



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE *Macrolobium acaciifolium* (Benth.) Benth.
(FABACEAE)

David Ribeiro da Silva

Manaus – AM

Julho, 2023

David Ribeiro da Silva

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE *Maclobium acaciifolium* (Benth.) Benth.
(FABACEAE)**

Trabalho de Tese de Doutorado apresentado à
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal do Amazonas,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Dra. Cecilia Veronica Nunez
Orientadora

Manaus – AM
Julho, 2023

Ficha Catalográfica

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

S586e Silva, David Ribeiro da
Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de
Macrobium acaciifolium (Benth.) Benth. (Fabaceae) / David
Ribeiro da Silva . 2023
178 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Cecilia Veronica Nunez
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Flavonoides. 2. Ácidos fenólicos. 3. Antibacteriano. 4.
Luteolina. 5. Apigenina. I. Nunez, Cecilia Veronica. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

Ao meu Deus, Senhor Jesus, sem o qual não consigo viver;
À minha esposa Eduarda. Você foi incrível nestes momentos de muitas batalhas;
Aos meus pais pelo apoio constante;
Aos companheiros de laboratório pela experiência e momentos de muita luta;
À doutora Cecilia Veronica Nunez pela incrível liderança e incentivo a este trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, a quem devo minha vida. Sou grato por minha existência. Este fato pra mim é um mistério porque sou tão impreciso e falho, com tantos defeitos que nem consigo contar, mas mesmo assim estendeu seu amor e misericórdia a minha vida e das pessoas próximas a mim. Seu perdão e amor ultrapassa os limites de tudo e me consola, mostrando que sou insignificante diante de tudo que criou, e que ainda assim, me ama. Obrigado Jesus, meu Deus.

À minha esposa Eduarda por ter estado ao meu lado com muita paciência e amor. Foi importantíssima em momentos de instabilidade emocional, cuidando de mim e me confortando com doses elevadíssimas de carinho. Sua inteligência é imensurável e seu esforço é absurdamente constante. Passamos por momentos bem delicados financeiramente, mas você esteve comigo de mãos dadas e me apoiando. Você é um exemplo de tudo de bom que há neste mundo. Ainda temos uma estrada longa pela vida juntos.

À minha família, nas pessoas de minha mãe Clenilda, meu pai Djalma e meus irmãos Diego e Diandra. O apoio e amor de vocês foram incríveis. Espero compartilhar minhas alegrias mais e mais com vocês.

À minha orientadora doutora Cecilia Veronica Nunez por ter apostado em mim e nunca ter me desamparado. O profissional que me tornei foi graças a observação de sua liderança, sensatez, ética e cuidado com todos os seus alunos. Por muitas vezes estive sem caminhos a seguir na pesquisa, mas seus direcionamentos foram cruciais e seu apoio, incompreensivelmente fundamentais.

Aos companheiros de laboratório, agradeço a todos por me proporcionarem momentos muito bons, desde os aniversários, lanches e dias de muito trabalho. Em especial aos que dividiram mais momentos nesta etapa: Andrei, Kalyne, Lana e Weison.

Obrigado aos meus amigos do Programa de Química da UFAM. Foi muito bom ter conhecido vocês durante o curso.

Agradeço imensamente ao Magno, Sabrina e Zelina por darem todo o apoio da Central Analítica do INPA.

Sou muito grato ao INPA pelo espaço cedido para realização do projeto e à FAPEAM pela bolsa de estudo.

Muito obrigado

RESUMO

A Química de Produtos Naturais tem proporcionado a descoberta de novas moléculas biologicamente ativas, as quais são extraídas de espécies vegetais com usos diversificados para humanos e animais. Uma dessas espécies é *Macrolobium acaciifolium*, uma árvore de grande porte pertencente à família Fabaceae, subfamília Detarioideae presente não apenas na Amazônia, mas em outros estados do Brasil, além de países da América Central e do Sul. O presente projeto visou realizar o estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *M. acaciifolium*. As folhas e galhos da planta foram moídos e extraídos com hexano e metanol. O estudo fitoquímico dos extratos de *M. acaciifolium* permitiu o isolamento e identificação de 18 substâncias, sendo 15 delas relatadas pela primeira vez nesta espécie. Do extrato metanólico das folhas foram obtidos os flavonoides luteolina-3'-*O*-ramnosídeo (1), neoastilbina (2), astilbina (3), neoisoastilbina (4), isoastilbina (5), quercetina-3-*O*-ramnosídeo (6), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (7), kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (8), quercetina-3-*O*-glucosídeo (9) e kaempferol-7-*O*-rutinosídeo (10) e do extrato metanólico dos galhos, os flavonoides crisoeriol (13), apigenina (14), 7,4'-dihydroxiflavona (16), eriodictiol (17) e luteolina (18), além dos ácidos fenólicos ácido 3,4-dihydroxibenzoico (11), ácido 3-metoxi,4-hydroxibenzoico (12) e 3,4-dihydroxibenzoato de metila (15). Do extrato hexânico das folhas foram isolados os triterpenos lupeol (19), β -amirina (20) e 24-metilenocicloartanol (21) e do extrato hexânico dos galhos, a mistura do triterpeno friedelina (22) e a xantona lichexantona (23). Os esteroides β -sitosterol (24) e estigmasterol (25) foram isolados em misturas em ambos extratos hexânicos. A identificação estrutural foi realizada por análises de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY. As fases AcOEt dos galhos e hidrometanólica das folhas mostraram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Morganella morganii* numa concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. O extrato hexânico das folhas mostrou atividade antimicrobiana contra *Aeromonas hydrophila* em 1000 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados corroboraram com a importância de *M. acaciifolium* como fonte de metabólitos secundários.

Palavras-chave: Flavonoides, Ácidos fenólicos, Antibacteriano, Luteolina, Apigenina.

ABSTRACT

The Chemistry of Natural Products has provided the discovery of new biologically active molecules, which are extracted from plant species with diversified uses for humans and animals. One of these species is *Macarobium acaciifolium*, a large tree belonging to the Fabaceae family, subfamily Caesalpinioideae, present not only in the Amazon, but in other states of Brazil, besides other countries in Central and South America. This project aimed to carry out a phytochemical study and evaluation of the antibacterial activity of *M. acaciifolium*. The leaves and branches of the plant were grounded and extracted with hexane and methanol. The phytochemical study of *M. acaciifolium* extracts allowed the isolation and identification of 18 substances, 15 of which are reported for the first time in this species. From the methanolic extract of the leaves, the flavonoids luteolin-3'-*O*- α -L-rhamnoside (**1**), neoastilbin (**2**), astilbin (**3**), neoisoastilbin (**4**), isoastilbin (**5**), quercetin-3-*O*- α -L-rhamnoside (**6**), quercetin-3-*O*-rutinoside (**7**), kaempferol-3-*O*-rutinoside (**8**), quercetin-3-*O*-glucoside (**9**) and kaempferol-7-*O*-rutinoside (**10**) and the methanolic extract of branches, the flavonoids chrysoeryol (**13**), apigenin (**14**), 7,4'-dihydroxyflavone (**16**), eriodictyol (**17**) and luteolin (**18**), in addition to the phenylpropanoids 3,4-dihydroxybenzoic acid (**11**), 3-methoxy,4-hydroxybenzoate (**12**) and methyl 3,4-dihydroxybenzoate (**15**). From the leaves hexane extract were isolated triterpenes lupeol (**19**), β -amyrin (**20**) and 24-methylenecycloartanol (**21**) and from branches hexane extract, mixture of triterpene friedelin (**22**) and xanthone lichexanthone (**23**). The β -sitosterol (**24**) and stigmasterol (**25**) steroids were isolated as mixture in both hexane extracts. The structural identification of the compounds was established by ^1H NMR, ^{13}C , HSQC, HMBC and COSY analyses. EtOAc phase of branches and hydromethanolic phase of leaves showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Morganella morganii* at a concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$. Hexane extract leaves showed antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila* at 1000 $\mu\text{g/mL}$. These results corroborate the importance of *M. acaciifolium* as a source of secondary metabolites.

Keywords: Flavonoids, Phenolic Acids, Antibacterial, Luteolin, Apigenin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Fabaceae	16
2.2 Flavonoides	18
2.2.1 Breve identificação de agliconas e glicosídeos de flavonas, flavanonas, flavonois e dihidroflavonas por RMN de ¹ H	21
2.3 Flavonoides em Fabaceae e atividade biológica	23
2.4 <i>Macrolobium acaciifolium</i>	24
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Lista de equipamentos, materiais, reagentes e solventes.....	27
4.2 Coleta das partes vegetais	28
4.3 Obtenção dos extratos	29
4.4 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos e frações de <i>M. acaciifolium</i>	30
4.5 Análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos extratos e frações.....	31
4.6 Fracionamento dos extratos.....	32
4.6.1 Partição dos extratos metanólicos	32
4.6.2 Purificação e isolamento das substâncias	32
4.6.3 Identificação das substâncias isoladas.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos extratos metanólicos das folhas e galhos de <i>Macrolobium acaciifolium</i>	34
5.2 Fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>M. acaciifolium</i> e isolamento de substância	36
5.3 Fracionamento do extrato metanólico dos galhos de <i>M. acaciifolium</i> e isolamentos das substâncias.....	47
5.4 Fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>M. acaciifolium</i> e isolamentos das substâncias.....	58
5.5 Fracionamento do extrato hexânico dos galhos de <i>M. acaciifolium</i> e isolamentos das substâncias.....	61
5.6 Rendimento dos extratos metanólicos e hexânicos	63
5.7 Identificação das substâncias isoladas.....	64
5.7.1 Luteolina, crisoeriol e luteolina-3'- <i>O</i> -ramnosídeo	64
5.7.2 Neoastilbina, astilbina, neoisoastilbina, isoastilbina, eriodictiol.....	70
5.7.3 Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo, Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo e Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo.....	78

5.7.4 Kaempferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo e kaempferol-7- <i>O</i> -rutinosídeo.....	83
5.7.5 Apigenina e 7,4'-dihidroxi-flavona	87
5.7.6 Ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido-3-metóxi-4-hidroxibenzoico e 3,4-dihidroxibenzoato de metila	90
5.7.7 Lupeol, β -amirina, 24-metilenocicloartanol e friedelina.....	93
5.7.8 Lichexantona	99
5.7.9 β -Sitosterol e estigmasterol	101
5.8 Grupos 5-OH dos flavonoides.....	102
5.9 Deslocamentos químicos dos ^{13}C dos açúcares dos flavonoides	103
5.10 Considerações acerca das análises por RMN	105
5.11 Análises por Espectrometria de Massas	106
5.12 Atividade antimicrobiana	109
6 CONCLUSÃO.....	113
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXOS	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classes químicas encontradas em espécies de Fabaceae.....	17
Figura 2. Esqueletos básicos das estruturas químicas dos principais flavonoides.....	18
Figura 3. Principais precursores na formação dos flavonoides (adaptado de Austin & Noel, 2003).....	19
Figura 4. Ligação de hidrogênios entre H de 5-OH e O de 4-CO.....	21
Figura 5. Flavonoides isolados de <i>M. acaciifolium</i> (SILVA, 2018).....	26
Figura 6. Fluxograma da preparação dos extratos de <i>M. acaciifolium</i>	29
Figura 7. Cromatograma da purificação de MFo.2.2.6.1.5-3.3.....	38
Figura 8. Cromatograma da purificação de MFo.2.2.7.4.....	39
Figura 9. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.2.4.10.....	42
Figura 10. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.1.3-4.....	43
Figura 11. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.1.3-4.4.....	44
Figura 12. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.1.5-6.....	44
Figura 13. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.1.7.....	45
Figura 14. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.1.8.....	45
Figura 15. Fluxograma das substâncias isoladas do extrato metanólico das folhas de <i>M. acaciifolium</i>	46
Figura 16. Cromatograma da purificação de MGa1.2.....	48
Figura 17. Cromatograma da purificação de MGa1.3.8-16.6.....	55
Figura 18. Cromatograma da purificação de MGa1.3.8-16.7.....	55
Figura 19. Cromatograma da purificação de MGa1.3.8-16.8.....	56
Figura 20. Cromatograma da purificação de MGa1.3.8-16.9.....	56
Figura 21. Fluxograma das substâncias isoladas do extrato metanólico dos galhos de <i>M. acaciifolium</i>	57
Figura 22. Cromatograma da purificação da fração MFH3-4.1.....	59
Figura 23. Fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>Macrolobium acaciifolium</i>	60
Figura 24. Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico dos galhos.....	62
Figura 25. Estrutura química dos flavonoides 18 , 13 e 1 e enumerações de seus carbonos.....	64

Figura 26. Espectro de RMN de ^1H expandido na região dos hidrogênios aromáticos da substância 18 em acetona- d_6	64
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H expandido da substância 13 em acetona- d_6	65
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H da substância 1 em DMSO- d_6	65
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H expandido na região dos H-2', H-5' e H-6' das substâncias 18 , 13 e 1	66
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H expandido na região dos H-3, H-6 e H-8 das substâncias 18 , 13 e 1	67
Figura 31. Correlação bidimensionais obtidas para identificação das substâncias 18 (A), 13 (B) e 1 (C). Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.....	67
Figura 32. Estrutura química dos flavonoides 2 , 3 , 4 , 5 , e 17 e enumerações de seus carbonos.....	70
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H da substância 2 em DMSO- d_6	70
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H da substância 3 em DMSO- d_6	71
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H da substância 4 em DMSO- d_6	71
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H da substância 5 em DMSO- d_6	72
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H da substância 17 em DMSO- d_6	72
Figura 38. Estrutura química padrão de dihidroflavonois.....	73
Figura 39. Comparação hidrogênios dos carbonos anoméricos das substâncias 2 , 3 , 4 e 5	73
Figura 40. Efeito anisotrópico atuante nas substâncias 2 , 3 , 4 e 5 (adaptado de DE BRITTO <i>et al.</i> , 1995).....	74
Figura 41. Correlação bidimensionais obtidas para identificação das substâncias 2 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D) e 17 (E). Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.....	75
Figura 42. Estrutura química dos flavonoides 6 , 7 e 9 e enumerações de seus carbonos.....	78
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H da substância 6 em DMSO- d_6	78
Figura 44. Espectro de RMN de ^1H da substância 9 em DMSO- d_6	79
Figura 45. Espectro de RMN de ^1H da substância 7 em DMSO- d_6	79
Figura 46. Comparação entre os hidrogênios da região dos aromáticos e anoméricos das substâncias 6 , 9 e 7	80

Figura 47. Correlação bidimensionais obtidas para identificação das substâncias 6 (A), 9 (B) e 7 (C). Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.....	80
Figura 48. Estrutura química dos flavonoides 8 e 10 e enumerações de seus carbonos.....	83
Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da substância 8 em $\text{DMSO-}d_6$	83
Figura 50. Espectro de RMN de ^1H da substância 10 em $\text{DMSO-}d_6$	84
Figura 51. Comparação entre os hidrogênios da região dos aromáticos e anoméricos das substâncias 8 e 10	84
Figura 52. Figura 51. Correlação bidimensionais obtidas para identificação das substâncias 8 (A) e 10 (B). Setas vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.....	85
Figura 53. Estrutura química dos flavonoides 14 e 16 e enumerações de seus carbonos.....	87
Figura 54. Espectro de RMN de ^1H expandido englobando todos os sinais da substância 14	87
Figura 55. Espectro de RMN de ^1H expandido englobando todos os sinais da substância 16	87
Figura 56. Comparação dos deslocamentos químicos dos H-3 das substâncias 14 e 16 . Além de H-6 e H-8 de 14	88
Figura 57. Exibição dos sinais de H-2'/H-6' e H-3'/H-5' das substâncias 14 e 16	88
Figura 58. Correlação bidimensionais obtidas para identificação das substâncias 14 (A) e 16 (B). Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.....	89
Figura 59. Estrutura química dos ácidos fenólicos 11 , 12 e 15 e enumerações de seus carbonos.....	90
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H da substância 11 em $\text{DMSO-}d_6$	90
Figura 61. Espectro de RMN de ^1H da substância 12 em $\text{DMSO-}d_6$	91
Figura 62. Espectro de RMN de ^1H da substância 15 em acetona- d_6	91
Figura 63. Comparação entre os H-2, H-5 e H-6 das substâncias 11 , 12 e 15	91
Figura 64. Correlação bidimensionais obtidas para identificação das substâncias 11 (A), 12 (B) e 15 (C). Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.....	92
Figura 65. Estrutura química das substâncias 19 , 20 , 21 e 22 e enumerações de seus carbonos.....	93
Figura 66. Espectro de RMN de ^1H da fração MFH3-4.1 em CHCl_3-d	93
Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C da fração MFH3-4.1 em CHCl_3-d	94

Figura 68. Espectro de RMN de ^1H expandido da substância 19 em CHCl_3-d	94
Figura 69. Espectro de RMN de ^1H expandido da substância 20 em CHCl_3-d	95
Figura 70. Espectro de RMN de ^1H expandido da substância 21 em CHCl_3-d	95
Figura 71. Espectro de ^{13}C da substância 21 em CHCl_3-d	96
Figura 72. Espectro de RMN de ^1H geral da mistura das substâncias 22 e 23	96
Figura 73. Espectro de RMN de ^1H expandido na região característica de triterpenos da substância 22	97
Figura 74. Espectro de ^{13}C da mistura das substâncias 22 e 23 em CHCl_3-d_6	97
Figura 75. Estrutura química da substância 23 e enumerações de seus carbonos.....	99
Figura 76. Espectro de RMN de ^1H das substâncias 22 e 23. Expandido na região dos sinais da substância 23	99
Figura 77. Espectro da substância 23 expandido nos sinais dos H-2, H-4, H-5 e H-7....	99
Figura 78. Correlação bidimensionais obtidas para identificação da substância 23 . Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.....	100
Figura 79. Estrutura química das substâncias 24 e 25 e enumerações de seus carbonos.....	101
Figura 80. Espectro de RMN de ^1H expandido na região dos sinais das substâncias 24 e 25	101
Figura 81. Proposta para as perdas neutras dos glicosídeos das substâncias 1 (A) e 8 (B)	107
Figura 82. Proposta para as fragmentações por MS^2 dos ácidos fenólicos e flavonoides não glicosilados isolados de <i>M. acaciifolium</i>	108

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1. <i>Macrolobium acaciifolium</i> . A: Copa da árvore; B: frutos; C: folhas e flores; D: galhos.....	29
Imagem 2. Extrato metanólico das folhas (Fo), eluído com AcOEt/MeOH/H ₂ O/HAc 9:1:2:1. A = luz visível, B = UV-254 nm, C = UV-365 nm, D = AlCl ₃ sob UV 365 nm, E = FeCl ₃ , F = NP/PEG sob luz visível, G = NP/PEG sob UV-365 nm, H = anisaldeído, I = sulfato cérico.....	34
Imagem 3. Extratos metanólico dos galhos (Ga), eluído com AcOEt/MeOH/H ₂ O/HAc 9:1:2:1. A = luz visível, B = UV-254 nm, C = UV-365 nm, D = AlCl ₃ sob UV 365 nm, E = FeCl ₃ , F = NP/PEG sob luz visível, G = NP/PEG sob UV-365 nm, H = anisaldeído, I = sulfato cérico.....	35
Imagem 4. Fase AcOEt (MFo2) eluída em AcOEt/MeOH 9:1. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl ₃ (C) e NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).	36
Imagem 5. Frações de 1-6 de MFo2 eluídas em CHCl ₃ /MeOH 7:3. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl ₃ (C) e AlCl ₃ + UV-365 nm (D).....	37
Imagem 6. Frações de 3-7 de MFo2.2 eluídas em CHCl ₃ /MeOH/HAc 85:15:2. Reveladores UV-254 nm (A), FeCl ₃ (B), NP/PEG (C), NP/PEG + UV-365 nm (D) e UV-365 nm (E).	37
Imagem 7. Fração de MFo2.2.7.4 eluída em CHCl ₃ /MeOH 8:2. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl ₃ (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).	39
Imagem 8. Frações de MFo2.4 eluídas em AcOEt/MeOH/H ₂ O/HAc 9:1:1:1. Reveladores FeCl ₃ (A) e NP/PEG (B).....	40
Imagem 9. Frações de MFo2.4.3 eluídas em AcOEt/MeOH/H ₂ O/HAc 9:1:1:1. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl ₃ (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).	41
Imagem 10. Frações de MFo2.4.3.2 eluídas em AcOEt/MeOH/H ₂ O/HAc 9:1:1:1.	42
Imagem 11. Frações de MFo2.4.3.1 eluídas em AcOEt/MeOH/ H ₂ O/HAc 9:1:1:1. Reveladores UV-254 nm (A), FeCl ₃ (B), NP/PEG (C).	43
Imagem 12. Fração MGa1 eluída em CHCl ₃ /MeOH 9:1. Visível (A), reveladores UV-254 nm (B), UV-365 nm (C), FeCl ₃ (D), NP/PEG (E) e NP/PEG + UV-365 nm (F).	47
Imagem 13. Frações MGa1.1(1) e MGa1.2 (2) eluídas em CHCl ₃ /MeOH 9:1. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl ₃ (C) e NP/PEG (D).....	48
Imagem 14. Fração MGa1.3 eluída em CHCl ₃ /MeOH 9:1. UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl ₃ (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).	49

Imagem 15. Frações de MGa1.3 eluídas em CHCl ₃ /acetona 8:2. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl ₃ (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).	50
Imagem 16. Frações de MGa1.3 eluídas em CHCl ₃ /acetona 7:3. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl ₃ (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm.	50
Imagem 17. Frações de MGa1.3.4-7 eluídas em CHCl ₃ /acetona 85:15. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl ₃ (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E)...	51
Imagem 18. Frações de MGa1.3 de 12-18 eluídas em CHCl ₃ /acetona 6:4. Reveladores NP/PEG + UV-365 nm (A), UV-254 nm (B), FeCl ₃ (C), NP/PEG (D).....	52
Imagem 19. Fração MGa1.3.8-16 eluídas em CHCl ₃ /acetona 8:2, 4 vezes. Reveladores FeCl ₃ (A), NP/PEG (B), UV-254 nm (C), UV-365 nm (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).	53
Imagem 20. Frações de MGa1.3.8-16, 1 até 5 eluídas em CHCl ₃ /acetona 8:2, 2 vezes. Reveladores FeCl ₃ (A), NP/PEG (B), UV-254 nm (C), UV-365 nm (D).	53
Imagem 21. Frações de MGa1.3.8-16, 6 até 9 eluídas em CHCl ₃ /acetona 8:2, 2 vezes. Reveladores FeCl ₃ (A), NP/PEG (B), UV-254 nm (C), UV-365 nm (D), NP/PEG + UV-365 nm (E).	54
Imagem 22. Fração MFH3-4.1 eluída em hex/AcOEt 85:15 (A) e hex/AcOEt 8:2 (B). Reveladores anisaldeído sulfúrico (A) e Ce(SO ₄) ₂	59
Imagem 23. Fração MFH5-7 (1) e MGH5 (2) eluídas em hex/AcOEt 8:2 (B). Reveladores anisaldeído sulfúrico (A e C) e Ce(SO ₄) ₂ (B e D).	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas da coluna de sílica da fração MFo2.....	36
Tabela 2. Volumes e frações da coluna em Sephadex LH-20 da fração MFo2.2.6.1.	38
Tabela 3. Volumes e frações da coluna em sílica gel da fração MFo2.2.6.1.3-5.....	38
Tabela 4. Volumes e frações da coluna em Sephadex LH-20 da fração MFo2.2.7	39
Tabela 5. Sistemas da coluna de Sephadex LH-20 da fração MFo2.4.	40
Tabela 6. Sistemas da extração em fase sólida da fração MFo2.4.3.	41
Tabela 7. Sistemas da coluna de Sephadex LH-20 da fração MFo2.4.3.2.	41
Tabela 8. Sistemas da coluna de Sephadex LH-20 da fração MFo2.4.3.1.	43
Tabela 9. Sistemas da extração em fase sólida da fração MGa1.....	48
Tabela 10. Sistemas da coluna de sílica da fração MGa1.3.	49
Tabela 11. Sistemas da coluna de sílica MGa1.3.2-3	50
Tabela 12. Sistemas da coluna de sílica MGa1.3.4-7.....	51
Tabela 13. Sistemas da coluna de Sephadex LH-20 da fração MGa1.3.8-16.	53
Tabela 14. Sistemas da coluna de sílica de MFH.	58
Tabela 15. Sistemas da coluna de sílica de MFH3-4.....	58
Tabela 16. Sistemas da coluna de sílica MGH.	61
Tabela 17. Rendimento dos extratos metanólicos, fases e extratos hexânicos.....	63
Tabela 18. Deslocamentos químicos de ^1H das substâncias 18 , 13 e 1	68
Tabela 19. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias 18 , 13 e 1	69
Tabela 20. Deslocamentos químicos de ^1H das substâncias 2 , 3 , 4 , 5 , e 17	76
Tabela 21. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias 2 , 3 , 4 , 5 e 17	77
Tabela 22. Deslocamentos químicos de ^1H das substâncias 6 , 9 e 7	81
Tabela 23. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias 6 , 9 e 7	82
Tabela 24. Deslocamentos químicos de ^1H das substâncias 8 e 10	86
Tabela 25. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias 8 e 10	86
Tabela 26. Deslocamentos químicos de ^1H das substâncias 14 e 16	89
Tabela 27. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias 14 e 16	89
Tabela 28. Deslocamentos químicos de ^1H das substâncias 11 , 12 e 15	92
Tabela 29. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias 11 , 12 e 15	92
Tabela 30. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias 19 , 20 , 21 e 22	98
Tabela 31. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da substância 23	100
Tabela 32. Deslocamento químico dos hidrogênios dos grupos 5-OH dos flavonoides.	102

Tabela 33. Deslocamento químico dos ^{13}C dos glicosídeos de flavonoides isolados ..	104
Tabela 34. Massas ionizadas e fragmentações dos flavonoides isolados de <i>M. acaciifolium</i>	106
Tabela 35. Porcentagem das atividades antimicrobianas dos extratos metanólicos, hexânicos e fases de <i>M. acaciifolium</i>	109

1 INTRODUÇÃO

As plantas são produtoras de metabólitos secundários, também chamados de metabólitos especiais, produtos secundários ou até mesmo produtos naturais. Estes compostos são estruturalmente e quimicamente diferentes dos metabólitos primários (lípidos, vitaminas, ácidos nucleicos, carboidratos e proteínas) e não possuem envolvimento direto no crescimento e desenvolvimento das plantas, mas podem atuar indiretamente para tal impedindo herbivoria de pragas e patógenos, atuando como sinalizadores de respostas de defesas e estresses ambientais, atraindo insetos ou animais para polinização e dispersão de sementes e agindo como correspondente para simbiose entre plantas e micróbios (YANG *et al.*, 2018; ISAH, 2019; GUERRIERI *et al.*, 2019; MRID *et al.*, 2021)

Os metabólitos secundários possuem papel fundamental quando se trata dos benefícios relacionados ao bem-estar dos seres humanos, principalmente pela ação química de substâncias com princípios ativos no tratamento de doenças como o câncer (ULLRICH, *et al.*, 2019; SERRA *et al.*, 2022). Os alimentos vegetais são a principal fonte de consumo dos metabólitos secundários pelos humanos e animais, estando presentes nas frutas e verduras. No entanto, o uso dos metabólitos secundários não está limitado apenas à alimentação, sendo empregado também em cosméticos e perfumarias (MAHAJAN *et al.*, 2020; TWILLEY *et al.*, 2020).

Enriquecendo os dados acerca do teor, qualidade e quantidade de metabólitos secundários nas plantas, as pesquisas em Produtos Naturais têm sido o grande indutor da busca e distribuidor das funcionalidades/atividades da grande maioria desses metabólitos identificados (DO *et al.*, 2014; SCHRIMPE-RUTLEDGE *et al.*, 2018). As atividades incluem combates a microrganismos como cepas de fungos, bactérias, além de parasitas e insetos como por exemplo, em grãos (ABDELGALEIL *et al.*, 2020; AZIZI *et al.*, 2021; BEZERRA *et al.*, 2019; ZIMMERMANN *et al.*, 2021).

A avaliação da atividade antioxidante de metabólitos secundários vem sendo empregada para medir seus potenciais de redução dos estresses oxidativos, visto a enorme quantidade de substâncias da classe química com este potencial presentes em plantas, como flavonoides (CHEN *et al.*, 2021; NURCHOLIS *et al.*, 2021).

Entre as diversas classes de metabólitos secundários estão os flavonoides e podem ser encontrados na forma de agliconas, prenilados ou isoprenilados e glicosilados. São amplamente distribuídos em Fabaceae. Uma das espécies dessa família é *Macrolobium acaciifolium*, a qual foi escolhida para realizar o presente trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fabaceae

A família Fabaceae ou Leguminosae está entre as três maiores famílias do reino vegetal por apresentar até aproximadamente 770 gêneros distribuídos em cerca de 19.500 espécies e outras espécies continuam a ser descobertas e adicionadas. Entre os gêneros, as características fundamentais confirmam a classificação na Família, porém existem variações morfológicas tão características de cada grupo, que foi possível dividir em 6 grandes subfamílias: Cercidoioideae com 12 gêneros e aproximadamente 335 espécies; Papilionoideae contém 503 gêneros e aproximadamente 14.000 espécies. Caesalpinioideae compreende 148 gêneros e aproximadamente 4.400 espécies; Dialioideae abrange 17 gêneros e aproximadamente 85 espécies; Duparquetioideae contribui apenas com 1 gênero e 1 espécie; Detarioideae possui 84 gêneros e aproximadamente 760 espécies (LPWG, 2017). Suas espécies têm grande importância nos mais diversos campos de interesse humano como o alimentício, ambiental, medicinal, científico, etc. (CUNNINGHAN *et al.*, 2021; OLADEJI *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020).

Essa família é reconhecida como uma das mais importantes no fornecimento de alimentos para humanos e animais como *Phaseolus vulgaris* (feijão) e *Glycine max* (soja), movimentando a economia nos setores alimentício e madeireiros com espécies como *Dalbergia nigra* (jacarandá), *Amburana cearenses* (cerejeira) e *Hymenolobium ssp* (angelim), as quais são consideradas madeiras muito resistentes (SHAVANOV, 2021). Outra grande importância das espécies de Fabaceae é a ecológica, atuando na fixação de nitrogênio como *Pisum sativum* (ervilha) e *Inga edulis* (ingá), presente nas substâncias básicas e essencial para as rotas metabólicas tanto de animais quanto plantas (JUSTINO *et al.*, 2017; MARTINELLI *et al.*, 2021).

Estudos farmacológicos apontam que várias espécies de Fabaceae têm comprovados potenciais para as mais diversas atividades biológicas. Trabalhos mais recentes demonstram atividade leishmanicida sobre *L. donovani* (WONKAM *et al.*, 2021), antidiabética e antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteos*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus piogenes* (PHUKHATMUEN *et al.*, 2021), além de diferentes partes vegetais de muitas espécies possuírem potenciais teratogênicos (BEZERRA, *et al.*, 2021).

Algumas pesquisas apontam fortes relações do uso de plantas desta família no tratamento de doenças femininas, como no caso do extrato metanólico de *Eriosema laurentii* possuir propriedades estrogênicas e prevenir sintomas da menopausa em ratas

ovarioctomizadas, permitindo credibilizar o tratamento de problemas ginecológicos com o uso dessa planta (ATEBA *et al.*, 2013).

Muitas substâncias fenólicas já foram isoladas de espécies da família fabaceae, sendo os flavonoides os mais identificados, com muitos derivados de isoflavonoides e flavonoides relacionados, como dímeros, pterocarpanos, rotenoides, dihidroflavonoides, flavanonas, além de substâncias de outras classes químicas como triterpenos, esteroides, cumarinas, antraquinonas, glicosídeos cianogênicos e alcaloides indólicos, pirrolinizidínicos e quinolizidínicos (WINK, 2013). Na Figura 1 estão ilustradas algumas moléculas encontradas em espécies de Fabaceae em estudos recentes.

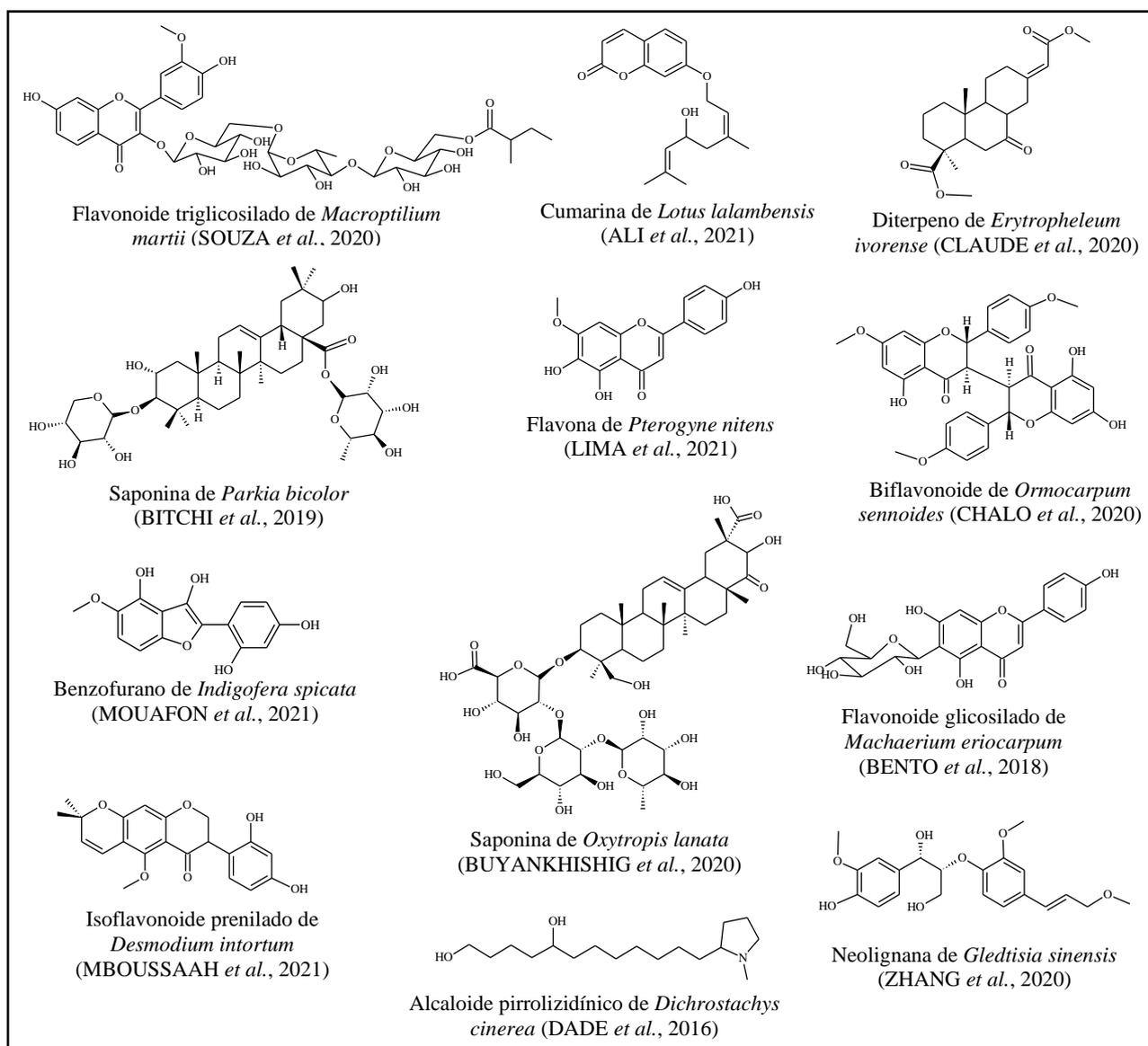


Figura 1. Classes químicas encontradas em espécies de Fabaceae.

2.2 Flavonoides

Flavonoides são particularmente as substâncias mais abundantes dentre os polifenóis dentro da área de produtos naturais, sendo classificados como: chalconas, flavanonas, flavonas, dihidroflavonois, antocianidinas e catequinas, os quais são principalmente formados por arranjos estruturais com o esquema C₆-C₃-C₆, com quinze unidades de carbono. As duas unidades de C₆ (A e B) são aromáticas e conectadas pela unidade C₃, podendo gerar as chalconas, caso essa unidade C₃ seja aberta ou gerar os demais flavonoides caso fechada, formando um terceiro anel (C).

As estruturas das principais subclassificações dos flavonoides são mostradas na Figura 2, abaixo e relacionam-se pelo grau de oxidação e saturação do anel C (MARAIS *et al.*, 2006).

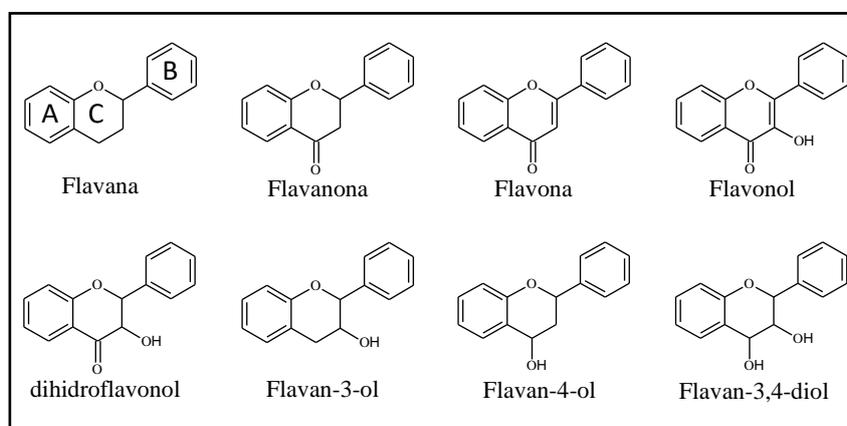


Figura 2. Esqueletos básicos das estruturas químicas dos principais flavonoides.

Os flavonoides são formados a partir da via biossintética mista, onde três moléculas de malonil coenzima A (CoA) derivadas da rota do acetato-malonato são condensadas com uma molécula de 4-hidroxicumaril-CoA, derivada da rota do chiquimato.

A estrutura básica dos flavonoides conta com o anel aromático A, formado pela condensação das unidades da via do acetato-malonato (C₆), as quais ligam-se aos 3 carbonos (C₃) ligados ao anel aromático B (C₆) provenientes da via do chiquimato. A primeira molécula formada da condensação das precursoras é uma chalcona que, em etapas posteriores de oxirredução, origina os demais flavonoides. Na Figura 3 é mostrado esquema resumido da formação biossintética dos principais flavonoides (AUSTIN & NOEL, 2003).

Essas substâncias são muito conhecidas por seus efeitos benéficos na dieta e saúde dos humanos, sendo consumidas, principalmente pelo consumo de alimentos, como frutas

e vegetais. Flavonoides mostraram excelentes atividades, como por exemplo, o flavonoide hesperetina tem sido reconhecido como inibidor de reações de estresses oxidativos, atuando também como anti-inflamatório celular (TENGG *et al*, 2021).

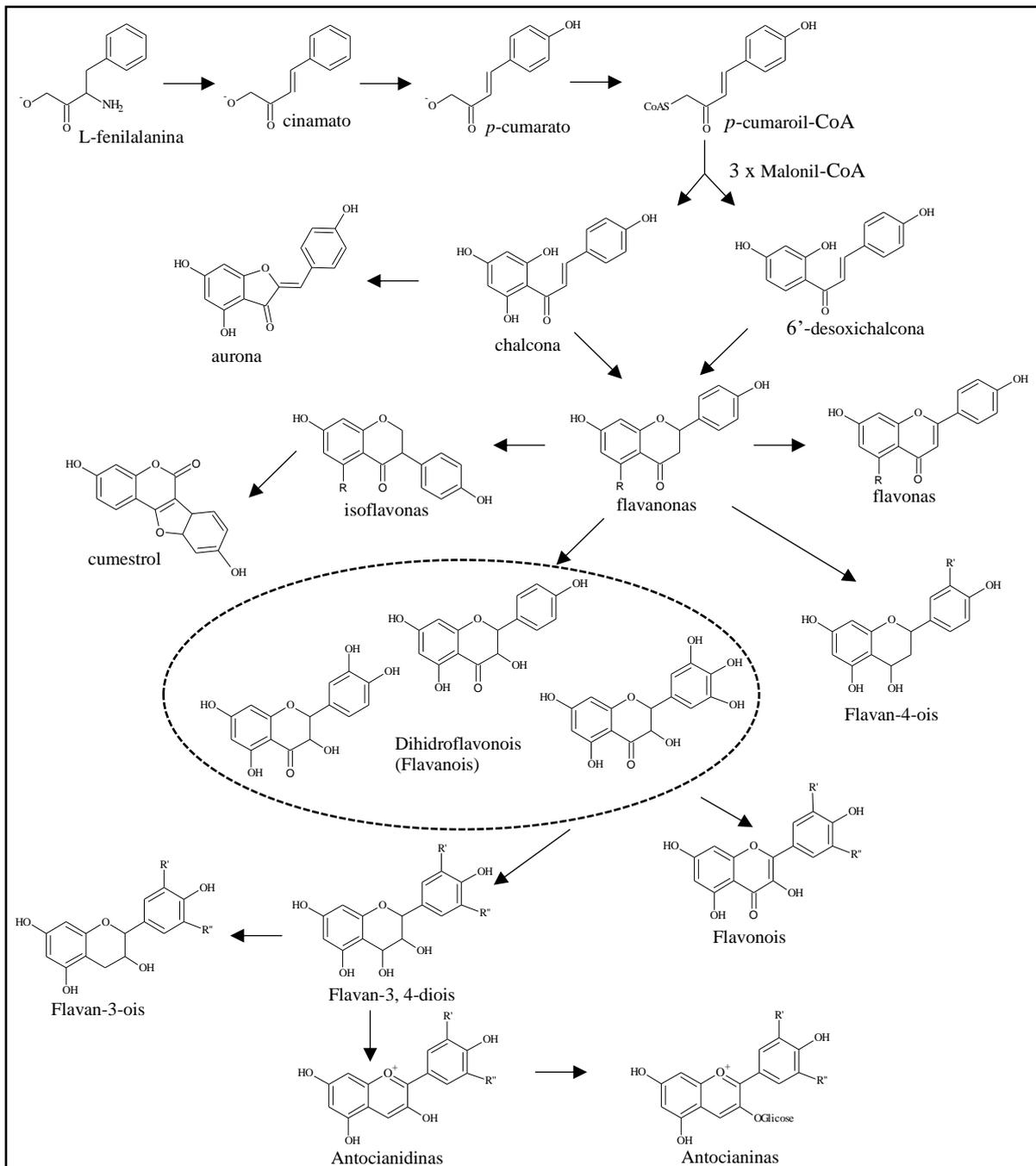


Figura 3. Principais precursores na formação dos flavonoides (adaptado de Austin & Noel, 2003).

Cercato *et al.* (2021) fizeram um levantamento bibliográfico e concluíram que a dieta com flavonoides teve grande auxílio pré-clínico no combate à obesidade, onde quercetina, genisteína, naringenina, apigenina, epigallocatequina-3-galato e cianidina-3-O-glicosídeo foram os principais flavonoides usados como complementos alimentares.

Estudos comprovam que pessoas intoxicadas por pesticidas podem se recuperar com mais facilidade e menor tempo quando fazem uso de suplementos contendo flavonoides. Esse efeito foi atribuído as diversas atividades anti-inflamatórias, antiapoptóticas, antimutagênicas e antiestresse, pois são efeitos que atuam na melhoria das funções dos órgãos (ZENG *et al.*, 2021).

O flavonoide apigenina tem sido bastante estudado e mostrado atividade citotóxica no tratamento de diversos tipos de câncer como no fígado, seios, tireoide, colorretal, próstata, bexiga, pâncreas, língua, pulmão, pele, ossos, sangue, cabeça e pescoço (SALMANI *et al.*, 2017). Pesquisas também relacionam apigenina com potenciais como antioxidante, antigenotóxico, antidiabético, hemostático, antialérgico, antiparasitário, antifúngico, antibacteriano, antiviral e anti-inflamatório (AHRED *et al.*, 2021).

De forma análoga, luteolina é outro flavonoide com diversas atividades anticâncer conhecidas, nas quais incluem câncer de ovários, rins, próstata, pulmão, cólon, pâncreas, glioblastoma (tumor cerebral), pele, língua, fígado, além de ser reconhecido como possível agente neuroprotetor contra Alzheimer, antioxidante atenuante na geração de estresse oxidativo neurológico responsável pela doença de Parkinson (IMRAN *et al.*, 2019; NAVABI *et al.*, 2015).

Assim como apigenina e luteolina, muitos flavonoides possuem potenciais anti-inflamatórios destacados por estudos científicos, pois atuam através de diferentes mecanismos para a inibição de enzimas regulatórias e fatores de transcrição que possuem importantes funções no controle de mediadores envolvidos em inflamações. Inibem com grande eficácia quinases e fosfodiesterases (MALEKI *et al.*, 2019).

As propriedades anti-inflamatórias dos flavonoides são reconhecidas e potencializadas principalmente nas moléculas que possuam em sua estrutura química ligação dupla entre os carbonos C-2 e C-3, hidroxila na posição C-3', C-4' ou C-3' + C-4' (anel B catecol) e grupo carbonila em C-4.

A glicosilação na posição C-5 é um dos fatores que diminui o potencial anti-inflamatório, pois cria um impedimento estérico devido ao grande volume da fração de açúcar, visto que a planaridade dos flavonoides é crucial para essa atividade, confirmando que cada modificação ou adição de substituintes pode ser decisiva para qualquer potencial (ÇELIK & KOŞAR, 2012; ISODA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2018).

2.2.1 Breve identificação de agliconas e glicosídeos de flavonas, flavanonas, flavonóis e dihidroflavonas por RMN de ^1H

Flavonoides têm sido identificados por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C há décadas. Por possuírem padrões estruturais com poucas variações no deslocamento químico e multiplicidades de seus sinais muito constantes, a identificação dessa classe químicas tornou-se menos complicada de ser realizada.

Um fator presente em análises em $\text{DMSO-}d_6$, $\text{acetona-}d_6$ e $\text{CHCl}_3\text{-}d_1$ é a ressonância de sinais de hidrogênios dos grupos hidroxilas (OH) de alguns flavonoides, o qual aparece nos espectros entre 8,5 e 13,5 ppm e auxilia principalmente para conclusão da presença de OH na posição 5 do anel A de flavonoides (5-OH, 11,8-13,5 ppm), o qual também são distantes dos sinais dos hidrogênios aromáticos. O sinal de 5-OH torna-se largo nos espectros à medida que a abundância de água vai aumentando no solvente, fato que ocorre devido a transferência de prótons intermolecular entre 5-OH e água (CHARISIADIS, *et al.*, 2014).

Esses hidrogênios das 5-OH formam ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio do grupo carbonila em C-4 (Figura 4), o qual desprotege o núcleo do hidrogênio de 5-OH e aparece nos espectros com leves variações de deslocamento químico dependendo do tipo de flavonoide. Em flavonas seu deslocamento fica próximo de 13,0 ppm, 12,40-12,70 em flavonóis e próximo a 12,0 ppm para flavanonas e dihidroflavonoides (SHEICHENKO *et al.*, 2016).

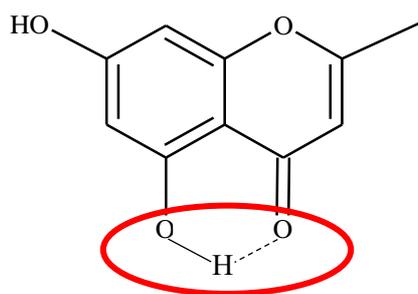


Figura 4. Ligação de hidrogênio entre H de 5-OH e O de 4-CO.

A estrutura química principal dos flavonoides consiste nos anéis A, B e C. O anel A de flavonas e flavonóis com dois substituintes 5-OH e 7-OH comumente possui os hidrogênios H-6 e H-8, os quais aparecem nos espectros de RMN de ^1H em sinais (geralmente) dupletos com constante de acoplamento (J) $\sim 2,5$ Hz, resultante do *meta*-acoplamento entre os dois em 6,0-6,2 ppm (H-6) e 6,3-6,5 ppm (H-8) (OSW & HUSSEIN, 2020). Para a mesma configuração de anel A de dihidroxiflavanonas e dihidroflavonóis,

esses mesmos H-6 e H-8 aparecem em 5,75-5,95 ppm e 5,90-6,10 ppm (PRAKASH *et al.*, 2020).

O anel C de flavonas possui hidrogênio na posição 3 (H-3) que frequentemente produz simpletos próximo a 6,3 ppm. O H-2 presente no anel C de flavanonas, geralmente aparece em 5,0-5,5 ppm na forma de duplo dupletos com $J \sim 11,0$ e 5,2 Hz para acoplamentos *trans* e *cis*, respectivamente, com os dois H-3, que por sua vez aparece nas formas de dois duplos dupletos com $J \sim 17,0$; 11,0 para H-3_{*trans*} e $J \sim 11,0$; 3,0 Hz para H-3_{*cis*} próximos a 2,8 ppm (OWOR *et al.*, 2020). Em dihidroflavonois, H-2 aparece entre 4,8-5,6 ppm enquanto H-3 entre 4,1-4,3 ppm com $J \sim 11,0$ ou 1,2 Hz, dependendo do acoplamento *trans* ou *cis* com H-2 (EKALU *et al.*, 2019; NOLETO-DIAS *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2021).

O anel B padrão dos flavonoides são do tipo fenol com 4'-OH como substituintes. Esse tipo de anel de estrutura com apenas 4'-OH produz simetria química entre os H-2' e H-6', produzindo sinais de segunda ordem na região de 7,1-8,1 ppm com os picos mais intensos na forma de duplete com $J \sim 8,5$ Hz resultante dos acoplamentos *orto* entre H-2' e H-3', assim como H-6' e H-5'. O mesmo é observado para H-3' e H'-5, os quais geram mesma constante de acoplamento, mas sinais entre 6,5-7,1 ppm. Esse padrão de anel é também chamado de Sistema AA'BB'' (KURATA *et al.*, 2019; MIZUNO *et al.*, 2022).

Uma adição de grupo hidroxila na posição C-3 do anel B dos flavonoides modifica as multiplicidades e deslocamentos químicos destes hidrogênios. Em flavonas e flavonois o deslocamento de H-2' aparece como duplete com $J \sim 2,5$ Hz entre 7,2-7,8 ppm, H-5' aparece como duplete com $J \sim 8,5$ Hz entre 6,7-7,1 ppm e H-6' como duplo duplete com $J \sim 8,5$; 2,5 Hz entre 7,3-7,9 Hz. Os sinais de H-2' e H-6' se sobrepõem em alguns flavonoides (HU *et al.*, 2017). Este padrão 3',4'-dihidroxissubstituído é chamado de Sistema ABX e apresenta diferentes deslocamentos químico e multiplicidades para flavanonas e dihidroflavonois em DMSO-*d*₆.

Para estes últimos, são gerados espectros com dois multipletos agudos entre 6,6-7,1 ppm, um para H-2' com integral para 1H e outro para H-5' e H-6' com integral para 2H (ZHAO *et al.*, 2020; AN *et al.*, 2022). A resolução destes picos, em alguns casos pode ser feita substituindo o DMSO-*d*₆ por acetona-*d*₆, piridina-*d*₅, MeOH-*d*₄ ou ácido acético-*d*₄ (YANG *et al.*, 2015).

Os açúcares ligados a determinados flavonoides terão deslocamentos químicos destacados nos espectros de RMN de ¹H. As ramnoses naturalmente encontram-se α -ligadas às estruturas dos flavonoides, fazendo com que seus hidrogênios do carbono

anomérico (H-1'') apareçam entre 5,0-5,3 ppm como duplete com $J \sim 2,0$ Hz resultante do acoplamento com seu H-2''. Corroborando com a presença da ramnose, um sinal duplete com $J \sim 6,5$ Hz é visível entre 0,8-1,2 ppm, referente ao H-6'' da metila (UTARI *et al.*, 2019; HENRI *et al.*, 2021; DUTRA *et al.*, 2023).

As glicoses ocorrem β -ligadas às estruturas dos flavonoides e são rapidamente reconhecidas no espectro de RMN de ^1H por um duplete com $J \sim 7,0$ Hz entre 4,8 e 5,8 ppm gerado pelo acoplamento em *trans* de seus H-1'' e H-2''. As rutinoses são ligadas aos flavonoides pelas glicoses e seus H-1'' aparecem nos mesmos deslocamentos químicos e J que os monômeros glicosilados. Em contrapartida, o H-1''' da ramnose ligada ao C-6'' da glicose aparece geralmente como duplete com seu J padrão, porém com deslocamento químico entre 4,2 e 4,4 ppm, além de H-6''' metila entre 1,10 e 1,30 ppm como J padrão (BABIKA *et al.*, 2020; AFIF *et al.*, 2022; MOHAMMED, *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2023).

2.3 Flavonoides em Fabaceae e atividade biológica

Por estarem tão largamente distribuídos nas plantas, os flavonoides são encontrados com grande frequência em espécies de Fabaceae. Em trabalho de revisão, Grafakou *et al.* (2021) listaram 66 espécies do gênero *Genista* (Papilionoideae), constatando o isolamento e identificação de 110 flavonoides distribuídos entre 46 isoflavonoides, 22 flavonas, 21 3-hidroxi flavonas, 8 flavanonas, 4 3-hidroxi flavanonas, 3 flavonoides prenilados, 1 isoflavona e 5 chalconas.

Em *Lotus lanuginosus* (Papilionoideae), Oueslati *et al.* (2020) isolaram e identificaram 4 flavonoides glicosilados (kaempferol-7-*O*-ramnosídeo, kaempferol-3-apiofuranosil-7-*O*-ramnosídeo, isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo e kaempferol-3-*O*-2''-arabnoramnosídeo-7-*O*-ramnosídeo).

Li *et al.* (2020) fizeram uma lista com 55 flavonoides isoprenilados isolados de *Sophora flavenses* (Papilionoideae) e dentre as atividades de alguns desses flavonoides, destacaram-se bactericida (frente cepas de bactérias gram-positivas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*), anticâncer, anti-inflamatória, antidiabético e antioxidante.

Em *Sophora tonkinensis* foram encontrados flavonoides glicosilados e ramnoglicosilados como rutina, narcissosídeo, hyperosídeo e naringina (HOU *et al.*,

2020). Foram isoladas de *Sophora davidii* cinco novas flavanonas chamadas de davidonas A, B, C, D e E (MA, *et al.*, 2021).

Komakech *et al.* (2019) agrupou várias atividades anti-inflamatórias dos flavonoides catequina, taxifolina, apigenina, luteolina e narigenina, apontando o uso de *Tamarindus indica* (Detarioideae) como anti-inflamatório devido à presença desses flavonoides.

Pinto *et al.* (2020) investigaram os efeitos do flavonoide semi-sintético palmitato de (-)-fisetinidol na osteólise inflamatória periodontal em ratos, doença que afeta a massa óssea dos dentes pela redução da reabsorção e remodelação dos tecidos ósseos pelas células osteoclastos. O palmitato de (-)-fisetinidol foi semi-sintetizado a partir do flavonoide (-)-fisetinidol, isolado de *Bauhinia pulchella* (Cercidoideae). Os resultados mostraram que o palmitato de (-)-fisetinidol foi efetivo no tratamento anti-inflamatório dos processos envolvendo as periodontites, principalmente pelo efeito antioxidante.

2.4 *Maclobium acaciifolium*

O gênero *Maclobium*, pertencente à Fabaceae, está classificado na subfamília Detarioideae com cerca de 95 espécies arbóreas ou arbustivas. As espécies desse gênero podem ser encontradas na América Central (Honduras, Costa Rica e Panamá) e principalmente na América do Sul (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela) nas margens dos rios, igarapés, praias ou em terra firme (*Maclobium* Schreb. em WFO, 2022).

No Brasil, é representado por 37 espécies e está presente nas regiões Norte, nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Roraima, Nordeste no estado do Maranhão e Centro-Oeste, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (MORIM & GURGEL, 2020).

Maclobium acaciifolium é conhecida popularmente como arapari. É uma árvore de grande porte e vivência de aproximadamente 500 anos, de 2-35 m de altura e 150 cm de diâmetro, sendo a espécie mais amplamente distribuída do gênero. Sua presença é descrita em florestas inundadas da Amazônia, tanto em várzeas como igapós, assim como em florestas de galerias, ciliares ou terras firmes. Seus frutos flutuam nas águas garantindo uma forma de dispersão (FÉLIX-DA-SILVA, 2016).

As plantas do gênero *Maclobium* são árvores de porte arbóreas e arbustivas, tendo algumas de suas espécies estudos de desenvolvimento de lenho como *M.*

angustifolium, *M. multijugum* e *M. acaciifolium* (LIMA & GOMES, 1998; SILVA *et al.*, 2014).

Os potenciais citotóxicos (frente cultura de células de carcinoma espinocelular bucal) dos extratos do caule e folhas de *M. multijugum* e caule de *M. acaciifolium* foram avaliados, mas não tiveram resultados promissores (OZI, 2009). Na última década, houve produção de trabalho visando verificar possíveis novos agentes despigmentantes da pele, avaliando extratos aquosos de plantas do Brasil e constatando que o extrato aquoso dos frutos de *M. acaciifolium* mostrou baixa atividade inibitória da tirosinase, enzima atuante na produção de melanina (MACRINI, 2004). Também foi estudada a influência do desmatamento de *M. acaciifolium* em relação com o meio ambiente, visando o controle da sua exploração por ser árvore lenhosa (SCHÖNGART, 2008; WITTMANN *et al.*, 2009) e mesmo sua morte quando seu habitat natural é modificado (ASSAHIRA, 2017).

Na literatura, é encontrado trabalho de caráter químico, onde Behrens *et al.* (2006) quantificaram os constituintes majoritários dos óleos das sementes de *M. acaciifolium*, encontrando ácido palmítico, ácido linoléico, ácido lignocérico, ácido mirístico e ácido eicosanóico (C_{20:1}). Juntamente com *M. angustifolium*, *M. acaciifolium* foi alvo de estudos para verificação da presença de taninos com as metodologias indicada por Matos (1980), o qual mostrou presença de taninos condensados e pirogálicos em *M. angustifolium* enquanto *M. acaciifolium* apresentou antocianina, catequina e taninos condensados (BARBOSA *et al.*, 2006).

Da fase AcOEt do extrato metanólico das folhas de *M. latifolium* foi isolada uma nova cromona C-glicosilada chamada de macrolobina, a qual apresentou atividade bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa* (CIM 250 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (CIM 150 µg/mL). Da fase DCM do extrato metanólico das folhas foram isoladas as substâncias apigenina, β-taraxerol, friedelina, estigmasterol, β-sitosterol e campesterol, enquanto foi isolada a substância apigenina da fase AcOEt do extrato metanólico das hastes de *M. latifolium* (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Em outro estudo, a fase AcOEt do extrato etanólico das cascas do tronco de *M. latifolium* mostrou atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* (CIM = MBC 250 µg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (CIM = MBC 50 µg/mL), *Klebsiella pneumoniae* (CIM = MBC 100 µg/mL) e *Proteus mirabilis* (CIM = MBC 100 µg/mL) (FERRAZ *et al.*, 2021).

As sementes de *M. acaciifolium* são conhecidas por acumularem em suas paredes celulares, reservas de amido e xiloglucano simultaneamente como estratégia de

germinação e estabelecimento de plântulas durante o período de inundação (RIBEIRO, 2013).

Barnett *et al.* (2015) descrevem em seu trabalho, a redução de macacos, papagaios e esquilos que se alimentam dos frutos de *M. acaciifolium* quando esses frutos se encontram infestados por colônias de formigas da espécie *Pseudomyrmex viduus*.

Silva (2018) isolou 3 flavonoides das folhas (luteolina-4'-*O*-ramnosídeo, luteolina-3'-*O*-ramnosídeo e apigenina) e 1 das flores (kaempferol-3-*O*-rutinosídeo) de *M. acaciifolium* (Figura 5).

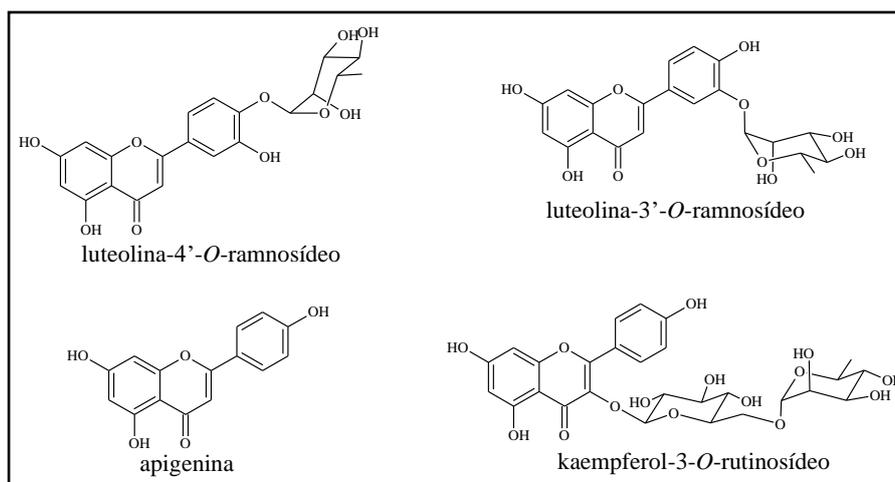


Figura 5. Flavonoides isolados de *M. acaciifolium* (SILVA, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar os metabólitos secundários dos extratos de *Macrolobium acaciifolium* e avaliar a atividade antibacteriana de seus extratos e frações.

3.2 Objetivos específicos

- Fracionar os extratos de *M. acaciifolium* e isolar os flavonoides presentes por meio de técnicas cromatográficas;
- Identificar as estruturas químicas dos flavonoides isolados por análises de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C mono e bidimensionais (HSQC, HMBC e COSY) e Espectrometria de Massas;
- Avaliar o potencial antibacteriano dos extratos e frações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Lista de equipamentos, materiais, reagentes e solventes

- Balança analítica AY220 (Shimadzu);
- Banho quente modelo 550 (Fisatom);
- Rotaevaporador rotativo modelo 802 (Fisatom);
- Capela Evolution (Permutation);
- Estufa ventilada (TE – 394/2, Tecnal);
- Moinho de facas (SL – 31, Solab);
- Moinho de martelo (DPM – 4, Nogueira);
- Ultrassom (Unique, 40 KHz);
- Cromatofolhas de sílica gel (Sigma-Aldrich, TLC Silica gel 60 F254);
- Lâmpadas ultravioletas 365 nm (T5, Orion) e 254 nm (G8 T5, Phillips),
- Cromatografia em camada delgada comparativa com indicador UV-254 nm (Sílica gel, WhatmanTM);
- Sílica gel preparativa (CCDP, Sigma-Aldrich, Sílica gel GF254);
- Sílica para coluna aberta (Machery-Negal, 0,04-0,063 mm/230-400 mesh ASTM);
- Resina Sephadex lipofílica (Sephadex LH-20, Sigma-Aldrich);
- Hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol (grau comercial, Araguaya);
- Cromatógrafo Líquido Prominense (Shimadzu): amostrador automático SIL-10AF, detector de rede de fotodiodo SPD-M20A e bomba líquida de alto desempenho LC-6AD;

- Solventes utilizados para as análises por CLAE: MeOH grau HPLC (SCIELAB);
- Purificador de água PURELAB Option (ELGA);
- Colunas analítica (250 x 4,6 mm) e semipreparativa (250 x 10,0 mm) Luna 5 μ C18(2) 100A (Phenomenex);
- Cloreto férrico P. A. (FeCl₃, Dinâmica: Química Contemporânea Ltda.);
- Difenilboriloxietilamina (NP, Sigma-Aldrich);
- Polietilenoglicol 4000 U.S.P. (PEG, Oxiteno);
- Ácido acético glacial (HAc, Synth).
- Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆, Sigma-Aldrich);
- Metanol deuterado (MeOH-*d*₄, Cambridge Isotope Laboratories);
- Acetona deuterada (Acetona-*d*₆, Cambridge Isotope Laboratories);
- Clorofórmio deuterado (CHCl₃-*d*, Cambridge Isotope Laboratories);
- Ressonância Magnética Nuclear, Fourier 300 (Bruker);
- Espectrômetro de Massas MicroTOF-Q II, fonte ESI (Eletrospray), resolução Full Width at Half Maximum – FWHM.

4.2 Coleta das partes vegetais

Folhas (468 g) e galhos (1,1 Kg) de *Macaranga acaciifolium* (Fabaceae) foram coletadas no Lago do Catalão (Igarapé Papocu) em 17/06/2009 nas coordenadas 3°10' S, 59°54' W, Amazonas, Brasil.

A coleta foi realizada durante o período de alagamento na localidade, estando a árvore com apenas a copa do lado externo da água (Imagem 1). Por não estar na estação seca, não foi possível registrar o ambiente próximo à espécie, como o tipo do solo e vegetação rasteira próxima.

As partes internas das cascas dos galhos eram de coloração avermelhadas e estavam com infestação interna de formigas de espécie não identificada. Os frutos de *M. acaciifolium* se apresentavam em forma de vagem, com as cascas avermelhadas.

O estudo foi registrado no banco de dados SISGEN sob número AD1E109. Uma exsicata do espécime (n° 258676) foi depositada no herbário do INPA, Manaus, Brasil.

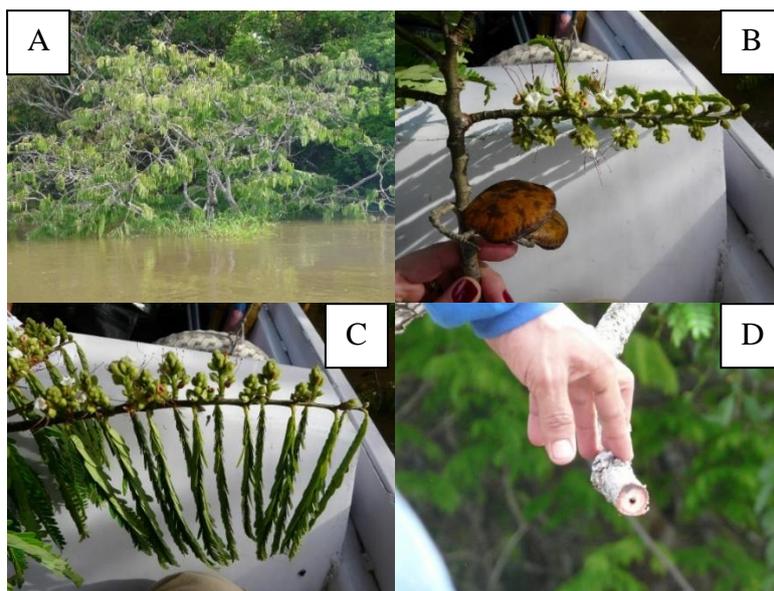


Imagem 1. *Macrolobium acaciifolium*. A: Copa da árvore; B: frutos; C: folhas e flores; D: galhos.

4.3 Obtenção dos extratos

As partes vegetais foram secas em estufa de ventilação forçada a 50 °C até evaporação da água. Após secagem, os galhos foram cortados e triturados em moinho de martelos enquanto as folhas foram pulverizadas em moinho de facas. Em seguida, a extração se deu pela adição de solvente orgânico ao material vegetal auxiliado pelo ultrassom por 20 minutos. Foram utilizados os solventes de polaridade crescente hexano (extrato hexânico), metanol (extrato metanólico) e água destilada (extrato aquoso), onde o processo de extração foi realizado três vezes com os solventes hexano e metanol, porém uma vez com a água. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo sendo o processo de extração apresentado na Figura 6.

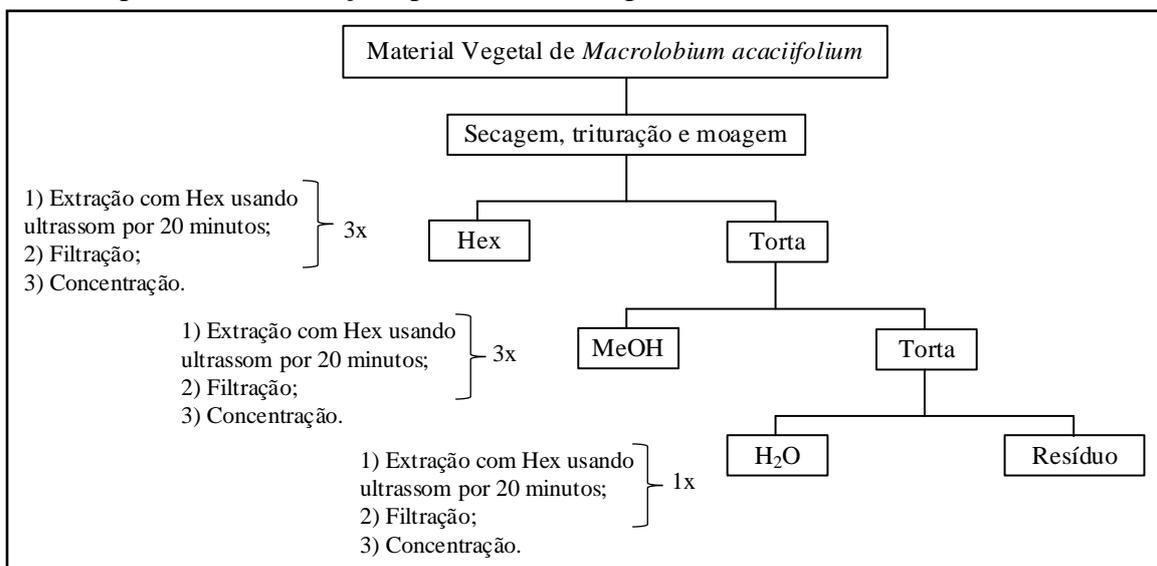


Figura 6. Fluxograma da preparação dos extratos de *M. acaciifolium*.

4.4 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos e frações de *M. acaciifolium*

As linhagens de microrganismos utilizadas neste ensaio foram: *Acinetobacter baumannii* (AB) (CBAM 0664), *Aeromonas hydrophila* (AH) (CBAM 0162), *Citrobacter freundii* (CF) (CBAM 0762), *Escherichia coli* (EC) (CBAM 0006), *Enterobacter cloacae* (ECL) (CBAM 0200), *Klebsiella pneumoniae* (KP) (CBAM 0051), *Morganella morganii* (MM) (CBAM 0138), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) (CBAM 0519), *Staphylococcus aureus* (SA) (CBAM 0026), *Salmonella enterica* (SE) (CBAM 0209), *Serratia marcescens* (SM) (CBAM 0069), *Staphylococcus epidermidis* (STE) (CBAM 0613).

As cepas foram gentilmente fornecidas pela Coleção de Bactérias da Amazônia, CBAM do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD – Fiocruz), sendo armazenadas no Laboratório de Biotecnologia e Bioprospecção – INPA (LABB/INPA). Os microrganismos foram reativados previamente através de uma incubação em caldo Müeller-Hinton por 16 a 24 horas.

Após o crescimento dos microrganismos, foram preparados os respectivos inóculos padronizados. Com auxílio de um espectrofotômetro a 625 nm realizou-se a padronização dos inóculos com turbidez correspondente à escala 0,5 de McFarland, tendo uma absorbância entre 0,08 a 0,10 que representa uma suspensão de microrganismos à aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Para esse ensaio foram utilizadas as orientações adaptadas que são recomendadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) para ensaios in vitro de sensibilidade à antimicrobianos.

As amostras de extratos foram solubilizadas previamente em DMSO a 5% e em seguida diluídas sucessivamente em caldo Müeller-Hinton, sendo utilizado uma concentração de 1000 µg/mL dos extratos para análise. Utilizando placas de 96 poços, foram adicionados aos poços testes 90 µL da solução com as amostras e uma alíquota de 10 µL dos inóculos dos microrganismos, para avaliação. Para o controle positivo (CP) foram utilizados 90 µL do antimicrobiano oxitetraciclina na concentração de 125 µg/mL e 10 µL de inóculo. Para o controle negativo (CN) foram utilizados 90 µL de caldo Müeller-Hinton com DMSO a 5% e 10 µL de inóculo. As amostras analisadas e os controles foram preparados em triplicata.

Em seguida, as placas de 96 poços foram incubadas a ± 37 °C por 16 à 24 horas. As placas preparadas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (λ : 625 nm) antes

e depois da incubação apropriada. Ao final, foram reveladas com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) para verificar a viabilidade celular.

Cada ensaio foi realizado em triplicata, com resultados expressos em porcentagem de inibição, média e desvio padrão. Os resultados das médias foram analisados por one-way ANOVA seguidas de pós-teste de Dunnett, comparando as amostras com o controle negativo, assumindo um intervalo o intervalo de confiança a 95% (valor de $p < 0,05$). Os dados obtidos foram processados e analisados com auxílio dos softwares GraphPadPrism (v8.0) e Excel®.

4.5 Análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos extratos e frações

Os extratos e frações de *Macrolobium acaciifolium* foram analisados por CCDC e fazendo-se uso de solventes orgânicos como eluente. Os solventes foram: hexano, diclorometano, acetato de etila, clorofórmio, acetona e metanol.

Os reveladores utilizados para visualização dos constituintes químicos dos extratos, foram as luzes ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 nm (compostos com ligações duplas conjugadas) e 365 nm (para substâncias fluorescentes, principalmente que contenham ligações duplas conjugadas, como em algumas classes de flavonoides, alcaloides, tocotrienóis, além de cumarinas) e como reveladores químicos: anisaldeído sulfúrico (agente oxidante geral, revela terpenos), sulfato cérico [Ce(SO₄)₂] (agente oxidante geral, revela terpenos), Reagente de Dragendorff (para alcaloides ou substâncias com aminas secundárias e terciárias), cloreto de alumínio (AlCl₃, para flavonoides), NP/PEG (difetilboriloxietilamina 1,0% em metanol, seguido de solução polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol, para compostos fenólicos) e cloreto férrico (FeCl₃, para compostos fenólicos) (CHOUDHARY & KHATOON, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015; DURIC *et al.*, 2015; STAHL & GLATZ, 1982; VAN DER HEIDE, 1966; GAGE *et al.*, 1951; BRASSEUR & ANGENOT, 1986; BENJAMIN & MULCHANDANI, 1976; CHAWLA & CHIBBER, 1976; CHEXAL *et al.*, 1970; GAGE *et al.*, 1951; NAGARAJAN & PARMAR, 1977; POETHKE *et al.*, 1970; SCHMIDTLEIN & HERRMANN, 1976; RAAL *et al.*, 2020).

4.6 Fracionamento dos extratos

4.6.1 Partição dos extratos metanólicos

Os extratos metanólicos foram fracionados por partições líquido-líquido como primeira etapa de separação de substâncias. Para as partições, os extratos metanólicos foram solubilizados em metanol (MeOH) na proporção 1:10 (m/v), sendo adicionada em seguida água destilada na mesma proporção de MeOH formando uma solução hidrometanólica.

Os extratos solubilizados foram então transferidos para funis de separação para extração primeiramente com diclorometano (DCM) e posteriormente com acetato de etila (AcOEt). Os volumes de DCM e AcOEt foram adicionados à solução hidrometanólica na proporção de 1:1.

A separação por partição líquido-líquido com DCM é caracterizada pela formação de duas fases, na qual a fase DCM por ser mais densa, se posiciona na parte de baixo da fase aquosa, diferente da fase AcOEt menos densa, posicionada em cima da fase aquosa.

4.6.2 Purificação e isolamento das substâncias

Após os fracionamentos por cromatografia em colunas abertas, outro processo para purificação das substâncias foi necessário. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizada para a etapa de separação e purificação das substâncias em misturas complexas e/ou pouca massa.

Os solventes utilizados foram de grau CLAE (High Purity Solvents, Tedia), usando coluna C₁₈ semi-preparativa Luna ® (Phenomenex) 250 x 10 mm, 5 µ, 100 Å. Os volumes de injeções usados foram de 5 µL para a coluna analítica na concentração na concentração de 1 mg/mL. Para a coluna semi-preparativa foram usados volumes de 50 µL com amostras na concentração de 2,5 mg/mL.

4.6.3 Identificação das substâncias isoladas

Para as identificações estruturais, utilizou-se o equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 300 MHz (Fourier 300 - Bruker), instalado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

As substâncias foram solubilizadas em solventes deuterados e os dados obtidos de RMN foram processados pelo software ACD/NMR Processor Academic Edition, da empresa Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs) e TopSpin (Bruker).

As fragmentações e massas exatas das substâncias foram obtidas por Espectrometria de Massas no modo negativo de ionização e fonte Eletrospray (ESI) em 10 eV e 22 eV por infusão direta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos extratos metanólicos das folhas e galhos de *Macrolobium acaciifolium*

Devido à complexidade de substâncias, somente o sistema quaternário AcOEt/MeOH/H₂O/HAc 9:1:2:1 (v/v/v/v) foi capaz de eluir com uma melhor resolução o extrato das folhas e suficiente para eluir algumas substâncias do extrato metanólico dos galhos. Os extratos metanólicos não mostraram coloração diferente de um leve amarelo pálido quando visualizado no visível (Imagem 2A e Imagem 3A).

No comprimento de onda de 254 nm (Imagem 2B e Imagem 3B), muitas manchas puderam ser visualizadas nos extratos dos galhos e folhas e somente na origem do extrato dos galhos, aparentemente em baixa concentração, mostrando que as classes químicas poderiam ter uma grande quantidade de oxigênios ou outro heteroátomo com pares de elétrons livres e duplas ligações.

Poucas substâncias absorveram no comprimento de onda de UV-365 nm (Imagem 2C e Imagem 3C), mas revelaram as mesmas substâncias apresentadas pela UV-254 nm quando AlCl₃ foi borrifado na placa e visualizada na UV-365 nm (Imagem 2D e Imagem 3D). Essas substâncias podem ser classificadas previamente como flavonoides, visto que é características do AlCl₃ revelar essa classe química com o auxílio da UV-365 nm. Infelizmente não é capaz de indicar qual subclasse de flavonoides, apenas que podem ser agliconas.

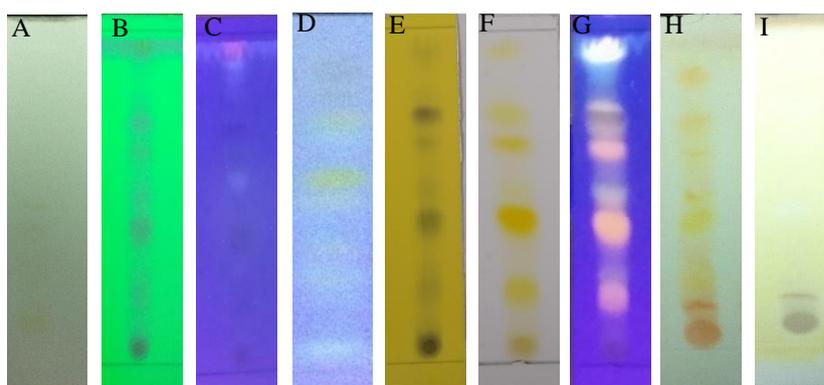


Imagem 2. Extrato metanólico das folhas (Fo), eluído com AcOEt/MeOH/H₂O/HAc 9:1:2:1. A = luz visível, B = UV-254 nm, C = UV-365 nm, D = AlCl₃ sob UV 365 nm, E = FeCl₃, F = NP/PEG sob luz visível, G = NP/PEG sob UV-365 nm, H = anisaldeído, I = sulfato cérico.

O reagente FeCl₃ revelou de cor levemente negra-esverdeada (Imagem 2E e Imagem 3E) todas as substâncias que apareceram no comprimento de onda de 254 nm, mostrando muita intensidade nos extratos das folhas, mas pouco para o extrato dos galhos.

De acordo com a literatura, o reagente FeCl_3 é específico para substâncias fenólicas, enóis e outras classes de metabólitos secundários com o grupo fenol, sendo útil na detecção de flavonoides.

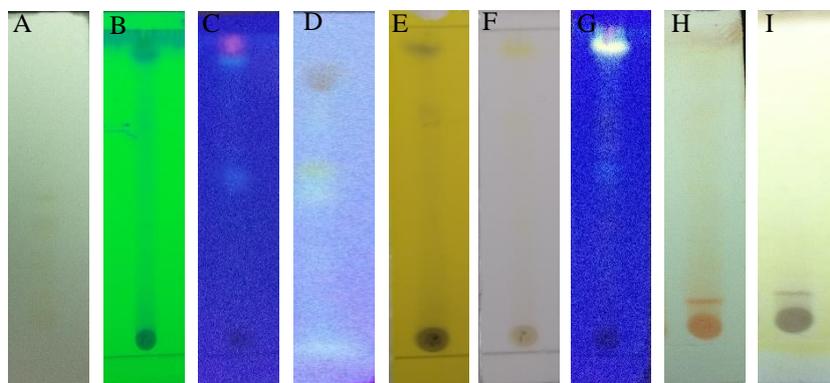


Imagem 3. Extratos metanólicos dos galhos (Ga), eluído com $\text{AcOEt/MeOH/H}_2\text{O/HAc}$ 9:1:2:1. A = luz visível, B = UV-254 nm, C = UV-365 nm, D = AlCl_3 sob UV 365 nm, E = FeCl_3 , F = NP/PEG sob luz visível, G = NP/PEG sob UV-365 nm, H = anisalaldeído, I = sulfato cérico.

Quando revelado com NP/PEG, o extrato metanólico das folhas mostrou-se muito diversificado em relação às substâncias fenólicas, mostrando manchas de cor amarela de várias tonalidades no visível (Imagem 2F) e laranja na presença da UV-365 nm (Imagem 2G).

