UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Química - Campus Araraquara

Marcelo Marucci Pereira Tangerina

Extratos padronizados para o tratamento de doenças crônicas: *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfed

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas
Co-Orientadora: Prof.ª Dr.ª Miriam Sannomiya

Araraquara
2012

MARCELO MARUCCI PEREIRA TANGERINA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 18 de janeiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wagner Vilegas (Orientador)
Campus Experimental do Litoral Paulista – UNESP, São Vicente

Profª Drª Alba Regina Monteiro Souza Brito
Instituto de Biologia – UNICAMP, Campinas

Profª Drª Elfriede Marianne Bacchi
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Marcelo Marucci Pereira Tangerina
Endereço Profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Laboratório de Fitoquímica
Rua Prof. Francisco Degni, 55. Jd. Quitandinha, CEP: 14800-900.
Telefone: 16 3301-9792
E-mail: marcelomptang@gmail.com; marcelomptang@hotmail.com

Formação Acadêmica:

Graduação

Bacharelado

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Instituto de Química, Campus Araraquara
Local: Araraquara - SP
Curso: Química com Atribuições Tecnológicas
Período: 2006-2009
Trabalho Orientado em Química – Departamento de Química Inorgânica:
- Investigação de Compostos de Ni(II) Coordenado a Diaminas e Pseudohaletos – Bolsista CNPq
- Investigação de compostos de Ni(II) coordenado a azida e aminoalcoois como precursores de filmes metálicos – Bolsista FAPESP
Orientador (a): Prof.ª Dr.ª Vânia Martins Nogueira

Pós Graduação

Mestrado

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Campus Araraquara
Local: Araraquara - SP
Período: 2010-2011
Bolsista: FAPESP
Título da Dissertação: Extratos Padronizados para o Tratamento de Doenças Crônicas: *Machaerium hirtum*
Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas
Co-Orientador: Prof.ª Dr.ª Miriam Sannomiya

“À minha família por todo apoio e
confiança em minhas escolhas e em minha capacidade,
e a todos que estiveram ao meu lado, dedico este trabalho”

Agradecimento

Neste momento, devo recordar e agradecer a todas as pessoas que me ajudaram a chegar aqui, tanto pela ajuda direta quanto pelo apoio e amizade, que contribuíram para formar a pessoa que sou hoje.

Meus pais, meus avós e meu irmão, que sempre me apoiaram em todas as decisões de minha vida, dando suporte para percorrer os longos caminhos de minha formação, tanto profissional quanto pessoal.

A todos os meus familiares, tios, tias, primos e primas, que acompanham meu desenvolvimento desde que nasci e que me propiciaram uma família estruturada e unida, a qual contribuiu muito para a formação do meu caráter.

Ao meu orientador e amigo Prof. Wagner Vilegas por aceitar me orientar em meu mestrado e por todo ensinamento, além de diversos momentos de descontração dentro e fora da universidade.

A minha co-orientador Prof.ª Miriam Sannomiya que, mesmo a distância, me passou seus ensinamentos de grande importância.

A agência FAPESP pelo auxilio financeiro e pela bolsa concedida.

A Prof.ª Lourdes C. dos Santos pela amizade e pelos ensinamentos passados ao longo de minha formação no mestrado.

A Prof.ª Vânia M. Nogueira, docente do Departamento de Química Geral e Inorgânica, que foi minha orientadora de Iniciação Científica desde meu 1º ano de faculdade.

Ao pessoal do Laboratório de Fitoquímica, Leonardo, Vivi, Aline, Maria do Socorro, Claudinha, Lima Neto, Fabiano, Fabi, sem esquecer dos ICs Maiara, Leonice, Sauna, Minicraque, Cintia, Aninha e as alunas de intercambio Raissa e Luisa, muito obrigado pela ajuda, pela amizade, pelos ensinamentos e pelos diversos momentos de descontração.

A todos os meus amigos que sempre estiveram presentes em todos os momentos, dos mais difíceis aos mais alegres. Em especial, devo citar Mei e Isabella, amigas desde o colegial, que mesmo com a distância não deixaram de manter o contato. Jerso e Miguel, grandes amigos, com os quais morei e moro desde os tempos da graduação, com os quais compartilhei todas minhas angústias e alegrias. Iraque, um grande amigo, que também mesmo com a distância não deixou de ser muito importante em minha vida. Glauco, com

quem tive a oportunidade de conviver mais no mestrado e se tornou um grande amigo. Aos moradores da Rep. Soh Xerolaine Pira, Muringa e Meira pelos churrascos e momentos de descontração. Mari Bizari, Fabi, Denise e Ana Paula, pela amizade e companhia. Aos meus vizinhos Leo, Mari e Blossom, pela amizade, momentos de descontração e pelas diversas comidas preparadas.

Ao Nivaldo e ao Albertinho pelas análises realizadas e pela amizade.

Todas estas pessoas foram essenciais para minha vida, pois sem elas não sei se chegaria onde cheguei, por isso o meu Muito Obrigado!

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”
Albert Einstein

Resumo

O uso de fitoterápicos padronizados com assegurada comprovação de eficácia e segurança tem apresentado resultados terapêuticos surpreendentes em diversos países. Contudo, no Brasil, onde há grande potencial de produção de fitoterápicos devido a sua enorme biodiversidade, há deficiências na correta caracterização química das matérias-primas e escassez de ensaios farmacológicos e toxicológicos desses materiais, etapas essenciais para assegurar eficácia e segurança dos fitoterápicos. *Machaerium hirtum* (Fabaceae) é utilizada popularmente para o tratamento de diarréia, tosse e câncer. Um estudo químico que identifique as substâncias presentes nesta espécie e as quantifique pode fornecer subsídios para o entendimento destas atividades. A primeira etapa consistiu no isolamento das substâncias do extrato EtOH 70% das partes aéreas de *M. hirtum* por meio de cromatografia de permeação em gel seguida de purificação das substâncias por HPLC-RI. A identificação das substâncias foi feita por Ressonância Magnética Nuclear e por Espectrometria de Massas. O perfil químico do extrato foi estabelecido por HPLC-PDA e a quantificação das substâncias foi feita com base em suas agliconas, pelo método da calibração externa. Foi possível identificar as flavonas saponarina (8,69 ± 0,46 mg/g de extrato), isovitexina (6,44 ± 0,45 mg/g de extrato), isoorientina, que se apresentou abaixo do limite de quantificação (LOQ) e swertisina, presente no perfil cromatográfico em co-eluição com outra substância. Tais resultados são fundamentais para a padronização do extrato EtOH 70% das folhas de *Machaerium hirtum.*

Abstract

The use of standardized phytomedicines with proven efficacy and safety has shown surprising therapeutic results in various countries. Brazil has great potential for production of herbal medicine due to its enormous biodiversity. However, there are deficiencies in the correct characterization of chemical raw materials and few reliable pharmacological and toxicological tests of these materials, essential steps to ensure efficacy and safety of herbal medicines. *Machaerium hirtum* (Fabaceae) is popularly used to treat diarrhea, cough and cancer. A chemical study to identify the substances present in this species may provide and quantify contributions to the understanding of these activities. The first step was the isolation of substances of 70% EtOH extract of aerial parts of *M. hirtum* by gel permeation chromatography followed by purification of substances by HPLC-RI. The identification of substances was performed by Nuclear Magnetic Resonance and Mass Spectrometry. The chemical profile of the extract was established by HPLC-PDA and quantification of the substances was based on their aglycones by the method of external calibration. It was possible to identify the flavones saponarin (8,69 ± 0,46 mg/g of extract), isovitexin (6,44 ± 0,45 mg/g of extract), isoorientin, which was below the limit of quantification (LOQ) and swertisin, present in the chromatographic profile in co-elution with another substance. These results are fundamental to the standardization of the crude 70% EtOH extract from the leaves of *Machaerium hirtum*.

Lista de Figuras

Figura 1. Áreas de distribuição original e atual do Cerrado no Brasil (SILVA, 2009) 19

Figura 2. Distribuição geográfica de espécies pertencentes à família Fabaceae 20

Figura 3. Partes aéreas de *Machaerium hirtum* (ANDRADE, 2008)..... 23

Figura 4. Distribuição geográfica de *Machaerium* e de *Machaerium hirtum* no estado de São Paulo (FAPESP, 2011)..... 24

Figura 5. Detalhes de *Machaerium hirtum*: caule, flores e folhas (MARTINS, 2009) 24

Figura 6. Perfil do extrato EtOH 70% das folhas de *Machaerium hirtum* e espectro no UV representativo dos picos observados. Tempo de retenção(min): 1) 26,5; 2) 28,0; 3) 30,0; 4) 32,0; 5) 33,0. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min. 31

Figura 7. Análise por TLC das 12 frações obtidas após o fracionamento do extrato EtOH 70% de *M. hirtum* e comparação com padrões de A - rutina, B - quercetina e com C - extrato bruto. 32

Figura 8. Perfil cromatográfico da Fração 7 e espectro no UV representativo dos picos observados. Tempo de retenção(min): 1) 26,0; 2) 28,5; 3) 30,0; 4) 32,5; 5) 33,0. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min. 34

Figura 9. Análise por HPLC-PDA do precipitado obtido da fração 7. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min. 35

Figura 10. Espectros NMR – ^1H de Mh1 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm) 36

Figura 11. Espectros gHMQC de Mh1 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm) 37

Figura 12. Espectros gHMBC de Mh1 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)..... 38

Figura 13. Espectro TOCSY-1D de Mh1 (irradiação em δ 4,57- 11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm) 41

Figura 14. Espectro NOESY-1D de Mh1 (irradiação em δ 3,8 - 11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm) 41

Figura 15. Estrutura de Mh1: apigenina-7-metoxi-6-C-β-D-glucopiranosídeo .. 42

Figura 16. Espectro de Massas de Mh1 (FIA-ESI-IT-MS^n – modo negativo) ... 43

Figura 17. Íons característicos formados pela quebra interna de uma hexose para modo positivo ou negativo (CUYCKENS & CLAEYS, 2004)..... 43

Figura 18. Análise por TLC das frações obtidas da purificação do sobrenadante da fração 7 44

Figura 19. Espectros NMR – ^1H da fração 7.2 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm) 45

Figura 20. Espectro de Massas da fração 7.2 (FIA-ESI-IT-MS^n – modo negativo)..... 46

Figura 21. Íons característicos formados pela quebra interna de uma pentose para modo positivo ou negativo (CUYCKENS & CLAEYS, 2004)..... 47

Figura 22. Estruturas de Mh2, Mh3 e Mh4, identificadas na fração 7.2 48

Figura 23. Perfil cromatográfico da fração 8 e espectro no UV representativo dos picos observados. Tempo de retenção(min): 1) 27,2; 2) 27,8. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min. 49

Figura 24. Análise por TLC das frações obtidas da purificação da Fração 8. A – isovitexina; B – rutina; C – quercetina. 50

Figura 25. Estrutura de Mh5: apigenina-6-C-β-D-glucopiranosídeo..... 50

Figura 26. Perfil cromatográfico da Fração 9 e espectros no UV dos picos observados. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm),

HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min. 51

Figura 27. Análise por TLC das frações obtidas da purificação da fração 9. A – isovitexina; B – vitexina. 52

Figura 28. Espectro NMR – ^{1}H da fração 9.4 (11,7 T, DMSO-*d_6*, TMS, ppm) .. 53

Figura 29. Espectro TOCSY-1D da fração 9.4 (irradiação em δ 4,58 ppm – 11,7 T, DMSO-*d_6*, TMS, ppm) 54

Figura 30. Estrutura de Mh6: luteolina-6-C-β-D-glucopiranosídeo 55

Figura 31. Espectro de massas de Mh6 (FIA-ESI-IT-MS^n – modo negativo) ... 55

Figura 32. Espectro NMR – ^{1}H da fração 9.5 (11,7 T, DMSO-*d_6*, TMS, ppm) .. 56

Figura 33. Espectros gHMQC da fração 9.5 (11,7 T, DMSO-*d_6*, TMS, ppm) ... 57

Figura 34. Espectros gHMBC da fração 9.5 (11,7 T, DMSO-*d_6*, TMS, ppm).... 58

Figura 35. Espectro TOCSY-1D da fração 9.5 (irradiação em δ 4,57 ppm – 11,7 T, DMSO-*d_6*, TMS, ppm) 61

Figura 36. Estrutura de Mh5: apigenina-6-C-β-D-glucopiranosídeo 61

Figura 37. Espectro de massas de Mh5 (FIA-ESI-IT-MS^n – modo negativo) ... 62

Figura 38. Análise por TLC das frações aquosa, n-butanólica e do precipitado da fração 5 63

Figura 39. Espectro NMR – ^{1}H do precipitado da fração 5 (11,7 T, DMSO-*d_6*, TMS, ppm)..... 64

Figura 40. Espectro TOCSY-1D do precipitado da fração 5 (irradiação em δ 4,64 – 4,73 ppm – 11,7 T, DMSO-*d_6*, TMS, ppm) 65

Figura 41. Espectro TOCSY-1D do precipitado da fração 5 (irradiação em δ 4,73 - 5,00 ppm – 11,7 T, DMSO-*d_6*, TMS, ppm) 65

Figura 42. Espectros gHMQC do precipitado da fração 5 (11,7 T, DMSO-*d_6*, TMS, ppm)..... 67

Figura 43. Espectros gHMBC do precipitado da fração 5 (11,7 T, DMSO-*d_6*, TMS, ppm)..... 67

Figura 44. Estrutura de Mh2: apigenina-6-C-β-D-glucopiranosil-7-O-β-D-glucopiranosídeo 69

Figura 45. Espectro de massas de Mh2 (FIA-ESI-IT-MS^n – modo negativo) ... 70

Figura 46. Espectro de massas em *full-scan* do extrato EtOH 70% de folhas de *M. hirtum* (FIA – ESI – IT, modo negativo) 71

Figura 47. Estrutura geral das substâncias identificadas por espectrometria de massas 72

Figura 48. Estrutura de Mh7: luteolina-6-C-β-D-glucopiranosil-7-O-β-D-glucopiranosídeo 73

Figura 49. Análise por UHPLC-PDA do extrato EtOH 70% das folhas de *Machaerium hirtum*. Coluna Thermo Scientific® Hypersil Gold RP-18 (50 x 2,1mm i.d.; 1.9µm), UHPLC (Thermo Scientific®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com HCOOH 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-30% de B em 4,0 min. 74

Figura 50. Curva analítica da Apigenina 75

Figura 51. Curva analítica da Luteolina 75

Lista de Tabelas

Tabela 1. Espécies de *Machaerium* e classes de metabólitos encontradas. ... 22

Tabela 2. Massa das 12 frações obtidas após o fracionamento do extrato EtOH 70% de *M. hirtum*. 33

Tabela 3. Deslocamentos químicos de NMR de ^{13}C e ^{1}H Mh1 (*CHENG *et al.*, 2000; **ANDERSEN & MARKHAM, 2006) 39

Tabela 4. Deslocamentos químicos de NMR - ^{1}H da fração 9.4 comparados com a literatura (11,7 T, DMSO-d_6, TMS) (*PENG *et al.*, 2005; **ANDERSEN & MARKHAM, 2006.) 54

Tabela 5. Deslocamentos químicos de NMR de ^{13}C e ^{1}H da fração 9.5 60

Tabela 6. Deslocamentos químicos de NMR de ^{13}C e ^{1}H para o precipitado da fração 5 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS) (*HARBORNE, 1994; **ANDERSEN & MARKHAM, 2006) 68

Tabela 7. Substâncias propostas através da análise do espectro de massas em *full-scan* do extrato bruto hidroalcóolico de folhas de *M. hirtum* 71

Tabela 8. Dados de calibração dos padrões de Apigenina e Luteolina. (a) – coeficiente linear; (b) – coeficiente angular; r^2 – coeficiente de correlação (*PLAZONIC *et al.*, 2009) 76

Tabela 9. Concentrações das flavonas encontradas nas folhas de *M. hirtum* . 77

Siglas e Abreviaturas

i.d.	Internal Diameter (Diâmetro Interno)
DAD	Diode Array Detector (Detector de Arranjo de Diodos)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
SPE	Solid Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)
LLE	Liquid-Liquid Extraction (Extração Líquido-Líquido)
GPC	Gel Permeation Chromatography (Cromatografia de Permeação em Gel)
HPLC-PDA	HPLC - Photodiode Array (Cromatografia Líquida de Alta Performance Acoplada a detector por Ultravioleta e Arranjo de fotodiodos)
HPLC-RI	HPLC – Refractive Index (Cromatografia Líquida de Alta Performance Acoplada a Detector de Índice de Refração)
UHPLC-PDA	UHPLC – Photodiode Array (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance Acoplada a detector por Ultravioleta e Arranjo de fotodiodos)
MeOH	Metanol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Ressonância Magnética Nuclear)
*g*HMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
*g*HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
*g*COSY	Gradient Correlation Spectroscopy
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
RP18	Reverse phase C18 (Fase reversa C18)
t_r	Retention time (Tempo de Retenção)
UV	Ultravioleta
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
FM	Fase móvel
PDA	Photodiode Array Detector (Detector de Arranjo de Fotodiodos)
δ	Deslocamento químico
Rf	Fator de retenção
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografia em Camada Delgada Comparativa)
NP/PEG	Difenilaminoborato/Polietilenoglicol
FIA	Flow Injection Analysis (Análise por injeção em fluxo ou análise por inserção direta da amostra)

FIA-ESI-IT-MS	Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap – Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas acoplada a um ion-trap com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra)
TFA	Trifluoracetic acid (ácido trifluoracético)
PTFE	Polytetrafluoroethylene (politetrafluoretileno)

Sumário

SÚMULA CURRICULAR i
Agradecimento iii
Resumo vi
Abstract vii
Lista de Figuras viii
Lista de Tabelas xii
Siglas e Abreviaturas xiii
Introdução 17
Fitoterápicos 17
Padronização de Extratos 18
O Cerrado 18
A família *Fabaceae* 19
O gênero *Machaerium* 21
Machaerium hirtum (Vell.) Stellfed 22
Objetivos 26
Parte Experimental 27
Instrumentos 27
Clean-up das frações 29
Análise das frações em HPLC-PDA 29
Desenvolvimento, Resultados e Discussão 30
Coleta e Preparo do Material Vegetal 30
Perfil Cromatográfico do Extrato 30
Fracionamento Cromatográfico do Extrato 31
Extração Líquido-Líquido 31
Fracionamento em Coluna de Permeação em Gel 32
Purificação das Frações obtidas do Extrato de *Machaerium hirtum* 33
Fração 7 33
Fração 9 51
Fração 5 62
Analise do extrato bruto por Espectrometria de Massas 70
Injeção direta do extrato 70
Identificação e quantificação das substâncias presentes no extrato bruto 73

Considerações finais 77
Referências 80

Introdução

O uso de plantas, partes de plantas e substâncias isoladas para a prevenção e tratamento de diversas doenças tem sido praticado desde os tempos antigos. Do total de 252 medicamentos da lista de remédios essenciais da Organização Mundial de Saúde, 11% são exclusivamente de origem vegetal (SAHOO *et al.*, 2010). Aproximadamente 80% das populações da África e da Ásia dependem de medicamentos tradicionais para seus tratamentos de saúde primários. Na Índia, cerca de 80% da população rural utiliza ervas medicinais ou sistemas indígenas de medicina (WORLD ..., 2008).

Fitoterápicos

A definição empregada pela ANVISA (RDC 14) para medicamentos fitoterápicos é: "medicamentos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Os medicamentos fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais". (AGÊNCIA ..., 2010).

A fórmula fitoterápica é a "*Relação quantitativa de todos os componentes de um medicamento fitoterápico*". Um marcador é o "*composto ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presentes na matéria prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico"*. O princípio ativo de medicamento fitoterápico é a "*substância, ou classes químicas (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.), quimicamente caracterizada, cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do medicamento fitoterápico"* (AGÊNCIA ..., 2010).

Padronização de Extratos

Para a produção de fitoterápicos, é necessário ter controlar a qualidade de materiais brutos, materiais processados e produtos finais. É essencial o desenvolvimento confiável, específico e sensível dos métodos de controle de qualidade utilizando-se a combinação de métodos clássicos e instrumentais modernos de análise. A padronização é essencial para assegurar o controle de qualidade das plantas medicinais. A expressão “padronização” é utilizada para descrever todas as medidas que são tomadas durante o processo de fabricação e controle de qualidade, levando a uma qualidade reprodutível (SAHOO *et al.*, 2010).

A “avaliação” de extratos ou de fitomedicamentos significa confirmar sua identidade, determinar sua qualidade e pureza e detectar adulterações em sua natureza.

A padronização de extratos para a produção de fitoterápicos não é uma tarefa fácil, devido aos numerosos fatores que influenciam a bioeficácia e a reprodutibilidade dos efeitos terapêuticos. A fim de se obter produtos à base de plantas com qualidade, devem ser tomados cuidados desde a identificação apropriada da planta, estação do ano e área onde foi coletada e seus processos de extração e purificação (SAHOO *et al.*, 2010).

As espécies de plantas que fornecem extratos com potencial para se tornar um fitoterápico podem ser de diversos biomas. Neste trabalho foi dado enfoque à *Machaerium hirtum*, uma espécie do cerrado.

O Cerrado

Com uma área de 204 milhões de hectares, o Cerrado é considerado a savana de maior biodiversidade vegetal do mundo. O bioma abrange cerca de 23% do território brasileiro, ocupando grande parte do Planalto Central, superado em tamanho apenas pela floresta amazônica. Ocorre também sob formas de disjunções na Amazônia, Região Nordeste, Sul e Sudeste. Devido à sua amplitude lati-altitudinal, o Cerrado exibe enorme heterogeneidade espacial, apresentando grande diversidade de solos e climas que se refletem

numa grande variação fisionômica, desde campestre a florestal. No entanto, o desconhecimento sobre a composição, estrutura e dinâmica (tanto sazonal quanto sucessional), e o funcionamento dos ecossistemas do Cerrado é ainda considerável.



Figura 1. Áreas de distribuição original e atual do Cerrado no Brasil (SILVA, 2009)

Com relação à diversidade biológica observa-se a extinção de espécies devido à redução na diversidade e tamanho populacional das espécies animais e vegetais, aumento dos níveis de endogamia nas populações, modificações nas interações bióticas e abióticas (SANTOS & VIEIRA, 2005). Este fato mostra a importância de um estudo de espécies pertencentes a este bioma, pois pode estar sendo perdida uma fonte de fitoterápicos inestimável.

Dentre as espécies pertencentes ao cerrado, foi escolhida uma planta pertencente à família Fabaceae.

A família *Fabaceae*

Fabaceae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18000 espécies, representando uma das maiores famílias de Angiospermas e também uma das principais do ponto de vista econômico. No Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 1500 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005).

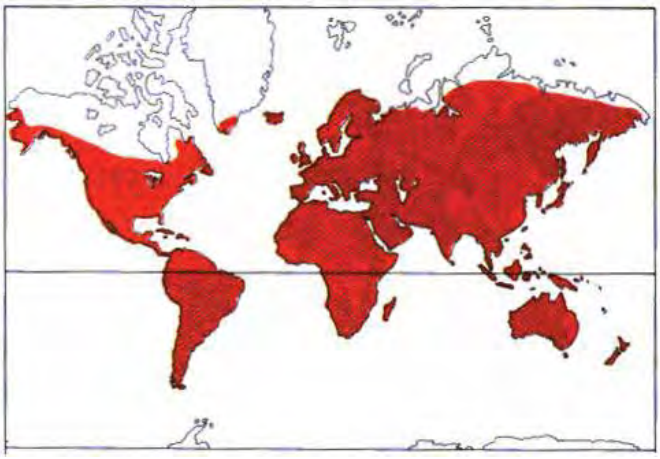


Figura 2. Distribuição geográfica de espécies pertencentes à família Fabaceae (HEYWOOD, 1993)

Como principais espécies da família destacam-se aquelas utilizadas na alimentação, especialmente o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glycine max*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a ervilha (*Pisum sativum*), o tremoço (*Lupinus spp.*), o grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e o tamarindo (*Tamarindus indica*). Outra importante aplicação das *Fabaceae* é o seu uso na adubação verde, principalmente considerando a associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium*) que produzem pequenos nódulos nas raízes, principalmente da subfamília Faboideae. Entre as espécies que são comercializadas com esta função estão o feijão-guandu (*Cajanus cajan*), o lab-lab (*Lablab purpureus*), a crotalária (*Crotalaria spp.*) e a alfafa (*Medicago sativa*), esta última também frequentemente utilizada como forrageira (SOUZA & LORENZI, 2005).

Na maioria dos ecossistemas naturais brasileiros, *Fabaceae* está incluída entre as principais famílias. Na Amazônia é a família com maior número de espécies arbóreas na Reserva Ducke, umas das áreas mais bem conhecidas da região, com destaque para espécies de inegável beleza, como as pertencentes aos gêneros *Parkia* e *Swartzia*. Nos cerrados destacam-se o barbatimão (*Stryphnodendron spp.*) e a copaíba (*Copaifera langsdorfii*), árvores utilizadas como medicinais, e também espécies de *Chamaecrista*, com flores amarelas de grande potencial ornamental, com impressionante diversidade no Estado de Goiás e no Distrito Federal (quase metade das espécies deste grande gênero ocorre nestas unidades da federação).

Nas florestas do interior do Brasil destacam a envira-do-sapo (*Lonchocarpus* spp.), o bico-de-pato (*Machaerium aculeatum* e outras espécies), a sapuvinha (*Machaerium stipitatum*) e o jacarandá-paulista (*Machaerium villosum*). Na Mata Atlântica, muitas são as espécies de *Fabaceae* nativas, mas são bem perceptíveis e conhecidas aquelas que ocorrem nas bordas e locais alterados, como o pau-cigarra (*Senna multijuga*), e o guapuruvu (*Schizolobium parahyba*), que também ocorrem mais para o interior do Brasil. Esta última espécie possui rápido crescimento, com madeira macia, utilizada pelos índios para a construção de canoas. Nas matas ciliares (e também em outros ambientes) merece destaque o ingá (*Inga* spp.), com diversas espécies com frutos comestíveis, muito procurados por macacos e outros animais (SOUZA & LORENZI, 2005).

