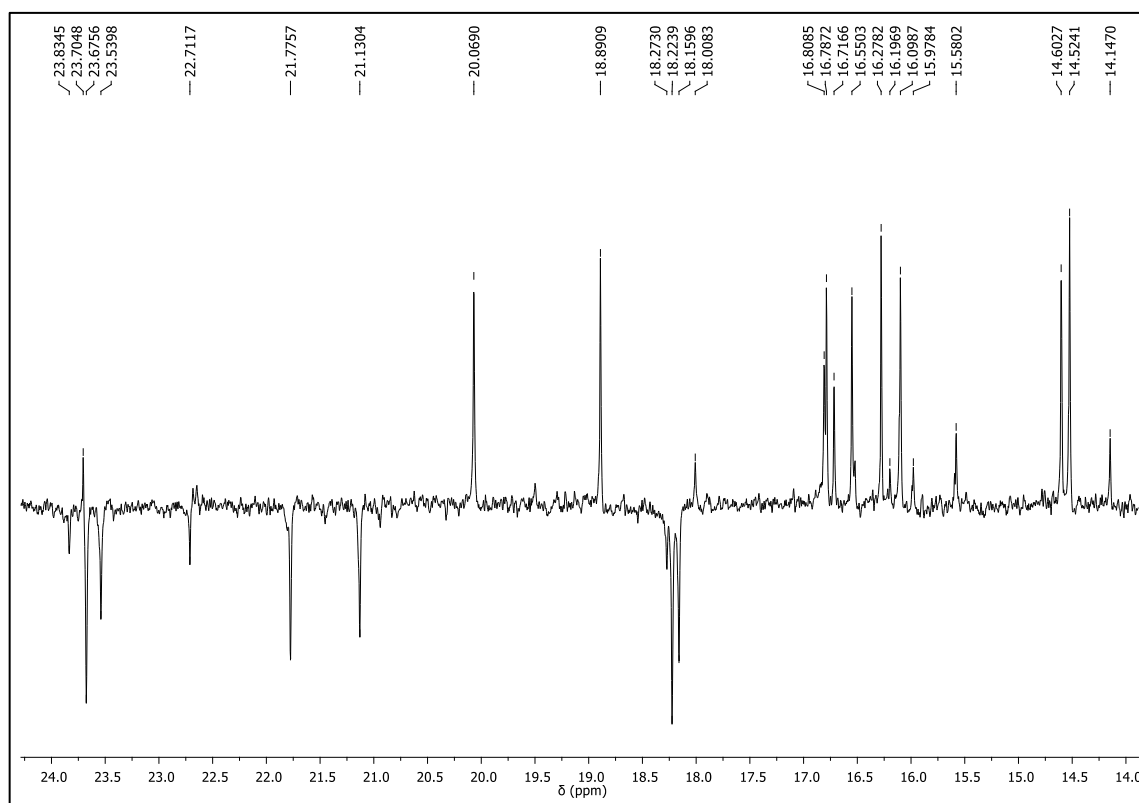


Figura 27 - Expansão da região de δ 14-24 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de M2 (CDCl_3 , 150 MHz).

3.2 Identificação dos constituintes químicos da fração acetato de etila da partição do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium*

3.2.1 Identificação dos constituintes químicos da subfração H_2O por DI-ESI-MS/MS

A subfração aquosa, oriunda fração acetato de etila (FAEFMa) do extrato etanólico das folhas (EEFMa), depois de analisada por inserção direta em espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (DI-ESI-MS/MS), no modo negativo, é mostrada no *fingerprint*, conforme Figura 28. Esta análise resultou na identificação de dez compostos: quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**13**), quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**14**), quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosídeo (**15**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 3)-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**16**), canferol-3-ramnosil-7-[6-feruloil-hexosil-(1 \rightarrow 3)-ramnosídeo] (**17**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**18**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**19**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosídeo (**20**), canferol-3-*O*-hexosídeo (**21**) e ácido 8(17),13-labdadieno-15,19-dióico (**22**) (Tabela 7 e Figuras 29).

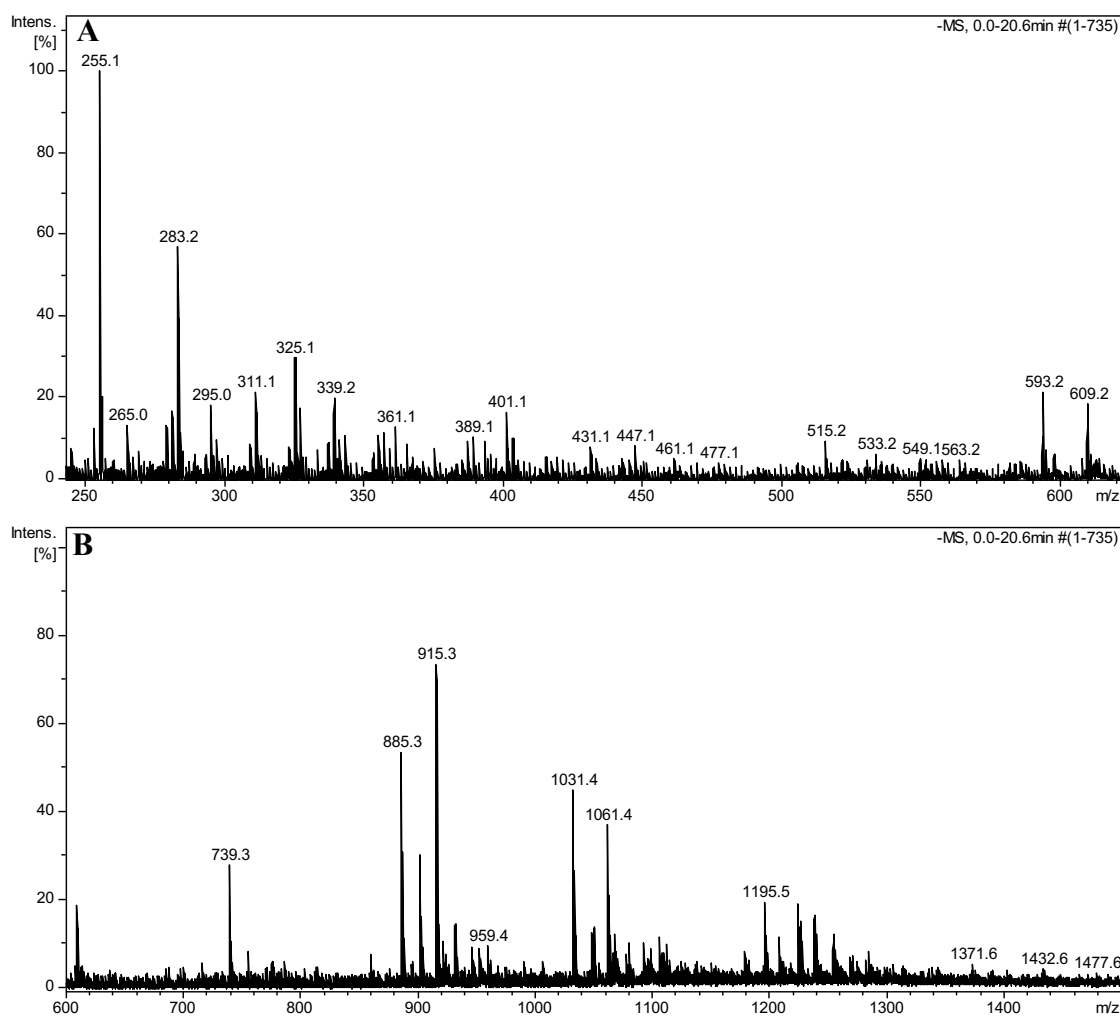


Figura 28 - *Fingerprint* da subfração aquosa oriunda da FAEFMa do EEFMa obtido por DI-ESI-MS/MS, no modo negativo. Expansão: m/z 250-600 (A) e m/z 600 to 1500 (B).

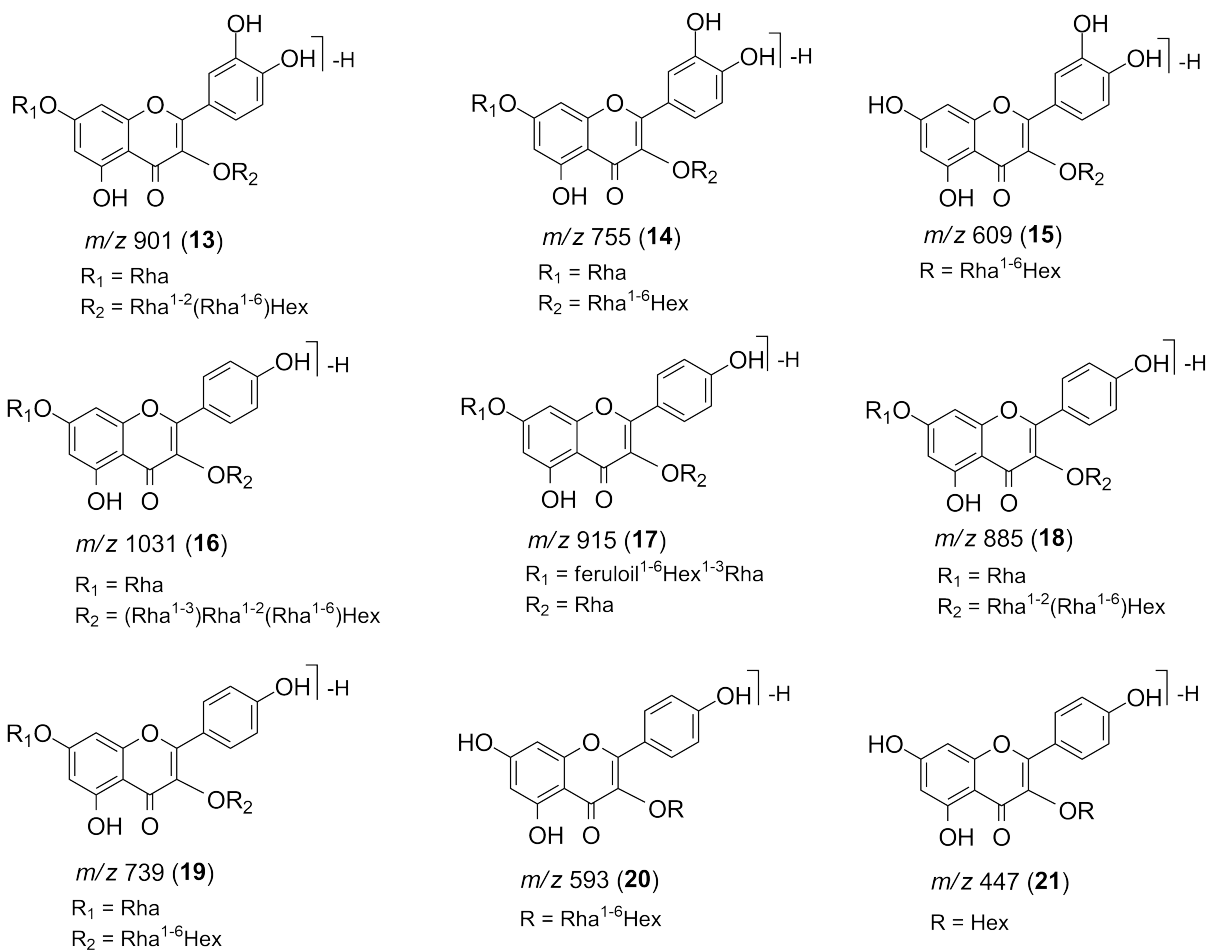


Figura 29 - Constituintes químicos identificados da subfração aquosa da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas.

Tabela 7 - Constituintes químicos identificados na subfração aquosa oriunda da fração acetato de etila por DI-ESI-MS/MS.

Compostos	Fórmula molecular	[M-H] ⁻	MS ⁿ (%)	Referência
quercetina-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (13)	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₄	901	MS ² [901]: 755(100) , 739(6), 609(14) 593(20), 447(2), 301(15) MS ³ [755]: 609(26), 593(10), 447(1) 301(54), 271(30)	Bamawa, Ndjele, Foma, 2016
quercetina-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→6)-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (14)	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755	MS ² [755]: 609(100) , 593(7), 447(6) 301(21), 271(3) MS ³ [609]: 593(6), 301(100) , 271(23), 227(10)	Crupi, Genghi, Antonacci, 2014
quercetina-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→6)-hexosídeo (15)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609	MS ² [609]: 591(8); 463(5); 426(5); 379(4); 343(4); 301(100) , 179(3) MS ³ [301]: 299(28); 285(13); 280(38); 255(30); 227(10); 207(3); 193(6); 179(100) ; 151(65)	Carvalho et al; 2019b; Ablajan et al., 2006
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→3)-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (16)	C ₄₅ H ₆₀ O ₂₇	1031	MS ² [1031]: 959(3); 885(91); 766(3); 739(100) ; 593(4) MS ³ [885]: 739(100) ; 721(10); 593(4) MS ⁴ [739]: 638(4); 575(545); 473(6); 393(39); 327(24); 284(100) ; 255(42); 227(6)	Veitch, Kite, Lewis, 2008
canferol-3-ramnosil-7-[6-feruloil-hexosil-(1→3)-ramnosídeo] (17)	C ₄₃ H ₄₈ O ₂₂	915	MS ² [915]: 880(5); 769(100) ; 739(17); 593(50); 531(3); 412(3) MS ³ [769]: 607(27); 593(100) ; 469(19); 409(4); 367(4); 285(24); 241(6) MS ⁴ [593]: 447(3); 357(6); 327(16); 285(100) ; 255(20); 229(4)	Mizuno et al., 1990
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (18)	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₃	885	MS ² [885]: 739(100) , 593(2) MS ³ [739]: 593(25), 575(73), 285(100) , 255(49)	Bresciani et al., 2015
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→6)-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (19)	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	739	MS ² [739]: 593(100) , 447(1), 285(3) MS ³ [593]: 575(1), 447(4), 285(100) , 255(21)	Morchid et al., 2014
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→6)-hexosídeo (20)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593	MS ² [593]: 447(81), 285(100) , 284(31), 257(4), 227(10) MS ³ [447]: 327(7), 285(100) , 255(16)	Crupi, Genghi, Antonacci, 2014
canferol-3- <i>O</i> -hexosídeo (21)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447	MS ² [447]: 429(7); 402(14); 379(7); 357(17); 338(6); 285(100) ; 255(5); 223(6); 195(4); 178(3); 163(5) MS ³ [285]: 270(44); 255(100) ; 241(38); 199(40); 175(38)	Ye; Yan; Guo, 2005; Crupi, Genghi, Antonacci, 2014

O composto **15** m/z 609,0 [M-H]⁻ apresentou MS² com íons fragmentos em m/z 463 [M-H-146]⁻ e 301 [M-H-308]⁻ indicando a perda de ramnosil (146 Da) e hexosil (162 Da), respectivamente, característicos da quercetina-3-*O*-ramnosil-(1→6)-hexosídeo (**15**) (Figuras 30 e 31). O MS³ do íon m/z 301 [M-H]⁻ apresentou íons fragmentos m/z 271, 179, 151

confirmando a quercetina como aglicona (DING et al., 2008; CARVALHO et al; 2019). Este é possivelmente o primeiro relato do composto **15** no gênero *Machaerium*.

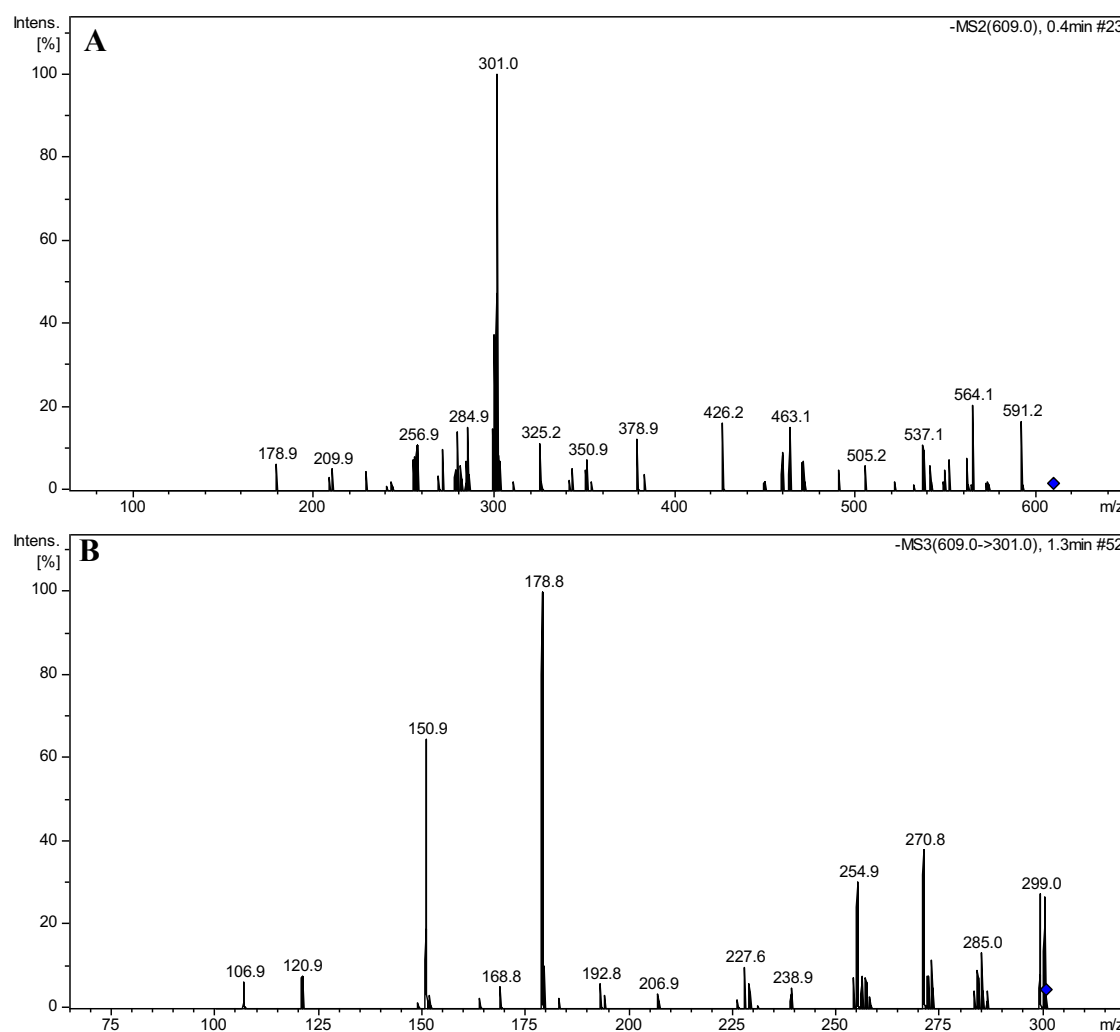


Figura 30 - Espectros de massas MS² (A) e MS³ (B) dos íons m/z 609 e 301 referentes a rutina (**15**).

Dois derivados glicosilados da quercetina-3-*O*-ramnosil-(1→6)-hexosídeo (**15**) também foram identificados, correspondentes aos íons precursores m/z 901 [M-H]⁻ e 755 [M-H]⁻. Os espectros MS² destes íons precursores apresentaram o íon fragmento m/z 609 indicando a perda de duas e uma unidade ramnosil, respectivamente (Figura 32). Os seus espectros de MS³ mostraram fragmentações idênticas à atribuída à quercetina-3-*O*-ramnosil-(1→6)-hexosídeo (**15**, m/z 609), sugerindo o composto quercetina-3-*O*-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**13**) e quercetina-3-*O*-ramnosil-(1→6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**14**) (BAMAWA, NDJELE, FOMA, 2016; CRUPI, GENGGI, ANTONACCI, 2014). Este é possivelmente o primeiro relato dos compostos **13** e **14** no gênero *Machaerium*.

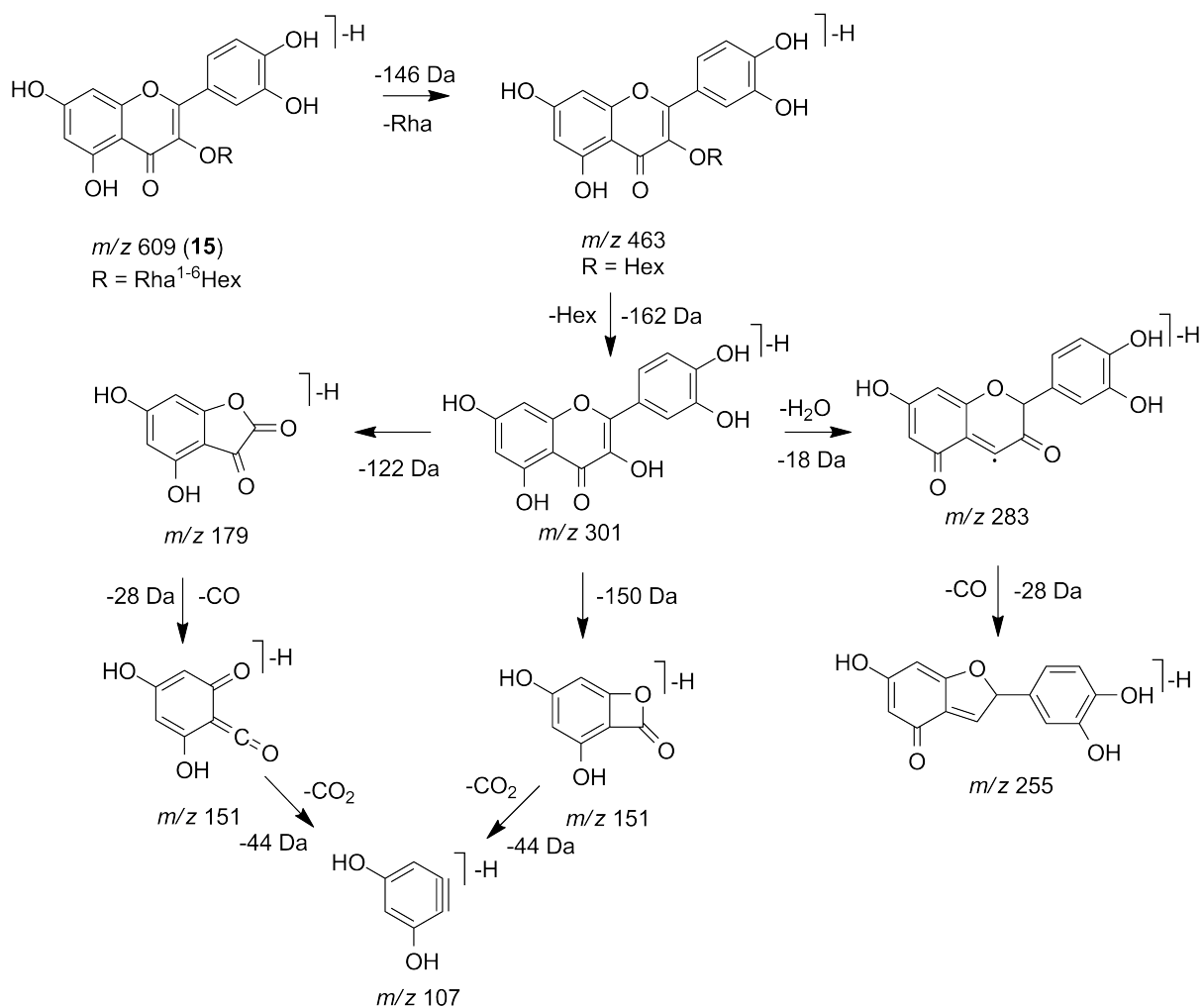


Figura 31 - Proposta de fragmentação para o flavonol quercetina-3-*O*-ramnosil-(1→6)-hexosídeo (**15**, m/z 609).

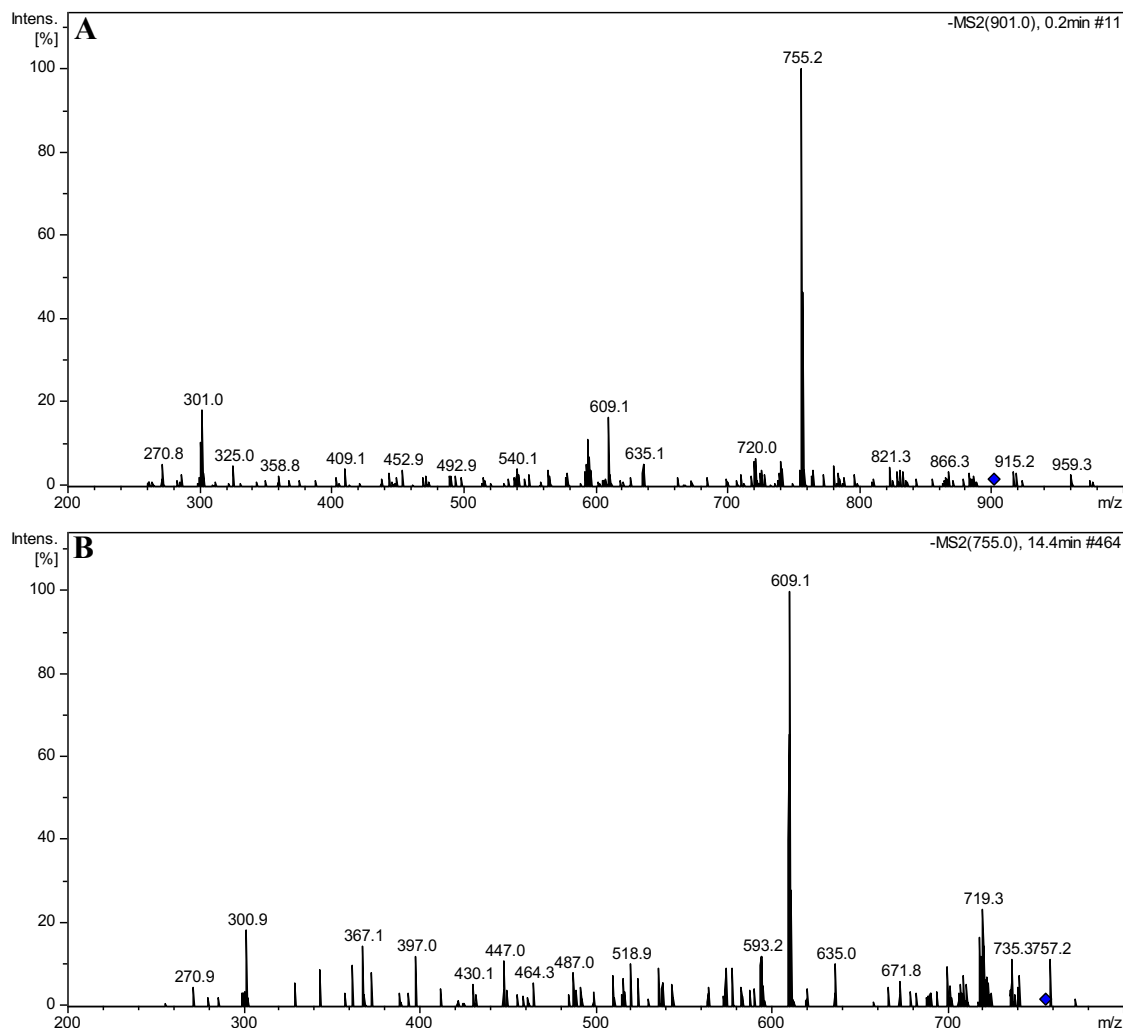


Figura 32 - Espectros de massas MS² dos íon m/z 901 (A) e 755 (B) referente a quercetina-3-O-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-O-ramnosídeo (**13**) e quercetina-3-O-ramnosil-(1→6)-hexosil-7-O-ramnosídeo (**14**).

O composto **17** com íon precursor m/z 915 [M-H]⁻, apresentou MS² com íon fragmento em m/z 769 [M-H-146]⁻, correspondente à perda de ramnosil (146 Da). O MS³ (m/z 769) mostrou o íon fragmento 593 [M-H-176]⁻ correspondendo a perda de resíduo de feruloil (176 Da), enquanto, o MS⁴ (m/z 593) mostrou o íon fragmento 285 [M-H-308]⁻, correspondente às perdas de ramnosil (146 Da) e hexosil (162 Da) (Figura 33). Este composto foi identificado como canferol-3-ramnosil-7-[6-feruloil-hexosil-(1→3)-ramnosídeo] (MIZUNO et al., 1990). Este é possivelmente o primeiro relato do composto **17** no gênero *Machaerium*.

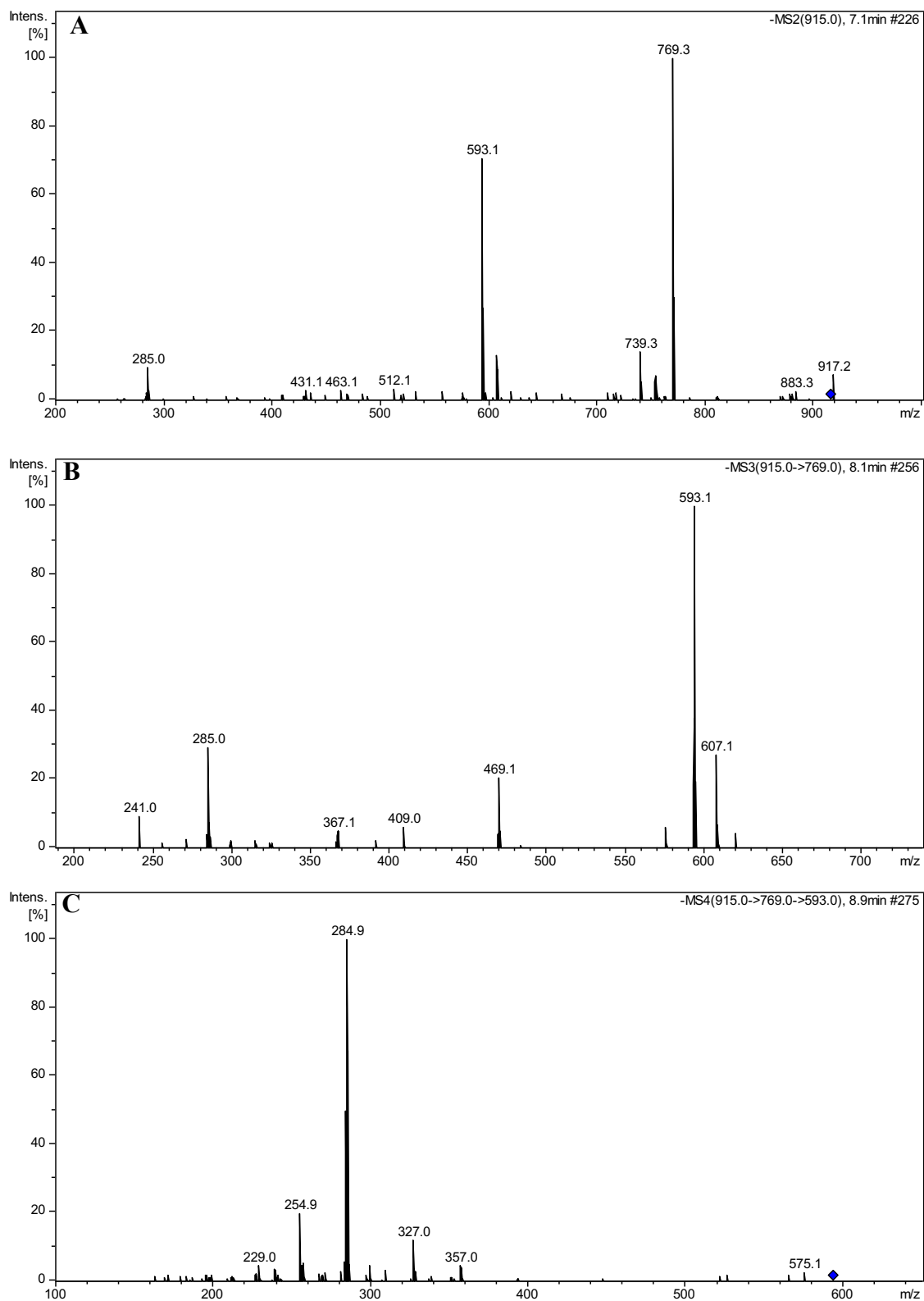


Figura 33 - Espectros de massas MS² (A), MS³ (B) e MS⁴ (C) dos íons m/z 915, 769 e 593 referentes ao canferol-3-ramnosil-7-[6-feruloil-hexosil-(1→3)-ramnosídeo] (17).

O espectro de MS² do íon precursor m/z 1031 [M-H]⁻ mostrou os íons fragmentos m/z 885 [M-H-146]⁻ e 739 [M-H-292]⁻ indicando a perda de uma e duas unidades de ramnosil, respectivamente. O MS³ (m/z 885) apresentou os íons fragmentos m/z 739 [M-H-146]⁻ e 593 [M-H-292]⁻ indicando perda de uma e duas unidades ramnose, respectivamente (Figura 34), enquanto m/z 285 e 255 indicou canferol como uma aglicona, sugerindo o flavonoide canferol-3-*O*-ramnosil-(1→3)-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (16) (VEITCH, KITE, LEWIS, 2008).

Os íons precursores m/z 885, 739, 593 e 447 são derivados do composto 16, porque eles mostram uma diferença nos valores m/z correspondentes de uma a quatro unidades de ramnose, respectivamente. Isso sugere os flavonóis canferol-3-*O*-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (18), canferol-3-*O*-ramnosil-(1→6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (19), canferol-3-*O*-ramnosil-(1→6)-hexosídeo (20), canferol-3-*O*-hexosídeo (21), o que é confirmado pelo MS³ desses íons fragmentos (BRESCIANI et al., 2015; MORCHID et al., 2014; CRUPI, GENGGHI, ANTONACCI, 2014; YE; YAN; GUO, 2005) conforme mostrado na Tabela 9.

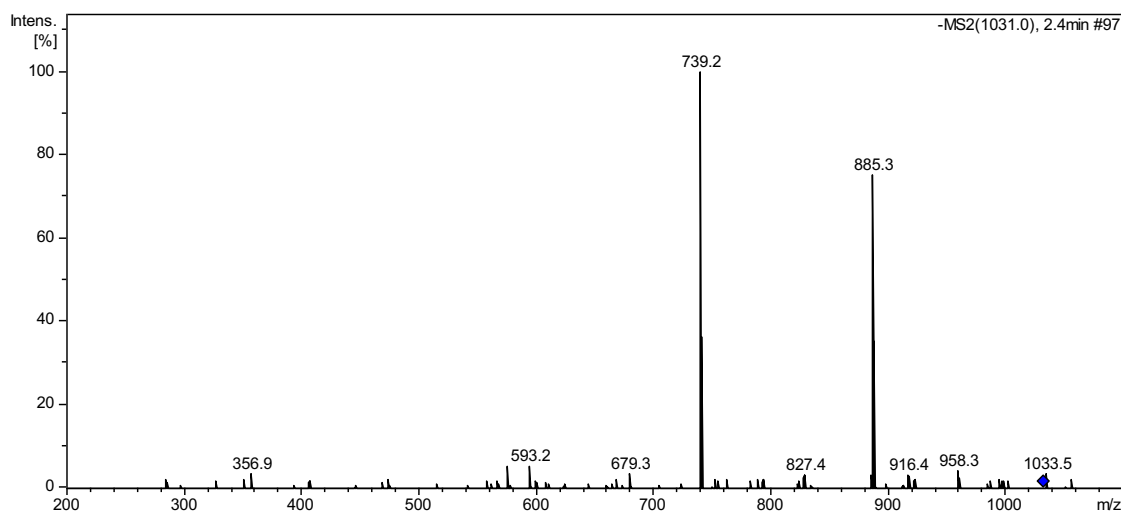


Figura 34 - Espectros de massas MS² do íon m/z 1031 referentes ao canferol-3-*O*-ramnosil-(1→3)-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-glucosil-7-*O*-ramnosídeo (16).

O composto 21 (Figura 35) m/z 447 [M-H]⁻, mostrou íon fragmento m/z 285 [M-H-162]⁻, correspondente a perda da hexosil (162 Da). O MS³ do íon m/z 285 [M-H]⁻ apresentou íon fragmento principal com m/z 255 [M-H-HCHO]⁻, atribuído como perda de carbonila em C-3 (30 Da), confirmando a identificação do composto como canferol-3-*O*-hexosídeo (astragalina)

(ENGELS et al., 2012; YE; YAN; GUO, 2005). Este é o primeiro relato dos flavonoides **16**, **18-21** no gênero *Machaerium*.

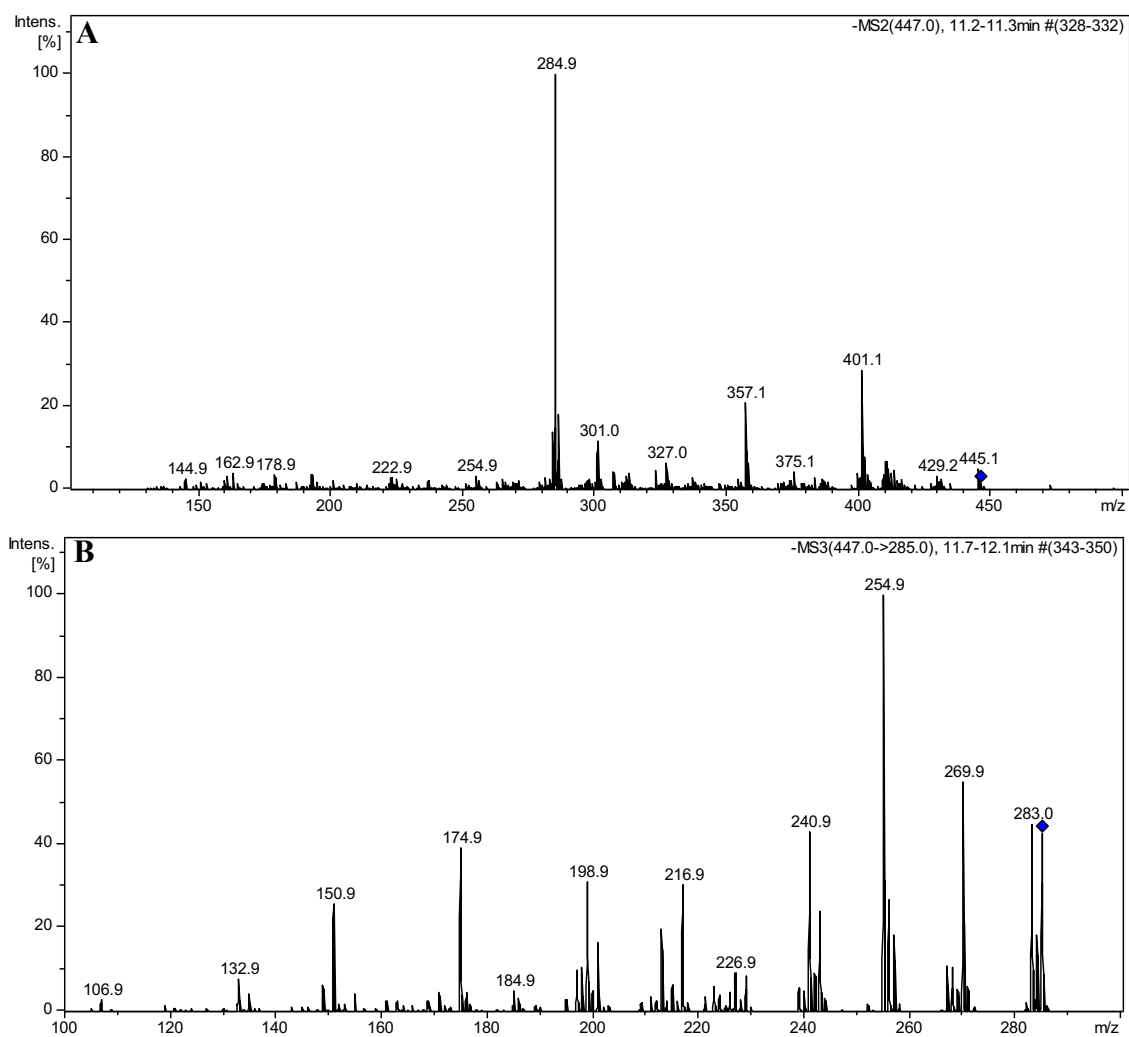


Figura 35 - Espectro de massas MS² (A) e MS³ (B) dos íons m/z 447 e 285 referente ao canferol-3-*O*-hexosídeo (**21**).

3.2.2 Identificação dos constituintes químicos da subfração metanol-água (1:1) oriunda da fração acetato de etila por DI-ESI-MS/MS

A subfração metanol-água (1:1), oriunda da FAEFMa do EEFMa, após analisada por DI-ESI-MS/MS, no modo negativo, é mostrada no *fingerprint*, conforme Figura 36. Esta análise resultou na identificação de oito compostos: quercetina-3-*O*-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**13**), quercetina-3-*O*-ramnosil-(1→6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**14**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1→3)-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**16**), canferol-3-ramnosil-7-[6-feruloil-hexosil-(1→3)-ramnosídeo] (**17**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**18**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1→6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**19**) (Tabela 8 e Figura 36). Todos estes compostos foram identificados na subfração aquosa oriunda da fração acetato de etila.

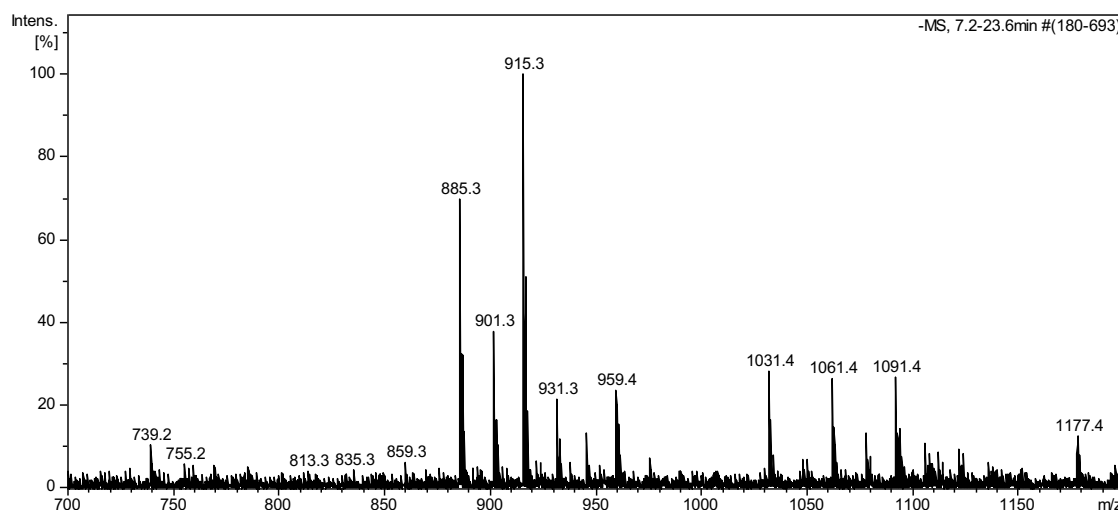


Figura 36 - *Fingerprint* da subfração metanol-água (1:1) da FAEFMa do EEFMa obtido por DI-ESI-MS/MS, no modo negativo.

Tabela 8 - Constituintes químicos identificados na subfração metanol-água (1:1) oriunda da fração acetato de etila por DI-ESI-MS/MS.

Composto	Fórmula molecular	[M-H] ⁻	MS ⁿ (%)	Referência
quercetina-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (13)	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₄	901	MS ² [901]: 755(100) , 739(6), 609(14) 593(20), 447(2), 301(15) MS ³ [755]: 609(26), 593(10), 447(1) 301(54), 271(30)	Bamawa, Ndjele, Foma, 2016.
quercetina-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→6)-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (14)	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755	MS ² [755]: 609(100) , 593(7), 447(6) 301(21), 271(3) MS ³ [609]: 593(6), 301(100) , 271(23), 227(10)	Crupi, Genghi, Antonacci, 2014
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→3)-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (16)	C ₄₅ H ₆₀ O ₂₇	1031	MS ² [1031]: 959(3); 885(91); 766(3); 739(100) ; 593(4) MS ³ [885]: 739(100) ; 721(10); 593(4) MS ⁴ [739]: 638(4); 575(545); 473(6); 393(39); 327(24); 284(100) ; 255(42); 227(6)	Veitch, Kite, Lewis, 2008
canferol-3-ramnosil-7-[6-feruloil-hexosil-(1→3)-ramnosídeo] (17)	C ₄₃ H ₄₈ O ₂₂	915	MS ² [915]: 881(5); 769(100) ; 739(17); 593(50); 531(3); 412(3) MS ³ [769]: 607(27); 593(100) ; 469(19); 409(4); 367(4); 285(24); 241(6) MS ⁴ [593]: 447(3); 357(6); 327(16); 285(100) ; 255(20); 229(4)	Mizuno et al., 1990
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (18)	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₃	885	MS ² [885]: 739(100) , 593(2) MS ³ [739]: 593(25), 575(73), 285(100) , 255(49)	Bresciani et al., 2015
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→6)-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (19)	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	739	MS ² [739]: 593(100) , 447(1), 285(3) MS ³ [593]: 575(1), 447(4), 285(100) , 255(21)	Morchid et al., 2014

3.2.3 Análise da subfração metanólica oriunda da fração acetato de etila por DI-ESI-MS/MS

A subfração metanólica, oriunda da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas, após análise por DI-ESI-MS/MS no modo negativo (Figura 37), não se mostrou promissora para a identificação dos constituintes químicos dentro dos parâmetros utilizados devido apresentar picos predominantemente atribuído a contaminantes, corroborando a análise por CCD (Figura 3) e por HPLC-DAD (Figura 4).

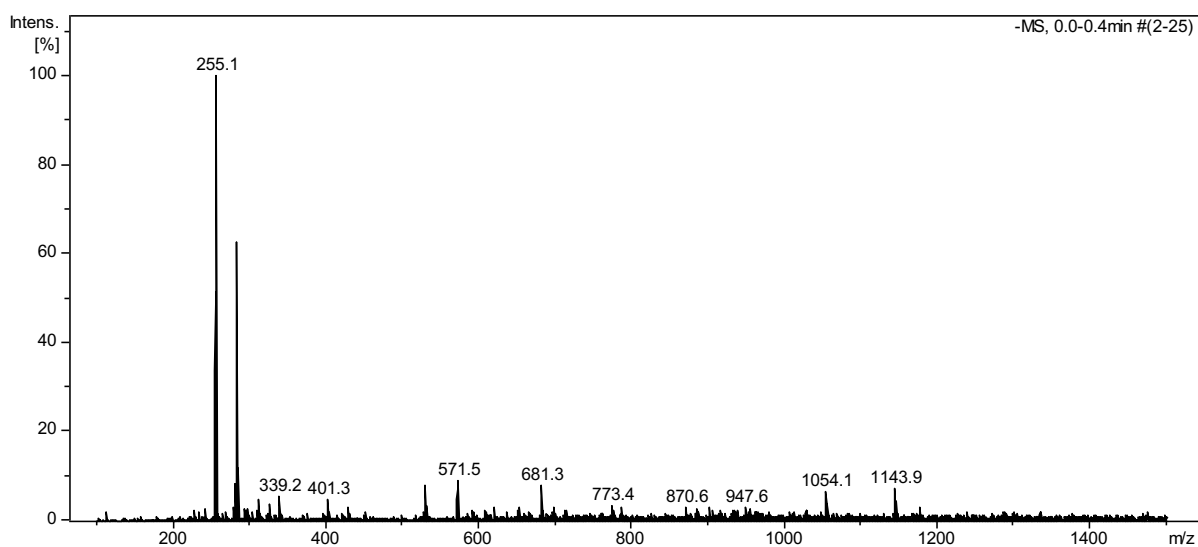


Figura 37 - *Fingerprint* da subfração metanólica da FAEFMA do EEFMa obtido por DI-ESI-MS/MS, no modo negativo.

3.3 Identificação dos constituintes químicos da fração aquosa da partição do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium* por DI-ESI-MS/MS

O *fingerprint* da fração aquosa (Figura 38), obtido por DI-ESI-MS/MS, indicou a presença dos flavonóis **13-16** e **18-21**, isoflavonoides genisteína (**25**) e daidzeína-8-*C*-glicosídeo (**26**) e biflavonoide morelloflavona (**27**) (Figura 39 e Tabela 9). Os compostos **13-16** e **18-21** foram identificados nas subfrações aquosa e metanol-água (1:1) oriundas da fração acetato de etila das folhas.

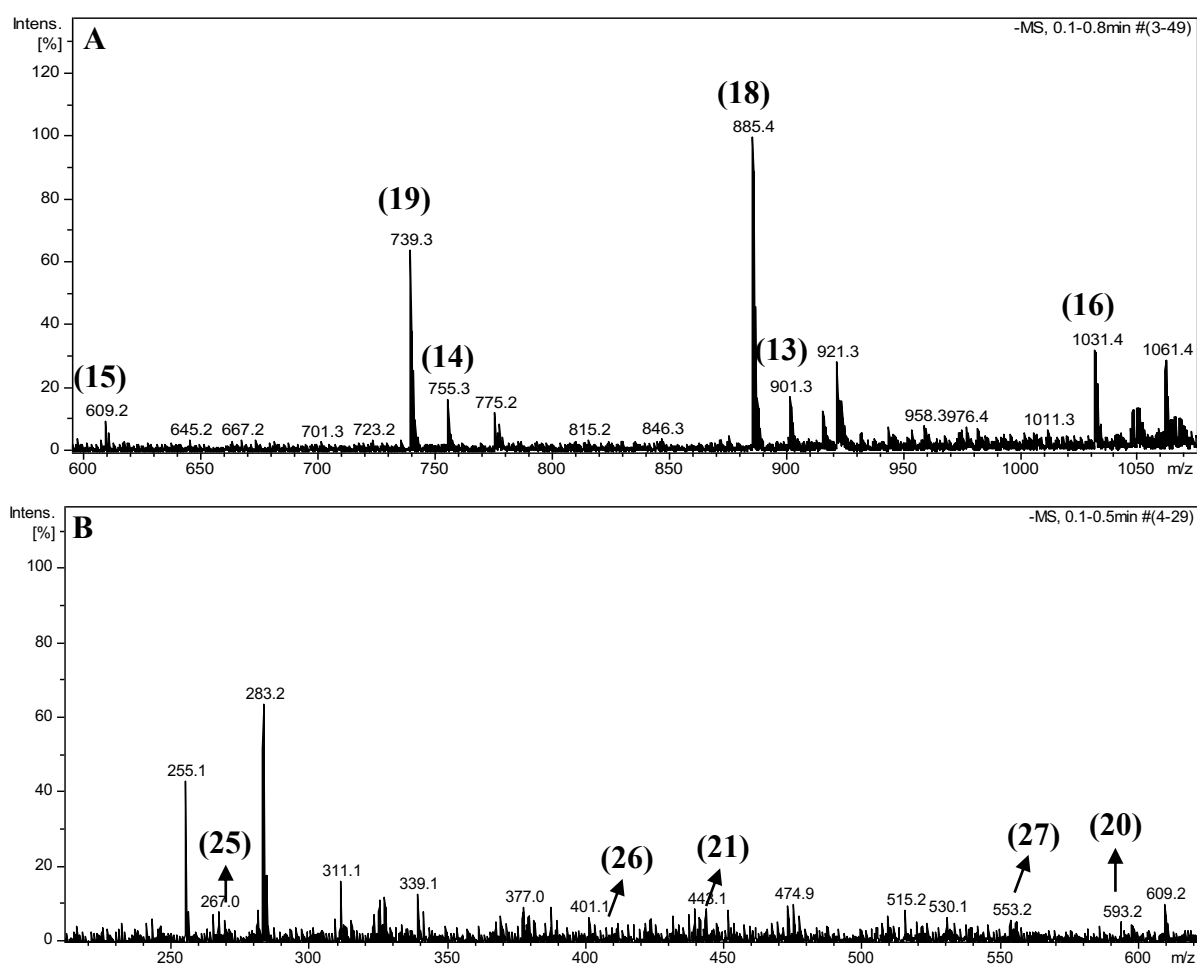


Figura 38 -*Fingerprint* da fração aquosa obtido por DI-ESI-MS/MS. Expansão *m/z* 600 a 1100 (A) e *m/z* 200 a 600 (B).

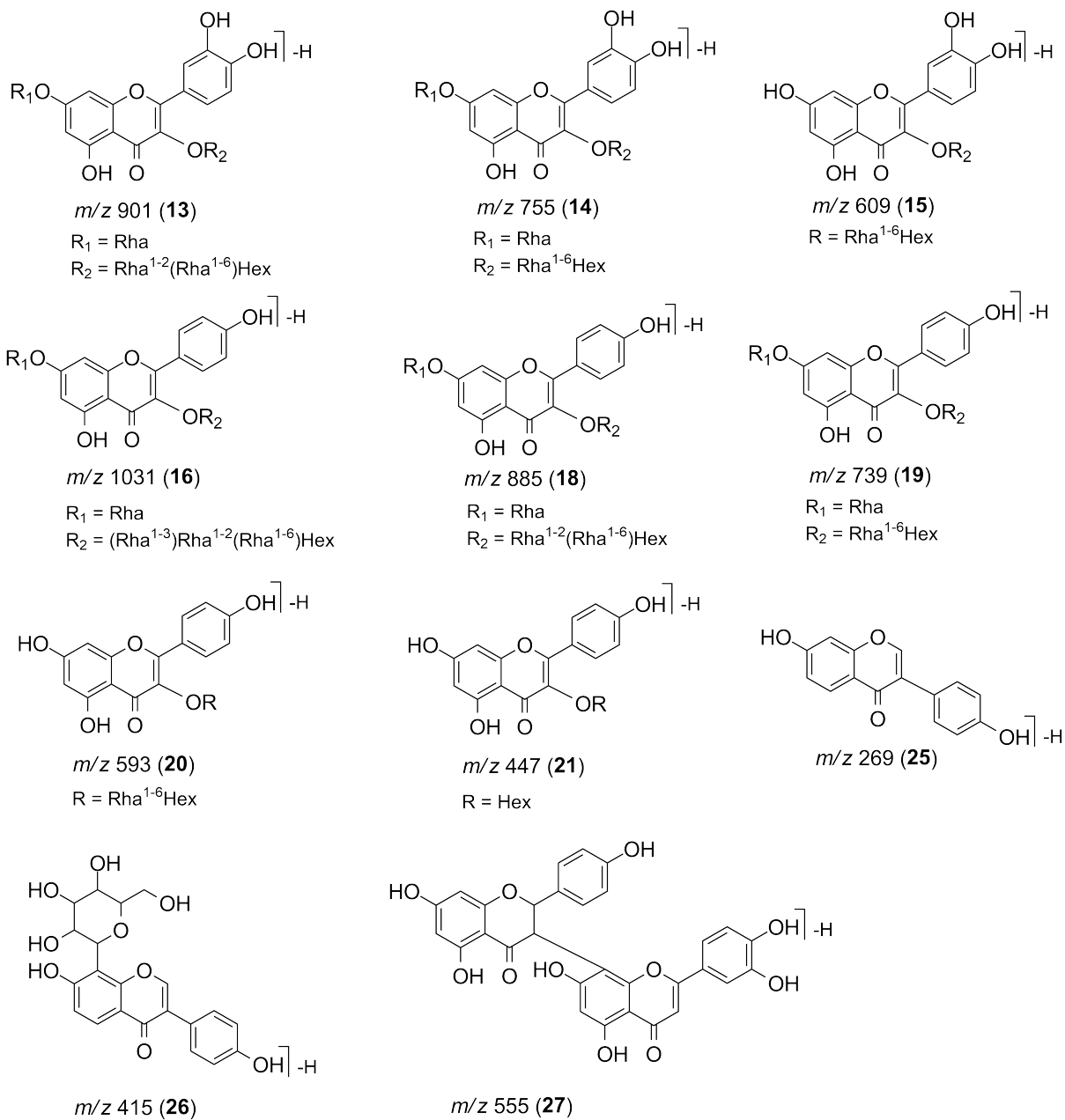


Figura 39 - Constituintes químicos identificados da fração aquosa do extrato etanólico das folhas.

Tabela 9 - Constituintes químicos identificados na fração aquosa da partição do extrato etanólico por DI-ESI-MS/MS.

Compostos	Molecular Formula	[M-H] ⁻	MS ⁿ	Ref.
quercetina-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (13)	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₄	901	MS ² [901]: 755(100) , 739(6), 609(14) 593(20), 447(2), 301(15) MS ³ [755]: 609(26), 593(10), 447(1) 301(54), 271(30)	Bamawa, Ndjele, Foma, 2016.
quercetina-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→6)-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (14)	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755	MS ² [755]: 609(100) , 593(7), 447(6) 301(21), 271(3) MS ³ [609]: 593(6), 301(100) , 271(23), 227(10)	Crupi, Genghi, Antonacci, 2014
quercetina-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→6)-hexosídeo (15)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609	MS ² [609]: 591(8); 463(5); 426(5); 379(4); 343(4); 301(100) , 179(3) MS ³ [301]: 299(28); 285(13); 280(38); 255(30); 227(10); 207(3); 193(6); 179(100) ; 151(65)	Carvalho et al; 2019; Ablajan et al., 2006
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→3)-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (16)	C ₄₅ H ₆₀ O ₂₇	1031	MS ² [1031]: 959(3); 885(91); 766(3); 739(100) ; 593(4) MS ³ [885]: 739(100) ; 721(10); 593(4) MS ⁴ [739]: 638(4); 575(545); 473(6); 393(39); 327(24); 284(100) ; 255(42); 227(6)	Veitch, Kite, Lewis, 2008
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (18)	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₃	885	MS ² [885]: 739(100) , 593(2) MS ³ [739]: 593(25), 575(73), 285(100) , 255(49)	Bresciani et al., 2015
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→6)-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (19)	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	739	MS ² [739]: 593(100) , 447(1), 285(3) MS ³ [593]: 575(1), 447(4), 285(100) , 255(21)	Morchid et al., 2014
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→6)-hexosídeo (20)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593	MS ² [593]: 447(81), 285(100) , 284(31), 257(4), 227(10) MS ³ [447]: 327(7), 285(100) , 255(16)	Crupi, Genghi, Antonacci, 2014
canferol-3- <i>O</i> -hexosídeo (21)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447	MS ² [447]: 429(7); 402(14); 379(7); 357(17); 338(6); 285(100) ; 255(5); 223(6); 195(4); 178(3); 163(5) MS ³ [285]: 270(44); 255(100) ; 241(38); 199(40); 175(38)	Ye; Yan; Guo, 2005; Crupi, Genghi, Antonacci, 2014
genistein (25)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269	MS ² [269]: 241(15), 225(30), 197(25), 143(6)	Zhao et al., 2018
daidzein-8- <i>C</i> -hexosídeo (26)	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415	MS ² [415]: 397(13), 379(96), 295(4), 267(19), 249(14)	Ablajan, 2010; Zhao et al., 2018
morelloflavona (27)	C ₃₀ H ₂₀ O ₁₁	555	MS ² [555]: 429(100) , 403(5) MS ³ [429]: 401(100) , 295(31)	Carrillo-Hormaza et al., 2016

O espectro de massas da fração aquosa apresentou uma série de perdas neutras regulares de 28 Da, 44 Da, 56 Da, 72 Da e 84 Da, geralmente atribuídas a perdas de CO, CO₂, 2xCO, CO+CO₂ e 3xCO, respectivamente. Estas fragmentações são características de isoflavonoides (MARCH et al., 2004; ZHAO et al., 2018).

A investigação do MS² do *m/z* 269 [M-H]⁻ mostrou a presença dos fragmentos *m/z* 241 [M-H-CO]⁻, 225 [M-H-CO₂]⁻, 197 [M-H-CO₂-CO]⁻ e 143 [M-H-C₆H₆O₃]⁻ que são característicos da genisteína (**25**), como mostra a proposta de fragmentação na Figura 40

(ZHAO et al., 2018). Embora a genisteína seja um isômero da flavona apigenina os padrões de fragmentação são bem diferentes. Na apigenina são observados fragmentos com m/z 151 $[M-H-C_8H_6O]^-$, 149 $[M-H-C_7H_5O_2]^-$, 121 $[M-H-C_8H_5O_3]^-$ e 117 $[M-H-C_7H_4O_4]^-$ (TROALEN et al., 2014).

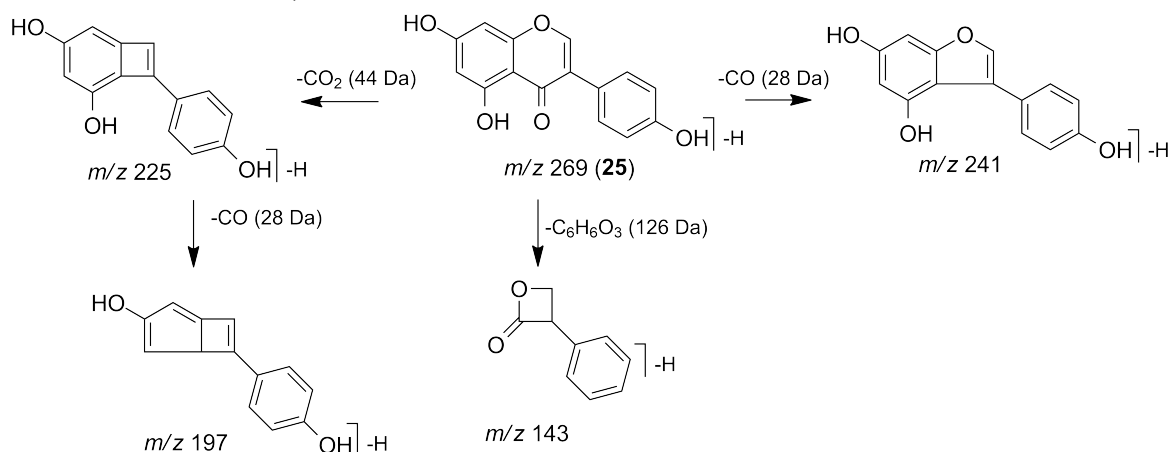


Figura 40 - Proposta de fragmentação para o isoflavonoide genisteína (25, m/z 269) (Adaptado de Zhao et al., 2018).

O MS^2 do m/z 415 $[M-H]^-$ apresentou os fragmentos m/z 397 $[M-H-H_2O]^-$ e 379 $[M-H-H_2O-H_2O]^-$ indicando perdas sucessivas de água que podem caracterizar isoflavonoides do tipo *C*-glicosilados (ZHAO et al., 2018). Adicionalmente observou-se os fragmentos m/z 295, 267 e 249 correspondentes as perdas de $C_4H_6O_3$, CO e H_2O , respectivamente (Figura 41), os quais permitem sugerir a presença da daidzeína-8-*C*-hexosídeo (26) (ABLAJAN, 2010; ZHAO et al., 2018).

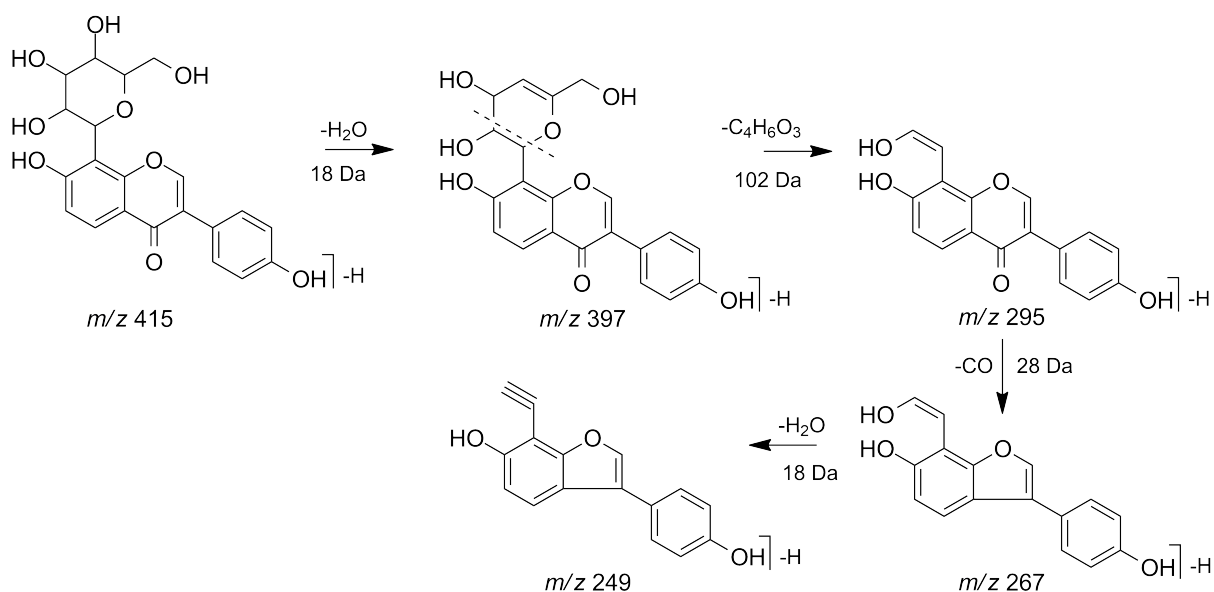


Figura 41 - Proposta de fragmentação para daidzeína-8-*C*-hexosídeo (26) (Adaptado de Zhao et al., 2018).

O espectro de MS² do íon precursor m/z 555 [M-H]⁻ mostrou os íons fragmentos m/z 429 [M-H-126]⁻ indicando a perda de C₆H₆O₃. O MS³ (m/z 429) apresentou os íons fragmentos m/z 401 [M-H-28]⁻ e 295 [M-H-134]⁻ indicando perda de CO e C₈H₈O₂, respectivamente (Figura 42), sugerindo o biflavonoide moreloflavona (**27**) (CARRILLO-HORMAZA et al., 2016).

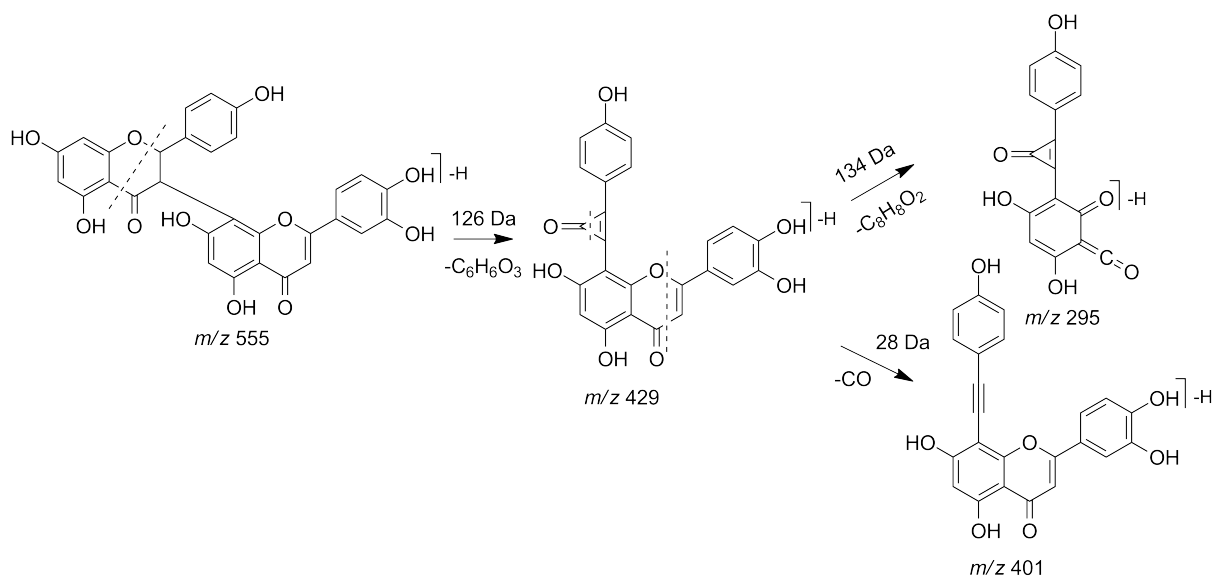
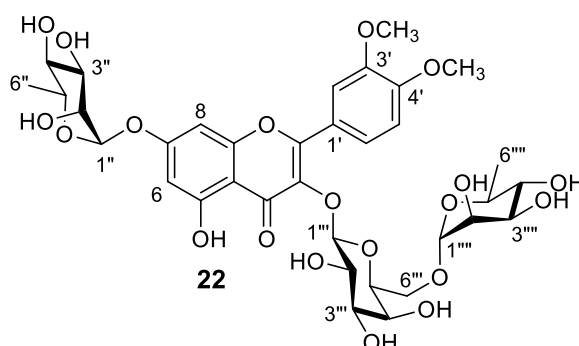


Figura 42 - Proposta de fragmentação para o biflavonoide moreloflavona (**27**).

