



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Aeschynomene fluminensis* e de *Machaerium hirtum* (Fabaceae) de Porto Rico - Paraná

Tese apresentada por **Marlene Capelin Ignoato** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.



MARINGÁ, JANEIRO/2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de
Aeschynomene fluminensis e de *Machaerium hirtum* (Fabaceae) de
Porto Rico - Paraná**

TESE DE DOUTORADO

Doutoranda: MARLENE CAPELIN IGNOATO

Orientadora Professora Dra. Silvana Maria de Oliveira Santin

Maringá-PR, 2012

Catálogo na Fonte por Elda Lopes Lira CRB9/1295

I247c Ignoato, Marlene Capelin

Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Aeschynomene fluminensis* e de *Machaerium hirtum* (Fabaceae) de Porto Rico – Paraná / Marlene Capelin Ignoato – 2012.
xxiii, 209 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Silvana Maria de Oliveira Santin
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá.
Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da UEM, área de concentração em Química, 2012.

Bibliografia

1. *Aeschynomene*. 2. *Machaerium*. 3. Estudo fitoquímico. 4. Atividade anti-inflamatória. I. Santin, Silvana Maria de Oliveira, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da UEM, área de concentração em Química. III. Título.

CDD(22. ed.) 547



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Tese apresentada por **Marlene Capelin Ignoato**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 31 de janeiro de 2012.

COMISSÃO JULGADORA:

.....
Prof. Dra. Silvana Maria de Oliveira Santin
PRESIDENTE - UEM-DQI

.....
Prof. Dra. Maria Helena Sarragiotto
MEMBRO - UEM/DQI

.....
Prof. Dr. Armando Mateus Pomini
MEMBRO - UEM-DQI

.....
Prof. Dr. Cesar Cornelio Andrei
MEMBRO - UEL

.....
Prof. Dra. Sirlei Dias Teixeira
MEMBRO - UTFPR

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus
pela vida e pela oportunidade.*

*Aos meus filhos Gabriel e Eduarda por terem suportado
tanto a minha ausência mesmo estando presente.*

Ao meu esposo Ivanor pela paciência.

*À minha mãe Maria, ao meu Pai Modesto pela
compreensão e apoio em todos os momentos difíceis de
minha vida.*

À minha sogra Maria pelo carinho e apoio.

Agradecimentos

À Deus, por permitir a realização deste trabalho.

À prof. Dra. Silvana Maria de Oliveira Santin, pela orientação, ensinamentos e amizade.

Aos professores Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado e Celso Vataru Nakamura pela orientação nas atividades biológicas.

Aos professores da pós-graduação (UEM) Ernani, Silvana, Cleuza, Maria Helena, Wagner, Wilian, João Carlos, Celso, Ciomar pela formação proporcionada.

À Ivânia, pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear realizados e, pelo auxílio fornecido.

Ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Claudemir e a Cristina pela simpatia no atendimento e nos esclarecimentos.

À prof. Dra. Maria Conceição de Souza, pela classificação das espécies vegetais estudadas.

Aos colegas de pesquisa no laboratório Fitosín: Leticia, Elisa, Gláucio, Júlio, Narcimário, Fayline, Hugo, Rafael, Vanessa e principalmente minha amiga Rebeca pela troca de idéias e pelo companheirismo.

Especialmente aos alunos de iniciação científica (PJBIC/Araucária – UEM) que passaram pela “minha bancada”: Marcos Felipe Pinatto Botelho e Rodrigo Monteiro Fabrão.

Às colegas Laura e Samara que contribuíram auxiliando nos testes biológicos.

E, todos aqueles, que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

À PJCDFec-CAPES, pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

À UFPR pelo afastamento concedido e, assim, tornar possível a realização deste curso.

Muito Obrigada!

*“O que nós somos é o presente de Deus a nós.
O que nós nos tornamos é nossa presente a Deus.”
(Eleanor Powell)*

Resumo

Palavras-chave: *Aeschynomene*, *Machaerium*, estudo fitoquímico, atividade anti-inflamatória.

A família **Fabaceae** (Leguminosae) é constituída por 750 gêneros e mais de 18000 espécies, distribuídas em todo o mundo. No Brasil esta é representada por aproximadamente 175 gêneros e 1500 espécies. As espécies da família **Fabaceae** são particularmente ricas em flavonoides e compostos biossinteticamente relacionados, como rotenóides e isoflavonoides. Alcalóides, terpenóides e esteróides são exemplos de outras classes de substâncias que ocorrem em muitos exemplares da família. Dentre as espécies representantes desta família na região de Porto Rico-PR, área de proteção ambiental, está *Aeschynomene fluminensis* e *Machaerium hirtum*. Uma revisão bibliográfica destas espécies indicou a ausência de estudos fitoquímicos e biológicos, o que motivou a escolha das mesmas para investigação. Ainda foi verificado que *M. hirtum* é utilizada na medicina popular contra tosse, diarreia e câncer. O estudo fitoquímico para as duas espécies foi iniciado a partir da obtenção dos extratos brutos metanólicos das folhas e dos galhos, por maceração, e as obtenções de frações destes extratos a partir de partições em solventes de polaridades diferentes. As frações obtidas foram submetidas a purificações cromatográficas em colunas de gel de sílica e/ou Sephadex LH-20. Os tratamentos cromatográficos realizados para as frações de *A. fluminensis* levaram ao isolamento dos flavonóides canferitrina, α -raminoisorobina, quercitrina, 3-O-apiofuranosil-7-O-raminopiranosil-canferol e avicularina, da procianidina A2; da flavanona iso-hemifolina; da isoflavona daidzeína e do açúcar 3-O-metil-*quiro*-inositol. O estudo das frações obtidas de *M. hirtum*, resultou no isolamento das flavonas isovitexina e swertisina; do alcalóide 4-hidróxi-N-metil-prolina; dos triterpenos friedelan-3-ona e lupen-20(29)-3 β -ol e da mistura dos esteróides estigmasterol e sitosterol, a qual também foi encontrada em *A. fluminensis*. A elucidação das estruturas foi realizada mediante análise de dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C e de técnicas bidimensionais (gCOSY,

gHSQC e gHMBC) e por comparação com os dados relatados na literatura. Os extratos brutos e frações de *A. fluminensis* foram submetidos a ensaios de atividade anti-inflamatória no modelo edema de orelha e se mostraram todos ativos, sendo mais significativos os extratos e frações hexânicas das folhas e dos galhos. Nos ensaios de atividade da enzima de mieloperoxidase (MPO) apresentaram resultados significativos todas as frações de *A. fluminensis* com maiores atividades as frações hexânicas e CHCl_3 das folhas e dos galhos. Os extratos brutos e todas as frações de *M. hirtum* apresentaram bons resultados quando submetidos a ensaios de atividade anti-inflamatória no modelo edema de orelha, para a substância 4-hidróxi-*N*-metil-prolina este ensaio resultou em redução moderada. Na atividade da enzima de mieloperoxidase apresentaram resultados significativos os extratos e todas as frações de *M. hirtum*, sendo mais ativas as frações hexânicas e AcOEt das folhas e dos galhos e CHCl_3 dos galhos. A mistura swertisina e isovitexina e a substância 4-hidróxi-*N*-metil-prolina apresentaram redução pronunciada da enzima. O teste de pleurisia foi significativo apenas para o extrato bruto das folhas de *M. hirtum*. No teste da atividade antitumoral de *A. fluminensis* sobre células Caco-2 foi observado que a fração CHCl_3 dos galhos e a canferitrina apresentaram os resultados mais promissores.

Abstract

Keywords: *Aeschynomene*, *Machaerium*; Phytochemical study; Anti-inflammatory activity.

The **Fabaceae** family (Leguminosae) comprises 750 genera and over 18000 species, distributed worldwide. In Brazil it is represented by approximately 175 genera and 1500 species. The **Fabaceae** species are particularly rich in flavonoids and biosynthetically related compounds, such as isoflavonoids and rotenoids. Alkaloids, terpenoids and steroids are examples of other classes of substances that occur in many samples of the family. *Aeschynomene fluminensis* and *Machaerium hirtum* are among the representative species of this family in the region of Porto Rico-Paraná state, an environmental protection area. A literature review of these species indicated the absence of phytochemical and biological studies, which motivated their choice for investigation. It was also found that *M. hirtum* is used in folk medicine against cough, diarrhea and cancer. The phytochemical study for both species was initiated after obtaining the methanol crude extracts of leaves and twigs, by percolation, and the varieties of extract fractions by means of partitions in different polarities solvents. The obtained fractions were subjected to purification on chromatographic columns of silica gel and/or Sephadex LH-20. The chromatographic treatments performed for *A. fluminensis* fractions led to the isolation of the following flavonoids: kaempferitrin, α -rhamnoisorobin, quercitrin, 3-*O*-apiofuranosyl-7-*O*-rhamnopyranosyl-kaempferol and avicularin, A2 procyanidin; the flavanone iso-hemipholin; the isoflavone daidzein and the 3-*O*-methyl-*chiro*-inositol sugar. The study of the obtained fractions of *M. hirtum* resulted in the isolation of the isovitexin and swertisin flavones; of the 4-hydroxy-N-methyl-proline alkaloid, the friedelan-3-one and lupen-20(29)-3 β -ol triterpenes and the stigmasterol and sitosterol steroids mixture, which was also found in *A. fluminensis*. The elucidation of the structures was performed by analysis of spectroscopic data of ^1H and ^{13}C NMR and bidimensional techniques (gCOSY, gHSQC and gHMBC) and by comparison with the data reported in the literature. The crude extracts and the *A. fluminensis*

fractions were tested for anti-inflammatory activity in the ear edema model and showed all active; the most significant were the extracts and hexane fractions from leaves and twigs. The tests of the myeloperoxidase (MPO) enzyme activity showed significant results for all *A. fluminensis* fractions with more activities for the CHCl_3 and hexane fractions of leaves and twigs. The crude extracts and all *M. hirtum* fractions showed good results when tested for anti-inflammatory activity in the ear edema model; for the substance 4-hydroxy-N-methyl-proline this test resulted in moderate reduction. For the activity of the myeloperoxidase enzyme, the *M. hirtum* extracts and all fractions showed significant results, being more active the hexane and EtOAc fractions of leaves and twigs and CHCl_3 of twigs. The swertisin and isovitexin mixture and the substance 4-hydroxy-N-methyl-proline showed pronounced enzyme reduction. The pleurisy test was significant only for the crude extract of *M. hirtum* leaves. When testing the *A. fluminensis* antitumor activity on Caco-2 cells, it was observed that the CHCl_3 fraction of the twigs and the kaempferitrin showed the most promising results.

Sumário

Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Esquemas.....	xxi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xxii
1. Introdução.....	01
1.1. A família Fabaceae (Leguminosae).....	02
1.2. O Gênero <i>Aeschynomene</i>	05
1.3. A espécie vegetal <i>Aeschynomene fluminensis</i> Vell.....	09
1.4. O Gênero <i>Machaerium</i>	09
1.5. A espécie vegetal <i>Machaerium hirtum</i> (Vell.) Stelfeld.....	21
2. Dados Botânicos das espécies <i>A. fluminensis</i> Vell. e <i>M. hirtum</i> Vell. Stelfeld	23
3. Objetivos.....	23
4. Parte experimental.....	23
4.1. Materiais e Métodos.....	23
4.2. Material Vegetal.....	25
4.3. Fracionamento dos Extratos Brutos das Folhas e dos Galhos de <i>Aeschynomene fluminensis</i> e <i>Machaerium hirtum</i>	26
4.4. Estudo das frações de <i>Aeschynomene fluminensis</i>	26
4.4.1. Estudo das frações das folhas de <i>Aeschynomene fluminensis</i>	26
4.4.2. Estudo da fração hexânica das folhas.....	27
4.4.3. Estudo da fração clorofórmica das folhas.....	28
4.4.4. Estudo da fração acetato de etila das folhas.....	28
4.4.5. Estudo da fração <i>n</i> -butanólica das folhas.....	30
4.4.6. Estudo da fração aquosa das folhas.....	31
4.4.7. Estudo das frações dos galhos de <i>Aeschynomene fluminensis</i>	31
4.4.8. Estudo da fração hexânica dos galhos	32
4.4.9. Estudo da fração clorofórmica dos galhos.....	33
4.4.10. Estudo da fração acetato de etila dos galhos.....	34

4.4.11. Estudo da fração <i>n</i> -butanólica dos galhos.....	34
4.4.12. Estudo da fração aquosa dos galhos.....	35
4.4.13. Estudo do Extrato Bruto das Sementes de <i>Aeschynomene fluminensis</i>	36
4.5. Estudo das frações de <i>Machaerium hirtum</i>	39
4.5.1. Estudo das frações das folhas de <i>Machaerium hirtum</i>	39
4.5.2. Estudo da fração hexânica das folhas.....	39
4.5.3. Estudo da fração clorofórmica das folhas.....	40
4.5.4. Estudo da fração acetato de etila das folhas.....	40
4.5.5. Estudo da fração <i>n</i> -butanólica das folhas.....	42
4.5.6. Estudo da fração hidrometanólica das folhas.....	43
4.5.7. Estudo das frações dos galhos de <i>Machaerium hirtum</i>	44
4.5.8. Estudo da fração hexânica dos galhos.....	45
4.5.9. Estudo da fração clorofórmica dos galhos.....	46
4.5.10. Estudo da fração acetato de etila dos galhos	47
4.5.11. Estudo da fração <i>n</i> -butanólica dos galhos.....	49
4.5.12. Estudo da fração aquosa dos galhos.....	49
4.6. Ensaio Biológicos.....	51
4.6.1. Atividade anti-inflamatória.....	51
4.6.1.1. Teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	51
4.6.1.2. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	51
4.6.1.3. Teste da atividade de pleurisia.....	52
4.6.2. Teste da Atividade Antitumoral.....	53
4.6.2.1. Cultura de células.....	53
4.6.2.2. Desenvolvimento da Atividade Antitumoral.....	53
5. Resultados e discussões.....	55
5.1. Substância A1.....	55
5.2. Substância A2.....	65
5.3. Substância A5.....	76
5.4. Substância A3.....	84
5.5. Substância A10.....	93

5.6. Substância A4.....	102
5.7. Substância A9.....	111
5.8. Substância A6.....	120
5.9. Substância A11.....	129
5.10. Substâncias A7 + A8 e M4 + M5.....	137
5.11. Substância M1.....	142
5.12. Substância M2.....	152
5.13. Substância M3.....	162
5.14. Substância M6.....	170
5.15. Substância M7.....	175
6. Resultado das Atividades Farmacológicas.....	182
6.1. Teste do Edema de Orelha.....	182
6.1.1. Efeito do extrato bruto das folhas e dos galhos de <i>A. fluminensis</i> e <i>M. hirtum</i> sobre o edema de orelha.....	182
6.1.2. Efeito das frações obtidas do extrato bruto das folhas e dos galhos de <i>A. fluminensis</i> sobre o edema de orelha.....	183
6.1.3. Efeito das frações obtidas do extrato bruto das folhas e dos galhos de <i>M. hirtum</i> sobre o edema de orelha.....	184
6.1.4. Efeito da mistura swertisina e isovitexina e a substância 4-hidróxi- <i>N</i> -metil-prolina isolada das folhas e galhos de <i>M. hirtum</i> sobre o edema de orelha.....	186
6.2. Efeito da atividade da enzima da mieloperoxidase (MPO).....	188
6.2.1. Efeito dos extratos brutos das folhas e dos galhos de <i>A. fluminensis</i> e <i>M. hirtum</i> sobre a atividade da enzima de MPO.....	188
6.2.2. Efeito das frações obtidas do extrato bruto das folhas e dos galhos de <i>A. fluminensis</i> sobre a atividade da enzima da MPO.....	189
6.2.3. Efeito das frações obtidas do extrato bruto das folhas e dos galhos de <i>M. hirtum</i> sobre a atividade da enzima da MPO.....	190
6.2.4. Efeito da mistura swertisina e isovitexina e a substância 4-hidróxi- <i>N</i> -metil-prolina isolada das folhas e galhos de <i>M. hirtum</i> sobre a atividade da enzima da MPO.....	191

6.3. Avaliação da atividade de pleurisia.....	192
6.3.1. Efeito dos extratos brutos das folhas e dos galhos de <i>A. fluminensis</i> sobre a pleurisia.....	192
6.3.2. Efeito dos extratos brutos das folhas de <i>M. hirtum</i> (500, 250 e 125 mg/kg) sobre a pleurisia.....	194
6.3.3. Efeito dos extratos brutos dos galhos de <i>M. hirtum</i> (500 mg/kg) sobre a pleurisia.....	195
6.4. Avaliação da atividade antitumoral.....	195
7. Conclusão.....	197
8. Referências.....	199

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais compostos isolados em algumas espécies do gênero <i>Machaerium</i>	10
Tabela 2: Classificação botânica das espécies <i>A. fluminensis</i> e <i>M. hirtum</i> .	23
Tabela 3: Obtenção do material vegetal e do extrato bruto.....	25
Tabela 4: Particionamento do extrato bruto e obtenção das frações.....	26
Tabela 5: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração hexânica das folhas de <i>A. fluminensis</i>	27
Tabela 6: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração AcOEt das folhas de <i>A. fluminensis</i>	29
Tabela 7: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração AcOEt das folhas de <i>A. fluminensis</i>	30
Tabela 8: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração <i>n</i> -BuOH das folhas de <i>A. fluminensis</i>	30
Tabela 9: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração aquosa (7-9) das folhas de <i>A. fluminensis</i>	31
Tabela 10: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração hexânica dos galhos de <i>A. fluminensis</i>	33
Tabela 11: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração CHCl ₃ dos galhos de <i>A. fluminensis</i>	33
Tabela 12: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração AcOEt dos galhos de <i>A. fluminensis</i>	34
Tabela 13: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração <i>n</i> -BuOH dos galhos de <i>A. fluminensis</i>	35
Tabela 14: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração aquosa dos galhos de <i>A. fluminensis</i>	36
Tabela 15: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 do extrato bruto metanólico das sementes de <i>A. fluminensis</i>	37
Tabela 16: Frações reunidas da CC em gel de sílica do extrato bruto metanólico das sementes de <i>A. fluminensis</i>	38
Tabela 17: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração hexânica	40

das folhas de <i>M. hirtum</i>	
Tabela 18: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração AcOEt das folhas de <i>M. hirtum</i>	41
Tabela 19: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração AcOEt das folhas de <i>M. hirtum</i> da junção 52-64.....	42
Tabela 20: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração <i>n</i> -BuOH das folhas de <i>M. hirtum</i>	43
Tabela 21: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração hidrometanólica das folhas de <i>M. hirtum</i>	44
Tabela 22: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração hexânica dos galhos de <i>M. hirtum</i>	46
Tabela 23: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração clorofórmica dos galhos de <i>M. hirtum</i>	47
Tabela 24: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração AcOEt dos galhos de <i>M. hirtum</i>	48
Tabela 25: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração <i>n</i> -BuOH dos galhos de <i>M. hirtum</i>	49
Tabela 26: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração aquosa dos galhos de <i>M. hirtum</i> da junção 20-28.....	50
Tabela 27: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos HMBC para A1	57
Tabela 28: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos COSY para A1	58
Tabela 29: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H , HMQC para a substância A1 em CD_3OD [ppm] (multiplicidade <i>J</i> Hz) e dados da literatura para a canferitrina.....	64
Tabela 30: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para a substância A2	68
Tabela 31: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos NOESY para A2	68
Tabela 32: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHSQC para a substância	75

A2 em CD ₃ OD [ppm] (multiplicidade <i>J</i> Hz) e dados da literatura para a α -raminoisorobina.....	
Tabela 33: Principais correlações heteronucleares ¹ H x ¹³ C observadas no mapa de contornos gHMBC para A5	80
Tabela 34: Dados de RMN de ¹³ C/DEPT, ¹ H e gHSQC para a substância A5 em CD ₃ OD [ppm] (multiplicidade <i>J</i> Hz) e dados da literatura para 3-O-apiofuranosil-7-O-raminopiranosil-canferol.....	83
Tabela 35: Principais correlações homonucleares ¹ H x ¹ H observadas no mapa de contornos gCOSY para A3	85
Tabela 36: Principais correlações heteronucleares ¹ H x ¹³ C observadas no mapa de contornos gHMBC para A3	90
Tabela 37: Dados de RMN de ¹³ C/DEPT, ¹ H e gHSQC para a substância A3 em CD ₃ OD [ppm] (multiplicidade <i>J</i> Hz) e dados da literatura para a quercitrina.....	92
Tabela 38: Principais correlações homonucleares ¹ H x ¹ H observadas no mapa de contornos NOESY para A10	94
Tabela 39: Principais correlações heteronucleares ¹ H x ¹³ C observadas no mapa de contornos gHMBC para a substância A10	99
Tabela 40: Dados de RMN de ¹³ C/DEPT, ¹ H e gHSQC para a substância A10 em CD ₃ OD [ppm] (multiplicidade <i>J</i> Hz) e dados da literatura para a avicularina.....	101
Tabela 41: Principais correlações homonucleares ¹ H x ¹ H observadas no mapa de contornos gCOSY para A4	103
Tabela 42: Principais correlações heteronucleares ¹ H x ¹³ C observadas no mapa de contornos gHMBC para A4	108
Tabela 43: Dados de RMN de ¹³ C/DEPT, ¹ H e gHSQC para a substância A4 em CD ₃ OD [ppm] (multiplicidade <i>J</i> Hz) e dados da literatura para a iso-hemifloina.....	110
Tabela 44: Principais correlações homonucleares ¹ H x ¹ H observadas no mapa de contornos gCOSY para A9	112
Tabela 45: Principais correlações heteronucleares ¹ H x ¹³ C observadas no	112

mapa de contornos gHMBC para A9	
Tabela 46: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHSQC para a substância A9 em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a isoflavona daidzeína.....	119
Tabela 47: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para A6	121
Tabela 48: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para a substância A6	126
Tabela 49: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHSQC para a substância A6 em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a procianidina A_2	128
Tabela 50: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para A11	130
Tabela 51: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para A11	136
Tabela 52: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHSQC para a substância A11 em D_2O [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para 3- <i>O</i> -metil- <i>quiro</i> -inositol.....	136
Tabela 53: Dados de RMN ^1H da mistura das substâncias A7 + A8 e M4 + M5 em CDCl_3 [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para estigmasterol e β -sitosterol.....	137
Tabela 54: Dados de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a mistura das substâncias A7 + A8 e M4 + M5 em CDCl_3 [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para os esteróides estigmasterol e β -sitosterol.....	141
Tabela 55: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para M1	144
Tabela 56: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para M1	149
Tabela 57: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHSQC para a substância M1 em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a swertisina.....	152

Tabela 58: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para M2	154
Tabela 59: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para M2	159
Tabela 60: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz) e ^1H (300 MHz), gHSQC e gHMBC para a substância M2 em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a isovitexina.....	161
Tabela 61: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para M3	162
Tabela 62: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para M3	167
Tabela 63: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHSQC para a substância M3 em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para 4-hidróxi-N-metil-prolina.....	169
Tabela 64: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz) e ^1H (300 MHz) para a substância M6 em CDCl_3 [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para friedelina.....	174
Tabela 65: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,5 MHz) e ^1H (300 MHz) para a substância M7 em CDCl_3 [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para lupeol.....	180
Tabela 66: Dados do teste da atividade antitumoral sobre células Caco-2..	196

Lista de Figuras

Figura 1: Foto da espécie vegetal <i>Aeschynomene fluminensis</i>	09
Figura 2: Imagem da espécie vegetal <i>Machaerium hirtum</i>	22
Figura 3: Espectro para a região do infravermelho ($V\text{ cm}^{-1}$) da substância A1 .	56
Figura 4: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300 MHz) para a substância A1	59
Figura 5: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,5 MHz) para a substância A1	60
Figura 6: Mapa de contornos HMQC (CD_3OD ; 75,5 e 300 MHz) para a substância A1	61
Figura 7: Mapa de contornos HMBC (CD_3OD ; 75,5 e 300 MHz) para a substância A1	62
Figura 8: Mapa de contornos COSY (CD_3OD ; 300 MHz) para a substância A1	63
Figura 9: Espectro de massas (70 eV) de A2	66
Figura 10: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300 MHz) para a substância A2	69
Figura 11: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,5 MHz) para a substância A2	70
Figura 12: Mapa de contornos gHSQC (CD_3OD ; 75,5 e 300 MHz) para a substância A2	71
Figura 13: Mapa de contornos gHMBC (CD_3OD ; 75,5 e 300 MHz) para a substância A2	72
Figura 14: Mapa de contornos gHMBC (CD_3OD ; 75,5 e 300 MHz) para a substância A2	73
Figura 15: Mapa de contornos NOESY (CD_3OD ; 300,06 MHz) para a substância A2	74
Figura 16: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A5	77
Figura 17: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,5 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A5	78

Figura 18: Mapa de contornos gHSQC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A5	79
Figura 19: Mapa de contornos gHMBC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A5	81
Figura 20: Mapa de contornos gHMBC (CD ₃ OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A5	82
Figura 21: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância A3	87
Figura 22: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a substância A3	87
Figura 23: Mapa de contornos gHSQC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância A3	88
Figura 24: Mapa de contornos COSY (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância A3	89
Figura 25: Mapa de contornos gHMBC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância A3	91
Figura 26: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância A10	95
Figura 27: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a substância A10	96
Figura 28: Mapa de contornos gHSQC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância A10	97
Figura 29: Mapa de contornos NOESY (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância A10	98
Figura 30: Mapa de contornos gHMBC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância A10	100
Figura 31: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A4	104
Figura 32: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A4	105
Figura 33: Mapa de contornos gHSQC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a	106

mistura das substâncias A1 e A4	
Figura 34: Mapa de contornos gCOSY (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A4	107
Figura 35: Mapa de contornos gHMBC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A4	109
Figura 36: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância A9	113
Figura 37: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a substância A9	114
Figura 38: Mapa de contornos gHSQC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância A9	115
Figura 39: Mapa de contornos gCOSY (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância A9	116
Figura 40: Mapa de contornos gCOSY (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância A9	117
Figura 41: Mapa de contornos gHMBC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância A9	118
Figura 42: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância A6	122
Figura 43: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a substância A6	123
Figura 44: Mapa de contornos gHSQC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância A6	124
Figura 45: Mapa de contornos gCOSY (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância A6	125
Figura 46: Mapa de contornos gHMBC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância A6	127
Figura 47: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância A11	131
Figura 48: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a substância A11	132

Figura 49: Mapa de contornos gHSQC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância A11	133
Figura 50: Mapa de contornos gCOSY (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância A11	134
Figura 51: Mapa de contornos gHMBC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância A11	135
Figura 52: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a mistura das substâncias A7 + M4 e A8 + M5	138
Figura 53: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a mistura das substâncias A7 + M4 e A8 + M5	140
Figura 54: Espectro de massas (70 eV) de M1	143
Figura 55: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância M1	145
Figura 56: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a substância M1	146
Figura 57: Mapa de contornos gHSQC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância M1	147
Figura 58: Mapa de contornos gCOSY (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância M1	148
Figura 59: Mapa de contornos gHMBC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância M1	150
Figura 60: Mapa de contornos NOESY (CD ₃ OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância 61	151
Figura 61: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância M2	155
Figura 62: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a substância M2	156
Figura 63: Mapa de contornos gHSQC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância M2	157
Figura 64: Mapa de contornos gCOSY (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância M2	158

Figura 65: Mapa de contornos gHMBC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância M2	160
Figura 66: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância M3	163
Figura 67: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a substância M3	164
Figura 68: Mapa de contornos gHSQC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância M3	165
Figura 69: Mapa de contornos gCOSY (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância M3	166
Figura 70: Mapa de contornos gHMBC (CD ₃ OD; 75,5 e 300 MHz) para a substância M3	168
Figura 71: Espectro de massas (70 eV) de M6	171
Figura 72: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância M6	172
Figura 73: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a substância M6	173
Figura 74: Espectro de massas (70 eV) de M7	176
Figura 75: Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD; 300 MHz) para a substância M7	178
Figura 76: Espectro de RMN de ¹³ C/DEPT (CD ₃ OD; 75,5 MHz) para a substância M7	179
Figuras 77a e 77b, 78a e 78b: Efeito do extrato bruto das folhas e dos galhos de <i>Aeschynomene fluminensis</i> e <i>Machaerium hirtum</i> sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (30-40g).....	182
Figuras 79a e 79b: Efeito das frações das folhas e dos galhos de <i>A. fluminensis</i> sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (30-40g).....	184
Figura 80: Efeito das frações das folhas de <i>M. hirtum</i> sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos	185

(30-40g).....	
Figura 81: Efeito das frações dos galhos de <i>M. hirtum</i> sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (30-40g).....	186
Figura 82: Efeito da mistura swertisina e isovitexina isolada nas frações acetato de etila das folhas e acetato de etila e <i>n</i> -butanólica dos galhos de <i>M. hirtum</i> sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (30-40g).....	187
Figura 83: Efeito da substância 4-hidróxi- <i>N</i> -metil-prolina isolada nas frações <i>n</i> -butanólica e hidrometanólica das folhas e aquosa dos galhos de <i>M. hirtum</i> sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (30-40g).....	188
Figuras 84a e 84b: Atividade da enzima da MPO no tecido das orelhas de camundongos Swiss, machos (30-40g): extrato bruto (EB) de <i>A. fluminensis</i> e de <i>M. hirtum</i>	189
Figuras 85a e 85b: Atividade da enzima da MPO no tecido das orelhas de camundongos Swiss, machos (30-40g): frações de <i>A. fluminensis</i>	190
Figuras 86a e 86b: Atividade da enzima da MPO no tecido das orelhas de camundongos Swiss, machos (30-40g): frações de <i>M. hirtum</i>	191
Figuras 87a e 87b: Atividade da enzima da MPO no tecido das orelhas de camundongos Swiss, machos (30-40g): mistura swertisina e isovitexina e a substância 4-hidróxi- <i>N</i> -metil-prolina das folhas e dos galhos de <i>M. hirtum</i>	192
Figuras 88a, 88b, 89a e 89b: Efeito do extrato bruto das folhas e dos galhos de <i>Aeschynomene fluminensis</i> sobre o acúmulo de exsudato pleural e migração celular (pleurisia) induzido pela injeção intrapleural de carragenina (Cg) em ratos Wistar (180-220 g).....	193
Figuras 90a e 90b: Efeito do extrato bruto das folhas de <i>Machaerium hirtum</i> (500, 250 e 125 mg/kg) sobre o acúmulo de exsudato pleural e migração celular (pleurisia) induzido pela injeção intrapleural de carragenina (Cg) em ratos Wistar, machos (180-220 g).....	194

Figuras 91a e 91b: Efeito do extrato bruto dos galhos de *Machaerium hirtum* 195
(500 mg/kg) sobre o acúmulo de exsudato pleural e migração celular
(pleurisia) induzido pela injeção intrapleural de carragenina (Cg) em ratos
Wistar, machos (180-220 g).....

Lista de Esquemas

Esquema 1: Procedimento utilizado no fracionamento das folhas de <i>A. fluminensis</i>	27
Esquema 2: Procedimento utilizado no fracionamento dos galhos de <i>A. fluminensis</i>	32
Esquemas 3 e 4: Procedimento utilizado no fracionamento das sementes de <i>A. fluminensis</i>	38
Esquema 5: Procedimento utilizado no fracionamento das folhas de <i>M. hirtum</i>	39
Esquema 6: Procedimento utilizado no fracionamento dos galhos de <i>M. hirtum</i>	45
Esquema 7: Propostas de fragmentações a partir do fragmento m/e 286 da substância A2	67
Esquema 8: Propostas de fragmentações para os picos m/e 267 e m/e 297 do Espectro de Massas da substância M1	143
Esquema 9: Propostas de fragmentações da substância M7	177

Lista de Abreviaturas e Símbolos

δ	deslocamento químico (em ppm)
θ	diâmetro
$\mu\text{g/mL}$	micrograma/mililitro
μL	microlitro
AcOEt	acetato de etila
AcOH	ácido acético
CC	coluna cromatográfica
CC ₅₀	concentração citotóxica (50%)
CCD	cromatografia em camada delgada
COSY	correlation spectroscopy; correlação ^1H - ^1H
gCOSY	gradient correlate spectroscopy
d	duplete
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DL ₅₀	dose letal capaz de matar 50% da população de animais
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EtOH/H ₂ O	etanol/água
E.P.M	erro padrão da média
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
gHMBC	gradient heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
gHSQC	gradient heteronuclear single-quantum coherence
Hz	hertz
J	constante de acoplamento
kg	quilograma
m	multiplete
MeOH	metanol
mg	miligrama
MHz	megahertz

<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -butanol
nm	nanômetro
NOESY	efeito nuclear overhauser enhancement spectroscopy
ppm	parte por milhão
R_f	fator de retenção
RMN	ressonância magnética nuclear
rpm	rotações por minuto
s	singleto
sl	sinal largo
ssp.	subespécie
q	quarteto
qd	quarteto de duplete
t	triplete
UV	ultravioleta

1. Introdução

O uso de plantas como alimento e para tratamento de doenças é prática comum do homem em toda sua história. Ao longo de gerações, a natureza foi observada, e entre constatações, mitos e rituais, os efeitos benéficos à saúde foram observados, bem como as propriedades alucinógenas e de cura de algumas espécies, que são os motivos que incorporam a busca por novas plantas em todas as épocas e em todas as culturas (Cechinel Filho *et al.*, 2003). Certamente as grandes civilizações dos antigos chineses, indianos e norte-africanos forneceram dados evidentes da engenhosidade do homem na utilização das plantas para tratamento de uma ampla variedade de doenças (Phillipson, 2001). A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente comprovando sua eficácia e segurança (Cechinel Filho *et al.*, 2003).

Com a demanda cada vez mais crescente da utilização de plantas medicinais na cura ou prevenção de doenças, e devido ao uso popular ou mesmo tradicional não serem suficientes para validar cientificamente as plantas medicinais como recurso terapêutico eficaz e seguro, tornaram-se intenso o interesse de pesquisadores em conhecer os verdadeiros potenciais químicos e biológicos responsáveis por tais ações (Sousa-Jr. *et al.*, 2009).

Desse modo, o estudo químico e farmacológico de plantas medicinais, visando obter novos compostos bioativos é de fundamental interesse na área de Produtos Naturais e para atingir este objetivo, no entanto, pesquisadores de várias áreas devem ser envolvidos.

Neste contexto, o Grupo de Pesquisa em Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica do Departamento de Química (DQI/UEM) em conjunto com pesquisadores das áreas de Botânica e Farmacologia da UEM, vêm consolidando a investigação de espécies vegetais, com o intuito de ampliar o estudo químico e biológico de algumas plantas e qualificar a utilização das mesmas, para que possam ser usadas de forma correta pela população.

Introdução

Desta forma, os estudos realizados com as espécies *Aeschynomene fluminensis* Vell. e *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld, vem ampliar o conhecimento do perfil químico e biológico dos gêneros e da família **Fabaceae**. Estas espécies estão presentes na região de Porto Rico, área de preservação ecológica do estado do Paraná.

1.1. A família Fabaceae (Leguminosae)

A família **Fabaceae** (Leguminosae) é constituída por 750 gêneros e mais de 18000 espécies (Wink, 2003), distribuída em todo o mundo, e representa uma das maiores famílias de Angiospermas depois de Asteraceae e Orchidaceae. No Brasil, esta família é representada por aproximadamente 175 gêneros e 1500 espécies (Oliveira, 1999; Souza e Lorenzi, 2008).

Os membros desta família mostram uma grande diversidade de hábito de crescimento, desde pequenas ervas efêmera a enormes árvores de vida longa. Também apresentam diversidade no habitat, ocorrendo em todas as regiões dentro do círculo ártico ao equador, em geral, seco, alagado, salino, montanhoso, aberto, sombreado e outros ambientes (Sprent, 1999). Tal diversidade morfológica gera muitas controvérsias no que se refere à taxonomia dessa família. Tradicionalmente Fabaceae foi reconhecida como uma única família, com três subfamílias (Faboideae ou Papilionoideae, Ceasalpinioideae, e Mimosoideae), exceto por Cronquist (1988) e alguns autores, que preferiram optar por três famílias distintas (Fabaceae, Ceasalpiniaceae e Mimosaceae). Este posicionamento não foi aceito totalmente, principalmente pelos especialistas em leguminosas, com base no fato destas três famílias, especialmente Ceasalpiniaceae, não constituírem grupos monofiléticos (não derivada de uma única espécie ancestral), o qual está sendo confirmado a cada novo trabalho. Desse modo, o reconhecimento das leguminosas em uma única família tem sido o posicionamento dos autores mais recentes, que se baseiam em dados macromoleculares e em cladística (análise das relações evolutivas: genealogia) (Souza e Lorenzi, 2008).

Encontram-se inúmeras espécies de interesse econômico, com variados tipos de utilização:

Introdução

- Utilizadas para o consumo humano e animal: o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glycine max*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a ervilha (*Pisum sativum*), o tremoço (*Lipinus spp.*), o grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e o tamarindo (*Tamarindus indica*).

- Fixadoras de nitrogênio (adubação verde): espécies de feijão-guandu (*Cajanus cajan*), o lab-lab (*Lablab purpureus*), a crotalária (*Crotalaria spp.*) e a alfafa (*Medicago sativa*), esta também usada como forrageira.

- Fornecedoras de madeira: a cerejeira (*Amburana cearensis*), o jatobá (*Hymenaea ssp.*), o angelim (*Hymenolobium ssp.*), a sucupira (*Bowdichia virgilioides* e outras espécies), o jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*), o angico (*Anadenanthera ssp.*), a canaviúna (*Dalbergia ssp.* e *Machaerium ssp.*) e muitas outras espécies.

- Fornecedoras de mel (néctar): canafístula (*Cassia grandis*), barreiro (*Machaerium aculeatum*), espinheiro, arranha gato, dorme-dorme (*Mimosa sp.*), aromita (*Acássia farnesiana*), etc.

- Fornecedoras de resina: goma arábica (extraída das espécies *Acacia senegal* e *Acacia seyal*), etc.

- Ornamentais: destacam-se a tipuana (*Tipuana tipu*) a sibipiruna (*Ceasalpinia pluviosa*), o pau-ferro (*Ceasalpinia ferrea*), o flamboyant (*Delonix regia*), a pata-de-vaca (*Bauhinia variegata*), a aleluia (*Senna macranthera*), o alecrim-de-campinas (*Holocalyx balansae*), o sombreiro (*Clitoria fairchildiana*) e a barba-de-barata (*Caesalpinia pulcherrina*).

- Fornecedoras de corantes: anileira (*Indigofera suffruticosa*) e pau-brasil (*Caesalpinia echinata*).

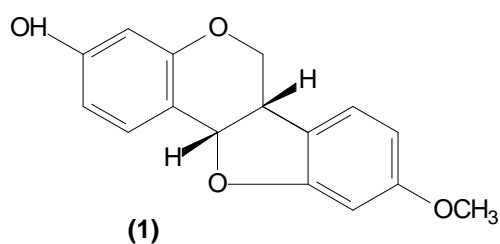
- Espécies usadas na medicina popular: sucupira (*Bowdichia major*), bálsamo-de-copaíba (*Copaifera langsdorffii*), fava (*Diplotropis purpurea*), caviúna, jacarandá, barreiro, espinheiro (*Machaerium sp.*), jurema (*Mimosa tenuiflora* e *Mimosa verrucosa*), cabriuva (*Myrocarpus frondosus*), bálsamo-do-peru (*Myroxylon peruiferum*), angico (*Piptadenia rígida*), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) etc. (Souza e Lorenzi, 2008; Kissmann, 1999; Seo et al., 2001; Pizzolatti et al., 2003; Pott e Pott, 1994).

Introdução

Sendo assim, o estudo fitoquímico tem se tornado imprescindível para auxiliar no posicionamento dos gêneros em suas tribos e subfamílias e também na identificação de substâncias bioativas, no caso de plantas usadas na medicina popular, auxiliando no uso correto das mesmas.

As espécies da família **Fabaceae** são particularmente ricas em flavonoides e compostos biossinteticamente relacionados, como rotenóides e isoflavonoides. Alcalóides, terpenóides e esteróides são exemplos de outras classes de substâncias que ocorrem em muitos exemplares da família, já os taninos têm frequência muito baixa se comparada aos flavonoides (Rocha e Silva *et al.*, 2007).

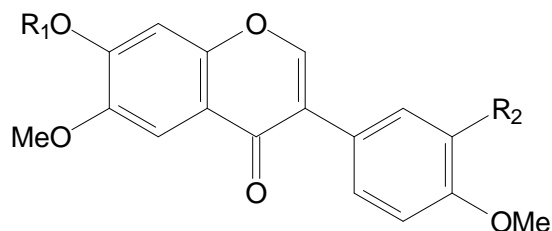
Os flavonoides são encontrados em todo o reino vegetal, enquanto os isoflavonoides são mais restritos e, particularmente prevalecem na subfamília Faboideae. Os isoflavonoides funcionam como substâncias pré-formadoras ou indutoras antimicrobianas, anti-inseticida, moléculas sinalizadoras de nodulação simbiótica por bactérias *Rhizobium*, ou como agentes alelopáticos. Pterocarpanos, como medicarpina **(1)** e isoflavonas glicosiladas são considerados isoflavonoides medicinais e sua ingestão tem um impacto significativo em ambos os seres humanos e animais, com base em suas atividades antimicrobiana, antioxidante, estrogênica, ou amplo espectro de outras atividades farmacológicas (Farag *et al.*, 2007).



Em pesquisa na literatura sobre a subfamília Faboideae, os derivados de isoflavona se destacaram na espécie *Bowdichia virgilioides* Kunt. Esta planta, conhecida na medicina popular como 'sucupira' é usada para tratar reumatismo, artrite e diabetes. Dentre os compostos isolados destacam-se os derivados de isoflavona: odoratina **(2)**, afromosina **(3)**, wistina **(4)**, cladrastina **(5)**, 7-O-β-D-

Introdução

glucopiranosil-cladrastina (6), fujiqinetina (7), fujiquinina (8) e iso-hemifloina (9) (Veloza *et al*, 1999).



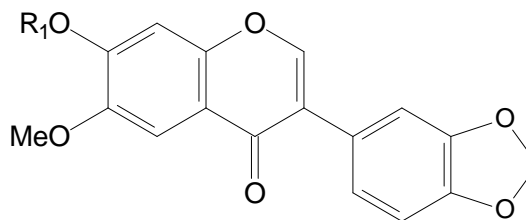
(2) R₁=H, R₂=OH

(3) R₁=R₂=H

(4) R₁=β-D-Glc, R₂=H

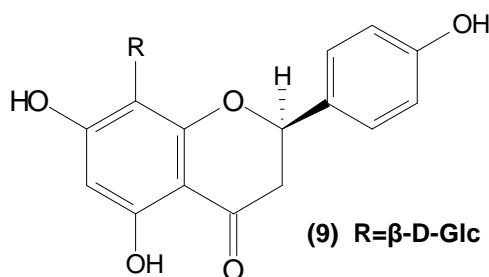
(5) R₁=H, R₂=OMe

(6) R₁=β-D-Glc, R₂=OMe



(7) R=H

(8) R=β-D-Glc



(9) R=β-D-Glc

Esta subfamília foi investigada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa com o estudo químico das espécies *Aeschynomene sensitiva* SW. (Arruda, 2011) e *Machaerium stipitatum* (Oliveira, 2001) pertencentes aos mesmos gêneros das espécies descritas neste trabalho. Nestes estudos foram isolados flavonoides, isoflavonoides, compostos fenólicos, saponina triterpênica, esteróides, ésteres de ácidos graxos, triterpenos e alcalóide, que confirmam a grande diversidade de metabólitos secundários na família Fabaceae.

1.2. O Gênero *Aeschynomene*

O gênero *Aeschynomene* (do grego=vergonhoso, devido à sensibilidade das folhas quando tocadas) pertencente à tribo Aeschynomeneae, é representado por 52 espécies brasileiras, de um total de 160 espécies até então descritas (América, África e Ásia). Destas espécies, 84 distribuem-se pelos continentes americanos, com predominância na região neotrópica (Fernandes, 1996).

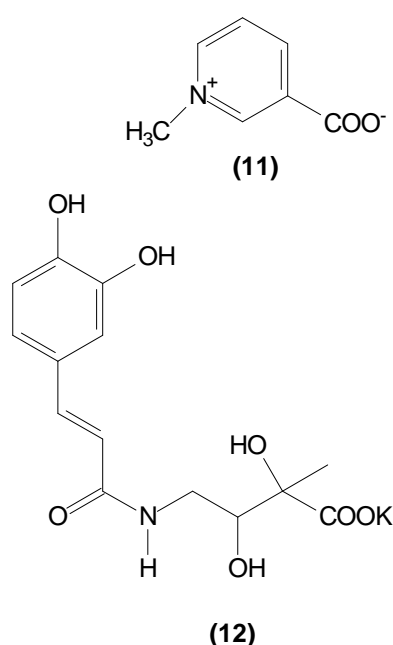
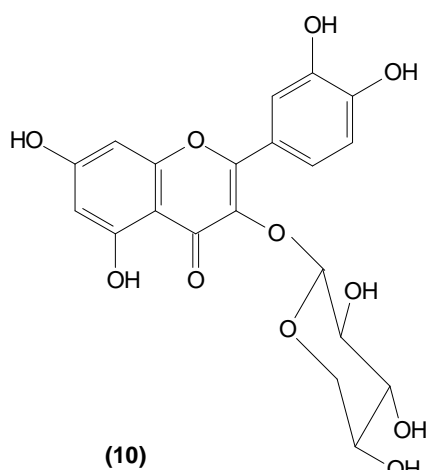
Representantes de *Aeschynomene* servem de alimento para bovinos e para fauna nativa; muitas espécies aquáticas fornecem madeira leve, que pode ser utilizada na produção de papel, pólvora, chapéu ou construção de jangadas.

Introdução

Algumas espécies são fixadoras de nitrogênio, enquanto outras são invasoras, tóxicas, apícolas, medicinais ou ornamentais, o que reforça a importância econômica e ecológica do gênero. (Lima *et al.*, 2006).

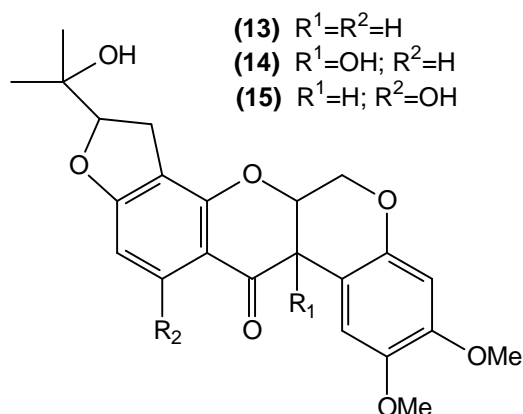
Em levantamento bibliográfico para o gênero *Aeschynomene* foram observados estudos químico e/ou biológico de apenas cinco espécies: *A. indica*, *A. mimosifolia*, *A. virgata*, *A. sensitiva* e *A. stolzii*.

A investigação química das folhas de *Aeschynomene indica* levou ao isolamento do flavonoide reinoutrina **(10)** e das substâncias responsáveis pelo fechamento e abertura das folhas desta planta: trigonelina **(11)** (Ueda *et al.*, 1995) e aeschynomato de potássio **(12)** (Ueda *et al.*, 1999), respectivamente.



A planta *A. indica* é responsável por casos de intoxicação em suínos, este efeito foi experimentalmente comprovado em camundongos quando tratados por via oral com a fração acetato de etila de suas sementes. Na investigação química desta fração foram isolados os rotenóides dalpanol **(13)**, 12- α -hidroxidalpanol **(14)** e 11-hidroxidalpanol **(15)** (Borghi *et al.*, 2006). Nesta espécie ainda foi observado a atividade espermicida do extrato EtOH/H₂O 50% obtido de toda a planta (Fullas *et al.*, 1996).

Introdução



Estudo das raízes de *Aeschynomene mimosifolia* constatou a presença do neoflavonoide mimosifoliol **(16)** e de um derivado incomum C₁₆-estiril-cicloheptanona, mimosifolenona **(17)** que revelou moderada atividade antitumoral. Para as espécies *A. sensitiva* e *A. stolzii* foram relatadas as atividades inseticida e citotóxica, repectivamente (Fullas *et al.*, 1996).

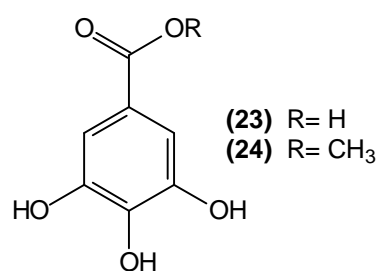
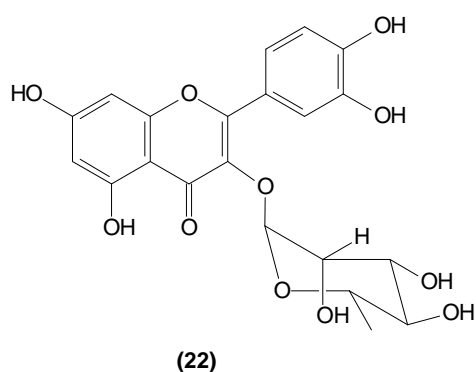
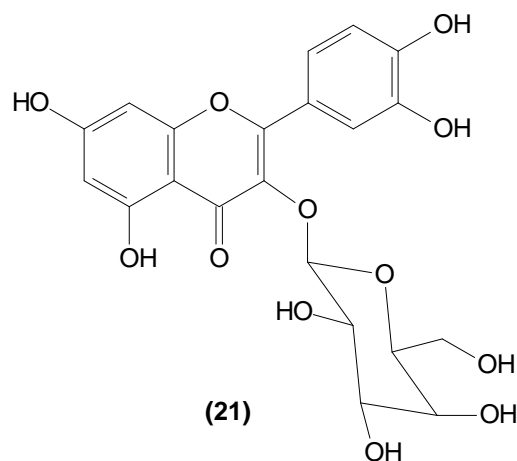
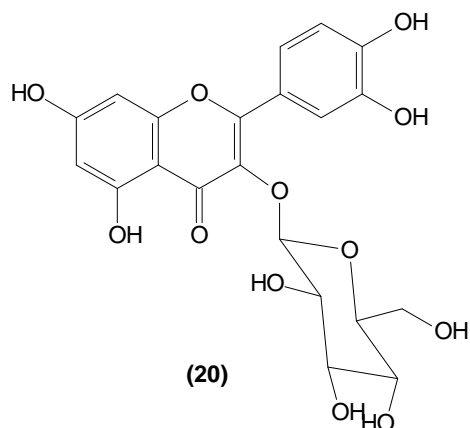
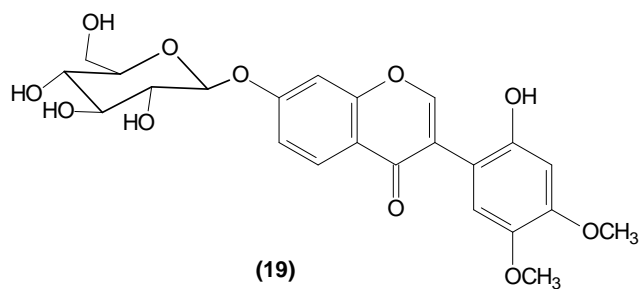
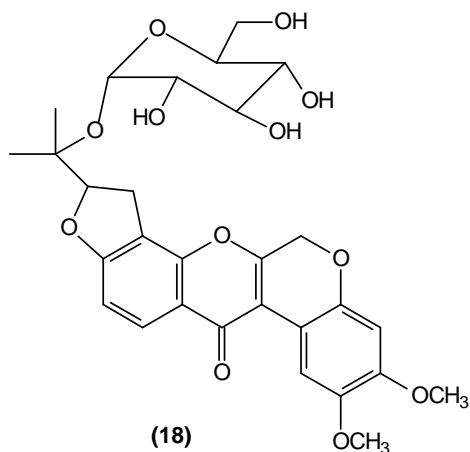


Ensaio de atividade contra herpesvirus de bovinos e suínos indicaram um acentuado efeito para a espécie *A. virgata* (*Sesbania virgata*) (Ikuno, *et al.*, 2003). Em outro estudo desta espécie, foi evidenciado que o sumo liofilizado das folhas exibe um acentuado efeito depressor do sistema nervoso central, além de propriedades analgésicas e antiinflamatórias (Braggio, 2002). Estudo químico das sementes de *S. virgata* constatou a presença de (+)-catequina e de quercetina em grandes quantidades, que conferem as sementes atividade de inibição de germinação de outras espécies (Simões *et al.*, 2008).

Recente estudo químico realizado em nosso laboratório para *A. sensitiva* SW. resultou no isolamento do rotenóide 6'-hidroxi-6 α , 12 α -deidrorrotenona glicopiranosídeo **(18)**, do isoflavonoide 2'-hidroxi-4',5'-dimetoxi-isoflavona-7-O- β -D-

Introdução

glicopiranosídeo **(19)**, dos flavonoides quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo **(20)**, quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo **(21)** e quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo **(22)** e os compostos fenólicos ácido gálico **(23)** e galato de metila **(24)** (Arruda, 2011).



Introdução

1.3. A espécie vegetal *Aeschynomene fluminensis* Vell.

Aeschynomene fluminensis Vell. (**Fabaceae**) se apresenta como planta de planície alagável ocorrendo predominantemente nos neotrópicos (Lima *et al.*, 2006). Esta espécie ocorre mais em regiões que são sazonalmente inundadas e seus troncos-nodulares exigem alta umidade, mas não de imersão total, podendo chegar até 2 m abaixo da água (Sprent, 1999).

A espécie *A. fluminensis*, conhecida vulgarmente como cortiça, é encontrada em Porto Rico-PR e não possui estudo fitoquímico e biológico até o momento.



Figura 1: Foto da espécie vegetal *Aeschynomene fluminensis*.
Foto:Robert H. Mohlenbrock @ USDA-NRCS PLANTS Database/ USDA SCS. 1991. *Southern wetland flora: Field office guide to plant species*. South National Technical Center, Fort Worth.

1.4. O Gênero *Machaerium*

O gênero *Machaerium*, subordinado à tribo Dalbergieae, é um dos maiores gêneros arbóreos tropicais de Faboideae, sendo constituído de aproximadamente 300 espécies predominantemente neotropicais (Polido e Sartori, 2007; Souza e Lorenzi, 2008; Ribeiro *et al.*, 2007).

Introdução

Espécies deste gênero são popularmente conhecidas como jacarandá e são encontradas em diferentes ambientes e utilizadas para variados fins, dentre os quais a recomposição de áreas degradadas (Polido e Sartori, 2007). Algumas espécies são usadas pelas populações indígenas da América do Sul para tratar diarreia, cólicas menstruais, tosses e úlceras causadas por aftas bucais (Seo *et al.*, 2001).

Investigações químicas de várias espécies de *Machaerium* no Brasil, Peru e Venezuela têm revelado a presença de triterpenos, benzoquinonas, e flavonoides, incluindo, isoflavonoides, neoflavonoides, isoflavonas, pterocarpanos, cinamilfenóis, quinóides e triterpenóides (Muhammad *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2001).

No levantamento bibliográfico de várias espécies do gênero *Machaerium* foram registrados o isolamento de uma grande variedade de classes metabólicas, como por exemplo: triterpenóides, neoflavonoides, isoflavonoides, conforme **Tabela 1**.

Tabela 1: Principais compostos isolados em algumas espécies do gênero *Machaerium*.

Classe Compostos	Espécie Vegetal	Referência
Esteróides		
β -sitosterol (25)	<i>M. villosum</i> e <i>M. kuhlmannii</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978 e Ollis, <i>et al.</i> , 1978
Triterpenóides		
3-O-acetil- β -amirina (26)	<i>M. villosum</i> , <i>M. Triste</i> , <i>M. incorruptibile</i> e <i>M. pedicellatum</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978 e Alves, <i>et al.</i> , 1966 Ogiyama and Yasue, 1973
3-O-acetileritrodiol (27)	<i>M. villosum</i> , <i>M. triste</i> e <i>M. incorruptibile</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978 e Alves, <i>et al.</i> , 1966

Introdução

aldeído O-acetil-oleanolico (28) ácido O-acetil-oleanolico (29)	<i>M. vestitum</i> e <i>M. incorruptibile</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978 e Alves, <i>et al.</i> , 1966
Neoflavonoides		
(R)-3,4-dimetoxidalbergiona (30)	<i>M. nictitans</i> , <i>M. kuhlmannii</i> , e <i>M. pedicellatum</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978 Ogiyama and Yasue, 1973
(R)-4'-hidroxi-3,4-dimetoxidalbergiona (31)	<i>M. nictitans</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978
(R)-3,4-dimetoxidalbergiquinol (32)	<i>M. nictitans</i> , <i>M. kuhlmannii</i> , <i>M. scleroxylon</i> e <i>M. pedicellatum</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978 Braga de Oliveira <i>et al.</i> , 1971 Ogiyama and Yasue, 1973
kuhlmaniquinol (33)	<i>M. nictitans</i> e <i>M. kuhlmannii</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978
(R)-dalbergifenol (34)	<i>M. scleroxylon</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978
kuhlmanina (35)	<i>M. scleroxylon</i> e <i>M. pedicellatum</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978 Ogiyama and Yasue, 1973
dalbergina (36)	<i>M. kuhlmannii</i> , <i>M. pedicellatum</i> , <i>M. nictitans</i> , e <i>M. scleroxylon</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978 Ogiyama and Yasue, 1973 Braga de Oliveira <i>et al.</i> , 1971
kuhlmaneno (37)	<i>M. nictitans</i> , <i>M. kuhlmannii</i> ,	Ollis, <i>et al.</i> , 1978 Braga de Oliveira <i>et</i>

Introdução

	<i>scleroxylon</i> e <i>M. pedicellatum</i>	<i>M. al.</i> , 1971 Ogiyama and Yasue, 1973
Isoflavonoides		
formononetina (38)	<i>M. aristulatum</i> , <i>M. vestitum</i> , <i>M. villosum</i> , <i>M. mucronulatum</i> , <i>M. nictitans</i> e <i>M. kuhlmannii</i>	Elsohly <i>et al.</i> , 1999 Seo <i>et al.</i> , 2001 Kurosawa <i>et al.</i> , 1978 Ollis, <i>et al.</i> , 1978 Braga de Oliveira <i>et al.</i> , 1971
3'-hidroxi-formononetina (39)	<i>M. villosum</i> , <i>M. mucronulatum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978
Isoformononetina (40)	<i>M. villosum</i> , <i>M. mucronulatum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978
daidzeína (41)	<i>M. mucronulatum</i> , <i>M. villosum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978 Braga de Oliveira <i>et al.</i> , 1971
3'-hidroxi-daidzeína (42)	<i>M. villosum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978
calicosina (43)	<i>M. aristulatum</i>	Elsohly <i>et al.</i> , 1999
Flavanonoides		
butina (44)	<i>M. villosum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978
Isoflavanoides		
vestitol (45)	<i>M. vestitum</i>	Gottlieb <i>et al.</i> , 1975 Kurosawa <i>et al.</i> , 1978

Introdução

mucronulatol (46)	<i>M. vestitum</i> , <i>M. opacum</i> , <i>M. mucronulatum</i> e <i>M.</i> <i>villosum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978 e Ollis, <i>et al.</i> , 1978
(-)-duartina (47)	<i>M. opacum</i> , <i>M.</i> <i>Mucronulatum</i> , <i>M.</i> <i>villosum</i> e <i>M. vestitum</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978 e Kurosawa <i>et al.</i> , 1978
(-)-mucroquinona (48)	<i>M. mucronulatum</i> e <i>M.</i> <i>villosum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978
Pterocarpanos		
(+)-mucronucarpano (49)	<i>M. mucronulatum</i> e <i>M. villosum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978
(+)-medicarpina (1)	<i>M. vestitum</i> , <i>M.</i> <i>aristulatum</i> , <i>M. nictitans</i> , <i>M. kuhlmannii</i> e <i>M.</i> <i>acutifolium</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978, Seo <i>et al.</i> , 2001 e Ollis, <i>et al.</i> , 1978
(+)-homopterocarpina (50)	<i>M. villosum</i> e <i>M. vestitum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978, Seo <i>et al.</i> , 2001 e Ollis, <i>et al.</i> , 1978
(+)-vesticarpano (51)	<i>M. vestitum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978
(+)-maackiaina (52)	<i>M. aristulatum</i>	Seo <i>et al.</i> , 2001
Chalconas		
buteína (53) e isoliquiritigenina (54)	<i>M. villosum</i> e <i>M.</i> <i>mucronulatum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978
Cinamilfenóis		

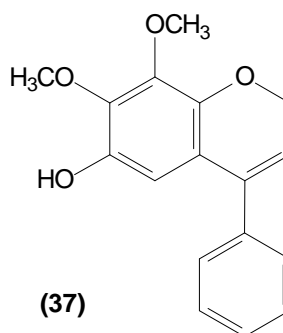
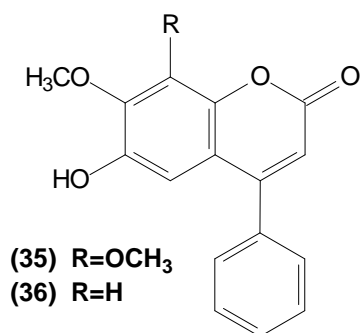
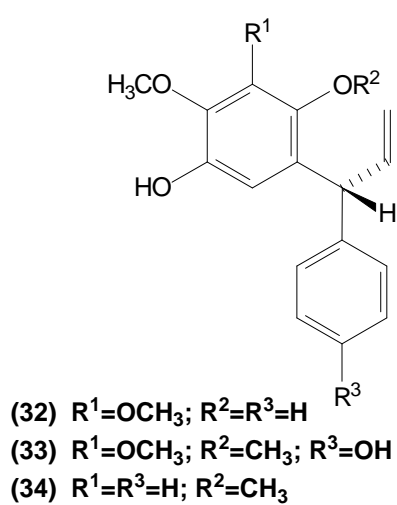
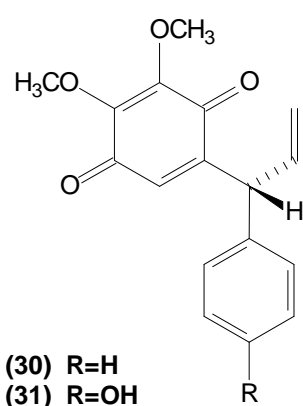
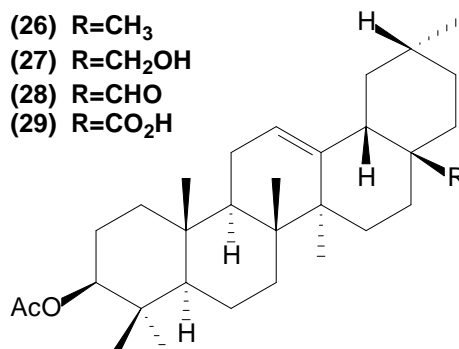
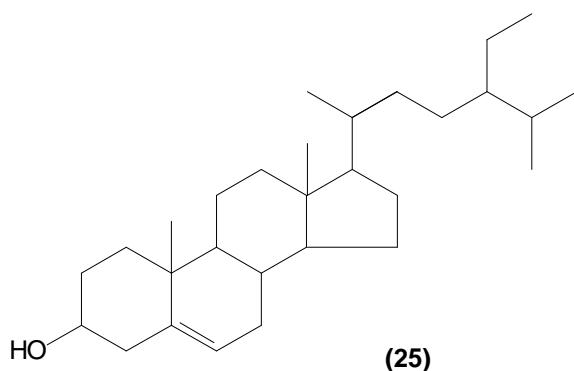
Introdução

mucronustireno (55)	<i>M. mucronulatum</i> , <i>M. kuhlmannii</i> , <i>M. villosum</i> , <i>M. acutifolium</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978 e Braga de Oliveira <i>et al.</i> , 1971
petrostireno (56)	<i>M. acutifolium</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978
macharistol (57)	<i>M. aristulatum</i>	Seo <i>et al.</i> , 2001
mucronulastireno (58)	<i>M. mucronulatum</i> e <i>M. villosum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978
vilostireno (59)	<i>M. mucronulatum</i> e <i>M. villosum</i>	Kurosawa <i>et al.</i> , 1978
kuhlmanistireno (60)	<i>M. kuhlmannii</i> , <i>M. villosum</i> , <i>M. acutifolium</i> e <i>M. mucronulatum</i>	Ollis, <i>et al.</i> , 1978 Braga de Oliveira <i>et al.</i> , 1971
hexaidrodibenzopiranos (HHDBPs)		
machaeriol A (61) machaeriol C (62)	<i>M. multiflorum</i>	Muhammad <i>et al.</i> , 2001 e 2003
machaeriol B (63) machaeriol D (64) 5,6-seco-machaeridiol A (65) 5,6-seco-machaeridiol B (66) 5,6-seco-machaeridiol C (67)	<i>M. multiflorum</i>	Muhammad <i>et al.</i> , 2001 e 2003
Estilbeno		

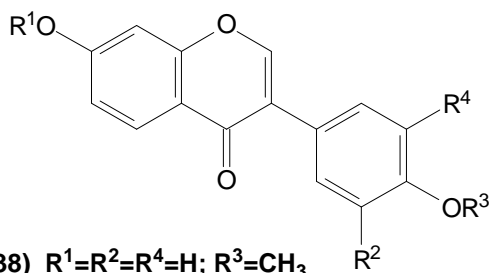
Introdução

éter-monometil-pinosilvin (68)	<i>M. opacum</i> e <i>M. acutifolium</i>	Ollis, et al., 1978
éter-dimetil-pinosilvin (69)	<i>M. opacum</i>	Ollis, et al., 1978
Derivados do benzeno		
2,3-dimetoxifenol (70)	<i>M. opacum</i> e <i>M. kuhlmannii</i>	Ollis, et al., 1978
2,6-dimetoxifenol (71) 2-hidroxi-3-metoxifenol (72) 2,3-dimetoxibenzaldeído (73)	<i>M. kuhlmannii</i>	Ollis, et al., 1978
Derivado de Cinamoíla		
metil 3-(2-hidroxi-4-metoxi-fenil)-propionato (74)	<i>M. kuhlmannii</i>	Ollis, et al., 1978
Outros		
palmitato de metila (75)	<i>M. kuhlmannii</i>	Ollis, et al., 1978
unidades de procianidina (76) unidades de prodelfinidina (77)	<i>M. floribundum</i>	Waage at al., 1984

Introdução



Introdução



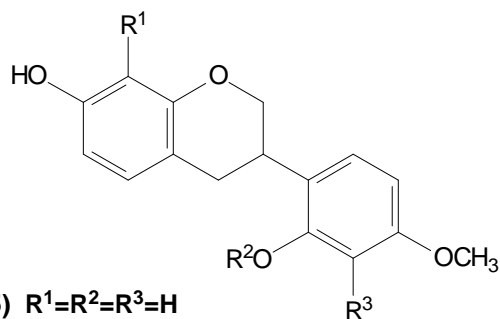
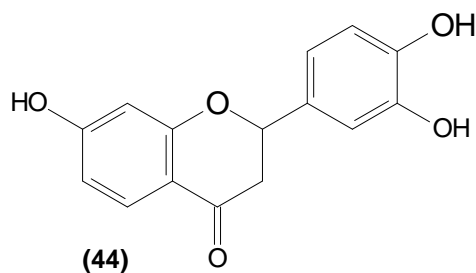
(39) $R^1=R^2=H$; $R^3=CH_3$; $R^4=OH$

(40) $R^1=CH_3$; $R^2=R^3=R^4=H$

(41) $R^1=R^2=R^3=R^4=H$

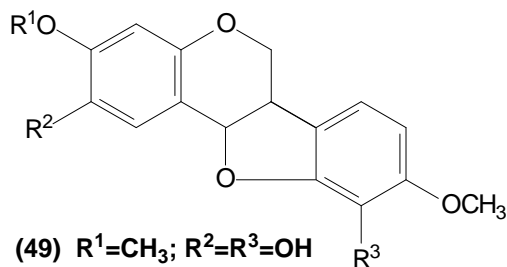
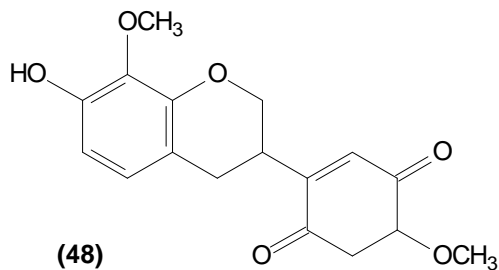
(42) $R^1=R^3=R^4=H$; $R^2=OH$

(43) $R^1=R^2=H$; $R^3=CH_3$; $R^4=OH$



(46) $R^1=H$; $R^2=CH_3$; $R^3=OH$

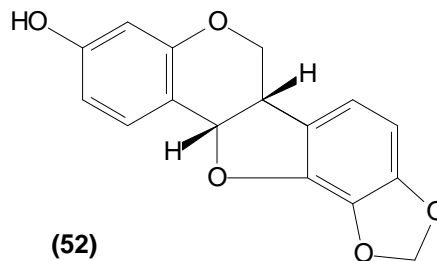
(47) $R^1=OCH_3$; $R^2=CH_3$; $R^3=OH$



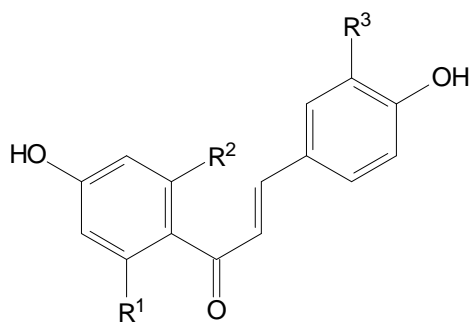
(1) $R^1=R^2=R^3=H$

(50) $R^1=CH_3$; $R^2=R^3=H$

(51) $R^1=R^2=H$; $R^3=OH$

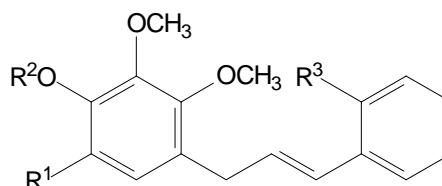


Introdução



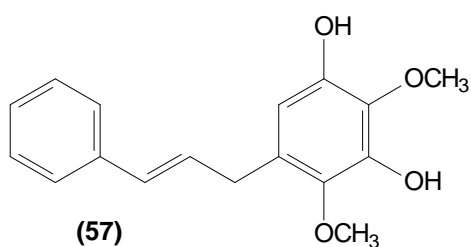
(53) $R^1=R^3=OH$; $R^2=H$

(54) $R^1=R^3=H$; $R^2=OH$

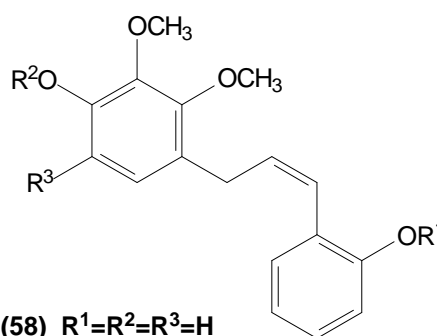


(55) $R^1=R^2=R^3=H$

(56) $R^1=OH$; $R^2=CH_3$; $R^3=OH$



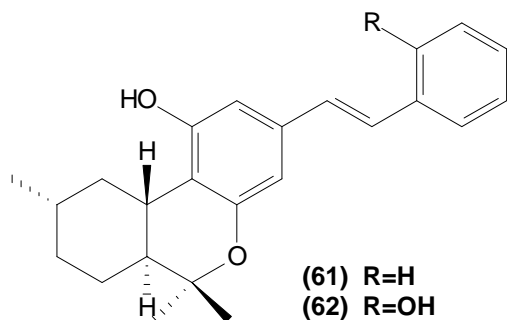
(57)



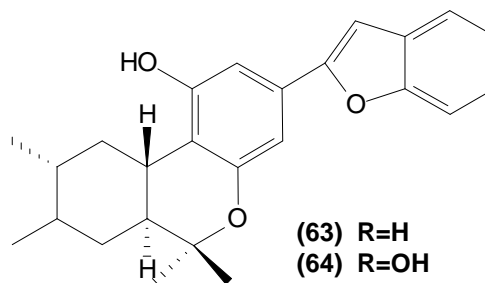
(58) $R^1=R^2=R^3=H$

(59) $R^1=CH_3$; $R^2=R^3=H$

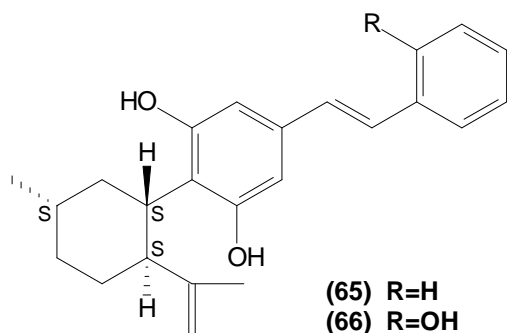
(60) $R^1=H$; $R^2=CH_3$; $R^3=OH$



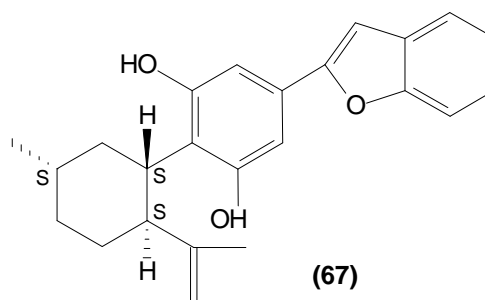
(61) $R=H$
(62) $R=OH$



(63) $R=H$
(64) $R=OH$

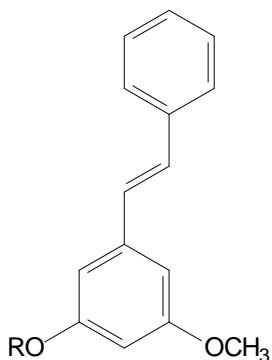


(65) $R=H$
(66) $R=OH$

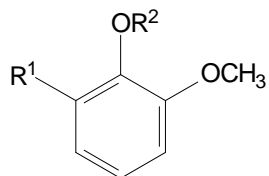


(67)

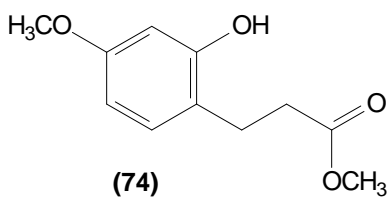
Introdução



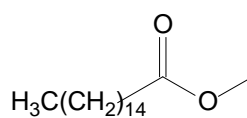
- (68) R=H
(69) R=CH₃



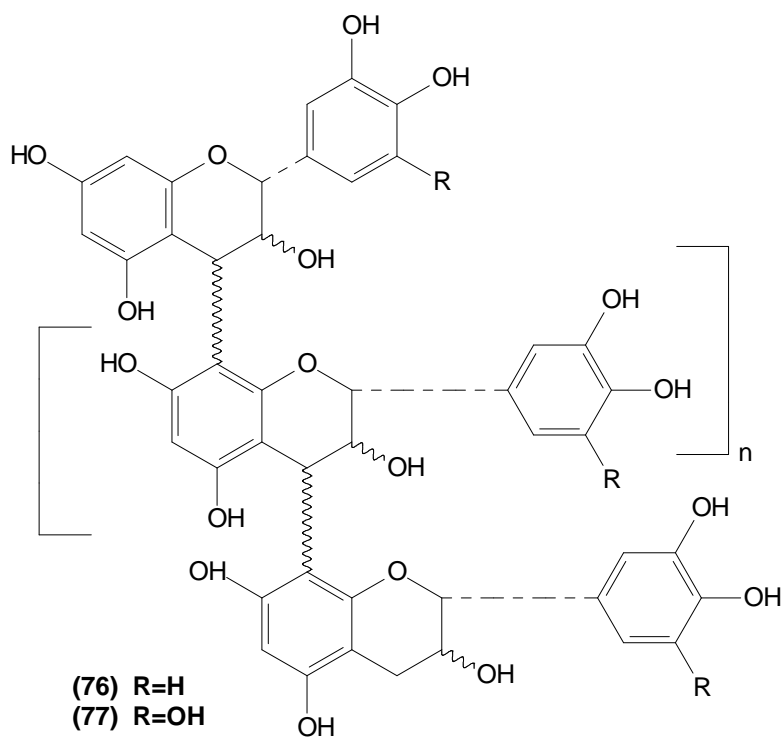
- (70) R¹=OH; R²=CH₃
(71) R¹=OCH₃; R²=H
(72) R¹=OH; R²=H
(73) R¹=COH; R²=CH₃



(74)



(75)



- (76) R=H
(77) R=OH

Introdução

Em estudos químicos anteriores, foram isolados em algumas espécies do gênero *Machaerium* o esteróide β -sitosterol (**25**) e os triterpenos 3-O-acetil- β -amirina (**26**), 3-O-acetileritrodíol (**27**), aldeído O-acetil-oleanólico (**28**) e ácido O-acetil-oleanólico (**29**) (Kurosawa *et al.*, 1978; Ollis, *et al.*, 1978 e Alves, *et al.*, 1966).

