



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

ISOLAMENTO POR CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE DE
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DE RESÍDUOS MADEIREIROS
AMAZÔNICOS DE *Andira parviflora* DUCKE E *Robrichia
schomburgkii* (BENTH.) A.R.M.LUZ & E.R.SOUZA BIOGUIADO
POR ATIVIDADE CITOTÓXICA

ISADORA MOITA DE ARAÚJO
DOUTORADO

Manaus/AM
Agosto/2025

ISADORA MOITA DE ARAÚJO

ISOLAMENTO POR CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE DE
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DE RESÍDUOS MADEIREIROS
AMAZÔNICOS DE *Andira parviflora* DUCKE E *Robrichia
schomburgkii* (BENTH.) A.R.M.LUZ & E.R.SOUZA BIOGUIADO
POR ATIVIDADE CITOTÓXICA

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal do
Amazonas, como parte das exigências
para o título de Doutora em Química, com
ênfase na Linha de Pesquisa: Produtos
Naturais e Biomoléculas.

Dr. ANDERSON CAVALCANTE GUIMARÃES

Orientador

Dr. FELIPE MOURA ARAÚJO DA SILVA

Coorientador

Manaus/AM

Agosto/2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- A663i Araújo, Isadora Moita de
 Isolamento por cromatografia contracorrente de substâncias
 fenólicas de resíduos madeireiros amazônicos de *Andira parviflora*
 Ducke e *Robrichia schomburgkii* (Benth.) A.R.M.Luz & E.R.Souza
 bioguiado por atividade citotóxica / Isadora Moita de Araújo. - 2025.
 217 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Anderson Cavalcante Guimarães.
 Coorientador(a): Felipe Moura Araújo da Silva.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas,
 Programa de Pós-Graduação em Química, Manaus, 2025.
1. Resíduos madeireiros. 2. Cromatografia contracorrente. 3.
 Atividade citotóxica. 4. Fabaceae. 5. Flavonoides. I. Guimarães,
 Anderson Cavalcante. II. Silva, Felipe Moura Araújo da. III.
 Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação
 em Química. IV. Título
-

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder vida, e me sustentar com saúde, sabedoria e perseverança a cada dia para concluir minha tese de doutorado.

Aos meus pais, minha base, Dijalmo Vasconcelos e Viviane Moita, por ter me dado todo o amor, apoio, dedicação, investimento e incentivo para que eu me tornasse uma profissional.

Ao meu esposo Davi Daniel, por ser minha base de incentivo para continuar meus estudos, companheirismo, amizade, paciência, auxílio e compreensão nos momentos que tive que abrir de estar em família e com amigos. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Ao meu filho Pedro Noah Araújo, minha herança de Deus. Obrigada filho por ser a minha alegria nos momentos de exaustão em meio ao desenvolvimento do meu trabalho.

A minha rede apoio incrível, incluindo meus pais, meu irmão João Paulo Moita, meu esposo, meus sogros Jetro Araújo e Lorema Araújo, Sebastiana (*in memoriam*) e todas as pessoas que me ajudaram cuidando do meu filho Pedro de alguma forma.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, Sarah Flores, Marcia Grace, Thais Sampaio, Ingrid, Bruna Amazonas, Letícia, que me auxiliaram e tornaram tudo mais leve.

Agradeço as minhas amigas de graduação e Dra. Ingrity Suelen de Sá, Yasmin da Silva e Lídia e pelo encorajamento para continuar essa jornada acadêmica. Sou grata também a minha primeira orientadora de bancada a Dra. Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi que é um exemplo de pessoa e profissional.

Agradeço aos meus amigos mais chegados que irmãos Railane, Brenda, Rafael e André pela amizade, incentivo para concluir o doutorado.

Ao Dr. Anderson Cavalcante Guimarães meu coorientador, que me acolheu, com confiança e dedicação. Obrigada por todo conhecimento que o senhor me transmitiu com muita paciência, agradeço também por sempre estar disponível em ajudar e incentivar a fazer sempre um trabalho de excelência.

Ao meu coorientador Dr. Felipe Moura Araújo da Silva, pela parceria, disponibilidade em ensinar, tranquilidade, incentivo e dedicação de tempo para auxiliar no desenvolvimento da pesquisa.

A Dra. Renata Takeara Hattori líder do grupo de pesquisa Produtos Naturais: Análise Química e Atividades Biológicas, pela colaboração e apoio durante todo o período do meu doutorado.

Ao Dr. Valdir Veiga, pela colaboração nos experimentos de alfa D, realizado no Instituto Militar de Engenharia-IME, além disso teve um papel primordial na minha formação, sendo meu orientador durante o mestrado e a graduação.

A Dra. Cláudia Pessoa e a Dra. Celina Guimarães, pela colaboração nos ensaios de atividade citotóxica contra células tumorais, realizados no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao Programa de Pós-graduação em Química e a Universidade Federal do Amazonas (UFAM), seus servidores técnicos e docentes pelo seu trabalho em auxiliar e ensinar de forma eficiente e facilitadora.

À Central Analítica da UFAM pela contribuição nos experimentos espectrométricos e espectroscópicos.

À FAPEAM por implementar a minha bolsa de estudos, e as outras agências (CNPq, CAPES, Finep) de fomento, que contribuíram para manutenção dos laboratórios de pesquisa.

RESUMO

A região Amazônica foi uma das principais produtoras de madeira tropical do mundo em 2019 e 2020, gerando grande quantidade de resíduos durante os processos de fabricação de madeira em tora. Dentre as espécies exploradas estão as sucupiras vermelha (*Andira parviflora*-A) e amarela (*Enterolobium schomburgkii*-E) da família Fabaceae. O objetivo desse trabalho é realizar a caracterização química dos resíduos (cascas-CA e cerne-CE) madeireiros das espécies de sucupira e avaliar sua toxicidade. Os extratos dos resíduos das espécies foram submetidos à partição líquido-líquido, obtendo frações em Hexano (ACA1, ACE1, E1), clorofórmio (ACA2, ACE2, E2), acetato de etila (ACA3, ACE3, E3), butanol (ACA4, ACE4, E4) e hidroalcoólica (ACA4, ACE4, E). A prospecção fitoquímica revelou taninos condensados e flavonoides em todos os extratos, além de triterpenoides e esteroides nas frações ACA1 e ACA2. Já as frações em acetato de etila, butanol e hidroalcoólica apresentaram taninos condensados, flavonas, flavonóis e xantonas em ambas as espécies. As análises por cromatografia em camada delgada (CCD), corroboraram com a prospecção em tubos evidenciando a presença de compostos fenólicos nas frações. Os extratos e frações também foram analisados quanto a atividade citotóxica frente a diferentes células tumorais como: PC3 (câncer de próstata), SNB19 (astrocitoma), HCT-116 (câncer de cólon). As frações ACA2 e ACE2 apresentaram atividade contra todas as células tumorais testadas, já as frações ACE3 ($Cl_{50}=8,74 \mu\text{g/mL}$), ACA3 ($Cl_{50}=74,8 \mu\text{g/mL}$) especificamente frente a célula de HCT-116. As frações ACE3, ACA2, E3 e as subfrações foram fracionadas por cromatografia contracorrente de alta eficiência (HPCCC) utilizando sistemas bifásicos constituídos por hexano, acetato de etila, butanol, metanol e água. As subfrações ACE3-4 e ACE3-17 foram submetidas ao fracionamento semi-preparativo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram isolados cinco flavonoides, sendo dois epímeros, a coatlina A e α -epi-coatlina A de ACE3-4, a chalcona isoliquiritigenina, e o pterocarpano medicarpina de ACE3-17 e a isoflavona biochanina A isolada da subfração ACE3-17 e da fração ACA2. Os três isoflavonoides sativanona, formononetina e arizonicanol A e a flavona liquiritigenina foram caracterizados por espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , DEPT e bidimensionais, em mistura de frações oriundas do fracionamento de ACE3-16-18 por HPCCC. A biochanina A e a subfração com a liquiritigenina apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais HL60 (leucemia promielocítica), MDA-MB-231 (carcinoma de mama) e NCI-H460 (carcinoma de pulmão).

Palavras-chave: Resíduos madeireiros, Cromatografia contracorrente, Atividade citotóxica, Fabaceae, Flavonoides

ABSTRACT

The Amazon region was one of the world's leading producers of tropical timber in 2019 and 2020, generating large amounts of waste during roundwood processing. Among the exploited species are the red sucupira (*Andira parviflora* – A) and the yellow sucupira (*Enterolobium schomburgkii* – E), both belonging to the Fabaceae family. The aim of this study was to chemically characterize the wood residues (bark – CA and heartwood – CE) of sucupira species and evaluate their cytotoxicity. The extracts of these residues were subjected to liquid–liquid partitioning, yielding fractions in hexane (ACA1, ACE1, E1), chloroform (ACA2, ACE2, E2), ethyl acetate (ACA3, ACE3, E3), butanol (ACA4, ACE4, E4), and hydroalcoholic (ACA4, ACE4, E). Phytochemical screening revealed condensed tannins and flavonoids in all extracts, as well as triterpenoids and steroids in fractions ACA1 and ACA2. Ethyl acetate, butanol, and hydroalcoholic fractions contained condensed tannins, flavones, flavonols, and xanthones in both species. Thin-layer chromatography (TLC) analyses corroborated the tube tests, confirming the presence of phenolic compounds in the fractions. Extracts and fractions were also evaluated for cytotoxic activity against different tumor cell lines, including PC3 (prostate cancer), SNB19 (astrocytoma), and HCT-116 (colon cancer). Fractions ACA2 and ACE2 exhibited activity against all tested cell lines, while fractions ACE3 ($IC_{50} = 8.74 \mu\text{g/mL}$) and ACA3 ($IC_{50} = 74.8 \mu\text{g/mL}$) were specifically active against HCT-116 cells. Fractions ACE3, ACA2, E3, and their subfractions were further fractionated by high-performance countercurrent chromatography (HPCCC) using biphasic systems composed of hexane, ethyl acetate, butanol, methanol, and water. Subfractions ACE3-4 and ACE3-17 were subjected to semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC), leading to the isolation of five flavonoids: two epimers, coatline A and α -epi-coatline A from ACE3-4; the chalcone isoliquiritigenin; the pterocarpin medicarpin from ACE3-17; and the isoflavone biochanin A from ACE3-17 and ACA2. Three isoflavonoids—sativanone, formononetin, and arizonicanol A—and the flavone liquiritigenin were characterized by mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (^1H , ^{13}C , DEPT, and 2D NMR) in mixtures of fractions obtained from ACE3-16-18 by HPCCC. Biochanin A and the subfraction containing liquiritigenin exhibited cytotoxic activity against HL60 (promyelocytic leukemia), MDA-MB-231 (breast carcinoma), and NCI-H460 (lung carcinoma) cell lines.

Keywords: Wood Residues; Countercurrent Chromatography; Cytotoxic Activity; Fabaceae; Flavonoids.

LISTA DE UNIDADES, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μ - micro
 ω – Velocidade angular
APCI – Ionização química à pressão atmosférica (do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*)
AR – Amostra residual
CCC – Cromatografia contracorrente
CCD – Cromatografia em camada delgada
céls – células
CD₃OD – Metanol deuterado
CG – Cromatografia gasosa
CHCl₃ - Clorofórmio
Cl₅₀ – Concentração inibitória média
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY – Correlação homonuclear (do inglês *correlation spectroscopy*)
CPC – Cromatografia de partição centrífuga
DAD – Detector de arranjo de diodos (do inglês *Diode array detector*)
DMSO - dimetilsulfóxido
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DEPT – Aprimoramento sem distorção por transferência de polarização (do inglês *distortionless enhancement by polarization transfer*)
DU-145 - Adenocarcinoma de próstata
EM – Espectrometria de massas
eV - Eletrovolts
FE – Fase estacionária
FM – Fase móvel
HaCat - Queratinócitos humano
HCT-116 – Carcinoma de cólon-humano
HL60 – Leucemia promielocítica
HMBC - Correlações de ligações múltiplas heteronucleares (do inglês *heteronuclear multiple-bond correlation*)
HSCCC - Cromatografia de alta velocidade (do inglês *high-speed countercurrent chromatography*)
HSQC – Correlação quântica única heteronuclear (do inglês *heteronuclear single quantum correlation*)
HPCCC - Cromatografia contracorrente de alta performance (do inglês - *high performance counter current chromatography*)
Hz - Hertz
IC% - Percentual de inibição do crescimento
IC – Intervalo de confiança
IS – índice de seletividade
K – Coeficiente de partição
K_d – Coeficiente de distribuição
MDA-MB-23 - Carcinoma de mama
MTT - (3-(4,5 dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium)
NP - 2-aminoetildifenilborinato
NCI-H460 - Carcinoma de pulmão
P.A. – Padrão Analítico
PC3 - Carcinoma de próstata

PEG - Polietilenoglicol 400
ppm – Parte por milhão
PTFE - Politetrafluoretileno
RDA – Retro Diels-Alder
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
Rpm – Rotação por minuto
Rt – Tempo de retenção
Rf – Fator de retenção
S_f – Fator de retenção da coluna
SNB-19 - Astrocitoma
UV – Ultravioleta
VIS - Visível
Vm – Volume morto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Substâncias isoladas das raízes <i>A. anthelmia</i>	32
Figura 2. Substâncias isoladas das raízes de <i>A. fraxinifolia</i>	33
Figura 3. Substância isoladas das raízes de <i>A. humilis</i>	34
Figura 4. Substâncias isoladas de <i>A. inermis</i>	35
Figura 5. Flavonoides isolados em espécies de <i>Andira</i>	36
Figura 6. Substâncias isoladas em <i>A. parviflora</i>	38
Figura 7. Distribuição geográfica do gênero <i>Robrichia</i>	39
Figura 8. Triterpenos isolados em espécies do gênero <i>Enterolobium</i>	41
Figura 9. Saponinas isolados em espécies do gênero <i>Enterolobium</i>	42
Figura 10. Compostos fenólicos isolados em espécies do gênero <i>Enterolobium</i>	43
Figura 11. Ilustração do movimento planetário síncrono de uma coluna em espiral em camadas múltiplas de equilíbrio hidrodinâmico do tipo-J.....	47
Figura 12. Movimento hidrodinâmico de duas fases líquidas imiscíveis dentro de uma coluna em espiral submetida ao movimento planetário.....	48
Figura 13. Cromatógrafo contracorrente de alta performance – HPCCC	59
Figura 14. Metodologia para o teste de sistemas de solventes com a fração ACE3.....	61
Figura 15. Prospecção fitoquímica para a indicação da presença de compostos fenólicos em extrato e frações de <i>A. parviflora</i>	78
Figura 16. Prospecção fitoquímica para a indicação da presença de compostos fenólicos em extrato e frações de <i>R. schomburgkii</i>	79
Figura 17. Prospecção fitoquímica para terpenos.	79
Figura 18. Prospecção fitoquímica para saponinas.....	80
Figura 19. Prospecção fitoquímica em tubos para alcaloides.....	80
Figura 20. Perfil cromatográfico do extrato e frações do cerne de <i>A. parviflora</i>	81
Figura 21. Perfil cromatográfico do extrato e frações da casca de <i>A. parviflora</i>	82
Figura 22. Perfil cromatográfico do extrato e frações da casca de <i>R.</i> <i>schomburgkii</i>	83
Figura 23. Placa cromatográficas das frações obtidas do fracionamento por HPCCC de ACE3 em modo normal.	90
Figura 24. Placas cromatográficas reveladas em diferentes reveladores das frações após a união da 1ª injeção de ACE3 no HPCCC.....	92
Figura 25. Placa cromatográficas das frações obtidas no 2º fracionamento por HPCCC de ACE3 em modo reverso. Representação dos degraus de eluição..	93
Figura 26. Placa cromatográficas das frações obtidas no 3º fracionamento por HPCCC de LSV-CE03 em modo reverso.....	95
Figura 27. Placa cromatográficas das frações após a união.	97
Figura 28. Placa cromatográficas das frações selecionadas do fracionamento de ACE3.....	98
Figura 29. Cromatograma de CLAE-DAD da fração ACE3-4 obtida do terceiro fracionamento de ACE3	101

Figura 30. Cromatograma em base peak de CLAE-EM de ACE3-4.....	101
Figura 31. Cromatograma do fracionamento de ACE3-4 por CLAE-UV nos comprimentos de onda 240 nm (preto) e 280 nm (rosa) (1) substância 1 - ACE3-4-2, (2) substância 2 - ACE3-4-2.....	102
Figura 32. Perfil cromatográfico obtido no fracionamento de ACE3-17 por CLAE-DAD nos comprimentos de onda 240 nm (preto) e 280 nm (rosa) (3) substância 3 - ACE3-17-9, (4) substância 4 - ACE3-17-13, (5) substância 5 - ACE3-17-15.....	103
Figura 33. Testes de sistemas bifásicos com a fração ACE3-16.....	104
Figura 34. Placa cromatográfica das frações obtidas do fracionamento de ACE3-16.....	105
Figura 35. Placa cromatográfica comparativa das frações ACE3-17, ACE3-16-18, ACE-16-27.....	106
Figura 36. Espectros de EM full scan (modo negativo) das frações ACE3-16, ACE3-16-18 e ACE3-16-27	107
Figura 37. Testes de sistemas bifásicos com a fração ACE3-16-18	108
Figura 38. Placa cromatográfica das frações obtidas do fracionamento de ACE3-16-18.....	110
Figura 39. Placa cromatográfica da união frações obtidas do fracionamento de ACE3-16-18.....	110
Figura 40. Testes de sistemas bifásicos de solventes com a fração ACA2... ..	112
Figura 41. Placas cromatográficas das frações obtidas do fracionamento de ACA2.....	113
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de ACE3-4-2	114
Figura 43. Ampliação na região de aromáticos (δ 7,73-6,41) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD).....	115
Figura 44. Anéis aromático A e B da molécula proposta com seus hidrogênios assinalados	115
Figura 45. Ampliação (δ 5,16-4,92) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD)	116
Figura 46. Ampliação da região de açúcar (A); Ampliação de sinais de hidrogênio metilênicos (B) do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OH) de ACE3-4-2.....	117
Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de ACE3-4-2.....	118
Figura 48. Espectro de DEPT-135 da subfração ACE3-4-2 (125 MHz, CD_3OH)	119
Figura 49. Mapa de correlação HSQC da subfração ACE3-4-2	119
Figura 50. Ampliação do mapa de correlação HSQC na região de aromáticos	120
Figura 51. Ampliação do mapa de correlação HSQC na região de hidrogênios alfa carbinólicos e anomérico	120
Figura 52. Ampliação do mapa de correlação HSQC na região de açúcar e metilênicos	121
Figura 53. Mapa de correlação HMBC da subfração ACE3-4-2	121
Figura 54. Ampliação do mapa de correlação de HMBC na região de aromáticos	122

Figura 55. Ampliação do mapa de correlação HMBC da subfração ACE3-4-2	122
Figura 56. Ampliações do mapa de correlação HMBC da subfração ACE3-4-2.	123
Figura 57. Correlações obtidas do HMBC observadas na substância 1	123
Figura 58. Espectro de massas de full scan (modo negativo) da subfração ACE3-4-2	124
Figura 59. Sobreposição dos espectros da subfração substância 1 (vermelho) e substância 2 (azul).....	125
Figura 60. CCDs da fração LSV3(3)17_9 eluídas em diferentes reveladores.	127
Figura 61. Espectro de RMN de ^1H e ampliações (500 MHz, CD_3OD , tendo o TMS como padrão interno) de ACE3-17-9 (substância 4).....	128
Figura 62. Estrutura da chalcona proposta com os deslocamentos químicos de hidrogênio.....	129
Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de ACE3-17-9.....	130
Figura 64. Mapa de correlação HSQC da substância 3	131
Figura 65. Estrutura da chalcona proposta com os deslocamentos químicos de carbono	131
Figura 66. Mapa de correlação HMBC da substância 3	132
Figura 67. Correlações obtidas do HMBC observadas na substância 3.....	132
Figura 68. Espectro de massas (full-scan-modo negativo) da subfração ACE3-17-9	133
Figura 69. Espectro de fragmentação do íon de m/z 255 - modo negativo ...	133
Figura 70. Molécula isoliquiritigenina isolada do cerne de <i>A. parviflora</i>	135
Figura 71. CCDs da fração ACE3-17-13	135
Figura 72. Espectro de RMN de ^1H e ampliações (500 MHz, CD_3OD) de ACE3-17-13	136
Figura 73. Estrutura do pterocarpano medicarpina (substância 4) com os seus respectivos deslocamentos de hidrogênio	137
Figura 74. Espectro de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de ACE3-17-13.....	138
Figura 75. Mapa de correlação HSQC da substância 4	139
Figura 76. Estrutura do pterocarpano proposto com os deslocamentos químicos de carbonos hidrogenados	139
Figura 77. Mapa de correlação HMBC de ACE3-17-13.....	140
Figura 78. Correlações obtidas do HMBC observadas na molécula proposta	140
Figura 79. Espectro de massas (full scan-modo positivo) da subfração ACE3-17-13	142
Figura 80. Espectro de fragmentação do íon 271 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e a proposta de fragmentação para a substância 4.	142
Figura 81. Espectro de massas da substância 4 (<i>full-scan</i> modo negativo)...143	
Figura 82. Estrutura da medicarpina, isolada do cerne de <i>A. parviflora</i>	144
Figura 83. CCDs da fração ACE3-17-15 eluídas em diferentes reveladores..	145
Figura 84. Espectro de RMN de ^1H em ampliações (500 MHz, CD_3OD) de ACE3-17-15	146

Figura 85. Estrutura da isoflavona biochanina A com os seus deslocamentos de hidrogênio.....	146
Figura 86. Mapa de correlação HSQC da substância 5	147
Figura 87. Estrutura da isoflavona proposta com os deslocamentos químicos de carbono	147
Figura 88. Mapa de correlação HMBC da substância 5	148
Figura 89. Correlações do HMBC observadas na molécula proposta	149
Figura 90. Espectro de massas full scan de ACE3-17-15 (modo positivo)....	150
Figura 91. Espectro de massas full scan de ACE3-17-15 (modo negativo) ..	151
Figura 92. Molécula da biochanina A isolada do cerne de <i>A. parviflora</i>	152
Figura 93. CCDs da subfração ACE3-16-18-37 reveladas em diferentes reagentes..	154
Figura 94. Espectro de RMN ¹ H e ampliações (500 MHz, CD ₃ OD) de ACE3-16-18-37	154
Figura 95. Estrutura da isoflavanona com os seus respectivos deslocamentos de hidrogênio.....	155
Figura 96. Mapa de correlação HSQC de ACE3-16-18-37.....	156
Figura 97. Mapa de correlação HMBC de ACE3-16-18-37	156
Figura 98. Principais correlações do mapa de correlação HMBC da sativanona (substância 6).....	157
Figura 99. Espectro de massas full scan de ACE3-16-18-37 (modo positivo) (A). Fragmentação do íon m/z 301 (B).....	159
Figura 100. Proposta de fragmentação do íon m/z 301 (substância 6) de acordo com Gampe et al. (2016).....	160
Figura 101. Espectro de massas full scan de ACE3-16-18-37 (modo negativo) (A). Fragmentação do íon m/z 299 (B).....	161
Figura 102. Proposta de fragmentação do íon m/z 299 (substância 6) de acordo com Zhao et al. (2020)	162
Figura 103. CCDs da subfração ACE3-16-18-38 reveladas em diferentes reagentes..	163
Figura 104. Sobreposição dos espectros de ¹ H (500MHz, CD ₃ OH) de ACE3-16-18-37 (azul) e ACE3-16-18-38 (vermelho)	164
Figura 105. Espectro de RMN ¹ H e ampliações com os sinais referentes a formononetina (500 MHz, CD ₃ OD) de ACE3-16-18-38	164
Figura 106. Estrutura da substância 7 com os seus deslocamentos de hidrogênio	165
Figura 107. Mapa de correlação HSQC de ACE3-16-18-38.....	165
Figura 108. Mapa de correlação HMBC de ACE3-16-18-38	166
Figura 109. Principais correlações do mapa de correlação HMBC da formononetina	166
Figura 110. Espectro de massas full scan de ACE3-16-18-38 (modo positivo) (A) Fragmentação do íon m/z 269 (B).....	168
Figura 111. CCDs da subfração ACE3-16-18-41 reveladas em diferentes reagentes..	169
Figura 112. Espectro de RMN de ¹ H e ampliações (500 MHz, CD ₃ OD) de ACE3-16-18-41	170

Figura 113. Estrutura da substância arizonicanol A (substância 8) com os seus deslocamentos químicos de hidrogênio	171
Figura 114. Mapa de correlação HSQC de ACE3-16-18-41	171
Figura 115. Mapa de correlação HMBC de ACE3-16-18-41	172
Figura 116. Principais correlações do mapa de correlações HMBC do arizonicanol A.....	172
Figura 117. Espectro de massas full scan de ACE3-16-18-41.	174
Figura 118. CCDs da subfração ACE3-16-18-42 reveladas em diferentes reagentes..	175
Figura 119. Espectro de RMN de ^1H e ampliações (500 MHz, CD_3OD) de ACE3-16-18-42.....	176
Figura 120. Estrutura da liquiritigenina com os seus deslocamentos de hidrogênio.....	176
Figura 121. Mapa de correlação HSQC de ACE3-16-18-42.....	177
Figura 122. Mapa de correlação de HMBC de ACE3-16-18-42.....	177
Figura 123. Principais correlações do mapa de correlação HMBC a substância 9	178
Figura 124. Espectro de massas full scan de ACE3-16-18-42	179
Figura 125. CCDs da fração ACA2-41 das cascas e <i>A. parviflora</i> reveladas em diferentes reagentes.....	180
Figura 126. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de ACA2-41	181
Figura 127. Testes de sistemas bifásicos com a fração E3.....	185
Figura 128. CCD das frações de E3.....	186
Figura 129. Placas cromatográficas das frações obtidas do fracionamento de E3.....	187

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies mais utilizadas na atividade madeireira da amazônia	24
Tabela 2. Códigos dos extratos e frações das duas espécies madeireiras.	54
Tabela 3. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes testados com a fração ACE3	61
Tabela 4. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes utilizados no fracionamento de fase normal de ACE3.....	62
Tabela 5. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes utilizados no fracionamento de fase reversa de ACE3.....	62
Tabela 6. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes utilizados no 3º fracionamento de fase reversa de ACE3.....	63
Tabela 7. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes testados com a fração ACE3-16.....	65
Tabela 8. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes utilizados no fracionamento da fração ACE3-16	66
Tabela 9. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes testados com as subfração ACE3-16-18.....	67
Tabela 10. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes testados com a fração ACA2.....	69
Tabela 11. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes utilizados no fracionamento (modo normal) de ACA2	69
Tabela 12. Proporções (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes testados com a fração E3.....	70
Tabela 13. Sistemas bifásicos de solventes utilizados no fracionamento (modo normal) de ACA3.....	71
Tabela 14. Rendimento de extratos e frações de sucupiras	75
Tabela 15. Resultado da prospecção fitoquímica de <i>A. parviflora</i> e <i>R. schomburgkii</i>	77
Tabela 16. Percentual de inibição do crescimento (IC%) dos compostos frente as linhagens tumorais em concentração única.....	84
Tabela 17. Cl ₅₀ das amostras em linhagens de células após diluição seriada nas concentrações máxima e mínima.....	88
Tabela 18. Rendimento das frações após união obtidas na 1ª Injeção de ACE3 no HPCCC.....	91
Tabela 19. Rendimento das frações após união obtidas na 2ª Injeção de ACE3 no HPCCC.....	94
Tabela 20. Rendimento das frações após união obtidas na 3ª Injeção de ACE3 no HPCCC.....	96
Tabela 21. Percentual de inibição do crescimento (IC%) dos compostos frente as linhagens tumorais em concentração única.....	98
Tabela 22. Resultados das análises por CLAE-EM de oito frações selecionadas	99
Tabela 23. Rendimentos das subfrações obtidas do fracionamento por CLAE-UV de ACE3-4.....	102
Tabela 24. Rendimentos das subfrações obtidas do fracionamento por CLAE-UV de ACE3-17.....	103

Tabela 25. Rendimento da união das frações obtidas do fracionamento de ACE3-16 por HPCCC	105
Tabela 26. Rendimento da união das frações obtidas do fracionamento de ACE3-16-18 por HPCCC	111
Tabela 27. Rendimento da união das frações obtidas do fracionamento de ACA2 por HPCCC	113
Tabela 28. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos isômeros coatlina A and α -epi-coatlina A.....	126
Tabela 29. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC da isoliquiritigenina.....	134
Tabela 30. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da medicarpina	141
Tabela 31. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da biochanina A.....	152
Tabela 32. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da sativanona	158
Tabela 33. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da formononetina.....	167
Tabela 34. Tabela de RMN de ^1H e ^{13}C do arizonicanol A	173
Tabela 35. Tabela de RMN de ^1H e ^{13}C da liquiritigenina	178
Tabela 36. Tabela de RMN de ^1H e ^{13}C da biochanina A	182
Tabela 37. Resultados dos testes de atividade citotóxica de subfrações, substâncias em mistura e isoladas.....	184
Tabela 38. Rendimento das frações obtidas do fracionamento de E2 por HPCCC	188

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Inibição em concentração única de <i>R. schomburgkii</i> frente a três células tumorais.	85
Gráfico 2. Curvas de viabilidade celular versus concentração extrato e frações de <i>R. shomburgkii</i> em cinco linhagens de células tumorais e uma normal	85
Gráfico 3. Inibição em concentração única das cascas e cerne de <i>A. parviflora</i> frente a três células tumorais	86
Gráfico 4. Curvas de viabilidade celular versus concentração extrato e frações de <i>A. parviflora</i> em cinco linhagens de células tumorais e uma normal	87

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Etapa inicial da metodologia realizada com as espécies madeireiras.....	59
Fluxograma 2. Etapas do fracionamento de ACE3 de <i>A. parviflora</i> até o isolamento das substâncias 1 e 2.	64
Fluxograma 3. Condições do fracionamento de ACE3-17	65
Fluxograma 4. Etapas do fracionamento realizado com ACE3-16 e subfrações	68
Fluxograma 5. Etapas do fracionamento de ACA2 de <i>A. parviflora</i> até o isolamento das substâncias 5.	70
Fluxograma 6. Fracionamento da fração E3	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 Resíduos da indústria madeireira da região amazônica	27
3.2 Família Fabaceae	28
3.3 Gênero <i>Andira</i>	29
3.3.1 A espécie <i>Andira parviflora</i> Ducke	36
3.4 Gênero <i>Robrichia</i>	38
3.4 Cromatografia contracorrente (CCC)	44
3.5.1 Definição e princípio de separação da CCC	44
3.5.2 Histórico da técnica	45
3.5.3 Instrumentação da CCC	46
3.5.4 Sistemas bifásicos de solventes	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 Reagentes, materiais e equipamentos	51
4.1.1 Reagentes	51
4.1.2 Materiais	51
4.1.3 Equipamentos	51
4.2 Preparação dos reveladores químicos	52
4.2.1 Vanilina sulfúrica	52
4.2.2 Anisaldeído	52
4.2.3 NP-PEG	52
4.2.4 Dragendorff	52
4.2.5 DPPH	53

4.3 Coleta do material vegetal	53
4.4 Obtenção dos extratos e fracionamento dos resíduos madeireiros	53
4.5 Prospecção fitoquímica em tubos dos extratos e frações	54
4.5.2 Teste para a presença de saponinas	55
4.5.3 Caracterização de compostos fenólicos.....	55
4.6 Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos e frações	56
4.7 Atividade citotóxica frente a células tumorais	57
4.7.1 Determinação da viabilidade celular	57
4.7.2 Determinação de concentração inibitória (CI ₅₀)	58
4.8 Fracionamento e isolamento das frações ativas	59
4.8.1 Cromatografia contracorrente de alta performance (HPCCC- <i>high performance counter current chromatography</i>)	59
4.8.2 Procedimento geral dos fracionamentos por HPCCC	60
4.8.2 Fracionamento e isolamento de constituintes químicos de <i>Andira parviflora</i> (cerne) – ACE3	60
4.8.2.1 Teste de sistemas de solventes bifásicos com a fração ACE3	60
4.8.2.2 Fracionamento por HPCCC– 1ª injeção (modo normal)	61
4.8.2.3 Fracionamento por HPCCC – 2ª Injeção (modo reverso)	62
4.8.2.4 Fracionamento por HPCCC – 3ª Injeção (modo reverso)	63
4.8.2.4.1 Purificação por CLAE-UV da fração ACE3-4	63
4.8.2.4.2 Fracionamento por CLAE-DAD da fração ACE3-17	64
4.8.2.4.3 Fracionamento por HPCCC da fração ACE3-16 da 3ª injeção de ACE3.....	65
4.8.3 Fracionamento e isolamento de constituintes químicos de <i>Andira parviflora</i> (cascas) – ACA2.....	68
4.8.3.1 Fracionamento por HPCCC de ACA2	68

4.8.4 Fracionamento e isolamento de constituintes químicos de <i>Robrichia schomburgkii</i> (Cascas) – Fração E3	70
4.10 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM).....	72
4.11 Espectrometria de massas (EM).....	73
4.12 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 Rendimentos dos extratos e frações das espécies madeireiras .	75
5.2 Prospecção fitoquímica em tubos de ensaio	75
5.3 Prospecção fitoquímica dos extratos e frações em placas cromatográficas (CCD)	81
5.3.1 Cerne e casca de <i>A. parviflora</i>	81
5.3.2 Casca de <i>R. schomburgkii</i>	83
5.4 Atividade citotóxica frente a células tumorais	83
5.5 Espécie <i>Andira parviflora</i> (sucupira vermelha).....	89
5.5.1.1 Definição dos sistemas bifásicos de solventes	89
5.5.1.2 1º Fracionamento de ACE3 em modo normal.....	89
5.5.1.3 2º Fracionamento de ACE3 em modo Reverso	92
5.5.1.4 3º Fracionamento de ACE3 em modo reverso.....	94
5.5.2 Testes de atividade citotóxica com as frações geradas do terceiro fracionamento de ACE3	97
5.5.3 Análise cromatográfica das frações do 3º fracionamento de ACE3	98
5.5.4 Fracionamento semi-preparativo de ACE3-4 por CLAE-UV	102
5.5.5 Fracionamento semi-preparativo de ACE3-17 por CLAE-DAD.....	102
5.5.6 Fracionamento de ACE3-16 por HPCCC.....	104
5.5.6.1 Fracionamento da subfração ACE3-16-18 por HPCCC	108
5.5.7 Fracionamento por cromatografia contracorrente de alta performance (HPCCC) da fração ACA2 das cascas de <i>A. parviflora</i>	112

5.5.8 Elucidação estrutural das substâncias isoladas do cerne de <i>A. parviflora</i>	114
5.5.8.1 Elucidação estrutural das substâncias 1 e 2	114
5.5.8.2 Elucidação estrutural da substância 3.....	127
5.5.8.3 Elucidação estrutural da substância 4.....	135
5.5.8.4 Elucidação estrutural da substância 5.....	144
5.5.9 Elucidação estrutural das substâncias em mistura obtidas do cerne de <i>A. parviflora</i>	153
5.5.9.1 Elucidação estrutural substância 6	153
5.5.9.2 Elucidação estrutural da substância 7.....	162
5.5.9.3 Elucidação estrutural da substância 8.....	169
5.5.9.4 Elucidação estrutural da substância 9.....	174
5.6.10 Elucidação estrutural da substância isolada da casca de <i>A. parviflora</i>	180
5.5.11 Atividade citotóxica das substâncias isoladas e em mistura de <i>A. parviflora</i>	182
5.6 Espécie <i>Robrichia schomburgkii</i> (sucupira amarela)	185
5.6.1 Fracionamento de E3 de <i>R. schomburgkii</i> por HPCCC	185
6. CONCLUSÃO	190
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	192
8. APÊNDICE	205
9. ANEXOS	213

1. INTRODUÇÃO

A Região Amazônica é conhecida como a mais biodiversa do mundo, e apresenta o maior bioma brasileiro. Com isso, a região é considerada um grande depósito natural de plantas, concentrando aproximadamente 40 mil espécies de plantas, entre árvores, cipós, samambaias e outras formas vegetais. Estima-se que cerca de 67,8% da Amazônia brasileira é composta por formações florestais, e que 81,3% do bioma permanece coberto por vegetação nativa (Diniz et al., 2017; MapBiomias, 2024).

A biodiversidade da Amazônia é base estratégica em potencial para o desenvolvimento econômico em diferentes cadeias produtivas, relacionadas a diferentes setores, como principalmente o de base florestal do tipo madeireiro e não-madeireiro (Diniz et al., 2017). Nesse contexto, o Brasil representado pela Amazônia, é um dos principais produtores de madeira tropical no mundo, ficando atrás somente da Indonésia, Índia e Vietnã no ano de 2021 (Maplesden, 2021).

A exploração e o processamento industrial de madeira, a mineração e a agropecuária são as principais atividades econômicas da Região Amazônica. O setor madeireiro impulsiona de forma direta a economia de dezenas de municípios da Amazônia. Como consequência direta deste processo, o volume de resíduo madeireiro tem crescido significativamente nos últimos anos, sendo boa parte não aproveitado (Ramos et al., 2018; Veríssimo; Pereira, 2014).

A problemática apresentada se torna uma grande oportunidade para explorar o potencial químico e farmacológico desses resíduos que podem ser utilizados em estudos de prospecção fitoquímica para a identificação de metabólitos secundários com aplicações tecnológicas, além disso contribuir para a quimiotaxonomia. Algumas espécies utilizadas na indústria madeireira vem sendo estudadas, inclusive no grupo de pesquisa Q-BiomA (Grupo de Pesquisa de Química de Biomoléculas da Amazônia), e foram relatados metabólitos secundários como: fenóis, flavonoides, triterpenos, saponinas, alcaloides, lignóides, quinonas e outras classes que apresentam atividade antioxidante, antibiótica, antifúngica, anti-inflamatória, antimicrobiana e citotóxica (Alves, 2020; Amorim et al., 2018; El-Din et al., 2017; Flores, 2022; Garcia et al., 2018; Silveira et al., 2017).

As espécies utilizadas na atividade madeireira podem ser encontradas nas seguintes famílias: Bignoniaceae, Caesalpinoideae, Caryocaraceae,

Fabaceae, Lauraceae, Lecythidaceae, Myristicaceae e Papilionoideae (Moutinho, 2008). As principais espécies madeireiras utilizadas nas indústrias podem ser observadas na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1. Espécies mais utilizadas na atividade madeireira da amazônia

Nome popular	Nome Científico	Família
Angelim vermelho	<i>Dinizia excelsa</i>	Fabaceae
Cumaru	<i>Dipteryx odorata</i>	Fabaceae
Cupiúba	<i>Goupia glaba</i>	Goupiaceae
Garapeira ou amarelão	<i>Apuleia leiocarpa</i>	Caesalpinioidea
Garrote ou tatajuba	<i>Bagassa guianensis</i>	Moraceae
Jatobá	<i>Hymenaea courbaril</i>	Fabaceae
Maçaranduba	<i>Manilkara elata</i>	Sapotaceae
Maracatiara	<i>Astronium lecointei</i>	Anacardiaceae
Marupá	<i>Simarouba amara</i>	Simaroubaceae
Paricá	<i>Schizolobium parahyba</i>	Fabaceae
Piquiarana	<i>Caryocar glabrum</i>	Caryocaraceae
Piquiá	<i>Caryocar vilosum</i>	Caryocaraceae
Sucupira Amarela	<i>Robrichia schomburgkii</i>	Fabaceae
Sucupira Vermelha	<i>Andira racemosa</i>	Fabaceae
Sucupira preta	<i>Diploptropis recemosa</i>	Fabaceae

Fonte: Cysneiros *et al.* (2018)

Dentre estas pode-se destacar as espécies conhecidas como sucupiras que pertencem à família Fabaceae, possuindo cerca de 770 gêneros e 19.500 mil espécies (Carvalho, 2014), detendo um grande valor comercial para a indústria madeireira, por suas diversas aplicações como confecções de móveis, construções, pisos e outros. A família Fabaceae é encontrada no bioma Amazônico, que engloba cerca de sete unidades federativas do Brasil: Acre, Amazonas, Amapá, metade do Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima (Coradin; Siminski; Reis, 2011). Estudos com espécies da família Fabaceae, revelaram a presença de grande variedade de flavonóides, alcalóides, terpenóides (El-Din *et al.*, 2014).

Tendo em vista a escassez de estudos relacionados aos resíduos de algumas espécies conhecidas como sucupira como: *Robrichia schomburgkii* e

Andira parviflora, que destaque as atividades citotóxica das substâncias propôs-se o presente estudo para descrever a composição química de frações ativas dessas espécies e assim agregar valor aos resíduos madeireiros tornando-os uma matéria prima para a produção de substâncias ativas com interesse tecnológico da indústria de química fina e farmacêutica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a composição química de frações ativas de resíduos das espécies *Andira parviflora* e *Robrichia schomburgkii* utilizadas na indústria madeireira da Região Amazônica e contribuir com o seu conhecimento farmacológico.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos, frações e substâncias isoladas de *Andira parviflora* e *Robrichia schomburgkii*;
- Avaliar o perfil cromatográficos das frações promissoras por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e/ou espectrometria de massas (CLAE-DAD, CLAE-EM);
- Estudar sistemas de solventes bifásicos para o isolamento de substâncias ativas por HPCCC;
- Isolar substâncias das frações ativas por cromatografia contracorrente (CCC) e CLAE-DAD.
- Identificar as estruturas das substâncias isoladas por técnicas espectrométricas e espectroscópicas, como EM, RMN uni e bidimensionais (¹H, ¹³C, DEPT-135, HSQC, HMBC e COSY) e alfa-D.
- Agregar valor aos resíduos madeireiros de *Andira parviflora* e *Robrichia schomburgkii*;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Resíduos da indústria madeireira da região amazônica

A Região Amazônica é umas das principais produtoras de madeira tropical no mundo, ficando atrás da Indonésia, Índia e Vietnã nos anos de 2019 e 2020 (OIMT, 2020). Dentre as atividades econômicas que impulsionam a economia da região a exploração madeireira é uma das mais importantes, pois contribui de forma direta para a economia de dezenas de municípios da Amazônia. Como consequência direta deste processo, o volume de resíduo madeireiro tem crescido significativamente nos últimos anos, sendo boa parte não aproveitado (Veríssimo; Pereira, 2014).

O processo de exploração da madeira apresenta várias etapas, onde cerca de 9 a 18% do resíduo produzido em todo processo é proveniente da coleta da madeira, já na etapa de beneficiamento das toras a produção de resíduos varia de 45 a 55% (Silva et al., 2020). Segundo o levantamento de Hummel e colaboradores (2010) cerca de 20 milhões de metros cúbicos de madeira foram processados e cerca de 8,4 milhões de metros cúbicos foram categorizados como resíduos do processo. Este fato representa também o desperdício de 59 % de um metabolismo vegetal valioso e inexplorado que pode apresentar aplicação tecnológica e agregar valor aos resíduos oriundos da atividade madeireira.

A alta produção de resíduos durante a produção de toras se deve muitas vezes, à baixa tecnologia, à mão-de-obra pouco especializada das indústrias madeireiras e o mau aproveitamento da madeira (Stragliotto; Pereira; Oliveira, 2020) . Uma das principais formas adotadas na região amazônica para diminuir a quantidade de resíduos, é por meio da queima a céu aberto, porém sabe-se que essa prática contribui para a geração de poluentes do ar, fazendo com que focos de incêndios sejam encontrados. Muitas vezes esses resíduos como as cascas de troncos e folhas são simplesmente descarregados e locais inapropriados (Homma, 2008; Hummel et al., 2010). Algumas formas de reciclagem ou reutilização de resíduos são empregadas, como: compostagem, geração de energia, produção de painéis e fabricação de pequenos móveis (Ramos et al., 2017).

De acordo com o estudo realizado por Cysneiros e colaboradores (2018), as espécies mais utilizadas na atividade madeireira da Amazônica, são: *Apuleia leiocarpa* (garapeira ou amarelão), *Astronium lecointei* (maracatiara), *Bagassa guianensis* (garrote ou tatajuba), *Clarisia racemosa* (guariúba), *Caryocar glabrum* (pequiarana), *Caryocar villosum* (pequiá), *Dinizia excelsa* (angelim vermelho), *Dipteryx odorata* (cumarú), *Enterolobium schomburgkii* (sucupira amarela ou orelha de macaco), *Goupia glabra* (azedinha ou cupiúba), *Hymenaea courbaril* (jatobá), *Manilkara elata* (maçaranduba), *Simarouba amara* (marupá), e *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (paricá).

Diversas espécies altamente valorizadas no setor madeireiro apresentam grande escassez de descrição da composição química e propriedades farmacológicas. Estes estudos poderiam cooperar com o conhecimento químico das famílias e gêneros além disso alavancar o conhecimento dos metabólitos secundários conhecidos e inéditos, e agregar valor aos resíduos provenientes da atividade madeireira (Ribeiro et al., 2016).

3.2 Família Fabaceae

A família Fabaceae é uma das mais diversas do mundo, pertence a ordem Fabales, classe Magnoliopsida e divisão Magnoliophyta. A família está amplamente distribuída em cerca de 770 gêneros e aproximadamente 19.500 espécies, é considerada a maior família de angiospermas em número de espécies, ficando atrás da Asteraceae e Orchidaceae em todo o mundo (Azani et al., 2017; Beech et al., 2017; Roskov et al., 2006).

Os gêneros mais numerosos são *Astragalus* (2.400 espécies), *Acacia* (950 espécies), *Indigofera* (700 espécies), *Crotalaria* (700 espécies) e *Mimosa* (500 espécies) representando cerca de 9,4% de todas as espécies de plantas. No Brasil, são encontradas cerca de 2.848 espécies, sendo 1.539 espécies endêmicas e 222 gêneros. A família está subdividida em seis subfamílias: Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae e Papilionoideae (Azani et al., 2017; Rahman; Parvin, 2015).

As espécies da família apresentam uma distribuição cosmopolita com árvores, arbustos, lianas e ervas. A grande importância da família se deve ao grande número de espécies comestíveis altamente nutritivas de proteínas e

micronutrientes, além disso são utilizadas na medicina popular, ornamentação, madeiras, produção de fibras, corantes, gomas, resinas e óleos (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002; Graham; Vance, 2003). Além disso, as espécies desta família são utilizadas economicamente para a fixação de nitrogênio, pois estas espécies possuem a habilidade de converter nitrogênio atmosférico em compostos nitrogenados que podem ser utilizados no crescimento de plantas (Ahmad; Anwar; Hira, 2016).

Quimicamente, a família Fabaceae é conhecida por apresentar uma grande diversidade de classes de metabólitos secundários, como: alcaloides, catequinas, esteroides, fenólicos, flavonoides, polifenóis, saponinas, taninos e terpenoides. A classe mais relatada nas espécies de Fabaceae são os flavonoides, dando ênfase a subclasse dos isoflavonoides (Akram et al., 2021; Fayek et al., 2021; Lawal et al., 2020; Sebastian; Jaykar; Gomathi, 2020).

Na literatura são apresentadas uma série de ações farmacológicas associadas a espécies da família, incluindo atividade analgésica, antibacteriana, antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana, antimutagênico, antioxidante, antiplasmódica, antirreumática, antiúlcera, citotóxica, hipoglicemiante e larvicida devido a presença de substâncias bioativas em diferentes órgãos vegetais dessas plantas (Ahmad; Anwar; Hira, 2016; Khan; Odokpe, 2020; Obistioiu et al., 2021; Santos et al., 2022).

A revisão de Usman e colaboradores (2022) relata que poucos são os estudos voltados para a atividade citotóxica de espécies da família Fabaceae, apesar de serem relatados diversas substâncias que apresentam atividade confirmada como: ácido gálico, butrina, castanospermina, catequina, genisteína, isoliquiritigenina, isoraminetina-3-O-raminosídeo, isoraminetina, quercetina, rutina e tricina. Esses dados indicam o caminho para novas pesquisas para avaliar as propriedades citotóxicas, que podem levar a descobertas de novos medicamentos a partir dessas espécies.

3.3 Gênero *Andira*

A pesquisa bibliográfica sobre o gênero *Andira*, um dos gêneros abordados nesta tese, foi consolidada com a publicação de um artigo de revisão sobre o gênero, intitulado: “O gênero *Andira* Lam: uma breve revisão sobre

ocorrência, composição química e atividades biológicas” na revista Cuadernos de Educación y Desarrollo, volume 17, número 7 no ano de 2025 (Araújo et al., 2025).

O gênero *Andira* Lam. (Fabaceae) pertence a subfamília Papilionoideae, compreende cerca de 29 espécies distribuídas pela América Tropical e uma espécie que é encontrada na África. As espécies de *Andira* são encontradas majoritariamente no Brasil, onde são catalogadas cerca de 27 espécies, distribuídas principalmente na Amazônia e Minas Gerais. Essas espécies compõem um grupo conhecido popularmente como “angelins” (Mattos, 1979; Pennington, 2003; Ramos; Cardoso; Pennington, 2020).

De acordo com Mattos (1979), as espécies do gênero são caracterizadas por árvores e arbustos com a casca cinzenta e flores róseas ou violáceas. Algumas espécies do gênero *Andira*, no Brasil ganham nomes populares como: *A. inermis* (lombrigueira e sucupira), *A. macrothyrsa* (Uxi de morcego), *A. humilis* (mata barata, angelim, angelim rasteiro e manga do campo), *A. surinamensis* (mangarana, manga brava, sucupira de várzea e angelim), *A. ormosioides* (angelim pedra, angelim tento, angelim rosa, angelim amargoso e jacarandá rajada), *A. nítida* (angelim branco, angelim da praia, angelim coco e angelim), *A. praecox* (andiroba jaruba e sucupira vermelha), *A. micranta* (acapu-rana, sucupira vermelha e sucupira chorona), *A. parviflora* (sucupira vermelha, acapu-rana, sucupira chorona e andira uchi), *A. legalis* (angelim coco, angelim preto e angelim roxo), *A. vermífuga* (angelim preto, mata barata e angelim branco), *A. anthelmia* (angelim coco e angelim preto), *A. cordata* (grão de galo), *A. unifoliolata* (sucupira amarela, sucupira chorona, sucupira vermelha e andira-uchi) (Pennington, 2003).

A importância econômica do gênero está voltada para a indústria madeireira, pois algumas espécies apresentam madeira de excelente qualidade, considerada forte, aplicável na construção naval, obras expostas, esteios, postes, carroçaria e carpintaria (Santos, 2012). Em 1755, o gênero conhecido por suas propriedades vermífugas, foi utilizado na Europa por médicos e farmacêuticos de diferentes países que desejavam industrializar o processamento das cascas em pó, com o qual almejavam obter uma droga anti-helmítica (Mattos, 1979; Pennington, 1996).

Popularmente, algumas espécies do gênero são utilizadas como anti-helmítica, *A. anthelma*, *A. fraxinifolia*, mesmo havendo estudos que indicam efeitos tóxicos no uso de altas doses (Silva et al., 2003). Além disso, as espécies são utilizadas na medicina tradicional como purgativo, febrífugo, narcótico, inseticida, pesticida e antimalárico (Braz Filho et al., 1973; Kraft et al., 2000; Silva; Velozo; Parente, 2000; Silva et al., 2006).

De acordo com Araújo *et al* (2025), a literatura científica registra a composição química de apenas oito espécies. Nelas, foram identificados 52 metabólitos, dos quais 37 são flavonoides. Entre os flavonoides, 19 são isoflavonas. A alta recorrência desses compostos sugere que as isoflavonas podem atuar como marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Andira*.

Nas raízes de *A. anthelmia* já foram isolados os seguintes metabólitos secundários: ácido ursólico (1), ácido p-hidroxibenzóico (2), catequina (3), engeletina (4), astilbina (5), calicosina (6), genisteína (7), biochanina A (8), biochanina A-7-O- β -D-glucopiranosídeo (9), biochanina A-7-O-rutinosídeo (10), biochanina A-7-O- β -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 5)- β -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopiranosídeo (11) e genisteína 7-O- β -D-glucopiranosídeo (12) (Figura 1). As sete últimas substâncias citadas são isoflavonas, sendo a genisteína glicosilada (12) isolada pela primeira vez no gênero *Andira* no trabalho de Silva e colaboradores (2008).

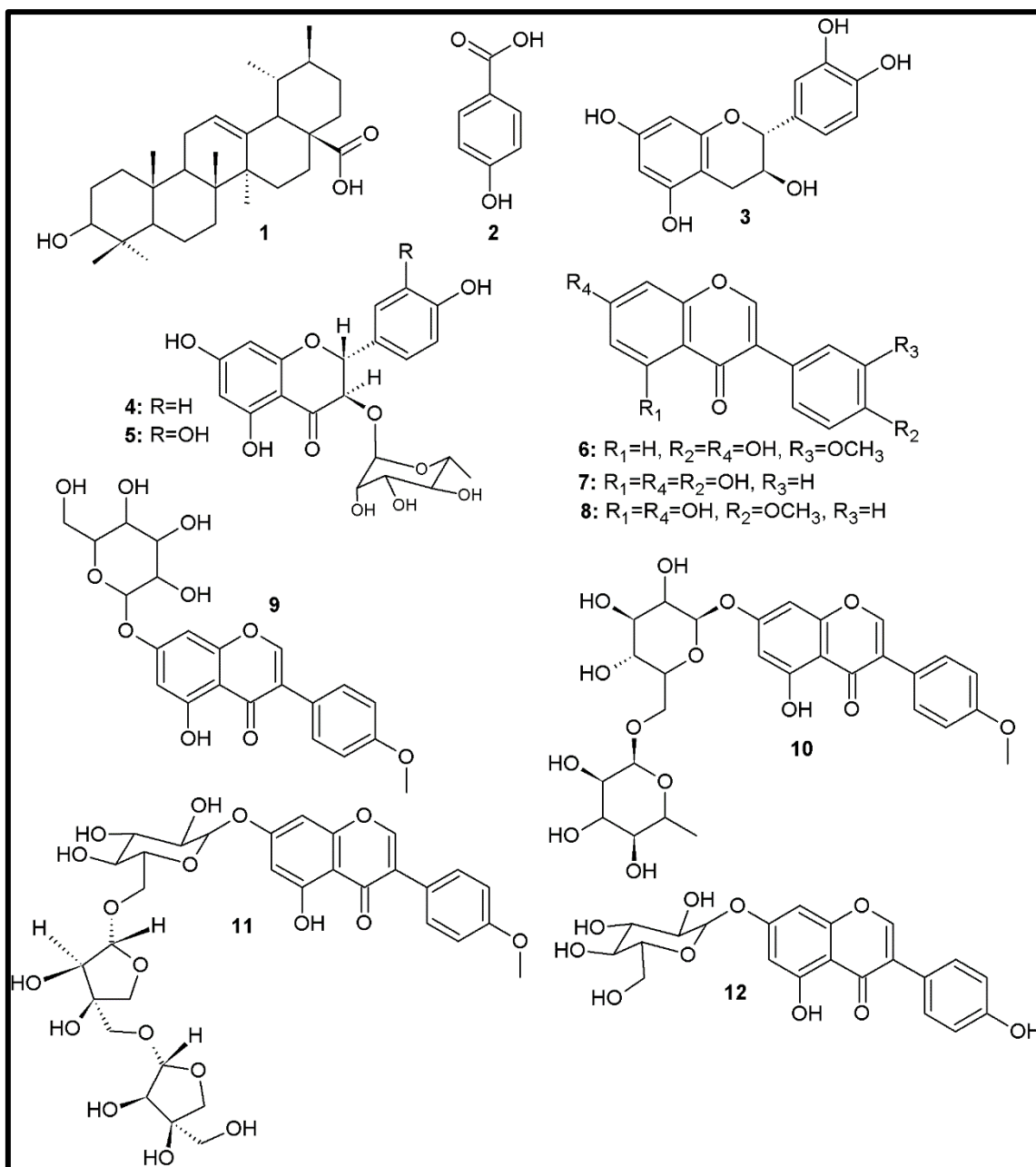


Figura 1. Substâncias isoladas das raízes *A. anthelmia*

Silva *et al.* (2006) conduziram o primeiro estudo fitoquímico envolvendo as raízes de *A. fraxinifolia*, no qual relataram o isolamento e a caracterização de diversos compostos. Entre eles, destacam-se uma mistura dos esteroides sitosterol (13) e estigmasterol (14), o derivado glicosilado 3-O-β-D-glicopiranosilsitosterol (15), além do lupeol (16) e do ácido betulínico (17). O estudo também identificou duas isoflavonas — biochanina A (8) e pratenseína (18) —, uma cromona denominada eucrifina (19), e dois flavonóis: isoengeletina (20) e isoastilbina (21). Todos esses compostos estão ilustrados na Figura 2.

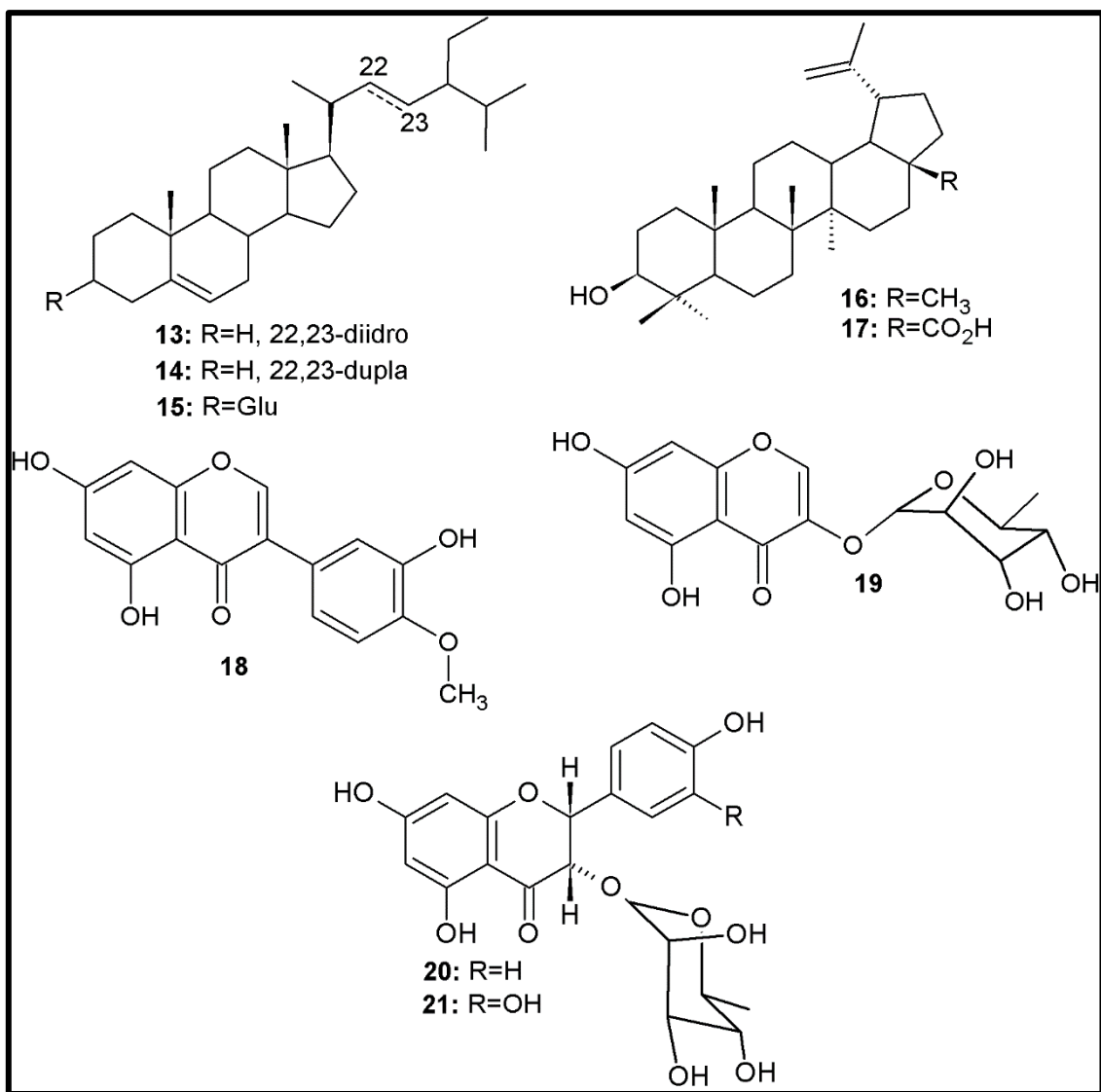


Figura 2. Substâncias isoladas das raízes de *A. fraxinifolia*

Nas raízes de *A. humilis*, foram descritas a biochanina A (**8**) e derivados glicosilados **9**, **22**, **23**, **24**, outras isoflavonas genisteína (**7**) e pratenseína (**18**), o flavonol kaempferol (**25**) e um derivado glicosilado kaempferol-3-O- α -L-raminopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)]-[β -D-xilopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-galactopiranosídeo (**26**) e a dihidrogenisteína (**27**) (Figura 3) (Garcez et al., 2010).

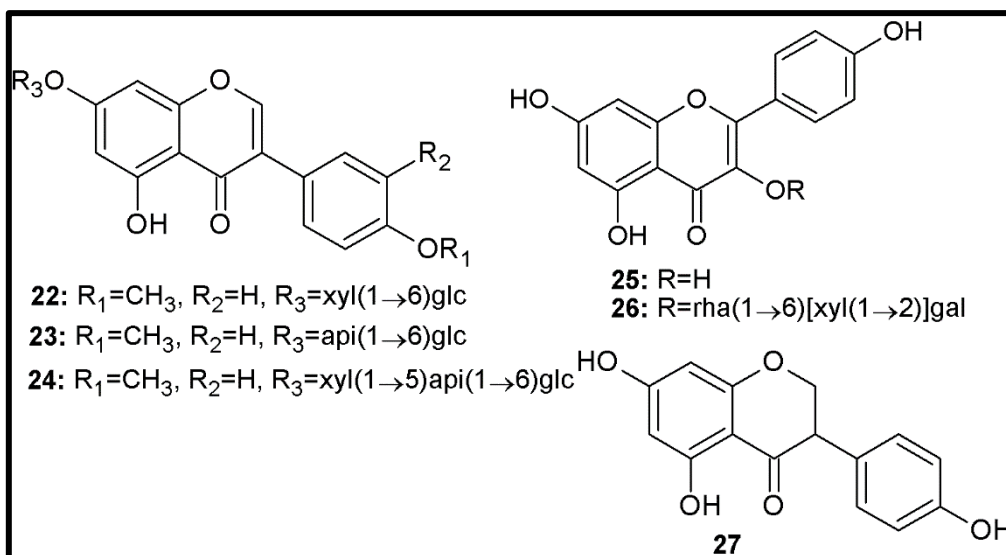


Figura 3. Substâncias isoladas das raízes de *A. humilis*

A espécie *A. inermis* destaca-se como uma das mais investigadas dentro do gênero, conforme evidenciado pelos diversos estudos que abordam a composição química de seus diferentes órgãos vegetativos. Na análise da madeira de *A. inermis*, foram identificados diversos compostos bioativos, incluindo o flavonoide do tipo pterocarpano pterocarpina (**28**) e as isoflavonas biochanina A (**8**), genisteína (**7**), formononetina (**29**), calicosina (**6**) e pratenseína (**18**), conforme descrito por Cocker *et al.* (1962) e Kraft *et al.* (2000).

No estudo conduzido por Kraft *et al.* (2000), merece destaque a identificação das isoflavonas calicosina e genisteína, as quais demonstraram atividade antiplasmódica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária. Além disso, nas folhas da espécie foram detectadas as mesmas isoflavonas previamente descritas na madeira, bem como outras já relatadas em espécies congêneres (**1**, **4**, **5**, **6**, **7**, **28**, **29**), conforme os trabalhos de Kraft *et al.* (2000, 2001).

Ainda nas folhas de *A. inermis* foram reportados os flavonoides prunetina (**30**), andirol A (**31**), andirol B (**32**), afrormosina (**33**), 3'-*O-trans*-cinnamoil-astilbina (**34**), as benzofuranas andinermol (**35**), andinermol A (**36**), andinermol B (**37**) e andinermol C (**38**). As substâncias Andirol A e B apresentaram atividade *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* (Kraft *et al.*, 2000, 2001, 2002). Nas raízes desta espécie a literatura reporta a presença isoflavonas glicosiladas biochanina A-7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 5)- β -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopiranosídeo

(11), genisteína 7-O-β-D-apiofuranosil-(1->6)-β-D-glucopiranosídeo (39) e a lanceolarina (40) (Silva; Velozo; Parente, 2000).

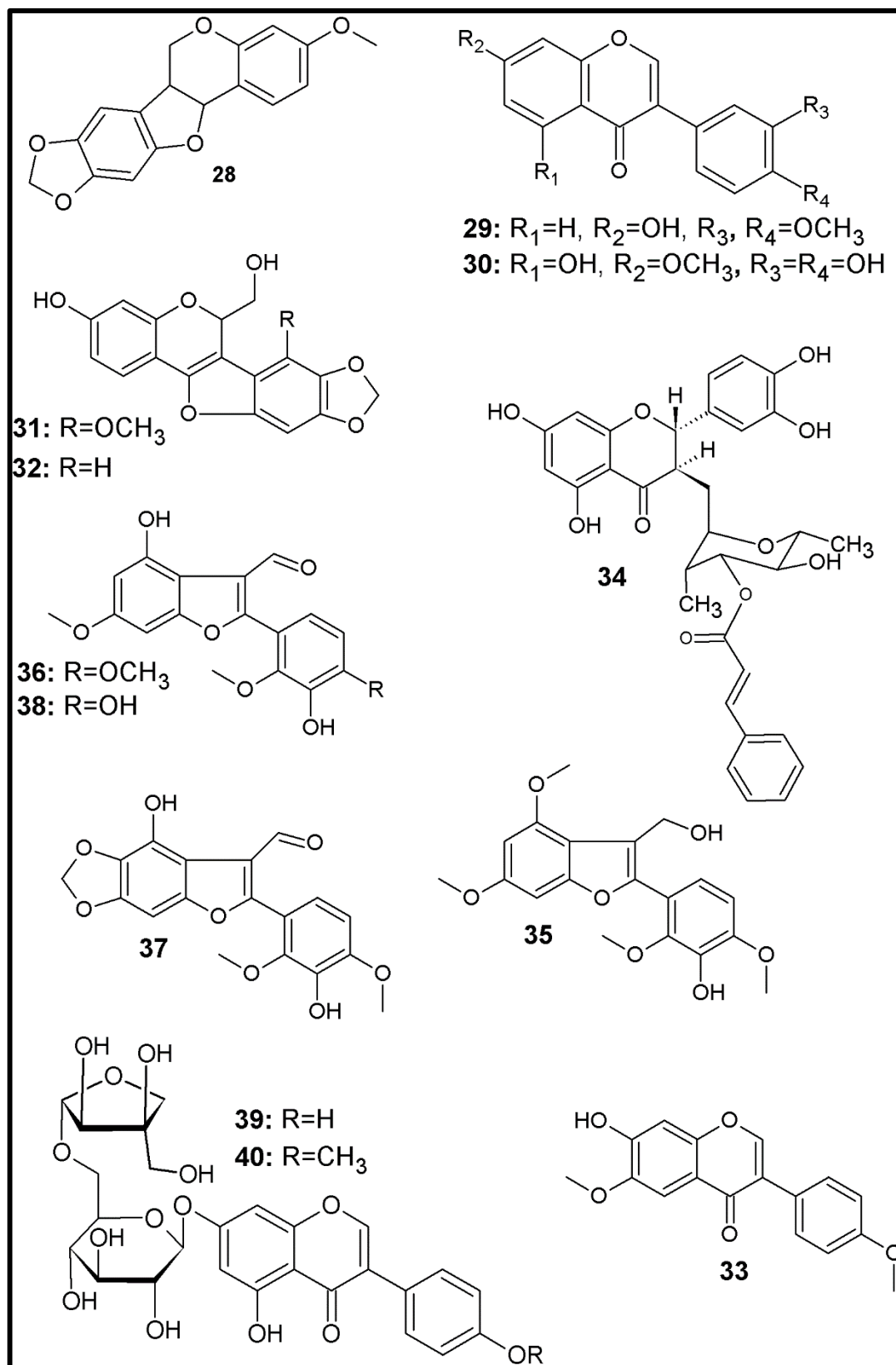


Figura 4. Substâncias isoladas de *A. inermis*.

Nas cascas de *A. retusa* foram isolados apenas o terpenoide lupeol (**16**) e a mistura dos esteroides β -sitosterol (**13**) e estigmasterol (**14**). Santos (2012b) em sua dissertação relatou atividade antioxidante dos extratos metanólico e diclorometano de folhas e galhos de *A. retusa*. Os extratos metanólicos de folhas e flor foram ativos contra o microorganismo *Staphylococcus aureus*, o extrato metanólico de folhas foi ativo também contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Almeida e colaboradores (2008) investigaram fitoquimicamente os extratos das cascas do tronco e das cascas dos galhos de *A. surinamensis*, que rendeu o isolamento de um dímero de isoflavonas surinamensina (**41**-Figura 5) isolada pela primeira vez no gênero, a conhecida e típica biochanina A (**8**), prunetina (**30**), calicosina (**6**), pratenseina (**18**) e o triterpeno lupeol (**16**).

Os epímeros de diidrochalconas, coatlina A (**42**) e a α -*epi*-coatlina A (**43**) foram isolados da madeira de *A. coriácea* (Genta-Jouve et al., 2013). Nas folhas de *A. peniculata*, Alves et al (2024) reportou os seguintes flavonoides: (-)-epicatequina (**44**), engeletina (**4**) e astilbina (**5**).

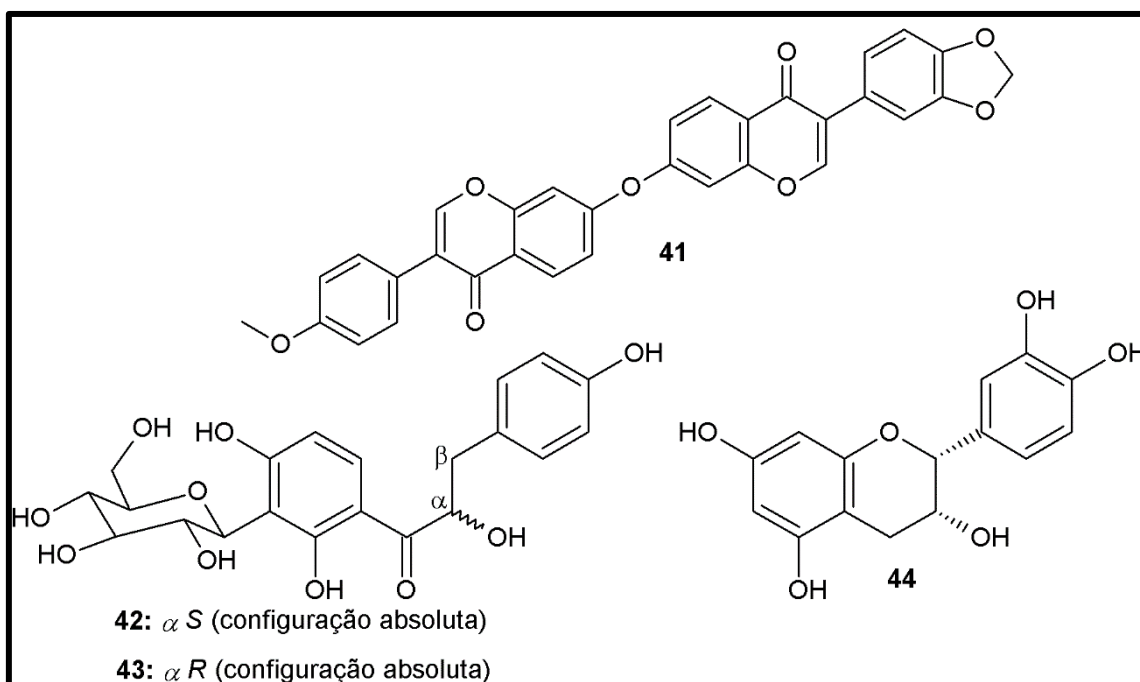


Figura 5. Flavonoides isolados em espécies de *Andira*

3.3.1 A espécie *Andira parviflora* Ducke

A. parviflora é uma espécie conhecida popularmente como sucupira vermelha ou angelim, ocorre principalmente nas matas de terra firme na região

Amazônica. É uma árvore de grande porte e possui casca com cor marrom avermelhado, suas folhas são cobertas por pelos avermelhados e flores brancas, seus frutos possuem formato ovoide. A madeira é pesada, apresentando um alburno amarelado e o cerne fibroso e avermelhado. Apresenta uma boa resistência a ação de fungos e cupins. A madeira é largamente utilizada na construção civil e naval, móveis, objetos de tornearia, bengalas, carpintaria e postes (Ramos; Cardoso; Pennington, 2020).

A espécie apresenta poucos estudos quanto a sua composição química, mas dois pesquisadores já relataram a presença de algumas substâncias no cerne, tronco e alburno do tronco. Braz-Filho, Gottlieb e colaboradores (1973), descreveram no tronco de *A. parviflora* a presença de dois terpenos a cicloartenona (**45**) e cicloartenol (**46**), duas isoflavonas a biochanina A (**8**) e 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanona (2,3-dihidrobiochanina A) (**47**) (Figura 6).

Nos resíduos madeireiros (cerne) estudados de *A. parviflora* por Garcia e colaboradores (2018) foram identificados novamente a biochanina A (**8**), genisteína (**7**) e 7,5',6'-triidroxi-4'-metoxiisoflavana (**48**). Na continuidade das pesquisas com a espécie, Garcia e colaboradores (2021) isolaram do extrato metanólico um novo bipterocarpan a medicarpina-7-O-7'' secundiflorol I (**49**), e os flavonoides dihidroxi-4'-metoxipterocarpan (**50**), nissolina (**51**), medicarpina (**52**) e biochanina A (**8**).