O extrato dos galhos mostrou para o sistema quaternário de eluição, apenas alguns constituintes na parte superior da placa e na origem da mesma quando revelados com NP/PEG (Imagem 3F), intensificando a fluorescência azul na presença da UV-365 nm na parte superior da placa (Imagem 3G). Este reagente geralmente revela flavonoides glicosilados de cor laranja fluorescente na UV-365 nm, agliconas são reveladas de cor azul, verde ou amarela, todas fluorescentes, dependendo da classe do flavonoide.

A revelação com anisalaldeído mostrou as mesmas substâncias visualizadas com UV 254 nm e FeCl_3 , no entanto com coloração amarela na extensão eluída e laranja na origem da aplicação da amostra para o extrato das folhas (Imagem 2H) e na origem da aplicação para o extrato dos galhos (Imagem 3H). O anisalaldeído sulfúrico é conhecido por revelar uma gama de classes químicas das mais diversas cores (cinza, rosa, roxa, violeta, verde azul, marrom, amarela e laranjada são as mais comuns) incluindo substâncias com grupos fenóis e antioxidantes em geral.

Não ocorreu mudança de coloração quando os extratos foram revelados em $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, apenas observação de oxidação (Imagem 2I e Imagem 3I).

5.2 Fracionamento do extrato metanólico das folhas de *M. acaciifolium* e isolamento de substância

Foi realizado uma partição líquido-líquido na proporção 1:10 (m/v) com o extrato metanólico das folhas (47 g). Foram geradas 3 frações resultantes, a fase diclorometânica (1), a fase acetato de etila (2) e a fase aquosa (3).

Das três fases resultantes, a fase AcOEt (MFo2) foi escolhida para fracionamento por conter muitas substâncias com características de flavonoides e outros compostos fenólicos quando revelado com FeCl₃, NP/PEG (Imagem 4C e 4D).

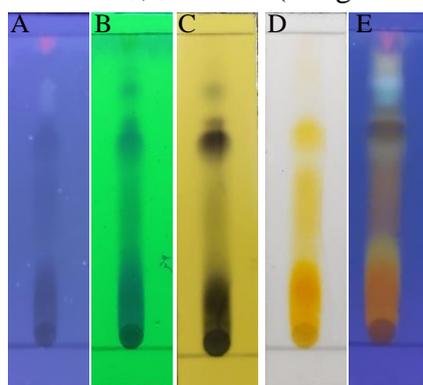


Imagem 4. Fase AcOEt (MFo2) eluída em AcOEt/MeOH 9:1. Reveladores UV-365 nm (A), UV-254 nm (B), FeCl₃ (C) e NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).

A fração 2 (MFo2, 3,0 g) foi submetida a análises em CCDC e posteriormente fracionada em coluna aberta (41 cm x 3,7 cm) de sílica (240 g). Os sistemas de solventes e suas respectivas frações são exibidas na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1. Sistemas da coluna de sílica da fração MFo2.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
AcOEt/MeOH 95:05	500	0 (300 mL), 1 (200 mL)
AcOEt/MeOH 9:1	500	2 (500 mL)
AcOEt/MeOH 8:2	700	3 (400 mL), 4 (300 mL)
AcOEt/MeOH 1:1	500	5 (500 mL)
MeOH 100%	500	6 (250 mL), 7(250 mL)

O fracionamento de MFo2 gerou 7 frações, cujas substâncias da classe dos fenólicos mostraram estar em maiores concentração nas frações 2 (MFo2.2, 283,7 mg), 3 (MFo2.3, 140 mg) e 4 (MFo2.4, 968 mg) conforme Imagem 5.

As frações MFo2.2 e MFo2.3 mostraram intensas absorções frente à luz UV-254 nm nos R_f = 0,48 e 0,63, dos quais os mesmos mostraram-se escuros na luz UV-365 nm. Auxiliado pelo FeCl₃ (Imagem 5C) revelando em preto (R_f = 0,48) e verde (R_f = 0,63)

assim como pelo NP/PEG + UV-365 nm (Imagem 5D) com cores fluorescentes verde amareladas, sugeriu se tratar de flavonoides.

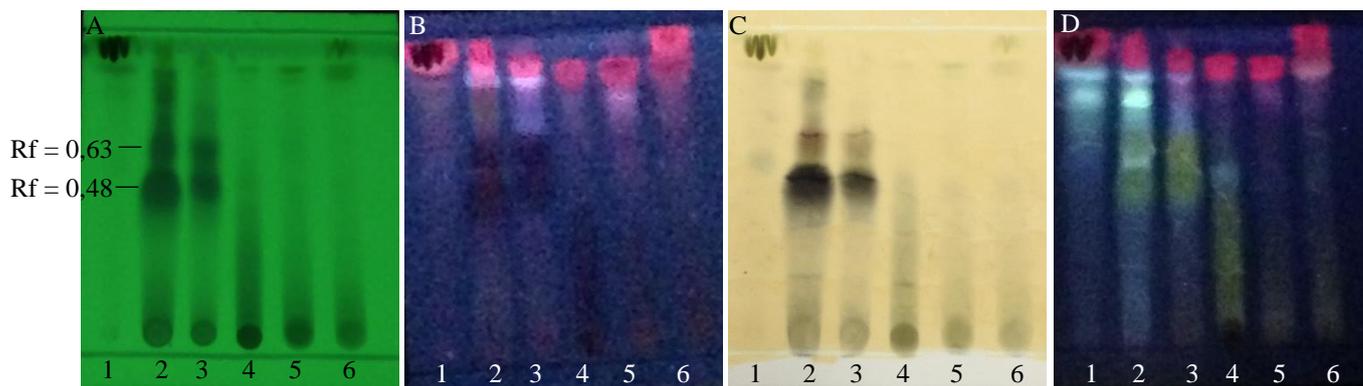


Imagem 5. Frações de 1-6 de MFO2 eluídas em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 7:3. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl_3 (C) e AlCl_3 + UV-365 nm (D).

A fração MFO2.2 foi escolhida para fracionamento por CCDP em placa de 20 x 20 cm e eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HAc}$ 85:15:2, em uma eluição somente. Foram recolhidas 7 frações posteriormente analisadas por CCDC, sendo revelados principalmente nos Rf = 0,29 (fração 6) e Rf = 0,15 (Fração 7) em FeCl_3 nas cores verde e preta, assim como em NP/PEG sob luz UV-365 nm nas cores fluorescentes amarela Rf = 0,29 (fração 6) e laranja Rf = 0,15 (Fração 7) conforme Imagem 6.

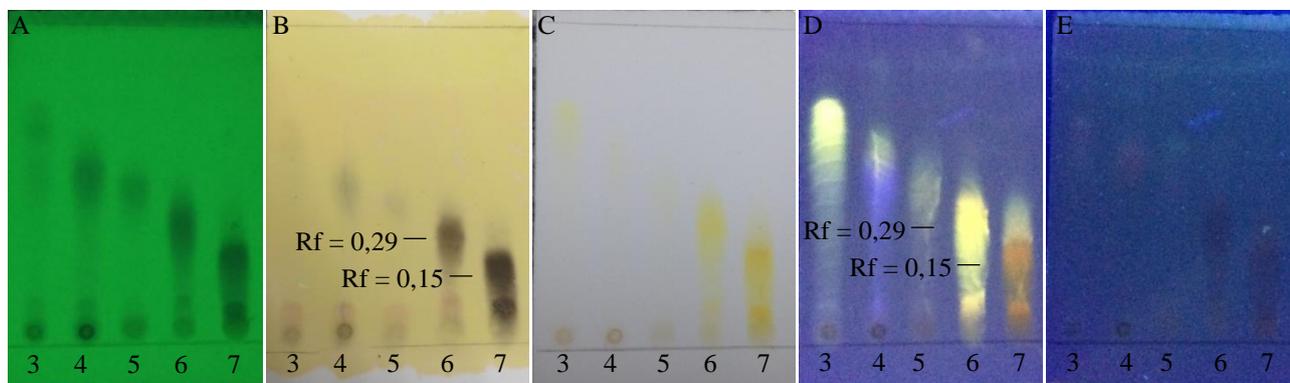


Imagem 6. Frações de 3-7 de MFO2.2 eluídas em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HAc}$ 85:15:2. Reveladores UV-254 nm (A), FeCl_3 (B), NP/PEG (C), NP/PEG + UV-365 nm (D) e UV-365 nm (E).

Em seguida, a fração MFO2.2.6 (93,7 mg) em mistura complexa foi então submetida a uma CCDP em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HAc}$ 85:15:2 e eluída 3 vezes até separação em duas faixas, as quais foram recolhidas como MFO2.2.6.1 (superior na placa, 60,0 mg) e MFO2.2.6.2 (inferior na placa, 25,2 mg).

A fração MFO2.2.6.2 provavelmente sofreu polimerização, tornando-se insolúvel. A fração MFO2.2.6.1 foi submetida a uma coluna aberta de Sephadex LH-20 eluída com

metanol, na qual foram recolhidas 5 frações. As dimensões da coluna foram 27 cm x 2 cm. Os volumes e frações são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Volumes e frações da coluna em Sephadex LH-20 da fração MFo2.2.6.1.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
MeOH 100 %	100 mL	1 (40 mL), 2 (50 mL), 3 (12 mL)
		4 (5 mL), 5 (5 mL)

Após reunião, a fração de 3-5 (MFo2.2.6.1.3-5, 25 mg) deste fracionamento anterior foi submetida a uma coluna aberta de sílica para separação de resíduos de clorofila, resultando no recolhimento de 6 frações. As dimensões da coluna foram 7 cm x 1,2 cm e $V_m = 10$ mL. Os volumes e frações deste fracionamento são exibidos na Tabela 3.

Tabela 3. Volumes e frações da coluna em sílica gel da fração MFo2.2.6.1.3-5.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
AcOEt/MeOH 85:15	40	1 (20 mL), 2 (10 mL), 3 (10 mL)
AcOEt/MeOH 8:2	40	4 (30 mL)
AcOEt/MeOH 7:3	20	5 (20 mL)

As frações reunidas MFo2.2.6.1.3-5.3 (12,0 mg) mostrou-se ainda em mistura complexa de substâncias, sendo então purificada por CLAE em coluna de fase estacionária reversa C_{18} , em modo isocrático MeOH 50%, pH 5.

O cromatograma da fração MFo2.2.6.1.3-5.3 é exibido na Figura 7. Foram recolhidos 5 picos no CLAE, no qual o pico 5 coletado em 29,55 min foi nomeado de fração MFo2.2.6.1.3-5.3.5 (2,0 mg) e considerado a substância **1**. As demais frações recolhidas não apresentaram massa suficiente para análises por RMN.

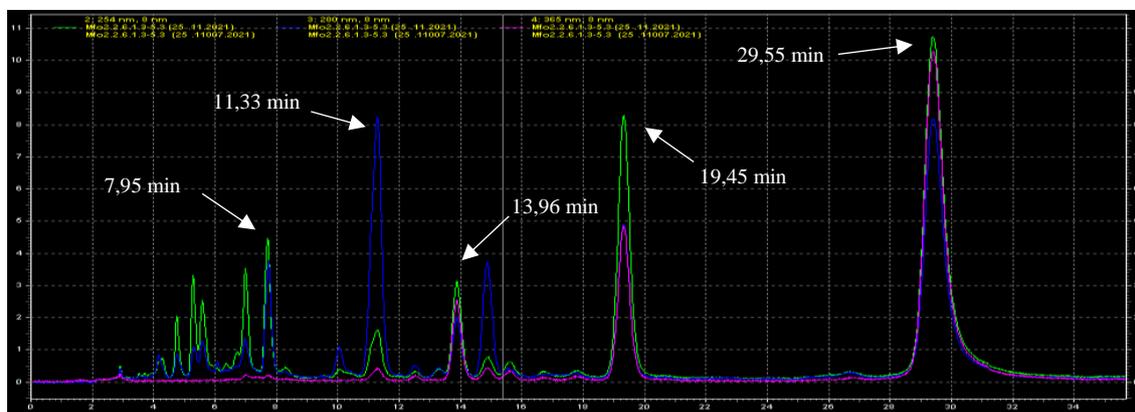


Figura 7. Cromatograma da purificação de MFo2.2.6.1.5-3.3.

Em prosseguimento ao trabalho, a fração MFo2.2.7 (190,0 mg) foi escolhida para continuação dos fracionamentos, a qual foi submetida a uma coluna aberta de Sephadex LH-20 com MeOH como fase móvel, sendo recolhidas 5 frações, conforme Tabela 4. As dimensões da coluna foram 45 cm x 2 cm.

Tabela 4. Volumes e frações da coluna em Sephadex LH-20 da fração MFo2.2.7

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
MeOH 100 %	270 mL	1 (50 mL), 2 (50 mL), 3 (80 mL)
		4 (40 mL), 5 (50 mL)

Após CCDC, a fração MFo2.2.7.4 (Imagem 7) foi escolhida para ser purificada por CLAE devido a presença de uma substância da classe dos flavonoides no $R_f = 0,39$ revelada em cor preta frente ao $FeCl_3$ (Imagem 7C), amarela em NP/PEG e NP/PEG + 365 nm (Imagem 7D e 7E).

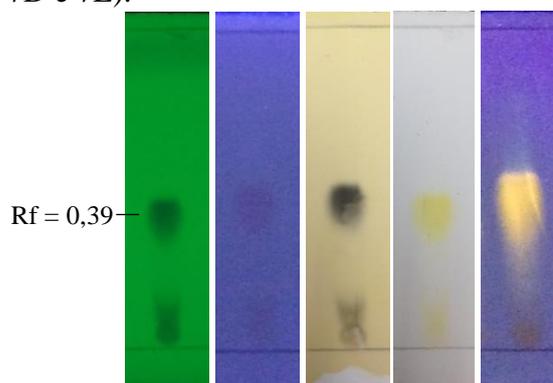


Imagem 7. Fração de MFo2.2.7.4 eluída em $CHCl_3/MeOH$ 8:2. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), $FeCl_3$ (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).

A purificação de MFo2.2.7.4 foi realizada em coluna de fase reversa C_{18} , em modo isocrático MeOH 44%, pH 5 (HAc). O cromatograma (Figura 8) da purificação mostrou tratar-se de uma mistura de 5 substâncias visualizadas nos tempos de retenção 9,50 min (substância 2, 21,0 mg), 10,40 min (substância 3, 20,0 mg), 12,45 min (substância 4, 3,4 mg), 13,30 min (substância 5, 8,3 mg) e 17,67 min (substância 6, 3,0 mg).

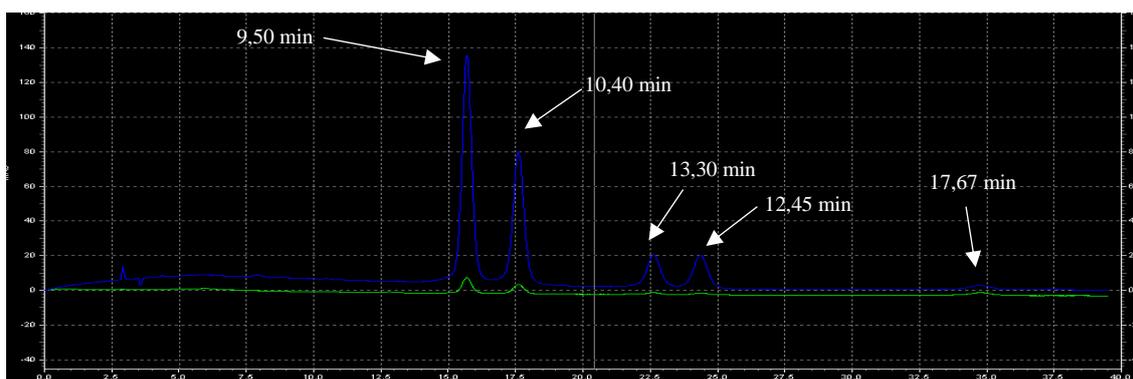


Figura 8. Cromatograma da purificação de MFo2.2.7.4.

Prosseguindo o fracionamento, a fração 4 (MFo2.4, 968,0 mg) foi submetida a uma coluna aberta (49 cm x 3 cm) de Sephadex LH-20, onde foram recolhidas 10 frações. Os sistemas de solventes e suas respectivas frações são exibidos na Tabela 5, a seguir.

Tabela 5. Sistemas da coluna de Sephadex LH-20 da fração MFo2.4.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
MeOH 100 %	1,5 L	0 (150 mL), 1 (100 mL), 2 (150 mL)
		3 (125 mL), 4 (100 mL), 5 (100 mL), 6 (200 mL),
		7 (125 mL), 8 (250 mL), 9 (100 mL), 10 (100 mL)

O fracionamento de MFo2.4 em Sephadex LH-20 gerou frações com substâncias de natureza fenólica concentradas (Imagem 8), no entanto ainda em misturas complexas.

Algumas combinações de solventes foram utilizadas para melhorar a visualização das substâncias em CCDC. Os sistemas binários AcOEt/MeOH 9:1 e CHCl₃/MeOH 7:3 não foram suficientes para uma boa análise visual das frações, devido grande retenção na sílica. Foi necessário após várias tentativas, estabelecer um sistema quaternário com os solventes AcOEt/MeOH/H₂O/HAc na proporção 9:1:1:1 (v/v/v/v).

As frações 3 (MFo2.4.3, 287 mg) e 4 (MFo2.4.4, 35 mg) exibiram concentração maior de substâncias fenólicas, porém muitas substâncias graxas estavam presentes, podendo ser visualizadas em Rfs superiores da placa em cor verde, assim como no frasco.

Quando reveladas com FeCl₃, as substâncias mostraram-se em coloração verde e em NP/PEG, coloração amarela principalmente nos Rf = 0,27, Rf = 0,37, Rf = 0,45 e Rf = 0,56 e Rf = 0,66 (Imagem 8A e 8B).

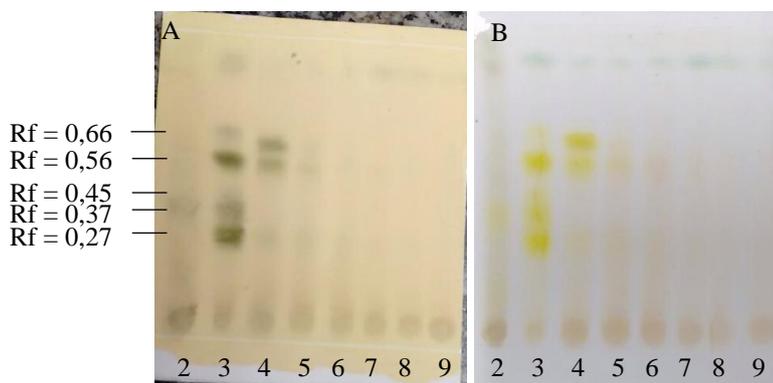


Imagem 8. Frações de MFo2.4 eluídas em AcOEt/MeOH/H₂O/HAc 9:1:1:1. Reveladores FeCl₃ (A) e NP/PEG (B).

Foram realizadas análises em CCDC com as frações resultantes e a fração 3 (MFo2.4.3, 287,0 mg) foi escolhida para ser fracionada por extração em fase sólida e

sílica C₁₈ (50 g). Os sistemas de solventes e suas respectivas frações estão dispostas na Tabela 6.

Tabela 6. Sistemas da extração em fase sólida da fração MFo2.4.3.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
H ₂ O 100%	60	1 (60 mL)
H ₂ O/MeOH 1:1	60	2 (60 mL)
MeOH 100%	60	3 (60 mL)
MeOH/CHCl ₃ 1:1	60	4 (60 mL)
CHCl ₃ 100%	60	5 (60 mL)

A fração MFo2.4.3 foi escolhida para extração em fase sólida e desta etapa foram recolhidas 5 frações, onde as substâncias fenólicas ficaram nas frações 1 (MFo2.4.3.1, 200 mg) e 2 (MFo2.4.3.2, 35,0 mg) e as graxas foram removidas nas frações 4 e 5.

Na Imagem 9 é possível observar com muito mais detalhes as substâncias fenólicas nas luzes UV-254 e 365 nm (Imagem 9A e 9B), além dos reveladores FeCl₃ e NP/PEG no visível e NP/PEG + UV-365 nm (Imagem 9C, 9D e 9E).

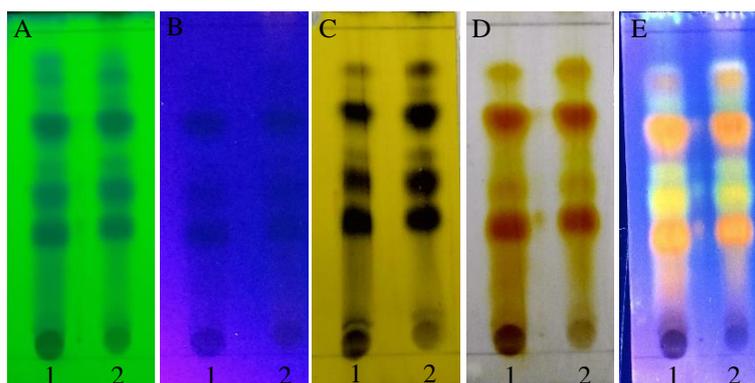


Imagem 9. Frações de MFo2.4.3 eluídas em AcOEt/MeOH/H₂O/HAc 9:1:1:1. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl₃ (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).

Após análises por CCDC, a fração 2 (MFo2.4.3.2) foi escolhida para ser fracionada em coluna aberta (32 cm x 1,5 cm) de Sephadex LH-20 como teste de fracionamento, visto ter as mesmas características da fração MFo2.4.3.1. Os volumes de solventes e suas respectivas frações são dispostas na Tabela 7, abaixo.

Tabela 7. Sistemas da coluna de Sephadex LH-20 da fração MFo2.4.3.2.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
MeOH 100 %	80 mL	1 (20 mL), 2 (5 mL), 3 (15 mL)
		4 (15 mL), 4 (5 mL), 5 (20 mL)

O resultado foi uma pequena separação de algumas das substâncias em duas frações, MFo2.4.3.2.4 (10,4 mg) e MFo2.4.3.2.5 (22,4 mg). A fração MFo2.4.3.2.5 mostrou-se com as mesmas substâncias de sua fração mãe e apesar de possuírem algumas substâncias em mesmos $R_f = 0,27$ e $R_f = 0,30$ (Imagem 10C e 10 D), as duas frações foram recolhidas como pratos teóricos separados na coluna em Sephadex LH-20.

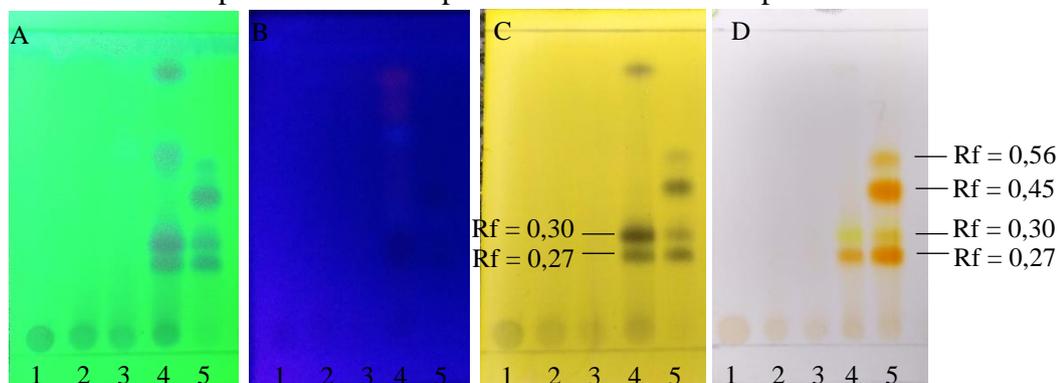


Imagem 10. Frações de MFo2.4.3.2 eluídas em AcOEt/MeOH/H₂O/HAc 9:1:1:1. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl₃ (C), NP/PEG (D).

Após análises por CCDC, a fração 4 (MFo2.4.3.2.4, 10,4 mg) foi escolhida para purificação por CLAE. A fração foi solubilizada em MeOH para injeção no equipamento, o qual foi realizado em modo isocrático, MeOH 45% (pH 5, HAc) com volume de injeção de 50 μ L e coluna semipreparativa de fase reversa, C₁₈.

Foram recolhidas 12 frações que resultaram no isolamento de uma substância com tempo de retenção de 21,19 minutos, observada no cromatograma (Figura 9), nomeada de MFo2.4.3.2.4.10 (substância **10**, 1,3 mg), a qual foi enviada para análises por RMN. Outros dois picos em 4,19 min (1,5 mg) e 13,98 min (1,3 mg) foram recolhidos e enviados ao para análise por RMN mas não mostraram sinais claros e intensos que pudessem fornecer uma identificação genuína.

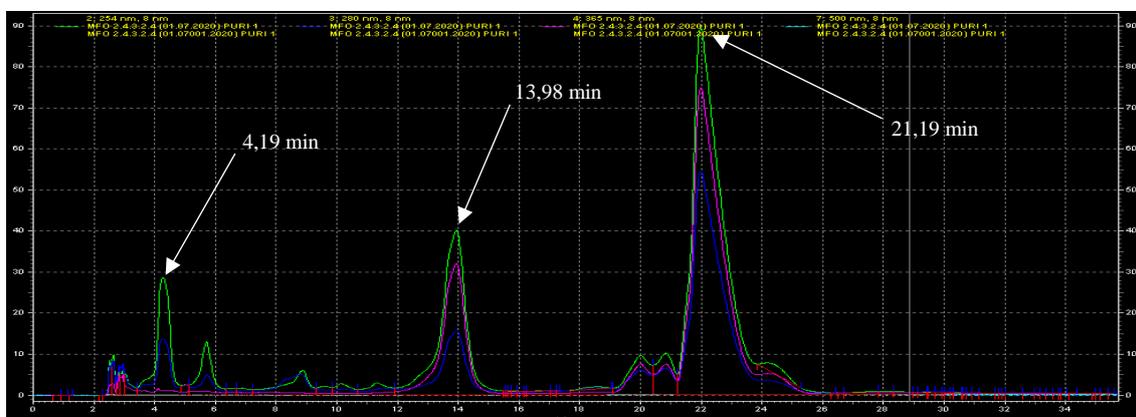


Figura 9. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.2.4.10.

Após bons resultados, a fração MFo2.4.3.1 (200,0 mg) foi então submetida a uma coluna aberta (32 cm x 1,5 cm) de Sephadex LH-20 e fase móvel MeOH, resultando na coleta de 8 frações. Os volumes e frações são exibidos na Tabela 8.

Tabela 8. Sistemas da coluna de Sephadex LH-20 da fração MFo2.4.3.1.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
MeOH 100 %	210 mL	1 (40 mL), 2 (90 mL), 3 (10 mL)
		4 (10 mL), 5 (5 mL), 6 (15 mL)
		7 (10 mL) 8 (30 mL)

É possível verificar muitas similaridades nas frações (Imagem 11), porém todas foram recolhidas como frações diferentes na coluna. As frações foram então reunidas da seguinte forma: MFo2.4.3.1.3-4, MFo2.4.3.1.5-6, além de MFo2.4.3.1.7 e MFo2.4.3.1.8.

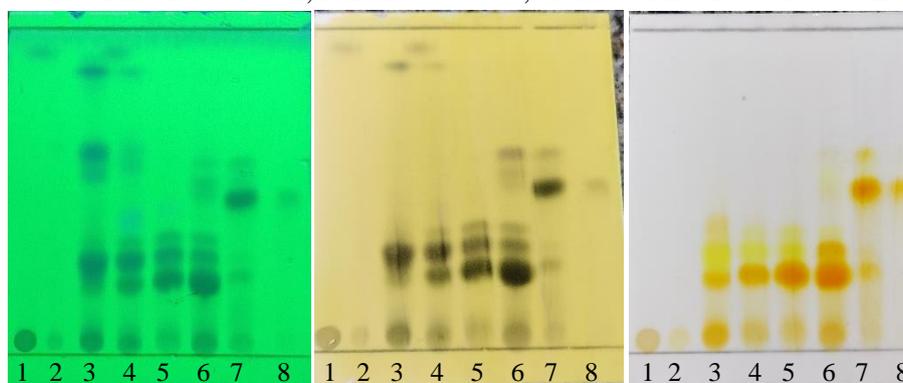


Imagem 11. Frações de MFo2.4.3.1 eluídas em AcOEt/MeOH/ H₂O/HAc 9:1:1:1. Reveladores UV-254 nm (A), FeCl₃ (B), NP/PEG (C).

Em seguida a fração MFo2.4.3.1.3-4 foi solubilizada em MeOH e submetida a purificação por CLAE em coluna de fase reversa C₁₈ e modo isocrático MeOH 44% (pH 5, HAc). Foram recolhidos 5 picos em 14,30 min (1), 20,51 min (2), 21,83 min (3), 23,67 min (4) e 25,42 min (5), sendo o pico número 3 (MFo2.4.3.1.3-4.3) considerado a substância 7. O cromatograma da análise pode ser visualizado na Figura 10.

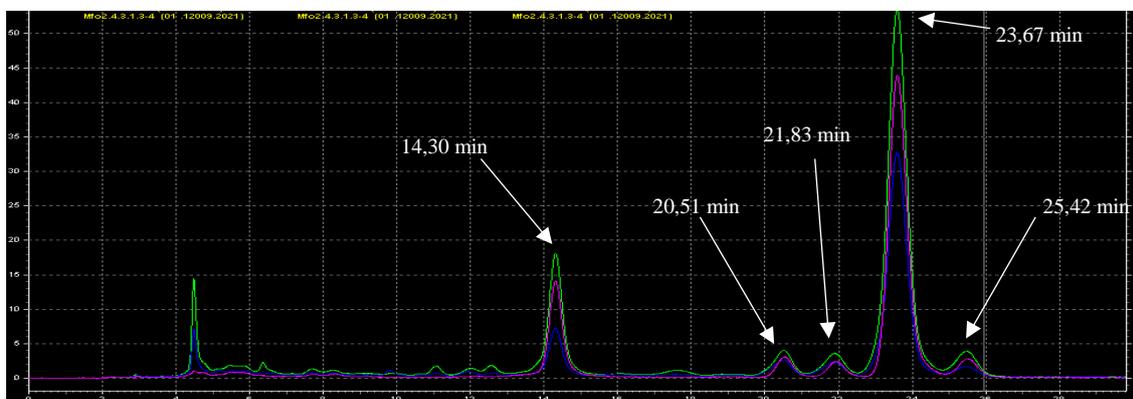


Figura 10. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.1.3-4.

O pico 4 em 23,67 min foi chamado de fração MFo2.4.3.1.3-4.4, sendo submetida a mais uma purificação por CLAE para separação de resíduos dos picos 3 e 5, em coluna de fase reversa de sílica C₁₈, modo isocrático MeOH 38% (pH 5, HAc). A purificação gerou 5 picos, no qual o pico 3 foi considerado a substância **8**. O cromatograma pode ser visualizado na Figura 11.



Figura 11. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.1.3-4.4.

Dando continuidade ao fracionamento, a fração MFo2.4.3.1.5-6 foi submetida a purificação por CLAE (Figura 12), em coluna de fase reversa de sílica C₁₈, modo isocrático MeOH 44% (pH 5, HAc), resultando na coleta de 7 picos, onde 5 (MFo2.4.3.1.5-6.5, 14,68 min) e 7 (MFo2.4.3.1.5-6.7, 24,40 min) foram constatadas ser as mesmas substâncias **7** e **8**, anteriormente isoladas.

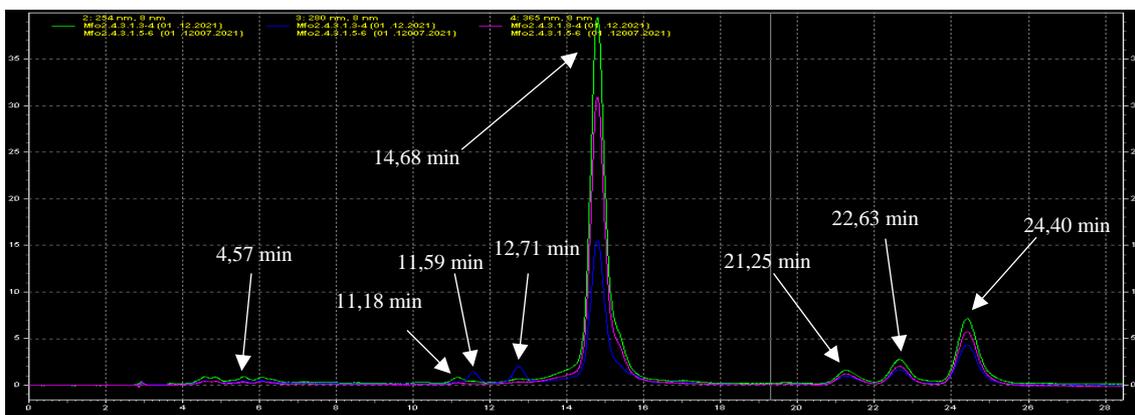


Figura 12. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.1.5-6.

Seguindo as etapas de fracionamento, a fração MFo2.4.3.1.7 foi purificada em fase reversa de sílica C₁₈, modo isocrático MeOH 44% (pH 5, HAc). O resultado foi a coleta de 5 picos em 9,57 min, 12,38 min, 16,65 min, 17,79 min e 18,60 min. O pico em 12,38 min (MFo2.4.3.1.7.2, 2,0 mg) foi considerado como a substância **9**. Seu cromatograma pode ser visualizado na Figura 13.

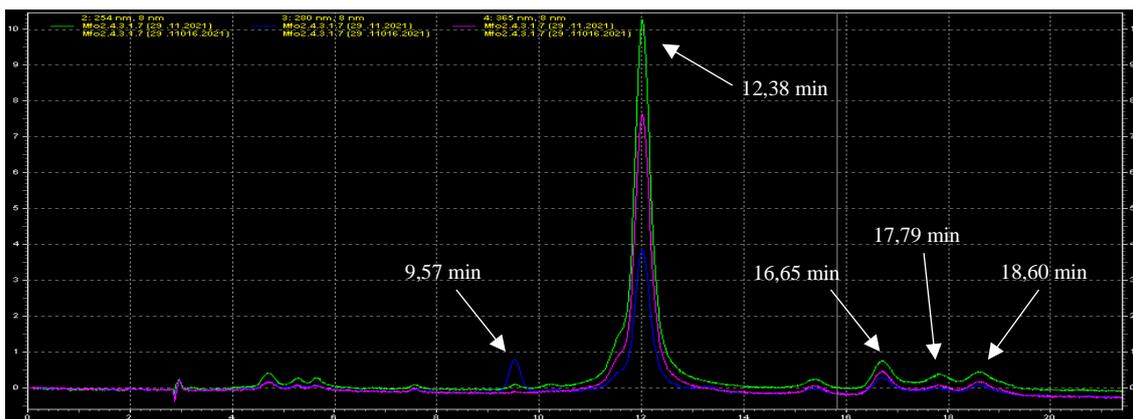


Figura 13. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.1.7.

A fração MFo2.4.3.1.8 foi purificada em fase reversa de sílica C₁₈, modo isocrático MeOH 50% (pH 5, HAc). foram coletados 5 picos em 3,41 min, 6,59 min, 9,60 min, 11,30 min e 13,65 min e o pico 9,50 min (MFo2.4.3.1.8.3, 4 mg) mostrou se tratar da mesma substância **9**. O cromatograma de sua purificação pode ser visualizado na Figura 14.

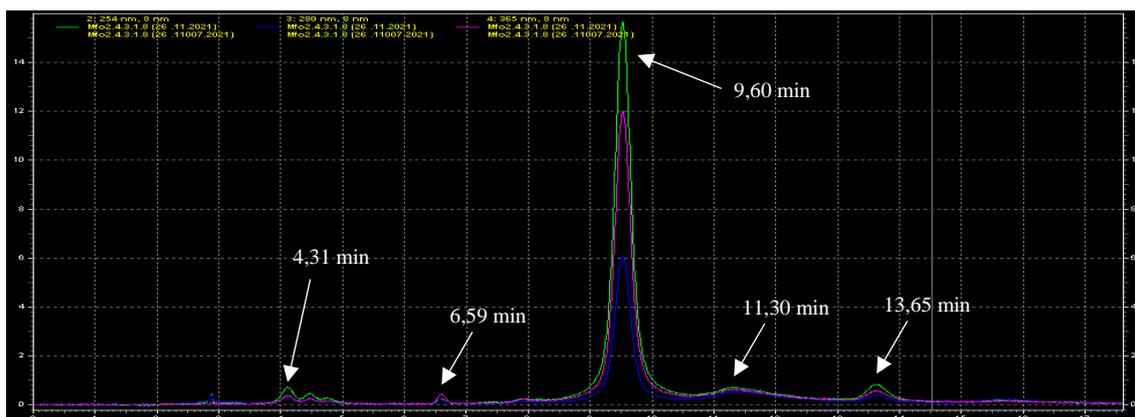


Figura 14. Cromatograma da purificação de MFo2.4.3.1.8.

Foram isoladas e identificadas 10 substâncias dos fracionamentos do extrato metanólico dos galhos: MFo2.2.6.1.3-5.5 (**1**, 2,0 mg,), MFo2.2.7.4.1 (**2**, 21,0 mg), MFo2.2.7.4.2 (**3**, 20,0 mg), MFo2.2.7.4.3 (**4**, 3,4 mg), MFo2.2.7.4.4 (**5**, 8,3 mg), MFo2.2.7.4.5 (**6**, 3,0 mg), MFo2.4.3.1.3-4.3 + MFo2.4.3.1.5-6.5.3 (**7**, 21,4 mg), MFo2.4.3.1.3-4.4.3 + MFo2.4.3.1.5-6.5.7 (**8**, 1,3 mg), MFo2.4.3.1.7.2 + MFo2.4.3.1.8.3 (**9**, 6,0 mg) e MFo2.4.3.2.4.10 (**10**, 1,3 mg). O fluxograma do isolamento das substâncias é mostrado na Figura 15.

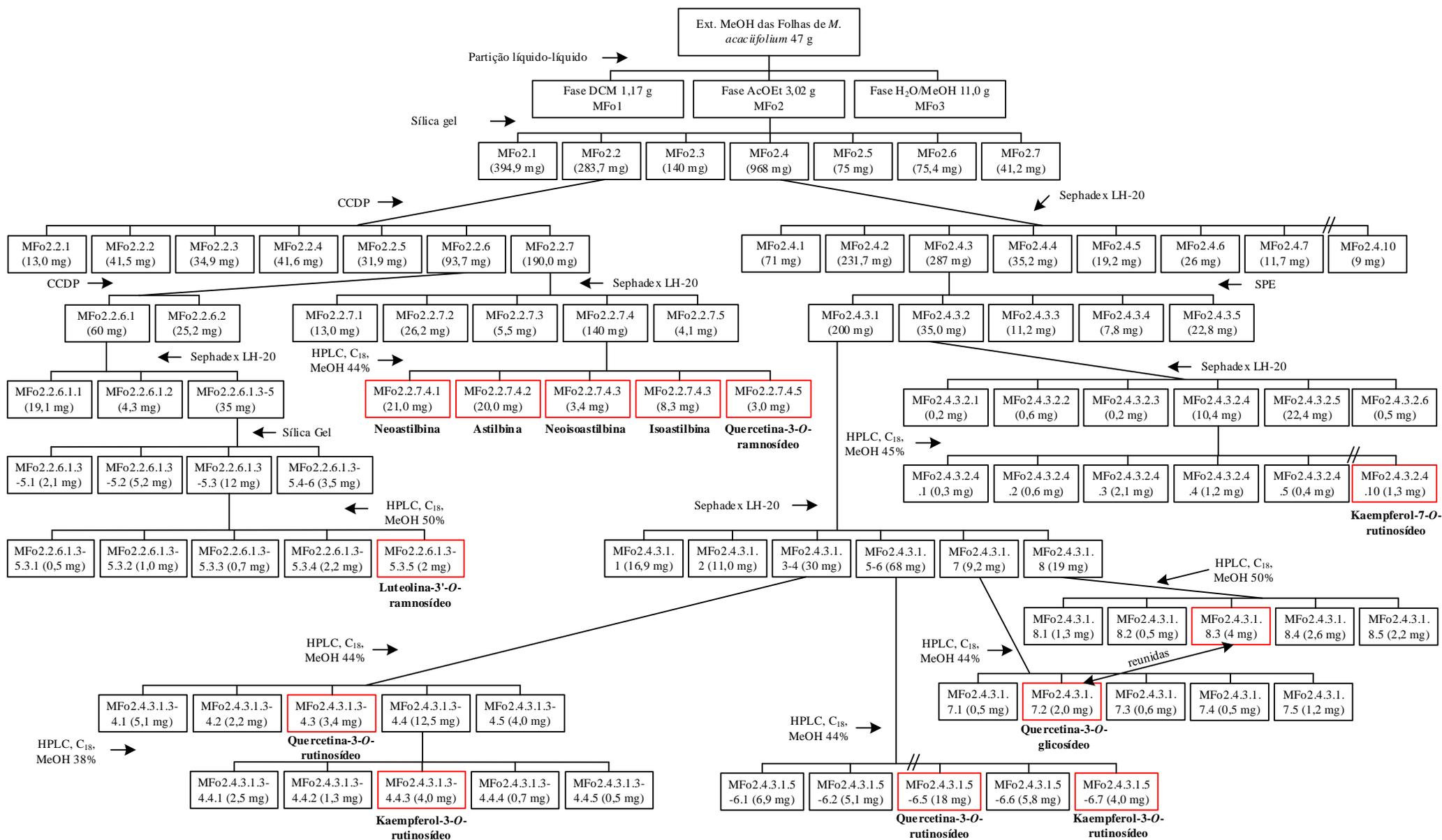


Figura 15. Fluxograma das substâncias isoladas do extrato metanólico das folhas de *M. acaciifolium*.

5.3 Fracionamento do extrato metanólico dos galhos de *M. acaciifolium* e isolamentos das substâncias

Foi realizada uma partição líquido-líquido na proporção 1:10 (g/mL) com apenas 30 g dos 75 g de extrato metanólico dos galhos. A partição consistiu na solubilização do extrato com 300 mL da mistura de MeOH/H₂O 1:1. Foram geradas 3 frações resultantes, a primeira da fase (1) diclorometânica (MGa1), a segunda (2) da fase acetato de etila (MGa2) e a terceira (3) da fase hidroalcolólica.

O extrato metanólico dos galhos continha substâncias de diferentes polaridades, por isso foi realizado uma partição líquido-líquido do mesmo, a fim de otimizar a análise por CCDC. As fases DCM (MGa1) e AcOEt (MGa2) foram escolhidas para fracionamento por conter muitas substâncias com características de flavonoides e outros compostos fenólicos quando revelado com FeCl₃ e NP/PEG.

A fase 1 do extrato metanólico dos galhos (MGa1) foi fracionada por apresentar a maior concentração de substâncias fenólicas e com características de flavonoides. Quando revelada com FeCl₃ (Imagem 12D) exibiu colorações verde e castanha, além de amarela, laranja e rosa com NP/PEG e NP/PEG + UV-365 nm (Imagem 12E e 12F).

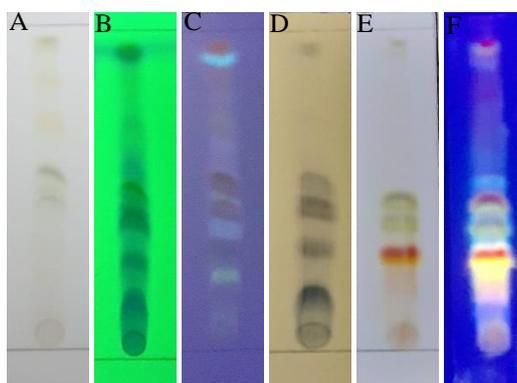


Imagem 12. Fração MGa1 eluída em CHCl₃/MeOH 9:1. Visível (A), reveladores UV-254 nm (B), UV-365 nm (C), FeCl₃ (D), NP/PEG (E) e NP/PEG + UV-365 nm (F).

A fase MGa1 (440 mg) após analisada por CCDC, foi fracionada por extração em fase sólida em cartucho de sílica C₁₈ (50 g) com os sistemas da Tabela 9, abaixo, apresentando a massa das cinco 5 frações geradas.

Tabela 9. Sistemas da extração em fase sólida da fração MGa1.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
H ₂ O 100%	60	1 (60 mL)
H ₂ O/MeOH 1:1	60	2 (60 mL)
MeOH 100%	60	3 (60 mL)
MeOH/CHCl ₃ 1:1	60	4 (60 mL)
CHCl ₃ 100%	60	5 (60 mL)

Deste fracionamento, MGa1 gerou cinco frações com distintas classes químicas. As frações MGa1.4 (MeOH/CHCl₃ 1:1) e MGa1.5 (CHCl₃ 100%) apresentaram somente os resíduos de graxas e clorofilas visivelmente nos seus respectivos frascos não sendo analisadas por CCDC. As frações MGa1.1 e MGa1.2 apresentaram substâncias com baixa reatividade frente aos reveladores FeCl₃ e NP/PEG conforme Imagens 13C e 13E.

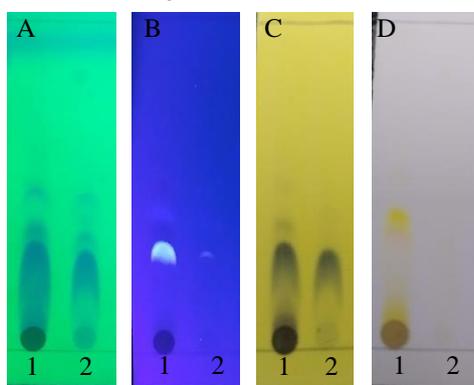


Imagem 13. Frações MGa1.1(1) e MGa1.2 (2) eluídas em CHCl₃/MeOH 9:1. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl₃ (C) e NP/PEG (D).

A fração MGa1.2 (28 mg) foi purificada por CLAE em fase reversa de C₁₈, isocrático MeOH 25% em solução aquosa (pH 5, HAc). Foram geradas 10 frações das quais as frações 3 (MGa1.2.3, 1,3 mg) e 6 (MGa1.2.6, 1,5 mg) foram enviadas para análises de RMN de ¹H e nomeadas como as substâncias **11** e **12**. A Figura 16 exhibe o cromatograma de purificação da fração MGa1.2.

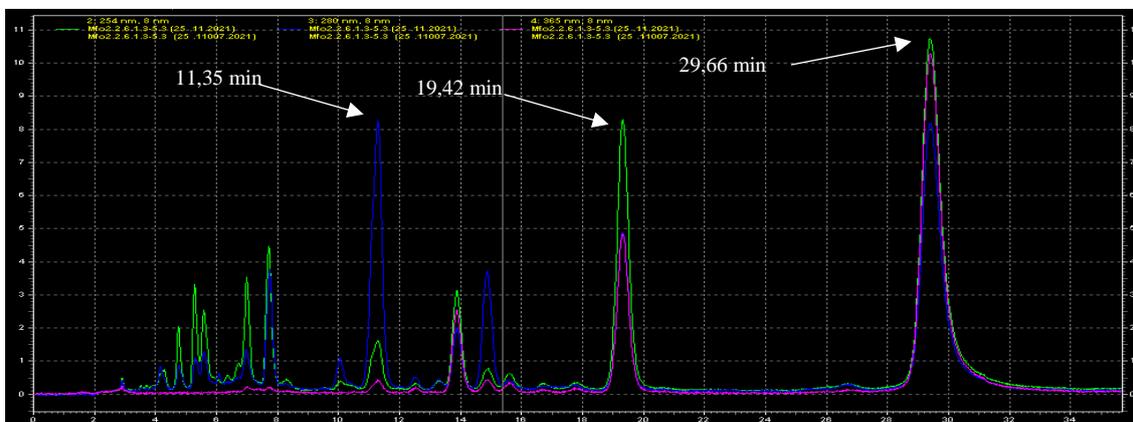


Figura 16. Cromatograma da purificação de MGa1.2.

Prosseguindo as análises, a fração MGa1.3 (269 mg) demonstrou concentração maior de substâncias fenólicas quando reveladas em FeCl₃ e NP/PEG (Imagem 14C, 14D), além NP/PEG + UV-365 nm (Imagem 14E), sendo escolhida para fracionamento.

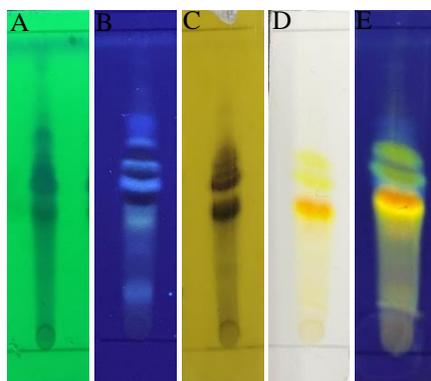


Imagem 14. Fração MGa1.3 eluída em CHCl₃/MeOH 9:1. UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl₃ (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).

Após submetida a CCDC, a fração 3 (MGa1.3, 269 mg) foi fracionada em coluna aberta (30 cm x 2 cm) em sílica (54 g). Foram recolhidas 43 frações. Os sistemas de solventes e suas respectivas frações são dispostas na Tabela 10, abaixo.

Tabela 10. Sistemas da coluna de sílica da fração MGa1.3.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
CHCl ₃ /MeOH 95:05	220	0 (120 mL), 1 – 5 (20 mL)
CHCl ₃ /MeOH 9:1	220	6 – 15 (20 mL)
CHCl ₃ /MeOH 8:2	220	16 – 25 (20 mL)
CHCl ₃ /MeOH 7:3	220	26 – 35 (20 mL)
CHCl ₃ /MeOH 1:1	220	36 – 43 (20 mL)

O fracionamento de MGa1.3 resultou em frações ricas em substâncias que supostamente seriam flavonoides quando reveladas em FeCl₃ e NP/PEG. As substâncias também mostraram absorções intensas quando visualizadas em UV-254 nm e UV-365 nm. A fração 1 (MGa1.3.1, 15,7 mg) apresentou misturas de outras substâncias quando comparada à concentração de substâncias fenólicas reveladas com FeCl₃ e NP/PEG, sendo desprezada para fracionamento.

As frações 2 e 3 (MGa1.2-3, 28,9 mg) foram reunidas por apresentar semelhanças das classes químicas. A Imagem 15 mostra as frações 2 e 3, sendo possível ver absorções no meio da placa nas luzes UV-254 nm e UV-365 nm (Imagem 15A e 15B), característica da presença de grupos com heteroátomos e cromóforos. As mesmas também revelaram em FeCl₃ (Imagem 15C) na cor marrom, NP/PEG na cor amarela (Imagem 15D) e NP/PEG + UV-365 nm (Imagem 15E), evidenciando a presença de possíveis flavonoides.

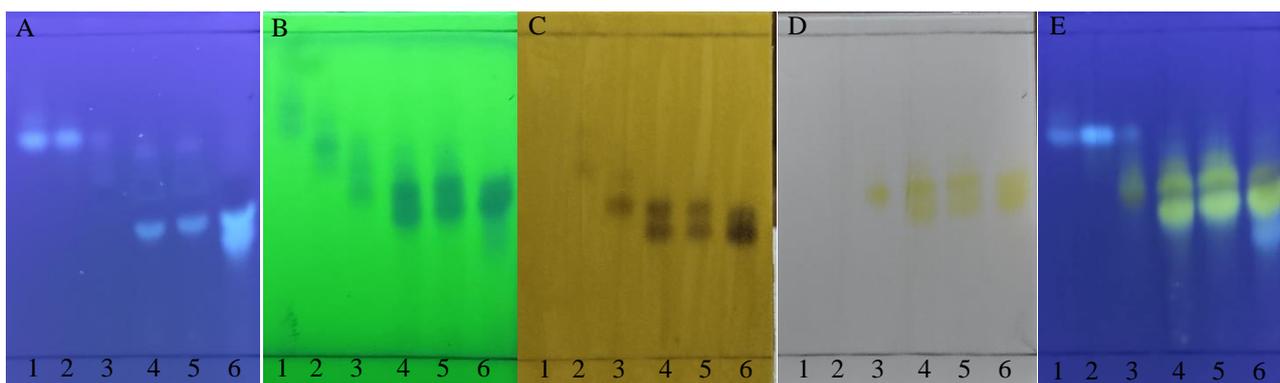


Imagem 15. Frações de MGa1.3 eluídas em CHCl_3 /acetona 8:2. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl_3 (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).

Após análises em CCDC, MGa1.3.2-3 foi fracionada por coluna aberta (4 cm x 1,2 cm) em sílica (2,9 g), o qual gerou duas frações. Seus sistemas móveis e volumes são exibidos na Tabela 11.

Tabela 11. Sistemas da coluna se sílica MGa1.3.2-3

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
CHCl_3 /acetona 95:5	20	1 (20 mL)
CHCl_3 /acetona 9:1	20	2 (20 mL)

A fração 1 (MGa1.3.2-3.1, 7 mg) apresentou substâncias nas paredes e fundo do frasco com aspectos diferentes. O sólido esbranquiçado foi removido com acetona e nomeado de MGa1.3.2-3.1.1 (5 mg) e a substância das paredes do frasco, MGa1.3.2-3.1.2 (1,8 mg) os quais foram enviados para análises por RMN, sendo considerados as substâncias **13** e **15**.

Dando prosseguimento ao fracionamento, é possível ver na Imagem 15 que as frações de 4-6 exibiram perfis químicos semelhantes. Essa característica se estende para a fração 7 (Imagem 16), permitindo a reunião das mesmas (MGa1.3.4-7, 34 mg).

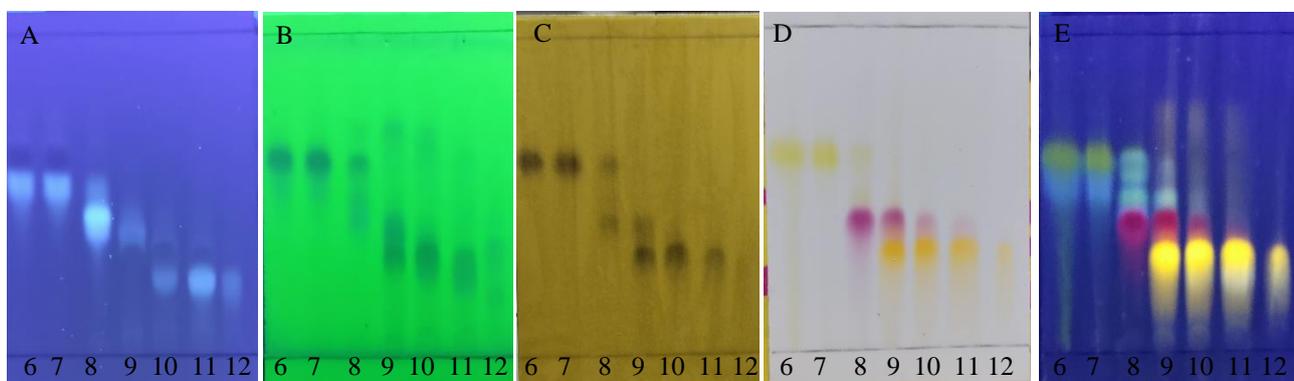


Imagem 16. Frações de MGa1.3 eluídas em CHCl_3 /acetona 7:3. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl_3 (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).

A Imagem 16C e 16D mostra as frações 6 e 7 na mesma placa na presença dos reveladores FeCl_3 e NP/PEG, evidenciando a semelhança química. As mesmas manchas que revelaram nesses dois reveladores, apresentaram absorções frente às luzes UV-254 nm (cor roxa) e UV-365 nm.

O fracionamento de MGa1.3.4-7 foi realizada em coluna aberta (6 cm x 1,2 cm) em sílica (3,4 g). Foram recolhidas 10 frações. Os sistemas de solventes e suas respectivas frações estão dispostas na Tabela 12, abaixo.

Tabela 12. Sistemas da coluna de sílica MGa1.3.4-7.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
CHCl_3 /acetona 9:1	40	1 (10 mL), 2 (20 mL)
CHCl_3 /acetona 8:2	20	3 (20 mL)
CHCl_3 /acetona 7:3	20	4 (20 mL)
CHCl_3 /acetona 6:4	20	5 (30 mL),
CHCl_3 /acetona 1:1	40	6 – 7 (20 mL)
CHCl_3 /MeOH 9:1	20	8 (20 mL), 9 (10 mL)
CHCl_3 /MeOH 1:1	20	10 (10 mL)

A fração 2 (MGa1.3.4-7.2, 2,8 mg) mostrou um grau de pureza aceitável para ser enviada para análises por RMN, sendo considerada a substância **14**. A Imagem 17 mostra a fração MGa1.3.4-7.2 visualizada nas luzes UV-254 nm (17A) em cor roxa e UV-365 nm (17B) em cor azul escuro, sendo possível observar características de flavonoides, revelando em FeCl_3 (17C) na cor cinza escuro, em NP/PEG (17D) na cor amarela no visível e verde fluorescente em NP/PEG frente UV-365 nm (E).

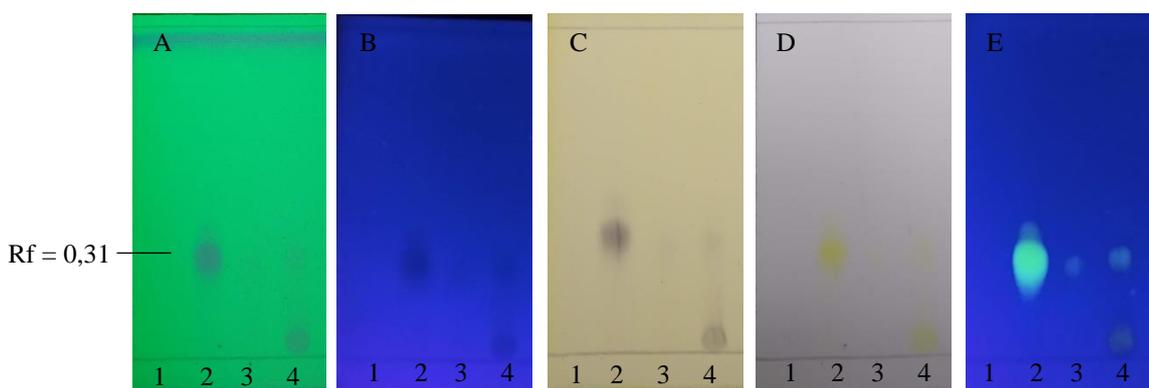


Imagem 17. Frações de MGa1.3.4-7 eluídas em CHCl_3 /acetona 85:15. Reveladores UV-254 nm (A), UV-365 nm (B), FeCl_3 (C), NP/PEG (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).

A Imagem 5 anteriormente exibida, mostrou uma substância ou grupo delas que revelam de cor amarela nas frações de 9-12 de MGa1.3 quando reveladas com NP/PEG.

Estas mesmas características estão presentes até a fração 16 (Imagem 18) e por isso foram reunidas as frações de 8-16, sendo nomeadas de MGA1.3.8-16. A fração 8 foi reunida por apresentar uma substância ou grupo delas que revelavam de cor rosa em NP/PEG em comum com as frações 9 e 10, mas não apresentava. Essas mesmas substâncias mostraram coloração cinza azulada quando reveladas com FeCl_3 , reforçando o indício de flavonoide.

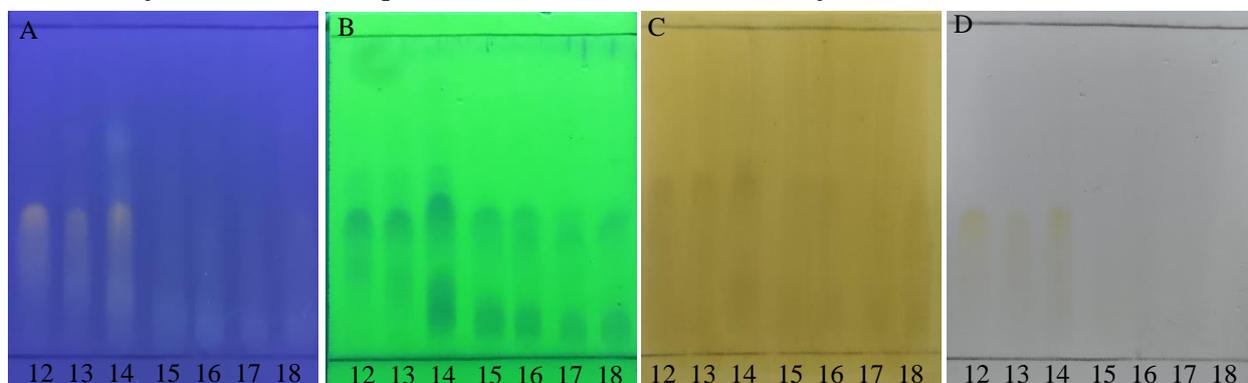


Imagem 18. Frações de MGA1.3 de 12-18 eluídas em CHCl_3 /acetona 6:4. Reveladores NP/PEG + UV-365 nm (A), UV-254 nm (B), FeCl_3 (C), NP/PEG (D).

Para dar seguimento ao estudo, as frações de 8-16 de MGA1.3 tiveram similaridades químicas e foram reunidas (MGA1.3.8-16, 116 mg) para fracionamento por demonstrar indícios de flavonoides frente as luzes UV-254 nm e UV-365 nm e os reveladores FeCl_3 e NP/PEG.

A fração MGA1.3.8-16 mostrou uma riqueza de substâncias da classe dos fenólicos, porém com polaridades muito similares. Todos os esforços de separá-las em CCDC não se mostraram eficientes devido à complexidade de substâncias. Várias misturas de solventes usando AcOEt ou MeOH foram empregadas, no entanto CHCl_3 /acetona foi a mistura que demonstrou melhor separação na proporção 8:2 eluída 4 vezes, para visualização.

Na Imagem 19 é possível ver pelo menos 4 substâncias de interesse em MGA1.3.8-16 que revelaram em FeCl_3 (19A), sendo possível observar na eluição, substâncias no $R_f = 0,57$ e $R_f = 0,69$ que revelaram nas cores verde e cinza respectivamente, uma mistura de substâncias no $R_f = 0,78$ que revelou nas cores marrom e verde, além se uma substância em menor concentração revelada em cor verde em $R_f = 0,90$.

Frente ao revelador NP/PEG (Imagem 19B) observado em luz UV-visível, foi possível ver a substância em $R_f = 0,57$ em cor amarela, seguida de uma substância de menor concentração revelada em rosa claro em $R_f = 0,61$, uma substância revelada em rosa escuro em $R_f = 0,69$, uma substância menos concentrada de cor amarela $R_f = 0,78$ e na parte superior a última substância revelada de cor amarela em $R_f = 0,90$.

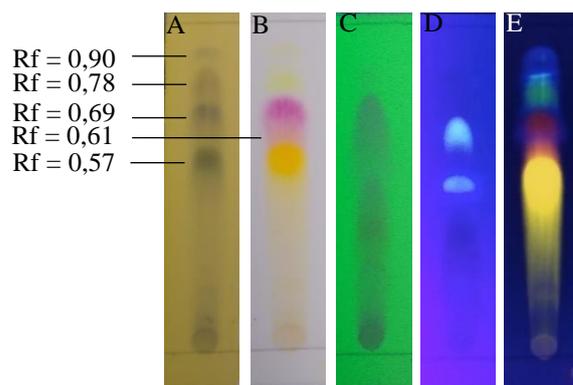


Imagem 19. Fração MGA1.3.8-16 eluídas em CHCl_3 /acetona 8:2, 4 vezes. Reveladores FeCl_3 (A), NP/PEG (B), UV-254 nm (C), UV-365 nm (D) e NP/PEG + UV-365 nm (E).

Após análise em CCDC de MGA1.3.8-16 (116 mg), optou-se por realizar uma coluna aberta de Sephadex LH-20 (32 cm x 1,5 cm), da qual foram recolhidas 9 frações. Os sistemas de solventes e suas respectivas frações são dispostas na Tabela 13, abaixo.

Tabela 13. Sistemas da coluna de Sephadex LH-20 da fração MGA1.3.8-16.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
MeOH 100 %	160 mL	1 – 3 (20 mL)
		4 – 5 (10 mL)
		6 – 9 (20 mL)

O fracionamento foi realizado em Sephadex LH-20, com o intuito de obter separação por tamanho molecular, visto a dificuldade de separar por polaridade (pois nem sempre a maior molécula é a mais polar).

Foram recolhidas 10 frações dessa separação, sendo a fração 3 (59,8 mg) de maior valor de massa, porém sem as características fenólicas vistas na fração mãe, e apesar de apresentar absorções nas luzes UV e uma leve revelação em FeCl_3 , as frações de 1-5 não se mostraram interessantes nessa etapa (Imagem 20).

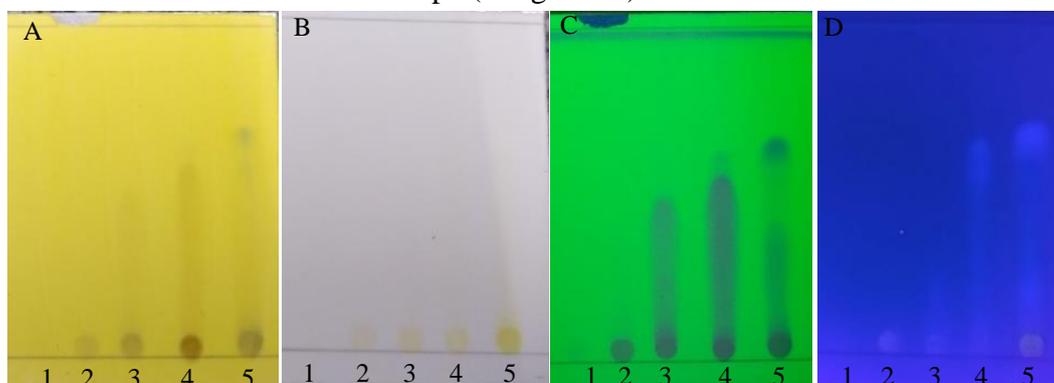


Imagem 20. Frações de MGA1.3.8-16, 1 até 5 eluídas em CHCl_3 /acetona 8:2, 2 vezes. Reveladores FeCl_3 (A), NP/PEG (B), UV-254 nm (C), UV-365 nm (D).

Todas as substâncias de interesse concentraram-se nas frações de 6-9 (Imagem 10). A fração 6 (MGa1.3.8-16.6, 2,4 mg) destacou-se pela quantidade de grupos cromóforos presentes quando visualizada em luz UV-365 nm, aparentes também na UV-254 nm. No entanto, seus constituintes foram pouco reativos com FeCl₃ e NP/PEG, apresentando coloração característica para esses reveladores apenas na origem.

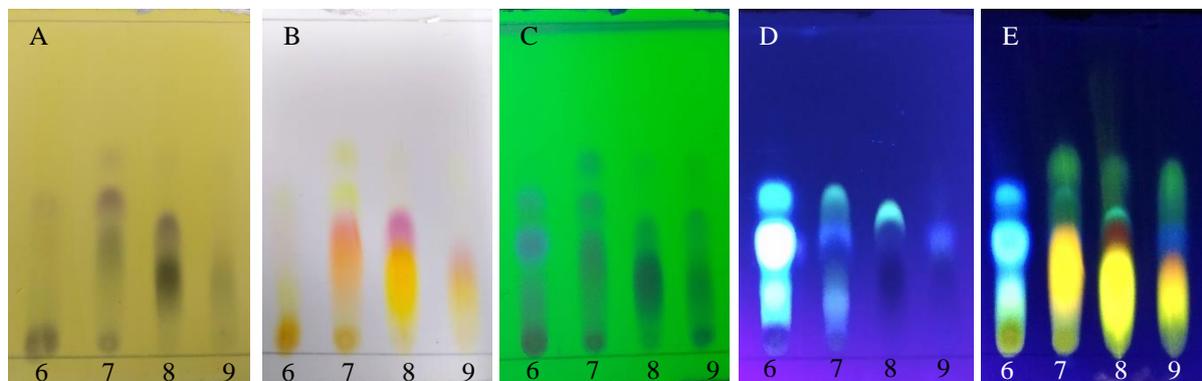


Imagem 21. Frações de MGa1.3.8-16, 6 até 9 eluídas em CHCl₃/acetona 8:2, 2 vezes. Reveladores FeCl₃ (A), NP/PEG (B), UV-254 nm (C), UV-365 nm (D), NP/PEG + UV-365 nm (E).

A fração 7 (MGa1.3.8-16.7, 4,1 mg) possuía pelo menos 4 substâncias observáveis sendo reveladas com FeCl₃, com duas substâncias de cores verde e uma cinza. No revelador NP/PEG, um conjunto do que parecia ser duas substâncias revelaram nas cores laranja e rosa, estando a substância sobrepondo a rosa. Duas manchas amarelas também revelaram nos mesmos Rf's do revelador FeCl₃ na parte superior (Figura 21A), mas não absorveram em UV-365 nm. Todas as substâncias absorveram na UV-254 nm e foram fluorescentes na UV-365 nm (Figura 21C e 21D).

A fração 8 (MGa1.3.8-16.8, 5,6 mg) apresentou apenas duas manchas mais intensas na placa, sendo uma verde na parte inferior da placa e uma cinza escura, logo acima da verde quando reveladas com FeCl₃. As mesmas duas manchas apresentaram cores amarelas e rosa respectivamente quando reveladas em NP/PEG, sendo tratadas como duas substâncias (Figura 21B).

A substância no Rf inferior se apresentou na cor roxa em UV-365 nm sobrepondo a de Rf superior presente como fluorescente de cor azul. Ambas absorveram em UV-254 nm e uma substância menos concentrada pôde ser visualizada nesse comprimento de onda, acima das duas outras, evidenciando em fluorescência de cor verde quando visualizada em UV-365 nm + NP/PEG (Figura 21E).

A fração 9 (MGa1.3.8-16.9, 7,7 mg) revelou no mesmo Rf da substância da fração 8, inferindo ser a mesma frente ao FeCl₃ (Figura 21A). Logo acima, apresentou uma substância de cor rosa menos intenso e com Rf abaixo da substância rosa na fração 8,

sendo considerada outra substância. Além disso, quando visualizada sob UV-365 nm, a placa com NP/PEG mostrou fluorescência de cor azul acima na substância rosa e outra fluorescência verde acima da azul.

As frações 6 (2,4 mg), 7 (4,1 mg), 8 (12,6 mg) e 9 (7,7 mg) foram individualmente enviadas para purificação por CLAE. Todas foram solubilizadas em MeOH 100% para injeção no equipamento, o qual foi realizado em modo isocrático para todas em MeOH 65% (pH 5, ácido acético) com volume de injeção de 50 μ L e coluna semi-preparativa C₁₈.

Da purificação da fração MGa1.3.8-16.6 (Figura 17) foi possível isolar uma substância com tempo de retenção de 7,13 minutos, nomeada como MGa1.3.8-16.6.2 (substância **16**) com massa de 0,5 mg, a qual foi enviada para análises por RMN.

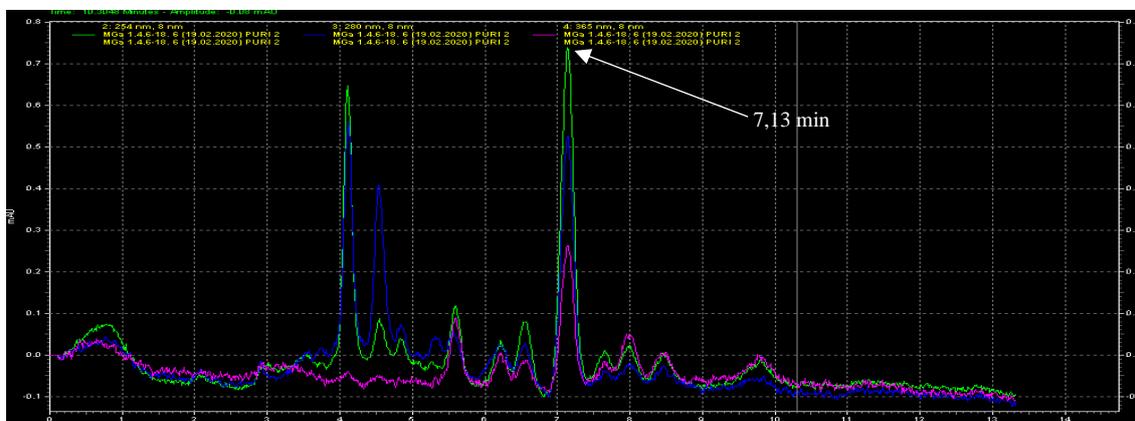


Figura 17. Cromatograma da purificação de MGa1.3.8-16.6.

A purificação de MGa1.3.8-16.7 resultou no isolamento de uma substância com tempo de retenção de 4,48 minutos (Figura 18), nomeada de MGa1.3.8-16.7.2 com massa de 1,2 mg, a qual foi enviada para análises por RMN. Os dados obtidos foram insuficientes para a identificação estrutural desta substância.

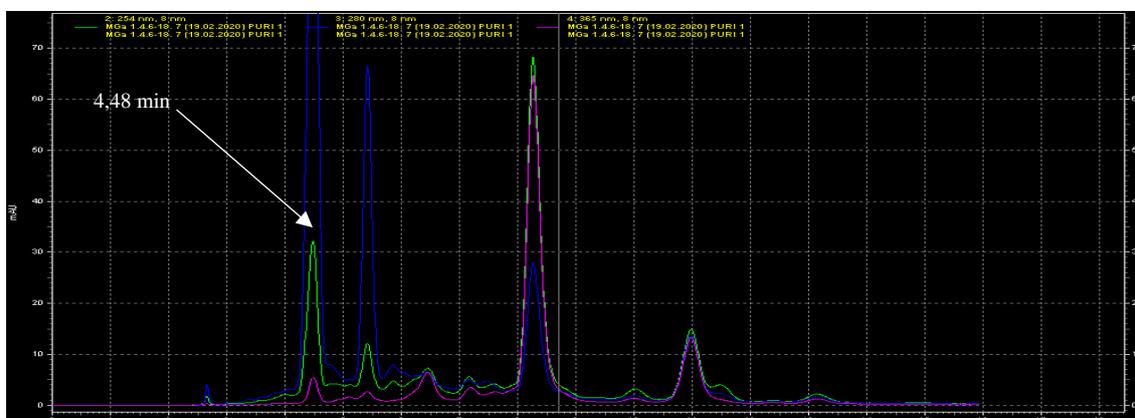


Figura 18. Cromatograma da purificação de MGa1.3.8-16.7.

A purificação de MGA1.3.8-16.8 (Figura 19) resultou no isolamento de uma substância com tempo de retenção de 5,47 minutos nomeada de MGA1.3.8-16.8.2 (substância **17**) com massa de 1,2 mg e outra com tempo de retenção de 7,98 minutos MGA1.3.8-16.8.4 (substância **18**) com massa de 1,3 mg, as qual foram enviadas para análises por RMN.

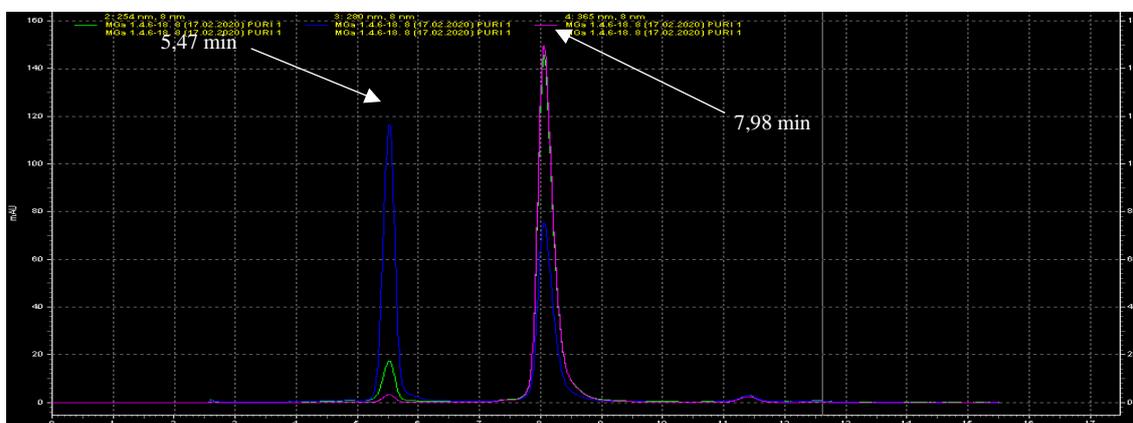


Figura 19. Cromatograma da purificação de MGA1.3.8-16.8.

A purificação de MGA1.3.8-16.9 (Figura 20) resultou no isolamento de quatro substâncias com tempos de retenção de 4,59, 6,42, 9,44 e 11,94 minutos. Elas foram nomeadas respectivamente de MGA1.3.8-16.9.2 (0,3 mg), MGA1.3.8-16.9.4 (0,4 mg), MGA1.3.8-16.9.6 (0,3 mg) e MGA1.3.8-16.9.8 (0,3 mg) as quais infelizmente não foram analisadas por RMN devido massas insuficientes para análise no equipamento disponível.

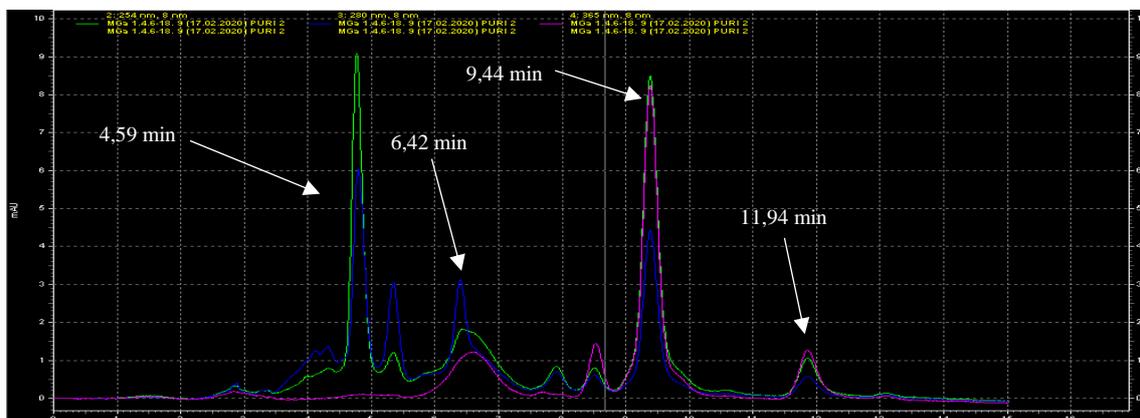


Figura 20. Cromatograma da purificação de MGA1.3.8-16.9.

Foram isoladas e identificadas 8 substâncias dos fracionamentos do extrato metanólico dos galhos: MGA1.2.3 (**11**, 1,3 mg), MGA1.2.6 (**12**, 1,5 mg), MGA1.3.2-3.1.1 (**13**, 5,0 mg), MGA1.3.2-3.1.2 (**15**, 1,8 mg), MGA1.3.4-7.2 (**14**, 2,8 mg), MGA1.3.8-16.6.2 (**16**, 0,5 mg), MGA1.3.8-16.8.2 (**17**, 1,2 mg) e MGA1.3.8-16.8.4 (**18**, 1,3 mg). O fluxograma do isolamento é mostrado na Figura 21.

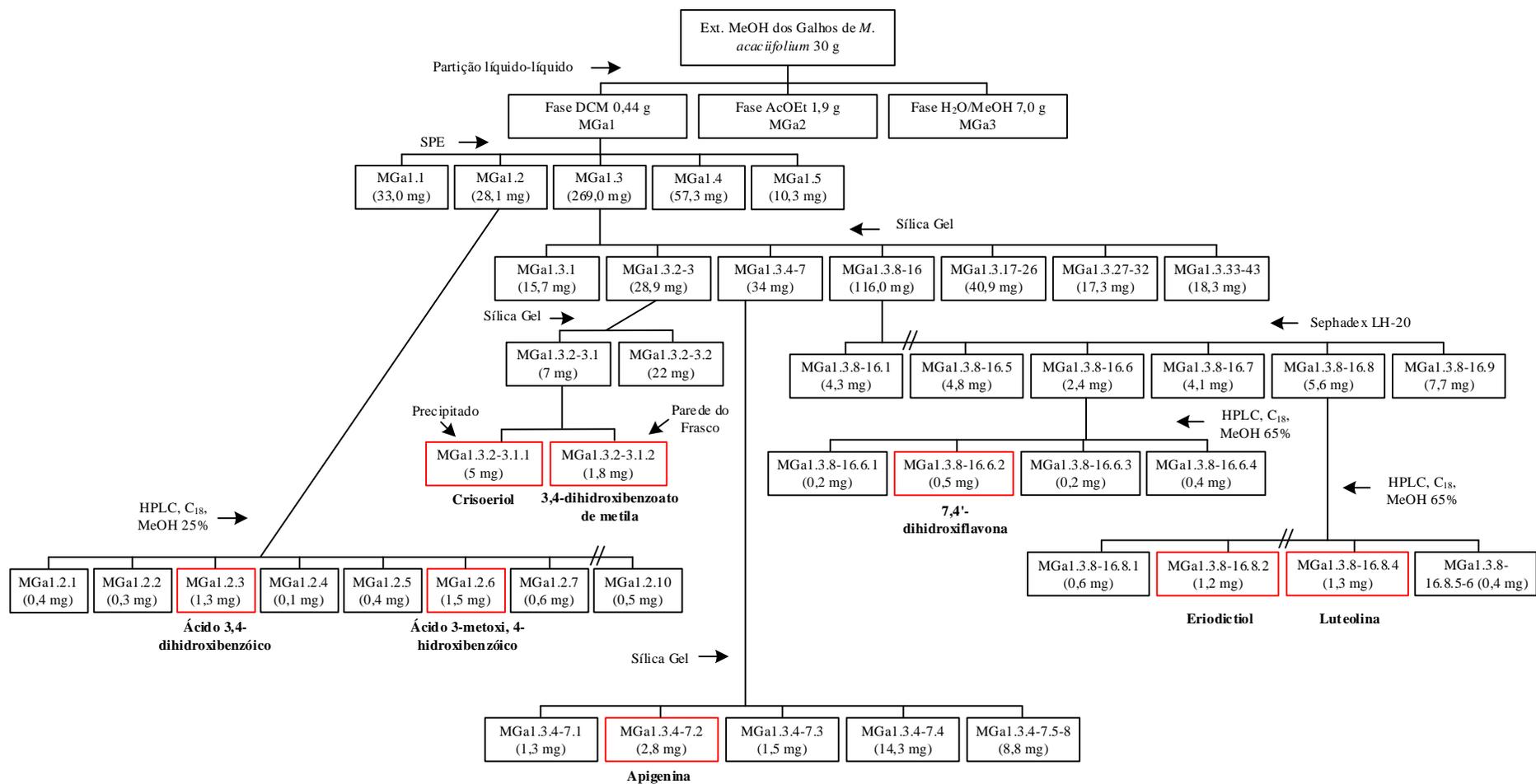


Figura 21. Fluxograma das substâncias isoladas do extrato metanólico dos galhos de *M. acaciifolium*.