Compostos dos tipos neoflavonoides e isoflavonoides são retratados como característicos da família **Fabaceae** (Donnelly, 1972 e Bruneton, 1991). Os isoflavonoides são resultantes de metabolismo de fitoalexinas como resposta a uma infecção por agente patogênico, muitas vezes de natureza fúngica. Alguns destes compostos possuem atividades inseticidas e estrogênicas. Esta última atividade é conferida as substâncias 4,7-diidroxiisoflavona (**41**), conhecido como “daidzeína”, e 2',7-diidroxi-4'-metóxi-isoflavona (**45**), conhecida como “vestitol” (Gupta *et al.*, 1971; Kurosawa *et al.*, 1978; Gottlieb *et al.*, 1975).

Neoflavonoides do tipo dalbergiona conferem atividade antimicrobiana e ação dermatológica adversa (Muangnoicharoen e Frahm, 1982). Derivados destes compostos como (R)-3,4-dimetoxidalbergiona (**30**) e (R)-dalbergifenol (**34**) são constituintes da espécie *Machaerium scleroxylon* (Ollis *et al.*, 1978).

O gênero *Machaerium*, confere ainda diversas atividades biológicas sendo que algumas já foram confirmadas em estudos químicos como, por exemplo, podemos citar as substâncias isoladas de *M. aristulatum*, o macharistol (**57**) e (+)-medicarpina (**1**) que exibiram atividade citotóxica bastante significativa, já as substâncias formononetina (**38**) e a calicosina (**43**) possuem atividade anti-giardíase (Seo *et al.*, 2001; Elsohly *et al.*, 1999).

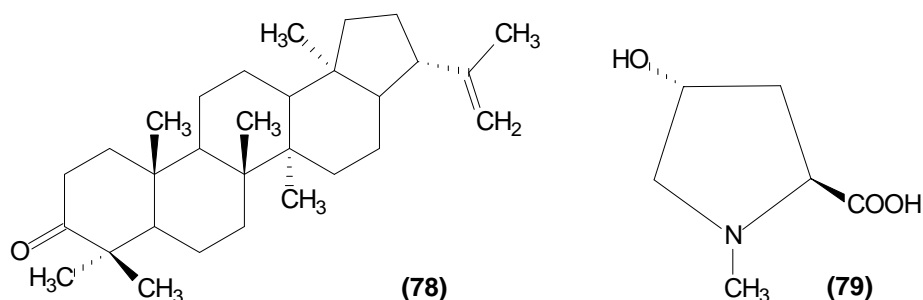
Em *M. multiflorum* Spruce, uma espécie nativa da Amazônia encontrada em Loreto, Peru, que ainda não possuía estudo fitoquímico foram isolados dois novos hexahidro-dibenzopiranos (HHDBP), chamado machaeriol A (**61**) e machaeriol B (**63**), sendo os responsáveis pelas atividades antimaláricas e antibacterianas e o primeiro relato de HHDBPs de uma fonte natural (Muhammad *et al.*, 2001 e Muhammad *et al.*, 2003). Em outro estudo de *M. multiflorum* Spruce, levou ao isolamento e caracterização de machaeriol C (**62**) que demonstrou atividade antibacteriana “in vitro” contra *Staphylococcus aureus* (IC₅₀ 0,65 μ g/mL) e resistente a metilicina *S. aureus* (MRSA) (IC₅₀ 0,70 μ g/mL), enquanto que os análogos 5,6-

Introdução

seco-machaeridiol A (65) e *machaeridiol B (66)* tiveram atividade antibacteriana contra *S. aureus* and MRSA (IC₅₀ 1,0-2,6 µg/mL) e atividade antifúngica contra *Candida albicans* (IC₅₀, 2,0-3,5 µg/mL) (Muhammad *et al.*, 2003).

Em um estudo prévio de *M. floribundum* compostos contendo *n* unidades de procianidina (**76**), inibiram o crescimento de bactérias *Pseudomonas maltophilia* (Waage *et al.*, 1984).

As folhas da espécie *M. stipitatum* foram objeto de estudo em nosso laboratório em um projeto de dissertação de mestrado onde foram isolados os esteróides sitosterol e estigmasterol, os ésteres de ácidos graxos palmitato de metila e estearato de metila, o triterpeno hopenona-B (21β-hop-22(29)-em-3-ona) (**78**) e o alcalóide 4-hidróxi-*N*-metilprolina (**79**). Estas duas últimas substâncias foram isoladas pela primeira vez no gênero (Oliveira, 2001).



Desta forma fica evidente que nas espécies do gênero *Machaerium* ocorrem principalmente neoflavonoides e isoflavonoides (Ollis *et al.*, 1978). Neste contexto, ficou claro que o gênero *Machaerium* possui um amplo espectro de atividades biológicas, sendo este um dos motivos que despertou o interesse pelo estudo da espécie *Machaerium hirtum* descrita a seguir.

1.5. A espécie vegetal *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld

Machaerium hirtum (Vell.) Stellfeld, é uma espécie utilizada na medicina popular no tratamento de diarreia, tosses e câncer (Pott e Pott, 1994). Esta planta é vulgarmente conhecida como barreiro, barreirinho, jacarandá-bico-de-pato, piquiá-pedra e espinheiro e é encontrada no Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bolívia e

Introdução

Paraguai (Lorenzi, 2008). Esta espécie também é encontrada em Porto Rico e não possui estudos fitoquímicos e biológicos relatados na literatura.



Figura 2: Imagem da espécie vegetal *Machaerium hirtum* (Lorenzi, 2008).

2. Dados Botânicos das espécies *A. fluminensis* Vell. e *M. hirtum* Vell. Stellfeld

A classificação para as espécies *A. fluminensis* Vell. e *M. hirtum* Vell. Stellfeld segundo Souza e Lorenzi (2008) é dada na **tabela 2**.

Tabela 2: Classificação botânica das espécies *A. fluminensis* e *M. hirtum*.

	Espécie	Espécie
Classificação	<i>A. fluminensis</i> (Vell.)	<i>M. hirtum</i> (Vell.) Stellfeld
Divisão	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Subclasse	Rosidae	Rosidae
Ordem	Fabales	Fabales
Família	Fabaceae (Leguminosae)	Fabaceae (Leguminosae)
Subfamília	Faboideae (Papilionoideae)	Faboideae (Papilionoideae)
Tribo	Aeschynomeneae	Dalbergieae
Gênero	<i>Aeschynomene</i>	<i>Machaerium</i>
Espécie	<i>Aeschynomene fluminensis</i>	<i>Machaerium hirtum</i>

3. Objetivos

Considerando que não existem estudos químicos e biológicos para *A. fluminensis* (Vell.) e *M. hirtum* (Vell.) Stellfeld, este trabalho teve como objetivo o estudo fitoquímico dessas espécies visando o isolamento e a identificação dos seus principais constituintes. E ainda, a avaliação das atividades anti-inflamatória e antitumoral dos extratos, frações e metabólitos isolados das mesmas.

4. Parte Experimental

4.1. Materiais e métodos

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais de ^1H e ^{13}C e os bidimensionais de gCOSY, NOESY, gHSQC e gHMBC foram obtidos em espectrômetro Gemini da Varian (modelo MERCURY plus BB) operando a 300,06 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C . Os deslocamentos químicos foram

dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano ($\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm). Os solventes deuterados utilizados foram CDCl_3 , CD_3OD e D_2O , das marcas Aldrich ou Isotec.

Os espectros de absorção no I.V. foram registrados em pastilhas de KBr e em célula líquida em um espectrofotômetro FT-IR-BOMEM, modelo MBseries na região de 500 a 4000 cm^{-1} .

Os espectros de massas foram obtidos através de inserção direta na fonte de íons **Direct Insertion Probe (DIP)**, marca **Thermo Electron Corporation**, com as seguintes condições: temperatura inicial de $70\text{ }^\circ\text{C}$ durante o tempo de 20 segundos. A rampa de temperatura foi de $90\text{ }^\circ\text{C}/\text{min.}$, até a temperatura de $450\text{ }^\circ\text{C}$ e o Hold da rampa de 180 seg.

Utilizou-se um espectrofotômetro de massas tipo Quadrupolo, da marca Thermo Electron Corporation, modelo DSQ II, com energia de impacto de elétrons a 70 eV , nas seguintes condições de análise: Modo Full Scan, Ions positivos, temperatura da fonte íons de 250°C e Massa range: 50 – 700.

A rotação específica $[\alpha]_D^{20}$ foi determinada em polarímetro da Perkin Elmer (modelo 343) operando em 589 nm e a $20\text{ }^\circ\text{C}$, o comprimento das celas utilizadas foi de 10 cm (1 dm) e de 10 mm ($0,1\text{ dm}$) e o branco utilizado foi o metanol e a acetona, respectivamente.

As cromatografias em coluna (CC) foram efetuadas utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 (Merck ou Fluka) ou Sephadex LH-20 (de exclusão molecular) da Sigma. O diâmetro e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material adsorvido. As eluições foram realizadas com solventes orgânicos P.A. ou foram destilados. Estes foram utilizados puros ou como mistura. As frações coletadas foram concentradas em evaporador rotatório à pressão reduzida.

O acompanhamento das cromatografias em coluna foi realizado através de cromatografia em camada delgada analítica (CCD), preparadas com fase estacionária de gel de sílica 60 G ou gel de sílica 60 GF, com $0,25\text{ mm}$ de espessura sobre placas de vidro de $20 \times 5\text{ cm}$. As visualizações das substâncias em CCD foram realizadas por irradiação com luz ultravioleta em 254 e 366 nm e/ou por

pulverização com solução de H₂SO₄/anilsadeído/AcOH (1,0: 0,5: 48,5) (revelador para terpenos), seguido de aquecimento e as frações que apresentaram Rf_s semelhantes foram reunidas.

4.2. Material Vegetal

Os materiais vegetais das espécies *Aeschynomene fluminensis* Vell. (folhas, galhos e sementes) e *Machaerium hirtum* Vell. Stellfeld (folhas e galhos) foram coletados em 15 de março e 06 de outubro de 2008, respectivamente, na planície de inundação no alto do Rio Paraná, em Porto Rico - PR. As plantas foram identificadas pela Prof^a Dr^a Maria Conceição de Souza e suas exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob os registros HUEM 15708 e 17539, respectivamente.

As folhas, galhos e sementes de *A. fluminensis* foram secos em estufa e as folhas e galhos de *M. hirtum* foram secos ao ar livre. Esses materiais vegetais foram triturados em moinho de facas e submetidos à extração exaustiva por maceração com metanol a frio. Os extratos foram concentrados à pressão reduzida à temperatura de 38 °C até eliminação total do solvente, resultando nos extratos brutos descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3: Obtenção do material vegetal e do extrato bruto

<i>A. fluminensis</i>	Partes da planta	Material seco	Extrato bruto
	Folhas	454,4 g	46,8 g
	Galhos	560,7 g	23,5 g
	Sementes	150,5 g	6,4 g
<i>M. hirtum</i>			
	Folhas	271,2 g	51,7 g
	Galhos	380,6 g	23,2 g

4.3. Fracionamento dos extratos brutos de *Aeschynomene fluminensis* e *Machaerium hirtum*

Parte dos extratos brutos das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* e de *M. hirtum* foi fracionado através de partições em solventes de polaridade crescente, resultando nas frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, *n*-butanólica e aquosa. Para isto estes extratos foram dissolvidos em H₂O ou em H₂O/MeOH 30% (para o extrato das folhas *M. hirtum*) (**Tabela 4**).

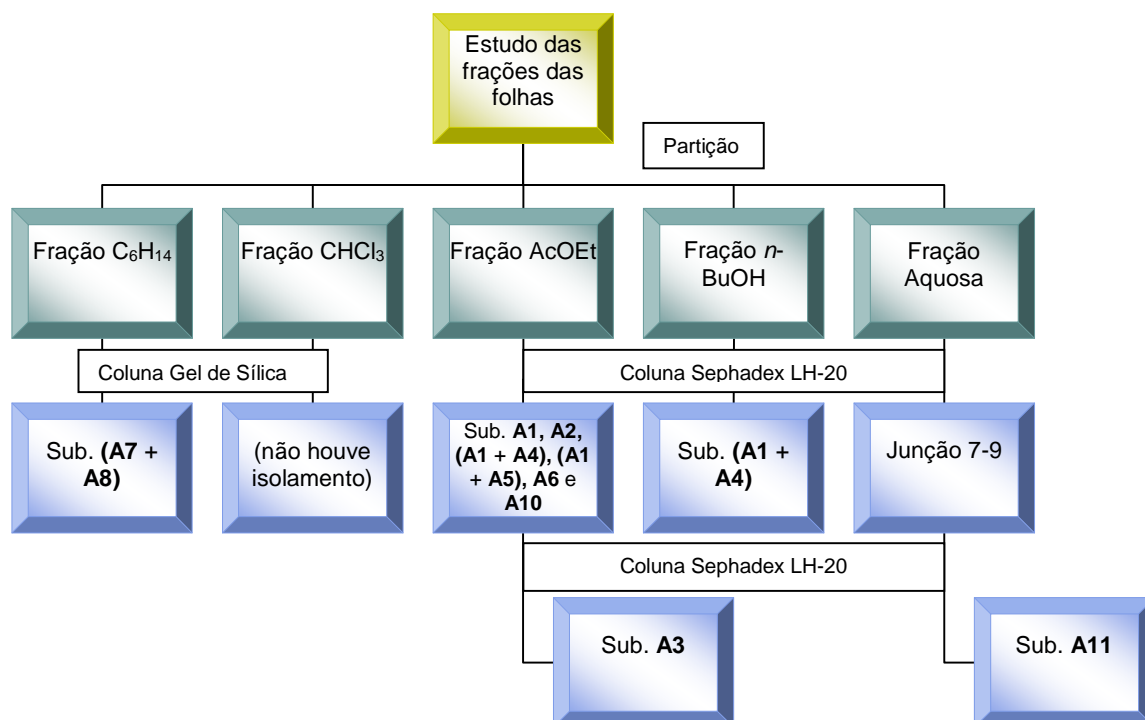
Tabela 4: Frações obtidas pelo particionamento dos extratos brutos.

Extrato bruto	Fração hexânica	Fração clorofórmica	Fração acetato de etila	Fração <i>n</i> -butanólica	Fração aquosa
<i>A. fluminensis</i> (folhas = 20,0 g)	6,5 g	0,7 g	0,9 g	10,0 g	1,9 g
<i>A. fluminensis</i> (galhos = 20,0 g)	1,3 g	0,9 g	1,8 g	6,7 g	9,3 g
<i>M. hirtum</i> (folhas = 20,0 g)	2,4 g	1,5 g	1,8 g	5,1 g	9,2 g (hidro-metanólica)
<i>M. hirtum</i> (galhos = 10,0 g)	1,4 g	1,2 g	1,3 g	3,8 g	2,3 g

4.4. Estudo das frações de *Aeschynomene fluminensis*

4.4.1. Estudo das frações das folhas de *Aeschynomene fluminensis*

Um resumo dos procedimentos experimentais utilizados para as frações das folhas e as substâncias isoladas para cada fração de *A. fluminensis* está representado no **Esquema 1**.



Esquema 1: Procedimento utilizado no fracionamento das folhas de *A. fluminensis*

4.4.2. Estudo da fração hexânica das folhas

Parte da fração hexânica (0,34 g) foi submetida à CC ($\theta = 1,5$ cm), contendo gel de sílica (13,0 g) com os eluentes hexano e hexano:AcOEt 5-40%, resultando em 95 frações. As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas conforme **tabela 5**.

Tabela 5: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração hexânica das folhas de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
Hex – 100 mL	1-7	81,0	
Hex/AcOEt 5% – 250 mL	8-20	92,5	
Hex/AcOEt 10% – 200 mL	21-24	20,5	
Hex/AcOEt 15% – 150 mL	25-30	3,9	A7 + A8
Hex/AcOEt 20% – 200 mL	31-49	15,1	
Hex/AcOEt 30% – 200 mL	50-72	18,5	
Hex/AcOEt 40% – 200 mL	73-95	17,3	

Através da análise por CCD da fração 25-30 foi observado fluorescência, quando submetido à irradiação UV 366 nm. Na revelação com “revelador para terpenos” observou-se a presença de apenas uma substância. Esta fração foi encaminhada para análise de RMN e forneceu a mistura **A7** e **A8**.

4.4.3. Estudo da fração clorofórmica das folhas

Parte da fração CHCl_3 (0,25 g) foi submetida à CC ($\theta = 1,5$ cm), contendo gel de sílica (10,0 g) e utilizando como eluentes hexano-AcOEt 5-60%. Foram coletados 100 frascos que após a análise por CCD foram reunidos. Este tratamento não resultou no isolamento de nenhuma substância pura.

4.4.4. Estudo da fração acetato de etila das folhas

A fração AcOEt (0,28 g) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) com os solventes H_2O , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 25-75% e MeOH totalizando 166 sub-frações que foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos observados em CCD (**Tabela 6**).

Tabela 6: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração AcOEt das folhas de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O – 30 mL	1-16	32,2	
H ₂ O – 8 mL	17-20	8,5	
H ₂ O – 8 mL	21-24	6,2	
H ₂ O – 8 mL	25-28	5,0	
H ₂ O – 8 mL	29-32	5,5	A1
H ₂ O – 4 mL	33-34	3,5	
H ₂ O/MeOH 25% – 66 mL	35-67	52,3	A1 + A4
H ₂ O/MeOH 50% – 6 mL	68-70	3,8	
H ₂ O/MeOH 50% – 20 mL	71-80	15,4	A1 + A5
H ₂ O/MeOH 50% – 8 mL	81-84	3,5	
H ₂ O/MeOH 50% – 26 mL	85-97	13,5	
H ₂ O/MeOH 50% – 18 mL	98-106	30,9	
H ₂ O/MeOH 50% – 12 mL	107-112	8,2	A10
H ₂ O/MeOH 50% – 8 mL	113-116	3,8	
H ₂ O/MeOH 50% – 6 mL	117-119	5,8	A2
H ₂ O/MeOH 50% – 4 mL	120-121	3,1	
H ₂ O/MeOH 50% – 14 mL	122-128	4,7	A6
H ₂ O/MeOH 75% – 20 mL	129-137	2,0	
H ₂ O/MeOH 75% – 12 mL	138-143	3,4	
MeOH – 44 mL	144-166	10,0	

As análises por CCD das frações 29-32, 35-67, 71-80, 107-112, 117-119 e 122-128 apresentaram fluorescência quando submetidas à irradiação UV 254 nm e, após revelação com “revelador para terpenos”, indicaram a presença de compostos puros. Estas substâncias foram então codificadas como **A1**, **A4**, **A5**, **A10**, **A2** e **A6**, respectivamente. As substâncias **A4** e **A5**, após análise de RMN, se apresentaram como misturas com **A1**.

A fração 98-106 (30,9 mg) foi submetida novamente à filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,0$ cm e 3 g) utilizando como eluentes MeOH. As frações foram reunidas conforme CCD (**Tabela 7**) e a análise das mesmas mostraram fluorescência, quando submetidas à irradiação UV 254 nm. A revelação com

“revelador para terpenos” da fração 7-8 indicou a presença de uma substância pura que foi codificada como **A3**.

Tabela 7: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração AcOEt das folhas de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
MeOH – 8 mL	1-4	1,5	
MeOH – 4 mL	5-6	13,0	
MeOH – 4 mL	7-8	6,0	A3
MeOH – 20 mL	9-18	3,5	
MeOH – 14 mL	19-25	2,0	

4.4.5. Estudo da fração *n*-butanólica das folhas

Parte da fração *n*-BuOH (0,29 g) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) utilizando os solventes H₂O, H₂O/MeOH 25-75% e MeOH. Foram coletados 96 frascos que foram reunidos após CCD, conforme **tabela 8**.

Tabela 8: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração *n*-BuOH das folhas de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O – 20 mL	1-10	129,4	
H ₂ O – 16 mL	11-18	27,3	
H ₂ O – 16 mL	19-26	20,0	
H ₂ O – 54 mL	27-53	33,2	A1
H ₂ O/MeOH 25% – 10 mL	54-58	4,1	
H ₂ O/MeOH 25% – 8 mL	59-62	10,7	
H ₂ O/MeOH 50% – 4 mL	63-64	11,2	A1 + A4
H ₂ O/MeOH 50% – 22 mL	65-75	7,3	
H ₂ O/MeOH 75% – 20 mL	76-85	7,6	
MeOH – 16 mL	89-96	6,0	

Das frações 27-53 e 63-64 foram novamente isoladas a substância **A1** e a mistura **A1** e **A4**.

4.4.6. Estudo da fração aquosa das folhas

Parte da fração aquosa (0,49 g) foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) utilizando como eluentes H₂O, H₂O/MeOH 25-75% e MeOH totalizando 72 sub-frações que foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos observados em CCD. Este tratamento não resultou no isolamento de nenhuma substância pura.

Parte da sub-fração 7-9 (130,5 mg) foi submetida novamente a filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,0$ cm e 3 g) com MeOH. As frações após serem analisadas por CCD foram reunidas conforme **tabela 9**.

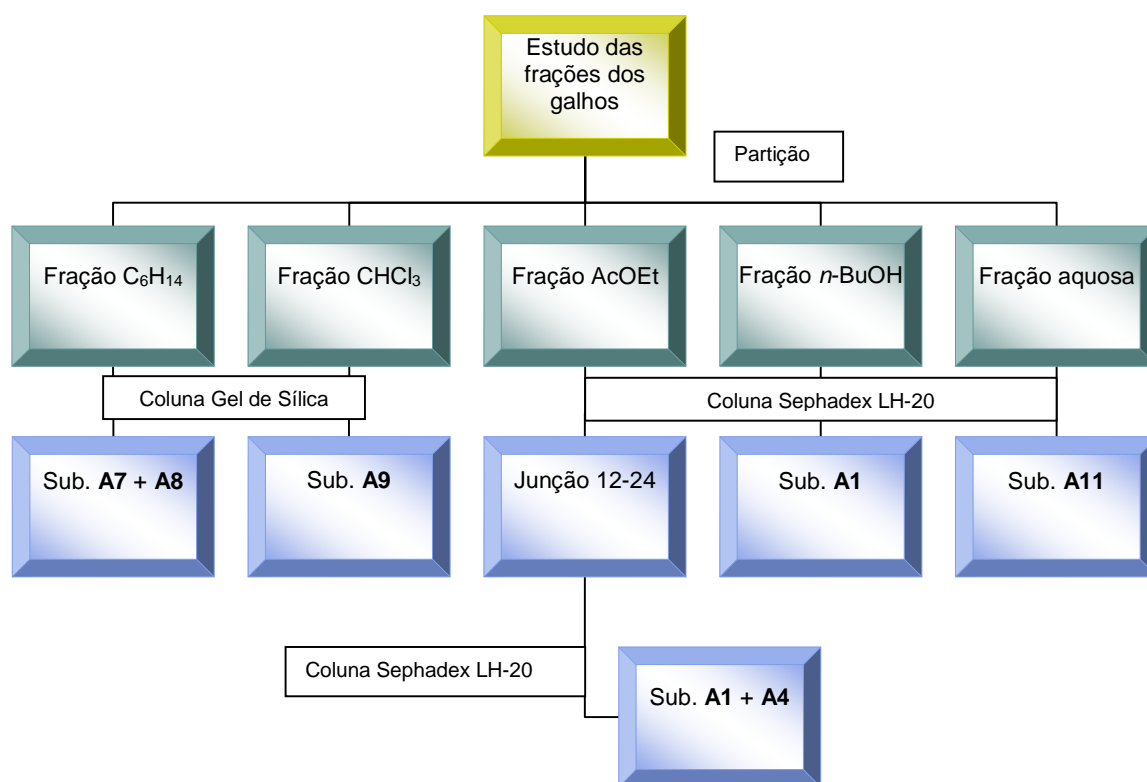
Tabela 9: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração aquosa (7-9) das folhas de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
MeOH – 16 mL	1-8	1,0	
MeOH – 8 mL	9-12	67,9	
MeOH – 6 mL	13-15	22,7	A11
MeOH – 10 mL	16-20	15,5	
MeOH – 24 mL	21-32	8,6	

A análise por CCD da fração 13-15 apresentou fluorescência, quando submetido à irradiação UV 366 nm. A revelação com “revelador para terpenos” indicou a presença de uma substância pura que foi codificada como **A10**.

4.4.7. Estudo das frações dos galhos de *Aeschynomene fluminensis*

Um resumo dos procedimentos experimentais utilizados para as frações dos galhos e as substâncias isoladas para cada fração de *A. fluminensis* está representado no **Esquema 2**.



Esquema 2: Procedimento utilizado no fracionamento dos galhos de *A. fluminensis*

4.4.8. Estudo da fração hexânica dos galhos

A fração hexânica (0,75 g) foi submetida a uma CC ($\theta = 2,0$ cm) de gel de sílica (26,0 g), eluída com os solventes hexano, hexano-AcOEt 10-90%, AcOEt e AcOEt/MeOH 10-70%, e resultou em 181 frações que foram reunidas após análise em CCD (**Tabela 10**). A fração 20-25 forneceu novamente a mistura **A7** e **A8**.

Tabela 10: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração hexânica dos galhos de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
Hex a Hex/AcOEt 10-15% – 380 mL	1-19	278,1	
Hex/AcOEt 15-25% – 120 mL	20-25	25,0	A7 + A8
Hex/AcOEt 15-25% – 520 mL	26-51	17,1	
Hex/AcOEt 25-40% – 480 mL	52-75	15,9	
Hex/AcOEt 40-60% – 400 mL	76-95	25,6	
Hex/AcOEt 70-90% – 560 mL	96-123	24,9	
AcOEt 100% a AcOEt/MeOH 10-20% – 380 mL	124-142	107,7	
AcOEt/MeOH 20-70% – 780 mL	143-181	153,8	

4.4.9. Estudo da fração clorofórmica dos galhos

Parte da fração clorofórmica (0,60 g) foi submetida à CC ($\theta = 2,0$ cm), contendo gel de sílica (21,0 g) utilizando como eluentes hexano-AcOEt 10-95%, AcOEt, AcOEt/MeOH 10-60% fornecendo 180 frações que foram combinadas por semelhanças em CCD (**Tabela 11**).

Tabela 11: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração CHCl_3 dos galhos de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
Hex/AcOEt 10-25% – 500 mL	1-25	36,3	
Hex/AcOEt 30-50% – 720 mL	26-61	75,6	
Hex/AcOEt 50-60% (incluso)	62-81 Ac	4,4	A9
Hex/AcOEt 50-60% – 400 mL	62-81	36,3	
Hex/AcOEt 60-80% – 320 mL	82-97	26,0	
Hex/AcOEt 80-95% – 320 mL	98-113	54,1	
AcOEt 100% – 200 mL	114-123	12,1	
AcOEt/MeOH 10% – 240 mL	124-135	40,9	
AcOEt/MeOH 10-20% – 240 mL	136-147	85,8	
AcOEt/MeOH 20-60% – 660 mL	148-180	159,7	

A análise por CCD da fração 62-81 Ac (após lavada com AcOEt) mostrou apenas uma substância, com fluorescência em luz de UV 254 nm e, após revelação

com “revelador para terpenos, indicou a presença de composto puro que foi denominado como **A9**.

4.4.10. Estudo da fração acetato de etila dos galhos

Uma parte da fração AcOEt (0,48 g) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) utilizando H₂O, H₂O/MeOH 25-75% e MeOH como eluentes, totalizando 90 novas frações que foram reunidas após análise em CCD. Este tratamento não resultou no isolamento de nenhuma substância pura.

A fração 12-24 (48,5 mg) foi novamente submetida à filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,0$ cm e 3 g) utilizando como solvente MeOH. As frações foram recombinaadas conforme CCD, e a sub-fração 12 (13-17) resultou novamente no isolamento da mistura **A1** e **A4** (**Tabela 12**).

Tabela 12: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração AcOEt dos galhos de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
MeOH – 12 mL	1-6	6,5	
MeOH – 6 mL	7-9	5,7	
MeOH – 6 mL	10-12	14,8	
MeOH – 10 mL	13-17	15,3	A1 + A4
MeOH – 42 mL	18-38	6,2	

4.4.11. Estudo da fração *n*-butanólica dos galhos

A fração *n*-BuOH (0,46 g) foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) utilizando como solventes H₂O, H₂O/MeOH 25-75% e MeOH. Foram obtidas 93 frações que foram recombinaadas de acordo com seus perfis cromatográficos observados em CCD (**Tabela 13**).

Tabela 13: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração *n*-BuOH dos galhos de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O – 16 mL	1-8	8,4	
H ₂ O – 6 mL	9-12	150,5	
H ₂ O – 6 mL	13-15	118,4	
H ₂ O – 8 mL	16-19	92,2	
H ₂ O – 10 mL	20-24	15,2	
H ₂ O/MeOH 25% – 6 mL	25-27	5,5	A1
H ₂ O/MeOH 25-50% – 42 mL	28-48	22,6	
H ₂ O/MeOH 50% – 24 mL	49-60	36,8	
H ₂ O/MeOH 75% a MeOH – 66 mL	61-93	8,4	

A fração 9-12 forneceu a substancia **A1** já isolada anteriormente nas frações obtidas das folhas de *A. fluminensis*.

4.4.12. Estudo da fração aquosa dos galhos

Uma parte da fração aquosa (0,58 g) foi submetida à coluna Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) utilizando como eluentes H₂O, H₂O/MeOH 25-75% e MeOH fornecendo 106 frações que foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos observados em CCD (**Tabela 14**).

Tabela 14: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração aquosa dos galhos de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O – 14 mL	1-7	91,9	
H ₂ O – 2 mL	8	54,1	
H ₂ O – 4 mL	9-10	97,9	
H ₂ O – 12 mL	11-16	39,5	
H ₂ O – 6 mL	17-19	5,2	A11
H ₂ O/MeOH 25% – 26 mL	20-32	6,0	
H ₂ O/MeOH 25% – 22 mL	33-43	8,3	
H ₂ O/MeOH 50% – 8 mL	44-47	3,4	
H ₂ O/MeOH 50% – 14 mL	48-54	59,2	
H ₂ O/MeOH 50% – 4 mL	55-56	3,5	
H ₂ O/MeOH 75% – 16 mL	57-64	41,3	
H ₂ O/MeOH 75% – 24 mL	65-76	83,4	
H ₂ O/MeOH 75% – 30 mL	77-91	11,6	
MeOH – 30 mL	92-106	8,9	

A fração 17-19 apresentou fluorescência em CCD, quando submetido à irradiação UV 366 nm, indicando um composto puro. A revelação com “revelador para terpenos” indicou a presença de uma substância pura, a qual foi encaminhada para RMN e forneceu **A11**.

4.4.13. Estudo do Extrato Bruto das Sementes de *Aeschynomene fluminensis*

Parte do extrato bruto das sementes (0,58 g) foi submetido a uma filtração em coluna Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) utilizando H₂O, H₂O/MeOH 25-75% e MeOH como solventes. As frações foram recombinadas de acordo com seus perfis cromatográficos observados em CCD (**Tabela 15 e Esquema 3**).

Tabela 15: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 do extrato bruto metanólico das sementes de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O – 32 mL	1-16	152,3	
H ₂ O – 18 mL	17-25	113,7	
H ₂ O – 28 mL	26-39	32,7	
H ₂ O/MeOH 25% – 20 mL	40-49	19,0	
H ₂ O/MeOH 25% – 10 mL	50-54	11,3	
H ₂ O/MeOH 25% – 22 mL	55-65	29,0	
H ₂ O/MeOH 25% – 12 mL	66-71	11,7	
H ₂ O/MeOH 50% – 10 mL	72-76	16,2	
H ₂ O/MeOH 50% – 10 mL	77-81	7,0	A1
H ₂ O/MeOH 50% – 8 mL	82-85	31,7	
H ₂ O/MeOH 50% – 22 mL	86-94	34,0	
H ₂ O/MeOH 50% – 10 mL	95-99	3,4	
H ₂ O/MeOH 50-75% – 42 mL	100-120	16,3	
H ₂ O/MeOH 50-75% – 48 mL	121-144	13,6	
MeOH – 32 mL	145-160	24,4	

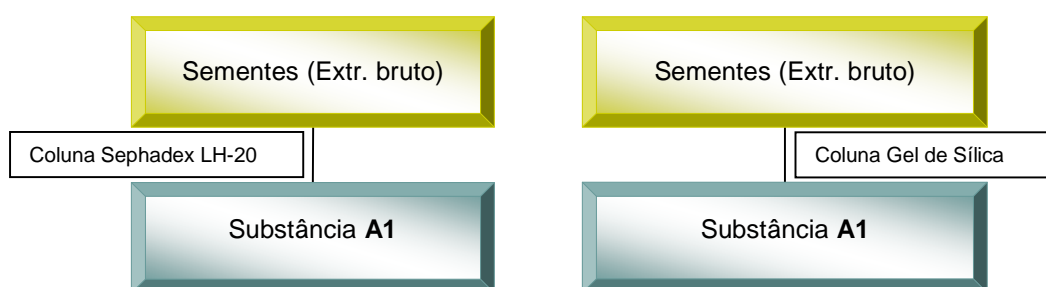
A análise por CCD e RMN de ¹H da fração 77-81 mostrou que se tratava da mesma substância isolada na fração AcOEt das folhas que foi codificada como **A1**.

A fração 100-120 (16,3 mg) foi submetida à uma nova filtração em coluna Sephadex LH-20 ($\theta = 1,0$ cm e 3 g) utilizando MeOH como solvente, mas não resultou no isolamento de nenhuma substância.

Em um novo tratamento, o extrato bruto das sementes (0,90 g) foi submetido à uma CC ($\theta = 2,0$ cm), contendo gel de sílica (30,0 g) utilizando como eluentes AcOEt, AcOEt/MeOH 5-90% e MeOH. As frações foram reunidas conforme seus perfis cromatográficos observados em CCD (**Tabela 16** e **Esquema 4**). A fração 10-28 mostrou por CCD e RMN de ¹H que se tratava da mesma substância **A1**, isolada na fração AcOEt das folhas.

Tabela 16: Frações reunidas da CC em gel de sílica do extrato bruto metanólico das sementes de *A. fluminensis*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
AcOEt a AcOEt/MeOH 5% – 18 mL	1-9	76,9	
AcOEt/MeOH 10-15% – 14 mL	10-16	81,3	A1
AcOEt/MeOH 10-15% – 24 mL	17-28	32,1	
AcOEt/MeOH 20% – 8 mL	29-32	90,5	
AcOEt/MeOH 20% – 10 mL	33-37	87,5	
AcOEt/MeOH 25% – 14 mL	38-44	41,1	
AcOEt/MeOH 30% – 10 mL	45-49	60,3	
AcOEt/MeOH 35% – 6 mL	50-52	16,9	
AcOEt/MeOH 40% – 10 mL	53-57	57,7	
AcOEt/MeOH 40-50% – 14 mL	58-64	96,3	
AcOEt/MeOH 50% – 6 mL	65-67	40,6	
AcOEt/MeOH 50% – 6 mL	68-70	35,4	
AcOEt/MeOH 50-60% – 14 mL	71-77	29,1	
AcOEt/MeOH 60-70% – 14 mL	78-84	16,8	
AcOEt/MeOH 70-80% – 20 mL	85-94	11,5	
AcOEt/MeOH 80% – 8 mL	95-98	15,4	
AcOEt/MeOH 80-90% – 14 mL	99-105	7,4	
MeOH – 26 mL	106-118	6,4	

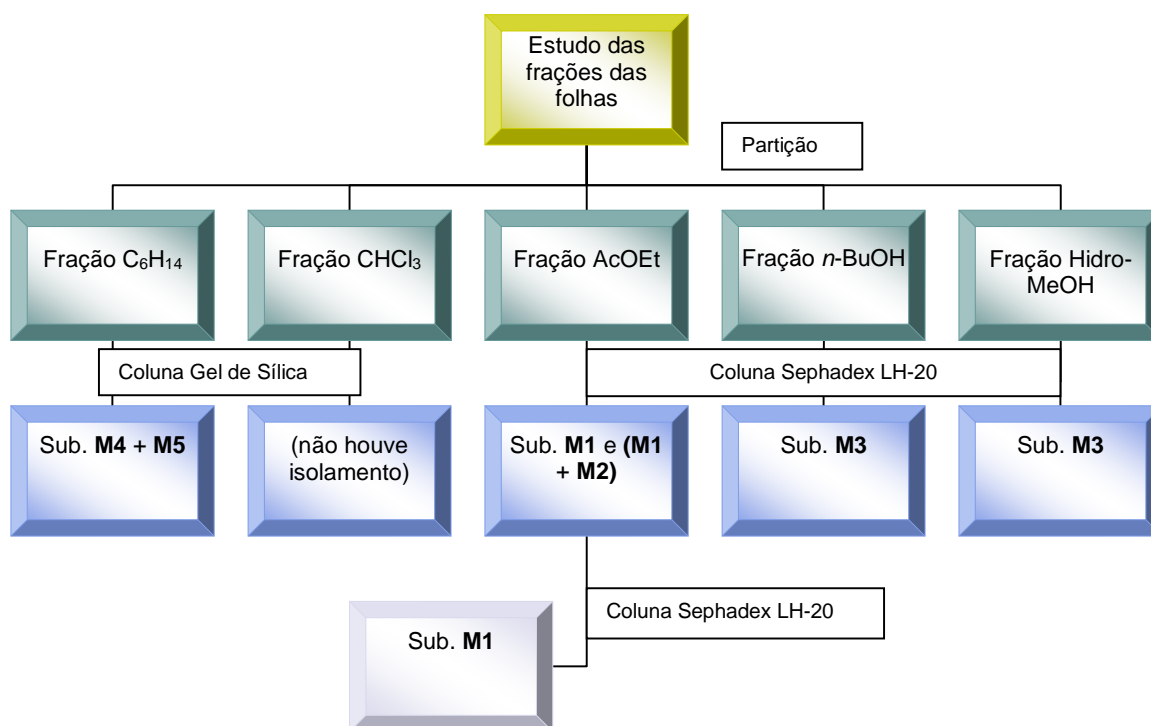


Esquemas 3 e 4: Procedimento utilizado no fracionamento das sementes de *A. fluminensis*

4.5. Estudo das frações de *Machaerium hirtum*

4.5.1. Estudo das frações das folhas de *Machaerium hirtum*

Um resumo dos procedimentos experimentais utilizados para o extrato das folhas e as substâncias isoladas para cada fração de *M. hirtum* está representado no **Esquema 5**.



Esquema 5: Procedimento utilizado no fracionamento das folhas de *M. hirtum*

4.5.2. Estudo da fração hexânica das folhas

A quantidade de 0,56 g da fração hexânica foi submetida à CC ($\theta = 2,0$ cm), contendo gel de sílica (22,0 g) utilizando como eluentes hexano e hexano-AcOEt 10-90% e AcOEt. Foram coletadas 158 frações, as quais foram reunidas após análise em CCD (**Tabela 17**).

Tabela 17: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração hexânica das folhas de *M. hirtum*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
hexano - 160 mL	1-8	105,0	
hexano-AcOEt 10-30% - 520 mL	9-34	192,5	
hexano-AcOEt 30% - 200 mL	35-44	47,6	M4 + M5
hexano-AcOEt 40% - 180 mL	45-53	35,4	
hexano-AcOEt 40% - 180 mL	54-62	25,9	
hexano-AcOEt 40-60% - 540 mL	63-89	23,6	
hexano-AcOEt 60-70% - 600 mL	90-119	13,2	
hexano-AcOEt 70-90% - 420 mL	120-140	9,5	
AcOEt - 360 mL	141-158	7,9	

Através da análise por CCD da fração 35-44 foi observada fluorescência quando submetida à irradiação UV 366 nm e, quando revelada com “revelador para terpenos” indicou a presença de uma substância pura. Esta foi encaminhada para análise de RMN que se constatou tratar de uma mistura de duas substâncias que foram denominadas **M4** e **M5**.

4.5.3. Estudo da fração clorofórmica das folhas

A partir de 0,33 g da fração CHCl_3 foi realizada uma coluna cromatográfica ($\theta = 2,0$ cm) contendo 14 g de gel de sílica, eluída com hexano:AcOEt 10-40%. Foram coletadas 181 frações, as quais foram combinadas de acordo com seus perfis cromatográficos observados em CCD. Este tratamento não resultou no isolamento de nenhuma substância pura.

4.5.4. Estudo da fração acetato de etila das folhas

A fração AcOEt (0,20 g) foi submetida a filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) utilizando H_2O , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 25-75% e MeOH como solventes. Foram coletadas 181 novas frações, as quais foram reunidas conforme CCD (**Tabela 18**).

Tabela 18: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração AcOEt das folhas de *M. hirtum*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O – 14 mL	1-7	5,5	
H ₂ O – 6 mL	8-10	5,7	
H ₂ O – 8 mL	11-14	5,3	
H ₂ O – 8 mL	15-18	5,5	
H ₂ O – 22 mL	19-29	6,2	
H ₂ O – 24 mL	30-41	5,5	
H ₂ O/MeOH 25% – 14 mL	42-48	5,4	M1
H ₂ O/MeOH 25% – 6 mL	49-51	7,2	
H ₂ O/MeOH 25% – 26 mL	52-64	23,0	
H ₂ O/MeOH 25-50% – 10 mL	65-69	6,6	
H ₂ O/MeOH 50% – 22 mL	70-80	6,4	
H ₂ O/MeOH 50% – 18 mL	81-89	7,3	
H ₂ O/MeOH 50% – 20 mL	90-99	8,1	
H ₂ O/MeOH 50% – 42 mL	100-120	25,0	M1 + M2
H ₂ O/MeOH 50% – 18 mL	121-129	6,7	
H ₂ O/MeOH 75% – 18 mL	130-138	6,5	
H ₂ O/MeOH 75% – 6 mL	139-142	6,3	
H ₂ O/MeOH 75% – 12 mL	143-148	5,4	
H ₂ O/MeOH 75% – 22 mL	149-159	6,7	
H ₂ O/MeOH 75% – 14 mL	160-166	7,2	
MeOH – 6 mL	167-169	6,7	
MeOH – 16 mL	170-177	6,4	
MeOH – 8 mL	178-181	6,5	

Através da análise por CCD das frações 42-48 e 100-120 foi observada fluorescência, quando submetidas à irradiação UV 366 nm e, na revelação com “revelador para terpenos” indicaram a presença de compostos puros. Esta fração foi então encaminhada para análise de RMN e forneceu a substância pura **M1** e a mistura **M1** e **M2**.

A fração 52-64 (23,0 mg) foi submetida novamente a uma filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,0$ cm e 3 g) utilizando como eluentes H₂O, H₂O/MeOH 25-75% e MeOH, onde foram coletadas 66 amostras, as quais foram combinadas de

acordo com seus perfis cromatográficos observados em CCD (**Tabela 19**). Este tratamento resultou novamente no isolamento da substância **M1**.

Tabela 19: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração AcOEt das folhas de *M. hirtum* da junção 52-64

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O – 10 mL	1-5	1,5	
H ₂ O – 6 mL	6-8	2,0	
H ₂ O/MeOH 25% – 8 mL	9-12	1,9	
H ₂ O/MeOH 25% – 20 mL	13-22	2,1	
H ₂ O/MeOH 25% – 12 mL	23-27	2,4	
H ₂ O/MeOH 50% – 12 mL	28-33	4,6	M1
H ₂ O/MeOH 50% – 8 mL	34-37	3,0	
H ₂ O/MeOH 50% – 18 mL	38-46	2,4	
H ₂ O/MeOH 75% – 32 mL	47-62	2,1	
MeOH – 8 mL	63-66	1,0	

4.5.5. Estudo da fração *n*-butanólica das folhas

A quantidade de 0,16 g da fração *n*-BuOH foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) utilizando como eluentes H₂O, H₂O/MeOH 25-75% e MeOH. Foram coletadas 177 amostras, as quais foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos observados em CCD (**Tabela 20**).

Tabela 20: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração *n*-BuOH das folhas de *M. hirtum*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O – 18 mL	1-9	6,6	
H ₂ O – 18 mL	10-18	66,4	M3
H ₂ O – 28 mL	19-32	8,0	
H ₂ O – 44 mL	33-54	6,9	
H ₂ O – 12 mL	55-60	3,8	
H ₂ O/MeOH 25% – 38 mL	61-79	4,5	
H ₂ O/MeOH 25-50% – 86 mL	80-122	8,1	
H ₂ O/MeOH 50% – 20 mL	123-132	3,6	
H ₂ O/MeOH 50-75% – 50 mL	133-157	8,1	
MeOH – 40 mL	158-177	5,5	

Através da análise por CCD das frações 1-9 e 10-18 observou-se fluorescência, quando submetidas à irradiação UV 366 nm. A revelação com “revelador para terpenos” indicou a presença de uma substância pura. Esta fração foi então encaminhada para análise de RMN fornecendo a substância **M3**.

4.5.6. Estudo da fração hidrometanólica das folhas

Parte da fração hidrometanólica (0,55 g) foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) utilizando como eluentes H₂O, H₂O/MeOH 25-75% e MeOH, fornecendo 171 frações. As frações foram combinadas de acordo com seus perfis cromatográficos observados em CCD (**Tabela 21**).

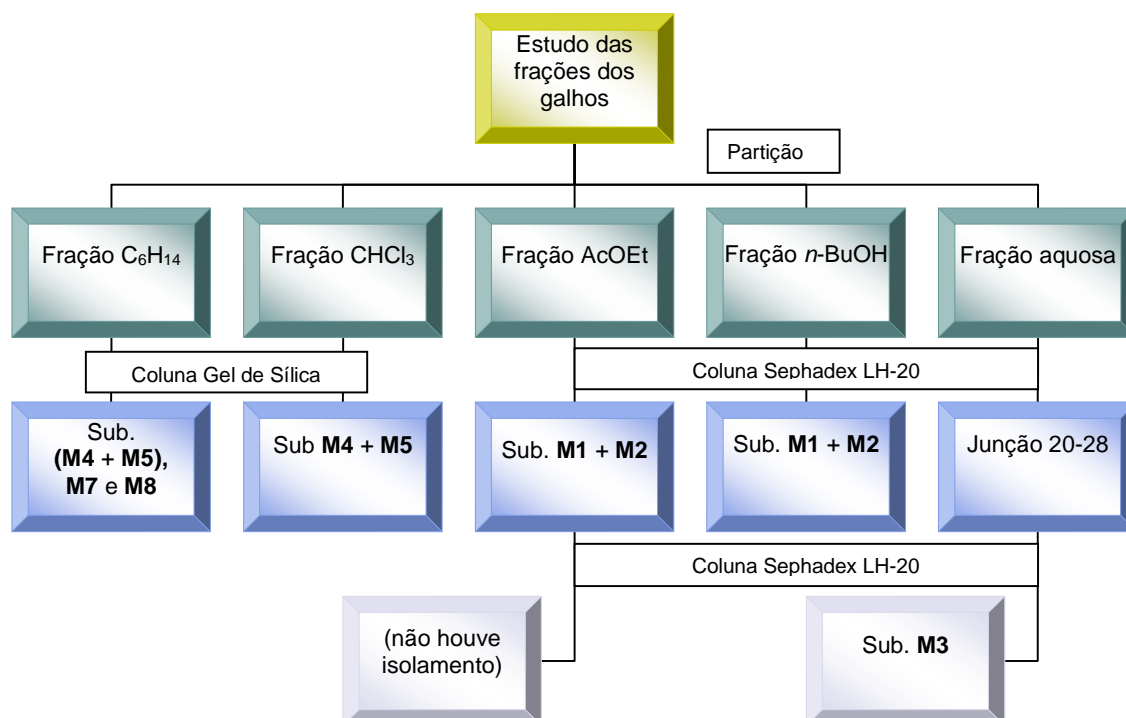
Tabela 21: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração hidrometanólica das folhas de *M. hirtum*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O – 6 mL	1-3	4,3	
H ₂ O – 12 mL	4-9	78,9	M3
H ₂ O – 12 mL	10-15	99,9	
H ₂ O – 10 mL	16-20	78,2	
H ₂ O – 34 mL	21-37	78,3	
H ₂ O a H ₂ O/MeOH 25% - 40 mL	38-57	50,9	
H ₂ O/MeOH 25% – 10 mL	58-62	15,4	
H ₂ O/MeOH 25% – 10 mL	63-67	5,0	
H ₂ O/MeOH 25% – 4 mL	68-69	7,1	
H ₂ O/MeOH 25-50% – 58 mL	70-98	25,8	
H ₂ O/MeOH 50% – 32 mL	99-114	5,8	
H ₂ O/MeOH 50% – 26 mL	115-127	37,8	
H ₂ O/MeOH 50% – 16 mL	128-135	8,0	
H ₂ O/MeOH 50-75% – 24 mL	136-147	9,6	
H ₂ O/MeOH 75% a MeOH – 48 mL	148-171	6,9	

Pela análise por CCD e RMN de ¹H da fração 4-9 mostrou que se tratava da substância **M3** isolada na fração *n*-BuOH das folhas.

4.5.7. Estudo das frações dos galhos de *Machaerium hirtum*

Um resumo dos procedimentos experimentais utilizados para as frações dos galhos e as substâncias isoladas para cada fração de *M. hirtum* está representado no **Esquema 6**.



Esquema 6: Procedimento utilizado no fracionamento dos galhos de *M. hirtum*

4.5.8. Estudo da fração hexânica dos galhos

A quantidade de 0,56 g da fração hexânica foi submetida a uma coluna cromatográfica ($\theta = 2,0$ cm) contendo gel de sílica (20,0 g) eluída com os solventes hexano, hexano:AcOEt 5-90% e AcOEt. Foram coletadas 145 frações, as quais foram reunidas após análise em CCD (**Tabela 22**).

Tabela 22: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração hexânica dos galhos de *M. hirtum*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
hexano - 260 mL	1-16	1,8	
hexano-AcOEt 5% - 20 mL	17	53,4	M6
hexano-AcOEt 5% - 60 mL	18-20	11,7	
hexano-AcOEt 10% - 20 mL	21	9,8	M7
hexano-AcOEt 10% - 60 mL	22-24	53,4	
hexano-AcOEt 10% - 40 mL	25-26	28,9	M4 + M5
hexano-AcOEt 10% - 60 mL	27-29	17,4	
hexano-AcOEt 10-15% - 180 mL	30-38	7,8	
hexano-AcOEt 15-20% - 80 mL	39-42	4,2	
hexano-AcOEt 20% - 300 mL	43-57	23,9	
hexano-AcOEt 20-25% - 120 mL	58-63	6,2	
hexano-AcOEt 25-35% - 400 mL	64-84	28,2	
hexano-AcOEt 35-40% - 280 mL	85-98	8,8	
hexano-AcOEt 50-60% - 340 mL	99-115	35,6	
hexano-AcOEt 60% - 20 mL	116	3,9	
hexano-AcOEt 70-90% - 400 mL	117-137	47,6	
AcOEt - 240 mL	138-149	184,4	

Através da análise por CCD das frações 17, 21 e 25-26 observou-se fluorescência quando submetidas à irradiação UV 366 nm, exceto 21. Após revelação com “revelador para terpenos, indicou a presença de compostos puros. Estas frações foram encaminhadas para análise de RMN e forneceram as substâncias **M6** e **M7** e a mistura **M4** e **M5**, respectivamente.

4.5.9. Estudo da fração clorofórmica dos galhos

Uma massa de 0,40 g da fração CHCl₃ foi submetida a uma coluna cromatográfica ($\theta = 2,0$ cm) contendo 16,0 g de gel de sílica utilizando como eluentes hexano, hexano-AcOEt 5-90% e AcOEt, fornecendo 293 frações que foram reunidas após análise em CCD (**Tabela 23**).

Tabela 23: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração CHCl_3 dos galhos de *M. hirtum*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
hexano - 260 mL	1-13	11,8	
hexano-AcOEt 5% - 40 mL	14-15	6,0	
hexano-AcOEt 5-10% - 220 mL	16-26	13,5	
hexano-AcOEt 10% - 100 mL	27-31	5,0	M4 + M5
hexano-AcOEt 10% - 380 mL	32-50	14,9	
hexano-AcOEt 10-15% - 200 mL	51-60	8,9	
hexano-AcOEt 15% - 800 mL	61-99	36,1	
hexano-AcOEt 15-20% - 200 mL	100-109	4,5	
hexano-AcOEt 20% - 1220 mL	110-170	59,8	
hexano-AcOEt 25% - 180 mL	171-179	19,3	
hexano-AcOEt 25-30% - 400 mL	180-199	16,6	
hexano-AcOEt 40% - 220 mL	200-210	17,3	
hexano-AcOEt 50% - 200 mL	211-220	8,8	
hexano-AcOEt 50-55% - 200 mL	221-230	5,4	
hexano-AcOEt 55-60% - 180 mL	231-239	9,3	
hexano-AcOEt 60-70% - 200 mL	240-249	9,3	
hexano-AcOEt 80-90% - 160 mL	250-257	6,7	
hexano-AcOEt 90% - 80 mL	258-261	8,5	
AcOEt - 80 mL	262-293	75,8	

Pela análise por CCD da fração 27-31 foi observado fluorescência, quando submetida à irradiação UV 366 nm. Na revelação com “revelador para terpenos” indicou a presença de uma substância pura. Esta fração foi então encaminhada para análise de RMN fornecendo novamente a mistura **M4** e **M5**.

4.5.10. Estudo da fração acetato de etila dos galhos

Parte da fração AcOEt (0,40 g) foi submetida à CC ($\theta = 2,0$ cm), contendo 16,0 g de gel de sílica utilizando como eluentes CHCl_3 , CHCl_3 -MeOH 5-75% e MeOH. Foram coletadas 168 frações que foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos observados em CCD (**Tabela 24**).

Tabela 24: Frações reunidas da CC em gel de sílica da fração AcOEt dos galhos de *M. hirtum*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
CHCl ₃ – 26 mL	1-13	10,0	
CHCl ₃ – 14 mL	14-20	8,5	
CHCl ₃ – 10 mL	21-25	6,0	
CHCl ₃ /MeOH 5% – 10 mL	26-30	17,5	
CHCl ₃ /MeOH 5% – 18 mL	31-39	11,5	
CHCl ₃ /MeOH 5% – 6 mL	40-42	12,6	
CHCl ₃ /MeOH 5% – 20 mL	43-52	12,5	
CHCl ₃ /MeOH 5% – 12 mL	53-58	19,2	
CHCl ₃ /MeOH 10% – 10 mL	59-63	16,0	
CHCl ₃ /MeOH 10% – 12 mL	64-69	18,5	
CHCl ₃ /MeOH 10-15% – 20 mL	70-79	17,0	
CHCl ₃ /MeOH 15% – 22 mL	80-90	52,3	M1 + M2
CHCl ₃ /MeOH 15% – 38 mL	91-109	18,0	
CHCl ₃ /MeOH 20% – 10 mL	110-114	15,9	
CHCl ₃ /MeOH 20-25% – 20 mL	115-124	19,6	
CHCl ₃ /MeOH 30-40% – 22 mL	125-135	20,0	
CHCl ₃ /MeOH 50-80% – 40 mL	136-155	15,2	
CHCl ₃ /MeOH 90% – 10 mL	156-160	17,5	
MeOH – 16 mL	161-168	28,2	

Através da análise por CCD da fração 80-90 observou-se fluorescência quando submetida à irradiação UV 366 nm e, após revelação com “revelador para terpenos, indicaram a presença de compostos puros. Esta fração foi encaminhada para análise de RMN e forneceu novamente a mistura **M1** e **M2**.

A fração 91-109 (18,0 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,0$ cm e 3 g) utilizando como eluente MeOH. Foram coletadas 70 sub-frações, as quais foram reunidas após análise em CCD. Este tratamento não resultou no isolamento de nenhuma substância pura.

4.5.11. Estudo da fração *n*-butanólica dos galhos

A quantidade de 0,33 g da fração *n*-BuOH foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) utilizando como eluentes H₂O, H₂O/MeOH 25-75% e MeOH. Foram coletadas 168 amostras que foram combinadas de acordo com seus perfis cromatográficos observados em CCD (**Tabela 25**).

Tabela 25: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração *n*-BuOH dos galhos de *M. hirtum*

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
H ₂ O – 6 mL	1-3	5,1	
H ₂ O – 12 mL	4-10	26,4	
H ₂ O – 6 mL	11-13	15,0	
H ₂ O – 16 mL	14-21	54,1	
H ₂ O – 22 mL	22-32	26,2	
H ₂ O - 24 mL	33-44	14,9	
H ₂ O/MeOH 25% – 18 mL	45-53	8,1	
H ₂ O/MeOH 25% – 20 mL	54-63	9,5	
H ₂ O/MeOH 25-50% – 48 mL	64-87	19,4	
H ₂ O/MeOH 50% – 62 mL	88-118	42,8	
H ₂ O/MeOH 50-75% – 58 mL	119-147	18,3	M1 + M2
MeOH – 10 mL	148-152	13,0	
MeOH – 10 mL	153-157	13,5	
MeOH – 10 mL	158-168	11,4	

Pela análise por CCD e RMN das frações 119-147 foi observado que se tratava das mesmas substâncias isoladas na fração AcOEt das folhas como mistura que foi codificada como **M1** e **M2**.

4.5.12. Estudo da fração aquosa dos galhos

Parte da fração aquosa (0,550 g) foi submetida à coluna Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) eluída com H₂O, H₂O/MeOH 25-75% e MeOH. Foram coletadas 112 amostras que foram reunidas após análise em CCD. Este tratamento não resultou no isolamento de nenhuma substância pura.

A junção 20-28 (428,8 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH-20 ($\theta = 1,5$ cm e 5 g) utilizando como eluente MeOH. Foram coletadas 31 amostras, as quais foram reunidas conforme seus perfis cromatográficos observados em CCD (**Tabela 26**).

Tabela 26: Frações reunidas da filtração em Sephadex LH-20 da fração aquosa dos galhos de *M. hirtum* da junção 20-28

Eluentes – V (mL)	Frações Reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
MeOH – 18 mL	1-9	4,0	
MeOH – 2 mL	10	9,9	M3
MeOH – 2 mL	11	41,5	
MeOH – 2 mL	12	91,6	
MeOH – 8 mL	13-16	226,2	
MeOH – 4 mL	17-18	34,9	
MeOH – 4 mL	19-20	11,6	
MeOH – 6 mL	21-23	6,9	
MeOH – 8 mL	24-31	2,2	

Através da análise por CCD da fração 10 observou-se fluorescência, quando submetida à irradiação UV 366 nm e na revelação com “revelador para terpenos” indicou a presença de uma substância pura. Esta fração foi encaminhada para análise de RMN e forneceu novamente a substância **M3**.

As frações que apresentaram massa suficiente foram estudadas quimicamente, porém somente as que foram descritas acima conduziram ao isolamento de substâncias.

4.6. Ensaio Biológicos

4.6.1. Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi realizada no Departamento de Farmacologia da UEM, sob coordenação da Professora Doutora Ciomar Aparecida Bersani Amado e aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação sob parecer número 058/2009 de 07/07/2009.

4.6.1.1. Teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton:

Para realização do teste de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton foram utilizados camundongos Swiss (n=6-10) machos, adultos, pesando entre 25-35 g de acordo com a metodologia descrita em Van Harman (1974). Os extratos e frações das folhas e dos galhos das espécies vegetais *A. fluminensis* e *M. hirtum*, foram aplicados topicamente nas orelhas na dose de 5 mg/orelha; imediatamente após a aplicação do óleo de cróton (200 µg/orelha). A indometacina (Indo), aplicada por via tópica (1 mg/orelha), foi utilizada como anti-inflamatório de referência (controle positivo) e a acetona 70% ou clorofórmio utilizados como veículo. Após 6 horas, os animais foram anestesiados e então sacrificados e, as orelhas seccionadas em discos com 7 mm de diâmetro para posterior pesagem em balança analítica. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (epm) e analisados utilizando teste de STUDENT para comparação de duas médias, ou análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, sendo utilizados $P < 0,05$ como nível de significância. A equação (1) foi utilizada para determinar a porcentagem de inibição do edema:

(1)

$$(\%) \text{ de inibição} = \frac{\text{peso das orelhas inflamadas (OC+V)} - \text{peso das orelhas tratadas}}{\text{peso das orelhas inflamadas (OC+V)} - \text{peso da orelha não inflamada (V)}} \times 100$$

4.6.1.2. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO foi avaliada no sobrenadante de homogenados das secções de orelhas (controles e tratadas com extrato bruto, 5,0 e 2,5 mg e indometacina 1 mg), de acordo com a técnica descrita por Bradley *et al.* (1982). O

tecido da orelha foi colocado em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil-amônio (Sigma - 1 mL/50 mg de tecido) em homogeneizador de Potter. O homogenado foi agitado em vórtex e centrifugado durante 5,0 min a 2500 rpm e 25 °C. Dez µL do sobrenadante obtido foram adicionados em microplaca de 96 cavidades, em triplicata, sendo a seguir, adicionados 200 µL de uma solução tampão contendo diidrocloreto de *o*-dianisidina (Sigma-16,7 mg), água bidestilada (90 mL), tampão fosfato de potássio (10 mL) e H₂O₂ 1% (50 µL). A reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M (pH 3,0) e a atividade da enzima foi determinada pela técnica do ponto final através da medida de absorbância (450 nm). A equação 1 foi usada para determinar a porcentagem de redução na atividade da enzima da mieloperoxidase.

4.6.1.3. Teste da atividade de pleurisia:

O modelo experimental de pleurisia foi utilizado para avaliar o efeito do extrato bruto das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* e *M. hirtum* sobre o aumento da permeabilidade vascular (acúmulo de exsudato inflamatório pleural) e a migração de células induzidos pela injeção intrapleural de carragenina (Cg). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, pesando de 180 a 220 g. O protocolo para estes experimentos foi encaminhado para o Comitê de Ética Animal da UEM, para apreciação e aprovação. A pleurisia foi induzida pela injeção de 0,25 mL de uma suspensão de carragenina (200 µg) na cavidade intrapleural, na região do mediastino direito, entre a 3^a e a 4^a costelas, de acordo com a técnica descrita por Vinegar *et al.* (1973). A carragenina foi diluída em salina tamponada com fosfato (PBS; pH=7,4). Na 4^o hora após a indução da pleurisia, os animais foram anestesiados e sacrificados, para a coleta do exsudato inflamatório intrapleural.

O material coletado por aspiração foi transferido para tubos cônicos de centrífuga. O volume total do exsudato foi medido e uma alíquota de 50 µL usada para determinar o número de leucócitos totais em câmara de Neubauer. Para a contagem de leucócitos totais, as hemáceas foram lisadas pela adição de líquido de Turk. O fluido remanescente foi centrifugado a 2500 rpm por 10 min, e as células ressuspendidas. As lâminas foram preparadas, secas, fixadas e coradas com

solução de May-Grünwald-Giemsa. O número de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares presentes no exsudato foram determinados em microscópio óptico comum. Os animais sob jejum de 15 h foram tratados por via oral (gavage) com os extratos brutos das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* e *M. hirtum* na dose de 500 mg/kg, (também foram usadas as doses de 250 e 125 mg/kg do extrato bruto das folhas de *M. hirtum*) 60 minutos antes da injeção de carragenina (200 µg). A indometacina (Indo) administrada por via oral (gavage) na dose de 5 mg/kg foi utilizada como antiinflamatório de referência (controle positivo). Um grupo de animais foi tratado com o veículo (água).

4.6.2. Teste da Atividade Antitumoral:

4.6.2.1. Cultura de células

Células Caco-2, originadas de adenocarcinoma de colon humano, foram cultivadas usando meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco®, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco®) e 50 µg/mL de gentamicina. A cultura foi mantida em garrafas plásticas com tampa de rosca e dispositivo para entrada de CO₂ e incubadas a 37°C em estufa úmida com tensão de 5% CO₂ (Fischer Scientific®, modelo Isotemp). Sempre que a monocamada de células encontrava-se confluenta, a cada 3 ± 1 dia, era feito a renovação ou repique da cultura, utilizando solução de tripsina (Gibco®) 0,25% contendo 1 mM EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), a fim de manter a linhagem celular continuamente.

4.6.2.2. Desenvolvimento da Atividade Antitumoral

A atividade antitumoral dos compostos em células Caco-2 foram realizadas através da técnica Sulforodamina B, como descrito por Skehan *et al.*, (1990), no Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, sob orientação do professor Dr. Celso Vataru Nakamura e colaboração da mestrandia do programa de Ciências Farmacêuticas Samara Requena Nocchi. As células foram cultivadas em placas de 96 poços e após a formação da monocamada confluenta, aproximadamente 24 horas, o meio antigo foi retirado e

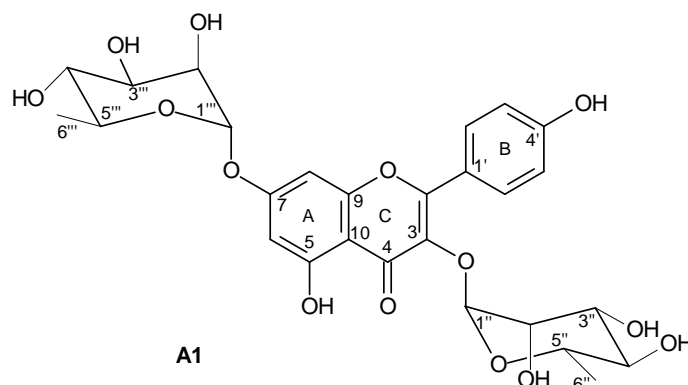
100 µL de DMEM foi adicionado em cada poço. Em seguida, 100 µL das várias concentrações dos extratos/frações/substância isolada foram adicionados por poço, em triplicata. Foram testadas as concentrações de 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL. Foi realizado controle de células sem a droga. Após a adição dos extratos/frações/substância isolada, a placa foi incubada por 48 h a 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi removido de cada poço e lavado com PBS (tampão fosfato salina) estéril. Em cada poço foi adicionado 50 µL de ácido tricloroacético à 10% (SYNTH[®]) e a placa foi incubada por 1h sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo de luz, para fixação. Após este período, a placa foi lavada 4x em água corrente e mantida em temperatura ambiente até secar. Após secagem da placa foi adicionado em cada poço 50 µL de uma solução a 0,4% de sulforodamina B (Sigma[®]) em ácido acético 1%. A placa foi incubada novamente sob refrigeração e ao abrigo da luz por 30 minutos. O corante foi retirado e a placa lavada 4x com ácido acético glacial à 1% para remoção do corante em excesso. O corante ligado às células viáveis foi dissolvido em 150 µL de solução Tris-base 10 mM. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Bio-Tek[®], modelo Power Wave XS) à 530 nm. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes. Os resultados foram comparados com o controle de células e a citotoxicidade foi determinada pela destruição celular provocada pelos extratos/frações/substância isolada, a fim de determinar o CC₅₀ (concentração da droga que é citotóxica para 50% das células). O Padrão utilizado é o Paclitaxel (taxol) da Sigma Chemical Co, MO. USA.

5. Resultados e discussão

O estudo químico de *Aeschynomene fluminensis* (folhas, galhos e sementes) resultou no isolamento de 11 substâncias. Destas, seis pertence à classe dos flavonoides (**A1**, **A2**, **A3**, **A5**, **A6** e **A10**), uma a das flavanonas (**A4**), duas pertencem a classe dos esteróides (**A7** e **A8**), uma a das isoflavonas (**A9**) e uma a dos açúcares (**A11**).

As estruturas das substâncias isoladas foram propostas pela análise de seus dados espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais e comparação com dados obtidos da literatura, conforme descrito a seguir.

5.1. Substância A1



A substância **A1** foi isolada das frações acetato de etila e *n*-butanólica das folhas e dos galhos e no extrato bruto das sementes de *A. fluminensis* como um sólido amorfo amarelo, solúvel em MeOH.

O espectro no IV (**Figura 3**) apresentou banda de absorção em 3390 cm^{-1} relativa a vibração de estiramento de ligação —OH, e bandas em 1601 cm^{-1} e 1658 cm^{-1} referentes a vibração de estiramento de ligações C=C e C=O α , β insaturada respectivamente.

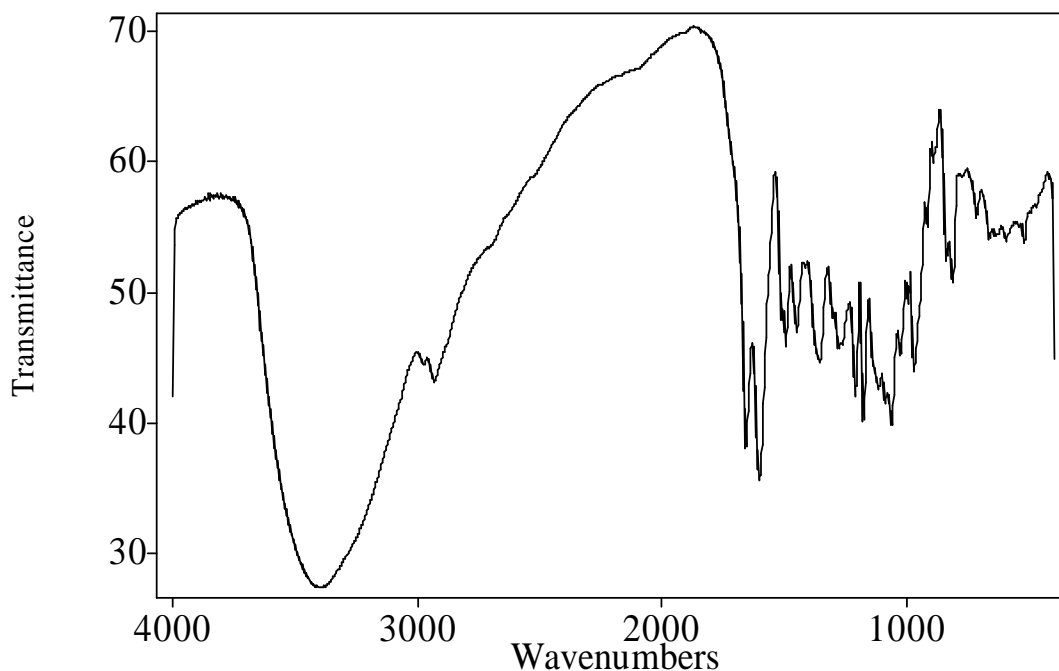


Figura 3: Espectro para a região do infravermelho (V cm^{-1}) da substância **A1**

No espectro de RMN ^1H (**Figura 4**) da substância **A1** foram observados dois dupletos em δ_{H} 6,93 ($J = 8,7$ Hz, H-3' e H-5') e 7,79 ($J = 8,7$ Hz, H-2' e H-6') característicos de anel **B** *p*-hidroxilado, dois dupletos em δ_{H} 6,46 ($J = 1,8$ Hz, H-6), 6,72 ($J = 1,8$ Hz, H-8) para o anel **A**, indicando a estrutura do canferol como aglicona (**Tabela 29**). A presença dos sinais em δ_{H} 5,39 (d, $J = 1,8$ Hz, H-1'') e 5,56 (sl, H-1'''), característicos de hidrogênios anoméricos e dos sinais em δ_{H} 0,92 (d; $J = 5,7$ Hz, H-6'') e 1,25 (d; $J = 6,0$ Hz, H-6''') e demais sinais na região de hidrogênios carbinólicos, indicaram duas unidades de raminose.

Os espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 5**) da substância **A1** apresentaram 25 sinais, dentre eles, os sinais em δ_{C} 95,6 (C-8), 100,6 (C-6), 116,6 (C-3' e C-5') e 132,0 (C-2' e C-6') característicos de sistemas aromáticos. Ainda, foram observados sinais em δ_{C} 103,5 e 99,9 de carbonos anoméricos e δ_{C} 17,7 e 18,1 de carbonos metílicos indicando duas unidades de raminose. Através do mapa de contornos HMQC (**Figura 6**) foram atribuídos todos os ^{13}C com seus ^1H , que também auxiliaram na identificação (**Tabela 29**).

As posições das unidades de raminose no C-3 e C-7 foram confirmadas pelas correlações do C-3 (δ_C 136,5) com o hidrogênio anomérico em δ_H 5,39 (H-1'') e do C-7 (δ_C 163,6) com o hidrogênio anomérico em δ_H 5,56 (H-1''') da aglicona observadas no mapa de contornos HMBC (**Figura 7**). Outras correlações observadas em HMBC estão apresentadas na **Tabela 27**.

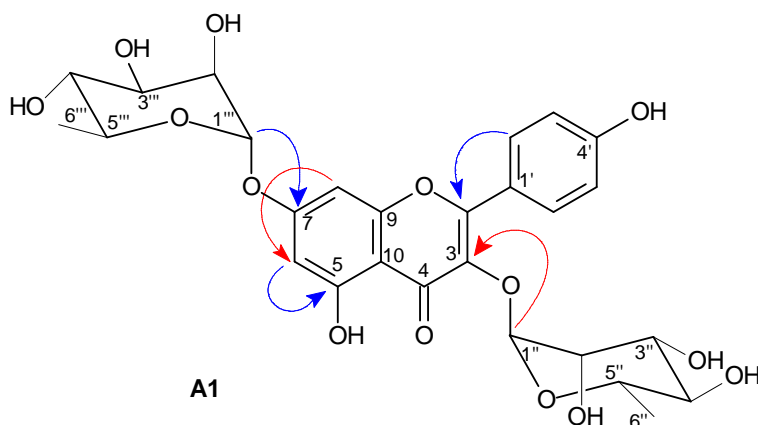


Tabela 27: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos HMBC para **A1**.

δ_H (^1H)	δ_C (^{13}C)
7,79 (2' e 6')	159,9 (C2), 132,0 (C2' e 6') e 161,8 (C4')
6,93 (3' e 5')	122,4 (C1') e 161,8 (C4')
6,72 (8)	100,6 (C6), 163,6 (C7), 158,1 (C9) e 107,6 (C10)
6,46 (6)	163,0 (C5), 95,6 (C8) e 107,6 (C10)
5,56 (1''')	163,6 (C7), 71,7 (C2''') e 72,1 (C3''')
5,39 (1'')	136,5 (C3) e 72,06 (C3'')
3,82 (3''')	73,6 (C4''')
3,71 (3'')	73,2 (C4'')
3,41-3,52 (4''')	71,3 (5''') e 71,7 (C2''')
1,25 (6''')	71,3 (5''')
0,92 (6'')	71,3 (C5'') e 73,2 (C4'')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

No mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (**Figura 8**) foram observadas correlações para a aglicona, entre o H-6 (δ_H 6,46) com H-8 (δ_H 6,72), entre o H-3' e 5' (δ_H 6,93) com H-2' e 6' (δ_H 7,79) e também correlações com unidades de raminose (**Tabela 28**).

Tabela 28: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos COSY para **A1**.