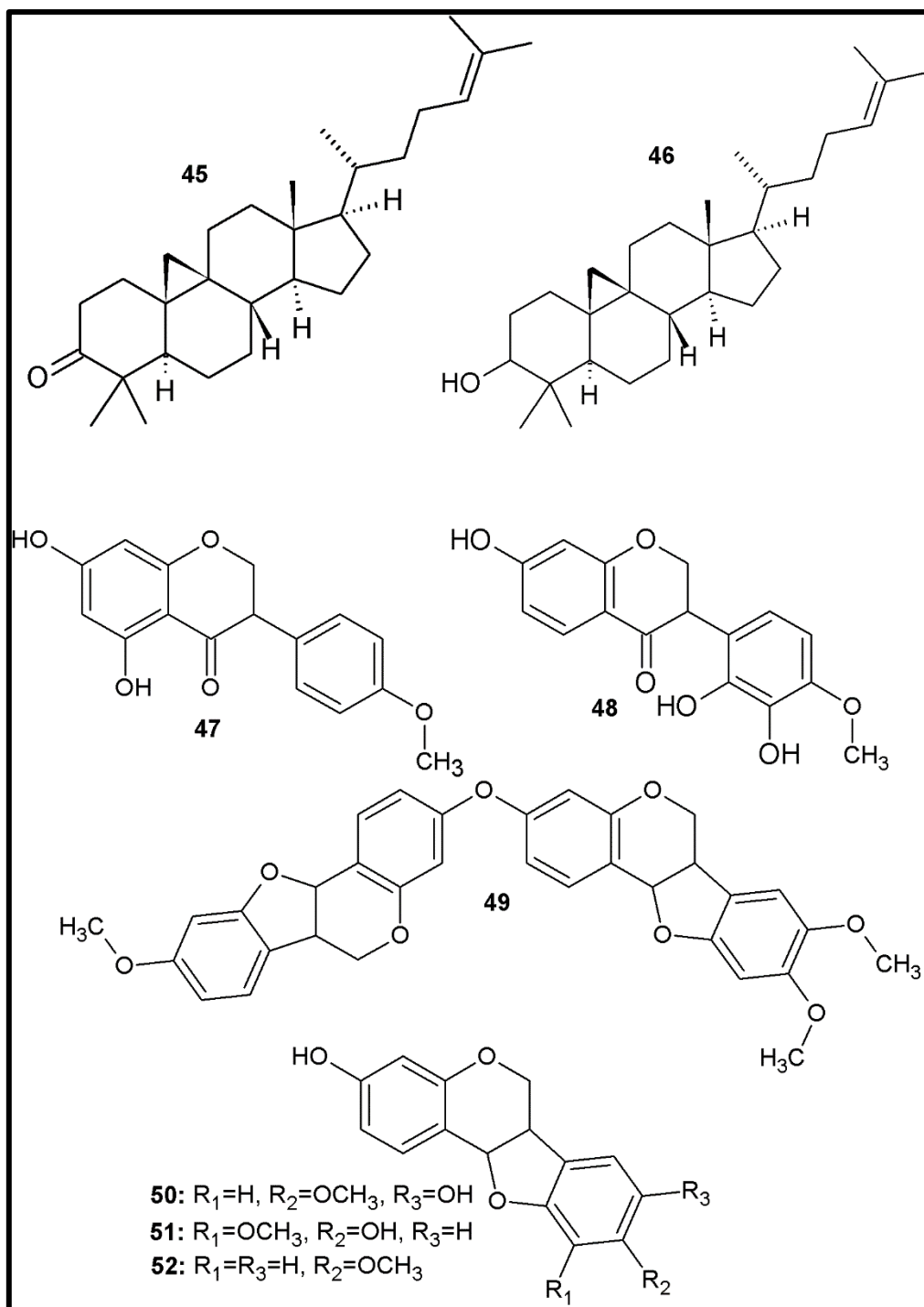


Figura 6. Substâncias isoladas em *A. parviflora*.

3.4 Gênero *Robrichia*

O gênero compreende três espécies, a *Robrichia glaziovii*, *Robrichia oldemanii* e *Robrichia schomburgkii*, derivado da família Fabaceae e subfamília Mimosoideae. As espécies de *Robrichia* são distribuídas do sul do México ao sul da América Tropical (Figura 7) (IPNI, 2025; Souza et al., 2022).

Investigações sobre o gênero *Enterolobium* indicam a existência de triterpenos, saponinas, fenólicos e ácidos graxos com potencial bioativo (El-Din et al., 2017; Matloub et al., 2015) Nos frutos da espécie *E. contortisiliquum* foram isolados lupeol (1), lupeil acetato (2), ácido 3 β -hidroxi-21 β -E-cinnamoil-oxiolean-12-en-20-oico (3), ácido 3 β ,21 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico (ácido machaerínico) (4) e a lactona 3 β -hidroxiolean-12-en-21 β →28-lactona (5), triterpenos ácido maslínico (6), ácido betulínico (7), 3-oxo- β -amirina (8), ácido ursólico (9), β -amirina (10) e esqualeno (11) (Figura 2) (Delgado; Silva; Fot, 1984; Marx; Trush, 1963, 1967).

No pericarpo de *E. contortisiliquum* foram isolados dois triterpenos nomeados como enterolosaponinas A (12) e B (13), e sete saponinas triterpênicas bisdesmosídicas chamadas de contortisiliosídeos A – G (14-20) (Mimaki et al., 2003, 2004). Nas folhas de *E. contortisiliquum* já foram identificados ácido cafeico (21), isoquercetrina (quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo) (22), hiperina (quercetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo) (23), astragalina (caempferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo) (24), hesperidina (25), rutina (26), quercetina (27), caempferol (28), herniarina (29) e crisina (30) (Figura 8 a 10) (El-Din et al., 2014; Matloub et al., 2015)

Algumas espécies do gênero *Enterolobium* mostram propriedades farmacológicas e biológicas como, atividade anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana e citotóxica. Estas atividades foram associadas na literatura as duas espécies mais estudadas do gênero *E. contortisiliquum* e *E. cyclocarpum* (El-Din et al., 2017).

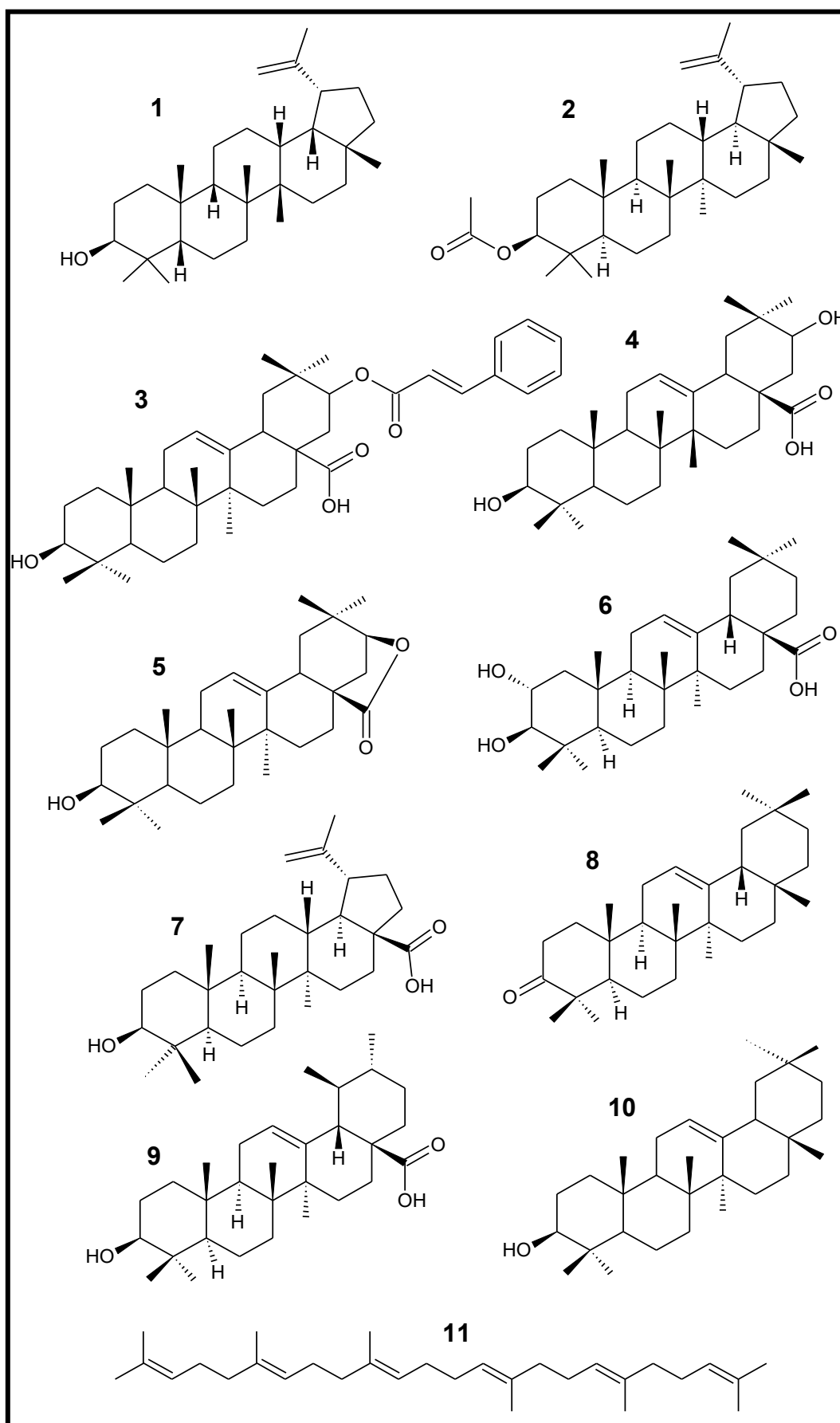


Figura 8. Triterpenos isolados em espécies do gênero *Enterolobium*

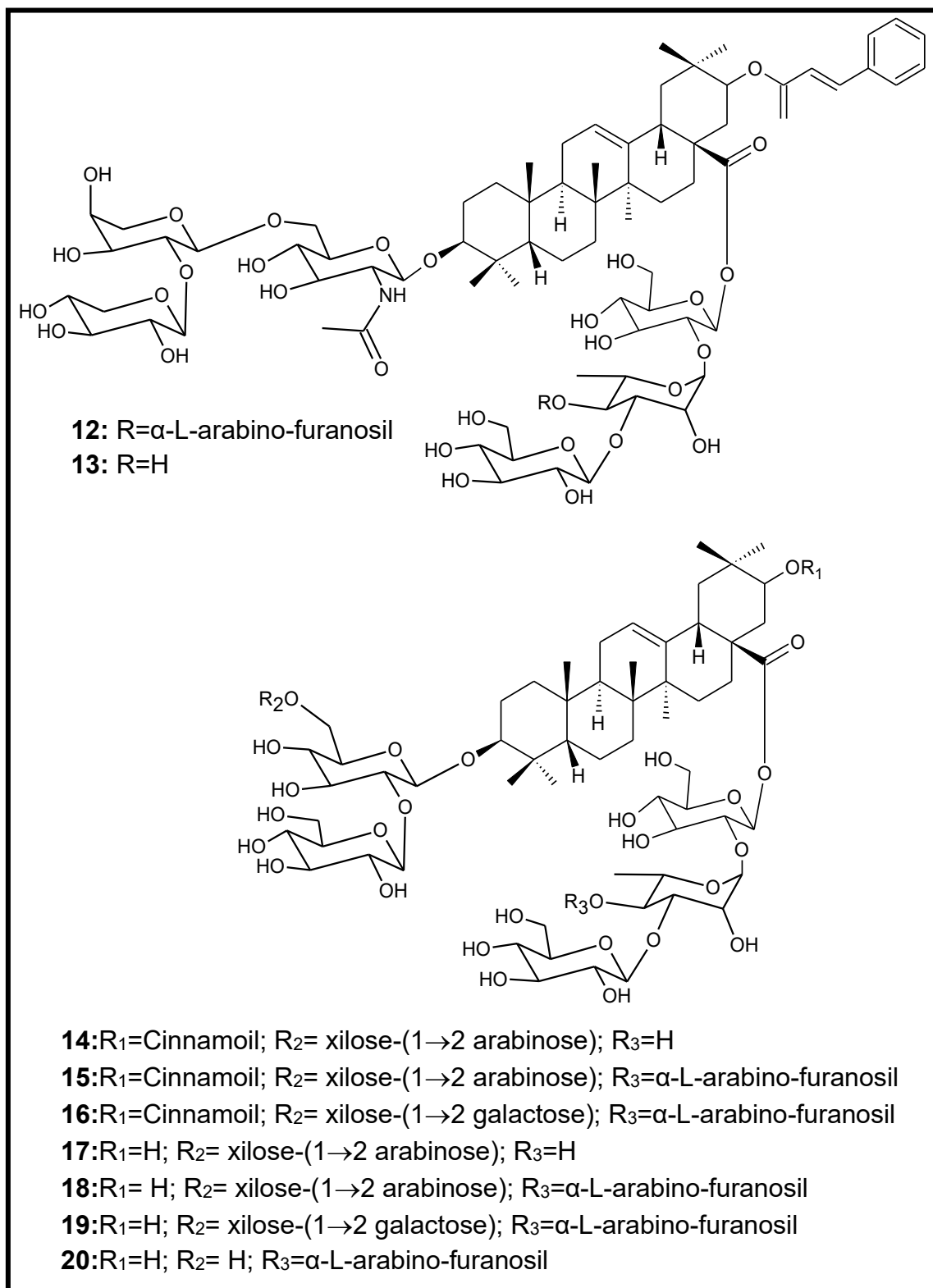


Figura 9. Saponinas isolados em espécies do gênero *Enterolobium*

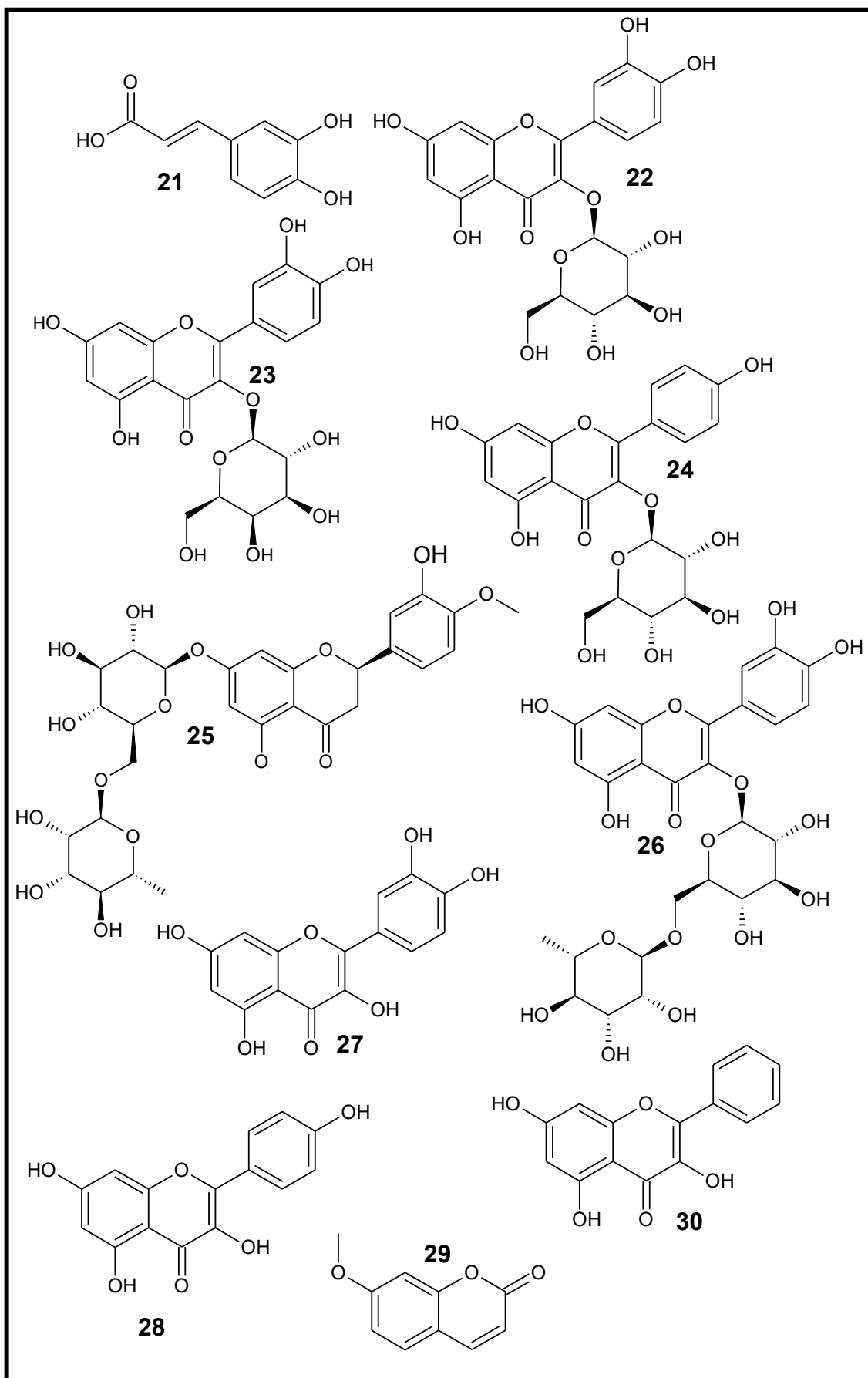


Figura 10. Compostos fenólicos isolados em espécies do gênero *Enterolobium*

3.4 Cromatografia contracorrente (CCC)

3.5.1 Definição e princípio de separação da CCC

A cromatografia em contracorrente (CCC) é definida como uma técnica cromatográfica totalmente líquida, onde a separação ocorre por meio da partição líquido-líquido, sem o uso de um suporte sólido poroso ou adsortivo (Conway, 1991; Marston; Hostettmann, 2006). A separação cromatográfica se baseia no princípio de partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis, e a distribuição do soluto em cada uma das fases é em função do seu coeficiente de partição (K) (Leitão, 2005; Marston; Hostettmann, 2006).

As fases líquidas imiscíveis são sistemas de solventes compostos por misturas de dois a cinco solventes incluindo a água, em sistemas de solventes aquosos, como o objetivo de formar um sistema bifásico onde uma das fases atuará como fase estacionária (FE) e a outra como fase móvel (FM). O sistema de solvente a ser aplicado vai variar de acordo com a polaridade das substâncias que serão separadas. Um exemplo, substâncias lipofílicas até substâncias com polaridade moderada podem ser separadas de forma eficiente com misturas que combinam hexano, acetato de etila, metanol e água em proporções variadas (Büttenbender; Simon; Volpato, 2018; Friesen; Pauli, 2007; Leitão et al., 2021).

Na literatura existem composições de sistemas de solventes bifásicos padronizados, como o sistema Arizona que é nomeado de A a Z para identificar as proporções variadas dos solventes (Büttenbender; Simon; Volpato, 2018; Ito, 2005). Outro exemplo é a tabela de sistemas de solventes apresentada no trabalho de Sumner (2011), que combina o sistema Arizona e HEMBWat (hexano: acetato de etila: metanol: butanol: água).

O coeficiente de partição (K) pode ser calculado pela razão entre a concentração de um soluto na FE e a concentração do composto na FM. Considerando um sistema ideal para o fracionamento o analito terá o valor de $K=1$. A faixa de K de um analito indicada para uma separação em CCC é 0,4 a 2,5. Quando os valores de K são baixos indica que a amostra tem mais afinidade com a FM podendo ocasionar uma eluição das substâncias no início da corrida cromatográfica, enquanto os valores de K foram elevados, indica maior interação com a FE levando a corridas mais longas (Friesen; Pauli, 2005).

A técnica de CCC pode ser aplicada de forma semi-preparativa e preparativa em separações de analitos de ampla faixa de polaridade, por esse motivo a CCC é utilizada na separação de amostras complexas, como produtos naturais (Bao et al., 2021; Cai et al., 2020; Leal et al., 2021; Santos et al., 2024; Xu et al., 2024), proteínas e nanopartículas (Wu; Pan, 2016).

3.5.2 Histórico da técnica

A técnica de CCC foi desenvolvida a partir de um método de extração para separação de compostos orgânicos designado como distribuição contracorrente (CCD), criado por Craig em 1940, para a separação de uma droga contra malária (Kresge; Simoni; Hill, 2005). Em 1950 Craig e Post construíram um equipamento comercial, composto 220 tubos de vidro conectados em série (funcionando como funis de separação em série), utilizando como fase móvel a fase superior do sistema bifásico de solventes (Costa; Leitão, 2010; Craig, 1950).

Em meados da década de 70 os primeiros protótipos utilizando o princípio da CCC, foram desenvolvidos por Yoichiro Ito. Na criação e desenvolvimento de métodos é comum os protótipos apresentarem alguns problemas e desafios (Ito, 2005).

O primeiro protótipo, chamado de *Helix* CCC operava com uma vedação rotativa e introduzia o efluente por meio de uma seringa também rotativa. Embora esse sistema analítico tenha alcançado milhares de pratos teóricos, sua execução exigia funcionamento contínuo durante a noite, com isso sua maior limitação era o tempo da separação cromatográfica. Posteriormente, o CCC de gotículas (*droplet* CCC) foi capaz de realizar separações preparativas com cerca de 1000 pratos teóricos; no entanto, a técnica foi limitada mais uma vez pelo tempo de operação, tendo em vista que foram necessários três dias para o isolamento de 30 mg de uma amostra teste. As limitações dos primeiros equipamentos deixaram uma percepção errônea sobre a CCC, de que seria uma técnica muito demorada (Ito, 2005; Tanimura et al., 1970).

Com o avanço tecnológico das pesquisas na década de 1980, a CCC evoluiu significativamente em aspectos de tempo de separação, resolução e capacidade de carga, culminando na criação de técnicas modernas como a cromatografia de alta velocidade (HSCCC). Nestas técnicas, campos de força

centrífuga são utilizados para manter a fase estacionária dentro da coluna, utilizando colunas do tipo hidrodinâmica e hidrostática (Berthod et al., 2009; Costa; Leitão, 2010; Ito, 2005)

Durante a década de 2000, foi o equipamento de cromatografia contracorrente de alta eficiência (HPCCC), que se caracteriza pelo emprego de equipamentos com arquitetura funcional semelhante aos da HSCCC, porém operando a velocidades superiores, alcançando rotações de até 1600 rpm. Essa condição resulta em maior retenção da fase estacionária (FE) e eficiência do processo de separação, devido a elevação do nível g, que é definido pela razão entre a aceleração centrípeta no raio do rotor e a aceleração da gravidade na Terra (Büttenbender; Simon; Volpato, 2018; Guzlek; Wood; Janaway, 2009).

3.5.3 Instrumentação da CCC

Os equipamentos modernos utilizados de CC podem ser divididos em dois sistemas:

- 1- Aparelho de cromatografia de partição centrífuga hidrostática (CPC) – Utiliza um campo de aceleração centrífuga constante produzido por uma rotação de eixo único e duas juntas de vedação rotativa para entrada e saída da fase móvel (Hu; Pan, 2012).
- 2- Aparelho de cromatografia de partição contracorrente de bobina hidrodinâmica - Utiliza campo de aceleração centrífuga variável produzido pelo mecanismo de rotação em dois eixos (movimento planetário) e um arranjo rotativo sem vedação para a coluna (Hu; Pan, 2012).

Nesta revisão a explanação será centrada no mecanismo do movimento planetário que está ilustrado na Figura 11.

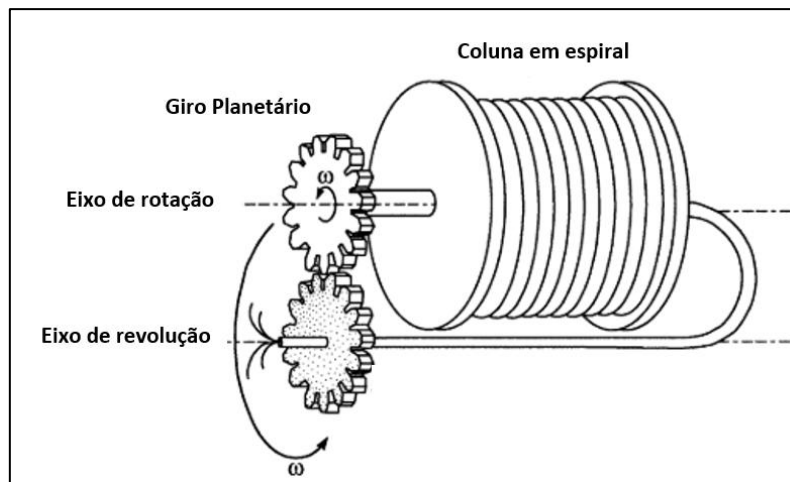


Figura 11. Ilustração do movimento planetário síncrono de uma coluna em espiral em camadas múltiplas de equilíbrio hidrodinâmico do tipo-J. Adaptado de (Ito, 2005).

A Figura 11 mostra a coluna em espiral numa bobina e os dois eixos paralelos o de rotação e o de revolução. O arranjo de engrenagens 1:1 possibilita o giro planetário na mesma velocidade. A bobina na qual a coluna se encontra enrolada, gira em seu próprio eixo e ao mesmo tempo gira entorno do eixo de revolução com a mesma velocidade angular (ω) e mesma direção. Este movimento planetário evita torcer o feixe de tubos de fluxo permitindo eluição contínua através de uma coluna rotativa sem risco de vazamento e contaminação (Ito, 2005).

O movimento planetário faz com que a fase menos densa do sistema bifásico, fique em uma das extremidades da coluna (cabeça), fazendo com que a fase mais densa se movimente para a outra extremidade da coluna (cauda) (Ito, 2005). Além disso, este movimento proporciona um contato eficiente da amostra com as duas fases líquidas, como pode ser observado na Figura 12a.

A figura 12a observa-se esquematicamente várias posições (I, II, III, IV) que a coluna atinge durante o movimento planetário do tipo J sob iluminação estroboscópica. As duas fases observadas na Figura 12 (preta e branca) mostram duas zonas hidrodinâmicas diferentes, a zona de mistura perto do eixo de revolução e a zona de decantação no lado oposto (Ito, 2014).

A Figura 12b apresenta de forma semelhante o processo hidrodinâmico das duas fases em uma coluna em espiral. As duas setas curvas na parte lateral indicam que as duas fases sofrem o movimento contracorrente, onde a fase superior se move para baixo e a fase inferior para cima sob a influência de um

forte campo de força centrífuga. O que indica que a fase que embora a fase estacionária confinada na coluna, ela não é estacionária, no entanto faz continuamente o movimento contracorrente contra a fase móvel. A zona de decantação na coluna está na parte em que o campo de força centrífuga é alto. A força centrífuga produzida no interior da coluna é alternante e não constante e estabelece um equilíbrio hidrodinâmico entre as fases, onde cada uma pode ocupar aproximadamente a metade do volume total da coluna (Ito, 2005, 2014)

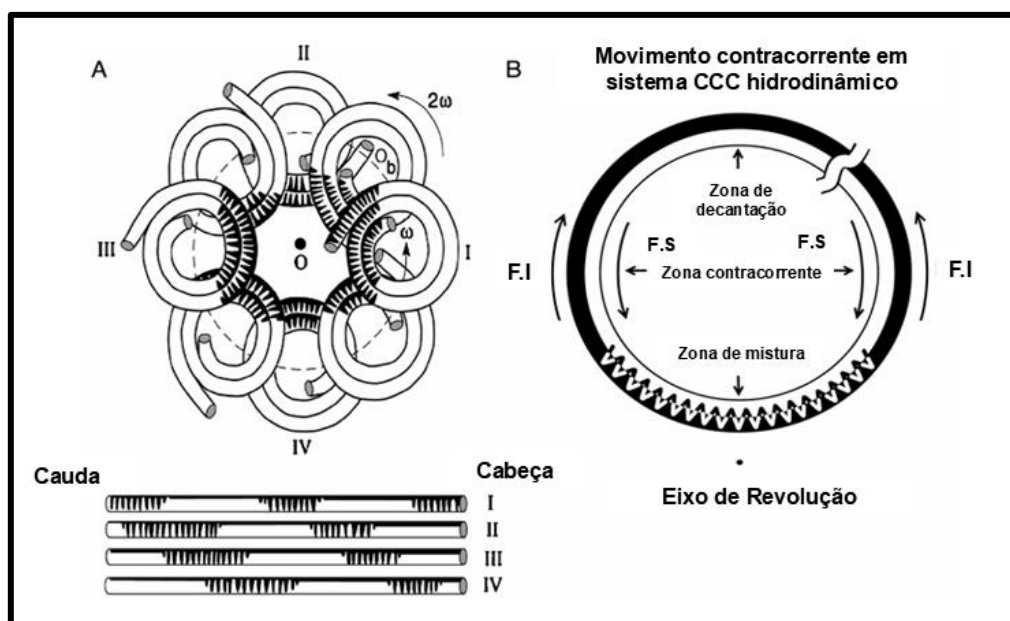


Figura 12. Movimento hidrodinâmico de duas fases líquidas imiscíveis dentro de uma coluna em espiral submetida ao movimento planetário.

Legenda: (A). Esquema do interior da coluna; (B) Movimento contracorrente das duas fases em um loop espiral sob o movimento planetário. Adaptado de (Ito, 2005).

3.5.4 Sistemas bifásicos de solventes

A escolha do sistema de solvente bifásico é uma das etapas decisivas para o isolamento eficaz de substâncias em produtos naturais. Grande parte dos sistemas são ternários e quaternários com água e solventes orgânicos que formam duas fases, fase superior e fase inferior. Sistemas bifásicos pré-definidos são propostos em tabelas, sendo a mais conhecida como sistema Arizona (Büttenbender; Simon; Volpato, 2018; Ito, 2005).

Berthod e colaboradores (2009) afirmam que existem três critérios para selecionar um sistema líquido bifásico:

1º Critério: O sistema de solventes deve formar fases imiscíveis;

2° Critério: A fase escolhida como fase estacionária deve ser retida pela coluna CCC;

3° Critério: A amostra deve ser separada pelo sistema líquido bifásico selecionado;

Ao comparar a CCC com a cromatografia líquida, que apresenta suporte sólido como fase estacionária, a seleção do sistema de solventes em CCC equivalente a escolha da coluna e do eluente de forma simultânea. Diversos são os métodos utilizados para a seleção de sistemas de solventes, como: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia de alta resolução (CLAE), espectroscopia de ultravioleta (UV), cromatografia gasosa (CG), gravimetria e pelo método *shake flask* (Friesen; Pauli, 2005).

Uma das estratégias mais simples, rápidas e eficazes para selecionar sistemas bifásicos adequados à separação CCC é a análise por CCD. Nesse procedimento, uma quantidade da amostra é dissolvida no sistema solvente bifásico, e alíquotas de volumes iguais de cada fase são aplicadas em uma placa de sílica. A eluição é realizada com a fase menos polar, permitindo a avaliação dos fatores de retenção (R_f) dos componentes, o que auxilia na definição dos modos de eluição e dos sistemas de detecção mais apropriados (Friesen; Pauli, 2005).

O modo de eluição mais comum em CCC é o modo isocrático para separação de substâncias majoritárias de misturas complexas. A diversidade de polaridade de substâncias presentes em produtos naturais levantou a necessidade de buscar alternativas para isolar substâncias de diferentes polaridades por CCC. Uma alternativa foi implementar o modo de eluição gradiente, onde a composição da fase móvel varia de forma a aumentar a força de eluição da fase móvel, no decorrer da corrida em CCC, podendo separar compostos com uma ampla faixa de K em misturas complexas (Ignatova et al., 2011).

O modo gradiente de eluição pode ser realizado de diferentes maneiras: gradiente linear, gradiente não-linear, gradiente de vazão, gradiente de pH e gradiente de salinização. No gradiente não-linear a modificação da fase móvel é mais abrupta, em algum ponto da corrida uma nova FM é bombeada para o sistema. Os principais objetivos de se utilizar o modo gradiente é diminuir o

tempo de fracionamento e melhorar a resolução cromatográficas (Huang et al., 2016; Leitão; Costa, 2015).

Os sistemas de detecção utilizados em CCC são os mesmos acoplados ao CLAE, como o detector de ultravioleta (UV-VIS), e o detector de arranjo de diodo (DAD). De acordo com Friesen et al (2015) a detecção mais utilizada é por UV-VIS, representando 87% dos cromatogramas obtidos de isolamento de produtos naturais por CCC.

A CCC é uma técnica que ainda está sendo difundida no Brasil e no laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química-ICE da Universidade Federal do Amazonas há um equipamento em operação, o HPCCC de modelo Spectrum da marca Dynamic Extraction. É um equipamento único em funcionamento no Amazonas e atualmente é utilizado para fracionamento e isolamento de substâncias de interesse farmacológico e tecnológico provenientes de resíduos madeireiros da Amazônia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes, materiais e equipamentos

4.1.1 Reagentes

Álcool metílico P.A. (Synth); álcool metílico grau HPLC (Merck); álcool etílico P.A. (Cinética); n-hexano P.A. (Synth); clorofórmio P.A. (Vetec); acetato de etila P.A. (Dinâmica); álcool butílico normal P.A. (Dinâmica); acetonitrila grau HPLC (Sigma-Aldrich); ácido acético glacial P.A. (Synth); ácido fórmico P.A. (Synth); ácido sulfúrico P.A. (Synth); ácido clorídrico P.A. (Synth); sulfato de sódio anidro P.A. (Synth); cloreto férrico P.A. (Dinâmica); anidrido acético P.A. (Synth); hidróxido de sódio P.A. (Synth); hidróxido de amônio (marca); nitrato de bismuto P.A. (Merck); iodeto de potássio P.A. (Synth); vanilina P.A. (Sigma-Aldrich); polietilenoglicol 400–PEG (Synth); 2-aminoetildifenilborinato-NP (Sigma-Aldrich); 2,2-difenil-1-picril-hidrazila-DPPH (Sigma-Aldrich); anisaldeído P.A. (Aldrich); carbonato básico de bismuto.

4.1.2 Materiais

Placas cromatográficas de sílica Gel 60 F254 (Sigma-Aldrich); microseringa de 25 µL para CCD (Hamilton), filtro de seringa PTFE de 0,45 µm e 13 mm (Unifil); fitas para medir pH (Macherey-Nagel).

4.1.3 Equipamentos

Balança semi analítica (Shimadzu); balança analítica (Shimadzu); capela (Quimis); chapa aquecedora (Corning PC-4200); manta aquecedora 1200 mL (Fisaton); evaporador rotatório (Fisaton); bomba de vácuo sl 061 (Solab); banho maria sl 150 (Solab); moinho de quatro facas (Solab); estufa de circulação forçada de ar (Nova Ética); estufa de secagem; TCL visualizer (CAMAG); circulador de água (Fisatom); espectrofotômetro de placa de multipos (VICTOR, Nivo); espectrômetro de massas - LQC Fleet (Thermo Scientific); polarímetro (Antor Paar, MPC 300); espectrômetro de ressonância magnética Nuclear (Brucker® Avancer III HD 11,74 T, 500 Hz-¹H e 125 Hz-¹³C); cromatógrafo líquido contracorrente de alta performance – HPCCC Spectrum (Dynamic Extraction); cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodo – Ultimate 3000 (Dionex, Thermo Scientific); cromatógrafo líquido de alta eficiência – LC-20AT, acoplado ao detector de

ultravioleta – SPD-M20A (Shimadzu); cromatógrafo líquido de alta eficiência - Accela HPLC (Thermo Scientific, Waltham)

4.2 Preparação dos reveladores químicos

Os reveladores químicos foram preparados para as análises por CCD dos extratos e frações, com o intuito de realizar a prospecção química e bioautografia. Os procedimentos utilizados para a produção dos reveladores são detalhados a seguir.

4.2.1 Vanilina sulfúrica

O ácido sulfúrico concentrado (5 mL) foi misturado cuidadosamente em 100 mL de etanol, sendo este processo realizado em banho de gelo para evitar o aquecimento do frasco (solução 1). A solução 2 foi preparada com 1 g de vanilina dissolvida em 100 mL de etanol em um balão volumétrico. As duas soluções foram misturadas e armazenadas em um frasco âmbar. Todo o procedimento foi realizado na capela (Wagner; Bladt, 1996).

4.2.2 Anisaldeído

A solução foi preparada com a mistura de 5 mL de anisaldeído, 90 mL de etanol, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de ácido acético glacial. A adição dos ácidos na solução foi feita cuidadosamente com o auxílio de pipeta graduada para evitar alguma reação brusca, além disso o procedimento foi feito na capela (Araújo, 2019)

4.2.3 NP-PEG

O revelador NP-PEG é formado por duas soluções que são aplicadas na CCD separadamente, estas são preparadas da seguinte forma:

-Solução 1: 1 g de 2-aminoetil-difenilborinato (NP) foi dissolvido em 100 mL de metanol;

-Solução 2: 5 g de PEG foram dissolvidos em 100 mL de etanol.

A aplicação nas placas cromatográficas é feita primeiro com a solução 1, esperou-se secar e em seguida a solução 2 foi aplicada (Wagner; Bladt, 1996).

4.2.4 Dragendorff

A solução estoque foi preparada com 25 mL de ácido acético, 2,6 g de carbonato básico de bismuto e 7 g de iodeto de sódio que foram misturados e aquecidos por alguns minutos. Ocorreu a precipitação de acetato de sódio que

foi filtrado após 12 horas, em seguida 20 mL desta solução foram misturados a 80 mL de acetato de etila e 0,5 mL de água destilada. A solução foi armazenada em frasco âmbar.

A solução reagente foi preparada com a mistura de 10 mL da solução estoque, 100 mL de ácido acético e 240 mL de acetato de etila. No momento da revelação a solução foi borrifada na CCD e observou-se as manchas (Wagner; Bladt, 1996)

4.2.5 DPPH

O radical DPPH (2,4 mg) foi solubilizado em 100 mL de metanol em um balão volumétrico, posteriormente a solução foi transferida para um a garrafa de vidro âmbar (Rufino et al., 2007).

4.3 Coleta do material vegetal

Os resíduos (cascas) das seguintes espécies: *Andira parviflora* Ducke (cascas e cerne), *Robrichia schomburgkii* (Benth.) A.R.M.Luz & E.R.Souza, foram coletados na empresa Mil Madeiras Preciosas Ltda, localizada no município de Itacoatiara-AM, Km 01 da rodovia AM-363 (Silves-Itapiranga) que pode ser acessada pela rodovia AM-010 no Km 227 (Manaus-Itacoatiara). A coleta foi autorizada e registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (Nº A43E99).

4.4 Obtenção dos extratos e fracionamento dos resíduos madeireiros

As cascas das duas espécies e o cerne de *A. parviflora* foram limpos e secos em estufa a 40 °C por 72 horas, posteriormente cada material foi triturado separadamente em moinho de 4 facas, em seguida foi pesado numa balança semi analítica.

O processo de obtenção de extratos se deu a partir de 800 g de cada material vegetal triturado das espécies *A. parviflora* e *R. schomburgkii*. A extração foi realizada por maceração exaustiva com etanol 70%, sob refluxo e aquecimento a 60 °C por 30 min a cada dia de extração, durante três dias consecutivos. Posteriormente a solução hidroalcóolica foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório para a remoção do solvente. Foram obtidos cerca de 1000 mL de cada extrato, estes foram separados em partes iguais, sendo uma

parte utilizada para realizar o fracionamento por partição líquido-líquido e a outra parte foi transferida para cápsulas de porcelana para secagem em banho-maria.

Os extratos foram particionados em ordem crescente de polaridade com os seguintes solventes orgânicos: hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. As frações foram concentradas em evaporador rotatório e levadas ao banho maria a 60 °C para finalizar o processo de eliminação de solvente. Os extratos e frações secos foram transferidos para frascos previamente identificados e pesados, após pesagem das amostras, seus rendimentos foram calculados. As amostras obtidas foram identificadas por códigos de acordo com sua espécie e órgão vegetal (Tabela 2).

Tabela 2. Códigos dos extratos e frações das duas espécies madeireiras.

Espécie	Amostra	Código
<i>A. parviflora</i> (Cerne-CE) Sucupira vermelha	Extrato bruto	ACEEB
	Fração em hexano	ACE1
	Fração em clorofórmio	ACE2
	Fração em acetato de etila	ACE3
	Fração em butanol	ACE4
	Fração hidroalcóolica	ACE5
<i>A. parviflora</i> (Casca-CA) Sucupira vermelha	Extrato bruto	ACAEB
	Fração em hexano	ACA1
	Fração em clorofórmio	ACA2
	Fração em acetato de etila	ACA3
	Fração em butanol	ACA4
	Fração hidroalcóolica	ACA5
<i>R. schomburgkii</i> (Casca) Sucupira amarela	Extrato bruto	EEB
	Fração em hexano	E1
	Fração em clorofórmio	E2
	Fração em acetato de etila	E3
	Fração em butanol	E4
	Fração hidroalcóolica	E5

4.5 Prospecção fitoquímica em tubos dos extratos e frações

A prospecção em tubos de ensaio foi realizada com os extratos e frações das cascas e cerne de *A. parviflora* e com as cascas de *R. schomburgkii*. Nestes testes foram indicados qualitativamente as classes de substâncias presentes em cada amostra, a partir das cores observadas nas reações químicas observadas. A metodologia utilizada foi a de Matos (2009).

5.1 Teste para a presença de terpenos (Lieberman-Burchard)

Utilizaram-se 300 mg dos extratos e 30 mg das frações ACE1, ACE2, ACE3, ACA1, ACA2, ACA3, E1, E2 e E3. Estas foram solubilizadas em clorofórmio e filtradas e transferidas para um tubo de ensaio limpo, seco e devidamente identificado. Em cada tubo de ensaio foi adicionado 1 mL de anidrido acético e os tubos foram agitados. Cuidadosamente foram adicionadas 3 gotas de ácido sulfúrico (0,1 mol/L) e logo foram levemente agitados. Visualmente as mudanças de cores e precipitação foram avaliadas.

4.5.2 Teste para a presença de saponinas

Neste teste foram pesados 300 mg dos extratos secos e 30 mg das frações ACE3, ACE4, ACE5, ACA3, ACA4, ACA5, E3, E4 e E5. Os extratos e frações foram solubilizados em água destilada (mL) e filtrados. Cada tubo foi agitado por três minutos e deixados em repouso. Observou-se quanto à formação espuma.

- Teste de confirmação para saponinas

Adicionaram-se 3 gotas de HCl (0,1 mol/L) nos tubos preparados no procedimento anterior. Estes foram deixados imersos em banho-maria durante 1 h. Os tubos foram retirados do aquecimento e resfriados à temperatura ambiente. Em seguida o conteúdo dos tubos foi neutralizado com NaOH (0,1 mol/L) e foram agitados por 3 minutos e por fim observou-se a presença ou ausência de espuma e precipitados.

4.5.3 Caracterização de compostos fenólicos

Os testes foram realizados com os extratos e com as frações ACE3, ACE4, ACE5, ACA3, ACA4, ACA5, E3, E4 e E5, desenvolvido em 4 etapas:

- Etapa 1 - Preparo da solução estoque:

Pesaram-se 300 mg dos extratos brutos e foram extraídos com clorofórmio para retirar as substâncias lipofílicas. O resíduo insolúvel em clorofórmio foi solubilizado em metanol 70%, resultando em uma solução hidroalcóolica que foi filtrada para um balão volumétrico de 100 mL e avolumada com metanol. O pH da solução foi ajustado com HCl (0,1 mol/L) até atingir pH 4.

As soluções estoque das frações foram preparadas com 30 mg de cada fração, seguindo o mesmo procedimento utilizado para os extratos com exceção da extração como CHCl_3 . Todas as etapas seguintes desse teste foram feitas em triplicata a partir de cada solução estoque.

Para a execução das etapas 2 a 4, foram utilizados 6 tubos com identificação de 1-6 e um branco negativo para realizar cada triplicata.

- Etapa 2 – Teste para fenóis e taninos:

No tubo 1 foram adicionados 3 mL da solução estoque e três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3). A reação ocorreu e alteração de cor foi comparada ao branco de cada amostra.

- Etapa 3 – Teste para antocianidinas, antocianinas e flavonoides

O volume de 3 mL da solução estoque foi adicionado nos tubos 2,3 e 4 de cada amostra. O pH do tubo 2 foi ajustado para 3 com HCl, já nos tubos 3 e 4 adicionou-se NaOH (0,1 mol/L) para basificar a solução até pH 8 e 11, respectivamente. Depois de alguns minutos avaliou-se a mudança de cor em comparação ao branco de cada amostra.

4.6 Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos e frações

Os extratos e frações foram submetidos à análise por CCD, estes foram preparados em uma concentração de 30 mg/mL e solubilizados em metanol, com exceção das frações em hexano que foram solubilizadas em hexano. As amostras foram aplicadas manualmente com uma seringa para CCD, utilizando o volume de 10 μL . Foram utilizadas, placas cromatográficas de fase normal de gel de sílica (TLC, sílica gel 60, UV254 aluminium-sheets, Macherey-Nagel, 20 x 20 cm). As placas foram previamente eluídas com metanol, em seguida as placas de CCD foram ativadas em estufa a 100 °C durante 1 h.

As eluições das placas cromatográficas foram feitas em cubas de vidro com o sistema de eluente preparado de acordo com natureza da amostra afim de se obter a melhor separação cromatográfica. Diferentes sistemas foram testados em diferentes proporções dos solventes: hexano (Hex), clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt), ácido acético (AcOH), ácido fórmico (HCOOH), metanol (MeOH) e água (H_2O).

Durantes os testes de sistemas as placas eluídas foram monitoradas com os seguintes reveladores: anisaldeído ou vanilina sulfúrica, NP-PEG e luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 366 (câmara de UV-Vizualizer Camag). Após a seleção do eluente as placas foram reveladas nos demais reveladores: cloreto férrico e DPPH.

4.7 Atividade citotóxica frente a células tumorais

A análise foi conduzida na Universidade Federal do Ceará (UFC), em colaboração com a professora Dra. Cláudia do Ó Pessoa, coordenadora do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE). Os dados obtidos foram submetidos à avaliação estatística por meio de regressão linear, utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.0.1.

4.7.1 Determinação da viabilidade celular

A atividade citotóxica dos extratos e frações foi avaliada frente a oito linhagens celulares, sendo sete tumorais e uma não tumoral. As linhagens tumorais utilizadas foram: SNB-19 (astrocitoma), HCT-116 (carcinoma de cólon humano), PC3 (carcinoma de próstata), HL60 (leucemia promielocítica), DU-145 (adenocarcinoma de próstata), MDA-MB-23 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão) e linhagem não tumoral HaCat (queratinócitos humano), cedida pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As linhagens de células tumorais foram cultivadas em meio RPMI 1640, e a linhagem não tumoral em DMEN. Ambos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As amostras de extratos, frações e substâncias purificadas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 50 mg/mL, 20 mg/mL e 2 mg/mL para a preparação das soluções estoque, respectivamente.

A análise de citotoxicidade foi realizada pelo método de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium), analisando a viabilidade celular das células, segundo (Mosmann, 1983). As células foram plaqueadas nas concentrações de 7 x 10⁴ céls/mL (HCT-116), 1 x 10⁵ céls/mL (SNB19 e PC3), 3 x 10⁵ céls/mL (HL60), e 5 x 10⁵ céls/mL (HaCat).

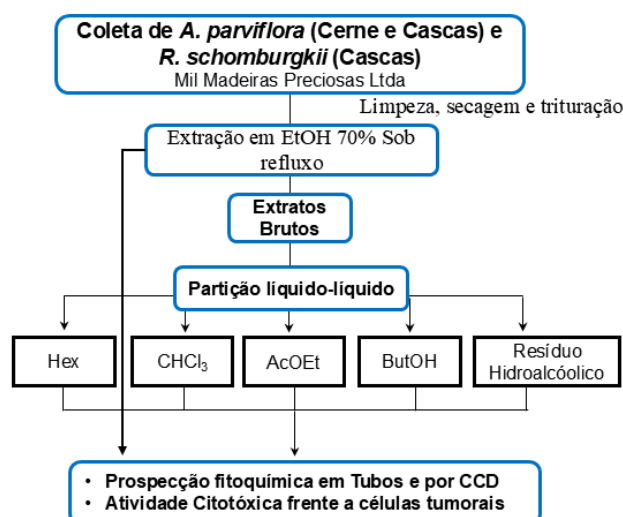
As amostras foram testadas primeiramente em concentração única (250 µg/mL para o extrato; 100 µg/mL para fração e 10 µg/mL para substâncias puras), nas linhagens HCT-116, PC3 e SNB-19. As amostras com porcentagem de inibição acima de 60% foram selecionadas para a determinação da concentração inibitória média (IC₅₀).

4.7.2 Determinação de concentração inibitória (CI₅₀)

Nesta etapa, a linhagem HL60 foi incluída para análise. Além disso, nos testes realizados com as subfrações, substâncias em mistura e isoladas, foram adicionadas as linhagens DU-145, MDA-MB-231, NCI-H460. As amostras foram submetidas à diluição seriada com as seguintes concentrações máximas e mínimas: extratos brutos (250 a 3,90 µg/mL), frações (100 a 1,56 µg/mL) e substâncias puras (10 a 0,15 µg/mL).

As placas contendo as células foram incubadas por 72 horas em estufa a 37 °C, sob atmosfera controlada com 5% de CO₂. Após o período de tratamento, realizou-se a centrifugação das placas e a remoção do sobrenadante. Em seguida, adicionaram-se 100 µL da solução de MTT a cada poço. As placas foram novamente incubadas por três horas, seguidas de nova centrifugação e remoção do sobrenadante. O precipitado formado foi então solubilizado com 100 µL de DMSO, e a absorbância da solução resultante foi medida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicatas em três experimentos diferentes. O índice de seletividade (IS), foi pela divisão entre o valor da CI₅₀ de cada composto-teste na linhagem de célula não tumoral (HaCat) e o valor da CI₅₀ de cada composto na linhagem de células tumorais ($IS = CI_{50} \text{ HaCat} / CI_{50} \text{ células tumorais}$).

O Fluxograma 1 apresenta o delineamento experimental realizado nesta primeira etapa do trabalho.



Fluxograma 1. Etapa inicial da metodologia realizada com as espécies madeiras

4.8 Fracionamento e isolamento das frações ativas

A etapa de fracionamento e isolamento descrita a seguir foi realizado com as frações que apresentaram resultados positivo nos testes de atividade citotóxica que foi utilizado para guiar todo o fracionamento.

4.8.1 Cromatografia contracorrente de alta performance (HPCCC-high performance counter current chromatography)

O Cromatógrafo Contracorrente utilizado foi o da marca Dynamic Extraction e modelo HPCCC Spectrum (Figura 13), que se encontra do Laboratório de Produtos Naturais no Departamento de Química da UFAM. O equipamento possui duas bobinas com duas colunas, sendo uma analítica com 24 mL e outra coluna preparativa com 136 mL.



Figura 13. Cromatógrafo contracorrente de alta performance – HPCCC

O sistema de refrigeração do equipamento utilizado foi um banho refrigerante da marca Lab Tec e modelo Smart H150-1500 que foi conectado ao HPCCC, mantendo a temperatura da água em 8 °C. O equipamento foi conectado também a uma bomba da marca Alpha 10 e modelo Isocratic Pump onde o fluxo variou de 0,1-10 mL/min para impulsionar as fases móveis e estacionárias para dentro da coluna. A temperatura do cromatógrafo foi mantida entre 20 e 25 °C.

4.8.2 Procedimento geral dos fracionamentos por HPCCC

Os fracionamentos foram realizados em coluna preparativa e gradiente não linear. Inicialmente, a coluna foi purgada com 35 mL da fase estacionária previamente selecionada, procedimento repetido antes da introdução de cada fase móvel. A coluna foi preenchida com a fase estacionária (10 mL/min), em seguida iniciou a rotação da coluna até chegar a 1600 rpm. Ajustou o fluxo para 6 mL/min e começou a bombear as fases móveis para dentro da coluna.

A amostra foi solubilizada em 7 mL do sistema bifásico utilizado, filtrada com algodão e injetada no equipamento por meio de seringa. A fração não filtrada, denominada amostra residual (AR), foi utilizada para determinar a massa efetivamente injetada e para análises por cromatografia em CCD.

Ao final do processo, interrompeu-se a rotação da coluna e a extrusão da fase estacionária foi realizada (10 mL/min), assegurando a completa recuperação dos compostos retidos.

4.8.2 Fracionamento e isolamento de constituintes químicos de *Andira parviflora* (cerne) – ACE3

4.8.2.1 Teste de sistemas de solventes bifásicos com a fração ACE3

A fração ACE3 foi submetida a testes de sistemas com os solventes hexano - acetato de etila – metanol - n-butanol - água em mistura de diferentes proporções, tendo como referência (Sumner, 2011) com adaptações. Foram solubilizados 2 mg da fração em 2 mL de misturas de solventes. A mistura foi agitada e deixada em descanso para entrar em equilíbrio e ocorrer a formação das fases.

Em seguida, as fases superior (FS) e inferior (FI) foram separadas em frasquinhos com o auxílio de uma pipeta automática de 1000 µL e aplicadas (10 µL) em CCD de gel de sílica 60 e eluídas com CHCl₃:AcOH:MeOH:H₂O-

60:16:12:8. Após eluição as placas foram reveladas em anisaldeído, NP-PEG e em 366 nm (UV). A Figura 14 apresenta um esquema básico da metodologia realizada para o teste de sistemas.

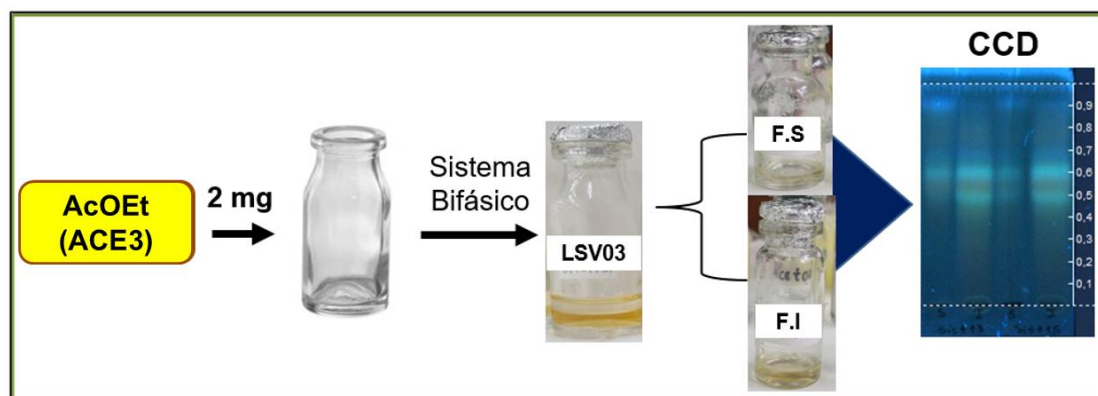


Figura 14. Metodologia para o teste de sistemas de solventes com a fração ACE3

Os sistemas testados constam na Tabela 3, de acordo com a avaliação da distribuição das manchas na CCD, os sistemas foram selecionados para o fracionamento.

Tabela 3. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes testados com a fração ACE3

Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	Butanol	Água
1	0	0	0	5	5
2	0	1	0	4	5
3	0	2	0	3	5
4	0	3	0	2	5
6	0	1	0	0	1
8	1	9	1	0	9
10	1	5	1	0	5
13	2	5	2	0	5
14	1	2	1	0	2
15	2	3	2	0	3
16	5	6	5	0	6
17	1	1	1	0	1
18	6	5	6	0	5
20	2	1	2	0	1

4.8.2.2 Fracionamento por HPLC— 1ª injeção (modo normal)

Os sistemas de solventes bifásicos selecionados para o fracionamento, são apresentados na Tabela 3, onde a fase aquosa (FI) do sistema 17 foi a fase estacionária e as fases orgânicas (FS) dos sistemas 17, 15 e 13 atuaram como

fase móvel. Os sistemas foram preparados com solventes de grau PA e água de Mili-Q, previamente sonicados por 20 min.

Tabela 4. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes utilizados no fracionamento de fase normal de ACE3

Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	Água
17 (FI e FS)	1	1	1	1
15 (FS)	1	1,5	1	1,5
13 (FS)	1	2,5	1	2,5

O fracionamento foi realizado em gradiente não-linear, em modo normal com 300 mg de ACE3, tendo como volume morto (VM) 19 mL. As frações foram coletadas em tubos de ensaio (18 mL/tubo na primeira etapa do gradiente e 12 mL/tubo na segunda e terceira). Após a coleta das três fases móveis, realizou-se a extrusão, onde foram coletadas 11 mL por tubo de ensaio. Foram coletadas no total de 42 frações, estas foram secas, seus rendimentos foram determinados e analisadas em CCD, as frações com perfil cromatográfico foram unidas e analisadas por EM.

4.8.2.3 Fracionamento por HPLCC – 2ª Injeção (modo reverso)

Para o fracionamento em modo reverso de ACE3 foram utilizados os sistemas 8, 10, 12 e 14, listados na Tabela 5. A fase superior do sistema 8 foi utilizada como fase estacionária e as fases inferiores do sistema 8 e as demais foram utilizadas como fases móveis. Os sistemas foram preparados com solventes de grau PA e água de ultrapura, previamente sonicados por 20 min.

Tabela 5. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes utilizados no fracionamento de fase reversa de ACE3

Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	Água
8 (FS e FI)	1	9	1	9
10 (FI)	1	5	1	5
12 (FI)	1	3	1	3
14 (FI)	1	2	1	2

Pesaram-se 300 mg da fração ACE3 para o fracionamento em fase reversa e em gradiente não-linear, a fração foi solubilizada no sistema 8. O fracionamento mostrou uma retenção de 63% (S_r) e 14 min de tempo de retenção da fase móvel. As frações foram coletadas em tubos de ensaio (12 mL/tubo).

Após a coleta das quatro fases móveis, realizou-se a extrusão, onde foram coletadas 15 mL por tubo de ensaio. Foram coletadas um total de 35 frações.

4.8.2.4 Fracionamento por HPLC – 3ª Injeção (modo reverso)

O fracionamento do item 4.8.3.3 foi otimizado para um fracionamento mais curto e um menor número de frações utilizando os seguintes sistemas da Tabela 6. A fase estacionária utilizada foi a fase orgânica (FS) do sistema 12 e as fases móveis foram as fases aquosas (FI) dos sistemas 12 e 14.

Tabela 6. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes utilizados no 3º fracionamento de fase reversa de ACE3

Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	Água
12 (FS e FI)	1	3	1	3
14 (FI)	1	2	1	2

A eluição foi realizada em modo gradiente não-linear, utilizando 500 mg de ACE3 para o fracionamento, a fração foi solubilizada no sistema 12. O volume morto foi de 54 mL, com um fator de retenção (S_r) de 62% e 14,05 min o tempo de retenção (R_t).

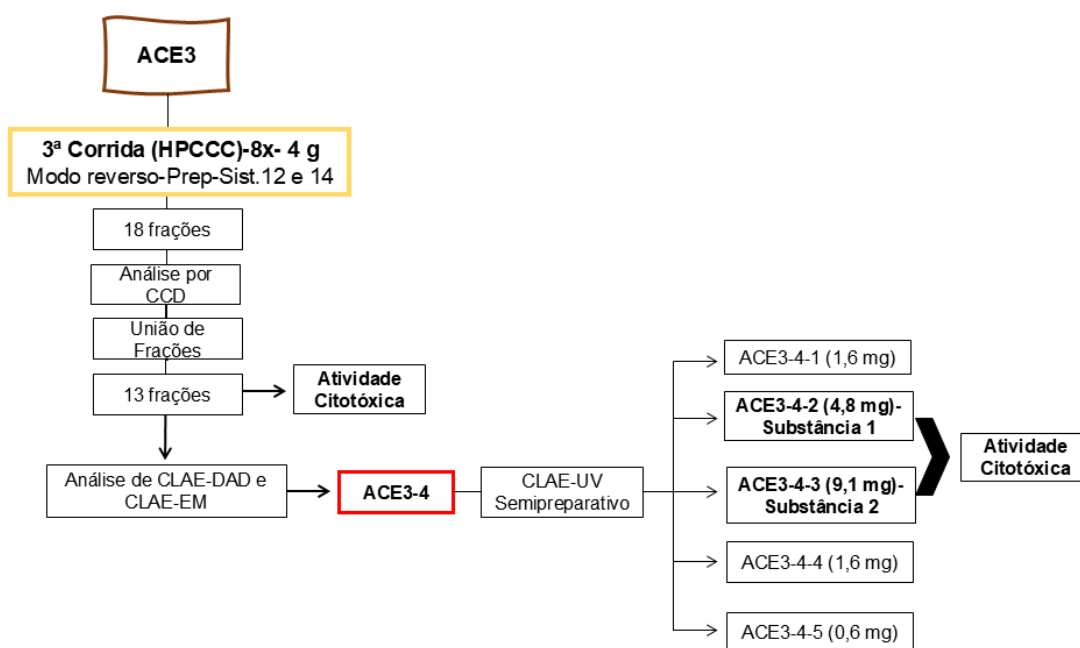
Durante o fracionamento em HPLC as frações foram coletadas em tubos de ensaio, sendo que a primeira fração referente a 1ª fase móvel foi coletada em um copo durante 8 min e 30 seg, a partir do tubo de ensaio 1 a coleta foi feita de 12 mL/tubo, no tubo 4 iniciou-se a coleta de 6 mL/tubo até o tubo 7. Após a passagem das 2 fases móveis foi realizada a extrusão, coletando-se 15 mL por tubo de ensaio. Ao final da separação foram obtidas 18 frações. Todo o processo descrito foi realizado 8 vezes com reprodutibilidade afim de se obter maior quantidade de cada fração obtida. As frações foram submetidas a análise por CCD e unidas de acordo com o perfil cromatográfico observado. Posteriormente as frações foram analisadas por CLAE-DAD e CLAE-EM.

4.8.2.4.1 Purificação por CLAE-UV da fração ACE3-4

O isolamento por CLAE-UV semipreparativo foi realizado no cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com uma coluna analítica Shim-Pack Prep-ODS C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m) mantida em 28 °C, um controlador de sistema CBM-20, degaseificador DGU-20A5. O sistema de eluição foi em modo gradiente com uma vazão de 1 mL/min de acordo com as condições a

seguir: gradiente de 20-100% de B (0-30 min), sendo o solvente A água ultrapura e o solvente B MeOH. Os cromatogramas foram obtidos nos comprimentos de onda 240 nm e 280 nm. As injeções foram feitas com 100 µL de amostra solubilizadas em DMSO. O software utilizado para o tratamento dos cromatogramas foi o Shimadzu LC-solutions. A purificação foi realizada com duas injeções de 30 mg da fração, onde foram coletadas 5 frações (ACE3-4-1, ACE3-4-2, ACE3-4-3, ACE3-4-4, ACE3-4-5). As frações foram analisadas por inserção direta em EM (descrição no item 4.10) utilizando como fonte de ionização APCI nos modos positivo e negativo, os íons mais intensos foram fragmentados. Posteriormente as frações foram enviadas para análise de RMN (item 4.11) de ^1H , ^{13}C , DEPT 135 e bidimensionais.

A seguir pode-se observar o Fluxograma 2 que abrange todo o fracionamento realizado com a fração ACE3 a partir da terceira corrida de fracionamento executado no HPCCC.

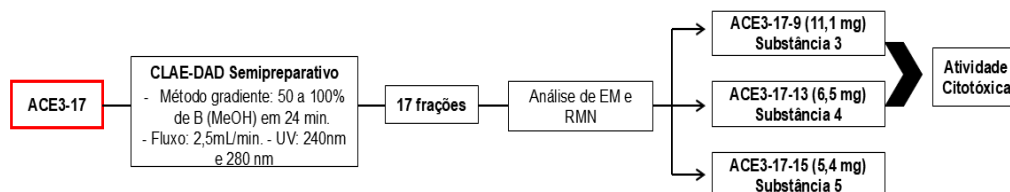


Fluxograma 2. Etapas do fracionamento de ACE3 de *A. parviflora* até o isolamento das substâncias 1 e 2.

4.8.2.4.2 Fracionamento por CLAE-DAD da fração ACE3-17

O fracionamento semipreparativo da fração ACE3-17 (50 mg) foi desenvolvido no cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com um detector DAD (SPD-M20A) e injetor automático (SIL-20AC). A fase móvel utilizada foi água (solvente A) e metanol (solvente B), com vazão constante de

2,5 mL/min. O sistema de eluição operou em modo gradiente nas seguintes condições: 50-100% de gradiente B (0-24 min), 50 mg de foi solubilizado em 1 mL de MeOH, sendo realizadas 10 injeções de 100 µL, o que resultou em 17 subfrações. Todas as subfrações foram analisadas por EM e as promissoras foram submetidas à análise ^1H , ^{13}C , DEPT 135 e bidimensionais (fluxograma 3).



Fluxograma 3. Condições do fracionamento de ACE3-17

4.8.2.4.3 Fracionamento por HPCCC da fração ACE3-16 da 3ª injeção de ACE3

a) Teste de sistemas bifásicos

A fração ACE3-16 foi submetida aos testes de sistemas de acordo com o item 4.8.2.1. Os sistemas utilizados nos testes variaram de 6 a 24, conforme a Tabela 7.

Tabela 7. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes testados com a fração ACE3-16

Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	Água
6	0	1	0	1
8	1	9	1	9
10	1	5	1	5
12	1	3	1	3
14	1	2	1	2
16	5	6	5	6
18	6	5	6	5
20	2	1	2	1
22	3	1	3	1
24	5	1	5	1

Todas as fases obtidas foram analisadas por CCD utilizando como eluente: Hexano:AcOEt:HCOOH-4:6:100 µL, reveladas com anisaldeído e NP-PEG.

b) Fracionamento da ACE3-16 de modo normal

O fracionamento de F16 foi realizado com eluição em gradiente não-linear utilizando 12 sistemas bifásicos compostos pelas proporções de solventes

listadas na Tabela 8. A fase estacionária utilizada foi a FI do sistema 28 e fases móveis foram as FS dos sistemas 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6.

Tabela 8. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes utilizados no fracionamento da fração ACE3-16

Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	Água
28 (FI e FS)	1	0	1	0
26 (FI)	9	1	9	1
24 (FI)	5	1	5	1
22 (FI)	3	1	3	1
20 (FI)	2	1	2	1
18 (FI)	6	5	6	5
16 (FI)	5	6	5	6
14 (FI)	1	2	1	2
12 (FI)	1	3	1	3
10 (FI)	1	5	1	5
8 (FI)	1	9	1	9
6 (FI)	0	1	0	1

A separação cromatográfica foi realizada com 317,7 mg da fração, esta foi solubilizada no sistema 28. O fracionamento apresentou $S_f = 96\%$ e $R_t = 21,08$ min. A fração referente aos sistemas 28 a 22 foram coletados em um erlenmeyer durante 6 min, a partir do tubo 1 ao 3 foram coletados 3 mL, a partir do tubo 4 ao 23 coletou-se 6 mL/tubo. Após a coleta das fases móveis, realizou-se a extrusão, onde foram coletadas 15 mL por tubo de ensaio. Foram coletadas um total de 38 subfrações. As subfrações foram analisadas por CCD e EM, onde as que apresentaram perfil semelhante foram unidas. A subfração 18 deste fracionamento foi novamente fracionada por HPCCC a fim de se obter substâncias isoladas.

Fracionamento por HPCCC da subfração ACE3-16-18

a) Teste de sistemas bifásicos

As subfrações ACE3-16-18 foi submetida aos testes de sistemas de acordo com o item 4.8.2.1. Os sistemas utilizados nos testes foram do 8 ao 21, conforme a Tabela 9.

Tabela 9. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes testados com as subfração ACE3-16-18

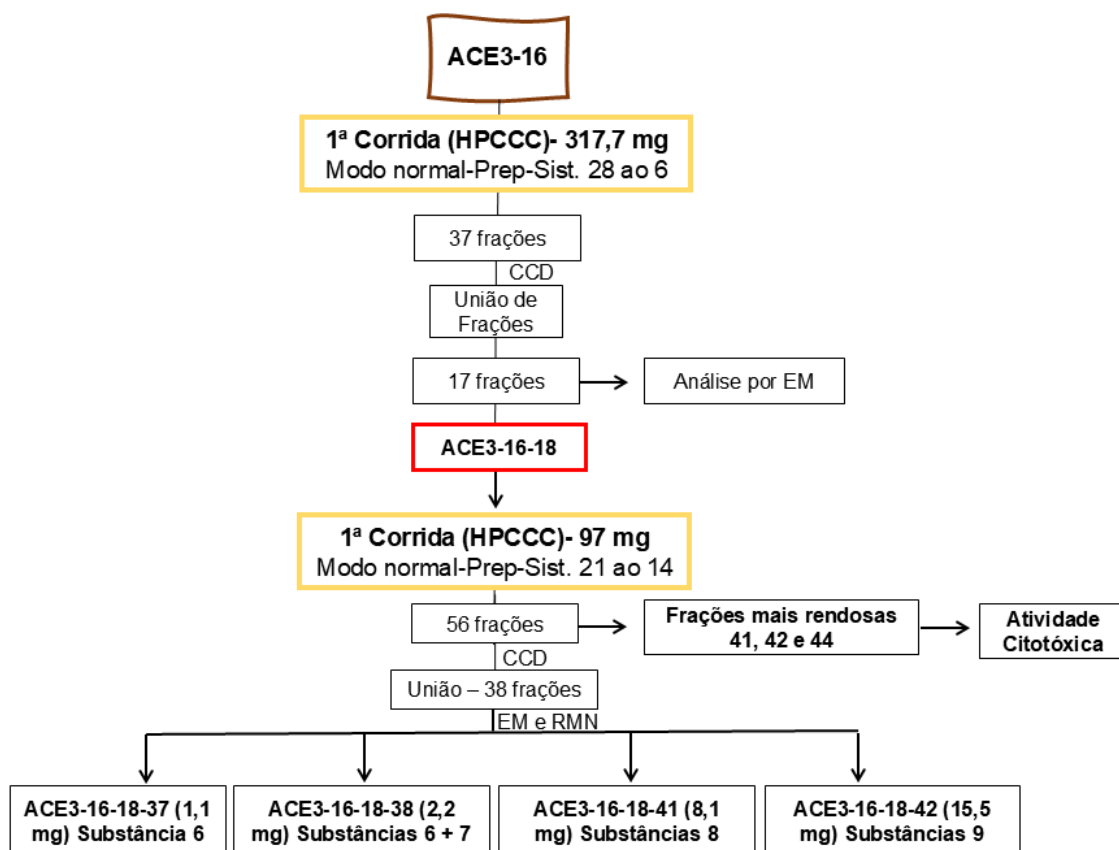
Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	Água
8	1	9	1	9
10	1	5	1	5
11	1	4	1	4
12	1	3	1	3
13	2	5	2	5
14	1	2	1	2
15	2	3	2	3
16	5	6	5	6
17	1	1	1	1
19	3	2	3	2
20	2	1	2	1
21	5	2	5	2

Todas as fases obtidas foram analisadas por CCD utilizando como eluente: Hexano:AcOEt:HCOOH-4:6:100 μ L, reveladas com anisaldeído e NP-PEG.

b) Fracionamento da ACE3-16-18 em modo normal

A subfração ACE3-16-18 foi fracionada utilizando como modo de eluição o gradiente não-linear com 6 sistemas bifásicos compostos pelas proporções (v/v) dos solventes listadas na Tabela 9. A fase estacionária utilizada foi a FI do sistema 21 e fases móveis foram as FS dos sistemas 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15 e 14.

A separação cromatográfica foi realizada em modo semipreparativo com 97 mg da subfração, esta foi solubilizada no sistema 21, posteriormente a solução foi filtrada e foi injetada no equipamento. O fracionamento apresentou um S_f = 86% e R_t =19,49 min e V_m =21 mL. A coleta das frações foi realizada em tubos de ensaios, onde foram coletados 9 mL em cada tubo. Na extrusão realizou-se a coleta de 15 mL por tubo de ensaio. Por fim foram obtidas 56 subfrações. Estas foram analisadas por CCD e unidas de acordo com as semelhanças do perfil cromatográfico, posteriormente foram analisadas por EM e as frações mais purificadas foram avaliadas por RMN ^1H e ^{13}C .



Fluxograma 4. Etapas do fracionamento realizado com ACE3-16 e subfrações

4.8.3 Fracionamento e isolamento de constituintes químicos de *Andira parviflora* (cascas) – ACA2

A fração ACA2 foi submetida aos testes de sistemas bifásicos de solventes de acordo com item 4.8.2.1. Os sistemas testados estão listados na Tabela 10.

4.8.3.1 Fracionamento por HPCCC de ACA2

a) Teste de sistemas bifásicos

O perfil cromatográfico de cada fase de sistemas obtidas foram analisadas por CCD, sendo eluídas com o eluente: Hexano:AcOEt:HCOOH:AcOH 3:7:10 µL:10 µL (v/v/v/v) e reveladas em NP-PEG e anisaldeído.

Tabela 10. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes testados com a fração ACA2

Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	Água
10	1	5	1	5
12	1	3	1	3
14	1	2	1	2
16	5	6	5	6
18	6	5	6	5
20	2	1	2	1
21	5	2	5	2

b) Fracionamento da ACA2 por eluição no modo normal

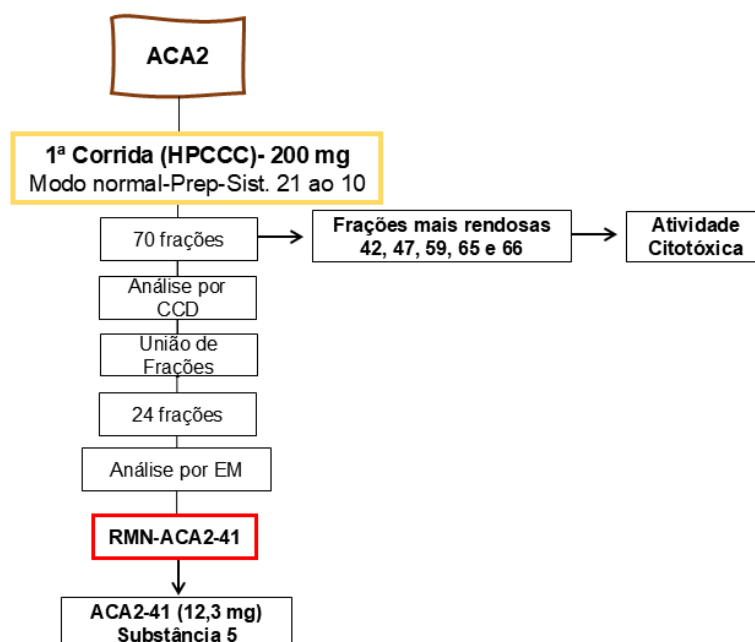
A separação foi realizada iniciando com o sistema 21, tendo como fase estacionária a fase inferior e utilizando como fases móveis as fases superiores de todos os sistemas listados na Tabela 11.