5.4 Fracionamento do extrato hexânico das folhas de *M. acaciifolium* e isolamentos das substâncias

Após análises por CCDC, o extrato hexânico das folhas (MFH, 2,5 g) de *M. acaciifolium* foi fracionado em coluna aberta com sílica (50 g) como adsorvente e fases móveis compostas por mistura de hexano e AcOEt. A dimensão da coluna foi 18 cm x 3 cm, $V_m = 150$ mL e o resultado gerou 13 frações. A Tabela 14 mostra valores de volumes, proporções e frações resultantes do fracionamento.

Tabela 14. Sistemas da coluna de sílica de MFH.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
Hex/AcOEt 95:05	300	0 (150 mL), 1 (125 mL)
Hex/AcOEt 9:1	300	2 (90 mL), 3 (100 mL), 4 (125 mL)
Hex/AcOEt 8:2	300	5 (75 mL), 6 (40 mL), 7 (110 mL), 8 (75 mL)
Hex/AcOEt 7:3	150	9 (125 mL)
Hex/AcOEt 1:1	150	10 (200 mL)
AcOEt 100 %	200	11 (115), 12 (50 mL)
MeOH 100 %	200	13 (225 mL)

As frações 3-4 (472 mg) do extrato hexânico das folhas foram reunidas e submetidas a fracionamento em coluna aberta de sílica (14 g) com as misturas hexano/ CHCl_3 . As dimensões de empacotamento da coluna foram de 28 cm x 1,2 cm, $V_m = 35$ mL, sendo geradas 8 frações. A Tabela 15 mostra valores de volumes, proporções e frações resultantes do fracionamento.

Tabela 15. Sistemas da coluna de sílica de MFH3-4.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
Hex/ CHCl_3 7:3	130	1 (125 mL)
Hex/ CHCl_3 6:4	150	2 (125 mL), 3 (125 mL)
Hex/ CHCl_3 1:1	350	4 (170 mL) 5 (245 mL),
CHCl_3 100 %	300	6 (75 mL), 7 (30 mL), 8 (35 mL)

A fração MFH3-4.1 (75,0 mg) apresentou forma cristalina de cor branca e análises por CCDC mostrou quando eluída em hex/AcOEt 85:15, substâncias que revelaram de cor roxa em anisaldeído sulfúrico nos $R_f = 0,41$ e $R_f = 0,44$ (Imagem 22A). Quando eluída em hex/AcOEt 8:2 e revelada com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, as substâncias apresentaram coloração em tom rosado nos $R_f = 0,53$ e $R_f = 0,60$, conforme Imagem 22B.

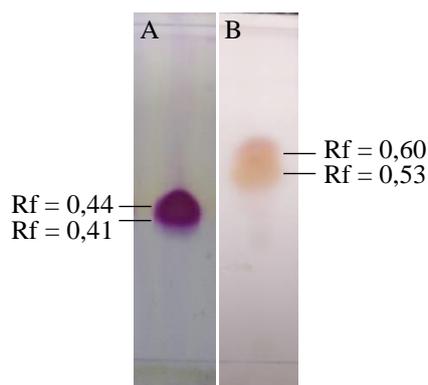


Imagem 22. Fração MFH3-4.1 eluída em hex/AcOEt 85:15 (A) e hex/AcOEt 8:2 (B). Reveladores anisaldeído sulfúrico (A) e $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$.

A fração MFH3-4.1 foi então solubilizada em ACN para purificação por CLAE. A análise garantiu o isolamento das substâncias **19** (36,56 min, 5,0 mg), **20** (38,42 min, 3,0 mg) e **21** (47,28 min, 2,0 mg).

A purificação da fração MFH3-4.1 foi realizada em ACN 67% em solução aquosa, em modo isocrático com volume de injeção empregado de 50 μL em coluna de sílica C_{18} . A concentração de injeção foi de 2,5 mg/mL e o monitoramento da fração seguiu observada nos comprimentos de onda de 210 e 254 nm. O cromatograma é exibido na Figura 22.

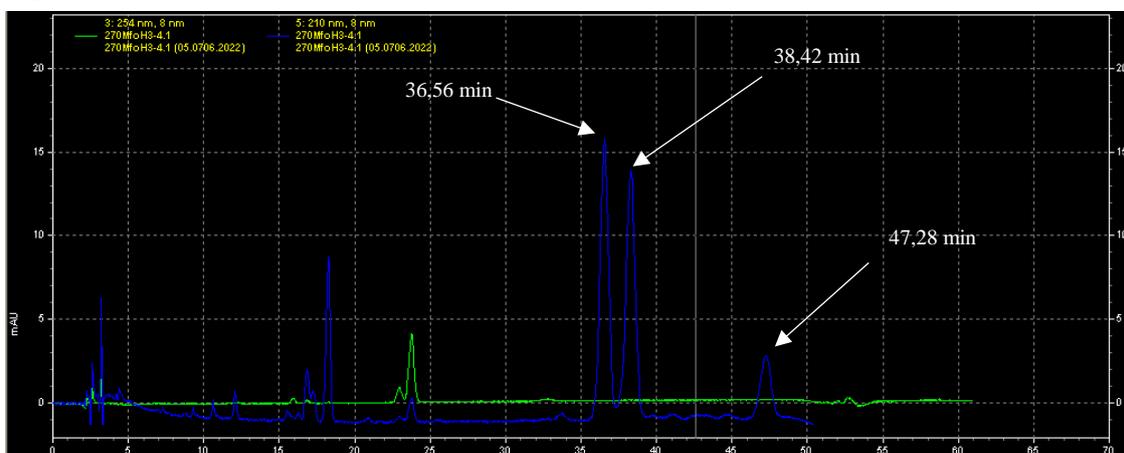


Figura 22. Cromatograma da purificação da fração MFH3-4.1

As frações reunidas 5-7 (MFH5-7, 305,6 mg) mostraram ser a mistura dos esteroides β -sitosterol (**24**) e estigmasterol (**25**). As substâncias aparecem em $R_f = 0,47$ quando eluídas em hex/AcOEt 8:2 e são mostradas ao lado da fração MGH5 na Imagem 23, por se tratar das mesmas substâncias. As etapas de fracionamento deste extrato são exibidas na Figura 23.

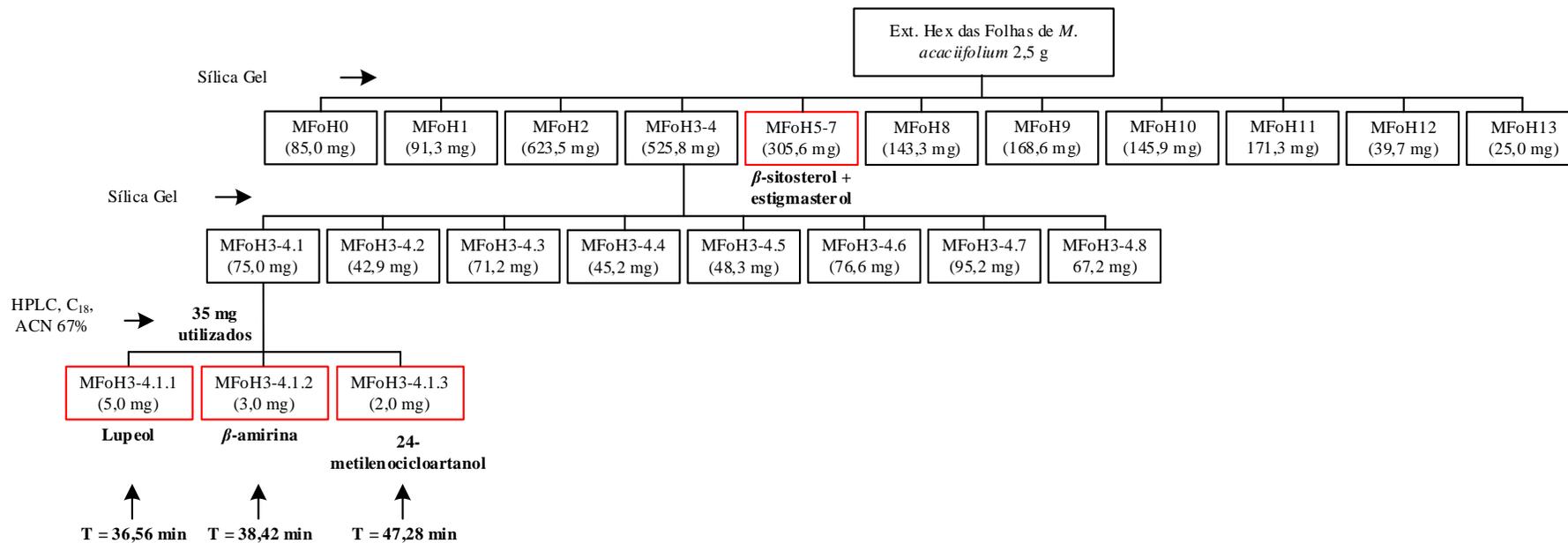


Figura 23. Fracionamento do extrato hexânico das folhas de *Macrobium acaciifolium*.

5.5 Fracionamento do extrato hexânico dos galhos de *M. acaciifolium* e isolamentos das substâncias

O extrato hexânico dos galhos (1,6 g) foi fracionado em coluna aberta de sílica (45 g) como adsorvente e como fase móvel as misturas de hexano/AcOEt. As dimensões da coluna foram de 13,5 cm x 3 cm, $V_m = 100$ mL e o fracionamento do extrato resultou em 13 frações coletadas. A Tabela 16 mostra valores de volumes, proporções e frações resultantes do fracionamento.

Tabela 16. Sistemas da coluna de sílica MGH.

FASE MÓVEL (FM)	VOLUME DA FM (mL)	FRAÇÕES
Hex/AcOEt 95:05	300	0 (140 mL), 1 (100 mL), 2 (150 mL),
Hex/AcOEt 9:1	300	3 (120 mL), 4 (140 mL)
Hex/AcOEt 8:2	300	5 (115 mL), 6 (125 mL), 7 (60 mL)
Hex/AcOEt 7:3	150	8 (75 mL), 9 (125 mL)
Hex/AcOEt 1:1	150	10 (125 mL)
AcOEt 100 %	200	11 (130), 12 (125 mL)
MeOH 100 %	200	13 (70 mL)

A fração 3 (MGH3) do extrato hexânico dos galhos se apresentou em forma de sólido amorfo branco com pigmentos de clorofila. Esses pigmentos sobrenadantes foram removidos por solubilização em éter de petróleo e o sólido (12,0 mg) restante foi enviado para análises de RMN de ^1H .

As análises permitiram constatar que a fração estava em mistura com duas substâncias (**22** e **23**) de classes químicas distintas, sendo uma terpenoides e a outra, de natureza aromática.

A fração 5 (MGH5, 230,5 mg) do extrato hexânico dos galhos também mostrou ser a mistura dos esteroides β -sitosterol (**24**) e estigmasterol (**25**). Foram eluidos em hex/AcOEt 8:2 e comparados com o padrão das substâncias, apresentando coloração roxa quando revelados em anisaldeído sulfúrico (Imagem 23C) e marrom avermelhado em $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ no $R_f = 0,47$ (Imagem 23D).

Por se tratar das mesmas substâncias, a fração MFH5-7 proveniente do extrato hexânico das folhas é exibida na Imagem 23A revelada em anisaldeído sulfúrico e Imagem 23B, revelada em $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ juntamente com MGH5 e o padrão das substâncias β -sitosterol e estigmasterol.

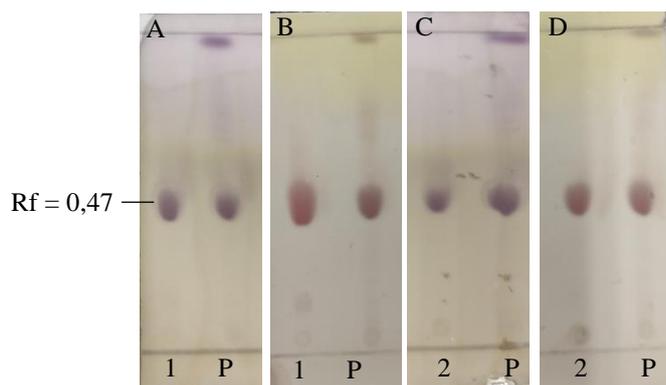


Imagem 23. Fração MFH5-7 (1) e MGH5 (2) eluídas em hex/AcOEt 8:2 (B). Reveladores anisaldeído sulfúrico (A e C) e $Ce(SO_4)_2$ (B e D).

As etapas de fracionamento do extrato hexânico dos galhos são exibidas no fluxograma da Figura 24. Na seção **Anexo** deste trabalho é possível ver a Tabela 1A referente a lista de todos os códigos das frações, nome das substâncias, massas das mesmas e rendimento. Ainda na seção **Anexo**, consta as imagens das CCDC de todas as substâncias isoladas e seus Rfs.

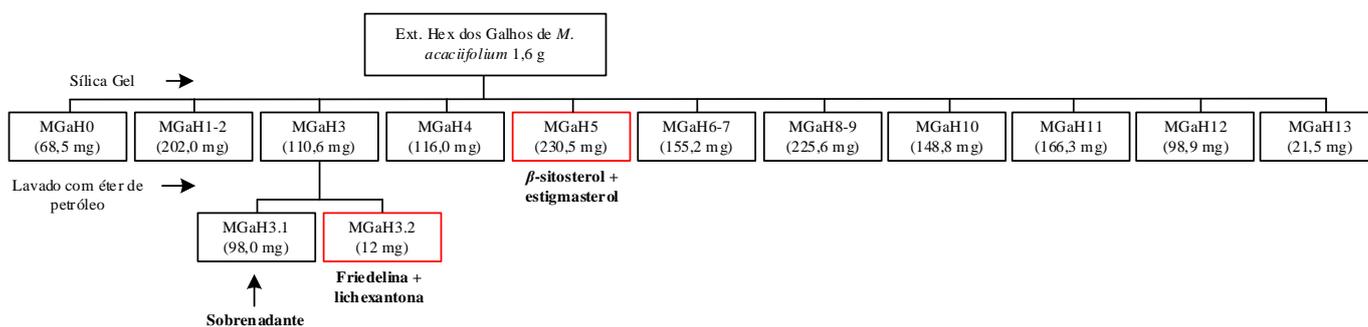


Figura 24. Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico dos galhos.

5.6 Rendimento dos extratos metanólicos e hexânicos

A Tabela 17 contém o valor das massas resultantes das extrações dos materiais vegetais e seus rendimentos, além das massas e rendimentos das três fases (Fase 1, DCM; Fase 2, AcOEt; Fase 3, H₂O/MeOH) geradas pelo processo de partição em relação a massa dos extratos. Ao fim das partições dos extratos metanólicos, resíduos insolúveis restaram no funil de separação. Estes resíduos se apresentavam na forma de gel e não solubilizaram com nenhum dos solventes orgânicos ou com água, após secarem.

Provavelmente estes resíduos poderiam ser da classe dos taninos, pois no decorrer do fracionamento posterior dos materiais, muitas frações tornaram-se insolúveis, sendo anteriormente frações ricas em substâncias com características flavonoídicas.

Tabela 17. Rendimento dos extratos metanólicos, fases e extratos hexânicos

Parte vegetal	Massa do material vegetal (g)	Massa do extrato (g)	Rend. (%)	Resíduos (g)	Fase	Massa da fase (g)	Rend. (%)
Galhos MeOH	1.127	75,0	6,65	17,7*	1	0,440*	1,46*
					2	1,9*	6,3*
					3	7,0*	23,3*
Folhas MeOH	468	47,0	10,25	32,0	1	1,17	2,48
					2	3,02	6,42
					3	11,0	23,4
Galhos Hex	1.127	1,6	0,14	-	-	-	-
Folhas Hex	468	2,5	0,53	-	-	-	-

Legenda: Os dados assinalados com * referem-se à massa de 30 g de extrato dos galhos usado para fracionamento.

A extração com diclorometano (Fase 1) permite que substâncias de baixas polaridades possam ser removidas do extrato original para o solvente. Substâncias das classes das clorofilas, terpenoides e esteroides não glicosiladas, certos alcaloides de baixa massa molecular aromáticos, além de alguns flavonoides isoprenilados são facilmente extraídas nesse processo.

A extração com AcOEt (Fase 2) permite a remoção de substâncias de média polaridade como alcaloides com massas moleculares maiores e glicosilados, juntamente com alguns flavonoides com hidroxilas livres e glicosilados.

A fase 3 (H₂O/MeOH - hidrometanólica) restante, é geralmente composta por substâncias de alta e altíssima polaridade, repleta de polímeros de açúcares e muitas outras classes químicas com um ou mais de um grupo de açúcar ligado às suas estruturas químicas.

5.7 Identificação das substâncias isoladas

5.7.1 Luteolina, crisoeriol e luteolina-3'-*O*-ramnosídeo

As substâncias **1**, **13** e **18** (Figura 25) mostraram em seus espectros de RMN de ^1H similaridades de sinais na região dos hidrogênios aromáticos e assim sugerindo esqueleto principal do tipo flavona com anel B *o*, *p*-substituídos (sistemas ABX).

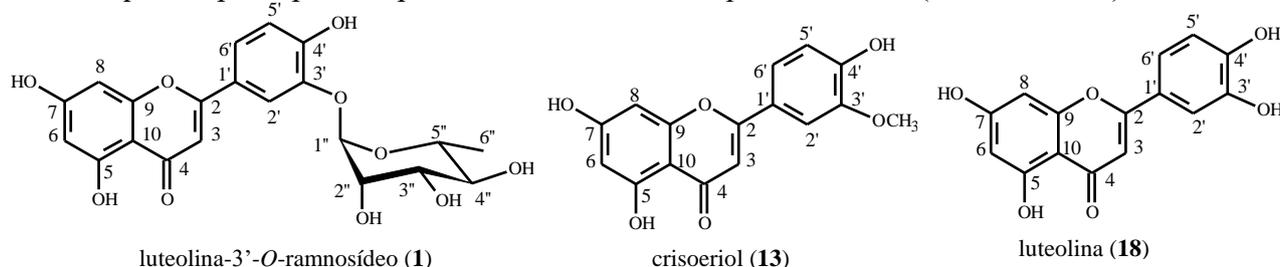


Figura 25. Estrutura química dos flavonoides **18**, **13** e **1** e enumerações de seus carbonos.

A substância **18** exibiu em seu RMN de ^1H (Figura 26) sinais em 7,50 ppm (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) relativo ao H-2', 7,48 ppm (1H, *dd*, $J = 8,2; 2,1$ Hz) para H-6', 7,00 ppm (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz) para H-5', simpleto em 6,59 ppm para H-3, 6,25 ppm (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) para H-6 e 6,52 ppm (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) para H-8, além de simpleto em 13,03 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila na posição C-5, o qual faz ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila em C-4, permitindo a identificação da substância como luteolina.

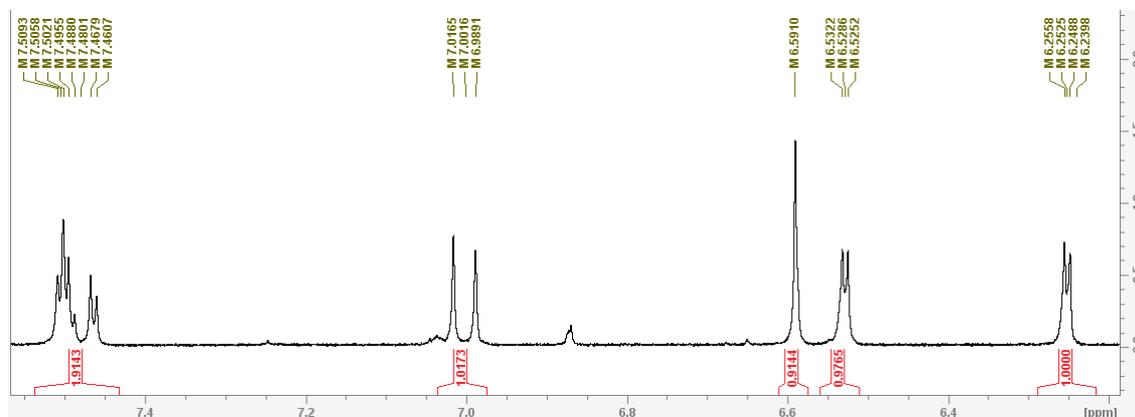


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H expandido na região dos hidrogênios aromáticos da substância **18** em acetona-*d*₆.

A substância **13** exibiu em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 27) sinal em 7,64 ppm (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) relativo ao H-2', 7,62 ppm (1H, *dd*, $J = 8,2; 2,1$ Hz,) para H-6', 7,02 ppm (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz) para H-5', simpleto em 6,72 para H-3, dupletos em 6,26 ppm (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) para H-6 e 6,56 ppm (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) para H-8, além da hidroxila em 13,03 ppm e metoxila em 4,00 ppm (3H, *s*), o qual mostrou correlação por HMBC com o C-3' em 148,1 ppm, confirmando a ligação da metoxila em C-3' e possibilitando a identificação da substância como crisoeriol.

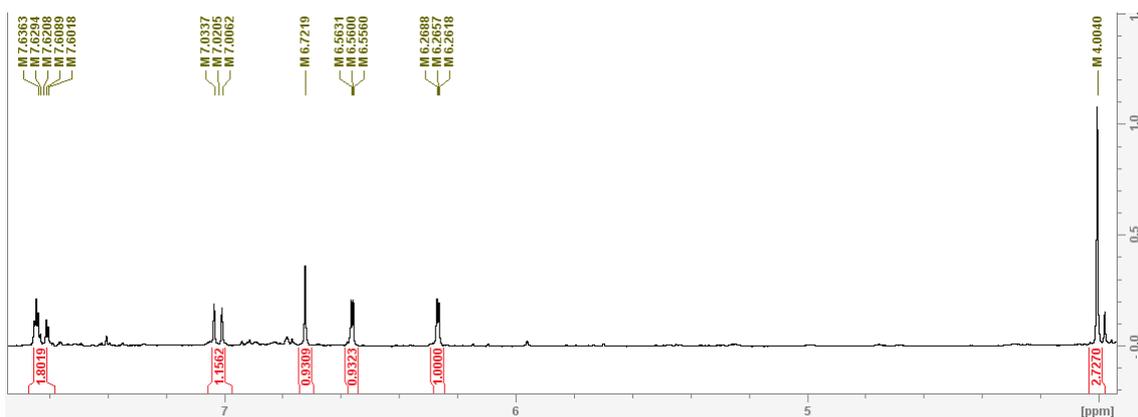


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H expandido da substância **13** em acetona- d_6 .

A substância **1** exibiu em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 28) sinal em 7,56 ppm (1H, *m*) relativo ao H-2', 7,51 ppm (1H, *dl*) para H-6', 6,84 ppm (1H, *dl*) para H-5', simpletos em 6,50 ppm para H-3, 5,88 ppm para H-6 e 6,11 ppm para H-8, além de hidroxila na posição C-5 em 12,94 ppm e 5,38 ppm para o H-1'' da ramnose, a qual mostrou correlação por HMBC com o C-3' em 145,3 ppm sendo de fundamental importância para confirmar a ligação da ramnose na posição C-3' do anel B do flavonoide. Um duplete em 1,13 ppm (3H, *d*, $J = 6,2$ Hz, H-6'') corroborou para a confirmação do açúcar ramnose, sendo possível identificar a substância como luteolina-3'-*O*- α -L-ramnosídeo.

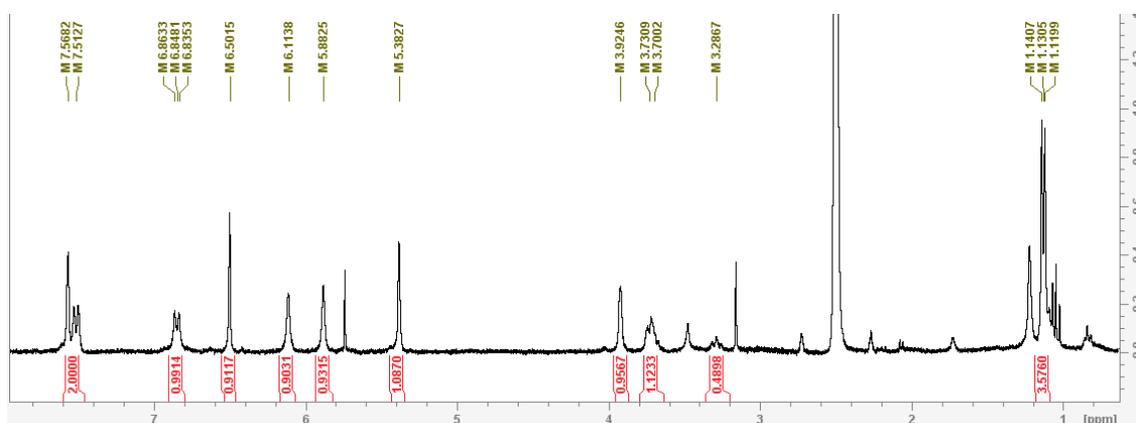


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H da substância **1** em DMSO- d_6 .

É possível observar nos espectros de RMN de ^1H dos três flavonoides que os sinais de H-2', H-5' e H-6' (Figura 29) demonstram padrão de deslocamento característico de anel aromático com sistema ABX. Este sistema produziu dupletos ($^3J \sim 2,0$ Hz) para o H-2' da luteolina e crisoeriol, resultante do *meta*-acoplamento com seus H-6'. Seus sinais de H-6' foram gerados como duplo dupletos ($^3,4J \sim 8,0; 2,0$ Hz) resultante dos *ortho*-acoplamentos com os H-5' e *meta*-acoplamentos com os H-2'. Adicionalmente, os

dupletos ($^3J \sim 8,0$ Hz) referentes ao H-5' mantiveram o padrão do sistema com o-acoplamento com seus H-6'.

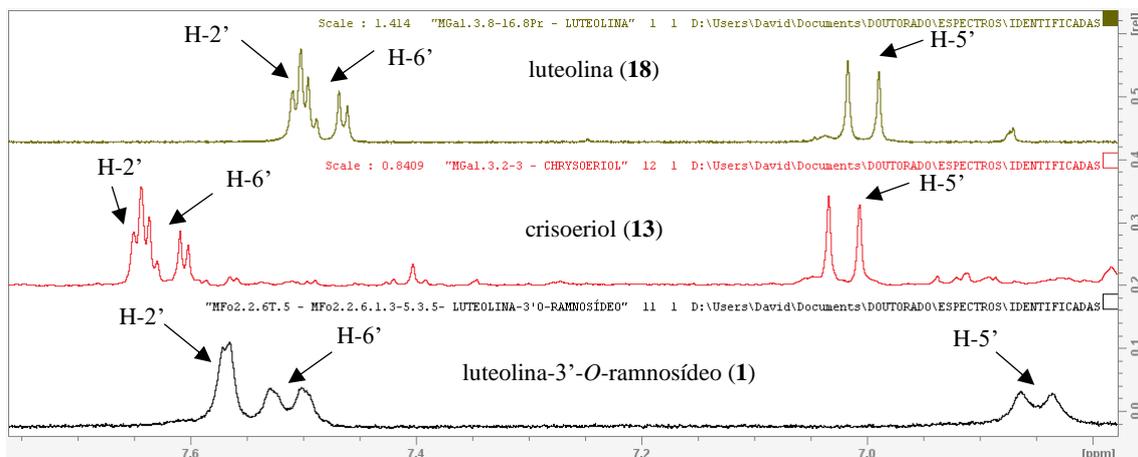


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H expandido na região dos H-2', H-5' e H-6' das substâncias **18**, **13** e **1**.

Um aspecto importante relacionado à luteolina e crisoeriol é deslocamento dos sinais dos H-2' e H-6' para a região desblindada no espectro do crisoeriol, influenciado pelo grupo metoxila em C-3' em substituição ao grupo hidroxila na luteolina. O H-5' na molécula do crisoeriol é menos afetado em comparação aos demais. Em trabalhos comparativos, nota-se esse efeito de deslocamentos para outros flavonoides metoxilados no anel B frente aos análogos hidroxilados (PARK *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2008, LEE *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2008b; YOON *et al.*, 2011).

Para luteolina-3'-O-ramnosídeo os sinais dos H-2', H-5' e H-6 (Figura 28) mostraram a resolução de suas multiplicidades imprecisa. O duplete de H-2' e o duplo duplete de H-6' foram assinalados como multipletos e H-5' apresentou a multiplicidade de duplete largo (*dl*). A baixa resolução das multiplicidades de luteolina-3'-O-ramnosídeo pode ter ocorrido principalmente (ou apenas) pela baixa massa de substância isolada (2,0 mg), sendo descartado qualquer desajuste dos parâmetros de aquisição para obtenção do espectro, constatado pelas multiplicidades adequadas do sinal do DMSO- d_6 .

O deslocamento químico do H-3 do crisoeriol (Figura 30) também mostrou leve mudança para a região desblindada do espectro, enquanto H-3, H-6 e H-8 da luteolina-3'-O-ramnosídeo foram deslocados para região blindada do espectro. A luteolina-3'-O-ramnosídeo também não mostrou as multiplicidades de dupletos para seus H-6 e H-8, sendo atribuídos como singletos.

Os deslocamentos químicos dos C-5, C-7, C-9 e C-1' da luteolina-3'-O-ramnosídeo não puderam ser inferidos HMBC. No entanto, os demais dados foram suficientes para a identificação da substância em comparação com a literatura científica.

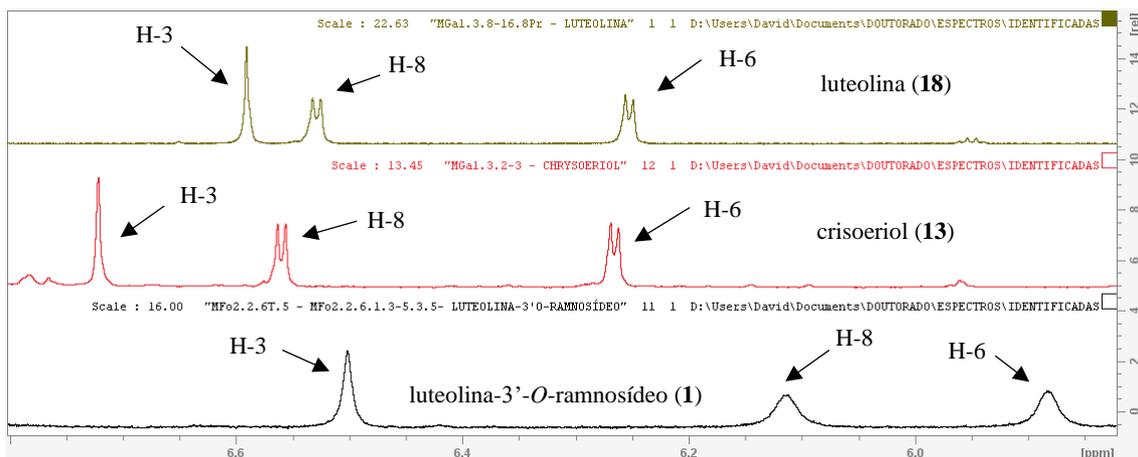


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H expandido na região dos H-3, H-6 e H-8 das substâncias **18**, **13** e **1**.

Todas as correlações por HMBC e COSY obtidas nas análises para as três substâncias estão expressas na Figura 31A para luteolina (**18**), Figura 31B para crisoiérol (**13**) e Figura 31C para luteolina-3'-*O*-ramnosídeo (**1**). Nas Tabelas 18 e 19 é possível comparar os valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C das substâncias isoladas com a literatura científica consultada.

Luteolina-3'-*O*-ramnosídeo não possui relatos de valores de ^1H e ^{13}C em seus isolamentos, estando até o momento indisponível sua pesquisa em inglês em plataformas e base de dados como Science Direct e Scifinder.

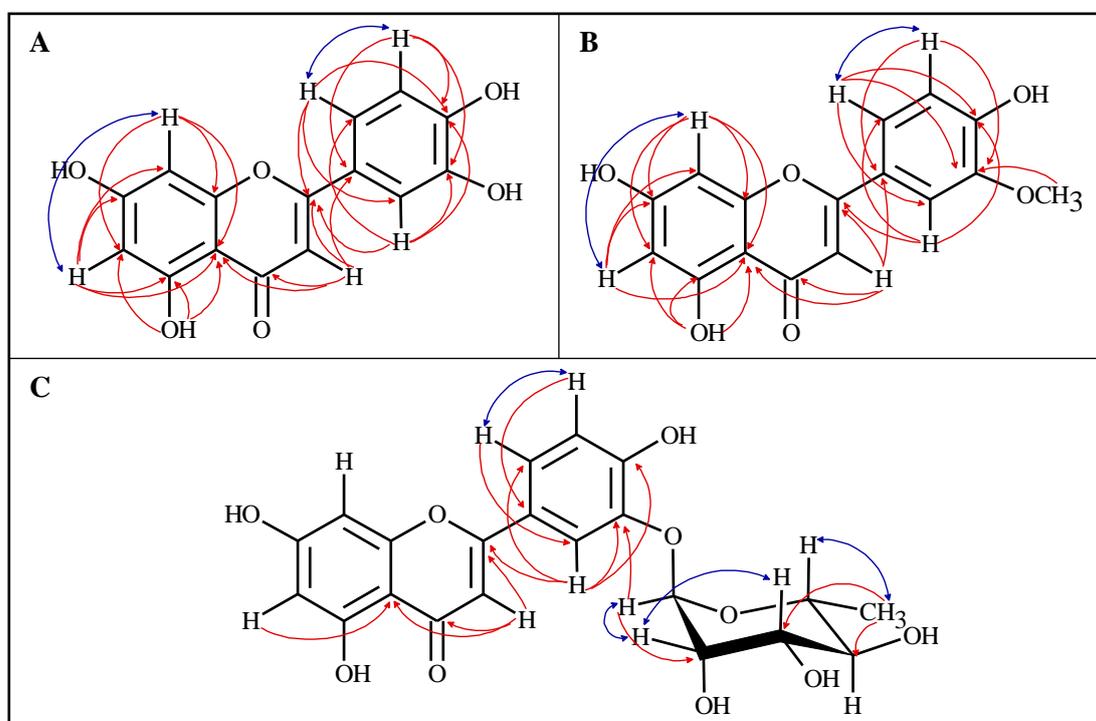


Figura 31. Correlação bidimensionais obtidas para identificação das substâncias **18** (A), **13** (B) e **1** (C). Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.

Tabela 18. Deslocamentos químicos de ^1H das substâncias **18**, **13** e **1**.

	Luteolina		Crisoeriol		Luteolina-3'- <i>O</i> -ramnosídeo	
	Substância 18	Ngoc <i>et al.</i> , 2021	Substância 13	Ban <i>et al.</i> , 2020	Substância 1	Hernández <i>et al.</i> , 2002
^1H	Acetona- d_6 300 MHz	Acetona- d_6 500 MHz	Acetona- d_6 300 MHz	Acetona- d_6 600 MHz	DMSO- d_6 300 MHz	DMSO- d_6 300 MHz
H-3	6,59 (1H, <i>s</i>)	6,65 (1H, <i>s</i>)	6,72 (1H, <i>s</i>)	6,69 (1H, <i>s</i>)	6,50 (1H, <i>s</i>)	6,77 (1H, <i>s</i>)
H-6	6,25 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,18 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,6 Hz)	6,26 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,25 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	5,88 (1H, <i>s</i>)	6,19 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)
H-8	6,52 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,44 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,56 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,54 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	6,11 (1H, <i>s</i>)	6,45 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)
H-2'	7,50 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	7,39 (1H, <i>s</i>)	7,64 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	7,62 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	7,56 (1H, <i>m</i>)	7,71 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)
H-5'	7,00 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz)	6,88 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz)	7,02 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz)	7,00 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0 Hz)	6,84 (1H, <i>dl</i>)	7,00 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)
H-6'	7,48 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2; 2,2 Hz)	7,42 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,8; 2,0 Hz)	7,62 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,2; 2,1 Hz)	7,59 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0; 2,0 Hz)	7,51 (1H, <i>m</i>)	7,65 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,5; 2,1 Hz)
H-1''	-	-	-	-	5,38 (1H, <i>s</i>)	5,43 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,3 Hz)
H-2''	-	-	-	-	3,92 (<i>m</i>)	3,95 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,3 Hz)
H-3''	-	-	-	-	3,73 (<i>m</i>)	3,76 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,4; 3,2 Hz)
H-4''	-	-	-	-	3,28 (<i>m</i>)	3,68 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,4; 9,3 Hz)
H-5''	-	-	-	-	3,70 (<i>m</i>)	N.R.
H-6''	-	-	-	-	1,13 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2 Hz)	1,15 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2 Hz)
3'-OCH ₃			4,00 (3H, <i>s</i>)	4,00 (3H, <i>s</i>)	-	-
5-OH	13,03 (<i>s</i>)	12,98 (<i>s</i>)	13,03 (<i>s</i>)	N.R.	12,94	12,96

Legenda: N.R. = Não relatado no trabalho.

Tabela 19. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias **18**, **13** e **1**.

	Luteolina		Crisoeriol		Luteolina-3'- <i>O</i> -ramnosídeo	
	Substância 18	Ngoc <i>et al.</i> , 2021	Substância 13	Ban <i>et al.</i> , 2020	Substância 1	Hernández <i>et al.</i> , 2002
^{13}C	Acetona- d_6 75 MHz	Acetona- d_6 125 MHz	Acetona- d_6 75 MHz	Acetona- d_6 150 MHz	DMSO- d_6 75 MHz	DMSO- d_6 75 MHz
C-2	164,2	164,3	164,0	164,9	162,6	164,1
C-3	103,3	102,8	103,4	104,5	101,5	103,3
C-4	182,1	181,6	182,4	182,9	180,3	181,7
C-5	162,5	161,4	162,1	163,3	N.O.	161,4
C-6	98,6	98,4	98,7	99,7	100,1	98,9
C-7	163,8	164,8	163,9	165,1	N.O.	163,5
C-8	93,8	93,8	93,7	94,7	94,6	93,9
C-9	157,8	157,3	157,9	158,7	N.O.	157,3
C-10	104,4	103,6	104,1	105,2	101,3	103,7
C-1'	122,7	121,3	122,4	123,6	N.O.	121,6
C-2'	113,2	113,2	109,5	110,7	116,3	116,5
C-3'	145,7	145,8	148,3	148,8	145,3	144,4
C-4'	149,3	149,8	150,4	151,3	154,6	152,0
C-5'	115,7	116,0	115,4	116,4	117,2	116,8
C-6'	119,2	118,9	120,6	121,4	122,0	122,1
C-1''	-	-	-	-	99,5	99,9
C-2''	-	-	-	-	70,0	70,1
C-3''	-	-	-	-	70,1	70,3
C-4''	-	-	-	-	71,8	71,9
C-5''	-	-	-	-	69,2	69,6
C-6''	-	-	-	-	17,7	17,9
3'-OCH ₃	-	-	55,6	56,6	-	-

Legenda: N.O. = Não Observado nas análises.

5.7.2 Neoastilbina, astilbina, neoisoastilbina, isoastilbina, eriodictiol

As substâncias **2**, **3**, **4**, **5** e **17** (Figura 32) mostraram em seus espectros de RMN de ^1H padrões de deslocamento de sinais e multiplicidades similares para os seus anéis B *o*, *p*-substituídos, assim como o anel C, com a ausência da ligação dupla entre os carbonos C-2 e C-3.

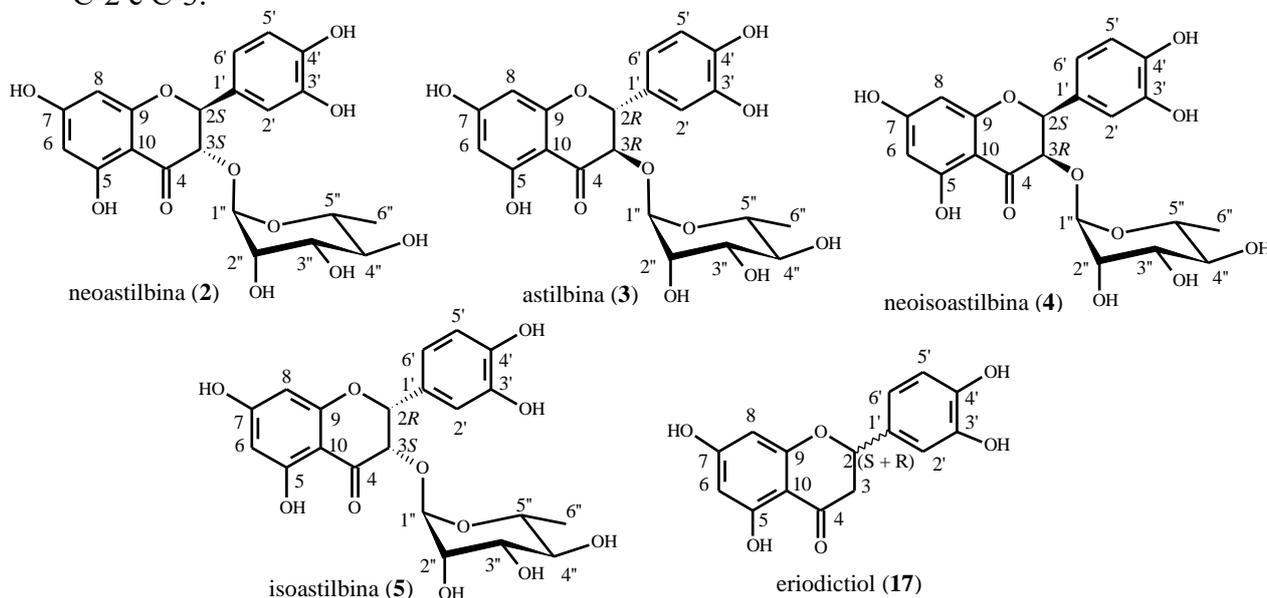


Figura 32. Estrutura química dos flavonoides **2**, **3**, **4**, **5**, e **17** e enumerações de seus carbonos.

A substância **2** exibiu em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 33) sinais em 6,89 ppm (1H, *s*) para H-2' e 6,69 ppm (2H, *s*) para os H-5' e H-6', simpletos em 5,88 e 5,84 para H-8 e H-6, 5,07 ppm (1H, *d*, $J = 11,0$ Hz) para H-2 e 4,71 ppm (1H, *d*, $J = 11,0$ Hz) para H-3, além de 4,92 ppm (1H, *s*) relativo ao hidrogênio anomérico da ramnose, o qual correlacionou por HMBC com o C-3 em 75,0 ppm e estabelecendo sua posição ligada a estrutura do flavonoide. Um duplete em 0,77 ppm (3H, $J = 6,0$ Hz, H-6'') confirmou a presença da ramnose na estrutura. Simpletos em 9,06 e 11,72 ppm indicaram a presença das hidroxilas das posições 4'-OH e 5-OH.

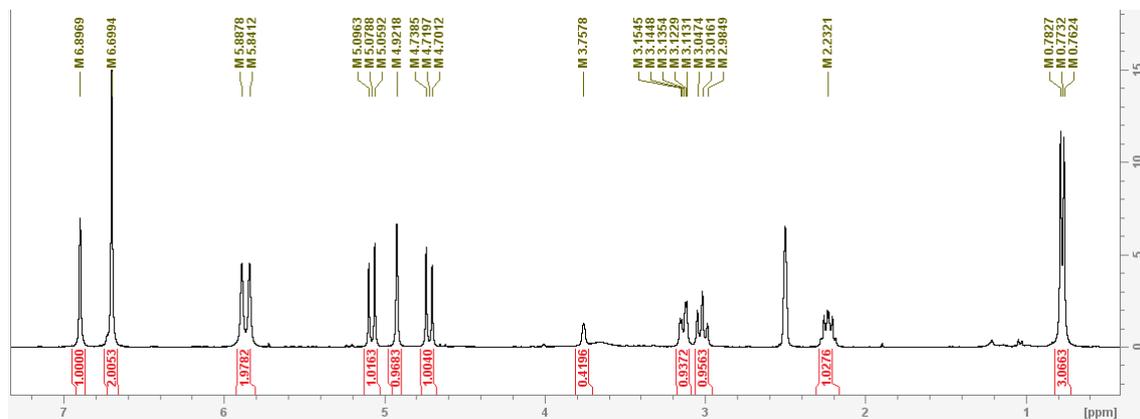


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H da substância **2** em DMSO- d_6 .

A substância **3** exibiu (Figura 34) sinais em 6,88 ppm (1H, *s*) para H-2' e 6,73 ppm (2H, *s*) para os H-5' e H-6', simpletos em 5,86 e 5,88 para H-6 e H-8, 5,22 ppm (1H, *d*, $J = 10,0$ Hz) para H-2 e 4,64 ppm (1H, *d*, $J = 10,0$ Hz) para H-3. O sinal relativo ao hidrogênio anomérico da ramnose foi definido em 4,01 ppm (1H, *s*), correlacionando com 75,7 ppm por HMBC, confirmando sua ligação ao C-3 do flavonoide. O duplete em 1,04 ppm (3H, $J = 6,1$ Hz, H-6'') confirmou ser o açúcar ramnose. As hidroxilas 4'-OH e 5-OH foram confirmadas pelos simpletos em 9,14 e 11,81.

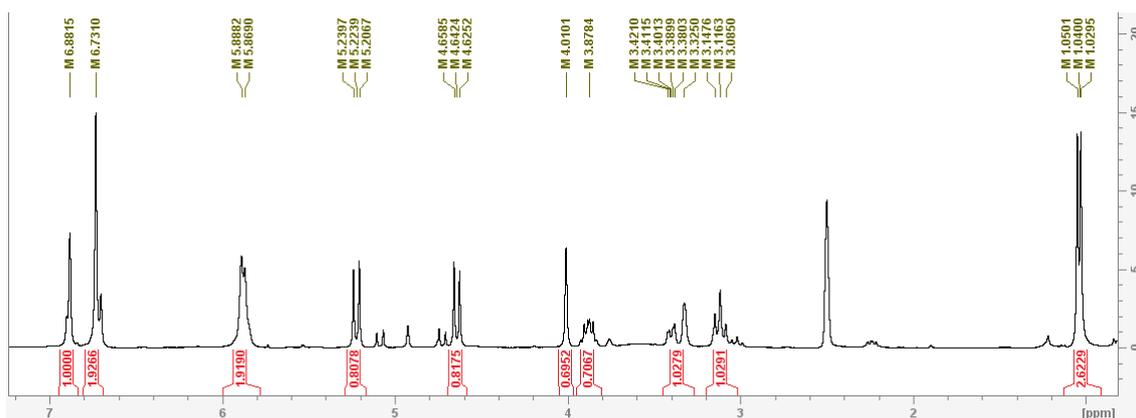


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H da substância **3** em $\text{DMSO-}d_6$.

A substância **4** exibiu em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 35) sinais em 6,89 ppm (1H, *s*) para H-2' e 6,73 ppm (2H, *s*) para os H-5' e H-6', simpleto em 5,82 e 5,84 para H-6 e H-8, 5,41 ppm (1H, *d*, $J = 1,2$ Hz) para H-2 e 4,05 ppm (1H, *s*) para H-3. A ramnose mostrou sinais dos H-1'' e H-6'' em 4,04 ppm (1H, *s*) e 0,99 ppm (3H, $J = 6,1$ Hz). A ramnose mostrou estar ligada ao C-3 em 75,2 ppm pela correlação com H-1'' por HMBC. Simpletos em 9,06 e 11,90 confirmaram as hidroxilas 4'-OH e 5-OH.

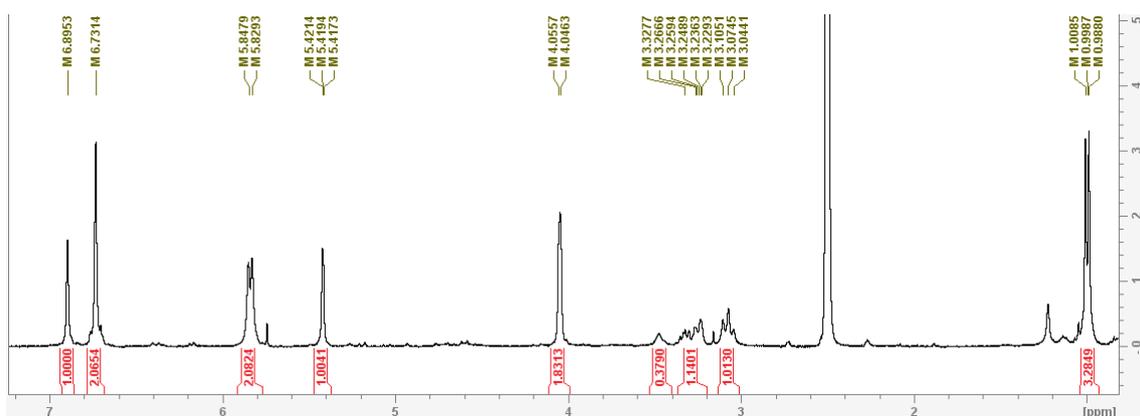


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H da substância **4** em $\text{DMSO-}d_6$.

A substância **5** exibiu em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 36) sinais em 6,83 ppm (1H, *s*) para H-2' e 6,70 ppm (2H, *s*) para os H-5' e H-6', simpletos em 5,86 e 5,89 para H-6 e H-8, 5,51 ppm (1H, *d*, $J = 2,3$ Hz) para H-2 e 4,17 ppm (1H, *d*, $J = 2,3$ Hz)

para H-3. Os H-1'' e H-2'' da ramnose apareceram em 4,75 ppm (1H, s) e duplete 0,82 ppm (3H, $J = 6,1$ Hz). A ramnose mostrou estar ligada ao C-3 em 73,8 ppm pela correlação com H-1'' por HMBC. Os simpletos em 8,97 e 11,80 confirmaram a presença das hidroxilas 4'-OH e 5-OH.

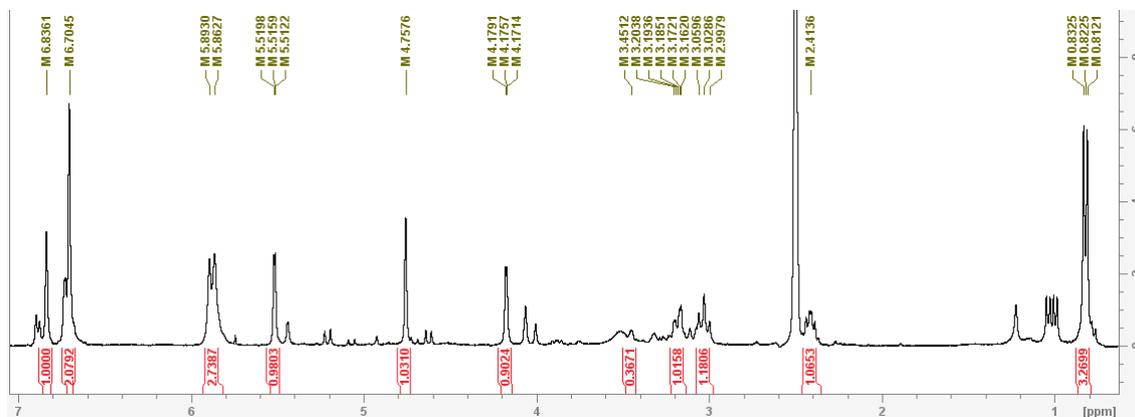


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H da substância **5** em $\text{DMSO}-d_6$.

A substância **17** mostrou em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 37) sinais em 6,93 ppm (1H, s) relativo ao H-2' e 6,80 ppm (2H, s) dos H-5'/H-6', 5,87 ppm (1H, d, $J = 2,1$ Hz) para o H-6 e 5,89 (1H, d, $J = 2,1$ Hz) para H-8, assim como sinais em 5,28 ppm (1H, dd, $J = 12,7; 3,0$ Hz) relativo ao H-2 acoplado com os H-3_{cis} em 2,74 (1H, dd, $J = 17,1; 3,0$ Hz) e H-3_{trans} em 3,0 ppm (1H, dd, $J = 17,1; 12,7$ Hz), sendo identificada como eriodictiol.

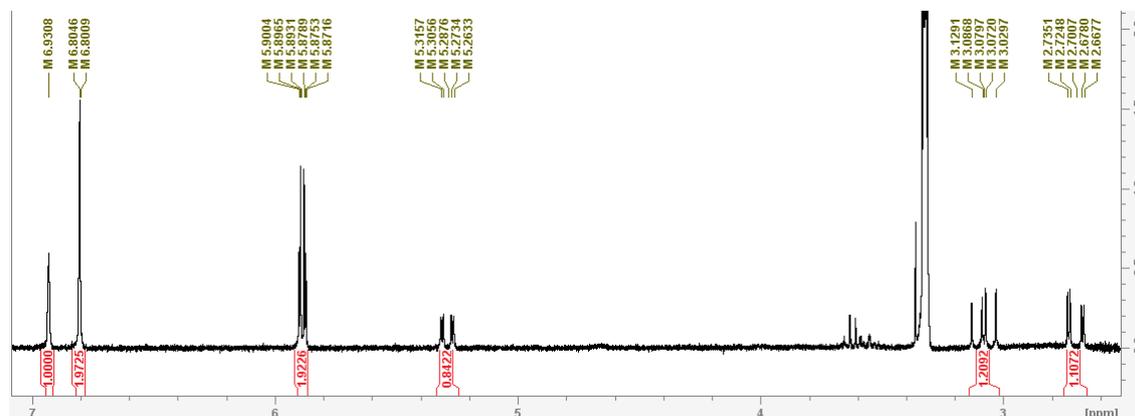


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H da substância **17** em $\text{DMSO}-d_6$.

Os sinais de H-2', H-5' e H-6' exibiram diferenças dos sistemas ABX de flavonas e flavonoides devido a estrutura conformacional dos esqueletos de dihidroflavonoides, o qual apresentam anel C não plano (Figura 38).

Os espectros de **2**, **3**, **4** e **5** corroboraram para identificação de dihidroflavonoides estereoisômeros que se diferenciaram principalmente nos deslocamentos químicos correspondentes aos H-2, H-3, onde os J resultantes de seus acoplamentos foram muito

maiores em neoastilbina (**2**) e astilbina (**3**) ($J = 11,1/9,9$ Hz) que neoastilbina (**4**) e isoastilbina (**5**) ($J = 1,2/2,2$ Hz). Este resultado indica os acoplamentos *trans* em neoastilbina e astilbina, enquanto acoplamentos *cis* em neoastilbina e isoastilbina dos H-2 e H-3 do anel C de suas estruturas.

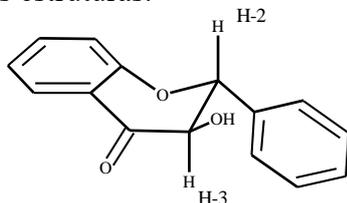


Figura 38. Estrutura química padrão de dihidroflavonóis.

Os hidrogênios dos carbonos anoméricos das ramnoses (H-1'') dos dihidroflavonóis exibiram deslocamentos químicos em 4,92 (neoastilbina), 4,01 (astilbina), 4,04 (neoastilbina) e 4,75 ppm (neoisoastilbina). Os H-3'' e H-4'' variaram pouco seus deslocamentos químicos em relação aos H-1'', H-2'', H-5'' com deslocamentos abruptos quando comparado para cada estereoisômero, porém mantendo as mesmas multiplicidades (Figura 39).

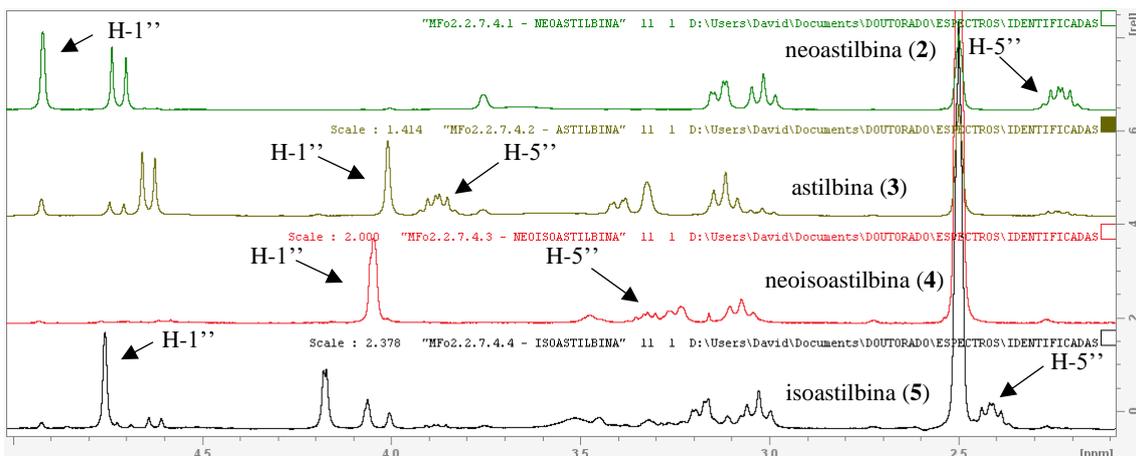


Figura 39. Comparação hidrogênios dos carbonos anoméricos das substâncias **2**, **3**, **4** e **5**.

A comparação entre neoastilbina e isoastilbina na Figura 38, revela que os H-1'' estavam mais deslocados para região desblindada do espectro, enquanto seus H-5'' exibiram deslocamento para região blindada. De forma contrária, os H-1'' de astilbina e neoisoastilbina estavam deslocados para região blindada, enquanto seus H-5'' deslocado para região desblindada.

O fenômeno dos deslocamentos ocorre pela presença do grupo carbonila em C-4, o qual desprotege os H-1'' e H-2'' próximos nas conformações *2S,3S* da neoastilbina e *2R,3S* da isoastilbina, os deslocando para região desblindada, enquanto o deslocamento

para o campo mais alto é consequência feita anisotrópico do anel aromático B, atuando como uma blindagem aos H-5''.

Nos casos das configurações $2R,3R$ da astilbina e $2S,3R$ da neoisoastilbina os mesmos efeitos atuam mais nos hidrogênios contrários. Enquanto o grupo carbonila desloca os H-5'' para região desblindada, o efeito anisotrópico descola os H-1'' e H-2'' para região blindada (DE BRITTO, *et al.*, 1995). Estas análises são realizadas assumindo que os H-1'' das ramnoses e os H-3 dos anéis C possuem conformação predominante onde estão em *sin* um em relação ao outro de acordo com a projeção de Newman (Figura 40).

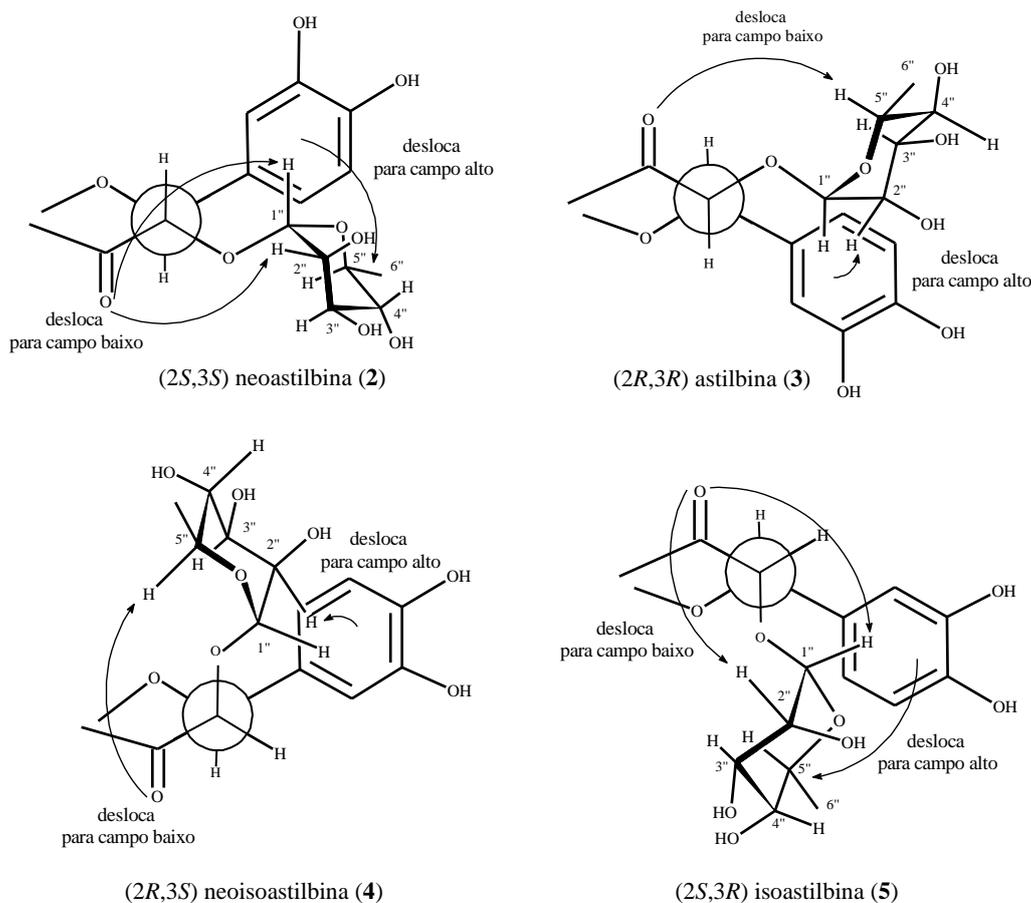


Figura 40. Efeito anisotrópico atuante nas substâncias **2**, **3**, **4** e **5** (adaptado de DE BRITTO *et al.*, 1995).

A flavanona eriodictiol (**17**) mostrou o mesmo padrão de multiplicidades para H-2', H-5' e H-6' de seu anel B que os dihidroflavonoides anteriores, com dois simpletos em 6,93 para H-2' e 6,80 ppm para H-5' e H-6'. As correlações de H-2 com os dois H-3 produziram as constantes de acoplamento relativas aos $_{cis}J = 3,0$ e $_{trans}J = 12,7$. O centro quiral H-2 do eriodictiol não produz valores diferentes para seus dois enantiômeros $2S$ e $2R$ (MATSUDA, *et al.*, 2002).

Não foi possível fazer uso da técnica de Dicroísmo Circular (CD) para aplicação e resolução dos centros quirais das moléculas, não sendo possível prever qual das duas conformações foi isolada apenas com dados de RMN (configuração relativa) e assumindo ter obtido neste trabalho os espectros de uma mistura racêmica das flavanonas 2*S*-eriodictiol e 2*R*-eriodictiol. Para efeito didático, 2*S*-eriodictiol produz absorção negativa por CD, enquanto 2*R*-eriodictiol produz sinal positivo (GUO *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2014).

As correlações por HMBC e COSY estão indicadas na Figura 41. Todos os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C das substâncias **2**, **3**, **4**, **5**, e **17** em comparação com a literatura científica estão presentes nas Tabelas 20 e 21.

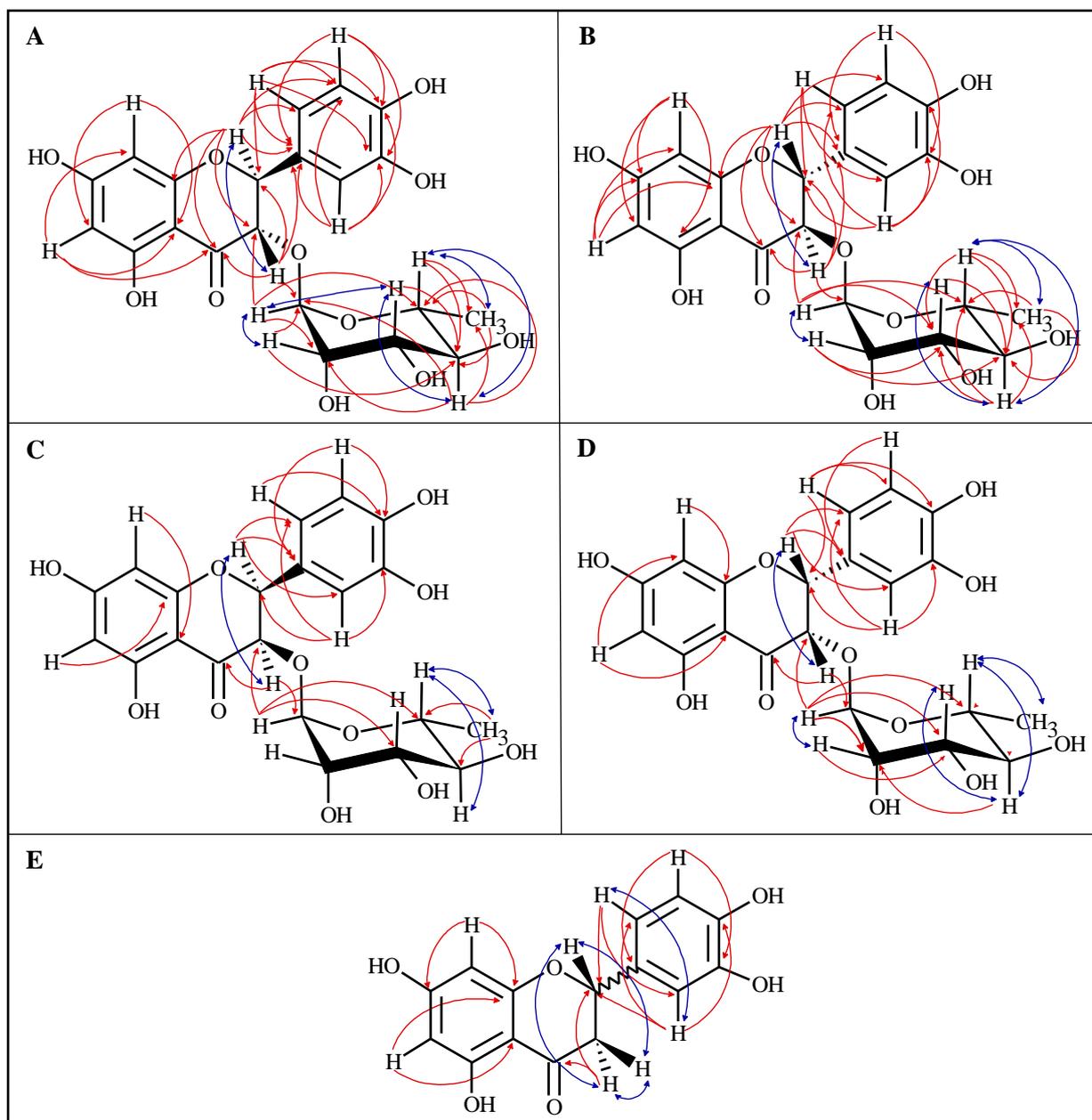


Figura 41. Correlação bidimensionais obtidas para identificação das substâncias **2** (A), **3** (B), **4** (C), **5** (D) e **17** (E). Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.

Tabela 20. Deslocamentos químicos de ¹H das substâncias 2, 3, 4, 5, e 17.

	Neoastilbina		Astilbina		Neoisoastilbina		Isoastilbina		Eriodictiol	
	Substância 2	Zhao <i>et al.</i> , 2021	Substância 3	Zhao <i>et al.</i> , 2021	Substância 4	Zhao <i>et al.</i> , 2021	Substância 5	Zhao <i>et al.</i> , 2021	Substância 17	Silva <i>et al.</i> , 2015
¹ H	DMSO- <i>d</i> ₆ 300 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 600 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 300 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 600 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 300 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 600 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 300 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 600 MHz	MeOH- <i>d</i> ₄ 300 MHz	MeOH- <i>d</i> ₄ 600 MHz
H-2	5,07 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 11,1 Hz)	5,10 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 11,1 Hz)	5,22 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9 Hz)	5,24 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9 Hz)	5,41 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,2 Hz)	5,74 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz)	5,51 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	5,55 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,6 Hz)	5,28 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12,7; 3,0 Hz)	5,28 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12,8; 3,0 Hz)
H-3	4,71 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 11,1 Hz)	4,72 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 11,1 Hz)	4,64 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9 Hz)	4,64 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9 Hz)	4,05 (1H, <i>s</i>)	4,10 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz)	4,17 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	4,21 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,7 Hz)	2,70cis (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 17,1; 3,0 Hz) 3,07trans (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 17,1; 12,7 Hz)	2,69cis (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 17,2; 3,0 Hz) 3,06trans (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 17,2; 12,8 Hz)
H-6	5,84 (1H, <i>s</i>)	5,90 (1H, <i>s</i>)	5,86 (1H, <i>s</i>)	5,90 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz)	5,82 (1H, <i>s</i>)	5,94 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	5,86 (1H, <i>s</i>)	5,96 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	5,87 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	5,88 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)
H-8	5,88 (1H, <i>s</i>)	5,85 (1H, <i>s</i>)	5,88 (1H, <i>s</i>)	5,88 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz)	5,84 (1H, <i>s</i>)	5,92 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	5,89 (1H, <i>s</i>)	5,92 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	5,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	5,90 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,32 Hz)
H-2'	6,89 (1H, <i>s</i>)	6,90 (1H, <i>s</i>)	6,88 (1H, <i>s</i>)	6,88 (1H, <i>s</i>)	6,89 (1H, <i>s</i>)	6,91 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,8 Hz)	6,83 (1H, <i>s</i>)	6,84 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz)	6,93 (1H, <i>s</i>)	6,91 (1H, <i>m</i>)
H-5'	6,69 (1H, <i>s</i>)	6,70 (1H, <i>s</i>)	6,73 (1H, <i>s</i>)	6,74 (1H, <i>s</i>)	6,73 (1H, <i>s</i>)	6,74 (1H, <i>m</i>)	6,70 (1H, <i>s</i>)	6,72 (1H, <i>m</i>)	6,80 (1H, <i>s</i>)	6,78 (1H, <i>m</i>)
H-6'	6,69 (1H, <i>s</i>)	6,70 (1H, <i>s</i>)	6,73 (1H, <i>s</i>)	6,74 (1H, <i>s</i>)	6,73 (1H, <i>s</i>)	6,74 (1H, <i>m</i>)	6,70 (1H, <i>s</i>)	6,72 (1H, <i>m</i>)	6,80 (1H, <i>s</i>)	6,79 (1H, <i>m</i>)
H-1''	4,92 (1H, <i>s</i>)	4,94 (1H, <i>s</i>)	4,01 (1H, <i>s</i>)	4,03 (1H, <i>s</i>)	4,04 (1H, <i>s</i>)	4,11 (1H, <i>s</i>)	4,75 (1H, <i>s</i>)	4,46 (1H, <i>s</i>)	-	-
H-2''	3,75 (1H, <i>s</i>)	3,77 (1H, <i>m</i>)	3,32 (1H, <i>s</i>)	3,34 (1H, <i>m</i>)	3,44 (1H, <i>s</i>)	3,46 (1H, <i>m</i>)	3,45 (1H, <i>s</i>)	3,46 (1H, <i>s</i>)	-	-
H-3''	3,13 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,5; 2,9 Hz)	3,14 (1H, <i>m</i>)	3,40 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,3; 2,8 Hz)	3,41 (1H, <i>m</i>)	3,24 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,0; 2,1 Hz)	3,25 (1H, <i>m</i>)	3,18 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,5; 3,0 Hz)	3,19 (1H, <i>m</i>)	-	-
H-4''	3,01 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,3 Hz)	3,03 (1H, <i>m</i>)	3,11 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,3 Hz)	3,13 (1H, <i>m</i>)	3,07 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,1 Hz)	3,09 (1H, <i>m</i>)	3,02 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9,3 Hz)	3,04 (1H, <i>m</i>)	-	-
H-5''	2,23 (1H, <i>m</i>)	2,27 (1H, <i>m</i>)	3,87 (1H, <i>m</i>)	3,88 (1H, <i>m</i>)	3,32 (1H, <i>m</i>)	3,30 (1H, <i>m</i>)	2,41 (1H, <i>m</i>)	2,45 (1H, <i>m</i>)	-	-
H-6''	0,77 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz)	0,90 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2 Hz)	1,04 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,1 Hz)	1,04 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2 Hz)	0,99 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,1 Hz)	1,00 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2 Hz)	0,82 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,1 Hz)	0,84 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,1 Hz)	-	-
5-OH	11,72 (<i>s</i>)	11,72*	11,81 (<i>s</i>)	11,80*	11,90 (<i>s</i>)	11,80*	11,80 (<i>s</i>)	11,81*	-	-
4'-OH	9,06 (<i>s</i>)	9,01*	9,14 (<i>s</i>)	9,97*	9,06 (<i>s</i>)	9,96*	8,97 (<i>s</i>)	9,00*	-	-

Legenda: * = referência de Zhao *et al.*, 2020 em DMSO-*d*₆, 600 MHz

Tabela 21. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias 2, 3, 4, 5 e 17.

	Neoastilbina		Astilbina		Neoisoastilbina		Isoastilbina		Eriodictiol	
	Substância 2	Zhao <i>et al.</i> , 2021	Substância 3	Zhao <i>et al.</i> , 2021	Substância 4	Zhao <i>et al.</i> , 2021	Substância 5	Zhao <i>et al.</i> , 2021	Substância 17	Silva <i>et al.</i> , 2015
^{13}C	DMSO- d_6 75 MHz	DMSO- d_6 600 MHz	MeOH- d_4 75 MHz	MeOH- d_4 150 MHz						
C-2	81,7	81,5	81,6	81,5	79,7	80,0	79,6	79,9	79,0	80,7
C-3	75,0	74,8	75,7	75,6	75,2	75,4	73,8	73,3	42,7	44,2
C-4	196,4	196,2	194,5	194,5	191,8	192,6	192,5	193,0	196,5	197,8
C-5	163,5	163,4	163,5	163,4	N.O.	163,8	N.O.	163,9	N.O.	165,6
C-6	95,3	96,2	95,3	96,0	96,2	96,0	96,1	99,1	95,8	97,2
C-7	167,6	167,4	167,5	167,0	N.O.	166,9	N.O.	167,0	167,9	168,6
C-8	96,4	95,1	96,2	95,0	95,3	94,9	95,2	95,1	95,1	96,2
C-9	162,6	162,4	162,2	162,2	162,6	162,5	162,3	162,4	163,3	164,9
C-10	100,6	101,3	101,0	101,0	100,0	100,6	99,7	100,3	101,8	103,5
C-1'	127,7	127,5	127,1	126,9	126,8	126,4	126,2	126,3	130,5	131,8
C-2'	114,7	114,6	114,8	114,7	114,2	114,4	113,9	114,0	113,2	114,7
C-3'	145,4	145,2	145,2	145,1	145,4	145,0	144,7	144,9	145,0	146,1
C-4'	146,2	146,0	146,0	145,9	145,5	145,3	145,5	145,1	145,5	147,1
C-5'	115,1	114,9	115,4	115,3	115,1	115,2	114,9	115,1	114,9	116,6
C-6'	119,7	119,4	119,0	118,9	117,6	117,8	117,4	117,5	117,8	119,2
C-1''	101,4	100,5	100,1	100,1	100,3	100,6	98,5	98,8	-	-
C-2''	70,3	70,1	70,2	70,1	69,7	69,8	69,9	70,2	-	-
C-3''	70,3	70,2	70,3	70,4	70,2	70,3	69,9	70,2	-	-
C-4''	71,4	71,3	71,7	71,6	71,3	71,6	71,1	71,2	-	-
C-5''	69,1	68,9	69,1	69,0	68,9	69,0	68,7	69,0	-	-
C-6''	17,8	17,6	17,8	17,7	17,3	17,4	17,4	17,6	-	-

Legenda: N.O. = Não Observado nas análises.

5.7.3 Quercetina-3-*O*-ramnosídeo, Quercetina-3-*O*-glicosídeo e Quercetina-3-*O*-rutinosídeo

As substâncias **6**, **7** e **9** (Figura 42) mostraram em seus espectros de RMN de ^1H ausência de sinais de H-2 e H-3, mas sinais característicos de flavonóis com anéis B *o*, *p*-substituídos (sistemas ABX).

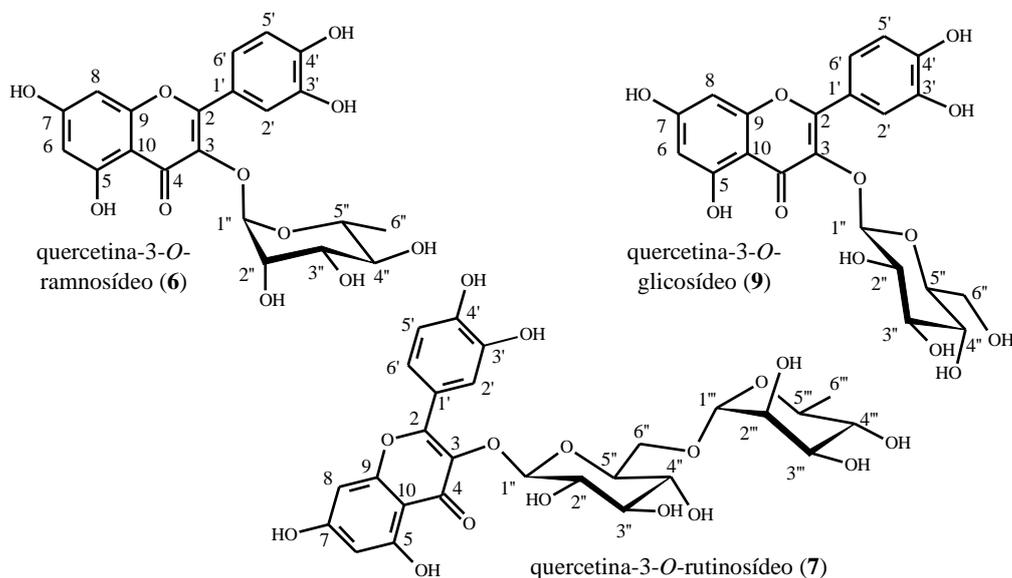


Figura 42. Estrutura química dos flavonoides **6**, **7** e **9** e enumerações de seus carbonos.

A substância **6** mostrou sinais (Figura 43) em 7,28 ppm (1H, *m*) relativo ao H-2', 7,24 ppm (1H, *m*) para H-6', 6,85 ppm (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz) para H-5', simpletos em 6,19 ppm para H-6 e 6,38 ppm para H-8, além de 5,24 ppm para o H-1'' da ramnose, o qual mostrou correlação por HMBC com o C-3 em 134,2 ppm, sendo identificada como quercetin-3-*O*- α -L-ramnosídeo (quercitrina).

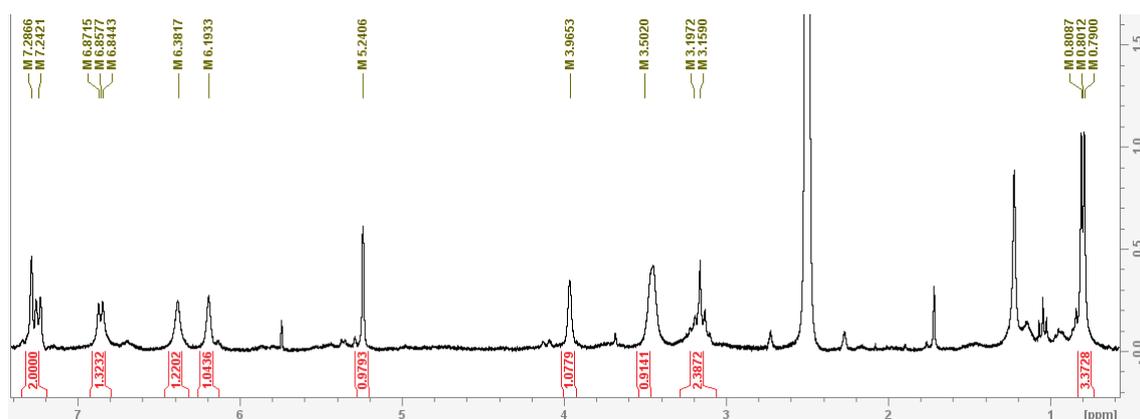


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H da substância **6** em DMSO- d_6 .

A substância **9** mostrou sinais (Figura 44) em 7,57 ppm (2H, *m*) relativo aos H-2' e H-6', 6,83 ppm (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz) para H-5', simpletos em 6,19 ppm para H-6 e 6,40 ppm para H-8, além de 5,45 ppm (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz) para o H-1'' da glicose, o qual

mostrou correlação por HMBC com o C-3 em 133,2 ppm, sendo identificada como quercetin-3-*O*- β -D-glicosídeo (isoquercetina ou isoquercitrina).