δ ^1H (mult.; J em Hz; H)	δ ^1H (mult.; J em Hz; H)
0,92 (<i>d</i> ; 5,7; H-6'')	3,34 (<i>d</i> ; 2,7; H-4'')
1,25 (<i>d</i> ; 6,0; H-6''')	3,56-3,61 (<i>m</i> ; H-5''')
3,34 (<i>d</i> ; 2,7; H-4'')	3,71 (<i>dd</i> ; 3,3 e 9,3; H-3'')
3,41-3,52 (<i>m</i> ; H-4''')	3,82 (<i>dd</i> ; 3,3 e 9,3; H-3''')
3,71 (<i>dd</i> ; 3,3 e 9,3; H-3'')	4,21 (<i>dd</i> ; 1,8 e 3,3; H-2'')
3,82 (<i>dd</i> ; 3,3 e 9,3; H-3''')	4,01 (<i>st</i> ; H-2''')
4,01 (<i>st</i> ; H-2''')	5,56 (<i>st</i> ; H-1''')
4,21 (<i>dd</i> ; 1,8 e 3,3; H-2'')	5,39 (<i>d</i> ; 1,8; H-1'')
6,46 (<i>d</i> ; 1,8; H-6)	6,72 (<i>d</i> ; 1,8; H-8)
6,93 (<i>d</i> ; 8,7; H-3' e 5')	7,79 (<i>d</i> ; 8,7; H-2' e 6')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD₃OD)

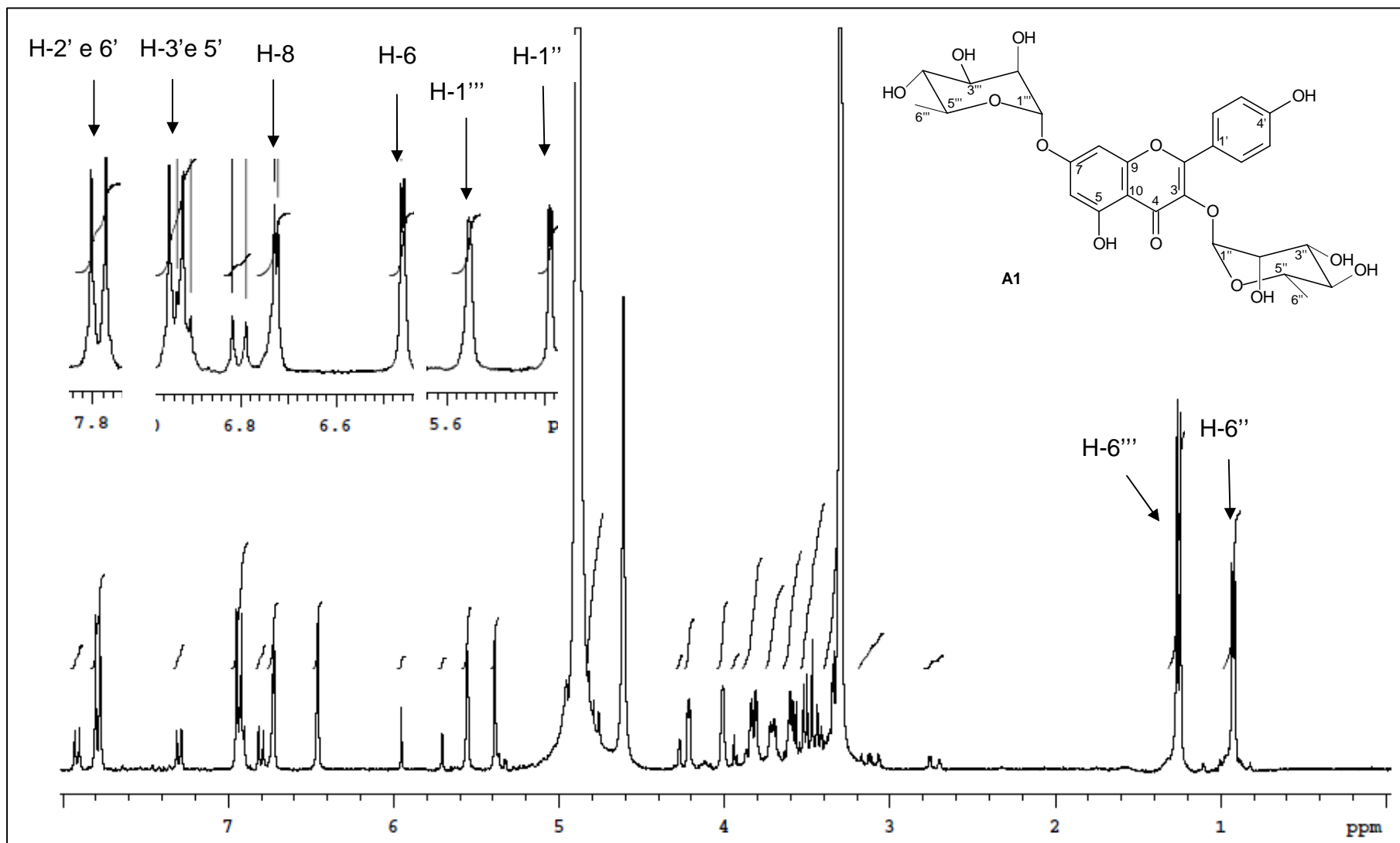


Fig. 4: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) para a substância A1.

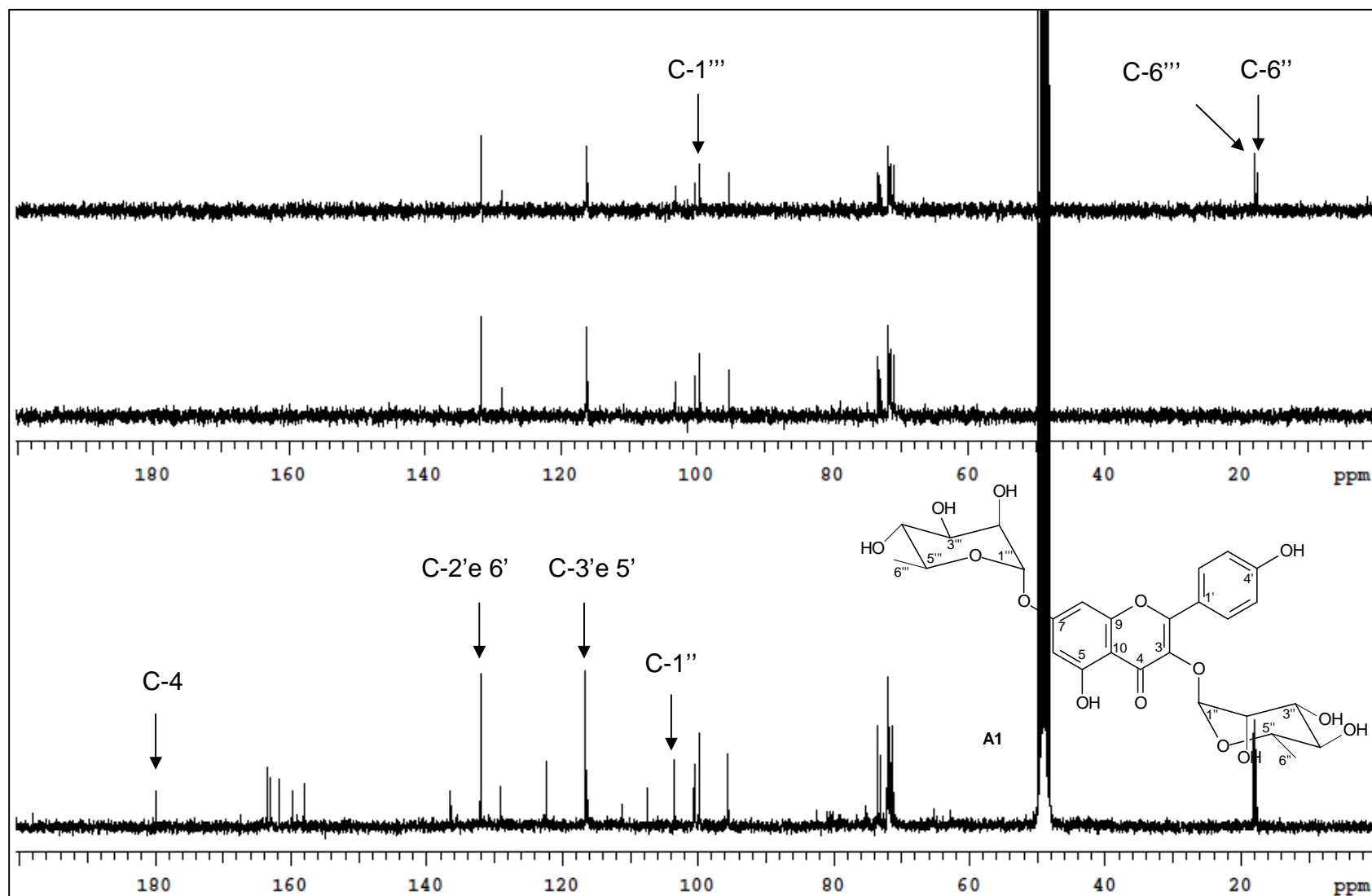


Fig. 5: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a substância A1.

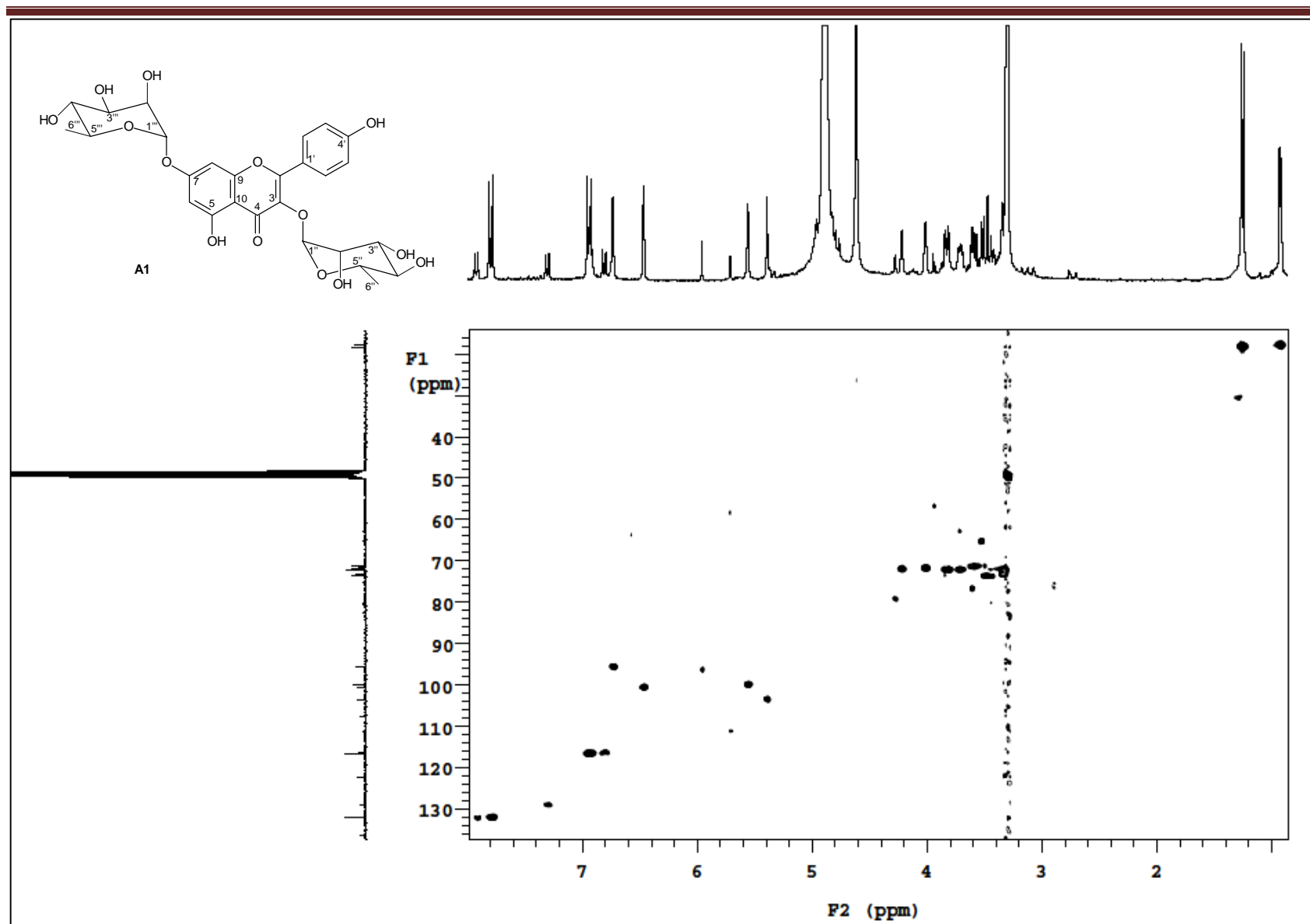


Fig. 6: Mapa de contornos HMQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A1.

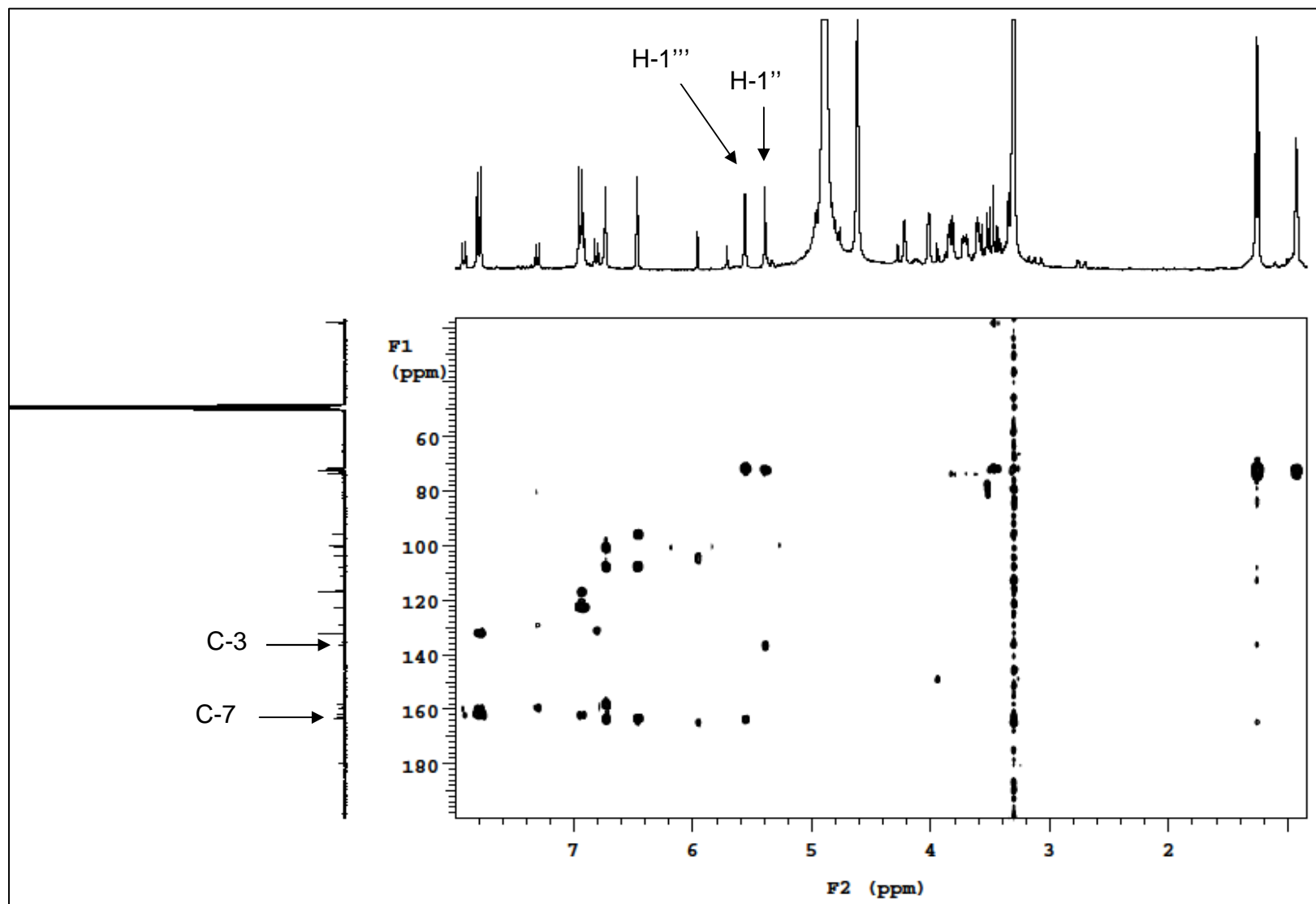


Fig. 7: Mapa de contornos **HMBC** (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância **A1**.

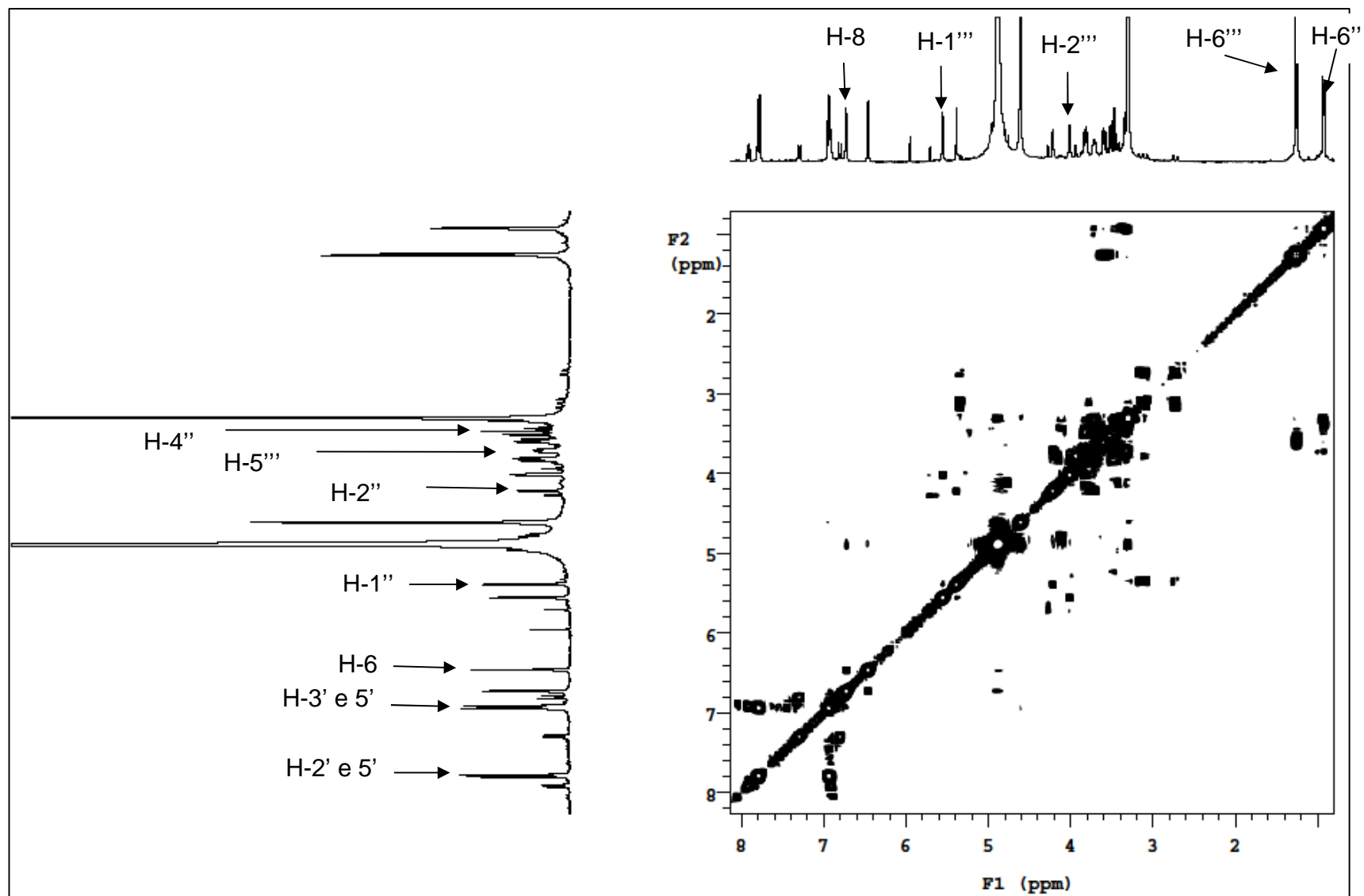


Fig. 8: Mapa de contornos COSY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância A1.

Os dados espectrais mencionados anteriormente para **A1** foram comparados aos já existentes na literatura para **3,7-di-O- α -L-raminopiranosilcanferol** (canferitrina) (Aragão *et al.*, 1990 e Menezes *et al.* 2007) (Tabela 29).

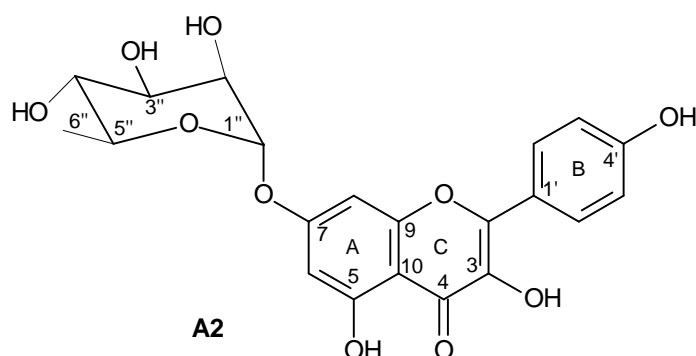
Tabela 29: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e HMQC para a substância **A1** em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a canferitrina.

C	A1	$^1\text{H}/\text{HMQC}$	Canferitrina^a	H
2	159,9 (C)		159,7	
3	136,5 (C)		136,4	
4	179,8 (C)		179,7	
5	163,0 (C)		162,9	
6	100,6 (CH)	6,46 $d/J= 1,8$ Hz	99,8	6,44 ($d, 2,1$)
7	163,6 (C)		163,5	
8	95,6 (CH)	6,72 $d/J= 1,8$ Hz	95,5	6,70 ($d, 2,0$)
9	158,1 (C)		157,9	
10	107,6 (C)		107,5	
1'	122,4 (C)		122,3	
2' e 6'	132,0 (CH)	7,79 $d/J= 8,7$ Hz	131,9	7,78 ($d, 8,8$)
3' e 5'	116,6 (CH)	6,93 $d/J= 8,7$ Hz	116,6	6,94 ($d, 8,8$)
4'	161,8 (C)		161,7	
1''	103,5 (CH)	5,39 $d/J= 1,8$ Hz	103,5	5,4 ($d, 1,6$)
2''	71,9 (CH)	4,21 $dd/J= 1,8; 3,3$ Hz	71,8	
3''	72,0 (CH)	3,71 $dd/J= 3,3; 9,3$ Hz	72,1	
4''	73,2 (CH)	3,34 $d/J= 2,7$ Hz	73,5	
5''	71,3 (CH)	3,56-3,61 m	71,6	
6''	17,7 (CH_3)	0,92 $d/J= 5,7$ Hz	17,7	0,9 ($d, 3,3$)
1'''	99,9 (CH)	5,56 sl	100,5	5,6 ($d, 1,16$)
2'''	71,7 (CH)	4,01 sl	72,1	
3'''	72,1 (CH)	3,82 $dd/J= 3,3; 9,3$ Hz	72,1	
4'''	73,6 (CH)	3,41-3,52 m	73,1	
5'''	71,3 (CH)	3,56-3,61 m	71,2	
6'''	18,1 (CH_3)	1,25 $d/J= 6,0$ Hz	18,1	1,3 ($d, 3,9$)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD); (^aMenezes *et al.* 2007; CD_3OD)

Este é o primeiro relato do isolamento de **canferitrina** no gênero *Aeschynomene*. Em **Fabaceae** esta substância está presente em *Bauhinia forficata* e confere as atividades anti-hiperglicêmica, antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória (Pizzolatti *et al.*, 2003, De Sousa *et al.*, 2004 e Toker *et al.*, 2004) e hipoglicemiante em ratos diabéticos (Jorge *et al.*, 2004).

5.2. Substância A2



A substância **A2** foi isolada da fração acetato de etila das folhas de *A. fluminensis* como sólido amorfo amarelo.

O espectro de massas de baixa resolução (**Figura 9**), obtido por inserção direta via sólidos, apresentou o pico base em m/e 286 referente a unidade canferol da fragmentação $[M^+ - C_6H_{11}O_4]^+$, não sendo observado o pico do íon molecular. Também foram observadas fragmentações a partir do fragmento m/e 286 como, por exemplo, os representados no **esquema 7**, segundo March e Miao (2004).

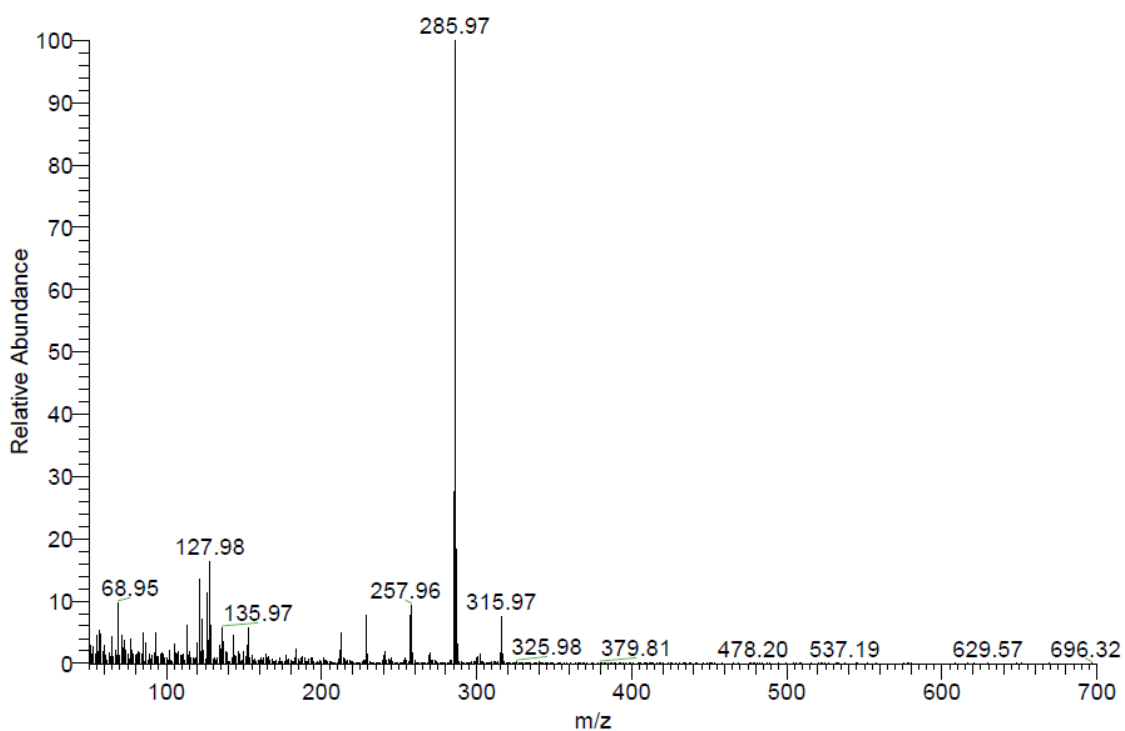
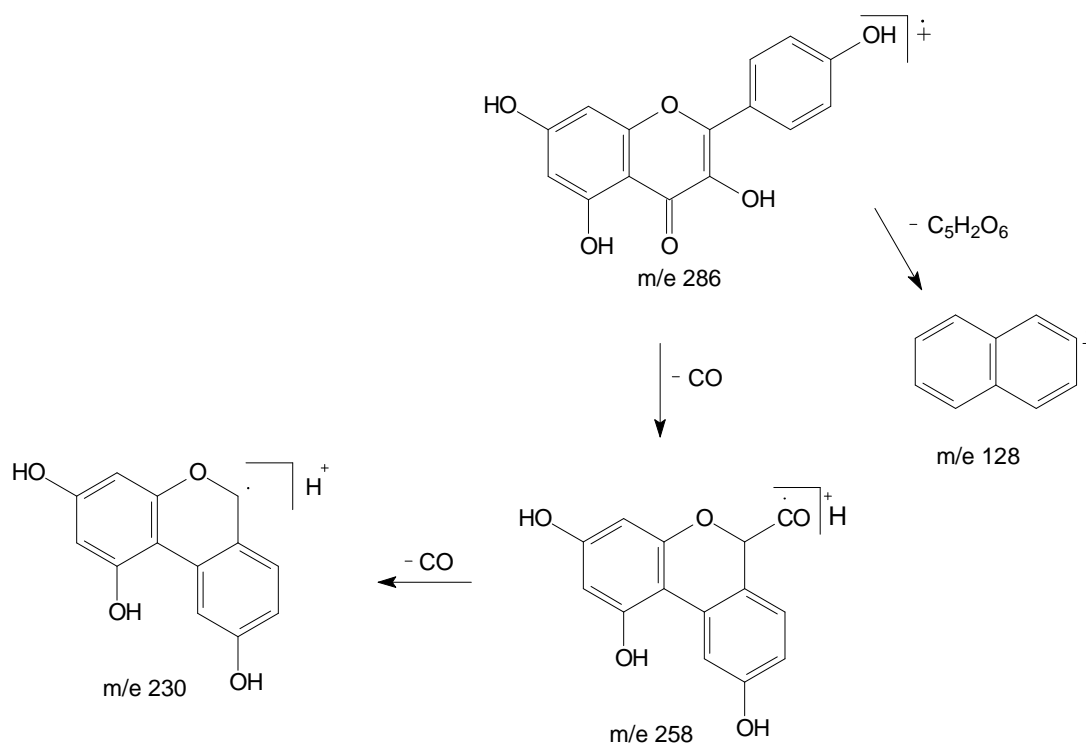


Figura 9: Espectro de massas (70 eV) de A2.



Esquema 7: Propostas de fragmentações a partir do fragmento m/e 286 da substância A2.

O espectro de RMN ^1H para **A2** (**Figura 10**) apresentou os seguintes deslocamentos para a aglicona: δ_{H} 6,42 (1H, *d*, $J=1,8$ Hz, H-6), 6,75 (1H, *d*, $J=1,8$ Hz, H-8), 6,90 (2H, *d*, $J=8,7$ Hz, H-3', H-5'), 8,11 (2H, *d*, $J=8,7$ Hz, H-2', H-6'). O sinal em δ_{H} 5,56 (1H, *sl*, H-1'') característico de hidrogênio anomérico e do sinal em δ_{H} 1,25 (1H, *d*, $J=6,0$ Hz) indicou a presença de uma unidade de raminose (**Tabela 32**).

Os espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ da substância **A2** apresentou 21 sinais, (**Figura 11**) dentre eles, sinais em δ_{C} 95,5 (C-8), 100,1 (C-6), 131,0 (C-2' e C-6') e 116,5 (C-3' e C-5') característicos de carbonos de sistema aromático, também sinal em δ_{C} 99,9 (C-1'') de carbono anomérico e em δ_{C} 18,8 de carbono metílico (C-6''), confirmando a presença de raminose. As correlações dos ^{13}C com seus ^1H foram confirmadas através do mapa de contornos gHSQC, (**Figura 12**) para a substância **A2** que também auxiliaram na identificação (**Tabela 32**).

A posição da raminose no C-7 da aglicona foi confirmada pela correlação do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,56 com o C-7 (δ_{C} 163,4). Demais correlações são observadas no mapa de contornos gHMBC (**Figuras 13 e 14 e Tabela 30**). Todos esses dados também foram comparados com a canferitrina **A1**, descrita anteriormente.

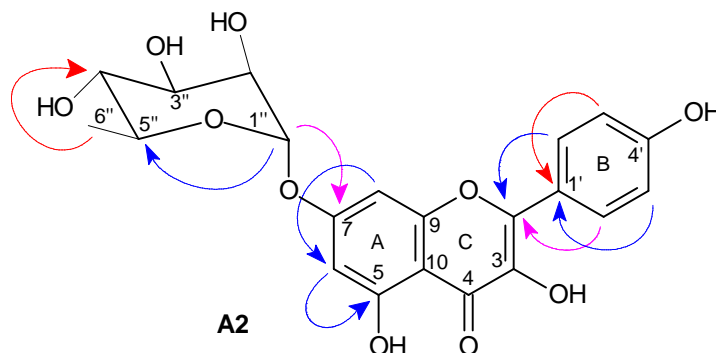


Tabela 30: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para a substância **A2**.

δ_{H} (^1H)	δ_{C} (^{13}C)
8,11 (2'e 6')	148,9 (C2), 131,0 (C2'e 6') e 160,9 (C4')
6,90 (3'e 5')	123,7 (C1') e 116,5 (C3'e 5')
6,75 (8)	106,3 (C7), 100,1 (C6), 157,9 (C9) e 106,3 (C10)
6,42 (6)	162,4 (C5), 163,4 (C7), 95,5 (C8) e 106,3 (C10)
5,56 (1'')	163,4 (C7), 72,2 (C3'') e 71,4 (C5'')
1,25 (6'')	73,8 (C4'') e 71,4 (C5'')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

Através do mapa de contornos NOESY (**Figura 15**) foi possível confirmar a conexão da unidade de raminose no C-7 devido as correlações do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,56 (H-1'') com os hidrogênios δ_{H} 6,42 (H-6) e δ_{H} 6,75 (H-8) (**Tabela 31**).

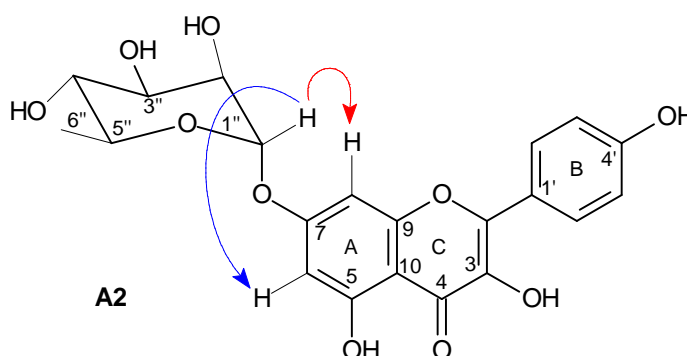


Tabela 31: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos NOESY para **A2**.

δ ^1H (mult.; J em Hz; H)	δ ^1H (mult.; J em Hz; H)
5,56 (s; H-1'')	6,75 (d; 1,8; H-8)
5,56 (s; H-1'')	6,42 (d; 1,8; H-8)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

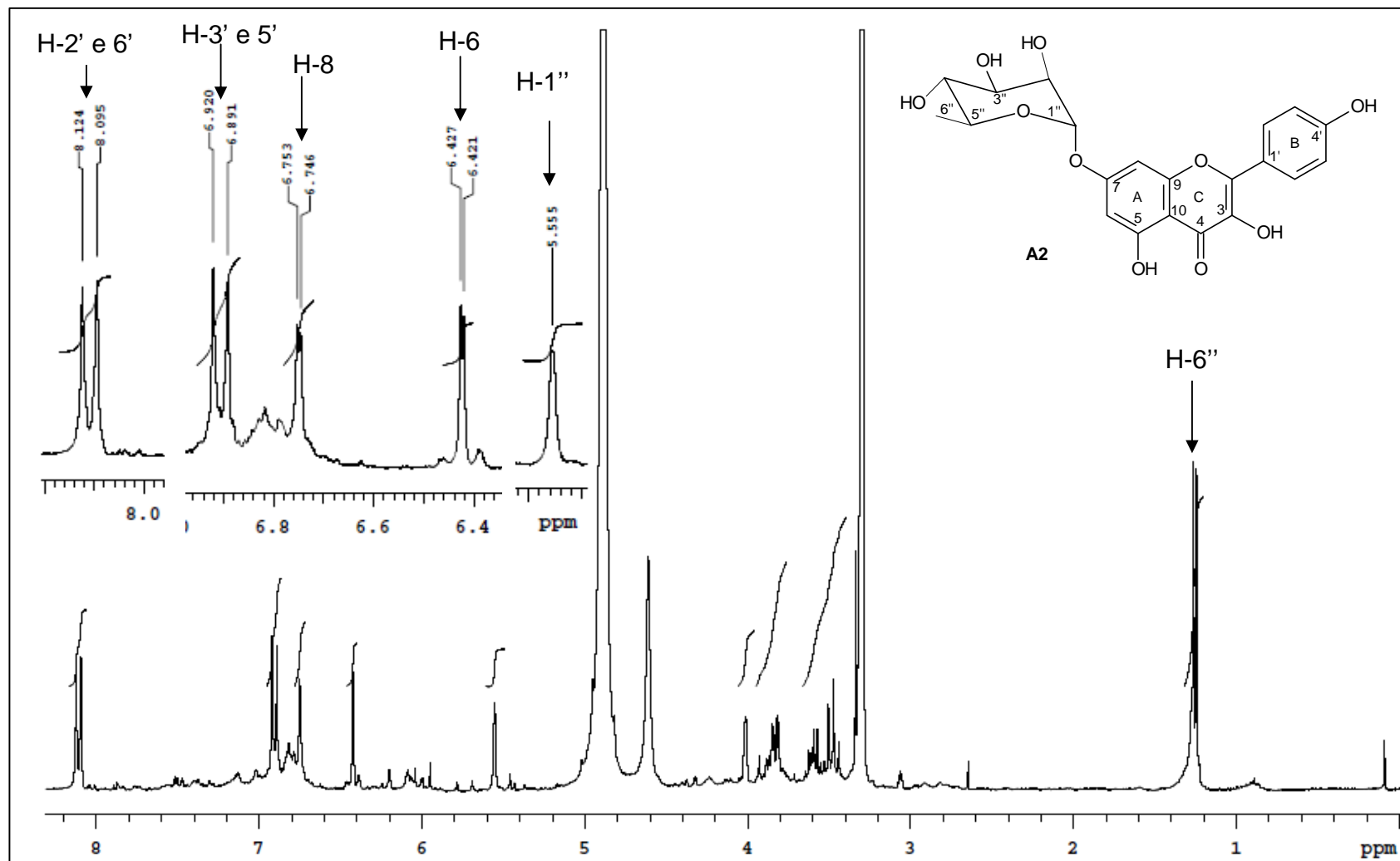


Fig. 10: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) para a substância **A2**.

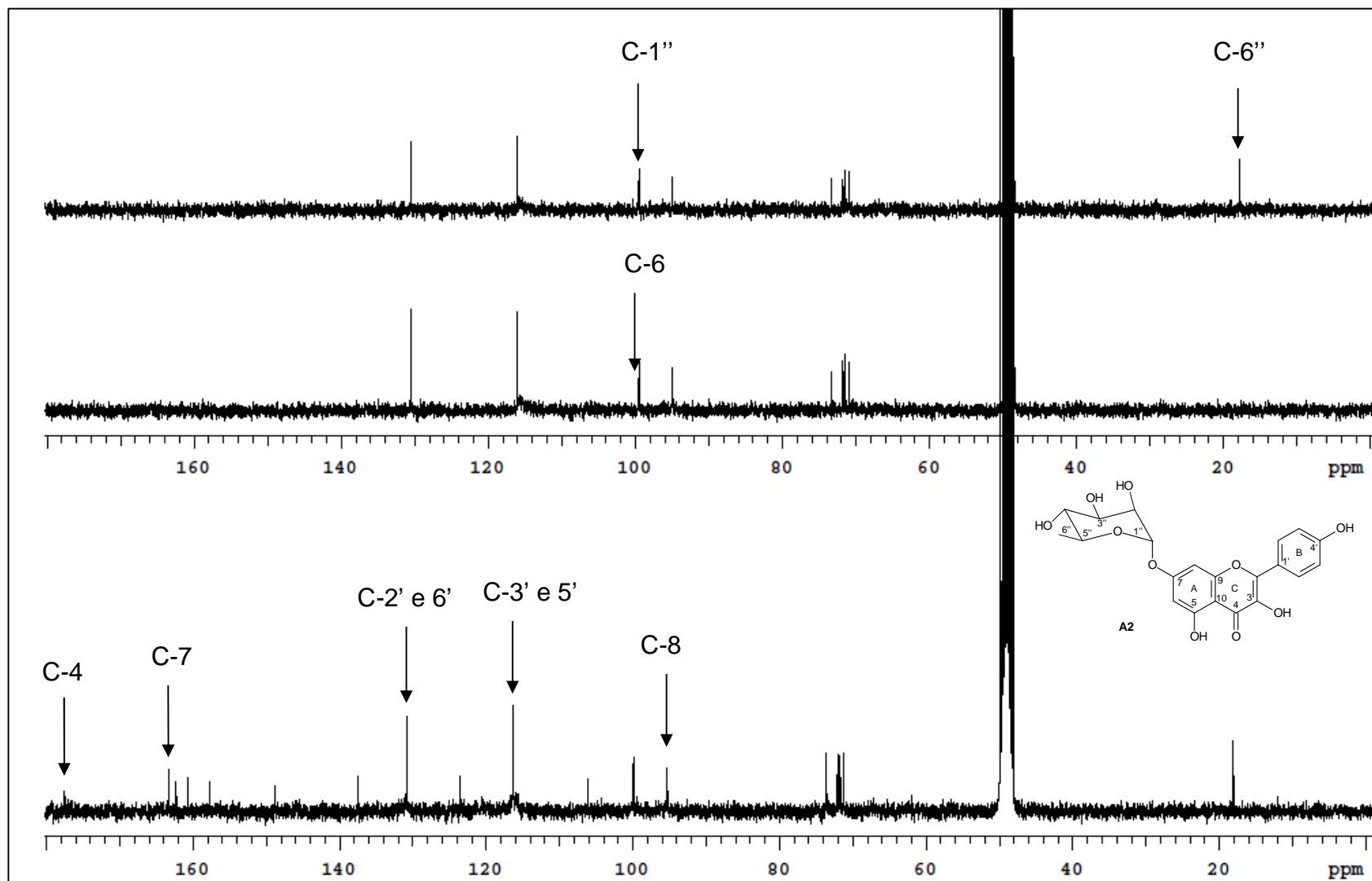


Fig. 11: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a substância A2.

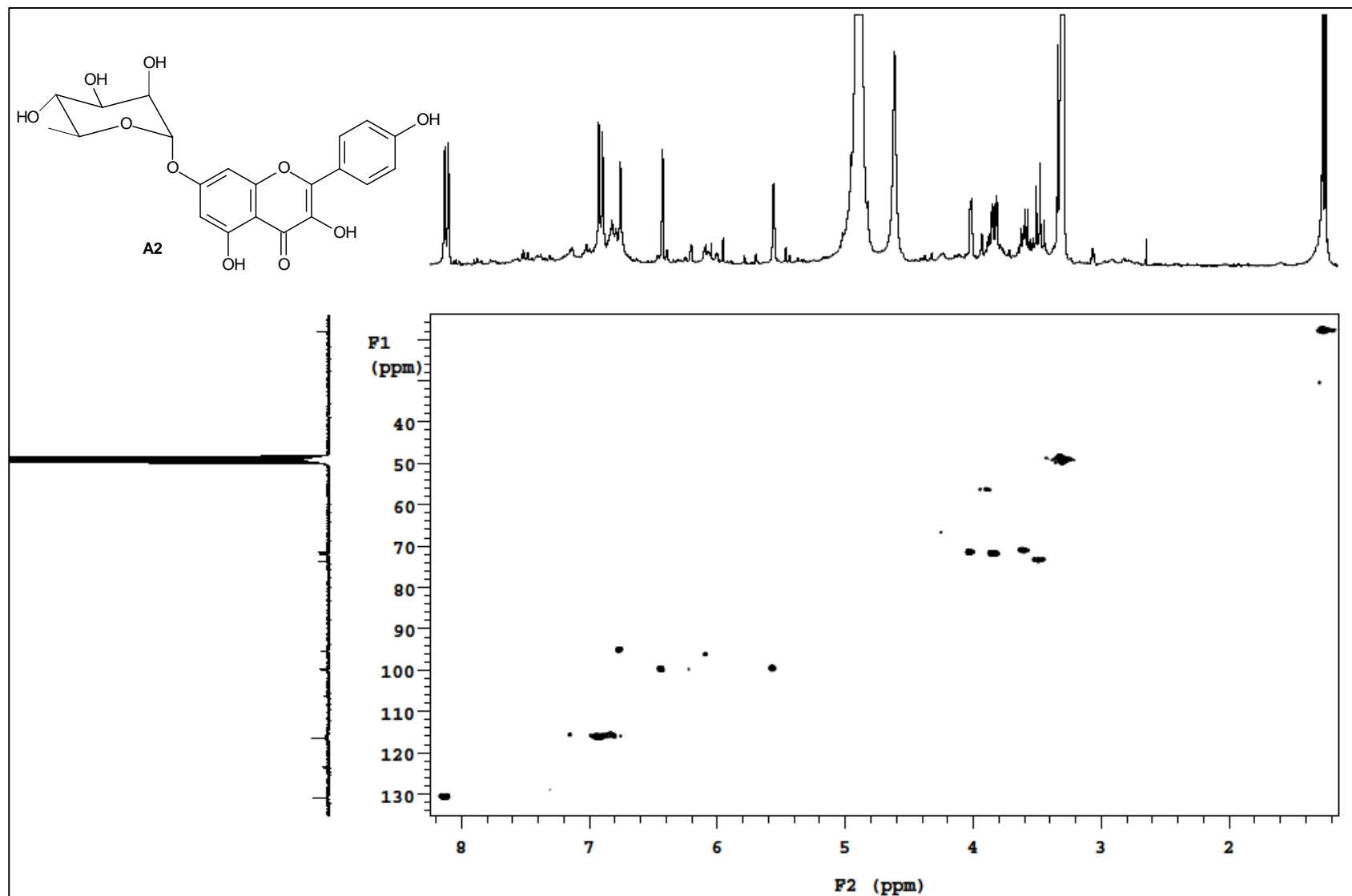


Fig. 12: Mapa de contornos gHSQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A2.

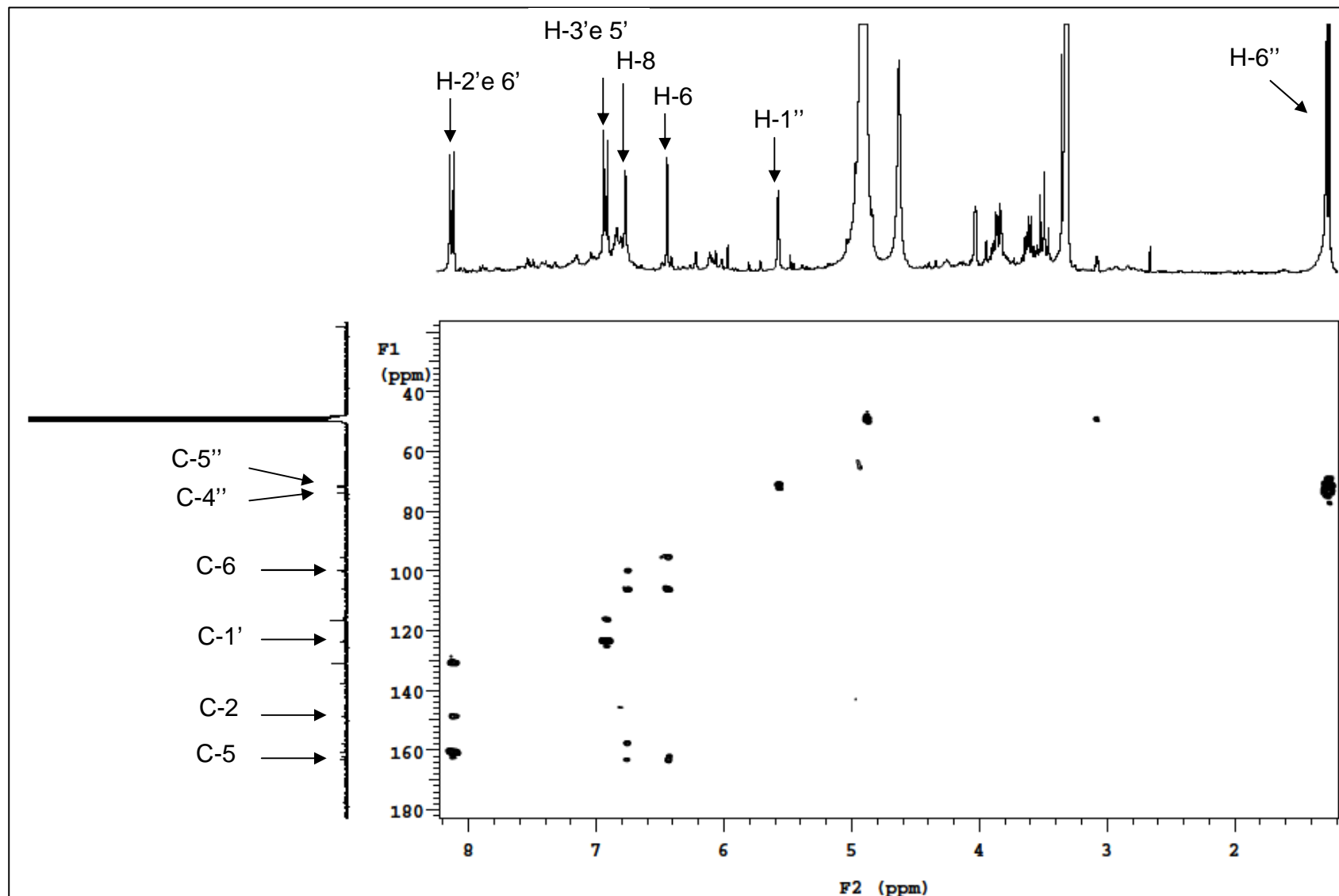


Fig. 13: Mapa de contornos gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A2.

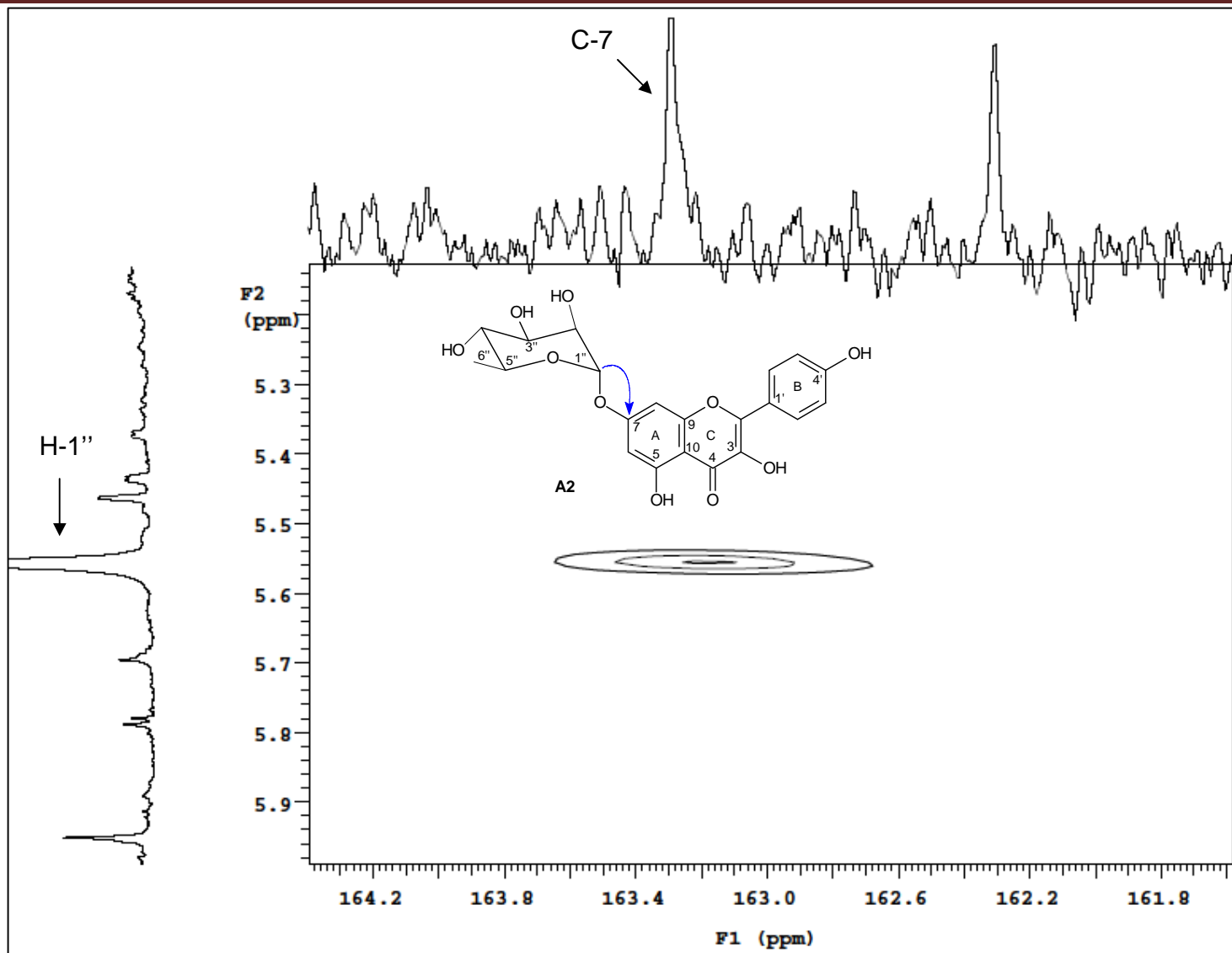


Fig. 14: Mapa de contornos gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A2.

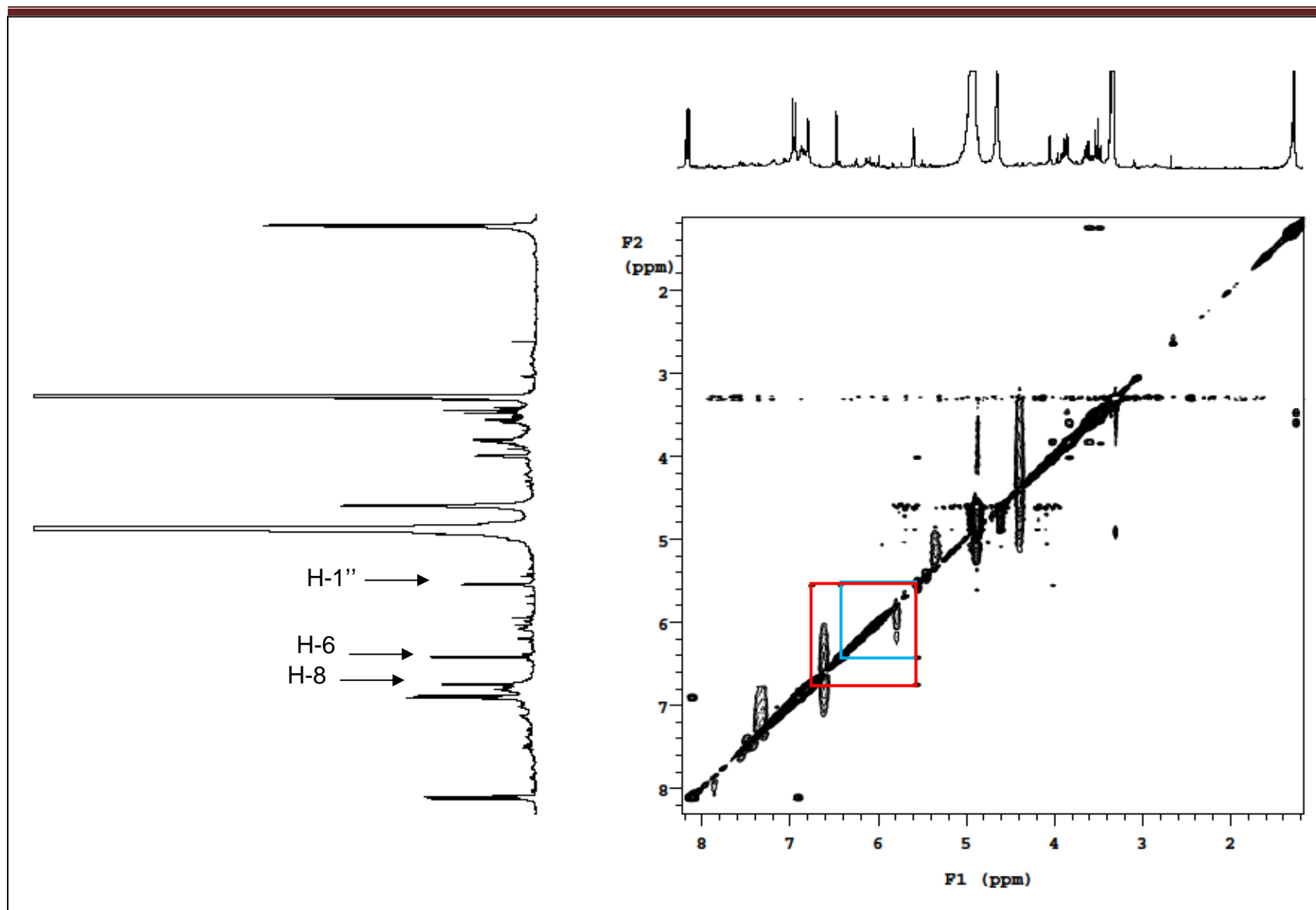


Fig. 15: Mapa de contornos NOESY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância A2.

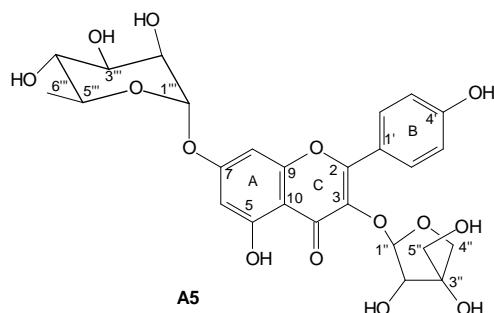
Tabela 32: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H , e gHSQC para a substância **A2** em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a α -raminoisorobina.

Carbono	A2	$^1\text{H}/\text{gHSQC}$	α -raminoisorobina ^a	^1H
2	148,9 (C)		148,7	
3	137,7 (C)		137,5	
4	177,7 (C)		177,4	
5	162,4 (C)		162,2	
6	100,1 (CH)	6,42 <i>d</i> / $J=1,8$ Hz	99,8	6,38 <i>s</i>
7	163,4 (CH)		163,2	
8	95,5 (CH)	6,75 <i>d</i> / $J=1,8$ Hz	95,3	6,69 <i>s</i>
9	157,9 (C)		157,7	
10	106,3 (C)		106,1	
1'	123,7 (C)		123,5	
2' e 6'	131,0 (CH)	8,11 <i>d</i> / $J=8,7$ Hz	130,8	8,06 <i>d</i> / $J=8,2$ Hz
3' e 5'	116,5 (CH)	6,90 <i>d</i> / $J=8,7$ Hz	116,3	6,88 <i>d</i> / $J=8,2$ Hz
4'	160,9 (C)		160,7	
1''	99,9 (CH)	5,56 <i>s</i>	99,9	5,54 <i>brs</i>
2''	71,9 (CH)	4,01 <i>brs</i>	71,7	4,01 <i>brs</i>
3''	72,2 (CH)	3,83 <i>dd</i> / $J=3,3$ e $9,3$ Hz	72,1	3,82 <i>dd</i> / $J=3,2$ e $9,5$ Hz
4''	73,8 (CH)	3,47 <i>t</i> / $J=9,3$ Hz	73,6	3,47 <i>t</i> / $J=9,5$ Hz
5''	71,4 (CH)	3,59 <i>dd</i> / $J=6,0$ e $9,3$ Hz	71,2	3,62 <i>dd</i> / $J=6,1$ e $9,5$ Hz
6''	18,2 (CH_3)	1,25 <i>d</i> / $J=6,0$ Hz	18,1	1,26 <i>d</i> / $J=6,1$ Hz

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD); (^aChua *et al.*, 2008; CD_3OD)

Os dados espectrais de **A2** foram comparados com os da literatura, confirmando a substância como **7-O- α -L-raminopiranosilcanferol (α -raminoisorobina)** (Tabela 32). Este flavonóide apresenta atividade antioxidante (Chua *et al.*, 2008).

5.3. Substância A5



Da fração acetato de etila das folhas de *A. fluminensis* foi obtido um sólido amarelo-castanho. Este sólido foi enviado para RMN e através da análise, foi possível constatar que se tratava de uma mistura de substâncias codificadas como **A5** juntamente com **A1**, em proporções aproximadamente iguais.

O espectro de RMN ^1H (**Figura 16**) da substância **A5** apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos: δ_{H} 6,44 (*d*, 1,8 Hz, H-6), 6,71 (*sl*, H-8), 7,90 (*d*, 8,7 Hz, H-2' e H-6'), 6,91 (*d*, 8,7 Hz, H-3' e H-5'), indicando a presença de canferol como aglicona. O sinal de hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,71 (*d*, 1,8 Hz, H-1'') e os sinais em δ_{H} 3,60 (*m*, H-4'') e δ_{H} 3,53 (*s*, H-5'') indicaram a presença da unidade apiose. O sinal de hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,56 (*sl*, H-1''') e do sinal em δ_{H} 1,25 (*d*, 6,0 Hz, H-6''') é característico da unidade de raminose (**Tabela 34**).

Os espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 17**) para a substância **A5** apresentaram 24 sinais, dentre eles sinais em δ_{C} 95,6 (C-8) e 100,5 (C-6), δ_{C} 116,5 (C-3' e C-5') e 132,0 (C-2' e C-6') e δ_{C} 179,8, (C-4) referente a uma carbonila, representando os carbonos característicos de canferol. Sinais em δ_{C} 111,1 (C-1'') e 2 carbonos metilênicos em δ_{C} 76,6 (C-4'') e 65,2 (C-5'') para a unidade de apiose, também sinais em δ_{C} 99,8 (C-1''') e de um carbono metílico em δ_{C} 18,1 (C-6'''), confirmando a presença de uma unidade de raminose. O mapa de contornos gHSQC (**Figura 18**), também auxiliou na identificação confirmando as correlações dos ^{13}C com seus ^1H (**Tabela 34**).

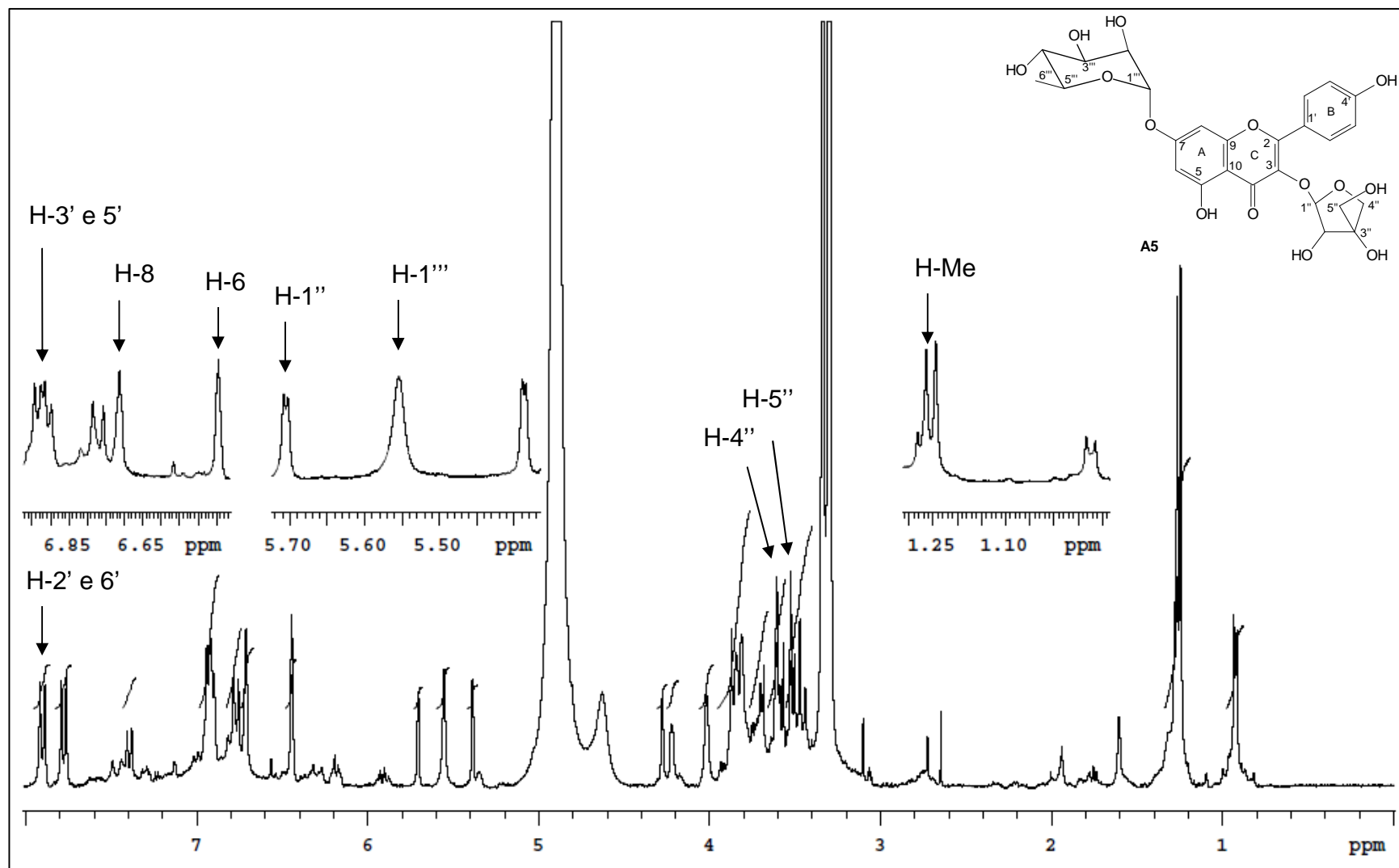


Fig. 16: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A5.

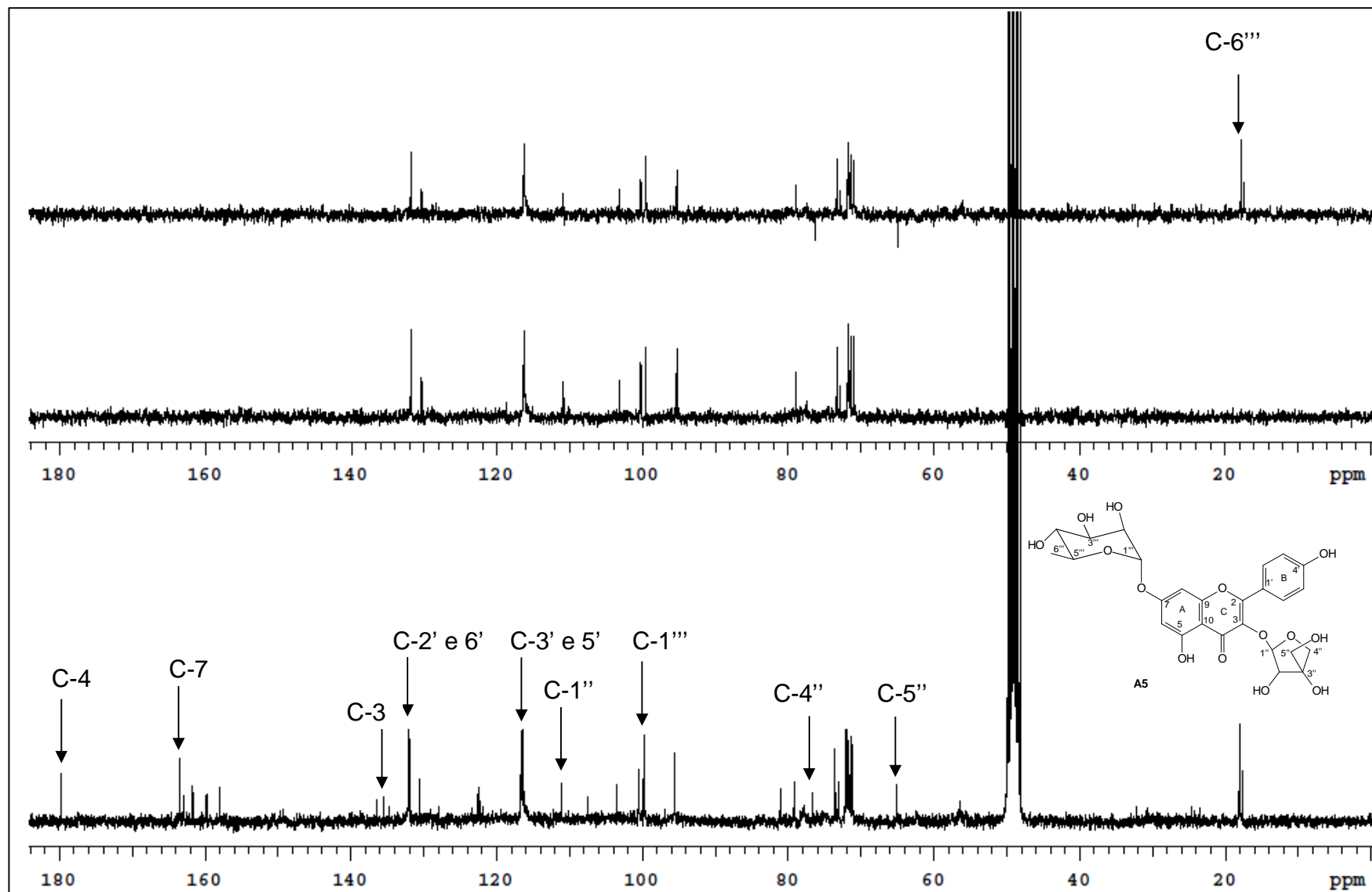


Fig. 17: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A5.

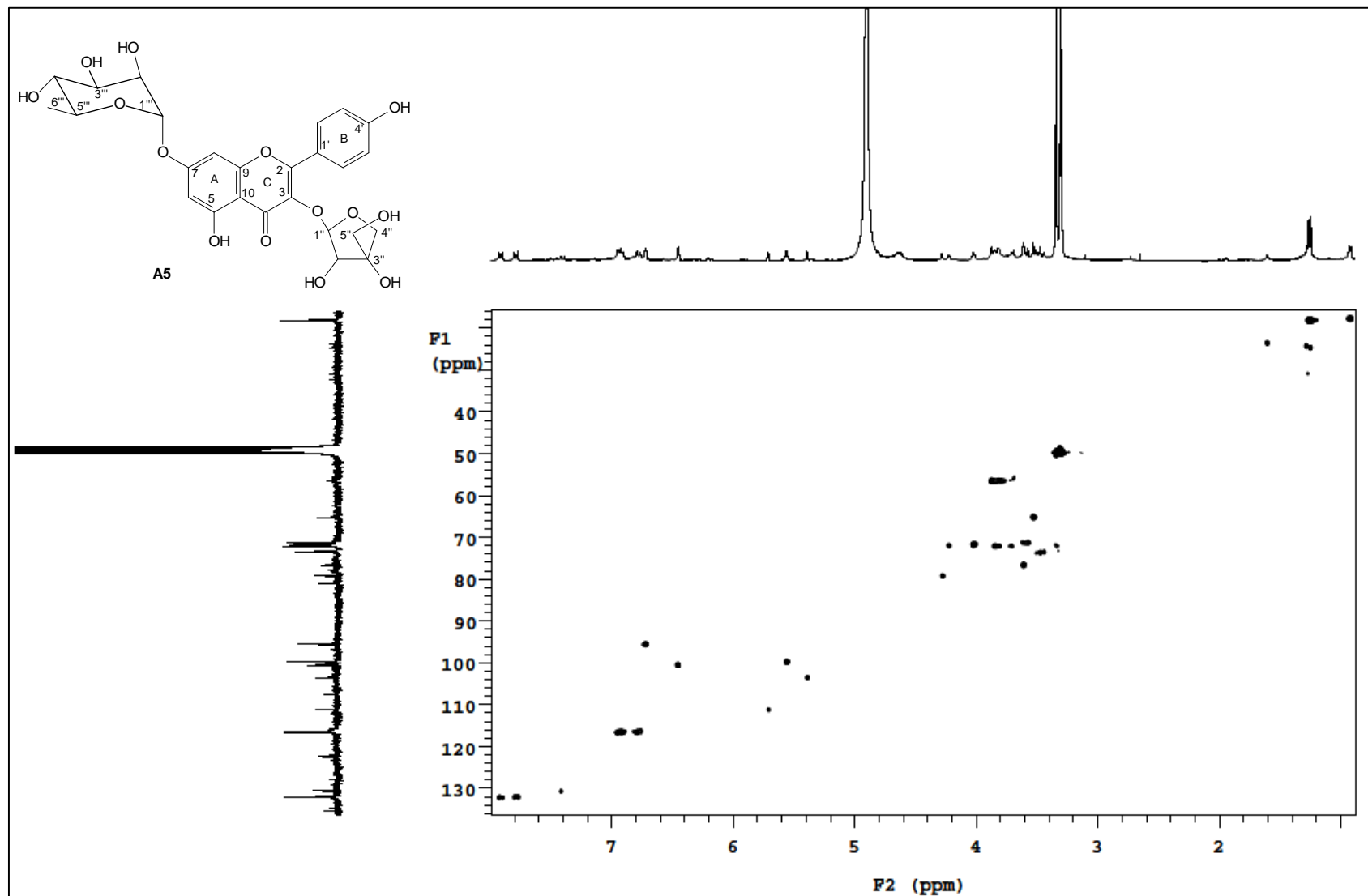


Fig. 18: Mapa de contornos gHSQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A5.

Através do mapa de contornos gHMBC (**Figuras 19 e 20**) foi confirmada a posição da unidade de raminose no C-7 da aglicona pela correlação em δ_C 163,5 com o hidrogênio anomérico H-1''' (δ_H 5,56) e a posição da unidade de apiose no C-3 em δ_C 135,5 com o hidrogênio anomérico H-1'' (δ_H 5,71). Outras correlações observadas em gHMBC estão apresentadas na **Tabela 33**.

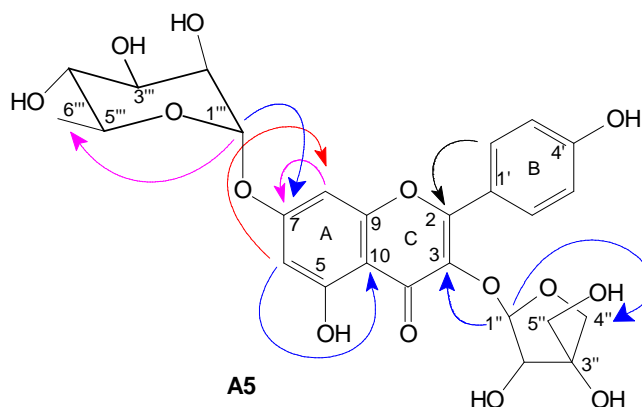


Tabela 33: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para **A5**.

δ_H (^1H)	δ_C (^{13}C)
7,90 (2' e 6')	161,7 (C4') e 160,0 (C2)
6,91 (3' e 5')	161,7 (C4') e 122,6 (C1')
6,71 (8)	163,5 (C7), 158,0 (C9) e 100,5 (C6)
6,44 (6)	163,5 (C7), 162,9 (C5), 107,5 (C10) e 95,6 (C8)
5,71 (1'')	135,5 (C3) e 76,6 (C4'')
5,56 (1''')	163,5 (C7) e 71,3 (C5''')
4,28 (2'')	111,1 (C1'') e 65,2 (C5'')
3,83 (3''')	73,6 (C4''')
3,60 (4'')	111,1 (C1'') e 79,2 (C2'')
3,59 (5''')	73,6 (C4''')
3,53 (5'')	81,1 (C3''), 79,2 (C2'') e 76,6 (C4'')
3,47 (4''')	71,3 (C5''')
1,25 (6''')	73,6 (C4''') e 71,3 (C5''')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

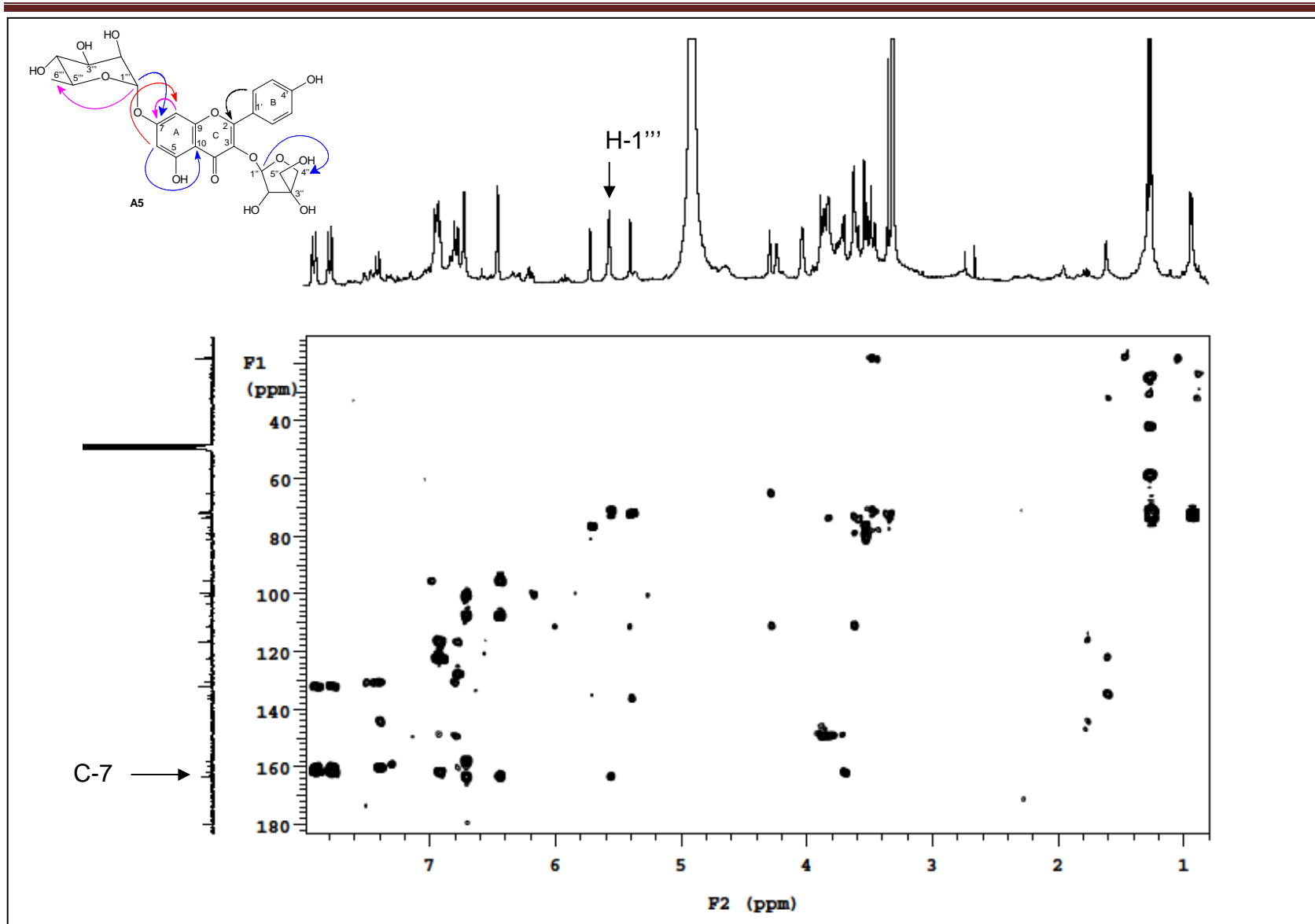


Fig. 19: Mapa de contornos gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A5.