3.3.2 Elucidação e/ou identificação dos constituintes químicos isolados da fração aquosa oriunda da partição do extrato etanólico

3.3.2.1 Elucidação estrutural do composto **22**



O composto **22**, correspondente a subfração SF-27-1 (3,0 mg), foi isolado como um sólido amarelo, solúvel em metanol (Esquemas 1, 3 e 4). A estrutura deste composto foi identificada por meio da análise dos espectros UV-Vis, RMN de ¹H e ¹³C 1D e 2D (Figuras 43-57, Tabela 10) e por comparação com dados relatados na literatura.

A análise do composto **22** por HPLC-DAD, usando um gradiente de MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), originou uma banda cromatográfica com o tempo de retenção em 14,28 min. O espectro UV-Vis correspondente apresentou absorções em 255 e 357 nm que sugerem tratar-se de um flavonol (Figura 43). A ausência de um ombro em aproximadamente 300 nm, entre as bandas I e II, sugere *O*-glicosilação em C-3 e C-7 (STEVENSON; NYIENDA; VEITCH, 2010; VEITCH; KITE; LEWIS, 2008).

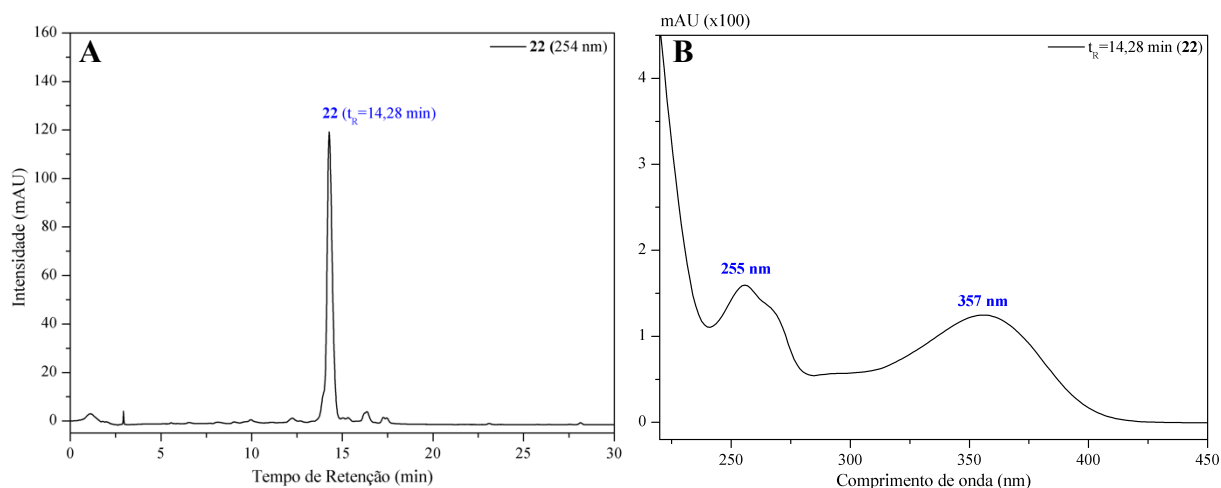


Figura 43 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD (A) e espectro UV-Vis (B) do composto **22**. Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min⁻¹, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) e λ=254 nm.

O espectro de RMN ¹H do composto **22** apresentou perfil característico de substância da classe dos flavonoides glicosilados (Figuras 44-47), evidenciado pelos sinais entre δ 6,0-8,0 e entre δ 3,2-4,0 correspondentes a hidrogênios em anel aromático e de açúcares, respectivamente. Os dupletos em δ 0,94 (*J*=6,2 Hz) e 1,0 (*J*=6,1 Hz) juntamente com os simpletos largos em δ 5,42 e 4,29, característicos de hidrogênios em carbonos anoméricos de açúcares com configuração α, sugeriram a presença de duas unidades de α-L-ramnose. O duplete em δ 5,23 (*J*=7,7 Hz) sugere a presença da β-D-hexose. Foi observado adicionalmente, dois simpletos em δ 3,67 e 3,72 indicativos de hidrogênios de metoxila. O simpleto de baixa intensidade em δ 12,5 foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila em C-5 em flavonol (BURNS; ELLIS; MARCH, 2007; MANGURO; UGI; LEMMEN, 2005; SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009;).

Na região de hidrogênios de anel aromático, o espectro apresentou dois dupletos em δ 6,31 ($J=1,9$ Hz) e 6,65 ($J=1,9$ Hz), correspondentes a hidrogênios posicionados *meta* e atribuídos a H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. A presença de dois dupletos em δ 6,72 ($J=8,4$ Hz, H-5') e 7,46 ($J=2,1$ Hz, H-2') e de um duplo duplete em δ 7,56 ($J=0,7$ e 8,5 Hz, H-6') definiu o padrão 1,3,4-trissubstituído para o anel B.

O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 48-51) apresentou 35 sinais, sendo 15 da aglicona, 2 de metoxila e 17 de três unidades de açúcar. O sinal em δ 17,9 foi atribuído aos carbonos metílicos (C-6'' e C-6'''), confirmando a presença de duas ramnoses, o sinal em δ 177,6 é referente à carbonila em C-4, enquanto os sinais em δ 55,6 e 56,0 confirmam os grupos metoxila em anel aromático (MARKHAM; TERNAL, 1976; SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009). A blindagem observada para C-2''' (-3,2 ppm), C-3''' (-3,7 ppm), C-4''' (-2,2 ppm), C-5''' (-2,5 ppm) e C-6''' (-2,2 ppm) em comparação aos dados da rotina permitiu identificar na estrutura do composto **22** a presença da β -D-galactose ao invés de β -D-glicose (WENKERT; GOTTLIEB, 1977).

Os mapas de contornos gHSQC (Figuras 52-54) e gHMBC (Figura 55-57, Tabela 10) permitiram definir a localização dos açúcares na aglicona.

O mapa de contornos gHMBC (Figura 55-57, Tabela 10) mostrou correlações de H-6 (δ 6,31) com C-7 (δ 161,6), C-8 (δ 94,5) e C-10 (δ 105,7), de H-8 (δ 6,65) com C-6 (δ 99,4), C-7 (δ 161,6), C-9 (δ 156,1) e C-10 (δ 105,7). H-2' (δ 7,46) correlaciona-se com C-2 (δ 156,9), C-1' (δ 122,1), C-3' (δ 148,7) e C-4' (δ 144,7), H-6' (δ 7,56) com C-2 (δ 156,9) e C-5' (116,2), enquanto H-5' (δ 6,72) apresentou correlação com C-1' (δ 122,1) e C-3' (148,7). Estas correlações confirmam os padrões de substituição, *meta* para o anel A e 1,3,4-trissubstituído para o anel B do flavonoide.

A correlação entre o hidrogênio anomérico H-1'''' (δ 4,29) com C-6''' (δ 65,1) indicou a presença de um grupo robinosídeo. A posição deste grupo no C-3 da aglicona foi definido pela correlação de H-1''' (δ 5,23) com C-3 (δ 133,8), enquanto, a correlação de H-1'' (δ 5,42) com C-7 (δ 161,6) mostrou a presença de uma ramnose em C-7. Adicionalmente, observou-se as correlações dos hidrogênios metoxílicos, 3'-OMe (δ 3,72) e 4'-OMe (δ 3,67) com C-4'' (δ 144,9) e C-3' (δ 148,7), respectivamente.

A comparação dos dados obtidos para as unidades de açúcar do composto **22** com os relatados para a robinina (SILVA et al., 2018; SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009) permitiu identificar o flavonoide 3',4'-dimetoxi-3-O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-

ramnopiranosídeo-7-*O*- α -L-ramnopiranosilflavonol (**22**). Não foi encontrado na literatura relato do composto **22**, sendo considerado inédito.

Tabela 10 - Dados de RMN ^1H , ^{13}C , gHSQC e gHMBC (600 e 150 MHz, DMSO- d_6) de **22**.

C	22			gHMBC $^nJ_{\text{CH}}/\text{Hz}$		Isoramnetina-3- O-robinoside-7- O-ramnosídeo ^a
	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	Multip.*	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
2	156,9	C			H-2' e H-6'	156,5
3	133,8	C		H-1''' (δ 5,23)		133,8
4	177,6	C				178,0
5	160,9	C				161,3
6	99,4	CH	6,31 (d, $J=1,9$ Hz)		H-8	98,8
7	161,6	C		H-1'' (δ 5,42), H-8 e H-6		162,1
8	94,5	CH	6,65 (d, $J=1,9$ Hz)		H-6	95,2
9	156,1	C		H-8		157,3
10	105,7	C			H-6 e H-8	106,1
1'	122,1	C		H-2' e H-6'		121,3
2'	115,3	CH	7,46 (d, $J=2,1$ Hz)		H-2' e H-6'	113,9
3'	148,7	C		H-2' e 4'-OMe	H-5'	147,5
4'	144,9	C		H-5' e 3'-OMe	H-2'	150,1
5'	116,2	CH	6,72 (d, $J=8,4$ Hz)		H-3' e H-5'	115,6
6'	120,9	CH	7,56 (dd, $J=0,7$ e $8,5$ Hz)		H-2' e H-6'	122,7
3'-OMe	55,6	CH ₃	3,72 (s)			56,4
4'-OMe	56,0	CH ₃	3,67 (s)			-
1''	98,5	CH	5,42 (sl)			98,5
2''	70,3	CH				70,0
3''	70,5	CH				70,7
4''	71,1	CH				71,6
5''	71,7	CH				69,7
6''	17,9	CH ₃	0,94 (d; $J=6,2$)			18,3
1'''	101,9	CH	5,23 (d; $J=7,7$)			102,1
2'''	70,6	CH				71,0
3'''	73,1	CH				73,2
4'''	68,1	CH				68,4
5'''	73,7	CH				73,4
6'''	65,1	CH ₂		H-1'''' (δ 4,29)		65,6
1''''	100,0	CH	4,29 (sl)			100,1
2''''	69,9	CH				70,5
3''''	70,1	CH				70,3
4''''	72,0	CH				72,3
5''''	68,3	CH				68,4
6''''	17,9	CH ₃	1,0 (d; $J=6,1$)			18,4

^aDeslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO- d_6 e relatados por Silva; Carvalho; Braz-Filho, 2009;

*Multiplicidade obtida dos espectros DEPTQ 135°.

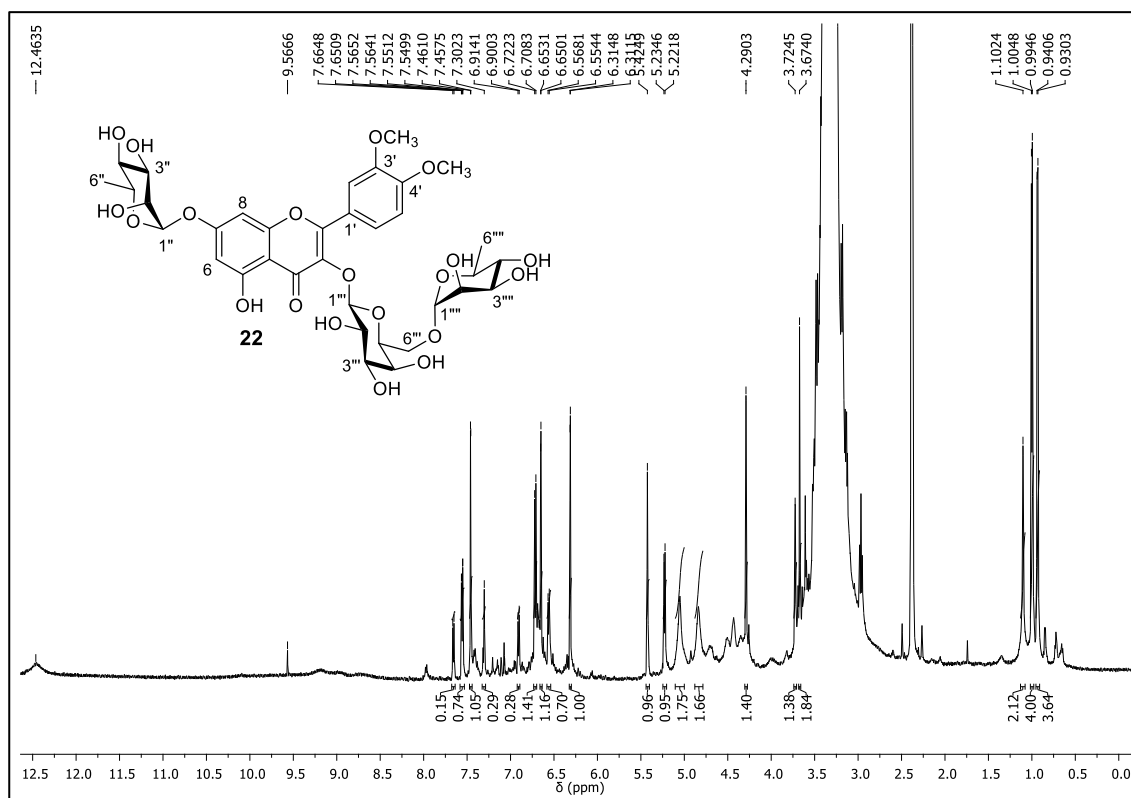


Figura 44 - Espectro de RMN ^1H de **22** ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz).

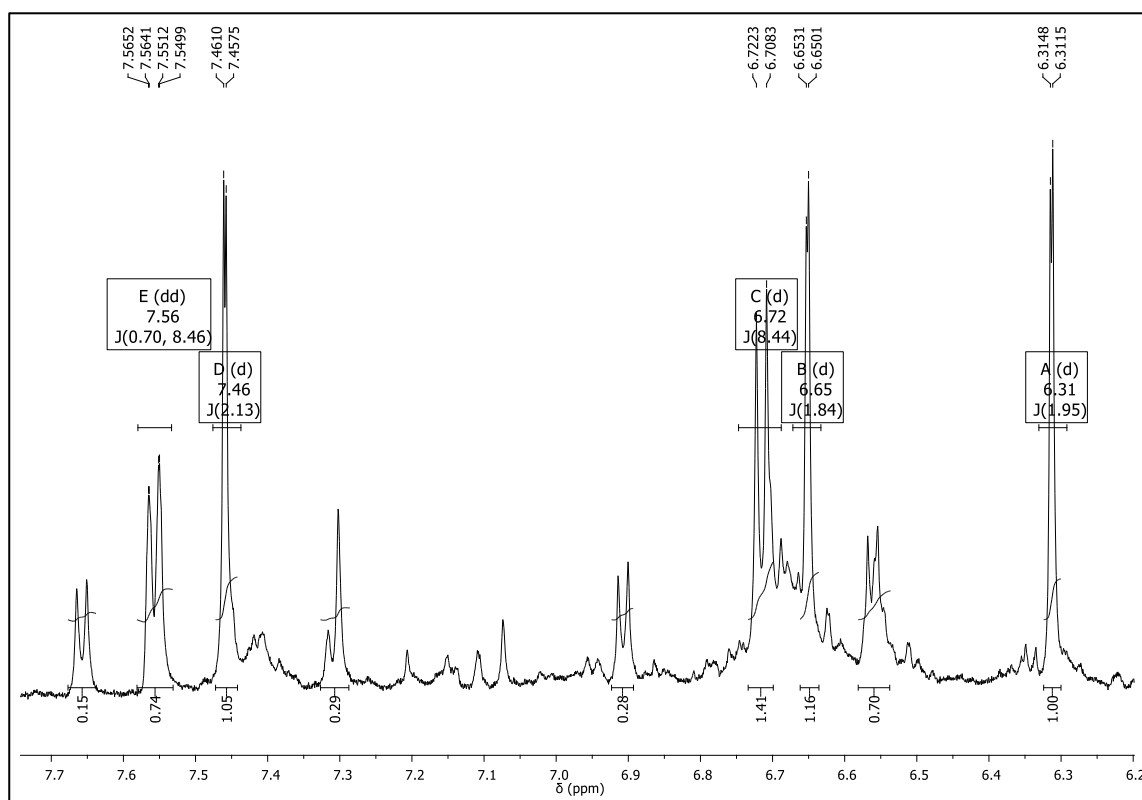


Figura 45 - Expansão da região de δ 6,2-7,7 do espectro de RMN ^1H de **22** ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz).

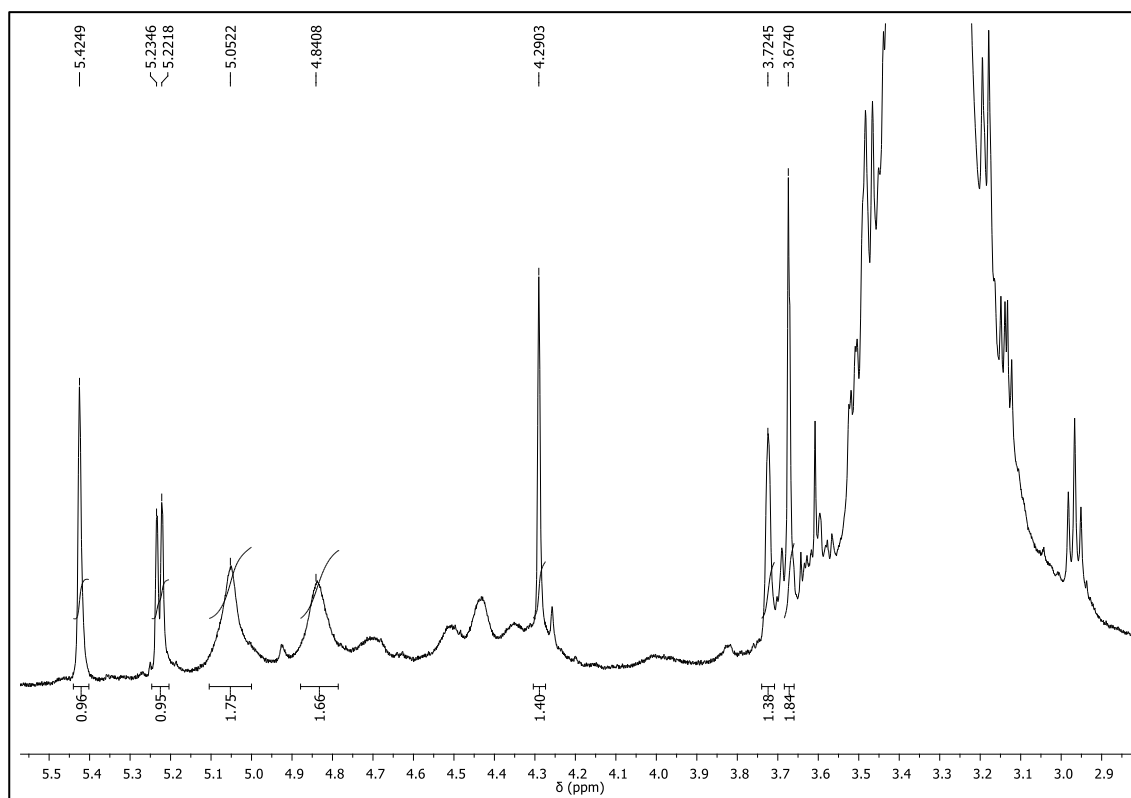


Figura 46 - Expansão da região de δ 2,9-5,5 do espectro de RMN ^1H de **22** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

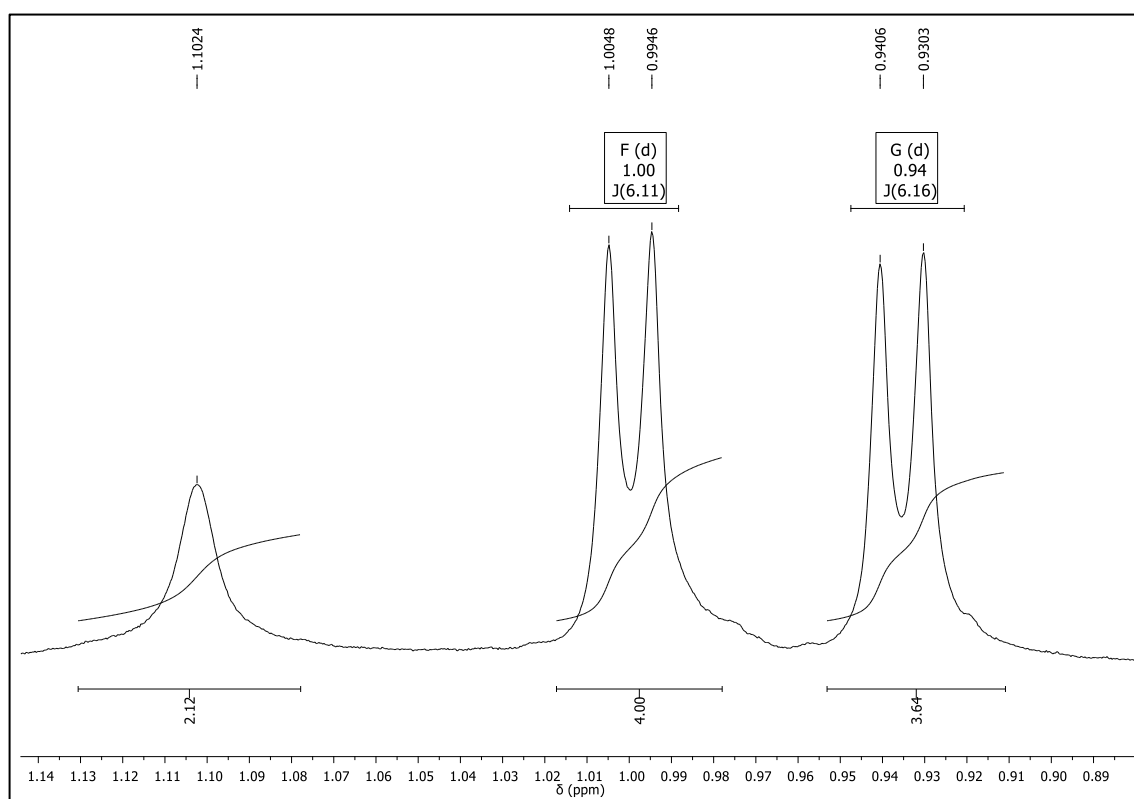


Figura 47 - Expansão da região de δ 0,6-2,6 do espectro de RMN ^1H de **22** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

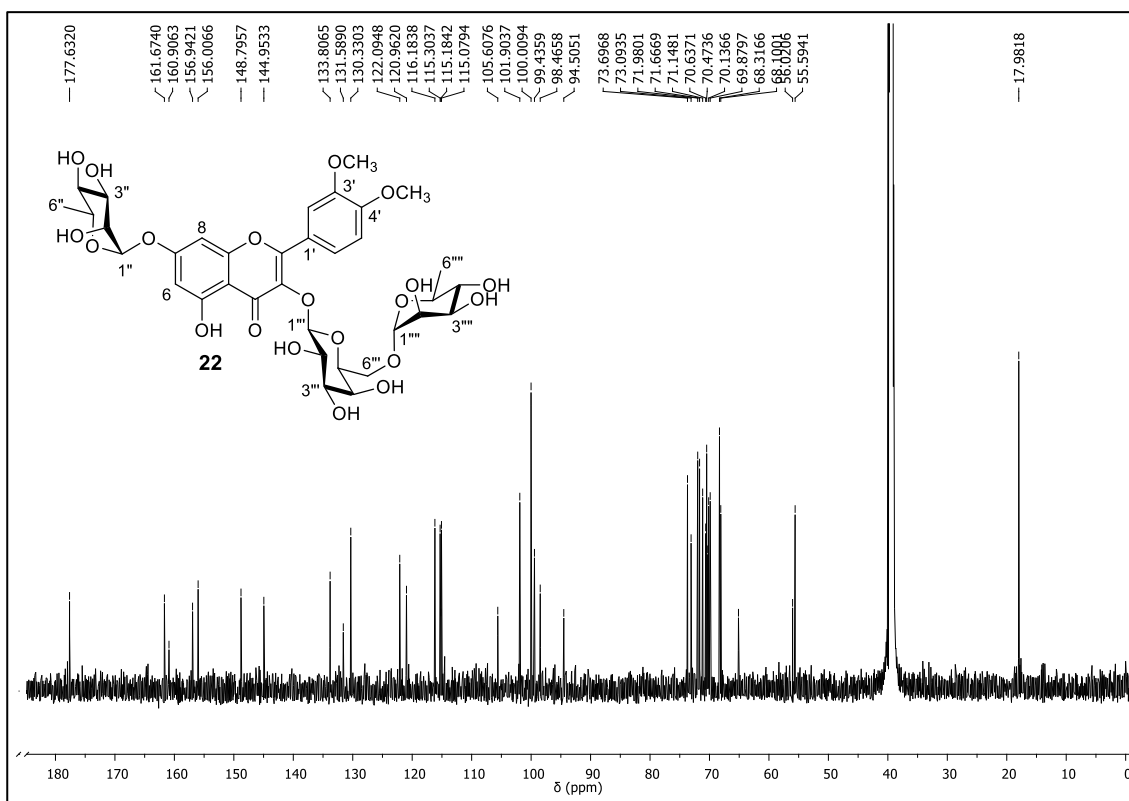


Figura 48 - Espectro de RMN ¹³C de **22** (DMSO-*d*₆, 150 MHz).

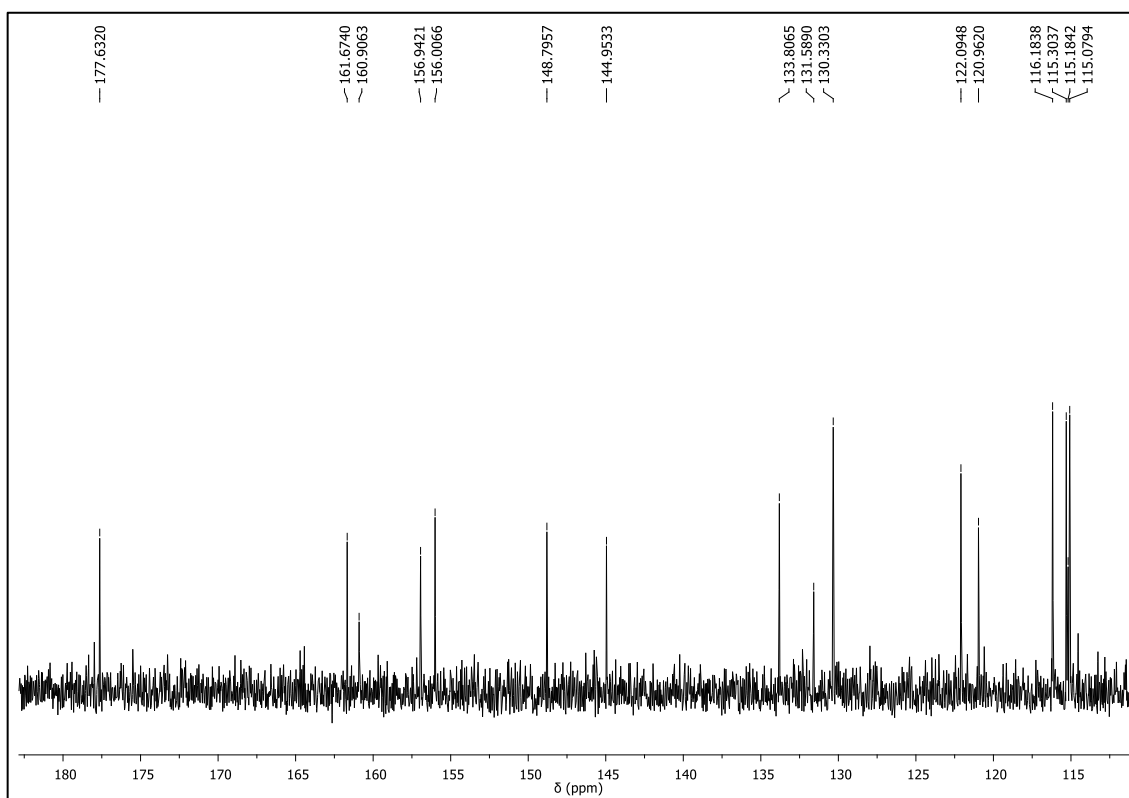


Figura 49 - Expansão da região de δ 115-180 do espectro de RMN ¹³C de **22** (DMSO-*d*₆, 150 MHz).

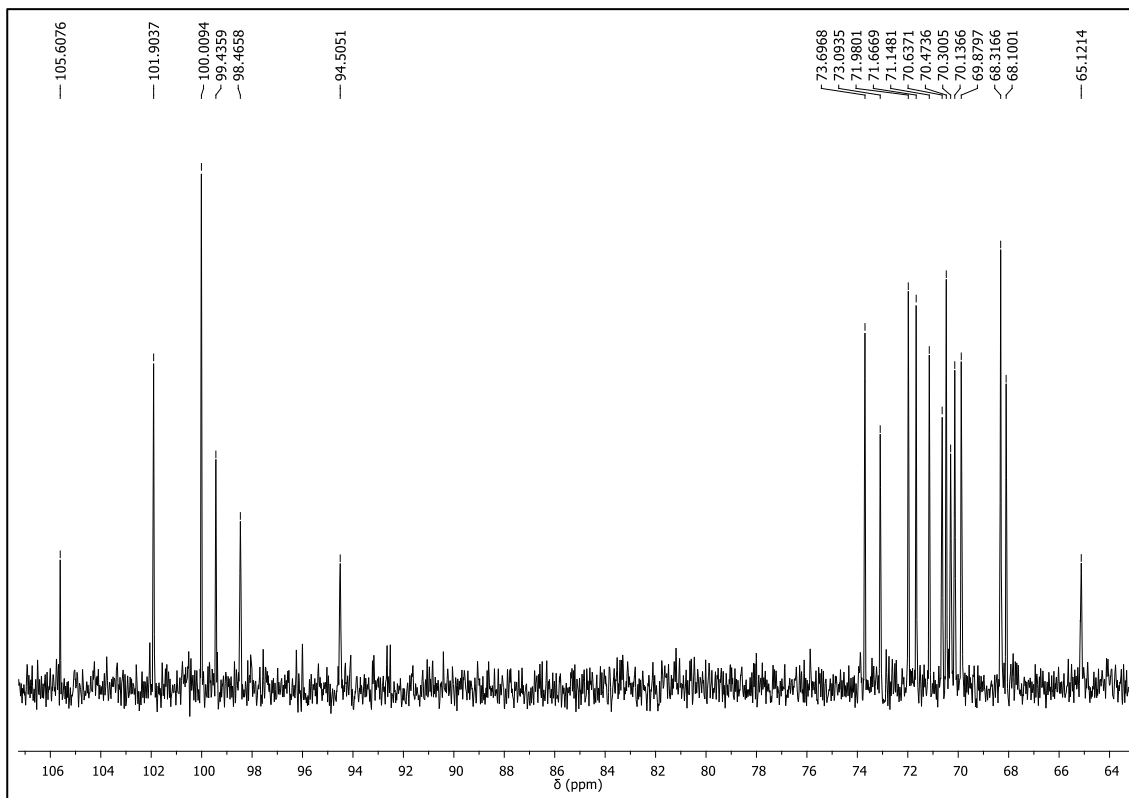


Figura 50 - Expansão da região de δ 64-106 do espectro de RMN ^{13}C de **22** (DMSO- d_6 , 150 MHz).

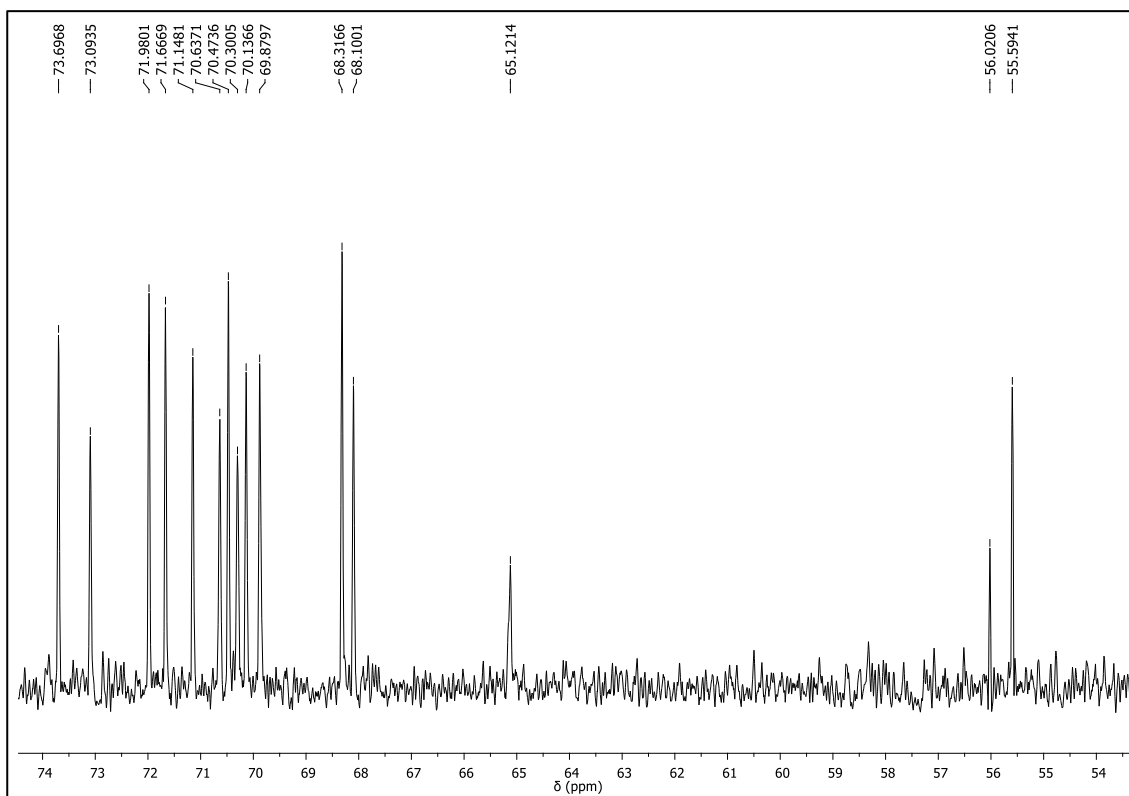


Figura 51 - Expansão da região de δ 54-74 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de **22** (DMSO- d_6 , 150 MHz).

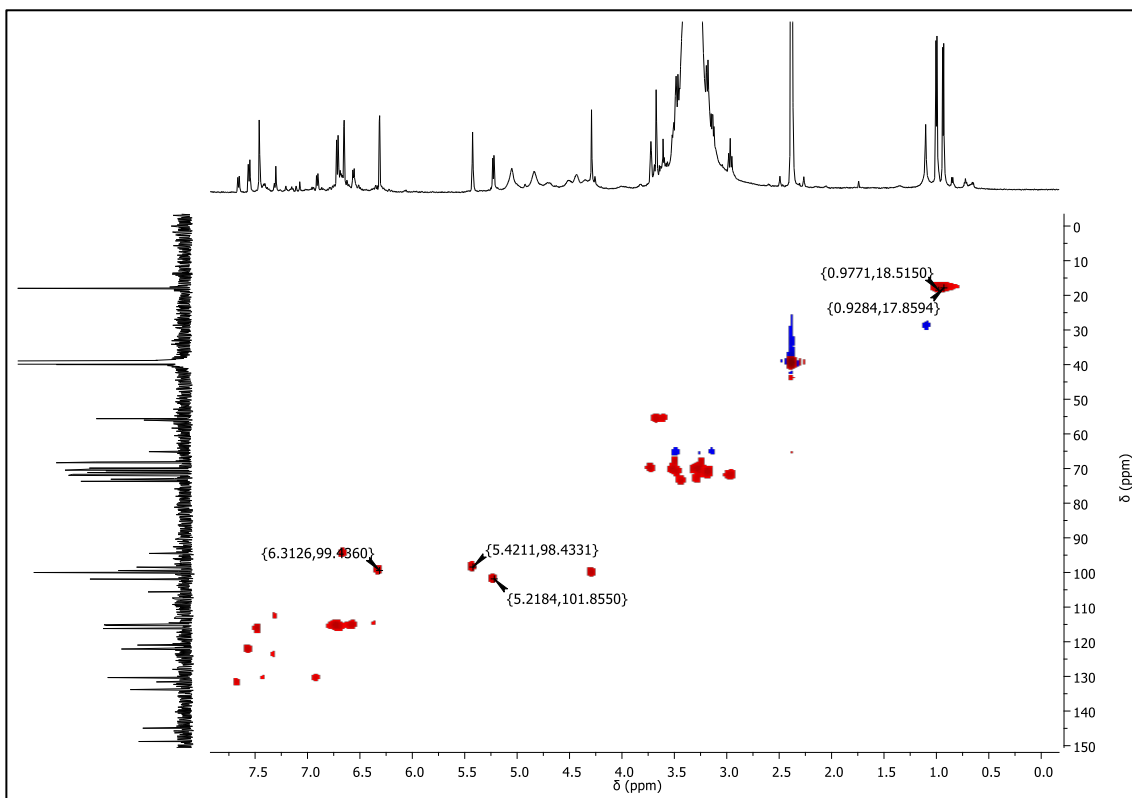


Figura 52 - Mapa de contornos gHSQC de **22** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

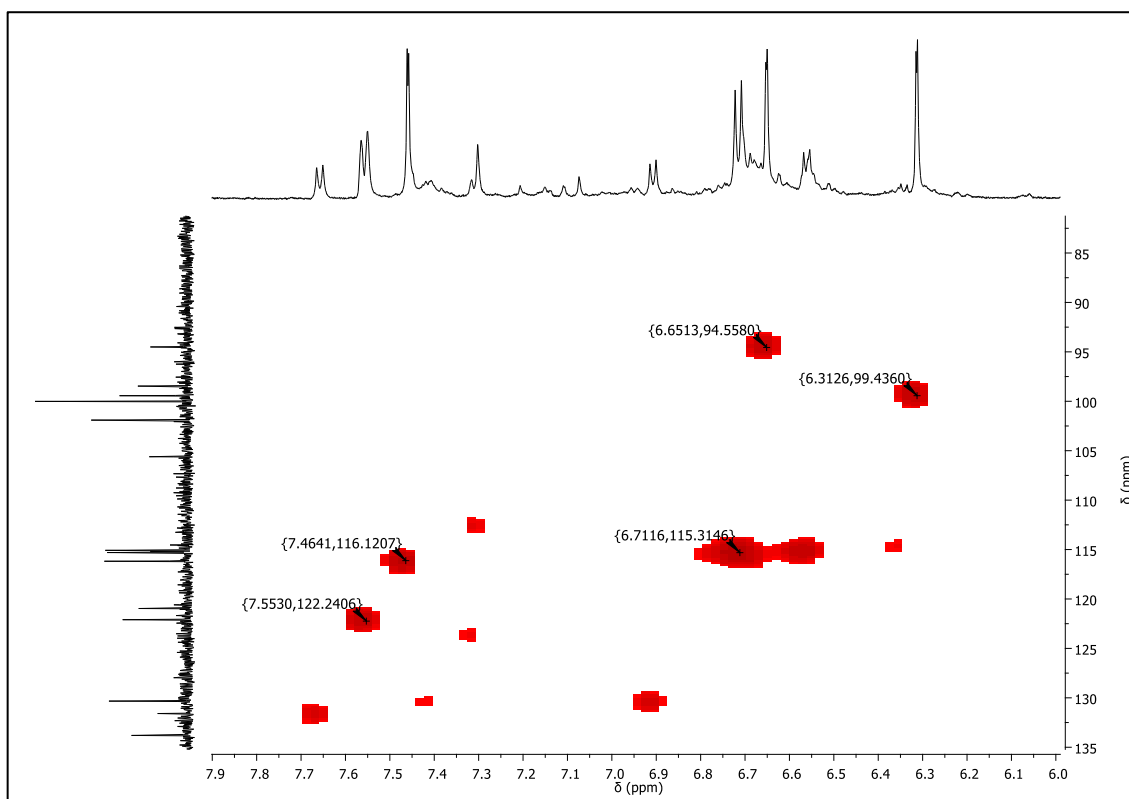


Figura 53 - Expansão da região de δ 6,0-7,9 do mapa de contornos gHSQC de **22** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

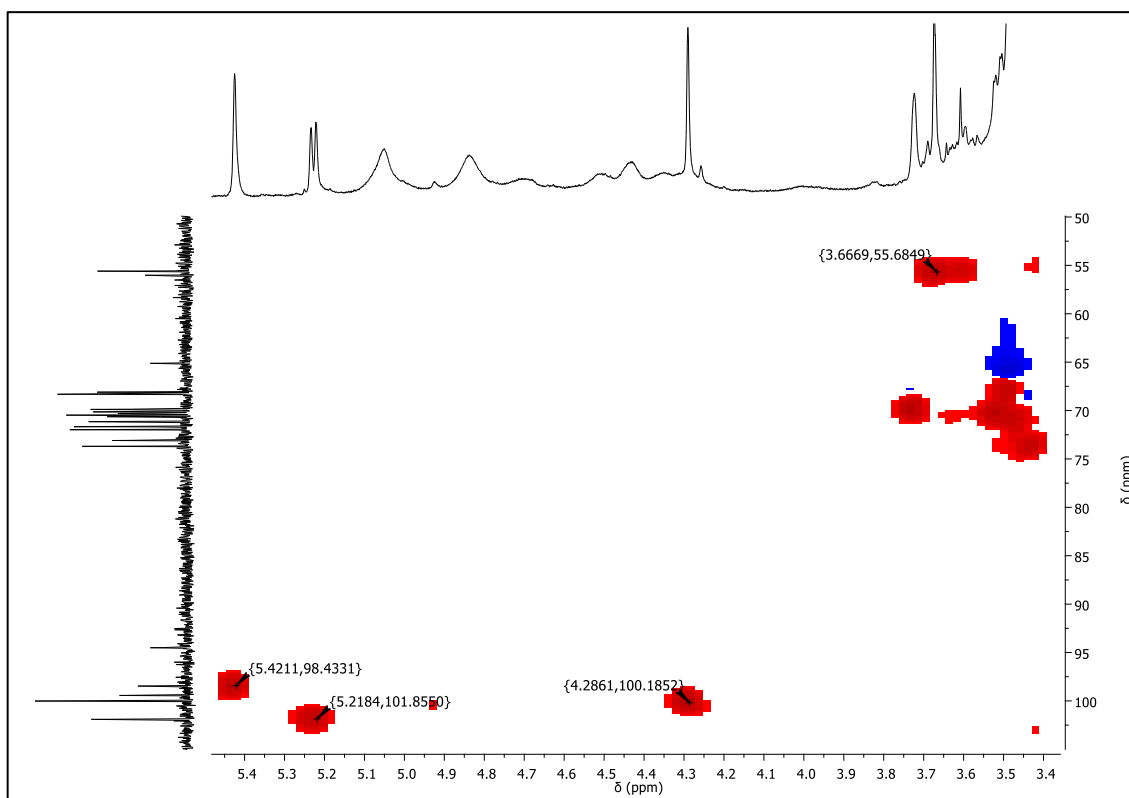


Figura 54 - Expansão da região de δ 3,4-5,4 do mapa de contornos gHSQC de **22** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

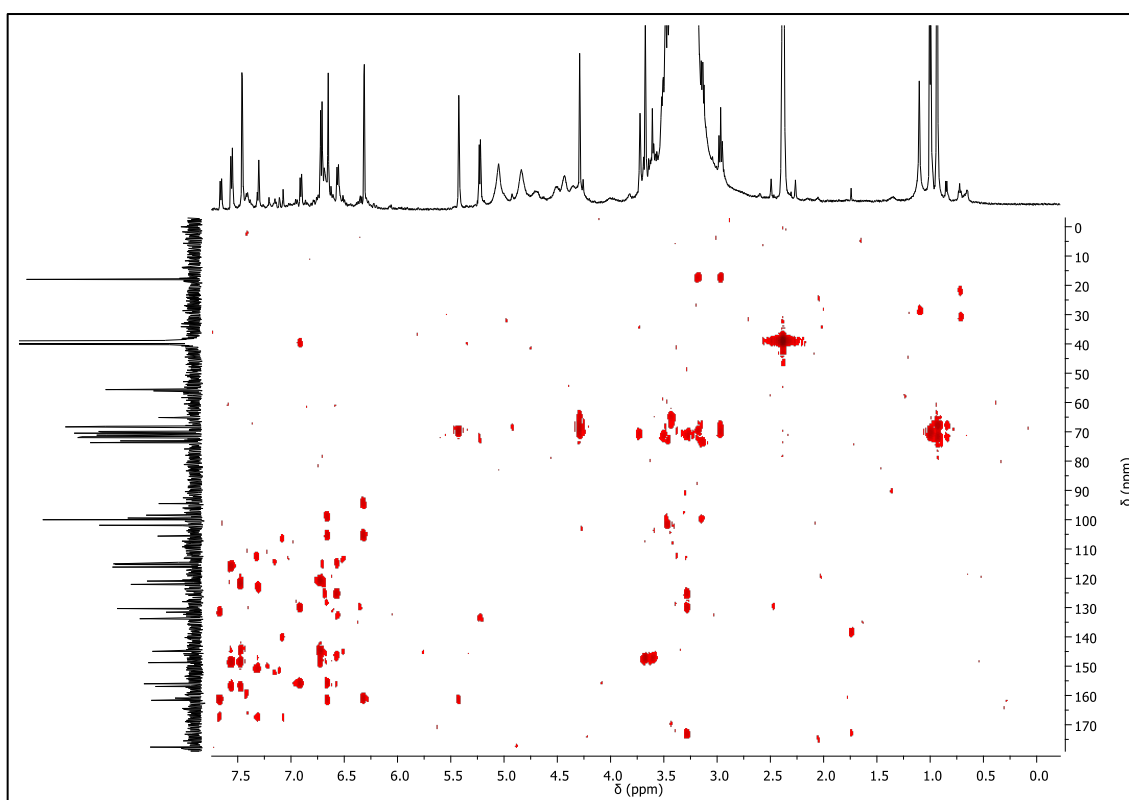


Figura 55 - Mapa de contornos gHMBC de **22** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

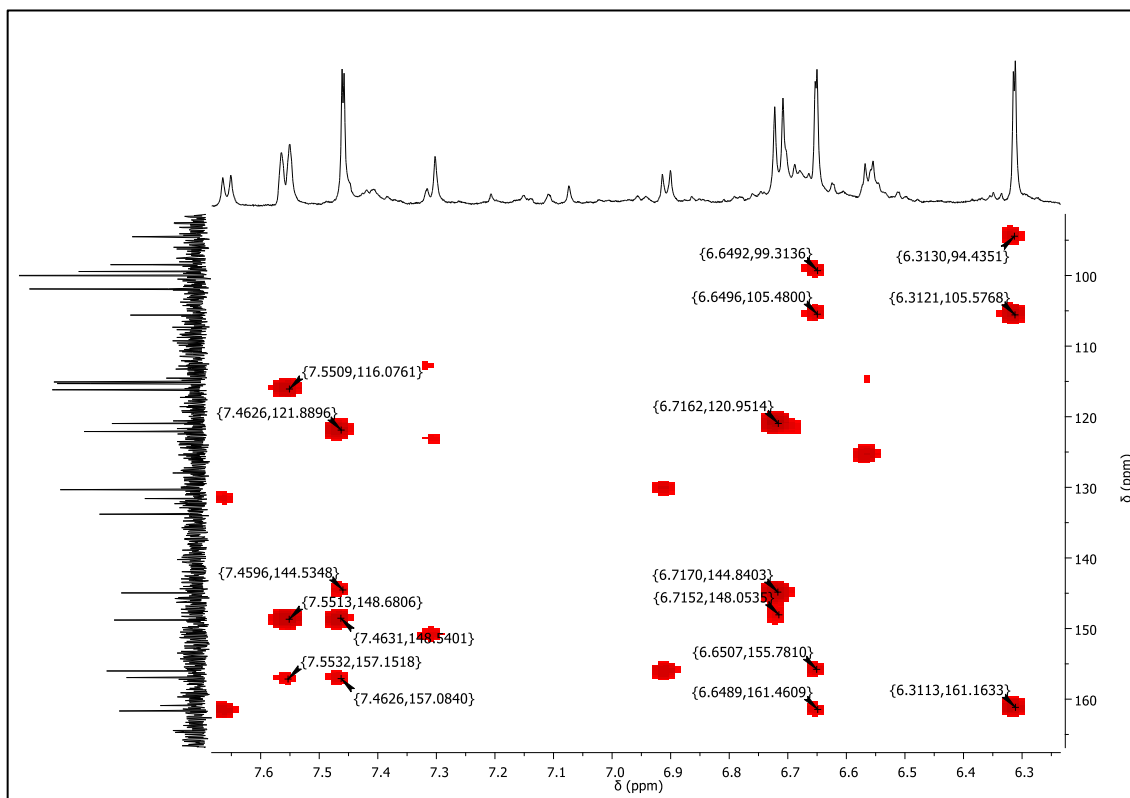


Figura 56 - Expansão da região de δ 6,3-7,6 do mapa de contornos gHMBC de **22** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

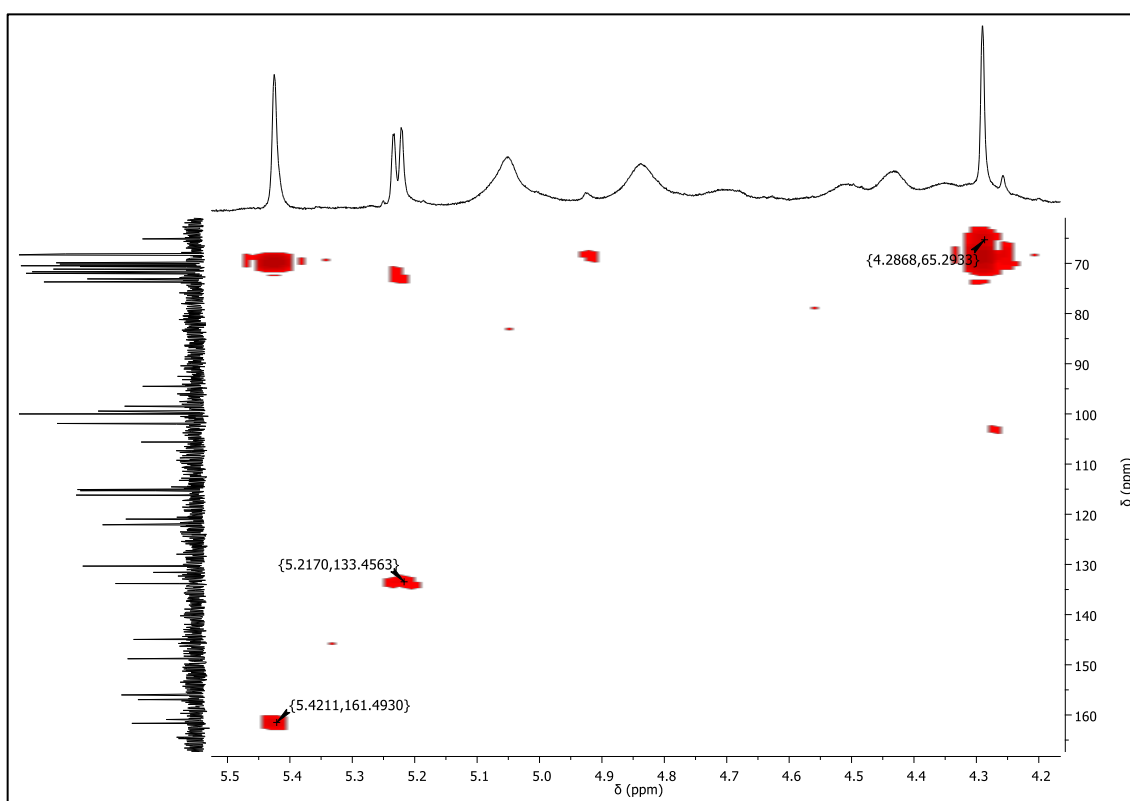
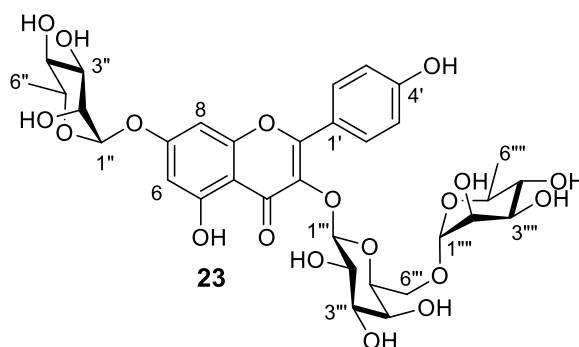


Figura 57 - Expansão da região de δ 4,2-5,5 do mapa de contornos gHMBC de **22** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

3.3.2.1 Identificação estrutural do composto 23



O composto **23**, correspondente a subfração SF-27-2 (5,7 mg), foi isolado como um sólido amarelo, solúvel em metanol (Esquemas 1, 3 e 4). A estrutura deste composto foi identificada pela análise dos espectros UV-Vis, HRMS, DI-ESI-MS/MS e RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D (Figuras 58-72, Tabela 11) e por comparação com dados relatados na literatura.

A análise do composto **23** por HPLC-DAD, usando um gradiente de MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), originou uma banda cromatográfica com o tempo de retenção de 16,27 min e o espectro UV-Vis correspondente apresentou absorções em 264 e 347 nm que sugerem tratar-se de um flavonol (Figura 58). A ausência de um ombro em aproximadamente 300 nm, entre as bandas I e II, sugere *O*-glicosilação em C-3 e C-7, pois a presença de um ombro nesta região é indicativa de *O*-glicosilação somente em C-3 (STEVENSON; NYIENDA; VEITCH, 2010; VEITCH; KITE; LEWIS, 2008).

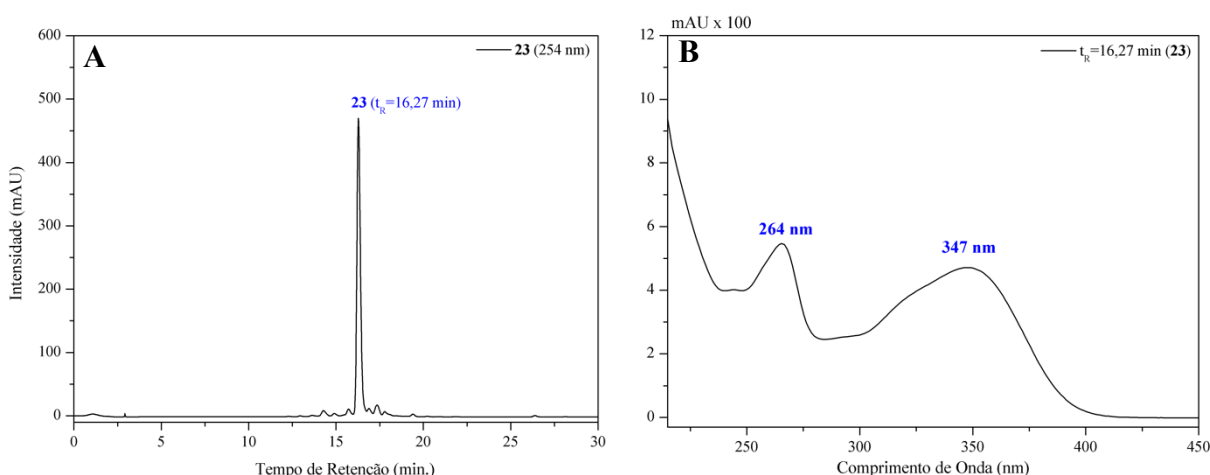


Figura 58 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD (A) e espectro UV-Vis (B) do composto **23**. Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min⁻¹ coluna C18 e $\lambda=348$ nm.

O espectro de massas de alta resolução do composto **23** apresentou pico do íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 740,2104 Da, consistente com a fórmula molecular $C_{33}H_{40}O_{19}$ (calculado 740,2163, erro: 8,0693 ppm), correspondente a um grau de insaturação igual a 15 (Figura 59).

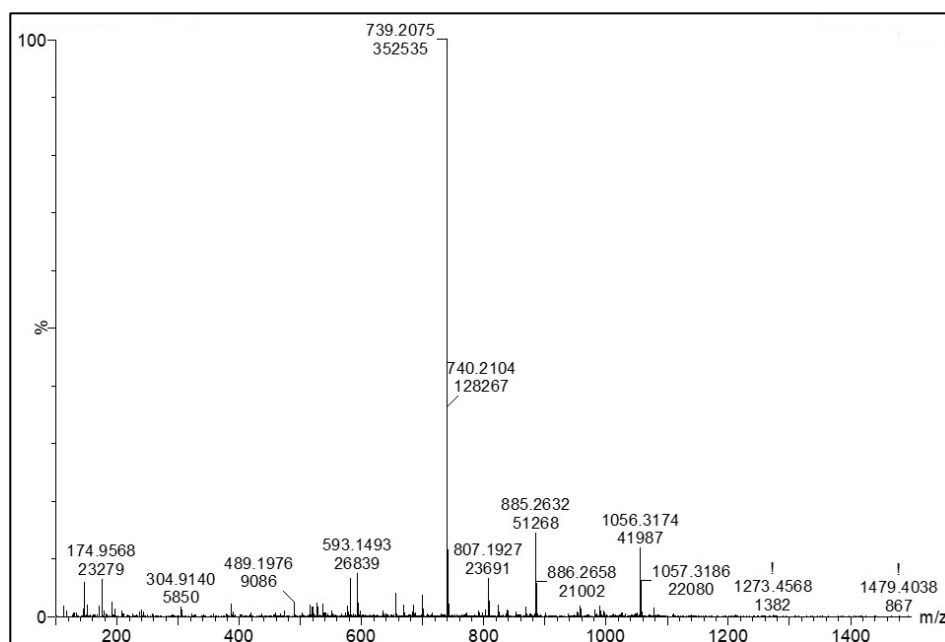


Figura 59 - Espectro de massas de alta resolução do composto **23**.

O espectro de RMN 1H do composto **23** apresentou perfil característico de substância da classe dos flavonoides glicosilados (Figuras 61-63), evidenciado pelos sinais entre δ 6,0-8,5 e entre δ 3,2-4,0 correspondentes a hidrogênios em anel aromático e de açúcares, respectivamente. Os dupletos em δ 1,01 ($J=6,2$ Hz) e 1,07 ($J=6,1$ Hz), juntamente com os simpletos largos em δ 5,50 e 4,35, característicos de hidrogênios em carbonos anoméricos de açúcares com configuração α , sugeriram a presença de duas α -L-ramnosos. O duplete em δ 5,31 ($J=7,7$ Hz) sugere a presença de uma β -D-galactose, conforme observado no composto **23**.

Na região de hidrogênios de anel aromático, o espectro apresentou dois dupletos em δ 6,41 ($J=2,0$ Hz) e 6,77 ($J=2,0$ Hz), correspondentes a hidrogênios posicionados *meta* e atribuídos a H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. A presença de dois dupletos em δ 6,83 ($J=8,8$ Hz, H-3' e H-5') e 8,05 ($J=8,8$ Hz, H-2' e H-6') definiu o padrão 1,4-dissubstituído para o anel B. Os simpletos em δ 12,56 e 10,20 sugerindo que as posições C-5 e C-4', respectivamente, encontram-se hidroxiladas (BURNS; ELLIS; MARCH, 2007; MANGURO; UGI; LEMMEN, 2005; SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009).

O espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° (Figuras 64-66) apresentou 30 sinais, sendo 13 da aglicona, com dois deles referentes a dois carbonos e 17 de três unidades de açúcar. O sinal em δ 17,9 foi atribuído aos carbonos metílicos (C-6" e C-6""), confirmando a presença de duas ramnosos e o sinal em δ 177,9 é referente à carbonila em C-4.

Os mapas de contornos gHSQC (Figuras 67-68) e gHMBC (Figura 69-71, Tabela 11) permitiram definir a localização dos açúcares na aglicona.

O mapa de contornos gHMBC (Figura 69-71 e Tabela 11) mostrou correlações de H-6 (δ 6,41) com C-7 (δ 161,6), C-8 (δ 94,7) e C-10 (δ 105,6), de H-8 (δ 6,77) com C-6 (δ 99,3), C-7 (δ 161,6), C-9 (δ 157,1) e C-10 (δ 105,6), de H-2'/H-6' (δ 8,05) com C-2'/C-6' (δ 131,1) e C-4' (δ 160,2), H-3'/H-5' (δ 6,83) com C-1' (δ 120,7), C-3'/C-5' (δ 115,1) e C-4' (160,2). Estas correlações confirmam os padrões de substituição, *meta* para o anel A e 1,4-dissubstituído para o anel B do flavonoide.

A correlação entre o hidrogênio anomérico H-1"" (δ 4,35) com C-6"" (δ 65,1) e de H-1" (δ 5,31) com C-3 (δ 133,5), indicou a presença de um grupo robinosídeo (*O*- α -L-ramnosil(1 \rightarrow 6)- β -D-galactosil) ligado ao C-3 da aglicona. A correlação de H-1" (δ 5,50) com C-7 (δ 161,6) mostrou a presença de outra unidade de ramnose em C-7.

O composto **23** foi também analisado por DI-ESI-MS/MS e o espectro apresentou pico para molécula desprotonada [M-H]⁻ com *m/z* 739, bem como íons fragmentos com *m/z* 593 ([M-H-146]⁻) e 447 ([M-H-292]⁻) que são característicos da perda de uma e duas unidades de ramnosos, respectivamente (Figura 72). O padrão de fragmentação do *m/z* 285, observado no MS⁴ do *m/z* 739 (Figura 72), confirmou o canferol como aglicona, pela presença dos íons fragmentos *m/z* 257, 255, 239, 229, 211 e 187, conforme proposta de fragmentação apresentada na Figura 60 (MARCH; MIAO, 2004).

A comparação dos dados de RMN observados mostraram-se consistentes com os relatados por Wenkert e Gottlieb (1977) e Silva et al. (2018), permitindo identificar o flavonoide canferol-3-*O*- α -ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosídeo-7-*O*- α -L-ramnosídeo (robinina, **23**). Este composto foi relatado anteriormente nas folhas de *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae), *Strychnos variabilis* (Loganiaceae), *Atropa beladonna* (Solanaceae), *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), *Genipa americana* (Rubiaceae) e *Melilotus elegans* (Fabaceae) e nas flores de *Astragalus falcatus* (Fabaceae) (ASRES; EDER; BUCAR, 2000; BRASSEUR; ANGENOT, 1988; BROCHADO et al., 2003; SILVA et al., 2018; VEITCH et al., 2010; TSIKLARI et al., 2012). Este é o primeiro relato da robinina (**23**) no gênero *Machaerium*.

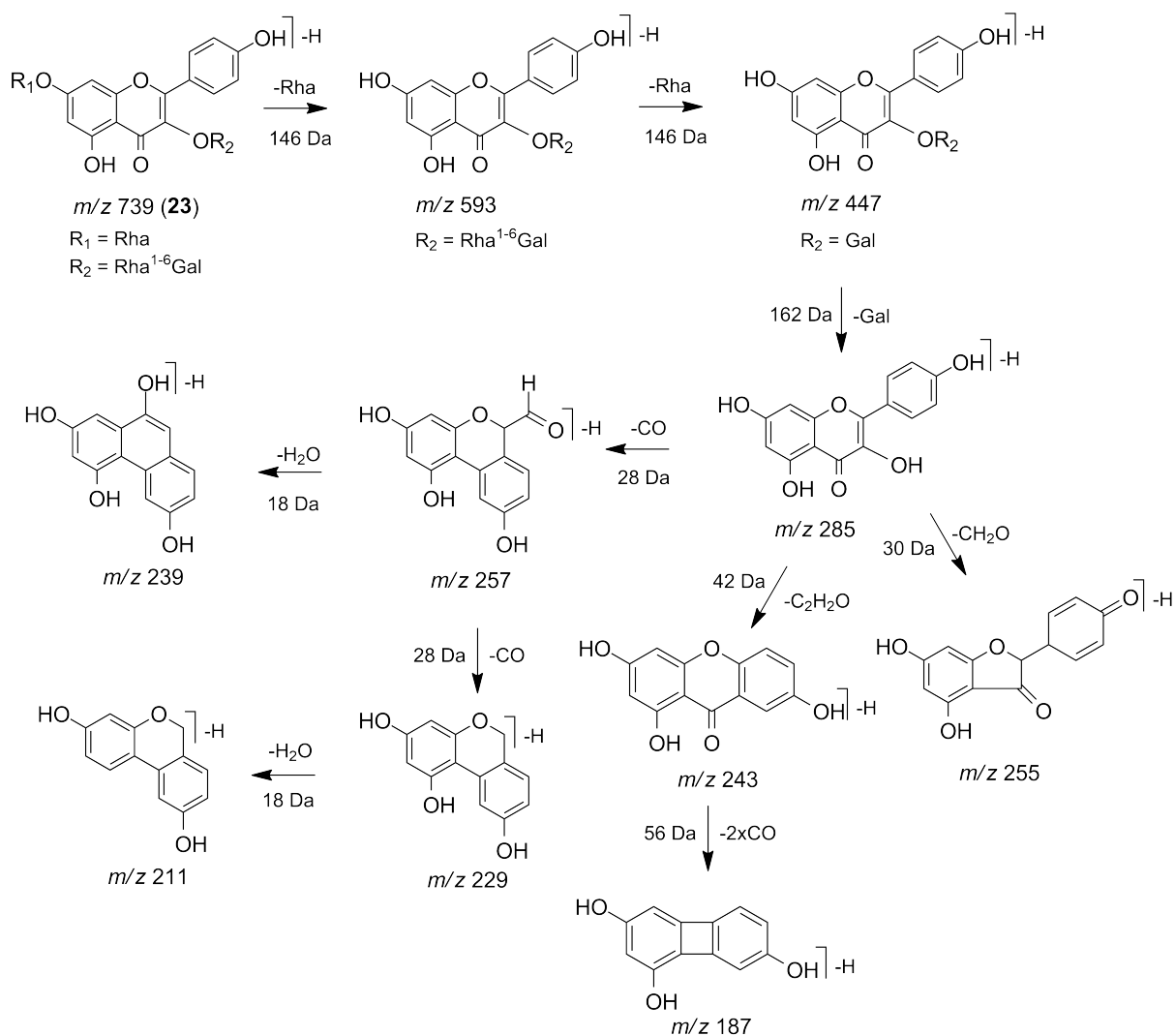


Figura 60 - Proposta de fragmentação do composto **23**. Adaptada de Veitch; Kite; Lewis (2008) e March; Miao (2004).

