

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA
RECURSOS AMAZÔNICOS



DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

THAIS SAMPAIO ALVES

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
Diploptropis racemosa (Hoehne), RESÍDUO MADEIREIRO DO MÉDIO
AMAZONAS

ITACOATIARA

2020

THAIS SAMPAIO ALVES

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Diplotropis racemosa*
(Hoehne), RESÍDUO MADEIREIRO DO MÉDIO AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de Ciências Ambientais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANDERSON CAVALCANTE GUIMARÃES

COORIENTADORA: Prof. Dr^a. GILDA GUIMARÃES LEITÃO

ITACOATIARA

2020

Ficha Catalográfica

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

A474e Alves, Thais Sampaio
Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de
Diploptropis racemosa (Hoehne), resíduo madeireiro do médio
Amazonas / Thais Sampaio Alves . 2020
152 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Anderson Cavalcante Guimarães
Coorientadora: Gilda Guimarães Leitão
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos
Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leguminosae. 2. Sucupira-preta. 3. hpccc. 4. Flavonas. 5.
Antioxidante. I. Guimarães, Anderson Cavalcante. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título



Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos

Thais Sampaio Alves

Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de *Diploptropis racemosa* (Hoehne), resíduo madeireiro do Médio Amazonas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado(a) em 27 de outubro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães
Presidente

Profa. Dra. Renata Takeara Hattori
Membro

Prof. Dr. Geone Maia Corrêa
Membro



Documento assinado eletronicamente por **Anderson Cavalcante Guimarães, Professor do Magistério Superior**, em 28/10/2020, às 15:55, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Geone Maia Corrêa, Professor do Magistério Superior**, em 03/11/2020, às 15:37, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Renata Takeara Hattori, Professor do Magistério Superior**, em 12/11/2020, às 15:49, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do



[Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0349335** e o código CRC **8F7B8B78**.

Rua Nossa Senhora do Rosário - Bairro Tiradentes nº 3863 -
Telefone: (92) 992718661 CEP 69103-128, Itacoatiara/AM,
ppgctra@ufam.edu.br

Referência: Processo nº 23105.037088/2020-02

SEI nº 0349335

*A Deus, aos meus pais Ivanildo e Roberia, ao meu noivo
Klauber, a minha filha Elisa, ao meu orientador Anderson Guimarães e as minhas amigas
Sarah Flores, Isadora Moita e Yasmin Cunha!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu bom e justo DEUS, ao seu Filho JESUS e a sua Mãe Maria;

À minha família: Ivanildo (pai), Roberia (mãe) e Italo (irmão) por todo amor;

À Klauber de Oliveira Lopes pelo companheirismo e compreensão;

À minha filha Elisa que é o meu maior presente divino;

Ao meu grande Mestre Prof. Dr. Anderson Guimarães;

A minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Gilda Leitão pelo voto de confiança;

À coordenação do programa de pós graduação;

Aos membros da banca por terem aceitado o convite;

Às minhas amigas de laboratório Sarah Flores, Isadora Moita e Yasmin Cunha por toda ajuda e dedicação;

À minha irmã de coração Débora Renata que nas horas mais difíceis esteve ao meu lado e se tornou a titia mais coruja do mundo;

À minha primeira amiga de laboratório Thais Marques, que além de amiga se tornou minha comadre, suas palavras sempre me incentivaram;

Ao Prof. Dr. Valdir Júnior por ter me acolhido no âmbito do seu laboratório;

Ao Prof. Dr. Emerson Lima (UFAM-Manaus) pelo apoio nas análises;

A cada membro do Grupo de Pesquisa Q-Bioma pelo acolhimento e atenção;

Ao corpo técnico da central analítica, em especial o Felipe Moura pela atenção e ajuda das análises solicitadas;

A CAPES pela bolsa concedida;

Aos amigos pelas palavras de apoio e incentivo;

Obrigada por não desistirem de mim, que Deus abençoe cada um de vocês.

“Jamais desista de si mesmo”.
Augusto Cury

RESUMO

Diploptropis racemosa (Hoehne) pertence à família Leguminosae, conhecida popularmente como Sucupira preta, possui dispersão pelo Brasil e é bastante utilizada em áreas degradadas. Estudos realizados na Região Amazônica apontam a presença de substâncias ativas como flavonoides, terpenos, saponinas e alcaloides em cascas e cernes de espécies da família. A prospecção fitoquímica teve como objetivo a identificação de grupos de metabólitos secundários presentes no extrato bruto e frações da casca de *D. racemosa*, cuja constituição química é desconhecida. A casca foi seca, triturada e o extrato bruto foi obtido sob refluxo com etanol 70%. O extrato bruto foi fracionado por partição líquido-líquido, sendo obtidas as seguintes frações: hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica e hidroalcolica. A constituição química dos extratos foi avaliada perante reação em tubos e em placas cromatográficas. A atividade antioxidante foi analisada frente aos radicais DPPH e ABTS, sendo determinado o teor de fenóis totais. A fração butanólica foi fracionada no HPLC utilizando sistemas de solventes compostos por: acetato de etila – butanol – água. Métodos cromatográficos e espectroscópicos foram utilizados para obtenção do perfil químico das amostras purificadas. A prospecção fitoquímica evidenciou qualitativamente a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: taninos condensados, flavonas, flavonóis, xantonas, flavanonóis, flavanonas, triterpenos pentacíclicos, saponinas e alcaloides. A análise por CCD evidenciou a presença de flavonoides nas seguintes amostras: extrato bruto, fração acetato de etila e fração butanólica. Além disso, permitiu acompanhar todo o processo de isolamento e atividade antioxidante frente ao DPPH, que no ensaio *in vitro* a fração em acetato de etila apresentou uma CI_{50} de 49,27 $\mu\text{g/mL}$ e maior concentração de fenóis totais. No entanto, o rendimento da fração em acetato de etila foi baixo, com isso o isolamento foi direcionado para a segunda fração mais ativa, considerando o ensaio antioxidante de ABTS. A técnica de HPLC possibilitou o direcionamento rápido e eficaz para o fracionamento e purificação das substâncias. No presente estudo foi possível purificar e identificar 4 flavonas C-glicosiladas inéditas na espécie *D. racemosa*, sendo elas: violantina (8,4 mg), isoviolantina (12,1 mg), vitexina (12 mg) e isovitexina (7,7 mg). Essa pesquisa foi pioneira na caracterização fitoquímica do resíduo madeireiro *D. racemosa*, coletada na região do Médio Amazonas. Estes resultados demonstram uma possibilidade para o aproveitamento dos resíduos pela indústria, fornecendo substâncias com potencial tecnológico, contribuindo para o meio ambiente. Este trabalho contribui para o conhecimento fitoquímico do gênero *Diploptropis* e deverá ser continuado para o encontro de novas substâncias presentes com potenciais biológicos, ainda a serem explorados.

Palavras-chave: Leguminosae, Sucupira preta, HPLC, flavonas, antioxidante.

ABSTRACT

Diploptropis racemosa (Hoehne) belongs to the Leguminosae family, popularly known as Sucupira preta, has dispersion throughout Brazil and is widely used in degraded areas. Studies carried out in the Amazon Region indicate the presence of active substances such as flavonoids, terpenes, saponins and alkaloids in the bark and heartwood of species of the family. The phytochemical prospecting aimed to identify groups of secondary metabolites present in the crude extract and fractions of the *D. racemosa* bark, whose chemical constitution is unknown. The peel was dried, crushed and the crude extract was obtained under reflux with 70% ethanol. The crude extract was fractionated by liquid-liquid partition, obtaining the following fractions: hexane, chloroform, ethyl acetate, butanolic and hydroalcoholic. The chemical constitution of the extracts was evaluated before reaction in tubes and chromatographic plates. The antioxidant activity was analyzed against the radicals DPPH and ABTS, and the content of total phenols was determined. The butanolic fraction was fractionated in the HPLC using solvent systems composed of: ethyl acetate - butanol - water. Chromatographic and spectroscopic methods were used to obtain the chemical profile of the purified samples. Phytochemical prospecting showed qualitatively the presence of the following classes of secondary metabolites: condensed tannins, flavones, flavonoids, xanthenes, flavanone, flavanones, pentacyclic triterpenes, saponins and alkaloids. CCD analysis showed the presence of flavonoids in the following samples: crude extract, ethyl acetate fraction and butanolic fraction. In addition, it allowed to monitor the entire process of isolation and antioxidant activity against DPPH, which in the in vitro assay the ethyl acetate fraction showed an IC₅₀ of 49.27 µg / mL and a higher concentration of total phenols. However, the fraction yield in ethyl acetate was low, so the isolation was directed to the second most active fraction, considering the antioxidant test of ABTS. The HPLC technique allowed for fast and effective targeting for the fractionation and purification of substances. In the present study, it was possible to purify and identify 4 novel C-glycosylated flavones in the species *D. racemosa*, namely: violantine (8.4 mg), isoviolantine (12.1 mg), vitexin (12 mg) and isovitexine (7.7 mg). This research was a pioneer in the phytochemical characterization of wood residue *D. racemosa*, collected in the Middle Amazon region. These results demonstrate a possibility for the use of residues by the industry, supplying substances with technological potential, contributing to the environment. This work contributes to the phytochemical knowledge of the genus *Diploptropis* and should be continued to find new substances present with biological potentials, yet to be explored.

Keywords: Leguminosae, black sucupira, HPLC, flavones, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribuição das espécies de <i>Staminodianthus</i>	20
Figura 2. Representação esquemática do DPPH.	24
Figura 3. Representação esquemática do ABTS.....	25
Figura 4. Princípio da técnica de cromatografia contra corrente.....	27
Figura 5. Localização da extração da espécie madeireira <i>D. racemosa</i>	37
Figura 6. Processo de obtenção de extrato e frações de <i>D. racemosa</i>	38
Figura 7. Fluxograma do fracionamento geral do extrato.	38
Figura 8. Etapas da preparação do processo cromatográfico.....	42
Figura 9. Modelo HPLC Spectrum.....	46
Figura 10. Aplicação dos sistemas de partição 17 a 3.....	48
Figura 11. Cromatofolha das frações no modo analítico da B-LSP04.....	50
Figura 12. Cromatofolha das frações no modo preparativo da B-LSP04.	52
Figura 13. Cromatofolha do modo preparativo da B-LSP04.	53
Figura 14. Cromatofolha das subfrações de B-LSP04.....	53
Figura 15. Perfil químico em CCD de SP04-01	54
Figura 16. Perfil químico em CCD de SP04-02.	55
Figura 17. Cromatograma da SP04-02 (Fração 10).....	56
Figure 18. Cromatoplaça e cromatograma das frações do CLAE (íon 577)	57
Figure 19. Fração FMV 431.....	58
Figure 20. Cromatofolha da análise de SP04-03	58
Figura 21. Cromatofolha da reunião da SP04-04	59
Figure 22. Cromatoplaça da junção de F32 e F37 da SP04-04	60
Figure 23. Cromatoplaça das frações do CLAE (íon 431)	61
Figure 24. Cromatograma da injeção em sistema gradiente no CLAE/DAD (íon 431).	61
Figure 25. Cromatograma representativo das injeções em sistema isocrático no CLAE/DAD (íon 431).....	61
Figure 26. Fluxograma das etapas do processo de separação e isolamento no HPLC.	63
Figura 27. Prospecção fitoquímica para caracterização dos fenólicos.....	66
Figura 28. Caracterização em tubos de terpenos.....	67
Figura 29. Caracterização em tubos de saponinas.....	68

Figura 30. Caracterização em tubos de alcaloides.....	68
Figura 31. Perfil de flavonoides e fenólicos em NP-PEG.....	69
Figura 32. Perfil para flavonoides e outros fenólicos em sulfato cérico.....	70
Figura 33. Caracterização de terpenos em CCD.....	71
Figura 34. Perfil qualitativo para DPPH.....	71
Figura 35. Espectro UV da amostra SP-F2.	74
Figura 36. Espectro de LC-MS da fração SP-F2.	75
Figura 37. Espectro de RMN ¹ H da fração SP-F2.....	75
Figura 38. Ampliações do espectro de RMN ¹ H. a: Região dos aromáticos e olefínicos; b: Região dos açúcares.	76
Figura 39. Espectro de carbono-13 da substância SP-F2.	78
Figura 40. Ampliação do espectro de ¹³ C da substância SP-F2 . a: Região de campo baixo; b: Região de campo alto.	79
Figura 41. Espectro de DEPT-135 da fração SP-F2.....	80
Figura 42. Estrutura da violantina com sinais dos carbonos atribuídos.	81
Figura 43. Mapa de correlações HSQC da amostra SP-F2.	82
Figura 44. Ampliação (campo baixo) do mapa de correlações HSQC da amostra SP-F2.....	82
Figura 45. Ampliação (campo alto) do mapa de correlações HSQC da amostra SP-F2.	83
Figura 46. Estrutura da violantina.....	83
Figura 47. Ampliação do mapa de correlações HSQC da amostra SP-F2 região da metila.	84
Figura 48. Mapa de correlações HMBC da fração SP-F2.....	85
Figura 49. Ampliação do mapa HMBC na região dos aromáticos da fração SP-F2.	85
Figura 50. Acoplamentos entre hidrogênios e carbonos da vizinhança SP-F2.	86
Figura 51. Mapa e correlações (COSY) da amostra SP-F2.....	86
Figura 52. Ampliações do mapa de correlações do COSY. a: Região dos açúcares; b: Região de metila.....	88
Figura 53. Correlações (COSY) ilustradas na estrutura da violantina.....	89
Figura 54. Estrutura da violantina com sinais atribuídos aos elementos correspondentes.	89

Figura 55. Espectro de UV da fração SP-F4	90
Figura 56. Espectro de LC-MS da amostra SP-F4.	91
Figura 57. Espectro de RNM ¹ H da fração SP-F4.....	91
Figura 58. Ampliação na região dos aromáticos e olefínicos (SP-F4).....	92
Figura 59. Ampliação na faixa dos açúcares e na região da metila da amostra SP-F4.	92
Figura 60. Espectro de ¹³ C da substância da amostra SF-F4.....	94
Figura 61. Ampliação da faixa do campo baixo com sinais emitidos da fração SP-F4	94
Figura 62. Ampliação da faixa do campo alto com sinais emitidos da fração SP-F4	95
Figura 63. Espectro de DEPT-135 gerado da amostra SP-F4.	95
Figura 64. Estrutura da isoviolantina com os sinais de carbono atribuídos.	97
Figura 65. Mapa de correlações HSQC da substância presente na amostra SP-F4.	97
Figura 66. Ampliações do mapa de correlações do HSQC. a: Região dos aromáticos e olefínicos; b: Região dos açúcares.	98
Figura 67. Ampliação do mapa de correlações do HSQC na região da metila da ramnose	99
Figura 68. Estrutura da isoviolantina, substância proposta na análise.....	100
Figura 69. Mapa de correlações HMBC da amostra SP-F4	100
Figura 70. Ampliações do mapa de correlação do HMBC da substância SP-F4. a: Região do campo baixo; b: Região do campo alto	101
Figura 71. Demonstração das correlações observadas para a amostra SP-F4.	102
Figura 72. Mapa de correlações COSY gerado da análise da amostra SP-F4. .	102
Figura 73. Aplicações do mapa de correlações do COSY. a: Sinais dos açúcares; b: Sinais da metila	103
Figura 74. Demonstração das correlações internucleares de hidrogênio na amostra SP-F4.....	104
Figura 75. Estrutura da isoviolantina com os sinais atribuídos nos respectivos elementos.	104
Figura 76. Espectro de UV gerado da fração SP-431.1	105

Figura 77. Espectro de LC-MS gerado da amostra SP-431.1	105
Figura 78. Espectro de RMN ¹ H da fração SP-431.1.....	106
Figura 79. Ampliações do espectro de ¹ H. a: Região dos aromáticos; b: Região dos açúcares.	107
Figura 80. Espectro de ¹³ C da amostra SP-431.1.....	109
Figura 81. Espectro de DEPT-135 gerado pela fração SP-431.1.....	110
Figura 82. Mapa de correlações HSQC da amostra SP-431.1	111
Figura 83. Ampliações do mapa de correlações do HSQC da substância SP.431.1. a: Região de aromáticos e olefínicos; b: Região de glicosídeos.	112
Figura 84. Mapa de correlações HMBC da fração	113
Figura 85. Ampliações do mapa de correlações do HMBC da substância SP-431.1. a: Região de aromáticos; b: Região de açúcar.	114
Figura 86. Demonstração das correlações internucleares (¹ H- ¹³ C) (SP-431.1).115	
Figura 87. Mapa de correlações COSY da amostra SP-431.1.....	115
Figura 88. Ampliação do mapa de correlações COSY com interações entre ¹ H da glicose.....	116
Figura 89. Correlações entre núcleos de hidrogênio na estrutura da vitexina....	116
Figura 90. Estrutura da substância vitexina isolada da fração SP-431.1.	117
Figura 91. Espectro de UV da fração SP-431.2.....	118
Figura 92. Espectro de LC-MS da amostra SP-431.2.....	118
Figura 93. Espectro de RMN ¹ H gerado da fração SP-431.2.....	119
Figura 94. Ampliação do espectro de ¹ H da fração SP-431.2. a: Região de aromáticos; b: Região de açúcar (5,00-3,50 ppm); c: Região de açúcar (4,00-3,00).	120
Figura 95. Espectro de ¹³ C da fração SP-431.2.....	121
Figura 96. Espectro de DEPT-135 da fração SP-431.2.	122
Figura 97. Estrutura da isovitexina proposta como a substância da fração SP-431.2.....	123
Figura 98. Mapa de correlações HSQC da amostra SP-431.2.	124
Figura 99. Ampliações do mapa de correlações do HSQC da Isoviteixina. a: Região de aromáticos; b: Região da glicose.	125
Figura 100. Mapa de correlações HMBC da fração SP-431.2.	126
Figura 101. Ampliações do mapa com correlações da região dos aromáticos. .127	

Figura 102. Ilustração das correlações HMBC (^1H - ^{13}C) da aglicona em SP-431.2.	127
Figura 103. Ampliação do mapa de correlações HMBC entra os núcleos do açúcar.....	128
Figura 104. Demonstração das interações internucleares no açúcar do flavonoide.	128
Figura 105. Mapa de correlações COSY da amostra SP-431.2.....	129
Figura 106. Ampliação das correlações entre os núcleos de H do glicosídeo ...	129
Figure 107. Correlações entre (^1H - ^1H) demonstradas na estrutura.....	130
Figure 108. Estrutura da isovitexina com as propostas dos assinalamentos de cada elemento.	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eluentes e reveladores empregados em CCD	41
Tabela 2. Reagentes de pulverização.....	42
Tabela 3. Sistemas de CCC aplicados em CCD	47
Tabela 4. Sistemas de partição avaliados em CCD	49
Tabela 5. Rendimento de B-LSP04	50
Tabela 6. Ordem de eluição e volume utilizado cromatografia preparativa de B-LSP04	51
Tabela 7. Rendimentos a partir de 1 g	52
Tabela 8. Rendimentos a partir de 500 mg	52
Tabela 9. Rendimento das subfrações B-LS04.....	53
Tabela 10. Rendimento das injeções no HPLC da SP04-01	54
Tabela 11. Rendimento das injeções no HPLC da SP04-02.....	55
Tabela 12. Rendimento das frações do CLAE (íon 577)	56
Tabela 13. Rendimento das injeções no HPLC da SP04-03.....	58
Tabela 14. Rendimento das injeções no HPLC da SP04-04.....	59
Tabela 15. Rendimento das frações do CLAE (íon 431)	60
Tabela 16. Rendimento da extração e fracionamento de <i>D. racemosa</i>	64
Tabela 17. Prospecção fitoquímica em tubos de <i>D. racemosa</i>	64
Tabela 18. Valores de porcentagem de atividade antioxidante e IC ₅₀ obtidos.....	72
Tabela 19. Concentração de fenóis totais.....	73
Tabela 20. Dados dos sinais observados no espectro de ¹ H da amostra SP-F2..	77
Tabela 21. Sinais observados nos espectros de ¹³ C e DEPT e comparados com a literatura.....	81
Tabela 22. Dados observados no mapa HSQC (amostra SP-F2) e comparados com a literatura.....	84
Tabela 23. Correlações encontradas no mapa HMBC da SP-F2	86
Tabela 24. Correlações ¹ H- ¹ H observados para fração SP-F2.....	88
Tabela 25. Dados dos sinais emitidos da fração SP-F4.....	93
Tabela 26. Registro dos sinais da amostra SP-F4 e comparados com os dados da literatura.....	96
Tabela 27. Dados obtidos das correlações HSQC e comparados com a literatura.....	99

Tabela 28. Correlações observadas para a fração SP-F4.	101
Tabela 29. Dados obtidos dos sinais da fração SP-431.1. e comparados com a literatura.	108
Tabela 30. Dados dos sinais dos espectros de ^{13}C e DEPT e comparados com a literatura.	110
Tabela 31. Dados obtidos das correlações e comparados com a literatura.	112
Tabela 32. Correlações observadas no mapa de correlações HMBC da amostra SP-431.1.	114
Tabela 33. Sinais observados no espectro de COSY da amostra SP-431.1.	116
Tabela 34. Dados dos sinais obtidos da fração SP-431.2.	121
Tabela 35. Dados obtidos dos sinais de ^{13}C e DEPT comparados com a literatura.	123
Tabela 36. Correlações observadas no mapa HSQC e comparadas com a literatura.	126
Tabela 37. Correlações observadas no mapa HMBC para isovitexina da amostra SP-431.2.	128
Tabela 38. Dados dos sinais observados nas correlações COSY para a isovitexina (SP-431.2.)	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
AL	Alcaloides
BAW	Butanol - ácido acético glacial – água
B-LSP01	Fração hexânica de Sucupira-Preta
B-LSP02	Fração clorofórmica de Sucupira-Preta
B-LSP03	Fração acetato de etila de Sucupira-Preta
B-LSP04	Fração butanólica de Sucupira-Preta
B-LSP05	Fração hidroalcoólica de Sucupira-Preta
CCC	Cromatografia Contra Corrente
CCD	Cromatografia em camada delgada
CHCl₃	Clorofórmio
CH₂O₂	Ácido fórmico
CH₃COOH	Ácido acético glacial
CH₃COCH₃	Acetona
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cl₅₀	Concentração que inibe 50% (de DPPH)
CL	Cromatografia líquida
CM	Clorofórmio: Metanol
COSY	Espectroscopia de correlação (acoplamento ¹ H- ¹ H)
DEPT	Distorção menos intensificação por transferência de polarização
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EBWat	Acetato de etila – butanol – água

EM	Espectrometria de massas
EtOAc	Acetato de etila
FeCl₃	Cloreto férrico
FE	Fase estacionária
FI	Fase inferior
FM	Fase móvel
FS	Fase superior
HAcet	Hexano - Acetato de etila
HEMWat	Hexano - acetato de etila – metanol – água
HMBC	Conectividade de ligação múltipla heteronuclear
HMQC	Coerência quântica múltipla heteronuclear
HPCCC	Cromatografia de contra-corrente de alto desempenho
LSP	Leguminosae Sucupira-Preta
NP	2-aminoetildifenilborato
PEG	Polietileno glicol
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.1 Brasil e Região Amazônica	17
1.2 Família Leguminosae	18
1.3 Gênero e Espécie	20
1.4 Radicais Livres e Estresse Oxidativo	21
1.5 Antioxidante e Defesa antioxidante	22
1.6 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	23
1.7 Cromatografia Contracorrente (CCC)	25
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Reagentes, Materiais e Equipamentos Utilizados	34
a) Reagentes	34
b) Materiais	34
c) Equipamentos	34
4.2 Coleta do vegetal	36
4.3 Extração e Fracionamento da casca de <i>D. racemosa</i>	37
4.4 Prospecção Fitoquímica em Tubos	38
4.4.1 Caracterização de Fenólicos	38
a) Preparação da solução estoque.....	39
b) Teste para fenóis e taninos.....	39
c) Teste para antocianidinas, antocianinas e flavonoides.....	39
d) Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	39
4.4.2 Caracterização de Terpenos (Lieberman-Burchard).....	40
4.4.3 Caracterização de Saponinas	40

4.4.4	Caracterização de Alcalóides	40
	4.5 Prospecção Fitoquímica em Cromatografia em Camada Delgada.....	41
a)	Procedimento.....	41
	4.6 Preparação de Soluções Reveladoras	42
	4.7 Ensaio de Atividade Antioxidante	43
4.7.1	Ensaio Qualitativo por CCD	43
4.7.2	Ensaio Quantitativo	43
4.7.3	Determinação de Fenóis Totais.....	44
4.7.4	Atividade Sequestrante do Radical ABTS	44
	4.8 Fracionamento e isolamento dos constituintes químicos.....	45
4.8.1	Fracionamento por cromatografia em contra corrente de alta performance (HPCCC) - High Performance Counter Current Chromatography	45
4.8.2	Preparo da amostra e definição dos sistemas por CCD	46
4.8.3	Análise e separação das substâncias no cromatógrafo de contracorrente.....	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	Rendimento	64
5.3	Prospecção Fitoquímica em Cromatografia em Camada Delgada	69
5.4	Ensaio de Atividade Antioxidante	71
5.4.1	Atividade Antioxidante Qualitativa frente ao radical livre DPPH	71
5.4.2	Atividade Antioxidante Quantitativa frente ao radical livre DPPH e ABTS.....	72
5.4.3	Determinação de Fenóis Totais	73
	5.5 Fracionamento dos Constituintes Químicos por Cromatografia em Contra Corrente de Alta Performance - HPCCC (High Performance Counter Current Chromatography).....	73
5.5.1	Purificação das frações e elucidação estrutural das substâncias isoladas	74
	CONCLUSÃO	135
	REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

As atividades da fitoquímica podem contribuir significativamente para a investigação da flora, divulgação e geração de novos conhecimentos e formação de recursos humanos qualificados. A química de produtos naturais (QPN) de vegetais – fitoquímica, se dedica principalmente à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos (TORSSELL, 1997).

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros, essenciais a todos os seres vivos, são os metabólitos primários ou macromoléculas. Nesse grupo estão incluídos os lipídeos, proteínas e glicídios com funções vitais bem definidas. Os produtos do metabolismo primário, por meio de rotas biossintéticas diversas e frequentemente desconhecidas, originam o segundo grupo de compostos químicos - os metabólitos secundários ou micromoléculas (SIMÕES et al., 2017).

Os metabólitos secundários apresentam estrutura complexa, baixa massa molecular, atividades biológicas marcantes e, diferentemente daqueles do metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas (SIMÕES et al., 2017).

O poder curativo dos vegetais é conhecido desde a antiguidade e as plantas vem sendo constantemente utilizadas pela indústria farmacêutica para a produção de medicamentos e pela população brasileira para o tratamento e/ou prevenção de diversas doenças (BRASIL, 2016).

O interesse em estudar as propriedades medicinais de plantas tornou-se constante e crescente a partir da década de 90 e o século XX foi marcado pelo avanço nas pesquisas envolvendo recursos naturais, como as plantas, o que por sua vez forneceu subsídios para a descoberta de inúmeras substâncias de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

1.1 Brasil e Região Amazônica

O Brasil lidera a lista dos países mais ricos em biodiversidade do mundo, o que implica em várias fontes de substâncias para formulações terapêuticas. Dentre as 500 mil espécies vegetais que existem no mundo, o Brasil contempla cerca de 55 mil

espécies e apenas 25% dos medicamentos fitoterápicos registrados é oriundo de espécies vegetais presentes na América do Sul. O país é provido de uma ampla e diversificada flora, mas estima-se que menos de 15% das espécies tenham sido estudadas para fins de utilização na medicina (FONSECA, 2012; CONSERVATION INTERNATIONAL, 2010).

A exploração e o processamento industrial de madeira estão entre as principais atividades econômicas da Amazônia, ao lado da mineração e da agropecuária. Esse fato está ligado principalmente à oferta abundante de madeira de diversas espécies (SOARES et al., 2014).

O estado do Amazonas ocupa a 5ª posição na produção de madeira nativa tropical em tora, mesmo assim é maior em área de floresta do Brasil (KOURY et al. 2014). O município de Itacoatiara, situado no Médio Amazonas, é um dos principais produtores de madeira comercial, mostrando-se com um enorme potencial de crescimento. As principais espécies encontradas no mercado, são: Cedrinho, Louro, Piquia, Sucupira, Marupa, Angelim, Muraicatiara, Marupá, Cumaru, Itaúba e Ipê (KOURY et al., 2013).

Os produtos naturais fornecem uma enorme gama de diversidade estrutural e atividades biológicas e farmacológicas em função dos processos coevolutivos (SIMÕES et al., 2017). Os metabólitos secundários encontrados na madeira agregam valor à mesma e têm-se buscado aplicações para os rejeitos da indústria madeireira. No entanto, há a necessidade do conhecimento do perfil químico da madeira (GRANATO et al., 2005).

1.2 Família Leguminosae

A família Leguminosae, também denominada Fabaceae, pertence à ordem Fabales, classe Magnoliopsida e divisão Magnoliophyta (ROSKOY et al., 2006). É composta por aproximadamente 19.327 espécies distribuídas em 727 gêneros (LEWIS et al., 2005; FRANÇA, 2014). Formada por árvores, arbustos, lianas e ervas e tem distribuição cosmopolita (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). No Brasil é a família com o maior número de espécies, compreendendo cerca de 2.827 espécies distribuídas em 222 gêneros, sendo que 1.524 espécies e 16 gêneros são endêmicos (BFG, 2015).

É uma das maiores e mais importantes famílias botânicas, devido ao grande número de espécies vegetais utilizadas como fonte de produtos alimentares, medicinais, ornamentais, madeireiros e fornecedores de forragem, fibras, corantes, gomas, resinas e óleos (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002; WATSON & DALLWITZ, 2009).

As espécies desta família são ricas em flavonoides e compostos biossinteticamente relacionados, como o rotenoides e isoflavonoides. Alcaloides, terpenoides e esteroides são exemplos de outras classes de substâncias na qual ocorrem em muitos exemplares da família, já os taninos têm frequência muito baixa se comparada aos flavonoides (ROCHA et al., 2007).

A família Leguminosae é dividida em três subfamílias: Papilionoideae também conhecida como Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (SOUZA & LORENZI, 2008). A subfamília Papilionoideae está distribuída desde florestas úmidas até desertos COWAN, 1981 e possui cerca de 440 gêneros, 28 tribos e 12.000 espécies. No Brasil ocorrem 119 gêneros, 1.182 espécies, 14 subespécies e 174 variedades (LIMA et al., 2011).

Estudos pioneiros entre os anos de 1922 a 1949 sobre as Leguminosae ocorrentes na Amazônia, são considerados os mais completos já elaborados sobre a família no âmbito regional (SILVA et al., 2013).

O potencial econômico de Leguminosae é enorme, são oleogênicas e resiníferas. Os frutos e sementes são utilizados como alimento, produção de corantes, óleos, perfumes, inseticidas e ainda apresenta uso medicinal, agrônômico (enriquecimento de solos), ornamental e, principalmente, para produção de madeiras nobres e valiosas usadas no mundo (LIMA et al., 1994).

Os estudos etnofarmacológicos de espécies da família Leguminosae demonstram atividades biológicas como: analgésica, antialérgica, antiinflamatória, antimalárica, cicatrizante, antidiarreica, anti-hipertensivo, citotóxica, antioxidante, antimicrobiana, anti-helmíntica, hipoglicemiante, diurética, laxativa, expectorante e hepatoprotetor (VIEGAS JUNIOR & BOLZANI, 2006).

Atividade antioxidante foi demonstrada nos extratos metanólico com a Cl_{50} 64,79 $\mu\text{g/mL}$ e no extrato aquoso com Cl_{50} de 56,60 $\mu\text{g/mL}$ das folhas de *Myroxylon peruiferum* (SILVA-JÚNIOR et al., 2015). Recentemente, Pereira e colaboradores (2019) extraíram o óleo essencial de folhas de *M. peruiferum* e isolaram o composto 7-hidróxi-4', 6-dimetóxi-isoflavona a partir do caule da mesma planta.

1.3 Gênero e Espécie

O gênero *Diploptropis* pertencente à subfamília Papilionoideae, distribui-se em zonas tropicais e apresenta-se em 39 espécies descritas no Tropicos (TROPICOS, 2015). Espécies de *Diploptropis* apresentam alcaloides como: 11-epileontidana, camoensidina, leontidana, tetrahidrorombifolina e 11,12-dihidrosparteina (KINGHORN; BALANDRIN; LIN, 1982), derivado fenólico como: 2-hidroxi-4-metoxi-6-propil-benzoato de etila (ALMEIDA et al. 2003b), flavonoides como: diploflavona, 3,6-dimetoxi-6",6"-dimetilcromeno-(7,8,2",3")-flavona (R-CH₃) (ALMEIDA et al., 2005b), (2-3-*trans*)-3,4,5,8-tetrametoxi-(6,7,2",3")-furanoflavona (R= OMe) (LIMA et al., 2005) e um triterpeno descrito como Lupeol (ALMEIDA et al., 2003b).

Segundo a base de consulta Fabaceae in Flora do Brasil 2020 (2019): a espécie *Diploptropis racemosa* (Hoehne) Amshoff, possui como sinônimos relevantes: basiônimo *Bowdichia racemosa* Hoehne e é sinônimo homotípico de *Staminodianthus racemosus* (Hoehne).

O sinônimo homotípico *Staminodianthus* foi circunscrito por Cardoso e colaboradores (2013) para compreender três espécies lenhosas. O gênero possui distribuição exclusiva na bacia amazônica do norte do Brasil, Colômbia, Guiana, Peru e Venezuela, conforme observado na **Figura 1**.

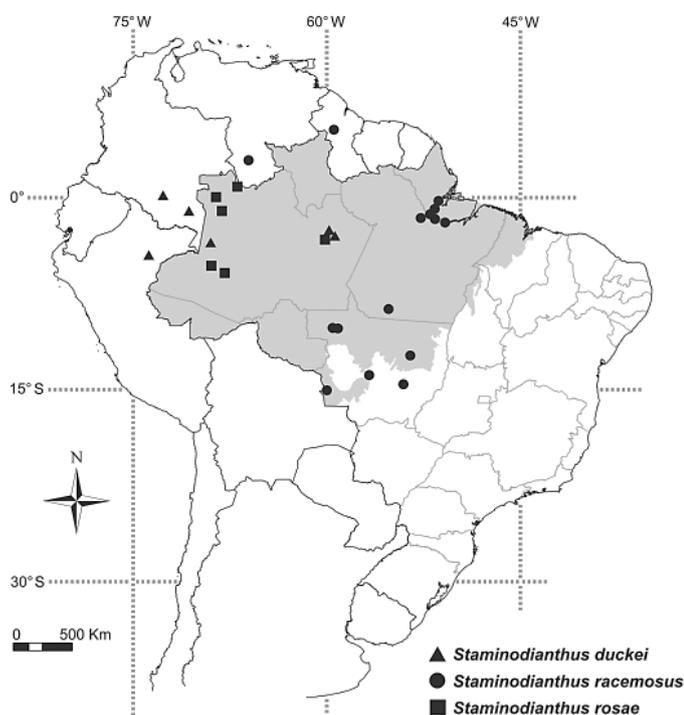


Figura 1. Mapa de distribuição das espécies de *Staminodianthus*. Fonte: CARDOSO et al., 2013.

Staminodianthus racemosus é uma árvore de tamanho médio a grande (6 a 40 m de altura). É morfológicamente muito semelhante a *S. rosae* com base no número e tamanho dos folhetos e nos racemos axilares. *Staminodianthus rosae* foi anteriormente descrito como uma variedade de *Diplotropis racemosa* por Lima (1981), que apontou diferenças na morfologia dos frutos, por exemplo. Porém, na análise filogenética realizada por Cardoso et al. (2012) elas não foram recuperadas como espécies irmãs, indicando uma diferença genética adicional.

A predominância desta espécie é nas savanas amazônicas do norte da América do Sul. No Brasil, a espécie foi encontrada em vegetação de savana (campinas e remanescentes de Cerrado), bem como em terra firme da Amazônia (floresta não inundada) em solo arenoso, do extremo norte da bacia amazônica (Amapá) a os limites da região Central (áreas do sul dos estados do Pará e Mato Grosso) (CARDOSO et al., 2013).

Essa espécie é muito utilizada em programas de recuperação de áreas degradadas de preservação permanente, e sua madeira, por ser de alta densidade possui longa durabilidade natural, é empregada na construção civil e na fabricação de móveis (LORENZI, 2002; MOURA et al., 2014).

1.4 Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Os radicais livres são moléculas altamente reativas que podem interferir em reações normais do organismo, causando alterações. Sua reatividade deve-se à instabilidade da molécula, por possuir elétrons desemparelhados. A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons no metabolismo celular (fatores endógenos) e pela exposição a fatores exógenos (LIOCHEV, 2013; DIAS et al., 2010; CHORILLI, et al., 2007; MACHADO et al., 2008).

Os radicais livres têm papel no sistema imunológico pois apresentam ação bactericida, fungicida, virótica, agindo como uma espetacular barreira de defesa do organismo frente à presença de microrganismos (RAHMAN, 2007).

No entanto, seu excesso acarreta efeitos prejudiciais, tais como a lipoperoxidação de membranas e oxidação de proteínas (SILVA et al., 2011). Alguns exemplos de radicais livres são: radical hidroxila (-OH), ânion superóxido (O_2^-), radical peroxil (ROO), radical alcóxil (- RO) e óxido nítrico (- NO). Entre esses radicais livres,

o $\cdot\text{OH}$ e $\text{O}_2\cdot$ são os que têm maior importância biológica, pois são formados durante o processo normal ou exacerbados da redução de oxigênio molecular (O_2) no interior das mitocôndrias. Embora o O_2 não seja um radical livre, pode favorecer a formação de espécies radicalares (ISSA et al., 2006; FUSCO et al., 2007; JOMOVA & VALKO, 2011).

1.5 Antioxidante e Defesa antioxidante

O termo antioxidante tem natureza multiconceitual e pode ser definido como uma família heterogênea de moléculas naturais, presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas que supostamente protegeriam o organismo, podendo prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo (HALLIWEL, 2012; TIEPPO, 2007).

Dentre os antioxidantes presentes na natureza os compostos fenólicos são os mais encontrados e que apresentam maior ação antioxidante, sendo muito utilizados em indústrias alimentícias a fim de prevenir oxidações lipídicas, contribuindo para a qualidade nutricional do alimento e, de promover benefícios à saúde humana reduzindo os danos provocados por espécies reativas (PRADO, 2009).

Os fenólicos tais como os flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), ácidos fenólicos (ácidos benzoicos, cinâmico e seus derivados), fenóis simples, cumarinas, ligninas e tocoferóis (ANGELO & JORGE, 2007) são responsáveis pela desativação de radicais livres como os superperóxidos ($\text{O}_2\cdot$), as hidroxilas ($\text{OH}\cdot$), os hidroperóxidos ($\text{HO}_2\cdot$), os óxidos nítricos ($\text{NO}\cdot$), os dióxidos de nitrogênio ($\text{NO}_2\cdot$) (BISCARO, 2009), radicais derivados de tióis ($\text{RS}\cdot$), espécies reativas de cloro, de carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr (HUBER et al., 2012), sendo as hidroxilas as mais reativas em lesionar moléculas celulares e os peróxidos responsáveis por danificar o DNA celular (BISCARO, 2009).

Os antioxidantes secundários retardam a etapa de iniciação da autooxidação, por meio de mecanismos diferentes, como complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete, dando origem as espécies não radicais (ANGELO & JORGE, 2007).

Desse modo, o mecanismo de ação dos compostos fenólicos permite a redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, contribuindo com a conservação e qualidade do alimento, além de promover a redução do risco de desenvolvimento de patologias, como hipertensão, arteriosclerose e câncer (ANGELO & JORGE, 2007).

A ação antioxidante dos compostos fenólicos depende de fatores como absorção e metabolismo os quais são determinados pela estrutura química (BALASUNDRAM et al., 2006; MELO et al., 2011), a conjugação com outros compostos fenólicos, o grau de glicosilação/acilação, tamanho molecular, solubilidade (BALASUNDRAM et al., 2006) e concentração deles no alimento (MELO et al., 2011).

Os fenólicos apresentam em sua estrutura química pelo menos um anel aromático, unido a uma ou mais hidroxilas (SOUSA et al., 2011), sendo o número e a posição dessas hidroxilas na cadeia determinantes para o modo de complexar os radicais livres e a intensidade da ação antioxidante (MELO et al., 2011; SOUSA et al., 2011).

Os flavonoides atuam eliminando espécies reativas oxidantes, como ânion superóxido, hidroxilas e radicais peroxil (HASSIMOTTO et al., 2005) e sequestrando quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos (HUBER & RODRIGUEZ-AMAYA, 2008), sendo sua capacidade antioxidante determinada pelas características estruturais e natureza de substituições nos anéis B e C (BALASUNDRAM et al., 2006) o número e a posição dos grupos de hidrogênio e suas conjugações; e a presença de elétrons nos anéis benzênicos (ROCKENBACH et al., 2008).

A substituição de grupos hidroxila no anel B dos flavonoides por grupos metoxil altera o potencial redox, o que modifica a capacidade de capturar os radicais pelos flavonoides. A presença de uma ligação dupla entre C2 e C3, conjugado com o grupo 4-oxo no anel C aumenta a capacidade antioxidante dos flavonoides (BALASUNDRAM et al., 2006). Flavonoides com grupos hidroxila nas posições 3, 4 e 5 do anel B apresentam maior potencial antioxidante do que compostos com apenas um grupo hidroxila (ROCKENBACH et al., 2008).

1.6 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

Os métodos DPPH e ABTS são relativamente simples, rápidos e de baixo custo para se realizarem (PRADO, 2009; TIVERON, 2010). As técnicas se baseiam em

reações de transferência de elétron, em que um composto antioxidante reduz um substrato oxidante por meio da transferência de elétrons (PAZINATTO, 2008).

O método DPPH, sugerido em meados da década de 50, a priori era utilizado para descobrir doadores de hidrogênio em produtos naturais e após algumas décadas começou a ser aplicado na determinação do potencial antioxidante em fenólicos na forma individual ou em conjunto (TIVERON, 2010).

O DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil) é um radical nitrogênio orgânico estável de cor violeta intenso com espectro de absorção de UV-Vis máxima em 515 nm em meio metanólico. Esse radical simula as espécies reativas de oxigênio (ROS) e ao receber um elétron do agente antioxidante tem seu elétron emparelhado (**Figura 2**) e sua intensidade de coloração reduzida até amarela (PAZINATTO, 2008), podendo ser medida a atividade antioxidante pelo método de espectrofotometria no comprimento de onda 517 nm, onde a medida que o antioxidante vai inativando os radicais por meio da doação de elétron ocorre a diminuição da intensidade da coloração violeta (TIVERON, 2010), ou seja, a redução da absorbância é proporcional a concentração e a atividade antioxidante da amostra (RIBEIRO, 2011).

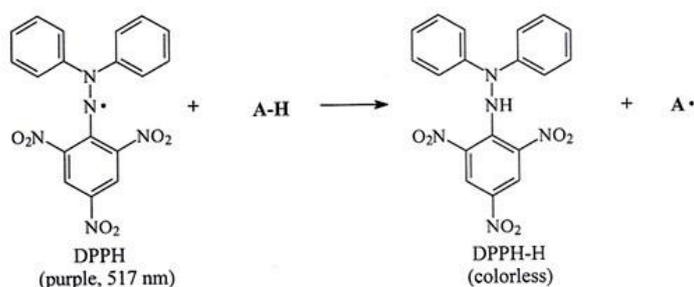


Figura 2. Representação esquemática do DPPH.

Fonte: <http://grupiv.wordpress.com/files/2009/10/dpph.jpg>

O ABTS (**Figura 3**) é um método caracterizado pelo sequestro de radicais cátions $ABTS^{\bullet+}$ por antioxidantes presentes na reação em longo prazo (PEREIRA, 2009), sendo um método indireto com boa estabilidade assim como o DPPH (TIVERON, 2010).

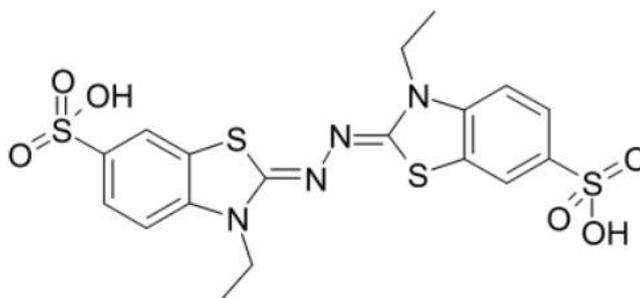


Figura 3. Representação esquemática do ABTS. Fonte: PEREIRA, 2009.

A leitura se dá por meio da absorbância lida em espectro de absorção de UV-Vis máxima em 734 nm, à medida que a captura do radical vai ocorrendo, há um decréscimo da absorbância, visualizada pela redução da intensidade da cor do composto (PEREIRA, 2009).

Apresenta a vantagem, em relação ao DPPH, de ser solúvel tanto em solventes aquosos como em orgânicos, não sendo afetado pela força iônica, assim pode ser aplicado na determinação da capacidade antioxidante de extratos e fluidos corpóreos, hidrofílicos e lipofílicos (RIBEIRO, 2011).

1.7 Cromatografia Contracorrente (CCC)

A cromatografia contracorrente (CCC) é uma técnica de separação por meio da partição da amostra em um sistema líquido-líquido, sem envolver uma fase sólida. A fase estacionária (FE) e a fase móvel (FM) são líquidos imiscíveis, obtidas a partir de uma mistura de solventes previamente equilibrados. A proporção relativa dos solutos da amostra em cada uma das fases está relacionada aos respectivos coeficientes de partição (MARSTON, HOSTETTMANN, 2006).

Em CCC, a eficiência do processo está relacionada à retenção da FE na coluna. A variação no volume relativo de FE na coluna é capaz de modificar a resolução entre compostos com diferentes coeficientes de partição, melhorando a eficiência de uma separação específica (SUTHERLAND, 2007). Dispondo apenas de alguns solventes de uso comum, pode-se ter grande variedade de sistemas de solventes, apenas variando as proporções de cada solvente no sistema (HUANG, 2015).

Princípio Fundamental da CCC

O princípio de separação em CCC é baseado na partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis, uma sendo mantida estacionária no interior da coluna, e outra móvel, no processo cromatográfico dentro da coluna. A FE é mantida no interior da coluna devido ao campo de força gravitacional gerado no equipamento, combinação dos movimentos síncronos de rotação e revolução (ITO, 2005).

A **Figura 4A** ilustra um equipamento que realiza este movimento planetário, conhecido como “tipo J”, em que os eixos de rotação e revolução são paralelos. A estrutura na qual a coluna está enrolada gira em torno do seu próprio eixo e em torno do eixo central do equipamento na mesma velocidade angular e na mesma direção (ITO, 2005). Este movimento mantém a fase menos densa do sistema em uma das extremidades da coluna, chamada de cabeça, enquanto a fase mais densa tende a se movimentar em direção à outra extremidade, chamada de cauda (MINGUILLÓN, 2012; ITO, 1981).

No modo normal, a coluna é preenchida pela fase mais densa (fase inferior) e, então, a FM de menor densidade (fase superior) é bombeada da cauda para a cabeça da coluna. Já no modo reverso, a coluna é preenchida com a fase menos densa e a fase mais densa é bombeada da cabeça para a cauda. Desta forma, com velocidade de rotação e vazão adequadas, é possível reter mais de 50% de FE na coluna, que é o percentual mínimo indicado para separações eficientes (MINGUILLÓN, 2011; ITO, 1981).

