



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

BRUNA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA ISOLAMENTO E
DETECÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIAIS E OBTENÇÃO DE DERIVADOS
QUÍMICOS DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE ESPÉCIES LEGUMINOSAS
BRASILEIRAS**

Salvador
2024

BRUNA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA ISOLAMENTO E
DETECÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIAIS E OBTENÇÃO DE DERIVADOS
QUÍMICOS DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE ESPÉCIES LEGUMINOSAS
BRASILEIRAS**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa
de Pós-graduação em Química do Instituto de
Química da Universidade Federal da Bahia,
como requisito para obtenção do grau de
Doutora em Química

Orientador: Prof. Dr. Jorge Mauricio David

Salvador
2024




TERMO DE APROVAÇÃO


BRUNA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

"DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIAIS E OBTENÇÃO DE DERIVADOS QUÍMICOS DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS BRASILEIRAS"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor(a) em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **JORGE MAURICIO DAVID**
Data: 14/06/2024 19:43:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jorge Maurício David
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
 **CALINE GOMES FERRAZ**
Data: 14/06/2024 09:38:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Caline Gomes Ferraz
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
 **ELIANE DE OLIVEIRA SILVA**
Data: 14/06/2024 16:31:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Eliane de Oliveira Silva
Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
 **VANDERLUCIA FONSECA DE PAULA**
Data: 13/06/2024 18:27:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula
Doutorado em Ciências, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Documento assinado digitalmente
 **MARIA FATIMA DAS GRACAS FERNANDES DA SILVA**
Data: 14/06/2024 08:17:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal de São Carlos

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

N244 Nascimento, Bruna Oliveira do

Desenvolvimento de metodologias para isolamento e
detecção de metabólitos especiais e obtenção de derivados
químicos de substâncias isoladas de espécies leguminosas
brasileiras/ Bruna Oliveira do Nascimento. – Salvador, 2024.

218 f.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Química, 2024.

1. Leguminosa. 2. Fitoquímicos. 3. *Produtos Naturais*. I.
David, Jorge Maurício. II. Universidade Federal da Bahia. III.
Título.

CDU 547.9

*Dedico este trabalho à minha família,
Em especial minha tia, Ednice, e minha vó, Eunice.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por me conceder muito mais do que eu pude imaginar, por me dar forças e coragem para enfrentar os diversos desafios e discernimento nas minhas escolhas.

À minha família, em especial minha vó, Eunice, e minha tia, Ednice, pelo apoio incondicional e orações, e a minha irmã, Geisiane, por sempre se fazer presente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Mauricio David, por todo apoio, paciência, correções, compreensão, pela confiança e principalmente na imensa contribuição na minha formação.

A todos professores pelo apoio e colaboração não somente neste trabalho, mas também pelas contribuições para minha formação.

Agradeço imensamente àqueles que fizeram e fazem minha trajetória mais leve, todos tiveram uma grande importância na minha formação e também nas minhas conquistas.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq pelo apoio aos projetos.

Na falta de algo melhor, nunca me faltou coragem
Humberto Gessinger

Resumo

A família Leguminosae é composta por aproximadamente 19500 espécies distribuídas em 770 gêneros com grande ocorrência no território brasileiro em especial no bioma Caatinga. Apesar da família apresentar número expressivo de espécies brasileiras, ainda existem poucos estudos sobre a composição química das mesmas. Espécies dos gêneros *Cenostigma*, *Canavalia* e *Clitoria* são comumente encontradas no território brasileiro, algumas delas além de serem endêmicas, são exclusivas de ambientes territorialmente restritos e pouco explorados tal como o Semi-árido brasileiro. Esse trabalho teve como objetivo explorar a biodiversidade brasileira do ponto de vista químico a partir de estudos de *Clitoria fairchildiana*, *Cenostigma pyramidale*, *Canavalia brasiliensis* e *Cenostigma microphylla* por meio de estudos fitoquímicos, análise do perfil químico, determinação estrutural dos metabólitos isolados e de modificação estrutural de alguns compostos bioativos. A partir das raízes de *C. fairchildiana* foram isolados, por meio de técnicas cromatográficas, nove compostos, dentre eles um novo derivado de ácido benzoico e o par de epímeros do 6-desoxiclitoriactal, um deles ainda não relatado na literatura. Paralelamente, a estereoquímica absoluta do anteriormente considerado (6aR,12aR)- 6-desoxiclitoriactal foi determinada a partir da análise de Dicroísmo Circular Eletrônico (DCE) e comparado com os resultados do DC calculado para os dois enantiômeros, que revelou estereoquímica absoluta oposta àquela relatada na literatura. Além disso, a partir 6-desoxiclitoriactal foram preparados três derivados químicos, onde a reação com etanolamina levou a formação de um derivado não usual com eliminação de uma unidade de floroglucinol. A partir das folhas de *Cenostigma pyramidale* foi desenvolvida uma metodologia simplificada para isolar agathisflavona com bons rendimentos, utilizando-se apenas duas etapas. Nesse procedimento, além da agathisflavona, foram obtidos o lupeol, a lupenona e a 5,7-dihidróxi-4-metil cumarina, sendo esta última ainda não relatada em fontes vegetais. Na terceira parte desse estudo, com o intuito de investigar o perfil químico de *Cenostigma pyramidale*, *Canavalia brasiliensis* e *C. microphylla* foi realizado um estudo metabolômico, utilizando-se UHPLC-HRMS para a análise dos extratos metanólicos das folhas dessas espécies, que permitiu a detecção/anotação de aproximadamente 200 metabólitos secundários nos diferentes extratos.

Palavras-chave: *Clitoria*, 6-desoxiclitoriactal, *Cenostigma*, agathisflavona, *Canavalia*, perfil químico

DEVELOPMENT OF METHODOLOGIES FOR ISOLATION AND DETECTION OF SPECIAL METABOLITES AND OBTAINING CHEMICAL DERIVATIVES OF SUBSTANCES ISOLATED FROM BRAZILIAN LEGUMINOUS SPECIES

Abstract

The Leguminosae family has approximately 19,500 species distributed in 770 genera with a large occurrence in Brazilian territory, especially in the Caatinga biome. Although the family has a significant number of Brazilian species, there are still few studies on their chemical composition. Species from the genera *Cenostigma*, *Canavalia* and *Clitoria* are commonly found in Brazilian territory, some of them, in addition to being endemic, are exclusive to territorially restricted and little explored environments such as the Brazilian Semi-arid. This work aimed to explore Brazilian biodiversity from a chemical point of view based on studies of *Clitoria fairchildiana*, *Cenostigma pyramidale*, *Canavalia brasiliensis* and *Cenostigma microphylla* through phytochemical studies, chemical profile analysis, structural determination of isolated metabolites and structural modification of some bioactive compounds. Nine compounds were isolated from the roots of *C. fairchildiana* using chromatographic techniques, including a new benzoic acid derivative and the pair of 6-deoxyclitoriacetal epimers, one of which has not yet been reported in the literature. In parallel, the absolute stereochemistry of the previously considered (6a*R*,12a*R*)- 6-deoxyclitoriacetal was determined from Electronic Circular Dichroism (DCE) analysis and compared with the results of the DC calculated for the two enantiomers, which revealed absolute stereochemistry opposite to that reported in literature. Furthermore, three chemical derivatives were prepared from 6-deoxyclitoriacetal, where the reaction with ethanolamine led to the formation of an unusual derivative with the elimination of a phloroglucinol unit. From the leaves of *Cenostigma pyramidale*, a simplified methodology was developed to isolate agathisflavone with good yields, using just two steps. In this procedure, in addition to agathisflavone, lupeol, lupenone and 5,7-dihydroxy-4-methyl coumarin were obtained, the latter of which has not yet been reported in plant sources. In the third part of this study, with the aim of investigating the chemical profile of *Cenostigma pyramidale*, *Canavalia brasiliensis* and *C. microphylla*, a metabolomic study was carried out, using UHPLC-HRMS to analyze the methanolic extracts of the leaves of these species, which allowed the detection/annotation of approximately 200 secondary metabolites in different extracts.

Keywords: *Clitoria*, 6-deoxyclitoriacetal, *Cenostigma*, agathisflavone, *Canavalia*, Chemical profile

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

CC - Cromatografia em Coluna

CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CD₃OD - Metanol Deuterado

CDCl₃ - Clorofórmio Deuterado

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

d - Dubleto

DCM - Diclorometano

dd - Duplo Dubleto

DEPT - Distortionless enhancement polarization transference

DMSO - Dimetilsulfóxido

dt - dubleto de tripleto

EM - Espectrometria de massas

EtOH - Etanol

GPPN - Grupo de pesquisa de produtos naturais

HMBC - *Heteronuclear multi bond correlation*

HSQC - *Heteronuclear simtiple single quantum coherence*

IV - Espectrofotometria no Infravermelho

J - Constante de Acoplamento

m - multiplete

m/z - Relação massa/carga

MeOH - Metanol

R² - Coeficiente de determinação

R_f - Coeficiente Fator de retenção

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN de ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – Singleto

t – Tripleto

UHPLC-HRMS UHPLC/MS/MS- Ultra High Performance Liquid Chromatography
- High Resolution Mass Spectrometry

UV – Espectrofotometria no Ultravioleta

δ - deslocamento químico

λ – comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Estruturas das substâncias isoladas das vagens de *C. lineata*
- Figura 1.2** Estruturas das substâncias isoladas das sementes de *C. gladiata*
- Figura 1.3** Estruturas das substâncias isoladas das partes aéreas de *C. rosea*
- Figura 1.4** Estruturas das principais substâncias isoladas das folhas de *C. pyramidale*
- Figura 1.5** Estruturas das substâncias isoladas dos caules de *C. pyramidale*
- Figura 1.6** Estruturas das substâncias isoladas das cascas do caule de *C. pyramidale*
- Figura 1.7** Estruturas das principais substâncias isoladas de *C. macrophyllum*.
- Figura 1.8** Estrutura da caesalpinioflavona isolada das folhas de *C. pluviosum*
- Figura 1.9** Estruturas das substâncias isoladas dos galhos de *C. fairchildiana*
- Figura 1.10** Estrutura dos rotenoides isolados de *C. fairchildiana*
- Figura 2.1** Captura de tela do resultado da separação cromatográfica do extrato em DCM registrado pelo MPLC – Isolera
- Figura 2.2** Esquema de tratamento do extrato bruto em DCM
- Figura 2.3** Esquema de tratamento do extrato bruto em metanol EBM-A
- Figura 2.4** Esquema de tratamento do extrato bruto em metanol EBM-B
- Figura 2.5** Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos ao 6-desoxiclitoriactal obtido da fração CFDI1 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]
- Figura 2.6** Região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a hidrogênios alifáticos ao 6-desoxiclitoriactal obtido da fração CFDI1 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]
- Figura 2.7** Estrutura do (6aS*,12aS*)-6-desoxiclitoriactal obtido da fração CFDI1 (1)
- Figura 2.8** Região do espectro APT de ^{13}C contendo todos os sinais de carbonos atribuídos a estrutura do 6-desoxiclitoriactal obtido da fração CFDI1 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]
- Figura 2.9** Principais fragmentos obtidos a partir das informações do espectro de HRESIMS do (6aR*,12aS*)-6-desoxiclitoriactal obtido da fração BMF3A82

Figura 2.10 Estrutura do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal obtido da fração BMF3A82 (2)

Figura 2.11 Espectro de RMN de ¹H contendo sinais atribuídos a estrutura do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal obtido da fração BMF3A82 [500 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

Figura 2.12 Expansão de região do espectro de RMN de ¹H contendo sinais atribuídos a estrutura do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal obtido da fração BMF3A82 [500 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

Figura 2.13 Região do espectro RMN de ¹³C contendo todos os sinais de carbonos atribuídos a estrutura do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal obtido da fração BMF3A82 [125 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

Figura 2.14 Espectro de HRESIMS do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal obtido da fração BMF3A82

Figura 2.15 Ampliação do espectro de HRESIMS do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal obtido da fração BMF3A82

Figura 2.16 Espectro na região UV-VIS do (6a*S*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal obtido da fração CFDIF1 em CHCl₃

Figura 2.17 Espectro na região do UV-VIS do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal obtido na fração BMF3A82 em CHCl₃

Figura 2.18 Espectro de NOESY do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal obtido na fração BMF3A82

Figura 2.19 Ampliação do espectro de NOESY do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal obtido na fração BMF3A82, correlação entre o H em 4,12 e o H em 4,71

Figura 2.20 Ampliação do espectro de NOESY do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal obtido na fração BMF3A82, correlação entre o H em 11,52 com os H em 6,71 e em 6,08

Figura 2.21 Estrutura do clitoriacetal (3) obtido da fração CFC4F36

Figura 2.22 Região do espectro de RMN de ¹H contendo sinais atribuídos a estrutura do clitoriacetal obtido da fração CFC4F36 [500 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

Figura 2.23 Expansão da região do espectro de RMN de ¹H contendo sinais da estrutura do clitoriacetal obtido da fração CFC4F36 [500 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

Figura 2.24 Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais da estrutura do clitoriacetal obtido da fração CFC4F36 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.25 Região do espectro de RMN de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos a estrutura do clitoriacetal obtido da fração CFC4F36 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.26 Expansão da região do espectro de RMN de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos a estrutura do clitoriacetal obtido da fração CFC4F36 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.27 Espectro de RMN de ^1H expandido contendo todos os sinais atribuídos a estrutura da biochanina A obtida da fração CFDI5 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.28 Expansão do espectro de RMN de ^1H na região de anéis aromáticos atribuídos a estrutura da biochanina A obtida da fração CFDI5 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.29 Região do espectro APT de ^{13}C contendo os sinais atribuídos aos carbonos da estrutura da biochanina A obtida da fração CFDI5 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.30 Estrutura da biochanina A (**4**) obtida da fração CFDI5

Figura 2.31 Estruturas da biochanina A (**4**) e da prunetina (**5**) obtidas da fração CFDI9

Figura 2.32 Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos as estruturas da biochanina A (**4**) e da prunetina (**5**) obtidas da fração CFDI9 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.33 Região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a hidrogênios aromáticos e vinílicos da biochanina A (**4**) e da prunetina (**5**) obtidas da fração CFDI9 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.34 Região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a hidrogênios em ligação de hidrogênio intermolecular e metoxilas aromáticas da biochanina A (**4**) e da prunetina (**5**) obtidas da fração CFDI9 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.35 Região do espectro de APT de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos a biochanina A (**4**) e a prunetina (**5**) obtidas da fração CFDI9 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.36 Estruturas do β -sitosterol e stigmasterol (**6**) obtidos na fração CFEBMPD2

Figura 2.37 Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos a mistura de esteroides obtidos na fração CFEBMPD2 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.38 Região do espectro de RMN de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos a mistura de esteroides obtidos na fração CFEBMPD2 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.39 Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a formononetina obtida na fração BMF5A5 [500 MHz, MeOD, $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.40 Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a formononetina obtida na fração BMF5A5 [500 MHz, MeOD, $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.41 Espectro HSQC contendo sinais atribuídos a formononetina obtida na fração BMF5A5 [125 MHz, MeOD, $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.42: EspectroHMBC contendo sinais atribuídos a formononetina obtida na fração BMF5A5 [125 MHz, MeOD, $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.43 Estrutura da formononetina (**7**) obtida na fração BMF5A5

Figura 2.44 Estrutura do santal (**8**) obtido da fração BMF5A3

Figura 2.45 Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, MeOD, $\delta(\text{ppm})$] contendo sinais atribuídos ao santal (**8**) obtido da fração BMF5A3

Figura 2.46 Espectro HSQC contendo sinais atribuídos à substância santal obtida da fração BMF5A3 [125 MHz, MeOD, $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.47 Espectro HMBC contendo sinais atribuídos à substância santal obtida da fração BMF5A3 [125 MHz, MeOD, $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.48 Espectro de massas em alta resolução (modo negativo) da substância santal obtida da fraçãoBMF5A3

Figura 2.49 Correlações observadas no HMBC

Figura 2.50 Região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos ao derivado de ácido benzoico obtido da fração CF5A12 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.51 Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos ao derivado de ácido benzoico obtido da fração CF5A12 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.52 Espectro em HSQC contendo sinais atribuídos **Figura 2.51**
Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos ao derivado de ácido benzoico obtido da fração CF5A12 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 2.53 Espectro em HMBC contendo sinais atribuídos ao derivado de ácido benzoico obtido da fração CF5A12 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 3.1 Rotenoides isolados com configuração absoluta determinada

Figura 3.2 Espectro de EDC calculado para os enantiômeros 6aR,12aR (azul) e 6aS,12aS (vermelho)

Figura 3.3 Espectro experimental e espectros teóricos calculados usando DFT wb97xd/6-311++g(d,p) em metanol (para a geometria das duas moléculas). E o ECD: TD DFT wb97xd/6-311++g(d,p) em metanol.

Figura 3.4 Espectro UV-VIS do 6-desoxiclitoriacetal calculado para o enantiômero 6aS,12aS

Figura 3.5 Espectro IV do 6-desoxiclitoriacetal calculado para o enantiômero 6aS,12aS

Figura 3.6 Espectro na região UV-VIS do 6-desoxiclitoriacetal obtido experimentalmente

Figura 3.7 Estruturas de ressonância do produto de desidratação

Figura 3.8 Estrutura do produto de desidratação (**10**)

Figura 3.9 Estrutura do produto de metilação (**11**)

Figura 3.10 Espectro do 6-desoxiclitoriacetal na região do IV feito em ATR

Figura 3.11 Espectro do produto de desidratação **10** obtido das reações em meio ácido na região do IV em ATR

Figura 3.12 Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos ao produto de desidratação **11** [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 3.13 Região do espectro de RMN de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos ao produto de desidratação **10** [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 3.14 Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos ao produto de metilação **11** [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 3.15 Expansão das regiões do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos ao derivado metilado **11**

Figura 3.16 Região do espectro HSQC contendo todos os sinais atribuídos ao produto metilado **11** [500/125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 3.17 Região do espectro HMBC contendo todos os sinais de correlação atribuídos ao produto metilado **11** [500/125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 3.18 Correlações observadas no espectro em HMBC

Figura 3.19 Estrutura da substância obtida a partir da reação multicomponente

Figura 3.20 Esquema da formação do produto da reação multicomponente

Figura 3.21 Mecanismo de formação do produto da reação multicomponente

Figura 3.22 Espectro na região do IV em ATR de **13**

Figura 3.23 Região do espectro de RMN de ^1H de **13** [500 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 3.24 Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos ao produto da reação multicomponente [500 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 3.25 Região do espectro de RMN de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos ao produto da reação multicomponente [125 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 3.26 Região do espectro HSQC contendo todos os sinais atribuídos ao produto da reação multicomponente [125 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 3.27 Região do espectro HMBC contendo todos os sinais atribuídos ao produto da reação multicomponente [125 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 3.28 Espectro de HRESIMS do produto da reação multicomponente

Figura 4.1 Biflavonoides isolados das folhas de *C. pyramidale*

Figura 4.2 Esquema de obtenção da fração rica em agathiflavona pelo método A2. A- Cartucho de 25 g com fase reversa C-18, B- A adição da amostra seca adsorvida em C-18 na amostra do cartucho, C- O cartucho conectado ao equipamento e D- A tela do equipamento com separação monitorada em 254 nm indicando o sinal alto na terceira fração que corresponde à fração rica em componentes.

Figura 4.3 Cromatograma das diferentes amostras de agathiflavona obtidas por meio de cada um dos métodos aplicados

Figura 4.4 Espectros ultravioleta de agathiflavona obtidos a partir dos procedimentos isolados (A) e padrão (B)

Figura 4.5 Estrutura da lupenona

Figura 4.6 Espectro de RMN de ^1H da lupenona [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 4.7 Ampliação de região do espectro de RMN de ^1H da lupenona [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 4.8 Ampliação de região do espectro de RMN de ^1H da lupenona [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 4.9 Espectro de RMN de ^{13}C da lupenona [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 4.10 Ampliação de região do espectro de RMN de ^{13}C da lupenona [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 4.11 Estrutura do lupeol

Figura 4.12 Região do espectro de RMN de ^1H do lupeol [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 4.13 Ampliação de região do espectro de RMN de ^1H do lupeol [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 4.14 Ampliação de região do espectro de RMN de ^1H do lupeol [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 4.15 Estrutura da 5,7 dihidroxi 4 metil cumarina

Figura 4.16 Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos a cumarina isolada e ampliação da região característica de H aromático [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Figura 4.17 Região do espectro de RMN de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos a estrutura [125 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{ppm})$]

Figure 5.1 Principal component analysis of Leguminosae species

Figure 5.2 Unsupervised hierarchical cluster analysis (HCA) built according to the fold-change heatmap based on phenolics in the extracts from different specimens of *C. pyramidale*, *C. microphyllum* and *C. brasiliensis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Frações obtidas da coluna do extrato em DCM submetido a cromatografia *flash* automatizada no MPLC: cartucho de 100g, fase móvel hexano:acetato, fluxo de 12mL/min.

Tabela 2.2 Frações obtidas a partir do fracionamento de DCM-A

Tabela 2.3 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração CFEBMPD3

Tabela 2.4 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração BMF3A5

Tabela 2.5 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração BMF3A8

Tabela 2.6 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração CFEBMPD4

Tabela 2.7 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração BMF5A1

Tabela 2.8 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração BMF5A4

Tabela 2.9 Frações obtidas da coluna do extrato em DCM-B

Tabela 2.10 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração CFIC1_2

Tabela 2.11 Frações obtidas da separação cromatográfica das frações F2-311 a F2-314 reunidas

Tabela 2.12 Principais dados de RMN de ^1H e de ^{13}C [500 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)] que evidenciam a diferenciação das estruturas

Tabela 2.13 Dados de RMN de ^1H do 6-desoxiclitoriacetal (**1**), (6aR*,12aS*)-6-desoxiclitoriacetal (**2**) e clitoriacetal (**3**) e [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)]

Tabela 2.14 Dados de RMN de ^{13}C do clitoriacetal (**2**) e 6-desoxiclitoriacetal (**3**) [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

Tabela 2.15 Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C [500 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)] da mistura de esteróides

Tabela 2.16 Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C [500 MHz (^1H) e ^{13}C por meio de HSQC e HMBC, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)] do novo derivado de ácido benzoico CF5A12 (**9**)

Tabela 2.17 Dados de RMN de ^1H das isoflavonas isoladas CFDI5 (**4**), CFDI9 (**5**), BMF5A5 (**7**) e BMF5A3 (**8**) [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)]

Tabela 2.18 Dados de RMN de ^{13}C das isoflavonas isoladas CFDI5 (**4**), CFDI9 (**5**), BMF5A5 (**7**) e BMF5A3 (**8**) [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)], e correlações (HSQC; HMBC) [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

Tabela 3.1 Dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) das substâncias obtidas [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)]

Tabela 3.2 Dados de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)] e RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 12 [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)]

Tabela 4.1 Resumo das etapas e rendimentos da purificação de agatisflavona por extrações cromatográficas (A) e de base direta (B)

Tabela 4.2 Resumo das etapas e rendimentos da purificação de agathisflavona por extrações cromatográficas (A) e de base direta (B)

Table 5. 1 VIP marker compounds (organized in metabolic classes) following OPLS-DA discriminant modelling, together with Log Fold-Change values for comparison of the species with the most expressive log FC value.

Sumário

Resumo	24
1.1 Introdução	25
1.2 Objetivos	27
1.2.1 Objetivos específicos	27
1.3 Leguminosas dos gêneros <i>Cenostigma</i> , <i>Canavalia</i> e <i>Clitoria</i>	28
1.3.1 <i>Canavalia</i>	28
1.3.2 <i>Canavalia brasiliensis</i> e fitoquímica de <i>Canavalia</i>	29
1.3.3 <i>Cenostigma</i>	32
1.3.4 <i>Cenostigma microphyllum</i> , <i>C. pyramidale</i> e fitoquímica de <i>Cenostigma</i>	33
1.3.5 <i>Clitoria</i>	40
1.3.6 <i>Clitoria fairchildiana</i>	41
1.4 Considerações finais	45
Capítulo 2: Isolamento e identificação dos constituintes isolados de <i>C. fairchildiana</i> por diferentes rotas de obtenção para os componentes majoritários	46
Resumo	46
2.1. Introdução.....	47
2.2. Objetivos.....	48
2.2.1 <i>Objetivo geral</i>	48
2.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	48
2.3. Parte Experimental.....	49
2.3.1 Equipamentos e solventes utilizados.....	49
2.3.2 Coleta do material e preparação dos extratos	50
2.3.3. Obtenção dos extratos das raízes de <i>C. fairchildiana</i> e fracionamento	50
2.3.3.1 Obtenção do extrato em DCM.....	50
2.3.3.2 Obtenção dos extratos em MeOH, EBMA e EBMB.....	53
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
2.4.1 Identificação estrutural dos compostos isolados.....	63
2.4.1.1 Identificação do 6-desoxiclitoriacetal (CFDI1).....	64
2.4.1.2 Elucidação estrutural do (6aR*,12aS*)-6-desoxiclitoriacetal obtido da fração BMF3A82.....	68
2.4.1.3 Identificação do clitoriacetal (CFC4F36)	80
2.4.1.4 Identificação da biochanina A (CFDI5)	87
2.4.1.5 Identificação da mistura de isoflavonas da fração CFDI9	91

2.4.1.6 Identificação da mistura de esteroides CFEBMPD2	95
2.4.1.7 Identificação da formononetina (BMF5A5)	99
2.4.1.8 Identificação do santal da fração BMF5A3	103
2.4.1.9 Proposta de estrutura para a substância da fração CF5A12.....	108
2.4.2 Estruturas isoladas de <i>C. fairchildiana</i>	118
2.5 Considerações finais	119
Capítulo 3: Determinação da configuração absoluta do 6-desoxiclitoriactal isolado de <i>Clitoria fairchildiana</i> por dicroísmo circular, síntese de derivados e modificação estrutural do principal composto isolado	120
Resumo	120
3.1 Introdução	121
3.2 Objetivos.....	123
3.2.1 Objetivo Geral	123
3.2.2 Objetivos específicos	123
3.3 Fundamentação teórica	124
3.3.1 Determinação da configuração absoluta por dicroísmo circular	124
3.3.2 Determinação da configuração absoluta do 6-desoxiclitoriactal	125
3.3.3 Estratégias de obtenção de derivados.....	128
3.4 Metodologia	130
3.4.1. Isolamento do 6-desoxiclitoriactal de <i>C. fairchildiana</i>	130
3.4.2. Cálculos teóricos de Dicroísmo Circular Eletrônico	130
3.4.3. Reações de modificação estrutural	130
3.4.3.1 Reação de Pechmann com o 6-desoxiclitoriactal	131
3.4.3.2 Acilação orto-dirigida do 6-desoxiclitoriactal	131
3.4.3.3 Obtenção de derivados do 6-desoxiclitoriactal com iodeto de metila	131
3.4.3.4 Reação multicomponente do 6-desoxiclitoriactal com etanolamina e formaldeído	132
3.4.4. Obtenção dos espectros.....	132
3.5. Resultados e discussão	132
3.5.1. Dicroísmo circular	132
3.5.2. Reações de modificação estrutural	136
Capítulo 4: Métodos de isolamento da agathisflavona de <i>Cenostigma pyramidale</i> e obtenção de outros constituintes.....	161
Resumo	161
4.1 Introdução.....	162

4.2	Objetivos.....	164
2.1	Objetivo geral.....	164
2.2	Objetivos específicos.....	164
4.3	Metodologia.....	165
4.3.1	Procedimentos gerais.....	165
4.3.2	Preparação do material vegetal.....	165
4.3.3	Extração e Isolamento.....	165
4.3.3.1	Método A: Purificações cromatográficas.....	166
4.3.3.1.1	Isolamento por partição e cromatografia em coluna A.1.....	166
4.3.3.1.2	Cromatografia líquida de média pressão automatizada (MPLC) - A.2.....	166
4.3.3.2	Método B: Extração alcalina de biflavona.....	167
4.3.3.2.1	Tratamento direto do extrato com base B.1.....	168
4.3.3.2.2	Tratamento do extrato particionado com base B.2.....	168
4.3.3.3	Tratamento do material residual do filtro da metodologia B.2.....	168
4.3.4	Análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para agathisflavona.....	169
4.4.	Resultados e discussão.....	170
4.4.1	Métodos de extração da agathisflavona de <i>Cenostigma pyramidale</i>	170
4.4.2	Identificação estrutural de PPEAFM1.....	173
4.4.3	Identificação estrutural da substância PPEAFM4.....	180
4.4.4	Identificação do composto PPEAFM11.....	184
4.5	Considerações finais.....	187
Capítulo 5: Untargeted phenolic profiling workflow.....		188
5.1	Introduction.....	189
5.2.	Material and methods.....	192
5.2.1.	Plant material.....	192
5.2.2	Extraction.....	192
5.2.3.	Instrumental conditions.....	192
5.2.4.	Data processing.....	193
5.2.5.	Statistical Analysis.....	193
5.3.	Results (untargeted approach).....	194
5.3.1	Metabolomic profiling.....	194
5.3.2	Multivariate data analysis following phytochemical profiling.....	195
5.4	Conclusions.....	206

Capítulo 1: REVISÃO DA LITERATURA

Resumo

As espécies leguminosas apresentam usos diversos, sejam ornamentais, como matéria-prima na fabricação de tintas, vernizes, corantes, mas também em medicamentos e, especialmente em países em desenvolvimento, são importantes na alimentação e são muito utilizadas em reurbanização. Especialmente no território brasileiro, e especificamente no bioma Caatinga, a família Leguminosae é uma das famílias que apresenta uma quantidade de espécies expressiva. No entanto, ainda existem poucos registros de investigação química dessas espécies. Espécies dos gêneros *Cenostigma*, *Canavalia* e *Clitória* são comumente encontradas no território brasileiro, algumas delas além de serem endêmicas, são exclusivas de ambientes territorialmente restritos e pouco explorados. Assim esse capítulo aborda a revisão da literatura sobre ocorrência, relatos da literatura relacionados a estudos químicos, fitoquímicos e bioatividade de modo a descrever as espécies estudadas neste trabalho. Parte desse levantamento bibliográfico resultou na publicação de uma revisão na literatura que trata da reclassificação taxonômica das espécies que pertencem ao grupo *Caesalpinia s.l.*

1.1 Introdução

A família Leguminosae tem pelo menos 19500 registros de espécies distribuídas nos 770 gêneros pertencentes a essa família (BFG, 2015; LPWG, 2017b). As espécies leguminosas apresentam usos diversos, sejam ornamentais, como matéria-prima na fabricação de tintas, vernizes, corantes, mas também em medicamentos e, especialmente em países em desenvolvimento, são importantes na alimentação (LPWG, 2017b). No território brasileiro, especificamente no bioma Caatinga a família Leguminosae é a que apresenta a maior quantidade de espécies (BFG, 2015). Esse bioma apresenta uma taxa de endemismo considerável, cerca de 23% das espécies e 31 gêneros são endêmicos (QUEIROZ et al., 2017). Apesar da conseqüente biodiversidade abundante, espécies dessa região ainda são pouco exploradas (QUEIROZ, 2009; SILVA et al., 2020a).