Tabela 11 - Dados de RMN ^1H , ^{13}C , gHSQC e gHMBC (600 e 150 MHz, DMSO- d_6) de **23**.

C	23			gHMBC $^nJ_{\text{CH}}/\text{Hz}$		robinina ^a
	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	Multip.*	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
2	156,0	C				156,0
3	133,5	C		H-1''' (δ 5,31)		133,6
4	177,6	C				177,6
5	160,9	C				161,6
6	99,4	CH	6,41 (d, $J=2,0$ Hz)		H-8	99,5
7	161,6	C		H-1'' (δ 5,50), H-6 e H-8		160,8
8	94,7	CH	6,77 (d, $J=2,0$ Hz)		H-6	94,8
9	157,1	C				157,1
10	105,6	C			H-6 e H-8	105,7
1'	120,7	C			H-3' e H-5'	120,7
2'	131,1	CH	8,05 (d, $J=8,8$ Hz)		H-6'	131,1
3'	115,1	CH	6,83 (d, $J=8,8$ Hz)		H-5'	115,2
4'	160,2	C		H-3' e H-5'	H-2' e H-6'	160,1
5'	115,1	CH	6,83 (d, $J=8,8$ Hz)		H-3'	115,2
6'	131,1	CH	8,05 (d, $J=8,8$ Hz)		H-2'	131,1
1''	98,4	CH	5,50 (sl)			98,5
2''	70,3	CH				70
3''	70,6	CH				70,7
4''	71,6	CH				71,8
5''	69,8	CH				69,7
6''	17,9	CH ₃	1,01 (d; $J=6,1$ Hz)			18,1
1'''	101,8	CH	5,31 (d, $J=7,7$ Hz)			102
2'''	71,1	CH				71,3
3'''	72,9	CH				73,2
4'''	68,0	CH				68,4
5'''	73,6	CH				73,8
6'''	65,1	CH ₂		H-1'''' (δ 4,35)		65,6
1''''	100,0	CH	4,35 (sl)			100,1
2''''	70,4	CH				70,5
3''''	70,1	CH				70,5
4''''	71,9	CH				72,1
5''''	68,3	CH				68,4
6''''	17,9	CH ₃	1,07 (d; $J=6,1$ Hz)			18,1

^aDeslocamentos químicos obtidos em DMSO- d_6 e relatados por Wenkert; Gottlieb, 1977 e Silva et al., 2018.

*Multiplicidade obtida dos espectros DEPTQ 135°.

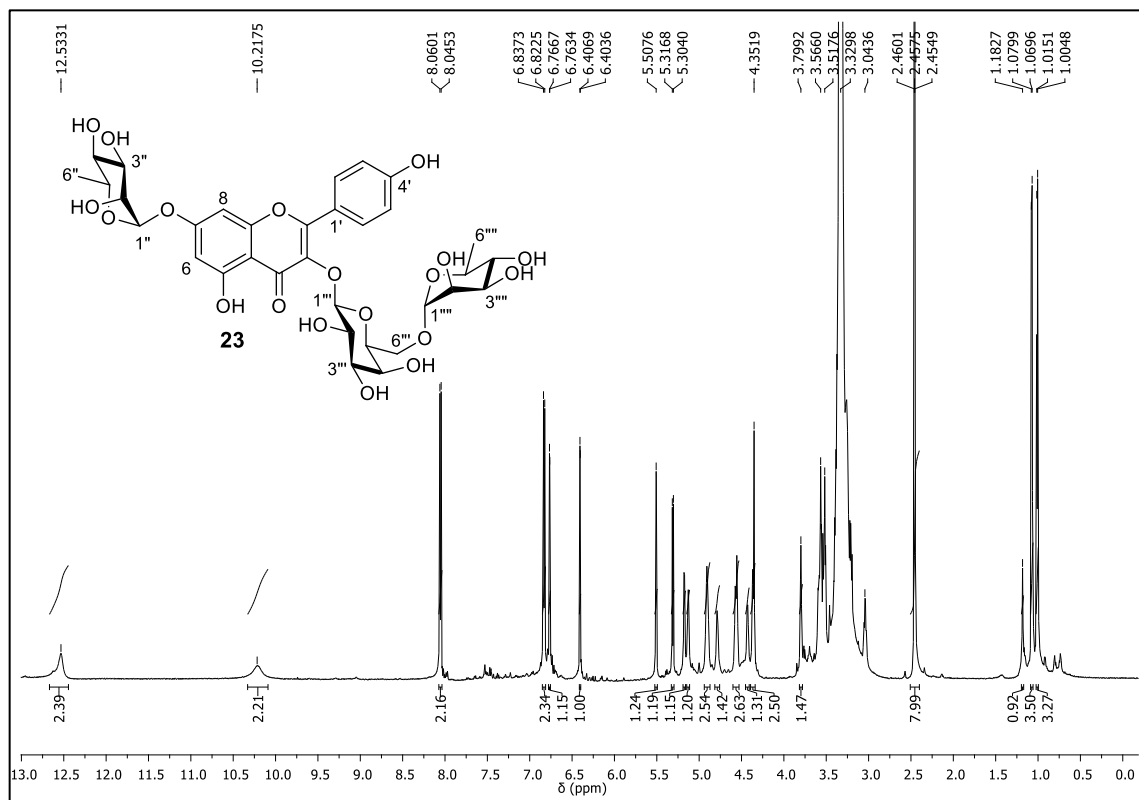


Figura 61 - Espectro de RMN ^1H de **23** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).

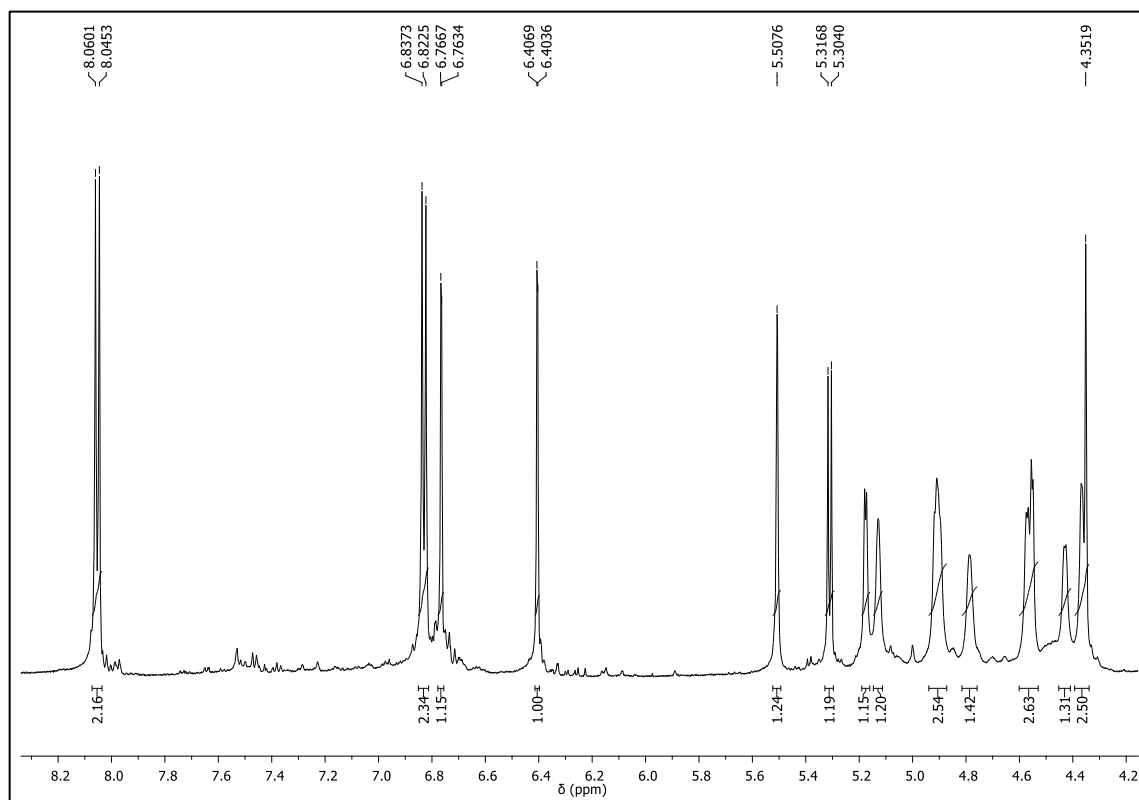


Figura 62 - Expansão da região de δ 4,2-8,2 do espectro de RMN ^1H de **23** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).

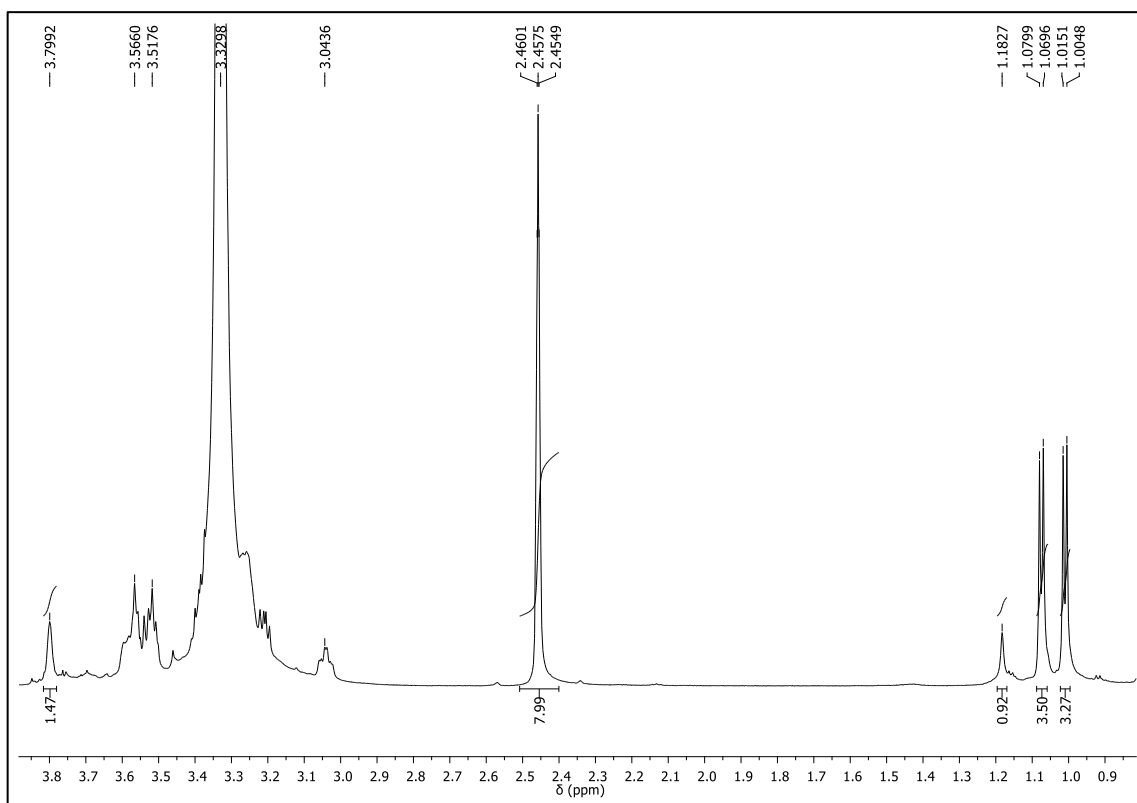


Figura 63 - Expansão da região de δ 0,9-3,9 do espectro de RMN ^1H de **23** ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz).

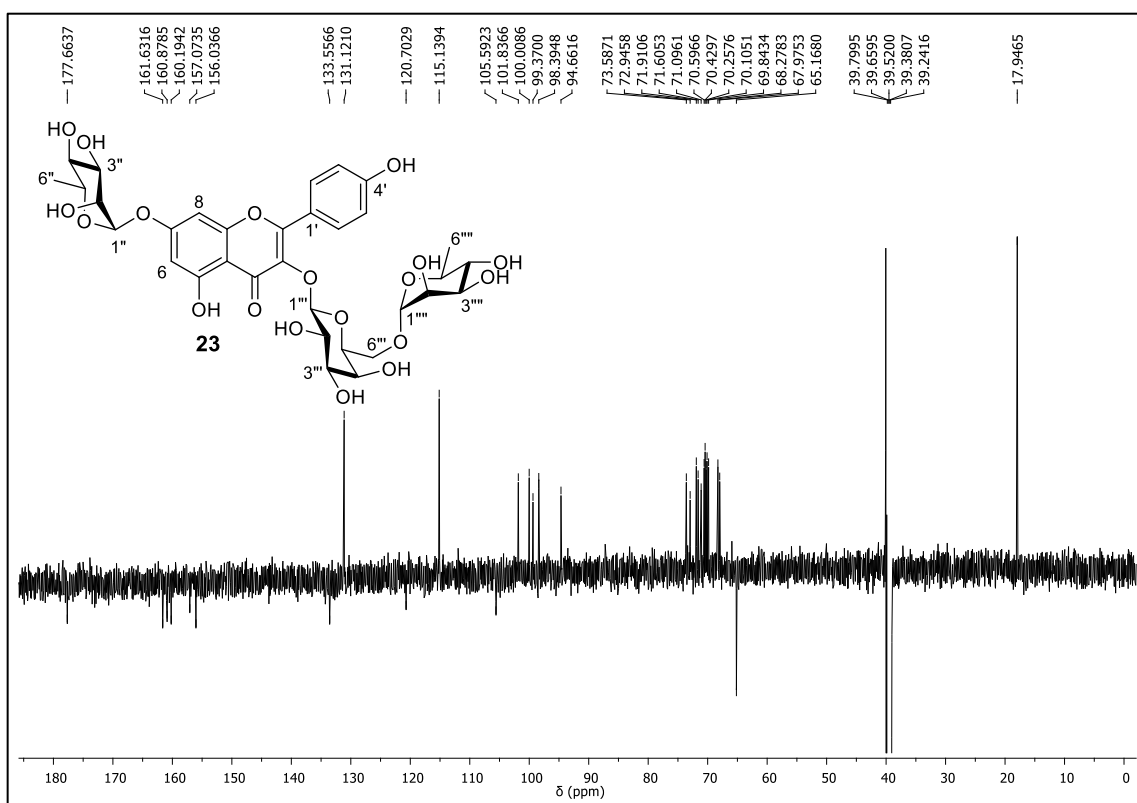


Figura 64 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de **23** ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz).

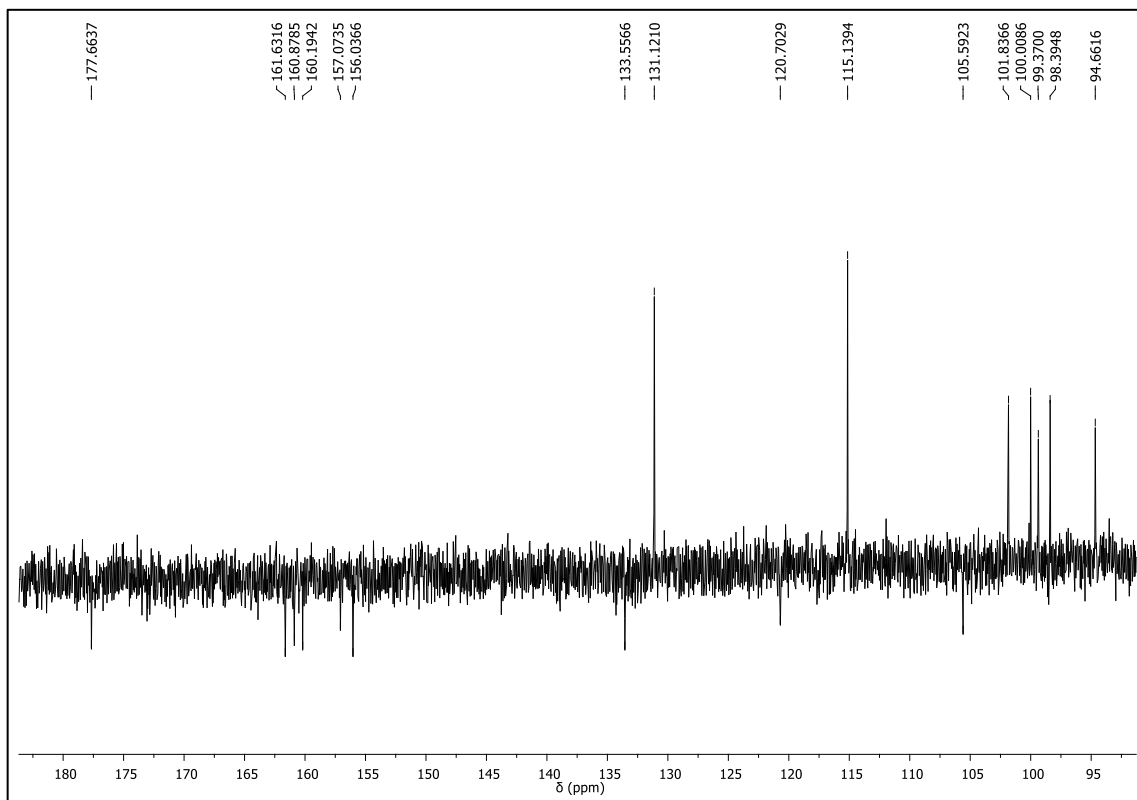


Figura 65 - Expansão da região de δ 95-180 de espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de **23** (DMSO- d_6 , 150 MHz).

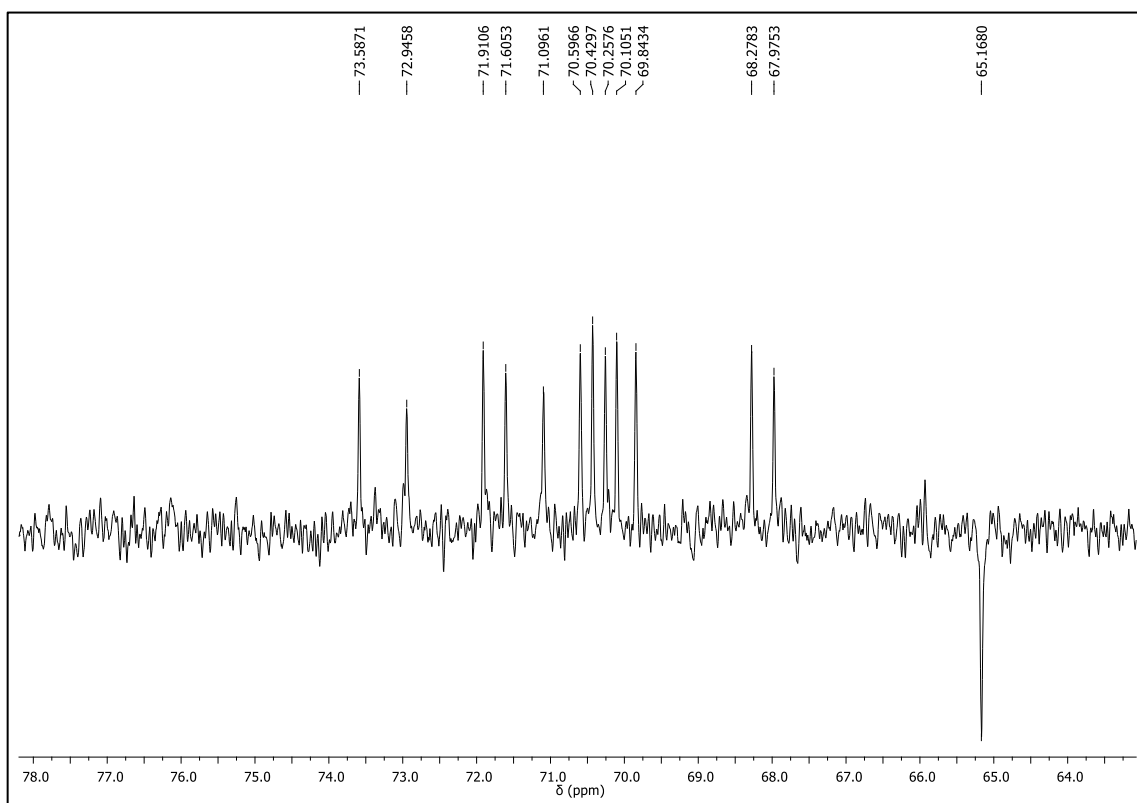


Figura 66 - Expansão da região de δ 64-78 de espectro de RMN ^{13}C de **23** (DMSO- d_6 , 150 MHz).

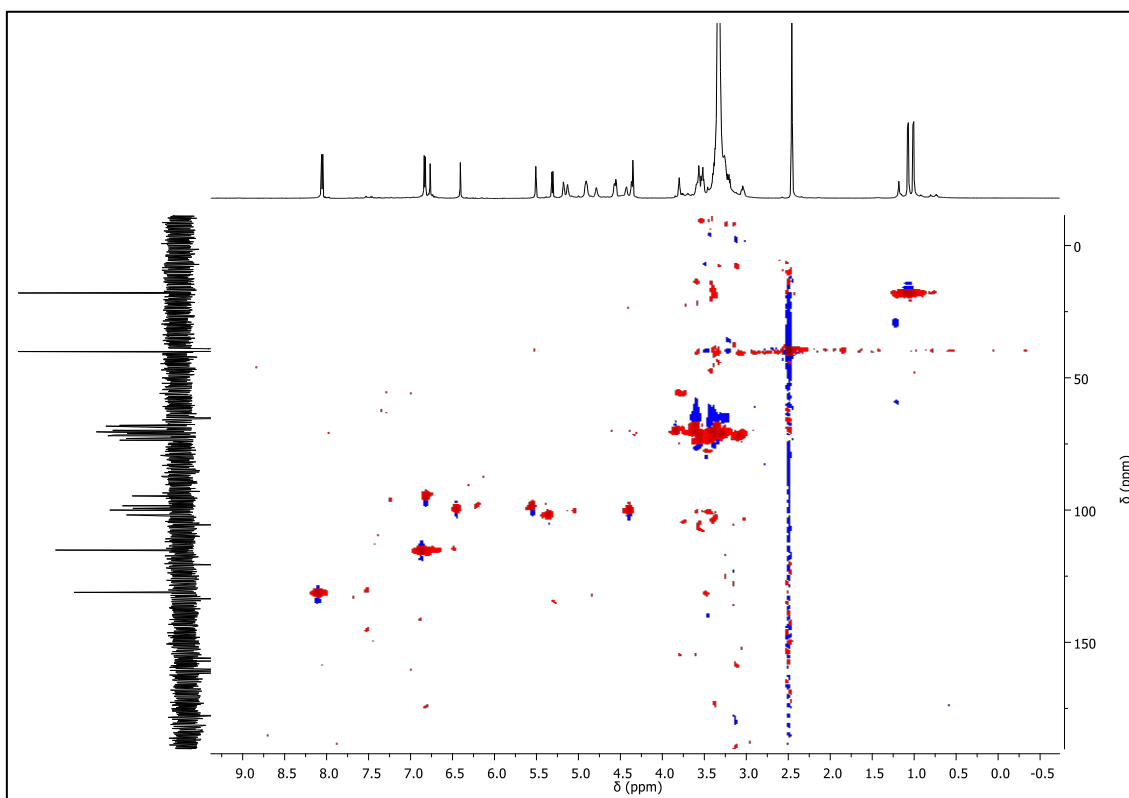


Figura 67 - Mapa de contorno gHSQC de **23** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

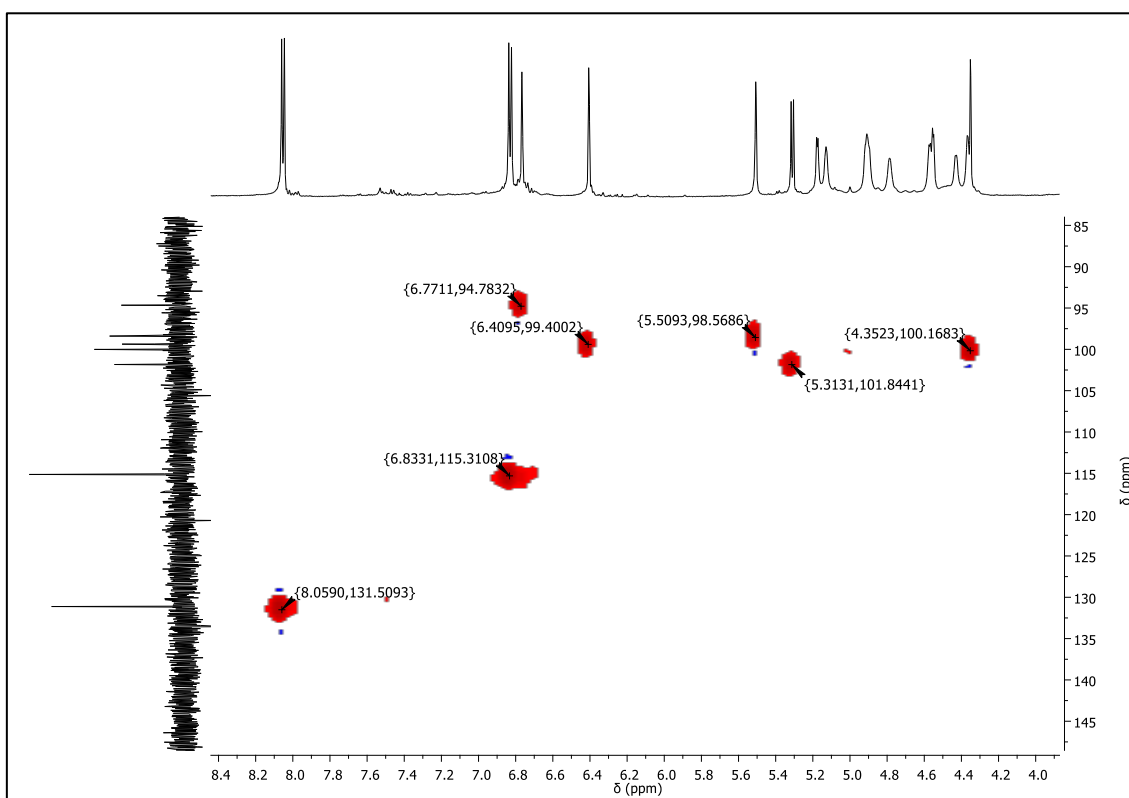


Figura 68 - Expansão da região de δ 4,0-8,5 do mapa de contorno gHSQC de **23** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

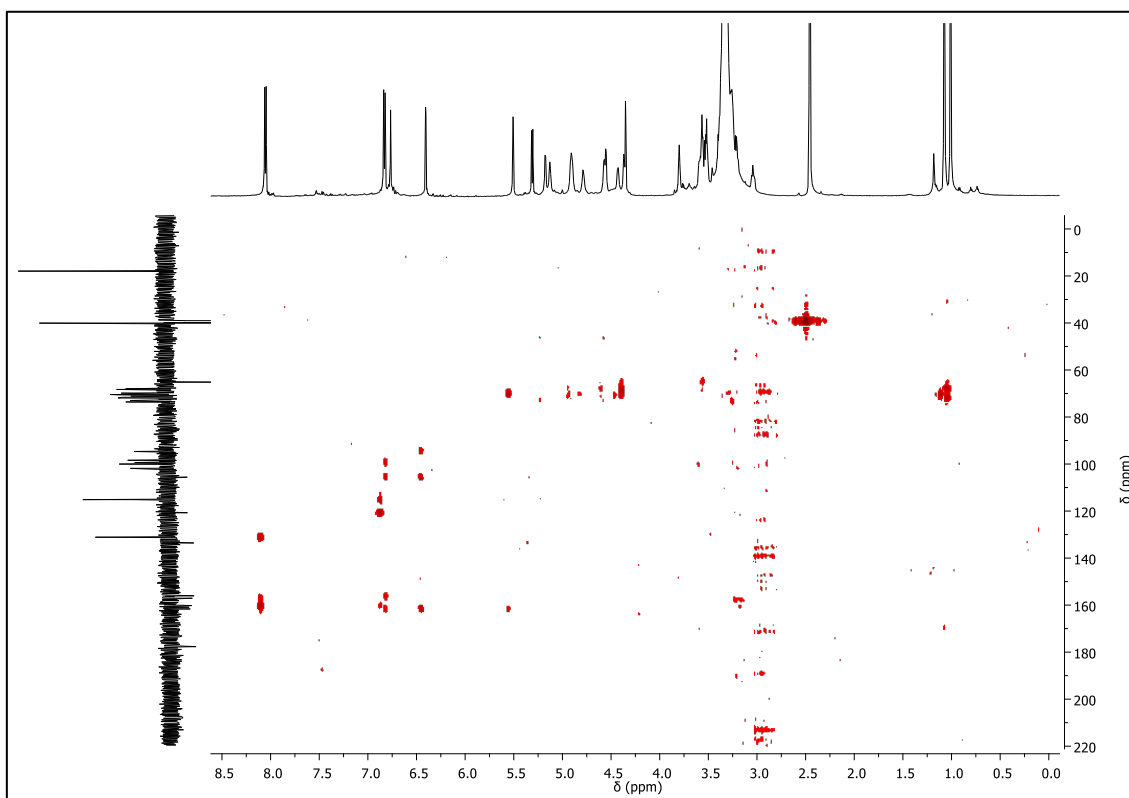


Figura 69 - Mapa de contorno gHMBC de **23** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

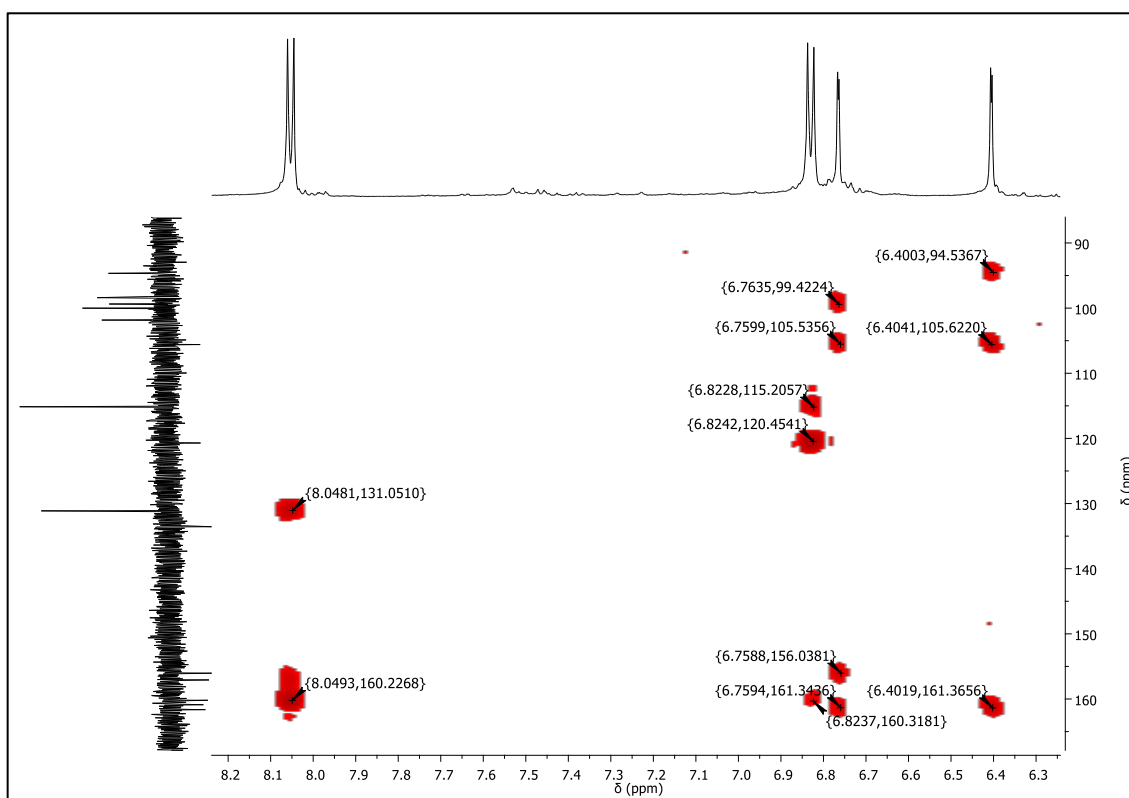


Figura 70 - Expansão da região de δ 4,0-8,5 do mapa de contorno gHMBC de **23** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

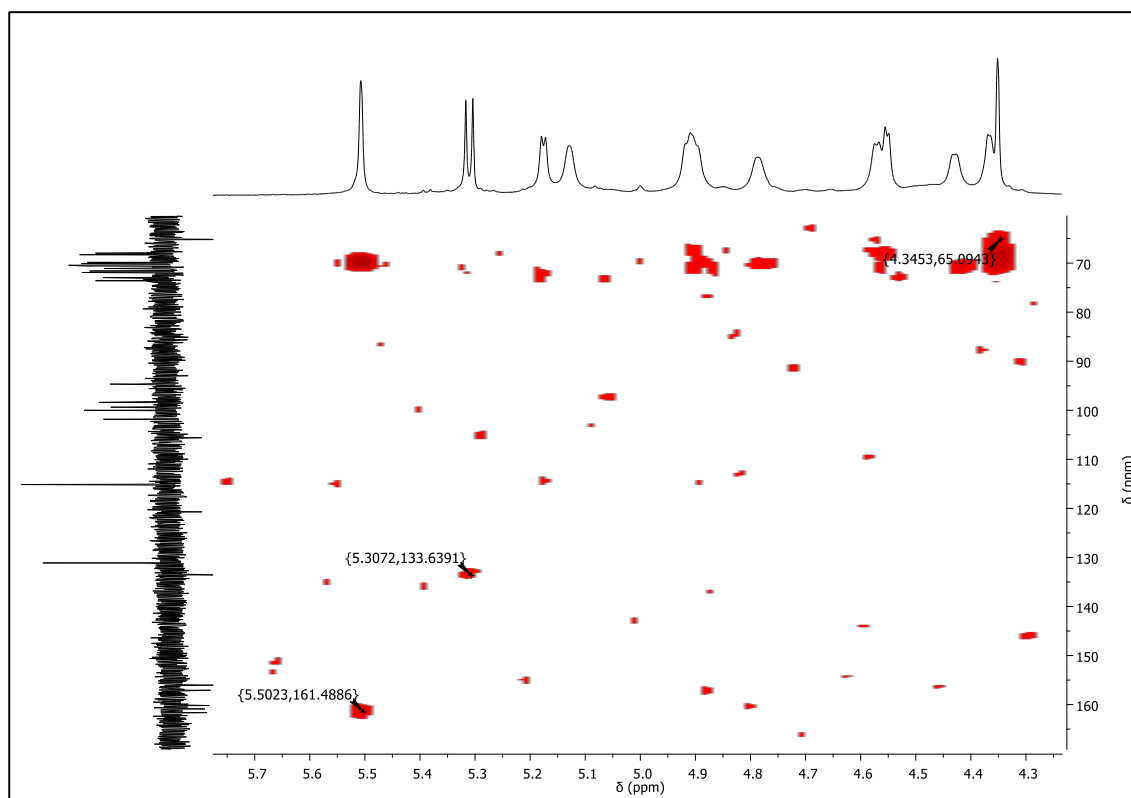


Figura 71 - Expansão da região de δ 4,3-5,7 do mapa de contorno gHMBC de **23** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

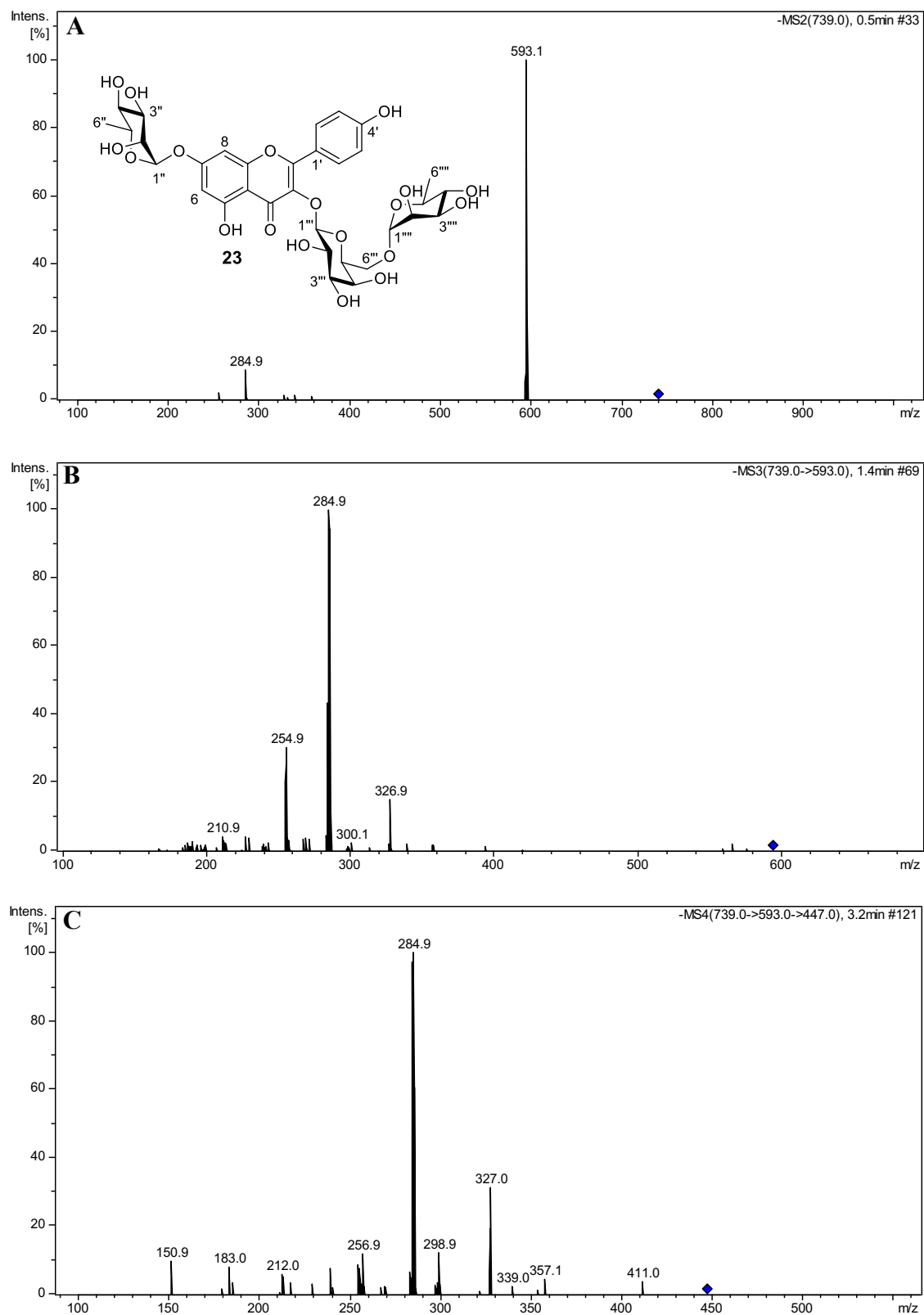
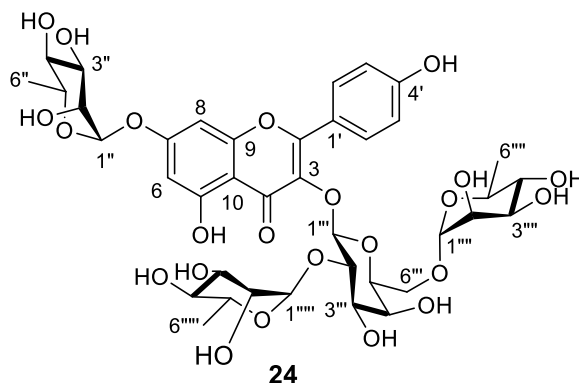


Figura 72 - Espectro de massas do composto **23**: MS²[739] (A), MS³ [593] (B) e MS⁴ [447] (C).

3.3.2.3 Identificação estrutural do composto 24



O composto **24**, correspondente a subfração SF-18-2 (28,8 mg), foi isolado como um sólido amarelo, solúvel em metanol (Esquemas 1, 3 e 4). A estrutura deste composto foi identificada pela análise dos espectros UV-Vis, HRMS, DI-ESI-MS/MS, RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D (Figuras 73-88, Tabela 12) e por comparação com dados relatados na literatura.

A análise do composto **24** por HPLC-DAD, usando um gradiente de MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), originou uma banda cromatográfica com o tempo de retenção de 9,87 min e o espectro UV-Vis correspondente apresentou absorções em 265 e 349 nm que sugerem tratar-se de um flavonol (Figura 73). A ausência de um ombro em aproximadamente 300 nm, entre as bandas I e II, sugere *O*-glicosilação em C-3 e C-7. (STEVENSON; NYIENDA; VEITCH, 2010; VEITCH; KITE; LEWIS, 2008).

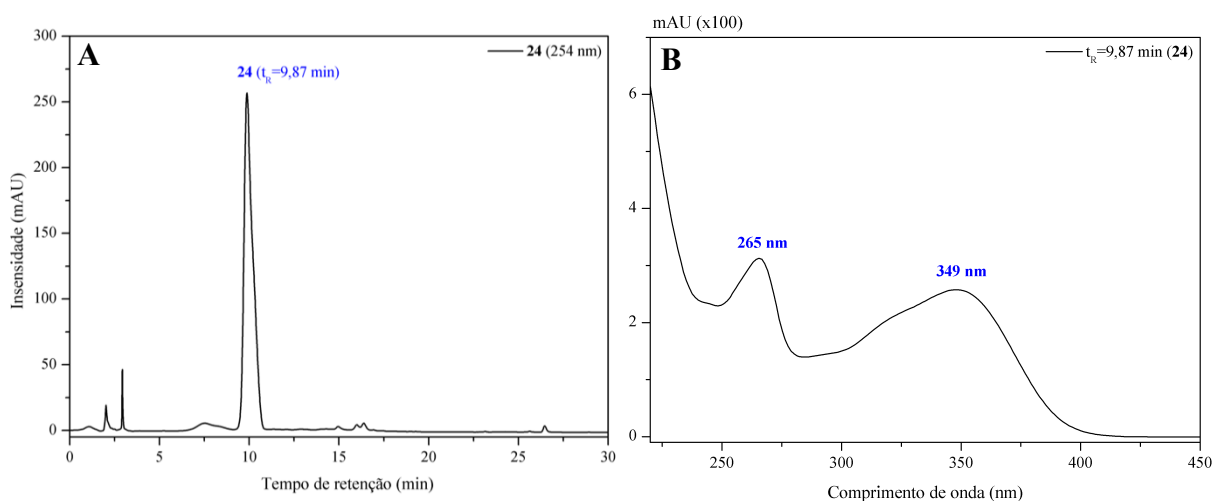


Figura 73 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD (A) e espectro de absorção molecular (B) do composto **24**. Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min⁻¹, coluna C18, $\lambda=348$ nm.

O espectro de massas de alta resolução do composto **24** apresentou pico do íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 886,2697 Da, consistente com a fórmula molecular $C_{39}H_{50}O_{23}$ (calculado 886,2743, erro: 5,1711 ppm), correspondente a um grau de insaturação igual a 15 (Figura 74).

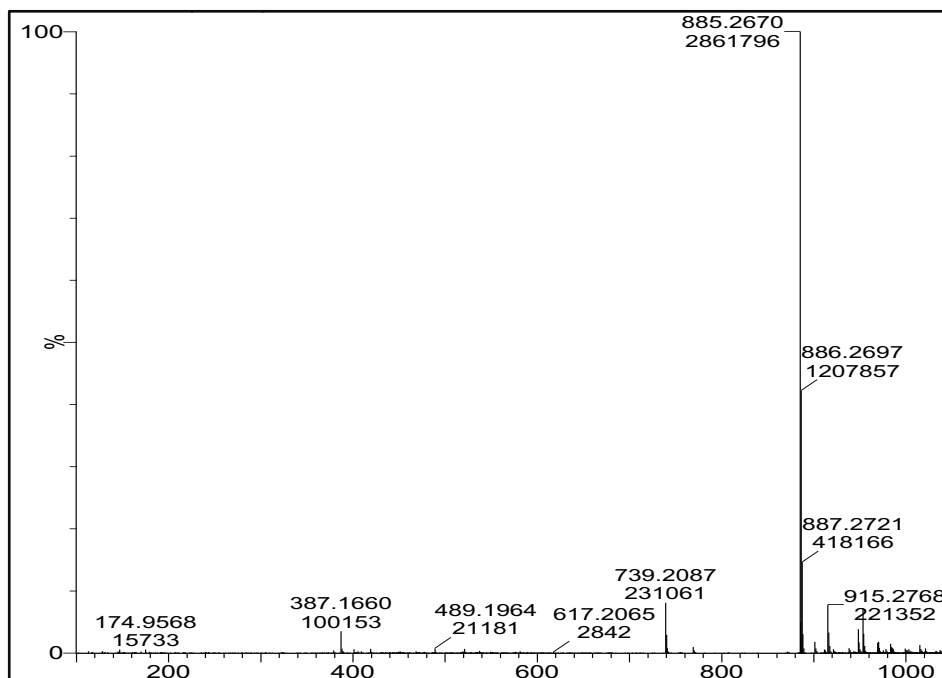


Figura 74 - Espectro de massas de alta resolução do composto **24**.

O espectro de RMN 1H do composto **24** apresentou perfil característico de substância da classe dos flavonoides glicosilados (Figuras 76-78), evidenciado pelos sinais entre δ 6,0-8,5 e entre δ 3,2-4,0 correspondentes a hidrogênios em anel aromático e de açúcares, respectivamente. Os dupletos em δ 0,69 ($J=6,1$ Hz), 0,96 ($J=6,1$ Hz) e 1,04 ($J=6,1$ Hz) juntamente com os simpletos largos em δ 5,46, 4,96 e 4,27, característicos de hidrogênios em carbonos anoméricos de açúcares com configuração α , sugeriram a presença de três unidades de α -L-ramnose, diferenciando dos observados para o composto **23** que só apresenta duas ramnoses. O duplete em δ 5,49 ($J=7,7$ Hz) sugere a presença da β -D-galactose, conforme observados para os compostos **22** e **23**.

Na região de hidrogênios de anel aromático, o espectro apresentou dois dupletos em δ 6,36 ($J=2,0$ Hz) e 6,72 ($J=2,0$ Hz), correspondentes a hidrogênios posicionados *meta* e atribuídos a H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. A presença de dois dupletos em δ 6,79 ($J=8,8$ Hz, H-3' e H-5') e 8,01 ($J=8,8$ Hz, H-2' e H-6') definiu o padrão 1,4-dissubstituído para o anel B.

O espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° (Figuras 79-82) apresentou 36 sinais, sendo 13 da aglicona com dois deles (δ 115,6 e 131,4) correspondentes a dois carbonos e 23 de quatro unidades de açúcar com um deles (δ 18,3) correspondente a dois carbonos. Os sinais em δ 17,7 e 18,3 (2C) foram atribuídos aos carbonos metílicos, confirmando a presença de três ramnoses e o sinal em δ 177,9 é referente à carbonila em C-4.

Os mapas de contornos gHSQC (Figuras 83-85) e gHMBC (Figura 86 e 87, Tabela 12) permitiram definir a localização dos açúcares na aglicona.

O mapa de contornos gHMBC (Figura 86 e 87, Tabela 12) mostrou correlações à longa distância de H-6 (δ 6,36) com C-7 (δ 162,0), C-8 (δ 95,1) e C-10 (δ 106,0) e de H-8 (δ 6,72) com C-6 (δ 99,3), C-7 (δ 162,01), C-9 (δ 157,3) e C-10 (δ 106,0). O sinal de H-2'/H-6' (δ 8,01) correlacionou com C-4' (δ 160,5) e de H-3'/H-5' (δ 6,79) com C-1' (δ 121,13), C-2'/6' (δ 131,4) e C-4' (160,5). Estas correlações confirmam os padrões de substituição, *meta* para o anel A e 1,4-dissubstituído para o anel B do flavonoide.

A posição de uma α -L-ramnose no C-7 de aglicona foi definida pela correlação de H-1'' (δ 5,46) com C-7 (δ 162,0). As correlações entre os hidrogênios anoméricos H-1'''' (δ 4,96) e H-1'''' (δ 4,27) com C-2''' (δ 75,3) e C-6''' (δ 65,4), respectivamente indicaram a presença de α -L-ramnoses ligadas em C-2''' e C-6''' da β -D-galactose.

Embora não se tenha observado a correlação de H-1''' (δ 5,49) da galactose com C-3 (δ 133,4) da aglicona, a posição do grupo α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactosil em C-3 foi definida com base no deslocamento químico de C-3 que é $\delta \cong 133,5$ quando ligado a açúcar e $\delta \cong 135,5$ a hidroxila (MARKHAM; CHARI, 1982). Adicionalmente, os simpletos de baixa intensidade em δ 12,56 e 10,20 foram atribuídos aos hidrogênios das hidroxilas em C-5 e C-4', respectivamente (BURNS; ELLIS; MARCH, 2007; MANGURO; UGI; LEMMEN, 2005; SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009).

O composto **24** foi também analisado por DI-ESI-MS/MS e apresentou no espectro pico da molécula desprotonada $[\text{M-H}]^-$ com m/z 885, íons fragmentos com m/z 739 ($[\text{M-H-146}]^-$) e 593 ($[\text{M-H-292}]^-$), característicos da perda de uma e duas unidades de ramnoses, respectivamente (Figura 88). O MS³ do m/z 885 gerou os íons fragmento m/z 593 e 447 que são indicativos da perda de uma e duas unidade de ramnose (JANG et al., 2018; MANGURO; UGI; LEMMEN, 2005). O padrão de fragmentação do m/z 285, observado no MS⁴ do m/z 885 (Figura 91), confirmou o canferol como aglicona, pela presença dos íons fragmentos m/z 257, 255, 239, 229, 211 e 187, conforme proposta de fragmentação apresentada na Figura 75 (MARCH; MIAO, 2004).

A análise dos espectros RMN e comparação com os dados relatados na literatura (KITE; STONEHAM; VEITCH, 2007; YAHARA; KOHJYOUA; KOHODA, 2000) permitiu identificar o flavonoide canferol-3-*O*- α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 2)[α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactosil-7-*O*- α -L-ramnosídeo (astrasikokiosídeo I, **24**). Este composto foi relatado anteriormente nas partes aéreas de *Astragalus shikokianus* e nas folhas de *Styphnolobium japonicum*, ambas pertencentes à família Fabaceae (KITE; STONEHAM; VEITCH, 2007; YAHARA; KOHJYOUA; KOHODA, 2000). Este é o primeiro relato da astrasikokiosídeo I (**24**) no gênero *Machaerium*.

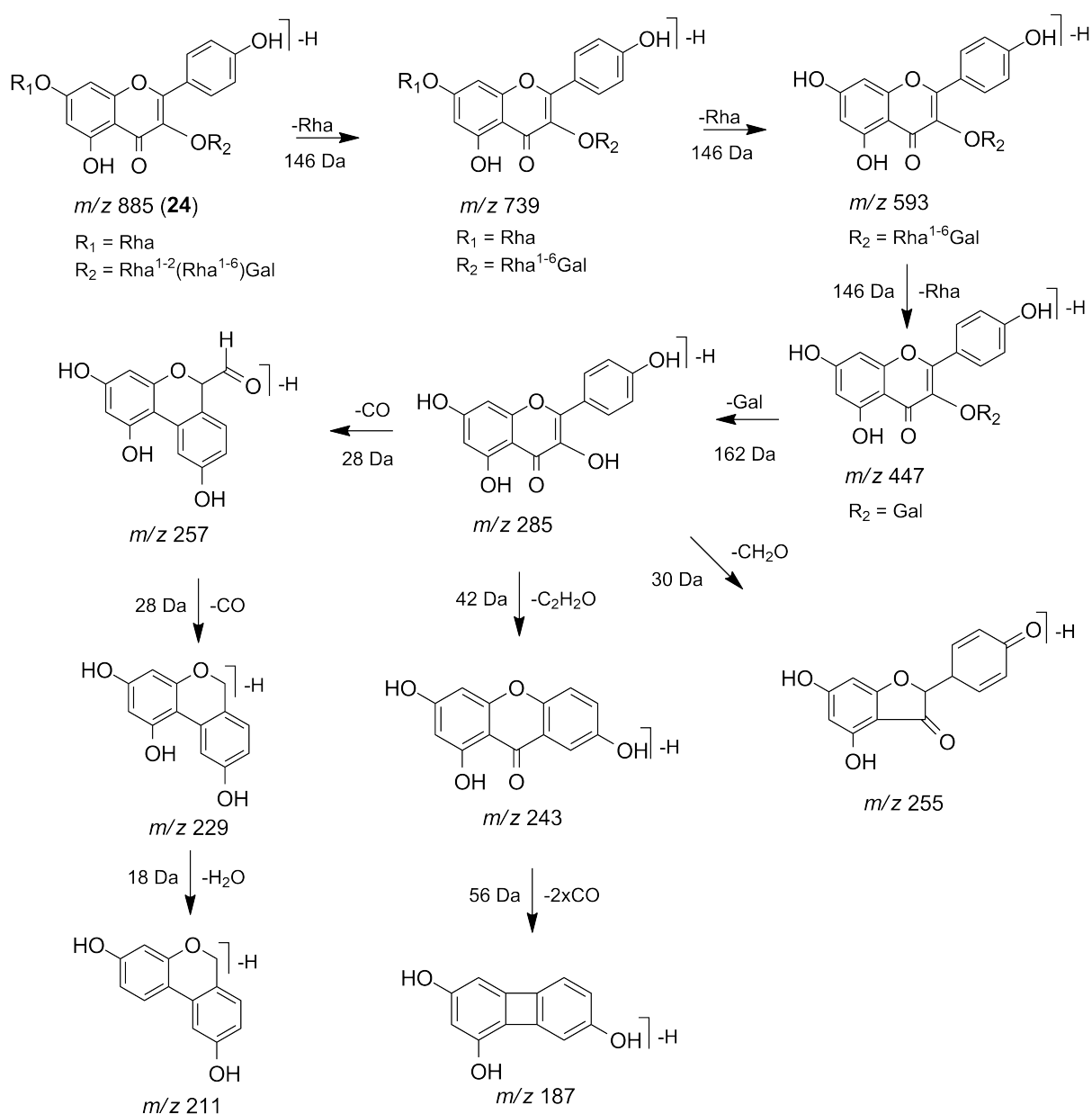


Figura 75 - Proposta de fragmentação do composto **24**. Adaptada de March; Miao (2004) e Veitch; Kite; Lewis (2008).

Tabela 12 - Dados de RMN ^1H , ^{13}C , gHSQC e gHMBC (600 e 150 MHz, DMSO- d_6) de **24**.

C	24			gHMBC $^nJ_{\text{CH}}/\text{Hz}$		astrasikokiosídeo I ^a
	δ_{C} ppm	Multip.*	δ_{H} /ppm	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
2	156,4	C				158,0
3	133,4	C				133,6
4	177,9	C				178,1
5	161,3	C				161,3
6	99,4	CH	6,36 (d, $J=2,0$ Hz)		H-8	99,8
7	162,0	C		H-1'' (δ 5,46), H-6 e H-8		162,1
8	95,1	CH	6,72 (d, $J=2,0$ Hz)		H-6	95,5
9	157,3	C				156,7
10	106,0	C			H-6 e H-8	106,4
1'	121,1	C			H-3' e H-5'	121,0
2'	131,4	CH	8,01 (d, $J=8,8$ Hz)	H-3'	H-6'	131,8
3'	115,6	CH	6,79 (d, $J=8,8$ Hz)		H-5'	116,2
4'	160,5	C		H-3' e H-5'	H-2' e H-6'	161,3
5'	115,6	CH	6,79 (d, $J=8,8$ Hz)		H-3'	116,2
6'	131,4	CH	8,01 (d, $J=8,8$ Hz)	H-5'		131,8
1''	98,8	CH	5,46 (sl)			98,9
2''	70,8	CH				70,9
3''	71,1	CH				71,2
4''	72,3	CH				72,6
5''	70,5	CH				70,3
6''	18,4	CH ₃	1,04 (d; $J=6,1$ Hz)			18,5
1'''	99,8	CH	5,49 (d, $J=7,7$ Hz)			100,0
2'''	75,3	CH		H-1'''' (δ 4,96)		76,2
3'''	74,2	CH				74,3
4'''	69,3	CH				69,2
5'''	73,8	CH				74,3
6'''	65,4	CH ₃		H-1'''' (δ 4,27)		66,3
1''''	101,0	CH	4,96 (sl)			101,5
2''''	70,5	CH				70,6
3''''	71,0	CH				71,0
4''''	72,0	CH				72,3
5''''	68,9	CH				68,9
6''''	17,7	CH ₃	0,96 (d; $J=6,1$ Hz)			17,8
1'''''	100,4	CH	4,27 (sl)			100,8
2'''''	70,7	CH				70,8
3'''''	71,0	CH				71,1
4'''''	72,3	CH				72,6
5'''''	69,1	CH				69,0
6'''''	18,4	CH ₂	0,69 (d; $J=6,1$ Hz)			18,4

^aDados em DMSO- d_6 relatados por Yahara; Kohjyouma; Kohoda, 2000. *Multiplicidade obtida dos espectros DEPTQ 135°.

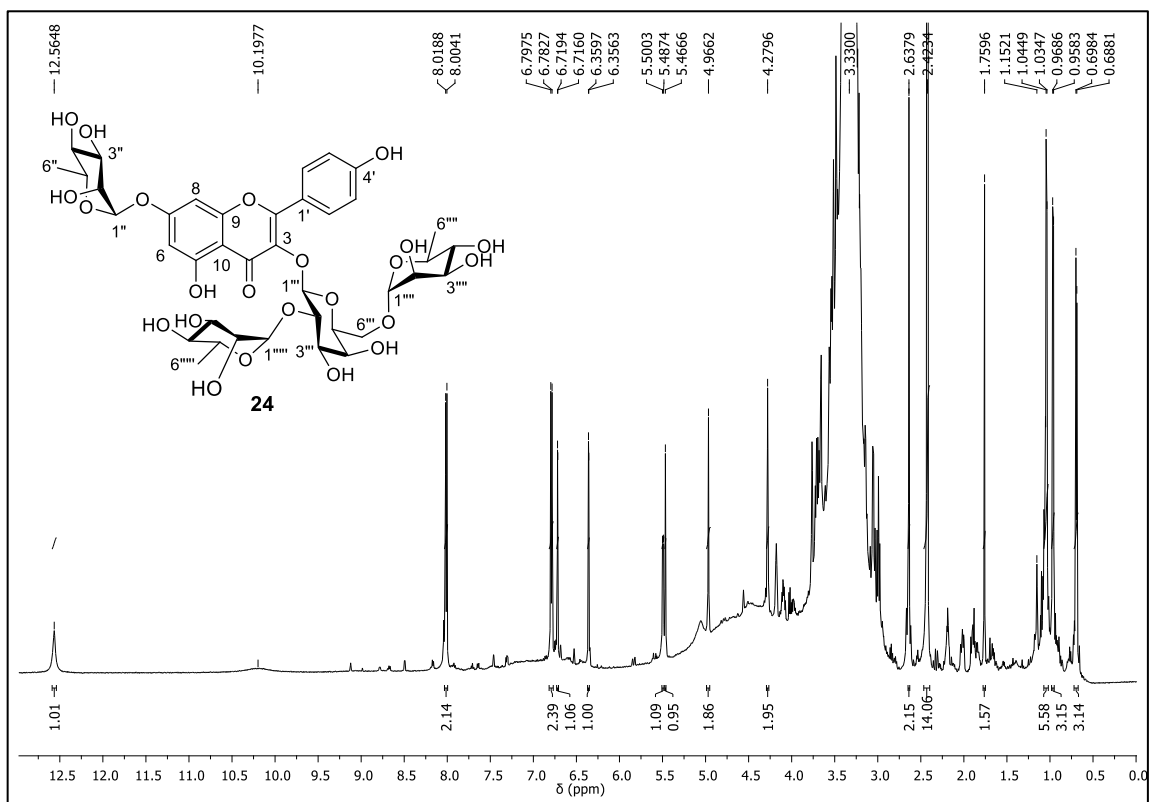


Figura 76 - Espectro de RMN ^1H de **24** ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz).

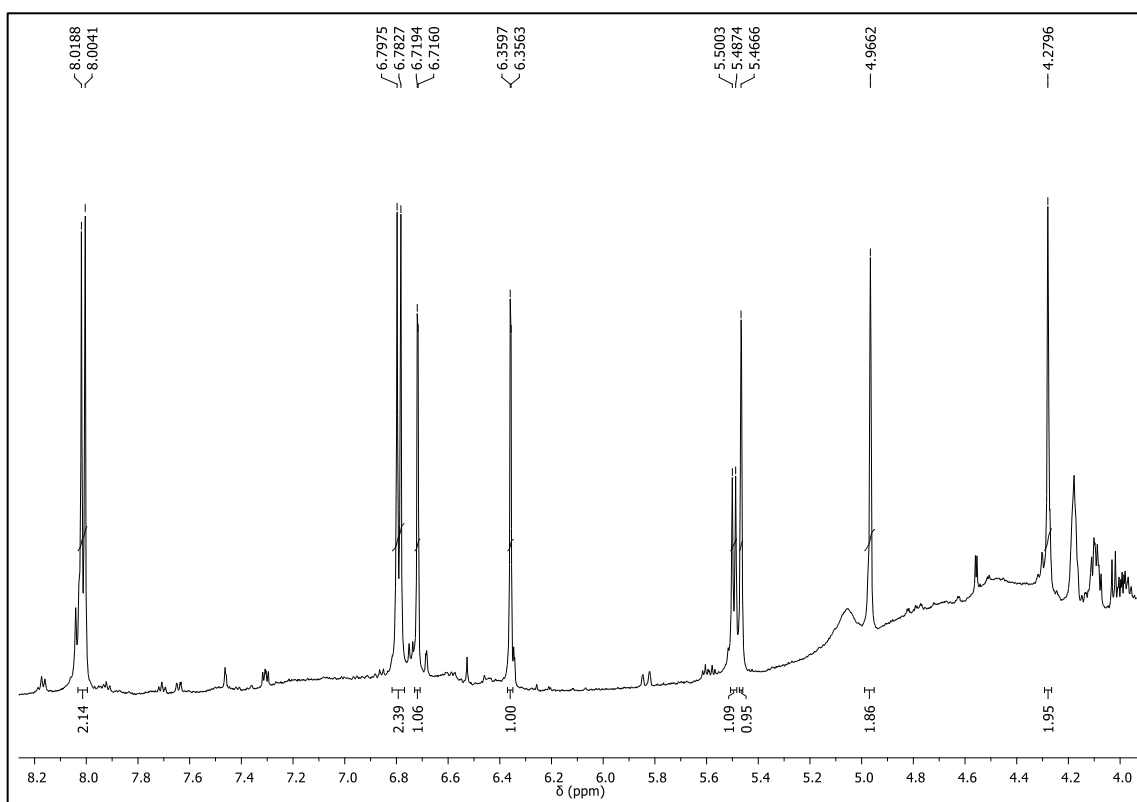


Figura 77 - Expansão da região de δ 4,0-8,2 do espectro de RMN ^1H de **24** ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz).

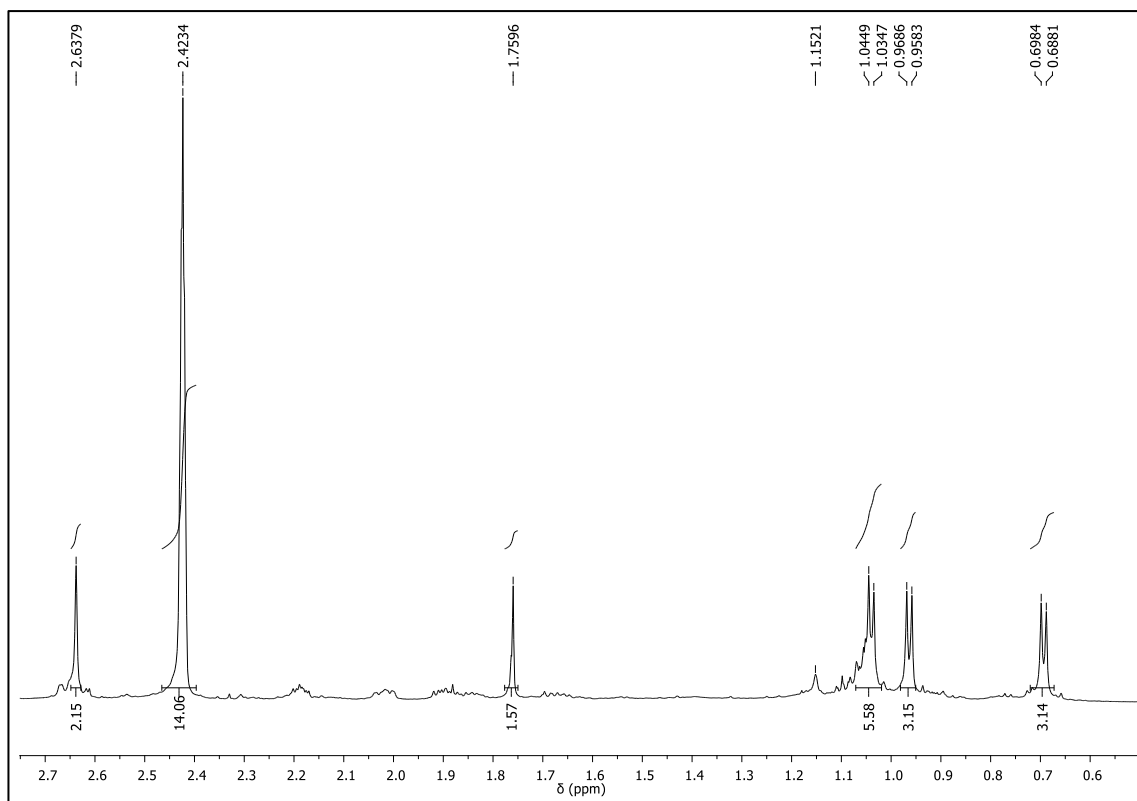


Figura 78 - Expansão da região de δ 0,5-2,7 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de **24** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

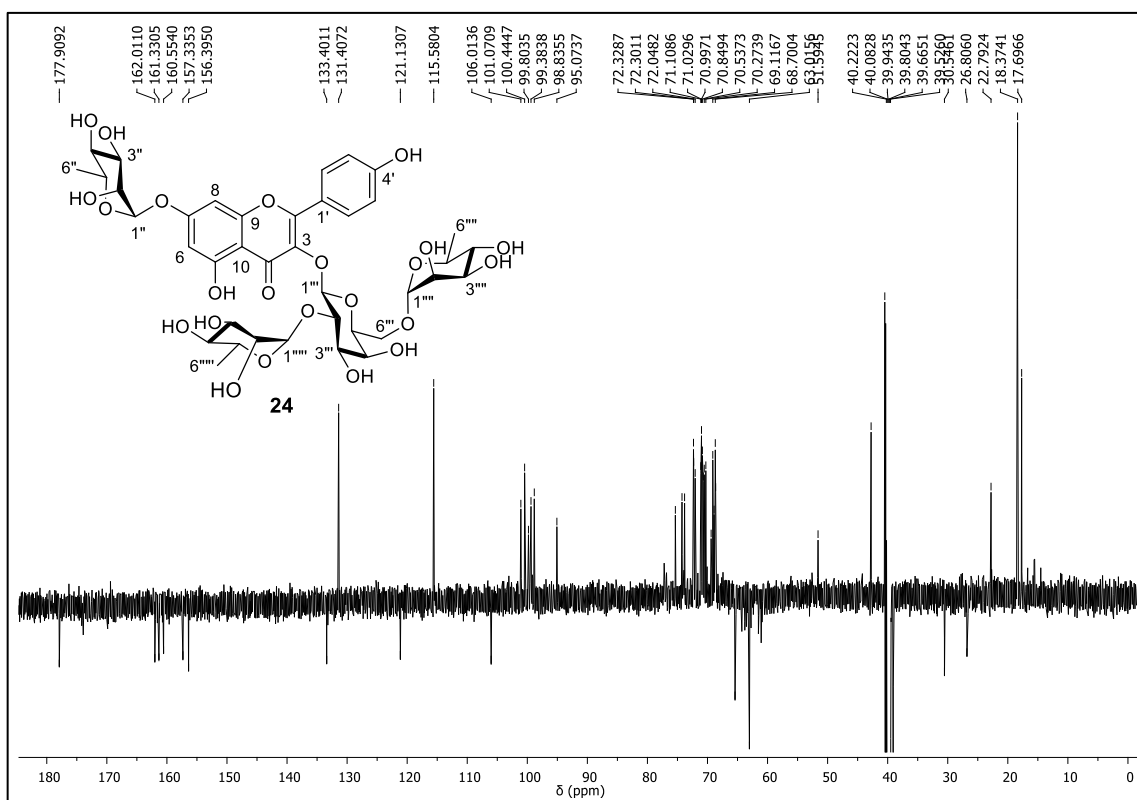


Figura 79 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de **24** (DMSO- d_6 , 150 MHz).