Este comportamento proporciona, ainda, um eficiente contato do soluto com as duas fases líquidas. Na **Figura 4B** é possível observar um esquema com várias posições (I, II, III e IV) que a coluna atinge durante o movimento planetário. O interior da coluna é dividido em zonas diferentes, no que se refere a força gravitacional resultante (**Figura 4C**). Próximo ao eixo central de rotação ocorre a mistura das duas fases líquidas, e na região restante tem-se a zona de decantação, em que o campo de força gravitacional é alto (MINGUILLÓN, 2011). Desse modo, o campo de força gravitacional produzido no interior da coluna é alternante e não constante. Estabelece-se um equilíbrio hidrodinâmico entre as fases, sendo que cada uma delas pode ocupar, aproximadamente, metade do volume total da coluna (ITO, 1981).

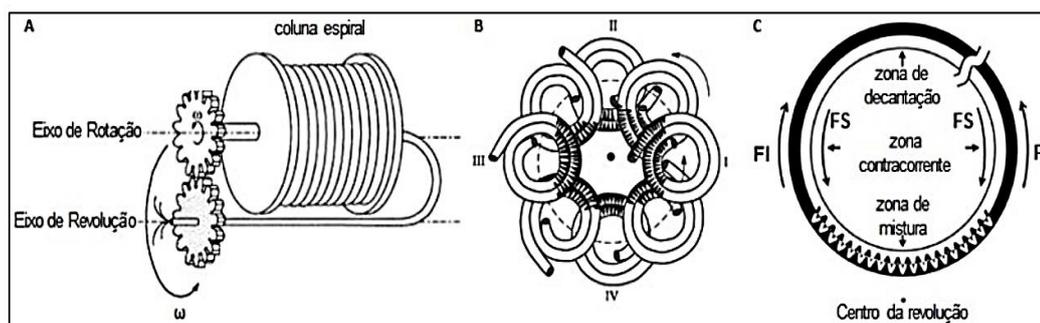


Figura 4. Princípio da técnica de cromatografia contra corrente. **Legenda:** (A) Coluna espiral de equilíbrio hidrodinâmico que realiza movimento planetário síncrono “tipo J”; (B) Distribuição das fases no interior da coluna espiral em diferentes momentos do movimento (I, II, III e IV); (C) Distribuição das fases em volta da coluna espiral. FI: Fase inferior; FS: Fase Superior. Fonte: Adaptado de ITO, 2005; ITO, 2014.

Em CCC, o coeficiente de partição (K) é calculado como a razão entre a concentração de soluto na FE por aquela na FM. A faixa mais indicada de valores de K é de 0,4 a 2,5. Valores baixos indicam afinidade do soluto pela FM, o que pode levar à eluição junto ao front de solvente, enquanto valores elevados estão associados à maior interação com a FE, levando a tempos de corrida mais longos (FRIESEN et al., 2005).

Sistemas de Solventes

A maior parte dos sistemas de solventes utilizados em CCC são misturas ternárias ou quaternárias contendo água e solventes orgânicos, que se separam em duas fases, a superior e a inferior. Sistemas que contém heptano ou hexano, acetato de etila, metanol e água em diferentes proporções são eficazes na separação de substâncias em uma ampla faixa de polaridade, abrangendo compostos lipofílicos até moderadamente polares (FRIESEN, 2007).

Composições pré-definidas desses solventes são propostas e tabeladas, sendo uma delas conhecida como sistema Arizona, com nomenclatura de A a Z para as diferentes proporções. Em geral, esses sistemas se separam em duas fases rapidamente, o que está relacionado a processos com boa retenção de FE (ITO, 2005).

Seleção do sistema de solventes bifásico (SSB)

Em CCC, a etapa crítica é a seleção do sistema de solventes bifásico (SSB), pois a FE e a FM não são independentes, a composição de cada uma das fases está

relacionada ao equilíbrio formado entre ambas. Por esta razão, não é possível escolher a FE separadamente da FM, são escolhidas em uma mesma etapa, avaliando a natureza e a proporção de cada componente da mistura de solventes que formará as duas fases (FRIESEN et al., 2015).

Para selecionar o sistema de solventes por CCD, uma porção de amostra é dissolvida em SSB com mesmo volume de fase inferior e superior. Alíquotas iguais coletadas de ambas as fases são aplicadas em uma placa cromatográfica de sílica e eluídas com a fase menos polar, avaliando-se então os valores de R_f dos componentes a serem separados (FRIESEN et al., 2005).

Modos de Eluição

As aplicações mais convencionais de CCC utilizam um sistema de solventes em modo de eluição isocrático para separação de componentes majoritários de misturas complexas (BERTHOD et al., 2009).

Diversas alternativas têm sido empregadas visando o isolamento de compostos de diferentes polaridades, por exemplo, a eluição em gradiente de polaridade. Alterar a proporção dos solventes da FM durante a corrida de CCC foi uma das primeiras estratégias empregadas para separar componentes com uma ampla faixa de valores de K de uma mistura complexa (IGNATOVA et al., 2011).

O gradiente pode ser linear ou não, sendo este último o mais empregado, no qual em algum ponto da corrida com o sistema de solventes primário é bombeada uma nova FM. Tipicamente, em uma corrida em modo reverso, a nova FM é composta por uma proporção menos polar dos mesmos solventes utilizados no SSB original, para eluir os analitos de menor polaridade (HUANG et al., 2016).

A eluição com a extrusão da FE é voltada para separação de amostras complexas, em que os solutos possuem grandes diferenças de polaridade entre si. O objetivo é acelerar a eluição dos compostos retidos na FE, ou seja, aqueles com maiores valores de K , que levariam mais tempo para serem eluídos na FM (HU & PAN, 2012).

Sistemas de Detecção

Embora seja recomendado o monitoramento contínuo do processo de separação, não é necessário que exista um sistema de detecção acoplado ao equipamento de CCC. Uma vez que o SSB e as condições cromatográficas estejam definidos, as frações coletadas podem ser analisadas posteriormente por CCD. De

modo geral, os equipamentos de CCC são acoplados aos mesmos detectores utilizados em CLAE. A detecção por ultravioleta (UV)-visível de forma contínua é a de maior emprego, sendo que 87% dos cromatogramas apresentados em isolamento de produtos naturais por CCC empregam este detector (FRIESEN et al., 2015).

Versatilidade da CCC

A CCC está estabelecida como uma técnica de separação preparativa e, apesar do seu surgimento na década de 1970, segue em evolução, sendo que uma parcela dos artigos publicados na área é referente ao desenvolvimento de novos instrumentos ou novos métodos de eluição (BUTTENBENDER et al., 2018). Dessa forma, a CCC representa uma ferramenta excelente na obtenção de padrões químicos de origem vegetal, pela simplicidade de operação, eficiência, economia de tempo e de solvente (LEITÃO, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

O estudo do aproveitamento dos resíduos é de grande importância e visa encontrar soluções e novas tecnologias que possam ser implementadas, potencializando a utilização dos resíduos de forma sustentável e viável com um retorno econômico considerável, e minimizando os impactos no meio, o que contribui para a preservação dos recursos florestais (BRAZ et al., 2014).

Um dos maiores gargalos no setor madeireiro é o enorme desperdício, pois boa parte da madeira se torna rejeito e sua destinação final incorreta tem ocasionado vários problemas ambientais (CLEMENT & HIGUCHI, 2006).

Em Itacoatiara, os resíduos são destinados na geração de energia, na agricultura ou simplesmente são acumulados no próprio local de origem (KOURY et al., 2013). Estes resíduos são gerados a partir de diferentes espécies e essa biodiversidade detém inúmeras substâncias biologicamente ativas (GARCIA, 1995).

A natureza nos oferece verdadeiros tesouros em forma de moléculas químicas, de substâncias com potencial terapêutico, onde muitas delas de grande complexidade estrutural, inviabilizaria técnica e economicamente a síntese orgânica de tais substâncias (LOPES et al., 2012).

Estudos realizados na Região Amazônica, apontam a presença de substâncias bioativas em cascas e cernes, tais como flavonoides, terpenoides, esteroides, taninos e alcaloides (BARBOSA et al., 2006).

A importância dos radicais livres no metabolismo celular vem se tornando clara, em função de intensa investigação em vários campos, incluindo estudos da peroxidação lipídica, sistemas de oxi redutase e no papel da superóxido dismutase. O interesse por radicais livres e antioxidantes tem se intensificado ultimamente, pelo possível papel dessas substâncias na patogênese de diversas doenças (WINTERBOURN, 2008).

Os produtos naturais têm desempenhado um papel cada vez mais importante na indústria farmacêutica, de cosméticos, flavorizantes e suplementos alimentares. Devido à preocupação crescente com a saúde e o meio-ambiente, vários produtos à base de produtos naturais (extratos ou substâncias puras) têm sido desenvolvidos para uso medicinal ou como alimentos funcionais, aditivos em cosméticos ou outros produtos de uso pessoal diário ou para o cuidado da casa (ZHANG, 2003).

Portanto, novas formas de utilização para o aproveitamento dos resíduos florestais devem ser inseridas, a fim de acabar com os problemas de desperdício de matéria prima, agregando valor e elevando a demanda de novos produtos, tecnologias e serviços de forma sustentável, assegurando a conservação dos recursos naturais (BRAZ et al., 2014).

O potencial químico desta família, bem como a disponibilidade dos resíduos gerados na indústria madeireira estimularam a investigação dos metabólitos secundários com intuito de contribuir com conhecimento científico e auxiliar na cadeia produtiva desse setor.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os constituintes químicos e determinar a ação antioxidante do extrato e frações da casca de *Diplotropis racemosa* (Leguminosae).

3.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar os grupos químicos do extrato bruto e frações por ensaios cromáticos e cromatografia em camada delgada;
- b) Definir sistemas de fracionamento utilizando a técnica de cromatografia em contracorrente de alta performance;
- c) Avaliar atividade antioxidante frente ao radical DPPH, quantificar o teor de fenóis totais e avaliar a atividade sequestrante do radical ABTS do extrato bruto e frações;
- d) Fracionar e purificar as substâncias da fração mais ativa;
- e) Identificar as substâncias isoladas da fração mais ativa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes, Materiais e Equipamentos Utilizados

a) Reagentes

Álcool etílico anidro P.A. (*Cinética*); n-hexano P.A. (*Vetec*), clorofórmio P.A. (*Vetec*), acetato de etila P.A. (*Dinâmica*), álcool butílico normal P.A. (*Dinâmica*), álcool metílico P.A. (*Synth*), metanol grau HPLC (Merck), sulfato de sódio anidro P.A. (*Vetec*), cloreto férrico P.A. (*Dinâmica*), anidrido acético P.A. (*Vetec*), ácido fórmico (*Synth*), ácido sulfúrico P.A. (*Synth*), ácido clorídrico P.A. (*Synth*), hidróxido de sódio em lentilhas P.A. (*Synth*), nitrato de bismuto P.A. (*Merck*), ácido acético glacial P.A. (*Vetec*), iodeto de Potássio P.A. (*Synth*), vanilina P.A. (*Vetec*), diclorometano P.A. (*Dinâmica*), polietilenoglicol 400 U.S.P. – PEG (*Synth*), 2-aminoetildifenilborinato - NP (*Sigma-Aldrich*), acetonitrila P.A. (*Vetec*), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH (*Sigma-Aldrich*), quercetina (*Sigma-Aldrich*), DMSO deuterado (*Sigma-Aldrich*), Metanol deuterado (*Sigma-Aldrich*).

b) Materiais

Placas cromatográficas de sílica Gel 60 F254 (*Sigma-Aldrich*), fita para medição de pH (*Macherey-Nagel*) e microcapilar aferido (*Sigma-Aldrich*).

c) Equipamentos

Balança analítica (*Marte*), balança analítica (*Shimadzu*), câmara escura BT 107/UV (*Biothec*), em chapa aquecedora (*Corning PC-4200*), manta aquecedora 12000 mL (*Fisaton*), rotaevaporador (*Fisaton*), ultrassom (*Quimis*), capela (*Quimis*), bomba de vácuo – sl 061 (*Solab*), banho maria sl 150 (*Solab*), banho ultratermostato (*Quimis*), moinho de Facas (*Solab*), estufa de circulação forçada de ar (*Nova Ética*) e TLC visualizer (*Camag*). Os equipamentos utilizados para separação e purificação estão descritos a seguir, assim como as técnicas aplicadas para identificação das substâncias químicas.

c.1 HPCCC Spectrum (*Dynamic extractions*): consiste em duas bobinas com duas colunas: analítica (24 mL) e uma coluna preparativa (136 mL). Conectado a um Chiller da marca (*Lab Tec*) modelo Smart H150-1500 mantendo a temperatura da água em 8 °C. e a uma bomba da marca (*Alpha*) onde o fluxo pode variar de 0-10

mL/min para impulsionar a FM e a FE para dentro da coluna. A velocidade de rotação do cromatógrafo foi de 1600 rpm, com temperatura à 20 °C.

c.2 Espectrômetro de massas (EM): As análises dos extratos e frações foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) Central Analítica-UFAM. Foi utilizada o espectrômetro de massas LQC Fleet (*Thermo Scientific*®), com fonte de ionização eletrospray (ESI) e APCI, modo negativo de ionização [M+H]⁻. Os espectros foram obtidos em uma faixa de 100-1000 Da com a voltagem do spray de 4,9 Kv, temperatura do capilar de 280 °C e voltagem do capilar de 26 V. Todas amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol (grau CLAE da marca *Tédia*), em seguida 20 µL foram retirados e em um outro frasco avolumados para 1 mL de metanol. Os espectros obtidos foram processados no programa Xcalibur 2.0.7. e comparados com os dados da literatura. As substâncias isoladas, também foram analisadas nas mesmas condições relatadas.

c.3 Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas (CL-EM): as frações foram solubilizadas em MetOH a 1 mg/mL e injetadas (2 µL) em uma coluna Phenomenex Luna C18 (5 µm, 150 × 4,6 mm d.i.) (Torrance, CA, EUA). As separações foram realizadas por um sistema Accela HPLC (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EUA). A fase móvel consistiu em solução aquosa de ácido fórmico a 1% (A) e metanol (B) a uma vazão de 1 mL min⁻¹. A fase móvel A foi realizada em modo gradiente consistindo de 20% de B a 100% de B ao longo de 20 min, seguido de 10 min no modo isocrático com 100% de B. As absorvâncias foram registadas de 240 a 400 nm. A saída do detector de arranjo de diodos (DAD) foi conectada através de uma válvula dividida (vazão de 0,3 mL. min⁻¹) a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo TSQ Quantum Access (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EUA), equipado com interface de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e funcionamento no modo íon negativo. As configurações de ionização foram as seguintes: tensão de pulverização, 3000 V; pressão do gás de bainha, 35 (arb); pressão de gás de varredura de íon, 0,0 (arb); pressão de gás auxiliar, 15 (arb); temperatura capilar, 270; desvio capilar, -35 V; deslocamento do skimmer, 0 V; faixa de massa, m / z 150 a 950; energia de colisão, 30 eV., software Xcalibur.

c.4 Cromatógrafo líquido de alta eficiência: As frações obtidas no HPCCC foram analisadas em aparelho Shimadzu LC-20AT HPLC, coluna analítica Shim – Pack Prep-ODS Coluna C18 (4,6 mm DI x 250 mm, tamanho da partícula 5 µm) mantida a 28 °C, equipado com controlador de sistema CBM-20A, detector SPD-M20A UV-vis, bomba LC- 6AD, auto injetor SIL 20A, degaseificador DGU-20A5 e estação de trabalho Shimadzu LC-solução. O sistema de eluição foi realizado no modo isocrático em fase reversa, sendo metanol à 20% e água ultra pura acidificada com ácido fórmico com um fluxo de 1,0 mL / min à 10 mL/min e injeção de 10 µL à 200 µL das amostras, sendo no modo analítico e semi-preparativa, respectivamente. O comprimento de onda do detector foi regulado para 254 e 364 nm.

c.5 Ressonância Magnética Nuclear: as frações purificadas foram encaminhadas para identificação das substâncias por RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT 135, COSY, HSQC e HMBC. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB), na central analítica na UFAM, no equipamento *Bruker advance* III HD MhZ MRI, 500 MHz. Para diluição das frações utilizou DMSO deuterado.

4.2 Coleta do vegetal

As cascas de *Diploptropis racemosa* (Hoehne) Amshoff, foram coletadas no ano de 2014 no próprio pátio da empresa Mil Madeireiras Preciosas Ltda., localizada na Rodovia AM-363, km 1,5 – Zona Rural, Itacoatiara – Amazonas– Brasil. O responsável técnico da empresa repassou as seguintes coordenadas geográficas do local exato da coleta da árvore: latitude -2°38'51.71" e longitude -58°26'58.659", não sendo possível acompanhar a equipe de extração, devido ao local ser uma área de mata fechada conforme demonstrado na **Figura 5**.

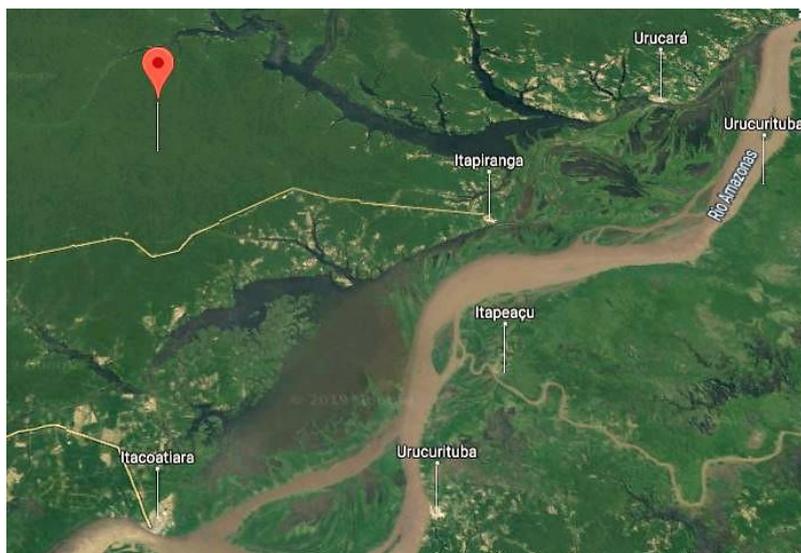


Figura 5. Localização da extração da espécie madeireira *D. racemosa*.

Fonte: <http://www.dpi.inpe.br/calcula/>. 2019.

A identificação da espécie foi realizada pelo pesquisador Jorge Alves de Freitas, anatomista de Madeira do Laboratório de Anatomia e Identificação de Madeiras/Xiloteca do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) com o número de registro 574189.

4.3 Extração e Fracionamento da casca de *D. racemosa*

As cascas foram secas em estufa de ar quente circulante a 40°C por 72 horas (**Figura 6.A**) e trituradas em moinho de facas. Para o processo extrativo, 1 kg de material foi submetido à extração por maceração com etanol 70%, sob refluxo, por três dias consecutivos (**Figura 6.B**). O extrato foi concentrado em evaporador rotativo a 45° C (**Figura 6.C**). Cerca de 1 L de extrato aquoso foi obtido após a remoção do etanol, sendo 300 mL para o extrato seco B-LSP e 700 mL foi utilizado para fracionamento.

Em ordem crescente de polaridade (hexano>clorofórmio>acetato de etila>butanol), realizou a partição líquido-líquido em um funil de separação (**Figura 6.D**), utilizando os seguintes solventes: n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol, sendo três repartições de 200 mL para cada solvente. O resíduo resultante após o término da partição com butanol denominou-se de fração hidroalcoólica. O processo executado está demonstrado na **Figura 7**.

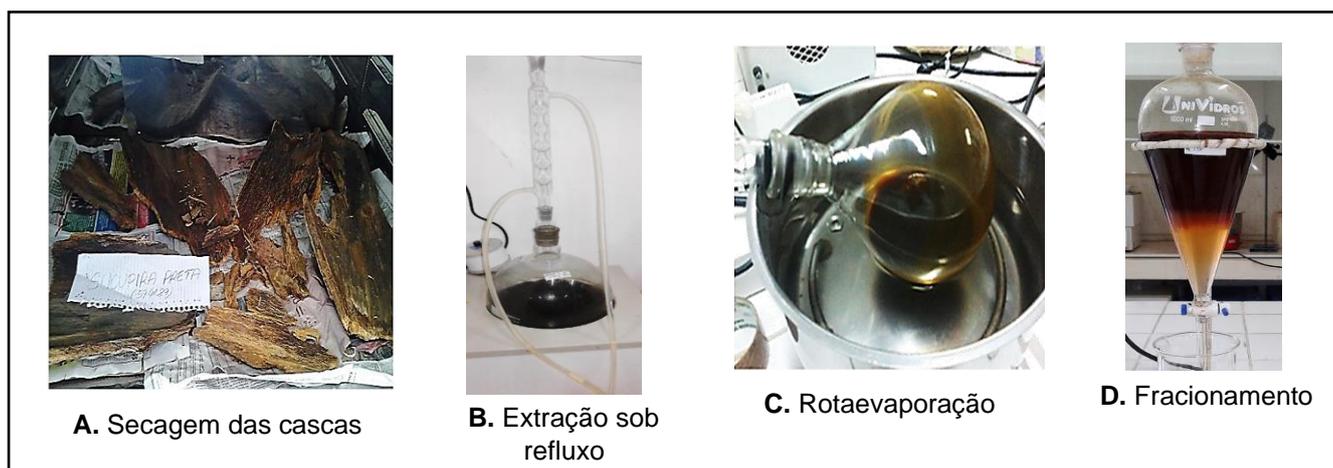


Figura 6. Processo de obtenção de extrato e frações de *D. racemosa*

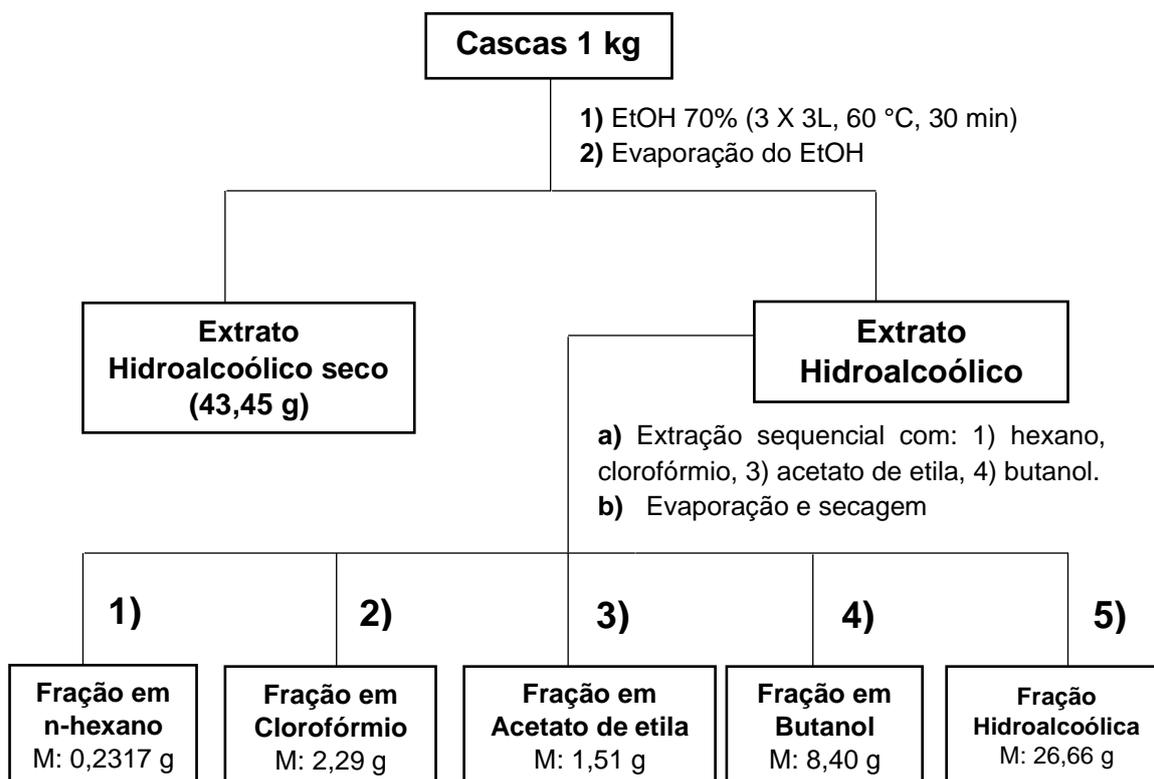


Figura 7. Fluxograma do fracionamento geral do extrato.

4.4 Prospecção Fitoquímica em Tubos

4.4.1 Caracterização de Fenólicos

A prospecção fitoquímica em tubos para análise de compostos fenólicos foi realizada seguindo a metodologia de Matos (2009) com o extrato bruto B-LSP e as frações em acetato de etila, butanólica e hidroalcoólica. Essa análise consiste em 4 etapas:

a) Preparação da solução estoque

Com aproximadamente 300 mg do extrato bruto B-LSP realizou uma extração com clorofórmio (CHCl_3). O resíduo insolúvel em CHCl_3 foi solubilizado em metanol a 70%. A solução hidrometanólica resultante foi filtrada para um balão volumétrico de 100 mL e o seu volume foi completado com este mesmo solvente. O potencial de hidrogênio (pH) desta solução foi ajustado para 4 acrescentando solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L, utilizando fita de pH como medidor.

Todos os ensaios desta análise fitoquímica foram realizados a partir desta solução-estoque e em triplicata, sendo num total de 60 tubos de ensaio. Na preparação das soluções das frações acetato de etila (B-LSP03), butanólica (B-LSP04) e hidroalcolica (B-LSP05) foram pesados 30 mg e realizou o mesmo procedimento descrito acima, no entanto, sem realizar a extração com o CHCl_3 .

b) Teste para fenóis e taninos

Foram adicionados 3 mL da solução estoque ao tubo número 1. A este tubo adicionou três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3). A alteração da cor após a reação foi observada e comparada com o branco negativo de cada amostra.

c) Teste para antocianidinas, antocianinas e flavonoides

Foram adicionados aos tubos enumerados de 2 a 4 cerca de 3 mL da solução estoque. O tubo nº 2, teve a solução ajustada com adição de HCl para o pH 3; os tubos de nº 3 e nº 4 tiveram as soluções ajustadas com adição de hidróxido de sódio 0,1 mol/L até atingir o pH 8 e pH 11, respectivamente. Após alguns minutos, observou se haveria mudança nas colorações das soluções, comparando com o branco de cada amostra.

d) Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Cerca de 3 mL da solução estoque foram adicionados nos tubos nº 5 e nº 6, sendo necessário ajustar o pH do tubo nº 5 para 3 com adição de HCl 0,1 mol/L e a solução do tubo nº 6 ajustada para pH 11 com adição de NaOH 0,1 mol/L. Os tubos foram submetidos a aquecimento no bico de Bunsen por cerca de 2 minutos e, após esse período, a coloração foi observada e comparada com o branco de cada amostra.

4.4.2 Caracterização de Terpenos (Lieberman-Burchard)

Pesou 300 mg de extrato bruto (B-LSP) e 30 mg das frações acetato de etila (B-LSP1), clorofórmica (B-LSP02) e acetato de etila (B-LSP03), posteriormente solubilizadas em CHCl_3 . As soluções em clorofórmio foram filtradas para um tubo de ensaio seco. Acrescentou anidrido acético $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, agitou e adicionou cuidadosamente ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 mol/L. Após uma leve agitação foram observados se houve mudança na coloração das soluções para verde com precipitado e/ou vermelho, cores características dos terpenos, segundo a metodologia de Matos (2009).

4.4.3 Caracterização de Saponinas

Pesou 300 mg de extrato bruto (B-LSP) e 30 mg das frações acetato de etila (B-LSP03), butanólica (B-LSP04) e hidroalcolólica (B-LSP05), sendo dissolvidas com água destilada e posteriormente filtradas. Os tubos foram agitados separadamente por três minutos e foram observados quanto à formação de espuma (MATOS, 2009).

- *Teste Confirmatório para saponinas:* Adicionou HCl 0,1 mol/L ao conteúdo dos tubos preparados no teste anterior e deixou imerso por 1 h em banho-maria. Após a retirada dos tubos, esperou o resfriamento, neutralização com NaOH 0,1 mol/L e agitação por 3 minutos, posteriormente foi observado à ausência e/ou presença de espuma e precipitados. Após a confirmação para saponinas, ocorreu a extração com CHCl_3 para realizar o teste de Lieberman-Buchard (4.4.2), segundo metodologia de Matos, 2009.

4.4.4 Caracterização de Alcalóides

Pesou cerca de 500 mg de extrato bruto (B-LSP) e 300 mg das frações butanólica (B-LSP04) e hidroalcolólica (B-LSP05), em seguida foram realizadas extrações com CHCl_3 e posteriormente filtradas. A porção insolúvel em CHCl_3 foi homogeneizada com água acidificada e filtrada.

As soluções filtradas foram basificadas com hidróxido de amônio (NH_4OH) a 0,1 mol/L até atingir o pH 11. Em seguida, realizou uma extração com CHCl_3 , coletando a fase orgânica e transferindo para outro tubo de ensaio. Novamente acidificou a solução para pH 4 com adição de HCl e em seguida basificou o meio para pH 11 com adição de NH_4OH .

Realizou uma segunda extração com CHCl_3 coletando a fase orgânica e transferindo para o tubo de ensaio contendo a solução da primeira extração. Após o término das extrações acrescentou gotas de HCl, ocasionando a formação de duas fases, sendo retirada a fase aquosa (superior) e transferindo-a para outro tubo de ensaio, posteriormente adicionou gotas do reagente de Dragendorff e foram observados quanto a formação de precipitados insolúveis, segundo metodologia de Simões et al., 2017.

4.5 Prospecção Fitoquímica em Cromatografia de Camada Delgada

A prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada seguindo a metodologia de Guimarães, 2005:

a) Procedimento

Numa balança analítica pesou 5 mg de B-LSP e das frações B-LSP01, B-LSP02, B-LSP03, B-LSP04 e B-LSP05, utilizando metanol para diluição das amostras, sendo a concentração final de 30 mg/mL. Aplicou nas placas o volume de 10 μL das soluções do extrato bruto e frações, com o auxílio de um microcapilar aferido.

As placas de gel de sílica foram cortadas na medida de: 8 (cm) de comprimento x 6,5 (cm) de largura. No processo cromatográfico foi permitido aos eluentes percorrerem a distância de 7 cm. O procedimento é ilustrado na **Figura 8**. Os eluentes e reveladores foram descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Eluentes e reveladores empregados em CCD

Eluentes	Composição	Proporção	Reveladores
A	$\text{EtOAc} - \text{CH}_2\text{O}_2 - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$	100:11:11:26	NP/PEG
B	$\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$	60:32:12:8	Sulfato cérico
BAW	$\text{ButOH} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}$	4:1:5	DPPH.
HAcet	$\text{C}_6\text{H}_{14} - \text{EtOAc}$	7:3	Vanilina

As placas reveladas com NP/PEG foram observadas na Câmara Escura BT 107/UV em 365 nm. A placas foram reveladas em vanilina sulfúrica e sulfato cérico sendo aquecidas em chapa aquecedora e em seguida calculou-se o R_f (fator de retenção).

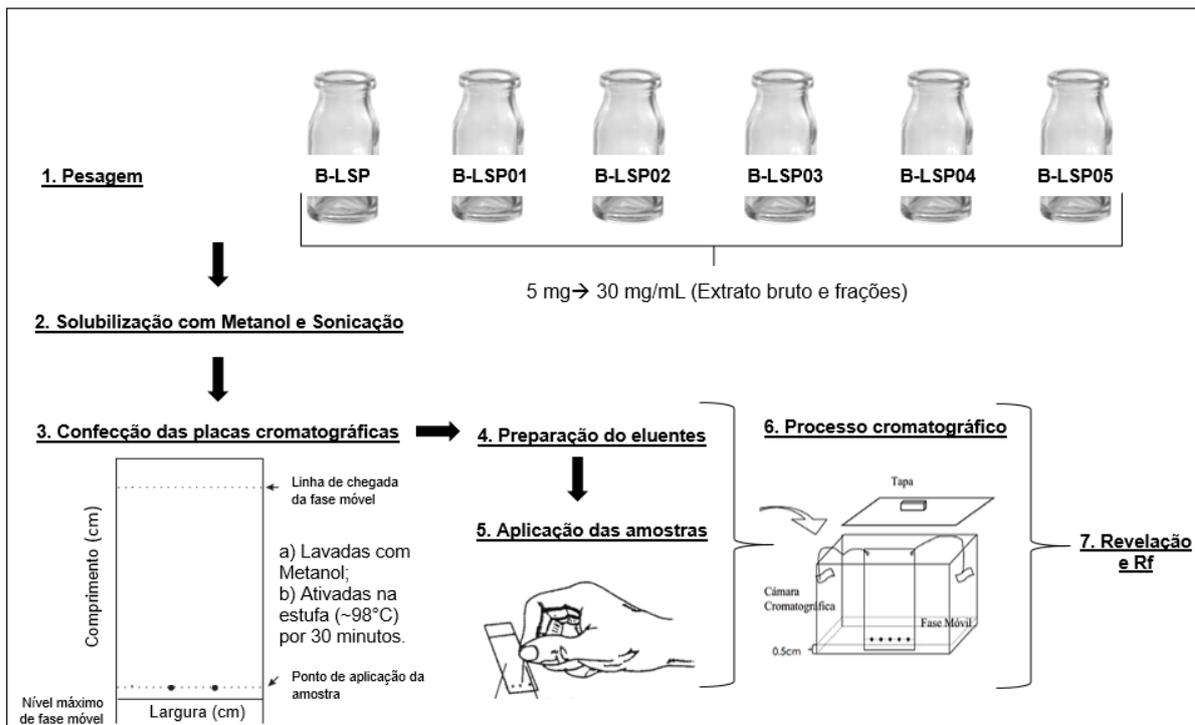


Figura 8. Etapas da preparação do processo cromatográfico

4.6 Preparação de Soluções Reveladoras

Durante o processo cromatográfico utilizou 5 reveladores diferentes, no qual a composição e o modo de preparo estão descritos na **tabela 2**.

Tabela 2. Reagentes de pulverização

REVELADORES	MODO DE PREPARO	DETECÇÃO
NP/PEG	<ul style="list-style-type: none"> Solução 1: dissolveu 1g do éster difenilboriloxietilamina (NP) em de metanol. Solução 2: dissolveu 5 g de polietilenoglicol 4000 (PEG) em 100 mL de etanol. Borrifou primeiramente com a solução 1 e em seguida com a solução 2. 	<i>Flavonoides e outros fenólicos</i> (WAGNER & BLADT, 2001).
Sulfato cérico	<ul style="list-style-type: none"> Dissolveu 2 g de sulfato cérico em 55 mL de ácido sulfúrico concentrado sob um banho de gelo e, em seguida completou com 1000 mL de água destilada. 	<i>Flavonoides</i> (GUIMARÃES, 2005).
Vanilina sulfúrica	<ul style="list-style-type: none"> Solução 1: misturou 5 mL de ácido sulfúrico em 100 mL de etanol. Solução 2: dissolveu 1 g de vanilina em etanol e completou o volume com etanol até 100 mL. 	<i>Terpenos, derivados fenilpropanoides e fenóis</i> (WAGNER & BLADT, 2001).

	<ul style="list-style-type: none"> Borrifou primeiramente com a solução 1, e em seguida com a solução 2. Aqueceu a placa a 100 °C por cinco minutos. 	
Dragendorff	<ul style="list-style-type: none"> Solução estoque: 25 mL de ácido acético, 2,6 g de carbonato básico de bismuto e 7,0 g de iodeto de sódio foram misturados e aquecidos por alguns minutos. O precipitado de acetato de sódio formado foi filtrado após 12 horas, 20 mL desta solução foram misturados a 80 mL de acetato de etila e 0,5 mL de água destilada. A solução foi conservada em frasco escuro. Solução reagente: misturou 10 mL da solução estoque, 100 mL de ácido acético e 240 mL de acetato de etila. Borrifou a placa e observou à luz natural. 	<p><i>Alcaloides</i> (WAGNER & BLADT, 2001).</p>
Solução de DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila) a 0,2%	<ul style="list-style-type: none"> Dissolveu 2,4 mg de DPPH em álcool metílico e completou o volume para 100 mL em um balão volumétrico com álcool metílico, homogeneizou e transferiu para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. 	<p><i>Teste de capacidade antioxidante</i> (EMBRAPA, 2007).</p>

4.7 Ensaio de Atividade Antioxidante

4.7.1 Ensaio Qualitativo por CCD

O processamento das amostras foi descrito na seção 4.5 item (a), página 41. O eluente empregado foi BAW (Butanol - Ácido acético glacial - água) (4:1:5) e a placa foi revelada com DPPH 0,2% em metanol e em seguida deixou à temperatura ambiente durante 30 minutos. A atividade antioxidante (AA) é positiva quando manchas amarelas são formadas a partir de branqueamento da cor púrpura do reagente DPPH (TEPE et al., 2005).

4.7.2 Ensaio Quantitativo

A atividade sequestrante do radical lipossolúvel DPPH foi realizada segundo metodologia utilizada por Burits e Bucar (2000) com modificações para possibilitar que o teste fosse realizado em microplacas de 96 poços. Preparou uma solução de 0,05 µg/mL de DPPH em etanol, 30 µL do extrato, padrão (ácido gálico) e o controle

(DMSO) na concentração de 1 mg/mL. Com as amostras na microplaca adicionou a solução de DPPH. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro e a leitura foi realizada em 492 nm no leitor de microplaca.

Os cálculos de porcentual de inibição (%) foram realizados baseando na absorbância do controle e utilizando o programa Excel. Quando o porcentual de inibição foi maior a 50%, foram realizadas até 8 diluições consecutivas para obtenção dos valores de CI_{50} , calculados pelo programa GraphPad Prism, versão 6.0.

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Absorbância amostra} / \text{Absorbância controle}] \times 100.$$

4.7.3 Determinação de Fenóis Totais

A concentração de fenóis totais foi quantificada pelo método descrito por Kim et al. (2013). Inicialmente, 10 μ L dos extratos numa concentração de 1 mg/ml foram colocados em cada poço mais 50 μ L de Folin-Ciocalteu 10% e incubados no escuro por 8 minutos a temperatura ambiente. Logo após esse tempo foi adicionado uma solução saturada de carbonato de sódio 0,4% e incubado novamente por 3 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura na absorbância em 620 nm no leitor de microplaca, o teor fenólico das amostras foi expresso em porcentual comparados com padrão ácido gálico e também como μ g equivalente a ácido gálico (μ gEqAG) quando comparado à diluição consecutiva do padrão.

$$\text{Fenóis totais (\%)} = (\text{Absorbância amostra} / \text{Absorbância padrão}) \times 100$$

4.7.4 Atividade Sequestrante do Radical ABTS

A atividade antirradical foi avaliada conforme a metodologia descrita por Shanty (2017). Inicialmente, foi preparada a solução de ABTS* 0,7 mM em 5 mL de água deionizada e 5 mL de persulfato de potássio 2,4 mM. Em seguida, incubou a mistura reacional em temperatura ambiente na ausência de luz por 12 horas para obtenção de uma solução oxidada de tonalidade azul esverdeada. Antes de plaquear, o ABTS* oxidado foi diluído (1:5) com água deionizada, após o plaqueamento incubou por 15 minutos na ausência de luz à temperatura ambiente e realizou a leitura no leitor de microplaca em 620 nm. Os resultados foram expressos em porcentual de inibição e a CI_{50} foi calculado através do programa GraphPad Prism 6.0. O padrão utilizado foi o ácido gálico.

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Absorbância amostra} / \text{Absorbância controle}] \times 100.$$

Todas as análises descritas a partir do tópico 5.7.2 foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM em Manaus sob supervisão do professor Emerson Silva Lima.

4.8 Fracionamento e isolamento dos constituintes químicos

4.8.1 Fracionamento por cromatografia em contra corrente de alta performance (HPCCC) - High Performance Counter Current Chromatography

O processo de separação e purificação iniciou após as análises por CCD, que direcionou para a escolha dos sistemas a serem empregados no cromatógrafo de contracorrente.

O equipamento de cromatografia em contracorrente de alta performance, modelo HPCCC Spectrum da Marca Dinâmica Extraction (**Figura 9**) consiste em duas bobinas com duas colunas: uma analítica de capacidade de 24 mL e uma coluna preparativa de 136 mL de volume. O HPCCC foi conectado a um Chiller da marca Lab Tec modelo Smart H150-1500 mantendo a temperatura da água em 8 °C. e a uma bomba da marca Alpha onde o fluxo pode variar de 0-10 mL/min para impulsionar a fase móvel e a fase estacionária para dentro da coluna.

O fluxo da bomba variou entre 1 mL/min. – 10 mL/min, para bombear as fases móvel e estacionária, de acordo com as características das colunas, e o tipo de análise (analítica ou preparativa). A velocidade de rotação do cromatógrafo foi de 1600 rpm, com temperatura à 20 °C.



Figura 9. Modelo HPCCC Spectrum

Durante as injeções no HPCCC foram avaliados alguns parâmetros considerados essenciais para o desenvolvimento do método de isolamento, afim de otimizar o processo de obtenção das frações purificadas ou enriquecidas, podendo assim avaliar os pontos negativos e positivos da utilização da técnica.

4.8.2 Preparo da amostra e definição dos sistemas por CCD

A definição dos sistemas de fracionamento do extrato bruto e das frações de *Diploptropis racemosa* foi realizada por meio de análises por cromatografia em camada delgada (CCD). O sistema HEMWAT foi utilizado como referência, segundo Garrard (2005), com variações. Segundo a literatura, os sistemas representam misturas de solventes e são numerados de 1 a 28. Os sistemas testados para *D. racemosa* foram do número 17, 12, 7, 5, 4, 4.1, 4.2 e 3, de acordo com o comportamento cromatográfico em CCD do extrato e frações. A **Tabela 3** demonstra os sistemas utilizados.

Tabela 3. Sistemas de CCC aplicados em CCD

Sistemas Nº.		Hexano	Acetato de etila	Metanol	Butanol	Água
3	Mais polar	0	2	0	3	5
4.2	↑	0	2,25	0	2,75	5
4.1		0	2,50	0	2,50	5
4		0	3	0	2	5
5		0	4	0	1	5
7		1	19	1	0	19
12		1	3	1	0	3
17		1	1	1	0	1

Fonte: Garrard (2005) com adaptações.

Para cada sistema de solvente a ser analisado, foram pesados 5 mg do extrato bruto B-LSP e 1 mg das frações B-LSP03, B-LSP04 e B-LSP05. Em cada frasco, foram adicionados 1 mL da mistura de solvente a ser analisada. Em seguida, o frasco foi tampado com rolha de silicone e agitado para a amostra entrar em contato com o sistema. Posteriormente as frações foram deixadas em repouso para a mistura entrar em equilíbrio. Quando a mistura apresentou duas fases, a fase superior (FS) foi retirada do frasco com o auxílio de uma pipeta automática e transferida para outro frasco identificado. A fase inferior recebeu a codificação (FI). A **Figura 10** demonstra a análise do extrato bruto e das frações com o sistema de número 17 e 3, seguindo a ordem crescente de polaridade. Pode-se observar que houve mudança da distribuição das substâncias, presentes nas frações BLSP03 e BLSP04 da fase inferior (água saturada com Hexano, acetato e metanol) para a fase superior, quando aumento a polaridade da fase superior (acetato, butanol saturada com água).

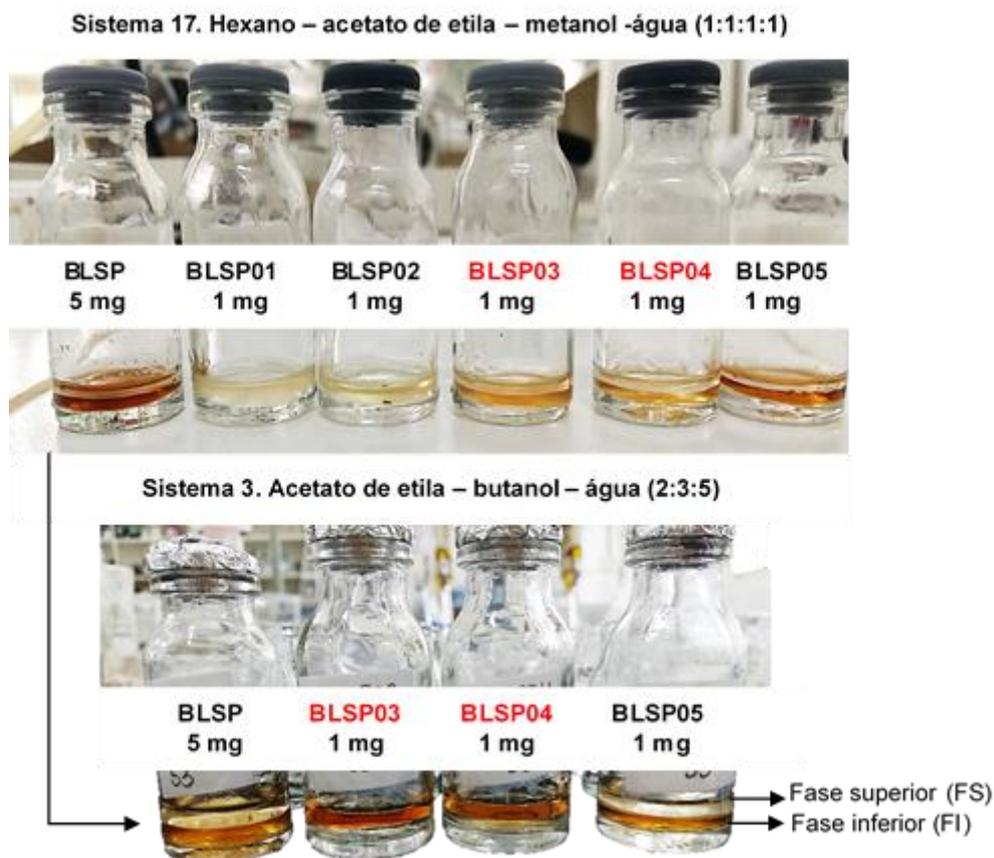


Figura 10. Aplicação dos sistemas de partição 17 e 3. Legenda: B-LSP → Extrato bruto, B-LSP01 → Fração hexânica, B-LSP02 → Fração clorofórmica, B-LSP03 → Fração acetato de etila, B-LSP04 → Fração butanólica e B-LSP05 → Fração hidroalcoólica. Fonte: ALVES, T.S. (2018).

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando cromatofolhas de alumínio com gel de sílica de 6,5 cm de altura. As soluções das amostras foram aplicadas por meio de microcapilares graduados em *spot* com 5 μ L de cada solução (FI e FS de cada extrato), com espaçamento de 0,5 cm entre cada amostra. As aplicações ocorreram a distância de 1 cm de altura em relação a base inferior da placa. Após a aplicação das amostras, a placa foi adicionada dentro da cuba cromatográfica contendo o eluente a ser testado. Em seguida, deixou-se a fase móvel percorrer a distância de 5 cm.

As análises cromatográficas em CCD das partições obedeceram a ordem crescente de polaridade dos sistemas empregados. A **tabela 4** demonstra os sistemas de solventes de partição, eluentes empregados em cada CCD e revelador aplicado.

Para o sistema hexano – acetato de etila – metanol – água (17 ao 7, sistemas menos polares, tabela 3) foram alteradas as concentrações de acetato de etila e água,

aumentando a polaridade. Já o sistema acetato de etila – butanol – água (5 ao 3, sistemas mais polares, tabela 3) foram variadas as proporções dos solventes acetato de etila e butanol. Todos os sistemas foram utilizados para cada extrato e frações. As FI e FS resultantes de cada processo de partição foram analisados por CCD para verificar a distribuição das substâncias nas fases superior e inferior e seus comportamentos cromatográficos.

Os eluentes BAW, acetato de etila-metanol-água, clorofórmio-ácido acético-metanol-água e acetato de etila-ácido fórmico-ácido acético-água, foram selecionados para avaliação do comportamento cromatográfico das FS e FI de cada extrato por CCD em gel de sílica. Para a avaliação de substâncias fenólicas foi utilizada solução de NP/PEG como revelador. Também foi empregado o revelador DPPH para observar a capacidade antioxidante dessa classe química. Esses processos nortearam a escolha dos sistemas a serem empregados no cromatógrafo de contracorrente para separação e purificação.