Devido à baixa pluviosidade e à depreciação dos nutrientes do solo da Caatinga (DE ALBERGARIA; DE OLIVEIRA; ALBUQUERQUE, 2021), espera-se que espécies presentes nessa região apresentem em sua composição química compostos que respondam a esses agentes externos, como os fenólicos. Ao passar por estresse ambiental e por diferentes estágios morfológicos de desenvolvimento, a planta pode se adaptar a essas condições. Esse processo adaptativo pode ser evidenciado como alteração morfológica (como a perda de folhas, por exemplo) e/ou fisiológica, onde mecanismos biossintéticos podem levar a produção de substâncias antioxidantes, tais como compostos fenólicos, como taninos e flavonoides (DE SOUSA ARAÚJO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2021).

Espécies pertencentes à família Leguminosae apresentam em sua composição compostos fenólicos, especialmente as espécies do gênero *Cenostigma* apresentam um grupo de fenólicos especial, os biflavonoides. Apesar disso, o isolamento de tais compostos químicos são relatados em poucas espécies, a maior parte das espécies desse gênero ainda não foram exploradas do ponto de vista fitoquímico (DO NASCIMENTO; DAVID, 2023).

Cenostigma pyramidale é considerada uma das espécies mais bem adaptadas à esta região, o estudo de tolerância desta espécie ao estresse salino revelou que esta apresenta percepção precoce do estresse salino por meio de mecanismos específicos que ainda podem ser explorados (FROSI et al., 2021). Ademais, há uma crescente preocupação com a propagação de espécies nativas (SCALON et al., 2006), principalmente com o objetivo de recuperar e conservar ecossistemas. *Clitoria fairchildiana* é uma dessas espécies, devido ao seu rápido crescimento e a sua capacidade de nodular e fixar nitrogênio atuando como adubo verde, essa espécie é amplamente utilizada em arborização de áreas urbanas e cobertura de áreas degradadas (ALVES et al., 2013).

Clitoria é gênero economicamente importante, mas muitas espécies são conhecidas apenas localmente (FANTZ, 1991). *Clitoria fairchildiana* é nativa da região amazônica, porém é encontrada em áreas urbanas em regiões de Mata Atlântica e é bastante utilizada em programas de reflorestamento (ALVES et al., 2013). Apesar de ser uma leguminosa muito resistente a agentes externos e ambientais, e algumas espécies do gênero *Clitoria* serem encontradas na Caatinga, não há relatos da presença de *C. fairchildiana* nesse bioma. No entanto, essa espécie também é rica em compostos fenólicos, especialmente flavonoides e rotenoides (SANTOS, 2014).

As espécies pertencentes ao gênero *Canavalia*, apresentam ampla distribuição no território brasileiro e são encontradas tanto em ambientes úmidos, como na Mata Atlântica, até ambientes secos, como a Caatinga (SNAK; QUEIROZ, 2013, 2016). *Canavalia brasiliensis* é utilizada como biossensor, no controle de saúvas, na adubação verde e na medicina (GUEDES; QUIRINO; GONÇALVES, 2009).

Espécies dos gêneros *Cenostigma*, *Canavalia* e *Clitoria* são comumente encontradas no território brasileiro, algumas delas além de serem endêmicas, são exclusivas de ambientes territorialmente restritos e pouco explorados como o bioma Caatinga.

1.2 Objetivos

Reunir informações bibliográficas gerais e sobre a composição química dos gêneros *Canavalia*, *Cenostigma* e *Clitoria*;

1.2.1 Objetivos específicos

- Reunir informações sobre estudos anteriores que tratam da ocorrência das espécies no território brasileiro;
- Reportar composição química, via identificação ou isolamento, e atividades biológicas importantes sobre as espécies e sobre os gêneros estudados.

1.3 Leguminosas dos gêneros *Cenostigma*, *Canavalia* e *Clitória*

No bioma Caatinga, a família Leguminosae é a que apresenta a maior quantidade de espécies, a Bahia é o segundo estado com o maior número de espécies angiosperma abrigadas nessa família, cerca de 1284 espécies considerando somente as angiospermas (BFG, 2015). Este bioma é formado por diversas plantas endêmicas, e uma consequente biodiversidade abundante, porém ainda pouco explorada (QUEIROZ, 2009; SILVA et al., 2020a).

O bioma Caatinga apresenta biodiversidade adaptada a temperaturas elevadas e baixa umidade, um ambiente caracterizado por florestas secas, que recobre 11% do território brasileiro (BARBOSA; GOMES FILHO, 2022). Apesar disso, tem passado por um intenso processo de desertificação devido à substituição da vegetação nativa por monoculturas, extrativismo ilegal, pastagem de ruminantes e queimadas (NOGUEIRA, 2022). Existe um grande esforço e dedicação de diversos especialistas no que se diz respeito ao gerenciamento das informações sobre a grande diversidade brasileira. Muitas estratégias e desafios têm sido encontrados a fim de completar a lista de espécies que compõe a flora do Brasil (BFG, 2018).

As espécies de leguminosas apresentam usos diversos, sejam ornamentais, como matéria-prima na fabricação de tintas, vernizes, corantes, mas também em medicamentos e, especialmente em países em desenvolvimento, são importantes na alimentação (LPWG, 2017a).

1.3.1 *Canavalia*

O gênero *Canavalia* pertence a subtribo Diocleinae, tribo Phaseoleae, pertencente a subfamília Papilionoideae e possui aproximadamente 60 espécies. No Brasil, existem 17 espécies, das quais 15 têm ocorrência natural e duas são cultivadas (SNAK; QUEIROZ, 2013). A tribo *Phaseoleae* é uma das 28 tribos das quais essa subfamília foi dividida. Essa tribo foi segregada em oito subtribos, dentre elas, Cajaninae, Phaseolinae, Clitoriae, Ophrestiinae, Kennediinae,

Erythrinae, Diocleinae e Glycininae. Essa última subtribo abriga treze gêneros, dentre eles, o *Canavalia*. O gênero *Canavalia* é dividido em quatro subgêneros, *Catadonia*, *Wenswrothia*, *Maunaloa* e *Canavalia* (Barbosa, 2013).

Das espécies pertencentes ao gênero *Canavalia*, seis estão incluídas no subgênero que leva o mesmo nome, *Canavalia brasiliensis*, *C. dictyota*, *C. ensiformis*, *C. gladiata*, *C. piperi* e *C. rosea*, e apresentam ampla distribuição, são encontradas tanto em ambientes úmidos como a Mata Atlântica, até ambientes secos como a Caatinga (SNAK; QUEIROZ, 2013, 2016). No estado da Bahia, *Canavalia* é composto por cinco espécies; *C. brasiliensis*, *C. dolichothyrsa*, *C. parviflora*, *C. cassidea* e *C. rosea* (SNAK; QUEIROZ, 2016).

Os organismos vivos possuem proteínas de ligação a carboidratos, as lectinas ou aglutininas, esse grupo de substâncias úteis para investigação de carboidratos na superfície celular, particularmente nas células malignas, como eritrócitos e linfócito. Espécies desse gênero, tais como, *C. brasiliensis*, *C. gladiata* e *C. maritima* apresentam lectinas com efeitos vasodilatadores (ASSREUY et al., 2009). A investigação do comportamento, especificidade e o papel fisiológico das lectinas de plantas ainda é objeto de muitos estudos (MOREIRA; CAVADA, 1984).

1.3.2 *Canavalia brasiliensis* e fitoquímica de *Canavalia*

Canavalia brasiliensis (Leguminosae, Tribo Phaseoleae, Sub tribo Diocleinae), conhecida popularmente como feijão-de-porco, feijão bravo ou feijão bravo do Ceará, é uma espécie predominante no continente americano de ocorrência no bioma Caatinga (QUEIROZ, 2009; BARBOSA, 2013). *C. brasiliensis* é uma espécie trepadeira, que alcança de 0,5 a 5m e apresenta padrão de floração de longa duração com períodos de maior floração na estação seca. De maneira geral essa espécie é utilizada como biossensor, no controle de saúvas, na adubação verde e na medicina (GUEDES; QUIRINO; GONÇALVES, 2009).

A lectina ConBr, extraída das sementes dessa espécie, apresenta funções diversas, tais como, estão envolvidas na ativação/indução da apoptose em linfócitos (TEIXEIRA et al., 2001), atividade antinociceptiva demonstrada pela

ativação do sistema opioide por via oral, apresentando efeito significativo e dose dependente (DE FREITAS PIRES et al., 2013), efeito antidepressivo (RIEGER et al., 2014), efeitos renais constatados por meio do método de perfusão isolada de rim de rato (TEIXEIRA et al., 2001), antiproliferativos em linhagens celulares de leucemia humana (FAHEINA-MARTINS et al., 2012), efeito vasodilatador (ASSREUY et al., 2009). Essa lectina também desempenha um papel importante na neuroproteção contra o ácido quinolínico, demonstrada em testes in vivo e atua na diminuição da motilidade espermática bovina sem afetar a viabilidade celular ou a peroxidação lipídica (KAEFER et al., 2013). Ainda assim, *C. brasiliense* é uma espécie pouco explorada, existem poucos relatos em relação a aspectos biológicos e morfológicos (GUEDES; QUIRINO; GONÇALVES, 2009), e não há relatos sobre estudos fitoquímicos ou de identificação de metabólitos secundários.

Em estudos anteriores, do extrato bruto hidroalcolólico de *C. rosea*, foi relatado o isolamento do flavonoide glicosilado, rutina (**1**) (KREUCH, 2003). Do extrato MeOH de *C. gladiata* foi isolado um novo composto, nomeado gladiatina (**3**) (DINDA; BANIK, 2014).

Os componentes bioativos das vagens de *C. lineata* (Thunb.) DC foram investigados usando isolamento guiado por bioatividade, e as estruturas químicas dos flavonoides **1–3**, derivados isoflavonoides **4–11** e compostos fenólicos **12** e **13**. Do extrato metanólico das vagens *C. lineata* foi isolado um novo flavonoide identificado como (2*R*,3*R*)-3-hidroxi-7-*O*- β -*D*-glucopiranosídeo-6-metoxiflavanona (**2**), além de outros 12 compostos que já haviam sido anteriormente isolados de outras fontes: rutina (**1**), prunetina (**4**), 7,4'-dimetoxiisoflavona (**5**), ononina (**6**), cajanina (**7**), 7,4'-dimetil-3'-hidroxigenisteína (**8**), medicarpina (**9**), homopterocarpina (**10**), pterocarpina (**11**), (+)-siringaresinol (**12**) e (-)-siringaresinol-4-*O*- β -*D*-glucopiranosídeo (**13**) (HONG et al., 2022).

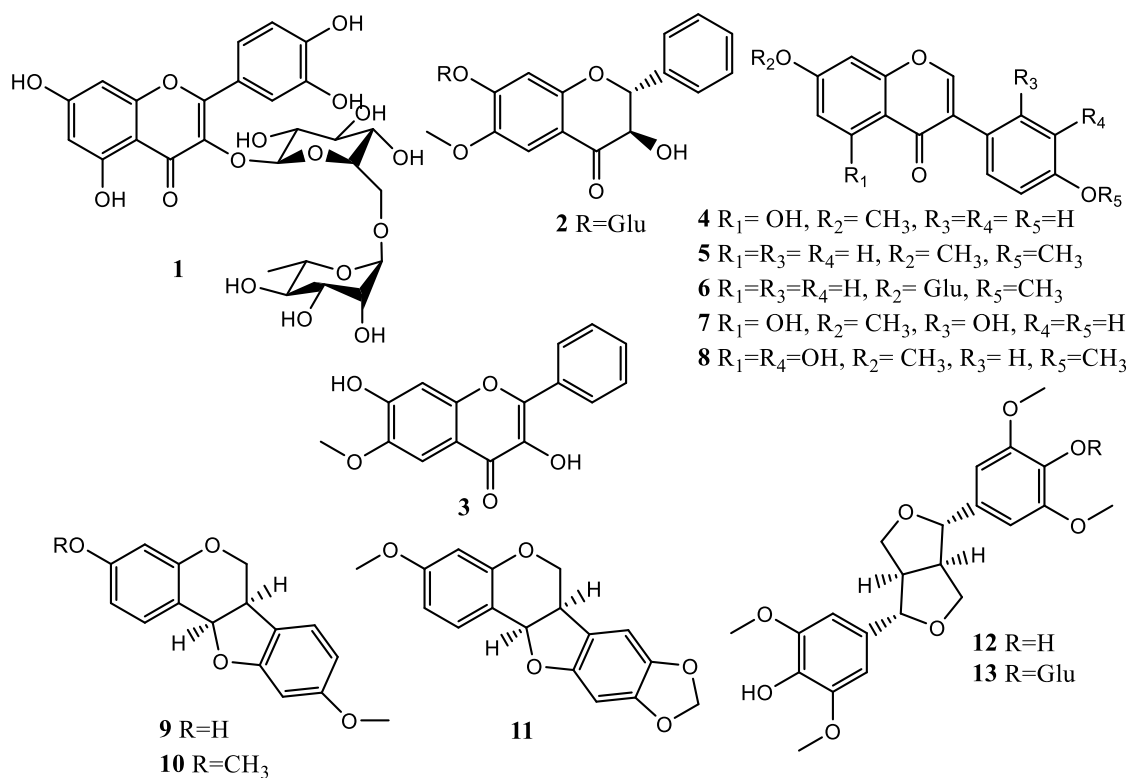


Figura 1.1 Estruturas das substâncias isoladas das vagens de *C. lineata*

O ácido 4-O-metilgálico (**14**) presente nas sementes de *C. gladiata*, juntamente com um derivado do ácido ferúlico (**15**), inibe de forma potente a invasão de células endoteliais sem apresentar citotoxicidade para as células sendo classificado como um composto com potencial para um agente antiangiogênico (JEON et al., 2005).

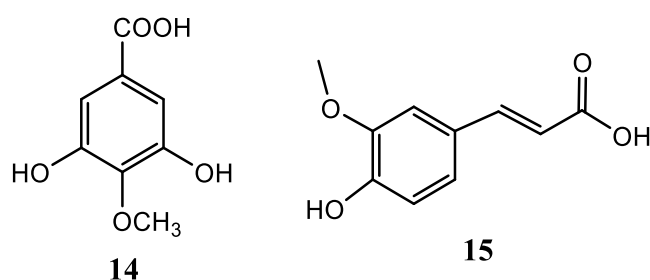


Figura 1.2 Estruturas das substâncias isoladas das sementes de *C. gladiata*

Uma nova substância nitrogenada denominada canarosina (**16**) foi isolado das partes aéreas de *C. rósea*, além desse outros cinco compostos conhecidos, β -sitosterol (**17**), estigmasterol (**18**), daucosterol (**19**), *epi*-inositol 6-O-metiléter (**20**) e rutina (**1**) (PATTAMADILOK et al., 2008).

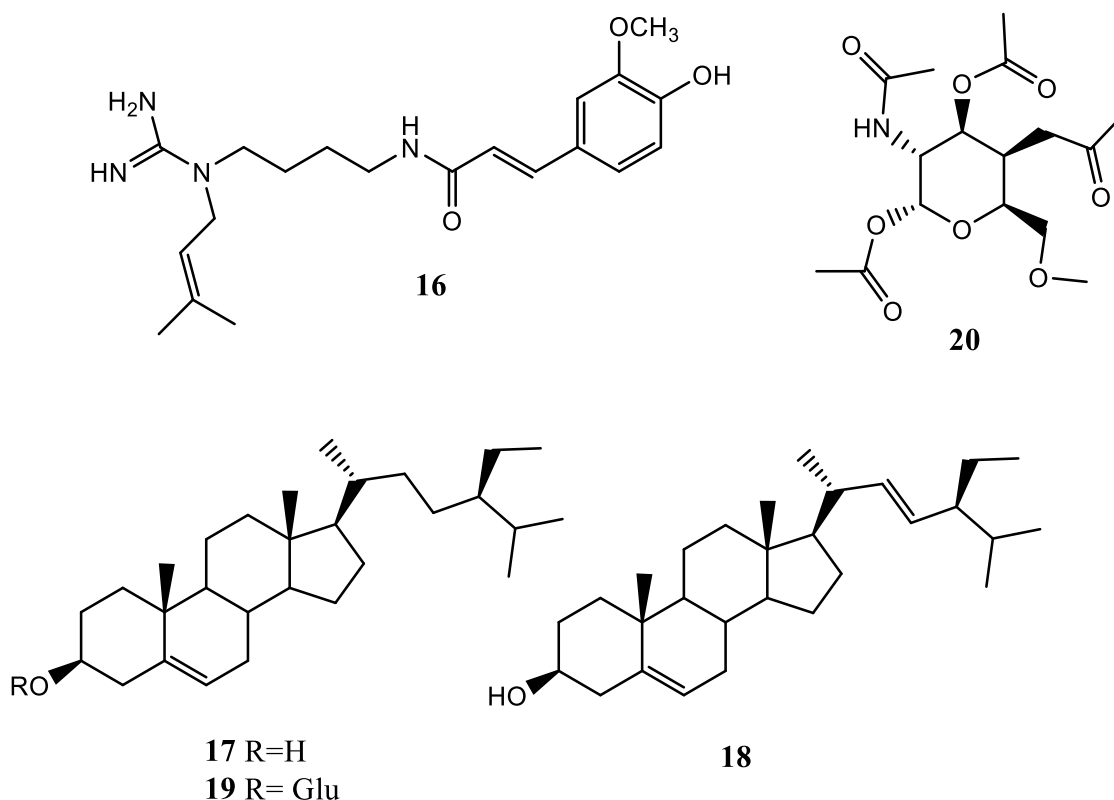


Figura 1.3 Estruturas das substâncias isoladas das partes aéreas de *C. rosea*

1.3.3 *Cenostigma*

O gênero *Cenostigma* pertence à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae. É importante salientar que o gênero *Cenostigma* terminou sendo modificado em consequência da nova classificação genérica do grupo *Caesalpinia* (AECYO et al., 2021). Isso implicou na reclassificação de algumas espécies que antes pertenciam ao gênero *Caesalpinia* para o gênero *Cenostigma*, a exemplo de *Cenostigma pyramidale* e *Cenostigma microphyllum* (GAGNON et al., 2016; NASCIMENTO E DAVID, 2023).

Espécies do gênero *Cenostigma* apresentam diversas atividades expressivas, a exemplo de *C. macrophyllum* Tul. var. *acuminata* cuja a avaliação do efeito de uma emulsão óleo em água na cicatrização de feridas cutâneas em ratos com *Diabetes mellitus* tipo 1 apresentou resultados promissores. Além dessa, outras propriedades antitumorais, antioxidantes, anti-inflamatórias,

antibacterianas e antivirais, também já reportadas foram atribuídas a composição química dos extratos dessa espécie (COELHO et al., 2013). Estudos que envolvem a determinação e quantificação dos principais metabólitos de *C. macrophyllum* revelaram a presença de compostos que apresentam bioatividade acentuada, como atividade anti-inflamatória e anticonceptiva. Foram identificados e quantificados fenólicos bioativos como ácido gálico, galato de metila, ácido elágico e também biflavonoides, agathisflavona e amentoflavona (Moreira et al., 2019).

Mais recentemente um estudo sobre a investigação demonstrou o potencial antiviral dos extratos e frações de *Cenostigma pluviosum* var. *peltophoroides* frente ao SARS-CoV-2 (PATTARO-JÚNIOR et al., 2022).

1.3.4 *Cenostigma microphyllum*, *C. pyramidale* e fitoquímica de *Cenostigma*

Muitas espécies endêmicas do Brasil são usadas pelos nativos como plantas medicinais, por exemplo, *C. macrophyllum* é utilizada no tratamento de doenças estomacais e intestinais (MOREIRA et al., 2019), apresenta atividade gastroprotetora (VIANA et al., 2013), além de estimular a cicatrização gástrica em ratos e culturas de células humanas (VIANA et al., 2021). Além do uso tradicional, *C. microphyllum* é uma espécie que pode ser utilizada em restauração de florestas sazonalmente secas, pois apresenta resistência a deficiência hídrica aguda além de recuperação mais rápida do estado hídrico e das trocas gasosas após a reidratação (PEREIRA et al., 2021).

Apesar de serem, em sua grande maioria, utilizadas para fins medicinais, alguns aspectos associados a perdas reprodutivas também estão ligados ao consumo de *Cenostigma pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis na sua forma fenada mesmo em baixas doses. Foi concluído que o consumo de *C. pyramidale* fenada não seria recomendado na dieta de ovelhas durante os primeiros 60 dias de gestação (REIS et al., 2020). Diferentemente do que ocorre em caprinos, o consumo da *C. pyramidale* não possui efeito tóxico sobre os parâmetros testiculares, na verdade essa espécie é uma alternativa a alimentação para esta categoria animal durante períodos de escassez, pois promoveu melhora no desenvolvimento corporal dos animais (SANTOS et al., 2020).

Cenostigma pyramidale apresenta função de proteção na aclimação as diferentes condições ambientais Caatinga. Tal característica foi evidenciada quando essa espécie foi investigada quanto a suas defesas físicas e químicas frente a condições xeromórficas e defesa contra herbívoros. Foi observada que a concentração de compostos fenólicos totais foi maior em amostras que apresentavam herbivoria, e em relação ao ambiente sérico foi observado que as folhas apresentaram resposta adaptativa observada por meio diminuição da estrutura total e dos tecidos (RIBEIRO et al., 2021).

Cenostigma microphyllum (Mart. ex G.Don) E.Gagnon & G.P.Lewis é uma espécie endêmica do bioma Caatinga, popularmente conhecida como Catingueira-rasteira, Catingueirinho, presente em uma área relativamente restrita, encontrada somente no sul do Piauí, sul de Pernambuco e norte da Bahia (QUEIROZ, 2009; AECYO et al., 2021).

Cenostigma microphyllum apesar de ser considerada uma espécie adaptada a distúrbios antropogênicos crônicos e mudanças climáticas, exibindo maior formação de frutos e sementes em habitats menos áridos e mais perturbados por intervenção humana, por exemplo, sua produção reprodutiva é afetada negativamente quando enfrentam uma combinação de altos níveis de aridez (OLIVEIRA et al., 2023).

A avaliação quantitativa do teor de fenólicos e taninos totais nas folhas e casca dos caules de *C. microphyllum* sob diferentes volumes de chuva e níveis de fertilidade do solo na Caatinga indica que ambas as partes têm alto teor dessas classes de compostos, sendo um pouco mais expressiva nas folhas. Não foi observada relação entre fertilidade do solo e teor de taninos totais, porém o teor de fenólicos totais foi afetado negativamente (DE ALBERGARIA; DE OLIVEIRA; ALBUQUERQUE, 2021).

O extrato aquoso de *C. microphyllum* apresenta ação antibiofilme não biocida contra *S. epidermidis* e a análise fitoquímica preliminar revelou a presença de flavonóides, terpenóides, esteróides, aminas e polifenóis (SILVA et al., 2015).

A investigação do extrato aquoso das sementes de *C. microphyllum* por LC-DAD-MS permitiu que possíveis compostos bioativos contra *T. vaginalis* fossem determinados, pois as frações enriquecidas com taninos foram as que apresentaram atividade anti-Trichomonas e nenhuma toxicidade no modelo *in vivo* de *G. mellonella*. Neste trabalho, vinte e seis compostos foram detectados nas frações de *C. microphyllum*, onde os principais compostos identificados foram taninos hidrolisáveis, O-digalloil hexosídeo, O-digalloil HHDP-hexosídeo, tri-O-galloil HHDP-hexosídeo, O-galloil HHDP-DHHDP-hexosídeo e seus isômeros, além desses o dímero de procianidina, epicatequina, o ácido elágico e o ácido O-(digalloil)quínico também foram identificados. No entanto, alguns compostos não foram possíveis de identificar, assim dentre os vinte e seis, somente doze foram identificados (SILVA et al., 2020b).

Cenostigma pyramidale (Mart. ex G.Don) E.Gagnon & G.P.Lewis conhecida por catingueira, catingueira verdadeira, é considerada uma das espécies mais adaptadas ao clima seco (FROSI et al., 2021). Estudos sobre a composição química das folhas de *C. pyramidale* indicam a presença de produtos naturais usuais como saponinas triterpênicas, flavonoides, derivados cinâmicos, e os principais compostos, os bioflavonoides.

Nessa espécie, a agathisflavona (**21**) é o biflavonoide que está presente em maior concentração nas folhas, porém não é encontrada nos caules (BAHIA et al., 2010). Dentre os constituintes isolados das folhas de *C. pyramidale*, foram reportados os biflavonoides agathisflavona (**21**), amentoflavona (**22**), sequioflavona (**23**), podocarpusflavona A (**24**), caesalflavona (**25**), loniflavona (**26**), 3'-O-metil-loniflavona (**27**) e 5'-hidroxi-amentoflavona (**28**), além dos flavonoides taxifolina (**29**), apigenina (**30**) e kaempferol (**31**), foram também reportados ácido 4-O- β -glucopiranosil-7-hidroxicinâmico (**32**), ácido 4-O- β -glucopiranosil-Z-8-hidroxicinâmico (**33**), lupeol (**34**), β -sitosterol (**17**). Nas flores, foram reportados galato de metila (**35**) a mistura de álcoois graxos α -amirina e β -amirina (**36** e **37**) e a mistura de esteroides β -sitosterol e estigmasterol (**17** e **18**). Dos caules foram isolados a 4,4-dihidroxi-2'-metoxichalcona (**38**), (-)-siringaresinol (**12**) e galato de metila (**35**) (MENDES et al., 2000; BAHIA et al., 2005, 2010; OLIVEIRA; DAVID; DAVID, 2016a, 2016b).

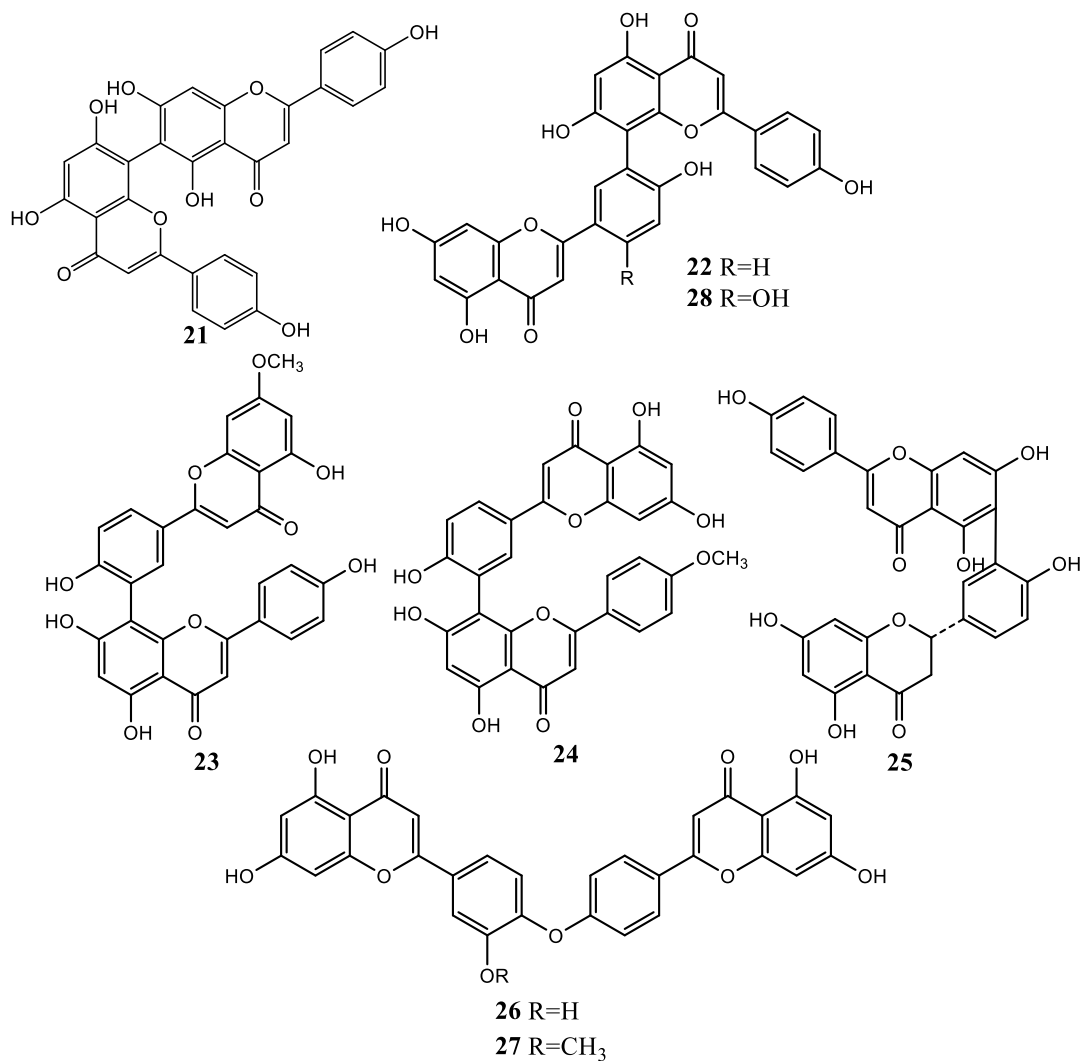


Figura 1.4 Estruturas das principais substâncias isoladas das folhas de *C. pyramidale*

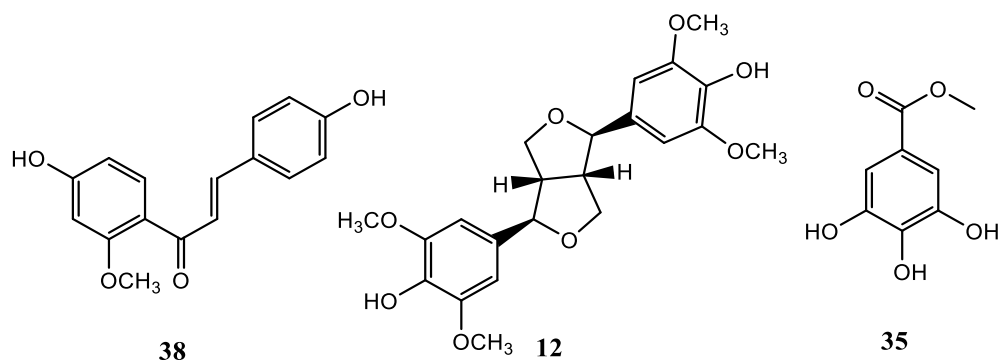


Figura 1.5 Estruturas das substâncias isoladas dos caules de *C. pyramidale*

A investigação fitoquímica do extrato bruto metanólico da casca das raízes de *C. pyramidale* levaram ao isolamento de biflavonoides até então não reportado na natureza (+)-5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona-6 α -2''',4'''-dihidroxi-4''-metoxidihidrochalcona, (+)-5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona-3 α -2'''-hidroxi-4''',4''-dimetoxidihidrochalcona, (-)-7-hidroxi-4'-metoxiflavona-3 α -2''',4'''-dihidroxi-4''-metoxidihidrochalcona, (-)-7,4'-dihidroxi-flavona,3-8'',5'',4''-trihidroxiflavona (**39-42**) (OLIVEIRA; DAVID; DAVID, 2016a, 2016b).