Sementes de *Fabaceae* são importante fonte de nutrientes como o amido, proteínas, fibras alimentares e minerais, particularmente em países do terceiro mundo. A incorporação de sementes de *Fabaceae* na dieta humana nos países em desenvolvimento pode oferecer efeitos protetores contra doenças crônicas. As *Fabaceae* contêm uma série de substâncias bioativas, incluindo compostos fenólicos, que podem diminuir a digestibilidade de proteínas e a biodisponibilidade de minerais. Por outro lado, substâncias como flavonóides, ácidos fenólicos, lignanas e taninos têm propriedades antioxidantes, e estas são de grande importância do ponto de vista nutricional e tecnológico. Várias evidências sugerem que o estresse oxidativo está intimamente ligado a uma variedade de doenças como o câncer e doenças cardiovasculares (AMAROWICZ & PEGG, 2008).

Dentro desta família, escolheu-se uma espécie do gênero *Machaerium*.

O gênero *Machaerium*

Machaerium, cujas espécies são popularmente conhecidas como jacarandá, é um dos maiores gêneros arbóreos tropicais da subfamília Papilionoideae, com aproximadamente 130 táxons. Várias de suas espécies são encontradas em diferentes biomas e são utilizadas para variados fins,

dentre os quais a recomposição de áreas degradadas (POLIDO & SARTORI, 2007).

Ocorre do México à Argentina, a maioria no Brasil, com uma espécie se estendendo até a costa oeste da África (*Machaerium lunatum*). No Brasil foi constatado o maior número de espécies (cerca de 120 espécies). As formas escandentes predominam na hiléia amazônica, enquanto as arbóreas, no sul do Brasil (ANDRADE, 2008).

Espécies pertencentes a esse gênero produzem principalmente flavonóides (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de *Machaerium* e classes de metabólitos encontradas.

Espécie	Classes de metabólitos	Substâncias	Ref.
M. acutifolium	cinamilfenóis	petrostireno	OLLIS *et al.*, 1977
M. aristulatum	cinamilfenóis; pterocarpanos; isoflavonas	macharistol; (+)-medicarpina; (+)-maackiaina; formononetina	SEO *et al.*, 2001
M. floribundum	procianidinas	--	WAAGE *et al.*, 1984
M. kuhlmannii	neoflavonóides; cinamilfenóis	--	OLLIS *et al.*, 1968
M. mucronulatum	chalconas; cinamilfenóis; isoflavanas	buteina; isoliquiritigenina; mucronustireno; mucronulastireno; (-)-mucronulatol; (-)-duartina; (-)-mucroquinona; (±)-mucronulatol	KUROSAWA *et al.*, 1977c
M. multiflorum	benzopiranos	machaeriol A, B, C e D; machaeridiol A, B e C	MUHAMMAD et al., 2001
M. opacum	isoflavanas	(-)-mucronulatol; (-)-duartina	KUROSAWA *et al.*, 1977b
M. vestitum	isoflavonoides	vestitol; vesticarpano	KUROSAWA *et al.*, 1977a
M. villosum	isoflavanas; cinamilfenóis	(-)-mucronulatol; (-)-duartina; vilostireno	OLIVEIRA *et al.*, 1968

Machaerium hirtum (Vell.) Stellfed

*M. hirtum é uma á*rvore 5-10 m alt. Ramos espinescentes, pubescentes. Folhas imparipinadas, 29-43 folíolos, alternos a opostos; estípulas 2,5-7 x 1-3 mm, espinescentes mais ou menos retilíneas e achatadas, persistentes;

pecíolo 0,3-0,8 cm compr.; raque 5,6-12 cm compr.; folíolos 0,7-2,4 x 0,3-0,6 cm, estreito-oblongos, os terminais oblanceolados, base oblíqua, ápice retuso, face adaxial glabra, abaxial serícea, nervação craspedódroma. Panículas 6,4-26,8 cm compr., terminais ou axilares, às vezes com folhas pequenas entrepostas; pedúnculo 1-2,6 cm compr.; pedicelos 1,5-2 mm compr.; brácteas não observadas; bractéolas 1,5-2,8 x 2-2,8 mm, orbiculares a suborbiculares, persistentes. Suas flores apresentam 11-15 mm compr. Cálice 5-7 mm compr., externamente ferrugíneotomentoso; lacínios superiores 0,9-1,3 mm compr., ápice arredondado a obtuso, lacínios inferiores 0,6-1,3 mm compr., ápice obtuso. Corola roxa, com estrias esbranquiçadas; estandarte 10-14 x 6-8,5 mm, oblongo, externamente seríceo; alas e pétalas da carena 9-15 x 3-5 mm, elíptico-falcadas, ápice obtuso a arredondado. Androceu isodiadelfo, 0,6-1 cm compr. Gineceu com ovário 4,5-6 mm compr., estipitado, estípite 3-5 mm compr., oblongo-falcado; estilete 3,2-5 mm compr., levemente curvo a reto. Frutos e sementes não são observados (ANDRADE, 2008).



Figura 3. Partes aéreas de *Machaerium hirtum* (ANDRADE, 2008)

A espécie *M. hirtum* ocorre na região Norte, nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins e Acre, na região Nordeste nos estados do Maranhão,

Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas e Sergipe, na região Centro-Oeste nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e no Distrito Federal, na região Sudeste em Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro e na região Sul nos estados do Paraná e em Santa Catarina (FILARDI, 2011). No estado de São Paulo o gênero *Machaerium* apresenta-se bem disperso em todo o estado e as espécies de *Machaerium hirtum* que já foram coletadas apresentam-se ao norte do estado (Figura 4).

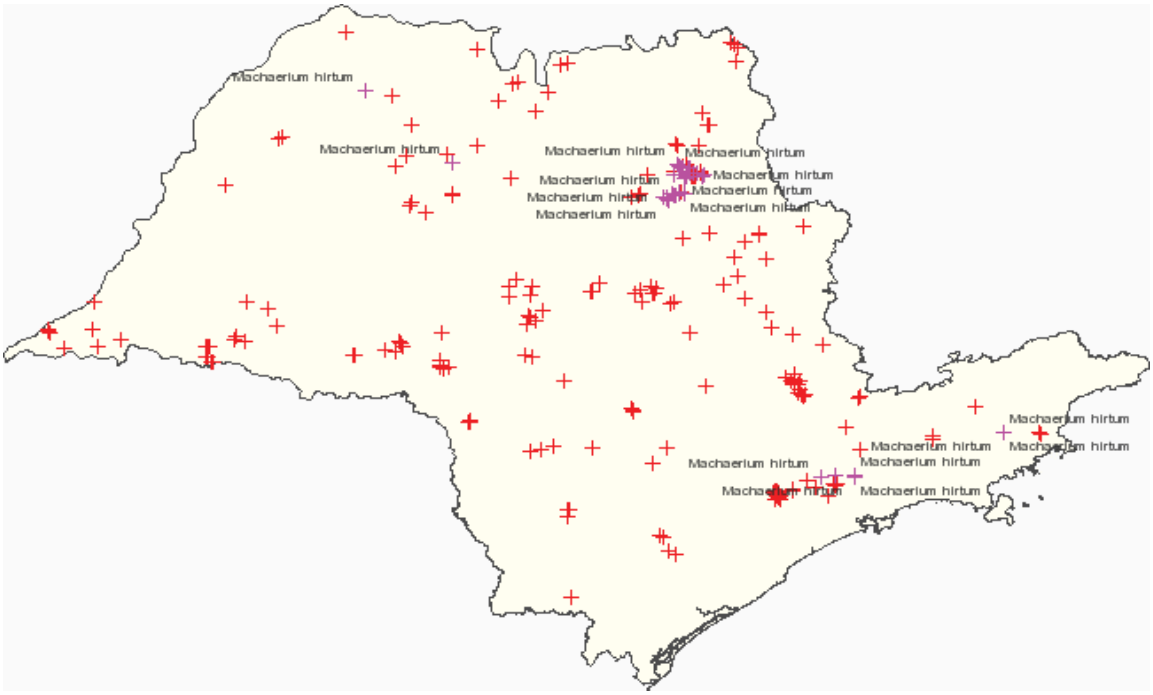


Figura 4. Distribuição geográfica de *Machaerium* e de *Machaerium hirtum* no estado de São Paulo (FUNDAÇÃO ..., 2011)



Figura 5. Detalhes de *Machaerium hirtum*: caule, flores e folhas (MARTINS, 2009)

Suas cascas são utilizadas popularmente contra diarréias, tosse e câncer (POTT & POTT, 2004). É popularmente conhecida como Adolfo, bico-de-andorinha e Jacarandá-de-espinho.

Selecionou-se esta espécie para estudo devido à utilização de suas cascas pela população para o tratamento de diarréia, tosse e câncer e pela sua abrangente disponibilidade no Brasil, ocorrendo em praticamente todo o território nacional. Ademais, a ausência de estudo químico-farmacológico de *M. hirtum* desperta interesse em estudá-la, visto que é uma espécie de composição totalmente desconhecida. Folhas serão o objeto de estudo, pois para a produção de um fitoterápico é inviável o uso de cascas, já que a retirada das mesmas pode ocasionar a morte da planta. Estudos preliminares indicam similaridade entre a composição das cascas e das folhas de *M. hirtum*. Estudos de atividade biológica estão sendo executados a fim de se confirmar a eficácia do extrato de *M. hirtum* contra doenças.

Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Desenvolver metodologia para estabelecer o perfil da composição química das folhas de *M. hirtum*.
- Estudar a composição química das folhas de *Machaerium hirtum*.
- Fornecer subsídios para o entendimento das atividades biológicas que estão sendo testadas (antiúlcera, antiistamínico antimutagênica, mutagênica, antimicrobiana).
- Contribuir no desenvolvimento do Projeto Temático que tem por objetivo: avançar nas pesquisas para a obtenção de fitoterápicos padronizados, abordando aspectos farmacológicos, toxicológicos e químicos.

Parte Experimental

Instrumentos

As separações cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco®) e um cromatógrafo líquido de alta eficiência (semipreparativo) com bomba de fluxo máximo 10 mL/min acoplada a detector por Índice de Refração Differential Refractometer, modelo Waters R401, da Millipore e registrador modelo L250E (Knauer). Os softwares *Star Chromatography Workstation* versão 5.31 (Varian®) e *EZChrom Elite Client/Server* versão 3.1.7 (Chromatec®) foram utilizados durante a aquisição e processamentos dos dados cromatográficos.

No modo analítico foram usadas colunas de fase reversa RP18 imobilizadas com octadecilsilano, modelos Luna 2 (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm i.d., apresentando partículas com tamanho médio de 5 µm; Synergi Hydro (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm i.d.; 4 µm, ambas com coluna de guarda (Phenomenex®) de 4 x 3 mm i.d. No modo semi-preparativo foi usada coluna de fase reversa RP18, modelo Luna 2 (Phenomenex®) de 250 x 10 mm i.d.; 10 µm; Synergi Hydro (Phenomenex®) de 250 x 10 mm i.d.; 4 µm. Amostras e padrões foram injetados através de um injetor Rheodyne® 7125 com um *loop* de 100 µL (modo analítico) e 500 µL (modo semi-preparativo).

Os espectros de massas e a quantificação foram realizados em espectrômetro de massas LCQ FLEET (UHPLC-PDA-ESI-IT-MS^n, Thermo Scientific®), equipado com dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA).

Para quantificação foi utilizado somente o sistema UHPLC-PDA, coluna de fase reversa RP18 imobilizada com octadecilsilano, modelo Thermo Scientific® Hypersil Gold 50 x 2,1mm i.d., apresentando partículas com tamanho médio de 1,9 µm.

As matrizes estudadas foram analisadas no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS^2, MS^3, MS^n) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido

para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MS^n), sob as seguintes condições: voltagem do capilar –4 V, voltagem do spray –5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N_2) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 50-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ.

O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS^n realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento.

O software *Xcalibur* (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

As soluções padrão de calibração foram preparadas a partir de alíquotas retiradas das soluções estoque por meio de micropipetas de alta precisão (Gilson Pipette®), modelos P20, P200 e P1000. A faixa de transferência de volumes estava contida no intervalo de amostragem de 2,0 a 1000,0 µL.

Os experimentos de ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR, obtidos em dimetil sulfóxido hexadeuterado (DMSO-d_6, Sigma Aldrich®), foram realizados em espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 11,7 T (Varian® Inova), operando em 500 MHz para ^{1}H-NMR e 125 MHz para ^{13}C-NMR. Os deslocamentos químicos são dados em δ (ppm) usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

Clorofórmio e diclorometano (Burdick & Jackson®), acetonitrila e metanol (Baker®), todos de grau HPLC, foram usados na preparação das amostras, padrões, nas eluições em SPE e como fase móvel em HPLC. Os demais solventes citados no trabalho são de grau analítico (PA).

Nas triagens das frações foram usadas placas de camada delgada de silicagel em suporte de alumínio (Merck®, Aldrich®), sendo usados como reveladores: Anisaldeído/H_2SO_4 e NP/PEG.

Clean-up das frações

O *clean-up* de todas as frações deste trabalho foi realizado da mesma maneira, utilizando cartucho de SPE RP18 (50 mg). O cartucho foi previamente ambientado com 5,0 mL de MeOH/H_2O, na proporção mais adequada. Em seguida, a amostra foi filtrada através do cartucho, o qual foi em sequência eluido com 5,0 mL da mesma mistura de MeOH/H_2O. A solução obtida foi seca em temperatura ambiente e o sólido resultante redissolvido em MeOH/H_2O, filtrado em filtro de PTFE (0,22 µm) e armazenado em vial de vidro.

Análise das frações em HPLC-PDA

A análise do perfil cromatográfico de todas as frações foi realizada por HPLC-PDA, Coluna Phenomenex® Luna RP-18 (250 x 4,6mm i.d.; 4µm), fluxo 1,0 mL.min^{-1}, Solventes: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min.

Desenvolvimento, Resultados e Discussão

Coleta e Preparo do Material Vegetal

Folhas de *Machaerium hirtum* foram secas em estufa a 40ºC e moídas em moinho de facas com um tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm. Em seguida, foram submetidas à percolação (PRISTA, 1995). O processo teve início com o intumescimento prévio de aproximadamente 1,0 kg do pó com 4,0 L de etanol 70% (v/v) durante 2 horas fora do percolador. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + EtOH 70%). O empacotamento foi feito de forma mais homogênea possível, respeitando a proporção 5:1 em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador foi ajustada para 1,0 a 2,0 mL/min/kg de material vegetal. Após a extração, os extratos foram rota-evaporados sob pressão reduzida em temperatura de 40°C, liofilizados e armazenado em frascos âmbar vedados. Após esse processo foi determinado o rendimento do extrato das folhas (170,0 gramas = 17%).

Perfil Cromatográfico do Extrato

Foram realizadas duas análises por TLC do extrato bruto (Sílicagel, $CHCl_3$/MeOH/n-propanol/H_2O 5:6:1:4, Revelação: anisaldeído/H_2SO_4 e NP/PEG). Ambas as placas mostraram manchas amarelas com Rf entre 0,0 e 0,8, sugerindo a presença de flavonoides (WAGNER *et al.*, 2001).

A fim de traçar o perfil cromatográfico, 130 mg do extrato foram solubilizados em 2,0mL de MeOH/H_2O 1:1, filtrados em cartucho SPE C18 e em membrana de 0,22 µm e diluídos com MeOH/H_2O 1:1 até obtenção de solução de concentração de 5 mg/mL.

A análise do perfil cromatográfico do extrato bruto foi realizada por HPLC-PDA, Coluna Phenomenex® Luna RP-18 (250 x 4,6mm i.d.; 4µm), fluxo 1,0 $mL.min^{-1}$, Solventes: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,05%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min (Figura 6).

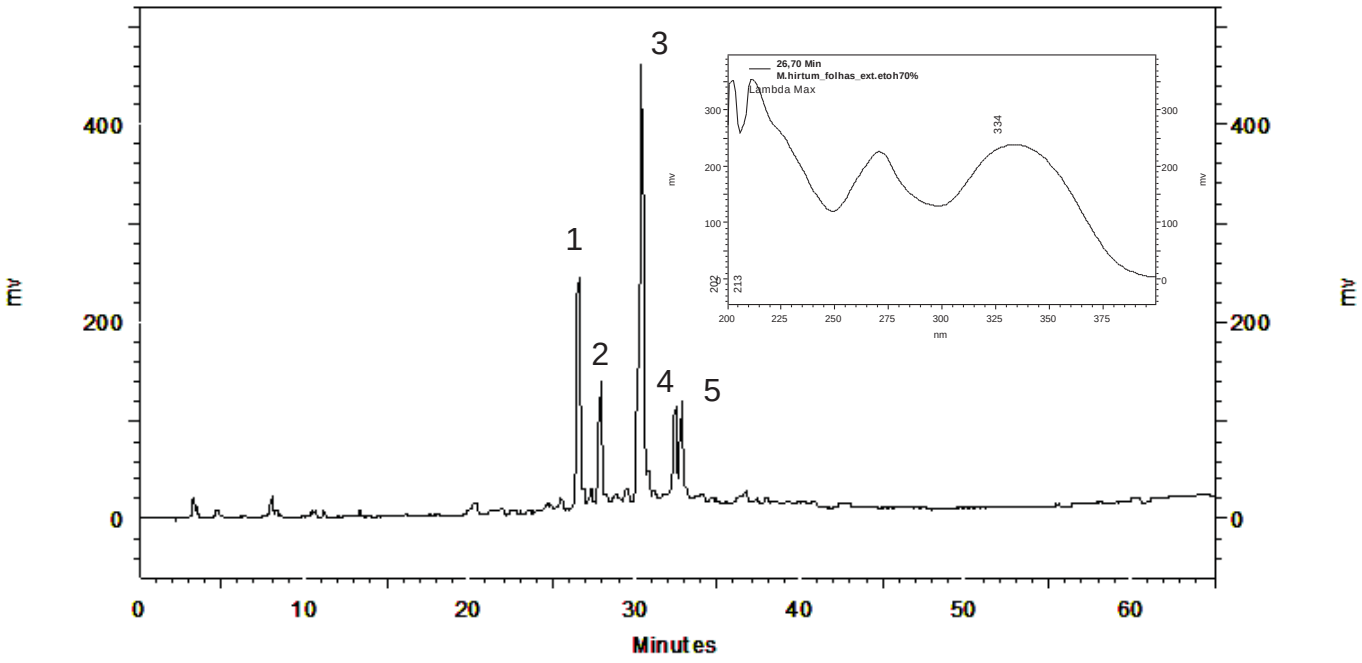


Figura 6. Perfil do extrato EtOH 70% das folhas de *Machaerium hirtum* e espectro no UV representativo dos picos observados. Tempo de retenção(min): 1) 26,5; 2) 28,0; 3) 30,0; 4) 32,0; 5) 33,0. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min.

Comparando os espectros no UV com os dados da literatura verificamos que as substancias detectadas pertencem à classe das flavonas (bandas em 270 e 330 nm) (MARKHAM, 1982).

Fracionamento Cromatográfico do Extrato

Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido foi necessária para separar substâncias de polaridades muito diferentes e assim obter frações de polaridades semelhantes. Pesou-se cerca de 40,00g do extrato bruto liofilizado e dissolveu-se o mesmo em 500mL de solução de H_2O/MeOH 8:2 e 500mL de hexano. Agitou-se a mistura e aguardou-se a separação das fases. Em seguida, retirou-se a fase hexânica e adicionou-se mais 300 mL de hexano. Repetiu-se o

processo até a exaustão, ou seja, até a fase hexânica não apresentar mais coloração ao ser misturada com a fase aquosa. Ambas as fases foram rotaevaporadas e armazenadas em frascos devidamente vedados.

Fracionamento em Coluna de Permeação em Gel

Optou-se pelo fracionamento do extrato por permeação em gel porque o princípio desta técnica (separação por tamanho) minimiza os problemas de adsorção irreversível de substancias polares, que usualmente ocorre quando se usa técnicas baseadas em cromatografia de adsorção. Parte da fase aquosa proveniente da extração líquido-líquido (4,00 g) foi solubilizada em MeOH/H_2O 8:2, colocada em banho de ultrassom por 10 minutos e em seguida centrifugada por 10 min, separando-se o precipitado (500mg) do sobrenadante. O sobrenadante foi aplicado numa coluna de Sephadex LH-20 (57 cm x 3,0 cm d.i.), eluída com solução de MeOH/H_2O 8:2 e fluxo de 2,5 mL/min. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes.

Em cada separação foram obtidas 390 frações, as quais foram analisadas por TLC (Sílica gel, $CHCl_3$/MeOH/n-propanol/H_2O 5:6:1:4, Revelação: anisaldeído/H_2SO_4). As frações semelhantes (comparação de Rfs e coloração) foram reunidas em 12 frações (Figura 7).

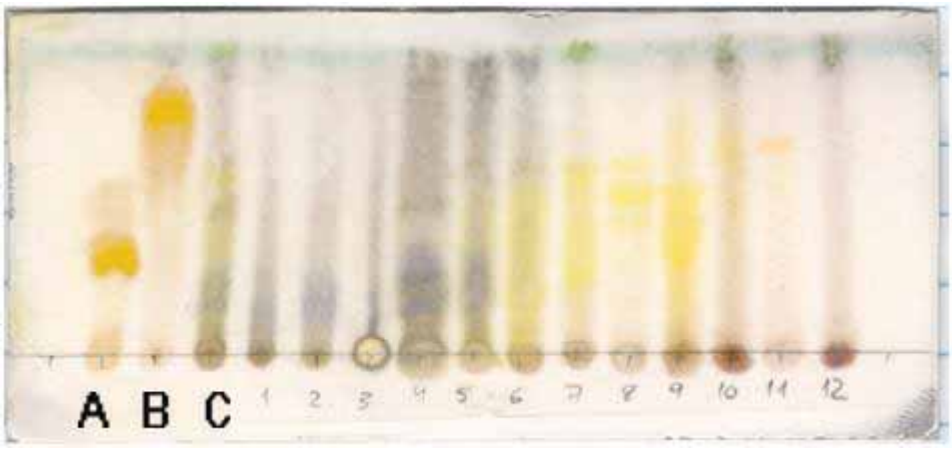


Figura 7. Análise por TLC das 12 frações obtidas após o fracionamento do extrato EtOH 70% de *M. hirtum* e comparação com padrões de A - rutina, B - quercetina e com C - extrato bruto.

As frações obtidas foram secas e suas massas determinadas (Tabela 2).

Tabela 2. Massa das 12 frações obtidas após o fracionamento do extrato EtOH 70% de *M. hirtum*.

Fração	Massa (g)
1	0,86
2	0,87
3	4,17
4	1,63
5	1,48
6	0,17
7	1,04
8	0,18
9	0,07
10	0,09
11	0,01
12	0,03

Tendo em vista que as análises do extrato por TLC e o perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA evidenciaram a presença de flavonóides, que estes exibem diversas atividades bio-famacológicas importantes (MANTHEY *et al.*, 2001) e que podem servir de marcadores para a padronização de extratos vegetais (AGÊNCIA ..., 2010), optou-se por iniciar a purificação das substâncias pelas frações que os apresentaram.

As frações de 1 a 5 apresentaram-se muito complexas. Revelação com anisaldeído mostrou manchas roxas e cinzas, que sugerem a presença de esteróides e ácidos fenólicos, respectivamente (WAGNER *et al.*, 2001). Por isso, não foram tomadas como prioritárias.

Purificação das Frações obtidas do Extrato de *Machaerium hirtum*

Fração 7

Traçou-se o perfil cromatográfico da fração 7 por HPLC-PDA a fim de se ter uma visão preliminar das substâncias presentes e da complexidade da mesma. Pesou-se 20 mg da fração e solubilizou-se em 1,0 mL de MeOH/H_2O

1:1. Após agitação, ocorreu precipitação de um sólido amarelo. Centrifugou-se a mistura, separando o precipitado do sobrenadante. Realizou-se ou *clean-up* do sobrenadante em cartucho de SPE C18 (50 mg) eluindo com MeOH/H_2O 1:1. O precipitado previamente separado foi solubilizado em 1,5 mL de MeOH/H_2O 9:1, filtrado em filtro de PTFE (0,22 µm) e armazenado em vial de vidro. Ambos foram analisados por HPLC-PDA (Figuras 8 e 9).

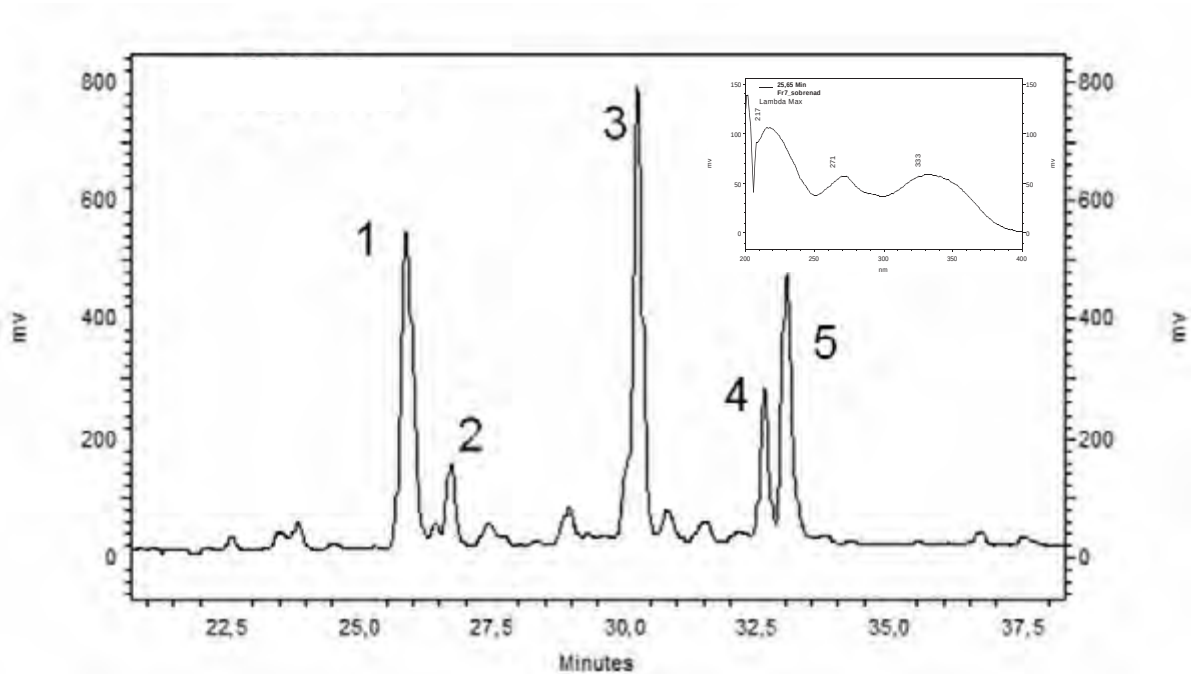


Figura 8. Perfil cromatográfico da Fração 7 e espectro no UV representativo dos picos observados. Tempo de retenção(min): 1) 26,0; 2) 28,5; 3) 30,0; 4) 32,5; 5) 33,0. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min.

