

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Química de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Química

NERILSON MARQUES LIMA

BIOPROSPECÇÃO EM ESPÉCIES DE *Inga* (FABACEAE MIMOSOIDEAE)

Araraquara
2015

NERILSON MARQUES LIMA

BIOPROSPECÇÃO EM ESPÉCIES DE *Inga* (FABACEAE MIMOSOIDEAE)

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

L732b Lima, Nerilson Marques
Bioprospecção em espécies de *Inga*
(Fabaceae Mimosoideae) / Nerilson Marques Lima –
Araraquara : [s.n], 2015
176 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

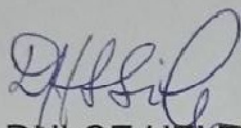
1. Ácido fenólico. 2. Produtos naturais. 3. Flavonóides.
4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Câncer.
I. Título.

NERILSON MARQUES LIMA

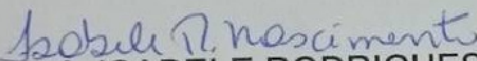
Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Química.

Araraquara, 10 de dezembro de 2015

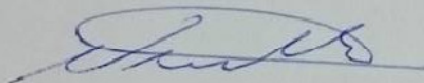
BANCA EXAMINADORA



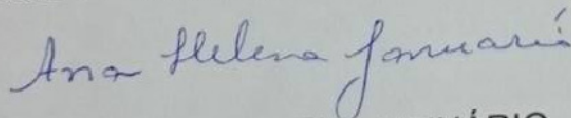
Prof^a. Dr^a. DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP



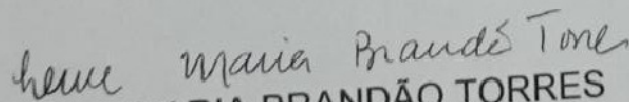
Prof^a. Dr^a. ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP



Dr. NIVALDO BORALLE
Instituto de Química / USP / Araraquara – SP



Prof^a. Dr^a. ANA HELENA JANUÁRIO
Universidade de Franca / UNIFRAN / Franca - SP



Dr^a. LUCE MARIA BRANDÃO TORRES
Instituto de Botânica / IBT / São Paulo - SP

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus.

Eu poderia passar a eternidade proferindo palavras de agradecimento, e ainda assim seria pouco para expressar a gratidão pelas suas bênçãos concedidas.

Aos meus pais, Noé de Souza Lima e Maria Lucilene Marques pelo exemplo de vida e coragem.

Às minhas irmãs Nirlande, Mari, Lina, Landia e aos meus irmãos Neilson e Lene, por entender as minhas decisões profissionais e pelo apoio durante esta etapa.

Aos meus sobrinhos que me contagia com seu brilho, seu sorriso encantador e nos mostra o verdadeiro sentido do amor.

Eu dedico esta tese

AGRADECIMENTOS

A FAPEM/CNPq pela bolsa de estudos concedida.

A UNESP e ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – Araraquara.

Ao Departamento de “Farmacognosy and Medicinal Chemistry” da “Ohio State University (OSU)” de Columbus (OHIO-USA) pela oportunidade de realizar o estágio de doutorado sanduíche.

À professora Dra. Dulce Helena Siqueira Silva pelos valiosos ensinamentos, orientação, paciência, confiança, receptividade e pela compreensão nos momentos mais difíceis. Meus sinceros agradecimentos!

Ao Professor Dr. Liva pela excelente orientação, amizade e por ter sido um “pai” durante os meses que fiquei sob sua orientação na OSU.

Aos amigos do laboratório de Farmacognosia (Michelle, Hanna, Young, Tejane, Preston e Keith) da OSU por toda a ajuda, receptividade e carinho. Em especial ao meu grande amigo Ermias Aldo pela inestimável amizade e ajuda nos momentos mais difíceis.

À Juliana Gubiani por ser não apenas uma amiga, mas uma companheira, alma gêmea. Por ouvir os meus choros, reclamações, pelos momentos de risada, festas, desabafos e pelas nossas inesquecíveis aventuras pelos EUA.

Aos amigos do NUBBE por compartilhar seus conhecimentos e pelas horas de distração, em especial a Alessandra, Gislaine, Luis Paulo, Airton, Camila, Alana, Vanessa Chapla, Vaninha, Rute, Raquel e Paula Bueno.

À Thaís Falcoski pela realização dos ensaios antitumorais e pela parceria na redação do paper.

As amigas de todas as horas: Terezinha (“a friend”), Juliana Gaspar (Ju Girl), Daniela Oliveira (DB), Ligia (Liginha) e Fabi.

Aos meus alunos de IC: Jéssica e Vítor.

Aos meus inesquecíveis professores da graduação e do mestrado, em especial a profa. Cecília Nunez por transmitir seus valiosos conhecimentos e pela sua inestimável contribuição na minha carreira acadêmica.

Aos professores, técnicos e alunos do NuBBE e do departamento de Química Orgânica do IQ da Unesp.

Aos meus grandes e fiéis amigos: Jaci, Orley, Francis, Taís, Lorena, Fabiely,
Daiane, David, Duli, Edivan, Bruno, Camila e Klenicy.

Ao Felipe e a Milan, por serem as pessoas mais maravilhosas que conheci
durante minha estadia em Araraquara.

A PIEBA, pelo apoio espiritual.

A todos que diretamente ou indiretamente, contribuíram para a construção
dos meus valores e aprendizado.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes.

É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe”.

Leonardo da Vinci

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos

aproxima”. *Louis Pasteur*

RESUMO

O estudo de produtos naturais como fonte de novos agentes anticâncer torna-se de grande importância, pois mesmo devido à grande quantidade de drogas já existente para o tratamento de neoplasias, ainda não se chegou a um composto ideal que tenha maior seletividade, menos efeitos colaterais, maior potência terapêutica e menor índice de resistência. Das famílias vegetais com reconhecido potencial terapêutico destaca-se a família Fabaceae, cuja quimiossistemática atesta para uma riqueza de compostos flavonoídicos com amplo espectro de atividade biológica, inclusive antitumoral. Desta forma, o objetivo principal deste estudo foi isolar e caracterizar substâncias fenólicas a partir de frações oriundas de espécies do gênero *Inga* (*I. laurina*, *I. edulis* e *I. marginata*) selecionadas através do bioensaio com linhagens de células antitumorais e identificar metabólitos em mistura através de CLAE-DAD, HPLC-MS, LC-SPE-TT e Espectroscopia de RMN. A composição química destas espécies indicou uma grande variedade de ácidos aromáticos, flavonóides, taninos e triterpenos. Este trabalho permitiu a caracterização das substâncias: lupeol, éster graxo da α -amirina, éster do olean-18-eno, fridolina, ácido vanílico, ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico, ácido gálico, galato de metila, ácido *p*-cumárico, ácido benzóico, *p*-hidroxi-benzóico, ácido protocateuico, ácido tânico, ácido cafeico, ácido *p*-metoxicinâmico, ácido *p*-hidroxibenzóico, derivado metilado do ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferúlico, miricetina, miricetina-3-O-ramnosídeo, miricetina-3-O-(2"-Ogaloil)- α -ramnopiranosídeo, apigenina, quercetrina, proantocianidina A-2, procianidina B, galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila, galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila e do glicosídeo do 4-vinil-fenol. Através das análises por CLAE-DAD detectamos a presença de uma antocianina altamente polar na fração aquosa e cinco outras antocianinas na fração metanólica das sementes de *I. edulis*. Através do fracionamento biomonitorado foi possível obter uma fração com promissor potencial antitumoral ($ED_{50} = 4,0 \mu\text{g/mL}$) que foi posteriormente caracterizada como sendo uma mistura do ácido *p*-hidroxibenzóico e do glicosídeo do 4-vinil-fenol. Os experimentos de desreplicação das folhas das três espécies através de CLAE-DAD pela co-injeção com padrões autênticos e HPLC-MS nos forneceu informações a cerca da composição química destas partes vegetativas atestando principalmente para a presença de flavonoides e ácidos fenólicos. Os experimentos de gentoxicidade demonstraram que os extratos avaliados não causam danos genotóxicos pelo ensaio do cometa.

ABSTRACT

The study of natural products as a source of new anticancer agents is very important, because even due to the large amount of existing drugs for the treatment of cancer, has not yet reached an optimal compound that has greater selectivity, fewer side effects, higher potency therapeutic and index of least resistance. One of the families with recognized therapeutic potential is the Fabaceae family, whose chemosystematics show an abundance of flavonoid with broad spectrum of biological activities, including antitumor. Thus, the aim of this study was to isolate and characterize phenolic compounds from fractions obtained of the genus *Inga* (*I. laurina*, *I. edulis* and *I. marginata*) selected by bioassay cytotoxic and identify metabolites in mixture by HPLC-PDA, HPLC-MS, LC-SPE-TT and NMR Spectroscopy. The chemical composition of these species indicated a wide variety of aromatic acids, flavonoids, tannins and triterpenes. This work describe the characterization of the compounds: lupeol, fatty ester of α -amyrin, the olean-18-ene ester and friedelin, vanillic acid, 3,4,5-trimethoxy benzoic acid, gallic acid, gallate methyl, *p*-coumaric acid, benzoic acid, *p*-hydroxybenzoic, protocateuico acid, tannic acid, caffeic acid, *p*-methoxycinnamic acid, *p*-hydroxybenzoic acid derivative methylated of 4-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, myricetin, myricetin-3-*O*-rhamnoside, myricetin-3-*O*-(2"-*O*-galoil)- α -rhamnopyranoside, apigenin, quercetrin, proanthocyanidin A-2 and procyanidin B, 2-rhamnopyranosyl-3,5-dihydroxyphenyl gallate, 2-rhamnopyranosyl-4,6-dihydroxyphenyl gallate and 4-vinyl-phenol. Through the analysis by HPLC-PDA detected the presence of one anthocyanin from aqueous fraction in five other anthocyanins in the methanolic fraction from seeds of *I. edulis*. Through the bioassay-guided fractionation was possible to obtain a fraction with high antitumor potential ($ED_{50} = 4.0$ mg/mL) that was characterized such a mixture of *p*-hydroxybenzoic acid and 4-vinyl-phenol glycoside. The dereplication experiments of leaves from three species by HPLC-PDA by co-injection with standards and HPLC-MS provided information about the chemical composition mainly for confirm the presence of flavonoids and phenolic acids. The genotoxicity experiments showed that the crude extracts evaluated not cause genotoxic damage by comet assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia para identificação de novos princípios ativos utilizando a combinação da triagem biológica (I) combinada com a triagem química (II) de acordo com Queiroz et al., 2009.

Figura 2. Estrutura de uma antocinina (A) e de uma antocianidina (B).

Figura 3. Biossíntese das antocianinas.

Figura 4. Detalhes das flores, folhas e partes do fruto de *Inga edulis* (Fonte: OTS Plant Database).

Figura 5. Detalhes das flores e partes do fruto de *Inga laurina* (Fonte: OTS Plant Database).

Figura 6. Detalhes das flores e do fruto de *Inga marginata* (Fonte: OTS Plant Database).

Figura 7. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 5 da fase AcOEt do extrato das folhas de *Inga marginata*.

Figura 8. Fração H₂O 100% (1), rica em açúcares livres, e fração MeOH 100% (2), obtida da CC eluída sobre Diaion.

Figura 9. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da Fração 5 do fracionamento da FBU do extrato das folhas de *I. edulis*.

Figura 10. Imagens dos procedimentos de extração dos pigmentos da fração aquosa das sementes de *I. edulis*.

Figura 11. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (520 nm) da fração metanólica do extrato das sementes de *I. edulis*.

Figura 12. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (280 nm) da fração metanólica obtida do extrato das folhas de *I. edulis*.

Figura 13. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (400 nm) da fração metanólica obtida do extrato das folhas de *I. edulis*.

Figura 14. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (254 nm) da fração metanólica obtida das folhas de *I. edulis*.

Figura 15. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (400 nm) da fração metanólica do extrato das folhas de *I. edulis*.

Figura 16. Cromatograma obtido via CLAE-DAD monitorado em 280 nm (A) e 400 nm (B) da fração metanólica obtida do extrato das sementes de *I. edulis*.

Figura 17. Cromatograma obtido via CLAE-DAD monitorado em 280 nm da fração metanólica obtida do extrato das sementes de *I. edulis*.

Figura 18. Trapeamento dos picos obtidos via LC-SPE-TT da fração metanólica do extrato das sementes de *I. edulis*.

Figura 19. Quadro de substâncias caracterizadas nas espécies de *Inga*.

Figura 20. Estruturas dos triterpenos identificados nas folhas de *I. marginata*

Figura 21. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 5 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *Inga marginata*.

Figura 22. Espectros de UV obtidos via CLAE-DAD da fração 5 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *Inga marginata*.

Figura 23. Estrutura do ácido vanílico.

Figura 24. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 6-7 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *Inga marginata*

Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da fração 6-7 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. marginata*.

Figura 26. Estrutura do ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico.

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da fração 13-14 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. marginata*.

Figura 28. Estrutura do ácido gálico.

Figura 29. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da fração 1 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. marginata*

Figura 30. Estrutura do galato de metila

Figura 31. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da fração 10 (ácido *p*-cumárico) do fracionamento cromatográfico da fração MeOH 100% da fase AcOEt das folhas de *I. marginata*

Figura 32. Estrutura do ácido *p*-cumárico.

Figura 33. Espectro de UV e estrutura da miricetrina.

Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da fração 6 do fracionamento cromatográfico da fase BuOH das folhas de *I. marginata*.

Figura 35. Cromatograma obtido via CLAE-DAD dos 5 grupos do fracionamento cromatográfico da raque foliar de *Inga marginata*.

Figura 36. Cromatograma e espectro de UV do ácido benzóico ($t_r = 25$ min) isolado da polpa dos frutos de *Inga laurina*.

Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) do ácido benzóico isolado da polpa dos frutos de *Inga laurina*.

Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) do ácido benzóico isolado da polpa dos frutos de *Inga laurina*.

Figura 39. Estrutura do ácido benzóico.

Figura 40. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 5 do fracionamento cromatográfico da casca dos frutos de *Inga laurina*.

Figura 41. Estrutura do galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila.

Figura 42. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da proantocianidina isolada do fracionamento cromatográfico da casca dos frutos de *Inga laurina*.

Figura 43. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1 obtida da análise em CCDP das cascas dos frutos de *Inga laurina*.

Figura 44. Estrutura da proantocianidina A-2 isolada das cascas dos frutos de *I. laurina*.

Figura 45. Fração H_2O 100% (1), rica em açúcares livres, e fração MeOH 100% (2), obtida da CC do extrato etanólico das sementes eluída sobre Diaion.

Figura 46. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 2 e da fração 3 obtida do fracionamento das cascas dos frutos de *Inga laurina*.

Figura 47. Estruturas do ácido *para*-hidroxi-benzóico e do glicosídeo do 4-vinil-fenol

Figura 48. Cromatograma obtido via CLAE-DAD das frações 2, 3, 4 e 5 obtidas do fracionamento da fração 1.

Figura 49. Espectros de UV de alguns picos das frações do fracionamento da fração 2.

Figura 50. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 11-12 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

Figura 51. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 13-14.3 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

Figura 52. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 13-14.4 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

Figura 53. Espectros de UV obtidos via CLAE-DAD dos principais picos da fração 13-14.4 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

Figura 54. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 6,55$ min obtido em modo negativo da análise por LC-MS da fração 13-14.4 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

Figura 55. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 14,22$ min obtido em modo negativo da análise por LC-MS da fração 13-14.4 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

Figura 56. Estrutura da miricetina-3-O-ramnopiranosídeo.

Figura 57. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 14,26$ min obtido em modo negativo da análise por LC-MS da fração 13-14.4 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

Figura 58. Estrutura da miricetina.

Figura 59. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 13-14.7 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

Figura 60. Espectro de UV obtido via CLAE-DAD do pico 1 da fração 13-14.7

Figura 61. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 18,2$ min obtido em modo negativo da análise por LC-MS da fração 13-14.7 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

Figura 62. Estrutura da procianidina B

Figura 63. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 5 do fracionamento da FBUOH das folhas de *I. laurina*.

Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) da fração 5 do fracionamento cromatográfico da fase BuOH das folhas de *Inga laurina*.

Figura 65. Estrutura do galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila.

Figura 66. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) da fração 24-28.1-2 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *Inga laurina*.

Figura 67. Estrutura do galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila.

Figura 68. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da fração 15 do fracionamento cromatográfico da fração 2 das folhas de *Inga laurina*.

Figura 69. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da fração 15 do fracionamento cromatográfico da fração 2 das folhas de *Inga laurina*.

Figura 70. Estrutura da miricetina-3-O-(2"-Ogaloil)- α -ramnopiranosídeo.

Figura 71. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da Fração 5 do fracionamento da raque foliar de *I. laurina*.

Figura 72. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da Fração 7 do fracionamento da raque foliar de *I. laurina*.

Figura 73. Estrutura da apigenina.

Figura 74. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da Fração 8-10 do fracionamento da raque foliar de *I. laurina*.

Figura 75. Cromatograma obtido via CLAE-DAD e espectros de UV das frações das flores de *I. laurina*.

Figura 76. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da Fração 5 do fracionamento da FBU das folhas de *I. edulis*

Figura 77. Espectros de UV obtido via CLAE-DAD dos picos da fração 5 do fracionamento da FBU das folhas de *I. edulis*.

Figura 78. Estrutura da quercetrina

Figura 79. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da Fração 1 do fracionamento da FHa das folhas de *I. edulis*

Figura 80. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das folhas da espécie *Inga edulis* coletada na Amazônia (1) e no Cerrado (2).

Figura 81. Cromatogramas obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das raque foliares da espécie *Inga edulis* coletada na Amazônia (1) e no Cerrado (2).

Figura 82. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (254 nm) da Fração aquosa obtida das sementes de *I. edulis*.

Figura 83. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (520 nm) da fração aquosa obtida das sementes de *I. edulis*.

Figura 84. Espectro de Massas da fração aquosa obtida das sementes de *I. edulis*.

Figura 85. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz; D₂O) da fração aquosa das sementes de *Inga edulis*.

Figura 86. Expansão do espectro de RMN de ¹H (600 MHz; D₂O) da fração aquosa das sementes de *Inga edulis*.

Figura 87. Esqueleto da antocianina da fração aquosa das sementes de *Inga edulis*.

Figura 88. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (520 nm) da fração metanólica obtida das sementes de *I. edulis*.

Figura 89. Espectros de UV das antocianinas obtidos via CLAE-DAD (520 nm) da fração metanólica das sementes de *I. edulis*.

Figura 90. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (254 nm) da fração aquosa obtida das sementes de *I. edulis*.

Figura 91. Espectro de UV obtido via CLAE-DAD do pico 2 (ácido tânico) da fração aquosa obtida das sementes de *I. edulis*.

Figura 92. Estrutura do ácido tânico

Figura 93. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (280 nm) da fração metanólica extratodas folhas de *I. edulis*.

Figura 94. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (400 nm) da fração metanólica obtida das folhas de *I. edulis*.

Figura 95. Espectros de UV obtidos via CLAE-DAD dos três picos observados em 400 nm da fração metanólica obtida das folhas de *I. edulis*.

96. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (254 nm) da fração metanólica obtida das folhas de *I. edulis*.

Figura 97. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (400 nm) da fração metanólica obtida das folhas de *I. edulis*.

Figura 98. Cromatograma obtido via CLAE-DAD monitorado em 280 nm (A) e 400 (B) da fração metanólica obtida das sementes de *I. edulis*.

Figura 99. Cromatograma obtido via CLAE-DAD monitorado em 280 nm da fração metanólica obtida das sementes de *I. edulis* analisada pela técnica LC-SPE-TT.

Figura 100. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz) da fração 1 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

Figura 101. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz) da fração 1 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

Figura 102. Expansão do espectro de RMN de ¹H (600 MHz) da fração 2 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

Figura 103. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz) da fração 3 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*

Figura 104. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz) da fração 4 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

Figura 105. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz) da fração 6 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

Figura 106. Espectro de UV e estrutura do ácido ferúlico.

Figura 107. Expansão do espectro de RMN de ¹H (600 MHz) da fração 6 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

Figura 108. Espectro de UV do flavonoide da mistura da fração 6 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

Figura 109. Cromatogramas obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H²O, fluxo 1 ml/min, detecção a 254 e 365nm) do extrato das folhas de *I. marginata*.

Figura 110. Cromatogramas obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) das folhas de *I. edulis*.

Figura 111. Cromatogramas obtido via CLAE-DAD ((C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) das folhas de *I. laurina*.

Figura 112. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (254) da mistura dos padrões.

Figura 113. Espectro de massas associado ao pico em tr =7,6 min obtido em modo positivo da análise por LC-MS das folhas de *I. marginata*.

Figura 114. Espectro de massas associado ao pico em tr =14,25 min obtido em modo negativo da análise por LC-MS das folhas de *I. marginata*.

Figura 115. Espectro de massas associado ao pico em tr =14,25 min obtido em modo negativo da análise por LC-MS das folhas de *I. edulis*.

Figura 116. Espectro de massas associado ao pico em tr =17,0 min obtido em modo negativo da análise por LC-MS das folhas de *I. laurina*.

Figura 117. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (254 e 365 nm, C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min, das fases Hexânica (1) e metanólica (2) obtidas da partição líquido-líquido das cascas dos frutos de *I. edulis*.

Figura 118. Ácidos orgânicos identificados na fase metanólica obtida da partição líquido-líquido das cascas dos frutos de *I. edulis*.

Figura 119. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) da fração metanólica obtida do fracionamento em XAD 4 da polpa dos frutos de *I. laurina*.

Figura 120. Figura 111. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) em XAD 4 das sementes de *I. laurina*.

Figura 121. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) da fração metanólica obtida do fracionamento em XAD 4 das cascas dos frutos de *I. laurina*.

Figura 122. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) da fração hexânica das folhas de *Inga edulis*.

Figura 123. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) da fração hexânica das folhas de *Inga marginata*.

Figura 124. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) da fração hexânica das folhas de *Inga laurina*.

Figura 125. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das folhas de *Inga edulis*.

Figura 126. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das raque foliar de *Inga edulis*.

Figura 127. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das folhas de *I. marginata*

Figura 128. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH da raque foliar de *I. marginata*

Figura 129. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das folhas de *I. laurina*.

Figura 130. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH da raque foliar de *I. laurina*.

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1. Esquema geral do tratamento cromatográfico das partes dos frutos de *I. laurina*.
- Fluxograma 2. Fracionamento cromatográfico da fase hexânica das folhas de *I. marginata*.
- Fluxograma 3. Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. marginata*
- Fluxograma 4. Fracionamento cromatográfico da raque foliar de *I. marginata*.
- Fluxograma 5. Fracionamento cromatográfico da da polpa dos frutos de *I. laurina*.
- Fluxograma 6. Primeiro fracionamento cromatográfico da casca dos frutos de *I. laurina*.
- Fluxograma 7. Segundo fracionamento cromatográfico da casca dos frutos de *I. laurina*.
- Fluxograma 8. Fracionamento cromatográfico das sementes de *I. laurina*.
- Fluxograma 9. Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. laurina*
- Fluxograma 10. Fracionamento cromatográfico da fase BuOH das folhas de *I. laurina*.
- Fluxograma 11. Segundo fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. laurina*
- Fluxograma 12. Segundo fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. laurina*
- Fluxograma 13. Fracionamento cromatográfico da raque foliar de *I. laurina*
- Fluxograma 14. Fracionamento cromatográfico das folhas de *I. edulis* da coleta Cerrado.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições cromatográficas da análise em CLAE-DAD das frações das partes dos frutos de *I. laurina*

Tabela 2. Gradiente de eluição cromatográfica otimizado para a eluição dos metabólitos secundários da fração metanólica das folhas de *I. edulis*

Tabela 3. Padrões e seus respectivos tempos de retenção utilizados na análise por CLAE-DAD.

Tabela 4. Condições de análise da amostra por LC-SPE-TT

Tabela 5. Gradiente de eluição cromatográfica desenvolvido na análise por LC-SPE-TT

Tabela 6. Valores de Dose Efetiva 50 (ED 50; µg/mL) obtidos do efeito citotóxico dos extratos das partes vegetativas das três espécies de *Inga* sob as linhagens tumorais de cancro do cólon humano (HT-29).

Tabela 7. Dados de RMN de ¹H (400 MHz; CD₃OD) da proantocianidina A-2

Tabela 8. Dados de RMN 1H para miricetina-3-O-(2"-O-galoil)-α-ramnopiranosideo (300 MHz) *Cavalheiro et al., 2011 (patente).

Tabela 9. Dados de RMN 1H para miricetina-3-O-(2"-O-galoil)-α-ramnopiranosideo (75 MHz)

Tabela 10. Tempos de retenção e comprimentos máximos de absorção das antocianinas encontradas na fração metanólica das sementes de *I. edulis*.

Tabela 11. Dados de RMN 1H para o ácido cafeico (600 MHz, MeOD).

Tabela 12. Dados de RMN 1H para o ácido *p*-metoxicinâmico (600 MHz, MeOD).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Fração de partição acetato de etila
BuOH	Butanol
C18	Fase reversa octadecilsilano
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia à Gás
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	CORrelated SpectroscopY
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DAD	Photodiode Array Detector (Detector com Arranjo de Fotodiodos)
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de Massas (Mass Spectrometry)
ELL	Extração líquido-líquido
ESI	Electrospray ionization (Ionização por <i>electrospray</i>)
EtOH	Etanol
Hex.	Fração hexânica
gCOSY	gradient Correlation Spectroscopy
gHMBC	gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlations
gHMQC	gradient Heteronuclear Multiple Quantun Coherence
HEX	Hexano
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos
Hz	Hertz
IC_{50}	Avaliação do índice de citotoxicidade
J	Constante de acoplamento

LC	Liquid Chromatography
M	Multiplete
[M – H]	Molécula desprotonada
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	Massa/carga
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RMN-13C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN-1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
SPE	Solid Phase Extraction
TOCSY-1D	Total Correlation Spectroscopy, 1D
tr	Tempo de retenção
TT	Transfer Tube
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2.OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.2 PARTE EXPERIMENTAL	45
3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal	45
3.2.2 Obtenção do extrato bruto	45
3.2.3 Partição dos extratos brutos	46
3.2.4 Detecção, isolamento e caracterização dos constituintes químicos	46
3.2.4.1 Estudo químico dos frutos de <i>I. laurina</i>	46
3.2.5 Estudo químico de <i>Inga marginata</i>	47
3.2.5.1 Estudo químico das folhas de <i>I. marginata</i>	47
3.2.6 Estudo químico de <i>Inga laurina</i>	52
3.2.6.1 Estudo químico da polpa dos frutos de <i>I. laurina</i>	52
3.2.6.2 Estudo químico das cascas dos frutos de <i>I. laurina</i>	53
3.2.6.3 Estudo químico das sementes de <i>I. laurina</i>	55
3.2.6.4 Estudo químico das folhas de <i>Inga laurina</i>	59
3.2.6.5 Estudo químico da raque foliar de <i>Inga laurina</i>	65
3.2.6.6 Estudo químico de <i>Inga edulis</i>	67
3.2.7 Estudo químico de <i>Inga edulis</i>	69
3.2.7.1 Estudo químico da espécie <i>Inga edulis</i> coletada no Bioma Amazônia	69
3.2.7.2 Investigação dos fenólicos presentes nas folhas de <i>Inga edulis</i>	71
3.2.7.3 Caracterização de fenólicos presentes nas sementes de <i>I. edulis</i> através de RMN de ¹ H obtida da análise em LC-SPE-TT	75
3.2.8 Estudos de desreplicação das folhas das espécies de <i>Inga</i>	75
3.2.8.1 Análise por CLAE-DAD	75
3.2.8.2 Análise por HPLC-MS	77
3.2.8.3 Análise por CCD e GC-MS das frações de baixa polaridade	77
3.2.9 Perfil químico das partes dos frutos de <i>I. edulis</i>	78
3.2.9 Caracterização de fenólicos presentes nas sementes de <i>I. edulis</i> através de LC-SPE-TT	78
3.2.11 Avaliação da citotoxicidade	80
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82

4.1	Estudo químico de <i>Inga marginata</i>	83
4.1.1	Estudo químico das folhas de <i>I. marginata</i>	83
4.2	Fracionamento biomonitorado: Avaliação da atividade antitumoral (citotoxicidade)	92
4.2 .1	Estudo químico da raque foliar de <i>I. marginata</i>	93
4.3	Estudo químico de <i>Inga laurina</i>	95
4.3.1	Estudo químico da polpa dos frutos de <i>I. laurina</i>	95
4.3.2	Estudo químico das cascas dos frutos de <i>I. laurina</i>	97
4.3.4	Estudo químico das sementes de <i>I. laurina</i>	100
4.3.5	Estudo químico das folhas de <i>Inga laurina</i>	104
4.3.6	Estudo químico da raque foliar de <i>I. laurina</i>	120
4.3.7	Estudo químico das flores de <i>I. laurina</i>	122
4.4	Estudo químico de <i>Inga edulis</i>	123
4.4.1	Estudo químico da espécie <i>Inga edulis</i> coletada no Bioma Amazônia....	126
4.5	Caracterização de fenólicos presentes nas sementes de <i>I. edulis</i> através de RMN de ¹ H obtida da análise em LC-SPE-TT.....	138
4.6	Estudos de desreplicação das folhas das espécies de <i>Inga</i>	147
4.6.1	Análise por CLAE-DAD.....	147
4.6.2	Análise por HPLC-MS.....	151
4.6.4	Análise por CCD e GC-MS das frações de baixa polaridade	155
4.7	Ensaio de Citotoxicidade e genotoxicidade frente às espécies de <i>Inga</i> ..	156
4.8	Perfil químico dos extratos das folhas, frutos e raque foliar das espécies de <i>Inga</i>	158
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	166
	REFERÊNCIAS	168

1 INTRODUÇÃO

O grande crescimento da área de produtos naturais nos últimos anos deve-se principalmente ao rápido avanço das técnicas de purificação e análise de compostos bioativos em plantas, bem como pela facilidade na busca de informações em vários sistemas e base de dados.¹

Um dos principais objetivos da pesquisa nesta área consiste especialmente, na identificação dos princípios ativos das plantas medicinais, através da investigação sistemática dos extratos e frações quanto a sua eficácia, sendo assim o isolamento e a determinação estrutural destes compostos é vital para o desenvolvimento deste campo, podendo ser posteriormente sintetizados, modificados ou extraídos de forma mais eficiente para aplicações desejadas no futuro.²

A pesquisa de novos agentes farmacologicamente ativos a partir de fontes naturais como microrganismos e extratos de plantas tem permitido a descoberta ou desenvolvimento de fármacos clinicamente úteis no tratamento de doenças humanas. Historicamente, a maioria dos fármacos baseados em produtos naturais, incluindo ciclosporina, paclitaxel e camptotecina foram descobertos por testes tradicionais *in vitro* baseados em células.³

O estudo químico e biológico de novas espécies além de contribuir com a quimiosistemática das espécies estudadas mostra-se promissor na descoberta de novos agentes antitumorais e substâncias com potencial antioxidante, o qual pode ser utilizado na área cosmética, tratamento de doenças coronárias e neurodegenerativas.

Das famílias vegetais com reconhecida e amplo espectro de bioatividade destaca-se a família Fabaceae, especialmente por apresentar uma grande riqueza de compostos flavonoídicos, relacionados a importantes atividades biológicas.

• PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS

A química de produtos naturais desempenha um papel indiscutível na validação científica e na regulamentação terapêutica dos produtos de origem natural e na bioprospecção de novos fármacos, identificando, isolando, quantificando e avaliando farmacologicamente os princípios ativos em matrizes naturais.⁴

Nesse contexto, a busca dos produtos naturais pelas indústrias farmacêuticas deve-se principalmente à grande diversidade molecular que eles apresentam para

uma ampla variedade de aplicações desejadas.^{5,6} Com o desenvolvimento de técnicas modernas que possibilitaram os estudos farmacológicos, bioquímicos, moleculares e toxicológicos, o interesse na procura de novos fármacos ou de protótipos de produtos naturais para obtenção de novos fármacos aumentou consideravelmente.⁷

Estudos realizados por Newman & Cragg (2012)⁸, revelaram que de 1940 até a presente data, das 175 micromoléculas anticâncer lançadas, 85, ou seja, 48,6% possuem algum tipo especial de relação com metabólitos isolados a partir de produtos naturais.

Na procura por substâncias biologicamente ativas o procedimento padrão é o fracionamento bioguiado, em que os extratos, frações e substâncias obtidas através de fracionamentos cromatográficos são submetidas a ensaios biológicos para isolamento dos constituintes responsáveis pela atividade. Novas abordagens foram desenvolvidas nos últimos anos visando otimizar os procedimentos experimentais para a investigação de produtos naturais, com destaque para a evolução de técnicas analíticas, em especial, as técnicas hífenadas.⁹

• ESTUDOS DE PRODUTOS NATURAIS POR DESREPLICAÇÃO

Uma eficiente triagem dos extratos realizada para a busca de produtos naturais biologicamente ativos pode ser alcançada através do monitoramento biológico e químico, realizados simultaneamente. Para isso, a utilização de técnicas analíticas hífenadas é de inestimável importância, pois fornece numerosas informações estruturais dos metabólitos antes mesmo do seu isolamento.

Os estudos de desreplicação têm sido amplamente utilizados na área de produtos naturais, pois permitem a caracterização rápida dos constituintes de misturas complexas utilizando técnicas acopladas. O *screening* químico utilizando técnicas como CLAE-EM, CLAE-DAD-EM, CLAE-DAD-RMN fornece rapidamente ampla informação estrutural, possibilitando em alguns casos a identificação inequívoca dos constituintes químicos sem a necessidade de isolamento clássico dos mesmos, auxiliando assim, na racionalização dos estudos fitoquímicos.^{10,11,12}

A desreplicação é uma etapa importante na busca de novas substâncias bioativas e tem se tornado um exercício rotineiro nos laboratórios de pesquisa avançados e companhias farmacêuticas.

Diferentes métodos espectroscópicos e/ou espectrométricos e cromatográficos são amplamente utilizados para análises metabômicas de plantas medicinais para controle de qualidade e descoberta de novas micromoléculas bioativas.⁶

Para obter informação estrutural que conduz à caracterização dos compostos presentes numa amostra bruta, a cromatografia líquida (LC), em geral Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG) ou Eletroforese Capilar (EC) é acoplada às técnicas de detecção espectroscópicas e/ou espectrométricas, por exemplo, Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Arranjo de fotodiodos (DAD), UV-vis ou emissão de Fluorescência, Espectrometria de Massas (EM) e/ou espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o que permite o uso de várias técnicas modernas hifenadas como CE-MS, GC-MS, LC-MS e LC-NMR.¹³

Nos estudos de desreplicação de micromoléculas naturais, o método mais utilizado é CLAE-DAD-EM, em que os espectros de UV e dados de EM podem ser utilizados em conjunto com informações quimiotaxonômicas da espécie em estudo disponíveis nos bancos de dados como SciFinder.¹⁴

A CLAE é uma técnica cromatográfica muito poderosa e versátil para a separação de metabólitos em matrizes complexas, como extratos vegetais. Entre os detectores usados em CLAE, o mais simples e amplamente utilizado é o UV, embora seja limitado para compostos que possuem cromóforos. No entanto, atualmente ele apresenta a melhor combinação de sensibilidade, linearidade, versatilidade e confiabilidade de todos os detectores desenvolvidos. Métodos desenvolvidos em CLAE-UV ou CLAE-DAD podem ser utilizados para comparar *fingerprints* e perfis metabólitos de espécies relacionadas taxonomicamente ou de uma mesma espécie provenientes de localidades diferentes¹⁵, ou ainda para detectar variações de perfis metabólicos de extratos que podem ocorrer devido a variações entre espécies ou variedade da espécie, adulteração, mudanças ambientais durante crescimento e colheita, tratamento pós-colheita, extração, método de preparação, explorar as influências de habitat e método de cultura, cujos fatores podem alterar significativamente o perfil da bioatividade.^{16, 17, 18, 19}

Técnicas analíticas hifenadas baseadas em RMN tem se destacado como uma poderosa ferramenta para o estudo de sistemas biológicos e tem sido aplicada em vários organismos, incluindo plantas, animais e microrganismos. Isso porque a

espectroscopia de RMN é capaz de fornecer uma "imagem global" dos metabolitos, e assim é vantajoso para estudos metabolômicos.²⁰

As análises de desreplicação estão atualmente bem estabelecidas e em contínuo aprimoramento no âmbito da pesquisa em produtos naturais, devido à sua versatilidade, rapidez, confiabilidade e reprodutibilidade na análise de extratos brutos, de maneira a promover uma rápida priorização de extratos e substâncias a serem isoladas, evitando-se o re-isolamento de substâncias já conhecidas. Atualmente se considera que a desreplicação constitui uma etapa essencial na descoberta de produtos naturais bioativos estruturalmente inéditos. Desta forma, o processo de desreplicação na pesquisa e descoberta de produtos naturais deve ser cada vez mais utilizado e aprimorado.²¹

A necessidade de desenvolver novos produtos farmacêuticos e agroquímicos, com rapidez e eficácia a partir de matrizes naturais tem impulsionado o desenvolvimento de novos estudos nesta área. No entanto, apesar dos recentes avanços neste campo, o processo de isolamento não pode ser excluído, uma vez que se necessita da substância pura para realizar ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* visando o estabelecimento e/ou confirmação de suas propriedades farmacológicas, toxicológicas, farmacocinéticas, etcno, processo de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.²²

Um resumo geral das estratégias adotadas na identificação de novos compostos está ilustrada na Figura 1.

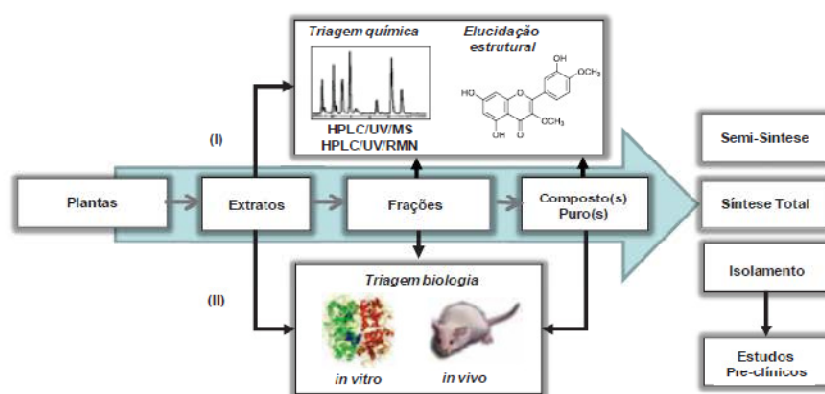


Figura 1. Estratégia para identificação de novos princípios ativos utilizando a combinação da triagem biológica (I) combinada com a triagem química (II) de acordo com Queiroz et al., 2009.²³

Tendo em vista que uma pequena parcela de organismos vegetais foi examinada do ponto de vista biotecnológico, ainda existe um enorme potencial para a identificação de diversos novos agentes biologicamente ativos. Assim, é importante aperfeiçoar os procedimentos experimentais e adotar metodologias eficientes para acelerar a análise das amostras garantindo a identificação dos principais constituintes químicos, mesmo aqueles presentes em baixas concentrações.

- **CÂNCER**

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), “câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo”. As causas do câncer podem ser externas, relacionadas ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade, ou internas ao organismo, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, podendo estar associadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas.

O processo de carcinogênese, em geral ocorre lentamente, podendo levar anos para que uma célula cancerosa prolifere e origine um tumor visível. Este processo passa por vários estágios:

- *Primeiro estágio ou estágio de iniciação*: as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos que alteram alguns de seus genes. Neste estágio, não há formação do tumor.
- *Segundo estágio ou estágio de promoção*: as células geneticamente modificadas sofrem os efeitos dos oncopromotores (agentes cancerígenos que possuem os oncogenes). Dessa forma, a célula modificada se transforma em uma célula maligna lenta e gradualmente. Se a exposição ao agente cancerígeno promotor for suspensa, o processo de carcinogênese pode ser interrompido neste estágio.
- *Terceiro estágio ou estágio de progressão*: as células multiplicam-se de maneira descontrolada, mais rapidamente que as células normais e invadem os tecidos à sua volta. Estas células têm a capacidade de induzir a formação

de vasos sanguíneos que as nutrirão e manterão o seu crescimento descontrolado. O acúmulo dessas células forma os tumores malignos.²⁴

Nas últimas décadas, ocorreu um aumento expressivo nos casos de câncer e isso se deve principalmente ao fato do aumento da expectativa de vida da população, tendo em vista que o câncer é uma doença majoritariamente associada às últimas décadas de vida. O câncer é a segunda doença crônica que causa mais morte em todo o mundo, perdendo apenas para cardiopatias. Cerca de 7 milhões de pessoas morrem todos os anos, vítimas dos mais variados tipos de câncer, tornando esta doença responsável por 12,5% das mortes no mundo inteiro (INCA, 2012). Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que no ano de 2030 pode-se esperar cerca de 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente com algum tipo de câncer.²⁵

Embora as taxas de sobrevivência tenham aumentado devido a novos agentes antineoplásicos, a cura para o câncer se mantém incerta. Os gliomas, grupo de neoplasias que se originam das células da glia, estão entre os cânceres mais mortais e com pior prognóstico.²⁶ Pacientes acometidos de glioblastoma multiforme raramente sobrevivem mais de um ano após o diagnóstico.²⁷ Desta forma, a alta agressividade dos gliomas somada à ineficácia e toxicidade das terapias disponíveis confirma a necessidade de busca por novas substâncias anticâncer.

Considerando que muitos produtos naturais e seus análogos semi-sintéticos oriundos de plantas possuem reconhecida atividade antitumoral, a busca de novos agentes anticâncer a partir de fontes naturais tem se mostrado bastante promissora.²⁸ Desta forma, as plantas constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos que podem ser usados na terapia anticâncer. Metabólitos isolados de espécies de Fabaceae tem se mostrado promissores candidatos no desenvolvimento de agentes anticâncer.²⁹

- **FAMÍLIA FABACEAE**

A família Fabaceae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18000 espécies distribuídas em três subfamílias (Papilionoideae ou Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae), representando uma das maiores famílias de Angiospermas e também uma das principais do ponto de vista econômico.³⁰

Uma particularidade da família Fabaceae é seu alto teor de substâncias flavonoídicas e outros polifenóis.³¹ Os flavonoides são uma classe de metabólitos secundários que possuem um largo espectro de atividade farmacológica incluindo atividade anticâncer. Devido aos seus múltiplos mecanismos de ação, tanto análogos naturais como sintéticos são investigados por suas potenciais aplicações em terapias anticâncer.³²

- **FLAVONOIDES: ANTOCIANINAS**

Os flavonóides, uma das mais representativas classes do metabolismo secundário vegetal, são pigmentos conhecidos por estarem universalmente presentes em folhas verdes, além de outros órgãos vegetais, os quais geralmente absorvem na região de 250-385 nm e por isso são capazes de atuarem na absorção da radiação ultravioleta protegendo os tecidos fotossintetizantes dos danos causados pelo excesso de radiação. Algumas classes de flavonoides como as antocianinas e as flavonas atuam na geração/estabilização das cores azuis das flores de angiospermas, essencial para o fenômeno de polinização por abelhas, além de desempenhar o importante papel na proteção contra infecções antimicrobianas e predadores herbívoros.³³ Além de reconhecida atividade antibacteriana, eles podem atuar na inibição de importantes enzimas virais, como a transcriptase reversa e protease e, geralmente apresentam baixa toxicidade para células animais.³⁴

Os flavonoides podem ser subdivididos em grandes subclasses, baseadas nas variações estruturais do anel heterocíclico C, incluindo: as flavonas, flavonóis, flavanonas, catequinas, chalconas, antocianidinas, antocianinas e isoflavonas. Podem ser encontrados em alimentos e bebidas de origem vegetal, como frutas, verduras, chás, cacau e vinho.³⁵ Em virtude da sua atividade antioxidante eles são importantes compostos dietéticos com grande potencial terapêutico, e efeitos pronunciados na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, câncer e insuficiências renal e hepática.^{36, 37, 38, 39}

As antocianinas (do grego *anthos*= flores e *kianos* = azul) constituem o maior grupo de flavonóides responsáveis pelas cores rosa, vermelho, violeta e azul encontradas em muitas flores, frutos e folhas. Nos vegetais, servem como atrativos para pássaros e insetos responsáveis pela polinização, proteção contra radiação

ultravioleta, herbívoros e infecções fungopatogênicas ^{40,41}. As antocianinas (figura 2A) são glicosídeos das antocianidinas (figura 2B), substâncias que apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico. A estrutura das antocianinas consiste de um anel aromático (anel A) ligado a um anel pirano (anel C) que está ligado por uma ligação carbono-carbono a um outro anel aromático (anel B).^{40, 42, 43}

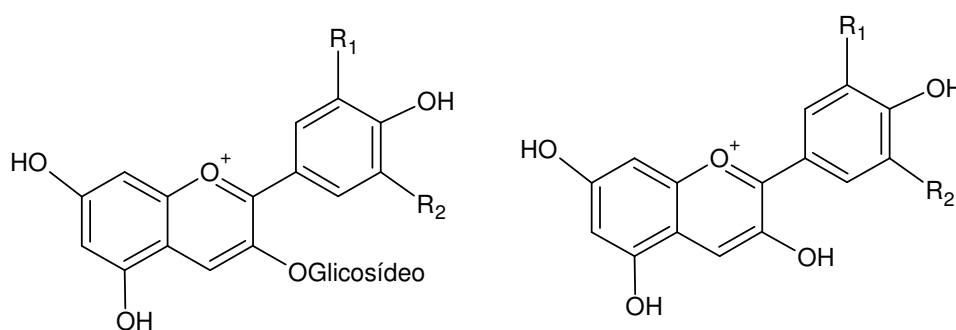


Figura 2.Estrutura de uma antocianina (A) e de uma antocianidina (B).

As antocianinas isoladas são altamente instáveis e muito suscetíveis a degradação. A sua estabilidade é afetada por fatores como pH, temperatura de armazenamento, concentração, luz, oxigênio, solventes, presença de enzimas, proteínas e íons metálicos. ^{40, 44}

A biossíntese das antocianinas está relacionada com a Via do Ácido Chiquímico e a Via Acetato (Figura 3).⁴⁵

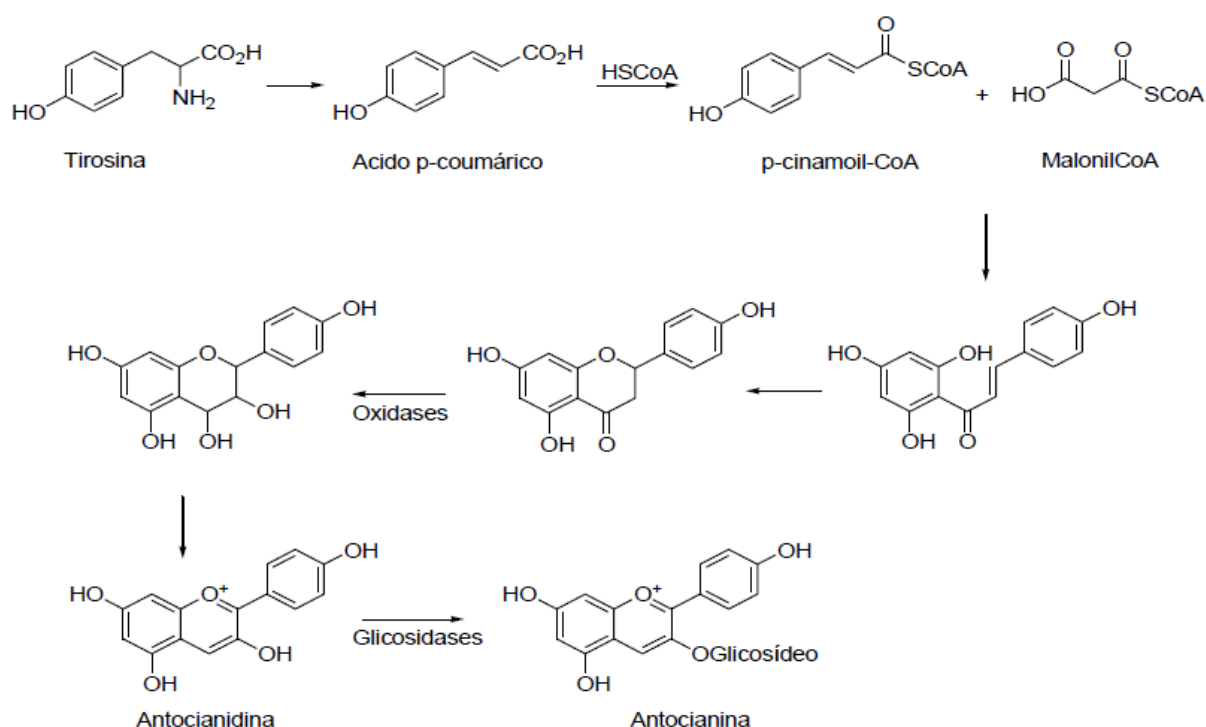


Figura 3. Biossíntese das antocianinas.

- **GÊNERO *Inga*: Bioatividade, Química e Quimiodiversidade**

O gênero *Inga* Miller (FabaceaeMimosoideae) possui aproximadamente 300 espécies de distribuição neotropical⁴⁶. A terminologia *Inga* deriva do vulgar indígena (tupi), angá = ingá, que significa “que possui semente envolvida”⁴⁷.

Os tegumentos (“casca” da semente) destas espécies parecem estar aderidos inseparavelmente ao endocarpo, os cotilédones (primeiras folhas que surgem dos embriões) são protegidos contra o sol através das antocianinas e pela predação através dos taninos.⁴⁸

Em consequência da variabilidade morfológica de espécies deste gênero persiste uma divergência taxonômica considerável. No entanto, a presença dos derivados de ácidos pipecólicos, presentes em 47 espécies de *Inga*, constitui uma característica relativamente constante destas espécies, e sua diversidade química os torna particularmente útil na resolução de problemas taxonômicos nesse gênero⁴⁹.

Etnofarmacologia e Bioatividade

Diversas espécies deste gênero são usadas em comunidades indígenas para o tratamento de feridas, dores de ouvido, descongestionante nasal em caso de resfriado, curar espinhas e feridas, antipirético, lavagens intestinais etc.

A espécie *I. edulis*, usada na medicina tradicional como antidiarréico e antiinflamatório, apresentou elevada capacidade antioxidante e capacidade de prevenção contra a oxidação da LDL⁵⁰.

Extrato etanólico de *I. verna* apresentou propriedades inibidoras da xantina oxidase com uma capacidade adicional de sequestro de superóxido. O potencial antioxidante deste extrato foi confirmado pelo método DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazil) que apresentou sequestro de 50% de radicais livres deste radical na concentração de 11,6 µg/mL. Sendo o ácido gálico e o ácido elágico identificados no extrato das folhas, os principais responsáveis por esta atividade.^{51,52}

Os frutos secos da espécie *I. umbratica* apresentaram elevada atividade hemolítica e inibitória contra tripsina (85,8%) e quimotripsina (99,1%). Em outro bioensaio avaliado pelo mesmo autor, esta espécie não mostrou potencial inibitório contra o fator humano Xa, que converte a protombina em trombina, impedindo a conversão de fibrinogênio em fibrina, responsável pela coagulação de sangue em um vaso lesado.⁵³

Em ensaios realizados com as espécies *I. goldmanii* e *I. umbellifera* observou-se atividade inibitória de larvas de *Heliothis*, uma importante praga agrícola conhecida como lagarta-das-maçãs-do-algodoeiro que tradicionalmente ataca cultivos de algodão, soja e tomate. Esta atividade foi atribuída a misturas complexas de monômeros e polímeros de flavan-3-óis, cujas substâncias compreendem mais de 30% do peso seco de folhas jovens de ambas as espécies.⁵⁴

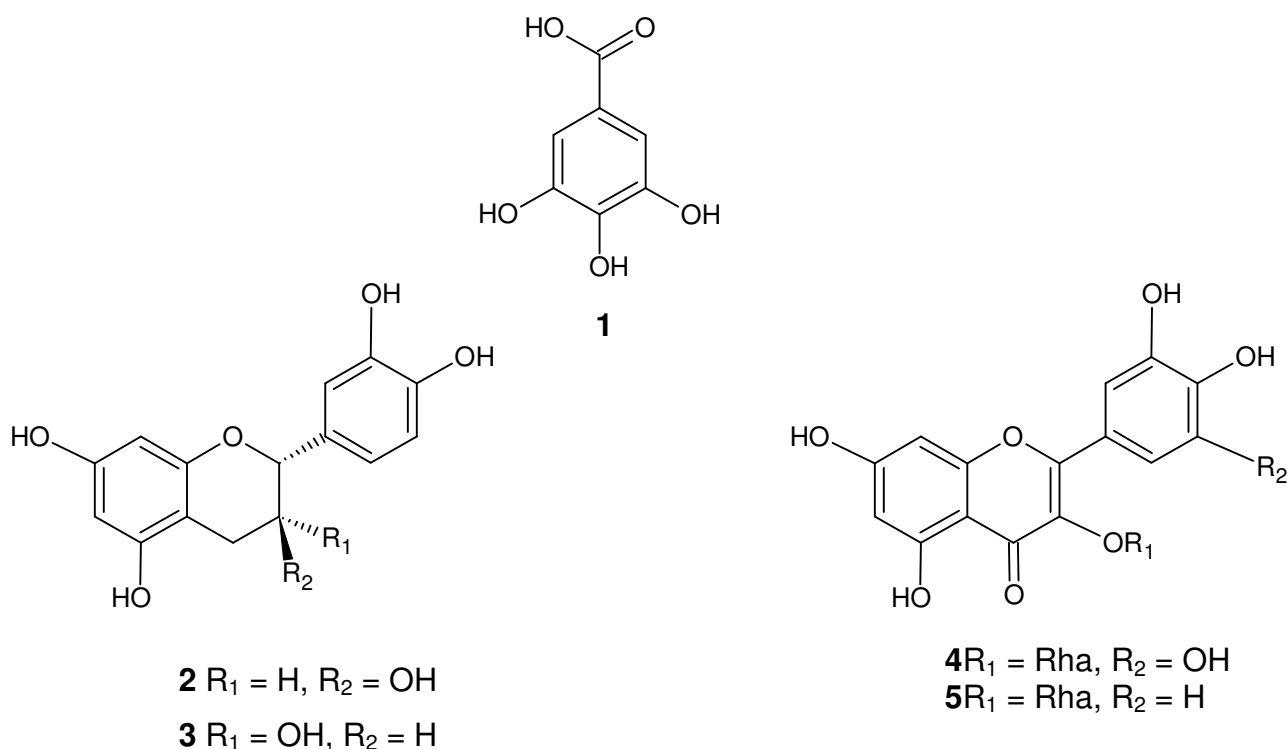
Estudos realizados com o extrato hidroalcoólico das folhas *I. edulis* demonstrou elevado teor de compostos fenólicos e alta capacidade antioxidante e atividade antiulcerogênica.⁵⁵

Química do gênero *Inga*

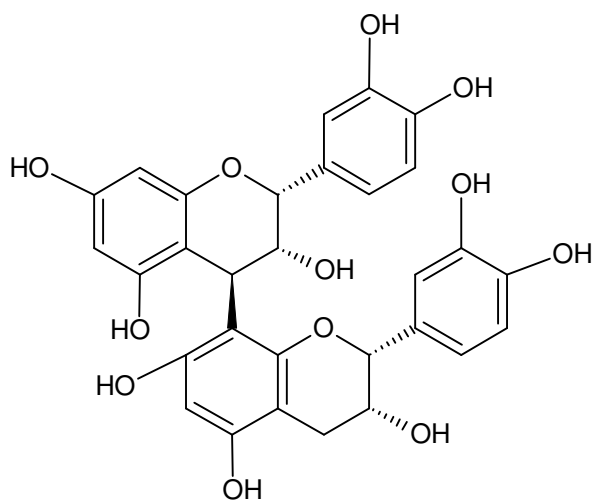
Estudos químicos mostraram que as folhas de espécies do gênero *Inga* possuem grandes quantidades de compostos fenólicos (5-20% da massa seca). As folhas das plantas que crescem em maiores altitudes possuem quantidade de fenóis maior do que as que crescem em baixas altitudes.⁵⁶

As folhas de *I. edulis* apresentaram alta capacidade antioxidante, a qual esta relacionada com a presença das substâncias fenólicas: ácido gálico (1), catequina (2), epicatequina (3), quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (4), miricetina-3-O- α -L-

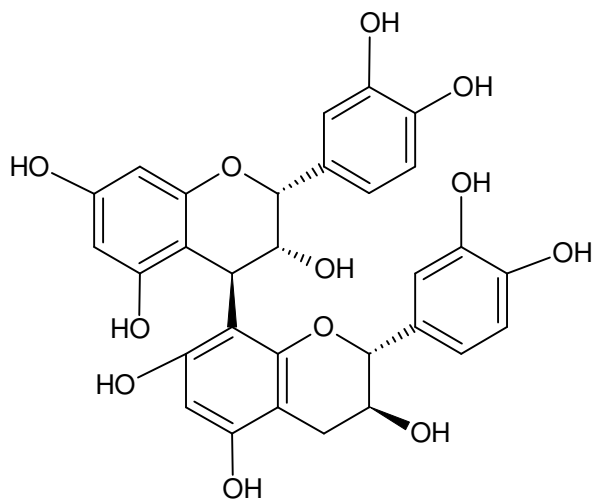
ramnopiranosídeo (5). Estes componentes químicos correspondem a 10% do total de compostos fenólicos da planta.⁵⁷



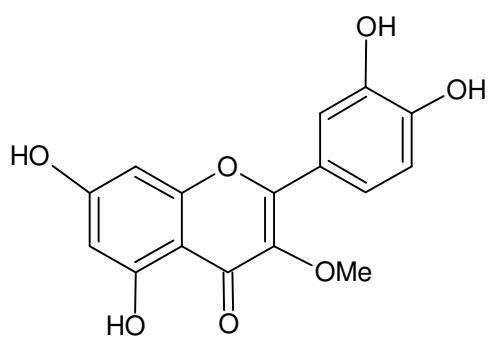
Nas folhas de *I. edulis* foram identificados os taninos proantocianidina B1(6) e proantocianidina B2 (7)⁴⁶ e nas raízes foram identificados os flavonóides 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-metoxiflavona (8), 5,7,4'-triidroxi-6,8-dimetilflavona (9) e 6,3',4'-triidroxi aurona (10).⁵⁸



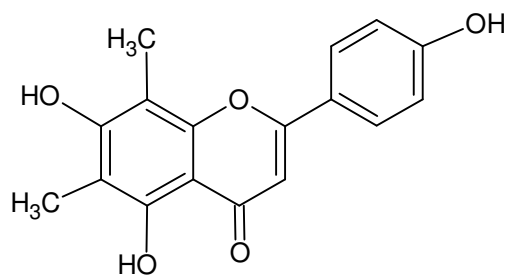
6



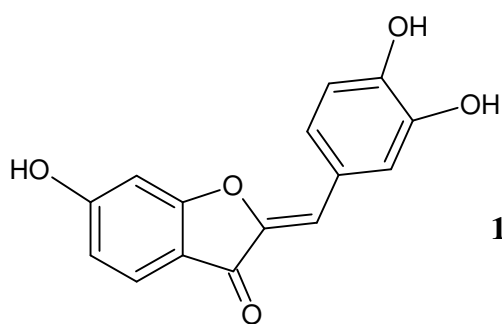
7



8

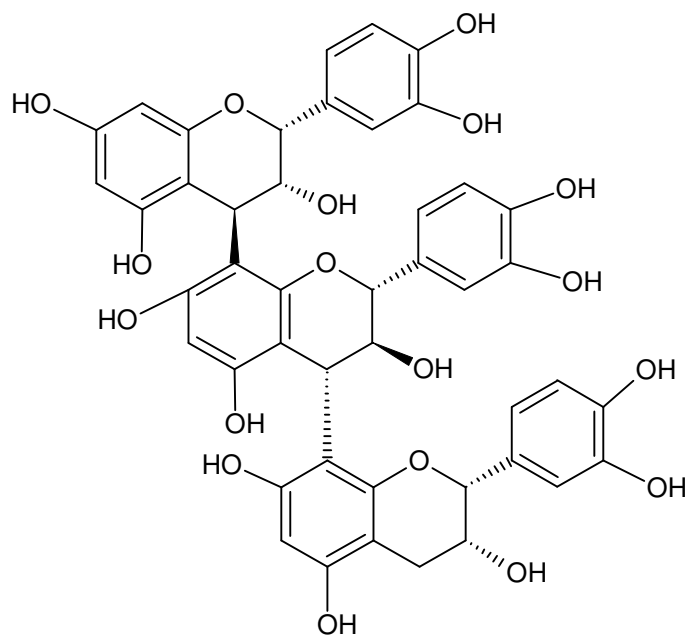


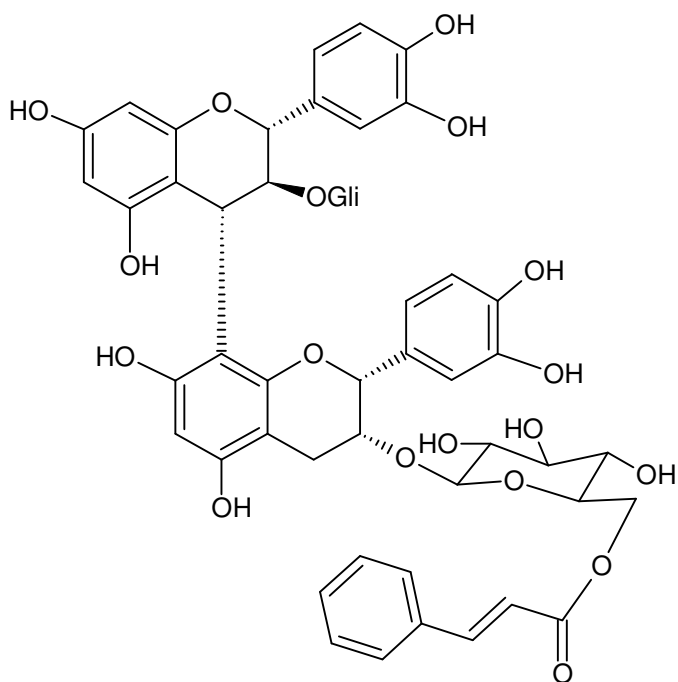
9



10

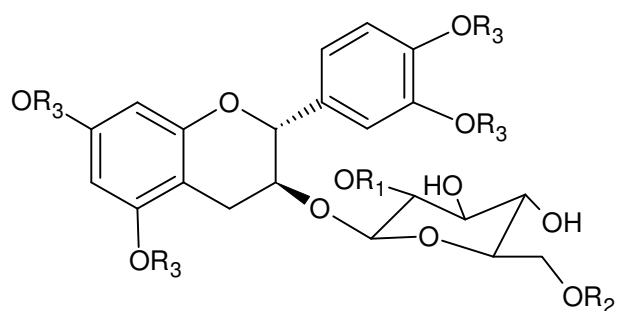
Estudos realizados por Lokvam e Kursar⁵⁹ mostraram diversos fenólicos nas espécies *I. goldmanii* e *I. umbellifera*, entre eles um trímero de procianidina (*epicatequina-4 β -8-catequina-4 α -8-epicatequina*) (**11**) em *I. goldmanii* e um dímero de procianidina (*catequina-3-O- β -D-glucopirano-catequina-(4 α -8)-epicatequina-3-O- β -D-glucopirano-(6-cinamoil)-piranosídeo*) (**12**) em *I. umbellifera*.