Tabela 11. Proporção (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes utilizados no fracionamento (modo normal) de ACA2

Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	Água
21 (FI e FS)	5	2	5	2
20 (FS)	2	1	2	1
18 (FS)	6	5	6	5
16 (FS)	5	6	5	6
14 (FS)	1	2	1	2
12 (FS)	1	3	1	3
10 (FS)	1	5	1	5

A separação preparativa foi realizada em gradiente não-linear, utilizando 200 mg de ACA2. A fração foi solubilizada no do sistema 21. A corrida cromatográfica apresentou $S_f=85\%$ e 19,27 min de tempo de retenção com volume morto de 20 mL.

Cada sistema foi eluido duas vezes e as frações foram coletadas em tubos de ensaio (5 mL/tubo). A extrusão foi realizada após a coleta de todas as fases móveis, coletando-se 15 mL por tubo de ensaio. Ao final da separação foram obtidas 70 frações (Fluxograma 5). As frações foram submetidas à análise por CCD e unidas de acordo com o perfil cromatográfico observado. Posteriormente foram analisadas por EM e as frações promissoras foram analisadas por RMN.



Fluxograma 5. Etapas do fracionamento de ACA2 de *A. parviflora* até o isolamento das substâncias 5.

4.8.4 Fracionamento e isolamento de constituintes químicos de *Robrichia schomburgkii* (Casca) – Fração E3

a) Teste de sistemas bifásicos

Os testes de sistemas bifásicos de solventes foram realizados de acordo com item 4.8.2.1. Os sistemas testados com a fração E3 estão listados na Tabela 12. As fases obtidas de cada sistema foram analisadas por CCD, eluídas com o eluente: Hexano: AcOEt: HCOOH: AcOH na proporção de 6:4:0,2:0,2 (v/v/v/v) e reveladas em NP-PEG e anisaldeído.

Tabela 12. Proporções (v/v) dos sistemas bifásicos de solventes testados com a fração E3

Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	Butanol	Água
1	0	0	0	5	5
2	0	1	0	4	5
3	0	2	0	3	5
4	0	3	0	2	5
5	0	4	0	1	5
6	0	1	0	0	1
7	1	19	1	0	19
8	1	9	1	0	9
10	1	5	1	0	5
12	1	3	1	0	3
14	1	2	1	0	2
16	5	6	5	0	6

Foram realizados dois fracionamentos com 200 mg da fração E3 em modo normal, onde foram utilizados todos os sistemas listados na tabela 11, no entanto os fracionamentos apresentaram intercorrências. Durante a eluição com as últimas fases móveis (FS dos sistemas 8 e 6) houve um aumento da pressão na bomba devido a precipitação da amostra na coluna do equipamento.

Tendo em vista a intercorrência, a fração E3 passou por um pré-tratamento para que não houvesse precipitação na coluna. A fração E3 (2,0 g) a solubilizada no sistema 8 (S8) composto por Hexano: AcOEt: MeOH: H₂O, nas proporções de 1:9:1:9, as fases superiores e inferiores foram separadas e levadas para secar, estas foram analisadas por CCD e amostra extraída na fase superior foi utilizada no fracionamento por HPLCCC.

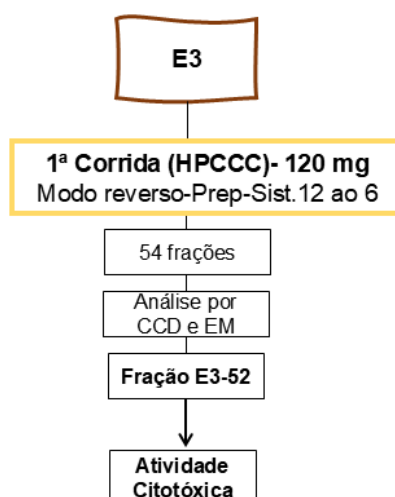
b) Fracionamento da E3 de modo normal

O fracionamento foi realizado em gradiente não-linear, iniciando com o sistema 12, tendo como fase estacionária a fase inferior e as fases superiores dos sistemas 12, 11, 10, 9, 8 e 7 como fases móveis (Tabela 13).

Tabela 13. Sistemas bifásicos de solventes utilizados no fracionamento (modo normal) de ACA3

Sistema	Hexano	AcOEt	MeOH	Água
12 (FI e FS)	1	3	1	3
11 (FS)	1	4	1	4
10 (FS)	1	5	1	5
9 (FS)	1	6	1	6
8 (FS)	1	9	1	9
7 (FS)	1	19	1	19

Utilizaram-se 120 mg de E3 que foi solubilizada no sistema 12, em seguida a solução foi filtrada e injetada no HPLCCC. A corrida apresentou S_f = 80% e 18,13 min de tempo de retenção com V_m = 27 mL. Foram coletadas 6 mL em cada tubo de ensaio, já no processo de extrusão foram coletados 15 mL por frasco com fluxo de 10 mL/min, porém durante este processo houve aumento de pressão na bomba, com isso utilizou-se o fluxo de 7 mL/min para finalizar a extrusão. Ao final do fracionamento foram obtidas 54 frações (Fluxograma 6). As frações foram submetidas a análise por CCD e unidas de acordo com o perfil cromatográfico observado. Posteriormente foram analisadas por EM e as frações promissoras foram avaliadas por RMN.



Fluxograma 6. Fracionamento da fração E3

4.9 Cromatografia de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)

As frações obtidas no terceiro fracionamento por HPCCC de ACA3 foram analisadas no Cromatógrafo com injetor automático e em modo analítico. As análises foram realizadas em fase reversa, utilizando a coluna Shim-pack H ODS C18-100, 4,6 x 250 mm (Shimadzu). As corridas cromatográficas foram otimizadas conforme a natureza de cada amostra utilizando as fases móveis ácido fórmico 0,5% (solvente A) e acetonitrila (solvente C), que foram previamente degaseificadas. O fluxo utilizado foi de 1 mL e a corrida se iniciou com um gradiente em 30% de C até 50% de C durante 10 min, seguido de um isocrático em 50% de C durante 5 min, em seguida mais um gradiente foi iniciado em 50% de C até 100% de C em 10 min e um isocrático em 100% por 10 min para a limpeza da coluna e por fim retornou-se para as condições iniciais da corrida em 10 min. As amostras foram diluídas em metanol grau CLAE, na concentração de 1 mg/mL, em seguida foram filtradas em uma membrana de 0,45 µm de PTFE w/GMF da marca Whatman. Os cromatogramas e espectros foram processados no software Chromelon.

4.10 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM)

As frações obtidas no fracionamento terceiro por HPCCC de ACA3 foram analisadas por CLAE-EM e estas foram solubilizadas em MeOH na concentração de 1 mg/mL. As corridas cromatográficas foram realizadas em modo gradiente

com as seguintes fases móveis, água de Mili-Q (solvente A) e Metanol (solvente B) em modo gradiente variando de 20% a 100 % de B em 30 min. O equipamento foi conectado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) equipado com interface de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e funcionamento no modo íon negativo. As condições de ionização foram as seguintes: tensão de pulverização, 3000 V; pressão do gás de bainha, 35 (arb); pressão de gás de varredura de íon, 0,0 (arb); pressão de gás auxiliar, 15 (arb); temperatura capilar, 270; desvio capilar, -35 V; deslocamento do skimmer, 0 V; faixa de massa, m/z 150 a 950; energia de colisão, 30 eV. Os cromatogramas e espectros foram processados no software Xcalibur. As análises foram realizadas no LBCEM na Central Analítica da UFAM.

4.11 Espectrometria de massas (EM)

As análises dos extratos, frações e substâncias das espécies de estudo foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) na Central Analítica-UFAM. Utilizou-se o espectrômetro de massas com fonte de ionização APCI, nos modos positivo e negativo de ionização. Os espectros foram obtidos em uma faixa de 100-1000 Da com voltagem do *spray* de 4,9 kV, temperatura do capilar de 280 °C e voltagem do capilar de 26 V. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol (grau CLAE) em seguida 20 µL foram retirados e em um outro frasco avolumados para 1 mL de metanol, para atingir a concentração de 10 ppm. Os espectros obtidos foram processados no programa Xcalibur 2.0.7. e comparados com os dados da literatura.

4.12 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises substâncias isoladas e em mistura por RMN foram realizadas na Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas. Os experimentos de RMN 1D e 2D [1D: ^1H e 2D: ^1H - ^{13}C HMBC (*heteronuclear multiple-bond correlation*) e HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*)] foram realizados no espectrômetro equipado com uma sonda multinuclear de observação direta de 5 mm (BBFO Plus SmartProbe®). As amostras foram solubilizadas em metanol deuterado (CD_3OD) com padrão interno TMS. Os

dados obtidos foram processados através do software ACD Labs/NMR
Processor academic edition (Versão 12.01).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimentos dos extratos e frações das espécies madeireiras

Após a preparação dos extratos e frações de *A. parviflora* (sucupira vermelha - cerne e casca) e *R. schomburgkii* (sucupira amarela - casca), foi calculado o rendimento por meio da massa final do extrato e das frações pelas massas do material botânico utilizado para a extração. Os rendimentos totais em massa das extrações foram de 65,58 g (ACE), 25,38 g (ACA) e 39,83 g (E) partindo de 800 g de material botânico para ACE e E e para ACA partindo de 1045,28 g.

Tabela 14. Rendimento de extratos e frações de sucupiras

Espécie	Código	Amostra	Solvente	Massa (g)	Rendimento %
<i>A. parviflora</i> - cerne	ACEEB	Extrato	Etanol 70%	48,02	6,00
	ACE1	Fração	Hexano	0,01	0,06
	ACE2	Fração	CHCl ₃	1,44	8,23
	ACE3	Fração	AcOEt	5,74	32,71
	ACE4	Fração	MeOH	6,15	35,00
	ACE5	Fração	Hidroalcoólico	4,21	23,80
<i>A. parviflora</i> - casca	ACAEB	Extrato	Etanol 70%	12,72	1,22
	ACA1	Fração	Hexano	0,01	0,10
	ACA2	Fração	CHCl ₃	0,54	4,25
	ACA3	Fração	AcOEt	2,24	17,70
	ACA4	Fração	MeOH	4,39	34,63
	ACA5	Fração	Hidroalcoólico	5,49	43,32
<i>R. schomburgkii</i> - casca	EEB	Extrato	Etanol 70%	20,47	2,56
	E1	Fração	Hexano	-	-
	E2	Fração	CHCl ₃	0,13	0,68
	E3	Fração	AcOEt	0,22	1,16
	E4	Fração	MeOH	1,84	9,49
	E5	Fração	Hidroalcoólico	17,16	88,66

O cerne de *A. parviflora* foi a que apresentou maior rendimento (6,00%) de extração em relação a outra espécie e as cascas de *A. parviflora*. De acordo com a Tabela 14 as frações que apresentaram maior rendimento foram as frações hidroalcoólicas (E5 e ACA5) e butanólica (ACE4), indicando a presença de maior quantidade de substâncias de média e alta polaridade.

5.2 Prospecção fitoquímica em tubos de ensaio

A Tabela 15 mostra a sumarização dos resultados obtidos das análises fitoquímicas para diferentes classes de metabólitos secundários realizadas com as espécies *A. parviflora* e *R. schomburgkii*. Pode-se destacar principalmente a

presença de taninos condensados, flavonas, flavonóis, xantonas, flavonóis, flavanonas, esteróides livres, terpenóides, saponinas e alcaloides.

Os resultados observados nos testes realizados foram baseados em modificações físicas das soluções testadas, como a mudança de coloração, formação de precipitado e formação de espuma. O teste de fenóis e taninos realizado com os extratos e frações, indicou a presença de taninos condensados no extrato bruto ACEEB e frações ACE3, ACE4, ACE5 (Figura 10-tubo 1), assim como no extrato bruto EEB e na fração E5 (Figura 11-tubo 1) devido à presença de precipitado escuro com coloração esverdeada (Matos, 2009).

Tabela 15. Resultado da prospecção fitoquímica de *A. parviflora* e *R. schomburgkii*

Metabólitos Secundários	Cerne de <i>A. parviflora</i>						Cascas de <i>A. parviflora</i>						Cascas de <i>R. schomburgkii</i>					
	ACEEB	ACE1	ACE2	ACE3	ACE4	ACE5	ACAEB	ACA1	ACA2	ACA3	ACA4	ACA5	EEB	E1	E2	E3	E4	E5
Taninos Condensados	+			+	+	+	+		+	+	+	+	+		NR	-	-	+
Antocianidinas	-			-	-	-	-		-	-	-	-	-			-	-	-
Antocianinas	-			-	-	-	-		-	-	-	-	-			-	-	-
Flavonas	-	NR	NR	+	+	+	-		+	-	-	+	-			-	-	-
Flavonóis	-			+	+	+	+		+	+	-	+	-			-	-	-
Xantonas	-	-		+	+	-	+	NR	-	-	-	-	-	NR		-	-	-
Flavononol	+			-	-	-	-		-	-	-	-	-			+	+	+
Flavanonas	-			+	-	-	-		-	-	-	-	-			+	+	+
Esteróides livres	-	+	-	-	-	-	-		-	-	-	-	+		+	+	-	-
Triterpenóides pentacíclicos livres	+		+	+	-	-	+		NR	NR	NR	NR	-		-	-	-	-
Saponinas	+	NR	NR	+	+	+	+		-	+	+	+	+		+	+	+	+
Alcaloides	+		-	-	+	+	-		-	-	-	-	+		+	-	+	+

Legenda: NR- Não realizado; - Não detectado; + detectado

Nenhum dos extratos e frações apresentaram resultado indicativo para antocianidinas e antocianinas. A ocorrência de resultados negativos não significa a ausência dessa subclasse de compostos na planta, pois fatores como o solvente utilizado na fase de extração, as baixas concentrações das substâncias nos tecidos vegetais ou até mesmo a interferência de outros constituintes no desenvolvimento das cores características nos testes podem inviabilizar a detecção por reações qualitativas (Almeida; Oliveira; Falcão, 2015).

As frações ACE3, ACE4 e ACE5 apresentaram resultados positivos para indicar a presença de flavonas, flavonóis e xantonas (Figura 16). A presença de flavonóis foi indicada no extrato bruto ACEEB (Figura 16-T4) e nas frações E3, E4 e E5 (Figura 17-T4), devido a coloração vermelha ou laranja observada após a alcalinização no tubo 4. No cerne de *A. parviflora* foi indicada a presença de flavanonas apenas na fração ACE3, já nas cascas de *R. schomburgkii* foi possível detectar flavanonas nas frações E3, E4 e E5 (Figura 17-T6).

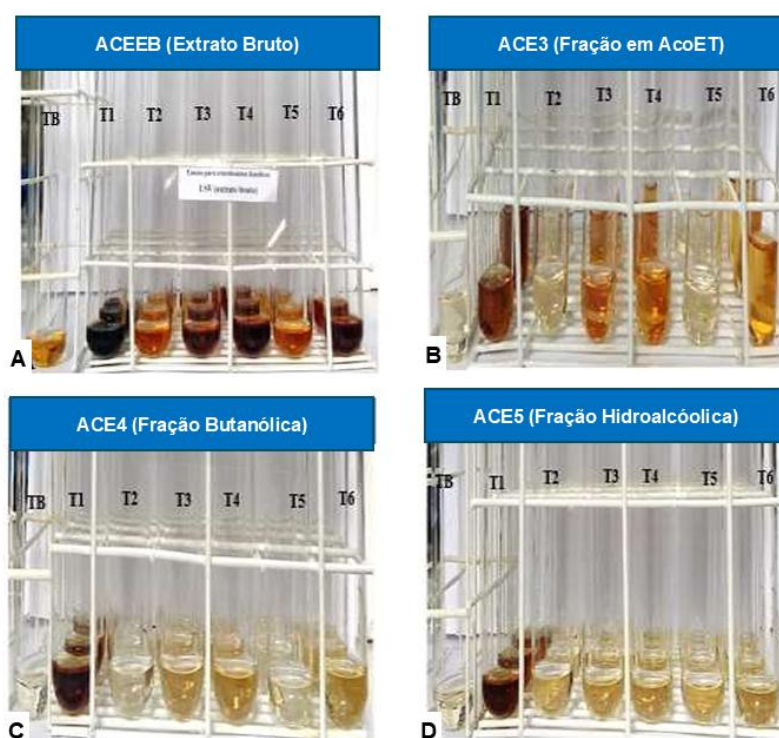


Figura 15. Prospecção fitoquímica para a indicação da presença de compostos fenólicos em extrato e frações de *A. parviflora*.

Legenda: Sequência dos tubos: TB- tubo branco; T1- tubo nº. 1 pH4; T2- tubo nº. 2 pH 3; T3- tubo nº. 3 pH 8,5; T4- tubo nº. 4 pH 11; T5- tubo nº. 5 pH 3 com aquecimento; T6- nº. 6 pH 11 com aquecimento.

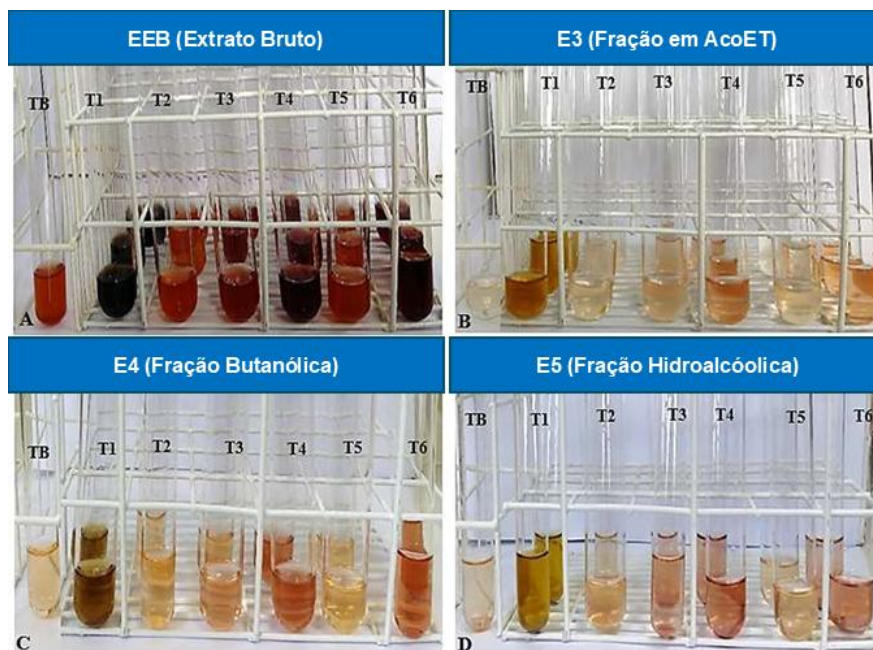


Figura 16. Prospecção fitoquímica para a indicação da presença de compostos fenólicos em extrato e frações de *R. schomburgkii*.

Legenda: Sequência dos tubos: TB- tubo branco; T1- tubo nº. 1 pH4; T2- tubo nº. 2 pH 3; T3- tubo nº. 3 pH 8,5; T4- tubo nº. 4 pH 11; T5- tubo nº. 5 pH 3 com aquecimento; T6- nº. 6 pH 11 com aquecimento.

A indicação da presença de esteroides livres foi evidenciada pela coloração verde no teste de tubos de Liberman-Burchard, nas seguintes amostras: EEB, E2 e E3 (Figura 18). Os terpenoides pentacíclicos foram detectados nas amostras ACEEB, ACE2 e ACE3, devido a coloração parda observada nos tubos.

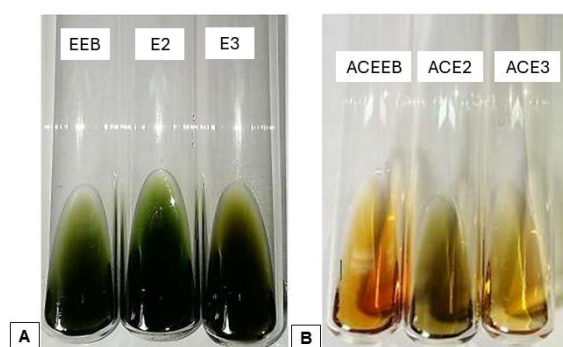


Figura 17. Prospecção fitoquímica para terpenos. A: *R. schomburgkii*; B: *A. parviflora*

A presença de espuma persistente após agitação dos tubos indicou a presença abundante de saponinas (Matos, 2009) em todos extratos e fração com os quais o teste foi realizado, com exceção da fração ACA2 (Figura 19).

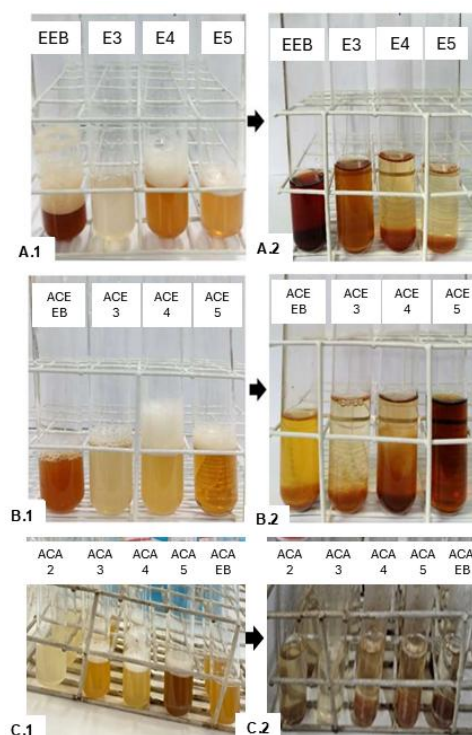


Figura 18. Prospeção fitoquímica para saponinas. A.1: Teste preliminar para saponinas com o cerne de *A. parviflora*; A.2: Teste confirmatório com o cerne de *A. parviflora*; B.1: Teste preliminar para saponinas com *R. schomburgkii*; B.2: Teste confirmatório com *R. schomburgkii*; C.1: Teste preliminar para saponinas com as cascas de *A. parviflora*; A.2: Teste confirmatório com as cascas de *A. parviflora*;

No teste em tubos de indicação de alcaloides, foi observada a formação precipitados após a adição do reagente Dragendorff, nas amostras: ACEEB, ACE4, ACE5, EEB, E2, E4 e E5 que podem ser observadas na Figura 20. De acordo com Simões *et al* (2017) esses resultados sugerem a presença de alcaloides nas amostras.

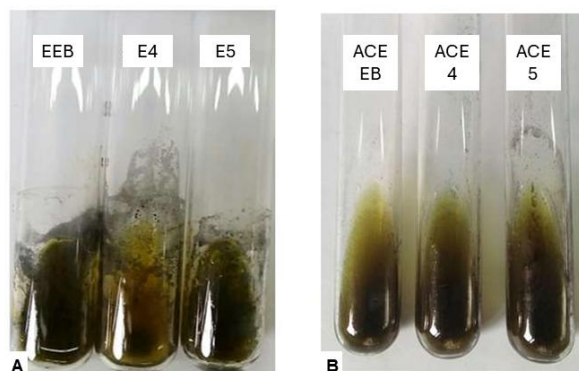


Figura 19. Prospeção fitoquímica em tubos para alcaloides. A: cerne de *A. parviflora*; B: *R. schomburgkii*

Os resultados obtidos até em tão estão corroborando com os relatos da literatura, pois no gênero *Andira* já foi relatada a presença de triterpenos, benzofuronas, esteroides, compostos fenólicos e flavonoides (Braz-Filho et al., 1973; Garcia, 2013; Garcia et al., 2018; Kraft et al., 2002; Santos, 2012b).

5.3 Prospecção fitoquímica dos extratos e frações em placas cromatográficas (CCD)

5.3.1 Cerne e casca de *A. parviflora*

A placa revelada com sulfato cérico mostrou manchas marrons intensas conforme demonstrado na Figura 21, observa-se o aparecimento de manchas escuras sugestivas de flavonoides em todas as amostras do cerne de *A. parviflora*, com manchas intensificadas no Rf variando de 0,45 a 0,62. O sulfato cérico é empregado para investigação de substâncias de natureza terpênicas e flavonoídicas.

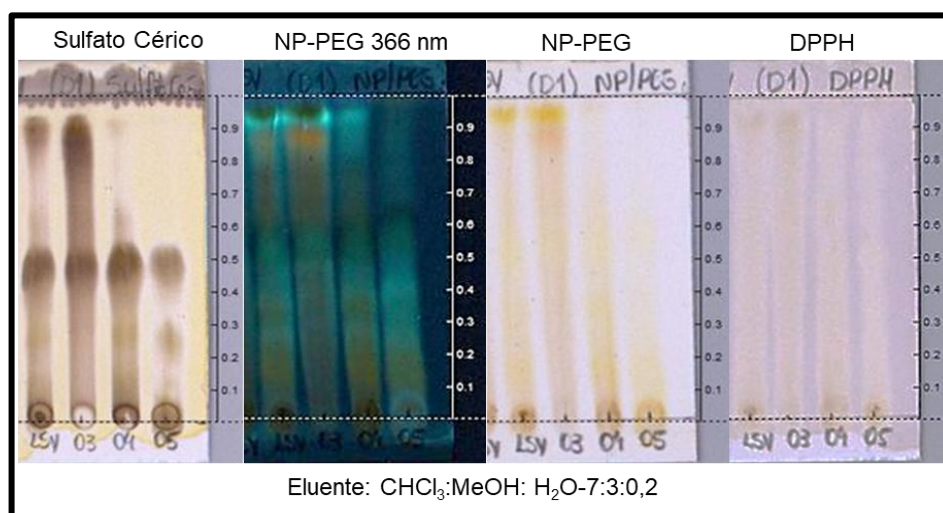


Figura 20. Perfil cromatográfico do extrato e frações do cerne de *A. parviflora*.

Legenda: LSV- Extrato do Cerne de *A. parviflora*; 03-Fração em acetato de etila; 04- Fração butanólica; 05- Fração hidroalcóolica.

Nas placas do cerne de *A. parviflora* (Figura 21) reveladas com NP-PEG visualizadas no visível e em 366 nm (UV), pôde-se observar manchas características de flavonoides. Na placa visualizada no UV observou-se manchas fluorescentes amarela, verde e laranja no extrato, na fração em acetato de etila, fração butanólica e hidroalcóolica com Rf variando entre 0,5 a 0,9 e 0,1 a 0,3. Na placa revelada com NP-PEG visualizada no visível foram observadas

manchas amarelas em todas as amostras evidenciando a presença de flavonoides no extrato e frações.

Utilizando o radical DPPH e comparando com as revelações em NP/PEG e sulfato cérico e cálculos de Rfs das manchas, observaram-se manchas amarelas em todas as amostras do cerne de *A. parviflora*, indicando a presença de substâncias fenólicas com atividade antioxidante. A fração acetato de etila do cerne de *A. parviflora* obteve a maior intensificação das manchas amarelo na revelação com DPPH indicando a presença de substâncias com potencial antioxidante, como pode ser visto na Figura 21.

Assim como o cerne, os extratos e frações das cascas de *A. parviflora* apresentaram manchas características de flavonoides e terpenoides. Na placa D da Figura 22 pode-se destacar manchas em amarelo e fluorescentes com Rfs 0,6 e 0,8, no extrato e frações em Hexano, em CHCl₃ e acetato de etila. As manchas com Rf 0,6 e 0,7 na placa D correspondem as manchas observadas na placa E, sendo assim características de flavonoides. As placas reveladas em anisaldeído revelaram manchas com cores variadas, indicando a presença de diferentes tipos de substâncias em ampla faixa de polaridade.

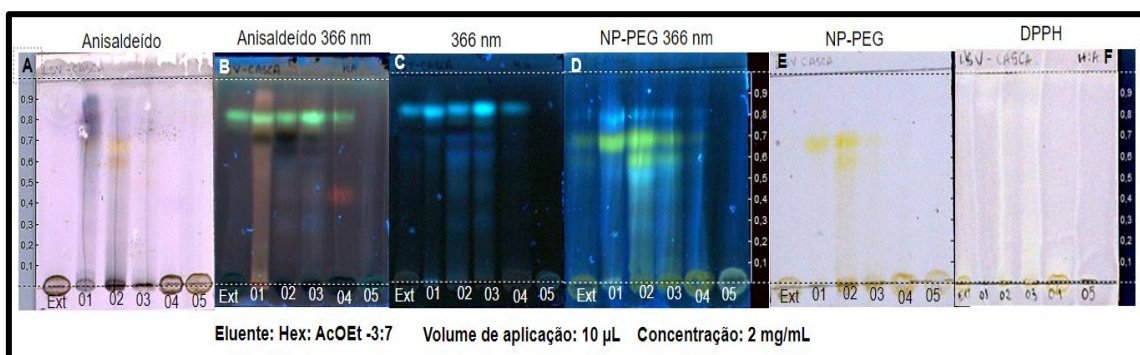


Figura 21. Perfil cromatográfico do extrato e frações da casca de *A. parviflora*.

Legenda: Ext.- Extrato da casca de *A. parviflora*; 01-Fração em hexano; 02- Fração em CHCl₃; 03- Fração em acetato de etila; 04- Fração butanólica; 05- Fração hidroalcolica.

A placa revelada em DPPH mostra que as frações 02 e 03 apresentam manchas em amarelo claro assim como um rastro que indica a presença de compostos com atividade antioxidante. Pode-se destacar que no extrato das cascas de *A. parviflora*, as frações 02, 03 e 04 apresentaram na base uma mancha amarela que também caracteriza uma concentração de substâncias capazes sequestrar o radical livre DPPH.

5.3.2 Casca de *R. schomburgkii*

As placas cromatográficas de *R. schomburgkii* podem ser observadas na Figura 23. Na placa D revelada em NP-PEG em 366 nm observou-se manchas fluorescentes em azul e amarelo entre os Rfs 0,1 e 0,9 no extrato e nas frações, com exceção da fração 05, estas manchas são características de compostos fenólicos. A placa 23A relevada em anisaldeído desenvolveu manchas de coloração roxa no intervalo de Rfs entre 0,3 e 0,9, sendo estas manchas características de terpenoides.

A placa 23F revelada com DPPH, apresentou rastros amarelos em todas as amostras, indicando assim a presença de substâncias capazes de inibir o radical livre DPPH. Pode-se sugerir que a atividade antioxidante observada de maneira qualitativo pode estar associada a presença de compostos fenólicos e ou flavonoides.

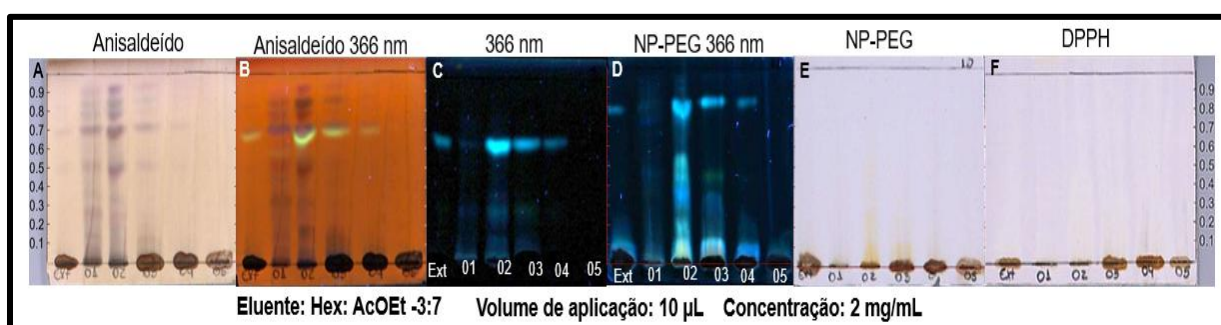


Figura 22. Perfil cromatográfico do extrato e frações da casca de *R. schomburgkii*. Legenda: Ext.- Extrato da casca de *R. schomburgkii*; 01-Fração em hexano; 02- Fração em CHCl_3 ; 03- Fração em acetato de etila; 04- Fração butanólica; 05- Fração hidroalcolica.

5.4 Atividade citotóxica frente a células tumorais

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos de concentração única para os extratos e frações das duas espécies conhecidas como sucupiras (*A. parviflora* e *R. schomburgkii*). Os campos em amarelo destacam o percentual de inibição (IC%) acima de 60%, sendo estes encaminhados para avaliação da atividade para de definir o IC_{50} .

Tabela 16. Percentual de inibição do crescimento (IC%) dos compostos frente as linhagens tumorais em concentração única

AMOSTRA	PC3		SNB-19		HCT-116	
	% de inibição	Desvio padrão	% de inibição	Desvio padrão	% de inibição	Desvio padrão
EEB	53,73	1,4	56,76	6,94	62,66	4,33
E2	38,88	6,7	39,06	0,39	57,61	1,29
E3	49,49	1,11	33,24	3,1	61,56	1,08
E4	84,4	0,64	86,92	2,11	51,02	3,27
E5	0	0	0	0	6,12	2,63
ACAEB	21,68	3,39	31,41	2,89	32,4	5,81
ACA2	79,27	1,75	53,51	1,44	89,54	0,84
ACA3	58,75	4,33	41,54	1,41	75,55	0,67
ACA4	24,73	1,84	14,45	5,17	17,33	0,17
ACA5	0	0	0,2	0,34	38,37	2,76
ACEEB	14,47	2,38	3,15	4,45	50,98	2,67
ACE2	85,6	1,16	85,22	1,79	93,68	0,09
ACE3	43,44	7,37	32,31	2,77	84,02	1,08
ACE4	4,28	6,06	0	0	0	0
ACE5	0	0	1,41	1,99	6,3	0,68

Legenda: SNB-19 (astrocitoma), HCT-116 (carcinoma de cólon - humano), PC3 (carcinoma de próstata); Concentração de 250 µg/mL para extratos e 100 µg/mL para as frações.

As amostras de EEB, E3 e E4 inibiram crescimento de 61 a 86 % das linhagens testadas em concentração única (Tabela 16 e Gráfico 1). Na determinação de CI_{50} , para as linhagens PC3, SNB19, HCT116 e HL60, o extrato EEB apresentou valores de 6,5; 31,09; 31,28 e 10,37 µg/mL, respectivamente, com destaque para as linhagens PC3 e HL60, com os menores valores. Quanto à fração E3, apresentou valores de CI_{50} acima 100 µg/mL para todas a linhagens, exceto para linhagem HL60, com valor de 67,47 µg/mL. EEB a fração E4 apresentou valor de CI_{50} de 3,5 µg/mL para linhagem PC3; 9,57 µg/mL para linhagem SNB19 e 1,58 µg/mL para linhagem HL60 (Tabela 17 e Gráfico 2).

Na linhagem não tumoral HaCat, as amostras foram testadas com o objetivo de obtenção de dados para o cálculo do índice de seletividade (IS), que indica a seletividade de uma amostra entre uma linhagem tumoral e uma não tumoral. O resultado direciona o potencial da amostra em questão em estudos futuros na respectiva linhagem tumoral avaliada (Tabela 16). Suffness e Pezzuto (1991) consideraram IS significativo aquele que apresentava um valor maior ou

igual a 2,0; ou seja, o composto apresenta atividade duas vezes maior na linhagem de células tumorais do que na linhagem não tumoral.

Os resultados de seletividade demonstraram uma seletividade aumentada para todas as linhagens tumorais testadas com o EEB e para as linhagens PC3 e HL60, quando testada com E4.

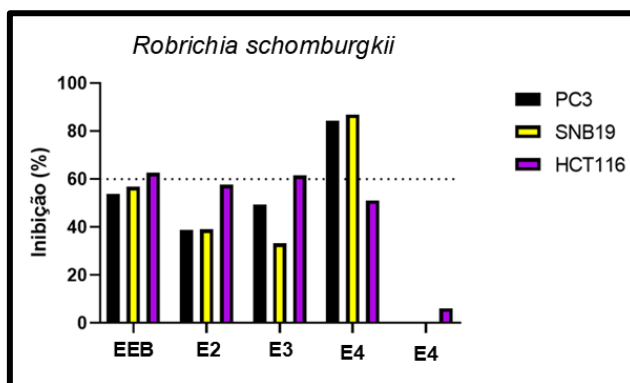


Gráfico 1. Inibição em concentração única de *R. schomburgkii* frente a três células tumorais. Legenda: SNB-19 (astrocitoma), HCT-116 (carcinoma de cólon - humano), PC3 (carcinoma de próstata). Concentração de 250 µg/mL para extratos e 100 µg/mL para as frações.

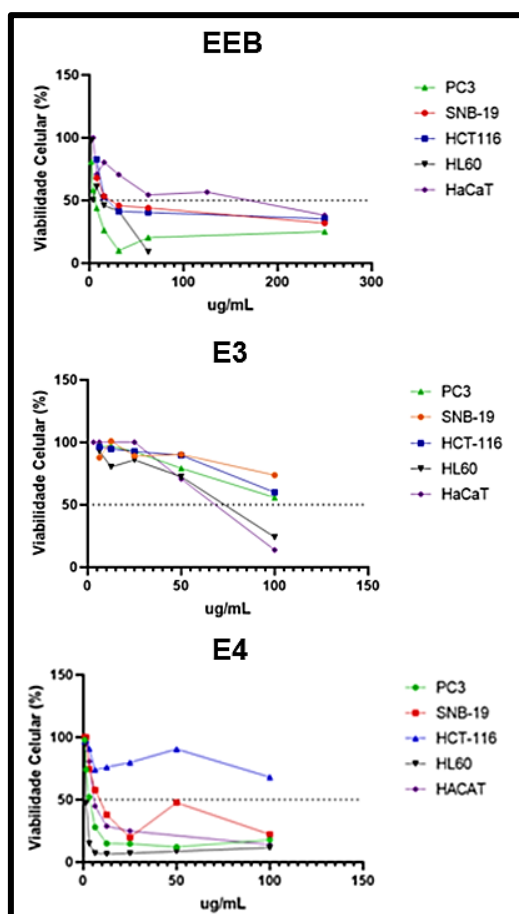


Gráfico 2. Curvas de viabilidade celular versus concentração extrato e frações de *R. schomburgkii* em cinco linhagens de células tumorais e uma normal. Legenda: O ponto de encontro da linha tracejada com uma curva indica o valor de CI_{50} ; SNB-19 (astrocitoma), HCT-116 (carcinoma de cólon - humano), PC3 (carcinoma de próstata), HL60 (leucemia promielocítica) e a linhagem não tumoral foi, HaCat (queratinócitos humano).

As amostras ACA2; ACA3; ACE2; e ACE3 inibiram crescimento de 25 a 89 % das linhagens testadas em concentração única (Tabela 16 e Gráfico 3). Para frações oriundas da casca, ACA2 apresentou valores de 18,41 (PC3); 25,31 (SNB19); 17,32 (HCT116) e 10,88 µg/mL (HL60). Enquanto a amostra LSV03, apresentou valores de 80,90; acima de 100; 74,80 e 57,76 µg/mL, respectivamente. Para as frações do cerne, a amostra ACE2 apresentou valores de 16,53; 27,46; 8,80 e 5,15 µg/mL; respectivamente, enquanto a amostra ACE3, apresentou valores maiores, tais como acima de 100 µg/mL para linguagem PC3 e SNB19; 78,16 e 32,6 µg/mL para as linhagens HCT116 e HL60, respectivamente (Tabela 17 e Gráfico 4). Quanto à seletividade, as amostras ACA3 e ACE3 não apresentaram potencial inibitório sobre a linhagem de célula não tumoral HaCat nas concentrações testadas (Tabela 17), exibindo seletividade sobre as células tumorais uma vez que seus IS podem ser maiores que 2. Contudo, em geral as frações ACA2 e ACE2 apresentaram potencial inibitório sobre linhagem não tumoral testada e IS menor que 2, ou seja, seletividade reduzida para as linhagens tumorais testadas, com exceção para amostra ACE2 frente a HL60, com IS maior que 2 (Tabela 17).

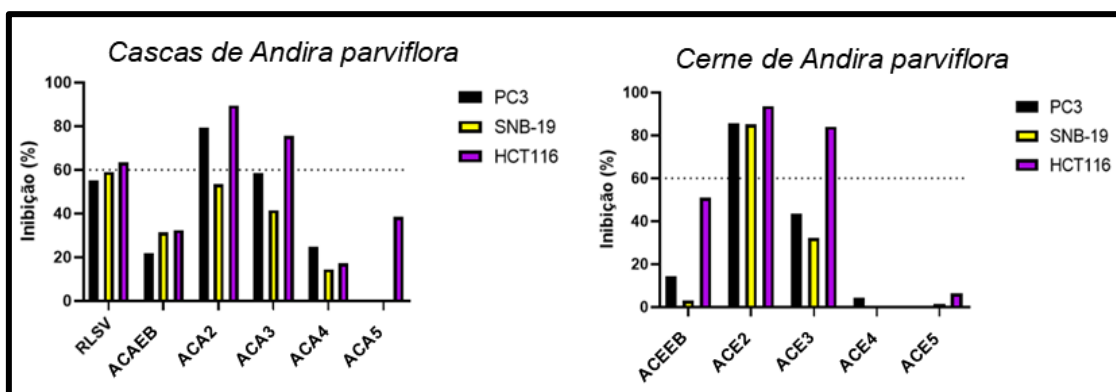


Gráfico 3. Inibição em concentração única das cascas e cerne de *A. parviflora* frente a três células tumorais
 Legenda: SNB-19 (astrocitoma), HCT-116 (carcinoma de cólon - humano), PC3 (carcinoma de próstata). Concentração de 250 µg/mL para extratos e 100 µg/mL para as frações.

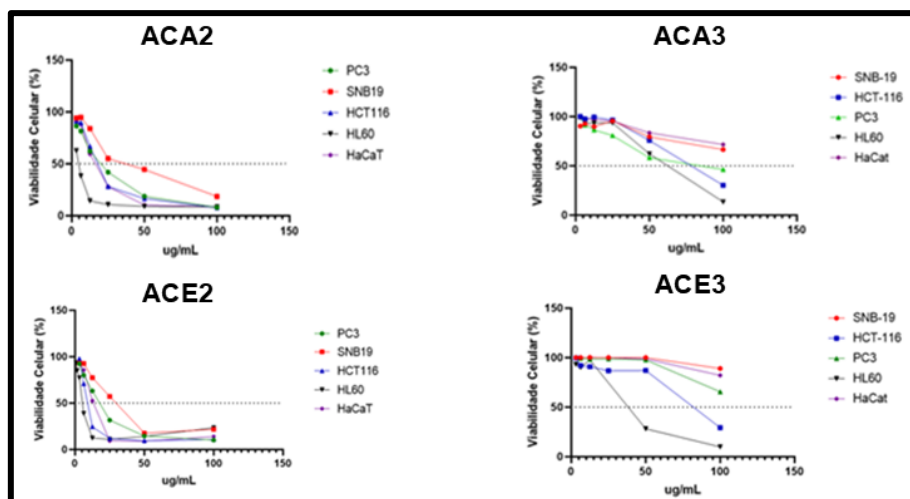


Gráfico 4. Curvas de viabilidade celular versus concentração extrato e frações de *A. parviflora* em cinco linhagens de células tumorais e uma normal

Legenda: O ponto de encontro da linha tracejada com uma curva indica o valor de CI_{50} ; SNB-19 (astrocitoma), HCT-116 (carcinoma de cólon - humano), PC3 (carcinoma de próstata), HL60 (leucemia promielocítica) e a linhagem não tumoral foi, HaCat (queratinócitos humano)

Tabela 17. CI₅₀ das amostras em linhagens de células após diluição seriada nas concentrações máxima e mínima

AMOSTRA	PC3			SNB19			HCT116			HL60			HaCaT	
	CI ₅₀ ^a	95% IC	IS	CI ₅₀	95% IC	IS	CI ₅₀	95% IC	IS	CI ₅₀	95% IC	IS	CI ₅₀	95% IC
E	6,05	3,85 - 8,45	22,6 9	31,09	21,86 - 43,79	4,41	31,28	20,26 - 53,51	4,39	10,37	6,476 - 16,30	13,23	137,2	95,37 - 224,1
E3	> 100	-	< 2	> 100	-	< 2	> 100	-	< 2	67,47	51,23 - 87,47	0,93	62,91	61,20 - 64,68
E4	3,5	2,92 - 4,13	2,04	9,57	7,35 - 12,98	0,75	>100	-	< 2	1,58	1,41 - 1,79	4,53	7,15	6,13 - 8,41
ACA2	18,18	15,90 - 20,76	0,85	35,99	15,90 - 20,76	0,62	17,32	15,45 - 19,45	0,90	4,35	3,57 - 5,10	1,43	15,61	14,24 - 17,12
ACA3	80,9	67,55 - 102,0	ND	> 100	-	ND	74,8	71,83 - 77,91	ND	57,76	52,18 - 64,13	ND	>100	-
ACE2	16,39	14,24 - 18,87	0,76	27,26	23,77 - 32,35	0,46	8,74	7,76 - 9,89	1,43	5,15	4,36 - 6,09	2,44	12,56	11,32 - 13,95
ACE3	> 100	-	ND	> 100	-	ND	78,16	68,24 - 87,84	ND	32,16	26,94 - 38,27	ND	>100	-
DOX ^b	0,22	0,19-0,25	-	0,41	0,32-0,55	-	0,13	0,11-0,15	-	0,09	0,07-0,12	-	ND	ND

Legenda: 95% IC - Intervalo de confiança. ND – Não detectado. IS – Índice de Seletividade. SNB-19 (astrocitoma), HCT-116 (carcinoma de cólon - humano), PC3 (carcinoma de próstata), HL60 (leucemia promielocítica) e a linhagem não tumoral foi, HaCat (queratinócitos humano). ^aCI₅₀ em µg/mL. ^bdoxorubicina.

A avaliação da atividade citotóxica serviu de parâmetro para a escolha das frações a serem trabalhadas, com o intuito de isolar e identificar as substâncias responsáveis pelas atividades descritas. Com base nos resultados obtidos da atividade citotóxica as frações mais promissoras foram ACE2, **ACE3**, **ACA2** e ACA3 da espécie *A. parviflora*, e na espécie *R. schomburgkii* as frações **E3** e E4. O fracionamento bioguiado foi executado com as frações destacadas em negrito.

5.5 Espécie *Andira parviflora* (sucupira vermelha)

5.5.1 Fracionamento por cromatografia contracorrente de alta performance (HPLCCC - high performance countercurrent chromatography) da fração **ACE3**

5.5.1.1 Definição dos sistemas bifásicos de solventes

Após a avaliação em CCD dos quatorze sistemas listados na Tabela 2, foram observadas as melhores distribuições das manchas nos sistemas HEMWat 1:1:1:1, 2:3:2:3, 1:2:1:2, 2:5:2:5, 1:3:1:3, 1:5:1:5, 1:9:1:9. Pode-se observar que nos sistemas HEMWat 1:9:1:9 e 1:5:1:5 o comportamento foi bem similar, onde apresentaram maior distribuição na fase superior do que na inferior. Entretanto, no sistema HEMWat 1:2:1:2 ocorreu maior distribuição na fase inferior.

Após as observações destacadas, realizou-se o fracionamento de ACE3 em modo normal, tendo como fase estacionária a FI do sistema HEMWat 1:1:1:1 e as FS dos sistemas HEMWat 1:1:1:1, 2:3:2:3 e 2:5:2:5 foram as fases móveis em ordem crescente de polaridade (tabela 3). No fracionamento em fase reversa foi utilizada como fase estacionária a FS do sistema HEMWat 1:9:1:9 e as fases móveis foram as FI dos sistemas HEMWat 1:9:1:9, 1:5:1:5, 1:3:1:3 e 1:2:1:2 (Tabela 4)

5.5.1.2 1º Fracionamento de ACE3 em modo normal

O fracionamento durou cerca de 3 horas e 15 minutos, gerando 42 frações. A Figura 18 mostra a placa cromatográfica de CCD associada a rampa de eluição em modo gradiente até a extrusão do fracionamento em fase normal. Pode-se observar na CCD da Figura 18 que as primeiras frações coletadas na

primeira fase móvel (HEMWat 1:1:1:1, fase superior) apresentaram perfis cromatográficos semelhantes com manchas azuis fluorescentes com Rf 0,9.

A fração 9 se refere ao início da coleta da 2ª fase móvel (HEMWat 2:3:2:3, fase superior) até a fração 16. Nas frações 12 e 13 observa-se manchas amarelas fluorescentes com Rf 0,9 que podem ser características de flavonoides, uma vez que a placa foi revelada em NP-PEG (Figura 24). A partir da fração 21 é possível identificar manchas azuis de forte fluorescência, características de flavonoides. Nas frações 26 e 27 foram observadas manchas de cor laranja eluidas na 3ª fase móvel (HEMWat 2:5:2:5, fase superior).

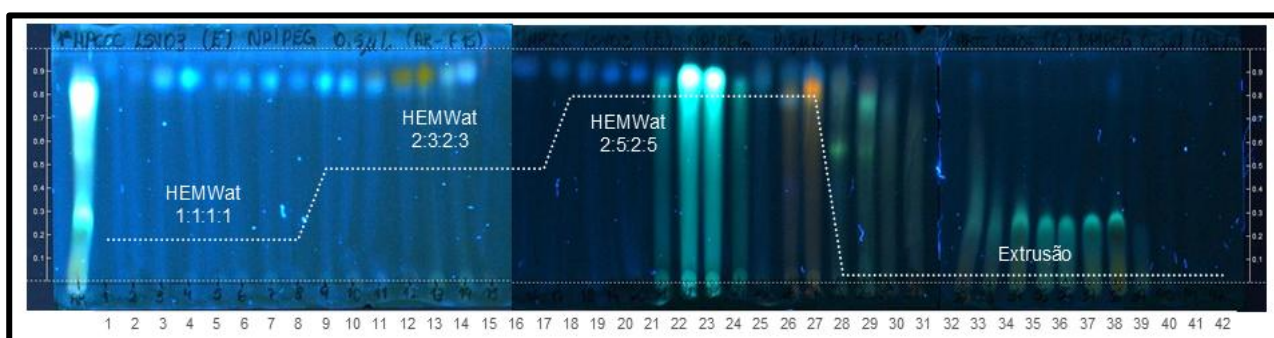


Figura 23. Placa cromatográfica das frações obtidas do fracionamento por HPLC de ACE3 em modo normal. Representação dos degraus de eluição. Eluente: AcOEt: MeOH-95:5; Revelador: NP-PEG em 366 nm. Volume de aplicação: 10 µL; Concentração: 1 mg/mL. NP-PEG em 366 nm.

No processo de extrusão foram reveladas manchas amarelas com Rfs variando de 0,6 a 0,8 nas frações 28 e 29. A partir da fração 34 observa-se maior retenção das manchas na placa cromatográfica com manchas fluorescentes até a fração 39. A placa cromatográfica da Figura 24 auxiliou como guia para unir as frações com perfil cromatográfico semelhante, a seguir estão listados os rendimentos (Tabela 18) das frações após as uniões e em seguida pode-se observar CCD (Figura 25).

A união das frações resultou em 24 frações mais o AR, com rendimento total de 285,9 mg, destaca-se que a perda de material foi de apenas 14,1 mg devido ao procedimento de filtragem ou transferência. As frações que apresentaram maior rendimento foram F38, F35, F29, F34 e F32 (Tabela 18).

Tabela 18. Rendimento das frações após união obtidas na 1ª Injeção de ACE3 no HPCCC

Fração	Rendimento (mg)
AR	63,5
F1	2,4
F3	3,9
F5	0,2
F6	2,5
F11	0,2
F12	2,1
F14	2,7
F16	7,5
F21	3,6
F22	5,0
F24	8,1
F25	3,7
F26	3,9
F27	7,6
F28	9,7
F29	19,6
F31	9,4
F32	19,0
F33	5,6
F34	19,1
F35	34,2
F38	48,6
F39	3,2
F40	0,6
Total	285,9

Na Figura 25, observa-se que as frações apresentaram perfil cromatográfico diferenciados e manchas características de flavonoides nas placas reveladas com NP-PEG.

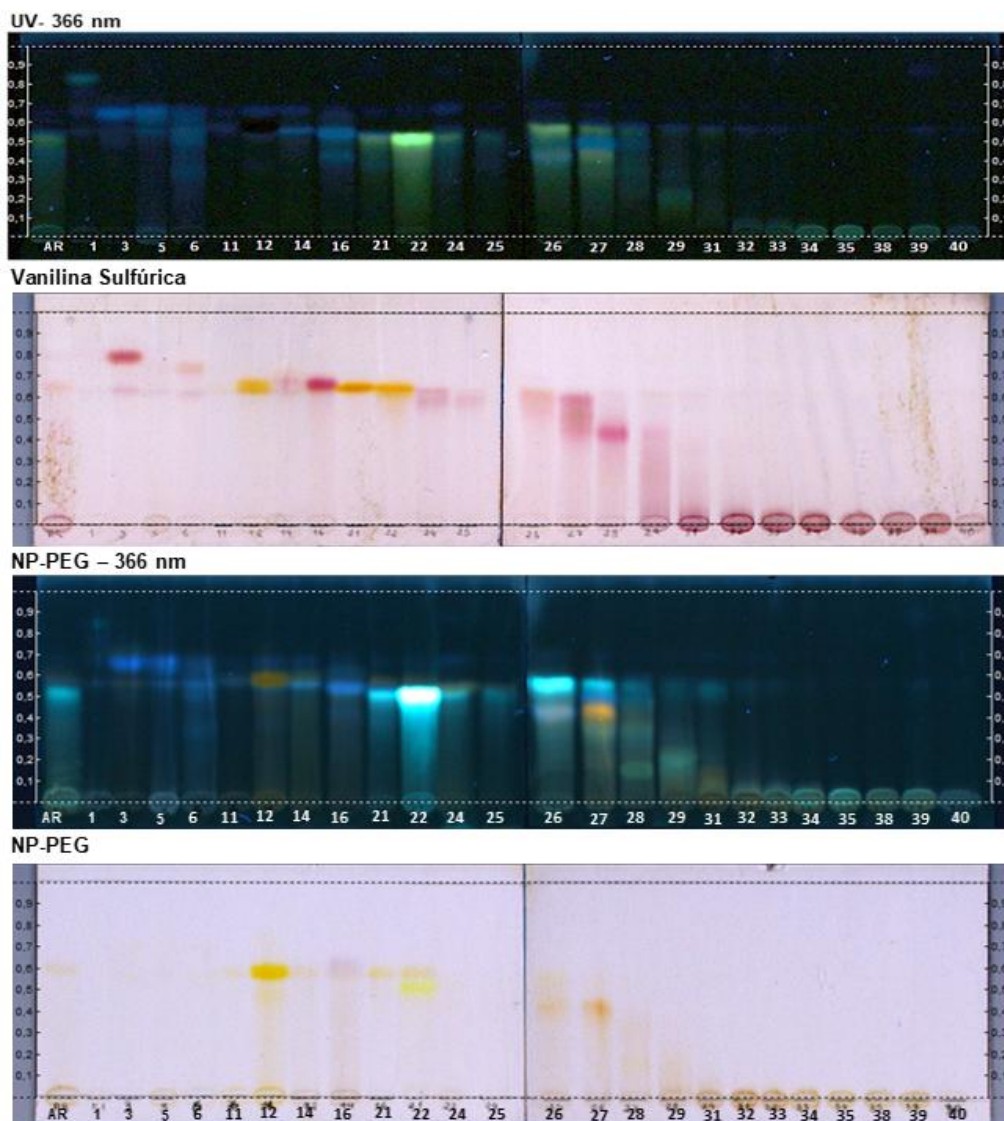


Figura 24. Placas cromatográficas reveladas em diferentes reveladores das frações após a união da 1ª injeção de ACE3 no HPLC. Eluente: Hexano:AcOEt:HCOOH- 4:6:100 µL; Volume de aplicação: 10 µL; Concentração: 1 mg/mL. AR: Amostra residual.

5.5.1.3 2º Fracionamento de ACE3 em modo Reverso

Neste fracionamento foram coletadas 35 frações em uma corrida que durou 2 horas e 42 min. A Figura 26 apresenta os degraus de eluição do gradiente não-linear associada as frações obtidas no fracionamento. As fases móveis foram bombeadas em ordem decrescente de polaridade. Na primeira etapa do gradiente (sist. 8 FI) coletou-se as frações 1 a 11 que apresentaram grande retenção na base da CCD devido à alta polaridade delas. A segunda etapa do gradiente (sist. 11 FI) eluiu frações com rastros azuis fluorescentes com manchas retidas na base da placa nas frações 13 a 16.

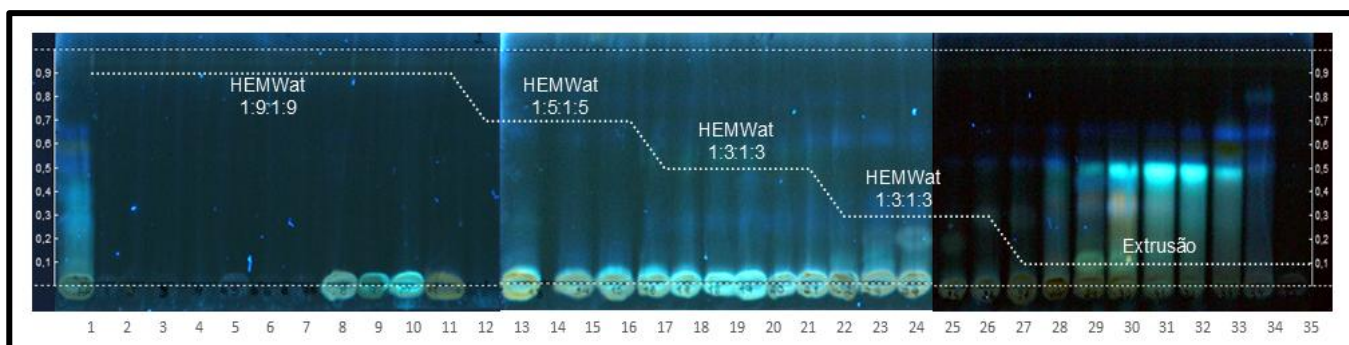


Figura 25. Placa cromatográfica das frações obtidas no 2º fracionamento por HPCCC de ACE3 em modo reverso. Representação dos degraus de eluição. Eluente: Hexano: AcOEt: HCOOH-4:6:100 μ L; Revelador: NP-PEG em 366 nm. Volume de aplicação: 10 μ L; Concentração: 1 mg/mL. NP-PEG em 366 nm.

Na terceira etapa do gradiente observou-se uma mancha azul nas frações 18 a 20 com R_f 0,3. As frações 22, 23 e 24 apresentaram manchas azul fluorescentes com R_f entre 0,6 e 0,7 e manchas azuis com R_f 0,4. A fração 24 apresentou mancha azul clara com R_f entre 0,2 e 0,3. Na extrusão foram eluídas frações ricas em manchas fluorescentes de cor azul, amarela, verde e laranja com R_f s que variaram entre 0,1 e 0,7.

As frações com perfil cromatográfico similar foram unidas resultando em 23 frações mais o AR. Os rendimentos obtidos das frações podem ser conferidos na Tabela 19. A fração com maior rendimento foi a F9 com 75,6 mg. Através da somatória das massas das frações e AR, foi possível calcular que apenas 17,8 mg de perda amostra.

Tabela 19. Rendimento das frações após união obtidas na 2ª Injeção de ACE3 no HPCCC

Fração	Rendimento (mg)
AR	27,7
F1	1,4
F8	2,1
F9	75,6
F10	14,1
F11	6,2
F12	4,2
F13	3,6
F14	3
F16	2,2
F17	3,2
F21	6
F22	1,9
F23	1,4
F24	2,7
F26	4,9
F27	7,3
F29	9,2
F30	26,2
F31	28,4
F32	26,8
F33	22,1
F34	1,2
F35	1,1
Total	282,5

Ao comparar os dois fracionamentos abordados até então, foi possível destacar algumas vantagens em se realizar o fracionamento em fase reversa frente ao de fase normal. Uma das vantagens foi o tempo de fracionamento, onde o fracionamento em fase reversa foi mais rápido (2 h 42 min), além disso gerou um menor número de frações e um menor volume de solventes orgânicos como Hexano, acetato e metanol, foram gastos. Sendo assim optou-se por realizar uma otimização da 2ª injeção para realização do fracionamento em larga escala, a fim de se obter frações ricas em substâncias bioativas em grande quantidade para isolamento.

5.5.1.4 3º Fracionamento de ACE3 em modo reverso

Na figura 27 a CCD ilustra as frações obtidas por meio do fracionamento otimizado com melhor resolução e separação das manchas. Os oito

fracionamentos renderam cerca de 18 frações cada, durando em média 1 hora e 45 minutos. As frações 1,2 e 3 foram eluídas na primeira fase móvel (sist. 12 FI), estas apresentaram manchas retidas na base da placa indicando a presença de substâncias de alta polaridade, sendo necessário o aumento da polaridade do eluente para analisá-las. As mesmas características foram observadas nas frações eluídas na segunda fase móvel.

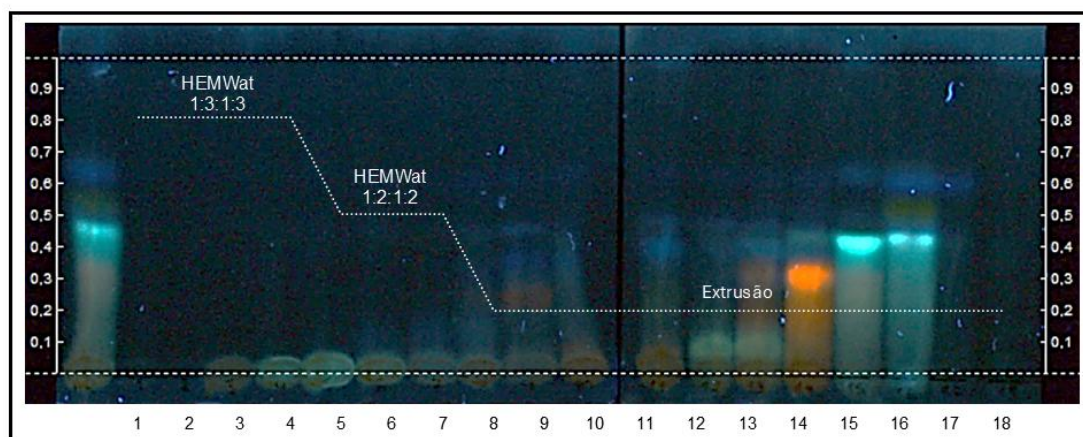


Figura 26. Placa cromatográfica das frações obtidas no 3º fracionamento por HPLC de LSV-CE03 em modo reverso.

Na placa está plotada a rampa de eluição em modo gradiente. Eluente: Hexano: AcOEt: HCOOH-4:6:100 μ L; Revelador: NP-PEG em 366 nm. Volume de aplicação: 10 μ L; Concentração: 1 mg/mL. NP-PEG em 366 nm.

Nas frações coletadas na extrusão, foram reveladas manchas laranjas, amarelas e azuis fluorescentes, sendo estas características de flavonoides. Pode-se destacar a fração ACE3-14 que apresentou uma mancha laranja intensa com Rf 0,3. As frações de todas corridas realizadas foram analisadas por CCD e unidas de acordo com o perfil cromatográfico, após as uniões foram obtidas 13 frações e o AR, os seus rendimentos estão expressos na tabela 20.

Tabela 20. Rendimento das frações após união obtidas na 3ª Injeção de ACE3 no HPCCC

Fração	Rendimento (mg)
AR	1.389,80
ACE3-1	2,5
ACE3-3	11,8
ACE3-4	1.031,00
ACE3-6	193,8
ACE3-7	168,4
ACE3-9	61,2
ACE3-10	56,9
ACE3-11	85,2
ACE3-12	223,6
ACE3-14	59,4
ACE3-15	146,9
ACE3-16	358,1
ACE3-17	53,9
Total	3.842,50

A massa total utilizada nos fracionamentos foi de 4 g e de acordo com o cálculo da massa total, a perda de amostra foi de 157,5 mg. A fração de maior rendimento foi a ACE3-4, sendo está uma excelente fração indicada para o processo de isolamento. Todas as frações obtidas foram analisadas por CCD (Figura 28), CLAE-DAD e CLAE-EM e foram enviadas para UFCE para realização de testes de atividade citotóxica para guiar o isolamento de substâncias bioativas, com exceção da fração ACE3-1 devido ao baixo rendimento.

A Figura 28 apresenta as placas cromatográficas das frações de ACE3, reveladas em diferentes reveladores. Destaca-se que as placas C e D apresentam manchas amarelas, laranja, verde e azul fluorescentes características de flavonoides. Na placa F, manchas amarelas foram reveladas com predominância a partir da fração ACE3-10 até a ACE3-17 que são características de substâncias com a capacidade antioxidante frente ao radical livre DPPH.

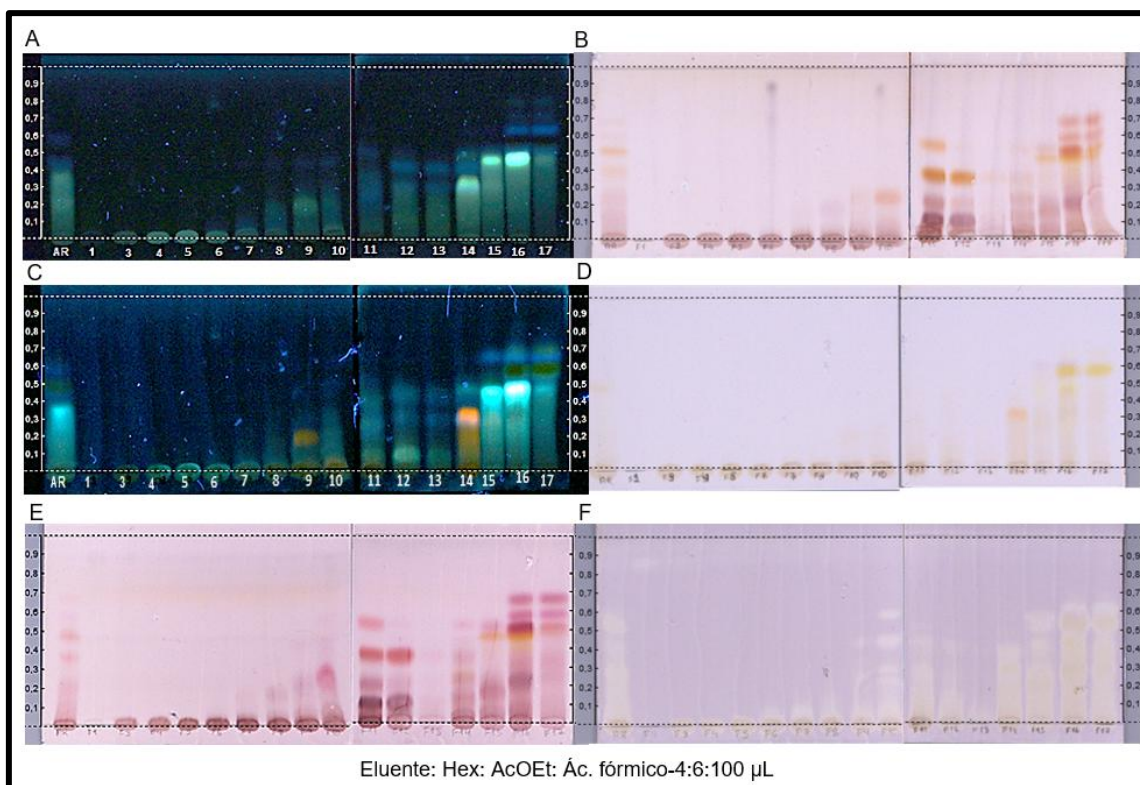


Figura 27. Placa cromatográficas das frações após a união. Legenda: A- 366 nm; B- Anisaldeído; C- NP-PEG 366 nm; D-NP-PEG; E-Vanilina Sulfúrica; F-DPPH; Volume de aplicação: 10 µL; Concentração: 1 mg/mL.

5.5.2 Testes de atividade citotóxica com as frações geradas do terceiro fracionamento de ACE3

O teste de atividade citotóxica com as frações (Tabela 21) obtidas do fracionamento de ACE3 foi realizado somente em concentração única para monitorar a atividade citotóxica apresentada na fração bruta ACE3, além disso nortear o fracionamento para obtenção de substâncias com potencial citotóxica.

As frações apresentaram atividade citotóxica principalmente contra as células de PC3 (carcinoma de próstata) e HCT-116 (carcinoma de cólon), com destaque para a fração ACE3-17 que apresentou que apresentou porcentagem de inibição 60% para todas as linhagens de células testadas. As maiores porcentagem de inibição de ACE-17 foi para as células de PC3 ($82,67 \pm 1,04$) e HCT-116 ($81,27 \pm 2,04$).

As três frações ACE3-16, ACE3-15 E ACE3-7 apresentaram inibição acima de 60% apenas contra a linha de célula PC3, caracterizando uma possível atividade específica contra células de câncer de próstata. As porcentagens de

inibição observada indicaram que essas frações devem ser fracionadas para investigar as substâncias que podem ser responsáveis pelo potencial citotóxico.

Tabela 21. Percentual de inibição do crescimento (IC%) dos compostos frente as linhagens tumorais em concentração única

AMOSTRA	PC3		SNB-19		HCT-116	
	% de inibição	Desvio padrão	% de inibição	Desvio padrão	% de inibição	Desvio padrão
ACE3-3	32,03	3,04	0,00	0,00	0,00	0,00
ACE3-4	36,85	2,53	0,00	0,00	0,00	0,00
ACE3-6	43,66	1,56	0,00	0,00	0,00	0,00
ACE3-7	67,15	1,06	34,13	3,92	33,59	0,45
ACE3-9	36,71	2,33	0,00	0,00	0,00	0,00
ACE3-10	26,51	5,73	0,00	0,00	0,00	0,00
ACE3-11	1,57	2,72	0,00	0,00	0,00	0,00
ACA3-12	49,63	1,21	0,00	0,00	0,00	0,00
ACE3-14	58,76	0,99	19,75	0,39	42,89	0,41
ACE3-15	78,59	0,85	43,53	2,28	57,60	1,81
ACE3-16	77,34	1,93	36,73	4,26	37,82	1,98
ACE3-17	82,67	1,04	67,50	1,11	82,27	2,04

Legenda: SNB-19 (astrocitoma), HCT-116 (carcinoma de cólon - humano), PC3 (carcinoma de próstata)

5.5.3 Análise cromatográfica das frações do 3º fracionamento de ACE3

A análise cromatográfica por CCD das frações ACE3-4, ACE3-6 e ACE3-7, pode ser observada na Figura 29. Na fração ACE3-4 (espote 4), pode-se destacar a mancha em amarelo de Rf 0,6 observada na CCD revelada em 366 nm que corresponde a mancha de mesmo Rf da placa revelada em NP-PEG de coloração azul fluorescente, indicando a presença de flavonoides nesta fração. A placa revelada em anisaldeído (366 nm) apresentou várias manchas na F4 entre os Rfs 0,3 e 0,6, indicando um sistema satisfatório para isolamento.

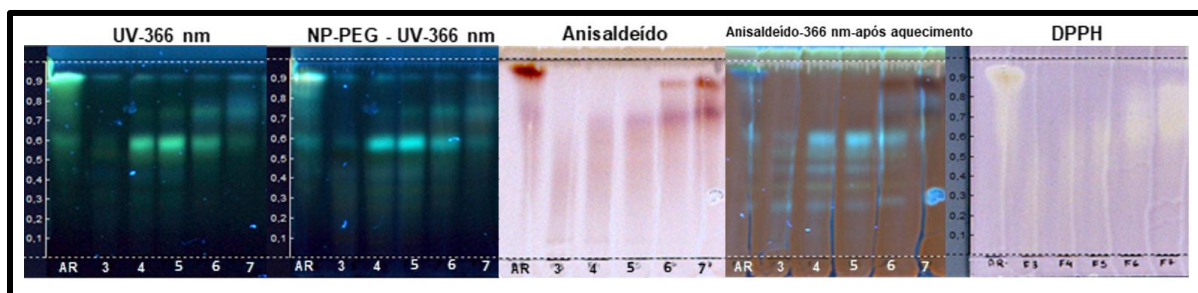


Figura 28. Placa cromatográficas das frações selecionadas do fracionamento de ACE3.

Legenda: Eluente: AcOEt: HCOOH: AcOH: H₂O-97:11:11:29; Volume de aplicação: 10 µL; Concentração: 1 mg/mL.

Na CCD revelada em DPPH um rastro amarelo foi observado na F4 entre os Rfs 0,3 e 0,6. Comparando as placas de CCD, indica-se a presença de compostos fenólicos com capacidade de inibir o radical livre DPPH na F4. A fração F6 apresenta três manchas fluorescentes de cor amarela reveladas em 366 nm (Rfs 0,6, 0,7 e 0,9), sendo estas correspondentes às três manchas fluorescentes de cor azul na placa revelada em NP-PEG (366 nm), sugerindo a presença de flavonoides. A revelação em anisaldeído da F6, apresentou manchas roxa (Rf 0,7) e marrom (Rf 0,9) correspondentes às manchas reveladas em preto na placa revelada em anisaldeído visualizada em 366 nm (Figura 29).

A fração F7 apresentou um perfil semelhante ao perfil da F6, apresentando manchas nos Rfs 0,7 e 0,9 observadas em todas as placas. A principal diferença entre as frações pode ser observada na placa revelada em anisaldeído observada em 366 nm, onde F7 não apresenta manchas entre os Rfs 0,3 e 0,5 comparada a fração F6 (Figura 29).

As frações obtidas no terceiro fracionamento de ACE3 foram analisadas também por CLAE-EM, os dados obtidos foram tabulados (Tabela 22) e comparados com dados da literatura assinalar a presença de substâncias correspondentes aos principais íons observados. As substâncias abaixo indicadas já foram relatadas no gênero *Andira* e pode-se observar maior concentração de flavonoides e compostos fenólicos.