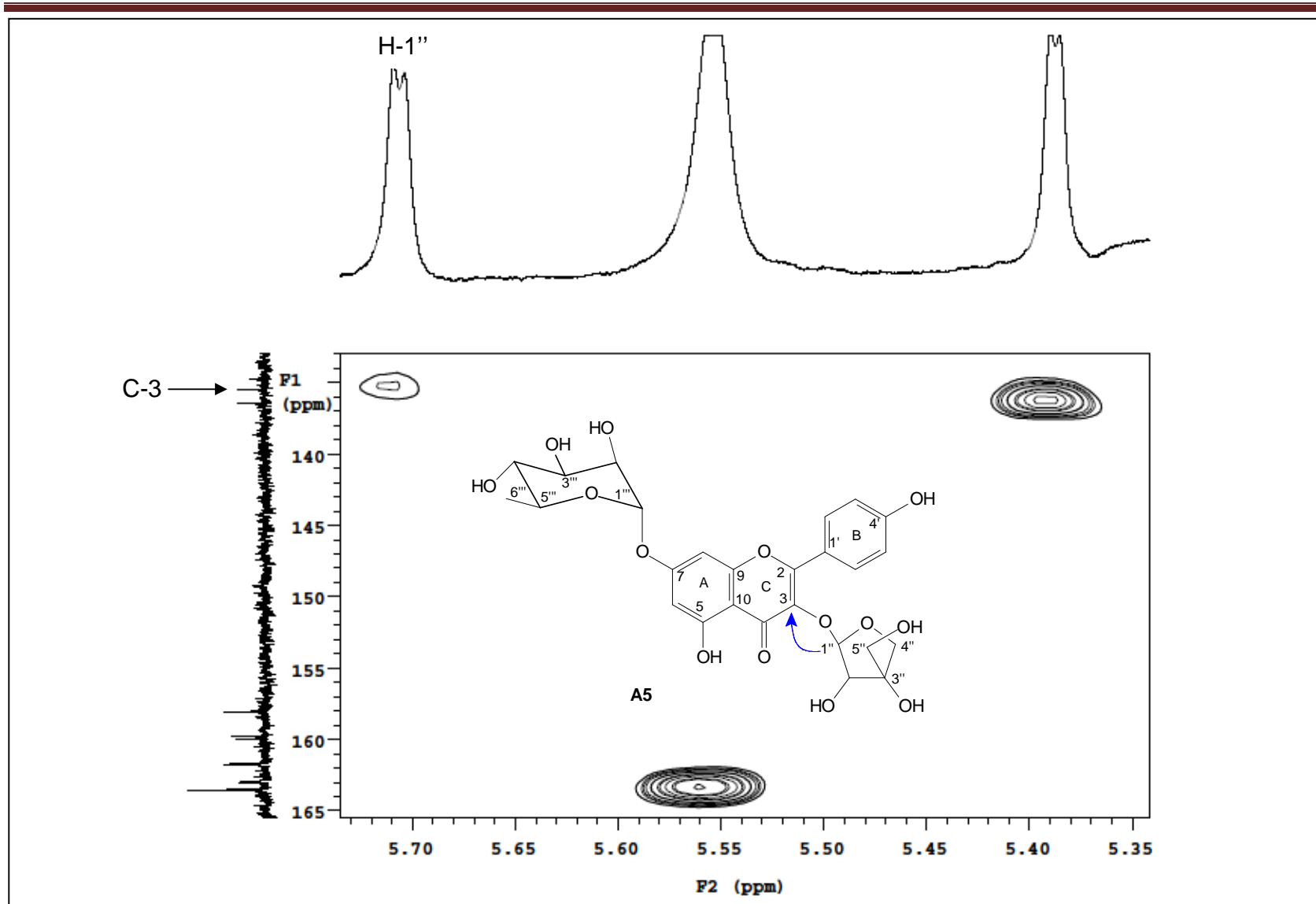


Fig. 20: Mapa de contornos ^gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A5.

Tabela 34: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHSQC para a substância **A5** em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a 3-*O*-apiofuranosil-7-*O*-raminopiranosil-canferol.

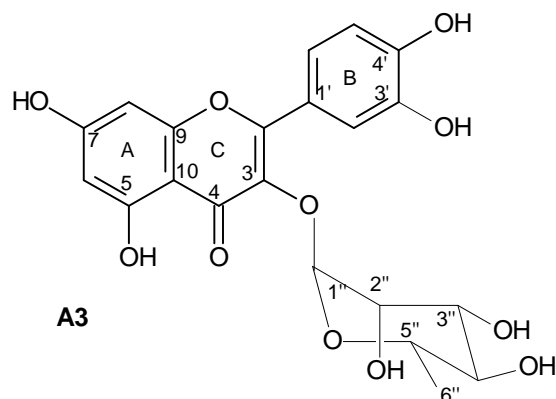
C	A5	$^1\text{H}/\text{gHSQC}$	3- <i>O</i> -api-7- <i>O</i> -rha-canferol ^a / H	
2	160,0 (C)		159,6 (C)	
3	135,5 (C)		135,2 (C)	
4	179,8 (C)		179,5 (C)	
5	162,9 (C)		162,6 (C)	
6	100,5 (CH)	6,44 <i>d</i> / $J= 1,8$ Hz	99,6 (CH)	6,46 <i>sl</i>
7	163,5 (C)		163,2 (C)	
8	95,6 (CH)	6,71 <i>sl</i>	95,3 (CH)	6,73 <i>sl</i>
9	158,0 (C)		157,7 (C)	
10	107,5 (C)		107,1 (C)	
1'	122,6 (C)		122,3 (C)	
2' e 6'	132,0 (CH)	7,90 <i>d</i> / $J= 8,7$ Hz	131,6 (CH)	7,90 <i>d</i> , 8,2
3' e 5'	116,5 (CH)	6,91 <i>d</i> / $J= 8,7$ Hz	116,1 (CH)	6,94 <i>d</i> , 8,2
4'	161,7 (C)		161,3 (C)	
1''	111,1 (CH)	5,71 <i>d</i> / $J= 1,8$ Hz	110,9 (CH)	5,73 <i>sl</i>
2''	79,2 (CH)	4,28 <i>d</i> / $J= 1,8$ Hz	-----	4,31 <i>sl</i>
3''	81,1 (C)		79,2 (CH)	
4''	76,6 (CH_2)	3,60 <i>m</i>	76,4 (CH_2)	H α =3,54 <i>d</i> , 12,5 H β =3,64 <i>d</i> , 12,5
5''	65,2 (CH_2)	3,53 <i>s</i>	69,8 (CH_2)	H α =4,14 <i>d</i> , 11,0 H β =3,89 <i>d</i> , 11,0
1'''	99,8 (CH)	5,56 <i>sl</i>	100,3 (CH)	5,57 <i>sl</i>
2'''	71,7 (CH)	4,02 <i>m</i>	72,0 (CH)	4,06 <i>sl</i>
3'''	72,0 (CH)	3,83 <i>dd</i> / $J= 3,3$ e 9,3 Hz	72,5 (CH)	3,86 <i>dd</i> , 9,5 e 1,7
4'''	73,6 (CH)	3,47 <i>t</i> / $J= 9,3$ Hz	73,7 (CH)	3,52 <i>t</i> , 9,5
5'''	71,3 (CH)	3,59 <i>dd</i> / $J= 6,0$ e 9,3 Hz	71,7 (CH)	3,64 <i>m</i>
6'''	18,1 (CH_3)	1,25 <i>d</i> / $J= 6,0$ Hz	17,8 (CH_3)	1,29 <i>d</i> , 6,4

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD); (^a Spanou, *et al.*, 2008; CD_3OD)

A substância **A5** foi caracterizada através dos dados espectroscópicos e comparação destes com os encontrados na literatura e 3-*O*-apiofuranosil-7-*O*-raminopiranosil-canferol (Spanou, *et al.*, 2008) (Tabela 34). Esta substância

apresenta atividades antioxidantes, quimiopreventivas (Spanou *et al.*, 2008) e estrogênica (Dall'Acqua *et al.*, 2009).

5.4. Substância A3



A substância **A3** foi isolada da fração acetato de etila das folhas de *A. fluminensis* como sólido amorfo amarelo.

O espectro de RMN ^1H para **A3** (Figura 21) apresentou para a aglicona os deslocamentos: δ_{H} 6,19 (1H, *d*, $J=1,8$ Hz, H-6), 6,36 (1H, *d*, $J=1,8$ Hz, H-8), 6,90 (1H, *d*, $J=8,1$ Hz, H-5'), 7,29 (1H, *dd*, $J=2,1$ e $8,1$ Hz, H-6'), 7,32 (1H, *d*, $J=2,1$ Hz, H-2'). O sinal em δ_{H} 5,33 (1H, *d*, $J=1,5$ Hz, H-1'') característico de hidrogênio anomérico e o sinal em δ_{H} 0,93 (3H, *d*, $J=5,7$ Hz, H-6''), indicaram a presença de uma unidade de raminose (Tabela 37).

Os espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ da substância **A3** apresentaram 21 sinais, (Figura 22) dentre eles sinais em δ_{C} 94,8 (C-8), 99,9 (C-6), 116,4 (C-5'), 116,9 (C-2'), 122,9 (C-6') e uma carbonila em 179,6 (C-4), característicos de uma unidade quercetina como aglicona. O sinal em δ_{C} 103,5 (C-1'') e de um carbono metílico em δ_{C} 17,6 (C-6'') confirmaram a presença de raminose. As correlações entre ^1H e ^{13}C foram confirmadas através do mapa de contornos gHSQC, (Figura 23) para a substância **A3** que também auxiliaram na identificação (Tabela 37).

No mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ gCOSY (Figura 24) para **A3** foram observadas correlações entre o H-6'' (δ_{H} 0,93) com H-5'' (δ_{H} 3,41), entre o H-6' (δ_{H} 7,29) com H-5' (δ_{H} 6,90) e também entre o H-6 (δ_{H} 6,19) com H-8 (δ_{H} 6,36). Demais correlações são observadas na Tabela 35.

Tabela 35: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para **A3**.

$\delta ^1\text{H}$ (mult.; J em Hz; H)	$\delta ^1\text{H}$ (mult.; J em Hz; H)
0,93 (<i>d</i> ; 5,7; H-6'')	3,41 (<i>dd</i> ; 5,7 e 9,2; H-5'')
3,74 (<i>dd</i> ; 3,2 e 9,2; H-3'')	3,32 (<i>m</i> ; H-4'')
3,74 (<i>dd</i> ; 3,2 e 9,2; H-3'')	4,21 (<i>dd</i> ; 1,5 e 3,2; H-2'')
5,33 (<i>d</i> ; 1,5; H-1'')	4,21 (<i>dd</i> ; 1,5 e 3,2; H-2'')
6,19 (<i>d</i> ; 1,8; H-6)	6,36 (<i>d</i> ; 1,8; H-8)
6,90 (<i>d</i> ; 8,1; H-5')	7,29 (<i>dd</i> ; 2,1 e 8,1; H-6')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD₃OD)

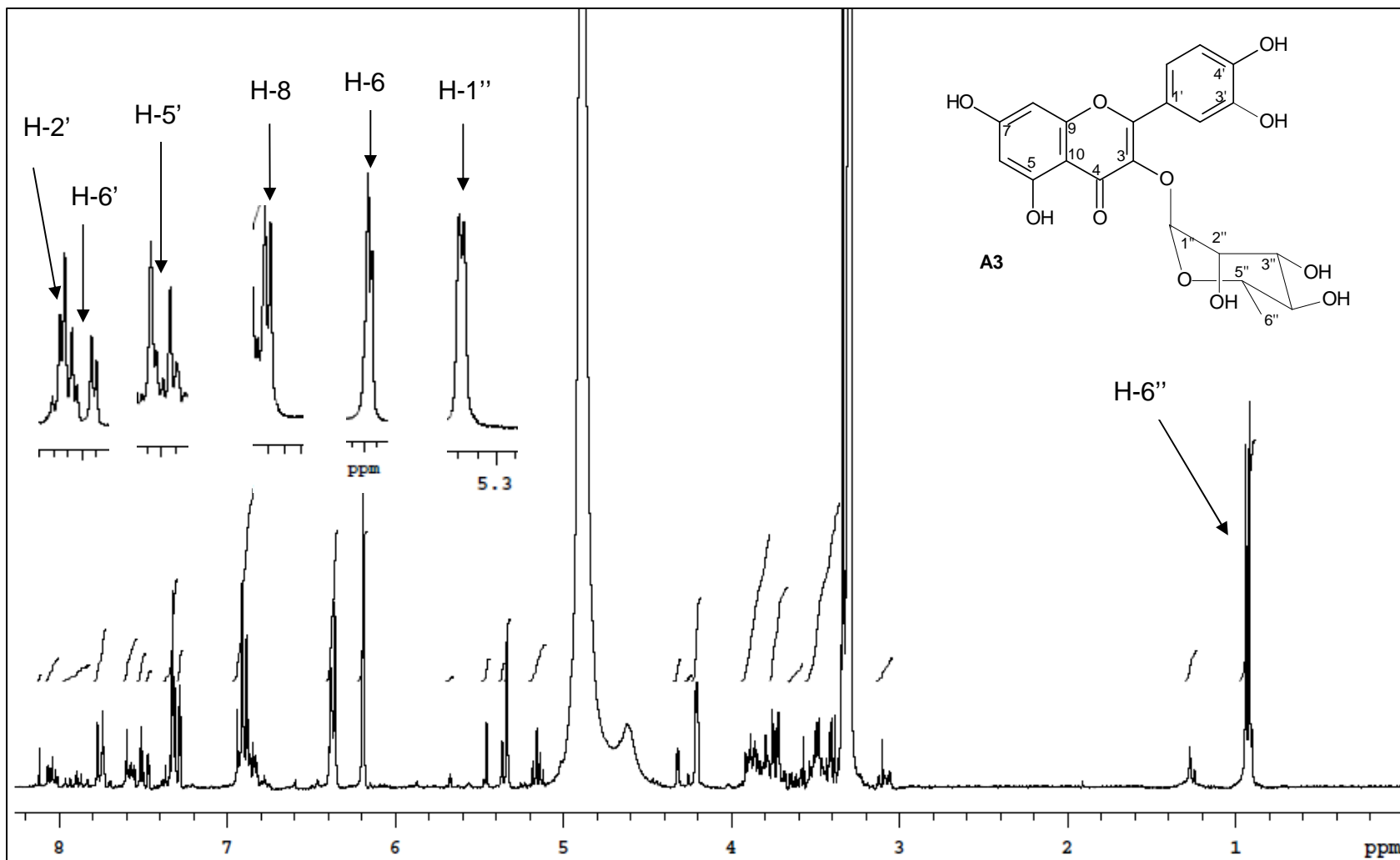


Fig. 21: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) para a substância **A3**.

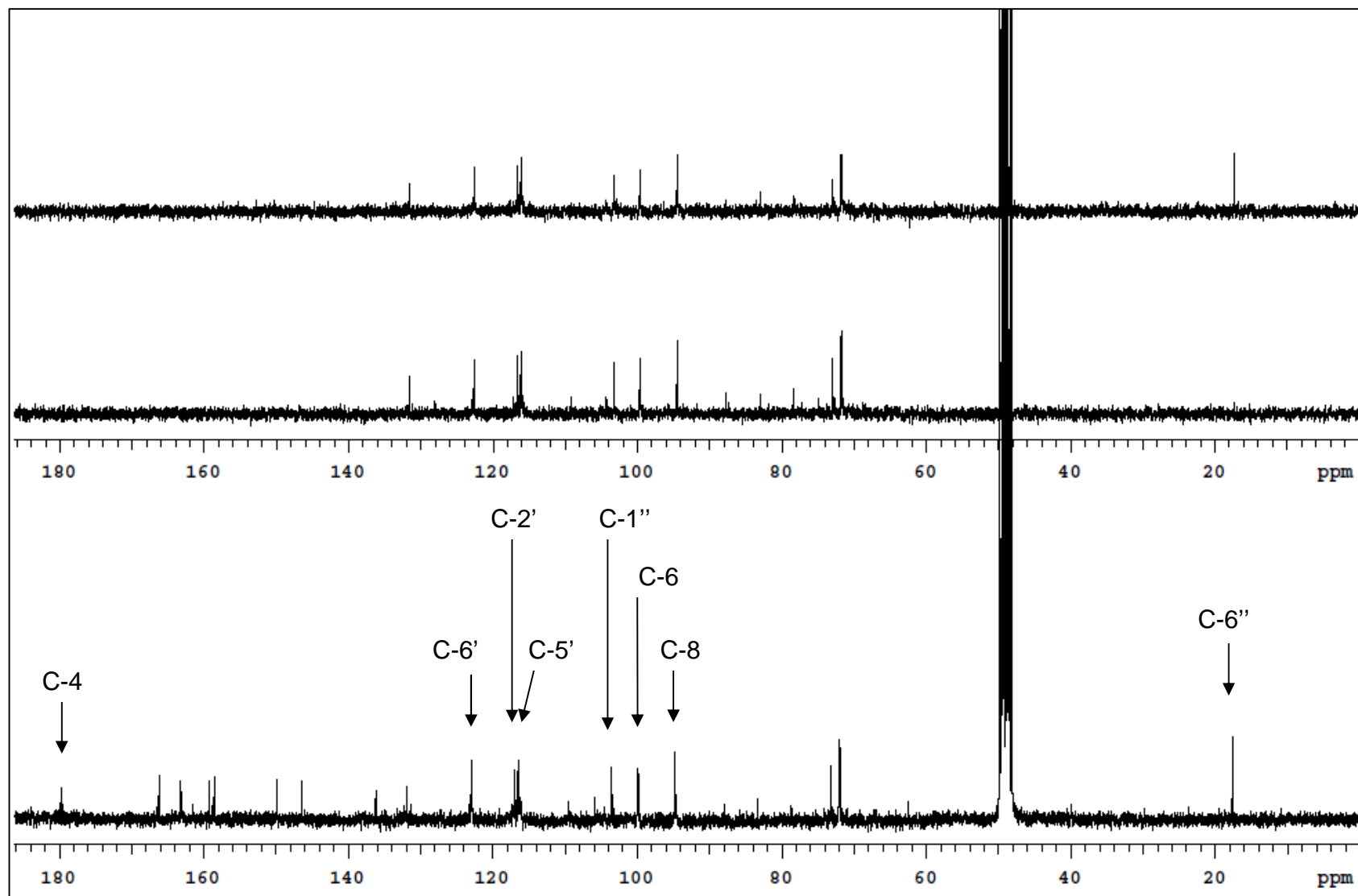


Fig. 22: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a substância **A3**.

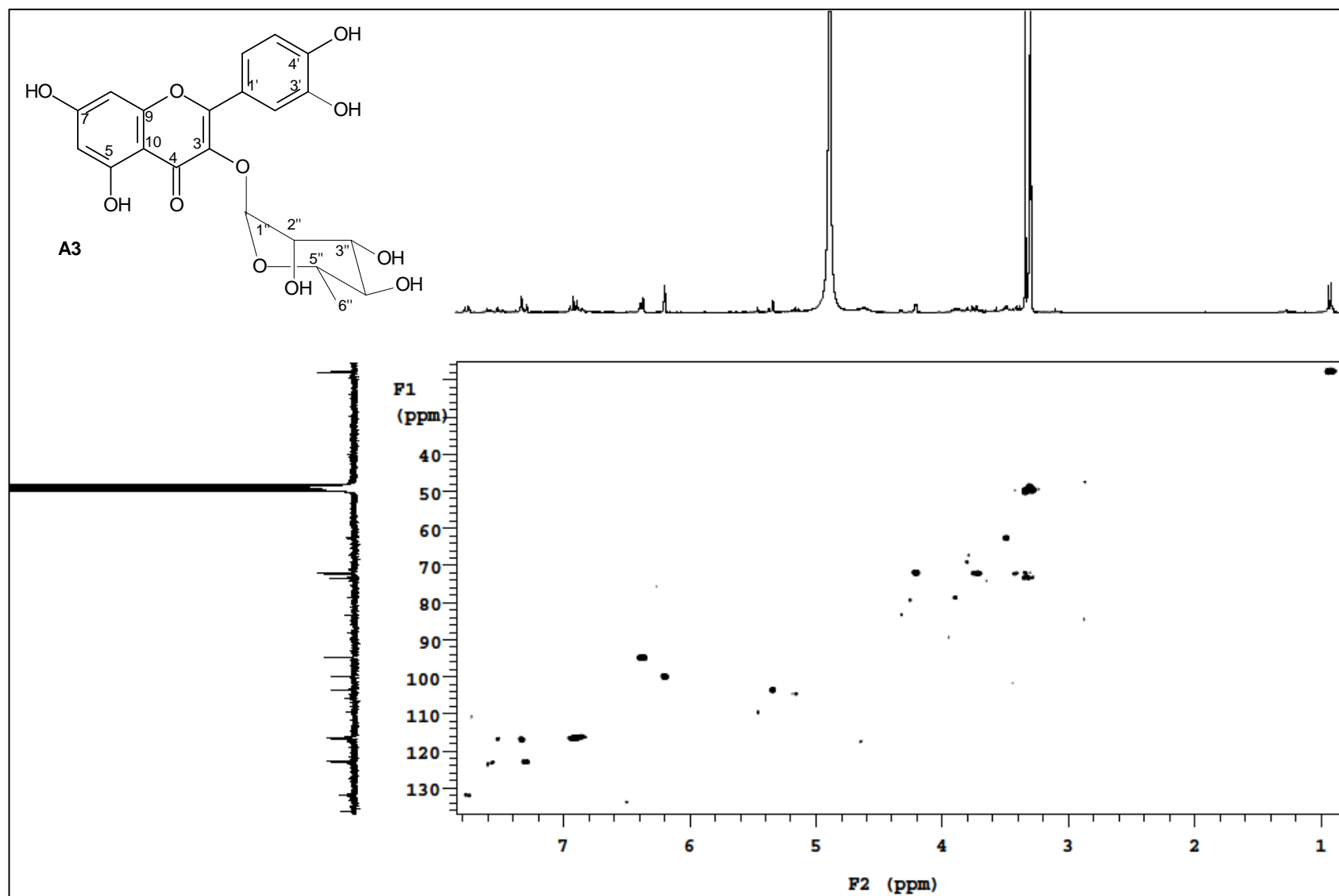


Fig. 23: Mapa de contornos gHSQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância **A3**.

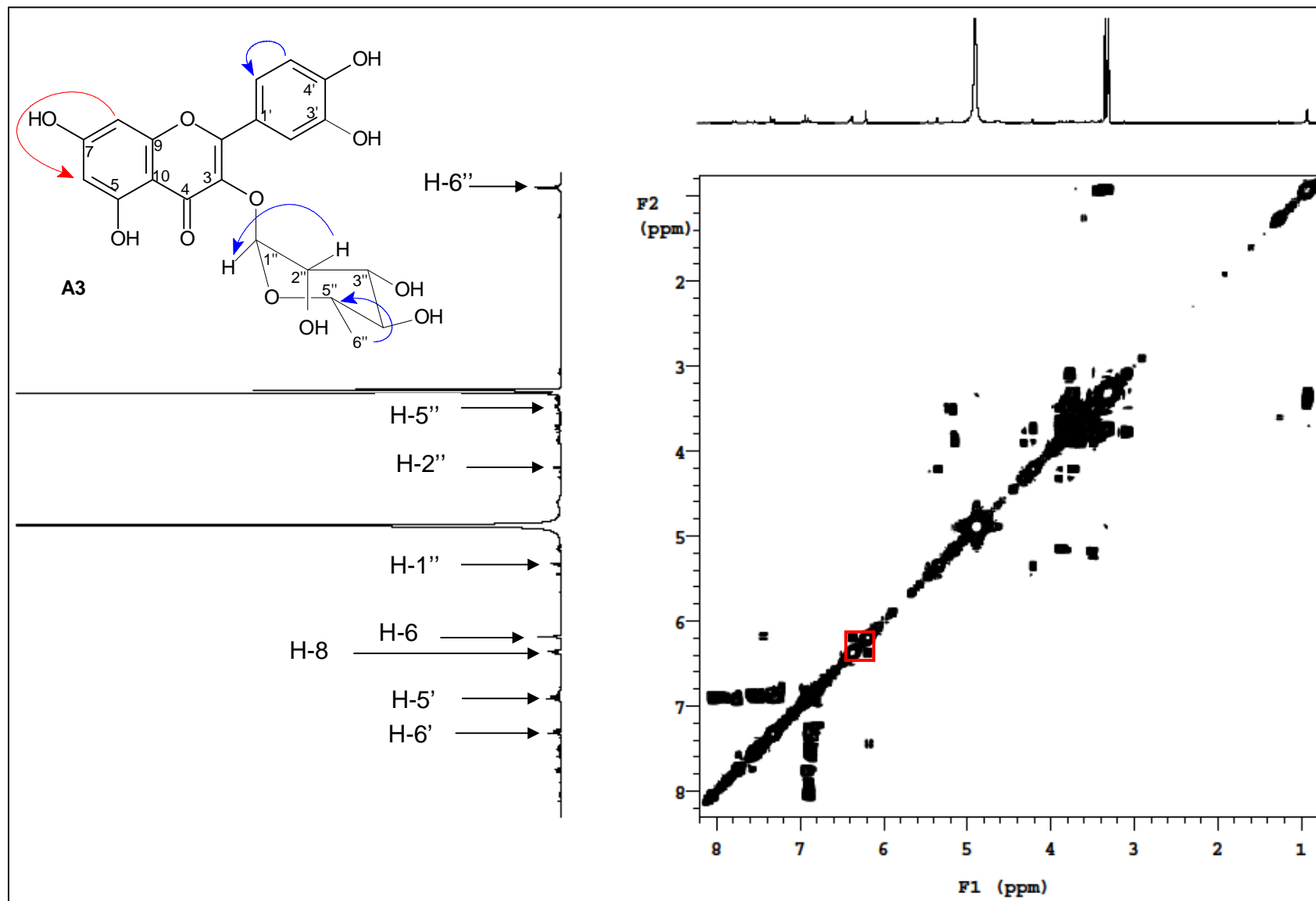


Fig. 24: Mapa de contornos gCOSY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância A3.

A posição da unidade de raminose no C-3 foi confirmada pela correlação em δ_C 136,2 (C-3) com o hidrogênio anomérico em δ_H 5,33 (H-1'') através do mapa de contornos gHMBC (**Figura 25**). As demais correlações de gHMBC são observadas na **tabela 36**.

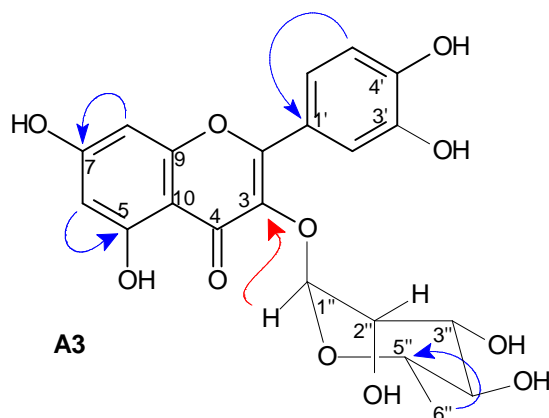


Tabela 36: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para a substância **A3**.

δ_H (^1H)	δ_C (^{13}C)
7,32 (2')	159,3 (C2), 123,0 (C1'), 146,4 (C3') e 149,8 (C4')
7,29 (6')	149,8 (C4') e 116,9 (2')
6,90 (5')	123,0 (C1'), 146,4 (C3') e 149,8 (C4')
6,36 (8)	99,9 (C6), 166,1 (C7), 158,5 (C9) e 105,8 (C10)
6,19 (6)	163,2 (C5), 94,8 (C8) e 105,8 (C10)
5,33 (1'')	136,2 (C3), 72,1 (C5''), 72,0 (C3'') e 71,9 (C2'')
0,93 (6'')	73,2 (C4'') e 72,1 (C5'')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

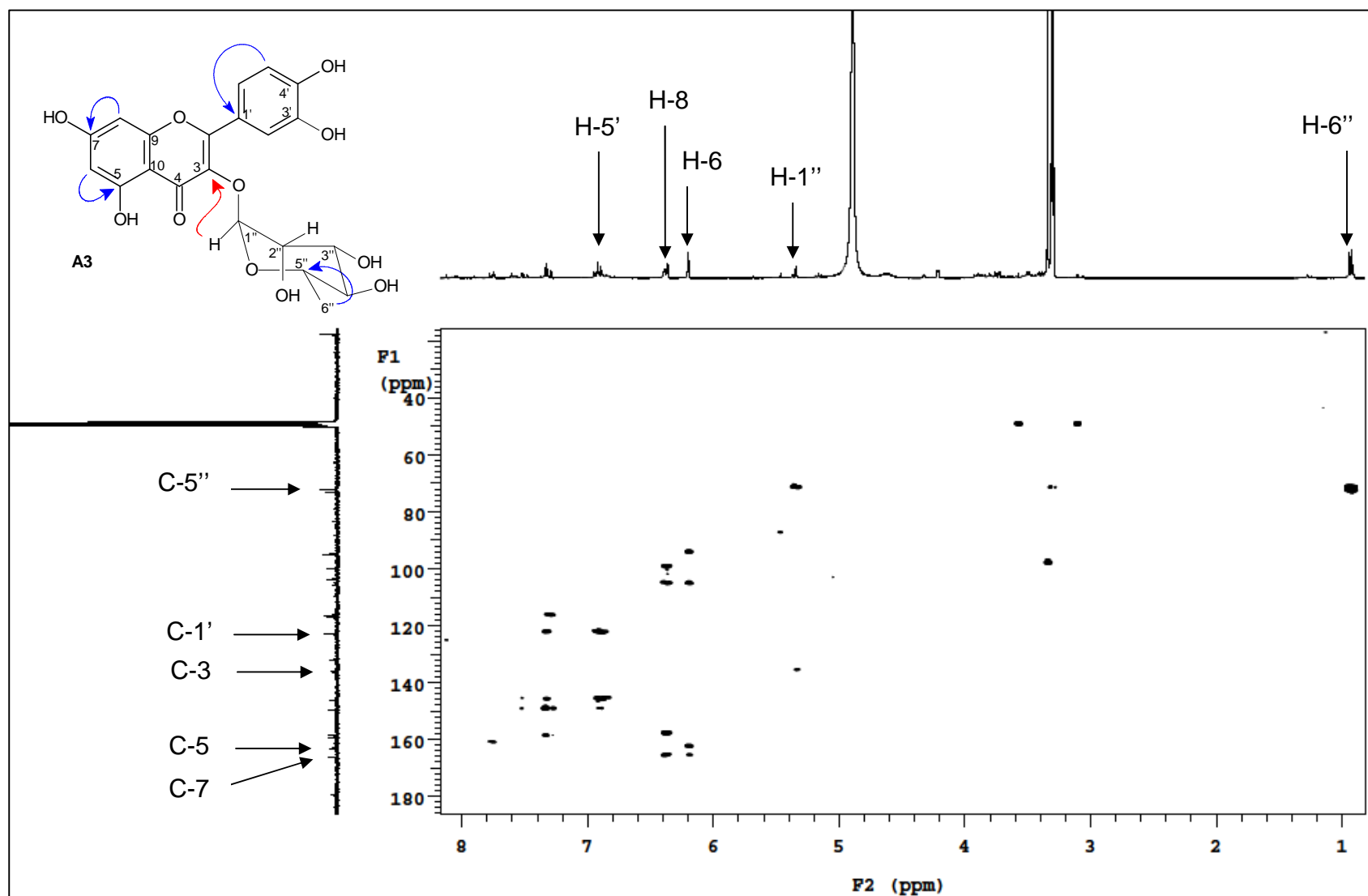


Fig. 25: Mapa de contornos gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A3.

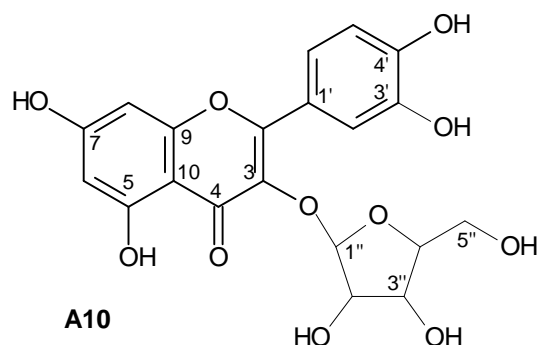
Tabela 37: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e HSQC para a substância **A3** em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a quercitrina.

Carbono	A3	$^1\text{H}/\text{gHSQC}$	Quercitrina ^a	$^1\text{H}/\text{HMQC}$
2	159,3 (C)		157,2	
3	136,2 (C)		134,1	
4	179,6 (C)		178,9	
5	163,2 (C)		162,2	
6	99,9 (CH)	6,19 $d/J=1,8$ Hz	98,3	6,10 $d/J=2,1$ Hz
7	166,1 (C)		164,0	
8	94,8 (CH)	6,36 $d/J=1,8$ Hz	94,0	6,27 $d/J=2,1$ Hz
9	158,5 (C)		156,2	
10	105,8 (C)		105,9	
1'	123,0 (C)		122,2	
2'	116,9 (CH)	7,32 $d/J=2,1$ Hz	116,0	7,24 $d/J=2,4$ Hz
3'	146,4 (C)		145,0	
4'	149,8 (C)		148,8	
5'	116,4 (CH)	6,90 $d/J=8,1$ Hz	115,7	6,82 $d/J=8,4$ Hz
6'	122,9 (CH)	7,29 $dd/J=2,1$ e 8,1 Hz	122,0	7,22 $dd/J=2,4$ e 8,4 Hz
1''	103,5 (CH)	5,33 $d/J=1,5$ Hz	102,5	5,25 $d/J=1,5$ Hz
2''	71,9 (CH)	4,21 $dd/J=1,5$ e 3,2 Hz	71,1	4,12 $dd/J=1,5$ e 3,3 Hz
3''	72,0 (CH)	3,74 $dd/J=3,2$ e 9,2 Hz	70,3	3,65 $dd/J=3,3$ e 9,0 Hz
4''	73,2 (CH)	3,32 m	72,5	3,22 m
5''	72,1 (CH)	3,41 $dd/J=5,7$ e 9,2 Hz	70,1	3,31 m
6''	17,6 (CH_3)	0,93 $d/J=5,7$ Hz	18,6	0,84 $d/J=6,0$ Hz

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD); (^a Sirat *et al.*, 2010; CD_3OD)

Os dados espectroscópicos mencionados anteriormente para **A3** estão condizentes aos da literatura para **3-O- α -L-raminopiranosil-quercetina (quercitrina)** (Sirat *et al.*, 2010). Esta substância apresenta atividade antioxidante (Sirat *et al.*, 2010, Kumari *et al.*, 2011, Ghanta *et al.*, 2007 e Tan *et al.*, 2007) e anti-inflamatória (Yen *et al.*, 2009).

5.5. Substância A10



A substância **A10** foi obtida da fração acetato de etila das folhas de *A. fluminensis* como um sólido amarelo castanho.

No espectro de RMN ^1H para **A10** (Figura 26) foram observados para a aglicona os deslocamentos: δ_{H} 6,20 (1H, *d*, $J=2,1$ Hz, H-6), 6,39 (1H, *d*, $J=2,1$ Hz, H-8), 6,89 (1H, *d*, $J=8,4$ Hz, H-5'), 7,49 (1H, *dd*, $J=2,1$ e 8,4 Hz, H-6'), 7,52 (1H, *d*, $J=2,1$ Hz, H-2'). A presença do sinal em δ_{H} 5,46 (1H, *d*, $J=0,9$ Hz, H-1'') característico de hidrogênio anomérico e do sinal em δ_{H} 3,49 (2H, *d*, $J=4,8$ Hz, H-5'') indicaram a presença de uma unidade de arabinose (Tabela 40).

Os espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ da substância **A10** (Figura 27) apresentaram 20 sinais, dentre eles sinais em δ_{C} 94,9 (C-8), 100,0 (C-6), 116,6 (C-5'), 117,0 (C-2') e 123,1 (C-6') e uma carbonila em 180,1 (C-4), característicos de uma unidade quercetina como aglicona. O sinal em δ_{C} 109,6 (C-1'') e um carbono metilênico em δ_{C} 62,6 (C-5'') confirmaram a presença da unidade de arabinose. As correlações dos ^{13}C com seus ^1H foram confirmadas através do mapa de contornos gHSQC (Figura 28 e Tabela 40).

No mapa de contornos NOESY (Figura 29) foi confirmada a posição da unidade de arabinose no C-3 da quercetina em δ_{C} 135,0, através das correlações do H-2' (δ_{H} 7,52) com os hidrogênios: H-1'' (δ_{H} 5,46), H-2'' (δ_{H} 4,32) e H-4'' (δ_{H} 3,86) (Tabela 38).

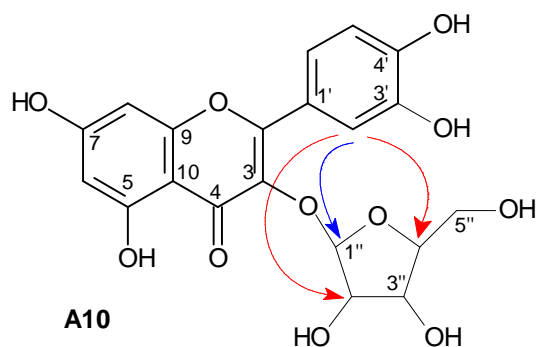


Tabela 38: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos NOESY para **A10**.

δ ^1H (mult.; J em Hz; H)	δ ^1H (mult.; J em Hz; H)
7,52 (<i>d</i> ; 2,1; H-2')	5,46 (<i>d</i> ; 2,1; H-1'')
7,52 (<i>d</i> ; 2,1; H-2')	4,32 (<i>dd</i> ; 0,9 e 3,0; H-2'')
7,52 (<i>d</i> ; 2,1; H-2')	3,86 (<i>m</i> ; H-4'')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

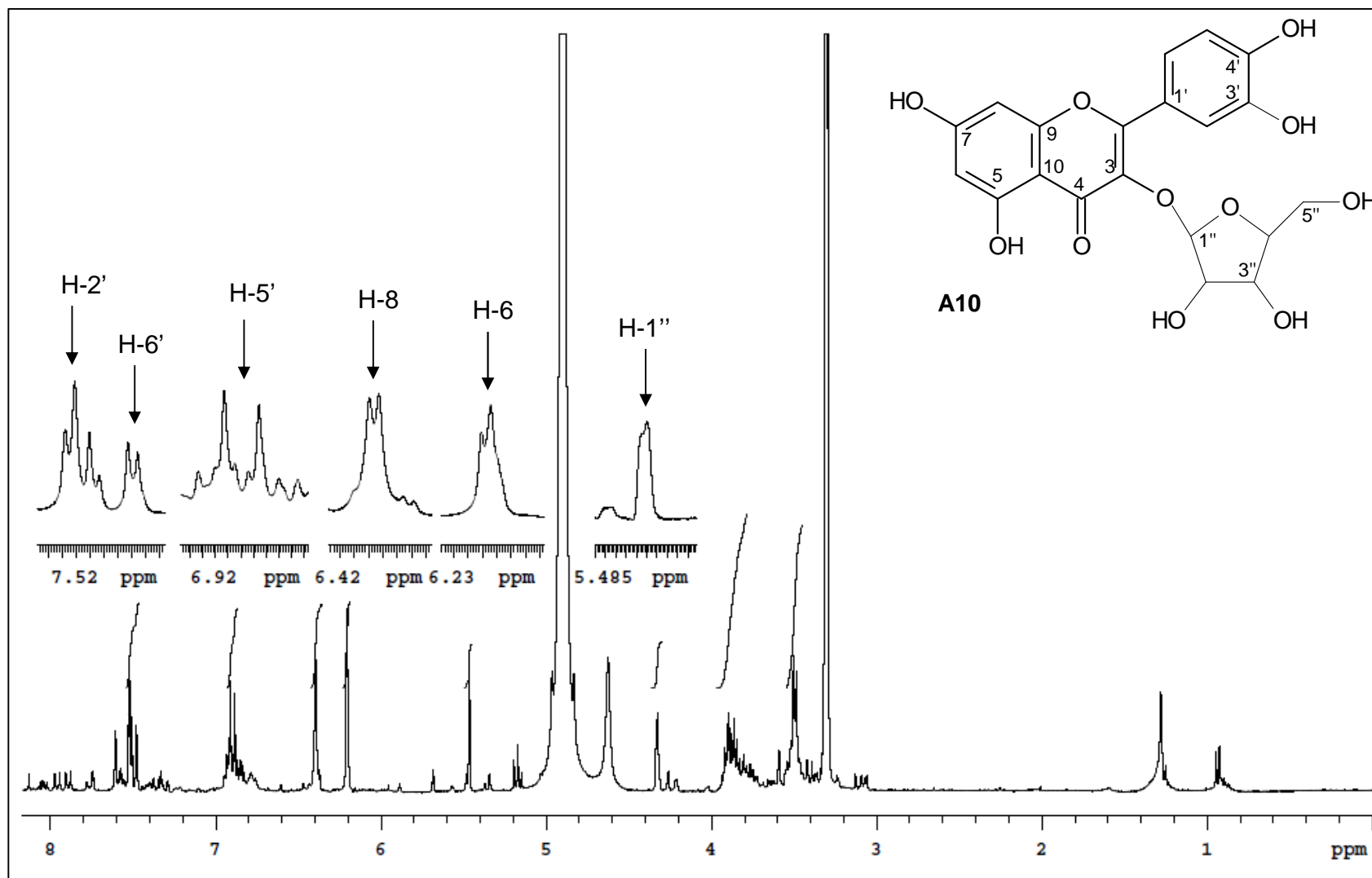


Fig. 26: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) para a substância A10.

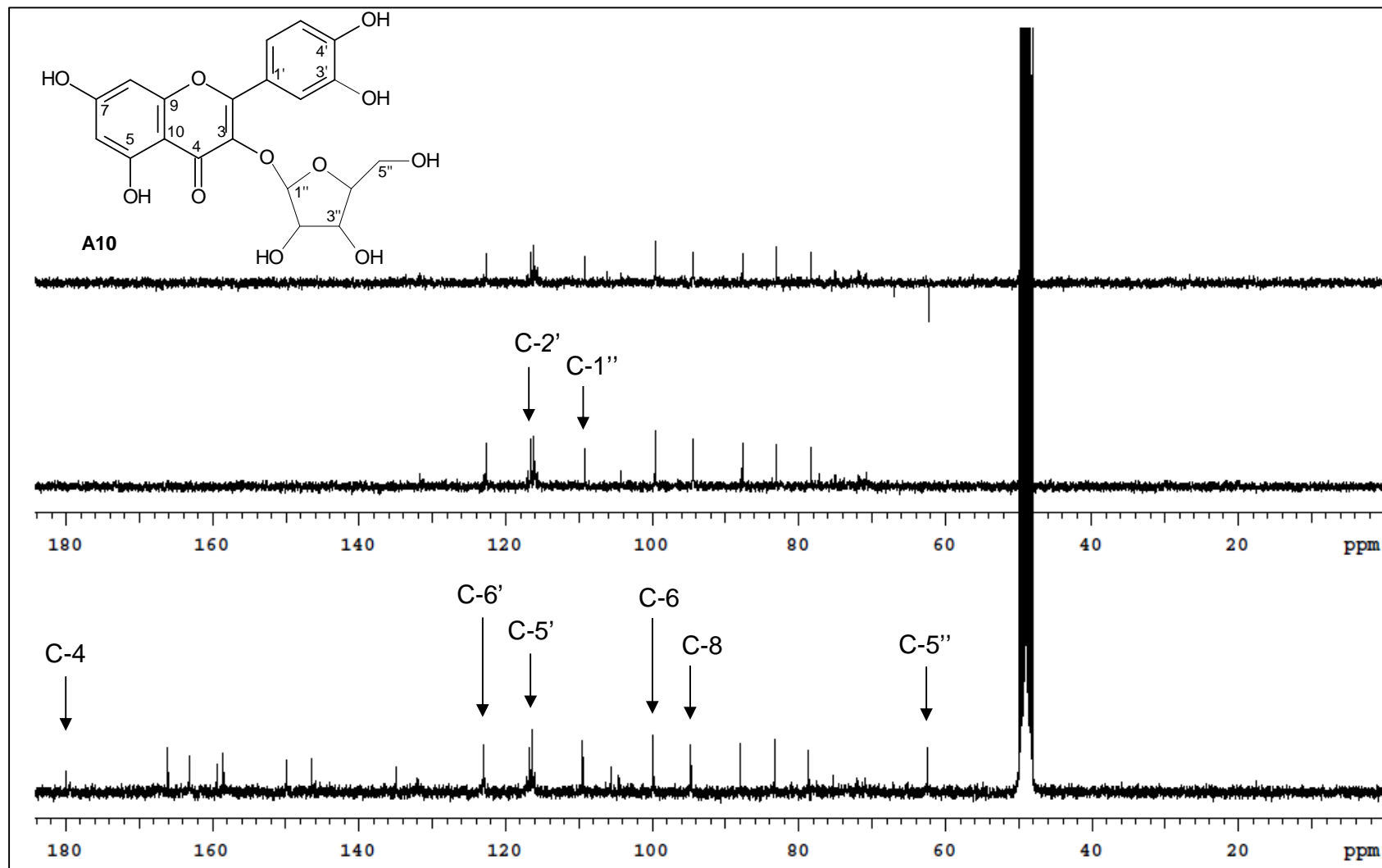


Fig. 27: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a substância A10.

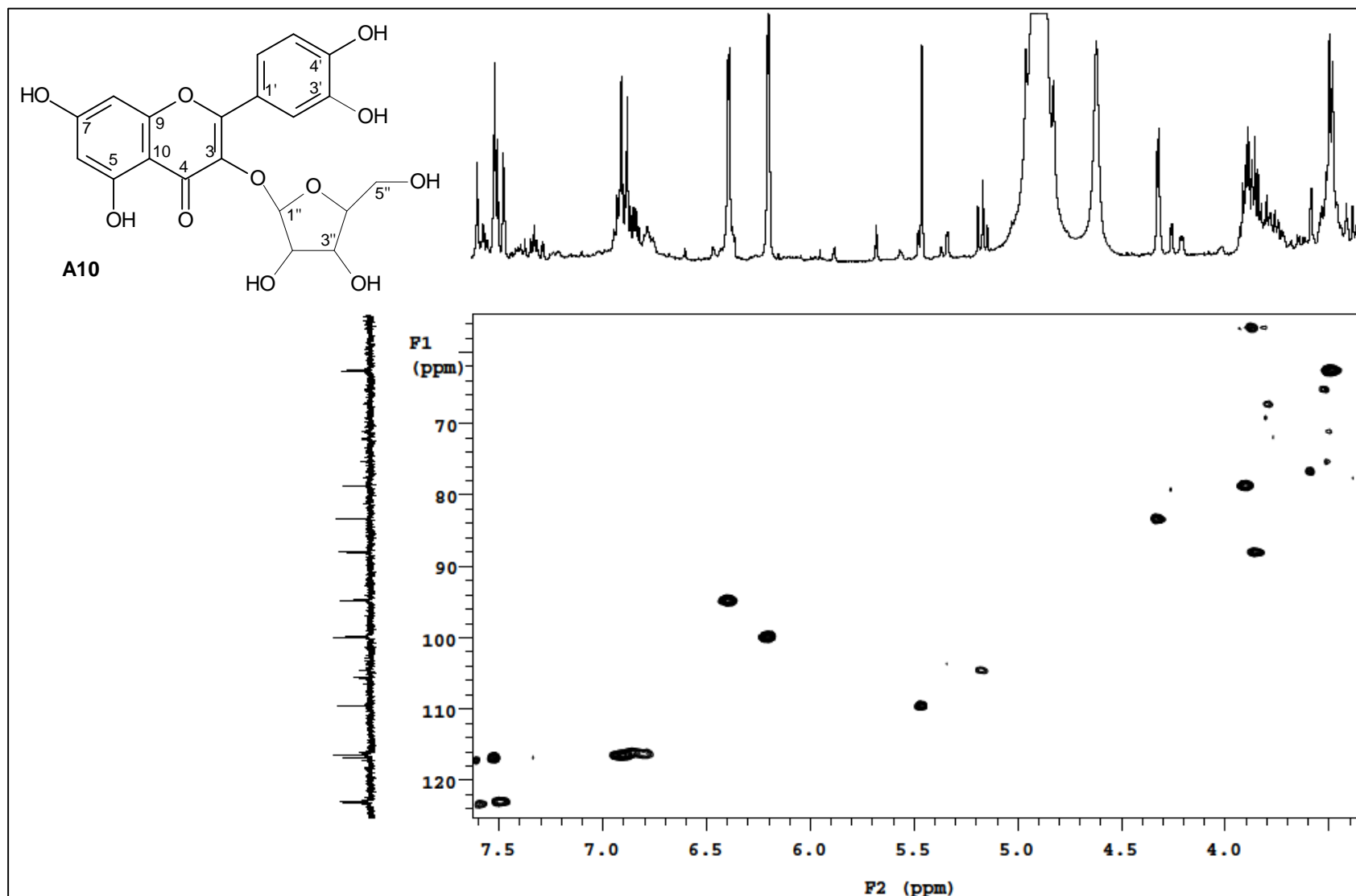


Fig. 28: Mapa de contornos gHSQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A10.

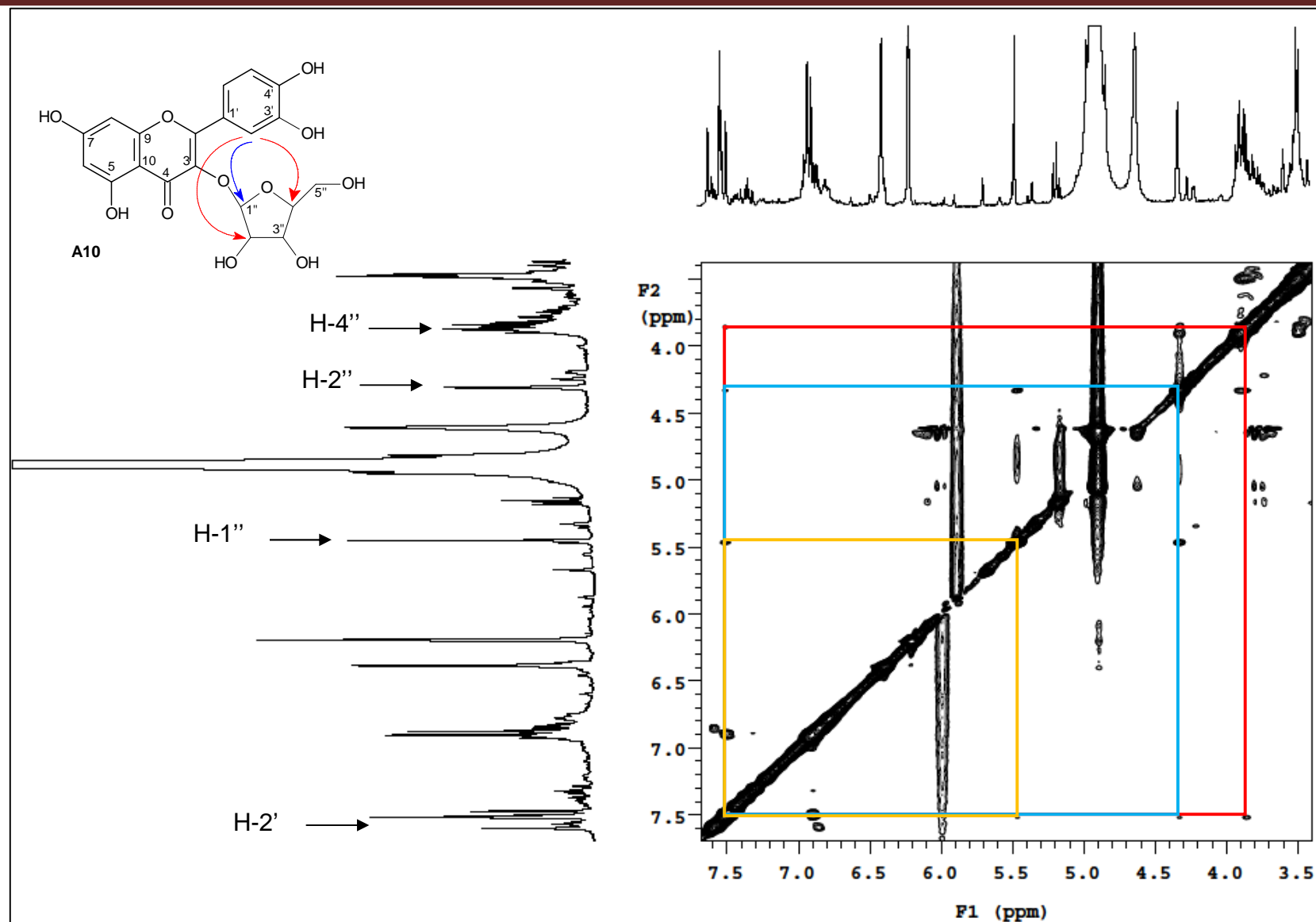


Fig. 29: Mapa de contornos NOESY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância A10.

As correlações entre hidrogênio e carbono foram confirmadas pelo mapa de contornos gHMBC (**Figura 30 e Tabela 39**).

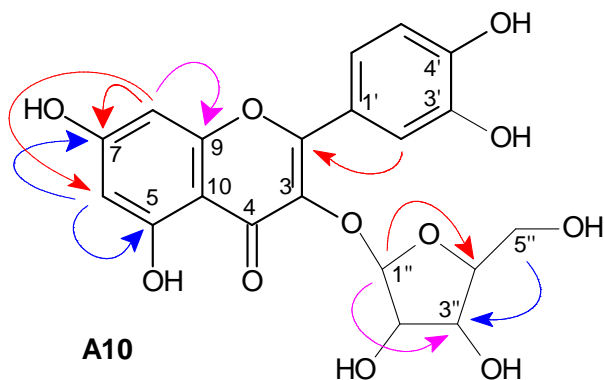


Tabela 39: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para a substância **A10**.

$\delta_{\text{H}} (^1\text{H})$	$\delta_{\text{C}} (^{13}\text{C})$
7,52 (2')	159,5 (C2), 123,2 (C1'), 146,5 (C3') e 150,0 (C4')
7,49 (6')	150,0 (C4') e 117,0 (2')
6,89 (5')	123,1 (C6'), 146,5 (C3') e 150,0 (C4')
6,39 (8)	100,0 (C6), 166,2 (C7), 158,7 (C9) e 105,7 (C10)
6,20 (6)	163,2 (C5), 166,2(C7), 94,9 (C8) e 105,7 (C10)
5,46 (1'')	88,1 (C4'') e 78,8 (C3'')
3,86 (4'')	78,8 (C3'')
3,49 (5'')	78,8 (C3'')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

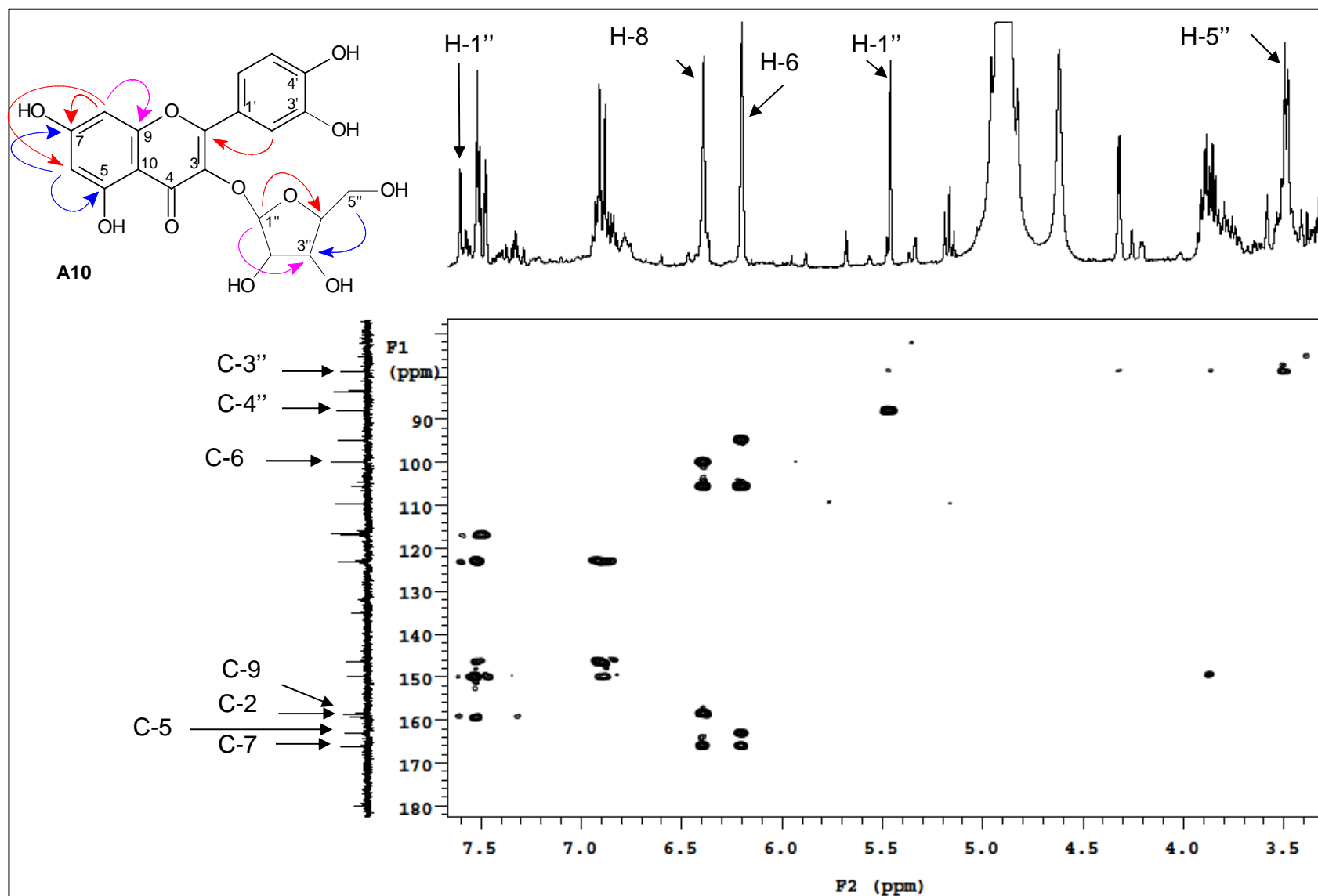


Fig. 30: Mapa de contornos gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A10.

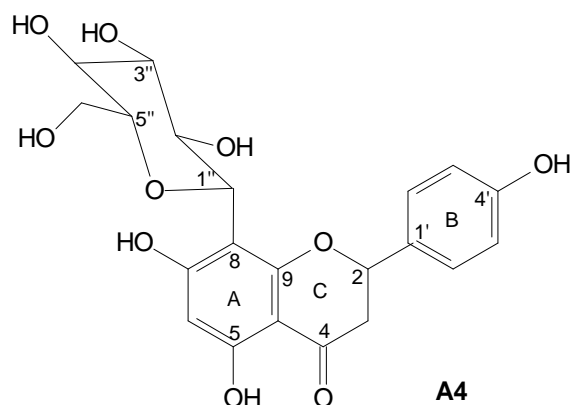
Tabela 40: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e HSQC para a substância **A10** em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a avicularina.

C	A10	$^1\text{H}/\text{HSQC}$	avicularina^a	
2	159,5 (C)		157,5 (C)	
3	135,0 (C)		134,1 (C)	
4	180,1 (C)		178,9 (C)	
5	163,2 (C)		163,2 (C)	
6	100,0 (CH)	6,20 $d/J= 2,1$ Hz	98,3 (CH)	6,22, $d, 2,1$
7	166,2 (C)		165,0 (C)	
8	94,9 (CH)	6,39 $d/J= 2,1$ Hz	94,0 (CH)	6,41, $d, 2,1$
9	158,7 (C)		157,2 (C)	
10	105,7 (C)		116,0 (C)	
1'	123,2 (C)		122,2 (C)	
2'	117,0 (CH)	7,52 $d/J= 2,1$ Hz	117,0 (CH)	7,54, $d, 2,1$
3'	146,5 (C)		145,0 (C)	
4'	150,0 (C)		148,8 (C)	
5'	116,6 (CH)	6,89 $d/J= 8,4$ Hz	116,7(CH)	6,92, $d, 8,4$
6'	123,1 (CH)	7,49 $dd/J= 2,1; 8,4$ Hz	122,0(CH)	7,52, $dd, 2,1; 8,4$
1''	109,6 (CH)	5,46 $d/J= 0,9$ Hz	109,5 (CH)	5,48, s
2''	83,5 (CH)	4,32 $dd/J= 0,9; 3,0$ Hz	82,1 (CH)	4,35, $dd, 0,9; 2,7$
3''	78,8 (CH)	3,90 $dd/J= 3,0; 5,1$ Hz	78,3 (CH)	3,90, m
4''	88,1 (CH)	3,86 m	88,0 (CH)	3,86, m
5''	62,6 (CH_2)	3,49 $d/J= 4,8$ Hz	62,2 (CH_2)	3,51, $t, 1,8; 3,0$

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD); (^a Sirat, *et al.*, 2010; CD_3OD)

Os dados espectroscópicos mencionados anteriormente para a substância **A10** estão condizentes aos já existentes na literatura para **3-O-arabinofuranosil-quercetina (avicularina)**, onde é citada ainda sua atividade antioxidante (Sirat, *et al.*, 2010).

5.6. Substância A4



Das frações acetato de etila (folhas e galhos) e *n*-butanólica (folhas) de *A. fluminensis* foi obtido um sólido amarelo-castanho. Este sólido foi enviado para RMN e através da análise foi possível constatar que se tratava de uma mistura da substância **A1** juntamente com **A4**, como substância minoritária.

No espectro de RMN ^1H (**Figura 31**) de **A4** apresentou 2 sinais na região de hidrogênios aromáticos: δ_{H} 6,80 (*d*, $J = 8,7$ Hz; H-3' e 5') e 7,29 (*d*, $J = 8,7$ Hz; H-2' e 6') característicos de anel **B** *p*-hidroxilado. Foi observada também a presença de um hidrogênio aromático em δ_{H} 5,95, como um singlete correspondente ao H-6 e ainda dois duplos dupletos em δ_{H} 2,72 (*dd*, $J = 17,1$ e 3,0 Hz, Ha-3) e 3,11 (*dd*, $J = 17,1$ e 12,3 Hz, Hb-3) correspondentes aos H-3 (**Tabela 43**).

Nos espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 32**) foram observadas a presença de 21 carbonos, sendo 12 carbonos aromáticos em: δ_{C} 164,2 (C-5), 96,4 (C-6), 167,5 (C-7), 106,0 (C-8), 163,0 (C-9), 103,2 (C-10), 130,9 (C-1'), 129,0 (C-2' e 6'), 116,3 (C-3' e 5') e 159,0 (C-4'). Foi constatado também, 3 carbonos oximetínicos, em: δ_{C} 71,8 (C-4''), 72,6 (C-2'') e 80,2 (C-3''), 2 carbonos metilênicos em δ_{C} 43,9 (C-3) e 62,9 (C-6'') e 1 carbono metínico em δ_{C} 75,2 (C-1''). O mapa de contornos gHSQC também auxiliou na identificação das correlações dos ^{13}C com seus ^1H (**Figura 33**; **Tabela 43**).

No mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ gCOSY (**Figura 34**) para **A4** foram observadas correlações entre o H-3b (δ_{H} 3,11) com H-3a (δ_{H} 2,72) e também entre o H-2 (δ_{H} 5,33) com H-3b (δ_{H} 3,11), estas correlações indicaram o anel **C**

hidrogenado. A análise das correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY estão apresentados na **Tabela 41**.

Tabela 41: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para **A4**.

$\delta ^1\text{H}$ (mult.; J em Hz; H)	$\delta ^1\text{H}$ (mult.; J em Hz; H)
5,33 (<i>dd</i> ; 3,0 e 12,3; H-2)	3,11 (<i>dd</i> ; 12,3 e 17,1; H-3b)
5,33 (<i>dd</i> ; 3,0 e 12,3; H-2)	2,72 (<i>dd</i> ; 3,0 e 17,1; H-3a)
2,72 (<i>dd</i> ; 17,1 e 3,0; H-3a)	3,11 (<i>dd</i> ; 17,1 e 12,3; H-3b)
3,39-3,44 (<i>m</i> ; H-3'')	4,12 (<i>m</i> ; H-2'')
4,78 (<i>d</i> ; 10,2; H-1'')	4,12 (<i>m</i> ; H-2'')
3,32-3,37 (<i>m</i> ; H-4'')	3,71 (<i>dd</i> ; 2,7 e 5,4; H-6''a)
3,39-3,44 (<i>m</i> ; H-3'')	3,82 (<i>dd</i> ; 2,7 e 5,4; H-6''b)
6,80 (<i>d</i> ; 8,7; H-3' e 5')	7,29 (<i>d</i> ; 8,7; H-2' e 6')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD₃OD)

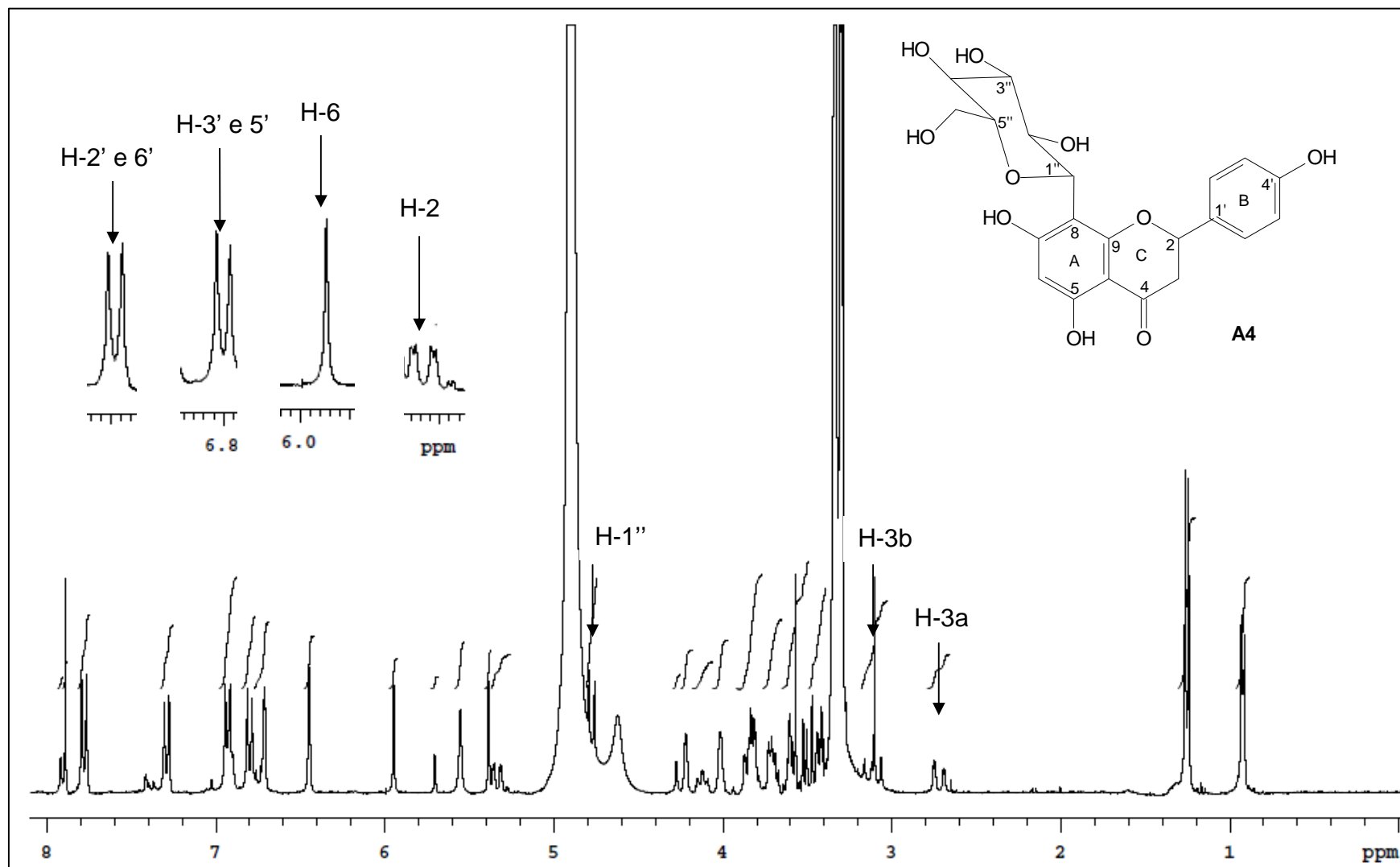


Fig. 31: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A4.

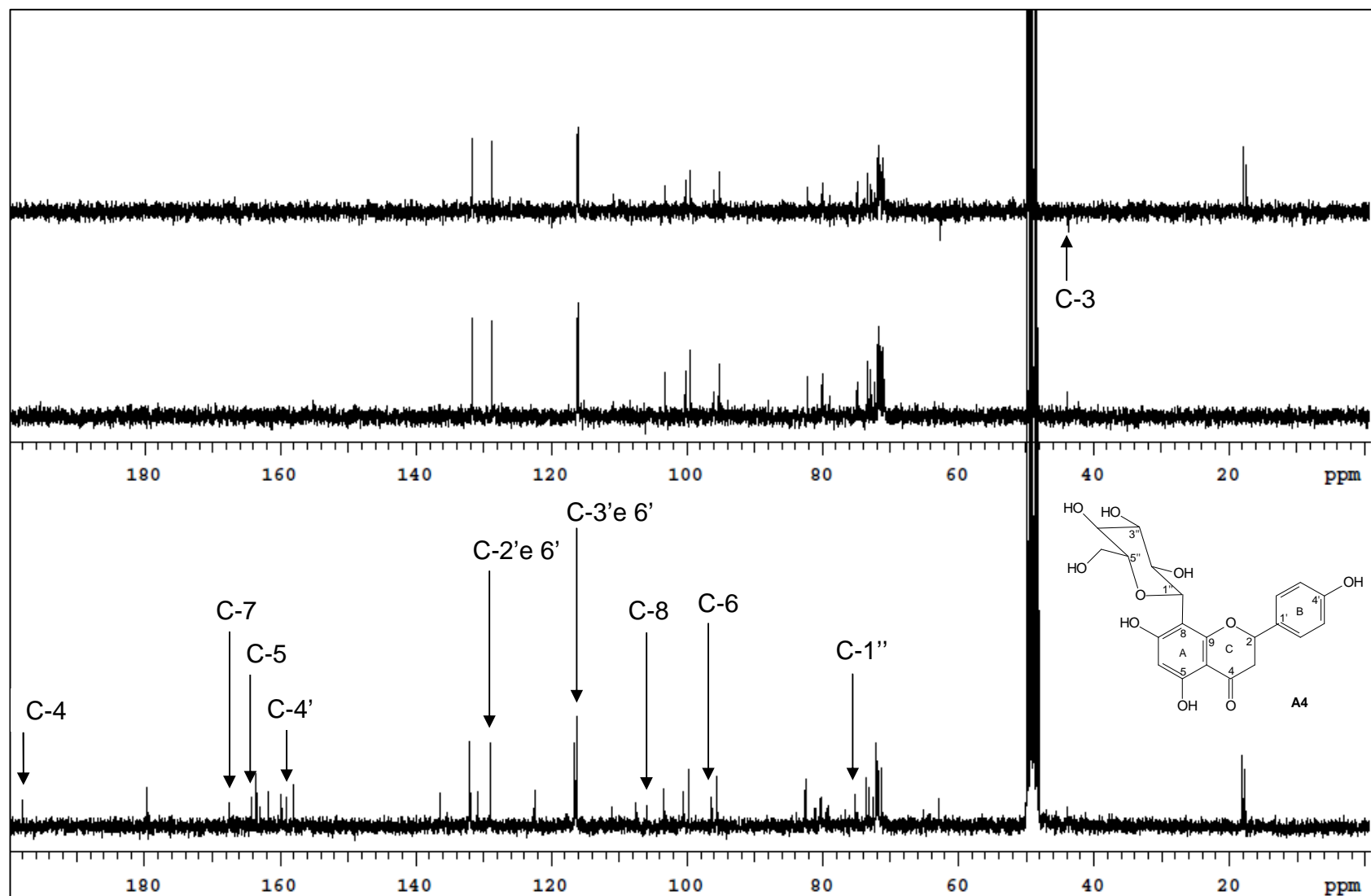


Fig. 32: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A4.

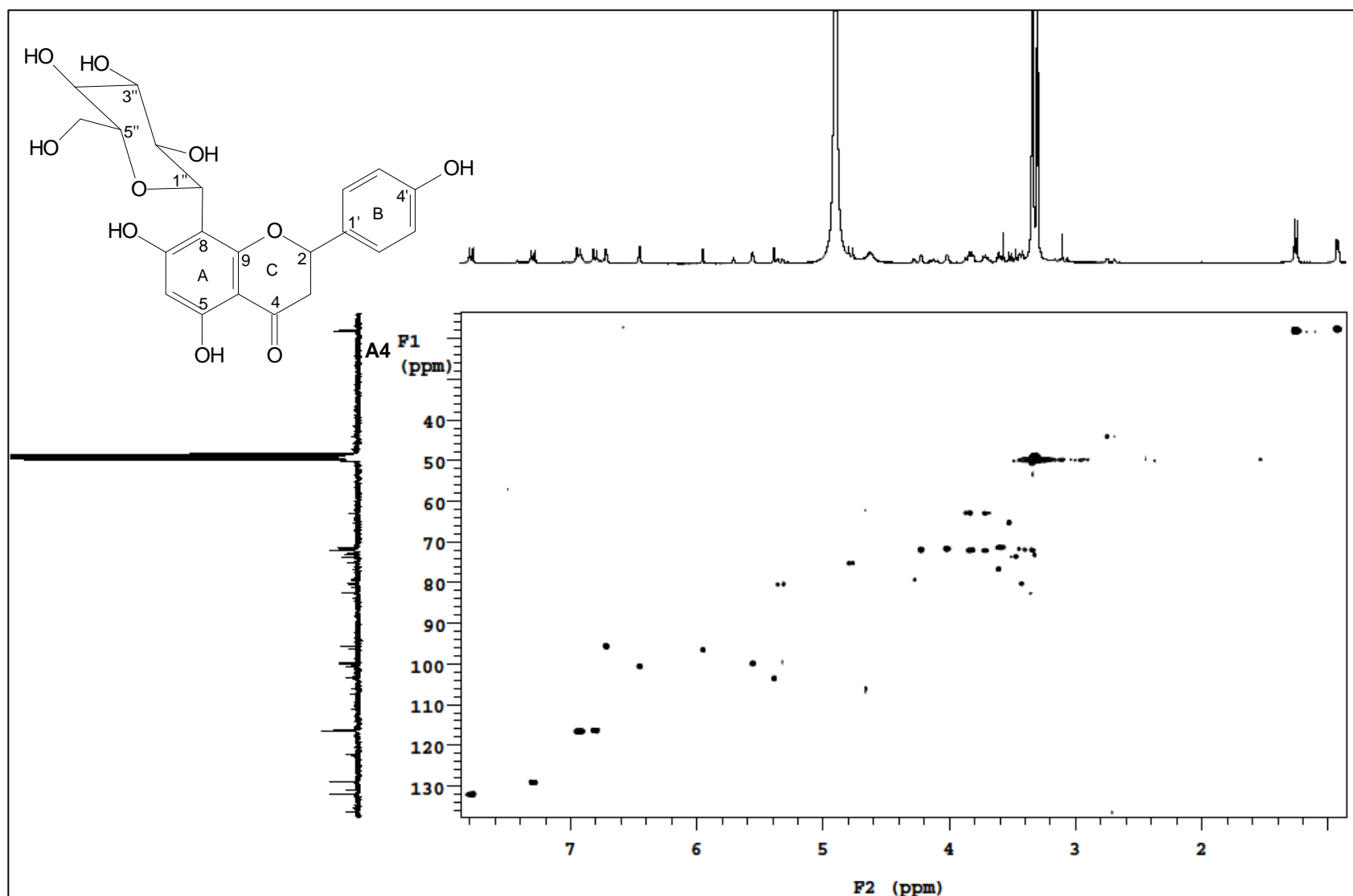


Fig. 33: Mapa de contornos gHSQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A4.