Tabela 4. Sistemas de partição avaliados em CCD

Sistemas de solventes	Hexano - EtOAc – CH ₃ OH – H ₂ O	EtOAc – ButOH – H ₂ O
	1:1:1:1 > 1:3:1:3 > 1:19:1:19	4:1:5 > 3:2:5 > 2,5:2,5:5 > 2,25:2,75:5 > 2:3:5
Eluentes	BAW	4:1:5
	EtOAc – CH ₃ OH – H ₂ O	77:13:10
	CHCl ₃ – CH ₃ COOH – CH ₃ OH – H ₂ O	60:32:12:8
	EtOAc – CH ₂ O ₂ – CH ₃ COOH – H ₂ O	100:11:11:26
Reveladores	NP/PEG e DPPH	

Legenda: o sinal > indica o aumento da polaridade à medida que se altera as proporções dos solventes em cada sistema testado.

A fração butanólica (B-LSP04) foi escolhida para iniciar os ensaios em escala analítica e em preparativa no HPLC. A escolha foi baseada, segundo o potencial antioxidante apresentado, o rendimento obtido, a quantidade e qualidade das fluorescências indicativas para fenólicos, após a revelação das cromatofolhas.

4.8.3 Análise e separação das substâncias no cromatógrafo de contracorrente

Para obtenção das frações purificadas e ou enriquecidas foram preparadas misturas em proporções crescentes de polaridade do sistema denominados EBWAT. Este sistema é composto por uma mistura de acetato de etila - butanol – água, em proporções diferentes.

Foram realizadas 3 (três) injeções de 20 mg de B-LSP04 no modo analítico, fase reversa e normal utilizando sistema de gradiente. Para cada processo cromatográfico realizado, foram produzidos cromatogramas em CCD. Em média, coletaram-se 28 frações por análise. Todas as frações foram analisadas observando os perfis por CCD e pelos espectros de massas obtidos por CL-EM (full-scan: modos positivo e negativo). Estas técnicas cromatográficas orientaram as uniões das frações, que resultaram em 16 frações. Após a secagem das frações, os rendimentos foram calculados e estão descritos na **Tabela 5**. A **Figura 11** representa o cromatograma das injeções em modo analítico.

Tabela 5. Rendimento de B-LSP04

Frações	Rendimento (mg)
2	0,4
3	0,6
4	0,5
5	0,4
6	0,6
8	0,3
9	0,3
10	0,7
11	0,2
13	0,6
16	0,4
21	0,3
22	0,3
23	2
26	1,3
27	0,9

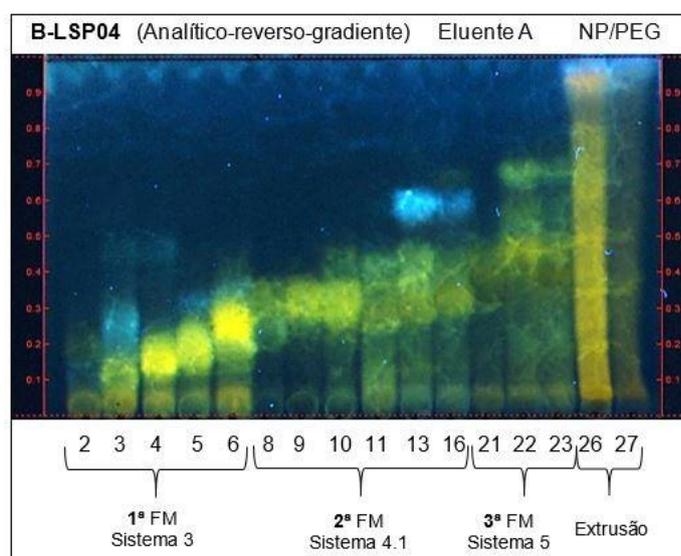


Figura 11. Cromatofolha das frações no modo analítico da B-LSP04

Após a definição do melhor sistema em modo analítico, a fração B-LSP04 foi injetada em modo preparativo. Foram realizadas 10 injeções da amostra naquele modo. Sete injeções foram realizadas a partir da preparação de 500 mg de amostra. Três injeções foram feitas, partindo da preparação de 1 g da fração. Essas injeções tiveram como objetivo verificar a resolutividade da coluna para a amostra analisada. Para essas análises cromatográficas em HPCCC foi utilizado looping com capacidade de 6 mL, em fase reversa e sistema gradiente.

O sistema de gradiente foi realizado na seguinte sequência: Preenchimento da coluna com a fase estacionária constituída da fase superior do sistema 3. Bombeamento de: a) Primeira fase móvel (fase inferior do sistema 3); b) Segunda fase móvel (fase inferior do sistema 4.1); c) terceira fase móvel (fase inferior do sistema 5)

e extrusão da fase estacionária (fase estacionária). A **Tabela 6** resume a ordem de eluição e o volume utilizado para cada fase. O fluxo de bombeamento das fases móveis foi de 6 mL/min. O processo de extrusão da fase estacionária da coluna foi realizado sem rotação e fluxo de 10 mL/ min.

Tabela 6. Ordem de eluição e volume utilizado cromatografia preparativa de B-LSP04

Ordem de eluição	Fases	Composição e volume de cada solvente (mL)			Volume total (mL)
		EtOAc	ButOH	H ₂ O	
Fase estacionária	FS do sistema 3	67,49	103,22	34,29	205
1ª Fase móvel	FI do sistema 3	7,47	10,89	156,64	175
2ª Fase móvel	FI do sistema 4.1	7,16	8,53	134,32	150
3ª Fase móvel	FI do sistema 5	10,37	4,11	135,53	150

Legenda: FS: fase superior, FI: fase inferior, EtOAc: acetato de etila, ButOH: butanol e H₂O: água destilada.

As amostras eluídas da coluna foram coletadas em tubo de ensaio de 20 mL considerando o fluxo de 6 mL por tubo. Já as amostras coletadas durante a extrusão da fase estacionária da coluna foram de 18 mL por tubo, gerando uma média de 30 frações coletadas em cada injeção.

Os perfis químicos das frações eluídas do HPCCC foram acompanhados por CCD e por LC-MS (full-scan, modo negativo). Em seguida, as frações foram reunidas baseando-se nas CCD's e pelos espectros de massas (m/z) de cada fração. Desta forma, foi possível racionalizar as uniões das frações, a fim de se obter amostras enriquecidas para serem novamente injetadas no HPCCC. A **Figura 12a** demonstra o cromatograma de uma das injeções no modo preparativo a partir de 500 mg e na **Figura 12b** a partir de 1 g da amostra B-LSP04.

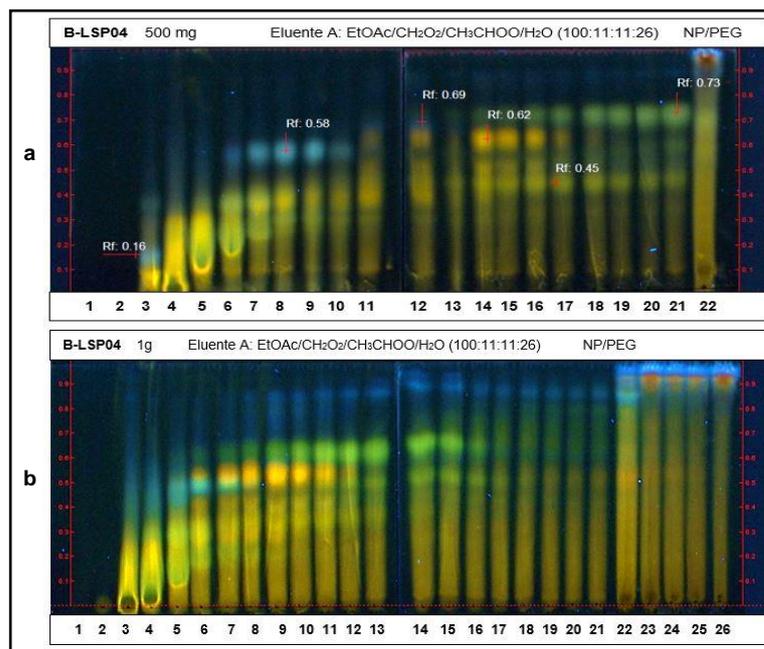


Figura 12. Cromatofolha das frações no modo preparativo da B-LSP04.

Legenda: 12a. Cromatofolha de uma das injeções no HPLCC a partir de 500 mg e a figura 12b corresponde a uma injeção de 1 g, fase reversa, modo preparativa e sistema gradiente.

Todas as frações obtidas foram secas em banho maria com auxílio de secador e os rendimentos calculados, processo esse realizado para todas as injeções. Os dados das **Tabela 7** e **Tabela 8** são representativos para as demais injeções preparativas realizadas, sendo um rendimento a partir de 500 mg e o outro a partir de 1g, respectivamente.

Tabela 7. Rendimentos a partir de 1 g

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
F1	0,6	F14	7,5
F2	6,5	F15	6,3
F3	310,9	F16	5,2
F4	248,6	F17	5
F5	86,5	F18	4,5
F6	18,3	F19	3,9
F7	17	F20	2,1
F8	11,1	F21	2,6
F9	11	F22	18,2
F10	9,3	F23	78,4
F11	17,7	F24	14,3
F12	9,2	F25	18,7
F13	8,1	F26-35	89,9

Tabela 8. Rendimentos a partir de 500 mg

Amostra: B-LSP04 500 mg Fase Reversa-Preparativa			
Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
F1	0,1	F12	3,5
F2	0,4	F13	4,1
F3	35,7	F14	2,3
F4	1016,7	F15	2,3
F5	68,2	F16	2,2
F6	28,9	F17	2
F7	10,9	F18	2
F8	6,9	F19	1,7
F9	6	F20	1,3
F10	4,9	F21	1,8
F11	3,6	F22	289,7

Todas as análises apresentaram uma excelente reprodutibilidade, tanto para as injeções a partir de 500 mg, quanto para 1 g da fração. E em relação ao rendimento as médias se obtiveram. A **Figura 13** representa o perfil químico obtido em CCD após junções das frações de uma injeção no modo preparativa.

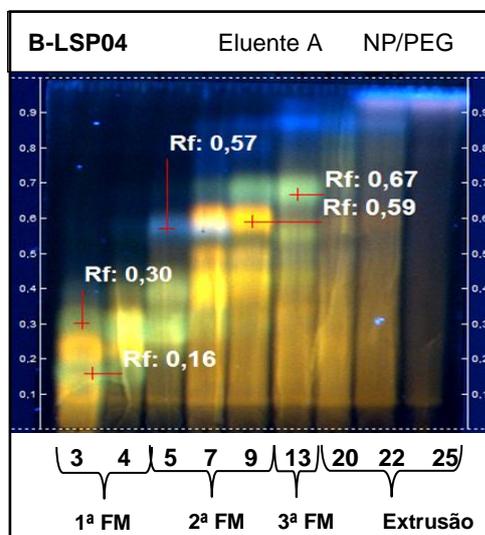


Figura 13. Cromatofolha do modo preparativo da B-LSP04.

Após as junções entre as injeções, realizou-se a reunião de frações de todas as injeções, obtendo assim no total de 4 (quatro) subfrações enriquecidas com substâncias fenólicas (**Figura 14**), sendo a fração SP04-01 a mais rendosa e com característica de maior polaridade. Na **Tabela 9** descreve-se as subfrações obtidas após 10 injeções da fração B-LSP04 e seus respectivos rendimentos.

Tabela 9. Rendimento das subfrações B-LS04

Frações	Massa (g)
SP04-01	3,068
SP04-02	0,464
SP04-03	0,316
SP04-04	0,316

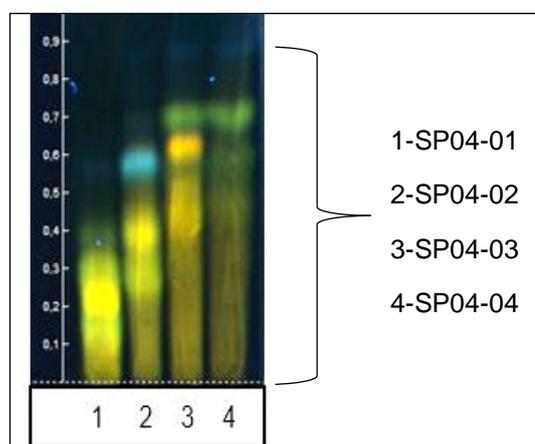


Figura 14. Cromatofolha das subfrações de B-LSP04

4.8.3 Purificação e Isolamento das Subfrações

Após a obtenção das subfrações enriquecidas das substâncias fenólicas de interesse, as frações foram injetadas novamente no HPLC. Para cada fração enriquecida foi utilizado o sistema isocrático, composto por acetato de etila – butanol – água, em proporções diferentes. As subfrações SP04-01, SP04-02, SP04-03 e SP04-04 foram trabalhadas separadamente, devido as características químicas distintas. Os procedimentos executados com as subfrações estão descritos a seguir.

→ Subfrações SP04-01 e SP04-02

a) Purificação da Subfração SP04-01

A análise em CCD de SP04-1 evidenciou manchas com fluorescências de coloração amarelo e verde com Rf's variando entre 0,1 a 0,6. Para esta fração foi eleito o sistema isocrático, modo preparativo e fase reversa. O sistema de solvente utilizado foi composto por: acetato de etila – butanol – água (7:3:10). Foram realizadas duas injeções de 150 mg da fração SP04-01.

As frações obtidas foram novamente analisadas por CCD observando o perfil das manchas com seus respectivos Rf. Realizou-se a reunião das frações, obtendo 13 frações que estão descritas na **Tabela 10**. Na **Figura 15** está demonstrado o cromatograma da subfração SP04-01, após a reunião das frações.

Tabela 10. Rendimento das injeções no HPLC da SP04-01

Frações	Rendimento (mg)
2	54
6	43
8	56
14	24
16	34
18	20
19	25
29	7
33	4
41	3
44	9
53	5
57	6

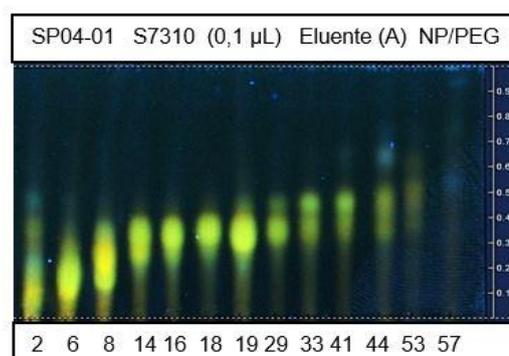


Figura 15. Perfil químico em CCD de SP04-01

b) Purificação da Subfração SP04-02

Em análise em CCD observou-se a presença de fluorescências de coloração verde (Rf 0,25 a 0,4), amarelo (Rf 0,45 a 0,6) e azul (Rf 0,65 a 0,7). Para esta fração foi eleito o sistema isocrático, modo preparativo e fase reversa. O sistema de solvente utilizado foi composto por: acetato de etila – butanol – água (7:3:10). Foram realizadas duas injeções, sendo a primeira injeção de 150 mg e a outra de 147 mg da fração SP04-02.

Após avaliação do perfil em CCD e dados dos espectros de massas ocorreu a união dessas frações, resultando no total de 13 frações (**Tabela 11**) e a **Figura 16** ilustra o perfil cromatográfico obtido destas frações.

Tabela 11. Rendimento das injeções no HPCCC da SP04-02

Frações	Rendimento (mg)
F5	40
F8	9
F9	13
F10	49
F12	14
F13	26
F17	24
F22	9
F29	13
F31	12
F33	4
F36	3
F38	8

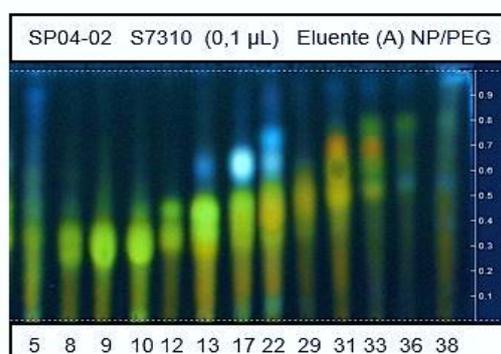


Figura 16. Perfil químico em CCD de SP04-02.

c) Isolamento das Subfrações SP04-01 e SP04-02

O perfil químico avaliado de ambas as subfrações eram bem semelhantes, determinadas frações continham no espectro de massas a predominância do íon com m/z 577 como pico base, sendo assim, encaminhou-se a fração nº 10 da SP04-02 para uma análise preliminar em CL-EM, onde foi possível verificar a presença de dois picos majoritários, com tempos de retenção de 9,29 e 10,44 minutos respectivamente, conforme o cromatograma demonstrado na **Figura 17**.

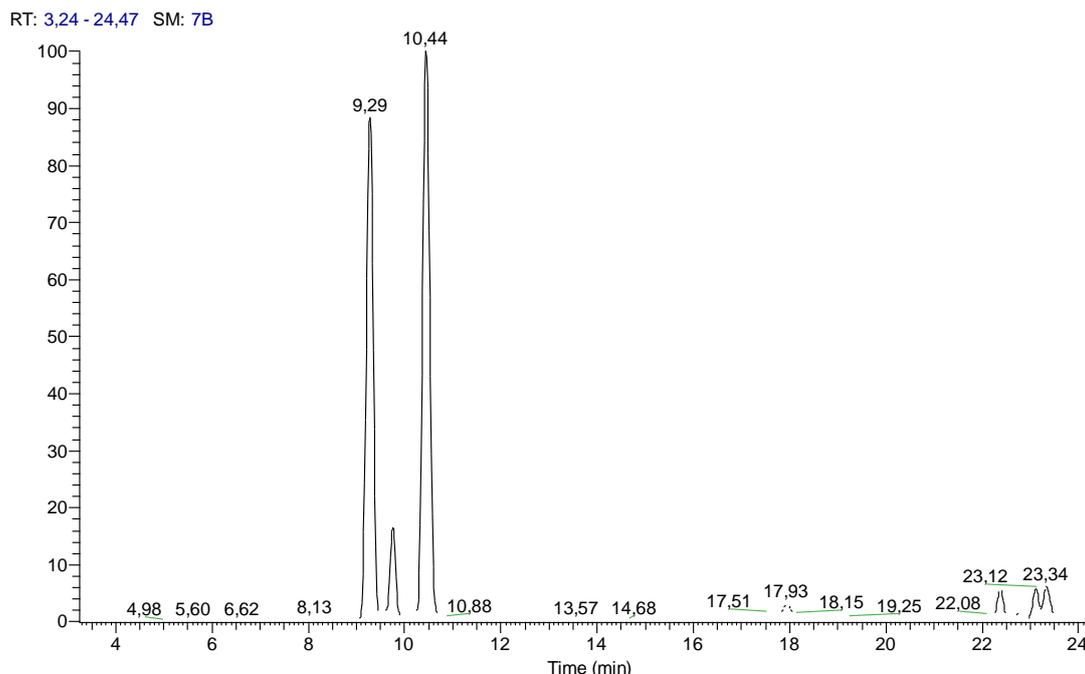


Figura 17. Cromatograma da SP04-02 (Fração 10)

Após realizar uma análise em full-scan no CL-EM, partiu-se para o isolamento no CLAE utilizando coluna semi-preparativa C18, onde as condições cromatográficas da injeção estão descritas no item 4.1c na p. 36. Para obter uma fração enriquecida com o íon 577 foi realizado a junção das seguintes frações: **SP04-01**: n° 14, n° 16, n° 18 e n° 19; **SP04-02**: n° 9, n° 10 e n° 12.

Realizou-se duas injeções no CLAE, obtendo 5 frações de cada análise, em seguida foram reunidas, secas e calculou-se o rendimento que está descrito na

Tabela 12:

Tabela 12. Rendimento das frações do CLAE (íon 577)

Código das subfrações	Reunião das frações	Massa (mg)
SP-F1		2,1
SP-F2	SP04-01: F14, F16, F18 e F19	8,4
SP-F3	SP04-02: F9, F10 e F12	0,9
SP-F4		12,1
SP-F5		0,1

Na **Figura 18** demonstra-se o perfil químico das frações em CCD e o cromatograma obtido no CLAE/DAD após as injeções dessas frações, onde observa-se a separação das manchas, com predominância de dois picos.

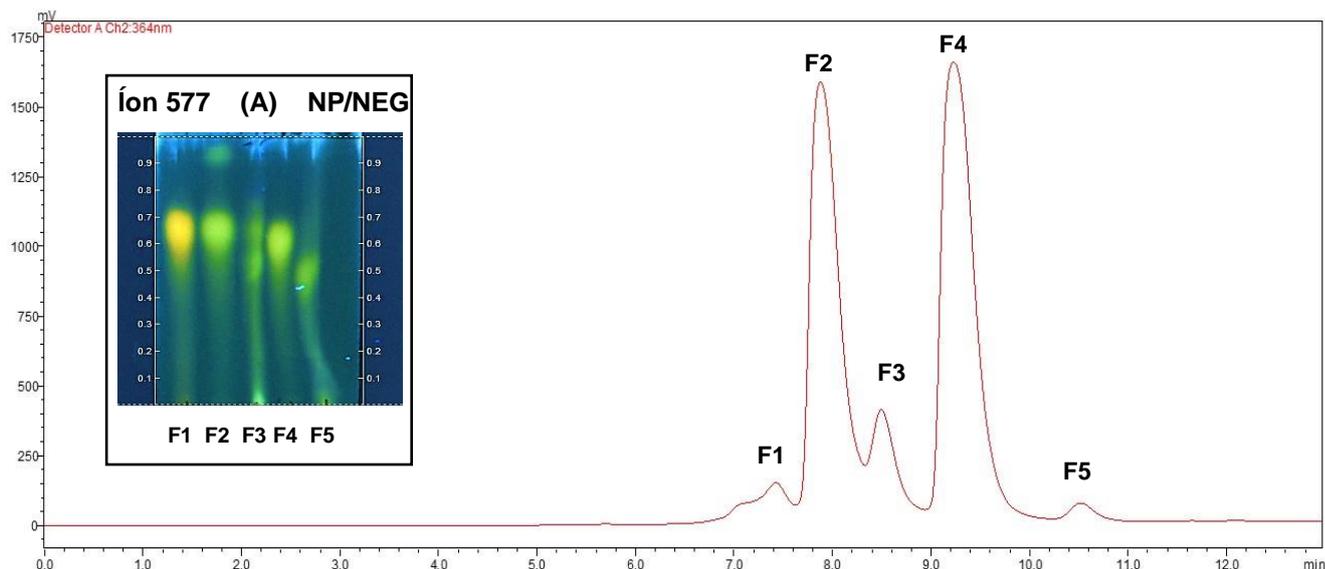


Figure 18. Cromatoplaça e cromatograma das frações do CLAE (íon 577)

Todas as frações descritas na **Tabela 12** foram encaminhadas para o laboratório de ressonância magnética nuclear (Central Analítica-UFAM-Manaus) para análise unidimensionais e bidimensionais apenas para as frações: SP-F2 e SP-04.

→ Subfrações SP04-03 e SP04-04

Purificação da Subfração SP04-03

Foram realizadas 4 injeções no HPLCC, modo analítico, sendo 3 análises em fase reversa e uma em fase normal, utilizando 20 mg em cada, o sistema de solvente utilizado foi: acetato de etila – butanol – água, nas seguintes proporções: 7:3:10; 8:2:10 e 9:1:10. A partir dessas injeções foi possível definir o melhor sistema isocrático para as demais frações.

Foram observadas fluorescência de colorações amarela (R_f variando de 0,45 a 0,66), azul (R_f 0,70) e verde (R_f 0,74). Após a realização das injeções analíticas, iniciou a injeção no preparativa, aplicando dois sistemas principais, sendo eles: 7:3:10 e 8:2:10, com o propósito de separar grupos de fenólicos diferentes. Essas frações foram encaminhadas para análise em espectrometria de massas.

Após comparar os espectros de massa ocorreu a união de frações com perfis de fragmentação semelhante, levando em consideração a resolutividade reunimos os compostos menos polares no qual descrevemos como FMV 431, devido a fluorescência verde (**Figura 19**) e conter o íon m/z 431 como pico base, obtendo após secagem 11,2 mg desta fração enriquecida em modo analítico.

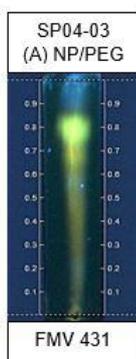


Figure 19. Fração FMV 431

Na análise no modo preparativa utilizou 170 mg da fração SP04-03, fase normal e sistema isocrático, aplicando o sistema 8:2:10, sendo observado o mesmo perfil de eluição analisado no modo analítico. Coletaram-se 33 frações que após avaliação do perfil em CCD e observando os espectros ocorreu a junção de frações, resultando no total de 15 subfrações. Os rendimentos obtidos estão demonstrados na **Tabela 13** e o perfil químico em CCD está evidenciado na **Figura 20**.

Tabela 13. Rendimento das injeções no HPCCC da SP04-03

Frações	Rendimento (mg)
1	10
2	7,7
4	4,5
5	8,1
7	14,3
10	20,2
14	5,8
15	8,4
17	7,8
19	3,4
20	4,5
22	3,9
24	7,5
27	3,9
29	32,2

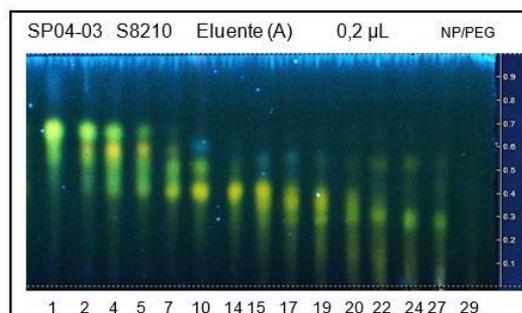


Figure 20. Cromatofolha da análise de SP04-03

a) Purificação da Subfração SP04-04

A análise em CCD evidenciou fluorescências de colorações amarelo (Rf 0,4 a 0,6) e verde (Rf 0,65 a 0,7) com características de baixa polaridade, onde efetuou-se duas injeções no HPCCC, sendo uma de 150 mg e a outra de 147 mg, fase reversa, modo preparativa e sistema isocrático composto por: acetato de etila – butanol - água na proporção 7:3:10. No final das duas injeções coletou-se 90 frações, sendo 45 na primeira e 45 na segunda. Essas frações foram encaminhadas para análise no EM e avaliação em CCD, que nortearam a junção das frações resultando no total de 12 subfrações, que após a secagem calculou-se os rendimentos (**Tabela 14**). O perfil em CCD é demonstrado na **Figura 21**.

Tabela 14. Rendimento das injeções no HPCCC da SP04-04

Frações	Rendimento (mg)
4	54,2
6	3,7
7	10,2
9	8,2
12	8,6
20	8,5
27	8,4
30	34,2
32	49,6
37	33
38	86,8
44	1,6

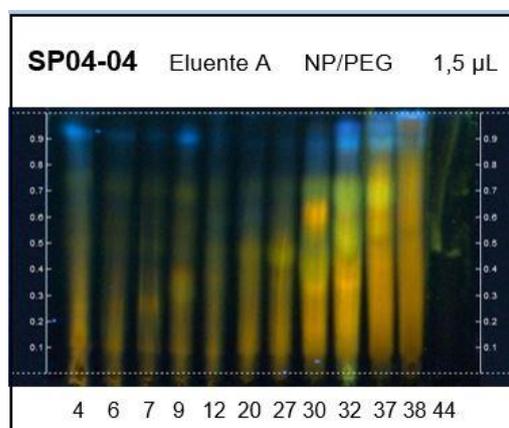


Figura 21. Cromatofolha da reunião da SP04-04

Após avaliar o perfil de fragmentação de cada subfração, realizou-se a junção de duas frações majoritárias **F32** e **F37** que após a secagem calculou-se o rendimento, que ficou em torno de 91,2 mg, efetuando assim uma nova injeção no HPCCC utilizando o mesmo sistema descrito acima, tendo como propósito a purificação desta fração contendo fluorescência de coloração verde com Rf variando de 0,72 a 0,79. Essa injeção gerou 62 frações, que após avaliação em CCD ocorreu a junção de frações, chegando a um total de 5 subfrações enriquecidas (**Figura 22**).

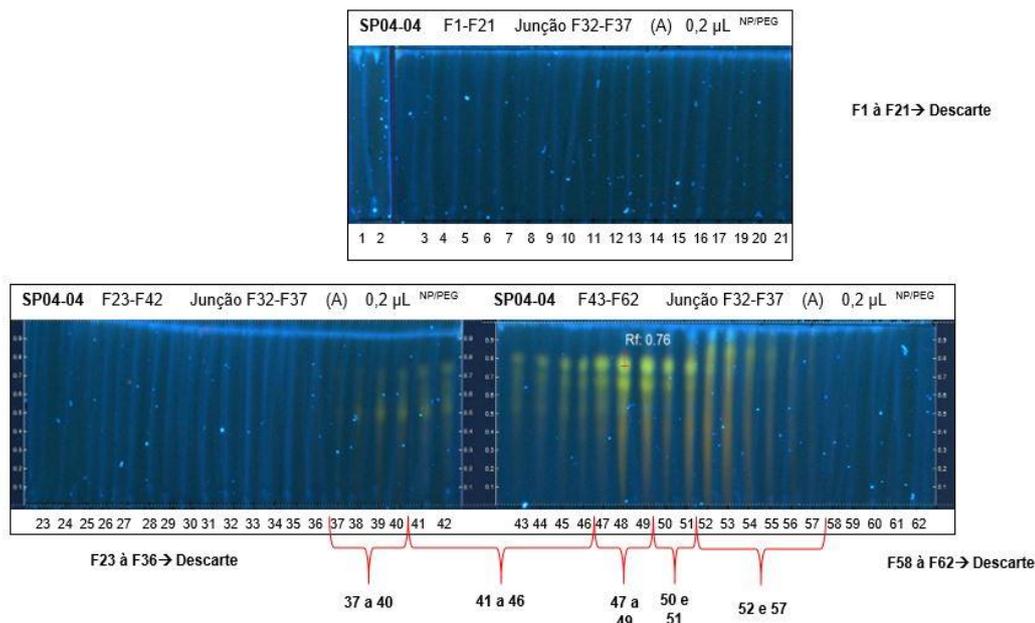


Figure 22. Cromatoplaça da junção de F32 e F37 da SP04-04

b) Isolamento das Subfrações SP04-03 e SP04-04

As subfrações foram encaminhadas para análise no espectrômetro de massas, sendo possível rastrear os sinais majoritários em determinadas amostras de ambas as subfrações, sendo observado a predominância do íon m/z 431. Posteriormente, ocorreu uma junção de amostras para obtenção da fração enriquecida com o íon de interesse e em seguida encaminhou-se para o isolamento no CLAE.

A fração enriquecida com íon m/z 431 foi composta por: FMV 431, F1 e F2 da SP04-03 e das frações 43 a 51 da subfração SP04-04. Realizou-se 5 injeções no CLAE em coluna semi-preparativa C18, sendo obtida 15 frações, que após realizar análise em CL-EM ocorreu a junção de amostras chegando no total final de 3 frações, que após a secagem calculou-se o rendimento conforme demonstrado na **Tabela 15** e o perfil em cromatoplaça evidenciado na **Figura 23**.

Tabela 15. Rendimento das frações do CLAE (íon 431)

Código das subfrações	Reunião das frações	Massa (mg)
SP-431.1	SP04-03: FMV 431, F1 e F2	12
SP-431.2	SP04-04: F43 a F51	7,7
SP-431.3		2,3

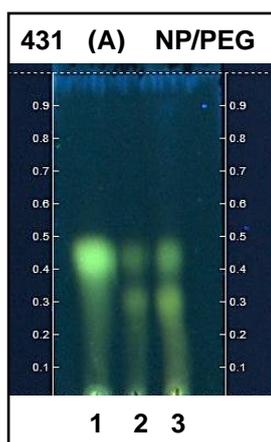


Figure 23. Cromatoplateca das frações do CLAE (íon 431)

A **Figura 24** demonstra o cromatograma de uma injeção no modo gradiente no CLAE, pode-se observar a presença de dois picos majoritários que posteriormente realizou-se 5 injeções no modo semi-preparativa em sistema isocrático, conforme demonstrado na **Figura 25**.

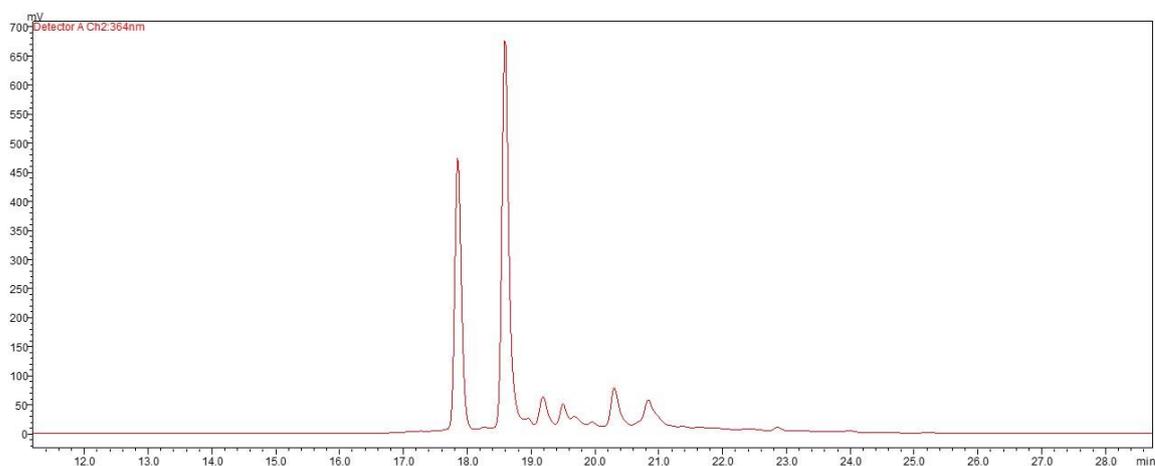


Figure 24. Cromatograma da injeção em sistema gradiente no CLAE/DAD (íon 431).

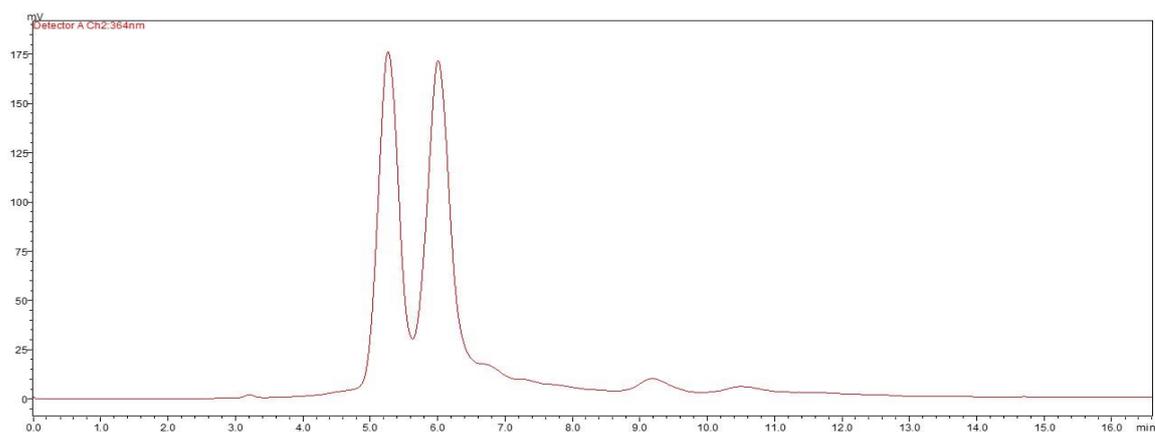


Figure 25. Cromatograma representativo das injeções em sistema isocrático no CLAE/DAD (íon 431).

As condições das injeções estão descritas no item 4.1 c.1 p. 36. As substâncias isoladas foram encaminhadas para análise em ressonância magnética nuclear, sendo as condições descritas no item 4.1 c.1 p. 36.

A **Figura 26** demonstra todo o processo de análise e tomada de decisão para direcionar o isolamento e identificação das substâncias presentes na fração ativa B-LSP04.

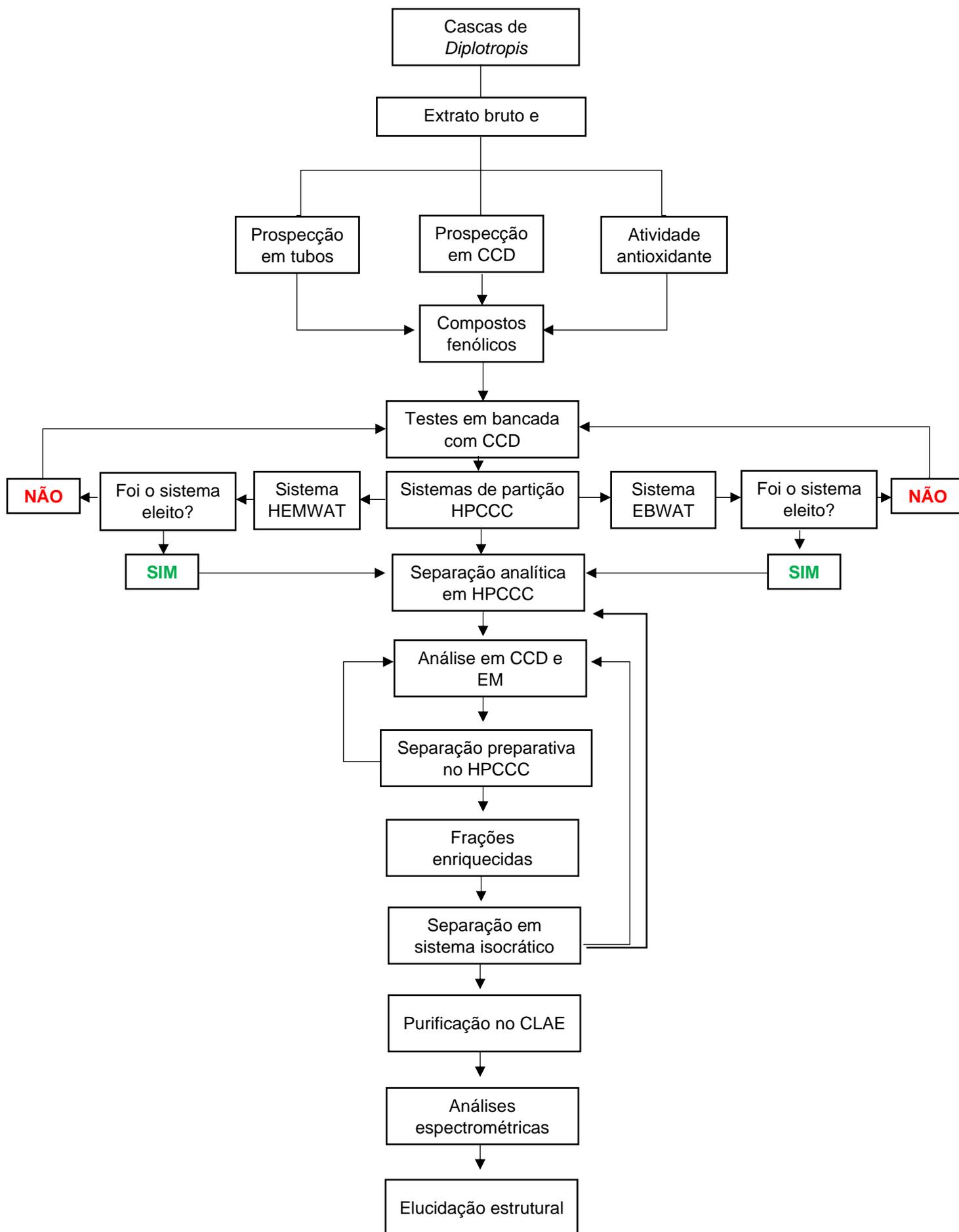


Figura 26. Fluxograma das etapas do processo de separação e isolamento no HPCCC.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento

O rendimento foi calculado através da massa final do extrato bruto e das frações pela massa inicial do material botânico submetido à extração. Na **Tabela 16** é demonstrado o rendimento em gramas e percentual de cada amostra obtida de *D. racemosa*.

Tabela 16. Rendimento da extração e fracionamento de *D. racemosa*

Amostras	Massas (g)	Rendimento %
Extrato bruto B-LSP	43,45	4,345
Fração B-LSP01	0,231	0,023
Fração B-LSP02	2,298	0,229
Fração B-LSP03	1,510	0,151
Fração B-LSP04	8,409	0,840
Fração B-LSP05	26,663	2,666
Soma das massas (g) e (%)	82,563	8,256

Com a massa inicial de 1 Kg de material vegetal seco, foi possível obter um extrato com 82,563 g de rendimento, sendo este particionado, foram obtidas 5 frações. De acordo com a tabela 16 as frações que apresentaram maior rendimento foram as frações butanólica (B-LSP04) e hidroalcolólica (B-LSP05), com isso pode-se destacar a presença de uma maior quantidade de substâncias de alta polaridade no extrato.

5.2 Prospecção Fitoquímica em Tubos

Na **Tabela 17** tem-se a sumarização dos resultados obtidos na prospecção fitoquímica. Pode-se destacar a indicação da presença de algumas classes e subclasses metabólicas nas amostras testadas, como: taninos condensados, flavonas, flavonóis, xantonas, flavonol, flavanonas, triterpenoides pentacíclicos livres e alcaloides.

Tabela 17. Prospecção fitoquímica em tubos de *D. racemosa*

Metabólitos secundários	B-LSP	B-LSP01	B-LSP02	B-LSP03	B-LSP04	B-LSP05
Fenóis	-	ND	ND	-	-	-
Taninos hidrolisáveis	-	ND	ND	-	-	-
Taninos condensados	+	ND	ND	+	+	+
Antocianidinas e Antocianinas	-	ND	ND	-	-	-

Flavonas, flavonóis e xantonas	-	ND	ND	+	+	+
Chalconas e Auronas	-	ND	ND	-	-	-
Flavanonol	+	ND	ND	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	ND	ND	-	-	-
Catequinas (taninos catéquicos)	-	ND	ND	-	-	-
Flavanonas	+	ND	ND	-	-	-
Esteróides	-	-	-	-	ND	ND
Triterpenóides pentacíclicos livres	+	+	+	+	ND	ND
Saponinas	+	ND	ND	+	+	+
Alcaloides	+	ND	ND	ND	+	+

Legenda: sinal (+) indica positivo, sinal (-) indica negativo e ND- não detectado.

Os testes realizados foram baseados na mudança de aspectos físicos da solução, os resultados foram comparados com dados da literatura sendo possível sugerir a presença de alguns metabólitos. O teste direcionado a detecção de fenóis e taninos realizado com o extrato bruto e frações apresentou no tubo 1 em pH4, coloração esverdeada com precipitado escuro, sendo esse um indicativo da presença de taninos condensados (**Figura 27**).

No tubo 2 e 3 apresentados na figura 27, não houve alterações, que de acordo com a literatura indica a ausência de antocianinas e antocianidinas (Matos, 2009). No tubo 4 em pH 11, referente ao teste para flavonas, flavonóis e xantonas, foi observado coloração amarela nas soluções das frações testadas. Este resultado sugere a presença de flavonas, flavonóis e xantonas. No tubo 5, apenas o extrato bruto apresentou mudança de coloração como pode-se observar na **Figura 27**, o que indica a presença de flavanonol.

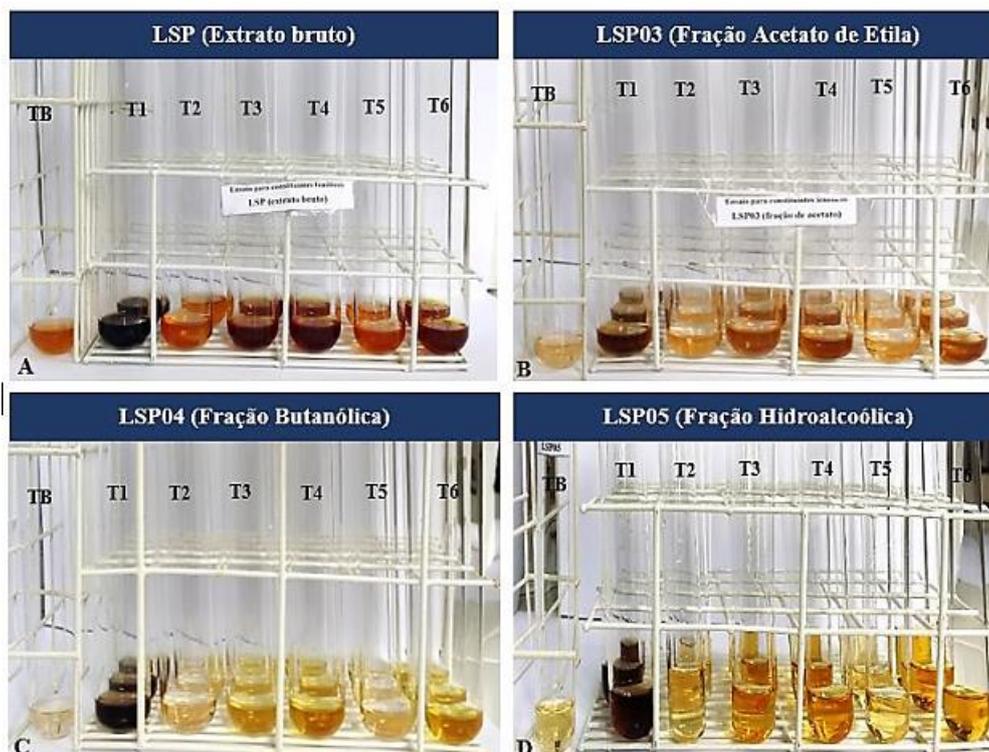


Figura 27. Prospecção fitoquímica para caracterização dos fenólicos. **Legenda:** **A**-Extrato bruto de LSP, **B**- Fração de LSP03, **C**-Fração de LSP04 e **D**-Fração de LSP05. Sequência dos tubos: **TB**-tubo branco; **T1**-tubo n°. 1 pH4; **T2**-tubo n°. 2 pH 3; **T3**-tubo n°. 3 pH 8,5; **T4**-tubo n°.4 pH 11; **T5**-tubo n°. 5 pH 3Δ (aquecimento) e **T6**-tubo n°. 6 pH 11Δ (aquecimento).

Os flavonoides são considerados marcadores taxonômicos da família Leguminosae, ainda que outras classes contribuam para a classificação do grupo. Poucas famílias de plantas têm sido tão pesquisadas em relação a esses compostos quanto as Leguminosae, devido ao aspecto etnobotânico e a diversidade do metabolismo flavonoídico (HEGNAUER & GRAYER-BARKMEIJER, 1993; BARBOSA et al., 2006).

O estudo realizado por Barbosa et al. (2006) com 29 espécies de leguminosas arbóreas da Amazônia, identificou as classes flavona, flavonol e xantona na casca de *D. martiussi* (Sucupira preta) e *D. sp.* (Sucupira-do-igapó). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos com a espécie *D. racemosa* coletada na área da Mil Madeireira, que reforçam a possibilidade das classes flavona, flavonol e xantona serem utilizadas como marcadores taxonômicos para o gênero *Diploptropis*.

No tubo 6, só ocorreu alteração na amostra de extrato bruto (B-LSP), quando comparado ao branco. Portanto, segundo Matos (2009) a presença dessa coloração indica reação positiva para flavanonas. A presença de catequinas (taninos catéquicos)

foi evidenciada em 26 espécies de leguminosas, inclusive a *D. martiussi* Benth (Sucupira-preta) e *Diploptropis* sp. Já as flavanonas foram identificadas somente em 3 espécies, sendo elas: *Hymenaceae courbaril* L. (Subfamília: Caesalpiaceae); *Inga disticha* Benth (Subfamília: Mimosoideae) e *Vatairea guianensis* Aubl (Subfamília: Papilionoideae) (BARBOSA et al., 2006).