Tabela 22. Resultados das análises por CLAE-EM de oito frações selecionadas

Fração	RT	m/z [M-H] ⁻	Substância	Referência
ACE3-4	3,15	433	engeletina	Silva, 2007
	4,21	289	catequina	Silva, 2007
	9,39	431	genisteína 7-O- β -D-glucopiranosídeo	Silva, 2007
	11,6	449	Astilbina	Silva, 2006
			biochina A	Garcia, 2018
	15,66	283	prunetina	Almeida, 2008
			calicosina	
			dimetilpiterocarpina	Cocker, 1962
ACE3-6	8,72	431	genisteína 7-O- β -D-glucopiranosídeo	Silva, 2007
		311	andiol B	Kraft, 2002
	11,13	449	Astilbina	Silva, 2006

			biochina A	Garcia, 2018
	15,58	283	prunetina	Almeida, 2008
			calicosina	
			dimetilpiterocarpina	Cocker, 1962
			biochina A	Garcia, 2018
ACE3-7	15,89	283	prunetina	Almeida, 2008
			calicosina	
			dimetilpiterocarpina	Cocker, 1962
	6,93	271	dihidrogenisteína	Garcez, 2010
ACE3-11	8,59	287	7,5',6'-triidroxi-4'-metoxiisoflavana	Garcia, 2018
	3,57	341	andiol A	Kraft, 2002
		297	afromosina	Kraft, 2001
ACE3-12	6,23	271	dihidrogenisteína	Garcez, 2010
	10,91	287	7,5',6'-triidroxi-4'-metoxiisoflavana	Garcia, 2018
			biochina A	Garcia, 2018
	3,69	283	prunetina	Almeida, 2008
ACE3-15			calicosina	
			dimetilpiterocarpina	Cocker, 1962
	4,69	269	genisteína	Garcia, 2018
		297	afromosina	Kraft, 2001
ACE3-16	3,89	287	7,5',6'-triidroxi-4'-metoxiisoflavana	Garcia, 2018
	5,48	269	genisteína	Garcia, 2018
	3,66	299	pratenseína	Garcez, 2010
		271	diidrogenisteína	Garcez, 2010
	3,91	287	7,5',6'-triidroxi-4'-metoxiisoflavana	Garcia, 2018
	4,2	269	genisteína	Garcia, 2018
			2,3-diidrobiochanina A	Braz-filho, 1973
ACE3-17	5,5	285	kaempferol	Garcez, 2010
			3,8-dihidroxi-9-metoxipterocarpano	Garcia, 2013
			nissolina	Garcia, 2013
			biochina A	Garcia, 2018
	6,83	283	prunetina	Almeida, 2008
			calicosina	
			dimetilpiterocarpina	Cocker, 1962

A fração ACE3-4 foi submetida ao fracionamento por CLAE-UV semi-preparativo, com o objetivo de isolar as substâncias correspondentes aos picos

majoritários observados na análise por CLAE-DAD (Figura 30). A fração foi selecionada devido a sua massa disponível (1,031 g) e a boa separação observada nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD e CLAE-EM (Figura 31).

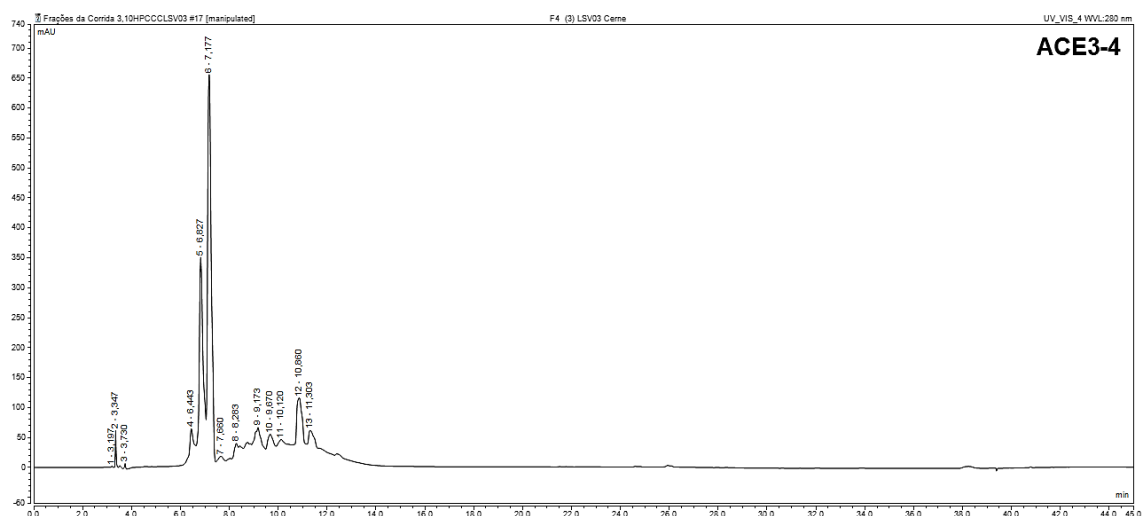


Figura 29. Cromatograma de CLAE-DAD da fração ACE3-4 obtida do terceiro fracionamento de ACE3

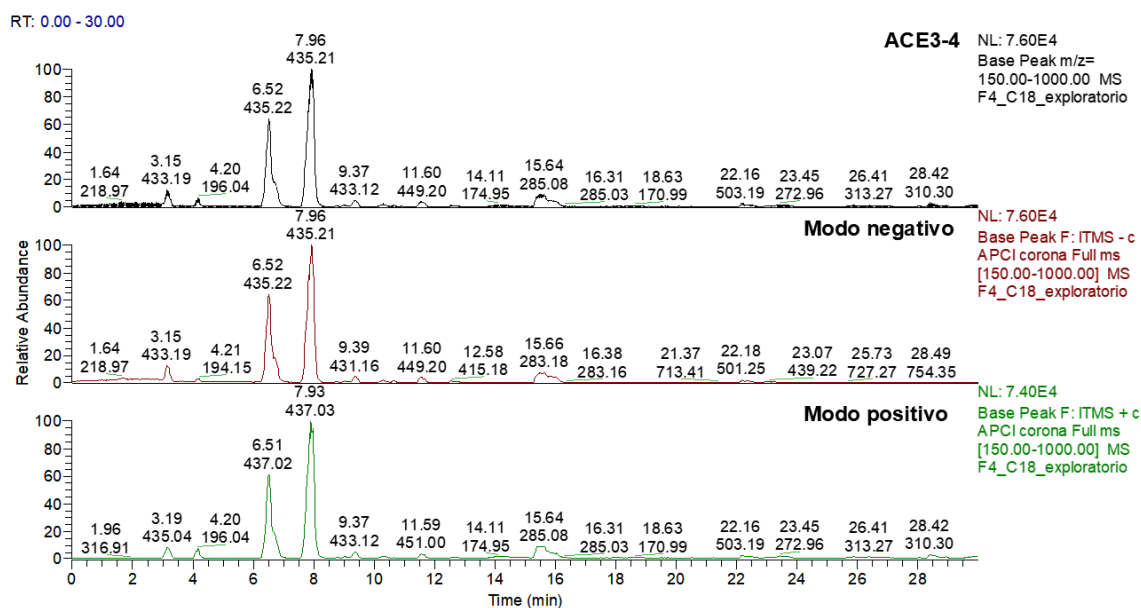


Figura 30. Cromatograma em *base peak* de CLAE-EM de ACE3-4

A partir das análises de CCD, CLAE-DAD, CLAE-EM e atividade citotóxica, levando em consideração as frações com maiores rendimentos, foram selecionadas as frações ACE3-4, ACE-16 e ACE-17 para dar continuidade ao estudo químico da fração ACE3.

5.5.4 Fracionamento semi-preparativo de ACE3-4 por CLAE-UV

No fracionamento por CLAE-UV de ACE3-4 (60 mg) foram coletadas cinco subfrações nomeadas como: ACE3-4-1, ACE3-4-2, ACE3-4-3, ACE3-4-4, ACE3-4-5. O cromatograma pode ser observado na Figura 32. As subfrações obtidas foram secas em liofilizadores e os seus rendimentos foram calculados (Tabela 23).

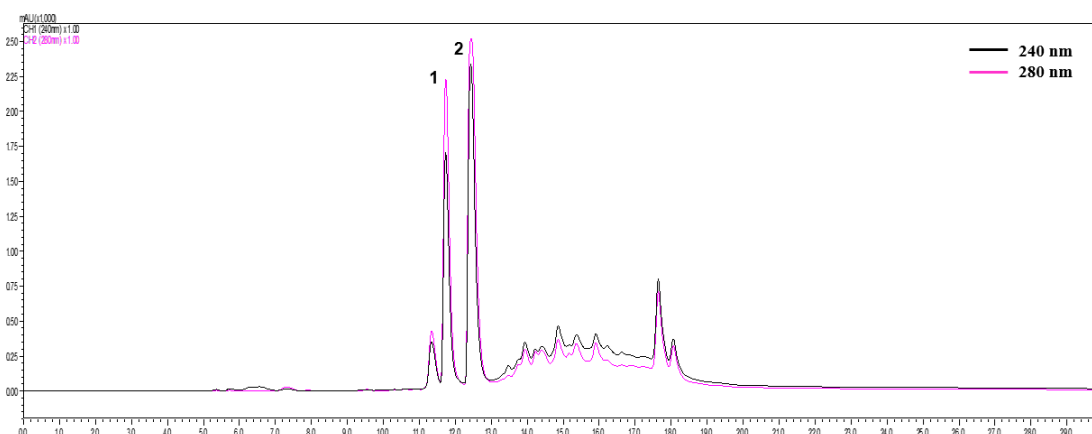


Figura 31. Cromatograma do fracionamento de ACE3-4 por CLAE-UV nos comprimentos de onda 240 nm (preto) e 280 nm (rosa) (1) substância 1 - ACE3-4-2, (2) substância 2 - ACE3-4-2.

Tabela 23. Rendimentos das subfrações obtidas do fracionamento por CLAE-UV de ACE3-4

Fração	Rendimento (mg)
ACE3-4-1	1,6
ACE3-4-2	4,8
ACE3-4-3	9,1
ACE3-4-4	1,6
ACE3-4-5	0,6

As subfrações foram analisadas por EM, RMN ^1H , ^{13}C e bidimensionais e foi possível identificar o isolamento das substâncias 1 e 2, posteriormente elas foram submetidas a teste de atividade citotóxica. O detalhamento da elucidação estrutural das duas substâncias pode ser consultado no item 5.5.8.1

5.5.5 Fracionamento semi-preparativo de ACE3-17 por CLAE-DAD

A figura 33 apresenta o cromatograma da separação semi-preparativa de ACE3-17 (50 mg), destacando os picos correspondentes as substâncias 3, 4 e 5 identificadas. Os rendimentos das 17 frações estão apresentados na tabela 24.

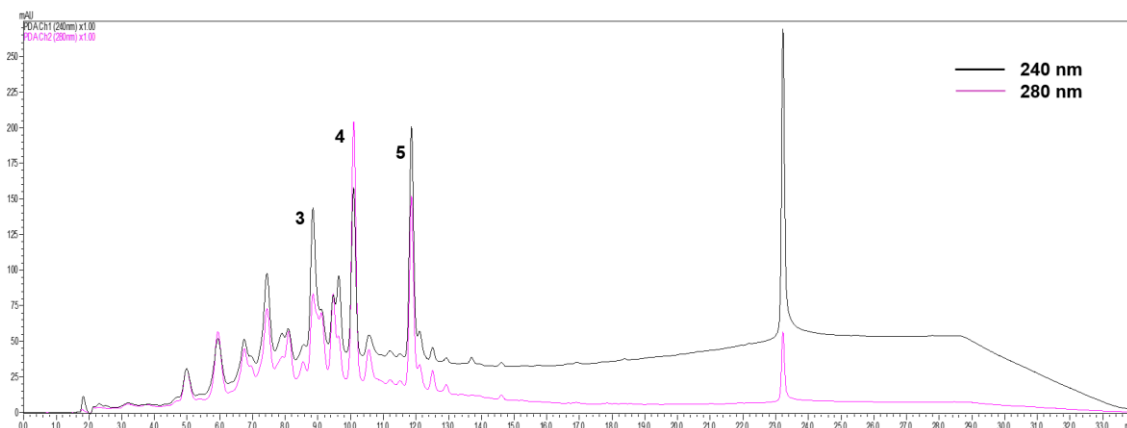


Figura 32. Perfil cromatográfico obtido no fracionamento de ACE3-17 por CLAE-DAD nos comprimentos de onda 240 nm (preto) e 280 nm (rosa) (**3**) substância 3 - ACE3-17-9, (**4**) substância 4 - ACE3-17-13, (**5**) substância 5 - ACE3-17-15.

Tabela 24. Rendimentos das subfrações obtidas do fracionamento por CLAE-UV de ACE3-17

Fração	Rendimento (mg)
ACE3-17-1	2,2
ACE3-17-2	2,7
ACE3-17-3	0,9
ACE3-17-4	1,1
ACE3-17-5	0,6
ACE3-17-6	3,7
ACE3-17-7	3,4
ACE3-17-8	1,7
ACE3-17-9	11,1
ACE3-17-10	2,7
ACE3-17-11	0,6
ACE3-17-12	0,6
ACE3-17-13	6,5
ACE3-17-14	1,9
ACE3-17-15	5,4
ACE3-17-16	0,9
ACE3-17-17	0,1

Após análise de espectrometria de massas as frações ACE3-17-9, ACE3-17-13 e ACE3-17-15, purificadas, foram encaminhadas para análise de RMN uni e bidimensional, através do qual foi possível identificar 3 substâncias.

5.5.6 Fracionamento de ACE3-16 por HPLCC

Após a avaliação em CCD (Figura 34) dos 10 sistemas listados na Tabela 7, observou-se que no sistema bifásico 6 (S6-EWat-1:1) a fração se concentrou na fase superior. A partir do sistema 12 (S12-HEMWat-1:3:1:3) observou-se que mancha amarela observada na CCD, visualizada na luz UV-366 nm, se distribuiu para a fase inferior e com o aumento da polaridade dos sistemas testados as manchas se distribuíram totalmente para a fase inferior, como pode-se observar para o sistema 24 (S24-HEMWat-5:1:5:1).

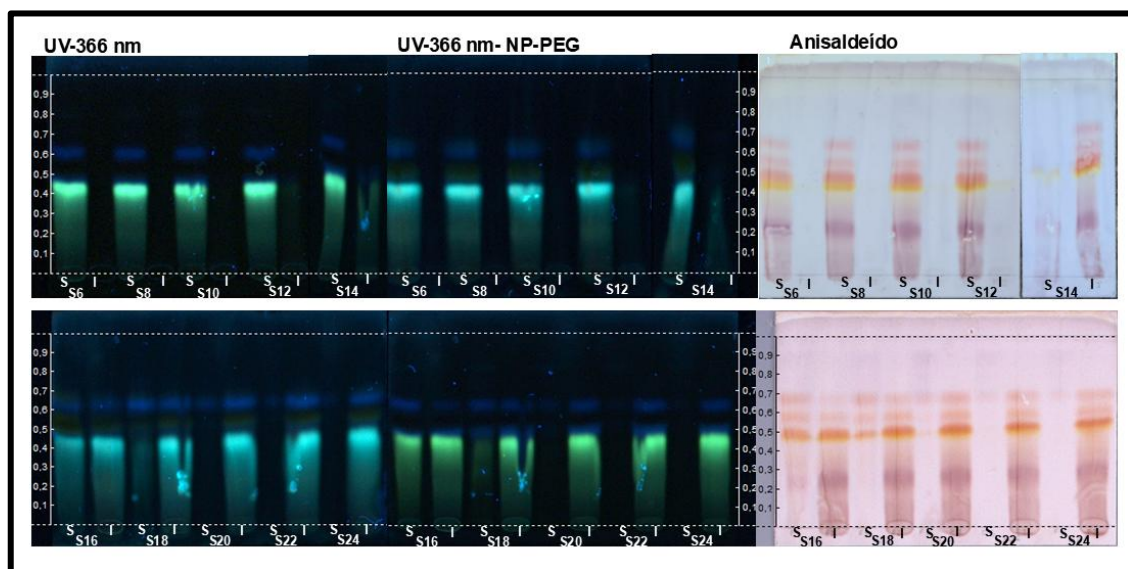


Figura 33. Testes de sistemas bifásicos com a fração ACE3-16. Eluente: Hexano:AcOEt:HCOOH-4:6:100 μ L. Volume de aplicação: 10 μ L

Após as observações destacadas, realizou-se o fracionamento de ACE3-16 em modo normal, além dos sistemas testados foram adicionados os sistemas 28 (HM-1:1) e 26 (HEMWat-9:1:9:1), tendo como fase estacionária a FI do sistema 28 e as FS dos sistemas 28 ao sistema 6 (Tabela 8) foram utilizadas como fases móveis.

A Figura 35 apresenta a CCD das 37 frações obtidas no fracionamento, assim como os degraus de eluição utilizados durante o fracionamento, para facilitar a visualização dos grupos de substâncias separados.

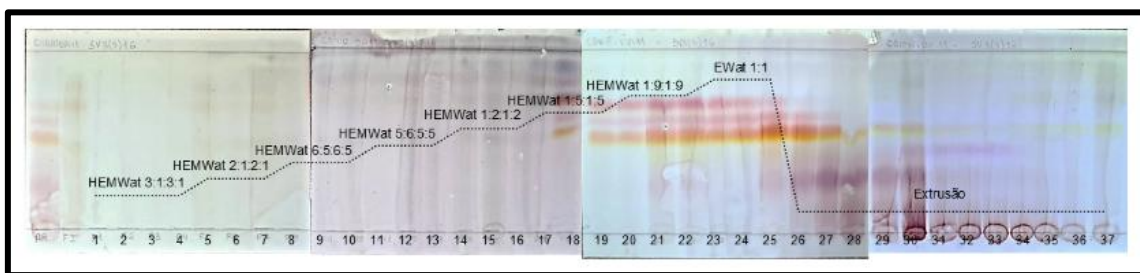


Figura 34. Placa cromatográfica das frações obtidas do fracionamento de ACE3-16. Eluente: Hexano: AcOEt: HCOOH-4:6:100 μ L; Revelador: anisaldeído. Volume de aplicação: 10 μ L; Concentração: 1 mg/mL.

A partir do sistema 10 (HEMWat 1:5:1:5) pode-se observar um maior número de manchas nas frações, o mesmo foi observado nas frações coletadas na extrusão, sendo estas as frações mais rendosas (Tabela 25). As frações (1-15) que eluíram antes do sistema 10 (HEMWat 1:5:1:5) apresentaram baixo rendimento corroborando com o que foi observado na análise de CCD, tendo em vista que estas apresentaram nenhuma ou poucas manchas. Assim, as frações foram unidas de acordo com o perfil observado na CCD, reduzindo o número de frações para 11 mais o AR.

Tabela 25. Rendimento da união das frações obtidas do fracionamento de ACE3-16 por HPLC

Fração	Rendimento (mg)
AR	32,4
FI	1,0
ACE3-16-1	2,3
ACE3-16-9	2,6
ACE3-16-12	2,1
ACE3-16-17	3,2
ACE3-16-18	94,6
ACE3-16-27	157,7
ACE3-16-30	12,8
ACE3-16-31	16,2
ACE3-16-34	5,3
ACE3-16-36	1,8

As frações ACE3-16-18 e ACE3-16-27 apresentaram os maiores rendimentos do fracionamento. Estas frações foram comparadas ao perfil da fração ACE3-17 com a finalidade de isolar maior quantidade das substâncias já isoladas nesta fração e rastrear os responsáveis pela atividade citotóxica detectada (Tabela 21).

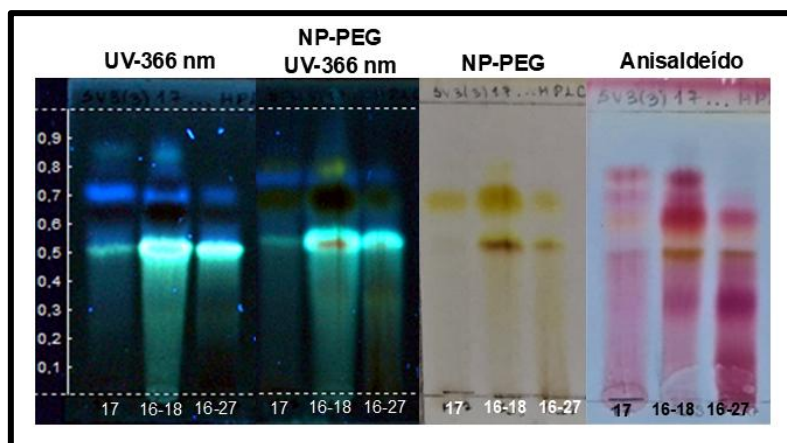


Figura 35. Placa cromatográfica comparativa das frações ACE3-17, ACE3-16-18, ACE-16-27. Eluente: Hexano: AcOEt: HCOOH-3:7:100 μ L;

As frações ACE3-17, ACE3-16-18 e ACE-16-27 apresentavam certa similaridade nas manchas observadas nas CCDs da Figura 36. No Rf 0,5 uma mancha fluorescente foi observada para as três frações nas placas visualizadas no UV 366 nm, já na CCD revelada com anisaldeído apresentou coloração marrom indicando a presença de flavonoides. As manchas localizadas no Rf 0,6 e 0,7 foram reveladas em todas as placas e frações com a mesma coloração. A análise de EM no modo negativo das três frações (Figura 37) mostrou a existência dos mesmos íons nos espectros com intensidades diferentes.

Os íons de m/z 255, m/z 299, m/z 301 e m/z 329 foram observados nos espectros de massas de todas as frações. Nas frações ACE3-17 e ACE3-16-18 foram constatadas as presenças dos seguintes íons em comum: m/z 269, m/z 283 e m/z 285. Segundo estudos realizados com outras plantas do gênero *Andira*, esses íons podem estar associados à existência de isoflavonas nas frações, como a biochanina A, genisteína, pratenseína e formononetina (Garcez et al., 2010; Garcia et al., 2018; Kraft et al., 2000, 2001). Embora vários íons foram comuns nas três frações, outros íons diferentes foram indicados, com isso optou-se por não unir as frações.

A fração ACE3-16-18 mostrou menor rendimento que a fração ACE3-16-27, no entanto foi fracionada por HPLC devido a maior semelhança com a fração ACE17, além disso apresentou um perfil químico de menor complexidade com menor quantidade de íons.

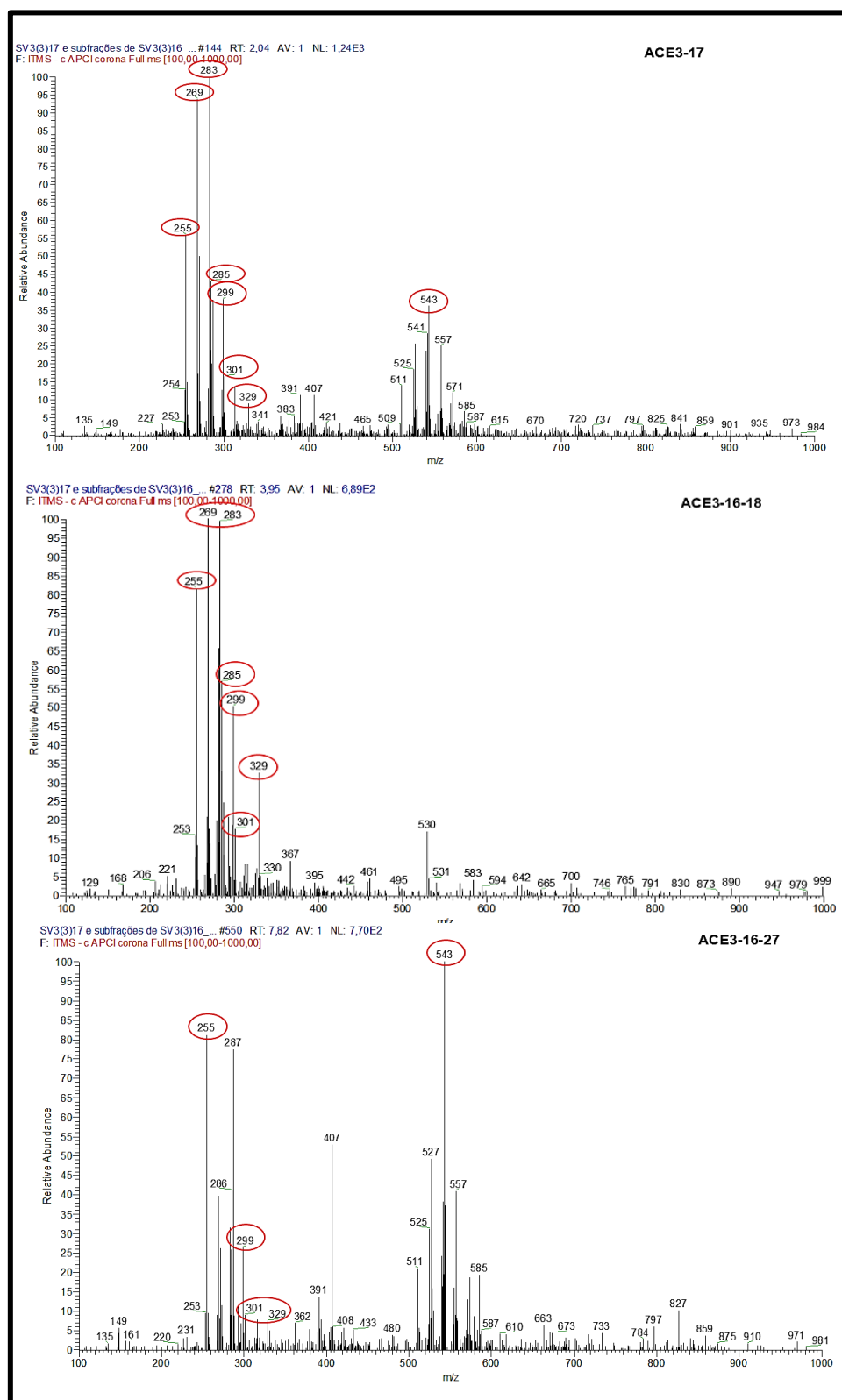


Figura 36. Espectros de EM full scan (modo negativo) das frações ACE3-16, ACE3-16-18 e ACE3-16-27

5.5.6.1 Fracionamento da subfração ACE3-16-18 por HPCCC

A Figura 38 evidencia a distribuição da fração entre os sistemas testados. No sistema 10 (S10-HEMWat 1:5:1:5) é possível observar que algumas manchas eluíram na fase inferior do sistema. No sistema 17 (HEMWat 1:1:1:1) houve uma distribuição de perfil cromatográfico semelhante nas suas duas fases, podendo estimar um $K_d=1$. Após as observações realizadas nos testes de sistemas optou-se por realizar um fracionamento de modo normal com todos os sistemas bifásicos 21 (HEMWat 5:2:5:2), 20 (HEMWat 2:1:2:1), 19 (HEMWat 3:2:3:2), 18 (HEMWat 6:5:6:5), 17 (HEMWat 1:1:1:1), 16 (HEMWat 5:6:5:6), 15 (HEMWat 2:3:2:3) e 14 (HEMWat 1:2:1:2) (Tabela 9), tendo como fase estacionária a FI do sistema 21 e as FS dos sistemas 21 (Tabela 9) foram utilizadas como fases móveis.

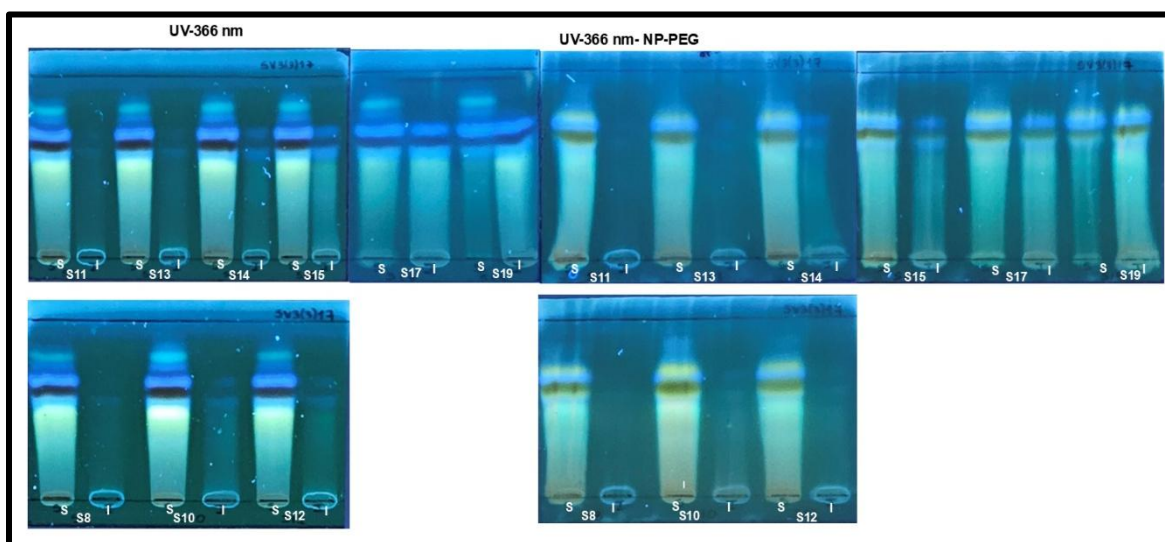


Figura 37. Testes de sistemas bifásicos com a fração ACE3-16-18. Eluente: Hexano:AcOEt:HCOOH-4:6:100 μ L. Volume de aplicação: 10 μ L

A Figura 39 apresenta a CCD das 56 frações obtidas no fracionamento, assim como os degraus de eluição utilizados durante o fracionamento, para facilitar a visualização dos grupos de substâncias separados.

A partir do sistema 17 (HEMWat 1:1:1:1) ao 14 (HEMWat 1:2:1:2) pode-se observar um maior número de manchas nas frações, sendo estas as frações mais rendosas. Nas frações 32 e 33 foram observadas manchas amarelas caracterizando a presença de flavonoides, assim como nas frações 41, 44 e 45. Fluorescências intensas de coloração verde água foram reveladas nas frações

42 e 43. As frações com perfil cromatográfico semelhante foram unidas, reduzindo o número de frações para 28 mais o AR (Figura 40 e Tabela 26).

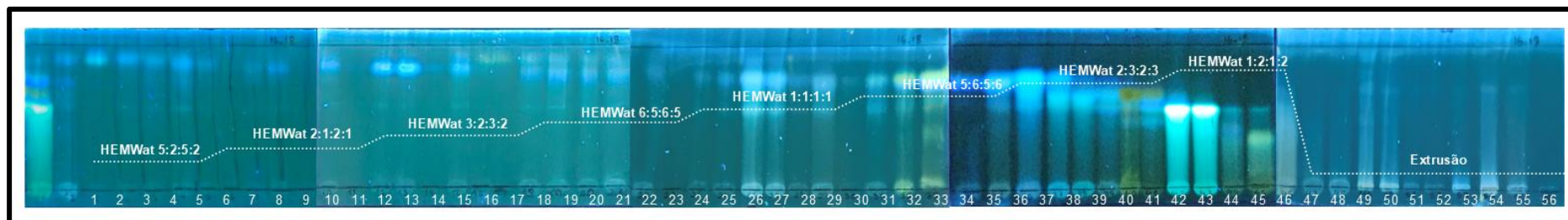


Figura 38. Placa cromatográficas das frações obtidas do fracionamento de ACE3-16-18. Eluente: Hexano: AcOEt: HCOOH-4:6:100 μ L; Revelador: Anisaldeído. Volume de aplicação: 10 μ L; Concentração: 1 mg/mL.

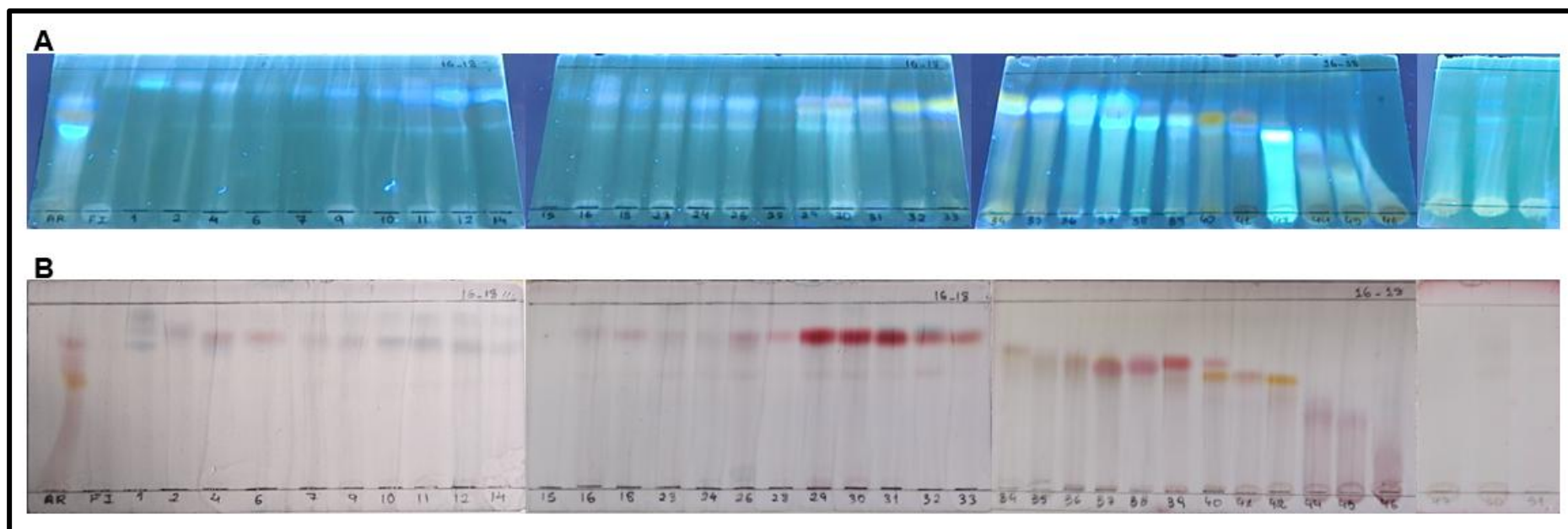


Figura 39. Placa cromatográficas da união frações obtidas do fracionamento de ACE3-16-18. Eluente: Hexano:AcOEt:HCOOH-4:6:100 μ L; Volume de aplicação: 10 μ L; Concentração: 1 mg/mL. (A) Revelador NP-PEG (UV-366 nm). (B) Revelador anisaldeído

Tabela 26. Rendimento da união das frações obtidas do fracionamento de ACE3-16-18 por HPCCC

Fração	Rendimento (mg)
AR	11,3
ACE3-16-18-1	2,3
ACE3-16-18-2	1,0
ACE3-16-18-6	0,7
ACE3-16-18-7	0,5
ACE3-16-18-9	0,4
ACE3-16-18-15	0,6
ACE3-16-18-18	1,2
ACE3-16-18-24	0,5
ACE3-16-18-26	0,3
ACE3-16-18-28	1,0
ACE3-16-18-31	0,6
ACE3-16-18-32	3,3
ACE3-16-18-33	2,1
ACE3-16-18-34	1,5
ACE3-16-18-35	0,7
ACE3-16-18-36	0,5
ACE3-16-18-37	1,1
ACE3-16-18-38	2,2
ACE3-16-18-39	2,5
ACE3-16-18-40	6,0
ACE3-16-18-41	8,1
ACE3-16-18-42	15,5
ACE3-16-18-44	7,3
ACE3-16-18-45	4,7
ACE3-16-18-46	2,0
ACE3-16-18-47	0,4
ACE3-16-18-50	0,7
ACE3-16-18-51	4,1

Dentre as 28 frações analisadas, pode-se destacar as frações ACE3-16-18-37 (substância 6), ACE3-16-18-38 (substância 6 + 7), ACE3-16-18-41 (substância 8) e ACE3-16-18-42 (substância 9) que foram analisados por espectrometria de massas e RMN e foram identificadas mais quatro substâncias em mistura. A atividade citotóxica das frações ACE3-16-18-41 e ACE3-16-18-42 foram avaliadas, as outras duas frações não foram avaliadas devido ao baixo rendimento.

5.5.7 Fracionamento por cromatografia contracorrente de alta performance (HPLCC) da fração ACA2 das cascas de *A. parviflora*

A Figura 41 o perfil cromatográfico por CCD das fases superiores e inferiores obtidas dos testes de sistemas com a fração ACA2. No sistema 12 (S12-HEMWat 1:3:1:3) a maioria das manchas concentram-se na fase superior e algumas manchas com Rf de 0,4 e 0,3 se distribuíram para o a fase inferior. A partir do sistema 16 (S16-HEMWat 5:6:5:6) as manchas se distribuirão das duas fases de forma assim como no sistema 18 (S18-HEMWat 6:5:6:5). Já no sistema 20 (S20-HEMWat 2:1:2:1) maior parte das manchas foram distribuídas para a fase inferior e poucas manchas continuaram somente na fase superior.

Após as observações destacadas, realizou-se o fracionamento de ACA2 em fase normal, além dos sistemas testados foram adicionados os sistemas 21 (HEMWat 5:2:5:2) e 10 (HEMWat 1:5:1:5), tendo como fase estacionária a FI do sistema 21 e as FS dos sistemas 21 ao sistema 10 (Tabela 11) foram utilizadas como fases móveis.

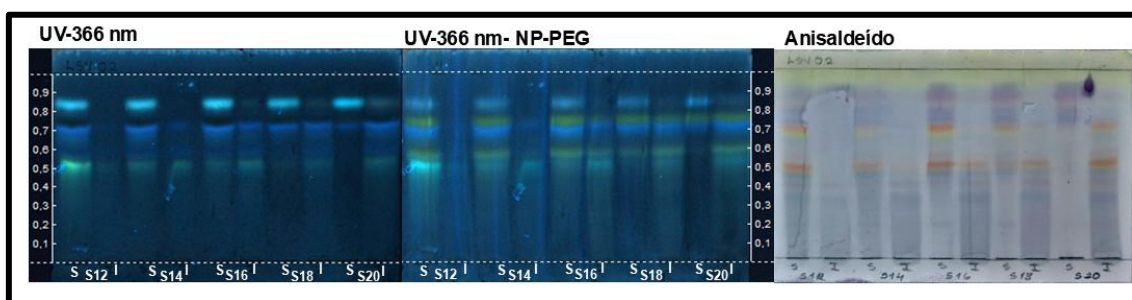


Figura 40. Testes de sistemas bifásicos de solventes com a fração ACA2. Eluente: Hexano:AcOEt: Á. fórmico: AcOH-3:7:10 μ L: 10 μ L

A Figura 42 mostra a CCD das 70 frações obtidas no fracionamento por HPLCC acompanhadas dos seus respectivos degraus de eluição, a fim de facilitar a visualização dos grupos de substâncias separados e associá-los aos sistemas de solventes bifásicos. A partir da CCD (Figura 42) pode-se observar uma excelente separação do fracionamento nas frações, pois na primeira fração referente ao sistema 21, mostrou manchas intensas. De acordo com a Tabela 27, a partir da fração 41 houve um aumento no rendimento das frações e nestas foram observadas manchas amarelas fluorescentes e intensas, características de flavonoides. As frações com perfil cromatográfico semelhante foram unidas, reduzindo o número de frações para 23 mais o AR (Tabela 27).

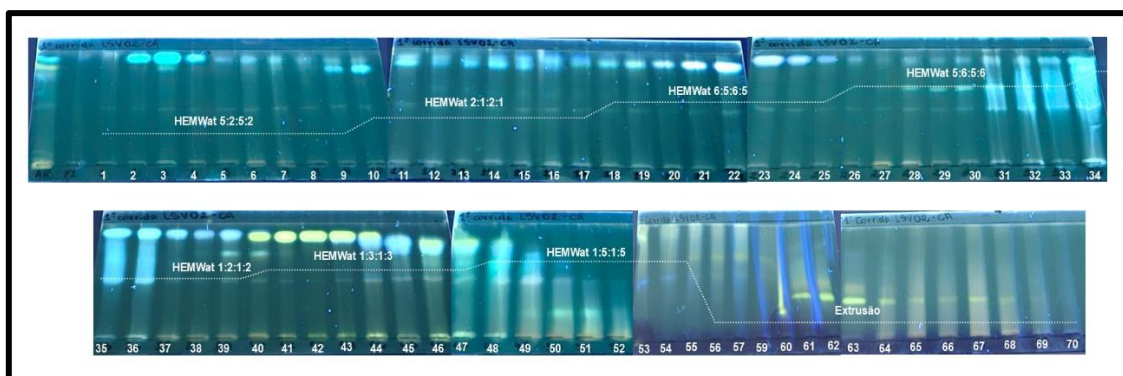


Figura 41. Placas cromatográficas das frações obtidas do fracionamento de ACA2. Eluente: Hexano:AcOEt:Ác.Fórmico:AcOH-3:7:10 μ L:10 μ L (para as frações AR-50); Eluente: AcOEt:Ác.Fórmico:AcOH:H₂O-97:11:11:29 (para as frações 53-70); Revelador: NP-PEG UV 366 nm; Volume de aplicação: 10 μ L; Concentração: 1 mg/mL.

Tabela 27. Rendimento da união das frações obtidas do fracionamento de ACA2 por HPLCC

Fração	Rendimento (mg)
AR	27,8
ACA2-1	3,4
ACA2-2	6,2
ACA2-3	3,0
ACA2-4	2,4
ACA2-5	2,4
ACA2-9	2,4
ACA2-15	1,9
ACA2-21	1,6
ACA2-29	0,5
ACA2-31	1,6
ACA2-37	1,2
ACA2-39	1,5
ACA2-41	12,3
ACA2-44	1,9
ACA2-46	12,8
ACA2-48	6,0
ACA2-49	4,2
ACA2-50	4,0
ACA2-51	7,6
ACA2-57	0,7
ACA2-59	9,4
ACA2-60	12,1
ACA2-64	35,6

Dentre as 23 frações analisadas, as frações que apresentaram maior rendimento foram direcionadas ao teste de atividade citotóxica frente a células tumorais (ACA2-41, ACA2-46, ACA2-59 e ACA2-64. A fração ACA2-41 (12,3)

após análise de EM e RMN foi identificada como substância **5**, já isolada no cerne da espécie (tópico 5.5.5).

5.5.8 Elucidação estrutural das substâncias isoladas do cerne de *A. parviflora*

5.5.8.1 Elucidação estrutural das substâncias **1** e **2**

A subfração ACE3-4-2 (4,8 mg) apresentou-se como um sólido amorfo branco. A elucidação estrutural foi baseada nas análises de EM, RMN de ^1H e ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC.

O espectro de RMN de ^1H da subfração ACE3-4-2 apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos entre δ 7,71 e 6,40, de hidrogênios metínicos, metilênicos e uma faixa de hidrogênios carbinólicos de açúcar entre δ 4,08 e 3,40 (Figura 42).

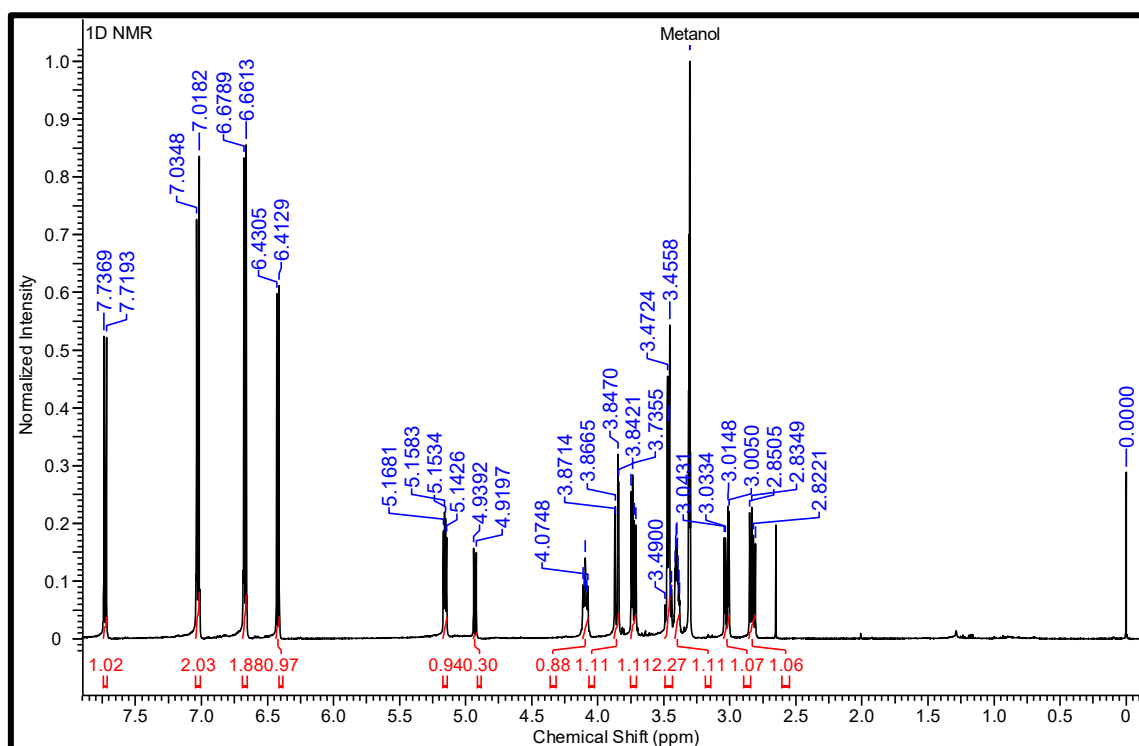


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de ACE3-4-2

A Figura 43 mostra ampliação do espectro de próton na região dos hidrogênios aromáticos com os seguintes sinais, δ 7,73 (1H, d), 6,42 (1H, d), δ 7,03 (2H, d), 6,67 (2H, d) e, atribuídos respectivamente a H-6', H-5' (anel aromático A), H-2 e H-6, H-3 e H-5 (anel aromático B) (Figura 44). As constantes de acoplamento associadas aos sinais de H-6 e H-2, H-5 e H-3, indicaram acoplamento em *orto* com $J=8,8$ Hz, além disso são sinais padrões de

hidrogênios homotópicos presentes no anel B com sistema AB. Observou-se também acoplamento de aproximadamente $J=8,8$ Hz indicando acoplamento em orto entre os hidrogênios H-5' e H-6'.

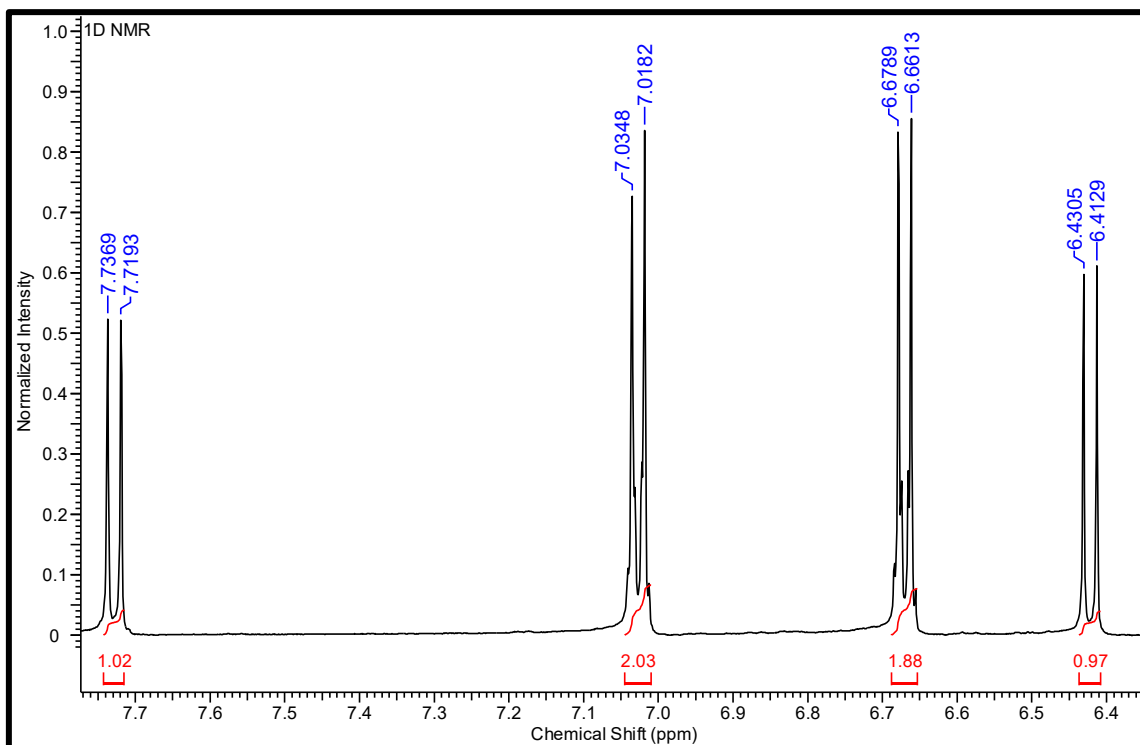


Figura 43. Ampliação na região de aromáticos (δ 7,73-6,41) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD)

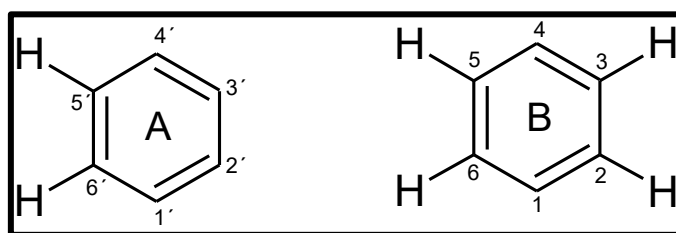


Figura 44. Anéis aromático A e B da molécula proposta com seus hidrogênios assinalados

A Figura 45 apresenta dois sinais de hidrogênio, sendo um duplo duplete com deslocamento em δ 5,15 (1H, $J=7,3$ e $4,9$ Hz) característico de um hidrogênio metínico próximo a um carbono carbinólico. Outro sinal é observado em δ 4,93 (1H, d, $J=9,8$ Hz) característico de hidrogênio anomérico (Agrawal, 1992), que foi atribuído a posição H-1'' o que confirma a presença um uma unidade de açúcar na molécula.

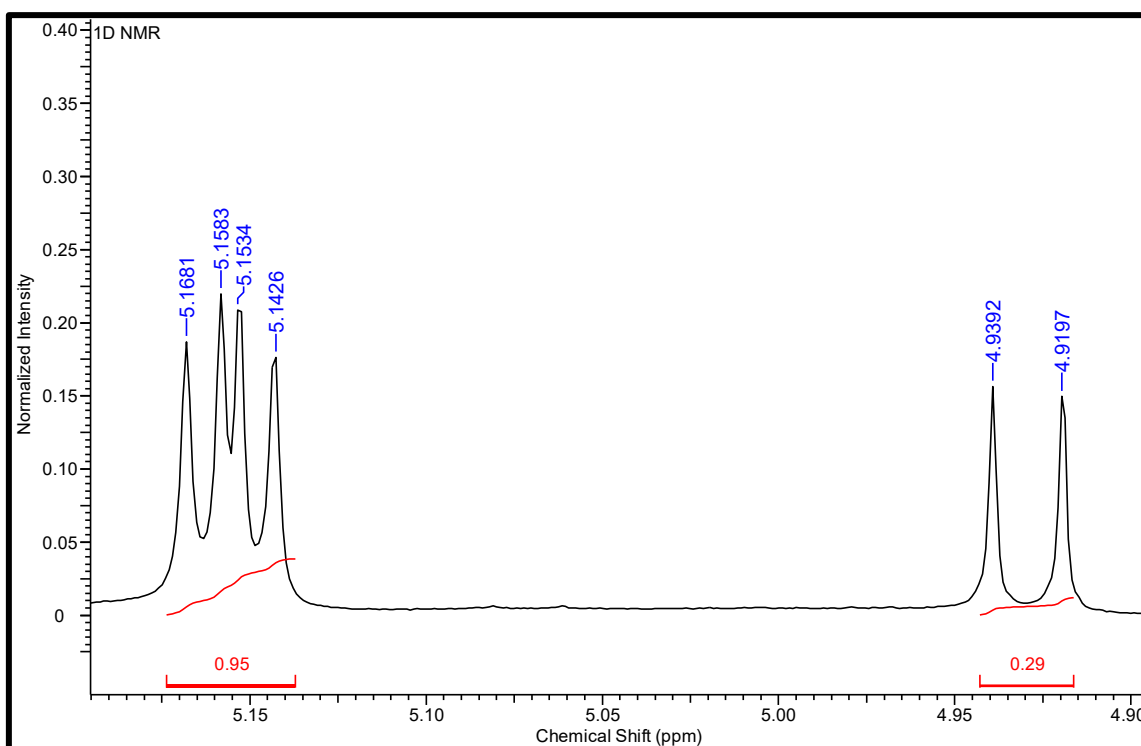


Figura 45. Ampliação (δ 5,16–4,92) do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD)

A Figura 46 mostra duas regiões de ampliações, de δ 4,11 ppm a δ 3,39 (46A) ppm e δ 3,04 ppm e δ 2,81 ppm (46B). A ampliação 46A mostra sinais típicos de hidrogênios metínicos de açúcar. O sinal em δ 4,09 foi identificado como triplo duplete com integração para um hidrogênio sendo possível calcular duas constantes de acoplamento $J=9,5$ Hz e $4,5$ Hz. Os duplos dupletos observados com deslocamento de δ 3,86 (1H, dd, $J=12,2$ e $2,4$ Hz) e δ 3,73 (1H, dd, $J=12,2$ e $5,4$ Hz) são característicos de metileno de açúcar e apresentaram acoplamentos típicos de correlações vicinais de geminais (Agrawal, 1992).

A ampliação 46B apresenta os sinais δ 3,02 (1H, dd, $J=14,2$ e $4,9$ Hz) e δ 2,85 (1H, dd, $J=14,2$ e $7,3$ Hz) com acoplamentos que evidenciaram a característica de hidrogênios metilênicos. Ambos demonstraram acoplamentos do tipo vicinal com o hidrogênio metínico em δ 5,15 e geminal ($J=14,2$ Hz). Com a comparação dos deslocamentos obtidos com dados da literatura, foi possível atribuir ao sinal em δ 5,15 a posição α ligado a um carbono carbinólico, apresentando acoplamentos vicinais com $J=7,3$ e $4,9$ Hz em relação hidrogênios β_a (δ 3,02) e β_b (δ 2,85) de um CH_2 (Shitamoto et al., 2010).

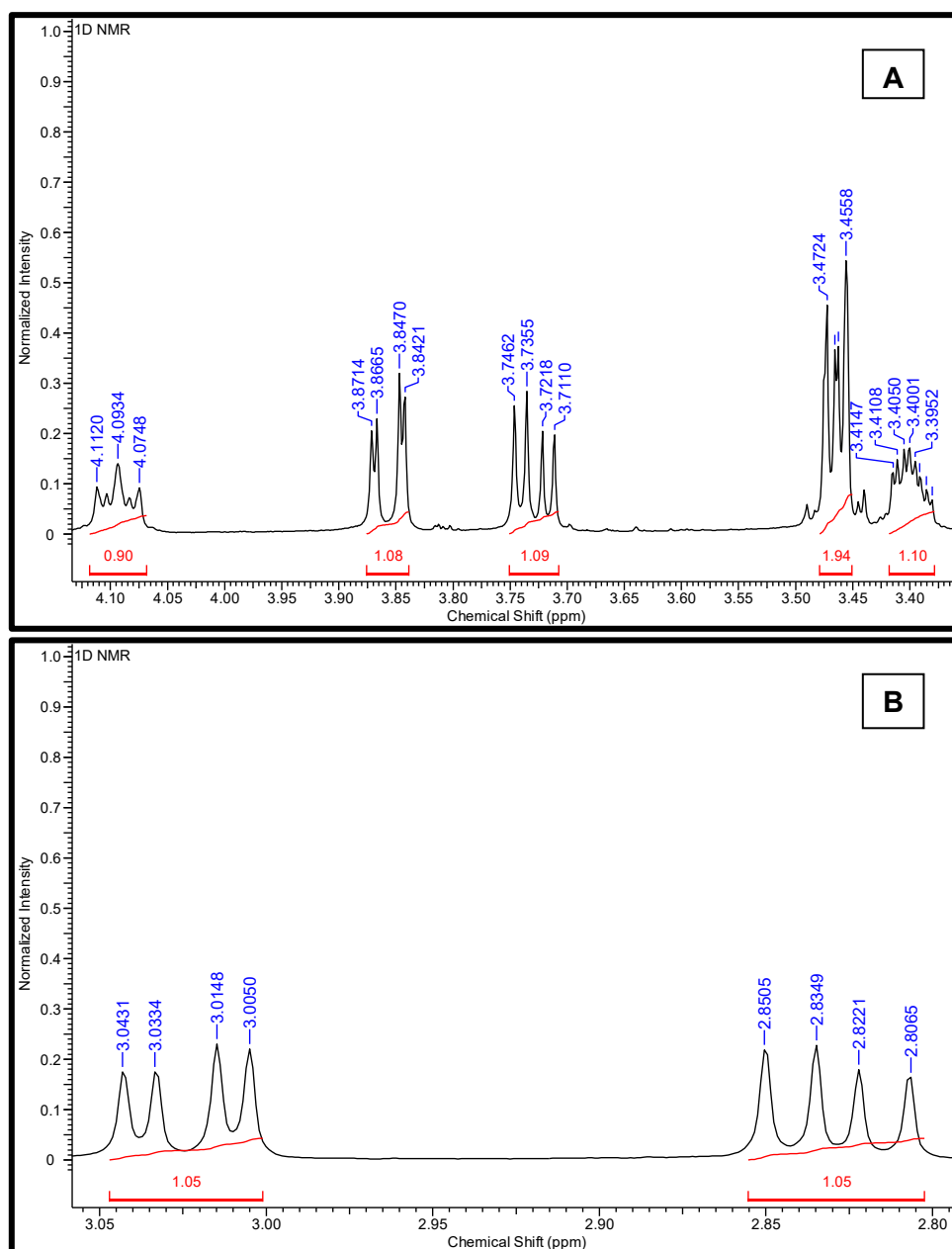


Figura 46. Ampliação da região de açúcar (A); Ampliação de sinais de hidrogênio metilênicos (B) do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OH) de ACE3-4-2

A partir do mapa de correlações COSY (Apêndice A) foi possível confirmar os acoplamentos entre os prótons de δ 7,73 e 6,42, δ 7,02 e 6,67, δ 5,16 e 3,02/2,83, δ 4,09 e 4,93/3,46, δ 3,86 e 3,73/3,40, δ 3,73 e 3,40, e δ 3,02 e 2,83.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 47) apresentou 18 sinais distribuídos nas regiões de aldeídos ou cetonas, aromáticos, carbonos metínicos e metilênicos (δ 205,7 a δ 42,2). Os sinais observados confirmaram a presença de um grupo carbonila em δ 205,7. Na região de aromáticos foram observados oito sinais sendo cinco destes carbonos quaternários, confirmados por meio do DEPT 135 (Figura 48). No intervalo entre δ 109,7 e δ 41,9 foram indicados os carbonos metínicos, anomérico e metilênicos da unidade de açúcar.

O sinal δ 205,7 foi atribuído ao carbono de uma cetona. Na região de aromáticos, foram observados cinco sinais com os seguintes deslocamentos: δ 165,8, δ 133,3, δ 112,9, δ 112,1, δ e δ 109,7 atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-4', C-6', C-3', C-1' e C-5' correspondentes ao anel A (Figura 47). Os outros quatro sinais de aromáticos com deslocamentos de δ 157,2, δ 131,7, δ 129,4 e δ 116,2 atribuídos aos carbonos C-4, C-6 e C-2, C-1, C-5 e C-3 respectivamente, correspondentes ao anel B.

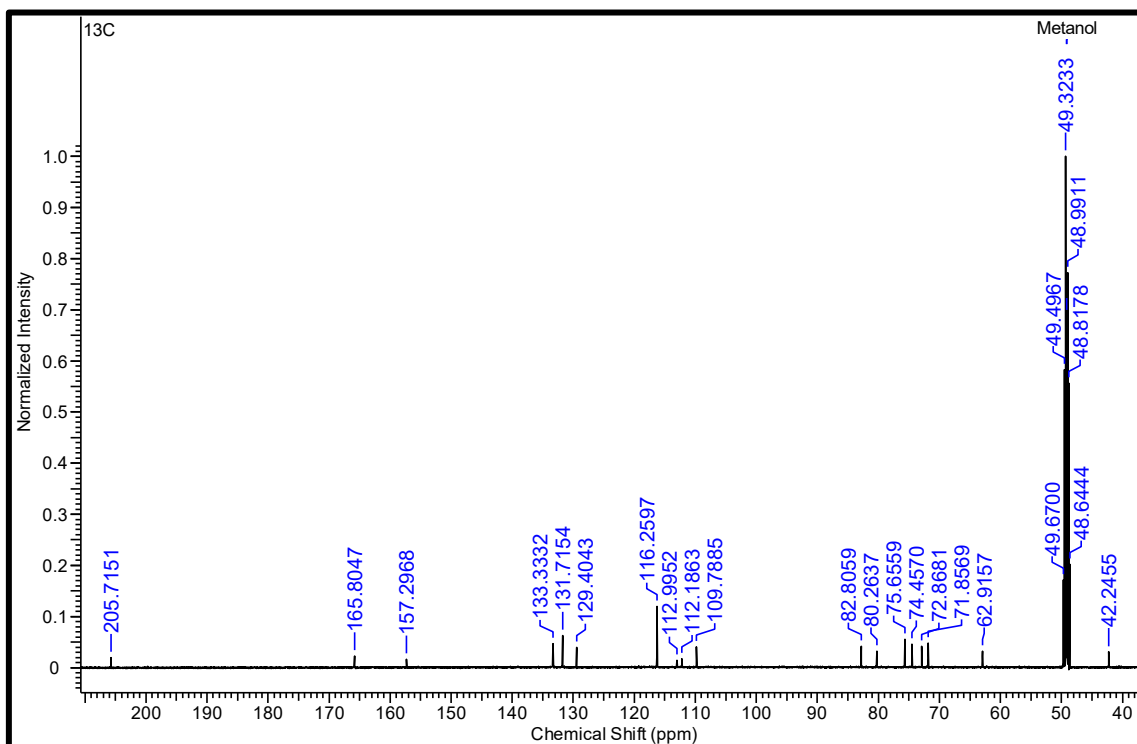


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de ACE3-4-2

A partir da análise do espectro de DEPT-135 (Figura 48) foi possível identificar dois carbonos metilênicos com deslocamento de δ 62,9 (C-6'') e δ 42,2 (C- β), além de confirmar a presença de carbonos metínicos, sendo um em δ 74,3 (C- α) próximo da carbonila da cetona e os outros sinais correspondentes

aos sinais de açúcar. Os dados foram todos listados na Tabela 27 e comparados com os dados da literatura compatíveis a molécula de coatlina A (substância 1).

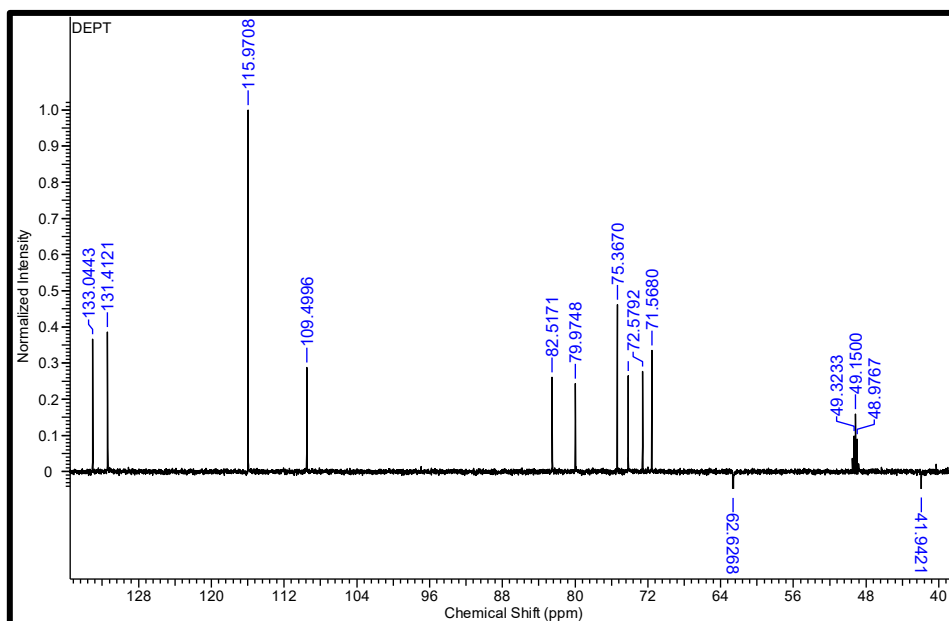


Figura 48. Espectro de DEPT-135 da subfração ACE3-4-2 (125 MHz, CD₃OH)

O mapa de correlações HSQC (heteronuclear single quantum correlation) da subfração ACE3-4-2 (Figura 49), orientou os assinalamentos de carbonos hidrogenados da molécula proposta.

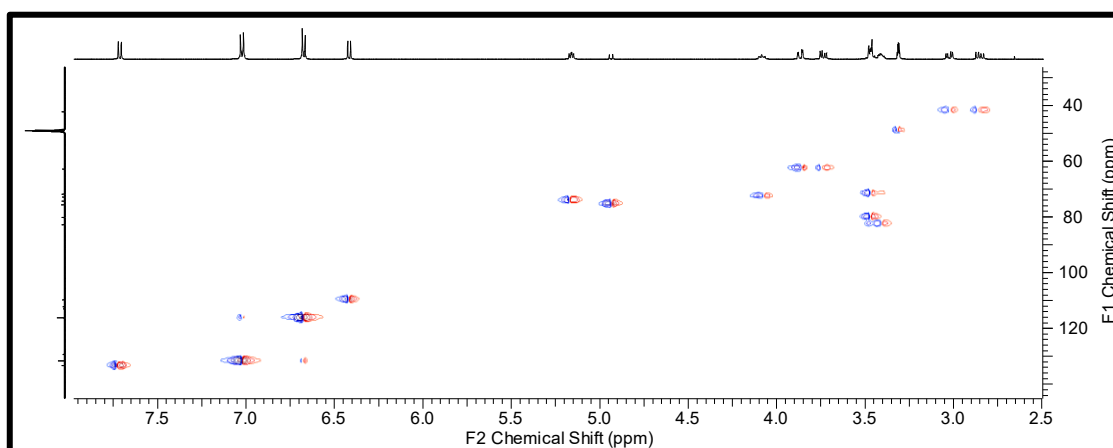


Figura 49. Mapa de correlação HSQC da subfração ACE3-4-2

A Figura 50 corresponde a ampliação do mapa de correlação HSQC na região dos aromáticos, onde é possível indicar os sinais dos hidrogênios homotópicos do anel B em 7,03 ppm (H-6, H-2) ligados aos carbonos C-6 e C-2 (δ 131,6) e em 6,67 ppm (H-5, H-3) ligados aos carbonos C-5 e C-3 (δ 116,2). Observa-se também destacado em azul os carbonos aromáticos do anel A.

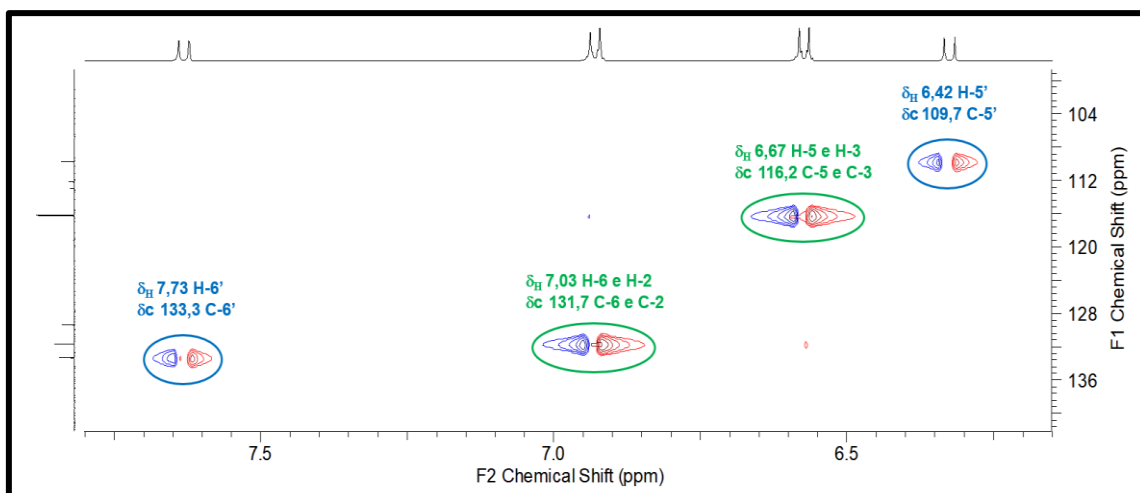


Figura 50. Ampliação do mapa de correlação HSQC na região de aromáticos

A ampliação abaixo (Figura 51), permitiu o assinalamento do carbono α (δ 74,4) ligado ao hidrogênio metínico α (δ 5,16) destacados em amarelo. O sinal em δ_H 4,93, correspondente ao carbono anomérico foi correlacionado ao sinal δ 75,6 (C-1'').

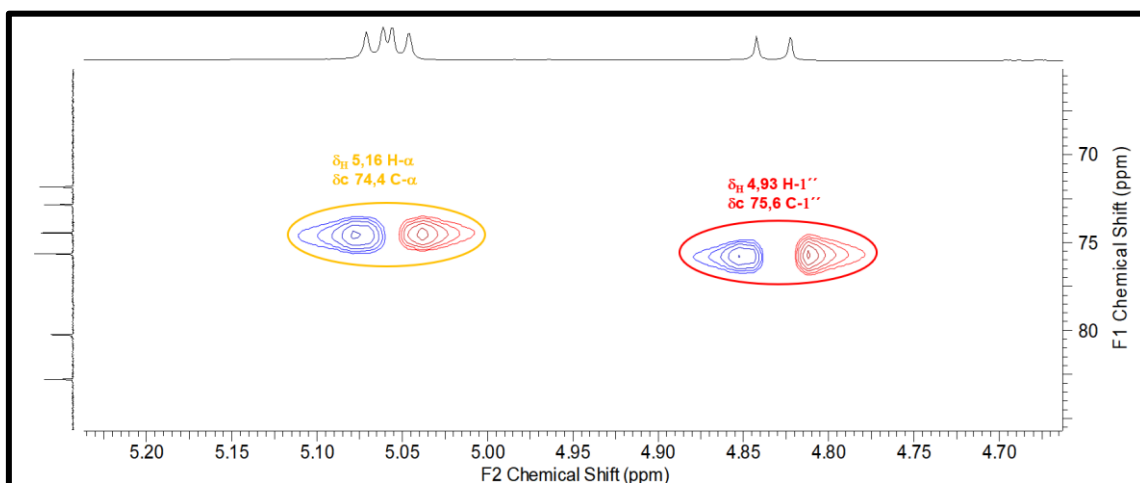


Figura 51. Ampliação do mapa de correlação HSQC na região de hidrogênios alfa carbinólicos e anomérico

Na Figura 52, observou-se o sinal em δ 3,40 (H-5'') que está correlacionado com o C-5'' (δ 82,8). Os hidrogênios H- β a (δ 3,02) e H- β b (δ 2,85) estão correlacionados ao mesmo carbono C- β (δ 42,2) correspondendo a um CH₂. As correlações obtidas no experimento HSQC corroboraram para a identificação da coatlina A. Vale ressaltar que na literatura não há relatos de dados de RMN bidimensionais, sendo este o primeiro relato.

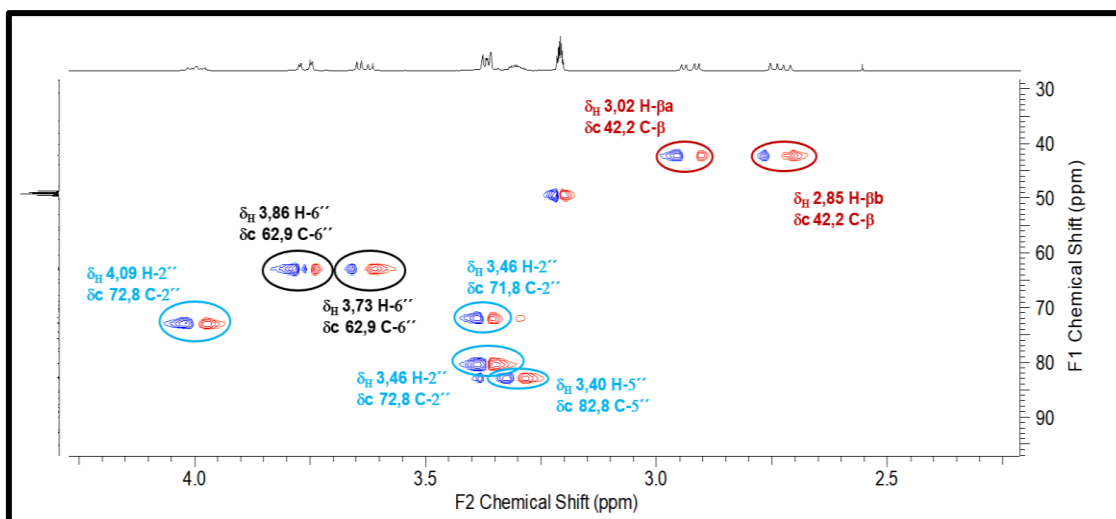


Figura 52. Ampliação do mapa de correlação HSQC na região de açúcar e metilênicos

A análise por HMBC forneceu informações acerca das correlações entre carbonos e hidrogênios a longa distância que podem ser observadas no mapa de correção na Figura 53 e na Tabela 27.