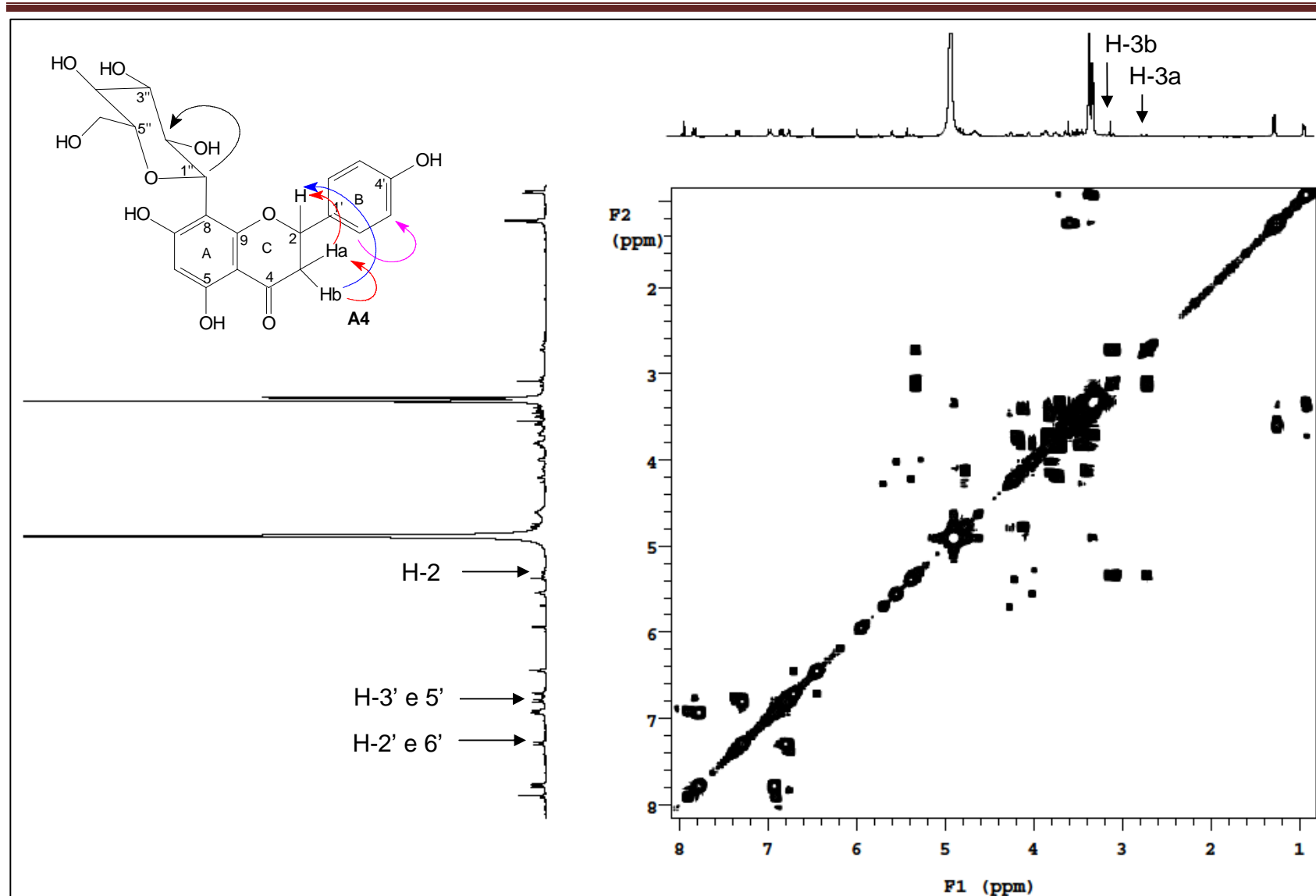


Fig. 34: Mapa de contornos gCOSY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A4.

A posição da unidade C-glicosilada foi confirmada pelo mapa de contornos gHMBC (**Figura 35**) através da correlação do H-1'' (δ_H 4,78) com o C-8 (δ_C 106,0) e ainda pela correlação do hidrogênio em δ_H 5,95 (H-6) com o C-5 (δ_C 164,2). Outras correlações observadas no gHMBC também foram importantes e estão apresentadas na **tabela 42**.

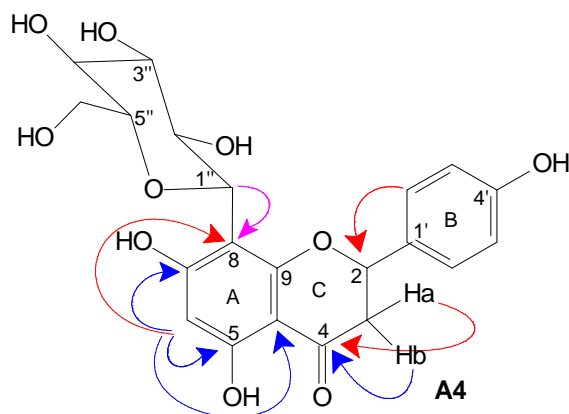


Tabela 42: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para **A4**.

δ_H (^1H)	δ_C (^{13}C)
7,29 (2' e 6')	80,4 (C2), 129,0 (C2' e 6') e 159,0 (C4')
6,80 (3' e 5')	130,9 (C1'), 116,3 (C3' e 5'); 159,0 (4')
5,95 (6)	164,2 (C5), 167,5 (C7), 106,0 (C8) e 103,2 (C10)
5,33 (2)	129,0 (C2' e 6')
4,78 (1'')	106,0 (C8), 167,5 (C7), 72,6 (C2''), 80,2 (C3'') e 82,5 (C5'')
4,12 (2'')	80,2 (C3'')
3,11 (3)	198,0 (C4)
2,72 (3)	198,0 (C4)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

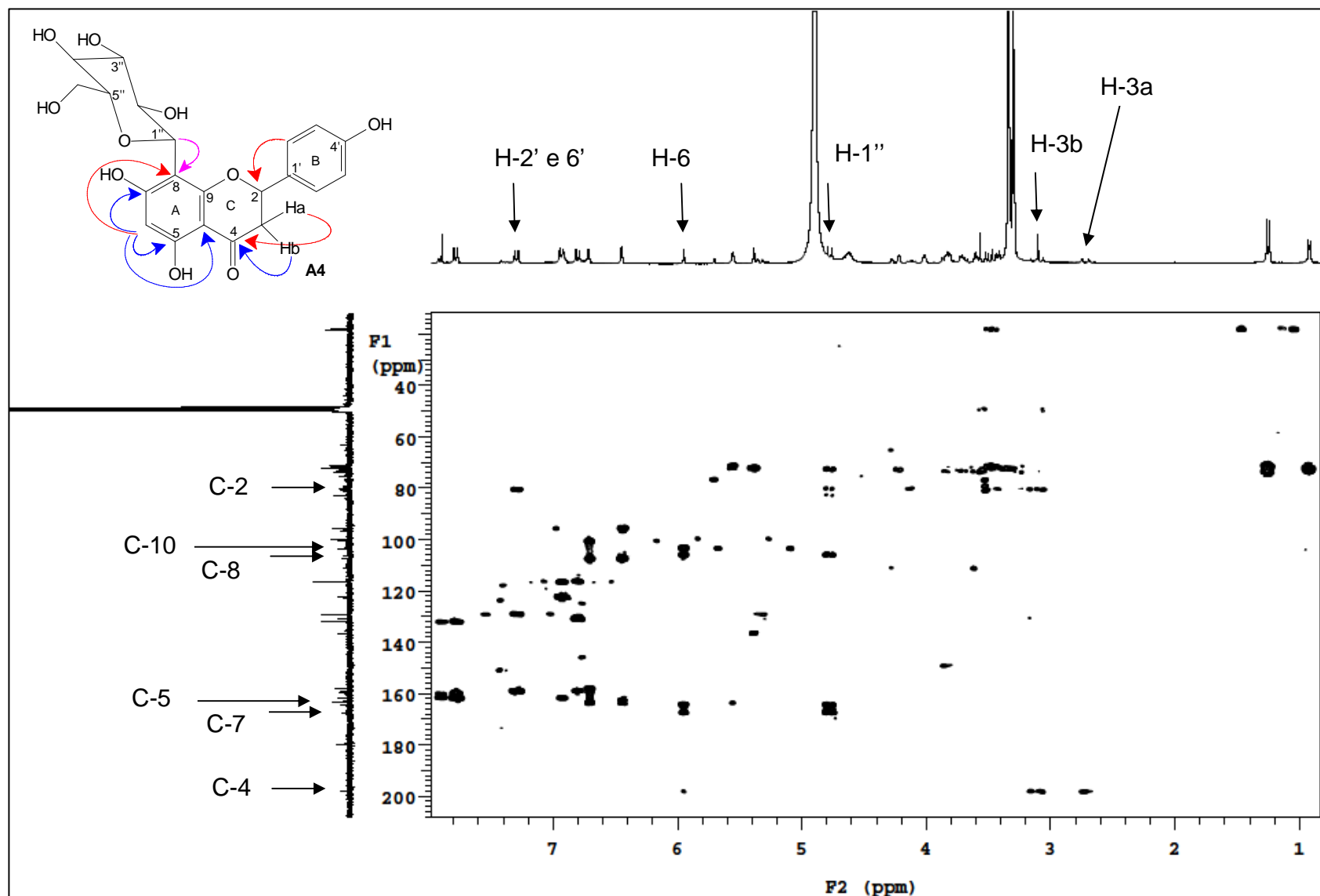


Fig. 35: Mapa de contornos gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a mistura das substâncias A1 e A4.

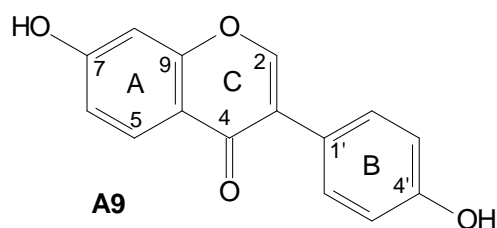
Tabela 43: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHSQC para a substância **A4** em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a iso-hemifloina.

C	A4	$^1\text{H}/\text{gHSQC}$	Iso-hemifloina^a
2	80,4 (CH)	5,33 <i>dd</i> / $J= 3,0$ e $12,3$ Hz	78,4 (CH)
3	43,9 (CH_2)	Ha 2,72 <i>dd</i> / $J= 3,0$ e $17,1$ Hz Hb 3,11 <i>dd</i> / $J=12,3$ e $17,1$ Hz	42,1 (CH_2)
4	198,0 (C)		196,6 (C)
5	164,2 (C)		161,8 (C)
6	96,4 (CH)	5,95 <i>sl</i>	95,0 (C)
7	167,5 (C)		166,1 (C)
8	106,0 (C)		105,9 (CH)
9 (8a)	163,0 (C)		162,9 (C)
10 (4a)	103,2 (C)		101,6 (C)
1'	130,9 (C)		129,0 (C)
2' e 6'	129,0 (CH)	7,29 <i>d</i> / $J= 8,7$ Hz	128,4 (CH)
3' e 5'	116,3 (CH)	6,80 <i>d</i> / $J= 8,7$ Hz	115,4 (CH)
4'	159,0 (C)		157,8 (C)
1''	75,2 (CH)	4,78 <i>d</i> / $J= 10,2$ Hz	73,1 (CH)
2''	72,6 (CH)	4,12 <i>m</i>	70,5 (CH)
3''	80,2 (CH)	3,39-3,44 <i>m</i>	79,2 (CH)
4''	71,8 (CH)	3,32-3,37 <i>m</i>	70,8 (CH)
5''	82,5 (CH)	3,39-3,44 <i>m</i>	81,6 (CH)
6''	62,9 (CH_2)	Ha 3,71 <i>dd</i> / $J= 2,7$ e $5,4$ Hz Hb 3,82 <i>dd</i> / $J= 2,7$ e $5,4$ Hz	61,7 (CH_2)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD); (^a Velozo *et al.*, 1999; DMSO_d)

A substância **A4** foi caracterizada através dos dados espectroscópicos e comparação destes com os encontrados na literatura, como sendo a flavanona **8-C- β -D-glicopiranosil-4',5,7-tri-hidroxiflavanona** também nomeada **8-C- β -D-glicopiranosil naringenina (iso-hemifloina)** (Velozo *et al.*, 1999) (Tabela 43).

5.7. Substância A9



A substância **A9** foi obtida da fração clorofórmica dos galhos como um sólido amarelo.

No espectro de RMN ^1H (**Figura 36**) para **A9**, foi observado a presença dos dupletos em δ_{H} 7,36 (*d*, $J = 8,7$ Hz, H-2' e 6') e 6,83 (*d*, $J = 8,7$ Hz, H-3' e 5') característicos de anel **B** *p*-hidroxilado, apresentou dupletos em δ_{H} 8,05 (*d*, $J = 8,7$ Hz; H-5), 6,93 (*dd*, $J = 2,4$ e 8,7 Hz, H-6) e 6,84 (*d*, $J = 2,4$ Hz, H-8) para o anel **A** e apresentou um singlete em δ_{H} 8,12 (*s*, H-2) para o anel **C** (**Tabela 46**).

Nos espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 37**) foram verificados a presença de 13 sinais, dentre eles, sinais de carbonos aromáticos em: δ_{C} 128,7 (C-5), 116,4 (C-6), 164,8 (C-7), 103,4 (C-8), 159,9 (C-9), 118,3 (C-10), 126,1 (C-1'), 131,6 (C-2' e 6'), 116,4 (C-3' e 5'), 158,9 (C-4'). Foi constatado, também sinais em δ_{C} 154,8 (C-2) e 124,4 (C-3) e de um sinal em δ_{C} 178,3, referente ao carbono carbonílico (C-4). O deslocamento de sinal do C-2 em δ_{C} 154,8 e do H-2 em δ_{H} 8,12 indicou se tratar de uma isoflavona. Através do mapa de contornos gHSQC (**Figura 38**), foram atribuídos todos os ^{13}C com seus ^1H , que também auxiliaram na identificação (**Tabela 46**).

No mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ gCOSY (**Figuras 39 e 40**) foram observadas correlações, entre o H-5 (δ_{H} 8,05) com H-6 (δ_{H} 6,93); entre o H-6 (δ_{H} 6,93) com o com H-8 (δ_{H} 6,84) e também entre o H-2' e 6' (δ_{H} 7,36) com o H-3' e 5' (δ_{H} 6,83) e não haviam correlações com o H-2. A análise das correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY estão apresentados na **tabela 44**.

Tabela 44: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para **A9**.

$\delta ^1\text{H}$ (mult.; J em Hz; H)	$\delta ^1\text{H}$ (mult.; J em Hz; H)
8,05 (d; 8,7; H-5)	6,93 (dd; 2,4 e 8,7; H-6)
6,93 (dd; 2,4 e 8,7; H-6)	6,84 (d; 2,4; H-8)
7,36 (d; 8,7; H-2' e 6')	6,83 (d; 8,7; H-3' e 5')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

A posição do anel **B** *p*-hidroxilado no C-3 foi confirmada pelas correlações do H-2 (δ_{H} 8,12) com o C-1' (δ_{C} 126,1) e com o C-3 (δ_{C} 124,4) no mapa de contornos gHMBC, o que confirma uma isoflavona (**Figura 41**). Outras correlações observadas em gHMBC estão apresentadas na **tabela 45**. Todos os dados espectroscópicos observados permitiram a atribuição dos deslocamentos químicos de todos os carbonos e hidrogênios da substância **A9**.

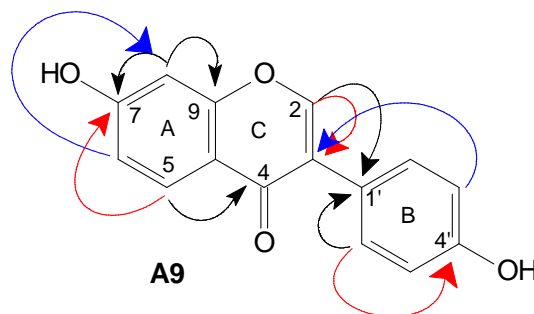


Tabela 45: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para **A9**.

δ_{H} (^1H)	δ_{C} (^{13}C)
8,12 (2)	126,1 (C1'), 124,4 (C3), 178,3 (C4) e 159,9 (C9)
8,05 (5)	178,3 (C4), 164,8 (C7) e 159,9 (C9)
7,36 (2'e 6')	126,1 (C1'), 131,6 (2'e 6') e 158,9 (C4')
6,93 (6)	103,4 (C8) e 118,3 (C10)
6,84 (8)	116,4 (C6), 164,8 (C7) e 159,9 (C9)
6,83 (3' e 5')	124,4 (C3) e 116,4 (C3' e 5')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

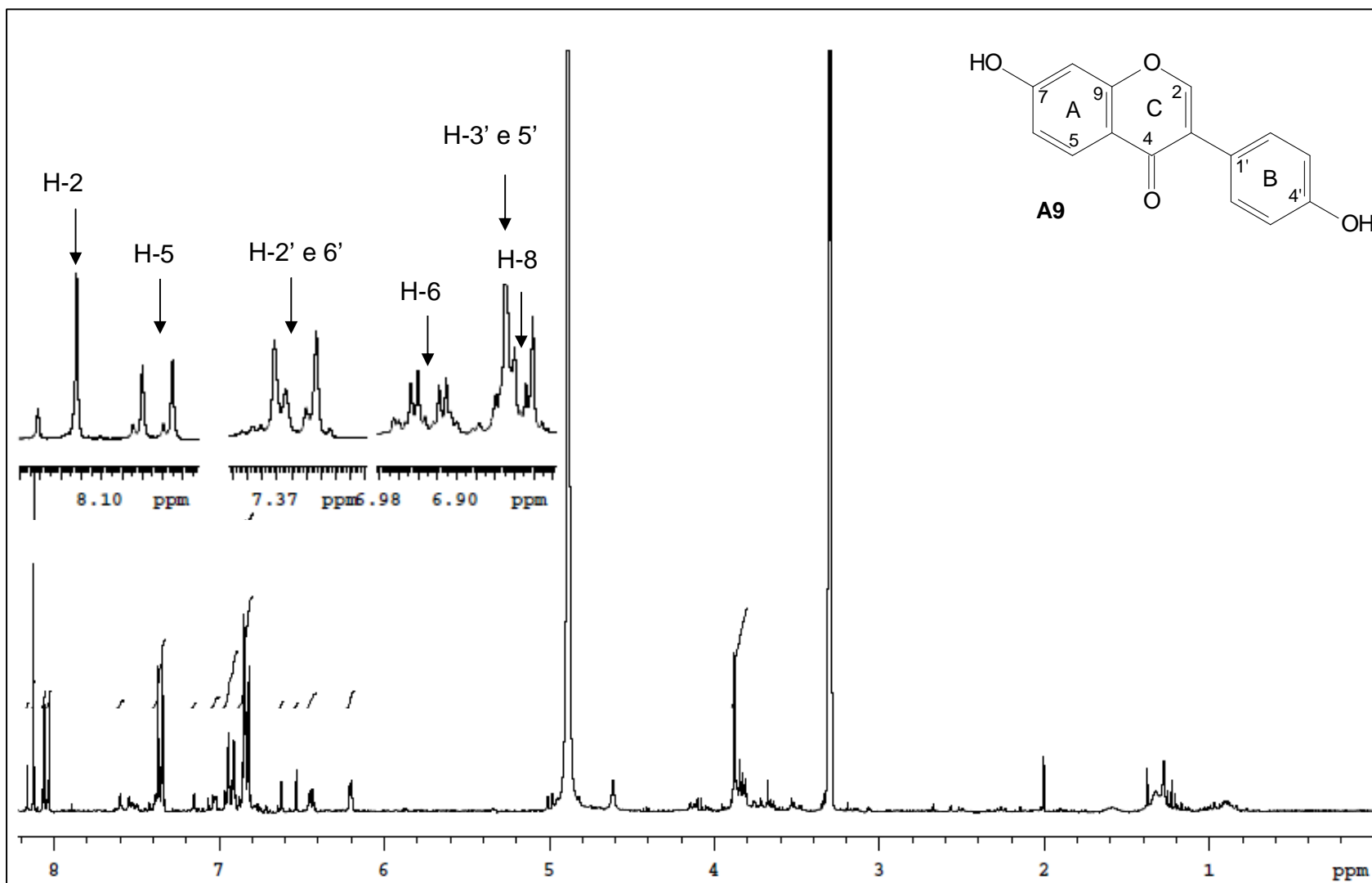


Fig. 36: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) para a substância **A9**.

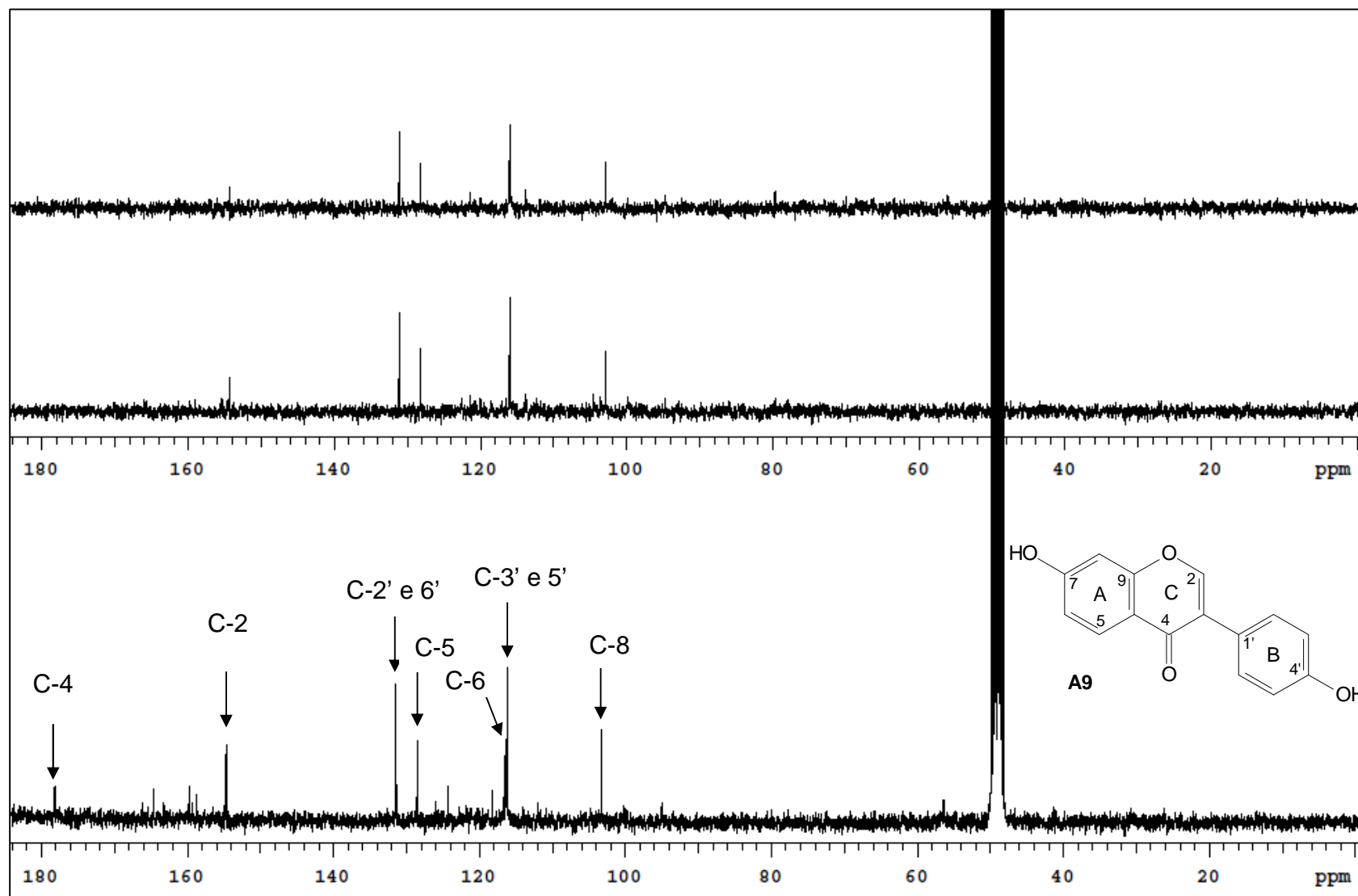


Fig. 37: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a substância **A9**.

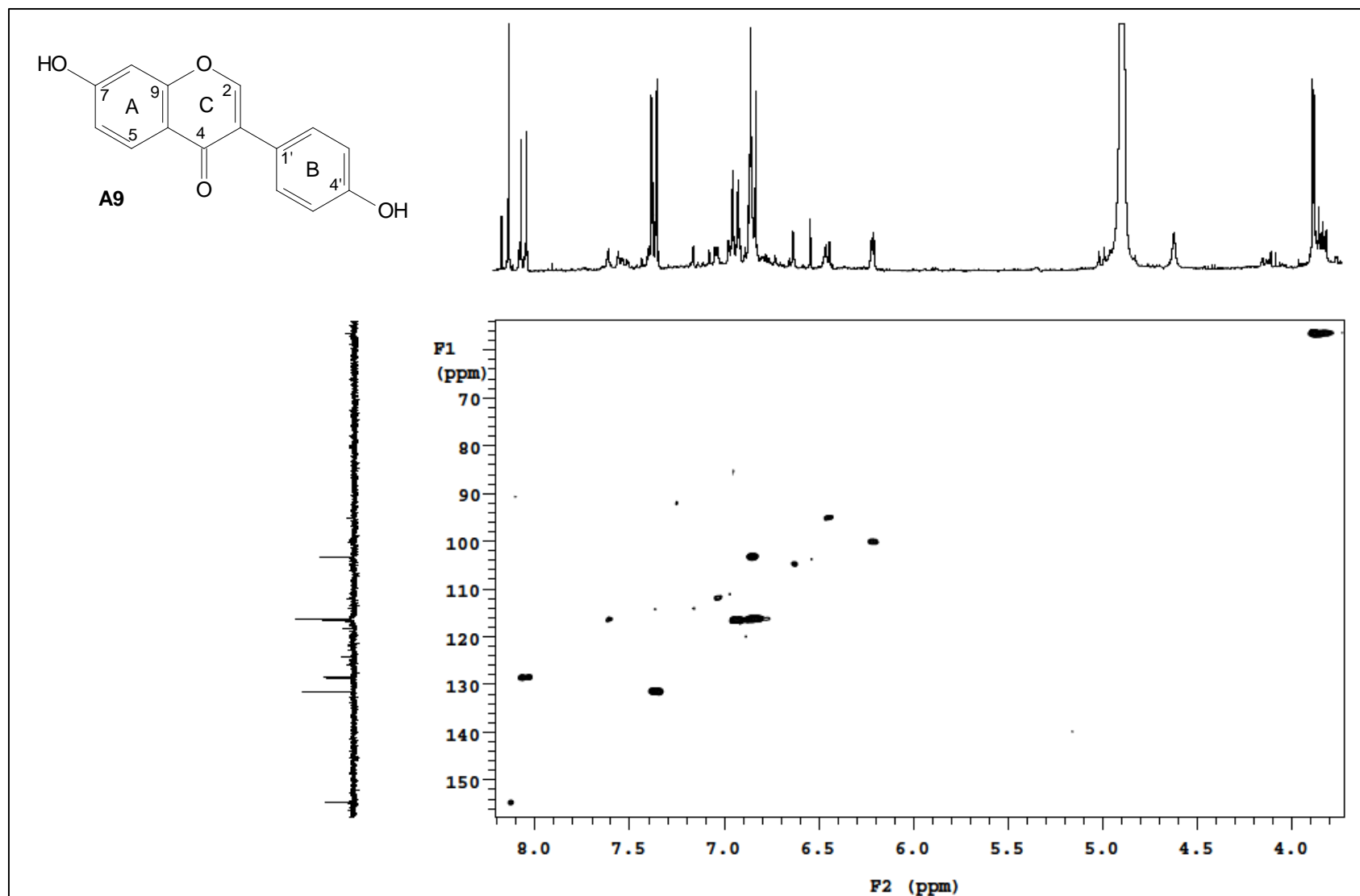


Fig. 38: Mapa de contornos gHSQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A9.

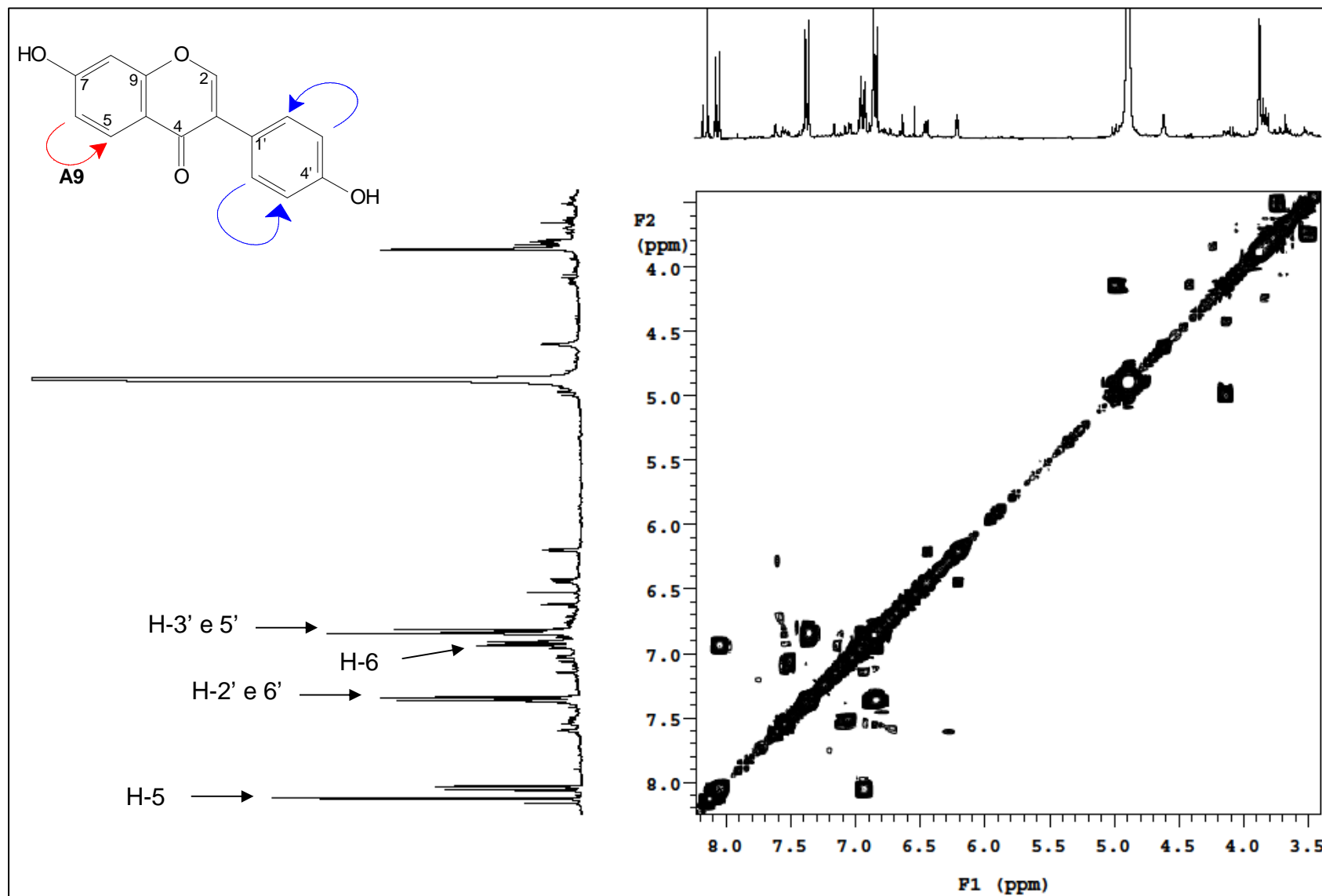


Fig. 39: Mapa de contornos gCOSY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância A9.

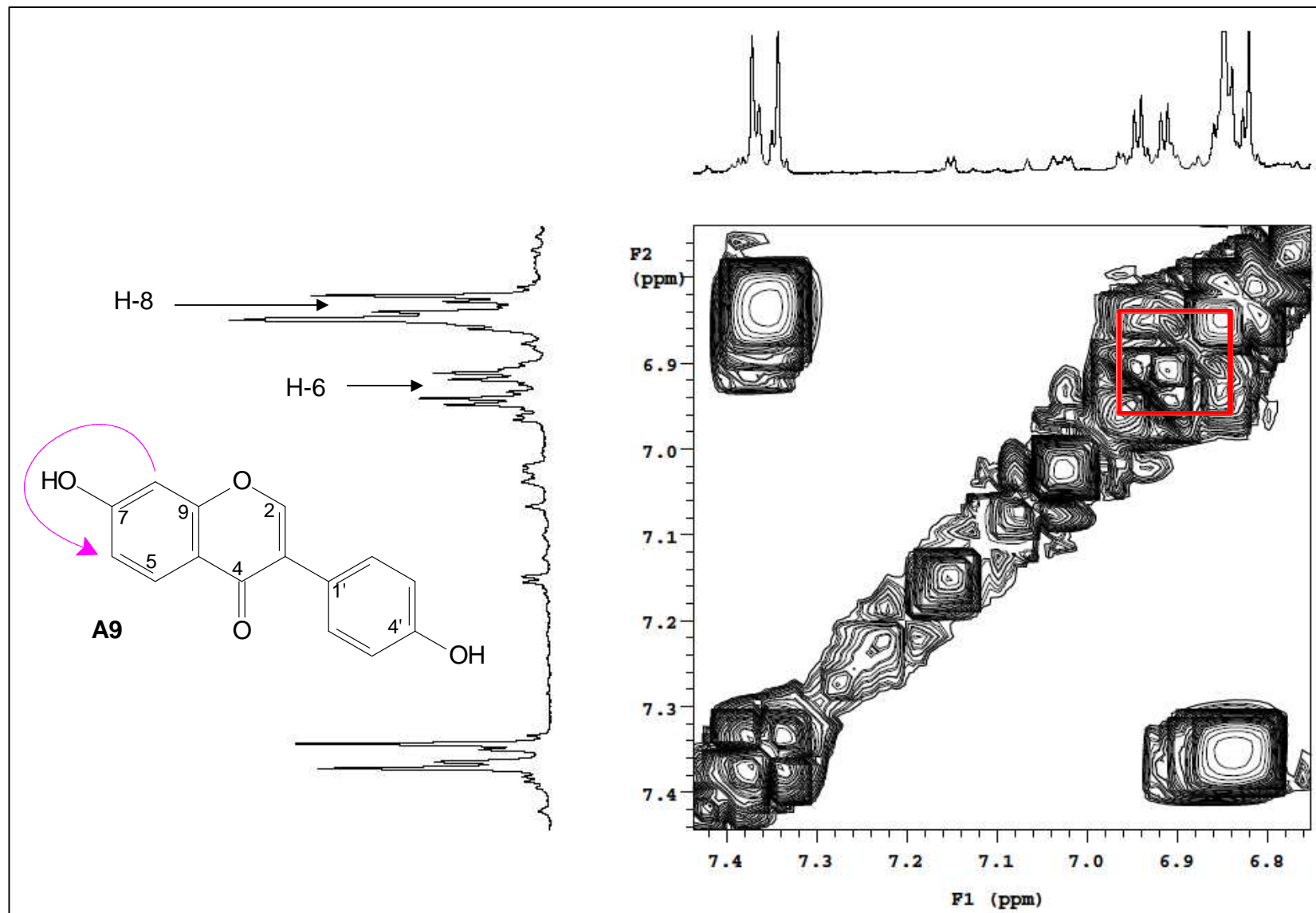


Fig. 40: Mapa de contornos gCOSY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância A9.

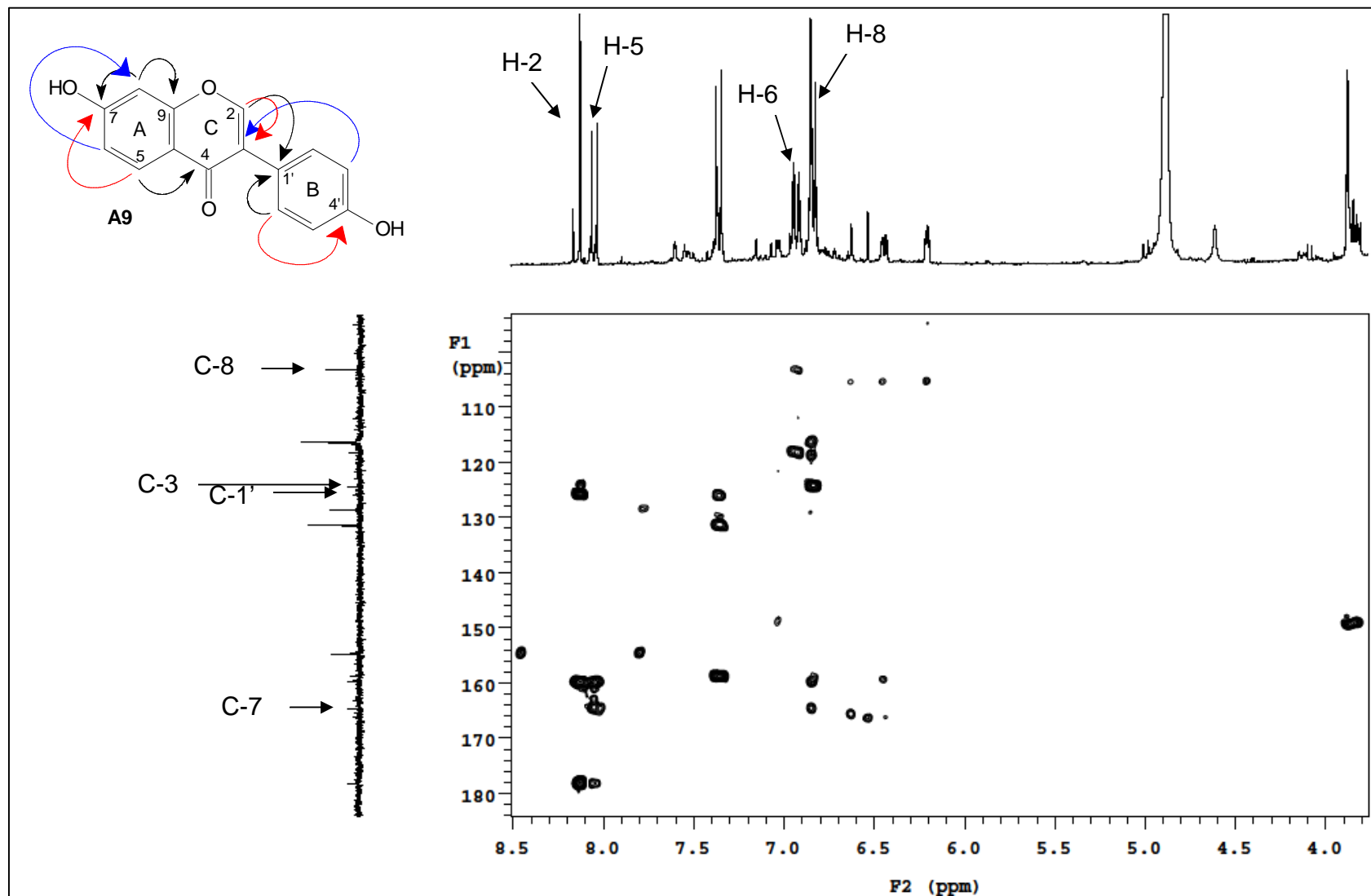


Fig. 41: Mapa de contornos gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A9.

Estes dados espectroscópicos obtidos para a substância **A9** foram comparados com os encontrados na literatura e indicaram que a mesma trata-se de uma isoflavona caracterizada como **4', 7-di-hidroxisoflavona (daidzeína)** (Agrawal, 1989) (**Tabela 46**).

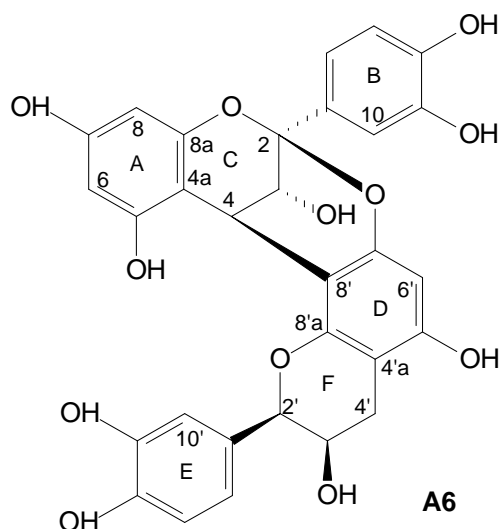
Tabela 46: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHSQC para a substância **A9** em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a isoflavona daidzeína.

Carbono	A9	$^1\text{H}/\text{gHSQC}$	Daidzeína ^a
2	154,8 (CH)	8,12 <i>s</i> /	152,3
3	124,4 (C)		122,7
4	178,3 (C)		178,6
5	128,7 (CH)	8,05 <i>d</i> / $J= 8,7$ Hz	127,2
6	116,4 (CH)	6,93 <i>dd</i> / $J= 2,4$ e $8,7$ Hz	115,0
7	164,8 (C)		162,6
8	103,4 (CH)	6,84 <i>d</i> / $J= 2,4$ Hz (<i>enc</i>)	102,1
9	159,9 (C)		157,6
10	118,3 (C)		116,9
1'	126,1 (C)		123,9
2' e 6'	131,6 (CH)	7,36 <i>d</i> / $J= 8,7$ Hz	130,0
3' e 5'	116,4 (CH)	6,83 <i>d</i> / $J= 8,7$ Hz	115,0
4'	158,9 (C)		157,3

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD); (^a Agrawal, 1989; CDCl_3)

Esta substância, a daidzeína, segundo literatura, apresenta atividade estrogênica (Schmitt *et al.*, 2003) e agente quimiopreventivo no câncer de mama (Ghazali and Waring, 1999) e na prevenção da osteoporose (Tapiero *et al.*, 2002).

5.8. Substância A6



Da fração acetato de etila das folhas de *A. fluminensis* foi obtida a substância **A6** como um sólido amorfo amarelo que foi submetido à análise por espectroscopia de RMN. Apresentou $[\alpha]_D^{20} = + 85,1$ (C= 0,47 mg/mL, metanol) e $[\alpha]_D^{20} = + 55,26$ (C= 3,8 mg/mL, acetona).

No espectro de RMN ^1H (**Fig. 42**) da substância **A6**, foi observada a presença de 9 sinais na região de hidrogênios aromáticos: δ_{H} 6,0 (*d*, $J = 2,4$ Hz, H-6), 6,06 (*d*, $J = 2,4$ Hz, H-8), 6,08 (*s*, H-6'), 6,81 (*d*, $J = 8,1$ Hz, H-13), 6,79 (*d*, $J = 8,1$ Hz, H-13'), 6,99 (*dd*, $J = 1,5$ e 3,9 Hz, H-14'), 7,02 (*dd*, $J = 1,8$ e 3,9 Hz, H-14), 7,12 (*d*, $J = 2,1$ Hz, H-10'), 7,14 (*d*, $J = 2,1$ Hz, H-10) (**Tabela 49**). Foi observada a presença do acoplamento entre δ_{H} 4,05 (1H, *d*, $J = 3,3$ Hz, H-3) e δ_{H} 4,40 (1H, *d*, $J = 3,3$ Hz, H-4) que foi atribuído aos prótons do anel C, os dubletos *meta* acoplados em δ_{H} 6,00 e 6,06 (H-6 e H-8 do anel A), um singlete de prótons aromáticos em δ_{H} 6,08 (H-6' do anel D), e dois sistemas com acoplamento *orto* e *meta* na região de carbonos aromáticos (δ_{H} 6,7-7,2) devido aos anéis B e E confirmaram a estrutura dimérica da proantocianidina tipo-A.

Nos espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Fig. 43**), para a substância **A6**, foram observados a presença de 30 carbonos, sendo 24 aromáticos em: δ_{C} 157,2 (C-5), 98,4 (CH-6), 158,3 (C-7), 96,8 (CH-8), 154,4 (C-8a), 104,4 (C-4a), 132,6 (C-9), 115,8 (CH-10), 146,5 (C-11), 145,8 (C-12), 116,2 (CH-13), 120,5 (CH-14), 156,8 (C-5'), 96,6 (CH-6'), 152,5 (C-7'), 107,4 (C-8'), 152,3 (C-8'a), 102,6 (C-4'a), 131,4 (C-

9'), 115,8 (CH-10'), 146,9 (C-11'), 146,2 (C-12'), 116,1 (CH-13'), 119,9 (CH-14') (**Tabela 49**). Também foram observados, três carbonos oximetínicos em: δ_C 68,2 (CH-3), 67,2 (CH-3') e 81,9 (CH-2'), 1 carbono metilênico em δ_C 30,1 (CH₂-4') e 1 carbono metínico em δ_C 29,4 (CH-4). A estrutura dimérica duplamente vinculada também foi demonstrada pela existência de um carbono cetal em δ_C 100,3 (C-2). Através do mapa de contornos gHSQC (**Figura 44 e Tabela 49**), foi possível observar que os hidrogênios em δ_H 4,05 e 4,23, (H-3 e H-3') estão ligados aos carbonos oximetínicos em δ_C 68,2 e 67,2 (C-3 e C-3'), respectivamente. A presença de 1 carbono metileno (CH₂), 13 carbonos metinos (CH) e 16 carbonos quaternários (C) também auxiliaram na confirmação da procianidina.

No mapa de contornos ¹H x ¹H gCOSY (**Figura 45**) foram observadas correlações com a estrutura, entre o H-13 (δ_H 6,81) com H-14 (δ_H 7,02), entre o H-3 (δ_H 4,05) com o H-4 (δ_H 4,40) e também correlações com Hb-4' (δ_H 2,94) com H-3' (δ_H 4,23). Demais correlações ¹H x ¹H observadas no mapa de contornos gCOSY estão apresentados na **tabela 47**.

Tabela 47: Principais correlações homonucleares ¹H x ¹H observadas no mapa de contornos gCOSY para **A6**.

δ ¹ H (mult.; J em Hz; H)	δ ¹ H (mult.; J em Hz; H)
6,81 (<i>d</i> ; 8,1; H-13)	7,02 (<i>dd</i> ; 1,8 e 3,9; H-14)
4,05 (<i>d</i> ; 3,3; H-3)	4,40 (<i>d</i> ; 3,3; H-4)
2,94 (<i>dd</i> ; 2,4 e 17,3; Hb-4')	4,23 (<i>d</i> ; 3,3; H-3')
2,75 (<i>dd</i> ; 2,4 e 17,1; Ha-4')	4,23 (<i>d</i> ; 3,3; H-3')
4,91 (<i>br.s</i> ; H-2')	4,23 (<i>d</i> ; 3,3; H-3')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD₃OD)

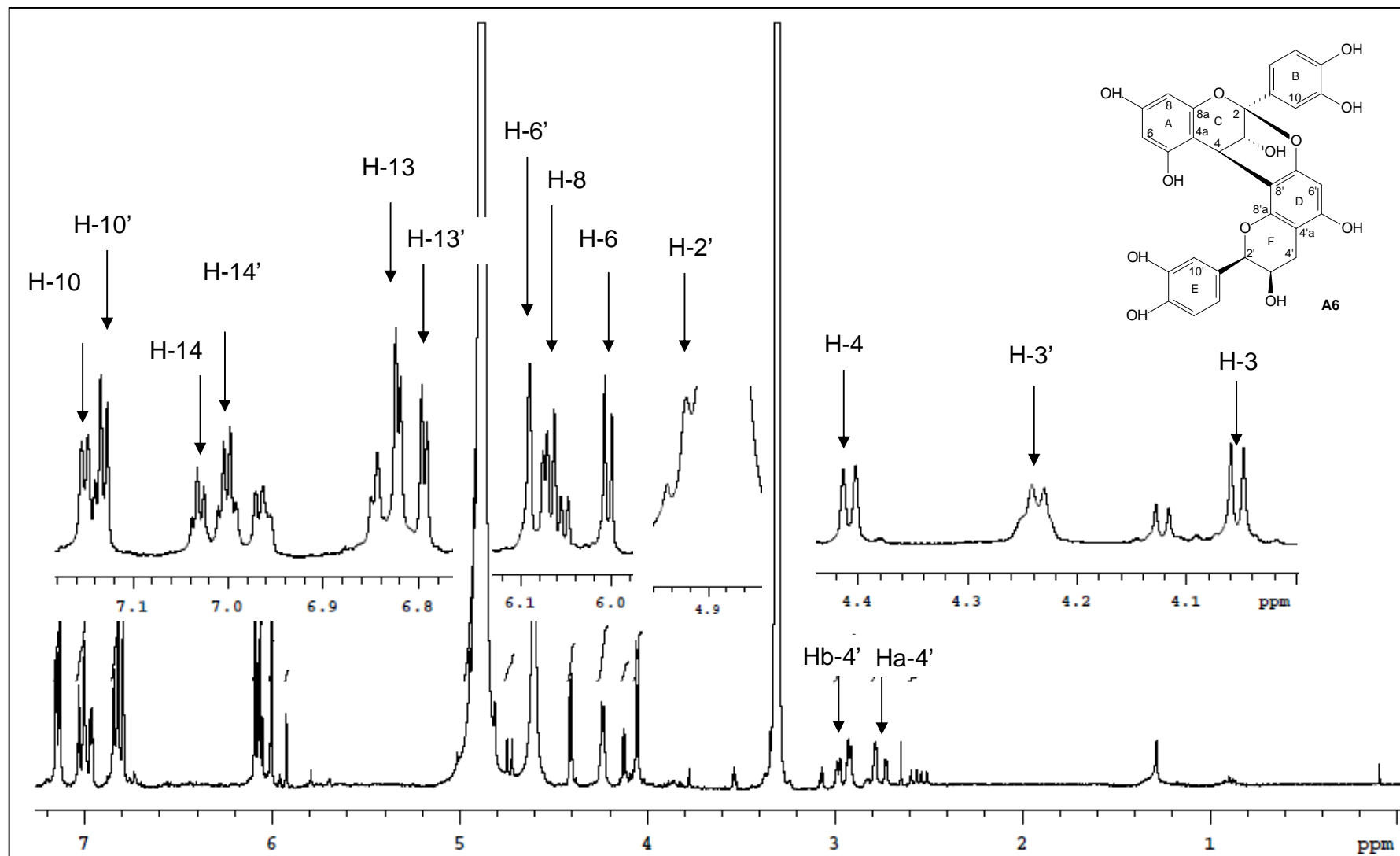


Fig. 42: Espectro de RMN de ¹H (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância A6.

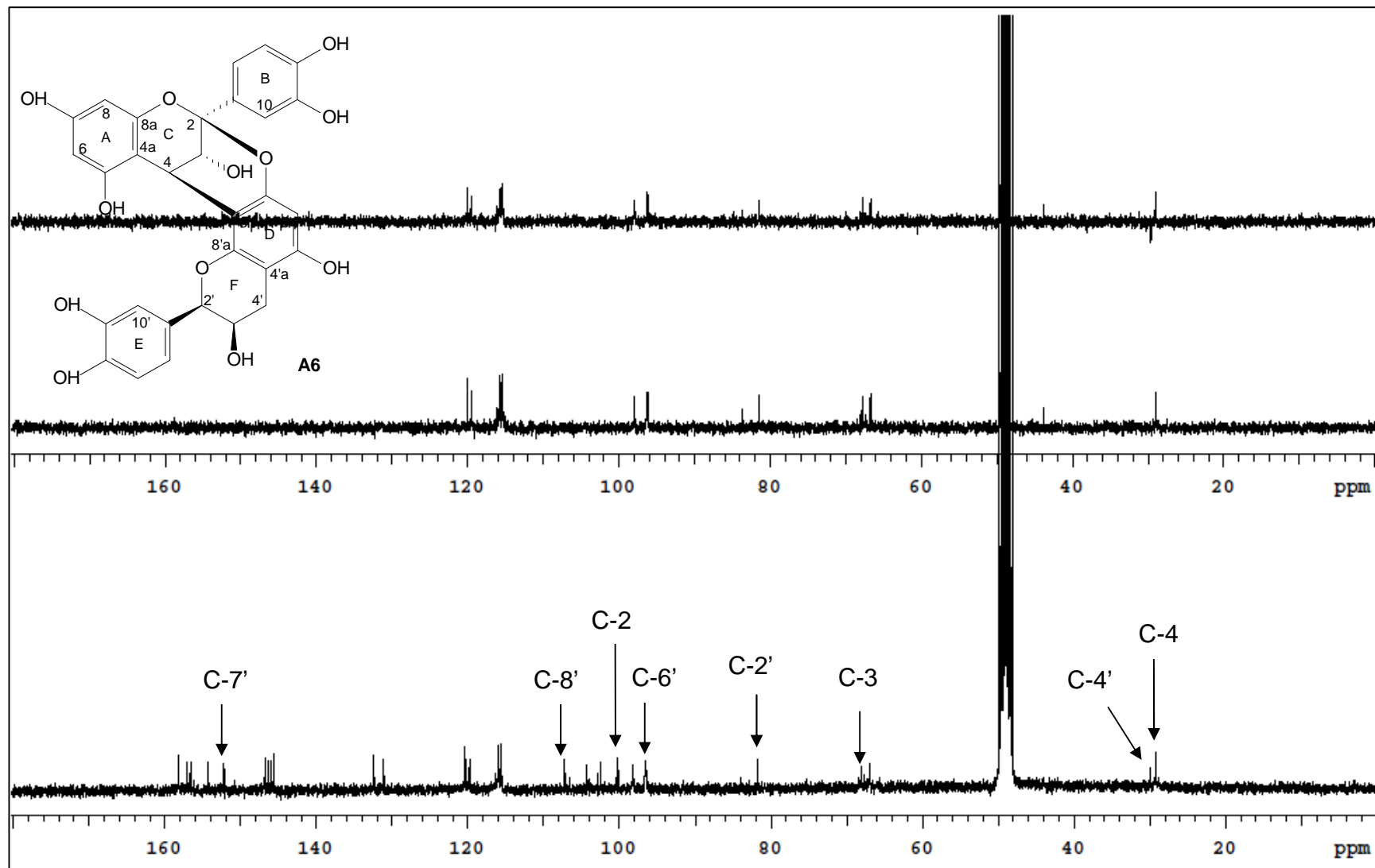


Fig. 43: Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a substância A6.

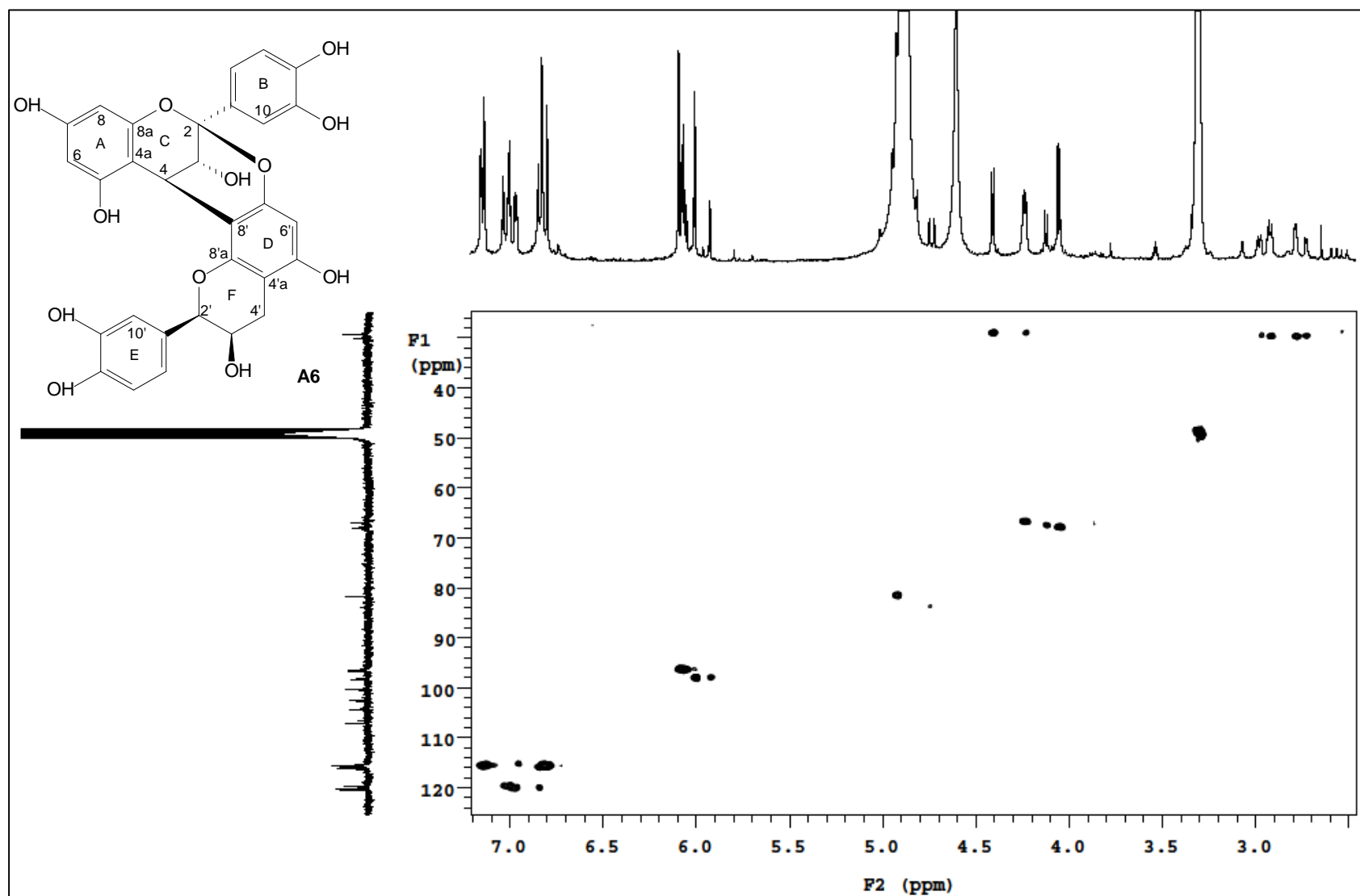


Fig. 44: Mapa de contornos gHSQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A6.

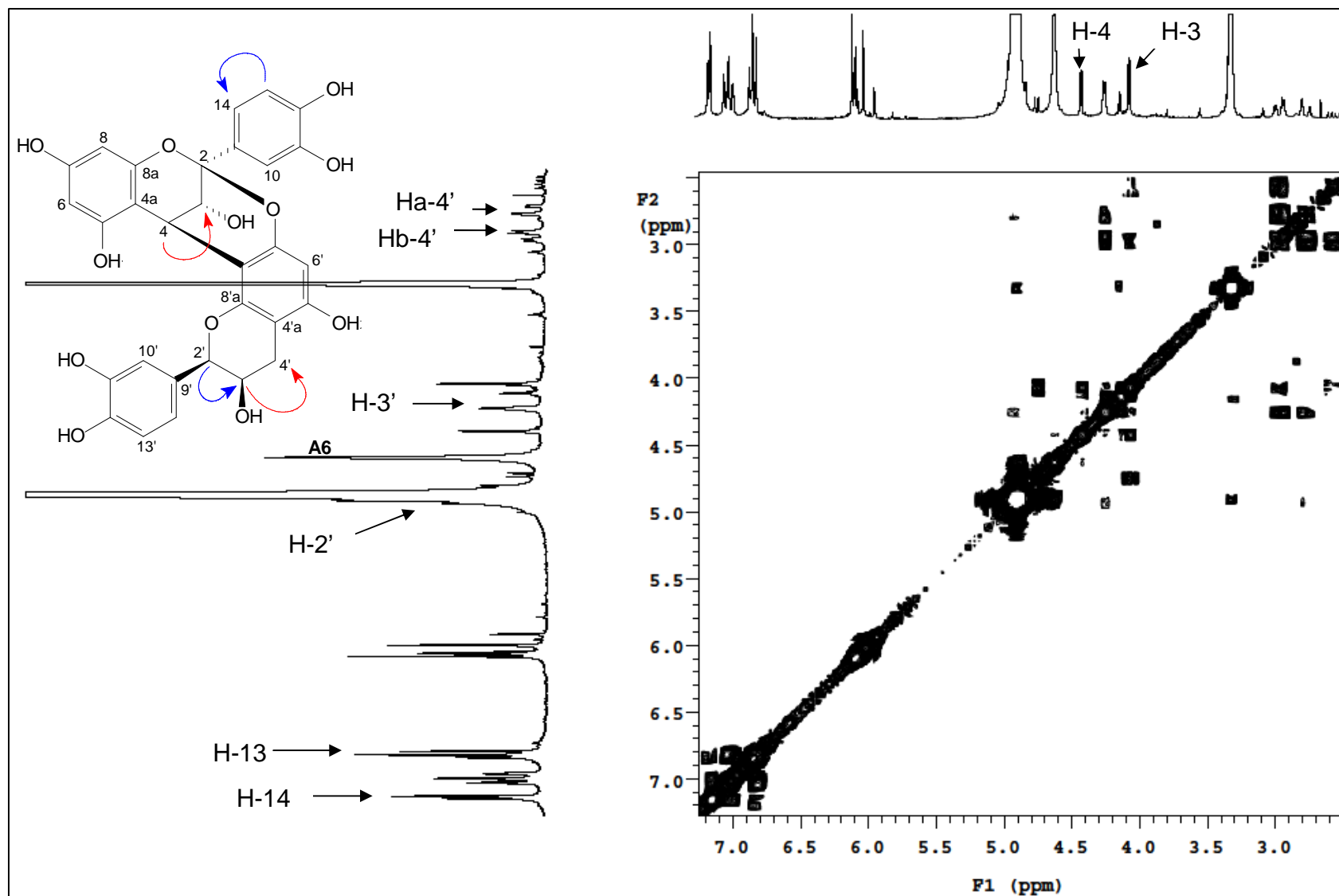


Fig. 45: Mapa de contornos gCOSY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância A6.

Através do mapa de contornos gHMBC (**Fig. 46**), foi possível confirmar a conexão do anel **C** com o anel **D** devido a correlação do H-4 (δ_H 4,40) com o C-8' (δ_C 107,4). Outras correlações observadas no gHMBC estão apresentados na **tabela 48**.

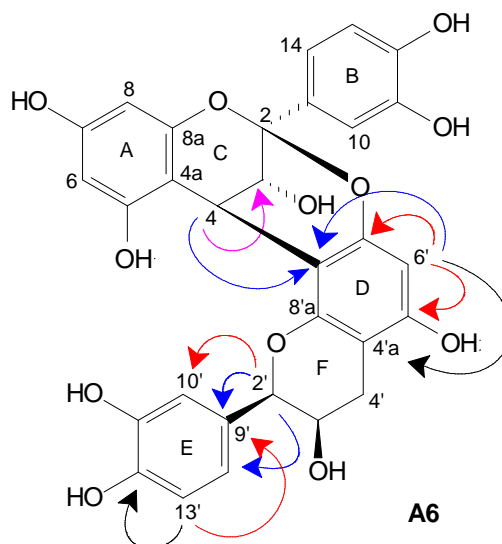


Tabela 48: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para **A6**.

δ_H (^1H)	δ_C (^{13}C)
7,14 (10)	146,5 (C11) e 120,5 (C14)
7,12 (10')	146,9 (C11') e 119,9 (C14')
7,02 (14)	146,5 (C11)
6,99 (14')	146,9 (C11') e 115,8 (C10')
6,81 (13)	132,6 (C9)
6,79 (13')	146,2 (C12') e 131,4 (C9')
6,08 (6')	102,6 (C4'a), 156,8 (C5'), 152,5 (C7') e 107,4 (C8')
6,06 (8)	154,4 (C8a)
6,00 (6)	104,4 (C4a)
4,91 (2')	119,9 (C14'), 115,8 (C10') e 131,4 (C9')
4,40 (4)	107,4 (C-8'), 104,4 (C4a), 68,2 (C3) e 100,3 (C2)
4,05 (3)	104,4 (C4a)
2,94 (4')	102,6 (C4'a)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

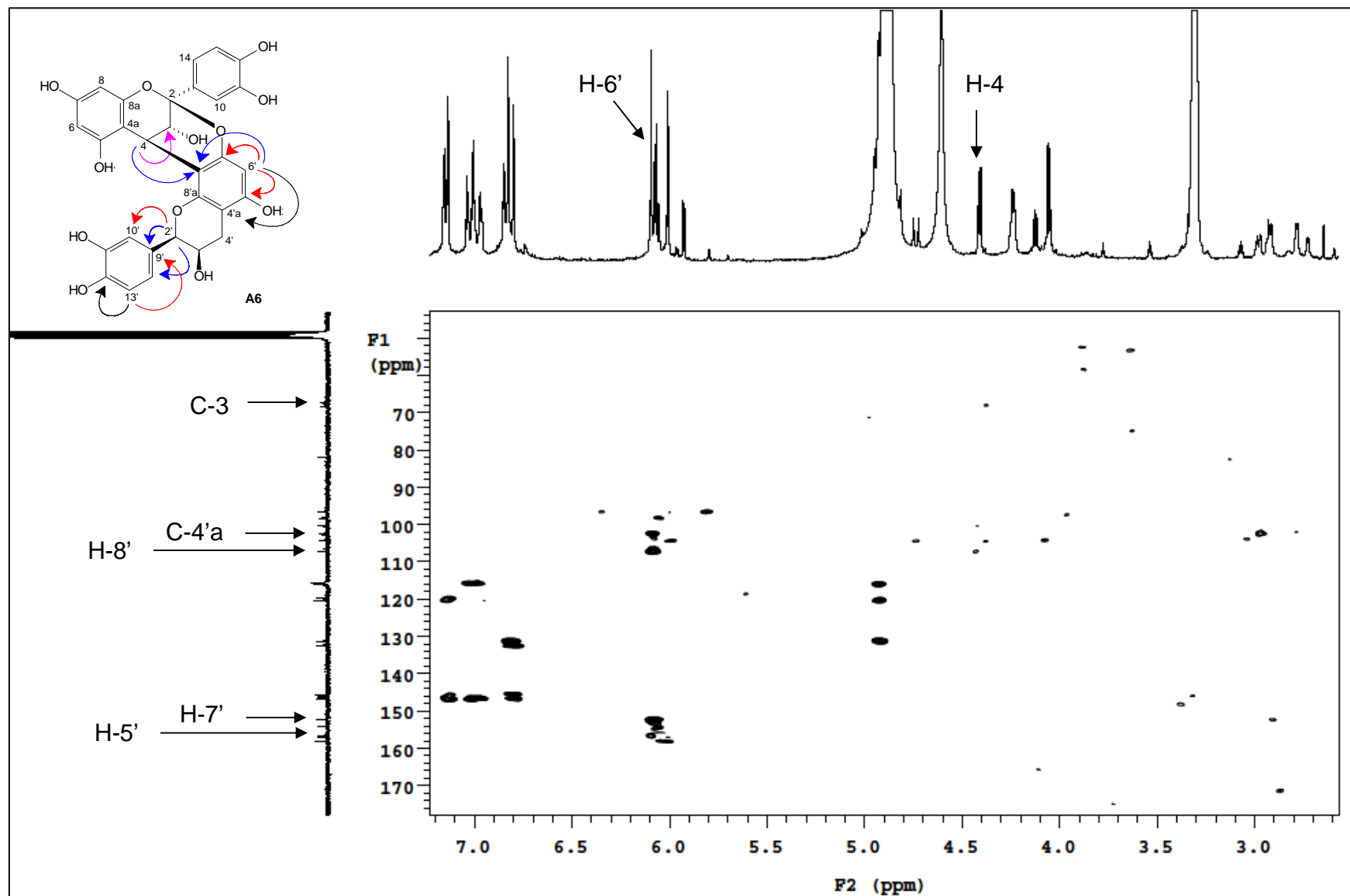


Fig. 46: Mapa de contornos gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A6.

Tabela 49: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHSQC para a substância **A6** em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para a procianidina A_2 .

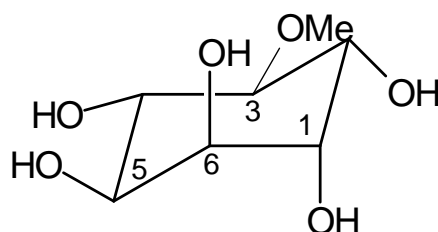
C	A6	$^1\text{H}/\text{HSQC}$	Procianidina A_2^{a} / H	
2	100,3 (C)		100,2	
3	68,2 (CH)	4,05 $d/J=3,3$ Hz	68,1	4,05 $d/J=3,4$ Hz
4	29,4 (CH)	4,40 $d/J=3,3$ Hz	29,3	4,39 $d/J=3,4$ Hz
4a	104,4 (C)		104,3	
5	157,2 (C)		157,1	
6	98,4 (CH)	6,00 $d/J=2,4$ Hz	98,3	6,00 $d/J=2,3$ Hz
7	158,3 (C)		158,2	
8	96,8 (CH)	6,06 $d/J=2,4$ Hz	96,7	6,07 $d/J=2,3$ Hz
8a	154,4 (C)		154,3	
9	132,6 (C)		132,5	
10	115,8 (CH)	7,14 $d/J=2,1$ Hz	115,7	7,14 $d/J=2,4$ Hz
11	146,5 (C)		146,3	
12	145,8 (C)		145,7	
13	116,2 (CH)	6,81 $d/J= 8,1$ Hz	116,1	6,82 $d/J=8,2$ Hz
14	120,5 (CH)	7,02 $dd/J= 1,8$ e 3,9 Hz	120,4	7,07 $dd/J=2,4$ e 8,2 Hz
2'	81,9 (CH)	4,91 <i>br.s</i>	81,8	4,91 <i>br.s</i>
3'	67,2 (CH)	4,23 $d/J=3,3$ Hz	67,0	4,23 <i>br.s</i>
4'	30,1 (CH_2)	Ha 2,75 $dd/J=2,4$ e 17,1 Hz Hb 2,94 $dd/J=2,4$ e 17,3 Hz	29,9	Ha 2,74 $dd/J=3,2$ e 17,3 Hz Hb 2,95 $dd/J=4,6$ e 17,3 Hz
4'a	102,6 (C)		102,5	
5'	156,8 (C)		156,7	
6'	96,6 (CH)	6,08 <i>sl</i>	96,5	6,09 <i>s</i>
7'	152,5 (C)		152,3	
8'	107,4 (C)		107,3	
8'a	152,3 (C)		152,3	
9'	131,4 (C)		131,2	
10'	115,8 (CH)	7,12 $d/J=2,1$ Hz	115,7	7,13 $d/J=2,2$ Hz
11'	146,9 (C)		146,8	
12'	146,2 (C)		146,0	
13'	116,1 (CH)	6,79 $d/J= 8,1$ Hz	116,0	6,81 $d/J=8,2$ Hz
14'	119,9 (CH)	6,99 $dd/J= 1,5$ e 3,9 Hz	119,8	6,99 $dd/J=2,2$ e 8,2 Hz

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD); (^a Lou *et al.*, 1999; CD_3OD)

Os dados espectroscópicos obtidos para a substância **A6** indicaram que a mesma tratava-se de um dímero, os quais foram então comparados com substâncias contendo este esqueleto, sendo consistentes com os da **epicatequina-(2 β →7, 4 β →8)-epicatequina (procianidina A₂)**, (Lou *et al.*, 1999) como mostrado na **Tabela 54**.

A **procianidina A₂**, segundo literatura apresenta atividade antioxidante, anticâncer, anti-inflamatória e forte ação antialérgica (David *et al.*, 2002; Pessuto *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2007 e Nandakumar *et al.*, 2008).

5.9. Substância A11



A11

A substância **A11** foi obtida da fração aquosa das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* como um sólido amarelo.

No espectro de RMN ¹H (**Figura 47**) para **A11**, observou-se um singlete em δ_H 3,60, devido a presença de um grupo OMe (s; OCH₃) e seis átomos de H-metino na forma de: duplete em δ_H 3,88 (*d*, J= 2,4 Hz; H-1 e 6), de duplos dupletos em δ_H 3,74 (*dd*, J= 9,9 e 2,4 Hz; H-2), 3,69 (*dd*, J= 9,9 e 2,4 Hz; H-5), 3,25 (*dd*, J= 9,6 e 9,0 Hz; H-3) e um tripleto em δ_H 3,59 (*t*, J=9,9 Hz; H-4) (**Tabela 52**).

Nos espectros de RMN ¹³C/DEPT (**Figura 48**) foi verificada a presença de 7 sinais, onde 6 são de grupos CH referentes aos carbonos em: δ_C 84,8 (C-3), 74,2 (C-4), 73,7 (C-6), 73,4 (C-1), 72,5 (C-5), 72,0 (C-2) e um grupo metílico em δ_C 60,8 (OCH₃) (**Tabela 52**).

No espectro de gHSQC (**Figura 49 e Tabela 52**) de **A11** sugeriu a presença de uma seqüência de seis grupos CH consecutivos, e suas constantes de acoplamento de RMN de ¹H foram de boa concordância com aqueles previamente relatados (Della-Greca *et al.*, 2007).

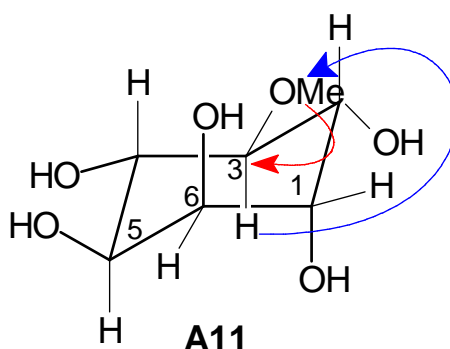
No mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ gCOSY (**Figura 50**) foram observadas correlações, entre o H-1 (δ 3,88) com H-5 (δ_{H} 3,69); entre o H-2 (δ_{H} 3,74) com os H-3 (δ_{H} 3,25) e H-6 (δ_{H} 3,88); entre o H-5 (δ_{H} 3,69) com H-4 (δ_{H} 3,59) e também entre o H-3 (δ_{H} 3,25) com H-4 (δ_{H} 3,59). A análise das correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY estão apresentados na **Tabela 50**.

Tabela 50: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para **A11**.

δ ^1H (mult.; J em Hz; H)	δ ^1H (mult.; J em Hz; H)
3,88 (<i>d</i> ; 2,4; H-1)	3,69 (<i>dd</i> ; 9,9 e 2,4; H-5)
3,74 (<i>dd</i> ; 9,9 e 2,4; H-2)	3,25 (<i>dd</i> ; 9,6 e 9,0; H-3)
3,74 (<i>dd</i> ; 9,9 e 2,4; H-2)	3,88 (<i>d</i> ; 2,4; H-6)
3,69 (<i>dd</i> ; 9,9 e 2,4; H-5)	3,59 (<i>t</i> ; 9,9; H-4)
3,25 (<i>dd</i> ; 9,6 e 9,0; H-3)	3,59 (<i>t</i> ; 9,9; H-4)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; D₂O)

A posição do grupo OCH₃ no C-3 (δ_{C} 84,8) foi confirmada pela correlação do H-3 (δ_{C} 3,25) com o C-7 (OCH₃) e dos H-metílicos (δ_{C} 3,60) com o C-3 (δ_{C} 84,8) através do mapa de contornos gHMBC, o que confirma um poliol do tipo inositol (**Figura 51**).



Outras correlações observadas em gHMBC estão apresentadas na **tabela 51**. Todos os dados espectroscópicos observados permitiram a atribuição dos deslocamentos químicos de todos os carbonos e hidrogênios da substância **A11**.