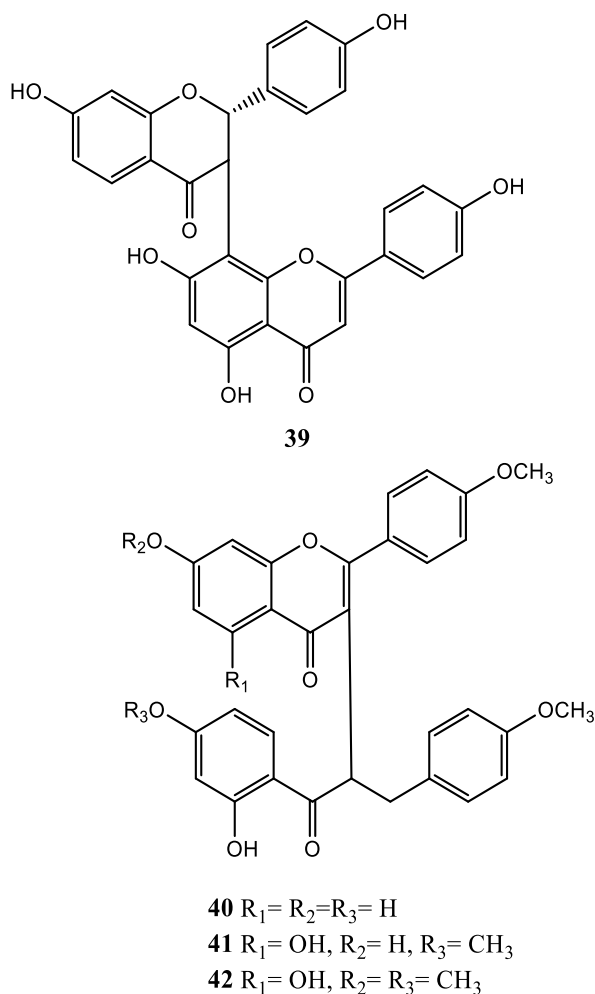


Figura 1.6 Estruturas das substâncias isoladas das cascas do caule de *C. pyramidale*

Extratos e substâncias isoladas de outras espécies de *Cenostigma* também apresentam atividades biológicas expressivas. O extrato bruto da casca do caule de *Cenostigma pluviosa* demonstrou fortes propriedades cicatrizantes. Quando incorporado a um gel e aplicado em feridas cutâneas estimulou a

regulação de proteínas e ajudou a acelerar os processos envolvidos na cicatrização, promovendo a angiogênese precoce, isso levou a um aumento da superfície reepitelizada, com significativa atividade mitótica (BUENO et al., 2016).

Foram reportados o isolamento de diversos compostos químicos nas espécies pertencentes ao gênero *Cenostigma*. Em *C. macrophyllum* foi reportado o isolamento da bergenina (43) como composto químico principal da casca do caule. Nas folhas foram isolados ácido gálico (44), galato de metila (35), ácido elágico (45), quercetina (46), quercetina-3-O-β-D-glucopiranosídeo (47), quercetina-3-O-(6"-O-galoil)-β-D-glucopiranosídeo (telimosídeo) (48), quercetina-3-O-(6"-O-E-p-cumaroil)-β-D-glucopiranosídeo(helichrisosídeo) (49), vitexina (50) e agathisflavona (21) (ALVES et al., 2012). Ainda de *C. macrophyllum* dois compostos com potencial atividade inibitória da acetilcolinesterase foram isolados das folhas, os derivados peptídicos, *N*-benzoilfenilalaninoil-fenilalaninolacetato (acetato de aurentiamida) (51) e *N*-benzoilfenilalaninil-*N*-benzoilfenilalaninato (52) (ALVES et al., 2012).

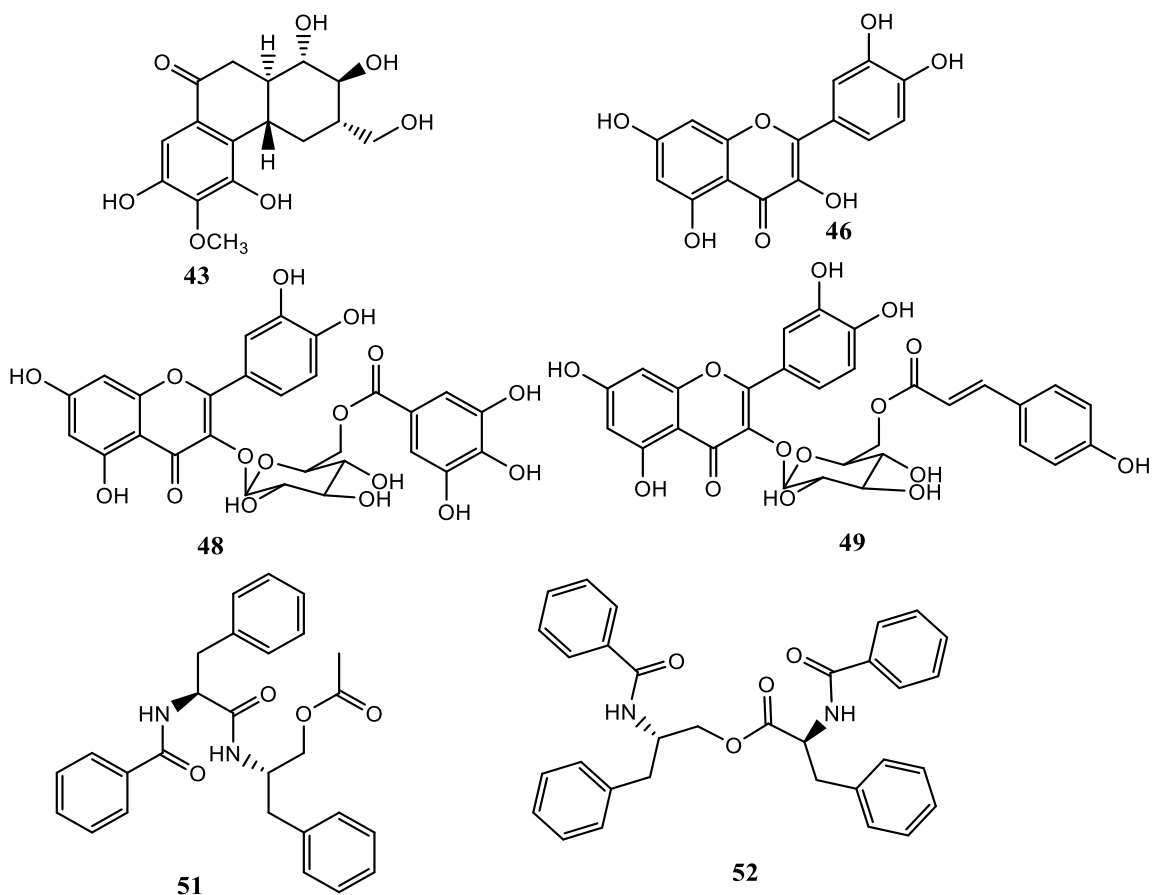


Figura 1.7 Estruturas das principais substâncias isoladas de *C. macrophullum*.

O fracionamento bioguiado do extrato da casca do caule levou ao isolamento e identificação de compostos citotóxicos em *C. pluviosum*. O extrato bruto de *C. pluviosum* foi preparado a partir das cascas do caule por maceração foi submetido a um estudo bioguiado que indicou que a bioatividade estava concentrada na fase em AcOEt, o fracionamento desse extrato e purificação das frações obtidas levou ao isolamento de um composto ainda não relatado na literatura nomeado caesalpinioflavona (**53**) (Figura 4) (ZANIN et al., 2015).

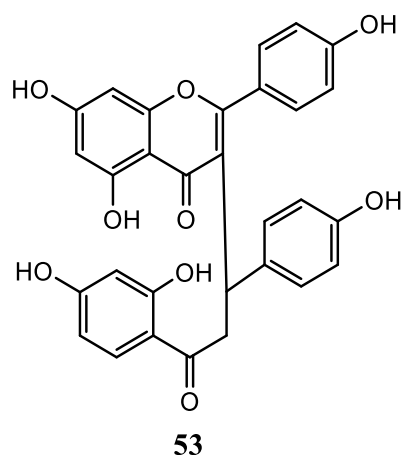


Figura 1.8 Estrutura da caesalpinioflavona isolada das folhas de *C. pluviosum*

1.3.5 *Clitoria*

O gênero *Clitoria* é formado por aproximadamente 60 espécies, nas quais 29 podem ser encontradas no Brasil, na maioria das vezes em regiões tropicais e subtropicais. É um gênero caracterizado como lenhoso com flores vistosas de cálice infundibular com bractéolas persistentes e ovários pedunculados com estilo geniculado e barbudo de cores diversas com formatos semelhantes ao clitóris (FANTZ, 1991; SANTOS, 2014). *Clitoria* é gênero economicamente importante, mas muitas espécies são conhecidas apenas localmente (FANTZ, 1991). *Clitoria fairchildiana* é nativa da região amazônica, porém é encontrada em áreas urbanas. É bastante utilizada em programas de reflorestamento (ALVES et al., 2013).

A avaliação do conteúdo de fenólicos e taninos totais de extratos das vagens e das sementes de *C. fairchildiana* indicou que essa espécie possui uma rica quantidade de antioxidantes naturais, nas continham alta concentração de fenólicos e apresentaram altas capacidades antioxidantes em comparação com os extratos de sementes (ANNEGOWDA et al., 2013). Além disso, as vagens também são aplicáveis como biossorbente para remoção de rodamina de efluentes de corantes sintéticos de águas residuais (DA SILVA et al., 2020).

Sementes de *C. fairchildiana* são refratárias à predação de insetos. A avaliação da atividade inseticida das sementes dessa espécie revelou que uma proteína solúvel em propanol atua como uma toxina de insetos por meio de sua capacidade de se ligar a estruturas de quitina presentes no intestino médio de insetos (BERTONCELI et al., 2022a).

A avaliação dos extratos brutos liofilizados e parcialmente purificados de pétalas de *Clitoria ternatea* demonstrou que ambos extratos demonstraram capacidade de absorção de radicais de oxigênio; inibição de cisão da fita de DNA; inibição da oxidação do colesterol LDL; atividade antioxidante intracelular contra espécies reativas de oxigênio. No entanto não apresentaram citotoxicidade frente contra as linhagens celulares A549, HCT8 e IMR90. Somente os extratos brutos apresentaram atividade antimicrobiana; efeito protetor contra hemólise de eritrócitos; inibição de α -amilase, α -glicosidase e enzimas conversoras de angiotensina-I (ACE-I); e inibição da peroxidação lipídica (ESCHER et al., 2020).

Clitoria mariana, comumente utilizada para o tratamento da diarreia (NGUYEN et al., 2020). *C. ternatea* produz um conjunto de peptídeos cíclicos de defesa de plantas chamados ciclotídeos, esses compostos são responsáveis pela atividade pesticida. Recentemente foi registrado um extrato de ervilha-borboleta, nome popular dessa espécie, como pesticida ecologicamente correto (Sero-X®) (OGUIS et al., 2020). Já *C. macrophylla* contém em sua composição química diversos rotenoides cujo o principal composto encontrado em maior quantidade é o que demonstra atividades antipiréticas e antiinflamatórias notáveis (PITAKPAWASUTTHI et al., 2019).

1.3.6 *Clitoria fairchildiana*

Clitoria fairchildiana (Howard) pertence à família Leguminosae, subfamília Faboideae (Papilionoideae) é uma espécie arbórea presente em áreas urbanas (Gondim, 2005). Também conhecida como faveira, sombreiro ou palheteira, *Clitoria fairchildiana* (Howard), sinonímia *Clitoria racemosa* Benth, é amplamente utilizada em arborização de áreas urbanas e cobertura de áreas degradadas, devido à sua copa larga, seu rápido crescimento e também devido a sua

capacidade de nodular e fixar nitrogênio atuando como adubo verde (ALVES et al., 2013). Apesar de ser uma leguminosa muito resistente a agentes externos e ambientais, e algumas espécies do gênero *Clitoria* serem encontradas na caatinga, não há relatos da presença de *Clitoria fairchildiana* nesse bioma.

Estudos químicos anteriores descrevem que a partir dos galhos foram isolados biochanina A (**54**), genisteína (**55**), prunetina (**4**) e narigenina (**56**) (Gomes, 2005), das folhas foram isolados β -sitosterol (**17**), estigmasterol (**18**), campesterol (**57**), lupeol (**34**), quercetina (**46**), isoquercitrina (**58**), astragalina (**59**), canferol 7-O-D-glicopiranosideo (**60**), quercetina 7-O-D-glicopiranosideo (**61**), nicotiflorina (**62**) e rutina (**1**) (GOMES et al., 2005).

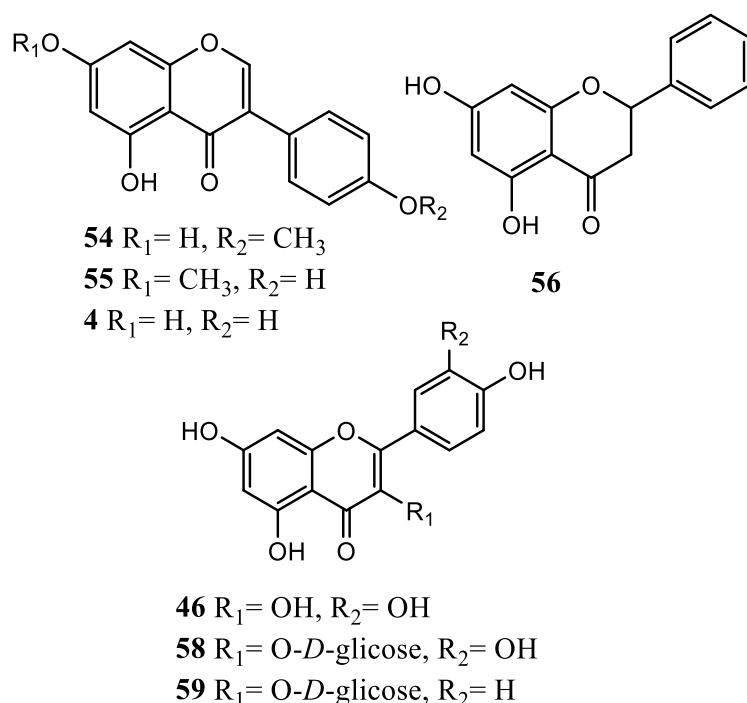


Figura 1.9 Estruturas das substâncias isoladas dos galhos de *C. fairchildiana*

Rotenoides são tetrahydrocromenos fundidos comumente encontrados no gênero *Clitoria* spp. (SANTOS; DAVID; DAVID, 2016), aplicados como pesticidas (MIYOSHI, 1998). Especialmente em *C. fairchildiana*. Relatos descrevem isolamento de flavonoides, especialmente rotenoides (Figura 1.3.6.2), tais como: clitoriactal (**63**), 6-desoxiclitoriactal (**64**), 9-demethylclitoriactal (**65**), 11-deoxiclitoriactal (**66**), stemonal (**67**), 6-desoxiclitoriactal-11-O- β -D-

glucopyranoside (**68**), clitoriactal 11-O- β -D-glucopyranoside (**69**) das raízes (DA SILVA; BERNARDO; PARENTE, 1998; MACHADO et al., 1998) além da stemonona (**70**) (SANTOS; DAVID; DAVID, 2016). Foram isolados 6-desoxiclitoriactal (**64**) e 11-deoxiclitoriactal (**66**) (Mathias et. al, 1998) e 6-hidroxi-2,3,9-trimetoxi-[1]-benzopirano[3,4- β][1]benzopiran-12(6H)-ona (**71**) (MATHIAS et al., 2005) das sementes.

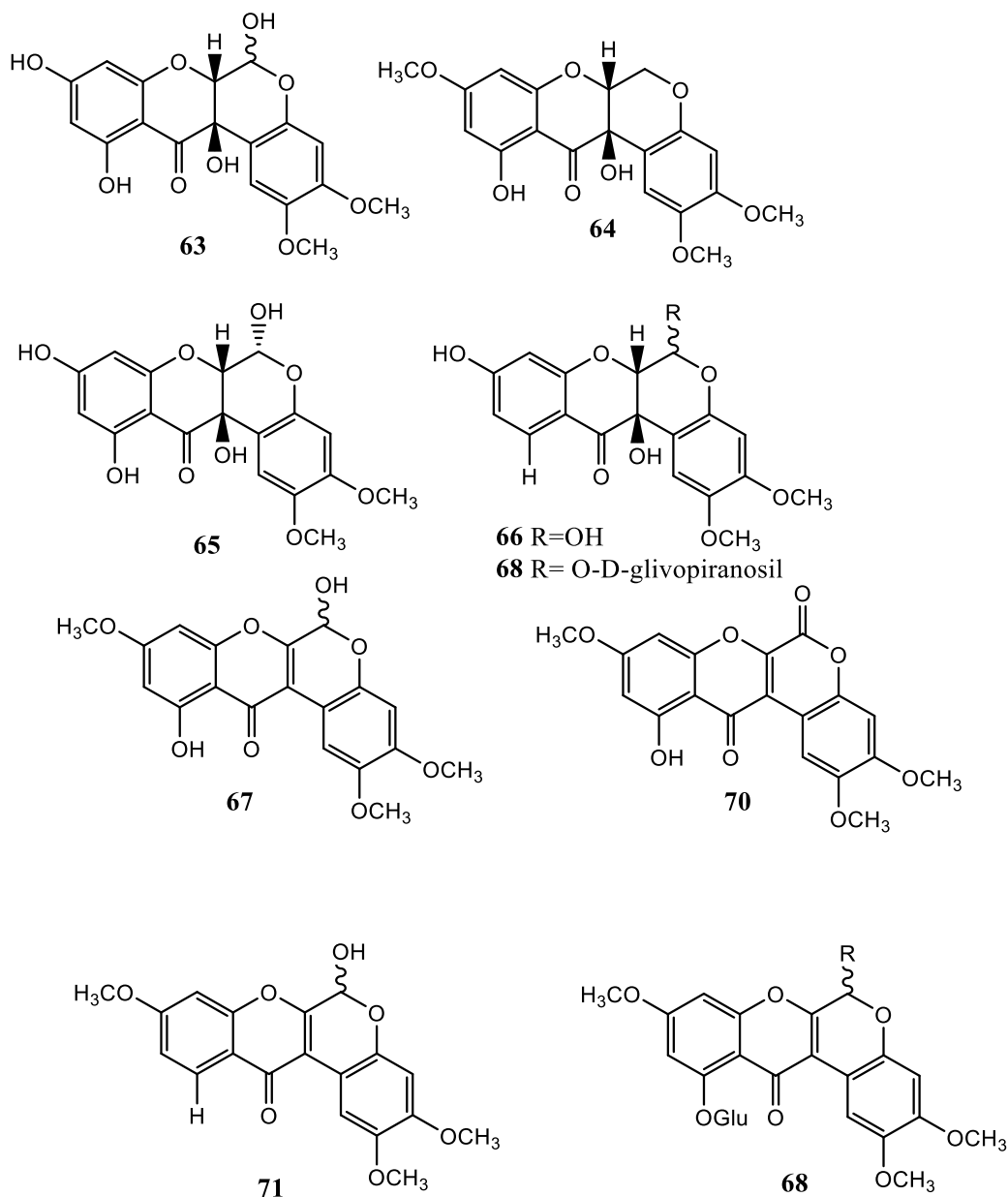


Figura 1.10 Estrutura dos rotenoides isolados de *C. fairchildiana*

A avaliação do perfil cromatográfico dos extratos metanólicos indica que existem rotenoides majoritários (o clitoriacetal e o 6-desoxiclitoriacetal) presentes nas diferentes partes da planta, raízes, galhos e sementes, cujo o maior conteúdo concentra-se nas raízes (SANTOS; DAVID; DAVID, 2016). Além disso, a avaliação das atividades antifúngicas dos rotenóides das sementes e raízes revelou que dentre os rotenoides testados, o clitoriacetal apresentou maior atividade e inibição de quatro leveduras *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kruzei* e *Candida parapsilosis*. Onde foi inferido que isso ocorreu devido a junção *cis* do anel B/C uma vez que stemonal (**67**) e stemonona (**70**) que não apresentam tal configuração apresentaram baixas atividades (SANTOS et al., 2018).

De forma similar na avaliação da atividade anti-inflamatória, o clitoriacetal (**63**) demonstrou atividade inibidora semelhante à droga padrão. Para essa atividade também foi atribuído que a junção *cis* do anel B/C desempenha papel importante já que o stemonal, que também foi avaliado, mostrou-se menos ativo. O 6-desoxiclitoriacetal (**64**), que possui um grupo metileno no anel B, apresentou atividade intermediária, já o 11-desoxiclitoriacetal (**66**) talvez devido a presença do grupo hidroxila fenólico em C-11 quelando a carbonila a atividade pode ter sido reduzida. Outra observação feita foi a de que a ausência de um grupo metoxila no anel A diminui a atividade, ao comparar o resultado para o 9-demetilclitoriacetal (**65**) (PEREIRA DA SILVA; PARENTE, 2002).

Dois rotenóides, o 11 α -O- β -D-glucopiranosilrotenóide (**72**) e o 6-desoxiclitoriacetal 11-O-n-glucopiranosídeo (**73**), foram isolados por meio do estudo bioguiado das sementes de *C. fairchildiana*. Ambos apresentaram toxicidade expressiva para o *Aedes aegypti*, levando a alterações do exoesqueleto, descolamento da cutícula e perfurações no tórax e abdome da larva (BERTONCELI et al., 2022b).

1.4 Considerações finais

Das quatro espécies estudadas nesse trabalho, somente duas delas apresentam dados relatados na literatura sobre composição química e bioatividade de compostos isolados, *Cenostigma pyramidale* e *Clitoria fairchildiana*.

Durante o período de doutorado, foi considerado oportuna a publicação de um artigo de revisão onde foi abordada a questão da reclassificação do grupo *Cesalpinia s.l.*, que gerou como consequência a migração de algumas espécies do gênero *Caesalpinia* para o gênero *Cenostigma*. Este trabalho aborda a reclassificação botânica de forma crítica já que não houve ponderações relacionadas a quimiosistemática.

É muito importante avaliar estratégias de obtenção de compostos bioativos, por isso ainda existem muitos trabalhos relacionados ao tema. Dentre as espécies escolhidas para este estudo, a única sem registros sobre composição química é a *Canavalia brasiliensis*. Os capítulos seguintes apresentam uma introdução e justificativas para cada uma das estratégias de estudo utilizadas, bem como os resultados de cada uma das investigações propostas para cada uma das espécies presentes nesse estudo.

Capítulo 2: Isolamento e identificação dos constituintes isolados de *C. fairchildiana* por diferentes rotas de obtenção para os componentes majoritários

Resumo

Em estudos anteriores, alguns metabólitos foram isolados e obtidos com rendimento expressivo dos extratos das raízes de *Clitoria fairchildiana*. Apesar da obtenção de quantidade em bons rendimentos, a maior parte dos relatos descrevem a obtenção desses compostos majoritários, clitoriacetal e 6-desoxiclitoriacetal, após pelo menos seis etapas cromatográficas. Este trabalho teve como objetivo fazer a reinvestigação fitoquímica das raízes dessa espécie de modo a propor diferentes rotas metodológicas para a obtenção dos componentes majoritários da espécie em bons rendimentos e com uma quantidade reduzida de etapas. No presente estudo, foi empregada uma metodologia, a partir dos extratos metanólicos e em diclorometano das raízes de *C. fairchildiana* que levou ao isolamento do 6-desoxiclitoriacetal, em apenas uma etapa cromatográfica com rendimento de 1% em relação ao material vegetal seco. Para isso, o material vegetal foi macerado com diclorometano e após remoção das graxas com hexano, o extrato em diclorometano da partição foi submetido a separação cromatográfica flash de média pressão que permitiu a obtenção do rotenoide mencionado e mais duas isoflavonas em apenas uma etapa cromatográfica. Uma série de isoflavonas foram isoladas e identificadas por da análise dos dados obtidos por meio de métodos espectrométricos, biochanina A, prunetina, formononetina e santal, bem como todas as outras substâncias obtidas. Além dessas substâncias conhecidas, ainda não relatadas nas raízes dessa espécie, um novo derivado de ácido benzoico e o par de epímeros do 6-desoxiclitoriacetal, que foram obtidos separadamente, sendo um deles ainda não relatado na literatura foram isolados e tiveram suas estruturas elucidadas.

2.1. Introdução

Neste capítulo estão descritos os objetivos, metodologia, resultados e discussão e considerações finais sobre o estudo fitoquímico e modificação estrutural dos principais compostos isolados de *C. fairchildiana*.

Conforme descrito no capítulo 1 deste trabalho, uma série de compostos químicos obtidos de diferentes partes dessa espécie foram relatados na literatura. Porém faz-se ainda necessário avaliar as melhores rotas de obtenção de componentes majoritários, tais como clitoriacetal e 6-desoxiclitoriacetal. Relatos de isolamento de tais compostos revelam que eles foram obtidos após no mínimo 6 etapas cromatográficas e em uma delas estava envolvida a separação por cromatografia em camada delgada preparativa (SANTOS, 2014).

Na literatura está relatada a obtenção da biochanina A, genisteína, prunetina e narigenina (Gomes, 2005). Outros flavonoides como quercetina, isoquercitrina, astragalina, canferol 7-O-D-glicopiranosídeo, quercetina 7-O-D-glicopiranosídeo, nicotiflorina e rutina foram observados apenas nas folhas (GOMES et al., 2005).

Já os rotenoides foram observados apenas nas raízes e sementes dessa espécie. O 6-deoxiclitoriacetal, foi relatado em ambas as partes, já o Clitoriacetal foi relatado apenas nas raízes. Bem como, 9-demethylclitoriacetal, 11-deoxiclitoriacetal, stemonal, 6-desoxiclitoriacetal-11-O- β -D-glucopyranosídeo, clitoriacetal 11-O- β -D-glucopyranosídeo nas raízes (DA SILVA; BERNARDO; PARENTE, 1998; MACHADO et al., 1998).

Este trabalho teve como objetivo fazer a reinvestigação fitoquímica das raízes dessa espécie de modo a propor diferentes rotas metodológicas para a obtenção dos componentes majoritários da espécie em bons rendimentos e com uma quantidade reduzida de etapas.

2.2. Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento químico das raízes de *C. fairchildiana* a partir do isolamento de seus constituintes, preparação de derivados e elucidação estrutural

2.2.2 Objetivos específicos

- Isolar componentes majoritários de *C. fairchildiana* com bons rendimentos empregando procedimentos simplificados;
- Preparar os extratos brutos em MeOH, em DCM e em clorofórmio das raízes de *C. fairchildiana*;
- Particionar os extratos obtidos;
- Fracionar por meio de métodos cromatográficos os extratos obtidos por partição;
- Realizar o isolamento, a purificação e a elucidação por métodos espectroscópicos e espectrométricos a estrutura química das substâncias puras, semi-puras ou em misturas obtidas no fracionamento das fases orgânicas existentes nos extratos.

2.3. Parte Experimental

2.3.1 Equipamentos e solventes utilizados

O material vegetal foi seco em estufa com circulação mecânica, modelo 320-SE e foi posteriormente moído utilizado moinho Thomas Wiley Laboratory Mill-Model4.

Os solventes acetona, hexano, MeOH, CHCl₃, AcOEt, DCM e BuOH empregados no preparo dos extratos, nos processos de partição, nas eluições cromatográficas em placa e em coluna foram de grau analítico das marcas Merck, Êxodo científica e Tedia. Nas análises por CLAE-EM e DAD foram empregados solventes (metanol e acetonitrila) grau HPLC, procedência Tedia Brazil e Baker.

Nas separações por cromatografia em coluna (CC) em bancada, os adsorventes utilizados como fase estacionária foram: gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm) da Aldrich. Sephadex LH-20 da Pharmacia ou Sigma para permeação e gel de sílica Flash com diâmetro de partícula entre 0,040-0,063 mm da Merck. Para evaporação dos solventes a pressão reduzida, foram utilizados os evaporadores rotatórios das marcas BUCHI modelo 461, e IKA LABORTECHNIK modelo HB4 basic.

Para a separação em coluna flash automatizada foi utilizado o cromatógrafo de média pressão, Isolera One da marca Biotage (mod. Isolara One System) usando colunas flash pré-empacotadas e um detector interno de comprimento de onda (200–400 nm).

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram feitas utilizando placas de alumínio pré-fabricadas 20x20 de gel de sílica fluorescente PF 254-366 60 F254 das marcas da Macherey-Nagel e Acros. As amostras submetidas às placas de CCD foram reveladas com luz na região do ultravioleta (254 e 365 nm) e reveladores químicos: reagentes de Liebermann-Burchard (uma solução 0,2% de ácido sulfúrico concentrado em anidrido acético), Cloreto de Alumínio (AlCl₃) e vapores de Iodo.

Os espectros na região do IV foram obtidos no equipamento IRAffinity-1 da Shimadzu, as leituras na região UV-vis foram feitas no espectrofotômetro de UV-vis Varian Cary 50, disponíveis no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia.

Os espectros de RMN e de massas foram obtidos da Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP) e também no Instituto de Química da UFG. Os espectros de RMN de ^1H foram registrados a 500 MHz e os espectros de RMN de ^{13}C a 125 MHz em um equipamento Bruker mod Avance III 500 (11,75T), os desvios químicos foram registrados em δ (ppm) do pico do solvente residual em relação ao TMS. As análises de massas foram realizadas no equipamento Amazon Speed ETD da Bruker, quando infusão direta.

2.3.2 Coleta do material e preparação dos extratos

Os extratos das raízes de *C. fairchildiana*, coletadas no campus universitário da UFBA no bairro Ondina, localizado na cidade de Salvador – Bahia, foram preparados por diferentes estratégias metodológicas. Inicialmente todo material coletado foi seco em estufas a 45 °C durante 72h, posteriormente o material foi triturado utilizando moinhos obtendo-se 2,0 kg de material vegetal. O material obtido foi condicionado em frascos apropriados e utilizados por partes para preparação dos extratos da forma descrita a seguir.

2.3.3. Obtenção dos extratos das raízes de *C. fairchildiana* e fracionamento

2.3.3.1 Obtenção do extrato em DCM

Foi obtido o extrato bruto em DCM, preparado por maceração durante o período de 48h, a partir de 600g de raiz seca e moída, que, após eliminação do solvente resultou em 3,36g de extrato bruto seco. A partir desse extrato, foram realizadas duas partições sucessivas utilizando-se 95:5 MeOH:H₂O/Hexano, onde a fase em hexano foi descartada e a fase hidrometanólica foi seca (0,96g) e posteriormente ressuspensa com MeOH:H₂O e particionada com DCM, levando a obtenção da fase solúvel em DCM (0,724g).