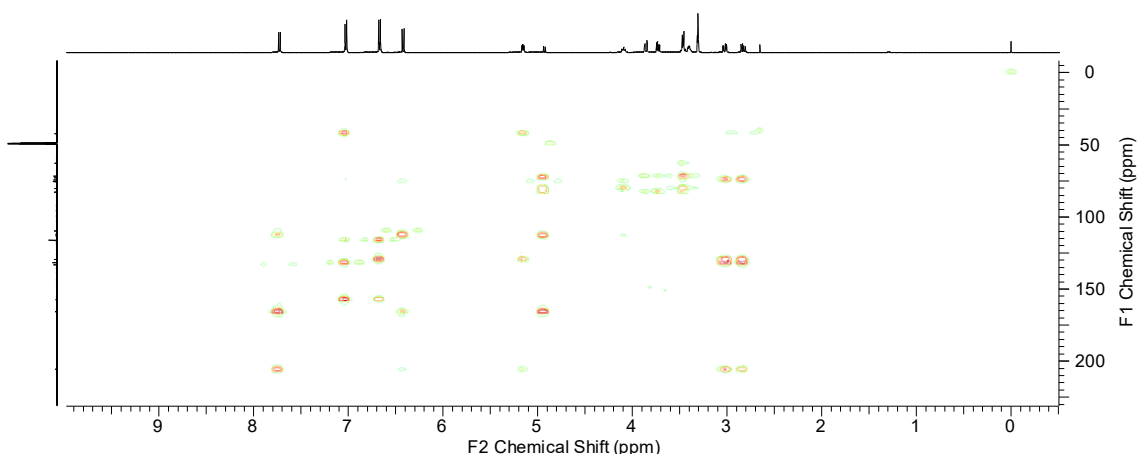


Figura 53. Mapa de correlação HMBC da subfração ACE3-4-2

De acordo com a Figura 54 os hidrogênios pertencentes ao anel A, H-6' e H-5' correlaciona com os carbonos carbinólico ($\text{C}=\text{O}$), C-4' e C-1', já o H-5' correlaciona também com os carbonos C-3' e C-1''. Quanto ao anel aromático B as correlações para os hidrogênios H-6 e H-2 são iguais pois estão em uma parte da molécula que apresenta simetria, o mesmo ocorre com os hidrogênios H-5 e H-3.

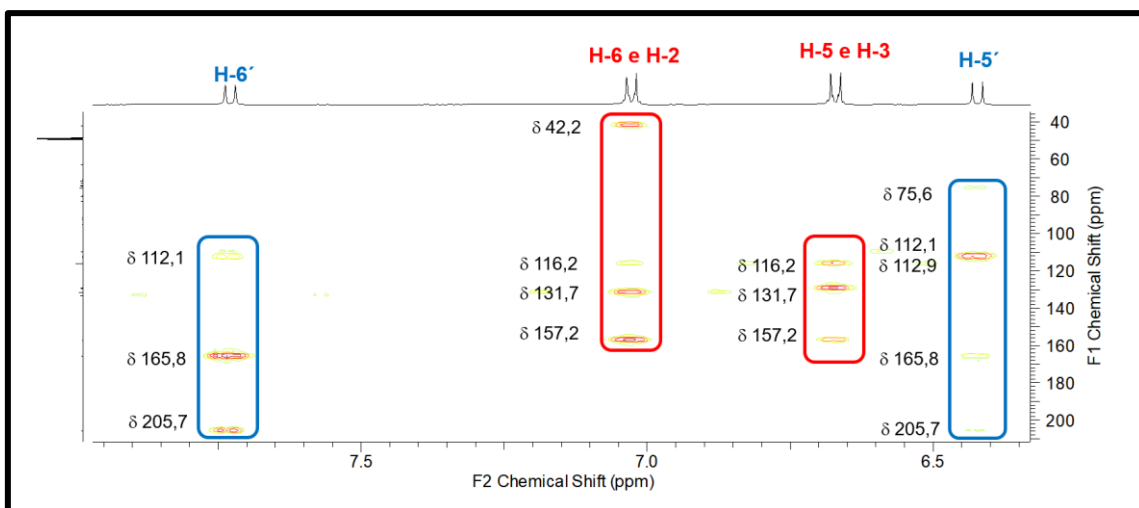


Figura 54. Ampliação do mapa de correlação de HMBC na região de aromáticos

Na ampliação de campo baixo (figura 55), foram fornecidas as seguintes informações: os hidrogênios H- β a e H- β b correlacionaram com os carbonos C=O, C-2 e 6; C-1 e C- α .

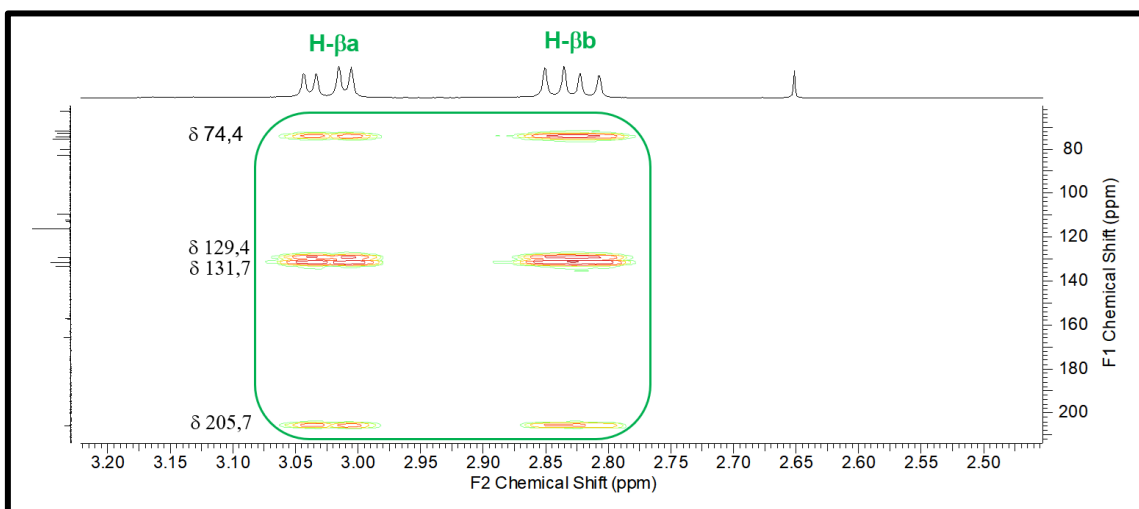


Figura 55. Ampliação do mapa de correlação HMBC da subfração ACE3-4-2

As ampliações da figura 56A fornece as correlações do hidrogênio metínico α com os carbonos: C=O, C-1' e C- β , bem como as correlações do hidrogênio anomérico com os carbonos: C-4', C-3', C-5'', C-3'' e C-2''. Na ampliação 56B pode-se destacar as correlações dos hidrogênios metilênicos (H-6''a, H-6''b) confirmando os assinamento. Pode-se observar também uma região com muita sobreposição de sinais correspondendo as outras correlações dos demais hidrogênios do açúcar. As principais atribuições e correlações do HMBC da coatlina A pode-se observar na figura 57.

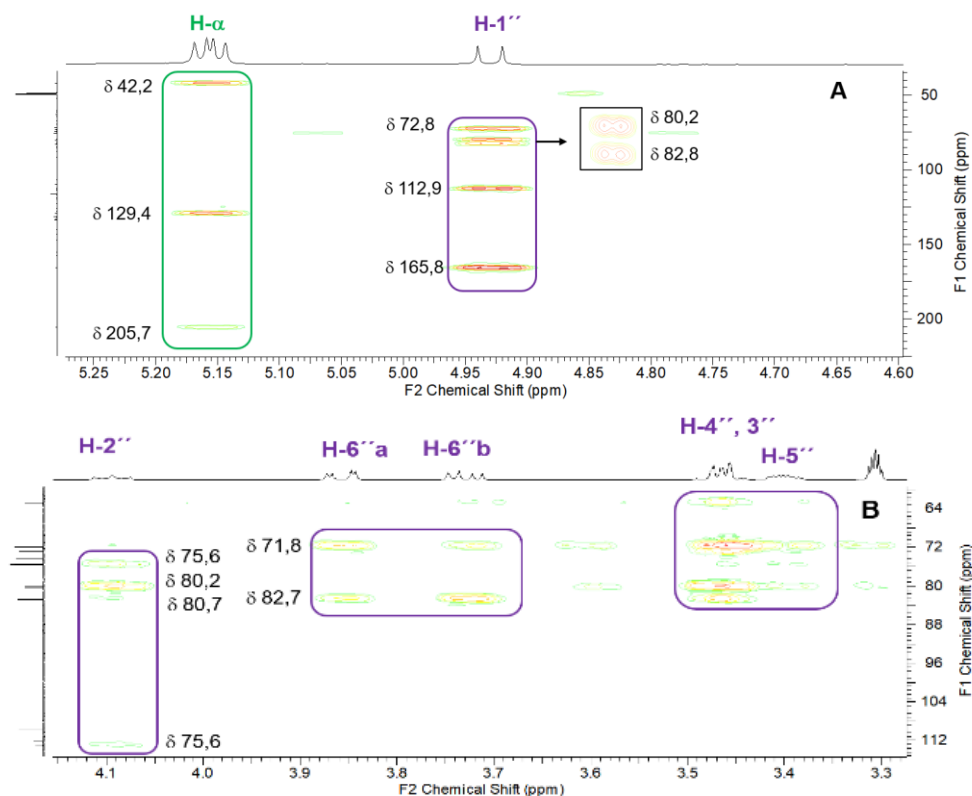


Figura 56. Ampliações do mapa de correlação HMBC da subfração ACE3-4-2.

Legenda: A-Região de metínicos e anomérico; B-região de açúcar

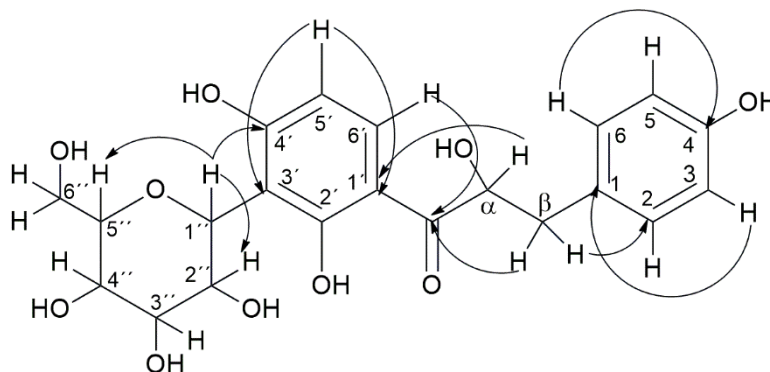


Figura 57. Correlações obtidas do HMBC observadas na substância 1

A análise de espectrometria de massas no modo negativo, indicou o íon molecular m/z 435 com maior intensidade do espectro em *full-scan* (Figura 58A), resultando em uma molécula com peso molecular de 436 Da.

A fragmentação do íon molecular gerou o pico base de m/z 315 (100%) indicando a perda de 120 Da, assim como o fragmento m/z 345 (38%) equivalente a perda de 90 Da. Os fragmentos até então observados podem ser correspondentes a clivagens de anel cruzado de uma unidade de açúcar em relação ao íon molecular, típicos de flavonoides C-glicosilados, caracterizando

assim a presença de açúcar na molécula (Karar; Kuhnert, 2016). Outro fragmento observado foi de m/z 417 (10%) indicando a perda de 18 Da equivalente a perda de água (Figura 58B).

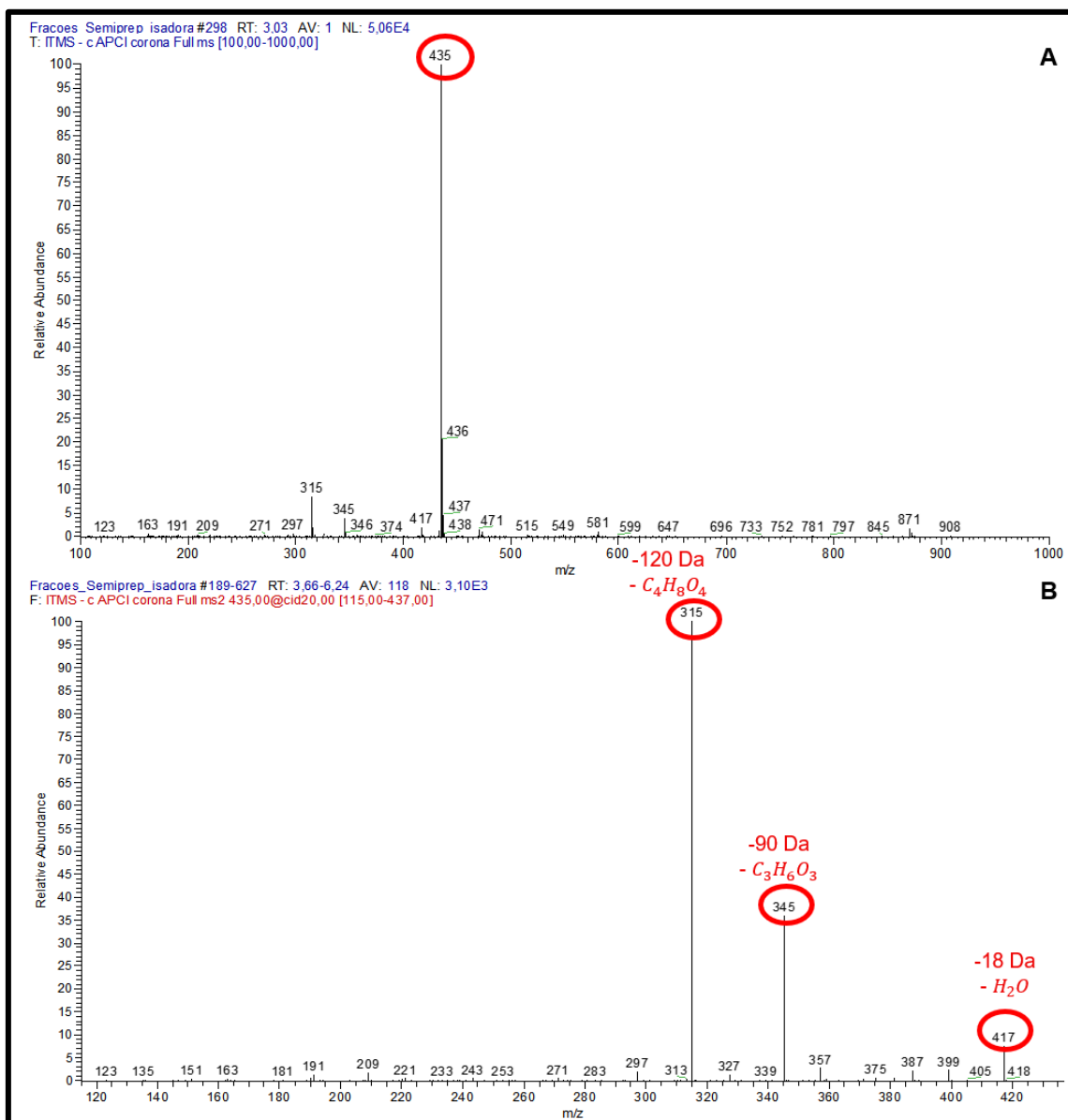


Figura 58. Espectro de massas de full scan (modo negativo) da subfração ACE3-4-2 (A) Espectro de fragmentação do íon de m/z 435 (B)

Os resultados obtidos apontaram para a identificação da **coatlina A**, porém foi constatado que a molécula possui estereocentros podendo ocorrer a formação de enantiômeros. Genta-Jouve *et al* (2013) determinou previamente a configuração para essa molécula por dicroísmo circular ($[\alpha]_D$ -43 (MeOH, c 0,20), correspondendo ao valor de $[\alpha]_D$ -38,89° (MeOH, 0,25 g/100 mL) obtido na análise no polarímetro (Anton Paar-MPC 300) que indica a configuração S da coatlina A.

Em relação a subfração ACE3-4-3, os espectros de RMN foram analisados e pode-se observar os mesmos deslocamentos químicos da coatlina A, como apresentado na figura 59 a comparação dos espectros de ^1H . Como evidenciado anteriormente a molécula apresenta isômeros, e esta segunda substância corresponde ao isômero da coatlina A. A análise realizada em polarímetro confirmou a identificação do epímero *R* com $[\alpha]_D +77,42^\circ$ (0,25 g/100 mL), correspondente ao da α -*epi*-coatlina A (**substância 2**) (Genta-Jouve et al., 2013; Shitamoto et al., 2010).

Os dados de RMN dos epímeros podem ser observados na tabela 28 e os demais espectros da **substância 2** estão no Apêndice B e C.

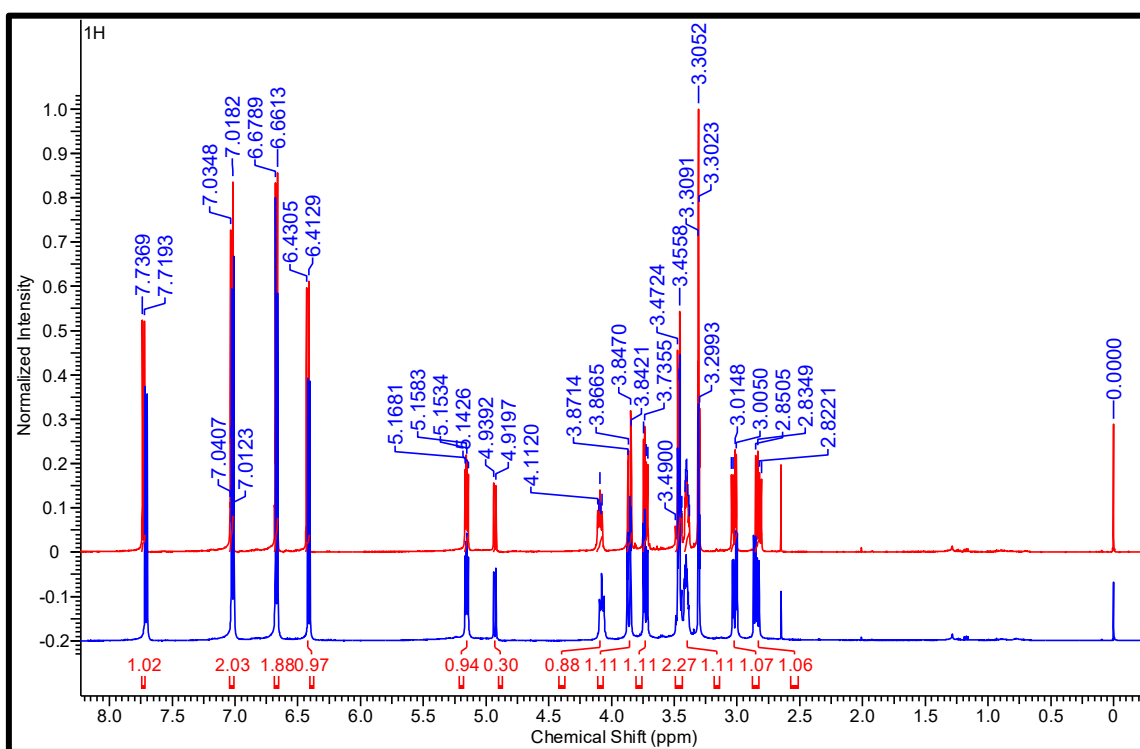


Figura 59. Sobreposição dos espectros da subfração **substância 1** (vermelho) e **substância 2** (azul)

Tabela 28. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos isômeros coatlina A and α -*epi*-coatlina A

Posição	coatlina A Substância 1		α - <i>epi</i> -coatlina A Substância 2		Shitamoto (2010)*	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^a	^1H δ (mult., J em Hz)	^{13}C (δ)
1	-	129,4	-	129,3	-	129,3
2	7,03 d (8,8)	131,7	7,02 d (8,8)	131,6	7,01 d (8)	131,6
3	6,67 d (8,8)	116,2	6,67 d (8,8)	116,2	6,67 d (8)	116,2
4	-	157,2	-	157,2		157,2
5	6,67 d (8,8)	116,2	6,67 d (8,8)	116,2	6,67 d (8)	116,2
6	7,03 d (8,8)	131,7	7,02 d (8,8)	131,6	7,01 d (8)	131,6
α	5,15 dd (7,3 e 4,9)	74,4	5,15 dd (7,6 e 5,1)	74,3	5,17 dd (7 e 5)	74,4
β a	3,02 dd (14,2 e 4,9)	42,2	3,02 dd (13,9 e 5,1)	42,2	3,04 dd (14 e 5)	42,2
β b	2,85 dd (14,2 e 7,3)		2,85 dd (13,9 e 7,6)		2,86 dd (14 e 7)	
C=O	-	205,7	-	205,6	-	205,7
1'	-	112,1	-	112,1	-	112,2
2'	-	165,8	-	165,7	-	165,4
3'	-	112,9	-	112,9	-	112,9
4'	-	165,8	-	165,7	-	165,6
5'	6,42 d (8,8)	109,7	6,41 d (8,8)	109,7	6,41 d (9)	109,7
6'	7,73 d (8,8)	133,3	7,71 d (8,8)	133,3	7,71 d (9)	133,2
1''	4,93 d (9,8)	75,6	4,93 d (9,8)	75,6	4,94 d (10)	75,6
2''	4,09 dt (9,5 e 4,5)	72,8	4,08 dt (9,3 e 4,6)	72,8	4,05 dd (10 e 10)	72,9
3''	3,46 m	80,2	3,46 m	80,2	3,48 dd (10 e 10)	80,2
4''	3,46 m	71,8	3,46 m	71,8	3,49 dd (10 e 10)	71,8
5''	3,40 m	82,8	3,40 m	82,7	3,42 m	82,7
6''a	3,86 dd (12,2 e 2,4)	62,9	3,86 dd (12 e 2,2)	62,9	3,86 dd (12 e 2)	62,8
6''b	3,73 dd (12,2 e 5,4)		3,73 dd (12,2 e 5,4)		3,74 dd (12 e 5)	

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CD_3OD , tendo o TMS como padrão interno.

O isolamento dos dois epímeros é inédito na espécie *A. parviflora*, no entanto foram isolados da madeira de *A. coriacea* pertencente ao mesmo gênero, conhecida por sua atividade antifúngica (Genta-Jouve et al., 2013). A α -*epi*-a-coatlina A já foi isolada em outras espécies da família Fabaceae, como no cerne de *Pterocapus marsupium* e nas folhas de *Crotalaria zanzibarica* (Achari et al., 2012; Shitamoto et al., 2010). Já o epímero coatlina A foi relatado na madeira de *Eysenhardtia polystachya* (Beltrami et al., 1980).

A literatura relata atividades biológicas diferentes para cada isômero. Anraku e colaboradores (2018) testaram os dois isômeros em relação à inibição

da metaloprotease da matriz (MMP-1) em fibroblastos gengivais humanos com o objetivo de avaliar se as substâncias isoladas de *P. marsupium* (“árvore escova de dente”) tem a capacidade de prevenir o mal hálito. Os resultados apontaram que a coatlina A não apresentou atividade e a α -epi-coatlina A mostrou atividade moderada, indicando que a configuração *R* influencia na supressão da MMP-1.

De acordo com Chakraborty *et al* (2014), a α -epi-coatlina A apresenta potencial antiinflamatório, sendo uma substância promissora para desenvolver tratamentos contra distúrbios inflamatórios. Apesar de poucos relatos das propriedades farmacológicas da coatlina A, a substância possui quatro depósitos de patentes relacionados ao uso como inibidor de micro-RNAs para o uso na prevenção ou atenuação do envelhecimento da pele, conforme a base de dados PubChem.

5.5.8.2 Elucidação estrutural da substância 3

A subfração **ACE3-17-9** (11,1 mg) apresentou-se como um pó amarelo-pálido. As CCDs (Figura 60) da fração apresentaram uma mancha com R_f 0,67. Na placa observada na luz UV ($\lambda=366$ nm) a mancha apresentou uma cor escura sem fluorescência, e uma mancha amarela na placa revelada com NP-PEG, sendo indicativo para a presença chalconas e flavonoides (Scheidemann; Wetzel, 1997; Wagner; Bladt, 1996).

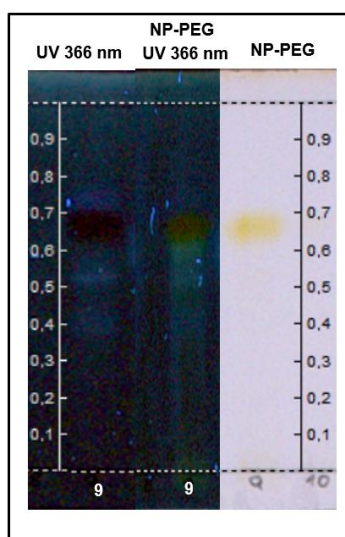


Figura 60. CCDs da fração LSV3(3)17_9 eluídas em diferentes reveladores. Legenda: Eluente: Hexano: AcOEt: HCOOH-3:7 100 μ L; Volume de aplicação: 5 μ L; Concentração: 1 mg/mL.

A elucidação estrutural foi baseada nas análises de EM, RMN de ^1H e ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H da subfração ACE3-17-

9 (Figura 61) apresentou sinais característicos de hidrogênios aromáticos em δ 7,97 (1H, d, $J=8,8$ Hz), δ 6,41 (1H, dd, $J=8,8$ e 2,4 Hz), δ 6,29 (1H, d, $J=2,4$ Hz), com constantes de acoplamento características de acoplamentos do tipo *orto* e *meta*, correspondendo a um sistema trissubstituído dioxigenado. Estes sinais foram atribuídos respectivamente aos prótons H-6', H-5' e H-3', correspondentes a um anel aromático A.

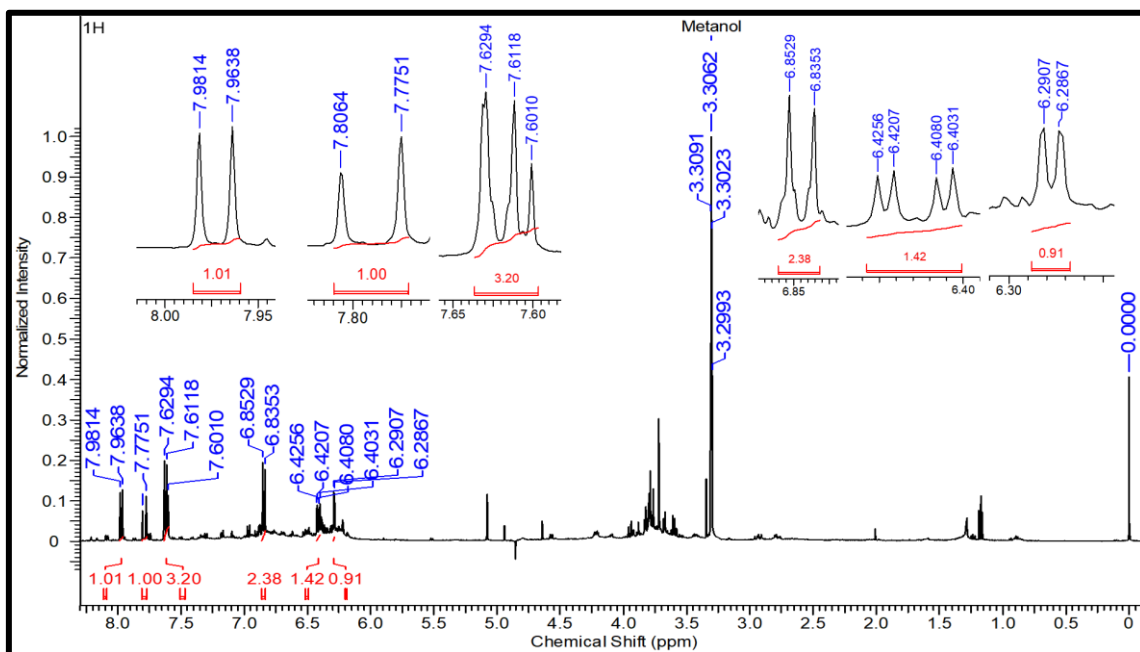


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H e ampliações (500 MHz, CD_3OD , tendo o TMS como padrão interno) de ACE3-17-9 (substância 4).

Outros sinais foram observados em δ 7,62 (H-2/6 d, $J=8,8$ Hz) e δ 6,84 (H-3/5, d, $J=8,8$ Hz), que apresentaram acoplamentos de spin AA'BB', atribuídos a quatro prótons de um anel B (Pu; Wang; Zhou, 2015). Sinais característicos de hidrogênios oleofínicos α , β -insaturados, com deslocamento químico em δ 7,61 (1H, d, $J=15,1$ Hz) e δ 7,79 (1H, d, $J=15,3$ Hz), os acoplamentos indicam uma configuração *E*. A partir do mapa de correlações COSY (Apêndice D) foi possível confirmar os acoplamentos entre os prótons de δ 7,97 e 6,41, δ 7,79 e 7,61, e δ 7,62 e 6,84. De acordo com a literatura esses dados apontam para um esqueleto de uma chalcona (**substância 3**), que pode ser observado a seguir (Figura 62):

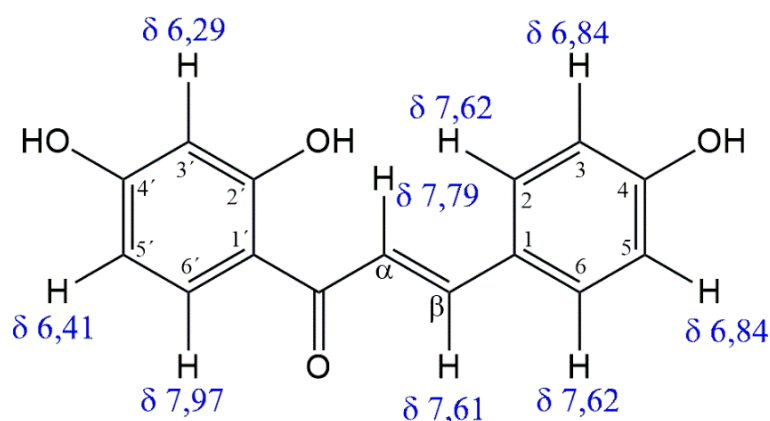


Figura 62. Estrutura da chalcona proposta com os deslocamentos químicos de hidrogênio

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 63a) apresentou doze sinais distribuídos nas regiões de carbonos de anéis aromáticos, carbonos alifáticos de alcenos (δ 167,6 a δ 103,9) (Pavia et al., 2015; Silverstein; Webster; Kiemle, 2005). A partir da análise do espectro de DEPT 135 (Figura 63b), foi comprovado que cinco sinais observados na região de aromáticos são correspondentes a carbonos hidrogenados (δ 133,5; δ 131,9; δ 117,0; δ 109,2 e δ 103,9) e outros cinco sinais de carbonos quaternários (δ 167,6; δ 166,5; δ 161,7 e δ 128,9). Os sinais em δ 145,8 e δ 118,5 foram associados a carbonos alifáticos.

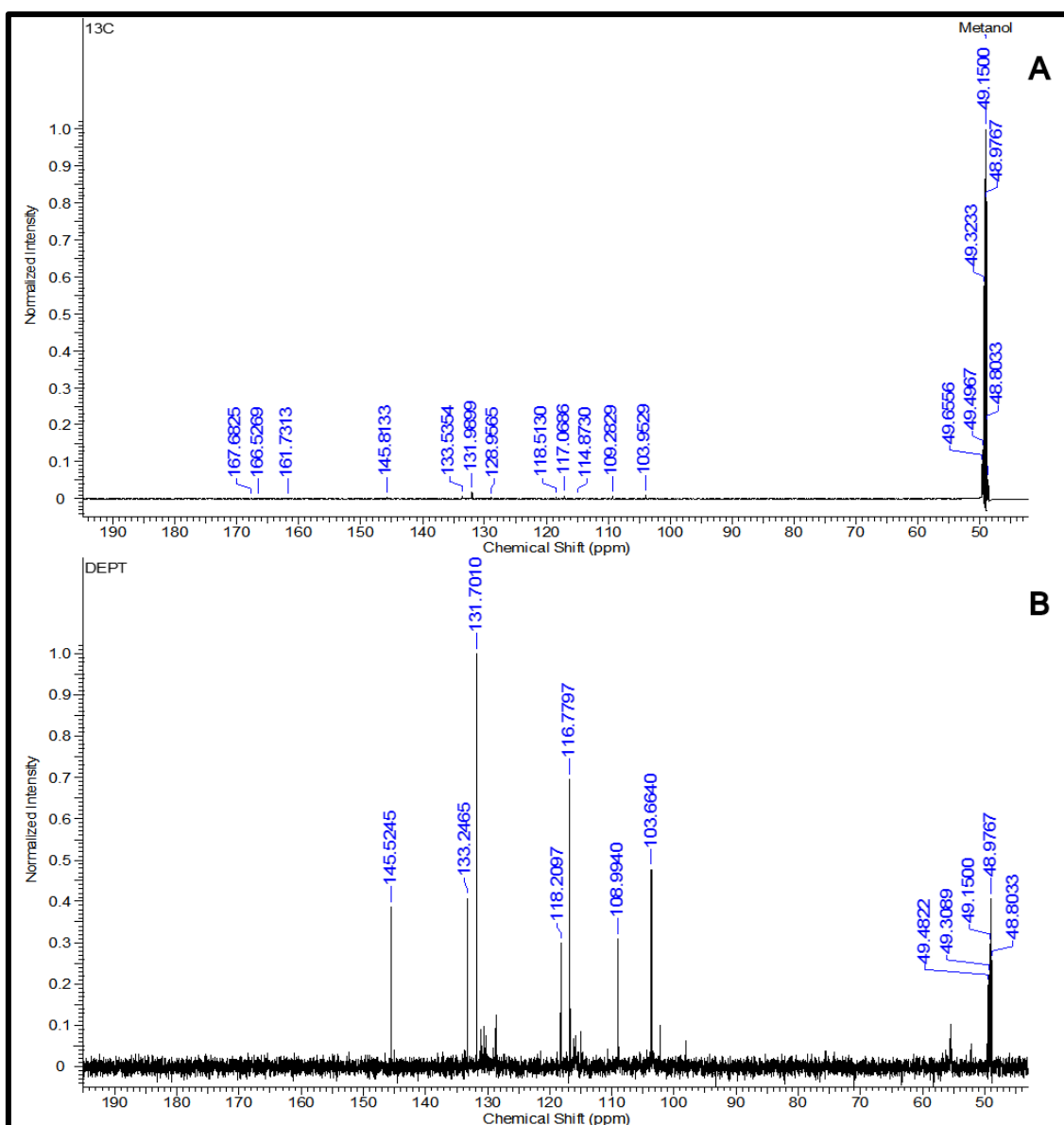


Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de ACE3-17-9 (A) Espectro de DEPT 35 de ACE3-17-9 (B)

O mapa de correlações HSQC da subfração ACE3-17_9 (Figura 64), orientou os assinalamentos de carbonos hidrogenados da molécula proposta (Figura 65). Assim, foi possível correlacionar os prótons aromáticos em δ 7,97 (H-6') com o carbono em δ 133,5 (C-6'), δ 6,41 (H-5') com o carbono δ 109,2 (C-5') e δ 6,29 (H-3') com o carbono δ 103,9 (C-3') que foram atribuídos ao anel A. Foram observadas outras duas correlações referentes ao anel B com hidrogênios homotópicos em δ 7,62 (H-2, H-6) com o carbono δ 131,9 (C-2, C-6) e δ 6,84 (H-3, H-5) com o carbono δ 117 (C-3, C-5). As correlações dos prótons atribuídos as posições a e b, confirmam a existência do esqueleto da

chalcona proposta, observadas em δ 7,79 com o carbono δ 145,8 (C- α) e δ 7,61 com o carbono δ 118,5 (C- β).

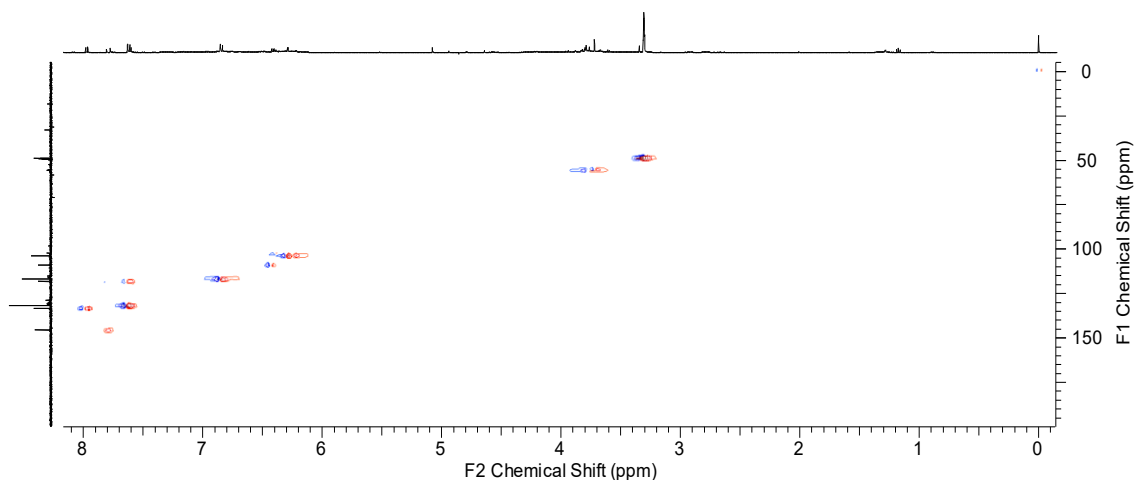


Figura 64. Mapa de correlação HSQC da substância 3

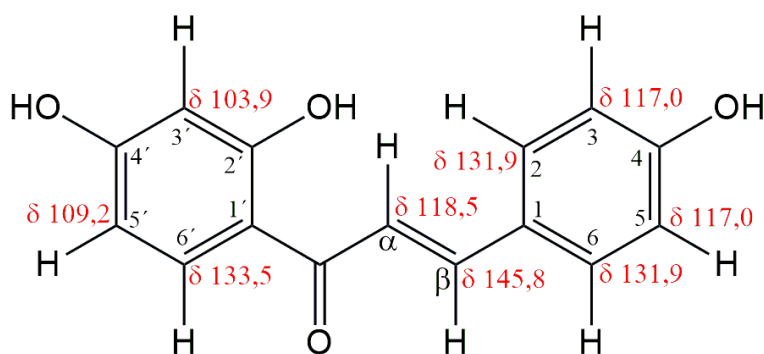


Figura 65. Estrutura da chalcona proposta com os deslocamentos químicos de carbono

A análise por HMBC (figura 66) forneceu informações acerca das correlações entre carbonos e hidrogênios a longa distância, possibilitando o assinalamento inequívoco dos carbonos quaternários. A partir do mapa de correlações observou-se que o hidrogênio aromático em δ 7,97 (H-6') correlaciona com os carbonos em δ 193,4 (C=O) e 167,6 (C-2'), confirmando a presença de um carbono carbinólico típico do esqueleto de chalconas e uma hidroxila no anel A. O próton em δ 7,79 (H- β) apresentou correlações com os carbonos em δ 193,4 (C=O) e δ 131,4 (C-6, C-2), indicando novamente a posição da carbonila na molécula, sendo este um dado importante para a elucidação estrutural da substância, pois o sinal do carbono carbonílico não foi observado no espectro de RMN de ^{13}C .

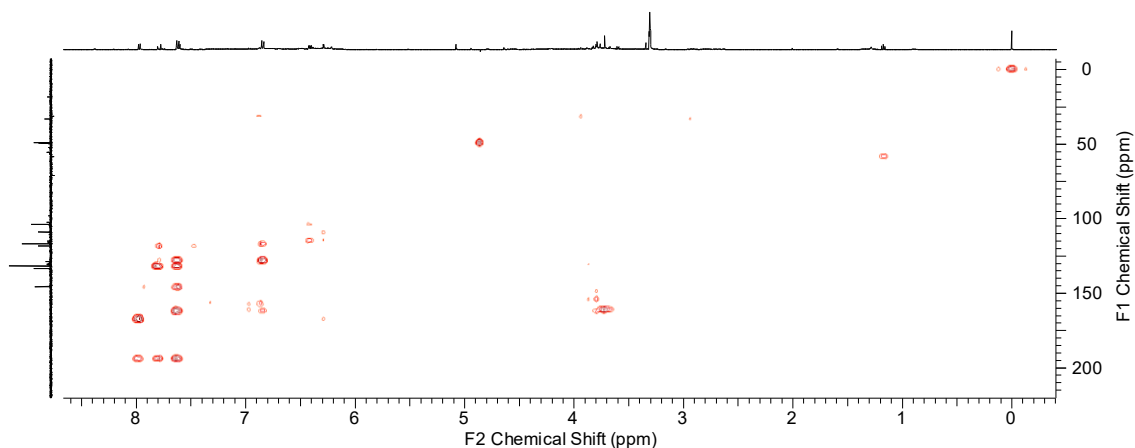


Figura 66. Mapa de correlação HMBC da substância 3

O sinal de hidrogênio com deslocamento químico em δ 7,62 correlacionou com o sinal de carbono quaternário em δ 161,7 (C-4) ligado a uma hidroxila, mostrou também as correlações com os carbonos em δ 145,8 (C- β) e δ 128,9 (C-1). Foram observadas correlações em ^3J dos prótons em δ 7,61 (H- α) e δ 6,84 (H-5, H-3) com o carbono C-1 (δ 128,9), indicando a posição do carbono quaternário do anel B. As correlações apresentadas podem ser observadas na figura 67.

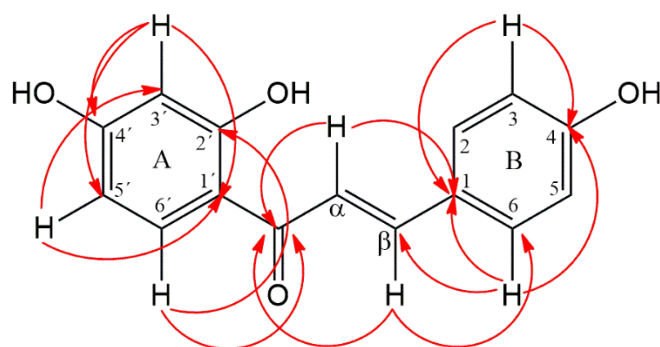


Figura 67. Correlações obtidas do HMBC observadas na substância 3

A análise por espectrometria de massas de ACE3-17-9, mostrou o íon m/z 255 $[M-H]^-$ com maior intensidade do espectro de *full-scan* (Figura 68).

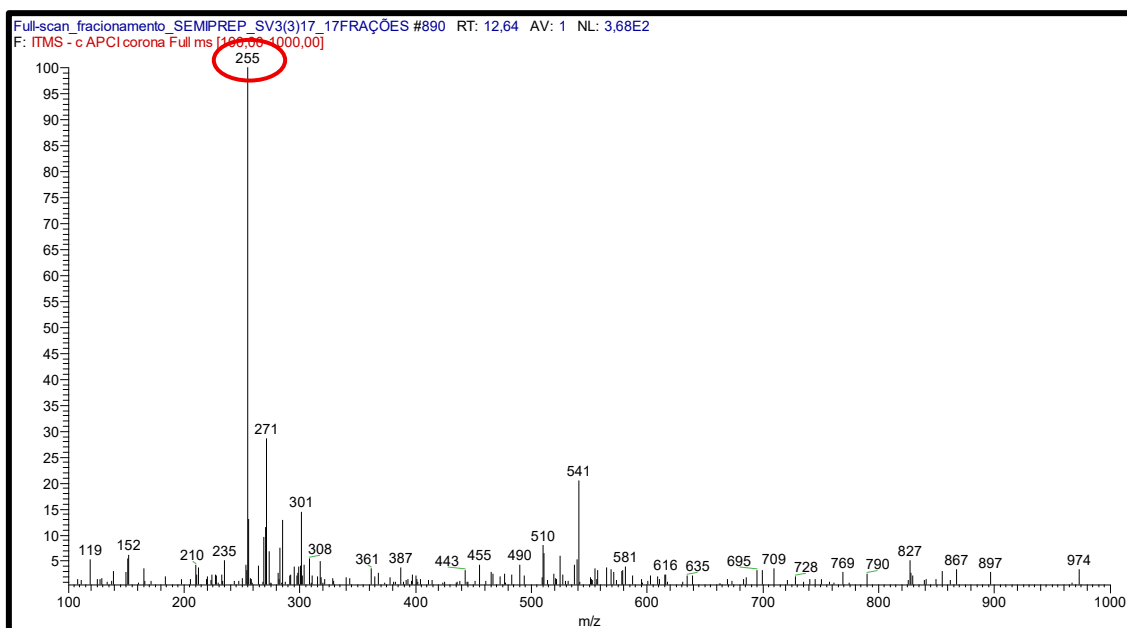


Figura 68. Espectro de massas (*full-scan*-modo negativo) da subfração ACE3-17-9

A fragmentação EM^2 do íon molecular m/z 255 $[M-H]^-$ (Figura 69) gerou o pico base de m/z 135 (100%) indicando a perda de 120 Da, assim como o fragmento m/z 119 (11%) equivalente a perda de 136 Da. Os dois fragmentos observados são típicos de chalconas e são formados por reação *retro Diels-Alder* (Guo et al., 2008). De acordo com Tan et al. (2010) esses fragmentos podem corresponder a isoliquiritigenina ou a liquiritigenina, isômeros que apresentam o mesmo padrão de fragmentação.

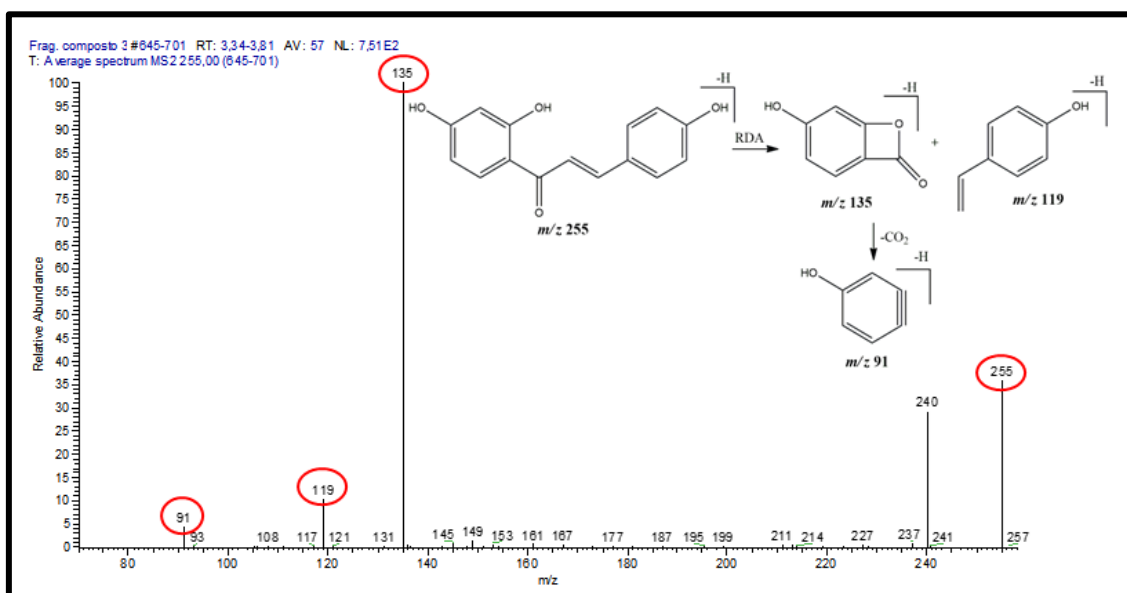


Figura 69. Espectro de fragmentação do íon de m/z 255 - modo negativo

Os dados de espectrometria de massas, RMN 1D e 2D (tabela 29) em conjunto com a comparação dos relatos da literatura foi possível identificar a

chalcona inédita no gênero *Andira* a isoliquiritigenina (substância 3) (Figura 70). A isoliquiritigenina já foi isolada em outras espécies da família Fabaceae, no tronco de *Bauhinia pentandra* (Silva et al., 2020), nas raízes de *Sophora davidii* e *Astragalus bhotanensis* (Qiu et al., 2020; Song et al., 2021), e nas folhas de *Erythrina secundiflora* (Luo et al., 2021).

Na revisão bibliográfica apresentada por Peng e colaboradores (2015), a isoliquiritigenina é qualificada com diversas propriedades farmacológicas: antiangiogênica, antianorexia, antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana, citotóxica frente a células tumorais, hepatoprotetora, Imunoregulatória e neuroproteção. Muitas destas já são confirmadas por meio de testes em animais, órgãos ou células e alguns mecanismos de ação já são conhecidos, porém é necessário desenvolver novas pesquisas para se definir as proteínas-alvo, a fim de facilitar sua aplicação clínica como medicamento.

Além disso, a isoliquiritigenina apresenta efeitos antivirais contra os vírus da hepatite e influenza A (Wang et al., 2023). Conforme busca realizada na base de dados SciFinder, existe 470 registros de patentes utilizando a isoliquiritigenina para diferentes aplicações como para o uso alimentício, uso terapêutico, uso agrícola, fabricação industrial entre outros.

Tabela 29. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC da isoliquiritigenina

Posição	Isoliquiritigenina Substância 3			Kang (2005)	
	^1H δ^a (mult. J em Hz)	^{13}C (δ) ^a	HMBC ^a	^1H δ (mult. J em Hz)	^{13}C (δ)
1		128,9	-		126,5
2	7,62 d (8,8)	131,9	C-4; C- β ; C-2 e 6; C-1	7,61 d (8,7)	130,4
3	6,84 d (8,8)	117	C-4; C-1; C-3 e 5	6,83 d (8,7)	115,6
4		161,7	-		160,2
5	6,84 d (8,8)	117	C-4; C-1; C-3 e 5	6,83 d (8,7)	115,6
6	7,62 d (8,8)	131,9	C-4; C- β ; C-2 e 6; C-1	7,61 d (8,7)	130,4
α	7,61 d (15,1)	118,5	C=O; C- β ; C-1	7,60 d (15,1)	117,0
β	7,79 d (15,7)	145,8	C=O; C-2 e 6; C-1; C- α	7,77 d (15,1)	144,3
1'		114,8	-		113,3
2'		167,6	-		165,0
3'	6,29 d (2)	103,9	C-4'; C-1'; C-5'	6,27 d (2,2)	102,5
4'		166,5	-		166,1
5'	6,41 dd (8,8 e 2,4)	109,2	C-1'; C-3'	6,40 dd (9,1 e 2,2)	107,8
6'	7,97 d (8,8)	133,5	C=O; C-2'	7,96 d (9,1)	132,0
C=O		193,4			192,2

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CD_3OD , tendo o TMS como padrão interno.

^bDados da literatura obtidos a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C em CD₃OD.

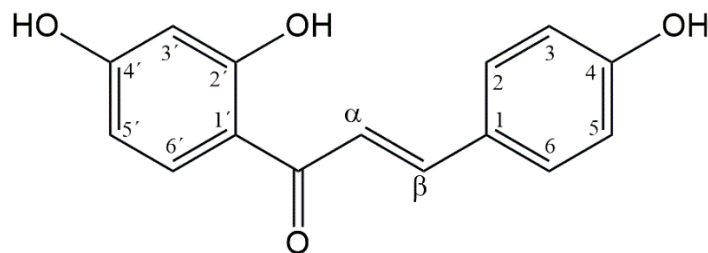


Figura 70. Molécula isoliquiritigenina isolada do cerne de *A. parviflora*

5.5.8.3 Elucidação estrutural da substância 4

A subfração ACE3-17-13 (6,5 mg) foi obtida como um pó branco amorfo. A Figura 71 mostra a CCDs com uma mancha de R_f 0,5 e cor azul, característica de fenólicos e flavonoides (Wagner; Blatt, 1996).

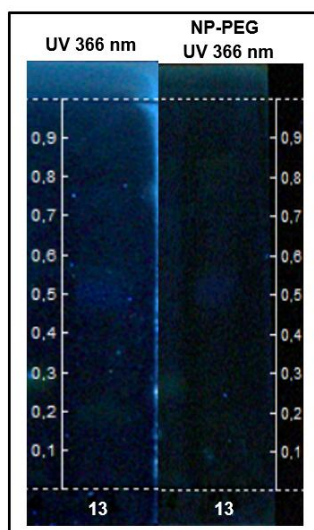


Figura 71. CCDs da fração ACE3-17-13 Legenda: Eluente: Hexano: AcOEt: HCOOH-3:7 100 µL; Volume de aplicação: 5 µL; Concentração: 1 mg/mL.

A elucidação estrutural foi realizada com base nos dados obtidos de EM, RMN de ¹H e ¹³C, COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN ¹H (Figura 72) de ACE3-17-13, mostrou sinais característicos de hidrogênios aromáticos (δ 7,29-6,29), hidrogênios metínicos e metilênicos (δ 5,46-3,51). Na região correspondente aos hidrogênios aromáticos, foram observados os sinais em δ 7,28 (1H, d, J=8,3 Hz), δ 6,49 (1H, dd, J=8,3 e 2,4 Hz) e δ 6,30 (1H, d, J=2,4 Hz), atribuídos aos prótons H-1, H-2 e H-4, respectivamente, caracterizando o sistema aromático do anel A. Na mesma região, foram identificados os sinais em δ 7,16 (1H, d, J=8,3 Hz), δ 6,44 (1H, dd, J=8,1 e 2,2 Hz) e δ 6,38 (1H, d, J=2,0

Hz), atribuídos aos prótons H-7, H-8 e H-10, relacionados à estrutura aromática do anel D (Figura 73).

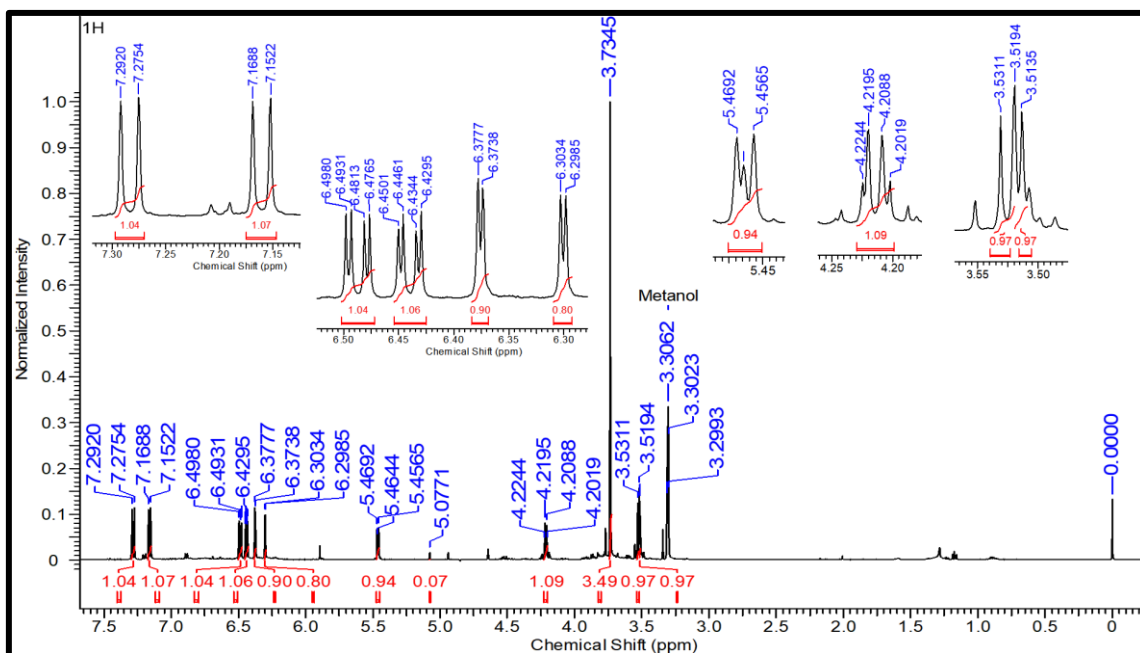


Figura 72. Espectro de RMN de ^1H e ampliações (500 MHz, CD_3OD) de ACE3-17-13

A Figura 72, mostra a ampliação do sinal característico do esqueleto de pterocarpano em δ 5,46 que se desdobrou em um duplete, com constante de acoplamento de 6,3 Hz que de acordo com a literatura pode ser atribuído a posição 11a de um hidrogênio metínico (Garcia, 2013). O espectro de prótons revelou mais três sinais em δ 4,21 (1H, dd, $J=8,1$ e 2,5 Hz), δ 3,53 (1H, d, $J=5,8$ Hz) e 3,52 (1H, d, $J=2,9$ Hz), os dois últimos sinais estão sobrepostos. A definição das posições de cada próton foi baseada principalmente nos mapas de correlações de COSY, HSQC e HMBC, que serão apresentados mais à frente.

O mapa de correlação COSY (Apêndice E) possibilitou a confirmação da correlação entre os prótons δ 6,49, 7,15 e 6,44, δ 6,49 e δ 7,28/ 6,30, δ 3,52 e δ 5,46/4,21, δ 4,21 e δ 3,53. Os dados observados até então confirmam a proposta apresentada por EM, que se trata do pterocarpano medicarpina (substância 4) apresentado na figura 73.

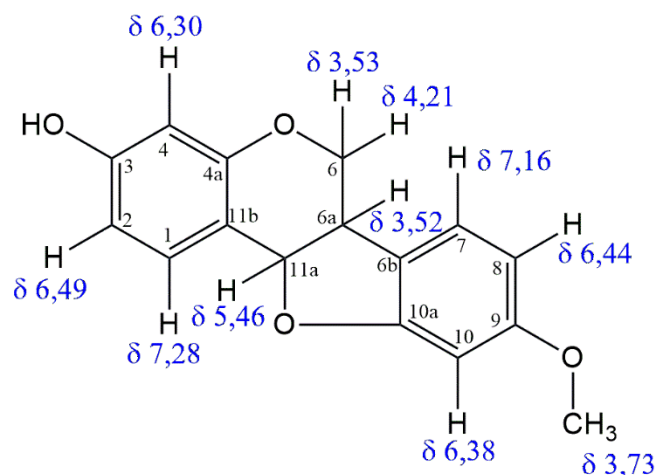


Figura 73. Estrutura do pterocarpano medicarpina (substância 4) com os seus respectivos deslocamentos de hidrogênio

A Figura 74a apresenta o espectro de RMN de ^{13}C com dezesseis sinais, localizados nas regiões de aromáticos (δ 162,7 a δ 97,7), metínicos, metilênicos e de metoxila (δ 80,2 a δ 41,0). Na região de carbonos aromáticos foram identificados doze sinais, sendo seis sinais correspondentes a carbonos quaternários (δ 162,7; δ 162,1; δ 160,2; δ 158,2; δ 121,0 e δ 113,0) e os demais sinais foram associados a carbonos hidrogenados (δ 153,3; δ 126,1; δ 110,8; δ 107,3; 104,2 e δ 97,7). Esta afirmativa foi confirmada por meio da análise do espectro de DEPT 135, pois este apresenta somente sinais de carbonos hidrogenados. Os sinais em δ 80,2 e δ 41,0 foram atribuídos a carbonos metínicos e o sinal δ 56,0 atribuído a um carbono de metoxila (Pavia et al., 2015; Silverstein; Webster; Kiemle, 2005).

O espectro de DEPT 135 (Figura 74b) gerou dez sinais, sendo um sinal em δ 67,7 voltado para baixo, correspondente a um carbono metilênico que foi atribuído a posição C-6 do anel B e C do pterocarpano. Os outros sinais observados indicaram os carbonos metínicos presentes nos anéis aromáticos, anéis do tipo pirano (anel B) e furano (anel C) e um carbono de metoxila.

O mapa de correlações HSQC de ACE3-17-13 (Figura 75), permitiu os assinalamentos dos carbonos hidrogenados da estrutura proposta (Figura 76). Observaram-se as correlações dos hidrogênios e carbonos do anel A e D em δ_{H} 7,28 com o carbono δ_{C} 133,3 (C-1), δ_{H} 6,49 com δ_{C} 110,8 (C-2), δ_{H} 6,30 com δ_{C} 104,2 (C-4), δ_{H} 7,16 com δ_{C} 126,1 (C-7), δ_{H} 6,44 com δ_{C} 107,3 (C-8) e δ_{H} 6,38 com δ_{C} 97,7 (C-10).

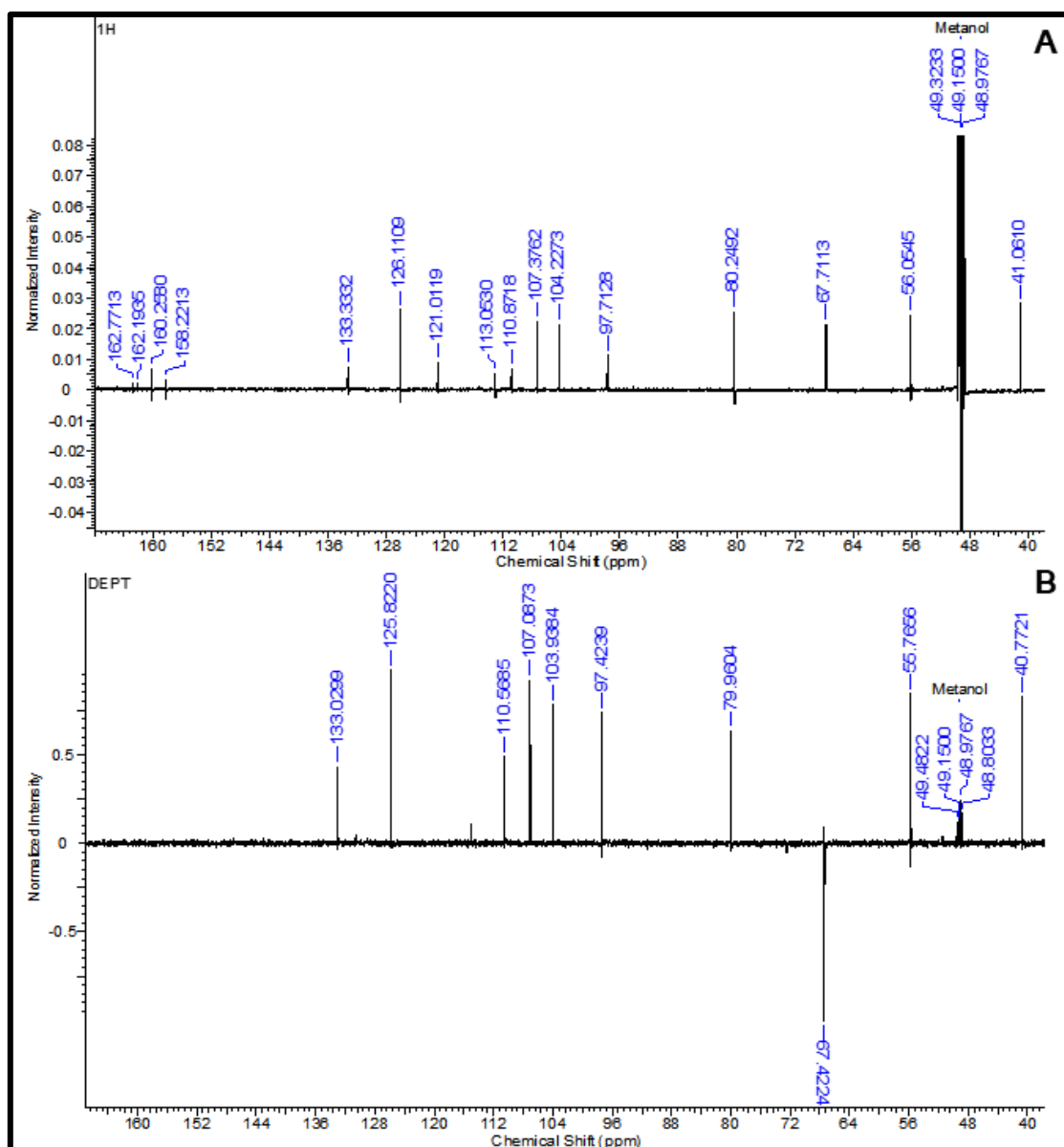


Figura 74. Espectro de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de ACE3-17-13 (A) Espectro de DEPT 135 de ACE3-17-13 (B)

Na figura 75, observou-se que os sinais característicos de pterocarpano em δ_{H} 5,46 e 3,52 correlacionaram-se com os de carbonos δ_{C} 80,2 (C-11a) e 41,0 (C-6a) respectivamente. Com a análise das correlações presentes no HSQC foi possível identificar que o sinal entre δ_{H} 3,53 e 3,51 se tratava de sinais sobrepostos, pois cada deslocamento correlacionou com carbonos diferentes. Os sinais em δ 4,21 (H-6) e 3,53 (H-6) foram caracterizados como hidrogênios diastereotópicos que correlacionam com o carbono metilênico em δ_{C} 67,7. Os sinais dos prótons em δ 3,73 com integração que corresponde a 3 hidrogênios, correlacionaram-se ao sinal de carbono em δ 56,0, atribuído à metoxila. A

estrutura proposta com os assinalamentos dos carbonos, podem ser observados na Figura 76.

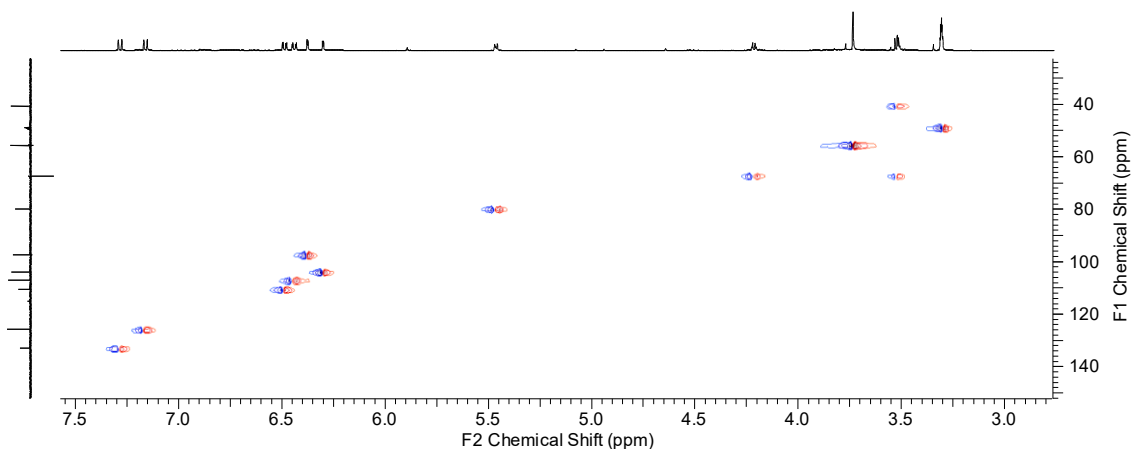


Figura 75. Mapa de correlação HSQC da substância 4

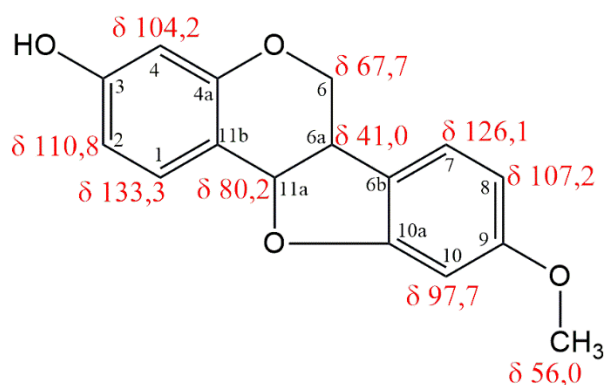


Figura 76. Estrutura do pterocarpano proposto com os deslocamentos químicos de carbonos hidrogenados

Através da análise do mapa de correlação HMBC (Figura 77) foram identificadas correlações cruciais para confirmar as posições dos carbonos da molécula. A correlação do sinal de hidrogênio em δ_H 7,28 a J^3 com o carbono em δ_C 80,2 (C-11a), permitiu confirmar que este próton está na posição 1 do anel A. Além disso, o sinal de H-1 correlacionou com os carbonos em δ 160,2 (C-3) e 158,2 (C-4a). Os sinais de prótons em δ 6,49 e 6,30 apresentaram correlações em J^3 com o sinal de carbono em δ 113,0, confirmando a posição 11b do carbono quaternário. As outras correlações observadas para os hidrogênios H-2 e H-4 foram úteis para assinalar os demais carbonos do anel aromático A.

O próton aromático do anel D em δ 7,16 mostrou correlação em J^3 com o carbono metínico em δ 41,0 da posição 6a, contribuindo para confirmar a estrutura da medicarpina. Este sinal correlacionou também com os carbonos em

J^3 com os carbonos quaternários em δ 162,7 (C-9) e δ 162,1 (C-10a) e em J^4 com o carbono da posição 10 do anel aromático D.

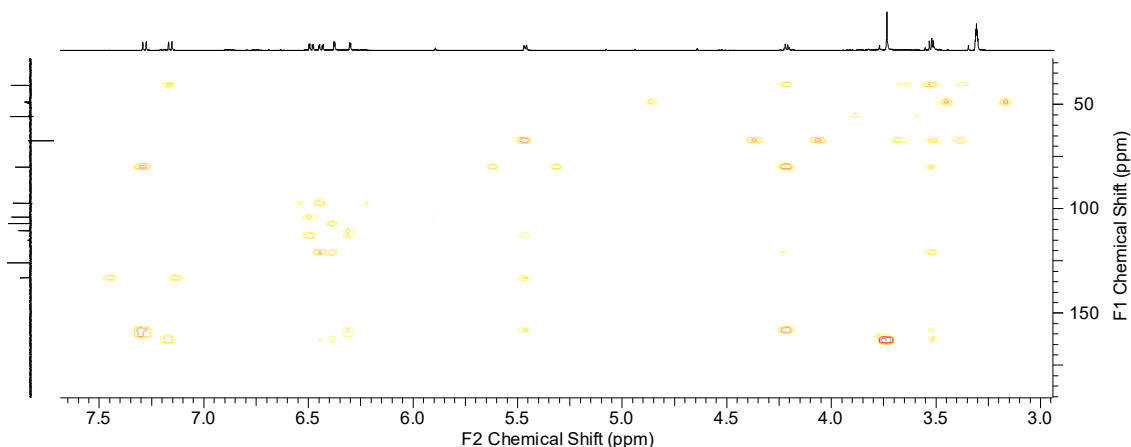


Figura 77. Mapa de correlação HMBC de ACE3-17-13

A posição 6b do carbono quaternário do anel D, foi confirmada pela correlação do sinal em δ 6,44 (H-8) com δ 121,0 (C-6b). O hidrogênio da posição 8 correlacionou também com os carbonos das posições C-9 e C-10. O sinal em δ 5,46 (H-11a) apresentou correlação em J^3 com o carbono quaternário em δ 158,2 (C-4a), e com os carbonos em δ 133,3 (C-1) e δ 67,7 (C-6). O próton da posição 11a mostrou correlações em J^2 com o carbono metínico em δ 41,0 (C-6a) e com o carbono quaternário em δ 113,0 (C-11b). Os sinais hidrogênios metilênicos em δ 4,21 e δ 3,53 (H-6) apresentaram correlações diferentes, confirmando a diferença do ambiente químico dos hidrogênios. Os prótons da metoxila (δ 3,73) apresentaram somente uma correlação com o carbono em δ 162,7 na posição C-9. Algumas das correlações explanadas a J^3 constam na figura a seguir.

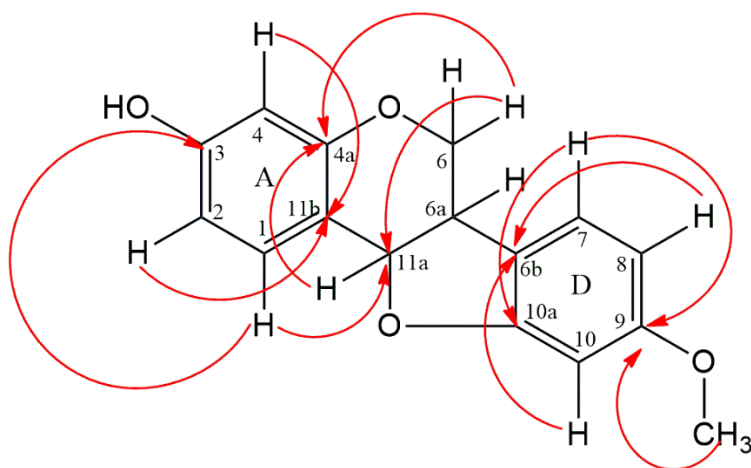


Figura 78. Correlações obtidas do HMBC observadas na molécula proposta

Tabela 30. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da medicarpina

Posição	Medicarpina Substância 4			Garcia (2021)	
	^1H δ^a (mult. J em Hz)	$^{13}\text{C}^a$ (δ)	HMBC ^a	^1H δ^b (mult. J em Hz)	$^{13}\text{C}^b$ (δ)
1	7,28 d (8,3)	133,3	C-3; C-4a; C-11a	7,29 d (8,4)	133,0
2	6,49 dd (8,3 e 2,4)	110,8	C-3; C-11b; C4	6,50 dd (8,4 e 2,4)	110,2
3		160,2	-		159,8
4	6,30 d (2,4)	104,2	C-3; C-4a; C-11b; C-2	6,30 d (2,4)	104,0
4a		158,2	-		157,8
	4,21 dd (7,8 e 2,4)		C-4a; C-11a; C-6a	4,20 dd (11,4 e 5,4)	
6		67,7			67,1
	3,53 d (5,8)		C-4a; C-6b; C-11a; C-6a	3,55 t (11,4)	
6a	3,52 d (5,4)	41,0	C-10a; C-6	3,49 m	40,5
6b		121,0	-		120,5
7	7,16 d (8,3)	126,1	-	7,16 d (8,4)	125,8
8	6,44 dd (8,3 e 2,4)	107,3	C-9; C-6b; C-10	6,45 dd (8,4 e 2,4)	107,1
9		162,7	-		162,3
10	6,38 d (2)	97,7	C-9; C-10a; C-8	6,38 d (2,4)	97,5
10a		162,1	-		162,2
11a	5,46 d (5,4)	80,2	C-4a; C-1; C-11b; C-6; C-6a	5,46 d (7,6)	80,0
11b		113	-		112,5
OMe-9	3,73 s	56,0	C-9	3,73 s	55,3

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo o TMS como padrão interno.

^bDados da literatura obtidos a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em MeOD.

A análise por espectrometria de massas no modo positivo de ACE3-17-13, indicou a presença do íon m/z 271 da molécula protonada ($[\text{M}+\text{H}]^+$) com maior intensidade do espectro *full-scan* (Figura 79).