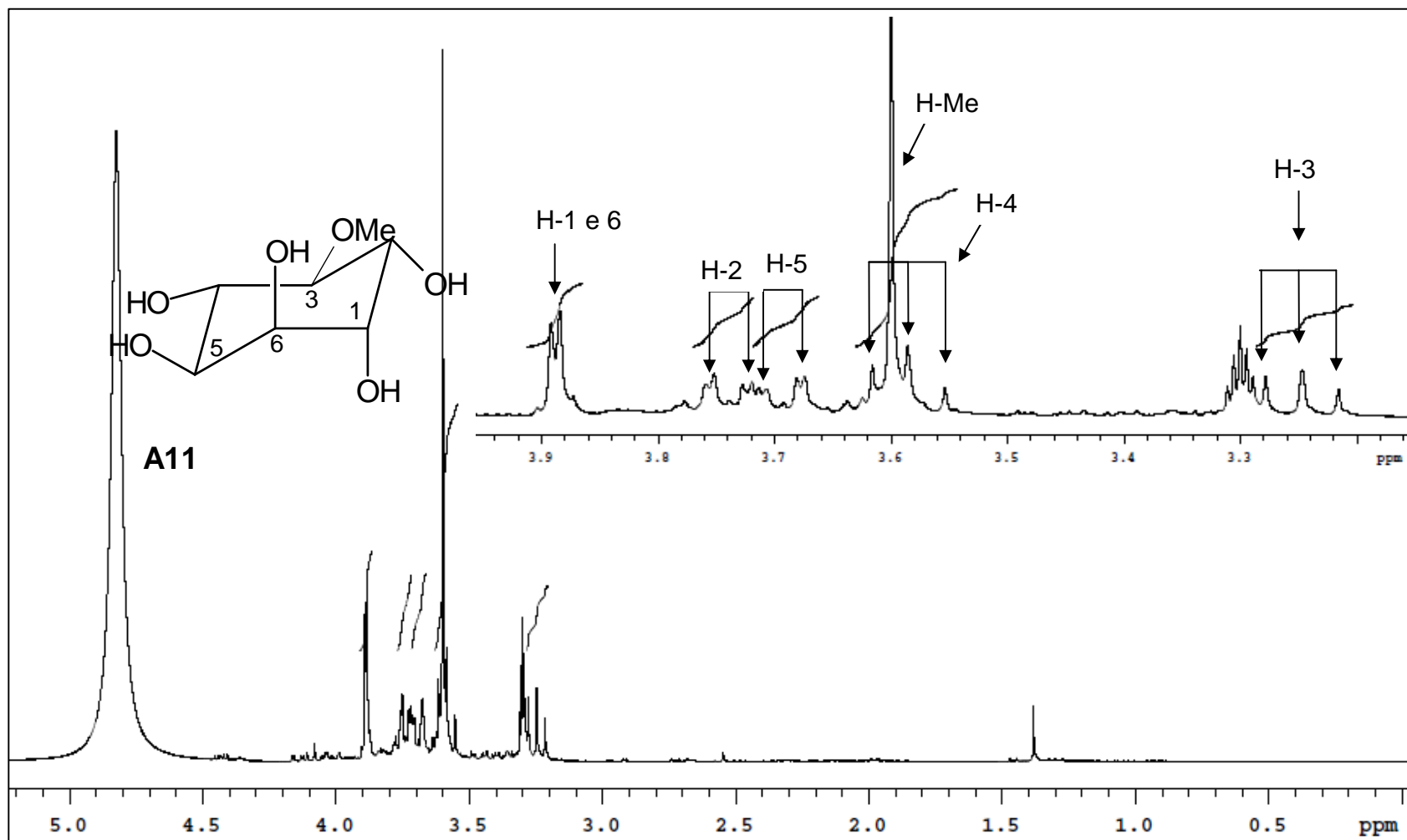


Fig. 47: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) para a substância **A11**.

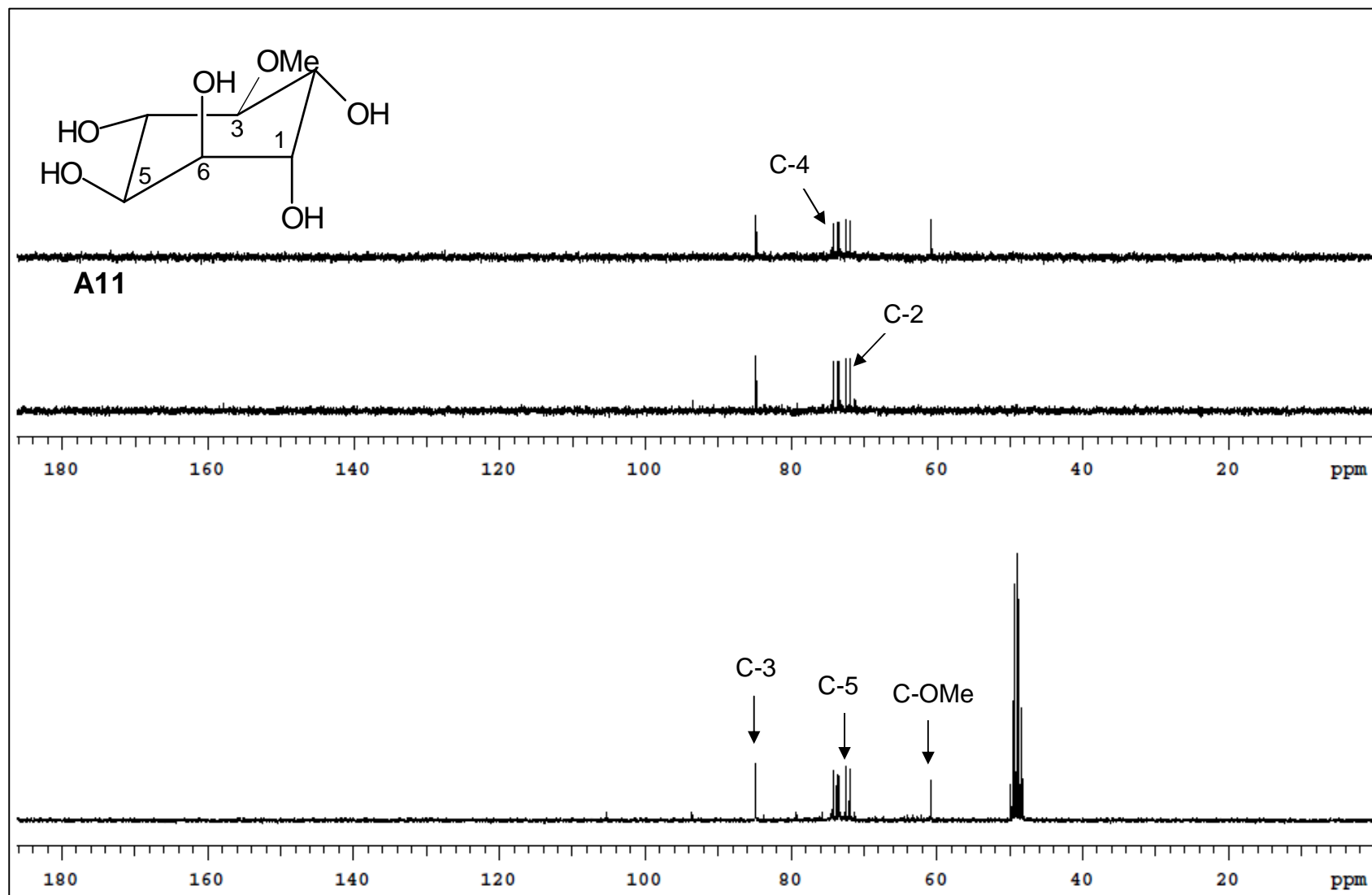


Fig. 48: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a substância A11.

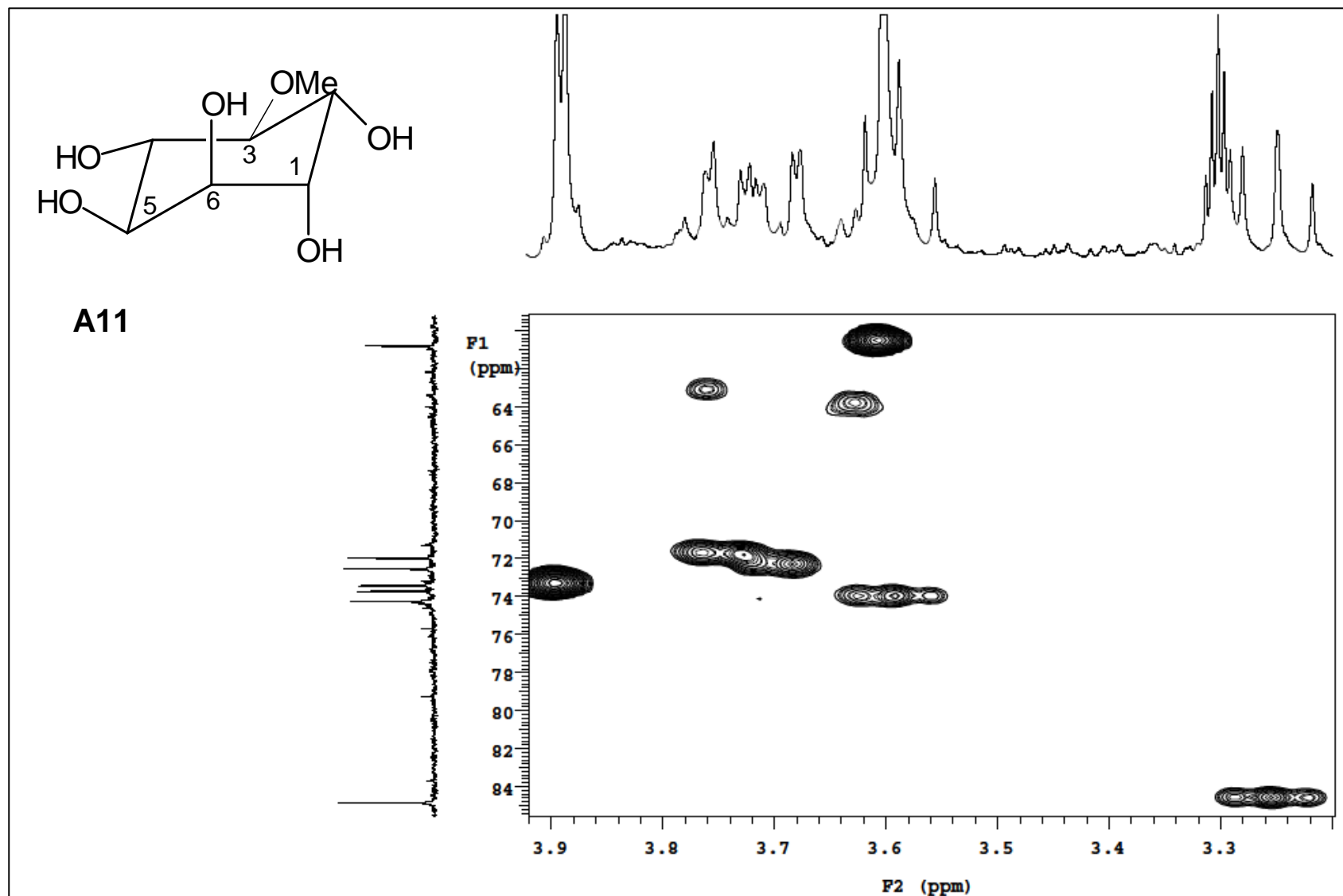


Fig. 49: Mapa de contornos gHSQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A11.

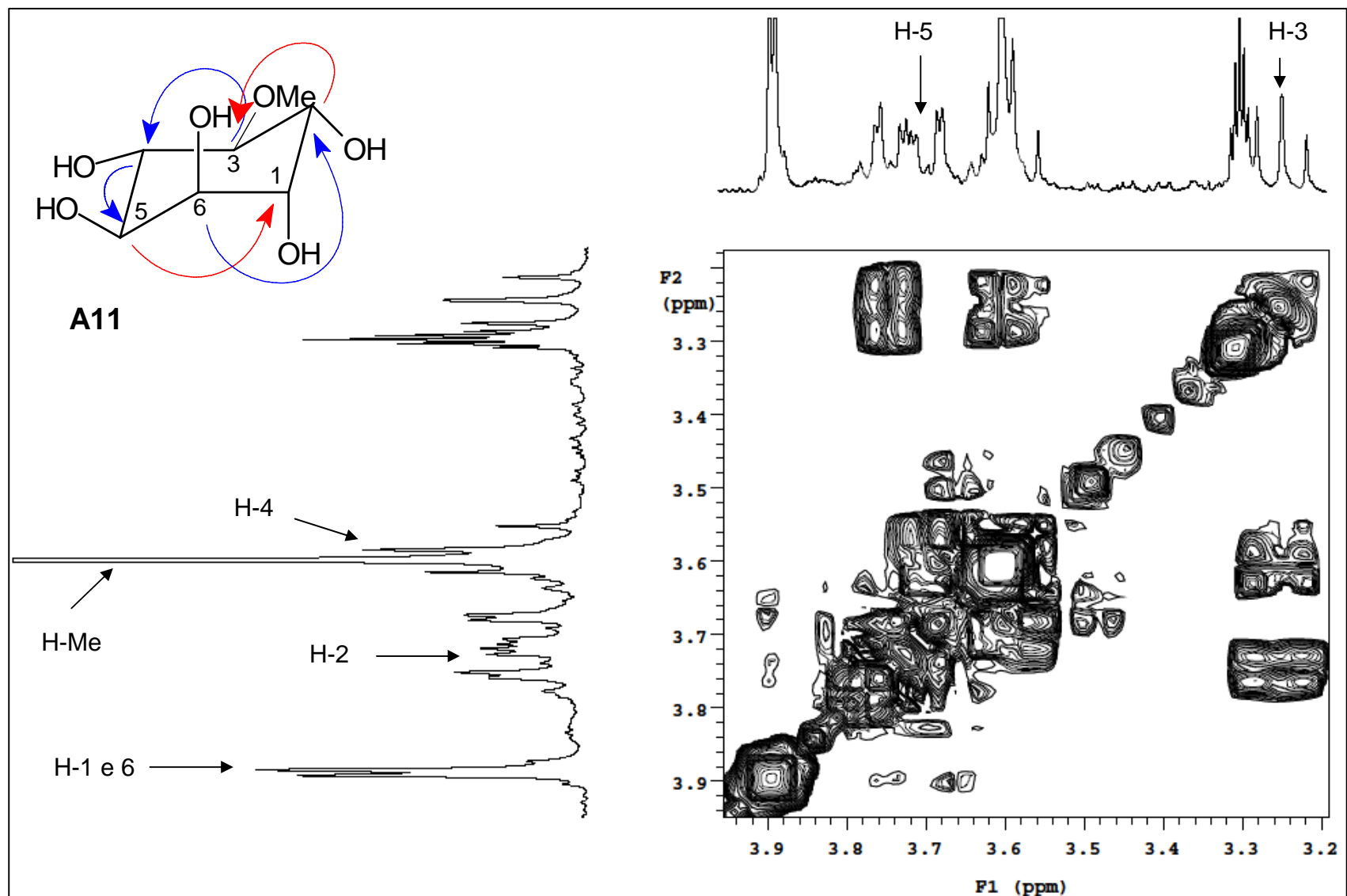


Fig. 50: Mapa de contornos gCOSY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância A11.

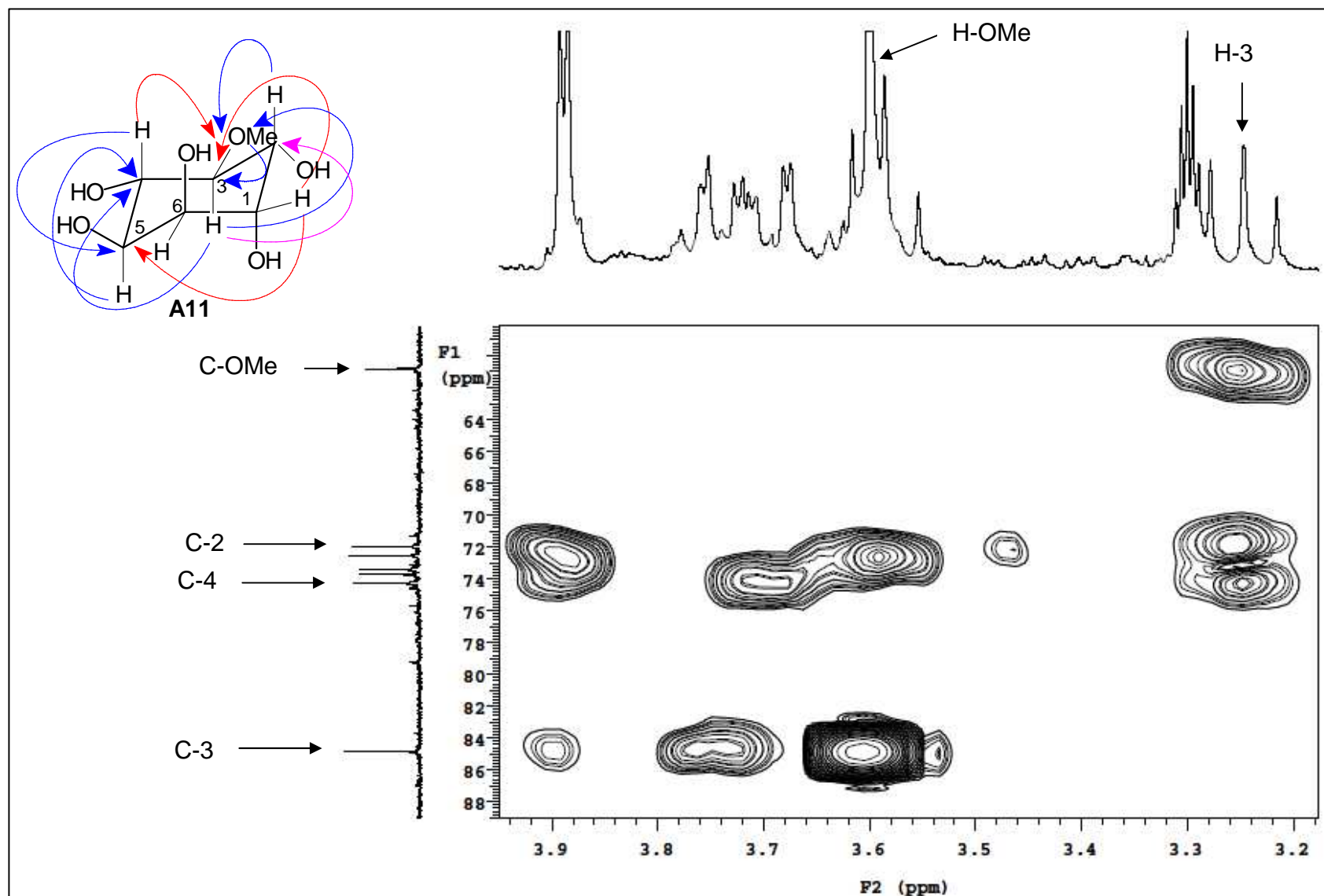


Fig. 51: Mapa de contornos gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância A11.

Tabela 51: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para **A11**.

$\delta_{\text{H}} (^1\text{H})$	$\delta_{\text{C}} (^{13}\text{C})$
3,88 (1)	84,8 (C3) e 72,5 (C5)
3,74 (2)	84,8 (C3)
3,69 (5)	74,2 (C4)
3,60 (H-OCH ₃)	84,8 (C3)
3,59 (4)	84,8 (C3) e 72,5 (C5)
3,25 (3)	72,0 (C2), 74,2 (C4) e 60,8 (OCH ₃)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; D₂O)

Os dados espectroscópicos uni e bidimensionais obtidos para a substância **A11** indicaram que a mesma trata-se de um poliol do tipo inositol os quais foram comparados com os encontrados na literatura sendo consistentes com **3-O-metil-qui-ro-inositol** (1R,2R,3S,4R,5S,6R)-6-metoxicicloexano-1,2,3,4,5-pentol (DellaGreca, 2007) (**Tabela 52**).

O estabelecimento da estereoquímica relativa de **3-O-metil-qui-ro-inositol** foi baseada nas correlações entre os ^1H observados no espectro de gCOSY e nos valores das constantes de acoplamento onde os H-1 e H-6 estão na equatorial.

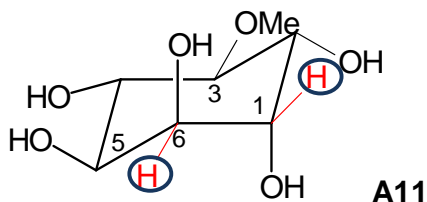


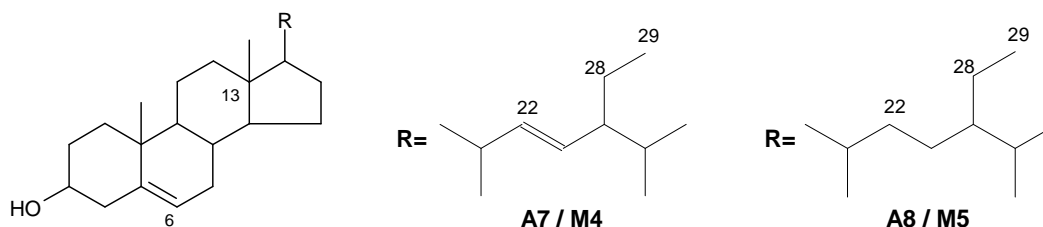
Tabela 52: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHSQC para a substância **A11** em D₂O [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para 3-O-metil-qui-ro-inositol.

Carbono	A11	$^1\text{H}/\text{HSQC}$	Inositol ^a	H
1	73,4 (CH)	3,88 $d/J= 2,4$ Hz	74,2	3,73 ($dd, 2,0, 9,5$)
2	72,0 (CH)	3,74 $dd/J= 9,9, 2,4$ Hz	72,5	3,91 ($dd, 2,0, 9,5$)
3	84,8 (CH)	3,25 $dd/J= 9,6, 9,0$ Hz	85,4	3,25 ($dd, 9,0, 9,5$)
4	74,2 (CH)	3,59 $t/J= 9,9$ Hz	74,8	3,58 ($t, 9,5$)
5	72,5 (CH)	3,69 $dd/J= 9,9, 2,4$ Hz	73,0	3,72 ($dd, 2,0, 9,5$)
6	73,7 (CH)	3,88 $d/J= 2,4$ Hz	74,0	3,89 ($d, 2,0$)
7	60,8 (OCH ₃)	3,60 s	61,2 (OCH ₃)	3,35 (s)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; D₂O); (^a DellaGreca, 2007; CDCl₃)

Esta substância segundo literatura apresenta atividade na inibição da germinação de sementes de alface (Della-Greca, 2007).

5.10. Substâncias A7/M4 e A8/M5



As substâncias **A7** + **A8** foram isoladas como uma mistura nas frações hexânica das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* e nas frações hexânica das folhas e galhos e clorofórmica dos galhos de *M. hirtum* (**M4** + **M5**), como cristais brancos os quais foram caracterizados por RMN.

No espectro de RMN ^1H (**Figura 52**) da mistura **A7** + **A8** e **M4** + **M5** foi observado um duplete em δ_{H} 5,36 ($J = 5,4$ Hz) que indicou o hidrogênio no carbono olefínico H-6, e um multiplete na região δ_{H} 3,48 – 3,59 indicando o hidrogênio carbinólico H-3. Também foram observados dois duplos dupletos na região δ_{H} 4,98 – 5,20 correspondentes aos hidrogênios dos carbonos olefínicos 22 e 23, sugerindo que o composto isolado é a mistura de dois esteróides, o estigmasterol e o β -sitosterol. E os sinais entre δ_{H} 0,68 a 1,03 são característicos de grupos metilas (**Tabela 53**).

Tabela 53 - Dados de RMN ^1H da mistura das substâncias **A7** + **A8** e **M4** + **M5** em CDCl_3 [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para estigmasterol e β -sitosterol.

Metilas	A7/M4	Estigmasterol ^a	A8/M5	β -Sitosterol ^a
18	0,70 s	0,698 s	0,69 s	0,681 s
19	1,02 s	1,010 s	1,02 s	1,010 s
21	0,97 d/J = 7,8 Hz	1,021 d/J = 6,6 Hz	0,93 d/J = 6,6 Hz	0,921 d/J = 6,6 Hz
26	0,84 d/J = 6,6 Hz	0,847 d/J = 6,6 Hz	0,84 d/J = 6,6 Hz	0,835 d/J = 6,6 Hz
27	0,88 d/J = 3,3 Hz	0,786 d/J = 6,6 Hz	0,84 d/J = 6,6 Hz	0,835 d/J = 6,3 Hz
29	0,86 s	0,825 d/J = 6,8 Hz	0,81 s	0,825 d/J = 6,8 Hz

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CDCl_3);

(^a Goulart *et. al.*, 1993; CDCl_3)

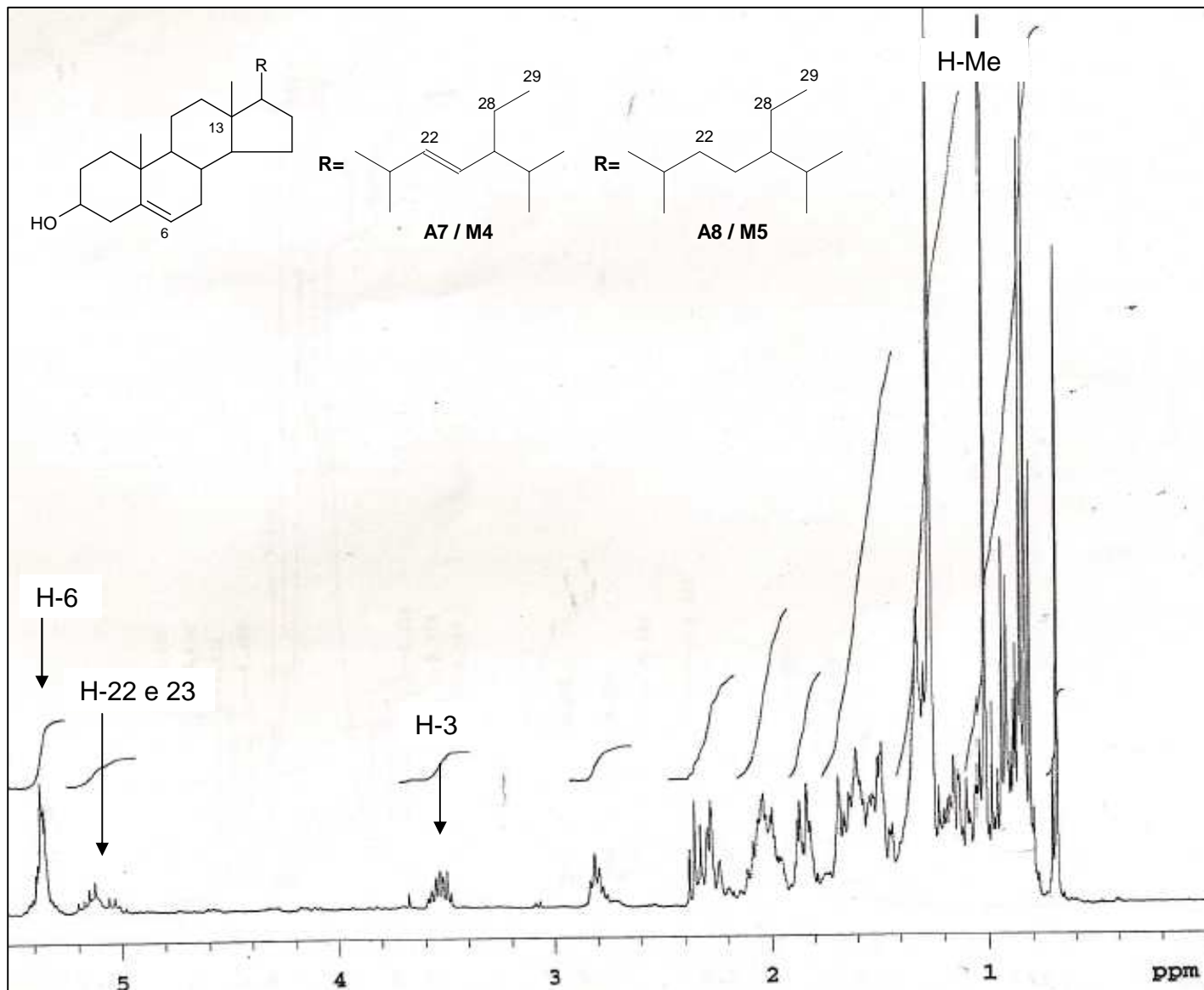


Fig. 52: Espectro de RMN de ^1H (CD₃OD; 300,06 MHz) para a mistura das substâncias **A7 + A8** e **M4 + M5**.

Analisando o espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 53**) foram observados sinais em δ_{C} 140,9 e 122,0 referentes aos carbonos olefínicos 5 e 6, respectivamente, um sinal em δ_{C} 72,0, característico de carbono carbinólico (C-3) e vários sinais na região δ_{C} 12,0 – 20,0 representando as metilas nas posições 18, 19, 21, 26, 27 e 29. Estes sinais estão presentes tanto no estigmasterol como no β -sitosterol, mas a presença de sinais fracos em δ_{C} 138,6 e 130,5 referentes aos carbonos olefínicos 22 e 23 respectivamente, presentes apenas no estigmasterol, sugerem que o mesmo se encontra em quantidade ínfima na mistura, nas frações em que foram isolados (**Tabela 54**).

Os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT (**Figura 53**) foram comparados com os dados da literatura para esteróides (Goulart *et. al.*, 1993). A partir da análise dos dados (**Tabela 54**) foi possível confirmar que a mistura isolada contém os esteróides: **24 α -etil-colest-5,22-dienol (estigmasterol) A7/M4** e **24 α -etil-colest-5-enol (β -sitosterol) A8/M5**, estas substâncias possuem atividades anti-inflamatórias (Cechinel Filho, 2000).

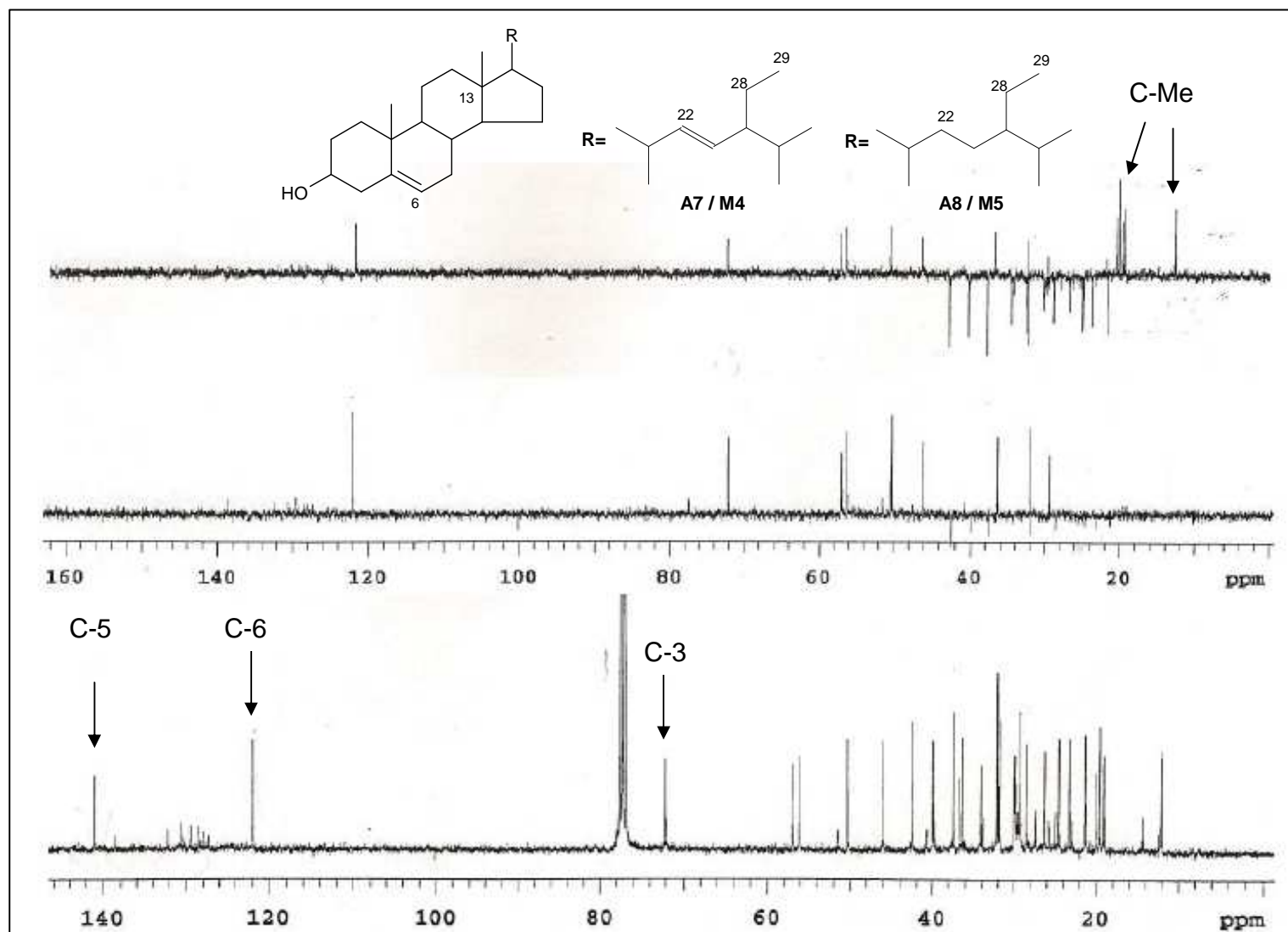


Fig. 53: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a mistura das substâncias A7 + A8 e M4 + M5.

Tabela 54: Dados de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para a mistura das substâncias **A7 + A8 e M4 + M5** em CDCl_3 [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para os esteróides estigmasterol e β -sitosterol.

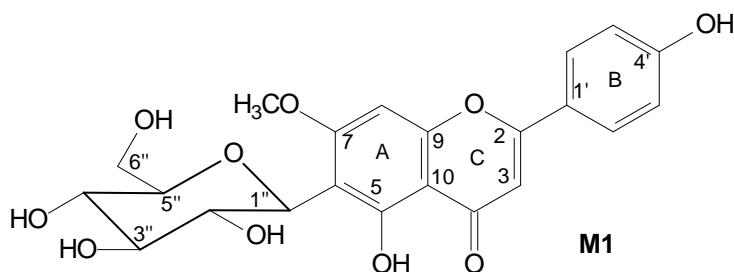
C	A7/M4	A8/M5	Estigmasterol^a	β-Sitosterol^a
1	37,4 (CH ₂)	37,4 (CH ₂)	37,3 (CH ₂)	37,3 (CH ₂)
2	31,8 (CH ₂)	31,8 (CH ₂)	31,6 (CH ₂)	31,6 (CH ₂)
3	72,0 (CH)	72,0 (CH)	71,9 (CH)	71,9 (CH)
4	42,5 (CH ₂)	42,5 (CH ₂)	42,3 (CH ₂)	42,3 (CH ₂)
5	140,9 (C)	140,9 (C)	140,7 (C)	140,7 (C)
6	122,0 (CH)	122,0 (CH)	121,7 (CH)	121,7 (CH)
7	32,2 (CH ₂)	32,2 (CH ₂)	31,9 (CH ₂)	31,9 (CH ₂)
8	32,1 (CH)	32,1 (CH)	31,9 (CH)	31,9 (CH)
9	50,3 (CH)	50,3 (CH)	50,1 (CH)	50,1 (CH)
10	36,7 (C)	36,7 (C)	36,4 (C)	36,4 (C)
11	21,3 (CH ₂)	21,3 (CH ₂)	21,1 (CH ₂)	21,1 (CH ₂)
12	39,9 (CH ₂)	39,9 (CH ₂)	39,7 (CH ₂)	39,8 (CH ₂)
13	42,5 (C)	42,5 (C)	42,3 (C)	42,3 (C)
14	57,0 (CH)	56,9 (CH)	56,9 (CH)	56,8 (CH)
15	24,6 (CH ₂)	24,6 (CH ₂)	24,4 (CH ₂)	24,3 (CH ₂)
16	28,5 (CH ₂)	28,5 (CH ₂)	28,2 (CH ₂)	28,2 (CH ₂)
17	56,1 (CH)	56,2 (CH)	55,9 (CH)	56,1 (CH)
18	12,1 (CH ₃)	12,1 (CH ₃)	11,9 (CH ₃)	11,8 (CH ₃)
19	19,6 (CH ₃)	19,6 (CH ₃)	19,4 (CH ₃)	19,4 (CH ₃)
20	39,9 (CH)	36,4 (CH)	40,5 (CH)	36,2 (CH)
21	20,0 (CH ₃)	19,2 (CH ₃)	21,2 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)
22	138,6 (CH)	34,1 (CH ₂)	138,4 (CH)	33,9 (CH ₂)
23	130,5 (CH)	37,4 (CH ₂)	129,3 (CH)	39,1 (CH ₂)
24	51,4 (CH)	46,0 (CH)	51,2 (CH)	45,8 (CH)
25	29,9 (CH)	29,3 (CH)	31,9 (CH)	26,0 (CH)
26	19,2 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)	18,8 (CH ₃)
27	20,1 (CH ₃)	20,1 (CH ₃)	19,0 (CH ₃)	19,8 (CH ₃)
28	27,4 (CH ₂)	26,2 (CH ₂)	25,4 (CH ₂)	23,1 (CH ₂)
29	12,3 (CH ₃)	12,2 (CH ₃)	12,3 (CH ₃)	12,0 (CH ₃)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CDCl_3); (^a Goulart *et. al.*, 1993; CDCl_3)

O estudo químico de *Machaerium hirtum* (folhas e galhos) levou ao isolamento de 7 substâncias. Destas, duas pertence à classe das flavanonas (**M1** e **M2**), uma a classe dos alcaloides (**M3**), dois pertencem a dos esteróides (**M4** e **M5**) e dois a classe dos triterpenóides (**M6** e **M7**).

A elucidação estrutural das substâncias isoladas foi realizada através da análise de seus dados espectroscópicos (RMN uni e bidimensionais) e comparação com dados obtidos da literatura, conforme descrito a seguir.

5.11. Substância M1



A substância **M1** foi isolada das frações acetato de etila das folhas e dos galhos de *M. hirtum*. Foi obtido como um sólido amarelo castanho que foi submetido à análise por espectroscopia de RMN.

O espectro de massas de baixa resolução (**Figura 54**), obtido por inserção direta via sólido, apresentou o pico base em m/e 298 $[C_{16}H_{10}O_6]^+$, não mostrou o pico do íon molecular e apresentou os fragmentos m/e 267 correspondente a perda de $CH_3O\cdot$ a partir do pico base, m/e 297 correspondente a perda de um $H\cdot$ também a partir do pico base (Colombo *et al.*, 2009) (Esquema **8**) e ainda foram observados os picos em m/e 179 $[C_9H_7O_4]^+$, m/e 149 $[C_5H_9O_5]^+$ e 120 $[C_4H_8O_4]^+$.

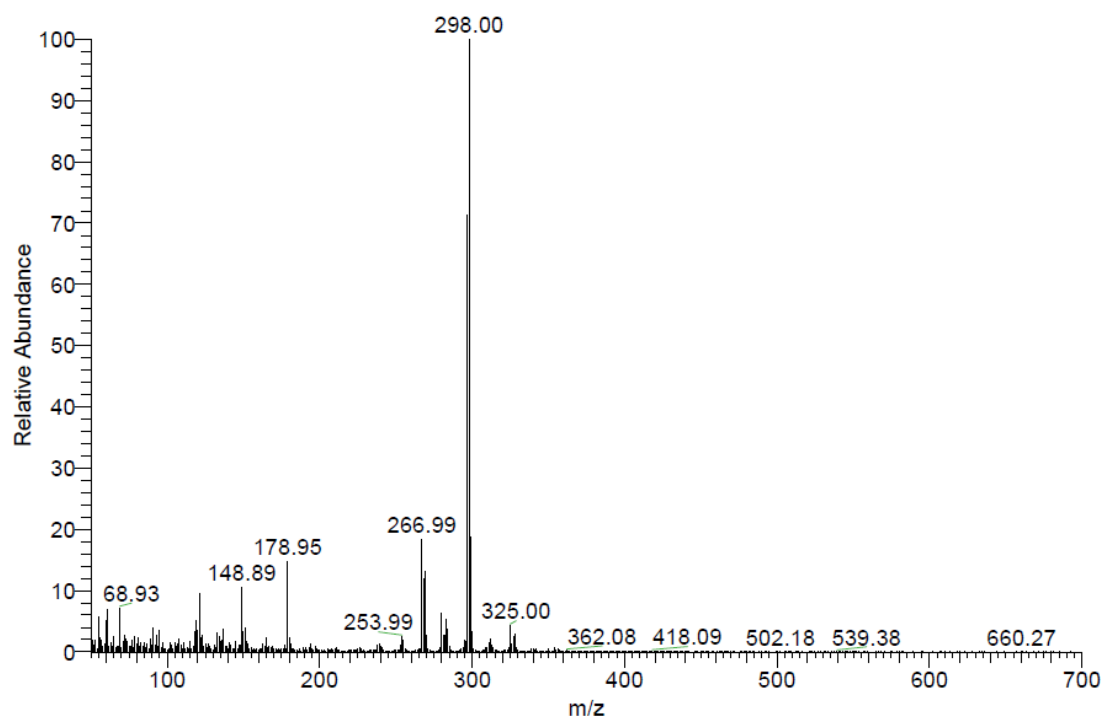
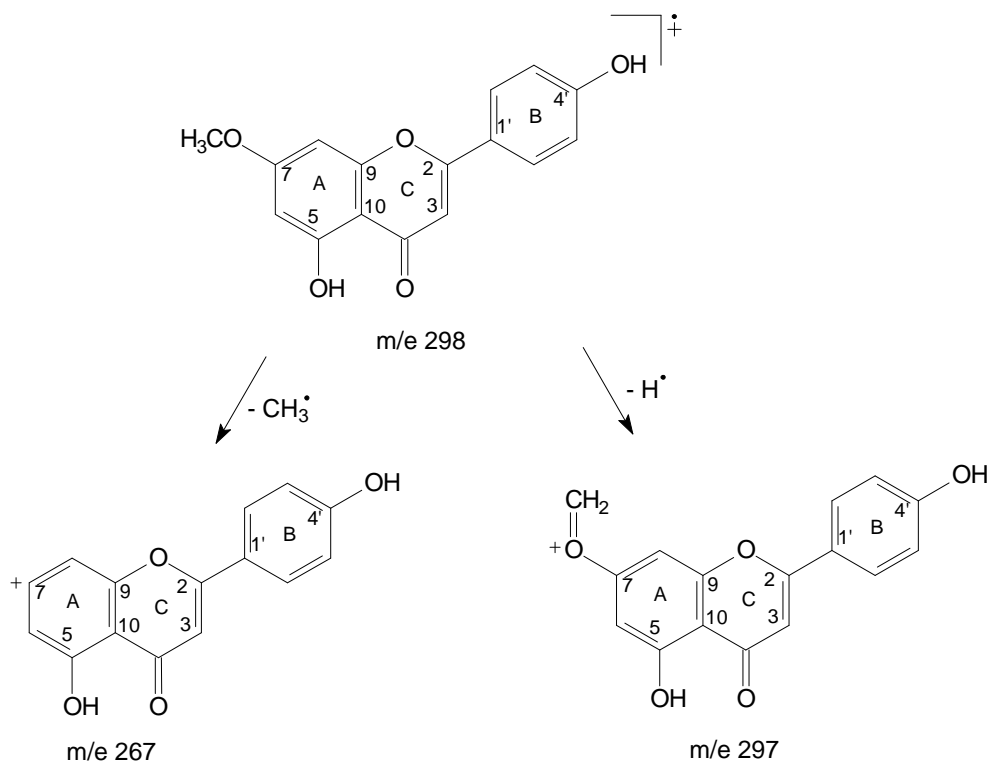


Figura 54: Espectro de massas (70 eV) de M1



Esquema 8: Propostas de fragmentações para os picos m/e 267 e m/e 297 do Espectro de Massas da substância M1.

No espectro de RMN ^1H (**Figura 55**) da substância **M1** foram observados dois dupletos em δ_{H} 7,89 ($J= 8,7$ Hz, H-2' e H-6') e 6,93 ($J= 8,7$ Hz, H-3' e H-5') evidenciando um anel **B** *p*-hidroxilado. Ainda foram observados 3 singletos em δ_{H} 6,75 para o anel **A** trissubstituído, δ_{H} 6,66 característico de H-3 de flavona e δ_{H} 3,93 representante de um grupo metoxila na molécula. Os sinais na região de δ_{H} 4,84 – 3,40 e a ausência de hidrogênio anomérico evidenciaram a presença de uma unidade C-glicosídica ligada ao anel **A** da apigenina como aglicona (**Tabela 57**).

Os espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 56**) apresentaram 22 carbonos, dentre esses, 15 são característicos da apigenina como aglicona e ainda um carbono em δ_{C} 63,4 ($\text{CH}_2\text{-6''}$) e 5 carbonos na região de δ_{C} 71,6 a 82,6 que confirmaram presença de uma unidade C-glicosídica. Observou-se também um carbono em δ_{C} 57,0, característico de grupo metoxila. Através do mapa de contornos gHSQC (**Figura 57**) foram atribuídos todos os ^{13}C com seus ^1H , que auxiliaram na identificação (**Tabela 57**).

No mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ gCOSY (**Figura 58**) foram observadas correlações, entre o H-6a'' (δ_{H} 3,85) com o H-6b'' (δ_{H} 3,68) e também o H-3' e 5' (δ_{H} 6,93) com o H-2' e 6' (δ_{H} 7,89) e não haviam correlações no anel **A**. Demais correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY estão apresentados na **tabela 55**.

Tabela 55: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para **M1**.

$\delta ^1\text{H}$ (mult.; J em Hz; H)	$\delta ^1\text{H}$ (mult.; J em Hz; H)
6,93 (<i>d</i> ; 8,7; H-3' e 5')	7,89 (<i>d</i> ; 8,7 Hz; H-2' e 6')
4,43 (<i>m</i> ; H-2'')	4,82 (enc. solv.; H-1'')
3,85 (<i>m</i> ; H-6a'')	3,68 (<i>m</i> ; H-6b'')
3,41 (<i>m</i> ; H-3'')	4,43 (<i>m</i> ; H-2'')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

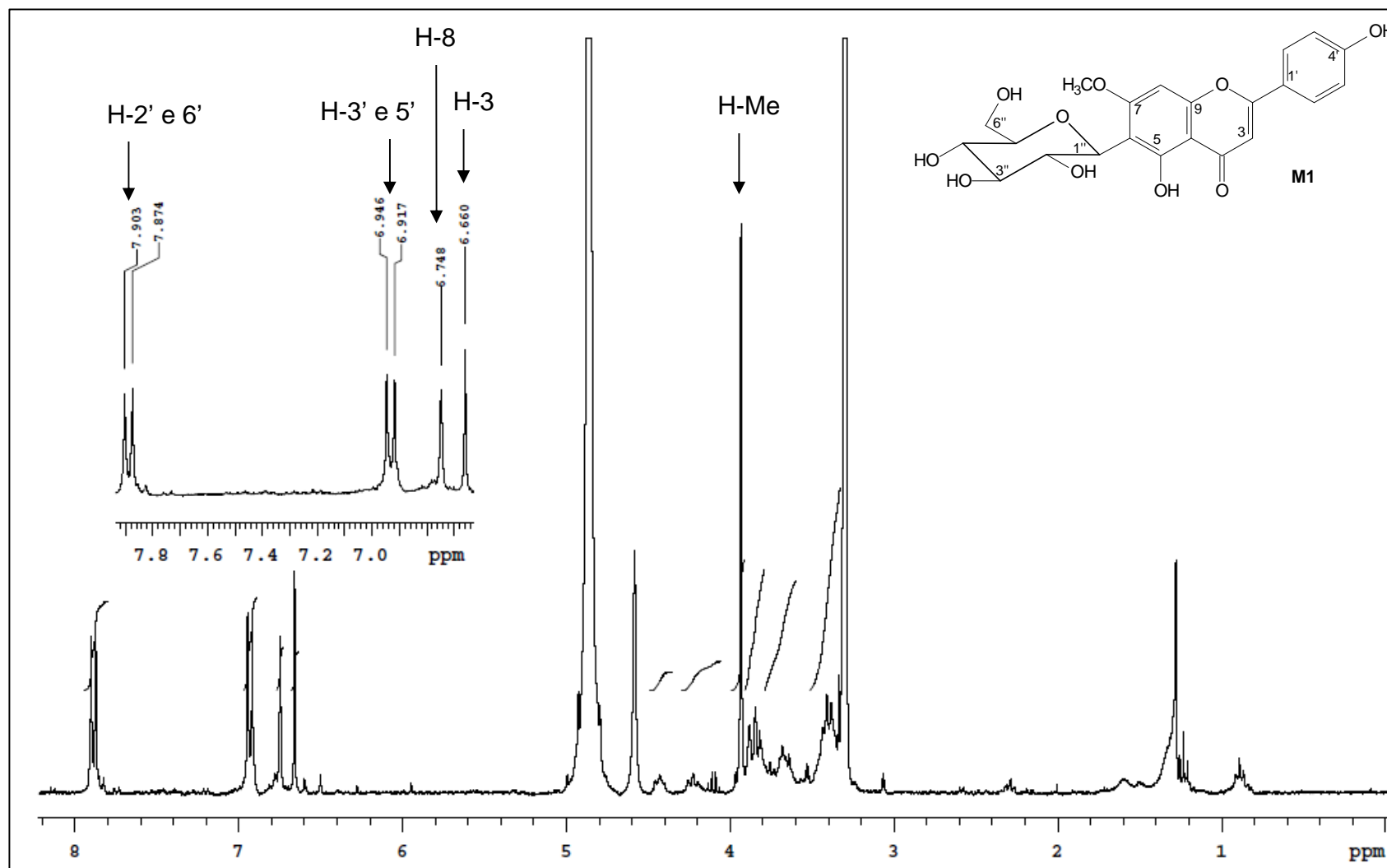


Fig. 55: Espectro de RMN de ¹H (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância M1.

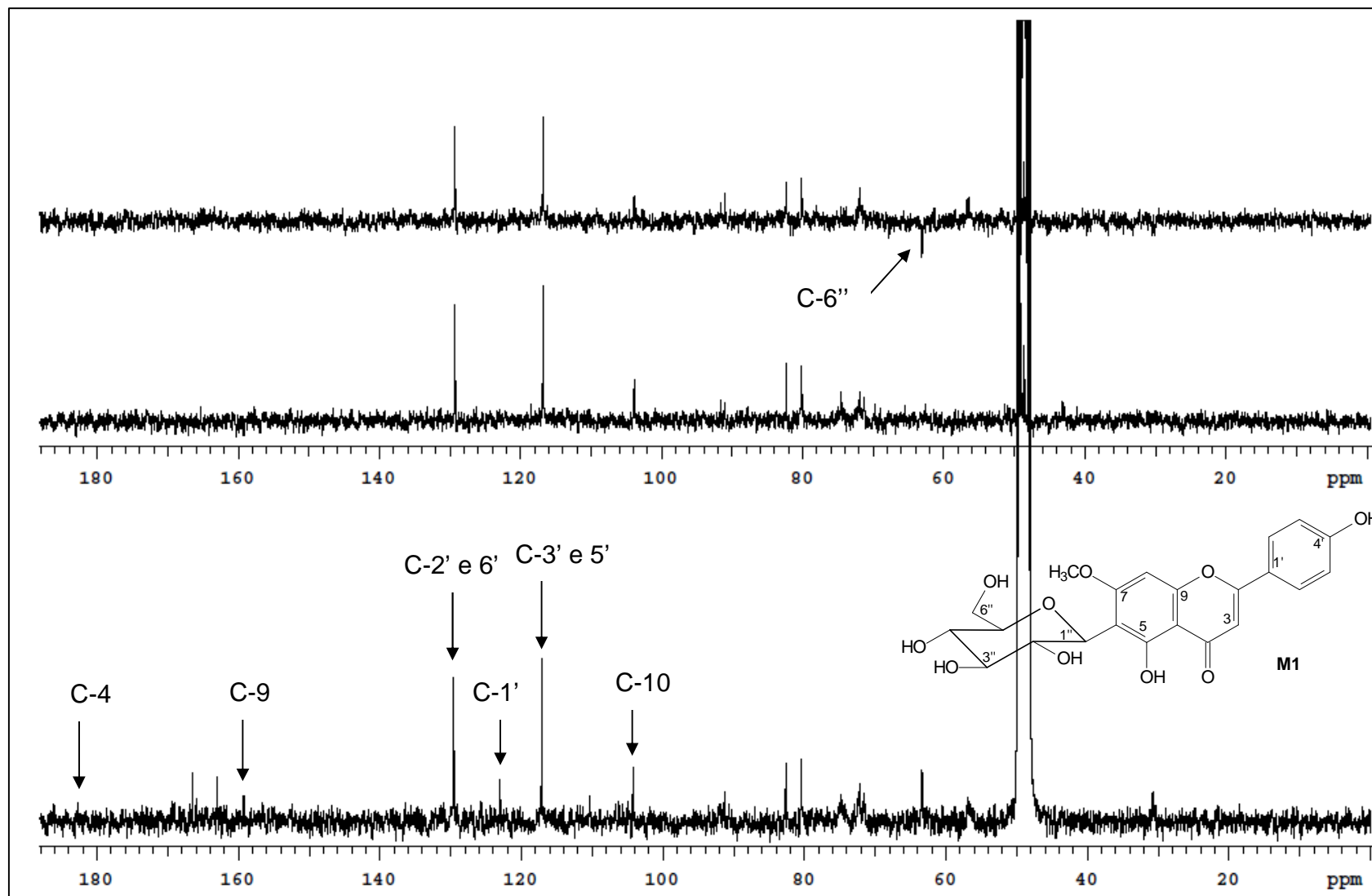


Fig. 56: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a substância M1.

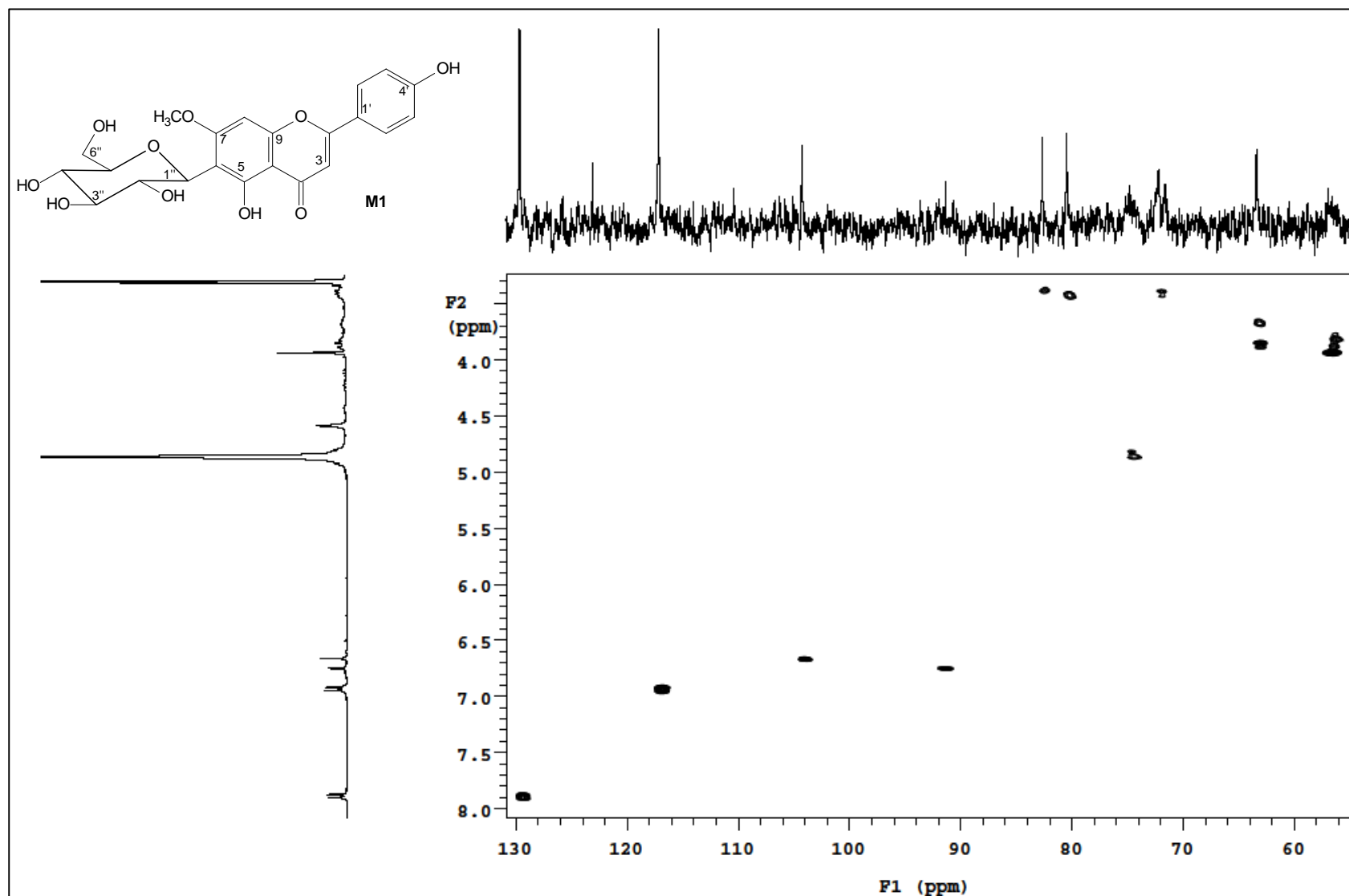


Fig. 57: Mapa de contornos gHSQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância M1.

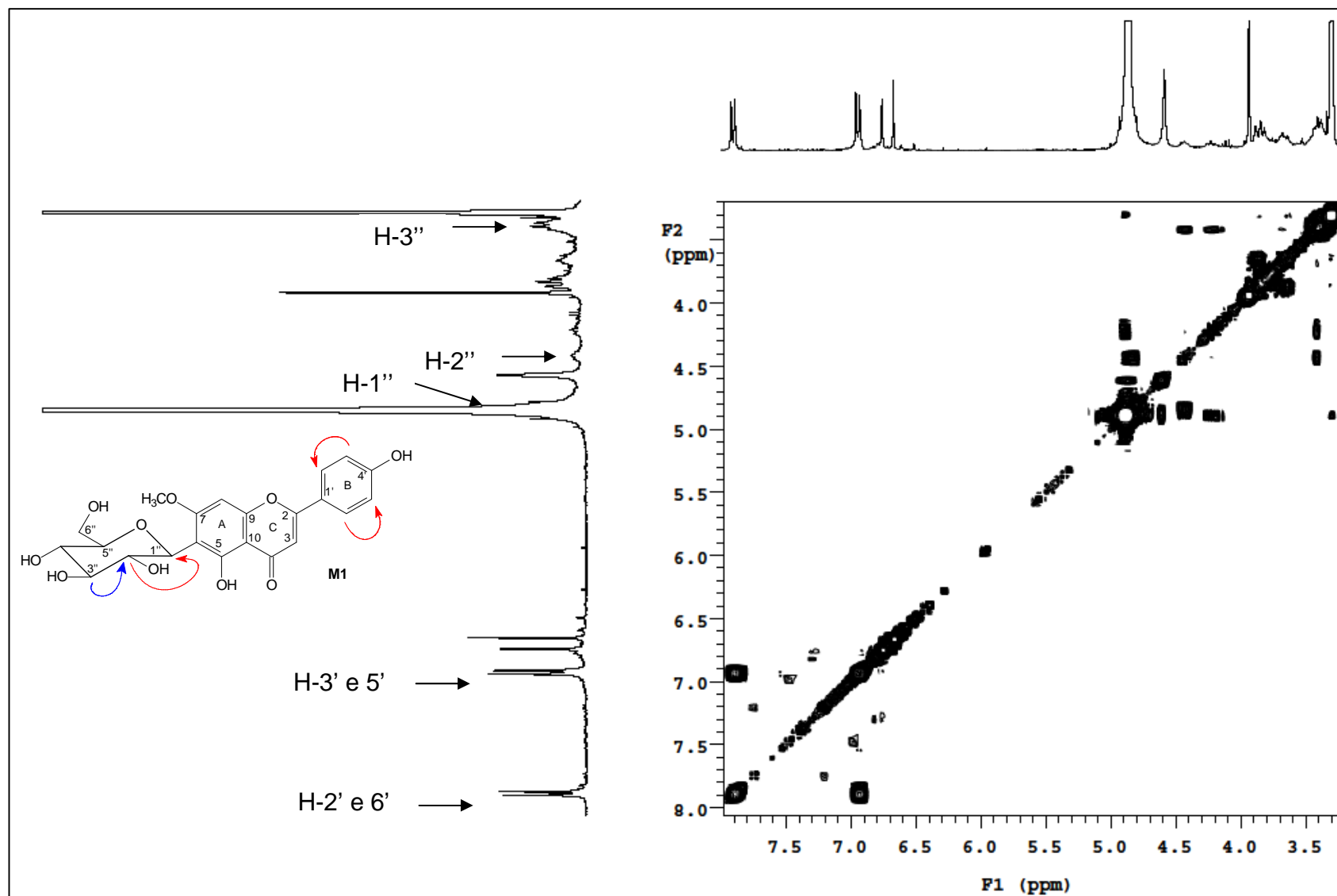


Fig. 58: Mapa de contornos gCOSY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância M1.

A posição da unidade C-glicosídica no C-6 foi confirmada pela correlação do hidrogênio H-8 (δ_H 6,75) com o C-6 (δ_C 110,3) indicando a existência de H no C-8 e ausência de H no C-6, e a posição do grupo OCH_3 foi evidenciada pela correlação em δ_H 3,93 (OCH_3) com o C7 (δ_C 166,0) através do mapa de contornos gHMBC (**Figura 59**). Outras correlações observadas em gHMBC estão apresentadas na **tabela 56**.

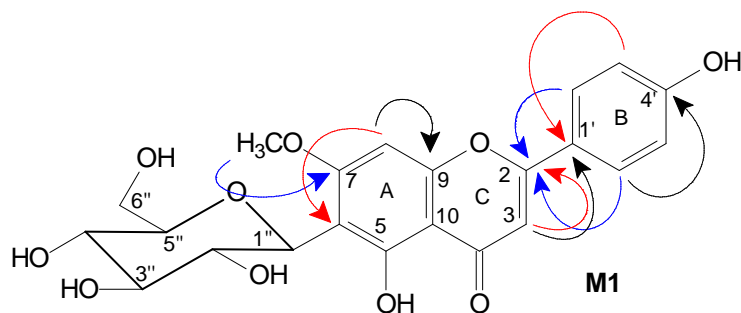
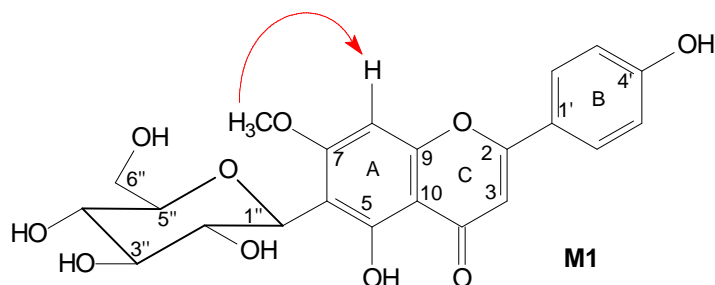


Tabela 56: Principais correlações heteronucleares $^1H \times ^{13}C$ observadas no mapa de contornos gHMBC para **M1**.

δ_H (1H)	δ_C (^{13}C)
7,89 (2'e 6')	129,6 (C2' e 6'), 166,5 (C2) e 163,0 (4')
6,93 (3' e 5')	123,0 (C1'), 117,1 (C3' e 5')
6,66 (3)	123,0 (C1'), 106,0 (10) e 166,5 (C2)
6,75 (8)	110,3 (C6), 106,0 (10) e 159,3 (9)
3,93 (OCH_3)	166,0 (C7)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD); $^a(CD_3OD)$

No mapa de contornos NOESY (**Figura 60**) foi confirmada a posição do grupo OCH_3 no C-7 (δ_C 166,0) da aglicona através da correlação dos H-OMe (δ_H 3,93) com o hidrogênio H-8 (δ_H 6,75).



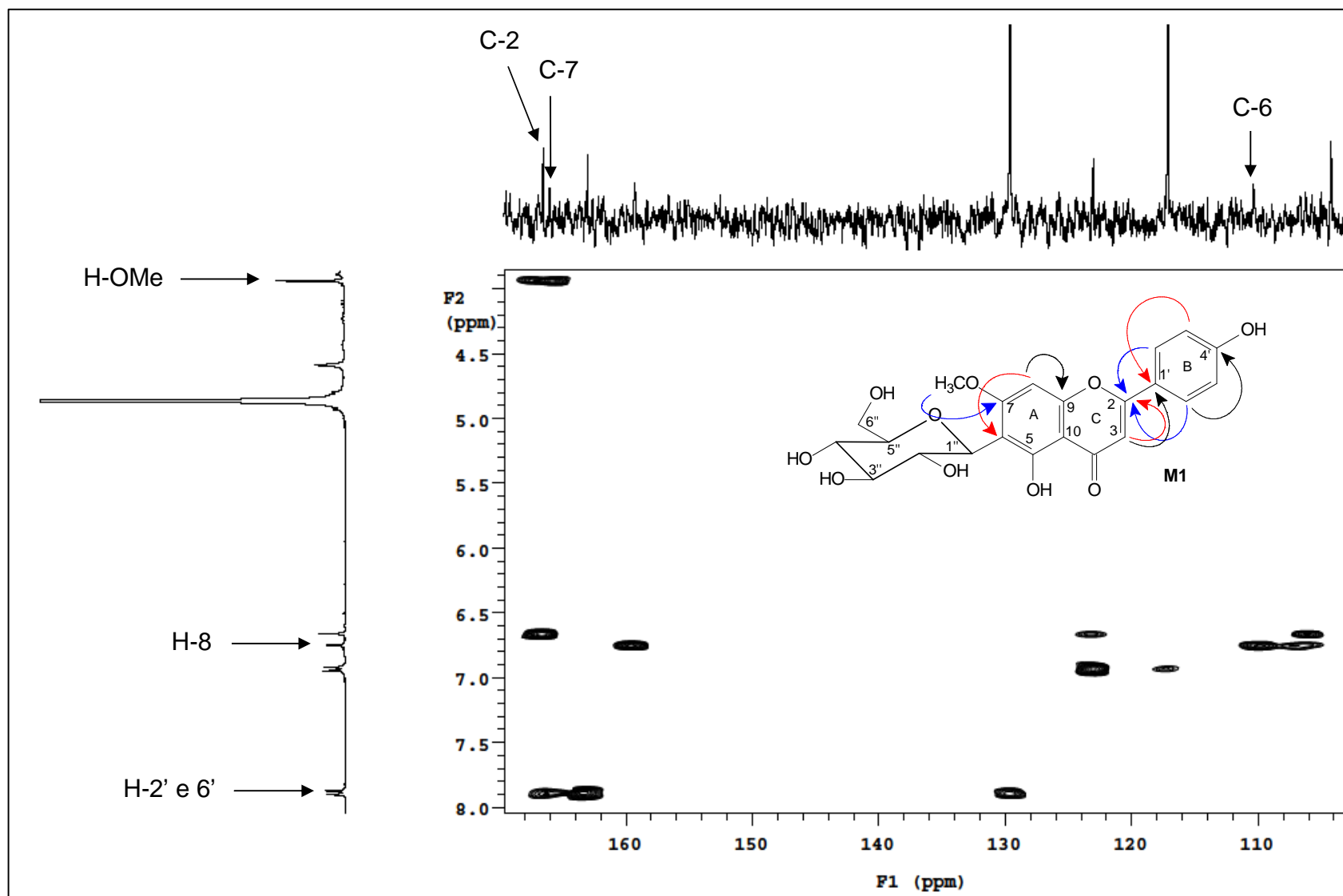


Fig. 59: Mapa de contornos ^gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância **M1**.

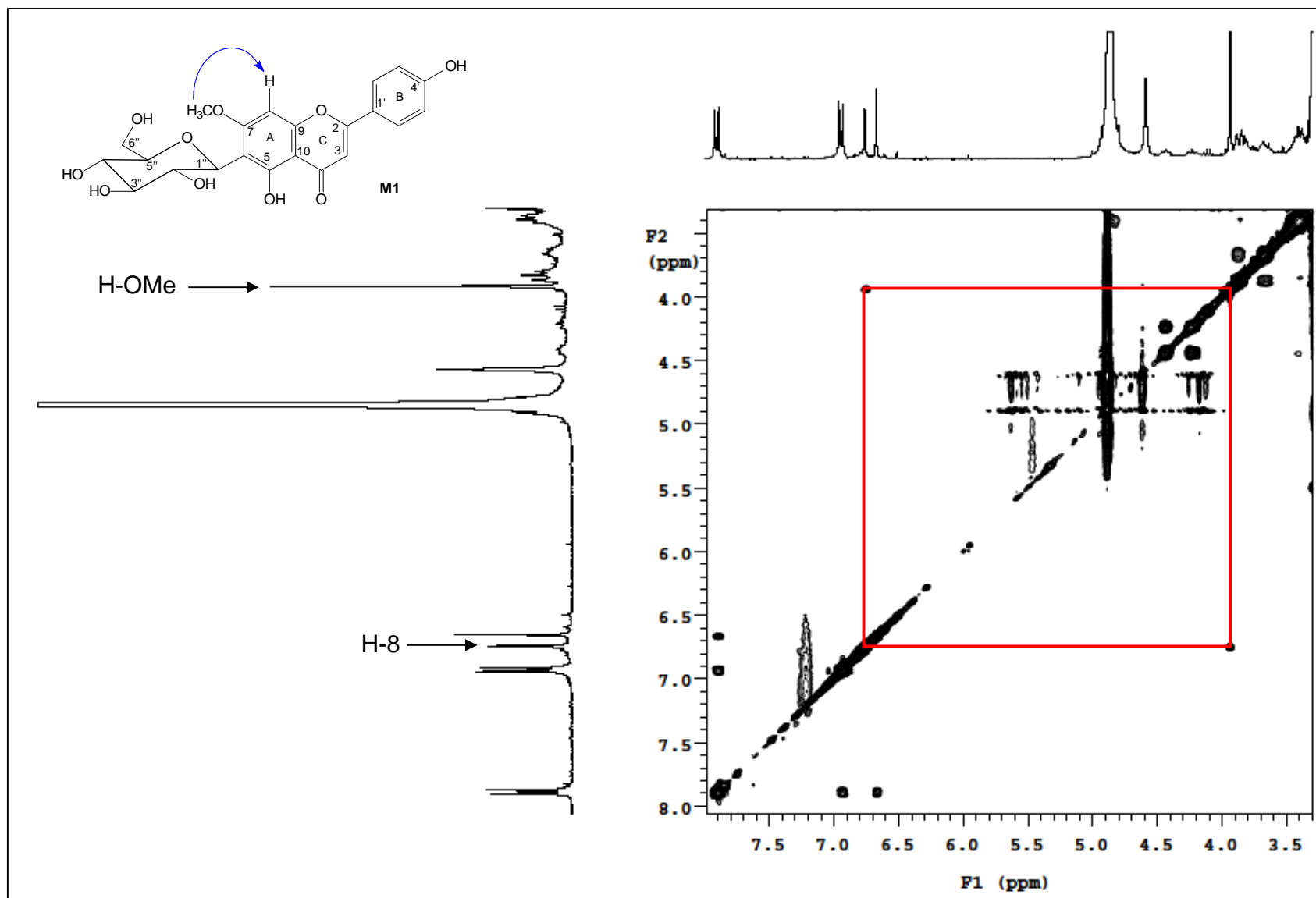


Fig. 60: Mapa de contornos **NOESY** (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância **M1**.

Através dos dados espectroscópicos uni e bidimensionais e comparação destes com os encontrados na literatura, indicaram que **M1** trata-se de uma flavona sendo caracterizada como **7-O-metil-6-C-β-D-glicopiranosil-apigenina (swertisina)** (Masuoka *et al.*, 2003), inédita para o gênero *Machaerium* (**Tabela 57**).

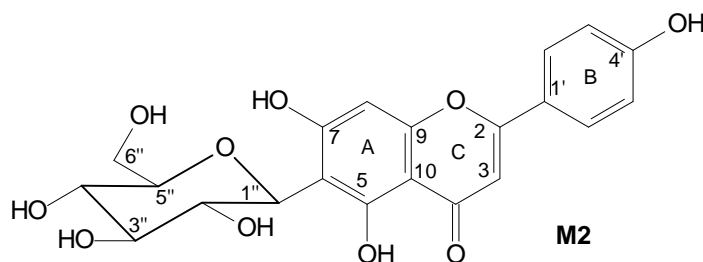
Tabela 57: Dados de RMN de ¹³C/DEPT, ¹H e gHSQC para a substância **M1** em CD₃OD [ppm] (multiplicidade *J* Hz) e dados da literatura para a swertisina.

C	M1	¹H/gHSQC	Swertisina^a	H
2	166,5 (C)		163,8 (C)	
3	104,2 (CH)	6,66 s	102,9 (CH)	6,83 s
4	183,0 (C)		182,2 (C)	
5	159,6 (C)		160,2 (C)	
6	110,3 (C)		109,6 (C)	
7	166,0 (C)		163,7 (C)	
8	91,3 (CH)	6,75 s	90,1 (CH)	6,83 s
9	159,3 (C)		156,7 (C)	
10	106,0 (C)		104,5 (C)	
1`	123,0 (C)		120,8 (C)	
2` e 6`	129,6 (CH)	7,89 <i>d/J</i> = 8,7 Hz	128,5 (CH)	7,97 <i>d/J</i> = 9,0 Hz
3` e 5`	117,1 (CH)	6,93 <i>d/J</i> = 8,7 Hz	115,9 (CH)	6,93 <i>d/J</i> = 9,0 Hz
4`	163,0 (C)		161,3 (C)	
1``	74,8 (CH)	4,82 (enc. solv.)	72,6 (CH)	4,58 <i>d/J</i> = 10,5 Hz
2``	71,6 (CH)	4,43 <i>m</i>	69,9 (CH)	
3``	80,5 (CH)	3,41 <i>m</i>	79,0 (CH)	
4``	72,2 (CH)	3,41 <i>m</i>	70,8 (CH)	
5``	82,6 (CH)	3,38 <i>m</i>	81,7 (CH)	
6``	63,4 (CH ₂)	Ha 3,85 <i>m</i> Hb 3,68 <i>m</i>	61,7 (CH ₂)	
OCH ₃	57,0 CH ₃	3,93 s	56,4 (CH ₃)	3,88 s

(δ-ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD₃OD); (^a Masuoka *et al.*, 2003; DMSO_d)

De acordo com a literatura os flavonóides C-glicosilados apresentam atividade antioxidante (Zielińska and Zieliński, 2011 e Zhang *et al.*, 2008) e a swertisina possui forte atividade antioxidante (Masuoka *et al.*, 2003).

5.12. Substância M2



A substância **M2** foi isolada das frações acetato de etila (folhas e galhos) e *n*-butanólica (galhos) como um sólido amarelo castanho.

No espectro de RMN ^1H para **M2** (**Figura 61**), foram observados 3 sinais na região de hidrogênios aromáticos: δ_{H} 7,82 (*d*, $J = 8,7$ Hz; H-2' e 6') e 6,92 (*d*, $J = 8,7$ Hz; H-3' e 5') característicos de anel **B** *p*-hidroxilado, também um hidrogênio em δ_{H} 6,48, como um singleto, correspondente ao H-8. Além de um singleto em δ_{H} 6,57 característicos de H-3 de flavona. Os sinais na região de δ_{H} 4,21–3,43 e a ausência de hidrogênio anomérico evidenciaram a presença de uma unidade C-glicosídica ligada ao anel **A** da apigenina como aglicona (**Tabela 60**) e a comparação dos dados obtidos revelou que se tratava de uma mistura das substâncias **M1** e **M2**, onde analisando a integração dos sinais notou-se que **M2** está na proporção de 2:1.

Foram verificados nos espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 62**) para **M2** a presença de 35 sinais, subtraindo-se os sinais referentes à substância **M1**, o espectro apresentou 21 sinais dentre esses, 15 sinais característicos da apigenina e ainda um sinal em δ_{C} 62,8 (CH_2) e 5 sinais na região de δ_{C} 71,7 a 82,6 que confirmaram presença de uma unidade C-glicosídica. As correlações dos ^{13}C com seus ^1H foram confirmadas através do mapa de contornos gHSQC (**Figura 63**) que também auxiliou na identificação (**Tabela 60**).

No mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ gCOSY (**Figura 64**) foram observadas correlações, entre o H-3' e 5' (δ_{H} 6,92) com o H-2' e 6' (δ_{H} 7,82) e também entre o H-2' (δ_{H} 4,21) com o H-1' (δ_{H} 4,90) e não haviam correlações no anel **A**. Demais correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY estão apresentados na **tabela 58**.

Tabela 58: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para **M2**.