**11**

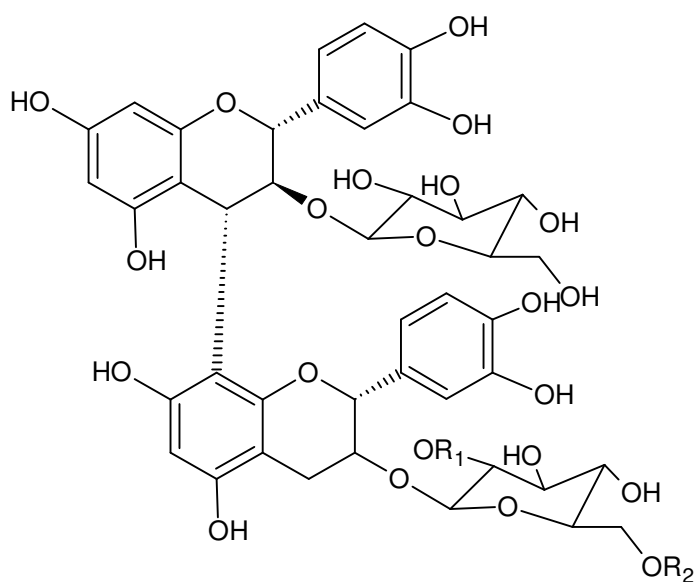


12

Na espécie *I. umbellifera* foram identificadas cinco estruturas inéditas de flavan-3-óis, sendo os três monômeros de catequina (+)-catequina-3-*O*- β -D-glucosídeo (2-cinamoil)-piranosídeo (**13**), (+)-catequina-3-*O*- β -D-glucosídeo(6-cinamoil)-piranosídeo (**14**) e (+)-catequina-3-*O*- β -D-glucosídeo(2,6-bis-cinamoil)-piranosídeo (**15**) e as duas procianidinas diméricas catequina-3-*O*- β -D-glucopirano-(4 α -8)-catequina-3-*O*- β -D-glucosídeo(2-cinamoil)piranosídeo (**16**) e a catequina-3-*O*- β -D-glucopirano-(4 α -8)-epicatequina-3-*O*- β -D-glucosídeo (6-cinamoil) piranosídeo (**17**)⁶⁰

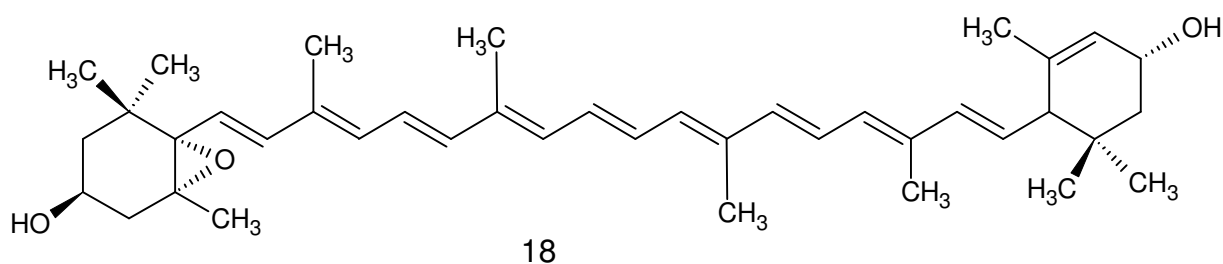


Composto	R ₁	R ₂	R ₃
13	H		H
14		H	H
15	H	H	CH ₃
16			

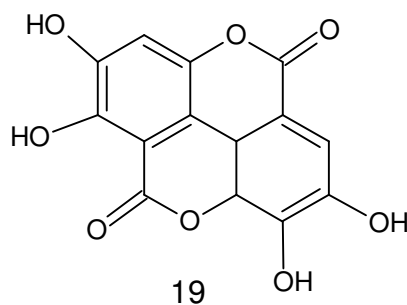


17

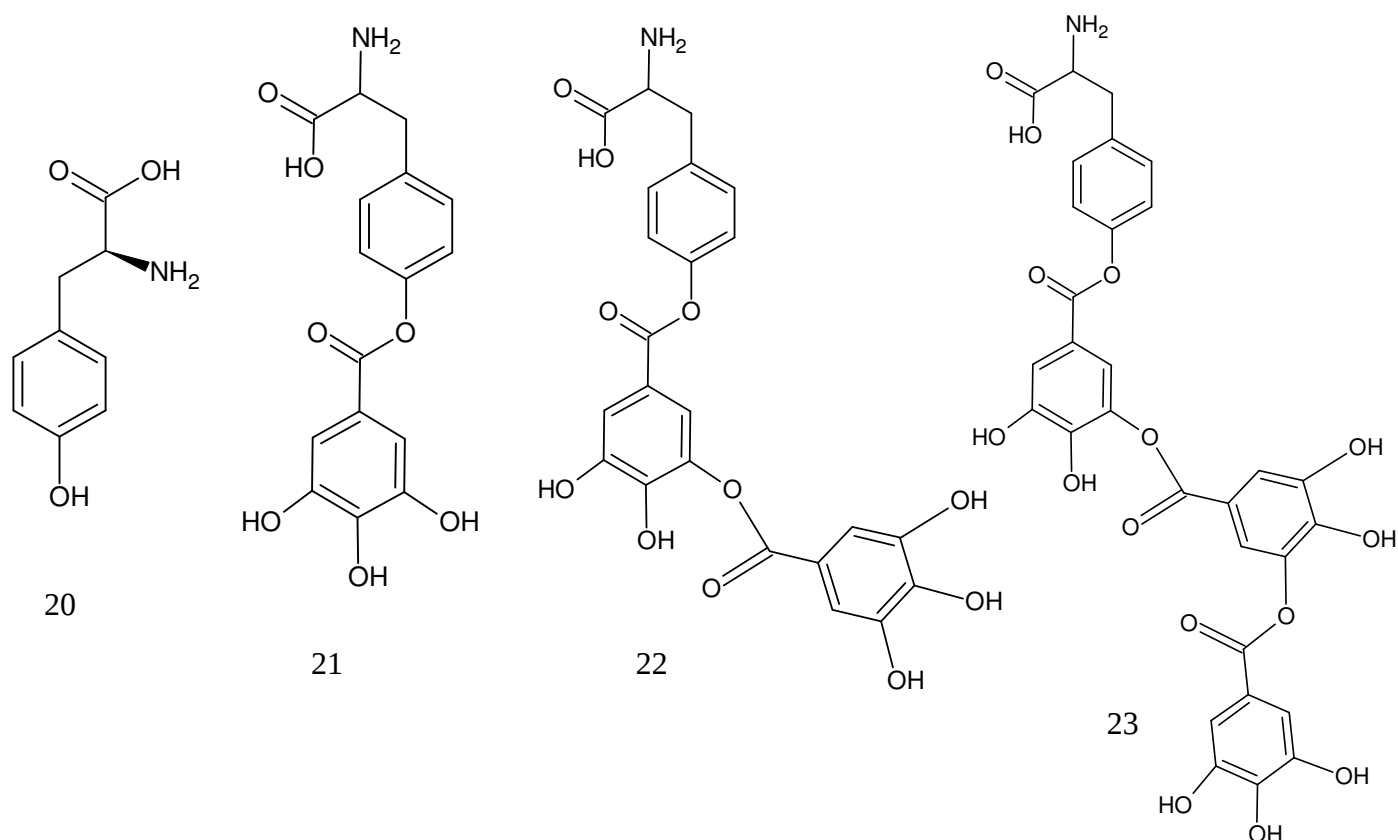
Na espécie *I. sapindoides* foi identificada a presença da 5,6-epoxidoluteína (18)⁶¹.



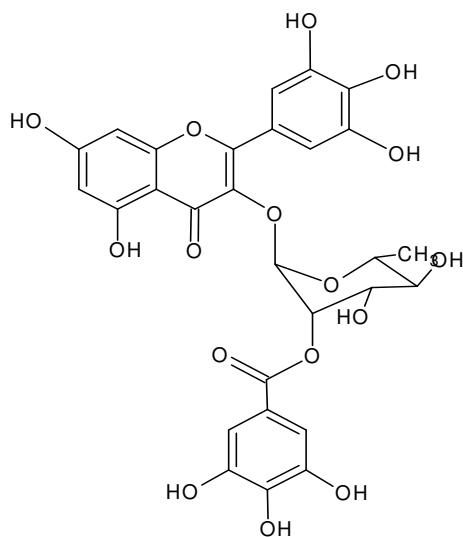
Na espécie *I. verna* foram identificados os fenólicos ácido gálico e ácido elágico (**19**).⁵¹



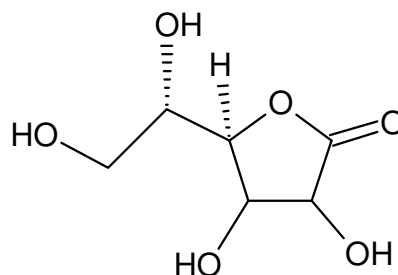
Além do aminoácido L-tirosina (**20**) foram encontradas altas concentrações de galoil (**21**), *m*-digaloil (**22**) e *m*-trigaloil-L-tirosina (**23**) em folhas jovens de *I. laurina*. Estes compostos são importantes para defesa química vegetal durante a fase da expansão foliar.⁶²



Também foram identificados desta espécie, em elevada concentração, o flavonoide miricetina 3-O- α -(2''-O-galoil)-ramnopiranosídeo (**24**) e o ácido ascórbico (**25**)⁶³.



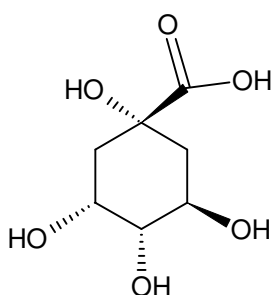
24



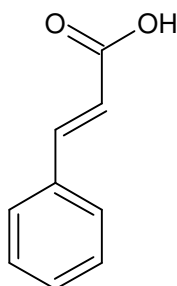
25

Na espécie *I. marginata* foram detectados taninos, saponinas, fitoestéroides e triterpenos.⁶⁴

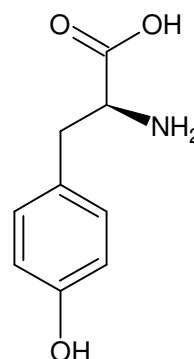
Estudos desenvolvidos por Kursar e colaboradores⁶⁵ com 37 espécies do gênero *Inga* mostraram em sua composição química ácidos quínico (**26**), gálico, cinâmico (**27**), tirosina (**28**), derivados de tirosina e tiramina (**29**) nas suas formas pura ou conjugadas. Neste trabalho a substância fenólica mais encontrada nas espécies foram os taninos condensados.



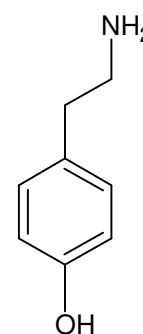
26



27



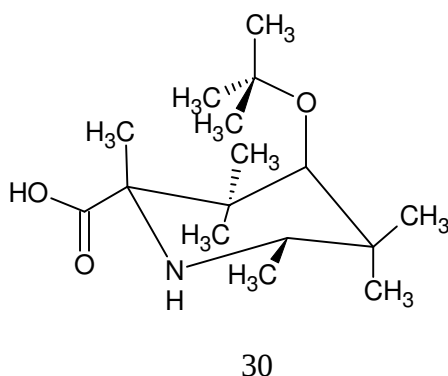
28



29

Ácidos pipecólicos hidroxilados foram caracterizados nas espécies *I. brenesii*, *I. longispica*, *I. oerstediana* e *I. Paterno*^{66, 49}. Das folhas da espécie *I. paterno* foi

elucidado um derivado metoxilado de ácido pipecólico inédito, denominado ácido *trans*-4-metoxipipecólico (30).⁶⁶



Para este estudo foram escolhidas as espécies *I. edulis*, *I. laurina* e *I. marginata*, para as quais foram encontradas importantes atividades biológicas associadas as suas substâncias fenólicas.

- *Inga edulis*

A espécie *Inga edulis* é conhecida popularmente como angá, ingá-cipó, ingá-macarrão, ingá-de-macaco, ingá-de-metro ou ingá-rabo-de-mico, sendo encontrada na região Amazônica e em toda a orla litorânea desde o Rio Grande do Norte até o norte de Santa Catarina na floresta pluvial Atlântica. Encontrada com facilidade nas margens de rios e lagos ou em regiões que se alagam facilmente. Seus frutos em forma vagem são comestíveis e possuem sementes que estão envoltas por uma polpa branca flocosa e adocicada.⁶⁷



Figura 3. Detalhes das flores, folhas e partes do fruto de *Inga edulis*(Fonte: OTS Plant Database)

- *Inga laurina*

A espécie *Inga laurina* é conhecida como: ingá-branco, ingá-de-chichica, ingá-de-macaco, ingá-de-praia, ingá-mirim ou ingá⁶⁸. Possui ampla distribuição no país desde a Amazônia até o Nordeste e daí para o sul até o Paraná, em quase todas as formações vegetais. Também encontrada nos demais países da América Latina, Central e Caribe. Seus frutos em forma vagem são comestíveis e contêm semente envolta por uma polpa flocosa branca e adocicada⁶⁹.



Figura 5. Detalhes das flores e partes do fruto de *Inga laurina* (Fonte: OTS Plant Database)

- *Inga marginata*

A espécie *Inga marginata* é conhecida como ingá, ingá-dedo, ingá-feijão, ingá-mirim e ingazinho. É encontrada na América Central e do Sul e é amplamente distribuída no território brasileiro em matas ciliares. Encontra-se preferencialmente em ambientes úmidos, alcança até 20 m de altura quando adulto. Pode ser reconhecido por um tronco curto e liso, com copa arredondada. Possuem frutos do tipo legume, que fornecem uma semente envolta por uma camada adocicada e comestível⁷⁰.



Figura 6. Detalhes das flores e do fruto de *Inga marginata* (Fonte: OTS Plant Database)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolamento, purificação e determinação estrutural de substâncias de espécies de *Inga*. Avaliar o potencial antitumoral dos extratos, frações e substâncias de espécies de *Inga* (Fabaceae Mimosoideae). Emprego de técnicas analíticas hifenadas, LC-SPE-TT e espectroscopia de RMN para a desreplicação e obtenção de perfis metabólicos dos extratos e frações semi-purificadas já obtidas de *Ingalaurina*, *Inga edulis* e *Inga marginata*.

2.2 Objetivos específicos

1. Fracionar e purificar as substâncias presentes nos extratos obtidos dos frutos, folhas e raque foliar de *I. laurina*, *I. marginata* e *I. edulis*.
2. Avaliar o potencial antitumoral dos extratos de *I. marginata*, *I. edulise I. laurina*, bem como das substancias isoladas a partir destes extratos.
3. Traçar um perfil químico micromolecular e comparar a composição química das partes do fruto (polpa, casca e semente), das flores e das folhas (folíolos e raque foliar) de *Inga laurina* e das folhas (folíolos e raque foliar) de *I. marginata* e *I. edulis*.
4. Comparar o perfil cromatográfico das frações obtidas com o extrato bruto das demais espécies através do uso de CLAE-DAD, CLAE-EM e de substâncias padrão anteriormente isoladas, assim como, identificar os constituintes majoritários das frações analisadas.
5. Identificar ou elucidar a estrutura química das substâncias isoladas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais, Equipamentos e Técnicas Utilizadas.

Solventes

- metanol: grau HPLC das marcas JT Baker® e Tedia;
- água: purificada com sistema Milli-Q da marca Millipore;
- hexano: grau HPLC da marca JT Baker®;
- acetato de etila: grau HPLC da marca JT Baker®;
- n-butanol: grau PA da marca Synth;
- acetato de etila, metanol e etanol: grau PA;
- ácido clorídrico: grau HPLC da marca JT Baker®.

Os solventes deuterados (metanol- d_4 , dimetilsulfóxido- d_6) foram da marca Cambridge Isotope Laboratories (CIL).

Reagentes

- Solução de anisaldeído (0,5mL de anisaldeído, 10,0mL de ácido sulfúrico concentrado e 85,0mL de MeOH) foi preparada com a adição dos reagentes em banho de gelo. Tal solução foi acondicionada em vidro âmbar e armazenada a 8° C para uso na revelação de CCD.

Concentração dos extratos

Para concentração dos extratos foram utilizados dois rotavaporadores:

- Rotavapor R-220, marca: Büchi, com bomba de vácuo Vacuum Controller V-805, marca: Büchi e circulador de água.
- Rotavapor Waterbath B-480, marca: Büchi, com bomba de vácuo MA-057/3, marca: Marconi e circulador de água.

Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Nestas análises foram utilizadas placas comerciais de sílica gel de fase normal (20 x 20 cm X 0,2 mm) ou em sílica de fase reversa (C18) (20 x 20 cm X 0,2 mm) ambas da marca Sorbent.

Cromatografia em coluna (CC)

Foram utilizadas colunas de vidro de dimensões compatíveis com a massa das amostras. A escolha da série de eluente e da fase estacionária foi realizada de acordo com as características da amostra. Como fase estacionária utilizou-se sílica

gel 60G (0,063-0,200mm) da Merck, 70-230 mesh para CC “flash”. Para frações mais polares utilizou-se sílica derivatizada com octadecilsilano LiChroprep® RP-18 40-63 µm da Merck ou gel polimérico 62 Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector com Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos foi utilizada na obtenção do perfil cromatográfico e também para monitoramento das subfrações obtidas através da purificação dos extratos provenientes das partições.

- O cromatógrafo *Shimadzu* equipado com duas bombas *Shimadzu* LC-10AD, auto injetor *Shimadzu* SIL 10A, detector de arranjo de diodos UV-VIS modelo *Shimadzu* SPD MX AVP. A aquisição e o tratamento de dados foram realizados via computador tipo *Pentium II* 500MHz utilizando software *Shimadzu CLASS LC10* (versão 1.64A). As análises realizadas em ambos os cromatógrafos no modo analítico na condição para gradiente exploratório em coluna cromatográfica Phenomenex Luna C18 (250 x 4.6mm), 5µm - a temperatura ambiente, fluxo de 1mL min⁻¹, volume de injeção foi de 30µL.

Análises por HPLC-MS

Parâmetros do equipamento de HPLC da Agilent 1200 Series, autosampler 1200 Series, detector DAD 1260, bomba quaternária 1200, e forno para coluna 1200 Series.

Coluna: Phenomenex Luna C18 (2) (250 x 4.6mm) 5µm

Solventes: H₂O + 0.1% de ácido fórmico e Metanol + 0.1 % de ácido fórmico, tempo de análise 52 minutos, volume de injeção: 10µL, fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna 40°C.

Condições do espectrômetro de massas 3200 QTRAP (quadrupolo – ion trap linear), Ionização por electrospray (Turbo Ion Spray) no modo positivo e no modo negativo.

Parâmetros da fonte de ionização no modo positivo: Ion Spray: 5500 V, Curtain Gas: 20 psi, Temperatura: 650°C, Gas 1: 50psi, Gas 2: 50psi, Interface heater: ON, DP (Declustering Potential) 35.0 V, EP (Entrance Potential) 10.0 V e CEP (Cell entrance potential) 20.0 V.

Modo de varredura de íons (Q1): 120 – 920 Da

Todas as amostras foram dissolvidas em 1 mL de metanol e diluídas 1:10 antes da injeção. Inicialmente, as análises foram realizadas no modo positivo e analisadas pela varredura de íons (full scan) utilizando o analisador Quadrupolo.

Sistema HPLC-SPE-TT

HPLC: Cromatógrafo Agilent 1260 Infinity, Bomba quaternária 1260 Quat Pump, Auto sampler 1260 ALS, Detector de arranjo de fotodiodos 1260 DAD VL, Injetor automático para 96 vials de 2 mL.

SPE: Sistema de extração em fase sólida Bruker/Spark Prospekt II com 192 cartuchos HySphere com adsorventes de resinas GP, CN, C2, C8, C18, resina SH e trocadores catiônico e aniônico.

TT: Transferidor e preparador automático de amostras Automatic Liquid Handling (Gilson), entrada: eluente dos cartuchos SPE, saída: tubos de RMN (tipo Match).

Softwares: HyStar: Controle automatizado do trapeamento, AMIX Basic: análise quimiométrica de dados de RMN 1D e 2D.

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN mono e bidimensionais das substâncias e frações foram obtidos no Espectrômetro Varian Inova 500®, Espectrômetro Bruker Avance III HD 600 (14,1 T) equipado com uma criossonda e Espectrômetro Bruker 300 Fourier (7,1 T).

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

As espécies de *Inga* (*I. marginata*, *I. laurinae* *I. edulis*) coletadas no bioma Cerrado foram obtidas na Fazenda Berrante - Usina Nova América de Tarumã e identificadas pela Dra. Giselda Durigan. A espécie *Inga edulis* coletada no bioma Amazônia foi coletada no município de Mâncio Lima, Acre. Sua exsicata foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

3.2.2 Obtenção do extrato bruto

O material vegetal (folhas, raque foliar e frutos) foi seco à temperatura ambiente, triturado em moinho de facas e pesados em balança analítica. Submeteu-se a cinco extrações com etanol em banho de ultra-som e concentrou-se em rotaevaporador, fornecendo o Extrato Etanólico (EtOH). Foram separadas alíquotas

dos extratos brutos secos para contraprova, para realização de CCD, para comparação com as frações da partição e para realização de bioensaios.

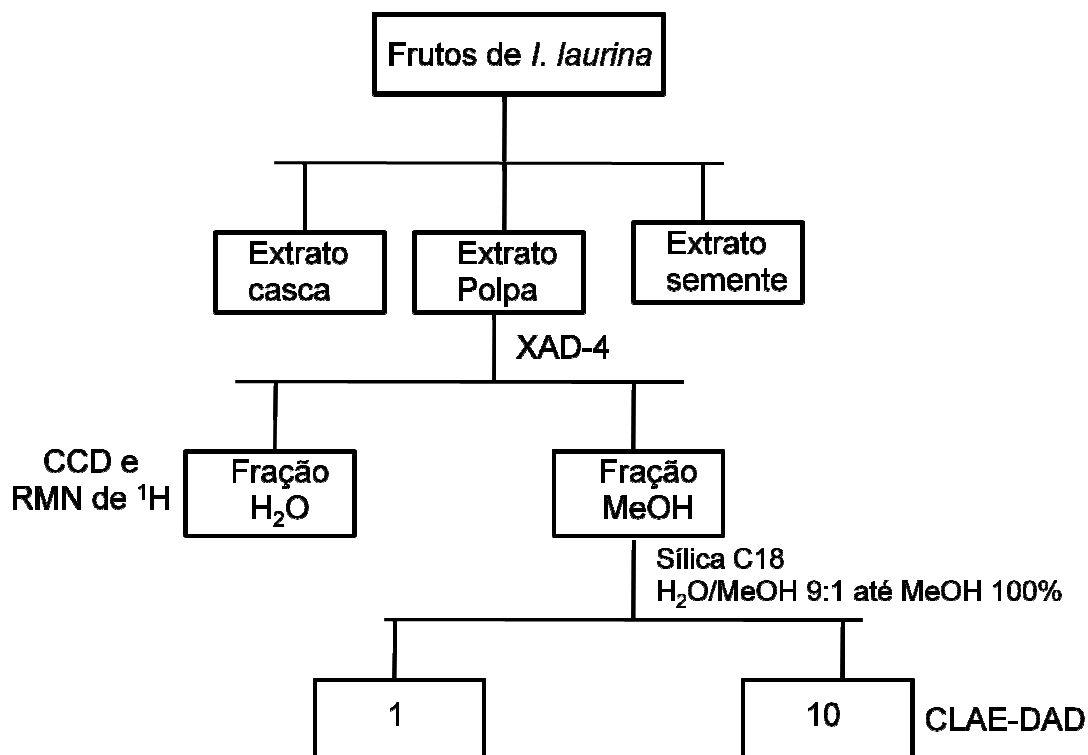
3.2.3 Partição dos extratos brutos

O extrato EtOH das folhas das três espécies foi dissolvido em 400mL de MeOH/H₂O e submetido a partição líquido-líquido com solventes orgânicos, fornecendo quatro frações de polaridades crescentes: fração hexânica (Hex.), fração AcOEt, fração n-butanol (BuOH) e fração hidrometanólica (Ha). Foram separadas alíquotas para realização de bioensaios, obtenção de perfis cromatográficos e análises de RMN.

3.2.4 Detecção, isolamento e caracterização dos constituintes químicos

3.2.4.1 Estudo químico dos frutos de *I. laurina*

Os frutos de *Inga laurina* foram inicialmente separados em polpa, casca e semente e, em seguida, extraídos com etanol em banho de ultra-som. Os extratos etanólicos da polpa, casca e semente foram submetidos ao fracionamento cromatográfico com Amberlite XAD-4 fornecendo duas frações: 1- fração metanólica, onde estão concentrados os compostos de interesse e 2- a fração aquosa, rica em açúcares livres, esta informação foi obtida com base na análise dos espectros de RMN de ¹H de ambas as frações. Ambas as frações foram submetidas a triagem química em CCD e RMN ¹H a fim de verificar a eficiência da separação e traçar um perfil químico preliminar das mesmas. As frações metanólicas de todas as partes do fruto foram submetidas a fracionamento por CC no modo reverso de eluição e as frações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD em coluna analítica C-18.



Fluxograma 1. Esquema geral do tratamento cromatográfico das partes dos frutos de *I. laurina*.

Tabela 1. Condições cromatográficas da análise em CLAE-DAD das frações das partes dos frutos de *I. laurina*

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
H ₂ O	MeOH	0	5
		60	100

Fluxo: 1 mL/min, volume de injeção: 20 µL, Coluna: Phenomenex Luna C18(partículas 5 µm), fases acidificadas com 0,1% de HCOOH.

3.2.5 Estudo químico de *Inga marginata*

3.2.5.1 Estudo químico das folhas de *I. marginata*

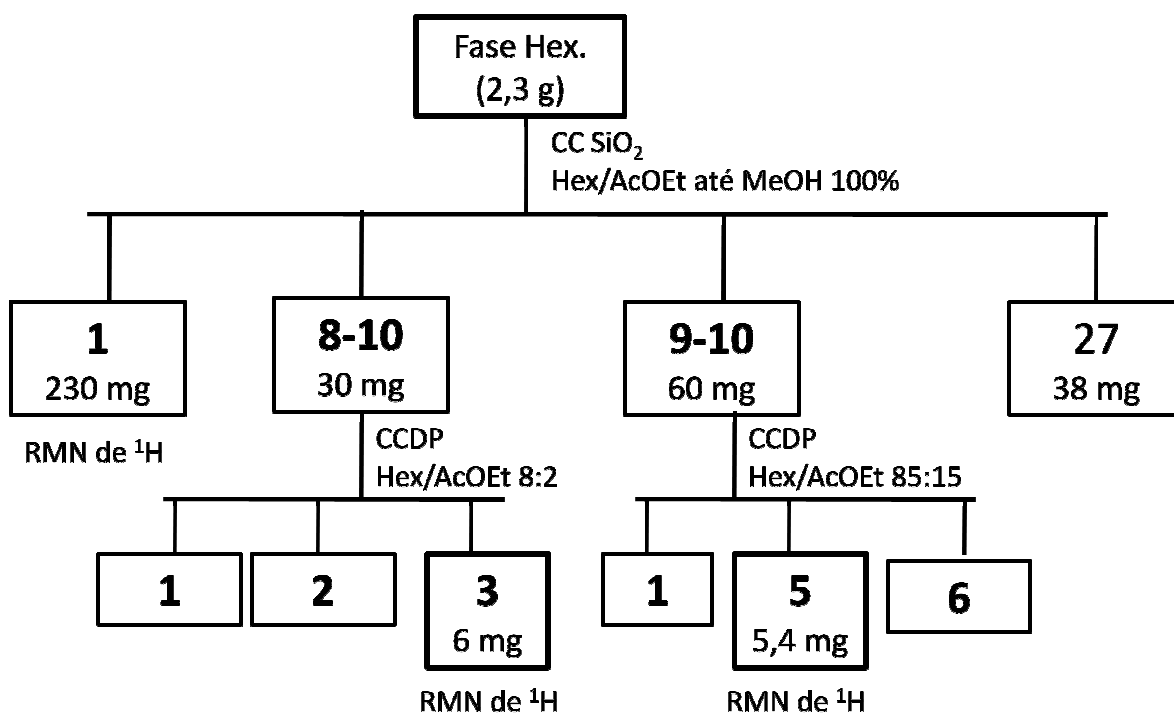
Estudo dos constituintes de baixa polaridade (Hex.)das folhas de *I. marginata*

A fase hexânica (2,3 g) foi submetida ao fracionamento químico em coluna cromatográfica de Silica gel 60 e eluída com gradiente de Hexano/AcOEt até MeOH

puro fornecendo 27 frações de 150 mL. Estas frações foram submetidas à análise em CCD para verificar o grau de pureza e a similaridade entre elas. A primeira fração nos forneceu 230 mg de um óleo amarelo que apresentou-se com elevado grau de pureza na análise por CCD e, por isso, foi enviado para a análise de RMN de ^1H .

A reunião das frações 8-10 (30 mg) apresentou poucas manchas de polaridades distintas e foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) de sílica fase normal e eluída com Hex/AcOEt 8:2, fornecendo três frações. As frações obtidas foram analisadas por RMN de ^1H para possível caracterização das substâncias terpênicas observadas na análise em CCD com revelador anisaldeído.

A fração 12 (200 mg) apresentou em CCD manchas com boa resolução e quantidade de massa adequada para continuidade do estudo. Esta fração foi então submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel 60 e eluída com misturas de hexano, AcOEt e MeOH para obtenção de substâncias puras ou frações enriquecidas com terpenóides. As frações 9 a 10 (60 mg), após agrupadas, foram purificadas por CCDP de sílica fase normal e eluída no sistema Hex/AcOEt 85:15, fornecendo 6 frações, que foram posteriormente analisadas por RMN de ^1H para caracterização de seus constituintes.



Fluxograma 2. Fracionamento cromatográfico da fase hexânica das folhas de *I. marginata*.

As frações (3 e 5) analisadas por RMN de ^1H mostraram uma mistura de triterpenos (**substâncias 1, 2, 3 e 4**)

• ***Estudo dos constituintes das fases AcOEt e BuOH das folhas de I. marginata***

As fases de partição AcOEt e BuOH foram fracionadas em coluna cromatográfica aberta e suas frações foram analisadas por CCD e RMN de ^1H para obtenção de substâncias puras ou frações enriquecidas.

A fase AcOEt (1,0 g) do extrato das folhas de *I. marginata* foi submetida a fracionamento cromatográfico em CC utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C18) eluída em gradiente de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95:5 até MeOH 100% fornecendo 10 sub-frações.

Com o objetivo de conhecer o perfil cromatográfico para a detecção de outras substâncias, as frações obtidas desta CC foram submetidas à análise por CLAE-DAD monitorando em 254nm. Injetou-se 20 μL de cada fração (concentração de 1 mg/mL) em coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18 (250mm x 4,60mm e 5 micra), eluída em gradiente de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95:5 até MeOH puro durante 50 min, fluxo de 1mL/min.

A fração 5 (2,0 mg) apresentou dois picos majoritários nesta análise, com tempos de retenção de 18,45 min e 19,06 min.

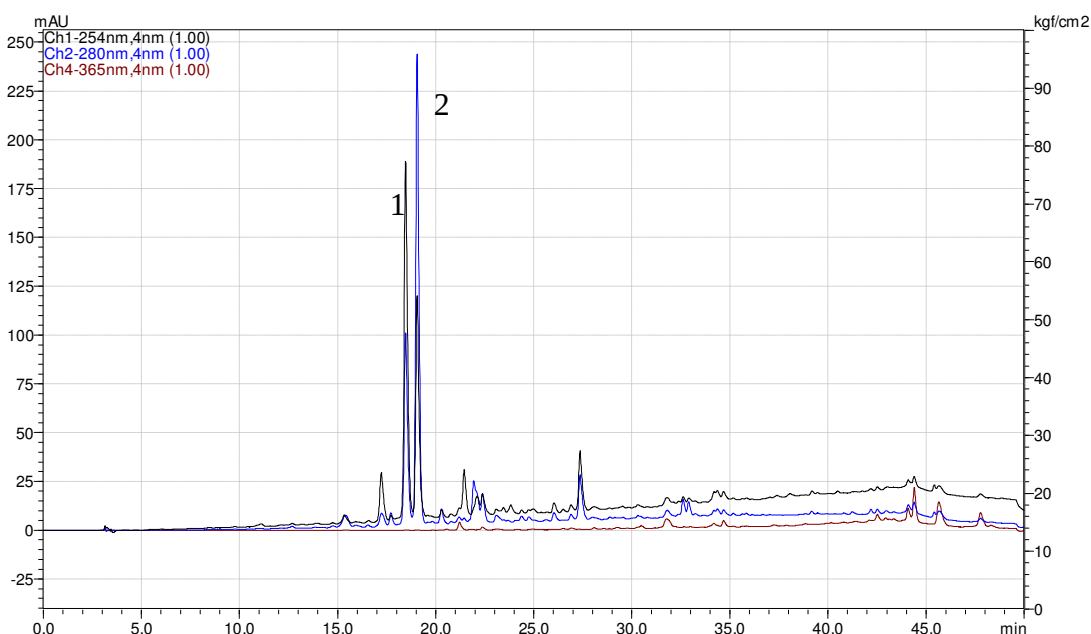
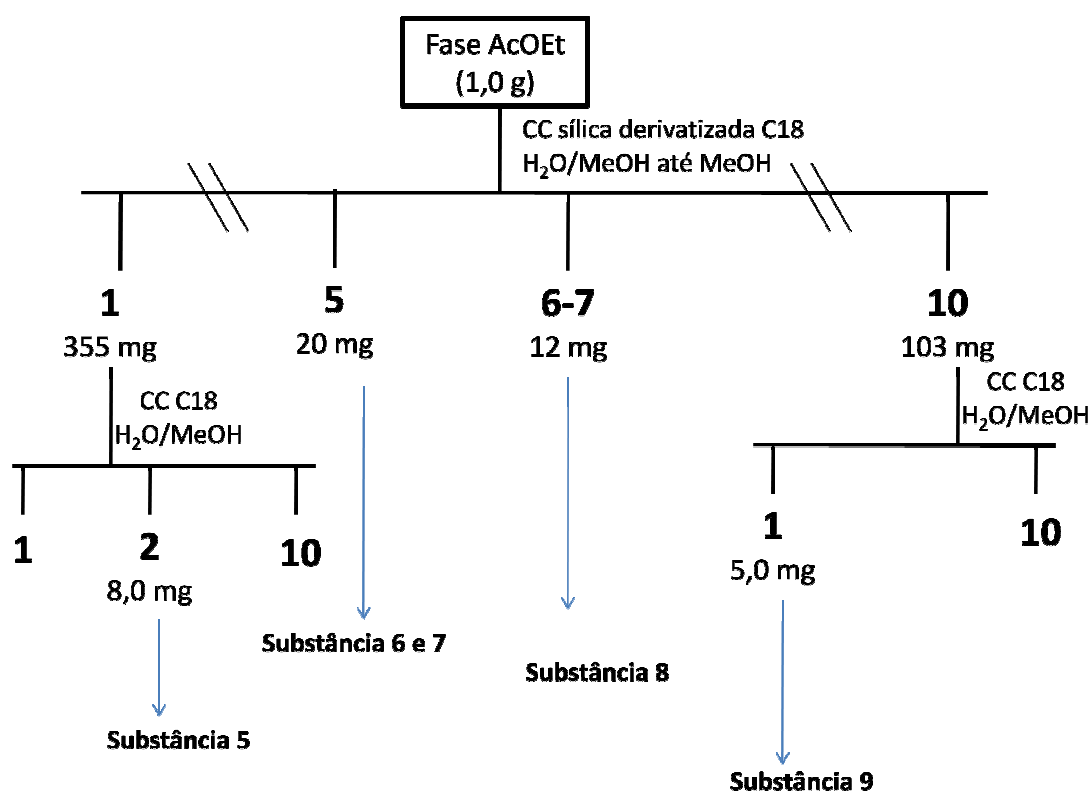


Figura 7. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 5 da fase AcOEt do extrato das folhas de *Inga marginata*.

A fração obtida em MeOH 100% (fração 10) foi fracionada em coluna cromatográfica com sílica derivatizada (C18) eluída em gradiente de H₂O/MeOH 95:5 até MeOH 100% fornecendo 10 sub-frações. A fração menos polar deste fracionamento forneceu uma substância fenólica que após análise espectral foi caracterizado como sendo o ácido *p*-cumárico.

As frações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD pelo mesmo método utilizado para obtenção dos perfis cromatográficos e, em seguida, analisadas por RMN de ¹H. A análise dos cromatogramas das frações mais polares indicou a presença de um composto majoritário, que após análise do seu espectro de UV e do tempo de retenção com padrão autêntico mostrou ser um flavonóide.



Fluxograma 3. Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt do extrato das folhas de *I. marginata*.

A fase butanólica (1,0 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico utilizando como fase estacionária sílica derivatizada C18 e eluída em gradiente de

H₂O/MeOH 95:5 até MeOH 100% fornecendo 10 sub-frações. A fração 1 foi submetida à cromatografia de exclusão (Sephadex LH-20 eluída com MeOH/H₂O 7:3), resultando em 6 sub-frações. Todas as frações foram submetidas a análise por CLAE-DAD (monitorado em 254nm, volume de injeção: 20 µL, coluna analítica “Luna” Phenomenex C-18, fluxo: 1 mL/min, método: gradiente de MeOH 80-100% (MeOH-H₂O). A fração 6 (2,5 mg) apresentou uma substância fenólica majoritária. Porém, devido a quantidade de massa para obtenção de espectros de RMN de ¹³C e 2D e, por estar em mistura com outras substâncias e não foi possível identificar esta substância.

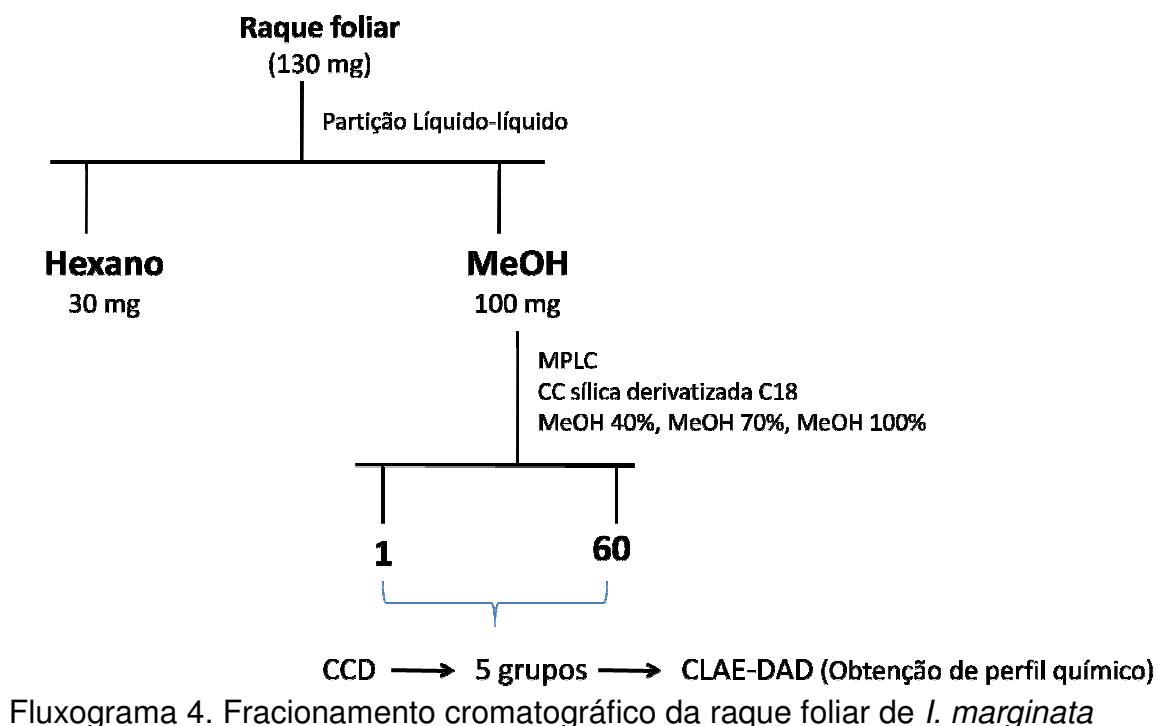
- **Fracionamento biomonitorado para obtenção de substâncias puras ou frações enriquecidas com potencial antitumoral**

Avaliação da atividade antitumoral (citotoxicidade)

Todos os extratos obtidos das espécies de *Inga* foram submetidas à análise de citotoxicidade frente às células HT-29 do cancro do cólon humano (Seo et al., 2001), utilizando doxorubicina como controle positivo. Este ensaio foi realizado no Department of Pharmacognosy and Medicinal Chemistry from College of Pharmacy at The Ohio State University (Columbus, OH - USA).

1.1.1 Estudo químico da raque foliar de *I. marginata*

O extrato etanólico da raque foliar de *I. marginata* apresentou uma promissora atividade antitumoral (ED₅₀ = 13,8 µg/mL) no ensaio avaliado, por isso, foi selecionado para a purificação dos metabólitos ativos. O extrato bruto (130 mg) foi submetido a partição com Hexano e MeOH, e as duas fases de partição obtidas foram avaliadas quanto ao seu potencial antitumoral. A fase metanólica (100 mg) apresentou melhor atividade (ED₅₀ = 7,4 µg/mL) em relação a fase hexânica (ED₅₀ = 20,0 µg/mL) e, por isso foi submetida a purificação por cromatografia líquida de média pressão (MPLC) em coluna de sílica derivatizada C18, com MeOH 40%, MeOH 70% e MeOH 100%. Foram obtidas 60 subfrações que, após análise em CCD, foram reunidas em 5 grupos e, em seguida, foram analisados por CLAE-DAD para obtenção de um perfil químico.



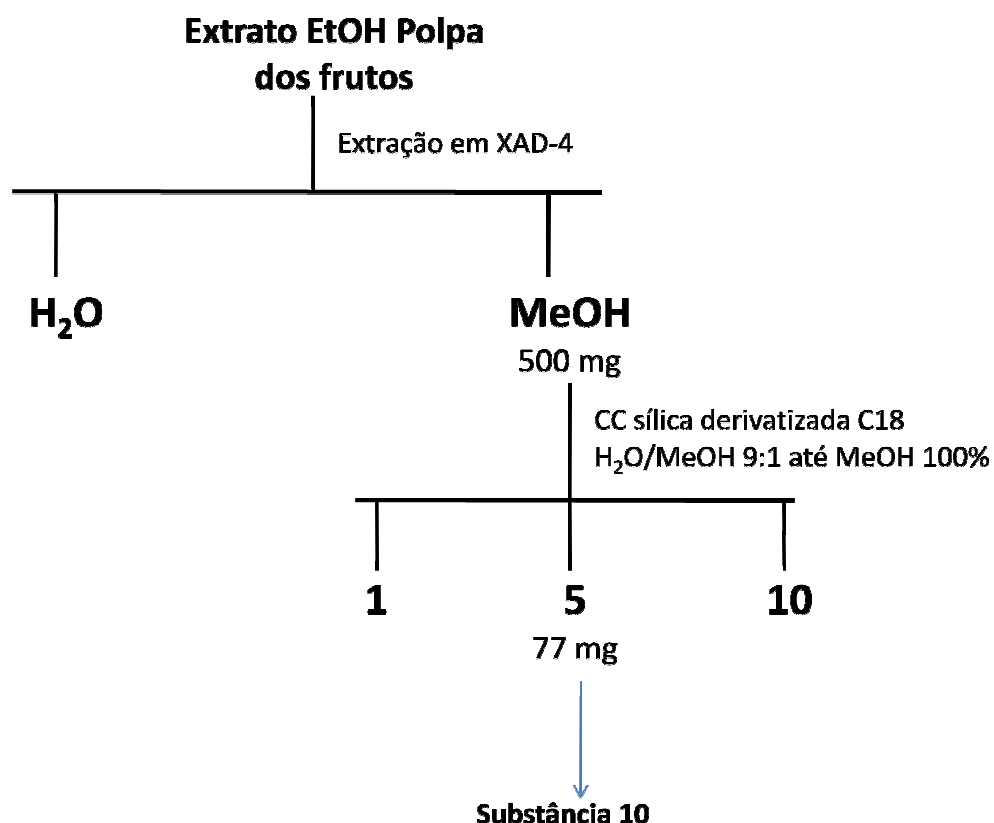
3.2.6 Estudo químico de *Inga laurina*

3.2.6.1 Estudo químico da polpa dos frutos de *I. laurina*

A fração metanólica da polpa do fruto foi submetida ao fracionamento por CC no modo reverso de eluição (sílica derivatizada C-18, gradiente MeOH/H₂O). As dez frações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (monitorado em 254nm, volume de injeção: 20 µL, fluxo: 1 mL/min, gradiente 5-100% MeOH por 50 min).

A fração 5 (77 mg) obtida em H₂O/MeOH 4:6 deste fracionamento forneceu uma substância com elevado grau de pureza, posteriormente identificada como ácido benzóico (substância 10).

A fração aquosa da casca dos frutos mostrou a presença de um flavonoide quando analisado por CLAE, no entanto, sua composição química apresentou-se visivelmente rica em açúcares livres quando analisado por RMN de 1H e por isso não foi possível caracterizá-la.

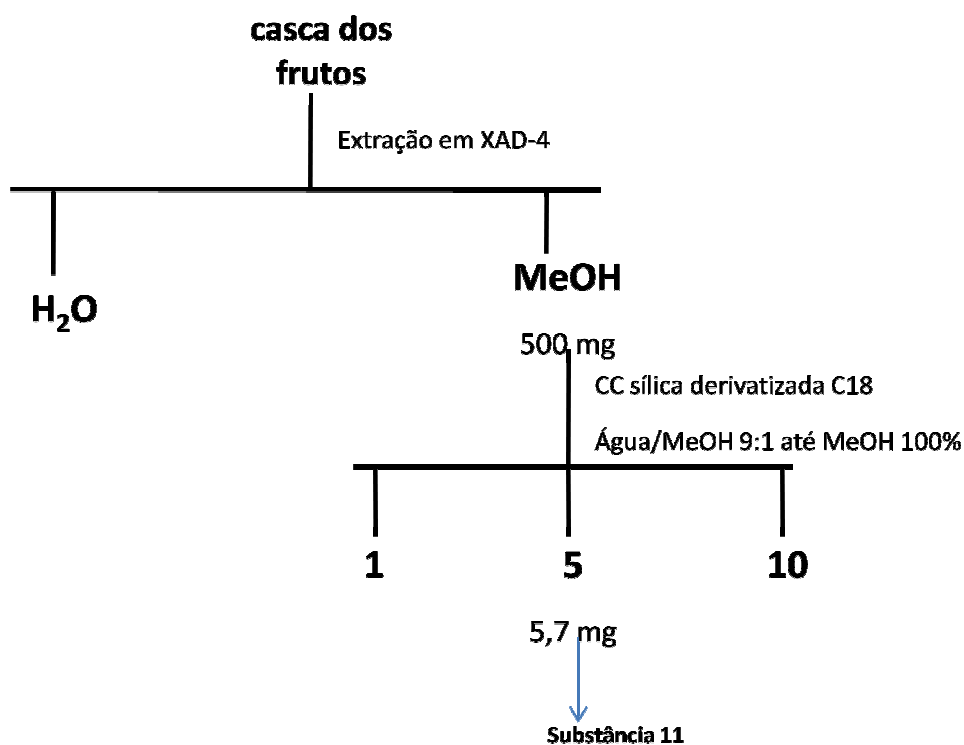


Fluxograma 5. Fracionamento cromatográfico do extrato de polpa dos frutos de *I. laurina*.

3.2.6.2 Estudo químico das cascas dos frutos de *I. laurina*

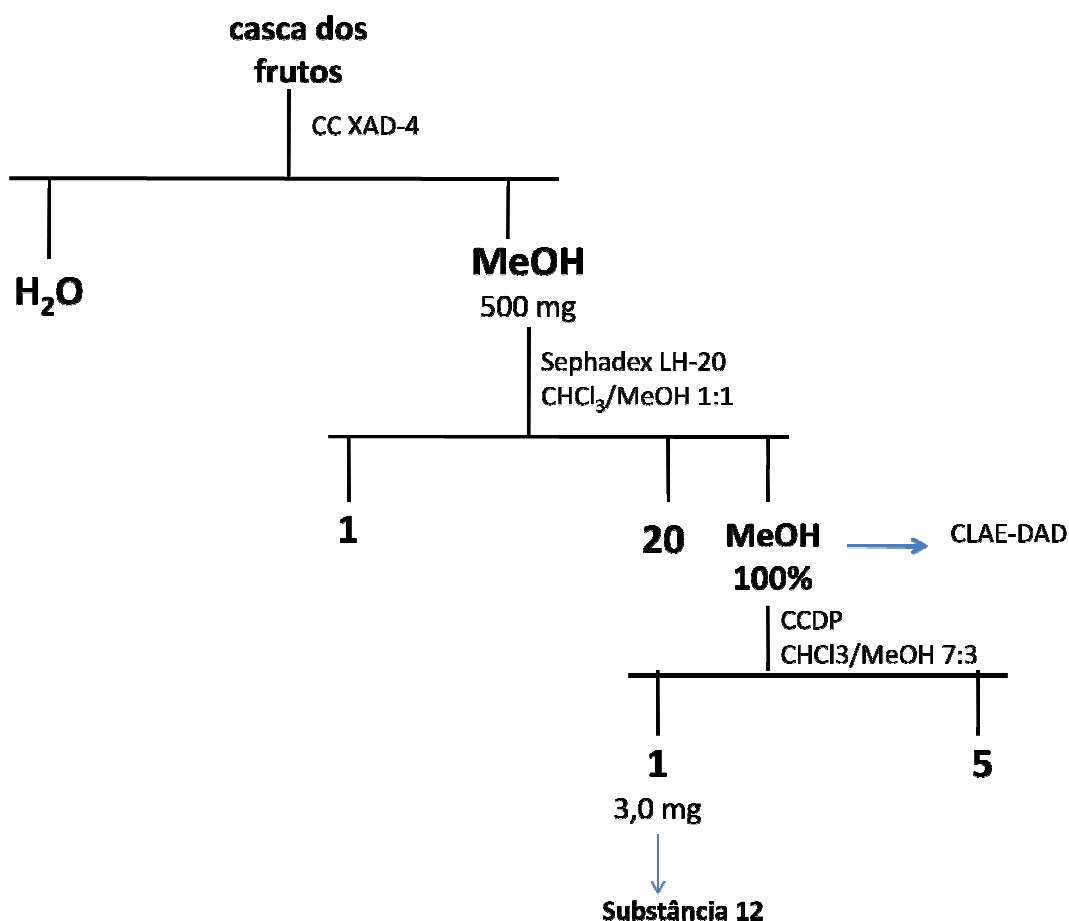
A partir da fração metanólica das cascas dos frutos de *I. laurina* obtidas do tratamento cromatográfico com XAD-4 foram realizados dois fracionamentos.

O primeiro fracionamento da fração MeOH foi realizado no modo reverso de eluição utilizando sílica derivatizada C-18, eluída com H₂O/MeOH 95:5 até MeOH 100%. As 10 subfrações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD (sílica derivatizada C-18, gradiente MeOH/H₂O), cuja análise permitiu verificar a presença de uma substância fenólica majoritária na fração 5 (5,7 mg).



Fluxograma 6. Primeiro fracionamento cromatográfico da casca dos frutos de *I. laurina*.

A fração metanólica das cascas dos frutos de *I. laurina* obtidas do tratamento cromatográfico com XAD-4 foi novamente fracionada em coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1, fornecendo 20 frações. A coluna foi lavada com metanol e esta fração foi submetida a análise por CLAE-DAD. Com base nos seus espectros de absorção na região do UV, foi possível inferir a presença de catequinas, que exibiram uma banda intensa em torno de 280 nm. Essa fração foi submetida a CCDP fornecendo 5 frações. A fração 1 foi analisada por CLAE-DAD e RMN de ^1H , cujos dados permitiram sua identificação como proantocianidina A-2.



Fluxograma 7. Segundo fracionamento cromatográfico do extrato da casca dos frutos de *I. laurina*.

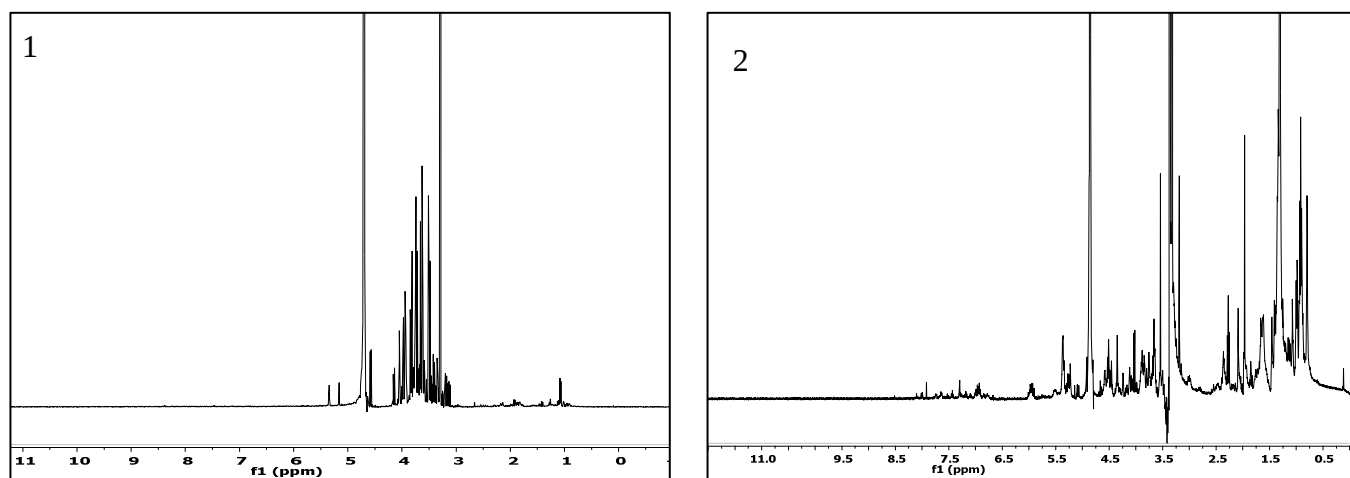
3.2.6.3 Estudo químico das sementes de *I. laurina*

O extrato etanólico (4,5 g) das sementes de *I. laurina* foi submetido a partição líquido-líquido com AcOEt e H₂O, fornecendo 500 mg da fase orgânica e 4,0 g da fase aquosa. Ambas as frações foram analisadas por RMN de ¹H (400 MHz) a fim de conhecer melhor a composição química e direcionar as etapas de purificação. O espectro de RMN da fração AcOEt indicou uma complexidade de metabólitos de baixa polaridade, no entanto, foi observado um singlete em 9,5 ppm característico de próton ligado a Nitrogênio. A fração aquosa concentrou as substâncias de interesse (fenólicos e nitrogenados), porém, rica em açúcares livres.

A fração aquosa foi submetida à coluna cromatográfica utilizando Diaion HP-20 (Neste procedimento os compostos contendo ligação dupla (s) e/ou grupo aromático são retidos pela resina enquanto outros são eluídos através da coluna. Os

carboidratos são usualmente separados por este procedimento. Ao aumentar a percentagem de MeOH, os compostos mais lipofílicos são eluídos para separação dos açúcares dos demais fenólicos). A coluna foi eluída inicialmente com água para obtenção dos açúcares livres e, em seguida com MeOH, para obtenção dos demais compostos fenólicos (figura 3). Ambas as frações foram analisadas por RMN de ^1H (400 MHz) e CLAE-DAD.

Figura 8. Fração H_2O 100% (1), rica em açúcares livres, e fração MeOH 100% (2), obtida da CC eluída sobre Diaion.



A fração metanólica (350 mg) foi submetida a análise por cromatografia em coluna em sílica derivatizada C18 e eluída com os sistemas: MeOH 40% (1), MeOH 70% (2) e MeOH 100% (3). As três frações obtidas foram submetidas ao bioensaio para avaliação de citotoxicidade (com células tumorais da linhagem HT-29) e analisadas por RMN de ^1H (400 MHz) e CLAE-DAD.

A fração obtida em metanol puro (fração 3) apresentou sinais referentes a alcalóides, ainda não identificados no gênero *Inga*. No entanto, não apresentou potencial antitumoral no ensaio realizado. As frações 1 (MeOH 40%) e 2 (MeOH 70%) apresentaram ED_{50} de 9.2 e 7.6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, contra a linhagem HT-29.

Foram obtidos espectros de RMN de ^1H das três frações com o intuito de observar os sinais em comum e relacionar as substâncias presentes responsáveis pelo potencial citotóxico.

Uma análise comparativa dos sinais presentes no espectro da fração mais ativa (fração 2) com a fração não ativa (fração 3) mostrou que os constituintes presentes em baixa concentração, informação obtida pela a integração dos sinais,

são os responsáveis pelo potencial citotóxico. O espectro de RMN de ^1H da fração 2 apresentou sinais de, pelo menos, duas substâncias aromáticas. Esta fração (45 mg) foi submetida a CC em sílica gel 60 e eluída com AcOEt/MeOH 1:1 até MeOH puro, fornecendo 10 subfrações que, após análise em CCD foram reunidas em 4 grupos. A fração mais polar, obtida em MeOH 100%, foi a única que apresentou boa atividade ($\text{ED}_{50} = 4,0 \mu\text{g/mL}$) no ensaio avaliado.

A fração 1 (240 mg) foi submetida a análise em CLAE analítica usando diferentes métodos e colunas de sílica C18 e C8 (C8 DYNAMAX). Porém, em nenhum dos métodos avaliados foi possível obter boa resolução dos picos que permitisse a análise no modo preparativo. Possivelmente devido à alta polaridade das substâncias, todas co-eluíram nos primeiros minutos da análise. Desta forma, a fração foi submetida à cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20, eluída com MeOH 100%, fornecendo 10 subfrações. As frações (2, 3, 4 e 5) que apresentaram melhor separação na análise por CCD em fase reversa foram submetidas à análise por CLAE-DAD (coluna analítica C-18 (250mm x 4,60mm e 5 μm), eluída em gradiente de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95:5 até MeOH puro durante 50 min, fluxo de 1mL/min) para a obtenção de um perfil químico.

O extrato das folhas de *I. laurina* apresentou maior atividade no ensaio de citotoxicidade frente a linhagens tumorais e por isso, foi submetido aos fracionamentos cromatográficos para a obtenção de compostos puros ou frações semipurificadas.

3.2.6.4 Estudo químico das folhas de *Inga laurina*

O extrato das folhas de *I. laurina* apresentou maior atividade no ensaio de citotoxicidade frente as linhagens tumorais avaliadas e por isso, foi selecionado para investigação detalhada. O extrato foi submetido a partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, fornecendo quatro frações: hexano, AcOEt, BuOH e água. As fases de partição foram analisadas por CCD, RMN de ^1H e CLAE-DAD com o intuito de obter um perfil químico e selecionar as condições de fracionamento cromatográfico. Através destas análises concluímos que a fase hexânica apresentou triterpenos como constituintes majoritários, enquanto na fase butanólica concentraram-se as saponinas, os compostos nitrogenados aromáticos e, possivelmente os aminoácidos não proteicos, muito comuns no gênero. Na fase AcOEt observou-se a presença de compostos de média polaridade, enquanto na fase hidrometanólica foi possível verificar grande concentração de fenólicos glicosilados, ácido gálico e taninos.

Todas as fases de partição obtidas foram fracionadas e suas frações foram analisadas por CCD, CLAE-DAD e RMN ^1H e ^{13}C para obtenção de substâncias puras ou frações semipurificadas.

Com o intuito de obter as substâncias bioativas isoladas anteriormente dessa espécie⁷¹, todas as fases de partição foram monitoradas por CLAE-DAD e RMN quanto a presença desses metabólitos. Dentre as fases de partição analisadas, a fração AcOEt e a BuOH apresentaram sinais em RMN referentes a essas substâncias, porém, devido a presença adicional de saponinas na fração BuOH, optou-se por iniciar os estudos com a fração AcOEt.