Comparando-se o cromatograma obtido com o da Figura 6, observa-se que ambos apresentam perfil muito similar. Portanto, dentre as substâncias que absorvem no UV, nesta fração estão presentes as majoritárias do extrato. Todas elas são flavonas, pois apresentam bandas em 270 nm e 330 nm (MARKHAM, 1982).

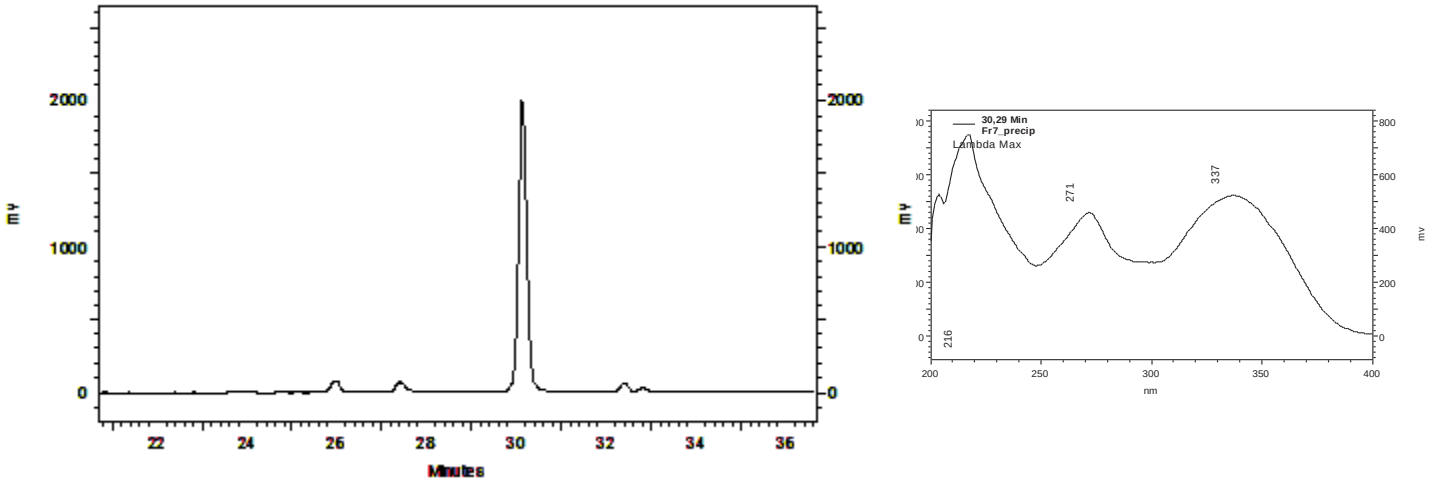
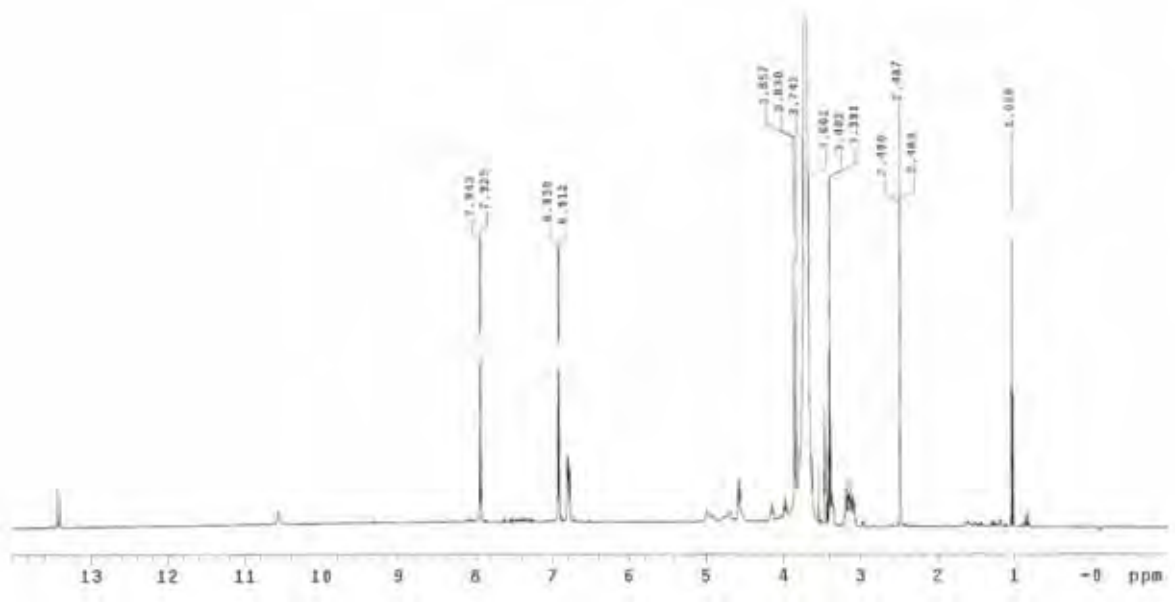


Figura 9. Análise por HPLC-PDA do precipitado obtido da fração 7. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min.

A análise do cromatograma da Figura 9 permite inferir que o precipitado encontra-se praticamente puro e corresponde ao pico 3. A substância isolada foi denominada de **Mh1**.

A fim de iniciar sua identificação, registrou-se os espectros de NMR-^{1}H(Figura 10), gHMQC(Figura 11) e gHMBC(Figura 12) (Tabela 3).



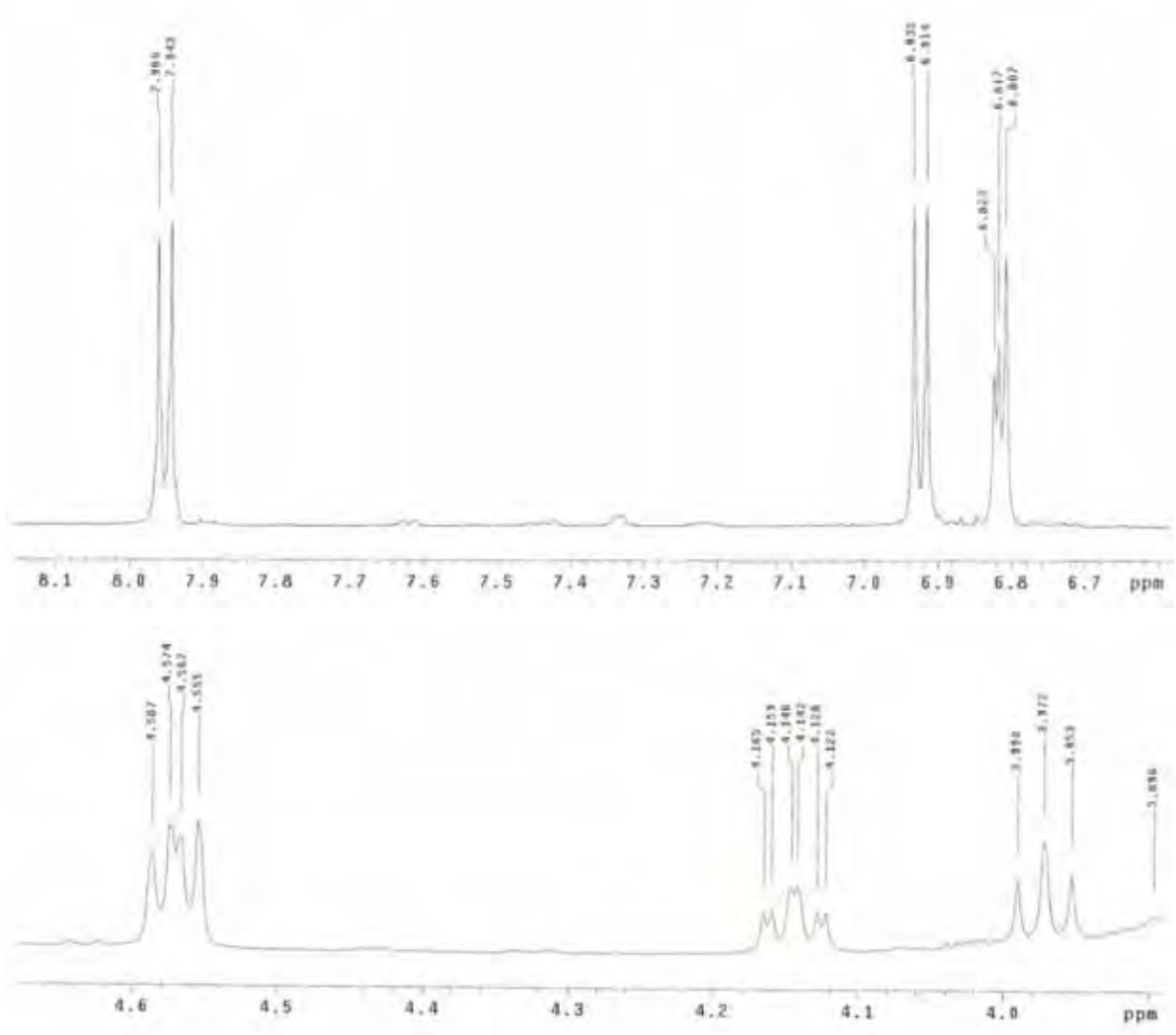


Figura 10. Espectros NMR – ^{1}H de **Mh1** (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

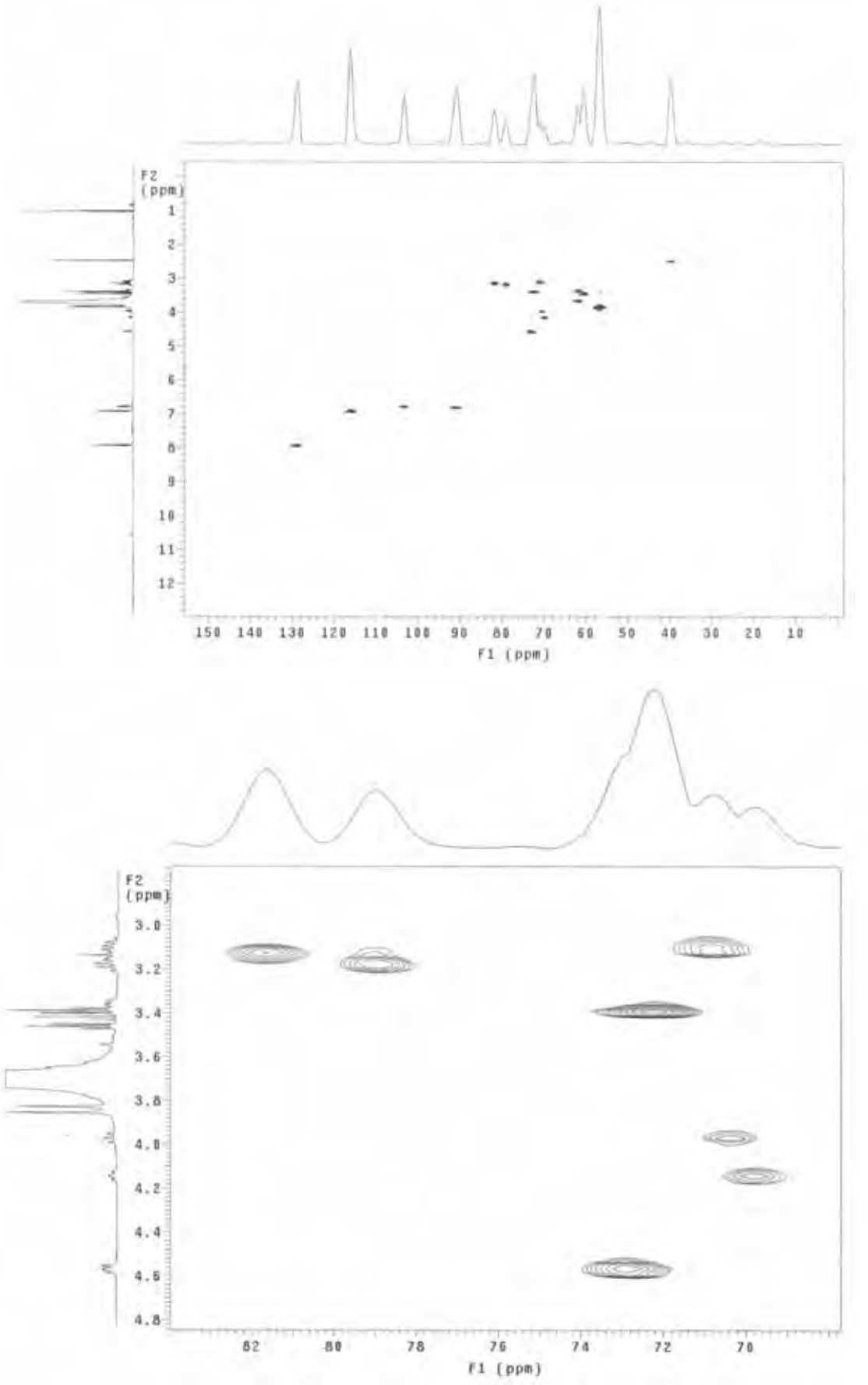


Figura 11. Espectros gHMQC de **Mh1** (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

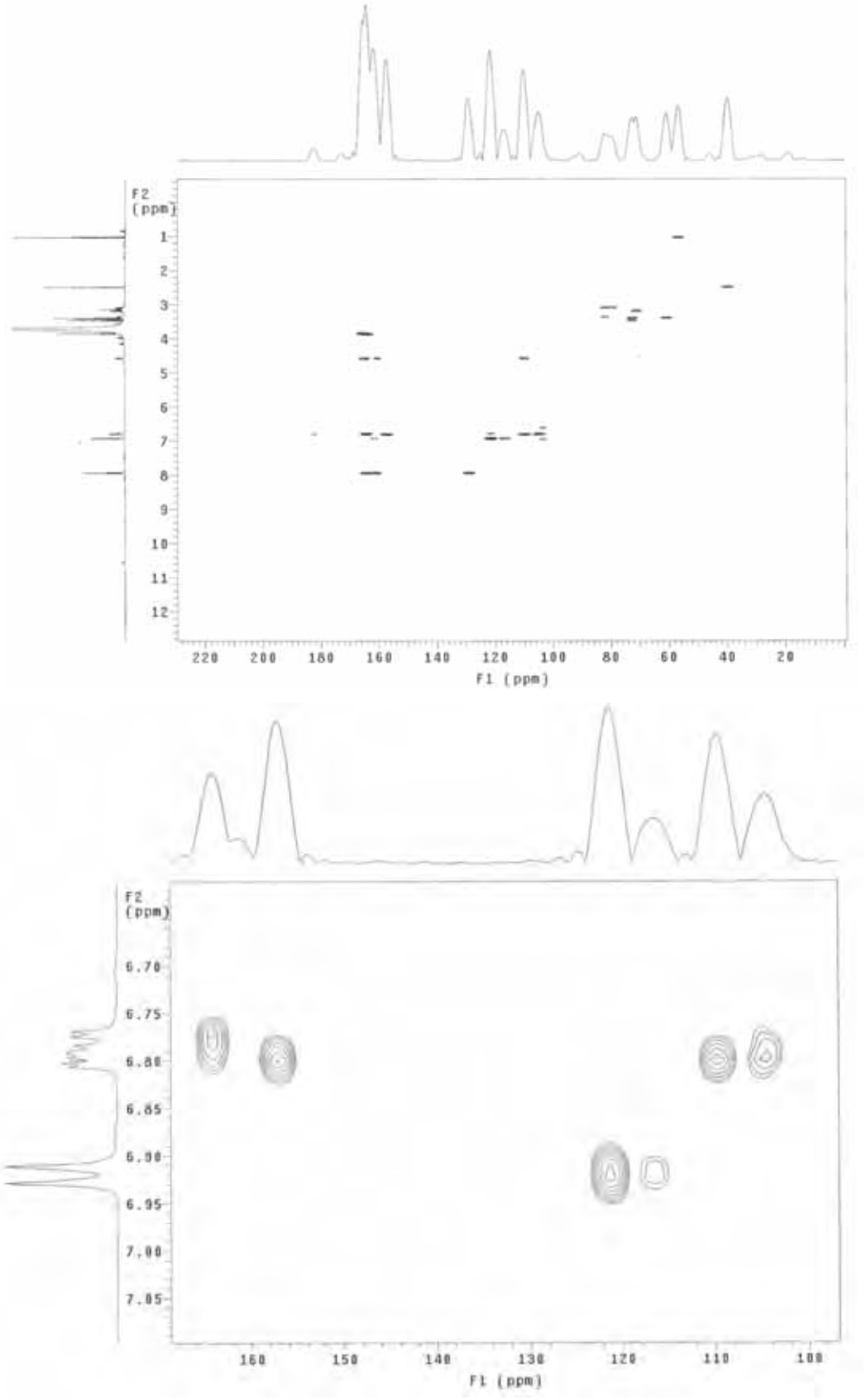


Figura 12. Espectros gHMBC de **Mh1** (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

Tabela 3. Deslocamentos químicos de NMR de ^{13}C e ^{1}H **Mh1** (*CHENG *et al.*, 2000; **ANDERSEN & MARKHAM, 2006)

Posição	Deslocamento Químico/ppm (*J*/Hz)			
	Mh1		Literatura*	
	^{13}C	^{1}H	^{13}C	^{1}H
2	164,0	-	163,8	-
3	100,4	6,80	103,0	6,83
4	182,0	-	182,2	-
5	161,8	-	160,2	-
6	110,0	-	109,6	-
7	164,0	-	164,9	-
8	90,0	6,82	91,0	6,85
9	156,4	-	156,8	-
10	106,0	-	104,5	-
1'	121,5	-	121,0	-
2'	129,0	7,95 (8,5)	128,4	7,97 (7,9)
3'	116,2	6,92 (8,5)	115,9	6,93 (7,9)
4'	164,0	-	161,2	-
5'	116,2	6,92 (8,5)	115,9	7,97 (7,9)
6'	129,0	7,95 (8,5)	128,4	6,93 (7,9)
C-Glicose				
				Literatura**
1''	73,0	4,57 *d* (9,0)	-	4,58 *d* (10,0)
2''	70,0	4,15 *dd* (9,0; -)	-	4,03 *dd* (9,4; 9,4)
3''	78,8	3,15 *m*	-	3,19 *t* (8,6)
4''	70,8	3,08 *m*	-	3,11 *t* (9,2)
5''	81,7	3,12 *m*	-	3,15 *m*
6''	60,0	3,38 *dd* (9,0; -)	-	3,40 *dd* (12,0; 1,8)
		3,65 *m*	-	3,68 *dd* (12,0; 1,8)

O espectro de NMR-^{1}H apresentou sinais na região aromática: dois dubletos de *J* = 8,5 Hz em δ 7,95 (2H, H2'/H6') e em δ 6,92 (2H, H3'/H5'), que evidenciaram que o anel B do núcleo flavonoídico é mono-oxigenado e *para*-di-substituído. Na caracterização do anel A, verifica-se um singleto em δ 6,80 (1H, H8). O singleto em δ 6,82 (1H, H3) caracteriza uma flavona. Esse conjunto de sinais sugere a presença de um derivado de apigenina (HARBORNE, 1994). A

presença de dois sinais na região de δ 13,4 indica se tratar de uma mistura de substâncias.

O espectro gHMQC exibiu todos os sinais de correlação direta entre ^{1}H e ^{13}C. A correlação entre o sinal em δ 6,80 (H3) e o sinal em δ 100,4 (C3) comprova que essa molécula é uma flavona derivada da apigenina (HARBORNE, 1994).

O espectro gHMBC de **Mh1** apresentou correlações à longa distância entre ^{1}H e ^{13}C. O sinal em δ 6,82 (H8) apresentou correlações com os sinais em δ 90,0 (C8 – ^{1}J), δ 110,0 (C6 – ^{3}J), δ 106,0 (C10 – ^{3}J), δ 156,4 (C9 – ^{2}J) e em 164,0 (C7 – ^{2}J). Correlações do sinal em δ 4,57 (H1'' – anomérico) com os sinais em δ 110,0 (C6 – ^{2}J), δ 164,0 (C7 – ^{3}J) e em δ 161,8 (C5 – ^{3}J) demonstram que o açúcar está ligado à posição 6 da aglicona, caracterizando-a como uma flavona 6-*C*-glicosilada (HARBORNE, 1994).

Observam-se sinais entre δ 3 e 5, o que sugere ligação do flavonóide a uma unidade glicosídica. Observa-se, ainda, sinal em δ 3,8, característico de metoxila.

Para auxiliar na determinação da identidade do açúcar, foi realizado o experimento TOCSY-1D (Figura 13). Irradiação do sinal do próton anomérico em δ 4,57 exibiu sinais em δ 4,15, δ 3,65, δ 3,38 e δ 3,19-3,08. Esses dados, associados com aqueles do espectro gHMQC, são coerentes com o sistema de spin de uma unidade de glicose. O tripleto aparente (*J* = 10Hz) em δ 3,97 não pertence a essa unidade de glicose de **Mh1**. No espectro gHMQC correlaciona-se com o sinal em δ 70,5, que poderia ser atribuído ao C2 de um flavonóide *C*-glicosilado na posição 8 (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

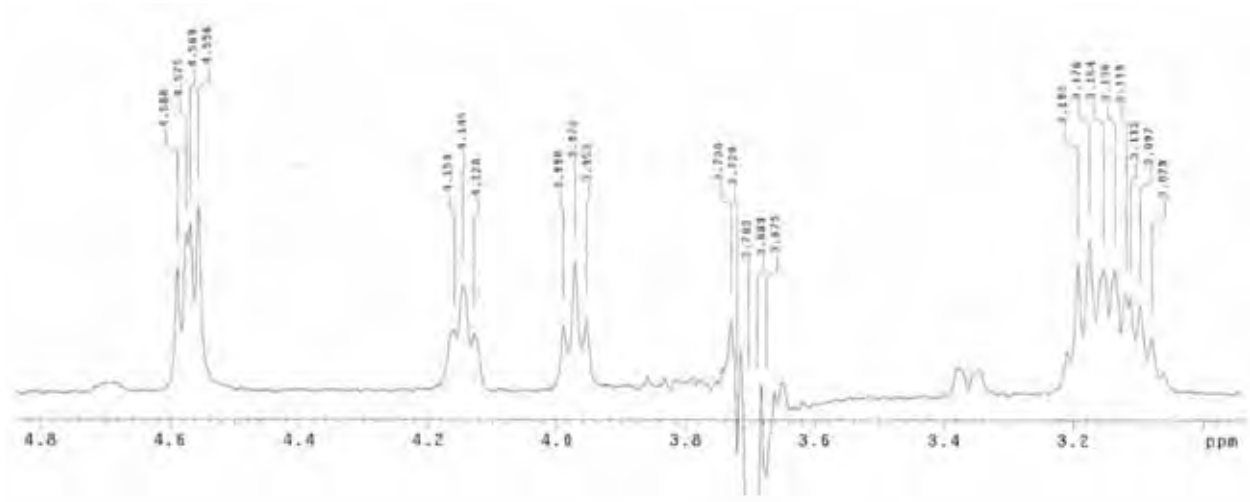


Figura 13. Espectro TOCSY-1D de **Mh1** (irradiação em δ 4,57- 11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

A fim de determinar a posição da metoxila, realizou-se experimento de NOESY-1D (Figura 14). Irradiação do sinal da metoxila em δ 3,8 mostrou correlação com o sinal do hidrogênio em δ 6,8 (H8), demonstrando que a mesma encontra ligada à posição 7.

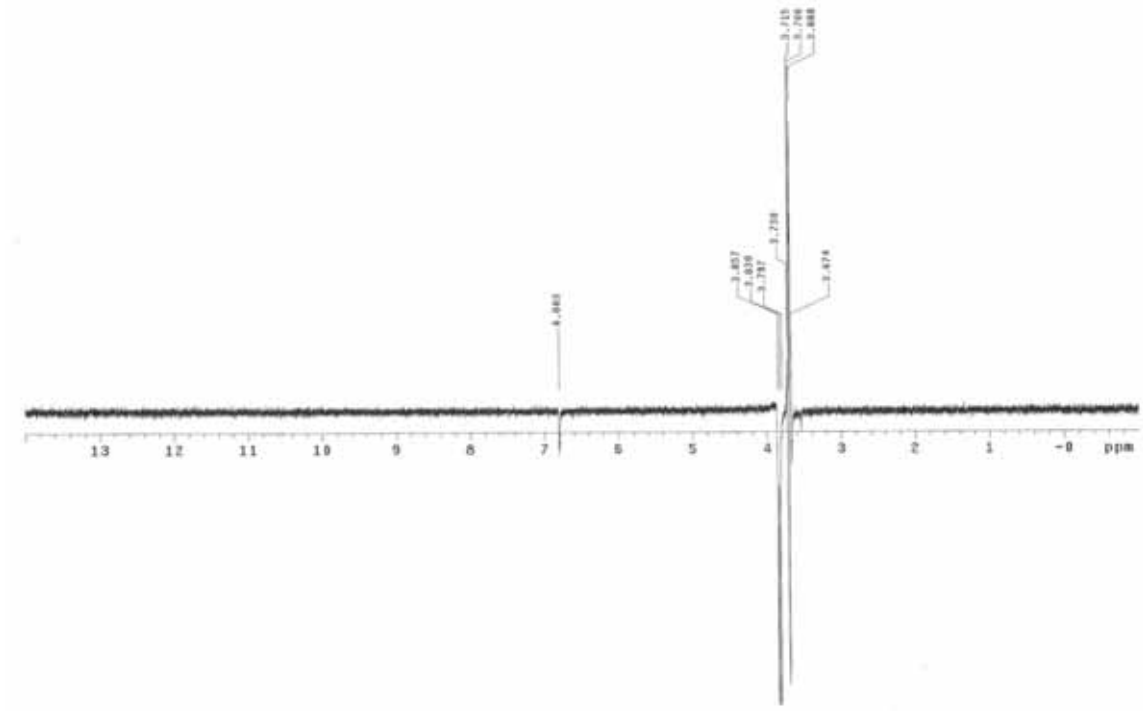


Figura 14. Espectro NOESY-1D de **Mh1** (irradiação em δ 3,8 - 11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

Esses dados e comparação com aqueles da literatura (HARBORNE, 1994) indicaram que **Mh1** é a apigenina-7-metoxi-6-C-β-D-glucopiranosídeo, swertisina (Figura 15).