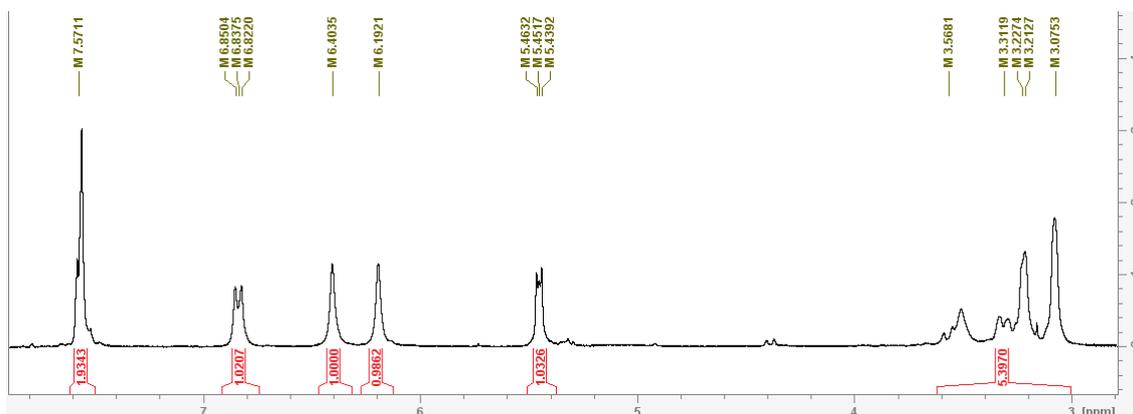


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H da substância **9** em $\text{DMSO-}d_6$.

A substância **7** mostrou picos (Figura 45) em 7,52 ppm (1H, *m*,) relativo ao H-6', 7,50 ppm (1H, *m*) para H-2', 6,83 ppm (1H, *d*, $J = 7,1$ Hz) para H-5', simpletos em 6,17 ppm para H-6 e 6,37 ppm para H-8, 5,31 ppm (1H, *d*, $J = 6,3$ Hz) para o H-1'' da glicose, o qual mostrou correlação por HMBC com o C-3 em 132,6 ppm, além de 4,36 ppm (1H, *s*) para H-1''' da ramnose, sendo identificada como quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina).

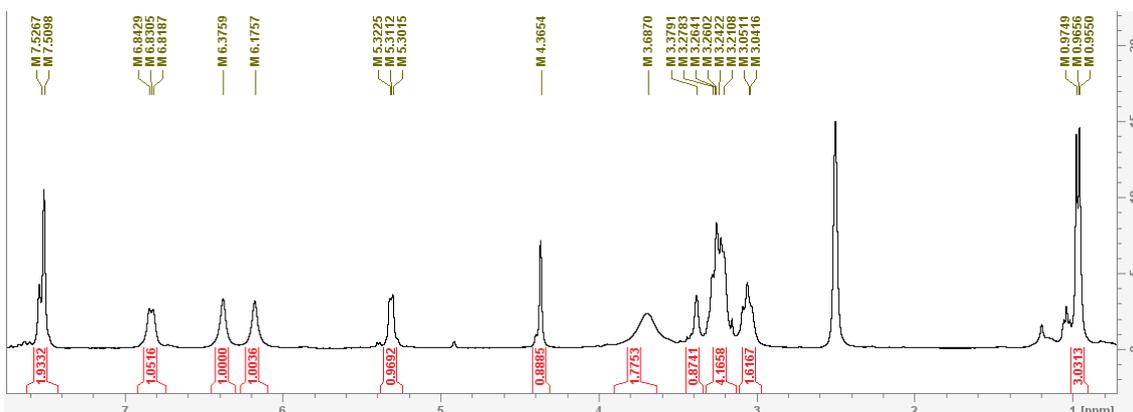


Figura 45. Espectro de RMN de ^1H da substância **7** em $\text{DMSO-}d_6$.

Na Figura 46 é possível observar que os H-6, H-8 e H-5' dos flavonoides praticamente não sofreram alteração de deslocamento químico relacionando aos diferentes tipos de açúcares ligados à posição C-3. Se compararmos os H-2' e H-6', em quercetina-3-*O*-ramnosídeo (**6**) ambos aparecem deslocado para região blindada em relação às duas outras substâncias, próximos entre si na região desblindada.

A ramnose parece afetar diretamente H-2' e H-6' exclusivamente, fornecendo proteção eletrônica para a parte mais próxima dela no anel B, favorecida pela posição em C-3. Pode ser creditado esse efeito a ausência de pelo menos um grupo OH, quando comparado à glicose, garantindo a característica de açúcar menos polar para a ramnose.

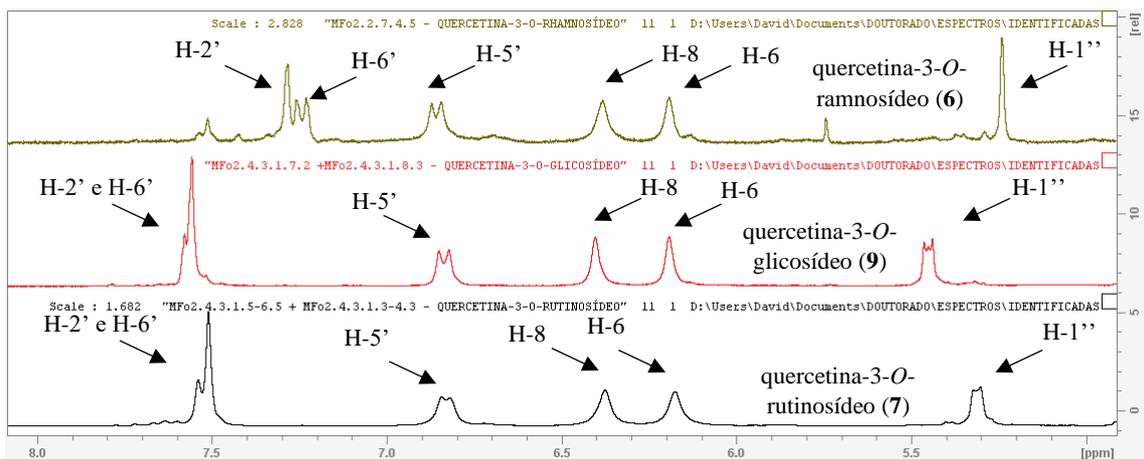


Figura 46. Comparação entre os hidrogênios da região dos aromáticos e anoméricos das substâncias **6**, **9** e **7**.

As correlações obtidas por HMBC e COSY estão indicadas na Figura 47. Os deslocamentos de ^1H e C^{13} de quercetina-3-*O*-ramnosídeo (**6**), quercetina-3-*O*-glicosídeo (**9**) e quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**7**) em comparação com a literatura científica podem ser vistos nas Tabelas 22 e 23.

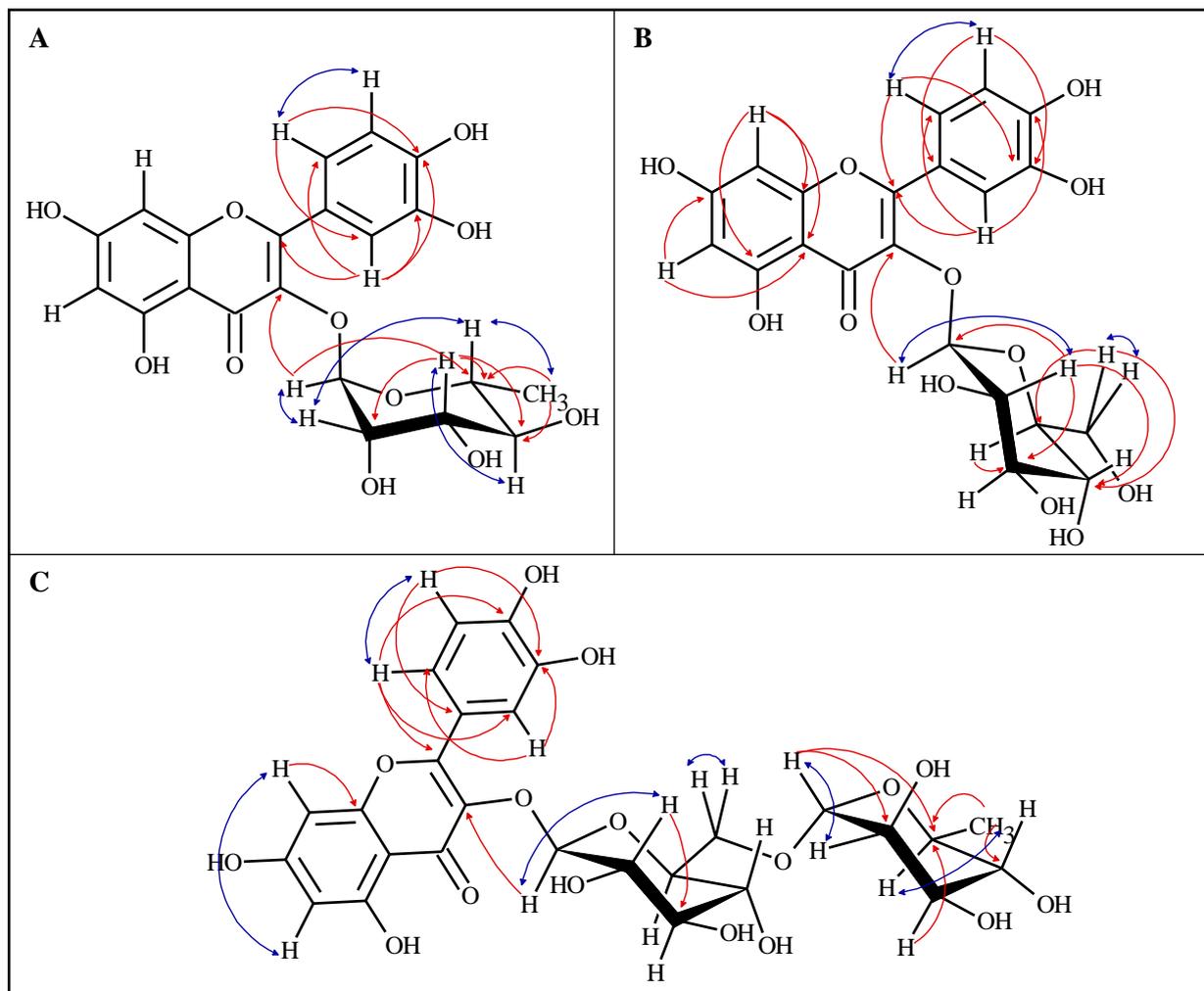


Figura 47. Correlação bidimensionais obtidas para identificação das substâncias **6** (A), **9** (B) e **7** (C). Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.

Tabela 22. Deslocamentos químicos de ^1H das substâncias 6, 9 e 7.

	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo		Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo		Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	
	Substância 6	Parvez <i>et al.</i> , 2021	Substância 9	Pokhilo <i>et al.</i> , 2021	Substância 7	Pokhilo <i>et al.</i> , 2021
^1H	DMSO- d_6 300 MHz	DMSO- d_6 700 MHz	DMSO- d_6 300 MHz	DMSO- d_6 500 MHz	DMSO- d_6 300 MHz	DMSO- d_6 500 MHz
H-6	6,19 (1H, s)	6,21 (1H, s)	6,19 (1H, s)	6,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	6,17 (1H, s)	6,19 (1H, s)
H-8	6,38 (1H, s)	6,40 (1H, s)	6,40 (1H, s)	6,40 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	6,37 (1H, s)	6,38 (1H, s)
H-2'	7,28 (1H, m)	7,31 (1H, d, $J = 2,1$ Hz)	7,57 (1H, m)	7,58 (1H, d, $J = 2,3$ Hz)	7,50 (1H, m)	7,50 (1H, d, $J = 1,9$ Hz)
H-5'	6,85 (1H, d, $J = 8,1$ Hz)	6,87 (1H, d, $J = 8,4$ Hz)	6,83 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	6,84 (1H, d, $J = 9,0$ Hz)	6,83 (1H, d, $J = 7,2$ Hz)	6,80 (1H, d, $J = 8,4$ Hz)
H-6'	7,24 (1H, m)	7,26 (1H, dd, $J = 8,4; 2,1$ Hz)	7,57 (1H, m)	7,57 (1H, dd, $J = 9,0; 2,3$ Hz)	7,52 (1H, m)	7,52 (1H, dd, $J = 8,4; 1,9$ Hz)
H-1''	5,24 (1H, s)	5,26 (1H, s)	5,45 (1H, d, $J = 7,2$ Hz)	5,46 (1H, d, $J = 7,5$ Hz)	5,31 (1H, d, $J = 6,3$ Hz)	5,34 (1H, d, $J = 7,5$ Hz)
H-2''	3,96 (1H, m)	3,97 (1H, m)	3,22 (1H, m)	3,23 (1H, m)	3,21 (1H, m)	3,22
H-3''	3,50 (1H, m)	3,51 (1H, dd, $J = 3,5; 3,5$ Hz)	3,21 (1H, m)	3,23 (1H, m)	3,21 (1H, m)	3,24
H-4''	3,15 (1H, m)	3,15 (1H, m)	3,07 (1H, m)	3,10 (1H, m)	3,26 (1H, m)	3,07
H-5''	3,19 (1H, m)	3,21 (1H, m)	3,07 (1H, m)	3,39 (1H, m)	3,24 (1H, m)	3,22
H-6''	0,80 (3H, d, $J = 5,6$ Hz)	0,82 (3H, d, $J = 6,3$ Hz)	3,31a (1H, m) 3,56b (1H, m)	3,57 (2H, d, $J = 11,0$ Hz)	3,27a (1H, m) 3,26b (1H, m)	3,63 (1H, dd, $J = 12,1; 5,9$ Hz) 3,97 (1H, dd, $J = 12,1; 3,9$ Hz)
H-1'''	-	-	-	-	4,36 (1H, s)	4,38 (1H, d, $J = 1,1$ Hz)
H-2'''	-	-	-	-	3,37 (1H, m)	3,28
H-3'''	-	-	-	-	3,04 (1H, m)	3,39
H-4'''	-	-	-	-	3,05 (1H, m)	3,05
H-5'''	-	-	-	-	3,26 (1H, m)	3,27
H-6'''	-	-	-	-	0,96 (3H, d, $J = 5,9$ Hz)	1,06 (3H, d, $J = 6,9$ Hz)
5-OH	12,65 (s)	12,67 (s)	12,63 (s)	12,63 (s)	12,55 (s)	12,58 (s)

Tabela 23. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias 6, 9 e 7.

	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo		Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo		Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	
	Substância 6	Parvez <i>et al.</i> , 2021	Substância 9	Pokhilo <i>al.</i> , 2021	Substância 7	Pokhilo <i>al.</i> , 2021
^{13}C	DMSO- <i>d</i> ₆ 75 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 700 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 75 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 125 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 75 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ 125 MHz
C-2	157,3	157,8	156,3	156,3	157,9	156,4
C-3	134,2	134,7	133,2	133,4	132,6	133,3
C-4	177,7	178,2	177,4	177,4	N.O.	177,4
C-5	N.O.	161,8	164,3	161,3	N.O.	161,3
C-6	98,6	99,1	98,5	98,7	98,6	98,8
C-7	164,6	164,6	164,5	164,2	N.O.	164,2
C-8	93,8	94,1	93,4	93,5	93,7	93,5
C-9	156,5	156,9	159,3	156,4	156,7	156,7
C-10	104,0	104,5	104,1	104,0	N.O.	103,9
C-1'	120,7	121,1	121,3	121,2	121,9	121,6
C-2'	115,7	116,1	116,0	116,3	116,1	161,1
C-3'	145,3	145,7	145,0	148,5	144,9	144,9
C-4'	148,5	148,9	148,6	144,9	148,5	148,5
C-5'	115,5	115,9	115,0	115,3	115,2	115,2
C-6'	121,2	121,5	121,6	121,6	121,6	121,6
C-1''	101,9	102,1	100,7	100,9	101,1	101,2
C-2''	70,1	70,5	73,9	73,2	74,0	74,1
C-3''	70,4	71,1	76,3	76,6	76,1	76,6
C-4''	71,2	71,6	69,7	70,0	70,4	70,6
C-5''	70,7	70,5	77,3	77,6	75,8	76,0
C-6''	17,6	17,9	60,8	61,0	66,9	67,0
C-1'''	-	-	-	-	100,7	100,7
C-2'''	-	-	-	-	70,3	70,4
C-3'''	-	-	-	-	69,9	70,0
C-4'''	-	-	-	-	71,4	71,9
C-5'''	-	-	-	-	68,1	68,2
C-6'''	-	-	-	-	17,6	17,9

Legenda: N.O. = Não Observado nas análises.

5.7.4 Kaempferol-3-*O*-ramnosídeo e kaempferol-7-*O*-rutinosídeo

As substâncias **8** e **10** (Figura 48) mostraram em seus espectros de RMN de ^1H similaridade em seus deslocamentos de sinais em sua íntegra, tratando-se de esqueletos de flavonóis e anéis B *p*-substituídos (sistemas AA'XX').

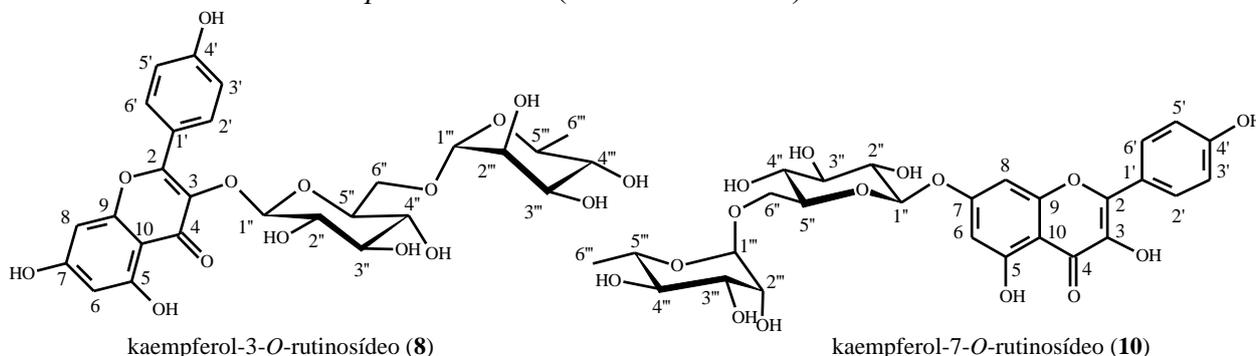


Figura 48. Estrutura química dos flavonoides **8** e **10** e enumerações de seus carbonos.

A substância **8** mostrou sinais (Figura 49) em 7,96 ppm (2H, *d*, $J = 8,7$ Hz) relativo aos H-2' e H-6', 6,86 ppm (2H, *d*, $J = 8,7$ Hz) para H-3' e H-5', simpletos em 6,17 ppm (1H, *s*) para H-6, 6,38 ppm (1H, *s*) para H-8, 5,27 ppm (1H, *d*, $J = 7,3$ Hz) para o H-1'' da glicose, o qual mostrou correlação por HMBC com o C-3 em 133,2 ppm, além de 4,35 ppm (1H, *s*) para H-1''' e 0,95 (1H, *d*, $J = 5,4$ Hz) para o H-6''' da ramnose, o qual mostrou correlação por HMBC com o C-6'' em 66,9 ppm, sendo identificada como kaempferol-3-*O*-rutinosídeo.

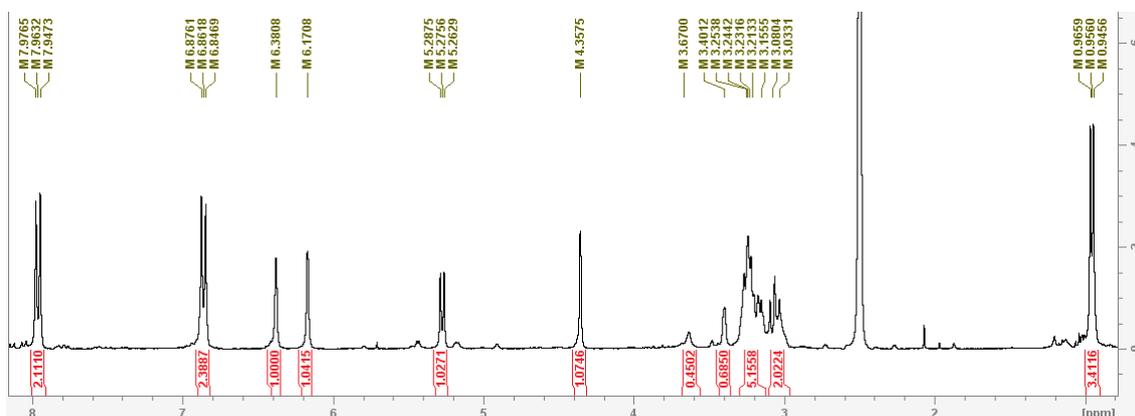


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da substância **8** em DMSO- d_6 .

A substância **10** mostrou sinais (Figura 50) em 7,94 ppm (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) relativos aos H-2' e H-6', 6,84 ppm (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) para H-3' e H-5', multipletos em 6,01 ppm (1H, *s*) para H-6, 6,19 ppm (1H, *s*) para H-8, 5,22 ppm (1H, *d*, $J = 7,3$ Hz) da glicose, além de 4,38 ppm (1H, *s*) e 0,99 ppm (3H, *d*, $J = 5,4$ Hz) para os H-1''' e H-6''' da metila da ramnose. O H-8 mostrou correlação por HMBC com o C-1'' em 102,3 ppm da glicose, auxiliando na identificação da substância como kaempferol-7-*O*-rutinosídeo.

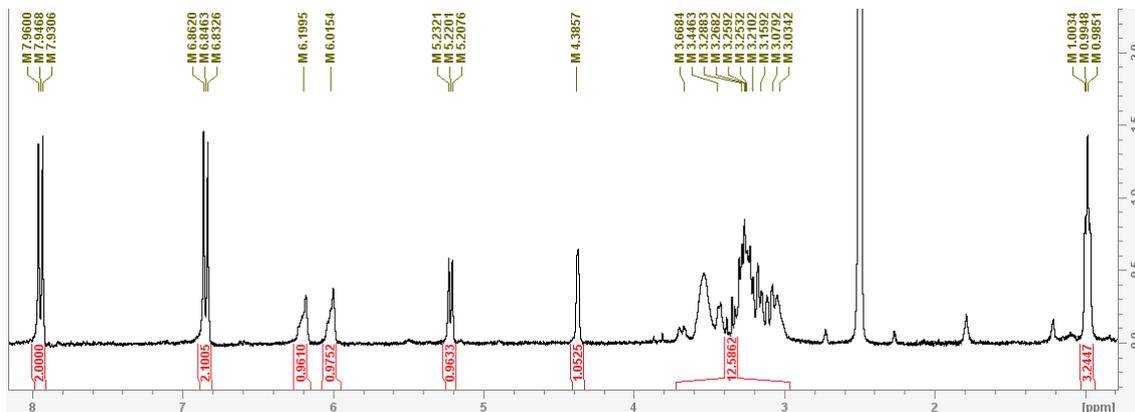


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H da substância **10** em $\text{DMSO-}d_6$.

Kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (**8**) e kaempferol-7-*O*-rutinosídeo (**8**) demonstraram o mesmo padrão de multiplicidade para H-2'/H-6' e H-3'/H-5' (Figura 51) em formatos que podem ser chamados de *pseudo*-dupletos. É conhecido que esse formato para sistemas de spin AA'XX', na verdade se trata de um sistema complexo entre seus análogos de cada lado dos anéis B, que interagem diferentemente por não serem magneticamente simétricos. São chamados de acoplamentos de ordem superior ou segunda ordem.

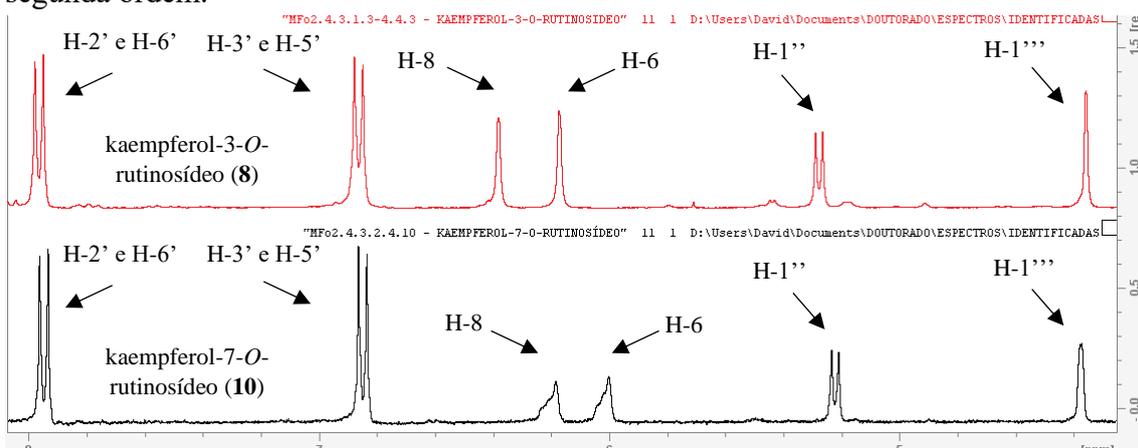


Figura 51. Comparação entre os hidrogênios da região dos aromáticos e anoméricos das substâncias **8** e **10**.

Enquanto para cada sinal, um dupletto se destaca como acoplamentos *orto*, o que parece ser dupletos surgem com menos intensidade nas bases de cada linha principal como resultados de acoplamentos *meta*. Partindo de hipóteses, a prerrogativa inicial sugere que cada núcleo interage separadamente para fornecer um acoplamento por vez, sendo em um primeiro instante realizado o acoplamento *orto* e em outro momento o acoplamento *meta*, diferente de interações de H-6' de anéis B com sistema ABX, onde a interação é instantânea e fornece o duplo dupletto dos acoplamentos com H-2' e H-5' ao mesmo tempo. Em resumo, cada sinal representando os núcleos A/A' e X/X' é um multipletto e pode ser chamado de *pseudo*-dupletto (*pd*). Mas visualmente observa-se como dupletto, então mantivemos a nomenclatura que é visível.

Não é possível ver os dupletos menores relativos aos acoplamentos de ordem superior nos espectros das substâncias **8** e **10** pois encontram-se dentro das bases dos sinais, notados pelo breve alargamento das bases dos mesmos.

Na Figura 51 também é possível observar deslocamento para região blindada dos H-6 e H-8 do kaempferol-7-*O*-rutinosídeo em relação ao kaempferol-3-*O*-rutinosídeo. As análises anteriores nos glicosídeos de quercetina mostraram que os H-6 e H-8 não sofreram deslocamentos significativos quanto aos diferentes substituintes glicosídicos ligados à mesma posição C-3 do anel C. O deslocamento está relacionado diretamente neste caso, às diferentes conexões do grupo rutinose aos sítios da estrutura do kaempferol, deixando claro por estas análises que o substituinte rutinose da posição C-7 atua causando efeito de blindagem nos H-6 e H-8.

Outro fator que deve ser levado em conta, é o formato da multiplicidade do H-6 e H-8. Devido à presença da rutinose em C-7 que apresenta livre rotação, estes hidrogênios experimentam mais de um ambiente magnético, gerando multipletos em forma de cascata. Os sinais das glicoses (H-1'') e ramnoses (H-1''') mostraram-se praticamente indiferentes frente às mudanças de posições nos flavonoides. As correlações por HMBC e COSY estão representadas pela Figura 52 e os deslocamentos químicos completos das substâncias **8** e **10** estão dispostos nas Tabelas 24 e 25.

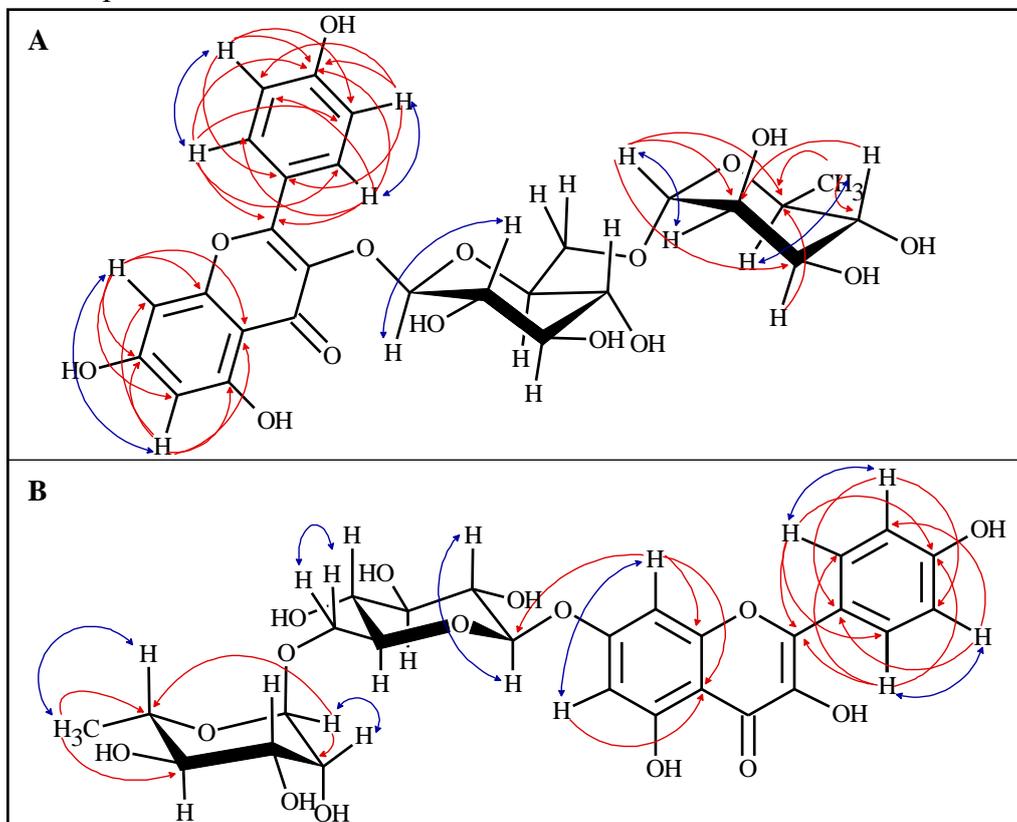


Figura 52. Correlação bidimensional obtidas para identificação das substâncias **8** (A) e **10** (B). Setas vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.

Tabela 24. Deslocamentos químicos de ¹H das substâncias **8** e **10**.

	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	Kaempferol-7- <i>O</i> -rutinosídeo	Isolado apenas kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo
	Substância 8	Substância 10	Pokhilo <i>al.</i> , 2021
¹ H	DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ , 700 MHz
H-6	6,16 (1H, <i>s</i>)	6,01 (1H, <i>s</i>)	6,09 (1H, <i>s</i>)
H-8	6,38 (1H, <i>s</i>)	6,19 (1H, <i>s</i>)	6,29 (1H, <i>s</i>)
H-2'/H-6'	7,96 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	7,94 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	7,97 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)
H-3'/H-5'	6,86 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)	6,84 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz)	6,86 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz)
H-1''	5,27 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,3 Hz)	5,22 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,3 Hz)	5,26 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,6 Hz)
H-2''	3,15 (1H, <i>m</i>)	3,15 (1H, <i>m</i>)	3,22 (1H, <i>m</i>)
H-3''	3,21 (1H, <i>m</i>)	3,21 (1H, <i>m</i>)	3,24 (1H, <i>m</i>)
H-4''	3,25 (1H, <i>m</i>)	3,28 (1H, <i>m</i>)	3,05 (1H, <i>m</i>)
H-5''	3,23 (1H, <i>m</i>)	3,26 (1H, <i>m</i>)	3,22 (1H, <i>m</i>)
H-6''	3,25a (1H, <i>m</i>) 3,67b (1H, <i>m</i>)	3,25a (1H, <i>m</i>) 3,66b (1H, <i>m</i>)	3,69 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,4 Hz)
H-1'''	4,35 (1H, <i>s</i>)	4,38 (1H, <i>s</i>)	4,39 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,1 Hz)
H-2'''	3,40 (1H, <i>m</i>)	3,44 (1H, <i>m</i>)	3,28 (1H, <i>m</i>)
H-3'''	3,03 (1H, <i>m</i>)	3,03 (1H, <i>m</i>)	3,39 (1H, <i>m</i>)
H-4'''	3,07 (1H, <i>m</i>)	3,07 (1H, <i>m</i>)	3,07 (1H, <i>m</i>)
H-5'''	3,24 (1H, <i>m</i>)	3,25 (1H, <i>m</i>)	3,27 (1H, <i>m</i>)
H-6'''	0,95 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0 Hz)	0,99 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 5,4 Hz)	0,99 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz)
5-OH	12,53 (<i>s</i>)	12,42 (<i>s</i>)	12,48 (<i>s</i>)

Tabela 25. Deslocamentos químicos de ¹³C das substâncias **8** e **10**.

	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	Kaempferol-7- <i>O</i> -rutinosídeo	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo
	Substância 8	Substância 10	Pokhilo <i>al.</i> , 2021
¹³ C	DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz	DMSO- <i>d</i> ₆ , 175 MHz
C-2	156,9	156,3	156,4
C-3	133,2	133,4	133,3
C-4	177,4	176,4	176,9
C-5	161,3	160,2	161,5
C-6	98,9	100,4	99,4
C-7	164,8	161,3	160,4
C-8	93,8	94,8	93,8
C-9	156,7	157,2	156,8
C-10	103,9	102,7	103,1
C-1'	121,0	121,2	120,9
C-2'/C-6'	130,8	131,3	130,7
C-3'/C-5'	115,1	115,4	115,1
C-4'	160,4	160,2	160,0
C-1''	101,3	102,3	101,6
C-2''	74,1	74,6	74,0
C-3''	76,6	76,5	75,8
C-4''	70,5	70,9	69,9
C-5''	75,8	76,1	76,4
C-6''	66,9	67,5	66,8
C-1'''	100,7	101,2	100,6
C-2'''	70,3	70,7	70,5
C-3'''	69,9	70,2	70,3
C-4'''	71,8	72,2	71,3
C-5'''	68,0	68,8	68,1
C-6'''	17,6	18,1	17,6

5.7.5 Apigenina e 7,4'-dihidroxiavona

As substâncias **14** e **16** (Figura 53) mostraram deslocamentos característicos de esqueletos de flavonas e anéis B *p*-substituídos com sistemas AA'XX' em seus espectros.

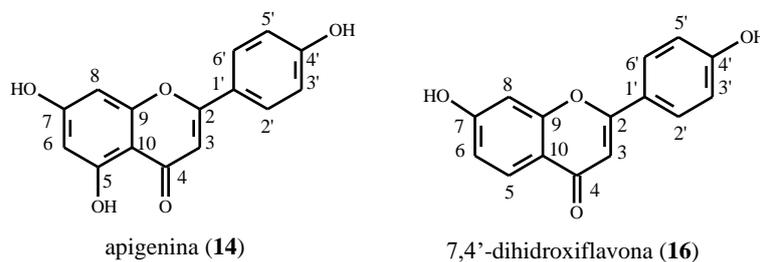


Figura 53. Estrutura química dos flavonoides **14** e **16** e enumerações de seus carbonos.

A substância **14** mostrou sinais (Figura 54) em 7,94 ppm (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) relativo aos H-2' e H-6', 7,03 ppm (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) para H-3' e H-5', simpleto em 6,64 para H-3, além de 6,26 ppm (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) para H-6 e 6,54 ppm (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) para H-8, sendo identificada como apigenina.

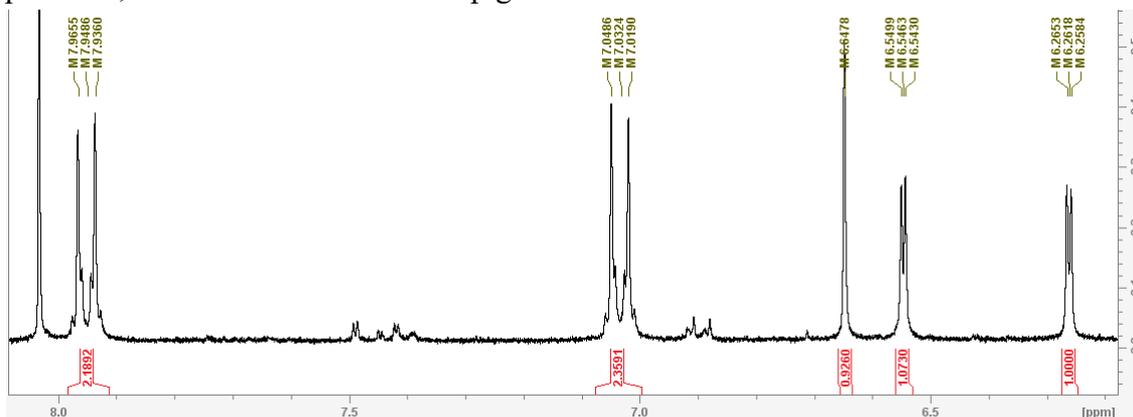


Figura 54. Espectro de RMN de ^1H expandido englobando todos os sinais da substância **14**.

A substância **16** (Figura 55) mostrou sinais em 7,88 ppm (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) para H-2' e H-6', 7,81 ppm (1H, *d*, $J = 8,6$ Hz) para H-5, 6,90 ppm (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) para H-3' e H-5', 6,89 ppm (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) para H-8, 6,84 ppm (1H, *dd*, $J = 8,6$ and 2,1 Hz), além do simpleto em 6,67 para H-3, sendo identificada como 7,4'-dihidroxiavona.

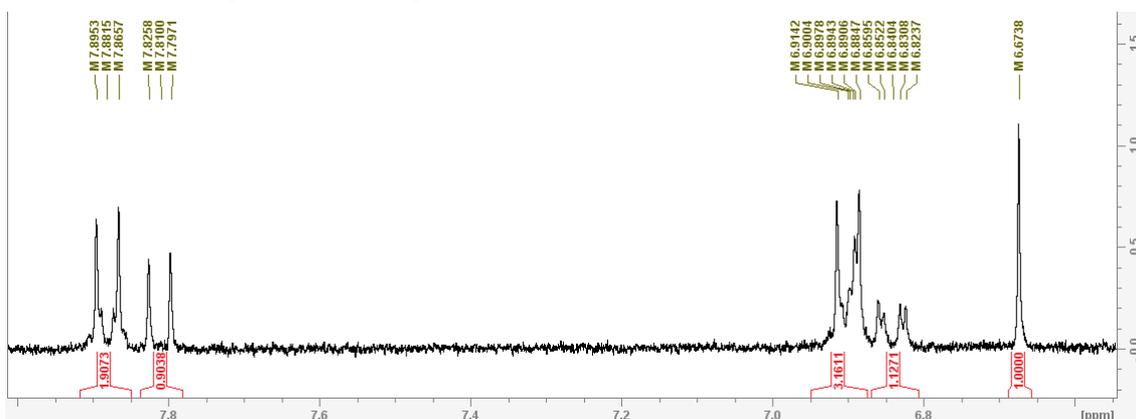


Figura 55. Espectro de RMN de ^1H expandido englobando todos os sinais da substância **16**.

As duas substâncias foram previamente reconhecidas como flavonas devido ao simpleto agudo em 6,64 ppm para apigenina (**14**) e 6,78 ppm para 7,4'-dihidroxiavona (**16**) gerado em seus espectros referente aos H-3 do anel C observados na Figura 56. O leve deslocamento para região desblindada de H-3 da 7,4'-dihidroxiavona está diretamente ligado à ausência do grupo 5-OH, que proporciona ligação de hidrogênio com o oxigênio do grupo carbonila em C-4, no caso de apigenina. Estando ausente o 5-OH, a carbonila mantém o máximo de sua eletronegatividade próximo à C-3, o desprotegendo e assim, proporcionando o deslocamento.

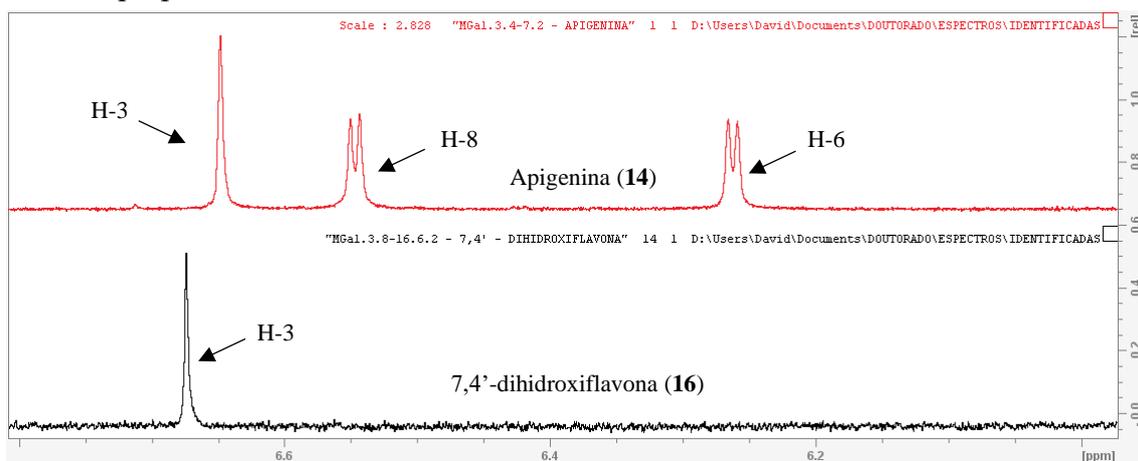


Figura 56. Comparação dos deslocamentos químicos dos H-3 das substâncias **14** e **16**. Além de H-6 e H-8 de **14**.

Os H-6 e H-8 da apigenina (Figura 57) mostraram nítidos acoplamentos *meta* na forma de dupletos, os quais não foram visualizados nos flavonoides glicosilados anteriores. O DMSO- d_6 pode ter relação com a baixa resolução das multiplicidades nos glicosídeos. Análises em equipamentos de potências superiores poderiam solucionar esta questão, infelizmente este trabalho não se propôs a seguir esta linha de investigação.

Na Figura 56 é possível verificar que os sinais referentes aos H-2'/H-6' e H-3'/H-5' exibiram formatos de acoplamentos de segunda ordem para as duas substâncias.

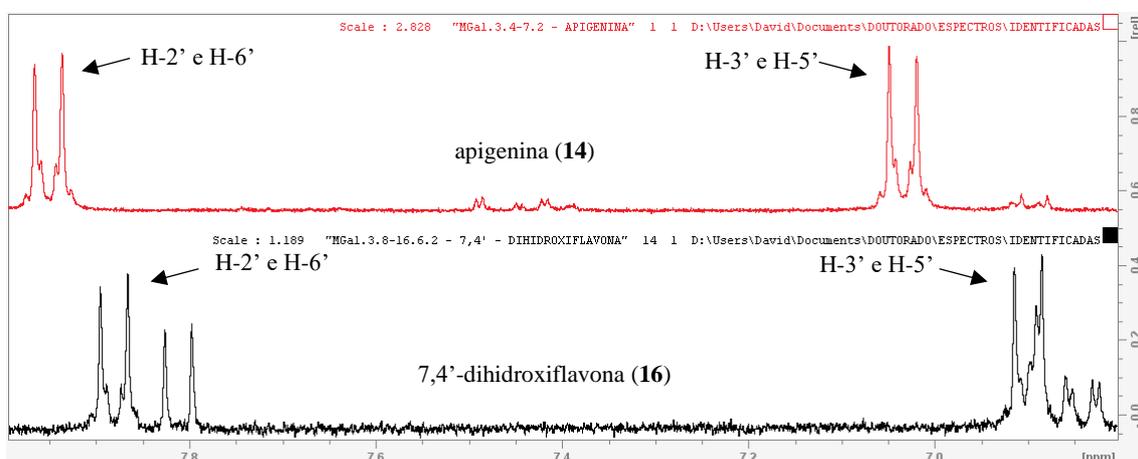


Figura 57. Exibição dos sinais de H-2'/H-6' e H-3'/H-5' das substâncias **14** e **16**.

A Figura 58 exibe as correlações obtidas por HMBC e COSY das flavononas. Nas Tabelas 26 e 27 podem ser observadas os deslocamentos de ^1H e ^{13}C das substâncias isoladas em comparação com dados da literatura científica.

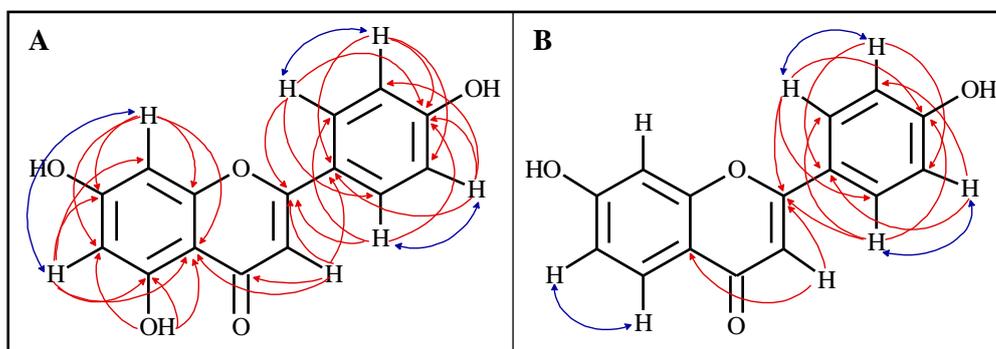


Figura 58. Correlação bidimensionais obtidas para identificação das substâncias **14** (A) e **16** (B). Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.

Tabela 26. Deslocamentos químicos de ^1H das substâncias **14** e **16**.

	Apigenina		7,4'-dihidroxi-flavona	
	Substância 14	Li <i>et al.</i> , 2020	Substância 16	Park <i>et al.</i> , 2007
^1H	Acetona- d_6 , 300 MHz	DMSO- d_6 , 400 MHz	DMSO- d_6 , 300 MHz	DMSO- d_6 , 600 MHz
H-3	6,64 (1H, s)	6,78 (1H, s)	6,67 (1H, s)	6,71 (1H, s)
H-5	-	-	7,81 (1H, d, $J = 8,6$ Hz)	7,86 (1H, d, $J = 8,7$ Hz)
H-6	6,26 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	6,19 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	6,84 (1H, dd, $J = 8,6$; 2,1 Hz)	6,89 (1H, d, $J = 8,7$; 2,2 Hz)
H-8	6,54 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	6,48 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	6,89 (1H, d, $J = 2,1$ Hz)	6,96 (1H, d, $J = 2,2$ Hz)
H-2'/H-6	7,94 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	7,92 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	7,88 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	7,90 (2H, d, $J = 8,7$ Hz)
H-3'/H-5	7,03 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	6,92 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	6,90 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	6,92 (1H, d, $J = 8,7$ Hz)
5-OH	13,02	12,95*	-	-

Legenda: * = referência de Milani *et al.*, 2020 em DMSO- d_6 , 400 MHz.

Tabela 27. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias **14** e **16**

	Apigenina		7,4'-dihidroxi-flavona	
	Substância 14	Li <i>et al.</i> , 2020	Substância 16	Park <i>et al.</i> , 2007
^{13}C	DMSO- d_6 , 75 MHz	DMSO- d_6 , 100 MHz	DMSO- d_6 , 75 MHz	DMSO- d_6 , 150 MHz
C-2	164,2	164,2	162,9	162,5
C-3	103,9	102,3	104,3	104,5
C-4	182,3	181,8	N.O.	176,3
C-5	163,3	157,3	126,8	126,5
C-6	98,8	98,8	115,9	114,8
C-7	164,3	163,7	N.O.	162,5
C-8	93,7	93,9	102,7	102,5
C-9	157,8	161,4	N.O.	157,4
C-10	104,3	103,7	115,7	116,1
C-1'	122,1	121,1	122,2	121,8
C-2'/C-6'	128,1	128,4	128,4	128,1
C-3'/C-5'	115,5	115,9	116,4	115,9
C-4'	161,2	161,1	161,2	160,7

Legenda: N.O. = Não observado nas análises.

5.7.6 Ácido 3,4-dihidroxi-benzoico, ácido-3-metóxi-4-hidroxi-benzoico e 3,4-dihidroxi-benzoato de metila

As substâncias **11**, **12** e **15** (Figura 59) demonstraram em seus espectros de RMN de ^1H , característica de anéis B de flavonoides com sistema ABX. Juntamente com ausência de sinais para H-6 e H-8, as análises bidimensionais revelaram se tratar de ácidos fenólicos.

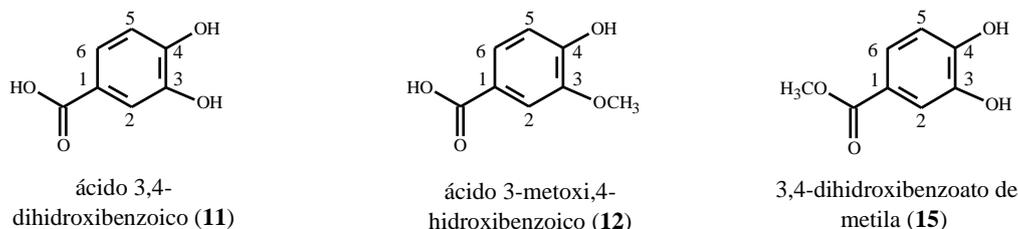


Figura 59. Estrutura química dos ácidos fenólicos **11**, **12** e **15** e enumerações de seus carbonos.

O ácido fenólico **11** exibiu sinais (Figura 60) em 7,31 ppm (1H, *s*.) referente ao H-2 do anel aromático, 7,26 ppm (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz) para H-6 e 6,75 ppm (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz) para H-5. Os H-2 e H-6 mostraram correlação por HMBC com a carbonila em 168,3 ppm, sugerindo a presença deste grupo ligado ao anel aromático. Após comparação com a literatura científica, a substância foi identificada como ácido 3,4-dihidroxi-benzoico/ácido protocatecuico.

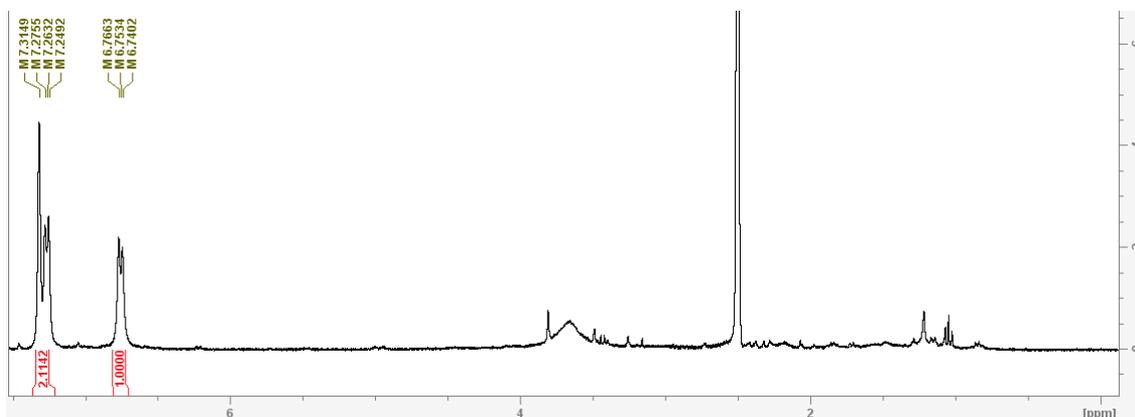


Figura 60. Espectro de RMN de ^1H da substância **11** em $\text{DMSO-}d_6$.

O espectro de RMN de ^1H da substância **12** mostrou sinais (Figura 61) em 7,41 ppm (1H, *s*) relativo ao H-2 do ácido fenólico, 7,39 ppm (1H, *m*) para H-6, 6,79 ppm (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz) para H-5 e 3,76 ppm (3H, *s*) característico de metoxila, a qual exibiu correlação com o C-3 em 147,3 ppm, inferindo a posição da mesma ao C-3 do anel benzeno. Os H-2 e H-6 correlacionaram por HMBC com a carbonila em 168,2 ppm, auxiliando na identificação da substância como ácido 3-metoxi,4-hidroxi-benzoico.

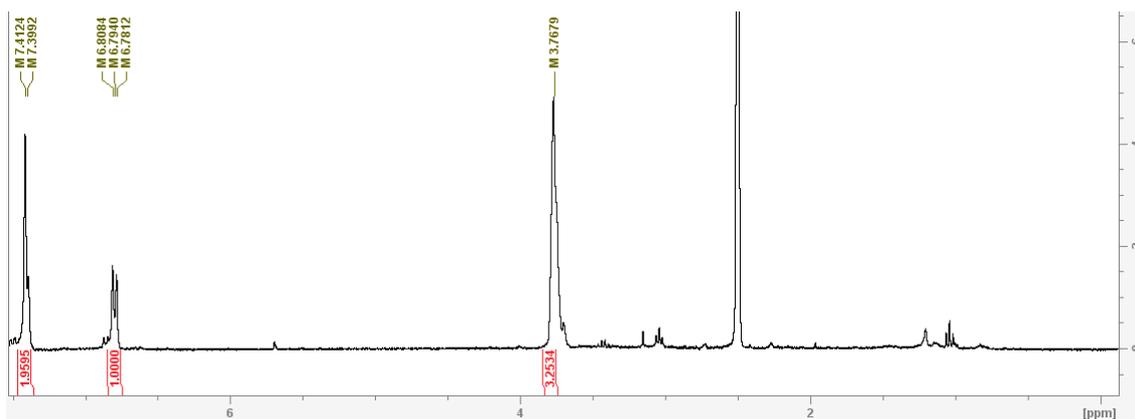


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H da substância **12** em $\text{DMSO-}d_6$.

A substância **15** mostrou sinais (Figura 62) em 7,48 ppm (1H, *d*, $J = 1,7$ Hz) relativo ao H-2, 7,42 ppm (1H, *dd*, $J = 8,2; 1,7$ Hz) para H-6, 6,88 ppm (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz) para H-5 e 3,80 ppm (3H, *s*) da metoxila, a qual mostrou correlação por HMBC com a carbonila em 166,7 ppm, sendo identificada como 3,4-dihidroxibenzoato de metila.

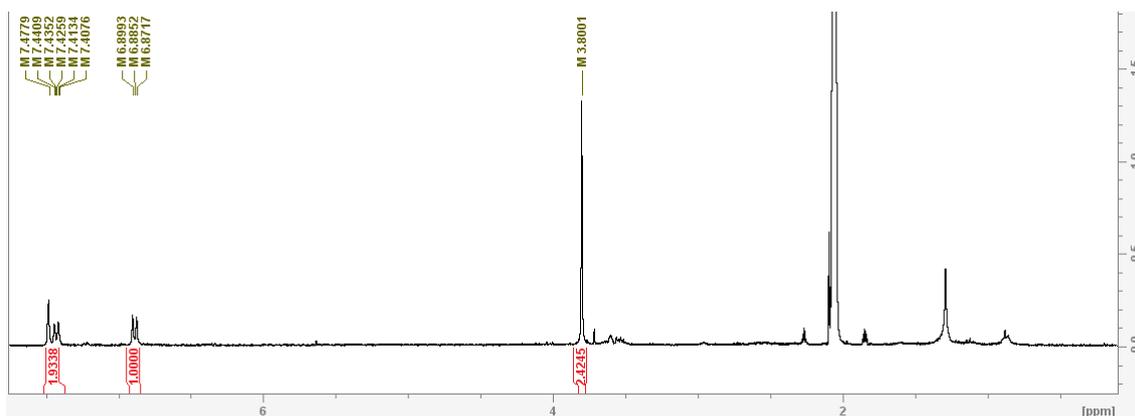


Figura 62. Espectro de RMN de ^1H da substância **15** em $\text{acetona-}d_6$.

É possível observar na Figura 63 que apesar de as três substâncias apresentarem sistema ABX, somente 3,4-dihidroxibenzoato de metila demonstrou o padrão de multiplicidade para os H-2 e H-6 como dupletos e duplo dupletos, respectivamente.

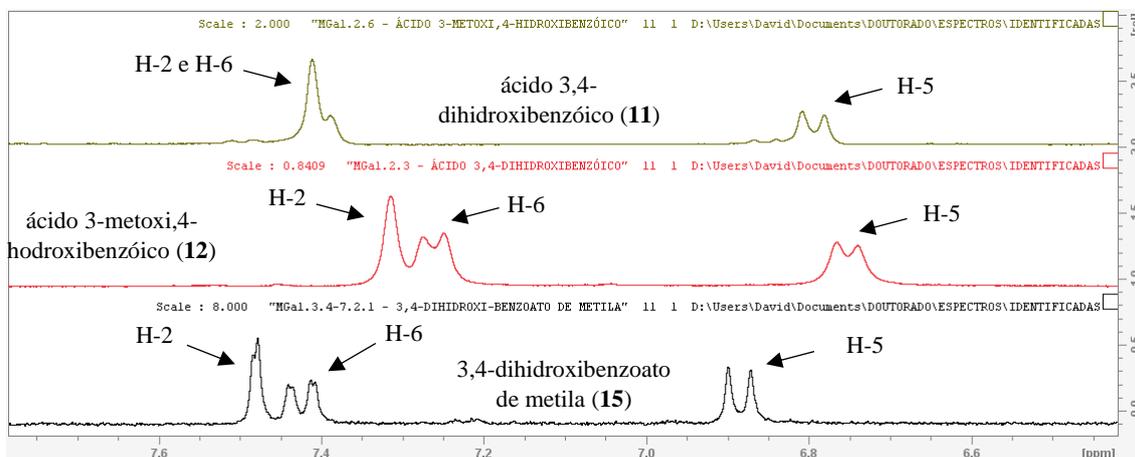


Figura 63. Comparação entre os H-2, H-5 e H-6 das substâncias **11**, **12** e **15**.

As correlações por HMBC e COSY são demonstradas na Figura 64. Os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C das substâncias são exibidos nas Tabelas 28 e 29.

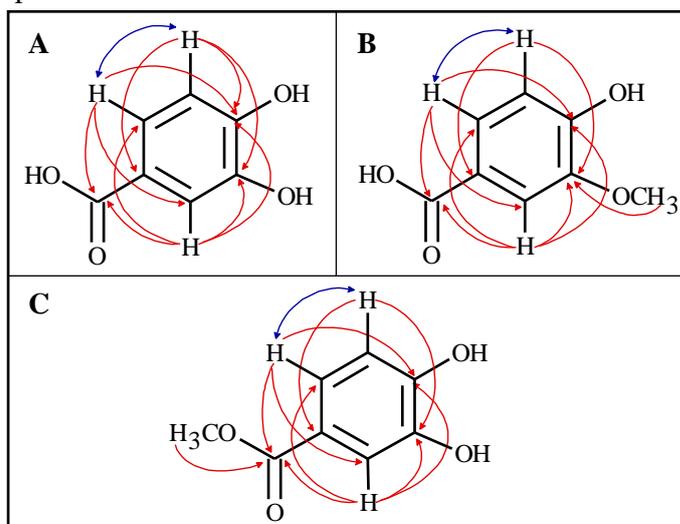


Figura 64. Correlação bidimensional obtidas para identificação das substâncias **11** (A), **12** (B) e **15** (C). Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.

Tabela 28. Deslocamentos químicos de ^1H das substâncias **11**, **12** e **15**.

	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico		Ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico		3,4-dihidroxibenzoato de metila	
	Substância 11	Miyazawa <i>et al.</i> , 2003b	Substância 12	Miyazawa <i>et al.</i> , 2003b	Substância 15	Miyazawa <i>et al.</i> , 2003a
^1H	DMSO- d_6 300 MHz	DMSO- d_6 500 MHz	DMSO- d_6 300 MHz	DMSO- d_6 500 MHz	Acetona- d_6 300 MHz	Acetona- d_6 500 MHz
H-2	7,31 (1H, s)	7,35 (1H, d, J = 2,0 Hz)	7,41 (1H, s)	7,46 (1H, d, J = 2,0 Hz)	7,48 (1H, d, J = 1,7 Hz)	7,39 (1H, d, J = 2,0 Hz)
H-5	6,75 (1H, d, J = 7,8 Hz)	6,80 (1H, d, J = 8,5 Hz)	6,79 (1H, d, J = 8,1 Hz)	6,85 (1H, d, J = 9,0 Hz)	6,88 (1H, d, J = 8,2 Hz)	6,80 (1H, d, J = 8,3 Hz)
H-6	7,26 (1H, d, J = 7,8 Hz)	7,30 (1H, dd, J = 8,5; 2,0 Hz)	7,39 (1H, m)	7,45 (1H, dd, J = 9,0; 2,0 Hz)	7,42 (1H, dd, J = 8,2; 1,7 Hz)	7,34 (1H, dd, J = 8,3; 2,0 Hz)
3-OCH ₃	-	-	3,76 (3H, s)	3,82 (3H, s)	-	-
CO-CH ₃	-	-	-	-	3,80 (3H, s)	3,80 (3H, s)

Tabela 29. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias **11**, **12** e **15**.

	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico		Ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico		3,4-dihidroxibenzoato de metila	
	Substância 11	Miyazawa <i>et al.</i> , 2003b	Substância 12	Miyazawa <i>et al.</i> , 2003b	Substância 15	Miyazawa <i>et al.</i> , 2003a
^{13}C	DMSO- d_6 75 MHz	DMSO- d_6 125 MHz	DMSO- d_6 75 MHz	DMSO- d_6 125 MHz	Acetona- d_6 75 MHz	Acetona- d_6 125 MHz
C-1	122,1	121,9	123,9	123,4	121,6	122,0
C-2	116,6	116,7	112,9	113,2	116,2	117,0
C-3	145,1	144,9	147,3	151,1	144,9	145,0
C-4	150,1	150,0	150,5	147,2	150,2	150,0
C-5	115,0	116,3	114,9	115,1	114,8	115,0
C-6	121,7	121,9	123,4	121,8	122,2	123,0
CH ₃	-	-	55,6	55,7	51,0	51,0
CO	168,3	167,2	168,2	167,0	166,7	166,0

5.7.7 Lupeol, β -amirina, 24-metilenocicloartanol e friedelina

As substâncias **19**, **20**, **21** e **22** (Figura 65) mostraram características de terpenoides em seus espectros de RMN de ^1H obtidos em CHCl_3-d , com sinais finos característicos de metilas na região mais blindada do espectro.

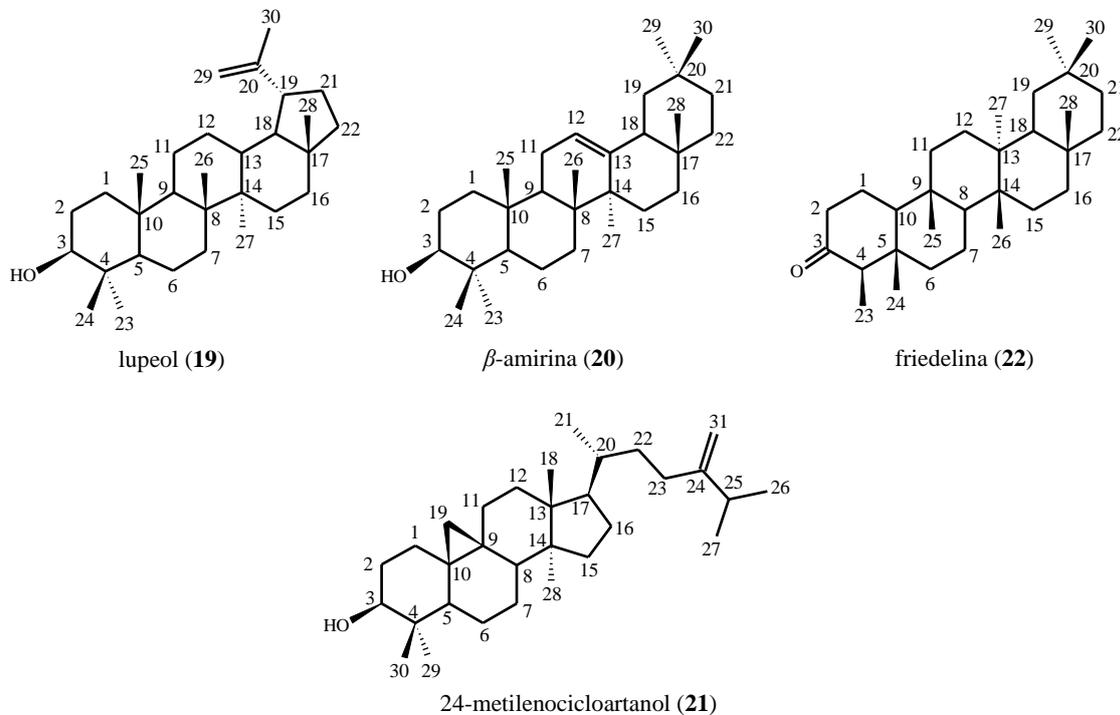


Figura 65. Estrutura química das substâncias **19**, **20**, **21** e **22** e enumerações de seus carbonos.

As substâncias **19**, **20** e **21** foram inicialmente isoladas em misturas e o espectro de ^1H da mistura foi obtido e exibido da Figura 66, onde é possível verificar a presença de pelo menos 4 substâncias pelos sinais de hidrogênios característicos de ligações duplas isoladas pelo espectro de ^1H . Após a purificação por CLAE, as substâncias **19**, **20** e **21** puderam ser analisadas por RMM separadamente.

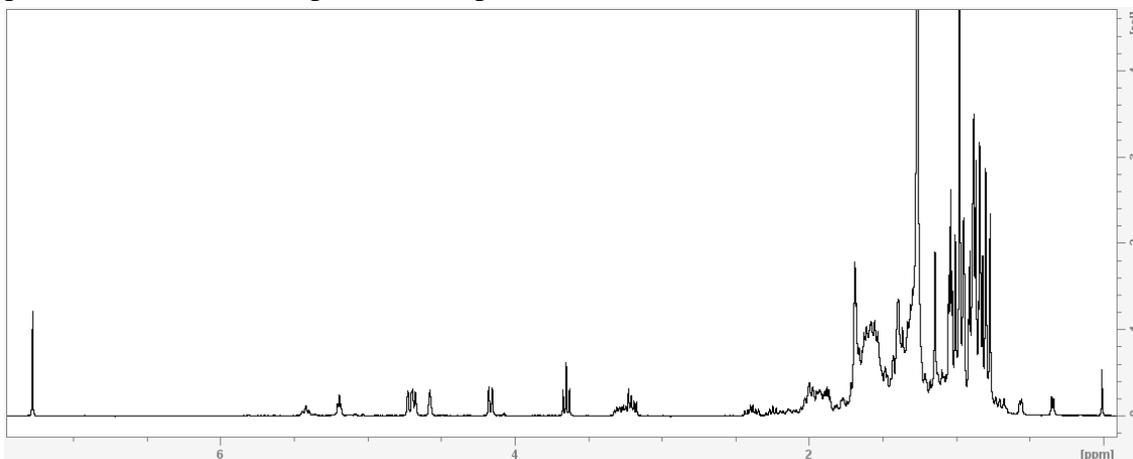


Figura 66. Espectro de RMN de ^1H da fração MFH3-4.1 em CHCl_3-d .

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou 4 pares de carbonos na região de 100 – 160 ppm, garantindo a presença de pelo menos uma ligação dupla para cada terpenoide (Figura 67).

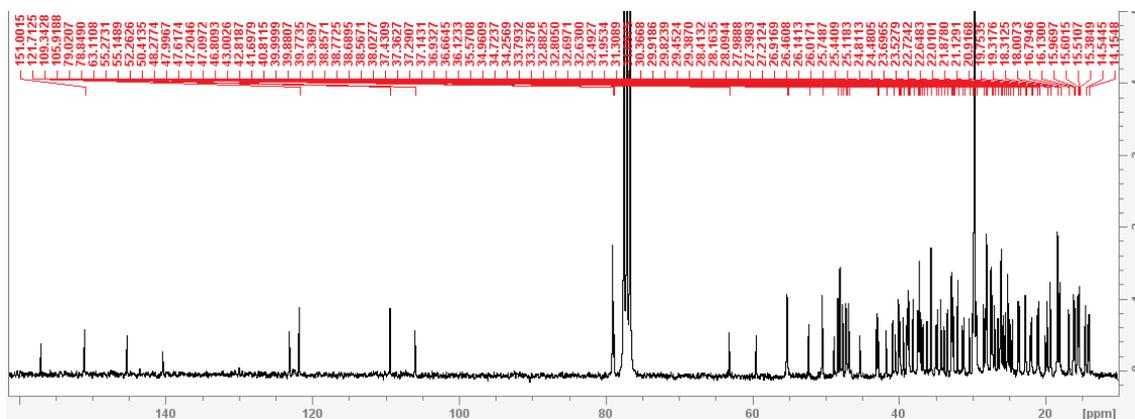


Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C da fração MFH3-4.1 em CHCl_3-d .

O espectro de RMN de ^1H (Figura 68) da substância **19** mostrou dois multipletos com integral para 1H cada em 4,69 e 4,57 ppm característico de hidrogênios ligados ao C-29 em estruturas do tipo lupano. Estes mesmos mostraram estar ligados ao carbono em 109,3 ppm, e adicionalmente à presença do carbono em 150,9 ppm (C-20) foram cruciais para a identificação.

Foi possível indicar a presença de uma $\beta\text{-OH}$ em C-3 na estrutura devido ao multiplete em 3,20 ppm ligado ao carbono em 78,9, característico deste grupo em triterpenos e esteroides. Sinais com integrais para 3H na região blindada do espectro confirmaram a presença de metilas em 1,69 (s, H-30), 1,03 (s, H-26), 0,97 (s, H-27), 0,95 (s, H-23), 0,83 (s, H-25), 0,79 (s, H-28) e 0,77 ppm (s, H-24).

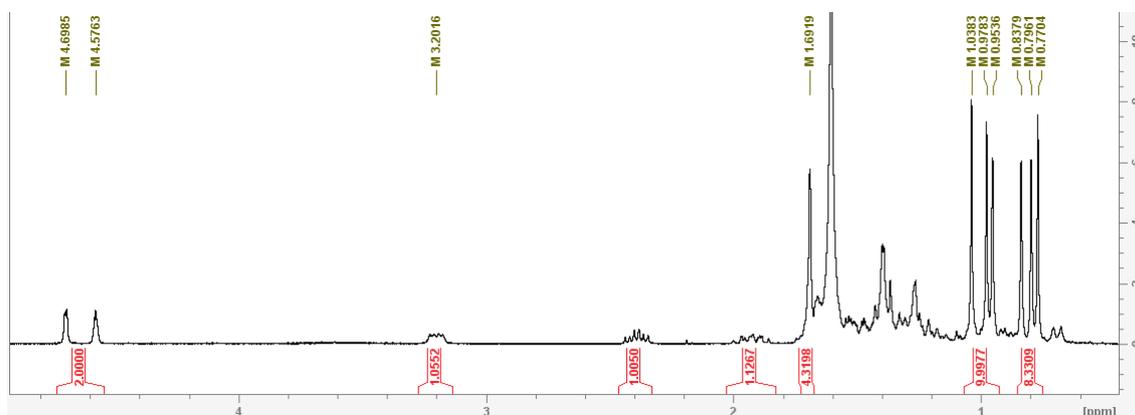


Figura 68. Espectro de RMN de ^1H expandido da substância **19** em CHCl_3-d .

Comparando com os dados da literatura científica (ALEXANDRE *et al.*, 2023), foi possível identificar a substância **19** como o lupeol.

Em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 69), a substância **20** mostrou um sinal em 5,18 ppm (1H, *t*, $J = 3,5$ Hz). Este hidrogênio mostrou estar ligado ao carbono 121,6 ppm e juntamente com a presença de um carbono em 145,1 ppm, sugeriram ser os C-12 e C-13 de estruturas de terpenoides dos tipos oleanano ou ursano. Um multipletto em 3,23 ppm ligado ao carbono 78,9 indicou uma β -OH em C-3.

Sinais com integrais para 3H na região blindada do espectro confirmaram a presença de metilas em 1,13 (*s*, H-27), 1,00 (*s*, H-28), 0,97 (*s*, H-23), 0,94 (*s*, H-24) 0,83 (*s*, H-26), 0,87 (*s*, H-29), 0,79 (*s*, H-25) e 0,87 ppm (*s*, H-30).

Os demais dados comparados com a literatura científica (ALEXANDRE *et al.*, 2023) possibilitou a identificação da substância **20** como o β -amirina.

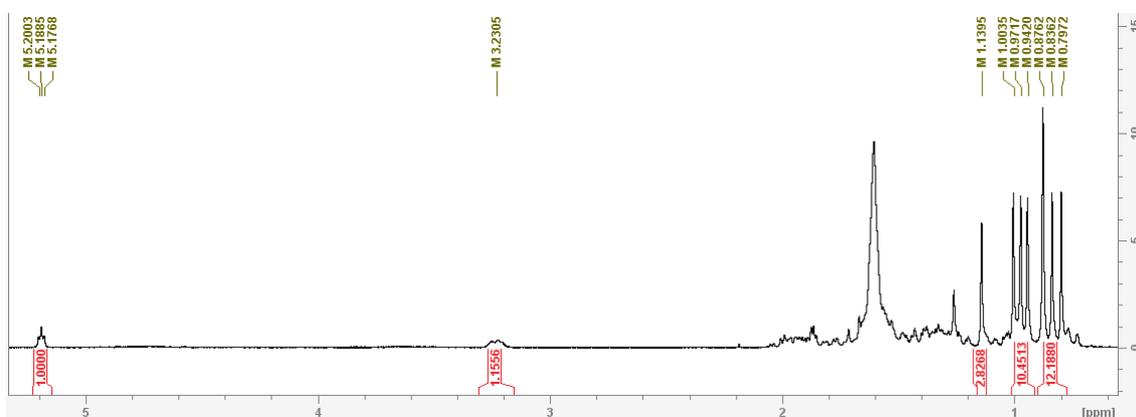


Figura 69. Espectro de RMN de ^1H expandido da substância **20** em CHCl_3 -*d*.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 70) da substância **21** mostrou dois sinais multipletos com integrais para 1H cada em 4,71 e 4,66 ppm. Estes hidrogênios mostraram estar ligados ao carbono 105,9 ppm e em conjunto com o carbono em 156,9 ppm sugeriram característica de um grupo olefínico terminal. Foi constatada a presença de uma β -OH em C-3 pela presença do multipletto em 3,28 ppm do hidrogênio ligado ao carbono 78,8 ppm.

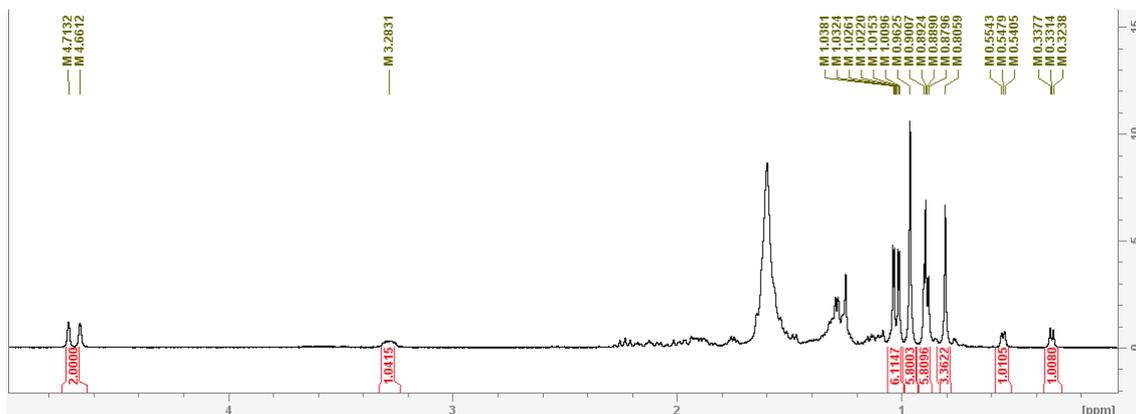


Figura 70. Espectro de RMN de ^1H expandido da substância **21** em CHCl_3 -*d*.

O espectro mostrou a presença de 7 metilas com integrais para 3H cada e sinais em 1,02 (*d*, *J* = 6,8 Hz, H-26), 1,02 (*d*, *J* = 6,8 Hz, H-27), 0,96 (*s*, H-30), 0,96 (*s*, H-18) 0,89 (*s*, H-28), 0,88 (*d*, *J* = 6,3 Hz, H-21), 0,80 ppm (*s*, H-29), confirmando se tratar de um triterpeno.

Os dupletos em 0,54 (1H, *J* = 4,1 Hz, H-19_a) e 0,33 ppm (1H, *J* = 4,1 Hz, H-19_b), ambos ligados ao carbono 29,8 ppm (C-19) sugeriu que o triterpeno possuía um anel de três membros em sua estrutura.

O espectro de ¹³C da substância **21** (Figura 71) exibiu dois carbonos olefínicos em 105,9 e 156,9 ppm, característicos de ligações duplas terminais. Os dados obtidos das análises por RMN em comparação com a literatura científica (MUHIT *et al.*, 2019), possibilitou a identificação da substância **21** como 24-metilenocicloartanol.

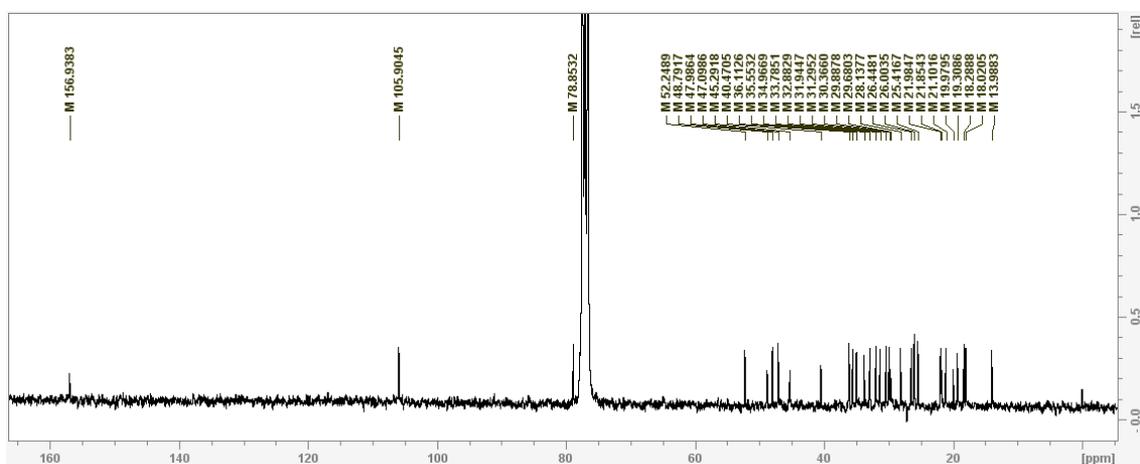


Figura 71. Espectro de ¹³C da substância **21** em CHCl₃-*d*.

As substâncias **22** e **23** foram analisadas por RMN de ¹H (Figura 72) em misturas na proporção de 6:1 resolvida pelas integrais de seus sinais. Para melhor visualização dos sinais, as expansões foram realizadas separadamente, uma vez que seus deslocamentos químicos não se sobrepõem.

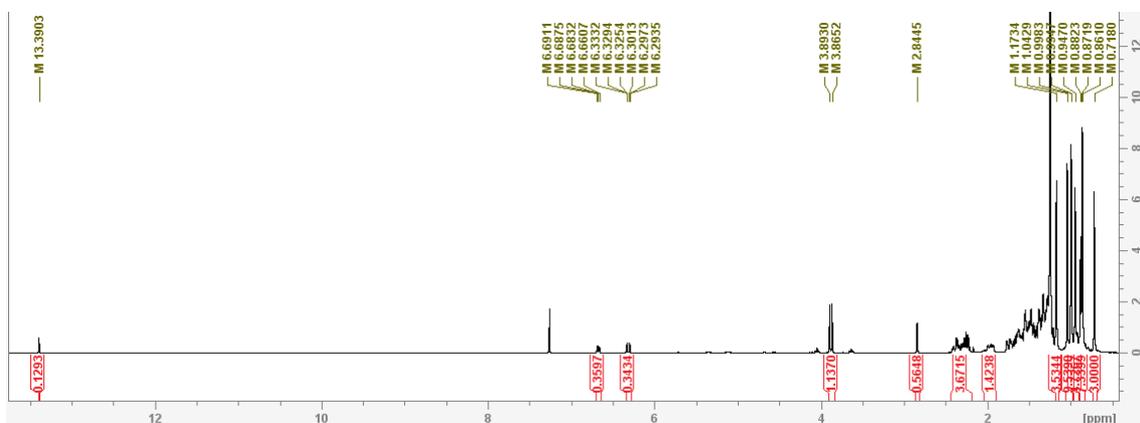


Figura 72. Espectro de RMN de ¹H geral da mistura das substâncias **22** e **23** em CHCl₃-*d*.

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 73) da substância **22** não mostrou presença de grupos olefínicos, mas mostrou 8 sinais na região blindada com integrais para 3H cada em 1,17 (s, H-28), 1,07 (s, H-27), 0,99 (s, H-29), 0,99 (s, H-26) 0,94 (s, H-30), 0,87 (d, $J = 6,3$ Hz, H-23), 0,86 (s, H-25) e 0,71 ppm (s, H-24), sugerindo ser um triterpeno.