A fração AcOEt (1,2 g) foi submetida a CC de baixa pressão em silica gel 60 e eluída com misturas de Hexano/AcOEt/MeOH, fornecendo 20 subfrações. As 10 frações obtidas em AcOEt e MeOH foram analisadas por CCD e CLAE-DAD (coluna C18, gradiente MeOH 5-100%, fluxo de 1 ml/min, detecção em 254 nm), afim de orientar a purificação dos compostos de interesse. A análise dos cromatogramas indicou a presença do ácido gálico nas frações mais polares, pela observação de

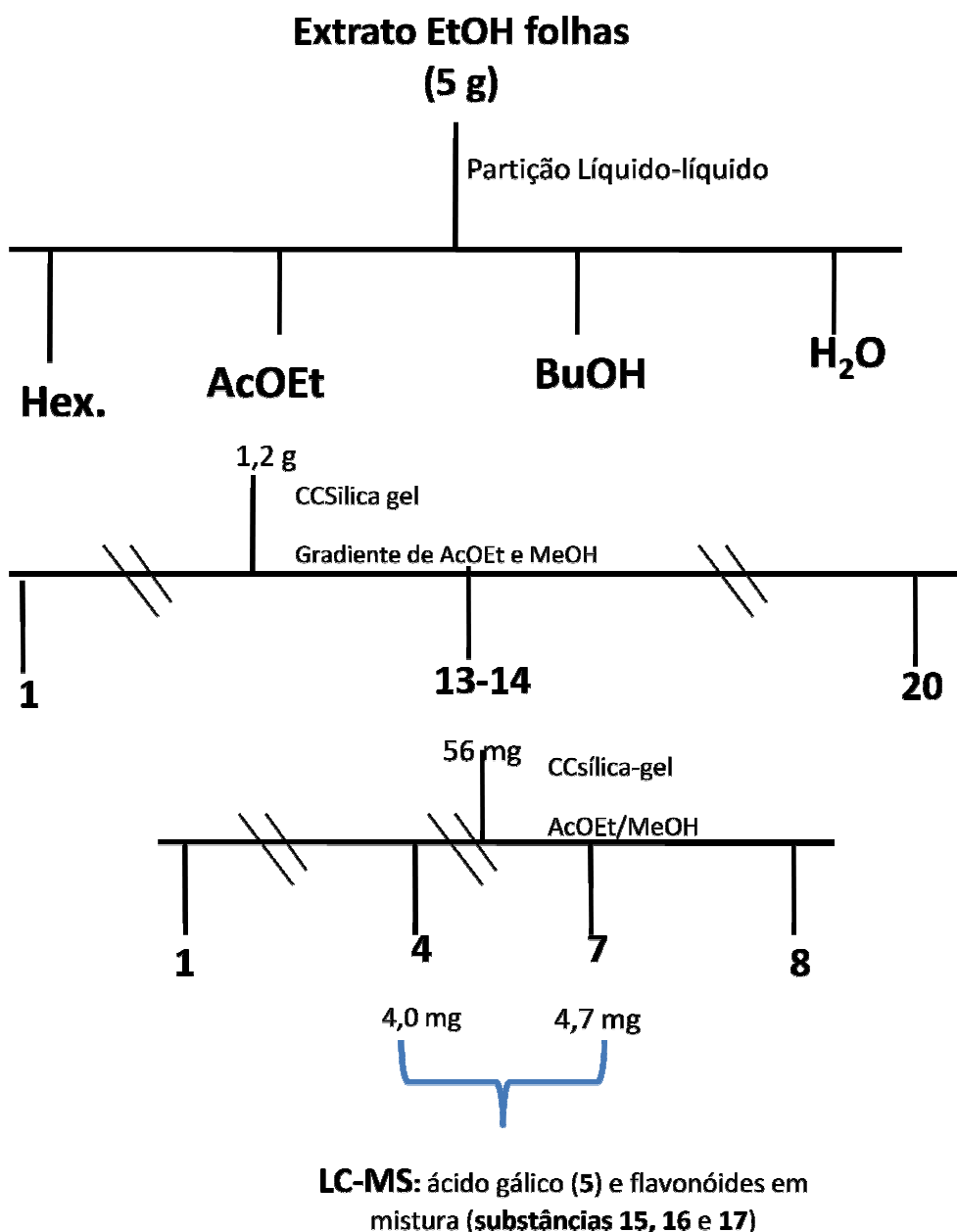
banda intensa em 270 nm no espectro de UV, que foi confirmada pelos sinais observados no espectro de RMN de ^1H , em especial um singlete em 7,1 ppm. As frações obtidas em AcOEt/MeOH 1:1 até MeOH puro forneceram frações ricas em flavonoides e outros fenólicos.

As frações 13-14 (56 mg), obtidas em AcOEt/MeOH 4:6, foram reunidas e submetidas a CC de sílica gel 60 utilizando gradiente de AcOEt -MeOH até MeOH puro. Foram obtidas 8 frações, e estas foram analisadas por CCD e CLAE-DAD nas mesmas condições empregadas anteriormente (coluna C18, gradiente MeOH 5-100%, fluxo de 1 ml/min, detecção em 254 nm).

A fração 3 (4,5 mg) apresentou um pico ($t_r = 43,2$ min) no final da corrida cromatográfica (figura 50) com espectro de UV diferente das classes de substâncias caracterizadas nas espécies de *Inga*.

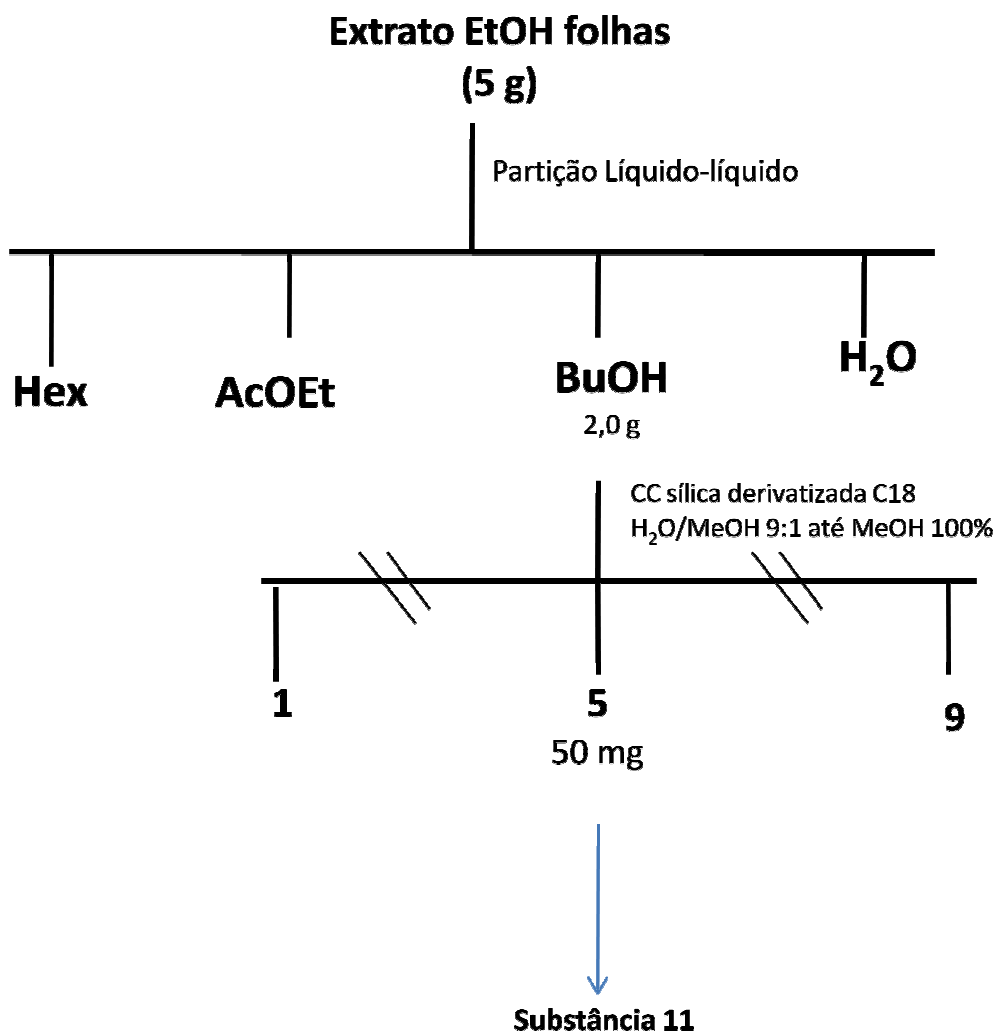
A fração 4 (4,0 mg) mostrou, na análise por CLAE-DAD, quatro picos majoritários. A análise dos seus espectros de UV indicou a presença do ácido gálico (1) e três flavonoides (picos 2, 3 e 4).

A fração 7 (4,7 mg) obtida em MeOH 100% apresentou, na análise por CLAE, uma mistura de 4 flavonoides. Porém, devido a quantidade de massa não foi possível isolar seus componentes majoritários, por isso, esta fração foi submetida a análise por LC-MS (figura 55).



Fluxograma 9. Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. laurina*

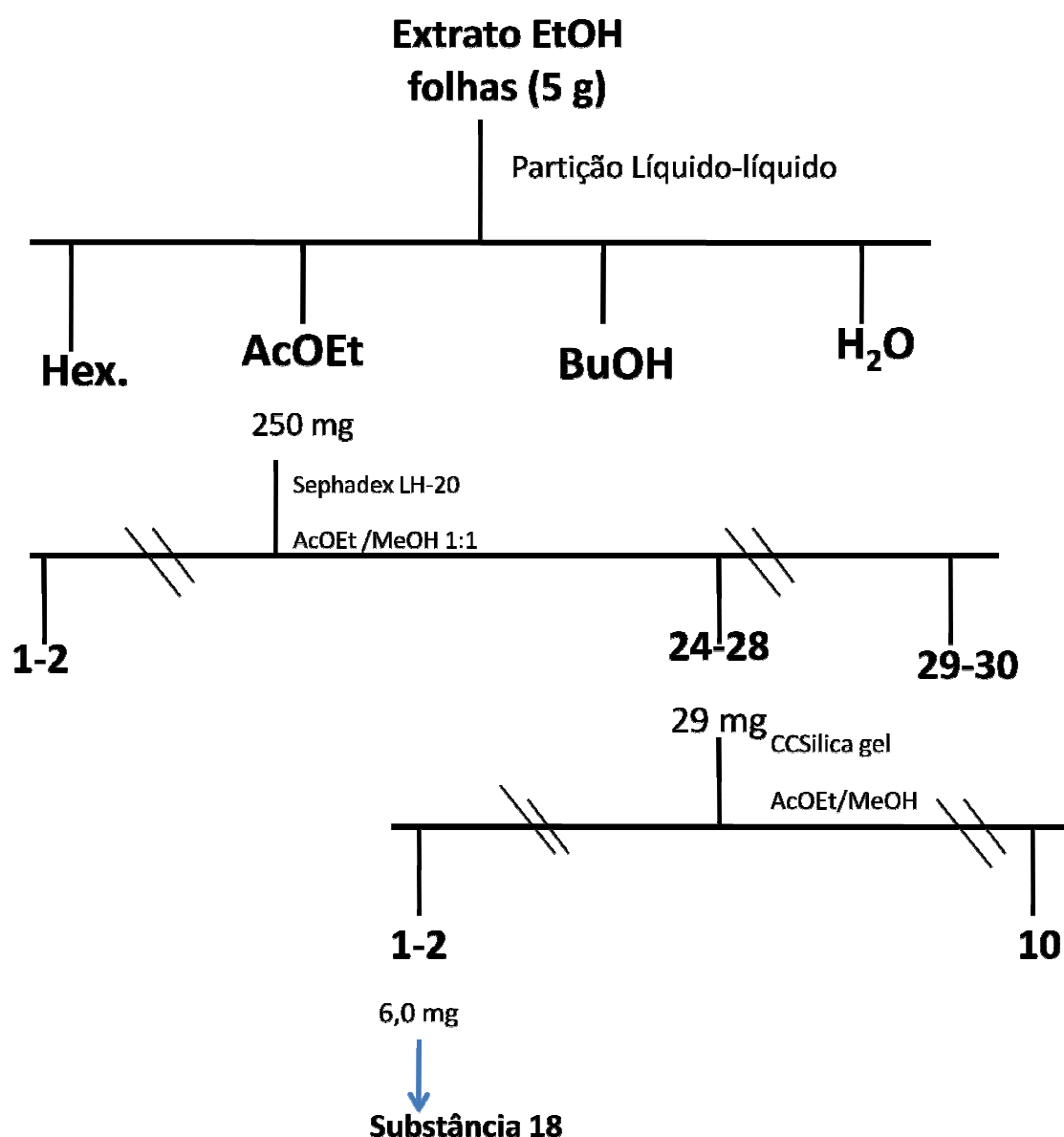
Ainda visando o isolamento das substâncias bioativas de *I. laurina* submeteu-se ao fracionamento por CC, a fase BuOH (2,0g), utilizando como fase estacionária sílica derivatizada (C18) eluída com gradiente de H₂O/MeOH 95:5 até MeOH 100% fornecendo 9 sub-frações. As frações com perfil cromatográfico mais interessante foram selecionadas por CLAE-DAD, e foram analisadas por RMN de ¹H. A fração 5, obtida em MeOH/H₂O 1:1 apresentou elevado grau de pureza na análise por CLAE-DAD apresentando um pico majoritário com tempo de retenção de 23,65 min.



Fluxograma 10. Fracionamento cromatográfico da fase BuOH do extrato das folhas de *I. laurina*.

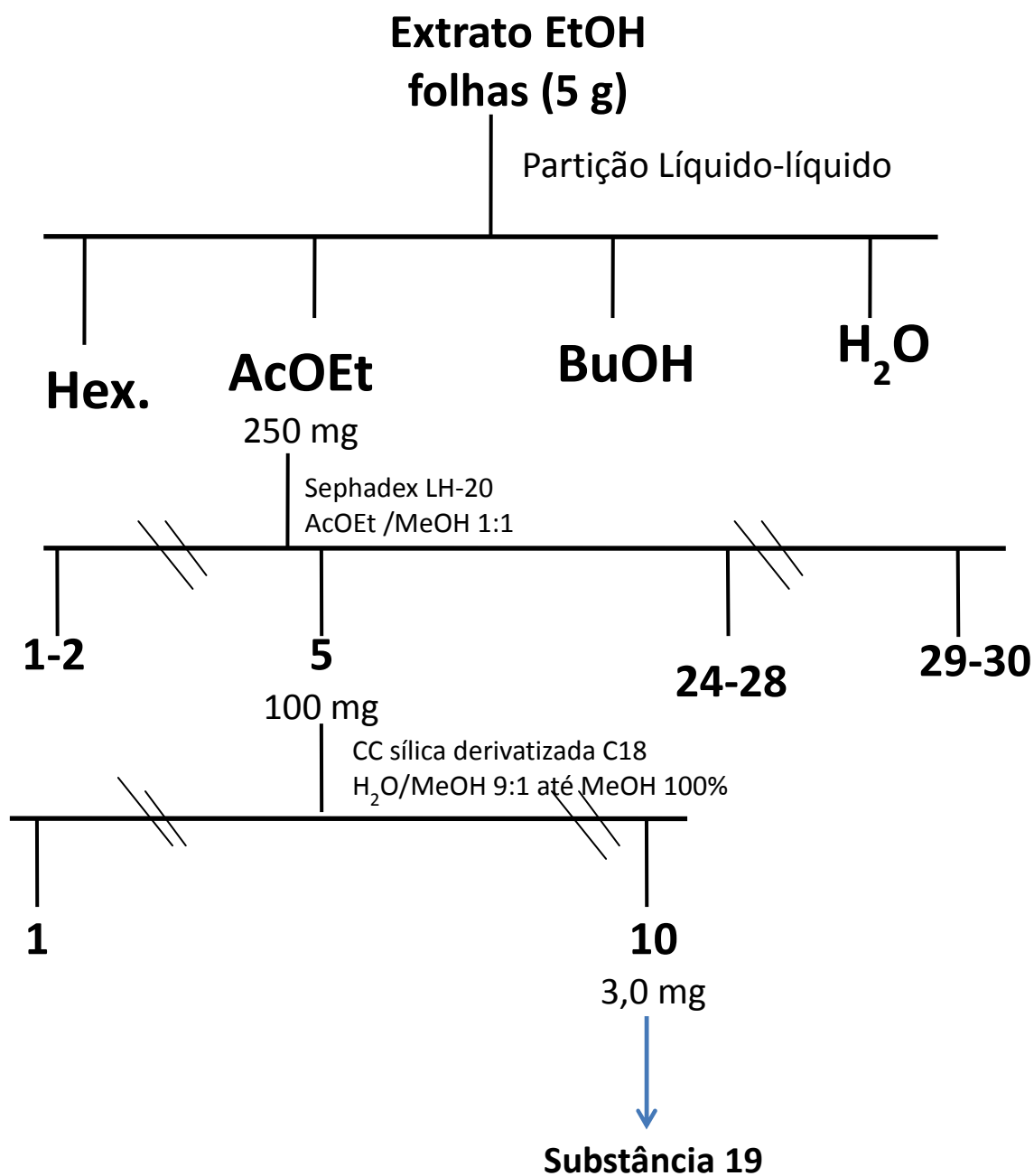
O extrato etanólico das folhas de *I. laurina* da segunda coleta foi submetido ao ensaio antitumoral frente a linhagem de células HT-29 (cancer de cólon humano) e apresentou uma promissora atividade (ED_{50} 7,20 $\mu\text{g/mL}$), por isso foi selecionada novamente para fracionamento cromatográfico biomonitorado. O extrato foi submetido a partição com hexano, AcOEt e H₂O, e as fases de partição obtidas foram submetidas ao referido bioensaio. A fração AcOEt foi a única que apresentou-se ativa. Esta fração foi submetida a CC em Sephadex LH-20 eluída com AcOEt/MeOH 1:1 fornecendo 30 subfrações, que após análise por CCD foram agrupadas em 8 frações. Estas oito frações foram submetidas ao bioensaio para citotoxicidade contra células da linhagem HT-29 e apenas as frações 20-23 e 24-28

apresentaram atividade citotóxica. Devido a quantidade de massa, apenas a fração 24-28 (29 mg) foi selecionada para purificação dos metabólitos ativos. Esta fração foi então submetida a CC de sílica gel 60 eluída com AcOEt/MeOH, fornecendo 10 subfrações. A reunião das frações 1-2 nos forneceu 6,0 mg de uma substância pura, posteriormente identificada com outro derivado de galoil-ramnopiranosídeo: galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila.



Fluxograma 11. Segundo fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. laurina*

A fração 5 (100mg) foi selecionada para continuar o estudo cromatográfico devido a quantidade de massa e por apresentar substâncias fenólicas de interesse como evidenciado na análise por CLAE-DAD. Esta fração foi submetida a CC com sílica derivatizada C-18 eluída em gradiente de H₂O/MeOH 9:1 até MeOH fornecendo 10 sub-frações. A fração 10 (3 mg) apresentou duas substâncias fenólicas majoritárias e, foi submetida a caracterização por RMN de ¹H (300 MHz) e ¹³C (75 MHz). Através da análise dos dados espectrais foi possível caracterizar apenas uma das substâncias, identificada como miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (**substância 19**).



Fluxograma 12. Segundo fracionamento cromatográfico da fase AcOEt do extrato das folhas de *I. laurina*

3.2.6.5 Estudo químico da raque foliar de *Inga laurina*

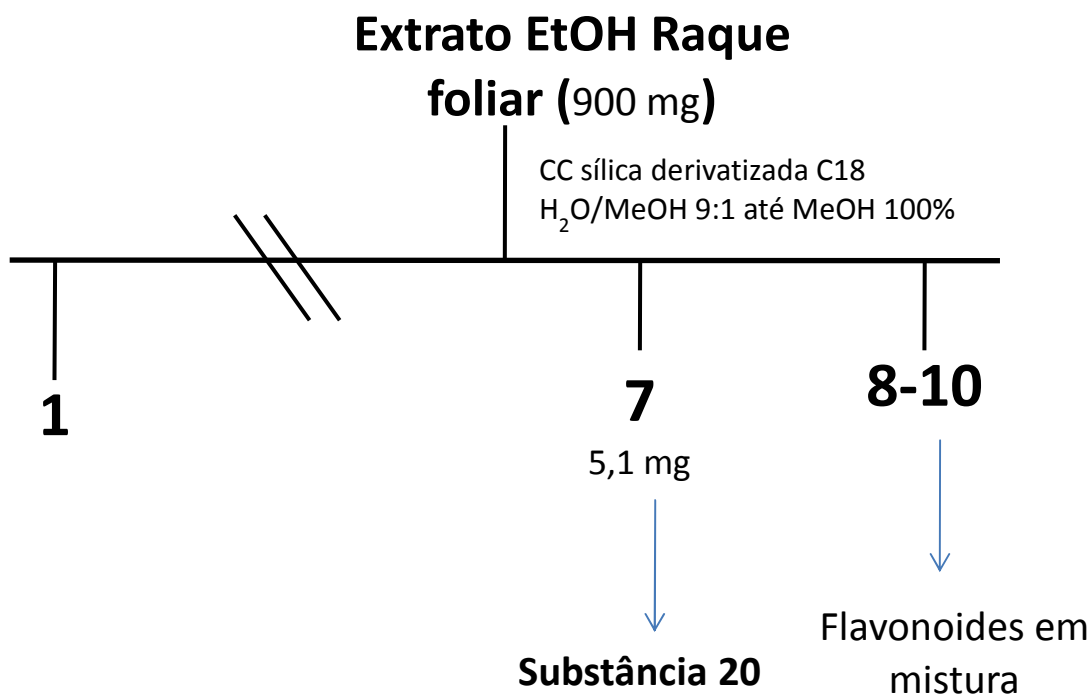
O extrato etanólico da raque foliar de *I. laurina* foi submetido ao fracionamento em CC no modo reverso de eluição (sílica derivatizada C18, gradiente MeOH/ H₂O), fornecendo dez frações que, em seguida, foram analisadas por CLAE-DAD (coluna

analítica C18, monitorado em 254nm, volume de injeção: 20 µL, fluxo: 1 mL/min, gradiente 5-100% MeOH em 50 min).

A avaliação dos perfis cromatográficos das cinco primeiras frações mostrou baixa resolução cromatográfica e eluição característica de um pico bastante alargado em cada cromatograma, indicando a presença de taninos condensados. No entanto, uma análise detalhada dos espectros de UV permitiu também verificar a presença do ácido gálico ($t_r = 8,74$ min) e um flavonóide ($t_r = 23,15$ min), como constituintes majoritários da fração 5 (40 mg), obtida em MeOH/H₂O 1:1.

A fração 7 (5,1 mg), apresentou elevado grau de pureza na análise por CLAE-DAD indicando a presença de um flavonóide ($t_r = 28,10$ min), pelas bandas apresentadas no espectro de UV, identificado como a flavona apigenina (**substância 20**).

A análise da fração reunida por CLAE-DAD-UV das frações 8 a 10 (figura 69) mostrou a presença de cinco flavonóides (picos 1, 2, 3, 4 e 5) diferentes conforme evidenciaram seus espectros de UV, porém não foi possível caracterizá-los por RMN devido à presença de outras substâncias.



Cromatograma 13. Fracionamento cromatográfico do extrato da raque foliar de *I. laurina*

Estudo químico das flores de *I. laurina*

O extrato etanólico das flores de *I. laurina* (54 mg) foi submetido a CCemmodo reverso utilizando sílica C18 e eluída com MeOH 10% em água e MeOH 100%. As duas frações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD para obtenção do perfil cromatográfico (figura 70).

3.2.6.6 Estudo químico de *Inga edulis*

A espécie *Inga edulis* foi coletada em dois biomas diferentes: Cerrado (folhas e raque foliares) e Amazônia (folhas, raque foliar, sementes, polpa e casca dos frutos).

O extrato bruto etanólico das folhas da coleta realizada no Cerrado foi solubilizado em 400 mL MeOH/H₂O 8:2. Em seguida, realizaram-se partições sucessivas (ELL) com hexano 1:1 v/v, seguido por AcOEt 1:1 v/v e butanol 1:1 v/v, obtendo-se quatro frações com polaridades distintas. As fases hexânicas, AcOEt e hidrometanólicas foram concentradas em rotaevaporador e a fração butanólica em Speed vac.

A fração hexânica (1,0 g) do extrato etanólico das folhas da coleta realizada no Cerrado foi submetida ao CCemsílica gel eluída com misturas de polaridade crescente dos solventes Hex, AcOEt e MeOH. As 50 frações obtidas foram analisadas por CCD e aquelas que apresentaram manchas bem resolvidas foram submetidas à análise por CCDP, a fim de se obter frações ricas em triterpenos. A primeira fração (30 mg) apresentou-se na forma de um sólido amorfo de coloração laranja e foi analisada por RMN 1H, que indicou a presença de um derivado graxo poli-insaturado.

A fase butanólica (100 mg) deste mesmo extrato foi submetida ao fracionamento cromatográfico no modo reverso de eluição utilizando sílica derivatizada C18 e sistemas de H₂O e MeOH. Foram obtidas 7 frações, que foram posteriormente analisadas por CCD e CLAE-DAD no mesmo método empregado nas análises anteriores. A fração 1 (3,3 mg) indicou a presença de saponinas, pela formação de espuma e através da coloração apresentada no revelador químico anisaldeído. Este fracionamento originou outras frações, tais como as frações 5 (4,3 mg) e 7 (3,8 mg), que se mostraram atrativas para o estudo em função da sua composição química flavonoídica.

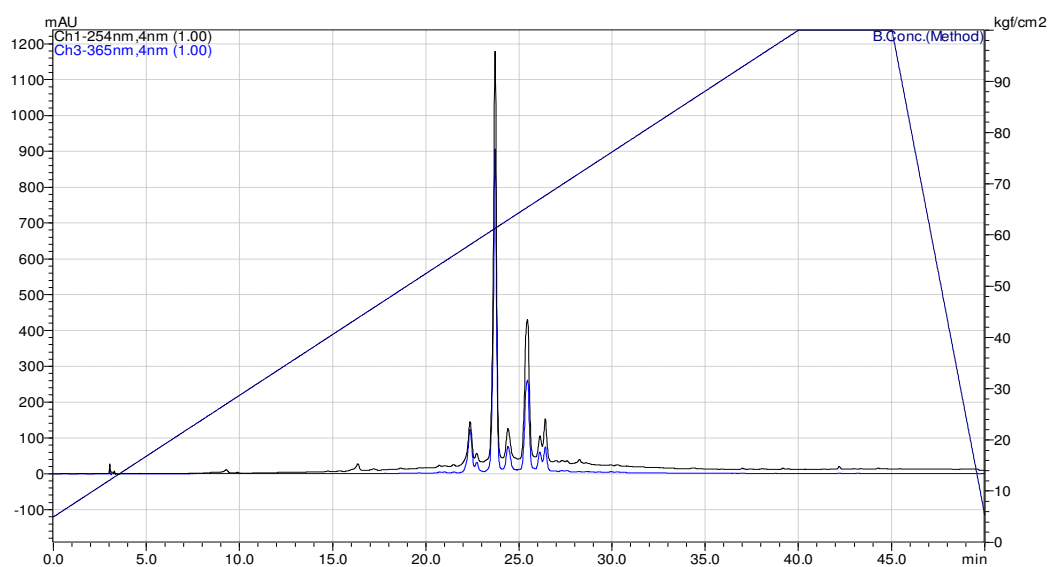
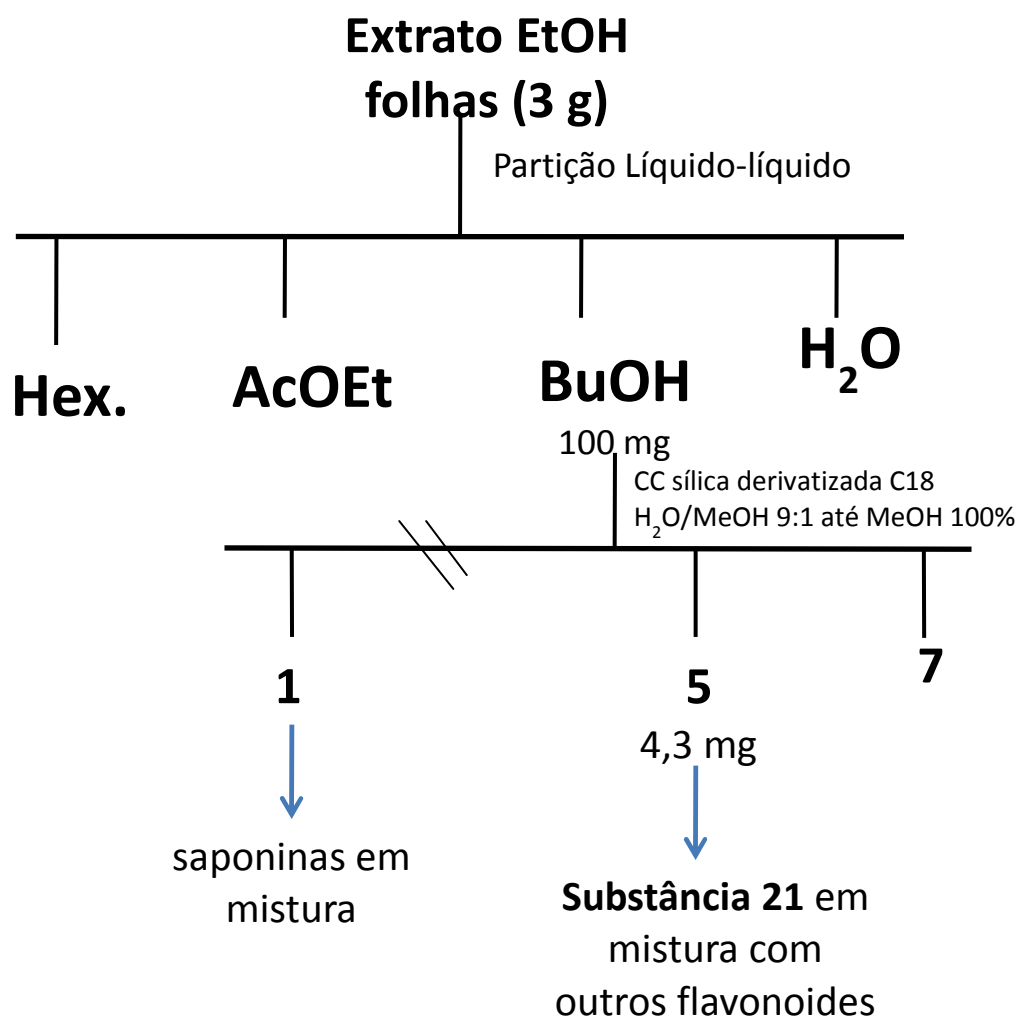


Figura 9. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da Fração 5 do fracionamento da FBU do extrato das folhas de *I. edulis*.



Fluxograma 14. Fracionamento cromatográfico do extrato das folhas de *I. edulis* da coleta Cerrado.

A fase hidrometanólica (400 mg) foi submetida aos mesmos fracionamentos cromatográficos. A análise dos cromatogramas indicou a presença do ácido gálico na fração 1 (270 mg) como constituinte majoritário. A evidência da presença do ácido gálico foi comprovada pelas bandas de absorção do sistema benzílico, com máximos na região do UV em 210-220 nm e entre 260-280 nm.

3.2.7 Estudo químico de *Inga edulis*

3.2.7.1 Estudo químico da espécie *Inga edulis* coletada no Bioma Amazônia

Investigação das antocianinas presentes nas sementes de *Inga edulis*

Os tegumentos das sementes de *Inga edulis* possuem coloração roxa e estão envoltas por uma polpa branca flocosa. Não foram encontrados estudos químicos a

cerca da composição química desse órgão vegetal na literatura avaliada e, por isso, optamos por investigar a presença desses pigmentos responsáveis pela coloração e possivelmente caracterizar através de técnicas analíticas hifenadas e espectroscopia de RMN. Em estudos realizados com sementes de outras espécies de Fabaceae observou-se que a coloração escura presente nos tegumentos desse órgão deve-se principalmente a presença de antocianinas. Nos tegumentos do feijão-caupí (*Vigna unguiculata*) foram identificadas cinco tipos de antocianinas: delphinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo⁷².

As sementes de *Inga edulis* obtidas da coleta realizada no Bioma Amazônia, após secas e moídas foram extraídas com água. Imediatamente após o contato do solvente extrator com as sementes observou-se a formação de uma solução de coloração lilás (figura 1a). A solução foi posteriormente filtrada (figura 1b) e seca (figura 1c) em ar comprimido para posterior análise química dos pigmentos.

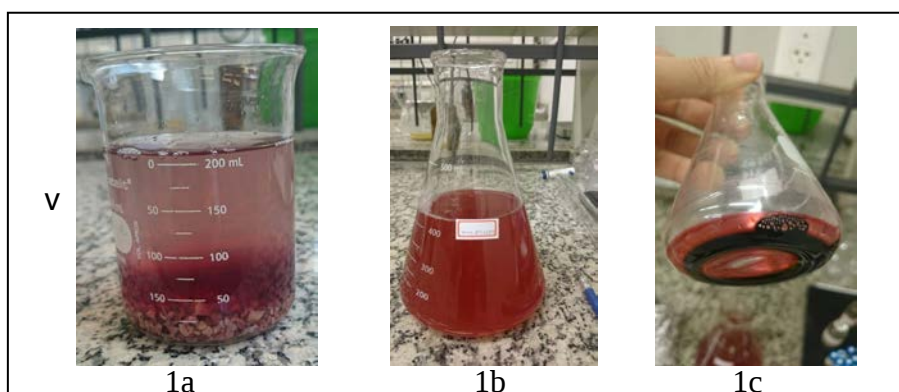


Figura 10. Imagens dos procedimentos de extração dos pigmentos da fração aquosa das sementes de *I. edulis*.

Estudo similar dos constituintes químicos das sementes foi realizado anteriormente com a espécie *Inga laurina*. No entanto, a solução de coloração lilás ainda em contato com as sementes formada após extração com água foi submetida ao banho de ultrassom para extração de outros fenólicos de alta polaridade. Porém, observou-se mudança na coloração lilás para marrom, indicando possivelmente a degradação das antocianinas responsáveis pela cor roxa dos tegumentos das sementes. Esta mudança no comprimento de onda máximo de absorção pode ter sido produzida pelas reações que ocorrem com o cátion *flavilium* levando a uma configuração estrutural das antocianinas em que, ocorre uma diminuição do número

de ligações duplas conjugadas, associadas ao aumento nos máximos de absorção das substâncias e a consequente coloração azul ou roxa. No caso das antocianinas a diminuição no comprimento de onda máximo de absorção caracteriza deslocamento hipsocrômico (para o vermelho) a perda da coloração roxa. Assim como também pela protonação do cátion *flavilium* ou pela abertura do anel C, gerando uma chalcona que absorve em comprimento de onda menor⁷³. As antocianinas são metabólitos altamente instáveis e suscetíveis a degradação.

Ainda visando a detecção de antocianinas nas sementes de *Inga edulis*, o material vegetal obtido após extração com água foi subsequentemente extraído com metanol. A fração metanólica (62 mg) apresentou coloração amarela, foi seca em ar comprimido e em seguida analisada por CLAE-DAD (figura 11) monitorado em 520 nm nas mesmas condições da fração aquosa.

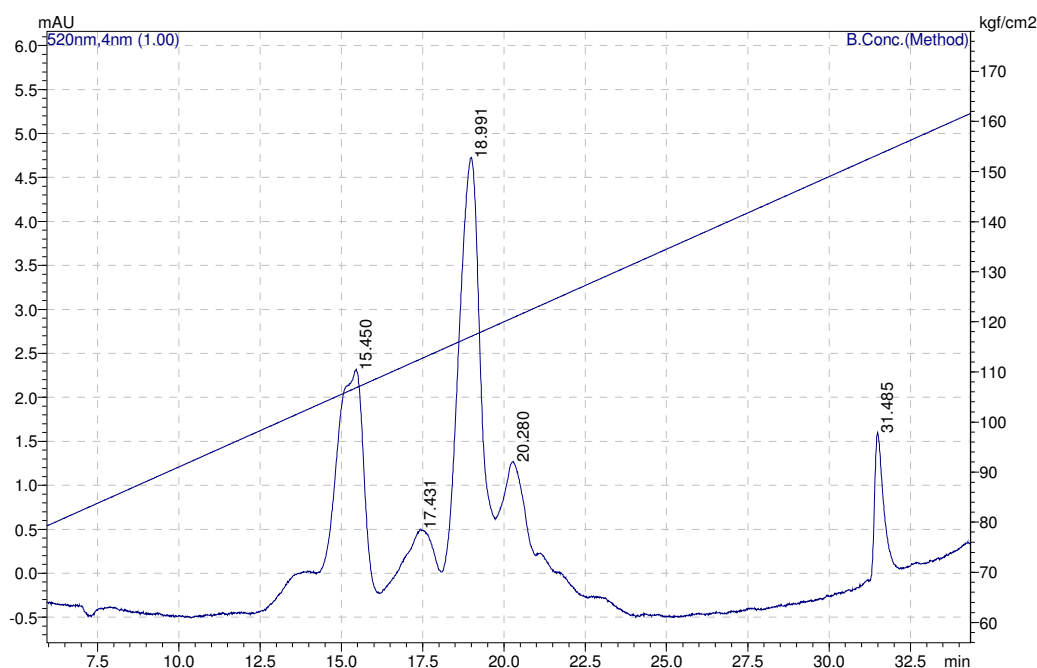


Figura 11. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (520 nm) da fração metanólica do extrato das sementes de *I. edulis*.

3.2.7.2 Investigação dos fenólicos presentes nas folhas de *Inga edulis*

As folhas de *Inga edulis*, após secas e moídas, foram extraídas com etanol em banho de ultrassom por 20 min. O extrato etanólico (130 mg) foi solubilizado em metanol e, em seguida, submetido a partição com hexano para remoção do material

lipofílico. A fração metanólica (65 mg) foi submetida ao processo de remoção de interferentes apolares por extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos de C18. Alíquotas de 30,0 µL das amostras (1,0 mg/mL) foram analisadas por CLAE/DAD nas mesmas condições empregadas anteriormente (fase móvel MeOH /HAc (0,1%, v/v) e H₂O/HAc (0,1%, v/v) na vazão de 1,0 mL/min, em coluna analítica C18, em método de gradiente exploratório: 5-100% B) para detecção das substâncias fenólicas e obtenção de um perfil químico micromolecular do extrato desse órgão vegetal.

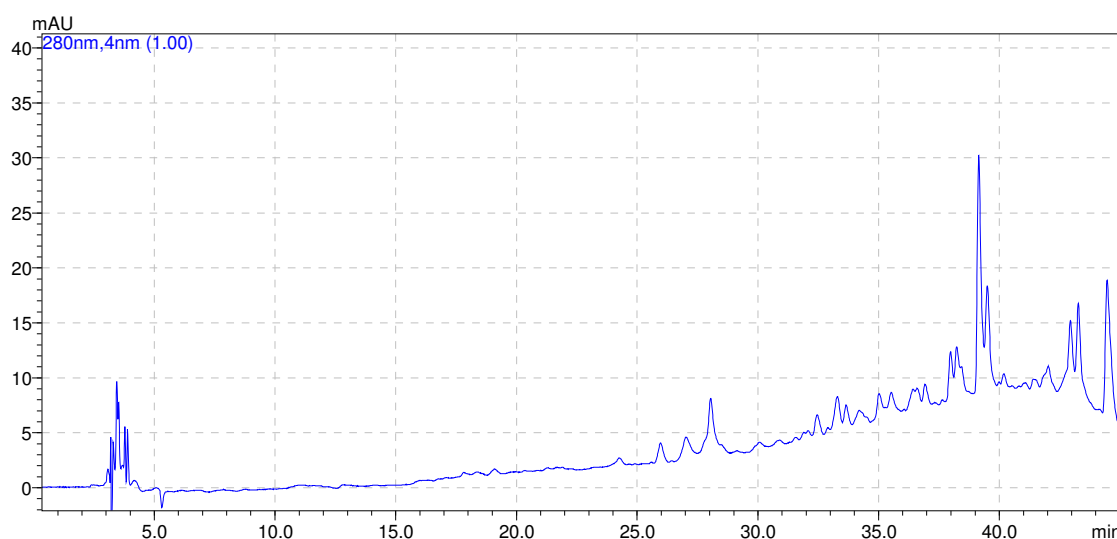


Figura 12. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (280 nm) da fração metanólica obtida do extrato das folhas de *I. edulis*.

No entanto, o método empregado não foi eficiente na separação dos constituintes químicos desta fração, tendo em vista, que as substâncias aromáticas extraídas majoritariamente em metanol possuíam polaridades semelhantes e foram observadas nos últimos minutos da corrida cromatográfica. É interessante notar que diferente das folhas da coleta realizada no Cerrado não observamos concentração expressiva de taninos, ácido gálico, galato de metila, catequinas e flavonoides glicosilados nesta análise que, são usualmente eluídos em proporção maior do solvente aquoso no método empregado. Uma varredura a 400 nm nos mostrou a presença de três picos com espectros de UV de substâncias ainda não detectado nas espécies estudadas neste trabalho, cujas características (bandas no espectro de UV e polaridade) indicam possivelmente a presença de pigmentos, tais como carotenóides, que ocorre em tecidos foliares.

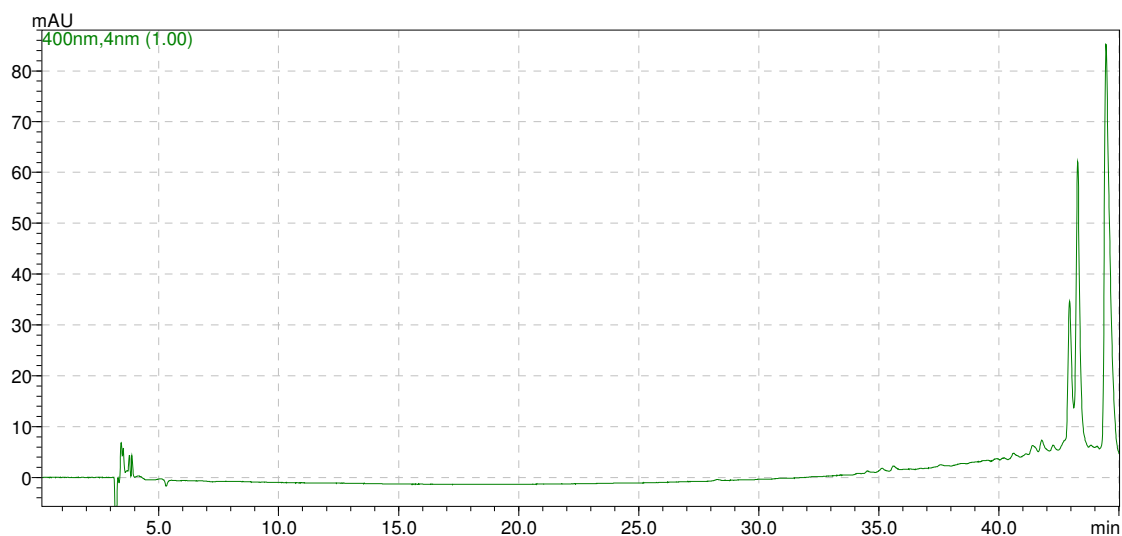


Figura 13. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (400 nm) da fração metanólica obtida do extrato das folhas de *I. edulis*.

O espectro de UV das substâncias associadas aos três picos analisados apresentou uma banda em torno de 400 nm: pico 1 (410 nm), pico 2 (403 nm), pico 3 (409 nm).

Tentativas de otimização do método foram realizadas, afim de separar os fenólicos desta fração e, possivelmente caracterizá-los em mistura através de Espectroscopia de RMN. A mesma fração foi novamente analisada por CLAE-DAD no método descrito abaixo.

Tabela 2. Gradiente de eluição cromatográfica otimizado para análise dos metabólitos secundários da fração metanólica do extrato das folhas de *I. edulis*.

Gradiente	
Tempo (min)	%B (Metanol)
0,01	60
15,00	70
25,00	85
37,00	100
42,00	100
45,00	60
55,00	60

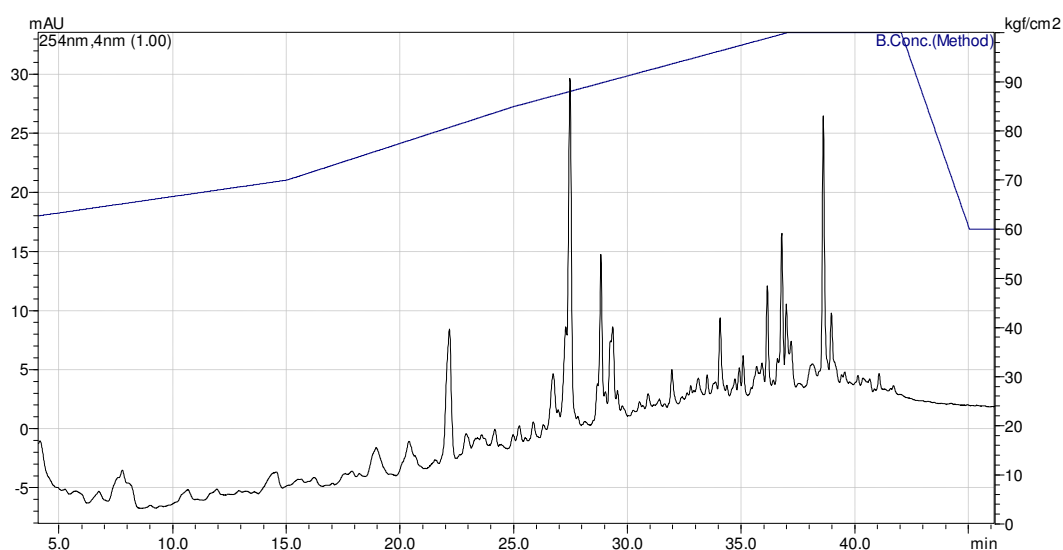


Figura 14. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (254 nm) da fração metanólica obtida das folhas de *I. edulis*.

O método de eluição empregado nesta análise forneceu uma boa separação dos picos, porém, a análise do espectro de RMN não forneceu informações conclusivas acerca da natureza desse grupo de substâncias com absorção em 400 nm. Devido a quantidade de massa da fração e da complexidade da mistura não foram conduzidas análises de isolamento no modo preparativo.

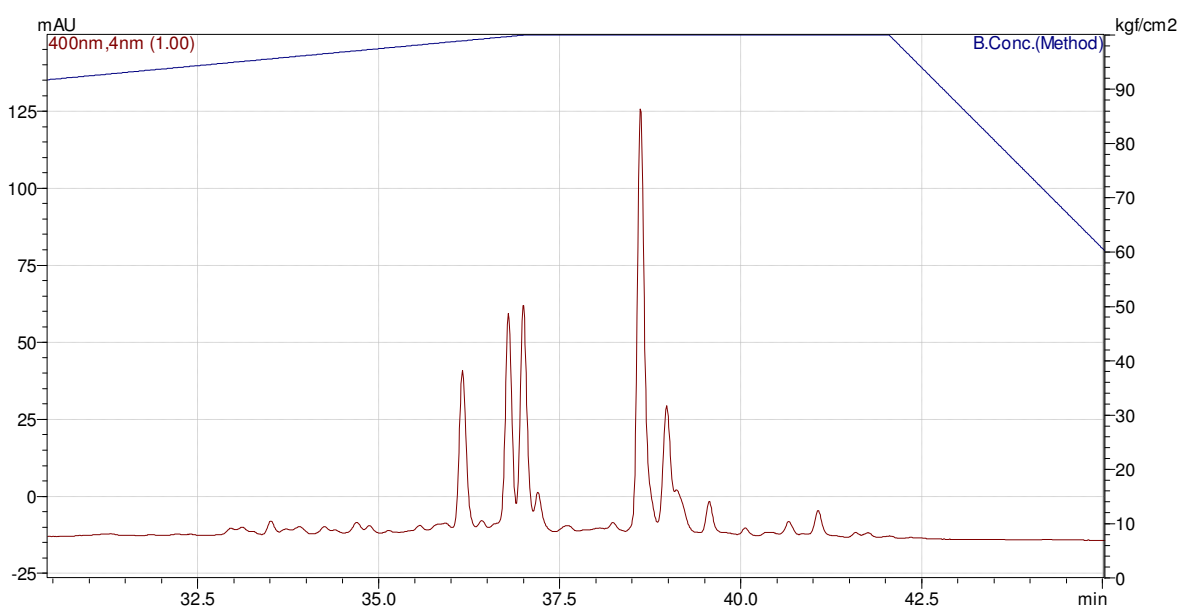


Figura 15. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (400 nm) da fração metanólica do extrato das folhas de *I. edulis*.

Este grupo de substâncias com absorção em 400 nm, também foi investigado em outras partes do vegetal. Na fração metanólica das sementes, onde foram detectadas as antocianinas, também se observou um pico ($t_r = 31,59$ min) no cromatograma com perfil similar ($\lambda(\text{nm})$: 227/397).

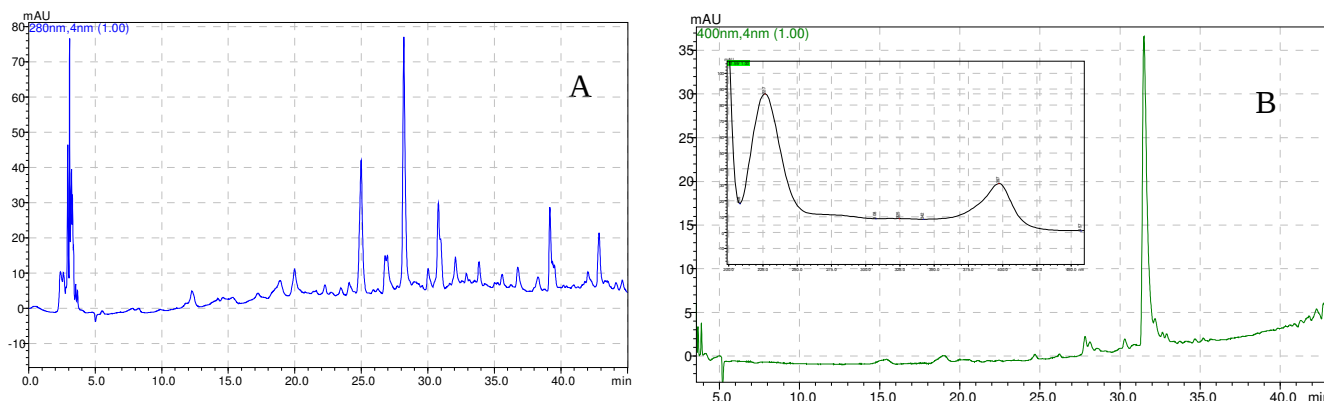


Figura 16. Cromatograma obtido via CLAE-DAD monitorado em 280 nm (A) e 400 (B) da fração metanólica obtida do extrato das sementes de *I. edulis*.

3.2.7.3 Caracterização de fenólicos presentes nas sementes de *I. edulis* através de RMN de ^1H obtida da análise em LC-SPE-TT

A fração metanólica das sementes de *Inga edulis* apresentou na análise por CLAE-DAD picos bem resolvidos e, após análise de seus espectros de UV, verificou-se que a mesma era constituída principalmente por substâncias fenólicas como ácidos orgânicos e flavonóides.

A análise por LC-SPE-TT desta fração (25 mg) nos forneceu 7 subfrações e, após obtenção de seus espectros de RMN de ^1H (600 MHz) foram caracterizadas cinco substâncias.

3.2.8 Estudos de desreplicação das folhas das espécies de *Inga*

3.2.8.1 Análise por CLAE-DAD

Os estudos de desreplicação das espécies de *Inga* iniciaram-se com o desenvolvimento de uma metodologia baseada em análises por CLAE-DAD na tentativa de realizar a identificação direta dos metabólitos secundários presentes nas matrizes estudadas (extratos de folhas) empregando experimentos de co-injeção de padrões autênticos. Inicialmente foi realizada a investigação dos extratos EtOH das folhas das três espécies em que 5 mg de cada extrato foi dissolvido em uma mistura de MeOH/H₂O (1:1, v/v), submetidos à extração em fase sólida (SPE) para remoção

dos interferentes e constituintes de baixa polaridade e injeção de 20 µL em CLAE analítico. As análises cromatográficas foram feitas com a utilização de uma coluna de RP18 e a fase móvel utilizada foi gradiente de MeOH/H₂O. Durante a eluição dos componentes químicos presentes em cada extrato, o gradiente exploratório de 5-100% de MeOH foi empregado na obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos.

As substâncias fenólicas foram identificadas através dos tempos de retenção e espectros de UV obtidos pela análise em CLAE-DAD, e pela comparação com o tempo de retenção de padrões autênticos.

A presença de substâncias como flavonóides, catequinas, taninos e derivados de ácido gálico pôde ser detectada com o auxílio do detector DAD realizando varredura na faixa espectral de 200-600 nm. Os flavonóides, fenólicos majoritários das frações analisadas, apresentam tipicamente duas bandas no espectro de UV, referentes aos anéis cinamoíla e benzoíla. O ácido gálico e seus derivados apresentam uma única banda intensa em 270 nm. As catequinas exibem no espectro de UV uma banda fraca em torno de 280 nm, um ombro próximo de 220 nm e máximo entre 205-210 nm.

A escolha dos padrões foi baseada na quimiossistemática do gênero *Inga* e incluiu as substâncias listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Padrões e seus respectivos tempos de retenção utilizados nas análises por CLAE-DAD.

Substância padrão	Tempo de retenção (min)
Quercetina	28,42
Quercetrina	16,00
Rutina	24,12
6-hidroxiflavanona	32,09
Ácido cinâmico	28,51
Ácido sinápico	22,01
Ácido cafeico	18,50
Ácido vanílico	18,34
Ácido p-cumárico	21,84
Ácido chiquímico	24,18
Ácido clorogênico	16,55

Ácido 2,4 - hidroxicinâmico	19,40
Chalcona	35,76
Triptofano	12,52
Ácido gálico	9,06
Ácido protocateuico	14,50
Galato de metila	18,80
Ácido benzóico	24,87
Ácido 2,5-diidroxibenzóico	17,06
Ácido 2,4-diidroxibenzóico	19,37
Ácido 3,4-diidroxibenzóico	13,07
Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico	22,24

Uma alíquota da mistura dos padrões foi co-injetada com a amostra das folhas de cada espécie na proporção 1:4 e injetada novamente no cromatógrafo nas mesmas condições cromatográficas. Após a obtenção dos cromatogramas, avaliou-se a intensidade dos picos com o intuito de verificar a presença dos padrões em cada amostra.

3.2.8.2 Análise por HPLC-MS

As análises foram realizadas com os extratos EtOH das folhas das três espécies e foram desenvolvidas com a mesma coluna cromatográfica e mesmo método empregado nos experimentos de co-injeção de padrões. As substâncias foram identificadas com base nos dados obtidos das substâncias isoladas, quimiotanoxomia do gênero e nos dados espectrométricos disponíveis na literatura.

3.2.8.3 Análise por CCD e GC-MS das frações de baixa polaridade

As análises por CCD das frações menos polares indicaram a presença de terpenoides, por isso foram submetidas à análise qualitativa por Cromatografia em Fase Gasosa, CG-FID (Varían model CP-3800) usando padrões autênticos dos triterpenos α -amirina, β -amirina, lupeol, fridelanol, fridelina, taraxerol e ácido oleanólico.

3.2.9 Perfil químico das partes dos frutos de *I. edulis*

Para a obtenção de perfis metabólicos através de CLAE-DAD, as amostras foram submetidas ao processo de remoção de interferentes apolares por extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos de C18. Alíquotas de 30,0 µL das amostras (1,0 mg.mL⁻¹) foram analisadas por CLAE-DAD usando fase móvel MeOH /HAc (0,1%, v/v) e H₂O/HAc (0,1%, v/v) na vazão de 1,0 mL.min⁻¹, em coluna analítica C18, em método de gradiente exploratório: 5-100% B, 0-50min.

3.2.9 Caracterização de fenólicos presentes nas sementes de *I. edulis* através de LC-SPE-TT

O sistema hifenado HPLC-SPE-TT (*High Performance Liquid Chromatography - Solid Phase Extraction - Transfer Tube*) é composto por um extrator de fase sólida (SPE) como interface entre um HPLC (Cromatógrafo Líquido de Alta Resolução) e um transferidor e preparador automático de amostras de RMN (TT). Neste sistema, após a amostra ser analisada por HPLC, os picos de interesse são selecionados e coletados *online* em cartuchos pré-condicionados (sistema SPE) em coletas múltiplas (*multitrapping*), que permitem a concentração das substâncias. Os cartuchos são então secos em um fluxo de nitrogênio gasoso, a amostra é resolubilizada em solvente deuterado e transferida diretamente para tubos de 3 mm. Todo o processo utilizando apenas cerca de 300 µL de solvente deuterado.

A fração metanólica do extrato das sementes de *I. edulis* foi analisada inicialmente por CLAE-DAD, onde foram observados fenólicos como flavonóides e ácidos orgânicos, evidenciados por seus perfis no UV.

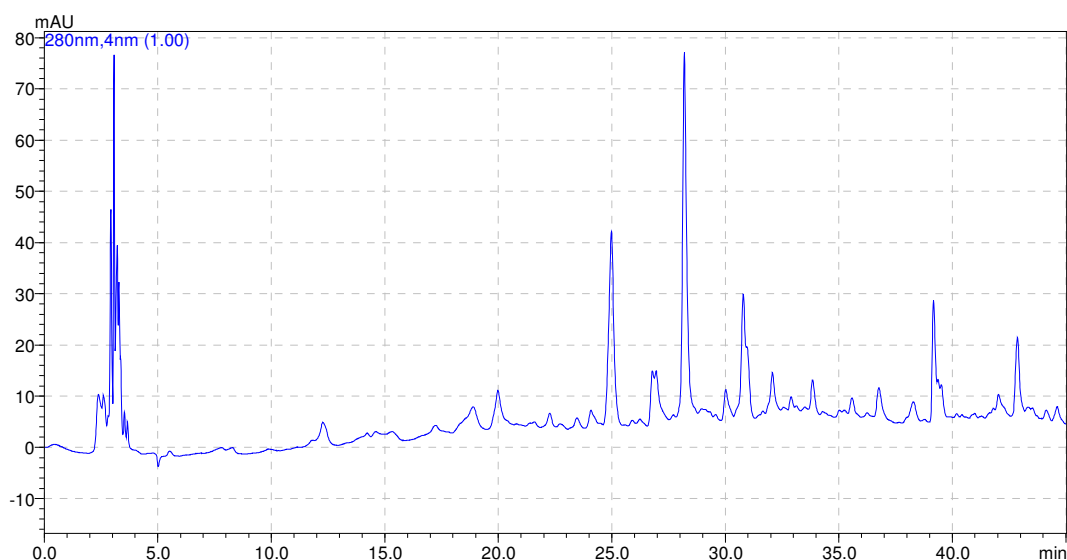


Figura 17. Cromatograma obtido via CLAE-DAD monitorado em 280 nm da fração metanólica obtida do extrato das sementes de *I. edulis*.

Esta fração foi analisada nas mesmas condições empregadas anteriormente e, após análise dos seus espectros de UV, foi submetida à análise por LC-SPE-TT para a caracterização das substâncias de interesse.

As condições de análise estão descritas nas tabelas abaixo:

Tabela 4. Condições de análise da amostra por LC-SPE-TT

Tempo de corrida (min)	Fluxo (ml/min)	Pressão Min/Max [bar]	Solventes	Volume (μ L)
60,00	0,80	0/400	A: H ₂ O + 0.1% HAC A: CH ₃ OH + 0.1% HAC	30,0

Tabela 5. Gradiente de eluição cromatográfica desenvolvido para análise por LC-SPE-TT

Gradiente		
Tempo (min)	%A (água)	%B (Metanol)
0,0	95,0	5,0
40,0	0,0	100,0
45,0	0,0	100,0
47,0	95,0	5,0
60,0	95,0	5,0

As amostras foram preparadas na concentração de 25 mg/mL e foi realizado um total de 20 injeções. Este experimento foi desenvolvido com a mesma coluna cromatográfica (Phenomenex Luna C18) utilizada na análise por CLAE-DAD.

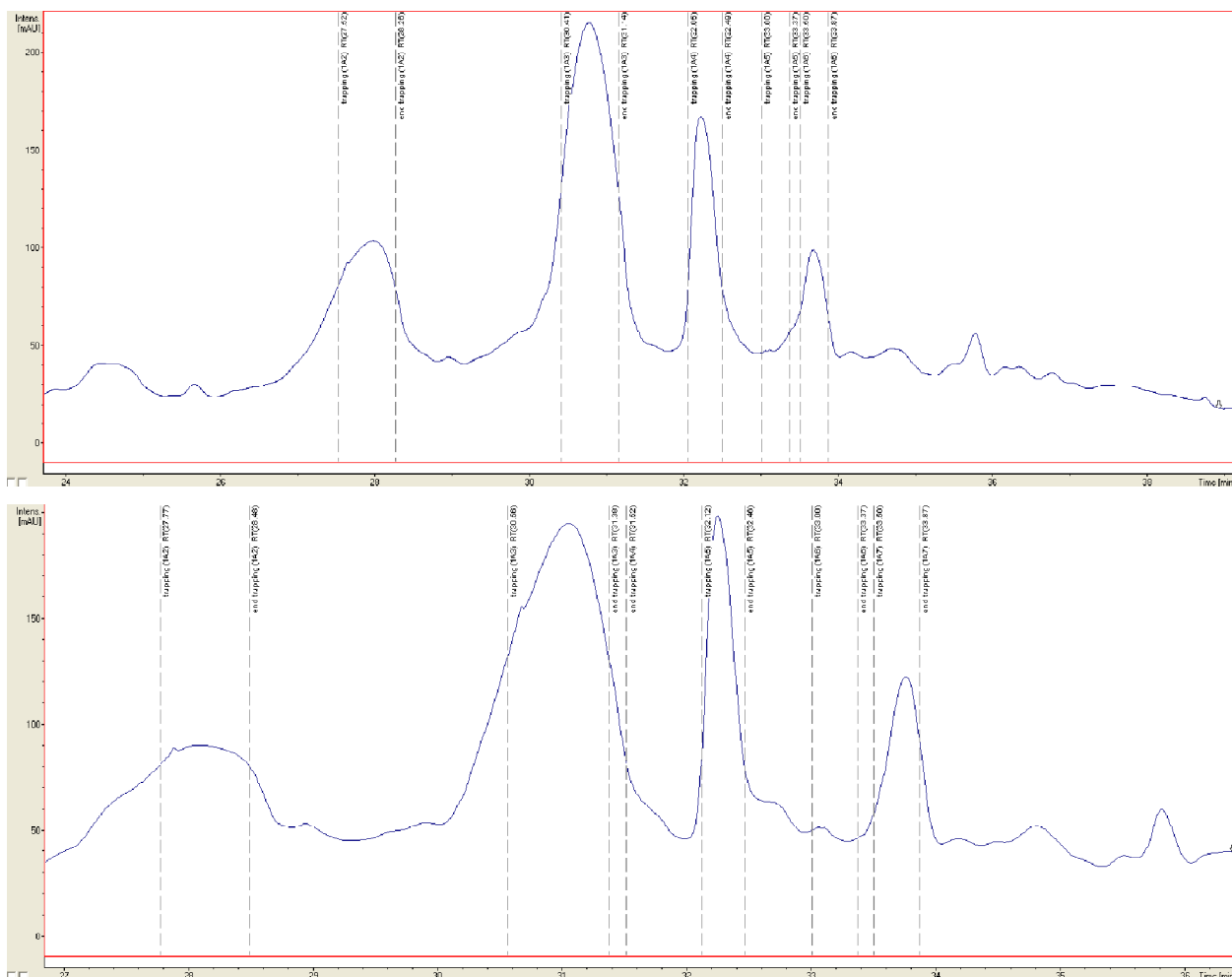


Figura 18. Trapeamento dos picos obtidos via LC-SPE-TT da fração metanólica do extrato das sementes de *I. edulis*.