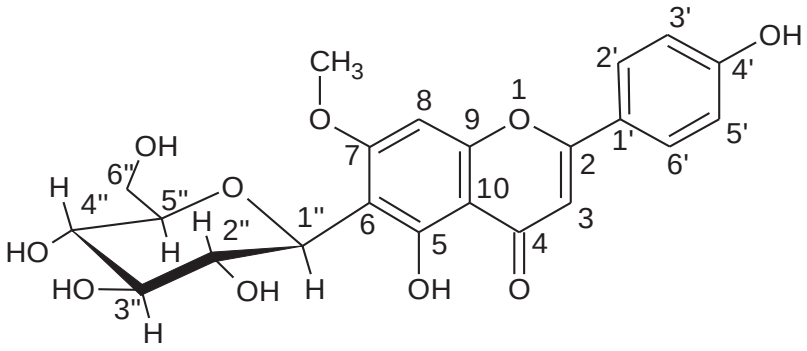
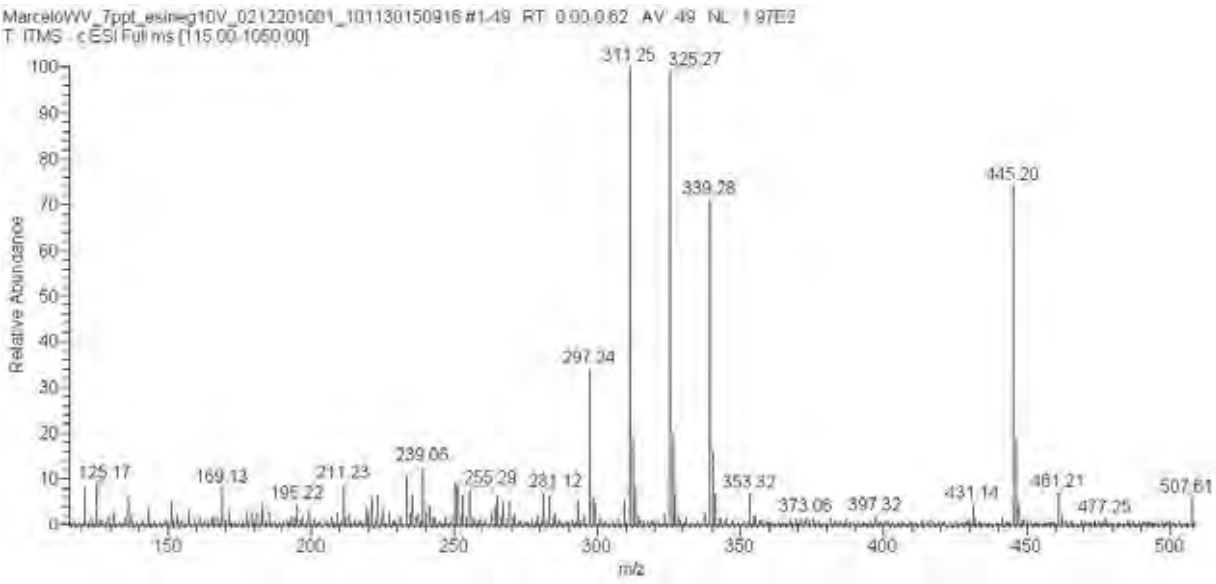


Figura 15. Estrutura de **Mh1**: apigenina-7-metoxi-6-C-β-D-glucopiranosídeo

A fim de se confirmar a estrutura proposta, a substância foi analisada por espectrometria de massas (FIA – ESI – IT – MS^n), em modo negativo (Figura 16).



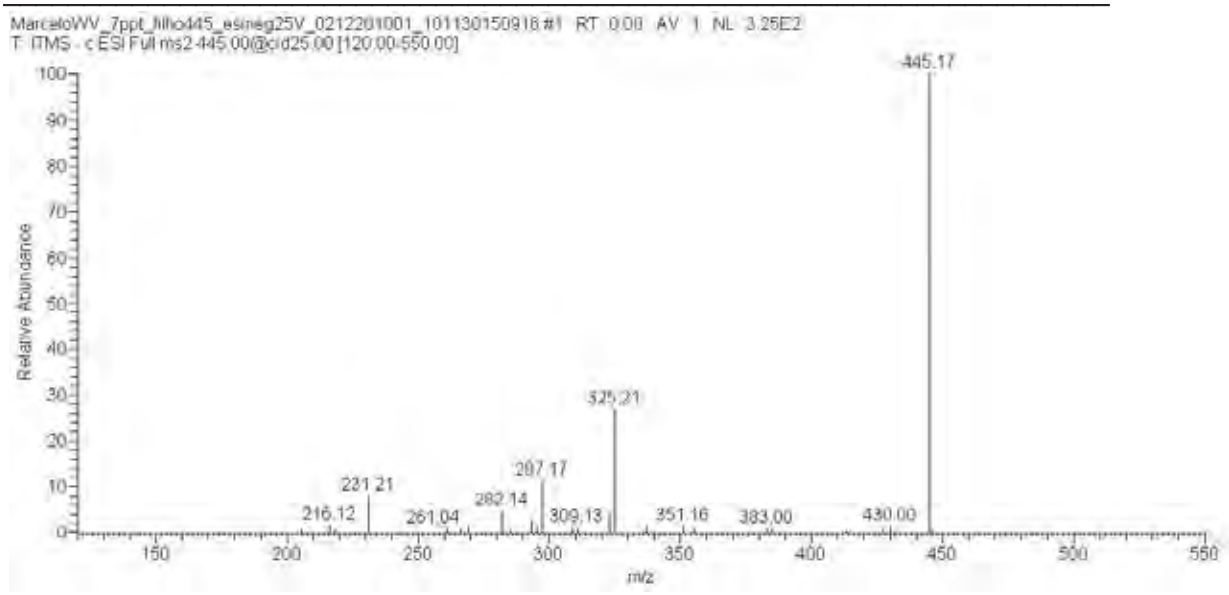


Figura 16. Espectro de Massas de **Mh1** (FIA-ESI-IT-MS^n – modo negativo)

O espectro de massas apresentou pico em *m/z* 445 Da correspondente ao íon $[M-H]^-$ e confirma a estrutura anteriormente proposta. Fragmentação MS^2 produz o íon produto de *m/z* 325 $[M-120-H]^-$ atribuído à quebra interna da unidade de açúcar e confirmando a estrutura *C*-glicosilada proposta. Hexoses *C*-glicosiladas podem sofrer perdas de 134 Da, 120 Da e 90 Da (Figura 17) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004).

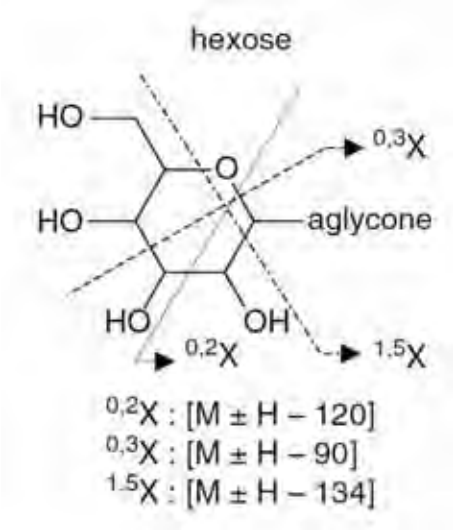


Figura 17. Íons característicos formados pela quebra interna de uma hexose para modo positivo ou negativo (CUYCKENS & CLAEYS, 2004)

O sobrenadante da Fração 7 (400 mg) foi dissolvido em 4 mL de MeOH/H_2O 1:1 e submetido à purificação por cromatografia liquida com detector de índice de refração (HPLC-RI). Foi utilizada coluna Phenomenex®

Luna RP - 18 (250 x 10 mm i.d.; 10µm), fluxo de 2,0 mL/min e fase móvel MeOH/H_2O 55:45 com 0,1% de ácido acético. Foram realizadas 40 injeções de 40,0 µL cada, o que forneceu 7 frações (denominadas 7.1 a 7.7), as quais foram analisadas por TLC (Figura 18).

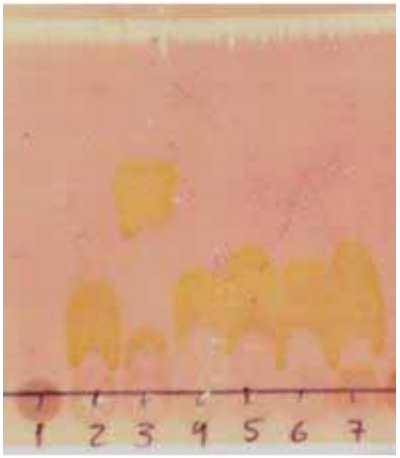
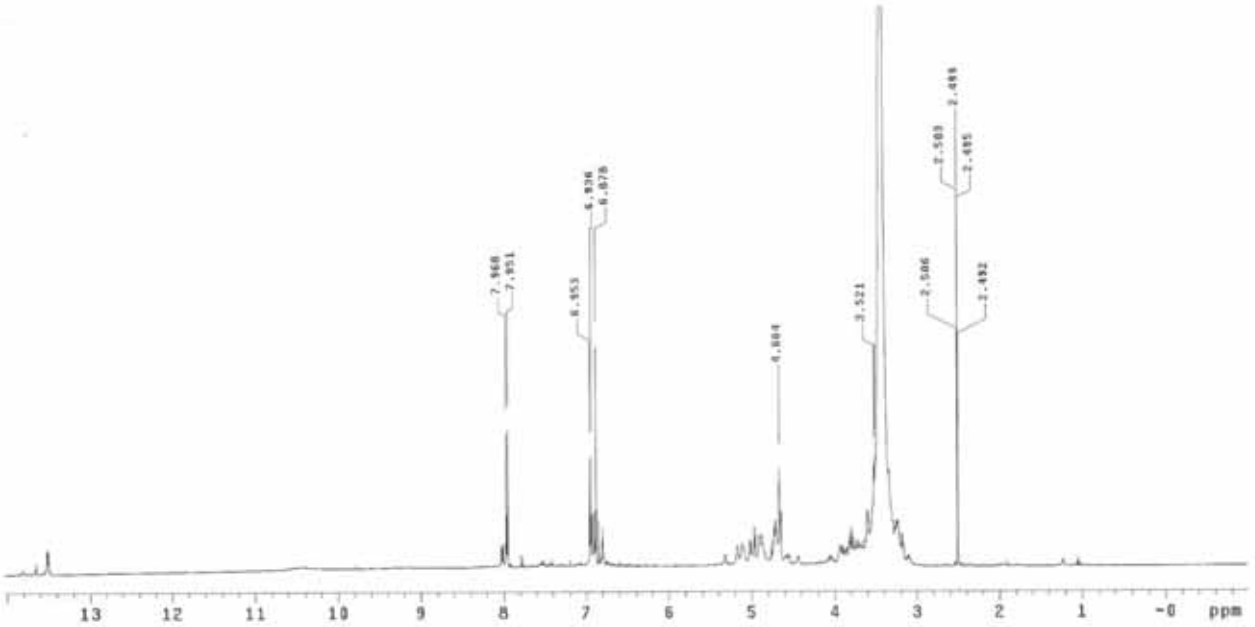


Figura 18. Análise por TLC das frações obtidas da purificação do sobrenadante da fração 7

Apenas a fração 7.2 (14mg) apresentou massa considerável e pureza adequada para a continuidade das análises. Foram realizados experimentos de NMR-^{1}H a fim de elucidar sua estrutura (Figura 19).



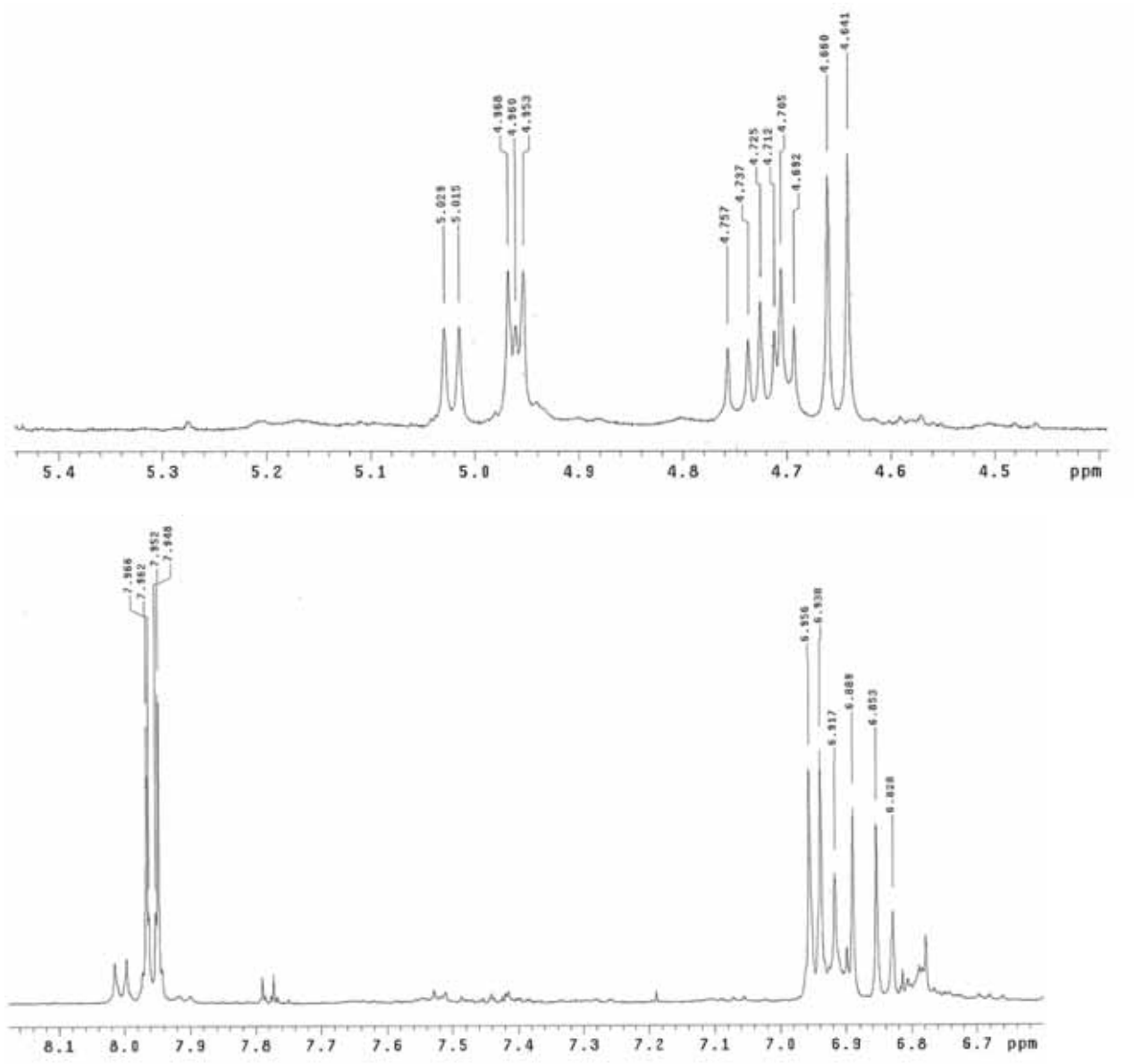


Figura 19. Espectros NMR – ^{1}H da fração 7.2 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

Analisando o espectro de NMR-^{1}H obtido, verificam-se sinais em δ 13,5, 13,6 e 13,8, de diferentes intensidades, sugerindo a presença de três unidades flavonoídicas em proporções diferentes. A análise detalhada da região do hidrogênio anomérico permite identificar seis unidades de açúcares presentes na mistura, indicando que as unidades flavonoídicas são diglicosiladas. A fração foi também analisada por espectrometria de massas (FIA – ESI – IT – MS^{n}), em modo negativo, a fim de se identificar as substâncias (Figura 20).

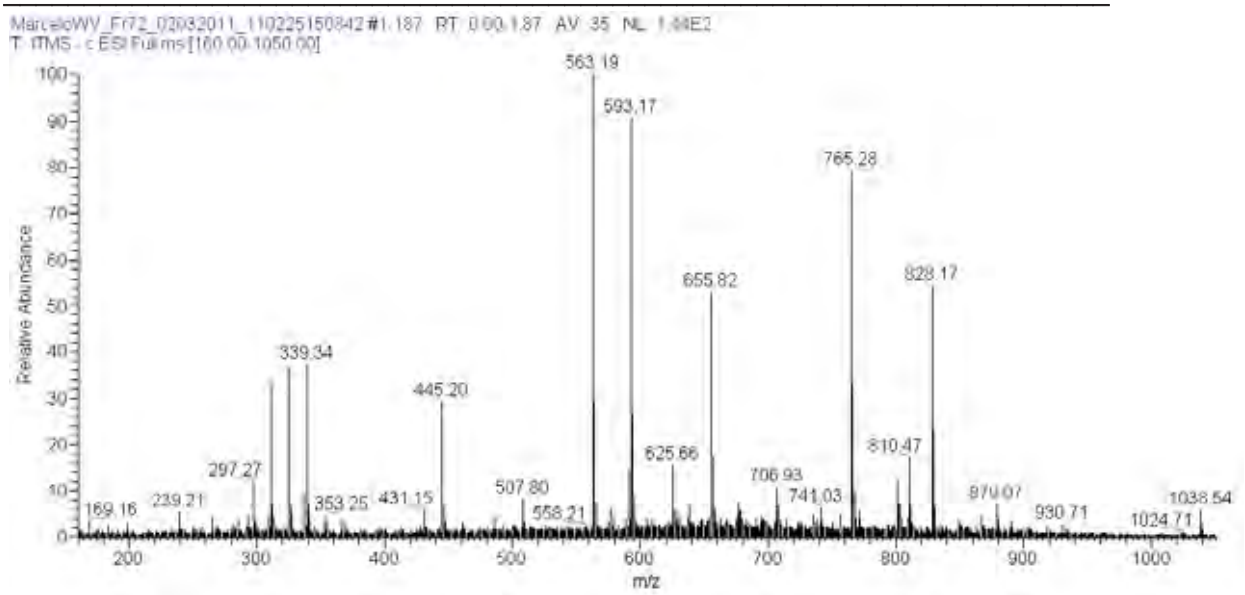


Figura 20. Espectro de Massas da fração 7.2 (FIA-ESI-IT-MS^n – modo negativo)

O espectro de massas obtido confirma que a fração 7.2 é uma mistura de flavonóides. Foi realizado o experimento MS^2 dos íons mais estáveis, em *m/z* 593 e 563.

A fragmentação do íon precursor de *m/z* 593 fornece os íons produtos de *m/z* 473 Da $[M-120-H]^-$, *m/z* 431 Da $[M-162-H]^-$ e *m/z* 311 Da $[M-162-120-H]^-$, sugerindo um derivado de apigenina contendo uma *O*-hexose e uma *C*-hexose.

A fragmentação do íon precursor de *m/z* 563 fornece os íons produtos em *m/z* 503 Da $[M-60-H]^-$, *m/z* 473 Da $[M-90-H]^-$ e *m/z* 443 Da $[M-120-H]^-$, sugerindo um derivado de apigenina glicosilado com uma *C*-hexose e uma *C*-pentose. Pentoses C-glicosiladas sofrem quebras similares às quebras das hexoses, com perdas de 104 Da, 90 Da e 60 Da, pois há quebra interna do açúcar (Figura 21) (CUYCKENS & CLAEYS, 2004).

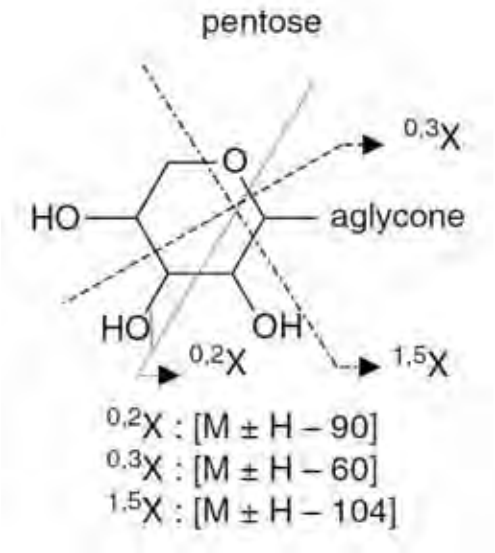


Figura 21. Íons característicos formados pela quebra interna de uma pentose para modo positivo ou negativo (CUYCKENS & CLAEYS, 2004)

O íon de *m/z* 445 sugere a presença da apigenina-7-metoxi-6-C-β-D-glucopiranosídeo, **Mh1**. Os íons de *m/z* 655, *m/z* 765 e *m/z* 828 não foram estáveis ao se realizar experimento MS^2, não sendo possível propor estruturas condizentes com os mesmos.

A análise conjunta dos espectros de NMR – H^1 (HARBORNE, 1994) e dos espectros de massa permite propor que estão presentes na mistura a apigenina-6-C-β-D-glucopiranosil-7-O-β-D-glucopiranosídeo, a apigenina-8-C-β-D-glucopiranosil-7-O-β-D-glucopiranosídeo e a apigenina-6-C-β-D-glucopiranosil-8-C-β-D-xilopiranosídeo, respectivamente **Mh2, Mh3** e **Mh4** (Figura 22).

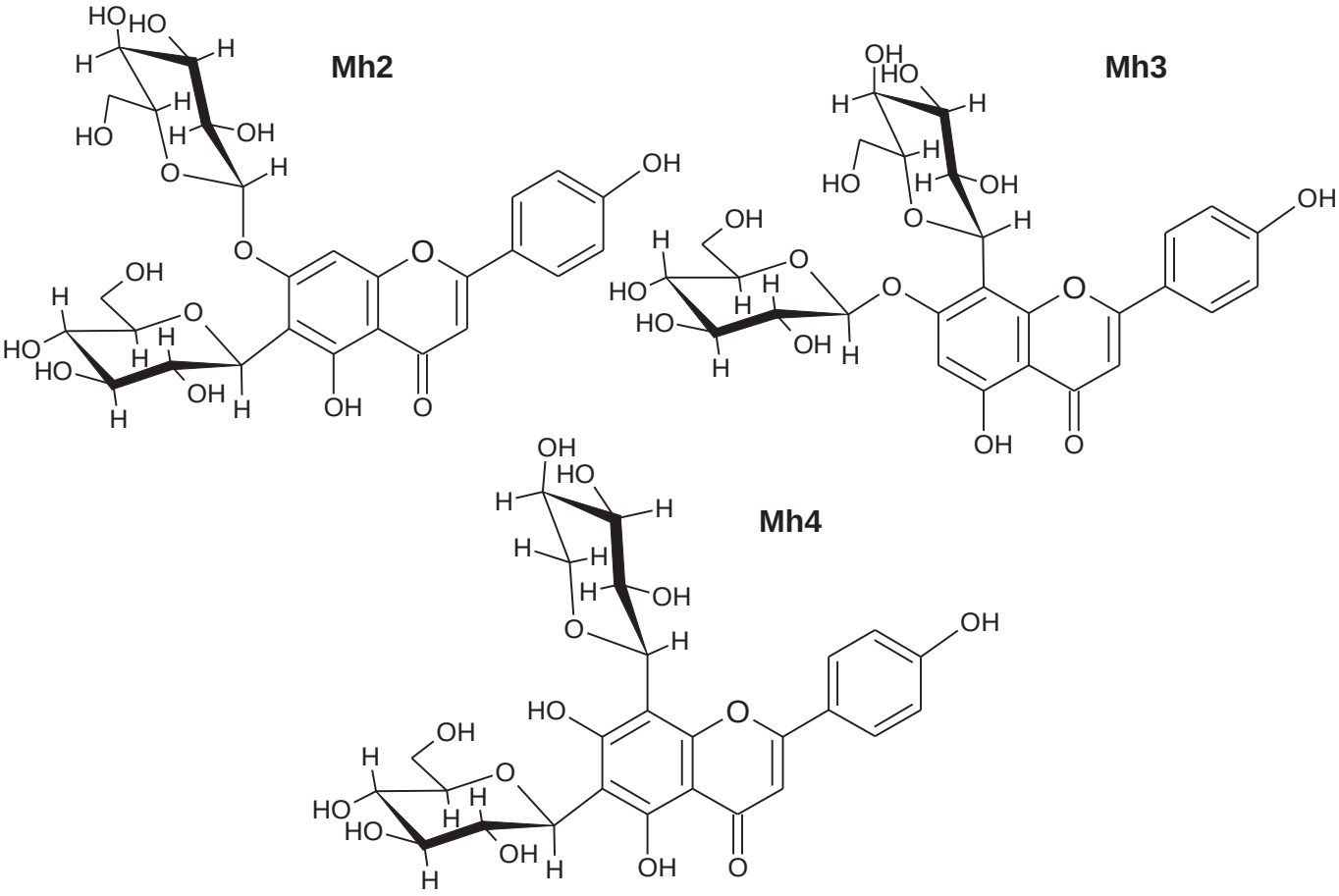


Figura 22. Estruturas de **Mh2**, **Mh3** e **Mh4**, identificadas na fração 7.2

A substância **Mh2** foi isolada na fração 5 e será posteriormente descrita com mais detalhamento com base em seus espectros de NMR. Comparação com dados da literatura (LIU *et al.*, 2008) sugere que a pentose presente em **Mh4** é a xilose.

Fração 8

Realizou-se o *clean-up* da fração 8 utilizando cartucho de SPE C18 eluido com MeOH/H_2O 1:1. A seguir, o perfil cromatográfico foi traçado por HPLC-PDA (Figura 23).