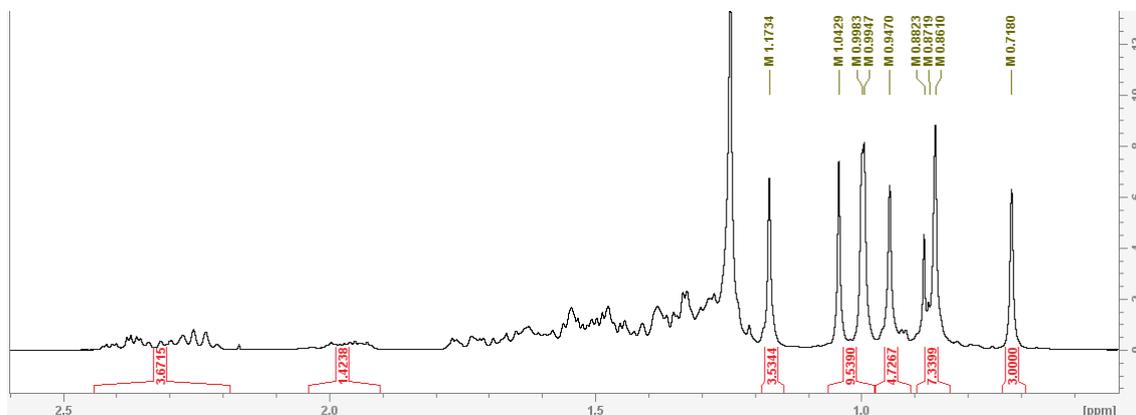


Figura 73. Espectro de RMN de ^1H expandido na região característica de triterpenos da substância **22**.

Os sinais não mostraram presença de grupo $\beta\text{-OH}$ na posição C-3, porém o espectro de ^{13}C (Figura 74) mostrou sinal de grupo carbonila em 213,3 ppm e em adição ao carbono da metila em 6,8 ppm (C-23), confirmou ser um triterpeno com esqueleto do tipo friedelano. Os demais dados foram comparados com a literatura científica (PEDROZA *et al.*, 2020), sendo possível identificar a substância **22** como a friedelan-3-ona (friedelina).

As comparações dos ^{13}C das substâncias com a literatura científica para identificação das mesmas podem ser visualizadas na Tabela 30.

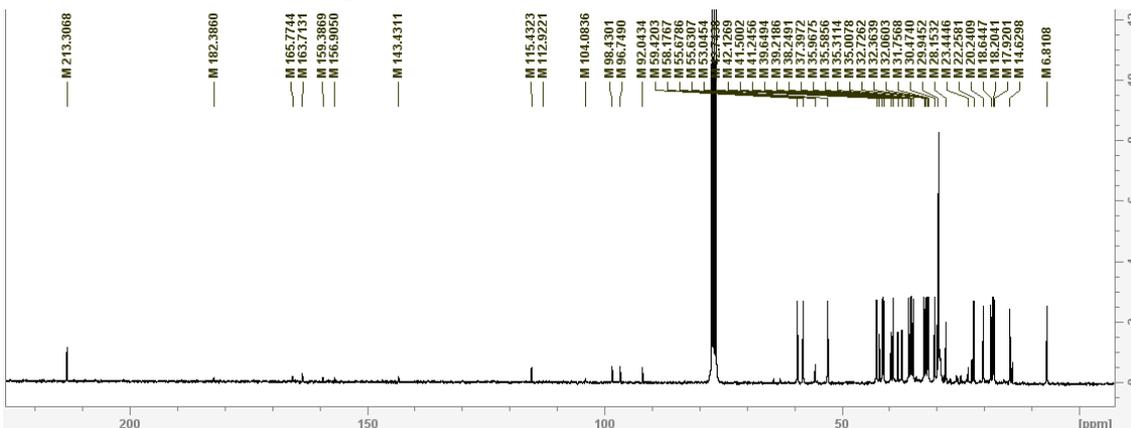


Figura 74. Espectro de ^{13}C da mistura das substâncias **22** e **23**.

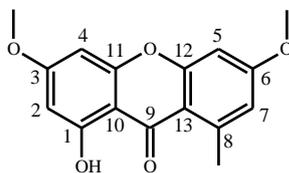
As integrais dos sinais de hidrogênios permitiram prever que as substâncias estavam em uma proporção de 6:1 das substâncias de **22/23**.

Tabela 30. Deslocamentos químicos de ^{13}C das substâncias **19**, **20**, **21** e **22**.

^{13}C	Lupeol		β -amirina		24-metilenocicloartenol		Friedelina	
	Substância 19	Alexandre, <i>et al.</i> , 2023	Substância 20	Alexandre, <i>et al.</i> , 2023	Substância 21	Muhit <i>et al.</i> , 2019	Substância 22	Pedroza <i>et al.</i> , 2020
	CDCl_3 , 75 MHz	CDCl_3 , 75 MHz	CDCl_3 , 75 MHz	CDCl_3 , 75 MHz	CDCl_3 , 75 MHz	CDCl_3 , 125 MHz	CDCl_3 , 75 MHz	CDCl_3 , 75 MHz
C-1	38,6	38,7	38,5	38,7	31,9	32,1	22,2	22,3
C-2	27,3	27,4	27,1	27,4	30,3	30,5	45,1	41,5
C-3	78,9	79,0	78,9	79,0	78,8	78,9	213,0	213,1
C-4	38,6	38,8	38,7	38,5	40,4	40,6	58,1	58,3
C-5	55,2	55,2	55,1	55,2	47,0	47,2	42,1	42,1
C-6	18,0	18,3	18,2	18,3	21,1	21,2	41,2	41,3
C-7	34,2	34,2	32,8	32,6	28,1	26,1	18,2	18,3
C-8	40,7	40,8	38,8	38,8	47,9	48,0	53,0	53,1
C-9	50,3	50,4	47,5	47,6	19,9	20,1	37,3	37,5
C-10	36,9	37,1	36,9	37,1	26,0	26,2	59,4	59,3
C-11	20,8	20,9	23,5	23,6	26,0	26,6	35,5	35,6
C-12	25,1	25,1	121,6	121,7	35,3	33,0	30,4	30,5
C-13	37,9	38,0	145,1	145,2	45,2	45,4	39,6	39,7
C-14	42,7	42,8	41,6	41,7	48,7	48,9	38,2	38,3
C-15	27,3	27,4	26,1	26,1	32,8	35,7	32,3	32,4
C-16	35,5	35,5	26,8	26,9	26,4	28,2	35,9	36,0
C-17	42,9	42,8	32,4	32,4	52,2	52,4	29,9	30,0
C-18	48,2	48,2	47,2	47,2	18,0	18,1	42,7	42,8
C-19	47,9	47,9	46,8	46,8	29,8	29,9	35,3	35,3
C-20	150,9	151,0	31,0	31,0	36,1	36,2	28,1	28,2
C-21	29,7	29,8	34,6	34,7	18,2	18,4	32,7	32,8
C-22	39,8	39,9	37,2	37,1	34,9	35,1	39,2	39,3
C-23	27,9	27,9	28,4	28,4	31,2	31,5	6,8	6,8
C-24	15,4	15,3	15,5	15,5	156,9	157,0	14,6	14,7
C-25	16,1	16,1	15,6	15,6	33,7	33,9	17,9	17,9
C-26	16,1	15,9	16,7	16,7	21,8	22,1	20,2	20,3
C-27	14,5	14,5	25,9	26,0	21,9	21,9	18,6	18,6
C-28	18,0	18,0	28,4	28,4	19,3	25,5	32,0	32,1
C-29	109,3	109,3	33,3	33,3	13,9	14,2	31,7	35,0
C-30	19,3	19,3	23,6	23,6	25,4	19,4	35,0	31,8
C-31	-	-	-	-	105,9	106,0	-	-

5.7.8 Lichexantona

A substância **23** (Figura 75) foi isolada em mistura com a substância **22**, porém seus sinais minoritários nos espectros mostraram se tratar de uma substância de classe química diferente dos terpenoides.



lichexantona (**23**)

Figura 75. Estrutura química da substância **23** e enumerações de seus carbonos.

O espectro de ^1H (Figura 76) da substância **23** mostrou em sinais na região de hidrogênios aromáticos com duplete em 6,68 (1H, $J = 2,3$ Hz) e multipletto em 6,66 ppm (m , 1H) característicos dos H-5 e H-7 em xantonas. Outros dois dupletos em 6,32 (1H, $J = 2,3$ Hz) e 6,29 ppm (1H, $J = 2,3$ Hz) sugeriram ser os H-4 e H-2 da estrutura praticamente simétrica.

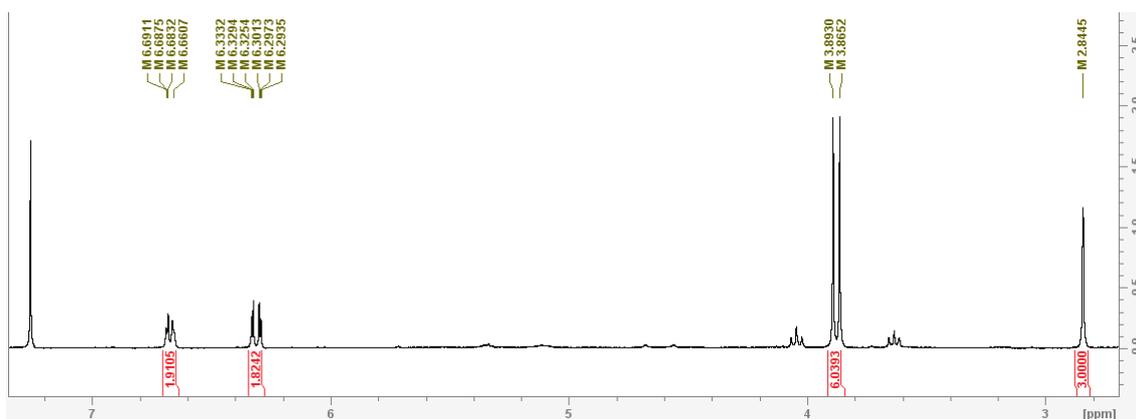


Figura 76. Espectro de RMN de ^1H das substâncias **22** e **23**. Expandido na região dos sinais da substância **23**.

Expandindo a região dos sinais de ^1H (Figura 77) é possível observar o multipletto de H-7 em 6,66 ppm, o qual acopla em 4J com os H-8 da metila. Os H-5, H-4 e H-2 mostraram características de acoplamentos de padrão *meta*.

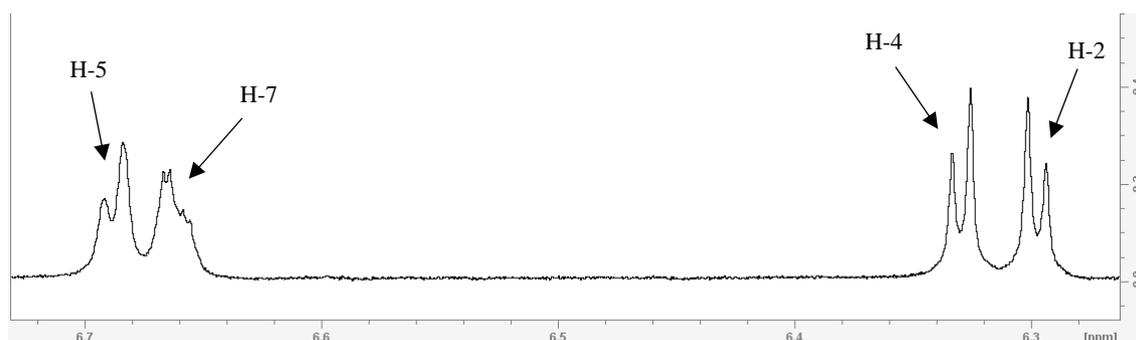


Figura 77. Espectro da substância **23** expandido nos sinais dos H-2, H-4, H-5 e H-7.

Duas metoxilas em 3,89 (3H, s) e 3,86 (3H, s) ppm e uma metila em 2,84 ppm finalizaram os sinais da estrutura. A presença de simpleto em 13,39 ppm no espectro confirmou o grupo hidroxila, a qual forma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila próximo, mostrada pelo espectro de RMN de ^{13}C como o carbono em 182,3 ppm, sugerindo a estrutura da classe das xantonas.

As análises de RMN confirmaram as posições das metoxilas que estavam ligadas em C-3 e C-6 pelas correlações de HMBC em 3,86 com 165,8 ppm (C-3) e 3,89 com 163,9 ppm (C-6). A metila em 2,84 ppm mostrou correlação por HMBC com o carbono em 143,4 ppm (C-8), confirmando sua posição em C-8. Em comparação com a literatura científica, a substância foi identificada como lichexantona (DÍAZ, *et al.*, 2010).

A Figura 78 representa as correlações por HMBC e COSY, enquanto é possível verificar os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C comparados com a literatura científica na Tabela 31.

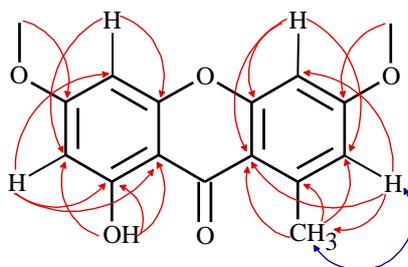


Figura 78. Correlação bidimensionais obtidas para identificação da substância **23**. Setas em vermelhas assinalam experimentos de HMBC e em azul, COSY.

Tabela 31. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da substância **23**.

	Lichexantona				
	Substância 23	Díaz <i>et al.</i> , 2010		Substância 23	Díaz <i>et al.</i> , 2010
^{13}C	CDCl_3 , 75 MHz	CDCl_3 , 100 MHz	^1H	CDCl_3 , 300 MHz	CDCl_3 , 400 MHz
C-1	163,7	163,8	-	-	-
C-2	96,7	96,8	H-2	6,29 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	6,29 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)
C-3	165,7	165,9	-	-	-
C-4	92,0	92,1	H-4	6,32 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	6,32 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)
C-5	98,3	98,5	H-5	6,68 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	6,65 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)
C-6	163,7	163,7	-	-	-
C-7	115,3	115,4	H-7	6,66 (1H, <i>m</i>)	6,67 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)
C-8	143,4	143,8	-	-	-
C-9	182,3	182,7	-	-	-
C-10	104,1	104,3	-	-	-
C-11	156,9	157,0	-	-	-
C-12	159,3	159,5	-	-	-
C-13	112,9	113,0	-	-	-
8-CH ₃	23,4	23,4	8-CH ₃	2,84	2,84
3-OCH ₃	55,6	55,6	3-OCH ₃	3,86	3,86
6-OCH ₃	55,6	55,7	6-OCH ₃	3,89	3,89
-	-	-	1-OH	13,39	13,39

5.8 Grupos 5-OH dos flavonoides

Na Tabela 32 estão dispostos os deslocamentos químicos dos grupos 5-OH das substâncias obtidas neste trabalho. Quando analisados os deslocamentos de seus hidrogênios, percebemos semelhanças nos valores das agliconas luteína, crisoeriol e apigenina com leve deslocamento de apigenina (0,01 ppm) para região blindada.

Em acetona- d_6 , 5-OH de luteína apareceu em 13,03 ppm em comparação ao DMSO- d_6 com valor para luteína em 12,97 ppm, produzindo uma diferença de 0,06 ppm (CUONG, *et al.*, 2019). Esta breve comparação exemplifica o efeito do solvente atuando nos deslocamentos químicos. Ao comparar o valor de 5-OH de luteína-3'-*O*-ramnosídeo (12,94 ppm) com a aglicona em DMSO- d_6 verificamos um deslocamento para região blindada do espectro de 0,03 ppm.

Tabela 32. Deslocamento químico dos hidrogênios dos grupos 5-OH dos flavonoides.

Substância	5-OH (ppm)	Solvente
Luteína (18)	13,03	acetona- d_6
Crisoeriol (13)	13,03	acetona- d_6
Luteína-3'- <i>O</i> -ramnosídeo (1)	12,94	DMSO- d_6
Neoastilbina (2)	11,72	DMSO- d_6
Astilbina (3)	11,81	DMSO- d_6
Neoisostilbina (4)	11,90	DMSO- d_6
Isoastilbina (5)	11,80	DMSO- d_6
Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (6)	12,64	DMSO- d_6
Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (7)	12,56	DMSO- d_6
Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo (9)	12,62	DMSO- d_6
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo (8)	12,53	DMSO- d_6
Kaempferol-7- <i>O</i> -rutinosídeo (10)	12,41	DMSO- d_6
Apigenina (14)	13,02	acetona- d_6

Os diastereoisômeros neoastilbina, astilbina, neoisoastilbina e isoastilbina, demonstraram com eficácia a diferença nos deslocamentos de 5-OH das flavanonas em comparação com flavonas e flavonóis. Todas as flavanonas apresentaram deslocamentos químicos deslocados para região blindada do espectro (abaixo de 12 ppm).

O fator crucial desta diferença se dá pela ausência da ligação dupla entre C-2 e C-3, atuando em conjugação com a carbonila em C-4 e fortalecendo a ligação de hidrogênio com 5-OH devido a polarização no anel C em flavonas e flavonóis. Outro fator pode estar relacionado à interação dos grupos carbonilas em C-4 com os hidrogênios dos açúcares estudada por Britto *et al.* (1995), enfraquecendo a efetividade da ligação de hidrogênio com os 5-OH.

Ao compararmos os glicosídeos de quercetina com a aglicona inferida por Cuong *et al.* (2019) com 12,48 ppm em DMSO- d_6 para seu 5-OH, observamos um deslocamento para região desblindada do espectro para os 5-OH nos glicosídeos. Quercetina-3-*O*-ramnosídeo desloca 0,16 ppm, enquanto quercetina-3-*O*-glicosídeo 0,14 ppm e quercetina-3-*O*-rutinosídeo 0,08 ppm. Esta análise conclui que a presença do grupo mais apolar ligada à mesma posição no flavonoide permite que os valores de 5-OH sejam deslocados com mais facilidade pelo grupo carbonila em C-4.

Apesar de não ser o foco de seu trabalho, Primikyri *et al.* (2015) obteve espectro de quercetina em acetona- d_6 e obteve valor de 5-OH em 12,51 ppm, com 0,03 ppm para região desblindada do espectro em comparação ao obtido em DMSO- d_6 por Cuong *et al.*, (2019), garantindo o efeito de solvente para o valor de 0,03 ppm entre estes dois solventes deuterado nos 5-OH de flavonas e flavonóis.

Kaempferol-3-*O*-rutinosídeo produziu valor de 5-OH em região desblindada (12,53 ppm) em comparação com kaempferol-7-*O*-rutinosídeo (12,41 ppm). A diferença gerada foi de 0,08 ppm, podendo ser atribuída à presença de 3-OH em kaempferol-7-*O*-rutinosídeo, o qual também realiza ligação de hidrogênio com o grupo carbonila em C-4, diminuindo a força de desproteção do hidrogênio de 5-OH.

5.9 Deslocamentos químicos dos ^{13}C dos açúcares dos flavonoides

Neoastilbina, astilbina, neoisoastilbina e quercetina-3-*O*-ramnosídeo mostraram deslocamentos químicos de C-1'' acima de 100,0 ppm, diferente de isoastilbina (98,5 ppm) e luteolina-3'-*O*-ramnosídeo (99,5 ppm) com C-1'' mais deslocado para região blindada, inferindo que a conformação 2*S*,3*R* de isoastilbina e a posição C-3' de luteolina-3'-*O*-ramnosídeo protegem ligeiramente mais os C-1'' de ramnoses. A Tabela 33 exhibe os deslocamentos químicos das porções glicosídicas dos flavonoides dos flavonoides.

Ao compararmos luteolina-3'-*O*-ramnosídeo com luteolina obtido em DMSO- d_6 por Cuong *et al.* (2015) – 113,3 ppm (C-2'), 149,7 ppm (C-4'), 116,0 (C-5') e 119,0 (C-6'), observamos os deslocamentos químicos dos C-2', C-4', C-5' e C-6' para região desblindada. O C-4' (154,6 ppm) de luteolina-3'-*O*-ramnosídeo foi o mais afetado pela presença da ramnose com 4,9 ppm para região desblindada, seguido por C-2' (3,0 ppm), C-6' (3,0 ppm) e C-5' (1,2 ppm).

Estas duas análises anteriores corroboram para o fato de o deslocamento eletrônico estar deslocado em sentido à porção da ramnose, onde a proteção de C-1'' é resultante do fluxo eletrônico de C-2', C-5' e C-6' em luteolina-3'-*O*-ramnosídeo.

Tabela 33. Deslocamento químico dos ^{13}C dos glicosídeos de flavonoides isolados

Substância	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Luteolina-3'- <i>O</i> -ramnosídeo (1)	99,5 ^R	70,0 ^R	70,1 ^R	71,8 ^R	69,2 ^R	17,7 ^R
Neostilbina (2)	101,4 ^R	70,3 ^R	70,3 ^R	71,4 ^R	69,1 ^R	17,8 ^R
Astilbina (3)	100,1 ^R	70,2 ^R	70,3 ^R	71,7 ^R	69,1 ^R	17,8 ^R
Neoisostilbina (4)	100,3 ^R	69,7 ^R	70,2 ^R	71,3 ^R	68,9 ^R	17,3 ^R
Isoastilbina (5)	98,5 ^R	69,9 ^R	69,9 ^R	71,1 ^R	69,0 ^R	17,6 ^R
Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (6)	101,9 ^R	70,1 ^R	70,4 ^R	71,2 ^R	70,7 ^R	17,6 ^R
Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo (9)	100,7 ^G	73,9 ^G	76,3 ^G	69,7 ^G	77,3 ^G	60,8 ^G
Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (7)	101,1 ^G	74,1 ^G	76,1 ^G	70,4 ^G	75,8 ^G	66,9 ^G
	100,7 ^R	70,3 ^R	69,9 ^R	71,4 ^R	68,1 ^R	17,6 ^R
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo (8)	101,3 ^G	74,1 ^G	76,6 ^G	70,5 ^G	75,8 ^G	66,9 ^G
	100,7 ^R	70,3 ^R	69,9 ^R	71,8 ^R	68,0 ^R	17,6 ^R
Kaempferol-7- <i>O</i> -rutinosídeo (10)	102,3 ^G	74,6 ^G	76,5 ^G	70,9 ^G	76,1 ^G	67,5 ^G
	101,2 ^R	70,7 ^R	70,2 ^R	72,2 ^R	68,8 ^R	18,1 ^R

Legenda: R = ramnose, G = glicose.

Este mesmo efeito de proteção ou blindagem é menos efetivo nos demais flavonoides com glicosídeos nas posições C-3 e C-7. Em destaque, kaempferol-7-*O*-rutinosídeo mostrou maior desproteção de C-1'' (102,3 ppm) para região desblindada do espectro, seguido de quercetina-3-*O*-ramnosídeo (101,9 ppm).

Por sua vez, o C-1'' de quercetina-3-*O*-ramnosídeo mostrou estar mais desprotegido que o C-1'' (100,7) de quercetina-3-*O*-glicosídeo, em comparação aos substituintes de mesma posição. Logo se observa no grupo glicose maior disputa de deslocalização eletrônica com o anel C do flavonoide que o grupo ramnose. O fato de ser mais polar que ramnose, influencia este efeito na glicose, o qual se estende aos C-2 e C-3 do anel C, com deslocamentos para região blindada do espectro de 1,0 ppm para ambos (156,3 e 133,2 ppm) em comparação com o flavonoide ramnosilado (157,3 e 134,2 ppm).

Os glicosídeos de quercetina apresentaram deslocamento ~ 10 ppm para região desblindada de seus C-2 e ~ 1,5 ppm para região blindada de seus C-3 em comparação com sua aglicona (C-2, 146,8 ppm e C-3, 135,7 ppm) reportada por Cuong *et al.* (2019).

Este fato prova que as porções dos glicosídeos na posição C-3 atuam fortemente desprotegendo os C-2 de suas agliconas. Por outro lado, protegem mais seus C-3, provavelmente diminuindo o efeito de ressonância entre os C-2, C-3 e C-4, deslocalizando para o açúcar parte deste efeito. A mesma analogia é empregada para os rutinosídeos de kaempferol comparado à sua aglicona (MILENKOVIĆ *et al.*, 2019).

5.10 Considerações acerca das análises por RMN

Todas as substâncias foram devidamente comparadas com a literatura científica para correta identificação de suas estruturas químicas. Com exceção dos esteroides, todas as substâncias foram analisadas por HSQC para confirmação das correlações C-H (1J). As análises por HMBC foram suficientes para obtenção dos valores dos carbonos quaternários da maioria dos flavonoides. Todos os espectros podem ser visualizados na seção **Anexos** deste trabalho.

As substâncias neoastilbina (**2**), astilbina (**3**), neoisoastilbina (**4**), isoastilbina (**5**), quercetina-3-*O*-ramnosídeo (**6**) e kaempferol-7-*O*-rutinosídeo (**10**) foram as únicas substâncias da classe dos flavonoides com análises de ^{13}C obtidas para averiguação precisa de alguns deslocamentos químicos sem comprometer a correta identificação.

Quando observados por HMBC, os H-6 e H-8 em algumas análises podem correlacionar tantos com os C-5, C-7, quanto com C-9 gerando sinais muito próximos e às vezes indistinguíveis. Como exemplo, os carbonos das posições C-9 dos quatro diastereoisômeros **3**, **4**, **5** e **6** apareceram todos próximos a 162 ppm, sendo esses valores de deslocamentos químicos comuns para esses dihidroflavonoides, porém são próximos dos valores de C-5 e C-7.

O kaempferol-7-*O*-rutinosídeo (**10**) mostrou por HMBC correlações dos hidrogênios H-8 e H-6 com carbonos próximos a 102 ppm, sendo distinguidos por ^{13}C como 102,3 e 102,7 ppm. Desta forma foi possível confirmar que H-8 além de estar acoplado com C-9 estava acoplado também com 102,3 que pertencia ao C-1' da glicose, inferindo a posição de ligação da porção do glicosídeo ao flavonoide pelo C-7.

Os espectros de ^{13}C são de fundamental importância para identificação de triterpenos, visto que a maioria dos esqueletos de triterpenos conhecidos são estabelecidos pela literatura científica (MAHATO & KUNDO, 1994), não sendo crucial dados de correlação de HMBC para sua identificação, pois os valores de muitos de seus ^1H são próximos e tornam a análise visual dos espectros complexa.

Em relação aos triterpenos lupeol (**19**), β -amirina (**20**), 24-metilenocicloartanol (**21**) e friedelina (**22**) as análises por ^{13}C inferiram os valores de carbonos com no máximo 1,0 ppm de diferença de deslocamento químico, sendo os valores próximos ou iguais aos das referências da literatura científica. O espectro de ^{13}C de lupeol e β -amirina foi obtido enquanto os triterpenoides encontravam-se em mistura na mesma fração, sendo possível ainda assim inferir a presença completa de seus carbonos. Após separação por CLAE, apenas os espectros de ^1H foram obtidos.

5.11 Análises por Espectrometria de Massas

As análises por espectrometria de massas por *eletrospray* foram obtidas em modo negativo para os flavonoides (ESI). Os dados das análises obtidos por de massas dos flavonoides podem ser visualizados na Tabela 34.

Os íons *quasi*-moleculares produziram picos condizentes com as respectivas massas moleculares para as substâncias isoladas, corroborando às corretas identificações por análises de RMN uni e bidimensionais.

Tabela 34. Massas ionizadas e fragmentações dos flavonoides isolados de *M. acaciifolium*.

Substância (n°)	Fórmula Molecular	MM (u)	[M-H] ⁻	MS ¹ [M-H] ⁻ m/z	MS ² [M-H] ⁻ m/z
Luteolina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (1)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	431,0984	[431] → 285 [M-H-ram] ⁻
Neoastilbina (2)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1080	[449] → 303 [M-H-ram] ⁻
Astilbina (3)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1078	[449] → 303 [M-H-ram] ⁻
Neoisostilbina (4)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1077	[449] → 303 [M-H-ram] ⁻
Isoastilbina (5)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1080	[449] → 303 [M-H-ram] ⁻
Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (6)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447,0917	[447] → 301 [M-H-ram] ⁻
Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (7)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609,1502	[609] → 301 [M-H-rut] ⁻
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo (8)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	593,1516	[593] → 285 [M-H-rut] ⁻
Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo (9)	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	464	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463,0900	[463] → 301 [M-H-gli] ⁻
Kaempferol-7- <i>O</i> -rutinosídeo (10)	C ₂₇ H ₂₀ O ₁₅	594	C ₂₇ H ₁₉ O ₁₅	593,1468	[593] → 285 [M-H-rut] ⁻
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (11)	C ₇ H ₆ O ₄	154	C ₇ H ₅ O ₄	153,0193	[153] → 109
Ácido 3-metoxi,4-hidroxibenzoico (12)	C ₈ H ₆ O ₄	168	C ₈ H ₇ O ₄	167,0350	[167] → 152, 123, 108
Crisoeriol (13)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299,0567	[299] → 284
Apigenina (14)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270	C ₁₅ H ₉ O ₅	269,0471	[269] → 151, 117
3,4-dihidroxibenzoato de metila (15)	C ₈ H ₈ O ₄	168	C ₈ H ₇ O ₄	167,0341	[167] → 152, 111
7,4'-dihidroxiflavona (16)	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254	C ₁₅ H ₉ O ₄	253,0500	[253] → 135, 117
Eriodictiol (17)	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,0555	[287] → 151, 135
Luteolina (18)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286	C ₁₅ H ₉ O ₆	285,0418	[285] → 175, 151, 133

As fragmentações das perdas de unidades dos glicosídeos apresentaram valores de 146 u (perda neutra de ramnose) para luteolina-3'-*O*-ramnosídeo (1) e quercetina-3-*O*-ramnosídeo (6), 164 u (perda neutra de glicose) para quercetina-3-*O*-glicosídeo (9) e

308 u (perda neutra de rutinose) para quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**7**), kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (**8**) e kaempferol-7-*O*-rutinosídeo (**10**).

As propostas para as perdas de unidades das ramnoses, glicose e rutinose são representadas na Figura 81, sendo usadas como exemplo as substâncias luteolina-3'-*O*-ramnosídeo (**1**) e kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (**8**).

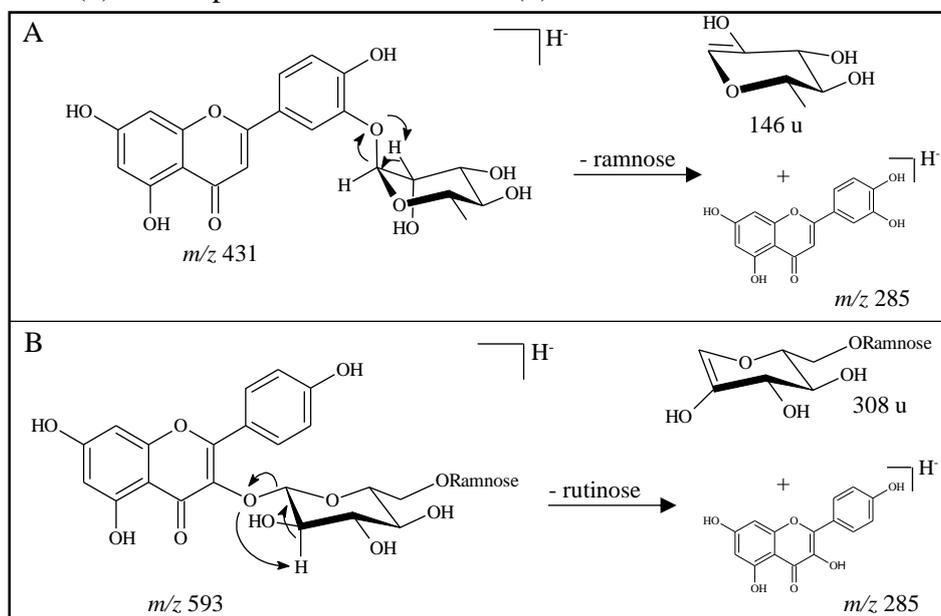


Figura 81. Proposta para as perdas neutras dos glicosídeos das substâncias **1** (A) e **8** (B).

Os ácidos fenólicos **11**, **12** apresentaram perdas dos grupos ácidos representados por “X” nas ilustrações de MS² da Figura 82. Como resultado, foram visualizados nos cromatogramas os picos de valores *m/z* 109 ([M-H-CO₂]⁻, **11**) e *m/z* 123 ([M-H-CO₂]⁻, **12**) como perdas de 44 u em **11** e **12**. Adicionalmente **12** e **15** mostraram picos por MS² em *m/z* 152 característico da perda de grupo CH₃ (15 u) ([M-H-CH₃]⁻) representado por “Y”. O fragmento por MS² de valor *m/z* 108 na substância **12** corroborou para perda de 59 u, características do CO₂ e CH₃ ([M-H-CO₂-CH₃]⁻), representados por “Z”. Uma perda de 56 u resultou em um pico em *m/z* 111 na substância **15**, permitindo inferir a saída neutra de parte do anel aromático ([M-H-C₂H₄O₂]⁻), representada por “U”.

O MS² da substância **13** mostrou um pico em *m/z* 284, característico da perda de 15 u de grupo CH₃ ([M-H-CH₃]⁻) presente na metoxila da posição 3' do crisoeriol. A substância **17** mostrou por MS² dois picos em *m/z* 151 e *m/z* 135 representados por “^{1,3}A⁻” e “^{1,3}B⁻”, característicos do desmembramento do anel C do flavonoide por retro Diers-Alder, onde *m/z* 151 infere fragmentação ionizada no anel A e *m/z* 135, fragmentação ionizada do anel B.

A substância **14** mostrou por MS² pico em m/z 135, enquanto **16** e **18** mostraram picos em m/z 151, sendo característicos de desmembramento do anel C por retro Diers-Alder, representado por “^{1,3} A⁻”. Os picos referem-se à fragmentação ionizada do anel A. Por outro lado, picos em m/z 117 em **14** e **16** e m/z 133 em **18** são característicos da fragmentação ionizada do anel B, representados por “^{1,3} B⁻”, resultante de retro Diers-Alder no anel C.

Por último, uma fragmentação por MS² com pico em m/z 175 na substância **18** sugere perda neutra do anel B de 110 unidades, por migração de hidrogênio entre os C-3 e C-1'. A Figura 81 ilustra os esquemas de fragmentações dos ácidos fenólicos e flavonoides não glicosilados.

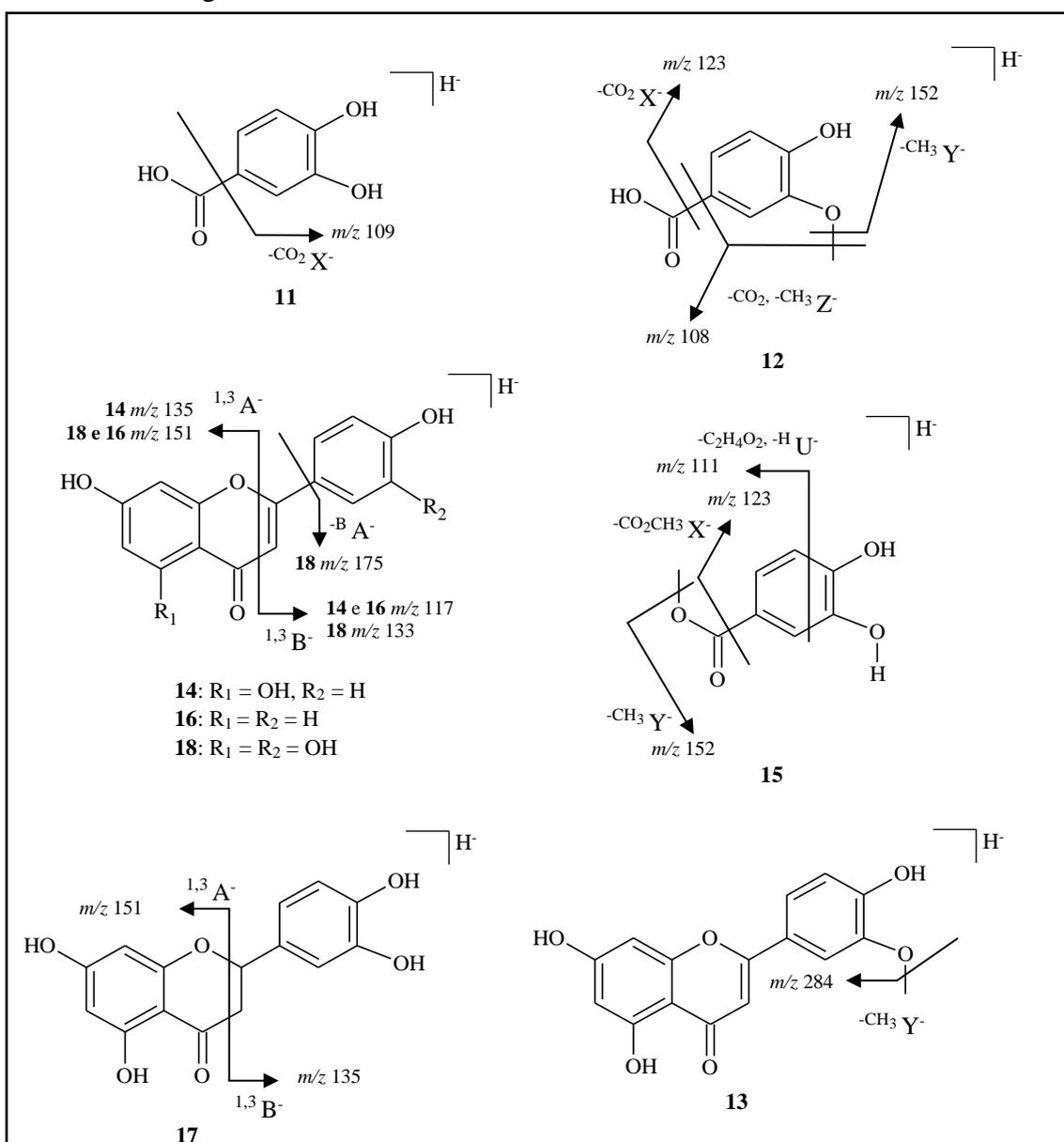


Figura 82. Proposta para as fragmentações por MS² dos ácidos fenólicos e flavonoides não glicosilados isolados de *M. acaciifolium*.

5.12 Atividade antimicrobiana

O ensaio antimicrobiano realizado com cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas mostrou atividades tóxicas presentes nas fases AcOEt dos galhos e fase H₂O/MeOH (hidrometanólica) das folhas.

A fase AcOEt dos galhos exibiu uma atividade antibacteriana de 100% de toxicidade para as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Morganella morganii* na concentração de 1000 µg/mL. A fase H₂O/MeOH das folhas exibiu atividade antibacteriana de 89,94% para *Staphylococcus aureus* e 91,15% para *Morganella morganii*, além de 73,52% para *Staphylococcus epidermidis*.

Dos extratos hexânicos, apenas o extrato das folhas foi efetivo no potencial antibacteriano com porcentagem de inibição de 87,51% na concentração de 1000 µg/mL para *Aeromonas hydrophila*.

Na Tabela 35 são apresentados os resultados dos extratos metanólicos, hexânicos, assim como das fases testadas e valores das porcentagens de inibição de crescimento das cepas bacterianas. É possível observar que os extratos metanólicos não exibiram atividade. Este resultado está relacionado principalmente à concentração de substância ativas estarem em mistura com resíduos de graxas, clorofilas, açúcares livres e outras substâncias não ativas, que provavelmente inibem a atividade.

Tabela 35. Porcentagem das atividades antimicrobianas dos extratos metanólicos, hexânicos e fases de *M. acaciifolium*.

Amostras	AB	AH	CF	EC	ECL	KP	MM	PA	SA	SM	STE
Ga MeOH	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MGa2	*	52,33 ^B ±0,09	*	*	*	63,84 ^B ±0,09	100 ^A ±0,04	*	100 ^A ±0,03	*	43,95 ^C ±0,11
MGa3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ga Hex	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Fo MeOH	*	*	*	*	*	22,84 ±0,03	*	*	*	*	*
MFo3	*	*	*	*	*	*	89,94 ^B ±0,05	*	91,15 ^A ±0,05	*	73,52 ^B ±0,03
Fo Hex	*	87,51 ^A ±0,05	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Oxitetraciclina	98,4 ±0,00	99,57 ±0,09	99,57 ±0,00	99,57 ±0,08	99,77 ±0,00	99,59 ±0,09	99,83 ±0,00	99,65 ±0,00	99,75 ±0,00	99,61 ±0,00	99,66 ±0,01

Legenda: Em destaque amarelo estão os valores reconhecidos como ativos. Ga MeOH = extrato metanólico dos galhos, MGa2 = fase AcOEt dos galhos, MGa3 = fase hidrometanólica dos galhos, Ga Hex = extrato hexânico dos galhos, Fo MeOH, extrato metanólico das folhas, MFo3, fase hidrometanólica dos galhos, Fo MFo3 = fase hidrometanólica das folhas e Fo Hex = extrato hexânico das folhas. Dados expressos em porcentagem de inibição (%) e desvio padrão ($n=3$). (*) amostras que não apresentaram atividade, com valores de inibição menores que 20%. ^A $p < 0,001$, ^B $p < 0,01$, ^C $p < 0,5$

As atividades das fases podem estar relacionadas aos constituintes químicos da classe dos fenólicos presentes nos extratos metanólicos de *M. acaciifolium*. Uma vez concentrados essas substâncias em fases, exclui-se ou diminui-se as concentrações de substâncias não ativas, se comparados aos extratos brutos.

Neste trabalho foram isoladas dos extratos metanólicos substâncias da classe dos flavonoides como flavonas, flavonois, flavanonas, uma dihidroxiflavona e ácidos fenólicos.

Corroborando com este fato, é possível dizer que a fase AcOEt dos galhos e fase H₂O/MeOH das folhas também são portadoras de metabólitos secundários das mesmas classes de flavonoides e ácidos fenólicos. Desta forma, os potenciais antibacterianos contido nestas fases podem estar relacionados a estes compostos fenólicos.

Em especial, a fase AcOEt demonstrou maior concentração destas substâncias com potencial antibacteriano. De forma exploratória, tanto a fase AcOEt dos galhos, quanto a fase H₂O/MeOH das folhas possuem tais substâncias em concentrações diferentes, porém muito específicas para estas cepas de bactérias *Morganella morganii* e *Staphylococcus aureus*, além de *Staphylococcus epidermidis* para qual a fase H₂O/MeOH das folhas mostrou maior concentração de tais substâncias.

É necessário destacar, que além de cepas de bactérias diferentes, as estruturas das paredes celulares das bactérias são diferentes. *Morganella morganii* é da classe das Gram-negativas, com paredes de peptidoglicano menos espessas e camada externa de lipopolissacarídeo, porém sem presença de ácidos tecóicos (GAN *et al.*, 2008). Diferente de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, as quais são Gram-positivas e possuem camadas espessas de lipopolissacarídeos e ácidos tecóicos (HAYHURST *et al.*, 2008).

Independentemente da classe das bactérias, as substâncias presentes nestas duas fases atuam por mecanismos diferenciados para as duas situações de ingresso ao interior das células bacterianas. As duas fases possuem substâncias muito polares e das substâncias obtidas na fase AcOEt das folhas (MFo2), 10 delas eram flavonoides glicosilados.

A presença de ramnose, glicose e rutinose nos flavonoides das fases ativas podem ser o fator de acesso às camadas lipopolissacarídica. Estas porções glicosídicas podem atuar substituindo os sacarídeos das camadas e assim desestruturando a impermeabilidade da mesma. Em um caso adicional, pode obstruir as entradas proteicas ou impregnar nas bicamadas lipídicas internas de *Morganella morganii*.

Um fator bem importante são as especificidades dos pesos moleculares das substâncias com potencial antibacteriano. Como por exemplo, vancomicina (1.449 Da) e teicoplanina (1.879 Da) são antibacterianos glicopeptídicos usados contra cepas de bactérias Gram-positivas e são ineficazes contra cepas Gram-negativas, devido as mesmas possuírem Porinas nas paredes celulares externas seletivas para moléculas com peso moleculares menores que 600 Da (JOHNSON, *et al.*, 1990).

Este exemplo anterior é sem dúvida importante para obtenção de moléculas com potencial antibacteriano oriundas de Produtos Naturais. Com algumas exceções, os pesos destas moléculas são geralmente na razão de 200-600 Da. De *M. acaciifolium*, a molécula isolada de maior peso molecular foi o flavonoide quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**7**) com 610 Da.

Apesar da pobre barreira de permeabilidade, vencer a barreira peptideoglicana das bactérias Gram-positivas não é simples. O mecanismo mais eficiente e mais funcional dos antibióticos, é o impedimento da síntese da camada peptideoglicana (RIU *et al.*, 2022).

Este é provavelmente uma das características das substâncias presentes na fase H₂O/MeOH das folhas, os quais podem atuar se ligando às unidades de aminoácidos da parede peptideoglicana, impedindo a adição de novas unidades naturais da camada.

Acentuando a efetividade de produção de substâncias com potencial antibacteriano, o extrato hexânico foi ativo para bactéria Gram-negativa de *Aeromonas hydrophila*. Em relação a este resultado, a atividade pode estar relacionada aos triterpenos lupeol e β -amirina presente na composição do extrato.

O acesso destas substâncias da classe dos terpenoides ao interior celular de *A. hydrophila* talvez tenha maior probabilidade de ocorrer devido a proteínas presentes nas camadas lipopolissacarídicas que absorvam especificamente a estrutura química destes triterpenos. Para que isto seja possível é necessário que estas proteínas possuam majoritariamente porções apolares de aminoácidos como alanina, valina, leucina, etc.

Esta hipótese é levantada devido à alta diferença de polaridade da própria camada de lipopolissacarídeo e os triterpenos, os quais possam chegar à bicamada lipídica por meio de proteínas específicas.

Com exceção de 24-metilenocicloartenol, os triterpenos lupeol e β -amirina são conhecidos pelas atividades antibacterianas já exibidas em estudos da literatura científica, em sua maioria, em bactérias Gram-negativas (ROSANDY, *et al.*, 2021; ABDEL-RAOULF *et al.*, 2015; SHAI *et al.*, 2008).

O potencial antimicrobiano contido nos galhos e folhas de *M. acaciifolium* demonstra o importante papel que esta espécie pode atuar ao combate à microrganismos como bactérias. Em contraste à diferentes cepas Gram-negativa e Gram-positiva, esta espécie mostrou potencial antimicrobiano, ainda que em uma dosagem exploratória de 1000 µg/mL.

Visto a necessidade ao combate de cepas de bactérias clinicamente oportunistas como *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, *Macrolobium acaciifolium* surge como nova alternativa de potencial antibacteriano, permitindo com que as substâncias presentes possam atuar ou servir de base sintética para o combate a estas bactérias.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi abordado o fracionamento fitoquímico dos extratos de *Macrolobium acaciifolium*, o que resultou no isolamento e identificação de 15 flavonoides, 3 ácidos fenólicos, 4 triterpenos, 1 xantona e 2 esteroides.

As substâncias das classes químicas dos ácidos fenólicos, terpenoides e xantona isoladas e identificadas neste trabalho estão sendo relatadas pela primeira vez em *M. acaciifolium*. Aumentando o conhecimento científico acerca das classes químicas presente nesta espécie.

Esta pesquisa também mostrou que flavonoides ramnosilados são caracteristicamente abundantes no extrato metanólico das folhas de *M. acaciifolium*, seguidos de rutinosilados e glicosilados. As agliconas luteolina, quercetina e kaempferol foram comumente isoladas ligadas aos resíduos de açúcares citados acima. Além disto, do extrato metanólico dos galhos de *M. acaciifolium*, foram isolados apenas agliconas de flavonoides e ácidos fenólicos.

Devido ao alto potencial antibacteriano das fases AcOEt dos galhos, H₂O/MeOH das folhas e extrato hexânico das folhas, *M. acaciifolium* mostrou-se ser uma excelente fonte para obtenção destes metabólitos com esta atividade e sendo esta, uma etapa direcionadora para o uso de frações e substâncias visando a possível utilidade desta espécie como produtora destas substâncias como possíveis fármacos.

Os resultados obtidos nesta pesquisa intensificam a importância do estudo *M. acaciifolium* oriunda da floresta Amazônica, contribuindo para o conhecimento químico acerca de espécies pertencente ao gênero *Macrolobium* e à subfamília Detarioideae.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELGALEIL, S. A. M.; SAAD, M. M. G.; ARIEFTA, N. R.; SHIONO, Y. Antimicrobial and phytotoxic activities of secondary metabolites from *Haplophullum tuberculatum* and *Chrysanthemum coronarium*. **South African Journal of Botany**, 128, p. 35, 2020.
- ABDEL-RAOULF, N.; AL-ENAZI, N. M.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B.; M.; AL-OTHAMAN, M. R.; HATAMLEH, A. A. Antibacterial β -amyryn isolated from *Laurencia microcladia*. **Arabian Journal of Chemistry**, 8, p. 32, 2015.
- ALBUQUERQUE, C. L. C.; SANTANA, A. L.; MEIRELES, M. A. A. Thin layer chromatographic analysis of annato extracts obtained using supercritical fluid. **Food and Public Health**, 5, p. 127, 2015.
- ALEXANDRE, A. S.; FACHIN-ESPINAR, M. T.; NUNEZ, C. V. Triterpenos, esteroides e fenólico isolados de *Minquartia guianensis* Aubl. (Coulaceae) e atividade antibacteriana. **Concilium**, 3, p. 883, 2023.
- ALI, E. M.; ALKUWAYTI, M. A.; ALDAYEL, M. F. ABDALLAH, B. M. Coumarin derivative, 5'-hydroxy-auraptane, extracted from *Lotus lalambensis*, displays antifungal and anti-aflatoxigenic activities against *Aspergillus flavus*. **Journal of King Saud University – Science**, 33, artigo 1001216, 2021.
- AN, H.; YOON, Y.; LEE, J. JEONG, N. Antioxidant and antimicrobial properties of dihydroquercetin esters. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 58, artigo e190800, 2022.
- ASSAHIRA, C.; PIEDADE, M. T. F.; TRUMBORE, S. E.; WITTMANN, F.; CINTRA, E. S.; RESENDE, A. F.; SCHÖNGART, J. Tree mortality of a flood-adapted species in response of hydrographic changes caused by an Amazonian river dam. **Forest Ecology and Management**, 2017, p. 113.
- ATEBA, S. B.; NJAMEN, D.; MEDJAKOVIC, S.; HOBIGER, S.; MBANYA, J. C.; JUNGBAUER, A.; HRENN, L. *Eriosema laurentii* De Wild (Leguminosae) methanol extract has estrogenic properties and prevents menopausal symptoms in ovariectomized Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 150, p. 298, 2013.
- AUSTIN, M. B.; NOEL, J. P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. **Natural Product Reports**, 20, p. 79, 2003.
- AZIZI, S.; DALLI, M.; BERRICHI, A.; GSEYRA, N. Quantification of secondary metabolites and the evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of the Argan tree of eastern Morocco. **Materials Today: Proceedings**, 45, p. 7314, 2021.
- BABIKA, S. B.; NIA, R.; ABUGA, K. O.; MBAH, J. A.; NZIKO, V. P. N.; PAPER, D. H.; NTIE-KANG, F. Antioxidant potential of flavonoids glycosides from *Manniophyton fulvum* Müll. (Euphorbiaceae): Identification and molecular modeling. **Scientific African**, 8, artigo e00423, 2020.

- BAN, H. V.; VAN, T. T. T.; CHIEN, V. V.; HUE, N. T.; HANG, P. T.; CUONG, P. V.; TUAN, N. L.; VUONG, N. Q. Flavonoids from flowers of *Amesiodendron chinense*. **Vietnam Journal of Science and Technology**, 58, p. 676, 2020.
- BARBOSA, A. P.; PALMEIRA, R. C. F; NASCIMENTO, C. S.; FEITOZA, D. S.; CUNHA, M. S. C. Leguminosas florestais da Amazônia Central. I. Prospecção das classes de compostos presentes na casca de espécies arbóreas. **Revista Fitos**, 1, p. 47, 2006.
- BARNETT, A. A.; ALMEIDA, T.; ANDRADE, R.; BOYLE, S.; LIMA, M. G.; MACLARNON, A.; ROSS, C.; SILVA, W. S.; SPIRONELLO, W. R.; RONCHI-TELES, B. Ants in their plants: *Pseudomyrmex* ants reduce primate, parrot and squirrel predation on *Macrolobium acaciifolium* (Fabaceae) seeds in Amazonian Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society**, 114, p. 260, 2015.
- BEHRENS, M. D.; TAPPIN, M. R. R.; FAVORETO, R.; SILVA, V. P.; NAKAMURA, M. J.; BARBOSA, A. P.; SOUSA, L. A. SIANI, A. C. Estudo prospectivo de Leguminosas da Amazônia Central, II. Composição química dos óleos das sementes. **Revista Fitos**, 1, p. 58, 2006.
- BENJAMIN, B. D.; MULCHANDANI, N. B. Effect of gamma irradiation on biosynthetic potential of callus cultures of *Tylophora indica*. **Planta Medica**, 29, p. 37, 1976.
- BENTO, C. C.; TANGERINA, M. M. P.; ZANATTA, A. C.; SARTORY, A. L. B.; FRANCO, D. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; ROLIM, L. F.; SANNOMIYA, M. Chemical constituents and allelopathic activity of *Machaerium eriocarpum* Benth. **Natural Product Research**, 34, p. 884, 2018.
- BEZERRA, J. W. A.; CORONEL, C.; GOMEZ, M. C. V.; ROLÓN, M. NUNEZ, C. V.; SILVA, D. R.; SILVA, L. A.; RODRIGUES, F. C.; BOLINGON, A. A.; SOUZA, M. A.; LINHARES, K. V.; SILVA, M. A. P.; MORAIS-BRAGA, M. F. B. Evaluation of antiparasitary, cytotoxic and antioxidante activity and chemical analysis os *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. (Cleomaceae). **South African Journal of Botany**, 124, p. 546, 2019.
- BEZERRA, J. J. L.; PINHEIRO, A. A. V.; LECENA, R. B. Phytochemistry and teratogenic potential of *Mimosa tenuiflora* (willd.) poir. (Fabaceae) in ruminants: A systematic review. **Toxicon**, 195, p. 78, 2021.
- BITCHI, M. B.; MAGID, A. A.; YAO-KOUASSI, P. A.; KABRAN, F. A.; HARAKAT, D.; MARTINEZ, A.; MORJANI, H.; TONZIBO, F. Z.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L. Triterpene saponins from the roots of *Parkia bicolor* A. Chev. **Fitoterapia**, 137, artigo 104264, 2019.
- BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Le mélange diphémylborate d'aminoéthanol-PEG 400. **Journal of Chromatography**, 351, p. 351, 1986.
- BUYANKHISHIG, B.; MURATA, T.; SUGARUMA, K.; BATKHUU, J.; SASAKI, K. Hyaluronidase inhibitory saponins and a trypanocidal isoflavonoid from the aerial parts of *Oxytropis lanata*. **Fitoterapia**, 145, artigo 104608, 2020.

- ÇELİK, H.; KOŞAR, M. Inhibitory effects of dietary flavonoids on purified hepatic NADH-cytochrome b5 reductase: Structure-activity relationships. **Chemico-Biological Interactions**, 197, p. 103, 2012.
- CERCATO, L. M.; OLIVEIRA, J. P.; SOUZA, M. T. S.; ANDRADE, N.; MARTEL, F. M.; CAMARGO, E. A. Effect of flavonoids in preclinical models of experimental obesity. **PharmaNutrition**, 16, artigo 100260, 2021.
- CHAWLA, H. M.; CHIBBER, S. S. TLC separation and identification of some flavonoid C-glycosides. **Chromatographia**, 9, p. 408, 1976.
- CHEN, X.; LI, Z.; LIU, L.; WANG, H.; YANG, S.; ZHANG, J.; ZHANG, Y. Green extraction using deep eutectic solvents and antioxidant activities of flavonoids from two fruits of *Rubia species*. **LWT – Food Science and Technology**, 148, artigo 111708, 2021.
- CHEXAL, K. K.; HANDA, B. K.; RAHMAN, W. Thin-layer chromatography of biflavonols on silica gel structure-chromatographic behaviour correlations. **Journal of Chromatography**, 48, p. 484, 1970.
- CHOUDHARY, N.; KHATOON, S. Pharmacognostic evaluation of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers and identification of biomarkers. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, 13, p. 543, 2014.
- CLAUDE, K. A. L.; FAUSTIN, K. A.; BARTHÉLEMY, A. K.; JACQUES, K. D.; SISSOUMA, D.; BLANDINE, M. S.; KARINE, L.; PIERRE, C. Chemical study of the seeds of *Erythrophleum ivorense* A. Chev. (Fabaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 91, artigo 104059, 2020.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard – Tenth Edition, 35, p. 15-24, 2015.
- CUONG, D. T. D.; DAT, H. T.; DUAN, N. T.; THUONG, P. D.; PHAT, N. T.; TRI, M. D.; SON, D. V.; HOA, N. T.; TUYEN, P. N. K.; PHUNG, N. K. P. Isolation and characterization of six flavonoids from the leaves of *Sterculia foetida* Linn. **Vietnam Journal of Chemistry**, 57, p. 438, 2019.
- DADE, J. M. E.; IRIE-N'GUESSAN, G.; KOMLAGA, G.; SAY, M.; OKPEKON, T. A.; BOTI, J. B.; KABLAN, B. J.; BAMABA, E. H. S. Pyrrolidine alkaloids and their glycosylated derivatives from the root bark of *Dichrostachys cinerea* (L) Wight & Arn (Fabaceae). **Phytochemistry Letters**, 16, p. 268, 2016.
- DE BRITTO, J.; MANICKAM, S.; GOPALAKRISHNAN, S.; USHIODA, T.; TANAKA, N. Determination of aglycone chirality in dihydroflavonol 3-O- α -L-rhamnosides by NMR spectroscopy. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 43, p. 338, 1995.
- DÍAZ, A. B.; VERA, J. R.; COTE, V.; BRUNO-COLMENÁREZ, J.; DELGADO, G. D. NMR elucidation and crystal structure analysis of 1-hydroxy-3,6-dimethoxy-8-methyl-9*h*-xanthen-9-one (lichexanthone) isolated from *Vismia baccifera*

(Guttiferae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, 9, p. 470, 2010.

- DO, T. K. T.; HADJI-MINAGLOU, F.; ANTONIOTTI, S.; FERNANDEZ, X. Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: comparison of two preparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography). **Journal of Chromatography A**, 1325, p.256, 2014.
- DUTRA, L. M.; TELES, P. H. V.; SANTOS, A. D. C.; MELO, N. F.; NAGATA, N.; ALMEIDA, J. R. G. S. ¹H-NMR-based metabolic profile and chemometric analysis of the discrimination of *Passiflora* species genotypic variations. **Food Research International**, 164, artigo 112441, 20223.
- DURIC, K.; KOVAC-BESOVIC, E. E. NIKSIC, H.; MURATOVIC, S.; SOFIC, E. Anticoagulant activity of some *Artemisia dracunculus* leaf extracts. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, 15, p. 9, 2015.
- EKALU, A.; AYO, R. G.; HABILA, J. D.; HAMISU, I. A bioactive (2R,3R)-dihydroflavonol-3-O- α -L-rhamnoside from *Bracystelma togoense* Schltr.
- FÉLIX-DA-SILVA, M. M. **Macrobium Schreb. (Leguminosae) no Brasil**. Tese (Doutorado em biodiversidade e biotecnologia) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2016.
- FERRAZ, C. M. S.; SANTOS, A. Q.; SANTOS, M. J.; SILVA, V. R.; SANTOS, L. S.; SOARES, M. B. P.; BEZERRA, D. P.; MACEDO, G. E. L.; PAULA, V. F.; QUEIROZ, R. F. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities of *Macrobium katifolium* Vogel (Fabaceae) stem bark. **South African Journal of Botany**, 140, p. 210, 2021.
- GAGE, T. B.; DOUGLASS, C. D.; WENDER, S. H. Identification of flavonoid compounds by filter paper chromatography. **Analytical Chemistry**, 23, p. 1583, 1951.
- GAN, L.; CHEN, S.; JENSEN, G. J. Molecular organization of gram-negative peptidoglycan. **The Proceedings of the National Academy**, 105, p. 18953, 2008.
- GRAFAKOU, M. E.; BARDA, C.; TOMOU, E.; SKALTSA, H. The genus *Genista* L.: A rich source of bioactive flavonoids. **Phytochemistry**, 181, artigo 112574, 2021.
- GUERRIERI, A.; DONG, L.; BOUWMEESTER, H. J. Role and exploitation of underground chemical signaling in plants. **Pest Management Science**, 75, p. 2455, 2019.
- GUO, X.; LI, C.; DUAN, L.; ZHAO, L.; LOU, H.; REN, D. Separation of enantiomers of narigenin and eriodictyol by amylose-based chiral reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Drug Discoveries & Therapeutics**, 6, p. 321, 2012.

- HAYHURST, E. J.; KAILAS, L.; HOBBS, J. K.; FOSTER, S. J. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. **The Proceedings of the National Academy**, 105, p. 14603, 2008.
- HERNÁNDEZ, J. D.; GARCÍA, L.; HERNÁNDEZ, A.; ALVAREZ, R.; ROMÁN, L. U. Glicósidos de luteolina e miricetina de Burseraceae. **Revista de la Sociedad Química de México**, 46, p. 295, 2002.
- HOU, M.; HU, W.; HAO, K.; Xiu, Z. Flavonoids and phenolic acids from the roots of *Sophora tonkinensis* Gagnep. **Biochemical Systematics and Ecology**, 80, artigo 104011, 2020.
- HU, J.; MA, W.; LI, N.; WANG, K. Antioxidant and anti-inflammatory flavonoids from flowers of Chujo, a medicinal cultivar of *Chrysanthemum morifolium* ramat. **Journal of the Mexican Chemical Society**, 61, p. 282, 2017.
- IMRAN, M.; RAUF, A.; ABU-IZNELD, T.; NADEEM, M.; SHARLATI, M. A.; LHAN I. A.; IMRAN, A.; ORHAN, I. E.; RIZWAN, M.; ATIF, M.; GONDAL, T. A.; MUBARAK, M. S. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agente: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 112, artigo 108612, 2019.
- ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Research**, 52, artigo 39, 2019.
- ISODA, H.; MOTOJIMA, H.; ONAGA, S.; SAMET, I.; VILLAREAL, M. O.; HAN, J. Analysis of the erythroid differentiation effect of flavonoid apigenina on K562 human chronic leukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, 220, p. 269, 2014.
- JOHNSON, A. P.; UTTLEY, A. H.; WOODFORD, N.; GEORGE, R. C. Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. **Clinical Microbiology Reviews**, 3, p. 280, 1990.
- JUSTINO, G. C.; OMENA-GARCIA, R. P.; SANTOS, L. S.; SODEK, L.; GONÇALVES, J. F. C. Nitrogen used strategies of nodulated Amazonian Legume: *Inga edulis*. **Journal of Tropical Forest Science**, 29, 1, 2017.
- KOMAKECH, R.; KIM, Y.; MATSABISA, G. M.; KANG, Y. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Tamarindus indica* Linn. (Fabaceae): a narrative review. **Integrative Medicine Research**, 8, p. 181, 2019.
- KURATA, T.; MISAWA, N.; HOSOYA, T.; YAMADA-KATO, T.; OKUNISHI, I.; KUMAZAWA, S. Isolation and identification of components from wasabi (*Wasabia japonica*) flowers and investigation of their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Science and Technology Research**, 25, p. 449, 2019.
- LEE, E.; MOON, B.; PARK, Y.; HONG, S.; LEE, Y.; LEE, Y.; LIM, Y. Effects of hydroxy and methoxy substituents on NMR data in flavonoids. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 29, p. 507, 2008a.

- LEE, H.; PARK, E.; LEE, B.; CHO, H.; PHAM, T.; HOANG, Q.; PAN, C.; OH, W. Flavonoids glycosides from the stems of *Myrsine seguinii* and their neuroprotective activities. **Pharmaceuticals**, 14, p. 911, 2021.
- LEE, S.; PARK, Y.; MOON, B.; LEE, E.; HONG, S.; LIM, Y. Substitution effect of hydroxyl groups on the ^1H and ^{13}C chemical shifts in hydroxyflavonols. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 29, p. 1597, 2008b.
- LI, H.; LI, C.; SHEN, T.; ZHAO, L.; REN, D. *R*-eriodictyol and *S*-eriodictyol exhibited comparable effect against H_2O_2 -induced oxidative stress in EA.hy926 cells. **Drug Discoveries & Therapeutics**, 8, p. 218, 2014.
- LI, J.; ZHANG, X.; SHEN, X.; LONG, Q.; XU, C.; TAN, C.; LIN, Y. Phytochemistry and biological properties of isoprenoid flavonoids from *Sophora flavescens* Ait. **Fitoterapia**, 143, artigo 104556, 2020.
- LI, Y.; CHENG, X.; CHEN, C.; WU, H.; ZHAO, H.; LIU, W.; XIANG, Z.; WANG, Q. Apigenin, a flavonoid constituent derived from *P. villosa*, inhibits hepatocellular carcinoma cell growth by CyclinD1/CDK4 regulation via p38 MAPK-21 signaling. **Pathology – Research and Practice**, 216, artigo 152701, 2020.
- LIMA, C. S.; PEREIRA, M. H.; GAINZA, Y. A.; HOSTE, H.; REGASINI, L. O.; CHAGAS, A. C.; Anthelmintic effect of *Pterogyne nitens* (Fabaceae) on eggs and larvae of *Haemonchus contortus*: Analises of structure-activity relationships based on phenolic compounds. **Industrial Crops & Products**, 164, artigo 113348, 2021.
- LOZANO, A. L.; SOUSA, A. B. B.; SOUZA, J. C.; SILVA, D. R.; SALAZAR, M. G. M.; HALICKI, P. C. B.; RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A.; NUNEZ, C. V. *Duroia saccifera*: in vitro germination, friable calli and identification of β -sitosterol and stigmasterol from the active extract against *Mycobacterium tuberculosis*. **Rodriguésia**, 71, artigo e01092019, 2020.
- LPWG. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, 66, p. 44, 2017.
- MA, Y.; ZHOU, T.; ZHAO, P.; CHOI, H.; HAO, J.; HUANG, H.; WU, C.; YANG, X.; PANG, K. New flavonoids from the roots of *Sophora davidii* (Franch.) Skeels and their glucose transporter 4 translocation activities. **Bioorganic Chemistry**, 106, artigo 104500, 2021.
- MACRINI, D. J. **Avaliação de extratos de plantas da região amazônica quanto à atividade inibitória da tirosinase**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.
- MAHAJAN, M.; KUIRY, R.; PAL, P. K. Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plant. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, 18, artigo 100255, 2020.
- MAHATO, S. B. & KUNDO, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, 37, p. 1517, 1994.

- MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, 299, artigo 125124, 2019.
- MARAIS, J. P. J.; DEAVOURS, B.; DIXON, R. A.; FERREIRA, D. The stereochemistry of flavonoids. In: *The Science of Flavonoids*. p. 1-3. **Springer**, USA, 2006.
- MARTINELLI, L. A.; ABDALLA-FILHO, A. L.; GOMES, T. F.; LINS, S. R. M.; MARIANO, E.; SOLTANGHEISI, A.; CAMARGO, P. B.; VIEIRA, S. A.; HIGUCHI, N.; NARDOTO, G. B. Partitioning of environmental and taxonomic controls on Brazilian foliar content of carbon and nitrogen and stable isotopes. **Frontiers in Forest and Global Change**, 4, artigo 662801, 2021.
- MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. **Universidade Federal do Ceará**. p. 129. Fortaleza, Brasil. 1980.
- MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; TOGUCHIDA, I.; HARIMA, S.; YOSHIKAWA, M. Medicinal flowers. VI.¹⁾ Absolute stereostructures of two new flavone glycosides and a phenylbutanoid glycoside from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L.: their inhibitory activities for rat lens aldose reductase. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 50, p. 972, 2002.
- MBOUSSAAH, A. D. K.; LATEEF, M.; FODOUOP, S. P. C.; NKENGFAK, A. E.; LENTA, B. N.; ALI, M. S.; TAPONDJOU, L. A. Intotins A-C: new isoflavonoides from the roots of *Desmodium tortum* (Fabaceae). **Chemical Data Collections**, 33, artigo 100678, 2021.
- MILANI, R. R.; ALVES, O. J. A.; BERTANHA, C. S.; GIMENEZ, V. M. M.; SQUARISI, I. S.; NICOLELLA, H. D.; PAGOTTI, M. C.; TAVARES, D. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MAGALHÃES, L. G.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M. Antipromastigote and cytotoxic activities of flavonoids from *Fridericia speciosa* leaves. **Química Nova**, 43, p. 1404, 2020.
- MILENKOVIĆ, D.; MARKOVIĆ, J. M. D.; DIMIĆ, D.; JEREMIĆ, S.; AMIĆ, D.; PIRKOVIĆ, S.; MARKOVIĆ, Z. S. Structural characterization of kaempferol: A spectroscopic and computational study. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, 38, p. 49, 2019.
- MIYAZAWA, M.; OSHIMA, T.; KOSHIO, K.; ITSUZAKI, Y.; ANZAI, J. Tyrosinase inhibitor from black rice brain. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 51, p. 6953, 2003a.
- MIYAZAWA, M.; OSHIMA, T.; TOKURA, M.; HISAMA, M. Suppression of chemical mutagens-induced SOS response by phenolic acids from black rice bran using *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 *umu* Test. **Journal of Oleo Science**, 52, p. 471, 2003b.
- MIZUNO, T.; UCHIYAMA, N.; TANAKA, S.; NAKANE, T.; DEVKOTA, H. P.; FUJIKAWA, K.; KAWAHARA, N.; IWASHINA, T. Flavonoids from *Sedum japonicum* subsp. *oryzifolium* (Crassulaceae). **Molecules**, 27, artigo 7632, 2022.
- MOHAMMED, M. A.; IBRAHIM, B. M. M.; ABDEL-LATIF, Y.; HASSAN, A. H.; RAEY, M. A.; HASSAN, E. M.; EL-GENGAIHI, S. E. Pharmacological and

metabolomic profiles of *Musa acuminata* wastes as a new potential source of anti-ulcerative colitis agents. **Scientific Reports**, 12, artigo 10595, 2022.

- MORIM, M. P.; GURGEL, E. S. C.; *Macrobium* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB23066> Acessado em: 14 de dezembro de 2022.
- MOUAFON, I.; TIANI, G. L. M.; MOUNTESSOU Y. G.; LATEEF, M.; ALI, M. S.; GREEN, I. R.; NGADUI, B. T.; KOUAM, S. F. Chemical constituents of the medicinal plant *Indigofera spicata* Forsk (Fabaceae) and their chemophenetic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, 95, artigo 104230, 2021.
- MRID, R. B.; BENMRID, B.; HAFSA, J.; BOUKCIM, H.; SOBEH, M.; YASRI, A. Secondary metabolites as biostimulant and bioprotectant agents: A review. **Science of the Total Environment**, 777, artigo 146204, 2021.
- MUHIT, M. A.; UMEHARA, K.; SHARMIN, N.; NOGUSHI, H. Cycloartane and stigmastane type triterpenoids from *Pothos scandens* inhibit estradiol (E₂) induced proliferations in breast cancer cells. **Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences**, 18, p. 93, 2019.
- NABAVI, S. F.; BRAIDY, N.; GORTZI, O.; SOBARBO-SANCHEZ, E.; DAGLIA, M.; SKALICKA-WOŹNIAK, L.; NABAVI, S. M. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. **Brain Research Bulletin**, 119, p. 1, 2015.
- NAGARAJAN, G. R.; PARMAR, V. S. Chemical examination of the heartwood of *Prunus domestica*. **Planta Medica**, 31, p. 146, 1977.
- NASCIMENTO, B. O.; NETO, O. C. S.; TEODORO, M. T. F.; SILVA, E. O.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. M. Maclobin: A new unusual C-glycoside chromone from *Macrobium latifolium* and anticholinesterase and antimicrobial activities. **Phytochemistry Letters**, 39, p. 124, 2020.
- NGOC, D. T. B.; DIEU, N. T. H.; HUY, D. T. Some flavonoids the leaves of *Combretum quadrangulare* growing in Vietnam. **Ho Chi Minh City University of Education Journal Science**, 18, p. 1359, 2021.
- NOLETO-DIAS, C.; HARFLETT, C.; BEALE, M. H.; WARD, J. L. Sulfated flavanones and dihydroflavonols from willow. **Phytochemistry Letters**, 35, p. 88, 2020.
- NURCHOLIS, W.; PUTRI, D. N. S.; HUSNAWATI, H.; AISYAH, S. I.; PRIOERYANTO. Total flavonoid content and antioxidant activity of ethanol and ethyl acetate extracts from accessions of *Amomum compactum* fruits. **Annals of Agricultural Sciences**, 66, p. 58, 2021.
- OSW, P. S.; HUSSAIN, F. H. S. Isolation of kaempferol 3-O-rutinoside from Kurdish plant *Anchusa italica* Retz. and bioactivity of some extracts. **Eurasian Journal of Science & Engineering**, 6, p. 141, 2020.

- OUESLATI, M. H.; BOUAJILA, J.; GUETAT, A.; AL-GAMDI, F. HICHRI, F. Citotoxic, α -glucosidade, and antioxidant activities of flavonoid glycosides isolated from flowers of *Lotus lanuninosus* Vent. (Fabaceae). **Pharmacognosy Magazine**, 16, p. 22, 2020.
- OWOR, R. O.; BEDANE, K. G.; ZÜHKKE, S.; DERESE, S.; ONG'AMO, G. O.; NDAKALA, A.; SPITELLER, M. Anti-inflammatory flavanones and flavones from *Tephrosia linearis*. **Journal of Natural Products**, 83, p. 996, 2020.
- OZI, J. M. **Avaliação da ação antitumoral de extratos de plantas Amazônicas e da Mata Atlântica: Atividade de células de carcinoma espinocelular de boca.** Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Paulista. São Paulo, 2009.
- PARK, Y.; LEE, Y.; KIM, H.; LEE, Y.; YOON, Y.; MOON, B.; CHONG, Y.; AHN, J.; SHIM, Y.; LIM, Y. NMR data of flavone derivatives and their anti-oxidant activities. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 27, p. 1537, 2006.
- PARK, Y.; MOON, B.; LEE, E.; LEE, Y.; YOON, Y.; AHN, J.; LIM, Y. ^1H and ^{13}C -NMR data of hydroxyflavone derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**. 45, p. 674, 2007.
- PARK, Y.; MOON, B.; LEE, E.; HONG, S.; LEE, S.; LIM, Y. The ^1H and ^{13}C NMR data of 19 methoxyflavonol derivatives. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 29, p. 81, 2008.
- PARVEZ, M. K.; AHMED, S.; AL-DOSARI, M. S.; ABDELWAHID, M. A. S.; ARBAB, A. H.; AL-REHAILY, A. J.; AL-OQAIL, M. M. Novel anti-hepatitis B virus activity of *Euphorbia schimperi* and its quercetin and kaempferol derivatives. **ACS Omega**, 6, p. 29100, 2021.
- PEDROZA, L. S.; SALAZAR, M. G. M.; OSORIO, M. I. C.; FACHIN-ESPINAR, M. T.; PAULA, R. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; OLIVEIRA, A. B.; NUNEZ, C. V. Estudo químico e avaliação da atividade antimalárica dos galhos de *Piranhea trifoliata*. **Revista Fitos**, 14, p. 476, 2020.
- PHUKHATMUEN, P.; MEESAKUL, O.; SUPHIPHASILP, V.; CHAROENSUP, R.; MANEERAT, T.; CHEENPRACHA, S.; LIMTHARAKUL, T.; PYNE, S. G.; LAPHOOKHIEO, S. Antidiabetic and antimicrobial flavonoids from the twigs and root of *Erythina subumbrans* (Hassk.) Merr. **Heliyon**, 7, artigo e06904, 2021.
- PINTO, I. R.; CHAVES, H. V.; FREIRE, J. M. O.; SOUSA, L. H. T.; MONTEIRO, D. A. M.; COSTA, J. J. N.; SILVA, M. R.; MONTEIRO, A. O.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. E. A.; FILHO, G. C.; PINTO, V. P. T.; BEZERRA, M. M. A semi-synthetic, flavonoid from *Bauhinia pulchella* stem attenuates inflammatory osteolysis in periodontitis in rats: Impact on cytokine levels. Oxidative stress, and RANK/RANKL/OPG pathway. **Archives of Oral Biology**, 117, artigo 104816, 2020.
- POETHKE, V. W.; SCHWARZ, C.; GERLACH, H. Über die Inhaltsstoffe von *Passiflora bryonioides*. 2. Mitt.: Flavonderivate. **Planta Medica**, 19, p. 177, 1970.

- POKHILO, N. D.; FEDOREYEV, S. A.; TARBEEVA, D. V.; VALESOVA, M. V.; GRIGORCHUK, V. P.; GOROVOY, P. G. Flavonoids glycosides from the aerial part of *Lespedeza tomentosa*. **Chemistry of Natural Compounds**, 57, p. 1023, 2021.
- PRAKASH, S.; ELAVARASAN, N.; SUBASHINI, K.; KANAGA, S.; DHANDAPANI, R.; SIVANANDAM, M.; KURARADHAS, P.; THIRUNAVUKKARASU, C.; SUJATHA, V. Isolation of hesperetin – A flavonoid from *Cordia sebestena* flowers extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via *in vitro* and *in silico* molecular docking studies. **Journal of Molecular Structure**, 1207, artigo 127751, 2020.
- PRIMIKYRI, A.; MAZZONE, G.; LEKKA, C.; TAZKOS, A. G.; RUSSO, N.; GEROTHANASSIS, I. P. Understanding zinc(II) chelation with quercetin and luteolin: A new combined NMR and theoretical study. **The Journal of Physical Chemistry**, 119, p. 83, 2015.
- RAAL, A.; MEOS, A.; HINRIKUS, T.; HEINÄMÄKI, J.; ROMÄNE, E.; GUDIENÉ, V.; JAKŠTAS, V.; KOSHOVYI, A.; KOVALEVA, A.; FURSENCO, C. Dragendorff's reagent: Historical perspectives and current status of a versatile reagent introduced over 150 years ago at the University of Dorpat Tartu, Estonia. **Pharmazie**, 75, p. 299, 2020.
- RIBEIRO, R. T. M. **Mobilização de reservas durante a germinação e estabelecimento de plântulas de *Macrolobium acaciifolium* Benth. (Leguminosae) e seu papel na adaptação aos pulsos de alagamento na Amazônia.** Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.
- RIU, F.; RUDA, A.; IBBA, R.; SESTITO, S.; LUPINO, I.; PIRAS, S.; WIDMALM, G.; CARTA, A. Antibiotics and carbohydrate-containing drugs targeting bacterial cell envelopes: an overview. **Pharmaceutical**, 15, p. 942, 2022.
- ROSANDY, A. R.; ISHAK, S. S. O.; SABRI, N. A.; AHMAD, W. Y. W.; MUQARRABUN, L. M. R. Antibacterial activity of lupeol from the bark of *Dehaasia cuneate* (Lauraceae). **Current Research on Biosciences and Biotechnology**, 2, p. 145, 2021.
- SALMANI, J. M. M.; ZHANG, X.; JACOB, J. A.; CHEN, B. Apigenin's anticancer properties and molecular mechanisms of action: Recent advances and future perspectives. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 15, p. 321, 2017.
- SCHMIDTLEIN, H.; HERRMANN, K. Quantitative analysis of flavonones and 3-hydroxyflavonones by thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography**, 123, p. 385, 1976.
- SCHÖNGART, J. Growth-Oriented Logging (GOL): A new concept towards sustainable forest management in Central Amazonian várzea floodplains. **Forest Ecology and Management**, 256, p. 46, 2008.
- SCHRIMPE-RUTLEDGE, A. C.; SHERROD, S. D.; McLEAN, J. A. Improving the Discovery of secondary metabolite natural products using ion mobility-mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, 42, p. 160, 2018.