2.3.3.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração solúvel em DCM do extrato DCM das raízes de *C. fairchidiana*

Toda a massa desse extrato foi submetida a cromatografia flash automatizada, no equipamento de MPLC mod. Isolera (Biotage), usando um cartucho de coluna flash pré-embalado com sílica de fase normal de 100g, cuja fase móvel utilizada foi a mistura binária em gradiente de Hexano/AcOEt num fluxo de 12mL/min. Nessa etapa foram obtidas 14 frações (Tabela 2.1), diferenciadas pelo registro de pelo no detector de comprimento de onda (Figura 2.1) em modo de coleta manual. Onde as frações CFIF1, CFBF5 e CFBF9 foram enviadas para análise de RMN. O tratamento desse extrato está resumido no esquema da figura 2.2.

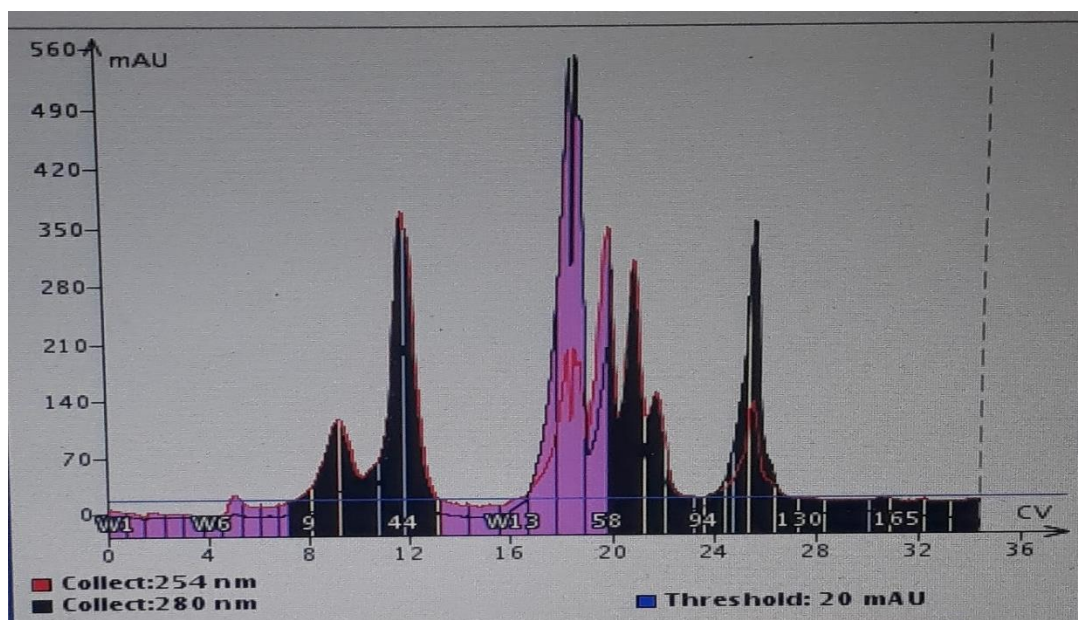


Figura 2.1 Captura de tela do resultado da separação cromatográfica do extrato em DCM registrado pelo MPLC - Isolera.

Tabela 2.1: Frações obtidas da coluna do extrato em DCM submetido a cromatografia *flash* automatizada no MPLC: cartucho de 100g, fase móvel hexano:acetato, fluxo de 12mL/min.

Código	Massa obtida	Sistema Hexano: acetato	Volume (mL)
CFDI1	116,2	8:2	300
CFDI2	7,2	8:2	200
CFDI3	7,4	8:2	200
CFDI4	10,9	8:2	200
CFDI5	22,5	8:2	200
CFDI6	21,1	8:2	150
CFDI7	27,8	8:2	130
CFDI8	1,4*	8:2	100
CFDI9	16,1	8:2	150
CFDI10	6,0	8:2	100
CFDI11	1,7	8:2	100
CFDI12	98,9	7:3	250
CFDI13	3,1	7:3	50
CFDI14	15,4	7:3	200
CFDI15	11,9	6:4	100
CFDI16	5,9	1:1	100
CFDI17	0,8	acetato	200

O esquema a seguir resume o tratamento do extrato bruto em DCM e fracionamento até a obtenção das frações purificadas.

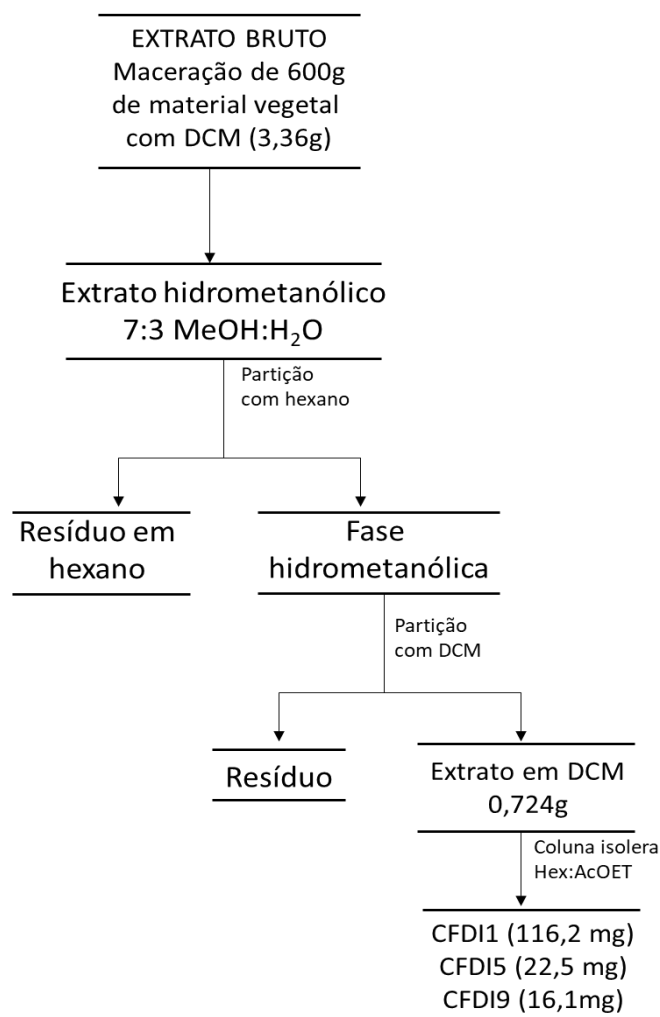


Figura 2.2 Esquema de tratamento do extrato bruto em DCM

2.3.3.2 Obtenção dos extratos em MeOH, EBMA e EBMB.

A partir da maceração de 200 g das raízes secas de *C. fairchildiana* com MeOH foi obtido um extrato MeOH de 15,04 g (EBMA). O extrato MeOH bruto seco (EBMA), foi ressuspensionado em MeOH:H₂O 7:3 e particionado com DCM (5x 200 mL), após a remoção de todo DCM foi pesado, obtendo-se 3,46 g de extrato em DCM-A.

Foram obtidas 7,77 g de extrato MeOH bruto seco (EBMB) por maceração com metanol de 100 g de material vegetal durante 48 h a temperatura ambiente. Esse extrato foi particionado com 5x de 100 mL com DCM ao ser ressuspensionado

em uma mistura de MeOH:H₂O 7:3 que resultou na obtenção do extrato em DCM-B de 1,60 g.

Os extratos em DCM obtidos por meio de cada uma das macerações foram fracionados e levaram a obtenção de frações puras.

2.3.3.2.1 Fracionamento da fração solúvel DCM-A

Foram separadas 2,4 g da fração solúvel DCM-A que foi submetida a separação cromatográfica flash automatizada em coluna de fase normal em equipamento MPLC (Isolera), utilizando como fase móvel DCM:MeOH em gradiente crescente de polaridade a fim de se obter frações purificadas (Tabela 2.2). Foi utilizado um cartucho de coluna flash embalado com sílica de fase normal de 100g, cuja fase móvel utilizada foi a mistura binária em gradiente de DCM/MeOH num fluxo de 12mL/min.

Dessa primeira separação foram obtidas 13 frações em modo de coleta manual, cujos detalhes estão descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 Frações obtidas a partir do fracionamento de DCM-A

Código	Frações reunidas	Sistema	Massa obtida
CFEBMPD1	1-2	DCM	8
CFEBMPD2	3	DCM	40,1
CFEBMPD3	5-6	DCM	380,2
CFEBMPD4	7-8	95:5	646,9
CFEBMPD5	9	9:1	14,5
CFEBMPD6	10	9:1	37,4
CFEBMPD7	11	9:1	254,9
CFEBMPD8	12	8:2	97,7
CFEBMPD9	13	8:2	62,3
CFEBMPD10	14	6:4	92,6
CFEBMPD11	15	1:1	26,2
CFEBMPD12	16	1:1	75,5
CFEBMPD13	17-19	3:7	123,1

A fração CFEBMPD2 foi submetida a análise de RMN enquanto que as frações CFEBMPD3 (380,2 g) e CFEBMPD4 (645 g) foram, separadamente, submetidas a uma nova separação em coluna.

A fração CFEBMPD3 foi submetida a separação cromatográfica flash automatizada em coluna de fase normal no Isolera, utilizando como fase móvel Hexano:AcOEt em gradiente crescente de polaridade num cartucho de coluna flash embalado com sílica de fase normal de 50g. As frações obtidas a partir dessa separação cromatográfica estão descritas na tabela 2.3.

Tabela 2.3 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração CFEBMPD3

Código	Frações reunidas	Sistema	Massa obtida (mg)
BMF3A1	1-12	Hexano	23,4
BMF3A2	13-16	9:1	19,5
BMF3A3	17-37	9:1	49,4
BMF3A4	38-52	9:1	6,3
BMF3A5	53-86	9:1	49,7
BMF3A6	87-90	8:2	4,3
BMF3A7	91-139	8:2	177,6
BMF3A8	140-174	6;4	119

As frações obtidas codificadas como BMF3A5 e BMF3A8 foram submetidas separadamente a separação cromatográfica em coluna CC utilizando sistema isocrático. Da fração BMF3A5 foram obtidas 4 frações, a partir da separação cromatográfica em coluna de fase normal na qual a fase móvel utilizada foi um sistema isocrático de CHCl₃:AcOEt 9:1, cujas massas das frações obtidas estão descritas na Tabela 2.4. Dessa separação em CC a fração BMF3A51 foi submetida a análise de RMN.

Tabela 2.4 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração BMF3A5

Código	Frações reunidas	Massa obtida (mg)
BMF3A51	1-2	4,7
BMF3A52	3-5	3,2
BMF3A53	6	1,6
BMF3A54	7	11,4

Assim como a fração anterior, a fração BMF3A8 foi submetida a uma coluna CC feita em sistema isocrático CHCl_3 :AcOEt 9:1 onde foram obtidas 4 frações e a fração BMF3A82 foi submetida a análise de RMN (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração BMF3A8

Código	Frações reunidas	Massa obtida (mg)
BMF3A81	1-2	3,9
BMF3A82	3	17,2
BMF3A83	4-5	4,8
BMF3A84	4-8	5

Conforme mencionado anteriormente, a fração CFEBMPD4 (646,9 mg) também foi submetida a separação cromatográfica flash automatizada em coluna de fase normal no Isolera, num cartucho de coluna flash embalado com sílica de fase normal de 50g utilizando como fase móvel Hexano:AcOEt em gradiente crescente de polaridade. As frações obtidas a partir dessa separação cromatográfica estão descritas na tabela 2.6. A fração BMF5A3 apresentou R_f idêntico ao da fração CFDI5, a fração BMF5A8 foi submetida a análise de RMN e as frações BMF5A1 e BMF5A4 foram submetidas a mais uma separação cromatográfica.

Tabela 2.6 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração CFEBMPD4

Código	Frações reunidas	Sistema	Massa obtida (mg)
BMF5A1	1-52	Hexano	168,2
BMF5A2	53-59	95:5	17,1
BMF5A3	60-72	9:1	6,8
BMF5A4	73-76	9:1	160,1
BMF5A5	77-155	9:1	24,5
BMF5A6	156-168	9:1	208,2
BMF5A7	169-200	8:2	22,0
BMF5A8	100mL	7:3	35,2
BMF5A9	250mL	1:1	43,9

A Fração BMF5A1 foi submetida a separação cromatográfica em uma coluna CC feita em sistema isocrático CHCl_3 :AcOEt em 9:1, onde foram recolhidas 8 frações e a fração CF5A12 foi submetida a análise de RMN. A fração BMF5A4 foi identificada como similar a CFDI1 por cromatografia em camada delgada. A fração BMF5A3 foi também identificada como similar a fração CFDI5 (tabela 2.7).

Tabela 2.7 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração BMF5A1

Código	Frações reunidas	Massa obtida (mg)
CF5A11	1	7,7
CF5A12	2	30,3
CF5A13	3	1,9
CF5A14	4	1,1
CF5A15	5-6	14,2
CF5A16	7-8	20,3

A Fração BMF5A4 foi submetida a separação cromatográfica em uma coluna CC feita em sistema isocrático CHCl_3 :AcOEt em 9:1, onde foram

recolhidas 5 frações e as frações BMF5A22 e BMF5A23 foram submetidas a análise de RMN, sendo esta última igual a fração BMF3A82 (tabela 2.8).

Tabela 2.8 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração BMF5A4

Código	Frações reunidas	Massa obtida (mg)
BMF5A21	1	7,0
BMF5A22	2-4	14,4
BMF5A23	5-8	21
BMF5A24	4	56
BMF5A25	5-6	26,1

O esquema da figura 2.3 ilustra a sequência de procedimentos para a obtenção das frações purificadas a partir desse primeiro extrato bruto obtido por meio da maceração do material vegetal com metanol que foram submetidas a análise de RMN. O extrato bruto em metanol EBM-A levou ao isolamento de algumas estruturas conforme resumido no esquema a seguir.

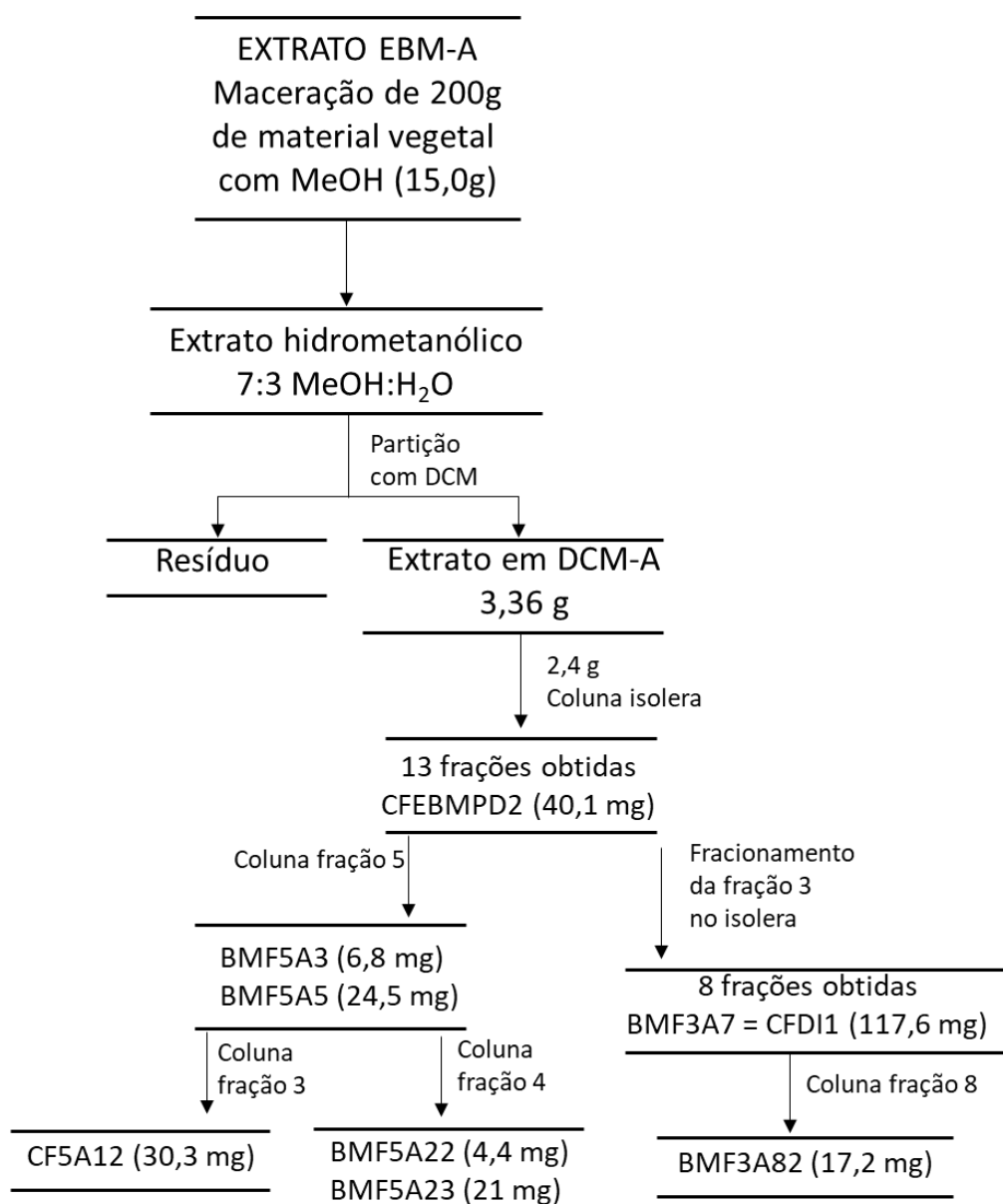


Figura 2.3 Esquema de tratamento do extrato bruto em metanol EBM-A

2.3.3.2.2 Fracionamento da fração solúvel em DCM-B

A fase solúvel em DCM-B do extrato MeOH, (1,60g), foi submetida a cromatografia flash automatizada, usando um cartucho de coluna flash com sílica de fase normal de 100g, cuja fase móvel utilizada foi a mistura binária em gradiente de DCM/MeOH num fluxo de 15mL/min. Nessa etapa foram obtidas 15 frações (Tabela 2.9), diferenciadas pelo registro de pelo no detector de comprimento de onda em modo de coleta manual. Dentre as frações obtidas, a análise por CCD comparativa resultou no agrupamento de algumas delas levando a obtenção de 9 frações distintas. Dentre as frações obtidas, as frações CFIC1_2 e CFIC1_3 foram submetidas a uma nova separação cromatográfica.

Tabela 2.9 Frações obtidas da coluna do extrato em DCM-B

Código	Frações reunidas	Sistema	Volume	Massa obtida (mg)
CFIC1_1	1	DCM	300	42,2
CFIC1_2	2-3	DCM	470	268,1
CFIC1_3	4	DCM	300	192,1
CFIC1_4	5-6	9:1	450	32
CFIC1_5	7-9	8:2	900	800
CFIC1_6	10-12	8:2	700	102,8
CFIC1_7	13	7:3	200	100,2
CFIC1_8	14	6:4	100	30,6
CFIC1_9	15	6:4	100	7,2

A fração CFIC1_2 foi submetida a cromatografia flash automatizada, usando um cartucho de coluna flash com sílica de fase normal de 50g, cuja fase móvel utilizada foi a mistura binária em gradiente de Hexano/AcOEt em um sistema gradiente num fluxo de 10mL/min (tabela 2.10). A fração F23I4 apresentou-se similar a fração CFDI9 e foi submetida a análise de RMN. A fração CFIC1_1 foi identificada como similar a CFDI1 por cromatografia em camada delgada.

Tabela 2.10 Frações obtidas da separação cromatográfica da fração CFIC1_2

Código	Frações reunidas	Sistema	Volume	Massa obtida (mg)
F2-3I1	1-4	DCM	60	4,1
F2-3I2	5-6	DCM	30	8,2
F2-3I3	7	DCM	15	8,5
F2-3I4	8-9	DCM	30	52
F2-3I5	10-16	99:1/95:5	90	4,7
F2-3I6	17-22	6:4/ 1:1	90	12,0

Coluna das frações F2-3I1 a F2-3I4 reunidas feita em bancada em sistema gradiente de CHCl_3 :AcOEt. As frações obtidas e reunidas estão descritas na tabela 2.11

Tabela 2.11 Frações obtidas da separação cromatográfica das frações F2-3I1 a F2-3I4 reunidas

Código	Frações reunidas	Sistema	Volume	Massa obtida (mg)
CFC4F31	1-2	CHCl_3	140	16,6
CFC4F32	3	CHCl_3	100	14,5
CFC4F33	4	CHCl_3	130	18
CFC4F34	5-7	9:1	100	37,1
CFC4F35	8-10	9:1	70	35,7
CFC4F36	11-12	8:2	210	22,4
CFC4F37	13	100%	70	5,7

O extrato bruto em MeOH levou ao isolamento de algumas estruturas conforme resumido no esquema da figura 2.4.

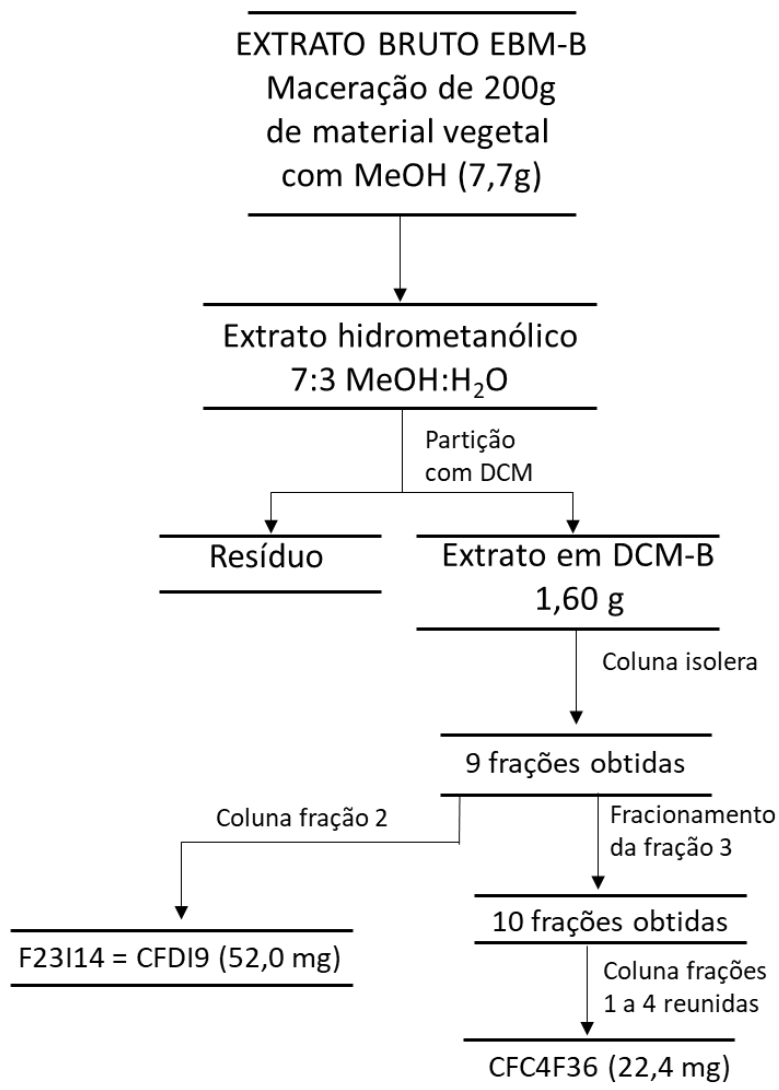


Figura 2.4 Esquema de tratamento do extrato bruto em metanol EBM-B

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Identificação estrutural dos compostos isolados

Conforme descrito na metodologia, três extratos brutos foram obtidos e particionados de modo a separar os compostos por polaridade. Os compostos de interesse desse trabalho foram, em sua maioria, isolados do extrato em DCM obtido a partir da partição do extrato bruto metanólico (SANTOS, 2014). Duas diferentes formas de obtenção desse extrato foram empregadas, a partir do extrato bruto obtido diretamente com DCM e posterior partição para obtenção do novo extrato em DCM e também de forma similar ao da literatura a partir do extrato bruto em metanol, porém utilizando cromatografia flash automatizada.

Na literatura o isolamento do 6-desoxiclitoriacetal envolveu 7 etapas cromatográficas em coluna de fase normal utilizando como eluente um gradiente de mistura binária de clorofórmio e metanol. Neste trabalho, tanto em cromatografia de média pressão quanto em coluna CC essa substância foi obtida em apenas uma etapa em bons rendimentos.

A obtenção do 6-desoclitoriacetal via extrato bruto em DCM e posterior purificação em cromatografia automatizada foi uma forma rápida de obtenção, porém não levou ao melhor rendimento, pois a massa de material vegetal utilizada foi de 600g e foram obtidas somente 116,2 mg dessa substância.

A identificação estrutural dos compostos isolados foi feita realizada por meio da análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e Espectrometria de Massas.

2.4.1.1 Identificação do 6-desoxiclitoriacetal (CFDI1)

A substância CFIF1 foi identificada a partir da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . O espectro RMN de ^1H indicou a presença um padrão de sinais que sugerem a presença de dois grupos aromáticos (Figura 2.5). Os dubletos integrando para 1 H registrados em δ 5,96 ($J = 2,3\text{Hz}$) e 6,04 ($J = 2,3\text{ Hz}$) indicam a presença de hidrogênios aromáticos que acoplam entre si numa relação *meta*, devido ao valor da constante de acoplamento. O deslocamento observado é indicativo de hidrogênios característicos de anel A de flavonoides. Os outros dois sinais de hidrogênio em δ 6,49 (s,1H) e 6,69 (s,1H) em região de hidrogênios aromáticos não apresentam desdobramentos e estão numa região característica de anel B de flavonoides.

A presença de um sinal desblindado em δ 11,5 (s,1H) sugere ligação de hidrogênio intramolecular, assim o anel aromático vizinho a carbonila apresenta um grupo hidroxila na posição 5. Os sinais em δ 3,81 (s,3H), 3,76 (s,3H) e 3,74 (s,3H), na região de hidrogênios metoxílicos, corrobora com natureza flavanoídica da substância. Adicionalmente, a presença dos sinais de hidrogênios alifáticos em regiões de maior desproteção sugere a formação de mais um anel na estrutura, comum em rotenoides já isolados nessa espécie. Assim a presença dos sinais em δ 4,67 (*dd*, 1H, $J = 12,0$ e $2,5\text{ Hz}$), 4,54 (*dd*, 1H, $J = 2,5$ e $0,9\text{ Hz}$), 4,45 (*dd*, 1H, $J = 12,0$ e $0,9\text{ Hz}$) característicos de hidrogênios diasterotópicos, devido a alternância de acoplamento e multiplicidade de sinais apresentados, indicam a formação de mais um ciclo na estrutura (Figura 2.6).

Rotenoides apresentam um quarto anel em sua estrutura e todas as características apresentadas sugerem que foi isolada uma estrutura desse tipo. Adicionalmente o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.8) também apresentou sinais que corroboravam com as informações obtidas pelos dados do espectro de RMN de ^1H .

Assim, o comparativo com dados da literatura (SANTOS; DAVID; DAVID, 2016; SANTOS et al., 2018) levou a confirmar essa estrutura como o rotenoide 6-desoxiclitoriacetal (1) (Figura 2.7), já isolado anteriormente nas raízes dessa espécie. Todos os sinais atribuídos foram enumerados bem como os dados comparativos a literatura estão descritos nas Tabelas 2.13 e 2.14.