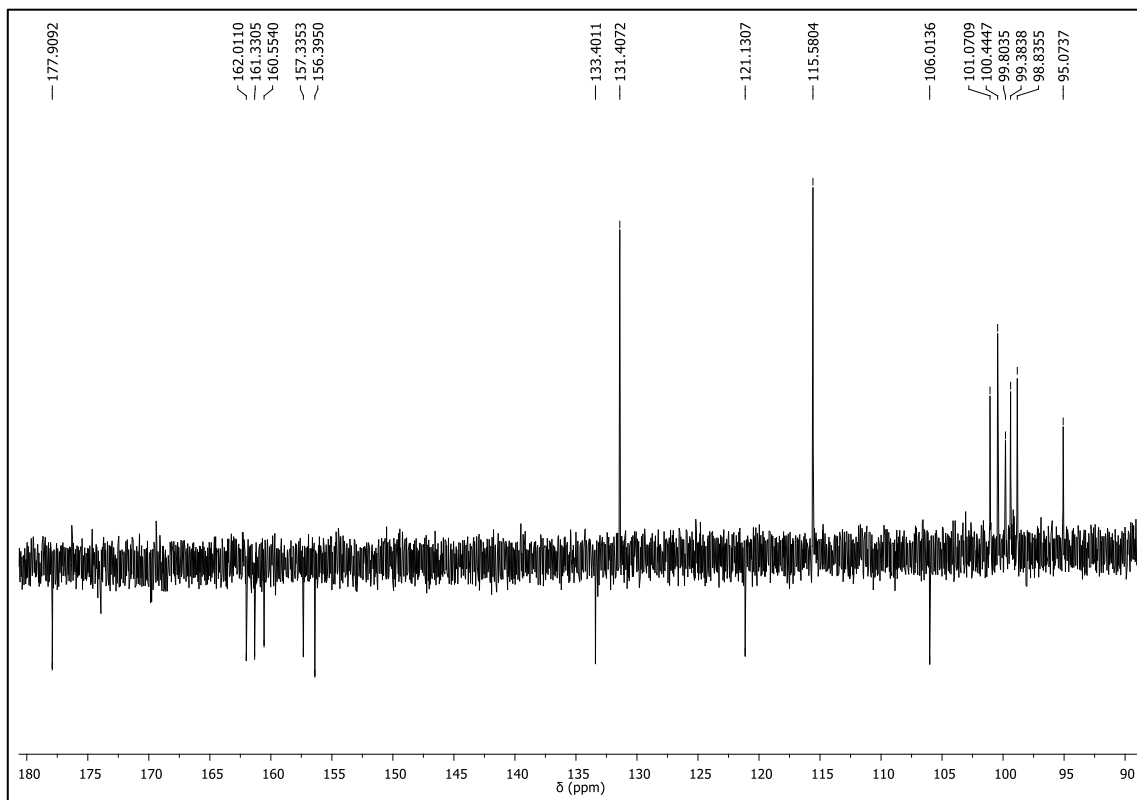


Figura 80 - Expansão da região de δ 90-180 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de 24 (DMSO- d_6 , 150 MHz).

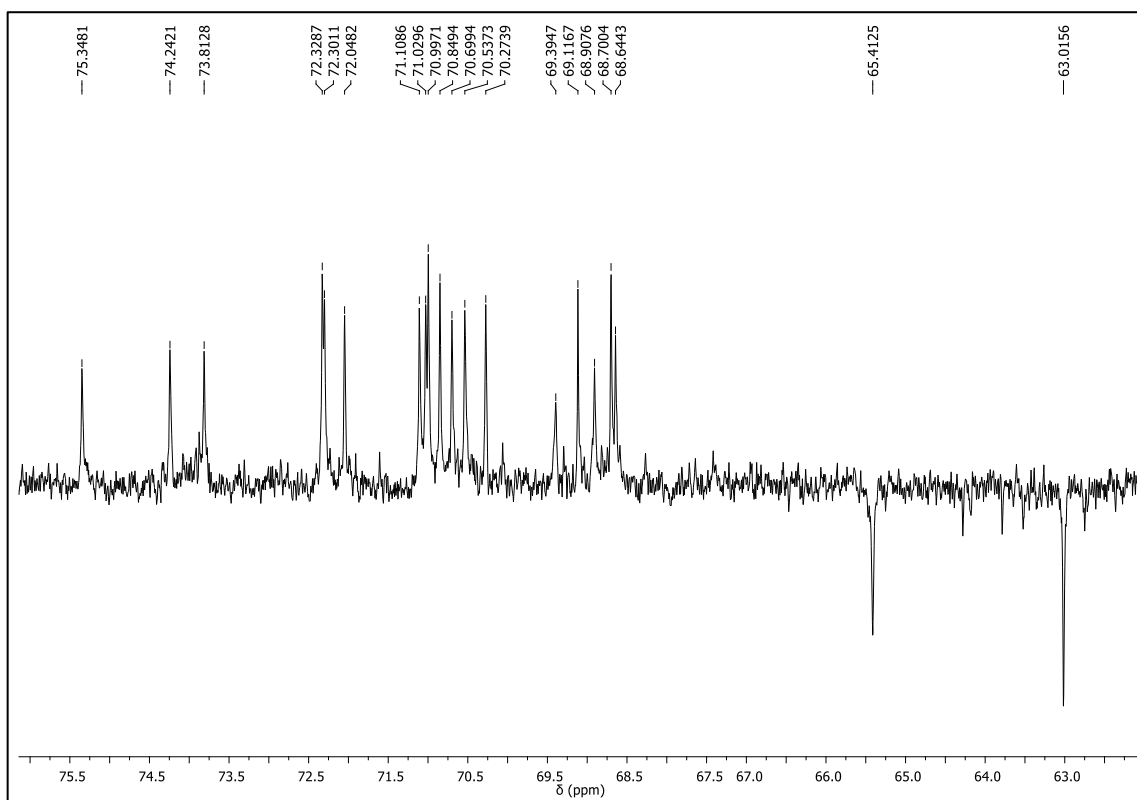


Figura 81 - Expansão da região de δ 63-75,5 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de 24 (DMSO- d_6 , 150 MHz).

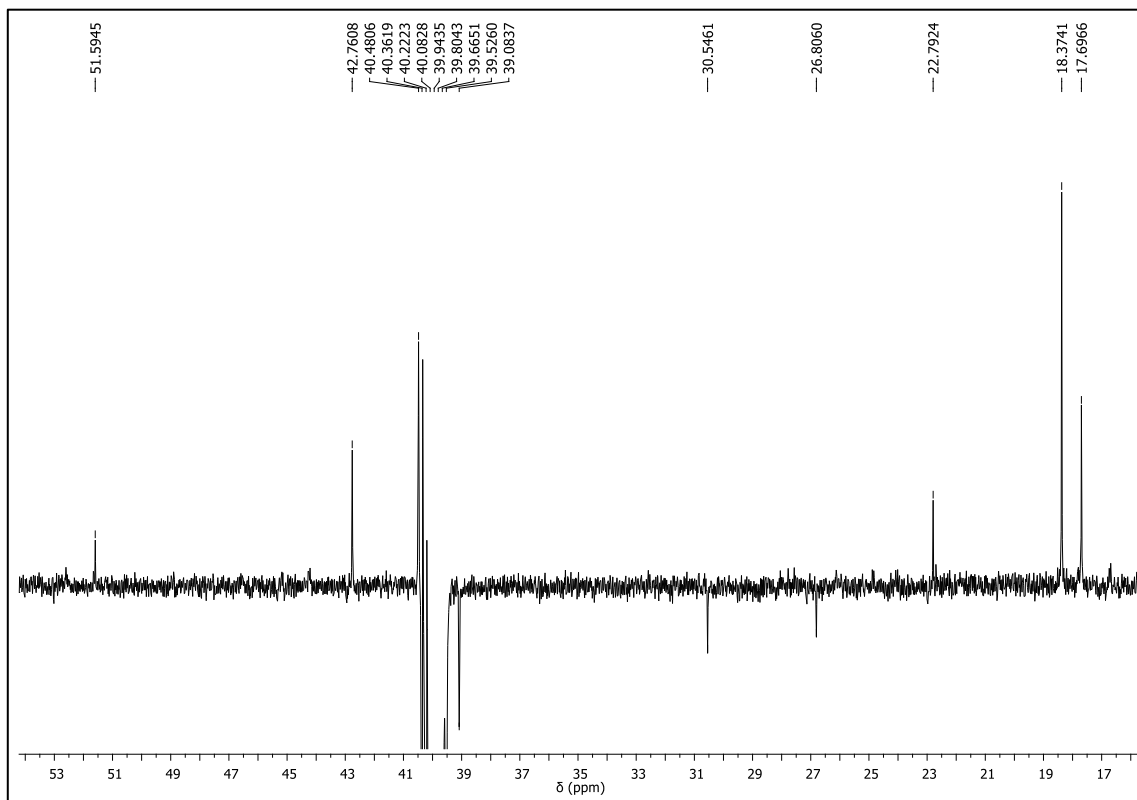


Figura 82 - Expansão da região de δ 18-52 do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ 135° de **24** (DMSO- d_6 , 150 MHz).

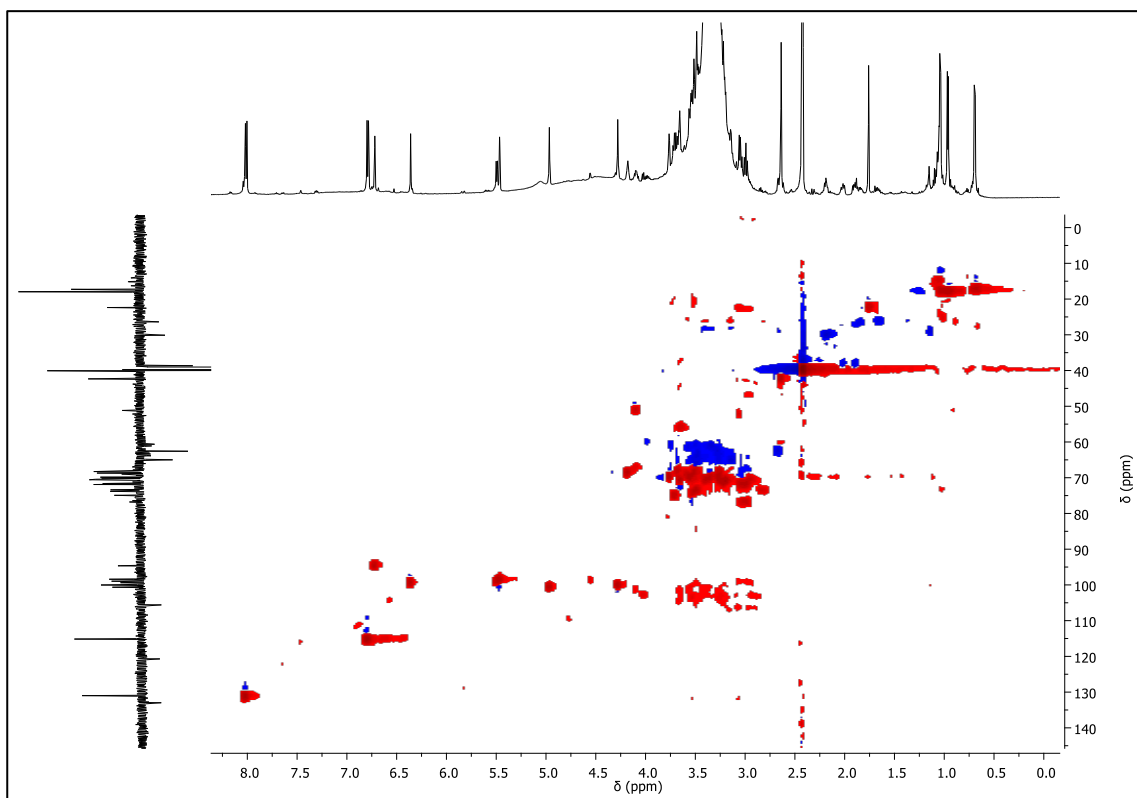


Figura 83 - Mapa de contornos gHSQC de **24** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

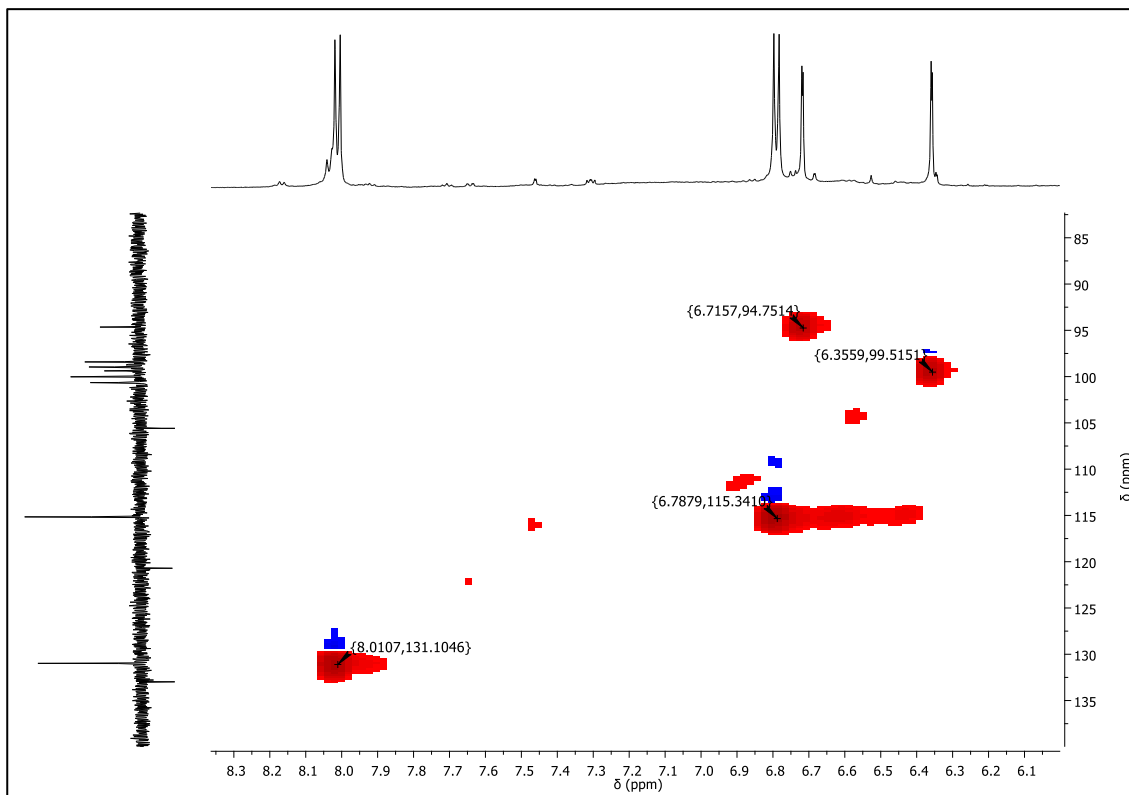


Figura 84 - Expansão da região de δ 6,1-8,3 do mapa de contornos gHSQC de **24** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

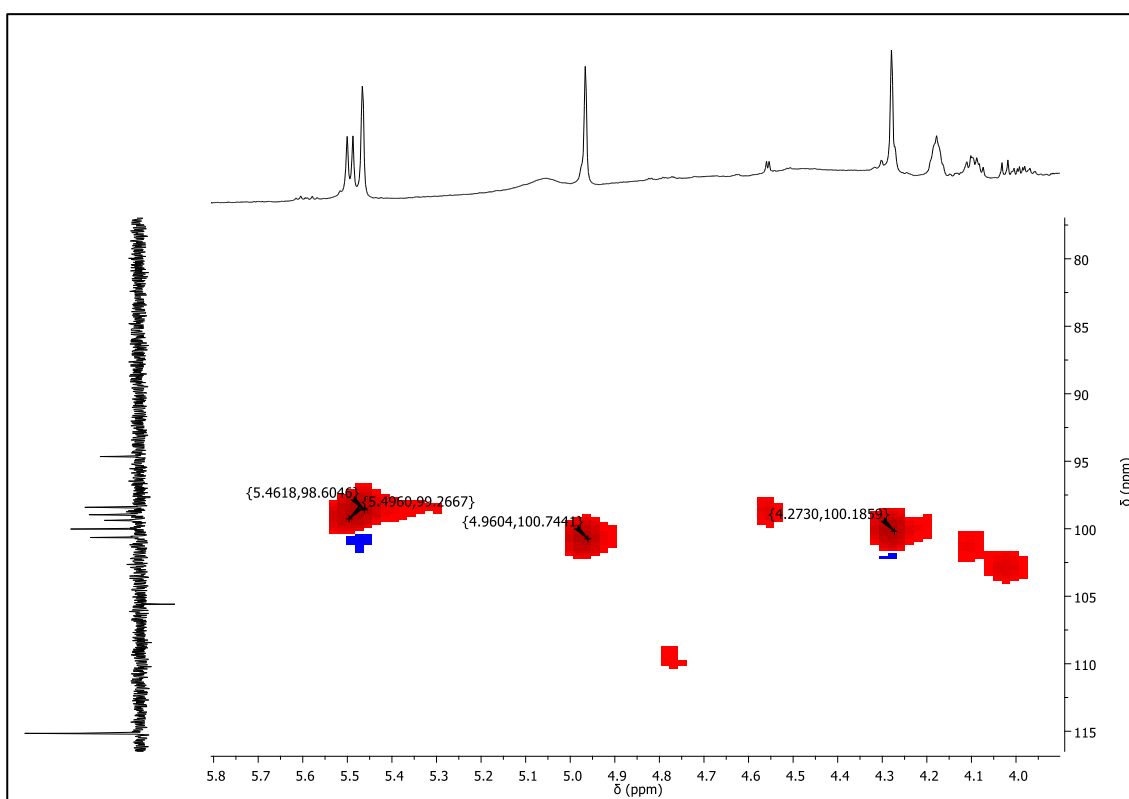


Figura 85 - Expansão da região de δ 4,0-5,8 do mapa de contornos gHSQC de **24** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

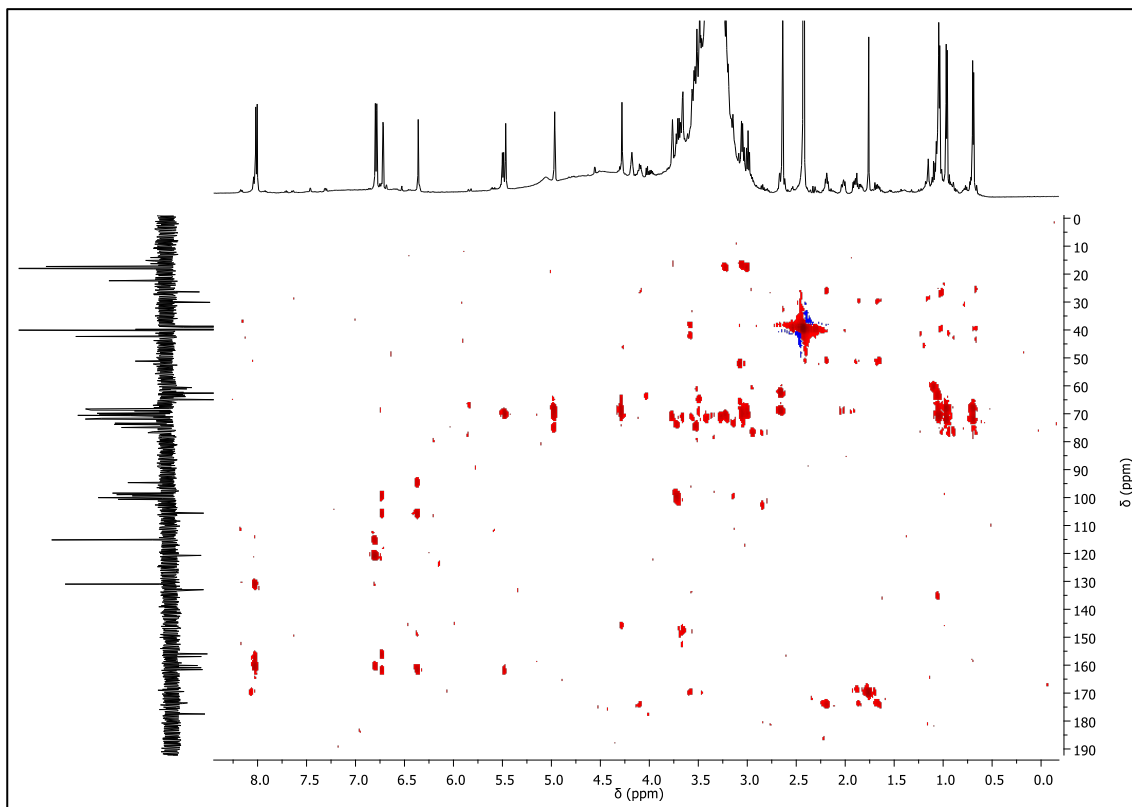


Figura 86 - Mapa de contornos gHMBC de **24** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

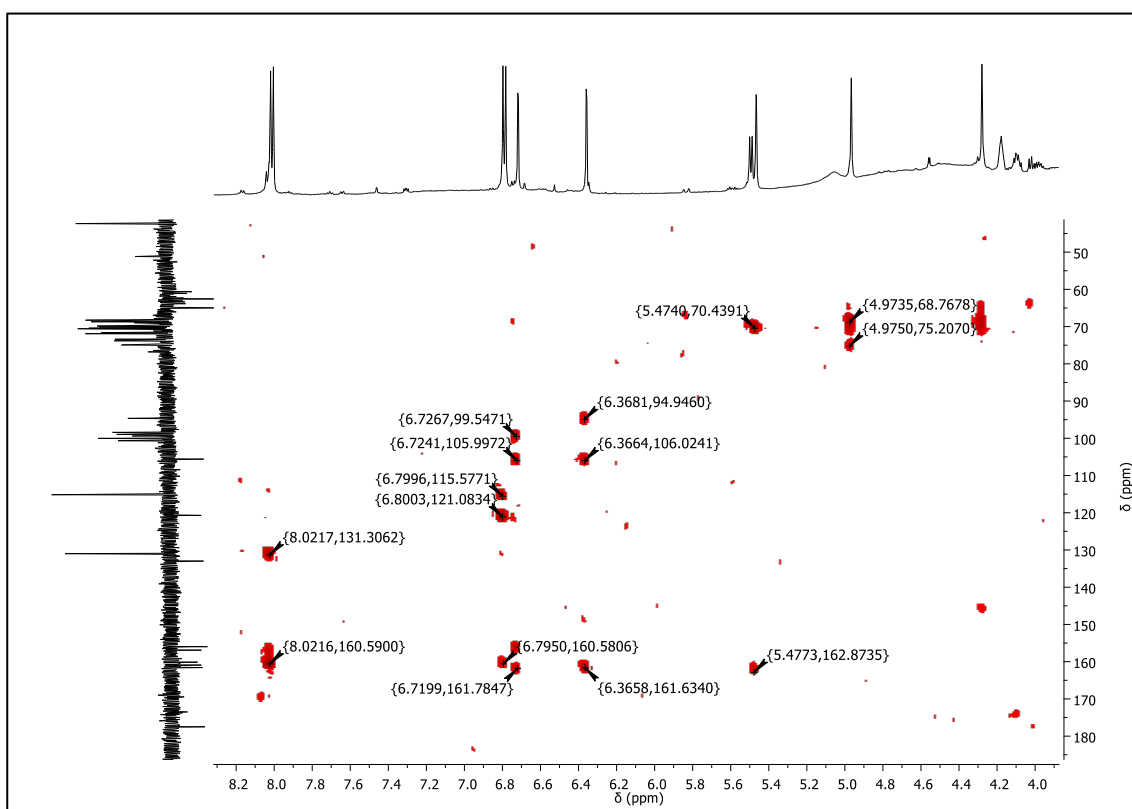


Figura 87 - Expansão da região de δ 4,0-8,2 do mapa de contornos gHMBC de **24** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz).

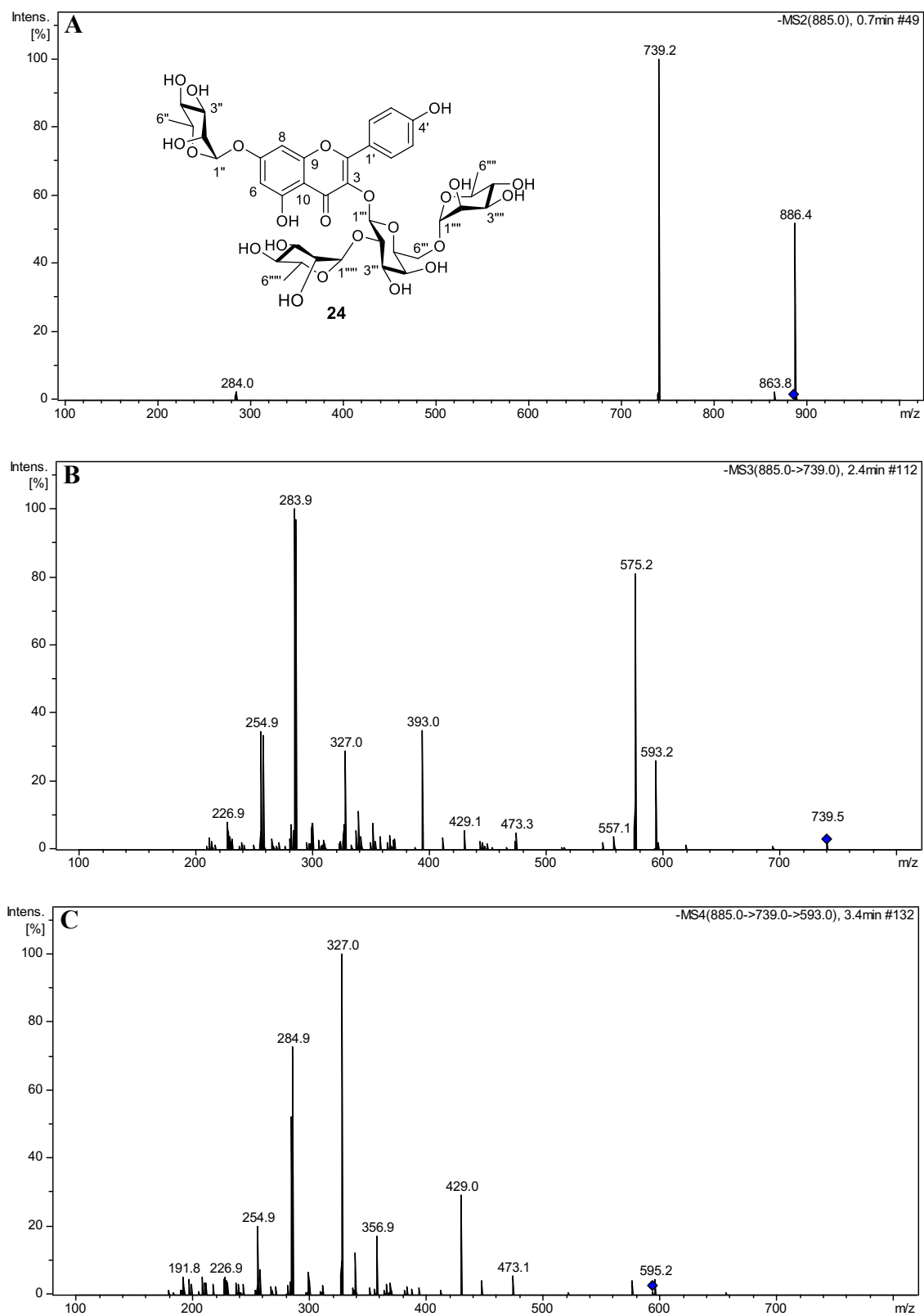
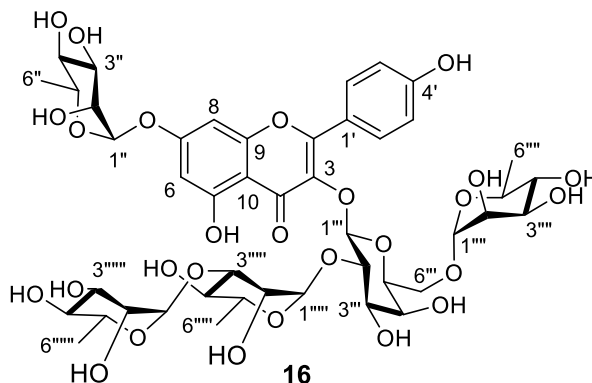


Figura 88 - Espectro de massas do composto **24**: MS²[885] (A), MS³ [739] (B) and MS⁴ [593] (C).

3.3.2.4 Identificação estrutural do composto 16



O composto **16**, correspondente a subfração SF-4-1 (37 mg), foi isolado como um sólido amarelo, solúvel em metanol (Esquemas 1, 3 e 4). A estrutura deste composto foi identificada pela análise dos espectros UV-Vis, HRMS, DI-ESI-MS/MS, RMN ^1H (Figuras 89-95).

A análise do composto **16** por HPLC-DAD originou uma banda cromatográfica com tempo de retenção de 2,92 min e espectro UV-Vis (Figura 89) com absorções em 268 e 350 nm indicativo de composto da classe dos flavonóis. Não foi observado um ombro em aproximadamente 300 nm, entre as bandas I e II, sugerindo *O*-glicosilação em C-3 e C-7 (STEVENSON; NYIENDA; VEITCH, 2010; VEITCH; KITE; LEWIS, 2008).

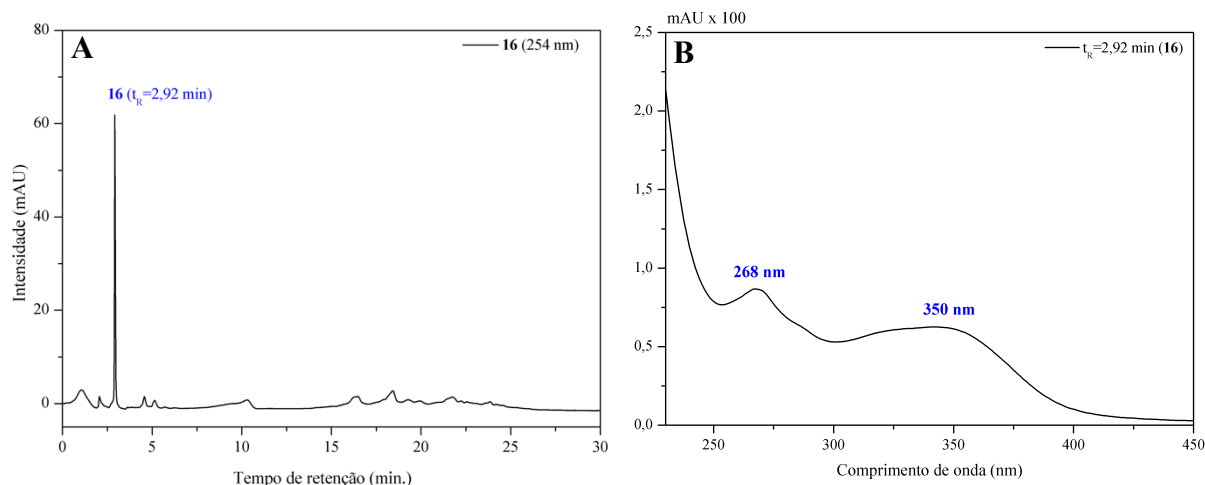


Figura 89 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD (A) e espectro UV-Vis (B) do composto **16**. Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 14-19 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-35 min, 100%, vazão 1,0 mL min⁻¹, coluna C18, $\lambda = 348$ nm.

O espectro de RMN ^1H do composto **16** apresentou perfil característico de substância da classe dos flavonoides glicosilados (Figuras 92-94), evidenciado pelos sinais entre δ 6,0-8,6 e entre δ 3,2-4,0 correspondentes a hidrogênios em anel aromático e de açúcares, respectivamente. Os dupletos em δ 0,89 ($J=6,5$ Hz), 0,96 ($J=6,0$ Hz), 1,16 ($J=6,1$ Hz) e 1,25 ($J=6,2$ Hz) sugeriram a presença de quatro ramnose. Foram observados três simpletos largos em δ 5,21, 4,56, 4,47 característicos de hidrogênios de carbonos anoméricos em açúcar com configuração α , entretanto, devido a sobreposição de sinais não foi observado o sinal de hidrogênio do carbono anomérico da quarta unidade α -L-ramnose. O duplete em δ 5,6 ($J=7,6$ Hz) indica a presença da β -D-galactose.

Na região de hidrogênios de anel aromático, o espectro apresentou dois simpletos largos em δ 6,46 e 6,73 correspondentes aos hidrogênios posicionados *meta* e atribuídos a H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. A presença de dois dupletos em δ 6,9 ($J=8,8$ Hz, H-3'/H-5') e 8,09 ($J=8,9$ Hz, H-2'/H-6') definiu o padrão 1,4-dissubstituído para o anel B.

O espectro de massa de alta resolução do composto **16**, mostrou o pico da molécula desprotonada $[\text{M-H}]^-$ em m/z 1032,3322 Da, permitindo definir a fórmula molecular $\text{C}_{45}\text{H}_{60}\text{O}_{27}$ (calculado 1032,3042, erro: 27,1189 ppm), correspondente a um grau de insaturação de 16 (Figura 90).

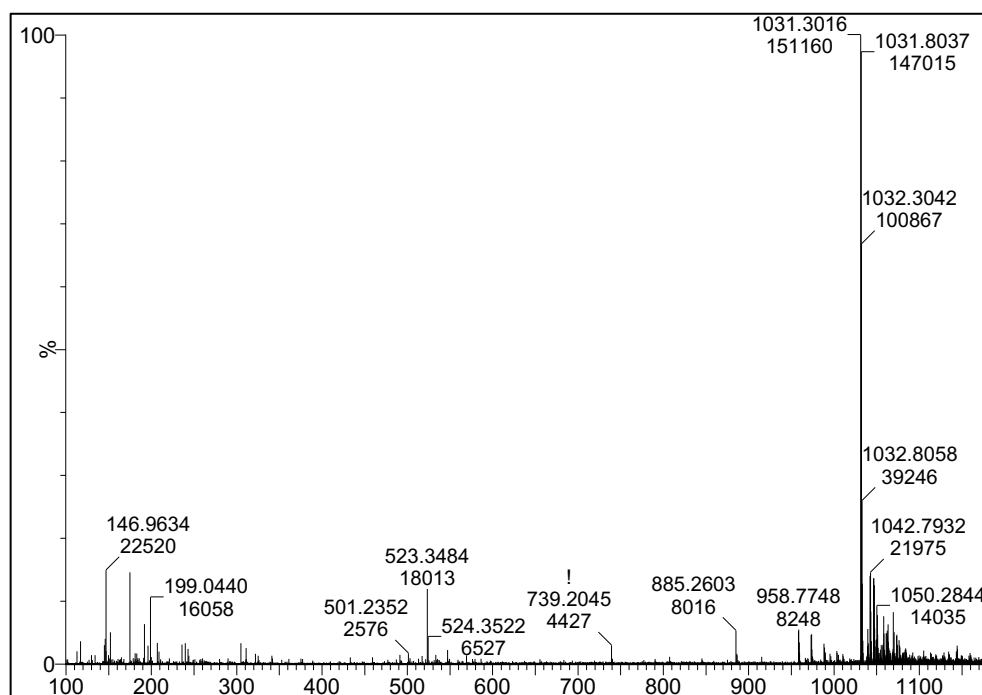


Figura 90 - Espectro de massas de alta resolução do composto **16**.

O composto **16** foi também analisado por DI-ESI-MS/MS e o espectro apresentou pico para molécula desprotonada $[M-H]^-$ com m/z 1031, íons fragmentos m/z 885 ($[M-H-146]^-$) e 739 ($[M-H-292]^-$) que são característicos da perda de uma e duas unidades de ramnose, respectivamente (Figura 94A). O MS^2 do m/z 739 gerou o íon fragmento m/z 593 que é indicativo da perda de mais uma unidade de ramnose (146 Da), enquanto o MS^3 do m/z 739 apresentou o íon fragmento m/z 285, correspondente à aglicona, após a perda adicional de um grupo galactosil-(1→2)-ramnosídeo (308 Da), conforme Figura 94B e 94C (JANG et al., 2018; MANGURO; UGI; LEMMEN, 2005).

O MS^2 do íon m/z 885 $[M-H-146]^-$ apresentou um único fragmento com m/z 739 ($[M-H-292]^-$) indicando também a perda de uma unidade de ramnose, corroborando com a fragmentação da molécula desprotonada (m/z 1031). O MS^3 do m/z 885 $[M-H-146]^-$ mostrou além do m/z 593 e 285, o íon fragmento m/z 575 resultante da perda de uma molécula de água a partir de m/z 593 (Figura 94D). As fragmentações observadas são consistentes com as relatadas por Veitch; Kite; Lewis (2008), que utilizou ionização no modo positivo, e verificou pico com m/z 1033 $[M+H]^+$ referente a molécula desprotonada e MS^2 com íons fragmentos m/z 887, 741, 595, 433 e 287.

O padrão de fragmentação do m/z 285, observado no MS^4 do m/z 739 (Figura 94E), confirmou o canferol como aglicona, pela presença dos íons fragmentos m/z 257, 255, 239, 229, 211 e 187 conforme proposta de fragmentação apresentada na Figura 91 (MARCH; MIAO, 2004).

A análise do espectro de RMN 1H , associado ao padrão de fragmentação observado no espectro de massas e comparação com os dados relatados na literatura (STEVENSON; NYIENDA; VEITCH, 2010; VEITCH; KITE; LEWIS, 2008), sugeriu o flavonoide canferol-3-*O*- α -L-ramnosil-(1→3)- α -L-ramnosil-(1→2)[α -L-ramnosil-(1→6)]- β -D-galactosil-7-*O*- α -L-ramnosídeo (cordilasina B, **16**). O composto **16** foi relatado anteriormente nas folhas de *Cordyla haraka*, *Cordyla pinnata* e *Cordyla richardii* (Fabaceae) e nas vagens de *Bobgunnia madagascariensis* (Fabaceae) (STEVENSON; NYIENDA; VEITCH, 2010; VEITCH; KITE; LEWIS, 2008). Este é o primeiro relato da cordilasina B (**16**) no gênero *Machaerium*.

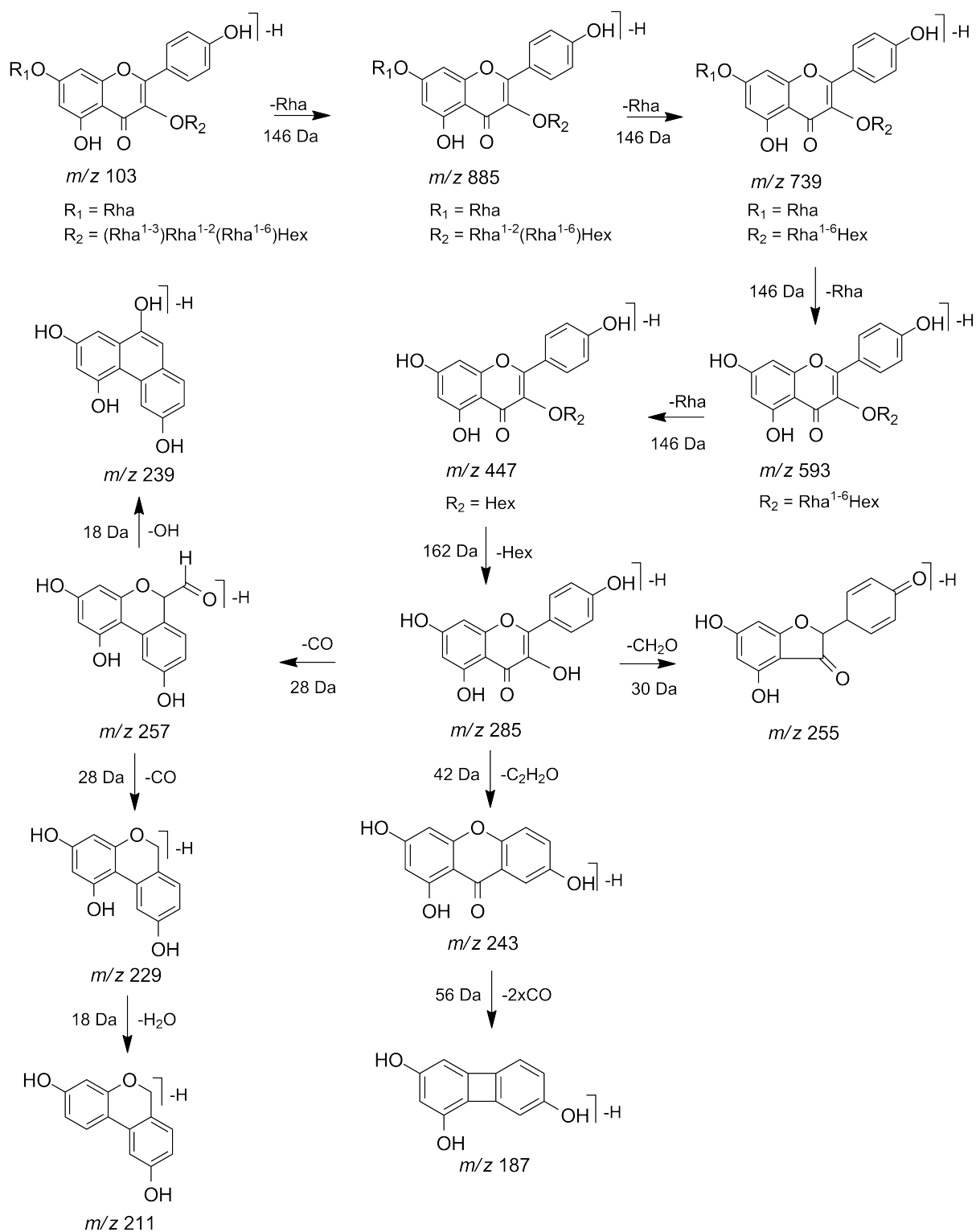


Figura 91 - Proposta de fragmentação do composto **16**. Adaptada de Veitch; Kite; Lewis (2008) e March; Miao (2004).

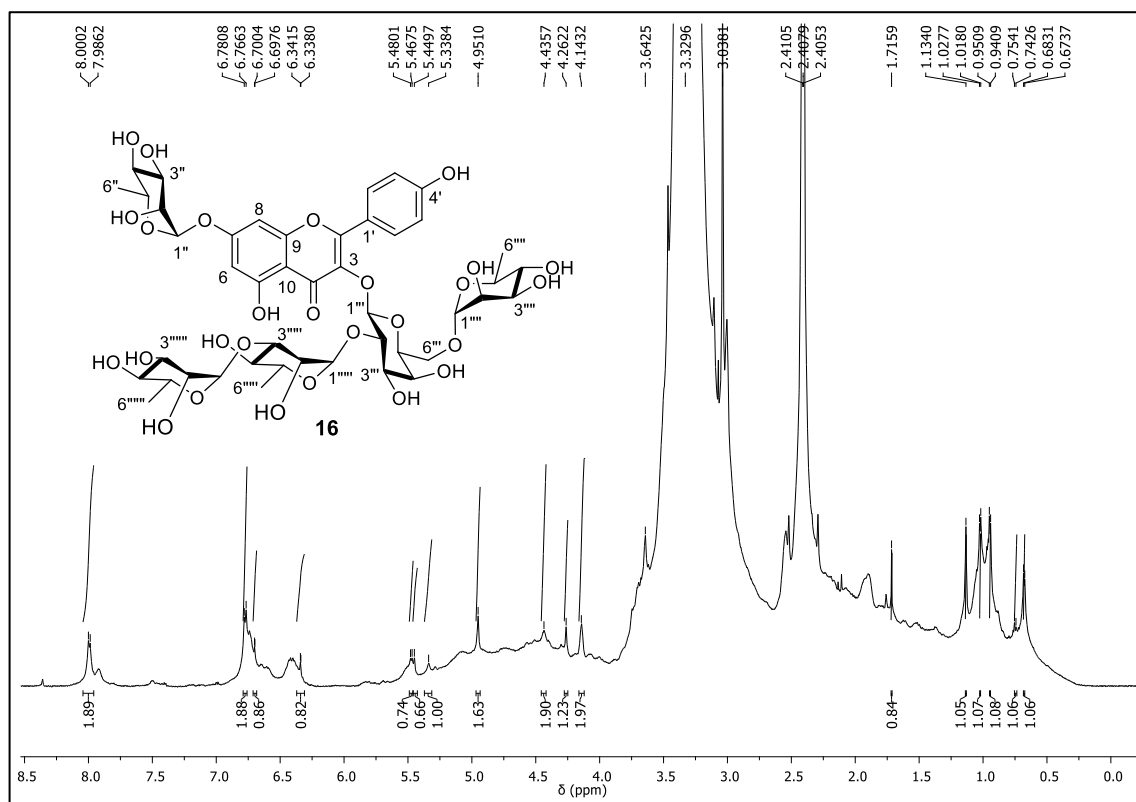


Figura 92 - Espectro de RMN ^1H de **16** (CD_3OD , 600 MHz).

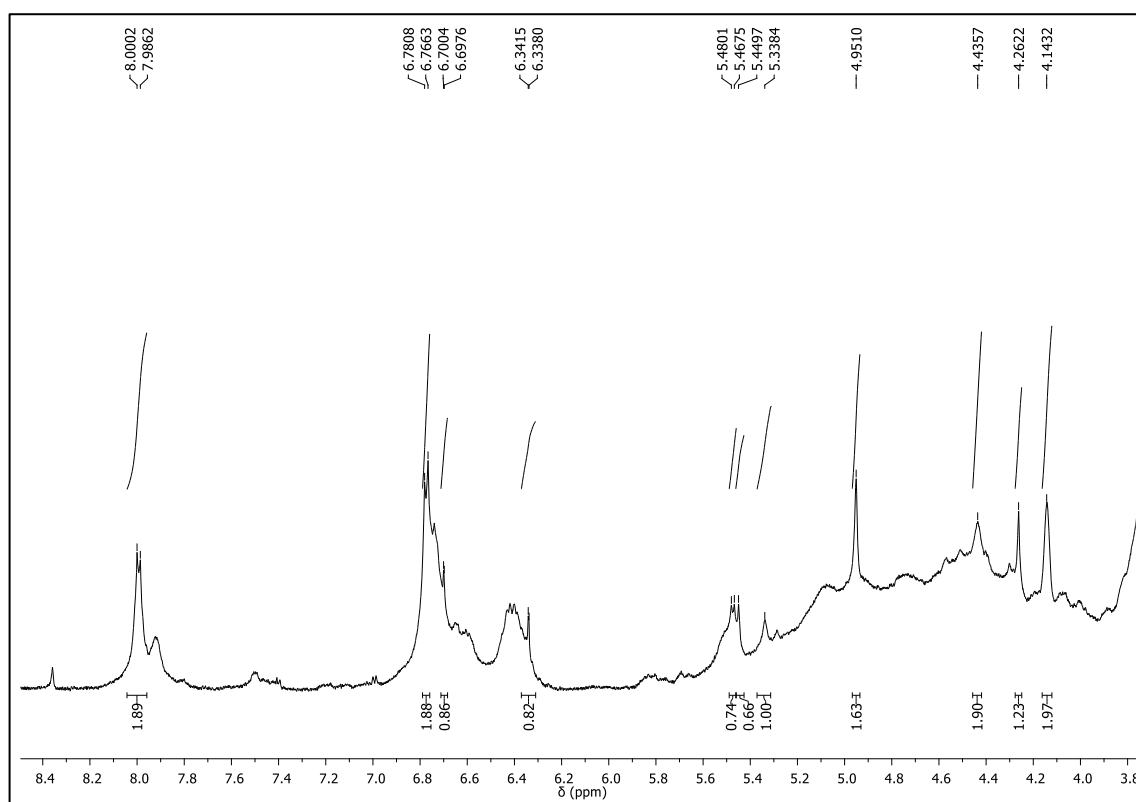


Figura 93 - Expansão da região de δ 3,8-8,4 do espectro de RMN ^1H de **16** (CD_3OD , 600 MHz).

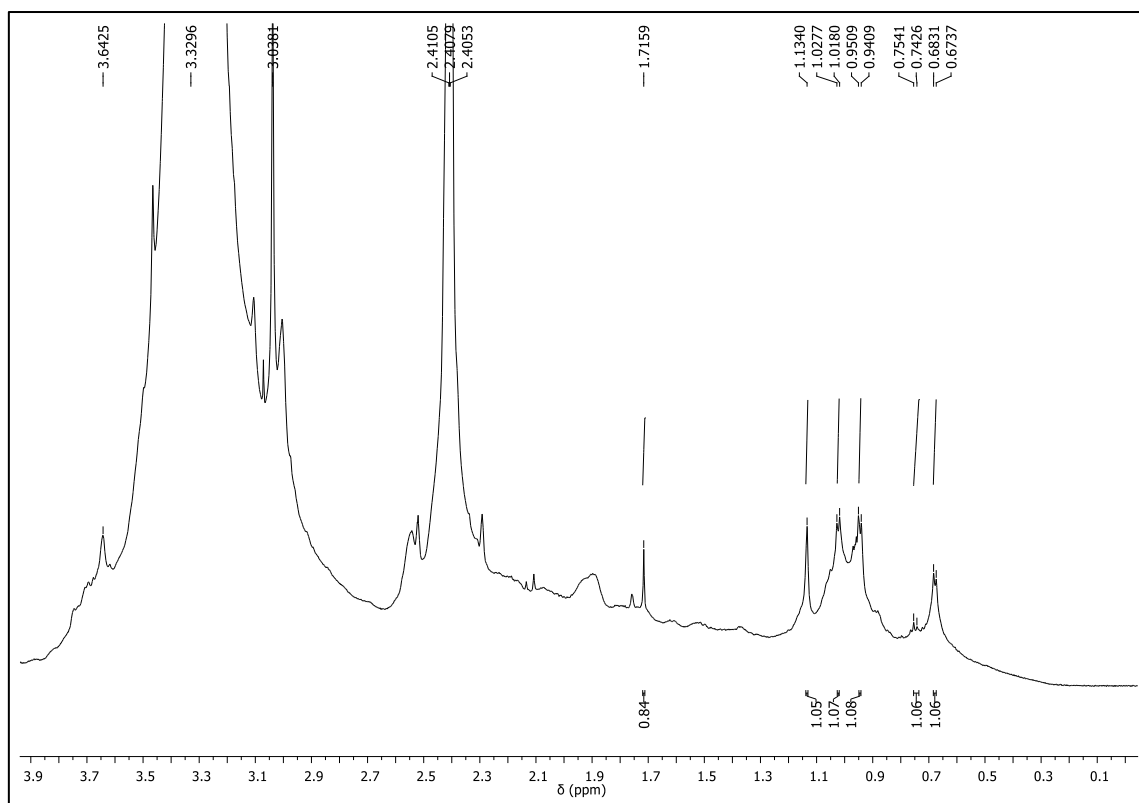


Figura 94 - Expansão da região de δ 0,1-3,9 de espectro de RMN ^1H de **16** (CD_3OD , 600 MHz).

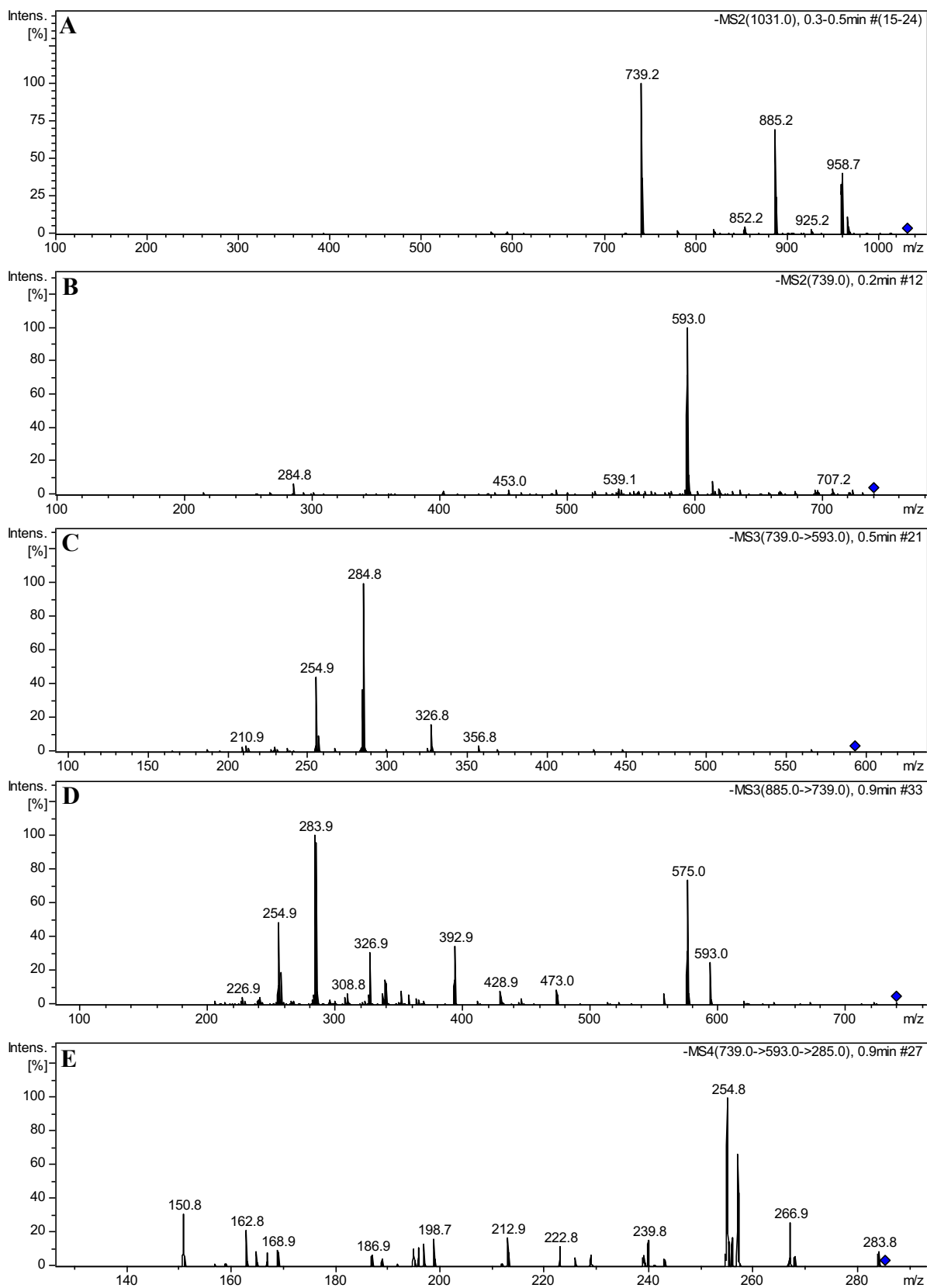


Figura 95 - Espectro de massas do composto **16** (A); MS² [M-H-292]⁻ (B); MS³ [M-H-292]⁻ (C); MS³ [M-H-146]⁻ (D); MS⁴ [M-H-292]⁻ (E).

CONCLUSÃO

O estudo químico das frações hexânicas, acetato de etila e aquosa, oriundas da partição do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium*, por CCD, HPLC-DAD, RMN ¹H e ¹³C (1D e 2D), GC-MS e DI-ESI-MS/MS, no modo negativo, permitiu identificar 27 compostos.

O fracionamento cromatográfico da fração hexânica resultou no isolamento e/ou identificação de α -tocoferol (**1**), colesterol (**2**), campesterol (**3**), sitosterol (**4**), estigmasterol (**5**) e triterpenoides lupeol (**6**), isômeros *E/Z* do 3-*O-p*-cumaroil- β -amirina (**7** e **8**), 3-*O-p*-cumaroilgermanicol (**9** e **10**) e 3-*O-p*-cumaroillupeol (**11** e **12**). Este é o primeiro relato dos compostos **1-3** e **7-12** no gênero *Machaerium*.

A fração acetato de etila, após extração em fase sólida (SPE) e seguida de análise por DI-ESI-MS/MS, permitiu a identificação de nove flavonoides: quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**13**), quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**14**), quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosídeo (**15**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 3)-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**16**), canferol-3-ramnosil-7-[6-feruloil-hexosil-(1 \rightarrow 3)-ramnosídeo] (**17**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**18**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**19**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosídeo (**20**) e canferol-3-*O*-hexosídeo (**21**). Este é o primeiro relato dos compostos **13-21** no gênero *Machaerium*.

A fração aquosa, após SPE e seguida de análise por DI-ESI-MS/MS, permitiu a identificação dos flavonoides **13-16** e **18-21**, isoflavonoides genisteína (**25**) e daidzeína-8-*C*-hexosídeo (**26**) e biflavonoide morelloflavona (**27**). Adicionalmente, foram isolados e identificados da FAFMa os flavonoides: canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 3)-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-galactosil-7-*O*-ramnosídeo (**16**), 3',4'-dimetoxi-3-*O*- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosídeo-7-*O*- α -L-ramnopiranosilflavonol (**22**), robinina (**23**) e astrasikokiosídeo I (**24**). Este é o primeiro relato do flavonoide **22** sendo considerado inédito.

Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da composição química das folhas da espécie *M. acutifolium*.

REFERÊNCIAS

- ABLAJAN, K., ABLIZ, Z., SHANG, X-Y., HE, J-M., ZHANG, R-P., SHI, J-G. Structural characterization of flavonol 3,7-di-*O*-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 41, n. 3, p. 352-360, 2006.
- AMEN, Y. M.; MARZOUK, A. M.; ZAGHLOUL, M. G.; AFIFI, M. S. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. **Natural Product Research**, v. 29, n. 15, p. 1388-1405, 2015.
- ARAÚJO, D. S.; CHAVES, M. H. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 996-999, 2005.
- ASRES, K.; EDER, U.; BUCAR, F. Studies on the anti-inflammatory activity of extracts and compounds from the leaves of *Melilotus elegans*. **Ethiopian Pharmaceutical Journal**, v. 18, p. 15–23, 2000.
- ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAGEORGIOU, V. P. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. **Chia**. **Biomedical Chromatography**, v. 19, p 285–311, 2005.
- AWAN, Z. I.; YASIN, H. K. A.; MINHAS, F. A. A new lupan type triterpene butilinol from *Viburnum grandiflorum*. **IOSR-JAC**, v. 5, n. 4, p. 58-66, 2013.
- BAMAWA, C. M., NDJELE, L. M., FOMA, F. M. Characterization of Leaf Phenolic Compounds of *Sabicea johnstonii* by HPLC-MSⁿ. **Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 2, p. 86-89, 2016.
- BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Six flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 1487-1490, 1988.
- BRESCIANI, L., CALANI, L., COSSU, M., MENA, P., SAYEGH, M., RAY, S., DEL RIO, D. (Poly)phenolic characterization of three food supplements containing 36 different fruits, vegetables and berries. **Pharma Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 11–19, 2015.
- BROCHADO, C. D. O.; ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P.; COSTA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; PEREIRA, R. L. C.; KOATZ, V. L. G.; COSTA, S. S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation in vitro. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 449-451, 2003.
- BURNS, D. C.; ELLIS, D. A.; MARCH, R. E. A predictive tool for assessing ¹³C NMR chemical shifts of flavonoids. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, p. 835-845, 2007.
- CARRILLO-HORMAZA, L., RAMÍREZ, A. M., QUINTERO-ORTIZ, C., COSSIO, M., MEDINA, S., FERRERES, F., GIL-IZQUIERDO, A., OSORIO, E. Comprehensive characterization and antioxidante activities of the main biflavonoids of *Garcinia madruno*: A novel tropical species for developing functional products. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 503–516, 2016.
- Carvalho, A. A.

CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; FREITAS, J. S.; CHAVES, M. H. Isoflavonoides da tribo Dalbergiaceae: uma contribuição quimiossistêmica para a subfamília Papilionoideae. **Química Nova**, v. 43, n. 9, p. 1294-1311, 2020.

CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H. Tocoferóis e isoprenoides do extrato hexânico das folhas de *Bauhinia pulchella*. In: Freitas, J. C. R.; Ladjane Pereira da Silva Rufino de Freitas, L. P. S. R. (orgs.). **Atividades de ensino e de pesquisa em química**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 252-264.

CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; SOUSA, R. P.; FREITAS, J. S.; ARAÚJO, B. Q.; CHAVES, M. H. Identificação de flavonoides das folhas de *Machaerium acutifolium* (Papilionoideae - Fabaceae) por Espectrometria de Massas. In: Freitas, R. M. (org.). **Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 2**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019b. p. 118-129.

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina “Química orgânica”. **Química Nova**, v. 20, n.5, p. 560-562, 1997.

CRUPI, P., GENCHI, R., ANTONACCI, D. In-time and in-space tandem mass spectrometry to determine the metabolic profiling of flavonoids in a typical sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar from Southern Italy. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 10, p. 1025-1034, 2014.

DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; GUEDES, M. L. S. Triterpenos e ferulatos de alquila de *Maprounea guianensis*. **Química Nova**, v. 27, n.1, p. 62-65, 2004.

DE-EKNAMKUL, W.; POTDUANG, B. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**, v. 62, p. 389, 2003.

DIEKMAN, J.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXXV. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl ethers. **Journal Organic Chemistry**, v. 32, n. 4, p.1005-1012, 1967.

DING, S.; DUDLEY, E.; PLUMMER, S.; TANG, J.; NEWTON, R. P.; BRENTON, A. G. Fingerprint profile of *Ginkgo biloba* nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS. **Phytochemistry**, v. 69, n. 7, p. 1555-1564, 2008.

ENGELS, C.; GRÄTER, D.; ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M.; GÄNZLE, M. G.; SCHIEBER, A. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 557-562, 2012.

EYTON, W.; OLLIS, W.; FINEBERG, M.; GOTTLIEB, O.; GUIMARAES, I.; MAGALHAES, M. Neoflavanoid group of natural products. II. Examination of *Machaerium scleroxylon* and some biogenetic proposals regarding the neoflavanoids. **Tetrahedron**, v. 21, p. 2697-2705, 1965.

FERREIRA, J. J. S.; OLIVEIRA, A. C. S.; QUEIROZ, R. T.; SILVA, J. S. A tribo Dalbergieae s.l. (Leguminosae-Papilionoideae) no município de Caetité, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, 70, e03502017, 2019.

FERREIRA, E. L. F.; MASCARENHAS, T. S.; OLIVEIRA, J. P. C.; CHAVES, M. H.; ARAUJO, B. Q.; CAVALHEIRO, A. B. Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythis pisonis* Camb. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 8, p. 353-360, 2014.

FORMIGA, M.; GOTTLIEB, O.; MENDES, P.; KOKETSU, M.; ALMIEDA, M.; PEREIRA, M. S.; MAGALHAES, M. Constituents of brazilian leguminosae. **Phytochemistry**, v. 14, p. 828-829, 1975.

IGNOATO, M.; FABRÃO, R.; SCHUQUEL, I.; BOTELHO, M.; BANNWART, G.; POMINI, A.; ARRUDA, L.; BERSANI-AMADO, C.; SANTIN, S. Chemical constituents of *Machaerium hirtum* Vell. (Fabaceae) leaves and branches and its anti-inflammatory activity evaluation. **Natural Product Research**, v. 27, p. 1556-1561, 2013.

JANG, G. H.; KIM, H. W.; LEE, M. K.; JEONG, S. Y.; BAK, A. R.; LEE, D. J.; KIM, J. B. Characterization and quantification of flavonoid glycosides in the *Prunus* genus by UPLC-DADQTOF/MS. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 1622-1631, 2018.

KITE, G. C.; STONEHAM, C. A.; VEITCH, N. C. Flavonol tetraglycosides and other constituents from leaves of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and related taxa. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1407-1416, 2007.

KUROSAWA, K.; OLLIS, W.; SUTHERLAND, I.; GOTTLIEB, O.; DE OLIVEIRA, A. Mucronulatol, mucroquinone and mucronucarpan, isoflavonoids from *Machaerium mucronulatum* and *M. villosum*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1405-1411, 1978.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Springer-Verlag: New York, 1970.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some saliente features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MANGURO, L. O. A.; UGI, I.; LEMMEN, P. Flavonol Glycosides from the Leaves of *Embelia keniensis*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 52, p. 201-208, 2005.

MARCH, R. E., MIAO, X-S., METCALFE, C. D., STOBIECKI, M., MARCZAK, L. A fragmentation study of an isoflavone glycoside, genistein-7-*O*-glucoside, using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 232, n. 2, p. 171-183, 2004.

MARKHAM, K. R.; TERNAL, B. ¹³C NMR of flavonoids II: flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. **Tetrahedron**, v. 32, p. 2607-2612, 1976.

MARKHAM, K. R.; CHARI, V. M. ¹³C NMR spectroscopy of flavonoids. In: Harborne, J. B., Mabry, T. J. (Eds.), *The Flavonoids: Advances in Research*. Chapman and Hall, London, pp. 19-134, 1982.

MATSUO, M.; URANO, S. ^{13}C NMR spectra of tocopherols and 2,2-dimethylchromanol. **Tetrahedron**, v. 32, p. 229-231, 1976.

MELO, S. J.; SOUSA, J. P. B.; SÁ, M. G.; MORAIS, L. S.; MAGALHÃES, N. M. G.; GOUVEIA, F. N.; ALBERNAZ, L. C.; ESPINDOLA, L. S. *Machaerium acutifolium* compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 77, n. 33, p. 1444–1451, 2021.

MIZUNO, M.; KYOTANI, Y.; IINUMA, M.; TANAKA, T.; IWATSUKI, K. Kaempferol 3-rhamnoside-7-[6-feruloylglucosyl(1→3)rhamnoside] from *Asplenium prolongatum*. **Phytochemist**, v. 29, n. 8, p. 2742-2743, 1990.