- SERRA, A. C. S.; SOUZA, N. S. V.; MIGLIOLO, L.; SILVA, L. M. G. E. Secondary metabolites with antitumor activity: a review. **Research, Society and Development**, 11, artigo e49511326786, 2022.
- SHAI, L. J.; MCGAW, L. J.; ADEROGBA, M. A.; MDEE, L. K.; ELOFF, J. N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, 119, p. 238, 2008.
- SHAVANOV, M. V. The role of food crops within the Poaceae and Fabaceae families as nutritional plants. **IOP Conferences Series: Earth and Environmental Sciences**, 642, artigo 012111, 2021.
- SHEICHENKO, V. I.; SHEICHENKO, O. P.; ANUFRIEVA, V. V.; TOLKACHEV, O. N.; DYUMAEV, K. M.; SOKOL'SKAYA, T. A. NMR study of the phenolic component composition of the plant metabolomes. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, 50, p. 83, 2016.
- SILVA, D. R. **Estudo fitoquímico dos extratos metanólicos de flores e folhas de *Macrolobium acaciifolium* e algumas atividades biológicas de seus extratos.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2018.
- SILVA, E. F. R.; REIS, A. R. S.; CARVALHO, J. C.; LISBOA, P. L. B.; URBINATI, C. V. Anatomia sistemática do lenho de espécies de Fabaceae. **Enciclopédia Biosfera**, 10, p. 128, 2014.
- SILVA, J. R.; YULE, T. S.; SCREMIN-DIAS, E. Structural features and contribution of belowground buds to conservation of Fabaceae species in a seasonally dry Neotropical environment. **Flora**, 264, artigo 151570, 2020.
- SILVA, L. A. L.; FAQUETE, L. G.; REGINATTO, F. H.; SANTOS, A. D. C.; BARISON, A.; BIAVATTI, M. W. Phytochemical analysis of *Venonanthura tweediana* and a validated UPLC-PDA method of quantification of eriodityol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 25, p. 375, 2015.
- SOUZA, R. B. L.; NASCIMENTO, Y. M.; GOUVEIA, R. G.; SOUTO, A. L.; SOBRAL, M. V.; COSTA, V. C. O.; MELO, J. I. M.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. Dereplication-guided isolation of a new flavonoid triglycoside from *Macroptilium martii* and its cytotoxicity evaluation. **Phytochemistry Letters**, 39, p. 144, 2020.
- STAHL, E.; GLATZ, A. Zur farbreaktion der anisaldehyd-schwefelsäure als reagenz in der dünnshicht-chromatographie. **Journal of Chromatography**, 240, p. 318, 1982.
- TENG, J.; LI, J.; ZHAO, Y.; WANG, M. Hesperetin, a dietary flavonoid, inhibits AGEs-induced oxidative stress and inflammation in RAW264.7 cells. **Journal of Functional Foods**, 81, artigo 104480, 2021.
- TWILLEY, D.; RADEMAN, S.; LALL, N. A review on traditionally used African medicinal plants, their secondary metabolites and their potential development

- into anticancer agente. **Journal of Ethnopharmacology**, 261, artigo 113101, 2020.
- ULLRICH, C. I.; ALONI, R.; SAEED, M. E. M.; ULLRICH, W.; EFFERTH, T. Comparison between tumors in plants and human being: Mechanisms of tumor development and therapy with secondary plant metabolites. **Phytomedicine**, 64, artigo 153081, 2019.
- UTARI, F.; ITAM, A.; SYAFRIZAYANTI, S.; PUTRI, W. H.; NINOMIYA, M.; KOKETSU, M.; TANAKA, K.; EFDI, M. Isolation of flavonol rhamnosides from *Pometia pinnata* leaves and investigation of α -glucosidase inhibitory activity of flavonol derivatives. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 9, p. 053, 2019.
- VAN DER HEIDE, R. F. Reagents for the detection of antioxidants on thin layer of silica. **Journal of chromatography**, 24, p. 239, 1966.
- WANG, T.; LI, Q.; BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 13, p. 12, 2018.
- WFO (2022): *Macrobium* Schreb. Disponível em: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000022724>. Acessado em: 14 de dezembro de 2022.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, 89, p. 164, 2013.
- WITTMANN, F.; SCHÖNGART, J.; QUEIROZ, H. L.; WITTMANN, A. O.; CONSERVA, A. S.; PIEDADE, M. T. F.; KESSELMEIER, J.; JUNK, W. J. The Amazon floodplain Demonstration Site: Sustainable timber production and management of Central Amazonian white-water floodplains. **Ecohydrology & Hydrobiology**, 1, p. 41, 2009.
- WONKAM, A. K. N.; NGANSOP, C. A. N.; TCHUENMOGNE, M. A. T.; TCHEGNITEGNI, B. T.; BITCHAGNO, G. T. M.; AWANTU, A. F.; BANKEU, J. J. K.; BOYOM, F. F.; SEWALD, N.; LENTA, B. N. Chemical constituents from *Baphia leptobotrys* Harms (Fabaceae) and their chemophenetic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, 96, artigo 104260, 2021.
- WU, C.; HE, L.; ZHANG, Y.; YOU, C.; LI, X.; JIANG, P.; WANG, F. Separation of flavonoids with significant biological activity from *Acacia mearnsii* leaves. **RSC Advances**, 13, p. 9119, 2023.
- XU, T.; WANG, C.; JIANG, S.; YANG, T.; WU, X. Glycosilation of luteolin in hydrophilic organic solvents and structure-antioxidant relationships of luteolina glycosides. **RSC Advances**, 12, p. 18232, 2022.
- YANG, L. WEN, K.; RUAN, X.; ZHAO, Y.; WEI, F.; WANG, Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, 23, p. 762, 2018.

- YANG, Y.; ZHU, H.; CHEN, Z.; LIU, FU.; AN, Y.; FENG, Z.; JIANG, J.; ZHANG, P. NMR spectroscopic method for the assignment of 3,5-dioxygenated aromatic ring in natural products. **Journal of Natural Products**, 78, p. 705, 2015.
- YOON, H.; EOM, S.; HYUM, J.; JO, G.; HWANG, D.; LEE, S.; YONG, Y.; PARK, J. C.; LEE, Y. H.; LIM, Y. ¹H and ¹³C data on hydroxy/methoxy flavonoids and the effects of substituents on chemical shift. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 32, p. 2101, 2011.
- ZENG, X.; DU, Z.; DING, X.; JIANG, W. Protective effects of dietary flavonoids against pesticide-induced toxicity: a review. **Trends in Food Science & Technology**, 109, p. 271, 2021.
- ZHANG, Y.; LAM, K.; CHEN, L.; WAN, H.; WANG, G.; LEE, K.; YIP, C.; LIU, K.; LEUNG, P.; CHAN, H.; SHI, Y.; ZHAO, J.; LAO, L.; LI, Y.; ZHANG, Y.; MENG, W. Chemical constituents from the thorns of *Gleditsia sinensis* and their cytotoxic activities. **Journal of Asian Natural Products Research**, 12, p. 1121, 2020.
- ZHAO, L.; QI, Z.; YI, L.; LI, J.; CUI, Y.; REHMAN, F. U.; YANG, J.; LIU, J.; LI, Y.; ZHANG, J. The interaction between gut microbiota and flavonoid extract from *Smilax glabra* Roxb. and its potent alleviation of fatty liver. **Food and Function**, 12, p. 7836, 2021.
- ZHAO, X.; CHEN, R.; SHI, Y.; ZHANG, X.; TIAN, C.; XIA, D. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids from *Smilax glabra* Roxb. **Molecules**, 25, artigo 5295, 2020.
- ZIMMERMANN, R. C.; ARAGÃO, C. E. C.; ARAÚJO, P. J. P.; BENATTO, A.; CHAABAN, A.; MARTINS, C. E. N.; AMARAL, W.; CIPRIANO, R. R.; ZAWADNEAK, M. A. Insecticide activity and toxicity of essential oils against two stored-product insects. **Crop Protection**, 144, artigo 105575, 2021.

ANEXOS

Tabela A1. Lista de frações, substâncias isoladas, massas obtidas e rendimentos.

Fração	Substância (n°)	Massa (mg)	Rendimento (%)
MFo2.2.6.1.3-5.3.5	Luteolina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (1)	2,0	0,004
MFo2.2.7.4.1	Neoastilbina (2)	21,0	0,044
MFo2.2.7.4.2	Astilbina (3)	20,0	0,042
MFo2.2.7.4.3	Neoisostilbina (4)	3,4	0,007
MFo2.2.7.4.4	Isoastilbina (5)	8,3	0,017
MFo2.2.7.4.5	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo (6)	3,0	0,006
MFo2.4.3.1.3-4.3	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (7)	3,4	0,045
MFo2.4.3.1.5-6.5		18,0	
MFo2.4.3.1.3-4.4.3	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo (8)	4,0	0,017
MFo2.4.3.1.5-6.7		4,0	
MFo2.4.3.1.7.2	Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo (9)	2,0	0,012
MFo2.4.3.1.8.3		4,0	
MFo2.4.3.2.4.10	Kaempferol-7- <i>O</i> -rutinosídeo (10)	1,3	0,002
MGa1.2.3	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (11)	1,3	0,004
MGa1.2.6	Ácido 3-metoxi,4-hidroxibenzoico (12)	1,5	0,005
MGa1.3.2-3.1.1	Crisoeriol (13)	5,0	0,016
MGa1.4-7.2	Apigenina (14)	2,8	0,009
MGa1.3.2-3.1.2	3,4-dihidroxibenzoato de metila (15)	1,8	0,006
MGa1.3.8-16.6.2	7,4'-dihidroxiflavona (16)	0,5	0,001
MGa1.3.8-16.8.2	Eriodictiol (17)	1,2	0,004
MGa1.3.8-16.8.4	Luteolina (18)	1,3	0,004
MFoH3-4.1.1	Lupeol (19)	5,0	0,200
MFoH3-4.1.2	β -amirina (20)	3,0	0,120
MFoH3-4.1.3	24-metilenocicloartenol (21)	2,0	0,080
MGaH3.2	Friedelina (22) + Lichexantona (23)	12,0	0,750
MFoH5-7	β -sitosterol (24) + Estigmasterol (25)	305,6	12,23
MGaH5		230,5	14,40

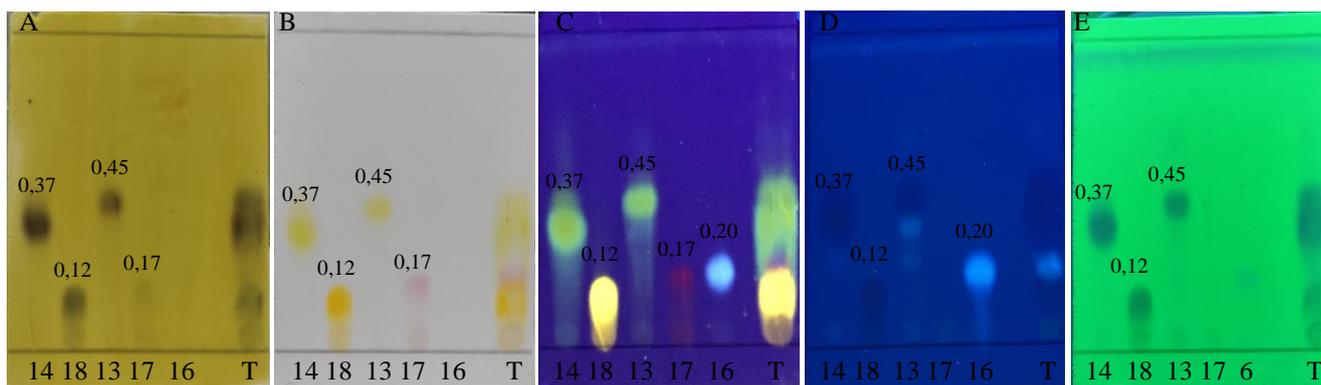


Imagem A1. Substâncias **14** (apigenina), **18** (luteolina), **13** (crisoeriol), **17** (eriodictiol) e **16** (7,4-dihidroxi flavona) eluídas em $\text{CHCl}_3/\text{acetona}$ 8:2. Reveladores FeCl_3 (A), NP/PEG (B), NP/PEG + UV-365 nm (C), UV-365 nm (D) e UV-254 nm (E). T = substâncias juntas. Valores acima das substâncias referem-se aos Rf.

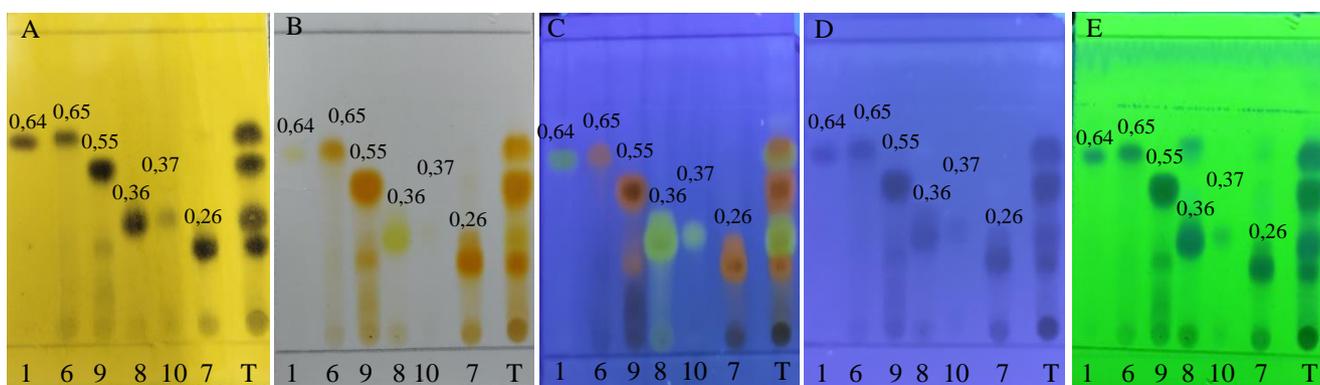


Imagem A2. Substâncias **1** (luteolina-3'-O-ramnosídeo), **6** (quercetina-3-O-ramnosídeo), **9** (quercetina-3-O-glicosídeo), **8** (kaempferol-3-O-rutinosídeo), **10** (kaempferol-7-O-rutinosídeo) e **7** (quercetina-3-O-rutinosídeo) eluídas em $\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$ 9:1:1:1. Reveladores FeCl_3 (A), NP/PEG (B), NP/PEG + UV-365 nm (C), UV-365 nm (D) e UV-254 nm (E). T = substâncias juntas.

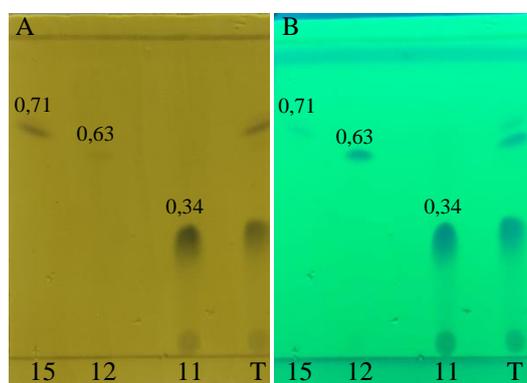


Imagem A3. Substâncias **15**, **12** e **11** eluídas em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 85:15. Reveladores FeCl_3 (A) e UV-254 nm (B). T = substâncias juntas.

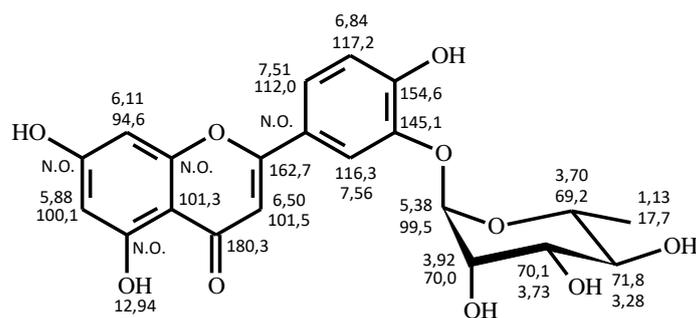


Figura 1A. Luteolina-3'-O-ramosídeo (**1**) e seus deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C

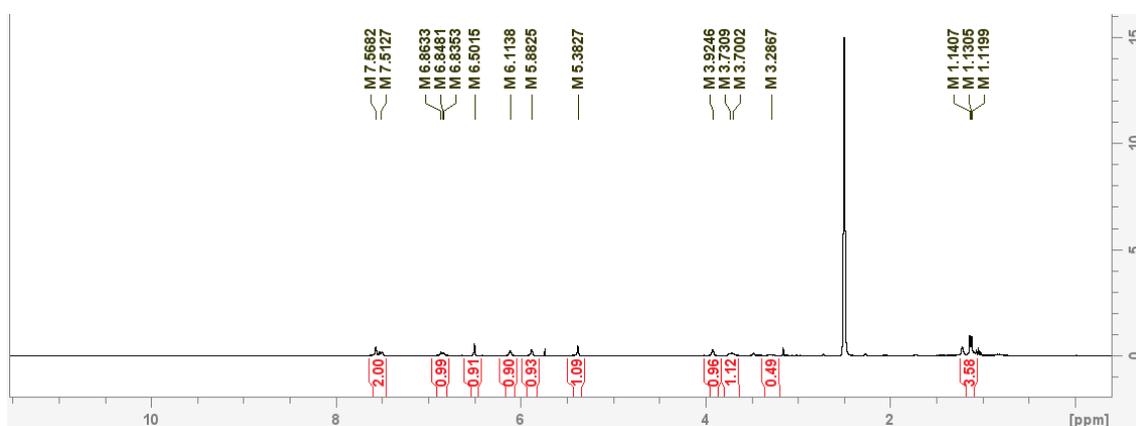


Figura 2A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) com supressão do sinal da água de **1** em 300 MHz

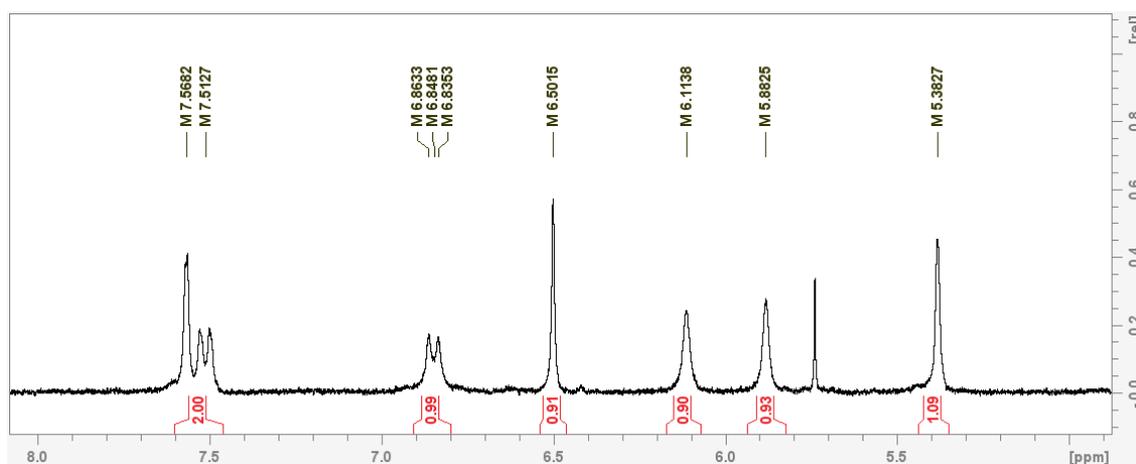


Figura 3A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) de **1** em 300 MHz (expansão 8,00-5,00 ppm)

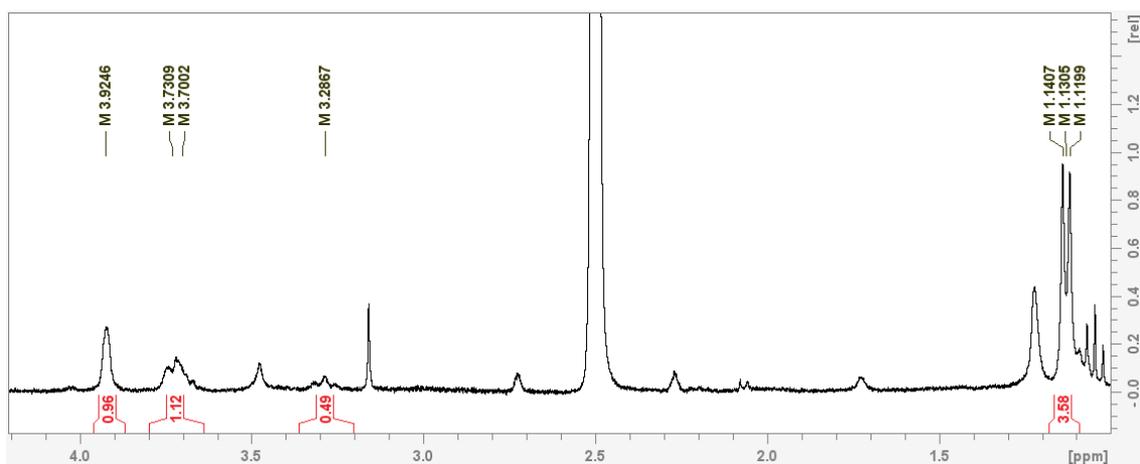


Figura 4A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) de **1** em 300 MHz (expansão 4,25-0,97 ppm)

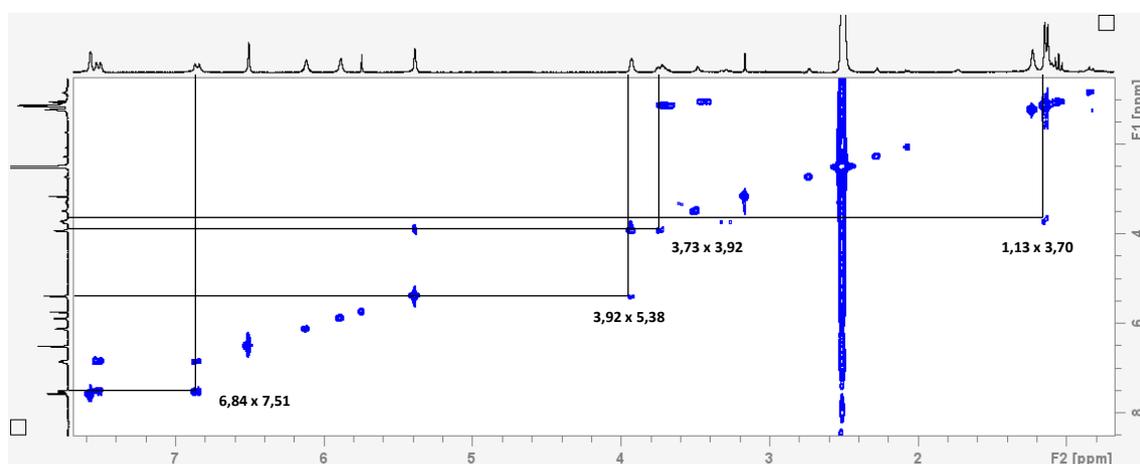


Figura 5A. Espectro COSY (DMSO-d_6) de **1**

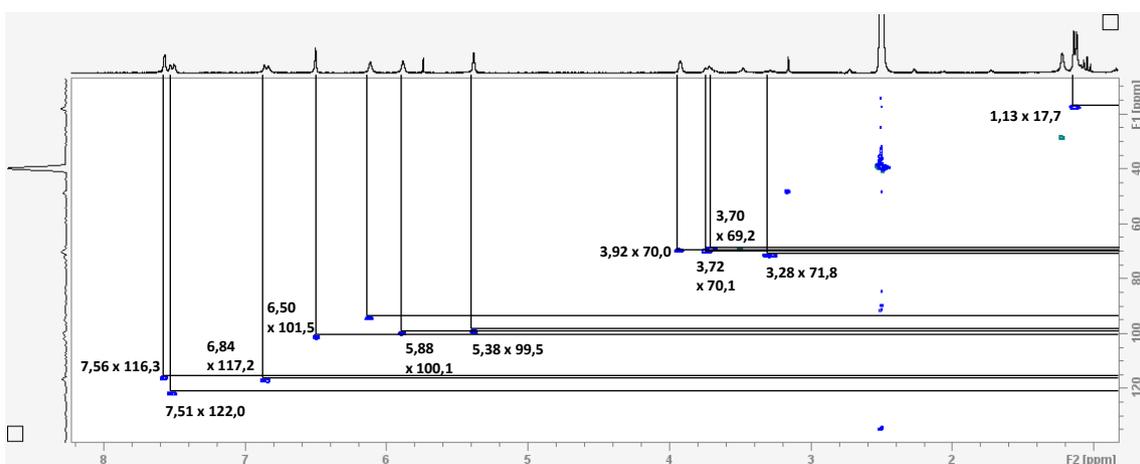


Figura 6A. Espectro HSQC (DMSO-d_6) de **1**

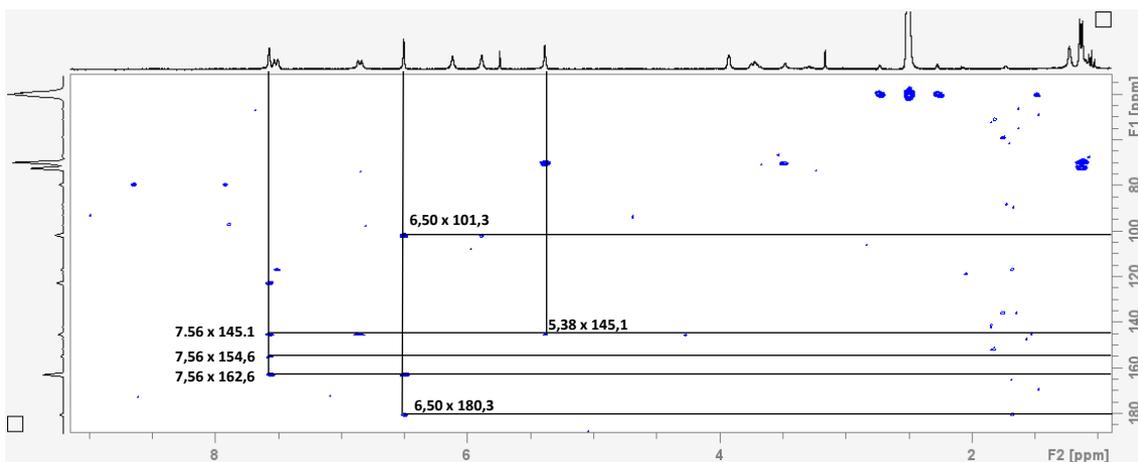


Figura 7A. Espectro HMBC (DMSO- d_6) de 1

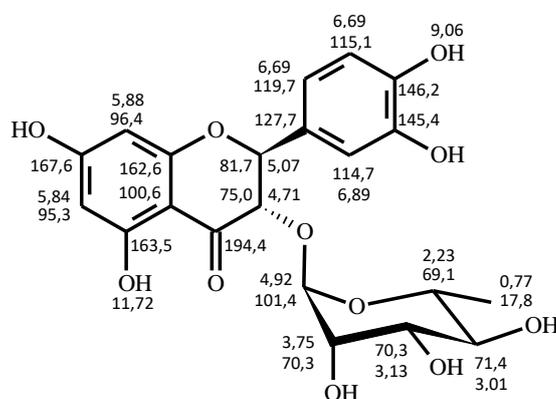


Figura 8A. Neoastilbina (2) e seus deslocamentos químicos de 1H e ^{13}C

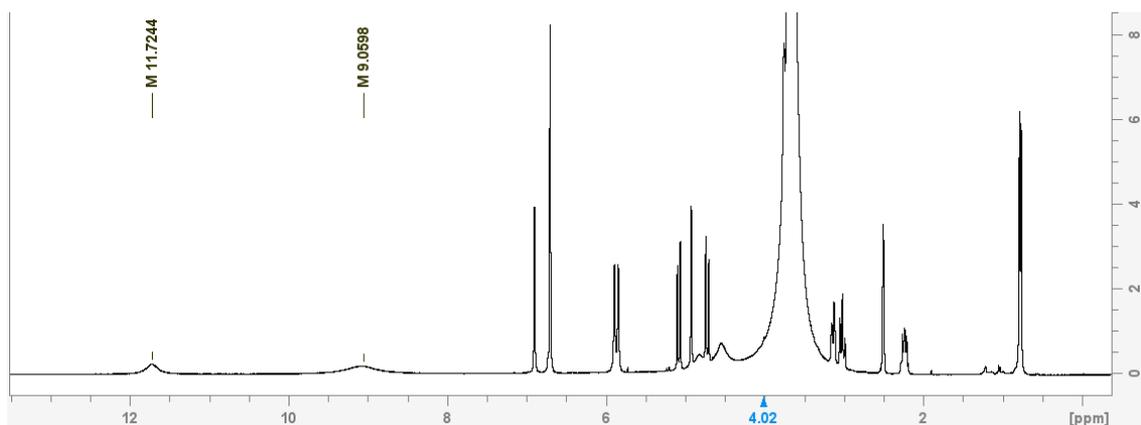


Figura 9A. Espectro de RMN de 1H (DMSO- d_6) sem supressão do sinal da água de 2 em 300 MHz

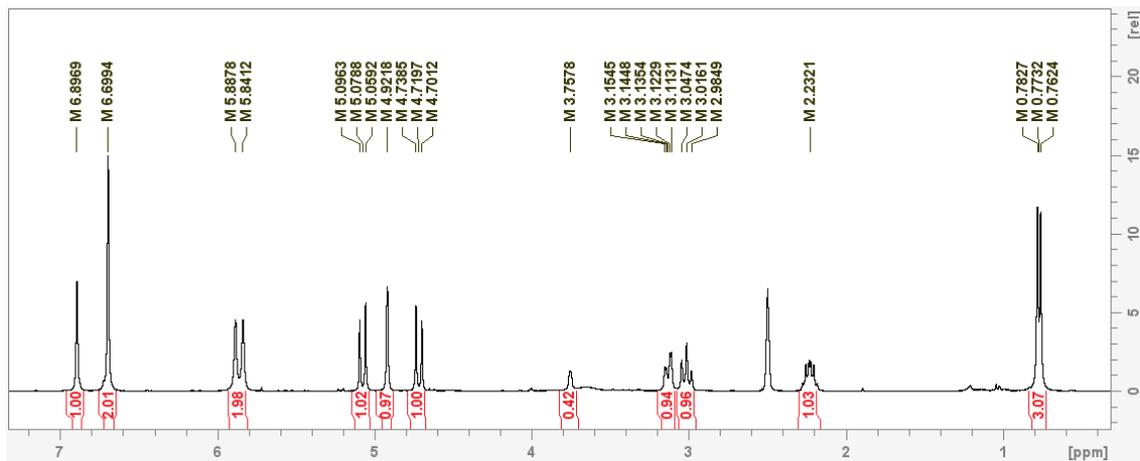


Figura 10A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) com supressão do sinal da água de **2** em 300 MHz

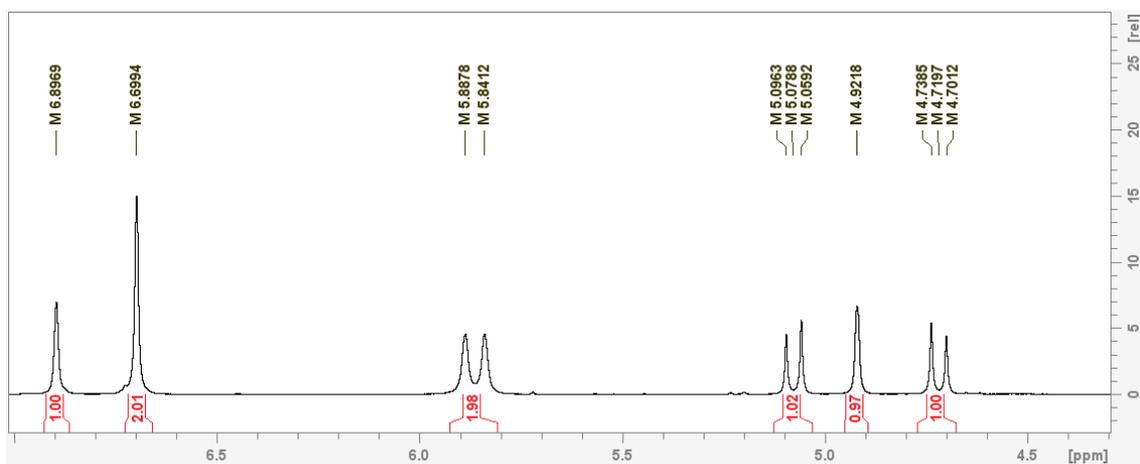


Figura 11A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) de **2** (expansão 7,00-4,35 ppm)

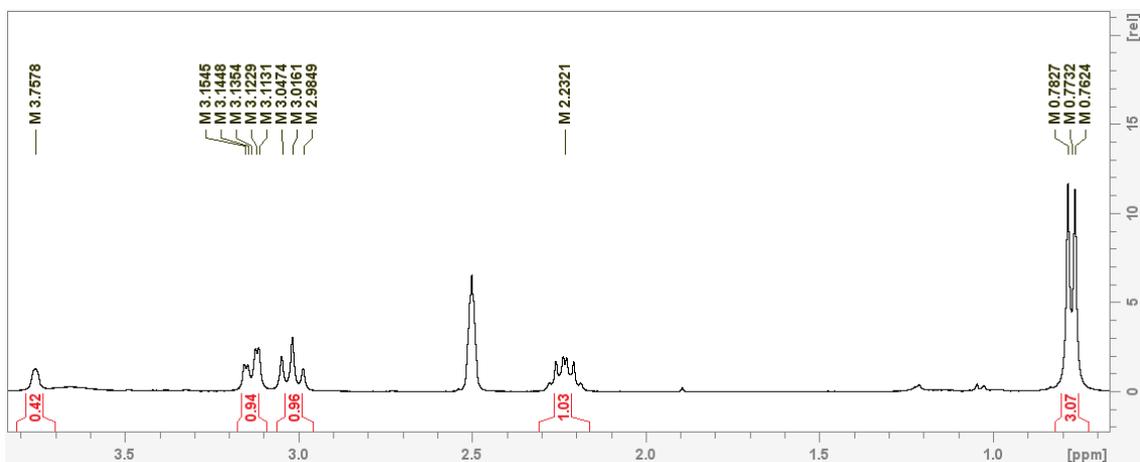


Figura 12A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) de **2** (expansão 3,8-0,50 ppm)

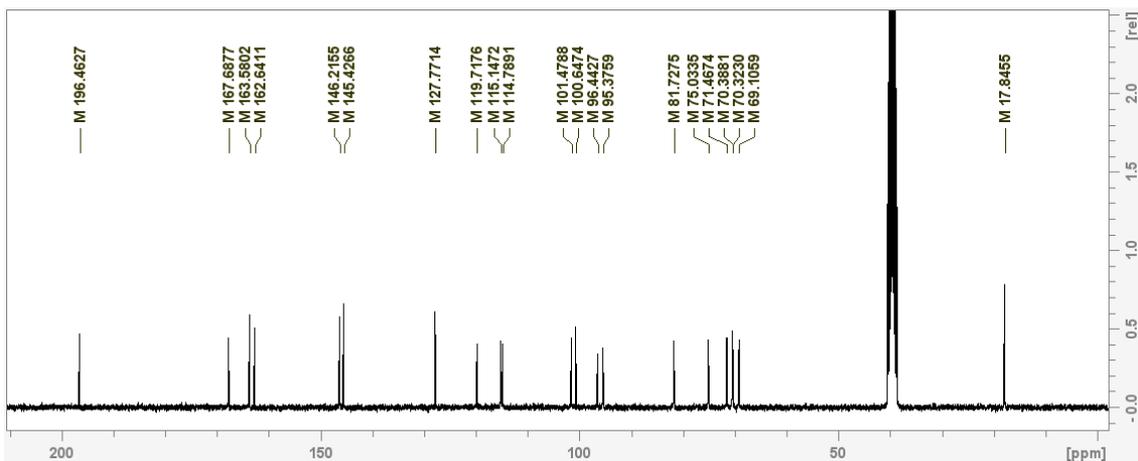


Figura 13A. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6) de 2 em 75 MHz

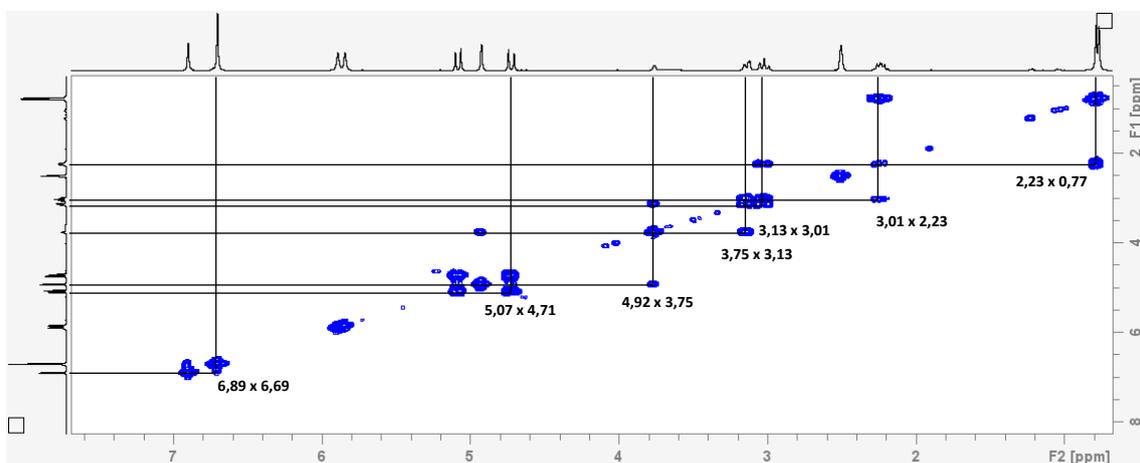


Figura 14A. Espectro COSY (DMSO-d_6) de 2

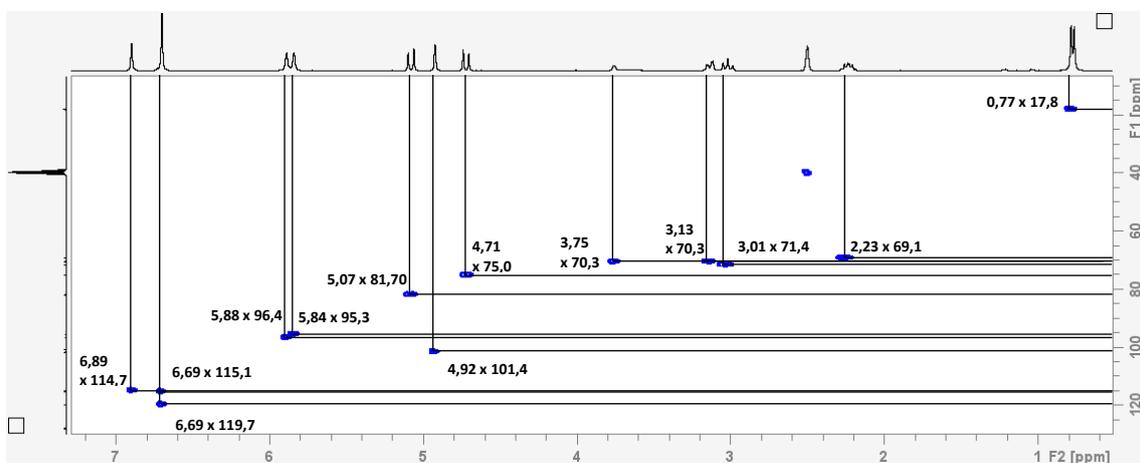


Figura 15A. Espectro HSQC (DMSO-d_6) de 2

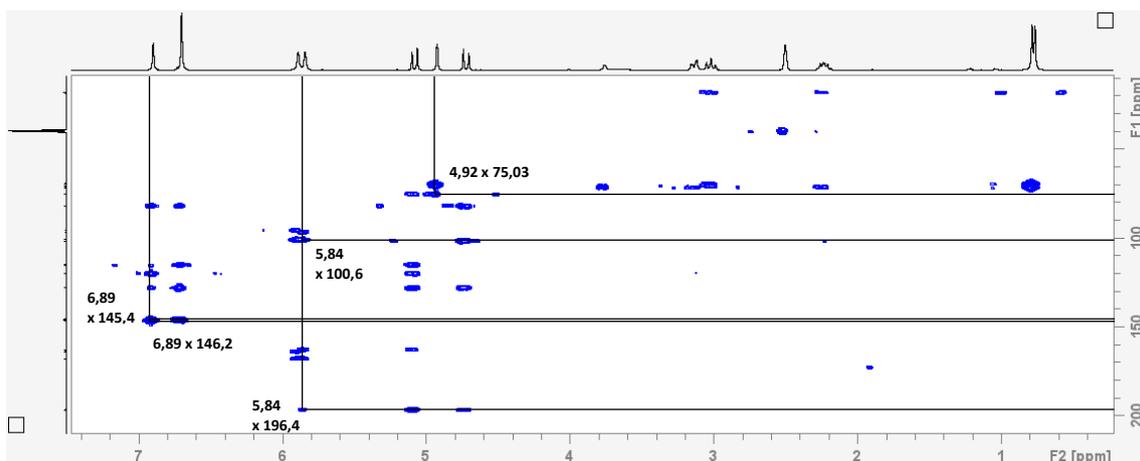


Figura 16A. Espectro HMBC (DMSO- d_6) de 2

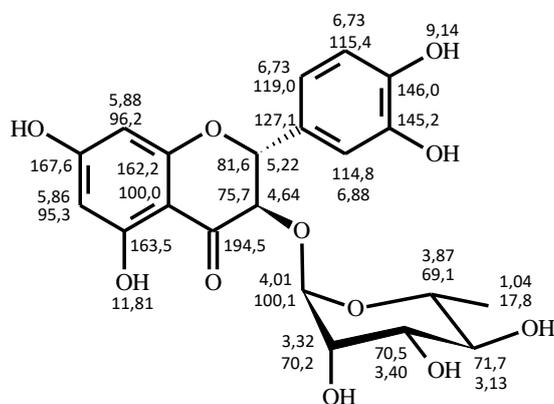


Figura 17A. Astilbina (3) e seus deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C

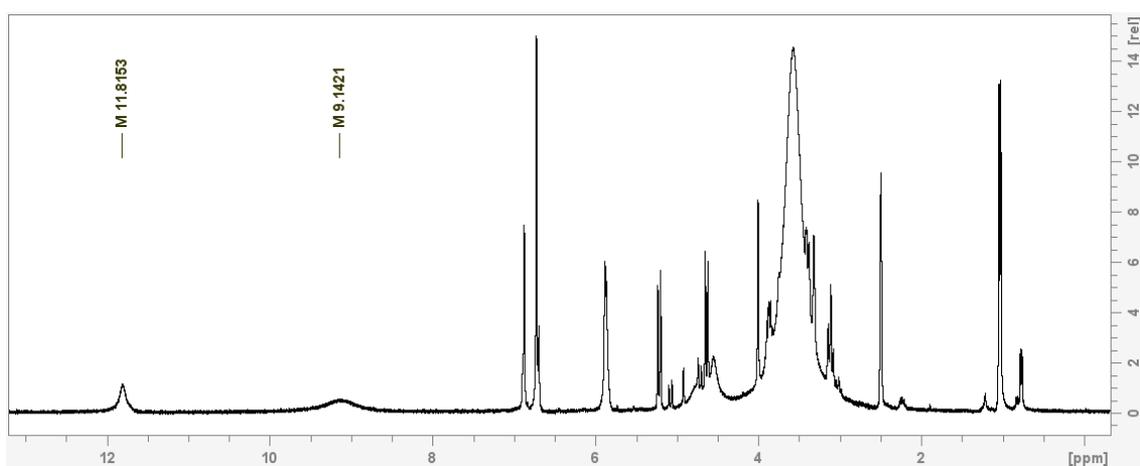


Figura 18A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) sem supressão do sinal da água de 3 em 300 MHz

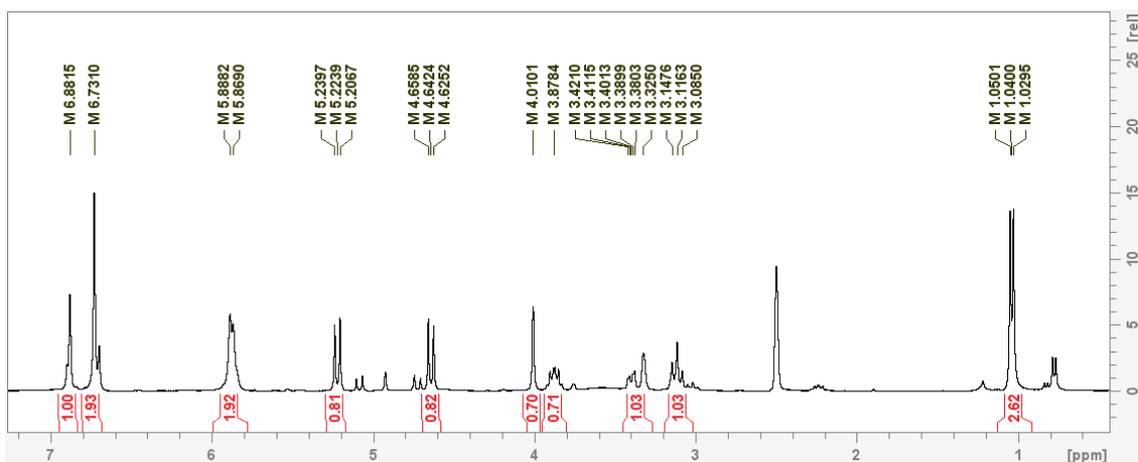


Figura 19A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) com supressão do sinal da água de **3** em 300 MHz

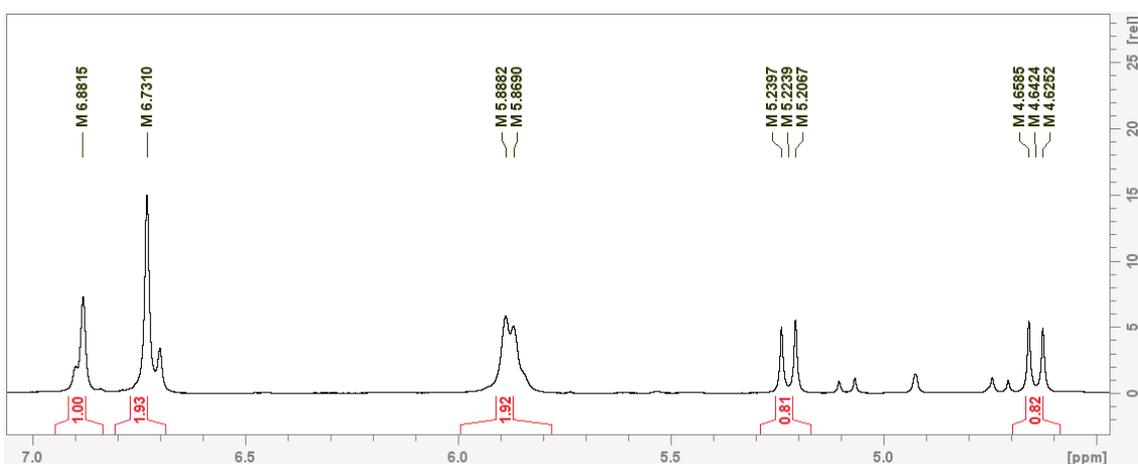


Figura 20A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de **3** (expansão 7,00-4,55 ppm)

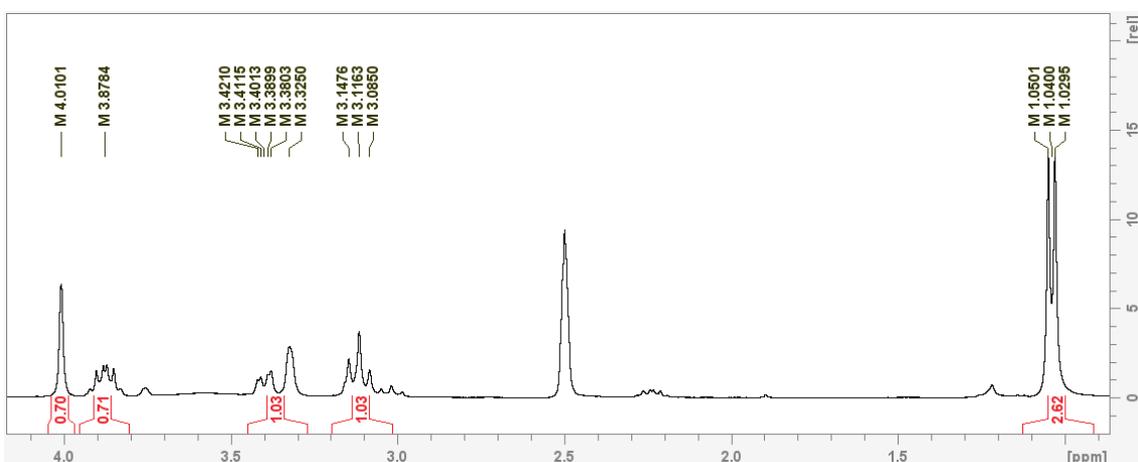


Figura 21A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de **3** (expansão 4,15-0,90 ppm)

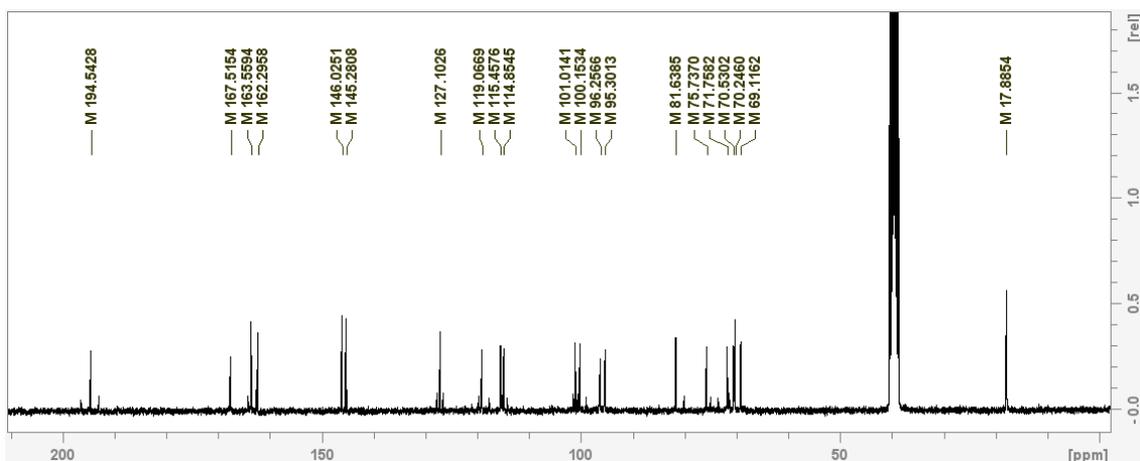


Figura 22A. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6) de 3 em 75 MHz

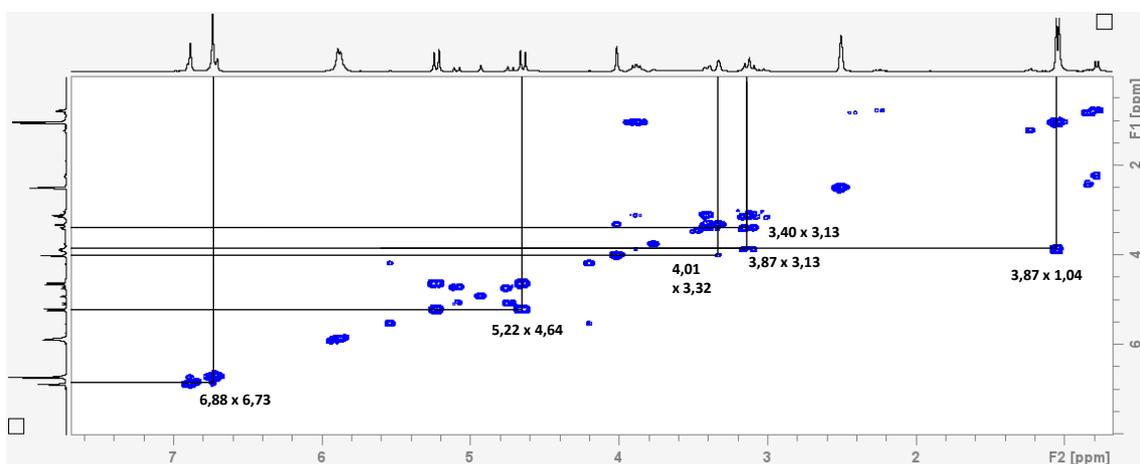


Figura 23A. Espectro COSY (DMSO- d_6) de 3

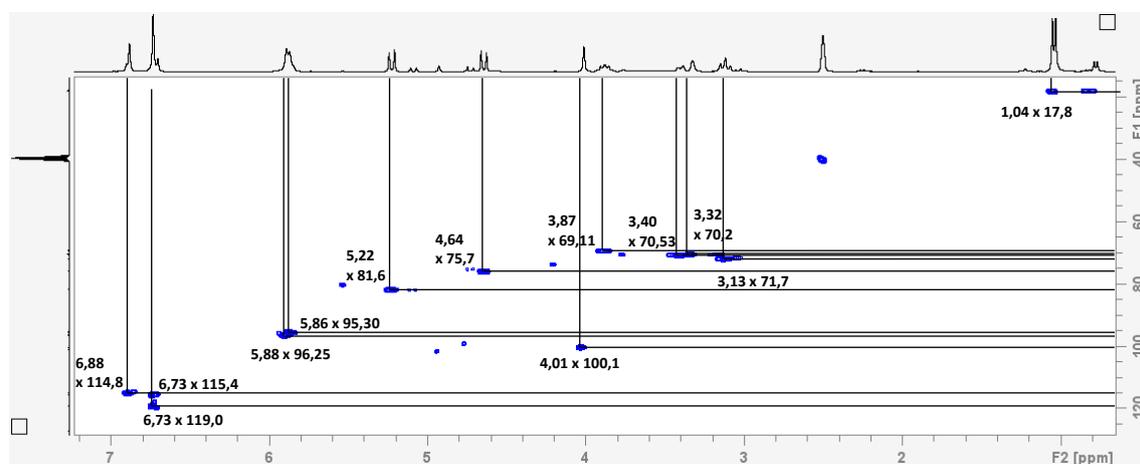


Figura 24A. Espectro HSQC (DMSO- d_6) de 3

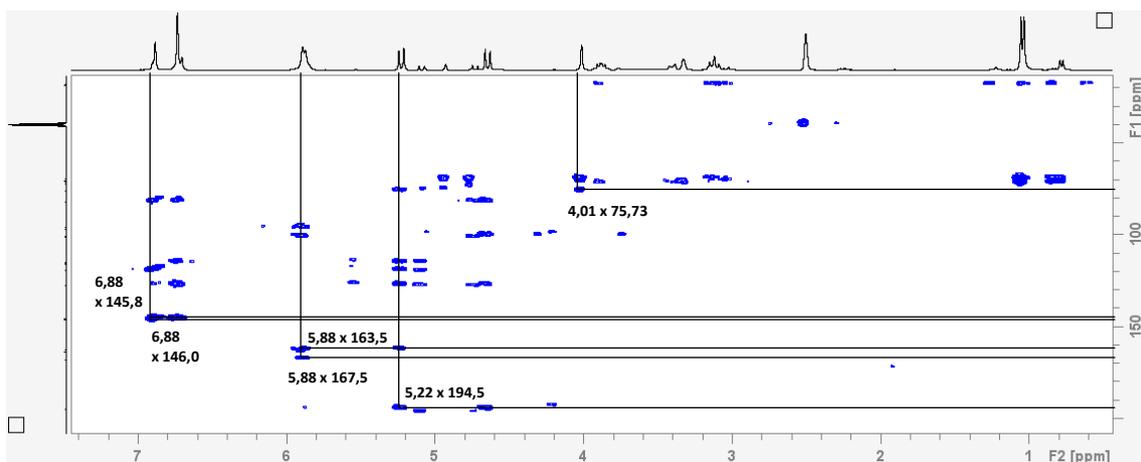


Figura 25A. Espectro HMBC (DMSO- d_6) de **3**

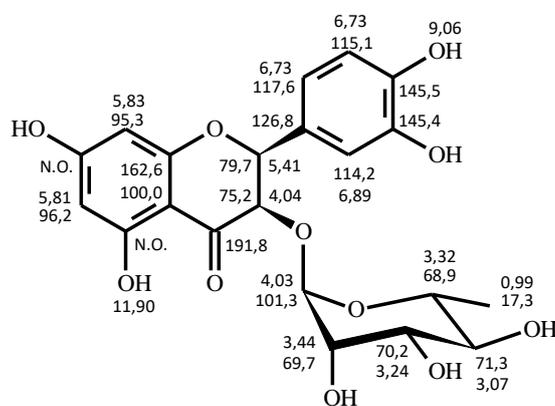


Figura 26A. Neisoastilbina (**4**) e seus deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C

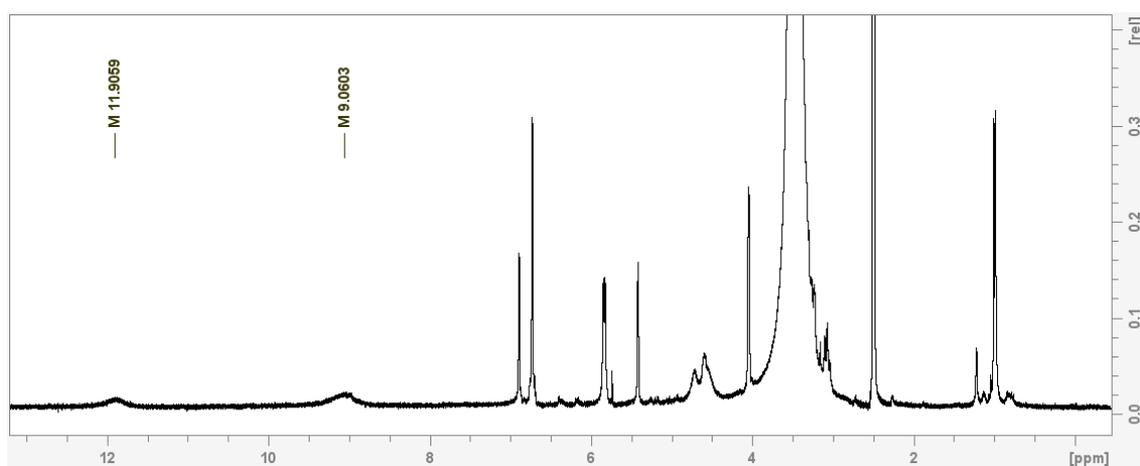


Figura 27A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) sem supressão do sinal da água de **4** em 300 MHz

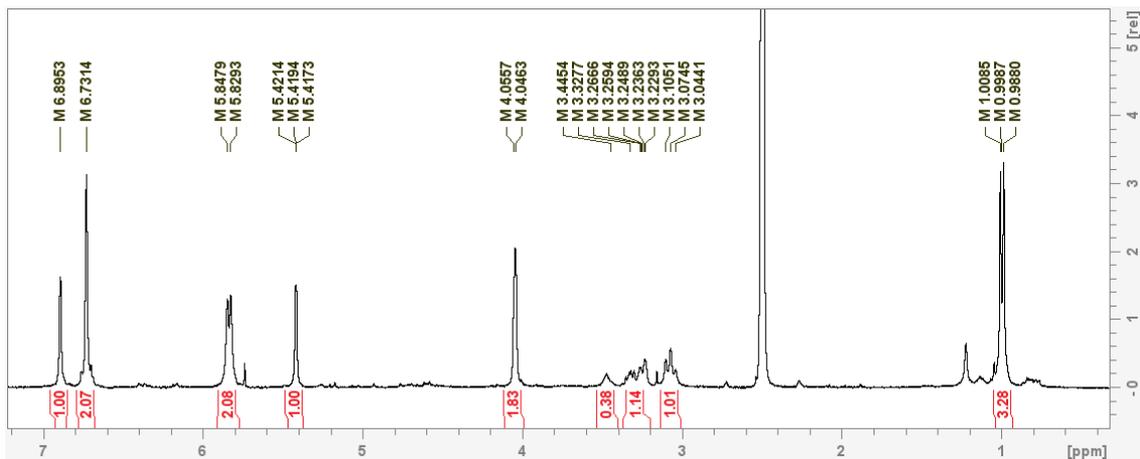


Figura 28A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) com supressão do sinal da água de **4** em 300 MHz

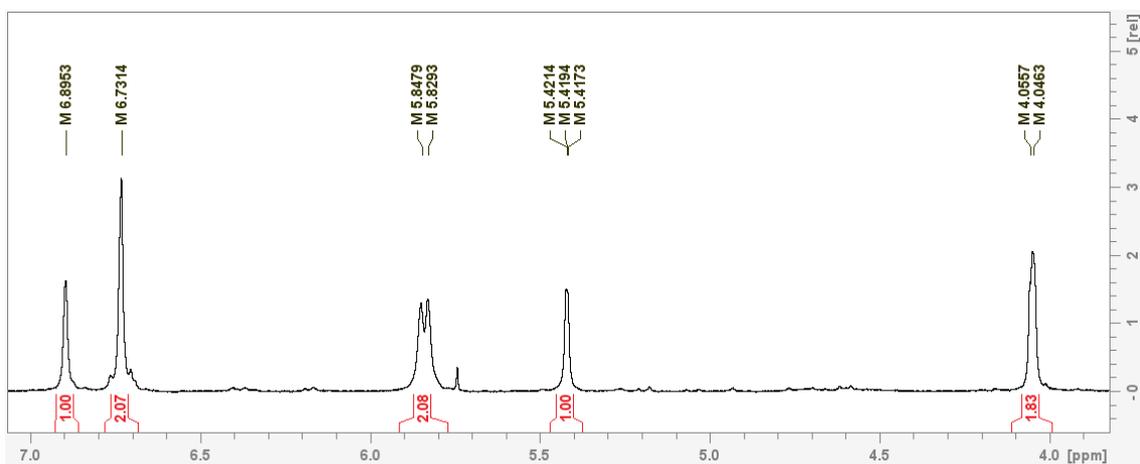


Figura 29A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) de **4** (expansão 7,00-4,00 ppm)

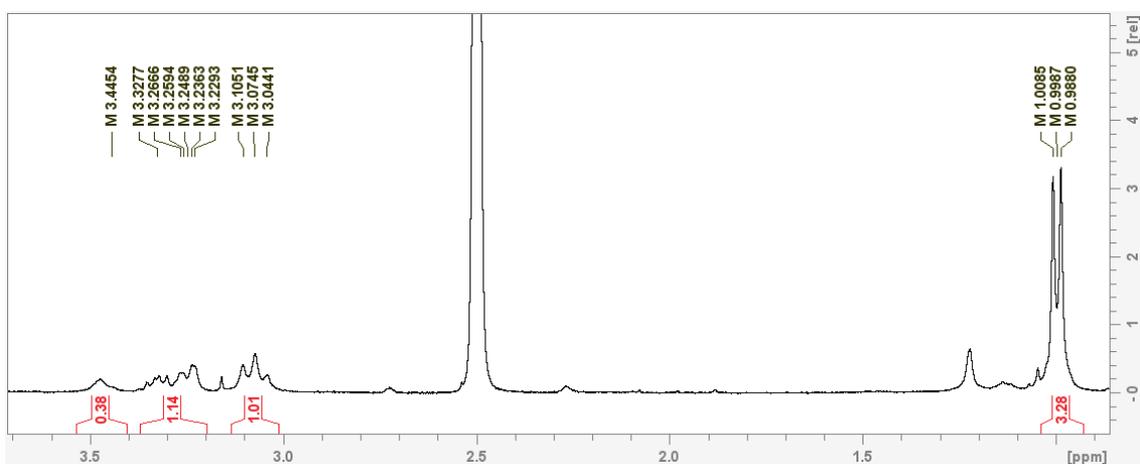


Figura 30A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) de **3** (expansão 3,70-0,90 ppm)

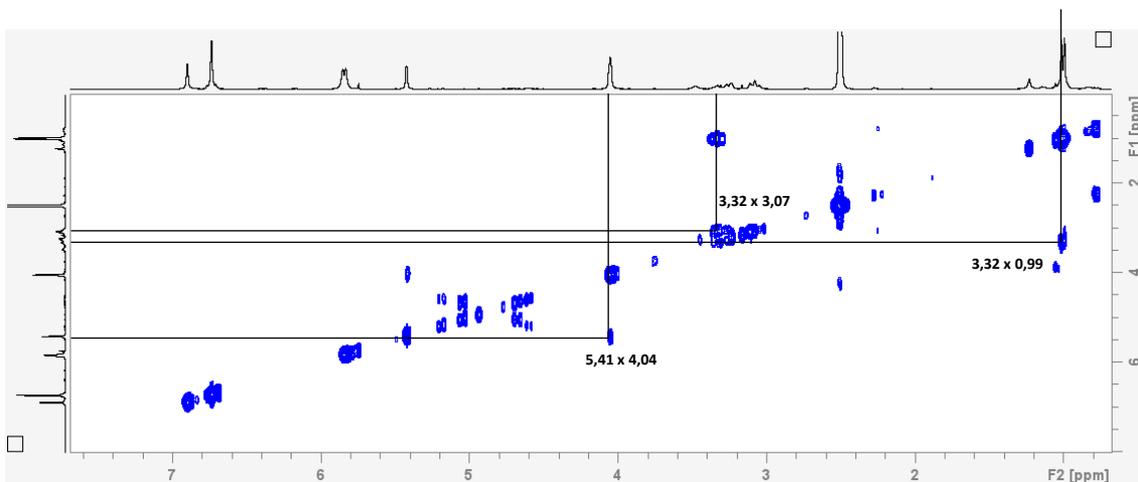


Figura 31A. Espectro COSY (DMSO- d_6) de 4

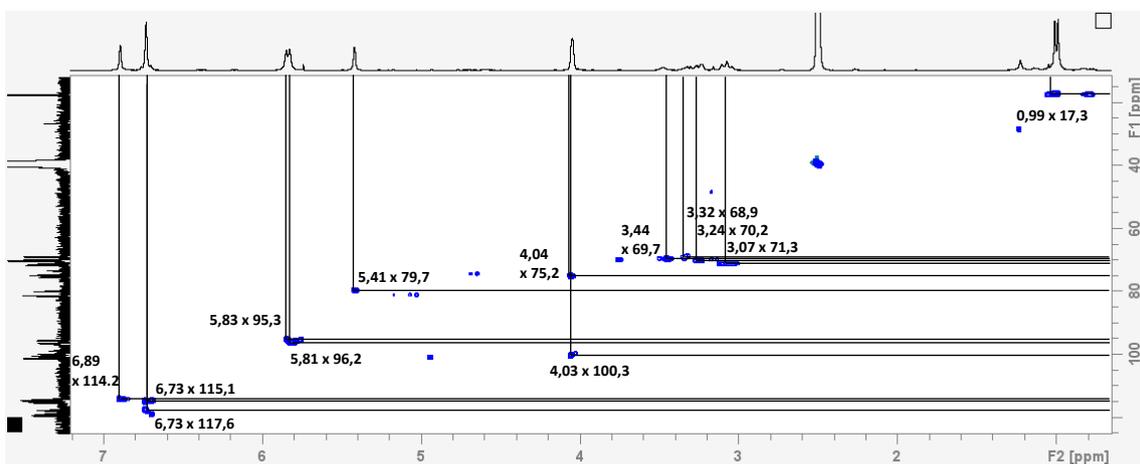


Figura 32A. Espectro HSQC (DMSO- d_6) de 4

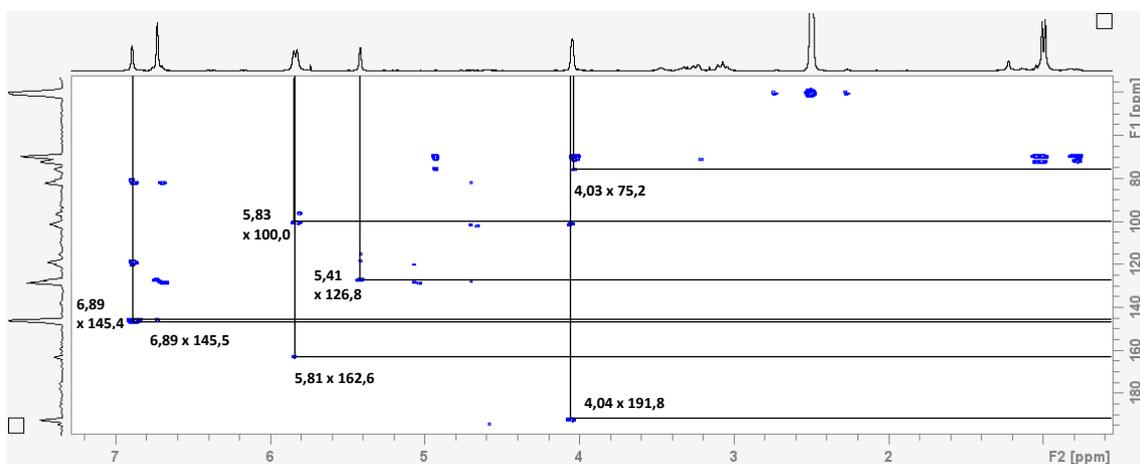


Figura 33A. Espectro HMBC (DMSO- d_6) de 4

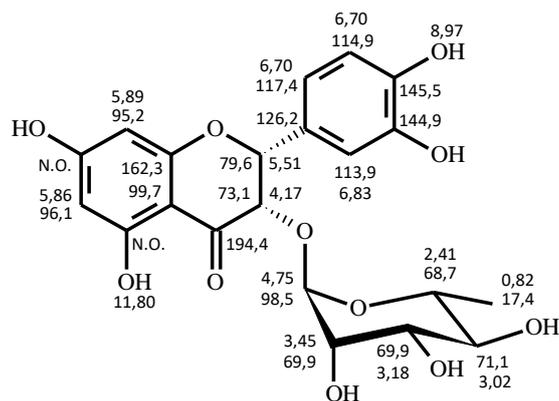


Figura 34A. Isoastilbina (5) e seus deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C

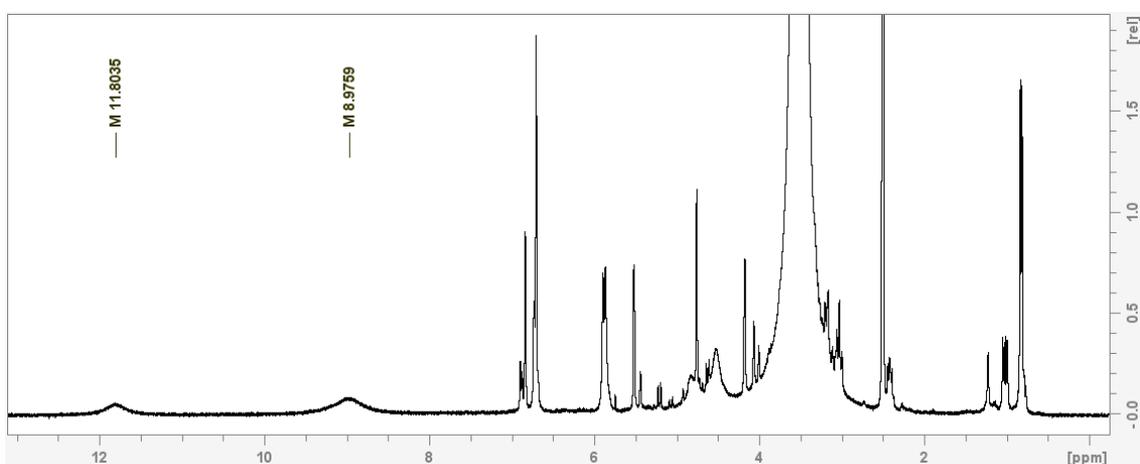


Figura 35A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) sem supressão do sinal da água de 5 em 300 MHz

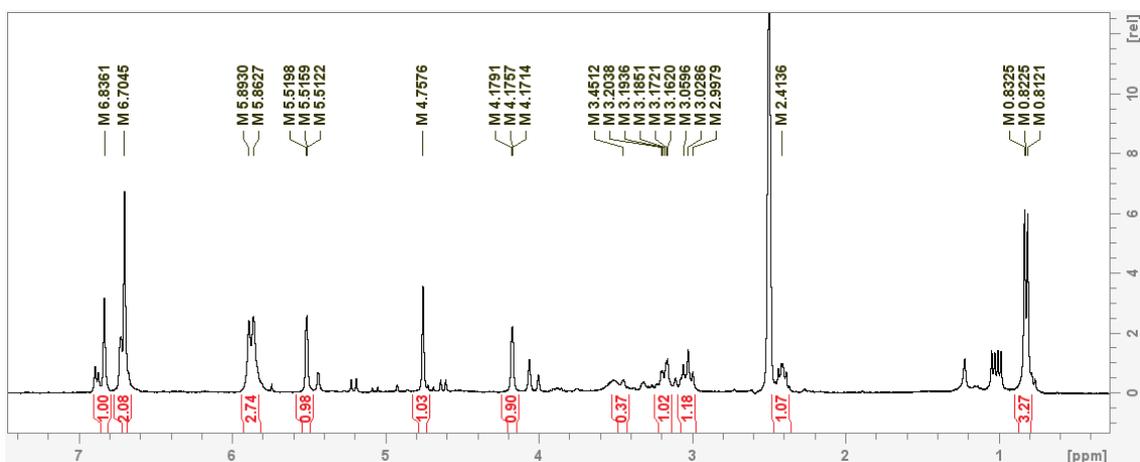


Figura 36A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) com supressão do sinal da água de 5 em 300 MHz

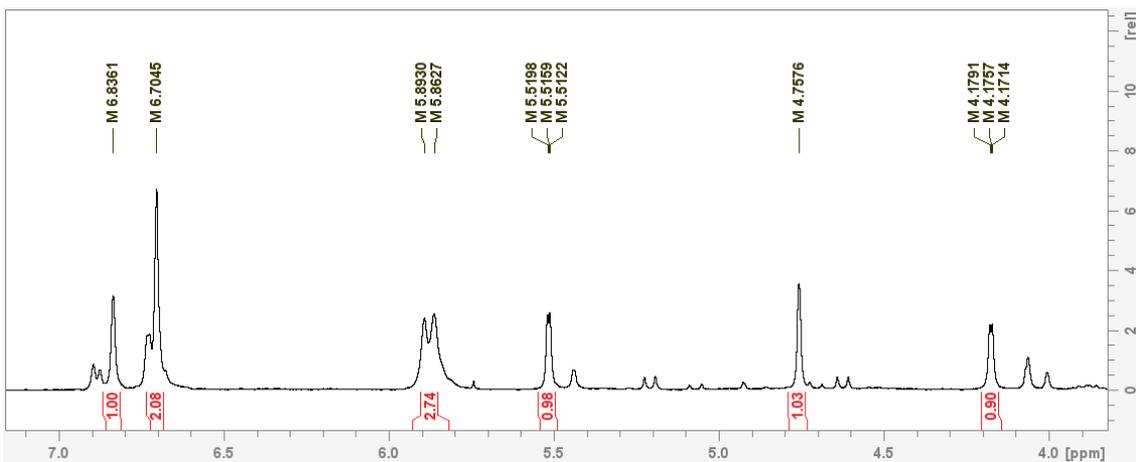


Figura 37A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) de 5 (expansão 7,00-4,00 ppm)

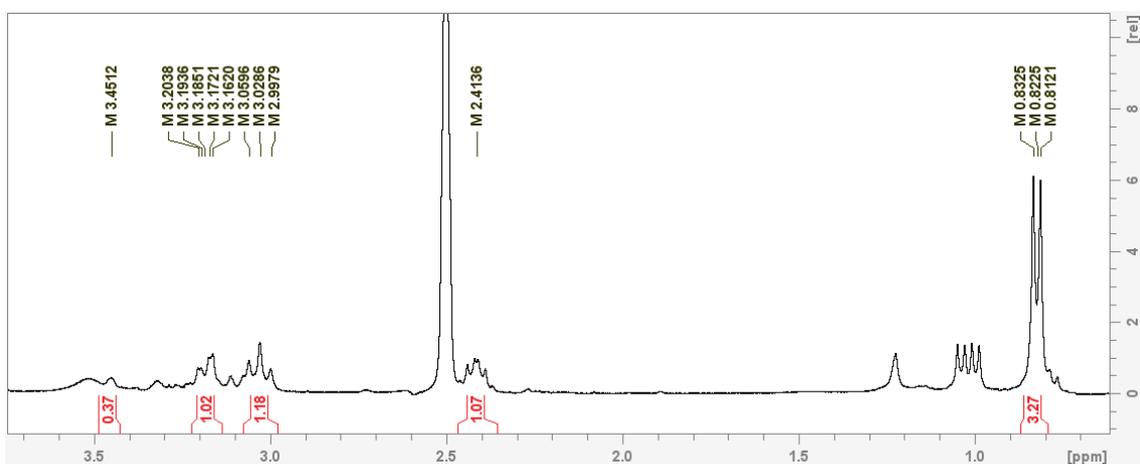


Figura 38A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) de 5 (expansão 3,70-0,60 ppm)

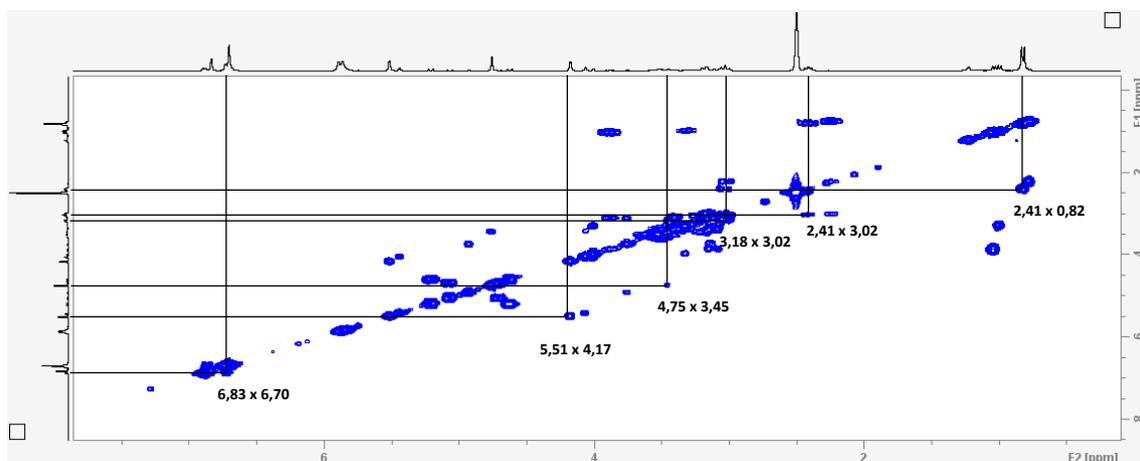


Figura 39A. Espectro COSY (DMSO-d_6) de 5

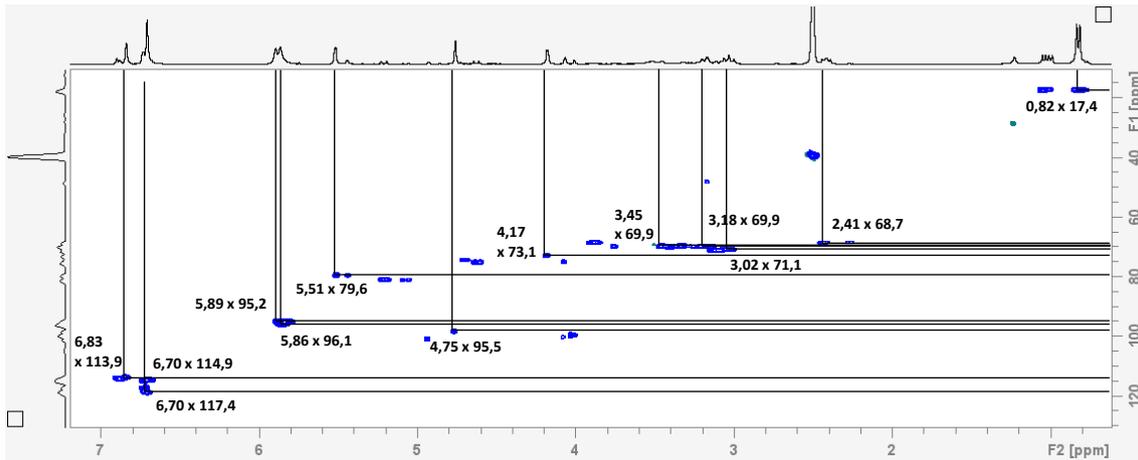


Figura 40A. Espectro HSQC (DMSO- d_6) de 5

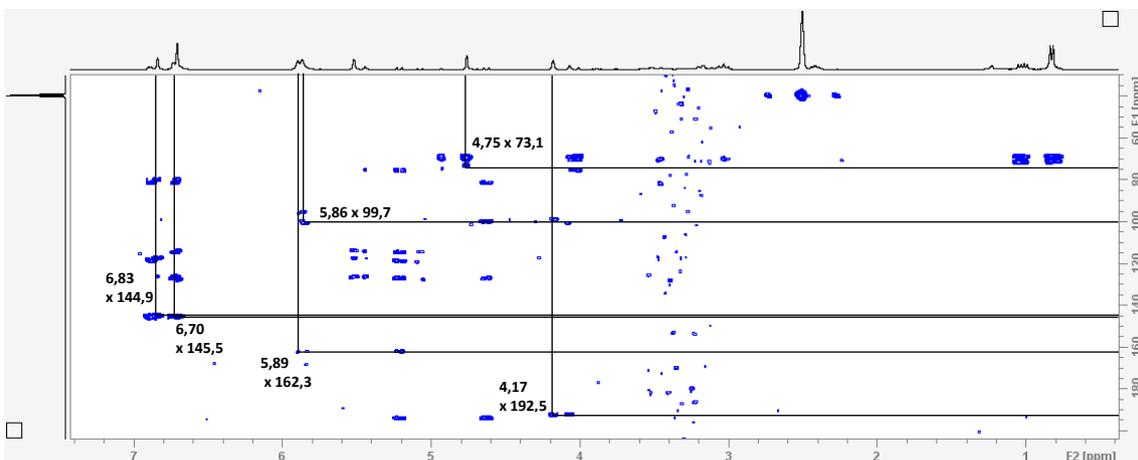


Figura 41A. Espectro HMBC (DMSO- d_6) de 5

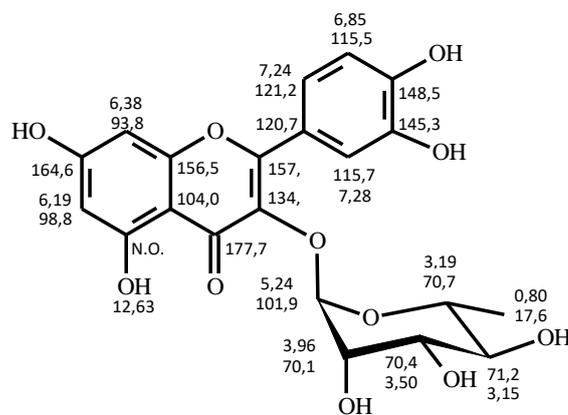


Figura 42A. Quercetina-3-O-ranmosídeo (6) e seus deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C