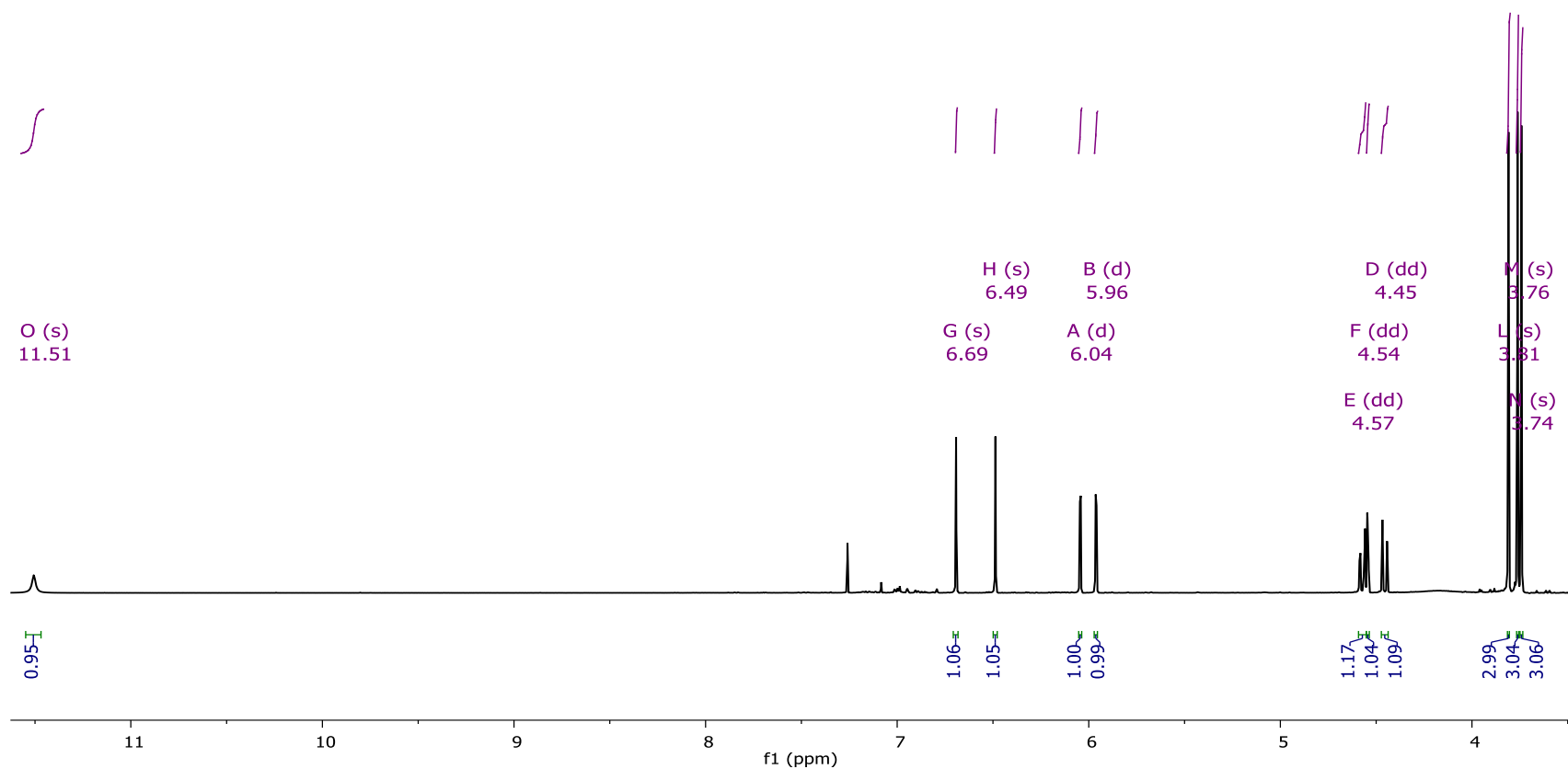


Figura 2.5 Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos ao 6-desoxyclitoriacetal obtido da fração CFD11 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

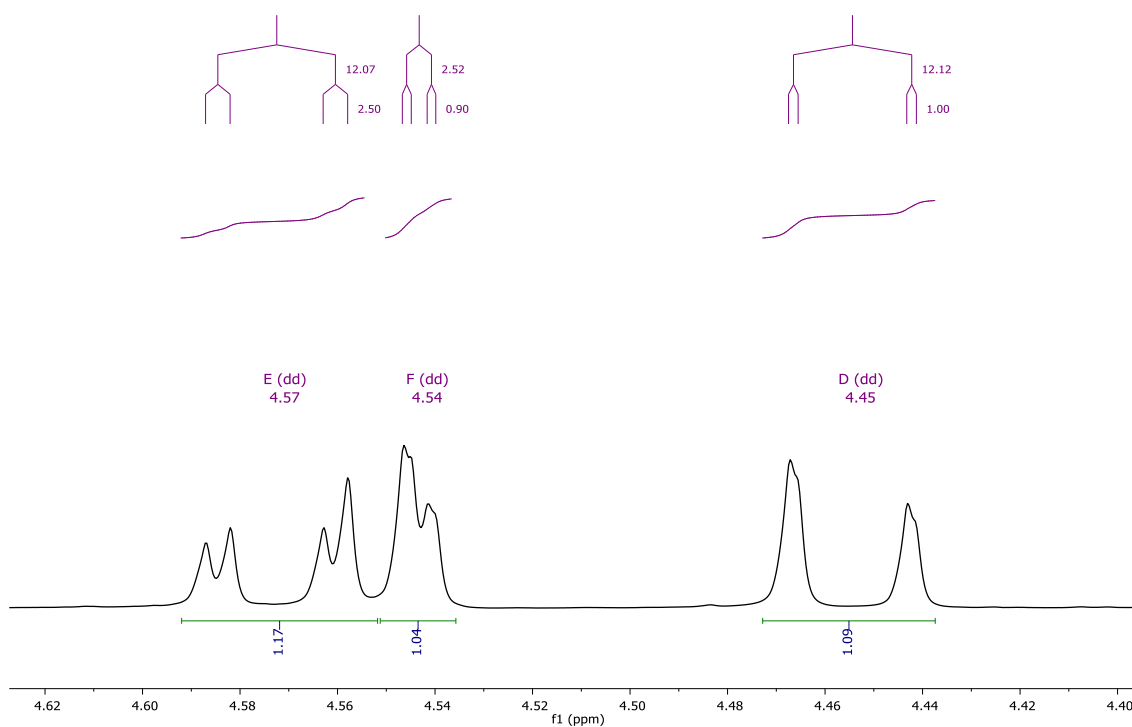


Figura 2.6 Região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a hidrogênios alifáticos ao 6-desoxyclitoriacetal obtido da fração CFDI1 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

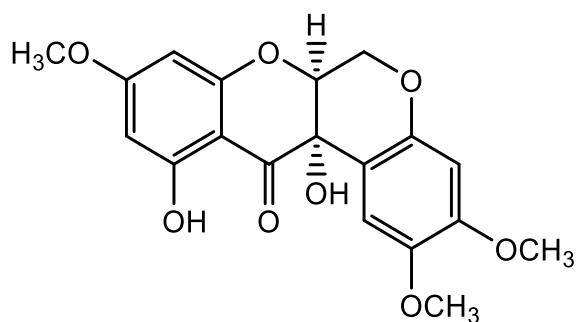


Figura 2.7 Estrutura do (6aS*,12aS*)-6-desoxyclitoriacetal obtido da fração CFDI1 (1)

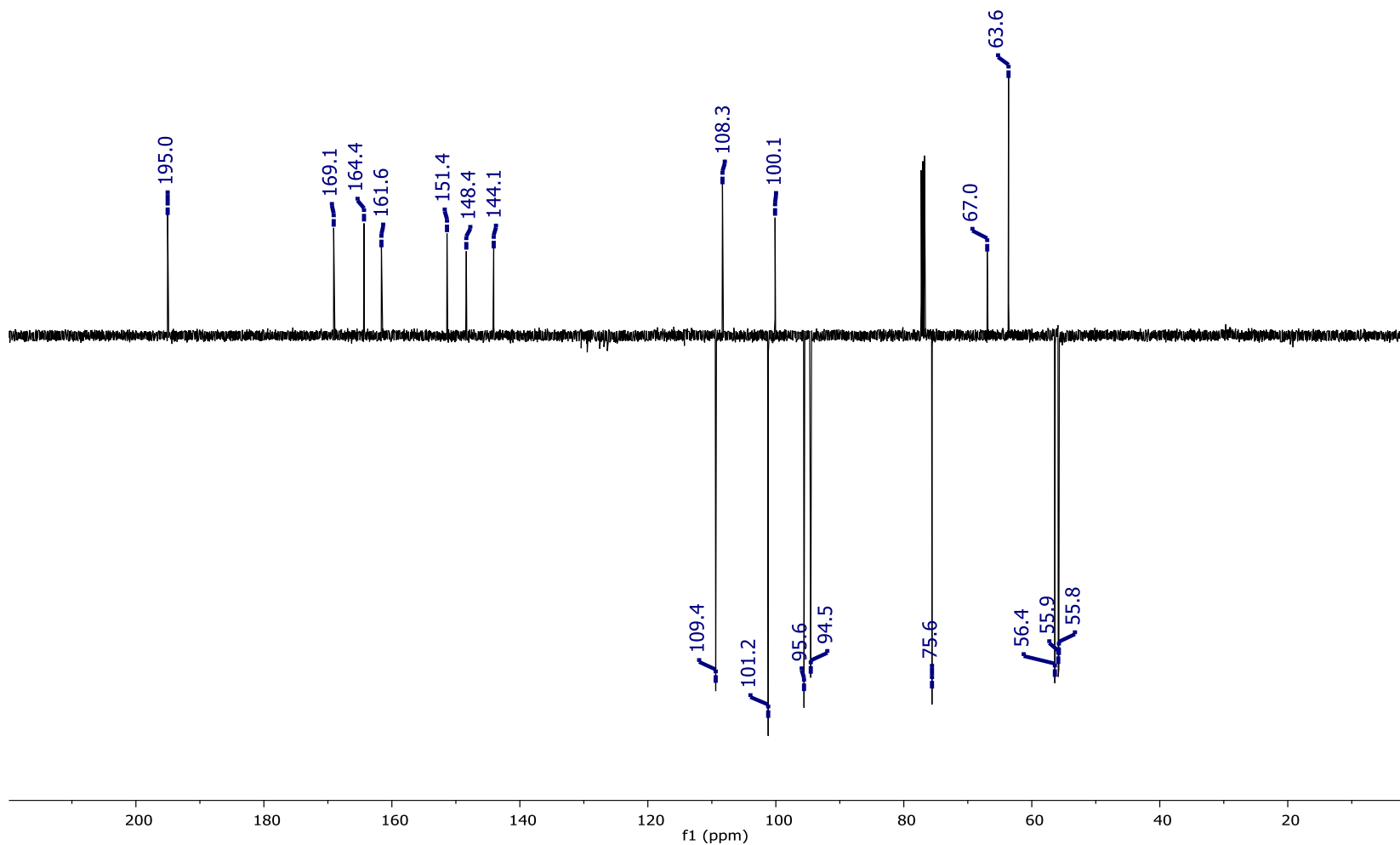


Figura 2.8 Região do espectro APT de ^{13}C contendo todos os sinais de carbonos atribuídos a estrutura do 6-desoxiclitoriactal obtido da fração CFDI1 [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

2.4.1.2 Elucidação estrutural do (6aR*,12aS*)-6-desoxiclitoriacetal obtido da fração BMF3A82

A substância BMF3A82 foi identificada a partir da análise de RMN de ^1H e de ^{13}C e comparação com dados da literatura. O espectro em RMN de ^1H (Fig. 2.11) revelou um padrão de sinais muito similar ao da substância identificada na fração CFDI1. No entanto, além de se diferenciar no R_f , o sinal registrado em δ 4,12 (s, 1H) sugeriu não havia correspondência entre as estruturas delas, apesar do padrão idêntico dos demais sinais.

Os dubletos em δ 6,00 (1H, 2,2 Hz, H-8) e 6,08 (1H, 2,2 Hz, H-10), que integram para 1 hidrogênio cada, estão numa região aromática onde indicam a presença de hidrogênios acoplados em *meta*, devido ao valor da constante de acoplamento e que eles estão em um anel aromático característico de anel A de flavonoides, devido ao deslocamento observado. Os outros dois sinais de hidrogênio em δ 6,52 (s) e 6,71 (s), em região de hidrogênios aromáticos não apresentam desdobramentos, o que sugere que eles estão em uma relação *para* entre eles em um anel aromático também substituído em quatro posições.

A presença de um sinal desblindado em δ 11,5 (s,1H) sugere a presença de ligação de hidrogênio intramolecular na estrutura, o que leva a sugestão de que um dos anéis aromáticos está vizinho a uma carbonila que permite tal interação. Os sinais em δ 3,80 (s,3H), 3,78 (s,3H) e 3,84 (s,3H), na região de hidrogênios metoxilicos ligados a anel aromático, corroboram com os dados que indicam a natureza flavonídica do composto.

A presença de sinais de hidrogênios alifáticos em regiões de maior desproteção 4,61 (*dd*, 1H, $J= 12,0$ e $2,5$ Hz), 4,58 (*dd*, 1H, $J= 2,5$ e $0,9$ Hz), 4,48 (*dd*, 1H, $J= 12,1$ e $1,0$ Hz), sugerem a formação de mais um anel na estrutura, comum em rotenoides já isolados nessa espécie. Essa estrutura é muito similar à do 6-desoxiclitoriacetal já isolado na espécie e também descrito neste trabalho. Porém vale destacar a presença do sinal em 4,12 (s, 1H), atribuído a o hidrogênio da hidroxila ligado ao carbono 12a diferencia esses dois rotenoides.

Também foi obtido o espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 2.13), cujos sinais corroboraram com a estrutura proposta e os dados apresentam grande similaridade com os do composto CFDFI e com os dados descritos na literatura.

Na tabela 2.12 estão descritos os sinais que apresentam maior diferenciação em deslocamento em cada um dos espectros. É possível observar que tal diferenciação ocorreu entre os hidrogênios ligados aos carbonos assimétricos da estrutura e os hidrogênios diasterotópicos, sendo mantido o deslocamento observado para os carbonos.

A diferenciação mais evidente foi para o hidrogênio ligado ao carbono 6 que provavelmente deve estar localizado em posição axial e conseqüentemente localizado mais próximo a hidroxila ligada ao carbono 12a.

Tabela 2.12 Principais dados de RMN de ^1H e de ^{13}C [500 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)] que evidenciam a diferenciação das estruturas

	CFDI1		BMF3A82	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
6	63,6	4,67 (<i>dd</i> , 1H, J= 12,0 e 2,5 Hz), 4,45 (<i>dd</i> , 1H, J= 12,1 e 1,0 Hz)	63,7	4,61 (<i>dd</i> , 1H, J= 12,0 e 2,5 Hz), 4,58 (<i>dd</i> , J= 2,5 e 0,9 Hz)
6a	75,6	4,54 (<i>dd</i> , 1H, J= 2,5 e 0,9 Hz)	75,6	4,48 (<i>dd</i> , J= 12,1 e 1,0 Hz)
12a	67,0	-	66,9	4,12 (s)
11-OH	100,1	11,5	100,1	11,5

De modo complementar foi obtido o espectro de HRESIMS dessa substância (Fig. 2.14 e 2.15) onde foi possível determinar a estrutura e a massa exata, cujo íon molecular que foi registrado em modo positivo em m/z 357,0966 permitiu determinar a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_7$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (calculado para 357,0973), que quando comparada com a fórmula molecular da estrutura identificada por meio da análise dos espectros de RMN de diferenciação pela perda de H_2O e formação de ligação dupla (Fig. 2.9).

O íon registrado em m/z 397,0887 permitiu determinar a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calculado para [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 397,0899). Na ampliação do espectro de HRESIMS é possível observar o íon de abundância relativa baixa em m/z 375 que corresponde a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (calculado para 375,10797). Essa FM apresenta índice de deficiência de hidrogênio (IDH)

igual a 11, cujo valor ratifica a presença de dois núcleos aromáticos, a presença de uma ligação dupla (correspondente a carbonila) e dois ciclos saturados.

Sendo a estrutura em questão de mesma fórmula molecular e padrão de RMN similar do 6-desoxiacilitoriacetal previamente isolado na espécie, foi sugerido que o que poderia gerar a diferenciação entre as duas estruturas, seria a posição da hidroxila que permitiria o registro do sinal em δ 4,12.

A presença do sinal em δ 4,12 identificado no espectro de ¹H dessa estrutura, acrescido da facilidade de perda de água, evidenciada pelo íon molecular no espectro de HRESIMS são indícios de que a hidroxila alifática e o hidrogênio vicinal nas posições 12a e 6a respectivamente, podem estar em lados opostos na estrutura. Desde o seu primeiro relato (LIN et al., 1992), é descrito na literatura que apenas o (6a*R*,12a*R*)-11,12a-dihidroxi-2,3,9-trimetoxirotenóide (6-desoxiclitoriacetal) foi isolado, não sendo registrado sinal atribuído ao hidrogênio da hidroxila em 12a. Sugerir que a OH-12a e o H-6a estão para lados opostos indica a possível obtenção de um dos dois enantiômeros (6a*R*,12a*S*) ou (6a*S*,12a*R*) possíveis para essa substância (Figura 2.10).

Diante dessa sugestão, foram obtidos os espectros na região UV-Vis para ambos (Figuras 2.16 e 2.17) os compostos isolados e o espectro de NOESY para a estrutura em questão, a fim de identificar correlações entre hidrogênios que pudessem evidenciar interações entre os hidrogênios que estão espacialmente próximos (Figuras 2.18, 2.19 e 2.20).

Na figura 2.16 está o registro do espectro UV-VIS obtido para o (6a*S*,12a*S*)-6-desoxiclitoriacetal (**1**) (CFDIF1) e na figura 2.17, está o do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriacetal (**2**). Nota-se que os espectros têm padrões de absorção distintos entre si, sendo os máximos de absorbância registrados para substância CFDI1 em 200,6 nm e 295 nm, enquanto que para a BMF3A82 um dos máximos foram registrados somente em região de menor energia, em 325 e 295 nm.

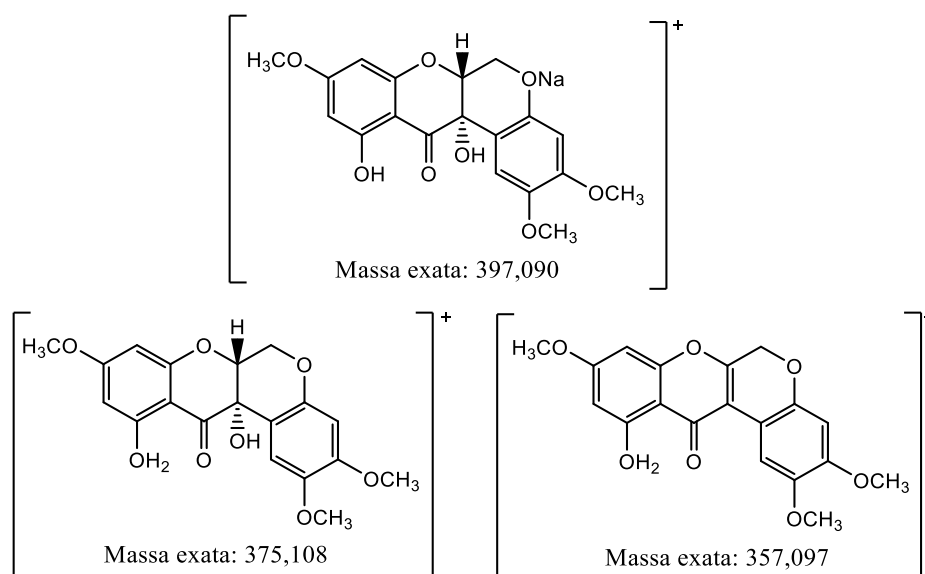


Figura 2.9 Principais fragmentos obtidos a partir das informações do espectro de HRESIMS do (6aR*,12aS*)-6-desoxyclitoriacetal obtido da fração BMF3A82

Na literatura, a rotação ótica do 6-desoxyclitoriacetal foi registrada em $[\alpha]^{24}_D +219.9$ (c 1.0, CHCl₃), e comparado ao registrado para essa mesma estrutura isolada da *Stemona collinsae* Craib $[\alpha]_D +233$ (c 0.1,CHCl₃) (KHORPHUENG et al., 2006). Para estrutura em questão foi registrado $[\alpha]^{24}_D +127,5$ (c 1.0, CHCl₃). Esse composto também foi obtido na fração BMF5A23.

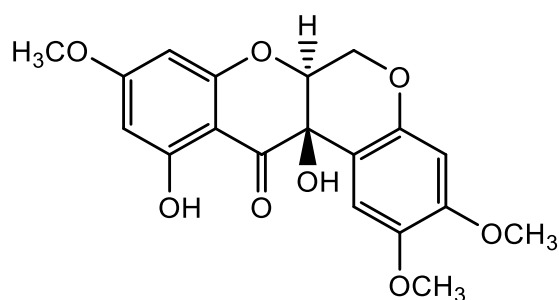


Figura 2.10 Estrutura do (6aR*,12aS*)-6-desoxyclitoriacetal do (6aR*,12aS*)-6-desoxyclitoriacetal obtido da fração BMF3A82 (**2**)

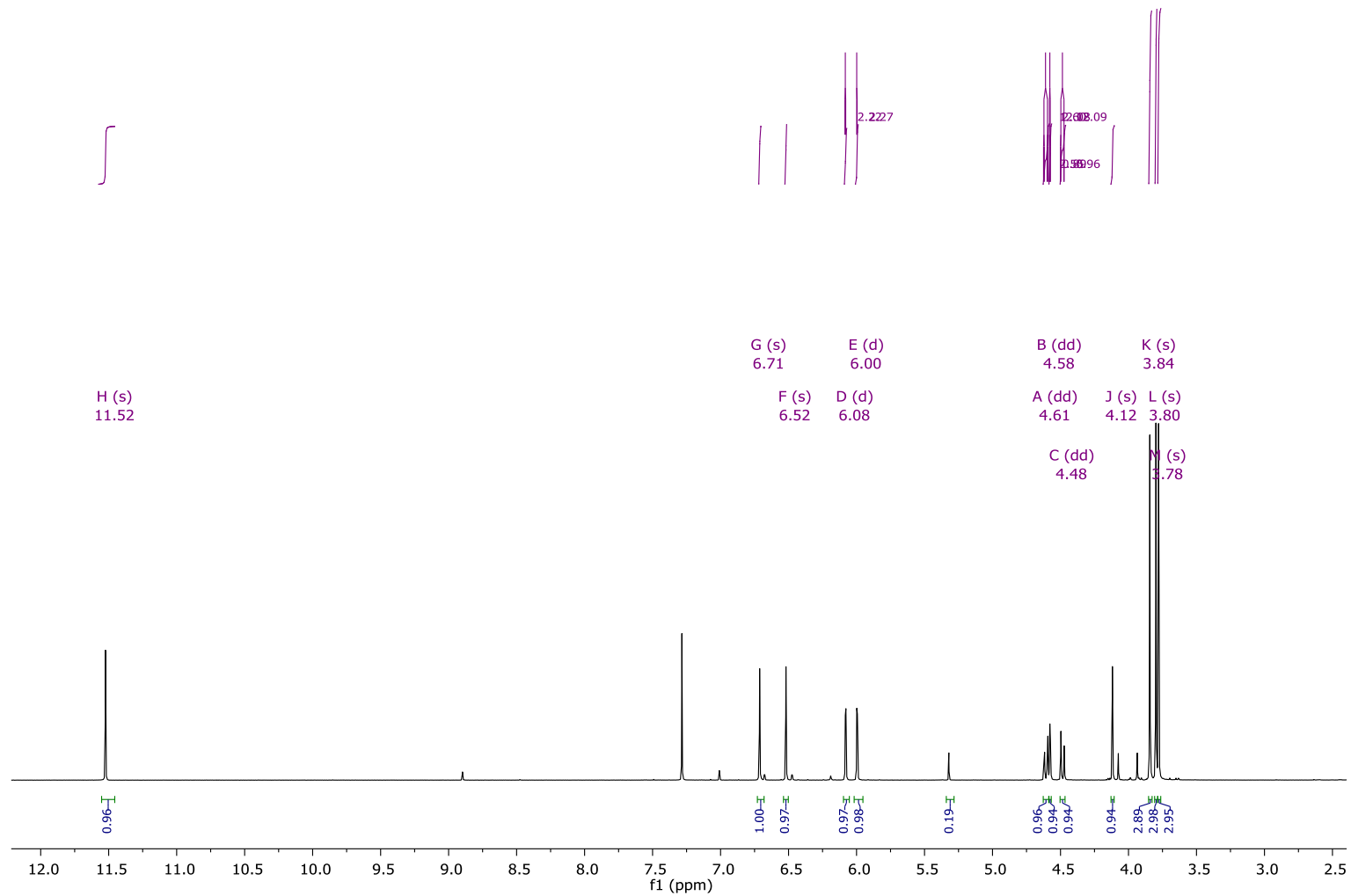


Figura 2.11 Espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a estrutura do (6aR*,12aS*)-6-desoxyclitriacetal obtido da fração BMF3A82 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

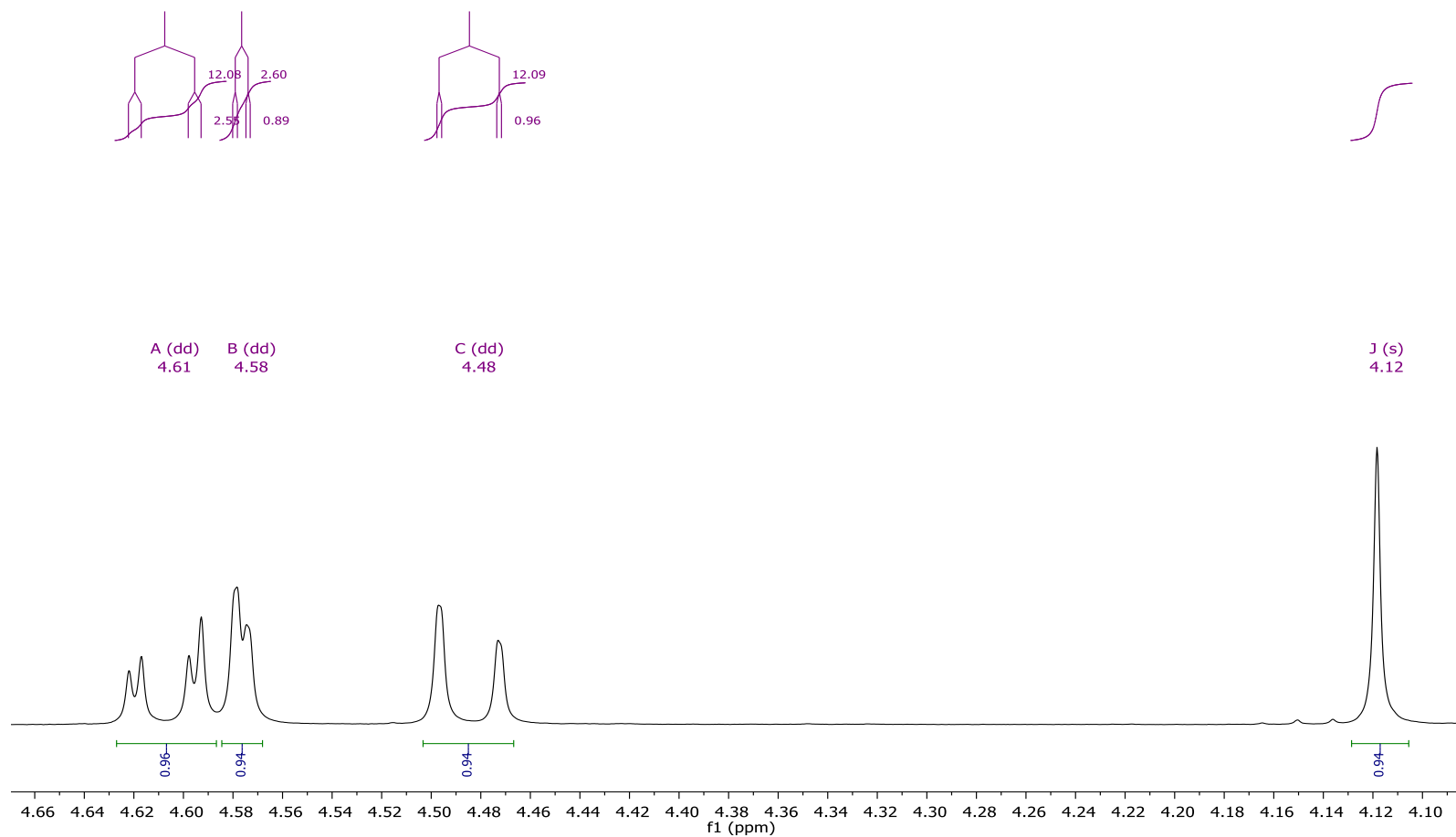


Figura 2.12 Expansão de região do espectro de RMN de ¹H contendo sinais atribuídos a estrutura do (6aR*,12aS*)-6-desoxyclitoriacetal obtido da fração BMF3A82 [500 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

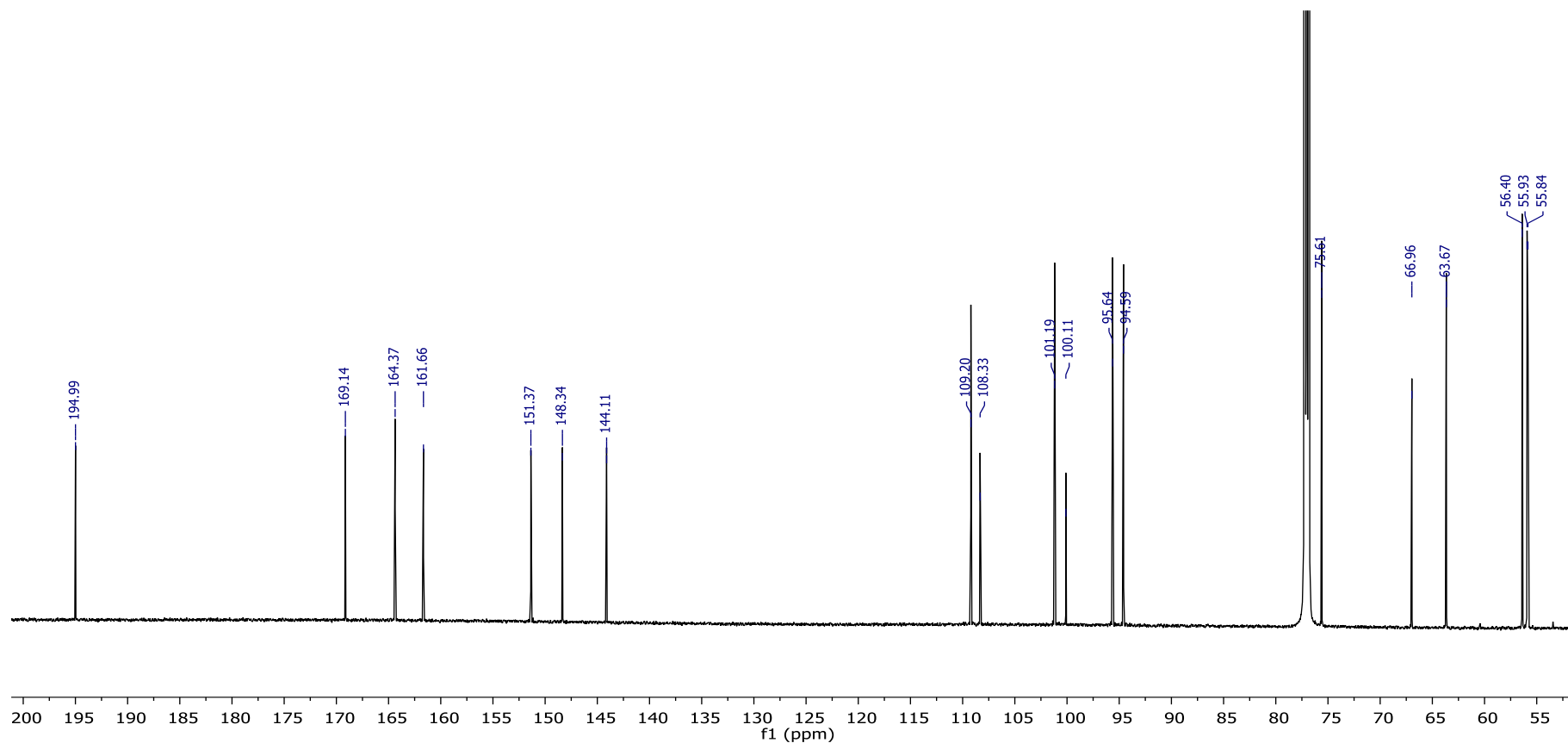


Figura 2.13 Região do espectro RMN de ^{13}C contendo todos os sinais de carbonos atribuídos a estrutura do (6aR*,12aS*)-6-desoxyclitriacetal obtido da fração BMF3A82 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