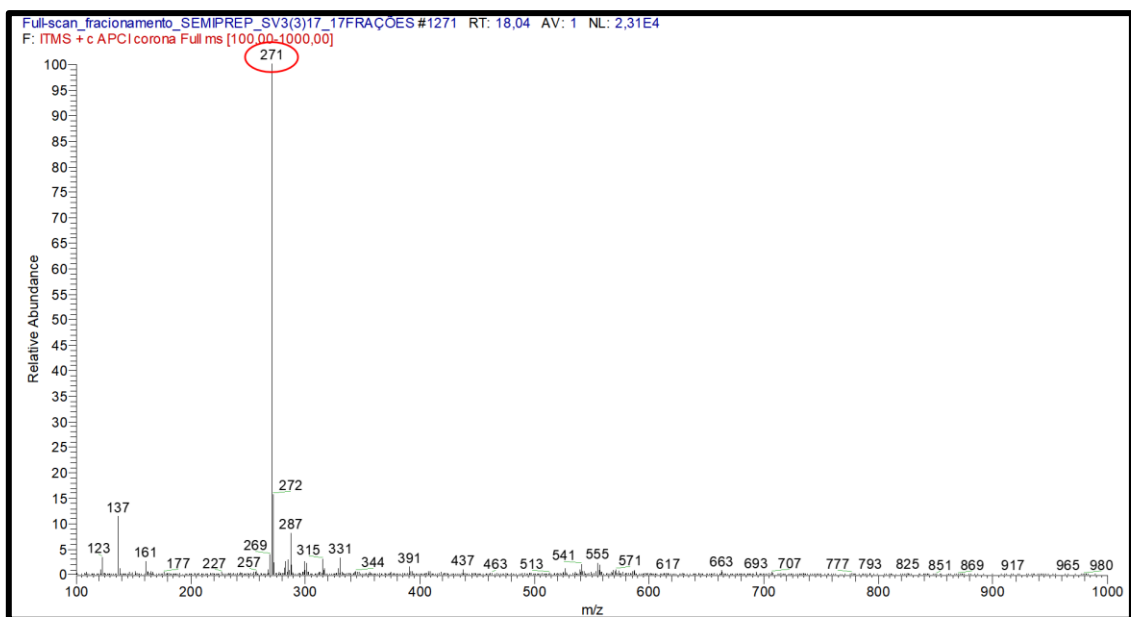


Figura 79. Espectro de massas (*full scan*-modo positivo) da subfração ACE3-17-13

A fragmentação EM^2 do íon molécula protonada m/z 271 $[M+H]^+$ (Figura 80), gerou o pico de m/z 161 $[M+H-C_6H_6O_2]^+$ indicando a perda de 110 Da que pode corresponder a quebra característica entre os anéis B e C do esqueleto de um pterocarpano. Observou-se também os fragmentos de m/z 137 $[M+H-C_8H_7O_2]^+$ e m/z 123 pode corresponder a perda de CO. O padrão de fragmentação quando comparado com a literatura sugeriu que a subfração corresponde ao pterocarpano medicarpina (Gampe et al., 2016; Zhang et al., 2007).

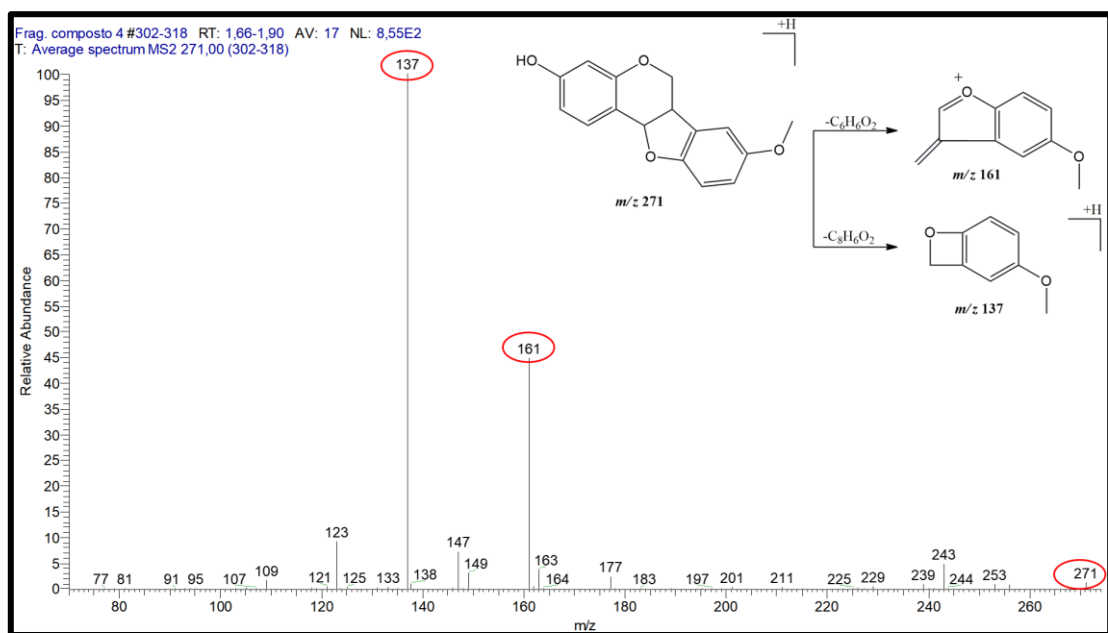


Figura 80. Espectro de fragmentação do íon 271 $[M+H]^+$ e a proposta de fragmentação para a substância 4 (Zhang et al., 2007).

A subfração ACE3-17-13 foi analisada também no modo negativo de ionização, apresentando o íon de m/z 269 com maior intensidade (Figura 81). A partir da fragmentação em EM² contatou-se o fragmento m/z 254 correspondente a uma perda de 15 Da, sendo esta característica a perda de uma metila. Conforme Wang et al (2019) esta fragmentação pode ocorrer na medicarpina via mecanismo radicalar.

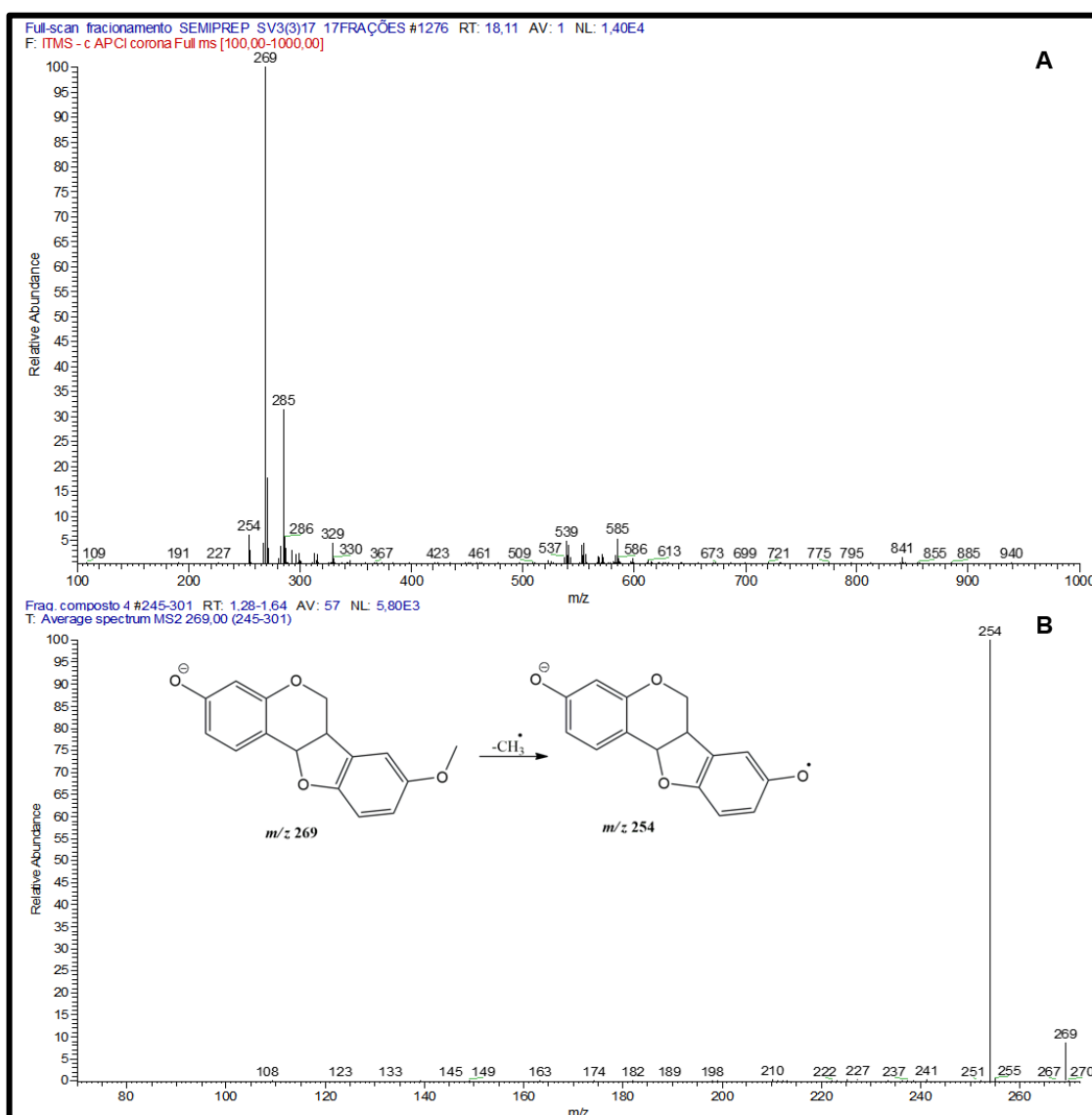


Figura 81. Espectro de massas da substância 4 (*full-scan* modo negativo) (A). Fragmentação no modo negativo do íon m/z 269 e a proposta de fragmentação (B).

Os dados de EM, RMN 1D e 2D (Tabela 30) associados a comparação dos dados da literatura, permitiram identificar que a fração ACE3-17-13 corresponde a medicarpina (Figura 82). Um pterocarpano já foi isolado do cerne de *A. parviflora* por Garcia e colaboradores (2021).

placas sugerem a presença de flavonoide (Scheidemann; Wetzel, 1997; Wagner; Bladt, 1996).

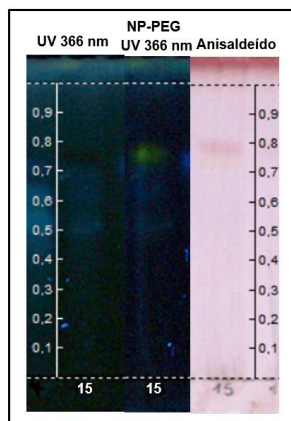


Figura 83. CCDs da fração ACE3-17-15 eluídas em diferentes reveladores. Legenda: Eluente: Hexano: AcOEt: HCOOH-3:7:100 μ L; Volume de aplicação: 5 μ L; Concentração: 1 mg/mL.

As análises de EM, RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC conduziram à elucidação estrutural. A Figura 84 apresenta o espectro de RMN de ^1H da substância 5, com sinais característicos de hidrogênios aromáticos entre δ 8,0 e 6,22, e de hidrogênio típico de metoxila com δ 3,82. Na região de prótons aromáticos observou-se o sinal mais desblindado do espectro em δ 8,0 (1H), sendo este um singlete comum em isoflavonas atribuído ao sinal do H-2 (anel C).

Os sinais δ 7,47 (d, $J=8,8$ Hz) e δ 6,98 (d, $J=8,8$ Hz) foram identificados como prótons aromáticos, cada sinal integrando para 2 hidrogênios (sistema AA'BB'), típicos de anel aromático *para*-substituído atribuídos respectivamente as posições H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel B da estrutura (Figura 85). Outros sinais aromáticos foram observados em δ 6,35 (1H, d, $J=2,4$ Hz) e δ 6,23 (1H, d, $J=2,4$ Hz), indicativos de hidrogênios com acoplamento do tipo *meta*, atribuídos aos H-8 e H-6 de anel A, respectivamente. A presença de uma metoxila como substituinte do anel aromático B foi confirmada por um sinal em δ 3,82 (3H, s).

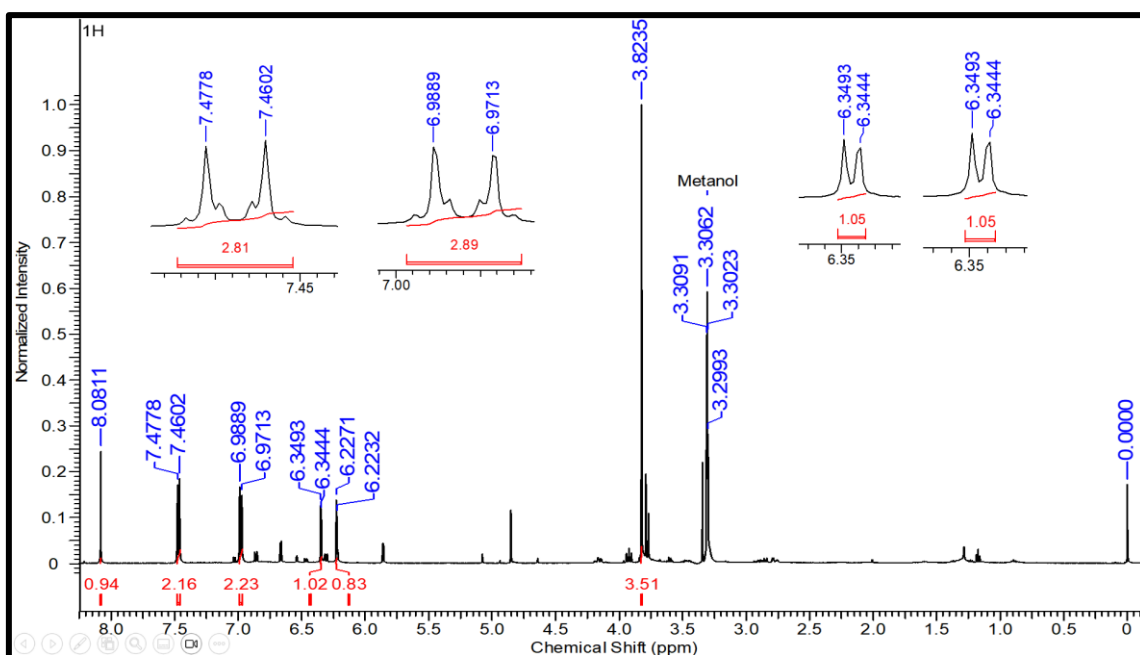


Figura 84. Espectro de RMN de ^1H em ampliações (500 MHz, CD_3OD) de ACE3-17-15

A análise do mapa de correlação COSY (Apêndice F), consolidou o acoplamento entre os hidrogênios em δ 7,47 e 6,98. Os resultados apresentados corroboraram com a proposta de estrutura indicada pela análise de espectrometria de massas, apontando para a identificação da isoflavona biochanina A (substância 5) (Garcia et al., 2021) (Figura 85).

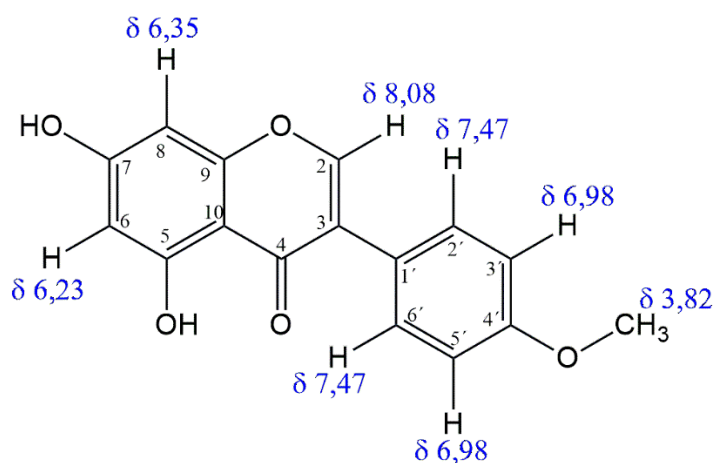


Figura 85. Estrutura da isoflavona biochanina A com os seus deslocamentos de hidrogênio

Os deslocamentos dos carbonos foram atribuídos baseados nos experimentos bidimensionais de HSQC (Figura 86) e HMBC (Figura 88). Na região correspondente aos sinais aromáticos no HSQC, observou-se que o sinal de próton com deslocamento químico em δ 6,35 correlacionou-se com o sinal de carbono em δ 94,7, atribuído à posição C-8, enquanto o sinal em δ 6,23

apresentou correlação com o carbono em δ 99,9, correspondente ao C-6, ambos pertencentes ao anel aromático A.

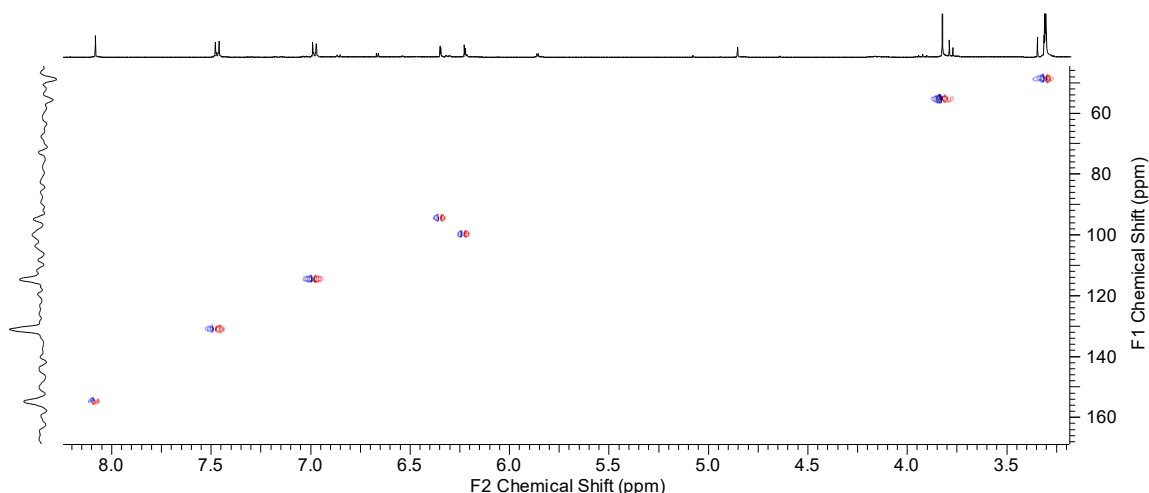


Figura 86. Mapa de correlação HSQC da substância 5

Ainda no espectro de HSQC, no anel aromático B, os prótons com sinais em δ 7,47 e δ 6,98 mostraram correlações com os sinais de carbonos em δ 131,0 (C-2' e C-6') e δ 114,6 (C-3' e C-5'), respectivamente, correspondentes a um sistema AA'BB. Além disso, o próton observado em δ 8,08 apresentou correlação com o carbono em δ 154,8, sendo este último atribuído à posição C-2 do anel C da isoflavona. Por fim, o sinal correspondente aos prótons da metoxila em δ 3,82 foi confirmado pela correlação com o carbono em δ 55,5. As atribuições dos carbonos hidrogenados da molécula podem ser observadas na Figura 87.

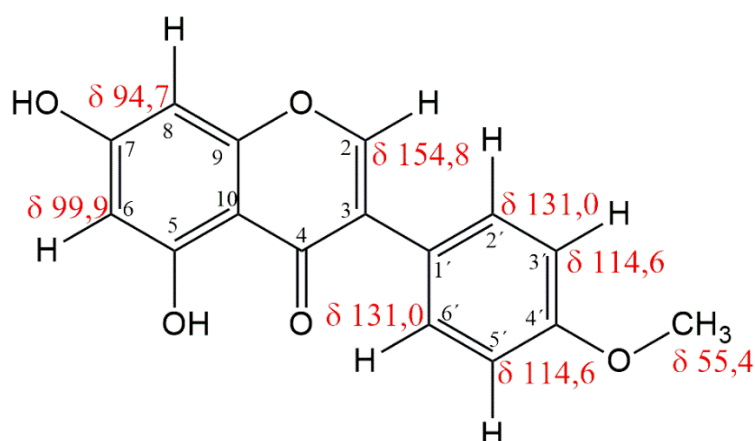


Figura 87. Estrutura da isoflavona proposta com os deslocamentos químicos de carbono

O experimento de HMBC (Figura 88) ofereceu informações importantes para a determinação dos deslocamentos e posições dos carbonos quaternários.

A partir do mapa de correlação HMBC, foi possível observar que o sinal em δ 8,05, que corresponde ao próton metínico da posição H-2, apresentou correlação com o sinal de carbono em δ 182,3, atribuído ao carbono da carbonila (C-4), δ 159,7 (C-9) e com δ 124,5 (C-1') (Figura 88).

Na região dos prótons aromáticos, foi possível visualizar a correlação do próton com sinal em δ 7,47 com o sinal de carbono em δ 161,3 atribuído a posição C-4' do anel B, caracterizada pela presença da metoxila. Além disso as correlações dos sinais de hidrogênios em δ 6,98 e 3,82 com o sinal de carbono em δ 161,3, confirmaram a presença da metoxila no anel aromático B. A correlação de H-3'/H5' (δ 6,98) com δ 124,6 a J^3 confirmou a posição C-1' do carbono quaternário.

O hidrogênio aromático com sinal em δ 6,35 (H-8) mostrou correlação a J^3 com o sinal de carbono em δ 106,4 (C-10), e J^2 com δ 166,1 (C-7) e com δ 159,9 (C-9), todos correspondentes a carbonos quaternários do anel aromático A. Por fim, o hidrogênio com sinal em δ 6,23 (H-6) correlacionou com δ 166,1 (C-7), δ 164,0 (C-5), δ 106,4 (C-10) e δ 94,5 (C-8) pertencentes ao anel A (Figura 89).

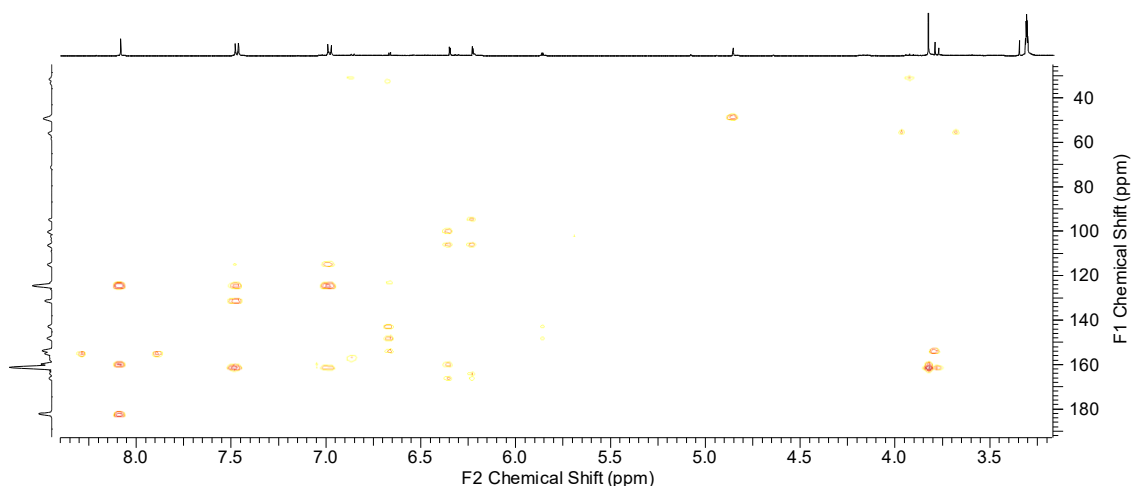


Figura 88. Mapa de correlação HMBC da substância 5

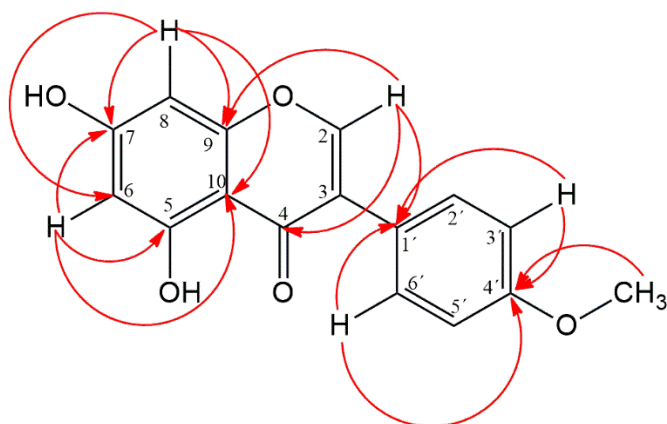


Figura 89. Correlações do HMBC observadas na molécula proposta

O espectro de massas *full scan* no modo positivo (Figura 90a) demonstrou o íon m/z 285 como o mais intenso. Este íon foi submetido à fragmentação EM^2 (Figura 90b), gerando o pico de m/z 270 conferindo uma perda de 15 Da correspondente a perda de metila, assim como o fragmento m/z 153 equivalente a perda de 132 Da. Conforme Lin e colaboradores (2005) o último fragmento é um importante identificador de isoflavonas, produzido pelo mecanismo de *retro Diels-Alder*. O mecanismo proposto foi baseado no trabalho de Wu *et al* (2003), indicando que substância 5 pode se tratar de um esqueleto de isoflavona.

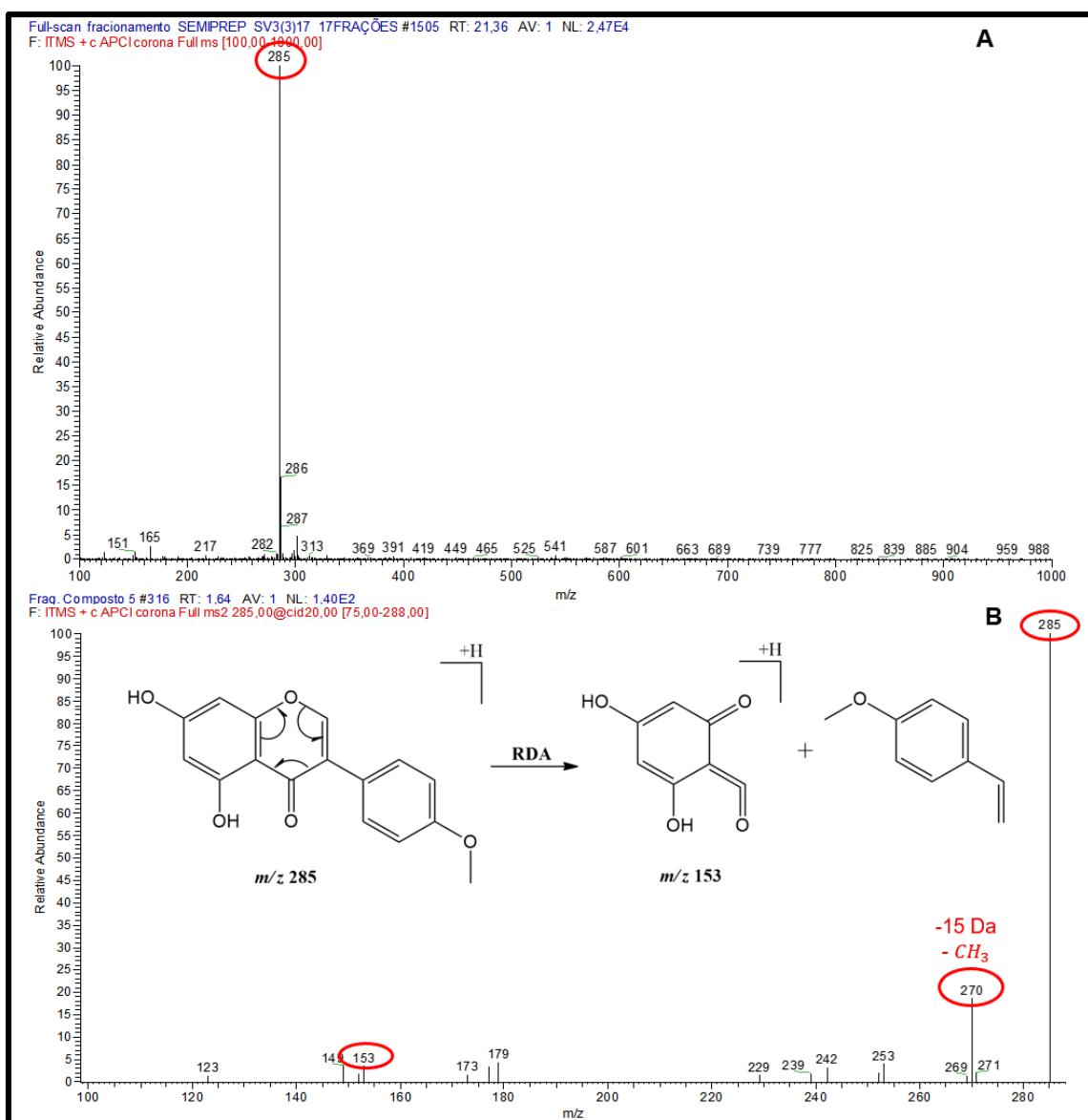


Figura 90. Espectro de massas *full scan* de ACE3-17-15 (modo positivo) (A). Fragmentação do íon m/z 285 e a proposta de fragmentação de acordo com Wu (2003) (B).

A subfração ACE3-17-15 foi avaliada por EM no modo negativo, mostrando o íon de m/z 283 com maior intensidade (Figura 91a). Na fragmentação observou-se um fragmento de m/z 268 indicativo da perda de uma metila. A proposta de fragmentação (Figura 91b) foi elaborada de acordo com os dados da literatura de Demarque *et al* (2016).

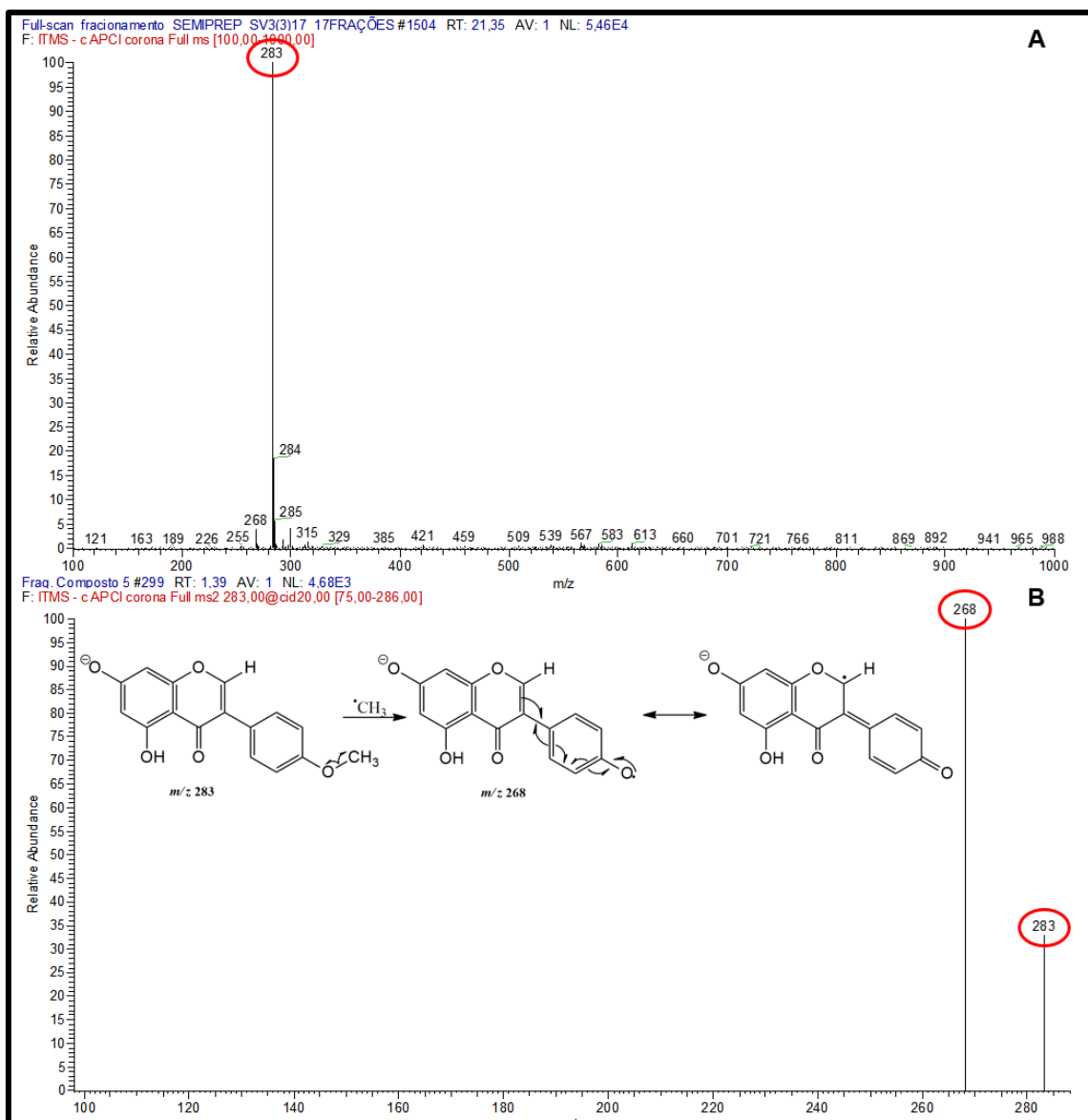


Figura 91. Espectro de massas full scan de ACE3-17-15 (modo negativo) (A). Fragmentação do íon m/z 283 e a proposta de fragmentação de acordo com Demarque *et al* (2016) (B).

A partir dos dados de EM e RMN (Tabela 31) e comparação com a literatura, foi possível identificar que a substância 5 como biochanina A (Figura 92). A isoflavona comum no gênero *Andira*, já foi isolada de cerne *A. parviflora*, utilizando exclusivamente, cromatografia com suporte sólido (CLAE-EFS-RMN), entretanto no presente trabalho foi utilizada a técnica de HPCCC (sem qualquer suporte sólido), associada com o CLAE-DAD (Garcia et al., 2021).

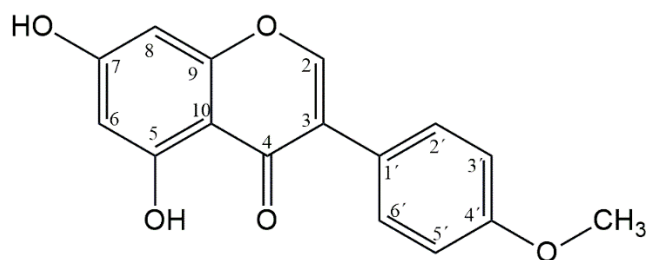


Figura 92. Molécula da biochanina A isolada do cerne de *A. parviflora*

Tabela 31. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da biochanina A

Biochanina A Substância 5				Garcia et al (2021)	
Posição	^1H δ^a (mult., J em Hz)	$^{13}\text{C}^b$ (δ)	HMBC	^1H δ^c (mult., J em Hz)	$^{13}\text{C}^c$ (δ)
2	8,08 s	155,1	C-4; C-9; C-1'	8,07 s	154,8
3		124,5	-		123,8
4		182,2	-		181,8
5		164	-		162,5
6	6,23 d (2,4)	99,9	C-7; C-5; C-10; C-8	6,21 d (2,4)	100
7		166,1	-		164,6
8	6,35 d (2,4)	94,5	C-7; C-9; C-10; C-6	6,33 d (2,4)	94,8
9		159,7	-		157,4
10		106,4	-		105,2
1'		124,6	-		123,8
2', 6'	7,47 d (8,8)	131	C-4'; C-2', C-6'; C-1'	7,49-7,47 dd (8,5; 2,3)	130,1
3', 5'	6,98 d (8,8)	114,6	C-4; C-1'; H-3'; H-5'	7,00-6,97 dd (8,5;2,3)	114,2
4'		161,3	-		158,9
OMe-4'	3,82 s	55,4	C-4'	3,82 s	55,5

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H em MeOD, tendo o TMS como padrão interno.

^bValores dos deslocamentos de ^{13}C foram obtidos dos experimentos de HSQC e HMBC.

^cDados da literatura obtidos a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em MeOD.

A biochanina A, considerada um fitoestrógeno, tem sido alvo de diversas pesquisas, pois tem atraído a atenção dos pesquisadores, devido as suas possíveis aplicações no desenvolvimento de fármacos e nutracêuticos em virtude de suas diversas propriedades biológicas (Feng; Lai, 2023). As diferentes atividades incluem: a atividade antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, hepatoprotetora e neuroproteção (Anuranjana et al., 2023; Feng; Lai, 2023; Pudhupalayam et al., 2022).

No estudo teórico de Castellano e Torrens (2015), foi comprovado que a atividade antioxidante conferida a biochanina A, está relacionada a algumas características da sua estrutura química. Uma das características é a presença

do grupo cetona e a posição e número de hidroxilas, assim como a presença da ligação dupla na posição 2,3 da molécula que potencializa suas propriedades oxidativas. A metoxila presente no anel B da biochanina A também influencia na atividade antioxidante, pois apresenta a capacidade de retirar a densidade eletrônica do anel aromático o que pode estabilizar os radicais livres.

Ghadimi e colaboradores (2019) investigaram o efeito da biochanina A nos níveis de colesterol de ratos diabéticos e puderam observar que ao utilizar a administração da dose de 5 mg/Kg da isoflavona, o nível de glicose no sangue, o peso corporal e o colesterol diminuíram significativamente nos animais testados. Os autores indicaram que a biochanina pode atuar melhorando a dislipidemia (uma complicação da doença) diabética.

De acordo com a literatura a biochanina A pode exercer seu papel anti-inflamatório de duas formas, no tratamento de fibrose pulmonar e na prevenção da pancreatite aguda (Andugulapati et al., 2020; Lee; Papachristou, 2019). Os inúmeros relatos de capacidades farmacológica da biochanina A, a tornam uma molécula promissora para o desenvolvimento de medicamentos para múltiplas aplicações e incentiva pesquisas com novas fontes naturais da isoflavona.

5.5.9 Elucidação estrutural das substâncias em mistura obtidas do cerne de *A. parviflora*

5.5.9.1 Elucidação estrutural substância 6

A substância 6 foi identificada na subfração ACE3-16-18-37 (1,1 mg). Na Figura 93, observa-se que a fração apresenta manchas características de flavonoides, com coloração amarela e azul nas CCDs visualizadas em UV no comprimento de onda 366 nm. A fluorescência azul observada, pode ser associada à presença de flavonoides do tipo isoflavona (Wagner; Bladt, 1996). A presença de mais de uma mancha nas CCDs indicam a presença de mistura de substâncias.

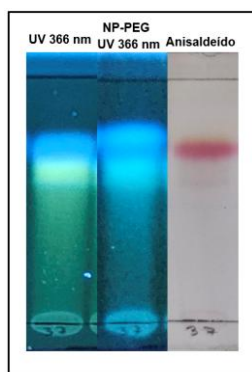


Figura 93. CCDs da subfração ACE3-16-18-37 reveladas em diferentes reagentes. Legenda: Eluente: Hexano:AcOEt:HCOOH-4:6 100 μ L; Volume de aplicação: 5 μ L; Concentração: 1 mg/mL.

O espectro de RMN ^1H (Figura 94) apresenta sinais consistentes com anel de benzeno 1,2,4-trissubstituídos na faixa de δ 7,76-6,33. Os três sinais em δ 7,76 (1H, d, $J=8,5$ Hz, H-5), 6,50 (1H, dd, $J=8,5$ e 2,4 Hz, H-6) e 6,33 (1H, d, $J=2,4$ Hz, H-8) foram atribuídos ao anel aromático A (Figura 97). Outros três sinais de prótons em δ 6,99 (1H, d, $J=7,9$ Hz, H-6'), δ 6,48 (1H, dd, $J=8,5$ e 2,4 Hz, H-5') e δ 6,56 (1H, d, $J=2,4$ Hz, H-3') foram atribuídos ao anel B. O espectro mostrou também sinais correspondentes a um grupo oximetileno em δ 4,55 (1H, m, Ha-2) e δ 4,40 (1H, dd, $J=11$ e 5,5 Hz, Hb-2), e um próton metínico em δ 4,16 (1H, dd, $J=11,6$ e 5,5 Hz) na posição 3 do anel C característico de isoflavonoides (Loan; Tân, 2024). Além disso, observou-se 2 simpletos correspondentes a hidrogênios de metoxila com os seguintes deslocamentos: δ 3,78 (3H, 2'-OCH₃) e δ 3,76 (3H, 4'-OCH₃) ligados ao anel aromático B.

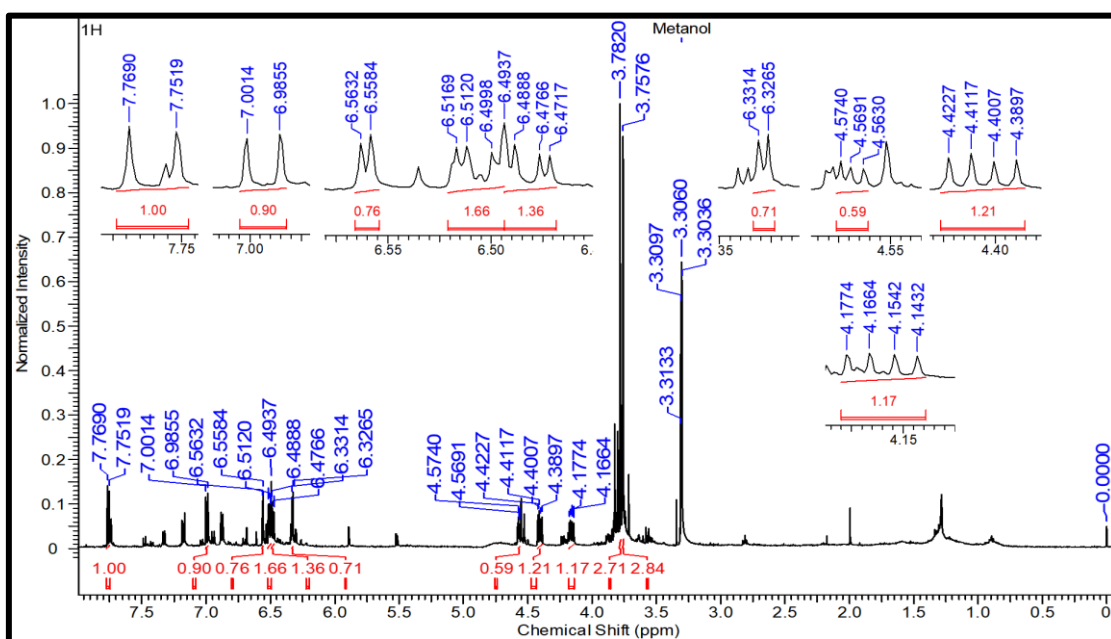


Figura 94. Espectro de RMN ^1H e ampliações (500 MHz, CD₃OD) de ACE3-16-18-37

No mapa de correlação COSY (Apêndice G), foi possível confirmar as correlações entre os hidrogênios em δ 7,76 e 6,50, δ 6,99 e δ 6,48, δ 4,55 e δ 4,40/4,16, δ 4,40 e δ 4,16. Os dados observados e a comparação com a literatura permitiram propor a estrutura da isoflavanona sativanona apresentada na Figura 95, com os seus respectivos sinais de hidrogênios.

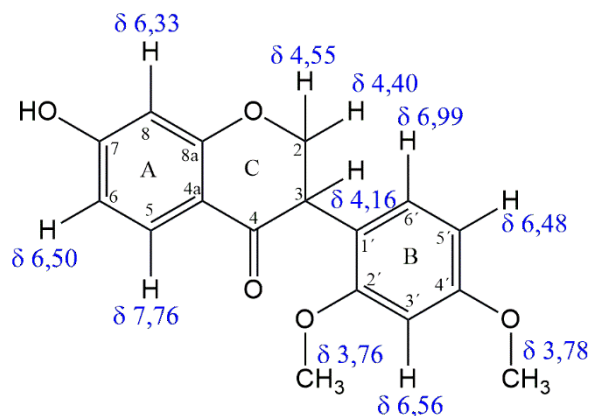


Figura 95. Estrutura da isoflavanona com os seus respectivos deslocamentos de hidrogênio

Os deslocamentos dos carbonos foram atribuídos baseados nos experimentos bidimensionais de HSQC (Figura 96) e HMBC (Figura 97). A partir da análise bidimensional HSQC, foi possível identificar os carbonos hidrogenados da molécula (Tabela 32). O experimento bidimensional HMBC (Figura 97) forneceu informações importantes para a determinação dos deslocamentos e posições dos carbonos quaternários, assim como confirmar as posições do carbono metilênico, metínico e das metoxilas. A partir do mapa de correlação HMBC, foi possível observar que o sinal em δ 7,76 (H-5), apresentou correlação com o carbono em δ 194,1,3 atribuído ao carbono da carbonila (C-4), confirmando a presença de uma carbonila no anel C. Além disso, H-5 (δ 7,76) correlacionou com dois carbonos quaternários em δ 166,6 e δ 165,3, atribuídos às posições 7 e 8a do anel A.

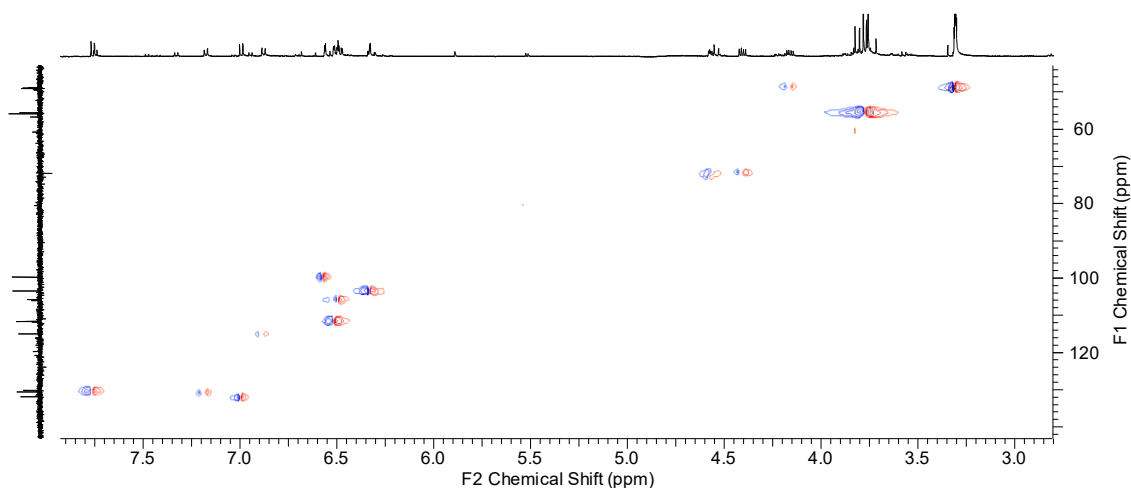


Figura 96. Mapa de correlação HSQC de ACE3-16-18-37

Os prótons em δ 6,50 (H-6) e δ 6,33 (H-8) correlacionaram em J^3 com δ 115,5, sinal atribuído a um carbono quaternário na posição 4a do anel aromático A. O hidrogênio aromático do anel B em δ 6,99 (H-6') correlacionou em J^3 com os carbonos em δ 162,1 (C-4'), δ 159,5 (C-2') e δ 48,9 (C-3), confirmando a presença de dois carbonos quaternários do anel B, a presença do carbono metínico do anel C e a sua ligação com o anel B. As correlações J^3 em dos hidrogênios em δ 6,56 (H-3') e δ 6,48 (H-5') com o carbono em δ 117,2 (C-1') comprovaram a posição do outro carbono quaternário pertencente ao anel aromático B.

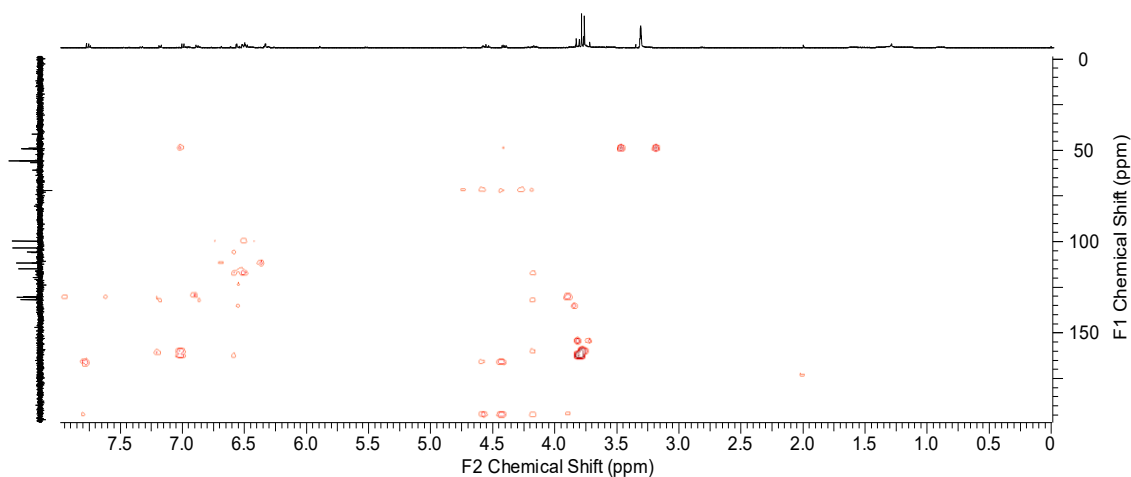


Figura 97. Mapa de correlação HMBC de ACE3-16-18-37

As correlações observadas para os hidrogênios oximetilênicos em δ 4,55 e δ 4,40, confirmaram a presença do carbono carbonílico na posição 4 (δ 194,1) do anel C, assim como auxiliaram no assinalamento do carbono quaternário na posição 8a (δ 165,3) do anel A. O próton metínico em δ 4,16 correlacionou em

J^3 com o carbono em δ 159,5, confirmando a atribuição deste na posição 2'. A confirmação da localização das metoxilas no anel B, se deu por meio das seguintes correlações: δ 3,78 (4'-OCH₃) com o carbono em δ 162,1 (C-4') e δ 3,76 (2'-OCH₃) com o carbono em 159,5 (C-2'). Na figura 98 estão as principais correlações extraídas do mapa de contorno HMBC.

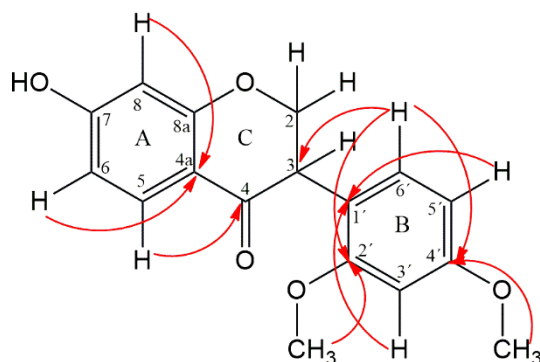


Figura 98. Principais correlações do mapa de correlação HMBC da sativanona (substância 6)

No espectro de massas *full scan* no modo positivo (Figura 99), observou-se o íon em m/z 301 como o mais intenso. A fragmentação EM² gerou os seguintes fragmentos, típicos de isoflavanonas, de m/z 163, m/z 135 e m/z 107. As isoflavanonas, ao contrário das isoflavononas, não geram fragmentos de mecanismos *retro Diels-Alder* da molécula intacta no modo positivo. Normalmente, apresentam perdas de CO e H₂O (Gampe et al., 2016).

Tabela 32. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da sativanona

Sativanona Substância 6				Gampe et al, 2016	
Posição	^1H δ^a (mult., J em Hz)	$^{13}\text{C}^b$ (δ)	HMBC	^1H δ^c (mult., J em Hz)	$^{13}\text{C}^c$ (δ)
2	4,55 m 4,40 dd (11 e 5,5)	71,8	C-4; C-8a C-4; C-8a; C-1'	4,53-4,57 m 4,39-4,43 m	72
3	4,16 dd (11,6 e 5,5)	48,9	C-4; C-2'; C-6'; C-1'	4,16 dd (11,4 e 5,4)	49,1
4	-	194,1	-	-	194,1
4a	-	115,5	-	-	115,5
5	7,76 d (8,5)	130,2	C-4; C-8a; C-7	7,76 d (8,7)	130,3
6	6,50 dd (8,5 e 2,4)	111,6	C-4a; C-8	6,50 dd (8,7 e 2,3)	112
7	-	166,6	-	-	-
8	6,33 d (2,4)	103,5	C-8a; C-4a	6,32 d (2,3)	103
8a	-	165,3	-	-	165
1'	-	117,2	-	-	-
2'	-	159,5	-	-	159,8
3'	6,56 d (2,4)	99,8	C-4'; C-2'; C-1'; C-5'	6,57 d (2,4)	99,9
4'	-	162,1	-	-	162,2
5'	6,48 dd (8,5 e 2,4)	106,1	C-4'; C-1'	6,49 dd (8,4 e 2,4)	106,0
6'	6,99 d (7,9)	131,8	C-4'; C-2'; C-3	7,00 d (8,4)	131,9
OMe-2'	3,78 s	55,6	C-4'	-	-
OMe-4'	3,76 s	55,8	C-2'	-	-

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H em CD_3OD , tendo o TMS como padrão interno.

^bValores dos deslocamentos de ^{13}C foram obtidos dos experimentos de HSQC e HMBC.

^cDados da literatura obtidos a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD .

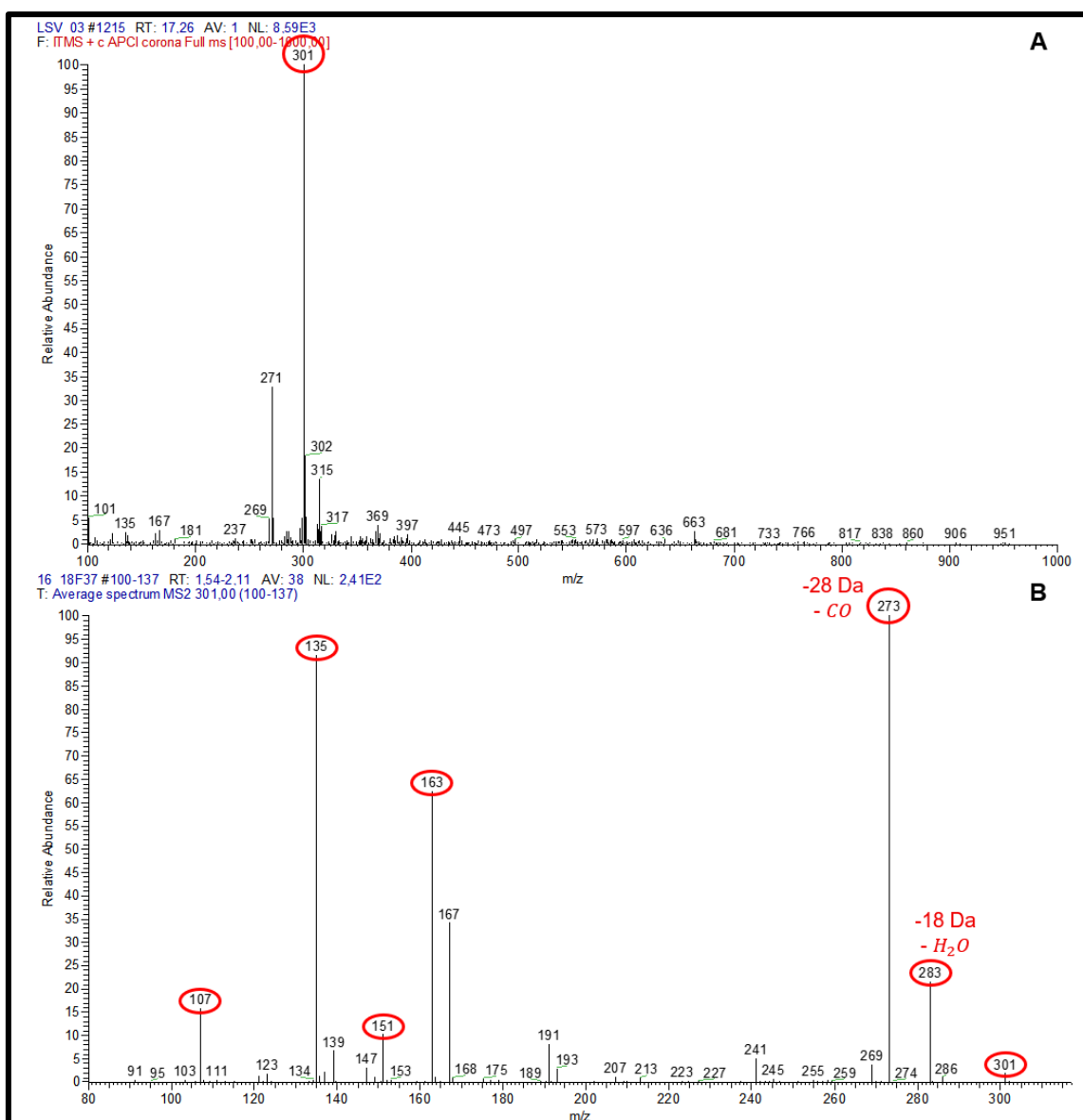


Figura 99. Espectro de massas full scan de ACE33-16-18-37 (modo positivo) (A). Fragmentação do íon m/z 301 (B).

Uma proposta de fragmentação foi realizada para a molécula de acordo com o trabalho de Gampe e colaboradores (2016) na figura 100.

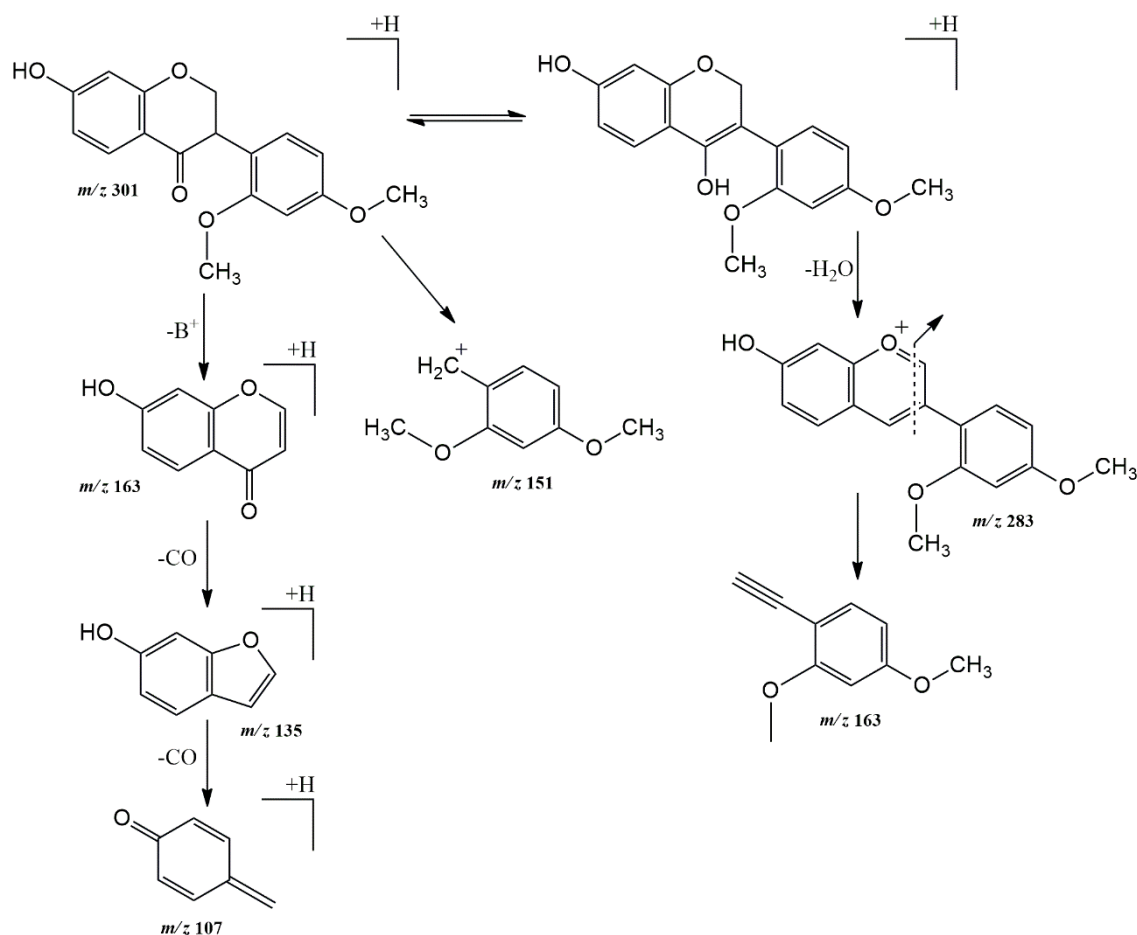


Figura 100. Proposta de fragmentação do íon m/z 301 (substância 6) de acordo com Gampe et al. (2016)

A subfração também foi avaliada por EM no modo negativo, mostrando o íon de m/z 299 com maior intensidade (Figura 101a). O íon m/z 299 foi submetido à fragmentação EM² (Figura 101b) e apresentou fragmentos de m/z 284 [M-H-CH₃] e m/z 269 [M-H-2CH₃] característicos de duas perdas sequenciais de metilas. De acordo com Zhao e colaboradores (2020), o fragmento de m/z 135 [^{1,3}A-H]⁻ é produto da quebra pelo mecanismo de RDA e em seguida é observado o fragmento m/z 91 [^{1,3}A-H-CO₂]⁻, correspondente a perda de CO₂. A proposta de fragmentação é apresentada na Figura 102.

As análises de EM e RMN (tabela 32) e comparação com a literatura, permitiram a identificação da sativanona como substância majoritária na subfração ACE3-16-18-37. Sendo este o primeiro relato da sativanona no gênero *Andira*. No entanto a isoflavanona já foi isolada em outras espécies da família Lauraceae, como no cerne de *Dalbergia tonkinensis* e *Dalbergia odorifera*, e nas raízes de *Ononis spinosa* (Gampe et al., 2016; Loan; Tân, 2024; Zhao et al., 2020).



Figura 101. Espectro de massas full scan de ACE3-16-18-37 (modo negativo) (A). Fragmentação do íon m/z 299 (B).

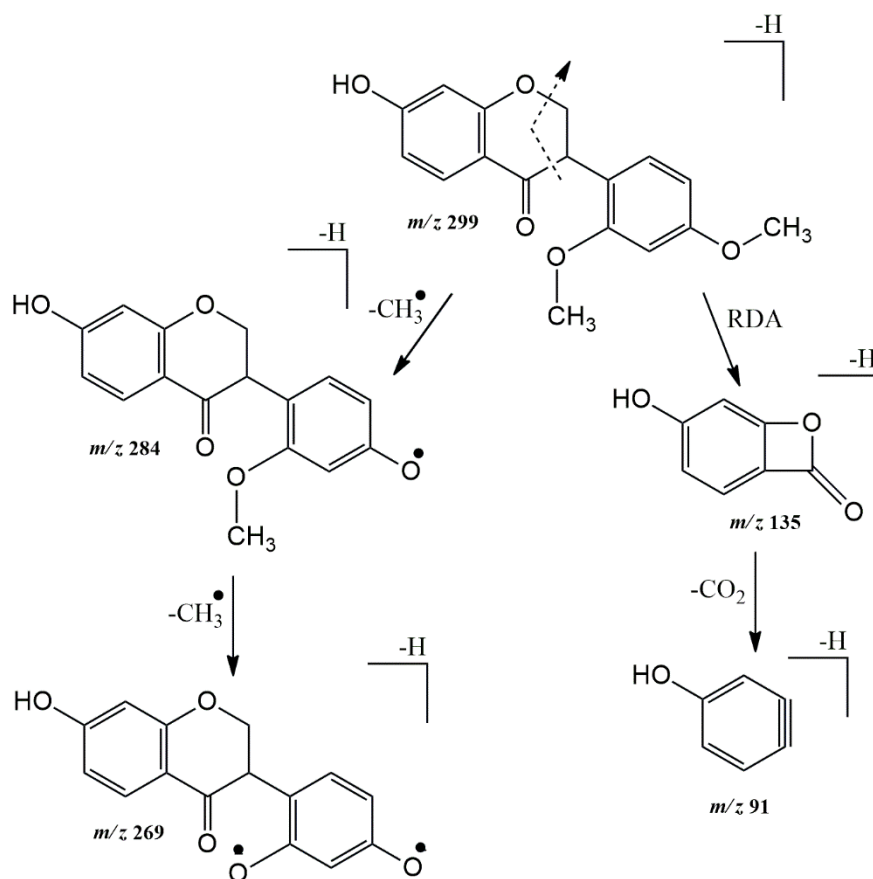


Figura 102. Proposta de fragmentação do íon m/z 299 (substância 6) de acordo com Zhao *et al.* (2020)

A sativanona apresenta diferentes atividades biológicas relatadas na literatura, como: antidiabética, anti-inflamatória e neuroprotetora (Alshabrm; Aba Alkhayl; Rehman, 2024; Elattar *et al.*, 2024; Van Bon *et al.*, 2018). Addotey *et al.* (2018) investigaram-se a o potencial de isoflavonoides das raízes de *Ononis spinosa*, quanto à inibição da enzima hialuronidase-1 humana (HYal-1). Por meio do estudo bioguiado, os autores isolaram cinco isoflavonoides incluindo a sativanona que foi mais ativa quanto a inibição de Hyal-1. Os inibidores dessa enzima podem ser aplicados como cicatrizante de feridas e auxiliar na função renal para a diurese.

5.5.9.2 Elucidação estrutural da substância 7

Na análise de CCD da subfração ACE3-16-18-38 (2,2 mg) (Figura 103), pode-se observar um perfil similar ao da subfração anterior (ACE3-16-18-37), indicando novamente a presença de flavonoides do tipo isoflavona (Wagner; Bladt, 1996). A identificação das substâncias em mistura foi baseada nas

informações obtidos das análises de EM, RMN de ^1H e ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC.

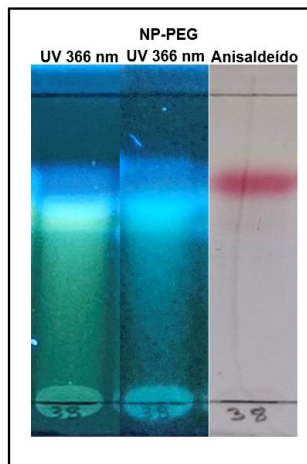


Figura 103. CCDs da subfração ACE3-16-18-38 reveladas em diferentes reagentes. Legenda: Eluente: Hexano:AcOEt:HCOOH-4:6 100 μL ; Volume de aplicação: 5 μL ; Concentração: 1 mg/mL.

A análise do espectro de RMN de ^1H e mapas de correlações HSQC e HMBC de ACE3-16-18-38, evidenciou a presença de sinais e correlações correspondentes aos da sativanona, identificada na subfração ACE3-16-18-37, observados na Figura 104. Além disso, pode-se perceber que os outros sinais observados, podem corresponder a uma substância semelhante à biochanina A. foram observados outros sinais como em δ 8,15 (1H, s) típico de isoflavonas que foi atribuído ao H-2 (Figura 104).

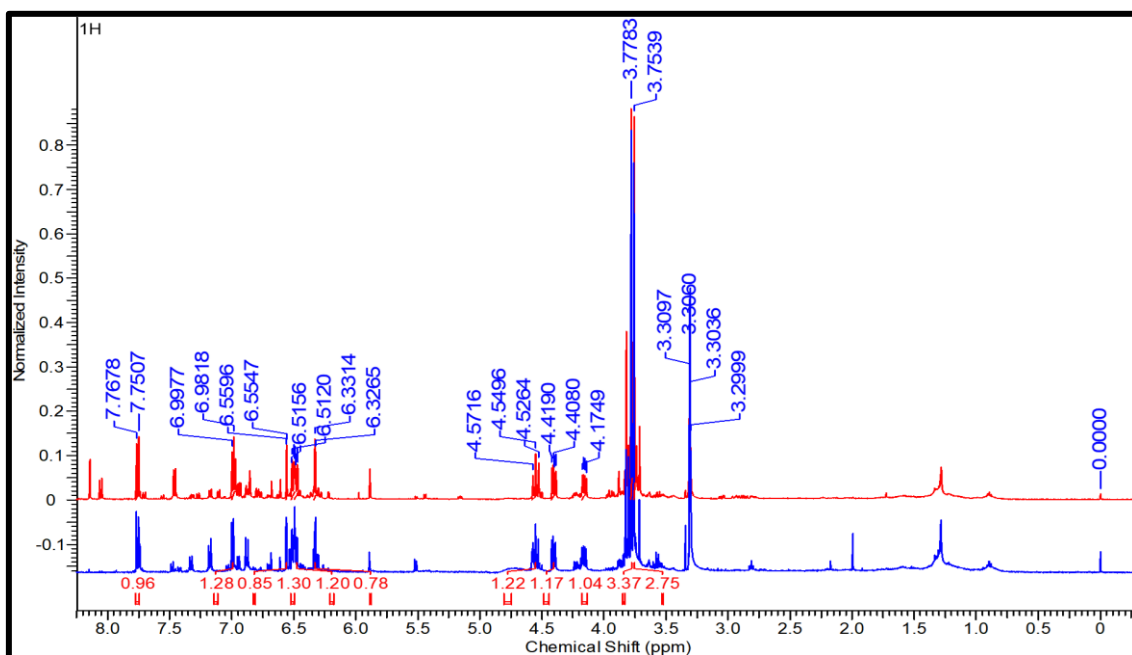


Figura 104. Sobreposição dos espectros de ^1H (500MHz, CD_3OH) de **ACE-3-16-18-37** (azul) e **ACE3-16-18-38** (vermelho).

A região de prótons de aromáticos revelou os sinais em δ 8,05 (1H, d, $J=8,5$ Hz), δ 6,94 (1H, dd, $J=8,5$ e 1,8 Hz) e δ 6,83 (1H, d, $J=1,8$ Hz) com correlações do tipo *orto* e *meta*. Estes sinais foram atribuídos respectivamente, aos hidrogênios H-5, H-6 e H-8 do anel aromático A (Figura 105). Os deslocamentos químicos de hidrogênios em δ 7,46 (2H, d, $J=8,5$ Hz) e δ 6,98 (2H, d, $J=8,5$ Hz) foram atribuídos as posições H-2'/H-6' e H-3'/H-5' caracterizando um sistema AA'BB' do anel aromático B.

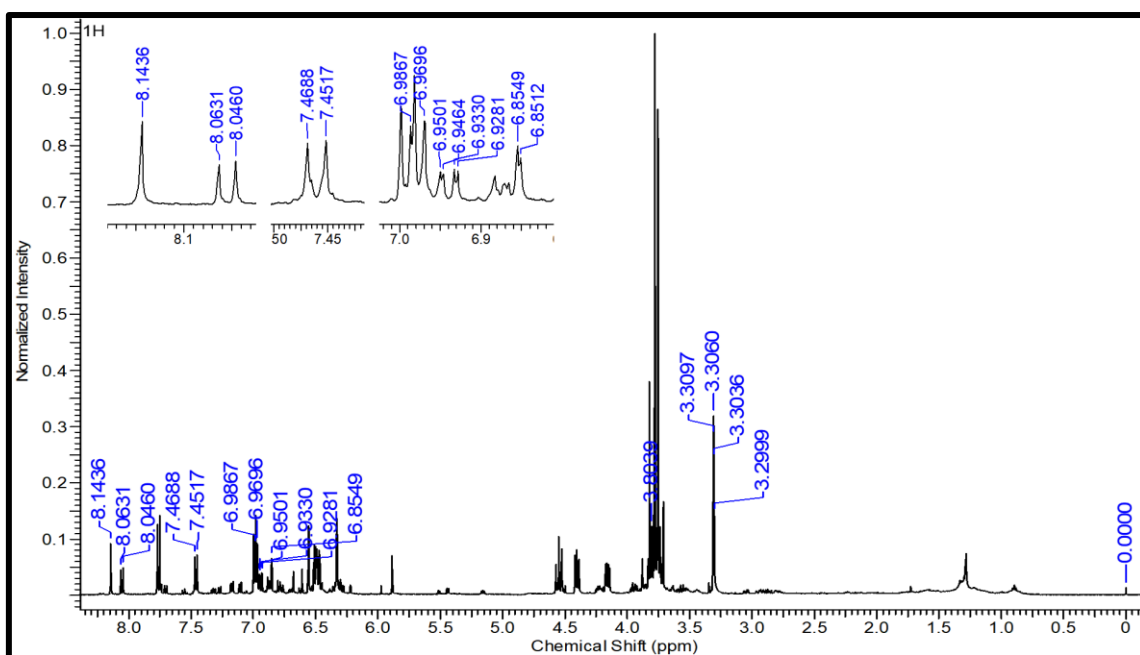


Figura 105. Espectro de RMN ^1H e ampliações com os sinais referentes a formononetina (500 MHz, CD_3OD) de ACE3-16-18-38

O mapa de correlação COSY (Apêndice H) foi importante para confirmar as posições dos prótons aromáticos, em virtude das correlações entre ^1H - ^1H apresentadas em δ 8,05 (H-5) e δ 6,94 (H-6), δ 7,46 (H-6') e δ 6,98 (H-3'). Os dados interpretados indicaram um esqueleto típico de isoflavona, correspondente a formononetina (substância 7) (Figura 106) (Chen et al., 2011).

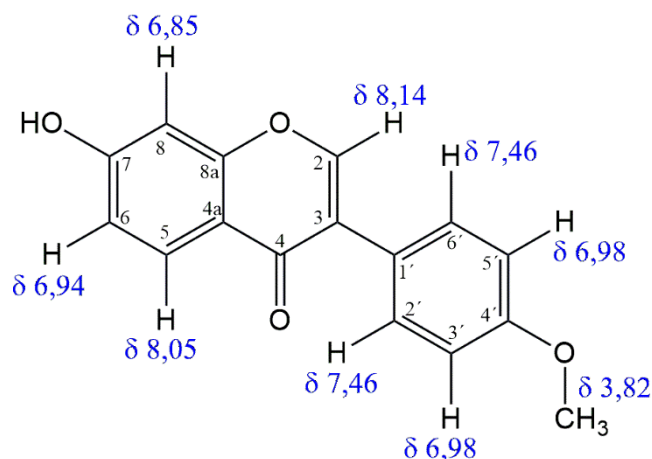


Figura 106. Estrutura da substância 7 com os seus deslocamentos de hidrogênio

A partir do mapa de correlação HSQC (Figura 107) foi possível definir os deslocamentos dos carbonos hidrogenados (Tabela 33).