Os cartuchos trapeados mudaram a partir da análise 13, devido ao deslocamento dos picos (devido à mudança na temperatura da sala ou sobrecarga da coluna).

Foram obtidas 7 frações (7 cartuchos) que, após secas em nitrogênio líquido no mesmo equipamento, foram analisadas por RMN de ^1H (600 MHz) em tubos de 3 mm. Os dados obtidos foram analisados e comparados com a literatura para identificação dos constituintes químicos presentes em cada amostra.

3.2.11 Avaliação da citotoxicidade

Todos os extratos dos órgãos das espécies de *Inga* foram submetidos à análise de citotoxicidade frente às células T98G (glioma humano), utilizando doxorubicina como controle positivo. Este ensaio foi realizado na Faculdade de Farmácia da

Universidade Estadual Paulista - UNESP (Araraquara - SP) sob supervisão da Profa. Dra. Christiane Pienna Soares.

Para o ensaio de citotoxicidade por Sulforrodamina B (SRB), foi utilizada uma suspensão de $1,5 \times 10^4$ células/poço da linhagem HepG2. As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades, e após 24 horas de cultivo, foram adicionadas as substâncias puras, seguindo uma diluição seriada 1:2 a partir da concentração de 40 µg/mL, (realizado em células T98G), pois no teste de genotoxicidade, foram utilizadas as células HepG2. Após 24 horas do tratamento, foram adicionados 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% à baixa temperatura e as placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C, posteriormente a solução de TCA foi removida e as placas foram lavadas, com água corrente de 3 a 4 vezes. Adicionou-se então 50 µL da solução de SRB a 0,4% (diluída em ácido acético) e as placas foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a remoção da SRB, as placas foram lavadas de 3 a 4 vezes com ácido acético a 1%, secas e o corante dissolvido com Tris Base 10 mM (Sigma). Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, as leituras espectrofotométricas da absorbância, foi realizada em comprimento de onda de 570 nm, no leitor de placas iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Os testes foram realizados em três experimentos independentes e a porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por ZHANG e colaboradores⁷⁴.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

	<i>I. marginata</i>	<i>I. laurina</i>	<i>I. edulis</i>
Folhas	• lupeol • fridolina • éster graxo do olean-18-eno • éster graxo da α-amirina • ácido vanílico • ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico • ácido gálico • galato de metila • ácido <i>p</i>-cumárico • miricetina-3-O-α-ramnosídeo • ácido ferúlico	• ácido gálico • galato de metila • miricetina • miricetina • procianidina • galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila • galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila • miricetina-3-O-(2"-Ogaloil)-α-ramnopiranosídeo • ácido <i>p</i>-cumárico • ácido cinâmico	• quercetrina • ácido gálico • galato de metila • ácido protocateuico • quercetrina
Raque foliar	• ácido gálico • galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila	• apigenina • ácido gálico	• ácido gálico • galato de metila • galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila
Polpa dos frutos	—	• ácido benzóico	—
Casca dos frutos	—	• galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila • proantocianidina A-2	—
Sementes	—	• ácido <i>p</i>-hidroxibenzóico • 4-vinil-fenol glicosídeo	• ácido cafeico • ácido <i>p</i>-metoxicinâmico • ácido <i>p</i>-hidroxibenzóico • ácido 4-metoxibenzoico • ácido ferúlico
Flores	—	• glicosídeo da flavona apigenina	—

Figura 19. Quadro de substâncias caracterizadas nas espécies de *Inga*.

O estudo químico das espécies *I. marginata*, *I. laurina* e *I. edulis* permitiram a caracterização de fenólicos e triterpenos já descritos na família Fabaceae. No entanto, alguns destes metabólitos estão sendo descritos pela primeira vez no gênero, assim como o estudo das antocianinas presentes nos tegumentos das sementes de *I. edulis*.

A Análise preliminar dos extratos brutos das folhas das espécies de *Inga* apresentou atividade antioxidante em teste com solução de β -caroteno e inibiu a peroxidação lipídica em modelo de lipossomas usando Fe^{2+} como iniciador de reações radicalares⁷¹. Após análise cromatográfica dos extratos das folhas das três espécies, optou-se por iniciar os estudos químicos com as folhas de *I. marginata*.

4.1 Estudo químico de *Inga marginata*

4.1.1 Estudo químico das folhas de *I. marginata*

Estudo dos constituintes de baixa polaridade (Hex.) das folhas de *I. marginata*: Caracterização de triterpenos em mistura através de RMN de ^1H e ^{13}C

A fase hexânica desta espécie apresentou-se ativa no ensaio de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase, por isso foi escolhida para estudo químico detalhado⁷¹. Com o intuito de obter um perfil químico prévio do extrato e verificar a presença de possíveis metabólitos, assim como auxiliar nos processos de fracionamento, iniciaram-se os estudos pela análise da fração hexânica através de CCD e RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3). A análise minuciosa deste espectro permitiu verificar sinais de hidrogênios hidroximetínicos em $\delta_{\text{H}} 3,6$, prótons metílicos em $\delta_{\text{H}} 0,8$ e sinais sobrepostos em $\delta_{\text{H}} [1,2-4,1]$. Este conjunto de sinais sugere a estrutura de ácido carboxílico de cadeia longa esterificado com uma unidade de etilenoglicol, indicando possivelmente a presença do éster dodecanoato de 2-hidroxietila isolado anteriormente das folhas e ramos de *Inga laurina*⁷¹.

A presença de compostos aromáticos foi observada em baixa concentração em relação aos compostos alifáticos.

A análise do espectro de RMN de ^1H da fração 1 (230 mg) mostrou dois conjuntos de sinais de prótons olefínicos e um sinal de próton carbinólico em mistura com ácidos graxos, as quais são substâncias de larga distribuição em folíolos vegetais, pois possui função protetora, como impermeabilizar as superfícies das folhas e proteger contra a perda excessiva de água pela transpiração.

As frações que se apresentaram semi purificadas (frações 3 e 5) pela análise em CCD foram analisadas por RMN ^1H e ^{13}C . A análise química destas frações resultou na identificação dos triterpenos lupeol (**1**), éster graxo da α -amirina (**2**), éster do olean-18-eno (**3**) e a fridolina (**4**) em mistura.

No espectro de RMN ^1H da mistura da fração 3 foram observados singletos entre 0,8 e 1,2 ppm, os quais são característicos de hidrogênios metílicos de esqueletos triterpênicos. Adicionalmente, a maioria dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C encontra-se na região entre 14 e 35 ppm, referente aos carbonos metílicos e metilênicos. O lupeol foi identificado no espectro de RMN ^1H pela presença adicional de um duplete largo em δ 4,68 (*dl*, $J=2,1$ Hz) e um duplo duplete largo em δ 4,56 (*ddl*, $J=1,5$ e $2,1$ Hz) integrando para um hidrogênio cada, característicos dos hidrogênios olefínicos geminais. O espectro de RMN ^{13}C confirmou a proposta estrutural através dos sinais observados, com destaque para os sinais de carbonos olefínicos em 109,3 (C29) e 151,0 ppm (C20).

A análise dos deslocamentos químicos dos carbonos sp^2 do espectro de RMN de ^{13}C da fração 5 em mistura sugeriu que a mesma era composta de triterpenos com estrutura do éster da α -amirina (139,4 ppm, para o C-13 e 124,3 ppm para o C-12). O espectro de RMN de ^{13}C também apresentou sinal de carbono carbonílico em 210,0 ppm e sinal de um grupo metila em 6,80 ppm, típicos do triterpeno fridolina. Adicionalmente, os sinais em 142,4 (C-18) e 129,4 ppm (C-19), bem como os sinais dos grupos metílicos indicaram a presença do triterpeno olean-18-eno esterificado com ácido graxo.

Os sinais em 142,4 (C-18) e 129,4 ppm (C-19), bem como os sinais dos grupos metílicos indicaram a presença do triterpeno olean-18-eno esterificado com ácido graxo.

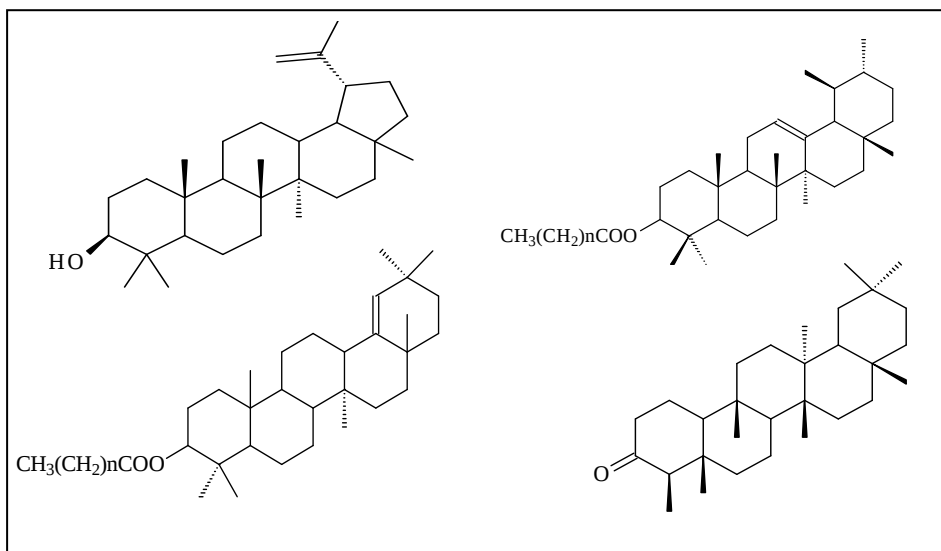


Figura 20. Estruturas dos triterpenos identificados nas folhas de *I. marginata*.

Este estudo mostrou que utilizando os dados de RMN de ^1H e ^{13}C , é possível, em muitos casos, identificar substâncias triterpênicas em misturas quando o objetivo é apenas registrar a composição química da mistura.

Estudo dos constituintes das fases AcOEt e BuOH das folhas de *I. marginata*

As fases de partição AcOEt e BuOH foram fracionadas em coluna cromatográfica aberta e suas frações foram analisadas por CCD e RMN de ^1H para obtenção de substâncias puras ou frações semipurificadas.

A fração 5 (2,0 mg) do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt do extrato de *I. marginata* apresentou dois picos majoritários, nesta análise, com tempos de retenção de 18,45 min e 19,06 min.

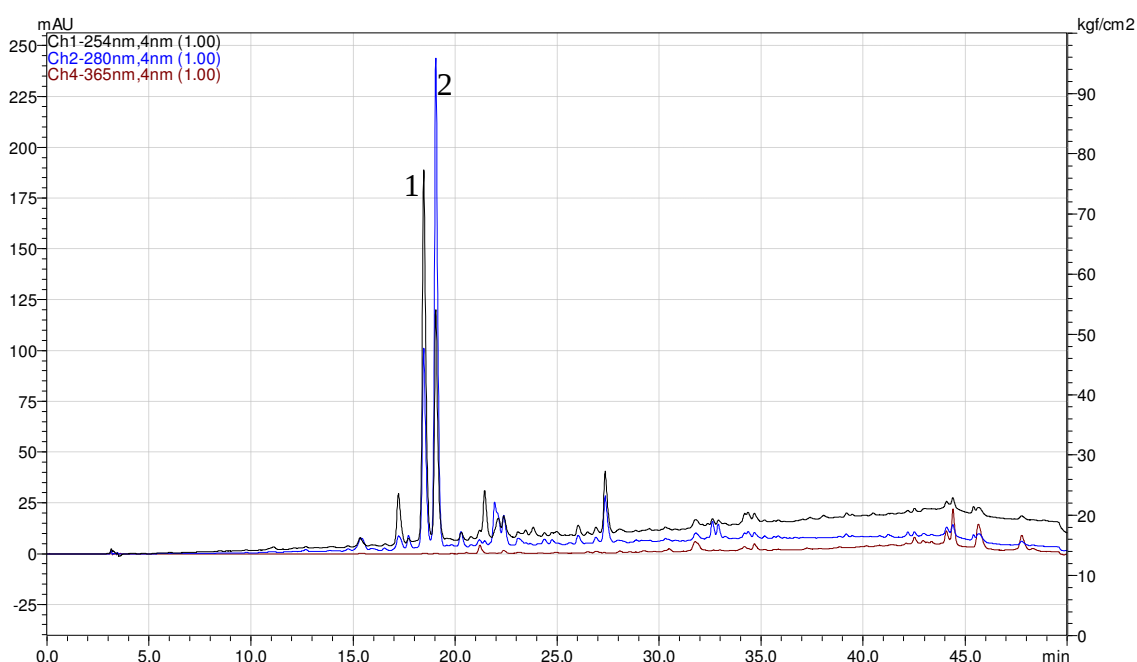


Figura 21. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 5 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *Inga marginata*.

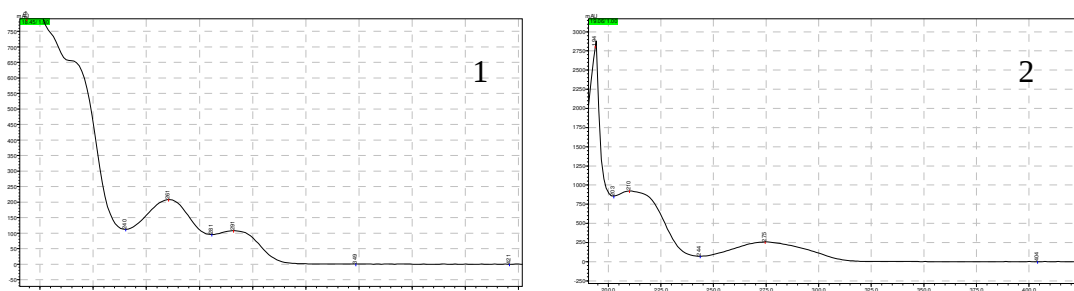


Figura 22. Espectros de UV obtidos via CLAE-DAD da fração 5 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *Inga marginata*.

A substância associada ao pico 2 ($t_r = 19,0$ min) foi obtida com excelente grau de pureza na fração 6-7, e após análise de RMN de ^1H foi caracterizada como sendo um derivado trimetilado do ácido gálico (**substância 8**).

A análise do tempo de retenção ($t_r = 18,45$ min) e das bandas apresentadas no espectro de UV ($\lambda(\text{nm})$: 261/291) da substância associada ao pico 1 permitiu identificá-la como ácido vanílico (**substância 7**).

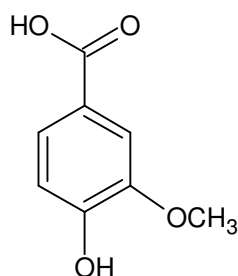


Figura 23. Estrutura do ácido vanílico (**7**).

A reunião das frações 6-7 (12 mg) apresentou, nesta análise, um pico majoritário no tempo de retenção de 18,92 min. A análise por RMN de ^1H (300 MHz) mostrou ser o derivado tri-metilado do ácido gálico (ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico)(**8**) [DMSO- d_6 ; δ_{H} 7,20 (2H, s; H-2/H-6), 3,80 (9H, s; H-8)]. O tempo de retenção desta substância condiz com a sua estrutura, uma vez que o galato de metila apresentou tempo de retenção em torno de 10 min nas mesmas condições de análise em estudos anteriores.

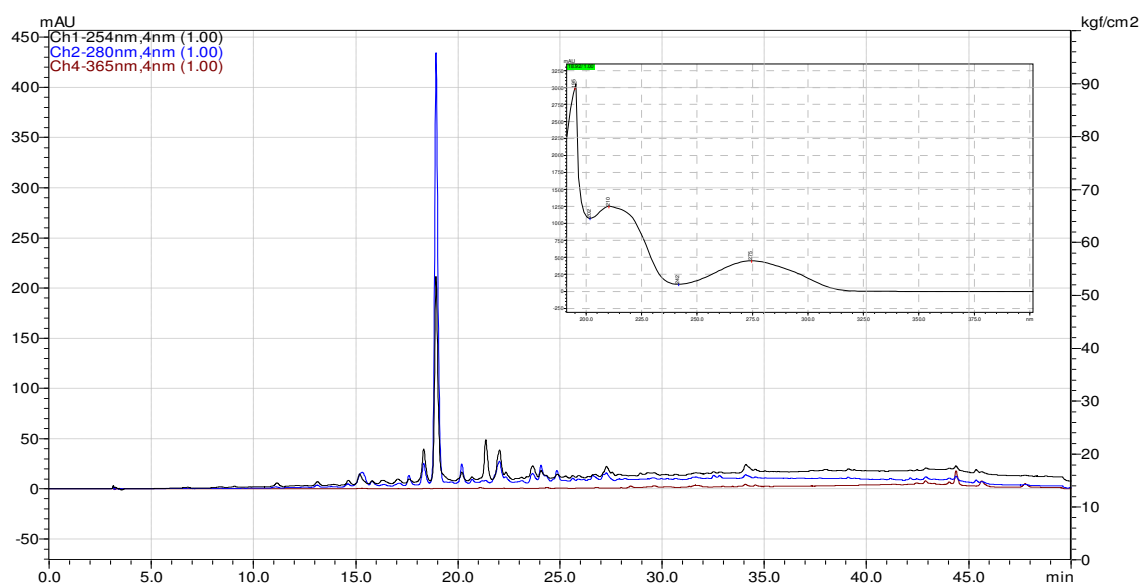


Figura 24. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 6-7 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *Inga marginata*.

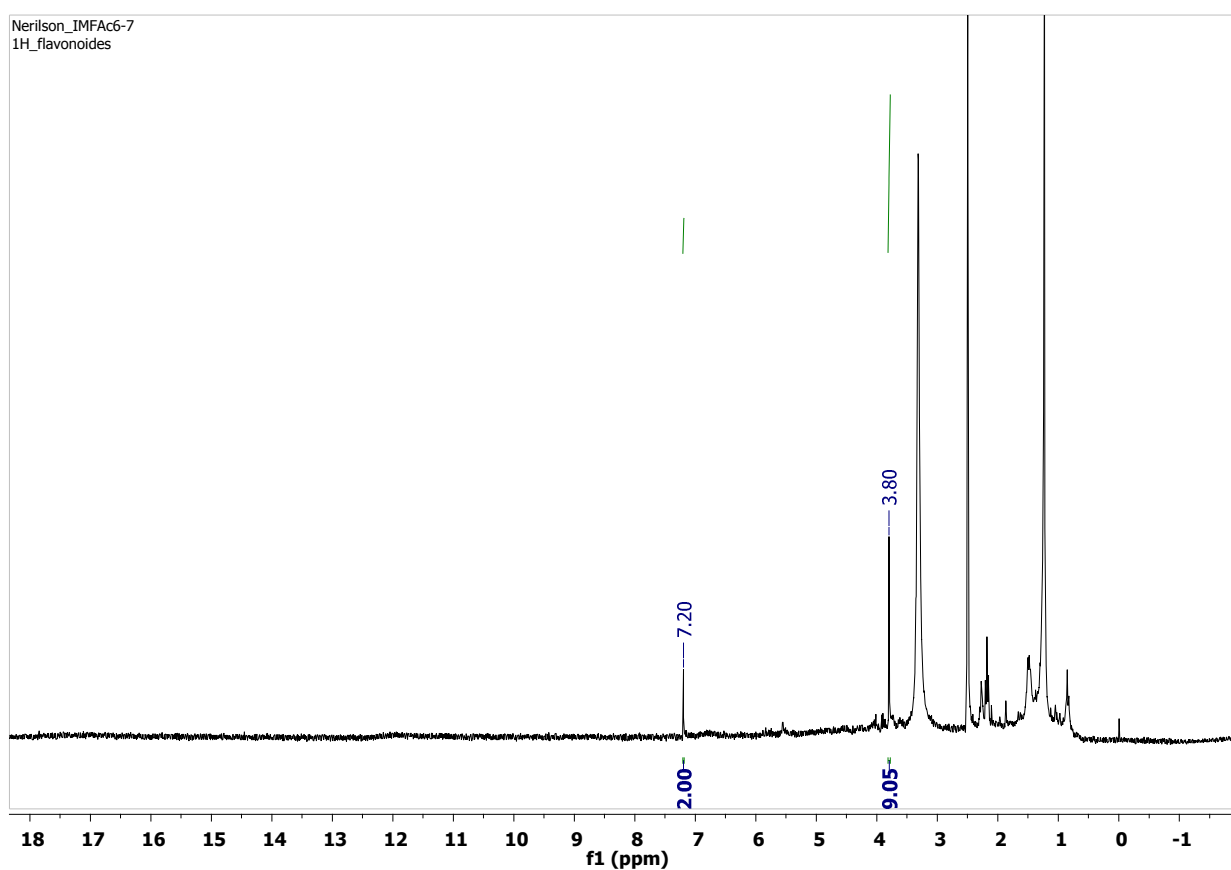


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da fração 6-7 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. marginata*.

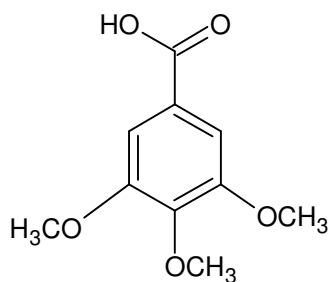


Figura 26. Estrutura do ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico (**8**).

A reunião das frações 13-15 (15 mg) apresentou um composto majoritário, que após análise por RMN de ^1H (300 MHz), revelou a presença do ácido gálico (**5**) [DMSO- d_6 ; d_H 6,92 (s, 2H)].

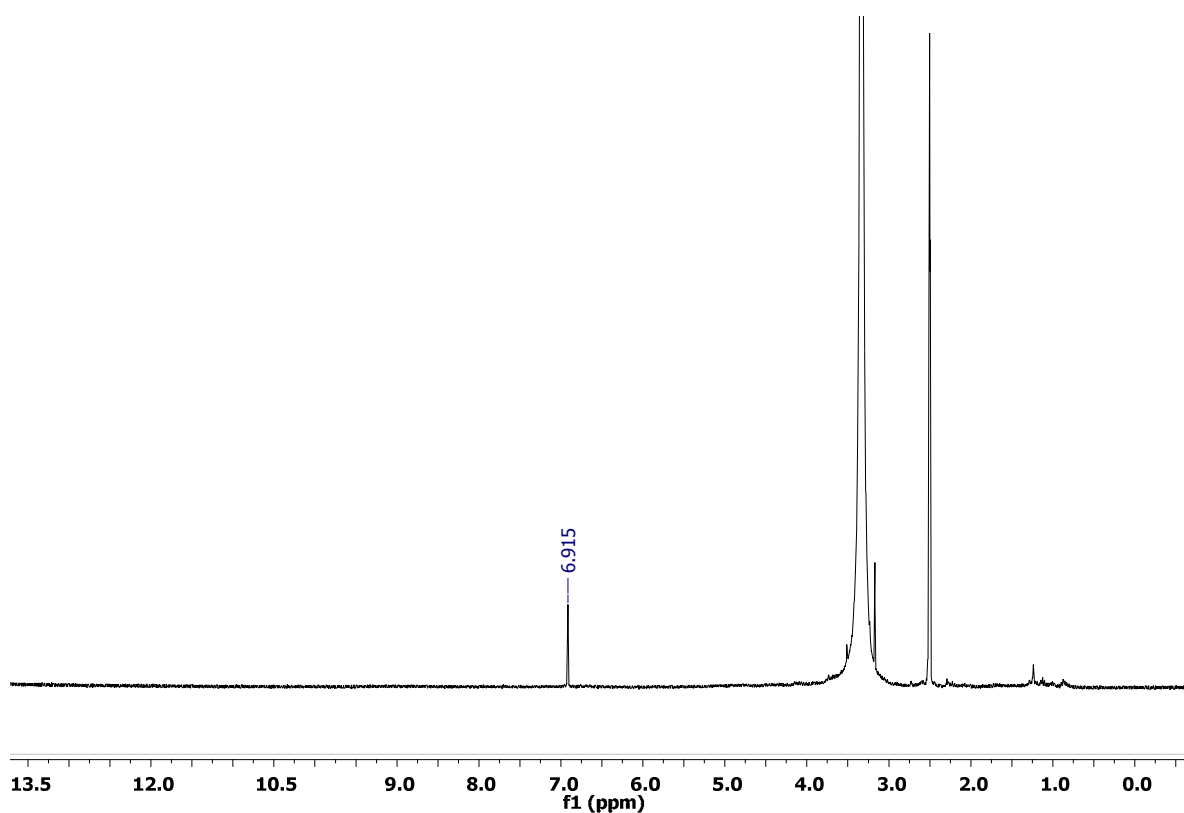


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da fração 13-14 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. marginata*.

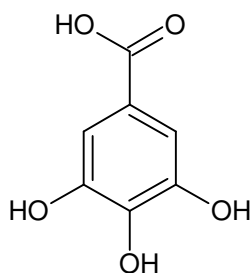


Figura 28. Estrutura do ácido gálico (**5**)

A primeira fração do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt do extrato de *I. marginata* (C18, eluição em H₂O/MeOH até MeOH 100%) foi submetida aos mesmos procedimentos cromatográficos fornecendo uma fração com elevado grau de pureza. O espectro de RMN de ¹H desta fração mostrou um sinal em 6,93 ppm integrando para 2H e um sinal em 3,73 integrando para 3H, sugerindo a presença do galato de metila (**substância 6**), que foi confirmado através dos sinais observados no espectro de RMN de ¹³C

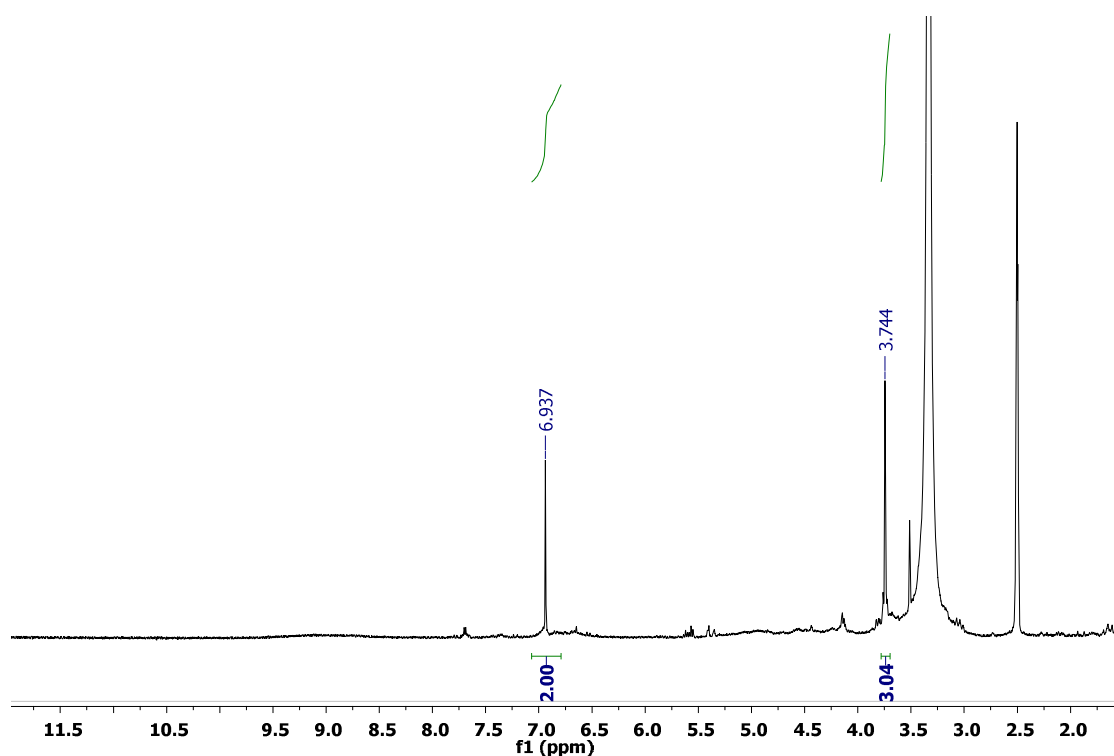


Figura 29. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz) da fração 1 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *I. marginata*

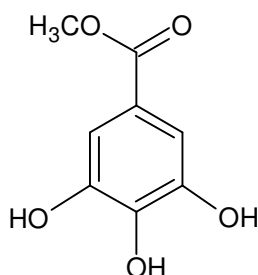


Figura 30. Estrutura do galato de metila (**6**)

A fração menos polar do fracionamento da subfração obtida em MeOH 100% forneceu uma substância fenólica que após análise espectral foi caracterizado como ácido *p*-cumárico (**substância 9**) através dos sinais em $\delta_{\text{H}} 7,60$ (d, $J = 16$ Hz) e $\delta_{\text{H}} 6,31$ (d, $J = 16$ Hz) e dos pares de dupletos em $\delta_{\text{H}} 7,43$ ($J = 8,4$ Hz) e $6,81$ ppm ($J = 8,4$ Hz), característicos dos hidrogênios aromáticos H-2/H-6 e H-3/H-5, respectivamente.

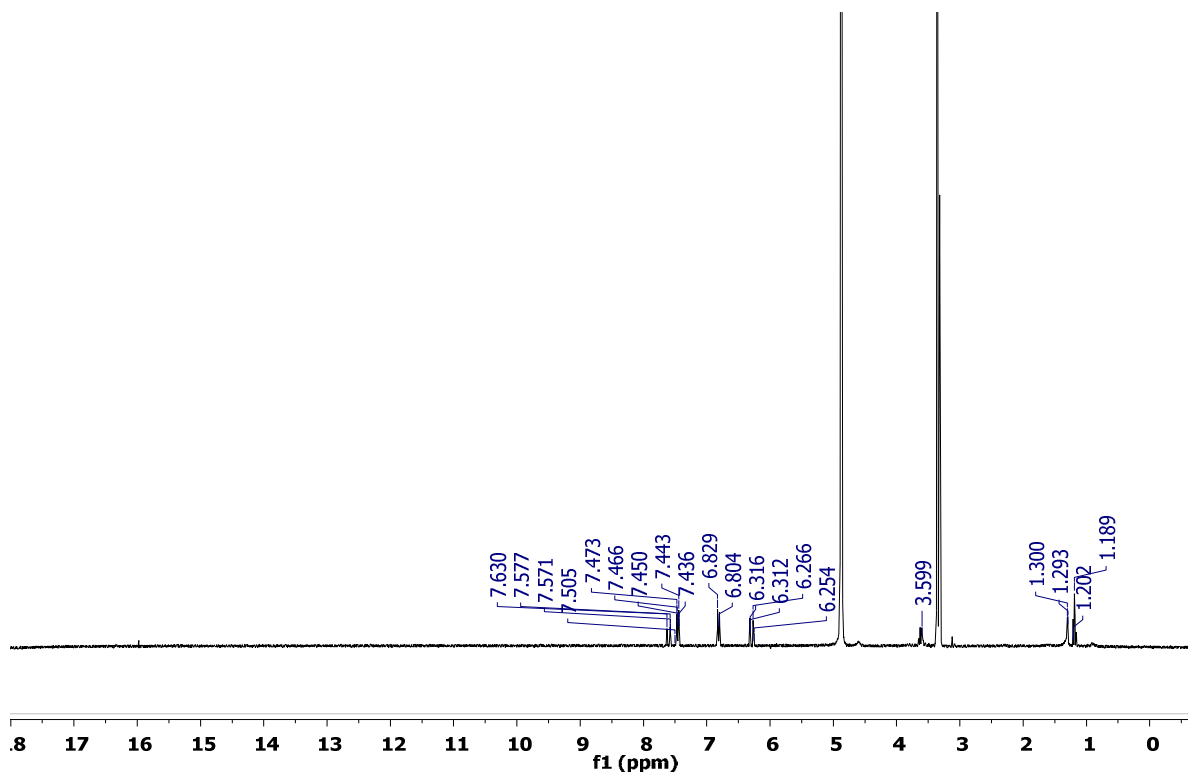


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da fração 10 (ácido *p*-cumárico) do fracionamento cromatográfico da fração MeOH 100% da fase AcOEt das folhas de *I. marginata*.

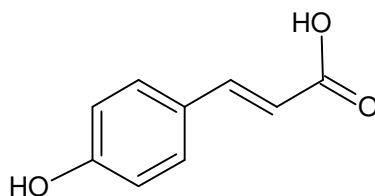


Figura 32. Estrutura do ácido *p*-cumárico (**9**)

As frações obtidas do fracionamento cromatográfico da fração 1 foram analisadas por CLAE-DAD pelo mesmo método (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) utilizado para obtenção dos perfis cromatográficos e, em seguida, analisadas

por RMN de ^1H . A análise dos cromatogramas das frações mais polares indicou a presença de um composto majoritário, que após análise do seu espectro de UV e comparação do tempo de retenção com padrão autêntico foi identificado como flavonoide miricetrina (miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo) (**substância 15**).

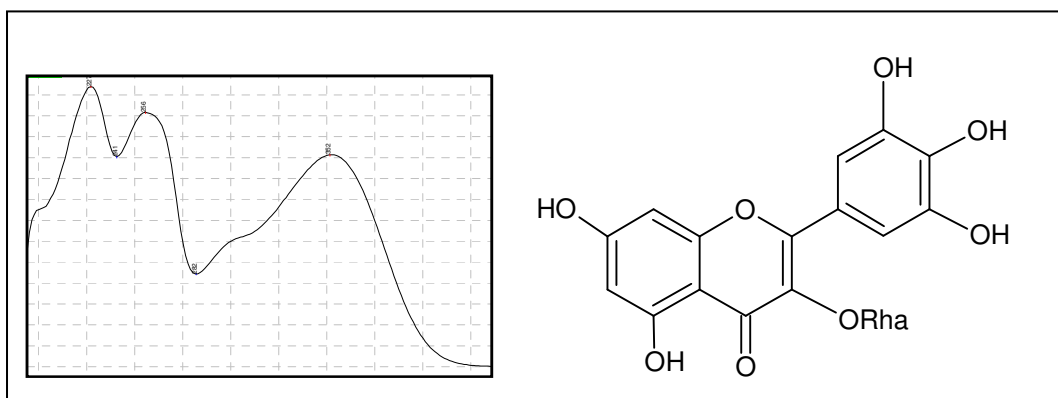


Figura 33. Espectro de UV e estrutura da miricetrina

A subfração 6 (2,5 mg) obtida do fracionamento da fase BuOH (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) apresentou uma substância fenólica majoritária (figura 8), conforme indicaram seus dados de RMN de ^1H : [DMSO- d_6 ; δ_{H} 7,36 (*d*; $J = 3,0$ Hz), 6,93 (*dd*; $J = 8,4$ e $3,0$ Hz), 6,62 (*d*; $J = 8,4$ Hz), além de sinais para uma unidade de Ramnose], sugerindo tratar-se do ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzóico). Porém, devido a pequena quantidade de massa para obtenção de espectros de RMN de ^{13}C e 2D e, por estar em mistura com outras substâncias não foi possível confirmar a presença desta substância.

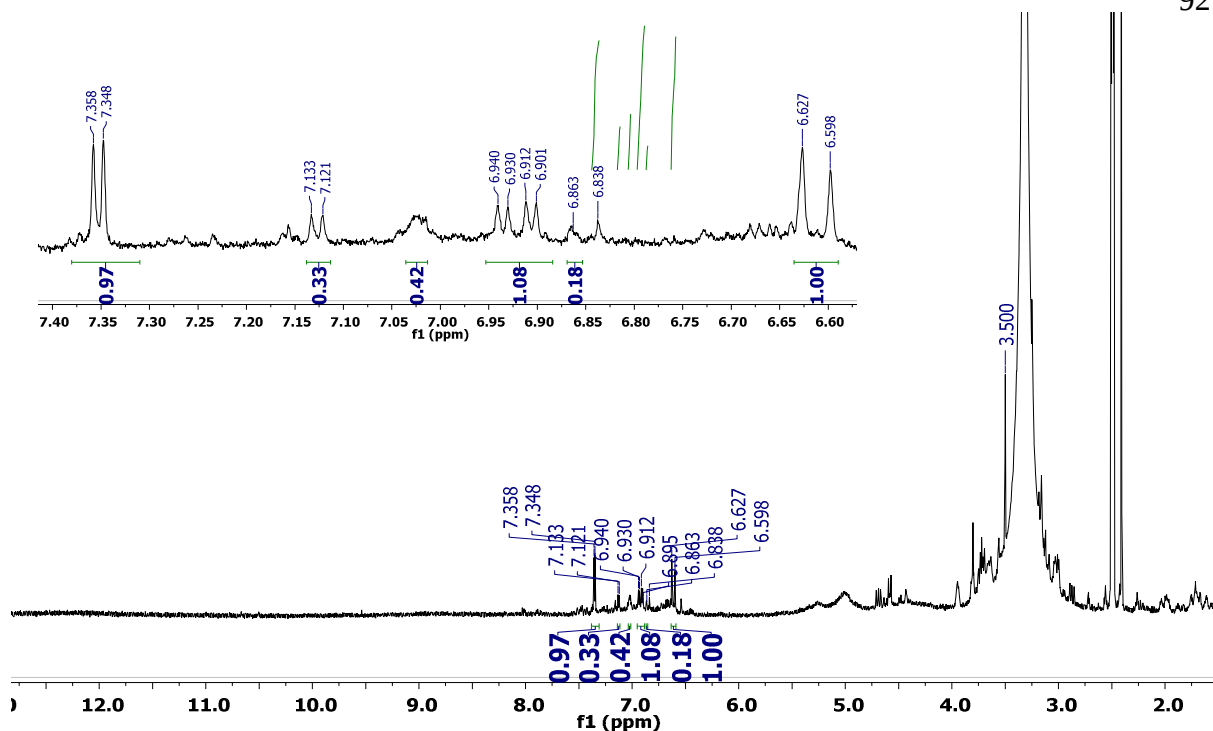


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da fração 6 do fracionamento cromatográfico da fase BuOH das folhas de *I. marginata*

A análise minuciosa dos espectros de RMN de ^1H da fração 2 mostrou sinais referentes a um derivado do ácido pipecólico já isolado de *Inga*⁶⁶ também encontrada na fase AcOEt. No entanto, as saponinas mostraram-se constituintes majoritários nesta fase, que apresentou formação abundante de espuma, as quais foram detectadas por meio de reagentes colorimétricos e RMN de ^1H . Algumas frações ricas em saponinas foram analisadas por RMN de ^1H e ^{13}C para caracterização das mesmas, porém a análise dos dados espectrais não forneceu resultados conclusivos a cerca da estrutura destas substâncias.

4.2 Fracionamento biomonitorado: Avaliação da atividade antitumoral (citotoxicidade)

Todos os extratos das partes vegetativas das espécies de *Inga* foram submetidas à análise de citotoxicidade frente às células HT-29 do câncer do cólon humano (Seo et al., 2001), utilizando doxorubicina como controle positivo. As amostras com potencial antitumoral foram selecionadas para estudo químico detalhado.

Tabela 6. Valores de Dose Efetiva 50 (ED 50; $\mu\text{g/mL}$) obtidos do efeito citotóxico dos extratos das partes vegetativas das três espécies de *Inga* sob as linhagens tumorais de cancro do cólon humano (HT-29).

	<i>I.laurina</i>	<i>I.edulis</i>	<i>I.marginata</i>
Folhas	7.5	>20	>20
Raque foliar	>20	>20	13.8
Flores	>20	-	-
Polpa do fruto	-	-	-
Casca do fruto	>20	-	-
Semente	15.2	-	-

As amostras que se apresentaram ativas no ensaio avaliado foram selecionadas para estudo químico detalhado.

4.2.1 Estudo químico da raque foliar de *I. marginata*

O extrato etanólico da raque foliar de *I. marginata* apresentou uma promissora atividade antitumoral ($\text{ED}_{50} = 13,8 \mu\text{g/mL}$) no ensaio avaliado, por isso, foi selecionado para a purificação dos seus constituintes químicos. O extrato bruto foi submetido a partição com Hexano e MeOH, e as duas fases de partição obtidas foram avaliadas quanto ao seu potencial antitumoral. A fase metanólica (100 mg) apresentou melhor atividade ($\text{ED}_{50} = 7,4 \mu\text{g/mL}$) em comparação à fase hexânica ($\text{ED}_{50} = 20,0 \mu\text{g/mL}$), e por isso foi submetida a purificação de seus metabólitos utilizando cromatografia líquida de média pressão (MPLC). Foram obtidas 60 subfrações que, após análise em CCD, foram reunidas em 5 frações que, em seguida, foram analisadas por CLAE-DAD.

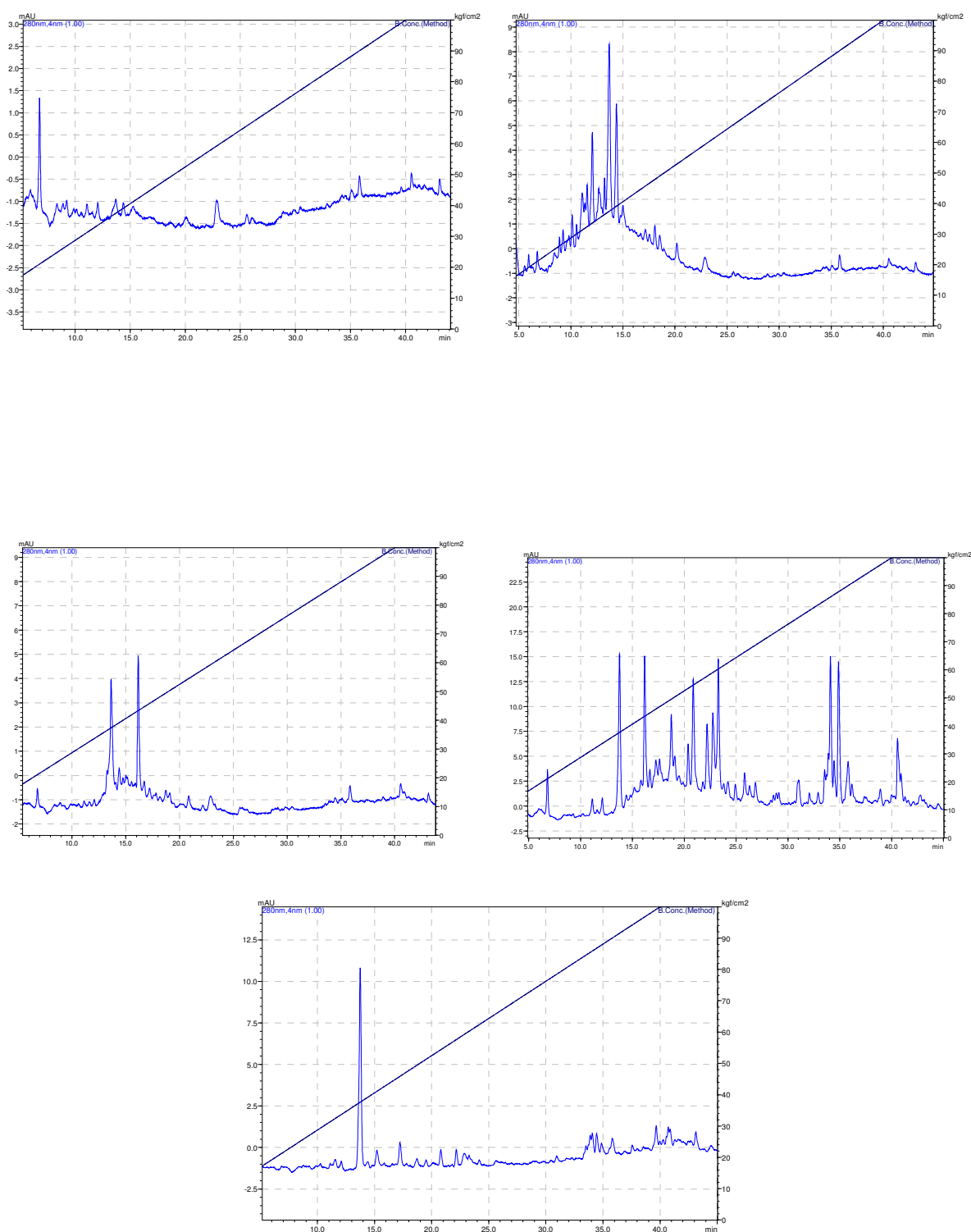


Figura 35. Cromatograma obtido via CLAE-DAD dos 5 grupos do fracionamento cromatográfico da raque foliar de *Inga marginata*.

No entanto, devido a complexidade da mistura e da reduzida quantidade de massa, não foi possível isolar os componentes ativos ou caracterizá-los em mistura.

4.3 Estudo químico de *Ingalaurina*

4.3.1 Estudo químico da polpa dos frutos de *I. laurina*

A fração 5 (5,3 mg) obtida em H₂O/MeOH 4:6 do fracionamento da fração metanólica da polpa do fruto forneceu uma substância com elevado grau de pureza ($t_r = 25$ min), que após análise de UV, RMN de ¹H [300 MHz, CD₃OD; δ_H 8,02 (*dd*; $J = 8,4$ e $1,5$ Hz; 2H), 7,57 (*tt*; $J = 7,5$ e $1,5$ Hz, 1H), 7,46 (*tq*; $J = 7,5$ e $1,5$ Hz; 2H)] e ¹³C [75 MHz, CD₃OD; 133,4 (1CH), 130,1 (2CH), 129,4 (2CH)], mostrou ser o ácido benzóico (**substância 10**).

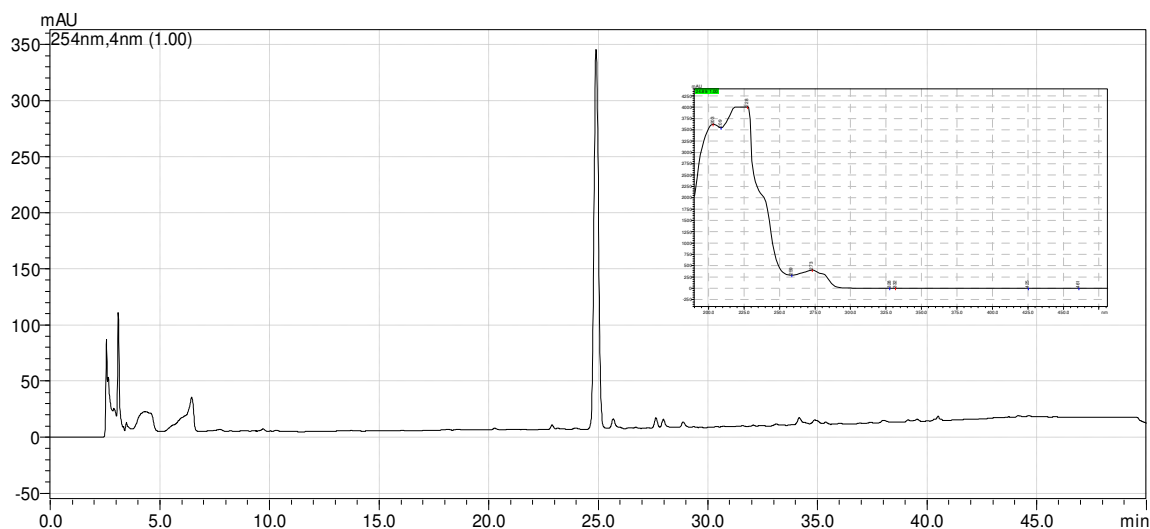


Figura 36. Cromatograma e espectro de UV do ácido benzóico ($t_r = 25$ min) isolado da polpa dos frutos de *Inga laurina*.

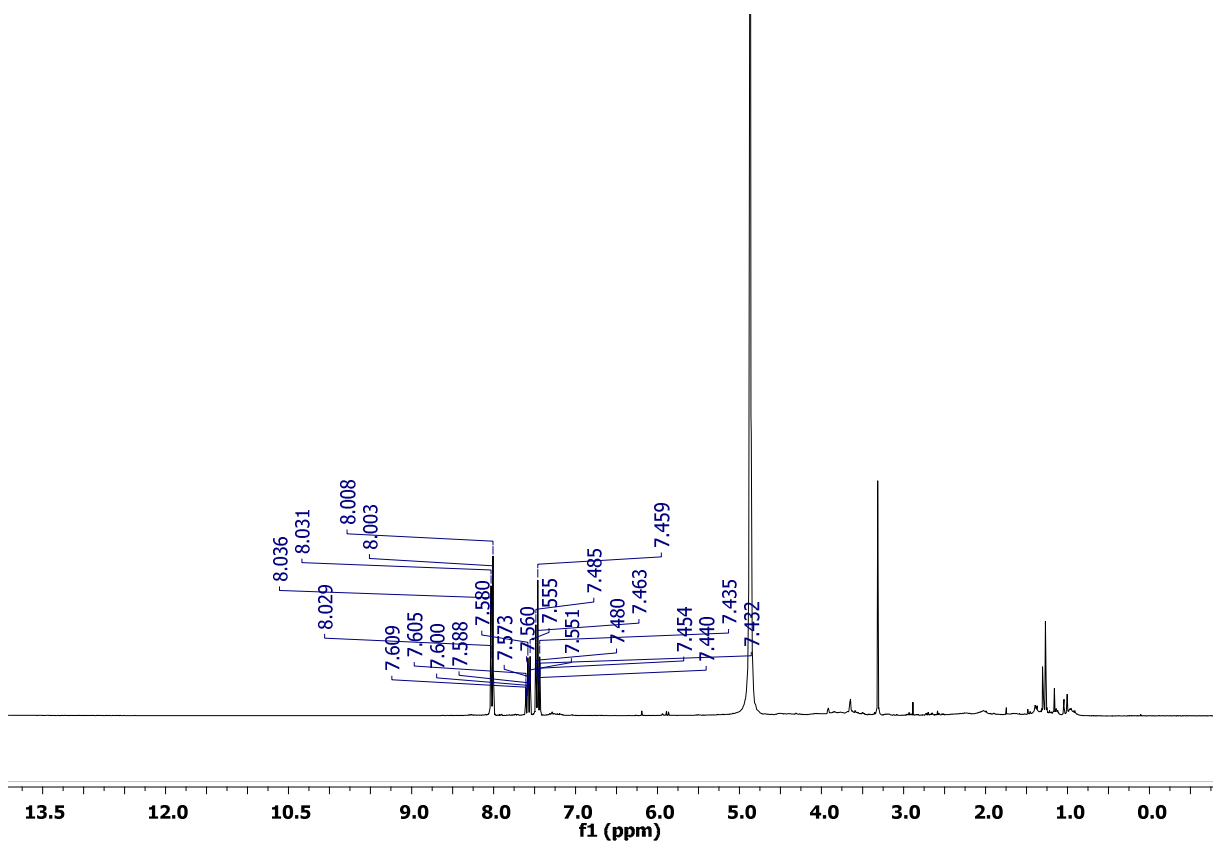


Figura 37. Espectro de RMN de ¹H(300 MHz) do ácido benzóico (**10**) isolado da polpa dos frutos de *Inga laurina*.

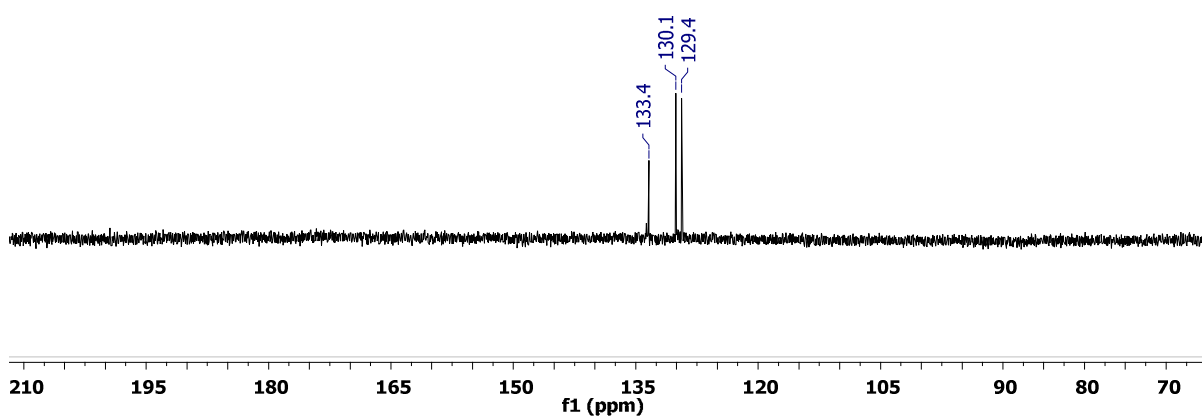


Figura 38. Espectro de RMN de ¹³C(75 MHz) do ácido benzóico (**10**) isolado da polpa dos frutos de *Inga laurina*.

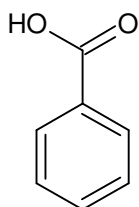


Figura 39. Estrutura do ácido benzóico (**10**)

A fração aquosa da casca dos frutos mostrou a presença de um flavonoide quando analisado por CLAE, no entanto, sua composição química apresentou-se visivelmente rica em açúcares livres na análise por RMN de ^1H e por isso não foi possível caracterizá-lo.

4.3.2 Estudo químico das cascas dos frutos de *I. laurina*

A fração 5 (5,7 mg) obtida do fracionamento da fração metanólica do extrato das cascas dos frutos de *I. laurina* mostrou uma substância majoritária na análise por CLAE-DAD. O espectro de UV e o tempo de retenção mostraram-se similares aos do galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila (**substância 11**), já isolado das folhas desta espécie, permitindo sua identificação.

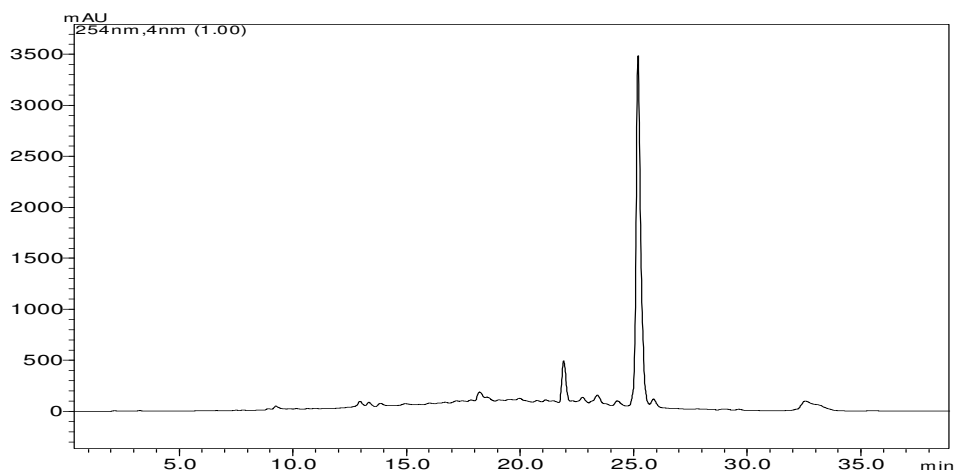


Figura 40. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 5 do fracionamento cromatográfico da casca dos frutos de *Inga laurina*.

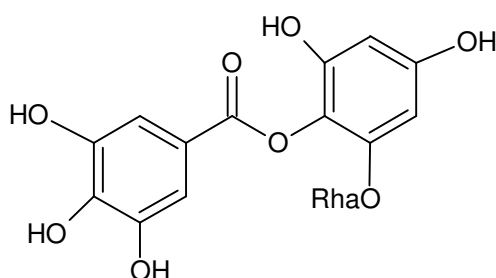


Figura 41. Estrutura do galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila (**11**)

A fração 1 foi analisada por CLAE-DAD e RMN de ^1H , cujos dados permitiram sua identificação como proantocianidina A-2 (**substância 12**)

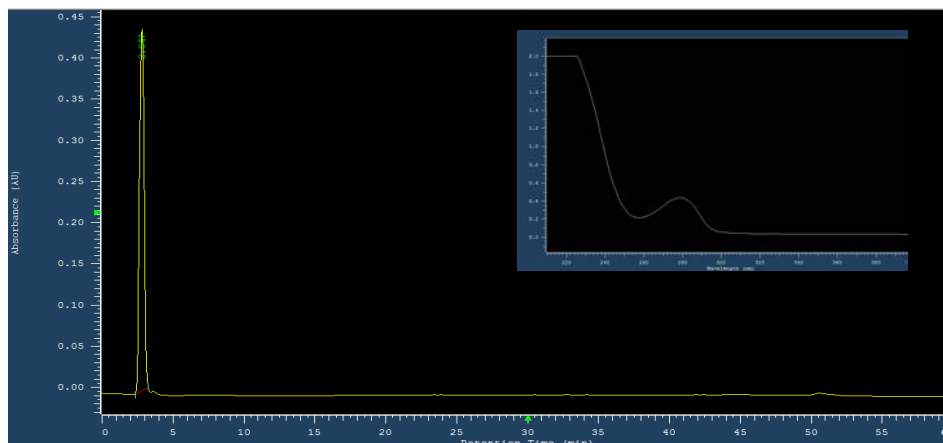


Figura 42. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da proantocianidina isolada do fracionamento cromatográfico da casca dos frutos de *Inga laurina*

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) da proantocianidina A-2.

Anel	H	$\delta_{\text{experimental}}$	$^*\delta_{\text{literatura}}$
C	3	4,08 (d; 3,2)	4.06 (d, 3.4)
	4	4,42 (d; 3,6)	4.41 (d, 3.4)
A	6	6,02 (d; 2,4)	6.01 (d, 2.4)
	8	6,09 (d; 2,8)	6.07 (d, 2.4)
B	10	7,17 (d; 2,4)	7.14 (d, 2.2)
	13	6,83 (d, 8,0)	6.81 (d, 8.3)
	14	7,04 (dd; 8,0 e 2,0)	7.02 (dd, 8.3, 2.2)
F	2'	4,95 (br.s)	4.92 (br s)
	3'	4,26 (m)	4.24 (m)
	4 α '	2,78 (dd; 17,2 e 2,4)	2.76 (dd, 17.2, 2.3)
	4 β '	2,97 (dd; 17,2 e 4,8)	2.95 (dd, 17.2, 4.9)
	6'	6,11 (s)	6.10 (s)
	8'	-	-
D	10'	7,15 (d; 2,4)	7.15 (d, 2.1)
E	13'	6,82 (d; 8,4)	6.81 (d, 8.2)
	14'	7,00 (dd; 8,0 e 2,0)	6.98 (d, 8.2, 2.1)

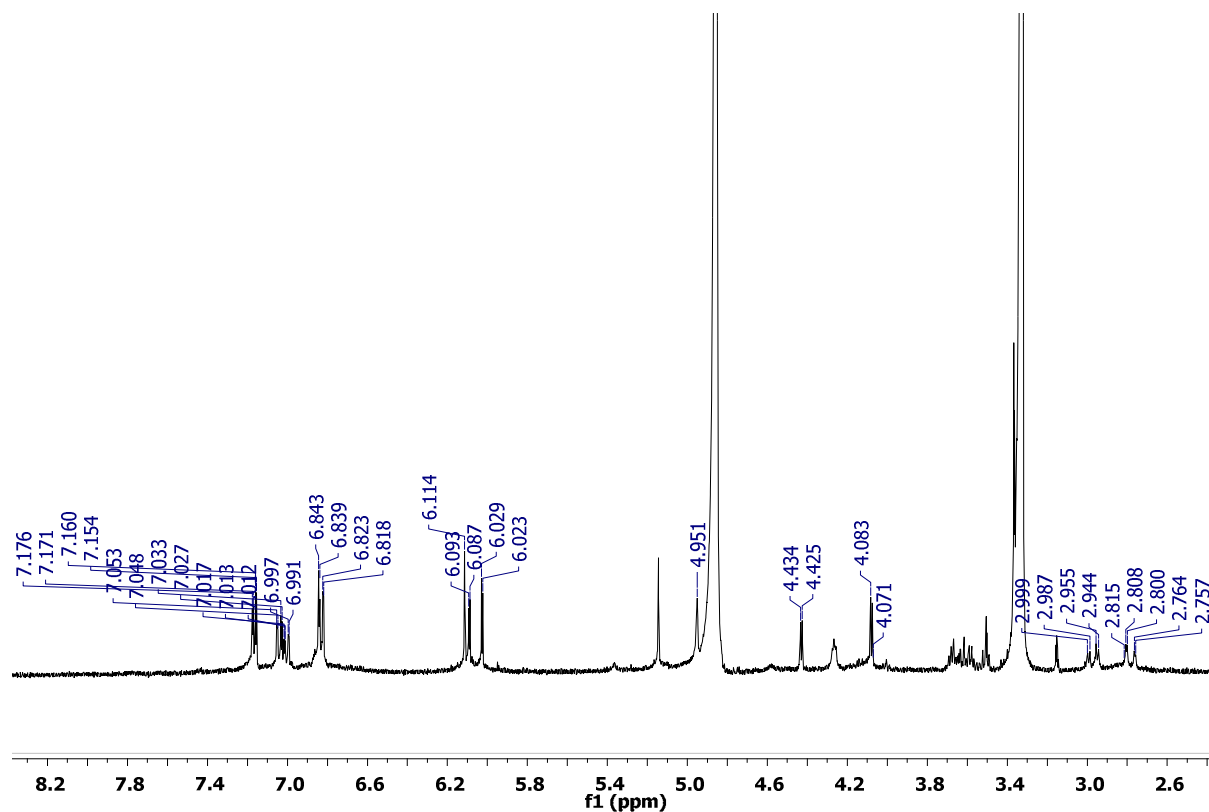


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 1 obtida da análise em CCDP das cascas dos frutos de *Inga laurina*

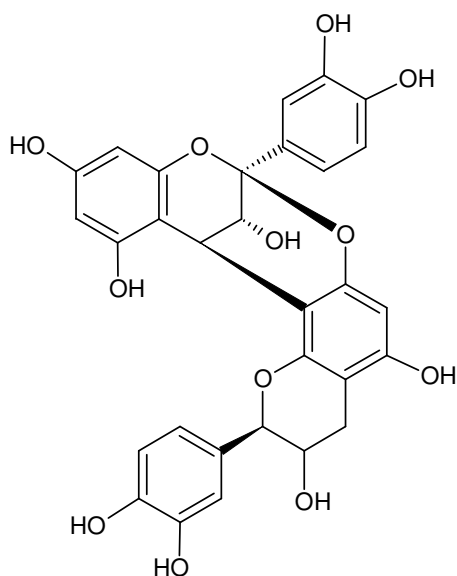


Figura 44. Estrutura da proantocianidina A-2 (**12**) isolada das cascas dos frutos de *I. laurina*.