Na **Tabela 17** os triterpenoides pentacíclicos foram detectados no extrato bruto e frações testadas, a indicação foi evidenciada devido a coloração parda observada nos tubos (**Figura 28**).

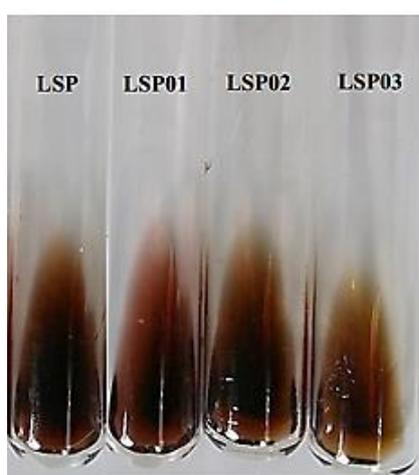


Figura 28. Caracterização em tubos de terpenos. **Legenda:** LSP-extrato bruto, LSP01-fração hexânica de LSP, LSP02-fração clorofórmica de LSP e LSP03-fração acetato de etila de LSP.

Os esteroides já foram identificados em 27 espécies das leguminosas estudadas. A classe dos triterpenos foram caracterizados somente na casca de duas espécies do gênero *Swartzia*, da subfamília Papilionoideae. Segundo Braz Filho et al. 1973 e Barbosa et al. 2006 o estudo com a espécie *D. purpurea* apresentou esteroides como: sitosterol e estigmasterol e o triterpeno lupeol.

Em relação as saponinas, todas amostras apresentaram resultado positivo, pois de acordo com a Figura 29A as amostras mostram as características descritas na literatura (Matos, 2009). Na fase confirmatória (**Figura 29b**), foi observado a formação de precipitados e ausência de espuma em todas as amostras testadas. Segundo Matos (2009), após a hidrólise ácida ocorre a precipitação da aglicona, ocasionando à não formação de espuma após a agitação.

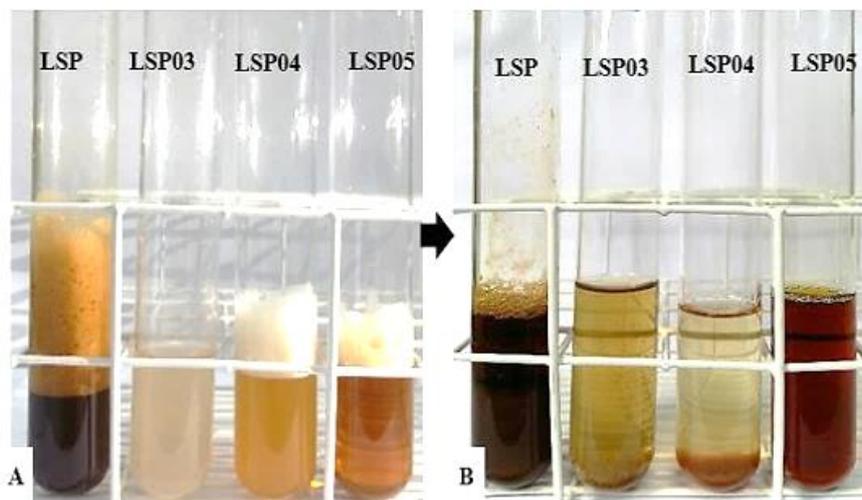


Figura 29. Caracterização em tubos de saponinas. **Legenda:** LSP-extrato bruto, LSP03-fração acetato de etila, LSP04-fração butanólica e LSP05-fração hidroalcoólica. A- Teste preliminar para saponinas e B- Teste confirmatório.

Saponinas são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura, que possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra parte hidrofílica (açúcares), determinam a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificante. A classificação das saponinas geralmente é feita de acordo com o núcleo fundamental aglicona, podendo ser denominadas saponinas esteroidais ou triterpênicas (SIMÕES et al., 2007).

A partir do ensaio em tubos utilizando o reagente Dragendorff, foi possível sugerir a presença de alcaloides no extrato bruto (B-LSP) e nas frações (B-LSP04 e B-LSP05), devido à presença de um precipitado após a adição do reagente Dragendorff (**Figura 30**).



Figura 30. Caracterização em tubos de alcaloides. **Legenda:** LSP-extrato bruto, LSP04-fração butanólica e LSP05-fração hidroalcoólica.

As espécies de leguminosas estudadas por Barbosa et al., (2006) evidenciaram a presença de precipitados e coloração alaranjada em 50% das espécies, indicando provável presença de alcalóides.

5.3 Prospecção Fitoquímica em Cromatografia em Camada Delgada

Estudo para presença de compostos fenólicos

Na placa revelada com NP/PEG no extrato bruto B-LSP e nas frações acetato de etila B-LSP03 e butanólica B-LSP04 revelaram manchas com fluorescência amarela e verde com Rfs que variaram entre 0,17 a 0,85; sendo colorações características para flavonoides. Fluorescências de coloração azul foram observadas no extrato bruto B-LSP com Rf 0,73. A **Figura 31** revela o perfil para flavonoides e outros fenólicos para o extrato bruto e frações.

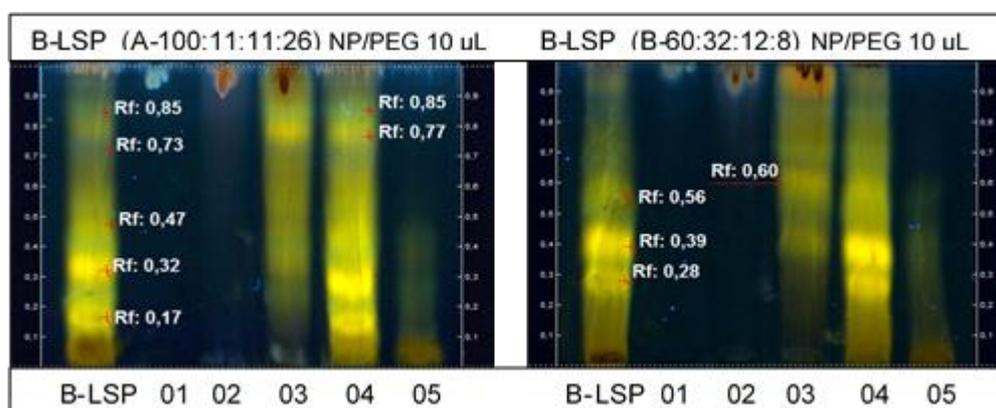


Figura 31. Perfil de flavonoides e fenólicos em NP-PEG. **Legenda:** B-LSP-extrato bruto, 01-fração hexânica, 02-fração clorofórmica, 03-fração acetato de etila, 04-fração butanólica, 05-fração hidroalcoólica. Eluente A→EtOAc-CH₂O₂-CH₃COOH-H₂O 100:11:11:26, eluente B→CHCl₃-CH₃COOH-MetOH-H₂O 60:32:12:8 e revelador→NP/PEG.

Na placa revelada com sulfato cérico, foi observado o aparecimento de manchas em tons de amarelo no extrato bruto B-LSP e nas frações B-LSP03, B-LSP04 e B-LSP05 com Rf's variando de 0,15 a 0,6; conforme demonstrado na **Figura 32**. Segundo Chaves (1997), o aparecimento de coloração amarela sugere a presença de flavonoides.

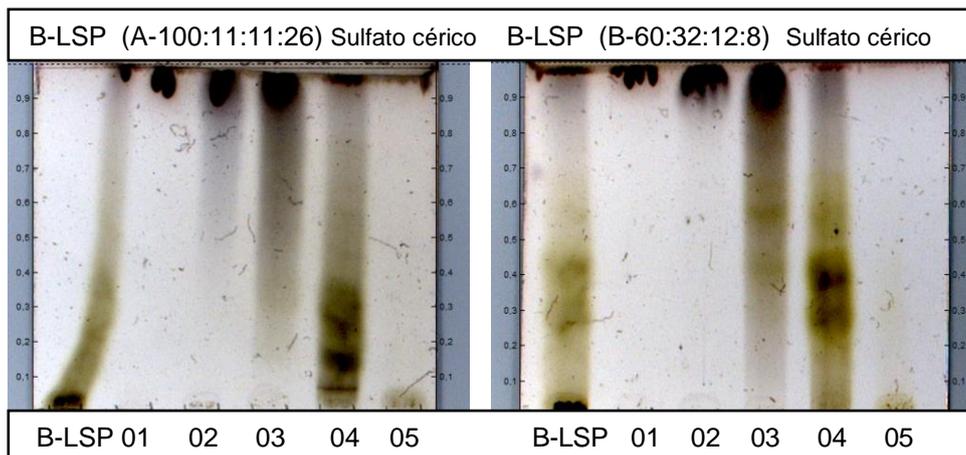


Figura 32. Perfil para flavonoides e outros fenólicos em sulfato cérico **Legenda:** B-LSP-extrato bruto, 01-fração hexânica, 02-fração clorofórmica, 03-fração acetato de etila, 04-fração butanólica, 05-fração hidroalcoólica. Eluente A→EtOAc-CH₂O₂-CH₃COOH-H₂O 100:11:11:26, eluente B→CHCl₃-CH₃COOH-MetOH-H₂O 60:32:12:8 e revelador→Sulfato cérico.

Estudo para presença de alcaloides

Na avaliação da placa revelada com Dragendorff não apareceram manchas de coloração marrom, resultando em uma análise negativa em CCD. Esse resultado negativo pode estar relacionado à concentração utilizada dos extratos na análise. Entretanto, baseado nas literaturas pesquisadas, a revelação com Dragendorff não é específica para alcaloides e é apenas sugestiva. Dessa forma, análises preliminares deverão ser confirmadas, por meio de estudos baseados em isolamento e identificação direcionados para aquela classe química.

Estudo para presença de terpenos

Na placa revelada com vanilina houve aparecimento de manchas roxas no extrato bruto B-LSP e em todas as frações, com Rf's variando de 0,13 a 0,84; conforme demonstrado na **Figura 33**. Segundo Wagner (1984) e Arruda, 2009: a vanilina é um reagente utilizado para detectar os terpenos, fenóis e derivados de fenilpropanoides, através de manchas de coloração roxa.

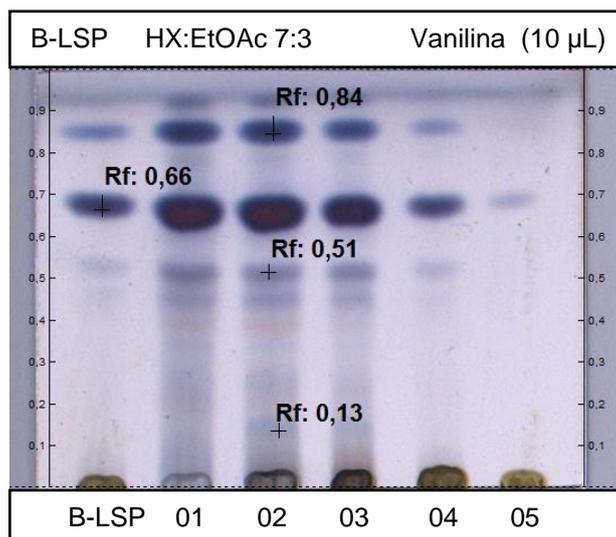


Figura 33. Caracterização de terpenos em CCD. **Legenda:** B-LSP-extrato bruto, 01-fração hexânica, 02-fração clorofórmica, 03-fração acetato de etila, 04-fração butanólica, 05-fração hidroalcoólica.

Eluente Hexano - Acetato de etila 7:3 e revelador → vanilina.

5.4 Ensaios de Atividade Antioxidante

5.4.1 Atividade Antioxidante Qualitativa frente ao radical livre DPPH

O potencial antioxidante de uma amostra é observado pelo grau de descoloração do radical, de violeta intenso para uma coloração amarelada, característica do produto reduzido (BURATTO et al., 2011). No teste qualitativo utilizando o radical DPPH ocorreu o aparecimento de manchas amarelas nas frações clorofórmica, acetato de etila e butanólica, indicando a presença de substâncias com potencial antioxidante, conforme demonstrado na **Figura 34**.

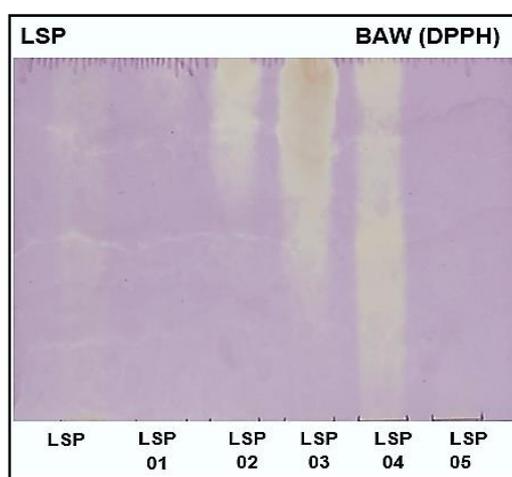


Figura 34. Perfil qualitativo para DPPH. **Legenda:** B-LSP-extrato bruto, 01-fração hexânica, 02-fração clorofórmica, 03-fração acetato de etila, 04-fração butanólica, 05-fração hidroalcoólica. Eluente

BAW → Butanol-Ácido acético-Água 4:1:5 e revelador → DPPH.

5.4.2 Atividade Antioxidante Quantitativa frente ao radical livre DPPH e ABTS

No ensaio quantitativo com DPPH somente a fração B-LSP03 (acetato de etila) apresentou uma porcentagem de atividade antioxidante de $74,41 \pm 1,91$ DP (desvio padrão) assim, sendo possível realizar o cálculo do CI_{50} que foi de $49,27 \mu\text{g/mL}$. Tanto o extrato bruto B-LSP como as demais frações B-LSP01, B-LSP02, B-LSP04 e B-LSP05 apresentaram porcentagem antioxidante inferior a 50%, por isso não foi possível calcular sua IC_{50} (**Tabela 18**).

O ensaio com o radical ABTS indica a presença de antioxidantes hidrofílicos, quanto maior atividade sequestrante menor será a CI_{50} . As amostras que apresentaram atividade antirradical foram o extrato bruto B-LSP e a fração B-LSP03, conforme demonstrado na **Tabela 18**.

Tabela 18. Valores de porcentagem de atividade antioxidante e CI_{50} obtidos.

Amostras	DPPH		ABTS	
	%AA \pm DP	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP	%ABTS	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
Extrato bruto B-LSP	$37,17 \pm 4,87$	-	$63,29 \pm 2,92$	$65,83 \pm 65,83$
Fração B-LSP01	$2,11 \pm 3,17$	-	$7,89 \pm 1,29$	-
Fração B-LSP02	$34,52 \pm 3,57$	-	$66,65 \pm 3,26$	-
Fração B-LSP03	$74,41 \pm 1,91$	$49,27 \pm 0,49$	$90,03 \pm 6,28$	$35,86 \pm 1,37$
Fração B-LSP04	$42,22 \pm 7,76$	-	$37,03 \pm 1,36$	-
Fração B-LSP05	$47,83 \pm 1,16$	-	$36,98 \pm 1,78$	-
Ácido gálico (padrão)	$93,45 \pm 0,56$	$3,2 \pm 0,45$		

Legenda: (% AA) Porcentagem de atividade antioxidante; (DP) Desvio padrão; (CI_{50}) concentração inibitória para 50%.

Segundo Sousa et al. (2007) quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI_{50} . Em sua pesquisa, Mensor (2001) analisou a atividade antioxidante utilizando o radical DPPH de 15 plantas coletadas no Brasil, usando como padrões o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e a substância pura rutina, sendo o CI_{50} do *Ginkgo biloba* $40,72 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ e da rutina $14,16 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$. Comparando o resultado obtido, a fração B-LSP03 demonstrou uma excelente atividade perante o extrato padronizado de *Ginkgo biloba*.

As propriedades antioxidantes são conferidas aos flavonoides pelos grupos de hidroxila fenólicos ligados às estruturas do anel, sendo eles capazes de atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio, capturarem radicais superóxidos e até mesmo atuarem como quelantes de metais, além de serem capazes de ativar enzimas antioxidantes (KHLEBNIKOV et al., 2007; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

No resultado da análise sobre a atividade antioxidante da espécie *Diploptropis racemosa* H., caracterizou-se a presença de metabólitos secundários da classe dos flavonoides e taninos condensados na fração ativa de acetato de etila (B-LSP03), que segundo a literatura são classes que possuem características antioxidantes. Resultando em dados preliminares que podem servir como base para o isolamento desses constituintes responsáveis pela atividade antioxidante.

5.4.3 Determinação de Fenóis Totais

A capacidade redutora da amostra é diretamente proporcional a concentração de fenóis presentes. O extrato bruto B-LSP e as frações B-LSP02 e B-LSP03 apresentaram maior atividade redutora e o menor teor foi registrado na fração B-LSP01, conforme demonstrado na **Tabela 19**.

Tabela 19. Concentração de fenóis totais

Amostra	Fenóis Totais	
	% Fenóis	(μg Ácido gálico/mL)
B-LSP	8,42 \pm 0,66	51,03 \pm 4,28
B-LSP01	1,33 \pm 0,28	4,74 \pm 1,83
B-LSP02	5,54 \pm 2,03	45,12 \pm 24,22
B-LSP03	10,85 \pm 0,21	66,88 \pm 1,38
B-LSP04	3,52 \pm 0,41	19,05 \pm 2,66
B-LSP05	1,37 \pm 1,03	5,03 \pm 6,73

Observou-se uma correlação positiva entre os fenóis totais e a CI_{50} do extrato bruto e das frações, esta análise sugere que existe algum constituinte que contribui particularmente e mais efetivamente para a ação sequestradora de radicais livres.

5.5 Fracionamento dos Constituintes Químicos por Cromatografia em Contra Corrente de Alta Performance - HPLC (High Performance Counter Current Chromatography)

Durante o fracionamento com HPLC foi possível avaliar parâmetros técnicos para a otimização e aprimoramento do uso da técnica. Em todo o processo cromatográfico utilizou-se cerca de 4,97 L de acetato de etila P.A.; 3,67 L de butanol P.A. e 13,06 L de água destilada. Em relação ao volume de resíduo gerado calculou-se um total de 10,56 L. A média de retenção da coluna foi 65 a 70% e o tempo de cada injeção variou de 1:45 à 2:30 hs. Essas informações corroboram com a

versatilidade, rapidez, eficiência e economia da técnica de cromatografia contracorrente de alta performance.

5.5.1 Purificação das frações e elucidação estrutural das substâncias isoladas

O estudo fitoquímico da fração butanólica das cascas da espécie *Diploptropis racemosa* (Hoehne) empregando as técnicas de CCD e HPLCC, orientou para o isolamento de quatro substâncias do grupo dos flavonoides glicosilados, e a partir da técnicas CLAE, CL-EM, RMN 1D/2D, e comparação com os dados descritos na literatura, foi possível realizar o isolamento e a elucidação estrutural das mesmas.

Análise da fração SP-F2

A fração SP-02 (8,4 mg) apresentou-se como sólido amorfo amarelo. Mostrou na análise por CCD uma mancha com fluorescência verde (Rf 0,3 a 0,4 366 nm) quando revelada com NP-PEG, indicando se tratar de um flavonoide. O espectro de UV (**Figura 35**) da fração corroborou com a análise em CCD com absorções máximas em 259 nm e 343 nm sugerindo que a substância 1 trata-se de uma flavona (MABRY,1970). A análise por CL-EM (**Figura 36**) indicou que o analito apresenta a massa 578 daltons compatível com a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{14}$. Este fato indicou que se trata de um flavonoide diglicosilado.

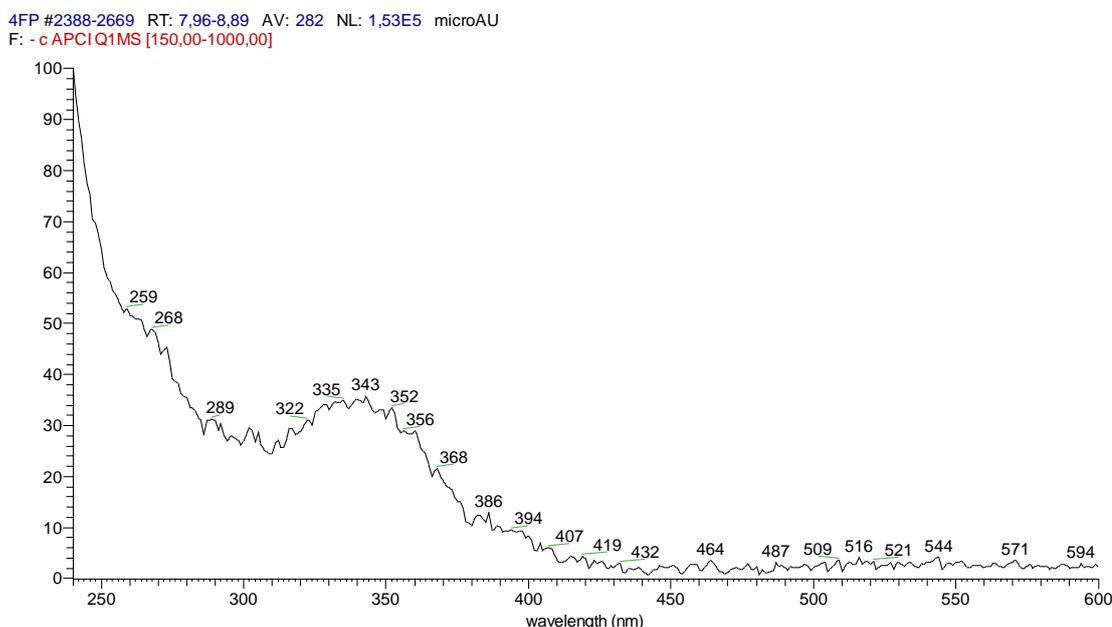


Figura 35. Espectro UV da amostra SP-F2.

4FP #1090-1119 RT: 9,14-9,37 AV: 15 NL: 3,70E8
 F: - c APCI Q1MS [150,000-1000,000]

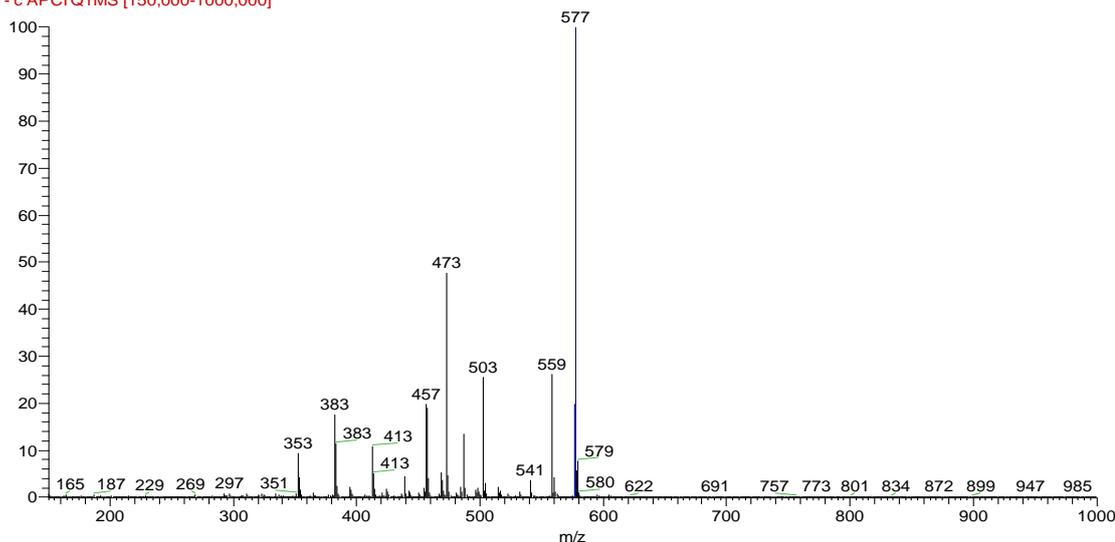


Figura 36. Espectro de CL-EM da fração SP-F2.

- Ressonância magnética nuclear

a) 1D (Análises unidimensionais)

O espectro de RMN ^1H da SP-F2 (**Figura 37**) reforçou a sugestão dos espectros UV que se trata de uma flavona e com CL-EM um flavonoide diglicosilado. Os sinais 7,98 ppm e 6,90 ppm mostraram o padrão característico de hidrogênios homotópicos presentes do anel aromático B com sistema AB. O simpleto em δ 6,78 corresponde ao hidrogênio presente no anel C compatível com flavona. Além disso os sinais de hidrogênios anoméricos na região 5,06-4,60 ppm apoiou a sugestão de um diglicosídeo. A faixa de sinais 4,15-2,90 ppm apresenta os sinais referentes aos hidrogênios dos açúcares. O duplete em 1,19 ppm correspondente a uma metila de um de um 6-deoxiglicosídeo.

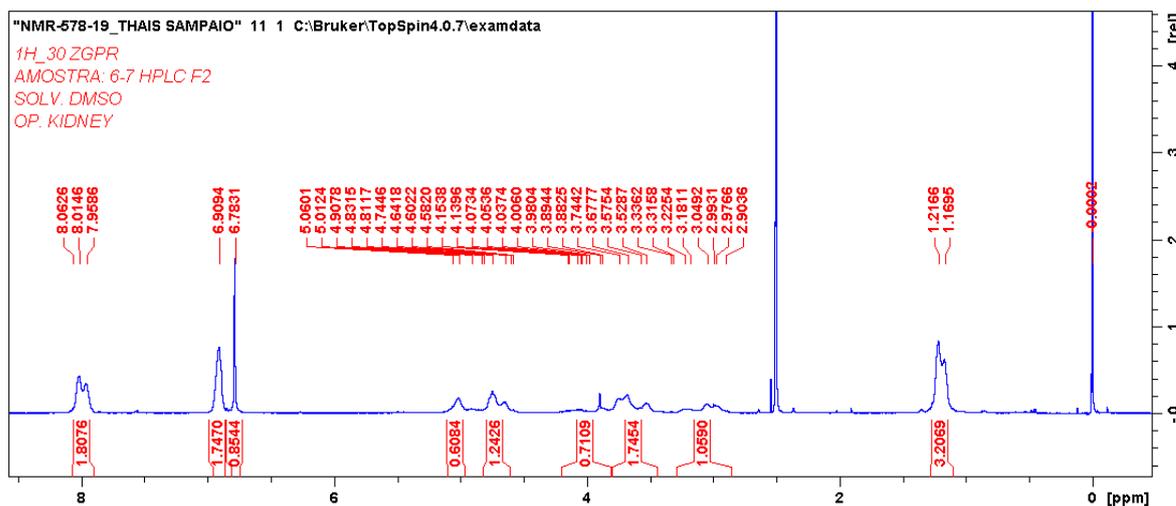


Figura 37. Espectro de RMN ^1H da fração SP-F2.

A **Figura 38** mostra a ampliação na região de 7,98 ppm a 6,78 ppm e 5,06 ppm a 1,16 ppm. Os sinais δ 7,98 (2H, *d*, H2'e H6'), δ 6,90 (2H, *s*, H3'e H5') na região dos aromáticos. O sinal em δ 6,78 ppm (1H, *s*, H3) característico de hidrogênio vinílico presente no anel C da Flavona (**Figura 38a**) (SILVERSTEIN, 2007; VUKICS, 2008). Na **Figura 38b** foram observados sinais dos hidrogênios anoméricos no intervalo de δ 4,58-5,06 e dos metínicos nos açúcares entre δ 3,52-4,15 e δ 2,90-3,33. O duplete em δ 1,19 (3H, *dl*, H6''') sugeriu a presença do grupo α -L-ramnosil como um dos açúcares da estrutura (AGRAWAL,1992). Não foi possível obter as constantes de acoplamento (*J*) desses sinais pois foram observadas sobreposições de sinais provavelmente de um isômero de massa 578 daltons ainda impurificando a amostra.

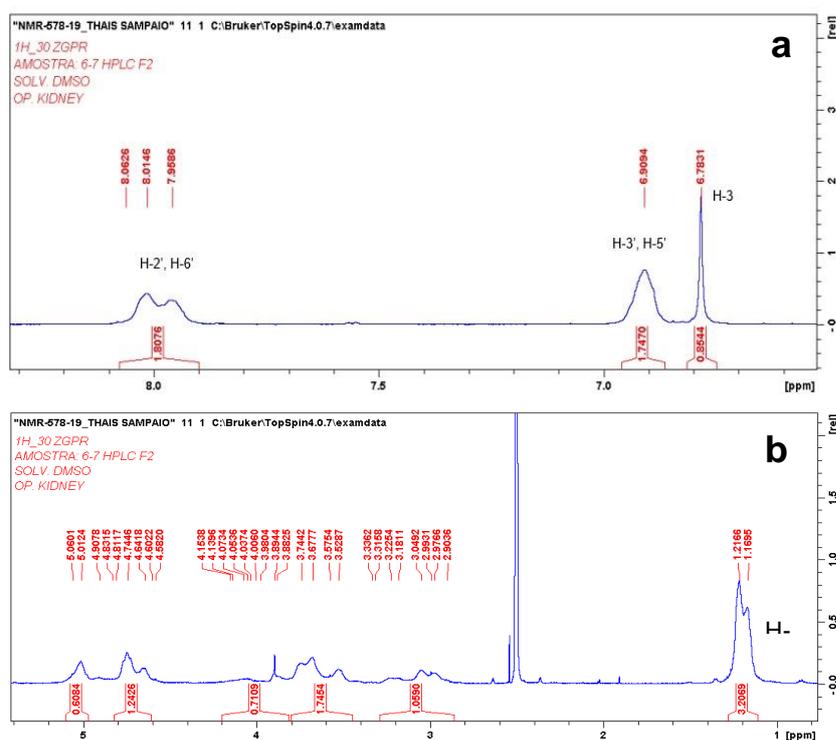


Figura 38. Ampliações do espectro de RMN 1H. **a:** Região dos aromáticos e olefinicos; **b:** Região dos açúcares.

Na **Tabela 20** estão listados os dados observados no espectro de ^1H comparados aos dados de VUKICS (2008), que indicou a presença do derivado da apigenina com dois açúcares ligados nas posições H6 e H8, e o sinal apontando a existência de uma metila com o deslocamento químico em 1,19 ppm, que corroborou os dados da literatura, indicando a presença do grupo α -L-ramnosil e β -D-glicosil.

Os deslocamentos químicos listados na **Tabela 20** somente foram possíveis com a associação dos experimentos bidimensionais que serão discutidos posteriormente.

Tabela 20. Dados dos sinais observados no espectro de ^1H da amostra SP-F2

^1H (DMSO- d_6) Vukics, 2008			SP-F2, ^1H (DMSO- d_6) 500 MHz		
^1H (ppm)	j (Hz)	m	^1H (ppm)	j (Hz)	m
7,89(H2', H6')	8.4	d	7,98	–	d, 2H
6,95(H3', H5')	8.4	d	6,90	–	m, 2H
6,78(H3)	–	s	6,78	–	s, 1H
β -D-glicosil					
4,62 (H1'')	9.8	d	4,66	–	m
4,10 (H2'')	9.8	t	3,89	–	m
3,20 (H3'')	9.0	t	3,23	–	m
3,14 (H4'')	8.9	t	3,40	–	m
3,15 (H5'')	–	m	3,25	–	m
3,69 (6''a)	12.0	d	3,70	–	m
3,41 (H6''b)	12;6	dd	3,53	–	m
α -L-ramnosil					
5,23 (H1''')	–	sl	5,01	–	m
3,9 (H2''')	–	m	4,74	–	m
3,59 (H3''')	8.9; 2.5	dd	–	–	m
3,39 (H4''')	8.9	d	3,68	–	m
3,46 (H5''')	–	m	3,29	–	dl
1,26(H6''')	6.0	d	1,19	–	d, 3H

LEGENDA — SINAIS NÃO ATRIBUÍDOS

A **Figura 39** apresenta o espectro de RMN ^{13}C de SP-F2. Os sinais confirmaram a presença do grupo carbonila em 182,1 ppm e de carbonos vinílicos em 163,6 ppm, pertencentes ao anel C da flavona. Foram observados os cinco sinais dos carbonos quaternários e metínicos, relacionados aos anéis aromáticos A e B. Na faixa entre 81,8 ppm e 59,8 ppm foram indicados os carbonos anoméricos, metínicos e metilênico dos açúcares. Segundo os relatos encontrados na literatura, os carbonos anoméricos absorvem na região entre 70 e 80 ppm. Este fato, indicou a presença de uma flavona C-glicosilada. O sinal em 18,0 ppm na metila reafirmou a presença do grupo α -L-ramnosil como um dos açúcares (AGRAWAL, 1992).

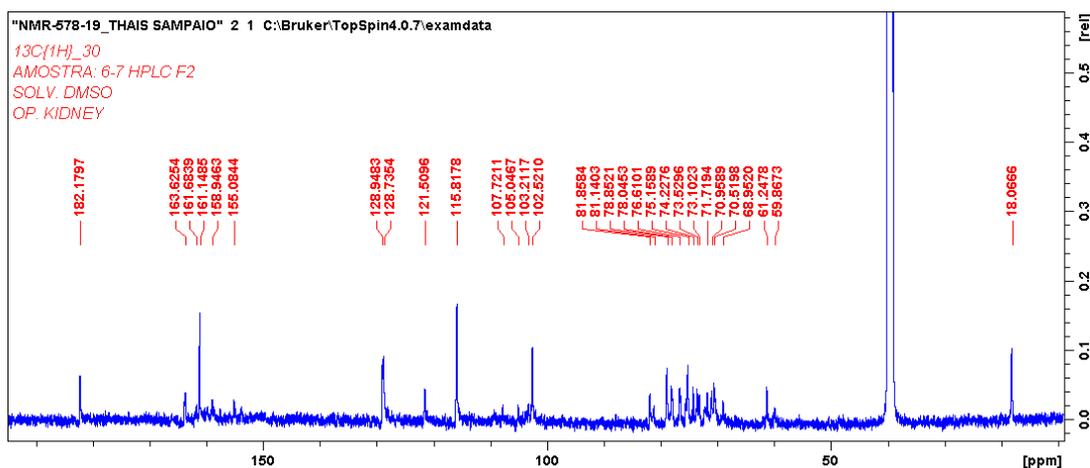


Figura 39. Espectro de carbono-13 da substância SP-F2.

A **Figura 40a** mostra a ampliação na região de campo baixo, entre 182,17 ppm a 102,52. Nessa região foram assinalados os deslocamentos químicos dos carbonos correspondentes à estrutura da aglicona com δ 128,7 (C2', C6'), δ 115,8 (C3', C5') e o carbono desblindado ligado a uma hidroxila em δ 161,1 (C4') no anel B. Foi possível determinar os deslocamentos químicos dos carbonos referentes ao anel C em δ 163,6 (C2) e δ 158,9 (diretamente ligados ao heteroátomo O), bem como os sinais 102,5 ppm (C3) e 103,2 ppm (C10) ligados a uma carbonila e o mais desblindado da estrutura em δ 182,1 (C4), devido a ligação dupla direta com o oxigênio (SILVERSTEIN, 2007). Já na análise envolvendo o anel aromático A foram encontrados os sinais referentes aos carbonos ligados aos açúcares por ligação C-glicosídicas em 105,0 ppm (C8) e 107,7 ppm (C6), e os carbinólicos (C5) em δ 155,0 e δ 161,6 (C7). A ampliação da área do campo alto, na faixa de 18,0 ppm a 81,8 ppm (**Figura 40b**) foram encontrados os sinais dos carbonos pertencentes aos glicosídeos.

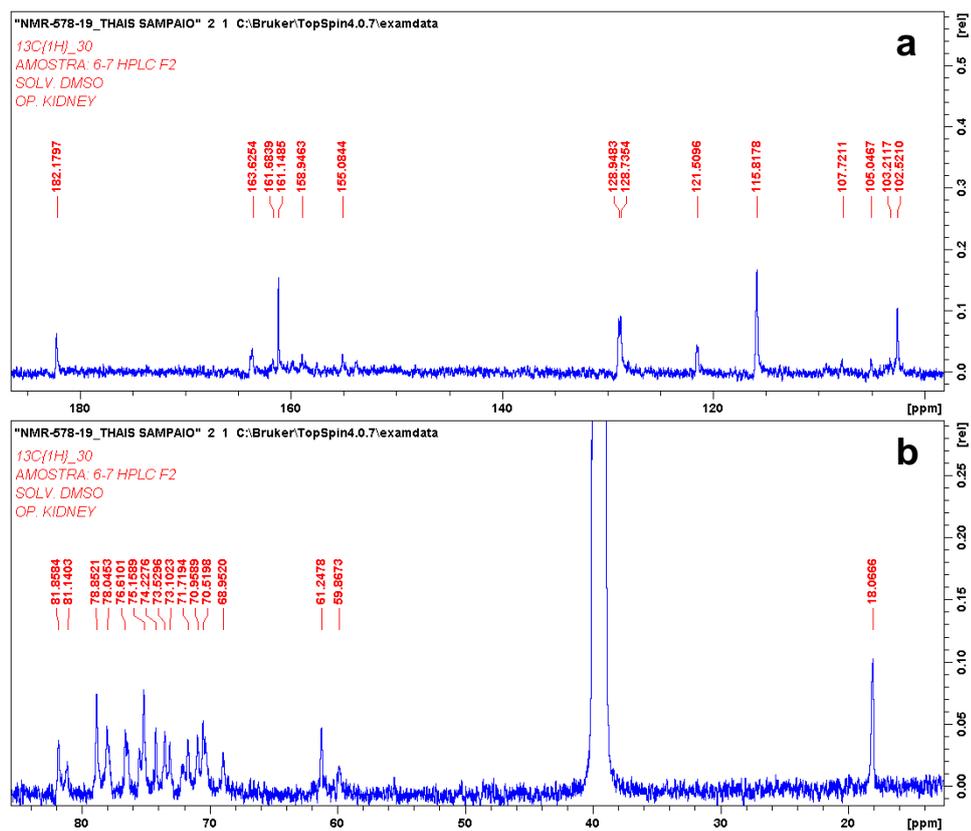


Figura 40. Ampliação do espectro de ^{13}C da substância SP-F2. **a:** Região de campo baixo; **b:** Região de campo alto.

O espectro de DEPT-135 (**Figura 41**) mostrou os onze sinais de carbono metínicos e um sinal de metila (sinais voltados para cima) confirmaram as presenças dos grupos metínicos do anel B em δ 128,7 e δ 115,8 e em δ 102,5 referente ao C3 do anel C. Também foi possível observar a metila característica da α -L-ramnose em δ 18,0. Já o sinal invertido em δ 61,2 evidenciou a presença de um carbono metilênico do outro glicosídeo presente. Os sinais suprimidos do espectro de C^{13} , foram relacionados para os carbonos quaternários, carbinólicos da aglicona.

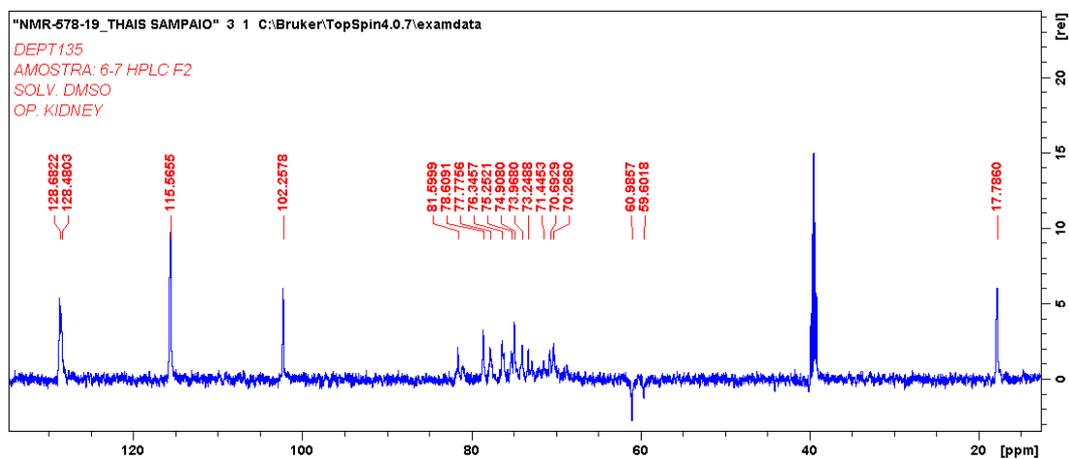


Figura 41. Espectro de DEPT-135 da fração SP-F2.

Na **Tabela 21** estão listados os sinais de ^{13}C atribuídos em cada posição e comparados aos da literatura. Quando comparado com a literatura, os sinais obtidos foram compatíveis para a substância **Violantina (Figura 42)** (VUKICS, 2008).

b) 2D Análises Bidimensionais

O mapa de correlações HSQC geral (**Figura 43**) orientou todos os assinalamentos das ligações ^1H - ^{13}C diretas, permitindo as atribuições dos sinais e apoiando a elucidação estrutural. A **Tabela 22** mostra os resultados das correlações através do ensaio de HSQC encontrados para a **Violantina**.

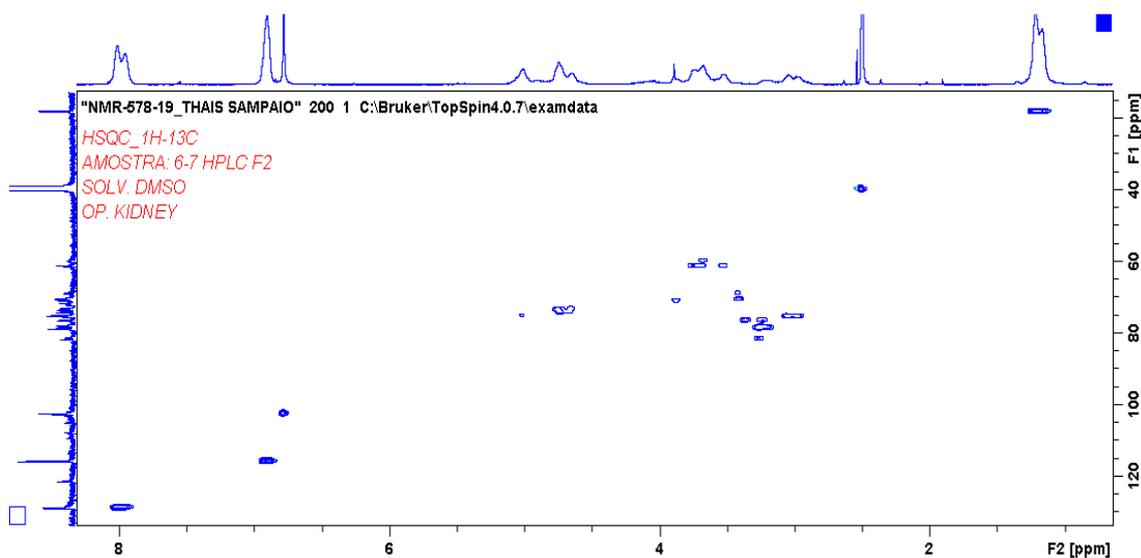


Figura 43. Mapa de correlações HSQC da amostra SP-F2.

Na **Figura 44**, está o mapa de correlações HSQC ampliado na área de campo baixo onde é possível observar os sinais dos H homotópicos do anel B em 7,98 ppm ($\text{H}2'$, $\text{H}6'$) ligados aos carbonos $\text{C}2'$ e $\text{C}6'$ (δ 128,7) e em 6,90 ppm ($\text{H}3'$; $\text{H}5'$) ligados aos carbonos $\text{C}3'$ e $\text{C}5'$ (δ 115,8). Também foi possível ver a ligação direta entre o $\text{H}3$ (δ 6,78) com o $\text{C}3$ (δ 102,5) do anel C da aglicona.

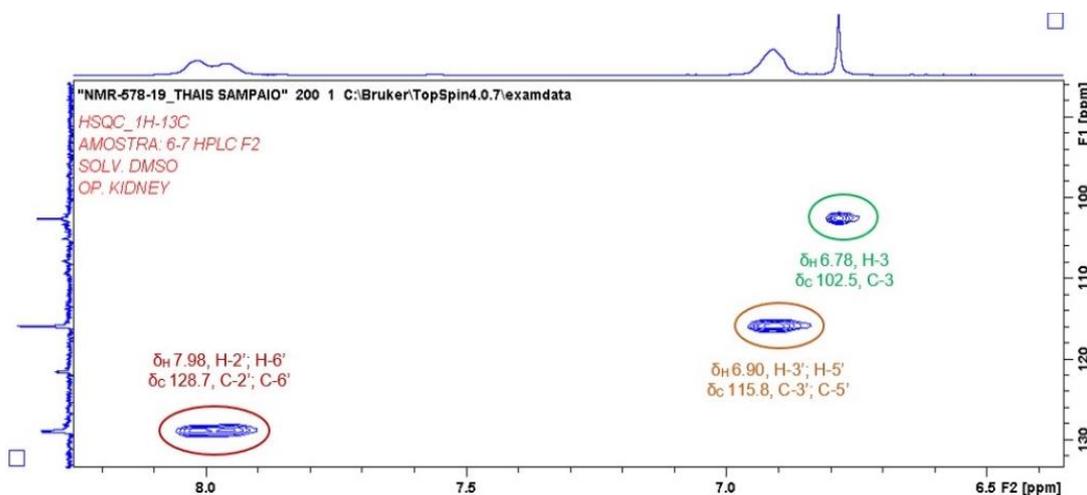


Figura 44. Ampliação (campo baixo) do mapa de correlações HSQC da amostra SP-F2.

A ampliação do mapa na região dos glicosídeos (**Figura 45**) indicou com maior precisão os sinais dos prótons, apoiando o experimento unidimensional (**Figura 44**). Portanto, o acompanhando os núcleos dos hidrogênios circulados no mapa é possível observar as ligações com seus carbonos correspondentes. Foi possível encontrar os hidrogênios anoméricos, com deslocamentos químicos em δ_H 5,01 (H-1''') ligado ao δ_C 75,1 (C-1''') da α -L-ramnose ligada ao C8 do anel A. Já o sinal em e δ_H 4,66 (H1'') ligado com δ_C 73,1 (C-1'') correspondente à β -D-glicose, ligada ao C6 do anel A. Outra correlação importante observada foi a do carbono metilênico da β -D-glicose em δ 61,2 que possui dois hidrogênios diastereotópicos, com deslocamentos em δ 3,70 (C6''a) e δ 3,53 (C6''b) (**Figura 46**).

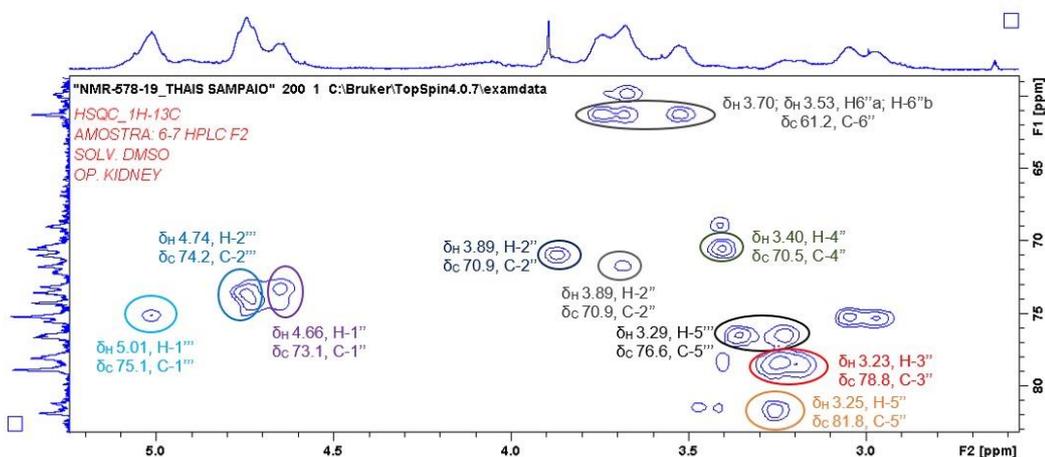


Figura 45. Ampliação (campo alto) do mapa de correlações HSQC da amostra SP-F2.