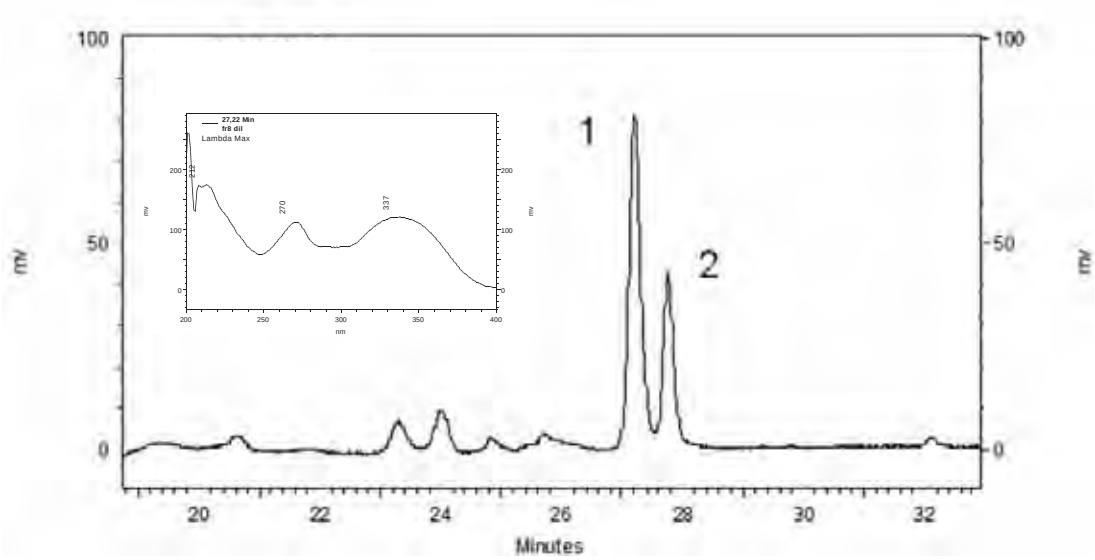


Figura 23. Perfil cromatográfico da fração 8 e espectro no UV representativo dos picos observados. Tempo de retenção(min): 1) 27,2; 2) 27,8. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min.

Comparando os espectros no UV com dados da literatura, concluiu-se que as substâncias presentes na fração são flavonas, pois apresentam bandas em aproximadamente 270 nm e 330 nm (MARKHAM, 1982).

A fração foi diluída em MeOH/H_2O 1:1 até concentração de 100mg/mL e submetida à purificação em sistema HPLC-RI. Foi utilizada coluna Phenomenex® Luna RP-18 (250 x 10 mm i.d.; 10µm), fluxo de 2,0 mL/min e fase móvel MeOH/H_2O 55:45 com 0,1% de ácido acético. Foram realizadas 30 injeções de 60,0 µL cada, o que forneceu 7 frações (denominadas 8.1 a 8.7) que foram analisadas por TLC (Figura 24).

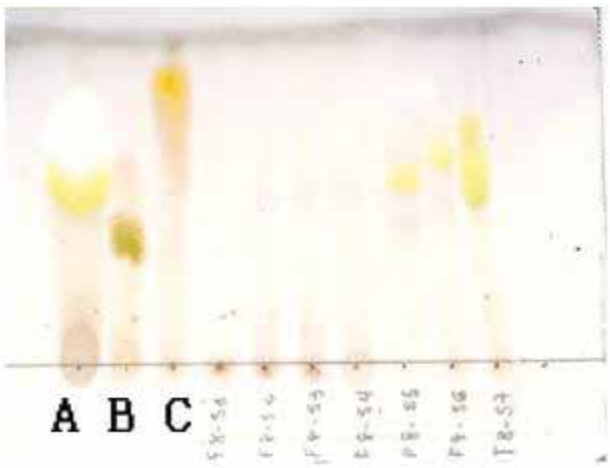


Figura 24. Análise por TLC das frações obtidas da purificação da Fração 8. A – isovitexina; B – rutina; C – quercetina.

Apenas a fração 8.6 (11mg) apresentou massa considerável e pureza adequada para a continuidade das análises. Foram realizados experimentos de NMR-^{1}H a fim de elucidar sua estrutura.

Fração 8.6

Analise por TLC mostrou apenas uma mancha. Foram realizados experimentos de NMR-^{1}H para a elucidação da substância, **Mh5**, o qual é semelhante ao da substancia presente na Fração 9 (Figura 25). A discussão será apresentada posteriormente, pois os espectros obtidos foram de qualidade superior.

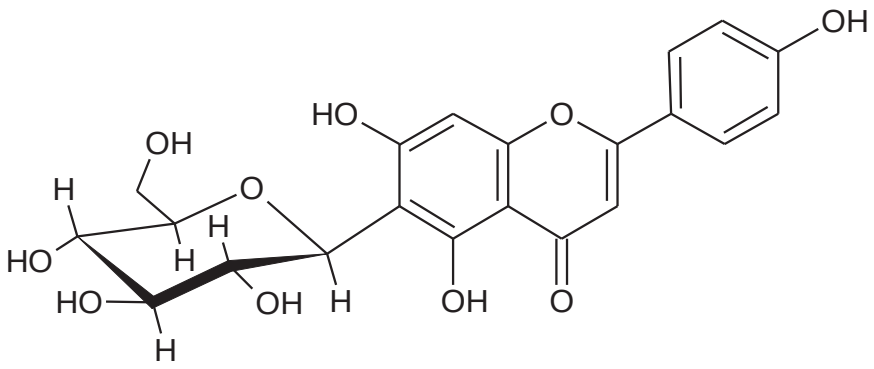


Figura 25. Estrutura de **Mh5**: apigenina-6-C-β-D-glucopiranosídeo

Fração 9

Foi realizado o *clean-up* da fração 9 e, em seguida, traçou-se o perfil cromatográfico por HPLC-PDA (Figura 26).

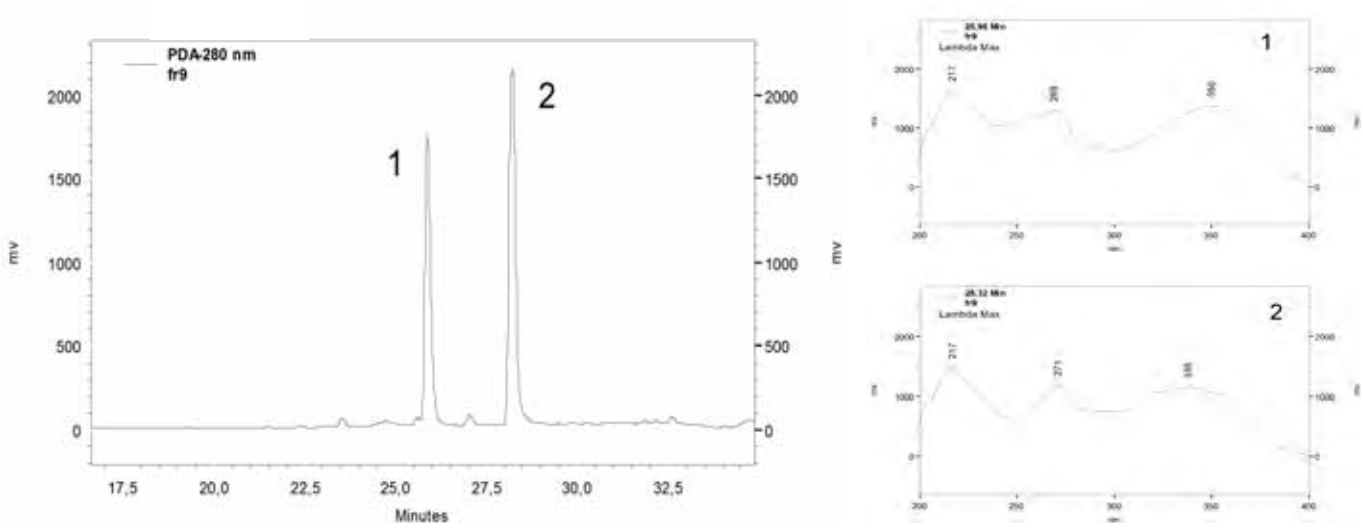


Figura 26. Perfil cromatográfico da Fração 9 e espectros no UV dos picos observados. Coluna Phenomenex® Luna (2) RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com TFA 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min.

A fração foi submetida à purificação por cromatografia liquida com detector de índice de refração (HPLC-RI). Foi utilizada coluna Phenomenex® Luna RP-18 (250 x 10 mm i.d.; 10µm), fluxo de 2,0 mL/min e fase móvel MeOH/H_2O 40:60 com 0,1% de ácido acético. Foram realizadas 40 injeções de 80,0 µL cada, o que forneceu 5 frações (denominadas 9.1 a 9.5). Tais frações foram analisadas por TLC (Figura 27).

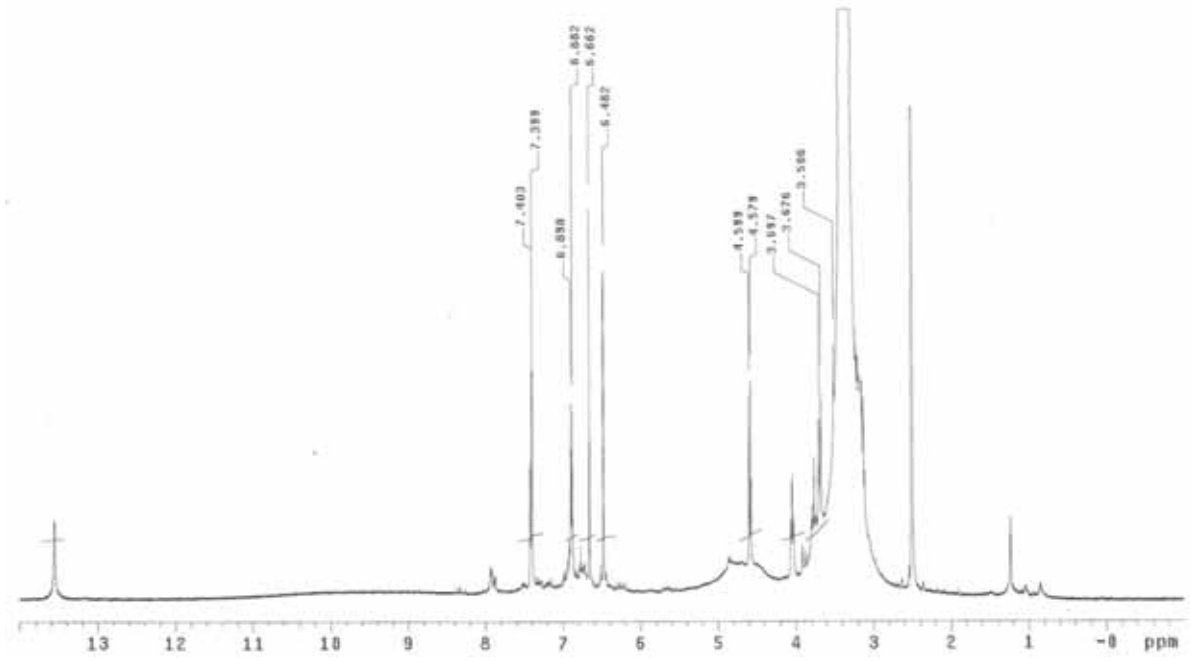


Figura 27. Análise por TLC das frações obtidas da purificação da fração 9. A – isovitexina; B – vitexina.

Apenas as frações 9.4 (9mg) e 9.5 (13mg) apresentaram massa considerável e pureza adequada para a continuidade das análises. Foram realizados experimentos de NMR-^{1}H a fim de elucidar suas estruturas.

Fração 9.4

Os espectros de NMR-^{1}H dessa fração estão apresentados na Figura 28.



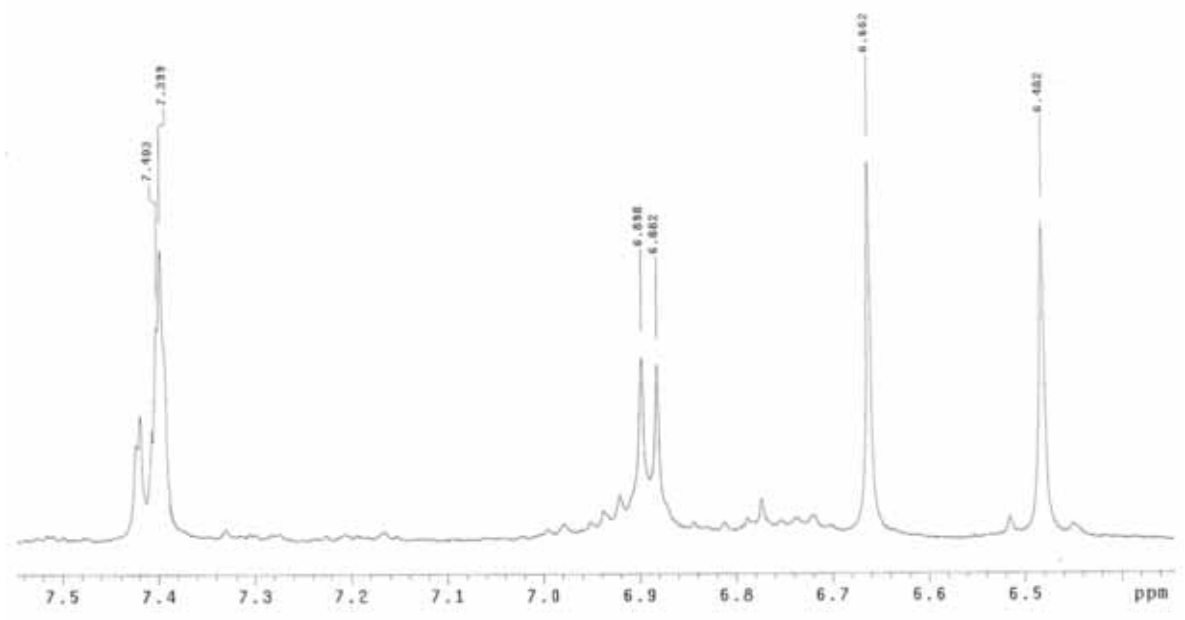


Figura 28. Espectro NMR – ^{1}H da fração 9.4 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

O espectro de NMR - ^{1}H da fração 9.4 apresentou dois dubletos de *J* = 8,0 Hz em δ 6,89 (1H, H5') e em δ 7,41 (1H, H6') e um dubleto de *J* = 2,0Hz em δ 7,40 (1H, H2'), que evidenciaram que o anel B do núcleo flavonoídico é *orto*-di-oxigenado e tri-substituído. Observam-se sinais entre δ 3 e 5, o que sugere ligação do flavonóide a uma unidade glicosídica. Na caracterização do anel A, verifica-se um singleto em δ 6,48 (1H, H8). O singleto em δ 6,66 (1H, H3) caracteriza uma flavona (HARBORNE, 1994). Esse conjunto de sinais sugere a presença de um derivado de luteolina. Em δ 4,58 observa-se um dubleto de *J* = 10,0 Hz (1H, H1'') referente ao hidrogênio anomérico de uma unidade de açúcar fazendo ligação C-C com a flavona (HARBORNE, 1994; PENG *et al.*, 2005).

Para auxiliar na determinação da identidade do açúcar, foi realizado experimento TOCSY-1D (Figura 29). Irradiação do sinal do próton anomérico em δ 4,58 exibiu os sinais em δ 4,03, δ 3,68, δ 3,41 e de δ 3,10 a 3,21, coerentes com o sistema de spin de uma unidade de glicose em ligação *C*-glicosídica (Tabela 4).

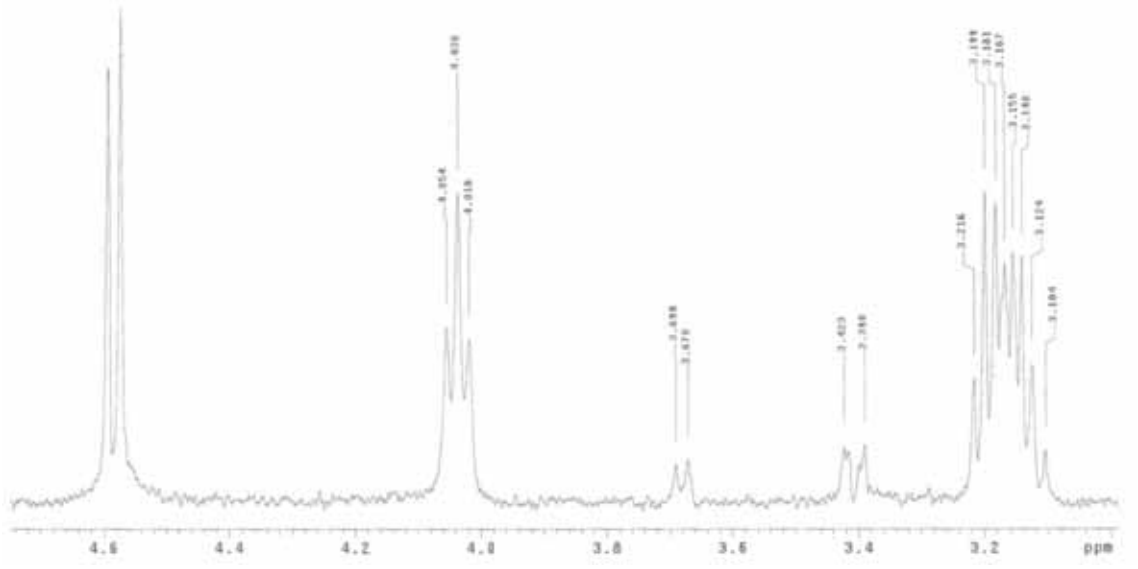


Figura 29. Espectro TOCSY-1D da fração 9.4 (irradiação em δ 4,58 ppm – 11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

Tabela 4. Deslocamentos químicos de NMR - ^{1}H da fração 9.4 comparados com a literatura (11,7 T, DMSO-d_6, TMS) (*PENG *et al.*, 2005; **ANDERSEN & MARKHAM, 2006.)

Posição	Deslocamentos Químicos / ppm (*J* / Hz)	
	Isoorientina	Fração 9.4
Aglicona*		
3	6,64 *s*	6,66 *s*
8	6,50 *s*	6,48 *s*
2'	7,38 *s*	7,40 *d* (2,0)
5'	6,90 *d* (9,0)	6,89 *d* (8,0)
6'	7,44 *d* (9,0)	7,41 *d* (8,0)
5-OH	13,55 *sl*	13,58 *sl*
C-glicose**		
1''	4,58 *d* (10,0)	4,58 *d* (10,0)
2''	4,03 *dd* (10,0; 9,0)	4,03 *dd* (10,0; 9,0)
3''-5''	3,15 – 3,19 *m*	3,10 - 3,21 *m*
6''a	3,68 *dd* (12,0; 1,8)	3,68 *dd* (10,0; 2,0)
6''b	3,40 *dd* (12,0; 1,8)	3,41 *dd* (10,0; 2,0)

Comparação com dados da literatura (PENG *et al.*, 2005) sugerem que a substância presente na fração 9.4, **Mh6**, é a luteolina-6-C-β-D-glucopiranosídeo (isoorientina – Figura 30).

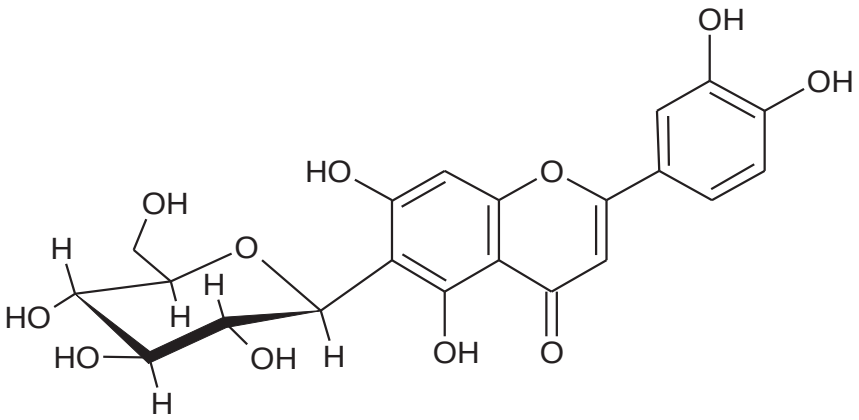


Figura 30. Estrutura de **Mh6**: luteolina-6-C-β-D-glucopiranosídeo

A fim de se confirmar a estrutura proposta, a substância **Mh6** foi analisada por espectrometria de massas (FIA – ESI – IT – MS^n, modo negativo) (Figura 31).

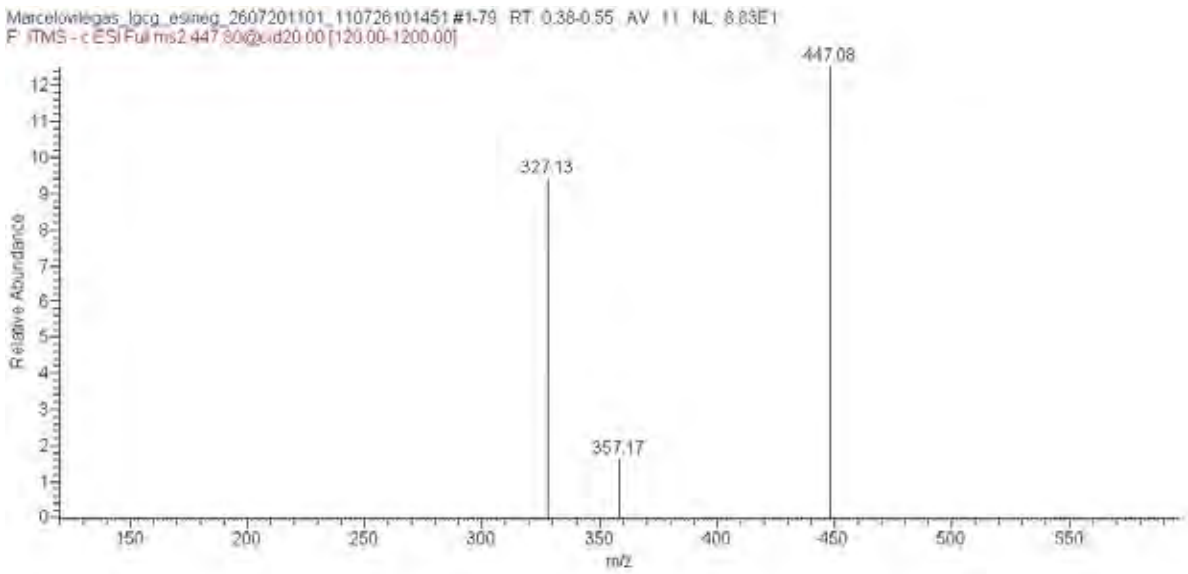


Figura 31. Espectro de massas de **Mh6** (FIA-ESI-IT-MS^n – modo negativo)

O espectro de massas apresentou íon em *m/z* 447 Da corresponde ao íon $[M-H]^-$ e confirma a estrutura anteriormente proposta. Fragmentação MS^2 produz os íons produtos de *m/z* 327 $[M-90-H]^-$ e *m/z* 357 $[M-120-H]^-$ atribuídos a

quebras internas da unidade de açúcar, confirmando a estrutura C-glicosilada proposta.

Fração 9.5

Análises por NMR-^{1}H (Figura 32), gHMQC (Figura 33) e gHMBC (Figura 34) forneceram os dados da Tabela 5.