As proantocianidinas são também conhecidas como taninos condensados e constituem a segunda classe mais abundante de compostos fenólicos de origem natural depois das ligninas⁷⁵.

4.3.4 Estudo químico das sementes de *I. laurina*

O extrato etanólico (4,5 g) das sementes de *I. laurina* foi submetido a partição líquido-líquido com AcOEt e H₂O, fornecendo 500 mg da fase orgânica e 4,0 g da fase aquosa. Ambas as frações foram analisadas por RMN de ¹H (400 MHz) a fim de conhecer melhor a composição química e direcionar as etapas de purificação. O espectro de RMN da fração AcOEt indicou uma complexidade de metabólitos de baixa polaridade, no entanto, foi observado um singlete em 9,5 ppm característico de próton ligado a Nitrogênio. A fração aquosa concentrou as substâncias de interesse (fenólicos e nitrogenados), porém, rica em açúcares livres.

A fração aquosa foi submetida à coluna cromatográfica utilizando Diaion HP-20. Neste procedimento os compostos contendo ligação dupla (s) e/ou grupo aromático são retidos pela resina enquanto outros são eluídos através da coluna. Os carboidratos são usualmente separados por este procedimento. Ao aumentar a percentagem de MeOH, os compostos mais lipofílicos são eluídos resultando na separação dos açúcares dos demais fenólicos. A coluna foi eluída inicialmente com água para obtenção dos açúcares livres e, em seguida com MeOH, para obtenção dos demais compostos fenólicos (figura 3). Ambas as frações foram analisadas por RMN de ¹H (400 MHz) e CLAE-DAD.

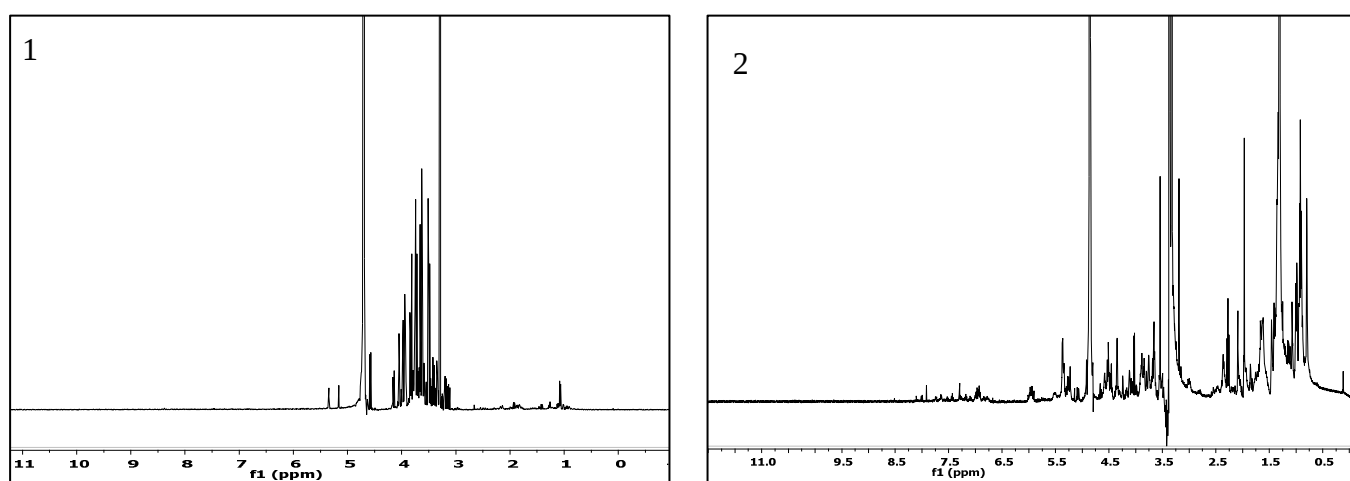


Figura 45. Fração H₂O 100% (1), rica em açúcares livres, e fração MeOH 100% (2), obtida da CC do extrato etanólico das sementes eluída sobre Diaion.

A fração metanólica (350 mg) foi submetida a análise por cromatografia em coluna em sílica derivatizada C18 e eluída com os sistemas: MeOH 40% (1), MeOH

70% (2) e MeOH 100% (3). As três frações obtidas foram submetidas ao bioensaio para avaliação de citotoxicidade (com células tumorais da linhagem HT-29) e analisadas por RMN de ^1H (400 MHz) e CLAE-DAD.

A fração obtida em metanol puro (fração 3) apresentou sinais referentes a alcalóides, ainda não identificados no gênero *Inga*. No entanto, não apresentou potencial antitumoral no ensaio realizado. As frações 1 (MeOH 40%) e 2 (MeOH 70%) apresentaram ED_{50} de 9.2 e 7.6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Foram obtidos espectros de RMN de ^1H das três frações com o intuito de observar os sinais em comum e possivelmente relacionar as substâncias presentes responsáveis pelo potencial citotóxico.

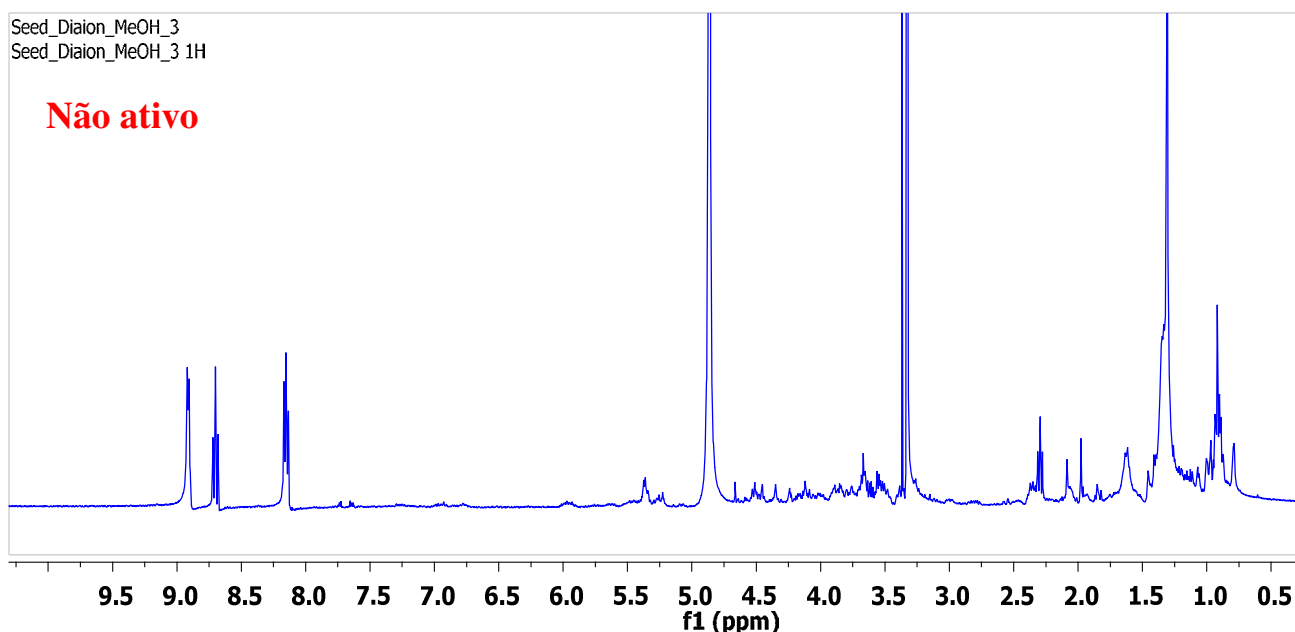
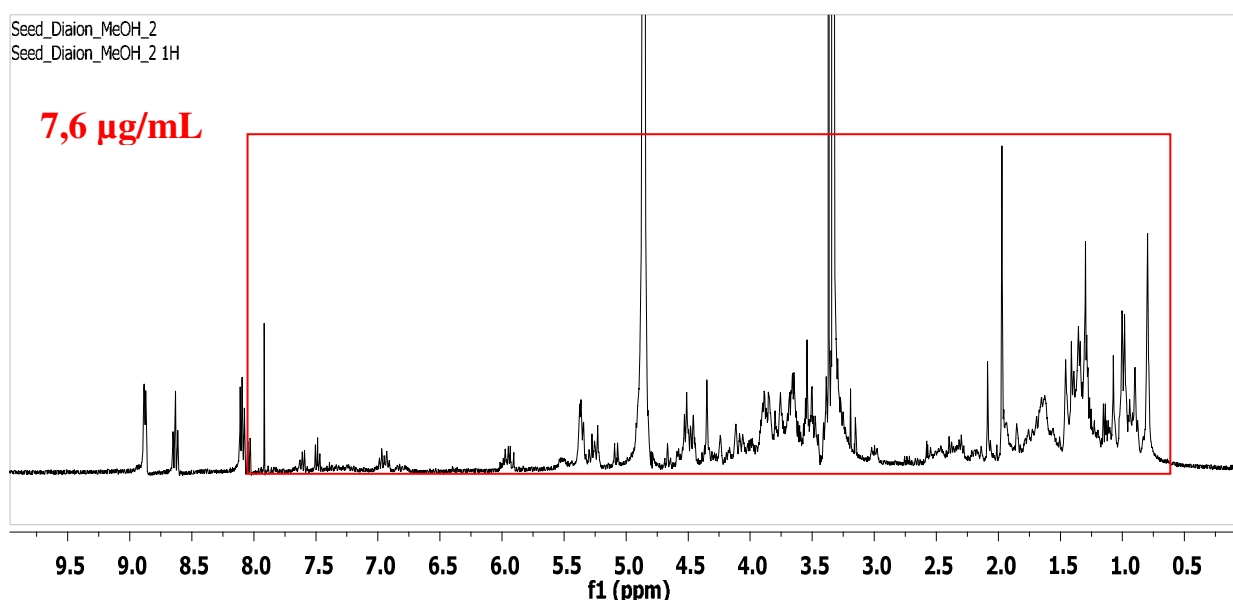


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da fração 2 e da fração 3 obtida do fracionamento das cascas dos frutos de *Inga laurina*

Uma análise comparativa dos sinais presentes no espectro da fração mais ativa (fração 2) com a fração não ativa (fração 3) mostrou que os constituintes presentes em baixa concentração, informação obtida pela integração dos sinais, são os responsáveis pelo potencial citotóxico, tendo em vista que a composição química da fração ativa apresenta maior concentração da substância majoritária na fração não ativa. O espectro de RMN de ^1H da fração 2 apresentou sinais de, pelo menos, duas substâncias aromáticas. Esta fração (45 mg) foi submetida a CC em sílica gel 60 e eluída com AcOEt/MeOH 1:1 até MeOH puro, fornecendo 10 subfrações que, após análise em CCD foram reunidas em 4 grupos. A fração mais polar, obtida em MeOH 100%, foi a única que apresentou boa atividade ($\text{ED}_{50} = 4,0 \mu\text{g/mL}$) no ensaio avaliado. A análise do espectro de RMN de ^1H desta fração mostrou uma mistura de fenólicos, e após minuciosa análise espectral foi possível inferir a presença do ácido *para*-hidroxi-benzóico [CD_3OD ; δ_{H} 8,00 (*d*, $J = 8,4 \text{ Hz}$), 6,90 (*d*, $J = 8,4 \text{ Hz}$)] (**substância 13**) e do glicosídeo do 4-vinil-fenol (**substância 14**), que foi identificado principalmente pelos sinais característicos da unidade vinílica [δ_{H} 5,94 (*dd*, $J = 17,2$ e $10,8 \text{ Hz}$), 5,25 (*dd*, $J = 17,2$ e $1,2 \text{ Hz}$), 5,08 (*dd*, $J = 10,8$ e $1,2 \text{ Hz}$)] e dos prótons aromáticos [δ_{H} 7,59 (*dd*, $J = 7,6$ e $1,6 \text{ Hz}$), 7,49 (*dd*, $J = 7,6$ e $1,6 \text{ Hz}$), 6,97 (*d*, $J = 7,6$) e 6,93 (*d*, $J = 7,6$)]. Seu derivado metoxilado 4-vinil-2-metoxi-fenol já foi amplamente reportado em espécies da família Fabaceae⁷⁶.

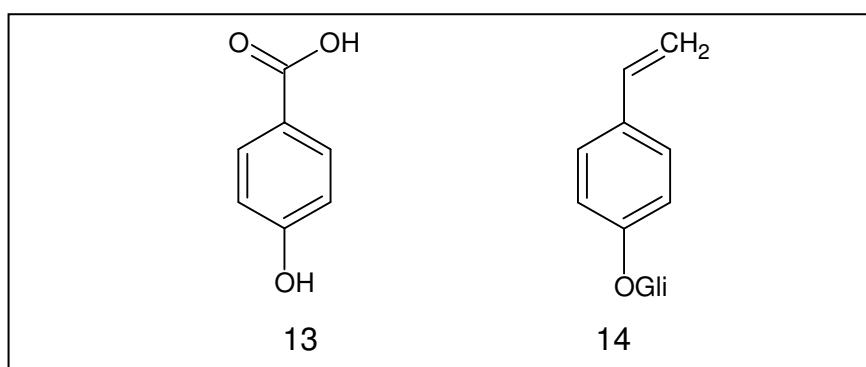


Figura 47. Estruturas do ácido *para*-hidroxi-benzóico e do glicosídeo do 4-vinil-fenol

As frações (2, 3, 4 e 5) obtidas do fracionamento da fração 1 em Sephadex LH-20 que apresentaram melhor separação na análise por CCD em fase reversa

foram submetidas à análise por CLAE-DAD (coluna analítica C-18 (250mm x 4,60mm e 5 um), eluída em gradiente de H₂O/MeOH 95:5 até MeOH puro durante 50 min, fluxo de 1mL/min) para a obtenção de um perfil químico.

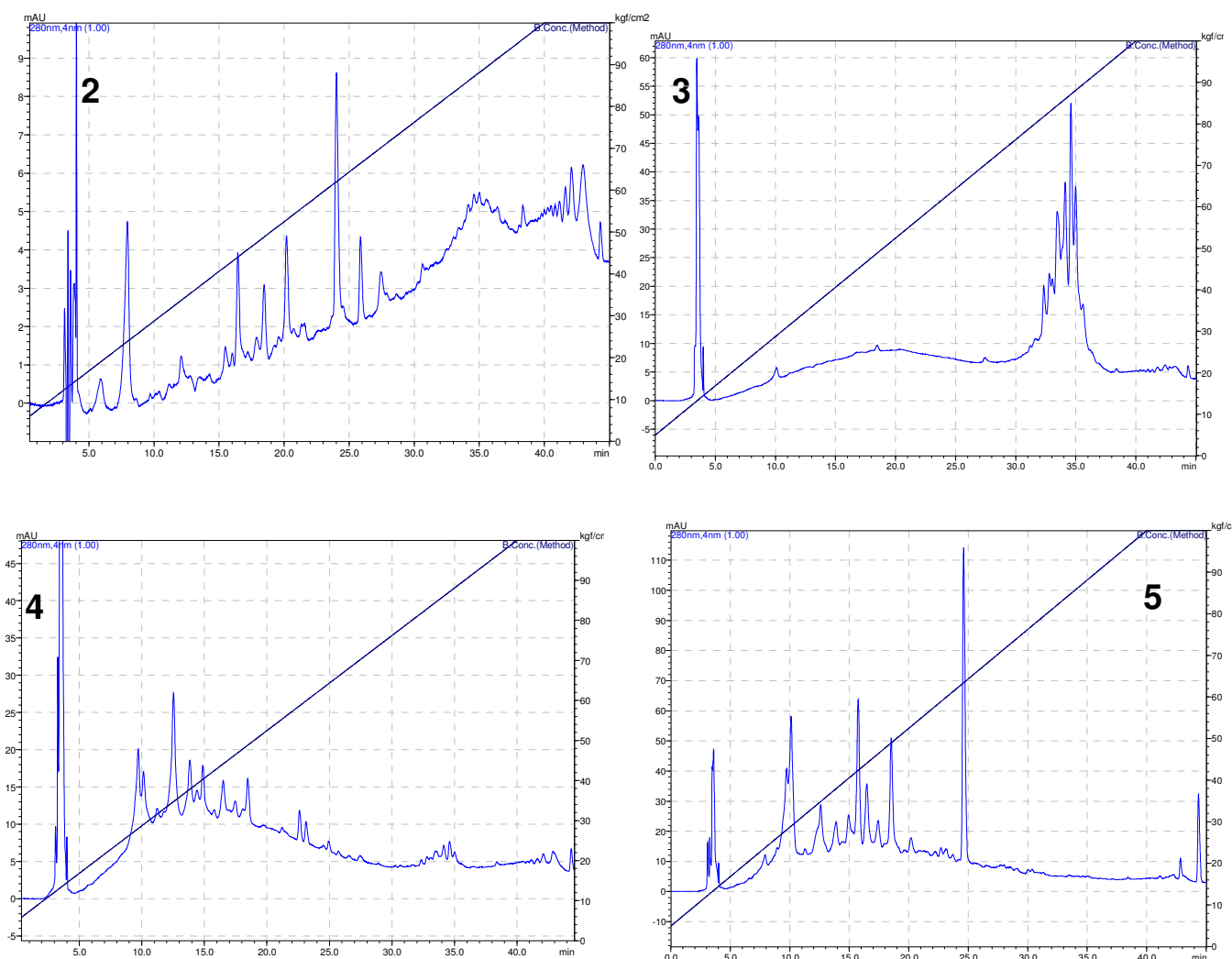


Figura 48. Cromatograma obtido via CLAE-DAD das frações 2, 3, 4 e 5 obtidas do fracionamento da fração 1.

Análise da corrida cromatográfica em vários comprimentos de onda revelou numerosas substâncias nas frações investigadas.

A análise dos espectros de UV dos picos mais resolvidos das frações 2 e 5 sugeriu principalmente, a presença de ácidos orgânicos (bandas em 270-280 nm) e catequinas (bandas em torno de 285 nm).

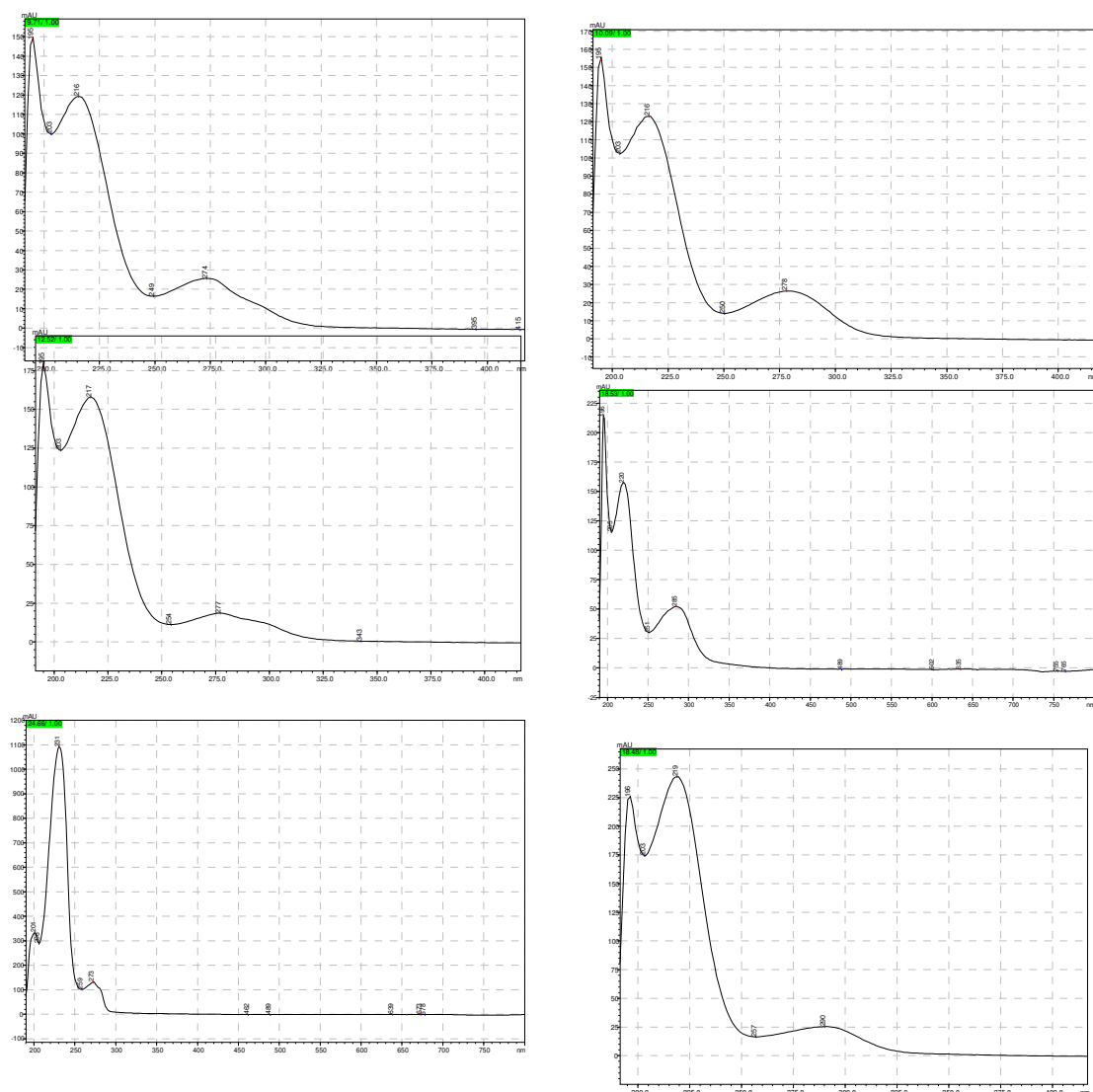


Figura 49. Espectros de UV de alguns picos das frações do fracionamento da fração 2.

O extrato das folhas de *I. laurina* apresentou maior atividade no ensaio de citotoxicidade frente a linhagens tumorais de câncer de colón (HT-29) e por isso, foi submetida aos fracionamentos cromatográficos para a obtenção de compostos puros ou frações semipurificadas.

4.3.5 Estudo químico das folhas de *Inga laurina*

O extrato das folhas de *I. laurina* apresentou maior atividade no ensaio de citotoxicidade frente as linhagens tumorais avaliadas e por isso, foi selecionado para investigação detalhada. O extrato foi submetido a partição líquido-líquido com

solventes de polaridade crescente, fornecendo quatro frações: hexano, AcOEt, BuOH e água. As fases de partição foram analisadas por CCD e RMN de ^1H , com o intuito de obter um perfil químico e selecionar as condições de fracionamento cromatográfico. A partir destas análises inferimos que a fase hexânica apresentou triterpenos como constituintes majoritários, enquanto na fase butanólica concentraram-se as saponinas, os compostos nitrogenados aromáticos e, possivelmente os aminoácidos não proteicos, muito comuns no gênero. Na fase AcOEt observou-se a presença de compostos de média polaridade, enquanto na fase hidrometanólica foi possível verificar grande concentração de fenólicos glicosilados, ácido gálico e taninos.

Todas as fases de partição obtidas foram fracionadas e suas frações foram analisadas por CCD, CLAE-DAD e RMN ^1H e ^{13}C para obtenção de substâncias puras ou frações semipurificadas.

Com o intuito de obter as substâncias bioativas isoladas anteriormente dessa espécie⁷¹, todas as fases de partição foram investigadas quanto a presença desses metabólitos. Dentre as fases de partição analisadas, a fração AcOEt e a BuOH apresentaram sinais referentes a essas substâncias, porém, devido a presença de saponinas na fração BuOH, optou-se por iniciar os estudos com a fração AcOEt.

A fração AcOEt (1,2 g) foi fracionada em coluna de silica gel e as frações mais polares foram analisadas por CLAE-DAD afim de orientar a purificação dos compostos de interesse e contribuir para uma avaliação prévia da natureza química das substâncias presentes. A análise dos cromatogramas indicou a presença do ácido gálico (banda intensa em 270 nm no espectro de UV) nas frações mais polares que foi confirmada pelos sinais observados no espectro de RMN de ^1H (um singlete em 7,1 ppm). As frações obtidas em AcOEt/MeOH 1:1 até MeOH puro forneceram frações ricas em flavonoides e outros fenólicos (cromatograma abaixo).

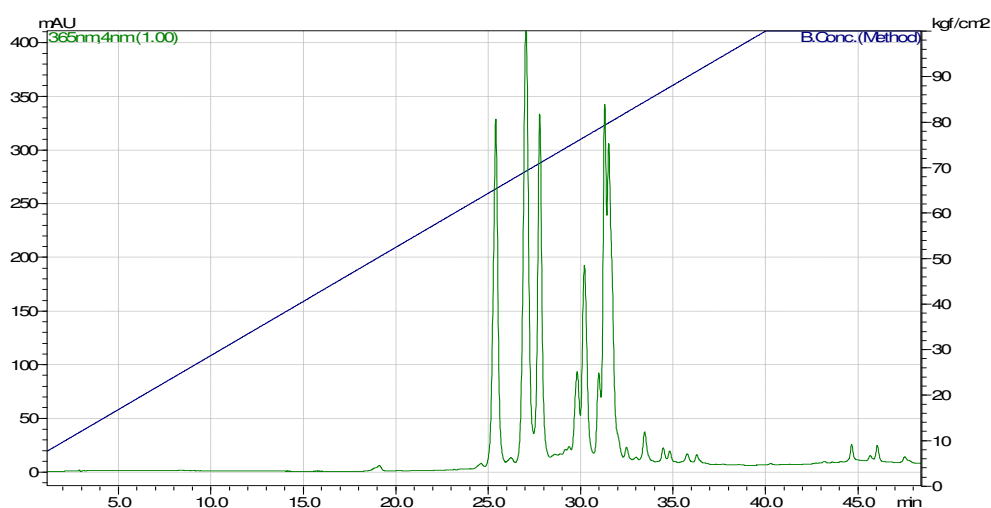


Figura 50. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 11-12 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

A fração 3 (4,5 mg) apresentou um pico ($t_r = 43,2$ min) no final da corrida cromatográfica com espectro de UV diferente das classes de substâncias caracterizadas nas espécies de *Inga* com λ_{max} em 404 nm. Outras substâncias com esse perfil foram observadas nas folhas de *I. edulis*, proveniente da coleta realizada no bioma Amazônia.

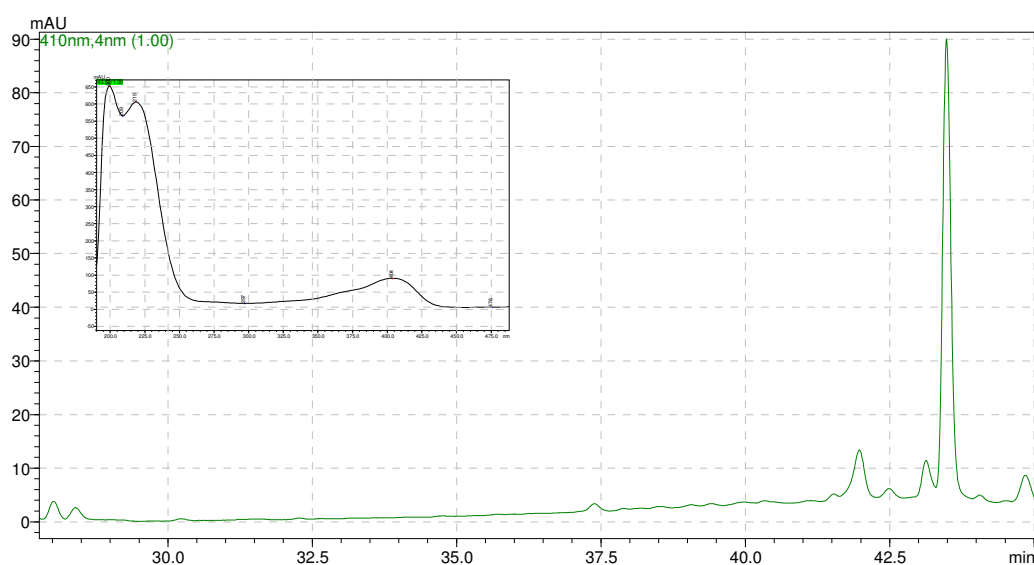


Figura 51. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 13-14.3 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

A fração 4 (4,0 mg) mostrou, na análise por CLAE-DAD, quatro picos majoritários. A análise dos seus espectros de UV indicou a presença do ácido gálico (1) e três flavonoides (2, 3 e 4).

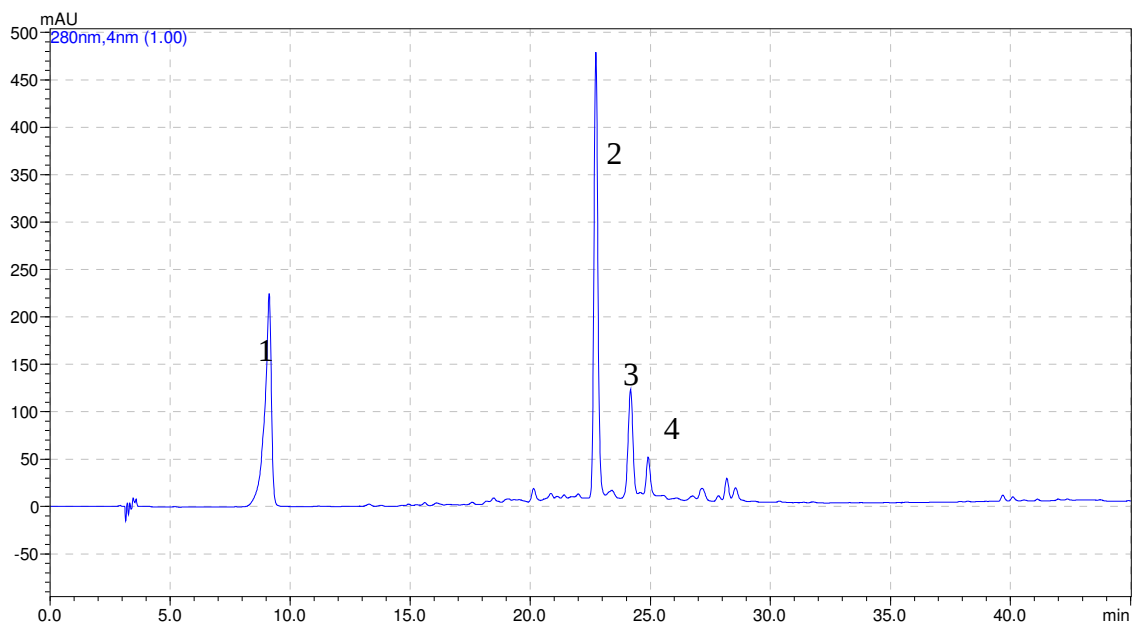


Figura 52. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 13-14.4 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

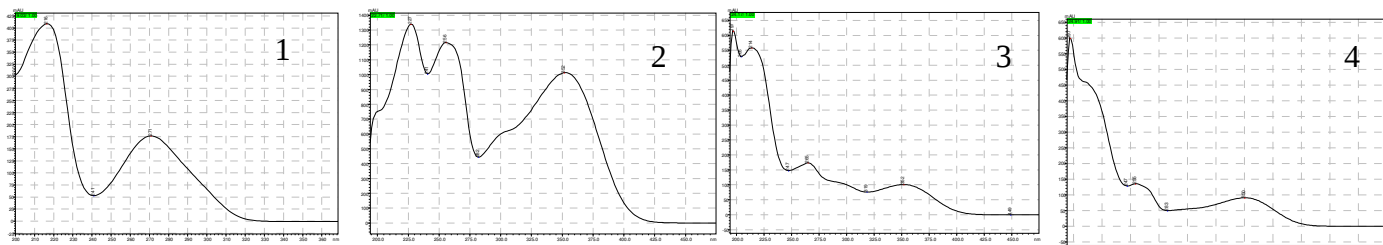


Figura 53. Espectros de UV obtidos via CLAE-DAD dos principais picos da fração 13-14.4 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

Esta fração foi submetida a análise por LC-MS para caracterização de seus constituintes.

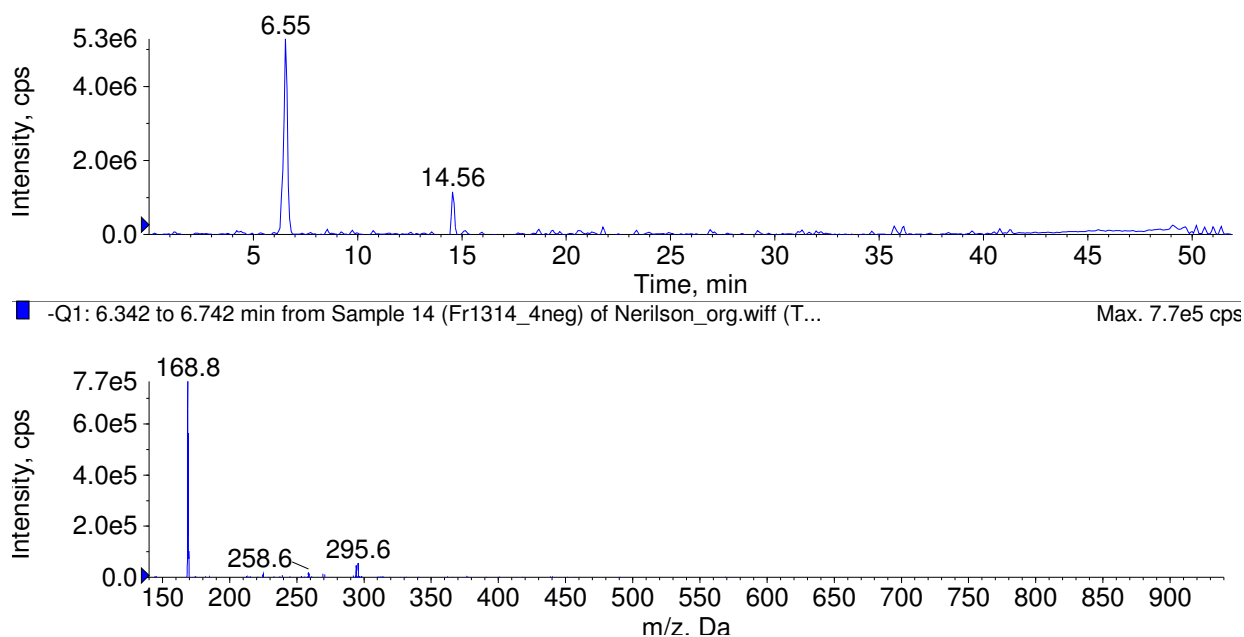
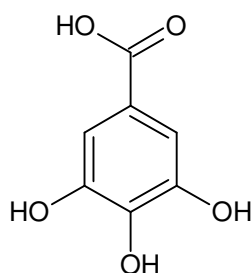


Figura 54. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 6,55$ min obtido em modo negativo da análise por LC-MS da fração 13-14.4 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

A análise do espectro do pico associado ao tempo de retenção de 6,55 min apresentou um pico no espectro de massas com m/z 168,8 [M-H], confirmando a presença do ácido gálico (MW = 170).



A análise do pico associado ao tempo de retenção de 14,22 min mostrou um pico de m/z 462,9[M-H], sugerindo a presença do flavonoide miricetina-3-O-ramnopiranosídeo (MW = 464) (**substância 15**).

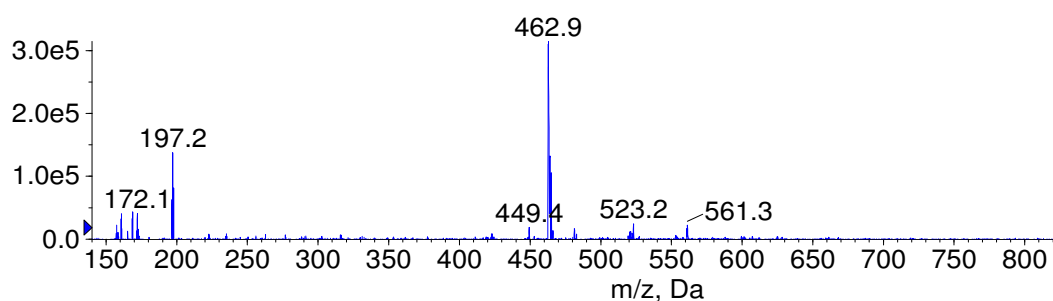
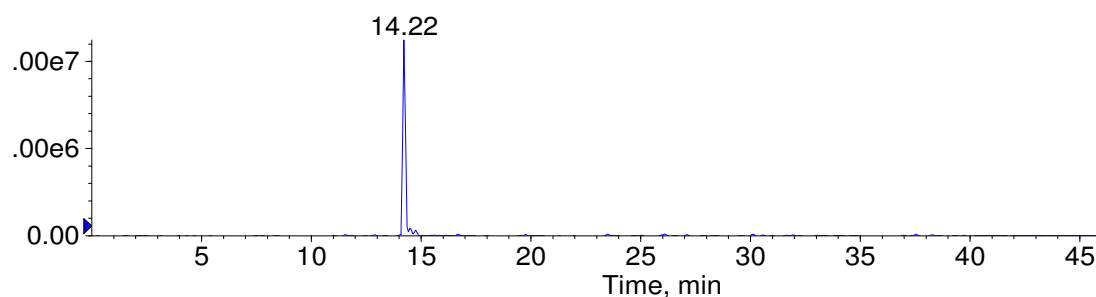


Figura 55. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 14,22$ min obtido em modo negativo da análise por LC-MS da fração 13-14.4 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

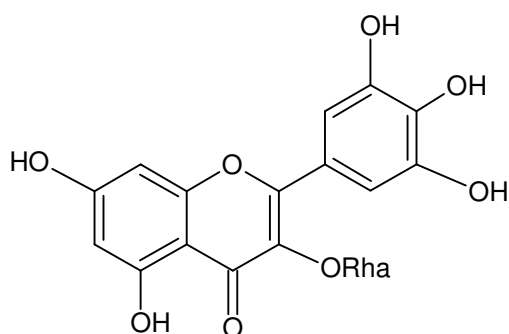


Figura 56. Estrutura da miricetina-3-O-ramnopiranosídeo (**15**)

A análise do pico associado ao tempo de retenção de 14,26 min mostrou um pico de m/z 319 $[M+H]^+$, sugerindo a presença do flavonoide miricetina (**substância 16**) na forma aglicona (MW = 318) em mistura com outro flavonoide.

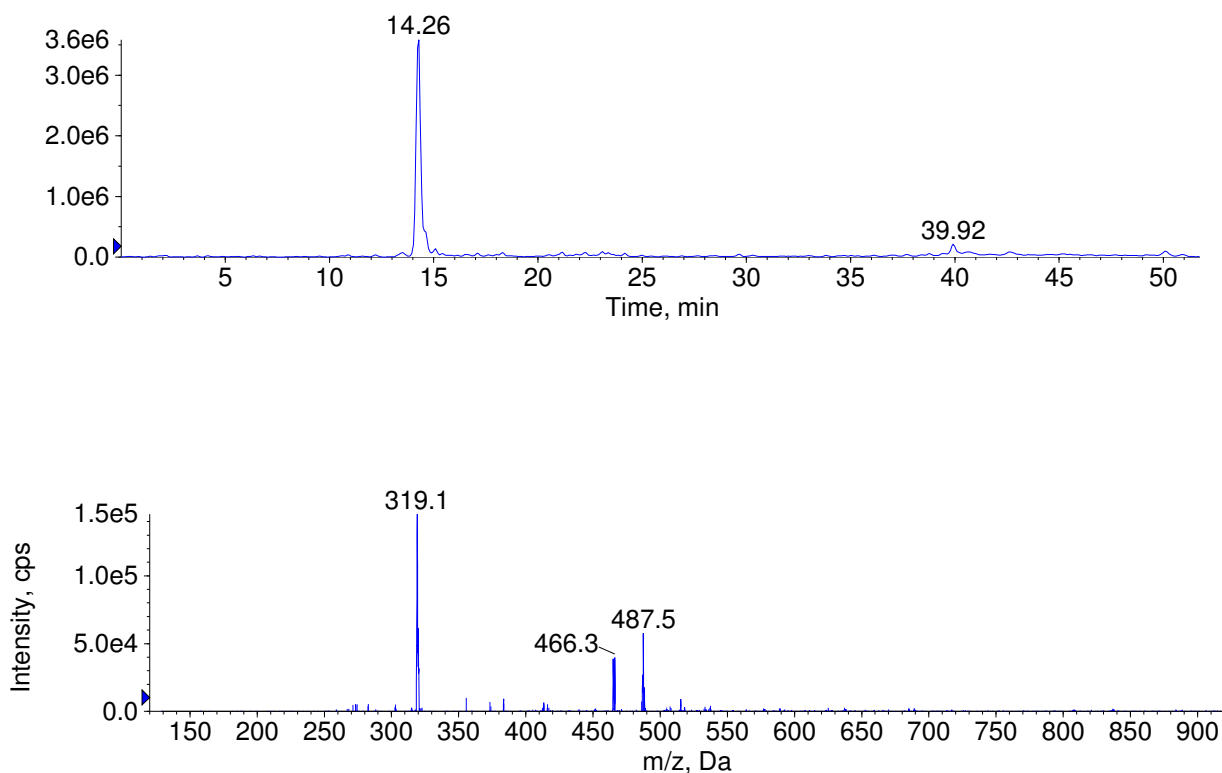


Figura 57. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 14,26$ min obtido em modo negativo da análise por LC-MS da fração 13-14.4 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

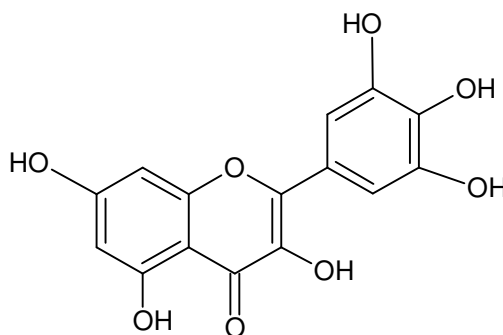


Figura 58. Estrutura da miricetina (**16**)

A fração 7 (4,7 mg) obtida em MeOH 100% apresentou, na análise por CLAE, uma mistura de 4 flavonoides. Porém, devido a quantidade de massa não foi possível isolar seus componentes majoritários, por isso, esta fração foi submetida a análise por LC-MS para identificação dos constituintes em mistura.

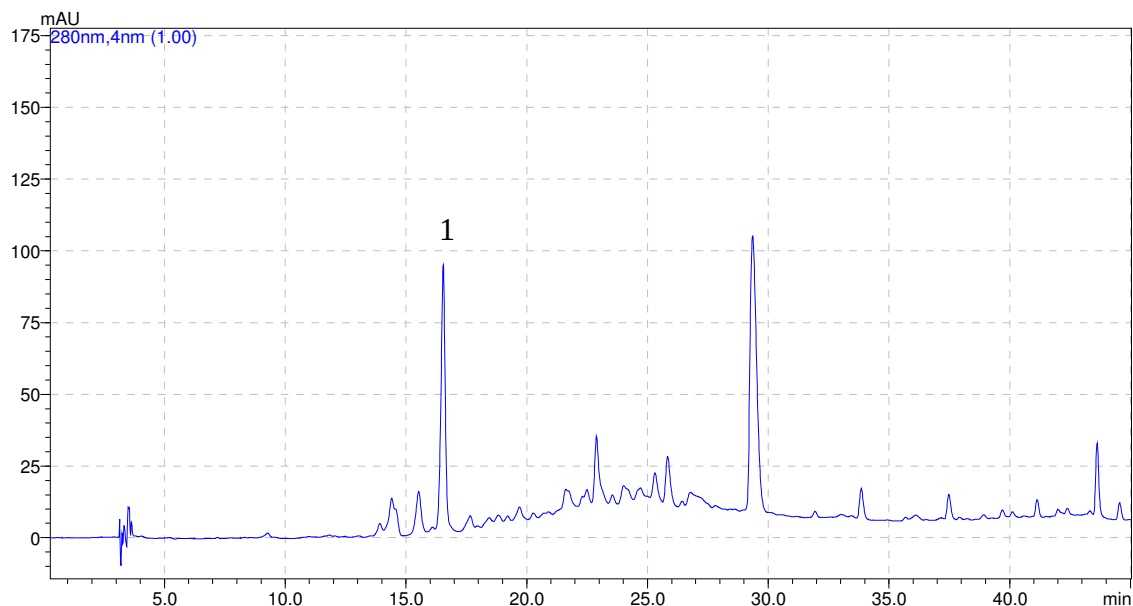


Figura 59. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 13-14.7 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

O pico 1 apresentou espectro de UV característico de catequina (banda em 285 nm).

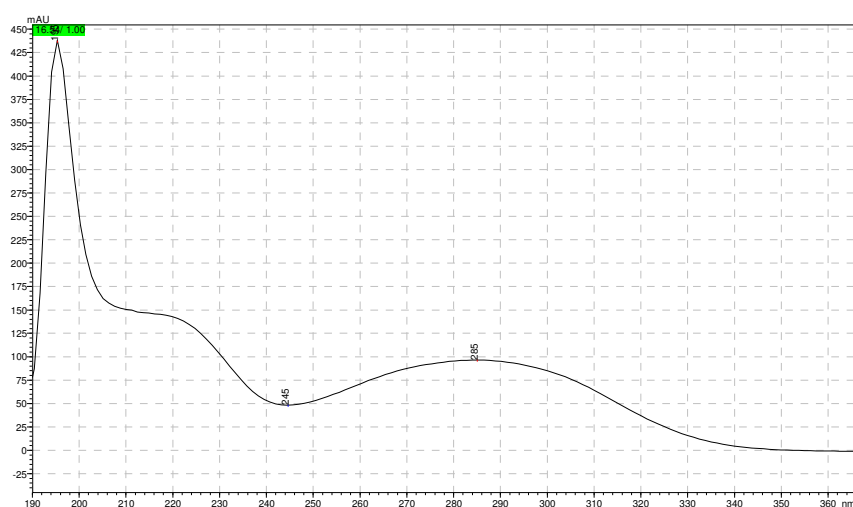


Figura 60. Espectro de UV obtido via CLAE-DAD do pico 1 da fração 13-14.7

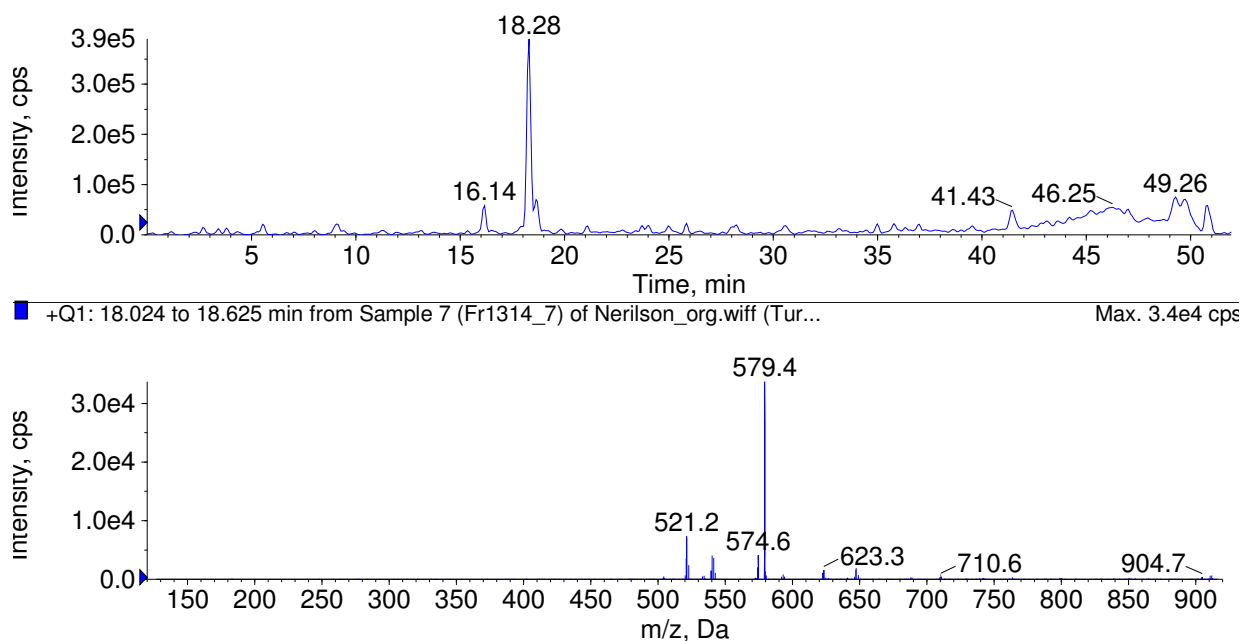


Figura 61. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 18,2$ min obtido em modo negativo da análise por LC-MS da fração 13-14.7 do fracionamento da FAc das folhas de *I. laurina*.

A análise deste pico por LC-MS, realizada no modo positivo, apresentou um pico no espectro de massas com m/z 579 $[M+H]^+$, sugerindo tratar-se uma procianidina (MW = 578) (**substância 17**).

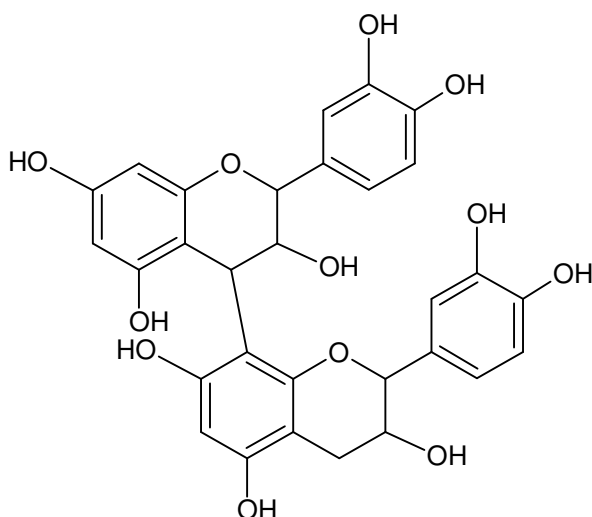


Figura 62. Estrutura da procianidina B (**17**)

Esta substância tem sido reportada na espécie *Inga edulis*.

As procianidinas B1 (epicatequina-(4 β →8)-catequina) e B2 (epicatequina-(4 β →8)-epicatequina) tem sido reportadas anteriormente nas folhas de *Inga edulis*⁵⁰.

Os flavan-3-óis, monômeros das procianidinas, têm uma ocorrência natural bastante distribuída e disseminada, especialmente sob a forma de agliconas. Estão registrados principalmente em plantas de interesse alimentar e em seus produtos alimentares. Esta classe de substâncias é muito freqüente em uvas, maçãs, peras, cerejas, pêssegos, ameixas, morangos, groselhas, mirtilos, ruibarbos, e framboesas. Nas Leguminosae está documentada a presença, em baixas quantidades, em favas, em feijão (pinto e branco) e em lentilhas⁷⁷.

As frações mais interessantes observadas pela análise em CLAE-DAD do fracionamento cromatográfico da fase BuOH de *I. laurina*, foram analisadas por RMN de ¹H. A fração 5, obtida em MeOH/H₂O 1:1 apresentou elevado grau de pureza na análise por CLAE-DAD apresentando um pico majoritário com tempo de retenção de 23,65min.

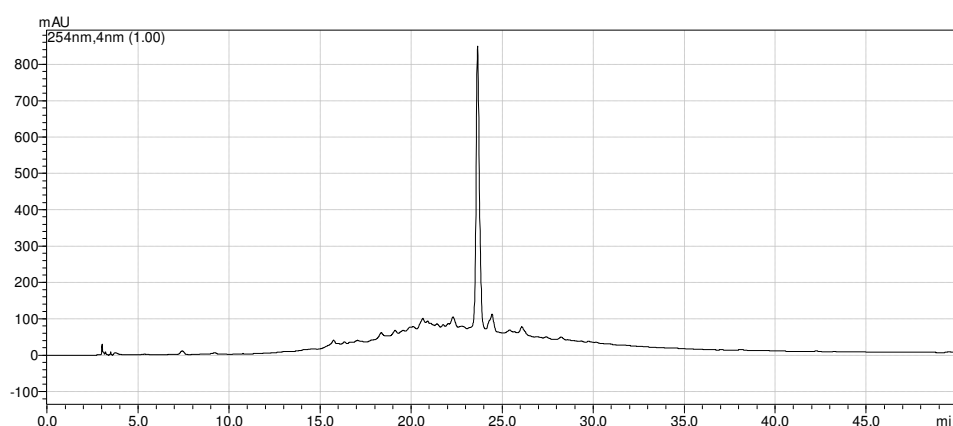


Figura 63. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da fração 5 do fracionamento da FBuOH das folhas de *I. laurina*.

A análise minuciosa do espectro de RMN de ¹H desta fração permitiu identificá-la com o galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila (**11**) [CD₃OD; δ_H 12,67(s; OH), 6,89 (s), 6,37 (*d*, *J* = 2 Hz), 6,20 (*d*, *J* = 2 Hz), 5,2 (*d*, *J* = 1,5 Hz), 4,0 (*m*), 3,5 (*m*), 3,3 (*m*), 3,1 (*m*) 0,8 (*d*, *J* = 6,5)], isolado anteriormente dessa espécie⁷¹.

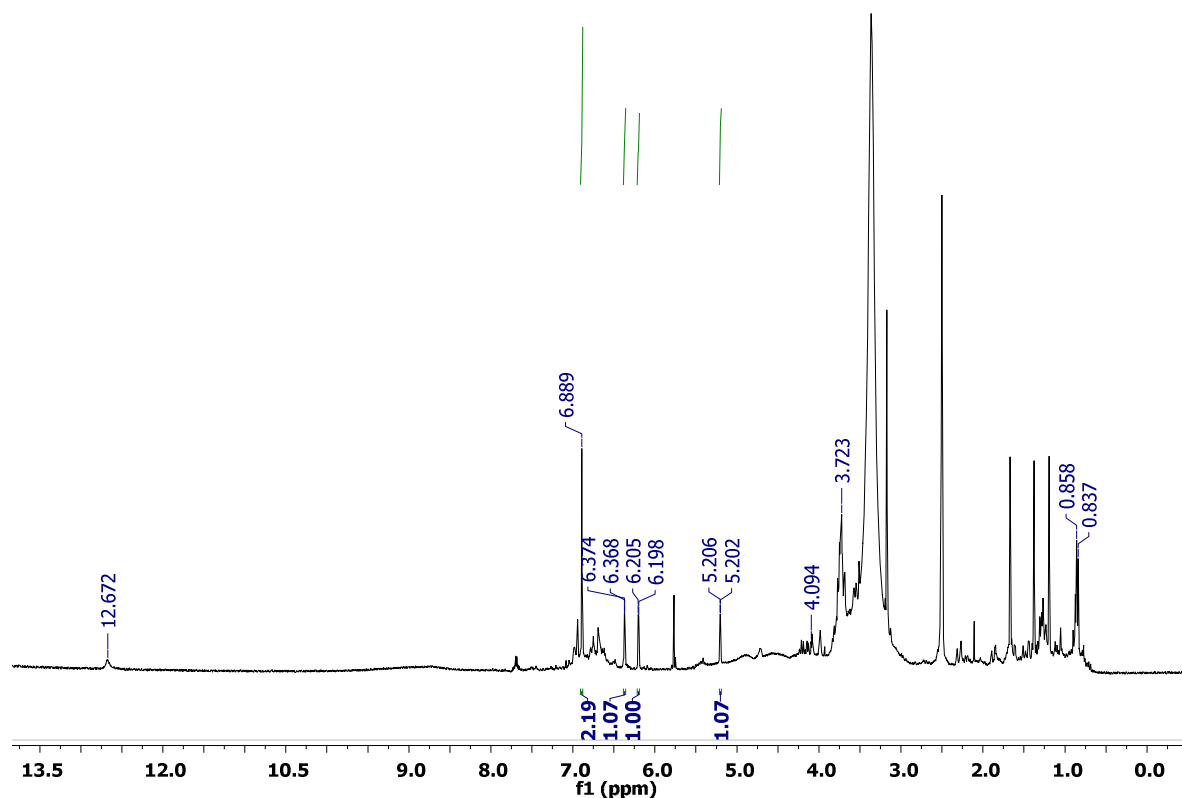


Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) da fração 5 do fracionamento cromatográfico da fase BuOH das folhas de *Inga laurina*.

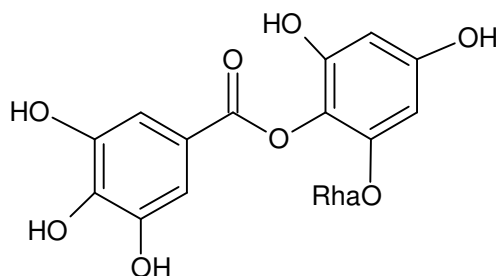


Figura 65. Estrutura do o galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila

O extrato etanólico das folhas de *I. laurina* da segunda coleta foi submetido ao ensaio antitumoral frente a linhagem de células HT-29 do cancro do cólon humano e apresentou uma promissora atividade (ED_{50} 7,20 $\mu\text{g/mL}$), por isso foi selecionada novamente para fracionamento cromatográfico biomonitorado. O extrato foi submetido a partição com hexano, AcOEt e H_2O , e as fases de partição obtidas foram submetidas ao referido bioensaio. A fração AcOEt foi a única que apresentou-se ativa. Esta fração foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH-20 fornecendo 30 subfrações, que após análise por CCD foram

agrupadas em 8 frações. Estas oito frações foram submetidas ao bioensaio para citotoxicidade e apenas as frações reunidas 20-23 e 24-28 apresentaram atividade citotóxica. Devido a quantidade de massa, apenas a fração 24-28 (29 mg) foi selecionada para purificação dos constituintes químicos. Esta fração foi submetida a CC de sílica gel 60 eluída com AcOEt/MeOH, fornecendo 10 subfrações. A reunião das frações 1-2 forneceu 6,0 mg de uma substância pura (**substância 18**), que após análise espectral mostrou ser o galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila [CD_3OD ; δ_{H} 7,07 (s; OH), 6,97 (2H, s), 6,39 (1H, d, $J = 2$ Hz), 6,22 (1H, d, $J = 2$ Hz), 5,34 (1H, d, $J = 1,6$ Hz), 4,24 (1H, m), 3,80 (1H, m), 3,53 (1H, m), 3,36 (1H, t, $J = 6,0$) 0,98 (3H, d, $J = 6,0$)], também isolado anteriormente dessa espécie⁷¹.

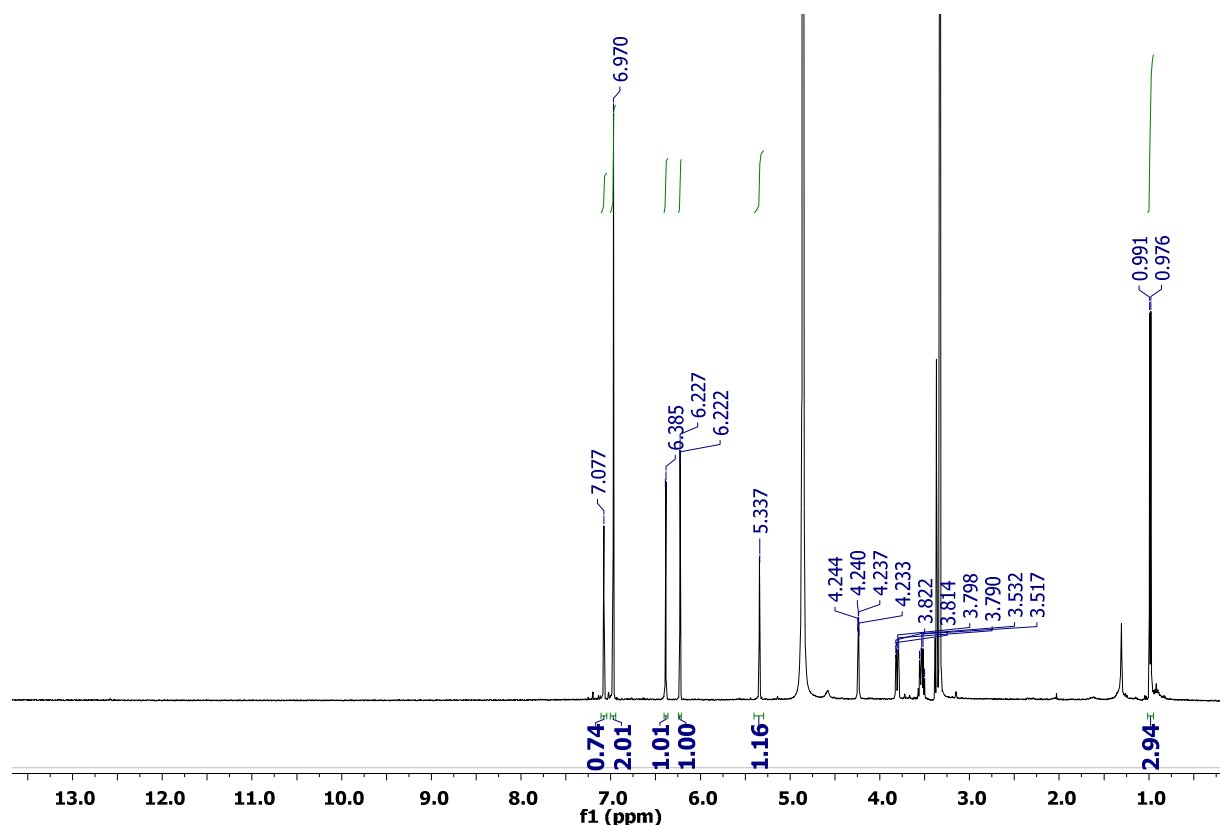


Figura 66. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz; CD_3OD) da fração 24-28.1-2 do fracionamento cromatográfico da fase AcOEt das folhas de *Inga laurina*.