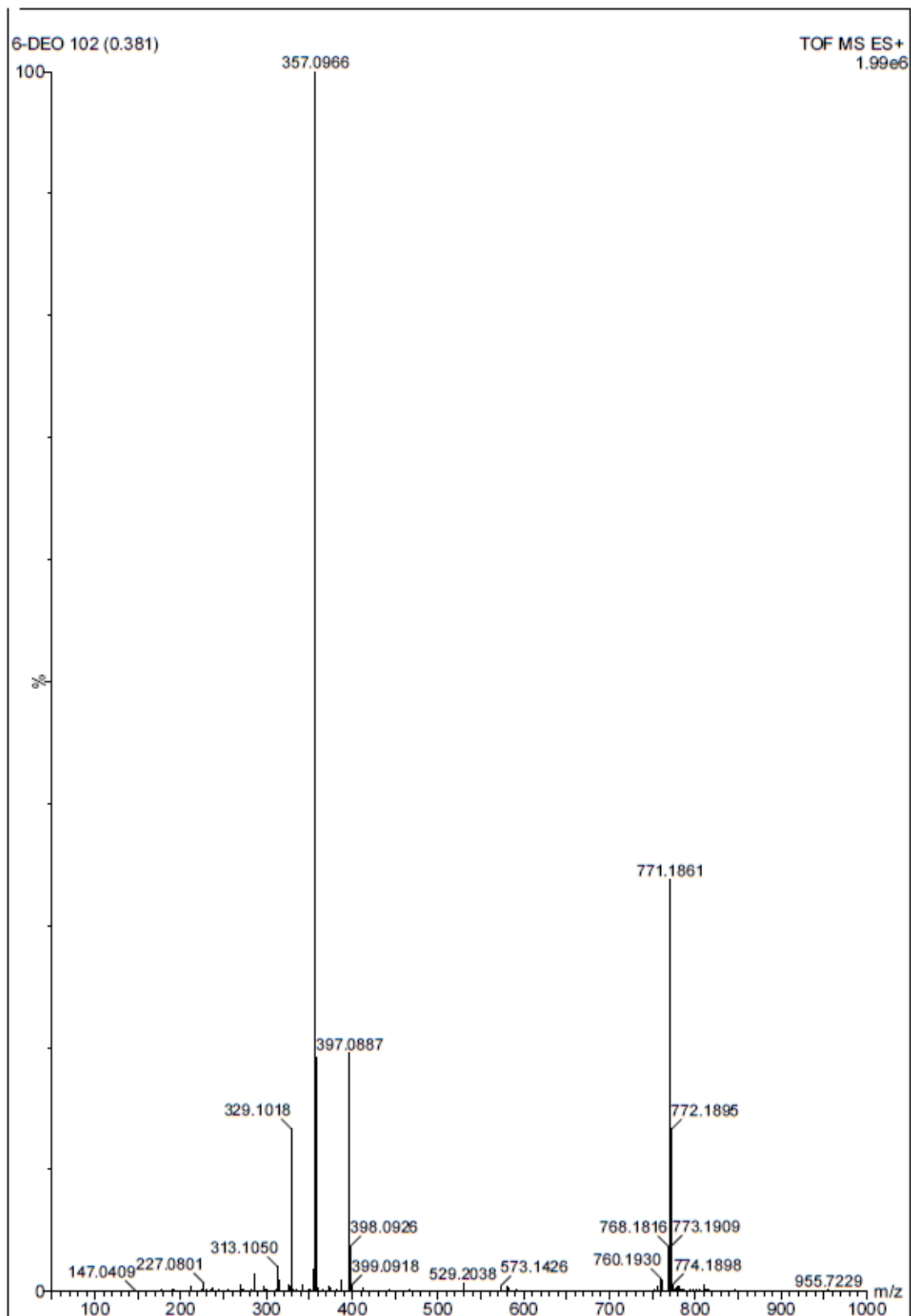


Figura 2.14 Espectro de HRESIMS do (6aR*,12aS*)-6-desoxyclitriacetal obtido da fração BMF3A82

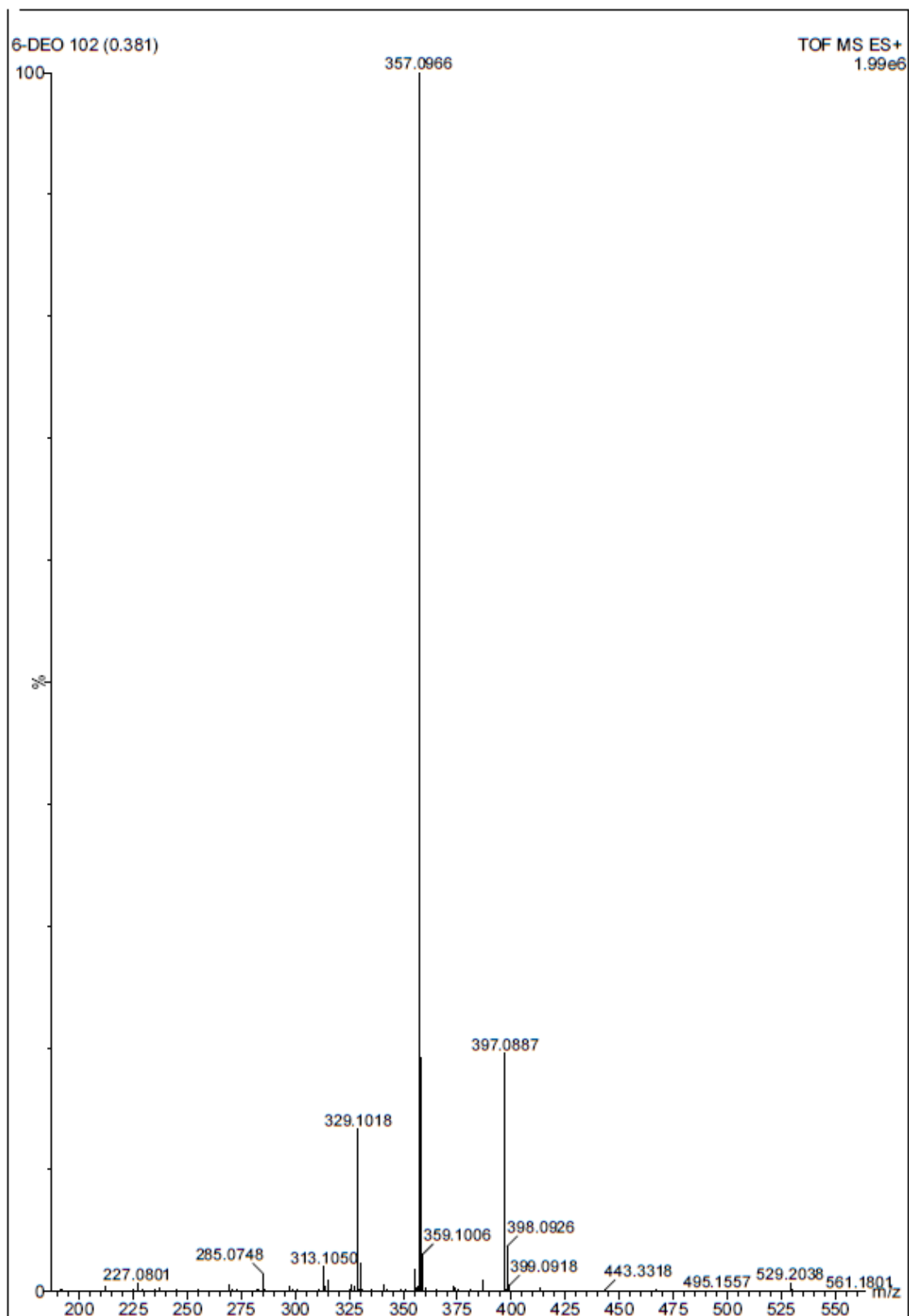


Figura 2.15 Ampliação do espectro de HRESIMS do (6aR*,12aS*)-6-desoxiclitoriactal obtido da fração BMF3A82

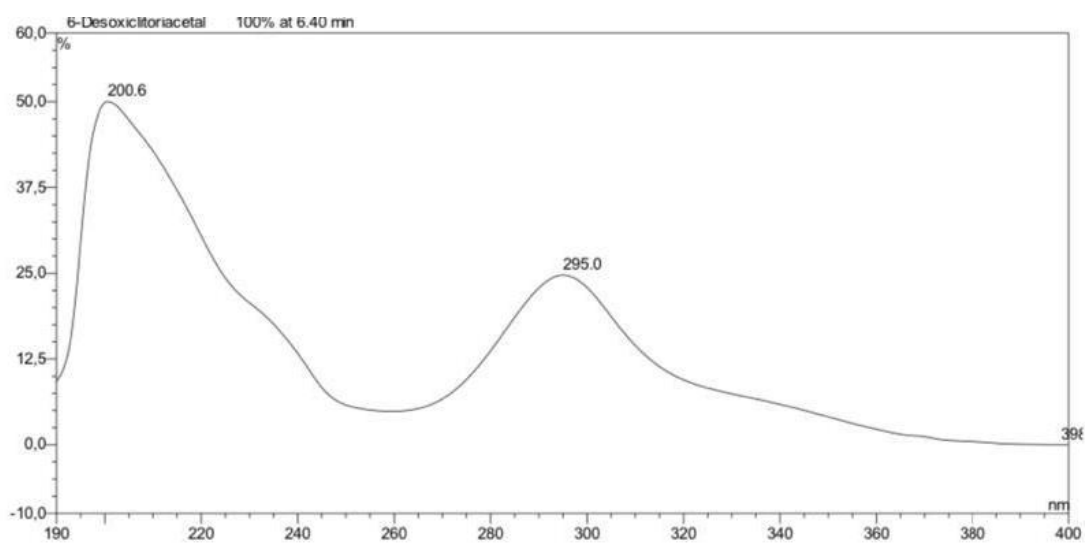


Figura 2.16 Espectro na região UV-VIS do (6aS*,12aS*)-6-desoxyclitoriacetal obtido da fração CFDIF1 em CHCl₃

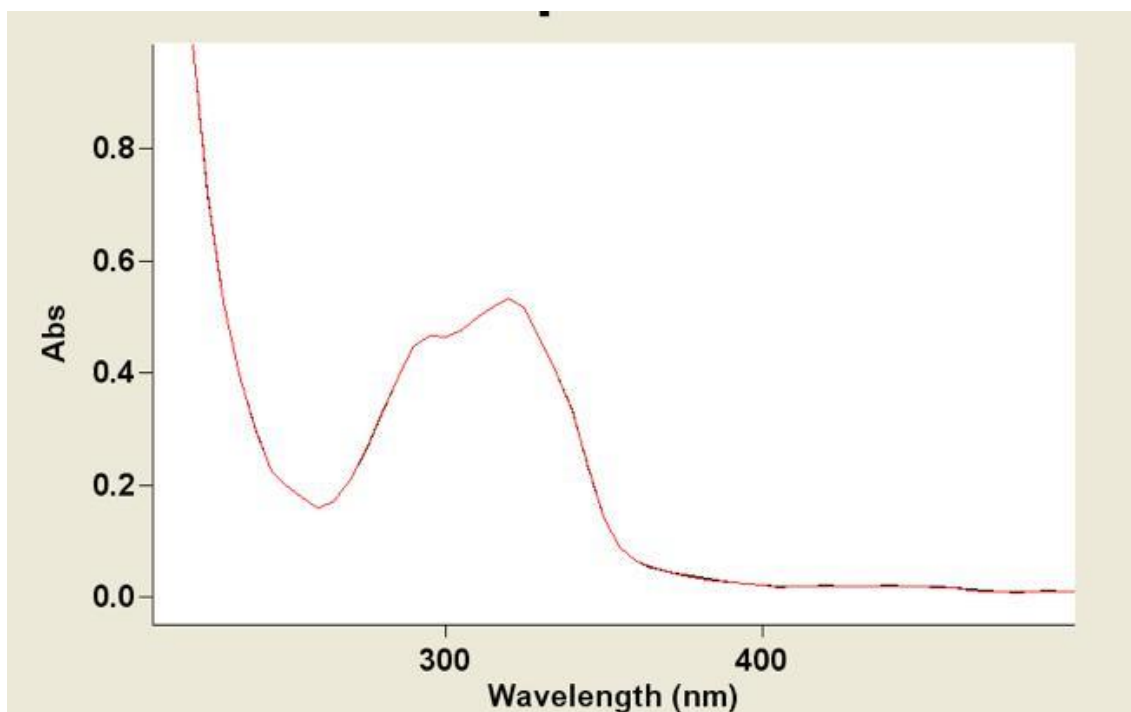


Figura 2.17 Espectro na região do UV-VIS do (6aR*,12aS*)-6-desoxyclitoriacetal obtido na fração BMF3A82 em CHCl₃

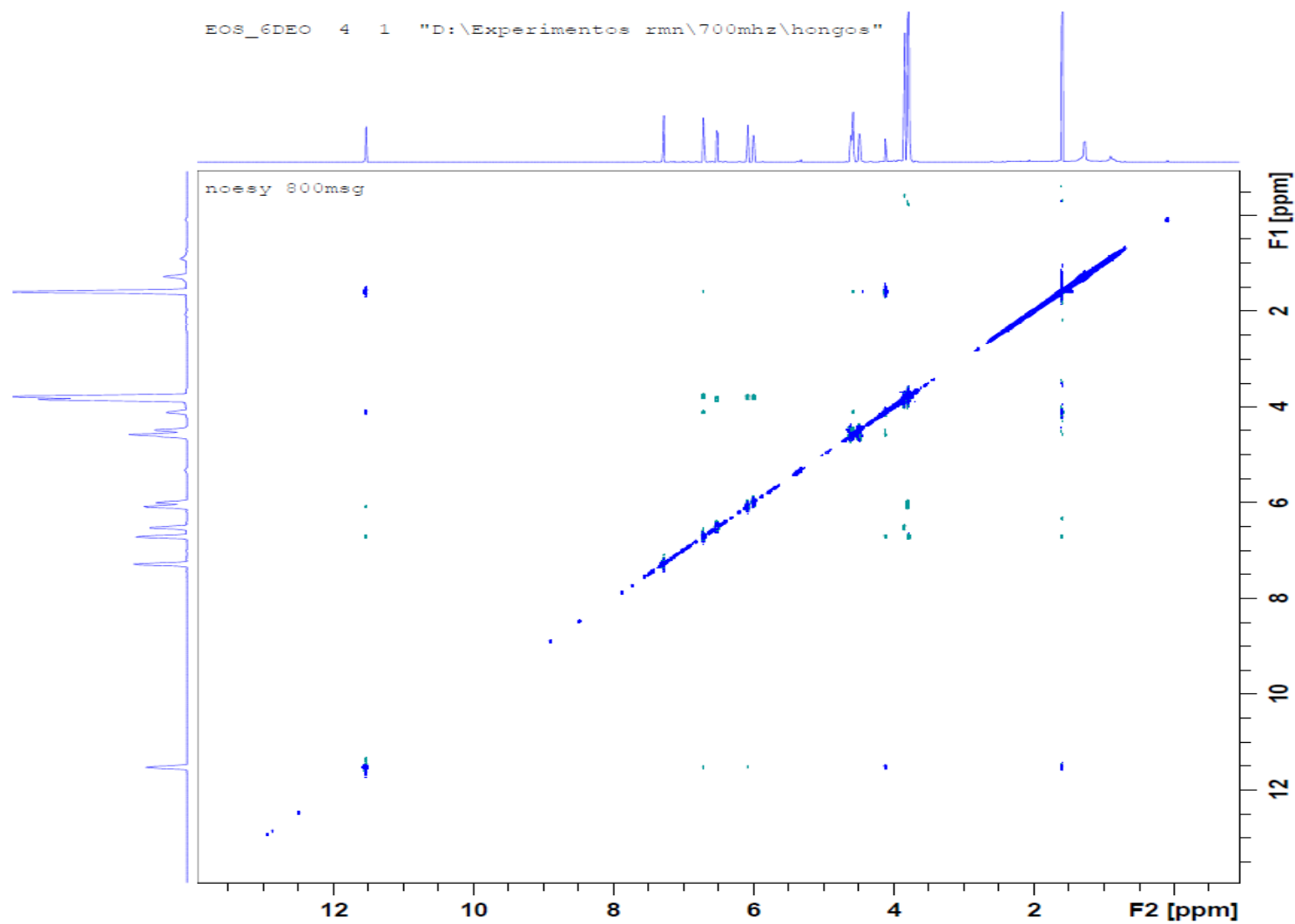


Figura 2.18 Espectro de NOESY do (6aR*,12aS*)-6-desoxyclitriacetal obtido na fração BMF3A82

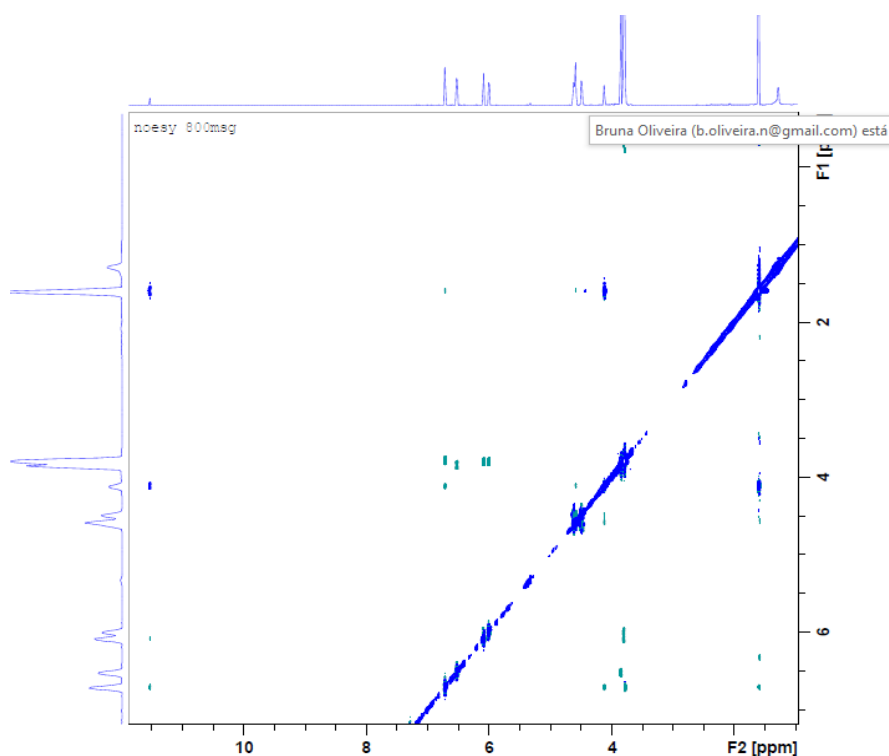


Figura 2.19 Ampliação do espectro de NOESY do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriactal obtido na fração BMF3A82, correlação entre o H em 4,12 e o H em 6,71

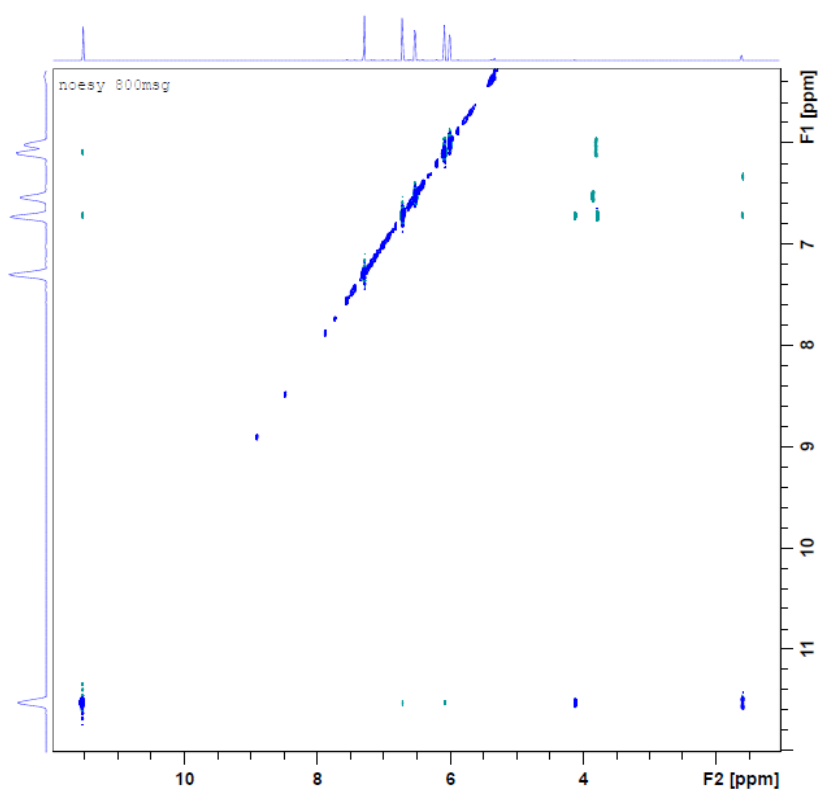


Figura 2.20 Ampliação do espectro de NOESY do (6a*R*^{*},12a*S*^{*})-6-desoxiclitoriactal obtido na fração BMF3A82, correlação entre o H em 11,52 com os H em 6,71 e em 6,08

2.4.1.3 Identificação do clitoriacetal (CFC4F36)

A substância CFC4F36 foi identificada a partir da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN de ^1H revelou um padrão de sinais duplicados com diferenças sutis de deslocamento químicos em proporções similares entre si, o que sugere que o composto isolado foi obtido como uma mistura isomérica (Figura 2.22).

Os dubletos integrando para 1 H cada registrados em δ 6,10 (*d*, 2H, 2,25 Hz), 6,02 (*d*, 1H, 2,26 Hz) e 6,00 (*d*, 1H, 2,23 Hz) estão numa região aromática onde sugerem a presença de hidrogênios acoplados em *meta*, devido ao valor da constante de acoplamento, sendo o primeiro desses sinais sobreposto. Tais deslocamentos observados são característicos de anel A de flavonoides.

Os outros dois grupos de sinais de hidrogênio duplicados em δ 6,72 (*s*, 1H) e 6,58 (*s*, 1H), δ 6,69 (*s*, 1H) e 6,54 (*s*, 1H) em região de hidrogênios aromáticos não apresentam desdobramentos, o que sugere que eles estão em uma relação *para* entre eles em um anel aromático característico de anel B de flavonoides (Figura 2.23).

A presença de uma dupla de sinais desblindados em δ 11,46 (*s*, 1H) e δ 11,42 (*s*, 1H) sugere a presença de ligação de hidrogênio intramolecular na estrutura, o que leva a sugestão de que um dos anéis aromáticos está vizinho a uma carbonila que permite tal interação. Os sinais em δ 3,86 (*s*, 3H), 3,85 (*s*, 3H), 3,80 (*s*, 6H), 3,78 (*s*, 3H), 3,77 (*s*, 3H), na região de hidrogênios metoxílicos ligados a anel aromático (Figura 2.24), corroboram a natureza flavanoídica da substância.

Adicionalmente a presença dos sinais de hidrogênios alifáticos em regiões de maior desproteção sugerem a formação de mais um anel na estrutura, comum em rotenoides já isolados nessa espécie, assim os sinais em δ 4,73 (*d*, 1H, $J= 2,26$ Hz), 4,58 (*d*, 1H, $J= 1,16$ Hz), 5,75 (*d*, 1H, $J= 7,21$ Hz) e 5,64 (*s*, 1H) pertencem aos anéis C e D. Tal diferenciação de deslocamento e desdobramento dos sinais ocorre por conta de esses hidrogênios pertencerem a dois carbonos quirais da estrutura, o que pode explicar o fato de que o composto tenha se apresentado em uma mistura de dois epímeros na qual em uma das

estruturas o H-6 encontra-se na posição equatorial (H-6eq) enquanto que na outra estrutura, o H-6 encontra-se na posição axial (H-6ax).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.25 e 2.26) também apresentou sinais congruentes com o indicativo do sugerido pela interpretação do espectro de RMN de ^1H também apresentando duplicidade e diferenças sutis de deslocamento para cada um dos sinais observados.

O comparativo com dados da literatura (SANTOS; DAVID; DAVID, 2016; SANTOS et al., 2018) levou a confirmar essa estrutura como um rotenóide, o clitoriactal (Figura 2.21), já isolado anteriormente nas raízes dessa espécie (Tabelas 2.13 e 2.14). A duplicidade para os sinais ocorre devido ao equilíbrio hemiacetal – acetal em decorrência da presença da hidroxila na posição 6.

A fração CFC4F45 (CFC4F412) também foi identificada como o clitoriactal por análise de RMN de ^1H .

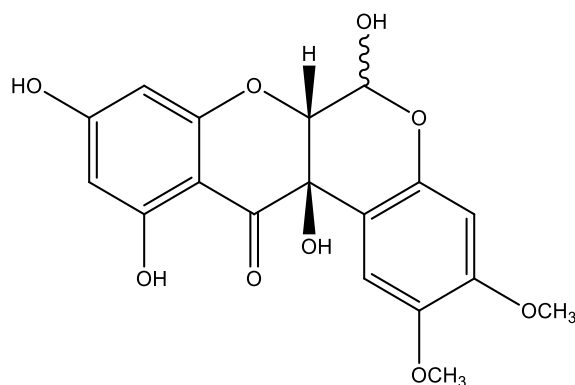


Figura 2.21 Estrutura do clitoriactal (**3**) obtido da fração CFC4F36

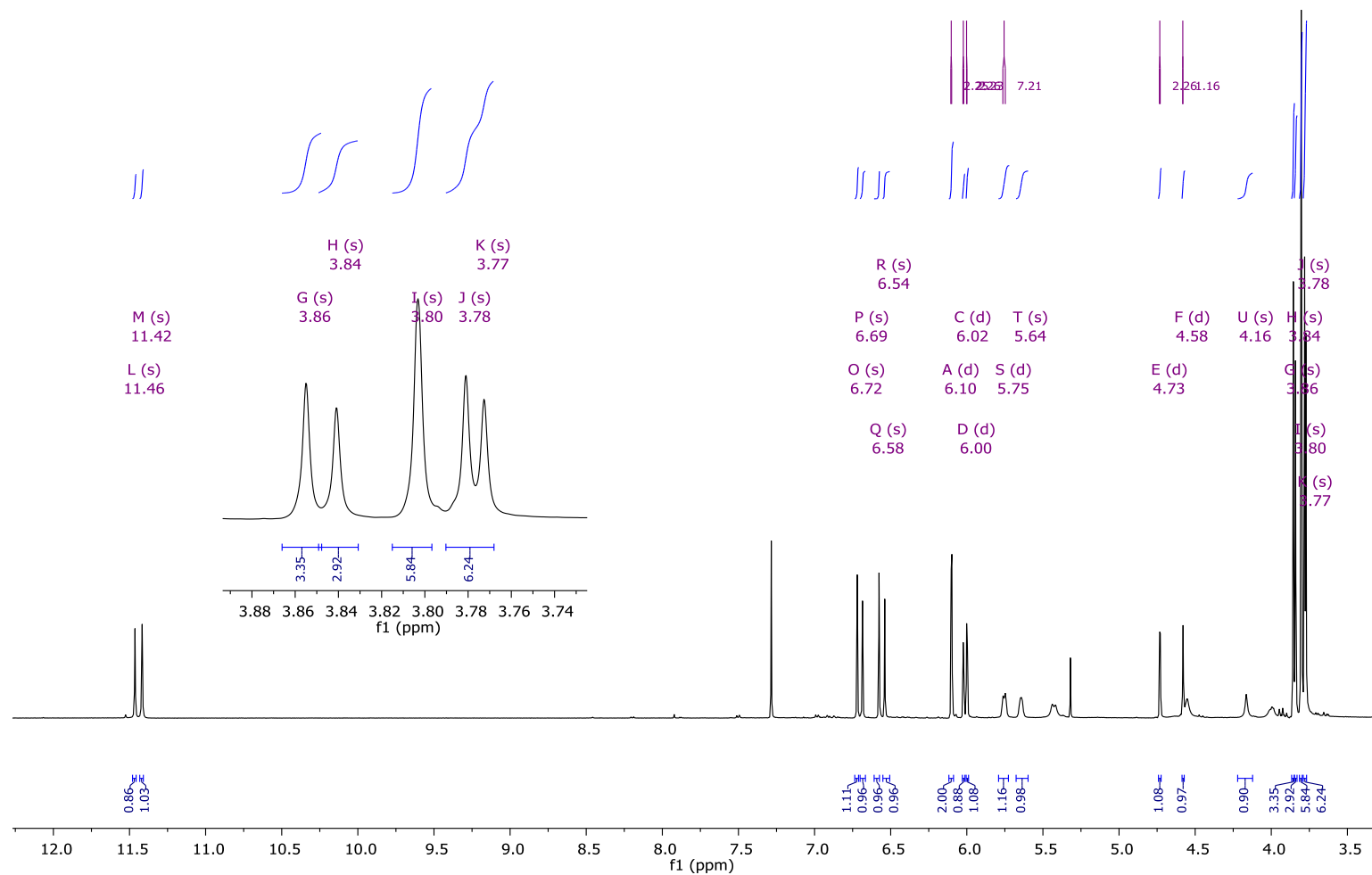


Figura 2.22 Região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a estrutura do clitoriactal obtido da fração CFC4F36 [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

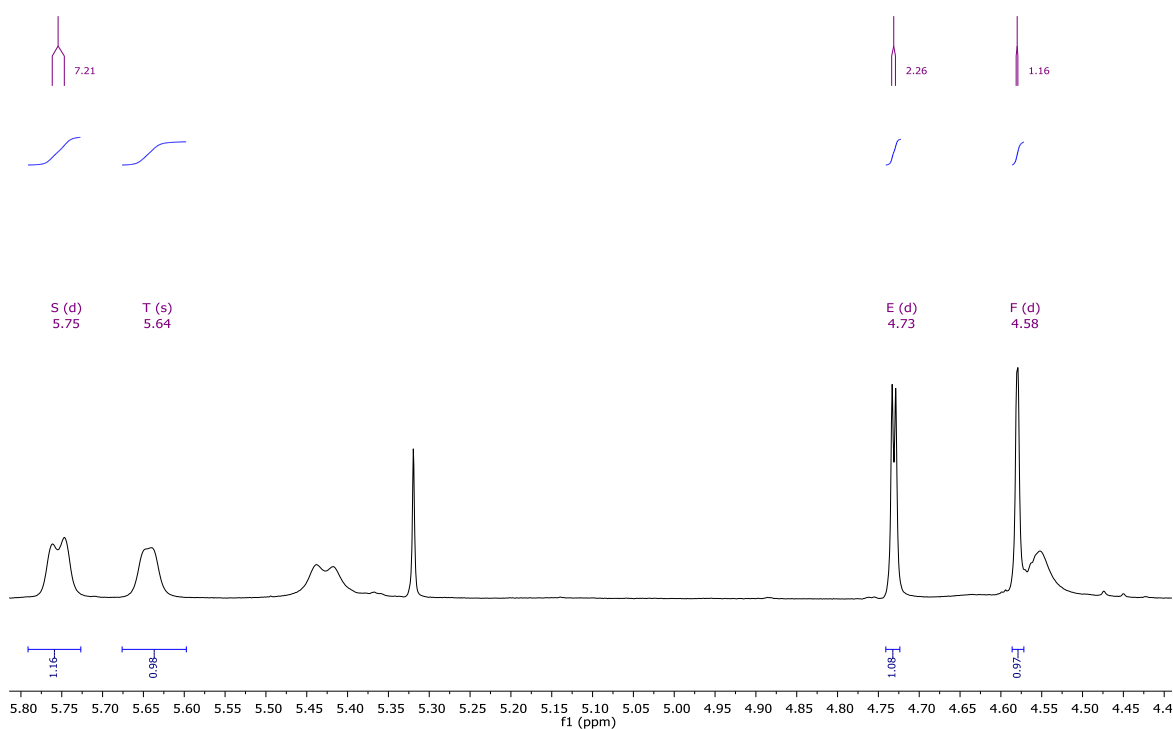


Figura 2.23 Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais da estrutura do clitoriacetal obtido da fração CFC4F36 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