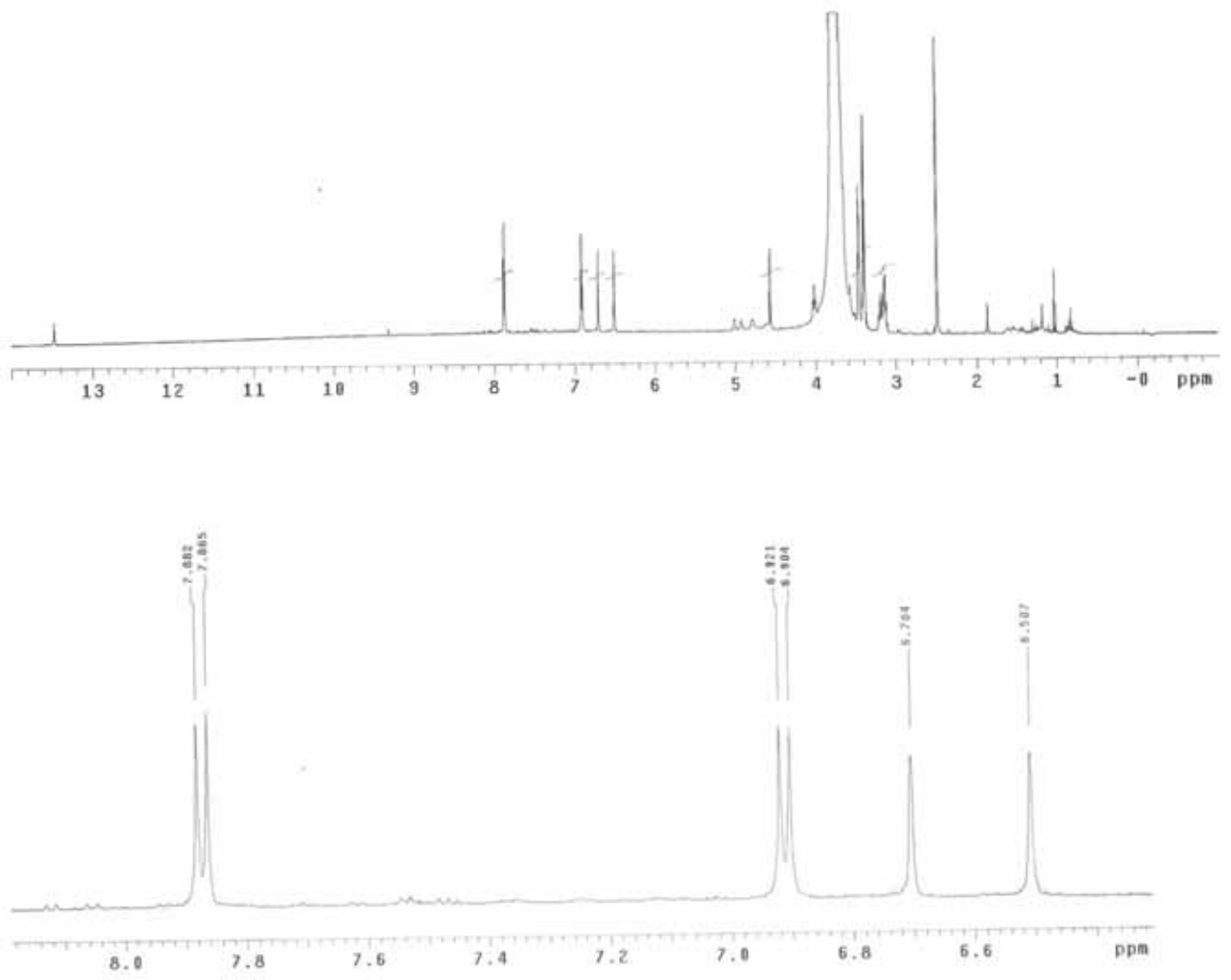


Figura 32. Espectro NMR – ^{1}H da fração 9.5 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

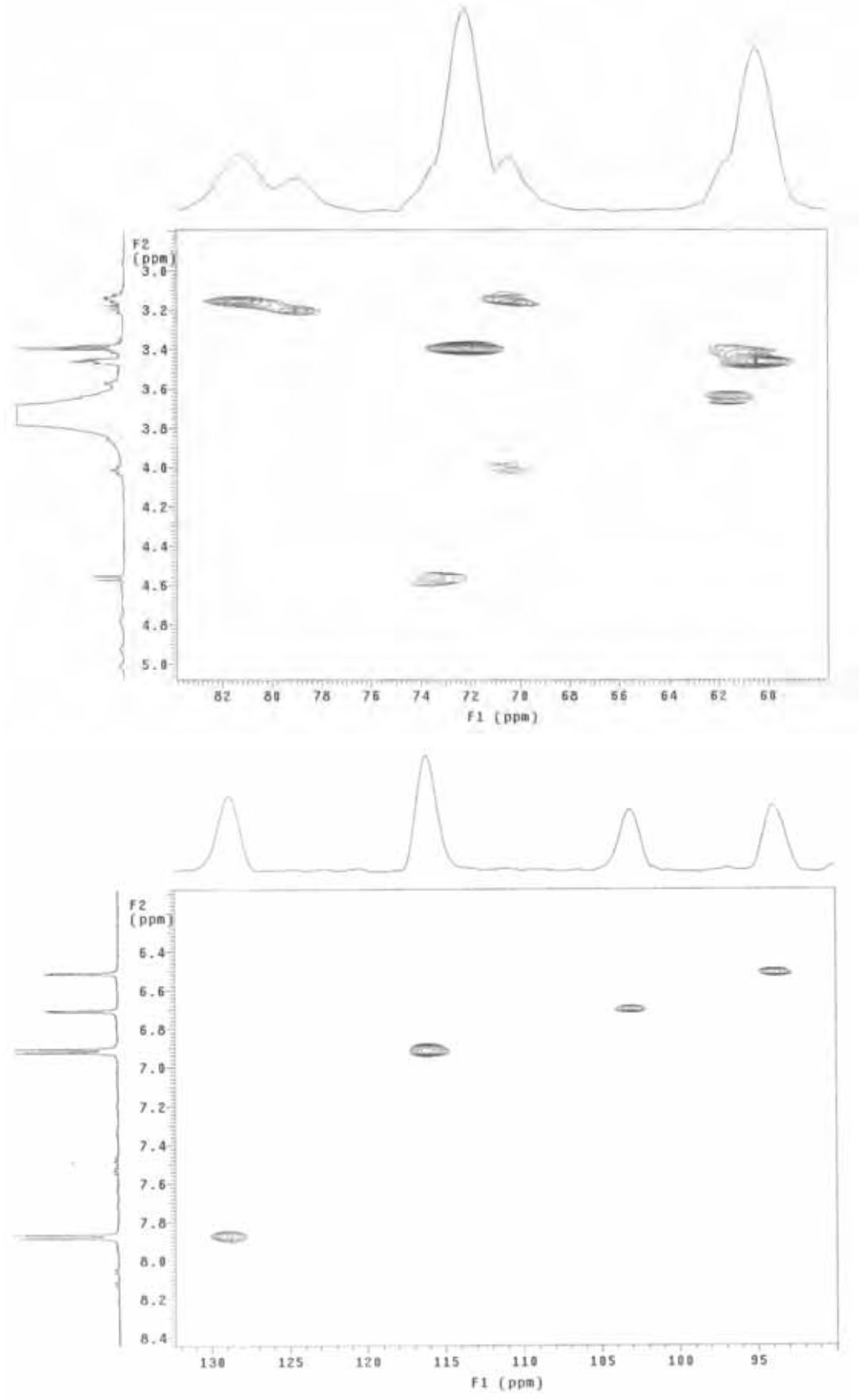


Figura 33. Espectros gHMQC da fração 9.5 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

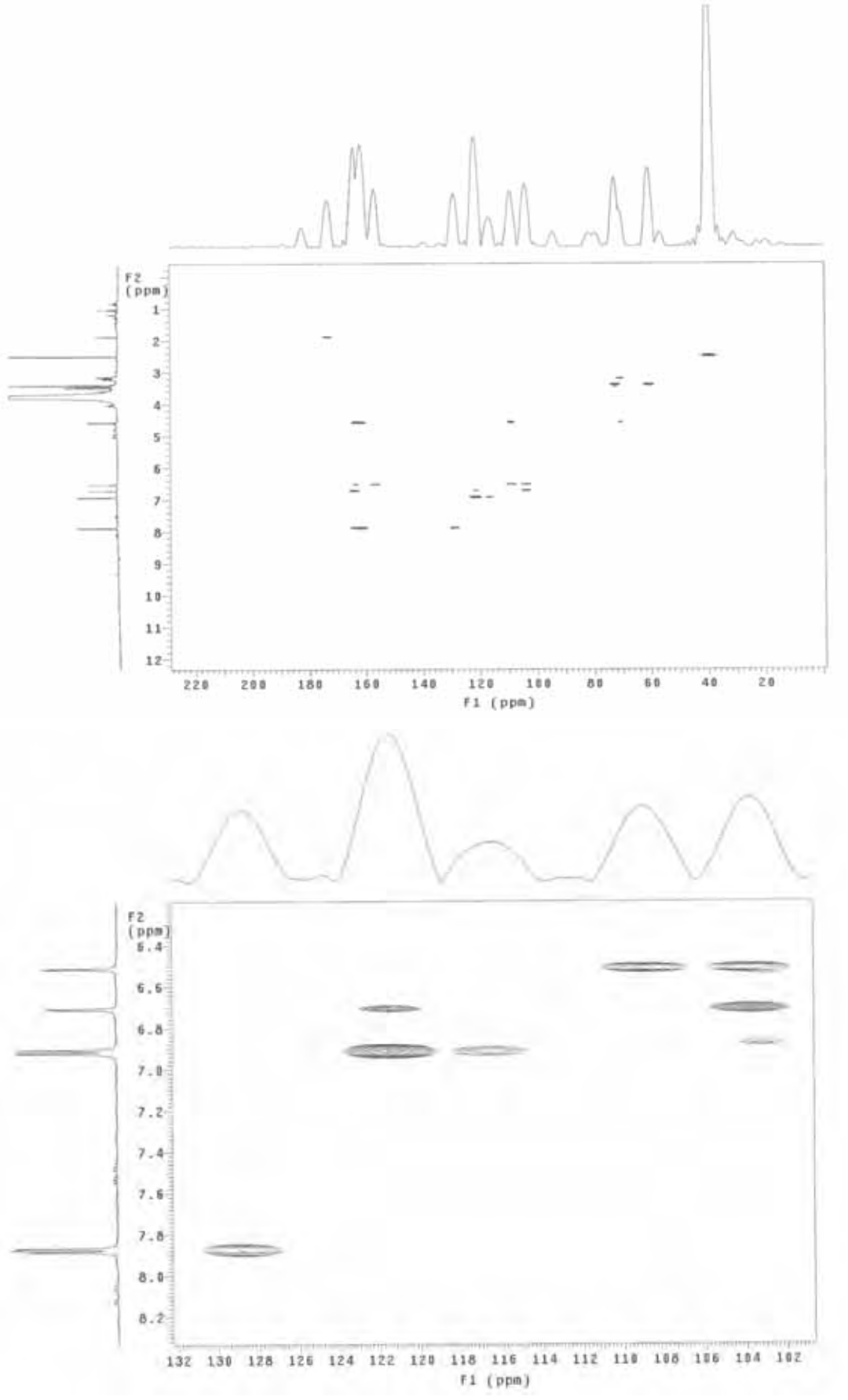


Figura 34. Espectros gHMBC da fração 9.5 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

O espectro de NMR - ^{1}H apresentou dois dubletos de *J* = 8,5 Hz em δ 7,89 (2H, H2'/H6',) e de *J* = 9,0 Hz em δ 6,91 (2H, H3'/H5') que evidenciaram que o anel B do núcleo flavonoídico é mono-oxigenado e para-di-substituído. Observam-se sinais entre δ 3 e 5, o que sugere ligação do flavonóide a uma unidade glicosídica. Na região de δ 4,57 (1H, H1'') observa-se um dubleto de *J* = 9,5 Hz referente ao hidrogênio anomérico de uma unidade de açúcar fazendo ligação C-C com a flavona (HARBORNE, 1994).

O espectro gHMQC exibiu todos os sinais de correlação direta entre ^{1}H e ^{13}C (Tabela 5). A correlação entre o sinal em δ 6,73 (H3) e o sinal em δ 103,0 (C3) comprova que essa molécula é uma flavona.

O espectro gHMBC apresentou correlações à longa distância entre ^{1}H e ^{13}C. O sinal em δ 6,49 (H8) apresentou correlações com os sinais em δ 94,0 (C8 – ^{1}J), δ 109,4 (C6 – ^{3}J), δ 104,0 (C10 – ^{3}J), δ 156,8 (C9 – ^{2}J) e em 164,0 (C7 – ^{2}J). Correlações do sinal em δ 4,57 (H1'' – anomérico) com os sinais em δ 109,4 (C6 – ^{2}J), δ 164,0 (C7 – ^{3}J) e em δ 161,3 (C5 – ^{3}J) demonstram que o açúcar está ligado à posição 6 da aglicona, caracterizando-a como uma flavona C-6-glicosilada derivada da apigenina.

Tabela 5. Deslocamentos químicos de NMR de ^{13}C e ^{1}H da fração 9.5

Posição	Deslocamentos Químicos/ppm (*J* / Hz)	
	^{13}C	^{1}H
2	163,5	-
3	103,0	6,73 *s*
4	182,0	-
5	161,3	-
6	109,4	-
7	164,0	-
8	94,0	6,49 *s*
9	156,8	-
10	104,0	-
1'	121,6	-
2'	129,0	7,89 *d* (8,5)
3'	116,6	6,91 *d* (9,0)
4'	161,4	-
5'	116,6	6,91 *d* (9,0)
6'	129,0	7,89 *d* (8,5)
C-glicose		
1''	73,2	4,57 *d* (10,0)
2''	70,4	4,03 *dd* (10,0; 9,0)
3'' – 5''	79,0	3,10 – 3,22 *m*
6''	61,0	3,40 *dd* (9,0; -) 3,68 *dd* (9,0; -)

Para auxiliar na determinação da identidade do açúcar, foi realizado experimento TOCSY-1D (Figura 35).

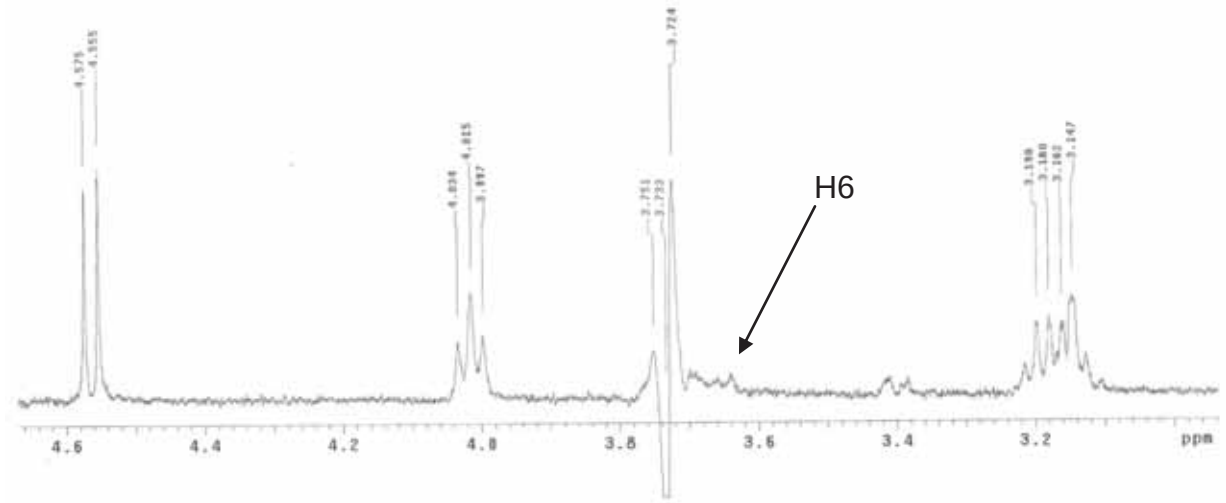


Figura 35. Espectro TOCSY-1D da fração 9.5 (irradiação em δ 4,57 ppm – 11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

Irradiação do sinal do próton anomérico em δ 4,57 exibiu sinais em δ 4,03, δ 3,68, δ 3,40 e δ 3,22 – 3,10. Esses dados, com conjunto com aqueles obtidos pelo espectro gHMQC, são coerentes com o sistema de spin de uma unidade de glicose em ligação *C*-glicosídica.

Portanto, a substância isolada foi a apigenina-6-C-β-D-glucopiranosídeo, isovitexina, **Mh5** (Figura 36).

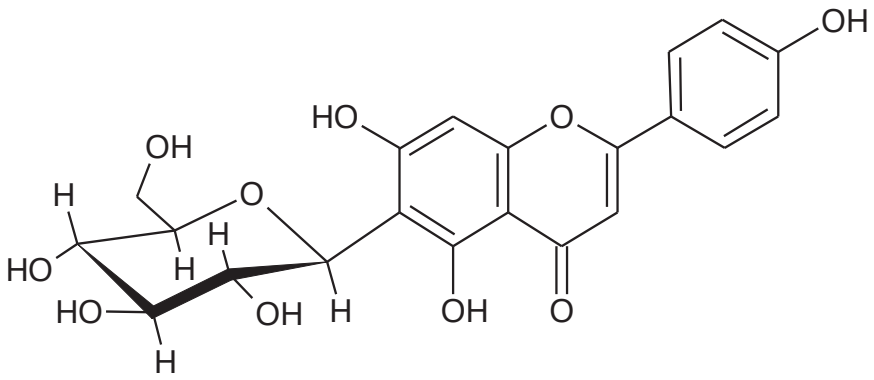


Figura 36. Estrutura de **Mh5**: apigenina-6-C-β-D-glucopiranosídeo

A fim de confirmar a estrutura proposta, a substância foi analisada por espectrometria de massas (Figura 37, FIA – ESI – IT – MS^n, modo negativo).

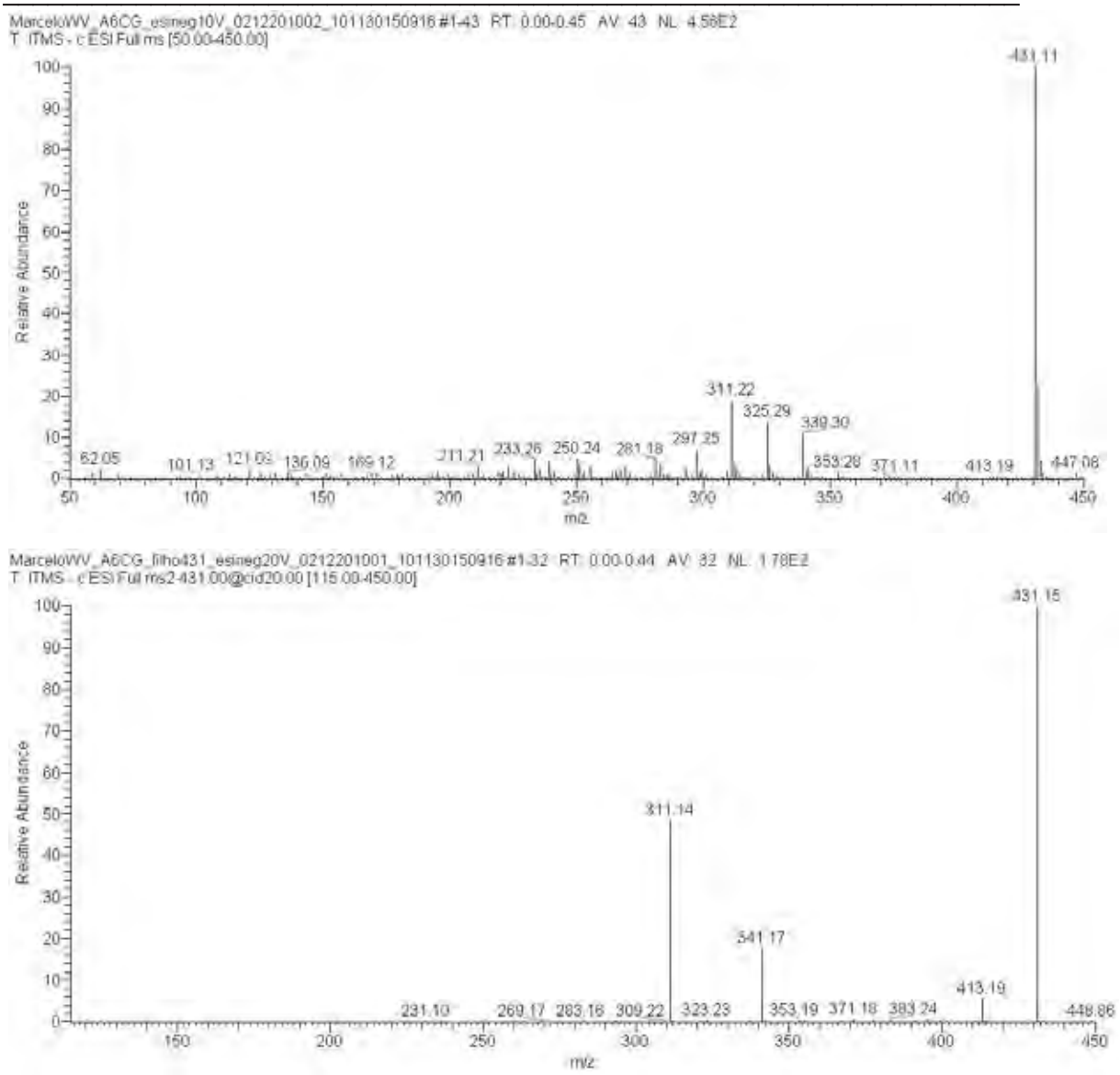


Figura 37. Espectro de massas de **Mh5** (FIA-ESI-IT-MS^n – modo negativo)

O espectro de massas apresentou pico em m/z 431 Da, correspondente ao íon $[M-H]^-$ e corrobora a estrutura anteriormente proposta. Fragmentação MS^2 produz os íons produtos de *m/z* 413 $[M-18-H]^-$, *m/z* 341 $[M-90-H]^-$ e *m/z* 311 $[M-120-H]^-$ atribuídos à perda de H_2O e quebras internas da unidade de açúcar, respectivamente.

Fração 5

Essa fração apresentou difícil solubilização. Para registrar seu perfil cromatográfico foi necessário proceder a uma partição preliminar. A fração foi

solubilizada em 300 mL de H_2O e 200 mL de n-butanol. Agitou-se a mistura e aguardou a separação das fases. Em seguida, retirou-se a fase n-butanólica e adicionou-se mais 200 mL de n-butanol. Repetiu-se o processo até a exaustão, ou seja, até que a fase n-butanólica não apresentasse coloração ao ser misturada com a fase aquosa. Observou-se formação de precipitado branco na fase aquosa, o qual foi separado por centrifugação. Rotaevaporou-se ambas as fases, que foram armazenadas em frascos devidamente vedados. As frações e o precipitado obtidos foram analisados por TLC (Figura 38).



Figura 38. Análise por TLC das frações aquosa, n-butanólica e do precipitado da fração 5

O espectro de NMR - ^1H do precipitado (Figura 39) sugeriu a presença de uma mistura de substâncias.

Apresentou dois dubletos (2H cada) de *J* = 7,5 Hz em δ 7,95 (2H, H2'/H6') e em δ 6,94 (2H, H3'/H5'), que demonstraram que o anel B do núcleo flavonoídico é mono-oxigenado e *para*-di-substituído. Sinais em δ 6,83 (s, 1H) e δ 6,89 (s, 1H) sugerem que sejam atribuídos aos H3 e H8 de um flavonóide *C*-glicosilado (HARBORNE, 1994). Observam-se sinais entre δ 3 e 5 ppm, que sugerem ligação do flavonóide a duas unidades glicosídicas. Ressaltam duas regiões correspondentes a hidrogênios anoméricos: uma entre δ 4,73 - 5,02 (H1''', *J* = 3,5 Hz), em ligação *O*-glicosídica, e outra entre δ 4,64 – 4,73 (H1'', *J* = 9,5 Hz), em ligação *C*-glicosídica (HARBORNE, 1994).

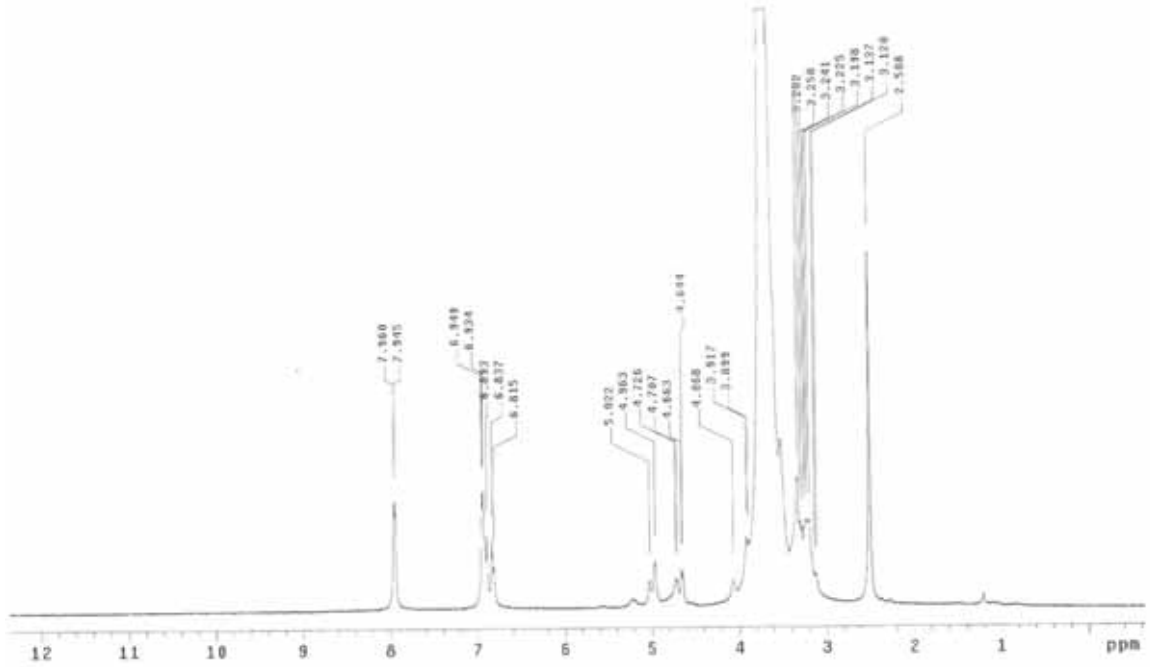


Figura 39. Espectro NMR – ^{1}H do precipitado da fração 5 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm).

Para identificar as unidades sacarídicas, realizou-se experimento TOCSY-1D, irradiando-se os sinais nessas duas regiões.

Irradiação dos sinais em δ 4,64 – 4,73 (Figura 40) forneceu o sistema de spin de uma unidade β-glucopiranosídica em ligação *C*-glicosídica. Particularmente típicos dessa configuração são o H1'' em δ 4,62 (d, *J* = 9,0 Hz) e o H2'' em δ 4,04 (m). H3'', H4'' e H5'' absorvem como multipletos entre δ 3,09 – 3,55. H6a'' e H6b'' são observados em δ 3,56 e δ 3,89.

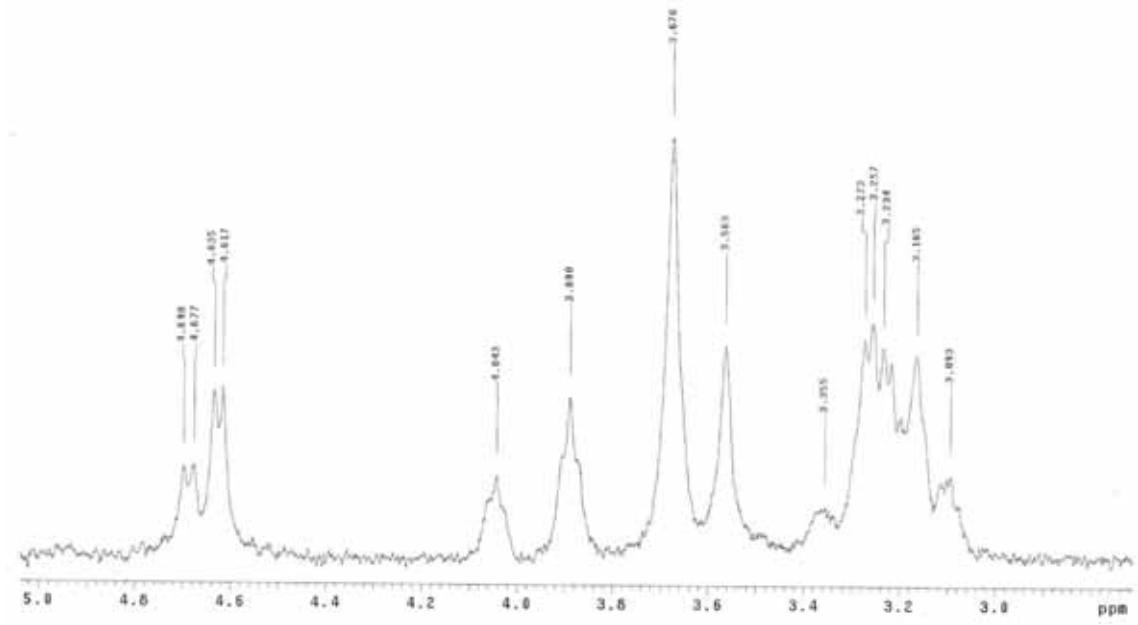


Figura 40. Espectro TOCSY-1D do precipitado da fração 5 (irradiação em δ 4,64 – 4,73 ppm – 11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

Irradiação dos sinais em δ 4,94 – 5,00 (Figura 41) forneceu o sistema de spin de uma unidade β-glucopiranosídica, que apresenta os sinais concentrados entre δ 3,19 – 3,73, em ligação *O*-glicosídica.