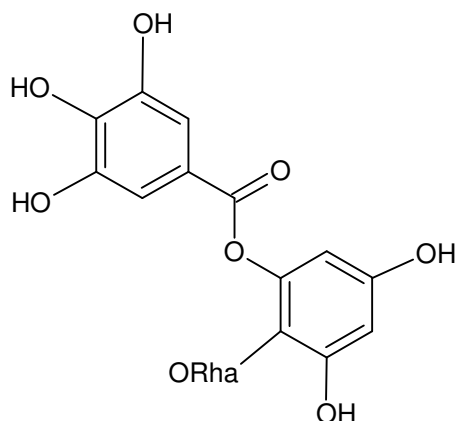


Figura 67. Estrutura do galato de 2-ramnopiranosil-3,5-diidroxifenila (**18**)

Esta substância foi avaliada quanto ao seu potencial antitumoral frente as células tumorais do cancro do cólon humano HT-29e células tumorais do câncer de mama MCF-7, porém, não mostrou-se ativa nos ensaios realizados.

Foi também investigada a presença dos derivados de tirosina nas frações do extrato foliar, porém, não foram observados sinais associados a estes compostos. Possivelmente esses metabólitos se acumulam apenas em folhas jovens, já que estas geralmente experimentam taxas muito mais altas de herbivoria do que as folhas maduras da mesma planta em árvores de florestas tropicais⁵¹. As folhas jovens, diferente das folhas maduras, não podem ser defendidas por tecidos estruturais inelásticos (lignina) durante a fase de expansão, resultando em teor de energia e de nutrientes das folhas jovens mais elevado em relação às folhas maduras, sendo então uma fonte de alimento preferido para muitos herbívoros. Na ausência de resistência, as folhas jovens são principalmente defendidas por aleloquímicos. Assim, substâncias associadas a defesa química são mais propensas a serem vistas em folhas jovens, em vez de folhas maduras⁶².

O ácido gálico e seu derivado, galato de metila, foram encontrados em alta concentração nessa parte do vegetal. Da fase hexânica foram obtidas frações ricas em triterpenos e pigmentos. Algumas frações também foram submetidas à análise por CG-Fid em comparação com padrões de triterpenos, no entanto, não foi possível caracterização de nenhuma substância, possivelmente trata-se de uma composição terpênica diferenciada dos padrões utilizados.

A fração 5 (100mg) foi escolhida para continuar o estudo cromatográfico devido a quantidade de massa e por apresentar substâncias fenólicas de interesse na análise por CLAE-DAD. Seu fracionamento nos forneceu a miricetina-3-O-(2''-Ogaloil)- α -ramnopiranosídeo (3 mg) que foi caracterizada através de seus espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz).

Determinação estrutural da substância 19 (miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo)

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 68) apresentou sinais característicos de flavonoides, porém com intensidades diferentes, permitindo inferir a presença de uma mistura, de pelo menos, duas substâncias.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais com deslocamentos químicos em δ 6,38 (sl) e δ 6,20(sl) característicos dos hidrogênios H-6 e H-8 de flavonoide (anel A). O singlete em δ 6,95 foi atribuído aos hidrogênios 2' e 6' do anel B e o singlete na região de δ_{H} 12,60 (1H) indicou a presença de uma hidroxila em C-5 do anel A. Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H são característicos da aglicona miricetina.

O dubleto em δ 5,50 (1H) foi atribuído ao hidrogênio anomérico da unidade glicosídica, mediante comparação com dados da literatura (Cavalheiro et al., 2011). O dubleto observado em δ 0,94 ($J = 5,5$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-6'' metílico da ramnose. Foi ainda observado um duplo dubleto em δ 5,47 referente ao H-2'' da porção glicosídica, e um singlete em δ 6,92 sugerindo a presença de uma unidade galoíla em C-2''.

Tabela 8. Dados de RMN ^1H para miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (300 MHz) ^{*78}.

H	$\delta_{\text{encontrado}}$	$\delta_{\text{literatura}}^*$
6	6,20 (sl)	6,20 (sl)
8	6,38 (sl)	6,38 (sl)
2' e 6'	6,95 (s)	6,95 (s)
1''	5,50(d, $J = 1,5$ Hz)	5,50(d, $J = 1,5$ Hz)
2''	5,47 (dd, $J = 1,5$ Hz)	5,47 (dd, $J = 1,5$ Hz)
3'', 4'' e 5''	3,8-3,3 (m)	-
6''	0,94(d, $J = 5,5$ Hz)	0,90(d, $J = 5,5$ Hz)
2''' e 6'''	6,92 (s)	6,92 (s)
5-OH	12,60 (sl)	12,61 (sl)

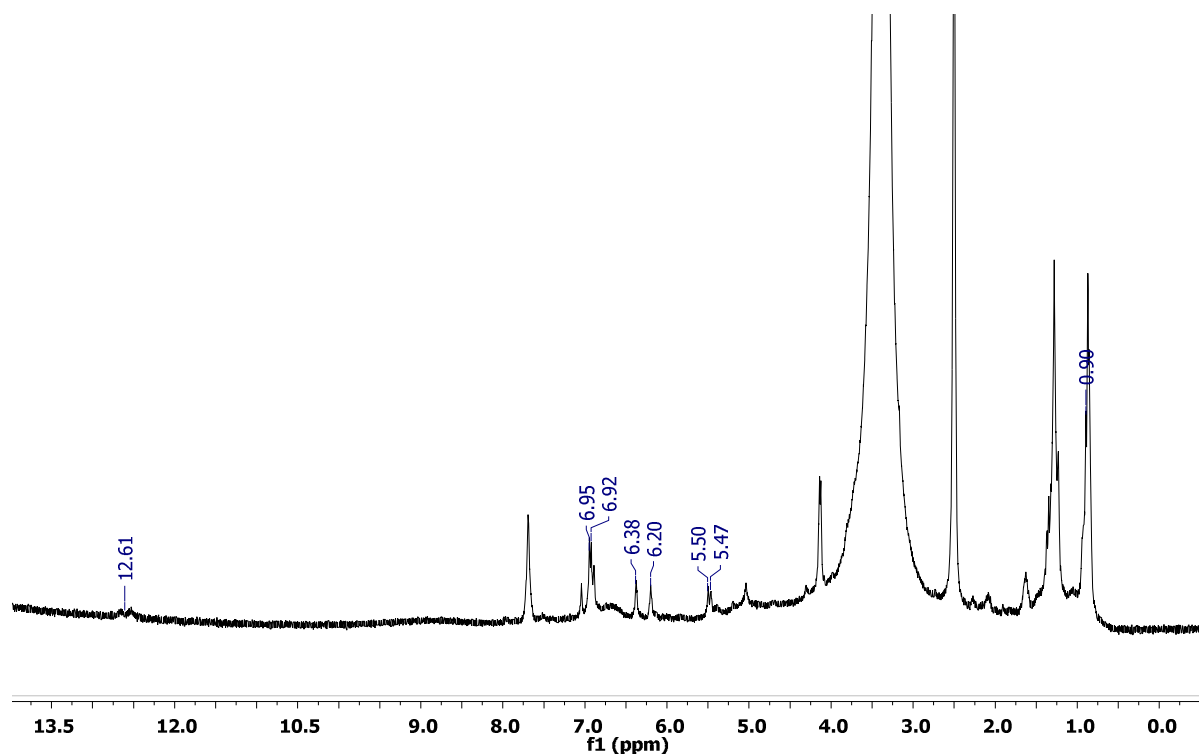


Figura 68. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da fração 15 do fracionamento cromatográfico da fração 2 das folhas de *Inga laurina*.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C desta fração apresentou sinais característicos da aglicona miricetina. A unidade glicosídica apresentou 6 sinais, dentre os quais, dois sinais em δ 98,8 e δ 17,5 atribuídos aos carbonos C-1" e C-6", respectivamente, sendo que o sinal em 17,5 ppm é característico de carbono metílico de ramnose.

Os sinais em δ 119,7, 108,0, 145,8 e 136,6 confirmaram a presença do grupo galoil, assim como o sinal em δ 164,5, típico de carbonila de éster. O estudo comparativo dos dados obtidos com dados da literatura permitiu identificar como sendo o flavonóide miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo em mistura com outra substância minoritária.

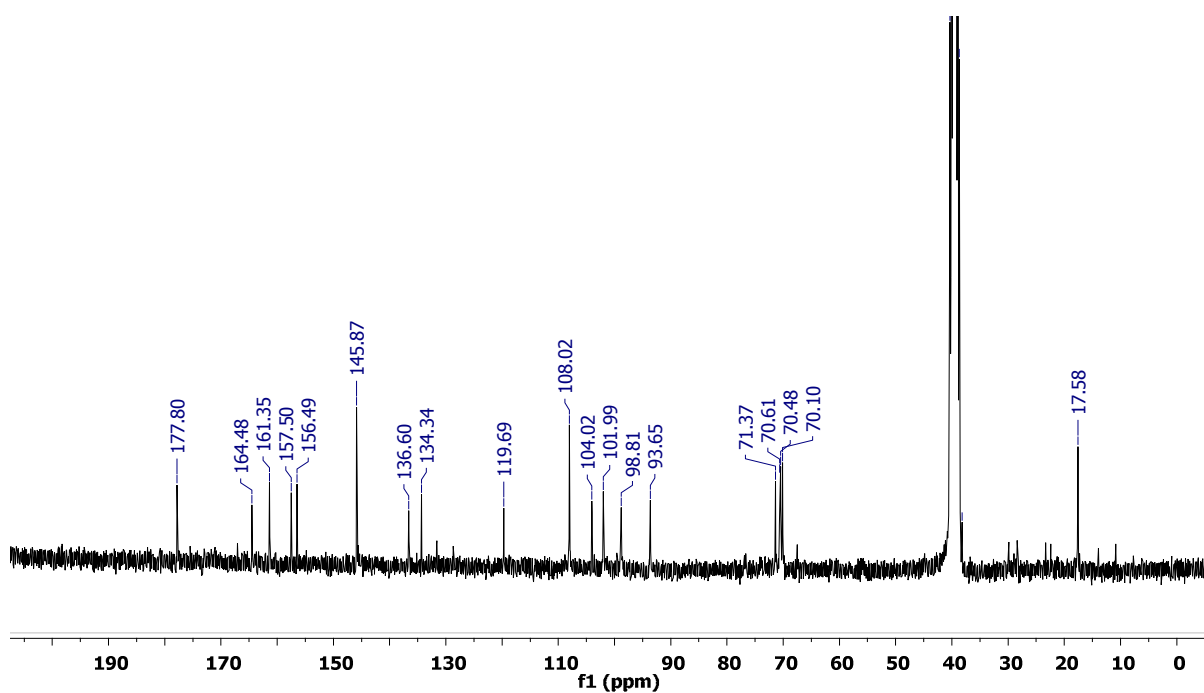


Figura 69. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da fração 15 do fracionamento cromatográfico da fração 2 das folhas de *Inga laurina*.

Posição	^{13}C
2	156,5
3	134,3
4	177,8
6	98,8
7	164,5
8	93,6
9	156,5
10	104,0
1'	119,7
2' e 6'	108,0
3' e 5'	145,8

4'	108,0
5-OH	161,3
Rhamnose	
1''	98,8
2''	71,4
3''	70,6
4''	70,0
5''	70,5
6''	17,5
2''-O-galoil	
1'''	119,7
2''' e 6'''	108,0
3''' e 5'''	145,8
4'''	136,6
C=O	164,5

Tabela 9. Dados de RMN 1H para miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (75 MHz)

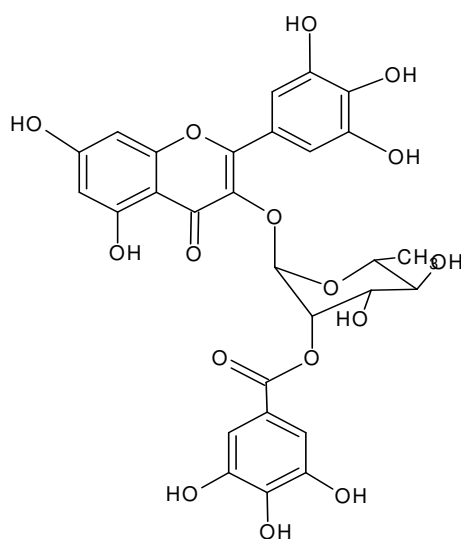


Figura 70. Estrutura da miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo.

Esta substância já foi reportada anteriormente na espécie *I. laurina*⁶³.

4.3.6 Estudo químico da raque foliar de *I. laurina*

O extrato etanólico da raque foliar de *I. laurina* foi submetido ao fracionamento em CC no modo reverso de eluição e as frações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD.

A avaliação dos perfis cromatográficos das cinco primeiras frações mostrou baixa resolução cromatográfica e eluição característica de um pico bastante alargado em cada cromatograma, sugerindo a presença de taninos condensados. No entanto, uma análise detalhada dos espectros de UV permitiu também verificar a presença do ácido gálico ($t_r = 8,74$ min) e um flavonóide ($t_r = 23,15$ min), como constituintes majoritários da fração 5 (40 mg), obtida em MeOH/H₂O 1:1.

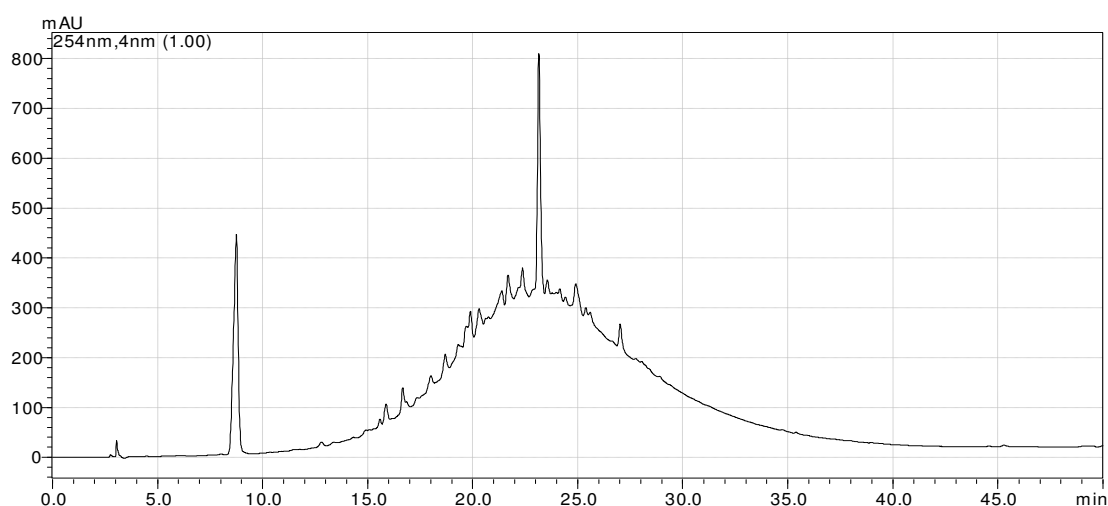


Figura 71. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da Fração 5 do fracionamento da raque foliar de *I. laurina*.

A fração 7 (5,0 mg), apresentou elevado grau de pureza na análise por CLAE-DAD indicando a presença de um flavonóide ($t_r = 28,10$ min), pelas bandas apresentadas no espectro de UV. O espectro de UV e o tempo de retenção sugeriram tratar-se do flavonóide apigenina (**substância 20**), detectada também nas flores de *Inga laurina*.

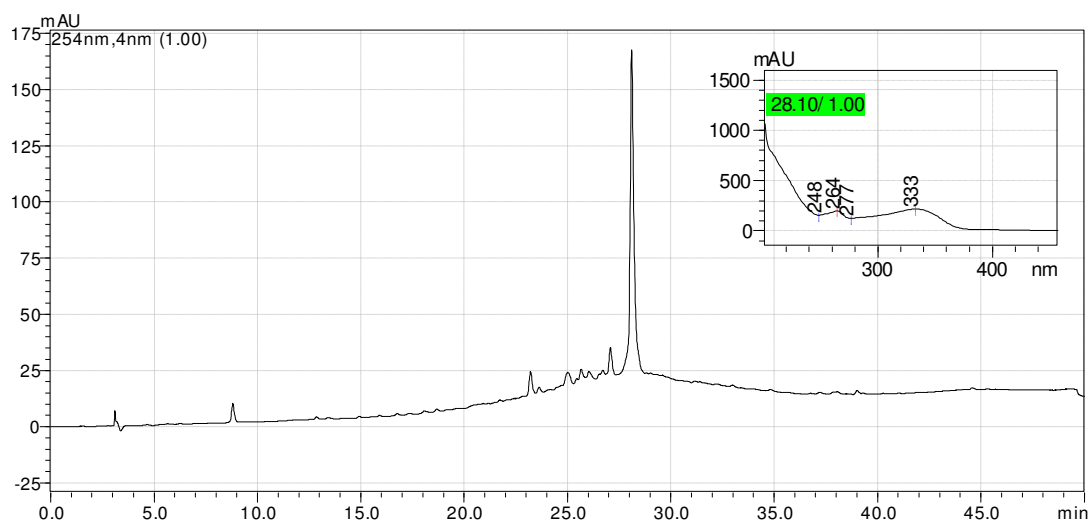


Figura 72. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da Fração 7 do fracionamento da raque foliar de *I. laurina*.

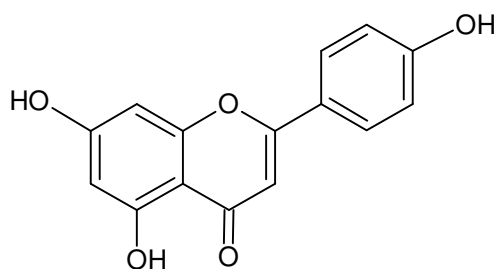


Figura 73. Estrutura da apigenina (**20**)

A reunião das frações de 8 a 10 mostraram a presença de cinco flavonóides (picos 1, 2, 3, 4 e 5) diferentes quando analisados seus espectros de UV, porém não foi possível caracterizá-los por RMN devido à presença de outras substâncias.

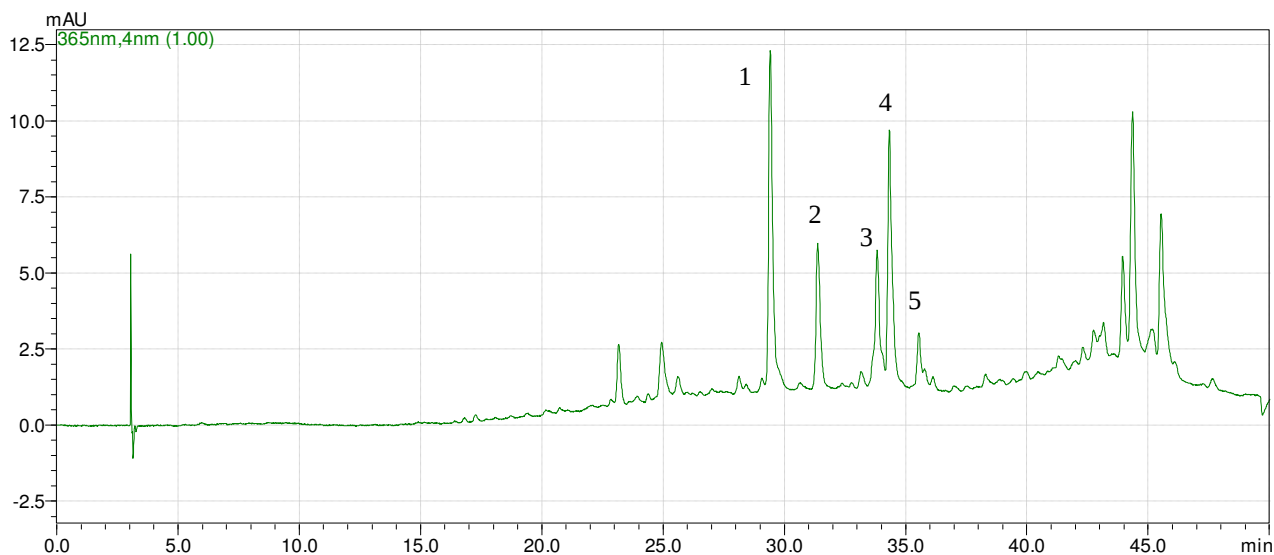
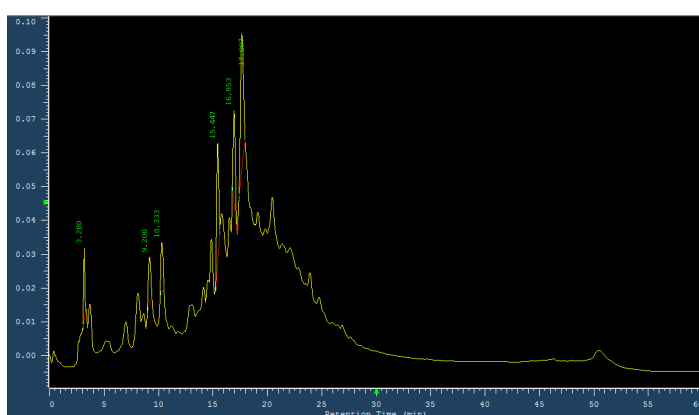


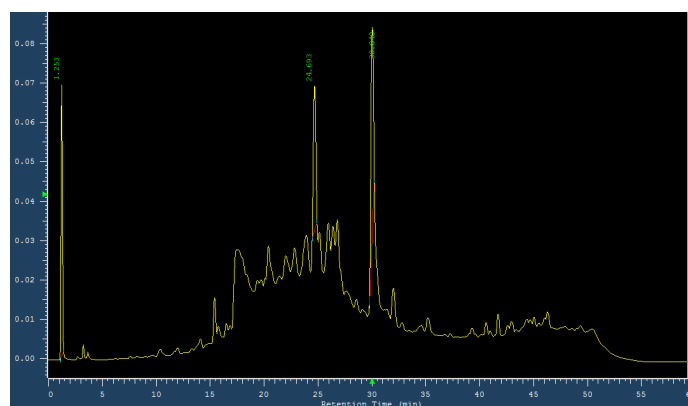
Figura 74. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da Fração 8-10 do fracionamento da raque foliar de *I. laurina*.

4.3.7 Estudo químico das flores de *I. laurina*

O extrato etanólico das flores de *I. laurina* (54 mg) foi submetido a cromatografia em coluna no modo reverso de eluição utilizando sílica C18 e eluída com MeOH 10% em água e MeOH 100%. As duas frações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD para obtenção do perfil cromatográfico.



MeOH 10%



MeOH 100%

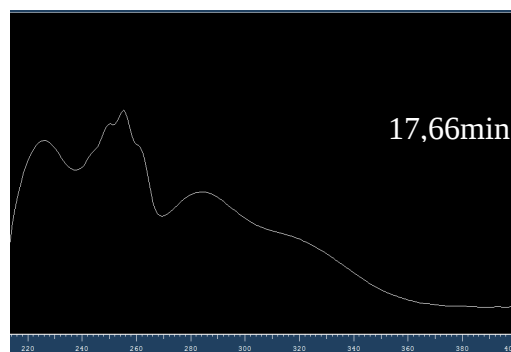
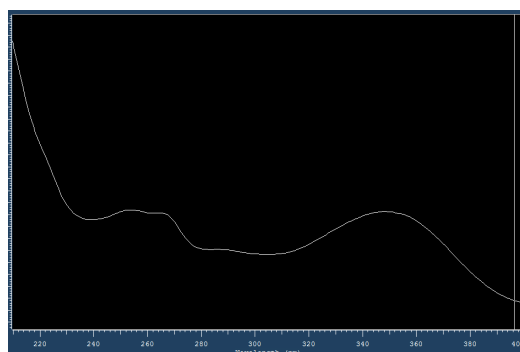
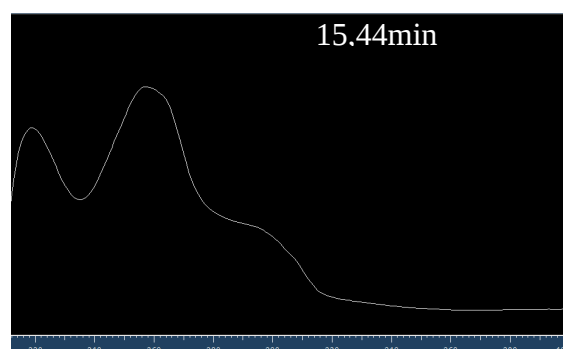
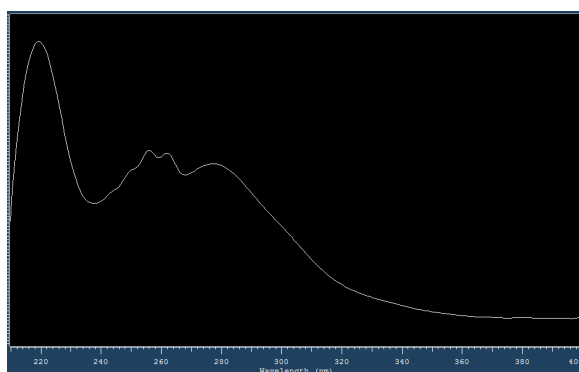


Figura 75. Cromatograma obtido via CLAE-DAD e espectros de UV das frações das flores de *I. laurina*.

A partir da análise dos cromatogramas, verificamos uma mistura complexa de compostos fenólicos, e após análise dos espectros de UV dos picos mais resolvidos foi possível inferir a presença de ácido gálico, taninos e flavonóides. O cromatograma da fração MeOH 100% mostrou um pico majoritário com tempo de retenção de 30,0 min, sugerindo ser uma flavona pelas bandas apresentadas no espectro de UV. Os espectros de UV de flavonas exibem duas bandas de absorção que são comumente referidos como banda I (300-380 nm) e banda II (240-280 nm). A análise do espectro de RMN de ^1H desta fração mostrou sinais referentes ao glicosídeo da flavona apigenina [CD_3OD ; δ_{H} 7,63 (*m*), 6,92 (2H, *d*, J 8,0 Hz), 6,56 (1H, *s*), 6,46 (1H, *d*, J 2,4 Hz), 6,23 (1H, *d*, J = 2,4 Hz), 4,34-089 (*m*)] e o experimento TOCSY permitiu confirmar os acoplamentos entre os hidrogênios do mesmo anel, corroborando a estrutura da substância proposta (glicosídeo da flavona apigenina). O cromatograma da fração MeOH 10% apresentou uma mistura bastante complexa (Figura 74), para a qual não foi possível inferir a presença de metabólitos conhecidos.

4.4 Estudo químico de *Inga edulis*

A espécie *Inga edulis* foi coletada em dois biomas diferentes: Cerrado (folhas e raque foliares) e Amazônia (folhas, raque foliar, sementes, polpa e casca dos frutos).

A fração hexânica do extrato etanólico das folhas da coleta realizada no Cerrado forneceu frações ricas em triterpenos e um derivado graxo poli-insaturado. A fase butanólica indicou a presença de saponinas, pela formação de espuma e através da coloração apresentada com uso do revelador químico anisaldeído em CCD. O fracionamento em CC (sílica derivatizada C18, eluição em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ até MeOH 100%) desta fase originou frações enriquecidas em substâncias fenólicas, tais como a fração 5 (4,3 mg) que mostrou a presença de quatro flavonoides.

Através de experimentos de co-injeção com padrões, foi possível identificar apenas o pico 2 ($t_r = 23,7$ min) como o flavonoide quercetrina (**substância 21**).

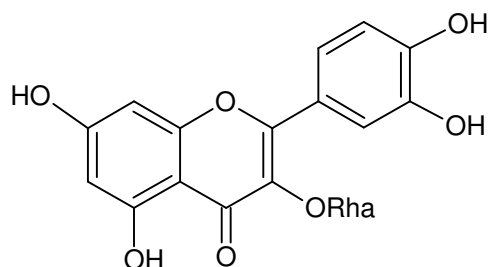


Figura 78. Estrutura da quercetrina (21)

A fase hidrometanólica (400 mg) foi submetida aos mesmos fracionamentos cromatográficos. A análise dos cromatogramas indicou a presença do ácido gálico na fração 1 (270 mg) como constituinte majoritário.

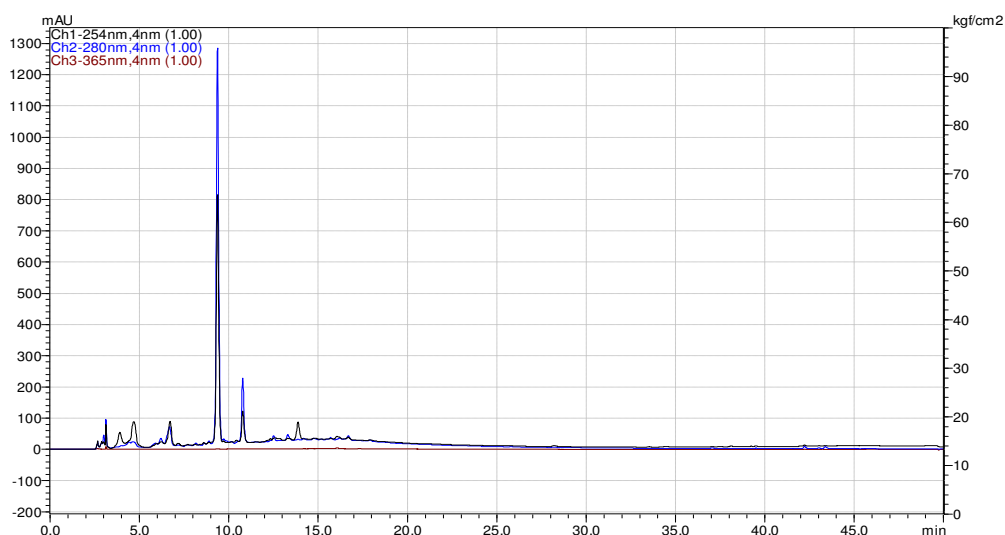


Figura 79. Cromatograma obtido via CLAE-DAD da Fração 1 do fracionamento daFHa das folhas de *I. edulis*.

Um estudo prévio comparativo da composição química das folhas e das raque foliares desta espécie dos diferentes biomas (Cerrado e Amazônia) realizado por CLAE-DAD indicou composição diferenciada. No entanto, o flavonoide observado em $t_r=24\text{min}$ parece ser constante nessa espécie. A presença do ácido galico e do seu derivado metilado só foram observados na espécie coletada no Cerrado.

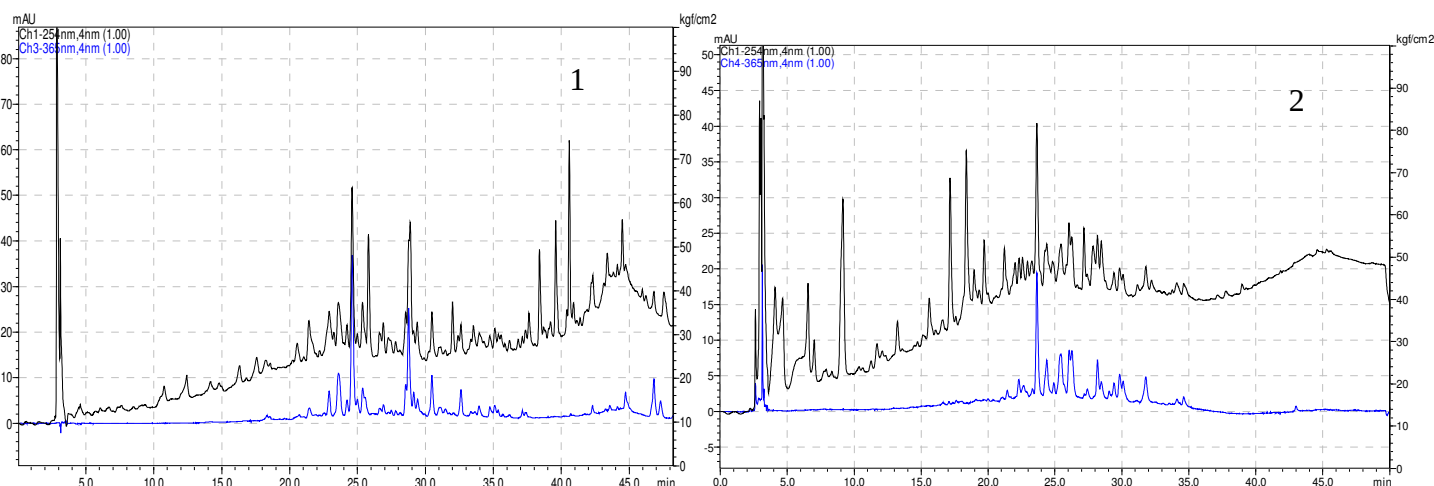


Figura 80. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das folhas da espécie *Inga edulis* coletada na Amazônia (1) e no Cerrado (2).

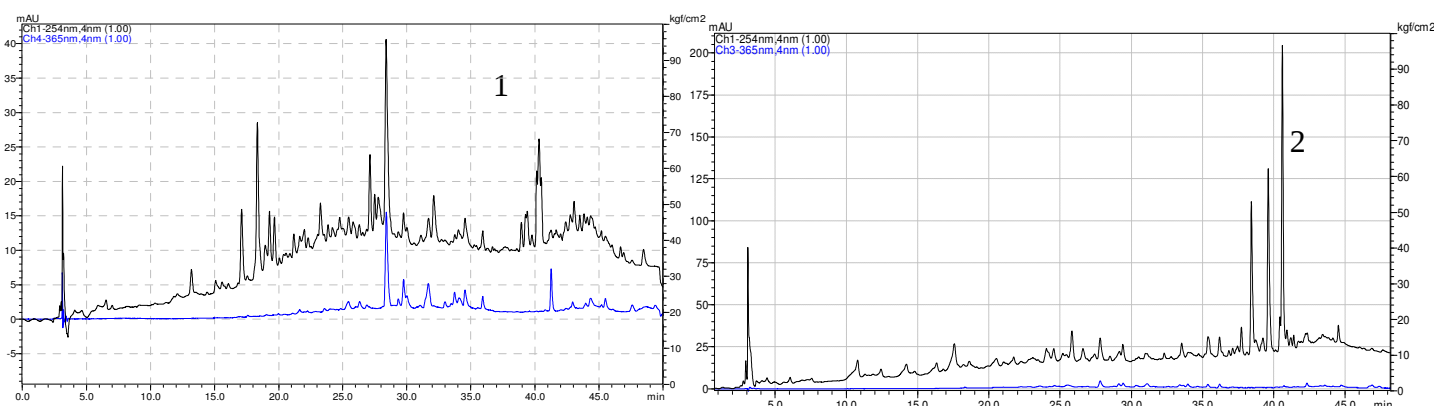


Figura 81. Cromatogramas obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das raque foliares da espécie *Inga edulis* coletada na Amazônia (1) e no Cerrado (2).

4.4.1 Estudo químico da espécie *Inga edulis* coletada no Bioma Amazônia

Investigação das antocianinas presentes nas sementes de *Inga edulis*

Os tegumentos das sementes de *I. edulis* possuem coloração roxa e estão envoltas por uma polpa branca flocosa. Na literatura avaliada não foram encontrados estudos químicos a cerca da composição química desse órgão vegetal, por isso, optamos por investigar a presença desses pigmentos responsáveis pela coloração e possivelmente caracterizar através de técnicas analíticas hífenadas e espectroscopia de RMN. Porém, estudos botânicos já indicam a presença das antocianinas nos cotilédones das espécies de *Inga*, mas não faz referência a cerca da constituição fitoquímica das sementes. Estudos realizados com as folhas de *I. punctata* indicou baixa quantidade de antocianinas. Uma explicação para a sua presença é que elas estão presentes nas folhas para proporcionar foto-protecção, mas não estão suficientemente em elevada concentração para transformar as folhas em coloração vermelha. Os autores também sugerem que a presença de antocianinas podem impedir o ataque de formigas cortadeiras⁷⁹. Este dado é de grande importância, uma

vez que esta espécie, *Inga edulis*, apresentou potencial contra formigas cortadeiras em ensaios anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

Em estudos realizados com sementes de outras espécies de Fabaceae observou-se que a coloração escura presente nos tegumentos desse órgão deve-se principalmente a presença de antocianinas. Nos tegumentos do feijão-caupí foram identificadas cinco tipos de antocianinas: delfinidina-3-glicosídeo, cianidina-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo⁷².

As antocianinas são metabólitos altamente instáveis e suscetíveis a degradação, cuja estabilidade pode ser afetada por fatores como pH, temperatura de armazenamento, concentração, luz, oxigênio, solventes, presença de enzimas, proteínas e íons metálicos^{80, 81, 82, 83}.

O cromatograma (figura 82) desta fração monitorado em 254 e 280 nm apresentou apenas dois picos no início da corrida cromatográfica, sugerindo a presença de duas substâncias de alta polaridade. Com o intuito de detectar as antocianinas presentes na amostra realizou-se uma varredura na faixa de 520 nm (figura 82), tendo em vista que esta classe de substância possui uma absorção máxima observada nas regiões de 500-535 nm⁸⁴.

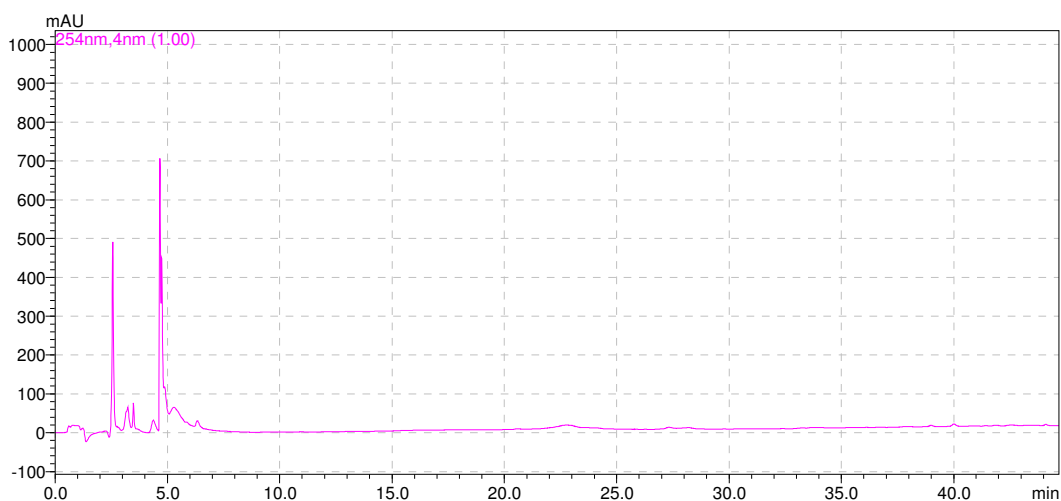


Figura 82. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (254 nm) da Fração aquosa obtida das sementes de *I. edulis*.

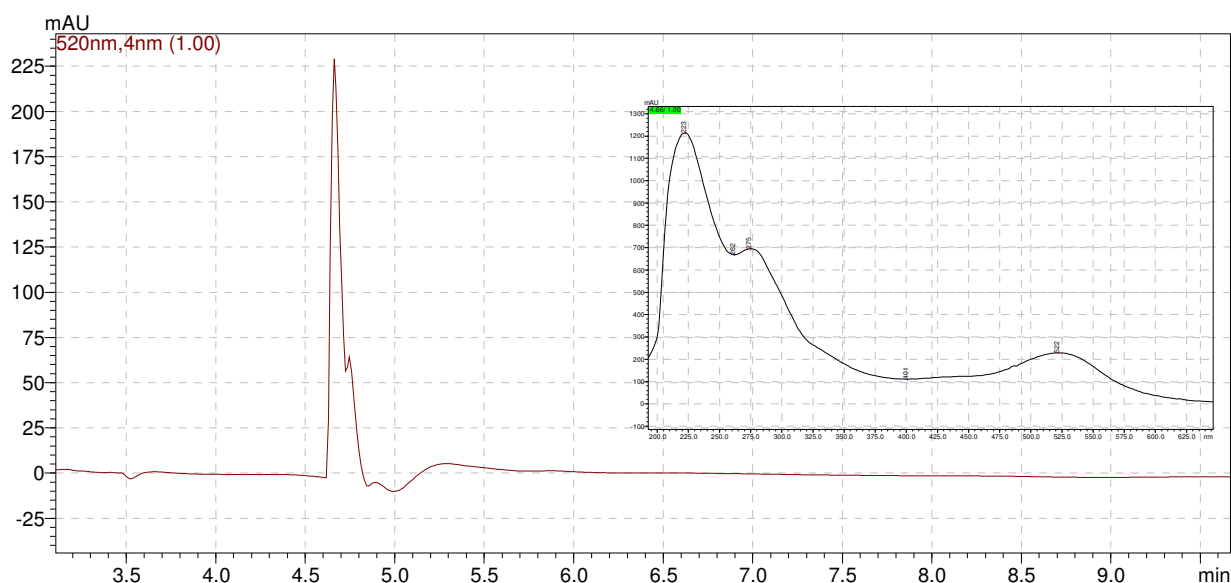


Figura 83. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (520 nm) da fração aquosa obtida das sementes de *I. edulis*.

O espectro de UV do pico principal ($t_r = 4,66$ min) indicou duas bandas de absorção em 275nm e 522 nm, confirmando a presença de antocianinas (As antocianinas possuem duas bandas específicas uma em 270nm e a outra em 520nm). Analisando o espectro de UV de uma antocianina é possivelmente extrair importantes informações sobre sua estrutura.

Diversos estudos mostram que a análise do espectro no UV/VIS fornece informações preliminares importantes sobre a estrutura de uma antocianina incluindo a natureza da aglicona, a posição do glicosídeo e a presença de ácidos fenólicos⁷¹. Quando as antocianinas são diglicosiladas é possível prever se estes glicosídeos estão na posição 3 apenas, ou estão nas posições 3 e 5 analisando o espectro na região de 440nm que apresentam um ombro característico quando os glicosídeos estão nas duas posições⁴⁴. A presença de ácido cinâmico ou um derivado na estrutura pode ser prevista analisando a região em 310nm, sendo que uma banda intensa nesta região indica que há na molécula este ácido ou algum derivado. Porém, a acilação com ácido acético e ácido malônico não apresenta a banda em 310nm, pois estes ácidos não absorvem na região do ultravioleta^{85, 86, 87, 88}. Desta forma, analisando o espectro de UV da antocianina presente nesta amostra não verificamos a presença de ombros em 440 nm, nem bandas em torno de 310 nm.

Com isso, inferimos que esta substância não possui glicosídeos nas posições 3 e 5 simultaneamente e nem tampouco ácido cinâmico ou derivado deste.

Esta fração foi submetida à análise por Espectroscopia de RMN de ^1H , Espectrometria de Massas (infusão direta) e LC-MS.

O espectro de massas obtido por infusão direta mostrou uma imensa quantidade de açúcar livre, possivelmente devido à baixa concentração dos pigmentos na amostra não foi possível extrair informações relevantes acerca da estrutura química da antocianina investigada. Também não foi possível observar o pico no espectro de massas referente a essa antocianina devido a baixa concentração na amostra em relação aos açúcares livres

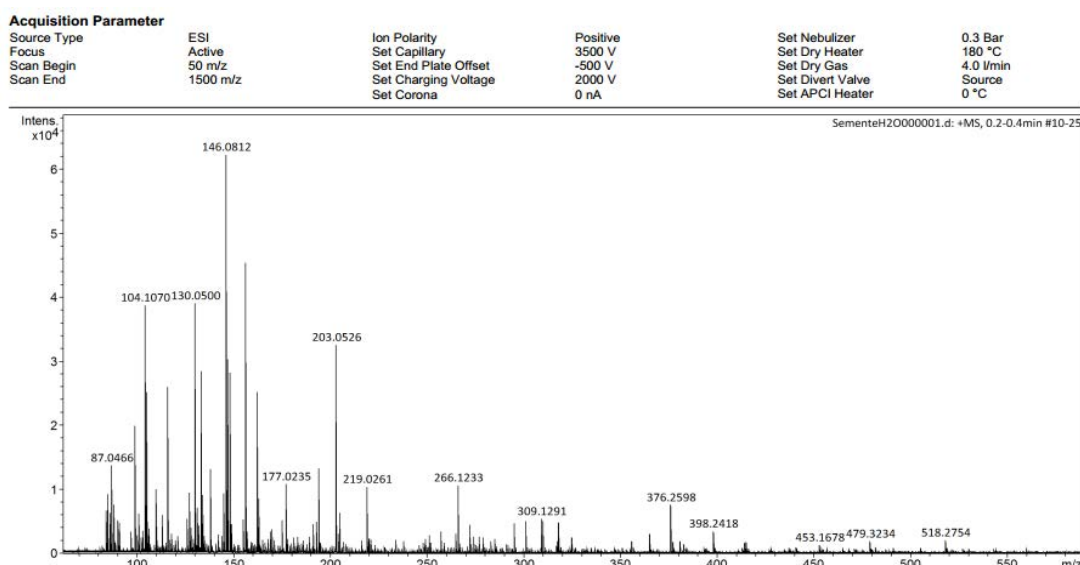


Figura 84. Espectro de Massas da fração aquosa obtida das sementes de *I. edulis*

No entanto, o espectro de RMN de ^1H assim como as informações obtidas da análise por CLAE-DAD (tempo de retenção e espectro de UV) forneceu valiosas informações sobre a estrutura química desta antocianina.

A análise do espectro de RMN de ^1H (figura 84) mostrou, como esperado, uma imensa quantidade de açúcar livre. Esta informação foi obtida com base na intensidade dos sinais na região dos açúcares e nas integrais em relação aos sinais dos hidrogênios aromáticos.

Uma análise minuciosa da expansão do espectro de RMN de ^1H (figura 85) na região dos aromáticos, após integração, mostrou quatro sinais principais. A presença de um singlete em δ_{H} 8,7 integrando para 1H associado ao H4, dois dubletos em

δ_{H} 7,52 (1H) e 6,66 (1H) com constante de acoplamento em meta ($J = 3$ Hz), e um singleto em δ_{H} 7,44(2H) forneceu indícios de um derivado da antocianina delfinidina-3-glicosídeo. Devido a grande quantidade de açúcares livres, não foi possível inferir o número de glicosídeos ligados a aglicona.

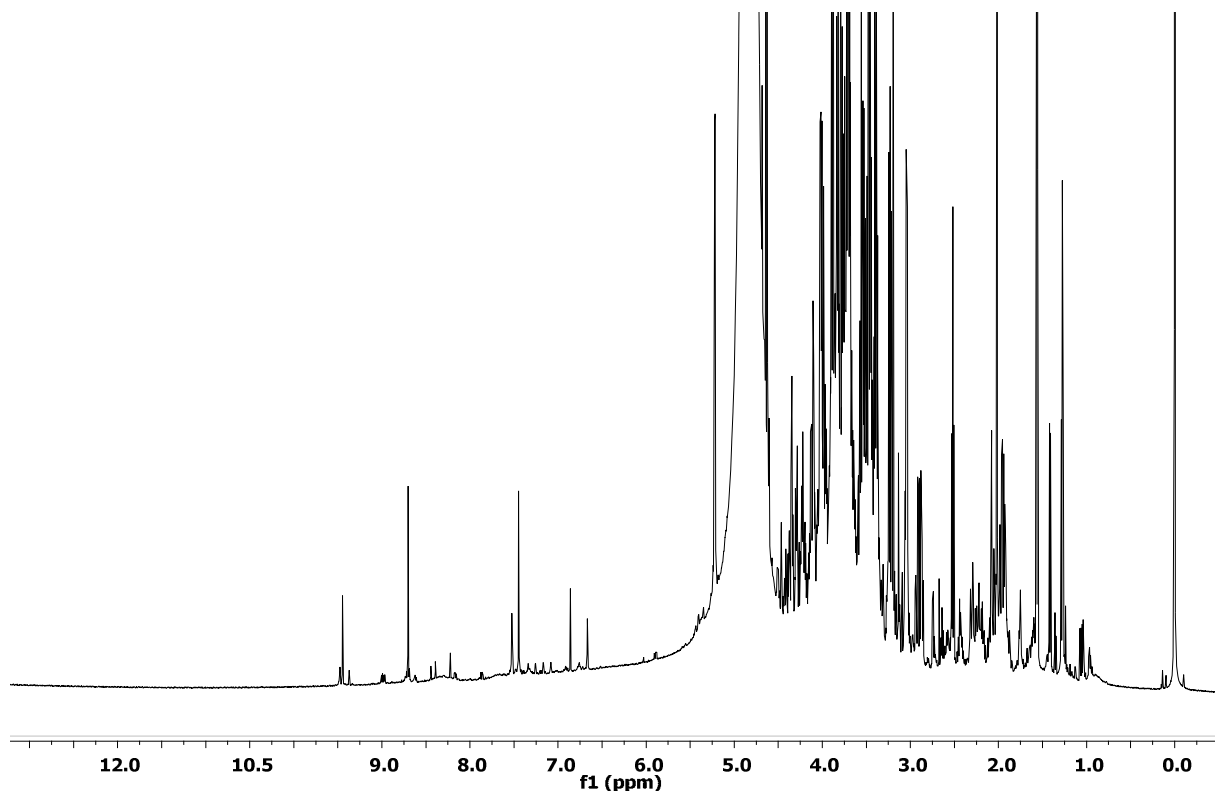


Figura 85. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz; D_2O) da fração aquosa das sementes de *Inga edulis*.

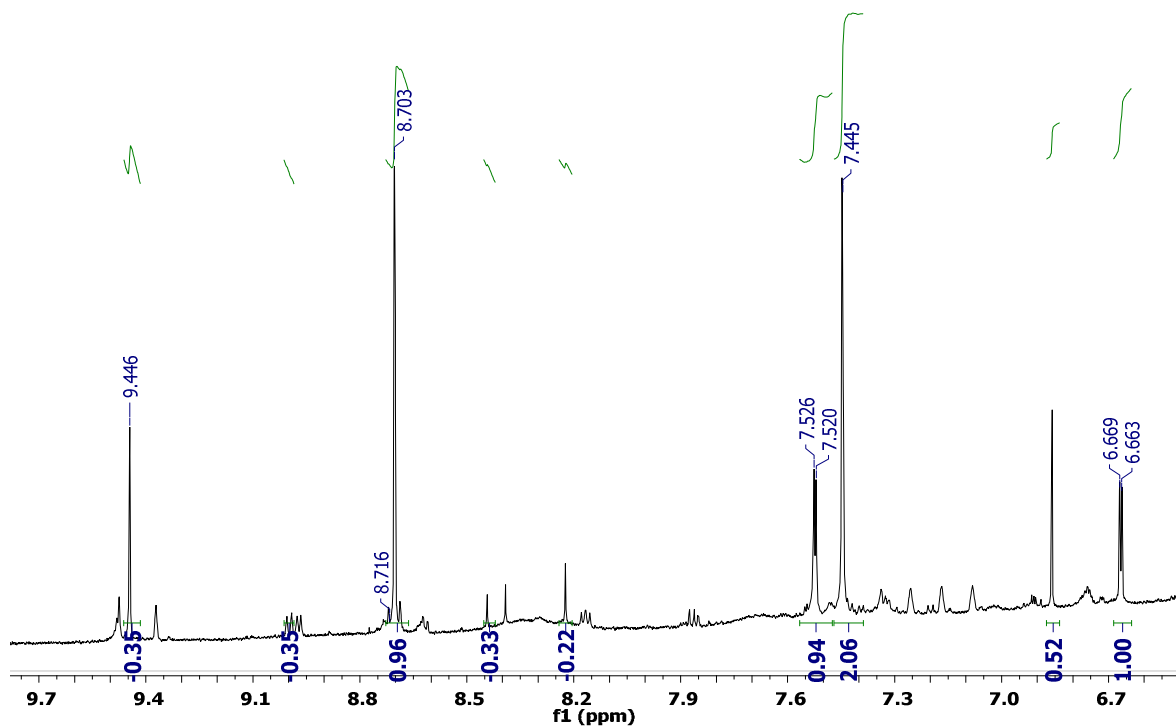


Figura 86. Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz; D_2O) da fração aquosa das sementes de *Inga edulis*.

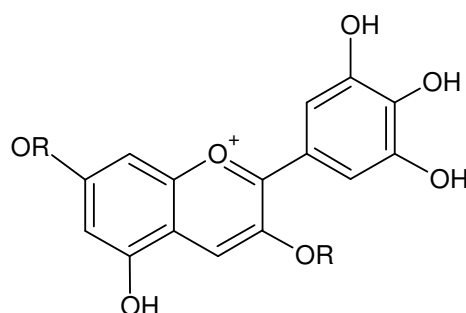


Figura 87. Esqueleto da antocianina da fração aquosa das sementes de *Inga edulis*

A análise do espectro do UV-Vis desta substância ($\lambda(\text{nm})$: 275/522) condiz com os dados da literatura para antocianinas com este padrão de substituição, $\lambda(\text{nm})$: 271/522⁸⁹.

Adicionalmente, observou-se a presença de um singlete em δ_{H} 9,44, característico de H-4 de antocianinas. Porém, não foi possível associar este sinal a uma outra estrutura desta classe.

Ainda visando a detecção de antocianinas nas sementes de *Inga edulis*, o material vegetal obtido após extração com água foi extraído com metanol. A fração metanólica (62 mg) apresentou coloração amarela, foi seca em ar comprimido e em seguida analisada por CLAE-DAD nas mesmas condições da fração aquosa.

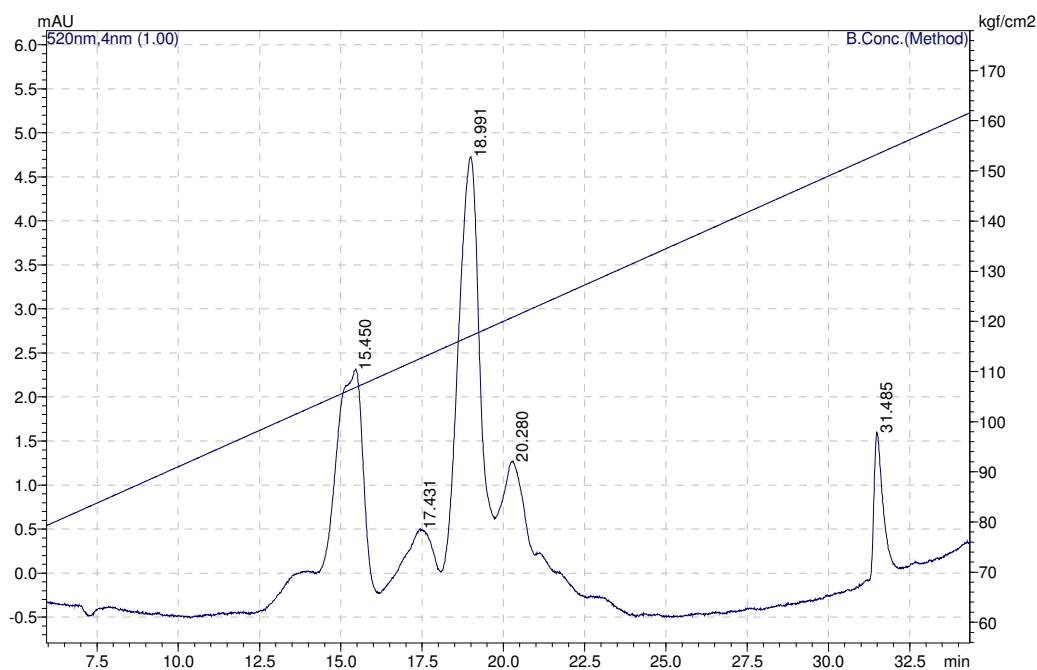
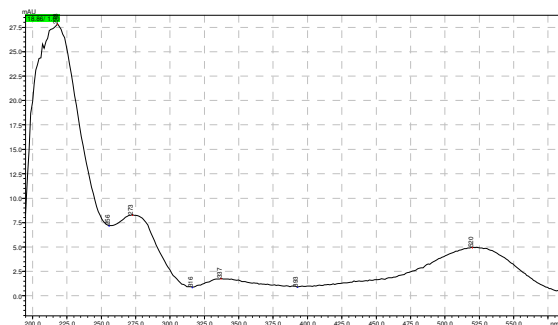
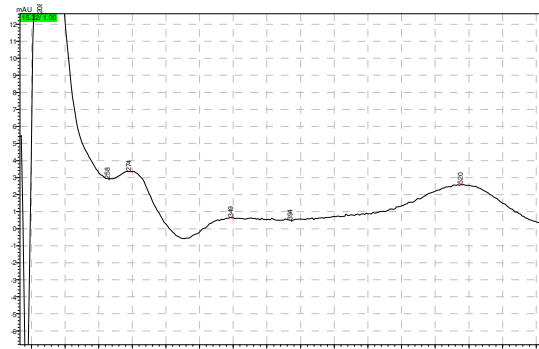
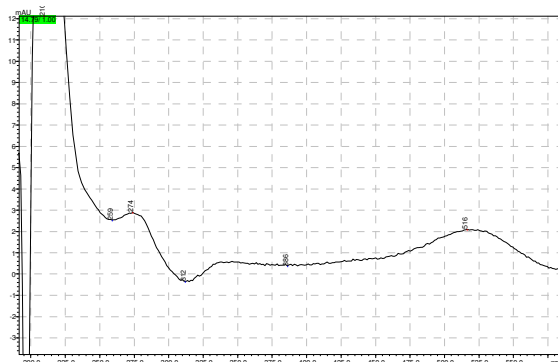


Figura 88. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (520 nm) da fração metanólica obtida das sementes de *I. edulis*.

A análise do cromatograma desta fração em 520 nm mostrou a presença de cinco antocianinas.



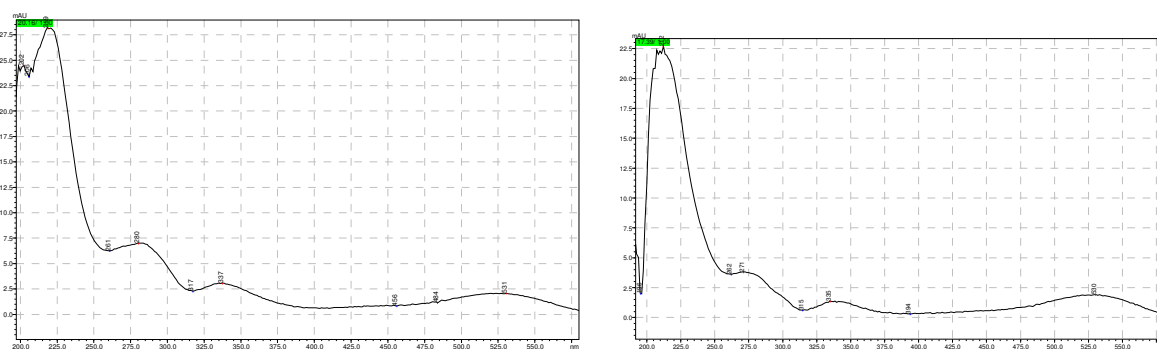


Figura 89. Espectros de UV das antocianinas obtidos via CLAE-DAD (520 nm) da fração metanólica das sementes de *I. edulis*.

É interessante notar que os cincospicos referente as antocianinas (tabela 10) possuem, além das bandas em torno de 270nm e 520nm, (característica principal desta classe de substância) uma banda em torno em 330-350 nm sugerindo acetilação com ácido cinâmico ou derivado deste na molécula de açúcar.

Tabela 10. Tempos de retenção e comprimentos máximos de absorção das antocianinas encontradas na fração metanólica das sementes de *I. edulis*.

Tempo de retenção (min)	Máximos de absorção (nm)
14,79	274; 335; 516
15,32	274; 349; 520
17,39	271; 335; 530
18,86	273; 337; 520
20,16	280; 337; 531

Pesquisas indicam que a presença de grupos acetilados está relacionada com a estabilidade do pigmento⁹⁰. Estudos realizados por MINIATI e colaboradores⁹¹ indicaram que a adição de fenólicos como o ácido gálico, a quercetina e a catequina aumentam a estabilidade do pigmento em solução. É importante mencionar que estas substâncias foram detectadas nesta fração quando analisadas por CLAE-DAD.

No entanto, as antocianidinas detectadas nesta fração não foram caracterizadas devido à baixa concentração em relação aos outros metabólitos extraídos nesse solvente. Foram realizadas análises de LC-MS e RMN de ¹H, porém

não forneceram resultados conclusivos acerca da estrutura química destas substâncias.

Investigação dos fenólicos presentes nas sementes de *Inga edulis*

A fração aquosa de coloração lilás obtida das sementes de *Inga edulis*, após análise por CLAE-DAD, mostrou outra substância ($t_r = 4,75$ min) coeluinto com a antocianina (1). A comparação do espectro de UV junto com o tempo de retenção do padrão nos permitiu identificar como sendo o tanino ácido tânico (**substância 22**) (pico 2).