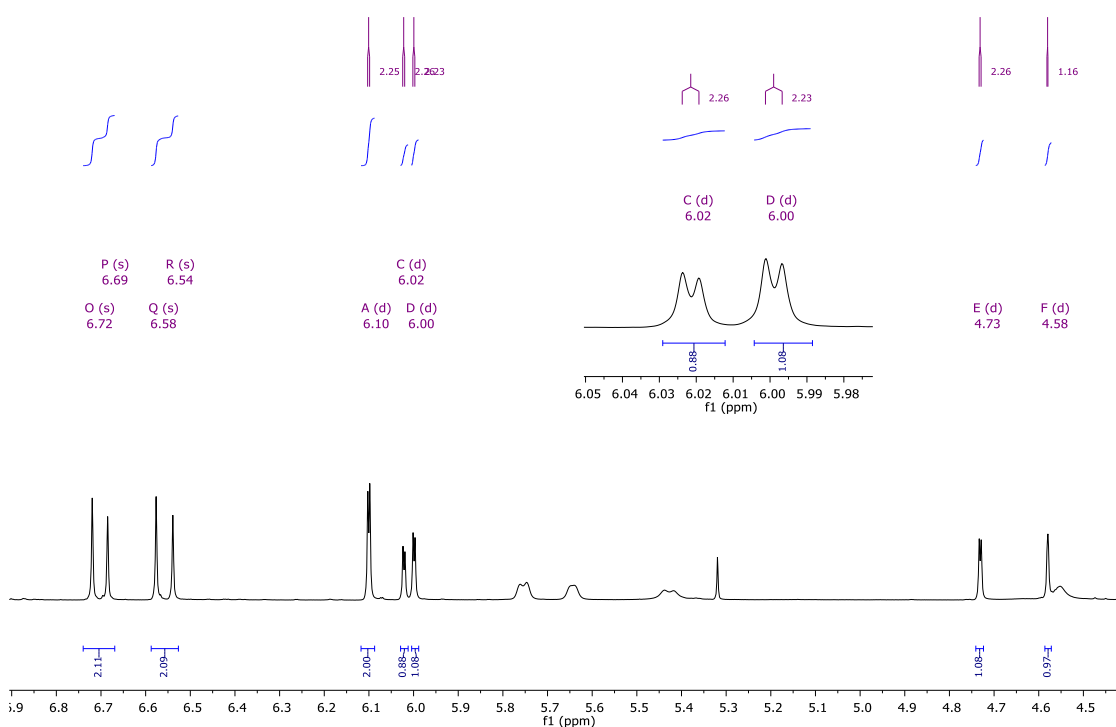


Figura 2.24 Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais da estrutura do clitoriacetal obtido da fração CFC4F36 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

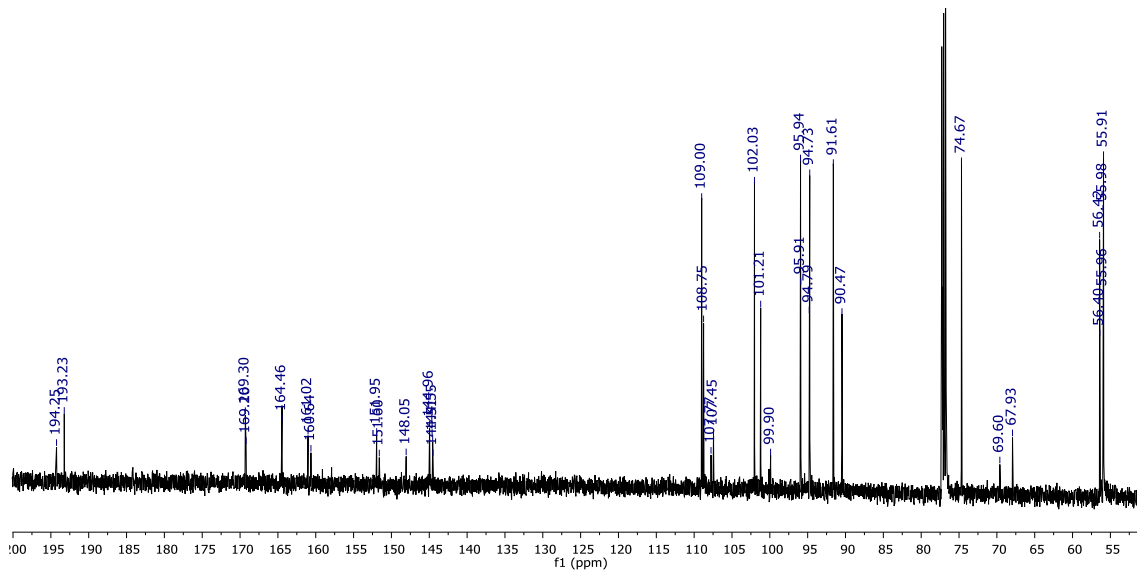


Figura 2.25 Região do espectro de RMN de ¹³C contendo todos os sinais atribuídos a estrutura do clitoriacetal obtido da fração CFC4F36 [125 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

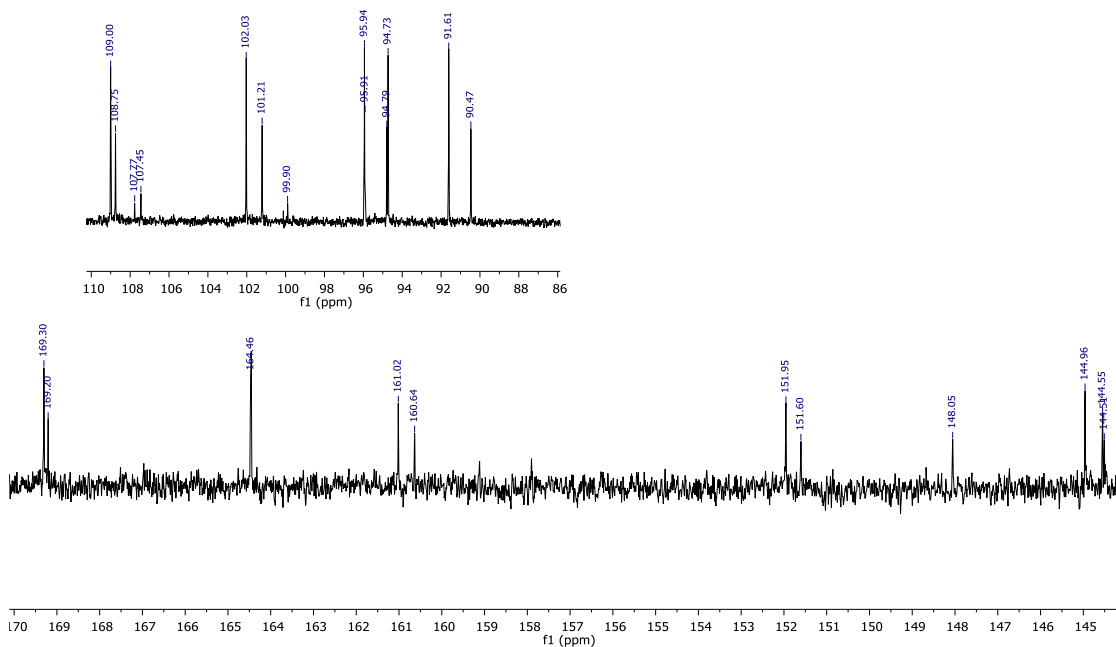


Figura 2.26 Expansão da região do espectro de RMN de ¹³C contendo todos os sinais atribuídos a estrutura do clitoriacetal obtido da fração CFC4F36 [125 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

Tabela 2.13 Dados de RMN de ^1H do 6-desoxiclitoriacetal (**1**), (6aR*,12aS*)-6-desoxiclitoriacetal (**2**) e clitoriacetal (**3**) e [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)]

^1H	CFDI1 (1)	CFC4F36 (3)	BMF3A82 (2)	6-desoxiclitoriacetal	Clitoriacetal
1	6,69 (s)	6,69 (s,1H) e 6,72 (s,1H)	6,71 (s)	6,69 (s)	6,68 (s)
4	6,49 (s)	6,54 (s,1H) e 6,58 (s, 1H)	6,52 (s)	6,49 (s)	6,48 (s)
6	4,67 (dd, 1H, J= 12,0 e 2,5 Hz), 4,45 (dd, 1H, J= 12,1 e 1,0 Hz)	5,75 (d, J= 7,21 Hz) e 5,64 (s)	4,61 (dd, 1H, J= 12,0 e 2,5 Hz), 4,58 (dd, J= 2,5 e 0,9 Hz)	4,48-4,56 (dd, 1,1 e 12 Hz)	5,54/ 5,75 (d, 2)
6a	4,54 (dd, 1H, J= 2,5 e 0,9 Hz)	4,58 (d, J= 1,16 Hz) e 4,73 (d, J= 2,26 Hz)	4,48 (dd, J= 12,1 e 1,0 Hz)	4,55 (d, 3)	4,56 (sl) e 4,72 (d, J=2,0 Hz)
8	5,96 (d, 1H, 2,27 Hz)	6,02 (d, 1H, 2,26 Hz), 6,00 (d, 1H, 2,23 Hz),	6,00 (d, 1H, 2,2 Hz)	5,97 (d, 2,5)	5,96 (d, J=2,3 Hz)
10	6,04 (d, 1H, 2,26 Hz)	6,10 (d, 2H, 2,25 Hz)	6,08 (d, 1H, 2,2 Hz)	6,05 (d, 2,5Hz)	6,06 (d, J=2,3 Hz)
12a			4,12 (s)		
2-OMe	3,81 (s)	3,80 (s) e 3,80 (s)	3,84	3,82 (s)	3,72 (s)
3-OMe	3,76 (s)	3,78 (s) e 3,77 (s)	3,80	3,77 (s)	3,76 (s)
9 OMe	3,74 (s)	3,86 (s) e 3,85 (s)	3,78	3,75 (s)	3,80 (s)
11-OH	11,5 (s)	11,46 (s) e 11,42 (s)	11,5	11,51 (s)	11,45 (s)
6-OH	-	-	-	-	4,40 (sl)

(SANTOS, 2014).

Tabela 2.14 Dados de RMN de ^{13}C do clitoriacetal (**2**) e 6-desoxiclitoriacetal (**3**)
[125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

^{13}C	Rotenoides isolados			Dados da literatura ¹	
	CFDI1 (1) 6- desoxiclitoriacetal	BMF3A82(2)	CFC4F36 (3) clitoriacetal	6- desoxiclitoriacetal	clitoriacetal
1	109,4	109,2	109,0 / 108,75	109,2	108,9
1a	108,3	108,3	107,77 / 107,45	108,2	107,6
2	144,1	144,1	144,55/ 144,51	144,0	144,8
3	151,4	151,4	151,95/ 151,60	151,3	151,8
4	101,2	101,2	102,03	101,1	101,8
4a	148,4	148,3	148,05	148,3	147,9
6	63,6	63,7	91,61 / 90,47	63,6	91,4
6a	75,6	75,6	74,67	75,5	76,9
7a	161,6	161,6	/ 161,02/ 160,4	161,6	160,8
8	94,5	94,6	94,79 / 94,73	94,5	94,5
9	169,1	169,1	169,30 / 169,20	169,0	169,0
10	95,6	95,6	95,91 / 95,94	95,6	95,8
11	164,4	164,4	164,46	164,3	164,2
11a	100,1	100,1	101,21 / 99,90	100,1	99,9
12	195,0	194,9	194,25/ 193,23	195,0	194,1
12a	67,0	66,9	69,60 / 67,93	66,9	69,5
2- OMe	56,4	56,4	55,91	56,3	55,8
3- OMe	55,9	55,9	56,42/ 56,40	55,8	56,3
9 OMe	55,8	55,8	55,98/ 55,96	55,8	55,8

¹(SANTOS, 2014).

2.4.1.4 Identificação da biochanina A (CFDI5)

A substância isolada e codificada como CFDI5 foi submetida a análise de RMN de ^1H e ^{13}C e indicou que se tratava de uma isoflavona. Essa proposição foi baseada no fato que o espectro de RMN de ^1H revelou um padrão de sinais que sugerem a presença de dois grupos aromáticos (Figura 2.27). Os dubletos integrando para 2H cada em δ 7,48 e 7,01 são característicos de anel B de um flavonóides *p*-disubstituído. Os outros dois sinais de hidrogênio em região de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos apresentam constante de acoplamento que sugere uma relação *meta* entre eles, em um anel A de flavonoides tetrasubstituído. (Figura 2.28).

A presença de um sinal desblindado em δ 12,9 (s,1H) sugere a presença de ligação de hidrogênio intermolecular na estrutura, o que leva a sugestão de que um dos anéis aromáticos está vizinho a uma carbonila que permite tal interação. O sinal de uma metoxila em δ 3,87 (s,3H), indica que esse grupo está ligado a um carbono aromático devido ao deslocamento observado.

O singlete em δ 7,88 é indicativo da presença de hidrogênio olefinico de isoflavonas pois encontra-se registrado em uma região mais desprotegida.

Adicionalmente o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.29) também apresentou sinais congruentes com o indicativo do sugerido pela interpretação do espectro de RMN de ^1H . Para a determinação inequívoca dessa estrutura foi necessário considerar os dados da literatura dos dois isômeros possíveis de serem formados considerando que a hidroxila e a metila aromática poderia estar em qualquer um dos anéis aromáticos, dessa forma a estrutura pode ser a biochanina A ou a prunetina.

Comparando-se os valores de RMN (Tabela 2.17 e 2.18) dos carbonos e, principalmente, dos hidrogênios de CFDI5 com a Biochanina A e Prunetina, pode-se sugerir que o composto isolado é a biochanina A (Figura 2.30), pois os H-3'/5' encontram-se mais desblindados que os mesmos hidrogênios da prunetina. Como o grupo metoxila tem maior caráter doador de elétrons, pode-se considerar que o C-4' em CFDI5 encontra-se substituído por um grupo OH. A substância BMF5A3 também foi identificada como a Biochanina A.

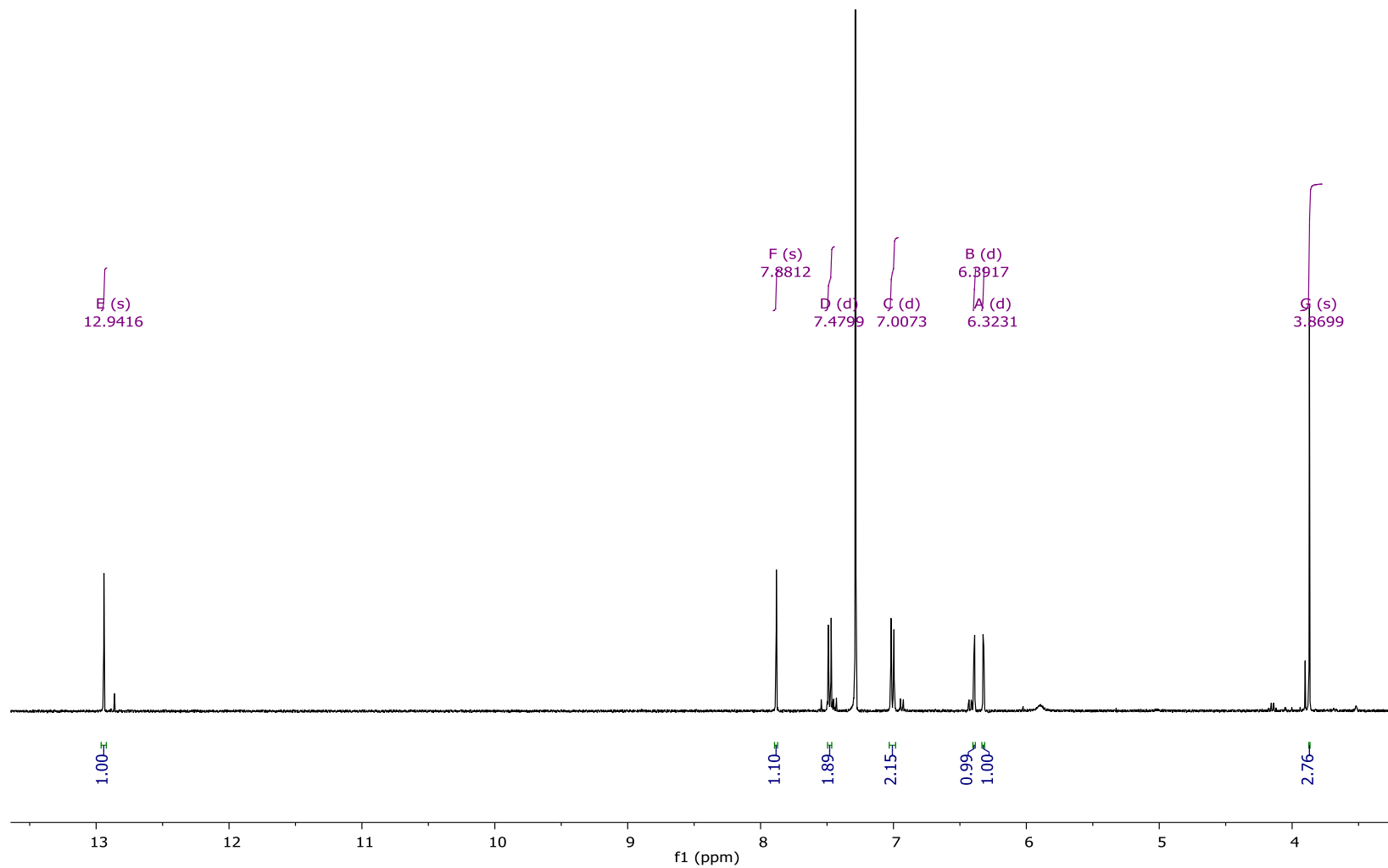


Figura 2.27 Espectro de RMN de ^1H expandido contendo todos os sinais atribuídos a estrutura da biochanina A obtida da fração CFDI5 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

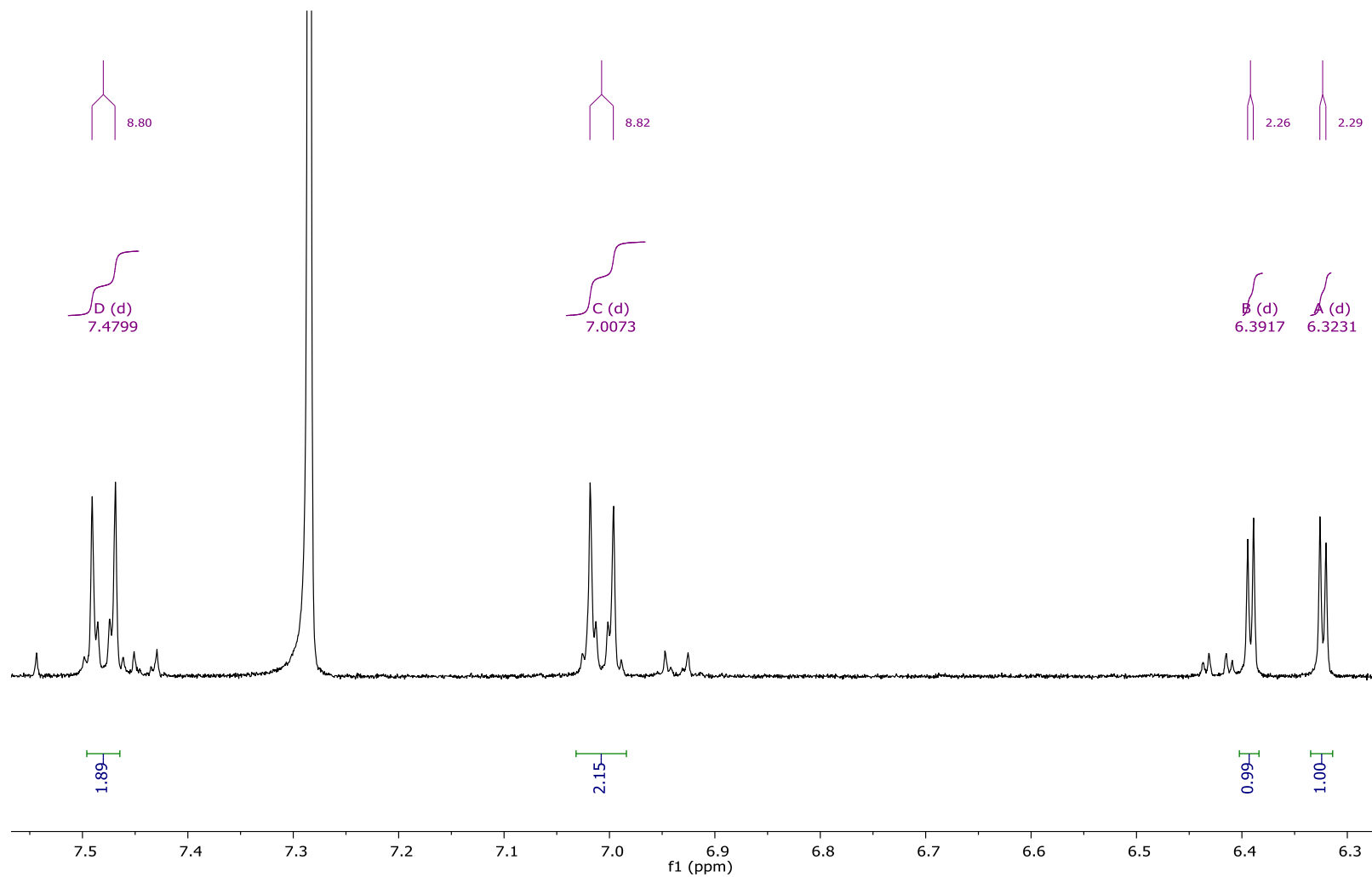


Figura 2.28 Expansão do espectro de RMN de ^1H na região de anéis aromáticos atribuídos a estrutura da biochanina A obtida da fração CFDI5 [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

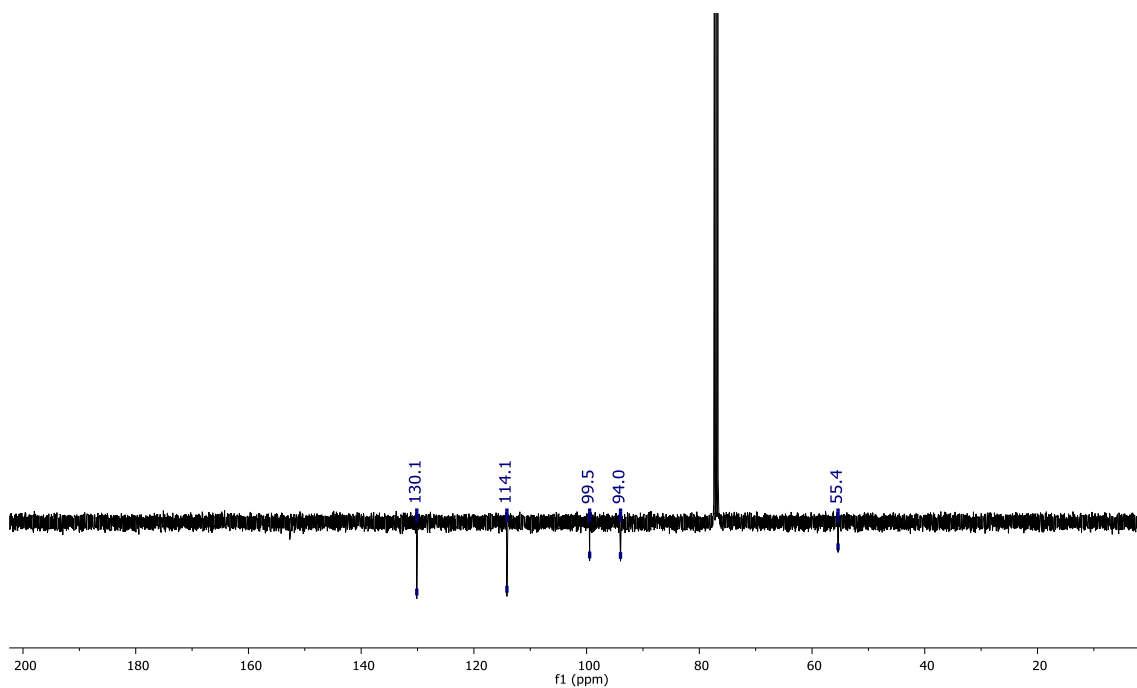


Figura 2.29 Região do espectro APT de ^{13}C contendo os sinais atribuídos aos carbonos da estrutura da biochanina A obtida da fração CFDI5 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

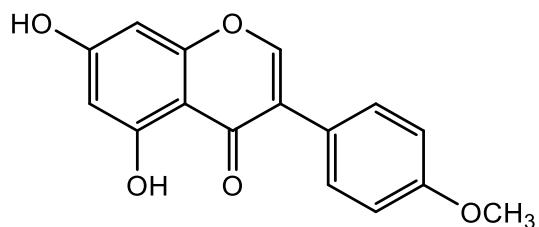


Figura 2.30 Estrutura da biochanina A (4) obtida da fração CFDI5

2.4.1.5 Identificação da mistura de isoflavonas da fração CFDI9

A substância isolada e codificada como CFDI9 foi submetida a análise de RMN de ^1H e ^{13}C e indicou que se tratava de uma mistura de isoflavonas. Foram observados quatro grupos de sinais na região de hidrogênio aromático, cuja multiplicidade e integrais indicavam evidenciavam a presença em mistura. Os dubletos integrando para 2 hidrogênios $\delta 7,45$ ($J=8,74\text{Hz}$), $\delta 7,40$ ($J=8,61\text{Hz}$), $\delta 6,98$ ($J=8,83\text{Hz}$), $\delta 6,90$ ($J=8,71\text{Hz}$) são característicos de anel B de um flavonoide *p*-disubstituído. Os sinais $\delta 6,40$ (*d*, 1H, $J=2,42\text{Hz}$), $\delta 6,38$ (*d*, 1H, $J=2,26\text{Hz}$), $\delta 6,36$ (*m*, 1H), $\delta 6,30$ (*m*, 1H) foram atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos aromáticos apresentam constante de acoplamento que sugere uma relação *meta* entre eles, em um anel A de flavonoides tetrasubstituído (Figura 2.32 e 2.33).

Além desses todos os outros sinais se encontravam duplicados com deslocamentos próximos e integral equivalente $\delta 12,91$ (*s*, 1H), $\delta 12,83$ (*s*, 1H), $\delta 3,87$ (*s*, 3H), $\delta 3,84$ (*s*, 2H).

O espectro em ^1H RMN revelou um padrão de sinais muito similar ao da fração CFDI5, identificada como Biochanina A, que também foi obtida nessa mesma etapa de purificação. A análise dos espectros levou a concluir que tais sinais correspondem a uma mistura de isoflavonas, cuja busca e comparativo com a literatura levou a concluir que se trata da mistura da biochanina A e da prunetina. A fração F23I4 também foi identificada como uma mistura dessas duas isoflavonas (Figura 2.31).