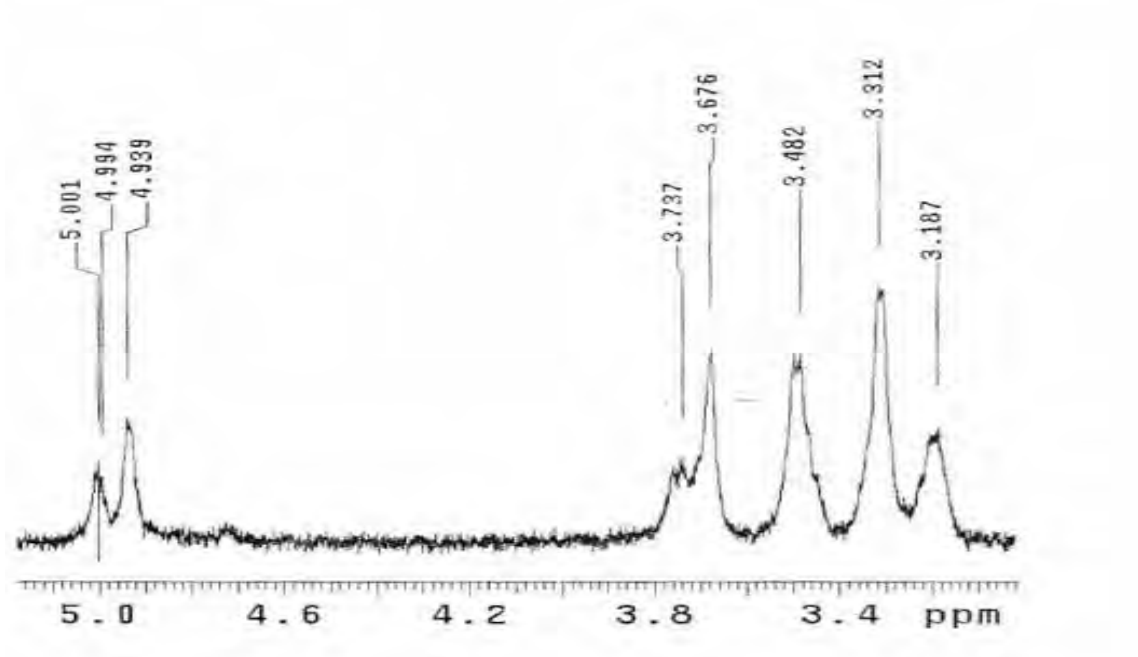
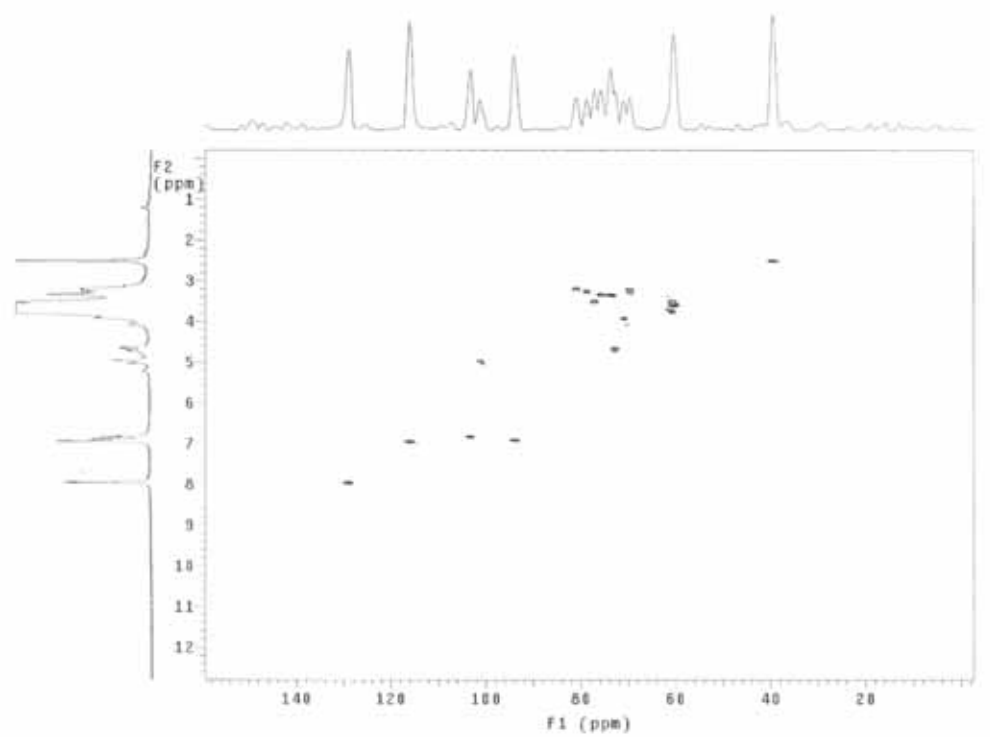


Figura 41. Espectro TOCSY-1D do precipitado da fração 5 (irradiação em δ 4,73 - 5,00 ppm – 11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

O espectro gHMQC (Figura 42) exibiu todos os sinais de correlação direta entre 1H e ^{13}C (Tabela 6). A correlação entre o sinal em δ 6,83 (H3) e o sinal em δ 103,1 (C3) comprova que essa molécula é uma flavona. As correlações entre os sinais referentes ao anel B indicam que se trata de um derivado de apigenina.

O espectro gHMBC (Figura 43) apresentou correlações à longa distância entre ^{1}H e ^{13}C. O sinal em δ 6,89 (H8) apresentou correlações com os sinais em δ 110,5 (C6 – ^{3}J), δ 105,0 (C10 – ^{3}J), δ 156,8 (C9 – ^{2}J) e em 162,4 (C7 – ^{2}J). Correlações do conjunto de sinais em δ 4,64 – 4,73 (correspondentes a H1'' – anomérico) com os sinais em δ 110,5 (C6 – ^{2}J), δ 162,4 (C7 – ^{3}J) e em δ 159,8 (C5 – ^{3}J) demonstram que a glicose está ligada à posição 6 da aglicona, assinalando que nessa mistura existe uma flavona C-6-glicosilada derivada da apigenina (Tabela 6).

Não foram observadas correlações entre os sinais dos hidrogênios em δ 4,94 – 5,00 e os carbonos da aglicona.



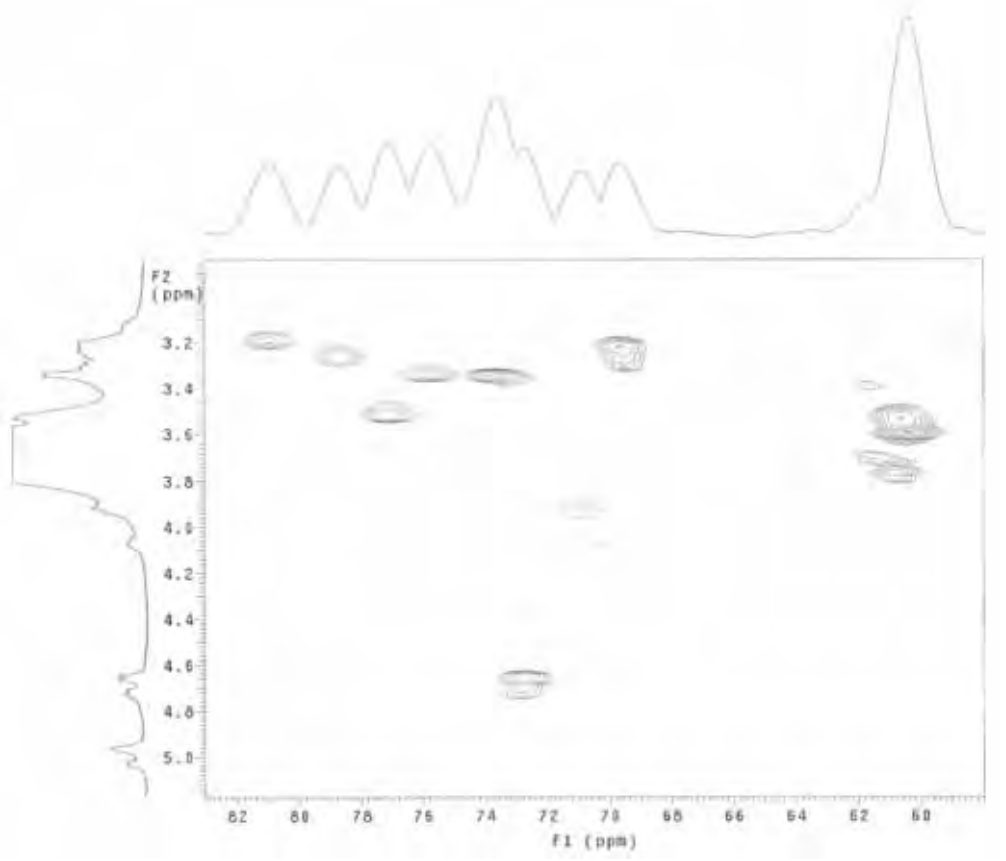


Figura 42. Espectros gHMQC do precipitado da fração 5 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm).

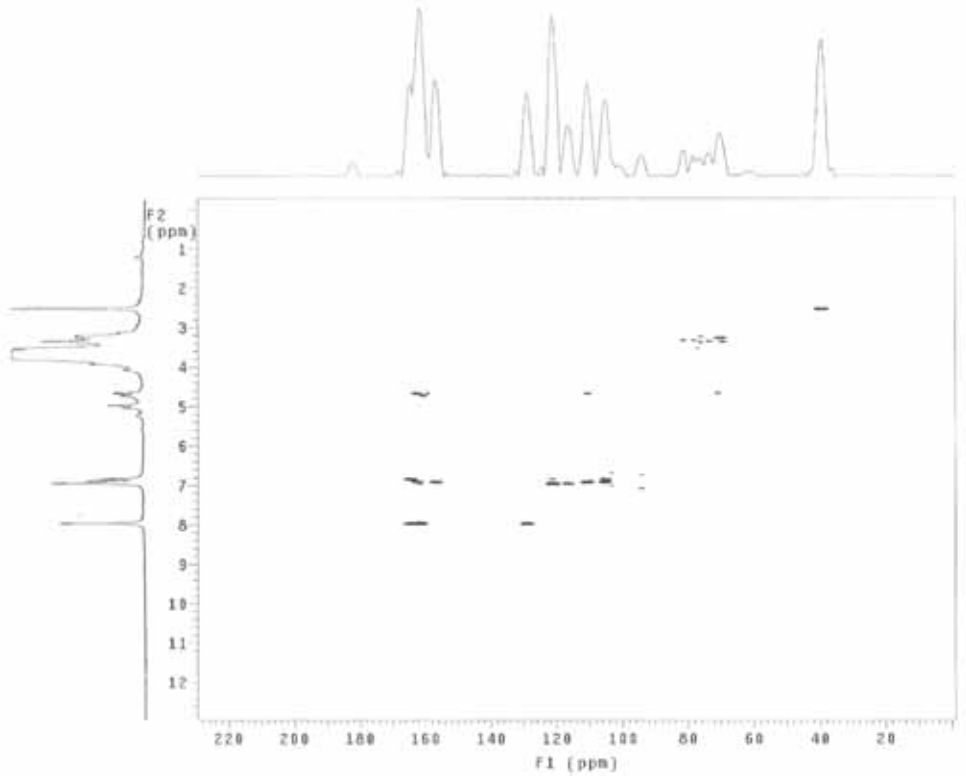


Figura 43. Espectros gHMBC do precipitado da fração 5 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS, ppm)

Tabela 6. Deslocamentos químicos de NMR de ^{13}C e ^{1}H para o precipitado da fração 5 (11,7 T, DMSO-d_6, TMS) (*HARBORNE, 1994; **ANDERSEN & MARKHAM, 2006)

Posição	Deslocamento Químico/ppm (*J*/Hz)		
	^{13}C	^{1}H	^{1}H
	Fração 5 - precipitado		Literatura*
2	164,5	-	-
3	103,1	6,83 *s*	6,79 *s*
4	-	-	-
5	159,8	-	OH
6	110,5	-	C-glc
7	162,4	-	O-glc
8	94,0	6,89 *s*	6,88 *s*
9	156,8	-	-
10	105,0	-	-
1'	121,0	-	-
2'	129,0	7,95 *d* (7,5)	7,92 *d*
3'	116,0	6,94 *d* (7,5)	6,95 *d*
4'	161,6	-	-
5'	116,0	6,94 *d* (7,5)	6,95 *d*
6'	129,0	7,95 *d* (7,5)	7,92 *d*
C-glicose			
			Literatura**
1''	72,8	4,72 *d* (9,0)	4,58 *d* (10,0)
2''	70,5	4,04 *m*	4,03 *dd* (9,4; 9,4)
3''	78,8	3,27 *m*	3,19 *m*
4''	69,5	3,19 *m*	3,11 *m*
5''	81,0	3,09 *m*	3,15 *m*
6a''	60,0	3,73 *m*	3,68 *dd* (12,0; 1,8)
6b''		3,48 *m*	3,40 *dd* (12,0; 1,8)
O-glicose			
1'''	100,3	4,94 *m*	4,87
2'''	73,5	3,31 *m*	3,23
3'''	77,0	3,48 *m*	3,26
4'''	69,2	3,19 *m*	3,12
5'''	75,5	3,29 *m*	3,37
6a'''	60,2	3,73 *m*	3,69
6b'''		3,40 *m*	3,46

Comparação com dados da literatura (HARBORNE, 1994) permite concluir que as unidade de açúcar estão ligadas nas posições 6 e 7 da aglicona e que a substância isolada é a apigenina-6-C-β-D-glucopiranosil-7-O-β-D-glucopiranosídeo ou saponarina, **Mh2** (Figura 44).

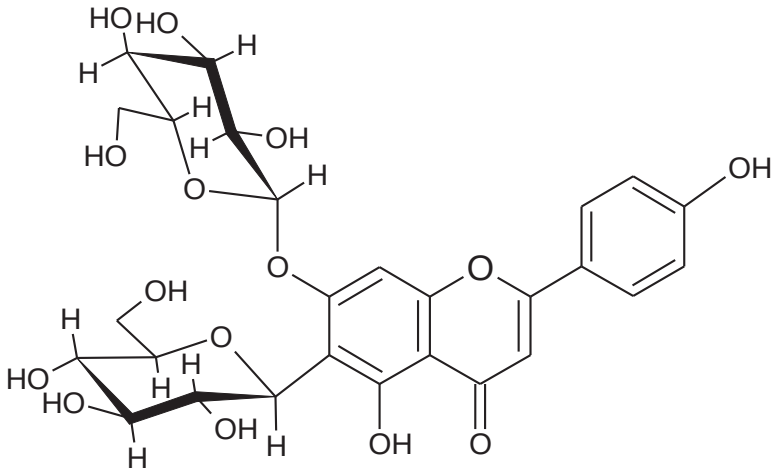
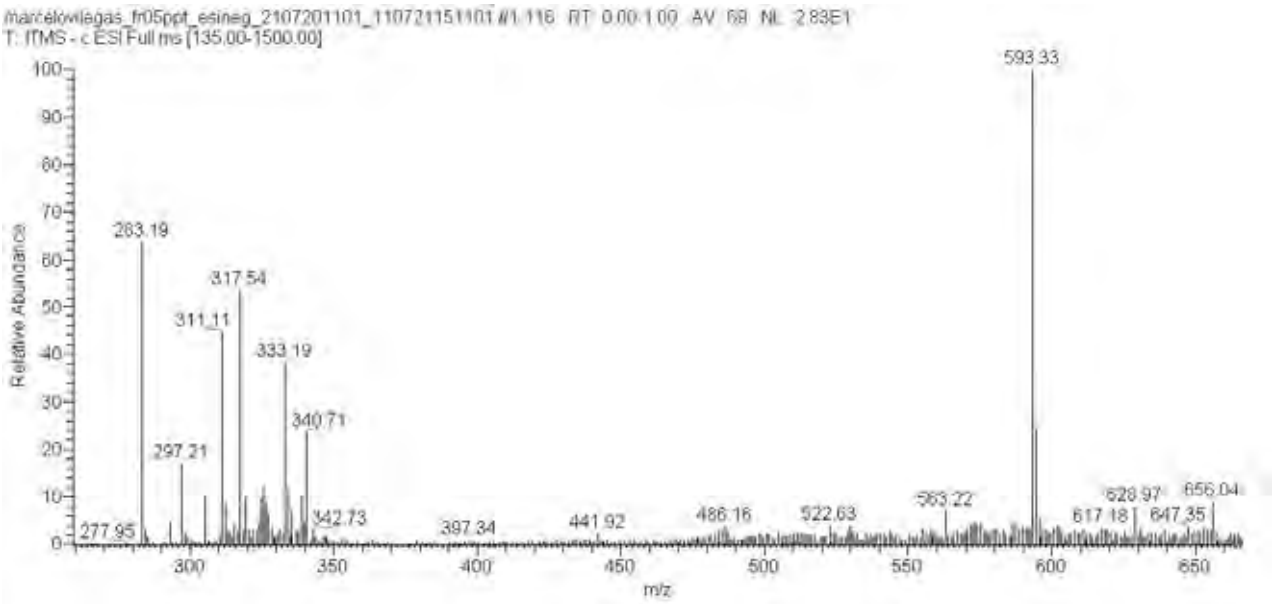


Figura 44. Estrutura de **Mh2**: apigenina-6-C-β-D-glucopiranosil-7-O-β-D-glucopiranosídeo

A fração 5, contendo **Mh2**, foi analisada por espectrometria de massas (Figura 45, FIA – ESI – IT – MS^n, modo negativo).



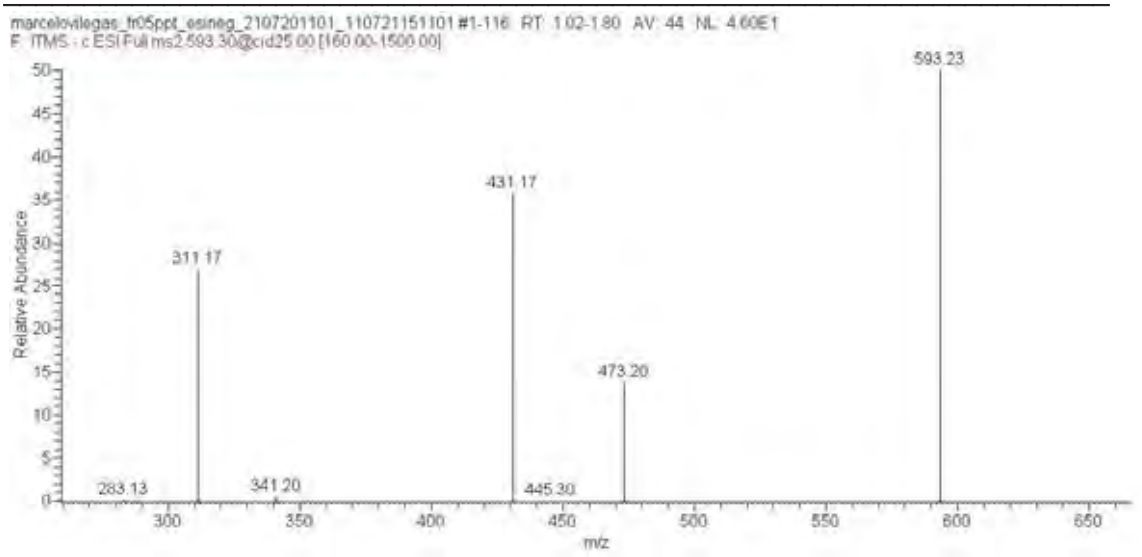


Figura 45. Espectro de massas de **Mh2** (FIA-ESI-IT-MS^n – modo negativo)

O espectro de massas apresentou o íon $[M-H]^-$ em *m/z* 593 Da, coerente com a estrutura proposta. Fragmentação MS^2 produz os íons produtos de *m/z* 473 $[M-120-H]^-$ (correspondente à quebra da unidade da hexose *C*-glicosilada), *m/z* 431 $[M-162-H]^-$ (atribuído à perda da unidade de hexose *O*-glicosilada) e de *m/z* 311 $[M-120-162-H]^-$ (atribuído à fragmentação das duas unidades glicosídicas).

Analise do extrato bruto por Espectrometria de Massas

Injeção direta do extrato

A fim de se ter um panorama geral da composição química do extrato EtOh 70% de *M. hirtum* foi realizada a injeção direta do mesmo em espectrômetro de massas (Figura 46, FIA – ESI – IT, modo negativo). Foram realizados experimentos MS^n dos picos majoritários a fim de obter dados adicionais que permitissem obter mais informações sobre as estruturas das substâncias.

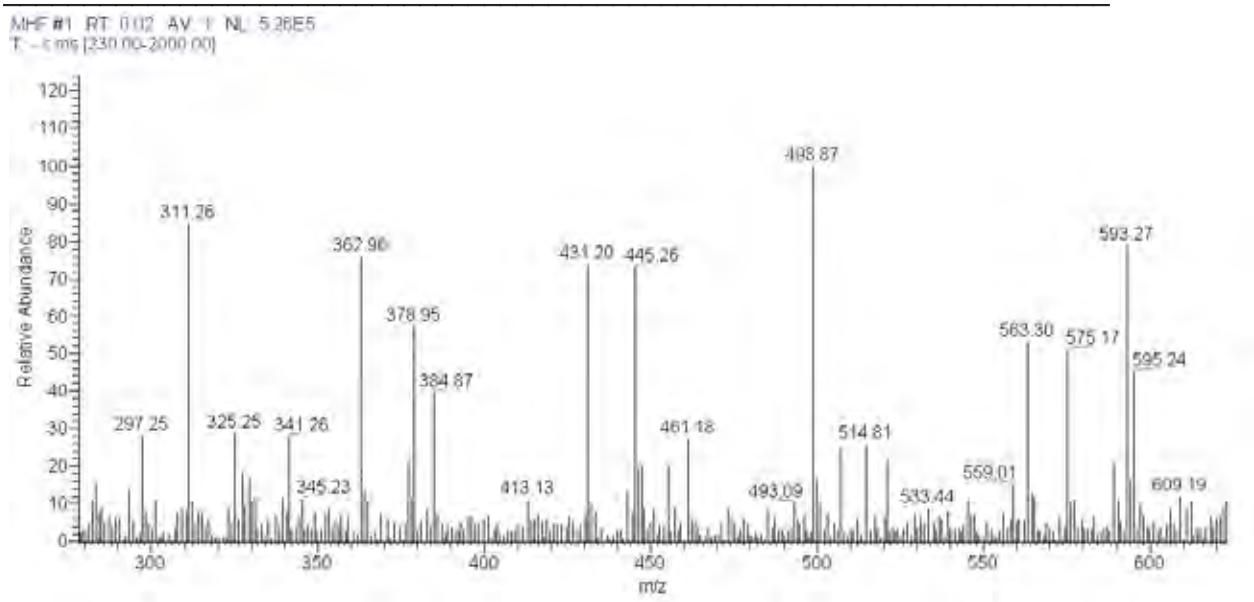


Figura 46. Espectro de massas em *full-scan* do extrato EtOH 70% de folhas de *M. hirtum* (FIA – ESI – IT, modo negativo)

Os picos apresentados pelo espectro de massas obtido podem ser relacionados com substâncias já isoladas e identificadas anteriormente, além de ser possível sugerir a presença de outros constituintes a partir da análise dos íons produtos de cada pico (Tabela 7 e Figura 47).

Tabela 7. Substâncias propostas através da análise do espectro de massas em *full-scan* do extrato bruto hidroalcóolico de folhas de *M. hirtum*

Substância	m/z $[M-H]^-$	MS^n	R_1	R_2	R_3	R_4
1	431	341; 311	H	hexose	H	H
2	445	325	H	hexose	H	CH_3
3	563	545; 503; 473; 443; 413; 353	H	hexose	pentose	H
4	593	473; 431; 341; 311	H	hexose	H	hexose
5	609	519; 489; 447	OH	hexose	H	hexose

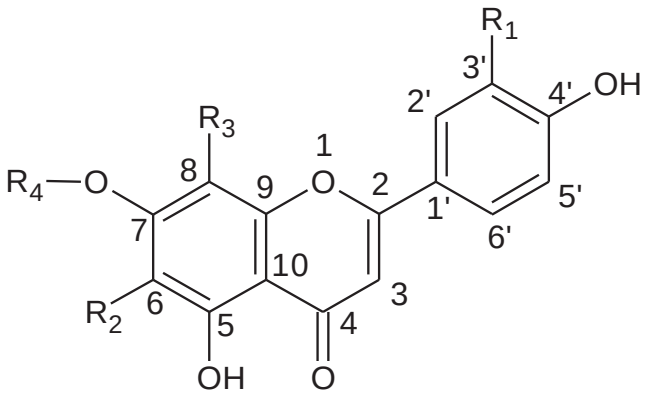


Figura 47. Estrutura geral das substâncias identificadas por espectrometria de massas

O íon de *m/z* 431, quando fragmentado, produz os íons produtos de *m/z* 341 Da $[M-90-H]^-$ e 311 $[M-120-H]^-$, atribuídos à quebras internas da unidade de açúcar, e corresponde à apigenina-6-C-β-D-glucopiranosídeo, **Mh5**.

O íon de *m/z* 445, quando fragmentado, produz o íon produto de *m/z* 325 Da $[M-120-H]^-$, atribuído à quebra interna da unidade de açúcar, e corresponde à apigenina-7-metoxi-6-C-β-D-glucopiranosídeo, **Mh1**.

O íon de *m/z* 563, quando fragmentado, produz s íon produto de *m/z* 545 Da $[M-18-H]^-$, referente à perda de uma molécula de água. Os íons produtos de *m/z* 443 Da $[M-120-H]^-$, 473 Da $[M-90-H]^-$ e 353 Da $[M-120-90-H]^-$ caracterizam a perda de uma hexose em ligação *C*-glicosídica. Os íons produtos de *m/z* 503 Da $[M-60-H]^-$ e 413 Da $[M-90-60-H]^-$ indicam a perda de uma pentose em ligação *C*-glicosídica. Com base na literatura (LIU *et al.*, 2008), atribuímos tentativamente a essa substância a estrutura da apigenina-6-C-β-D-glucopiranosil-8-C-β-D-xilopiranosídeo, **Mh4**.