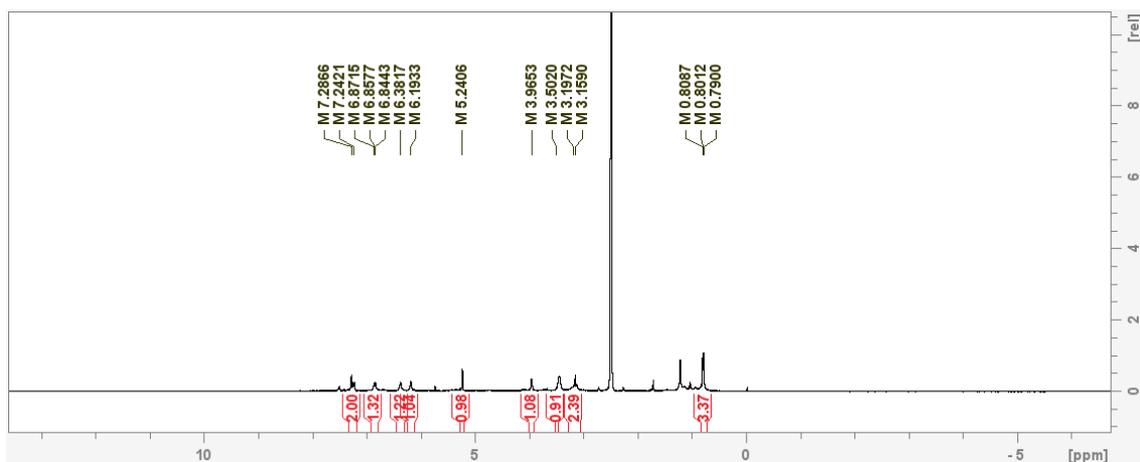


Figura 43A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) com supressão do sinal da água de **6** em 300 MHz

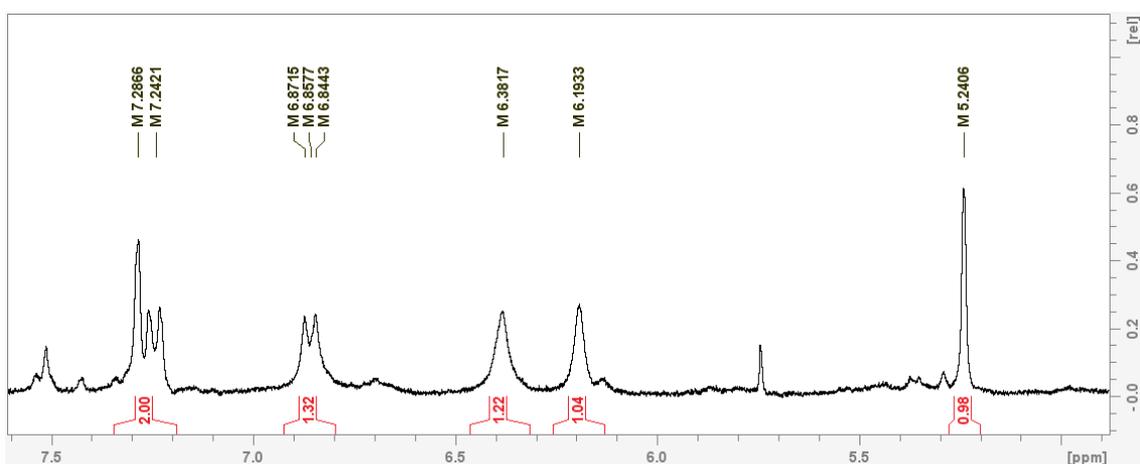


Figura 44A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de **6** (expansão 7,50-5,00 ppm)

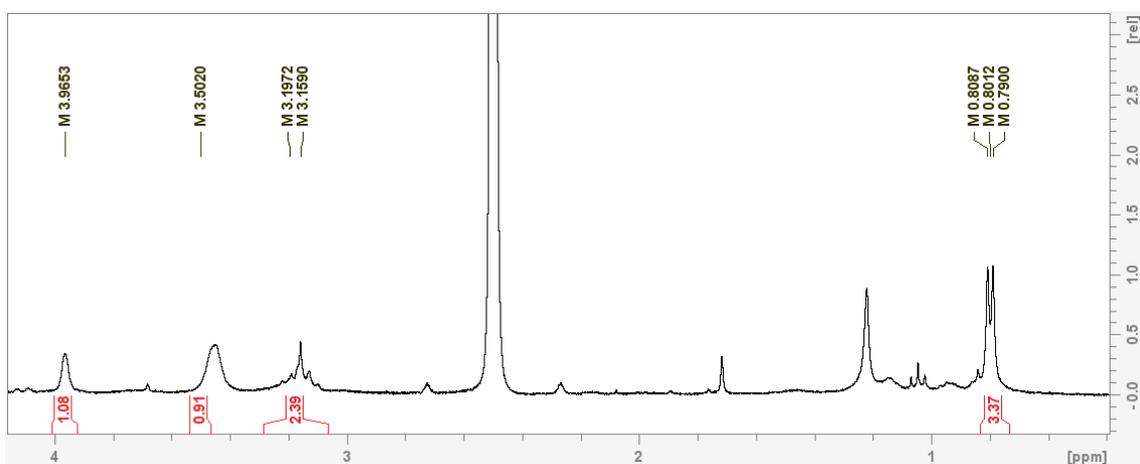


Figura 45A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de **6** (expansão 4,15-0,50 ppm)

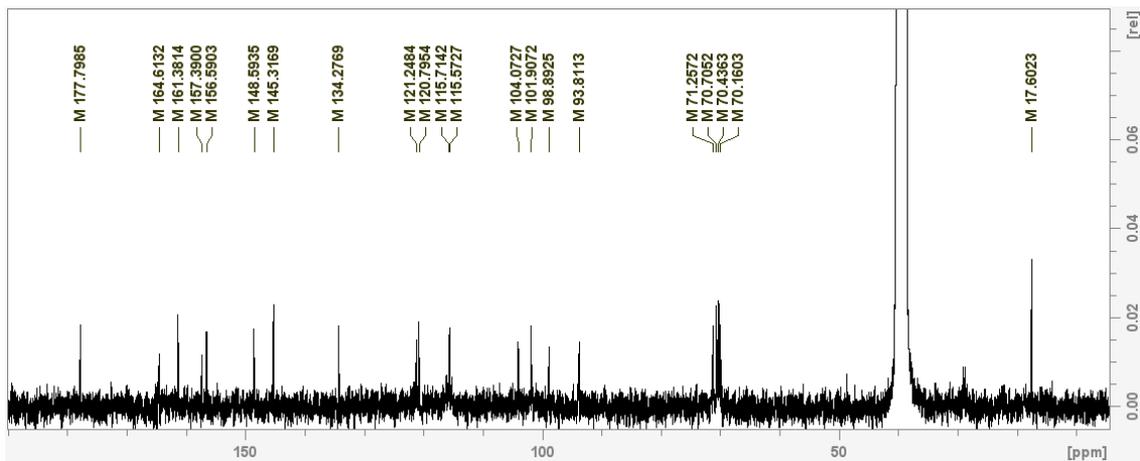


Figura 46A. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6) de **6** em 75 MHz

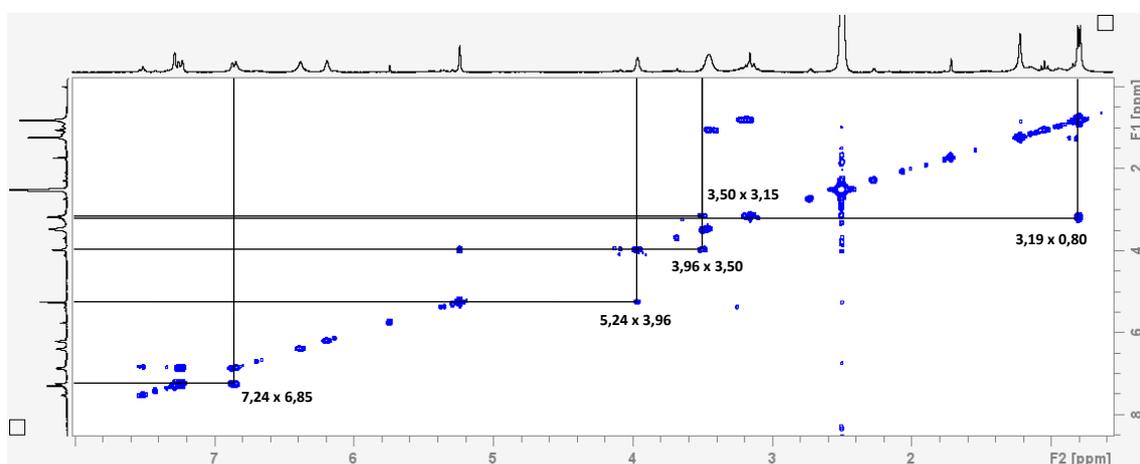


Figura 47A. Espectro COSY (DMSO-d_6) de **6**

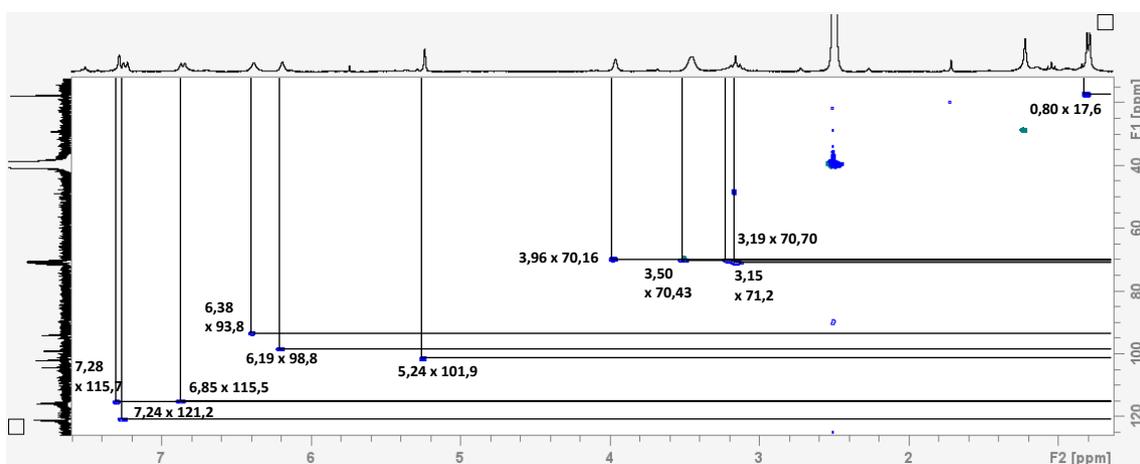


Figura 48A. Espectro HSQC (DMSO-d_6) de **6**

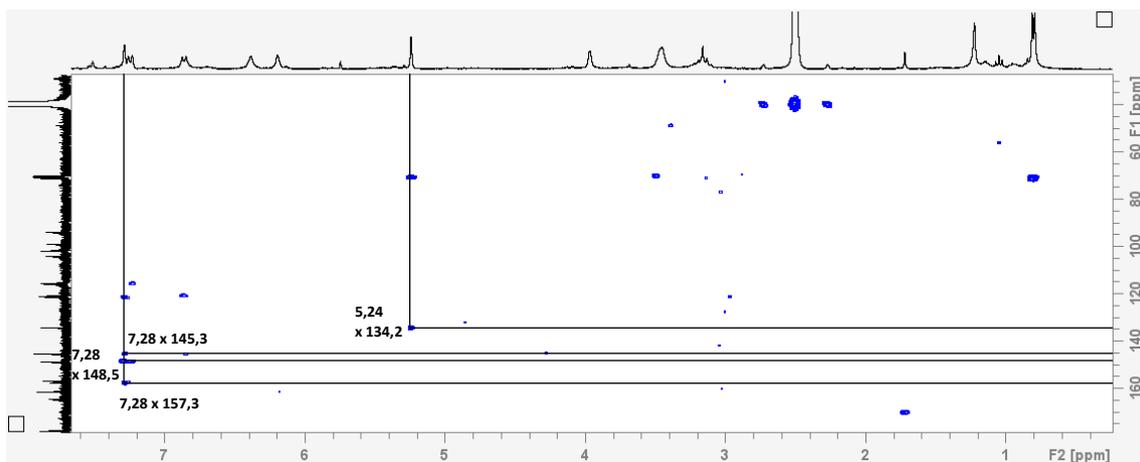


Figura 49A. Espectro HMBC (DMSO- d_6) de 6

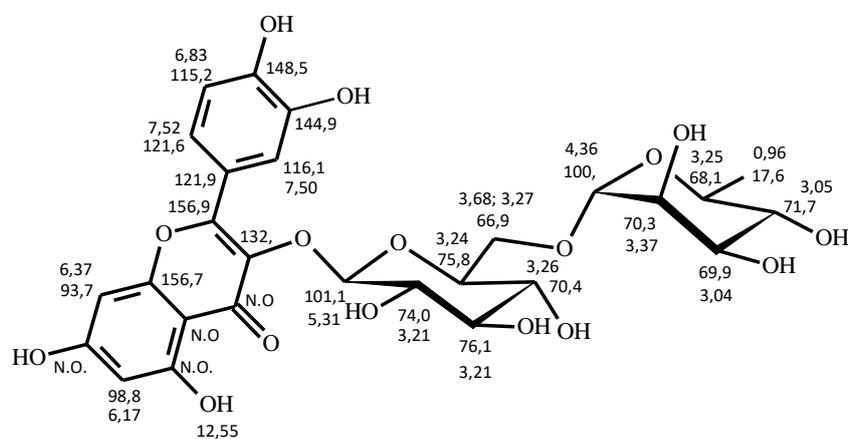


Figura 50A. Quercetina-3-O-rutinosídeo (7) e seus deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C

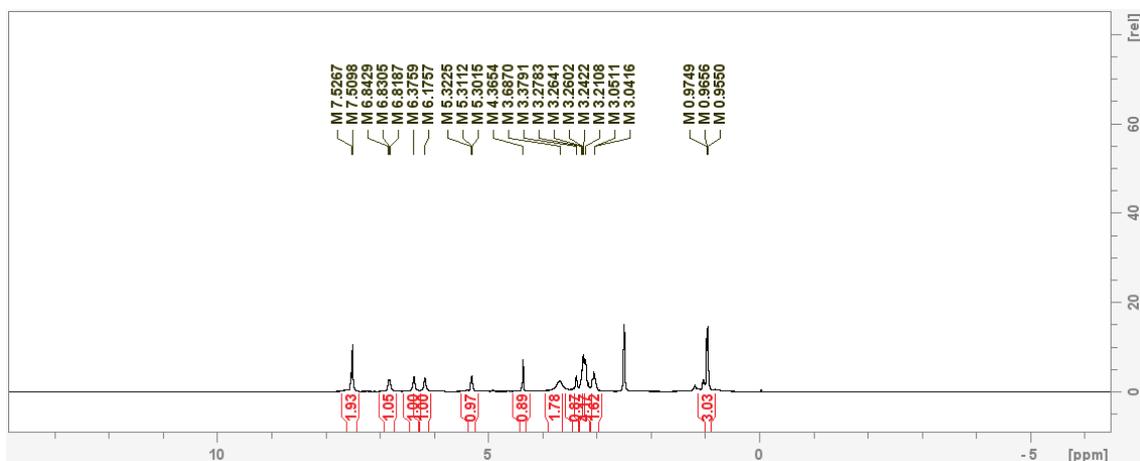


Figura 51A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) com supressão do sinal da água de 7 em 300 MHz

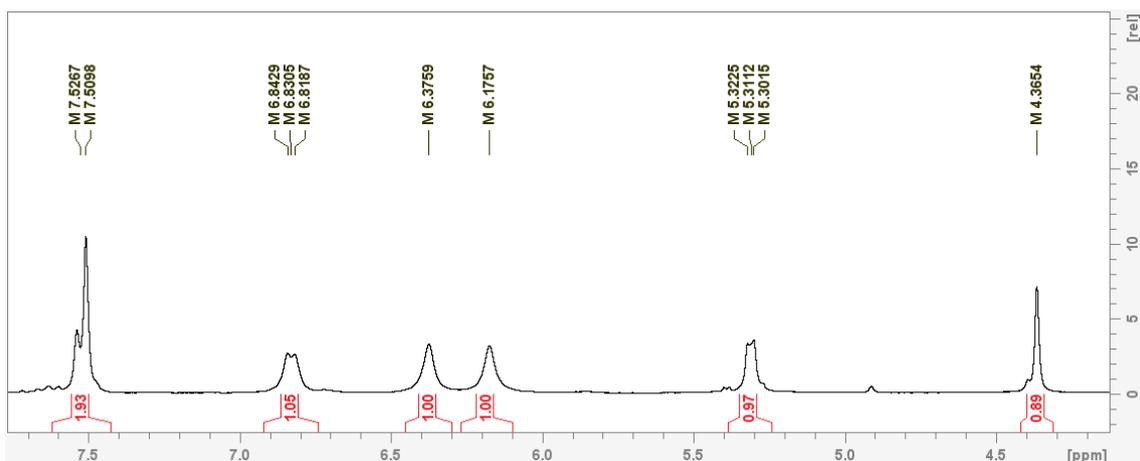


Figura 52A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de 7 (expansão 7,70-4,20 ppm)

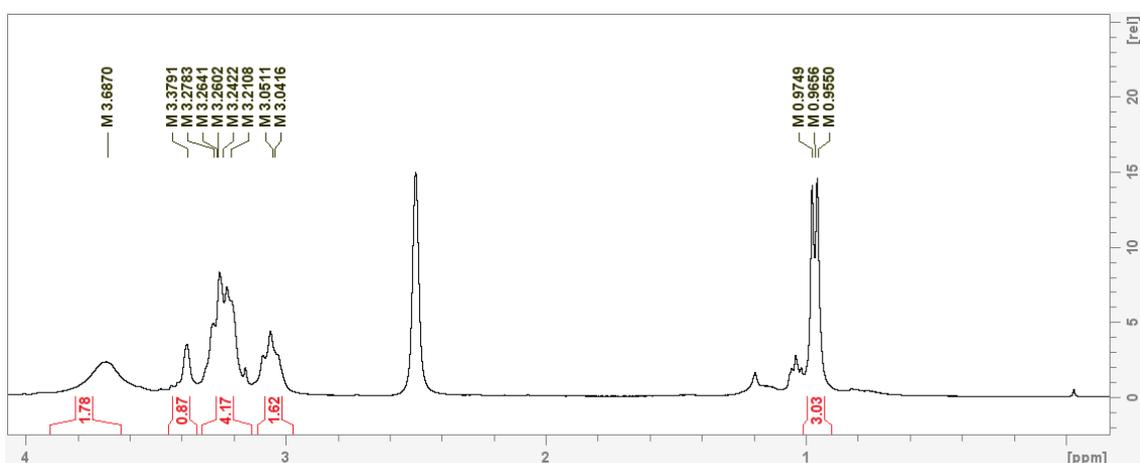


Figura 53A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de 7 (expansão 4,00-0,60 ppm)

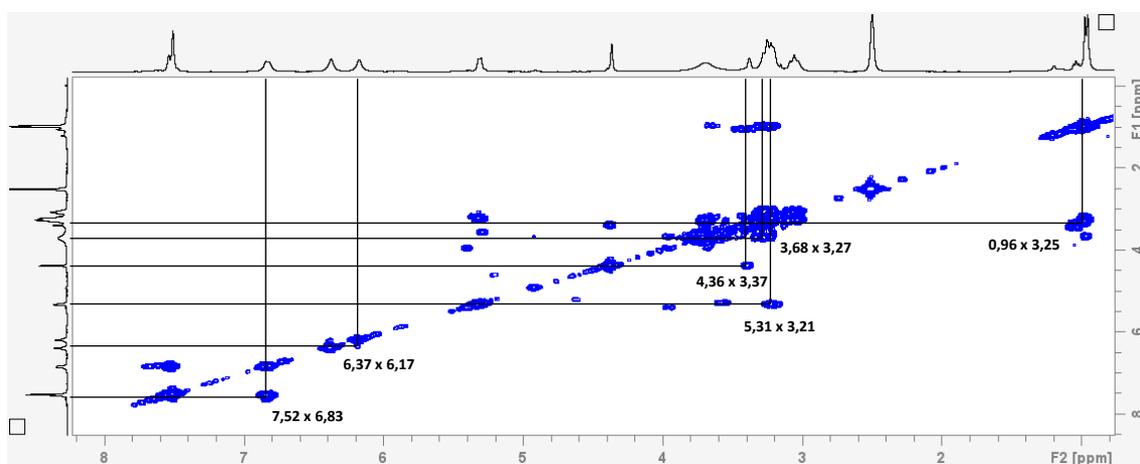


Figura 54A. Espectro COSY ($\text{DMSO-}d_6$) de 7

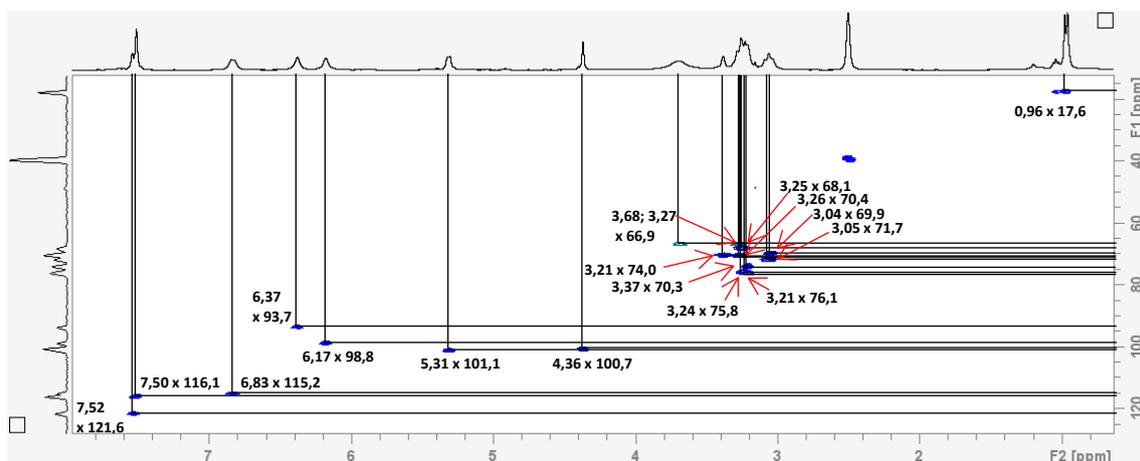


Figura 55A. Espectro HSQC (DMSO- d_6) de 7

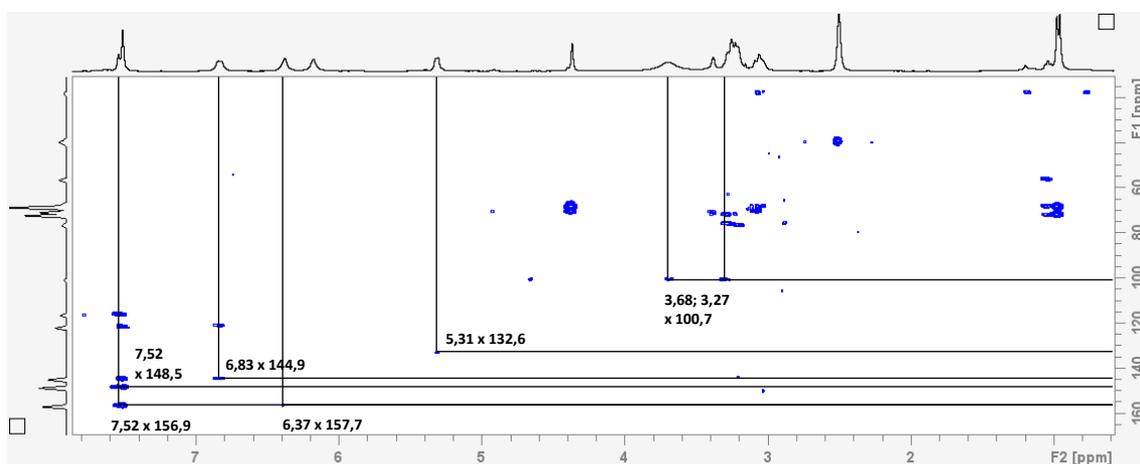


Figura 56A. Espectro HMBC (DMSO- d_6) de 7

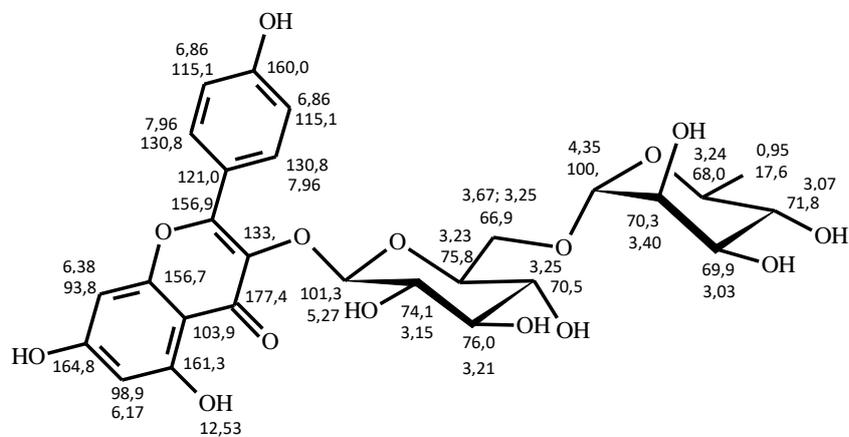


Figura 57A. Kaempferol-3-O-rutinosídeo (8) e seus deslocamentos químicos de 1H e ^{13}C

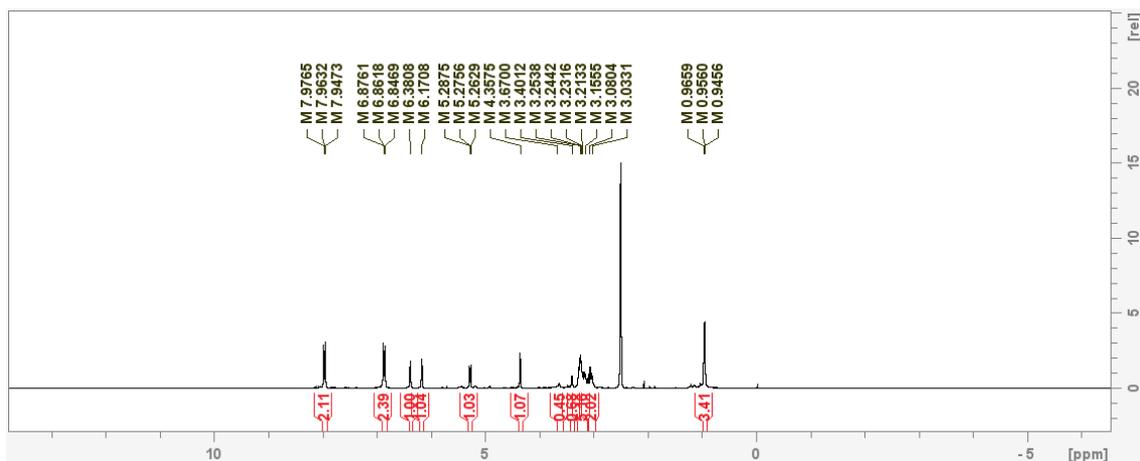


Figura 58A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) com supressão do sinal da água de **8** em 300 MHz

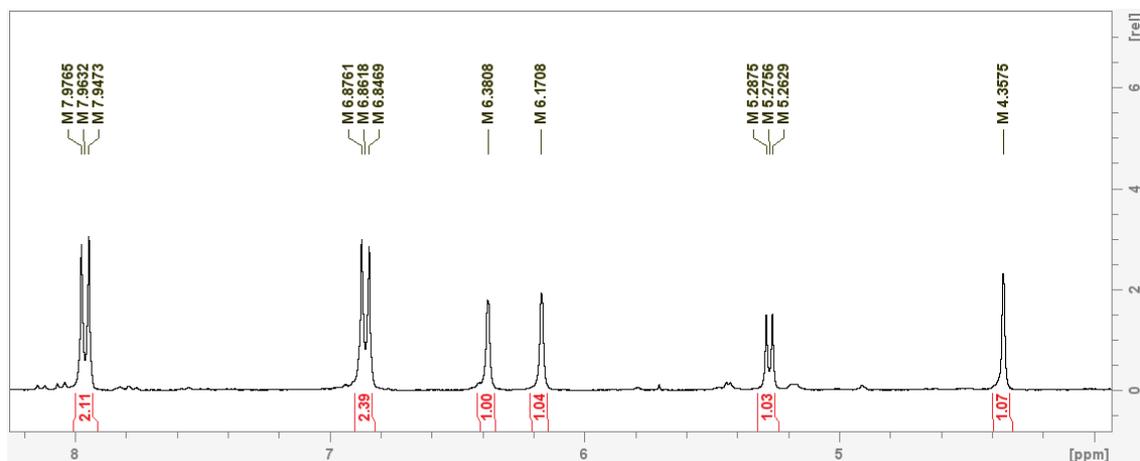


Figura 59A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de **8** (expansão 8,20-4,00 ppm)

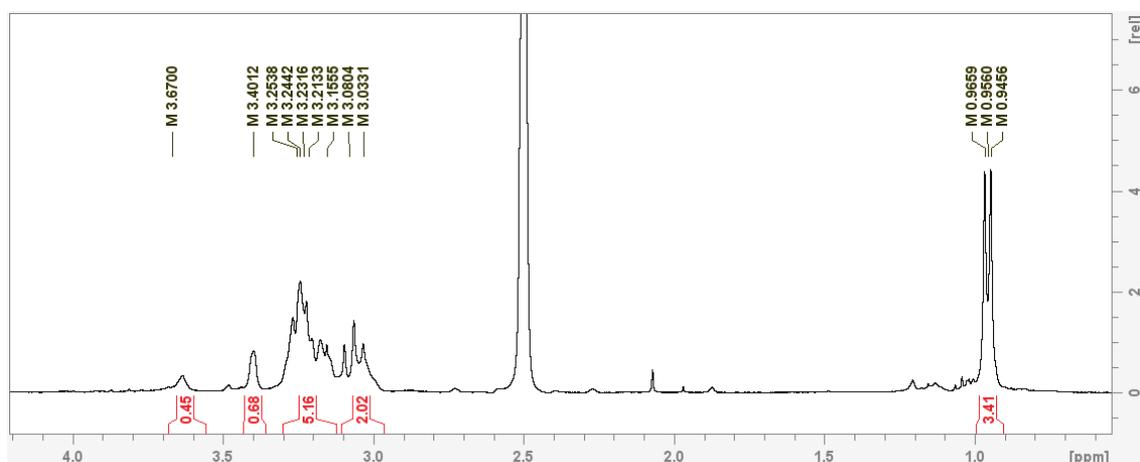


Figura 60A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de **8** (expansão 4,40-0,80 ppm)

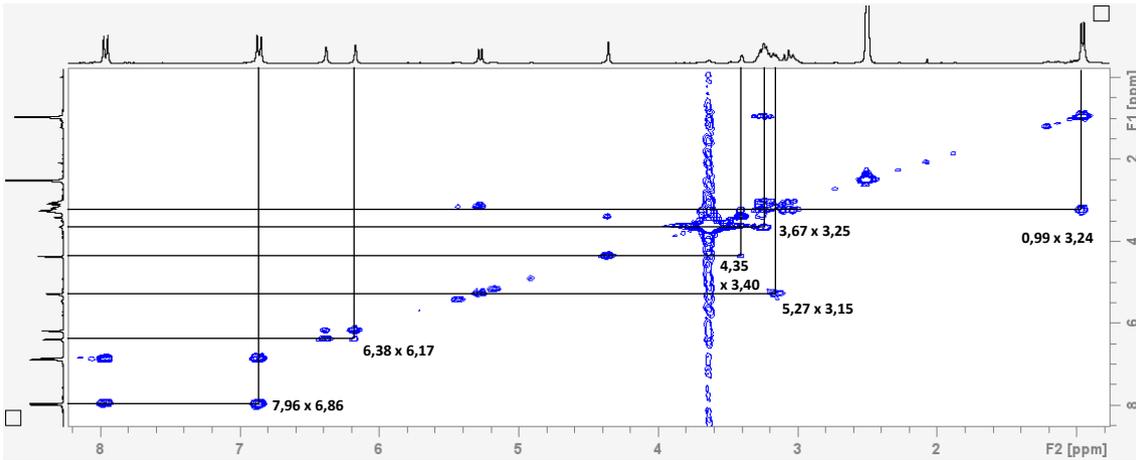


Figura 61A. Espectro COSY (DMSO-d₆) de 8

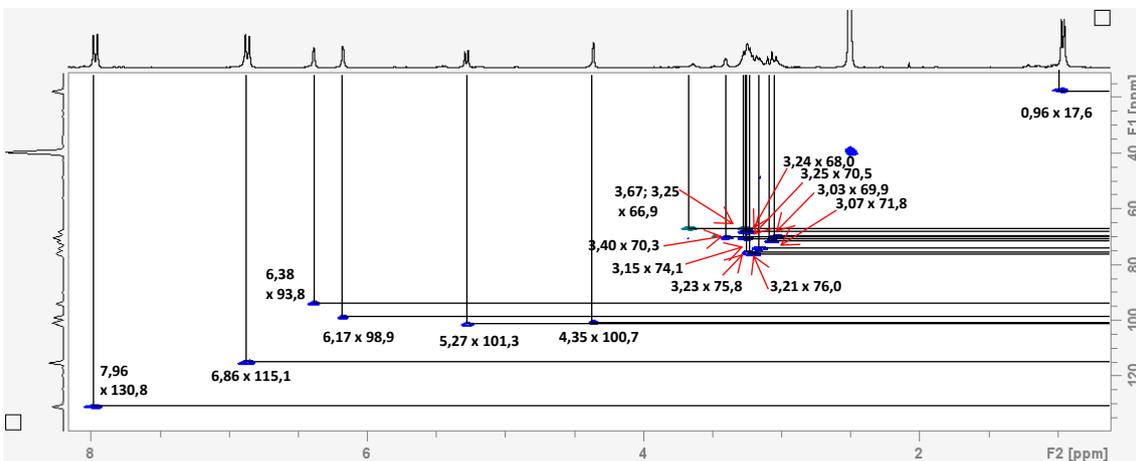


Figura 62A. Espectro HSQC (DMSO-d₆) de 8

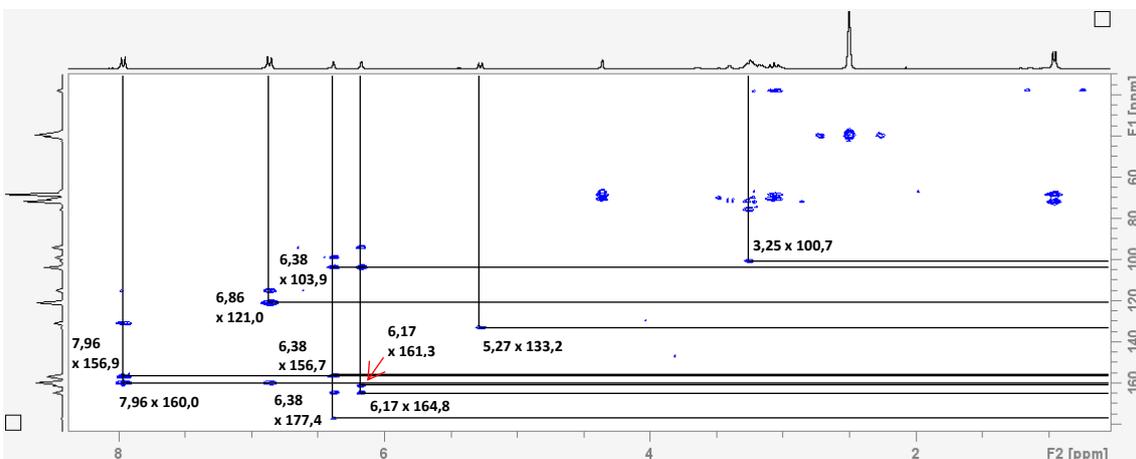


Figura 63A. Espectro HMBC (DMSO-d₆) de 8

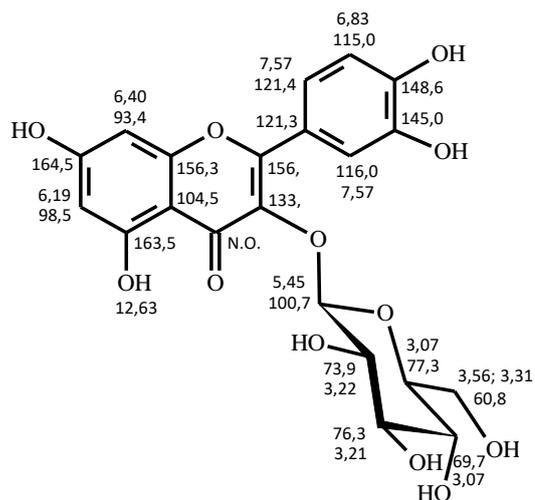


Figura 64A. Quercetina-3-O-glicosídeo (9) e seus deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C

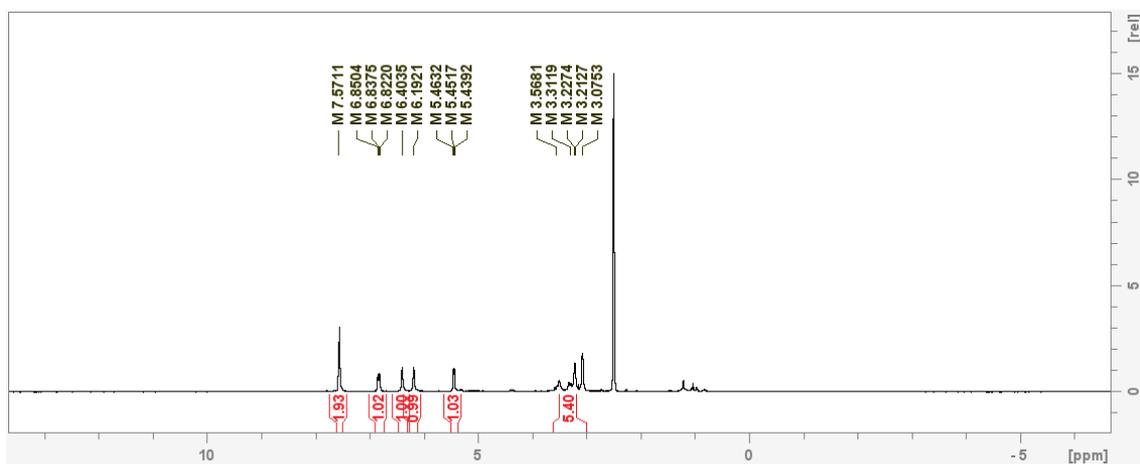


Figura 65A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) com supressão do sinal da água de 9 em 300 MHz

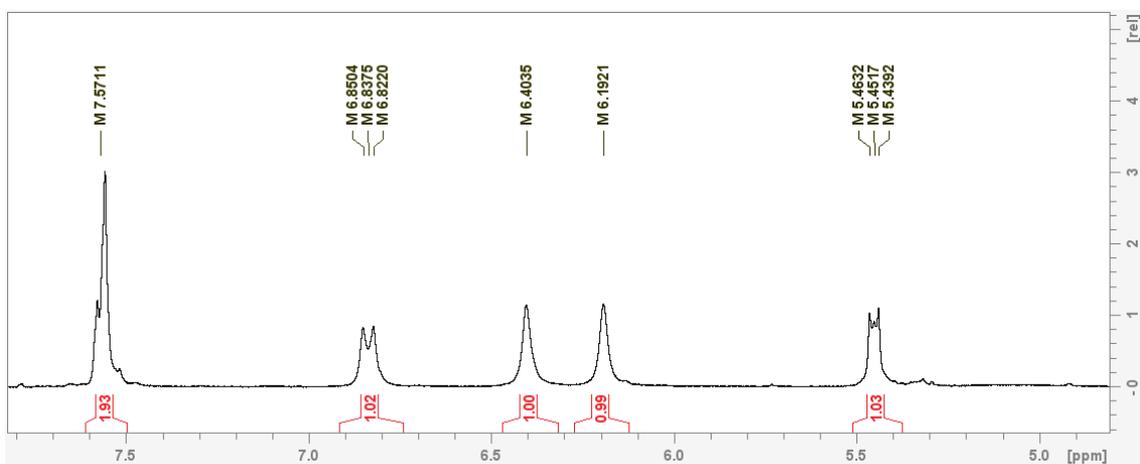


Figura 66A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de 9 (expansão 7,70-4,70 ppm)

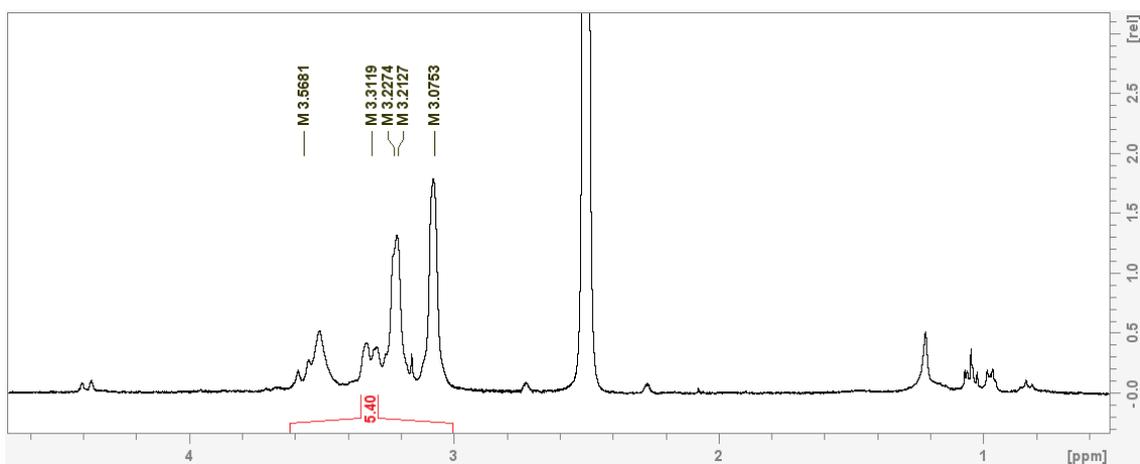


Figura 67A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) de **9** (expansão 4,20-2,40 ppm)

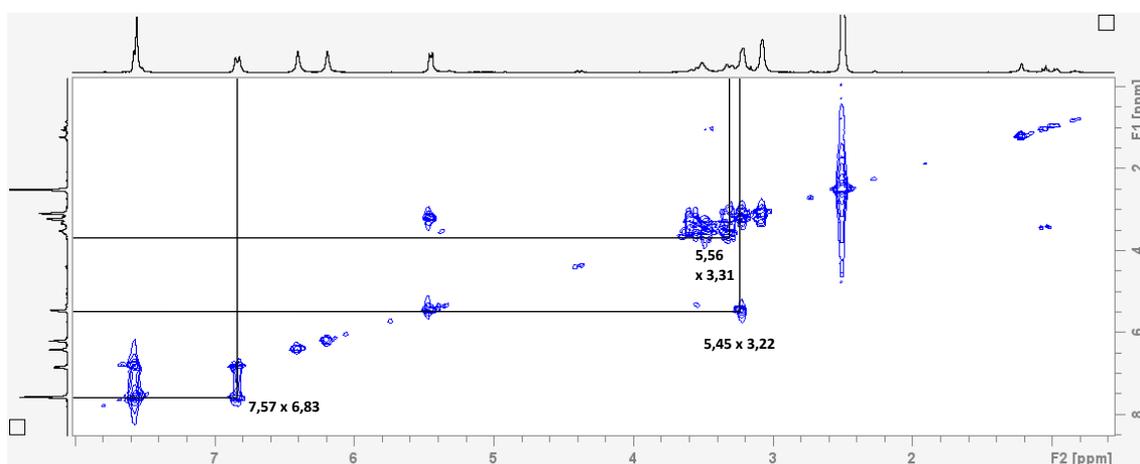


Figura 68A. Espectro COSY (DMSO-d_6) de **9**

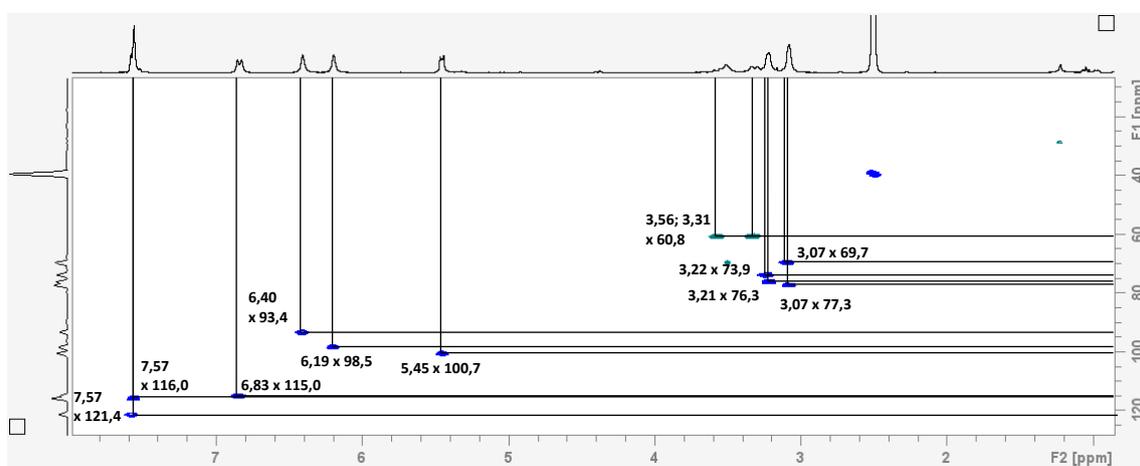


Figura 69A. Espectro HSQC (DMSO-d_6) de **9**

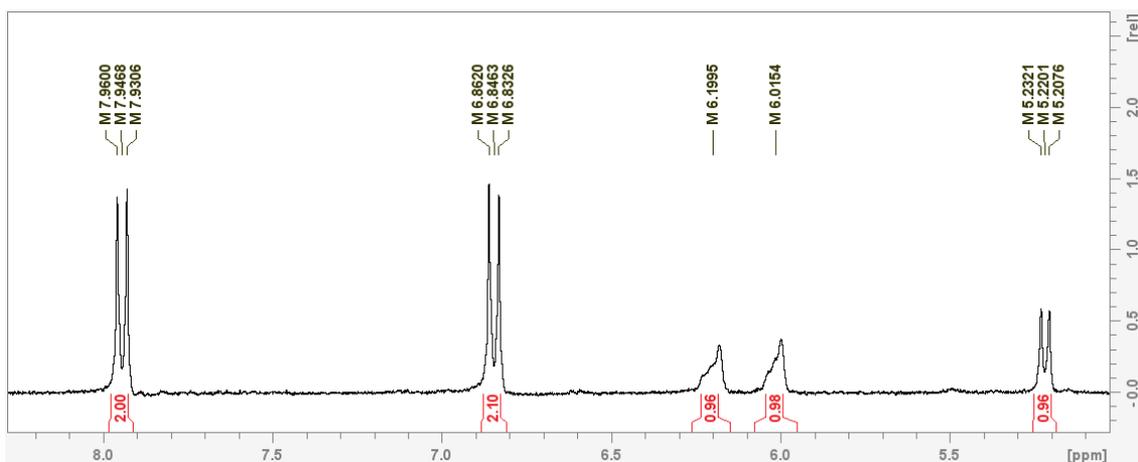


Figura 73A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de **10** (expansão 8,10-5,1 ppm)

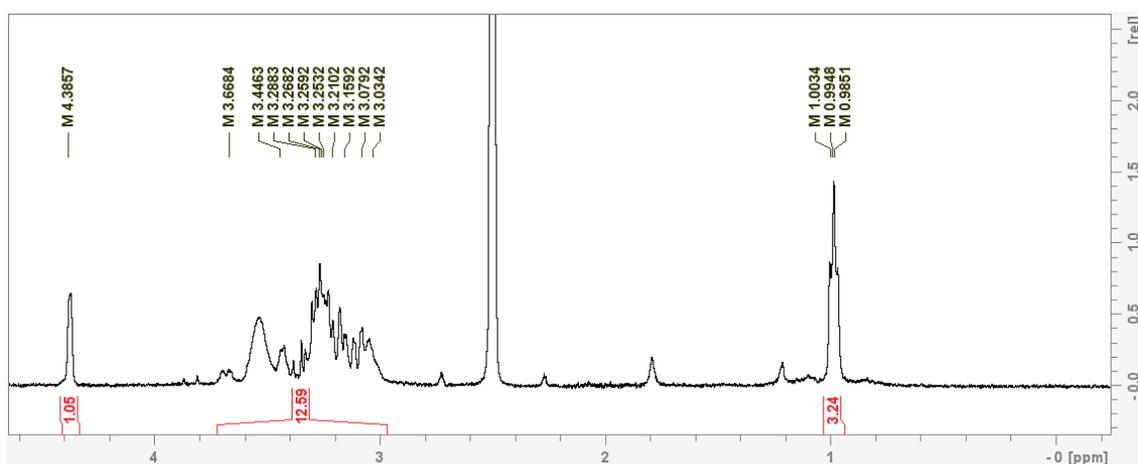


Figura 74A. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) de **10** (expansão 4,60-0,80 ppm)

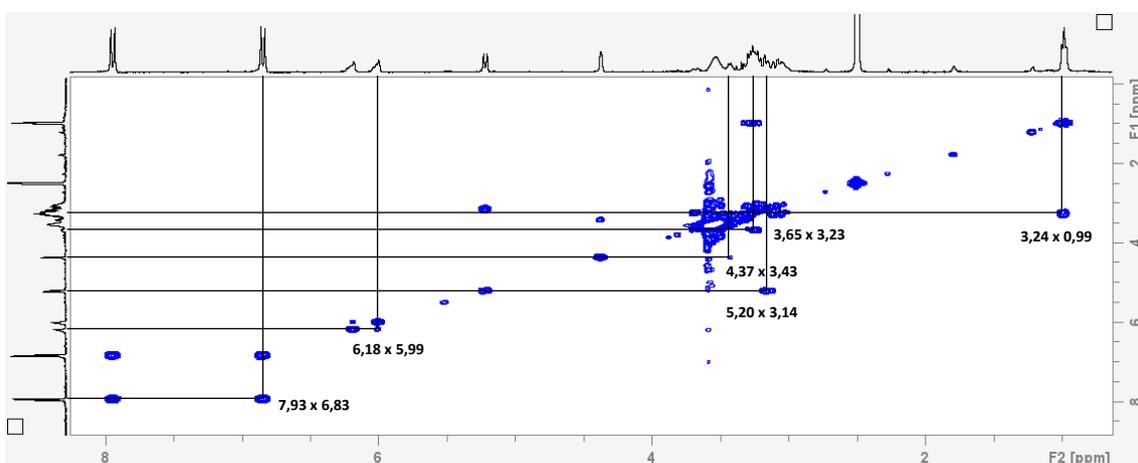


Figura 75A. Espectro COSY ($\text{DMSO-}d_6$) de **10**

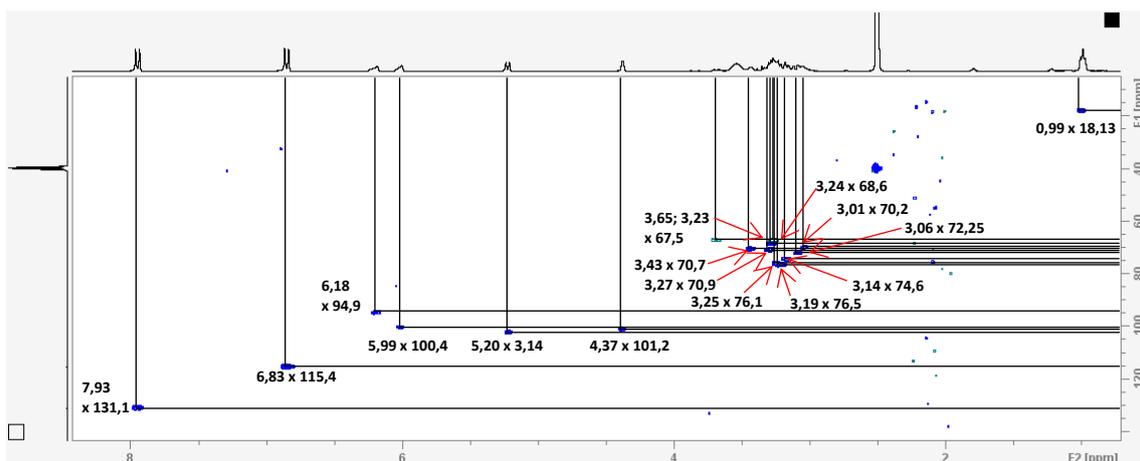


Figura 76A. Espectro HSQC (DMSO- d_6) de 10

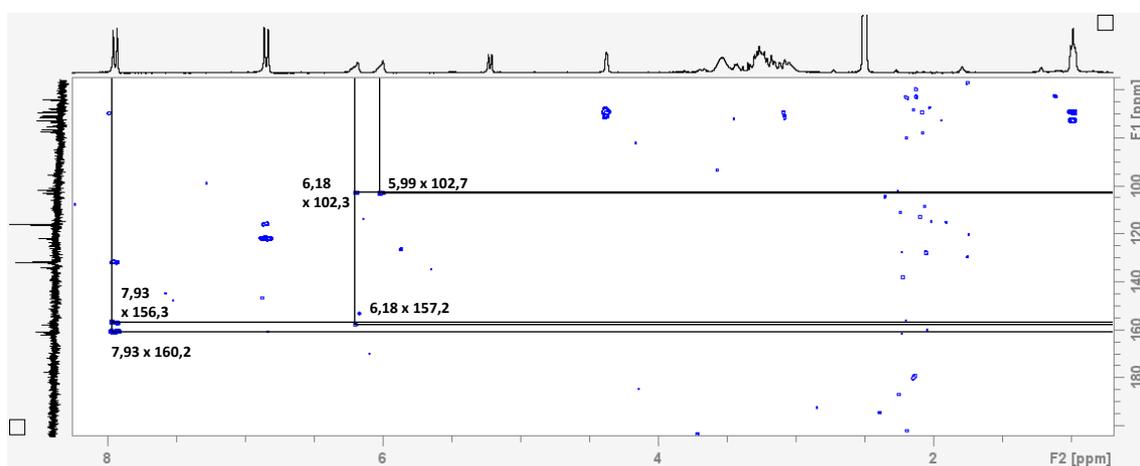


Figura 77A. Espectro HMBC (DMSO- d_6) de 10

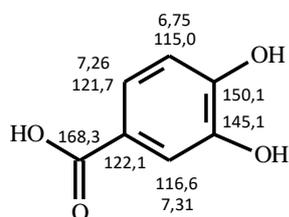


Figura 78A. Ácido 3,4-dihidroxi-benzoico (11) e seus deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C

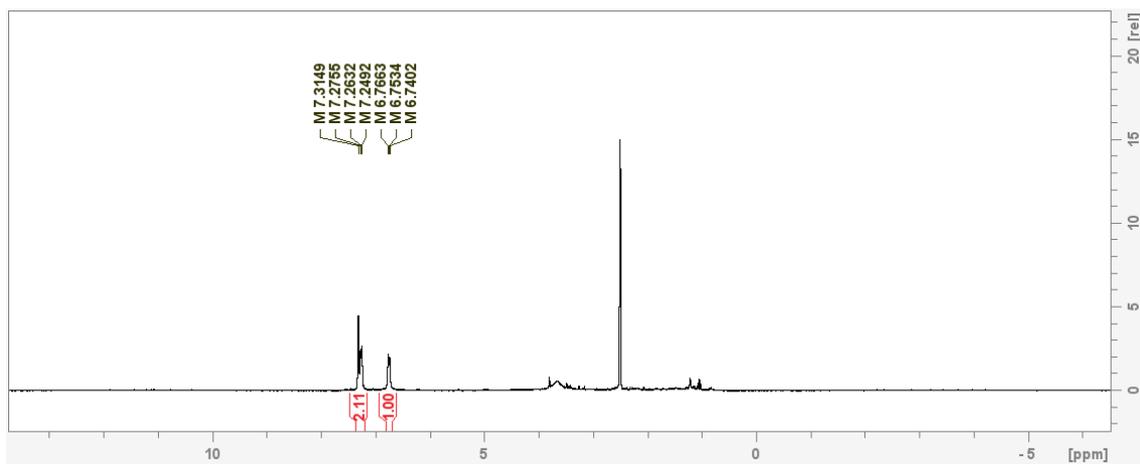


Figura 79A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) com supressão do sinal da água de **11** em 300 MHz

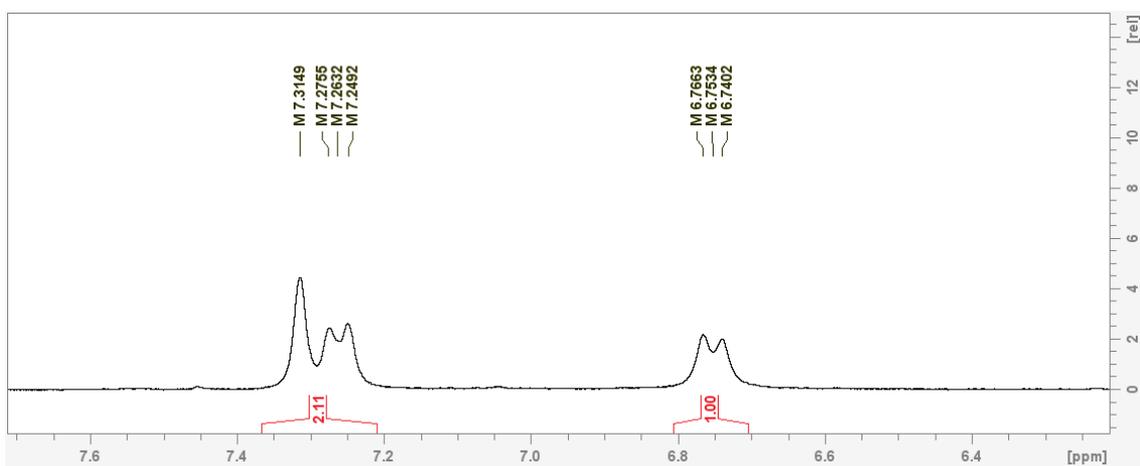


Figura 80A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) de **11** (expansão 7,70-6,20 ppm)

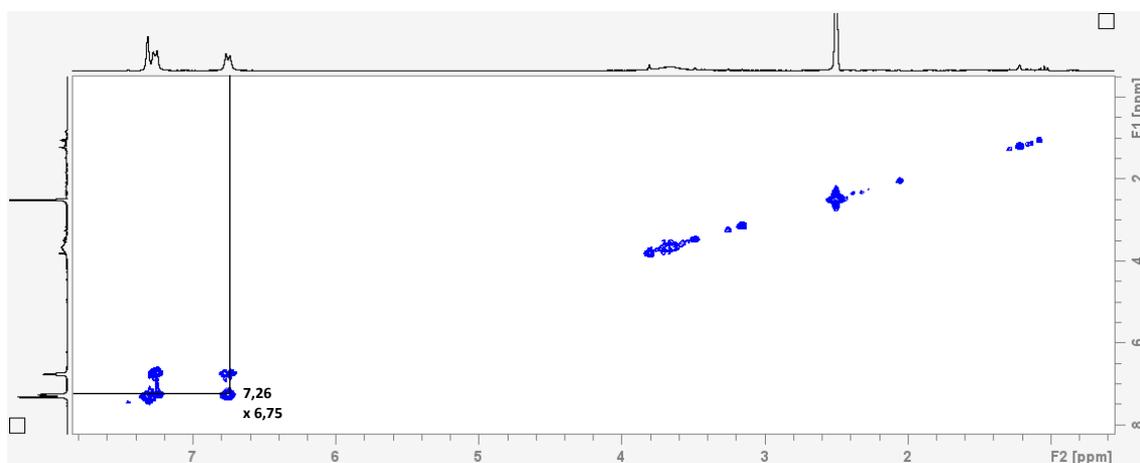


Figura 81A. Espectro COSY (DMSO-d_6) de **11**

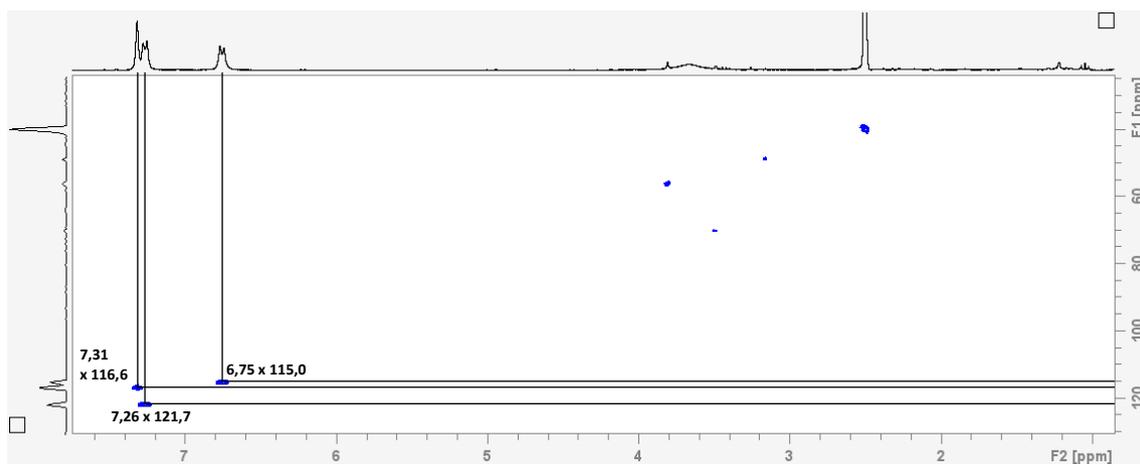


Figura 82A. Espectro HSQC (DMSO- d_6) de 11

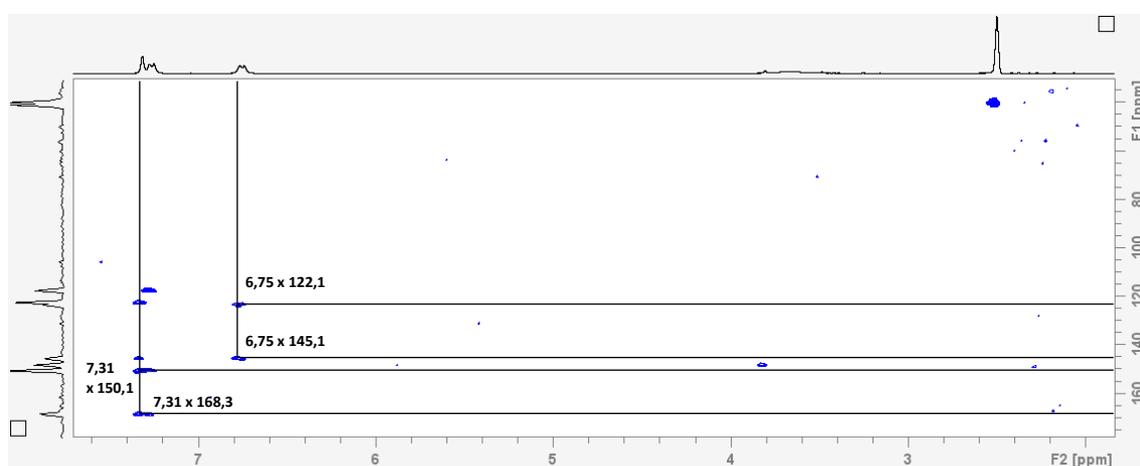


Figura 83A. Espectro HMBC (DMSO- d_6) de 11

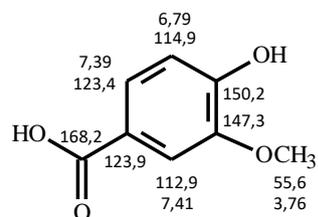


Figura 84A. Ácido 3-metil,4-hidroxibenzoico (12) e seus deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C

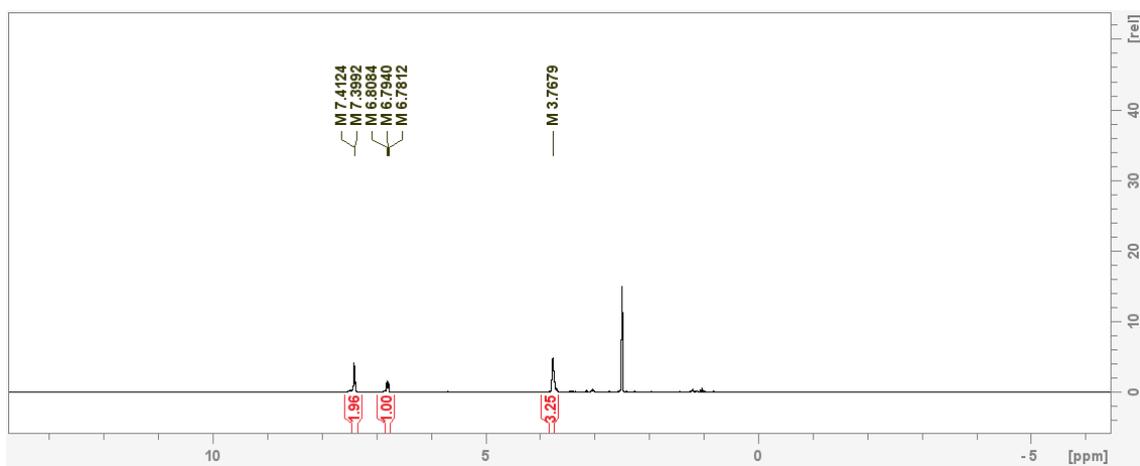


Figura 85A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) com supressão do sinal da água de **12** em 300 MHz

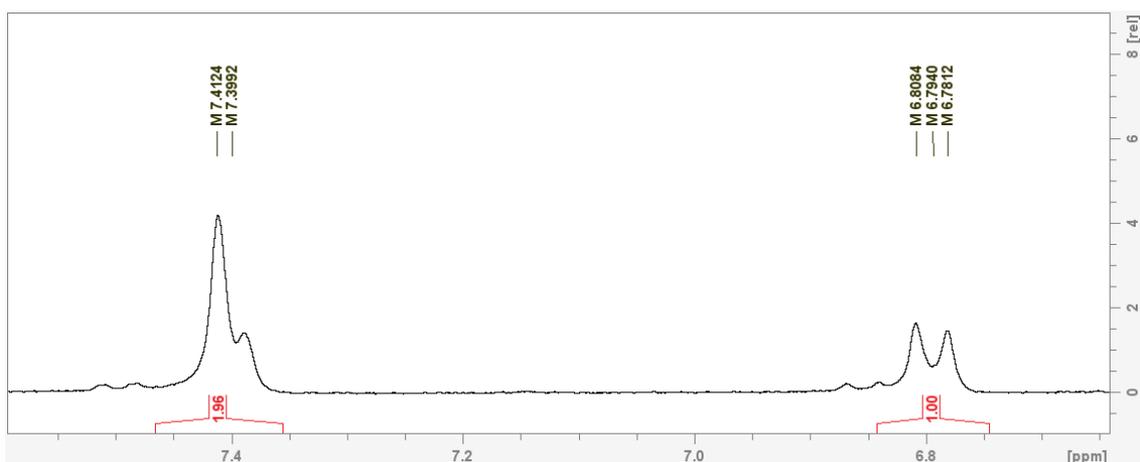


Figura 86A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) de **12** (expansão 7,62-6,62 ppm)

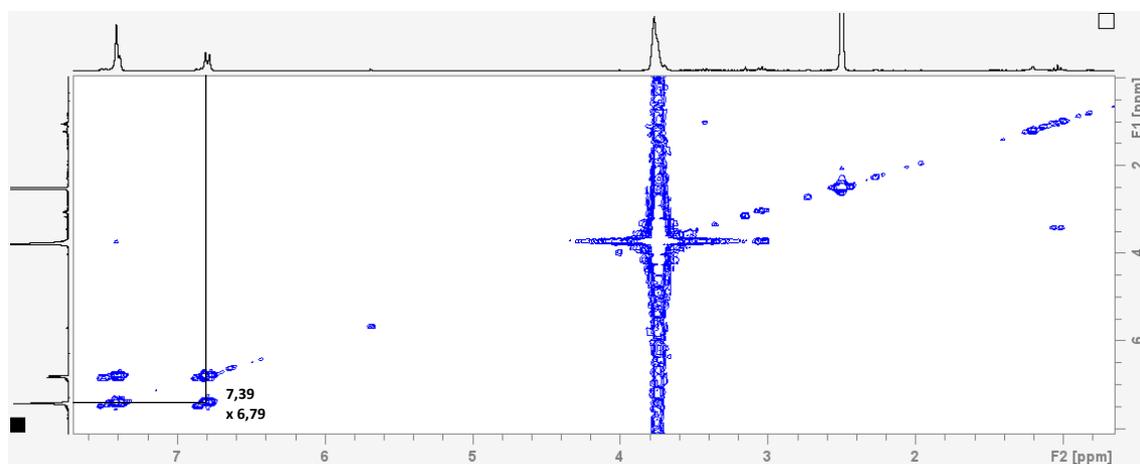


Figura 87A. Espectro COSY (DMSO-d_6) de **12**

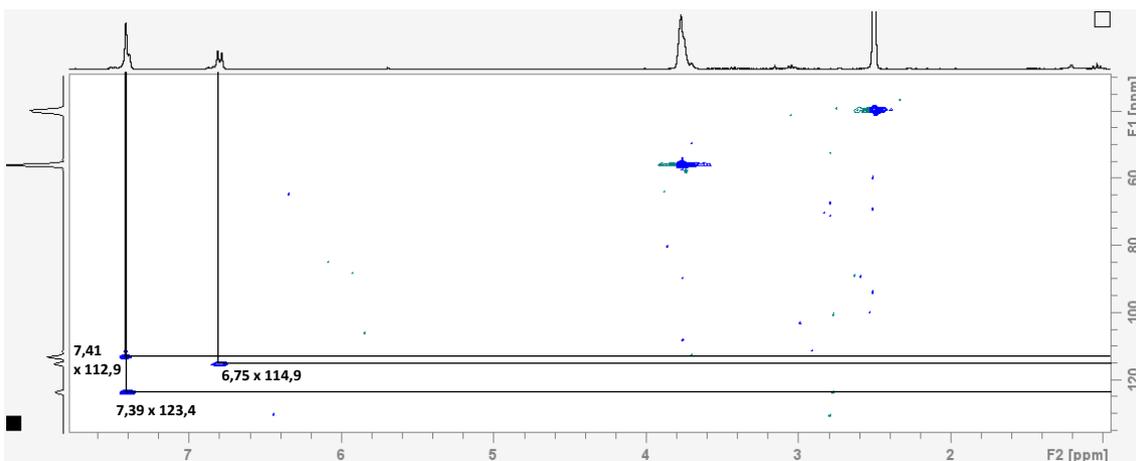


Figura 88A. Espectro HSQC (DMSO- d_6) de 12

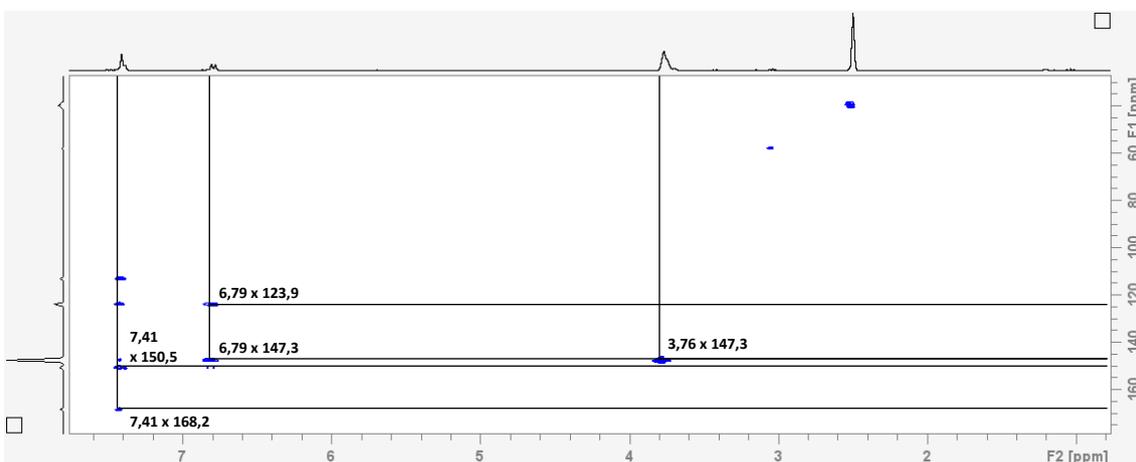


Figura 89A. Espectro HMBC (DMSO- d_6) de 12

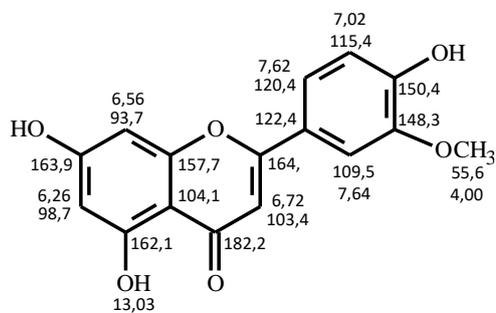


Figura 90A. Crisoeriol (13) e seus deslocamentos químicos de 1H e ^{13}C

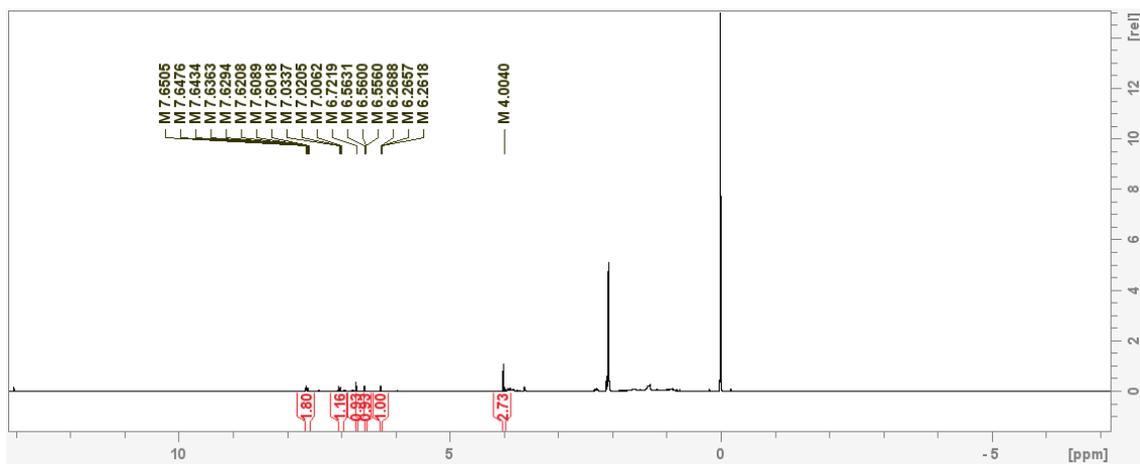


Figura 91A. Espectro de RMN de ^1H (acetona- d_6) com supressão do sinal da água de **13** em 300 MHz

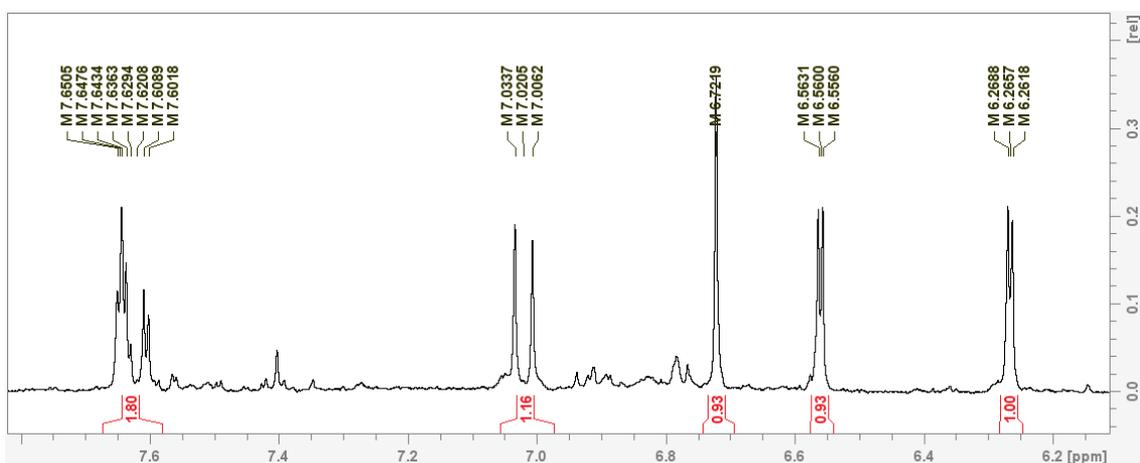


Figura 92A. Espectro de RMN de ^1H (acetona- d_6) de **13** (expansão 7,75-6,20 ppm)

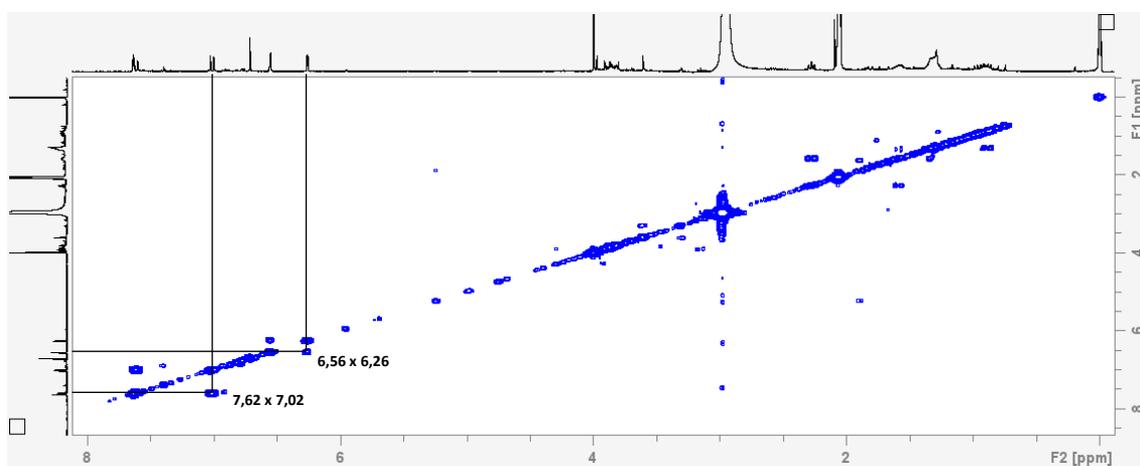


Figura 93A. Espectro COSY (acetona- d_6) de **13**

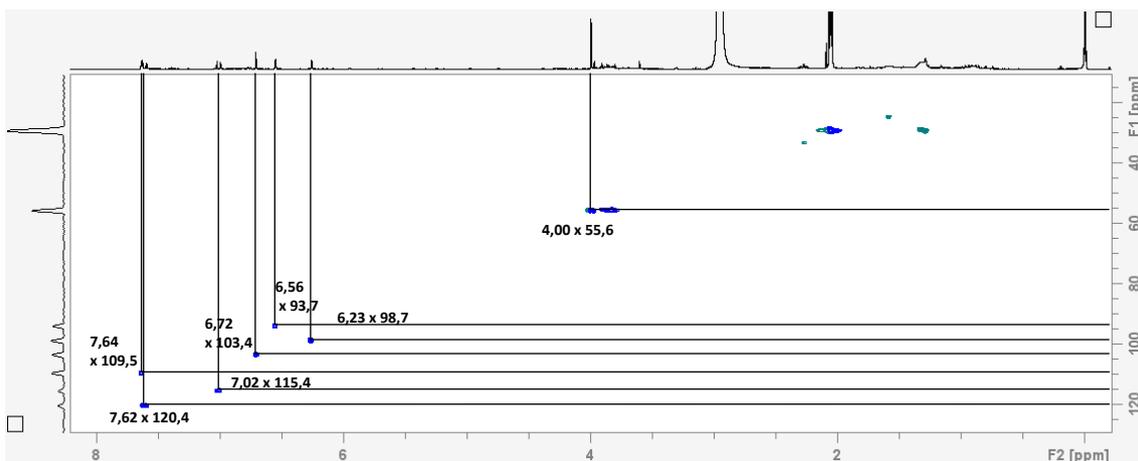


Figura 94A. Espectro HSQC (acetona- d_6) de 13

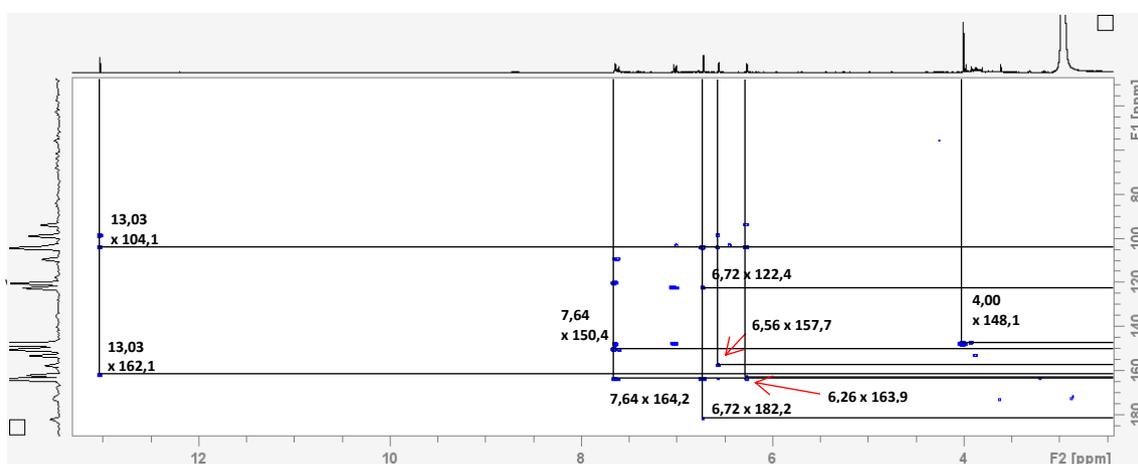


Figura 95A. Espectro HMBC (acetona- d_6) de 13

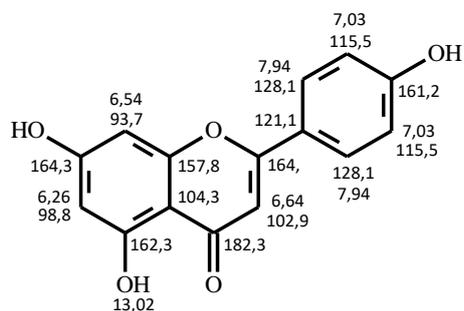


Figura 96A. Apigenina (14) e seus deslocamento químicos de ^1H e ^{13}C

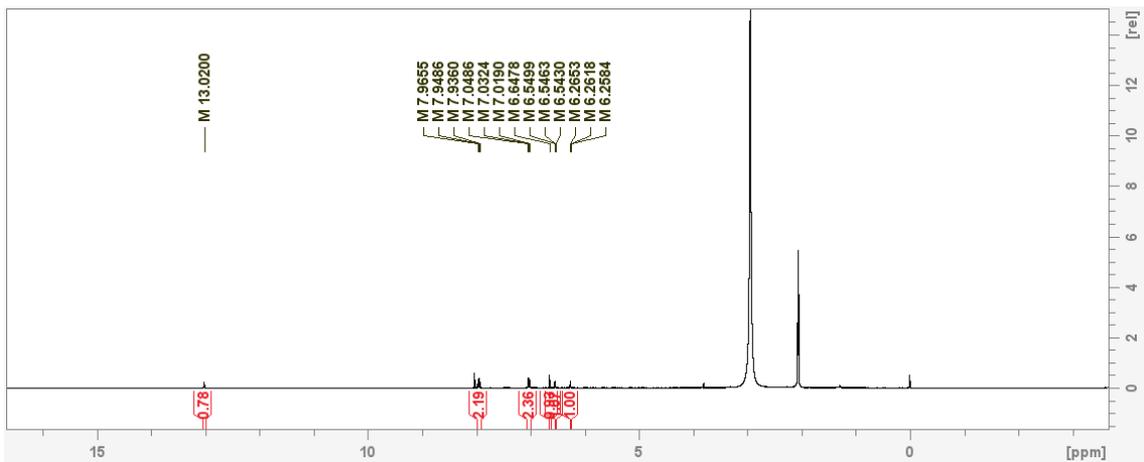


Figura 97A. Espectro de RMN de ^1H (acetona- d_6) sem supressão do sinal da água de 14 em 300 MHz