$\delta ^1\text{H}$ (mult.; J em Hz; H)	$\delta ^1\text{H}$ (mult.; J em Hz; H)
6,92 (<i>d</i> ; 8,7; H-3'e 5')	7,82 (<i>d</i> ; 8,7; H-2'e 6')
4,21 (<i>m</i> ; H-2'')	4,90 (enc. solv.; 1,8; H-1''')
3,49 (<i>m</i> ; H-4'')	3,43 (<i>m</i> ; H-5'')
3,46 (<i>m</i> ; H-3'')	4,21 (<i>m</i> ; H-2'')
3,76 (<i>d</i> ; 4,8; Hb-6'')	3,88 (<i>dd</i> ; 1,8; Ha-6'')
3,43 (<i>m</i> ; H-5'')	3,76 (<i>d</i> ; 4,8; Hb-6''); 3,88 (<i>dd</i> ; 1,8; Ha-6'')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD₃OD)

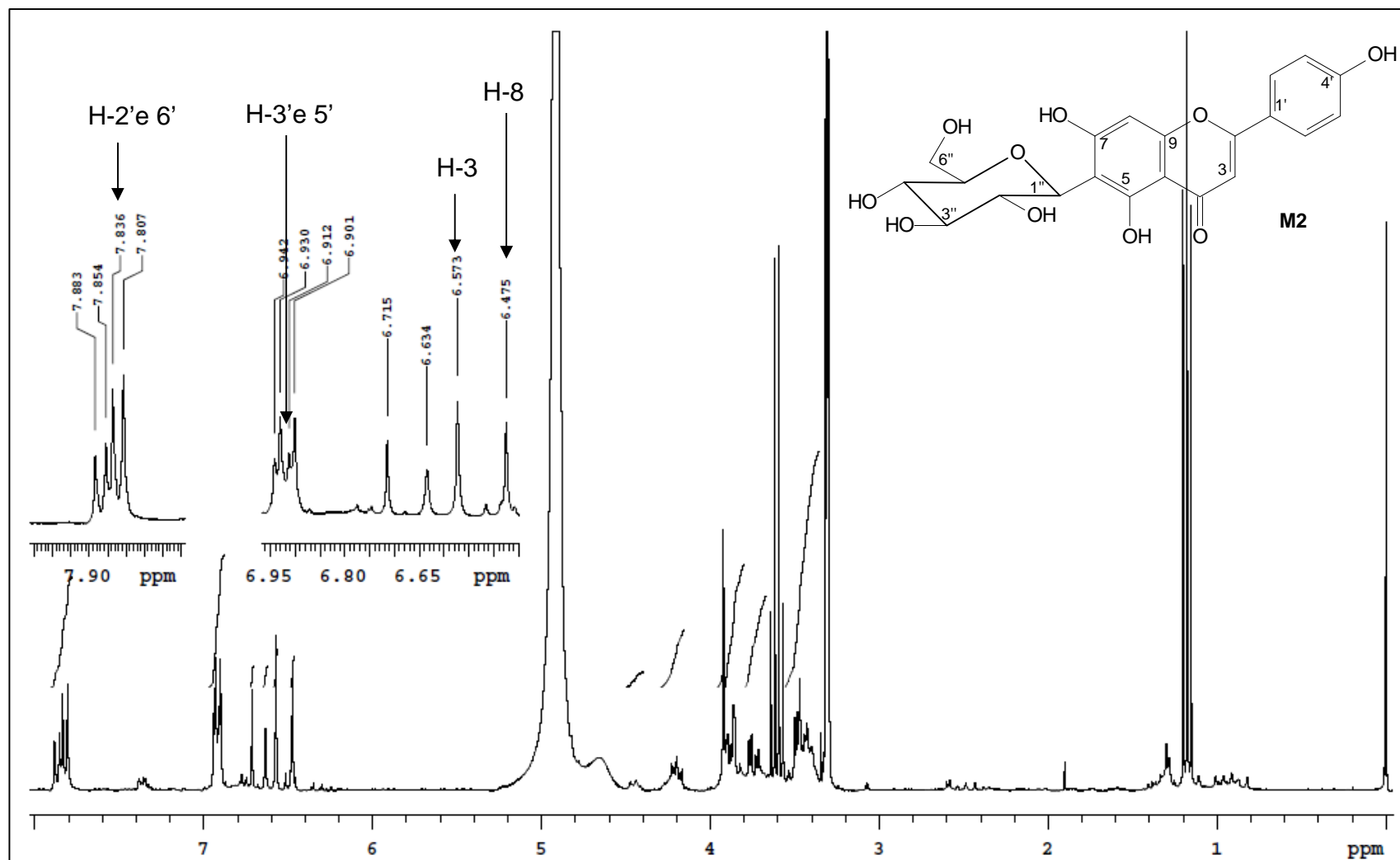


Fig. 61: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) para a mistura das substâncias M1 e M2.

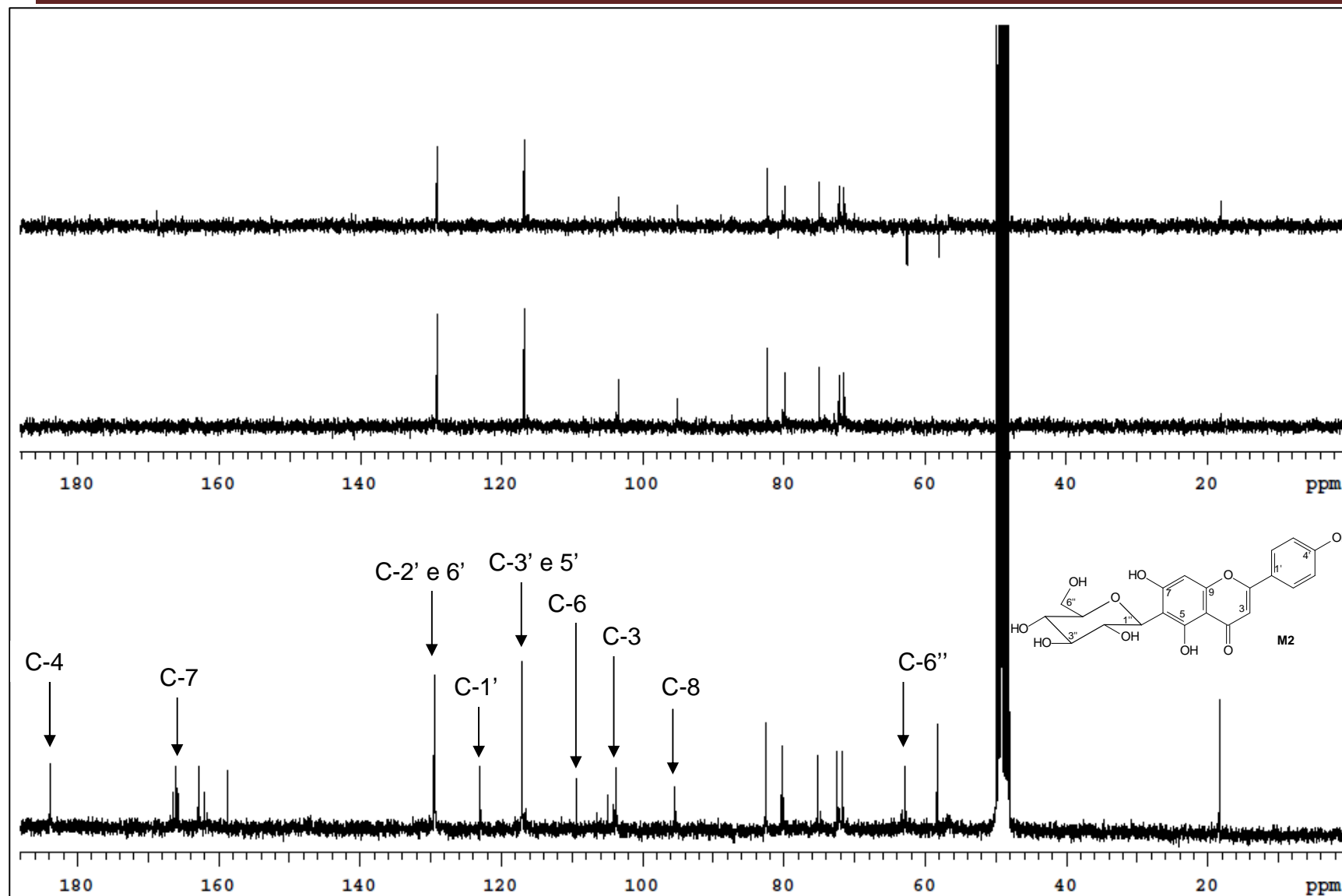


Fig. 62: Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a mistura das substâncias M1 e M2.

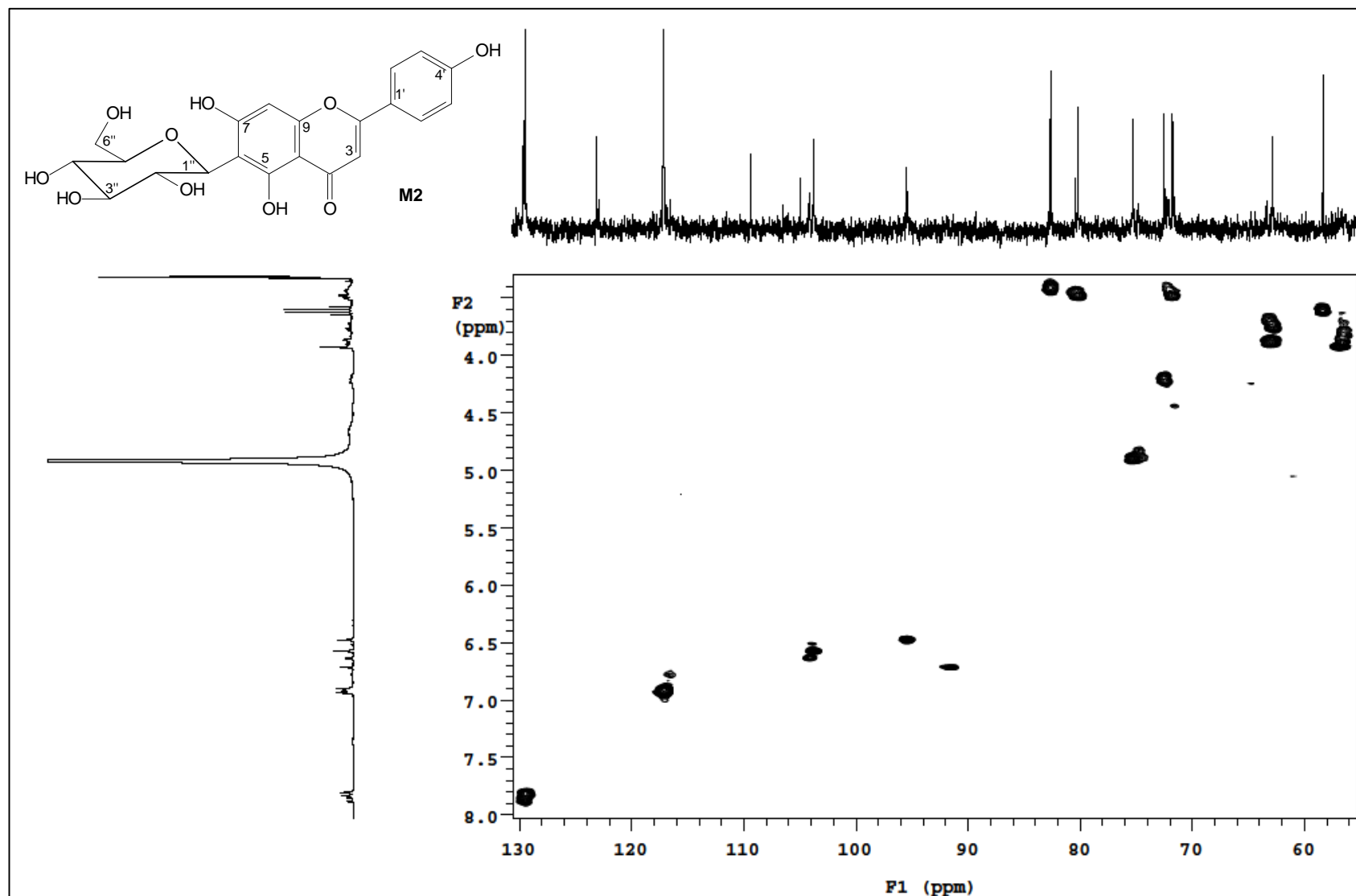


Fig. 63: Mapa de contornos gHSQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a mistura das substâncias M1 e M2.

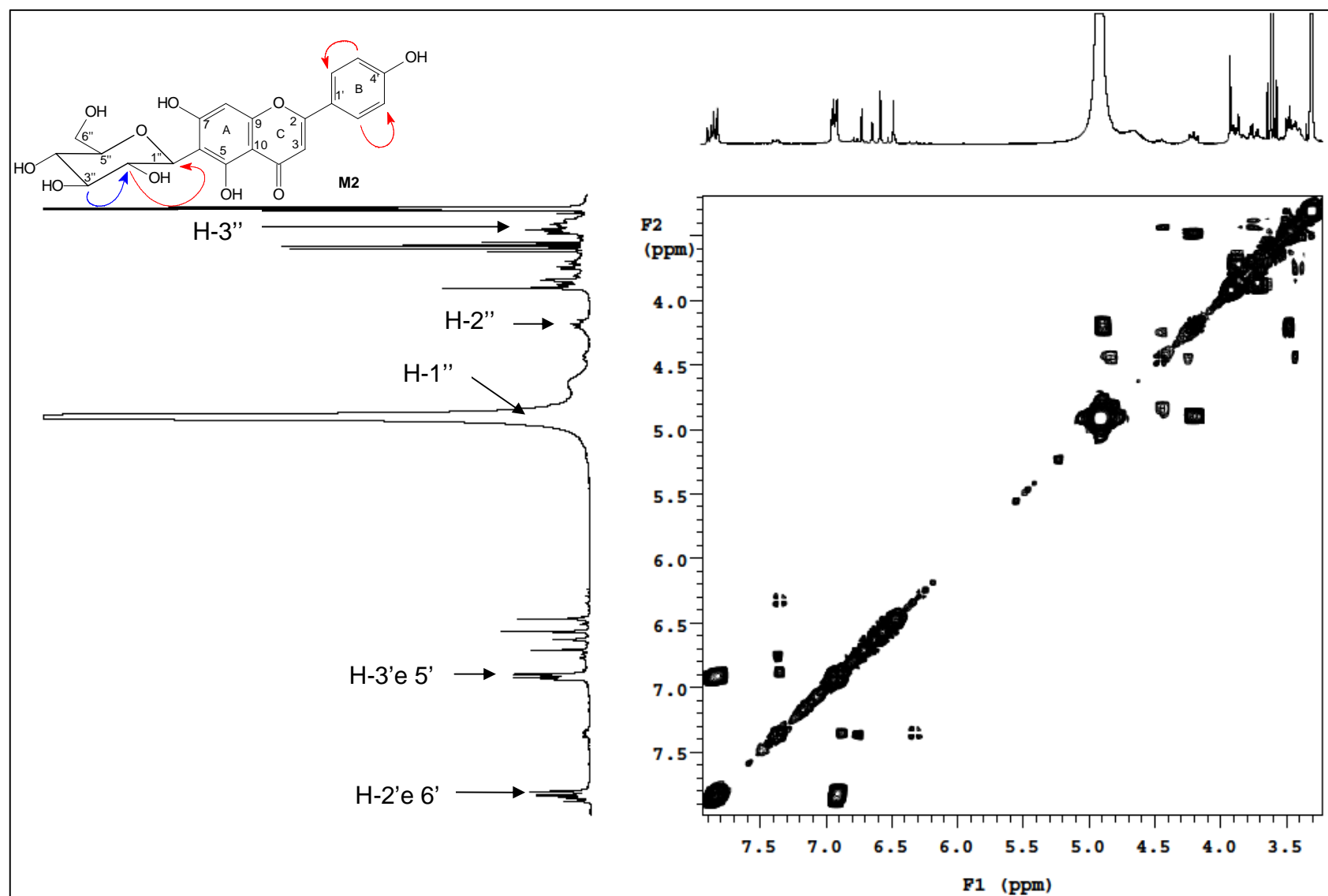
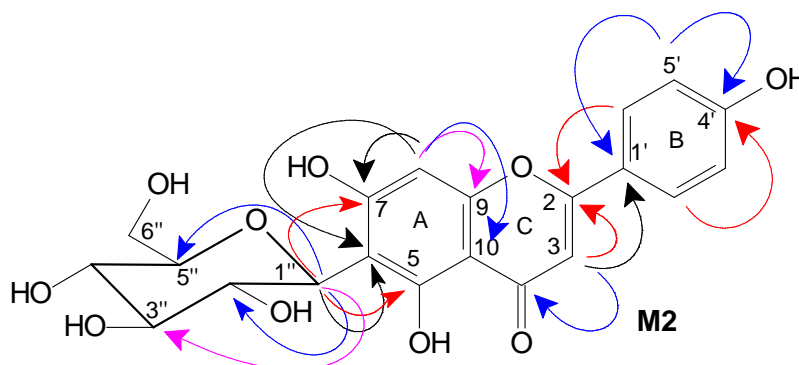


Fig. 64: Mapa de contornos gCOSY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a mistura das substâncias M1 e M2.

A posição da unidade C-glicosilada no C-6 (δ 109,3) foi confirmada pela correlação do hidrogênio em δ_H 6,48 (H-8) e δ_H 4,90 (H-1'') com o C-6, que foram confirmadas pelo mapa de contornos gHMBC (**Figura 65**).



Outras correlações observadas no gHMBC estão apresentadas na **tabela 59** e na **figura 65**. Todos os dados espectroscópicos observados permitiram a atribuição dos deslocamentos químicos de todos os carbonos e hidrogênios da substância **M2**.

Tabela 59: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para **M2**.

δ_H (^1H)	δ_C (^{13}C)
7,82 (2' e 6')	129,4 (C2' e 6'), 166,1 (C2) e 162,9 (4')
6,92 (3' e 5')	123,0 (C1'), 117,1 (C3' e 5') e 162,9 (4')
6,57 (3)	123,0 (C1'), 104,9 (10), 166,1 (C2) e 183,9 (C4)
6,48 (8)	109,3 (C6), 165,8 (C7), 104,9 (10) e 158,8 (9)
4,90 (1'')	162,0 (C5), 109,3 (C6), 165,8 (C7), 72,5 (C2''), 80,2 (C3'') e 82,6 (C5'')
4,21 (2'')	80,2 (C3'')
3,49 (4'')	80,2 (C3'')
3,46 (3'')	71,7 (C4'')
3,43 (5'')	71,7 (C4'')

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

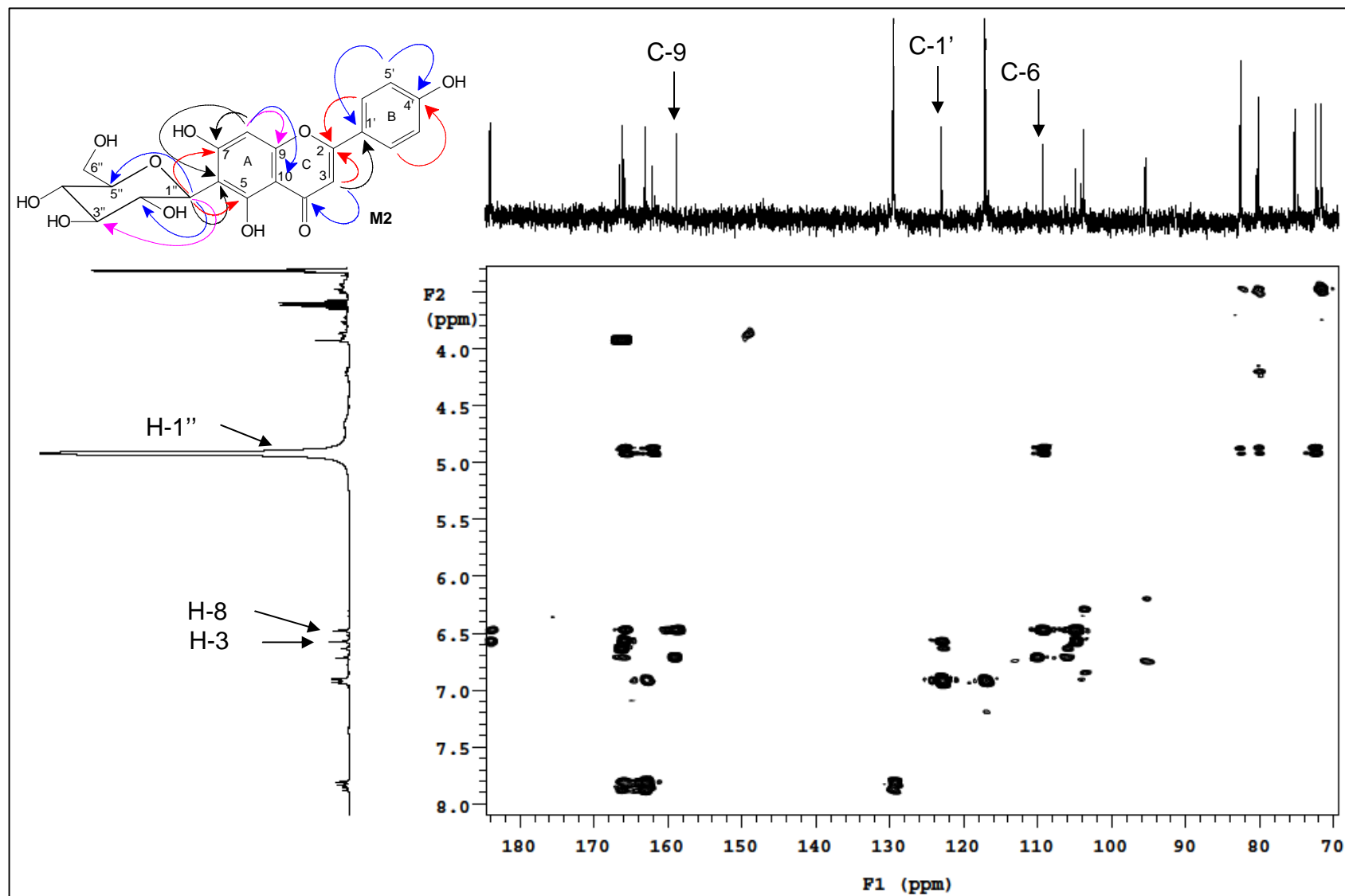


Fig. 65: Mapa de contornos gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a mistura das substâncias M1 e M2.

Os dados espectroscópicos mencionados anteriormente para **M2** estão condizentes aos da literatura para a flavona **6-C-β-D-glicopiranosil-apigenina (isovitexina)** (Leong *et al.*, 2010), sendo inédita para o gênero *Machaerium* (**Tabela 60**).

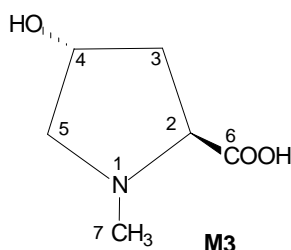
Tabela 60: Dados de RMN de ¹³C/DEPT, ¹H e gHSQC para a substância **M2** em CD₃OD [ppm] (multiplicidade *J* Hz) e dados da literatura para a isovitexina.

Carbono	M2	¹ H/gHSQC	isovitexina	H
2	166,1 (C)		163,39 (C)	
3	103,7 (CH)	6,57 s	102,73 (CH)	6,82 s
4	183,9 (C)		181,87 (C)	
5	162,0 (C)		160,70 (C)	
6	109,3 (C)		108,91 (C)	
7	165,8 (C)		-	
8	95,4 (CH)	6,48 s	93,68 (CH)	6,53 s
9	158,8 (C)		156,27 (C)	
10	104,9 (C)		103,18 (C)	
1'	123,0 (C)		121,09 (C)	
2' e 6'	129,4 (CH)	7,82 <i>d</i> / <i>J</i> = 8,7 Hz	128,47 (CH)	7,96 <i>d</i> / <i>J</i> = 8,8 Hz
3' e 5'	117,1 (CH)	6,92 <i>d</i> / <i>J</i> = 8,7 Hz	115,94 (CH)	6,95 <i>d</i> / <i>J</i> = 8,8 Hz
4'	162,9 (C)		160,70 (C)	
1''	75,3 (CH)	4,90 (enc. solv.)	73,08 (CH)	4,60 <i>d</i> / <i>J</i> = 9,9 Hz
2''	72,5 (CH)	4,21 <i>t</i> / <i>J</i> = 9,6 Hz	70,64 (CH)	
3''	80,2 (CH)	3,46 <i>m</i>	78,97 (CH)	
4''	71,7 (CH)	3,49 <i>m</i>	70,15 (CH)	
5''	82,6 (CH)	3,43 <i>m</i>	81,62 (CH)	
6''	62,8 (CH ₂)	Ha 3,88 <i>dd</i> / <i>J</i> = 1,8 Hz Hb 3,76 <i>d</i> / <i>J</i> = 4,8 Hz	61,49 (CH ₂)	

(δ-ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD₃OD); (^a Leong *et al.*, 2010; DMSO_d)

De acordo com a literatura os flavonóides C-glicosilados apresenta atividade antioxidante (Zielińska e Zieliński, 2011; Zhang *et al.*, 2008; Leong *et al.*, 2010) e diminuem o risco de doenças cardiovasculares e atuam em diferentes tipos de câncer (Zhang *et al.*, 2005), da mesma forma a isovitexina possui forte atividade antioxidante (Masuoka *et al.*, 2003).

5.13. Substância M3



A substância **M3** foi isolada das frações *n*-butanólica e hidro-metanólica das folhas como um óleo amarelo, solúvel em água e metanol.

No espectro de RMN ^1H (**Figura 66**) da substância **M3** foi observado um singlete em δ_{H} 3,0 (H-7), um multipletto em δ_{H} 4,49 (H-4), além de dupletos e tripletos referentes aos CH_2 dos H-3 e H-5 e ao CH do H-2 do anel (**Tabela 63**).

Os espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 67**) para **M3** apresentaram 6 carbonos, onde um carbono carbonílico em δ_{C} 172,8 (C-6), um carbono metílico ligado a nitrogênio em δ_{C} 44,0 (C-7), um carbono carbinólico em δ_{C} 70,9 (C-4) e 2 carbonos metilênicos em δ_{C} 40,2 (C-3) e 64,2 (C-5), além de um carbono metínico em δ_{C} 71,8 (C-2). No mapa de contornos gHSQC (**Figura 68**) foram confirmadas as correlações dos ^{13}C com seus ^1H , que também auxiliaram na identificação (**Tabela 63**).

No mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ gCOSY (**Figura 69**) foram observadas correlações entre o Ha-3 (δ_{H} 2,16) com o H-4 (δ_{H} 4,49), o H-2 (δ_{H} 4,06) com o Hb-3 (δ_{H} 2,44) e também o Ha-5 (δ_{H} 3,83) com o H-4 (δ_{H} 4,49). Demais correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY estão apresentadas na **Tabela 61**.

Tabela 61: Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no mapa de contornos gCOSY para **M3**.

δ ^1H (mult.; <i>J</i> em Hz; H)	δ ^1H (mult.; <i>J</i> em Hz; H)
4,49 (<i>m</i> ; H-4)	2,16 (<i>ddd</i> ; 4,8; 10,8 e 13,8; Ha-3)
4,06 (<i>dd</i> ; 10,8 e 7,2; H-2)	2,44 (<i>ddt</i> ; 3,9; 7,5 e 13,65; Hb-3)
4,06 (<i>dd</i> ; 10,8 e 7,2; H-2)	2,16 (<i>ddd</i> ; 4,8; 10,8 e 13,8; Ha-3)
3,83 (<i>dd</i> ; 4,8 e 12,6; Ha-5)	4,49 (<i>m</i> ; H-4)
3,08 (<i>dt</i> ; 3,9 e 12,6; Hb-5)	3,83 (<i>dd</i> ; 4,8 e 12,6; Ha-5)
2,16 (<i>ddd</i> ; 4,8; 10,8 e 13,8; Ha-3)	2,44 (<i>ddt</i> ; 3,9; 7,5 e 13,65; Hb-3)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD)

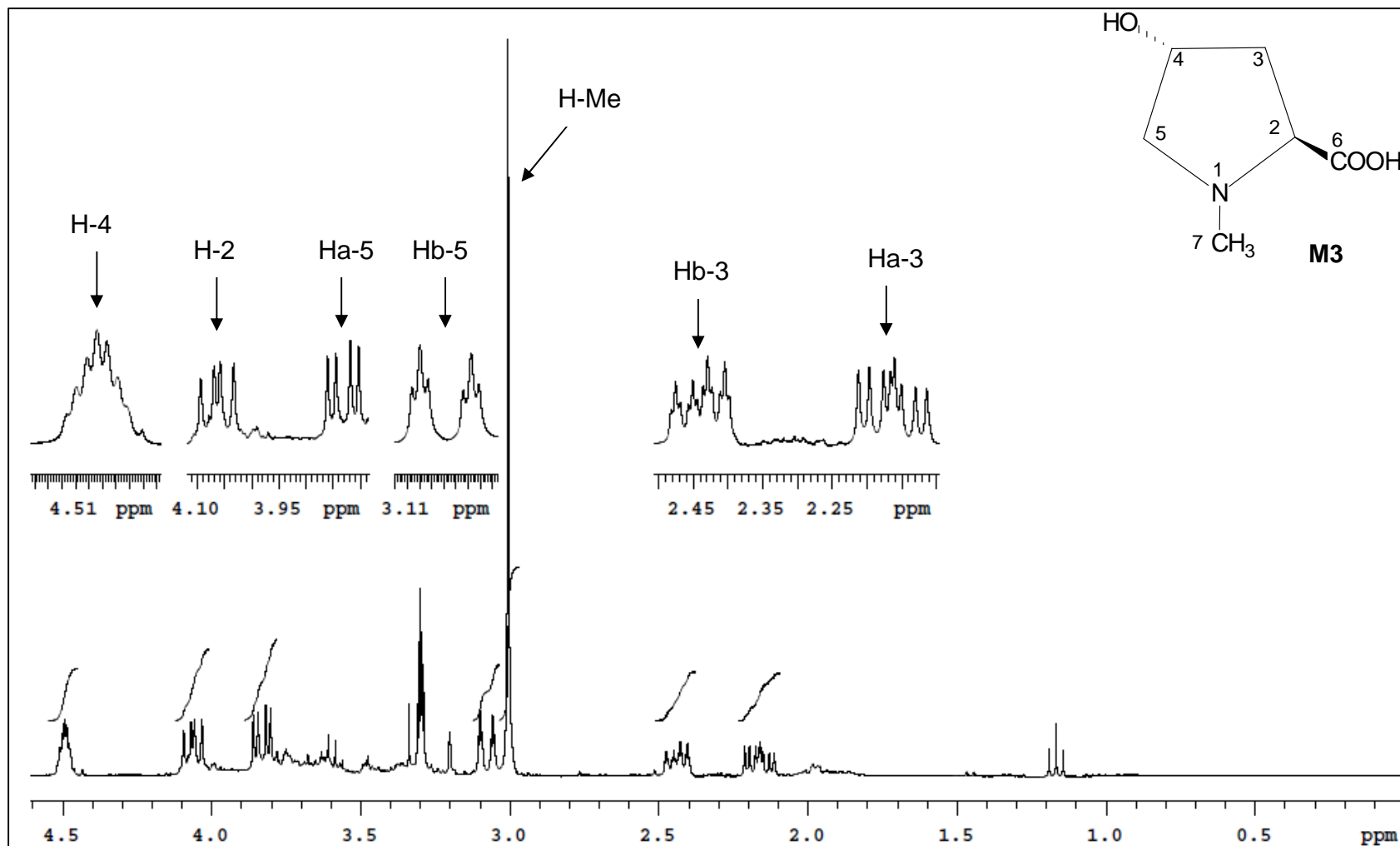


Fig. 66: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD ; 300,06 MHz) para a substância **M3**.

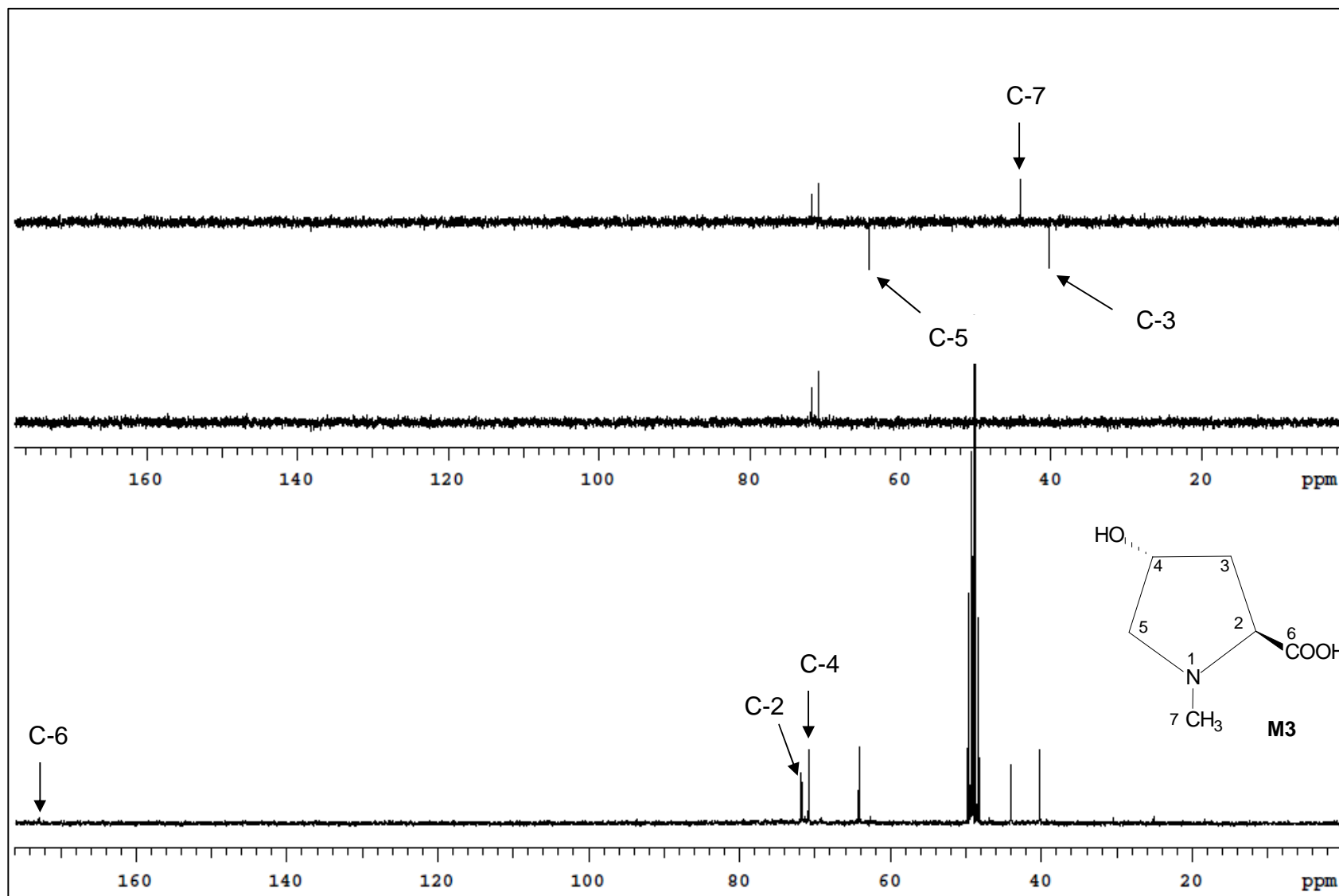


Fig. 67: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3OD ; 75,45 MHz) para a substância **M3**.

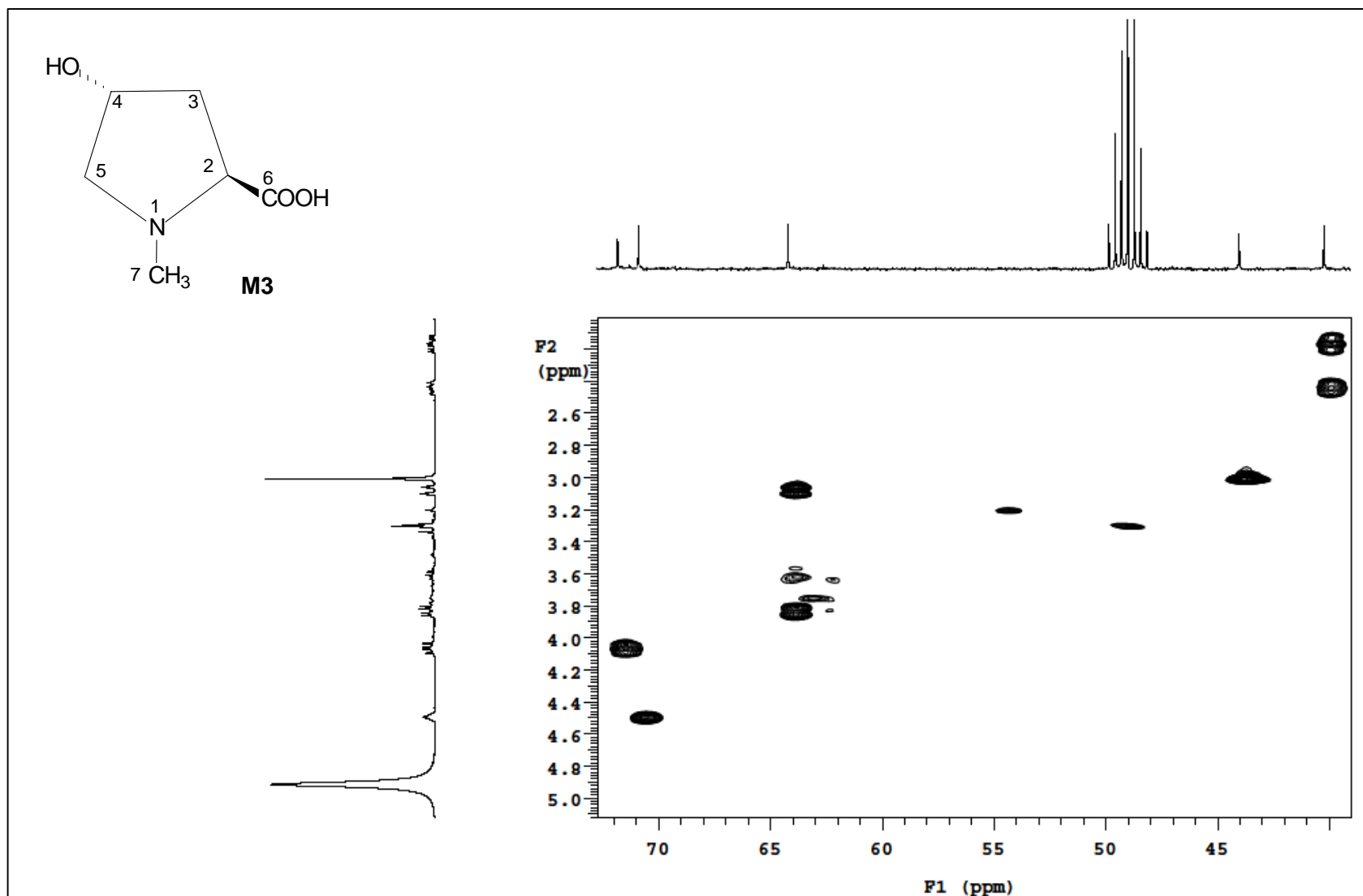


Fig. 68: Mapa de contornos gHSQC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância M3.

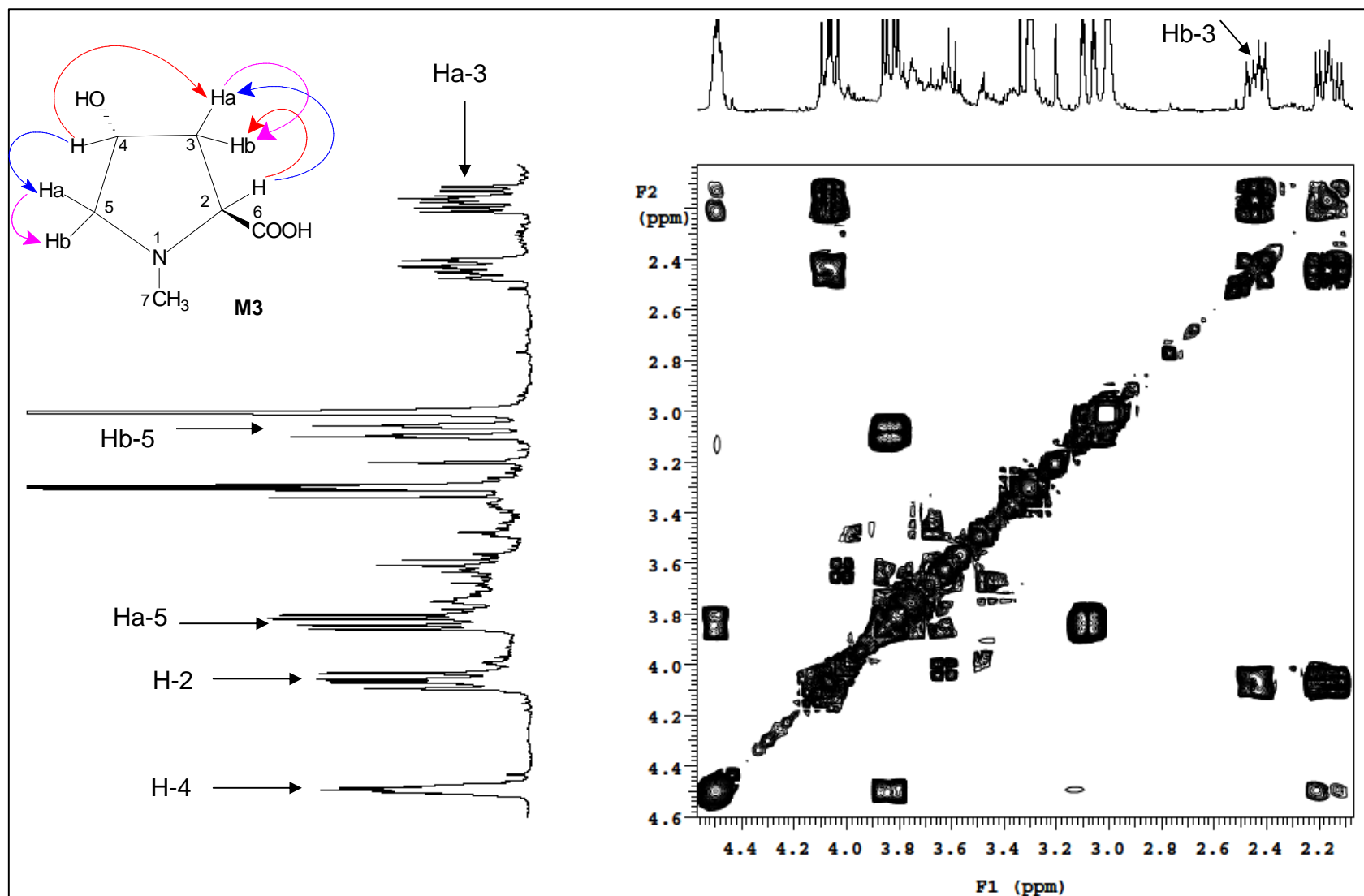


Fig. 69: Mapa de contornos gCOSY (CD₃OD; 300,06 MHz) para a substância M3.

A posição da carbonila foi confirmada pela correlação do hidrogênio em δ_H 2,16 (Ha-3) e 4,06 (H-2) com o C-6 (172,8) e a posição do grupo N-CH₃ foi evidenciada pela correlação em δ_H 4,06 (H-2), 3,83 (Ha-5) e o 3,08 (Hb-5) com 44,0 (C-7), o hidrogênio em δ_H 3,0 (H-7) apresentou correlação com os carbonos C-5 e o C-2, o hidrogênio em δ_H 3,08 apresentou correlação com o carbono C-4, o hidrogênio em δ_H 3,83 apresentou correlação com o carbono C-2, que foram confirmadas pelo mapa de contornos gHMBC (**Figura 70**). Outras correlações observadas em gHMBC estão apresentadas na **tabela 62**.

Tabela 62: Principais correlações heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos gHMBC para **M3**.

δ_H (^1H)	δ_C (^{13}C)
4,06 (2)	172,8 (C6), 40,2 (C3) e 44,0 (C7)
3,83 (Ha-5)	71,8 (C2) e 44,0 (C7)
3,08 (Hb-5)	40,2 (C3), 70,9 (4) e 44,0 (C7)
3,00 (7)	71,8 (C2) e 64,2 (C5)
2,44 (Hb-3)	70,9 (4) e 64,2 (C5)
2,16 (Ha-3)	172,8 (C6) e 71,8 (C2)

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD₃OD)

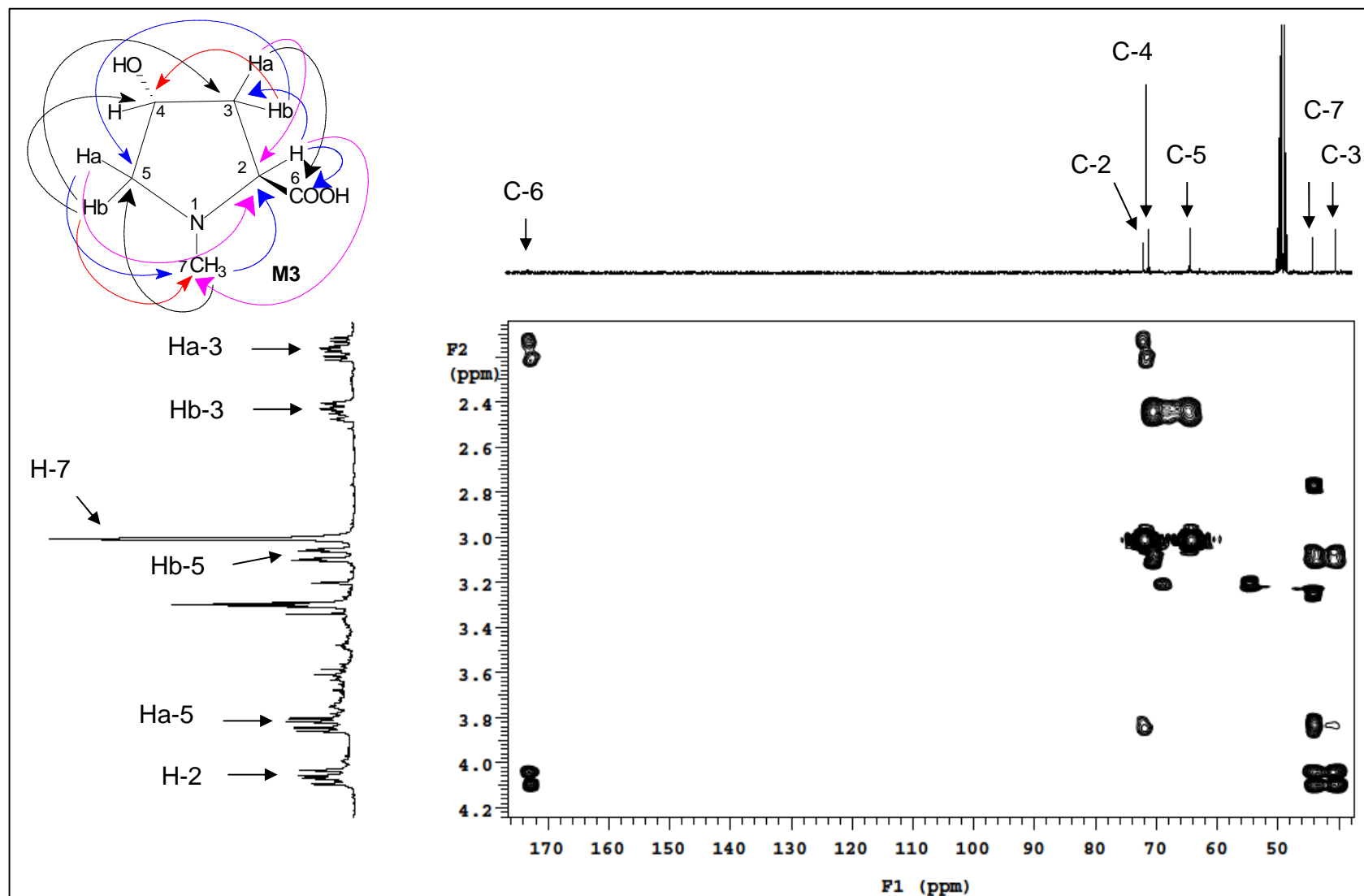


Fig. 70: Mapa de contornos gHMBC (CD₃OD; 75,45 e 300,06 MHz) para a substância M3.

Através dos dados espectroscópicos uni e bidimensionais e comparação destes com os encontrados na literatura, indicaram que **M3** trata-se de um alcalóide (aminoácido não protéico), sendo caracterizado como **4-hidróxi-N-metil-prolina** (4-hidróxi-1-metil-2-pirrolidina-ácido carboxílico) (Haraguchi *et al.*, 2003) (**Tabela 63**).

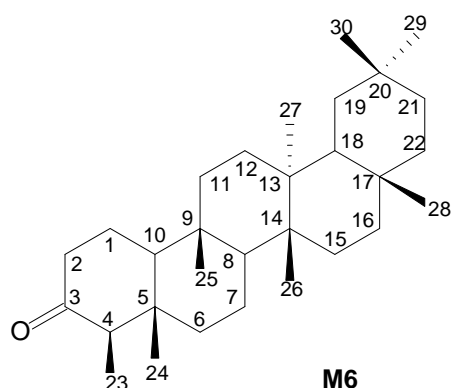
Tabela 63: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ^1H e gHMQC para a substância **M3** em CD_3OD [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para 4-hidróxi-N-metil-prolina.

C	M3	$^1\text{H}/\text{HSQC}$	Literatura ^a	H
2	71,8 (CH)	4,06 $dd/J= 10,8$ e $7,2$ Hz	73,0	4,20 $dd/J= 7,3; 11,0$;Hz
3	40,2 (CH_2)	Ha 2,16 $ddd/J= 4,8;10,8;13,8$ Hz Hb 2,44 $dt/J=3,9; 7,5; 13,65$ Hz	41,1	H α - 2,26 $ddd/J= 4,6; 11,0; 14,2$ Hz H β - 2,49 $dddd/J= 1,8; 2,3; 7,3; 14,2$ Hz
4	70,9 (CH)	4,49 m	72,3	4,64 m
5	64,2 (CH_2)	Ha 3,83 $dd/J= 4,8$ e $12,6$ Hz Hb 3,08 $dt/J= 3,9$ e $12,6$ Hz	65,5	H α - 3,97 $dd/J= 4,6; 12,8$;Hz H β - 3,22 $ddd/J= 1,8; 2,3; 12,8$;Hz
6	172,8 (C)		175,8	
7	44,0 (CH_3)	3,0 sl	46,0	3,05 s

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CD_3OD); (^a Haraguchi *et al.*, 2003; D_2O)

A substância **4-hidróxi-N-metil-prolina** possui atividade anti-inflamatória no modelo edema de pata com 35,0% de inibição (Moreira *et al.*, 2000).

5.14. Substância M6



A substância **M6** foi isolada da fração hexânica dos galhos como cristais brancos.

O espectro de massas de baixa resolução obtido por inserção direta via sólido (**Figura 71**), apresentou o pico do íon molecular em m/e 426 $[M\cdot^+]$ correspondente a $C_{30}H_{50}O$, juntamente com o fragmento m/e 411 $[M^+ -15]$ referente a perda do grupo metila a partir do pico de íon molecular. Foi verificado ainda os picos em m/e 234 $[M\cdot^+] - [C_{13}H_{20}O]\cdot^+$, correspondendo a uma possível clivagem nos carbonos C-8/C-14 e C-9/C-11, e ainda os picos em m/e 341 $[C_{24}H_{37}O]^+$, m/e 302 $[C_{21}H_{34}O]\cdot^+$, m/e 273 $[C_{20}H_{33}]^+$ e $[C_{19}H_{29}O]^+$, m/e 246 $[C_{18}H_{30}]\cdot^+$, m/e 231 $[C_{17}H_{27}]^+$, m/e 218 $[C_{16}H_{26}]\cdot^+$, m/e 205 $[C_{14}H_{21}O]^+$, m/e 192 $[C_{13}H_{20}O]\cdot^+$, m/e 179 $[C_{12}H_{19}O]^+$, m/e 163 $[C_{12}H_{19}]^+$, m/e 149 $[C_{11}H_{17}]^+$, m/e 135 $[C_{10}H_{15}]^+$, m/e 123 $[C_8H_{11}O]^+$ e $[C_9H_{15}]^+$, m/e 109 $[C_8H_{13}]^+$, m/e 95 $[C_7H_{11}]^+$, m/e 81 $[C_6H_9]^+$, m/e 69 $[C_5H_9]^+$. Estes dados foram comparados aos da literatura e estavam condizentes (Thanakijcharoenpath and Theanphong, 2007).

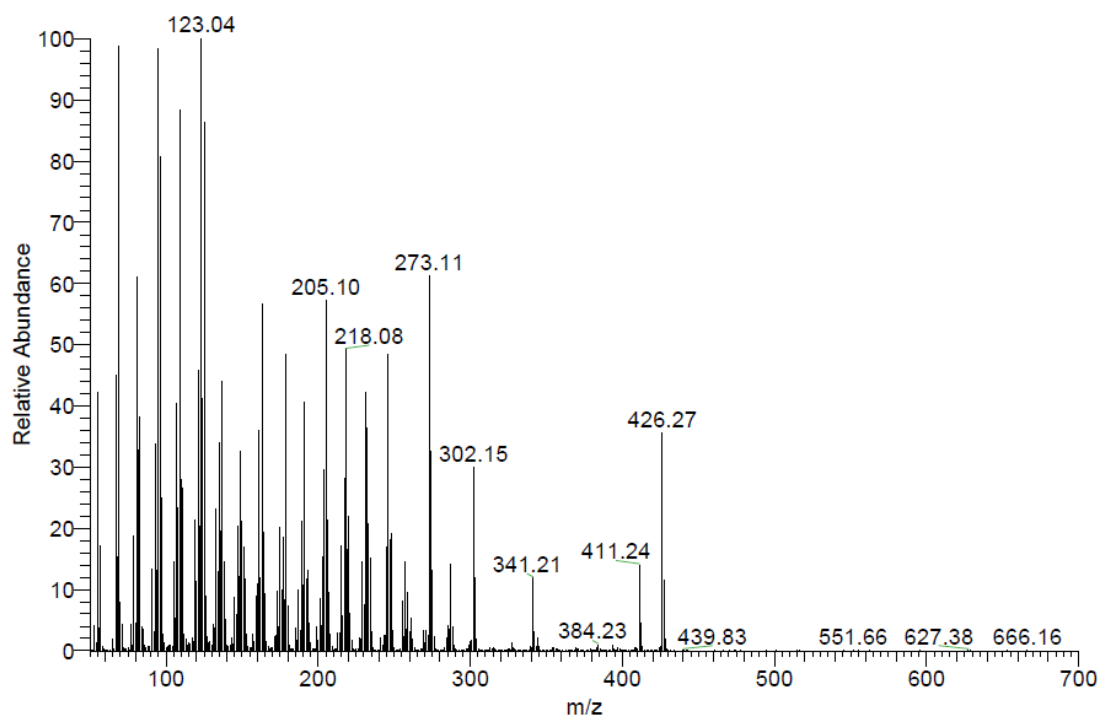


Figura 71: Espectro de massas (70 eV) de **M6**

No espectro de RMN ^1H (Figura 72) da substância **M6** foi observado sete sinais na forma de singletos que foram atribuídos para as metilas em δ_{H} 1,18 (H-28), 1,05 (H-27), 1,01 (H-26), 1,00 (H-30), 0,96 (H-29), 0,87 (H-25) e 0,73 (H-24), um dubleto metílico em δ_{H} 0,88 (d , $J= 6,6$ Hz, H-23), um próton metínico em δ_{H} 2,25 (q , $J= 6,9$ Hz, H-4), e prótons metilênicos em δ_{H} 2,40 (qd , $J= 13,8, 5,25, 2,25$ Hz, H-2a) e δ_{H} 2,32 (t , $J= 6,15$ Hz, H-2b), respectivamente. Nenhum sinal de prótons vinílicos foram observados. Os sinais restantes de prótons estão na região de δ_{H} 1,19-2,01 que são confirmados na tabela 64.

Foram observados nos espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (Figura 73) para **M6** um total de 30 carbonos, dentre eles um em δ_{C} 213,5 característico de cetona, e oito sinais de grupos metílicos em δ_{C} : 7,1 (C-23), 14,9 (C-24), 18,2 (C-25), 20,5 (C-26), 18,9 (C-27), 32,3 (C-28), 35,2 (C-29), 31,9 (C-30). Além de onze carbonos metilênicos, quatro carbonos metínicos e seis carbonos quaternários. Os dados de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT da substância **M6** foram idênticos àqueles relatados na literatura para o triterpeno **friedelan-3-ona (friedelina)** (Subhadhirasakul, 2005) (Tabela 64).

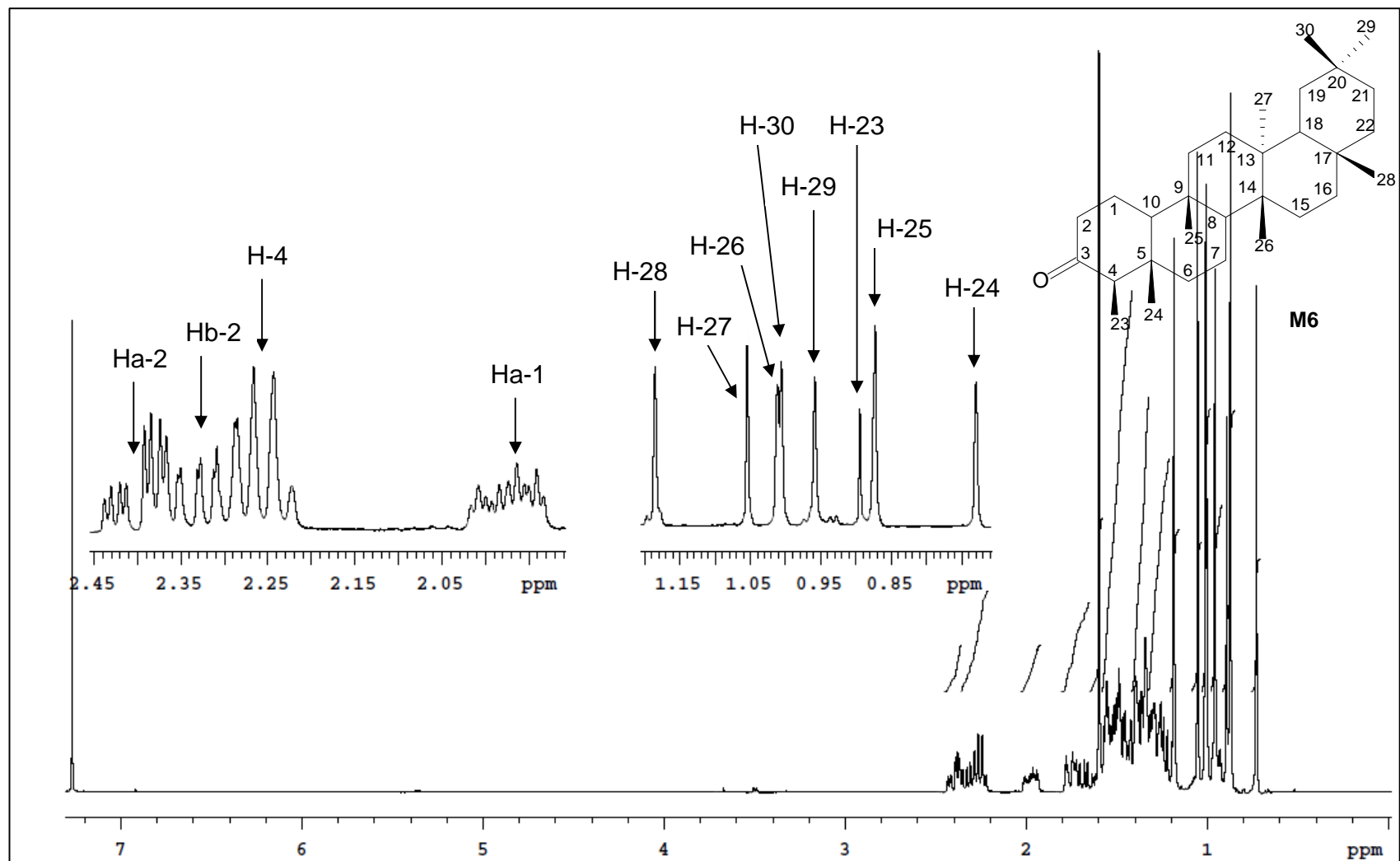


Fig. 72: Espectro de RMN de ^1H (CD_3Cl ; 300,06 MHz) para a substância **M6**.

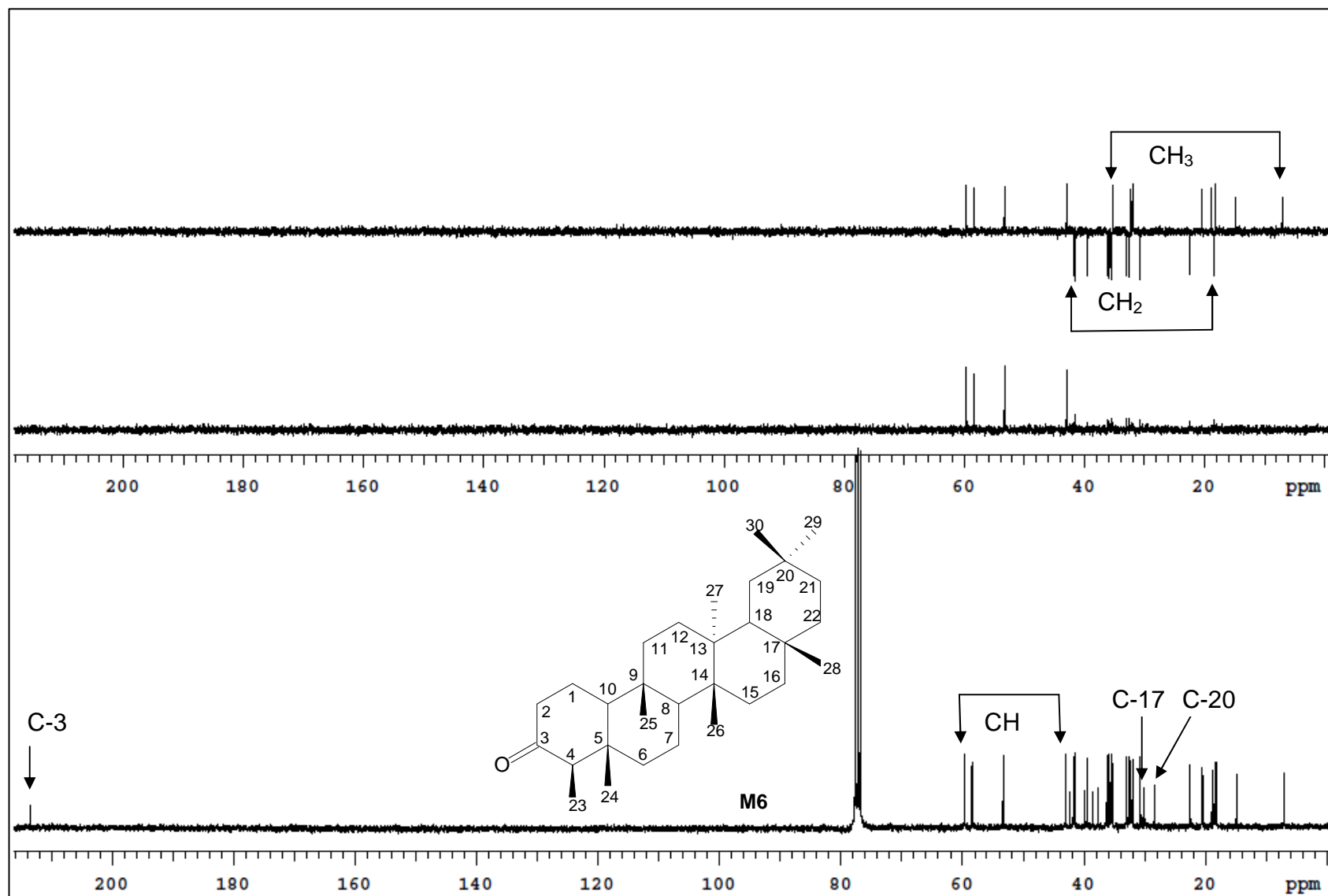


Fig. 73: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3Cl ; 75,45 MHz) para a substância **M6**.

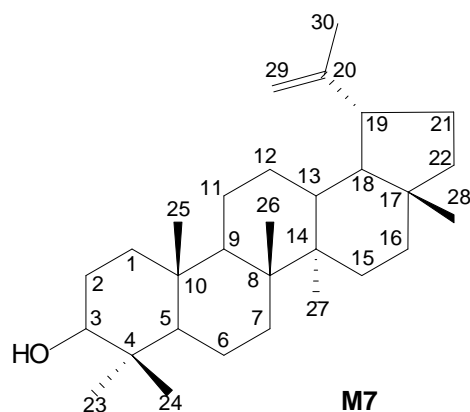
Tabela 64: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ e ^1H para a substância **M6** em CDCl_3 [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para **friedelina**.

C	M6	$^1\text{H}/\text{gHSQC}$	Friedelina^a	H
1	22,5 (CH_2)		22,3 (CH_2)	
2	41,7 (CH_2)	Ha- 2,40 $\text{ddd}/J= 2,25;5,25;13,8$ Hz Hb- 2,32 m	41,5 (CH_2)	2,40 $\text{ddd}/J=2,06;5,26;13,96$ Hz 2,31 $\text{ddd}/J=1,15;7,09;13,96$ Hz
3	213,5 (C)		213,3 (C)	
4	58,4 (CH)	2,25 $q/J=6,9$ Hz	58,2 (CH)	2,25 $q/J=6,64$ Hz
5	42,4 (C)		42,1 (C)	
6	41,5 (CH_2)		41,3 (CH_2)	
7	18,4 (CH_2)		18,2 (CH_2)	
8	53,3 (CH)		53,1 (CH)	
9	37,6 (C)		37,4 (C)	
10	59,7 (CH)		59,4 (CH)	
11	35,8 (CH_2)		35,6 (CH_2)	
12	30,7 (CH_2)		30,5 (CH_2)	
13	39,9 (C)		39,7 (C)	
14	38,5 (C)		38,2 (C)	
15	32,6 (CH_2)		32,4 (CH_2)	
16	36,2 (CH_2)		36,0 (CH_2)	
17	30,2 (C)		30,0 (C)	
18	43,0 (CH)		42,8 (CH)	
19	35,5 (CH_2)		35,3 (CH_2)	
20	28,4 (C)		28,2 (C)	
21	32,9 (CH_2)		32,7 (CH_2)	
22	39,5 (CH_2)		39,2 (CH_2)	
23	7,1 (CH_3)	0,88 $d/J=6,6$ Hz	6,8 (CH_3)	0,88 $d/J=6,64$ Hz
24	14,9 (CH_3)	0,73 s	14,6 (CH_3)	0,73 s
25	18,2 (CH_3)	0,87 s	17,9 (CH_3)	0,87 s
26	20,5 (CH_3)	1,01 s	20,3 (CH_3)	1,01 s
27	18,9 (CH_3)	1,05 s	18,7 (CH_3)	1,05 s
28	32,3 (CH_3)	1,18 s	32,1 (CH_3)	1,18 s
29	35,2 (CH_3)	0,96 s	35,0 (CH_3)	0,96 s
30	31,9 (CH_3)	1,00 s	31,8 (CH_3)	1,00 s

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CDCl_3); (^a Subhadhirasakul, 2005; CDCl_3)

A **friedelina** segundo literatura apresenta atividade estrogênica (Aswar *et al.*, 2010), atividade anti-inflamatória (Thanakijcharoenpath and Theanphong, 2007) e forte atividade antitumoral (Lu *et al.*, 2010).

5.15. Substância M7



A substância **M7** foi isolada da fração hexânica dos galhos como cristais brancos.

O espectro de massas de baixa resolução obtido por inserção direta via sólido (**Figura 74**), apresentou o pico do íon molecular em m/e 426 [M^+] correspondente a $C_{30}H_{50}O$, juntamente com o fragmento m/e 411 [$M^+ - 15$] referente a perda do grupo metila a partir do pico do íon molecular. Verificou-se ainda o pico base em m/e 218 [M^+] - [$C_{14}H_{23}O$] $^+$, correspondendo a uma possível clivagem nos carbonos C-8/C-14 e C-9/C-11 (**Esquema 9**), e ainda um pico em m/e 189 [$207 - OH/ + H$] $^+$ com transferência de um hidrogênio através de rearranjo (Branco & Pizzolatti, 2002).

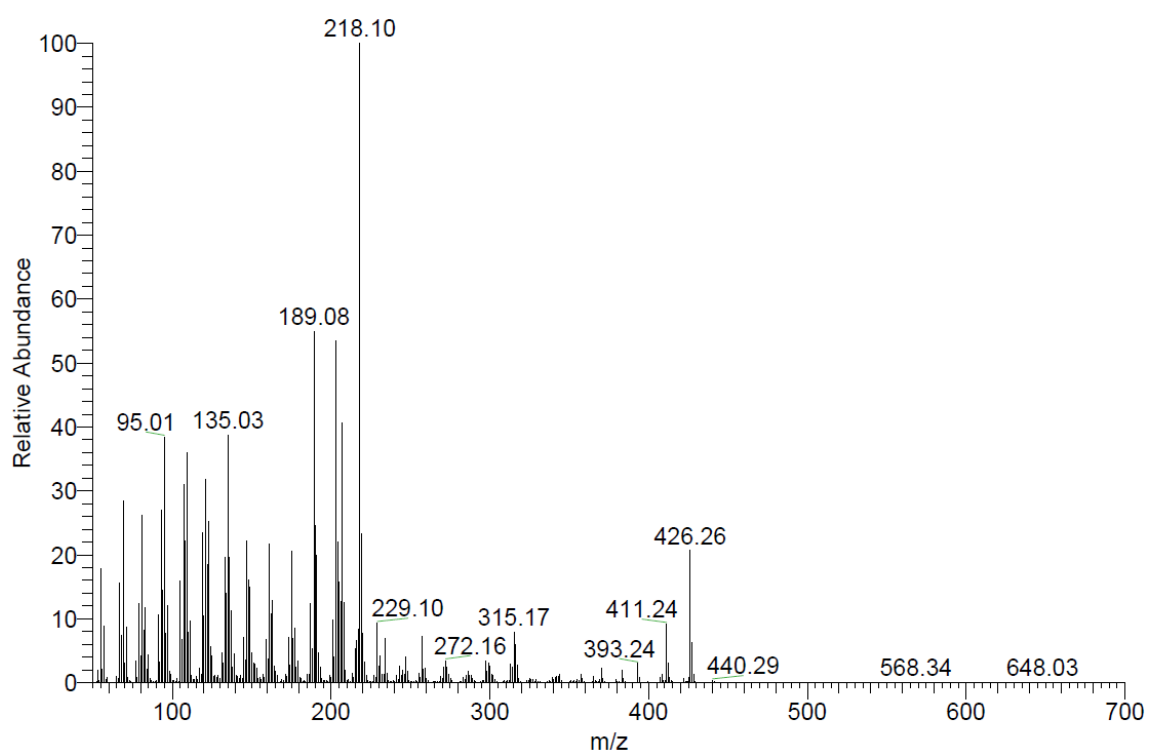
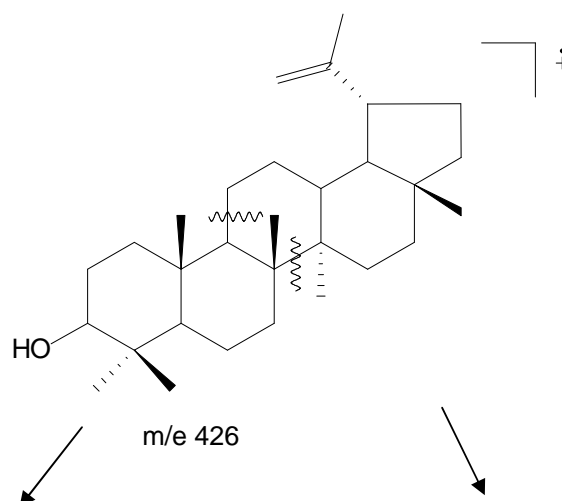
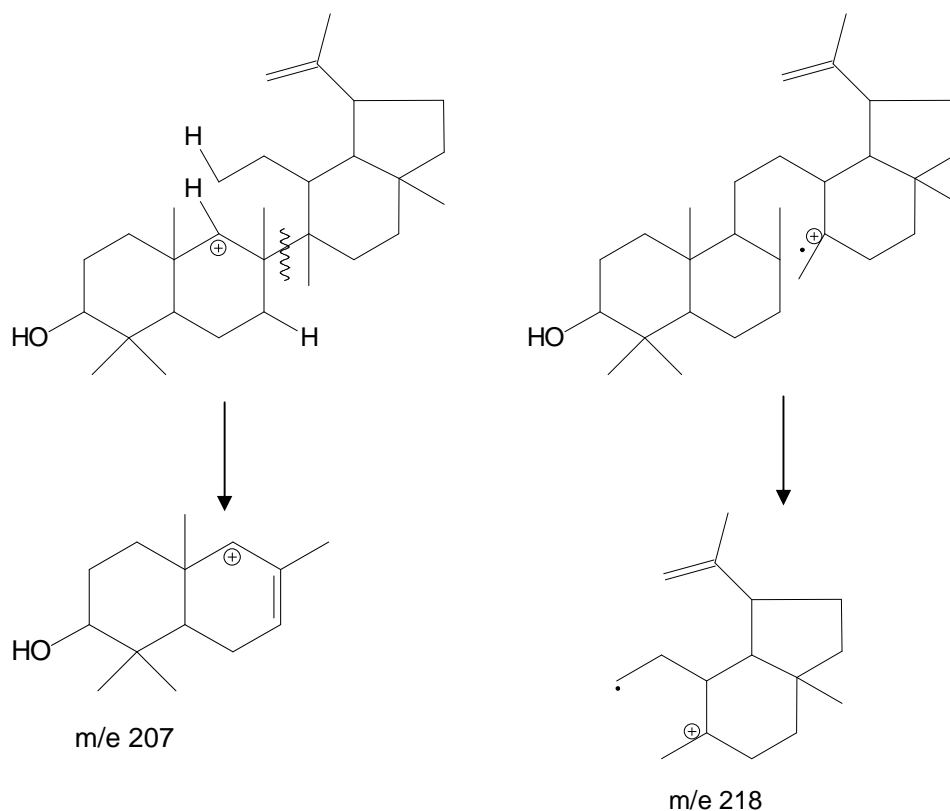


Figura 74: Espectro de massas (70 eV) de M7





Esquema 9: Propostas de fragmentações da substância **M7**.

No espectro de RMN ^1H (**Figura 75**) da substância **M7** foi observado seis singletos metílicos de carbono terciário em δ_{H} 0,77 (H-28), 0,79 (H-23), 0,84 (H-24), 0,95 (H-25), 0,97 (H-26) e 1,04 (H-27), um grupo metino como singlete em δ_{H} 1,68 (H-30), um grupo carbinólico secundário em δ_{H} 3,20 (*dd*, $J = 10,8$ e $5,1$ Hz, H-3) e um grupo exometileno em δ_{H} 4,57 (1H, *d*, $J = 2,4$ Hz, $\text{H}_{\text{a}}\text{-29}$) e δ_{H} 4,69 (1H, *dq*, $J = 1,35$ e $2,55$ Hz, $\text{H}_{\text{b}}\text{-29}$), típico de triterpenóides pentacíclicos como o lupeol (**Tabela 65**).

A determinação estrutural de **M7** foi também determinada pelo seu espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (**Figura 76**) que mostrou sete grupos metílicos em δ_{C} : 28,2 (C-23), 19,5 (C-30), 18,2 (C-28), 16,3 (C-25), 16,2 (C-26), 15,6 (C-24), 14,8 (C-27), um grupo exometileno em δ_{C} : 151,2 (C-20), 109,5 (C-29) e um carbono secundário com uma hidroxila ligada em δ_{C} 79,2 (C-3), além de dez carbonos metilênicos, cinco carbonos metínicos e cinco carbonos quaternários. A blindagem do carbono metílico-23 de **M7** pode ser devido à influência do grupo hidroxílico adjacente C-3.