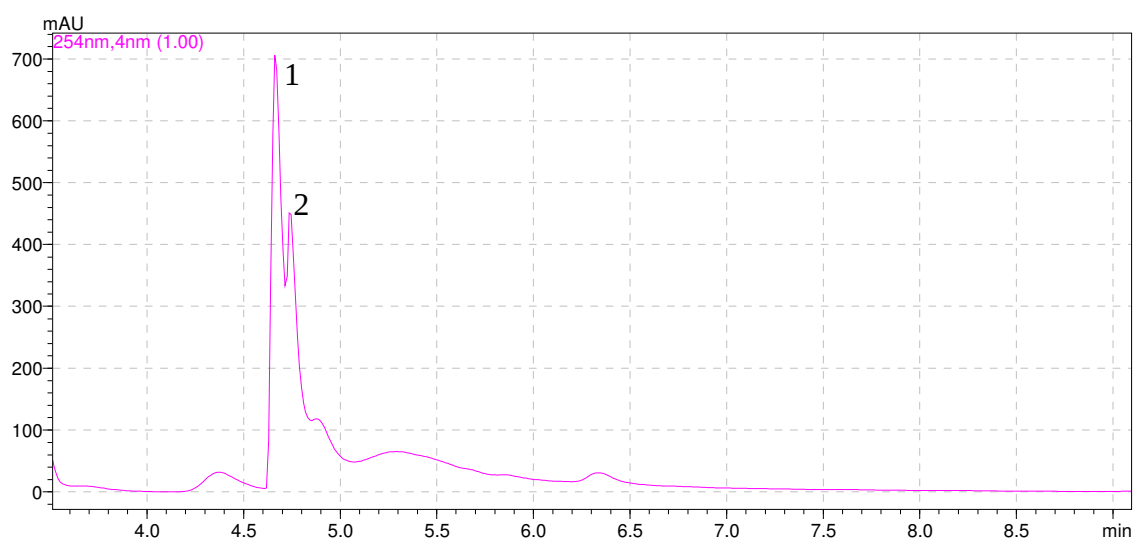


Figura 90. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (254 nm) da fração aquosa obtida das sementes de *I. edulis*.

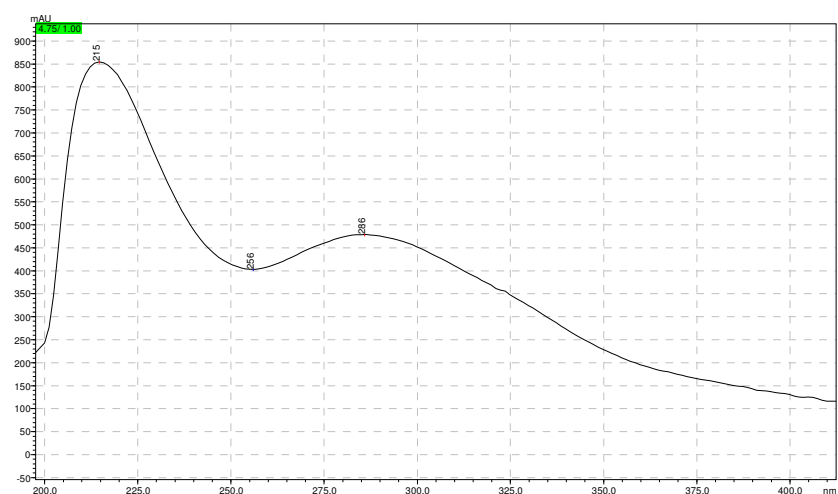


Figura 91. Espectro de UV obtido via CLAE-DAD do pico 2 (ácido tânico) da fração aquosa obtida das sementes de *I. edulis*.

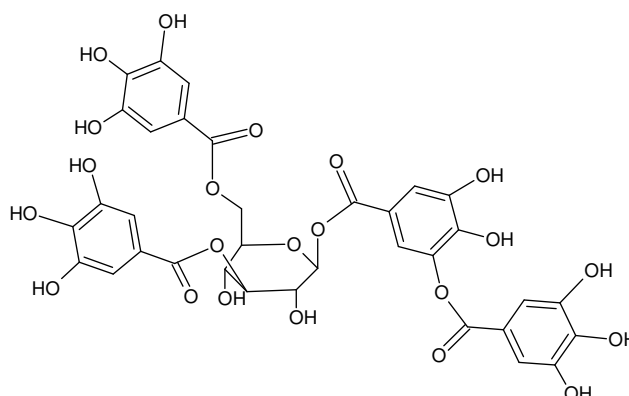


Figura 92. Estrutura do ácido tânico (22)

Investigação dos fenólicos presentes nas folhas de *Inga edulis*

As folhas de *Inga edulis*, após secas e moídas, foram extraídas com etanol em banho de ultrassom por 20 min. O extrato etanólico (130 mg), preparado em pequena escala, foi submetido a partição com hexano para remoção do material lipofílico. A fração metanólica foi analisada por CLAE-DAD (Figura 92). Cromatograma obtido via CLAE-DAD (280 nm) da fração metanólica obtida das folhas de *I. edulis*.

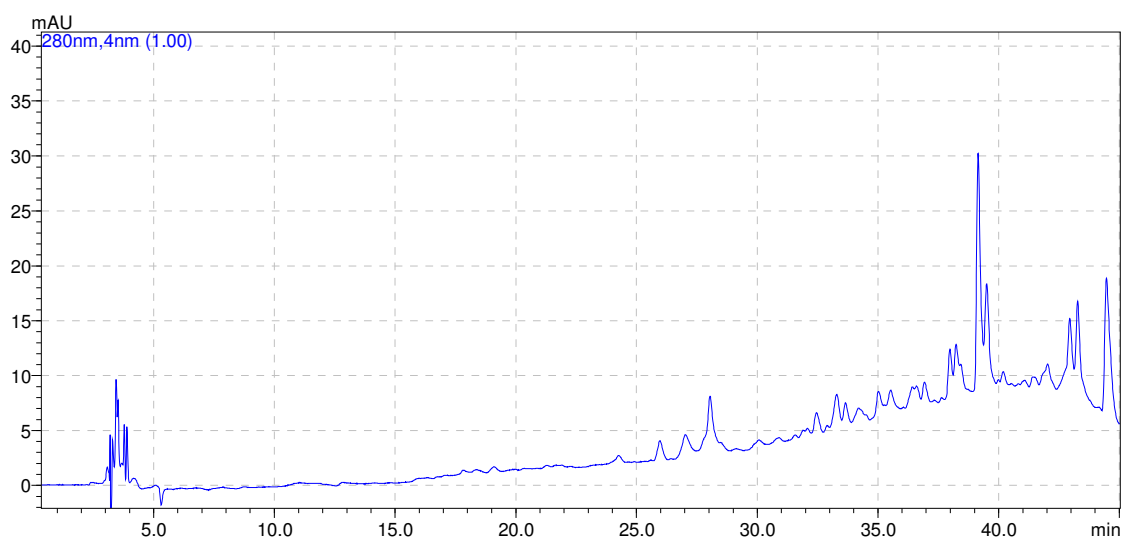


Figura 93. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (280 nm) da fração metanólica das folhas de *I. edulis*.

No entanto, o método empregado não foi eficiente na separação dos constituintes químicos da fração, tendo em vista, que as substâncias aromáticas extraídas no metanol possuíam polaridade semelhantes e foram observadas nos últimos minutos da corrida cromatográfica. É interessante notar, que diferente das folhas da coleta realizada no Cerrado não observamos concentração expressiva dos taninos, ácido gálico, galato de metila, catequinas e flavonoides glicosilados que, são eluídos em uma concentração maior do solvente aquoso no método empregado. Uma varredura na região de 400 nm nos mostrou a presença de três compostos pertencentes aumdistintinto grupo de substâncias ainda não detectado nas espécies estudadas neste trabalho.

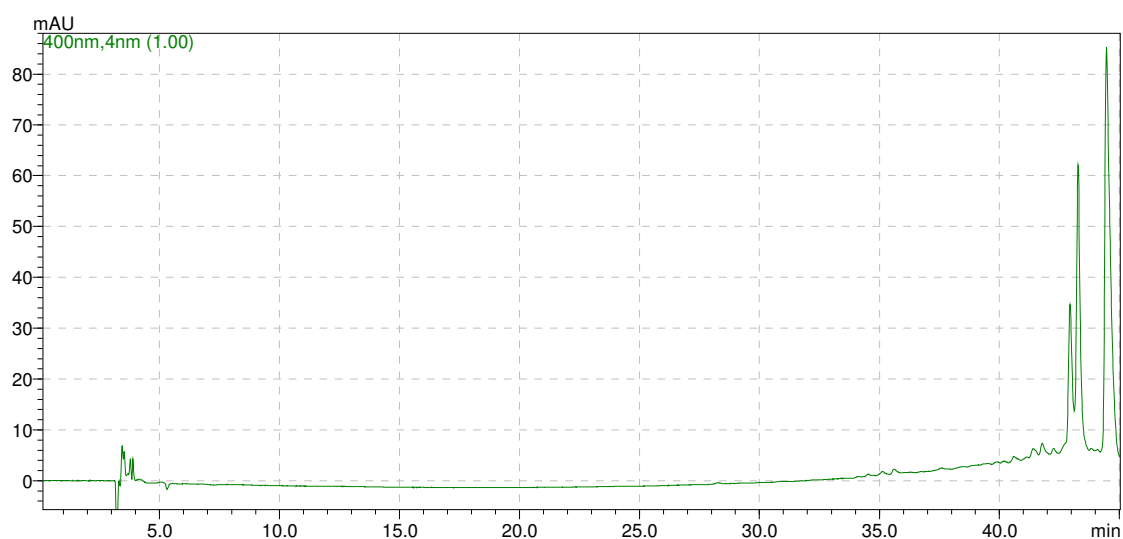


Figura 94. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (400 nm) da fração metanólica obtida das folhas de *I. edulis*.

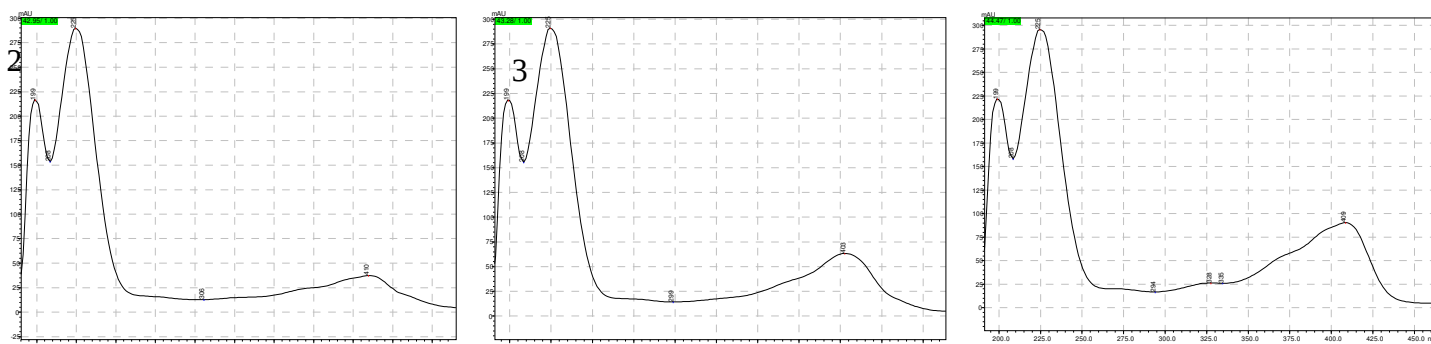


Figura 95. Espectros de UV obtidos via CLAE-DAD dos três picos observados em 400 nm da fração metanólica obtida das folhas de *I. edulis*.

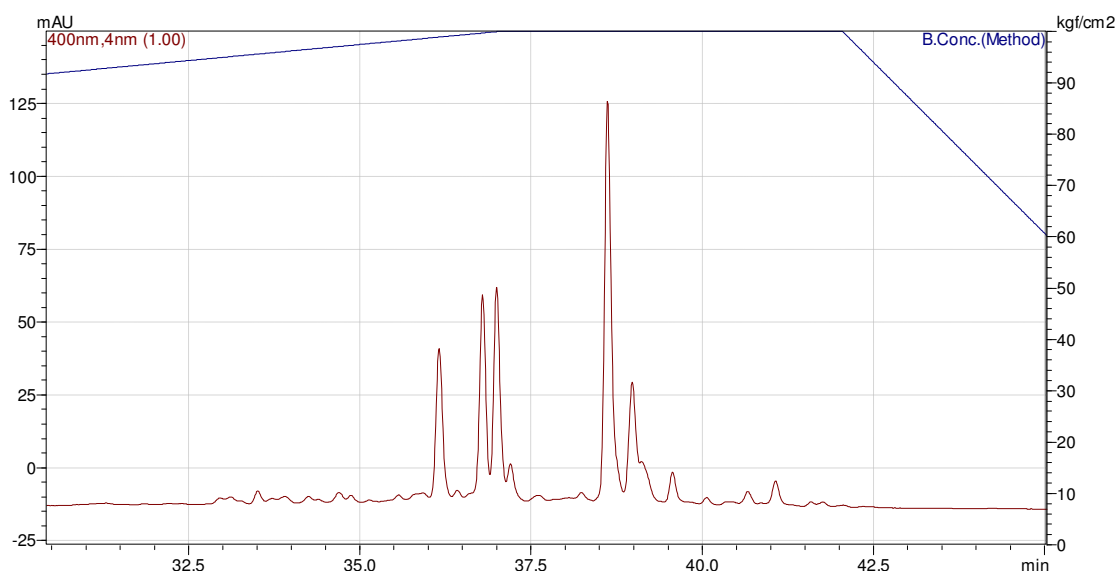


Figura 97. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (400 nm) da fração metanólica obtida das folhas de *I. edulis*.

Este grupo de substâncias com absorção em 400 nm, também foi investigado em outras partes vegetativas desta espécie. Na fração metanólica das sementes, onde foram detectadas as antocianinas, também se observou um pico (tr = 31,59 min) no cromatograma com este mesmo perfil (λ (nm): 227/397).

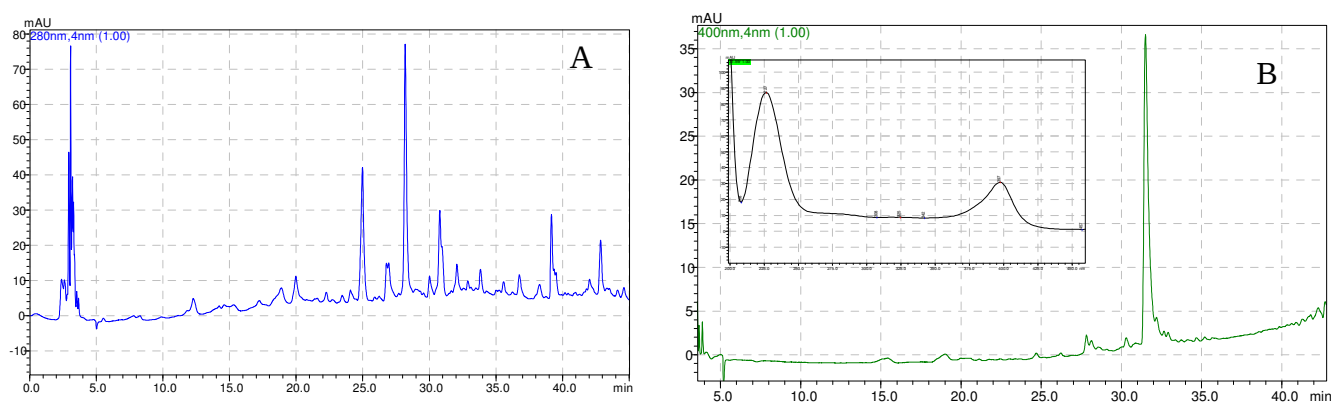


Figura 98. Cromatograma obtido via CLAE-DAD monitorado em 280 nm (A) e 400 (B) da fração metanólica obtida das sementes de *I. edulis*.

4.5 Caracterização de fenólicos presentes nas sementes de *I. edulis* através de RMN de ^1H obtida da análise em LC-SPE-TT

A fração metanólica das sementes de *Inga edulis*, apresentou na análise por CLAE-DAD, picos bem resolvidos e, após análise de seus espectros de UV verificou-se que a mesma era constituída principalmente por substâncias fenólicas como ácidos orgânicos e flavonóides.

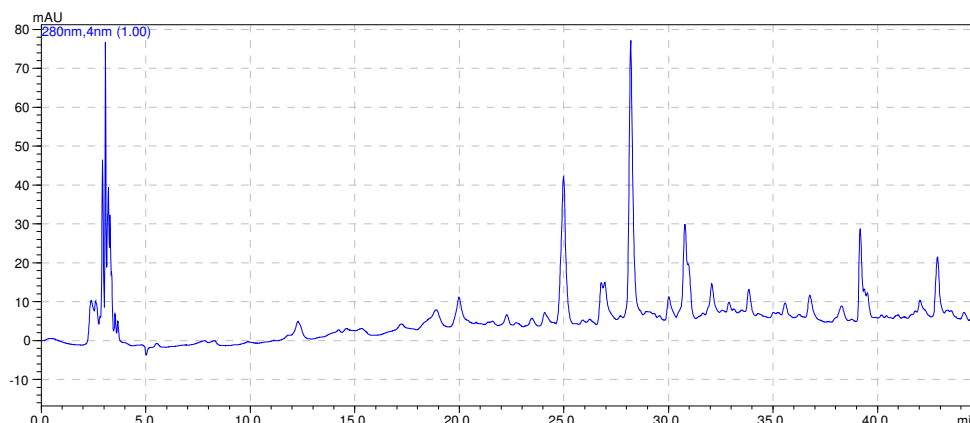


Figura 99. Cromatograma obtido via CLAE-DAD monitorado em 280 nm da fração metanólica obtida das sementes de *I. edulis* analisada pela técnica LC-SPE-TT.

A análise por LC-SPE-TT desta fração (25 mg) nos forneceu 7 subfrações e, após obtenção de seus espectros de RMN de ^1H (600 MHz) foram caracterizadas cinco substâncias.

4.5.1 Análise da fração 1 (pico 1, $t_r = 27,0$ min)

O espectro de RMN de ^1H desta fração apresentou um par de dupletos em δ 7,40 e δ 6,16 com larga constante de acoplamento ($J = 15,6$ Hz) típicos de um sistema *trans*-cinâmico, um duplo duplete em 6,96 (1H, $J = 8,4$ e $J = 1,8$ Hz) acoplado em *meta* com o duplete em 7,00 (1H, $J = 1,8$ Hz) e em orto com o duplete em 6,77 (1H, $J = 8,4$ Hz) indicando a estrutura do ácido cafeico (**substância 23**).

Tabela 11. Dados de RMN ^1H para o ácido cafeico (600 MHz, MeOD).

Posição	δ H
7	7,40 (1H, d, $J = 15,6$)
2	7,00 (1H, d, $J = 1,8$)
6	6,96 (1H, $J = 8,4$ e $1,8$ Hz)
5	6,77 (1H, d, $J = 1,8$)
8	6,16 (1H, d, $J = 15,6$)

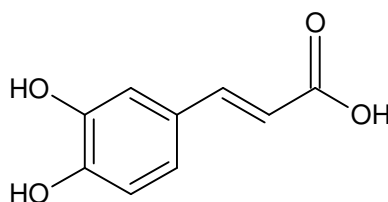
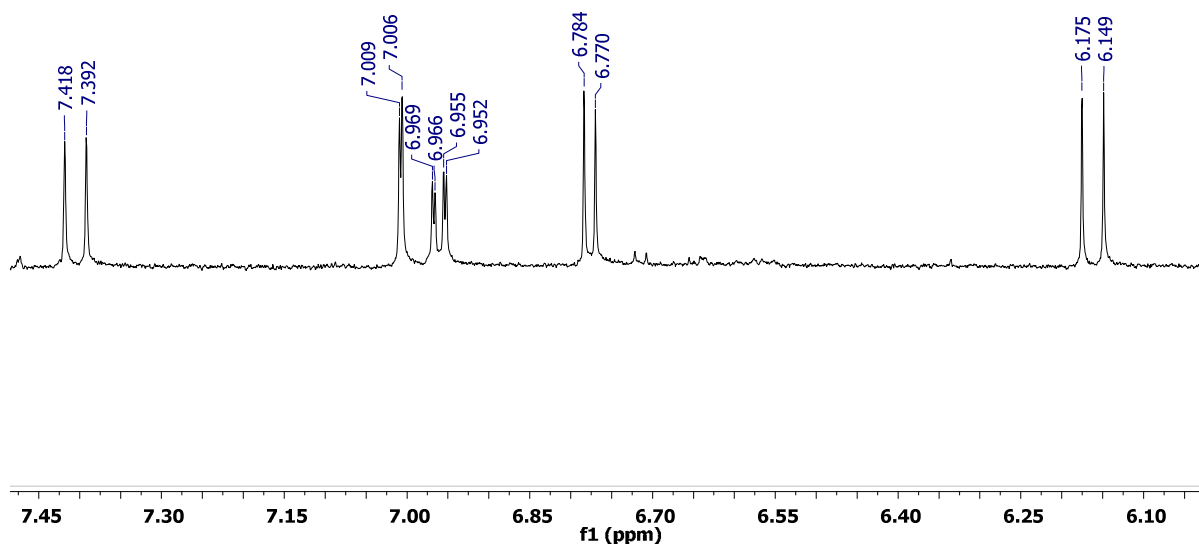


Figura 100. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da fração 1 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.



4.5.2 Análise da fração 2 (pico 2, tr = 28 min)

O espectro de RMN de ^1H da fração 2 apresentou dois dupletos em δH 7,64 e δ 6,35 com constante de acoplamento de 16 Hz, integrando para 1H, caracterizando um sistema *trans*-olefinico, dois duplos dupletos em δH 7,56($J = 9,0$ e $J = 1,8$ Hz) e δ 6,97 ($J = 9,0$ e $J = 1,8$ Hz) integrando para 2H e um singleto em δH 3,85 (3H), indicando a estrutura do ácido cinâmico substituído em *para* por uma metoxila (**substância 24**).

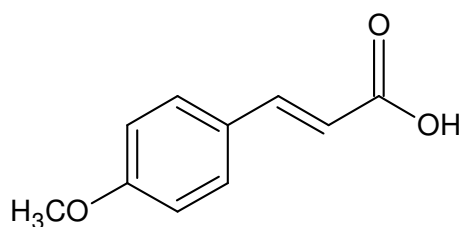


Tabela 12. Dados de RMN ^1H para o ácido *p*-metoxicinâmico (600 MHz, MeOD).

Posição	δH
7	7,64 (1H, J = 16 Hz)
2, 6	7,56(2H, J = 9,0 e J = 1,8 Hz)
3, 5	6,97 (J = 9,0 e J = 1,8 Hz)
8	6,35 (1H, J = 16 Hz)
4-OCH ₃	3,85 (3H, s)

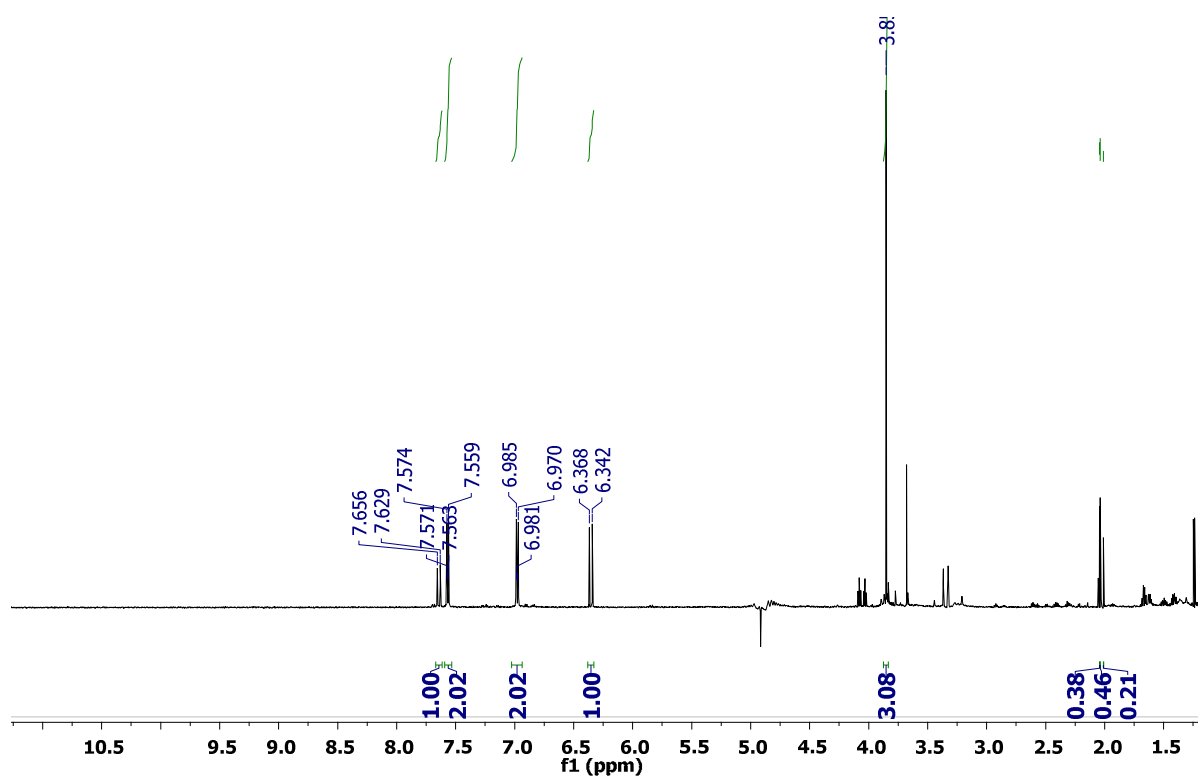


Figura 101. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da fração 1 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

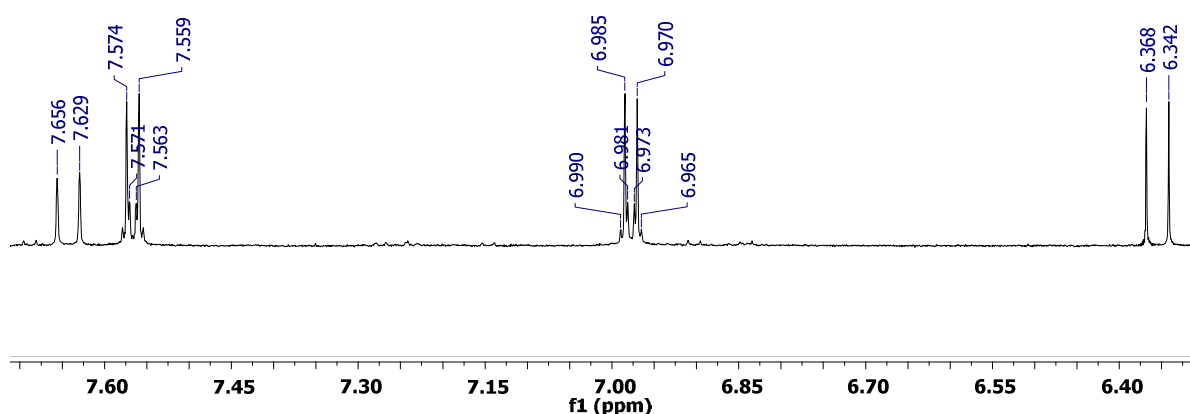
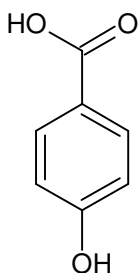


Figura 102. Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da fração 2 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

4.5.3 Análise da fração 3 (pico 3, $t_r = 30$ min)

O espectro de RMN de ^1H da fração 3 mostrou uma mistura de duas substâncias aromáticas e sinais de hidrogênios alifáticos. No entanto, com base nas integrais e no espectro de UV obtido da análise em CLAE-DAD foi possível caracterizar a substância majoritária como sendo o ácido *p*-hidroxibenzóico (**substância 13**) através dos pares de dupletos em δH 7,80 (2H, dd, $J = 9,0$ e $2,4\text{Hz}$) e δH 6,85 (2H, dd, $J = 9,0$ e $2,4\text{Hz}$).



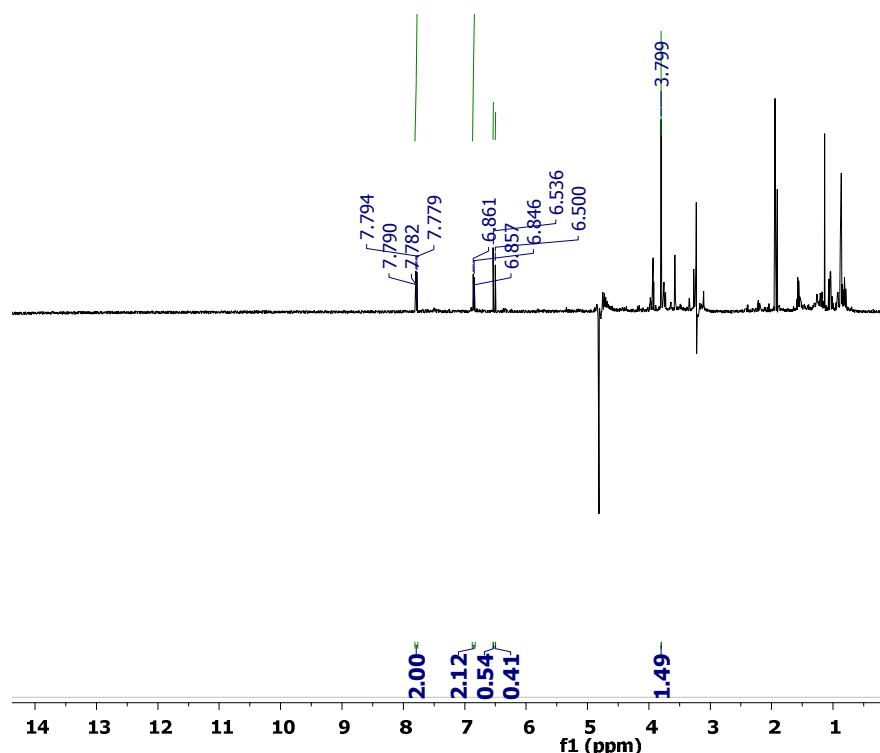


Figura 103. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da fração 3 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

4.5.4 Análise da fração 4 (pico 4, $t_r = 32,0$ min)

O espectro de RMN de ^1H da fração 4 apresentou uma complexidade de sinais na região dos hidrogênios alifáticos, indicando claramente tratar-se de uma mistura através da intensidade dos sinais e das integrais. Analisando a região dos hidrogênios aromáticos, observamos a presença de dois dupletos e dois singletos. Após integração dos sinais constatamos a presença de duas substâncias, na proporção de 1:2, aproximadamente. Com base no espectro de UV das substâncias aromáticas da mistura, foi possível detectar derivados do ácido benzóico. Os pares de dupletos em $\delta\text{H} 7,89$ (d , $J = 9,0$ Hz) e $\delta\text{H} 6,95$ (d , $J = 9,0$ Hz) acoplando em orto e integrando para 2H, assim como o singlete em 3,90 (s, 3H), típico de metoxila aromática, sugeriram a presença do ácido benzóico metoxilado *em para*. O ácido 4-metoxibenzoico (**substância 25**), conhecido principalmente pelo nome ácido

anísico, é um derivado metilado do ácido 4-hidroxibenzóico detectado na fração anterior (pico 3).

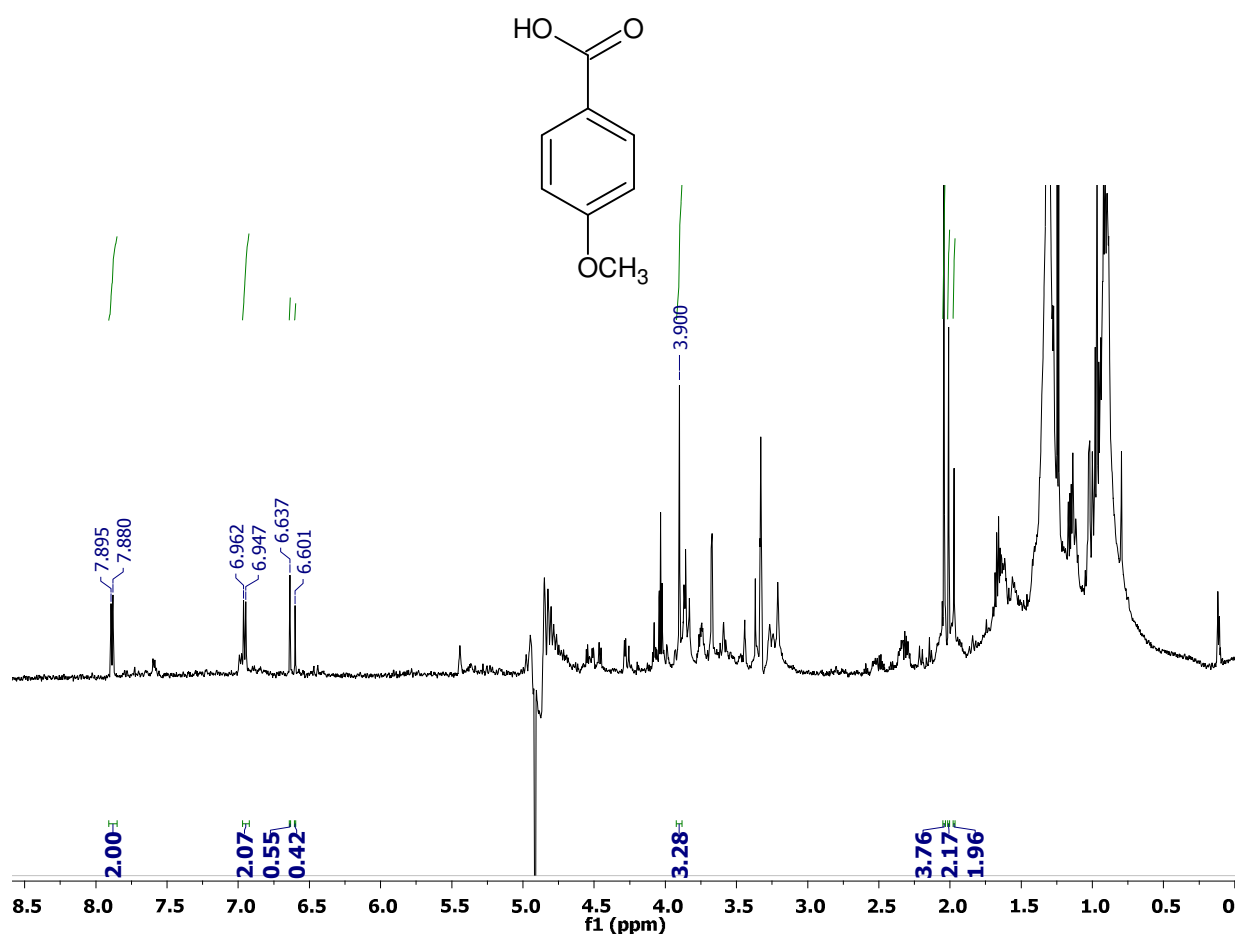


Figura 104. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da fração 4 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

4.5.5 Análise da fração 5 (pico 5, $t_r = 33,0$ min)

O espectro de RMN de ^1H da fração 5 apresentou uma complexidade de sinais na região dos hidrogênios aromáticos e alifáticos e, por isso não foi possível caracterização de nenhuma substância.

4.5.6 Análise da fração 6 (pico 6)

O espectro de RMN de ^1H da fração 6 mostrou uma mistura de, pelo menos, duas substâncias aromáticas e sinais de hidrogênios alifáticos. Com base nos tempos de retenção e nos espectros de UV da região em que foi coletada a fração, foi possível inferir a presença de um ácido orgânico em mistura com um flavonoide.

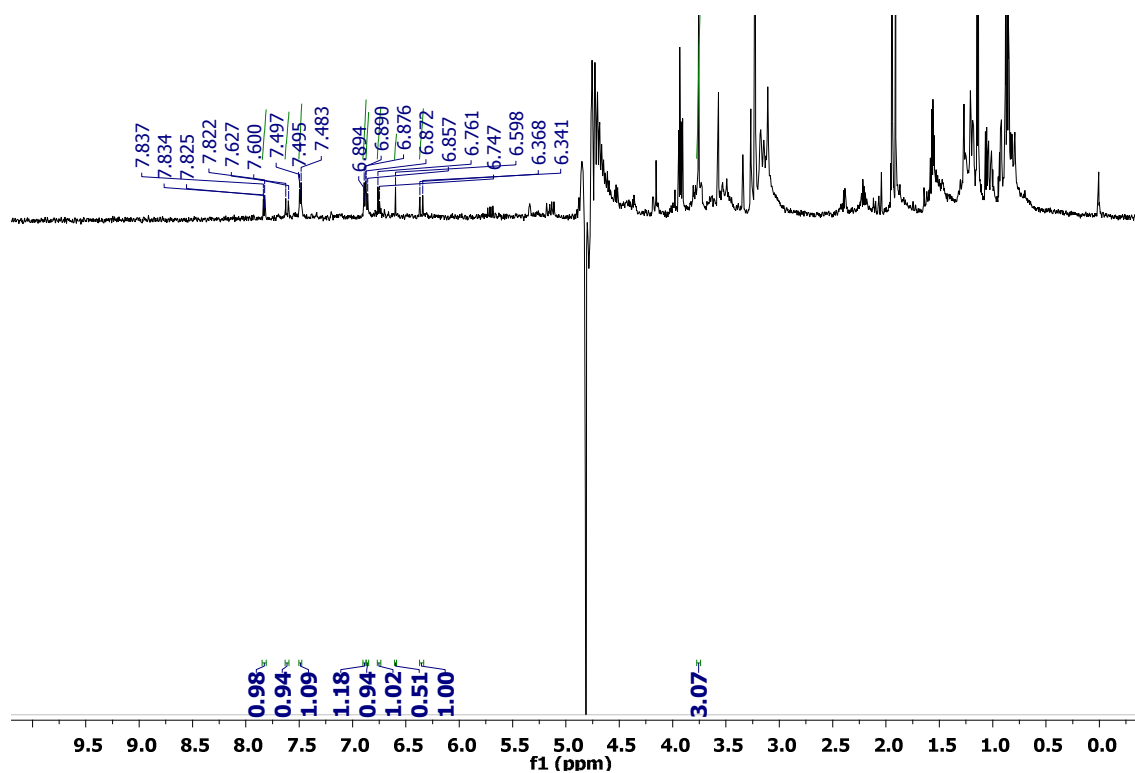


Figura 105. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da fração 6 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

Uma análise minuciosa da região dos hidrogênios aromáticos nos permitiu identificar a presença do ácido ferúlico (**substância 26**) através dos dupletos δH 7,61(1H) e δ 6,35 (1H) com constante de acoplamento de 16 Hz, caracterizando o sistema *trans*-cinâmico, do duplo duplete em δH 7,84 (1H, $J = 9,0$ e $J = 1,8$ Hz) acoplando em meta com o duplete em δH 6,90 (1H, $J = 1,8$ Hz) e em orto com o duplete em δH 6,86 (1H, $J = 9,0$ e $J = 1,8$ Hz) e da presença do grupamento metoxila em δH 3,75 (s, 3H).

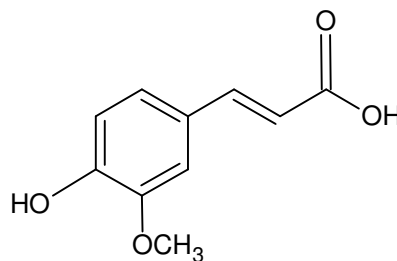
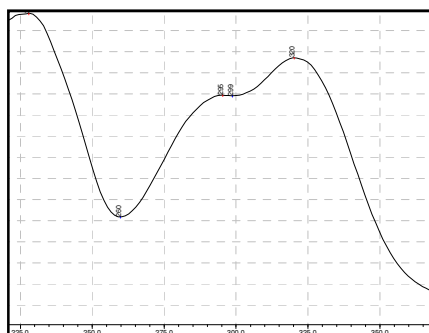
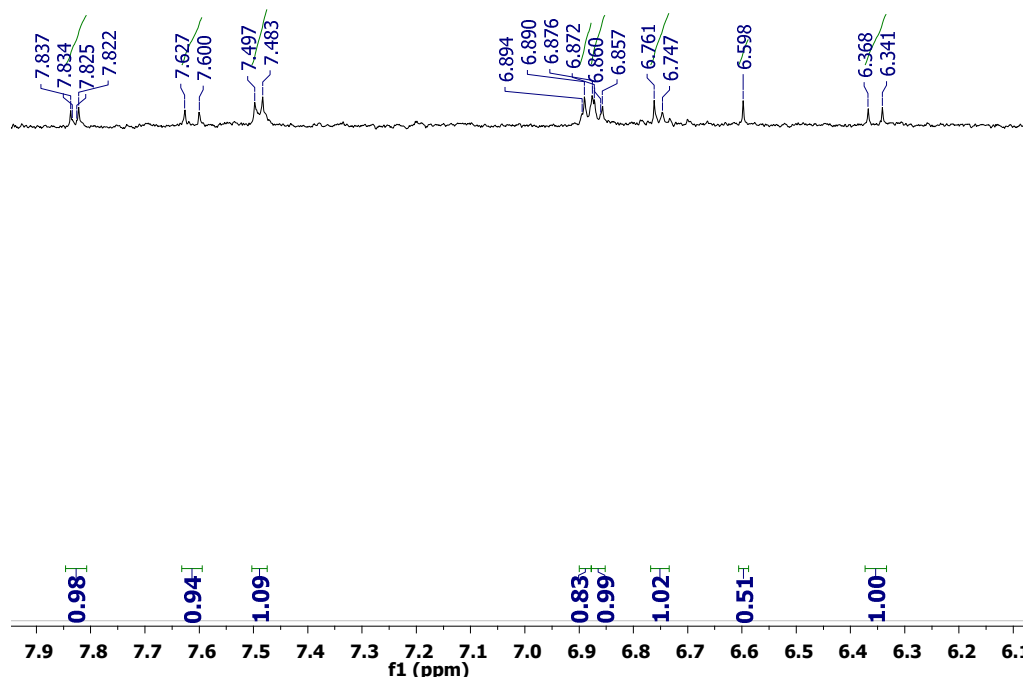


Figura 106. Espectro de UV e estrutura do ácido ferúlico

Figura 107. Expansão do espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da fração 6 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

O espectro de UV associado a esse pico obtido da análise por CLAE-DAD corrobora este tipo de estrutura.

Os demais sinais encontrados na região dos hidrogênios aromáticos, possivelmente provém de um flavonoide. O singlete em δH 6,6 é característico de H-3 de flavona e as bandas observadas no espectro de UV (figura 27) desta região condizem com esta classe de substância.

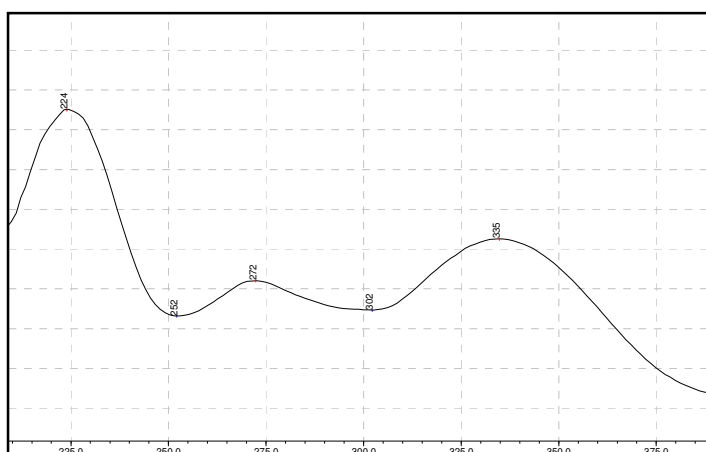


Figura 108. Espectro de UV do flavonoide da mistura da fração 6 obtida da análise em LC-SPE-TT da fração MeOH das sementes de *I. edulis*.

4.5.7 Análise da fração 7 (pico 7, tr = 34,0 min)

O espectro de RMN de ^1H da fração 7 apresentou apenas sinais de hidrogênios alifáticos e não foi possível caracterizar seus constituintes químicos.

4.6 Estudos de desreplicação das folhas das espécies de *Inga*

4.6.1 Análise por CLAE-DAD

Os estudos de desreplicação das espécies de *Inga* iniciaram-se com o desenvolvimento de metodologia baseada em análises por CLAE-DAD visando realizar a identificação direta dos metabólitos secundários presentes nas matrizes estudadas (folhas) empregando experimentos de co-injeção de padrões autênticos. Inicialmente foi realizada a investigação dos extratos EtOH das folhas das três espécies em que 5 mg de cada extrato foi dissolvido em uma mistura de MeOH/H₂O (1:1, v/v), submetido à extração em fase sólida (SPE) para remoção dos interferentes e constituintes de baixa polaridade, seguida de injeção de 20 μL em CLAE analítico. As análises cromatográficas foram feitas com a utilização de uma coluna RP18 e a fase móvel gradiente de MeOH/H₂O. Durante a eluição dos componentes químicos presentes em cada extrato, o gradiente exploratório de 5-100% de MeOH foi empregado na obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos.

As substâncias fenólicas foram identificadas através dos tempos de retenção e espectros de UV obtidos pela análise em CLAE-DAD, pela comparação com o tempo de retenção de padrões autênticos.

A presença de substâncias como flavonóides, catequinas, taninos e derivados de ácido gálico pode ser detectada com o auxílio do detector DAD realizando varredura na faixa espectral de 200-600 nm. Os flavonóides, fenólicos majoritários das frações analisadas, apresentam tipicamente duas bandas no espectro de UV, referentes aos anéis cinamoíla e benzoíla. O ácido gálico e seus derivados apresentam uma única banda intensa em 270 nm. As catequinas exibem no espectro de UV uma banda fraca em torno de 280 nm, um ombro próximo de 220 nm e máximo entre 205-210 nm.

Desta forma, após a obtenção dos cromatogramas das folhas das espécies em estudo foi realizada uma varredura em todos esses comprimentos de onda a fim de verificar a presença desta classe de metabólitos e, posteriormente caracterizá-los através dos experimentos de LC-MS.

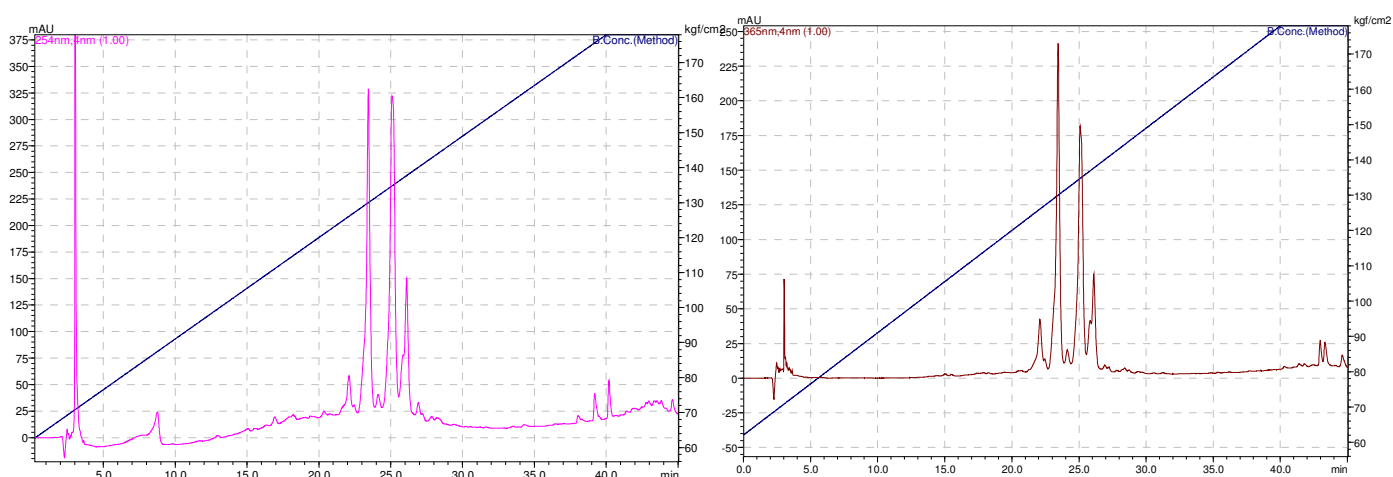


Figura 109. Cromatogramas obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min, detecção a 254 e 365nm) do extrato das folhas de *I. marginata*.

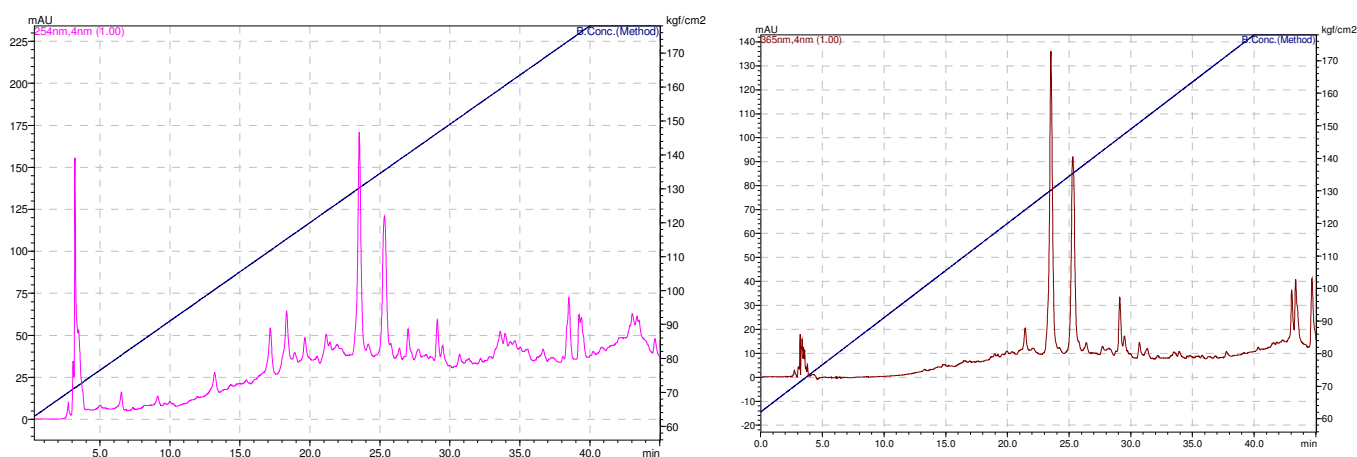


Figura 110. Cromatogramas obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) das folhas de *I. edulis*.

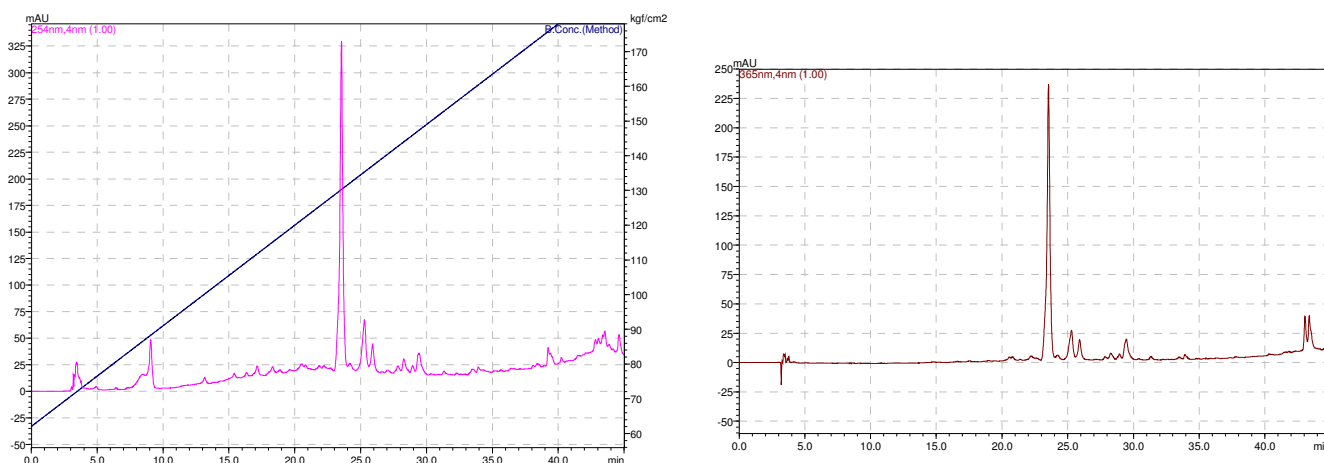


Figura 111. Cromatogramas obtido via CLAE-DAD ((C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) das folhas de *I. laurina*.

A mistura dos padrões, de concentração igual, foi injetada nas mesmas condições cromatográficas.

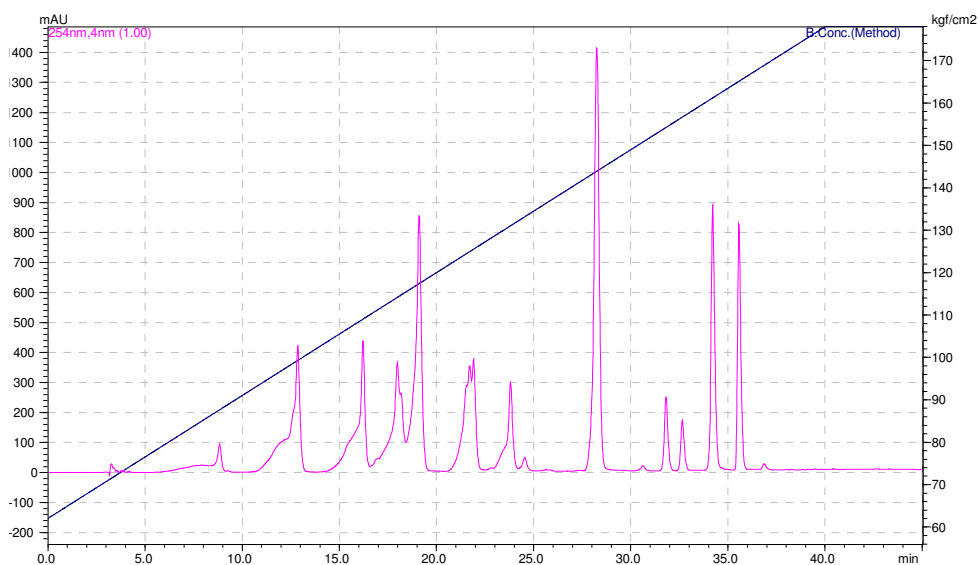


Figura 112. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (254) da mistura dos padrões.

A escolha dos padrões foi baseada na quimiosistemática do gênero *Inga*.
Tabela 7. Padrões e seus respectivos tempos de retenção utilizados na análise por CLAE-DAD.

Tabela 13. Padrões e seus respectivos tempos de retenção utilizados na análise por CLAE-DAD.

Substância padrão	Tempo de retenção (min)
Quercetina	28,42
Quercetrina	16,00
Rutina	24,12
6-hidroxi flavanona	32,09
Ácido cinâmico	28,51
Ácido sinápico	22,01
Ácido cafeico	18,50
Ácido vanílico	18,34
Ácido p-cumárico	21,84
Ácido chiquímico	24,18
Ácido clorogênico	16,55
Ácido 2,4 - hidroxicinâmico	19,40
Chalcona	35,76
Triptofano	12,52
Ácido gálico	9,06
Ácido protocateuico	14,50
Galato de metila	18,80
Ácido benzóico	24,87
Ácido 2,5-diidroxibenzóico	17,06
Ácido 2,4-diidroxibenzóico	19,37
Ácido 3,4-diidroxibenzóico	13,07
Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico	22,24

Através deste experimento foi possível verificar apenas a presença dos metabólitos ácido gálico e galato de metila em *Inga marginata*, do ácido gálico, do galato de metila, do ácido protocateuico e da quercetrina na espécie *Inga edulis* e do ácido gálico, galato de metila, ácido *p*-cumárico e ácido cinâmico na espécie *Inga laurina*. A presença dos outros metabólitos pode não ter sido verificada devido sua concentração na amostra das folhas em virtude do sistema empregado na extração das substâncias (mistura de MeOH e água) ou pode não ter sido produzida pela espécie ou ainda estar presente em quantidade não detectável pelo sistema

empregado. Por isso, análises por LC-MS foram necessárias a fim de comprovar a existência desses metabólitos na amostra analisada.

4.6.2 Análise por HPLC-MS

4.6.2.1 Análise das folhas de *I. marginata*

O pico em $t_r = 7,6$ min apresentou um íon precursor de m/z 95 $[M+H]^+$, 217 $[M+Na]^+$. Este dado em conjunto com os dados de seu espectro de UV e tempo de retenção permitiram a identificação do ácido ferúlico (MW = 194), identificado previamente nas sementes de *I. edulis*.

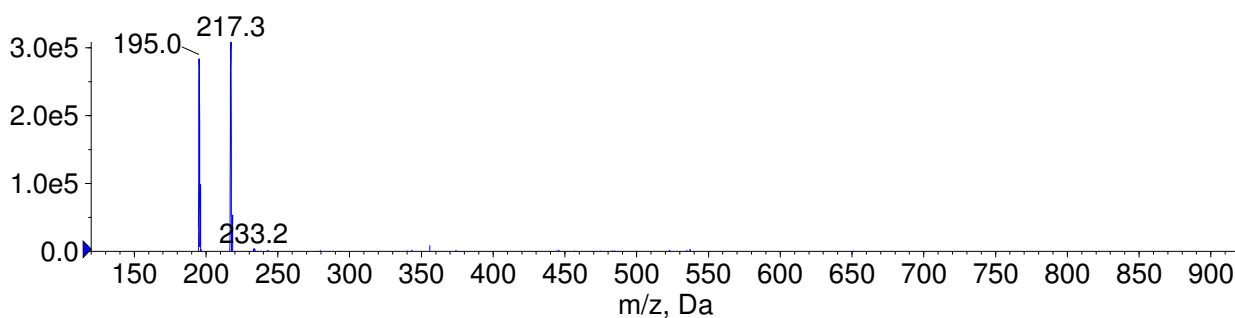
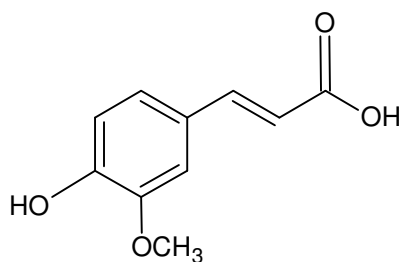


Figura 113. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 7,6$ min obtido em modo positivo da análise por LC-MS das folhas de *I. marginata*.



O pico em $t_r = 14,25$ min apresentou um íon precursor de 463 $[M-H]^-$. O tempo de retenção da substância associada a esse pico e o espectro de UV obtido por CLAE-UV-DAD são compatíveis com a substância miricetina-3-*O*- α -raminopiranosídeo (miricetrina), previamente caracterizada na espécie *I. laurina*.

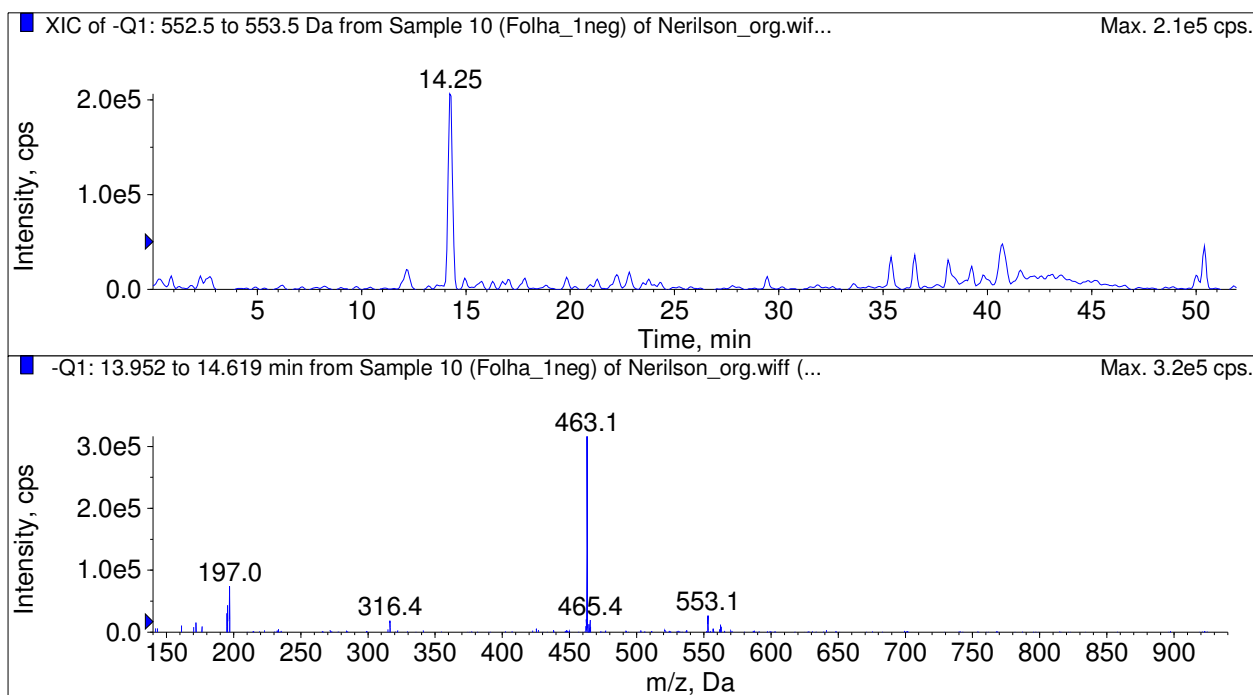
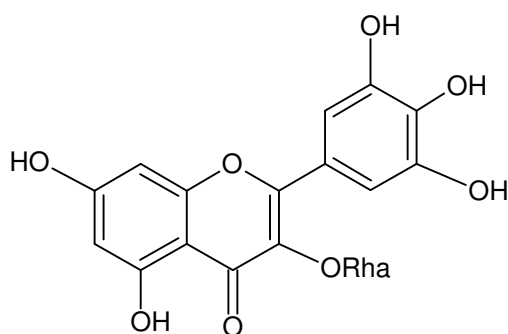


Figura 114. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 14,25$ min obtido em modo negativo da análise por LC-MS das folhas de *I. marginata*.