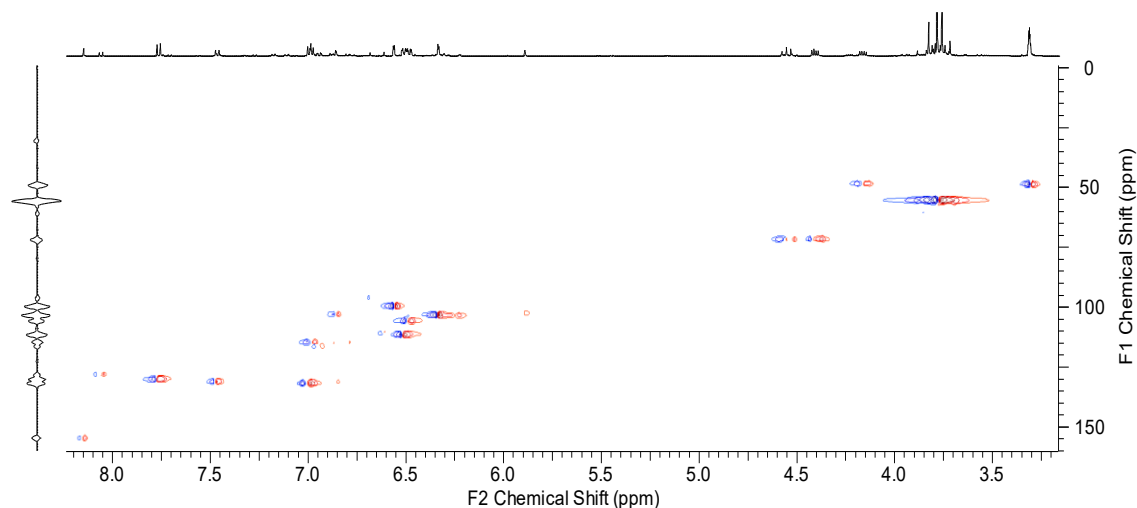


Figura 107. Mapa de correlação HSQC de ACE3-16-18-38

A análise do mapa de correlação HMBC (Figura 108) permitiu a definição dos carbonos quaternários e a posição dos demais carbonos da molécula. A presença de uma carbonila na molécula foi confirmada por meio das correlações dos sinais em δ 8,14 e 8,05 com o sinal do carbono em δ 176,7 atribuído à posição 4 do anel C da isoflavona (Figura 109). O sinal δ 8,14 correlacionou também com o sinal do carbono quaternário em δ 158,5 na posição 8a do anel aromático A. Além disso o sinal de hidrogênio em δ 8,05 correlacionou com o sinal de carbono em δ 163,4, confirmando a existência de mais um carbono quaternário na posição 7 do anel A. Os sinais de prótons aromáticos em δ 6,94 e δ 6,85 correlacionaram em J^{β} com o sinal do carbono quaternário em δ 116,8 pertencente ao anel aromático A na posição 4a.

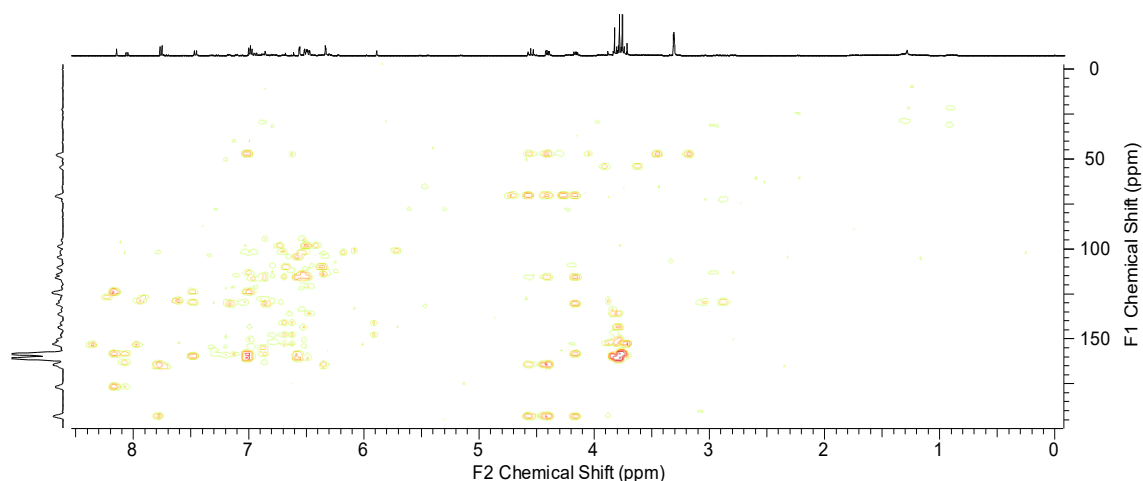


Figura 108. Mapa de correlação HMBC de ACE3-16-18-38

Ainda na parte aromática, atribuída ao anel aromático B, foi possível visualizar que o sinal em δ 7,46 (H-2'/6') correlacionou em J^3 com os carbonos em δ 159,6 (C-4') e δ 124,1 (C-3), confirmando a posição de mais dois carbonos quaternários, respectivamente, no anel B ligado a metoxila e no anel C localizado na ligação entre os anéis C e B típico de isoflavonas. O sinal dos hidrogênios da metoxila em δ 3,82 correlacionou com o sinal de carbono em δ 159,6 (C-4'), o que confirmou sua posição 4' no anel aromático B. A Figura 109 apresenta as principais correlações na formononetina observadas no mapa de correlação HMBC.

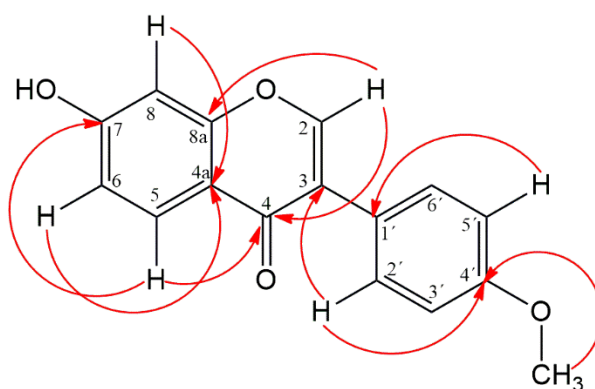


Figura 109. Principais correlações do mapa de correlação HMBC da formononetina

As análises de RMN 1D e 2D em conjunto com o EM, aliadas à comparação com a literatura, permitiram identificar a formononetina pela primeira vez na espécie *A. parviflora*. A isoflavona foi previamente descrita nas folhas e caules de *A. inermis*, onde foi isolada utilizando CLAE (Kraft et al., 2000).

Tabela 33. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da formononetina

Formononetina Substância 7				Chen <i>et al.</i> (2011); Herath (1998)	
Posição	^1H δ (mult.. J em Hz)	^{13}C (δ)*	HMBC	^1H δ (mult.. J em Hz)	^{13}C (δ)
2	8,14 s	154,5	C-4; C-8a; C-3	8,14 s	153,1
3	-	124,4	-		125,1
4	-	176,7	-		177,5
4a	-	116,8	-		117,5
5	8,05 d (8,5)	128,3	C-4; C-7; C-8a	8,04 d (9)	128
6	6,94 dd (1,8 e 8,5)	114,6	-	6,92 dd (2 e 9)	115,7
7	-	163,4	-		163,0
8	6,85 d (1,8)	103,1	C-7; C-8a; C-4a	6,83 d (2)	102,8
8a	-	158,5	-		158
1'	-	124,1	-		124,8
2' e 6'	7,46 d (8,5)	130,1	C-4'; C-2' e C-6'; C-1'	7,46 d (9)	130,6
3' e 5'	6,98 d (8,5)	114,5	C-1'	6,97 d (9)	114,3
4'	-	159,7	-		160,2
OMe	3,82 s	55,7	C-4'	3,82 s	55,6

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CD_3OD , tendo o TMS como padrão interno. ^bValores dos deslocamentos de ^{13}C foram obtidos dos experimentos de HSQC e HMBC. ^cDados da literatura de acordo com Chen *et al.* (2011). ^dDados da literatura de acordo com Herath (1998)

Na análise do espectro de massas *full scan* de ACE3-16-18-38, foi possível observar a presença do íon de m/z 301 $[\text{M}+\text{H}]^+$ como o mais intenso, e o íon de m/z 269 $[\text{M}+\text{H}]^+$, na Figura 110a. Os dois íons foram submetidos a fragmentação EM^2 no modo positivo, para o íon de m/z 301 $[\text{M}+\text{H}]^+$ observou-se os fragmentos correspondentes da sativanona já explanados na elucidação anterior. Já o íon de m/z 269 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Figura 110b) apresentou os seguintes íons de fragmentação: m/z 254, m/z 241, m/z 237, m/z 228 e 213. Os fragmentos observados, de acordo com a literatura correspondem a formononetina corroborando com os dados de RMN analisados. A proposta de fragmentação está fundamentada nos estudos de Kuhn (2003) e Gampe (2016), onde relatam que a formononetina é fragmentada por perdas sequenciais de CH_4O , CH_3 , CO . Além disso há outro caminho de fragmentação via *retro Diels-Alder*, entretanto se faz necessário o uso de pelo menos 43 eV de energia de colisão.

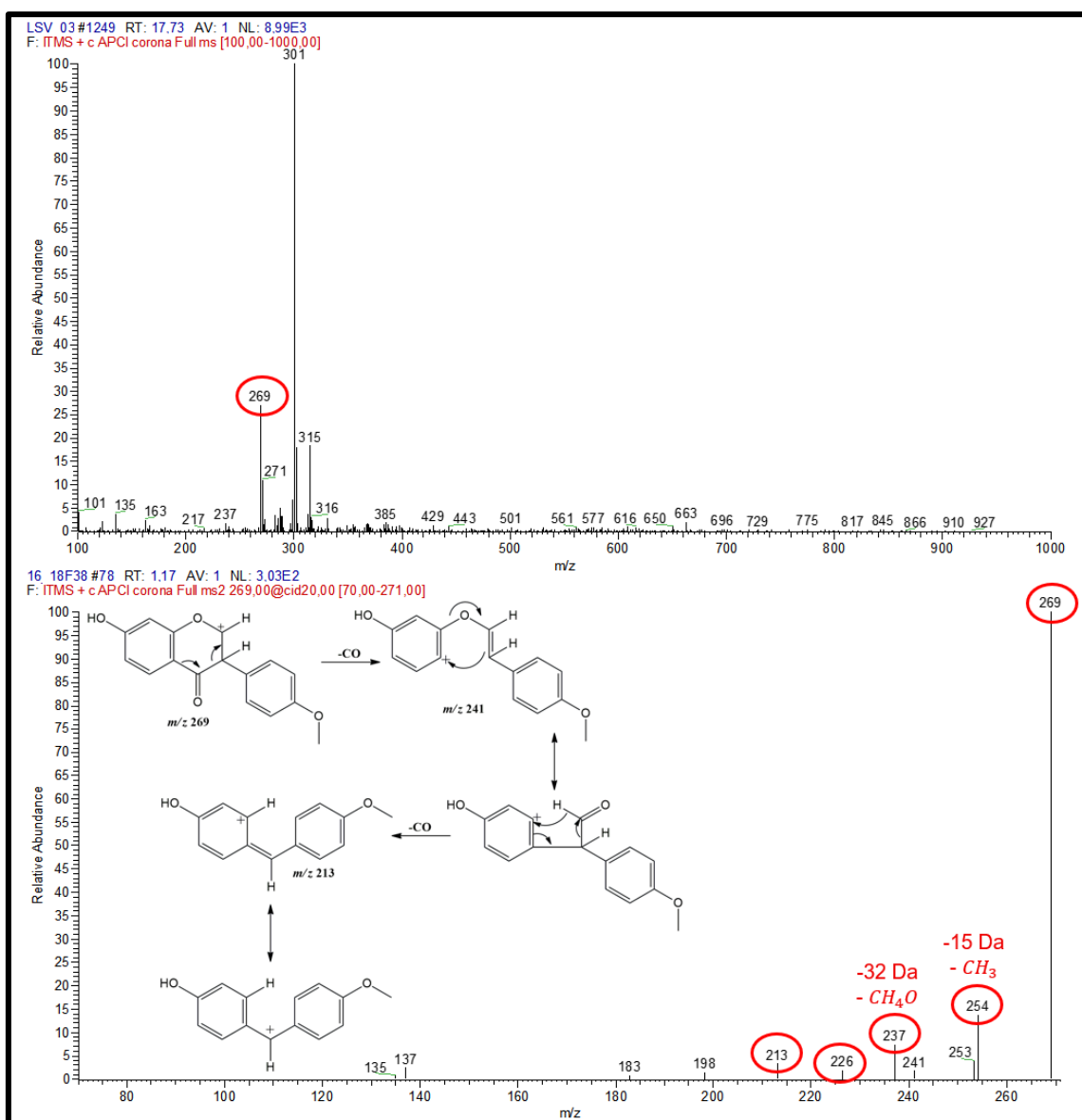


Figura 110. Espectro de massas full scan de ACE3-16-18-38 (modo positivo) (A) Fragmentação do íon m/z 269 (B)

A formononetina, assim como a biochanina A, é classificada como um fitoestrógeno que apresenta diversas propriedades biológicas, como atividade anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antiviral, citotóxica, controle de diabetes e neuroproteção (Dutra; Espitia; Batista, 2021). De acordo com a pesquisa realizada na base de dados Scifinder Scholar há o registro de cerca de 766 patentes onde a formononetina, utilizando-a como suplemento para animais, fungicida e inseticida, composição de cosméticos, cicatrização de feridas, prevenção e tratamento de doenças virais, produto de reação de síntese.

5.5.9.3 Elucidação estrutural da substância 8

A substância 8 foi identificada na subfração ACE3-16-18-41 com rendimento de 8,1 mg. A análise de CCD (Figura 111) pode-se observar manchas fluorescentes de cor azul escura, azul claro e amarela na CCD visualizada em UV no comprimento de onda 366 nm, já na placa revelada em NP-PEG observou-se manchas com fluorescência amarelo ouro e azul claro, sendo estas características de flavonoides (Wagner; Bladt, 1996). A determinação da estrutura da substância presente na mistura foi baseada em análises detalhadas por espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN), além de experimentos bidimensionais como COSY, HSQC e HMBC.

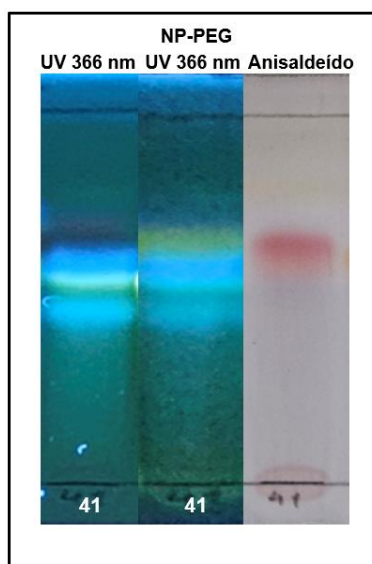


Figura 111. CCDs da subfração ACE3-16-18-41 reveladas em diferentes reagentes. Legenda: Eluente: Hexano:AcOEt:HCOOH-4:6 100 μL ; Volume de aplicação: 5 μL ; Concentração: 1 mg/mL.

De acordo com o espectro de RMN ^1H de ACE3-16-18-41, apresentado na Figura 112, foi possível observar na região de hidrogênios aromáticos sinais em δ 6,86 (1H, d, $J=7,9$ Hz), δ 6,31 (1H, d, $J=7,9$ e 2,4 Hz) e δ 6,22 (1H, d, $J=2,4$ Hz) com contantes de acoplamento do tipo *orto* e *meta*, atribuídos aos hidrogênios H-5, H-6 e H-8, respectivamente do anel aromático A (Figura 113). Nesta mesma região espectral, foram observados mais dois sinais em δ 6,54 (1H, d, $J=8,5$ Hz) e δ 6,43 (1H, d, $J=8,5$ Hz) com acoplamento em *orto*, assinalados respetivamente para as posições 6' e 5' do anel aromático C.

O espectro mostrou sinais característicos de prótons heterocíclicos, típicos de isoflavonas. Os prótons metilênicos em δ 4,23 (1H, ddd, $J=10,1$; 3,0 e 1,8 Hz) e δ 3,94 (1H, t, $J=10,1$ Hz) apresentando acoplamentos do tipo geminal, atribuídos ao H-2 do anel C. Foram observados também um sinal de próton metínico em δ 3,45 (1H, m) assinalado para a posição 3, e dois sinais metilênicos em δ 2,94 (1H, dd, $J=15,3$ Hz e 11 Hz) e δ 2,78 (1H ddd, $J=15,3$ Hz, 4,8 Hz e 1,8 Hz) que foram atribuídos aos H-4a e H-4b.

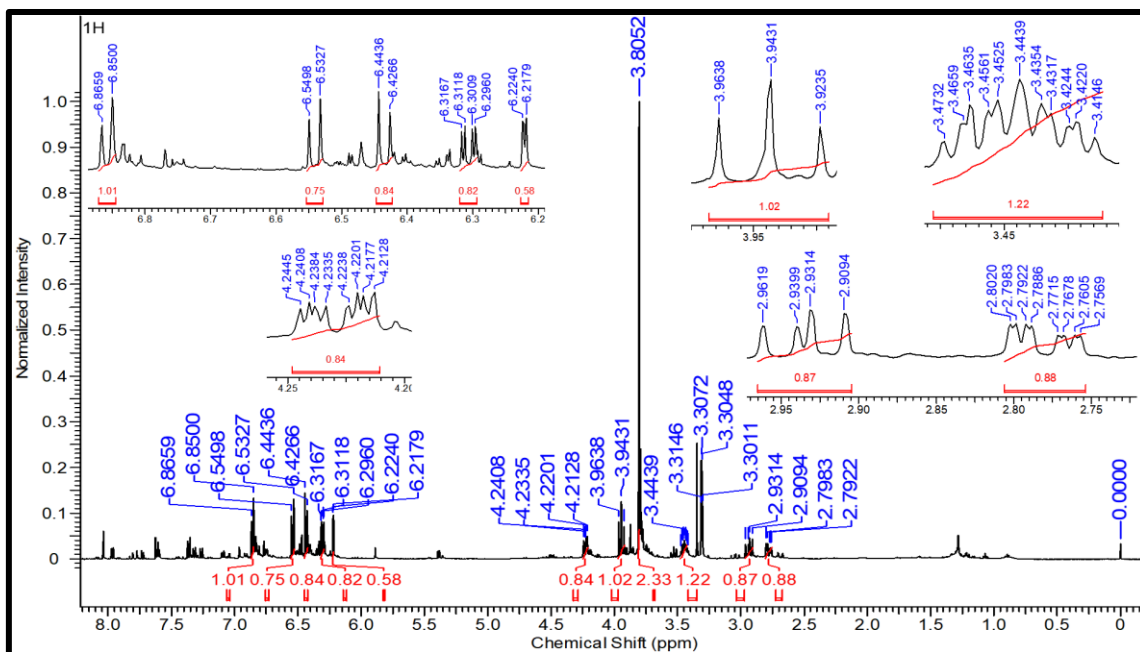


Figura 112. Espectro de RMN de ^1H e ampliações (500 MHz, CD_3OD) de ACE3-16-18-41

As correlações do mapa de contorno COSY (Apêndice I) foram fundamentais para a confirmação das posições dos hidrogênios da molécula, observadas entre os hidrogênios com descolamento químicos δ 6,86 (H-5) e δ 6,31 (H-6), δ 6,43 (H-5') e δ 6,54 (H-6'), δ 3,45 (H-3) correlacionando com os prótons metilênicos em δ 4,23 (H-2eq)/3,94 (H-2ax) e δ 2,94 (H-4ax)/ δ 2,78 (H-4eq), δ 2,94 (H-4ax) e δ 2,78 (H-4eq). A interpretação dos dados permitiu a atribuição de um esqueleto característico de isoflavona, semelhante com a estrutura do arizonicanol A (substância 8) (Figura 113) (Lotti et al., 2010).

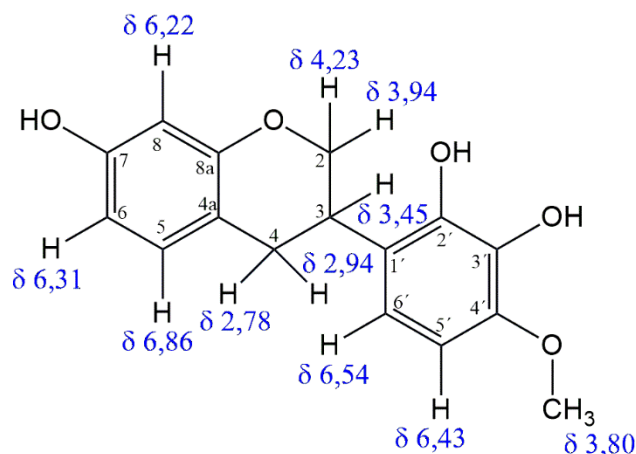


Figura 113. Estrutura da substância arizonicanol A (substância 8) com os seus deslocamentos químicos de hidrogênio

Através da análise bidimensional HSQC (Figura 114), foi possível realizar as atribuições dos carbonos hidrogenados da molécula, como apresentado na Tabela 34.

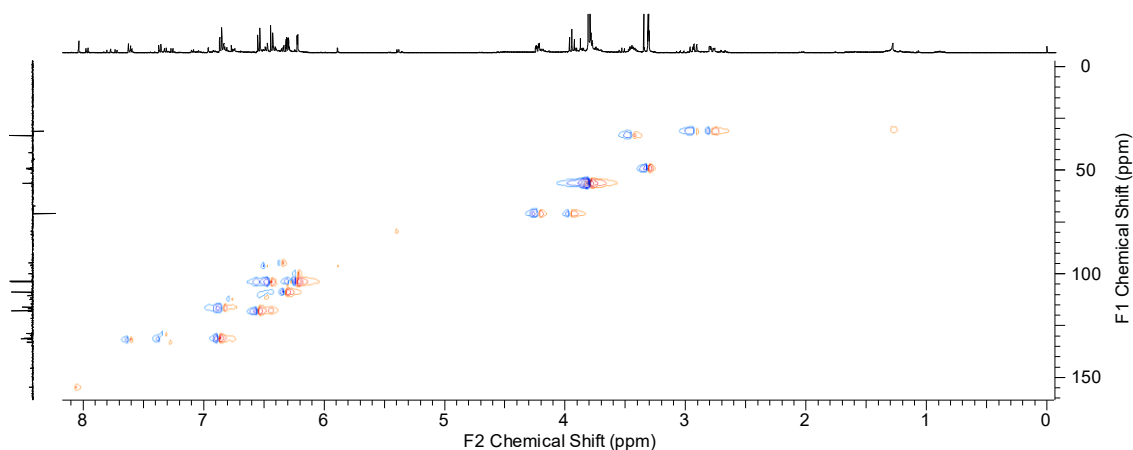


Figura 114. Mapa de correlação HSQC de ACE3-16-18-41

A partir da análise do mapa de correlação HMBC (Figura 114), foi possível estabelecer a posição dos carbonos quaternários, bem como inferir a atribuição dos demais carbonos na estrutura da molécula. As correlações dos prótons em δ 6,31 (H-6) e δ 6,22 (H-8) do anel A com o carbono em δ 115,0 indicaram que este é um carbono quaternário localizado na posição 10 da isoflavona. O sinal em δ 6,31 (H-6) correlacionou em J^2 com o carbono em δ 157,5, confirmando a existência de um carbono quaternário oxidado na posição 7 do anel aromático A. Ainda no anel A, foi observada a correlação em J^3 do próton em δ 6,86 com o carbono quaternário em δ 156,9 atribuído a posição 9.

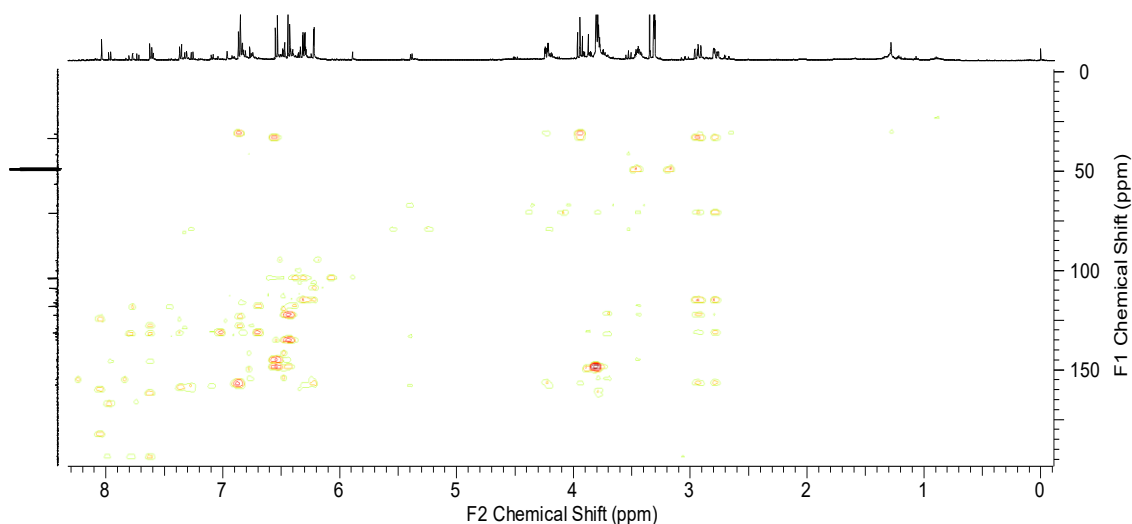


Figura 115. Mapa de correlação HMBC de ACE3-16-18-41

O hidrogênio aromático em δ 6,54 e os prótons de metoxila em δ 3,80 correlacionaram em J^3 com δ 148,5 (C-4'), atribuído ao carbono quaternário do anel B ligado a metoxila. Além disso, o hidrogênio em δ 6,54 correlacionou em J^3 com δ 144,9 (C-2') e com o carbono metínico em δ 33,3 (C-3). O sinal do próton aromático em δ 6,43 (H-5') correlacionou com δ 135,0 (C-3'), e correlacionou também com δ 122,4 (C-1'). A figura 116 apresenta as principais correlações observadas na molécula do arizonicanol A.

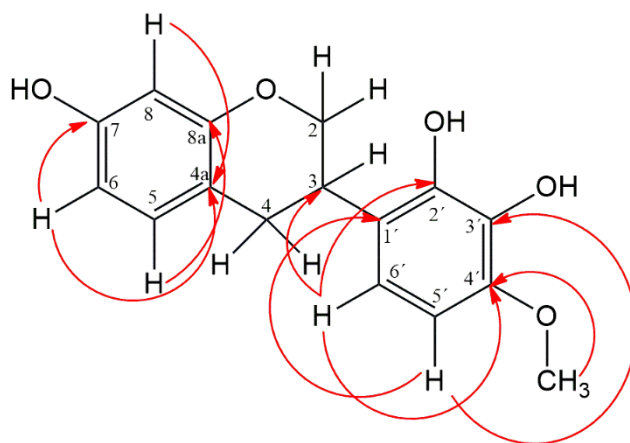


Figura 116. Principais correlações do mapa de correlações HMBC do arizonicanol A

Tabela 34. Tabela de RMN de ^1H e ^{13}C do arizonicanol A

Arizonicanol A Substância 8				Lotti (2010)	
Posição	^1H δ^a (mult.. J em Hz)	^{13}C (δ) ^b	HMBC	^1H δ (mult.. J em Hz)	^{13}C (δ)
2ax	3,94 t (10,1)	70,9	C-8a; C-1'; C-3; C-4	3,98 br t (10,0)	71,4
2eq	4,23 ddd (10,1; 3,0; 1,8)		C-8a; 122,4; C-3; C-4	4,26 br dd (10,0)	
3	3,45 m	33,3	144,9; C-1'; C-6'; C-4a; C-2; C-4	3,50 m	33,0
4 eq	2,78 ddd (15,3; 4,8; 1,8)	31,5	C-8a; C-5; C-1'; C-4a; C-2; C-3	2,81 dd (15,5 e 4,9)	31,6
4 ax	2,94 dd (15,3 e 11)		C-8a; C-5; C-1'; C-4a; C-2; C-3	2,97 dd (15,5 e 11)	
5	6,86 d (7,93)	131,0	C-8a; C-8; C-4	6,90 d (8,2)	130,8
6	6,31 dd (7,93 e 2,44)	109,0	C-7; C-4a; C-8	6,34 dd (8,2 e 1,8)	109,3
7	-	157,5	-		157,4
8	6,22 d (2,4)	103,9	C-8a; C-4a; C-6	6,26 br s	104,2
8a	-	156,9	-		156,1
4a	-	115,0	-		113,7
1'	-	122,4	-		128,3
2'	-	144,9	-		144,3
3'	-	135,0	-		135,1
4'	-	148,5	-		147,8
5'	6,43 d (8,54)	103,8	C-4'; C-2'; C-3'; C-1'	6,58 d (8,5)	103,6
6'	6,54 d (8,54)	117,7	C-4'; C-2'; C-3	6,77 d (8,5)	117,6
OMe	3,80 s	56,3	C-4'	3,84	56,0

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CD_3OD , tendo o TMS como padrão interno. ^bValores dos deslocamentos de ^{13}C foram obtidos dos experimentos de HSQC e HMBC

Na análise do espectro de *full scan* no modo positivo (Figura 117), foi detectado o íon m/z 289 como mais intenso. Este íon foi fragmentado, gerando os seguintes fragmentos de m/z 153 e m/z 123, característicos de isoflavana e correspondentes a fragmentação do arizonicanol A de acordo com o trabalho de Huang *et al.* (2009).

A integração dos dados de RMN 1D e 2D (Tabela 34), junto com a análise de espectrometria de massas e à comparação com os dados da literatura, foi possível a identificação do arizonicanol A (7,2',3'-trihidroxi-4'-metoxiisoflavana) como substância majoritária na subfração LSV3(3)16-18-41. A substância arizonicanol A é uma isoflavana previamente relata em *A. parviflora* (Garcia *et al.*, 2018) e em outras espécies da família Fabaceae, como no cerne de *Dipteryx odorata* (Imai *et al.*, 2008), *Gliricidia maculata* (Jurd; Manners, 1997) e nas raízes

de *Radix Astragali* (Huang et al., 2009). Além disso, apresenta potencial antioxidante de acordo com Imai e colaboradores (2008). A substância é pouco explorada quanto ao seu potencial biológico, se faz necessário a purificação para que esteja submetida a outros ensaios biológicos.

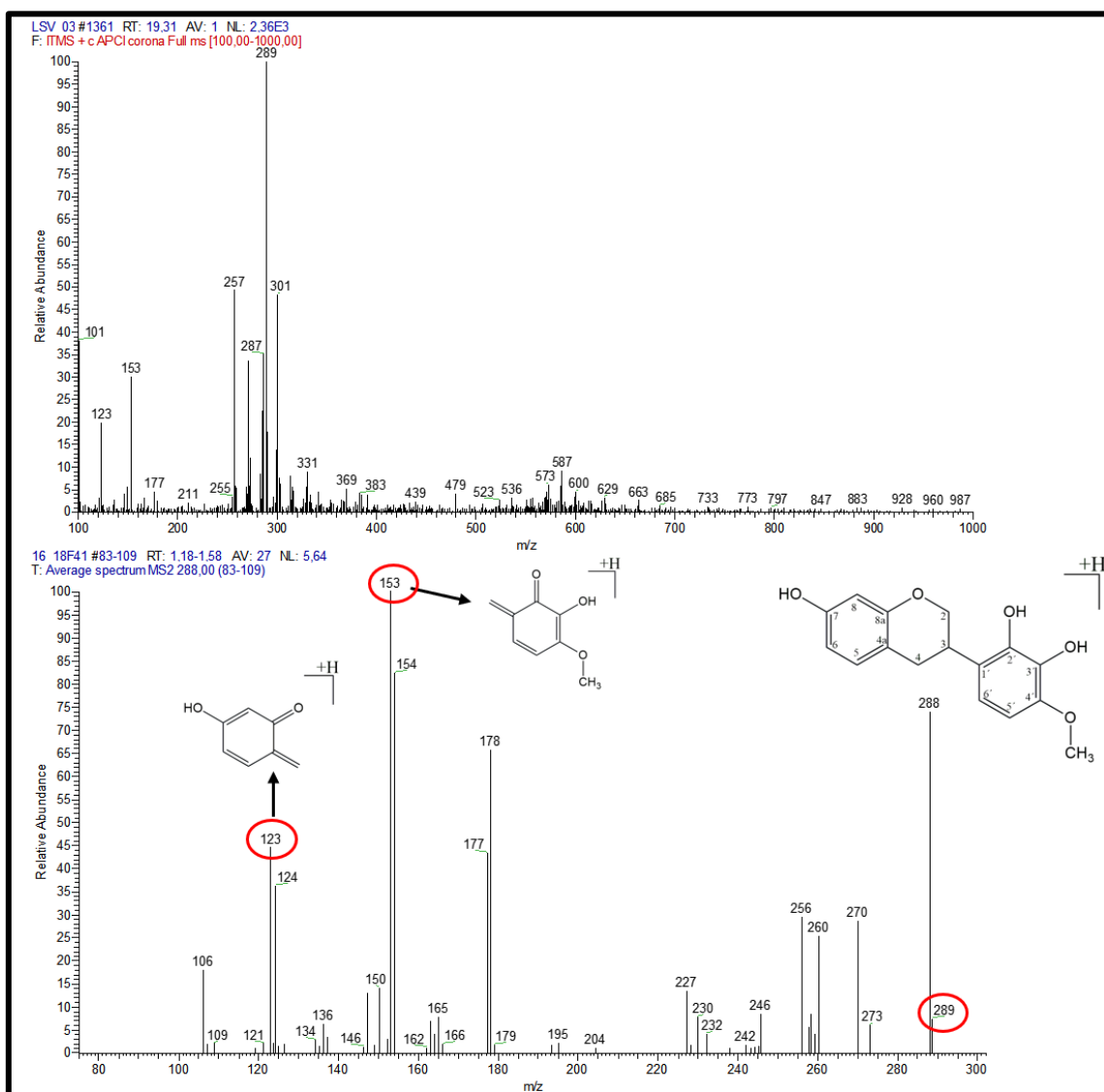


Figura 117. Espectro de massas *full scan* de ACE3-16-18-41 (A). Fragmentação do íon m/z 289 e sua proposta de fragmentação de acordo com Huang *et al.* (2009) (B).

5.5.9.4 Elucidação estrutural da substância 9

A substância 9 foi identificada na subfração ACE3-16-18-42 com 15,5 mg. Conforme ilustrado na Figura 118, essa fração apresenta manchas características de flavonoides, evidenciadas por colorações amarela e azul nas CCDs visualizadas sob luz UV a 366 nm e reveladas com o reagente NP-PEG. A fluorescência azul observada pode ser atribuída à presença de flavonoides do tipo isoflavona, conforme descrito por Wagner e Bladt (1996b). A determinação

da estrutural da substância presente na mistura, foi baseada em análises de EM, RMN ^1H e ^{13}C , além de experimentos bidimensionais como COSY, HSQC e HMBC.

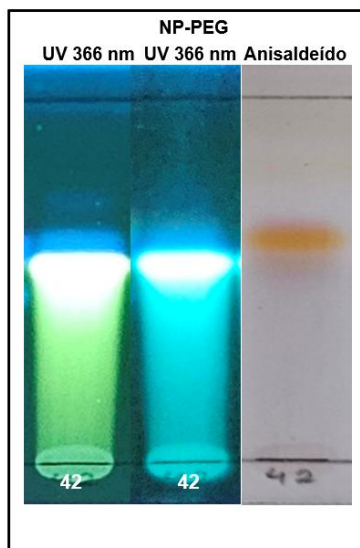


Figura 118. CCDs da subfração ACE3-16-18-42 reveladas em diferentes reagentes. Legenda: Eluente: Hexano:AcOEt:HCOOH-4:6 100 μL ; Volume de aplicação: 5 μL ; Concentração: 1 mg/mL.

A figura 119 mostra o espectro de RMN de ^1H , com sinais característicos de unidade aromática do tipo ABX em δ 7,72 (1H, d, $J=8,5$ Hz), δ 6,48 (1H, dd, $J=8,5$ e 2,4 Hz) e em δ 6,35 (1H, d, $J=2,4$ Hz) atribuídos aos prótons na posição 5, 6 e 8 do anel A. Foram observados outros sinais associados a outra unidade aromática do tipo AA'BB' em δ 7,31 (2H, d, $J=8,5$ Hz, H-2'/6') e δ 6,81 (1H, d, $J=8,5$ Hz, H-3'/5') atribuídos anel B. Os sinais em δ 5,36 (1H, d, $J=13,1$ e 2,7 Hz, H-2), δ 3,04 (1H, d, $J=17,1$ e 12,8 Hz, H-3eq) e δ 2,68 (1H, d, $J=17,1$ e 3,1 Hz, H-3) associados aos prótons alifáticos do anel C.

As correlações observadas no mapa de contorno COSY (Apêndice J) foram essenciais para confirmar as posições dos hidrogênios na estrutura molecular. Destacam-se as interações entre os hidrogênios com deslocamentos químicos em δ 7,72 (H-5) e δ 6,49 (H-6), δ 7,31 (H-2'/6') e δ 6,81 (H-3'/5'), além das correlações entre δ 5,36 (H-2) e os prótons metilênicos localizados em δ 3,04 (H-3eq) e δ 2,68 (H-3ax). A interpretação desses dados possibilitou a identificação de um esqueleto característico de dihidroflavona, compatível com a estrutura proposta da liquiritigenina (Figura 120), conforme descrito por Chen *et al.* (2011).

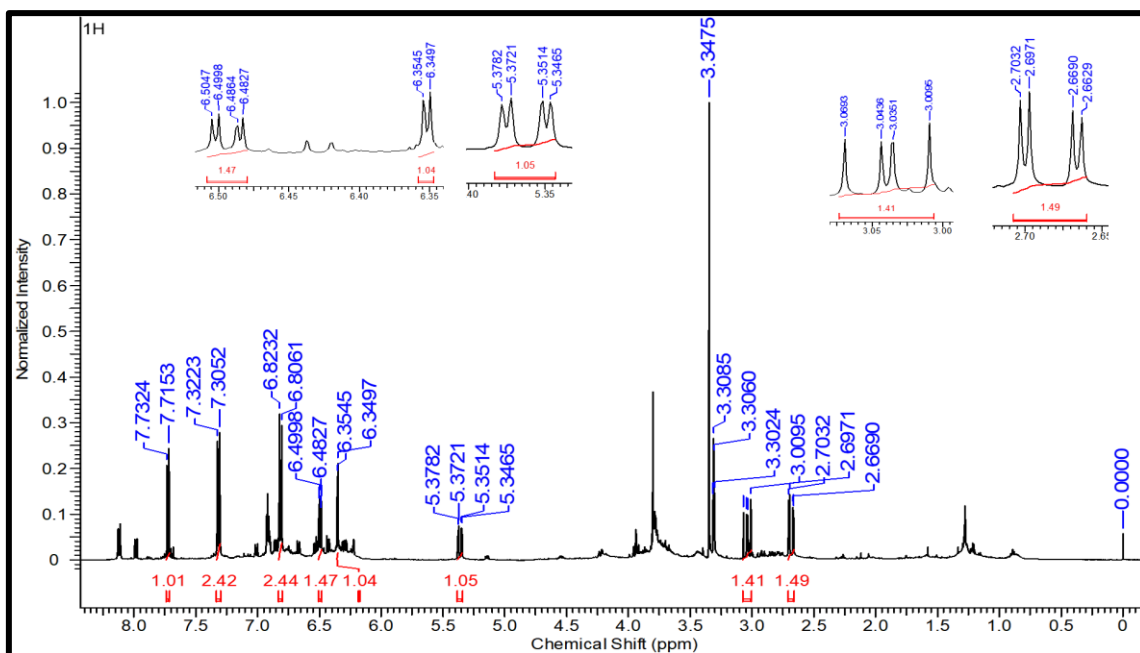


Figura 119. Espectro de RMN de ^1H e ampliações (500 MHz, CD_3OD) de ACE3-16-18-42

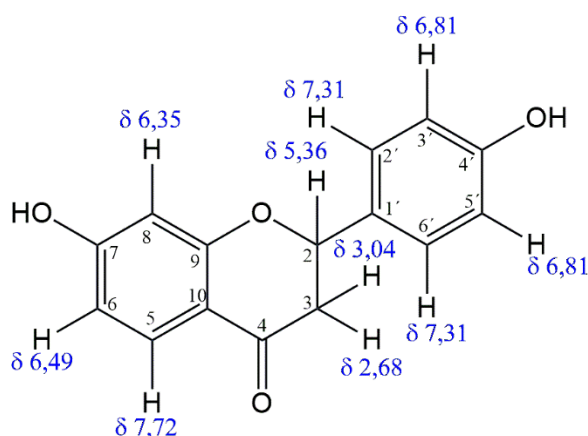


Figura 120. Estrutura da liquiritigenina com os seus deslocamentos de hidrogênio

O mapa de correlação de HSQC pode-se observar na Figura 121. No HMBC, os sinais em δ 7,12 (H-5) e δ 5,36 (H-2) apresentaram correlação com o carbono em δ 193,8 atribuído à carbonila (C-4), localizada no anel C (Figura 123).

Na região de prótons aromáticos, observaram-se correlações entre os sinais de prótons em δ 6,49 (H-8) e δ 6,35 (H-6) com o sinal de carbono em δ 115,1, atribuídas a um carbono quaternário localizado na posição 10 do anel A. O próton H-6 (δ 6,49) apresentou correlação de J^2 com o carbono em δ 167,0, evidenciando a presença de um carbono quaternário oxidado na posição 7 do mesmo anel. Ademais, foi registrada uma correlação de J^3 entre o sinal de δ 7,72 e o carbono quaternário em δ 165,8, atribuído à posição 9.

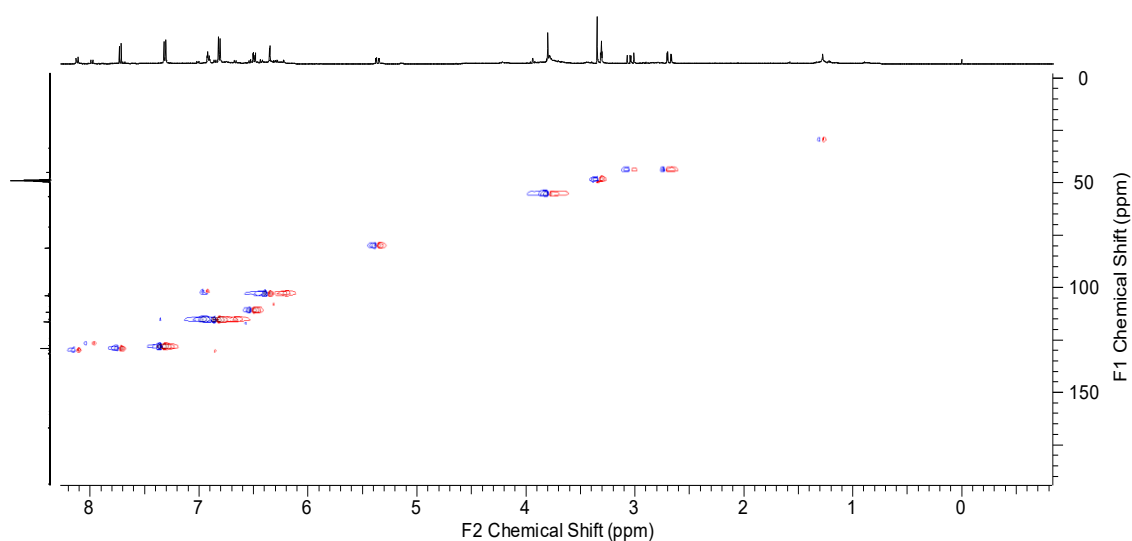


Figura 121. Mapa de correlação HSQC de ACE3-16-18-42

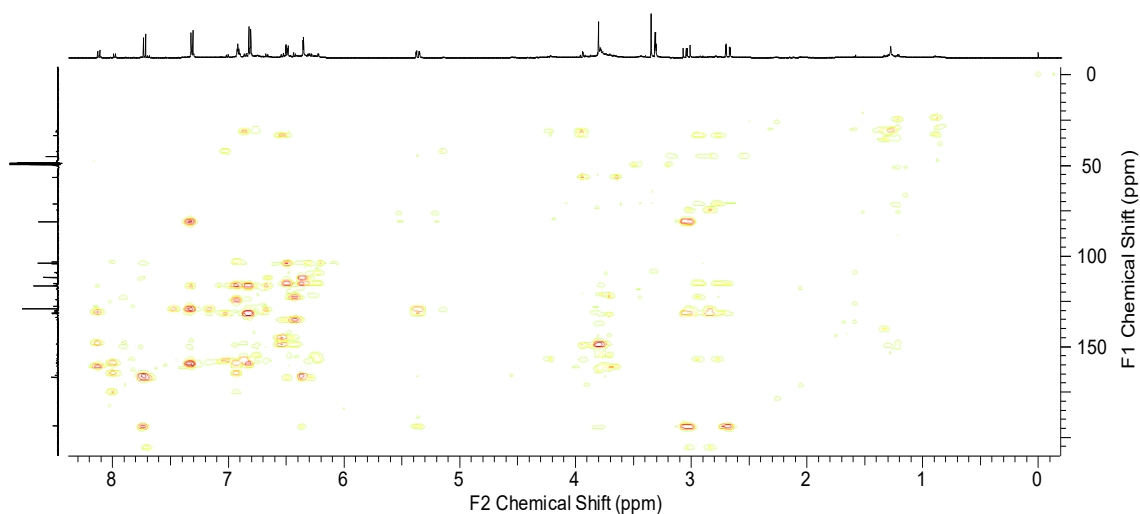


Figura 122. Mapa de correlação de HMBC de ACE3-16-18-42

Na região aromática correspondente ao anel B, destacaram-se as correlações de J^3 observadas para o sinal de próton em δ 7,31 (H-2'/6') correlacionando com os sinais de carbonos em δ 159,2 (C-4') e em δ 81,1 (C-2), confirmando o esqueleto estrutural típico de uma diidroflavonas. O sinal de próton em δ 6,81 (H-3') e os metilênicos em δ 3,04 (H-3eq) e δ 2,68 (H-3ax) correlacionaram com o carbono quaternário em δ 131,3 (C-1'), como pode ser visto na Figura 123 a seguir.

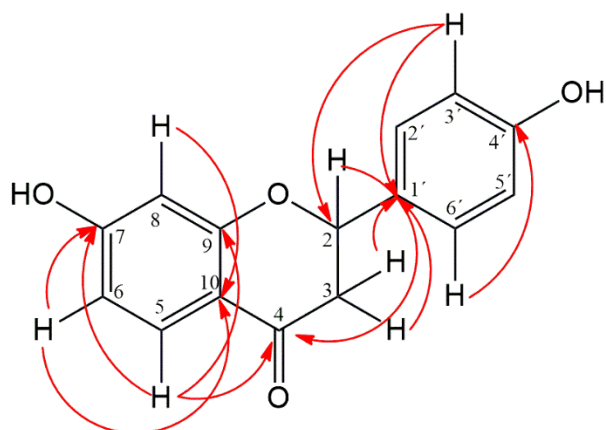


Figura 123. Principais correlações do mapa de correlação HMBC a substância 9

Tabela 35. Tabela de RMN de ^1H e ^{13}C da liquiritigenina

Liquiritigenina Substância 9				Chen <i>et al.</i> (2011); Khamsan (2012)	
Posição	^1H δ^a (mult.. J em Hz)	$^{13}\text{C}^{a,b}$ (δ)	HMBC	^1H δ^a (mult.. J em Hz)	$^{13}\text{C}^{a,b}$ (δ)
2	5,36 dd (12,8 e 2,7)	81,1	C-4; C-1'; C-6'	5,37 dd (12,5 e 3,0)	80,8
3ax	2,68 dd (17,1 e 3,1)	45,0	C-4; 115,1	2,70 dd (17,0 e 3,0)	44,9
3eq	3,04 dd (17,1 e 12,8)		C-4; C-1'; C-2	3,05 dd (17,0 e 12,5)	
4	-	193,6	-	-	193,3
5	7,72 d (8,5)	130,0	C-4; C-7; C-9; C-8	7,72 d (8,4)	129,8
6	6,49 dd (8,5 e 2,4)	111,8	C-7; C-10; C-8	6,48 dd (8,8 e 2,0)	113,1
7	-	166,8	-	-	165,7
8	6,35 d (2,4)	103,9	C-4; C-7; C-9; C-10; C-6	6,34 d (2,0)	104,2
9	-	165,6	-	-	169,9
10	-	115,1	-	-	113,7
1'	-	131,3	-	-	131,1
2' e 6'	7,31 d (8,5)	129,1	C-4'; C-2' e 6'; C-3' e 5'; C-2	7,32 d (8,4)	128,8
3' e 5'	6,81 d (8,5)	116,4	C-4'; C-1'; C-3' e 5'	6,81 d (8,4)	116,2
4'	-	159,1	-	-	159

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CD_3OD , tendo o TMS como padrão interno. ^bValores dos deslocamentos de ^{13}C foram obtidos dos experimentos de HSQC e HMBC

A análise do espectro de *full scan* em modo negativo (Figura 124a), observou-se o íon de m/z 255 como o sinal mais intenso. A fragmentação desse íon (Figura 124b) resultou na formação de íons de m/z 135 e m/z 119, os quais são característicos de estruturas do tipo flavanona, corroborando com os dados

de RMN 1D e 2D, indicando o padrão de fragmentação da liquiritigenina, conforme descrito por Zhang *et al.* (2018).

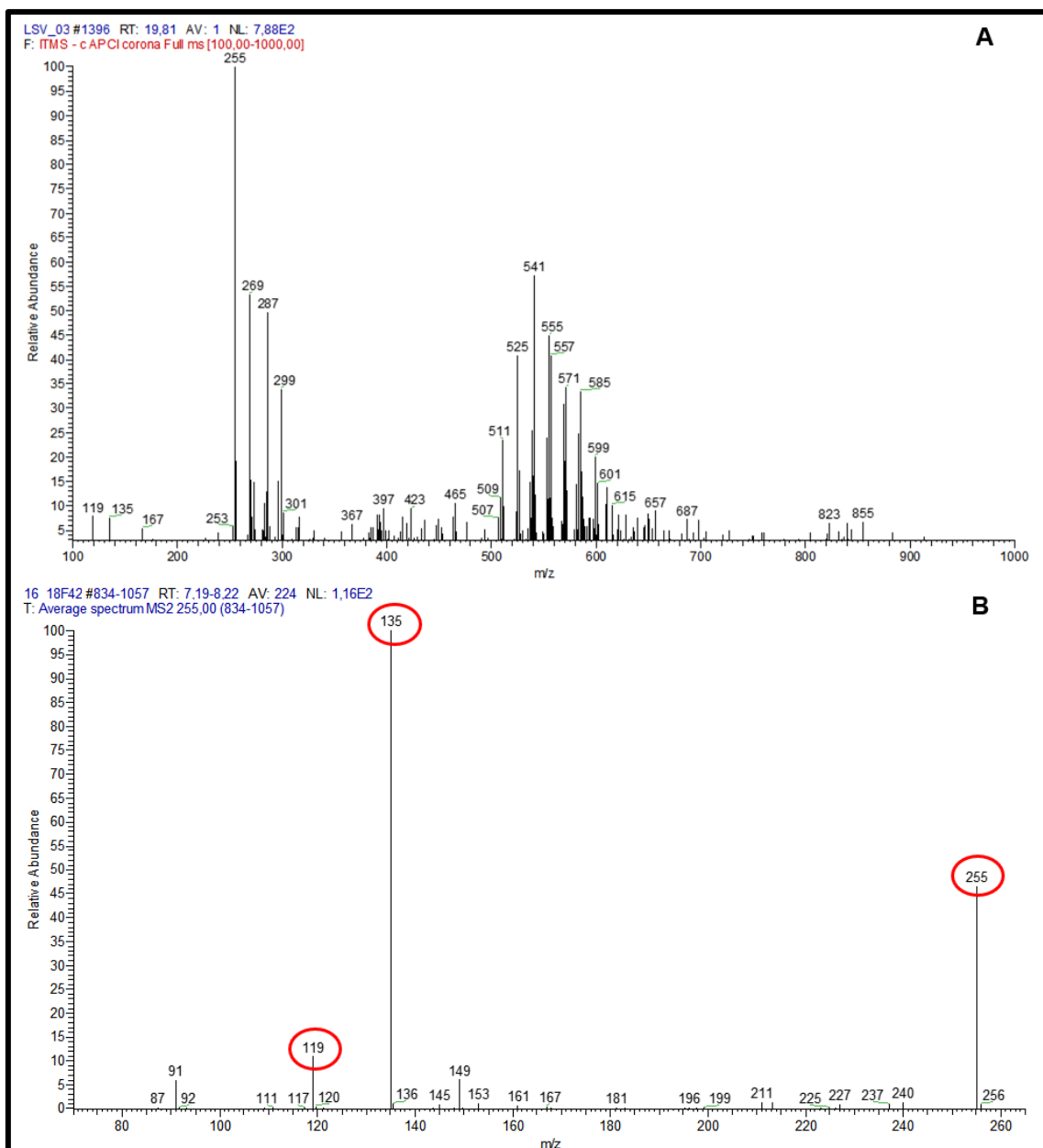


Figura 124. Espectro de massas *full scan* de ACE3-16-18-42 (**A**). Fragmentação do íon m/z 255 e sua proposta de fragmentação de acordo com Zhang *et al.* (2018) (**B**)

A partir da análise de RMN uni e bidimensional (Tabela 35), em conjunto com a espectrometria de massas e a comparação com dados da literatura, permitiu a identificação substância 9 a liquiritigenina, como substância majoritária da subfração ACE3-16-18-42. A flavanona liquiritigenina é inédita no gênero *Andira*, no entanto já foi relatada em outras espécies da família, como nas raízes de *Glycyrrhiza uralensis* conhecida como alcaçuz-chinês, e nas flores de *Butea monosperma* (Chokchaisiri *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009).

Mersereau *et al.* (2008) descreve que a liquiritigenina é o principal composto ativo de um extrato herbáceo da medicina tradicional chinesa (MF101), que é utilizado para atenuar sintomas da menopausa. Além disso, os autores comprovaram que a liquiritigenina é um agonista seletivo do estrógeno receptor beta (ER- β), ou seja, ela pode se ligar a este receptor e ativá-lo.

Estudos evidenciam que a flavanona apresenta diversas propriedades farmacológicas e bioquímicas, incluindo: atividade antifibrogênica, anti-inflamatórias, antioxidante, citotóxica, estrogênicas e hepatoprotetoras, (Asl; Hosseinzadeh, 2008; Lee *et al.*, 2019, 2021; Li *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2024; Mersereau *et al.*, 2008; Zhai *et al.*, 2024)

5.6.10 Elucidação estrutural da substância isolada da casca de *A. parviflora*

A subfração ACA2-41 (12,3 mg) foi obtida como um pó branco amorfo. A Figura 125 apresenta as CCDs reveladas em diferentes reagentes onde pode-se observar uma mancha com Rf 0,90. As colorações em azul escuro e fluorescência amarela das manchas reveladas nas placas sugerem a presença de flavonoide (Scheidemann; Wetzel, 1997; Wagner; Bladt, 1996b).

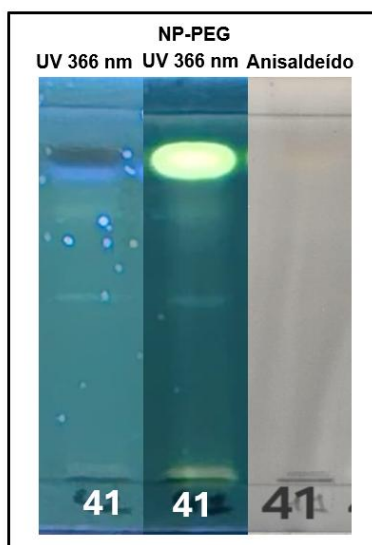


Figura 125. CCDs da fração ACA2-41 das cascas e *A. parviflora* reveladas em diferentes reagentes. Eluente: Hexano:AcOEt:Ác.Fórmico:AcOH-3:7:10 μ L:10 μ L; Volume de aplicação: 10 μ L; Concentração: 1 mg/mL.

A elucidação estrutural foi realizada tendo como base as análises de EM, RMN de ^1H e ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC. O espectro de RMN de ^1H (Figura 126), que apresentou na região correspondente aos prótons aromáticos, o sinal mais desprotegido do espectro em δ 8,05 (1H), caracterizado como singlete

típico de isoflavonas, atribuído ao H-2 do anel C. Os sinais em δ 7,45 (d, $J=8,8$ Hz) e δ 6,96 (d, $J=8,8$ Hz), cada um integrando para dois hidrogênios, correspondem a um sistema AA'BB', atribuídos aos H-2'/H-6' e H-3'/H-5', respectivamente. Adicionalmente, foram detectados sinais aromáticos em δ 6,33 (1H, d, $J=2,0$ Hz) e δ 6,21 (1H, d, $J=2,0$ Hz), indicativos de hidrogênios acoplados em posição *meta*, correspondentes aos prótons H-8 e H-6 do anel A. A presença de um grupo metoxila como substituinte no anel B foi confirmada por um singlete em δ 3,81 (3H).

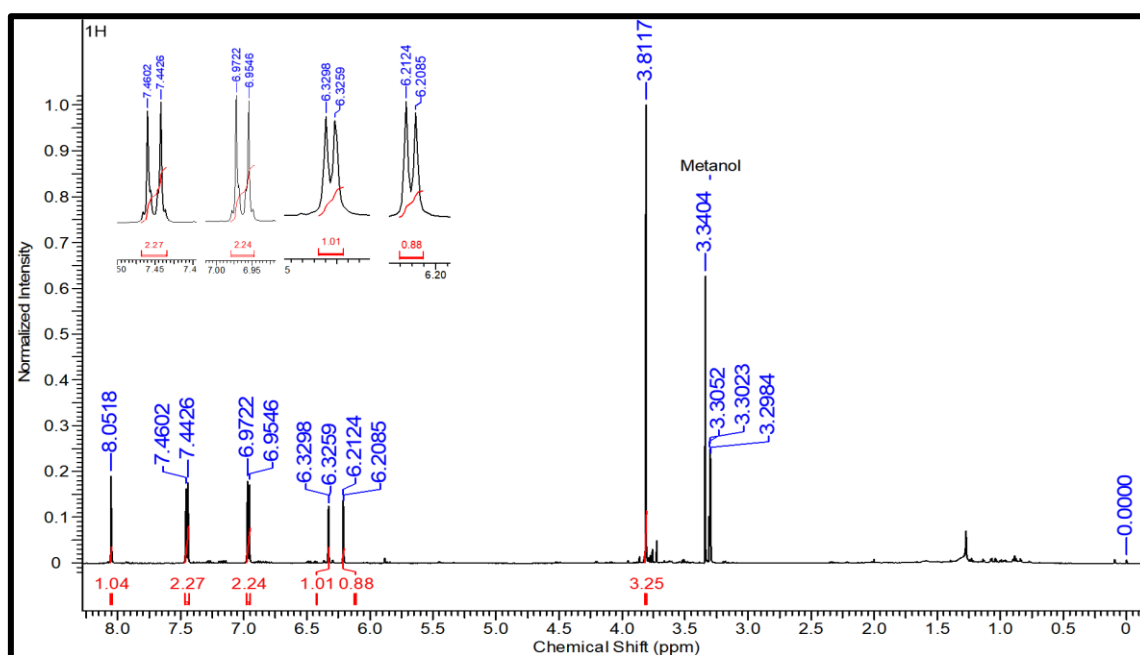


Figura 126. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de ACA2-41

A análise do mapa de correlação COSY (Apêndice K) confirmou o acoplamento entre os sinais de hidrogênio em δ 7,45 (H-2'/H-6') e δ 6,96 (H-3'/H-5'), reforçando a confirmação do acoplamento do tipo *orto* desses dois prótons. As análises dos espectros de RMN uni e bidimensionais (Tabela 36) evidenciaram que a fração ACA2-41 corresponde a biochanina A (substância 9) que foi previamente isolada no cerne de *A. parviflora*, cuja elucidação estrutural em detalhes está no tópico 5.6.12.4 (pg. 145).

Tabela 36. Tabela de RMN de ^1H e ^{13}C da biochanina A

Biochanina A				Garcia et al. (2021)	
Posição	^1H δ^a (mult., J em Hz)	^{13}C (δ) ^b	HMBC ^a	^1H δ (mult., J em Hz)	^{13}C (δ)
2	8,05	154,9	182,2; 159,8; 124,6	8,07 s	154,8
3	-	124,6	-		123,8
4	-	182,2	-		181,8
5	-	163,9	-		162,5
6	6,21 d (2,0)	100,2	166,1; 163,9; 106,4; 94,9	6,21 d (2,4)	100
7		166,2	-		164,6
8	6,33 d (2,0)	94,9	166,2; 159,8; 106,4; 100,2	6,33 d (2,4)	94,8
9		159,8	-		157,4
10		106,4	-		105,2
1'		124,7	-		123,8
2'	7,45 d (8,8)	131,3	161,3; 131,3; 124,6	7,49-7,47 dd (8,5; 2,3)	130,1
3'	6,96 d (8,8)	114,6	161,3; 124,6; 114,6	7,00-6,97 dd (8,5; 2,3)	114,2
4'		161,3	-		158,9
5'	6,98 d (8,8)	114,6	161,3; 124,6; 114,6	7,00-6,97 dd (8,5; 2,3)	114,2
6'	7,45 d (8,8)	131,3	161,3; 131,3; 124,6	7,49-7,47 dd (8,5; 2,3)	130,1
OMe-4'	3,81 s	55,7	161,3 (C-4')	3,82 s	55,5

^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em MeOD, tendo o TMS como padrão interno. ^bOs valores dos deslocamentos de ^{13}C foram obtidos dos experimentos de HSQC e HMBC.

5.5.11 Atividade citotóxica das substâncias isoladas e em mistura de *A. parviflora*

As substâncias isoladas coatlina A (αS), α -epi-coatlina A (αR), isoliquiritigenina, medicarpina não apresentam atividade citotóxica frente as células tumorais testadas (Tabela 37). No entanto a isoliquiritigenina apresenta efeito inibitório em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de mama, hepatoma, cólon, próstata e leucemia (Peng et al., 2015). Um fator que dever observado com atenção é a concentração em que a substância foi testada, assim como o tipo de célula, para que haja um efeito de comparação efetivo.

Li e colaboradores (Li et al., 2013) investigaram a ação da isoliquiritigenina nas concentrações de 5 μM , 10 μM e 20 μM , frente a células de câncer de mama e por meio de testes *in vitro* a substância diminuiu a concentração da viabilidade celular em de MCF-7 e MDA-MB-231. A concentração utilizada neste trabalho é menor do que a utilizado nos testes de MTT que foi de 10 $\mu\text{g/mL}$ equivalente a 39,06 μM , com isso o potencial citotóxico da isoliquiritigenina não deve ser descartado. Em relação ao potencial citotóxico frente a células de câncer de cólon, a isoliquiritigenina tem a capacidade de suprimir o crescimento celular,

acarretando a apoptose em células de carcinoma de cólon de camundongos e humano (Takahashi et al., 2006).

O pterocarpano medicarpina é conhecido como uma fitoalexina natural que apresenta variedades de atividades biológicas, incluindo atividade citotóxica frente a células tumorais de câncer de mama humano (BCA-1), carcinoma epidermoide humano (KB) e células de leucemia (P388) (Wang et al., 2019) sendo estas células diferentes das testadas no presente trabalho.

A fração ACE3-16-18-41 apresentou atividade citotóxica frente a todas as células testadas, com exceção da DU-145 (adenocarcinoma de próstata em expressão aumentada de EGFR). Os valores mais expressivos de CE_{50} forma para as seguintes células: HL60 ($CI_{50}=2,08 \mu\text{g/mL}$), HCT-116 ($CI_{50}=3,74 \mu\text{g/mL}$), PC3 ($CI_{50}=4,34 \mu\text{g/mL}$). A substância identificada nesta fração não apresenta relatos de atividade citotóxica na literatura, por tanto se faz necessário estudos futuros para a obtenção desta isoflavona purificada para que a atividade citotóxica seja confirmada. O resultado observado pode estar ligado a sinergismos de substâncias, sendo em vista que se tratar de uma mistura, no entanto essa hipótese dever investigada.

Quanto à fração ACE3-16-18-42, onde foi identificada a liquiritigenina, apresentou também atividade citotóxica, com destaque para as células HL60 ($CI_{50}=5,48 \mu\text{g/mL}$) e HCT-116 ($CI_{50}=4,51 \mu\text{g/mL}$). Estes resultados podem estar associados a liquiritigenina, uma vez que está apresenta atividade citotóxica frente a diferentes células tumorais como: NCI-H187 (pequenas células de câncer de pulmão), câncer de bexiga e carcinoma epidermoide pulmonar (Khamsan et al., 2012; Liu et al., 2024; Zhai et al., 2024). Em comparação com os dados da literatura, a liquiritigenina apresenta inibição contra diferentes tipos de células de câncer de pulmão, visto que na tabela 36 mostra um $CI_{50}=19,35$ (NCI-H460).

A biochanina A isolada do cerne e das cascas de *A. parviflora*, mostrou potencial citotóxico frente as células tumorais HL60 com $CI_{50}=2,15 \mu\text{g/mL}$, e NCI-H460 com $CI_{50}=32,18 \mu\text{g/mL}$. A partir deste resultado é possível afirmar que a atividade detectada nas frações ACE3 (fração acetato de EM etila do cerne) e ACA3 (fração em acetato de etila das cascas) frente a HL60, pode estar relacionada a presença da biochanina A.

Tabela 37. Resultados dos testes de atividade citotóxica de subfrações, substâncias em mistura e isoladas

AMOSTRA	PC3		HL60		SNB-19		DU-145		MDA-MB-231		NCI-H460		HCT-116	
	% de inibição	CI ₅₀ (µg/mL) 95% IC	CI ₅₀ 95% IC	% de inibição	CI ₅₀ (µg/mL) 95% IC	% de inibição	CI ₅₀ (µg/mL) 95% IC	% de inibição	CI ₅₀ (µg/mL) 95% IC	% de inibição	CI ₅₀ (µg/mL) 95% IC	% de inibição	CI ₅₀ (µg/mL) 95% IC	
ACE3-4-2 (coatlina A (αS))	-8,491	ND	ND	0,097	ND	10,907	ND	-9,259	ND	13,326	ND	8,115	ND	
ACE3-4-3 (α-epi-coatlina A (αR))	-3,480	ND	ND	10,197	ND	2,743	ND	-5,480	ND	10,418	ND	19,563	ND	
ACE3-17-9 (isoliquiritigenina)	-17,408	ND	ND	-22,135	ND	12,105	ND	18,424	ND	12,732	ND	-3,316	ND	
ACE3-17-13 (medicarpina)	36,213	ND	ND	-27,102	ND	-0,506	ND	20,445	ND	-5,127	ND	-9,290	ND	
ACE3-16-18-41 (arizonicanol A)	87,475	4,34 3,94-4,78	2,08 1,55-2,74	75,648	ND	58,965	ND	64,839	5,68 4,57-7,10	82,469	10,31 9,43-11,29	92,329	3,74 2,88-4,85	
ACE3-16-18-42 (liquiritigenina)	39,886	ND	5,48 3,72-8,69	54,078	ND	24,254	ND	63,694	13,87 10,69-19,00	64,167	19,35 16,89-24,38	85,193	4,51 3,4-6,88	
ACE3-16-18-44	11,333	ND	ND	-16,808	ND	-14,362	ND	15,023	ND	78,430	ND	13,036	ND	
ACA2-41 (biochanina A)	41,698	ND	2,15 1,87-2,48	-8,931	ND	43,635	ND	18,593	ND	63,602	32,18 25,69-43,92	57,647	ND	
ACA2-46	64,287	13,11 10,33-17,43	4,04 3,08-5,27	26,659	ND	0,217	ND	66,894	27,15 19,65-45,16	68,420	21,24 16,73-29,83	50,960	ND	
ACA2-59	-6,451	ND	ND	6,907	ND	0,174	ND	-5,457	ND	23,311	ND	-4,354	ND	
ACA2-64	10,897	ND	ND	11,088	ND	-23,683	ND	-19,113	ND	19,079	ND	-1,063	ND	

Legenda: PC3 (Carcinoma de próstata), HL60 (Leucemia promielocítica), SNB-19 (Astrocitoma), DU-145 (Adenocarcinoma de próstata com expressão aumentada de EGFR), MDA-MB-23 (Carcinoma de mama), NCI-H460 (Carcinoma de pulmão) HCT-116 (Carcinoma de cólon - humano), ND-Não detectad

De acordo com Anuranjana *et al.*, em uma revisão da literatura sobre o os mecanismos de aplicação farmacológica da biochanina A, afirmam que estudos mostram que a isoflavona possui resultados favoráveis para interromper o desenvolvimento de vários tipos de cânceres, principalmente os dependentes de hormônio, como de mama, próstata e além de outros tipos, incluindo o câncer de pâncreas, cólon, pulmão, osteossarcoma e glioma.

5.6 Espécie *Robrichia schomburgkii* (sucupira amarela)

5.6.1 Fracionamento de E3 de *R. schomburgkii* por HPCCC

Após a avaliação em CCD (Figura 127) dos 13 sistemas listados na tabela 11, observou-se que em todos os sistemas houve distribuição entre as duas fases, porém a partir do sistema bifásico 14 (S14) a fração se concentrou na fase inferior, assim como no sistema 16 (S16). Após as observações destacadas, realizou-se o fracionamento de E3 em fase normal, tendo como fase estacionária a FI do sistema 12 e as FS dos sistemas 12 ao sistema 7 (Tabela 13) foram utilizadas como fases móveis.

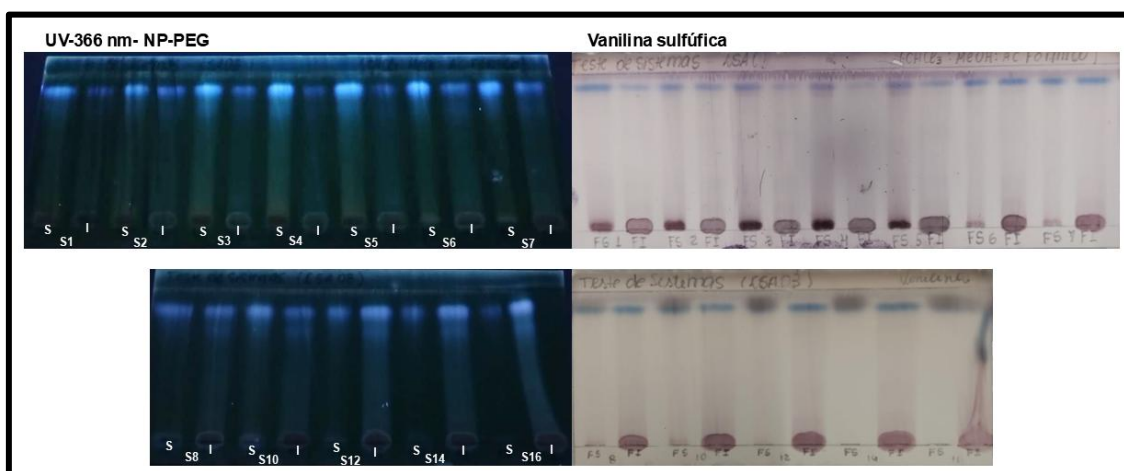


Figura 127. Testes de sistemas bifásicos com a fração E3. Eluente: CHCl_3 :MeOH:HCOOH-7:3:0,2 Volume de aplicação: 10 μL

5.7.2 Tratamento da fração E3 para injeção em HPCCC

Após o tratamento, foram obtidos 1,221 g da amostra para injeção. As amostras da fração acetato, bem como as frações obtidas após o pré-tratamento (parte solúvel e não solúvel), foram analisadas por cromatografia em camada delgada. Os resultados dessa análise revelaram perfis e comportamentos semelhantes entre a fração original e a parte solúvel após o tratamento, indicando que ocorreu uma separação eficaz entre as substâncias de interesse

e aquelas que precipitam na coluna do HPCCC. O perfil cromatográfico obtido está ilustrado na Figura 128. As duas placas foram eluídas no mesmo eluente, composto por Hexano: Acetato de etila: ácido Fórmico: ácido acético na proporção 6: 4: 0,2: 0,2.

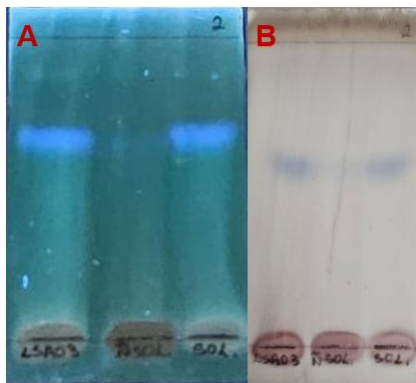


Figura 128. CCD das frações de E3

Legenda: (1A) Placa revelada em NP/PEG. Ordem de aplicação: Fração E3 sem o tratamento → Fração que não solubilizou após o tratamento → Fração solúvel após o tratamento. (1B) Placa revelada em Vanilina. Ordem de aplicação: Fração E3 sem o tratamento → Fração que não solubilizou após o tratamento → Fração que não solubilizou após o tratamento.

5.7.3 Fracionamento de E3 por HPCCC

O fracionamento por HPCCC rendeu 54 que foram analisadas por CCD (Figura 129). Nos primeiros sistemas de eluição (S12, S11 e S10) foram observadas manchas características de flavonoides nas primeiras frações. Nos seguintes sistemas e extrusão o perfil cromatográfico foi bem similar, indicando que este método poderá ser otimizado a fim de diminuir a quantidade de sistemas e obter frações mais concentradas. Os rendimentos das frações podem ser observados na Tabela 38, as frações que apresentaram massa abaixo de 0,5 mg não foram listadas na tabela.

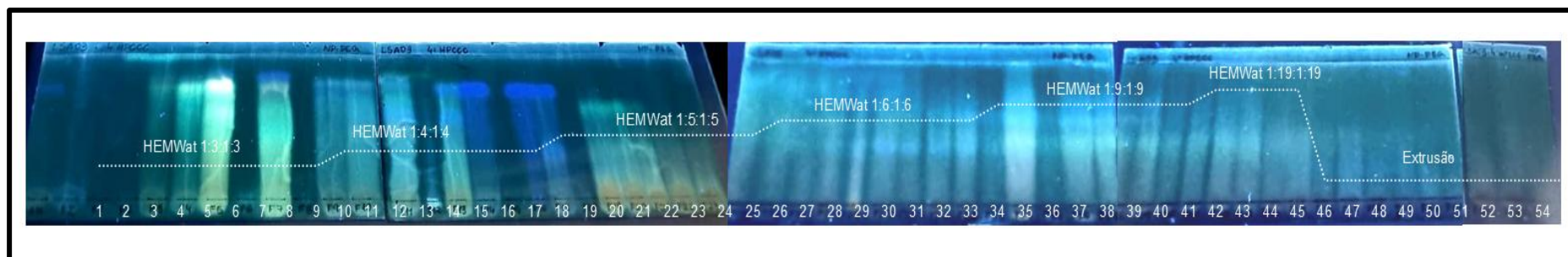


Figura 129. Placas cromatográficas das frações obtidas do fracionamento de E3. Eluente: Hexano:AcOEt:Ác.Fórmico:AcOH-3:7:0,2 μ L: 0,2 μ L (para as frações AR-23); Eluente: AcOEt:Ác.Fórmico:AcOH:H₂O-97:11:11:29 (para as frações 24-54); Revelador: NP-PEG UV 366 nm; Volume de aplicação: 10 μ L; Concentração: 1 mg/mL.