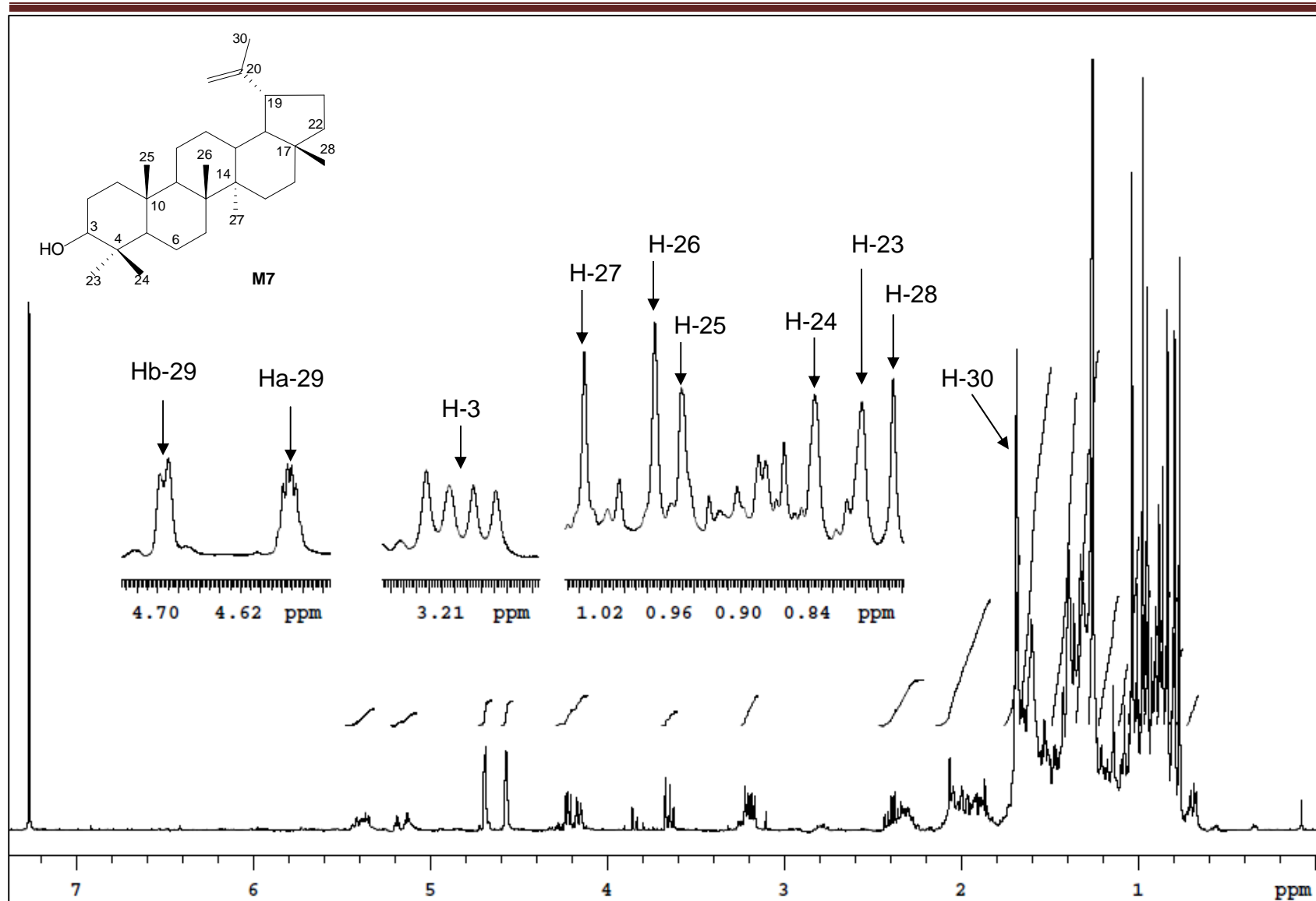


Fig. 75: Espectro de RMN de ^1H (CD_3Cl ; 300,06 MHz) para a substância M7.

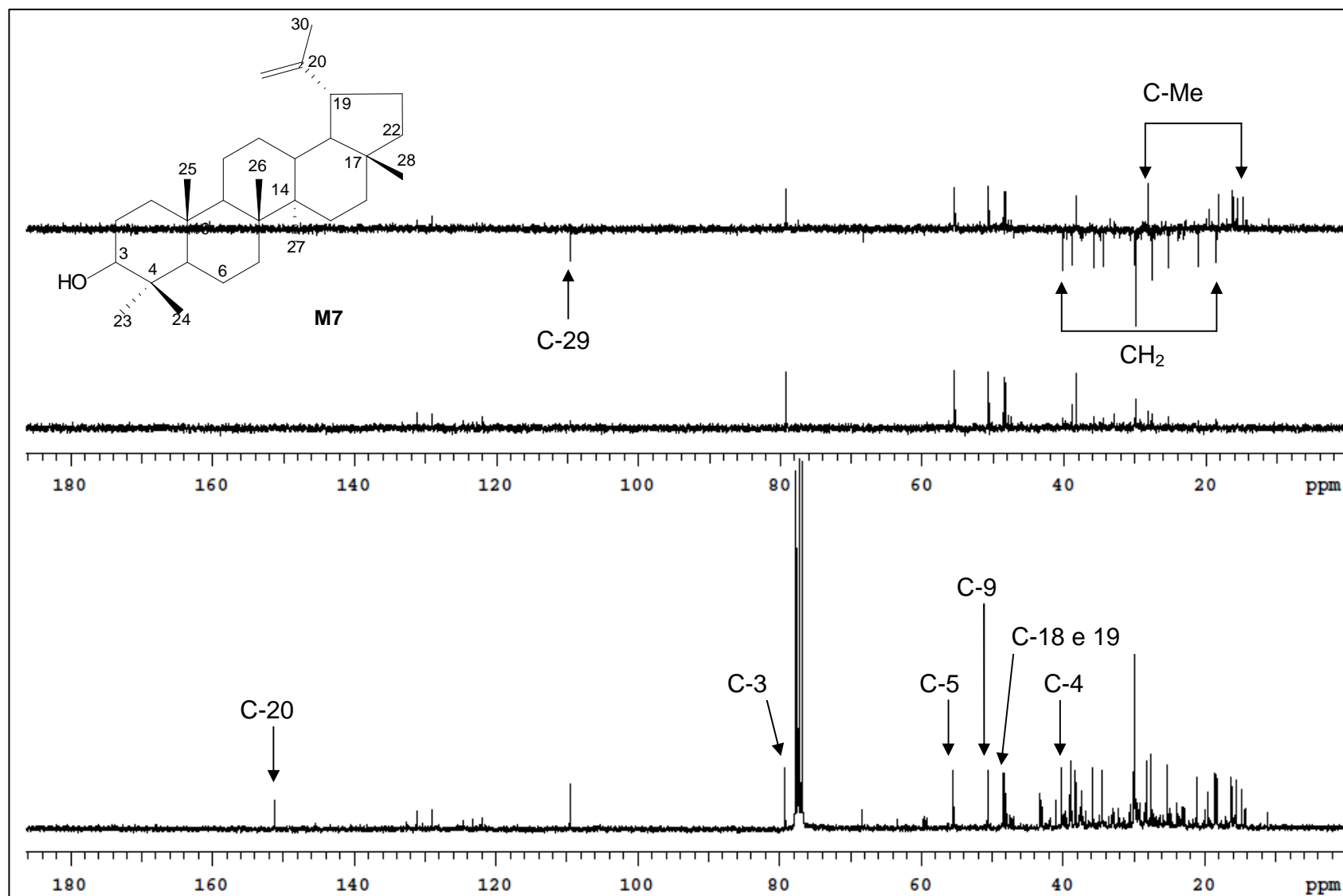


Fig. 76: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (CD_3Cl ; 75,45 MHz) para a substância M7.

Tabela 65: Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ e ^1H para a substância **M7** em CDCl_3 [ppm] (multiplicidade J Hz) e dados da literatura para **lupeol**.

C	M7	^1H	Lupeol^a	$^1\text{H}^b$
1	38,9 (CH ₂)		38,7 (CH ₂)	
2	27,6 (CH ₂)		27,4 (CH ₂)	
3	79,2 (CH)	3,20 <i>dd</i> / $J= 5,1; 10,8$ Hz	78,9 (CH)	3,18 <i>dd</i> , $J=9,6; 6,2$ Hz
4	39,1 (C)		38,8 (C)	
5	55,5 (CH)		55,3 (CH)	
6	18,5 (CH ₂)		18,3 (CH ₂)	
7	34,5 (CH ₂)		34,2 (CH ₂)	
8	41,0 (C)		40,8 (C)	
9	50,6 (CH)		50,4 (CH)	
10	37,4 (C)		37,1 (C)	
11	21,1 (CH ₂)		20,9 (CH ₂)	
12	25,3 (CH ₂)		25,1 (CH ₂)	
13	38,2 (CH)		38,0 (CH)	
14	43,0 (C)		42,8 (C)	
15	27,6 (CH ₂)		27,4 (CH ₂)	
16	35,8 (CH ₂)		35,5 (CH ₂)	
17	43,2 (C)		43,0 (C)	
18	48,5 (CH)		48,2 (CH)	
19	48,2 (CH)		47,9 (CH)	
20	151,2 (C)		150,9 (C)	
21	29,9 (CH ₂)		29,8 (CH ₂)	
22	40,2 (CH ₂)		40,0 (CH ₂)	
23	28,2 (CH ₃)	0,79 <i>s</i>	28,0 (CH ₃)	0,78
24	15,6 (CH ₃)	0,84 <i>s</i>	15,4 (CH ₃)	0,81
25	16,3 (CH ₃)	0,95 <i>s</i>	16,1 (CH ₃)	0,92
26	16,2 (CH ₃)	0,97 <i>s</i>	15,9 (CH ₃)	0,94
27	14,8 (CH ₃)	1,04 <i>s</i>	14,5 (CH ₃)	1,02
28	18,2 (CH ₃)	0,77 <i>s</i>	18,0 (CH ₃)	0,75
29	109,5 (CH ₂)	Ha 4,57 <i>d</i> / $J= 2,4$ Hz Hb 4,69 <i>dq</i> / $J= 1,2; 2,4$ Hz	109,3 (CH ₂)	Ha 4,56 (1H, <i>d</i> , $J=0,4$ Hz Hb 4,67 (1H, <i>dq</i> , $J=0,4; 0,5$ Hz)
30	19,5 (CH ₃)	1,68 <i>s</i>	19,3 (CH ₃)	1,67 <i>br d</i> , $J=0,5$ Hz

(δ -ppm; 300,06 e 75,45 MHz; CDCl_3); (CDCl_3 ; ^a De Souza *et al.*, 2001 e ^b Haque *et al.*, 2006)

Estes dados espectroscópicos estão concordantes com os da literatura (De Souza *et al.*, 2001 e Haque *et al.*, 2006) e confirmaram a indentidade de **M7** para o triterpenóide **lupen-20(29)-3 β -ol (lupeol) (Tabela 65)**.

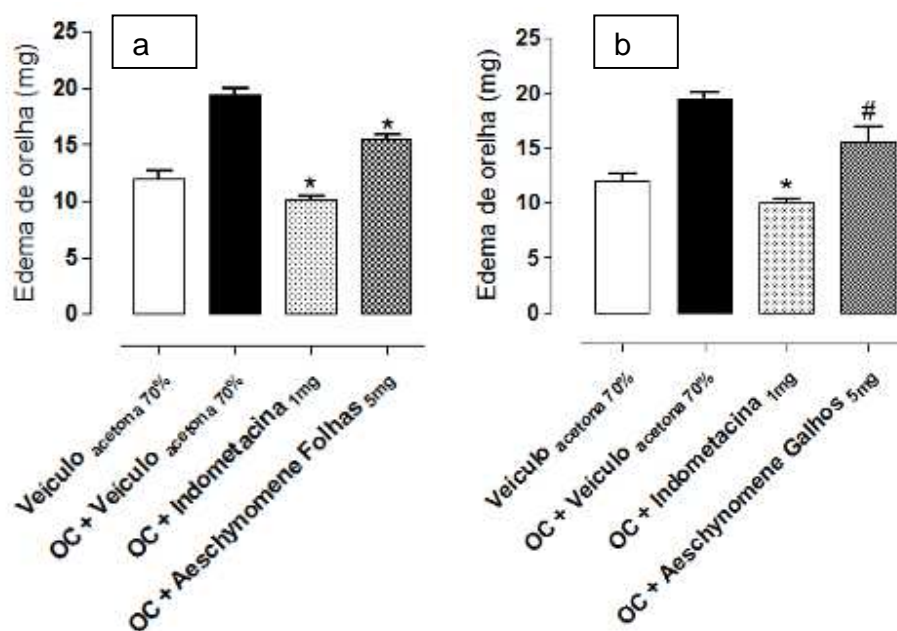
O **lupeol** segundo literatura é ativo em diversos estados patológicos de inflamação, tais como câncer e infecção viral (Gallo & Sarachine, 2009), inibidor do câncer de pele em camundongos (Saleem *et al.*, 2004), possui atividades anti-inflamatória, antimicobacteriana, antitumoral, antioxidante, antimutagênica, antiartríticas, antilitíaca, antineoplásica, antimalárica e antiparasitária (Thanakijcharoenpath & Theanphong, 2007; Noldin *et al.*, 2003; Agarwal & Rangari, 2003; Sousa-Jr. *et al.*, 2009; Akihisa *et al.*, 1996).

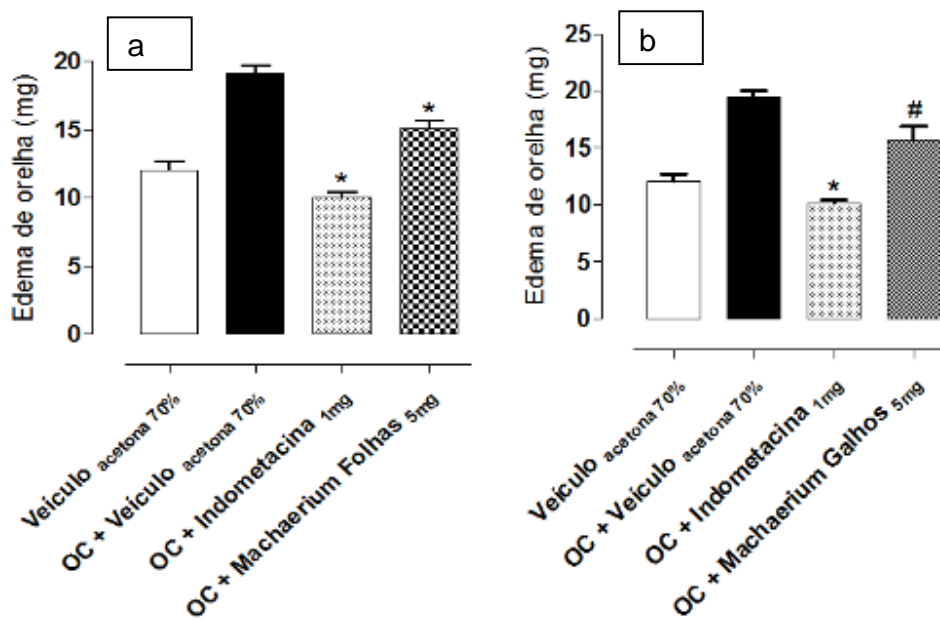
6. Resultado das Atividades Farmacológicas:

6.1. Teste do Edema de Orelha

6.1.1. Efeito do extrato bruto das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* e *M. hirtum* sobre o edema de orelha

De acordo com as **figuras 77a e 77b** foi possível observar que os extratos brutos de *A. fluminensis* das folhas e dos galhos causaram uma inibição da resposta inflamatória em 54,4% e 51,8%, respectivamente. Como demonstrado nas **figuras 78a e 78b** o tratamento com o extrato bruto das folhas de *M. hirtum* causaram uma inibição maior (57,5%) quando comparado ao extrato bruto dos galhos (49,9%).

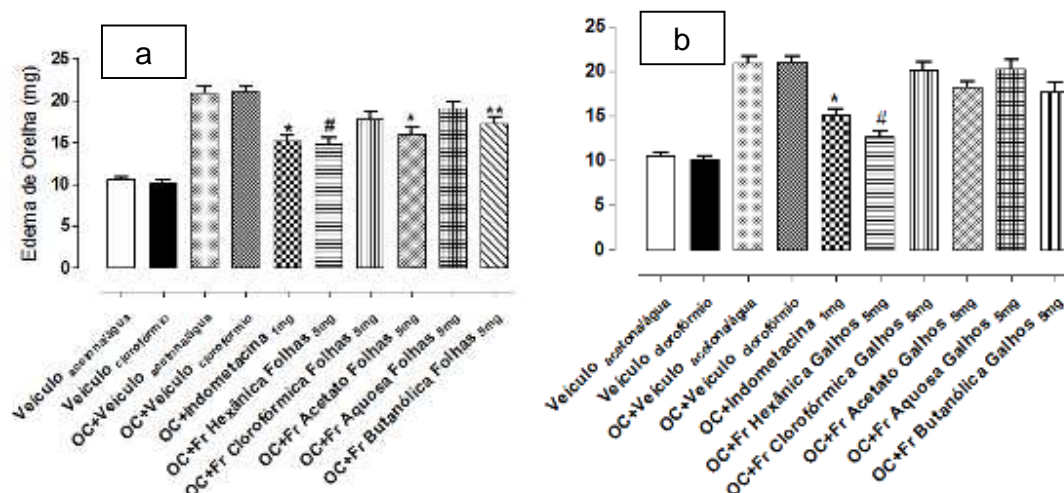




Figuras 77a e 77b, 78a e 78b: Efeito do extrato bruto das folhas e dos galhos de *Aeschynomene fluminensis* e *Machaerium hirtum* sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (30-40g). O extrato bruto na concentração indicada (5 mg/orelha), foi aplicado topicamente nas orelhas, imediatamente após a aplicação do OC (200 µL/orelha). A indometacina (I) aplicada por via tópica, 1mg, foi utilizada como antiinflamatório de referência (controle positivo) e a acetona 70% utilizada como veículo (V). Cada barra representa o peso médio das orelhas ± E.P.M., 6 h após aplicação de OC. *P<0,001 e #P<0,01, comparado ao grupo OC+V_{acetona 70%}, (ANOVA seguida do teste de Tukey).

6.1.2. Efeito das frações obtidas do extrato bruto das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* sobre o edema de orelha

As frações obtidas do extrato bruto das folhas de *A. fluminensis* que apresentaram resultado significativo na inibição do edema de orelha foram: hexânica (57,4%), CHCl₃ (30,1%), AcOEt (47,8%) e *n*-BuOH (35,3%), e apresentou inibição mas não foi significativa, a fração aquosa (18,3%) das folhas. As frações obtidas do extrato bruto dos galhos de *A. fluminensis* que apresentaram inibição significativa do edema de orelha foram: e hexânica (77,0%), AcOEt (26,3%) e *n*-BuOH (31,6%) dos galhos (**Figura 79a e 79b**).



Figuras 79a e 79b: Efeito das frações das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (30-40g). Os veículos, a indometacina (1 mg/orelha) (dissolvidas em acetona/água) e as frações hexânica e clorofórmica (5 mg/orelha) (dissolvida em clorofórmio), acetato de etila, *n*-butanólica e aquosa (5 mg/orelha) (dissolvidas em acetona/água) das folhas e dos galhos, foram aplicadas topicamente nas orelhas, imediatamente após a aplicação do OC (200 µL/orelha). A indometacina (I) aplicada por via tópica, 1mg, foi utilizada como antiinflamatório de referência (controle positivo) e a acetona 70% e o clorofórmio foram utilizados como veículo (V) (20 µL/orelha). Cada barra representa o peso médio das orelhas ± E.P.M., 6 h após aplicação de OC. *P<0,001 e **P<0,05, comparado ao grupo OC+V_{acetona 70%}; #P<0,001 comparado ao OC+V_{clorofórmio} (ANOVA seguida do teste de Tukey, com 5% de nível de significância).

6.1.3. Efeito das frações obtidas do extrato bruto das folhas e dos galhos de *M. hirtum* sobre o edema de orelha

As frações do extrato bruto das folhas de *M. hirtum* que apresentaram atividade inibitória significativa do edema de orelha foram: hexânica (33,1%) e AcOEt (32,7%), e apresentaram inibição mas não significativa foram: *n*-BuOH (17,8%) e a hidrometanólica (10,7%). As frações de *M. hirtum* obtidas dos galhos que apresentaram uma atividade inibitória significativa do edema de orelha foram: hexânica (55,6%), CHCl₃ (35,4%), AcOEt (33,1%) e aquosa (52,5%), e apresentou inibição mas não significativa foi: *n*-BuOH (17,8%) (**Figura 80 e 81**).

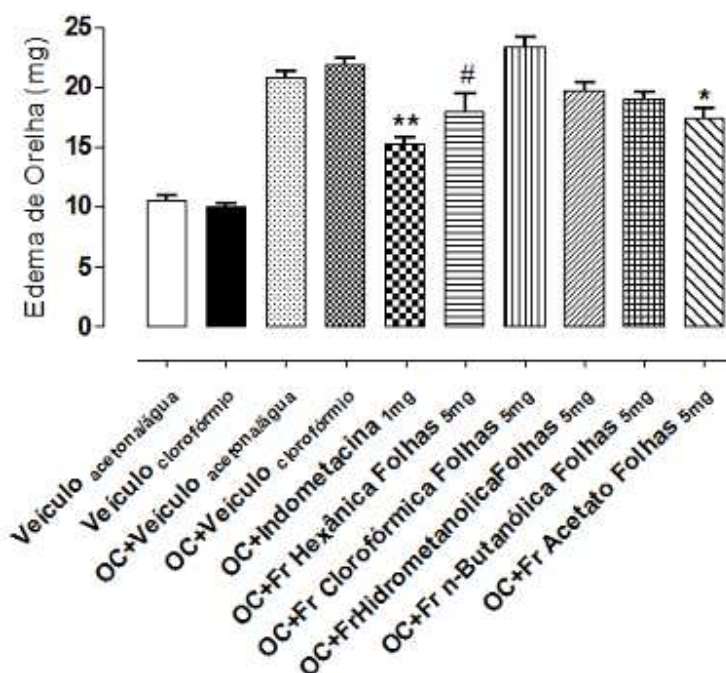


Figura 80: Efeito das frações das folhas de *M. hirtum* sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (30-40g). Os veículos, a indometacina (1 mg/orelha) (dissolvida em acetona/água) e as frações hexânica e clorofórmica (5 mg/orelha) (dissolvidas em clorofórmio), acetato de etila, *n*-butanólica e hidrometanólica (5 mg/orelha) (dissolvidas em acetona/água) das folhas, foram aplicadas topicamente nas orelhas, imediatamente após a aplicação do OC (200 μ L/orelha). A indometacina (I) aplicada por via tópica, 1mg, foi utilizada como antiinflamatório de referência (controle positivo) e a acetona 70% e o clorofórmio foram utilizados como veículo (V) (20 μ L/orelha). Cada barra representa o peso médio das orelhas \pm E.P.M., 6 h após aplicação de OC. * $P < 0,01$ e ** $P < 0,001$, comparado ao grupo OC+V_{acetona 70%}; # $P < 0,05$ comparado ao OC+V_{clorofórmio} (ANOVA seguida do teste de Tukey, com 5% de nível de significância).

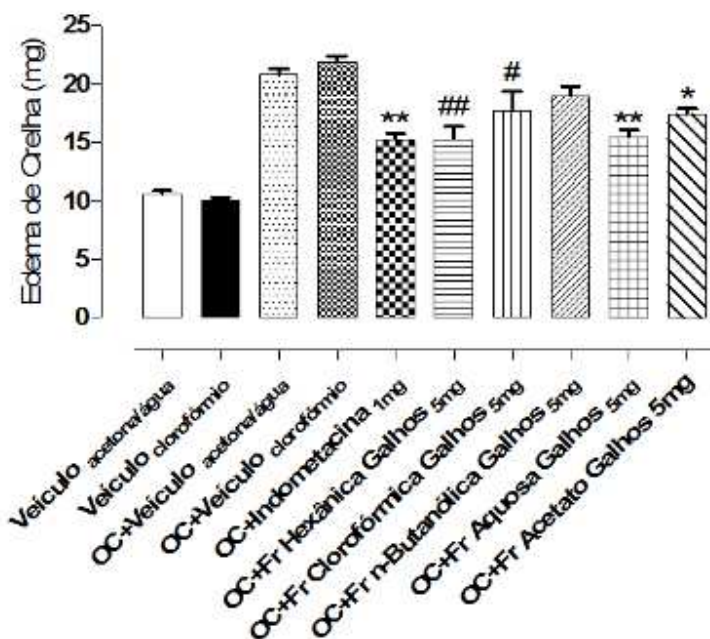


Figura 81: Efeito das frações dos galhos de *M. hirtum* sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (30-40g). Os veículos, a indometacina (1 mg/orelha) (dissolvida em acetona/água) e as frações hexânica e clorofórmica (5 mg/orelha) (dissolvidas em clorofórmio), acetato de etila, *n*-butanólica e aquosa (5 mg/orelha) (dissolvidas em acetona/água) dos galhos, foram aplicadas topicamente nas orelhas, imediatamente após a aplicação do OC (200 μ L/orelha). A indometacina (I) aplicada por via tópica, 1mg, foi utilizada como antiinflamatório de referência (controle positivo) e a acetona 70% e o clorofórmio foram utilizados como veículo (V) (20 μ L/orelha). Cada barra representa o peso médio das orelhas \pm E.P.M., 6 h após aplicação de OC. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$, comparado ao grupo OC+V_{acetona 70%}; # $P < 0,01$ ## $P < 0,001$ comparado ao OC+V_{clorofórmio} (ANOVA seguida do teste de Tukey, com 5% de nível de significância).

6.1.4. Efeito da mistura swertisina e isovitexina e a substância 4-hidróxi-*N*-metil-prolina isolada das folhas e galhos de *M. hirtum* sobre o edema de orelha

Das substâncias isoladas de *M. hirtum*, que foram testadas apenas a substância 4-hidróxi-*N*-metil-prolina causou uma redução do edema de orelha (26,8%) (Figura 82 e 83). Em Moreira *et al.*, (2000) esta substância (4-hidróxi-*N*-metil-prolina) apresentou um percentual de inibição significativa (35,0%) no modelo de edema de pata na dose de 200 mg/kg, em ratos Wistar (150–250 g).

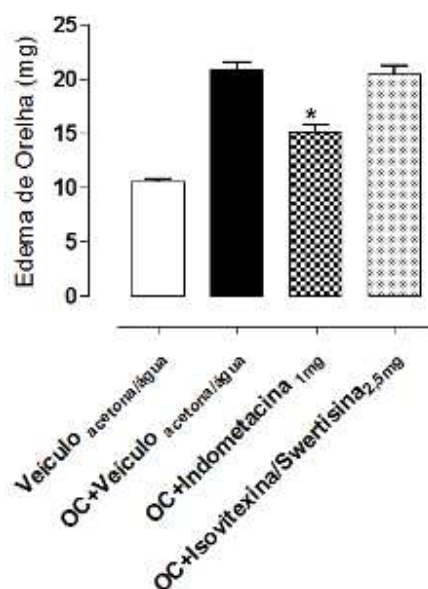


Figura 82: Efeito da mistura swertisina e isovitexina isolada nas frações acetato de etila das folhas e acetato de etila e *n*-butanólica dos galhos de *M. hirtum* sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (30-40g). O veículo, a indometacina (1 mg/orelha) (dissolvida em acetona/água) e a mistura swertisina e isovitexina (2,5 mg/orelha) (dissolvida em acetona/água), foi aplicada topicamente nas orelhas, imediatamente após a aplicação do OC (200 µL/orelha). A indometacina (I) aplicada por via tópica, 1mg, foi utilizada como antiinflamatório de referência (controle positivo) e a acetona 70% foi utilizada como veículo (V) (20 µL/orelha). Cada barra representa o peso médio das orelhas ± E.P.M., 6 h após aplicação de OC. *P<0,001 comparado ao grupo OC+V_{acetona 70%}; (ANOVA seguida do teste de Tukey, com 5% de nível de significância).

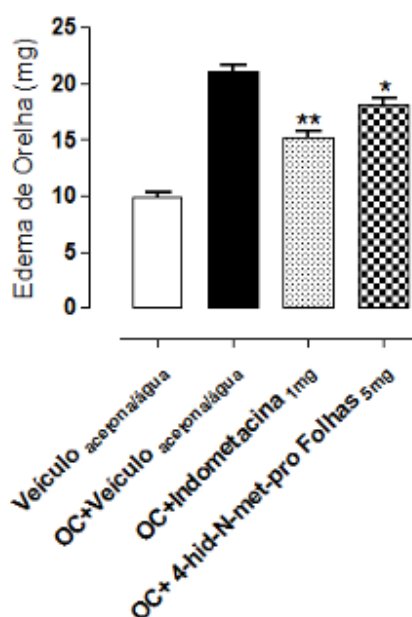


Figura 83: Efeito da substância 4-hidróxi-*N*-metil-prolina isolada nas frações *n*-butanólica e hidrometanólica das folhas e aquosa dos galhos de *M. hirtum* sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (30-40g). O veículo, a indometacina (1 mg/orelha) (dissolvida em acetona/água) e a substância 4-hidróxi-*N*-metil-prolina (5,0 mg/orelha) (dissolvida em acetona/água), foi aplicada topicamente nas orelhas, imediatamente após a aplicação do OC (200 µL/orelha). A indometacina (I) aplicada por via tópica, 1mg, foi utilizada como antiinflamatório de referência (controle positivo) e a acetona 70% foi utilizada como veículo (V) (20 µL/orelha). Cada barra representa o peso médio das orelhas ± E.P.M., 6 h após aplicação de OC. * $P < 0,01$ e ** $P < 0,001$ comparado ao grupo OC+V_{acetona 70%}; (ANOVA seguida do teste de Tukey, com 5% de nível de significância).

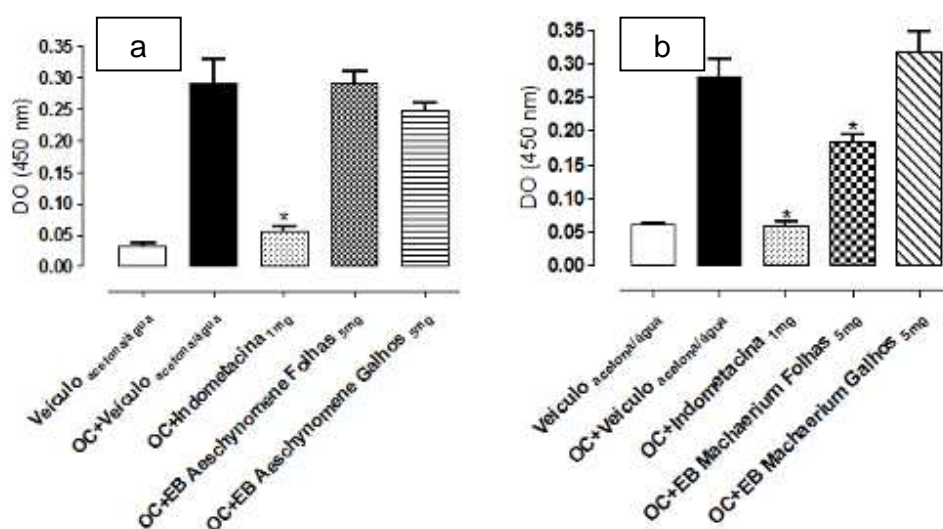
6.2. Efeito da atividade da enzima da mieloperoxidase (MPO)

A aplicação do óleo de cróton induziu um aumento na ordem de 20 vezes na atividade da MPO, na 6ª hora após a aplicação do óleo de cróton.

6.2.1. Efeito dos extratos brutos das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* e *M. hirtum* sobre a atividade da enzima de MPO

Os extratos brutos obtidos das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* (5,0 mg/orelha) não apresentaram atividade sobre MPO (**Figura 84a**).

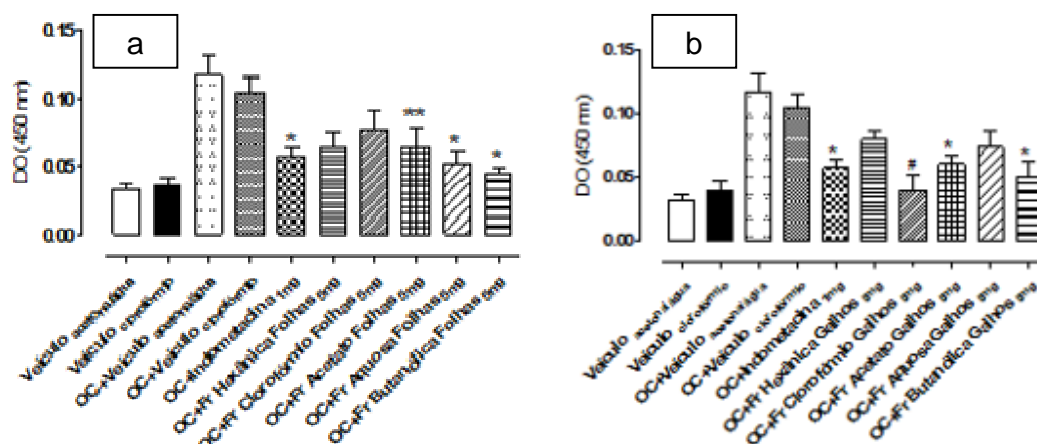
Por outro lado, o extrato bruto das folhas de *M. hirtum* (5,0 mg/orelha) causou uma redução significativa na atividade da enzima ($P < 0.001$). A aplicação do extrato, na dose de 5,0 mg/orelha diminuiu a atividade da mieloperoxidase, pois reduziu em 44,1%. O extrato bruto obtido dos galhos de *M. hirtum* não mostrou efeito inibitório sobre a MPO (**Figura 84b**).



Figuras 84a e 84b: Atividade da enzima da MPO no tecido das orelhas de camundongos Swiss, machos (30-40g). Os animais foram tratados por via tópica com veículo (acetona/água 7:3) extrato bruto (EB) das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* e *M. hirtum* (5 mg) e indometacina (1 mg), imediatamente após a aplicação do OC. Cada coluna representa a atividade média da MPO \pm E.P.M. * $P < 0,001$ comparado ao grupo OC+V_{acetona 70%}; (ANOVA seguida do teste de Tukey, com 5% de nível de significância).

6.2.2. Efeito das frações obtidas do extrato bruto das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* sobre a atividade da enzima da MPO

Para *A. fluminensis* (5,0 mg/orelha) todas as frações reduziram a migração de neutrófilos. Para as frações das folhas foram: hexânica (57,8%), CHCl_3 (39,6%), AcOEt (61,7%), *n*-BuOH (86,4%) e aquosa (77,0%) e dos galhos foram: hexânica (38,9%), CHCl_3 (100,0%), AcOEt (67,1%), *n*-BuOH (78,8%) e aquosa (50,9%) que provocaram redução acentuada na atividade da enzima de mieloperoxidase mostrando resultados muito significativos (**Figura 85a e 85b**).



Figuras 85a e 85b: Atividade da enzima da MPO no tecido das orelhas de camundongos Swiss, machos (30-40g). Os animais foram tratados por via tópica com os veículos (acetona/água 7:3 e clorofórmio), as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, *n*-butanólica e aquosa das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* (5 mg) e indometacina (1 mg), imediatamente após a aplicação do OC. Cada coluna representa a atividade média da MPO \pm E.P.M. * $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ comparado ao grupo OC+V_{acetona 70%}; (ANOVA seguida do teste de Tukey, com 5% de nível de significância).

6.2.3. Efeito das frações obtidas do extrato bruto das folhas e dos galhos de *M. hirtum* sobre a atividade da enzima da MPO

As frações obtidas das folhas de *M. hirtum* (5,0 mg/orelha) que provocaram redução significativa na atividade da enzima de mieloperoxidase foram: a hexânica (57,0%) e a AcOEt (63,8%) e as obtidas dos galhos de *M. hirtum* (5,0 mg/orelha) foram: a hexânica (63,8%), a CHCl₃ (93,0%), a AcOEt (98,2%), a *n*-BuOH (61,4%) e a aquosa (47,3%) (**Figura 86a e 86b**).

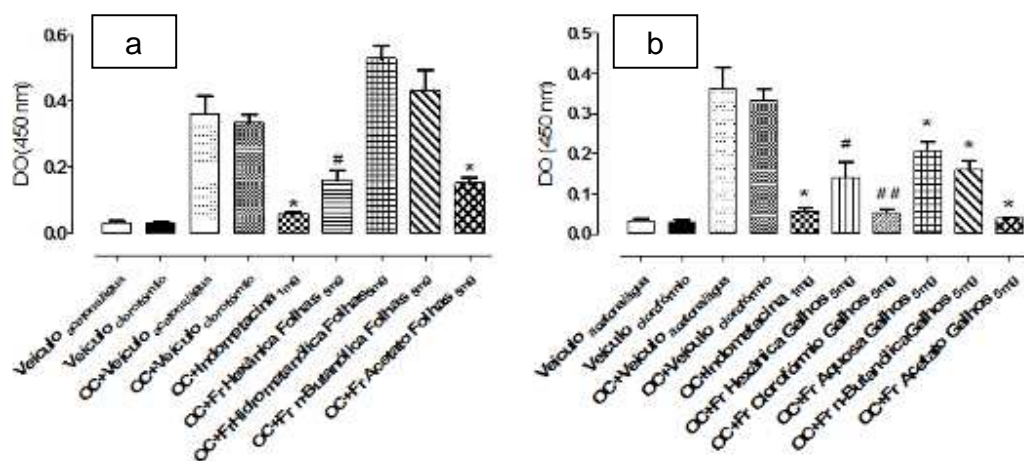
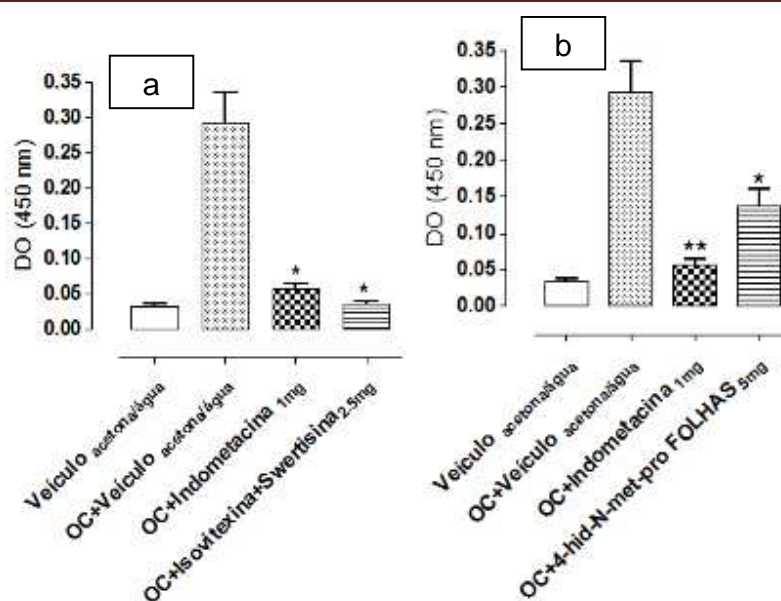


Figura 86a e 86b: Atividade da enzima da MPO no tecido das orelhas de camundongos Swiss, machos (30-40g). Os animais foram tratados por via tópica com os veículos (acetona/água 7:3 e clorofórmio), as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, *n*-butanólica e aquosa e hidrometanólica das folhas e dos galhos de *M. hirtum* (5 mg) e indometacina (1 mg), imediatamente após a aplicação do OC. Cada coluna representa a atividade média da MPO \pm E.P.M. * $P < 0,001$ comparado ao grupo OC+V_{acetona 70%}; e # $P < 0,05$ e ## $P < 0,001$ comparado ao grupo OC+V_{clorofórmio} (ANOVA seguida do teste de Tukey, com 5% de nível de significância).

6.2.4. Efeito da mistura swertisina e isovitexina e a substância 4-hidróxi-N-metil-prolina isolada das folhas e galhos de *M. hirtum* sobre a atividade da enzima da MPO

A mistura swertisina e isovitexina (2,5 mg/orelha) e a substância 4-hidróxi-N-metil-prolina (5,0 mg/orelha) isoladas de *M. hirtum*, causaram uma redução da atividade da enzima de mieloperoxidase de 98,8% e 59,7% respectivamente (Figura 87a e 87b).



Figuras 87a e 87b: Atividade da enzima da MPO no tecido das orelhas de camundongos Swiss, machos (30-40g). Os animais foram tratados por via tópica com os veículos (acetona/água 7:3 e clorofórmio), a mistura swertisina e isovitexina (2,5 mg) e a substância 4-hidróxi-*N*-metil-prolina (5 mg) das folhas e dos galhos de *M. hirtum* e indometacina (1 mg), imediatamente após a aplicação do OC. Cada coluna representa a atividade média da MPO \pm E.P.M. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$ comparado ao grupo OC+V_{acetona 70%}; (ANOVA seguida do teste de Tukey, com 5% de nível de significância).

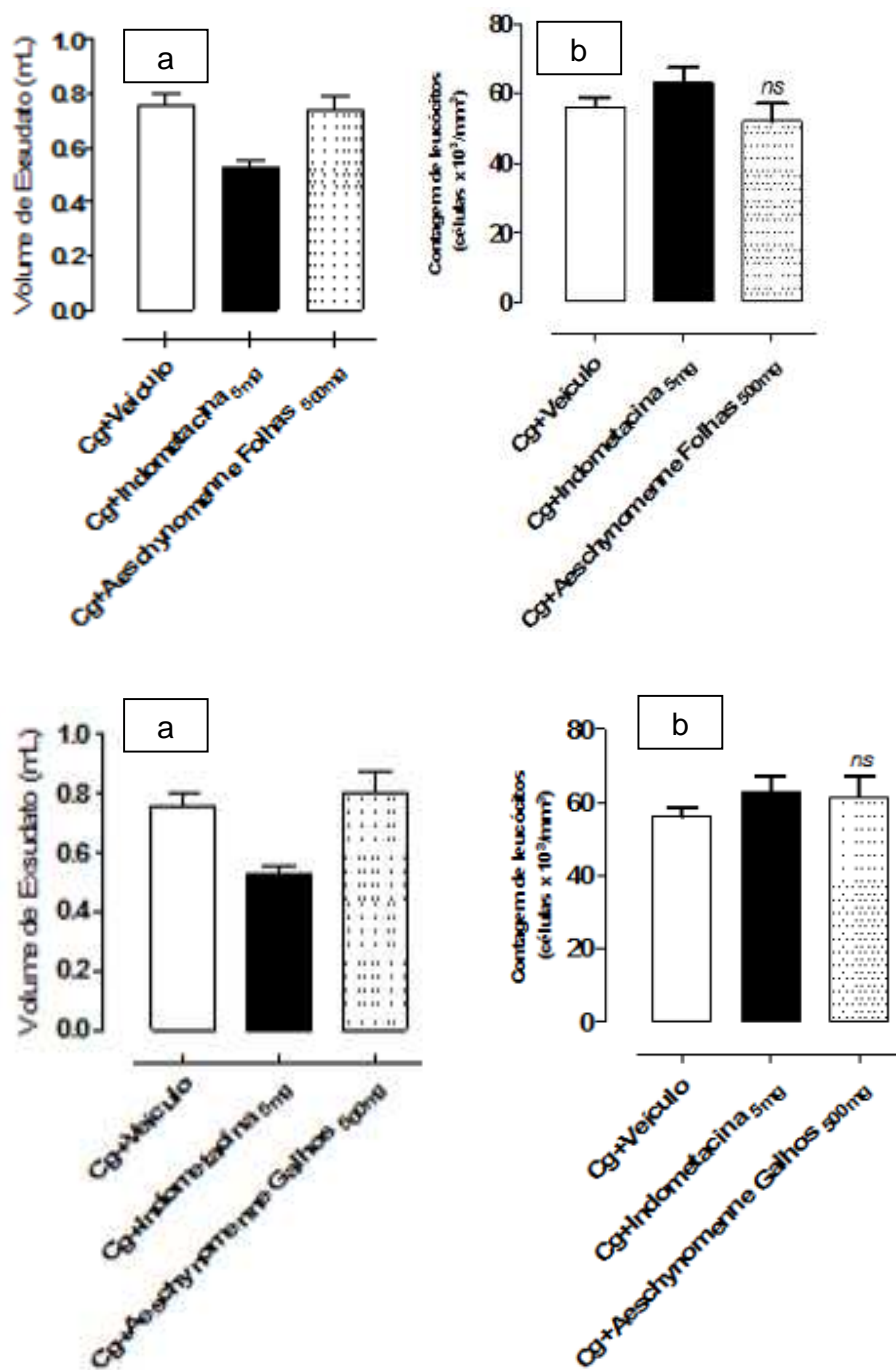
6.3. Avaliação da atividade de pleurisia

O teste consistiu em avaliar o efeito do extrato bruto tanto das folhas como dos galhos de *A. fluminensis* e de *M. hirtum* sobre o acúmulo de exsudato pleural (aumento de permeabilidade vascular) e a migração de leucócitos induzidos pela injeção intrapleural de carragenina em ratos Wistar, machos (180-220 g). Para o teste de pleurisia o mesmo consistiu em avaliar a redução no volume de líquido produzido na pleura após a administração das substâncias que foram analisadas.

6.3.1. Efeito dos extratos brutos das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* sobre a pleurisia

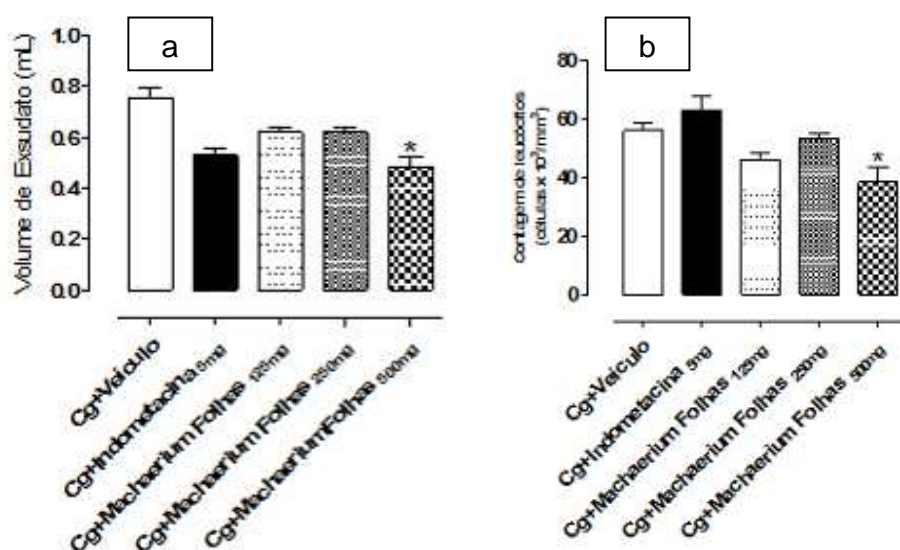
Para *A. fluminensis* (folhas e galhos) não houve redução do volume do exsudato inflamatório pleural e do número de leucócitos migrados quando

comparados aos animais controles (Figuras 88a, 88b, 89a e 89b), já para *M. hirtum* apenas o extrato bruto das folhas e na dose de 500 mg/kg, causou uma inibição significativa de exsudato inflamatório pleural ($0,4857 \pm 0,03891$ mL) e do número de leucócitos migrados ($38,54 \pm 5,139$ células $\times 10^3/\text{mm}^3$) (Figuras 90a, 90b, 91a e 91b).



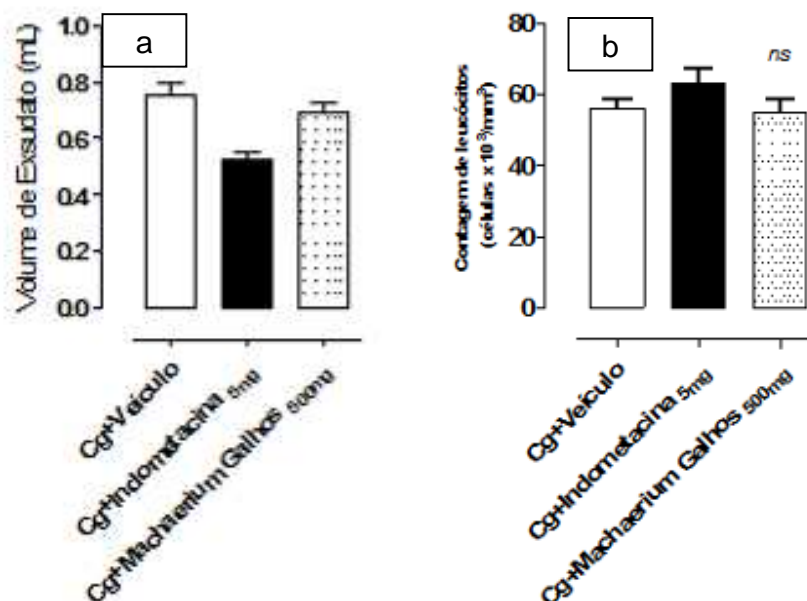
Figuras 88a, 88b, 89a e 89b: Efeito do extrato bruto das folhas e dos galhos de *Aeschynomene fluminensis* sobre o acúmulo de exsudato pleural e migração celular (pleurisia) induzido pela injeção intrapleural de carragenina (Cg) em ratos Wistar (180-220 g). Os animais foram tratados por via oral com os extratos brutos das folhas e dos galhos de *A. fluminensis* (500 mg/kg), 60 minutos antes da injeção de carragenina (200 µg). A indometacina (Indo) administrada por via oral, 5 mg/kg, foi utilizada como anti-inflamatório de referência (controle positivo). Um grupo de animais recebeu o veículo (água). Cada ponto representa o volume médio de exsudato pleural ± E.P.M. ns: não significativo comparado ao grupo controle (Cg+água) (ANOVA, teste de Tukey).

6.3.2. Efeito dos extratos brutos das folhas de *M. hirtum* (500, 250 e 125 mg/kg) sobre a pleurisia



Figuras 90a e 90b: Efeito do extrato bruto das folhas de *Machaerium hirtum* sobre o acúmulo de exsudato pleural e migração celular (pleurisia) induzido pela injeção intrapleural de carragenina (Cg) em ratos Wistar, machos (180-220 g). Os animais foram tratados por via oral com os extratos brutos das folhas (500, 250 e 125 mg/kg) de *M. hirtum* 60 minutos antes da injeção de carragenina (200 µg). A indometacina (Indo) administrada por via oral, 5 mg/kg, foi utilizada como anti-inflamatório de referência (controle positivo). Um grupo de animais recebeu o veículo (água). Cada ponto representa o volume médio de exsudato pleural ± E.P.M. *P<0,001 (acúmulo de exsudato pleural) e *P<0,05 (migração celular), comparado ao grupo controle (Cg+água) (ANOVA, teste de Tukey).

6.3.3. Efeito dos extratos brutos dos galhos de *M. hirtum* (500 mg/kg) sobre a pleurisia



Figuras 91a e 91b: Efeito do extrato bruto dos galhos de *Machaerium hirtum* sobre o acúmulo de exsudato pleural e migração celular (pleurisia) induzido pela injeção intrapleural de carragenina (Cg) em ratos Wistar, machos (180-220 g). Os animais foram tratados por via oral com os extratos brutos dos galhos (500 mg/kg) de *M. hirtum* 60 minutos antes da injeção de carragenina (200 µg). A indometacina (Indo) administrada por via oral, 5 mg/kg, foi utilizada como anti-inflamatório de referência (controle positivo). Um grupo de animais recebeu o veículo (água). Cada ponto representa o volume médio de exsudato pleural ± E.P.M. (ANOVA, teste de Tukey).

6.4. Avaliação da atividade antitumoral

O teste foi feito com o extrato bruto e as frações, tanto das folhas como dos galhos de *A. fluminensis* e também para a canferitrina, substância isolada na maioria das frações de *A. fluminensis*. Verifica-se, a partir dos resultados mostrados na tabela 66, que o extrato bruto e as frações hexânica, AcOEt, *n*-BuOH e aquosa das folhas, bem como as frações hexânica, CHCl₃, *n*-BuOH e aquosa dos galhos e também para a substância isolada, a canferitrina, tiveram pouca atividade sobre células Caco-2. Observa-se ainda que a fração CHCl₃ dos galhos (CC₅₀ de 372,73

µg/mL) e a canferitrina (CC₅₀ de 278 µg/mL) apresentaram os resultados mais promissores (**Tabela 66**).

Tabela 66: Dados do teste da atividade antitumoral sobre células **Caco-2**

<i>Aeschynomene fluminensis</i>	Extrato bruto e frações	CC ₅₀
Folhas	Extrato bruto	810 ± 15,34 µg/mL
	Fração hexânica	812,2 ± 44,55 µg/mL
	Fração clorofórmica	>1000 µg/mL
	Fração acetato de etila	673 ± 255,9 µg/mL
	Fração <i>n</i> -butanólica	781,8 ± 236,6 µg/mL
	Fração aquosa	740 ± 44,1 µg/mL
Galhos	Extrato bruto	>1000 µg/mL
	Fração hexânica	760,7 ± 3,6 µg/mL
	Fração clorofórmica	372,7 ± 67,13 µg/mL
	Fração acetato de etila	>1000 µg/mL
	Fração <i>n</i> -butanólica	725 ± 226,2 µg/mL
	Fração aquosa	780 ± 245,6 µg/mL
Substância isolada	Canferitrina	278 ± 42,9 µg/mL
Padrão	Taxol	3,8 µg/mL

7. Conclusão

O estudo químico da espécie vegetal *Aeschynomene fluminensis* conduziu ao isolamento da mistura dos esteróides estigmasterol e β -sitosterol, dos flavonoides canferitrina, α -raminoisorobina, 3-*O*-apiofuranosil-7-*O*-raminopiranosil-canferol, quercitrina e avicularina, da procianidina A₂, da flavanona iso-hemifloina, da isoflavona daidzeina e do poliol 3-*O*-metil-*quiro*-inositol. Na literatura não existem relatos do isolamento de nenhuma destas substâncias no gênero *Aeschynomene*. Nos ensaios de atividade anti-inflamatória realizados para os extratos brutos das folhas e dos galhos e suas frações, utilizando o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongo, todas as amostras provenientes das folhas apresentaram significativa inibição. Das amostras provenientes dos galhos, o extrato bruto e as frações hexânica, clorofórmica e *n*-butanólica foram as que apresentaram melhores resultados.

A atividade sobre a enzima mieloperoxidase (MPO), utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi também avaliada para os extratos brutos e as frações polares de *A. fluminensis*. Os resultados mostraram que as frações acetato de etila, *n*-butanólica e aquosa das folhas e dos galhos inibiram significativamente a enzima.

O flavonoide canferitrina foi encontrado nas frações polares das folhas e dos galhos em quantidades expressivas. Esta substância, e também a quercitrina e a procianidina A₂, isoladas da fração acetato de etila das folhas, são conhecidas como agentes anti-inflamatórios, e a presença das mesmas contribuem para as significativas atividades observadas nestas frações.

Na avaliação da atividade antiproliferativa para a célula Caco-2 para *A. fluminensis* verificou-se que a fração CHCl₃ dos galhos (CC₅₀ de 372,73 μ g/mL) e a canferitrina (CC₅₀ de 278 μ g/mL) foram moderadamente ativas.

O estudo fitoquímico de *Machaerium hirtum* resultou no isolamento das flavonas swertisina e isovitexina, do aminoácido 4-hidróxi-*N*-metilprolina, dos triterpenos friedelina e lupeol e da mistura dos esteróides estigmasterol e β -sitosterol. Na literatura não foram encontrados relatos do isolamento dessas

substâncias no gênero *Machaerium*, com exceção de β -sitosterol isolado em *M. villosum* e *M. kuhlmannii*.

Na atividade anti-inflamatória dos extratos brutos dos galhos e das folhas, de suas frações, da mistura das flavonas swertisina e isovitexina e de 4-hidróxi-*N*-metilprolina, foram observadas ativas as frações hexânica, acetato de etila e *n*-butanólica das folhas e dos galhos e a fração aquosa dos galhos. As atividades de inibição do edema de orelha apresentadas para a mistura de swertisina e isovitexina e para 4-hidroxi-*N*-metilprolina indicam que estas substâncias são responsáveis em parte, pelas atividades observadas para as frações polares.

Para o teste de pleurisia apenas apresentou atividade o extrato bruto das folhas de *M. hirtum* na dosagem de 500 mg/kg.

Sabem-se da crescente importância do estudo de Química de Produtos Naturais, no sentido de elucidar estruturas, metabólitos secundários, produzidos por plantas ainda não estudadas ou com poucos relatos na literatura.

Desta forma, este trabalho, por meio de estudo fitoquímico detalhado das espécies *A. fluminensis* e *M. hirtum*, além de testes biológicos realizados com as mesmas, se constituiu em importante contribuição para o conhecimento das espécies dos gêneros *Aeschynomene* e *Machaerium* ainda pouco estudados.

8. Referências

- Agarwal, R. B. e Rangari, V. D. "Antiinflammatory and antiarthritic activities of lupeol and 19 α -H lupeol isolated from *Strobilanthus callosus* and *Strobilanthus ixiocephala* roots". *Indian Journal of Pharmacology*, **2003**, 35, 384.
- Agrawal, P. K. "Studies in Organic Chemistry: Carbon-13 NMR of Flavonoids". Editora Elsevier Science, Lucknow-India, **1989**, 39, 194.
- Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Oinuma, H.; Kasahara, Y.; Yamanouchi, S.; Takido, M.; Kumari, K. e Tamura, T. "Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects." *Phytochemistry* **1996**, 43(6) 1255.
- Alves, H. M.; Arndt, V. H.; Ollis, W. D.; Eyton, W. B.; Gottlieb O. R. e Magalhães, M. T. "Triterpenoids isolated from *Machaerium incorruptibile*". *Phytochemistry*, **1966**, 5, 1327 (Short communication).
- Aragão, P. C. A.; Toledo, J. B.; Morais, A. A. e Braz-Filho, R. "Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*." *Quím. Nova*, **1990**, 13 (4), 254.
- Arruda, R. F. de. "Estudo químico e avaliação das atividades anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante e moluscicida da espécie vegetal *Aeschynomene sensitiva* SW. (Leguminosae)." Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2011.
- Aswar, U. M.; Bhaskaran, S.; Mohan, V. e Bodhankar, S. L. "Estrogenic activity of friedelin rich fraction (IND-HE) separated from *Cissus quadrangularis* and its effect on female sexual function." *Phcog Res*, **2010**, 2(3), 138.
- Borghi, G. A.; Górnaiak, S. L.; Latorre, A.; Lopes, L. M. X.; Lopes, P. L. e Haraguchi, M. "Rotenóides das sementes de *Aeschynomene indica* (Leguminosae)". *Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. **2006**.

- Bradley, P. P.; Priebat, D. A.; Christensen, R. D. e Rothstein, G. "Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker". *J. Invest. Dermatol.* **1982**, 78, 206.
- Braga de Oliveira, A.; Gottlieb, O. R.; Ollis, W. D. e Rizzini, C. T. "A Phylogenetic correlation of the genera *Dalbergia* and *Machaerium*". *Phytochemistry*, **1971**, 10, 1863.
- Braggio, M. M.; Lima, M. E. L.; Veasey, E. A. e Haraguchi, M. "Atividades farmacológicas das folhas da *Sesbania virgata* (CAV.) PERS". *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **2002**, 69 (4), 49.
- Branco, A.; & Pizzolatti, M. G. "CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (Euphorbiaceae)". *Quím. Nova*, **2002**, 25 (1), 15.
- Bruneton, J. "Elements de Fitoquímica y de Farmacognosia". 1ª ed., Editorial Acribia S.A.: Zaragoza, **1984**, 257p.
- Cechinel Filho, V. "Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI." *Quím. Nova*, **2000**, 23 (5), 680.
- Cechinel Filho, V.; Noldin, V. F.; Monache, F. D.; Bessani, J. D.; Cristmann, I. L.; Pedrosa, R.C. e Yunes, R.A. "Composição Química e Atividades Biológicas das Folhas de *Cynara scolymus* L. (Alcachofra) Cultivada no Brasil." *Quím. Nova*, **2003**, 26 (3), 331.
- Chua, M.-T.; Tung, Y.-T. e Chang, S.-T. "Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*." *Bioresource Technology* **2008**, 99, 1918.
- Colombo, R.; Yariwake, J. H.; Queiroz, E. F.; Ndjoko, K. e Hostettmann, K. "On-line Identification of Minor Flavones from Sugarcane Juice by LC/UV/MS and Post-Column Derivatization." *J. Braz. Chem. Soc.*, **2009**, 20 (9), 1574.

- Dall'Acqua, S.; Tomè, F.; Vitalini, S.; Agradi, E. e Innocenti, G. "In vitro estrogenic activity of *Asplenium trichomanes* L. extracts and isolated compounds". *J. of Ethnopharm.*, **2009**, 122, 424.
- David, J. P.; Santos, E. O. dos; Miranda, M. S.; Santos, I. D. dos; Barreiros, A. L. B. S. e David, J. M. "Atividade antioxidante da epicatequina-(2 β →7, 4 β →8)-epicatequina isolada de *Dioclea lasiophylla*". *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2002**, 12, supl., 05.
- DellaGreca, M.; Fiorentino, A.; Izzo, A.; Napoli, F.; Purcaro, R. e Zarrelli, A. "Phytotoxicity of Secondary Metabolites from *Aptenia cordifolia*". *Chemistry & Biodiversity*, **2007**, 4, 118.
- De Sousa, E.; Zanatta, L.; Seifriz, I.; Creczynski-Pasa, T. B.; Pizzolatti, M. G.; *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 829.
- De Souza, A. D. L.; da Rocha, A. F. I.; Pinheiro, M. L. B.; Andrade, C. H. de S.; Galotta, A. L. de A. Q.; dos Santos, M. do P. S. S. "Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae)." *Quím. Nova*, **2001**, 24 (4), 439.
- Donnelly, D. M. X.; O'Reilly, J.; Thompson, "Neoflavanoids of *Dalbergia cultrata*", *Phytochemistry*, **1972**, 11, 823.
- Elsohly, H. N.; Joshi, A. S. e Nimrod, A. C. "Antigiardial Isoflavones from *Machaerium aristulatum*". *Planta Medica*, **1999**, 65, 490.
- Farag, M. A.; Huhman, D. V.; Zhentian, L. e Sumner, L. W. "Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC–UV–ESI–MS and GC–MS". *Phytochemistry*, **2007**, 68, 342.
- Fernandes, A. O táxon *Aeschynomene* no Brasil. Editora Universidade Federal do Ceará. **1996**, 130 p.
- Fullas, F.; Kornberg, L. J.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Farnsworth, N. R.; Chagwedera, T. E. e Kinghorn, A. D. "Two New Aromatic Constituents from the Rootwood of *Aeschynomene mimosifolia*." *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 190.

- Gallo, M. B. C. e Sarachine, M. J. "Biological Activities of Lupeol." *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. **2009**, 3 (Special Issue 1) 46.
- Gottlieb, R. O; Oliveira, A. B.; Gonçalves, T. M. M.; Oliveira G. G.; Pereira, S. A.; "Isoflavonoids from *Cyclolobium* Species", *Phytochemistry*, **1975**, 17, 2495.
- Goulart, M. O. F.; Sant`ana, A. E. G.; Lima, R. A.; Cavalcante, S. "Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolanos A e B." *Quím. Nova*, **1993**, 16 (2), 95.
- Ghanta, S.; Banerjee, A.; Poddar, A. e Chattopadhyay, S. "Oxidative DNA Damage Preventive Activity and Antioxidant Potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a Natural Sweetener." *J. Agric. Food Chem*, **2007**, 55, 10962.
- Ghazali, R. A. e Waring, R. H. "The Effects of flavonoids on human phenolsulphotransferases: potential in drug metabolism and chemoprevention." *Life Sciences*, **1999**, 65 (16), 1625.
- Gupta, S. R.; Ravindranath, B. e Seshadri, T. R., "Synthesis of Some Flavonoid Glucosides of *Trifolium subterraneum*", *Phytochemistry*, **1971**, 10, 877.
- Haque, Md. E.; Shekhar, H. U.; Mohamad, A. U.; Rahman, H.; Islam, AKM M. e Hossain M. S. "Triterpenoids from the Stem Bark of *Avicennia officinalis*." *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* **2006**, 5 (1-2), 53 (June-December)
- Haraguchi, M.; Górnjak, S. L.; Ikeda, K.; Minami, Y; Kato, A.; Watson, A. A.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J. e Asano N. "Alkaloidal Components in the Poisonous Plant, *Ipomoea cárnea* (Convolvulaceae)". *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4995.
- Ikuno, A. A.; Braggio, M. M.; Haraguchi, M; "Antiherpes activities of fractions from *Sesbania virgata* leaves". *Arq. Inst. Biol.*, **2003**, 70 (2), 183.
- Jorge, A. P.; Horst, H.; de Sousa, E.; Pizzolatti, M. G.; Silva, F. R. "Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle". *Chem. Biol. Interact.* **2004**, 149, 89.

- Kissmann, K. G. "Plantas Infestantes e Nocivas". Tomo II, 2^a. ed., SP: BASF, **1999**, 978p.
- Kumari, A.; Yadav, S. K.; Pakade, Y. B.; Kumar, V.; Singh, B.; Chaudhary, A. e Yadav, S. C. "Nanoencapsulation and characterization of Albizia chinensis isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2011**, 82, 224.
- Kurosawa, K.; Ollis, W. D.; Sutherland, I. O.; Gottlieb, O. R. e Oliveira, A. B. de. "Mucronustyrene, mucronulastyrene and villostyrene, cinnamylphenols from *Machaerium mucronulatum* and *M. villosum*". *Phytochemistry*, **1978**, 17, 1389.
- Kurosawa, K.; Ollis, W. D.; Sutherland, I. O.; Gottlieb, O. R. e Oliveira, A. B. de. "Mucronulatol, mucroquinone and mucronucarpan, isoflavonóides from *Machaerium mucronulatum* and *M. villosum*". *Phytochemistry*, **1978**, 17, 1405.
- Kurosawa, K.; Ollis, W. D.; Redman, B. T.; Sutherland, I. O. e Gottlieb, O. R. "Vestitol and vesticarpan, isoflavonóides from *Machaerium vestitum*". *Phytochemistry*, **1978**, 17, 1413.
- Kurosawa, K.; Ollis, W. D.; Redman, B. T.; Sutherland, I. O.; Alves, H. M. and Gottlieb, O. R. "Absolute configurations of isoflavans". *Phytochemistry*, **1978**, 17, 1423.
- Leong, A. C.-N.; Kinjo, Y.; Tako, M.; Iwasaki, H.; Oku, H. e Tamaki, H. "Flavonoid glycosides in the shoot system of Okinawa Taumu (*Colocasia esculenta* S.)". *Food Chemistry*, **2010**, 119, 630.
- Lima, L. C. P.; Sartori, Â. L. B.; Pott, V. J. "*Aeschynomene* L. (Leguminosae, Papilionoideae, Aeschynomeneae) no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil". *Hoehnea*, **2006**, 33 (4), 419.
- Lorenzi, H. "Árvores Brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas Arbóreas Nativas do Brasil". 5^a ed., V 1 Nova Odessa, SP. *Instituto Plantarum* **2008**, 384 p.
- Lou, H.; Yamazaki, Y.; Sasaki, T.; Uchida, M.; Tanaka, H. e Oka, S. "A-type proanthocyanidins from peanut skins". *Phytochemistry* **1999**, 51, 297.

- Lu, B.; Liu, L.; Zhen, X.; Wu, X. e Zhang, Y. "Anti-tumor activity of triterpenoid-rich extract from bamboo shavings (*Caulis bambusae* in Taeniam)". *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, 9(38), 6430.
- March, R. E. e Miao, X.-S. "A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution". *International J. of Mass Spectrometry*, **2004**, 231, 157.
- Masuoka, C.; Ono, M.; Ito, Y. e Nohara T. "Antioxidative, Antihyaluronidase and Antityrosinase Activities of Some Constituents from the Aerial Part of *Piper elongatum* VAHL". *Food Sci. Technol. Res.*, **2003**, 9 (2), 197.
- Menezes, F. de S.; Minto, A. B. M.; Ruela, H. S.; Kuster, R. M.; Sheridan, H.; Frankish, N. "Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz." *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **2007**, 17(1), 08.
- Moreira, A. S.; Spitzer, V.; Schapoval, E. E. S. e Schenkel, E. P. "Antiinflammatory Activity of Extracts and Fractions from the Leaves of *Gochnatia polymorpha*". *Phytother. Res.*, **2000**, 14, 638.
- Muangnoicharoen, N.; Frahm, A. W., "Neoflavonoids of *Dalbergia parviflora*". *Phytochemistry*, **1982**, 21(3), 767.
- Muhammad, I.; Li, X.-C.; Dunbar, D. C.; Elsohly, M. A. e Khan I. A. "Antimalarial (+)-*trans*-Hexahydrodibenzopyran Derivatives from *Machaerium multiflorum*". *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 1322.
- Muhammad, I.; Li, X.-C.; Jacob, M. R.; Tekwani, B. L.; Dunbar, D. C. e Ferreira, D. "Antimicrobial and Antiparasitic (+)-*trans*-Hexahydrodibenzopyrans analogues from *Machaerium multiflorum*". *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 804.
- Nandakumar, V.; Singh, T. e Katiyar, S. K. "Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins". *Cancer letters*, **2008**, 269, 378.
- Noldin, V. F.; Cechinel Filho, V.; Monache, F. D.; Benassi, J. C.; Christmann, I. L. e Pedrosa, R. C. Yunes, R.A. "Composição química e atividades biológicas das

- folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil”. *Quím. Nova*, **2003**, 26(3), 331.
- Ogiyama, K. e Yasue, M. “Constituents of *Machaerium pedicellatum* heartwood”. *Phytochemistry*, **1973**, 12, 2544.
- Oliveira, D. M. T. “Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas”. São Paulo, *Revta brasil. Bot.* (dez)**1999**, 22 (3), 413.
- Oliveira, S. M. Relatório de Pesquisa do Projeto “Estudo e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie *Machaerium stipitatum* (Leguminosae-Papilionoideae)” Processo no. 1595/99-UEM, **2001**.
- Ollis, W. D.; Sutherland, I. O; Alves, H. M. e Gottlieb, O. R. “Duartin, an isoflavan from *Machaerium opacum*”. *Phytochemistry*, **1978**, 17, 1401.
- Ollis, W. D.; Redman, B. T.; Roberts, R. J.; Sutherland, I. O.; Gottlieb, O. R. e Magalhães, M. T. “Neoflavonoids and the Cinnamylphenol Kuhlmannistyrene from *Machaerium kuhlmannii* and *M. nictitans*”. *Phytochemistry*, **1978**, 17, 1383.
- Ollis, W. D.; Redman, B. T.; Sutherland, I. O. e Gottlieb, O. R. “Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*”. *Phytochemistry*, **1978**, 17, 1379.
- Pessuto, M. B.; Costa, I. C. da; Souza, A. B. de; Nicoli, F. M.; Mello, J. C. P. de; Petereit F.; Luftmann, H. “Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.” *Quím. Nova*, **2009**, 32 (2), 412.
- Phillipson, J. D. “Phytochemistry and medicinal plants”. *Phytochemistry*, **2001**, 56, 237.
- Pizzollatti, M. G.; Cunha Jr., A.; Szpoganicz, B.; de Sousa, E. “Flavonóides glicosilados das folhas de *Bauhinia forficata* (Leguminosae)”. *Quím. Nova*, **2003**, 26 (4), 466.

- Polido, C. do A. e Sartori, A. L. B. "O gênero *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergieae no Pantanal brasileiro". *Rodriguésia*, **2007**, 58 (2), 313.
- Pott, A.; Pott, V. J.; Plantas do Pantanal, EMBRAPA-SPI: Corumbá, MS. 1994, 320p.
- Ribeiro, R. A.; Lavin, M.; Lemos-Filho, J. P.; Filho, C. V. M.; dos Santos, F. R. e Lovato, M. B. "The Genus *Machaerium* (Leguminosae) is More Closely Related to *Aeschynomene* Sect. *Ochopodium* than to *Dalbergia*: Inferences From Combined Sequence Data". *Systematic Botany*, **2007**, 32 (4), 762.
- Rocha e Silva, H.; da Silva, C. C. M.; Caland-Neto, L.B.; Lopes, J. A. D.; Citó, A. M. G. L. e Chaves, M. H. "Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol". *Quím. Nova*, **2007**, 30 (8), 1877.
- Saleem, M.; Afaq, F.; Adhami, V. M. e Mukhtar, H. "Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice". *Oncogene*. **2004**, 23, 5203.
- Schmitt, E.; Metzler, M.; Jonas, R.; Dekant, W.; Stopper, H. "Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzeina." *Mutation Research*. **2003**, 542, 43.
- Seo, E.-K.; Kim, N.-C.; Mi, Q.; Chai, H.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Navaro, H. A.; Burgess, J. P.; Graham, J. G.; Cabieses, F.; Tan, G. T.; Farnsworth, N. R.; Pezzuto, J. M. e Kinghorn, A. D. "Macharistol, a New Cytotoxic Cinnamylphenol from the Stems of *Machaerium aristulatum*". *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 1483.
- Simões, C. M. O. *et al.* "Farmacognosia: da planta ao medicamento/organizado por Claudia Maria Oliveira Simões." 6^a ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, **2007**, 604.

- Simões, K.; Du, J.; Kretzschmar, F. S.; Broeckling, C. D.; Stermitz, F. S.; Vivanco, J. M. e Braga, M. R. "Phytotoxic Catechin Leached by Seeds of the Tropical Weed *Sesbania virgata*". *J Chem Ecol.* **2008**, *34*, 681.
- Sirat, H. M.; Rezali, M. F. e Ujang, Z. "Isolation and Identification of Radical Scavenging and Tyrosinase Inhibition of Polyphenols from *Tibouchina semidecandra* L". *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10404.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudeiro, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S. e Boyd, M. R. "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening". *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda, **1990**, *82*, 1107.
- Sousa-Jr, P. T.; Dall'Oglio, E. L.; Silva, L. E.; Figueiredo, U. S.; Vieira, P. C.; Machado, H. V.; Santos, L. G. dos. "Gênero *Acosmium*: composição química e potencial farmacológico". *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, *19* (1A), 150.
- Souza, V. C.; Lorenzi, H. "Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II". 2ª ed. Nova Odessa, SP: *Instituto Plantarum.* **2008**, 381.
- Spanou, C.; Bourou, G.; Dervishi, A.; Aligiannis, N.; Angelis, A.; Komiotis, D.; Skaltsounis, A.-L. e Kouretas, D. "Antioxidant and Chemopreventive Properties of Polyphenolic Compounds Derived from Greek Legume Plant Extracts". *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6967.
- Sprent, J. I. "Nitrogen fixation e growth of non-crop legume species in diverse environments". *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **1999**, *2/2*, 149.
- Subhadhirasakul, S. e Pechongs, P. "A Terpenoid and two steroids from the flowers of *Mammea siamensis*." *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2005**, *27* (Suppl. 2), 555.
- Tan, L.; Zhang, X-F.; Yan, B-Z.; Shi, H-M.; Du, L-B.; Zhang, Y-Z.; Wang, L-F.; Tang, Y-L. e Liu, Y. "A novel flavonoid from *Lespedeza virgata* (Thunb.) DC.:

- Structural elucidation and antioxidative activity". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2007**, 17, 6311.
- Tapiero, H.; Tew, K. D.; Nguyen Ba, G.; Mathé, G. "Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?" *Biomed. Pharmacother.* **2002**, 56, 200.
- Thanakijcharoenpath, W. e Theanphong, O. "Triterpenoids from the stem of *Diospyros glandulosa*". *Thai J. Pharm. Sci.* **2007**, 31, 1.
- Token, G.; Küpeli, E.; Menisoğlu, M. e Yesilada, E. "Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden)". *J. of Ethnopharm.*, **2004**, 95, 393.
- Tsunoda, Y.; Okawa, M.; Kinjo, J.; Ikeda, T. e Nohara, T. "Studies on the Constituents of *Gueldenstaedtia multiflora*". *Chem. Pharm. Bull.*, **2008**, 56 (8), 1138.
- Ueda, M.; Hiraoka, T.; Niwa, M. e Yamamura, S. "Potassium aeshynomate, a leaf-opening substance of *Aeshynomene indica* L., containing a novel γ -amino acid.". *Tetrahedron letters*, **1999**, 40 (37), 6777.
- Ueda, M.; Niwa, M. e Yamamura, S. "Trigonelline, a leaf-closing factor of the nyctinastic plant, *Aeschynomene indica*". *Phytochemistry*, **1995**, 39 (4), 817.
- USDA, NRCS. 2011. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 14 September 2011). National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA.
- Van Arman, G. C. "Anti-inflammatory drugs". *Clin. Pharmacol. and Ther.*, **1974**, 16, 900.
- Velozo, L. S. M.; Da Silva, B. P.; Da silva, E. M. B. e Parente, J. P. "Constituents from the roots of *Bowdichia virgilioides*". *Fitoterapia*. **1999**, 70, 532.
- Vinegar, R.; Truax, J. F.; Selph, J. L. "Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat (37397)". *Proc. Soc. Exp. Biol.*, Malden, **1973**, 143, 711.
- Waage, S. K.; Hedin, P. A. e Grimley, E. "A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum*". *Phytochemistry*, **1984**, 23 (12), 2785.

- Wink, M. "Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective". *Phytochemistry*, **2003**, 64, 3. (Review)
- Yen, C.-T.; Hsieh, P.-W.; Hwang, T.-L.; Lan, Y.-H.; Chang, F.-R. e Wu, Y.-C. "Flavonol Glycosides from *Muehlenbeckia platyclada* and Their Anti-inflammatory Activity". *Chem. Pharm. Bull.*, **2009**, 57 (3), 280.
- Zhang, Y.; Bao, B.; Lu, B.; Ren, Y.; Tie, X.; Zhang, Y. "Determination of flavone C-glycosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection". *J of Chromatogr. A*, **2005**, 1065, 177.
- Zhang, Y.; Jiao, J.; Liu, C.; Wu, X. e Zhang, Y. "Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography". *Food Chemistry*. **2008**, 107, 1326.
- Zielińska, D.; Zieliński, H. "Antioxidant activity of flavone C-glycosides determined by updated analytical strategies". *Food Chemistry*. **2011**, 124, 672.