4.6.2.2 Análise das folhas de *I. edulis*

O pico no tempo de retenção 14,44 min apresentou um íon precursor de 449 [M+H]. O tempo de retenção da substância associada a esse pico e o espectro de UV obtido por CLAE-UV-DAD com padrão autêntico são compatíveis com a substância quercetrina (quercetina-3-*O*- α -raminopiranosídeo)

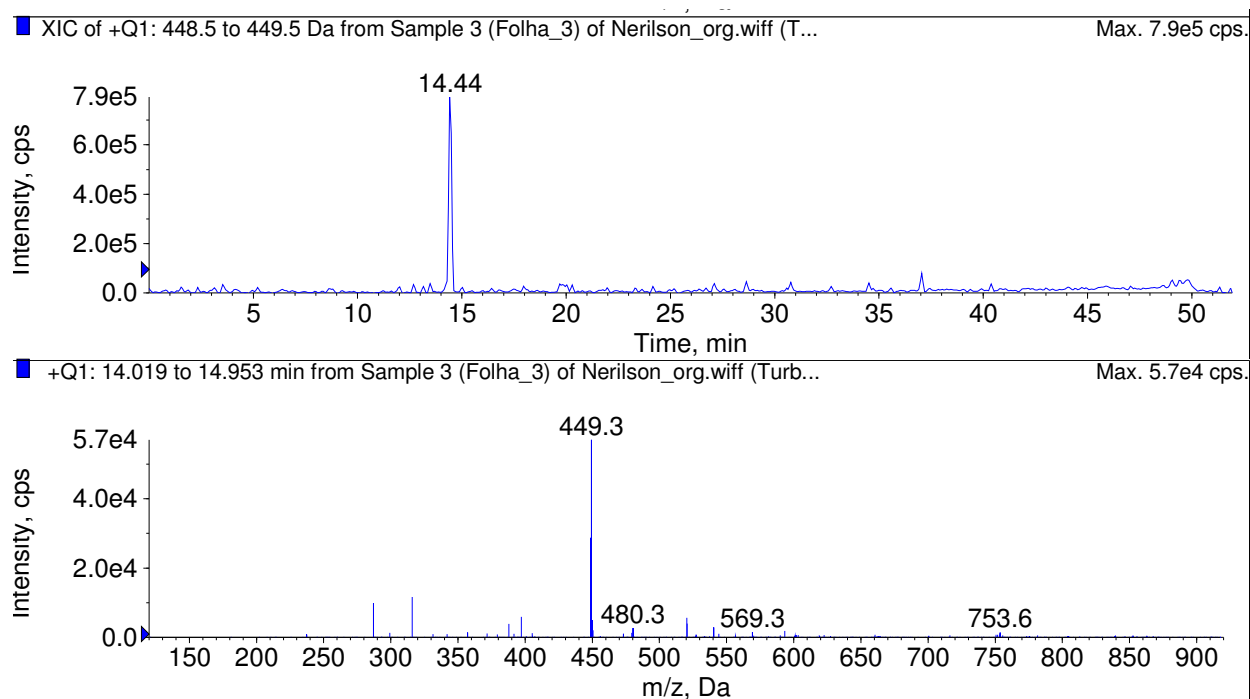
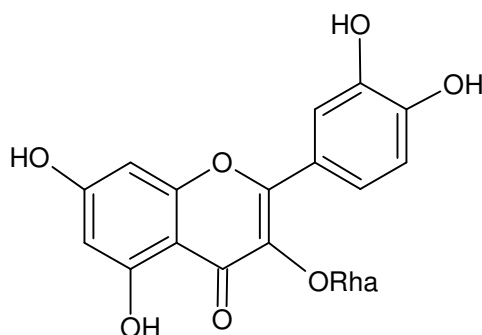


Figura 115. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 14,25$ min obtido em modo negativo da análise por LC-MS das folhas de *I. edulis*.



4.6.3 Análise das folhas de *I. laurina*

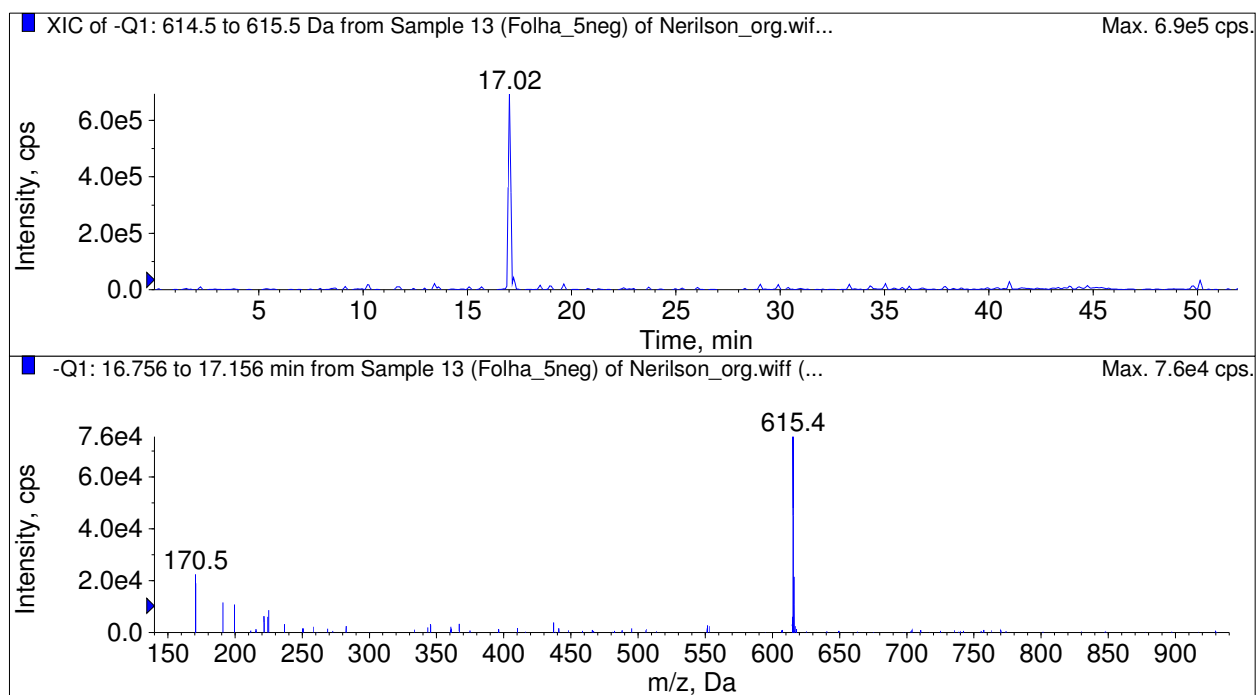
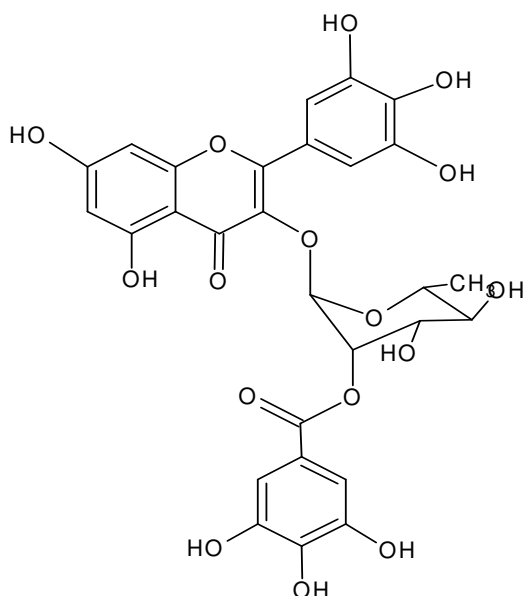
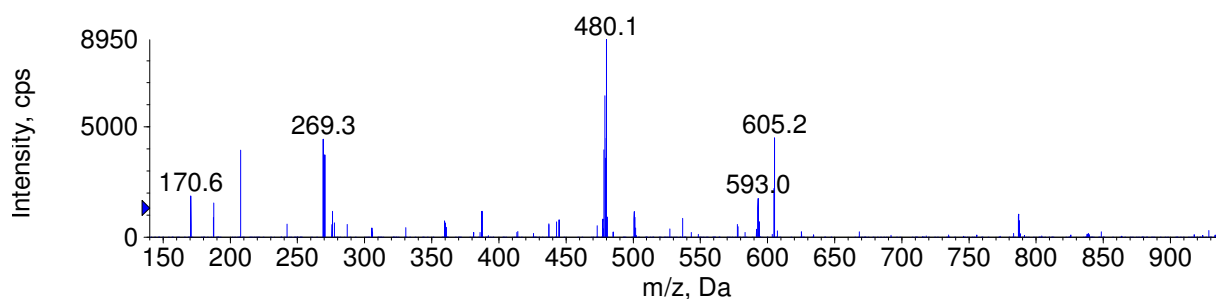


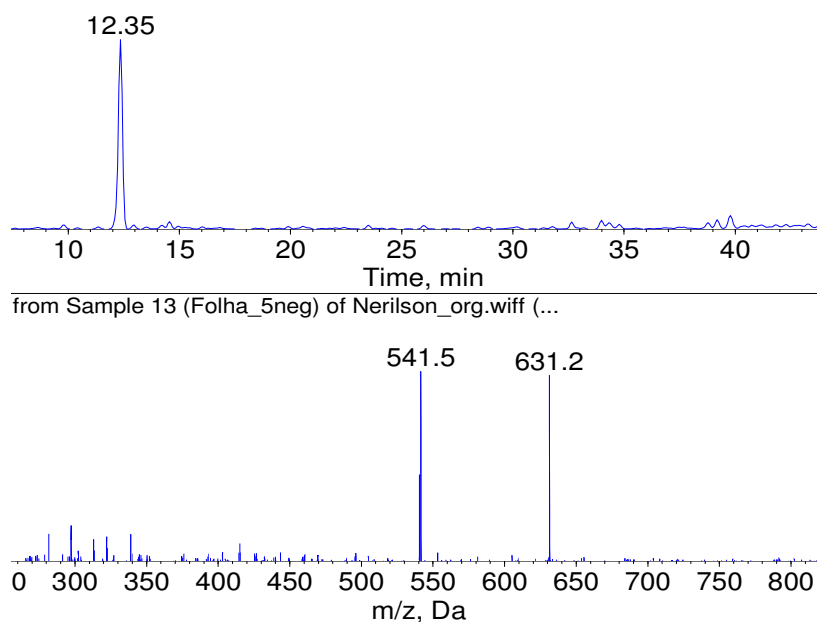
Figura 116. Espectro de massas associado ao pico em $t_r = 17,0$ min obtido em modo negativo da análise por LC-MS das folhas de *I. laurina*.



Apigenina (MW = 270,24) em mistura com outros flavonoides.



O pico no tempo de retenção 12,35 min apresentou os íons precursores de 631,2 [M-H] e 541,5 [M-H]. O tempo de retenção da substância associada a esse pico e o espectro de UV obtido por CLAE-UV-DAD sugeriram a miricetina-*O*-(*O*-galoil)-hexose em mistura com outro fenólico.



4.6.4 Análise por CCD e GC-MS das frações de baixa polaridade

A análise por CCD das frações menos polares indicou a presença de terpenoides, por isso, foram submetidas à análise qualitativa por Cromatografia em Fase Gasosa, CG-FID (Varían model CP-3800 gas chromatograph) usando padrões autênticos dos triterpenos α -amirina, β -amirina, lupeol, fridelanol, fridelina, taraxerol e ácido oleanólico. Os estudos de desreplicação de triterpenos em desenvolvimento com as três espécies de *Inga* são de extrema importância, a fim de possibilitar a comparação da presença destes metabólitos nas diferentes partes do vegetal e contribuir para estudos sobre o seu papel no metabolismo secundário do vegetal.

O extrato etanólico das folhas e das raques foliares das três espécies foram previamente analisadas por CCD, a fim de se obter um perfil químico preliminar da composição e da semelhança entre as espécies e entre as partes do vegetal. Esta análise indicou a presença de compostos fluorescentes ($R_f = 0,77$; Hex/AcOEt 8:2), possivelmente em maior concentração nas espécies *I. edulis* e *I. laurina*. Os compostos derivados graxos poliinsaturados ($R_f = 0,95$) extraídos dos extratos das folhas não foi encontrado nas raques, sugerindo que a função destes metabólitos no vegetal possa estar relacionada com a proteção dos folíolos.

Embora o perfil químico das espécies seja semelhante, alguns compostos foram detectados em apenas uma das espécies. Além deste fato, há uma grande variação na concentração dos compostos entre as espécies, abrindo perspectivas para estudos sobre parâmetros edáficos ou outros que interfiram com a produção e/ou armazenamento destes metabólitos.

4.7 Ensaio de Citotoxicidade e genotoxicidade frente às espécies de *Inga*

- **Citotoxicidade em T98G (glioma humano) das espécies de *Inga* e análise química do material bioativo.**

Todos os extratos das partes vegetativas das espécies de *Inga* foram submetidos à análise de citotoxicidade frente às células T98G (glioma humano), utilizando doxorubicina como controle positivo.

Tabela 14. Valores de Dose Efetiva 50 (ED₅₀; µg/mL) obtidos do efeito citotóxico dos extratos das partes vegetativas das três espécies de *Inga* sob as linhagens tumorais de glioma humano (T98G).

	<i>I.laurina</i>	<i>I.edulis</i>	<i>I.marginata</i>
Folhas	>20	>20	>20
Raque foliar	>20	>20	>20
Flores	>20	>20	-
Polpa do fruto	>20	>20	-
Casca do fruto	>20	18,6	-
Semente	14,4	>20	-

Observou-se que, com exceção do extrato das sementes de *I. aurina* e da cascas dos frutos da espécie *I. edulis*, o material vegetal obtido das três espécies de *Inga* não apresentou efeito citotóxico frente a esta linhagem de célula tumoral. As sementes de *I. laurina* também apresentaram potencial antitumoral no ensaio realizado frente às linhagens tumorais de cancro do cólon humano (HT-29) e foram submetidas a procedimentos cromatográficos para caracterização de suas micromoléculas. Do estudo das sementes da espécie *I. laurina* obteve-se uma mistura de duas substâncias aromáticas com pronunciado efeito citotóxico. No

entanto, mais estudos são necessários a fim de esclarecer quais são as substâncias responsáveis por este efeito.

O extrato das cascas dos frutos (900 mg) de *Inga edulis* foi submetido a uma partição líquido-líquido, fornecendo duas fases de polaridades distintas: hexano (270 mg) e MeOH (470 mg). As fases de partição obtidas foram avaliadas no mesmo bioensaio, e apenas a fase MeOH ($ED_{50} = 12,0 \mu\text{g/mL}$) apresentou potencial citotóxico. Desta forma, pode-se inferir que as substâncias responsáveis pelo potencial antitumoral possuem polaridade mais elevada. A fim de se obter um perfil químico de ambas as frações e conhecer melhor a composição química do material mais ativo, estas fases foram analisadas por CLAE-DAD nas mesmas condições empregadas anteriormente.

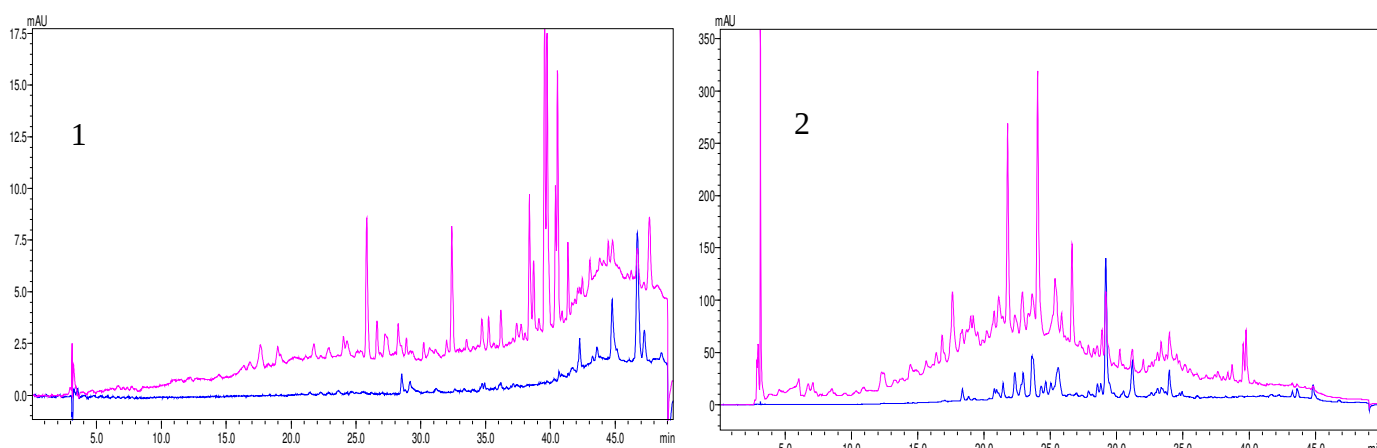


Figura 117. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (254 e 365 nm, C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min, das fases Hexânica (1) e metanólica (2) obtidas da partição líquido-líquido das cascas dos frutos de *I. edulis*.

A análise do cromatograma da fase mais ativa (MeOH) mostrou elevado teor de substâncias fenólicas, com destaque para os flavonoides e ácidos orgânicos. Uma análise mais detalhada dos tempos de retenção e dos espectros de UV dos picos mais resolvidos em comparação com as substâncias isoladas previamente das outras espécies nos permitiu verificar a presença apenas do ácido benzóico ($t_r = 24,6 \text{ min}$) e do ácido vanílico ($t_r = 17,6 \text{ min}$).

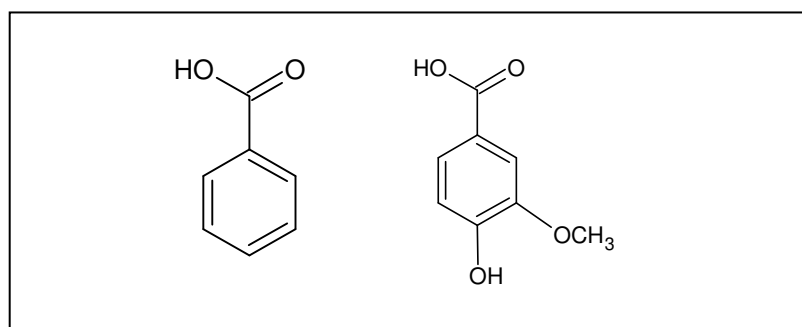


Figura 118. Ácidos orgânicos identificados na fase metanólica obtida da partição líquido-líquido das cascas dos frutos de *I. edulis*.

É importante ressaltar que na busca de novos agentes anticancer, as substâncias fenólicas tem sido apontadas como potenciais candidatos terapêuticos. Compostos que possuem esqueleto catecol em sua estrutura (naturais ou sintéticos), tem fornecido uma perspectiva estimulante no tratamento de gliomas^{93, 94}.

Esta fase de partição mostrou-se rica em açúcares livres e, devido a quantidade de massa e complexidade da mistura, optou-se por não realizar a purificação de seus constituintes.

• Ensaio de genotoxicidade

Os experimentos de genotoxicidade pelo ensaio do cometa, que mede quebras de fita simples e dupla no DNA, demonstraram que os extratos brutos foliares avaliados não causam danos genotóxicos. Estes resultados são encorajadores, tendo em vista, que os danos ao DNA podem ser nocivos para os seres humanos e pode estar relacionado ao desenvolvimento da maioria dos tumores malignos, desordens degenerativas, anomalias genéticas, entre outros.

4.8 Perfil químico dos extratos das folhas, frutos e raque foliada das espécies de *Inga*

Perfil químico das partes do fruto

As análises do perfil químico dos extratos da polpa e da casca dos frutos da espécie *Inga laurina* indicam composição química muito semelhante entre ambos. As sementes, no entanto, apresentaram composição química diferenciada, visto que neste órgão vegetal é esperado encontrar substâncias classificadas como

componentes estruturais, materiais de reserva armazenados e produtos secundários, além de se observar teores mais elevados de proteínas e lipídios.

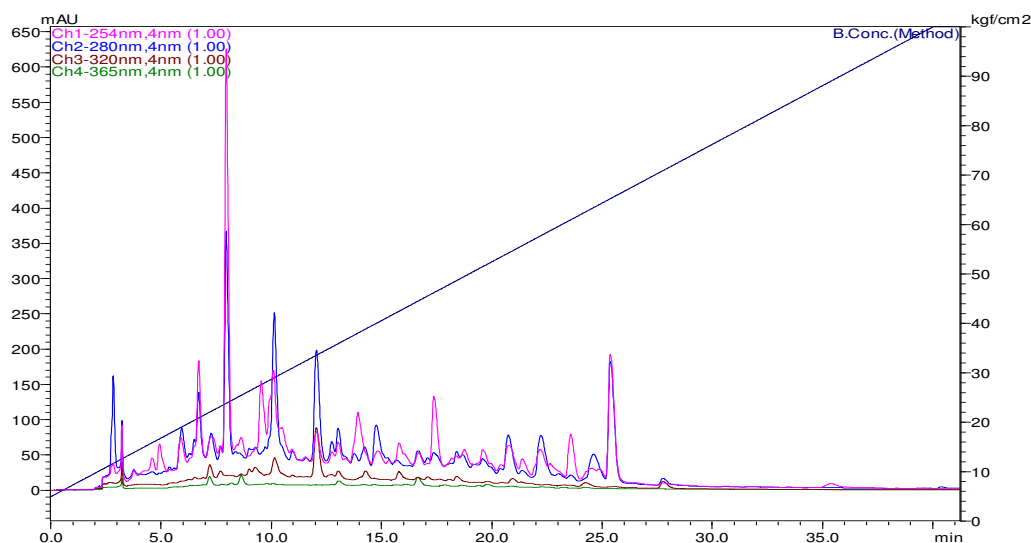


Figura 119. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) da fração metanólica obtida do fracionamento em XAD 4 da polpa dos frutos de *I. laurina*.

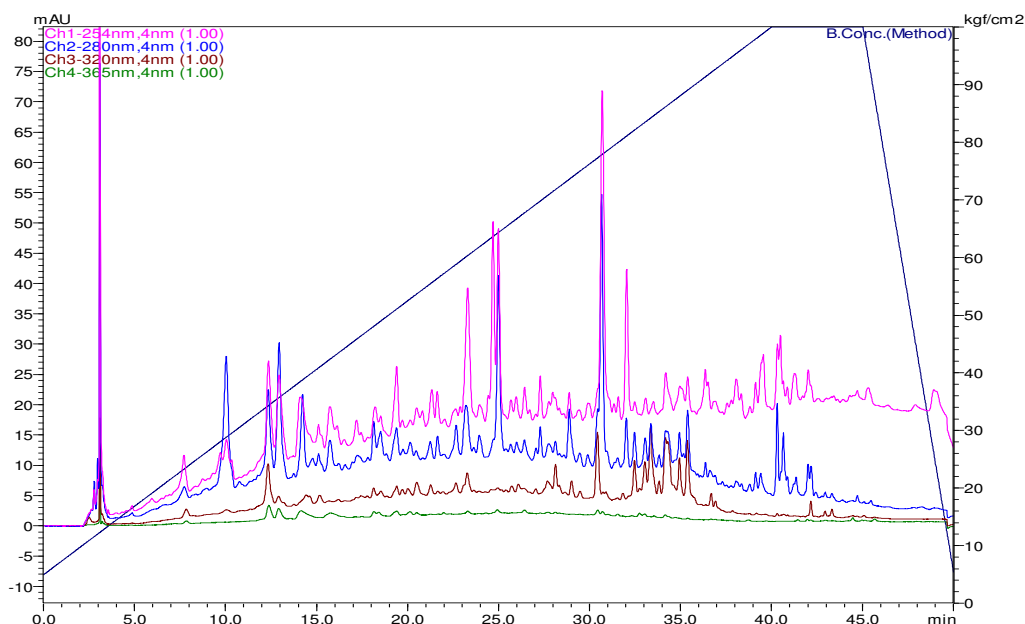


Figura 120.Figura 111. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) em XAD 4 das sementes de *I. laurina*.

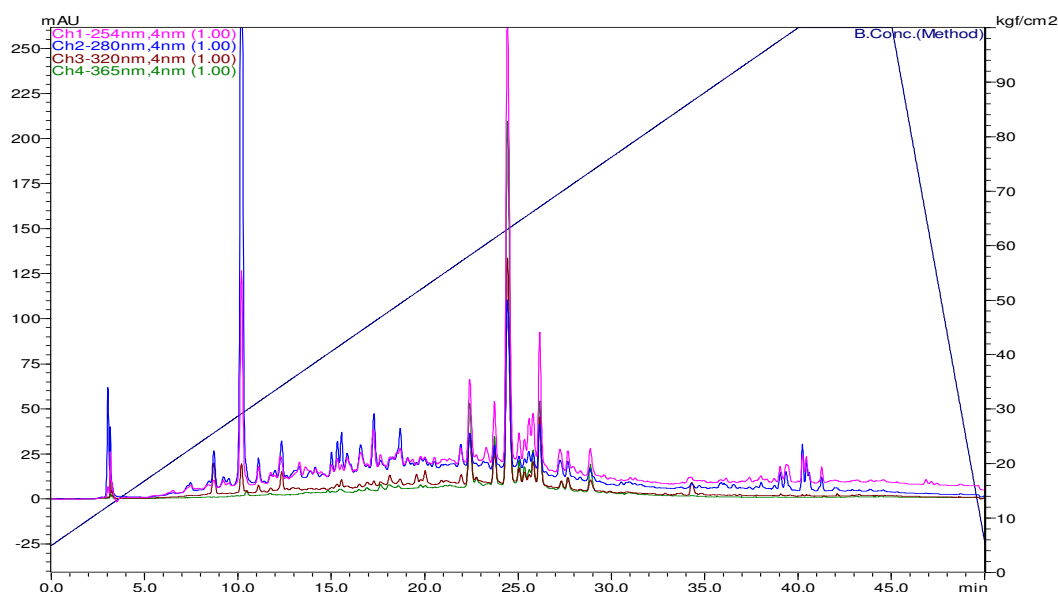


Figura 121. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) da fração metanólica obtida do fracionamento em XAD 4 das cascas dos frutos de *I. laurina*.

Comparação da composição química das fases Hexânicas dos extratos das folhas das espécies de *Inga*

A análise por CLAE-DAD possibilitou a avaliação dos perfis químicos dos extratos hexânicos das três espécies de *Inga*, após a etapa de *clean up* com cartuchos de C18. Verificou-se que as espécies possuem perfis químicos semelhantes e que os principais picos nos cromatogramas indicam a presença de flavonóides.

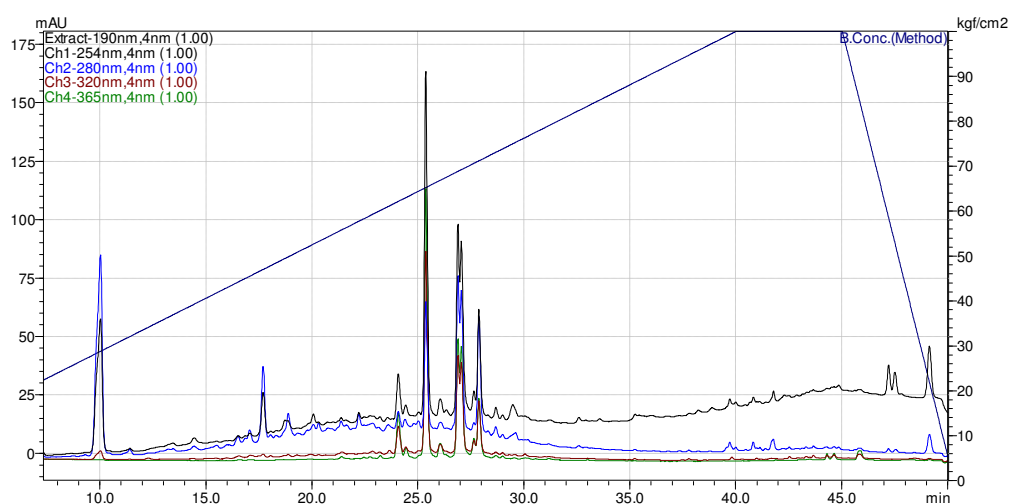


Figura 122. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) da fração hexânica das folhas de *Inga edulis*.

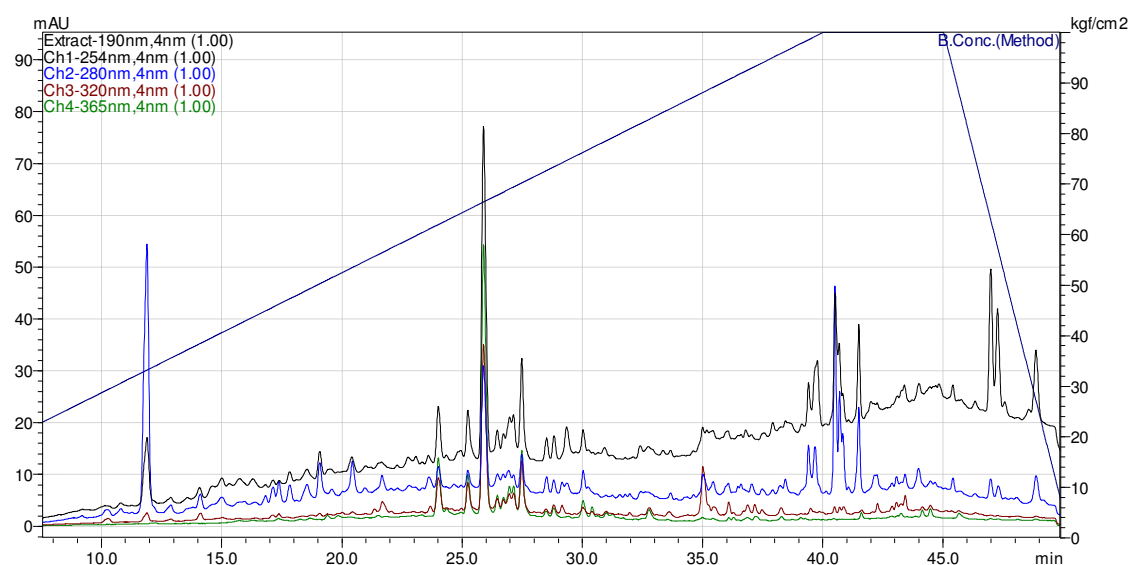


Figura 123. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) da fração hexânica das folhas de *Inga marginata*.

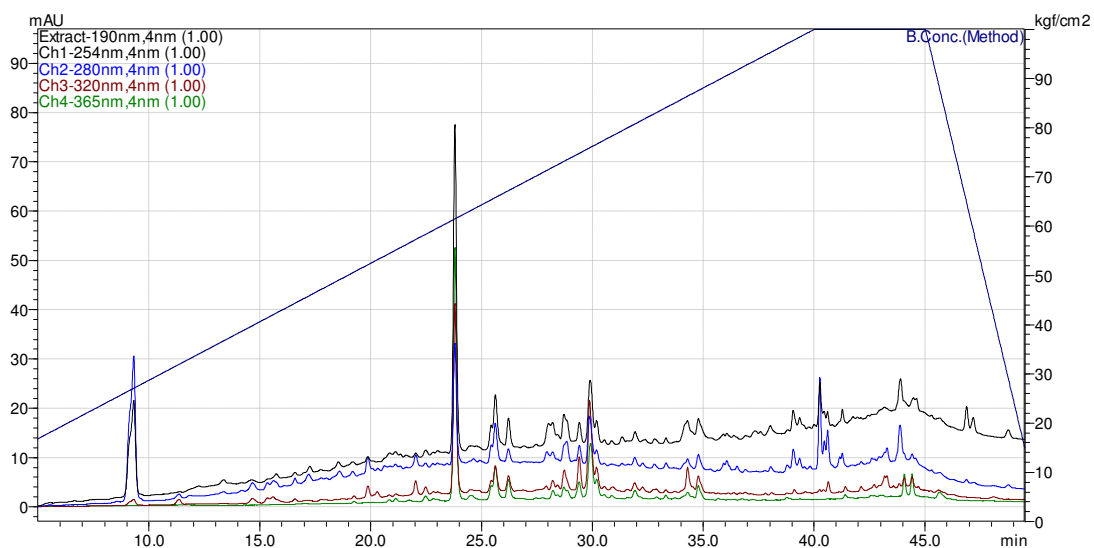


Figura 124. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) da fração hexânica das folhas de *Inga laurina*.

Estudo comparativo por CLAE-DAD da composição química dos extratos das folhas e das raques foliares das espécies de *Inga*

***Inga edulis* – FOLHA**



Figura 125. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das folhas de *Inga edulis*.

***Inga edulis*– RAQUE FOLIAR**

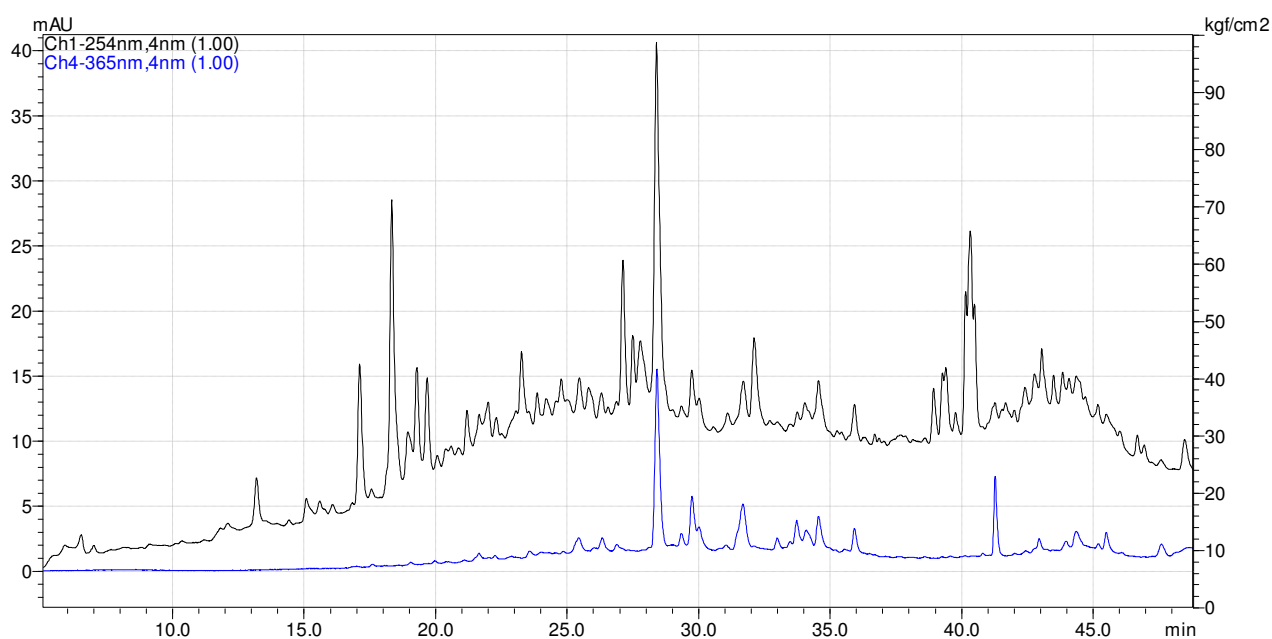


Figura 126. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das raque foliar de *Inga edulis*.

Inga marginata – FOLHA

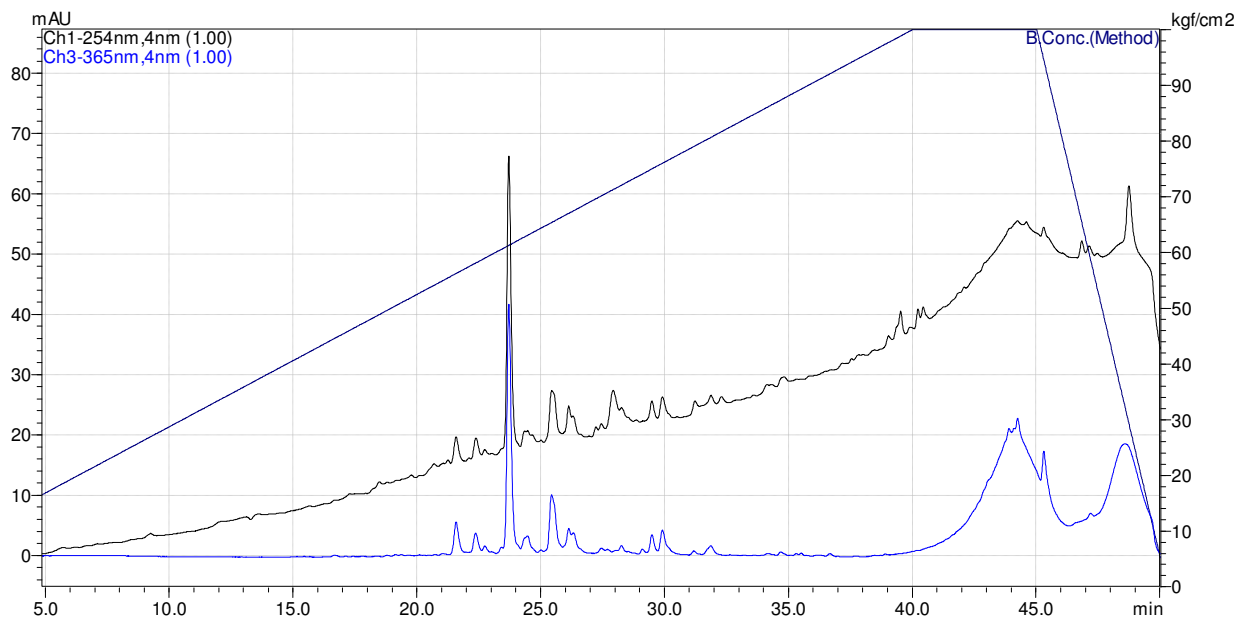


Figura 127. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das folhas de *I. marginata*.

Inga marginata – RAQUE FOLIAR

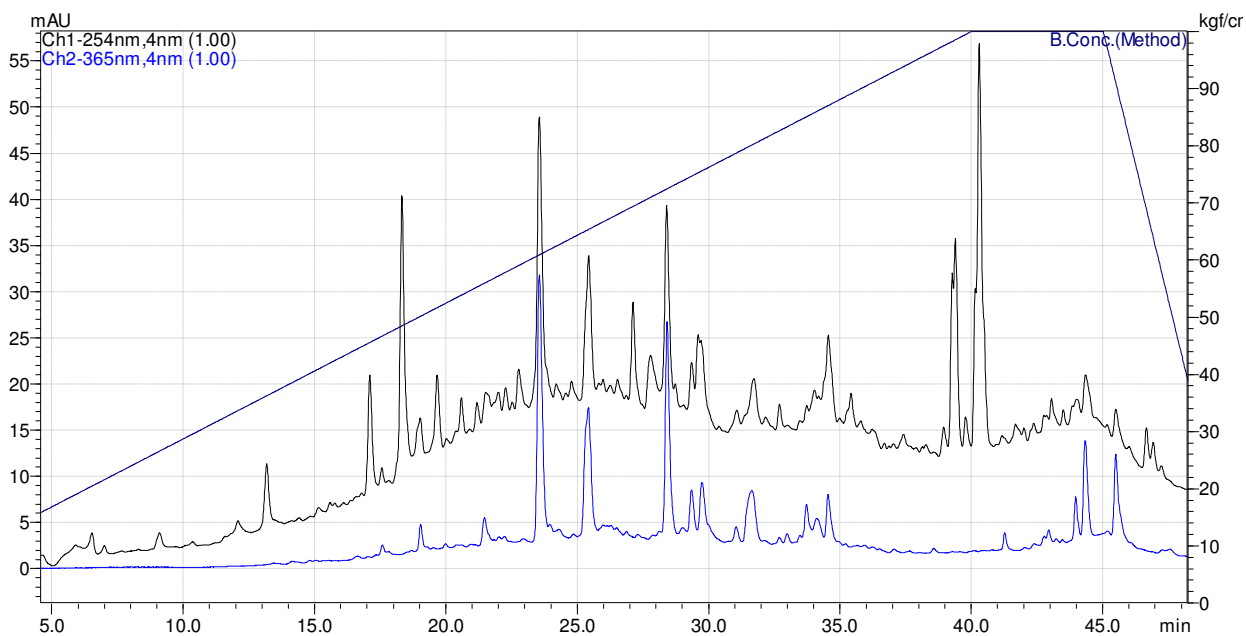


Figura 128. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH da raque foliar de *I. marginata*.

Inga laurina– FOLHA

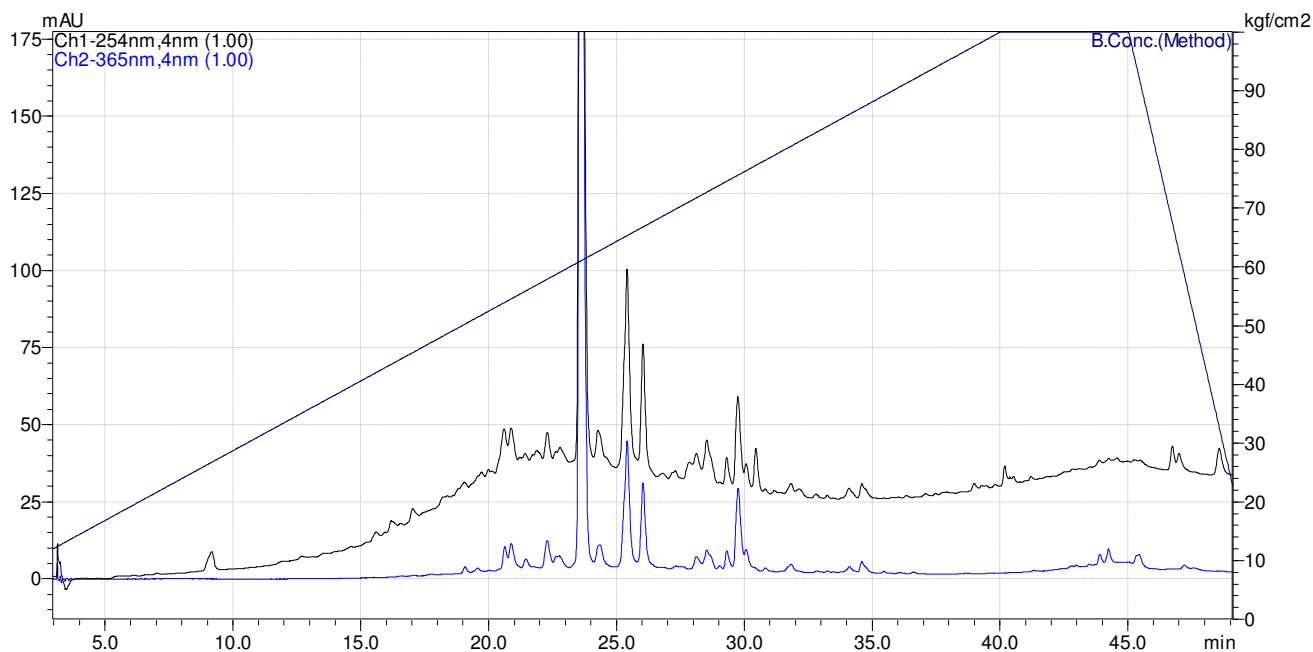


Figura 129. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH das folhas de *I. laurina*.

Inga laurina – RAQUE FOLIAR

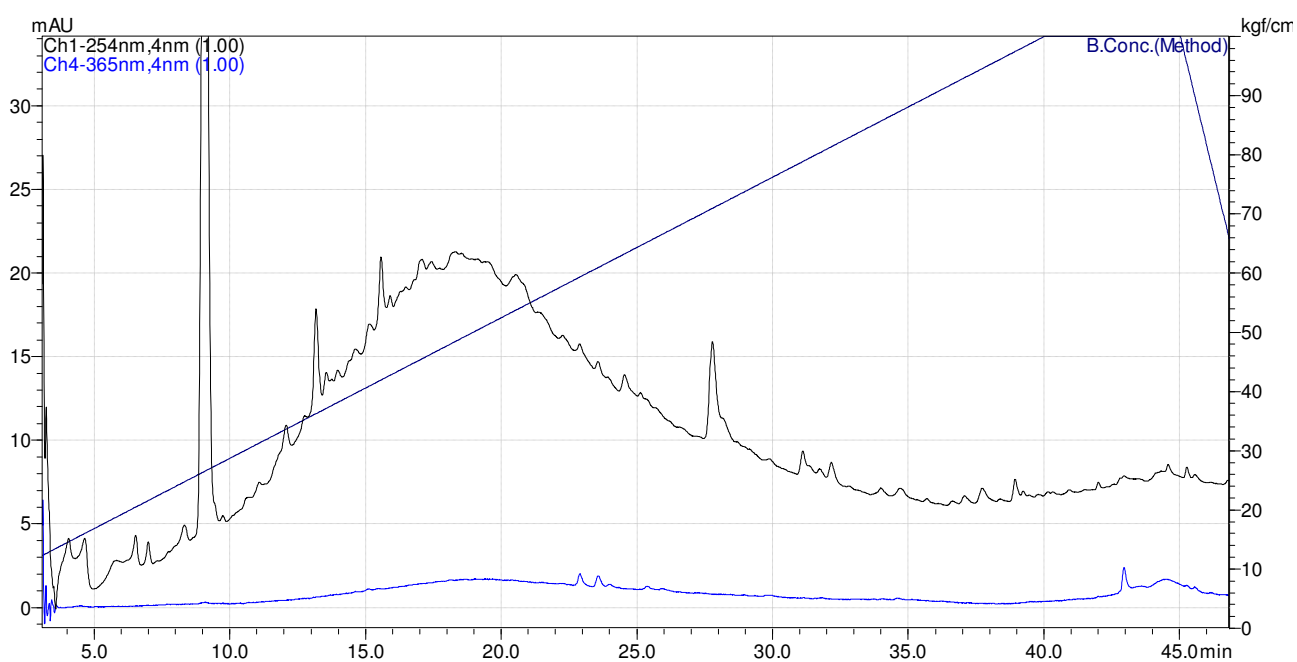


Figura 130. Cromatograma obtido via CLAE-DAD (C18, gradiente MeOH/H₂O, fluxo 1 ml/min) do extrato EtOH da raque foliar de *I. laurina*.

Uma análise prévia dos cromatogramas dos extratos brutos indicou que o ácido gálico e galato de metila foram identificados como constituintes majoritários das fases hidrometanólica e butanólica, as quais são também ricas em taninos condensados, o que dificultou as análises por CLAE. As frações obtidas do fracionamento da fase metanólica do extrato da raque foliar da espécie *Ingalaaurina* apresentou picos alargados muito acima da linha de base, indicando possivelmente a presença de taninos condensados. Os taninos são substâncias fenólicas de grande interesse econômico e ecológico. Estudos revelam que forragens taniníferas possuem atividade antihelmíntica, podendo contribuir no controle de parasitas na pecuária⁸⁰. Outra importante propriedade dos taninos é sua atividade antioxidante, que está relacionada à sua capacidade de quelação de metais de transição, de radicais livres, inibição enzimática e ainda a ativação de proteínas de defesa/destoxificadoras⁸¹.

A substância galato de 2-ramnopiranosil-4,6-diidroxifenila ($t_r = 23,6$ min) foi observada nas folhas das três espécies e na raque foliar da espécie *Inga marginata*. Mais estudos são necessários a fim de elucidar o seu papel no vegetal.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados com as espécies de *Inga* (*I. edulis*, *I. laurina* e *I. marginata*) permitiram o isolamento e caracterização de substâncias fenólicas e terpenoides já descritos na família Fabaceae e obtenção de frações enriquecidas com outros metabólitos interessantes. As análises cromatográficas permitiram também a seleção de amostras a serem avaliadas por seu potencial antitumoral para identificação das substâncias bioativas.

Os dados de CLAE-DAD analisados em conjunto com os dados de HPLC-MS, e comparados com tempos de retenção e absorção no UV de substâncias padrões, possibilitaram a caracterização dos perfis flavonoídicos das três espécies em estudo, evidenciando a presença de flavonóides na forma aglicona e heterosídeos, catequina, ácido gálico e outros ácidos fenólicos.

Os estudos realizados através de CLAE-DAD e RMN de ^1H com os tegumentos das sementes de *Inga edulis* forneceram valiosas informações a cerca da natureza química das antocianinas extraídas nas frações polares. Através dos dados de UV obtidos desta análise foi possível inferir a presença de antocianinas altamente glicosiladas na fração aquosa e antocianinas com unidades de derivados de ácidos cinâmico na fração metanólica, porém em baixa concentração em relação aos demais metabólitos. A detecção e caracterização parcial desta classe de metabólitos no gênero *Inga* é de grande relevância quimiosistemática, uma vez que poucos metabólitos pertencentes a esta classe de produtos naturais tem sido reportados na família Fabaceae.

A avaliação da bioatividade dos extratos brutos das folhas, raque foliar e das partes dos frutos (polpa, casca e semente) das espécies de *Inga*, bem como de suas fases de partição orientou a seleção das frações bioativas para investigação fitoquímica detalhada na busca por substâncias antitumorais, gerando frações com expressivo potencial citotóxico frente às linhagens de células avaliadas, encorajando estudos futuros para o isolamento dos componentes ativos.

O perfil químico das partes vegetativas das espécies obtido por CLAE-DAD indicou composição química semelhante. No entanto, alguns compostos ocorrem em apenas uma das espécies. Além deste fato, há uma grande variação na concentração dos compostos entre as espécies.

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa com essas três espécies mostraram resultados promissores para as fases de partição obtidas das espécies *I. edulis* e *I. laurina* no ensaio de avaliação do potencial inibidor para formigas cortadeiras, o que sugere a presença de substâncias com atividade inseticida em suas frações. Assim como também mostrou potencial antimalárico para espécie *Inga edulis* e atividade inibitória de AChE no ensaio de bioautografia em CCD para *A. marginata*. O estudo químico detalhado destas espécies realizado neste trabalho torna-se de crucial importância para o entendimento do potencial biológico apresentado nestes bioensaios.

Os experimentos de genotoxicidade pelo ensaio do cometa, que mede quebras de fita simples e dupla no DNA, demonstraram que os extratos brutos foliares avaliados não causam danos genotóxicos.

De modo geral, os resultados obtidos neste trabalho corroboram a importância de estudos de bioprospecção envolvendo técnicas analíticas contribuindo para a exploração racional da biodiversidade com vistas à detecção de protótipos bioativos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- 1 LANÇAS, F. M. Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação: uma visão pessoal. **Scientia Chromatographica**, p. 17-44, 2008.
- 2 BRUSOTTI, G. et al. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218-228, 2014.
- 3 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: WERMUTH, C. G. (Ed.). **The practice of medicinal chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2008. Chap. 8, p. 159-186.
- 4 VIEGAS JÚNIOR, C. et al. Modificações estruturais na (-)-Cassina e LASSBio-767: estratégias para a descoberta e otimização de novos candidatos a fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 117-127, 2009.
- 5 TURNER, D. M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the glaxo experience. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 39-44, 1996.
- 6 YULIANA, N. D. et al. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, p. 293-304, 2013.
- 7 CALIXTO, J. B. et al. Biological activity of plants extractes: novel analgesic durgs. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v.6, n. 2, p. 261-279, 2001.
- 8 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.
- 9 PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1/2, p. 57-60, 2005.
- 10 WOLFENDER, J. L. et al. MS-based plant metabolomic approaches for biomarker discovery. **Natural Product Communication**, v. 4, n. 10, p. 1417-1430, 2009.
- 11 WILSON, I. D.; BRINKMAN, U. A. T. Hyphenation and hypernation: the practice and prospects of multiple hyphenation. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 325-356, 2003.
- 12 ESPADA, A. et al. Application of LC/MS and related teqniques to high-throuhput drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9, 2008.
- 13 PATEL, K. N. et al. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. **Pharmaceutical Methods**, v. 1, n. 1, p. 2-13, 2010.

- 14 NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication for standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p.111-136, 2003.
- 15 LIANG, Z. et al. Comparative analysis of *Oldenlandia diffusa* and its substitutes by high performance liquid chromatographic fingerprint and mass spectrometric analysis. **Planta Medica**, v. 73, p. 1502-1508, 2007.
- 16 CHANG, W.-T. et al. Traditional processing strongly affects metabolite composition by hydrolysis in *Rehmannia glutinosa* roots. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, p. 546-552, 2011.
- 17 Van der KOOY, F. et al. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. **Planta Medica**, v. 75, p. 763-775, 2009.
- 18 WANG, M. et al. Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional chinese medicine and molecular pharmacology. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 173-182, 2005.
- 19 QIN, X. et al. Metabolic fingerprinting by ^1H NMR for discrimination of the two species used as *Radix bupleuri*. **Planta Medica**, v. 78, n. 9, p. 926-933, 2012.
- 20 KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? **Trends Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 267-275, 2011.
- 21 ALALI, F. Q.; TAWAHA, K. Dereplication of bioactive constituents of the genus *Hypericum* using LC-(+,-)-ESI-MS and LC-PDA techniques: *Hypericum triquetrifolium* as a case study. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 17, p. 269-274, 2009.
- 22 SASIDHARAN, S. et al. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.
- 23 QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K. Modern approaches in the search for new lead antiparasitic compounds from higher plants. **Current Drug Targets**, v. 10, p. 202-211, 2009.
- 24 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é o câncer?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322>. Acesso em: 20 de jun. 2015.
- 25 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativas de câncer.** Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias>>. Acesso em: 20 de jun. 2015.
- 26 QUANT, E. C.; WEN, P. Y. Novel medical therapeutics in glioblastomas, including targeted molecular therapies, current and future clinical trials. **Neuroimaging Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 425-448, 2010.

- 27 PREUSSER, M. et al. Current concepts and management of glioblastoma. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 1, p. 9-21, 2011.
- 28 CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 703-723, 2014.
- 29 YUENYONGSAWAD, S. et al. Anti-cancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 765-769, 2013.
- 30 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 Plantarum, 2005. 640 p.
- 31 HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEIJER, R. J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 3-16, 1993.
- 32 RAVISHANKAR, D. et al. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, p. 2821-2831, 2013.
- 33 HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.
- 34 HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.
- 35 HERTOOG, M. G. L. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart-disease – the Zutphen elderly study. **The Lancet**, v. 342, n. 8878, p. 1007-1011, 1993.
- 36 AHLENSTIEL, T. et al. Bioflavonoids attenuate renal proximal tubular cell injury cold preservation in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. **Kidney International**, v. 63, p. 554-563, 2003.
- 37 DECKER, E. A. Phenolics: pro-oxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, p. 396-398, 1997.
- 38 HERTOOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2379-2883, 1992.
- 39 LEE, E. S. et al. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 8, p. 1169-1174, 2003.
- 40 ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. The anthocyanins. In: _____. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and application**. Boca Raton: CRC, Taylor & Francis, 2006. Chap. 10, p. 471-523.

- 41 MESKIN, M. S. et al. Absorption and metabolism of anthocyanins: potencial health effects. In: _____. **Phytochemical mechanisms of action**. Flórida: CRC, Taylor & Francis, 2004. Chap. 1, p. 1-16.
- 42 PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocynins: from plantto health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 281-299, 2008.
- 44 MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.
- 45 DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenilpropanoids. In: _____. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. London: Wiley, 1997. Chap. 4, p. 121-164.
- 46 SOUZA, M. S. Adiciones al gênero *Inga* (Ingeae, Mimosoideae, Leguminosae) para la flora mesoamericana. **Acta Botanica Mexicana**, v. 89, p. 25-41, 2009.
- 47 RODRIGUEZ, J. B. **A botanica**: nomenclatura indígena e seringueiras. Rio de Janeiro: [s. n.], 1992.94p.
- 48 ROTH, I. **Stratification of a tropical forest as seen in dispersal types**. Boston: W. Junk, 1987.324p.
- 49 MORTON, T. C. Chemotaxonomic significance of hydroxylatedpipecolic acids in Central American *Inga* (Fabaceae: Mimosoideae: *Ingeae*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, n. 4, p. 379-401, 1998.
- 50 SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technolog**, v. 55, p. 381-387, 2007.
- 51VIVOT, E. et al. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 65-71, 2001.
- 52 SOUSA, C. M. M.et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- 53 CALDERON, L. A. et al. Serine protease inhibitors from Amazon Leguminosae seeds: purification and preliminary characterization of two chymotrypsin inhibitors from *Inga umbratica*. **Protein and Peptide Letters**, v. 8, n. 6, p. 485-493, 2001.
- 54 LOKVAM, J.; KURSAR, T. A. Divergence in structure and activity of phenolic defences in young leaves of two co-occurring *Inga* species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 11, p. 1109-1115, 2005.
- 55 POMPEU, D. R. et al. Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. **Acta Amazônica**, v. 42, n. 1, p. 165-172, 2012.

- 56 KOPTUR, S. Alternative defenses against herbivores in *Inga* (Fabaceae Mimosoideae) over the elevational gradient. **Ecology**, v. 66, n. 5, p. 1639-1650, 1985.
- 57 DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 38-42, 2010.
- 58 CORREA, S. M. V. C.; CONSERVA, L. M.; MAIA, J. G. S. Constituents of roots of *Inga edulis* var. *parviflora*. **Fitoterapia**, v. 66, n. 4, p. 379, 1995.
- 59 LOKVAM, J.; KURSAR, T. A. Divergence in structure and activity of phenolic defences in young leaves of two co-occurring *Inga* species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 11, p. 1109-1115, 2005.
- 60 LOKVAM, J.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Cinnamoyl glucosides of catechin and dimeric procyanidins from young leaves of *Inga umbellifera* (Fabaceae). **Phytochemistry**, v. 65, p. 351-358, 2004.
- 61 MATSUBARA, S. et al. Short- and long-term operation of the lutein-epoxide cycle in light-harvesting antenna complexes. **Plant Physiology**, v. 144, p. 926-941, 2007.
- 62 LOKVAM, J. et al. Galloyl depsides of tyrosine from young leaves of *Inga laurina*. **Journal Natural Products**, v. 70, n. 1, p. 134-136, 2007.
- 63 MILTON, K.; JENNESS, R. Ascorbic acid content of neotropical plant parts available to wild monkeys and bats. **Experientia**, v. 43, p. 339-342, 1987.
- 64 ALVAREZ, J. C. et al. Actividad biológica de las saponinas de la corteza de *Inga marginata* Willd. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 27, p. 17-19, 1998.
- 65 KURSAR, T. A. et al. The evolution of antiherbivore defenses and their contribution to species coexistence in the tropical tree genus *Inga*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 18073-18078, 2009.
- 66 MORTON, T. C. et al. Trans-4-methoxypipelicolic acid, an amino acid from *Inga paterno*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2397-2399, 1991.
- 67 LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1998. 352 p.
- 68 LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 384 p.
- 69 MACEDO, M. L. R. et al. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1104-1111, 2007.

70 LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. 384 p.

71 MARQUI, S. R. **Bioprospecção em espécies de Fabaceae**: agentes quimiopreventivos e substâncias de interesse agroecológico. 2011. 200 p. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

72 HA, D.; NOH, M.; LEE, Y. Bias reduction of likelihood estimators in semiparametric frailty models. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 37, n. 2, p. 307-320, 2010.

73 BORDIGNON JÚNIOR, C. L. et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 183-188, 2009.

74 ZHANG, Y. et al. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 1, p. 83-89, 2004.

75 KHANBABAEE, K.; REE, V. T. Tannins: classification and definition. **Natural Product Report**, v. 18, n. 6, p. 641-649, 2001.

76 AOURAHOUM, K. et al. Essential oil of *Cytisus triflorus* L'Her. **DerPharmacia Lettre**, v. 5, n. 5, p. 276-279, 2013.

77 ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.

78 NATURA COSMÉTICOS S. A.; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. (Brasil). A. J. CAVALHEIRO et al. **Extrato vegetal padronizado, processo para preparação de extrato de plantas do gênero *Sclerolobium*, composição cosmética, composição farmacêutica e uso do referido extrato**. WO2011038472A8, 30 set. 2010, 7 abr. 2011.

79 HERTEL, A. **Anthocyanins and delayed greening: inhibition of leafcutter ants (*Atta cephalotes*) in *Inga punctata* (Mimosaceae) and *Zygia palmana* (Fabaceae)**. Wisconsin: University of Wisconsin-Madison, Department of Biology. Disponível em: <<http://digital.lib.usf.edu/SFS0001460/00001>>. Acesso em: 20 jul. 2015.

80 CASTANEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859-871, 2009.

81 BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, p. 103-109, 1996.

- 82 OLIVEIRA, M. C.; ESPERANÇA, P.; ALMOSTER FERREIRA, M. A. Characterization of anthocyanins by electrospray ionization and collisioninduceddissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, p. 1525-1532, 2001.
- 83 HONG, V.; WORLSTAD, R. E. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. **Journal of Agricultural and FoodChemistry**, v. 38, p. 708-715, 1990.
- 84 SHIPP, J.; ABDEL-AAL, E. M. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. **The Open Food Science Journal**, v. 4, p. 7-22, 2010.
- 85 HARBONE, J. B. Spectral methods of characterizing anthocyanins. **Biochemical Journal**, v. 70, p. 22-28, 1958.
- 86 MACZ-POP, G. A. et al. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 94, p. 448-456, 2006.
- 87 ALCALDE-EON, C. et al. Identification of anthocyanins of pinta boca (*Solanum stentomum*) tubers. **Food Chemistry**, v. 86, p. 441-448, 2004.
- 88 ZHANG, Y. et al. Isolation, identification, andcolor characterization of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-sophoroside from red raspberry. **European Food Research Technology**, v. 226, p. 395-403, 2008.
- 89 GOUVÊA, A. C. M. S. et al. Isolamento das antocianinas do epicarpo de uvas-pretas (*Vitis* spo.) por CLAE-DAD e sua identificação através do sistema CLUE-QTOF-ESI/EM/EM. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 6, n. 1/2, p. 37-45, 2014.
- 90 GIUSTI, M.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p. 4631-4637, 1999.
- 91 MINIATI, E.; DAMIANI, P.; MAZZA, G. Copigmentation and self-association of anthocyanins in food model systems.**Italian Journal Food Science**, v. 4, n. 2, p. 109-116, 1992.
- 92 ACTON, Q. A. Patent issued for xanthophyll composition containing *trans*, *meso*-zeaxanthi, *trans*, *R*, *R*-zeaxanthin and *trans*, *R*, *R*-Lutein useful for nutrition and health care and a process for its preparation. In:_____. **Carotenoids**: advances in research and application. Atlanta: 2013. Chap. 3, p. 79.
- 93 YANG, D. P. et al. How many drugs are catecholics. **Molecules**, v. 12, n. 4, p. 878-884, 2007.

94 ORLIKOVA, B.; DIEDERICH, M. Power from the garden: plant compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2061-2087, 2012.