MORCHID, E. M. E., LONDOÑO, P. T., Papagiannopoulos, M., Gobbo-Neto, L., Müller, C. Variation in flavonoid pattern in leaves and flowers of *Primula veris* of different origin and impact of UV-B. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 53, p. 81–88, 2014.

PERFEITO, J. P.; SANTOS, M. L.; LÓPEZ, K. S. E.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 183-186, 2005.

PRYTZYK, E.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; PEREIRA, A. S.; BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; AQUINO NETO, F. R. Flavonoids and trypanocidal activity of *Bulgarian propolis*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 88, p.189-193, 2003.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C . **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 278-281, 1990.

OLLIS, W.; REDMAN, B.; ROBERTS, R.; SUTHERLAND, I.; GOTTLIEB, O.; MAGALHÃES, M. Neoflavonoids and the cinnamylphenol kuhlmannistyrene from *Machaerium kuhlmannii* and *M. Nictitans*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1383-1388, 1978.

OLLIS, W. D.; BRIAN, T.; REDMAN, B. T.; SUTHERLANDT, I. O.; GOTTLIEB, O. R.; Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1379-1381, 1978.

POLIDO, C. A.; SARTORI, A. L. B. O gênero *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergiaceae) no pantanal brasileiro. **Rodriguésia**, v. 58, n. 2, p. 313-329, 2007.

POVH, J. A.; PINTO, D. D.; CORRÊA, M. O. G.; ONO, E. O. Atividade alelopática de *Machaerium acutifolium* Vog. na germinação de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 447-449, 2007.

ROSA, P. A. L.; ALVES, M. C.; VIDEIRA, L. M. L.; BONINI, C. B. S. Recuperação de um solo de cerrado após 19 anos: ocorrência espontânea de espécies arbóreas. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 1, n. 1, p. 44-57, 2014.

STEVENSON, P. C.; NYIRENDA, S. P.; VEITCH, N. C. Highly glycosylated flavonoids from the pods of *Bobgunnia madagascariensis*. **Tetrahedron Letters**, v. 51, p. 4727–4730, 2010.

SILVA, L. M. P.; ALVES, J. S. F.; SIQUEIRA, E. M. S.; SOUZA NETO, M. A.; ABREU, L. S.; TAVARES, J. F.; PORTO, D. L.; FERREIRA, L. S.; DEMARQUE, D. P.; LOPES, N. P.; ARAGÃO, C. F. S.; ZUCOLOTTI, S. M. Isolation and identification of the five novel flavonoids from *Genipa americana* leaves. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 1-13, 2018.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* AGRA & NEE E *S. paludosum* MORIC. **Quim. Nova**, v. 32, n. 5, 1119-1128, 2009.

TSIKLAURI, L. K.; AN, G.; ALANIA, M. D.; KEMERTELIDZE, E. P.; MORRIS, M. E. Optimum HPLC parameters for simultaneous determination of robinin and kaempferol. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 46, n. 1, p. 64-67, 2012.

TROALEN, L. G.; PHILLIPS, A. S.; PEGGIE, D. A.; BARRAN, P. E.; HULME, A. N. Historical textile dyeing with *Genista tinctoria* L.: a comprehensive study by UPLC-MS/MS analysis. **Analytical Methods**, v. 6, p. 8915-8923, 2004.

ULUBELEN, A.; TOPCU, G.; LOTTER, H.; WAGNER, H.; ERIS, C. Triterpenoids from the aerial parts of *Salvia montbretii*. **Phytochemistry**, v. 36, n.2, p. 413-415, 1994.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CARVALHO, A. A.; GONZAGA, W. A.; CHAVES, C. H. Cromatografando em coluna com resina de almécega: um projeto para química orgânica experimental. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 491-493, 2007.

VEITCH, N. C.; ELLIOTT, P. C.; KITE, G. C.; LEWIS, G. P. Flavonoid glycosides of the black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 71, p. 479-486, 2010.

VEITCH, N. C.; KITE, G. C.; LEWIS, G. P. Flavonol pentaglycosides of *Cordyla* (Leguminosae: Papilionoideae: Swartzieae): Distribution and taxonomic implications. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2329-2335, 2008.

WENKERT, E.; GOTTLIEB, H. E. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoid and isoflavonoid compounds. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1811-1816, 1977.

WYLLIE, S. G. Electron impact induced fragmentation of cholesterol and related C-5 unsaturated steroids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 725-732, 1977.

YAHARA, S.; KOHJYUMA, M.; KOHODA, H. Flavonoid glycosides and saponins from *Astragalus shikokianus*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 469-471, 2000.

YANG, Y.; DENG, Z.; PROKSCH, P.; LIN, W. Two new 18-en-oleane derivatives from marine mangrove plant, *Barringtonia racemosa*. **Pharmazie**, v. 61, n. 4, p. 365-366, 2006.

YE, M.; YAN, Y.; GUO, D. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 11, p. 1469-1484, 2005.

ZHAO, W., SHANG, Z., LI, Q., HUANG, M., HE, W. WANG, Z., ZHANG, J. Rapid Screening and Identification of Daidzein Metabolites in Rats Based on UHPLC-LTQ-Orbitrap Mass Spectrometry Coupled with Data-Mining Technologies. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 1-24, 2018.

Capítulo 4

**Quantificação dos flavonoides robinina e astrasikokiosideo I em
*Machaerium acutifolium***

QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONOIDES ROBININA E ASTRASIKOKIOSIDEO I EM *Machaerium acutifolium*

RESUMO

Os flavonoides são conhecidos sobretudo pela sua ação antioxidante. A robinina e o astrasikokiosideo I são compostos da classe dos flavonoides que foram isolados nas folhas da espécie *Machaerium acutifolium* (Fabaceae-Papilionoideae). Estes flavonoides foram quantificados por HPLC-DAD no extrato etanólico e frações acetato de etila e aquosa das folhas *M. acutifolium*. A seletividade e linearidade do método estão dentro da faixa de concentração avaliada, apresentando coeficiente de correlação linear $R=0,9997$. Os maiores teores de robinina e o astrasikokiosideo I foram obtidos para a fração aquosa das folhas ($127,1\pm 7,9$ e $192,2\pm 15,7$), quando comparado ao extrato etanólico ($66,8\pm 2,0$ e $93,8\pm 3,7$) e a fração acetato de etila (nd e $3,4\pm 0,3$). Não foi observado diferença significativa entre os teores quando a quantificação dos flavonoides foi realizada nos comprimentos de onda 265 e 348 nm. Robinina e o astrasikokiosideo I não foram detectados no extrato etanólico dos galhos, mostrando que a composição química é diferente do extrato etanólico das folhas. Este é o primeiro relato da quantificação de robinina e o astrasikokiosideo I. A quantificação destes flavonoides serve de base para padronização do extrato e frações e para caracterização de marcadores químico.

Palavras-chaves: robinina, astrasikokiosideo I, *Machaerium acutifolium*, quantificação, flavonoides

ABSTRACT

Flavonoids are known mainly for their antioxidant action. Robinin and astrasikokioside I are compounds of the class of flavonoids that were isolated from leaves of the species *Machaerium acutifolium* (Fabaceae-Papilionoideae). These flavonoids were quantified by HPLC-DAD in the ethanol extract and ethyl acetate and aqueous fractions of *M. acutifolium* leaves. The selectivity and linearity of the method are within the evaluated concentration range, presenting a linear correlation coefficient $R=0.9997$. The highest levels of robinin and astrasikokioside I were obtained for the aqueous fraction of the leaves (127.1 ± 7.9 and 192.2 ± 15.7), when compared to the ethanol extract (66.8 ± 2.0 and 93.8 ± 3.7) and the ethyl acetate fraction (nd e 3.4 ± 0.3). No significant difference was observed between the levels when the quantification of flavonoids was performed at wavelengths 265 and 348 nm. Robinina and astrasikokioside I were not detected in the ethanolic extract of the branches, showing that the chemical composition is different from the ethanolic extract of the leaves. This is the first report on the quantification of robinin and astrasikokioside I. The quantification of these flavonoids serves as a basis for standardizing the extract and fractions and for obtaining chemical markers.

Keywords: robinin, astrasikokioside I, *Machaerium acutifolium*, quantification, flavonoids

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Machaerium* (Fabaceae-Papilionoideae) contém 262 espécies distribuídas do sul do México a América do Sul. Plantas deste gênero são utilizadas tradicionalmente contra a tosse, a seiva é usada para curar aftas da boca (AMEN et al., 2015). Apenas dezesseis espécies deste gênero apresentaram estudo químico, sendo relatado a presença de flavonoides, alcaloides, triterpenoides, esteroides, cinamoilfenóis, derivados de ácidos graxos, entre outros (AMEN et al., 2015; CARVALHO et al., 2020). Algumas atividades biológicas são relatadas, tais como estrogênica, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, mutagênica e alelopática (AMEN et al., 2015; BENTO et al., 2018; CARVALHO et al., 2020).

A espécie *Machaerium acutifolium* Vogel (sin. *M. muticum* Benth) é conhecida tradicionalmente por jacarandá do campo, jacarandá caroba e jacarandá bico de pato. No Brasil, ocorre da Amazônia até São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia, Piauí e Maranhão, principalmente em área de cerrado (POLIDO; SARTORI, 2007; ROSA et al., 2014).

O extrato benzênico do tronco *M. acutifolium* contém os polifenóis éter monometil de pinsilvina, (+)-medicarpina e petroestireno (OLLIS et al., 1978). No extrato acetato de etila do tronco foi relatado a presença de um derivado de 3-arilcumarina, *trans*-estilbeno, indeno e dois flavonoides: (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-dihidro-3-(2'-hidroxi-3', 4'-dimetoxifenil) e (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-di-hidro-3-(2'-hidroxi-3', 4'-dimetoxifenil)-8-metoxi (MELO et al., 2021). Este extrato e o indeno apresentaram toxicidade frente a larvas de *Aedes aegypti* (MELO et al., 2021).

A fração hexânica, oriunda da partição do extrato etanólico das folhas, contém α -tocoferol, colesterol, campesterol, sitosterol, estigmasterol e os triterpenóides lupeol, 3-*O*-(*E*)-*p*-cumaroil- β -amirina, 3-*O*-(*Z*)-*p*-cumaroil- β -amirina, 3-*O*-(*E*)-*p*-cumaroilgermanicol, 3-*O*-(*Z*)-*p*-cumaroilgermanicol, 3-*O*-(*E*)-*p*-cumaroillupeol e 3-*O*-(*Z*)-*p*-cumaroillupeol (CARVALHO et al., 2020; FREITAS et al., 2020). O estudo da fração aquosa, resultante da partição do extrato etanólico das folhas, por inserção direta em espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* (DI-ESI-MS/MS) resultou na identificação dos flavonoides canferol-3-*O*-rutinosil-7-*O*-diramnosídeo, quercetina-3-*O*-rutinosil-7-*O*-ramnosídeo, rutina, canferol-3-*O*-rutinosídeo e canferol-3-*O*-glicosídeo e dos isoflavonoides daidzeína-8-*C*-glicosídeo e genisteína (CARVALHO et al., 2019).

Considerando a presença de flavonoides poliglicosilados raros e a ausência de quantificação desta classe compostos no gênero *Machaerium*, um método cromatográfico foi

desenvolvido para quantificação dos flavonoides majoritários robinina e astrasikokiosideo I nos extratos e frações das folhas e galhos de *M. acutifolium*.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes e equipamentos

Nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizados solventes grau HPLC da J. T. Backer e água ultrapura (18 Ω) obtida em sistema Milli-Q Plus e em ultrapurificador Master All da Gehaka.

As amostras injetadas em HPLC-DAD foram submetidas a um pré-tratamento (*clean up*) em cartucho de extração em fase sólida (SPE) Strata™ C18-E (1000 mg/6 mL, 55 μ m, 70 Å) da Phenomenex. Todos os extratos e frações foram filtrados em membrana filtrante da Phenomenex (30 mm e poro 0,45 μ m). As análises por HPLC foram realizadas em cromatógrafos: i) analítico, Shimadzu® equipado com bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector de arranjo de fotodiodo SPD-M20A, forno para coluna CTO-20A, pré-coluna C18 Shim-pack 6-SIL, coluna C-18Shim-pack VP-ODS (250 x 4,6 mm, partícula de 5,0 μ m) e ii) semipreparativo, Shimadzu® *prominence system* equipado com sistema binário de bombas LC-6AD, injetor manual, detector UV SPD-20A, coluna Phenomenex Luna (C18, 250 x 20 mm, 15 μ m).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker Ascend, modelo 600 da UNESP de Araraquara-SP operando a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , equipado com criosonda. Foram utilizados como solventes CDCl_3 , CD_3OD , $\text{DMSO}-d_6$ (Cambridge Isotope Laboratories Inc) e TMS como referência interna.

2.2 Material Vegetal

As folhas e galhos de *M. acutifolium* foram coletados em março de 2017, no município de Jatobá do Piauí, nas coordenadas S 04° 51 006" e W 42° 05 057", a 90 m de altitude. A espécie foi identificada pela bióloga Dra. Ruth Raquel Soares de Farias e a exsicata foi depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí-UFPI, na cidade de Teresina com o número de registro TEPB 31568 e cadastro de acesso SisGen nº AAB530D.

2.3 Preparação e fracionamento dos extratos

As folhas e galhos foram secados à temperatura ambiente e moídos em moinho de facas, obtendo-se 1,4 kg e 2,0 kg, respectivamente. O material vegetal foi submetido à maceração exaustiva com etanol (95%). As soluções dos extratos foram concentradas em evaporador

rotativo à pressão reduzida e a água residual removida por liofilização, fornecendo o extrato etanólico das folhas (EEFMa, 74,4 g, 5,3%) e galhos (EEGMa, 41,7 g, 2,1%).

Uma alíquota de 64 g do EEFMa foi suspensa em 1,2 L de MeOH/H₂O (1:2, v/v) e submetida a partição, resultando nas frações hexânica (FHFMa, 33,5 g, 52,3%), acetato de etila (FAEFMa, 5 g, 7,8%) e aquosa (FAFMa, 25,5 g, 39,8%). O EEGMa (31 g) foi submetido à cromatografia em coluna filtrante de gel de sílica, fornecendo as frações hexânica (FHGMa, 0,5 g), clorofórmica (FCGMa, 3,7 g), acetato de etila (FAEGMa, 3,8 g), metanólica (FMGMa, 22 g) e metanol-água (FMAGMa, 1,0 g).

2.4 Extração em fase sólida da fração aquosa das folhas

Sete alíquotas de 500 mg da fração aquosa das folhas foram solubilizadas em H₂O/MeOH (8:2) com auxílio de banho ultrassônico e aplicadas em cartucho de extração em fase sólida (SPE, C18-E, 10 g/60 mL, 55 µm, 70 Å), inicialmente ambientado com H₂O/MeOH (8:2), e eluídas sucessivamente com 150 mL de cada um dos seguintes eluentes: MeOH/H₂O (8:2), MeOH (100%) e CHCl₃ (100%). Os eluatos correspondentes foram reunidos fornecendo as subfrações R1 (3140 mg, 89,7%), R2 (300,5 mg, 8,6%) e R3 (59,5 mg, 1,7%), respectivamente.

2.5 Obtenção dos flavonoides

A subfração R1 foi fracionada em HPLC-UV semipreparativo, com fase móvel MeOH/H₂O, gradiente: 0-104 min; 30-90% MeOH, volume de injeção 1 mL, vazão 4 mL min⁻¹ e λ=330 nm. A separação cromatográfica permitiu o isolamento dos flavonoides robinina (45,9 mg, 1,3%) e astrasikokiosídeo I (66,6 mg, 1,9%).

2.6 Identificação dos flavonoides

Os flavonoides robinina e astrasikokiosídeo I foram analisados por HPLC-DAD (Figura 2), inserção direta em espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* (DI-ESI-MS/MS) e RMN ¹H e ¹³C 1D e 2D.

Canferol-3-*O*-β-L-robinosil-7-*O*-α-L-ramnosídeo (robinina): sólido amorfo amarelo; HPLC-UV λ_{max}/nm: 264 and 347; t_R=15,44 min, 45,9 mg. HRMS (ESI) m/z, calcd. for C₃₃H₄₀O₁₉ [M-H]⁻: 740.6593, found: 740.2104. DI-ESI-MS/MS: m/z 739 [M-H]⁻, MS²: 593, 285; MS³: 285, 255, 211; MS⁴: 411, 327, 285, 151. Dados de RMN: RMN ¹H (DMSO-d₆, 600 MHz): δ 6,41 (d, J=2,0 Hz, H-6); 6,77 (d, J=2,0 Hz, H-8); 8,05 (d, J=8,8 Hz, H-2' and 6'); 6,83 (d, J=8,8 Hz, H-3' and 5'); 5,50 (sl, 7-O-Rha-1); 4,35 (sl, 6"-O-Rha-2); 5,31 (d, J=7,7 Hz, 3-O-

Gal-1); 1,01 (d, $J=6,2$ Hz, C-6-Rha-1); 1,07 (d, $J=6,1$ Hz, C-6-Rha-2); RMN ^{13}C (DMSO-d, 150 MHz): δ 156,0 (C-2), 133,5 (C-3), 177,6 (C-4), 160,9 (C-5), 99,4 (C-6), 161,6 (C-7), 94,7 (C-8), 157,1 (C-9), 105,6 (C-10), 120,7 (C-1'), 131,1 (C-2' and 6'), 115,1 (C-3' and 5'), 160,2 (C-4'), 98,4 (7-O-Rha-C-1''), 70,3 (C-2''), 70,6 (C-3''), 71,6 (C-4''), 69,8 (C-5''), 17,9 (7-O-Rha-CH₃); 101,8 (3-O-Gal-C-1'''), 71,1 (C-2'''), 72,9 (C-3'''), 68,0 (C-4'''), 73,6 (C-5'''), 65,1 (3-O-Gal-CH₂), 100,0 (6-O-Rha-C-1'''), 70,4 (C-2'''), 70,1 (C-3'''), 71,9 (C-4'''), 68,3 (C-5'''), 17,9 (6-O-Rha-CH₃).

Canferol-3-O- α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 2)[α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactosil-7-O- α -L-ramnosídeo (astrasikokiosídeo I): sólido amorfo amarelo; HPLC-UV $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: 265 and 349; $t_{\text{R}}=9,99$ min, 66,7 mg. HRMS (ESI) m/z , calcd. for C₃₉H₅₀O₂₃ [M- H]⁻: 886.2742, found: 886.2697. DI-ESI-MS/MS: m/z 885 [M-H]⁻, MS²: 739, 285; MS³: 593, 575, 447, 285; MS⁴: 447, 429, 327, 285, 255. Dados de RMN: RMN ^1H (DMSO-d, 600 MHz): δ 6,36 (d, $J=2,0$ Hz, H-6); 6,72 (d, $J=2,0$ Hz, H-8); 8,01 (d, $J=8,8$ Hz, H-2' and 6'); 6,79 (d, $J=8,8$ Hz, H-3' and 5'); 5,46 (sl, 7-O-Rha-1); 4,96 (sl, 6'''-O-Rha-2); 4,27 (sl, 2'''-O-Rha-3); 5,49 (d, $J=7,7$ Hz, 3-O-Gal-1); 0,69 (d, $J=6,1$ Hz, C-6-Rha-1); 0,96 (d, $J=6,1$ Hz, C-6-Rha-2); 1,04 (d, $J=6,1$ Hz, C-6-Rha-3); RMN ^{13}C (DMSO-d, 150 MHz): δ 156,4 (C-2), 133,4 (C-3), 177,9 (C-4), 161,3 (C-5), 99,4 (C-6), 162,0 (C-7), 95,1 (C-8), 157,3 (C-9), 106,0 (C-10), 121,1 (C-1'), 131,4 (C-2' and 6'), 115,6 (C-3' and 5'), 160,5 (C-4'), 98,8 (7-O-Rha-C-1''), 70,8 (C-2''), 71,1 (C-3''), 72,3 (C-4''), 70,5 (C-5''), 18,4 (7-O-Rha-CH₃), 99,8 (3-O-Gal-C-1'''), 75,3 (C-2'''), 74,2 (C-3'''), 69,3 (C-4'''), 73,8 (C-5'''), 65,4 (6-O-Gal-CH₂), 101,0 (2-O-Rha-C-1'''), 70,5 (C-2'''), 71,0 (C-3'''), 72,0 (C-4'''), 68,9 (C-5'''), 17,7 (2-O-Rha-CH₃), 100,4 (6-O-Rha-C-1'''), 70,7 (C-2'''), 71,0 (C-3'''), 72,3 (C-4'''), 69,1 (C-5'''), 18,4 (6-O-Rha-CH₃).

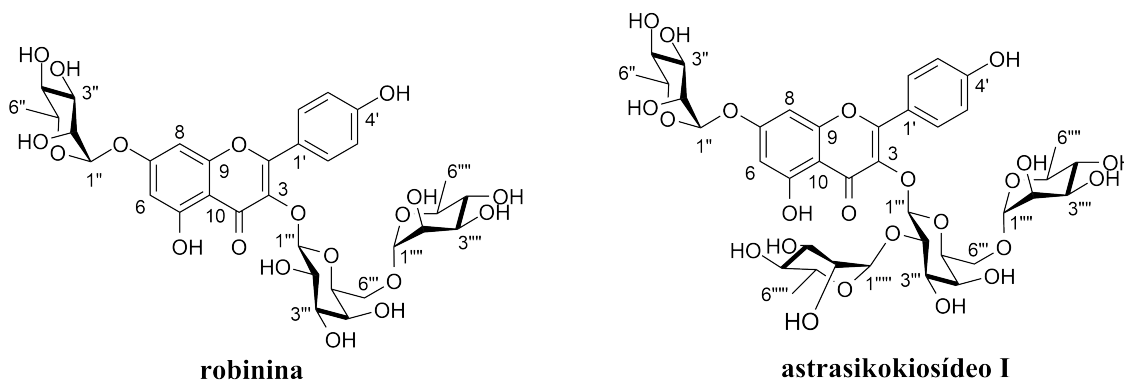


Figura 1 - Estrutura dos flavonoides robinina e astrasikokiosídeo I

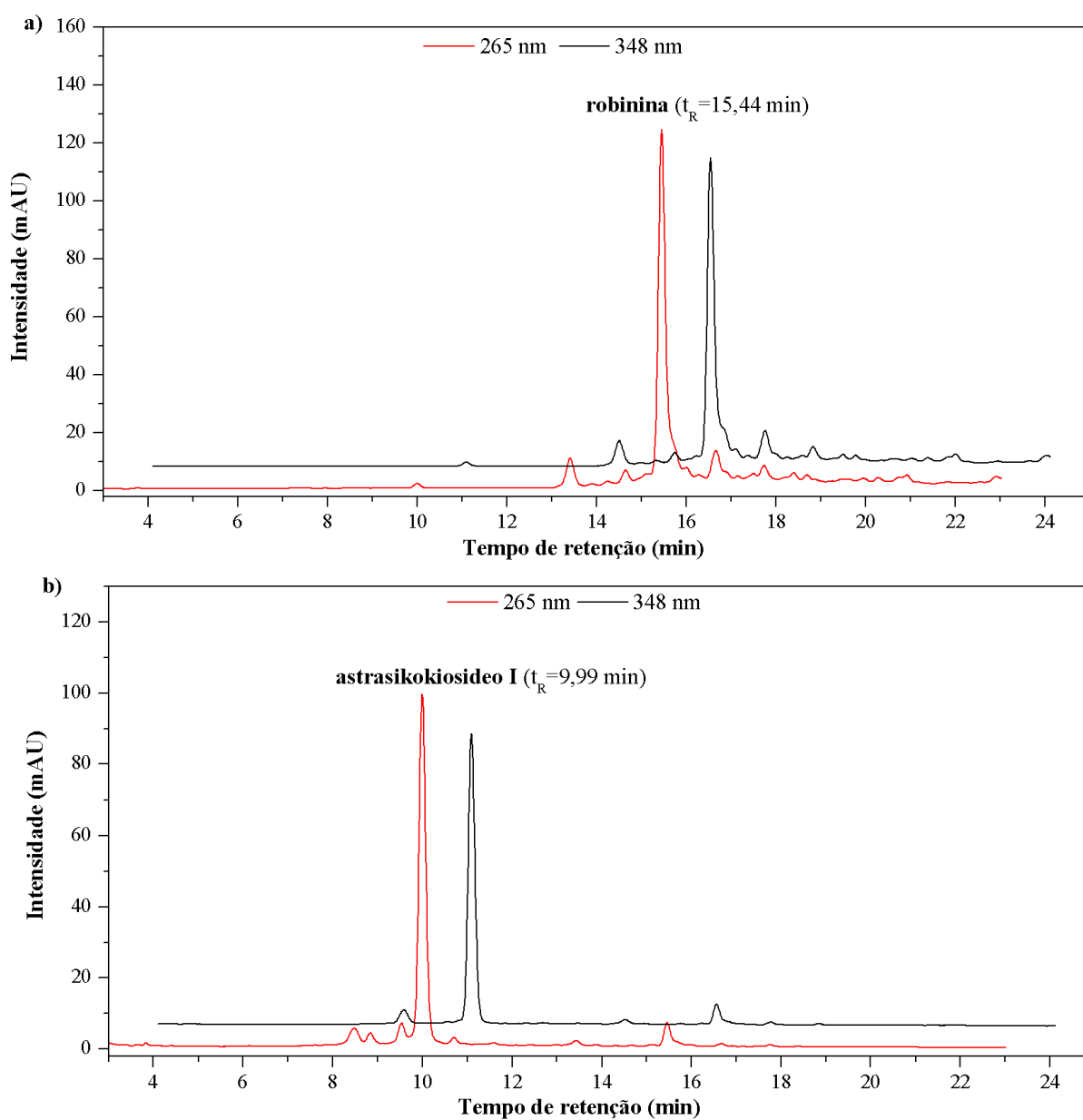


Figura 2 - Cromatogramas dos flavonoides robinina (a) e astrasikokiosideo I (b). Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2% v/v), gradiente: 0-5min, 30-40% MeOH; 5-7min, 40% MeOH; 7-12min, 40-50% MeOH; 12-14min, 50% MeOH; 14-19min, 50-60% MeOH; 19-23min, 60-100% MeOH, vazão de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 10 µL, coluna de fase reversa C18 e $\lambda = 265$ e 348 nm.

2.7 Condições cromatográficas da quantificação

A quantificação dos flavonoides robinina e astrasikokiosideo I, nos extratos e frações das folhas e galhos de *M. acutifolium*, foi realizada usando como fase móvel H₂O/AcOH (0,2% v/v) (Solvente A) e MeOH (Solvente B) na seguinte programação: gradiente, 0-5min, 30-40% MeOH; 5-7min, 40% MeOH; 7-12min, 40-50% MeOH; 12-14min, 50% MeOH; 14-19min, 50-60% MeOH; 19-23min, 60-100% MeOH. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 10 µL, temperatura do forno da coluna de 30 °C e coluna de fase reversa C18 (Phenomenex® Luna 5 µm, 250 x 4,6 mm).

A seleção dos comprimentos de onda para construção das curvas analíticas foi realizada por monitoramento da faixa de comprimento de onda de 200 a 450 nm a partir da injeção dos padrões de robinina e astrasikokiosideo I com purezas determinada em HPLC-DAD de 95,17% e 99,67%, respectivamente. Os espectros UV-Vis fornecidos pelo detector de arranjo de fotodiodo indicaram os máximos de absorção de 265 e 347 nm para a robinina e 265 e 348 nm para astrasikokiosideo I. Assim estes comprimentos de onda foram selecionados para a construção das curvas analíticas.

2.8 Preparação das amostras para quantificação

A preparação das amostras para quantificação foi realizada conforme metodologia descrita por Pereira et al. (2004) e adaptada por Santos (2019). Alíquotas de 20 mg de EEFMa, EEGMa, FAEFMa, FAFMa, FAEGMa e FMGMa foram solubilizadas em 5,0 mL de MeOH/H₂O (8:2) com auxílio de banho ultrassônico por 2 min. As soluções das amostras foram filtradas em algodão a fim de eliminar as partículas em suspensão. O filtrado foi adicionado em cartucho de extração de fase sólida (SPE, C18-E, 1000 mg/6 mL, 55 µm, 70 Å) previamente condicionado com 10,0 mL de MeOH/H₂O (8:2). Após a eluição dos compostos flavonoídicos com 5 mL de MeOH/H₂O (8:2) e 50 mL de MeOH, o eluato foi concentrado em evaporador rotativo, o volume ajustado para 5,0 mL, filtrado em membrana filtrante (30 mm e poro 0,45 µm) e analisado em cromatógrafo analítico. Para a fração aquosa das folhas foi necessário realizar uma diluição posterior, na qual uma alíquota de 1,7 mL da amostra foi diluída para um volume de 5 mL de MeOH/H₂O (8:2) e analisada por HPLC-DAD.

2.9 Desenvolvimento do método cromatográfico

O método para quantificação de robinina e astrasikokiosideo I nos extratos e frações das folhas e galhos de *M. acutifolium* foi desenvolvido e os parâmetros seletividade, linearidade,

faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação foram avaliados conforme as normas da *International Conference on Harmonization* (ICH, 1995).

2.9.1 Seletividade

A seletividade do método desenvolvido foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos padrões de referência robinina e astrasikokiosideo I com os do EEFMa, EEGMa, FAEFMa, FAFMa, FAEGMa e FMGMa. A análise da sobreposição de vários espectros na região do UV-Vis, obtidos pelo detector de arranjo de diodos, forneceu informações sobre a pureza espectral dos picos de interesse presentes nas amostras a serem quantificadas.

2.9.2 Linearidade

O método de padronização externa foi utilizado para obtenção das curvas analíticas na forma $y=ax+b$, onde y é área do pico e x é a concentração do padrão em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os padrões de referência robinina e astrasikokiosideo I foram dissolvidos em MeOH/H₂O (1:1) e filtrados em membrana filtrante, obtendo-se soluções estoques na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir destas foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 10; 40; 80; 120; 160; 240; 320 e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a robinina e 5; 20; 80; 120; 160; 240; 320 e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o astrasikokiosideo I.

A linearidade foi determinada pelos coeficientes de correlação obtidos a partir da regressão linear das curvas analíticas construídas com os padrões de referência em oito concentrações. O teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para verificar o ajuste do modelo linear.

2.9.3 Faixa de trabalho

Uma alíquota de 5 mg de cada amostra foi solubilizada em 5 mL de H₂O/MeOH (3:7). O volume foi aplicado em um cartucho de extração em fase sólida (SPE) C18-E (1000 mg/6 mL, 55 μm e 70Å) e filtrado em membrana filtrante (30 mm e poro 0,45 μm). Transferiu-se uma alíquota de 1 mL de cada amostra para *vials* previamente identificados.

Para determinar as concentrações adequadas para construção das curvas, injetou no HPLC-DAD, em concentração conhecida, os flavonoides de referência e os extratos e frações de interesse. Com base na concentração teórica dos padrões e na área integrada, em comparação com área integrada do referido padrão presente nos extratos/frações, foi possível estimar a

concentração teórica dos padrões nas amostras. Uma vez estimado a concentração teórica, usou-se o intervalo recomendado pela literatura de 80 a 120% (ICH, 1995). Com base nestas informações determinou-se o intervalo de trabalho com as concentrações de 5 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (5, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 240, 320 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para os padrões robinina e astrasikokiosideo I.

2.9.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir dos parâmetros das curvas analíticas e calculados empregando as Equações 1 e 2, onde s é o desvio padrão da resposta e S é a inclinação da curva analítica.

$$LD = \frac{s \times 3,3}{S} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{s \times 10}{S} \quad \text{Equação 2}$$

2.10 Análise estatística

A construção das curvas analíticas e o tratamento dos dados de quantificação foram obtidos usando os *softwares* *LC Solutions* e *Microcal Origin 8.0*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A robinina foi relatada anteriormente em três espécies da família Fabaceae, nas folhas de *Robinia pseudoacacia* e *Melilotus elegans* e nas flores de *Astragalus falcatus*. E ainda nas folhas de *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae), *Strychnos variabilis* (Loganiaceae), *Atropa beladonna* (Solanaceae) e *Genipa americana* (Rubiaceae) (ASRES; EDER; BUCAR, 2000; BRASSEUR; ANGENOT, 1988; BROCHADO et al., 2003; VEITCH et al., 2010; SILVA et al., 2018; TSIKLARI et al., 2000).

O astrasikokiosídeo I foi relatado anteriormente nas partes aéreas de *Astragalus shikokianus* e nas folhas de *Styphnolobium japonicum*, ambas pertencentes à família Fabaceae (KITE; STONEHAM; VEITCH, 2007; YAHARA; KOHJYUUMA; KOHODA, 2000).

3.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes existentes nas amostras (PASCHOAL et al., 2008). A seletividade do método pode ser observada comparando-se os cromatogramas dos padrões de referência robinina e astrasikokiosídeo I com os cromatogramas do extrato e frações das folhas.

Os índices de similaridade superiores a 99,9 % indicam que as bandas cromatográficas com tempos de retenção de 9,99 min e 15,44 min, presentes nos extratos e frações, correspondem aos flavonoides astrasikokiosídeo I ($\lambda_{\text{max}}=265$ e 348 nm) e robinina ($\lambda_{\text{max}}=265$ e 347 nm), respectivamente (Figura 3).

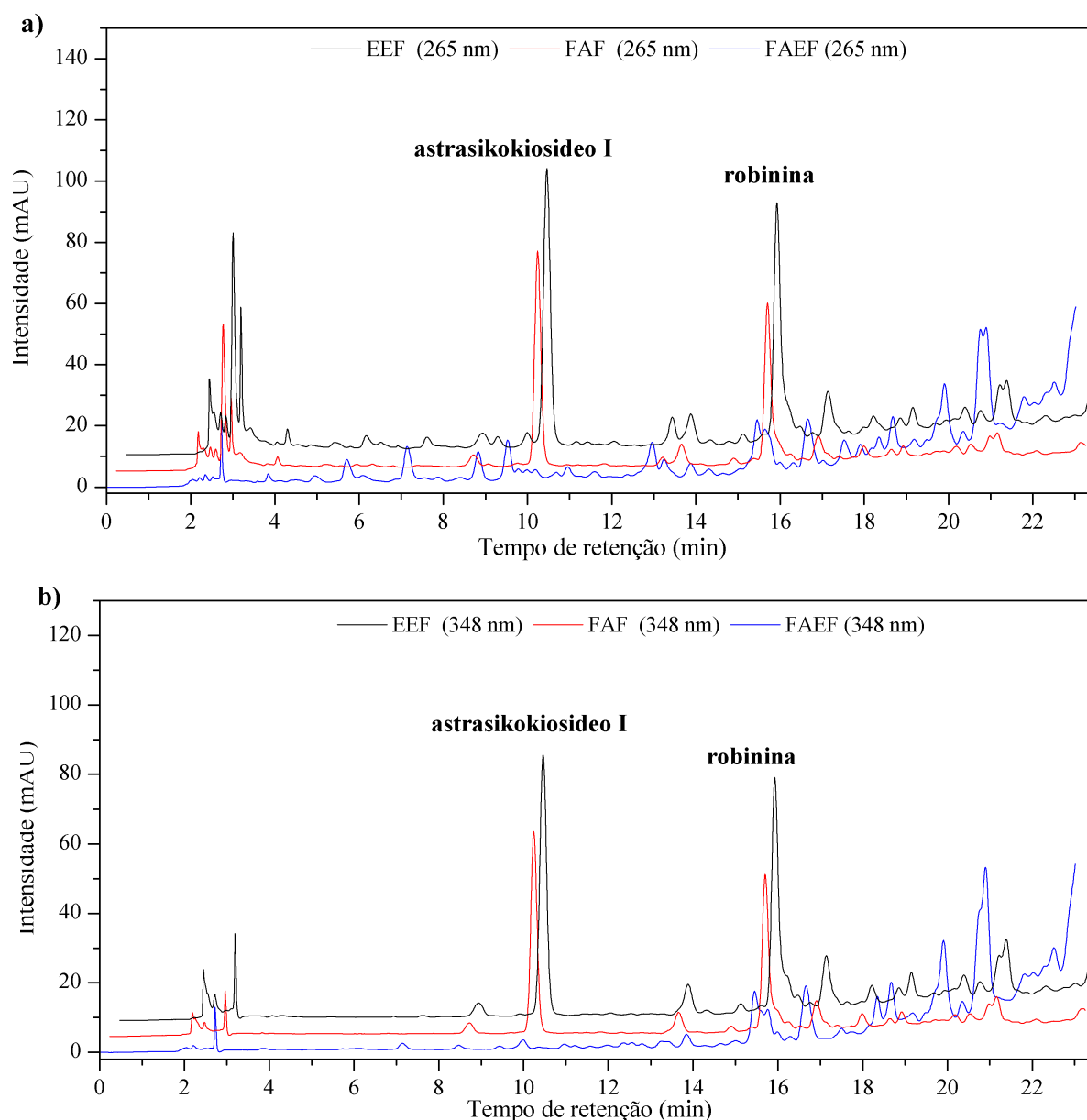


Figura 3 - Cromatogramas do extrato (EEF) e frações acetato de etila (FAEF) e aquosa das folhas (FAF) nos comprimentos 265 nm (a) e 348 nm (b). Fase Móvel: MeOH-H₂O/AcOH (0,2%), coluna C18, gradiente: 0-5min, 30-40% MeOH; 5-7min, 40% MeOH; 7-12min, 40-50% MeOH; 12-14min, 50% MeOH; 14-19min, 50-60% MeOH; 19-23min, 60-100% MeOH; vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹.

3.2 Linearidade

A linearidade é determinada pelos coeficientes de correlação obtidos a partir da regressão linear de curvas analíticas construídas com os padrões de referência em concentrações diferentes (COSTA et al., 2012). O teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para

verificar o ajuste do modelo linear. O método de padronização externa foi utilizado para obtenção das equações de regressão linear na forma $y=ax+b$, onde y é área da banda e x é a concentração do padrão em $\mu\text{g mL}^{-1}$. As curvas analíticas apresentaram boa linearidade dentro da faixa de trabalho de 10 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para robinina e de 5 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para astrasikokiosideo I, com coeficiente de correlação de 0,9997 para todas as curvas, indicando que, as concentrações de cada padrão foram diretamente proporcionais às áreas das bandas dentro da faixa de concentração avaliada (Tabela 1).

A linearidade do método e a validade da regressão foram avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA). Foram comparados valores de F obtidos ou calculados (F_0) para a linearidade de cada curva analítica com o $F_{\text{crítico}}$ ou $F_{\text{significação}}$, assim o método é considerado linear quando F_0 é maior que $F_{\text{significação}}$ (COSTA et al., 2012; POLONINI et al., 2011). O valor de F_0 é dado pela razão entre a média quadrática do modelo de regressão (MQm) e a média quadrática residual (MQr) (SKOOG et al., 2006).

Para todas as curvas o valor de F_0 é maior que o $F_{\text{significação}}$, confirmando assim que a inclinação de cada reta não é nula com 95% de confiança e que os modelos das curvas são lineares (COSTA et al., 2012; POLONINI et al., 2011).

Tabela 1 - Parâmetros de regressão das curvas analíticas dos flavonoides robinina e astrasikokiosideo I.

Composto	λ_{max} (nm)	equação da curva analítica	coeficiente de correlação (R)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
robinina	265	$y=3290,21x+2878,05$	0,9999	26,86	81,39
	348	$y=2867,92x+2253,13$	0,9999	26,87	81,41
astrasikokiosideo I	265	$y=2720,35x-2174,49$	0,9997	2,37	7,18
	348	$y=2261,73x-1852,05$	0,9997	2,65	8,02

3.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade ou concentração do analito na amostra que pode ser diferenciada do zero, de forma confiável (PASCHOAL et al., 2008) e o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (PASCHOAL et al., 2008). LD e LQ determinados para robinina e astrasikokiosideo I nos extratos e frações de *M. acutifolium* são apresentados na Tabela 1. As curvas analíticas obtidas em 265 e 348 nm

não mostraram diferenças significativas nos valores de LD e LQ de robinina e astrasikokiosideo I, indicando que a quantificação pode ser realizada em ambos os comprimentos de onda.

3.4 Quantificação dos flavonoides no extrato e frações

Os teores de robinina e astrasikokiosideo I no extrato etanólico e frações de *M. acutifolium* são apresentados na Tabela 2. A fração aquosa das folhas apresentou os maiores teores robinina e astrasikokiosideo I, confirmando que a partição concentrou os flavonoides nesta fração.

A fração aquosa das folhas apresentou teores de robinina iguais a $127,1 \pm 7,9 \text{ mg g}^{-1}$ (265 nm) e $127,1 \pm 7,6 \text{ mg g}^{-1}$ (348 nm). Estes valores são maiores do que os determinados para o extrato etanólico das folhas: $66,8 \pm 2,0 \text{ mg g}^{-1}$ (265 nm) e $66,9 \pm 2,1 \text{ mg g}^{-1}$ (348 nm), entretanto, não foi possível a quantificação de robinina na fração acetato de etila das folhas, pois o valor obtido ficou abaixo do limite de quantificação (Tabela 2).

Os teores de astrasikokiosideo I para o extrato etanólico e frações das folhas, ficaram entre $3,4 \pm 0,3 - 192,2 \pm 15,7 \text{ mg g}^{-1}$ e $3,3 \pm 0,1 - 190,9 \pm 15,6 \text{ mg g}^{-1}$ nos comprimentos de onda de 265 e 348 nm, respectivamente. A fração aquosa das folhas apresentou o maior teor de astrasikokiosideo I (Tabela 2).

O extrato etanólico e frações acetato de etila e metanólica dos galhos foram analisados nas mesmas condições do extrato etanólico e frações acetato de etila e aquosa das folhas, no entanto, os flavonoides robinina e astrasikokiosideo I ficaram abaixo do limite de detecção, indicando ausência destes compostos nos galhos.

Os resultados obtidos indicam que a quantificação de robinina e astrasikokiosideo I em *M. acutifolium* pode ser realizada em 265 e 348 nm, uma vez que não há diferença significativa entre os valores obtidos em ambos os comprimentos de onda, corroborando os relatos da literatura nos quais em alguns trabalhos a quantificação de flavonoides é feita com detecção no comprimento de onda da absorção referente à banda I (300 a 380 nm) e em outros com detecção no λ_{max} referente a banda II (240 a 280 nm) (COSTA, 2013; JIANG et al., 2015; LANDIM; FEITOSA; SANTOS et al., 2019; YI et al., 2012).

Este é o primeiro relato de quantificação dos flavonoides robinina e astrasikokiosideo I em *M. acutifolium* e não foi encontrado na literatura a quantificação destes flavonoides em outras espécies vegetais.

Tabela 2 - Teores de robinina e astrasikokiosideo I no extrato e frações das folhas de *M. acutifolium*

Flavonoides	Amostra	265 nm		348 nm	
		mg g ⁻¹	%	mg g ⁻¹	%
robinina	EEFMa	66,8±2,0	6,7	66,9±2,1	6,7
	FAEFMa	nq	-	nq	-
	FAFMa	127,1±7,9	12,7	127,1±7,6	12,7
astrasikokiosideo I	EEFMa	93,8±3,7	9,4	93,4±3,5	9,3
	FAEFMa	3,4±0,3	0,3	3,3±0,1	0,3
	FAFMa	192,2±15,7	19,2	190,9±15,6	19,1

EEFMa: extrato etanólico das folhas; FAEFMa: fração acetato de etila das folhas; FAFMa: fração aquosa das folhas; nq: não quantificável, pois os valores ficaram abaixo do limite de quantificação.

4 CONCLUSÃO

Os flavonoides robinina e astrasikokiosideo I foram quantificados por HPLC-DAD no extrato etanólico e frações das folhas de *M. acutifolium*. O método para quantificação apresentou boas seletividade e linearidade dentro da faixa de concentração, apresentando coeficiente de correlação linear $R=0,9997$. A fração aquosa das folhas apresentou os maiores teores dos dois flavonoides, quando comparado ao extrato etanólico e a fração acetato de etila.

Os resultados indicam que a quantificação dos flavonoides pode ser realizada nos comprimentos de onda 265 e 348 nm sem diferenças significativas entre os teores. Estes flavonoides não foram detectados nos galhos, mostrando que a composição química dos galhos e das folhas é distinta. Este é o primeiro relato de quantificação dos flavonoides robinina e astrasikokiosideo I em espécies vegetais. A quantificação destes flavonoides serve de base para padronização do extrato e frações e para caracterização de marcadores químico.

REFERENCIAS

- AMEN, Y. M.; MARZOUK, A. M.; ZAGHLOUL, M. G.; AFIFI, M. S. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. **Natural Product Research**, v. 29, n. 15, p. 1388-1405, 2015.
- ASRES, K.; EDER, U.; BUCAR, F. Studies on the anti-inflammatory activity of extracts and compounds from the leaves of *Melilotus elegans*. **Ethiopian Pharmaceutical Journal**, v. 18, p. 15-23, 2000.
- BENTO, C. C.; TANGERINA, M. M. P.; ZANATTA, A. C.; SARTORI, A. L. B.; FRANCO, D. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; ALMEIDA, L. F. R.; SANNOMIYA, M. Chemical constituents and allelopathic activity of *Machaerium eriocarpum* Benth. **Natural Product Research**. v. 34, n. 6, p. 884-888, 2018.
- BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Six flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 1487-1490, 1988.
- BROCHADO, C. D. O.; ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P.; COSTA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; PEREIRA, R. L. C.; KOATZ, V. L. G.; COSTA, S. S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation in vitro. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 449-451, 2003.
- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; FREITAS, J. S.; CHAVES, M. H. Isoflavonoides da tribo Dalbergieae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília Papilionoideae. **Química Nova**, v. 43, n. 9, p. 1294-1311, 2020.
- CARVALHO, A. A.; FREITAS, J. S.; SANTOS, L. R.; ARAÚJO, B. Q.; CHAVES, M. H. Identificação de isoprenoides na fração hexânica das folhas de *Machaerium acutifolium* por CG-EM. In: Avanços Científicos, Tecnológicos e de Inovação na Botânica. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020, v.1, p. 24-34.
- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; SOUSA, R. P.; FREITAS, J. S.; ARAÚJO, B. Q.; CHAVES, M. H. Identificação de flavonoides das folhas de *Machaerium acutifolium* (Papilionoideae - Fabaceae) por Espectrometria de Massas. In: Freitas, R. M. (org.). **Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 2**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 118-129.
- COSTA, M. A. B.; RICCI-JÚNIOR, E.; SANTOS, E. P.; MANSUR, C. R. E.; CAMPOS, V. E. B. Desenvolvimento e validação de método analítico para a determinação de sulfassalazina em suspensão oral: comparação do método espectrofotométrico e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Química Nova**. v. 35, n. 4, p. 808-813, 2012.
- FREITAS, J. S.; CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; SANTIAGO, R. F.; ARAÚJO, B. Q.; CHAVES, M. H. Isoprenoides da fração hexânica das folhas de *Machaerium acutifolium* Vogel. In: 43ª REUNIÃO ANUAL VIRTUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2020, Evento Virtual.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

JIANG, H.; ENGELHARDT, U. H.; THRÄNE, C.; MAIWALD, B.; STARK, J. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC. **Food Chemistry**. v. 183, p. 30-35, 2015.

KITE, G. C.; STONEHAM, C. A.; VEITCH, N. C. Flavonol tetraglycosides and other constituents from leaves of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and related taxa. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1407-1416, 2007.

LANDIM, L. P.; FEITOZA, G. S.; COSTA, J. G. M. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra gardneriana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 23, n. 1, 2013.

MELO, S. J.; SOUSA, J. P. B.; SÁ, M. G.; MORAIS, L. S.; MAGALHÃES, N. M. G.; GOUVEIA, F. N.; ALBERNAZ, L. C.; ESPINDOLA, L. S. *Machaerium acutifolium* compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 77, n. 33, p. 1444-1451, 2021.

OLLIS, W. D.; BRIAN, T.; REDMAN, B. T.; SUTHERLANDT, I. O.; GOTTLIEB, O. R.; Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1379-1381, 1978.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, 1190-1198, 2008.

PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC Densitometric Determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 241-248, 2004.

POLIDO, C. A.; SARTORI, A. L. B. O gênero *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergieae) no pantanal brasileiro. **Rodriguésia**, v. 58, n. 2, p. 313-329, 2007.

POLONINI, H.; SANTOS, F. C.; VAZ, U. P.; BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B.; FERREIRA, A. O. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do teor de sinvastatina em cápsulas magistrais. **Química Nova**. v. 34, n. 3, p. 516-519, 2011.

ROSA, P. A. L.; ALVES, M. C.; VIDEIRA, L. M. L.; BONINI, C. B. S. Recuperação de um solo de cerrado após 19 anos: ocorrência espontânea de espécies arbóreas. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 1, n. 1, p. 44-57, 2014.

SANTOS, L. R.; CARVALHO, A. A.; SILVA, L. F. F.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; FARIAS, R. R. S.; CHAVES, M. H. Validação de metodologia para quantificação de rutina e quercetina nas folhas de *Senna acuruensis*. In: Santos, C. C. (Org.). **Estudos Interdisciplinares nas Ciências Exatas e da Terra e Engenharias 2**. 1 ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 144-156.

SILVA, L. M. P.; ALVES, J. S. F.; SIQUEIRA, E. M. S.; SOUZA NETO, M. A.; ABREU, L. S.; TAVARES, J. F.; PORTO, D. L.; FERREIRA, L. S.; DEMARQUE, D. P.; LOPES, N. P.; ARAGÃO, C. F. S.; ZUCOLOTTI, S. M. Isolation and identification of the five novel flavonoids from *Genipa americana* leaves. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 1-13, 2018.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

TSIKLAURI, L. K.; AN, G.; ALANIA, M. D.; KEMERTELIDZE, E. P.; MORRIS, M. E. Optimum HPLC parameters for simultaneous determination of robinin and kaempferol. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 46, n. 1, p. 64–67, 2012.

VEITCH, N. C.; ELLIOTT, P. C.; KITE, G. C.; LEWIS, G. P. Flavonoid glycosides of the black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 71, p. 479–486, 2010.

YAHARA, S.; KOHJYUUMA, M.; KOHODA, H. Flavonoid glycosides and saponins from *Astragalus shikokianus*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 469-471, 2000.

YI, Y.; ZHANG, Q.; LI, S.; WANG, Y.; YE, W.; ZHAO, J.; WANG, Y. Simultaneous quantification of major flavonoids in ‘‘Bawanghua’’, the edible flower of *Hylocereus undatus* using pressurised liquid extraction and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 135, p. 528-533, 2012.

Material Suplementar

**QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONOIDES ROBININA E ASTRASIKOKIOSIDEO I
EM *Machaerium acutifolium***

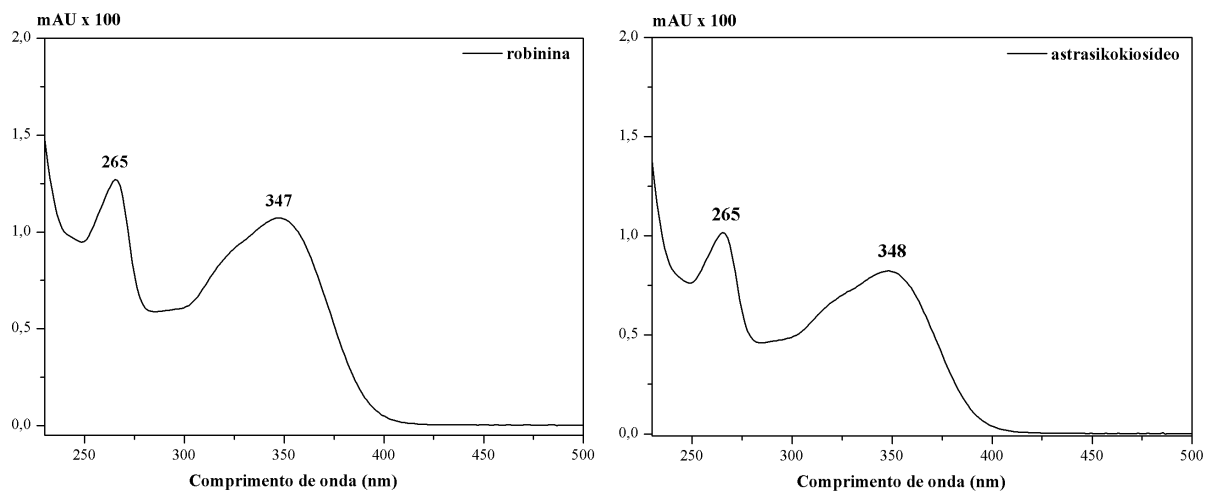


Figura 1S - Espectros de absorção UV-Vis dos padrões autênticos de robinina (23) e astrasikokiosideo I (24).

Tabela 1S - Similaridade das bandas do cromatograma do extrato etanólico das folhas (EEFMa) e das frações acetato de etila (FAEFMa) e aquosa (FAFMa) de *M. acutifolium*

Extrato/fração	Índice de similaridade (%)	
	robinina ($t_R=15,44\text{min}$)	astrasikokiosideo I ($t_R=9,99\text{min}$)
EEFMa	99,94	99,98
FAEFMa	99,88	99,99
FAFMa	99,98	99,89

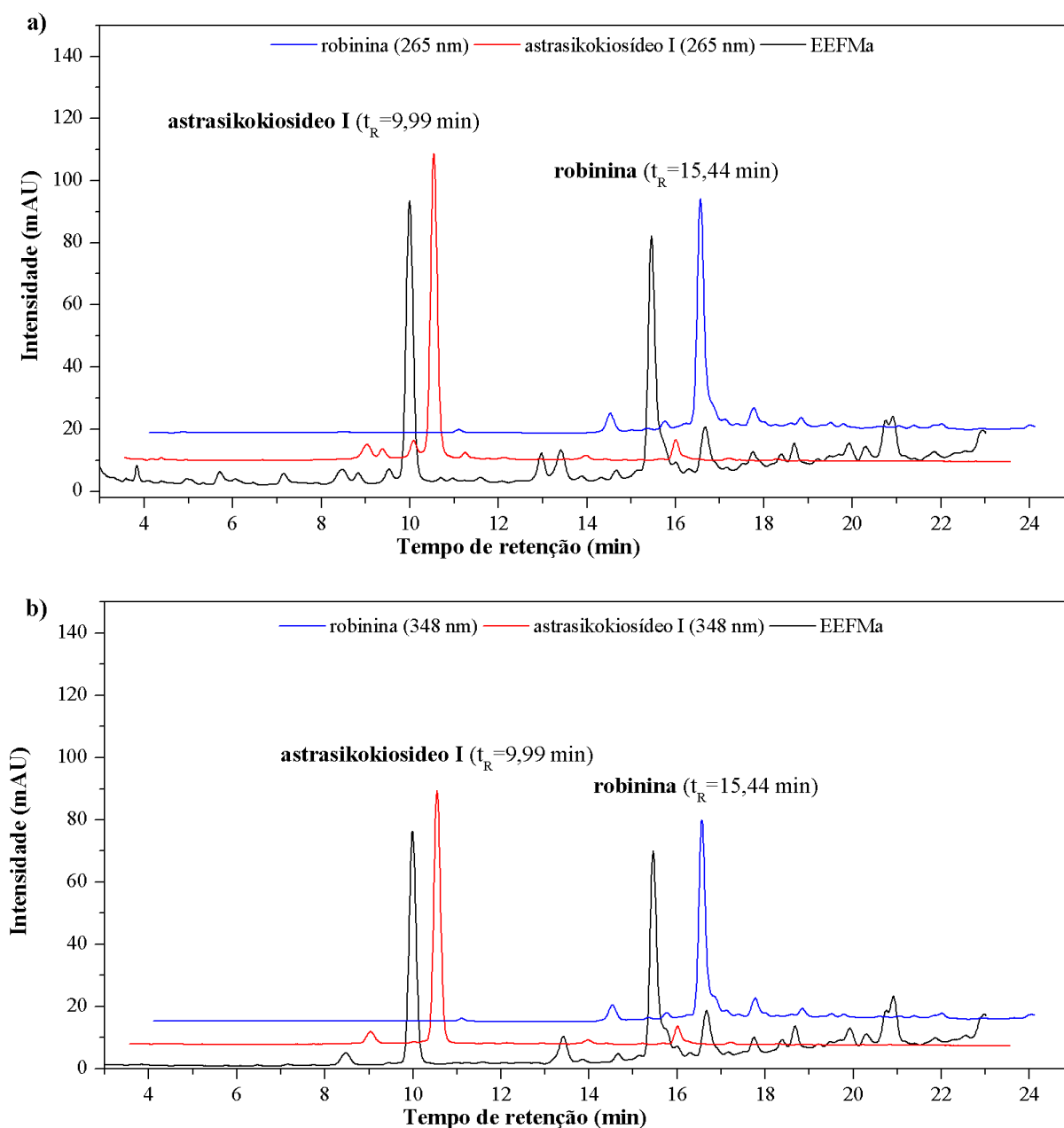


Figura 2S - Sobreposição dos comatogramas do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium* (EEFMa) com os padrões: a) robinina e astrasikokiosideo I em 265 nm e b) robinina e astrasikokiosideo I em 348 nm. Fase Móvel: MeOH-H₂O/AcOH (0,2%), coluna C18, gradiente: 0-5min, 30-40% MeOH; 5-7min, 40% MeOH; 7-12min, 40-50% MeOH; 12-14min, 50% MeOH; 14-19min, 50-60% MeOH; 19-23min, 60-100% MeOH; vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹.

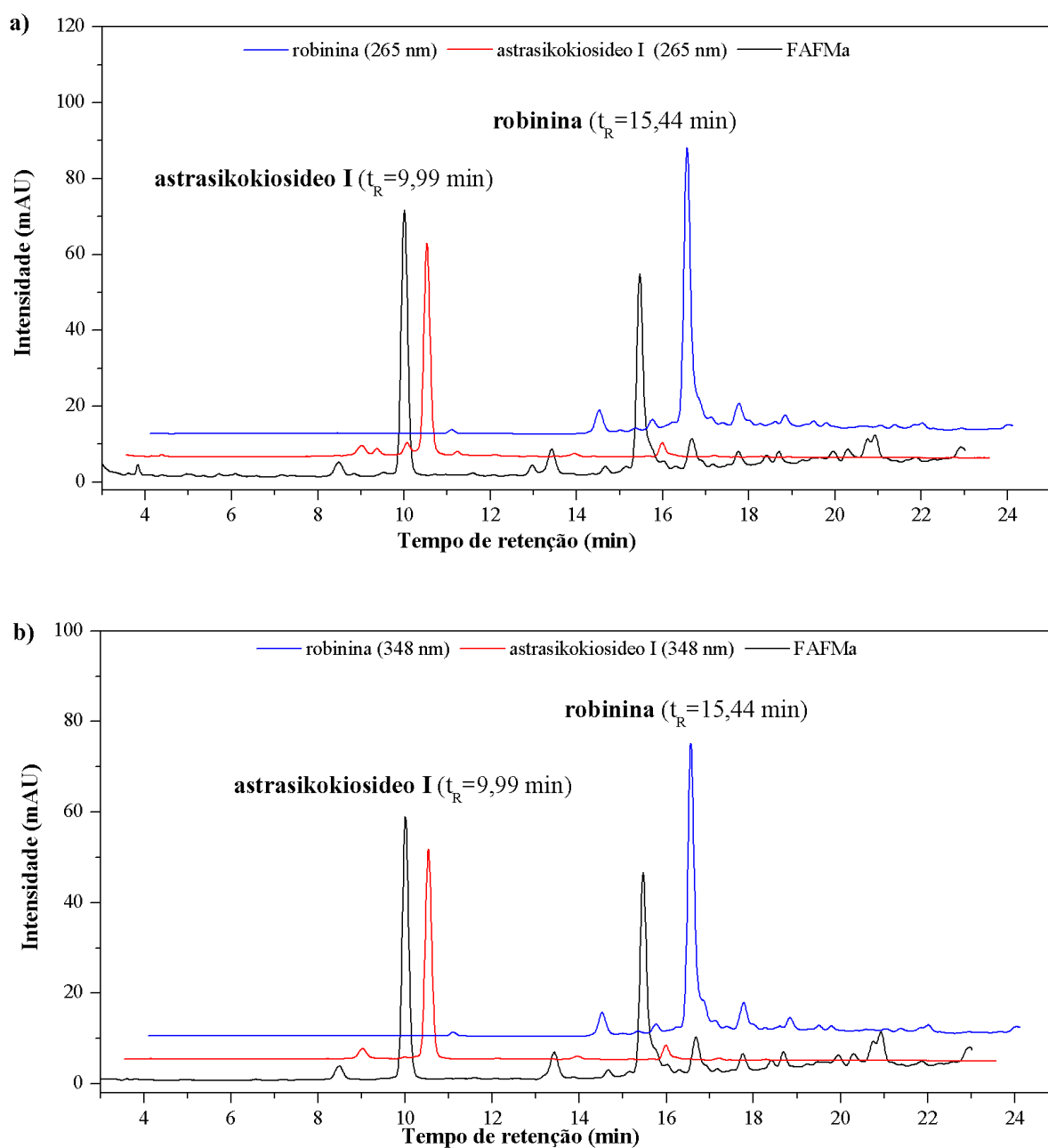


Figura 3S - Sobreposição dos comatogramas da fração aquosa das folhas de *M. acutifolium* (FAFMa) com os padrões: a) robinina e astrasikokiosideo I em 265 nm e b) robinina e astrasikokiosideo I em 348 nm. Fase Móvel: MeOH-H₂O/AcOH (0,2%), coluna C18, gradiente: 0-5min, 30-40% MeOH; 5-7min, 40% MeOH; 7-12min, 40-50% MeOH; 12-14min, 50% MeOH; 14-19min, 50-60% MeOH; 19-23min, 60-100% MeOH; vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹.

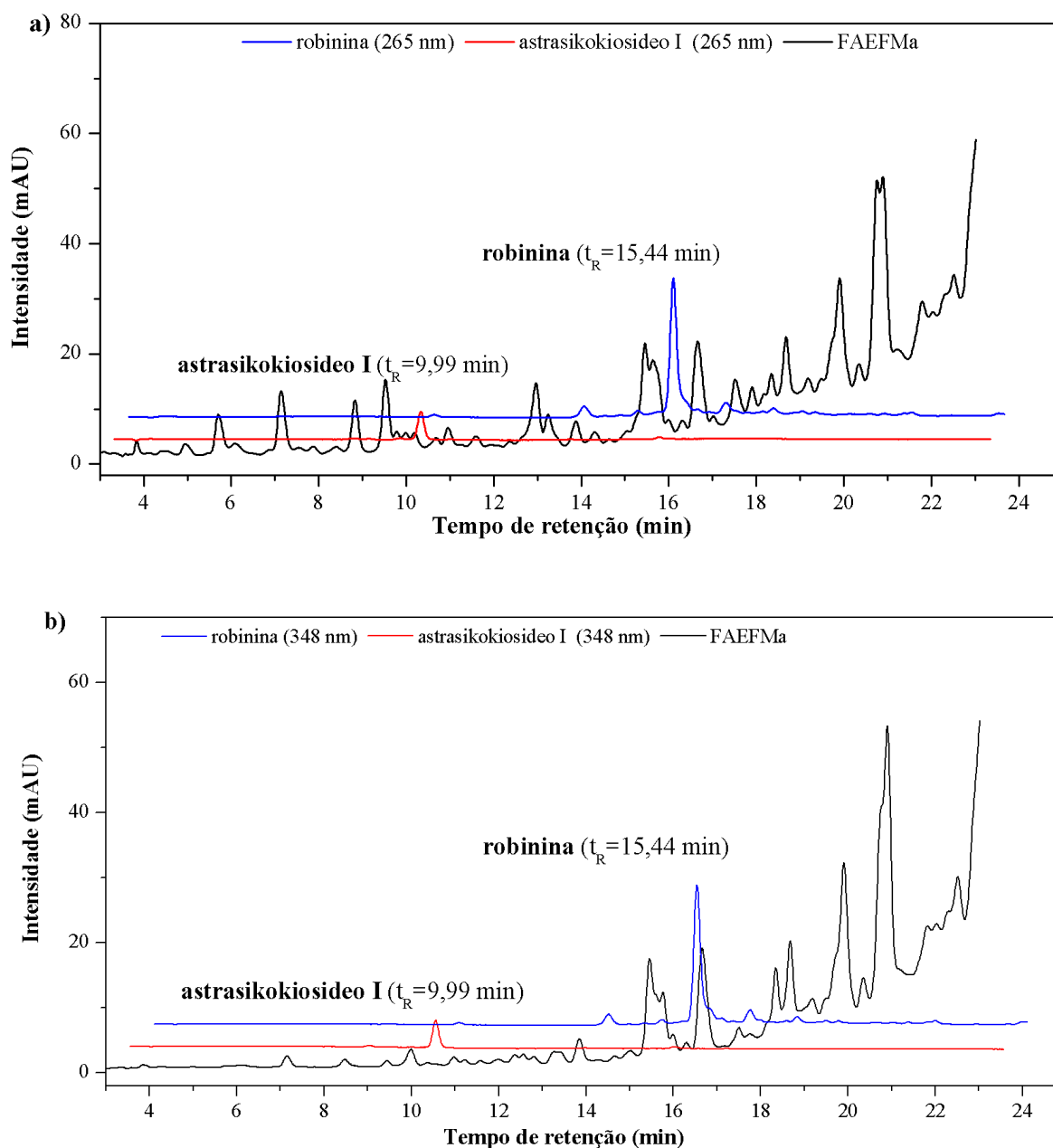


Figura 4S - Sobreposição dos comatogramas da fração acetato de etila das folhas de *M. acutifolium* (FAEFMa) com os padrões: a) robinina e astrasikokiosideo I em 265 nm e b) robinina e astrasikokiosideo I em 348 nm. Fase Móvel: MeOH-H₂O/AcOH (0,2%), coluna C18, gradiente: 0-5min, 30-40% MeOH; 5-7min, 40% MeOH; 7-12min, 40-50% MeOH; 12-14min, 50% MeOH; 14-19min, 50-60% MeOH; 19-23min, 60-100% MeOH; vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹

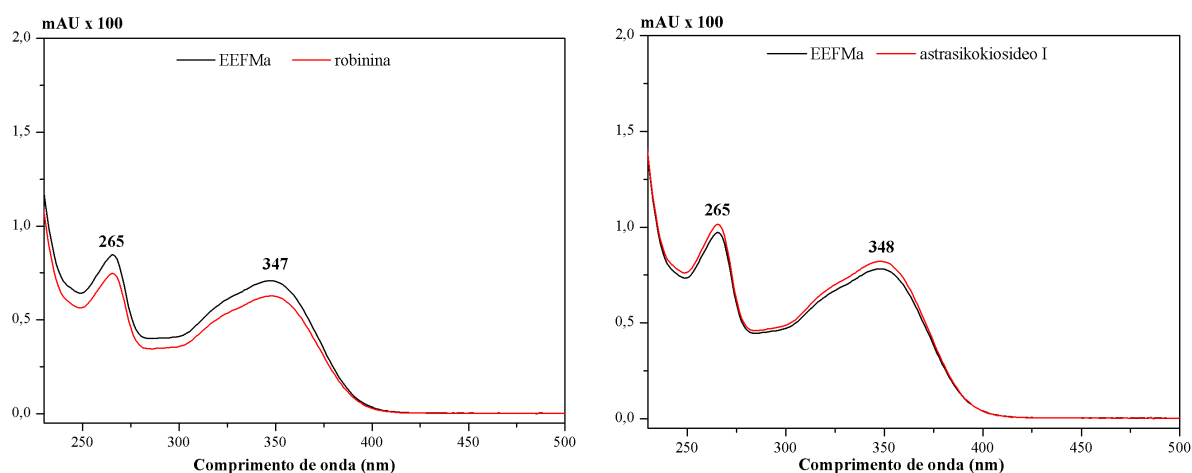


Figura 5S - Sobreposição dos espectros de absorção UV-Vis do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium* (EEFMa) com os padrões robinina e astrasikokiosideo I

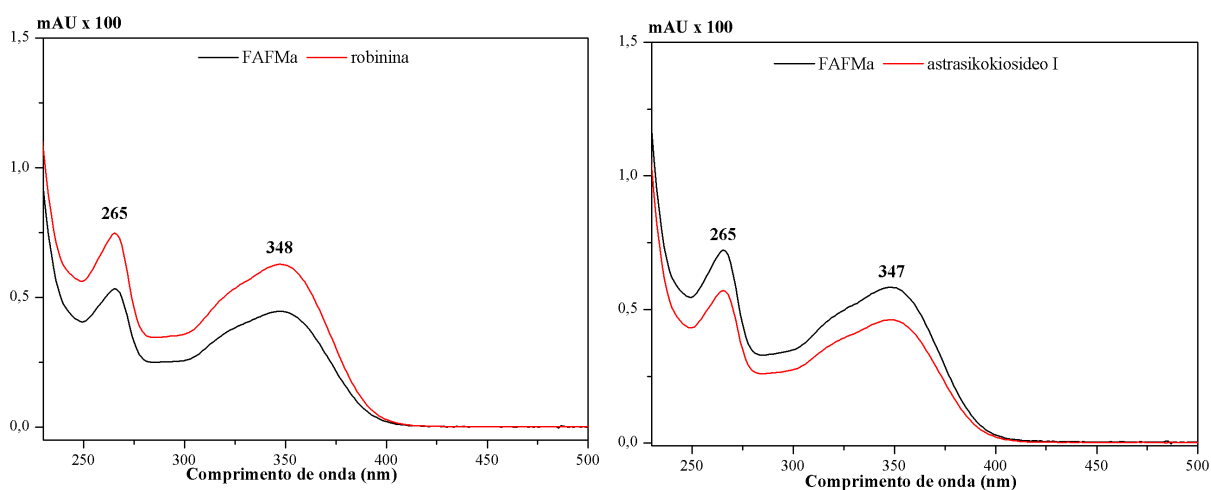


Figura 6S - Sobreposição dos espectros de absorção UV-Vis da fração aquosa das folhas de *M. acutifolium* (FAFMa) com os padrões robinina e astrasikokiosideo I.