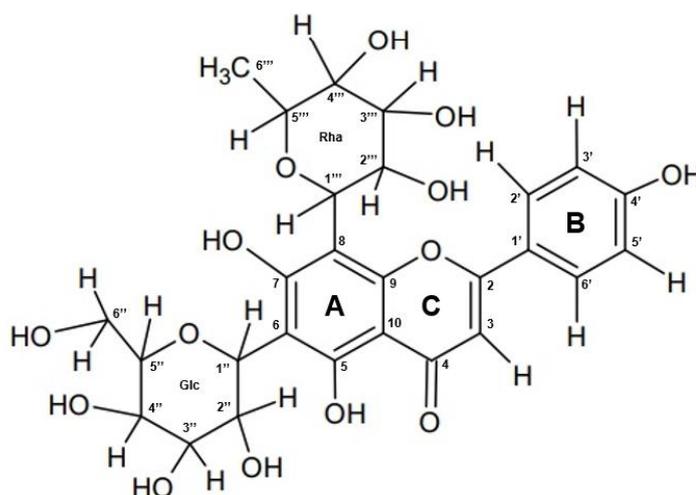


Figura 46. Estrutura da violantina.

A **Figura 47** demonstra a região da correlação dos três hidrogênios homotópicos com o carbono da metila (C6'''), correspondente à α -L-ramnose. Esses ensaios apoiaram fortemente para a proposta estrutural da violantina (6-C-glicosil-8-C-ramnosil apigenina) (VUKICS, 2008).

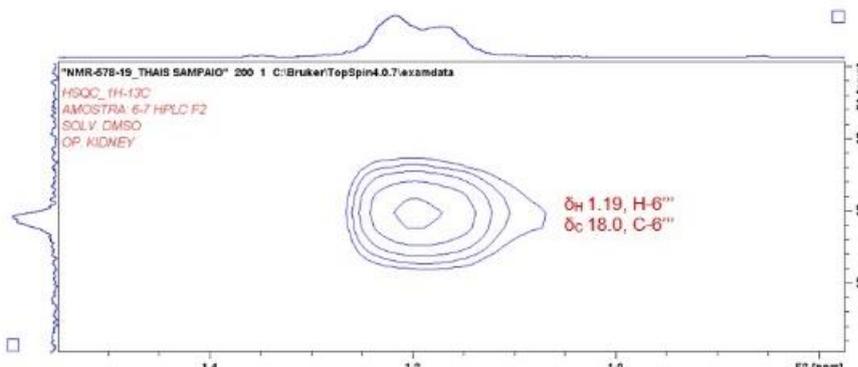


Figura 47. Ampliação do mapa de correlações HSQC da amostra SP-F2 região da metila.

Na **Tabela 22**, estão todos os sinais observados no mapa HSQC, que corroboram com os dados da literatura fortalecendo a elucidação da SP-F2.

Tabela 22. Dados observados no mapa HSQC (amostra SP-F2) e comparados com a literatura.

Dados das correlações HSQC			
HSQC - (VUKICS,2008)		HSQC → SP-F2	
¹ H, ppm	¹³ C, ppm	¹ H, ppm	¹³ C, ppm
7,89 (H2', H6')	128,4 (C2', C6')	7,98	128,7
6,95 (H3', H5')	116,1 (C3', C5')	6,90	115,8
6,78 (H3)	102,5 (C3)	6,78	102,3
β-D-glicosil	—	—	—
4,62 (H1'')	—	4,74	74,2
4,10 (H2'')	—	3,89	70,9
3,20 (H3'')	—	3,23	78,8
3,14 (H4'')	—	3,40	70,5
3,15 (H5'')	82,4 (C5'')	3,25	81,8
3,69 (H6''a)	61,9 (C6'')	3,70	61,2
3,41 (H6''b)	—	3,53	—
α-L-ramnosil	—	—	—
5,23 (H1''')	—	5,01	75,1
3,90 (H2''')	—	4,66	73,1
3,59 (H3''')	—	—	73,5
3,39 (H4''')	71,9 (C4''')	3,68	71,7
3,46 (H5''')	77,2 (C5''')	3,29	76,6
1,26 (H6''')	18,1 (C6''')	1,19	18,0

LEGENDA — SINAIS NÃO ATRIBUÍDOS

O experimento de correlações HMBC, forneceu as informações dos acoplamentos dos hidrogênios com os carbonos vizinhos a distâncias de 2, 3, 4 e 5 ligações (**Figura 48**).

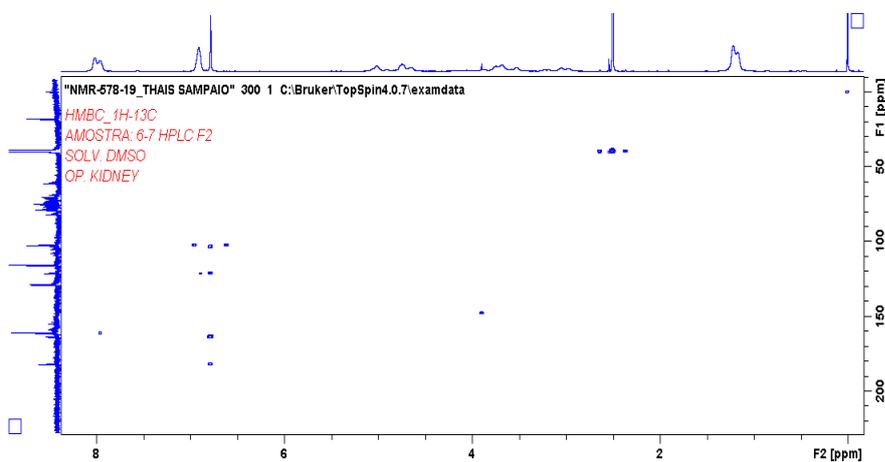


Figura 48. Mapa de correlações HMBC da fração SP-F2.

A ampliação na **Figura 49**, indicou as correlações entre os hidrogênios H2', H3', H5', H6' correlacionando com os carbonos do anel aromático B e o H3 do anel C correlacionando com carbonos dos três anéis da apigenina. A análise desse experimento permitiu assinalar sem dúvidas os deslocamentos dos C7 e C9 (**Tabela 23**).

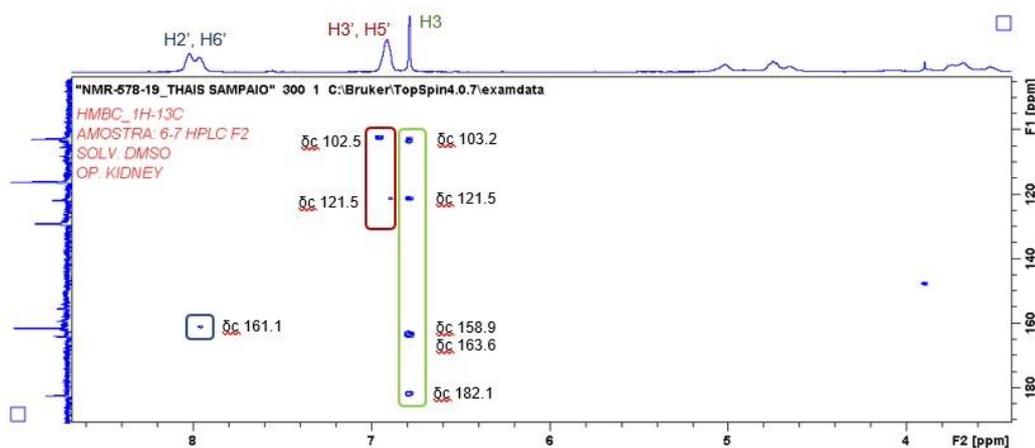
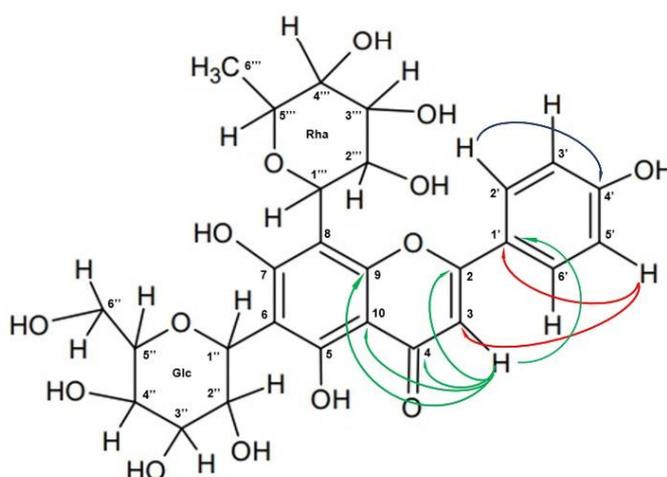


Figura 49. Ampliação do mapa HMBC na região dos aromáticos da fração SP-F2.

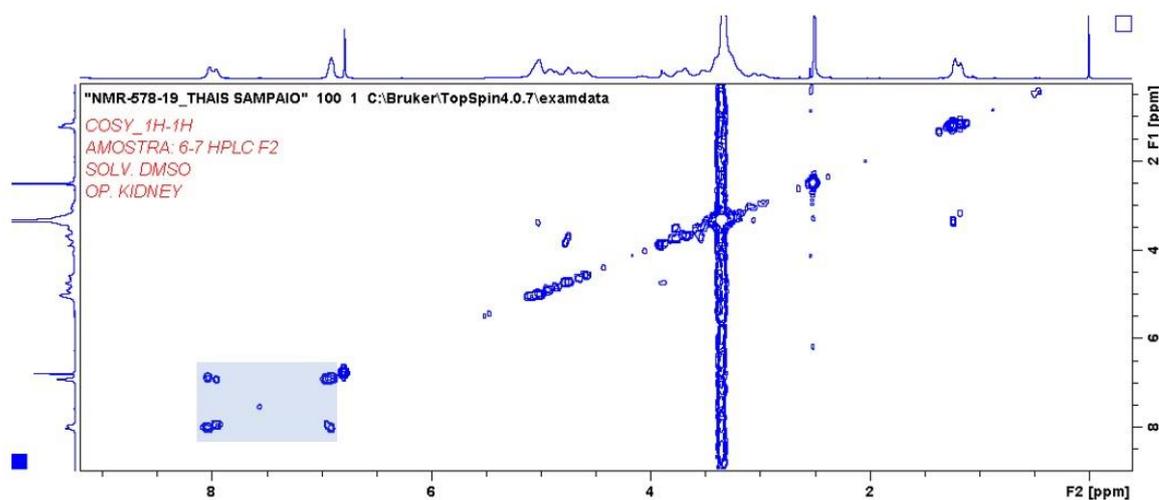
Tabela 23. Correlações encontradas no mapa HMBC da SP-F2

Dados das correlações HMBC da SP-F2	
7,98 (H2', H6')	161,1 (C4')
6,90 (H3', H5')	102,5 (C3); 121,5 (C1')
6,78 (H3)	103,2 (C10); 121,5 (C1'); 158,9 (C9); 163,6 (C2); 182,1 (C4)

A **Figura 50** demonstrou as correlações entre os hidrogênios 3' e 5' do B com o carbono C3 do anel C da aglicona a cinco ligações de distância.

**Figura 50.** Acoplamentos entre hidrogênios e carbonos da vizinhança SP-F2.

O mapa de correlações COSY (**Figura 51**) mostra algumas das correlações ^1H - ^1H presentes na estrutura da violantina. Nesta análise observou-se (destacado no retângulo azul) a correlação entre H2', H6' (δ 7,98) com H3', h5' (δ 6,90).

**Figura 51.** Mapa de correlações (COSY) da amostra SP-F2.

A ampliação do mapa na região dos glicosídeos (**Figuras 52a e 52b**) permitiu assinalar com segurança os deslocamentos químicos dos hidrogênios anoméricos da β -*D*-glicose e da metila da α -*L*-ramnose. A **Figura 52a** demonstra as correlações do hidrogênio anomérico da β -*D*-glicose com vizinhos H2'' e H6'' a três e cinco ligações de distância. Já para a ramnose (**Figura 52b**) foram observadas as correlações entre os hidrogênios da metila da α -*L*-ramnose com o H5''' a quatro ligações de distância. Segundo Agrawal (1992), essas correlações a distância foram observadas para β -*D*-glicose. Não há menção na literatura de correlações a distância para ramnose.

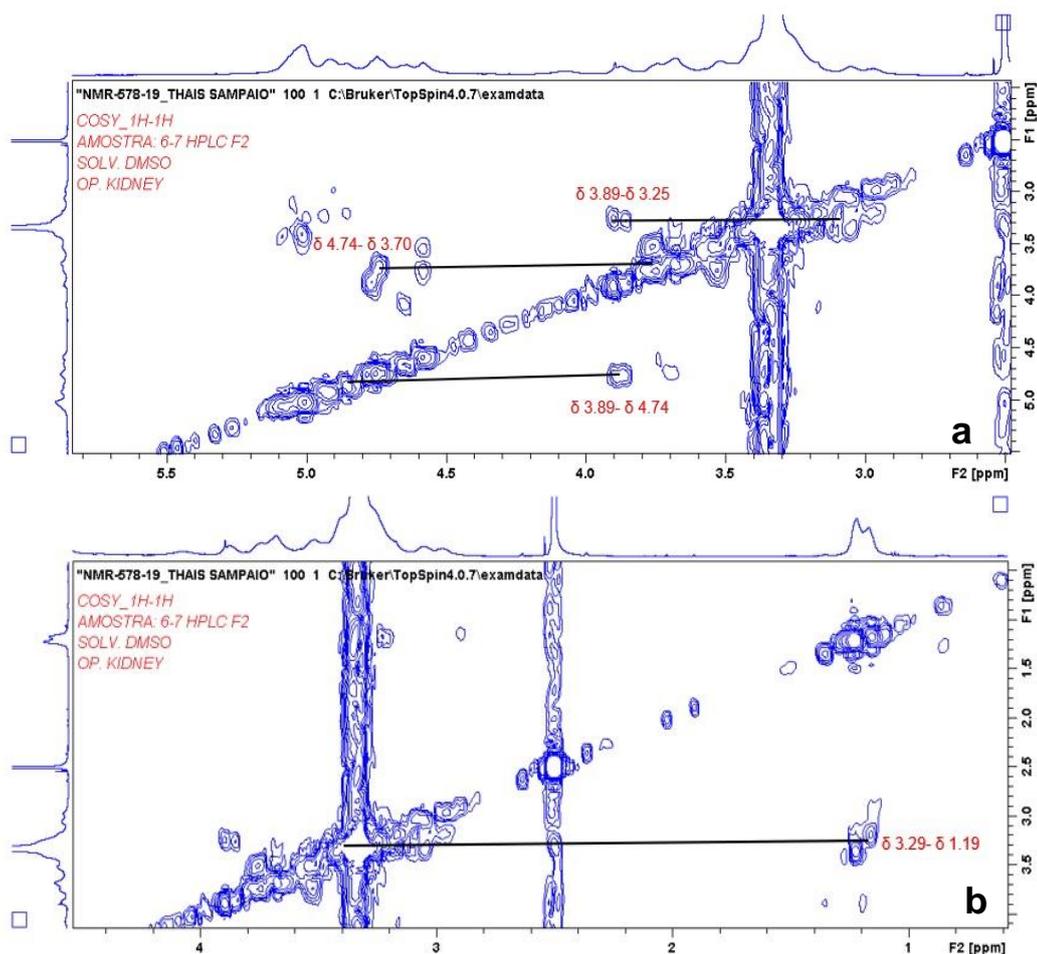


Figura 52. Ampliações do mapa de correlações do COSY. **a:** Região dos açúcares; **b:** Região de metila.

As correlações observadas estão listadas na **Tabela 24** e representadas na estrutura da **Figura 53**.

Tabela 24. Correlações ^1H - ^1H observados para fração SP-F2.

Correlações (COSY) SP-F2	
7,98 (H2', H6')	6,90 (H3', H5')
4,74 (H1'')	3,89 (H2''); 3,70 (H6''a)
3,25 (H5'')	3,89 (H2'')
3,39 (H5''')	1,19 (H6''')

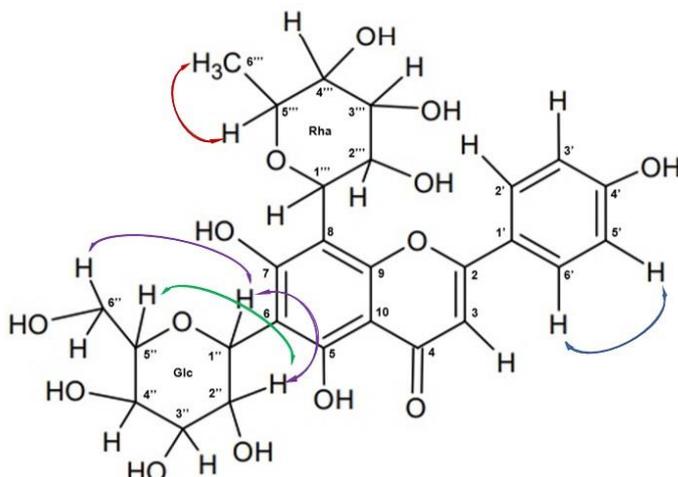


Figura 53. Correlações (COSY) ilustradas na estrutura da violantina.

As reuniões de todos os resultados experimentais forneceram subsídios para a confirmação e determinação estrutural da fração SP-F2. Comparando com os dados da literatura, foi possível determinar a estrutura com o auxílio de análises das técnicas bidimensionais e completar os assinalamentos para os carbonos e hidrogênios da substância 6-C- β -D-glicosil-8- α -L-ramnosilapigenina, mais conhecida como violantina, utilizando como solvente o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) (**Figura 54**) (VUKICS, 2008; AGRAWAL, 1992).

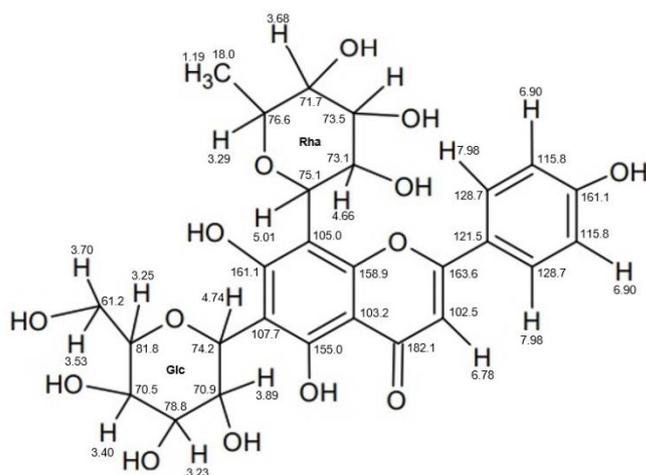


Figura 54. Estrutura da violantina com sinais atribuídos aos elementos correspondentes.

→ Subfração SP-F4 (Isoviolantina)

A fração SP-F4 (12,1 mg), isômero de SP-F2 (violantina), apresentou-se como sólido amorfo, coloração amarela e na análise por CCD apresentou uma mancha com

fluorescência verde (Rf 0,30-0,40; 366 nm) quando revelada em NP-PEG, indicando a presença de um flavonoide. O espectro de UV (**Figura 55**) apresentou duas bandas com as respectivas absorções máximas em 263 nm e 340 nm, próximas das absorções observadas para a Violantina. Segundo Mabry (1970) as absorções apresentadas são características de flavona. De acordo com a análise por CL-EM (**Figura 56**), o analito possui massa de 578 daltons correspondente a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{14}$. Essas análises reforçaram a possibilidade que a amostra se tratava de um flavonoide diglicosilado, possivelmente isômero da violantina com a glicosilação diferente.

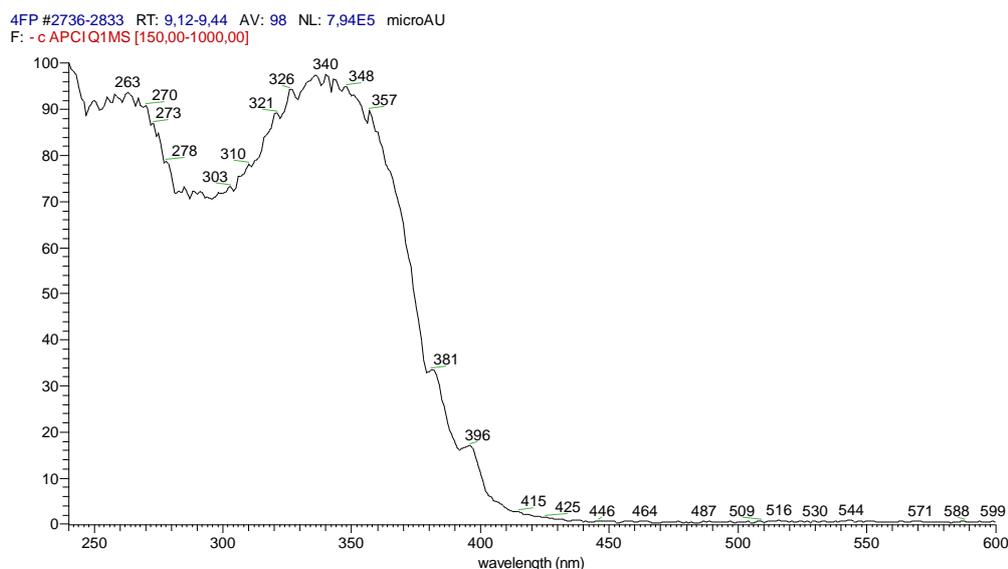


Figura 55. Espectro de UV da fração SP-F4

4FP #1227-1264 RT: 10,27-10,58 AV: 19 NL: 3,33E8
 F: - c APCI Q1MS [150,000-1000,000]

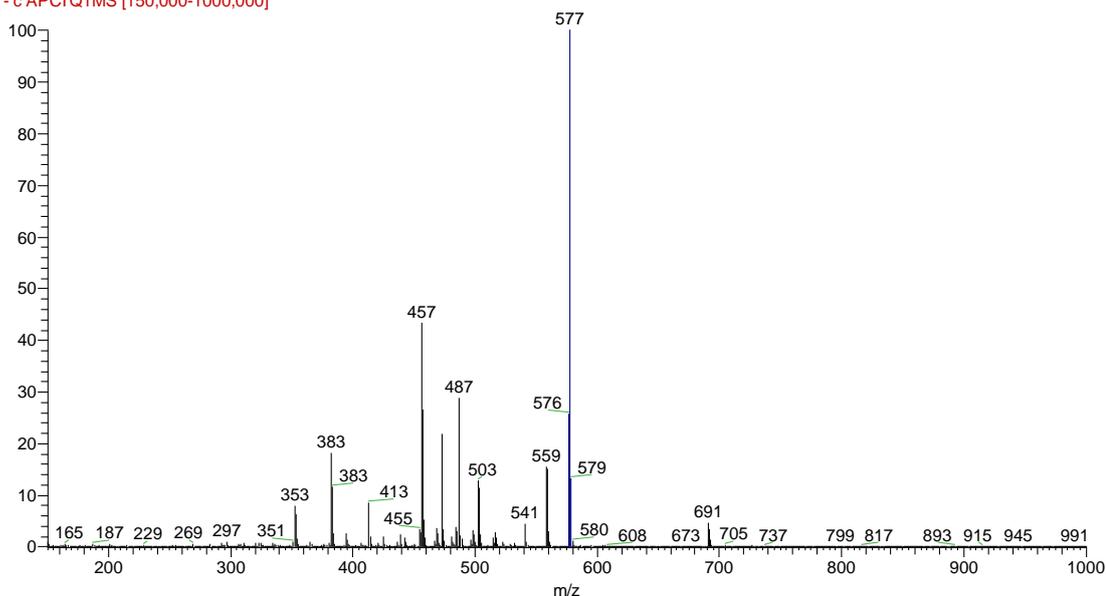


Figura 56. Espectro de CL-EM da amostra SP-F4.

- Ressonância magnética nuclear

a) 1D Análises unidimensionais

A **Figura 57** mostra espectro de RMN ^1H de SP-F4. Foi possível observar sinais na região dos aromáticos, multipletos de carbonos secundário com característica de sinais de açúcares e um sinal no campo alto característico de metila.

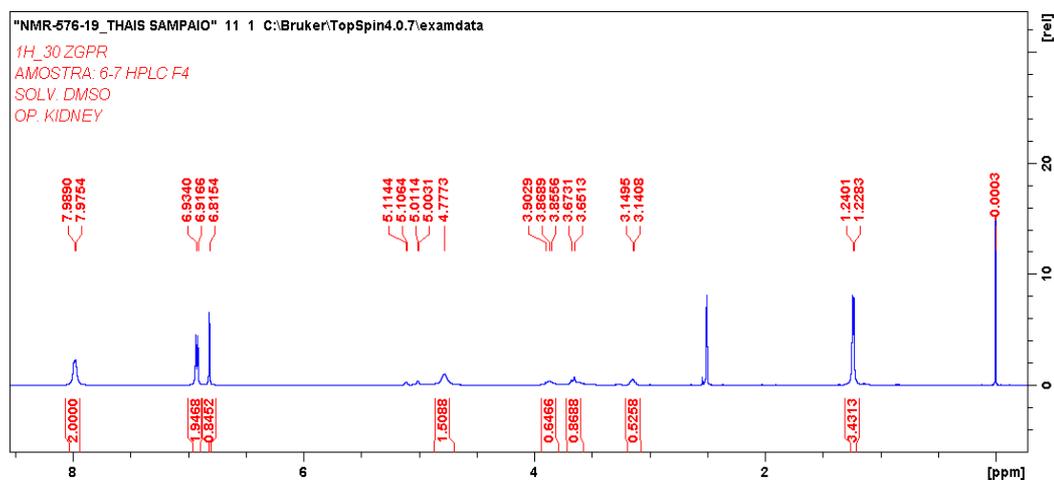


Figura 57. Espectro de RNM ^1H da fração SP-F4.

A ampliação do espectro (**figura 58**) demonstrou a presença de dupletos de hidrogênios homotópicos no anel aromático B com sistema de estrutura AB, e um simpleto com deslocamento químico 6,81 ppm característico de hidrogênio da posição

C3 do anel C da aglicona. Em δ 4,77 foi observado um simpleto largo de um hidrogênio anomérico, pertencente a um dos glicosídeos presentes na estrutura.

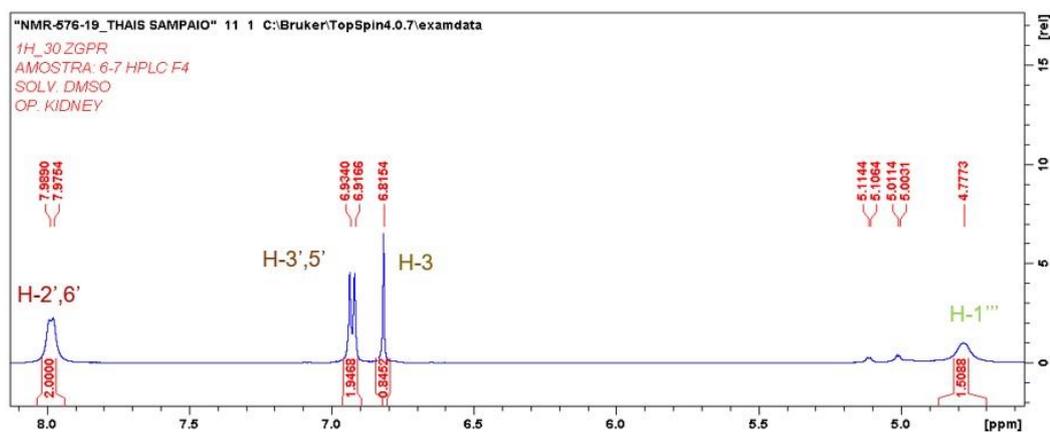


Figura 58. Ampliação na região dos aromáticos e olefínicos (SP-F4).

A ampliação em campo alto do espectro (**Figura 59**, faixa de 4,00-3,00 ppm) foram observados três multipletos, referentes aos C-glicosídeos da molécula e um duplete em 1,23 ppm, indicativo da metila da α -L-ramnose.

Os sinais observados no espectro de ^1H foram registrados e analisados com dados da literatura, a qual norteou para a substância isoviolantina (**Tabela 25**) (**FLAMINI,2007**).

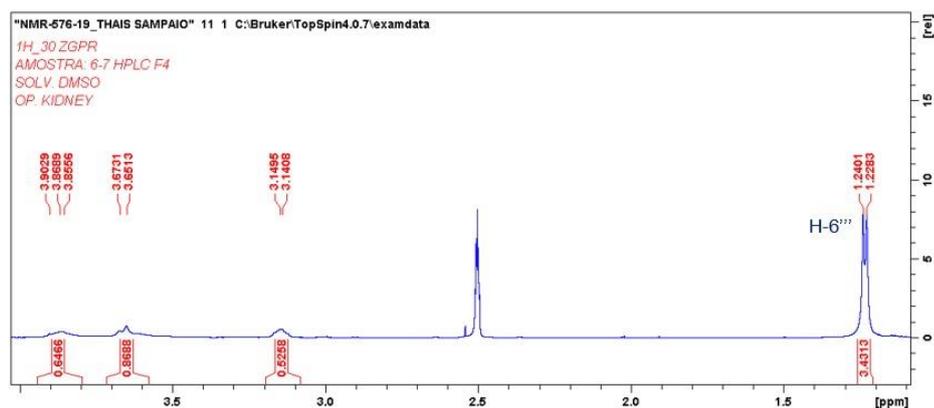


Figura 59. Ampliação na faixa dos açúcares e na região da metila da amostra SP-F4.

Tabela 25. Dados dos sinais emitidos da fração SP-F4.

¹ H (DMSO-d ₆) FLAMINI, 2007			SP-F4, ¹ H (DMSO-d ₆) 500MHz		
¹ H (ppm)	<i>j</i> (Hz)	multiplicidade	¹ H (ppm)	<i>j</i> (Hz)	multiplicidade
7,90 (H2', H6')	8.3	d	7,98 (H2', H6')	6.89	d, 2H
6,93 (H3', H5')	8.3	d	6,92 (H3', H5')	8.61	d, 2H
-		-	6,81 (H3)		s, 1H
4,59	9.8	-	3,86 (H1'')		sl, 1H
-		-	-		-
-		-	3,27 (H3''')		m
-		-	3,32 (H4''')		m
-		-	3,30 (H5''')		m
-		-	3,66 (H6''')		m
5,03		s	4,77 (H1''')		sl
-		-	3,14 (H2''')		m
-		-	-		-
-		-	3,34 (H4''')		m
-		-	-		-
1,26	6.4	d	1,23 (H6''')	5.9	d, 3H

LEGENDA — SINAIS NÃO ATRIBUÍDOS

Observando o espectro de RMN ¹³C de SP-F4 (**Figura 60**) pôde-se observar a semelhança com a violantina. Os sinais do grupo carbonila em 182,2 ppm, dos carbonos vinílicos em 163,6 ppm, pertencentes ao anel C da flavona. Também foram observados os cinco sinais dos carbonos quaternários e três sinais metínicos, relacionados aos anéis aromáticos A e B. Na faixa entre 80,9 ppm e 59,9 ppm foram indicados os carbonos anoméricos, metínicos e metilênico dos dois açúcares. Esses dados também indicaram a presença de uma flavona C-glicosilada. O sinal em 18,0 ppm na metila confirmou a presença do grupo α-L-ramnosil, como um dos açúcares (AGRAWAL, 1992).

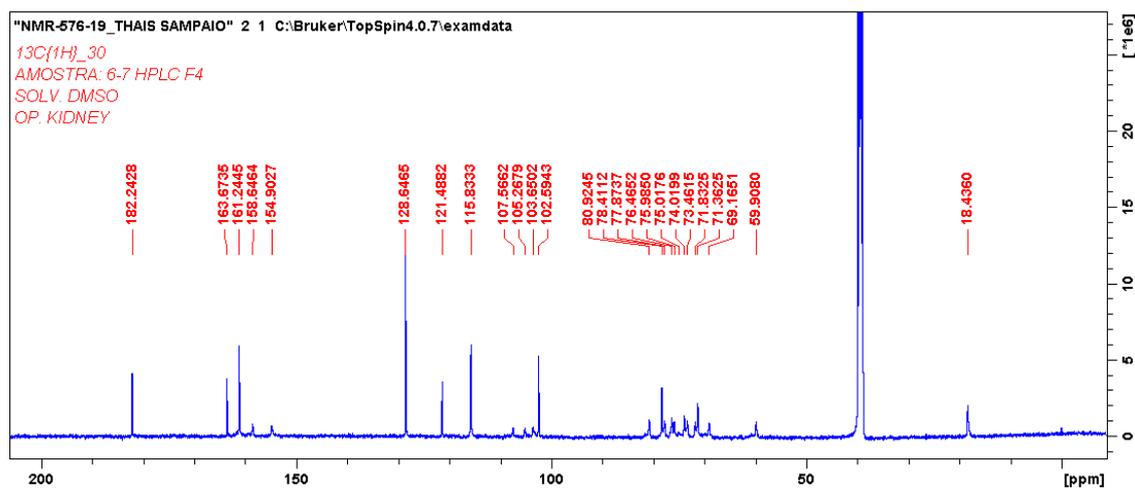


Figura 60. Espectro de ^{13}C da substância da amostra SF-F4.

A Figura 61 mostra ampliação do espectro da região característica da aglicona, entre 182,2 ppm a 102,5. Nessa região foram assinalados os deslocamentos de δ 128,6 (C2', C6'), δ 115,8 (C3', C5') δ e 161,2 (C4') referentes ao anel B. Foi possível determinar os deslocamentos químicos dos carbonos do anel C em δ 163,6 (C2) e δ 158,6 (C9), bem como os sinais 102,5 ppm (C3), 103,6 ppm (C10) e δ 182,1 (C4). Os sinais para os carbonos do anel aromático A foram semelhantes ao da Violantina, indicando a conexão dos açúcares à aglicona por ligações C-glicosídicas em 105,2 ppm (C8) e 107,6 ppm (C6), e os carbinólicos (C5) em δ 147,8 e 154,9 (C7).

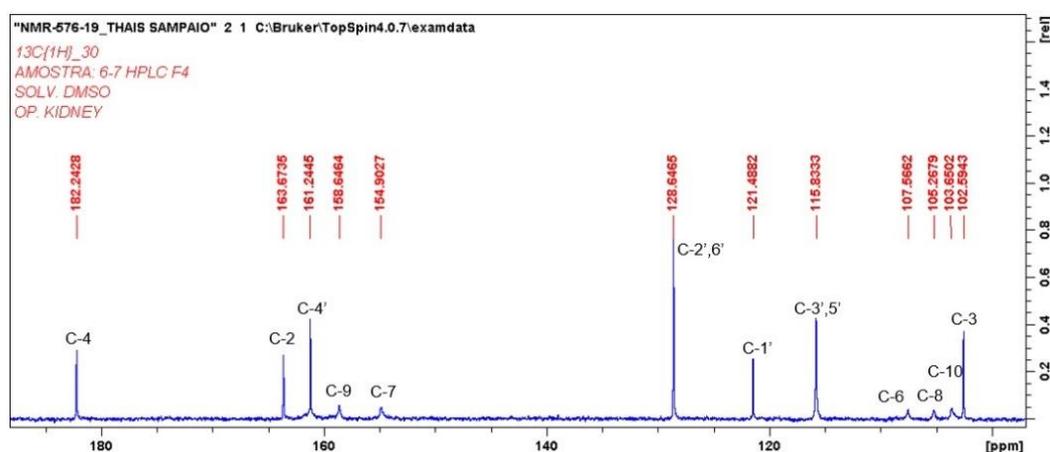


Figura 61. Ampliação da faixa do campo baixo com sinais emitidos da fração SP-F4

Comparando com os dados da Violantina, houve mudanças nos deslocamentos de - 7,2 ppm para C5 e - 6,7 ppm para C7. Comparando esses dados com a literatura a diferença no deslocamento químico foi de - 6,9 ppm para C5 e - 1,1 ppm para C7. Esta observação parece indicar um efeito de proteção relacionado à inversão das posições dos ligantes à aglicona (FLAMINI, 2007; VUKICS, 2008).

A ampliação da área do campo alto, na faixa de 18,4 ppm a 80,9 ppm (**Figura 62**) foram encontrados os sinais dos carbonos pertencentes aos açúcares glicose e ramnose.

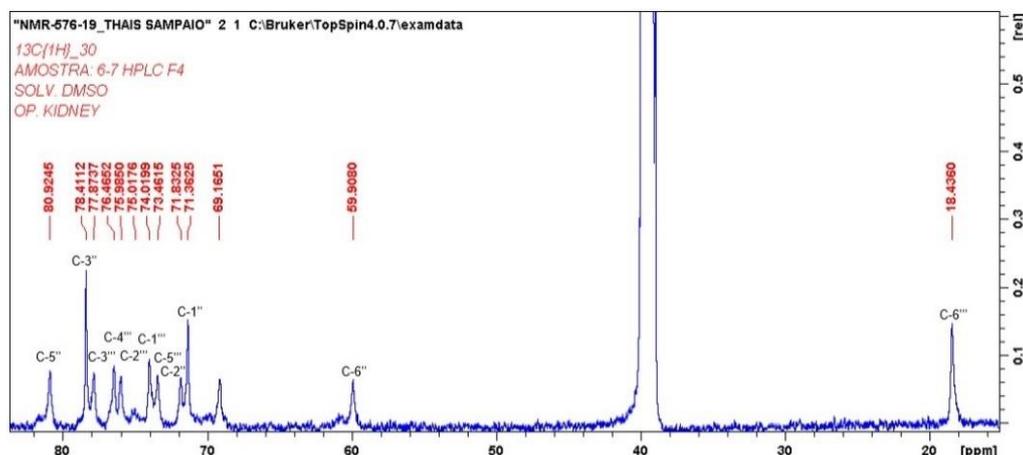


Figura 62. Ampliação da faixa do campo alto com sinais emitidos da fração SP-F4

O espectro de DEPT-135 (**Figura 63**) também mostrou os onze sinais de carbono metínicos e um sinal de metila e um de metileno. Os deslocamentos dos grupos metínicos do anel B foram em δ 128,6 e δ 115,8 e em δ 102,5 referente ao C3 do anel C. Também foi possível observar a metila característica da α -L-ramnose em δ 18,4. Já o deslocamento do carbono metilênico ocorreu em δ 59,9, referente ao C6'' glicose.

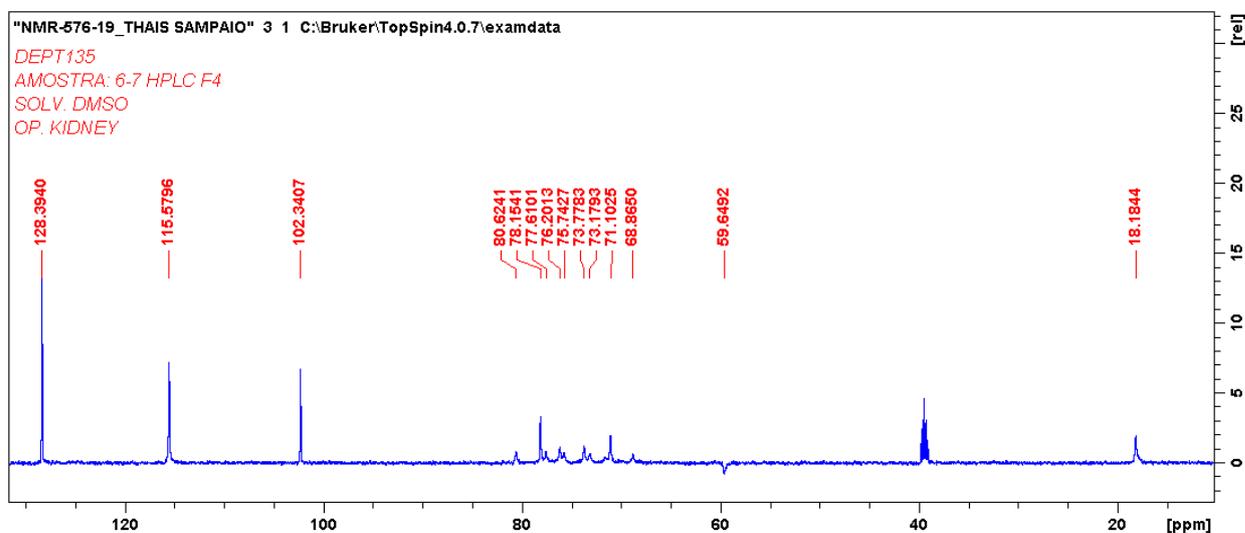


Figura 63. Espectro de DEPT-135 gerado da amostra SP-F4.

Na **Tabela 26** estão listados os sinais de ^{13}C atribuídos em cada posição da estrutura de SP-F4. Quando comparado com a literatura, os sinais obtidos foram compatíveis para o isômero **Isoviolantina** (**Figura 64**) (FLAMINI, 2007).

Tabela 26. Registro dos sinais da amostra SP-F4 e comparados com os dados da literatura.

¹³ C (DMSO-d-6) 125MHz			
Posição	FLAMINI,2007	SP-F4	
	ppm	ppm	DEPT-135
C4	182,6	182,2	C
C2	163,4	163,6	C
C4'	160,3	161,2	C
C9	161,3	158,6	C
C7	162,3	154,9	C
C5	153,0	147,8	C
C2', C6'	128,6	128,6	CH
C1'	121,3	121,4	C
C3', C5'	116,1	115,8	CH
C6	109,1	107,5	C
C8	103,2	105,2	C
C10	102,5	103,6	C
C3	102,8	102,5	CH
C5''	81,7	80,9	CH
C3''	79,0	78,4	CH
C3'''	74,2	77,8	CH
C4'''	72,4	76,4	CH
C2'''	75,1	75,9	CH
C1'''	77,3	74,0	CH
C5''''	71,8	73,4	CH
C2''	70,8	71,8	CH
C1''	74,2	71,3	CH
C4''	70,1	69,1	CH
C6''	61,6	59,9	CH ₂
C6''''	18,2	18,4	CH ₃

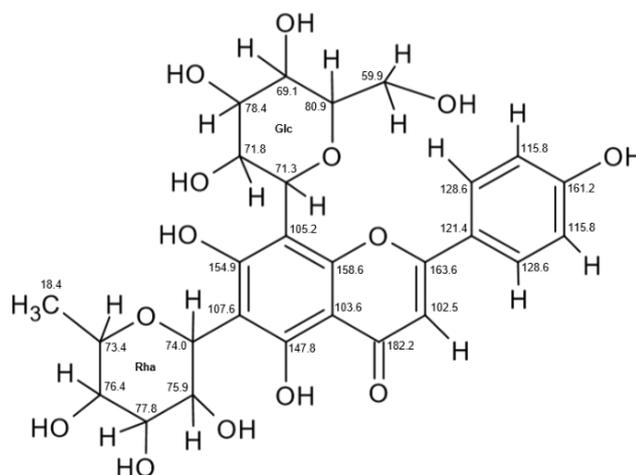


Figura 64. Estrutura da isoviolantina com os sinais de carbono atribuídos.

b) 2D (Análises bidimensionais)

O mapa de correlações HSQC **Figura 65** permitiu observar as correlações das ligações ^1H - ^{13}C diretas. Foi possível atribuir os sinais, que apoiaram a elucidação estrutural da isoviolantina. A **Tabela 27** mostra os resultados das correlações através do ensaio de HSQC encontrados para a **Isoviolantina**.

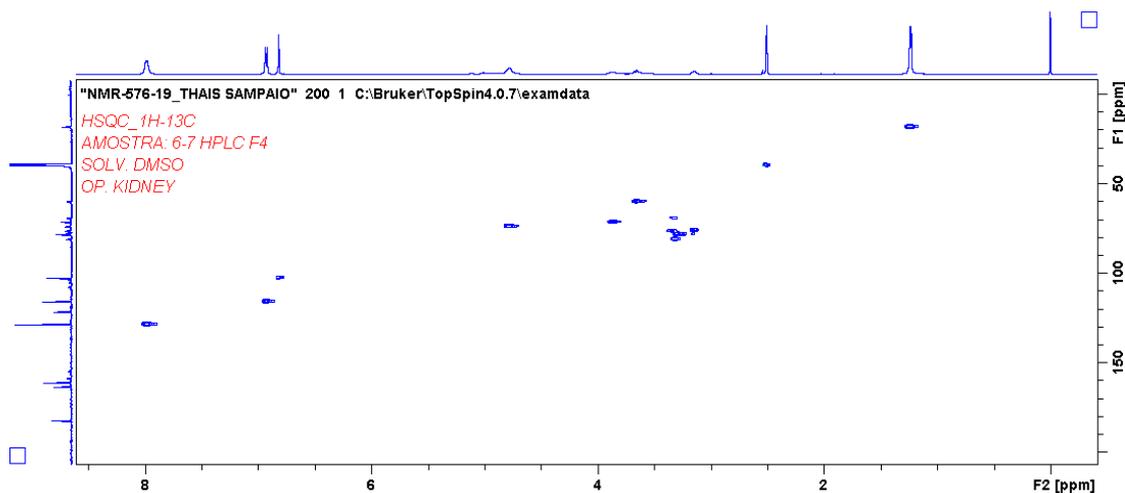


Figura 65. Mapa de correlações HSQC da substância presente na amostra SP-F4.

O mapa de correlações HSQC ampliado (**Figura 66a**) mostra os sinais em 7,98 ppm ($\text{H}2'$, $\text{H}6'$) ligados aos carbonos $\text{C}2'$ e $\text{C}6'$ (δ 128,6) e em 6,92 ppm ($\text{H}3'$; $\text{H}5'$) ligados aos carbonos $\text{C}3'$ e $\text{C}5'$ (δ 115,8) do anel B. Além disso, observou-se a ligação entre o $\text{H}3$ (δ 6,81) com o $\text{C}3$ (δ 102,5) do anel C da aglicona.

A região dos glicosídeos (**Figura 66b**) demonstra de maneira clara os sinais dos prótons correlacionados com os carbonos. Foram assinalados os hidrogênios anoméricos, com deslocamentos químicos em δ_H 4,77 (H-1''') ligado ao δ_C 74,0 (C-1''') da α -L-ramnose ligada ao C6 do anel A. Já o sinal em δ_H 3,86 (H-1'') ligado com δ_C 71,3 (C-1'') correspondeu à β -D-glicose, ligada ao C8 do anel A. O sinal referente ao carbono metilênico da β -D-glicose deslocou em δ 59,9, correlacionando na região do RMN 1H com δ 3,66 (H-6''). O carbono metílico da ramnose (C6''') em 18,4 ppm correlacionou com o sinal na região do próton em 1,23 ppm (**Figura 67**).