Fragmentação do íon de *m/z* 593 produz o íon produto de *m/z* 473 Da $[M-120-H]^-$, característico da quebra interna de uma hexose. O íon produto de *m/z* 431 Da $[M-162-H]^-$ é típico da perda de uma unidade de hexose em ligação *O*-glicosídica. Os íons produtos de *m/z* 341 Da $[M-162-90-H]^-$ e 311 Da $[M-162-120-H]^-$ resultam de quebras *O*- e *C*-glicosídicas combinadas. Tendo em vista este padrão de fragmentação e os dados da literatura (HARBORNE, 1994), sugerimos a presença da apigenina-6-C-β-D-glucopiranosil-7-O-β-D-glucopiranosídeo, **Mh2**.

Fragmentação do íon de *m/z* 609 produz os íons produtos de *m/z* 519 Da $[M-90-H]^-$, 489 Da $[M-120-H]^-$, referentes a quebras de uma hexose em

ligação *C*-glicosídica, bem como o íon produto de *m/z* 447 Da $[M-162-H]^-$, correspondente à perda de uma hexose em ligação *O*-glicosídica. Este padrão de fragmentação em conjunto com dados da literatura (CUYCKENS & CLAEYS, 2004) permite sugerir a presença da luteolina-6-C-β-D-glucopiranosil-7-O-β-D-glucopiranosídeo, **Mh7** (Figura 48).

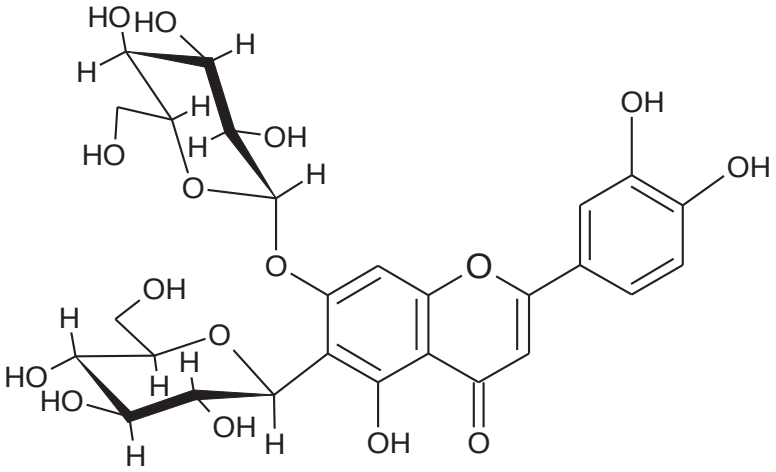


Figura 48. Estrutura de **Mh7**: luteolina-6-C-β-D-glucopiranosil-7-O-β-D-glucopiranosídeo

São observadas a perda de 162 Da, correspondente à perda de uma unidade de hexose (*O*-hexose), e perdas de 90 Da e 120 Da, correspondentes às quebras internas da unidade de açúcar. Tal comportamento é similar ao de derivados *C*-glicosilados de flavonas, diglicosídeos e um derivado de luteolina, o que reforça a proposta apresentada.

Identificação e quantificação das substâncias presentes no extrato bruto

A padronização de um extrato vegetal inclui a identificação e quantificação das substâncias presente no perfil cromatográfico do extrato bruto.

Primeiramente foi realizada a otimização das condições cromatográficas, a fim de se obter uma corrida de menor tempo (Figura 49). As condições utilizadas foram:

1) fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com HCOOH 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-30% de B em 4,0 min

2) fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com HCOOH 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 10-30% de B em 3,0 min

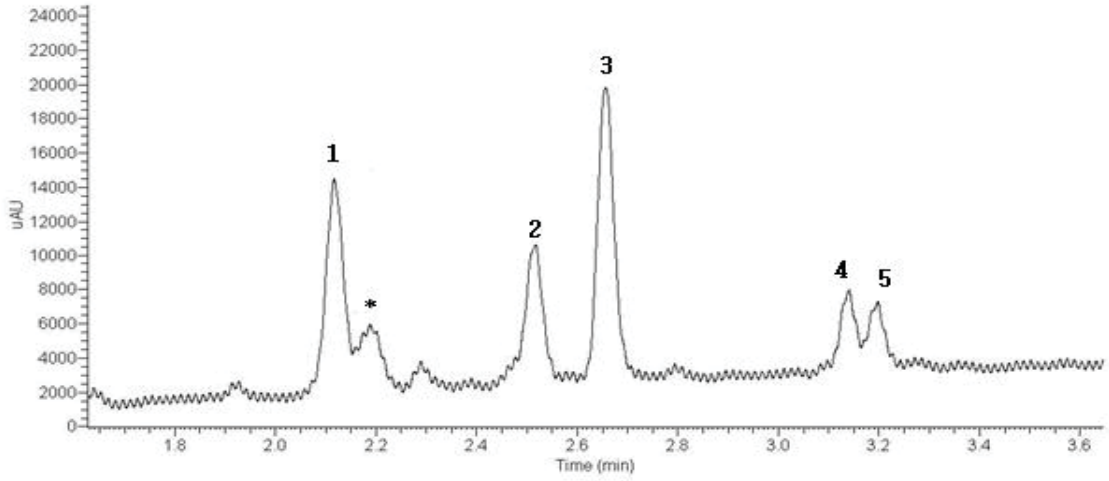


Figura 49. Análise por UHPLC-PDA do extrato EtOH 70% das folhas de *Machaerium hirtum*. Coluna Thermo Scientific® Hypersil Gold RP-18 (50 x 2,1mm i.d.; 1.9µm), UHPLC (Thermo Scientific®), fluxo 1,0 mL min^{-1}. Eluição: A=H_2O, B=MeOH, ambos com HCOOH 0,1%. Sistema de eluição gradiente linear 5-30% de B em 4,0 min.

Pode-se observar que as condições utilizadas diminuíram o tempo total de analise do extrato EtOH 70% em 10 vezes em relação àquele obtido pela análise por HPLC-PDA (Figura 6). O último pico eluiu em 3,20 min enquanto que o último pico do cromatograma da figura 5 eluiu em 33,0 min.

Em seguida, cada pico foi identificado por meio de co-injeção das substancias isoladas anteriormente em dois sistemas de eluição distintos (SNYDER e*t al.*, 1997). Os picos foram identificados como 1 – saponarina **(Mh2)**; *isoorientina **(Mh6)** (não detectada em HPLC); 2 – isovitexina **(Mh5)**; 3 – swertisina **(Mh1)** em mistura. O pico correspondente a isoorientina não foi detectado anteriormente na análise do EtOH 70% em sistema HPLC-PDA (Figura 6).

O método proposto foi aplicado para a quantificação de flavonas presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de *M. hirtum* usando o mesmo

procedimento de *clean-up* por SPE adotado na construção do perfil cromatográfico descrito na página 29. A quantificação das flavonas presentes no extrato foi realizada em termos das agliconas das quais são derivadas. O comprimento de onda estabelecido para essa determinação foi λ = 365 nm, o qual é seletivo para esse tipo de flavonóides (CROZIER *et al.*, 1997). Para isso, utilizou-se o método de padronização externa, que consistiu na construção de duas curvas analíticas com padrões certificados de apigenina e luteolina. Essas curvas foram obtidas através de sete diluições da solução estoque (1000 µg mL^{-1}) no intervalo de concentração de 10 a 200 µg mL^{-1}. As diluições foram realizadas em H_2O/MeOH (1:1, v/v) e injetadas em triplicata no UHPLC-PDA.

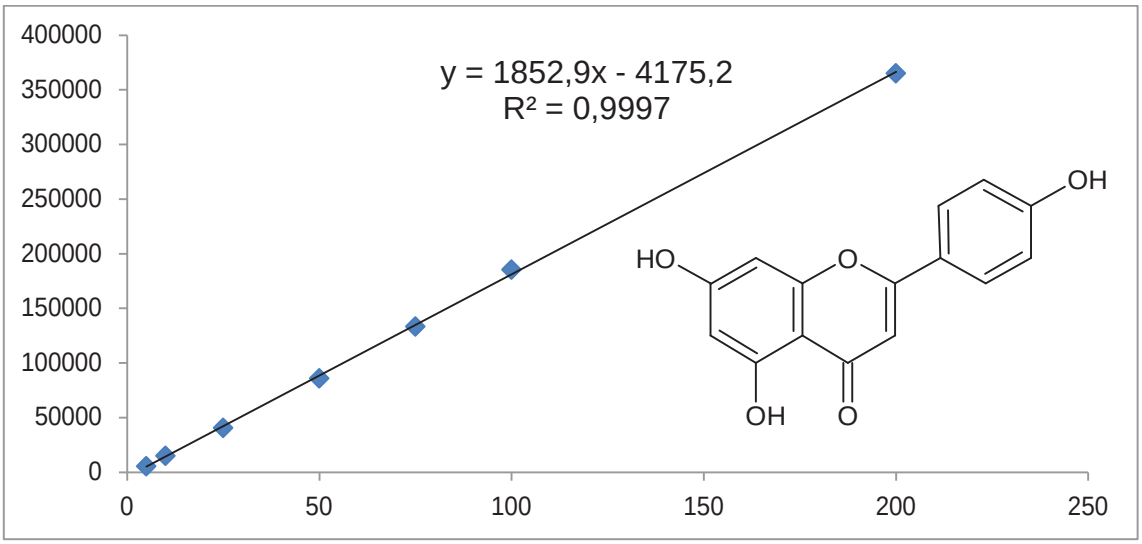


Figura 50. Curva analítica da Apigenina

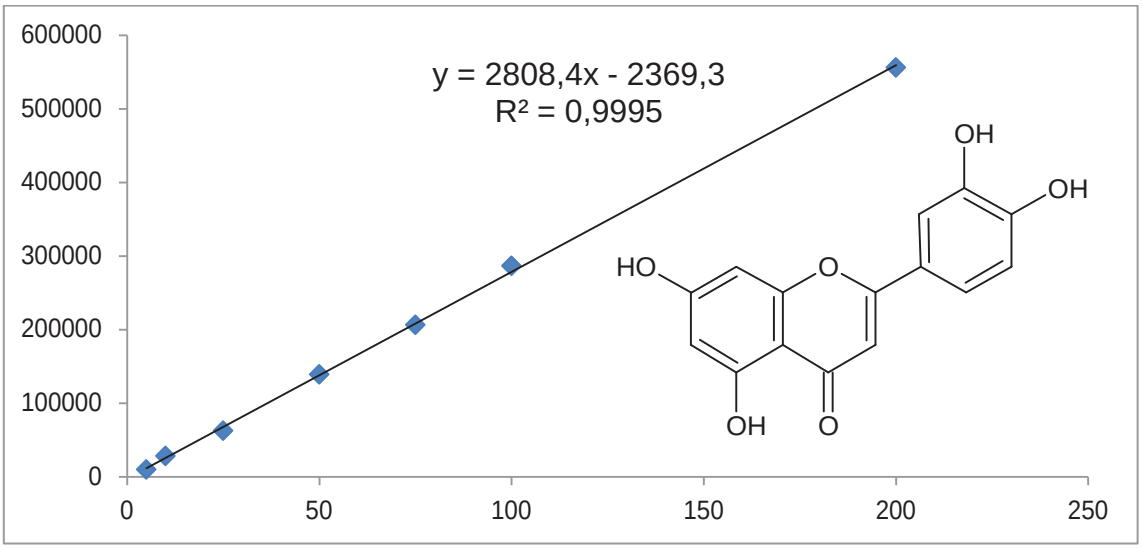


Figura 51. Curva analítica da Luteolina

As curvas analíticas (Figuras 50 e 51) apresentaram boa linearidade no intervalo de concentração estudado e coeficientes de correlação (r^2) com valores superiores a 0,999, o que indica que há uma boa correlação entre as áreas e as concentrações estudadas.

O limite de detecção (LOD) foi determinado como o sinal equivalente a 3,3 vezes o valor entre a razão do coeficiente linear (a) pelo coeficiente angular (b) ($3{,}3\ x\ \frac{a}{b}$) obtidos pela equação da reta da curva analítica de calibração. O limite de quantificação (LOQ) foi dado como 10 vezes o valor desta razão ($10\ x\ \frac{a}{b}$) (RIBANI *et al.*, 2004). Usando esta relação, foram obtidos para a apigenina LOD de 0,007 mg/mL e LOQ de 0,022 mg/mL, e para a luteolina LOD de 0,003 mg/mL e LOQ de 0,008 mg/mL (Tabela 8).

Tabela 8. Dados de calibração dos padrões de Apigenina e Luteolina. (a) – coeficiente linear; (b) – coeficiente angular; r^2 – coeficiente de correlação (*PLAZONIC *et al.*, 2009)

Padrão	**(a)**	**(b)**	**r^2**	**Faixa Linear (µg/mL)**	**LOD (mg/mL)**	**LOQ (mg/mL)**	**LOD* (mg/mL)**	**LOQ* (mg/mL)**
Apigenina	4175,19	1852,56	0,9997	5-200	0,007	0,022	0,001	0,002
Luteolina	2369,3	2808,41	0,9995	5-200	0,003	0,008	0,001	0,003

Os LODs e LOQs obtidos para a apigenina e luteolina no método desenvolvido por UHPLC-PDA são mais altos do que aqueles reportados na literatura usando HPLC-PDA (PLAZONIC *et al.*, 2009). Contudo, o tempo de análise por UHPLC (~3,20 min) é cerca de 10 vezes menor do que aquele obtido usando HPLC (~ 33 min). Esses resultados indicam, ao mesmo tempo, a necessidade de se aperfeiçoar o método desenvolvido por UHPLC, mas sua grande potencialidade para a análise de extratos vegetais candidatos a serem usados como fitoterápicos.

A partir das curvas analíticas foi possível a quantificação das flavonas identificadas no perfil cromatográfico do extrato bruto de *M. hirtum* (Tabela 9).

Tabela 9. Concentrações das flavonas encontradas nas folhas de *M. hirtum*

Substância	[flavona] ± DP ($\mu g\ mL^{-1}$)	[flavona] ± DP ($mg\ g^{-1}$ de extrato)	Curva
Saponarina	52 ± 3	8,7 ± 0,5	Apigenina
Isoorientina	9 ± 3	1,5 ± 0,5	Luteolina
Isovitexina	39 ± 3	6,4 ± 0,5	Apigenina

A isoorientina, **Mh6**, foi a que apresentou os maiores DPs, pois encontra-se abaixo do limite de quantificação (LOQ). A saponarina **Mh2** e a isovitexina **Mh5** foram satisfatoriamente quantificadas.

A saponarina **Mh2** apresentou participação expressiva no extrato bruto (~0,87%), e é comparável à plantas medicinais já utilizadas. Por exemplo, *Dianthus versicolor* FISCH (Cariofilaceae) é uma planta medicinal tradicional da Mongólia utilizada contra insuficiência hepática, cuja atividade está relacionada à presença de flavonóides *C*-glicosilados. Ela apresenta teores entre 0,41-3,30% de saponarina em seu extrato dependendo de local e época de coleta (OBMANN *et al.,* 2011). Entretanto as quantidades encontradas das substâncias presentes no perfil não podem ser relacionadas às atividades relatadas pela população. Ensaios de atividade biológicas estão sendo realizados para a identificação das atividades que o extrato EtOH 70% de *M. hirtum* possa apresentar.

Considerações finais

O rendimento do extrato é de grande importância, pois indica a viabilidade de a planta de se tornar um fitoterápico. Uma planta seca após extração e filtração fornece um extrato líquido que, se levado a resíduo por evaporação, fornece uma quantidade de material sólido (sem adição de excipientes) na proporção de cerca de 30%, havendo casos em que a variação vai de 5-50% segundo solubilidade dos seus metabólitos (GREGORIO *et al.*, 2006) A planta em estudo apresentou um rendimento significativo (17%), sendo promissora para a finalidade desejada.

Os flavonóides possuem diversos efeitos biológicos documentados. Dentre eles, pode-se se citar o antiinflamatório, antialérgico, antimicrobiano, hepatoprotetor, antiviral, antitrombótico, cardioprotetor, fortalecimento capilar, antidiabético, anticarcinogênica e efeito antineoplásico, entre outros (KANADASWAMI *et al.,* 2005). Os efeitos terapêuticos de muitos medicamentos tradicionais podem estar relacionados, em muitos casos a presença destes polifenóis. Por exemplo, uma grande variedade de atividades farmacológicas têm sido relatadas para essas substâncias, incluindo antivirais, antialérgicos, antiplaquetários, antiestrogênicos, anticancerogênicos, propriedades antiinflamatórias, antiproliferativas, antiangiogênicas e antioxidantes, e sua ingestão geralmente não produz ou produz pouca toxicidade. Flavonóides também foram relatados pela sua ação no trato gastrointestinal, tendo propriedade antiespasmódica, antisecretora, antidiarréica e antiulcerosa (MOTA *et al.*, 2009)

A propriedade mais descrita de quase todos os grupos de flavonóides é sua capacidade de agir como antioxidantes. As flavonas e as catequinas parecem ser os flavonóides mais poderosos para proteger o corpo contra espécies reativas de oxigênio (NIJVELDT *et al.*, 2001). Quanto à relação estrutura-atividade, estudos de flavonóides têm mostrado que a estrutura o-dihidroxi do anel B e a ligação dupla 2,3 em conjugação com a função 4-oxo no anel C (como nas flavonas) são essenciais para a efetiva atividade antioxidante. Um grupo hidroxila adicional no anel B aumenta a atividade antioxidante (PANNALA *et al.*, 2001).

Outra atividade atribuída aos flavonóides é sua ação antitumoral.

Os flavonóides atuam em diversas atividades no que diz respeito à prevenção e ao combate ao câncer. Significativamente, a maior parte da atividade dos flavonóides parece ter impacto sobre leucócitos do sangue e células endoteliais microvasculares (MANTHEY *et al.*, 2001). Portanto, não é surpreendente que duas das principais áreas de pesquisa sobre as ações biológicas de flavonóides têm sido inflamação e câncer.

Os compostos isolados são flavonóides *C*-glicosilados, os quais são estáveis à hidrólise (BRAZIER-HICKS *et al.*, 2009). Esta característica é de suma importância, pois a estabilidade do extrato viabiliza a produção de um

fitoterápico, já que o mesmo deve manter sua composição química durante o armazenamento. O extrato EtOH 70% de *Machaerium hirtum* possui flavonóides *C*-glicosilados e estas substâncias apresentam diversas atividades biológicas já mencionadas na literatura.

O método desenvolvido para a padronização do extrato mostrou-se eficaz para o controle da composição química do extrato de *Machaerium hirtum*. Entretanto pode ser melhorado a fim de se quantificar todas as substâncias identificadas no perfil cromatográfico. A otimização em UHPLC é uma técnica relativamente recente e que tem apresentado resultados promissores, devido à redução no tempo de análise e à melhor separação de substâncias durante a corrida cromatográfica.

Referências

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Legumes as a source of natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Tecnology**, v. 110, n. 10, p. 865-878, Aug. 2008.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids**: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC Press, 2006. 1197 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n. 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 5 abr. 2010. Disponível em: www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/103507-14.html. Acesso em: 10 out. 2011.

ANDRADE, A. L. P. **A subfamília Faboideae (Fabaceae Lindl.) no parque estadual do Guartelá, município de Tibagi, estado do Paraná**. 2008. 130 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BRAZIER-HICKS, M.; EVANS, K. M.; GERSHATER, M. C.; PUSCHMANN, H.; STEEL, P. G.; EDWARDS, R. The C-glycosylation of flavonoids in cereals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 27, p. 17926-17934, May 2009.

CHENG, G.; BAI, Y.; ZHAO, Y.; TAO, J.; LIU, Y.; TU, G.; MA, L.; LIAO, N.; XU, X. Flavonoids from *Ziziphhus jujube Mill var. spinosa*. **Tetrahedron**, v. 56, p. 8915-8920, Sept. 2000.

CROZIER, A.; LEAN, M. E. J.; McDONALD, M. S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 590-595, Mar. 1997.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1-15, Apr. 2004.

FILARDI, F. L. R. ***Machaerium in* lista de espécies da flora do Brasil**. Disponível em: <*http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB023059*>. Acesso em: 11 out. 2011.

FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Atlas Biota**. Disponível em: <http://www.biota.org.br/mapcria/viewer4.0?server=mapas.biota.org.br&proto=tcp&port=59600&search=http://www.biota.org.br/mapcria/biota_app/search&title=Atlas/Biota&layers_status=on&info_area=http://sinbiota.biota.org.br/atlas/info&logo=http://sinbiota.biota.org.br/atlas/sinbiota.gif&lang=pt&map=1327977530&ref=1327977529&window_width=1280&window_height=760>. Acesso em: 30 dez. 2011.

GREGORIO, G.; ALBANO, O.; MARQUES, L. C.; AYALAS, S.; CARVALHO, J. E.; COZZOLINO, S.; YARIWAKE, J. H. Soyfemme a isoflavona contra o climatério. **Phytociência**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2006.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1994. 676 p.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 1993. 335 p.

KANADASWAMI, C.; LEE, L. T.; LEE, P. P.; HWANG, J. J.; KE, F. C.; HUANG, Y. T.; LEE, M. T. The antitumor activities of flavonoids. **In Vivo**, v. 19, n. 5, p. 895-910, Sept. 2005.

KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. Isoflavonoid constituents of *Dalbergia* and *Machaerium* species. Part 3. Vestitol and vesticarpan, isoflavonoids from *Machaerium vestitum*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 8, p. 1405-1411, Oct. 1977a.

KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R.; OLIVEIRA, A. B. Mucronulatol, Mucroquinone and Mucronucarpan, isoflavonoids from *Machaerium mucronulatum and M. villosum.* **Phytochemistry**, v. 17, n. 8, p. 1389-1394, Oct. 1977b.

KUROSAWA, K.; OLLIS, W. D.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R.; OLIVEIRA, A. B. Mucronustyrene, Mucronulastirene and Villostyrene, cinnamylphenols from *Machaerium mucronulatm and M. villosum.* **Phytochemistry**, v. 17, n. 8, p. 1413-1415, Oct. 1977c.

LIU, Z. W.; QUE, Z. L.; YE, Z. W.; ZHANG, X. Q.; WANG, H.; YE, W. C.; ZHAO, S. X. *Chemical constituents* from the *aerial parts* of *Abrus mollis.* **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 6, n. 6, p. 415-417, Jan. 2008.

MANTHEY, J. A.; GROHMANN, K.; GUTHRIE, N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 135-153, Feb. 2001.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 113 p.

MARTINS, M. V. **Leguminosas arbustivas e arbóreas de fragmentos florestais remanescentes no noroeste paulista, Brasil**. 2009. 173 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

MOTA, K. S. L.; DIAS, G. E. N.; PINTO, M. E. F.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BARBOSA FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, p. 979-1012, Mar. 2009.

MUHAMMAD, I.; LI, X. C.; DUNBAR, D. C.; ELSOHLY, M. A.; KHAN, I. A. Antimalarial (+)-*trans*-hexahydrodibenzopyran derivatives from *Machaerium multiflorum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1322-1325, Apr. 2001.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; VAN HOORN, D. E. C.; BOELENS, K. N.; LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action ans potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, Oct. 2001.

OBMANN, A.; ZEHL, M.; PUREVSUREN, S.; NARANTUYA, S.; REZNICEK, G.; KLETTER, C.; GLASL, S. Quantification of flavonoid glycosides in an aqueous extract from the traditional mongolian medicinal plant *Dianthus versicolor* FISH. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 3, p. 292-298, Jan. 2011.

OLIVEIRA, A. B.; GOTTLIEB, O. R.; OLLIS, W. D. Chemistry of brazilian Leguminosae. XVII. Constituents of *Machaerium villosum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 40, n. 2, p. 147-150, 1968.

OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. Neoflavonoid group of natural products. Part 5. Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 8, p. 1379-1381, Oct. 1977.

OLLIS, W. D.; REDMAN, B. T.; ROBERTS, R. J.; SUTHERLAND, I. O.; GOTTLIEB, O. R. Neoflavanoids from *Machaerium kuhlmannii* and *Machaerium nictitans* and the recognition of a new neoflavanoid type, the neoflavenes. **Chemical Communications**, n. 22, p. 1392-1393. 1968.

PANNALA, A. S.; CHAN, T. S.; O'BRIEN, P. J.; RICE-EVANS, C. A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinectics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1161-1168, Apr. 2001.

PENG, J.; FAN, G.; HONG, Z.; CHAI, Y.; WU, Y. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, n. 1-2, p. 111-115, Mar. 2005.

PLAZONIC, A.; BUCAR, F.; MALES, Z.; MORNAR, A.; NIGOVIC, B.; KUJUNDZIC, N. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 14, p. 2466-2490, July 2009.

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

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2004. 320 p.

PRISTA, L. N. **Tecnologia farmaceutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1995. v. 3.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: standards and regulation. **Fitoterapia**. v. 81, n. 6, p. 462-471, Feb. 2010.

SANTOS, R. M.; VIEIRA, F. A. Análise estrutural do componente arbóreo de três áreas de cerrado em diferentes estádios de conservação no município de Três Marias, Minas Gerais, Brasil. **Cerne**, v. 11, n. 4, p. 399-408, dez. 2005.

SEO, E. K.; KIM, N. C.; MI, Q.; CHAI, H.; WALL, M. E.; WANI, M. C.; NAVARRO, H. A.; BURGESS, J. P.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; TAN, G. T.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Macharistol, a new cytotoxic cinnamylphenol from the stems of *Machaerium aristulatum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 11, p. 1483-1485, Nov. 2001.

SILVA, N. **Agricultores de SP desmatam o Cerrado apesar de multas altas**. Disponível em: <http://www.ecodebate.com.br/2009/12/05/agricultores-de-sp-desmatam-o-cerrado-apesar-de-multas-altas/>. Acesso em: 30 dez. 2011.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Pratical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Platarum, 2005. 640 p.

WAAGE, S. K.; HEDIN, P. A.; GRIMLEY, E. A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum.* **Phytochemistry**, v. 23, n. 12, p. 2785-2787, May 1984.

WAGNER, H.; BLADT, S.; RICKL, V. ***Plant drug analysis***: a thin layer chromatography atlas*. 2nd ed. Berlin: Springer, 2001*. 385 p*.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional medicine**. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Acesso em: 29 dez. 2011.