Tabela 38. Rendimento das frações obtidas do fracionamento de E2 por HPLC

Fração	Rendimento (mg)
AR	10,9
E3-2	0,6
E3-3	0,6
E3-4	0,5
E3-6	2,6
E3-8	0,9
E3-14	0,9
E3-15	3,7
E3-16	1,6
E3-17	0,8
E3-18	0,8
E3-19	1,1
E3-20	1,0
E3-21	0,5
E3-22	0,7
E3-23	0,8
E3-24	0,7
E3-25	1,3
E3-26	1,5
E3-27	1,7
E3-28	2,1
E3-29	0,9
E3-30	1,3
E3-31	1,9
E3-32	0,6
E3-33	0,7
E3-35	0,5
E3-38	0,5
E3-39	0,6
E3-40	0,5
E3-41	0,5
E3-44	0,8
E3-45	7,0
E3-46	2,8
E3-47	4,1
E3-48	1,8
E3-49	1,0
E3-50	2,2
E3-51	6,0
E3-52	37,0
E3-53	1,1
E3-54	0,5

As frações foram analisadas por EM e a fração E3-52 foi encaminhada para o teste citotóxico frente a células tumorais. A fração foi testada frente a três linhagens de células HCT116, PC3 e SNB-19, sendo ativa frente a célula PC3 apresentando inibição da viabilidade celular acima de 60%. Esse resultado indica que o CI_{50} deve ser calculado e esta fração deve ser fracionada em estudos futuros para que as substâncias responsáveis pela atividade sejam identificadas.

6. CONCLUSÃO

A presente tese alcançou seu objetivo ao caracterizar a composição química de resíduos de *Andira parviflora* e *Roubrichia schomburgkii*, espécies provenientes da indústria madeireira amazônica, e ao investigar sua atividade citotóxica frente a linhagens celulares tumorais. Os extratos e frações de resíduos das espécies, *A. parviflora* e *R. schomburgkii* apresentaram resultados indicativos da presença de compostos fenólicos, esteroides livres, terpenoides, saponinas, alcaloides e taninos condensados na prospecção fitoquímica. Estes achados demonstraram que mesmo materiais frequentemente descartados podem esconder complexidade química e potencial terapêutico.

As análises por CCD corroboram com os testes em tubos evidenciando presença de compostos fenólicos como flavonoides, em todos os extratos e frações testadas, do cerne e das cascas de *A. parviflora*. Na espécie *R. schomburgkii* a presença de flavonoides foi detectada principalmente nas frações E2, E3 e E4.

A atividade citotóxica se concentrou nas frações E3 (fração em acetato de etila) e E4 (fração butanólica) de *R. schomburgkii*. Já na espécie *A. parviflora* a atividade se concentrou nas frações em clorofórmio (ACE2 e ACA2) e em acetato de etila (ACE3 e ACA3).

Na fração ACE3 de *A. parviflora* com potencial citotóxico foram isolados e caracterizados por EM, RMN 1D e 2D cinco flavonoides: os epímeros **coatlina A** e **α -epi-coatlina A**, **isoliquiritigenina**, **medicarpina** e a **biochanina A**. Este é o primeiro relato dos epímeros na espécie e o primeiro relato da isoliquiritigenina no gênero *Andira*. Além disso, essas substâncias foram isoladas pela primeira vez utilizando a combinação das técnicas de HPCCC e HPLC.

A partir do fracionamento bioguiado da subfração ACE3-16-18, foi possível caracterizar mais 4 flavonoides em mistura, sendo três isoflavonoides: **sativanona**, **formononetina**, **arizonicanol A** e uma flavona a **liquiritigenina**. Todas as substâncias, com exceção do arizonicanol A, foram descritas pela primeira vez na espécie *A. parviflora*. Na fração ACA2 das cascas de *A. parviflora* foi isolada a **biochanina A** novamente.

A **biochanina A** e a **liquiritigenina** podem ser responsáveis pela atividade citotóxica detectada na fração ACE3 de *A. parviflora*. Porém, não se

pode descartar a possibilidade da **isoliquiritigenina** e da **medicarpina** também contribuírem para esse potencial citotóxico frente a células tumorais, uma vez estas já apresentaram atividade citotóxica confirmada pela literatura.

As demais frações promissoras, quanto a atividade citotóxica, devem ser exploradas em novas pesquisas que serão desenvolvidas pelo grupo de pesquisa Q-BiomA, a fim de elucidar as substâncias responsáveis pela atividade.

Esta pesquisa destaca a eficácia do HPCCC como uma ferramenta poderosa para o fracionamento de substâncias bioativas em escala semi-preparativa de matrizes complexas derivadas de resíduos de madeira, com reprodutibilidade, economia de solventes orgânicos e além sem perde de amostra por adsorção.

Além disso, os achados contribuem significativamente para o conhecimento fitoquímico dos gêneros *Andira* e *Robrichia*, ampliando os horizontes para novas investigações em bioatividade composição química. Ao transformar resíduos florestais em recurso biotecnológico, esta pesquisa promove a valorização da biodiversidade amazônica, a inovação científica e o aproveitamento sustentável de recursos naturais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARI, B. *et al.* Fluorescent pigment and phenol glucosides from the heartwood of *Pterocarpus marsupium*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 655–660, 2012.
- ADDOTEY, J. N. *et al.* Isoflavonoids with inhibiting effects on human hyaluronidase-1 and norneolignan clitorienolactone B from *Ononis spinosa* L. root extract. **Fitoterapia**, v. 130, p. 169–174, 2018.
- AGRAWAL, P. K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3307–3330, 1992.
- AHMAD, F.; ANWAR, F.; HIRA, S. Review on medicinal importance of Fabaceae family. **Pharmacology Online**, v. 3, p. 151–156, 2016.
- AKRAM, M. *et al.* Traditional use, phytochemistry and pharmacology of genus *Sesbania*: A review menstrual flow for the reduction of the size of enlarged spleen and use in skin ailments as well as in case of rheumatic. **Advanced Journal of Science and Engineering**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2021.
- ALMEIDA, H. M.; OLIVEIRA, F. F. M.; FALCÃO, D. A. Análise fitoquímica dos extratos hidroalcoólico da entrecasca e da folha de *Pseudobombax marginatum* (St. Hill) Rob. **Blucher Chemistry Proceedings**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2015.
- ALMEIDA, J. G. L.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. NMR spectral assignments of a new [C-O-C] isoflavone dimer from *Andira surinamensis*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 103–106, 2008.
- ALSHABRMI, F. M.; ABA ALKHAYL, F. F.; REHMAN, A. Novel drug discovery: advancing alzheimer's therapy through machine learning and network pharmacology. **European Journal of Pharmacology**, v. 976, 2024.
- ALVES, L. A. *et al.* Estudo fitoquímico e propriedades de *Andira paniculata* Benth (Fabaceae) na inibição de linhagens tumorais de leucemia, próstata e carcinoma de cólon. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, n. 1, p. 140–152, 2024.
- ALVES, T. S. **Estudo químico e avaliação da atividade de *Diploptropis racemosa* (Hoehne), resíduo madeireiro do médio Amazonas**. Dissertação de Mestrado—Itacoatiara: Universidade Federal do Amazonas, 2020.
- AMORIM, F. *et al.* Quantification and qualification of tannins from residues of forest species *Hymenea courbaril* Duke and *Bowdichia virgiloides* Kunth. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 23, n. 3, p. 1–11, 2018.
- ANDUGULAPATI, S. B. *et al.* Biochanin-A ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing the TGF- β mediated EMT, myofibroblasts differentiation and collagen deposition in in vitro and in vivo systems. **Phytomedicine**, v. 78, n. 153298, 2020.

ANRAKU, T. *et al.* Inhibitory activities against methioninase, collagenase and release of matrix metalloprotease-1 from human gingival fibroblast by heartwood extract from *Pterocarpus marsupium*. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 7, p. 837–840, 2018.

ANURANJANA, P. V. *et al.* Mechanisms behind the pharmacological application of biochanin-A: a review. **F1000Research**, v. 12, p. 107, 2023.

ARAÚJO, I. M. de *et al.* O gênero *Andira* Lam.: uma breve revisão sobre ocorrência, composição química e atividades biológicas. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, v. 17, n. 7, p. e8920, 2025.

ARAÚJO, M. S. **Constituintes Químicos e Investigação do Potencial Citotóxico das Cascas e Folhas de *Guatteria olivacea* (Annonaceae)**. [S.l.]: Universidade Federal do Amazonas, 2019.

ASL, M. N.; HOSSEINZADEH, H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 709–724, 2008.

AZANI, N. *et al.* A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44–77, 2017.

BAO, H. *et al.* Preparative separation of structural isomeric pentacyclic triterpenes from *Eriobotrya japonica* (Thunb.) leaves by high speed countercurrent chromatography with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as additive. **Journal of Chromatography A**, v. 1646, 2021.

BEECH, E. *et al.* GlobalTreeSearch: The first complete global database of tree species and country distributions. **Journal of Sustainable Forestry** v. 36, n. 5, p. 454–489, 4 jul. 2017.

BELTRAMI, E. *et al.* Coatline A and B, two C-glucosyl- α -hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2931–2933, 1980.

BERTHOD, A. *et al.* Countercurrent Chromatography in Analytical Chemistry. **Pure Application Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 355–387, 2009.

BRAZ FILHO, R. ;. *et al.* Flavonoids from Amazonian Leguminosae. **Phytochemistry**, v. 12, n. 18, p. 1184–1186, 1973.

BRAZ-FILHO, R. *et al.* Flavonoids from Amazonian Leguminosae. **Phytochemical Reports**, v. 12, p. 1184–1183, 1973.

BÜTTENBENDER, S. L.; SIMON, E. De S.; VOLPATO, N. M. Cromatografia contracorrente: princípios e aplicações. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 15, n. e, 2018.

CAI, Xu *et al.* Separation of six antioxidants from *Hypsizygus marmoreus* by high-speed countercurrent chromatography utilizing an approach based upon the polarity parameter model. **Journal of Chromatography A**, v. 1633, 2020.

- CARRANZA-MONTANO, M. A. *et al.* Forrage quality and potential of species from the Sierra de Manantlan (Mexico) tropical dry forest. **Agrociencia**, v. 37, n. 2, p. 203–210, 2003.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. **Embrapa Florestas, Circular Técnica**, v. 5, p. 637, 2014.
- CASTELLANO, G.; TORRENS, F. Quantitative structure-antioxidant activity models of isoflavonoids: a theoretical study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12891–12906, 2015.
- CHAKRABORTY, P.; SARASWAT, G.; KABIR, S. N. α -Dihydroxychalcone-glycoside (α -DHC) isolated from the heartwood of *Pterocarpus marsupium* inhibits LPS induced MAPK activation and up regulates HO-1 expression in murine RAW 264.7 macrophage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 277, n. 1, p. 95–107, 2014.
- CHEN, H. J. *et al.* Anti-inflammatory effects and chemical study of a flavonoid-enriched fraction from adlay bran. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1741–1748, 15 jun. 2011.
- CHERN, C. M. *et al.* Medicarpin isolated from *Radix hedysari* ameliorates brain injury in a murine model of cerebral ischemia. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 29, n. 4, p. 581–605, 2021.
- CHOKCHAISIRI, R. *et al.* Bioactive flavonoids of the flowers of *Butea monosperma*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 4, p. 428–432, 2009.
- COCKER, W. *et al.* Extractives from woods. Part I. Extractives from *Andira inermis* (Wright). **Journal of the Chemical Society**, v. 33, p. 4906–4909, 1962.
- CONWAY, W. D. Counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 538, p. 21–35, 1991.
- CORADIN, Lidio; SIMINSKI, Alexandre; REIS, Ademir. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas pra o futuro. *In*: **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011. p. 934.
- COSTA, F. N.; LEITÃO, G. G. Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 3, p. 336–347, 2010.
- CRAIG, Lyman C. Partition Chromatography and Countercurrent Distribution. **Analytical Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1346–1352, 1950.
- CYSNEIROS, V. C. *et al.* Espécies madeireiras da Amazônia: riqueza, nomes populares e suas peculiaridades. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 38, 2018.

DELGADO, M. C. C.; SILVA, M. S.; FOT, R. B. 3B-Hydroxy-21B-E-cinnamoyloxyolean-12-en-28-oic acid, a triterpenoid from *Enterolobium Contorstisiliquum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 10, p. 2289–2292, 1984.

DEMARQUE, D. P. *et al.* Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.

DENDUP, T. *et al.* α -Glucosidase inhibitory activities of isoflavanones, isoflavones, and pterocarpanes from *Mucuna pruriens*. **Planta Medica**, v. 80, p. 604–608, 2014.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. L. **Plantas Medicansi na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ª ed. ed. São Paulo: Editora UNESP., 2002.

DINIZ, M. B. *et al.* Região Amazônica: biodiversidade e possibilidades de transformação industrial. **Cadernos Cepec**, v. 6, n. 5, p. 1–50, 2017.

DUTRA, J. M.; ESPITIA, P. J. P.; BATISTA, R. A. Formononetin: biological effects and uses – a review. **Food Chemistry**, v. 359, 2021.

ELATTAR, M. M. *et al.* Insights into bioactive constituents of onion (*Allium cepa* L.) waste: a comparative metabolomics study enhanced by chemometric tools. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 24, n. 1, 2024.

EL-DIN, M. G. I *et al.* Genus *Enterolobium*: traditional uses, chemistry and biological activities. **Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University**, v. 1, n. 1, p. 1–18, 2017.

EL-DIN, M. I. G. *et al.* Cytotoxicity of *Enterolobium timbouva* plant extract and its isolated pure compounds. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 7, p. 826–836, 2014.

FAYEK, N. M. *et al.* UPLC-MS metabolome-based seed classification of 16 *Vicia* species: a prospect for phyto-equivalency and chemotaxonomy of different accessions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 17, p. 5252–5266, 2021.

FENG, Z. J.; LAI, W. F. Chemical and biological properties of biochanin A and its pharmaceutical applications. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 4, 2023.

FLORES, S. L. G. **Estudo fitoquímico do resíduo medeiro de *Sextonia rubra* (Mez) van der Werff (Lauraceae) e investigação do potencial antioxidante**. Dissertação de Mestrado—Manaus: Universidade Federal do Amazonas, jul. 2022.

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

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

FRIESEN, J. B. *et al.* Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1765–1796, 2015.

GAMPE, N. *et al.* Characterization and identification of isoflavonoid glycosides in the root of spiny retharow (*Ononis spinosa* L.) by HPLC-QTOF-MS, HPLC-MS/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 123, p. 74–81, 10 maio 2016.

GARCEZ, W. S. *et al.* Isoflavones and flavonols from *Andira humilis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1242–1245, 2010.

GARCIA, M. G. **Estudos dos Constituintes Químicos dos Resíduos Madeireiros de *Andira parviflora*, *Dipteryx odorata* e *Swartzia laecarpa* (Fabaceae)**. Dissertação de Mestrado—Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2013.

GARCIA, M. G. *et al.* Identification of isoflavonoids in wood residue from *Swartzia laevicarpa*, *Dipteryx odorata*, and *Andira parviflora*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 54, n. 5, p. 856–859, 2018.

GARCIA, M. G. *et al.* Isolation of new compounds from *Andira parviflora* and *Inga alba* wood residues using LC-DAD-SPE/NMR. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 57, n. 2, p. 258–262, 2021.

GENTA-JOUE, G. *et al.* Revising the absolute configurations of coatlines via density functional theory calculations of electronic circular dichroism spectra. **Chirality**, v. 25, n. 3, p. 180–184, 2013.

GHADIMI, D. *et al.* The effect of biochanin A as PPAR γ agonist on LDL particles diameter and type 2 diabetic dyslipidemia. **International Journal of Medical Laboratory**, v. 6, n. 2, p. 107–114, 2019.

GHRIBI, L. *et al.* Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from the roots of the tunisian *Ononis angustissima* L. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 18, p. 3825–3830, 2015.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 872–877, 2003.

GUO, Jian *et al.* In vitro metabolism of isoliquiritigenin by human liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 2, p. 461–468, 2008.

GUZLEK, H.; WOOD, P. L.; JANAWAY, L. Performance comparison using the GUESS mixture to evaluate counter-current chromatography instruments. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 19, p. 4181–4186, 2009.

HOMMA, A. K. O. **Extratativismo, biodiversidade e biopirataria na Amazônia**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.

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

HUANG, X. *et al.* Studies on principal components and antioxidant activity of different *Radix Astragali* samples using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multiple-stage tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 1090–1101, 2009.

HUANG, Xin Yi *et al.* An overview of recent progress in elution mode of counter current chromatography. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 214–225, 2016.

HUMMEL, A. C. *et al.* A atividade madeireira na Amazônia brasileira: produção, receita e mercados. **Serviço Florestal Brasileiro, Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia**, p. 32, 2010.

IGNATOVA, Svetlana *et al.* Gradient elution in counter-current chromatography: A new layout for an old path. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 36, p. 6053–6060, 2011.

IMAI, T. *et al.* Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecointei* and their antioxidant activities. **Journal of Wood Science**, v. 54, n. 6, p. 470–475, 2008.

IPNI. **Robrichia (Barneby & JWGrimes) ARMLuz & ERSouza**. Disponível em: <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77301633-1#children>>. Acesso em: 29 set. 2025.

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

ITO, Y. Counter-current motion in counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1372, p. 128–132, 2014.

JURD, L.; MANNERS, G. D. Isoflavene, isoflavan, and flavonoid constituents of *Gliricidia sepium*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 723–726, 1997.

KARAR, M. G. E.; KUHNERT, N. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) leaves, fruits and their herbal derived drops (crataegutt tropfen). **Journal of Chemical Biology & Therapeutics**, v. 1, n. 2, p. 1–23, 2016.

KHAMSAN, S. *et al.* The isolation of bioactive flavonoids from *Jacaranda obtusifolia* H. B. K. ssp. *rhombofolia* (G. F. W. Meijer) Gentry. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, n. 2, p. 181–190, 2012.

KHAN, M. E.; ODOKPE, A. U. Isolation and of β - sotosterol FROM *Cassia sieberiana* (Fabaceae) leaf extract. **Journal of Chemical Society of Nigeria**, v. 45, n. 1, p. 135–142, 2020.

KRAFT, C. *et al.* Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 131–135, 2000.

KRAFT, C. *et al.* Andinermals A – C, antiplasmodial constituents from. **Phytochemistry**, v. 58, p. 769–774, 2001.

KRAFT, C. *et al.* Andiol A and B, two unique 6-hydroxymethylpterocarpenes from *Andira inermis*. **Zeitschrift für Naturforsch C Journal Biosciences**, v. 9–10, p. 785–790, 2002.

KRESGE, N.; SIMONI, R. D.; HILL, R. t L. Lyman Creighton Craig: developer of the counter-current distribution method. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 127–129, 2005.

KUHN, F. *et al.* Differentiation of isomeric flavone/isoflavone aglycones by MS2 ion trap mass spectrometry and a double neutral loss of CO. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 17, p. 1941–1949, 2003.

LAWAL, B. A. *et al.* Novel cholinesterase inhibitory effect of α -spinasterol isolated from the leaves of *Acacia auriculiformis* A. Cunn ex. Benth. (Fabaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 7, p. 1473–1480, 2020.

LEAL, Carla Monteiro *et al.* Flavonoids from *Siparuna cristata* as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Replication. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 658–666, 2021.

LEE, E. H. *et al.* Liquiritigenin inhibits hepatic fibrogenesis and TGF- β 1/Smad with Hippo/YAP signal. **Phytomedicine**, v. 62, set. 2019.

LEE, E. J. *et al.* Isolation and characterization of compounds from *Glycyrrhiza uralensis* as therapeutic agents for the muscle disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 1–20, 2021.

LEE, P. J.; PAPACHRISTOU, G. I. New insights into acute pancreatitis. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 8, p. 479–496, 1 ago. 2019.

LEITÃO, G. G. Uso da cromatografia contracorrente na obtenção de padrões de origem vegetal. **Revista Fitos**, v. 1, n. 02, p. 48–50, 2005.

LEITÃO, G. G. *et al.* Purification of alkaloids by countercurrent chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 625–647, 2021.

LEITÃO, Gilda Guimarães; COSTA, Fernanda Das Neves. Gradient Elution in Countercurrent Chromatography. **Planta Medica**, v. 81, n. 17, p. 1592–1596, 2015.

LI, L. *et al.* Liquiritigenin attenuates isoprenaline-induced myocardial fibrosis in mice through the $\text{tgf-}\beta$ 1/ smad2 and akt/erk signaling pathways. **Molecular Medicine Reports**, v. 24, n. 686, 2021.

LI, Y. *et al.* Isoliquiritigenin induces growth inhibition and apoptosis through downregulating arachidonic acid metabolic network and the deactivation of

- PI3K/Akt in human breast cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 1, p. 37–48, 2013.
- LIN, C. C.; WU, C. I.; SHEU, S. J. Determination of 12 *Pueraria* components by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 14, p. 1785–1795, 2005.
- LIU, Y. *et al.* Liquiritigenin induces cell cycle arrest and apoptosis in lung squamous cell carcinoma. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 2, p. 1397–1407, 2024.
- LOAN, L. T. T.; TÂN, N. T. Chemical constituents of *Dalbergia tonkinesis* collected in dak lak. **TNU Journal of Science and Technology**, v. 229, n. 09, p. 469–473, 20 jun. 2024.
- LOTTI, Cinzia *et al.* Chemical constituents of red Mexican propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2209–2213, 24 fev. 2010.
- LUO, R. *et al.* ($\pm$) Erysectin A, a new isoprenylated isoflavone with a rare acetyl group from *Erythrina secundiflora* Hassk. **Natural Product Research**, v. 36, n. 19, p. 4886–4891, 2021.
- MAPBIOMAS. **Mapeamento Anual de Cobertura e Usa da Terra no Brasil**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <https://www.imazon.org.br/wp-content/uploads/2024/10/Factsheet-Amazonia_C9_01.10_v2_compressed.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2025.
- MAPLESDEN, F. A review of tropical timber production, consumption and trade, 1990-2020. **Série Técnica - Organização Internacional de Madeira Tropical**, n. TS-52, p. 1–38, 2021.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1–2, p. 181–194, 2006.
- MARX, J. C.; TRUSH, B. Lupeol, lupeyl acetate, and saponins in the fruits of *Enterolobium contortisiliquum*. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 22, p. 31–35, 1963.
- MARX, J. C.; TRUSH, B. Occurrence of a triterpene of the β -amyrin type, the lactone of machaerinic acid, in the fruits of *Enterolobium contortisiliquum*. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 23, p. 5–7, 1967.
- MATLOUB, A. A. *et al.* Phytochemical and biological activity studies on *Enterolobium contortisiliquum* pods. **Planta Medica**, v. 81, p. 108, 2015.
- MATOS, F. J. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3ª ed. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.
- MATTOS, N. F. O gênero *Andira* Lam. (Leguminosae Papilionoideae) no Brasil. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 2, p. 241–266, 1979.

MENG, Xiangyu *et al.* Studies on triterpenoids and flavones in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. by HPLC-ESI-MSn and FT-ICR-MSn. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 299–305, fev. 2009.

MERSEREAU, J. E. *et al.* Liquiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen receptor β agonist. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 283, n. 1–2, p. 49–57, 2008.

MIMAKI, Yoshihiro *et al.* Enterolosaponins A and B, novel triterpene bisdesmosides from *Enterolobium contortisiliquum*, and evaluation for their macrophage-oriented cytotoxic activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 4, p. 623–627, 2003.

MIMAKI, Yoshihiro *et al.* Contortisiliosides A - G: Isolation of Seven New Triterpene Bisdesmosides from *Enterolobium contortisiliquum* and Their Cytotoxic Activity. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, n. 4, p. 851–865, 2004.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MOUTINHO, V. H. P. **Caracterização das madeiras conhecidas na Amazônia brasileira como matá-matá**. Dissertação de Mestrado—[S.l.]: Universidade Federal de Lavras, 2008.

OBISTIOIU, D. *et al.* Phytochemical profile and microbiological activity of some plants belonging to the Fabaceae family. **Antibiotics**, v. 10, n. 662, 2021.

OH, J. M. *et al.* Calycosin and 8-O-methylretusin isolated from *Maackia amurensis* as potent and selective reversible inhibitors of human monoamine oxidase-B. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 441–448, 15 maio 2020.

OIMT. **Reseña bienal y evaluación de la situación mundial de las maderas 2019-2020**. Japão: OIMT, 2020.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. 2 ed. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PENG, F. *et al.* A review: the pharmacology of isoliquiritigenin. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 7, p. 969–977, 2015.

PENNINGTON, R. T. Monograph of *Andira* (Leguminosae-Papilionoideae). **Systematic Botany Monographs**, v. 64, p. 1–143, 2003.

PENNINGTON, R. T. Molecular and morphological data provide phylogenetic resolution at different hierarchical levels in *Andira*. **Systematic Biology**, v. 45, n. 4, p. 496–515, 1996.

PU, W.; WANG, D.; ZHOU, D. Structural characterization and evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds from *Astragalus taipashanensis* and their structure-activity relationship. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–11, 2015.

PUDHUPALAYAM, S. P. *et al.* Biochanin A attenuates hyperglycemia in high-fat diet–streptozotocin–induced diabetic rats by modulating the activities of carbohydrate-metabolizing enzymes in vital organs. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 32, n. 4, p. 608–617, 2022.

QIU, L. *et al.* Bioactive hydroxypropionylated glucose derivatives from *Astragalus bhotanensis*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 23, p. 5066–5074, 2020.

RAHMAN, A. H. M.; PARVIN, M. R. A. Taxonomic studies on the family Fabaceae (weeds) at rajshahi university campus. **Plant**, v. 3, n. 3, p. 20, 2015.

RAMOS, G.; CARDOSO, D. B. O. S.; PENNINGTON, R. T. ***Andira* in Flora e Funga do Brasil**. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB22786>>. Acesso em: 3 jun. 2025.

RAMOS, W. F. *et al.* Generation of wood waste from the forest based sector in the Metropolitan region of Belém, Pará. **Ciencia Florestal**, v. 28, n. 4, p. 1823–1830, 2018.

RAMOS, Wilson Fernandes *et al.* Análise da indústria madeireira na Amazônia: gestão, uso e armazenamento de resíduos. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 43, p. 1–16, 2017.

RIBEIRO, R. B. da S. *et al.* Métodos para estimar o volume de fustes e galhos na floresta nacional do Tapajós. **Revista Árvore**, v. 40, n. 1, p. 81–88, 2016.

RINCÓN, F.; OBERTO, A.; PINTO, G. L. de. Functionality of *Enterolobium cyclocarpum* gum in the Preparation of liquid low fat yogurt. **Revista Científica**, v. XV, p. 83–87, 2005.

ROSKOV, Y. R. *et al.* **ILDIS World Database of Legumes: draft checklist, version 10**. Disponível em: <<https://ildis.org/LegumeWeb10.01.shtml>>.

RUFINO, M. do S. M. *et al.* Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Online EMBRAPA**, v. 127, p. 1–4, 2007.

SANTOS, C. C. Dos. S. *et al.* Countercurrent chromatography isolation of green propolis biomarkers: potential blockers of SARS-COV-2 RBD and ACE2 interaction. **Journal of Chromatography A**, v. 1734, n. 465265, p. 1–8, 2024.

SANTOS, P. A. L. dos *et al.* Perfil químico e atividade antimicrobiana de *Abarema cochliacarpos*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e22911427226, 2022.

SANTOS, V. N. C. **Estudo fitoquímico e Bioatividade de extratos de *Andira retusa* (Poir.) Kunth**. [S.l.]: Universidade Federal do Amazonas, 2012.

SCHEIDEMANN, P.; WETZEL, A. Identification and characterization of flavonoids in the root exudate of *Robinia pseudoacacia*. **Tree**, v. 11, p. 316–321, 1997.

SEBASTIAN, R.; JAYKAR, B.; GOMATHI, V. Current status of anticancer research in Fabaceae family. **The Pharma Innovation Journal**, v. 9, n. 8, p. 52–60, 2020.

SHITAMOTO, Junko *et al.* Crotalinosides A-C, Three New Megastigmane Glucosides, Two New Pterocarpan Glucosides and a Chalcone C-Glucoside from the Whole Plants of *Crotalaria zanzibarica*. **Regular Article Chem. Pharm. Bull.**, v. 58, n. 8, p. 1026–1032, 2010.

SILVA, B. P.; VELOZO, L. S. M.; PARENTE, J. P. U. Biochanin A triglycoside from *Andira inermis*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 663–667, 2000.

SILVA, L. F. F. da *et al.* Seleção de espécie, temperatura e tempo de carbonização na produção de carvão vegetal com resíduos madeireiros da Amazônia. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 40, 2020a.

SILVA, H. C. *et al.* Chemical constituents and acetylcholinesterase inhibitory activity from the stems of *Bauhinia pentandra*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 23, p. 5277–5281, 2020b.

SILVA, S. L. C. ;. *et al.* Ação anti-helmítica de extratos brutos de *Andira anthelmia* (Vell.) Macbr. e *Andira fraxinifolia* Beth., em camundongos naturalmente infectados por *Vampirolepis nana* e *Aspiculuris tetraptera*. **Parasitol Latinoam**, v. 58, p. 23–29, 2003.

SILVA, V. C. ;. *et al.* Constituintes fenólicos e terpenóides isolados das raízes de *Andira fraxinifolia* (Fabaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1184–1186, 2006.

SILVA, V. C. *et al.* Atividade anti-helmítica dos flavonóides isolados das raízes de *Andira anthelmia* (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 573–576, 2008.

SILVA, V. C.; DE CARVALHO, M. G.; SILVA, S. L. da C. Chemical Constituents from roots of *Andira anthelmia* (LEGUMINOSAE). **Revista Latinoamericana Química**, v. 31, n. 1, p. 13–19, 2007.

SILVEIRA, S. Z. *et al.* Antibacterial enhancement of antibiotic activity by *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 10, p. 945–949, 1 out. 2017.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7ª ed. ed. United State: John Wiley & Sons, Ltd, 2005.

SIMÕES, C. M. O.;. *et al.* **Farmacognosia- do produto natural ao medicamento**. 1ª ed. ed. Rio de Janeiro: Grupo a educação S/A Rio, 2017.

SONG, Ping *et al.* Davidones f and g, two novel flavonoids from *Sophora davidii* (Franch.) skeels. **Molecules**, v. 26, n. 14, 2 jul. 2021.

SOUZA, E. R. de *et al.* Molecular and morphological analysis supports the separation of *Robrichia* as a genus distinct from *Enterolobium* (Leguminosae):

Caesalpinioideae: Mimosoid Clade). **Systematic Botany**, v. 47, n. 1, p. 268–277, 2022.

STRAGLIOTTO, M. C.; PEREIRA, B. L. C.; OLIVEIRA, A. C. Indústrias madeireiras e rendimento em madeira serrada na Amazônia brasileira. **Engenharia Florestal: Desafios, Limites e Potencialidade**, p. 499–518, 2020.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO. Assay related to cancer drug discovery. *In*: HOSTETTMANN, K. (Org.). **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**. London: Academic Press, 1991.

SUMNER, N. Developing counter current chromatography to meet the needs of pharmaceutical discovery. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 36, p. 6107–6113, 2011.

TAKAHASHI, T. *et al.* Cyclooxygenase-2 plays a suppressive role for induction of apoptosis in isoliquiritigenin-treated mouse colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 231, n. 2, p. 319–325, 2006.

TAN, G. *et al.* Analysis of phenolic and triterpenoid compounds in licorice and rat plasma by high-performance liquid chromatography diode-array detection, time-of-flight mass spectrometry and quadrupole ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 2, p. 209–218, 2010.

TANIMURA, T. *et al.* Droplet Countercurrent Chromatography. **Science**, v. 169, n. 3940, p. 54–56, 1970.

TYAGI, A. M. *et al.* Medicarpin inhibits osteoclastogenesis and has nonestrogenic bone conserving effect in ovariectomized mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 325, n. 1–2, p. 101–109, 2010.

USMAN, M. *et al.* Exploring the phytochemicals and anti-cancer potential of the members of Fabaceae family: a comprehensive review. **Molecules**, v. 27, n. 12, 2022.

VAN BON, N. *et al.* New records of potent in-vitro antidiabetic properties of *Dalbergia tonkinensis* heartwood and the bioactivity-guided isolation of active compounds. **Molecules**, v. 23, n. 7, 2018.

VERÍSSIMO, A.; PEREIRA, D. Produção na Amazônia florestal: características, desafios e oportunidades. **Parcerias Estratégicas**, v. 19, n. 38, p. 13–44, 2014.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed ed. Berlin: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1996.

WANG, H. Y. *et al.* Metabolites of medicarpin and their distributions in rats. **Molecules**, v. 24, n. 1966, 2019.

WANG, Haojia *et al.* Isoliquiritigenin inhibits virus replication and virus-mediated inflammation via NRF2 signaling. **Phytomedicine**, v. 114, 1 jun. 2023.

WEN, R. *et al.* Anti-inflammatory pterocarpanoids from the roots of *Pongamia pinnata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 21, n. 9, p. 859–866, 2019.

WU, Da Tong; PAN, Yuan Jiang. Recent Development in Counter-current Chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 319–326, 2016.

WU, Q.; WANG, M.; SIMON, J. E. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, n. 2, p. 195–209, 2003.

XU, P. *et al.* Application of two-dimensional reversed phase countercurrent chromatography × high-performance liquid chromatography to bioactivity-guided screening and isolation of α -glucosidase inhibitors from *Rheum palmatum* L. **Journal of Chromatography A**, v. 1717, 2024.

ZHAI, Z. *et al.* The changes of intestinal microbiota and metabolomics during the inhibition of bladder cancer by liquiritigenin. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 26, n. 12, p. 1445–1454, 2024.

ZHANG, L. *et al.* Characterization of flavonoids in the extract of *Sophora flavescens* Ait. by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector and electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 5, p. 1019–1028, 2007.

ZHANG, Y. *et al.* UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS analysis, antioxidant activity combined fingerprints for quality consistency evaluation of compound liquorice tablets. **RSC Advances**, v. 8, n. 49, p. 27661–27673, 2018.

ZHAO, X. *et al.* Analysis of flavonoids in *Dalbergia odorifera* by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 25, n. 2, 2020.

8. APÊNDICE

Apêndice A – Mapa de Correlação COSY da subfração ACE3-4-2

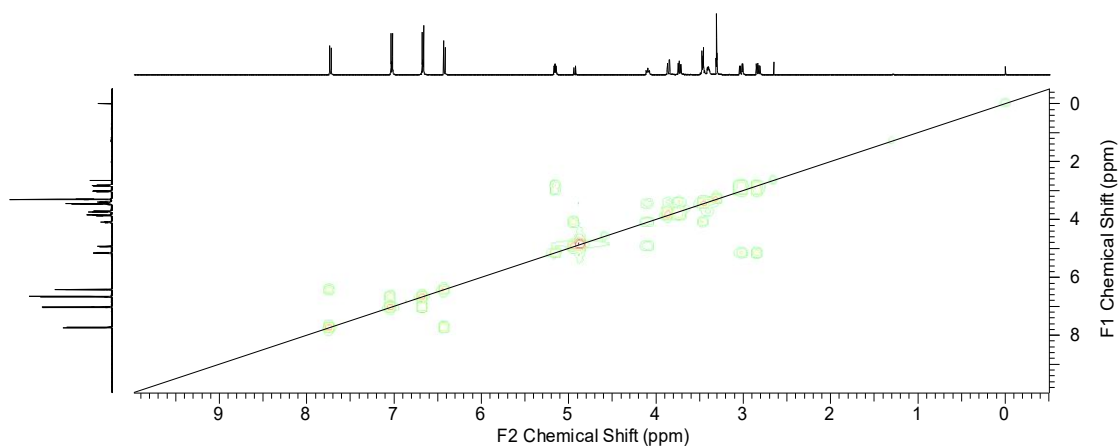


Figura A.1 Mapa de correlação COSY de ACE3-4-2

Apêndice B – Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da subfração ACE3-4-3

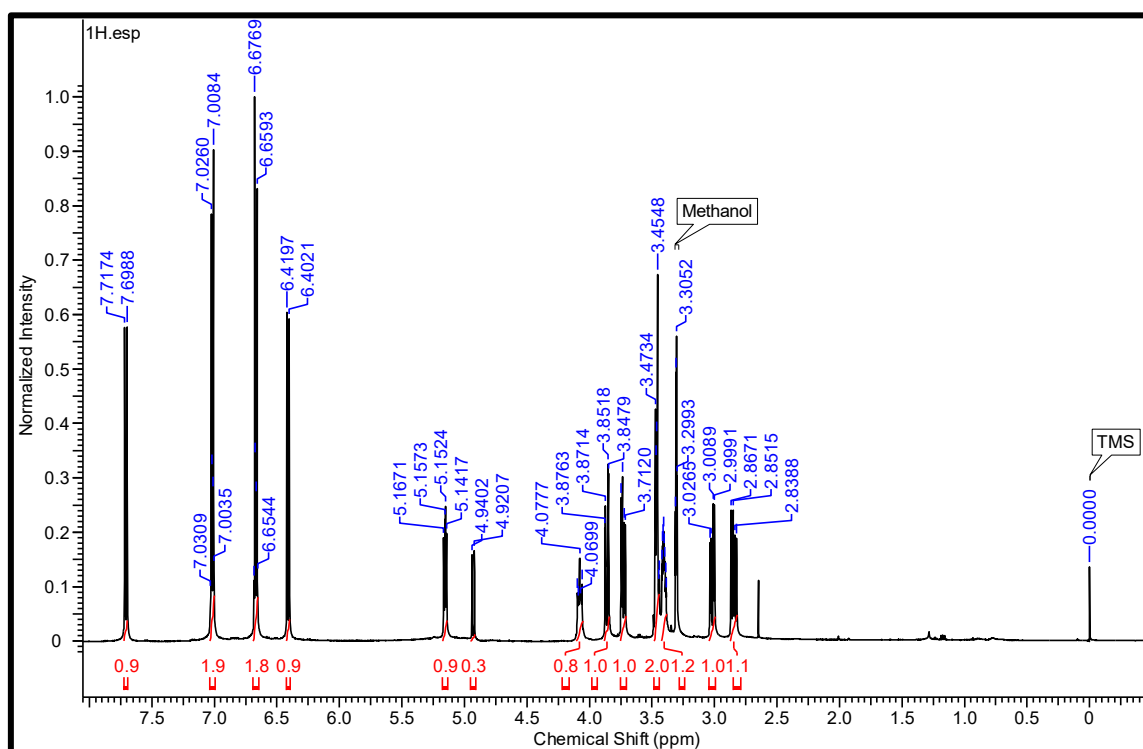


Figura A.1 Espectro de RMN de ^1H da subfração ACE3-4-3

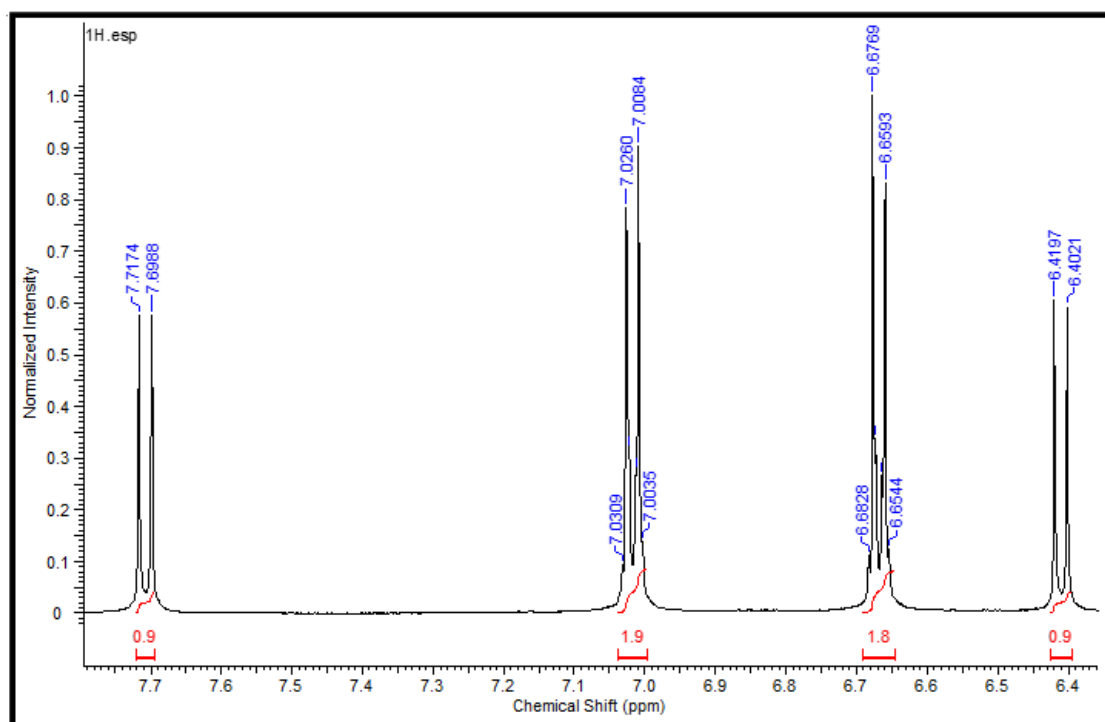


Figura C.2 Ampliação entre 7,7 ppm e 6,4 ppm do espectro de RMN de ^1H na região dos aromáticos

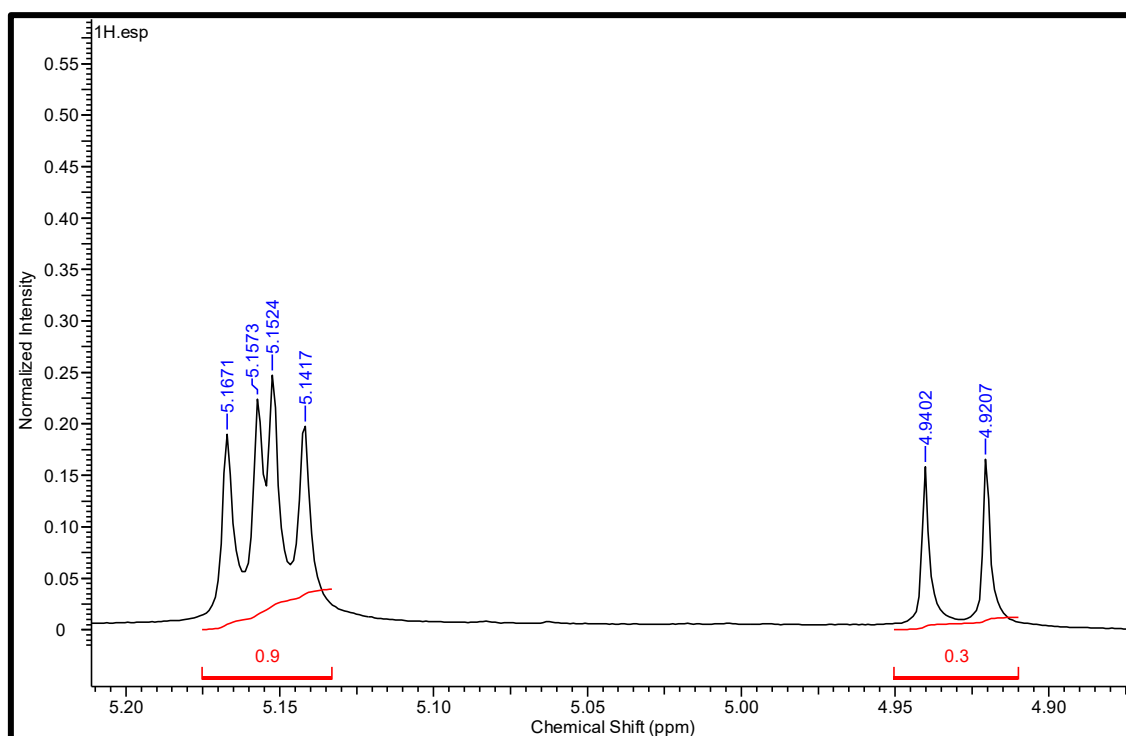


Figura C.3 Ampliação entre 5,20 ppm e 4,90 ppm do espectro de ^1H .

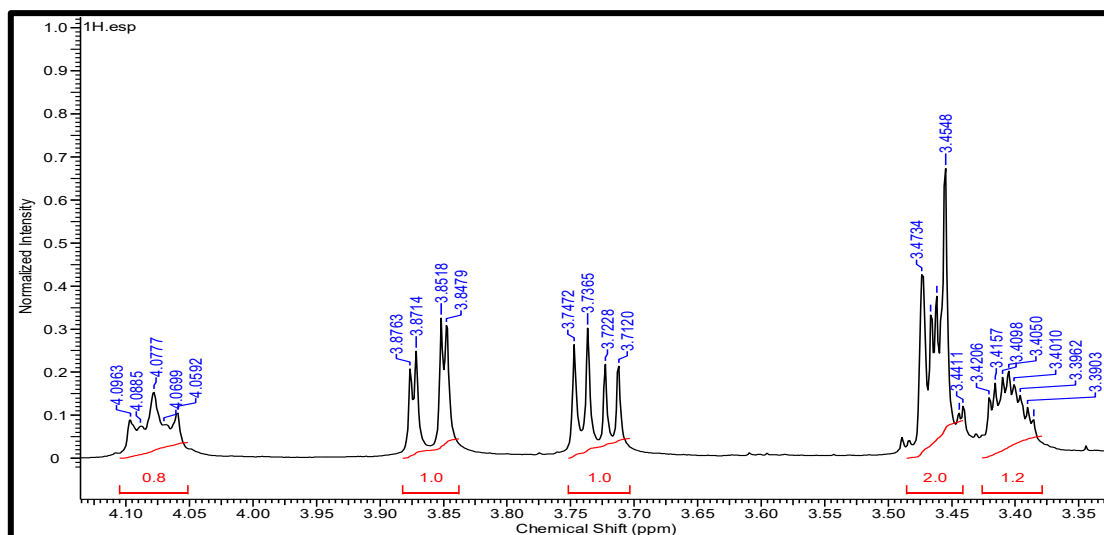


Figura C.4 Ampliação entre 4,1 e 3,35 ppm do espectro de ^1H .

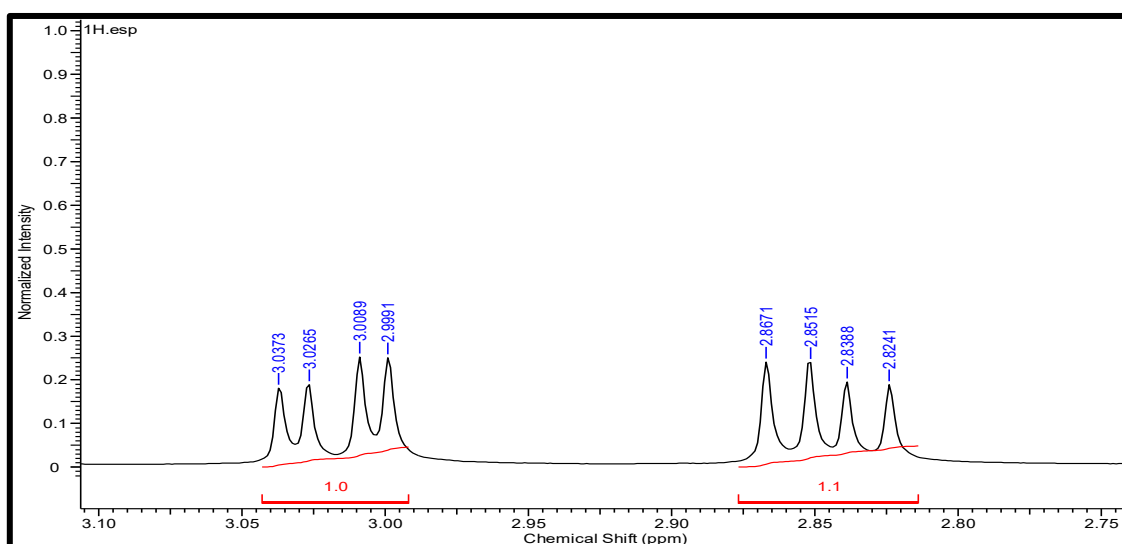


Figura C.5 Ampliação entre 3,10 e 2,75 ppm do espectro de ^1H .

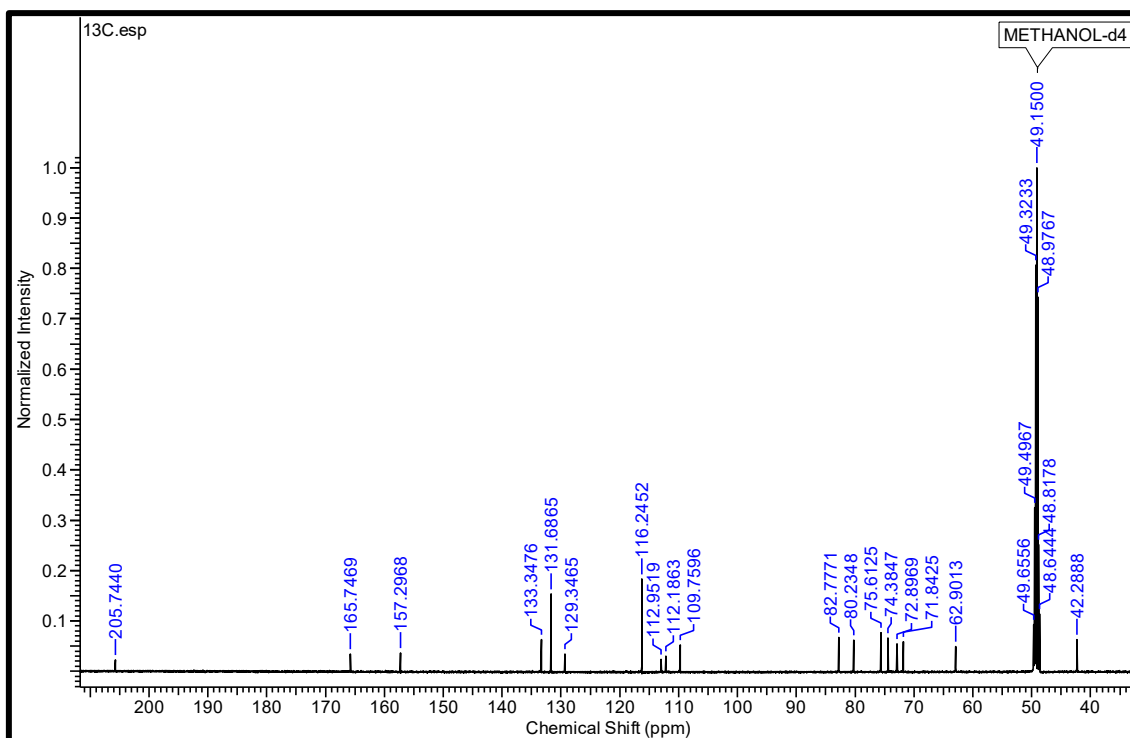


Figura C.6 Espectro de ^{13}C da subfração ACE3-4-3

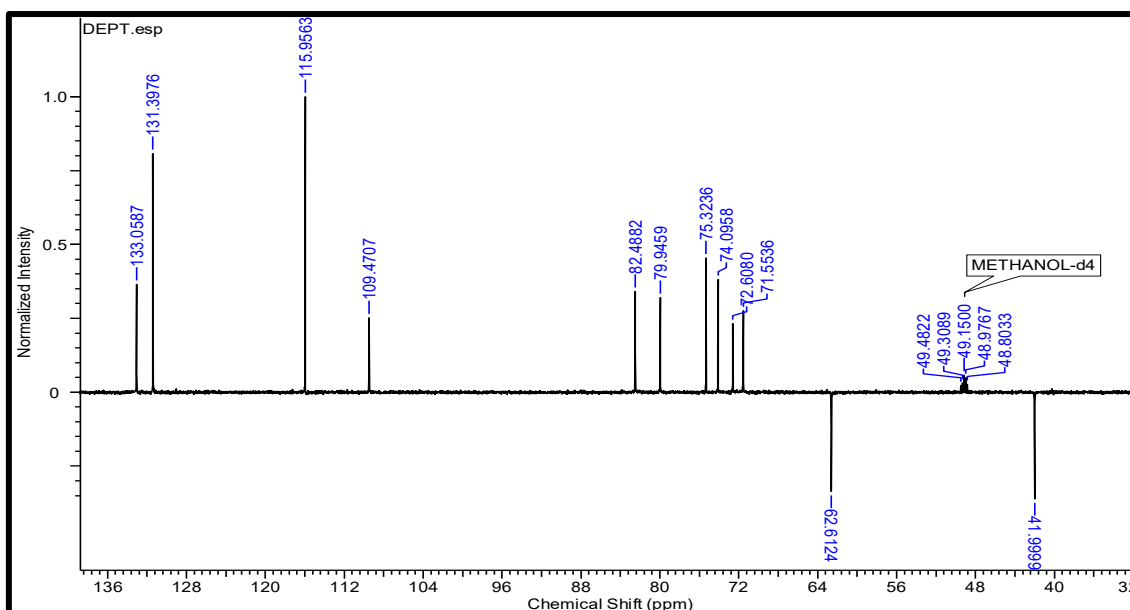


Figura C.7 Espectro de DEPT 135 da subfração ACE3-4-3

Apêndice C - Espectros de RMN de experimentos bidimensionais da subfração ACE3-4-3

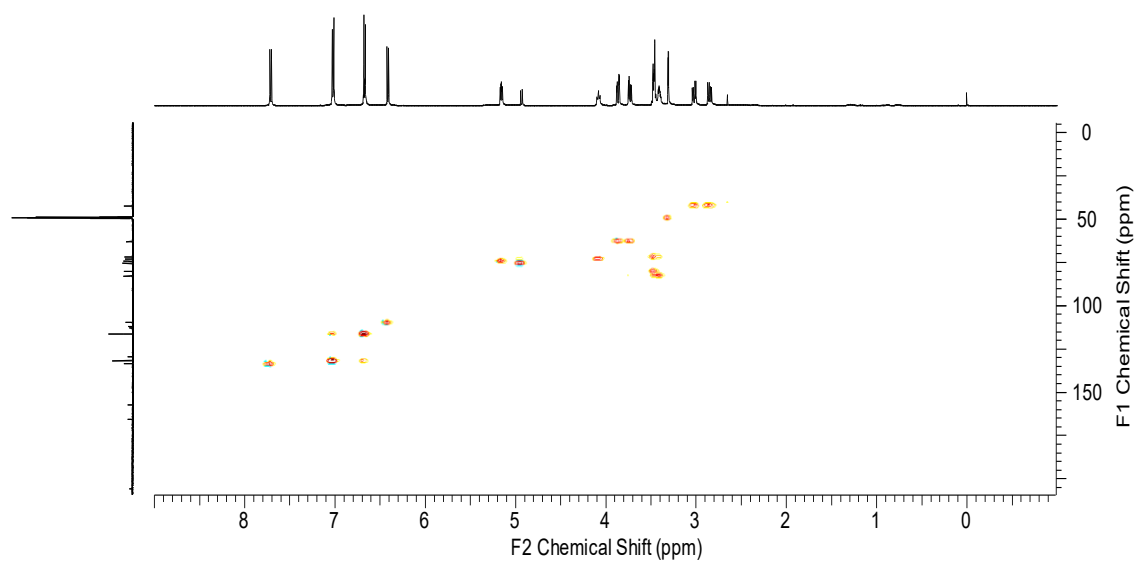


Figura D.1 Mapa de correlação HSQC

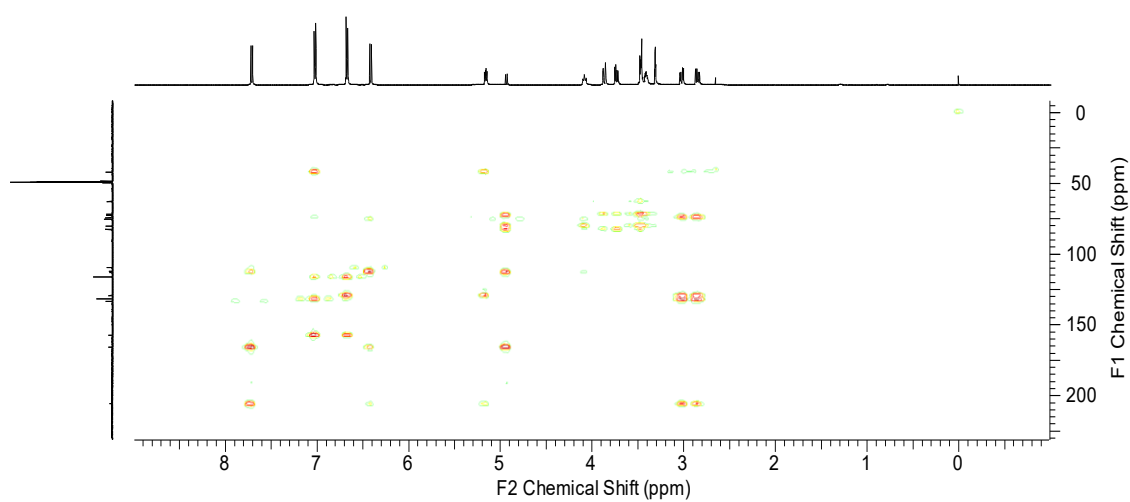
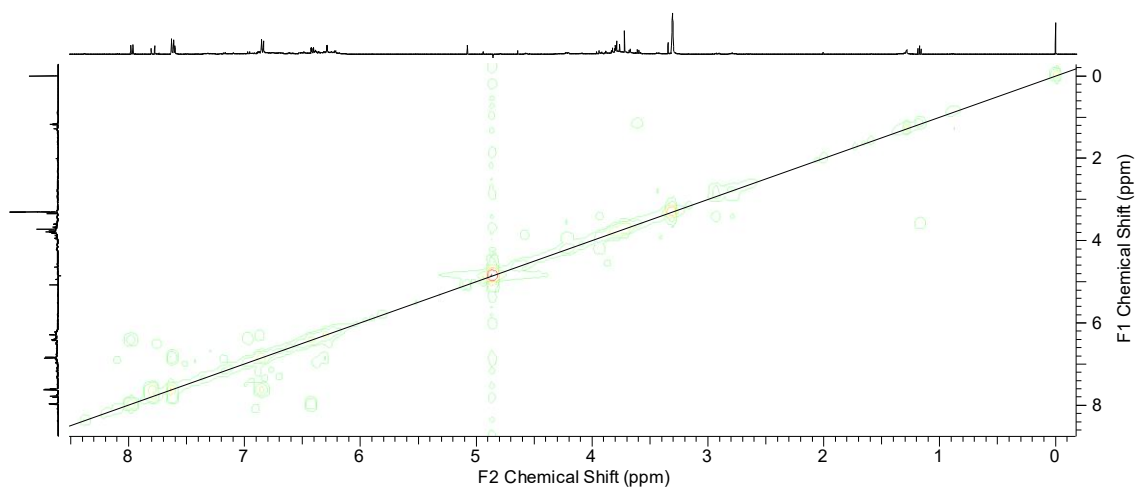
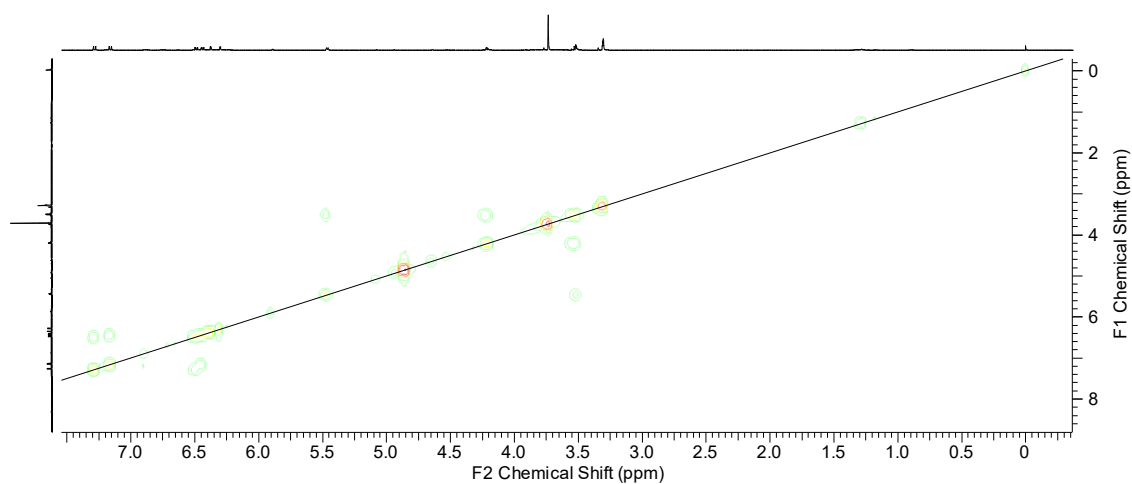


Figura D.2 Mapa de correlação HMBC

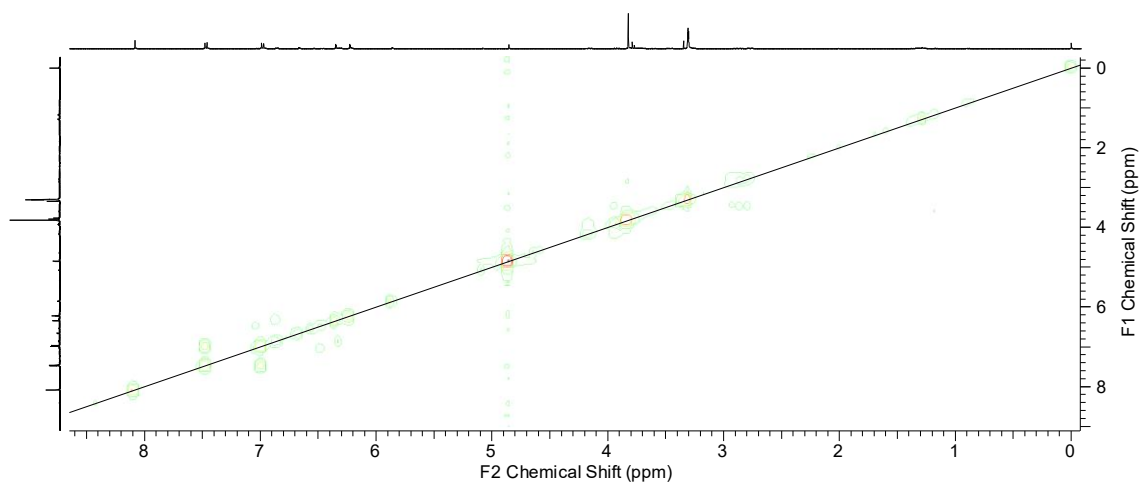
Apêndice D – Mapa de correlação COSY subfração ACE3-17-9



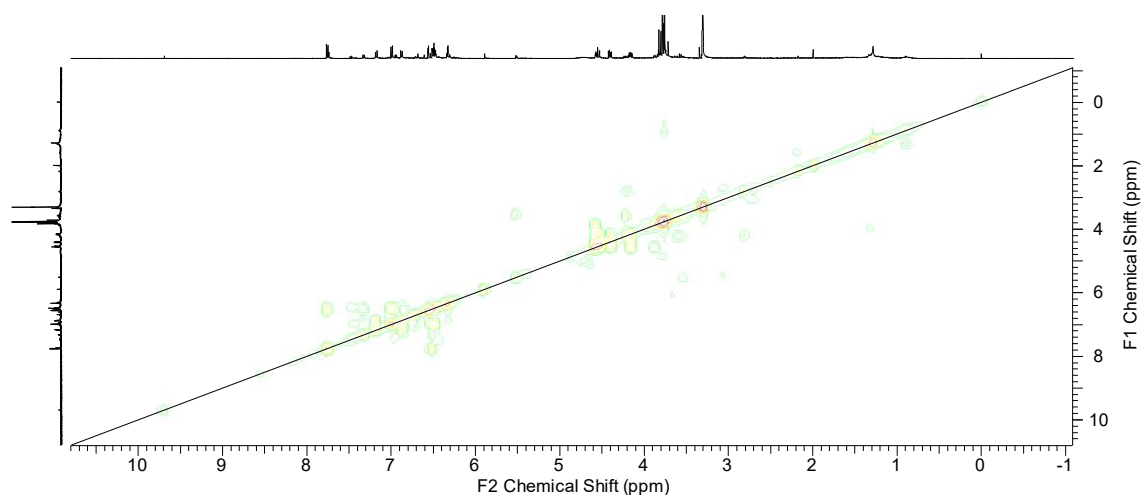
Apêndice E – Mapa de correlação COSY subfração ACE3-17-13



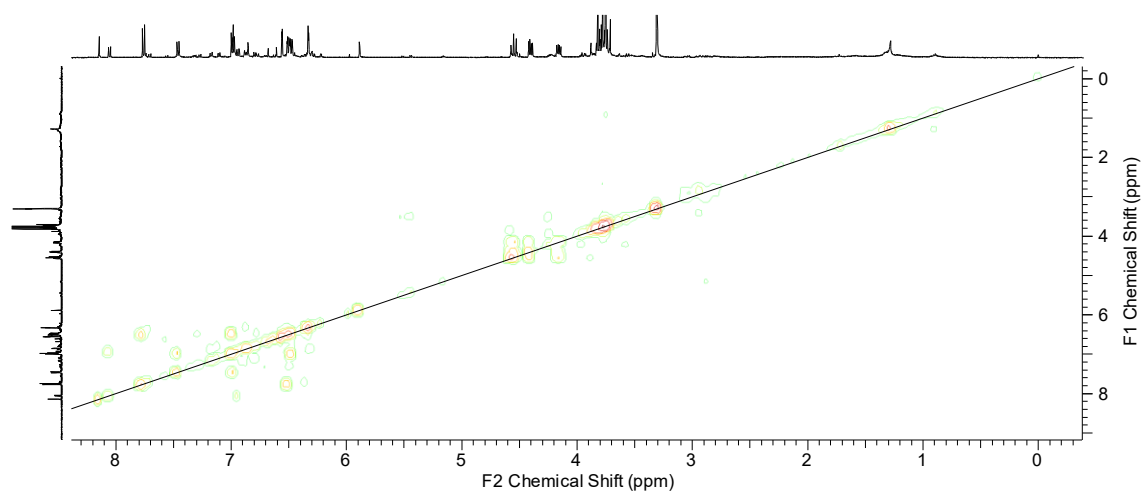
Apêndice F – Mapa de correlação COSY subfração ACE3-17-15



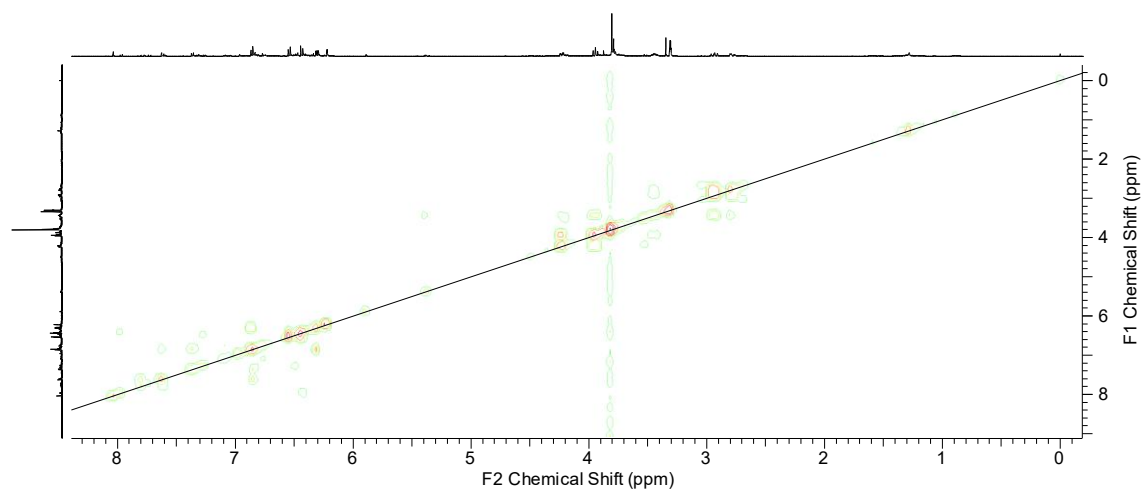
Apêndice G – Mapa de correlação COSY subfração ACE3-16-18-37



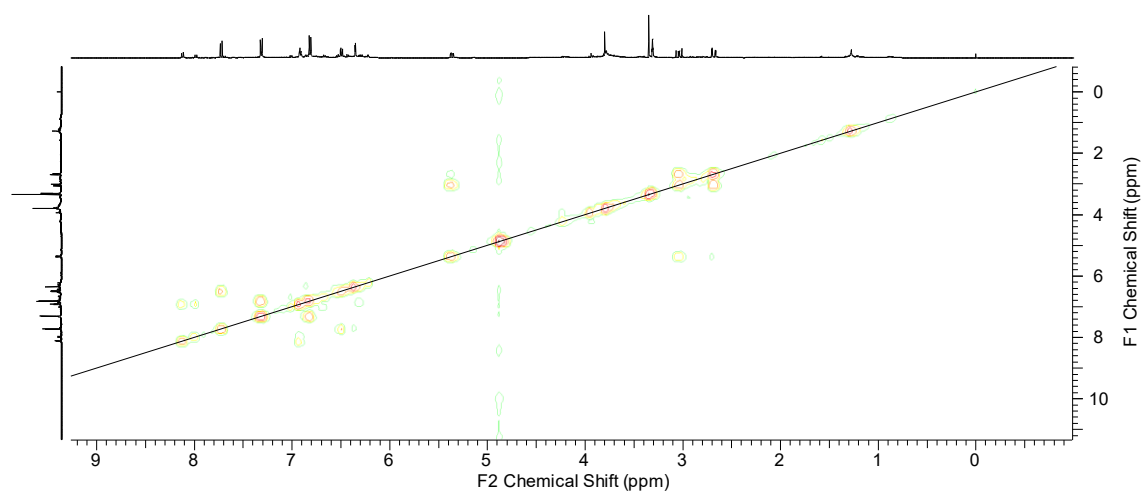
Apêndice H – Mapa de correlação COSY subfração ACE3-16-18-38



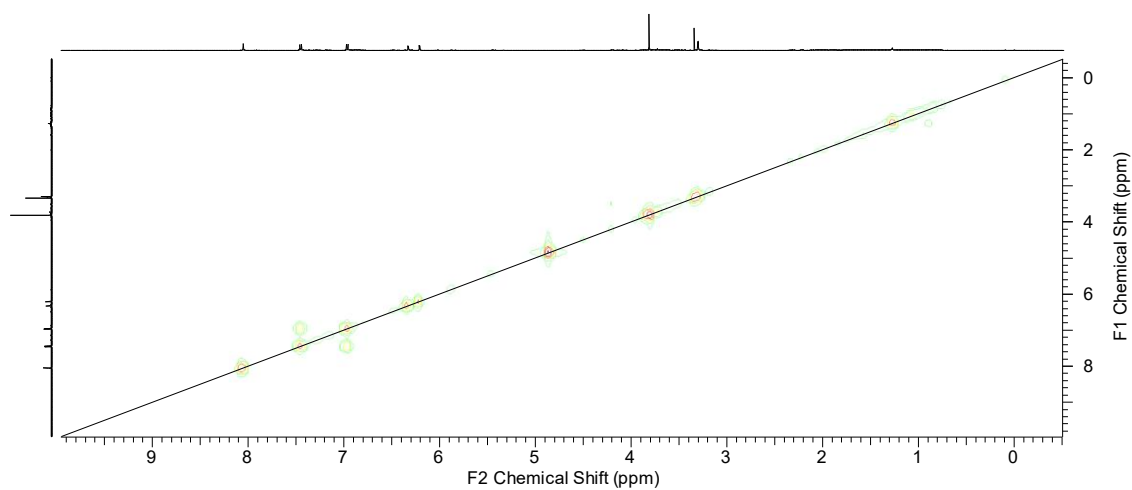
Apêndice I – Mapa de correlação COSY subfração ACE3-16-18-41



Apêndice J – Mapa de correlação COSY subfração ACE3-16-18-42



Apêndice K – Mapa de correlação COSY subfração ACA2-41



9. ANEXOS

Anexo – A Participação em eventos científicos – Apresentação de resumos, minicursos







Certificado

Certificamos que **Araújo, I.M.; Rodrigues, F.N.; Lima, E.S.; Flores, S.L.G.; Leitão, G.G.; Silva, F.M.A.; Guimarães, A.C.** apresentou(aram) o trabalho "Definição de sistemas de solventes para separação de compostos fenólicos da fração em acetato de etila do cerne de Sucupira Vermelha (*Andira parviflora*) por cromatografia contracorrente (CCC)" no **35º Congresso Latinoamericano de Química e 61º Congresso Brasileiro de Química**, realizados de 14 a 18 de Novembro de 2022, no Centro de Eventos do Windsor Flórida Hotel, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

Rio de Janeiro, 18 de Novembro de 2022.

Jorge Cardoso Messeder
Presidente do 35º CLAQ

Florinda do Nascimento Cersósimo
Presidente do 61º CBQ

Verify the authenticity code 9503650.546509.621044.7.5036505465096210447 at <https://www.event3.com.br/documents>

CERTIFICATE

This certifies that the work titled
HPCCC Flavonoids Isolation from a cytotoxic extract of *Andira parviflora* waste wood from
the amazon region
authored by Isadora Moita de Araújo, Gilda Guimaraes Leitão, Colin Bright, SARAH
LARISSA GOMES FLORES, Celina de Jesus Guimarães, Claudia do Ó Pessoa, Felipe
Moura Araújo Da Silva and Anderson Cavalcante Guimarães,
was submitted and presented, at the 12th Countercurrent Chromatography Conference -
2024, held at Rio de Janeiro, from July 24 to 26.

CCC
RIO 2024

Prof. Gilda Guimarães Leitão
President of the Organizing Committee

Organization:





Anexo – B Premiação em Evento Científico