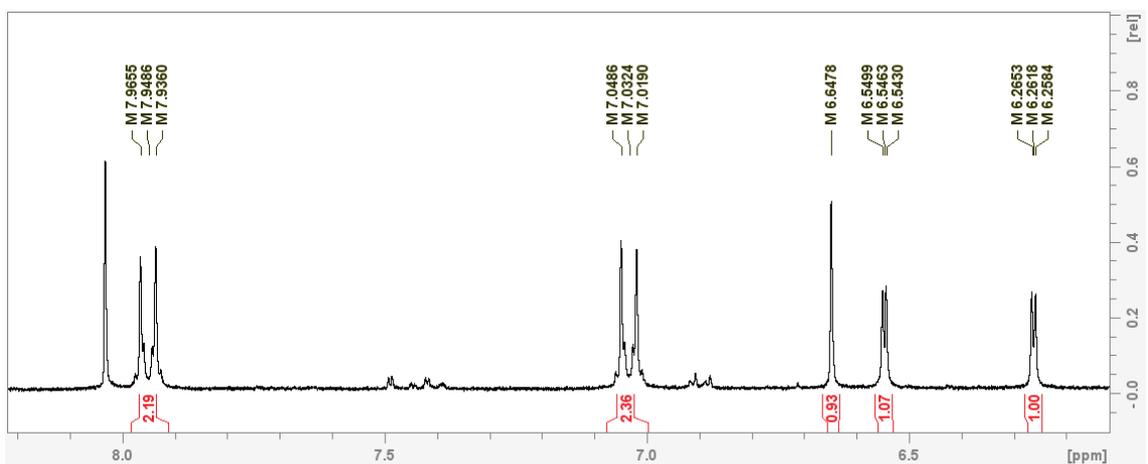


Figura 98A. Espectro de RMN de ^1H (acetona- d_6) de 14 (expansão 8,15-6,2 ppm)

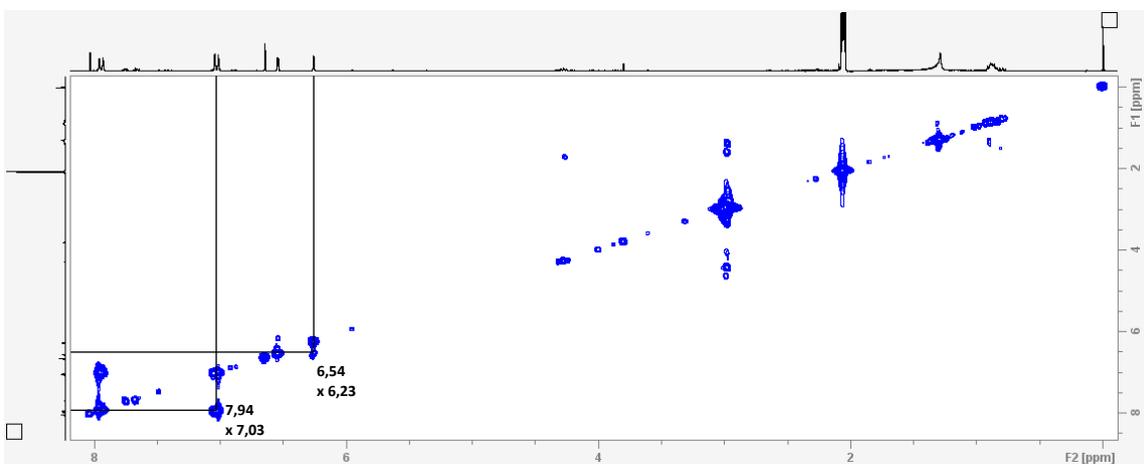


Figura 99A. Espectro COSY (acetona- d_6) de 14

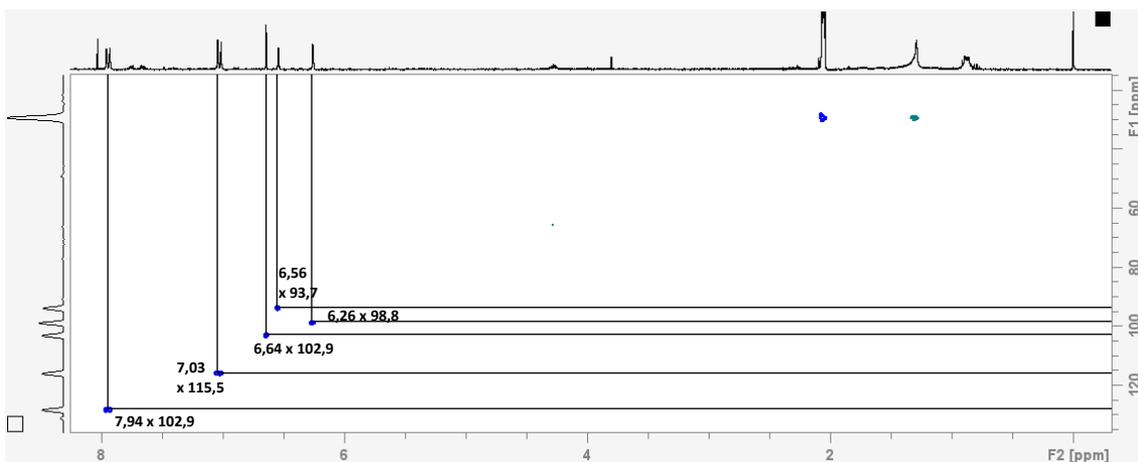


Figura 100A. Espectro HSQC (acetona- d_6) de 14

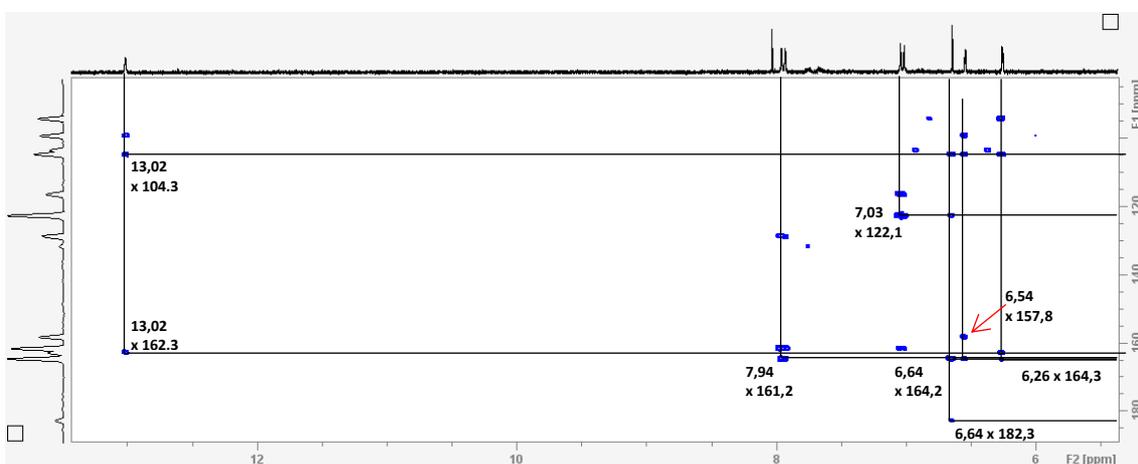


Figura 101A. Espectro HMBC (acetona- d_6) de 14

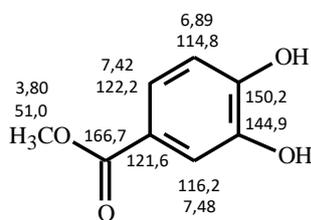


Figura 102A. 3,4-dihidroxibenzoato de metila (15) e seus deslocamento químicos de ^1H e ^{13}C

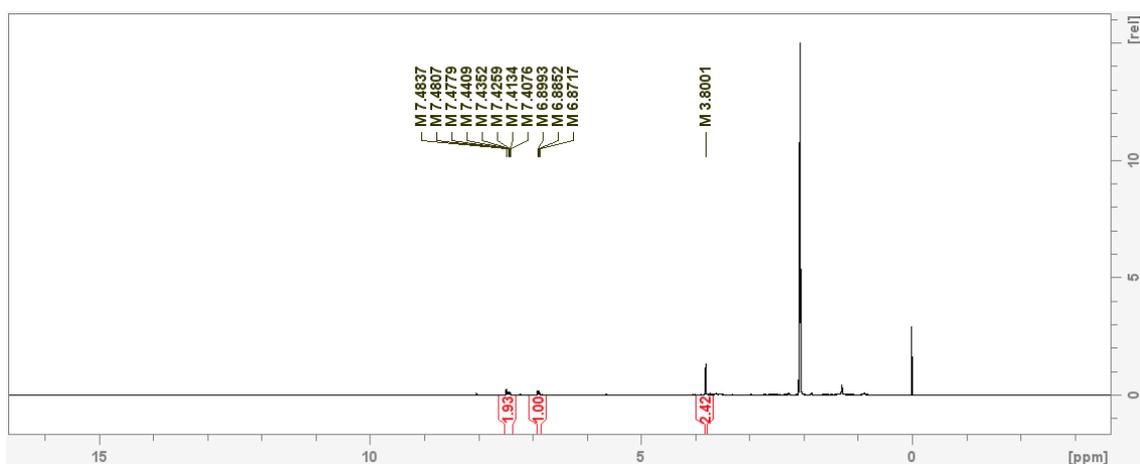


Figura 103A. Espectro de RMN de ^1H (acetona- d_6) com supressão do sinal da água de **15** em 300 MHz

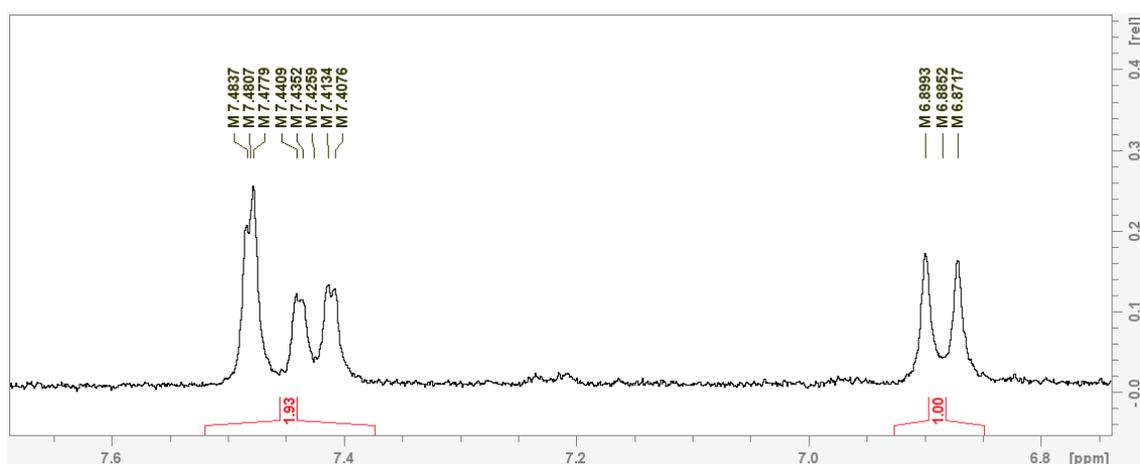


Figura 104A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) de **15** (expansão 7,80-6,65 ppm)

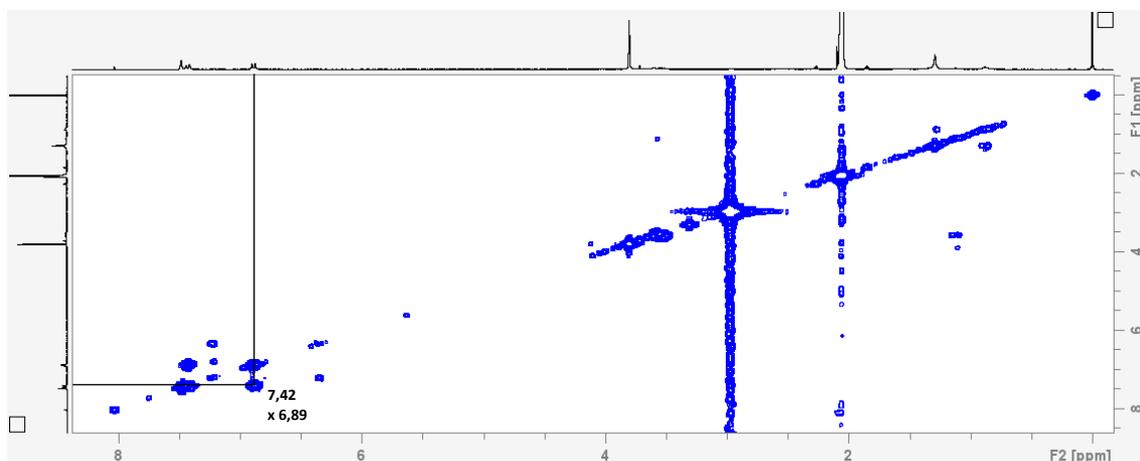


Figura 105A. Espectro COSY (acetona- d_6) de **15**

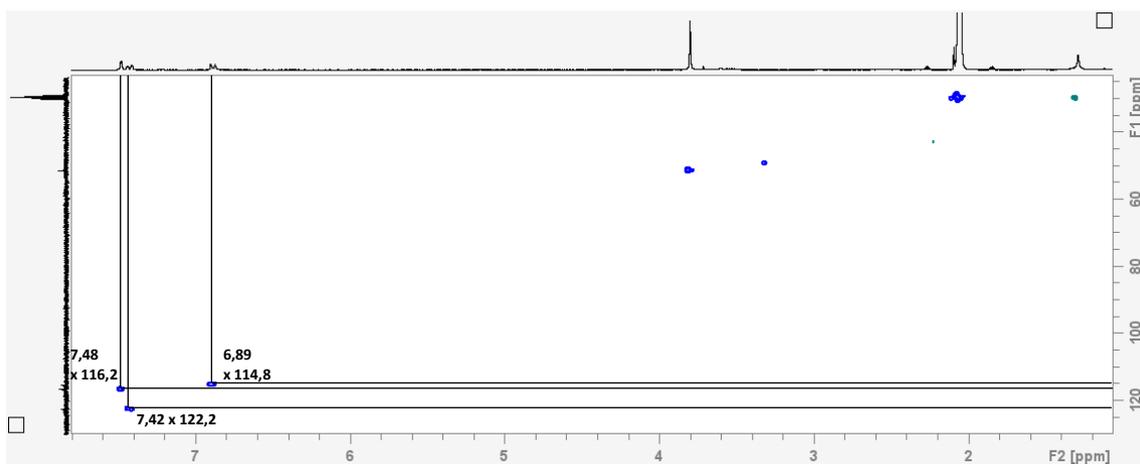


Figura 106A. Espectro HSQC (acetona- d_6) de 15

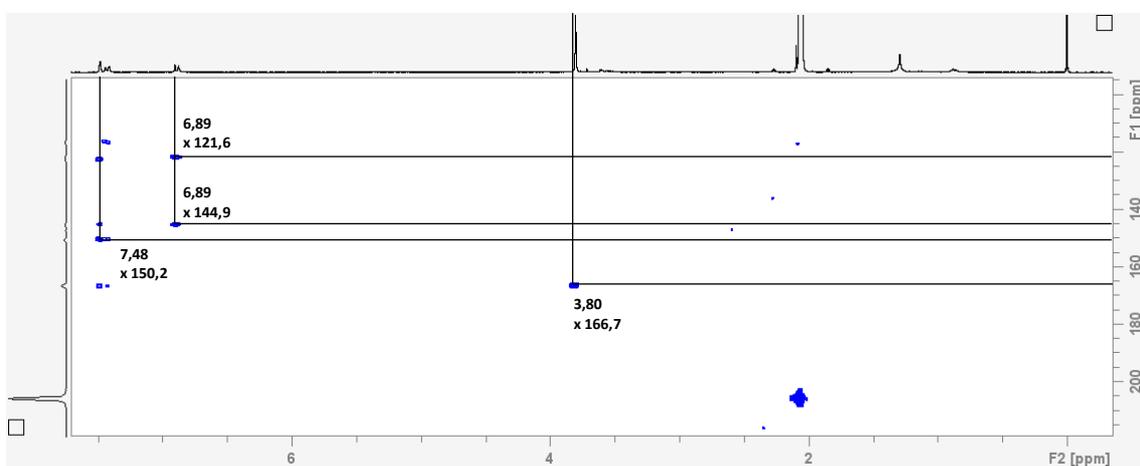


Figura 107A. Espectro HMBC (acetona- d_6) de 15

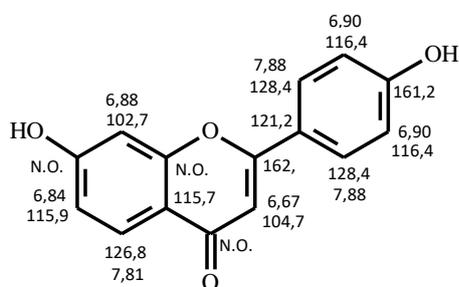


Figura 108A. 7,4-dihidroxi flavona (16) e seus deslocamentos químicos de $1H$ e $13C$

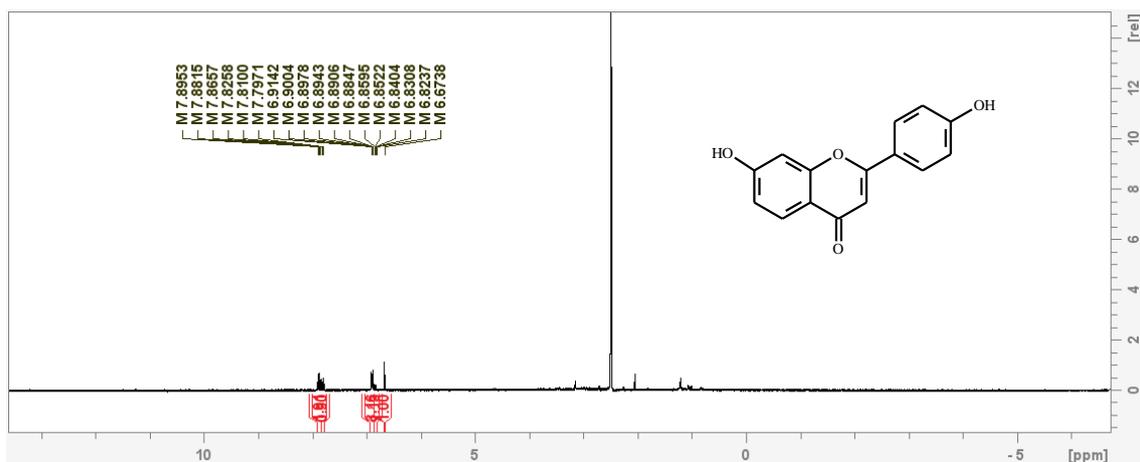


Figura 109A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) com supressão do sinal da água de 16 em 300 MHz

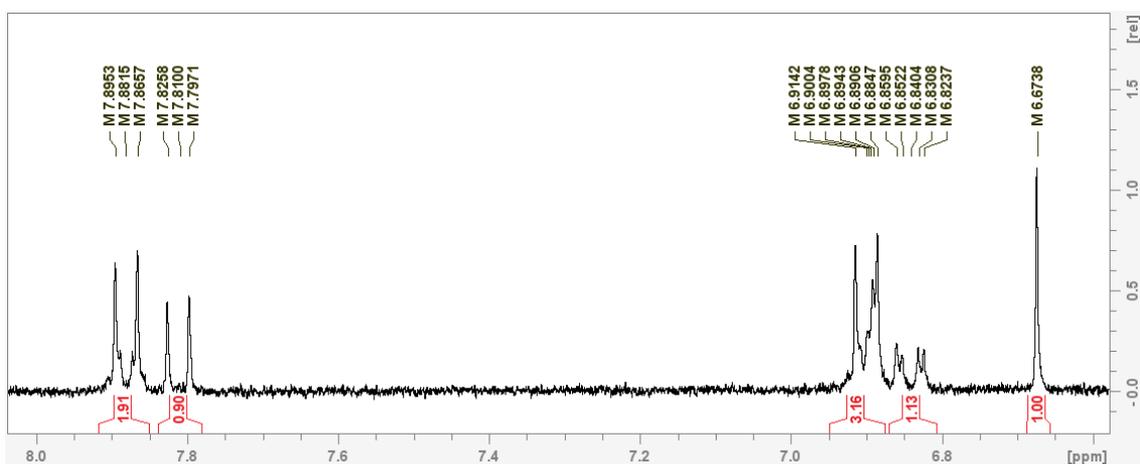


Figura 110A. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) de 16 (expansão 7,95-6,60 ppm)

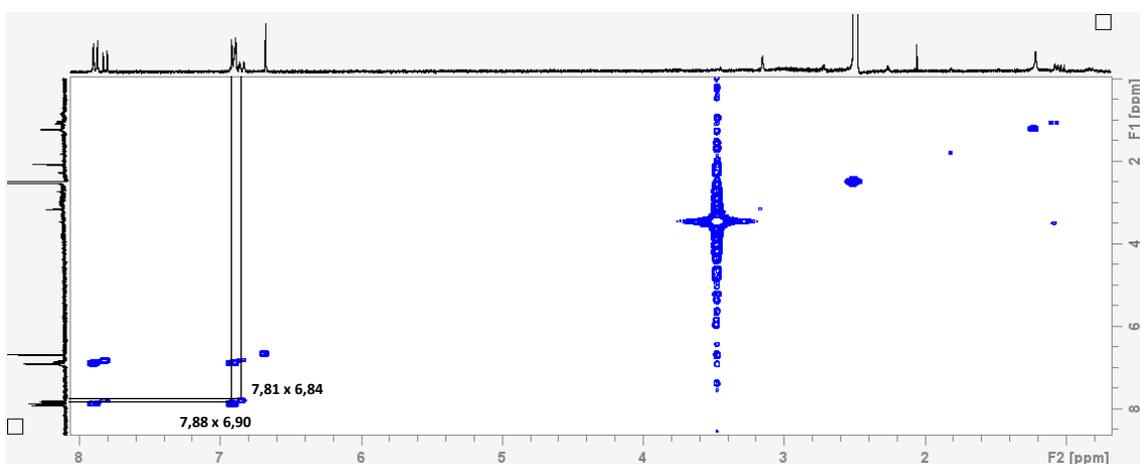


Figura 111A. Espectro COSY (DMSO-d_6) de 16

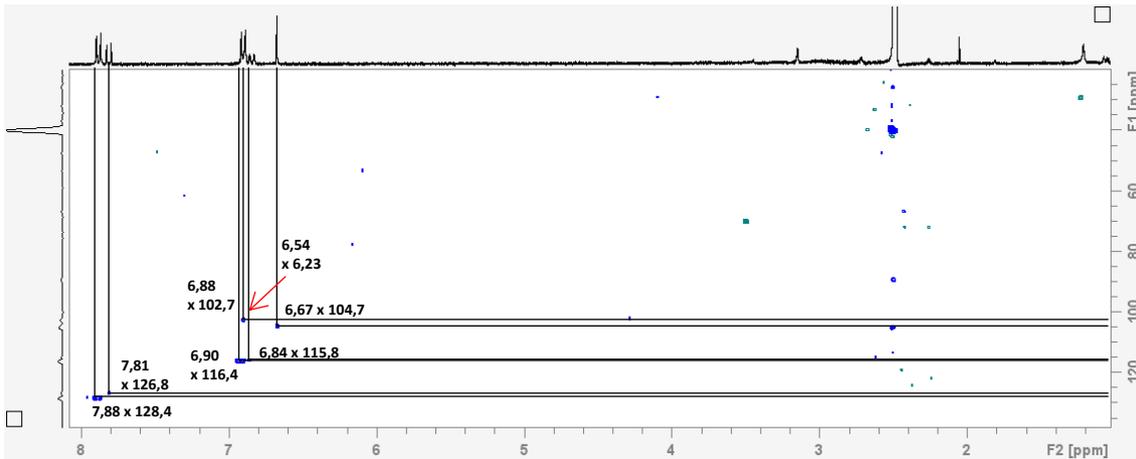


Figura 112A. Espectro HSQC (DMSO- d_6) de 16

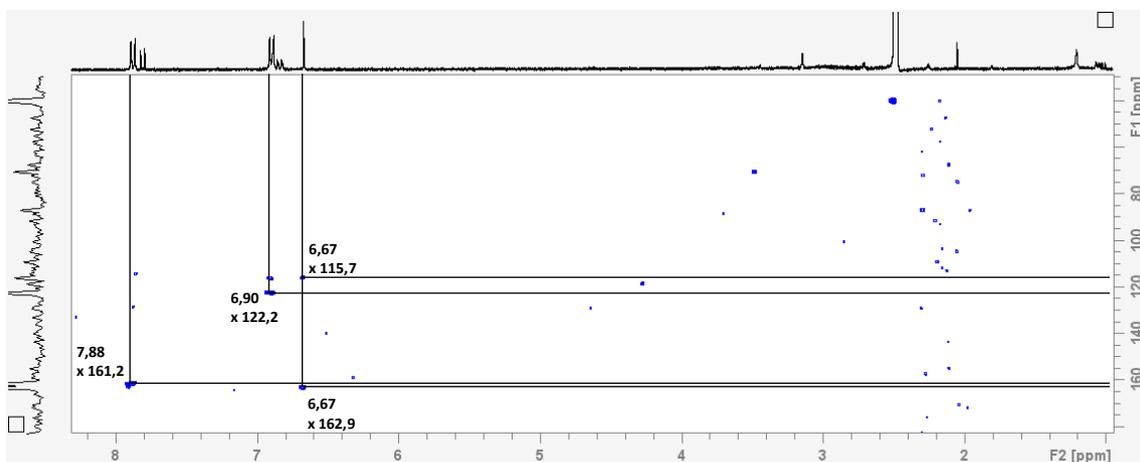


Figura 113A. Espectro HMBC (DMSO- d_6) de 16

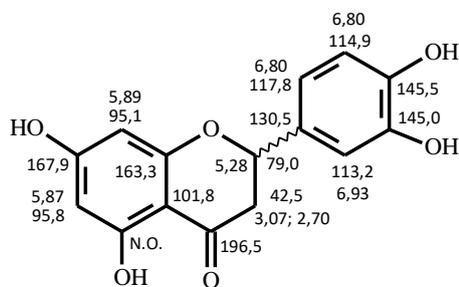


Figura 114A. Eriodictiol (17) e seus deslocamentos químicos de 1H e ^{13}C

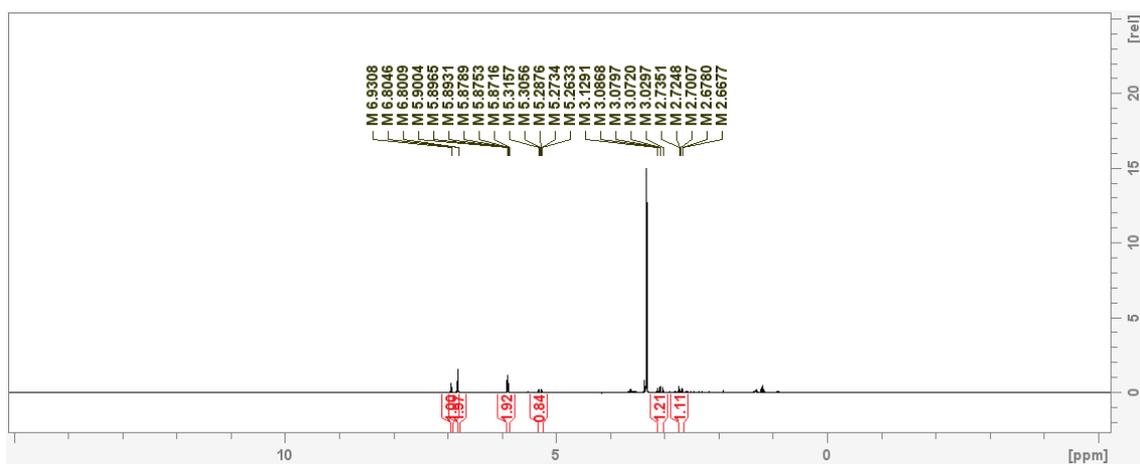


Figura 115A. Espectro de RMN de ^1H (metanol- d_4) com supressão do sinal da água de 17 em 300 MHz

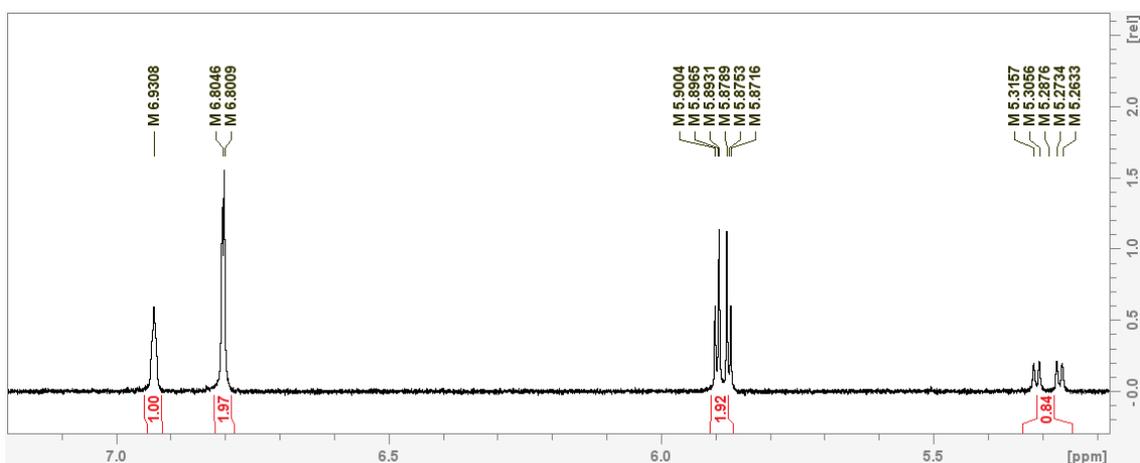


Figura 116A. Espectro de RMN de ^1H (metanol- d_4) de 17 (expansão 7,20-5,20 ppm)

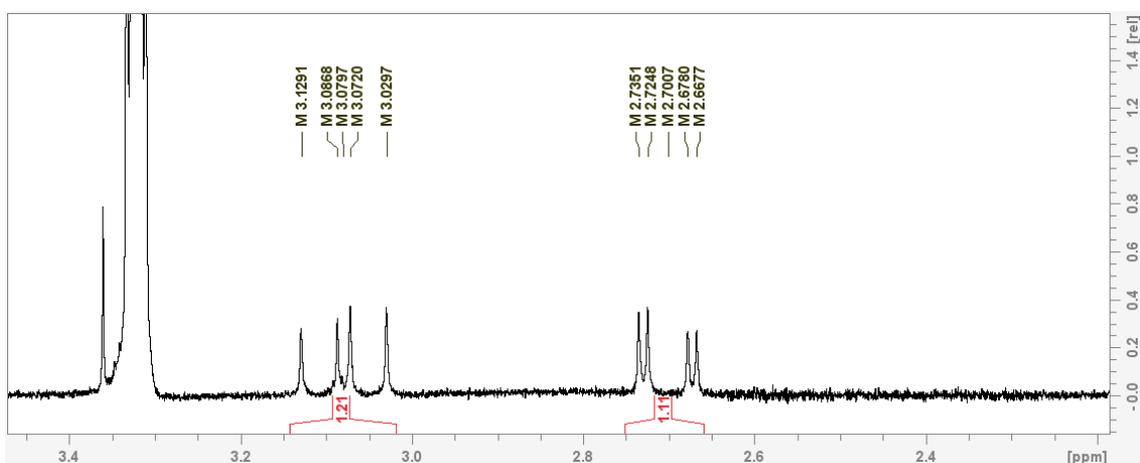


Figura 117A. Espectro de RMN de ^1H (metanol- d_4) de 17 (expansão 3,50-2,10 ppm)

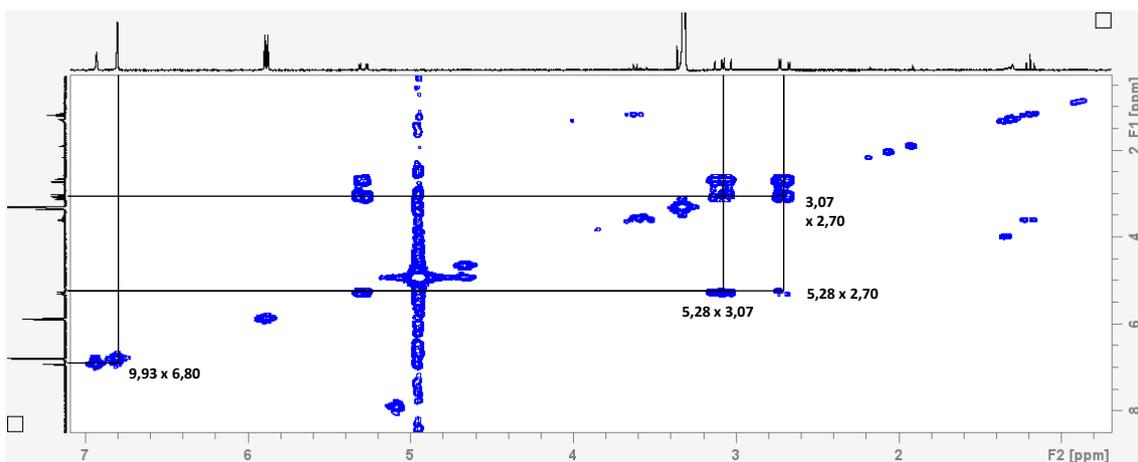


Figura 118A. Espectro COSY (metanol-d₄) de 17

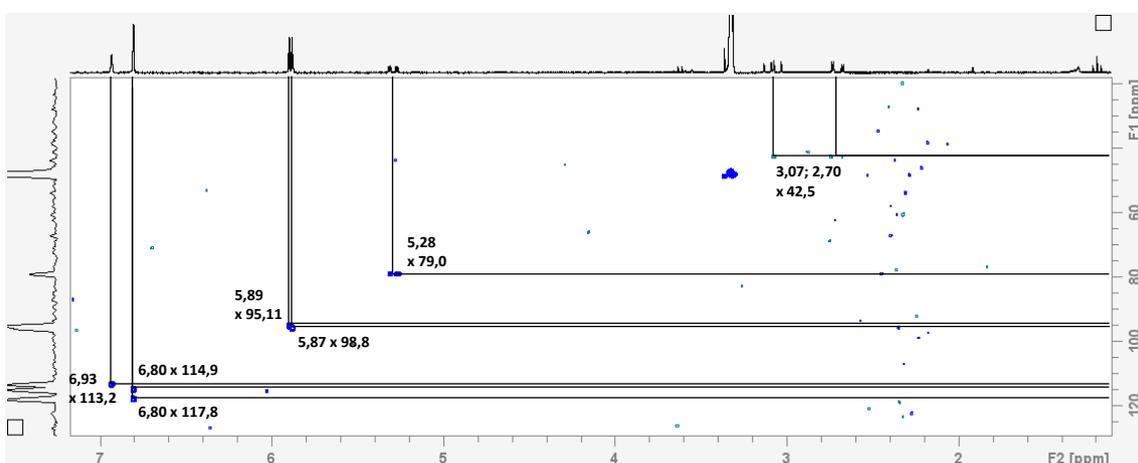


Figura 119A. Espectro HSQC (metanol-d₄) de 17

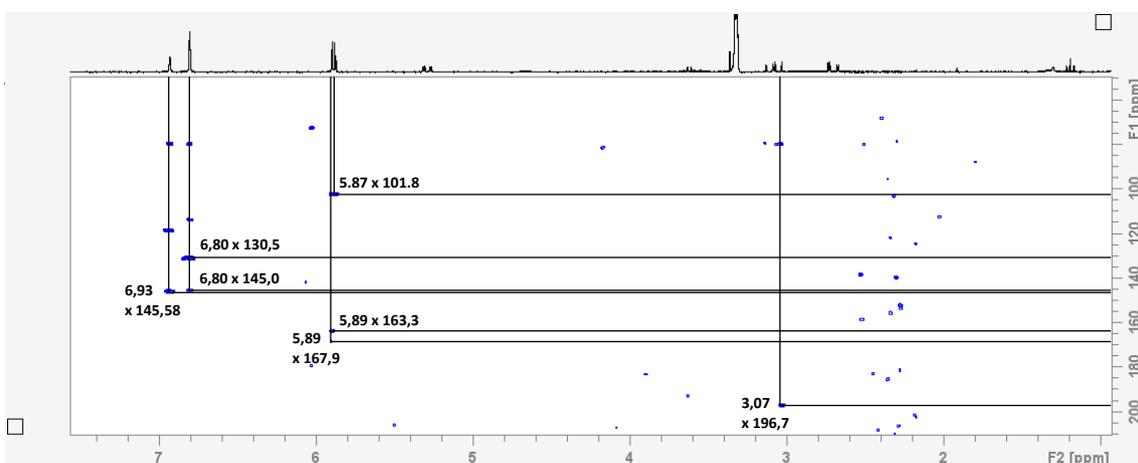


Figura 120A. Espectro HMBC (metanol-d₄) de 17

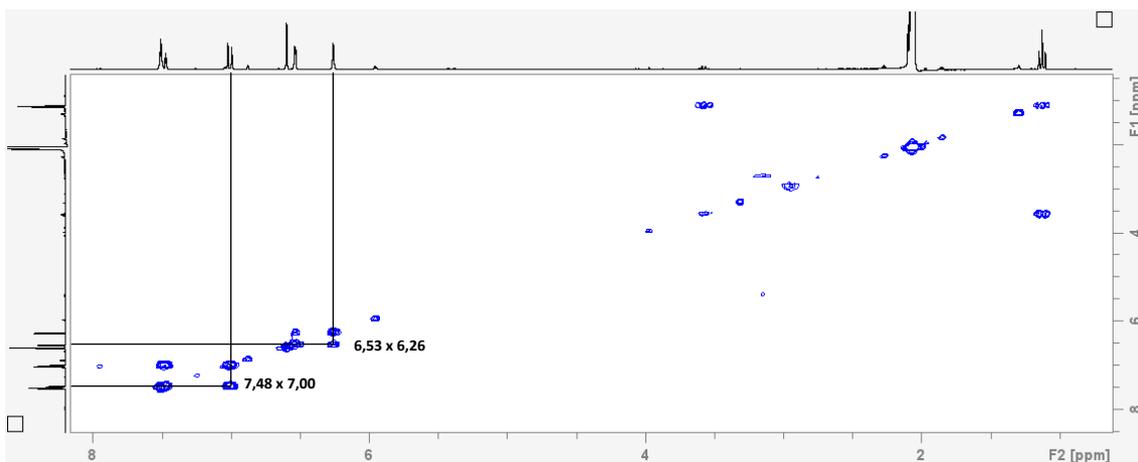


Figura 124A. Espectro COSY (acetona- d_6) de **18**

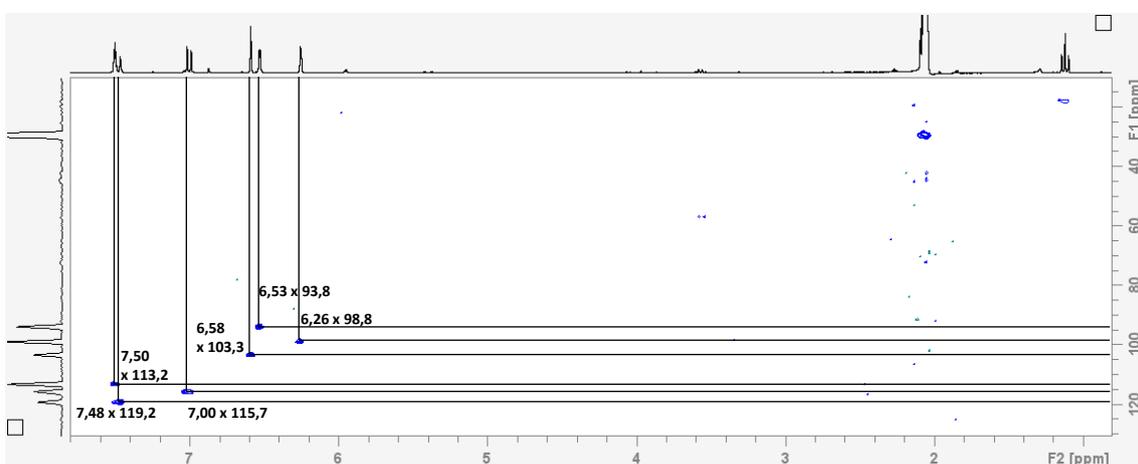


Figura 125A. Espectro HSQC (acetona- d_6) de **18**

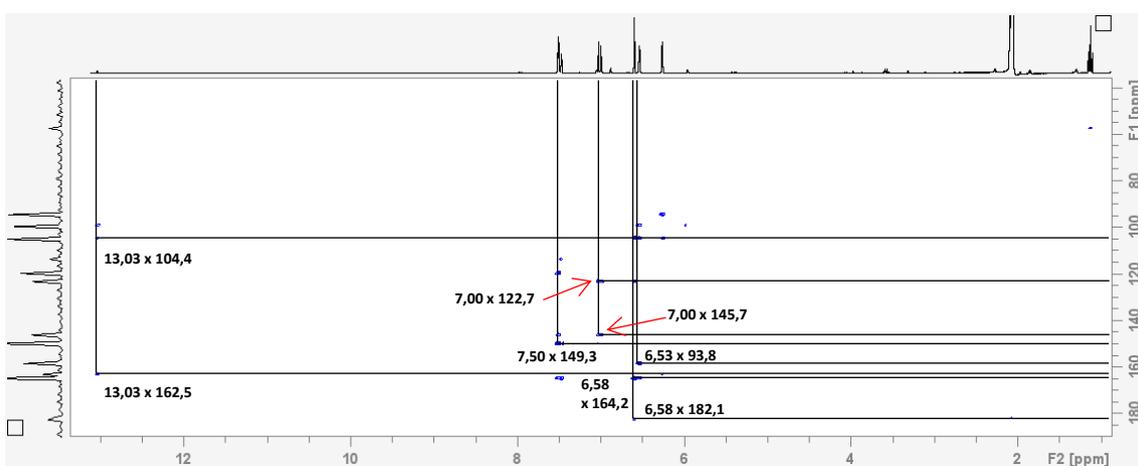


Figura 126A. Espectro HMBC (acetona- d_6) de **18**

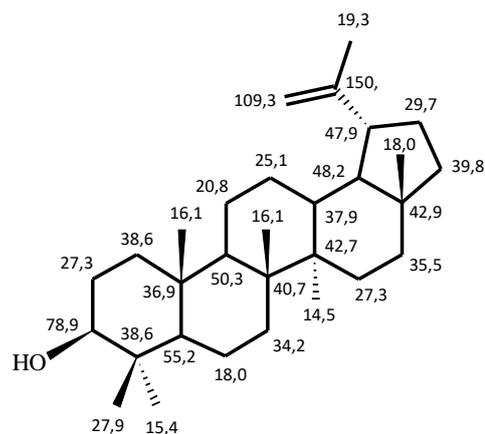


Figura 127A. Lupeol (**19**) seus deslocamentos químicos de ^{13}C

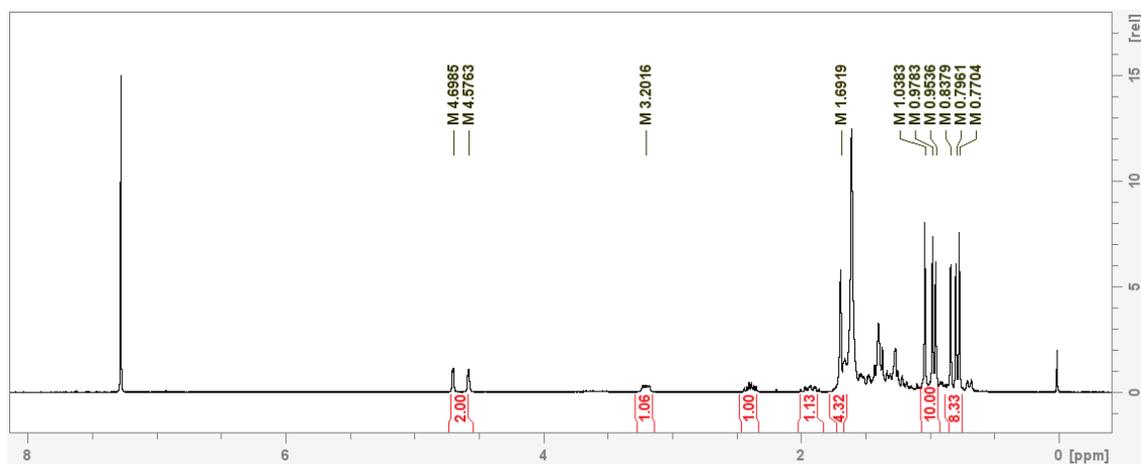


Figura 128A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de **19** em 300 MHz

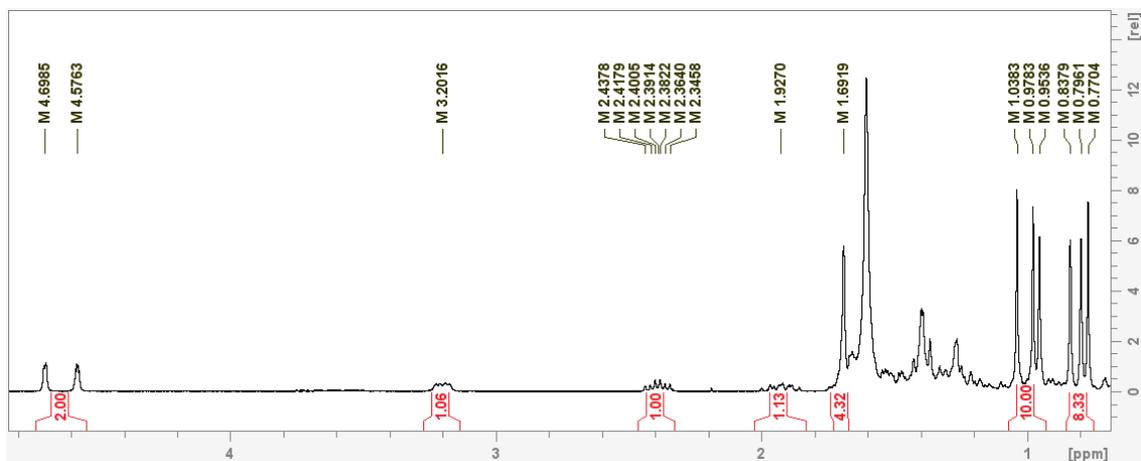


Figura 129A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de **19** (expansão 4,90-0,75 ppm)

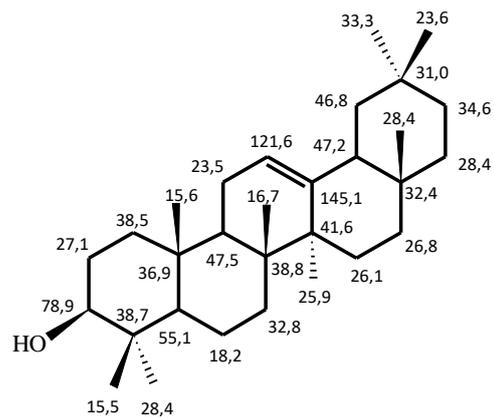


Figura 130A. β -amirina (20) e seus deslocamentos químicos de ^{13}C

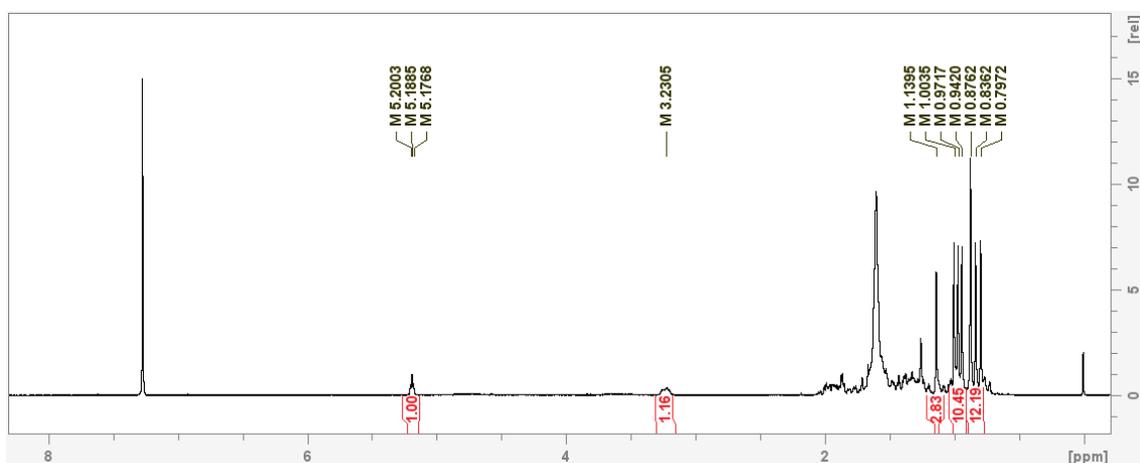


Figura 131A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de 20 em 300 MHz

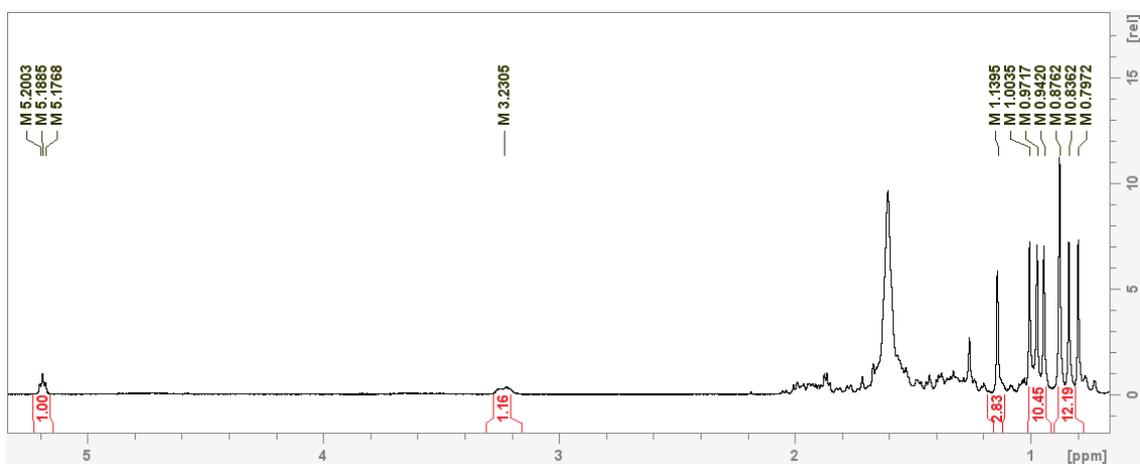


Figura 132A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de 20 (expansão 5,28-0,75 ppm)

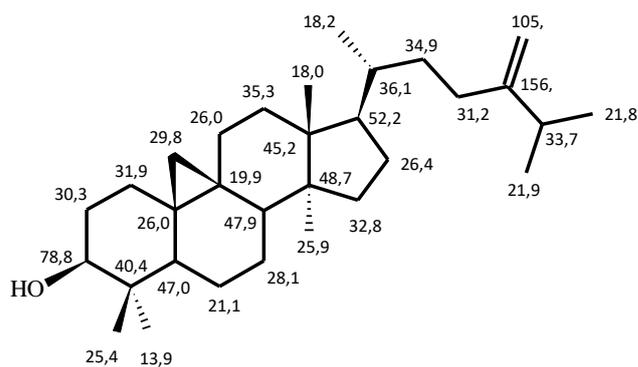


Figura 133A. 24-metilenocicloartenol (**21**) e seus deslocamentos químicos de ^{13}C

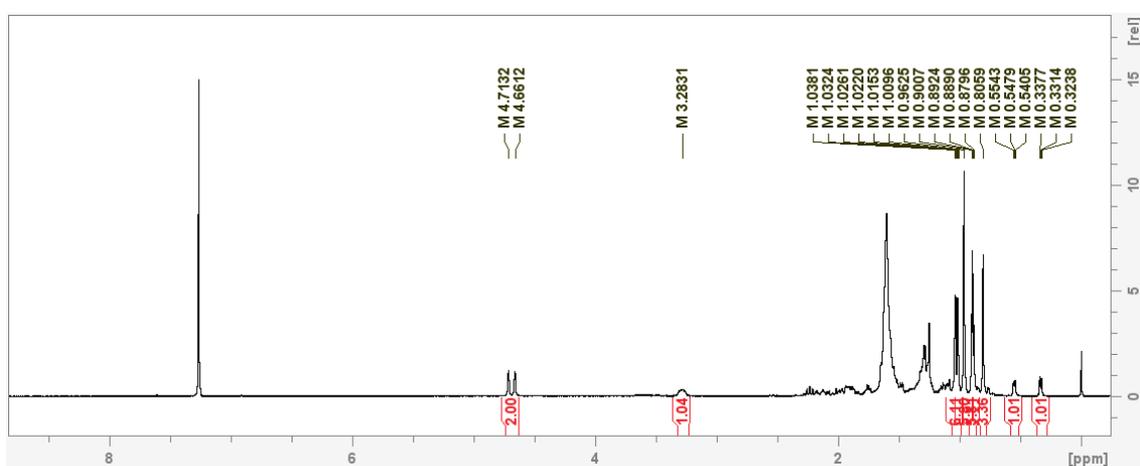


Figura 134A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de **21** em 300 MHz

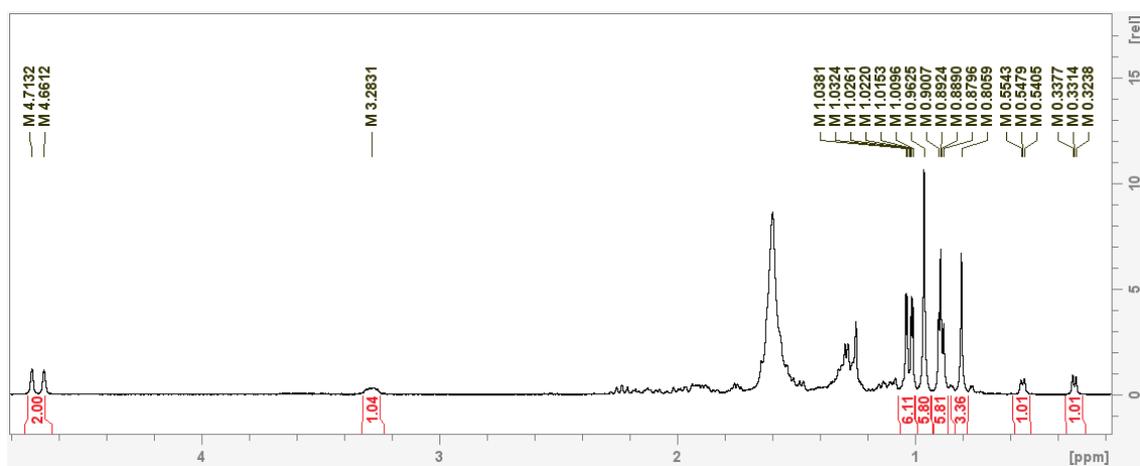


Figura 135A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de **21** (expansão 4,80-0,20 ppm)

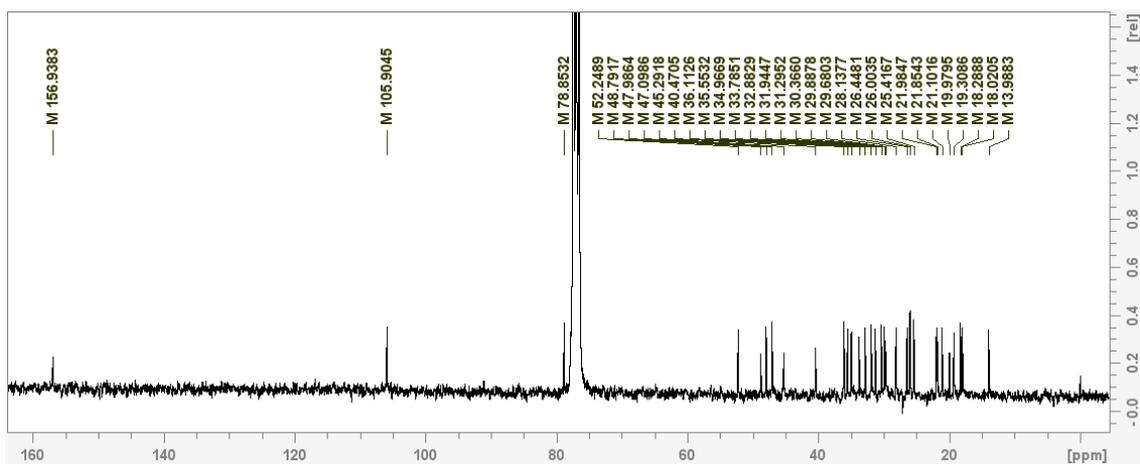


Figura 136A. Espectro de RMN de ^{13}C (clorofórmio-d) de **21** em 75 MHz

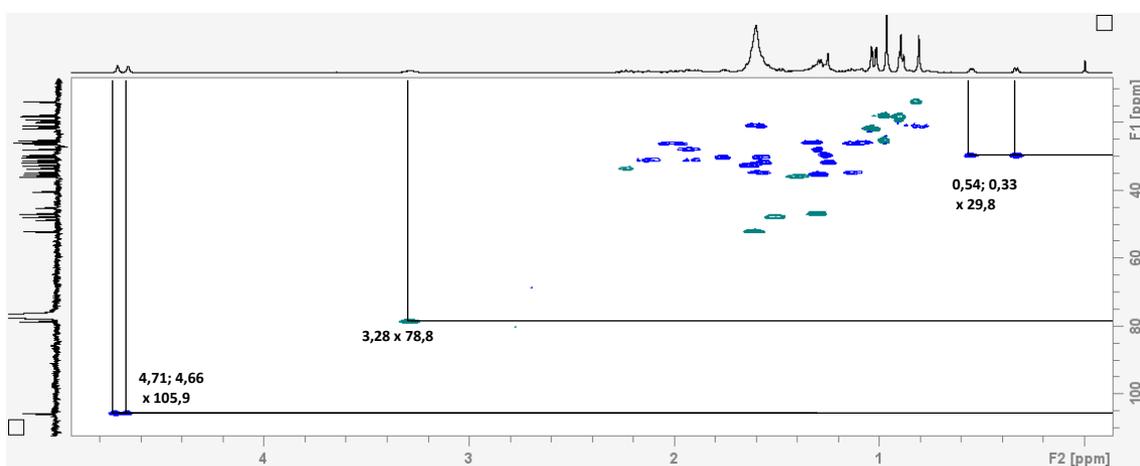


Figura 137A. Espectro HSQC (clorofórmio-d) de **21**

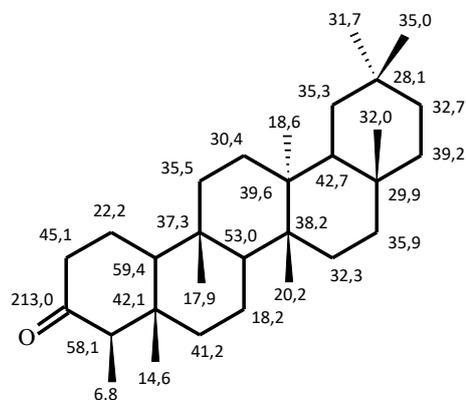


Figura 138A. Friedelina (**22**) e seus deslocamentos de ^{13}C

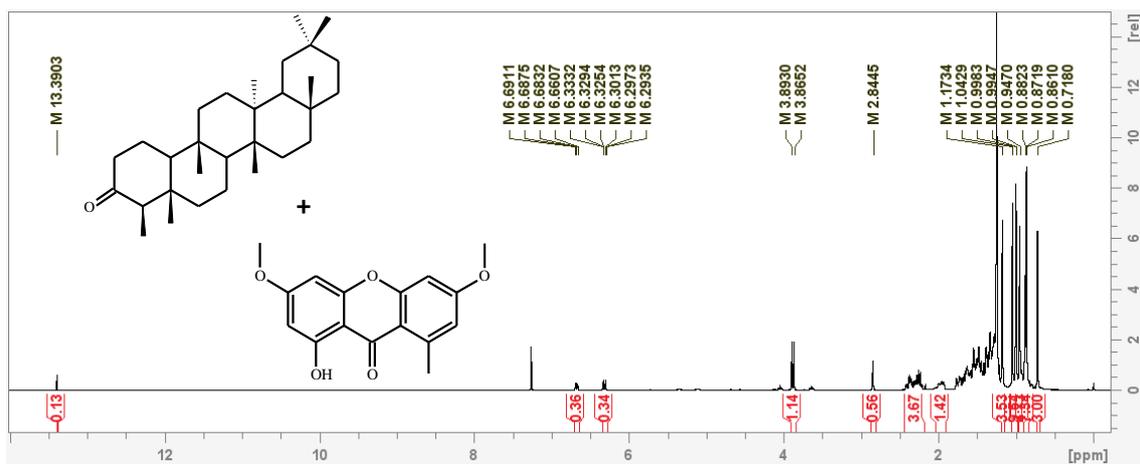


Figura 139A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de 22 e 23 em 300 MHz

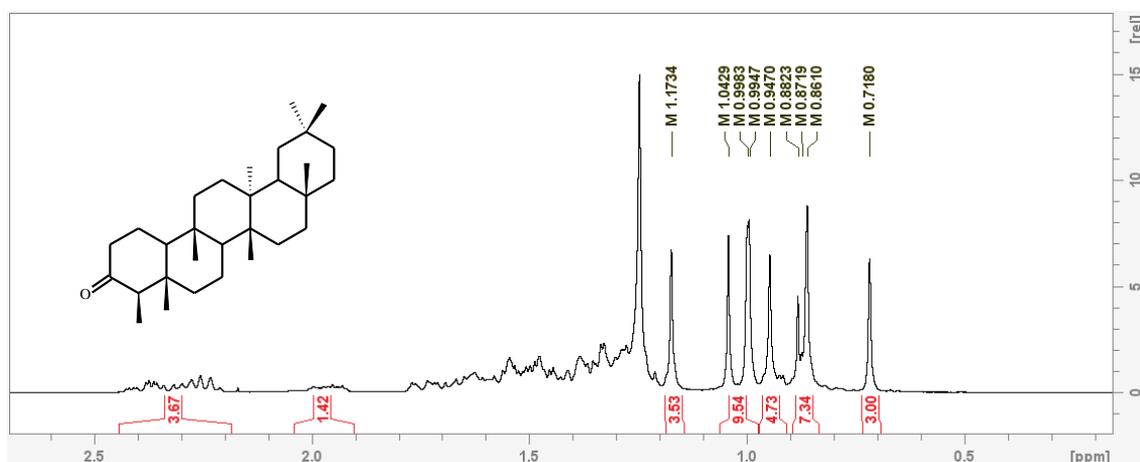


Figura 140A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de 22 e 23 (expansão 2,70-1,16 ppm)

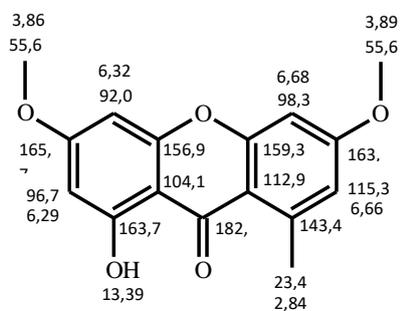


Figura 141A. Lichexantona e seus deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C

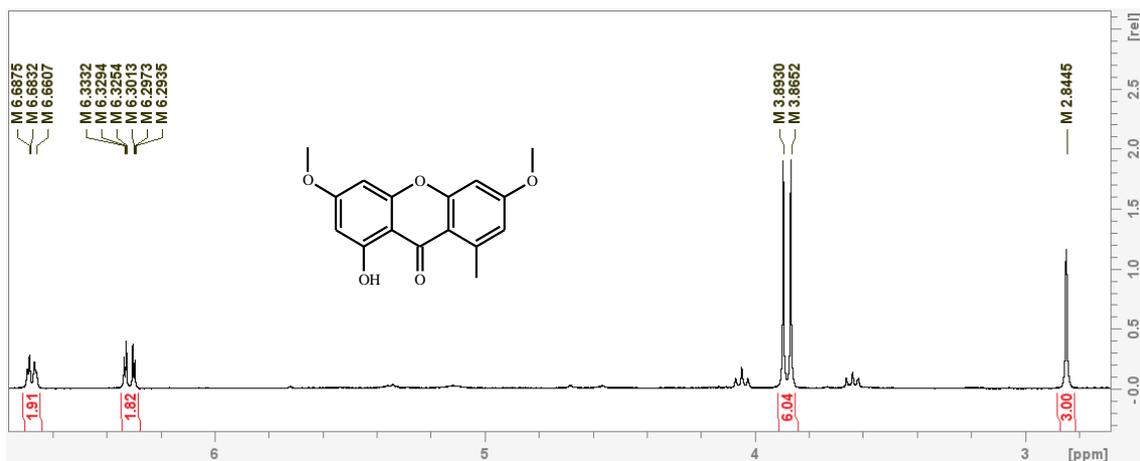


Figura 142A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de 22 e 23 (expansão 6,80-2,70 ppm)

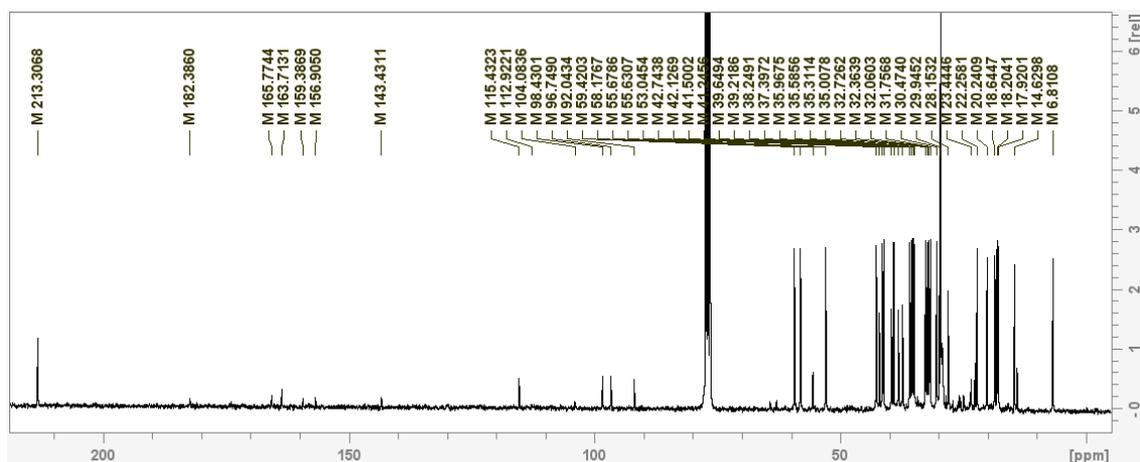


Figura 143A. Espectro de RMN de ^{13}C (clorofórmio-d) de 22 e 23 em 75 MHz

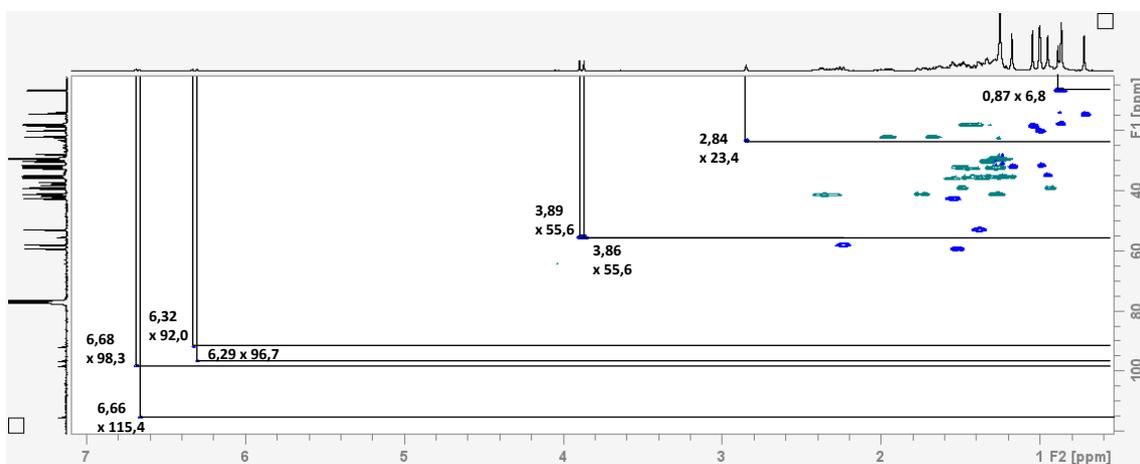


Figura 144A. Espectro HSQC (clorofórmio-d) de 22 e 23

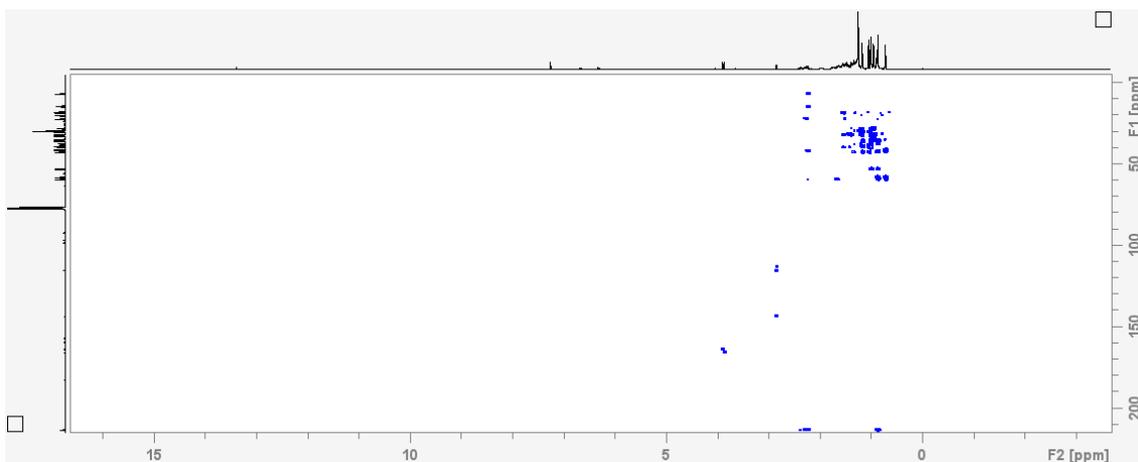


Figura 145A. Espectro HMBC (clorofórmio-d) de 22 e 23

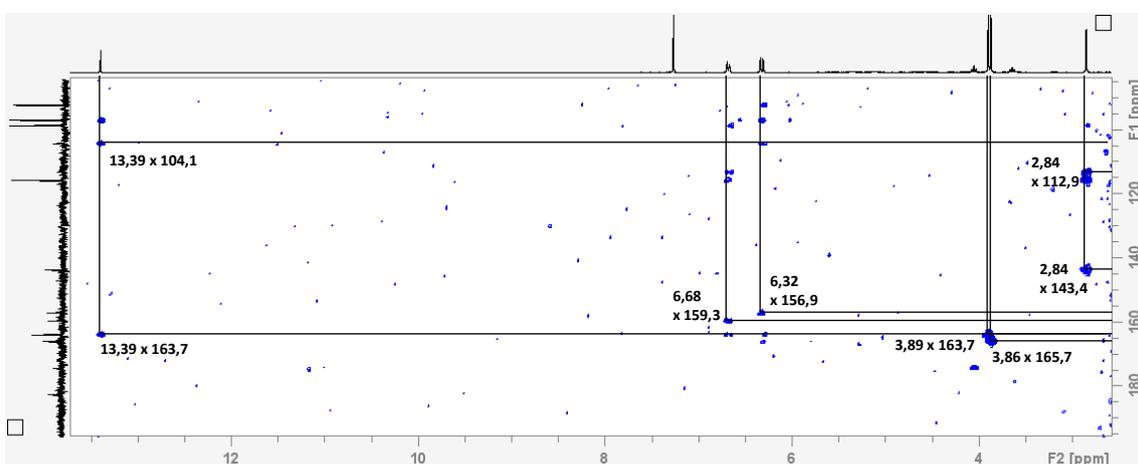


Figura 146A. Espectro HMBC (clorofórmio-d) de 22 e 23 (expansão)

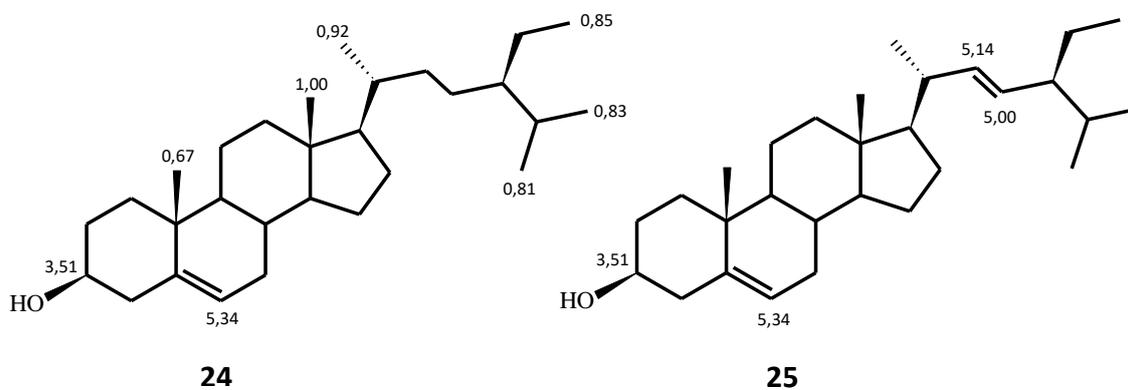


Figura 147A. β -sitosterol (24) e estigmasterol (25) e seus deslocamentos químicos de ^1H observados no espectro

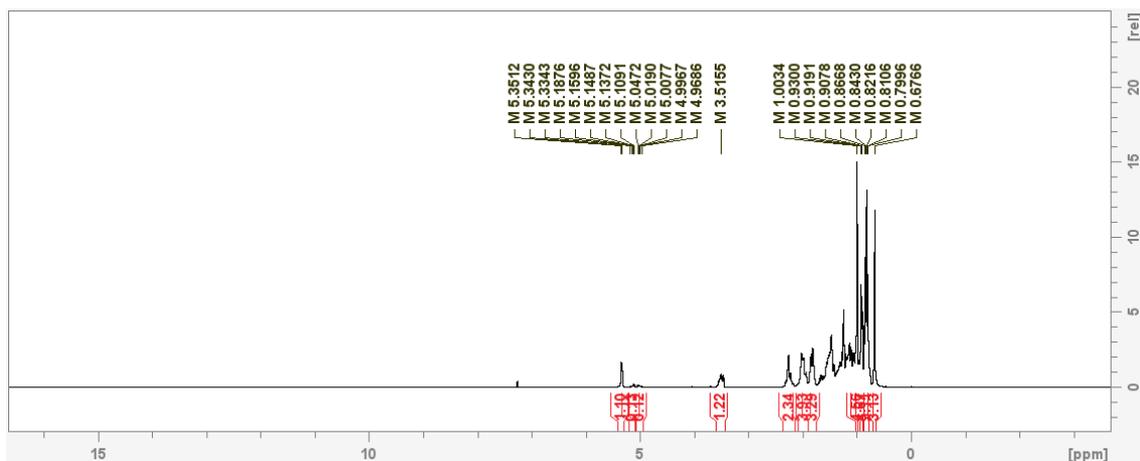


Figura 148A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de 24 e 25 em 300 MHz

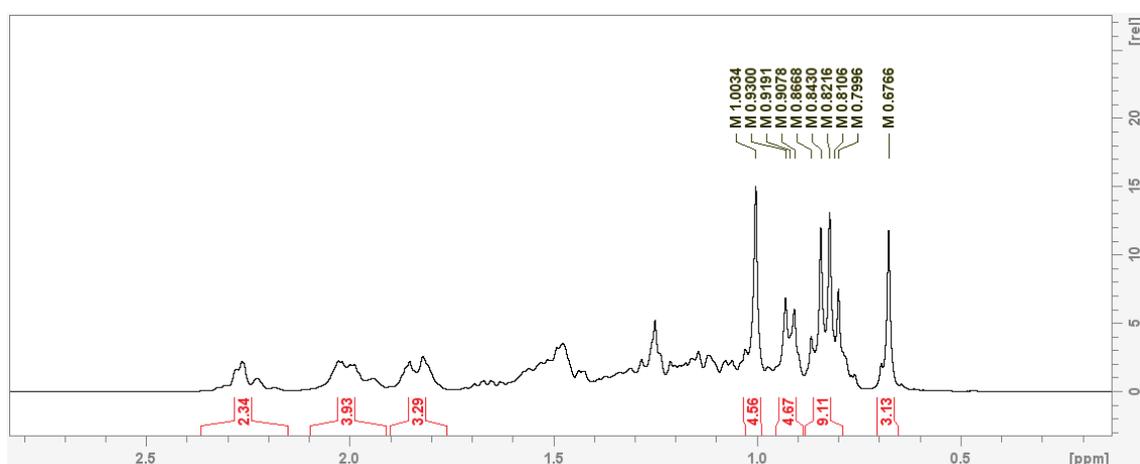


Figura 149A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de 24 e 25 (expansão 2,80-0,15 ppm)

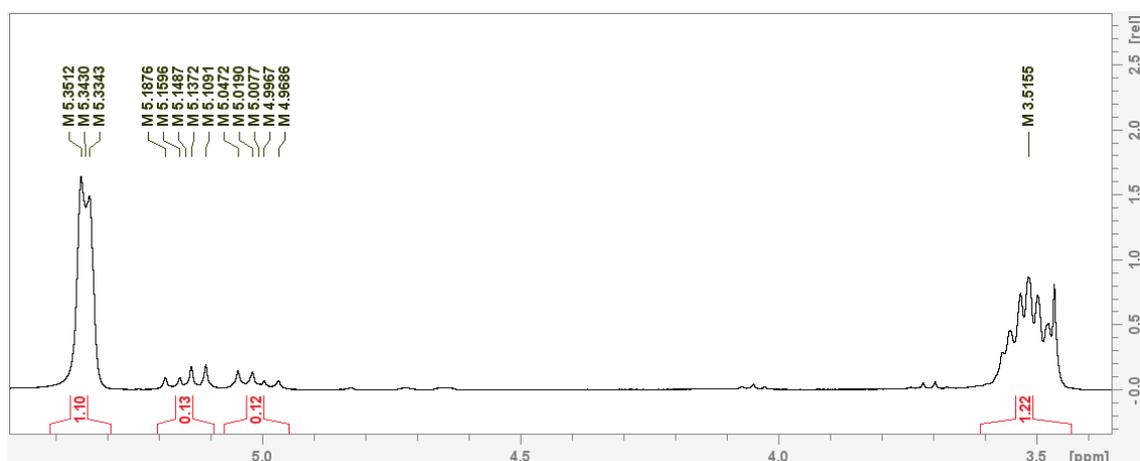


Figura 150A. Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio-d) de 24 e 25 (expansão 2,80-0,15 ppm)