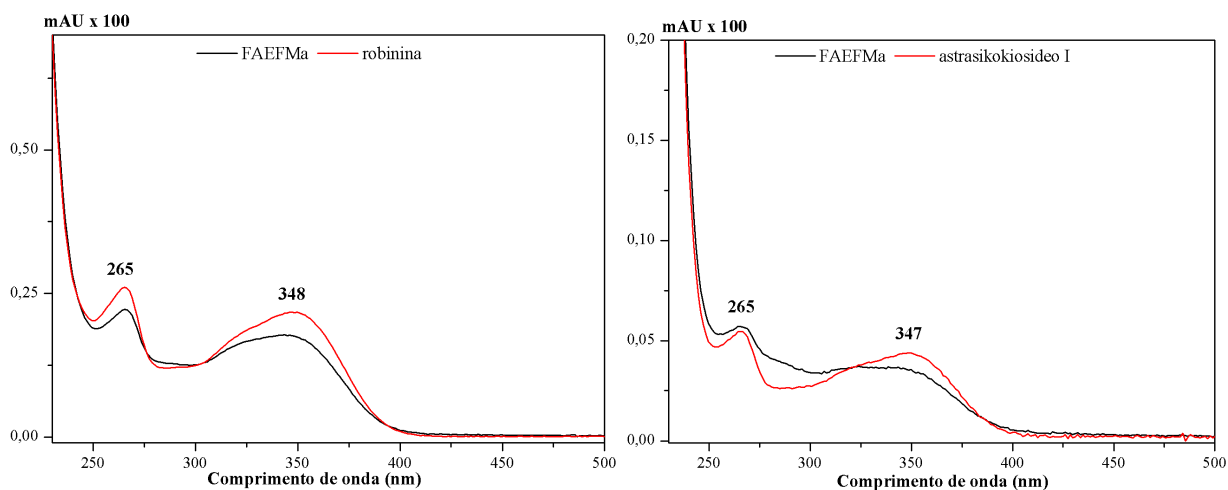


Figura 7S - Sobreposição dos espectros de absorção UV-Vis da fração aquosa das folhas de *M. acutifolium* (FAEFMa) com os padrões robinina e astrasikokiosideo I.

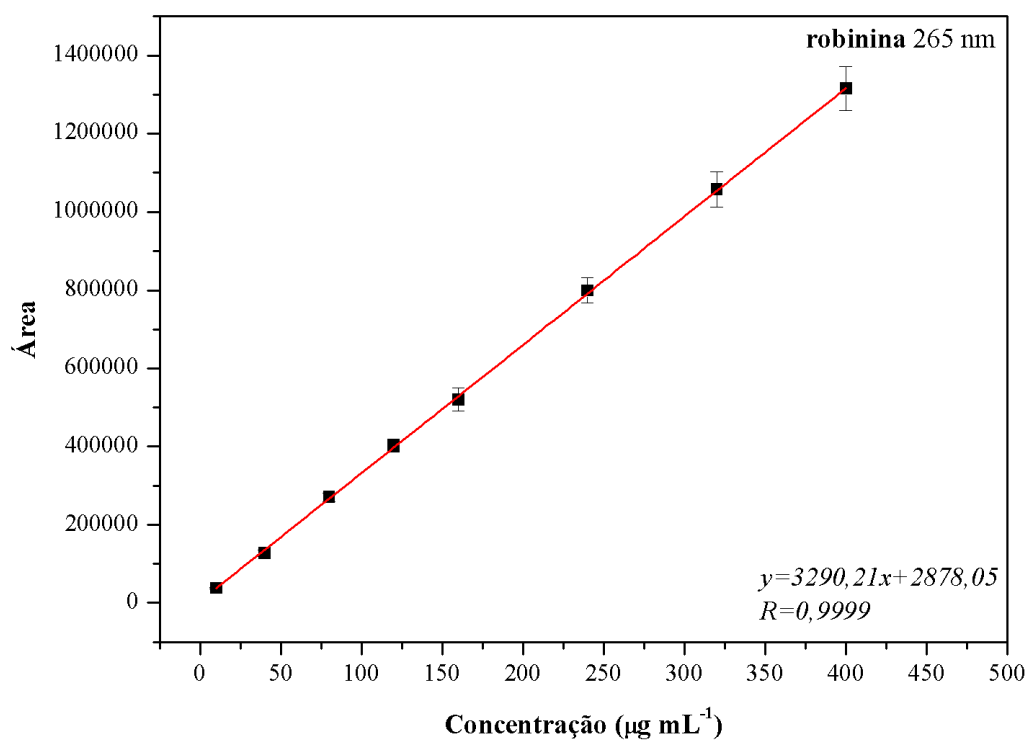


Figura 8S - Curva analítica robinina obtida a 265 nm

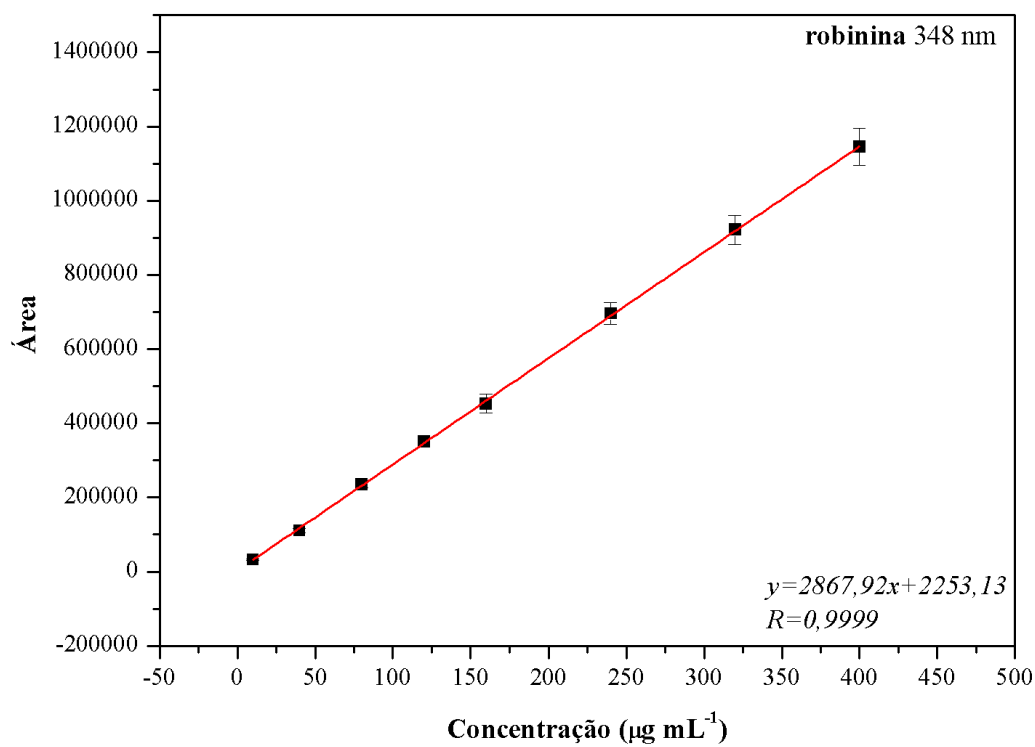


Figura 9S - Curva analítica robinina obtida a 348 nm

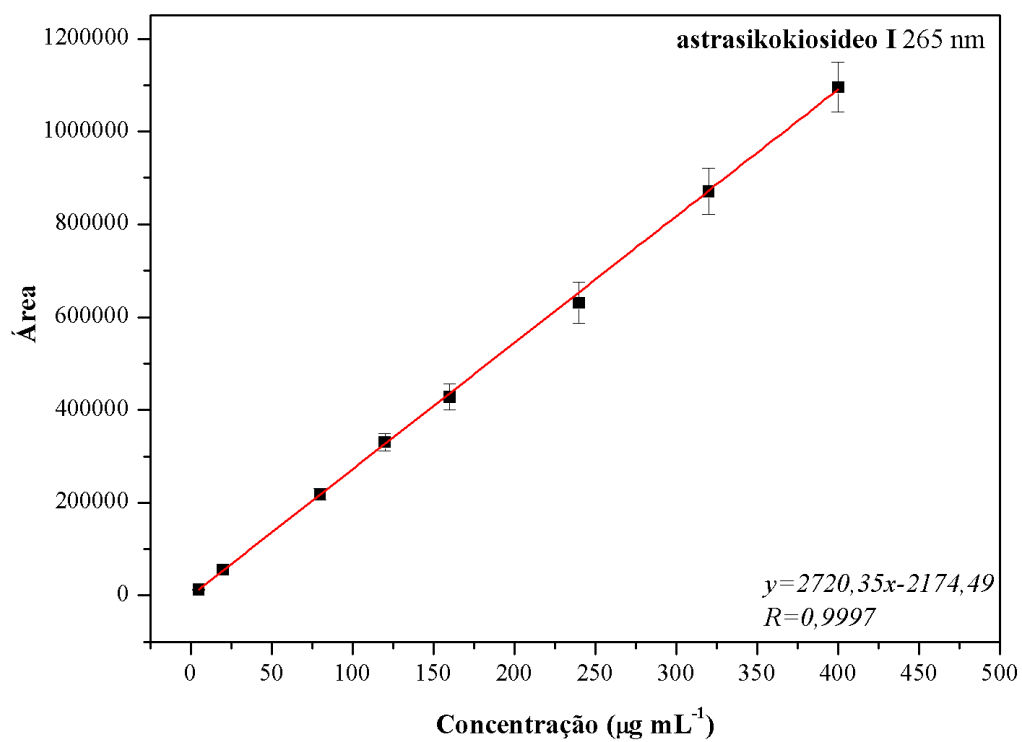


Figura 10S - Curva analítica astrasikokiosideo I obtida a 265 nm

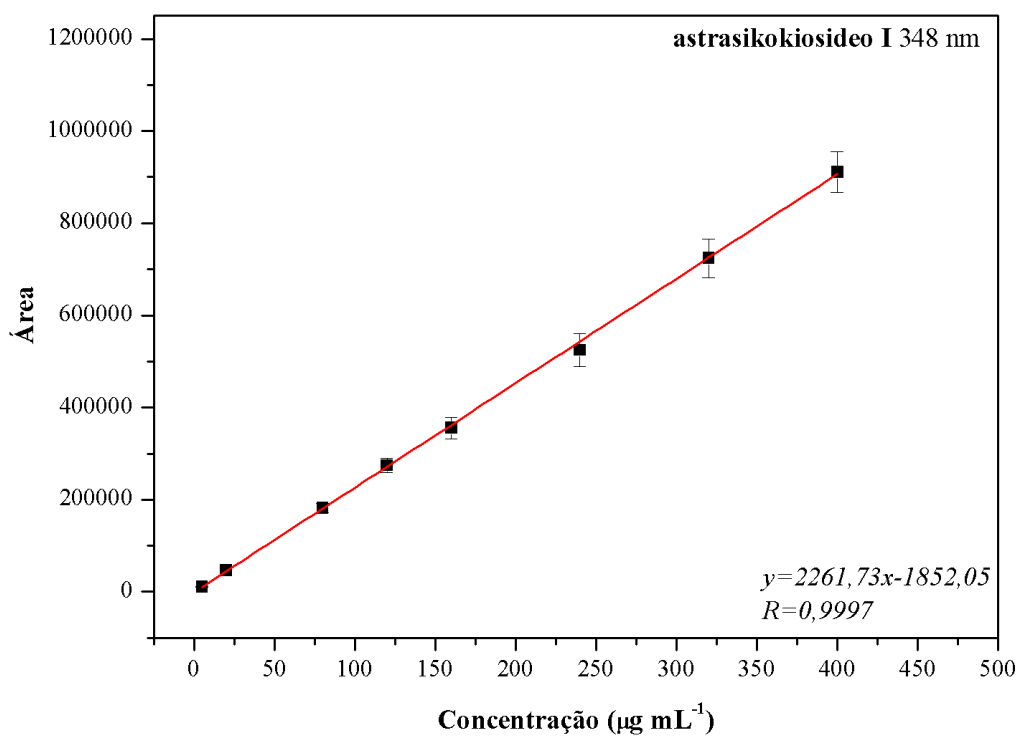


Figura 11S - Curva analítica astrasikokiosideo I obtida a 348 nm

Tabela 2S - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste da regressão linear para robinina ($\lambda=265$ nm)

	<i>gl</i>	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,7389x10 ³	2,7389 x10 ³	9990,9606	6,7577x10 ⁻¹¹
Resíduo	6	1,6448	2,7413x10 ⁻¹		
Total	7	2,7405x10 ³			

gl: graus de liberdade, SQ: soma quadrática, MQ: média quadrática

Tabela 3S - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste da regressão linear para robinina ($\lambda=348$ nm)

	<i>gl</i>	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	2,7306x10 ³	2,7306x10 ³	9592,2042	7,6355x10 ⁻¹¹
Resíduo	6	1,7080	2,8467x10 ⁻¹		
Total	7	2,7323x10 ³			

gl: graus de liberdade, SQ: soma quadrática, MQ: média quadrática

Tabela 4S - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste da regressão linear para astrasikokiosideo I ($\lambda=265$ nm)

	<i>gl</i>	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,8494x10 ³	1,8494x10 ³	15932,8231	1,6672x10 ⁻¹¹
Resíduo	6	6,9647x10 ⁻¹	1,1608x10 ⁻¹		
Total	7	1,8501x10 ³			

gl: graus de liberdade, SQ: soma quadrática, MQ: média quadrática

Tabela 5S - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste da regressão linear para astrasikokiosideo I ($\lambda=348$ nm)

	<i>gl</i>	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,8050x10 ³	1,8050x10 ³	15722,8244	1,7349x10 ⁻¹¹
Resíduo	6	6,888x10 ⁻¹	1,148x10 ⁻¹		
Total	7	1,8057x10 ³			

gl: graus de liberdade, SQ: soma quadrática, MQ: média quadrática

Capítulo 5

**Fracionamento e desreplicação do extrato etanólico dos galhos de
Machaerium acutifolium Vogel**

FRACIONAMENTO E DESREPLICAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DOS GALHOS DE *Machaerium acutifolium* VOGEL

RESUMO

Machaerium acutifolium Vogel (Fabaceae-Papilionoideae), sin. *M. muticum* Benth, ocorre no território brasileiro da Amazônia até São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia, Piauí e Maranhão, principalmente em área de cerrado. Esta espécie é conhecida popularmente por jacarandá do campo, jacarandá caroba e jacarandá bico de pato. Os galhos de *M. acutifolium* foram submetidos a maceração com etanol, fornecendo o extrato etanólico dos galhos (EEGMa). O EEGMa foi submetido a coluna filtrante de gel de sílica, fornecendo as frações hexânica (FHGMa), clorofórmica (FCGMa), acetato de etila (FAEGMa), metanólica (FMGMa) e metanol-água (FMAGMa). O fracionamento de FHGMa e FCGMa forneceu o esqualeno (**28**) e a mistura de esteroides sitosterol (**4**) e estigmasterol (**5**), respectivamente. A FAEGMa, após desrepliação por inserção direta em espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* (DI-ESI-MS/MS), permitiu a identificação de sete compostos escopoletina (**29**), (epi)catequina (**30**), dímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2] (**31**), trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)→A→(1)2] (**32**), trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**33**), trímero de proantocianidina [duas (epi)catequina e uma (epi)galocatequina] (**34**) e tetrâmero de procianidina tipo A [(1)2→B→(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**35**). A FMGMa, após desrepliação por DI-ESI-MS/MS, permitiu a identificação de oito compostos: canferol-3-*O*-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**18**), **30**, **32**, **33**, **35**, ácido quínico (**36**), biochanina A (**37**) e dímeros isoméricos de procianidina B1 e/ou procianidina B2 (**38**). A fração metanol-água dos galhos não se mostrou promissora para identificação dos constituintes químicos dentro dos parâmetros utilizados na análise por DI-ESI-MS/MS no modo negativo. Todos os compostos estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Machaerium*, exceto o **4**, **5**, **18** e **35**. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da composição química dos galhos da espécie *M. acutifolium*.

Palavras-chave: Fabaceae, *Machaerium acutifolium*, flavonoides, isoflavonoides, DI-ESI-MS/MS

ABSTRACT

Machaerium acutifolium Vogel (Fabaceae-Papilionoideae), syn. *M. muticum* Benth, occurs in the Brazilian territory from the Amazon to São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia, Piauí and Maranhão, mainly in the cerrado area. This species is popularly known as “jacarandá do campo”, “jacarandá caroba” and “jacarandá bico de pato”. The branches of *M. acutifolium* were submitted to maceration with ethanol, providing the ethanol extract of the branches (EEGMa). The EEGMa was submitted to a silica gel filtering column, providing the hexane (FHGMa), chloroform (FCGMa), ethyl acetate (FAEGMa), methanolic (FMGMa) and methanol-water (FMAGMa) fractions. Fractionation of FHGMa and FCGMa provided squalene (**28**) and the mixture of steroids sitosterol (**4**) and stigmasterol (**5**), respectively. The FAEGMa, after dereplication by direct insertion in a mass spectrometer with an electrospray ionization source (DI-ESI-MS/MS), allowed the identification of seven compounds scopoletin (**29**), (epi)catechin (**30**), procyanidin dimer type A [(1)2→A→(1)2] (**31**), procyanidin trimer type A [(1)2→A→(1)→A→(1)2] (**32**), procyanidin trimer type A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**33**), proanthocyanidin trimer [two (epi)catechin and one (epi)gallocatechin] (**34**) and type procyanidin tetramer A [(1)2→B→(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**35**). FMGMa, after dereplication by DI-ESI-MS/MS, allowed the identification of eight compounds: kaempferol-3-*O*-rhamnosyl-(1→2)-[rhamnosyl-(1→6)]-hexosyl-7-*O*-rhamnoside (**18**), **30**, **32**, **33**, **35**, quinic acid (**36**), biochanin A (**37**) and isomeric dimers of procyanidin B1 and/or procyanidin B2 (**38**). The methanol-water fraction of the branches did not show promise for identifying the chemical constituents within the parameters used in the analysis by DI-ESI-MS/MS in negative mode. All compounds are being reported for the first time in the genus *Machaerium*, except for **4**, **5**, **18** and **35**. The results obtained contribute to the knowledge of the chemical composition of branches of the species *M. acutifolium*.

Keywords: Fabaceae, *Machaerium acutifolium*, flavonoids, isoflavonoids, DI-ESI-MS/MS

INTRODUÇÃO

A família Fabaceae é composta por espécie vegetais com ocorrência frequente de flavonoides, além de outros metabólitos secundários como alcaloides, terpenoides e esteroides. O gênero *Machaerium* (Fabaceae - Papilionoideae) é constituído por 262 espécies, entretanto, somente dezesseis apresentam estudo químico, sendo relatado a presença de flavonoides, alcaloides, triterpenoides, esteroides, cinamoilfenóis, derivados de ácidos graxos, entre outros (AMEN et al., 2015; CARVALHO et al., 2020; FERREIRA et al., 2019).

A espécie *Machaerium acutifolium* Vogel (sin. *M. muticum* Benth), no Brasil, ocorre da Amazônia até São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia, Piauí e Maranhão, principalmente em área de cerrado. Esta espécie é conhecida popularmente por jacarandá do campo, jacarandá caroba e jacarandá bico de pato (POLIDO; SARTORI, 2007; ROSA et al., 2014).

O estudo químico realizado com o extrato benzênico da madeira do tronco de *M. acutifolium* resultou no isolamento e identificação dos polifenóis éter monometil de pinsilvina, (+)-medicarpina e petroestireno (OLLIS et al., 1978). Em um estudo recente, realizado com tronco de *M. acutifolium* revelou que o extrato acetato de etila contém: um derivado de 3-árilcumarina, *trans*-estilbeno, indeno e dois flavonóides: (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-dihidro-3-(2'-hidroxi-3',4'-dimetoxifenil) e (3*R*)-2*H*-benzopiran-7-ol, 3,4-di-hidro-3-(2'-hidroxi-3', 4'-dimetoxifenil)-8-metoxi (MELO et al., 2021).

Considerando o potencial químico de plantas da família Fabaceae, em especial do gênero *Machaerium*, este estudo tem como objetivo isolar e/ou identificar constituintes químicos do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais e equipamentos

A obtenção dos extratos, coluna filtrante, cromatografia em coluna (CC) e em camada delgada (CCD) foram feitas com solventes de padrão analítico (PA) adquiridos da Synth. Nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizados solventes grau HPLC da J. T. Backer e água ultrapura (18 Ω) obtida em sistema Milli-Q Plus e em ultrapurificador Master All da Gehaka.

Os galhos foram moídos em moinho de facas da Marconi e o extrato, frações e subfrações concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida Laborota 4000 Heidolph e a água residual removida em liofilizador Modulyod Freeze Dryer da Thermo Electron Corporation. A dissolução do extrato e frações foi realizada com auxílio de banho de ultrassom modelo Q3.0/40 da Ultranique e conservados em refrigerador modelo Zyrium Frostfree 430 da Brastemp. As massas obtidas em balanças modelos KN 4000 da Digimed e AUY220 da Shimadzu.

O fracionamento cromatográfico em coluna foi feito usando gel de sílica (0,060-0,200 mm) da Acros Organics. As placas para cromatografia em camada delgada foram preparadas por aplicação manual da suspensão de gel de sílica 60 G (Fluka) em água destilada (1:2) sobre lâminas de vidro (9,5 x 5,9 cm) e a ativação foi realizada a 110 °C por 1h em estufa EL-1.3 da Odontobras.

As substâncias foram reveladas nas cromatoplasmas por nebulização com solução de sulfato cérico, preparada por dissolução de 2,1 g de sulfato cérico ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) da Vetec em 15 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) da Chemco e posteriormente diluído com 800 mL de água destilada, seguida de aquecimento em placa aquecedora 509T da Fisaton.

As amostras injetadas em HPLC-DAD foram submetidas a um pré-tratamento (*clean up*) em cartucho de extração em fase sólida (SPE) StrataTM C18-E (1000 mg/6 mL, 55 μm , 70 Å) da Phenomenex. O extrato e frações foram filtrados em membrana filtrante da Phenomenex (30 mm e poro 0,45 μm). As análises por HPLC analítico foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu® equipado com bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector de arranjo de fotodiodo SPD-M20A, forno para coluna CTO-20A, pré-coluna C18 Shim-pack 6-SIL, coluna C-18Shim-pack VP-ODS (250 x 4,6 mm, partícula de 5,0 μm).

Os espectros de massas foram adquiridos por inserção direta em espectrômetro de massas acoplado a fonte de ionização por *electrospray* (DI-ESI-MS/MS), AmaZon X, Bruker

Daltonics. O tratamento dos dados de massas foi realizado em software Compass 1.3 Data Analysis (versão 4.0, Bruker Daltonics).

2.2 Material Vegetal

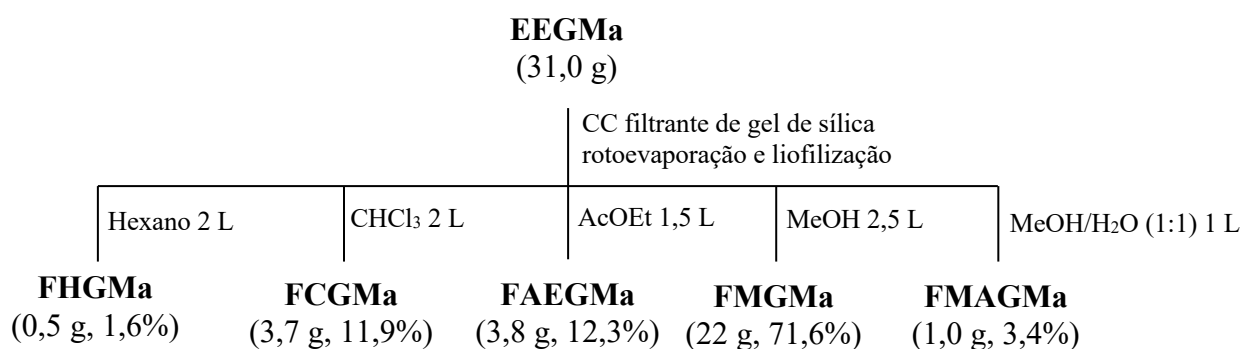
Os galhos de *M. acutifolium* foram coletados em março de 2017, no município de Jatobá do Piauí, nas coordenadas S 04° 51 006” e W 42° 05 057”, a 90 m de altitude. A espécie foi identificada pela bióloga Dra. Ruth Raquel Soares de Farias e a exsicata foi depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí-UFPI, na cidade de Teresina com o número de registro TEPB 31568 e cadastro de acesso SisGen nº AAB530D.

2.3 Preparação do extrato etanólico dos galhos

Os galhos foram secados à temperatura ambiente e moídos em moinho de facas, obtendo-se 2,0 kg. O material vegetal foi submetido à maceração exaustiva com etanol (95%). A solução do extrato foi concentrada em evaporador rotativo à pressão reduzida e a água residual removida por liofilização, fornecendo o extrato etanólico dos galhos (EEGMa, 41,7 g, 2,1%).

2.4 Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*

Uma alíquota do EEGMa (31 g) foi submetida à cromatografia em coluna filtrante de gel de sílica (33 x 5,5 cm; 148 g), utilizando diferentes eluentes, em ordem crescente de polaridade, fornecendo as frações hexânica (FHGMa, 0,5 g), clorofórmica (FCGMa, 3,7 g), acetato de etila (FAEGMa, 3,8 g), metanólica (FMGMa, 22 g) e metanol-água (FMAGMa, 1,0 g), conforme Esquema 1.



Esquema 1 - Fracionamento do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*.

Os perfis cromatográficos por CCD e HPLC-DAD do extrato etanólico e das frações acetato de etila (FAEGMa), metanólica (FMGMa) e metanol-água (FMAGMa) dos galhos de *M. acutifolium* são apresentados nas Figuras 1 e 2. O fracionamento do EEGMa concentrou os compostos de natureza isoprênica na fração clorofórmica, que são evidenciados pela presença de manchas roxas e alaranjadas na cromatoplaça, quando eluída com hexano/AcOEt (8:2) e revelada com solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (Figura 1). A mancha marrom presente no ponto de aplicação, mesmo após a eluição com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) sugerem a ocorrência de taninos na FMGMa, enquanto, as manchas amarelas intensas indicam que os compostos pertencem à classe dos flavonoides e estão presentes na FAEGMa.

Os perfis do EEGMa e FAEGMa obtidos por HPLC-DAD confirmam que os compostos da classe dos flavonoides foram concentrados nesta fração. A maioria dos picos cromatográficos destas amostras apresentaram tempos de retenção superiores a 30 min (Figura 2).

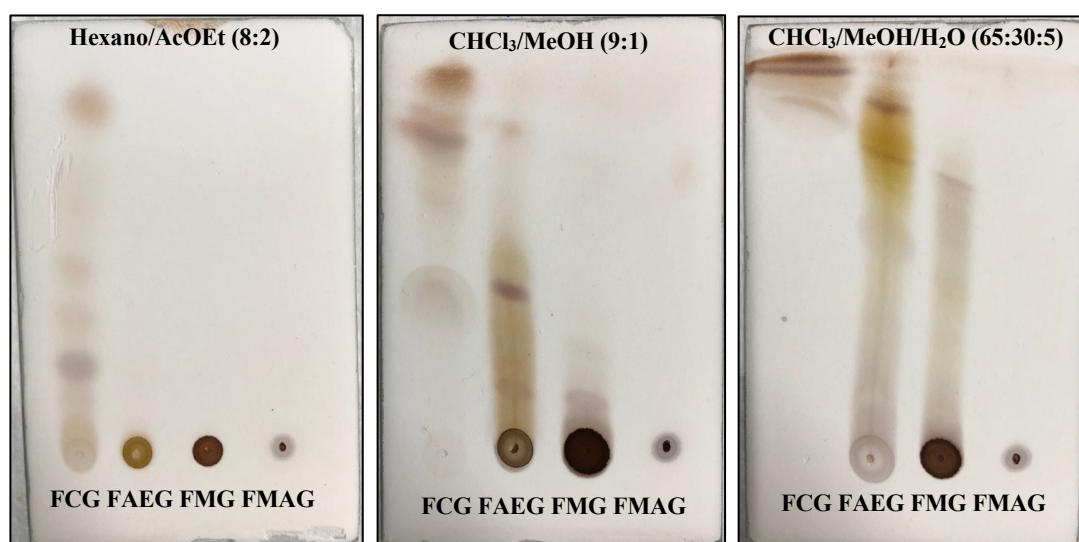


Figura 1 - Cromatoplaças das frações obtidas do fracionamento do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*. Revelador: solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$.

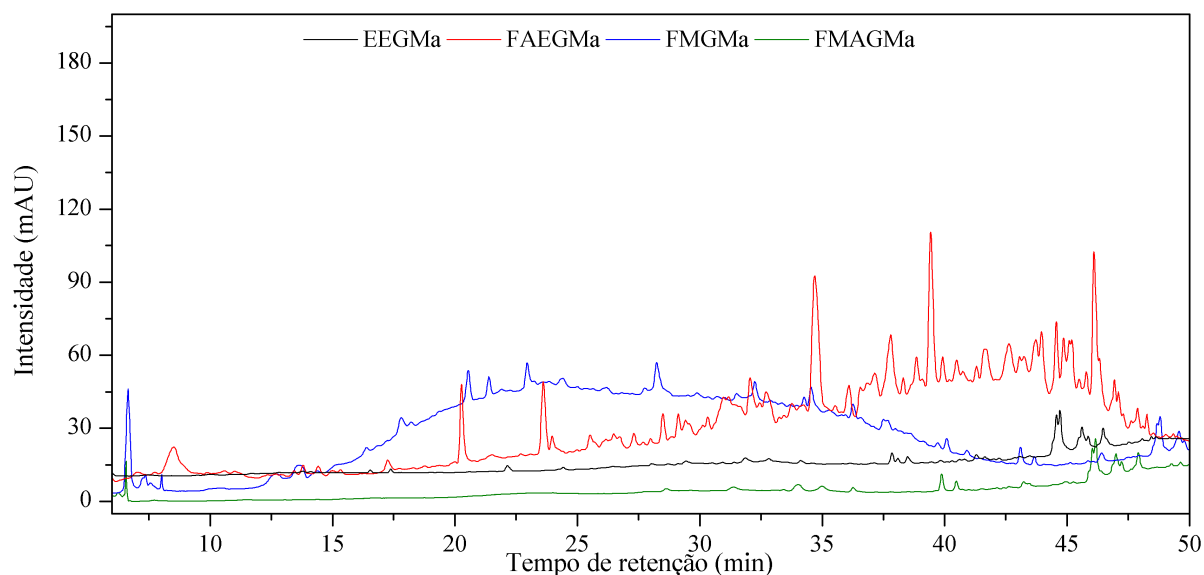


Figura 2 - Cromatogramas do extrato etanólico dos galhos (EEGMa) e das frações acetato de etila (FAEGMa), metanólica (FMGMa) e metanol-água (FMAGMa). Fase Móvel: MeOH/H₂O (0,2%), gradiente: 0-40 min (5-100% MeOH), 40-50 min (100% MeOH), vazão 1,0 mL min⁻¹ e $\lambda = 254$ nm. Coluna C-18 (250 x 4,6 mm, partícula de 5,0 μ m).

2.5 Fracionamento cromatográfico da fração hexânica dos galhos de *M. acutifolium*

A FHGMa (500 mg) foi submetida a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 com hexano/CH₂Cl₂ (1:4) fornecendo 25 subfrações, que foram analisadas por CCD e reunidas em 4 grupos: FHG-4 (252,7 mg), FHG-13 (62,7 mg), FHG-15 (15,7 mg) e FHG-19 (1,4 mg). A cromatoplaça do grupo FHG-4, utilizando como eluente hexano (100%) e solução de Ce(SO₄)₂ como revelador, apresentou uma única mancha de coloração alaranjada que com a continuação do aquecimento muda para roxo. A comparação com padrão autêntico permitiu identificar este composto como sendo o **29**.

2.6 Fracionamento cromatográfico da fração clorofórmica dos galhos de *M. acutifolium*

A FCGMa (3,7 g) foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica (40 x 2,8 cm; 90 g) utilizando como eluentes hexano e AcOEt, em ordem crescente de polaridade, fornecendo 87 subfrações. As subfrações obtidas foram analisadas por CCD e reunidas em 12 grupos, com base na coloração e fatores de retenção das manchas observadas nas cromatoplaças (Tabela 1). Os grupos FCG-12, FCG-23, FCG-28, FCG-54, FCG-59 e FCG-62 foram selecionados para dar prosseguimento ao fracionamento, por apresentaram em suas cromatoplaças manchas alaranjadas, amarelas, roxas e azuis indicativas de compostos de origem isoprênica.

Tabela 1 - Grupos obtidos do fracionamento em coluna de gel de sílica da FCGMa.

Grupo	Subfrações	Eluentes	Massa (mg)
FCG-1	1-11	Hexano	23,2
FCG-12	12-13	Hexano/AcOEt (98:2)	413,0
FCG-14	14-22	Hexano/AcOEt (98:2)	526,2
FCG-23	23	Hexano/AcOEt (95:5)	154,9
FCG-24	24-27	Hexano/AcOEt (95:5)	298,5
FCG-28	28-34	Hexano/AcOEt (9:1)	600,0
FCG-35	35-53	Hexano/AcOEt (9:1)	339,1
FCG-54	54-58	Hexano/AcOEt (8:2)	200,9
FCG-59	59-61	Hexano/AcOEt (7:3)	212,1
FCG-62	62-66	Hexano/AcOEt (7:3)	231,3
FCG-67	67-85	Hexano/AcOEt (6:4)	229,0
FCG-86	86-87	AcOEt 100%	97,5

2.6.1 Fracionamento cromatográfico do grupo FCG-28

O grupo FCG-28 (600 mg) foi submetido a cromatografia em Sephadex LH-20 com eluição em hexano/CH₂Cl₂ (1:4), fornecendo o subgrupo FCG-28-8 (108,8 mg). O subgrupo FCG-28-8 (108,8 mg) quando analisado em CCD, utilizando hexano/AcOEt (8:2) e revelado com solução de Ce(SO₄)₂, apresentou uma mancha de coloração azul que muda para roxo com a continuação do aquecimento. Para este subgrupo sugeriu-se a presença da mistura de esteroides (4 e 5) por comparação em CCD com o padrão autêntico (CARVALHO et al., 2019).

2.7 Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila dos galhos de *M. acutifolium*

Uma alíquota de 200 mg da fração acetato de etila dos galhos (FAEGMa), foi aplicada em cartucho de extração de fase sólida, C18-E (SPE, 10 g/60 mL, 55 µm, 70 Å) da Phenomenex, previamente equilibrado com H₂O e eluído sucessivamente com MeOH/H₂O (1:1) (50 mL), MeOH (50 mL) e CHCl₃ (50 mL), fornecendo as subfrações MeOH/H₂O (1:1), MeOH e CHCl₃. O solvente orgânico foi retirado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e a água removida por liofilização (Tabela 2).

Tabela 2 - Rendimento da extração em fase sólida (C-18) da fração acetato de etila dos galhos de *M. acutifolium*.

Amostra	Massa (mg)	Rendimento (%)
MeOH/H ₂ O (1:1)	82,9	41,4
MeOH	68,5	34,2
CHCl ₃	33,6	16,8

2.7.1 Análise das subfrações da fração acetato de etila dos galhos por HPLC-DAD

A análise por HPLC-DAD no comprimento de onda em 254 nm mostrou os cromatogramas das subfrações com perfis distintos, sendo observado um maior número de picos cromatográficos na subfração MeOH/H₂O (1:1) (Figura 3).

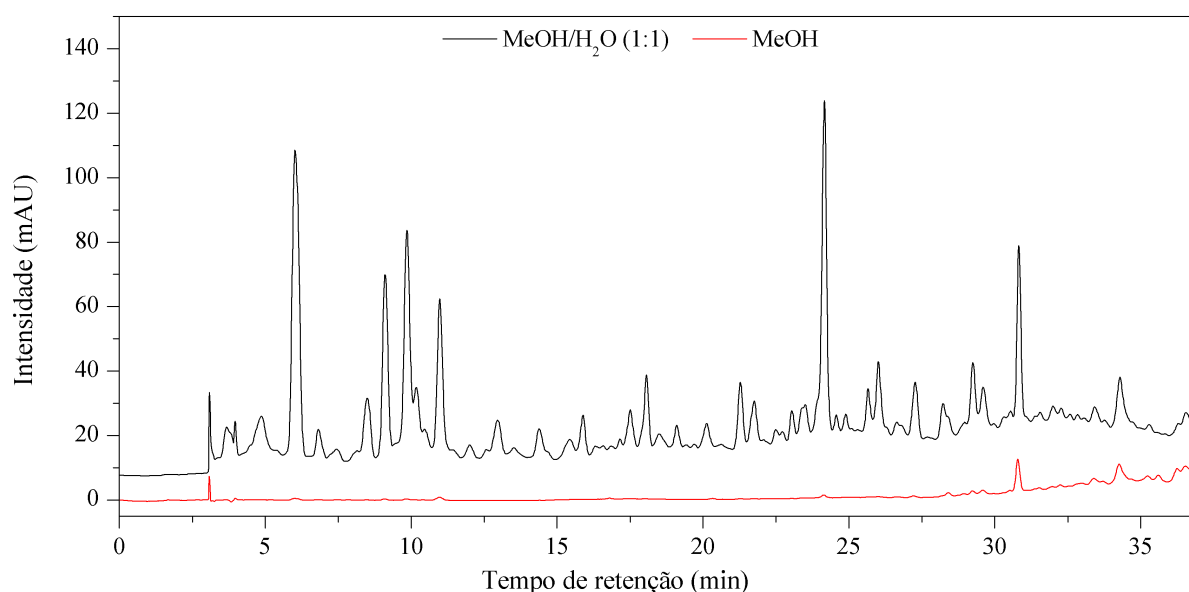


Figura 3 - Cromatograma das subfrações MeOH/H₂O (1:1) e MeOH obtidas por C-18 da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*. Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 26-30 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-38 min, 100%, 38-41 min, 100-30% MeOH, 41-46 min, 30%, vazão 1,0 mL min⁻¹, coluna C-18 (250 x 4,6 mm, partícula de 5,0 μm) e λ=254 nm.

2.7.2 Análise das subfrações da fração acetato de etila dos galhos por DI-ESI-MS/MS

As subfrações MeOH/H₂O (1:1) e MeOH obtidas por extração em fase sólida (SPE, C-18) da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium* foram

dissolvidas em metanol, na concentração de 50 ppm e filtradas em membrana de nylon (Chromafil® Xtra, diâmetro de 47 mm e poro de 0,22 μm).

As condições utilizadas para a análise de DI-ESI-MS/MS da subfração MeOH/H₂O (1:1) foram: fonte de ionização ESI no modo íon negativo, [ESI(-)], faixa de m/z 100-1500 Da, fluxo da seringa 3,0 $\mu\text{L min}^{-1}$, voltagem do capilar 4,5 kV, fluxo do gás de secagem (N₂) 8,0 L min^{-1} , pressão de nebulização 12,0 psi e temperatura da fonte 300 °C. A análise da subfração MeOH foi realizada nas mesmas condições da subfração MeOH/H₂O (1:1), exceto o fluxo da seringa (5,0 $\mu\text{L min}^{-1}$), voltagem do capilar (5,0 Kv) e fluxo do gás de secagem (N₂) (5,0 L min^{-1}).

Para as análises em MS/MS, os parâmetros energia de colisão, amplitude do sinal, tempo de aquisição de dados e radiofrequência foram ajustados para cada sinal, a fim de obter informações estruturais máximas a partir do íon precursor. Esta análise permitiu identificar 7 compostos **29-35**.

2.8 Fracionamento cromatográfico da fração metanólica dos galhos de *M. acutifolium*

Uma alíquota de 200 mg da fração metanólica dos galhos (FMG_{Ma}), foi aplicada em cartucho de extração em fase sólida, C18 (SPE, 10 g/60 mL, 55 μm , 70 Å), previamente equilibrado com H₂O e eluído sucessivamente com H₂O (50 mL), MeOH/H₂O (1:1) (50 mL), MeOH (50 mL) e CHCl₃ (50 mL), fornecendo as subfrações H₂O, MeOH/H₂O (1:1), MeOH e CHCl₃. O solvente orgânico foi retirado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e a água removida por liofilização (Tabela 3).

Tabela 3 - Rendimento da extração em fase sólida (C-18) da fração metanólica dos galhos (FMG) de *M. acutifolium*.

Amostra	Massa (mg)	Rendimento (%)
H ₂ O	80	40
MeOH/H ₂ O (1:1)	97,5	47,75
MeOH	10	5
CHCl ₃	3	1,5

2.8.1 Análise das subfrações da fração metanólica dos galhos por HPLC-DAD

As subfrações H₂O, MeOH/H₂O (1:1) e MeOH foram filtradas em membrana filtrante (30 mm e poro 0,45 µm) e tiveram seus perfis obtido em HPLC-DAD. A análise no comprimento de onda em 254 nm mostrou os cromatogramas das subfrações com perfis distintos, com maior número de bandas na subfração MeOH/H₂O (1:1) (Figura 4).

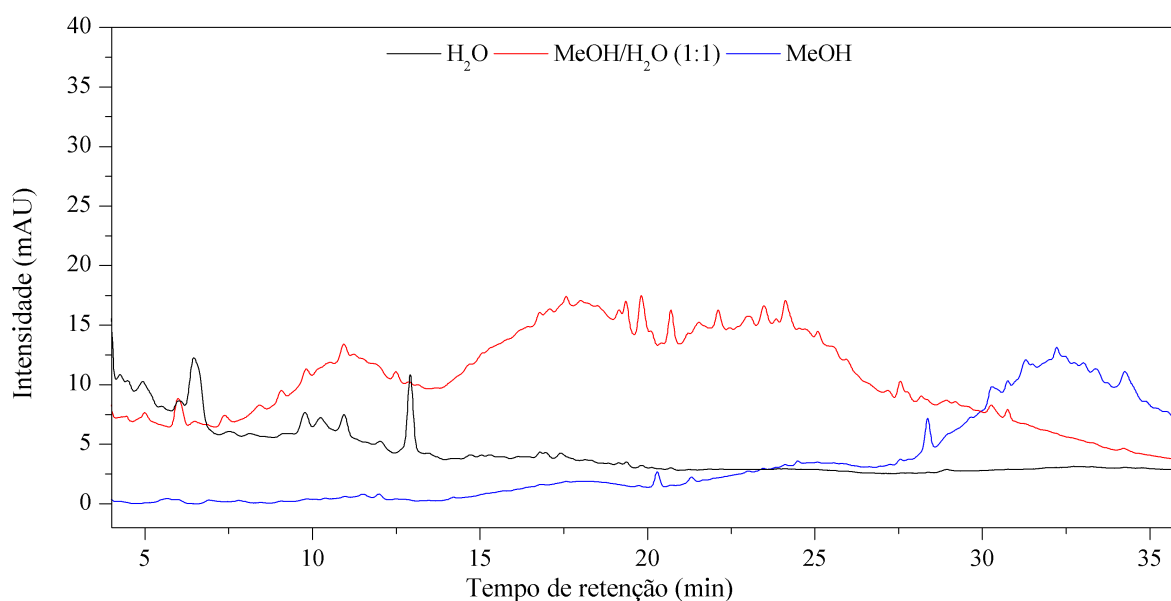


Figura 4 - Cromatograma das subfrações H₂O, MeOH/H₂O (1:1) e MeOH obtidas por C-18 da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *M. acutifolium*. Fase móvel: MeOH/H₂O-AcOH (0,2%), gradiente: 0-5 min, 30-40% MeOH; 5-7 min, 40% MeOH; 7-12 min, 40-50% MeOH; 12-14 min, 50%; 26-30 min, 50-60% MeOH; 19-21 min, 60%; 21-26 min, 60-70% MeOH; 26-30 min, 70%; 30-33 min, 70-100% MeOH; 33-38 min, 100%, 38-41 min, 100-30% MeOH, 41-46 min, 30%, vazão 1,0 mL min⁻¹, coluna C-18 (250 x 4,6 mm, partícula de 5,0 µm) e λ=254 nm.

2.8.2 Análise das subfrações da fração metanólica dos galhos por DI-ESI-MS/MS

As subfrações H₂O, MeOH/H₂O (1:1) e MeOH, obtidas por extração em fase sólida (SPE, C-18) da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos, foram dissolvidas em metanol, na concentração de 50 ppm e filtradas em membrana de nylon (Chromafil® Xtra, diâmetro de 47 mm e poro de 0,22 µm).

As condições utilizadas para a análise de DI-ESI-MS/MS da subfração H₂O foram: fonte de ionização ESI no modo íon negativo, [ESI(-)], faixa de m/z 100-1500 Da, fluxo da seringa 5,0 µL min⁻¹, voltagem do capilar 4,0 kV, fluxo do gás de secagem (N₂) 5,0 L min⁻¹, pressão de nebulização 10,0 psi e temperatura da fonte 250 °C. A análise das subfrações MeOH/H₂O

(1:1) e MeOH foram realizadas nas mesmas condições da subfração H₂O, exceto voltagem do capilar (5,0 kV) e pressão de nebulização (20,0 psi).

Para as análises em MS/MS, os parâmetros energia de colisão, amplitude do sinal, tempo de aquisição de dados e radiofrequência foram ajustados para cada sinal, a fim de obter informações estruturais máximas a partir do íon precursor. Esta análise permitiu identificar 8 compostos: **18, 30, 32, 33 e 35-38**.

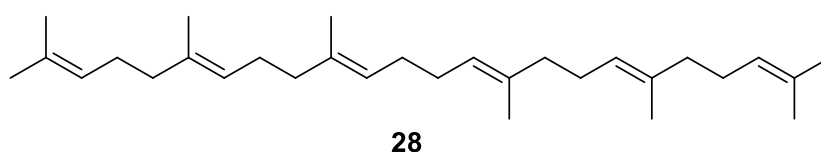
2.9 Análise da fração metanol-água dos galhos de *M. acutifolium*

A fração metanol-água (FMAGMa) não se mostrou promissora para o prosseguimento do fracionamento, conforme observado na análise por CCD (Figura 1) e no perfil por HPLC-DAD (Figura 2).

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Identificação dos constituintes químicos da fração hexânica da coluna filtrante do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*

3.1.1 Identificação estrutural do composto 29



O composto **28** foi identificado como o esqualeno em cromatografia em camada delgada (CCD) e comparação com padrão autêntico (Figura 5) (SANTOS, 2016). Este é primeiro relato do esqualeno no gênero *Machaerium*.

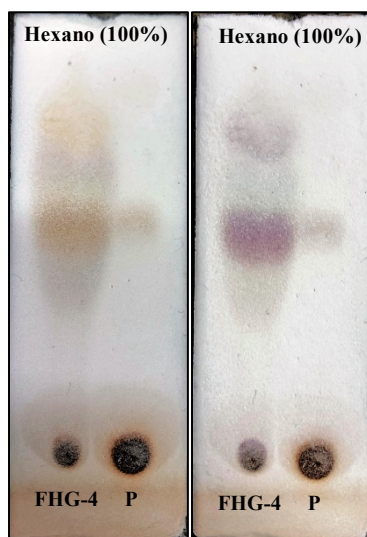
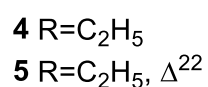
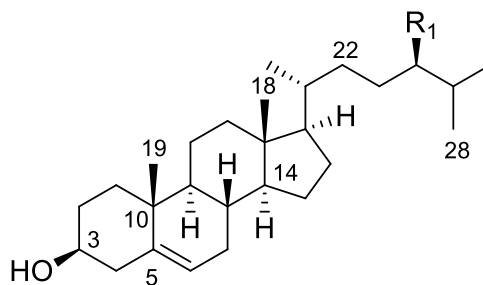


Figura 5 - Cromatoplaça do grupo FHG-4 e o padrão esqualeno (P). Revelador: solução de $Ce(SO_4)_2$.

3.2 Identificação dos constituintes químicos da fração clorofórmio da coluna filtrante do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*

3.2.1 Identificação estrutural da mistura de esteroides



A mistura dos compostos **4** e **5** foi identificada como sitosterol (**4**) e estigmasterol (**5**) em análise por CCD e comparação com padrão autêntico (Figura 6) (SANTOS, 2016). Esta mistura de esteroides foi isolada e identificada na fração hexânica das folhas de *M. acutifolium*.

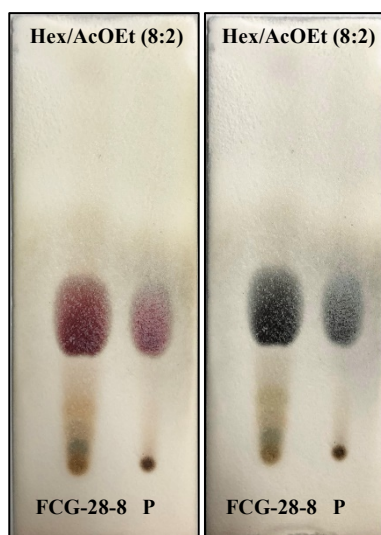


Figura 6 - Cromatoplaça do grupo FCG-28-8 (**4** e **5**) e o padrão autêntico da mistura de esteroides sitosterol e estigmasterol (P). Revelador: solução de Ce(SO₄)₂.

3.3 Identificação dos constituintes químicos da fração acetato de etila da coluna filtrante do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*

3.3.1 Identificação dos constituintes químicos da subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração acetato de etila por DI-ESI-MS/MS

A subfração MeOH/H₂O (1:1), oriunda da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos, após análise por inserção direta em espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (DI-ESI-MS/MS) no modo negativo, apresentou *fingerprint*, conforme Figura 7. As fragmentações subsequentes MS/MS resultaram na identificação dos compostos escopoletina (**29**), (epi)catequina (**30**), dímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2] (**31**), trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)→A→(1)2] (**32**), trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**33**), trímero de proantocianidina (duas ligações do tipo A, com uma (epi)galocatequina) (**34**) e tetrâmero de procianidina tipo A [(1)2→B→(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**35**) (Tabela 4 e Figuras 8). Este é primeiro relato dos compostos **29-35** no gênero *Machaerium*.

Tabela 4 - Identificação de compostos subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração acetato de etila dos galhos.

Compostos	Molecular Formula	[M-H] ⁻	MS ⁿ	Ref.
escopoletina (29)	C ₁₀ H ₈ O ₄	191	MS ² [191]: 175,9 (100)	Ng; Lafontaine; Vanier, 2004
(epi)catequina (30)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	289	MS ² [289]: 202,9 (12); 204,8 (24); 244,9 (95)	Sarnoski et al., 2012
dímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2] (31)	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	575	MS ² [575]: 284,9 (33); 289 (30); 406,9 (16); 423 (100); 449 (43)	Sarnoski et al., 2012
trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)→A→(1)2] (32)	C ₄₅ H ₃₄ O ₁₈	861	MS ² [861]: 693,1 (29); 709,1 (20); 735 (100) MS ³ [735]: 446,9 (3); 567,1 (100); 610 (16)	Sarnoski et al., 2012
trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (33)	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	863	MS ² [863]: 410,9 (53); 451 (23); 573 (16); 693 (42); 711 (100)	Sarnoski et al., 2012
trímero de proantocianidina (duas ligações do tipo A, com uma (epi)galocatequina) (34)	C ₄₅ H ₃₄ O ₁₉	877	MS ² [877]: 331,2 (7); 572,9 (19); 575 (5); 707,1 (49); 725,1 (100); 741,1 (46)	Sarnoski et al., 2012
tetrâmero de procianidina tipo A [(1)2→B→(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (35)	C ₄₄ H ₃₆ O ₁₇	1151	MS ² [1151]: 572,9 (22); 863,1 (100); 999,2 (61); 1024,9 (39)	Sarnoski et al., 2012

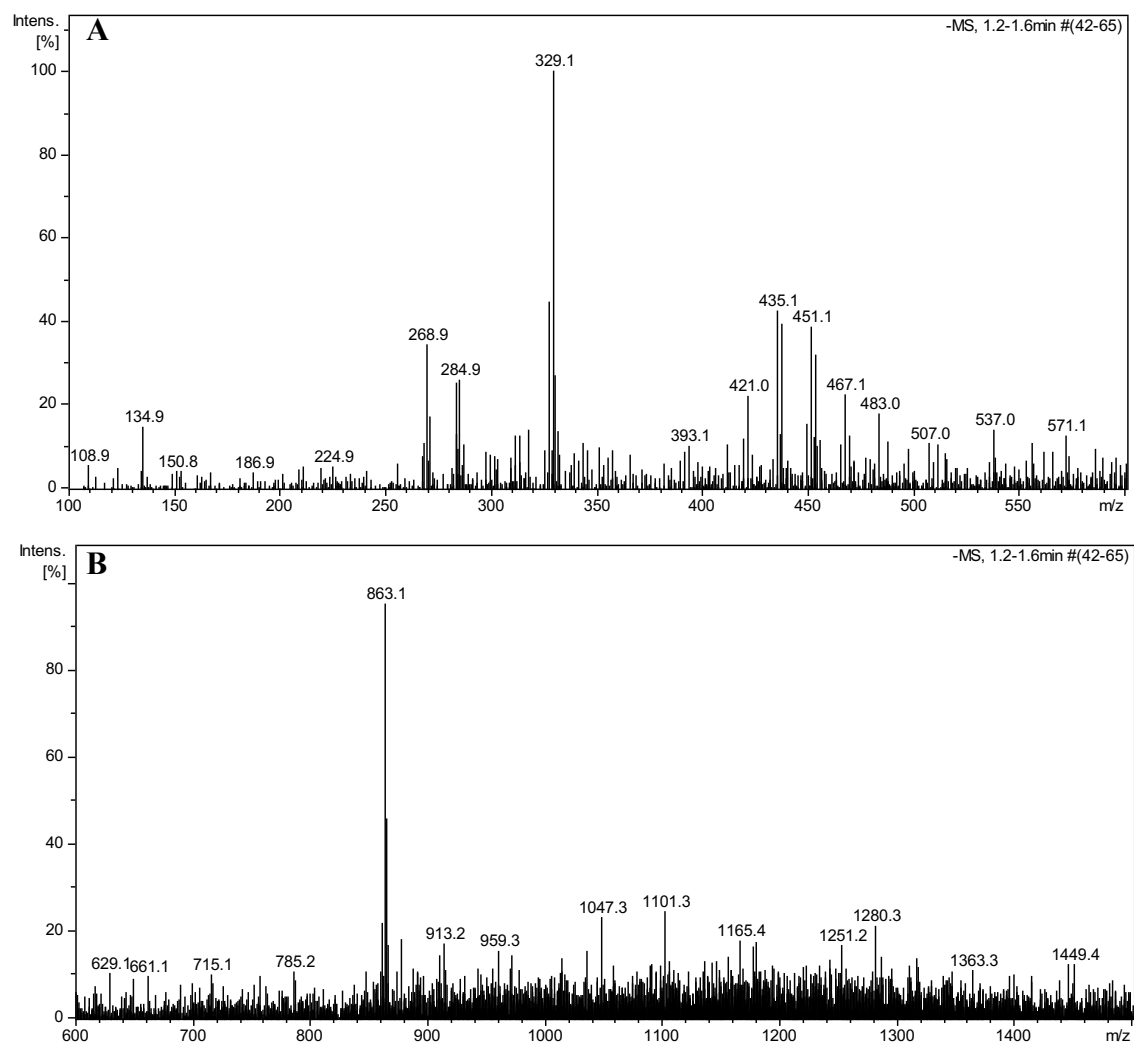


Figura 7 - *Fingerprint* da subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos obtido por DI-ESI-MS/MS no modo negativo. Expansão: *m/z* 100-600 (A) e *m/z* 600-1500 (B).

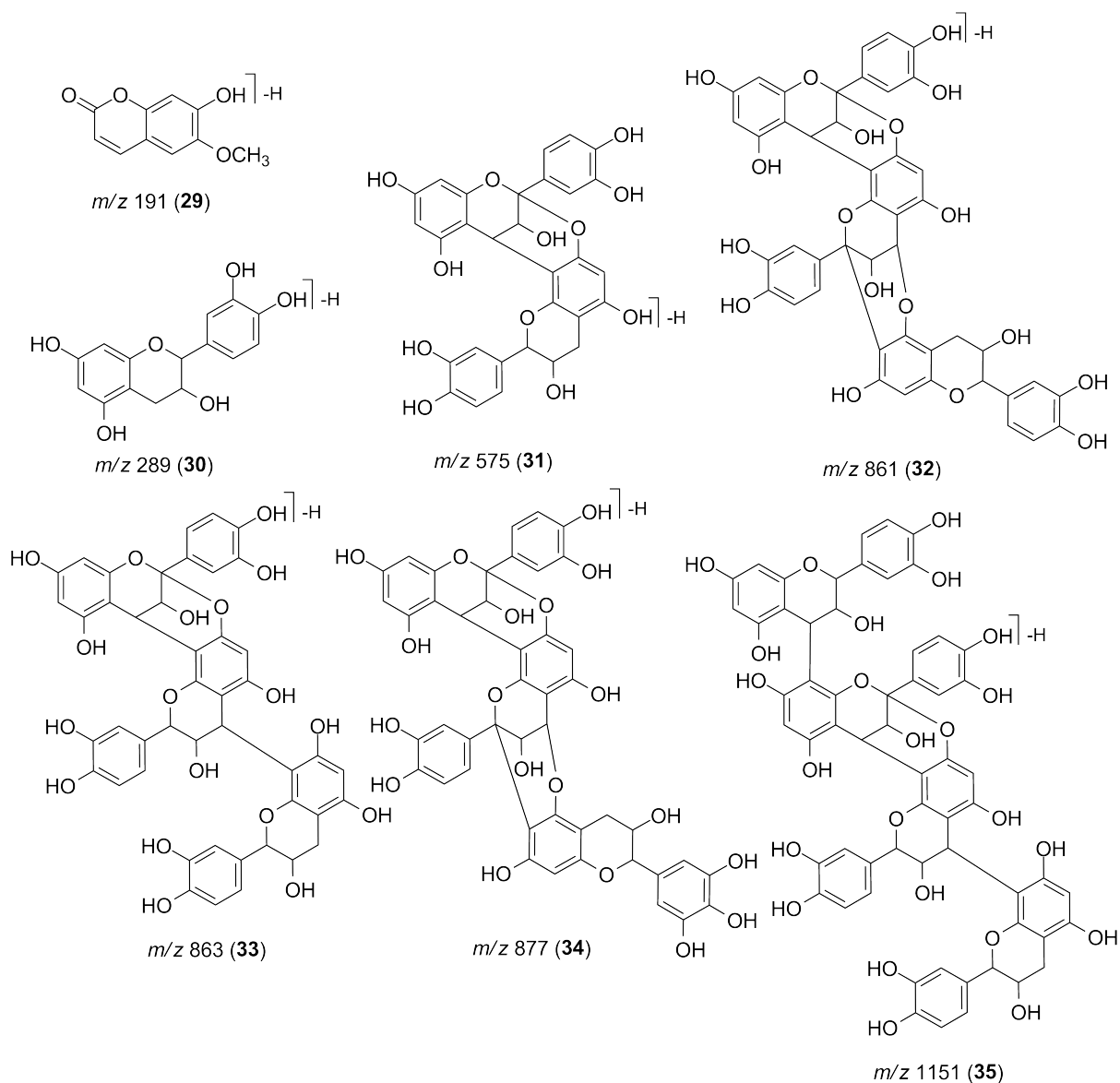


Figura 8 - Constituintes químicos identificados da subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos.

O espectro de MS² do íon precursor m/z 191 [M-H]⁻ (Figura 9) apresentou o íon fragmento m/z 176 [M-H-15]⁻ decorrente da perda de uma metila, sugerindo tratar-se da escopoletina (**29**) (NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004). A escopoletina possui atividades anti-inflamatória, antioxidante, antiúlcera, anti-HIV e entre outras (LEITE, 2012).

O espectro MS² do m/z 289 [M-H]⁻ (Figura 10) mostrou a presença dos íons fragmentos m/z 245, referente a perda de CO₂, 205 e 203 característicos de clivagem do anel A de flavan-3-ol. Esta fragmentação é característica da (epi)catequina (**30**) (ROCKENBACH et al., 2012; SARNOSKI et al., 2012).

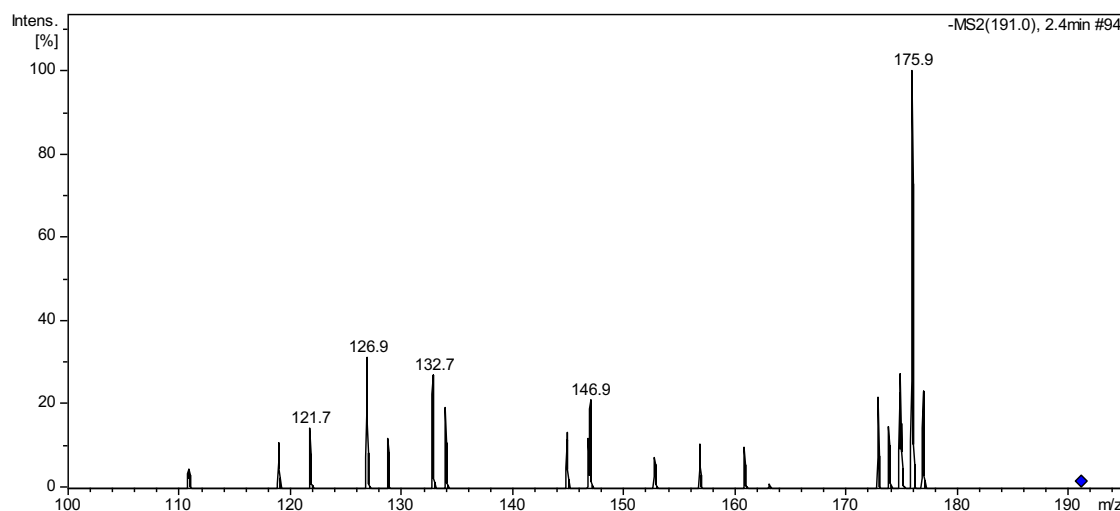


Figura 9 - Espectros de massas MS² do íon m/z 191 referente a escopoletina (29).

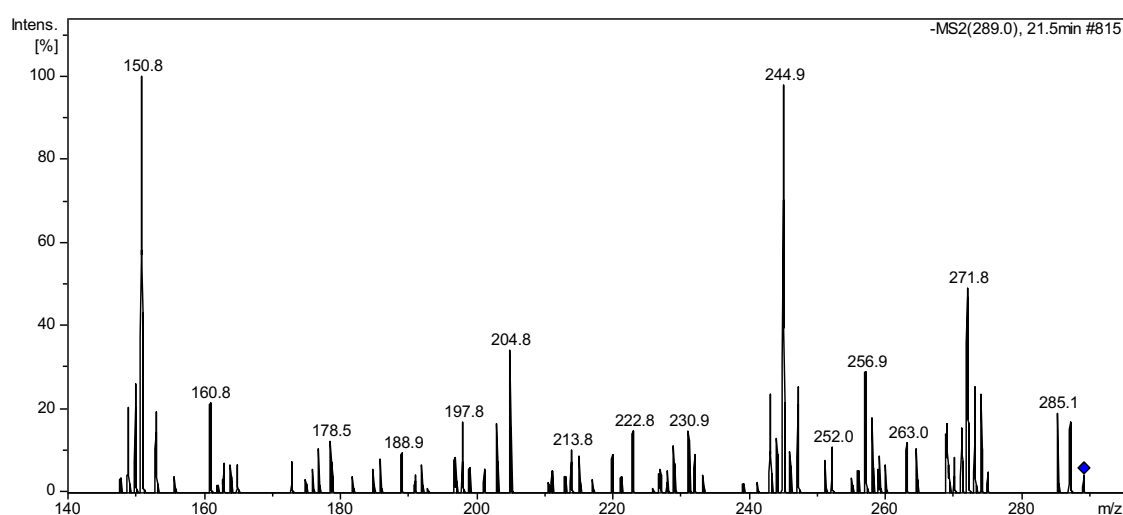


Figura 10 - Espectros de massas MS² do íon m/z 289 referente a (epi)catequina (30).

O espectro MS² do m/z 575 [M-H]⁻ (Figura 11) mostrou a presença dos fragmentos m/z 285, 289, 407, 423 e 449 característicos de procianidina tipo A, identificada como o dímero de (epi)catequina [(epi)catequina→A→(epi)catequina [(1)2→A→(1)2] (31) (SARNOSKI et al., 2012; ZHANG; ZHU, 2015).