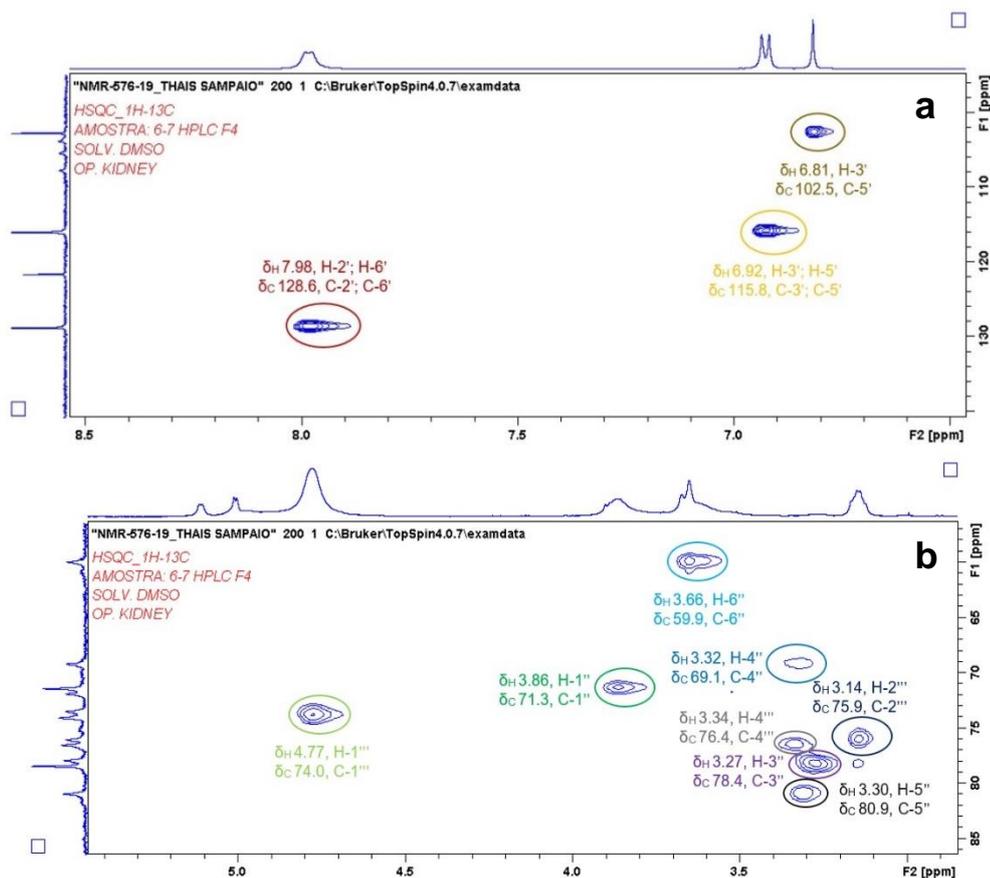


Figura 66. Ampliações do mapa de correlações do HSQC. **a:** Região dos aromáticos e olefínicos; **b:** Região dos açúcares.

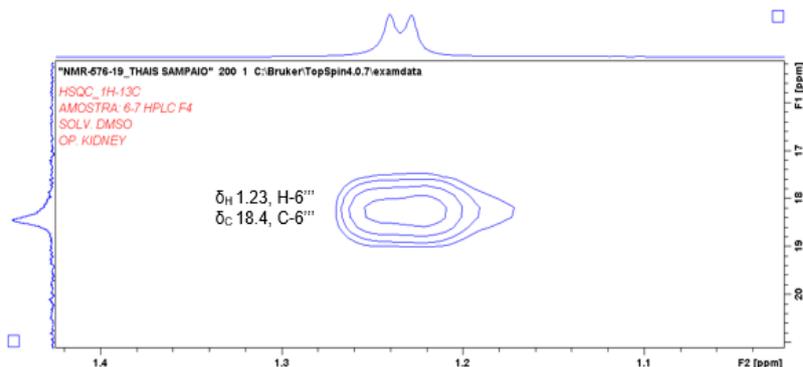


Figura 67. Ampliação do mapa de correlações do HSQC na região da metila da ramnose

A **Tabela 27** mostra as correlações obtidas para a amostra SP-F4 comparadas com a literatura. Esses dados apoiaram a identificação da Isoviolantina (6-C-ramnosil-8-C-glicosilapigenina) (**Figura 68**) (FLAMINI, 2007).

Tabela 27. Dados obtidos das correlações HSQC e comparados com a literatura.

HSQC - (FLAMINI, 2007)		HSQC → SP-F4	
¹ H, ppm	¹³ C, ppm	¹ H, ppm	¹³ C, ppm
7,9	128,6	7,98 (H2', H6')	128,6
6,93	116,1	6,92 (H3', H5')	115,8
6,82	102,8	6,81 (H3)	102,5
<i>β</i> -D-glicosil			
4,59	74,2	3,86 (H1'')	71,3
–	70,8	–	–
–	79,0	3,27 (H3'')	78,4
–	70,1	3,32 (H4'')	69,1
–	81,7	3,30 (H5'')	80,9
–	61,6	3,66 (H6'')	59,9
<i>α</i> -L-ramnose			
5,03	77,3	4,77 (H1''')	74,0
–	75,1	3,14 (H2''')	75,9
–	74,2	–	–
–	72,4	3,34(H4''')	76,4
–	71,8	–	–
1,26	18,2	1,23 (H6''')	18,4

LEGENDA — SINAIS NÃO ATRIBUÍDOS

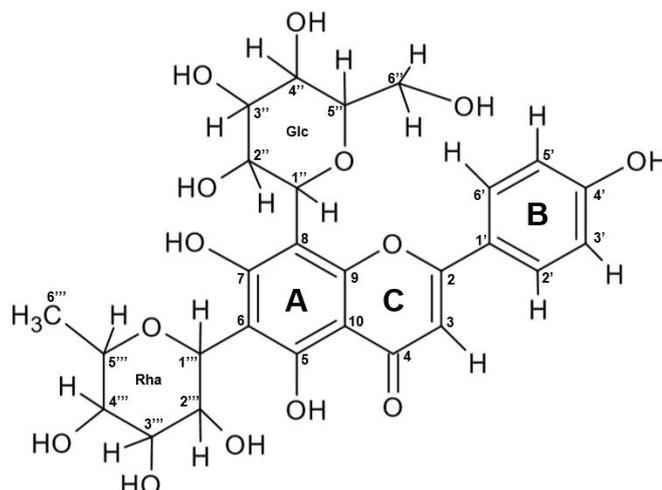


Figura 68. Estrutura da isoviolanina, substância proposta na análise.

O experimento de correlações HMBC (**Figura 69, Tabela 28**), forneceu as seguintes informações: correlações entre os hidrogênios H2', H3', H5', H6' correlacionando com os carbonos do anel B aromático; H3 do anel C com carbonos dos três anéis da apigenina (C4, C10, C2 e C1') **Figura 70a**. Para a ramnose foi possível observar as correlações: H2''' com os carbonos C3''' e C6''' e H6''' com C4''' **Figura 70b**.

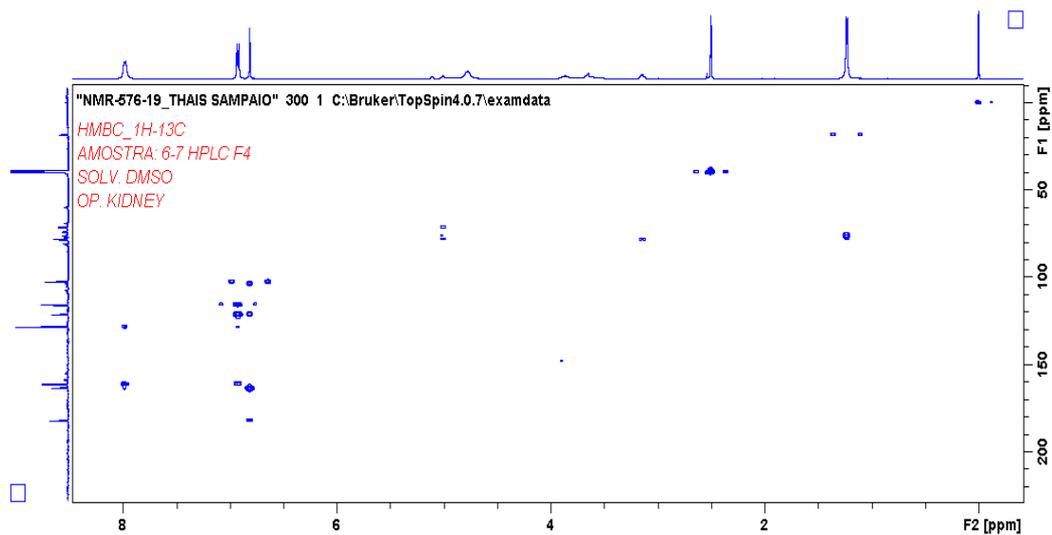


Figura 69. Mapa de correlações HMBC da amostra SP-F4

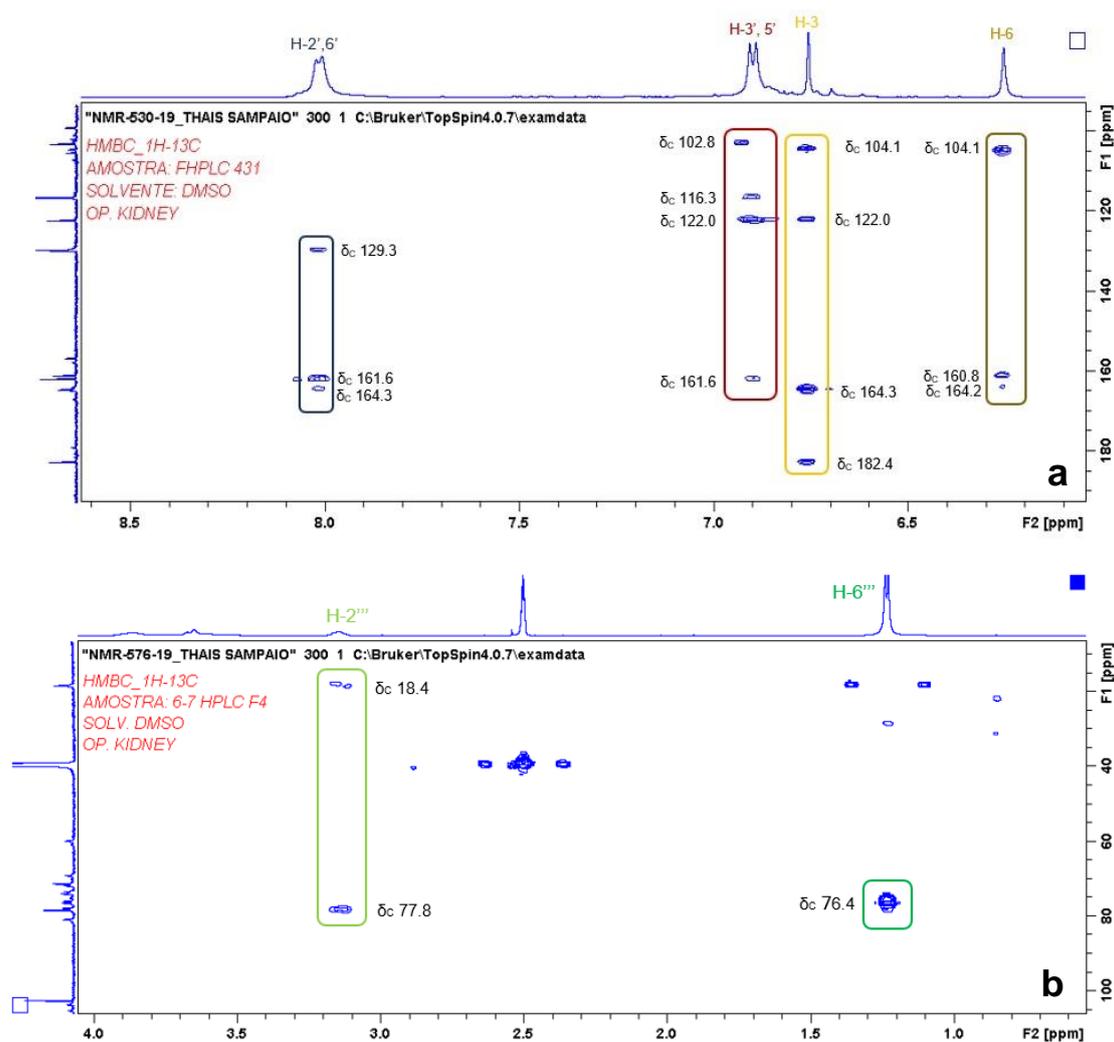


Figura 70. Ampliações do mapa de correlação do HMBC da substância SP-F4. **a:** Região do campo baixo; **b:** Região do campo alto

Tabela 28. Correlações observadas para a fração SP-F4.

Correlações HMBC → SP-F4	
7,98 (H2', H6')	128,6 (C2', C6'); 161,2 (C4'); 163,6 (C2)
6,92 (H3', H5')	115,8 (C3', C5'); 121,4 (C1'); 128,6 (C2', C6'); 161,2 (C4')
6,81 (H3)	103,6 (C10); 121,4 (C1'); 163,6 (C2); 182,2 (C4)
3,14 (H2''')	77,8 (C3'''); 18,8 (C6''')
1,23 (H6''')	76,4 (C4''')

Na **Figura 71** está a ilustração das interações entre os núcleos de ^1H com os de carbono na estrutura.

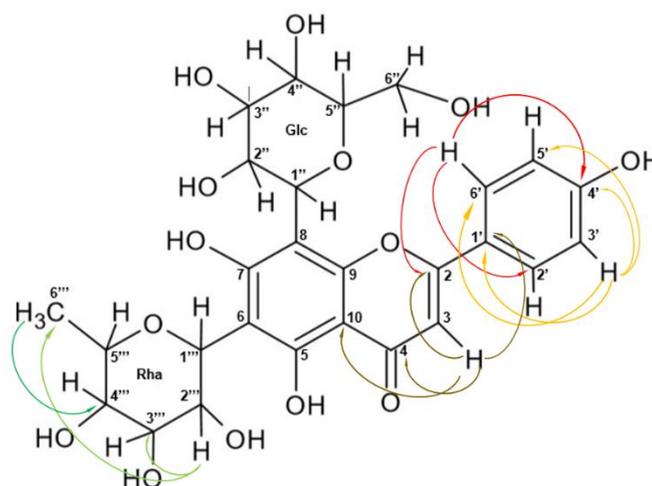


Figura 71. Demonstração das correlações observadas para a amostra SP-F4.

O mapa de correlações COSY (**Figura 72**) demonstrou correlações ^1H - ^1H presentes na estrutura da isoviolantina. Foram observadas (destacadas no retângulo azul) as correlações entre $\text{H}2'$, $\text{H}6'$ (δ 7.98) com $\text{H}3'$, $\text{H}5'$ (δ 6.92).

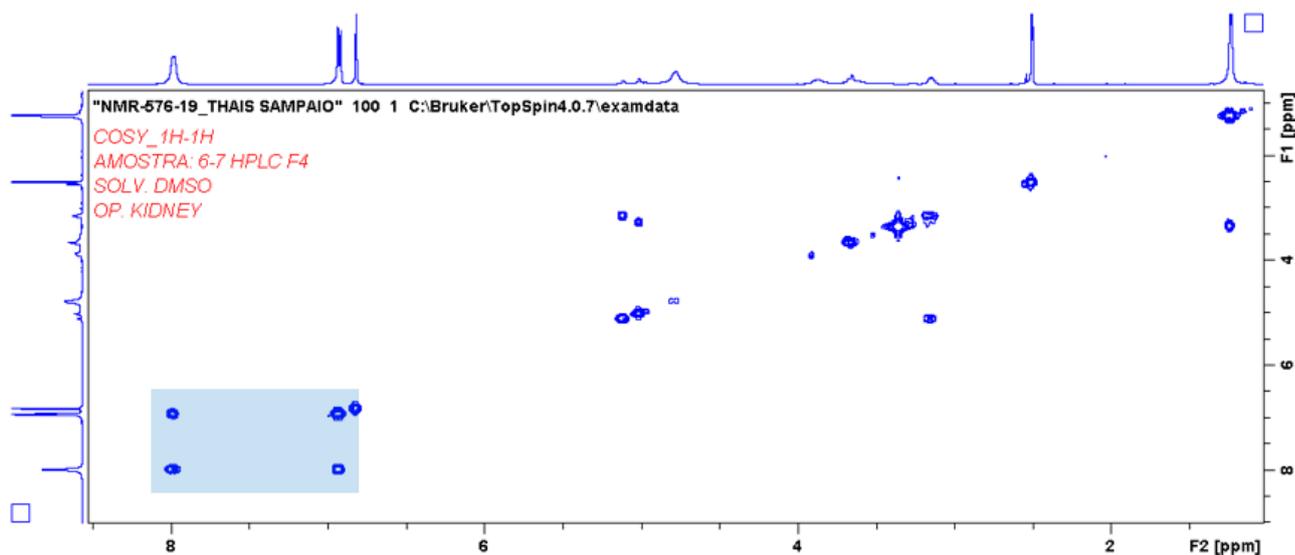


Figura 72. Mapa de correlações COSY gerado da análise da amostra SP-F4.

O mapa na região dos açúcares (**Figuras 73**) forneceu os dados para assinalamento dos deslocamentos químicos dos hidrogênios anoméricos da β -D-glicose e da metila da α -L-ramnose. A **Figura 73a** mostrou as seguintes correlações:

H1 anomérico da β -D-glicose com H3''; H6'' com H4''. Para a ramnose (**Figura 73b**) foram observadas as correlações entre os hidrogênios da metila com H4'''.

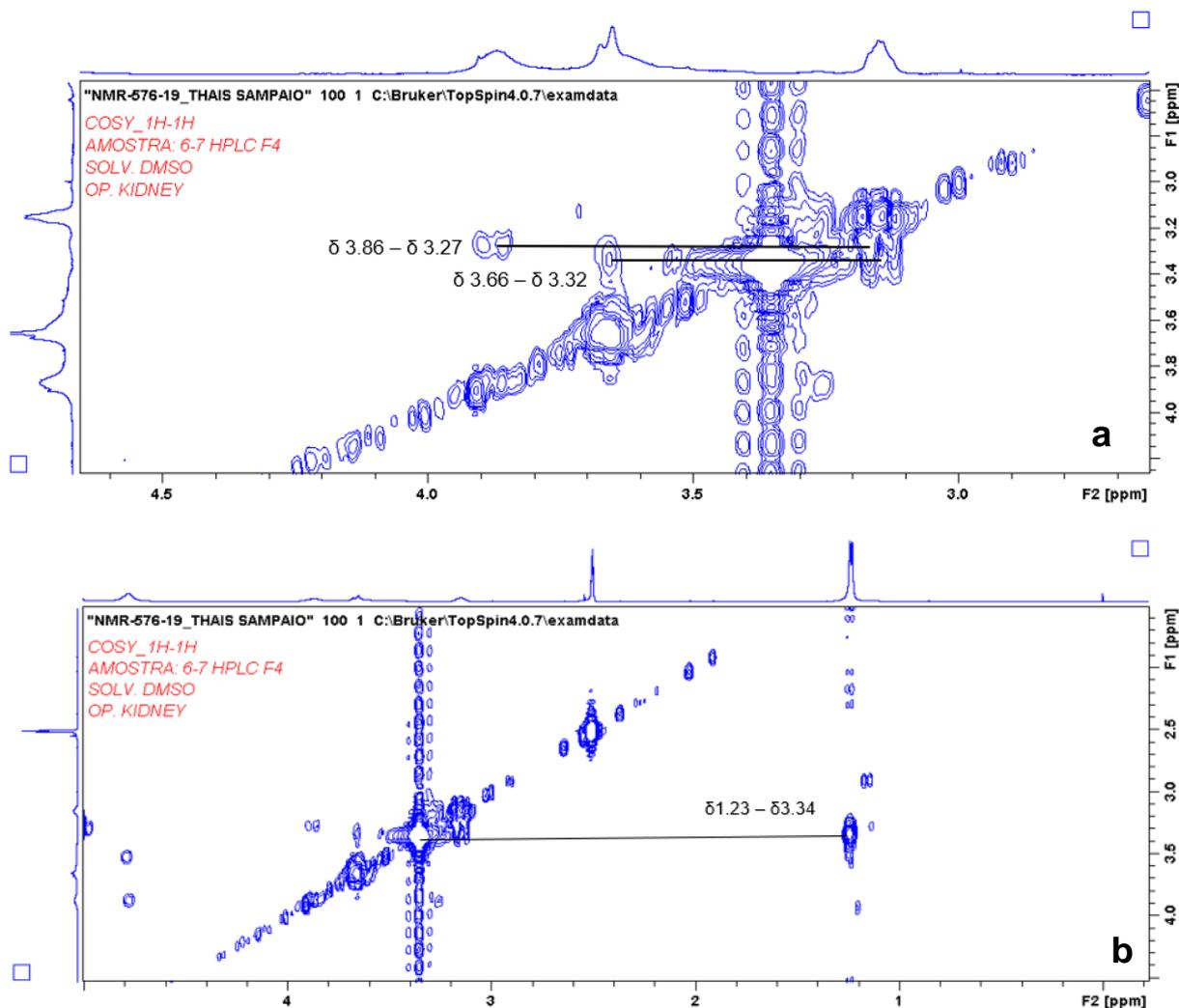


Figura 73. Aplicações do mapa de correlações do COSY. **a:** Sinais dos açúcares; **b:** Sinais da metila

As correlações observadas estão listadas na **Tabela 29** e representadas na estrutura da **Figura 72**.

Tabela 29: Interações COSY observadas para SP-F4.

Correlações-COSY → SP-F4	
7.98 (H2', H6')	6.92 (H3', H5')
3.86 (H1'')	3.27 (H3'')
3.66 (H6'')	3.32 (H4'')
3.34 (H4''')	1.23 (H6''')

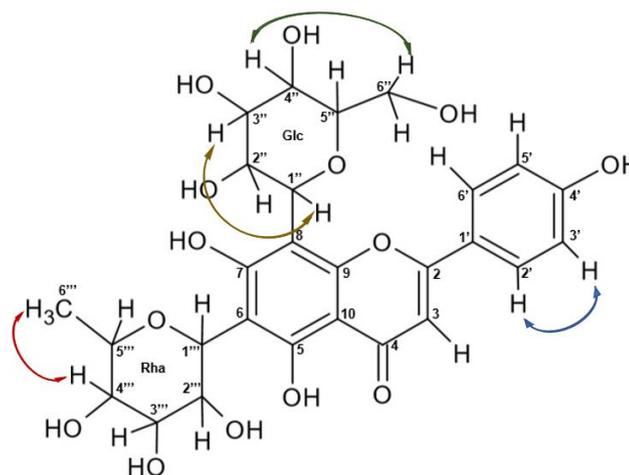


Figura 74. Demonstração das correlações internucleares de hidrogênio na amostra SP-F4.

Esses resultados apontaram para a identificação da isoviolantina, isômero da violantina, presente na amostra SP-F4 (**Figura 75**) (FLAMINI, 2007; AGRAWAL, 1992).

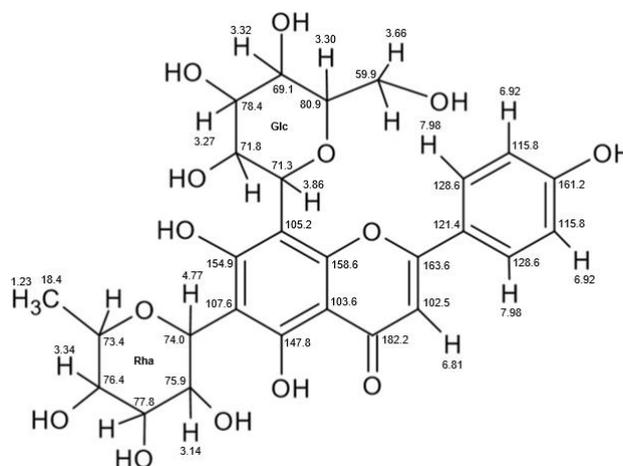


Figura 75. Estrutura da isoviolantina com os sinais atribuídos nos respectivos elementos.

→ Análise da Subfração SP-431.1

A fração SP-431.1 (12 mg) mostrou-se como sólido amorfo, coloração amarela e na análise por CCD apresentou uma mancha com fluorescência amarela (R_f 0,70-0,76; 366 nm) quando revelada em NP-PEG, indicando tratar-se de um flavonoide. O espectro de UV (**Figura 76**) apresentou duas bandas com as respectivas absorções máximas em 264 nm e 335 nm que segundo Mabry (1970) as absorções apresentadas são características de flavona. A análise por CL-EM (**Figura 77**) evidenciou que o analito possui massa de 432 daltons correspondente a fórmula molecular $C_{21}H_{18}O_{10}$.

Essas análises evidenciaram a possibilidade que a amostra se trata de um flavonoide glicosilado derivado de uma apigenina.

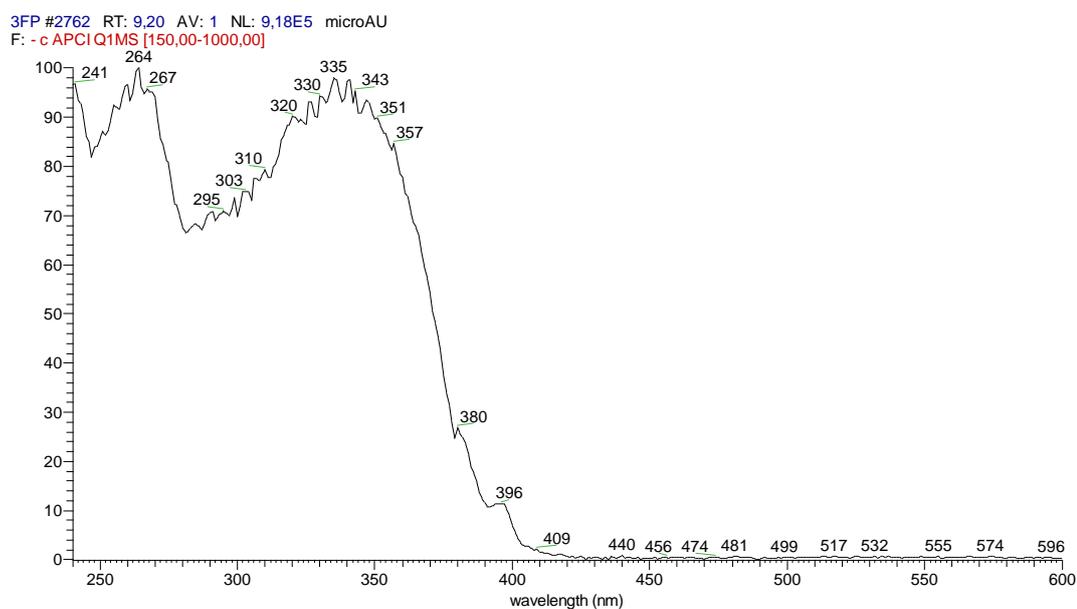


Figura 76. Espectro de UV gerado da fração SP-431.1

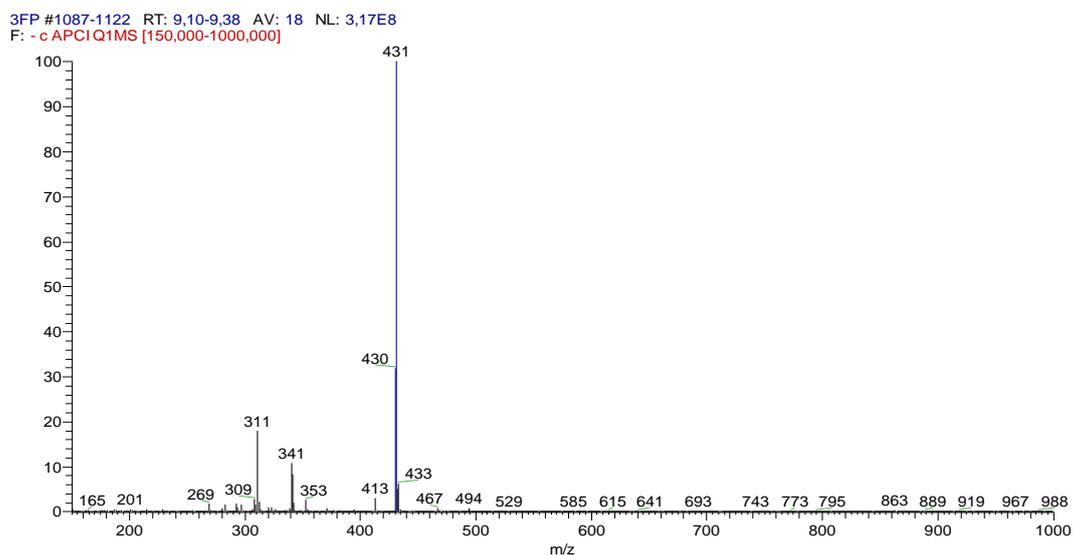


Figura 77. Espectro de CL-EM gerado da amostra SP-431.1

- Ressonância magnética nuclear

a) 1D (Análises unidimensionais)

No espectro de RMN ^1H (**Figura 78**) estão sinais emitidos da substância SP-431.1. Foram observados sinais na região dos aromáticos e multipletos de carbonos secundário característicos de açúcares

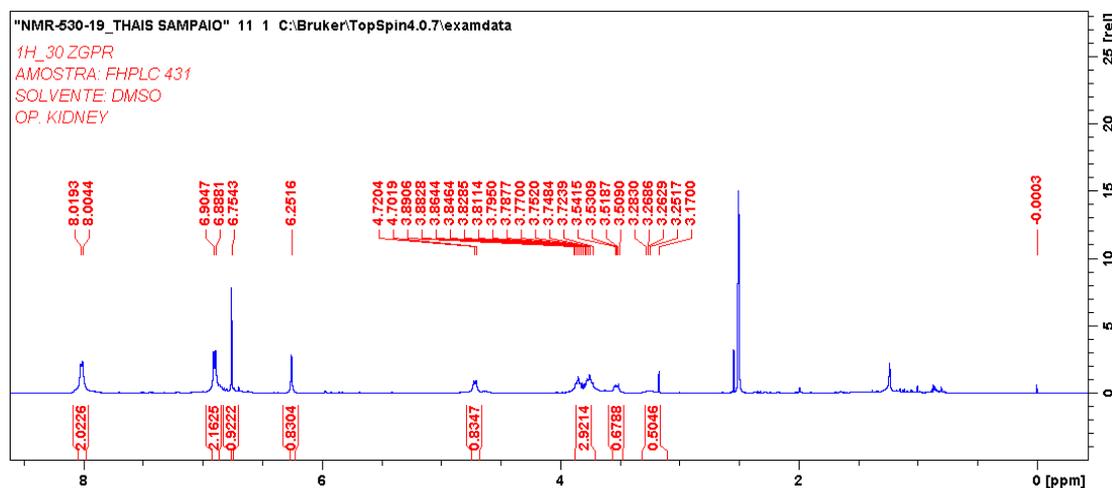


Figura 78. Espectro de RMN ^1H da fração SP-431.1.

Na **Figura 79** estão as ampliações do espectro anterior. Estão presentes na região dos aromáticos dois dupletos em δ 8,01 (d, $J = 7,3\text{Hz}$, 2H, H-2' e H6') e δ 6,69 (d, $J = 8,3\text{Hz}$, 2H, H-3' e H-5') presentes no anel B de sistema AB. Um simpleto apareceu em 6,75 ppm (H-3) indicando o hidrogênio vinílico presente no anel C da flavona e outro simpleto foi observado em 6,25 ppm (H-6) pertencente ao anel aromático A (**Figura 79a**). Na ampliação da faixa dos açúcares (**Figura 79b**) está o sinal do H anomérico em δ 4.71 (d, $J = 8,7$; 1H), os multipletos entre 3,89-3,72 ppm referentes aos hidrogênios H-2'' e H-6''a, um duplo duplete em 3,52 ppm indicando o H-6''b e outra faixa entre 3,28-3,17 ppm apontando H-3'' e H-5''. Estes dados unidos às informações extraídas da análise por CL-EM informam que a aglicona encontra-se monossubstituída por um glicosídeo (AGRAWAL, 1992).

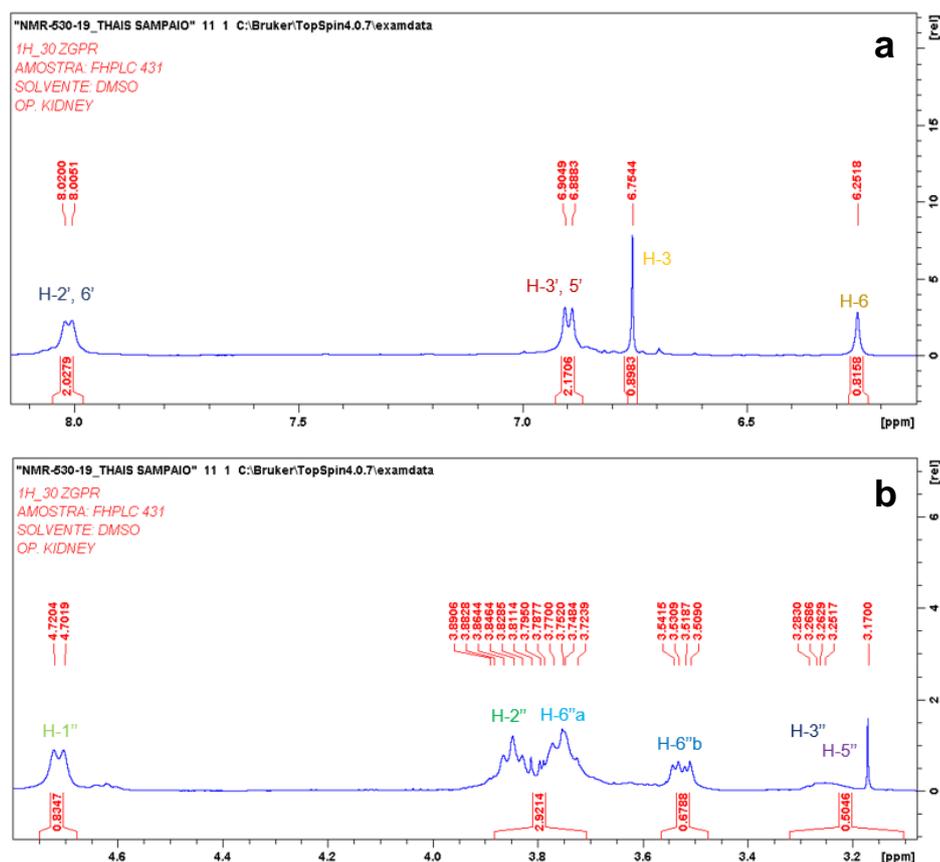


Figura 79. Ampliações do espectro de ^1H . **a:** Região dos aromáticos; **b:** Região dos açúcares.

Os sinais observados foram registrados na **Tabela 29** e analisados com a literatura, a qual orientou a elucidação para a substância 8-glicopiranosilapigenina (MOHAMMED, 2014). Os deslocamentos químicos listados na tabela somente os que foram possíveis com a associação dos experimentos bidimensionais que serão discutidos adiante.

Tabela 29. Dados obtidos dos sinais da fração SP-431.1. e comparados com a literatura.

RMN ¹ H (DMSO-d ₆) 500MHz					
MOHAMMED, 2014			SP-431.1		
¹ H (ppm)	<i>j</i> (Hz)	M	¹ H (ppm)	<i>j</i> (Hz)	m
7,81	8,4	D	8,01 (H2', H6')	7,3	d, 2H
6,87	8,4	D	6,89 (H3', H5')	8,3	d, 2H
6,59		S	6,75 (H3)		s, 1H
			6,25 (H6)		s, 1H
β-D-glicosil					
4,52	9,8	D	4,71 (H1'')	8,7	d, 1H
3,2-3,9		M	3,84 (H2'')		m, 1H
—			3,26 (H3'')		m, 1H
			—		
3,2-3,9		M	3,23 (H5'')		m, 1H
			3,75 (H6''a)		m, 1H
			3,52 (H6''b)	11,5; 5,0	dd, 1H

LEGENDA — SINAIS NÃO ATRIBUÍDOS

A **Figura 80** apresenta o espectro de carbono-13 da substância SP-431.1. São observados os sinais pertencentes à aglicona (região dos aromáticos e olefínicos), no anel C (flavona) estão os sinais em δ 182,4 está o C-4 do grupo carbonila, δ 164,3 e δ 156,4 pertencentes aos C-2 e C-9, respectivamente, ligados diretamente ao heteroátomo e os carbonos em δ 104,1 (C-10) e δ 102,8 (C-3) diretamente ligados ao grupo carbonila. Já no anel A, estão os sinais carbinólicos 164,2 ppm (C-7) e 160,8 ppm (C-5), o sinal 105,0 ppm (C-8) ligado ao glicosídeo e em 98,7 ppm está o carbono metínico(C-6). E no anel B estão os carbonos homotópicos em δ 129,3 (C-2' e C-6') e δ 116,3 (C-3' e C-5'), o terciário em δ 122,0 e em 161,6 ppm está o carbinólico C-4'.

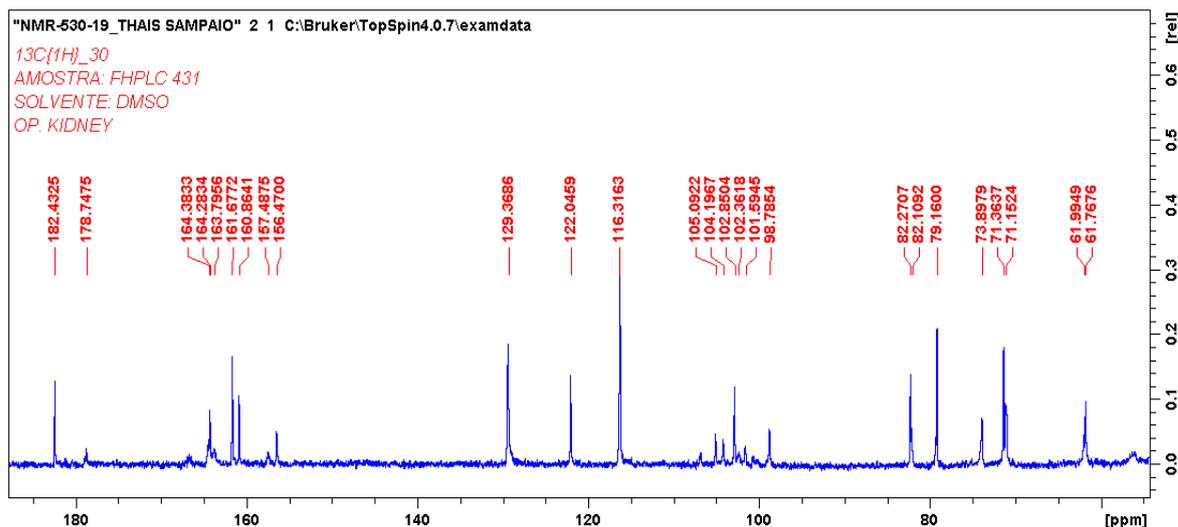


Figura 80. Espectro de ^{13}C da amostra SP-431.1.

Ainda na **Figura 80** estão registrados os açúcares. Com o deslocamento químico em 73,8 ppm está o carbono anomérico (C-1''), em δ 71,3 (C-2''), δ 79,1 (C-3''), δ 71,1 (C-4'') e δ 82,1 (C-5'') estão os metínicos e o carbono metilênico (C-6'') encontra-se em 61,9 ppm. Os deslocamentos químicos apresentados pelo espectro, apontam pra uma aglicona C-glicosilada, a qual está literatura identificada como Vitexina (8-C-glicosilapigenina) (MOHAMMED, 2014)

No espectro DEPT-135 (**Figura 81**) estão os sinais dos carbonos hidrogenados da SP-431.1. Apresentou dez sinais para a substância isolada, entre elas os C-H homotópicos do aromático B (C-2' e C-6') e (C-3' e C-5'), o vinílico (C-3) da flavona e metínico (C-6) do aromático A. Na região dos açúcares, aparecem os sinais dos C-H nas posições 1'', 2'', 3'', 4'' e 5'', e menos deslocado aparecem os sinais voltados para baixo indicando CH_2 confirmando com os dados anteriores a presença da β -D-glicose (MOHAMMED, 2014).

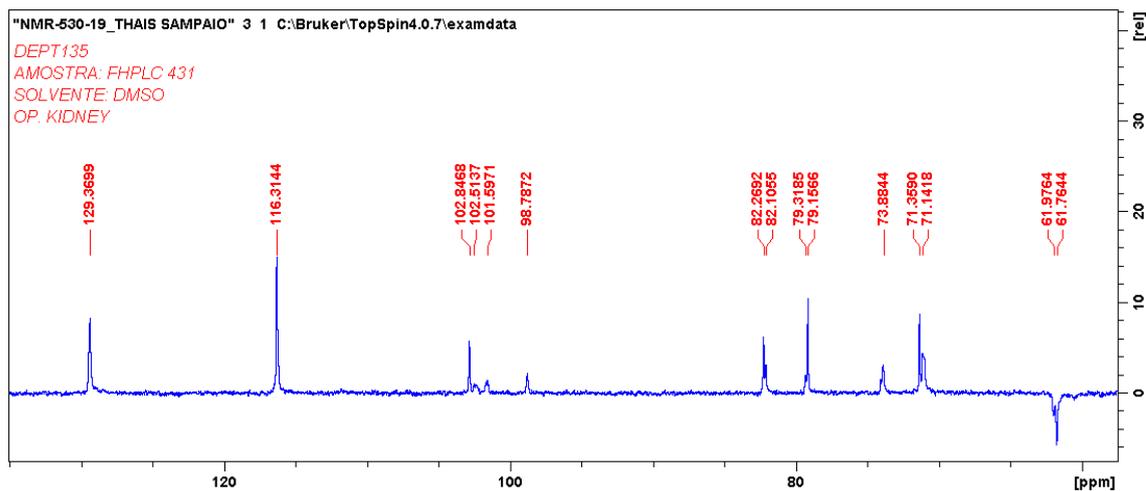


Figura 81. Espectro de DEPT-135 gerado pela fração SP-431.1.

Na **Tabela 30** estão os dados obtidos nos espectros de C-13 e DEPT-135 e comparados com a literatura reafirmando a presença da Vitexina na amostra (MOHAMMED, 2014).

Tabela 30. Dados dos sinais dos espectros de ^{13}C e DEPT e comparados com a literatura.

^{13}C (DMSO-d-6) 125MHz			
	MOHAMMED,2014	SP-431.1	DEPT-135
C4	181,6	182,4	C
C2	164,3	164,3	C
C7	163,2	164,2	C
C4'	161,8	161,6	C
C5	161,1	160,8	C
C9	157,1	156,4	C
C2', C6'	128,6	129,3	CH
C1'	121,6	122,0	C
C3', C5'	116,5	116,3	CH
C8	109,6	105,0	C
C10	102,9	104,1	C
C3	102,3	102,8	CH
C6	94,9	98,7	CH
C5''	81,8	82,1	CH
C3''	79,3	79,1	CH
C1''	74,0	73,8	CH
C2''	70,7	71,3	CH
C4''	70,9	71,1	CH
C6''	61,7	61,9	CH ₂

b) 2D (Análises bidimensionais)

O mapa de correlações HSQC da fração SP-431.1 (**Figura 82**) permitiu observar as correlações das ligações ^1H - ^{13}C diretas. Foi possível atribuir os sinais que apoiaram a elucidação estrutural da vitexina. A **Tabela 31** mostra os resultados das correlações através do ensaio de HSQC encontrados para a substância 8-C- β -D-glicosilapigenina.

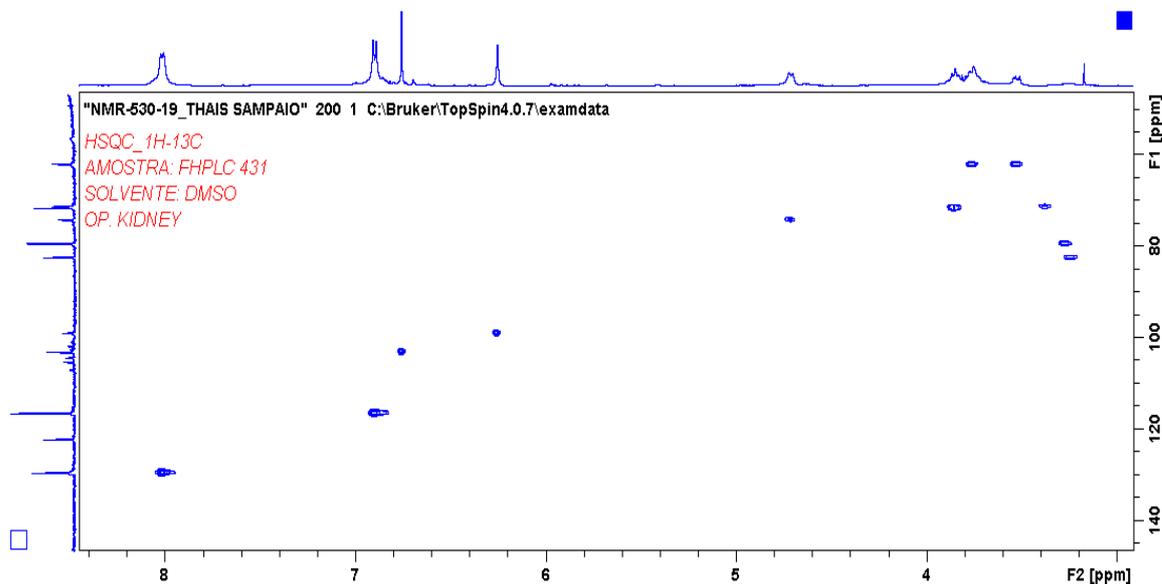


Figura 82. Mapa de correlações HSQC da amostra SP-431.1

Na ampliação do mapa (**Figura 83a**) são mostrados os sinais em 8,01 ppm ($\text{H}2'$, $\text{H}6'$) ligados aos carbonos $\text{C}2'$ e $\text{C}6'$ (δ 129,3) e em 6,89 ppm ($\text{H}3'$; $\text{H}5'$) ligados aos carbonos $\text{C}3'$ e $\text{C}5'$ (δ 116,3) do anel B. Observou-se também a ligação entre o $\text{H}3$ (δ 6,75) com o $\text{C}3$ (δ 102,8) do anel C da aglicona.

A região do açúcar (**Figura 83b**) demonstra explicitamente os sinais dos prótons correlacionados com os carbonos. Foram assinalados o hidrogênio anomérico δ_{H} 4,71 ($\text{H}-1''$) ligado ao δ_{C} 73,8 ($\text{C}-1''$) que corresponde à β -D-glicose, ligada ao $\text{C}8$ do anel A. O sinal referente ao carbono metilênico deslocou em δ 61,9, correlacionando com os hidrogênios diastereotópicos δ 3,75 ($\text{H}6''\text{a}$) e δ 3,52 ($\text{H}6''\text{b}$).

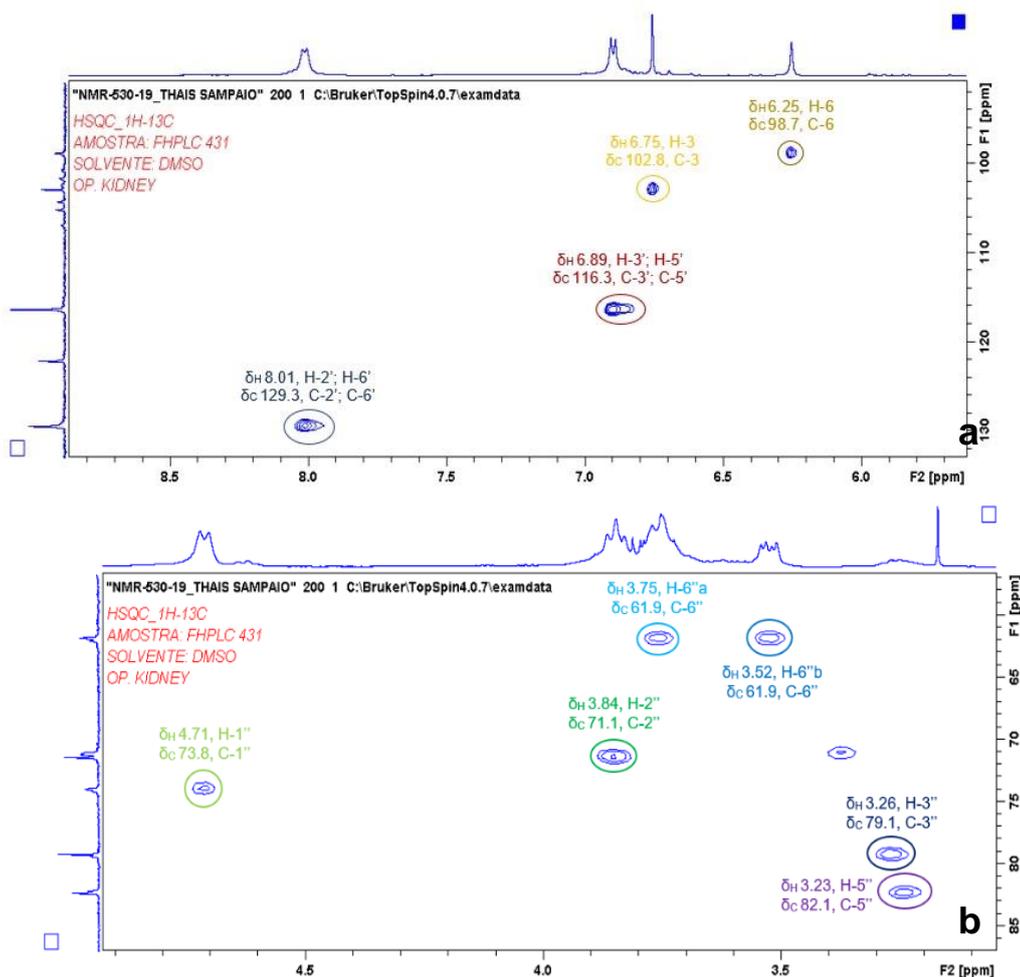


Figura 83. Ampliações do mapa de correlações do HSQC da substância SP.431.1. **a:** Região de aromáticos e olefínicos; **b:** Região de glicosídeos.