O espectro MS² do m/z 861 [M-H]⁻ (Figura 12A) mostrou o íon fragmento principal m/z 735 característicos da quebra do anel heterocíclico, juntamente com m/z 709 e 693. O MS³ do m/z 735 mostrou os íons fragmentos m/z 609, 567 e 447 (Figura 12B) sugerindo trata-se de procianidina tipo A, identificada como o trímero [(epi)catequina→A→(epi)catequina→A→(epi)catequina] (32) (SARNOSKI et al., 2012; ZHANG; ZHU, 2015).

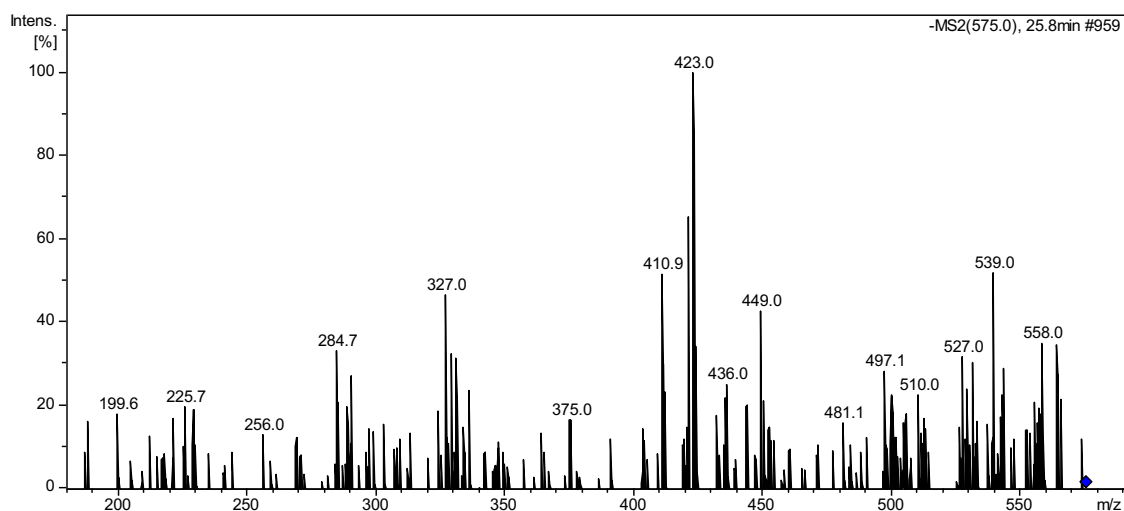


Figura 11 - Espectros de massas MS² do íon m/z 575 referente ao dímero de procianidina tipo A, (epi)catequina→A→(epi)catequina [(1)2→A→(1)2] (**31**)

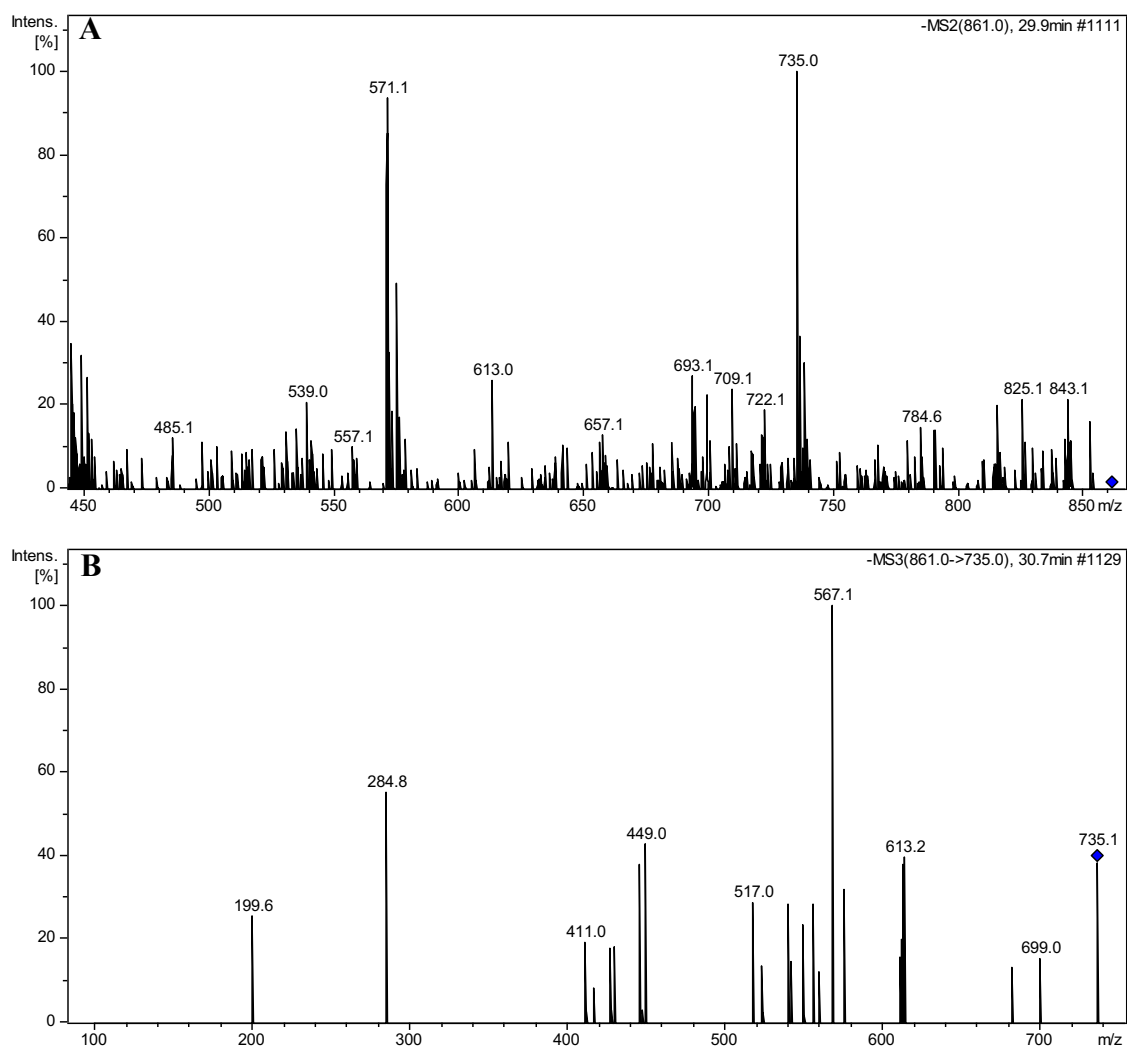


Figura 12 - Espectros de massas MS² do íon m/z 861 (**A**) e MS³ do íon m/z 735 (**B**) referente a trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)→A→(1)2] (**32**).

O espectro MS² do m/z 863 [M-H]⁻ (Figura 13) mostrou a presença dos íons fragmentos m/z 711, 693, 573, 451 e 411 característicos de procianidina tipo A, identificado como o trímero de (epi)catequina [(epi)catequina→A→(epi)catequina→B→(epi)catequina [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**33**) (SARNOSKI et al., 2012; ZHANG; ZHU, 2015).

O espectro MS² do m/z 877 [M-H]⁻ (Figura 14) mostrou a presença dos íons fragmentos m/z 741, 725, 707, 573, 575 e 331, característicos de proantocianidina do tipo A, identificada como o trímero formado a partir de duas unidades de (epi)catequina e uma unidade de (epi)galocatequina (**34**) (SARNOSKI et al., 2012; ZHANG; ZHU, 2015).

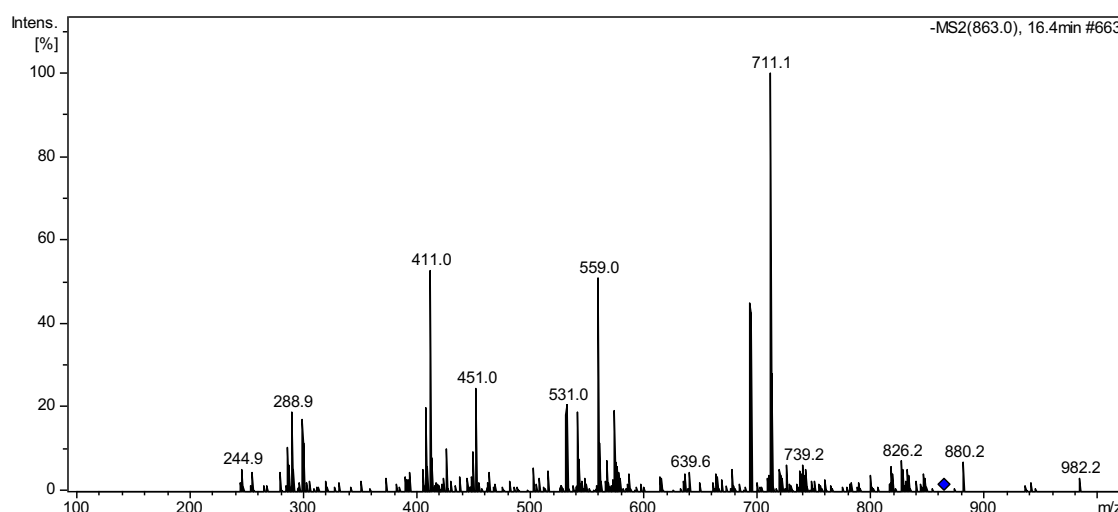


Figura 13 - Espectros de massas MS² do íon m/z 863 referente ao trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**33**).

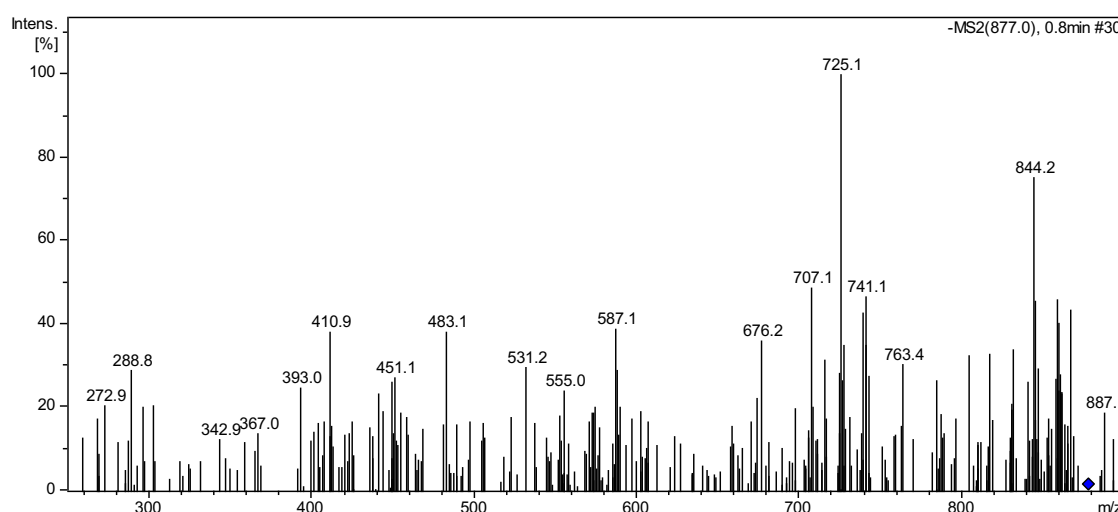


Figura 14 - Espectros de massas MS² do íon m/z 877 referente ao trímero de proantocianidina tipo A, com uma (epi)galocatequina (**34**).

O espectro MS² do m/z 1151 [M-H]⁻ (Figura 15) mostrou a presença dos íons fragmentos m/z 1025, 999, 863 e 573, característico de procianidina tipo A, identificada como tetrâmero de (epi)catequina [(epi)catequina→B→(epi)catequina→A→(epi)catequina→B→(epi)catequina] (**35**) (SARNOSKI et al., 2012; ZHANG; ZHU, 2015). O composto **35** foi isolado anteriormente no extrato etanólico das cascas do caule de *M. floribundum* (WAAGE; HEDIN; GRIMLEY, 1984).

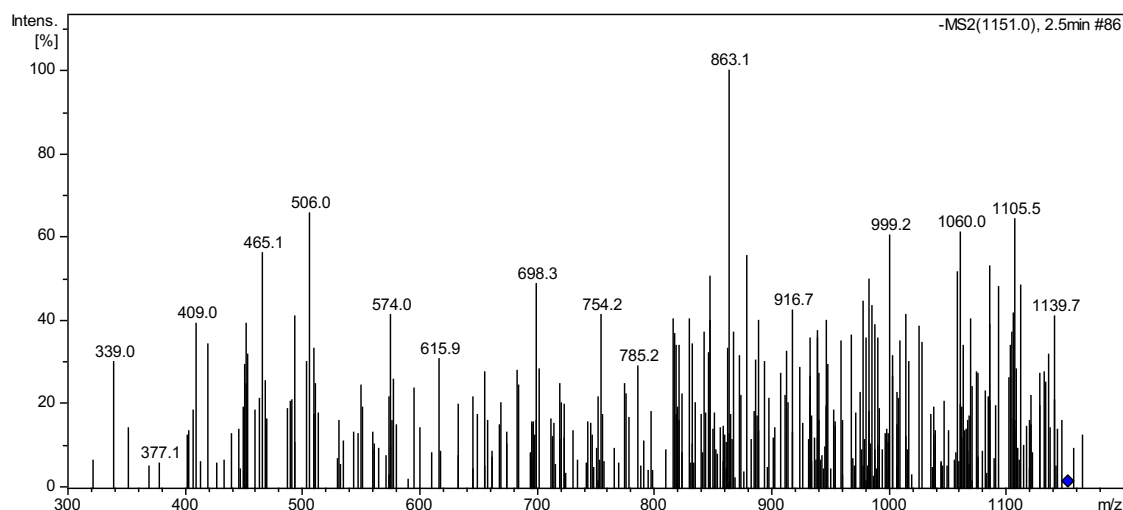


Figura 15 - Espectros de massas MS² do íon m/z 1151 referente ao tetrâmero de procianidina tipo A [(epi)catequina→B→(epi)catequina→A→(epi)catequina→B→(epi)catequina] (**35**)

3.3.2 Análise da subfração MeOH da fração acetato de etila por DI-ESI-MS/MS

A subfração MeOH, oriunda fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS no modo negativo, apresentou *fingerprint* conforme Figura 16. Esta análise mostrou picos característicos de contaminantes, corroborando a análise por HPLC-DAD (Figura 3).

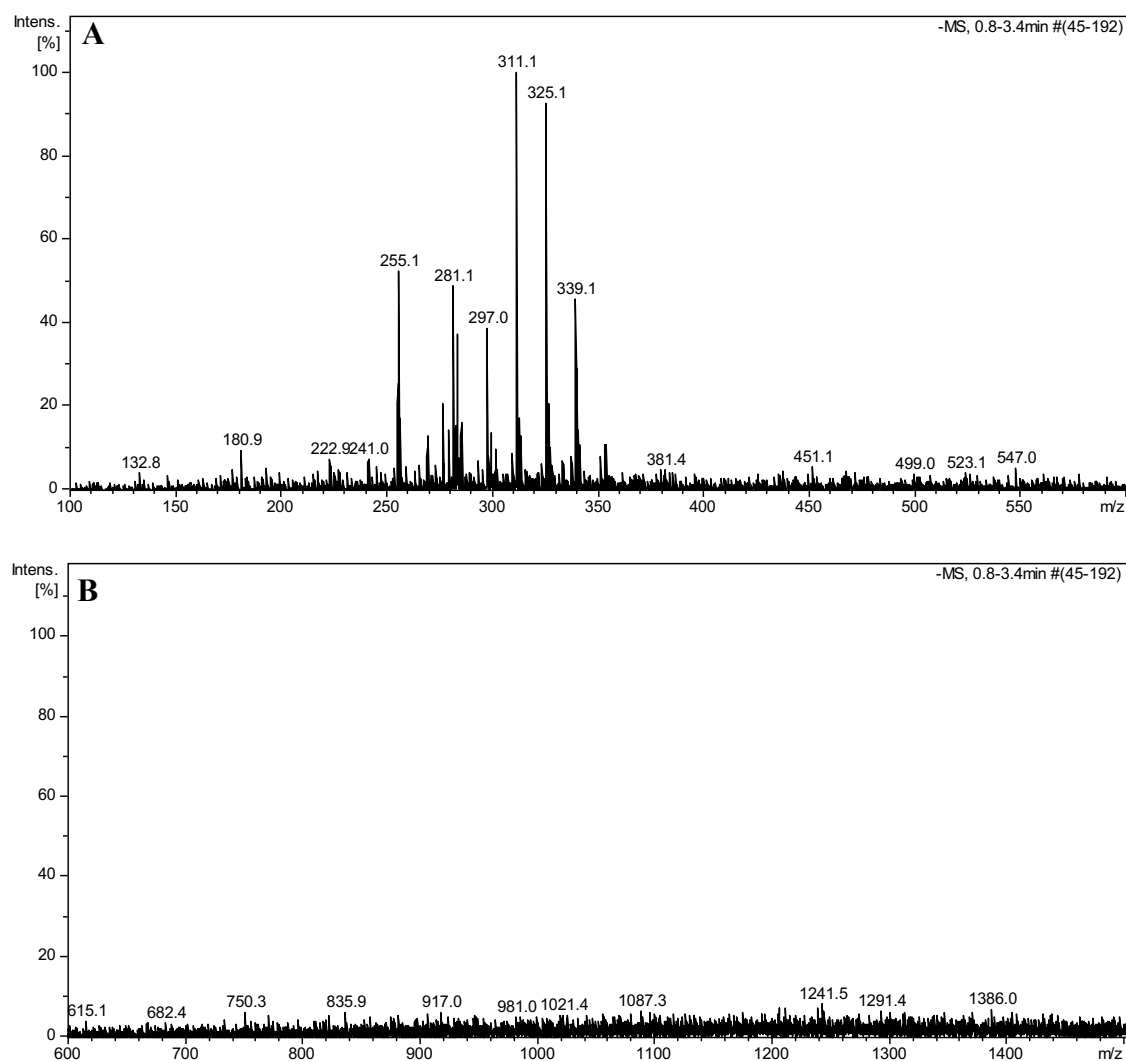


Figura 16 - *Fingerprint* da subfração metanólica da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos obtido por DI-ESI-MS/MS no modo negativo. Expansão: m/z 100-600 (A) e m/z 600-1500 (B).

4.4. Identificação de constituintes químicos da fração metanólica da coluna filtrante do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*

4.4.1 Identificação de constituintes químicos da subfração H₂O da fração metanólica por DI-ESI-MS/MS

A subfração H₂O, oriunda fração metanólica do extrato etanólico dos galhos, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, no modo negativo, apresentou um *fingerprint* conforme Figura 19. As fragmentações subsequentes MS/MS, permitiram a identificação dos compostos canferol-3-*O*-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**18**), trímico de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**33**), ácido quínico (**36**) e biochanina A (**37**) (Tabela 5 e Figuras 17 e 18). O composto **18** foi relatado nas frações acetato de etila e aquosa da partição do extrato etanólico das folhas e o **33** foi identificado na subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos. Este é primeiro relato dos compostos **18**, **33** e **36-37** no gênero *Machaerium*.

Tabela 5 - Identificação dos compostos da subfração H₂O da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos.

Compostos	Molecular Formula	[M-H] ⁻	MS ⁿ	Ref.
ácido quínico (36)	C ₇ H ₁₂ O ₆	191	MS ² [191]: 108,8 (25); 126,8 (79); 170,8 (22); 172,8 (100)	Fathoni et al., 2017
biochanina A (37)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	283	MS ² [283]: 134,8 (9); 194,7 (4); 223,9 (50); 238,9 (22); 267,8 (100)	Roriz et al., 2007
trímico de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (33)	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	863	MS ² [863]: 411 (64); 451,1 (22); 573,1 (19); 711,1 (100)	Sarnoski et al., 2012
canferol-3- <i>O</i> -ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7- <i>O</i> -ramnosídeo (18)	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₃	885	MS ² [885]: 431,0 (4); 739,2 (100) MS ³ [739]: 285 (71); 575,1 (72); 592 (21)	Bresciani et al., 2015

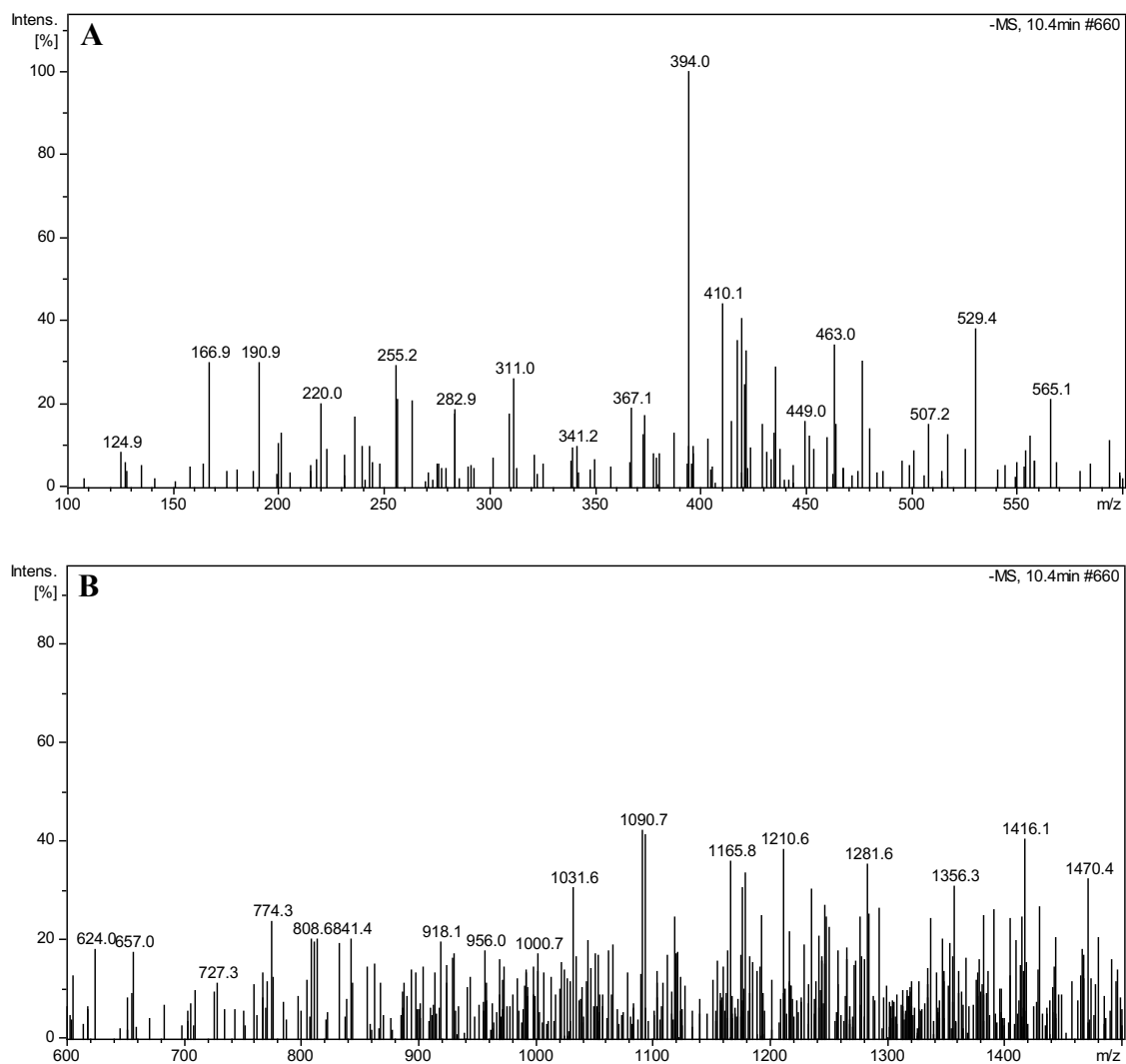


Figura 17 - *Fingerprint* da subfração H₂O da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos obtido por DI-ESI-MS/MS no modo negativo. Expansão: *m/z* 100-600 (A) e *m/z* 600-1500 (B).

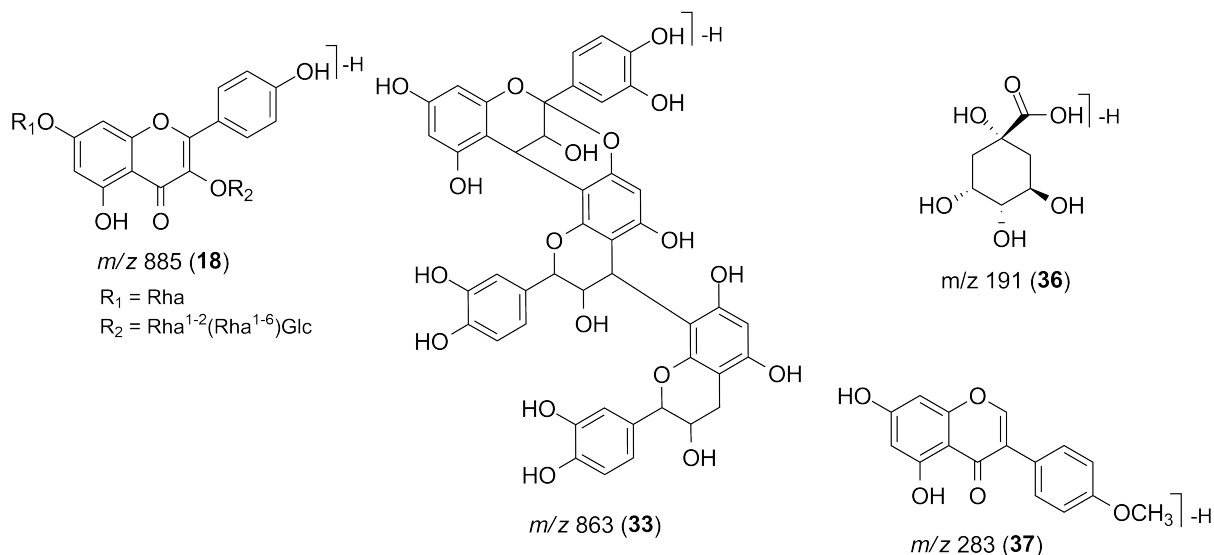


Figura 18 - Constituintes químicos identificados da subfração H_2O da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos.

O espectro de MS^2 do íon precursor m/z 191 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Figura 19) apresentou os íons fragmentos m/z 173 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ e 127 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{HCOOH}-\text{CO}]^-$ sugerindo trata-se do ácido quínico (**36**) (FATHONI et al., 2017; MASIKE et al., 2017).

A investigação do MS^2 do m/z 283 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Figura 20) mostrou a presença dos fragmentos m/z 268 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$, 239 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{CO}]^-$, 224 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{CO}_2]^-$, 195 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{CO}_2-\text{CO}-\text{H}]^-$ e 135 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3]^-$ que são característicos do isoflavonoide biochanina A (**37**) (KANG, HICK, PRICE, 2007; RORIZ et al., 2014).

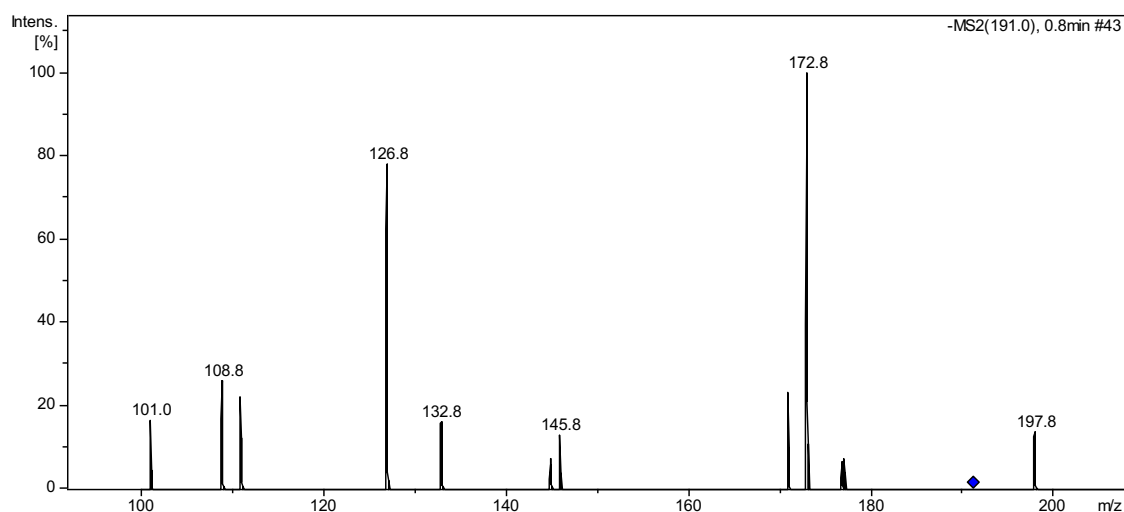


Figura 19 - Espectros de massas MS^2 do íon m/z 191 referente a ácido quínico (**36**).

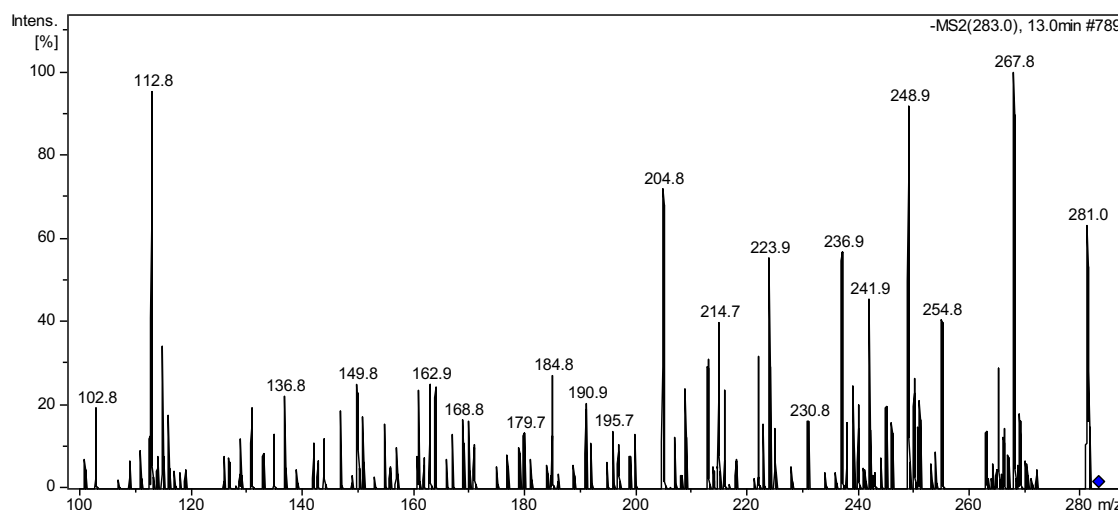


Figura 20 - Espectros de massas MS² do íon m/z 283 referente a biochanina A (**37**).

O espectro de MS² do íon precursor m/z 885 [M-H]⁻ (Figura 21) mostrou os fragmentos de íons m/z 739 [M-H-146]⁻ indicando a perda de uma ramnose e 431 [M-H-146-308]⁻, indicando a perda de ramnose seguida de rutinose (glicose + ramnose), respectivamente. O espectro MS³ do íon precursor m/z 739 [M-H]⁻ apresentou íons fragmentos m/z 593 [M-H-146]⁻, característico da perda de uma ramnose, m/z 575 [M-H-146-H₂O]⁻, da perda de uma ramnose seguido de desidratação, m/z 285 [M-H-146-308]⁻, referente a perda de uma ramnose seguido de rutinose (glicose + ramnose). Estas fragmentações indicaram o canferol como uma aglicona, sugerindo o flavonoide canferol-3-*O*-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**18**) (BRESCIANI et al., 2015).

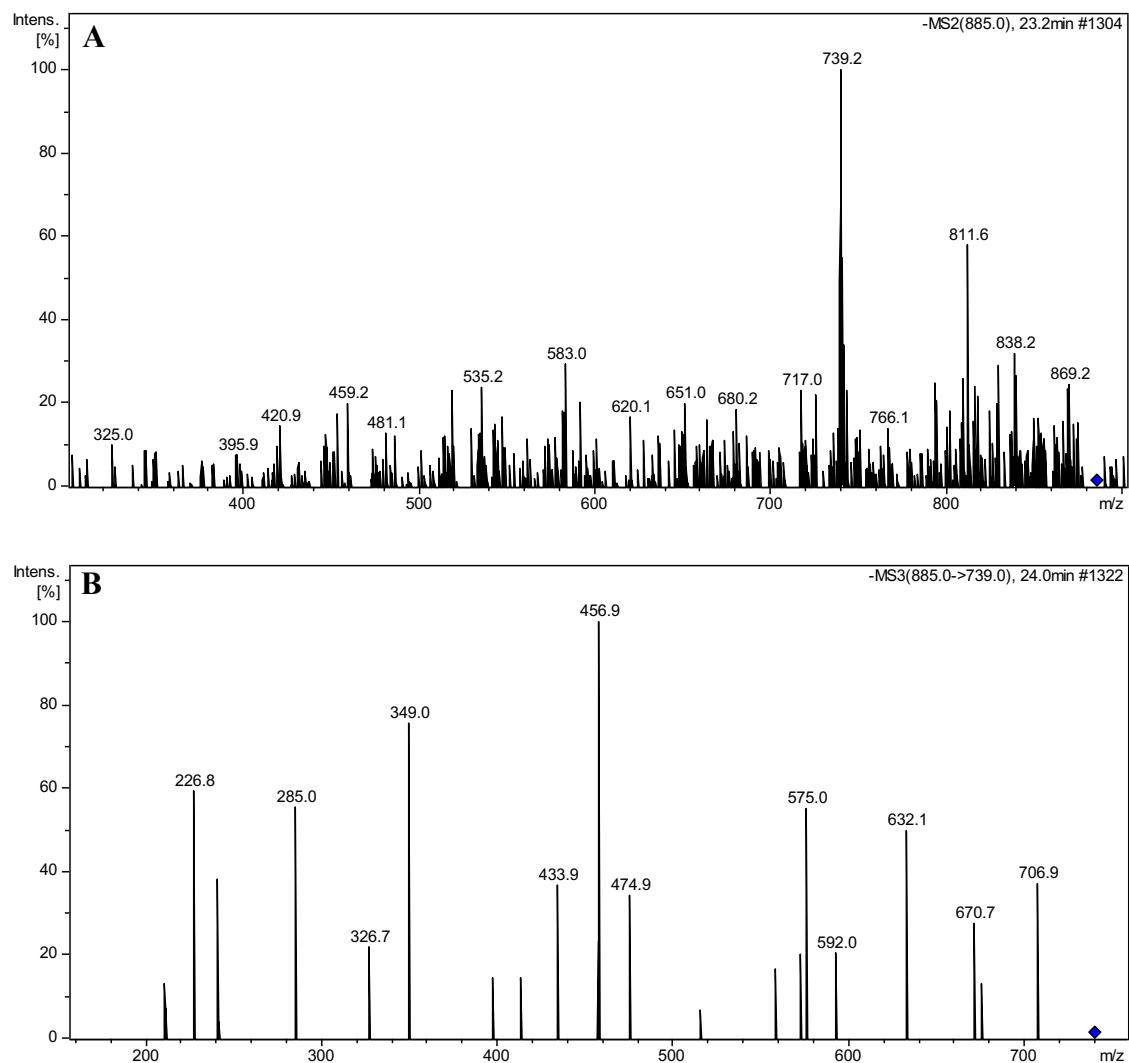


Figura 21 - Espectros de massas MS² do íon *m/z* 885 (A) e MS³ do íon *m/z* 739 (B) referente a canferol-3-*O*-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**18**).

4.4.2 Identificação de constituintes químicos da subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração metanólica por DI-ESI-MS/MS

A subfração MeOH/H₂O (1:1), oriunda da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, no modo negativo, apresentou um *fingerprint* conforme Figura 22. As fragmentações subsequentes MS/MS, resultaram na identificação dos compostos (epi)catequina(**30**), trímero de procianidina [(1)2→A→(1)2→A→(1)2] (**32**), trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**33**), tetrâmero de procianidina tipo A [(1)2→B→(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**35**) e ácido quínico (**36**) (Tabela 6 e Figuras 23). Os compostos **30**, **32**, **33** e **35** foram identificados na subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos, enquanto os compostos **33** e **36** foram na subfração H₂O da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos. Este é primeiro relato dos compostos **30**, **32-33** e **36** no gênero *Machaerium*.

Tabela 6 - Identificação dos compostos da subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos.

Compostos	Molecular Formula	[M-H] ⁻	MS ⁿ	Ref.
ácido quínico (36)	C ₇ H ₁₂ O ₆	191	MS ² [191]: 108,9 (18); 126,7 (22); 170,9 (22); 172,7 (100)	Fathoni et al., 2017
(epi)catequina (30)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	289	MS ² [289]: 178,8 (23); 204,8 (49); 244,9 (100)	Sarnoski et al., 2012
trímero de procianidina [(1)2→A→(1)2→A→(1)2] (32)	C ₄₅ H ₃₄ O ₁₈	861	MS ² [861]: 449 (64); 571,1 (100); 575 (33); 693,4 (25); 708,9 (40); 735,1 (48)	Sarnoski et al., 2012
trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (33)	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	863	MS ² [863]: 411 (69); 451 (45); 573 (21); 711 (100)	Sarnoski et al., 2012
tetrâmero de procianidina tipo A [(1)2→B→(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (35)	C ₄₄ H ₃₆ O ₁₇	1151	MS ² [1151]: 573 (32); 863 (100); 999,1 (24); 1025,2 (29)	Sarnoski et al., 2012

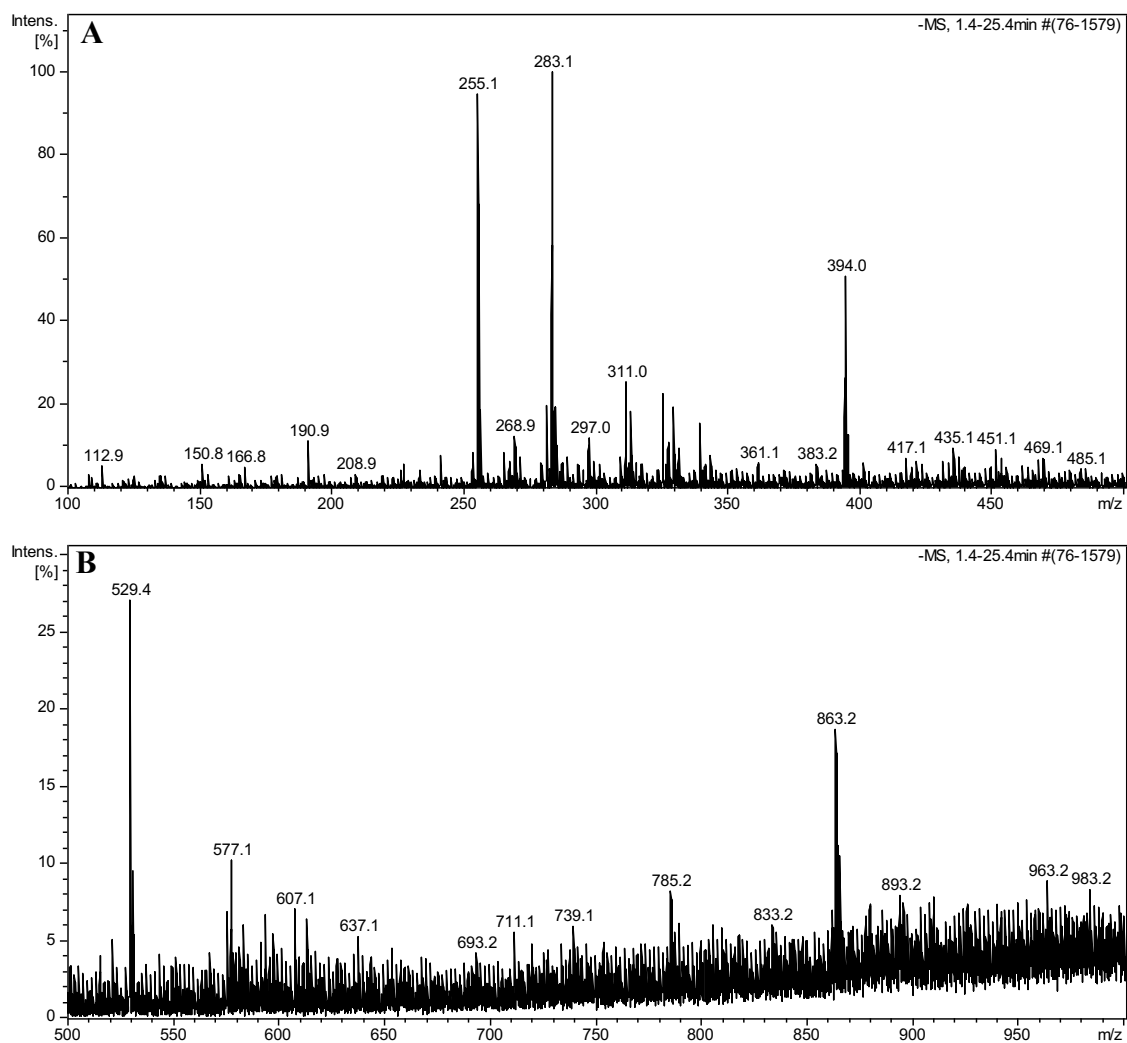


Figura 22 - *Fingerprint* da subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos obtido por DI-ESI-MS/MS no modo negativo s. Expansão: m/z 100-600 (A) e m/z 600-1500 (B).

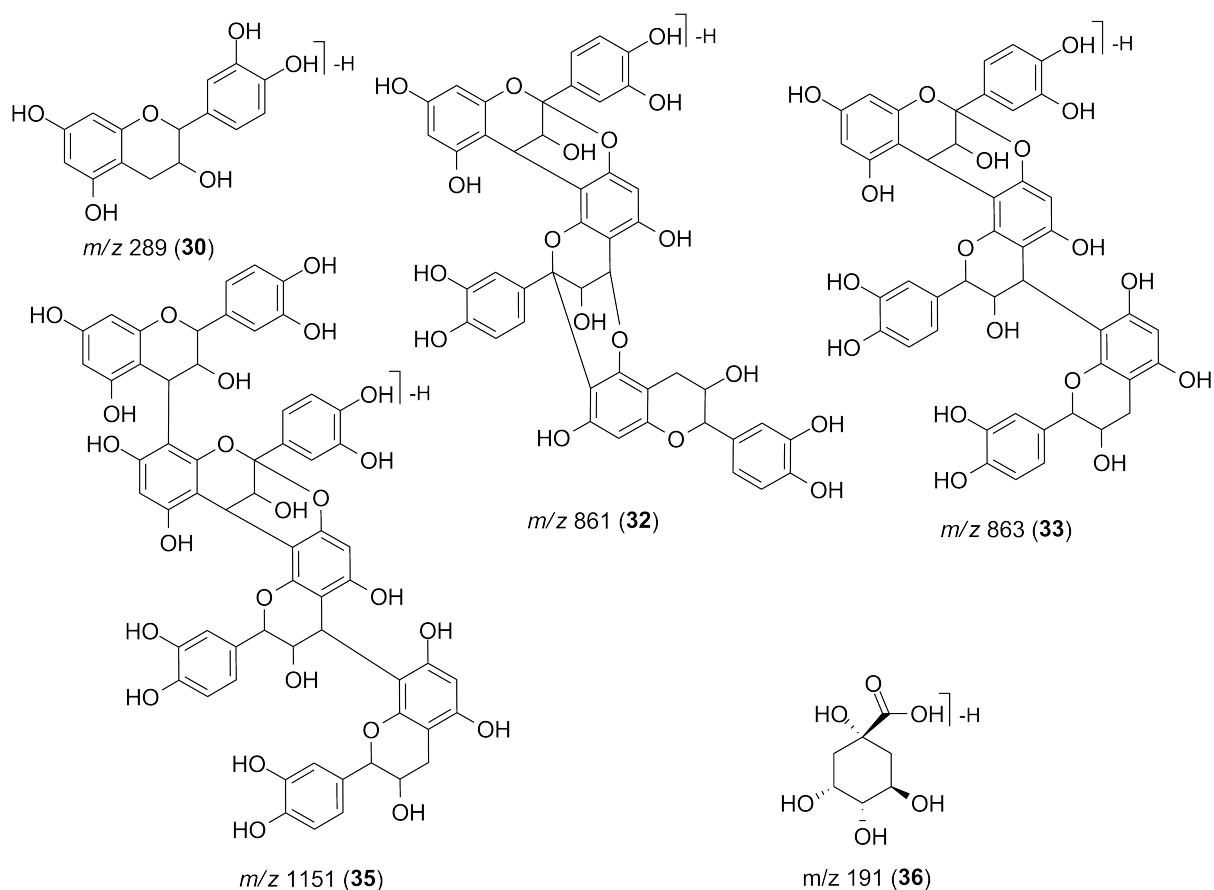


Figura 23 - Constituintes químicos identificados da subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos.

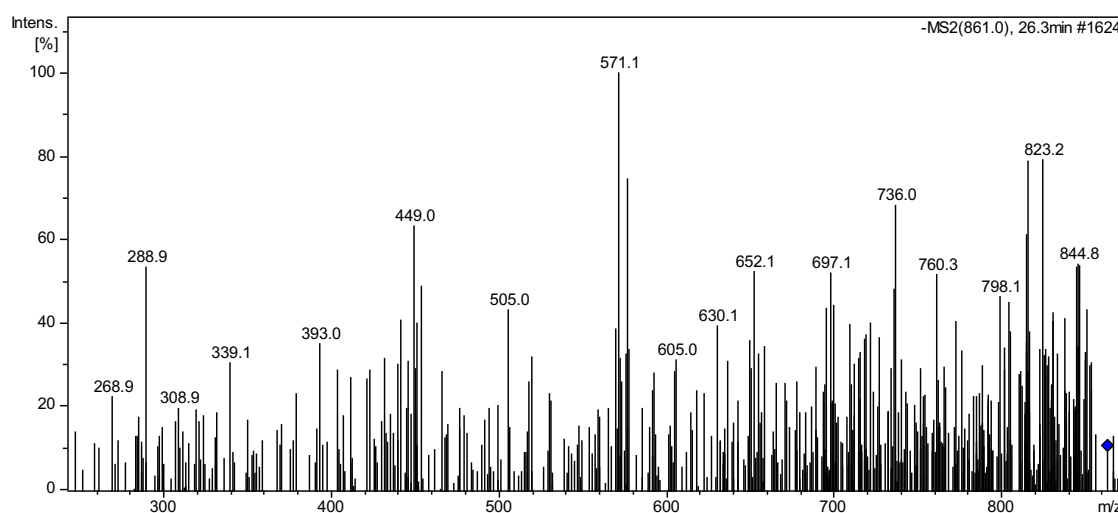


Figura 24 - Espectros de massas MS² do íon m/z 861 referente ao trímero de procianidina [(1)2→A→(1)2→A→(1)2] (32)

O espectro de MS² do íon m/z 861 [M-H]⁻ (Figura 24) mostrou os íons fragmentos m/z 735, 709, 693, 575, 571 e 449, sendo o 571 o pico base, enquanto que na subfração MeOH/H₂O

(1:1) da fração acetato de etila do extrato etanólico dos galhos, este mesmo íon fragmento apresentou espectro MS² com as fragmentações em m/z 735, 693, 709 com o íon fragmento m/z 735 como pico base. O MS³ em m/z 735 [M-H]⁻ mostrou os íons fragmentos m/z 567, 447 e 609. De acordo com Sarnoski et al. (2012) as principais vias de fragmentação das proantocianidinas são quinona metídeo (QM), fissão Retro Diels-Alder (RDA) e fissão de anel heterocíclico (HRF). A diferença observada na fragmentação do íon m/z 861, pode ser atribuída ao fato de que na subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração acetato de etila, este íon fragmentou-se pela via HRF, enquanto na subfração MeOH/H₂O (1:1) da fração metanólica, a fragmentação ocorreu pela via QM (Figura 25). Estes perfis distintos de fragmentação ocorrem provavelmente devido a menor coeluição, no entanto, trata-se da mesma molécula, formada a partir de três unidades de (epi)catequina (288 Da), exibindo ligações distintas ou diferenças na estereoquímica (SARNOSKI et al., 2012; ZHANG; ZHU, 2015).

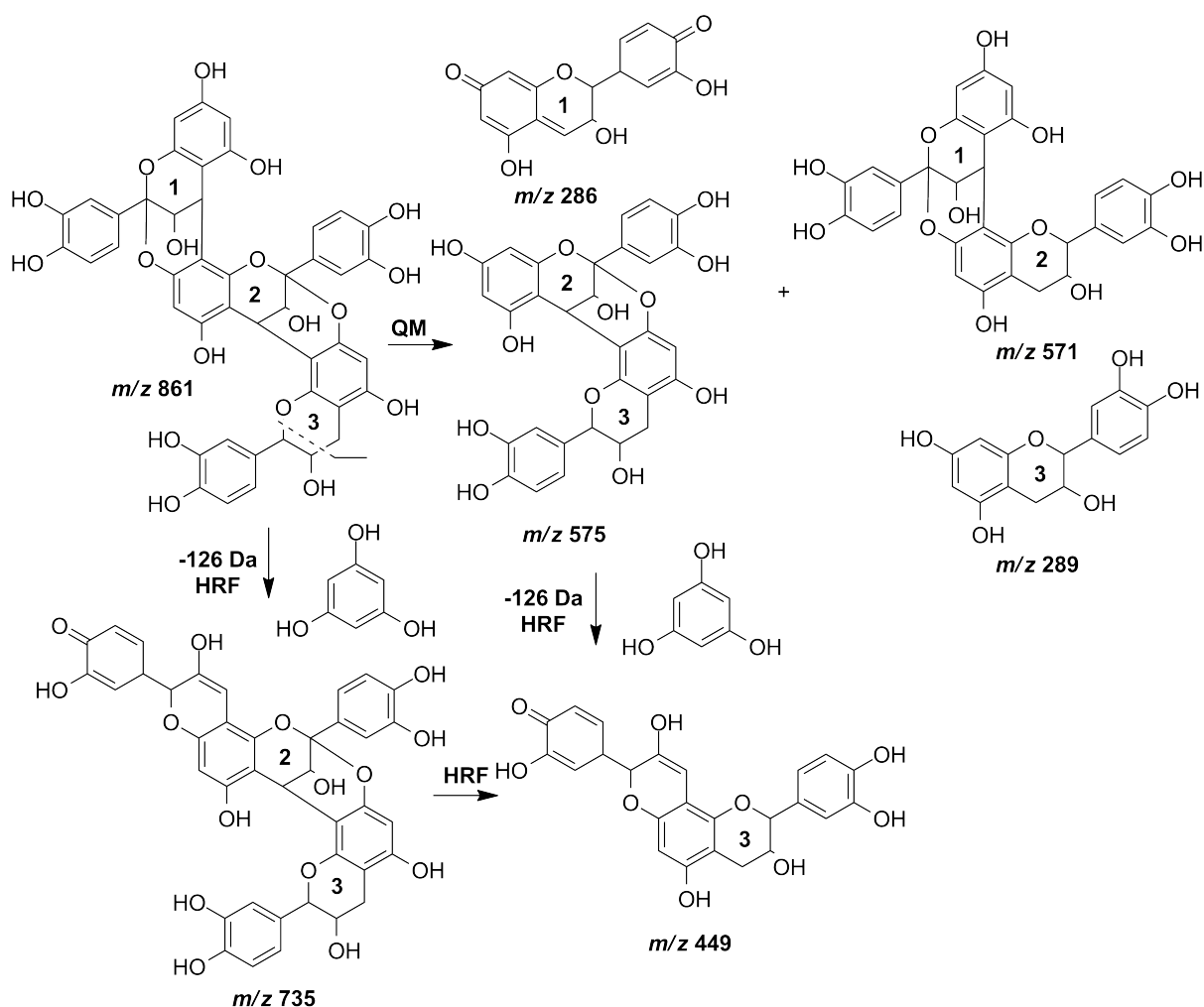


Figura 25 - Via de fragmentações das proantocianidinas: quinona metídeo (QM), fissão Retro Diels-Alder (RDA) e fissão de anel heterocíclico (HRF) proposta por GU et al. (2003).

4.4.3 Identificação dos constituintes químicos da subfração MeOH da fração metanólica por DI-ESI-MS/MS

A subfração MeOH, oriunda fração metanólica do extrato etanólico dos galhos, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, no modo negativo, apresentou um *fingerprint* conforme Figura 26. As fragmentações subsequentes MS/MS resultaram na identificação dos compostos, (epi)catequina (**30**), biochanina A (**37**) e dímeros isoméricos de procianidina B1 e/ou procianidina B2 (**38**) (Tabela 7 e Figura 27). O composto **30** foi anteriormente identificado nas subfrações MeOH/H₂O (1:1) da fração acetato de etila e MeOH/H₂O (1:1) da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos, enquanto o **37** foi anteriormente identificado na subfrações H₂O da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos. Este é primeiro relato dos compostos **30**, **37** e **38** no gênero *Machaerium*.

Tabela 7 - Identificação dos compostos da subfração MeOH da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos.

Compostos	Molecular Formula	[M-H] ⁻	MS ⁿ	Ref.
biochanina (37)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	283	MS ² [283]: 134,9(1), 194,9(5), 223,9(4); 238,9(5), 268(100)	Roriz et al., 2014
(epi)catequina (30)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	289	MS ² [289]: 178,9(7), 204,8(58), 244,9(100)	Sarnoski et al., 2012
dímeros isoméricos de procianidina B1 e/ou procianidina B2 (38)	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577	MS ² [577]: 289(25), 406,9(100), 451(44), 425(7)	Sun et al., 2007

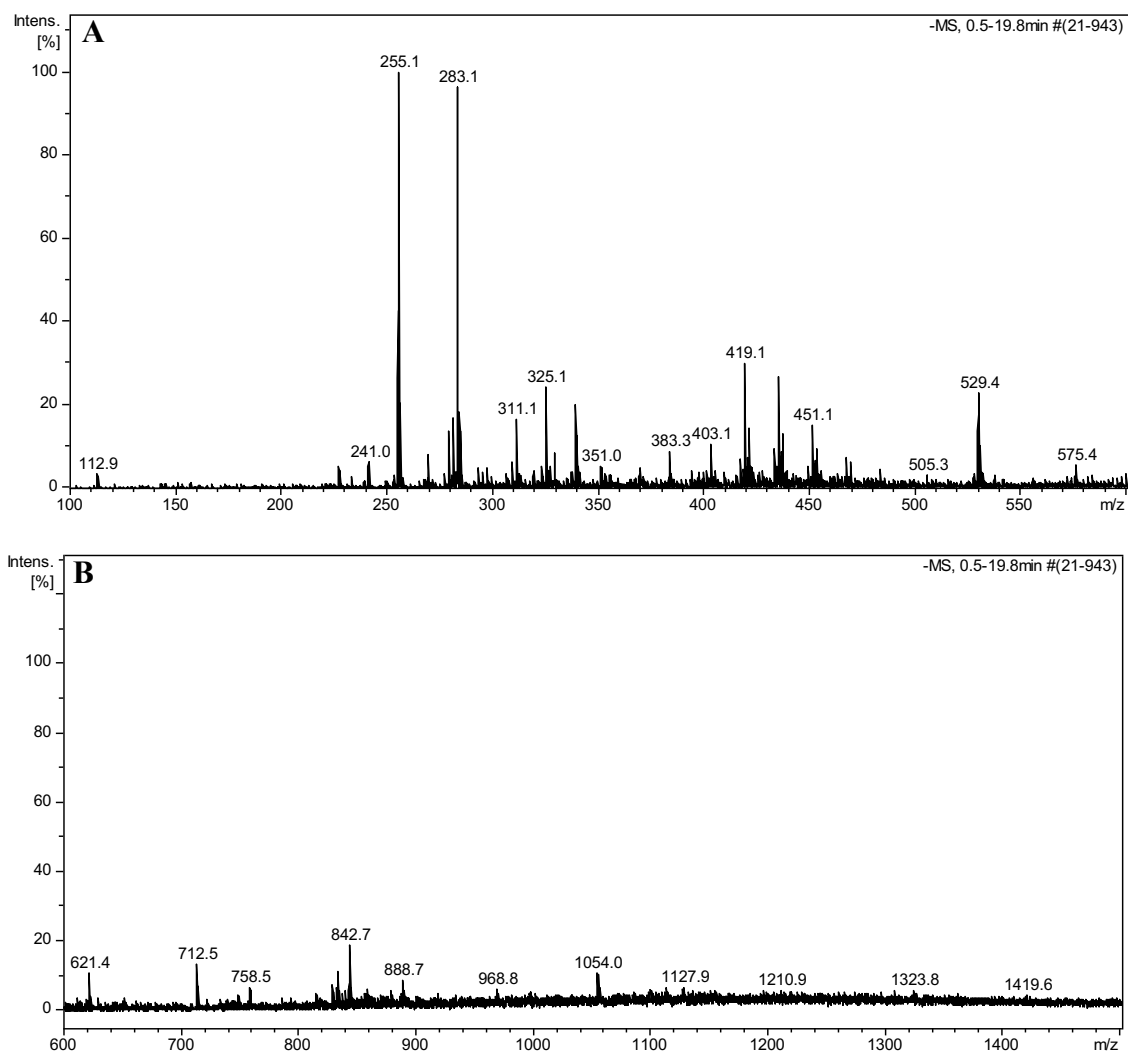


Figura 26 - *Fingerprint* da subfração MeOH da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos obtido por DI-ESI-MS/MS no modo negativo. Expansão: m/z 100-600 (A) e m/z 600-1500 (B).

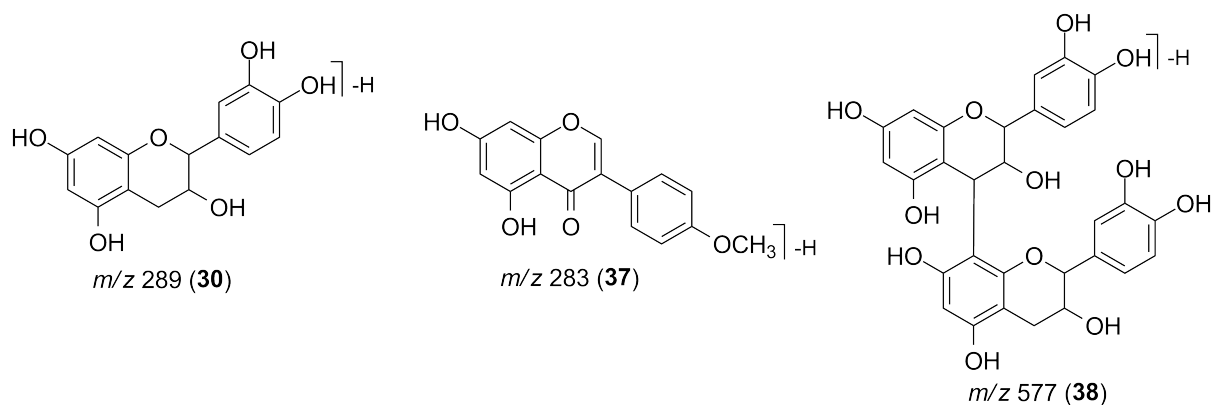


Figura 27 - Constituintes químicos identificados da subfração MeOH da fração metanólica do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*.

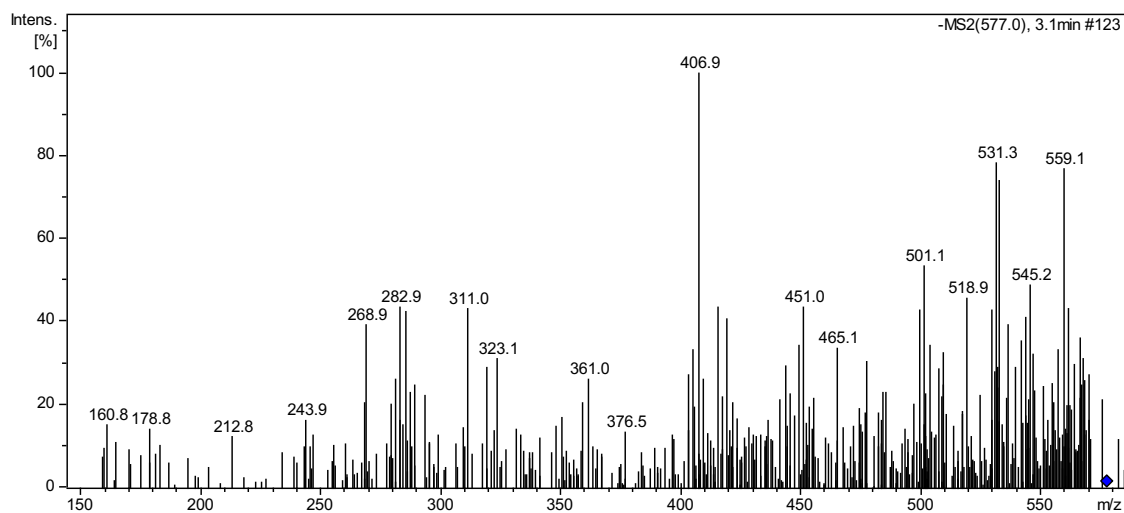


Figura 28 - Espectros de massas MS² do íon m/z 577 referentes a dímeros isoméricos de procianidina B1 e/ou procianidina B2 (**38**).

O espectro MS² do íon precursor m/z 577 [M-H]⁻ (Figura 28) mostrou os íons fragmentos m/z 425 [M-H-152]⁻ característico do rearranjo Retro Diels-Alder (RDA) do anel heterocíclico, m/z 407 [M-H-170]⁻ indicativo do RDA-F do anel heterocíclico e perda de H₂O, m/z 451 [M-H-126]⁻ característico da clivagem entre C4-C5 e O-C2 de anel pirano e m/z 289 [M-H-289]⁻ característico da clivagem do vínculo interflavânico. Este composto foi identificado como dímeros isoméricos de procianidina B1 e/ou procianidina B2 (SUN et al., 2007).

CONCLUSÃO

O estudo químico das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, metanólica e metanol-água, oriundas da coluna filtrante de gel de sílica do extrato etanólico dos galhos de *M. acutifolium*, por CCD, HPLC-DAD e DI-ESI-MS/MS, no modo negativo, permitiu identificar 14 compostos.

O fracionamento cromatográfico das frações hexânica e clorofórmica dos galhos forneceram o esqualeno (**28**) e a mistura de esteroides: sitosterol (**4**) e estigmasterol (**5**), respectivamente. A fração acetato de etila dos galhos, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, permitiu a identificação de sete compostos escopoletina (**29**), (epi)catequina (**30**), dímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2] (**31**), trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)→A→(1)2] (**32**), trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**33**), trímero de proantocianidina [(epi)catequina e uma (epi)galocatequina] (**34**) e tetrâmero de procianidina tipo A [(1)2→B→(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**35**).

A fração metanólica dos galhos, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, permitiu a identificação de oito compostos: canferol-3-*O*-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**18**), **30**, **32**, **33**, **35**, ácido quínico (**36**), biochanina A (**37**) e dímeros isoméricos de procianidina B1 e/ou procianidina B2 (**38**). Os compostos **4**, **5** e **18** foram relatados nas folhas de *M. acutifolium*. A fração metanol-água (1:1) dos galhos não se mostrou promissora para identificação dos constituintes químicos dentro dos parâmetros utilizados na análise por DI-ESI-MS/MS no modo negativo.

Todos os compostos estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Machaerium*, exceto mistura de esteroides (**4** e **5**), **18** e **35**. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da composição química dos galhos da espécie *M. acutifolium*.

REFERÊNCIAS

- AMEN, Y. M.; MARZOUK, A. M.; ZAGHLOUL, M. G.; AFIFI, M. S. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. **Natural Product Research**, v. 29, n. 15, p. 1388-1405, 2015.
- BRESCIANI, L., CALANI, L., COSSU, M., MENA, P., SAYEGH, M., RAY, S., DEL RIO, D. (Poly)phenolic characterization of three food supplements containing 36 different fruits, vegetables and berries. **Pharma Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 11–19, 2015.
- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; FREITAS, J. S.; CHAVES, M. H. Isoflavonoides da tribo Dalbergieae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília Papilionoideae. **Química Nova**, v. 43, n. 9, p. 1294-1311, 2020.
- CARVALHO, A. A.; SANTOS, L. R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H. Tocoferóis e isoprenoides do extrato hexânico das folhas de *Bauhinia pulchella*. In: Freitas, J. C. R.; Ladjane Pereira da Silva Rufino de Freitas, L. P. S. R. (orgs.). **Atividades de ensino e de pesquisa em química**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 252-264.
- FATHONI, A.; SAEPUDIN, E.; CAHYANA, A. H.; RAHAYU, D. U. C.; HAIB, J. Identification of nonvolatile compounds in clove (*Syzygium aromaticum*) from Manado. **AIP Conference Proceedings**, 1 ed., v. 1862, 2017.
- FERREIRA, J. J. S.; OLIVEIRA, A. C. S.; QUEIROZ, R. T.; SILVA, J. S. A tribo Dalbergieae s.l. (Leguminosae-Papilionoideae) no município de Caetité, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, 70, e03502017, 2019.
- GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; ZHANG, Z.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, p. 1272-1280, 2003.
- KANG, J.; HICK, L. A.; PRICE, W. E. A fragmentation study of isoflavones in negative electrospray ionization by MSⁿ ion trap mass spectrometry and triple quadrupole mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 6, p. 857-868, 2007.
- LEITE, C. M. B. **Avaliação da atividade antiulcerogênica, antimicrobiana e citotóxica da cumarina escopoletina**. Tese (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá, 2012.
- MASIKE, K.; MHLONGO, M.; MUDAU, S. P.; NOBELA, O.; NCUBE, E. N.; TUGIZIMANA, F.; GEORGE, M. J.; MADALA, N. E. Highlighting mass spectrometric fragmentation differences and similarities between hydroxycinnamoyl-quinic acids and hydroxycinnamoyl-isocitric acids. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 29, p. 1-7, 2017.
- MELO, S. J.; SOUSA, J. P. B.; SÁ, M. G.; MORAIS, L. S.; MAGALHÃES, N. M. G.; GOUVEIA, F. N.; ALBERNAZ, L. C.; ESPINDOLA, L. S. *Machaerium acutifolium* compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 77, n. 33, p. 1444–1451, 2021.

NG, L.-K.; LAFONTAINE, P.; VANIER, M. Characterization of Cigarette Tobacco by Direct Electrospray Ionization–Ion Trap Mass Spectrometry (ESI-ITMS) Analysis of the Aqueous Extracts A Novel and Simple Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7251-7257, 2004.

OLLIS, W. D.; BRIAN, T.; REDMAN, B. T.; SUTHERLANDT, I. O.; GOTTLIEB, O. R.; Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1379-1381, 1978.

POLIDO, C. A.; SARTORI, A. L. B. O gênero *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergiaceae) no pantanal brasileiro. **Rodriguésia**, v. 58, n. 2, p. 313-329, 2007.

ROCKENBACH, I. I.; JUNGFER, E.; RITTER, C.; SCHÜBEL, B. S.; THIELE, B.; FETT, R.; GALENSA, R. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSⁿ and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, p. 848–855, 2012.

RORIZ, C. L.; BARROS, L.; CARVALHO, A. M.; BUELGA, C. S.; FERREIRA, I. C. F. R. *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. **Food Research International**, v. 62, p. 684–693, 2014.

ROSA, P. A. L.; ALVES, M. C.; VIDEIRA, L. M. L.; BONINI, C. B. S. Recuperação de um solo de cerrado após 19 anos: ocorrência espontânea de espécies arbóreas. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 1, n. 1, p. 44-57, 2014.

SANTOS, L. R. **Contribuição ao conhecimento químico e biológico das folhas de *Senna acuruensis* (Benth.) Irwin & Barneby (Fabaceae)**. 2016. Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

SARNOSKI, P. J.; JOHNSON, J. V.; REED, K. A.; TANKO, J. M.; O'KEEFE, S. F. Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC–MSⁿ. **Food Chemistry**, v. 131, p. 927-939, 2012.

SIMIRGIOTIS, M. J.; Benites, J.; Areche, C. Sepúlveda, B. Antioxidant capacities and analysis of phenolic compounds in three endemic *Nolana* species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11490-11507, 2015.

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. **Molecules**, p. 679-693, 2007

WAAGE, S.; HEDIN, P.; GRIMLEY, E. A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 12, p. 2785-2787, 1984.

ZHANG, S.; ZHU, M. J. Characterization of Polyphenolics in Grape Pomace Extracts Using ESI Q-TOF MS/MS. **Journal of Food Science & Nutrition**, v.1, n. 001, p. 1-10, 2015.

Capítulo 6

Outras Atividades Desenvolvidas

OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o doutoramento foi possível realizar estudos colaborativos com a resina de *Protium heptaphyllum* fornecida pelo nosso grupo de pesquisa, bem como produzir trabalhos a partir de disciplinas obrigatórias e ainda colaborar em outros trabalhos.

1 ESTUDO COLABORATIVO COM A RESINA DE *Protium heptaphyllum*

A espécie *Protium heptaphyllum* (Burseraceae), conhecida popularmente como almecegueira, trata-se de uma árvore de grande porte, de até 20 m de altura, largamente distribuída na região amazônica, sendo também encontrada nos Estados do Piauí, Bahia, Minas Gerais e Goiás, e em outros países como Suriname, Colômbia, Venezuela e Paraguai (CORRÊA, 1926; VIEIRA JÚNIOR; SOUZA; CHAVES, 2005). Esta espécie exsuda uma resina oleosa e amorfa, cuja cor é branco-avermelhada também conhecida como almécega do Brasil, almécega vermelha, breu branco, goma limão, entre outros (MAIA et al., 2000). A resina é utilizada para a fabricação de vernizes e tintas, cosméticos, repelentes de insetos e calafetagem de embarcações (MAIA et al., 2000).

Algumas indicações terapêuticas, como analgésica, cicatrizante e expectorante são relatadas para resina, tendo sido comprovadas as ações antiulcerogênica e anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 2004a; OLIVEIRA et al., 2004b). O óleo essencial de *P. heptaphyllum* possui propriedades anti-inflamatória, antinocicepitiva, antifúngica e gastroprotetora (AMARAL et al., 2009; ARAUJO et al., 2011; MOBIN et al., 2016; RAO et al., 2007; SIANI, et al. 1999).

A resina da almécega é um sólido branco amorfo, constituída por triterpenóides pentacíclicos monohidroxilados (α -amirina e β -amirina) e di-hidroxilados (breína e maniladiol). A mistura de α -amirina e β -amirina (Figura 1) corresponde a 45,3% da constituição química da resina, seguida pela mistura de breína e maniladiol (Figura 1), que representa 9,5% (MAIA et al., 2000; VIEIRA JÚNIOR; SOUZA; CHAVES, 2005).

A mistura triterpênica de α -amirina e β -amirina possui comprovadas propriedades farmacológicas, como antiobesidade (CARVALHO et al., 2017; CARVALHO et al., 2015; SANTOS et al., 2017; SANTOS et al., 2013), de resistência insulínica induzida por palmitato em células C2C12 (MELO et al., 2019), anti-hiperglicêmica e anti-hipolipidêmica (SANTOS et al., 2012), anti-inflamatória (LIMA JÚNIOR et al., 2007; MELO et al., 2011; PINTO et al., 2008a), inibidora de pancreatite (MELO et al., 2011; MELO et al., 2010), antinoceptiva (LIMA

JÚNIOR et al., 2007; LIMA JÚNIOR et al., 2006; PINTO et al., 2008b), gastroprotetora e antipruriginosa (OLIVEIRA et al., 2004b).

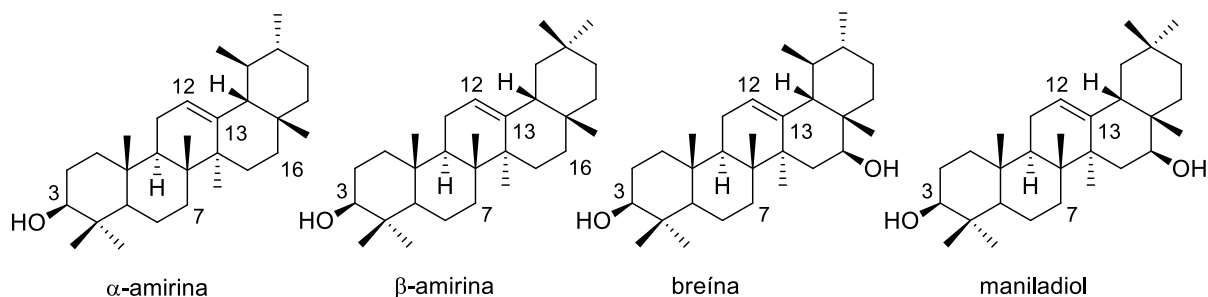


Figura 1 - Estruturas dos principais constituintes da resina de almécega

1.1. Fracionamento da resina de almécega

A resina de *P. heptaphyllum* foi adquirida no Mercado Central de Teresina-PI, proveniente de um almecegal existente no município de Timon-MA. A espécie vegetal foi coletada neste local e identificada no Herbário Graziela Barroso da UFPI e registrada a exsicata com o nº 18.247.

A resina bruta (20 g) foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica (5,5 x 31 cm; 250 g), empacotada com hexano/acetato de etila (98:2), com volume morto de 400 mL, utilizando como eluente hexano e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade. No desenvolvimento da cromatografia em coluna, obtém-se a mistura de amirinas (α - e β -amirina), na forma de um sólido branco e amorfo, eluída em hexano-acetato de etila 95:5, nas frações de 12 a 20 (~ 9,0 g). A seguir, obtém-se a mistura de dióis (breína e maniladiol) eluída em hexano-acetato de etila 9:1 nas frações de 48 a 62 (~2,0 g).

As misturas de amirinas e de dióis aparecem no cromatograma obtido em CCD, revelado com solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, inicialmente como manchas de cor alaranjada, que após um período de 15 min se tornam púrpura e verde, respectivamente (VIEIRA JÚNIOR et al., 2007).

1.2. Colaboração com a UFC

A mistura de amirinas foi enviada para o Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob os cuidados da Profa. Dra. Flávia Almeida Santos. Durante o doutorado enviamos oito gramas da mistura de amirinas. Neste laboratório foram avaliados os efeitos antiobesidade e de resistência insulínica induzida por palmitato em células C2C12 da mistura de α e β -amirina. A colaboração com a UFC proporcionou dois artigos e quatro trabalhos em

Anais de Congressos nacionais e internacionais. A seguir listamos os trabalhos frutos desta colaboração.

Lima, R. P.; Nunes, P. I. G. Viana, A. F. S. C.; Oliveira, F. T. B.; Silva, R. A. C.; Alves, A. P. N. N.; Viana, D. A.; Fonseca, S. G. C.; Carvalho, A. A.; Chaves, M. H.; Rao, V. S.; Santos, F. A. α,β -Amyrin prevents steatosis and insulin resistance in a high-fat diet-induced mouse model of NAFLD via the AMPK-mTORC1-SREBP1 signaling mechanism. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, n. 10, e11391, p. 2021.

Melo, K. M.; Oliveira, F. T. B.; Silva, R. A. C.; Quinderé, A. L. G.; Marinho Filho, J. D. B.; Araújo, A. J.; Pereira, E. D. B.; Carvalho, A. A.; Chaves, M. H.; Rao, V. S.; Santos, F. A. α, β -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1860-1866, 2019.

Lima, R. P.; Nunes, P. I. G.; Viana, A. F. S. C.; Oliveira, F. T. B.; Silva, R. A. C.; Freire, G. P.; Silva, A. V. L.; Moreira, T. S.; Carvalho, A. A.; Chaves, M. H.; Santos, F. A. Effect of the mixture of triterpenes α,β -amyrin in the prevention of non-alcoholic fatty disease in mice. *In: 51st Brazilian Congress do Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2019, Alagoas. Programm of the 51st Brazilian Congress do Pharmacology and Experimental Therapeutics. São Paulo: SBFTE, 2019. v. 1. p. 69-69.

Silva, A. V. L.; Oliveira, F. T. B.; Viana, A. F. S. C.; Lima, R. P.; Silva, R. A. C.; Carvalho, A. A.; Chaves, M. H.; Rao, V. S.; Santos, F. A. Alpha, beta-Amyrin Ameliorates Glucose Uptake in Palmitate-induced Insulin Resistance in C2C12 Cell. *In: Experimental Biology 2019 Meeting*, 2019, Orlando. FASEB Journal, 2019. v. 33. p. 1-2.

Braga, R. D.; Lima, R. P.; Nunes, P. I. G.; Carvalho, A. A.; Chaves, M. H.; Santos, F. A. Avaliação do efeito da mistura de alfa e beta-amirina sobre o ganho de peso corporal e os parâmetros bioquímicos séricos de camundongos com DHGNA induzida por dieta hipercalórica. *In: XXXVII Encontro de Iniciação Científica*, 2018, Fortaleza. Revista Encontros Universitários da UFC, 2018. v. 3. p. 1012.

Moreira, T. S.; Oliveira, F. T. B.; Viana, A. F. S. C.; Carvalho, A. A.; Chaves, M. H.; Santos, F. A. Avaliação do efeito da mistura de alfa e beta-amirina na resistência insulínica induzida por palmitato em células C2C12. *In: XXXVII Encontro de Iniciação Científica*, 2018, Fortaleza. Revista Encontros Universitários da UFC, 2018. v. 3. p. 1011.

1.3 Colaboração com a UNESP

A mistura de amirinas foi enviada para Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob os cuidados da Profa. Dra. Daniela Atili Brandini de Weert. Durante o doutorado enviamos 30,27 g da mistura de amirinas para avaliação da atividade anti-inflamatória no tratamento de superfície em reimplante dentário imediato. Esta colaboração resultou na publicação de um artigo científico.

Côvre, L. M.; Debortoli, C. V. L.; Amaral, M. F.; Carvalho, A. A.; Freitas, J. S.; Vieira Júnior, G. M.; Chaves, M. H.; Casatti, C. A.; Brandini, D. A. Uso da mistura de α - e β -amirina como meio de conservação em reimplante dentário. **Research, Society and Development**, v. 9, p.e948998134, 2020.

2 TRABALHOS PRODUZIDOS A PARTIR DAS DISCIPLINAS OBRIGATÓRIAS

Ao cursar algumas disciplinas obrigatórias foi possível elaborar trabalhos e publicá-los na forma de artigo científico e capítulo de livro. Nas disciplinas seminários I e II foi elaborado um artigo de prospecção científica e tecnológica do gênero *Erythrina*, que foi publicado na revista Cadernos de Prospecção. Na disciplina Química Inorgânica Avançada foi elaborado um artigo de prospecção tecnológica, publicado na forma de capítulo de livro na Editora Atena e apresentado no I Workshop do Programa da Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da UFPI. A seguir listamos os trabalhos elaborados a partir das disciplinas de Seminários I e II e Química Inorgânica Avançada.

Carvalho, A. A.; Silva, L. F. F.; Freitas, J. S.; Santiago, R. F.; Chaves, M. H. Análise prospectiva com ênfase científica e tecnológica do gênero *Erythrina* (Fabaceae). **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 3, p. 723-732, 2020.

Carvalho, A. A.; Sousa, R. B.; Costa, J. C. S.; Chaves, M. H.; Silva Filho, E. C. Prospecção tecnológica de biocompósitos à base de quitosana e hidroxiapatita para aplicações na

engenharia tecidual óssea. *In:* Carmen Lúcia Voigt. (Org.). **Atividades de Ensino e de Pesquisa em Química 2**. 1ed. Ponta Grossa-PR: Atena Editora, 2020. p. 140-150.

Carvalho, A. A.; Sousa, R. B.; Vieira, E. G.; Osajima, J. A.; Fialho, A. C. V.; Silva Filho, E. C. Prospecção tecnológica de biocompósitos à base de quitosana e hidroxiapatita aplicada à engenharia de tecidos. *In:* **I Workshop do Programa da Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da UFPI**, Teresina-Piauí, 2017.

3 COLABORAÇÃO EM OUTROS TRABALHOS

Durante o doutoramento foi possível ainda colaborar em cinco artigos científicos que foram publicados na Editora Atena na forma de capítulos de livros, conforme apresentados a seguir.

Veras, M. D. A.; Santos, L. R.; Carvalho, A. A.; Chaves, M. H. Prospecção tecnológica da carboplatina: um fármaco usado no tratamento de câncer. *In:* Iara Lúcia Tescarollo. (Org.). **Farmácia e Promoção da Saúde 2**. 1ed. Ponta Grossa-PR: Atena Editora, 2020. p. 100-108.

Oliveira, J. S. S. M.; Santos, L. R.; Carvalho, A. A.; Sousa, R. P.; Vieira Júnior, G. M.; Farias, R. R. S.; Chaves, M. H. Composição química, fenóis totais e atividade antioxidante das folhas de *Simaba ferruginea*. *In:* Cleberton Correia Santos (Org.). **Estudos Interdisciplinares nas Ciências Exatas e da Terra e Engenharias 4**. 1ed. Ponta Grossa-PR: Atena Editora, 2019. p. 144-156.

Santos, L. R.; Carvalho, A. A.; Silva, L. F. F.; Vieira Júnior, G. M.; Farias, R. R. S.; Chaves, M. H. Validação de metodologia para quantificação de rutina e quercetina nas folhas de *Senna acuruensis*. *In:* Cleberton Correia Santos (Org.). **Estudos Interdisciplinares nas Ciências Exatas e da Terra e Engenharias 2**. 1ed. Ponta Grossa-PR: Atena Editora, 2019. p. 144-156.

Santos, L. R.; Carvalho, A. A.; Santiago, R. F.; Chaves, M. H. Alcaloides do gênero *Senna* e potencial farmacológico. *In:* Amanda Natalina de Faria. (Org.). **Princípios Físico Químicos em Farmácia**. 1ed. Ponta Grossa-PR: Atena Editora, 2019. p. 1-13.

Santos, L. F.; Santos, L. R.; Carvalho, A. A.; Sousa, R. P.; Neris, M. L.; Vieira Júnior, G. M.; Freitas, S. D. L.; Chaves, M. H. Triterpenoides, esteroides e atividade antioxidante das cascas do caule de *Luehea divaricata*. In: Juliano Carlo Rufino de Freitas e Ladjane Pereira da Silva Rufino de Freitas. (Orgs.). **Atividades de Ensino e de Pesquisa em Química**. 1ed. Ponta Grossa-PR: Atena Editora, 2019. p. 241-251.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, M. P. M.; BRAGA, F. A. V.; PASSO, F. F. B.; ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, R. C. M.; CARVALHO, A. A.; CHAVES, M. H.; OLIVEIRA, F. A. Additional Evidence for the Anti-inflammatory Properties of the Essential Oil of *Protium heptaphyllum* Resin in Mice and Rats. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 28, p. 775-782, 2009.
- ARAUJO, D. A. O. V.; TAKAYAMA, C.; FARIA, F. M.; SOCCA, E. A. R.; DUNDER, R. J.; MANZO, L. P.; FERREIRA, A. L.; BRITO, A. R. M. S. Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 721-729, 2011.
- CARVALHO, K.; MELO, T.; MELO, K. M.; QUINDERÉ, A.; OLIVEIRA, F.; VIANA, A.; NUNES, P.; QUETZ, J.; VIANA, D.; SILVA, A.; HAVT, A.; FONSECA, S.; CHAVES, M.; RAO, V.; SANTOS, F. Amyrins from *Protium heptaphyllum* Reduce High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice via Modulation of Enzymatic, Hormonal And Inflammatory Responses. **Planta Medica**, v. 83, p. 285-291, 2017.
- CARVALHO, K. M.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; MELO, T.; ARAUJO, A. J.; QUETZ, J.; CUNHA, M. P.; MELO, K.; SILVA, A. A. C. A.; TOMÉ, A. R.; HAVT, A.; FONSECA, S. G. C.; BRITO, G. A.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. The resin from prevents high-fat diet-induced obesity in mice: scientific evidence and potential mechanisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print)**, v. 2015, p. 1-13, 2015.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1926, vol. 1.
- LIMA JÚNIOR, R. C. R.; SOUSA, D. I. M.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, alpha, beta-amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK1-receptors, and K-ATP(+) channels. **Inflammation Research**, v. 56, p. 487-494, 2007.
- LIMA JÚNIOR, R. C. P.; OLIVEIRA, F. A.; GURGEL, L. A.; CAVALCANTE, I. J. M.; SANTOS, K. A.; CAMPOS, D. A.; VALE, C. A. L.; SILVA, R. M.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. Attenuation of viceral nociception by alpha-and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. **Planta Medica**, v. 71, n. 1, p. 34-39, 2006.
- MAIA, R. M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Bursaceae): caracterização de misturas binárias. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 623-626, 2000.
- MELO, K. M.; OLIVEIRA, F. T. B.; SILVA, R. A. C.; QUINDERÉ, A. L. G.; MARINHO FILHO, J. D. B.; ARAÚJO, A. J.; PEREIRA, E. D. B.; CARVALHO, A. A.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of

PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1860-1866, 2019.

MELO, C. M.; MORAIS, T. C.; TOMÉ, A. R.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Inflammation Research (Printed ed.)**, p. 673-681, 2011.

MELO, C. M.; CHAVES, M. H. α,β -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, p. 4272, 2010.

MOBIN, M.; LIMA, S. G.; ALMEIDA, L. T. G.; TAKAHASHI, J. P.; TELES, J. B.; SZESZS, M. W.; MARTINS, M. A.; CARVALHO, A. A.; MELHEM, M. S. C. MDGC-MS analysis of essential oils from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) and their antifungal activity against *Candida* specie. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, p. 531-538, 2016.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORENCIO, M. G.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective and anti-inflammatory effects from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 2. p. 105-111, 2004a.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; SANTOS, K. A.; MARTINS, F. S.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective effect of α - and β -amyrins from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Medica**, v. 70, n. 8, p. 780-782, 2004b.

PINTO, S. A. H.; PINTO, L. M. S.; CUNHA, G. M. A.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology (Dordrecht)**, v. 16, p. 48-52, 2008a.

PINTO, S. A. H.; PINTO, L. M. S.; GUEDES, M. A.; CUNHA, G. M. A.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antinociceptive effect of triterpenoid, alfa, beta-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine (Stuttgart)**, v. 15, p. 630-634, 2008b.

RAO, V. S.; MAIA, J. L.; OLIVEIRA, F. A.; LEMOS, T. L. G.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A. Composition and antinociceptive activity of the essential oil from *Protium heptaphyllum* resin. **Natural Product Communications**, v. 2, p. 1199-1202, 2007.

SANTOS, F. A.; CARVALHO, K. M. M. B.; LIMA, F. J. B.; NUNES, P. I. G.; VIANA, A. F. S. C.; SILVA, A. A. C. A.; FONSECA, S. G. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; MAGALHAES, P. J. C.; BRITO, T. S. The triterpenoid alpha, beta-amyrin prevents the impaired aortic vascular reactivity in high-fat diet-induced obese mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, p. 1029-1039, 2017.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S.; CARVALHO, K. M. M.; MORAIS, T. C.; SILVA, A. A. C. A.; CHAVES, M. H. The alpha, beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* exerts antiobese-related effects in mice fed on high fat diet. **Planta Medica**, v. 79, p. 79 - PE14, 2013.

SANTOS, F. A.; FROTA, J. T.; ARRUDA, B. R.; MELO, T. S.; SILVA, A. A. C. A.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of alpha, beta-amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, p. 98-105, 2012.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; DE LIMA, O. M.; DOS SANTOS, R. R.; FERREIRA, E. F.; SOARES, R. O. A.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI M. G. B.; HENRIQUES, M. G. M. O. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 57-69, 1999.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CARVALHO, A. A.; GONZAGA, W. A.; CHAVES, C. H. Cromatografando em coluna com resina de almécega: um projeto para química orgânica experimental. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 491-493, 2007.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 183-187, 2005.

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão bibliográfica dos isoflavonoides da tribo Dalbergieae (Fabaceae-Papilionoideae), no período de 1945 a 2019, mostrou a ocorrência de 240 compostos distribuídos em 69 espécies e 15 gêneros. Os isoflavonoides formononetina, biochanina A e medicarpina foram isolados com maior frequência na tribo. Os gêneros *Dalbergia*, *Machaerium*, *Andira* e *Pterocarpus* apresentaram maior número de espécies com ocorrência de isoflavonoides. A tribo Dalbergieae possui 46 espécies e 81 isoflavonoides bioativos se destacando como detetora de importante potencial biológico.

O perfil metabolômico dos extratos etanólico das folhas e galhos de *Machaerium acutifolium*, obtidos por CCD e HPLC-DAD, sugeriu a presença flavonoides e compostos de natureza isoprênica. A investigação do potencial biológico revelou que o extrato etanólico dos galhos, no ensaio com o DPPH, possui atividade sequestradora de radicais livres superior ao extrato etanólico das folhas e ao controle positivo BHT, no entanto, foi menos ativo que a rutina e ácido gálico. O ensaio com ABTS mostrou que o extrato etanólico dos galhos foi mais ativo que o extrato etanólico das folhas e que os controles positivos. Os teores de fenóis totais apresentaram correlação positiva com a atividade antioxidante, nos dois ensaios. O extrato etanólico das folhas apresentou maior teor de flavonoides totais e fator de proteção solar que o extrato etanólico dos galhos. O extrato etanólico dos galhos apresentou indicativo de atividade inibidora da acetilcolinesterase, enquanto extrato etanólico das folhas não se mostrou ativo. Os extratos etanólico das folhas e galhos não apresentaram atividade larvicida contra *Aedes aegypti*.

O estudo fitoquímico dos extratos etanólico das folhas e galhos de *M. acutifolium* resultou no isolamento e identificação de 38 compostos, distribuídos nas classes dos tocoferóis, esteroides, triterpenoides e flavonoides.

O fracionamento cromatográfico da fração hexânica das folhas resultou no isolamento de α -tocoferol (**1**), colesterol (**2**), campesterol (**3**), sitosterol (**4**), estigmasterol (**5**), lupeol (**6**), isômeros *E/Z* do 3-*O-p*-cumaroil- β -amirina (**7** e **8**), 3-*O-p*-cumaroilgermanicol (**9** e **10**) e 3-*O-p*-cumaroillupeol (**11** e **12**).

A fração acetato de etila das folhas, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, permitiu a identificação dos quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**13**), quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**14**), quercetina-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 6)-hexosídeo (**15**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1 \rightarrow 3)-ramnosil-(1 \rightarrow 2)-[ramnosil-(1 \rightarrow 6)]-

hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**16**), canferol-3-ramnosil-7-[6-feruloil]-hexosil-(1→3)-ramnosídeo (**17**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**18**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1→6)-hexosil-7-*O*-ramnosídeo (**19**), canferol-3-*O*-ramnosil-(1→6)-hexosídeo (**20**), canferol-3-*O*-hexosídeo (**21**)

A fração aquosa das folhas, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, permitiu a identificação dos flavonoides **13-16** e **18-21**, isoflavonoides genisteína (**25**) e daidzeína-8-*C*-glicosídeo (**26**) e o biflavonoide moreloflavona (**27**). Adicionalmente, da fração aquosa foram isolados e identificados os flavonoides: canferol-3-*O*-ramnosil-(1→3)-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-glicosil-7-*O*-ramnosídeo (**16**), 3',4'-dimetoxi-3-*O*-β-D-galactopiranosil-(1→6)-α-L-ramnopiranosídeo-7-*O*-α-L-ramnopiranosilflavonol (**22**), robinina (**23**) e astrasikokiosídeo I (**24**). Este é o primeiro relato do flavonoide **22** sendo considerado inédito. Os compostos isolados foram identificados por RMN ¹H e ¹³C (1D e 2D), CG-EM e DI-ESI-MSⁿ

Os flavonoides robinina e astrasikokiosídeo I foram quantificados por HPLC-DAD no extrato etanólico e frações das folhas. A fração aquosa das folhas apresentou os maiores teores dos dois flavonoides (127,1±7,9 e 192,2±15,7), quando comparado ao extrato etanólico (66,8±2,0 e 93,8±3,7) e a fração acetato de etila (nd e 3,4±0,3). Os resultados indicam que a quantificação dos flavonoides pode ser realizada nos comprimentos de onda λ 265 e 348 nm sem diferenças significativas entre os teores. Estes flavonoides não foram detectados nos galhos, mostrando que a composição química dos galhos e das folhas é distinta. Este é o primeiro relato de quantificação dos flavonoides robinina e astrasikokiosídeo I. A quantificação destes flavonoides serve de base para padronização do extrato e frações e para caracterização de marcadores químico.

O fracionamento cromatográfico das frações hexânica e clorofórmica dos galhos forneceram o esqualeno (**28**) e a mistura de esteroides sitosterol (**4**) e estigmasterol (**5**), respectivamente. A fração acetato de etila dos galhos, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, permitiu a identificação da sete compostos: escopoletina (**29**), (epi)catequina (**30**), dímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2] (**31**), trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)→A→(1)2] (**32**), trímero de procianidina tipo A [(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**33**), trímero de proantocianidina (duas (epi)catequina e uma (epi)galocatequina) (**34**) e tetrâmero de procianidina tipo A [(1)2→B→(1)2→A→(1)2→B→(1)2] (**35**).

A fração metanólica dos galhos, após desreplicação por DI-ESI-MS/MS, permitiu a identificação dos compostos dos compostos: **18**, **30**, **32**, **33**, **35**, ácido quínico (**36**), biochanina

A (37) e dímeros isoméricos de procianidina B1 e/ou procianidina B2 (38). Os compostos 4-5 e 18 foram relatados nas folhas de *M. acutifolium*. A fração metanol-água (1:1) dos galhos não se mostrou promissora para identificação dos constituintes químicos dentro dos parâmetros utilizados na análise por DI-ESI-MS/MS, no modo negativo. Todos os compostos estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Machaerium*, exceto a mistura de esteroides (4 e 5), 6, 18 e 35.

Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento do perfil metabolômico e biológico das folhas e galhos da espécie *M. acutifolium*.

Anexas



ORIGINAL ARTICLE

First report of flavonoids from leaves of *Machaerium acutifolium* by DI-ESI-MS/MS



Adonias Almeida Carvalho^{a,b}, Lucivania Rodrigues dos Santos^b,
Jurema Santana de Freitas^b, Renato Pinto de Sousa^b,
Ruth Raquel Soares de Farias^c, Gerardo Magela Vieira Júnior^b, Mahendra Rai^d,
Mariana Helena Chaves^{b,*}

^a Federal Institute of Piauí - Piripiri Campus, 64260-00 Piripiri, Piauí, Brazil

^b Department of Chemistry, Federal University of Piauí, 64049-550 Teresina, Piauí, Brazil

^c bioTEM, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^d Department of Biotechnology, SGB Amravati University, Amravati 444 602, Maharashtra, India

Received 16 July 2021; accepted 2 February 2022

Available online 7 February 2022

KEYWORDS

Machaerium acutifolium;
HPLC-DAD;
DI-ESI-MS/MS;
Flavonoids;
Isoflavonoids;
Antioxidant activity;
Total phenolic content

Abstract The aqueous fraction obtained by the partition of the ethanolic extract from leaves of *Machaerium acutifolium* (Fabaceae-Papilionoideae) was analyzed by high-performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD) and direct insertion in a mass spectrometer with an ion trap analyzer equipped with an electrospray ionization source (DI-ESI-MS/MS). The chemical analysis of the extract demonstrated the occurrence of eight flavonols (1–8), two isoflavonoids (9 and 10) and one biflavonoid (11). These compounds are being reported for the first time from *M. acutifolium*. The aqueous fraction showed $28.37 \pm 0.94\%$ of AA in assay on DPPH and 151.70 ± 9.44 GAE of the total phenolic content.

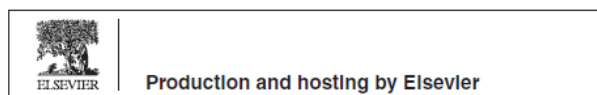
© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abbreviations: HPLC-DAD, high-performance liquid chromatography with diode array detector; HPLC-UV, high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection; DI-ESI-MS/MS, direct insertion in a mass spectrometer with an ion trap analyzer equipped with an electrospray ionization source; AA, antioxidant activity; TPC, total phenolic content; GAE, gallic acid equivalent; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

* Corresponding author.

E-mail addresses: adonias.carvalho@ifpi.edu.br (A.A. Carvalho), magela@ufpi.edu.br (G.M. Vieira Júnior), mariana@ufpi.edu.br (M.H. Chaves).

Peer review under responsibility of King Saud University.



<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103765>

1878-5352 © 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University.

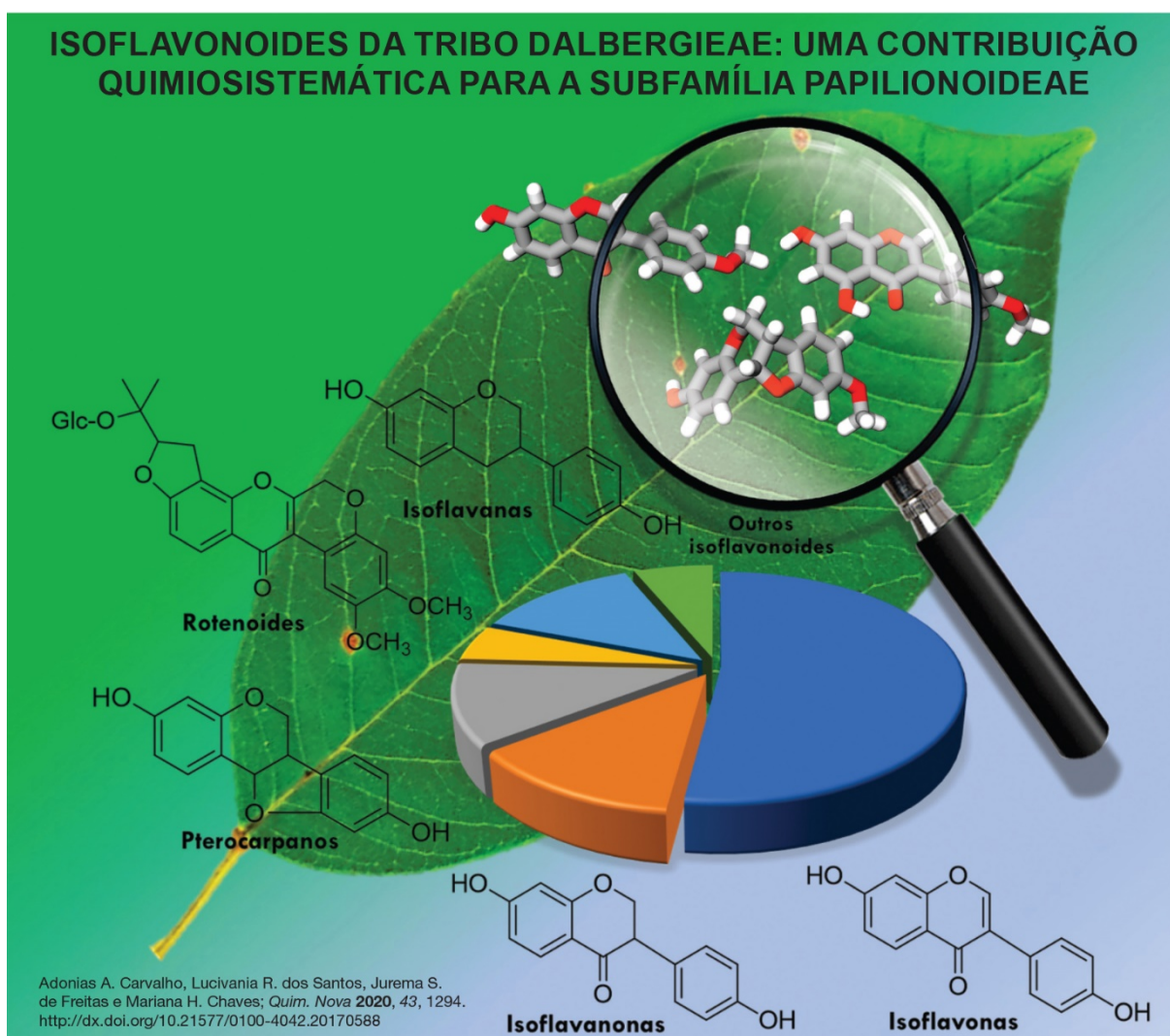
This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

química nova

ISSN: 0100-4042

ISSN: 1678-7064 on line

Volume 43, Número 9, 2020



ISOFLAVONOIDES DA TRIBE DALBERGIEAE: UMA CONTRIBUIÇÃO QUIMIOSSISTEMÁTICA PARA A SUBFAMÍLIA PAPILIONOIDEAE

Adonias A. Carvalho^{ab}, Lucivania R. dos Santos^a, Jurema S. de Freitas^a e Mariana H. Chaves^{a*†}^aDepartamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina – PI, Brasil^bDiretoria de Ensino, Instituto Federal do Piauí, 64260-000 Piriápolis – PI, Brasil

Recebido em 28/02/2020; aceito em 25/05/2020; publicado na web em 08/07/2020

ISOFLAVONOIDS OF THE TRIBE DALBERGIEAE: A CHEMOSYSTEMATIC CONTRIBUTION TO THE SUBFAMILY PAPILIONOIDEAE. Plants from Fabaceae family have several secondary metabolites and high biological potential. The subfamily Papilionoideae (Fabaceae) has 28 tribes, of which Dalbergieae comprises 49 genera and 1325 species. Isoflavonoids are chemotaxonomic markers of Papilionoideae and have important biological properties. This review describes the isoflavonoids and biological activities from the tribe Dalbergieae (Fabaceae–Papilionoideae) species, in the period of 1945 to 2019. A total of 240 isoflavonoids were found in 69 species and in 15 genera. Formononetin, biochanin A and medicarpin were the most frequent isoflavonoids in this tribe. *Dalbergia*, *Machaerium*, *Andira* and *Pterocarpus* genera had a high number of species with occurrence of isoflavonoids. A total of 81 isoflavonoids and 46 species showed biological activities. This suggests that more works are necessary to evaluate the potential of this tribe. The present study contributes to the taxonomic classification of genus or species in the family, subfamily or tribe, once the correlation between secondary metabolites and morphological data is an important tool for the classification, phylogeny and evolution of species. This compilation also contributes to extend and update the researched period on the occurrence of isoflavonoids in species of the tribe Dalbergieae, described in the literature in other bibliographic reviews.

Keywords: isoflavonoids; isoflavones; Dalbergieae; Papilionoideae; Fabaceae.

INTRODUÇÃO

Estudos quimiosistemáticos ou quimiotaxonômicos utilizam dados químicos provenientes do metabolismo especializado ou micromolecular das plantas e podem auxiliar na identificação e classificação de espécies de difícil caracterização com o uso somente de análises morfológicas. A quimiosistemática considera o fato dos metabólitos especializados e suas vias biossintéticas serem frequentemente específicas e restritas a organismos taxonomicamente relacionados.^{1,2}

A grande variedade de constituintes químicos isolados de espécies vegetais em conjunto com a morfologia e dados citológicos permitem diagnosticar o histórico do organismo e as modificações sofridas em seu ambiente.³

Recentemente, um novo termo denominado quimiofenética foi proposto para descrever estudos quimiosistemáticos que não visem somente elucidar relações filogenéticas, mas também descrever a variedade de produtos naturais micro e macromoleculares de um determinado táxon.¹⁴ Dessa forma, além das abordagens anatômicas, morfológicas e cariológicas já reconhecidas como de grande importância para o estabelecimento de sistemas naturais, os estudos quimiofenéticos reúnem uma combinação de dados fitoquímicos e macromoleculares e até mesmo a busca sistemática de produtos naturais raros que podem ajudar na caracterização de clados, até agora suportados apenas por dados de sequência de DNA.⁴

Plantas da família Fabaceae Lind (Leguminosae) são conhecidas pela diversidade de metabólitos secundários e por seu elevado potencial biológico.⁵ O modo de distribuição destes metabólitos pode ser usado para identificar a origem botânica e muitas vezes expressa a adaptação, regulação e evolução sofrida por um determinado táxon.^{6,8}

Os isoflavonoides são metabólitos secundários ou micromoleculares quase que exclusivamente restritos a subfamília Papilionoideae

(Fabaceae), sendo alvo de três revisões bibliográficas compreendendo o período de 1997 a 2011.⁶ Entretanto, considerando a relevância dos metabólitos secundários como instrumentos de classificação taxonômica, que a tribo Dalbergieae (Fabaceae–Papilionoideae) passou por várias modificações, especialmente, após avanços na filogenia molecular,⁹ o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica dos isoflavonoides e atividades biológicas de espécies desta tribo, no período de 1945 a 2019, contribuindo para ampliar e atualizar o período pesquisado sobre a ocorrência destes metabólitos nesta tribo, como também ajudar na caracterização de clados e fornecer subsídios para guiar futuras prospeções fitoquímicas que visem a descoberta de novos agentes terapêuticos.

O táxon Fabaceae

Fabaceae é considerada a terceira maior família de Angiospermas em número de espécies ficando atrás apenas de Asteraceae e Orchidaceae. É constituída por aproximadamente 36 tribos, 770 gêneros, 19.500 espécies e está distribuída em quase todos os continentes, exceto na Antártida.^{7,10} Essa família é a segunda em importância econômica, ficando atrás apenas da Poaceae.^{7,8}

No Brasil, Fabaceae é constituída por 213 gêneros, 2.756 espécies, sendo 1.458 endêmicas, 53 subespécies e 731 variedades.¹¹ A classificação tradicional dividia a família Fabaceae em três subfamílias: Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae, as quais podem ser diferenciadas principalmente pela prefloração das pétalas.¹⁰ No entanto, uma classificação mais recente baseada em estudos taxonômicos e moleculares foi endossada pelo *Legume Phylogeny Working Group*,⁷ no qual dividiu a família Fabaceae em seis subfamílias: Papilionoideae (503 gêneros, cerca 14.000 espécies), Caesalpinioideae (148 gêneros, cerca de 4.400 espécies; incluindo os gêneros do clado Mimosoideae), Detarioideae (84 gêneros, cerca de 760 espécies), Dialioideae (17 gêneros, cerca 85 espécies), Cercidoideae (12 gêneros, cerca de 335 espécies) e Duparquetioideae (1 gênero, 1 espécie).⁷

*e-mail: mariana@ufpi.edu.br

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DE ISOPRENOIDES NA FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FOLHAS DE *MACHAERIUM ACUTIFOLIUM* POR CG-EM

Data de aceite: 06/02/2020

Adonias Almeida Carvalho

Instituto Federal do Piauí – IFPI (Campus Piriipiri)

Piriipiri – Piauí

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Jurema Santana de Freitas

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Lucivania Rodrigues dos Santos

Universidade Federal do Piauí– UFPI

Teresina – Piauí

Bruno Quirino Araújo

Universidade Federal do Piauí– UFPI

Teresina – Piauí

Programa de Pós-Graduação em Química,

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória – Espírito Santo

Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

RESUMO: O estudo fitoquímico da fração hexânica das folhas de *Machaerium acutifolium* Vogel (Fabaceae-Papilionoideae) resultou no isolamento de uma mistura composta por quatro esteroides: colesterol (1), campesterol

(2) sitosterol (3) e estigmasterol (4) e um triterpenoide: lupeol (5). As estruturas destes compostos foram identificadas por CG-EM, considerando o tempo de retenção, padrão de fragmentação e por comparação com dados da literatura. Este é o primeiro relato de identificação dos compostos 1, 2 e 4 no gênero *Machaerium*.

PALAVRAS-CHAVE: triterpenoide, esteroides, estudo fitoquímico, *Machaerium acutifolium*, Fabaceae

IDENTIFICATION OF ISOPRENOIDS FROM HEXANIC FRACTION OF LEAVES OF *MACHAERIUM ACUTIFOLIUM* BY CG-EM

ABSTRACT: The phytochemical study of the hexane fraction of the leaves of *Machaerium acutifolium* Vogel (Fabaceae-Papilionoideae) resulted in the isolation of the M1 mixture and identification of four steroids: cholesterol (1), campesterol (2) sitosterol (3) and stigmasterol (4) and one triterpenoid: lupeol (5). The structures of these compounds were identified by GC-MS, considering retention time, fragmentation pattern and by comparison with literature data. This is the first report of identification of compounds 1, 2 and 4 in the genus *Machaerium*.

KEYWORDS: triterpenoid, steroids, phytochemical study, *Machaerium acutifolium*, Fabaceae

CAPÍTULO 13

IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES DAS FOLHAS DE *MACHAERIUM ACUTIFOLIUM* (PAPILIONOIDEAE-FABACEAE) POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS

Adonias Almeida Carvalho

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Instituto Federal do Piauí – IFPI (Campus Piripiri)

Piripiri – Piauí

Lucivania Rodrigues dos Santos

Universidade Federal do Piauí– UFPI

Teresina – Piauí

Renato Pinto de Sousa

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Jurema Santana de Freitas

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Bruno Quirino Araújo

Universidade Federal do Piauí– UFPI

Teresina – Piauí

Programa de Pós-Graduação em Química,
Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória - ES

Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

RESUMO: A fração aquosa proveniente da partição do extrato etanólico das folhas de *Machaerium acutifolium* (Fabaceae-Papilionoideae) foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo

de diodo (CLAE-DAD), fase móvel MeOH/H₂O-AcOH (0,2%) e coluna de fase reversa C18, e por espectrometria de massas acoplado a fonte de ionização por electrospray (ESI-MS), no modo negativo. O estudo químico mostrou a ocorrência de flavonóis e isoflavonoides, os quais foram identificados como canferol-3-*O*-rutinosil-7-*O*-diraminosídeo (1), quercetina-3-*O*-rutinosil-7-*O*-ramnosídeo (2), rutina (3), canferol-3-*O*-rutinosídeo (4), canferol-3-*O*-glicosídeo (5), daidzeína-8-*C*-glicosídeo (6) e genisteína (7). Estes compostos estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Machaerium*.

PALAVRAS-CHAVE: *Machaerium acutifolium*, CLAE-DAD, ESI-MS, flavonoides, isoflavonoides

FLAVONOIDS IDENTIFICATION FROM LEAVES OF *MACHAERIUM ACUTIFOLIUM* (PAPILIONOIDEAE-FABACEAE) BY MASS SPECTROMETRY

ABSTRACT: The aqueous fraction obtained by partition of the ethanolic extract from leaves of *Machaerium acutifolium* (Fabaceae-Papilionoideae) was analyzed by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), MeOH/H₂O-AcOH (0.2%) and reverse phase C18 column, and by mass spectrometry coupled to electrospray



XXXIII
RESEM
Brazilian Conference
on Natural Products

7th
BCNP

November 10-13, 2019 - Rio de Janeiro - Brazil

Certificate

We hereby certify that the poster entitled

Flavonoids identification of *Machaerium acutifolium* by ESI-MS

from the authors

Adonias Almeida Carvalho, Lucivania Rodrigues dos Santos, Renato Pinto de Sousa, Jurema Santana de Freitas, Mariana Helena Chaves

was presented during the 7th Brazilian Conference on Natural Product/ XXXIII RESEM helded between
November 10-13, 2019.

Claudia Moraes de Rezende
Claudia Moraes de Rezende
Organizing Committee of 7th Brazilian
Conference on Natural Products

Maria de Fátima das Graças Fernandes da Silva
Maria de Fátima das Graças Fernandes da Silva
Director of the Division of Natural Products/
Brazilian Chemical Society

ab
Sociedade Brasileira de Química

FIQ/UNIZ

IME

UFRJ

ufes

unesp

Certification by Galois



**43ª REUNIÃO ANUAL
VIRTUAL DA SBQ**

DE 5 A 16 DE OUTUBRO/2020

Certificamos que o trabalho intitulado:
**Isoprenoides da fração hexânica das folhas de
Machaerium acutifolium Vogel**

De autoria de

**Jurema Santana de Freitas, Adonias Almeida
Carvalho, Lucivania Rodrigues dos Santos, Rodrigo
Ferreira Santiago, Bruno Quirino Araújo, Mariana
Helena Chaves**

foi submetido, aprovado e apresentado na divisão de *Produtos
Naturais - QPN* como *Sessão Coordenada IC - Aluno de
graduação* da 43ª Reunião Anual Virtual da SBQ, que ocorreu
nos dias 5 a 16 de outubro de 2020.

Fernando de Carvalho da Silva

Secretário Geral da SBQ
Presidente da Comissão Organizadora da 43ª RASBQ



Certification by Galois

Apêndice



α,β -Amyrin prevents steatosis and insulin resistance in a high-fat diet-induced mouse model of NAFLD via the AMPK-mTORC1-SREBP1 signaling mechanism

R.P. de Lima¹✉, P.I.G. Nunes¹✉, A.F.S.C. Viana¹✉, F.T.B. de Oliveira¹✉, R.A.C. Silva¹✉,
A.P.N.N. Alves²✉, D.A. Viana³✉, S.G.C. Fonseca⁴✉, A.A. Carvalho⁵✉, M.H. Chaves⁶✉,
V.S. Rao¹✉, and F.A. Santos¹✉✉✉

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

²Departamento de Clínica Odontológica, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

³Laboratório de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Ciência Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

⁴Departamento de Farmácia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

⁵Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Piriá Campus, Piriá, PI, Brasil

⁶Departamento de Química, Ministro Petrônio Portella Campus, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), characterized by hepatosteatosis and steatohepatitis, is intrinsically related to obesity. Our previous study reported on the anti-obese activity of α,β -amyrin (AMY), a pentacyclic terpenoid isolated from *Protium heptaphyllum*. This study investigated its ability to prevent fatty liver and the underlying mechanism using the mouse model of NAFLD. NAFLD was induced in male Swiss mice fed a high fat diet (HFD) for 15 weeks. The controls were fed a normal chow diet (ND). The mice were simultaneously treated with AMY at 10 and 20 mg/kg or fenofibrate at 50 mg/kg. Lipid levels along with metabolic and inflammatory parameters were assessed in liver and serum. The liver sections were histologically examined using H&E staining. RT-qPCR and western blotting assays were performed to analyze signaling mechanisms. Mice fed HFD developed severe hepatic steatosis with elevated triglycerides and lipid droplets compared with ND controls. This was associated with a decrease in AMP-activated protein kinase (AMPK) activity, an increase of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling, and enhanced sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) expression, which have roles in lipogenesis, inhibition of lipolysis, and inflammatory response. AMY treatment reversed these signaling activities and decreased the severity of hepatic steatosis and inflammatory response, evidenced by serum and liver parameters as well as histological findings. AMY-induced reduction in hepatic steatosis seemed to involve AMPK-mTORC1-SREBP1 signaling pathways, which supported its beneficial role in the prevention and treatment of NAFLD.

Key words: α,β -Amyrin; High-fat diet; Nonalcoholic fatty liver disease; Hepatosteatosis; Signaling pathways; Lipid metabolism

Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a spectrum of liver diseases that comprises hepatosteatosis and nonalcoholic steatohepatitis (NASH), progressing to fibrosis and cirrhosis (1,2). Hepatic steatosis is characterized by the accumulation of free fatty acids and cholesterol in liver tissues, whereas NASH is associated with hepatocyte death, inflammation, and fibrosis (3). The global prevalence of NAFLD in the general population has been estimated at 25% and the prevalence rate in South America is higher than that reported for the US, approximately

30–45% (4). The persistent increase in liver lipids in NAFLD, such as diacylglycerols and triglycerides, intensifies hepatic insulin resistance, which may further lead to cardiovascular complications and type 2 diabetes (5). Currently, there is no approved pharmacological treatment for NAFLD (6), so a need exists to develop drugs that are effective against NAFLD and the associated health risks (7). In this regard, there is growing interest in the search for natural medicinal substances of plant origin that inhibit fatty liver (8,9).

Correspondence: F.A. Santos: <flavia@ufc.br>

Received March 23, 2021 | Accepted May 27, 2021

Braz J Med Biol Res | doi: 10.1590/1414-431X2021e11391



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph

α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells

Karina Moura de Melo^a, Francisca Tuelly Bandeira de Oliveira^b, Rose Anny Costa Silva^b, Ana Luiza Gomes Quinderé^b, José Delano Barreto Marinho Filho^c, Ana Jérnia Araújo^c, Eanes Delgado Barros Pereira^b, Adonias Almeida Carvalho^d, Mariana Helena Chaves^d, Vietla Satyanarayana Rao^e, Flávia Almeida Santos^{e,*}

^a Postgraduate Program in Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Postgraduate Program in Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Research Center on Biodiversity and Biotechnology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^d Department of Organic Chemistry, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^e Department of Physiology and Pharmacology, Natural Products Laboratory, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

α , β -Amyrin
3T3-L1 cells
Adipocyte differentiation
PPAR γ
C/EBP α
GLUT4
Antiadipogenicity

ABSTRACT

Previous studies have reported the anti-obesity effects of α , β -Amyrin in high fat fed mice. This study aimed to evaluate whether α , β -Amyrin has an anti-adipogenic effect in 3T3-L1 murine adipocytes and to explore the possible underlying mechanisms. 3T3-L1 pre-adipocytes were differentiated in a medium containing insulin, dexamethasone, and 1-methyl-3-isobutylxanthine. Cytotoxicity of α , β -Amyrin was assessed by MTT assay. Lipid content in adipocytes was determined by Oil-Red O staining. In addition, the protein expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), CCAAT/enhancer binding proteins alpha (C/EBP α), beta (C/EBP β), and delta (C/EBP δ) and glucose transporter 4 (GLUT4) were determined by qRT-PCR and western blot analysis. Oil-Red O staining revealed markedly reduced fat accumulation by α , β -Amyrin (6.25–60 μ g/mL) without affecting cell viability. Furthermore, our results indicate that α , β -Amyrin can significantly suppress the adipocyte differentiation by downregulating the expression levels of adipogenesis-related key transcription factors such as PPAR γ and C/EBP α , but not C/EBP β or C/EBP δ . In addition, the protein expression of membrane GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes treated with α , β -Amyrin was significantly higher than in control cells, indicating that α , β -Amyrin augments glucose uptake. These findings suggest that α , β -Amyrin exerts an anti-adipogenic effect principally via modulation of lipid and carbohydrate metabolism in 3T3-L1 cells. The present *in vitro* findings, taken together with our earlier observation of the anti-obesity effect *in vivo*, suggest that α , β -Amyrin can be developed as a new therapeutic agent for treatment and prevention of obesity.

1. Introduction

Obesity is a multifactorial disease and its incidence has increased at an alarming rate in recent years, thus becoming a worldwide health problem, with incalculable social costs [1]. The availability of only few effective treatment options for most individuals with obesity has prompted the search for natural products. In this regard, the potential of herbal compounds to counteract obesity are currently receiving much attention [2–4]. α , β -Amyrin is an isomeric triterpenoid mixture

isolated from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March (Burceraceae Family), comprising two different subgroups of pentacyclic triterpenoids, ursane and oleanane (60:40), respectively [5]. The only structural variation involves the E-ring methyl group, which occupies the position either at C-19 (α -Amyrin) or C-20 (β -Amyrin) (Fig. 1). α , β -Amyrin has been shown to possess a wide spectrum of biological and pharmacological activities including anti-inflammatory [6,7], anti-nociceptive [8], gastroprotective [9], hepatoprotective [10], anti-hyperglycemic and hypolipidemic [11] effects. More recently, we reported the anti-obesity

* Corresponding author at: Department of Physiology and Pharmacology, Natural Products Laboratory, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Cel Nunes de Melo, 1315, Fortaleza, Ceará, 60430-270, Brazil.

E-mail address: fasufc@gmail.com (F.A. Santos).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2018.11.027>

Received 19 June 2018; Received in revised form 3 November 2018; Accepted 6 November 2018

0753-3322/© 2018 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

DOI: <http://dx.doi.org/10.9771/cp.v13i3.28283>

Análise Prospectiva com Ênfase Científica e Tecnológica do Gênero *Erythrina* (Fabaceae)

Prospective Analysis with Scientific and Technological Envelope of the Genus Erythrina (Fabaceae)

Adonias Almeida Carvalho^{1,2}

Luanda Ferreira Floro da Silva²

Jurema Santana de Freitas²

Rodrigo Ferreira Santiago²

Mariana Helena Chaves²

¹Instituto Federal do Piauí, Pripri, PI, Brasil

²Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

Resumo

O gênero *Erythrina* (Fabaceae) compreende 100 espécies de plantas de valor comercial e com propriedades biológicas importantes. O objetivo deste estudo foi realizar uma prospecção científica e tecnológica do gênero *Erythrina*. Os bancos de patentes pesquisados foram o European Patent Office (EPO), o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do Brasil, o Banco de Patentes Latino-Americanas (LATIPAT), o United States Patent and Trademark Office (USPTO) e o World Intellectual Property Organization (WIPO). A maioria das patentes está depositada na EPO e WIPO com 271 e 234 registros, respectivamente. O crescimento no número de patentes depositadas ocorreu a partir de 2010. A China, os Estados Unidos, o Canadá e o Japão são os principais depositantes de patentes envolvendo as espécies de *Erythrina* nas bases EPO e WIPO. As classificações internacionais mais frequentes das patentes foram A61K, seguida de A61P e C12N.

Palavras-chave: *Erythrina*. Fabaceae. Prospecção Tecnológica.

Abstract

The genus *Erythrina* (Fabaceae) comprises 100 species of plants of commercial value and with important biological properties. The objective of this study was to carry out a scientific and technological survey of the genus *Erythrina*. The patent banks surveyed were the European Patent Office (EPO), the National Institute of Industrial Property of Brazil (INPI), the Latin American Patent Bank (LATIPAT), the United States Patent and Trademark Office (USPTO) and the World Intellectual Property Organization (WIPO). Most patents are deposited in the EPO and WIPO with 271 and 234 registrations, respectively. The growth in the number of patents deposited occurred as of 2010. China, the United States, Canada and Japan are the main patent depositors involving *Erythrina* species in the EPO and WIPO bases. The most frequent international patent classifications were A61K, followed by A61P and C12N.

Keywords: *Erythrina*. Fabaceae. Technological Prospecting.

Área Tecnológica: Prospecção Tecnológica.



Direito autorial e licença de uso: Este artigo está licenciado sob uma Licença Creative Commons. Com essa licença você pode compartilhar, adaptar, para qualquer fim, desde que atribua a autoria da obra, forneça um link para a licença, e indique se foram feitas alterações.

Artigo recebido em: 04/08/2019

Revisado em: 04/11/2019

Aprovado em: 10/12/2019

CAPÍTULO 13

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE BIOCAMPÓSITOS À BASE DE QUITOSANA E HIDROXIAPATITA PARA APLICAÇÕES NA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

Data de aceite: 05/12/2019

Adonias Almeida Carvalho

Instituto Federal do Piauí – IFPI (Campus Piriipiri)
Piriipiri – Piauí

Ricardo Barbosa de Sousa

Instituto Federal do Tocantins – IFTO (Campus Araguaína)
Araguaína – Tocantins

Jean Claudio Santos Costa

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Mariana Helena Chaves

Laboratório de Produtos Naturais
Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Edson Cavalcanti da Silva Filho

Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados
Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

RESUMO: Os biocompósitos são uma classe de materiais estruturais oriundos da combinação de dois ou mais materiais componentes, visando aperfeiçoar suas propriedades, tal como a combinação da quitosana com a hidroxiapatita. Foram realizadas buscas por depósitos de patentes nas bases *European Patent Office* (EPO), *United States Patent and*

Trademark Office (USPTO) e Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI) e de artigos na *Web of Science*, com coleta de dados no mês de outubro de 2019. A China foi o país que mais publicou artigos científicos e mais depositou patentes. O depósito de patentes se destacou a partir de 2007 e as publicações de artigos a partir de 2009. A área de Ciência de Materiais se destacou com artigos publicados sobre o tema. A classificação de patente mais abundante foi à classe A61 relacionada a finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas).

PALAVRAS-CHAVE: Biocompósito, Hidroxiapatita, Quitosana.

TECHNOLOGICAL PROSPECTION CHITOSAN AND HYDROXYAPATITE-BASED BIOCAMPÓSITES FOR BONE TISSUE ENGINEERING PURPOSES

ABSTRACT: Biocomposites are a class of structural materials derived from the combination of two or more component materials, aiming to perfect the properties, such as by combining chitosan to hydroxyapatite. Researches were made for patent deposits at the European Patent Office (EPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO) and National Institute of Industrial Property of Brazil (INPI) and articles in the Web of Science, with data

CAPÍTULO 12

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA CARBOPLATINA: UM FÁRMACO USADO NO TRATAMENTO DE CÂNCER

Data de aceite: 23/01/2020

Márcia Denise Alves Veras

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Lucivania Rodrigues dos Santos

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Adonias Almeida Carvalho

Instituto Federal do Piauí – IFPI (Campus Piri-piri)

Piri-piri - Piauí

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

RESUMO: A carboplatina ou *cis*-diamino-(1,1-ciclobutanodicarboxilato) platina(II) é um fármaco, análogo da cisplatina, comumente utilizado no tratamento de diversos tipos de cânceres devido a sua comprovada ação anticancerígena e baixa toxicidade *in vivo*. O objetivo deste estudo foi realizar uma prospecção tecnológica sobre a carboplatina e sua utilização no tratamento de câncer. Foram analisadas a ocorrência de depósitos de patentes em bancos de inovação e tecnologia nacionais e internacionais (INPI, USPTO, EPO e WIPO), bem como de artigos científicos nas

bases de dados *Science Direct*, *Web of Science*, *Pubmed* e *Scielo* selecionando as patentes e artigos que possuíam o termo carboplatina e combinação deste com o termo câncer no título e/ou resumo. Durante as buscas nas bases de dados foram utilizadas as palavras-chave em português para as bases brasileiras e os termos em inglês nas demais bases. Os resultados demonstraram que os Estados Unidos é o principal país depositário e ainda o que possui maior número de publicações nos últimos 10 anos. A classificação internacional (CIP) mais abundante nessa prospecção foi A61K, a qual trata de preparações para finalidades médicas, sendo a Oncologia a área que apresenta maior quantidade de publicações.

PALAVRAS-CHAVE: carboplatina, câncer, prospecção tecnológica

TECHNOLOGICAL PROSPECTION CARBOPLATIN: A DRUG USED IN CANCER TREATMENT

ABSTRACT: Carboplatin or *cis*-diamino-(1,1-cyclobutanedicarboxylate) platinum(II) is a cisplatin-like drug commonly used in the treatment of various cancers due to its proven anticancer action and low *in vivo* toxicity. The aim of this study was to conduct a technological prospecting for carboplatin and its use in cancer treatment. The occurrence of patent filings in national and international innovation and

CAPÍTULO 15

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Simaba ferruginea*

Jessica Sara de Sousa Macêdo Oliveira

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Lucivania Rodrigues dos Santos

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Adonias Almeida Carvalho

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Instituto Federal do Piauí – IFPI (Campus Piriapiri)
Piriapiri – Piauí

Renato Pinto de Sousa

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Gerardo Magela Vieira Júnior

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Ruth Raquel Soares de Farias

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

RESUMO: O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Simaba ferruginea* (Simaroubaceae) resultou no isolamento e identificação do composto fenólico ácido elágico (1) e do flavonoide quercitrina (2). O

composto 1 está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Simaba*. O extrato, bem como as frações provenientes da partição deste apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH, sobretudo a fração acetato de etila, seguida da fração diclorometano. O extrato e fração acetato de etila exibiram os menores valores de CE_{50} e maiores percentuais de atividade antioxidante e teores de fenóis totais, determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. O potencial antioxidante do extrato etanólico e das frações pode ser em parte atribuído a presença de compostos fenólicos ácido elágico e quercitrina.

PALAVRAS-CHAVE: ácido elágico, quercitrina, fenóis totais, *Simaba ferruginea*, Simaroubaceae

ABSTRACT: The phytochemical study of the ethanolic extract of the leaves of *Simaba ferruginea* (Simaroubaceae) resulted in the isolation and identification of the phenolic compound ellagic acid (1) and the flavonoid quercitrin (2). Compound 1 is being reported for the first time in the genus *Simaba*. The extract, as well as the fractions from the partition, showed antioxidant activity against the DPPH radical, especially the ethyl acetate fraction, followed by the dichloromethane fraction. The extract and ethyl acetate fraction showed the lowest values of IC_{50} and higher of percentage of antioxidant activity and total phenol contents,

CAPÍTULO 15

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE RUTINA E QUERCETINA NAS FOLHAS DE *Senna acuruensis*

Lucivania Rodrigues dos Santos

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Adonias Almeida Carvalho

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Instituto Federal do Piauí – IFPI (Campus Piripiri)

Piripiri – Piauí

Luanda Ferreira Floro da Silva

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Gerardo Magela Vieira Júnior

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Ruth Raquel Soares de Farias

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

RESUMO: Um método para quantificação de rutina e quercetina nas folhas de *Senna acuruensis* (Fabaceae-Caesalpinioideae) foi desenvolvido e validado. Todos os resultados estão de acordo com a Resolução RE nº 899/2003 (ANVISA). Os flavonoides foram quantificados nos extratos e frações por cromatografia líquida de alta eficiência em 255 e 356 nm para rutina

e 255 e 370 nm para quercetina, demonstrando que quantificação pode ser realizada em qualquer um destes comprimentos de onda. Os teores de rutina e quercetina nos extratos etanólico e aquoso e fração hidrometanólica das folhas de *S. acuruensis* variaram de 52,40-89,49 mg g⁻¹ (255 nm) e 54,54-92,07 mg g⁻¹ (356 nm) para rutina e de 11,49-24,34 mg g⁻¹ (255 nm) e 11,56-24,88 mg g⁻¹ (370 nm) para quercetina e foram superiores aos relatados para outras espécies de *Senna*. O método proposto pode ser considerado linear, seletivo, sensível, exato e preciso.

PALAVRAS-CHAVE: Rutina, Quercetina, Quantificação, *Senna acuruensis*, Fabaceae

ABSTRACT: A method for quantification of rutin and quercetin in the leaves of *Senna acuruensis* (Fabaceae-Caesalpinioideae) was developed and validated. All results were according to the Resolution RE 899/2003 (ANVISA). Flavonoids were quantified in extracts and fractions by high performance liquid chromatography at 255 and 356 nm for rutin and 255 and 370 nm for quercetin, demonstrating that quantification can be performed at any of these wavelengths. The levels of rutin and quercetin in the ethanolic and aqueous extracts and the hydrometanic fraction of leaves of *S. acuruensis* ranged from 52.40-89.49 mg g⁻¹ (255 nm) and 54.54-92.07 mg g⁻¹ (356 nm) for rutin and 11.49-24.34 mg g⁻¹ (255

CAPÍTULO 1

ALCALOIDES DO GÊNERO *Senna* E POTENCIAL FARMACOLÓGICO

Lucivania Rodrigues dos Santos

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Adonias Almeida Carvalho

Instituto Federal do Piauí – IFPI (Campus Piriipiri)

Piriipiri - Piauí

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Rodrigo Ferreira Santiago

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí – UFPI

Teresina – Piauí

RESUMO: *Senna* (Fabaceae-Caesalpinioideae) é um gênero pantropical cujas espécies são usadas na medicina tradicional no tratamento de vários tipos de doenças, principalmente as de pele e malária. Uma revisão bibliográfica foi realizada com o intuito de documentar a ocorrência de alcaloides neste gênero, bem como as suas atividades biológicas. Foram encontrados 51 alcaloides, principalmente piperídnicos, distribuídos em seis espécies, dos quais 36 são bioativos. Também se observou a presença de alcaloides piridínico e tricíclicos com núcleo isoquinolínico. Os compostos ativos apresentaram atividades antioxidante,

antimalárica, antimicrobiana, tripanocida, anticolinesterásica, dentre outras, o que justifica o uso farmacológico de algumas espécies.

PALAVRAS-CHAVE: *Senna*, alcaloides, potencial biológico, Fabaceae

ALKALOIDS OF *Senna* GENUS AND PHARMACOLOGICAL POTENTIAL

ABSTRACT: *Senna* (Fabaceae-Caesalpinioideae) is a pantropical genus whose species are used in traditional medicine to treat various types of diseases, especially skin and malaria. A literature review was performed to document the occurrence of alkaloids in this genus, as well as their biological activities. We found 51 alkaloids, mainly piperidines, distributed in six species, of which 36 are bioactive. The presence of pyridine and tricyclic alkaloids with isoquinoline nuclei was also observed. The active compounds showed antioxidant, antimalarial, antimicrobial, trypanocidal, anticholinesterase activities, among others, which justifies the pharmacological use of some species.

KEYWORDS: *Senna*, alkaloids, biological potential, Fabaceae

1 | INTRODUÇÃO

O gênero *Senna* Mill (Fabaceae-Caesalpinioideae) é constituído por

CAPÍTULO 21

TRITERPENÓIDES, ESTERÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS CASCAS DO CAULE DE *Luehea divaricata*

Lilides Ferreira Santos

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Lucivania Rodrigues dos Santos

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Adonias Almeida Carvalho

Instituto Federal do Piauí – IFPI (Campus Piriipiri)
Piriipiri – Piauí

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Renato Pinto de Sousa

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Mateus Lima Neris

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Gerardo Magela Vieira Júnior

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Samya Danielle Lima de Freitas

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí – UFPI
Teresina – Piauí

RESUMO: A investigação fitoquímica do extrato etanólico das cascas do caule de *Luehea*

divaricata Mart & Zucc resultou no isolamento e identificação dos triterpenóides pentacíclicos friedelina (1), lupenona (2), lupeol (3), hop-17(21)-en-3-ona (4), hop-17(21)-en-3-ol (5), taraxasterol (6), ácido 3-O-acetil-oleanólico (7) e ácido 3-O-acetil-ursólico (8) e dos esteróides sitosterol (9) e estigmasterol (10). O extrato etanólico e suas frações da partição apresentaram atividade antioxidante no ensaio frente ao radical DDPH, sendo o extrato e a fração acetato de etila mais ativos e com os maiores teores de fenóis totais, determinado pelo método de Folin-Ciocalteu.

PALAVRAS-CHAVE: *Luehea divaricata*, triterpenóides, atividade antioxidante, Fabaceae

TRITERPENÓIDS, STEROIDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM STEM BARK OF *Luehea divaricata*

ABSTRACT: The phytochemical investigation of the ethanolic extract of the stem bark of *Luehea divaricata* Mart & Zucc resulted in the isolation and identification of pentacyclic triterpenoids: friedelina (1), lupenone (2), lupeol (3), hop-17(21)-en-3-one (4), hop-17(21)-en-3-ol (5), taraxasterol (6), 3-O-acetyl oleanolic acid (7) and 3-O-acetyl ursolic acid (8) and the steroids sitosterol (9) and stigmasterol (10). The ethanolic extract and its partition fractions