Tabela 31. Dados obtidos das correlações e comparados com a literatura.

Correlações HSQC			
MOHAMMED, 2014		→ SP-431.1	
^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
7,81	128,6	8,01 (H2', H6')	129,3
6,87	116,6	6,89 (H3', H5')	116,3
6,59	102,3	6,75 (H3)	102,8
6,3	94,9	6,25 (H6)	98,7
4,52	74,0	4,71 (H1'')	73,8
3,2-3,9	70,7	3,84 (H2'')	71,3
	79,6	3,26 (H3'')	79,1
	70,9	—	71,1
3,2-3,9	81,8	3,23 (H5'')	82,1
	61,7	3,75 (H6''a)	61,9
		3,52 (H6''b)	

LEGENDA — SINAIS NÃO ATRIBUIDOS

Na **Figura 84** está o mapa de correlações HMBC da vitexina que forneceu informações sobre as posições dos carbonos quaternários presentes no anel A e definiu as posições dos hidrogênios e carbonos da β -D-glicose.

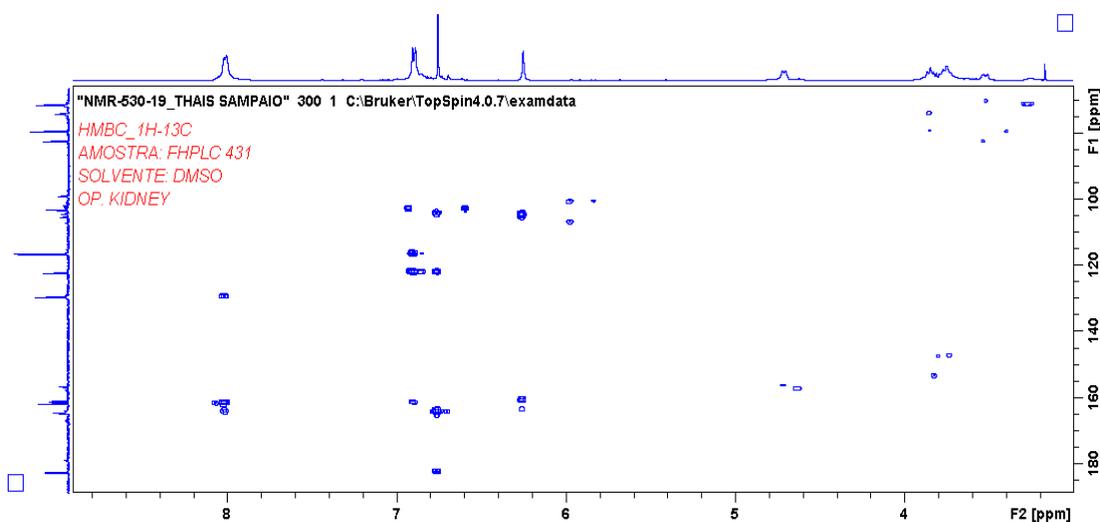


Figura 84. Mapa de correlações HMBC da fração

Na ampliação da região do campo alto (**Figura 85a**), forneceu as seguintes informações: correlações entre os hidrogênios H2', H3', H5', H6' correlacionando com os carbonos dos anéis B e C; H3 do anel C com carbonos dos três anéis da apigenina (C4, C10, C2 e C1') e correlações entre H6 e C5, C7 e C10 do anel A. Para a glicose foram observadas correlações entre H1'' e C9; H2'' com C1'' e C3''; H3'' e C2''; H6''b com C4'' e C5'' (**figura 85b**).

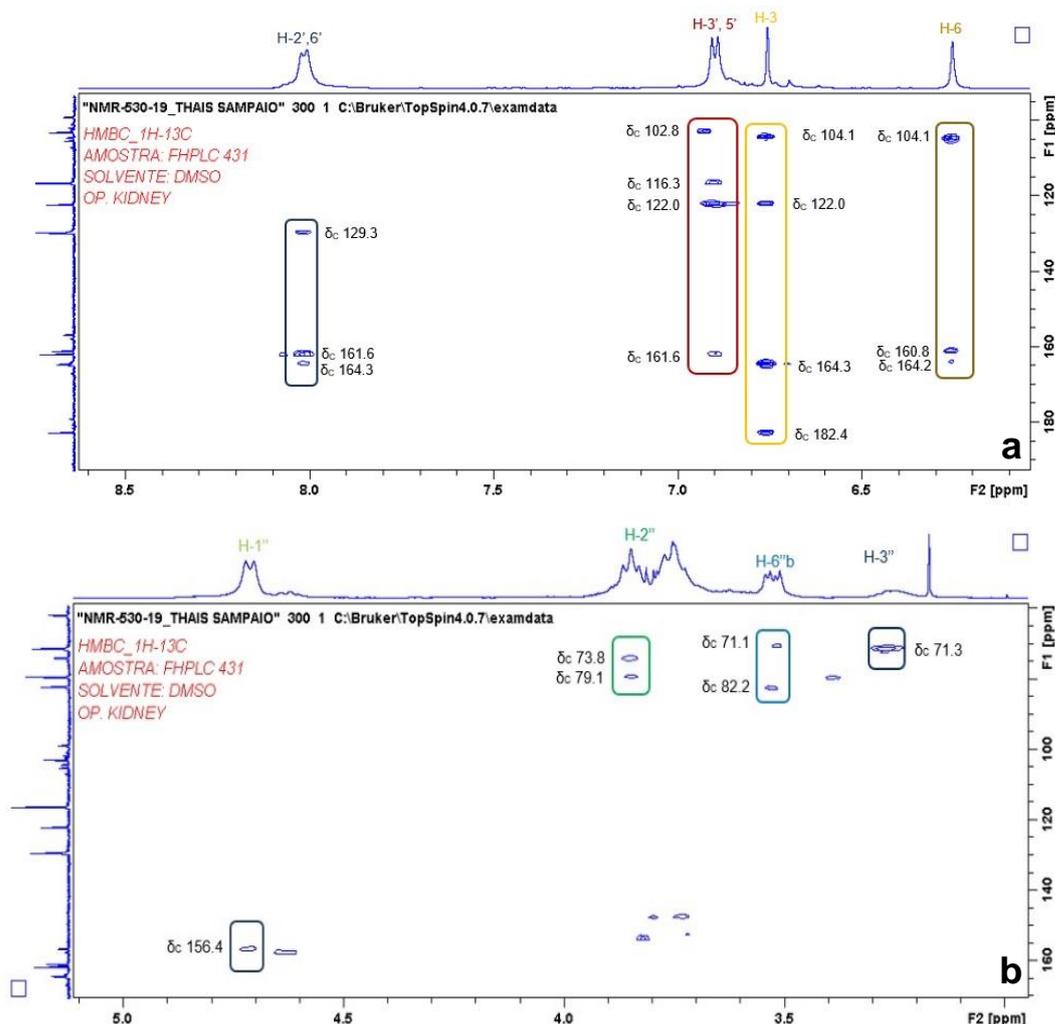


Figura 85. Ampliações do mapa de correlações do HMBC da substância SP-431.1. **a:** Região de aromáticos; **b:** Região de açúcar.

Na **Tabela 32** estão listadas todas as correlações de hidrogênio com os carbonos da vizinhança em distâncias de até cinco ligações. As correlações foram ilustradas na **Figura 86**.

Tabela 32. Correlações observadas no mapa de correlações HMBC da amostra SP-431.1.

Correlações HMBC → SP-431.1, ppm	
8,01 (H2', H6')	161,6 (C4'); 164,3 (C2), 128, 8, (C2', C6')
6,89 (H3', H5')	102,8 (C3); 116,3 (C3', C5'); 122,0 (C1'); 161,6 (C4')
6,75 (H3)	104,1(C10); 122,0 (C1'); 164,3 (C2); 182,4 (C4)
6,25 (H6)	104,2 (C10); 160,8 (C5); 164,2 (C7)
4,71 (H1'')	156,4 (C9)
3,84 (H2'')	73,8 (C1''); 79,1 (C3'')
3,52 (H6''b)	82,2 (C5''); 71,1 (C4'')
3,26 (H3'')	71,3 (C2'')

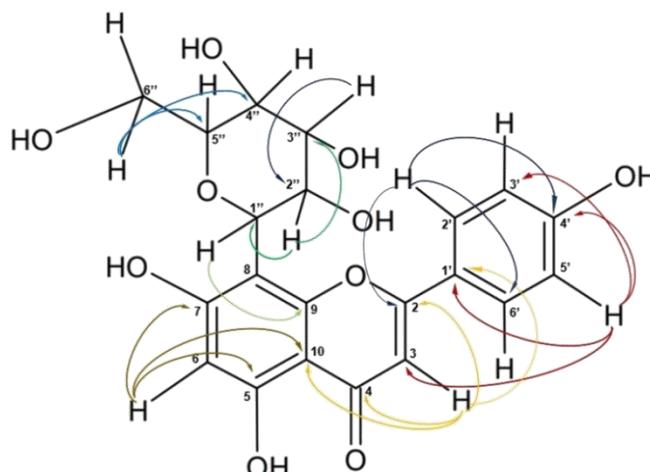


Figura 86. Demonstração das correlações internucleares (^1H - ^{13}C) (SP-431.1).

Por meio do mapa de correlações COSY (**Figura 87**) foram retiradas as informações necessárias para confirmar as posições de alguns sinais dos hidrogênios presentes na estrutura da vitexina. Destacado no retângulo azul está a correlação entre H2', H6' (δ 7,98) com H3', H5' (δ 6,90) sinais do aromático B.

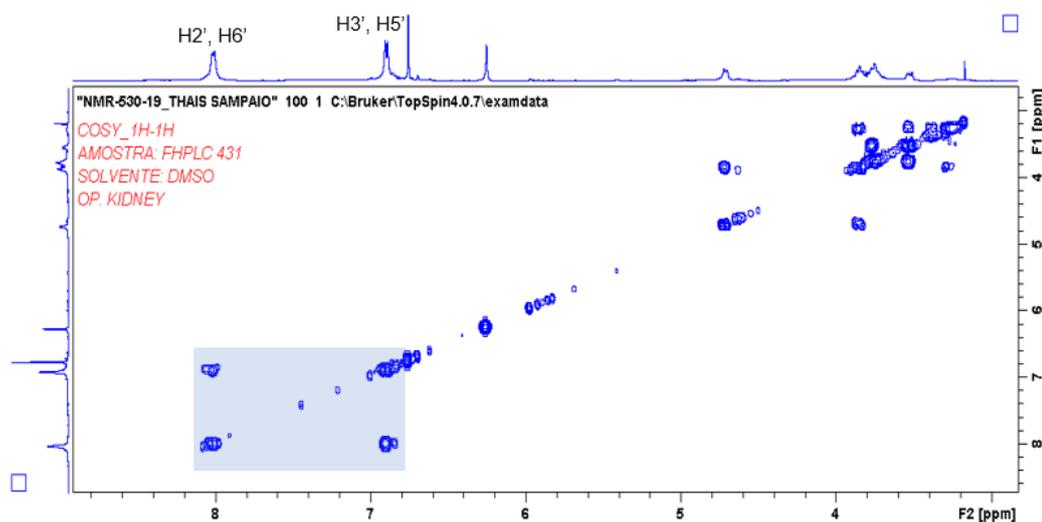


Figura 87. Mapa de correlações COSY da amostra SP-431.1.

Na ampliação do mapa na região das correlações entre os H do glicosídeo, foram observadas as seguintes interações: o anomérico da glicose (H1'') com o H2'' a distância de três ligações; O H-2'' com H3'' também a três ligações de distância. Houve também correlações entre os diastereotópicos H-6''e H6''b do metileno e entre o H-6''com o H5'' (**Figura 88**).

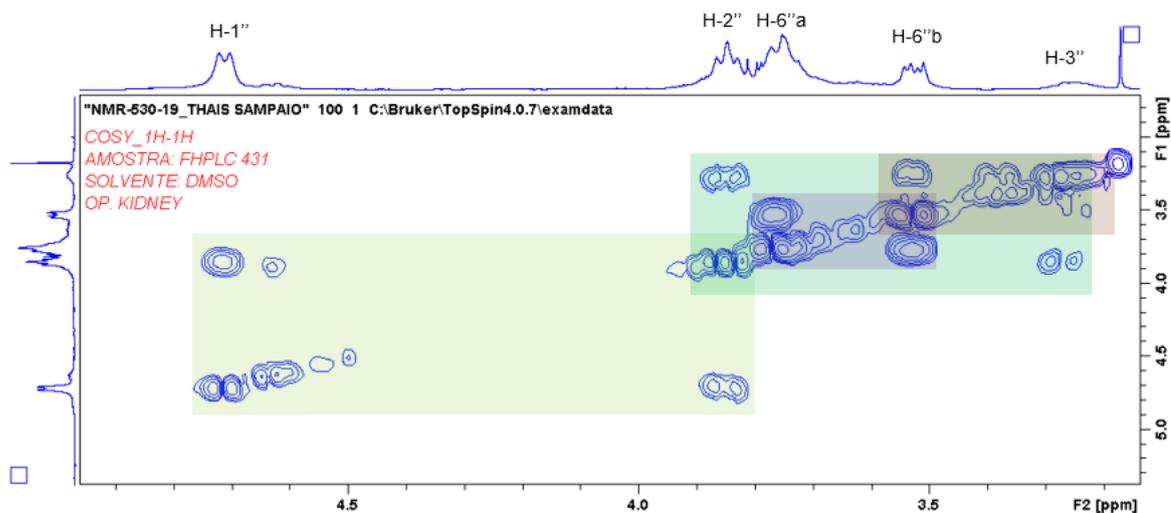


Figura 88. Ampliação do mapa de correlações COSY com interações entre ^1H da glicose.

Na **Figura 89** estão ilustradas as correlações dos núcleos de ^1H na molécula da vitexina. Na **Tabela 33** estão os dados obtidos do mapa com seus deslocamentos químicos e hidrogênios correspondentes.

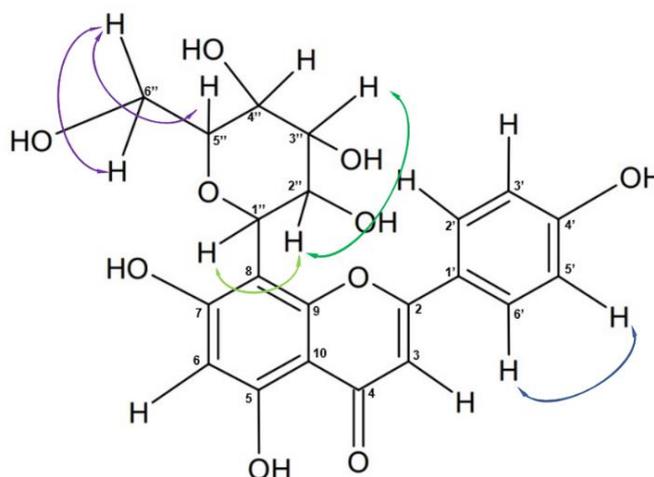


Figura 89. Correlações entre núcleos de hidrogênio na estrutura da vitexina.

Tabela 33. Sinais observados no espectro de COSY da amostra SP-431.1

Correlações COSY → SP-431.1, ppm	
8,01 (H2', H6')	6,89 (H3', H5')
4,71 (H1'')	3,84 (H2'')
3,84 (H2'')	3,26 (H3'')
3,75 (H6''a)	3,52 (H6''b)
3,52 (H6''b)	3,23 (H5'')

Na **Figura 90** apresenta-se a estrutura da substância 8-C- β -glicosil apigenina (vitexina) elucidada pelos espectros de UV, CL-EM e RMN.

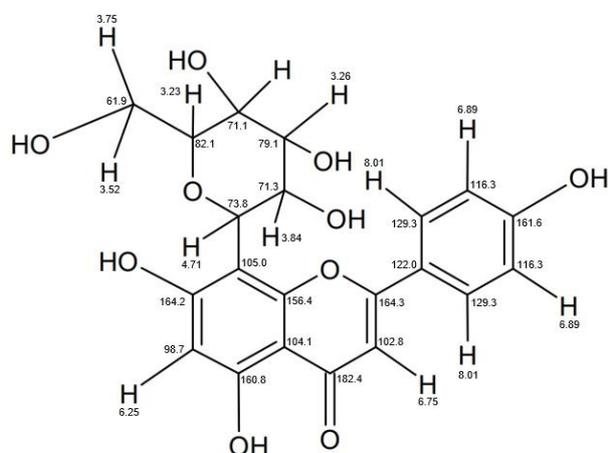


Figura 90. Estrutura da substância vitexina isolada da fração SP-431.1.

Análise da Subfração SP-431.2

A fração SP-431.2 (7,7 mg) mostrou-se como sólido amorfo, coloração amarela e na análise por CCD apresentou uma mancha com fluorescência amarela (R_f 0,70-0,76; 366 nm) quando revelada em NP-PEG, característico de flavonoide. O espectro de UV (**Figura 91**) mostrou absorções máximas em 249 nm e 340 nm, semelhantes as absorções da **SP-431.1** (Vitexina). Mabry (1970) afirma que as absorções apresentadas são características de flavona. A análise por CL-EM (**Figura 92**) evidenciou que o analito possui massa de 432 daltons, correspondente a fórmula molecular $C_{21}H_{18}O_{10}$. Essas análises corroboraram com a possibilidade de que o analito é um flavonoide glicosilado derivado de uma apigenina, sendo este um possível isômero da vitexina, com diferença na posição do glicosídeo.

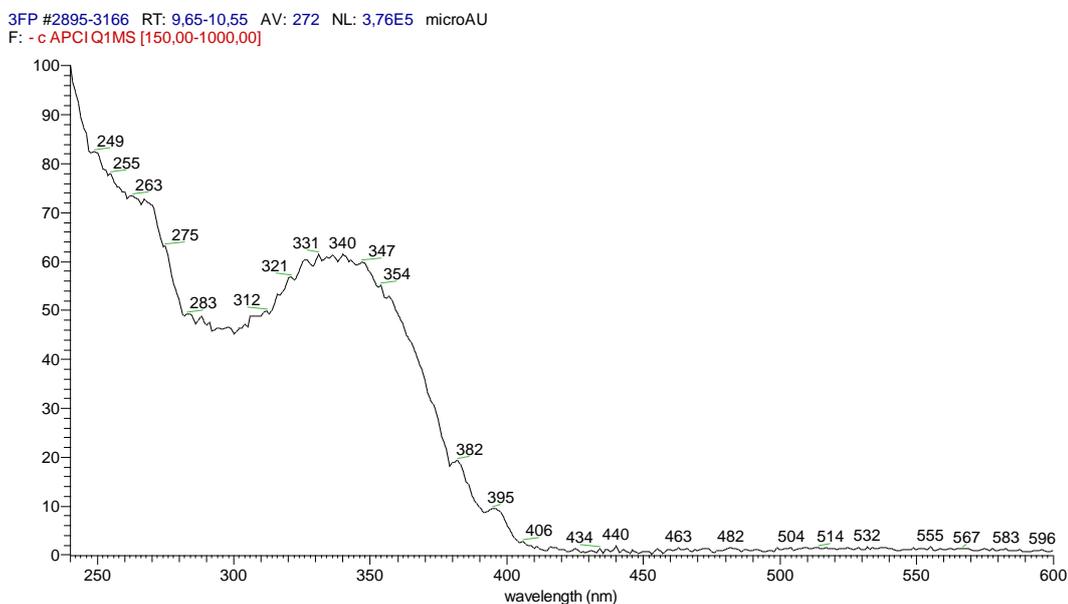


Figura 91. Espectro de UV da fração SP-431.2

26hpcc_hplc #2540 RT: 43.82 AV: 1 NL: 2,36E7
T: - c APCI Q1MS [150,000-1000,000]

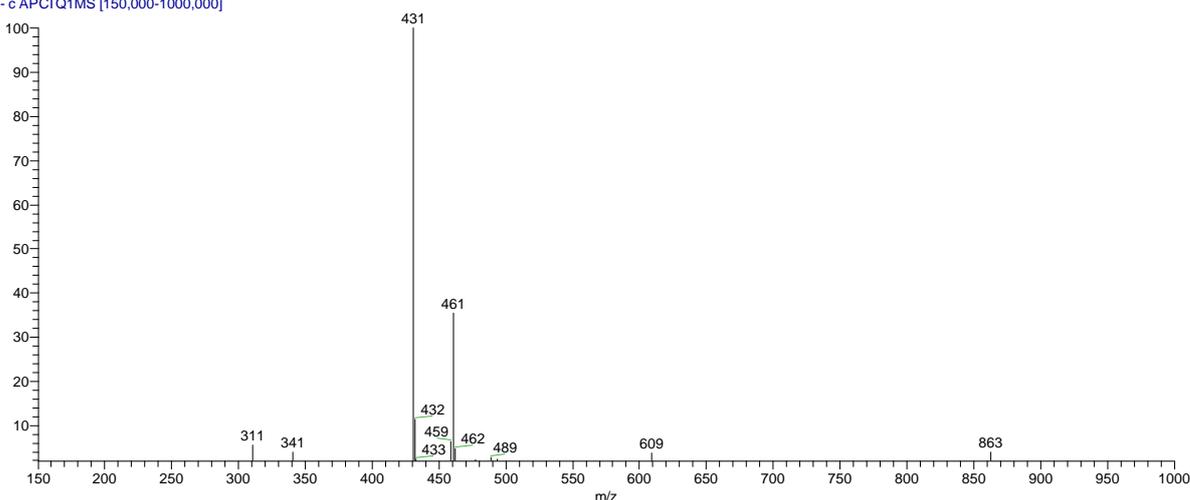


Figura 92. Espectro de CL-EM da amostra SP-431.2

- Ressonância magnética nuclear

a) 1D Análises unidimensionais

Na **Figura 93** está o espectro de RMN ^1H dos sinais gerados pela fração SP-431.2 na análise. No campo baixo são observados dupletos em aromáticos e simpletos em olefínicos. São observados sinais de açúcares na faixa entre δ 4,62 e δ 3,11. Apresenta também alguns sinais de impurezas.

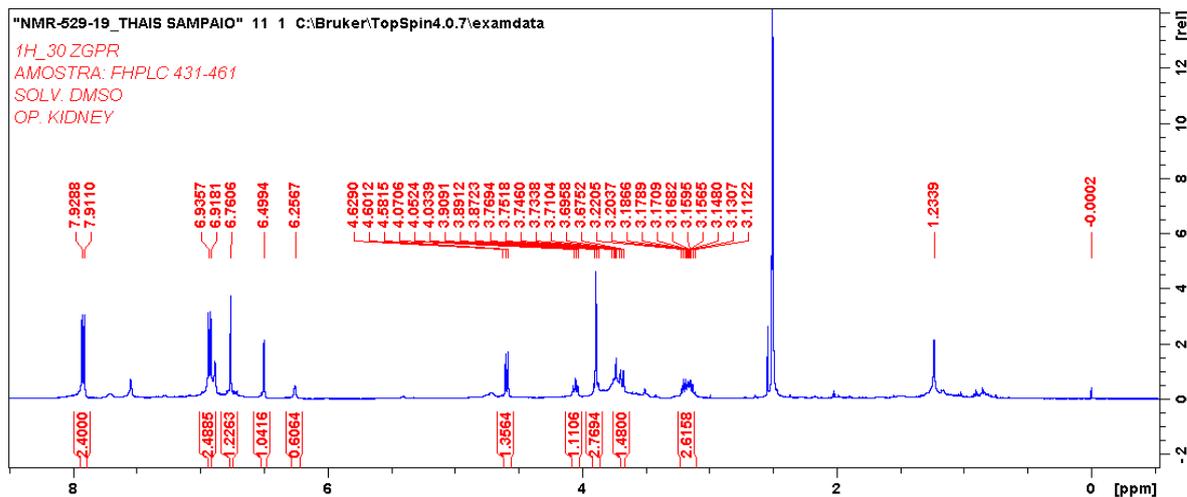


Figura 93. Espectro de RMN ^1H gerado da fração SP-431.2

Nas ampliações do espectro anterior é possível ver claramente cada sinal e a sua multiplicidade. Na **Figura 94a** estão os hidrogênios homotópicos em 7,92 ppm (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H2' e H6') e 6,92 ppm (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H3' e H5'), do aromático B com sistema de acoplamento AB. Também são observados dois simpletos pertencentes aos hidrogênios H3 em δ 6,76 (s, 1H) do anel C da flavona e em 6,49 ppm (s, 1H)

caracterizando o H8) do anel A. Nas **Figuras 94b e 94c** estão as ampliações dos sinais dos hidrogênios anomérico do açúcar em δ 4,59 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H, H1'') e os sinais de hidrogênios metínicos em δ 3,89 (t, $J = 9,1$ Hz, 1H, H2''), δ 3,20 (m, H3), δ 4,05 (t, $J = 9,0$ Hz, 1H, 4H''), δ 3,16 (m, H5'') e o sinal de dois hidrogênios metilênicos homotópicos em δ 3,68 (dd, $J = 11,8$ e $1,4$ Hz, 2H, H6'').

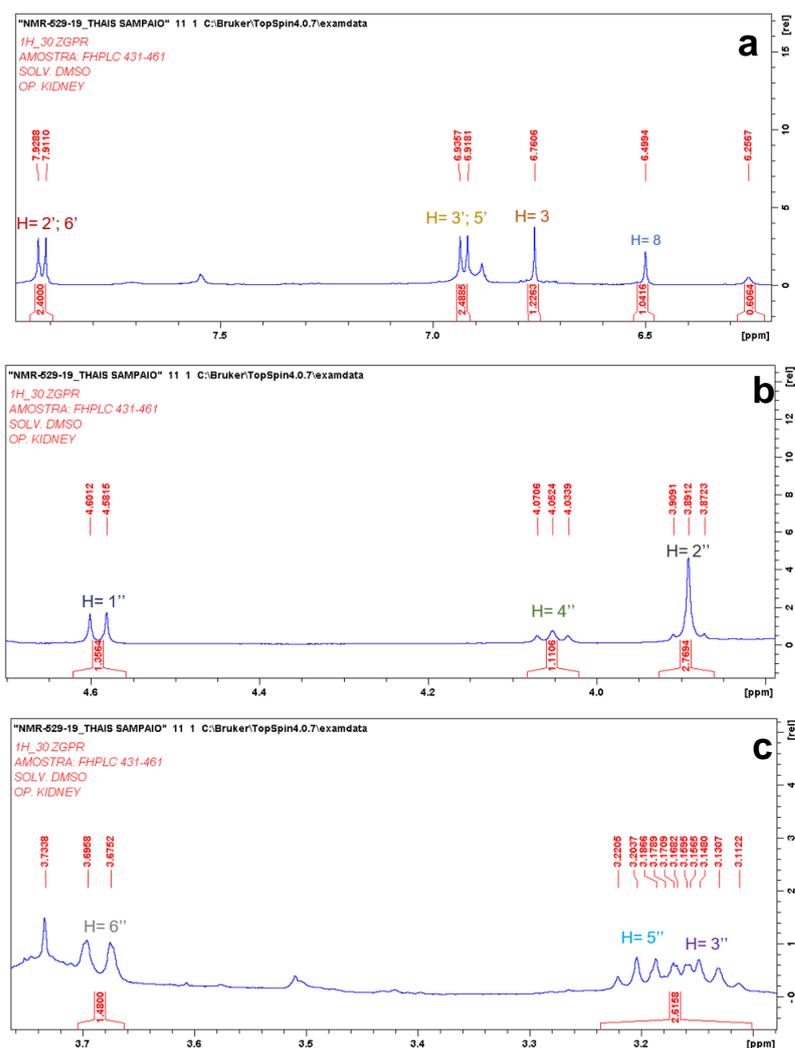


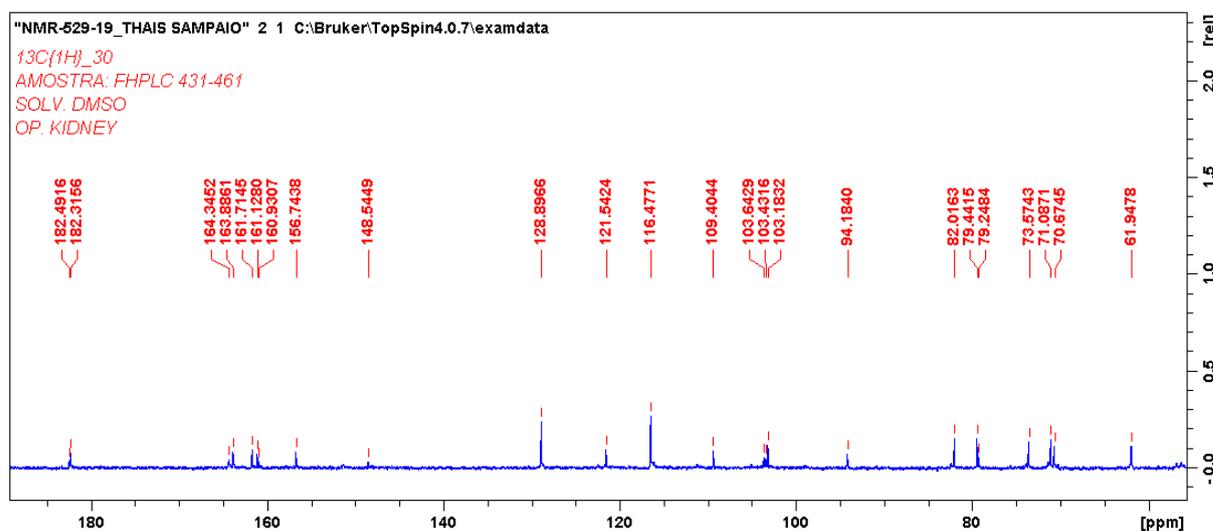
Figura 94. Ampliação do espectro de ¹H da fração SP-431.2. **a:** Região de aromáticos; **b:** Região de açúcar (5,00-3,50 ppm); **c:** Região de açúcar (4,00-3,00).

Na **Tabela 34** estão atribuídos os sinais aos seus hidrogênios e os dados foram comparados com da literatura que norteou para a substância Isovitexina (6-C-glicosilapigenina) (MOHAMMED, 2014). Os sinais multipletos foram atribuídos com o auxílio das análises bidimensionais que serão discutidas no decorrer desta análise.

Tabela 34. Dados dos sinais obtidos da fração SP-431.2.

RMN ^1H (DMSO- d_6) 500MHz					
MOHAMMED, 2014			SP-431.2		
^1H (ppm)	j (Hz)	m	^1H (ppm)	j (Hz)	m
7,86	8,4	d	7,92 (H2', H6')	8,9	d, 2H
6,89	8,4	d	6,92 (H3', H5')	8,9	d, 2H
6,71		s	6,76 (H3)		s, 1H
6,50	2,3	d	6,49 (H-8)		s, 1H
4,54	9,8	d	4,59 (H1'')	9,8	d, 1H
4,05		–	3,89 (H2'')	9,8	t, 1H
			3,20 (H3'')	9,1	t, 1H
			4,05 (H4'')	11,8; 1,4	dd, 1H
3,7-3,1		m	3,16 (H5'')		m, 1H
			3,68 (H6'')		m, 1H

No espectro de carbono-13 da fração SP-431.1, apresentado na **Figura 95**, foram observados os sinais pertencentes à aglicona (região dos aromáticos e olefínicos), no anel C (flavona) estão os sinais em δ 182,4 (C-4) do grupo carbonila, δ 163,8 e δ 156,7 (C-2 e C-9), ligados diretamente ao heteroátomo e os carbonos em δ 103,6 (C-10) e δ 103,0 (C-3) diretamente ligados ao grupo carbonila. Já no anel A estão os sinais carbinólicos 164,3 ppm (C-7) e 148,5 ppm (C-5), o sinal 109,4 ppm (C-6) ligado ao glicosídeo e em 94,1 ppm está o carbono metínico (C-8). E no anel B estão os carbonos homotópicos em δ 128,8 (C-2' e C-6') e δ 116,4 (C-3' e C-5'), o terciário em δ 121,5 e o carbinólico (C-4') em 161,7 ppm.

Figura 95. Espectro de ^{13}C da fração SP-431.2.

Também estão registrados os açúcares na **Figura 95**. Com deslocamento químico em 73,3 ppm está o carbono anomérico (C-1''), em δ 71,0 (C-2''), δ 79,4 (C-3''), δ 70,6 (C-4'') e δ 82,1 (C-5'') estão os metínicos e o carbono metilênico (C-6'') encontra-se em 61,9 ppm. Os sinais apresentados pelo espectro apontam para a aglicona C-glicosilada identificada na literatura como Isovitexina (6-C-glicosil apigenina) (MOHAMMED, 2014)

No espectro DEPT-135 (**Figura 96**) estão os sinais dos carbonos hidrogenados da SP-431.2. Apresentou dez sinais para a substância em análise, entre elas os C-H homotópicos do aromático B (C-2' e C-6') e (C-3' e C-5'), o vinílico (C-3) da flavona e metínico (C-8) do aromático A. Na região dos açúcares, aparecem os sinais dos C-H nas posições 1'', 2'', 3'', 4'' e 5'', e menos deslocado aparece o sinais voltado para baixo indicando CH₂ confirmando com os dados anteriores a presença da β -D-glicose (MOHAMMED, 2014).

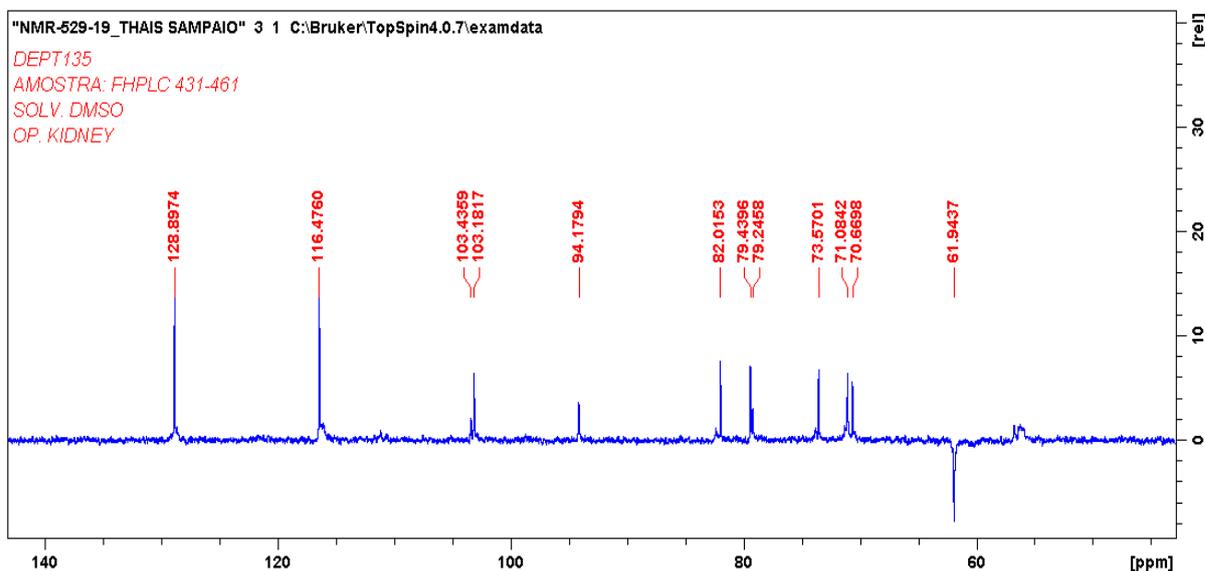


Figura 96. Espectro de DEPT-135 da fração SP-431.2.

Na **Tabela 35** estão os sinais de carbono comparados a MOHAMMED (2014) confirmando a presença da Isovitexina na fração e na **Figura 97** está a estrutura com seus devidos assinalamentos.

Tabela 35. Dados obtidos dos sinais de ^{13}C e DEPT comparados com a literatura.

^{13}C (DMSO-d-6) 125MHz			
	MOHAMMED, 2014	SP-431.2	DEPT-135
C4	181,7	182,4	C
C7	163,3	164,3	C
C2	163,0	163,8	C
C4'	161,1	161,7	C
C9	156,1	156,7	C
C5	160,5	148,5	C
C2', C6'	128,3	128,8	CH
C1'	120,1	121,5	C
C3', C5'	115,9	116,4	CH
C6	103,1	109,4	C
C10	103,5	103,6	C
C3	102,6	103,1	CH
C8	93,9	94,1	CH
C5''	81,4	82,0	CH
C3''	78,8	79,4	CH
C1''	72,9	73,5	CH
C2''	70,7	71,0	CH
C4''	70,9	70,6	CH
C6''	61,3	61,9	CH ₂

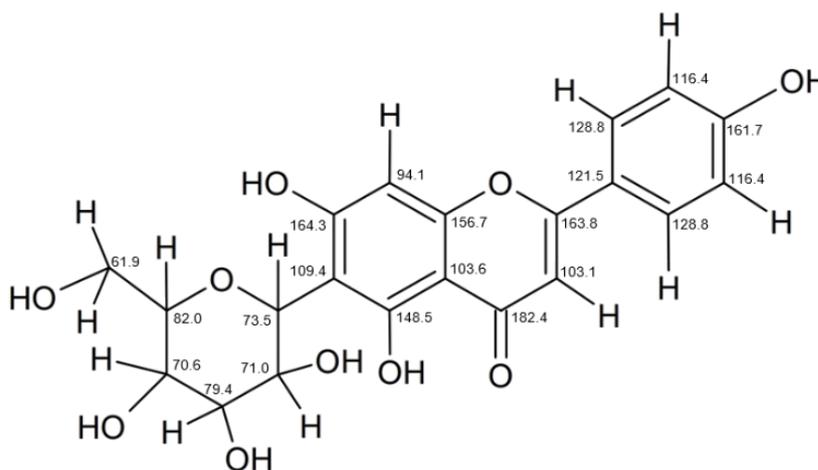


Figura 97. Estrutura da isovitexina proposta como a substância da fração SP-431.2.

b) 2D (Análises bidimensionais)

O mapa de correlações HSQC da fração SP-431.2 (**Figura 98**) permitiu observar as interações das ligações ^1H - ^{13}C diretas que atribuídas apoiaram a elucidação estrutural da Isovitexina.

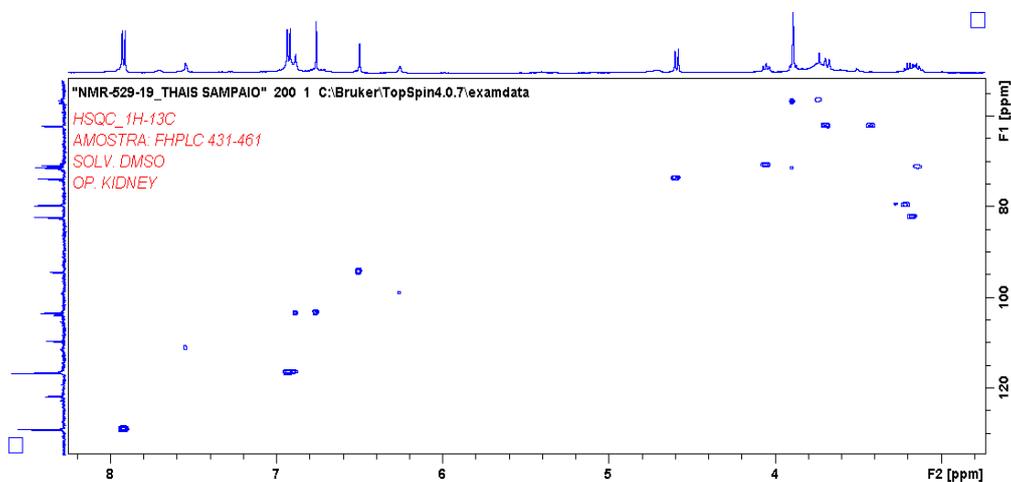


Figura 98. Mapa de correlações HSQC da amostra SP-431.2.

Na ampliação do mapa (**Figura 99a**) foram correlacionados os sinais em 7,92 ppm (H2', H6') ligados aos carbonos C2' e C6' (δ 128,8) e em 6,92 ppm (H3'; H5') ligados aos carbonos C3' e C5' (δ 116,4) do anel B. Observou-se também a ligação entre o H3 (δ 6,76) com o C3 (δ 103,1) do anel C da aglicona.

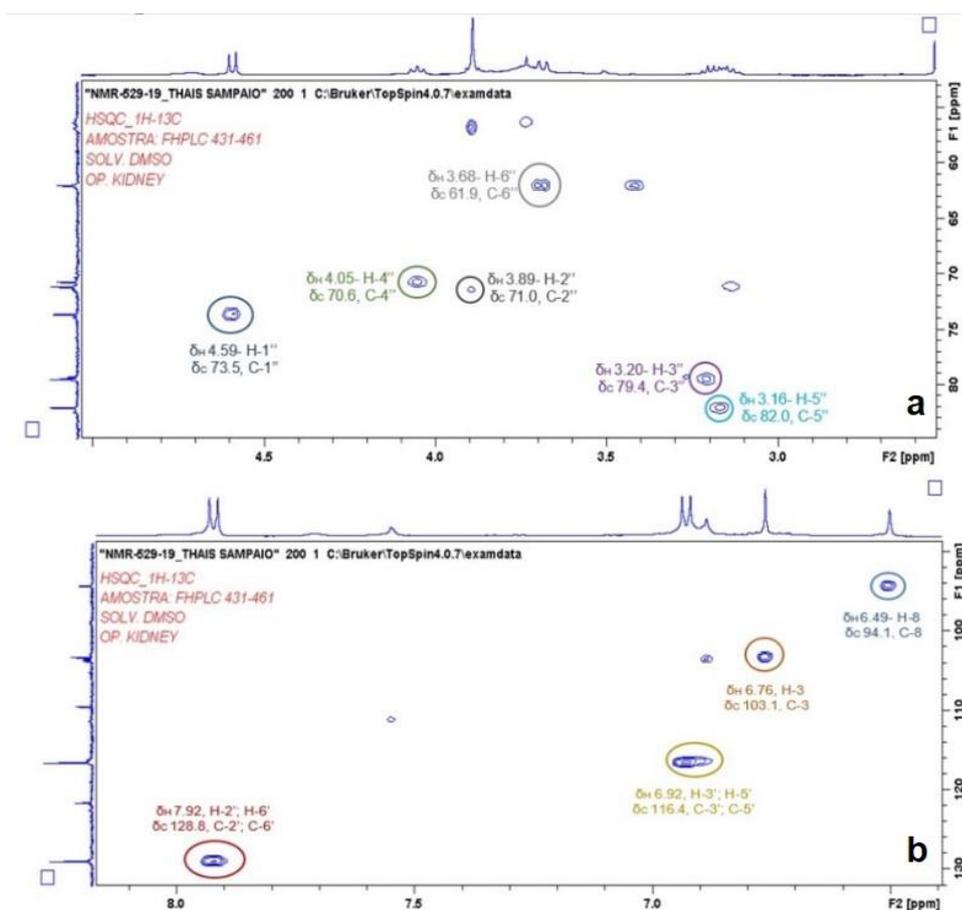


Figura 99. Ampliações do mapa de correlações do HSQC da Isovitexina. **a:** Região de aromáticos; **b:** Região da glicose.

Na região do açúcar (**Figura 99b**) foram assinalados o hidrogênio anomérico δ_H 4,59 (H-1'') ligado ao δ_C 73,5 (C-1'') que corresponde à β -D-glicose, ligada ao C8 do anel A. O sinal referente ao carbono metilênico deslocou em δ 61,9, correlacionando com os hidrogênios homotópicos δ 3,68 (H6'').

A **Tabela 36** mostra os resultados das correlações através do ensaio de HSQC encontrados para a substância 6-C- β -D-glicosilapigenina (Isovitexina).

Tabela 36. Correlações observadas no mapa HSQC e comparadas com a literatura.

Correlações- HSQC SP-431.2			
MOHAMMED, 2014		SP-431.2	
^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
7,86	128,3	7,92 (H2', H6')	128,8
6,89	115,9	6,92 (H3', H5')	116,4
6,71	102,6	6,76 (H3)	103,1
6,50	93,9	6,49 (H-8)	94,1
4,54	72,9	4,59 (H1'')	73,5
4,05	70,0	3,89 (H2'')	70,6
	78,8	3,20 (H3'')	79,4
3,7-3,1	70,9	4,05 (H4'')	70,6
	81,4	3,16 (H5'')	82,0
	61,3	3,68 (H6'')	61,9

Na **Figura 100** está o mapa de correlações HMBC da Isovitexina que forneceu informações sobre as posições dos carbonos quaternários presentes no anel A e definiu as posições dos hidrogênios e carbonos da β -D-glicose.

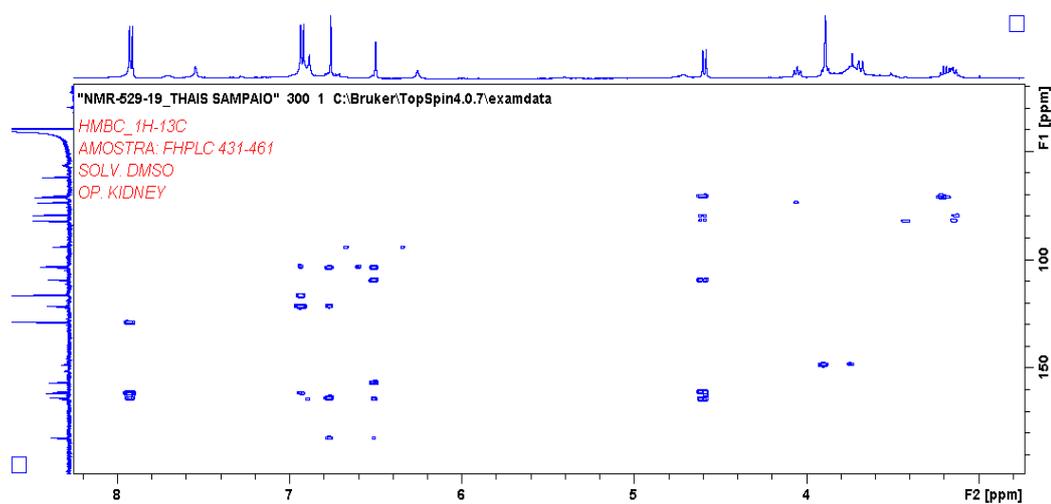


Figura 100. Mapa de correlações HMBC da fração SP-431.2.

Na ampliação da área dos aromáticos e olefínicos (**Figura 101**) estão as correlações entre os hidrogênios do anel B (H2' e H6') e (H3' e H5') com carbonos dos anéis B e C, o H3 que correlaciona com os três anéis da aglicona o H6 que interage

com os anéis A e C. Os acoplamentos ocorrem em até cinco ligações de distância. A **Figura 102** mostra as interações dos núcleos por meio de setas na estrutura.

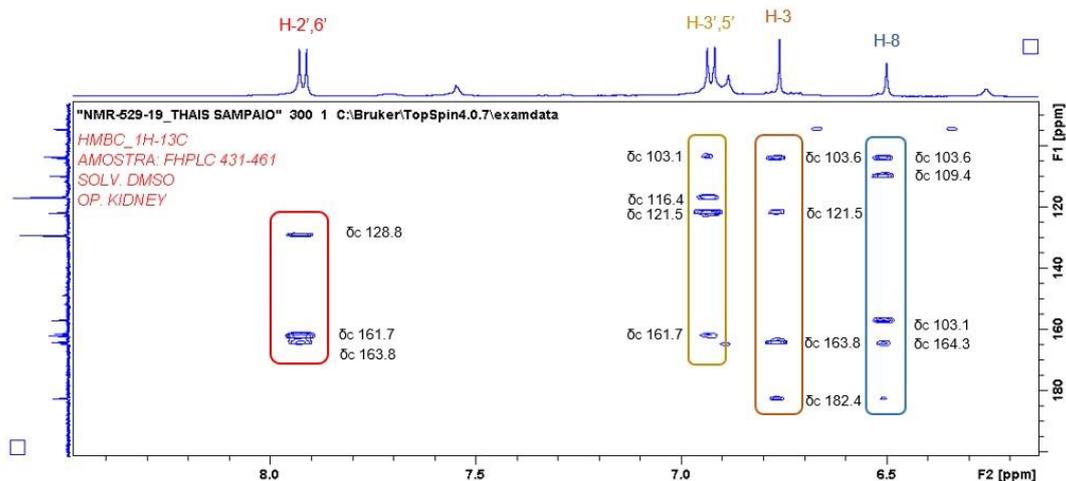


Figura 101. Ampliações do mapa com correlações da região dos aromáticos.

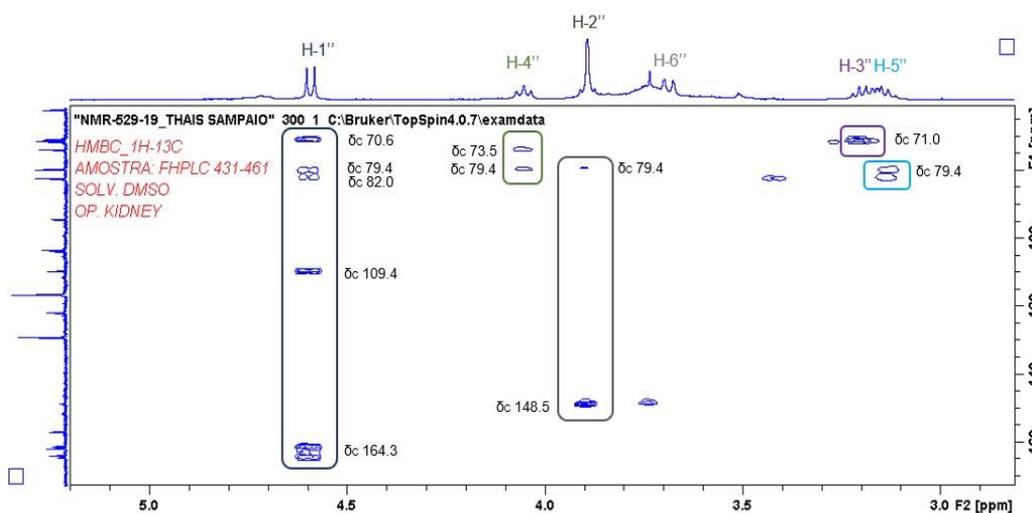


Figura 102. Ilustração das correlações HMBC (^1H - ^{13}C) da aglicona em SP-431.2.

Na ampliação da região da β -D-glicose (**Figura 103**) estão destacados acoplamentos entre o anomérico (H1'') com carbonos pertencentes aos anéis A e glicosil, os acoplamentos de H3'' e H4'' com os carbonos do glicosídeo e a interação do H2'' com C3'' e C5.

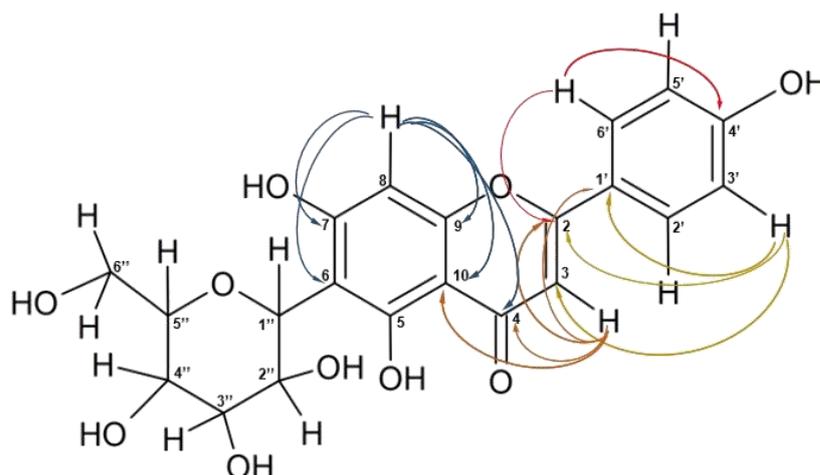


Figura 103. Ampliação do mapa de correlações HMBC entre os núcleos do açúcar.

A ilustração dos acoplamentos internucleares é mostrada na **Figura 104**.

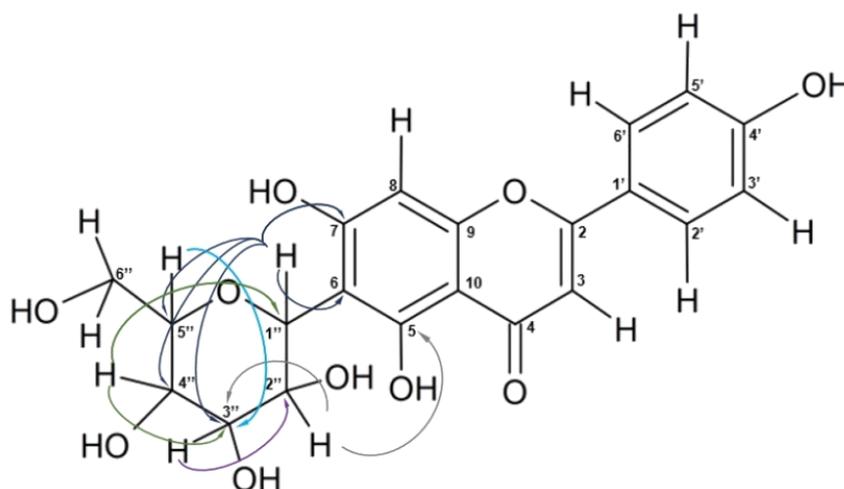


Figura 104. Demonstração das interações internucleares no açúcar do flavonoide.

O registro de todas as correlações está na **Tabela 37**.

Tabela 37. Correlações observadas no mapa HMBC para isovitexina da amostra SP-431.2.

Correlações-HMBC → SP-431.2	
7,92 (H2', H6')	128,8 (C2', C6'); 161,7 (C4'); 163,8 (C2)
6,92 (H3', H5')	103,1 (C3); 116,4 (C3', C5'); 121,5 (C1'); 161,7 (C4')
6,76 (H3)	103,6 (C10); 116,4 (C3', C5'); 121,5 (C1'); 163,8 (C2); 182,4 (C4)
6,49 (H8)	103,6 (C10); 109,4 (C6); 156,7 (C9); 164,3 (C7); 182,4 (C4)
4,59 (H1'')	70,6 (C4''); 79,4 (C3''); 82,0 (C5''); 109,4 (C6); 164,3 (C7)
4,05 (H4'')	73,5 (C1''); 79,4 (C3'')
3,89 (H2'')	148,5 (C5); 79,4 (C3)
3,16 (H5'')	71,0 (C2); 79,4 (C3)

Pelo do mapa de correlações COSY (**Figura 105**) foram utilizadas as informações necessárias para confirmar as posições de alguns hidrogênios presentes na estrutura da isovitexina. No retângulo azul está a correlação entre H2', H6' (δ 7,98) com H3', H5' (δ 6,90) sinais do aromático B.

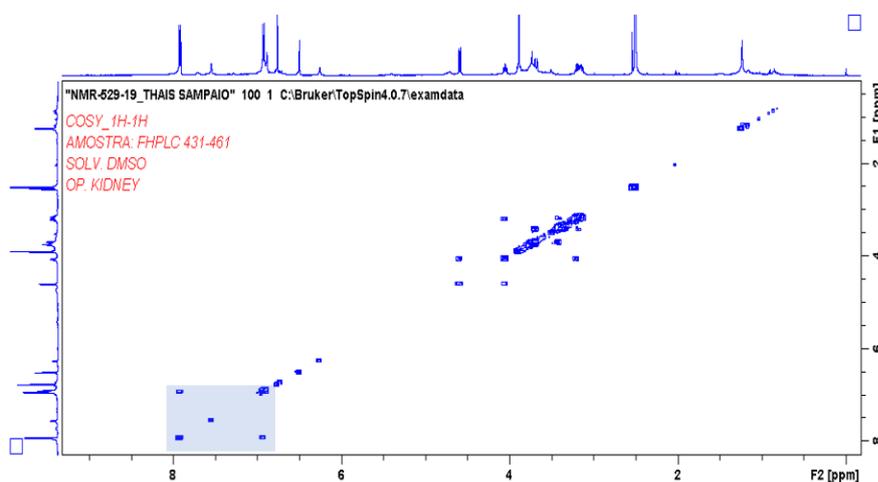


Figura 105. Mapa de correlações COSY da amostra SP-431.2.

Na ampliação do mapa na região do glicosídeo, foram observadas as seguintes interações: o anomérico da glicose (H1'') com o H4'' a distância de cinco ligações; O H-2'' com H4'' a três ligações de distância (**Figura 106**).

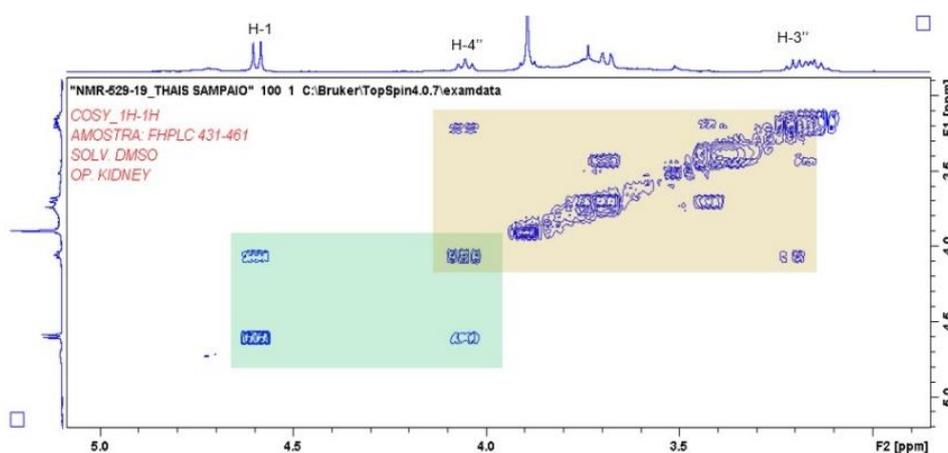
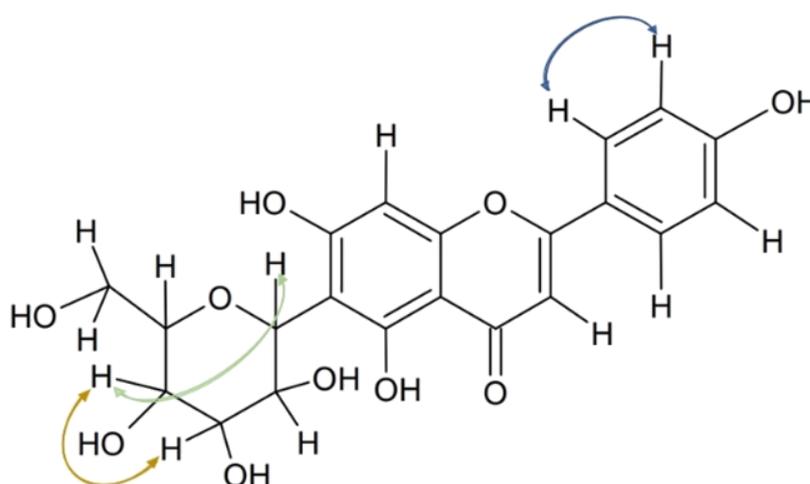


Figura 106. Ampliação das correlações entre os núcleos de H do glicosídeo

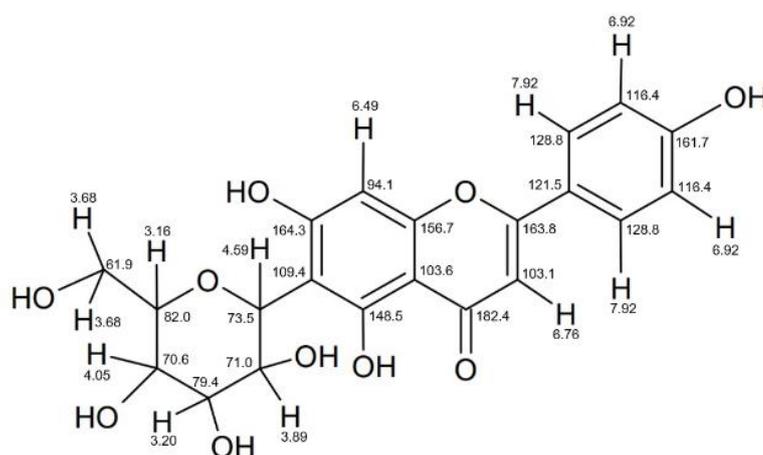
A **Tabela 38** mostra as correlações observadas no mapa entre os hidrogênios da isovitexina. A **Figura 107** indica onde ocorrem as interações na estrutura.

Tabela 38. Dados dos sinais observados nas correlações COSY para a isovitexina (SP-431.2).

Correlações COSY → SP-431.2	
7,92 (H2', H6')	6,92 (H3', H5')
4,59 (H1'')	4,05 (H4'')
4,05 (H4'')	3,16 (H3'')

**Figure 107.** Correlações entre (^1H - ^1H) demonstradas na estrutura.

O uso das técnicas de elucidação estrutural possibilitou a identificação da substância isolada da fração SP-431.2. Segundo MOHAMMED (2014), os espectros se tratam da estrutura da substância conhecida por Isovitexina (6-C- β -D-glicosil apigenina) (**Figura 108**).

**Figure 108.** Estrutura da isovitexina com as propostas dos assinalamentos de cada elemento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estado do Amazonas é um dos principais estados na produção de madeira nativa tropical em tora, sendo o município de Itacoatiara um dos principais fornecedores de madeira comercial para atender o tanto a comunidade local, como também para fins de exportação. Ao mesmo tempo, a produção de resíduo oriundo daquela atividade também deve ser uma das maiores, considerando o volume de 8,3 milhões de metros cúbicos de resíduos produzidos na Amazônia Legal.

Somente quarenta e um por cento de toda a madeira coletada é aproveitada com valor agregado. Cerca de cinquenta e nove por cento é considerado resíduo, que demonstra um baixo aproveitamento durante o processo de beneficiamento da madeira. Além disso, a produção de resíduos madeireiro representa um problema para o desenvolvimento sustentável, em virtude do destino incorreto, causando contaminação do ar, solo e dos aquíferos da região. Este fato, pode trazer problemas de saúde pública e do trabalhador local, além do desperdício de matéria prima e energia.

Algumas espécies madeireiras são consideradas medicinais. Poucas são estudadas em relação à aplicação medicinal e, também, em relação à constituição química. Dentre essas plantas, vale destacar o uso para fins madeireiros a Andiroba, o Breu, a Castanheira, o Cumaru e o Ipê. Algumas substâncias presentes nessas plantas apresentam atividades biológicas importantes e representam o potencial para aproveitamento do resíduo, que pode agregar valor para este material que é desperdiçado. Dentre elas podemos destacar o cariofileno, os fitosteróis, o lapachol, a cumarina que têm importância mercadológica. Trata-se de ouro branco que é jogado fora e que ocasiona a poluição do ambiente.

O objetivo deste trabalho foi estudar fitoquimicamente o resíduo da Sucupira-preta (*D. racemosa* (Hoenne)) e avaliar o potencial antioxidante do extrato bruto e frações. Dessa forma, pôde-se demonstrar o potencial tecnológico, que os extratos das cascas desta espécie podem representar para o manejo do resíduo produzido.

O extrato bruto gerou um rendimento de 8,25% da extração. O estudo fitoquímico preliminar, permitiu caracterizar as presenças de triterpenos, saponinas, alcaloides, taninos condensados, flavonas e flavanonas. A avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações indicou a capacidade de sequestro do radical DPPH do extrato etanólico (B-LSP) e a mesma capacidade continuou sendo

observada nas frações mais polares: acetato de etila (B-LSP03), butanólica (B-LSP04), e aquosa (B-LSP05). A partir desta avaliação, foi proposto o isolamento químico baseado na avaliação dos ensaios antioxidantes do extrato e frações. Esses resultados nortearam para a escolha do extrato butanólico (B-LSP04), rico em substâncias fenólicas para o isolamento e identificação dos ativos presentes.

Wallace *et al* (1979), relatou o isolamento da flavona **violantina** pela segunda vez e pela primeira vez do seu isômero isoviolantina, ocorrendo naturalmente na espécie de samambaia, *Angiopteris evecta* (G. Forst) Hoffm. (Maratiales). Essas flavonas c-glicosiladas também já foram descritas nas partes aéreas da espécie *Viola etrusca*, assim como em outras espécies do gênero *Viola* (FLAMINI, 2007; VUKICS *et al.*, 2008).

As espécies conhecidas como 'sucupira' pertencem à família Fabaceae subfamília Faboideae e são representadas por espécies pertencentes aos gêneros *Bowdichia* Kunth, (cerca de 20 espécies), e *Diploptropis* Benth., (aproximadamente 22 espécies). Segundo Soares *et al* (2014), as espécies *Bowdichia nitida*, *Bowdichia virgilioides*, *Diploptropis purpurea*, *Diploptropis racemosa* e *Diploptropis martiusii* recebem essa designação popular com maior frequência. São espécies que apresentam madeira de alta densidade e lenho resistente, sendo por isso utilizadas para fabricação de dormentes, construção civil e naval, tacos e tábuas para assoalhos, móveis e faqueados decorativo.

Em relação às aplicações etnomedicinais, estudos químicos e biológicos, o gênero *Bowdichia* é o único que apresenta citações. A espécie *B. virgilioides* é descrita contra diabetes, larvicida (*Aedes aegypti*), antibacteriano, anti-inflamatório e antinociceptivo, A espécie *B. major* é relatada como antiofídico (LAKSHMI *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2005; PATHAK *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2014, THOMAZZI *et al.*, 2010)

De acordo com a literatura, a **violantina** apresenta um grande potencial farmacológico, devido sua atividade inibitória frente a enzima acetilcolinesterase, como antioxidante e neuroprotetor (VUKICS, 2008). Além disso, possui um grande valor econômico para a indústria química pois 1 mg pode custar até U\$ 483,64 dólares, de acordo com o fornecedor Sigma-Aldrich.

A presença da flavona c-glicosilada **isoviolantina** já foi descrita nos caules de *Dendrobium crystallinum*, *D. officinale* e *D. devonianum*, nas folhas de *D. officinale*, partes aéreas de *Viola etrusa* e em raízes de espécies do gênero *Glycyrrhiza* (WANG et al., 2009; FLAMINI, 2007; YANG, et al., 1990; YE et al., 2017; XING et al., 2018). Não foram encontrados registro da presença dessa substância no gênero *Diplotropis*. Portanto, pode-se afirmar que a presença dessa substância na espécie *D. racemosa* seja inédita.

No estudo de Xing e colaboradores (2018), foi evidenciado que a isoviolantina possui potencial como agente terapêutico no tratamento de estágios avançados de células de carcinoma hepatocelular metastático. Portanto, essa substância demonstra potencial tecnológico a ser explorado para outras atividades farmacológicas. A **isoviolantina** possui o mesmo valor de mercado da violantina, o que ressalta um interesse comercial para a indústria química, tendo resíduos madeireiros como matéria prima para a obtenção de padrões desses metabólitos secundários.

A flavona **vitexina** é um derivado da apigenina com um 8-C-glicosídeo que já foi relatada em diferentes espécies botânicas, porém na espécie *Diplotropis racemosa* é o primeiro relato. Até então, a principal fonte de vitexina são as folhas de espinheiro (*Ceraia cuneata*) pertencente ao gênero *Crataegus* (HE et al., 2016; FU et al., 2006).

Farmacologicamente, a **vitexina** apresenta um grande potencial devido as inúmeras atividades relatadas na literatura, como: **atividade antioxidante**, atividade anti-inflamatória, efeito antineoplásico, efeito protetor contra doenças neurológicas e psiquiátricas, atividade antimicrobiana e anti-viral. Um estudo recente sobre constituintes bioativos da medicina indiana, indicou que a **vitexina** demonstra apresentar uma capacidade de interagir com componentes que bloqueiam a replicação viral no SARS-CoV2 (HE et al., 2016; LAKSHMI et al., 2016).

Na indústria química a **vitexina** tem uma grande importância econômica, pois o seu preço pode variar entre U\$ 50,0 a \$ 78,0. Portanto, a presença dessa substância pode agregar valor ao resíduo madeireiro estudado, no presente trabalho.

A substância **isovitexina** também foi isolada pela primeira vez nesta espécie em estudo. Sendo está um isômero da **vitexina**, a flavona apresenta vários potenciais farmacológicos semelhantes aos da vitexina. De acordo com a literatura, a vitexina é precursora da isovitexina, pois na espécie *Lemna minor* a vitexina foi encontrada

sendo convertida em isovitexina. Com isso, é muito provável encontrar as duas substâncias juntas em espécies vegetais (HE et al., 2016; WALLACE et al., 1979; MABRY et al., 1970).

A **isovitexina** assim como seu isômero, possui diversas atividades biológicas relatadas na literatura, como as **atividades antioxidante**, anti-inflamatória e anti-diabetes (HONGMING et al., 2016; CHOO et al., 2012). Além disso, esta substância tem grande valor de mercado na indústria química, maior que o seu isômero **vitexina**. O preço encontrado para 1 mg de **isovitexina** foi de U\$ 205,0, de acordo com o fornecedor Astatech.

As substâncias podem justificar a atividade antioxidante encontrada no extrato bruto e frações. Contudo, ainda há muito a se explorar sobre o potencial dessas e de outras substâncias presentes nas cascas de *D. racemosa*, pois existem outras frações ativas com substâncias fenólicas presentes, ainda não estudadas, bem como as contribuições de cada uma para a atividade encontrada do extrato. Ainda, deve-se reforçar a necessidade de explorar outros ensaios biológicos a serem realizados com esses extratos, frações e substâncias presentes, considerando que este trabalho direcionou apenas para atividade antioxidante. É bem relatado em diversas literaturas, substâncias como terpenóides, saponinas, alcalóides e fenólicos apresentarem diversas potencialidades tecnológicas. Este achado contribui para o conhecimento e valorização para o aproveitamento dos resíduos de *D. racemosa*, agregando valor ao material, bem como contribuindo para diminuir a poluição ambiental, causada pela atividade madeireira.

6. CONCLUSÃO

- A prospecção fitoquímica realizada com o extrato e frações de resíduos madeireiros da espécie *Diplotropis racemosa* por meio de reações em tubos de ensaio e por CCD evidenciou qualitativamente a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: taninos condensados, flavonas, flavonóis, xantonas, flavanonois, flavanonas, triterpenos pentacíclicos, saponinas e alcaloides.
- A análise por CCD foi importante para confirmar o rastreamento químico em tubo de ensaio para a presença de flavonoides no extrato bruto (B-LSP), e frações em acetato de etila (03), butanol (04) e resíduo hidroalcoólico (05). Além disso, permitiu acompanhar todo o processo de isolamento e, também, avaliar quais frações continuaram apresentando a atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH, após o fracionamento. Somente a fração em acetato de etila (03) apresentou capacidade redutora acima de 50 %, sendo possível obter CI_{50} de 49,27 $\mu\text{g/mL}$. A fração em acetato de etila (03) também apresentou maior concentração de fenóis totais. Devido a quantidade da fração acetato de etila, o isolamento foi direcionado para a segunda fração mais ativa, considerando o ensaio antioxidante de ABTS.
- A técnica de cromatografia de contra corrente de alta performance possibilitou o direcionamento rápido e eficaz para o fracionamento das substâncias com baixo custo, em virtude de não necessitar de solventes caros, ser reprodutível e ter capacidade de carga de amostra. Além disso, a técnica diminuiu o uso de solventes orgânicos em grande quantidade e de fases estacionárias, contribuindo dessa forma para minimizar a produção de resíduo oriundo desta pesquisa.
- No presente estudo de resíduos madeireiros foi possível purificar e identificar 4 flavonas C-glicosiladas inéditas da espécie *D. racemosa*, violantina (8,4 mg), isoviolantina (12,1 mg), vitexina (12 mg) e Isovitexina (7,7 mg), fazendo o uso de técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas.
- Essa pesquisa foi pioneira na caracterização fitoquímica dos resíduos madeireiros da espécies *D. racemosa*, coletada na região do Médio Amazonas. Para essa espécie não havia qualquer estudo fitoquímico relatado. Essa

espécie é beneficiada em grande escala na indústria madeireira, produzindo toneladas de resíduos.

- Estes resultados demonstram uma possibilidade para o aproveitamento tecnológico dos resíduos pela indústria, tornando uma fonte alternativa para agregar valor para esse rejeito, fornecendo substâncias com potencial tecnológico, contribuindo para o meio ambiente.
- Este trabalho contribui para o conhecimento fitoquímico do gênero *Diploptropis* e deverá ser continuado para o encontro de novas substâncias presentes e para novos potenciais biológicos, ainda a serem explorados.

7. REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, n. 10, vol. 31, pp. 3307-3330, 1992.

ALMEIDA, J.R.G.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; CABRAL, A.G.S.; AGRA, M.F.; DA-CUNHA, E.V.L.; DA SILVA, M.S.; NASCIMENTO, S.C.; BRAZ-FILHO, R. Diploflavone, a new flavonoid from *Diploptropis ferruginea* Benth (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 16, n. 6b, p. 1454-1457, 2005b.

ALMEIDA, J.R.G.S.; DA-CUNHA, E.V.L.; DA SILVA, M.S.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BRAZ-FILHO, R.; BARBOSA-FILHO, J.M. Outros constituintes químicos de *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n.2, p. 44-46, 2003b.

ANGELO, P. M.; JORGE, N.; Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66. n. 1. p. 232-40, 2007.

ARRUDA, A. L. A. Contribuição ao estudo de atividade biológica de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). **Tese de Doutorado**. Brasília, 2009.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

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. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 03, mar. 2006.

BERTHOD, A.; RUIZ-ÁNGEL, M. J.; CARDA-BROCH, S. Countercurrent chromatography: People and applications. **Journal Chromatography**. v. 1216, n. 19, p. 4206–4217, 2009.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia** n. 66. v. 4 p. 1085-1113, 2015.

BISCARO, L. M. Efeitos da irradiação gama e da cocção sobre aspectos físicos, químicos e sensoriais de cultivares de soja (*Glycine max*) com e sem lipoxigenase.

Dissertação de Mestrado. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2009.

BRASIL, **Ministério da Saúde.** Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília, 2016. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2017.

BRAZ, R. L.; NUTTO, L.; BRUNSMEIER, M. BECKER, G.; SILVA, D. A. Resíduos da colheita florestal e do processamento da madeira na Amazônia-uma análise da cadeia produtiva. **Journal of Biotchnology and Biodiversity**, Gurupi-Tocantins, v. 5, n. 2, p. 168-181, 2014.

BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; PINHO, S. L. V.; MONTE, F. J. Q; ROCHA, A. I. Flavonoids from Amazonian Leguminosae. **Phytochemistry**, v.12, p.1184-1186, 1973.

BURATTO, A. P.; CARPES, S. T.; VECCHIA, P. D.; LOSS, E. M. S. Determinação da atividade antioxidante e antimicrobiana em castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*). **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão (PR), v.2, n.1, p. 60-65, 2011.

BURITS, M.; BUCAR, F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. **Phytotherapy research**, v. 14, n. 5, p. 323-8, 2000.

BUTTENBENDER, S. L.; SIMON, E. S.; VOLPATO, N. M. Cromatografia contracorrente: princípios e aplicações. **Revista Eletrônica de Farmácia.** Ed. 15, 2018.

CARDOSO, D.; LIMA, H. C.; QUEIROZ, L. P. *Staminodianthus*, a new neotropical Genistoid legume genus segregated from *Diploptropis*. **Phytotaxa.** n. 110, p. 1-16, 2013.

CARDOSO, D.; LIMA, H. C.; RODRIGUES, R. S.; QUEIROZ, L. P.; PENNINGTON, R. T.; LAVIN, M. The *Bowdichia* clade of Genistoid legumes: Phylogenetic analysis of combined molecular and morphological data and a recircumscription of *Diploptropis*. **Taxon.** n. 61. p. 1074-1087, 2012.

CAROCHO, M. & FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**. p. 15-25, 2013.

CHAVES, M.H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina “química orgânica”. **Química Nova**. p. 560-561, 1997.

Choo, C.Y.; Sulong, N.Y.; Man, F.; Wong, T.W. Vitexin and isovitexin from the Leaves of *Ficus deltoidea* with in-vivo α -glucosidase inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 142. V. 3. P. 776-781, 2012.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88. n. 3. p. 113-8, 2007.

CLEMENT, B. A.; HIGUCHI, N. A. Floresta Amazônia e o Futuro do Brasil. **Ciência e Cultura**. Manaus, v. 58, n. 3, p. 44-29, 2006.

CONSERVATION INTERNATIONAL. **Biodiversity Hotspots**. 2010. Disponível em: <http://www.biodiversityhotspots.org/xp/hotspots/Pages/default.aspx>>. Acesso em: 27 abr. 2018.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E.A. MORAES, M. O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

COWAN, R. S. Caesalpinioideae. *In*: R. M. Polhill & P. H. Raven (eds.). Advances in Legume Systematics part I. Kew: **Royal Botanic Gardens**, p. 57-64, 1981.

DI STASI, L. C. & HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. revista ampliada, São Paulo, 2002.

DIAS, C. A. R.; MOURA, P. M. S. S.; D'ANGELIZ, C. E. M. A complexa interação entre radicais livres, suplementação e doenças. **Revista Multidisciplinar**, n. 10. p. 34-43, 2010.

FABACEAE IN FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**.

Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB79058>>. Acesso em: 02 Junho de 2019.

FLAMINI, G. Flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Viola strusca*. **Chemistry & Biodiversity**. v. 4, 2007.

FONSECA, M.C.M. **Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS**. Espaço para o produtor, Viçosa, 2012.

FRANÇA, J. R. K. G. **Estudo taxonômico de Leguminosae-“Caesalpinioideae” do Parque Nacional do Caparaó, Espírito Santo, Minas Gerais, Brasil**, 2014.

FRIESEN, J. B.; MCALPINE, J. B.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F. Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. **Journal of Natural Products**. v. 78, n. 7, p. 1765–1796, 2015.

FRIESEN, J.B.; PAULI, G.F. G.U.E.S.S. - A generally useful estimate of solvent systems in CCC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 28, n. 17, p. 2777–2806, 2005.

FRIESEN, J.B.; PAULI, G.F. Rational development of solvent system families in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 1151, n. 1–2, p. 51–59, 2007.

FU, U.; ZU, Y.; LIU, W.; HOU, C.; CHEN, L.; LI, S.; SHI, X.; TONG, M. Preparative separation of vitexin and isovitexin from pigeonpea extracts with microporous resins. **Journal of Chromatography A**. 2006.

FUSCO, D.; COLLOCA, G. L. O.; MONACO, M. R.; CESARI, M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. **Clinical Interventions Aging**, v. 2. n. 3. p. 377-87, 2007.

GARCIA, E.S. Biodiversity, Biotechnology and Health. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 491-494, jul./set. 1995.

GARRARD, J. I. J. Simple Approach to the Development of a CCC Solvent Selection Protocol Suitable for Automation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v.28, p. 1923, 2005.

GRANATO, D., NUNES, D. S., MATTOS, P. P., RIOS, E. M., GLINSKI, A., RODRIGUES, L. C., JÚNIOR, G. Z. Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 48, p. 237-241, 2005.

GUIMARÃES, A. C. Estudo químico e biológico de Cladocolea micranta (Loranthaceae), uma planta medicinal da região Amazônica. 305 p. **Tese de Doutorado em Ciências**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, n. 70, p. 257-65, 2012.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, n. 53, p. 2928-2935, 2005.

HE, M.; MIN, J.W.; KONG, W.L.; HE, X.H.; LI, J.X.; PENG, B.W. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**. P. 74-85. 2016.

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEIJER, R. J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae a chemotaxonomic approach. Review Article Number 80, **Phytochemistry**, v.44, n.1, p.3-16, 1993.

HONGMING, LV.; YU, Z.; ZHENG, Y.; WANG, L.; QIN, X.; CHENG, G.; CI, X. Isovitexin exerts anti-inflammatory and anti-oxidant activities on lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting MAPK and NF-kB and activating HO-1/Nrf2 Pathways. **Internacional Journal of Biological Sciences**. N. 1. V. 12. p. 72-86, 2016.

HU, R.; PAN, Y. Recent trends in counter-current chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 40, p. 15–27, 2012.

HUANG, X.; DI, D. Chiral separation by countercurrent chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 67, p. 128–133, 2015.

HUANG, X.Y.; SVETLANA, I.; HEWITSON, P.; DI, D.L. An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 77, p. 214–225, 2016.

HUBER, K.; QUEIROZ, J. H.; MOREIRA, A. V. B.; RIBEIRO, S. M. R. Caracterização química do resíduo agroindustrial da manga ubá (*Mangifera indica* L.): uma perspectiva para a obtenção de antioxidantes naturais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 1, p. 640-654, 2012.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.1, p. 97-108, 2008.

IGNATOVA, S.; SUMNER, N.; COLCLOUGH, N.; SUTHERLAND, I. Gradient elution in counter-current chromatography: A new layout for an old path. **Journal Chromatography**. v. 1218, n. 36, p. 6053–6060, 2011.

ISSA, A. Y.; VOLATE, S. R.; WARGOVICH, M. J. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. **Journal of Food Composition Analysis**, n. 19. p. 405-19, 2006.

ITO, Y. Countercurrent chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v. 5, n. 2, p. 105–129, 1981.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 1065, n. 2, p. 145–168, 2005.

JOMOVA, K. & VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283. n. 2-3. p. 65-87, 2011.

KHLEBNIKOV, A. I., SCHEPETKIN, I. A., DOMINA, N. G., KIRPOTINA, L. N., QUINN, M. T. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1749–1770, 2007.

KIM, H. J.; PARK, G. M.; KIM, J. K. Anti-inflammatory effect of pristimerin on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. **Archives of Pharmacal Research**. v, 36. n, 4. p:495-500, 2013.

KINGHORN, A.D.; BALANDRIN, M.F.; LIN, L. Alkaloid distribution in some species of the papilionaceous tribes Sophoreae, dalbergieae, loteae, brongniartieae and bossiaeeae. **Phytochemistry**. v. 21, n. 9, p. 2269-2275, 1982.

KOURY, C. G.; VIANNA, A. L. M. **Guia prático do Manejo Florestal Sustentável em Pequena Escala**. Manaus: Instituto de Conservação e Desenvolvimento Sustentável do Amazonas (IDESAM), 2014.

KOURY, C. G.; VIANNA, A. L. M., RIZZO, E. G., ROCHA, S. R. S., LATTARI, P. **Diagnóstico das Cadeias Produtivas Florestais Análise dos municípios de Apuí, Boa Vista do Ramos, Itacoatiara, Itapiranga, Maués e São Sebastião do Uatumã**. Manaus: Instituto de Conservação e Desenvolvimento Sustentável do Amazonas (IDESAM), 2013.

LAKSHMI, R., SUPRAJA M., MOUNIKA M.; SRINIVASA, P. A Review on Hypoglycaemic Activity of Different Extracts of Various Medicinal Plants. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 7, n.8, p.3173-3184, 2016.

LAKSHMI, R., Supraja M., Mounika M.; Srinivasa, P. A Review on Hypoglycaemic Activity of Different Extracts of Various Medicinal Plants. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n.8, p.3173-3184, 2016.

LEITÃO, G.G. Uso da cromatografia contracorrente na obtenção de padrões de origem vegetal. **Revista Fitos**. v.1, n. 2, 2005.

LEITE, L. H.; TINTINO, S.R.; FIGUEREDO, F.G., OLIVEIRA C. D. de M, OLIVEIRA, L.; SIEBRA, A. L. de A.; SAMPAIO, R. de S.; BOLIGON A. A., SOUZA D. O; ATHAYDE M. L.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; KERNTOPF, M. R. Composição química e estudo da atividade antibacteriana de *Bowdichia virgilioides* Kunth (Sucupira) – Fabaceae – Papilionoidae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. v.13, n. 5, p. 477 – 487, 2014.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Eds.) **Legumes of the World**. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 1-7, 2005.

LIMA, H. C. Contribuição ao estudo do gênero *Diplotropis Benth* (Leguminosae-Faboideae). **Bradea**, n. 3, p.187-192, 1981.

LIMA, H. C.; CORREIA, C. M. B.; FARIAS, D. S. **Leguminosae**. In: Lima, M. P. M.; Guedes-Bruni, R. R. (eds). Reserva Ecológica de Macaé de Cima: Nova Friburgo-RJ: Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 167-228, 1994.

LIMA, H.C.; QUEIROZ, L.P.; MORIM, M.P.; SOUZA, V.C.; DUTRA, V.F.; BORTOLUZZI, R.L.C.; IGANCI, J.R.V.; FORTUNATO, R.H.; VAZ, A.M.S.F.; SOUZA, E.R.; FILARDI, F.L.R.; VALLS, J.F.M.; GARCIA, F.C.P.; FERNANDES, J.M.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; PEREZ, A.P.F.; MANSANO, V.F.; MIOTTO, S.T.S.; TOZZI, A.M.G.A.; MEIRELES, J.E.; LIMA, L.C.P.; OLIVEIRA, M.L.A.A.; FLORES, A.S.; TORKE, B.M.; PINTO, R.B.; LEWIS, G.P.; BARROS, M.J.F.; RIBEIRO, R.D.; SCHUTZ, R.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B.B.; RANDO, J.G.; SCALON, V.R.; CARDOSO, D.B.O.S.; COSTA, L.C.; SILVA, M.J.; MOURA, T.M.; BARROS, L.A.V.; SILVA, M.C.R.; QUEIROZ, R.T.; SARTORI, A.L.B. & CAMARGO, R.. **Fabaceae**. In Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. v. 2. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acessado em 21/10/2017.

LIMA, J.T.; ALMEIDA, J.R.G.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ASSIS, T.S.; SILVA, M.S.; DA-CUNHA, E.V.L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, B.A. Spasmolytic action of Diplotropin, a furanoflavan from *Diplotropis ferruginea* Benth., Involves calcium Blockade in Guinea-Pig Ileum. **Zeitschrift fur Naturforschun B**. v. 60b, p. 1093-1100, 2005.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radicals theory of aging. **Free Radical Biology & Medicine**, n. 60. p. 1-4, 2013.

LOPES, N. P.; DE SOUZA; G. H.; DE MELLO; J. C. P. **Farmacognosia: coletânea**. Ouro Preto: UFOP, 2012.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil vol. 2**. Nova Odessa: Instituto Platarum, 2ª ed., p. 368, 2002.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. Reagents and procedures for the ultraviolet spectral analysis of flavonoids. In: *The systematic identification of flavonoids*. Springer Berlin Heidelberg, p. 35-40, 1970.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27. n. ½. p. 33-9, 2008.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **Journal of Chromatography**. v. 1112, p. 181–194, 2006.

MATOS, F. T. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, p. 150, 2009.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p.1088-1093, 2011.

MENSOR, L. L.; MENEZER, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MINGUILLÓN, C. Countercurrent chromatography, scope and perspectives: Application to chirotechnology. **Chemical Engineering & Technology**. v. 35, n. 1, p. 35–45, 2012.

MOHAMMED, R.S.; ZEID, A.H.A.; HAWARY, S.S.; SLEEM, A.A.; ASHOUR, W.E. Flavonoid constituents, cytotoxic and antioxidant activities of *Gleditsia triacanthos* L. leaves. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2014.

MOURA, L.C.; TITON, M.; FERNANDES, J.S.C.; SANTANA, R.C. Germinação in vitro e aclimação de plântulas de sucupira-preta (*Bowduchia virgilioides* Kunth). **Journal of Biosciences**, v. 30, supl. 2, p. 678-687, 2014.

PATHAK, M; KUMAR R., SINGH, M. K., MAURYA O.; AVINASH K. BHARATI A Review on Traditional Larvicidal Plants. **Mintage journal of Pharmaceutical & Medical Sciences**, v. 7, Suppl 3, p.1-9, 2018

PAZINATTO, C. Avaliação in vitro da capacidade antioxidante de grãos de amaranto (*Amaranthus cruentus*). **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

PEREIRA, A. C. S. Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante total de frutas tropicais e cítricas produzidas no Ceará. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2009.

PEREIRA, R.; SOUZA, E. B.; FONTENELLE, R. O. S.; VASCONCELOS, M. A.; SANTOS, H. S.; TEIXEIRA, E. H. Diversidade estrutural e potencial biológico dos metabólitos secundários de espécies do gênero *Myroxylon L.f.* (Fabaceae): uma revisão da literatura. **Hoehnea** n. 46, v. 1, p. 1-11, 2019.

PRADO, A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. **Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2009.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and cofactors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2. n. 2. p. 219-36, 2007.

RIBEIRO, E. M. G. Atividade antioxidante e polifenóis totais do fruto de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) com e sem casca. **Dissertação de Mestrado**. Rio de Janeiro, 2011.

ROCHA, S. H., SILVA, C. C. M., CALAND-NETO, L. B., LOPES, J. A. D., CITÓ, A. M. G. L.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Química Nova**, n. 30, p.1877-1881, 2007.

ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; CATANEO, C.; GONZAGA, L. V.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.3, p. 271-276, 2008.

ROSKOY, Y. R., BISBY, F. A., ZARUCCHI, J. L., SCHRIRE B. D. & WHITE R. J. **International Legume Database and Information Service** (ILDIS), 2006. Disponível em [http:// https://ildis.org/LegumeWeb10.01.shtml](http://https://ildis.org/LegumeWeb10.01.shtml), acessado em 11/08/2020.

RUFINO, M. do S.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S. de; MORAIS, S.M. de; SAMPAIO, O. de G; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2007.

SHANTY, A.; MOHANAN, P. Heterocyclic Schiff bases as non toxic antioxidants: Solvent effect, structure activity relationship and mechanism of action. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 192, p. 181-187, 2017.

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química nova**, v. 34. n. 2. p. 300-305, 2011.

SILVA, W.L.S.; GURGEL, E.S.C.; DOS SANTOS, J.U.M.; SILVA, M.F. Inventário e distribuição geográfica de Leguminosae no arquipélago de Marajó, PA, Brasil. **Hoehnea**. n. 40, v. 4, p. 627-647, 2012.

SILVA-JÚNIO, R. C. A.; SILVA, L. C. N.; SOUZA, R. M.; ARANDA-SOUZA, M.; PEREIRA, D. S. T.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. *Myroxylum peruiferum*: antioxidant activity and phenolic content. **Current Topics in Phytochemistry**, n. 1, p. 21-25, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. LTC-Rio de Janeiro, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC. Porto Alegre, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCKENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, Artmed, 2017.

SOARES, M.; TICLIA, F. K.; MARCUSSI, S., LOURENÇO, M.V., JANUÁRIO, A.; SAMPAIO H.S.V.; GIGLIOB, J.R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. S. Medicinal Plants

with Inhibitory Properties Against Snake Venoms Andreimar **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 22, p. 2625-2641, 2005.

SOARES, W.F.; MELO, L.E.L.; LISBOA, P.L.B. Anatomia do lenho de cinco espécies comercializadas como “sucupira”. **Floresta e Ambiente**, n. 21. n. 1, p. 114-125, 2014.

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

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

SUTHERLAND, I. A. Recent progress on the industrial scaleup of counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 1151, p. 6–13, 2007.

TEPE, B.; MUNEVVER, H.; AKPULAT, A. SOKMEN, A. Atividade antioxidante in vitro dos extratos de metanol de cinco espécies de *Allium* da Turquia. **Química dos Alimentos**. p. 89-92, 2005.

THOMAZZI, S.M.; SILVA, C.B.; SILVEIRA, D.C.R.; VASCONCELLOS, C.L.C.; LIRA, A.F., CAMBUI, E.V.F.; ESTEVAM, C.S.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of Ethnopharmacology** v.127, p. 451–456, 2010.

TIEPPO, M. *Croton Cajucara* Benth (SACACA) uma planta da Amazônia - Avaliação do seu potencial antioxidante. **Dissertação de Mestrado (Mestrado em Medicina)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

TIVERON, A. P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2010.

TORSSELL, K. B. G. **Natural Product Chemistry: A mechanistic, biosynthetic and ecological approach** (2nd ed.), Apotekarsocieteten-Swedish Pharmaceutical Society: Stockholm, 1997.

TROPICOS.org. Jardim **Botânico de Missouri**. Disponível em: <http://legacy.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Deguelia&commonname=>. Acessado em 14 de setembro de 2020.

VIEGAS JUNIOR., C. & BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, 326-337, 2006.

VUKICS, V; KERY, A.; BONN, G.K; GUTTMAN, A. **Major flavonoid components of heartsease (*Viola tricolor L.*) and their antioxidant activities**. Anal Bioanal Chem. P. 1917-1925, 2008.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Springer, Ed. 2. p. 359 – 364. 2001.

WAGNER, S. B. H.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Springer – Verlag, Berlin Heidelberg, New York Tokyo, 1984.

WALLACE, J.W.; STORY, D.T., BESON; CHOPIN, J. **Violanthin and Isoviolanthin From The Marattiaceous Fern *Angiopteris Evecta***. Phytochemistry, 1979, v. 18, p. 1077

WANG, L.; CHAO-FENG ZHANG, ZHENG-TAO WANG, MIAN ZHANG & LUO-SHAN XU (2009) Five new compounds from *Dendrobium crystallinum*. **Journal of Asian Natural Products Research**, 11:11, 903-911.

WATSON, L. & DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. 2009. Disponível em: <http://delta-intkey.com> (acesso em 10-09-2018).

WINTERBOURN, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**. n. 4. p. 278-86, 2008.

XING, S.; YU, W.; ZHANG, X.; LUO, Y.; LEI, Z.; HUANG, D.; LIN, J.; HUANG, Y.; HUANG, S.; NONG, F.; ZHOU, C.; WEI, G. Isoviolanthin extracted from *Dendrobium officinale* reverses TGF- β 1-Mediated epithelial-mesenchymal-transition in hepatocelular carcinoma cells via deactivating the TGF- β /Smad and PI3K/Akt/mTOR

signaling pathways. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 19, p. 1556, 2018.

YANG, L., LIU, Y.L.; LIN, S.Q. HPLC analysis of flavonoids in the root of six *Glycyrrhiza* species. **Acta Pharmaceutica**. Pecado. 1990; 25: 840–848.

YE, Z.; DAI, J.R.; ZHANG, C.G.; LU, Y.; WU, L.L.; GONG, A.G.W.; XU, H.; TSIM, K.W.K.; WANG, Z.T. Chemical diferenciação de *Dendrobium officinale* e *Dendrobium devonianum* usando impressões digitais UPLC, HPLC-ESI-MS, e análises HPTLC. Complemento baseado em evidências. **Alternative Medicine**. 2017.

ZHANG, T.; CAO, X.; HAN, X. Preparation of National Certified Reference Materials of Active Compounds from Natural Products by CCC. **Journal of Chromatography and Related Technologies**, n. 26, p. 9-10, 2003.