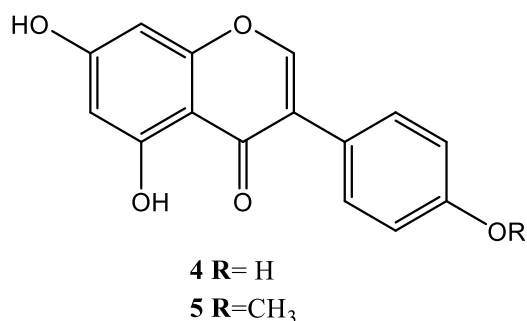


Figura 2.31 Estruturas da biochanina A (4) e da prunetina (5) obtidas da fração CFDI9

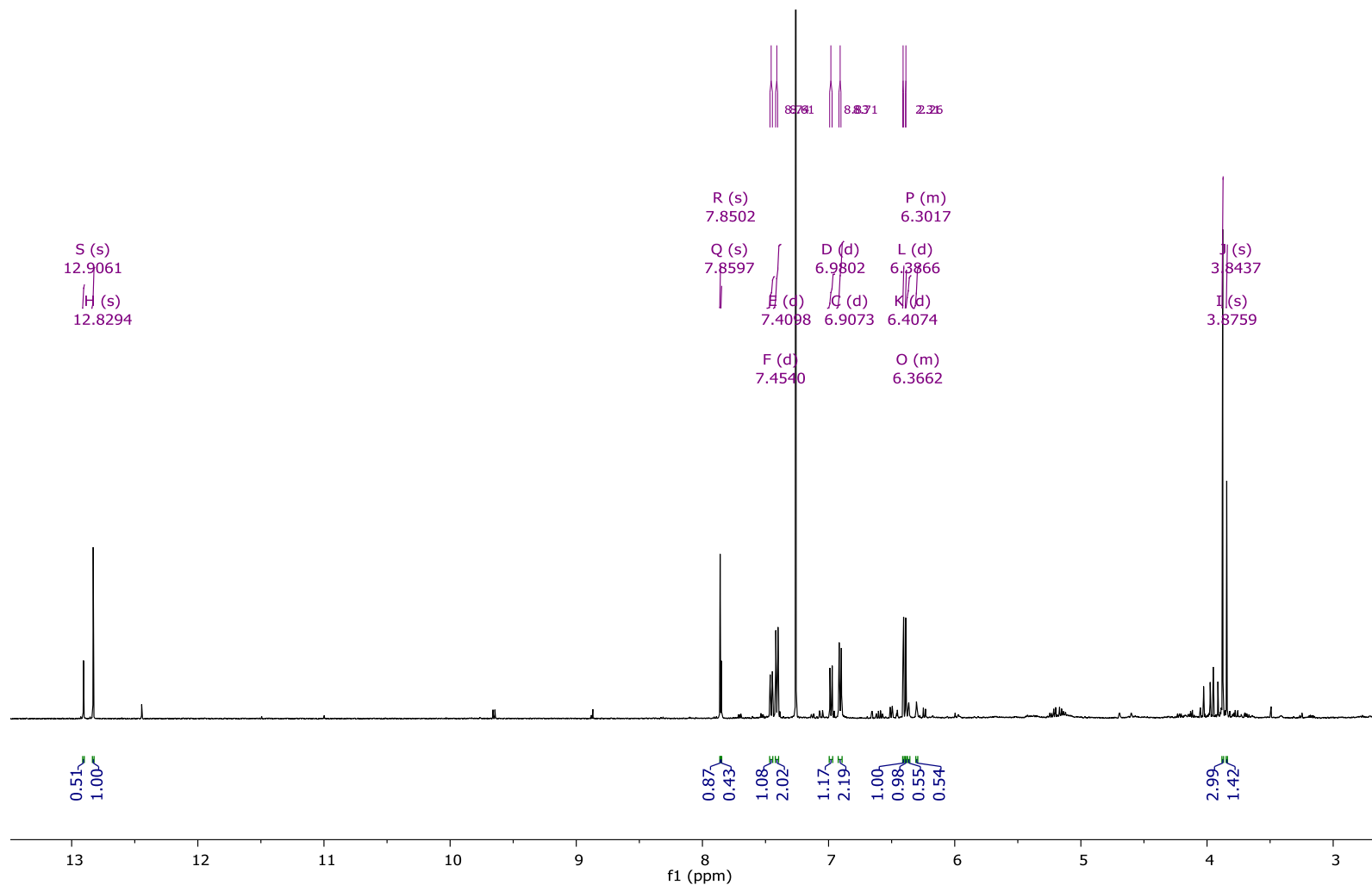


Figura 2.32 Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos as estruturas da biochanina A (**4**) e da prunetina (**5**) obtidas da fração CFD19 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

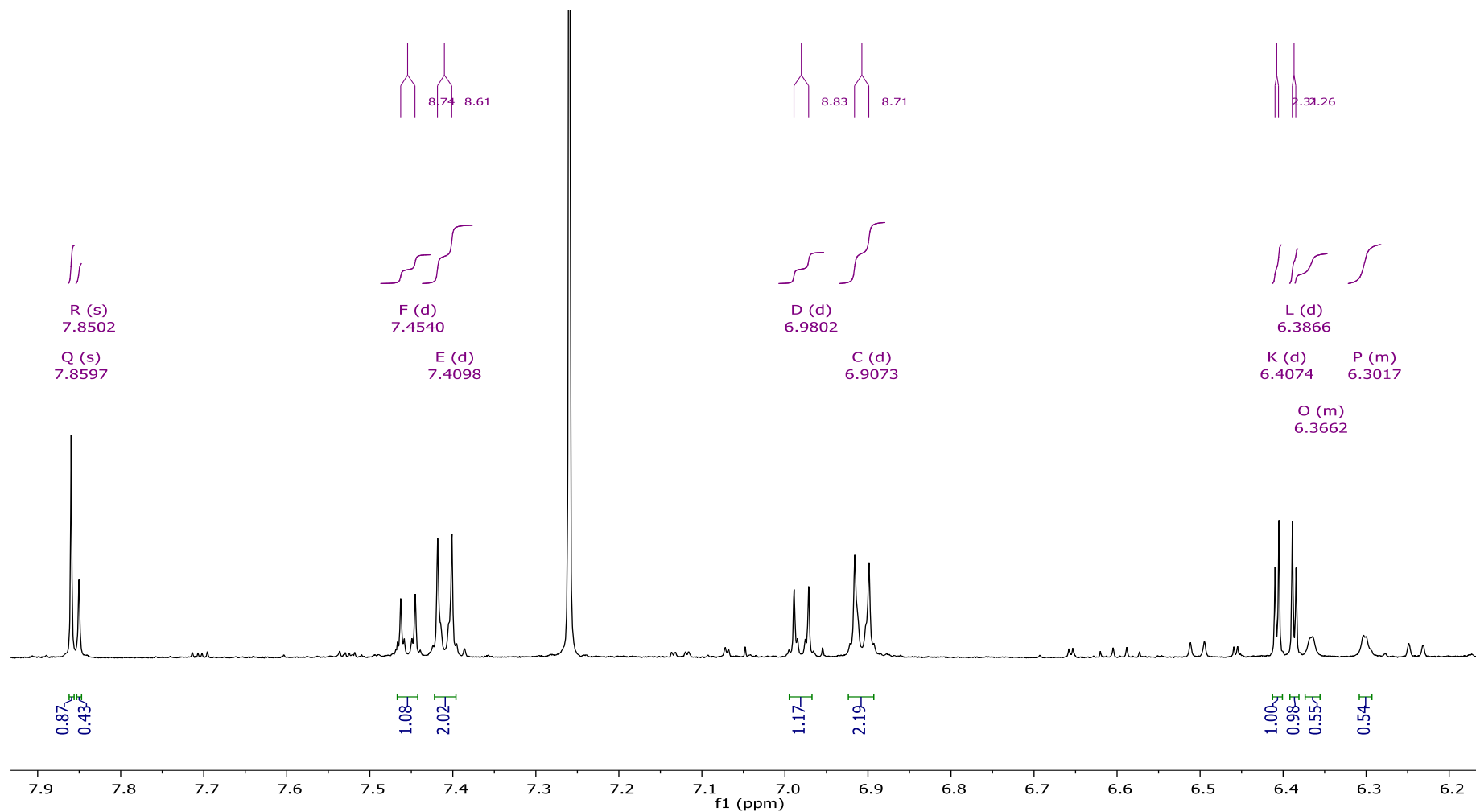


Figura 2.33 Região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a hidrogênios aromáticos e vinílicos da biochanina A (**4**) e da prunetina (**5**) obtidas da fração CFDI9 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

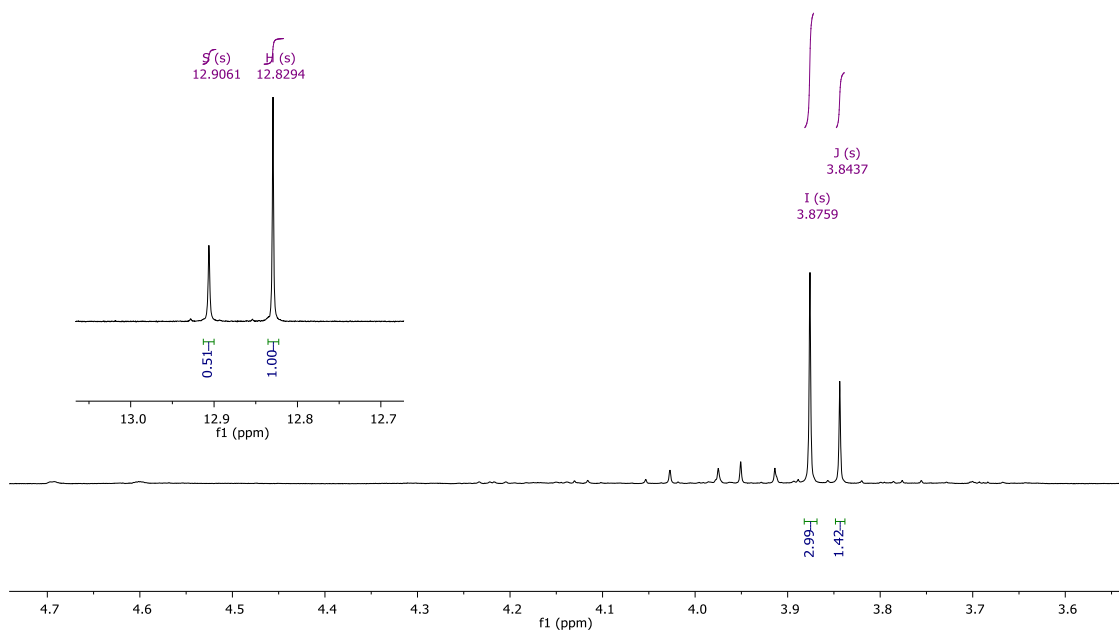


Figura 2.34 Região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a hidrogênios em ligação de hidrogênio intermolecular e metoxilas aromáticas da biochanina A (**4**) e da prunetina (**5**) obtidas da fração CFDI9 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

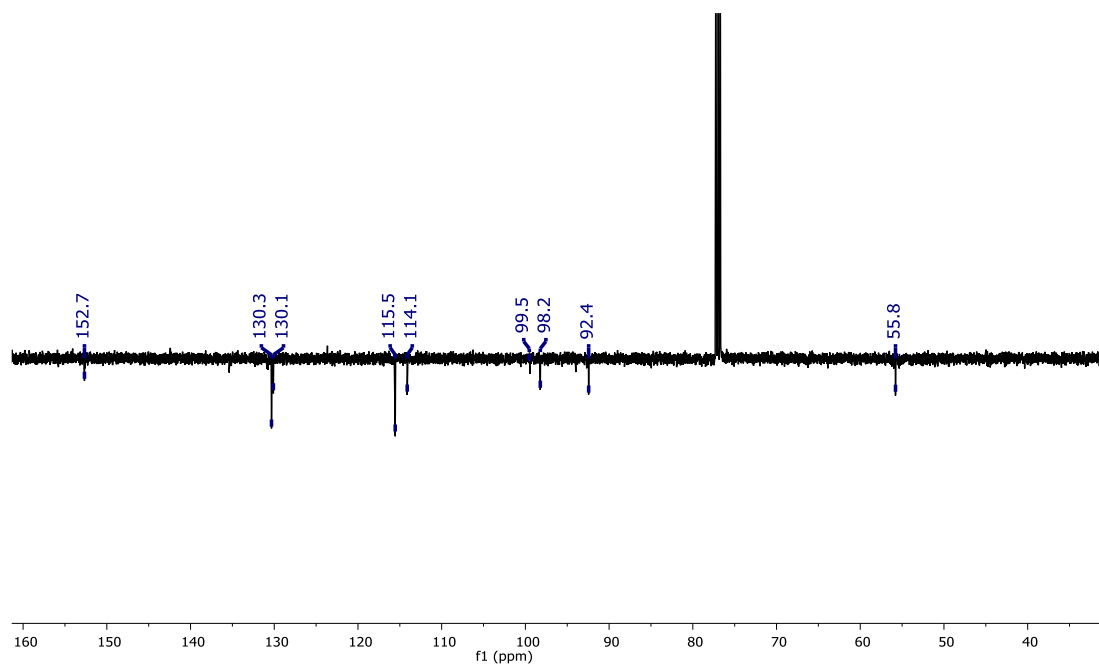


Figura 2.35 Região do espectro de APT de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos a biochanina A (**4**) e a prunetina (**5**) obtidas da fração CFDI9 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

2.4.1.6 Identificação da mistura de esteroides CFEBMPD2

Análise dos dados de RMN de ^1H (Figura 2.37) e ^{13}C (Figura 2.38) e comparação com dados da literatura (Tabela 2.15) permitiram identificar que essa fração era composta do sitosterol e estigmasterol (Figura 2.36), dois fitoesteroides muito comuns em espécies vegetais (ALVES, 2012).

Tratando-se de uma mistura, é possível determinar a porcentagem relativa dos componentes da mistura a partir da integração dos hidrogênios olefínicos das estruturas. O cálculo tomou como base a integração dos sinais correspondentes ao H-6 que é comum para ambas as estruturas, cuja intensidade relativa é 1,00 e a intensidade relativa dos hidrogênios H-22 e H-23 com valores de 0,38 e 0,25. Como os sinais foram encontrados separadamente foi considerada a média das intensidades desses H olefínicos, cujo valor de intensidade considerado para os cálculos foi de 0,31. Subtraindo-se este valor 0,31 de 1,00 obteve-se a intensidade de 0,69 correspondente a um hidrogênio do β -sitosterol. Dessa forma pode-se considerar que a mistura é composta aproximadamente por 69% de β -sitosterol e 31% de estigmasterol.

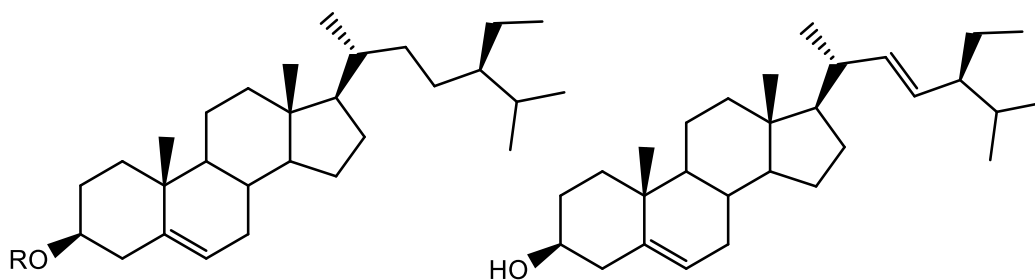


Figura 2.36 Estruturas do β -sitosterol e stigmasterol (**6**) obtidos na fração CFEBMPD2

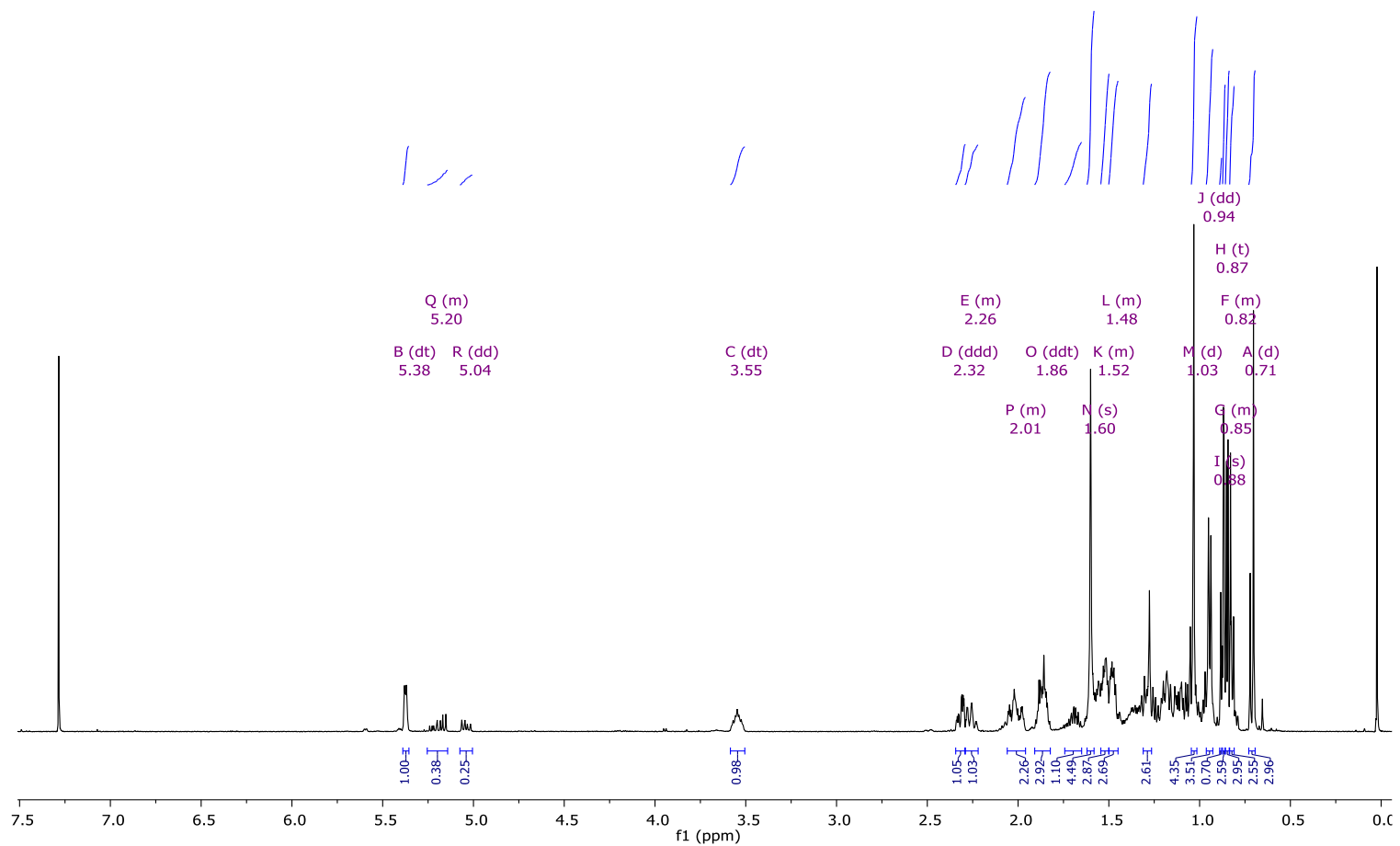


Figura 2.37 Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos a mistura de esteroides obtidos na fração CFEBMPD2 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

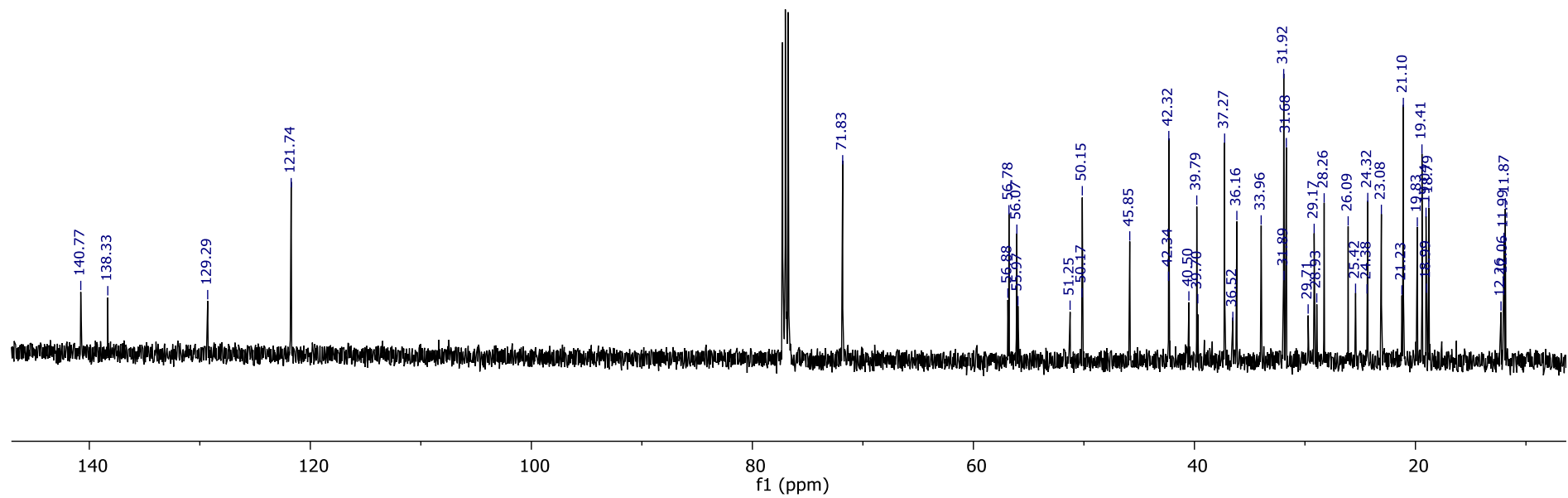


Figura 2.38 Região do espectro de RMN de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos a mistura de esteroides obtidos na fração CFEBMPD2 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

Tabela 2.15 Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C [500 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)] da mistura de esteróides

^{13}C	CFEBMPD2	β -sitosterol/estigmasterol (ALVES, 2012)
1	37,27	37,2
2	31,68	31,6
3	71,83	71,8
4	42,34	42,3
5	140,77	140,7
6	121,74	121,7
7	31,92	31,9
8	31,68	31,9
9	50,15	50,1
10	36,53	36,5
11	21,10	21,1
12	39,79	39,8
13	42,32	42,3
14	56,78	56,7
15	24,38	24,3
16	28,93	28,2
17	56,07	56,1
18	11,87	11,8
19	19,41	19,4
20	36,15	36,1
21	19,04	19,0
22	33,96	33,9
23	29,17	29,1
24	45,85	45,8
25	26,09	26,1
26	18,79	18,8
27	19,83	19,8
28	23,08	23,0
29	12,06	12,0

2.4.1.7 Identificação da formononetina (BMF5A5)

A substância BMF5A5 foi submetida a análise de RMN de ^1H , cujo espectro obtido indicou que se tratava de uma isoflavona. Essa proposição foi baseada no fato que o espectro em RMN de ^1H que revelou um padrão de sinais que sugerem a presença de dois grupos aromáticos (Figura 2.39). Os dubletos com integral para um hidrogênio cada 8,0 ($J=8,7$ Hz), 6,88 ($J=2,2$ Hz) acoplam simultaneamente com o hidrogênio marcado como um duplodoubleto em 6,95 ($J=8,7$ e 2,2 Hz) que estão em região característica de anel A de flavonoides. Os dubletos integrando para 2H cada em 7,5 ($J=8,7$ Hz), 6,9 ($J=8,7$ Hz), são característicos de anel B de flavonóides *p*-disubstituído. O singlete em δ 8,34 é indicativo da presença de hidrogênio olefinico de isoflavonas (Figura 2.40).

A presença de um sinal desblindado em δ 10,79 (s,1H) foi atribuída a presença de ligação de hidrogênio intermolecular, apesar do espectro ter sido obtido em metanol tal interação pode ser observada. O do singlete que integra para três hidrogênios em δ 3,79 indica a presença de hidrogênios metoxílicos na estrutura ligados a anel aromático devido ao deslocamento observado (Figura 2.40).

A busca por dados na literatura indicou que dois isômeros são possíveis de ocorrer: a isoformononetina e a formononetina, cuja diferenciação está na posição dos grupos hidroxila e metoxila aromáticos. A análise das correlações observadas no HMBC e atribuições inequívocas permitidas pelas correlações diretas fornecidas pelo HSQC permitiram identificar a estrutura (Figura 2.41).

A correlação mais importante observada foi a do hidrogênio do grupo hidroxila com os carbonos δ 102,5 e δ 116, 1 que se encontram no anel A, conforme análise do espectro de RMN de ^1H . Outras três correlações corroboram com a presença da hidroxila no anel A e consequente presença da metoxila no anel B, pois por meio do HMBC foi observada a correlação entre os hidrogênios metoxílicos e o carbono em δ 159,3. Além disso os hidrogênios presentes nesse anel também se correlacionam com esse carbono (Figura 2.42). Dessa forma, tais sinais permitiram identificar que esse composto isolado se trata da formononetina (Figura 2.43), uma isoflavona comum em produtos naturais, porém ainda não reportada nesse gênero (Tabela 2.17 e 2.18).

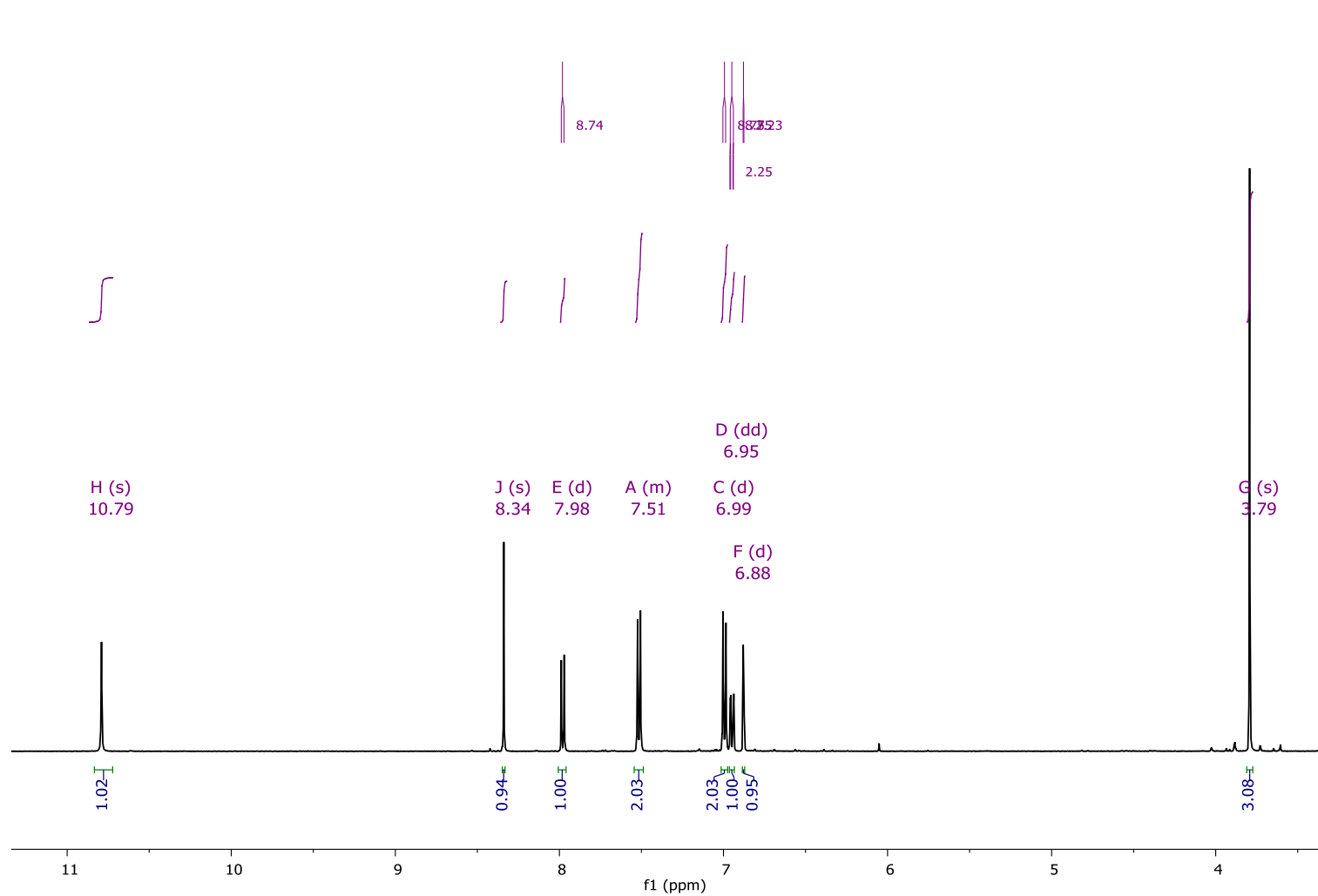


Figura 2.39 Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a formononetina obtida na fração BMF5A5 [500 MHz, MeOD, $\delta(\text{ppm})$]

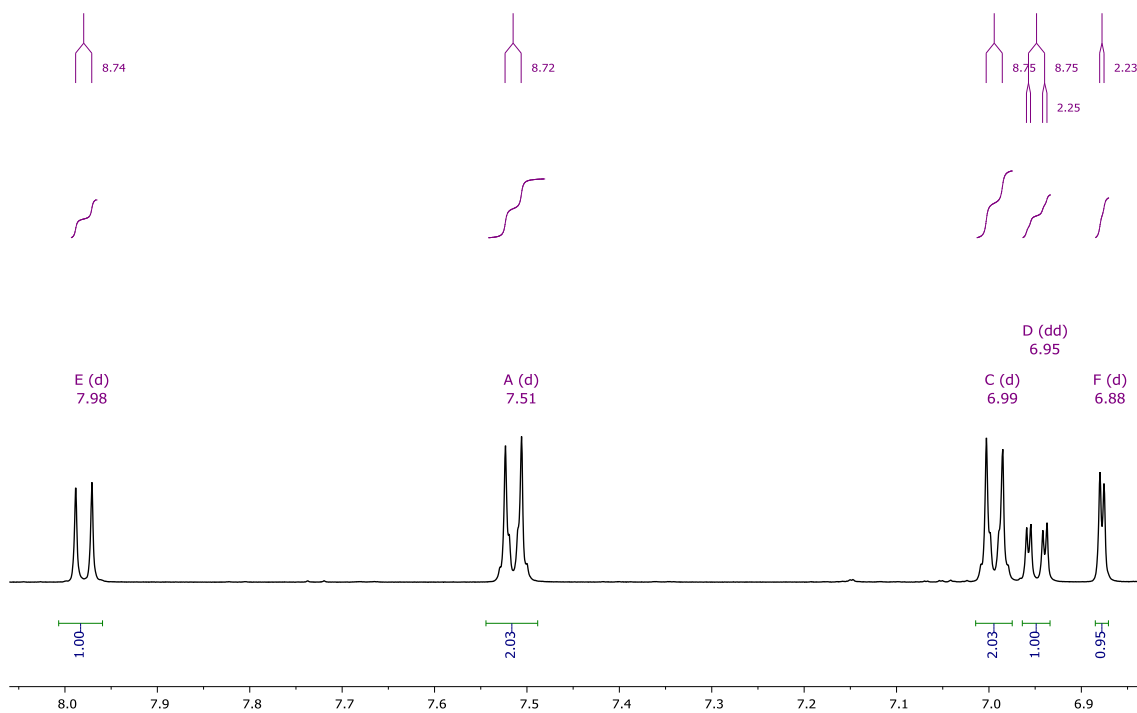


Figura 2.40 Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos a formononetina obtida na fração BMF5A5 [500 MHz, MeOD, $\delta(\text{ppm})$]

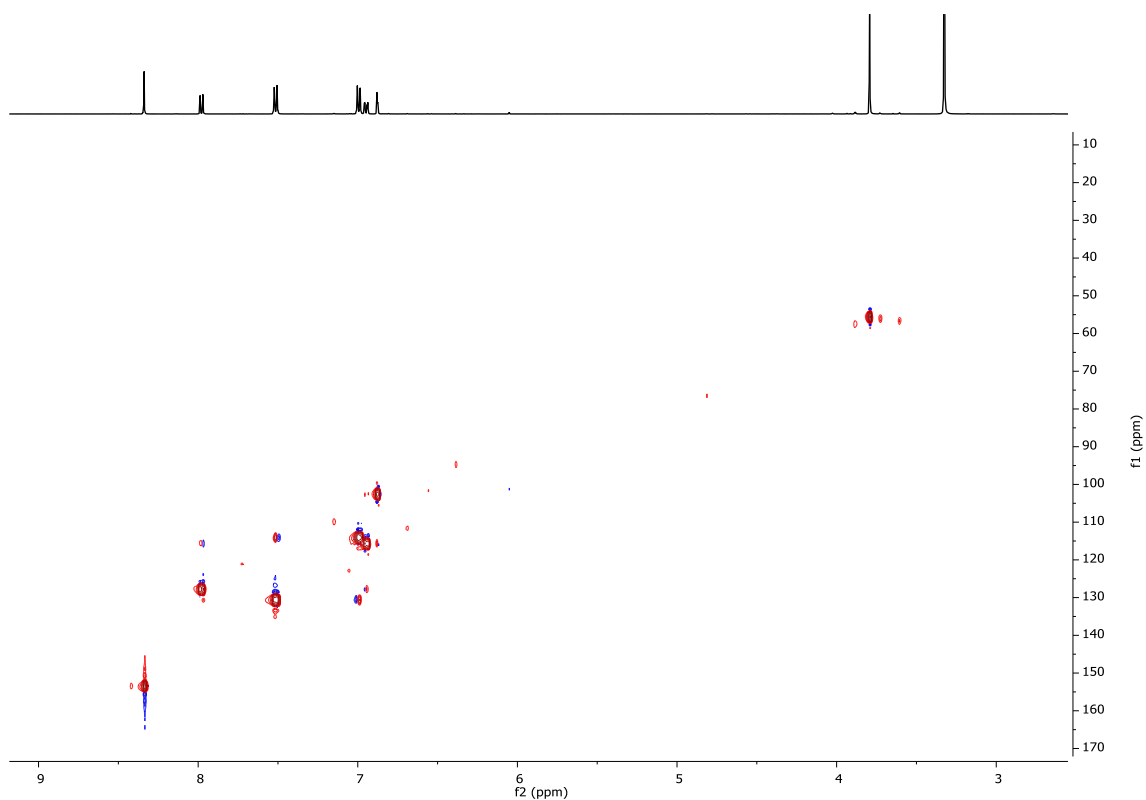


Figura 2.41 Espectro HSQC contendo sinais atribuídos a formononetina obtida na fração BMF5A5 [125 MHz, MeOD, $\delta(\text{ppm})$]

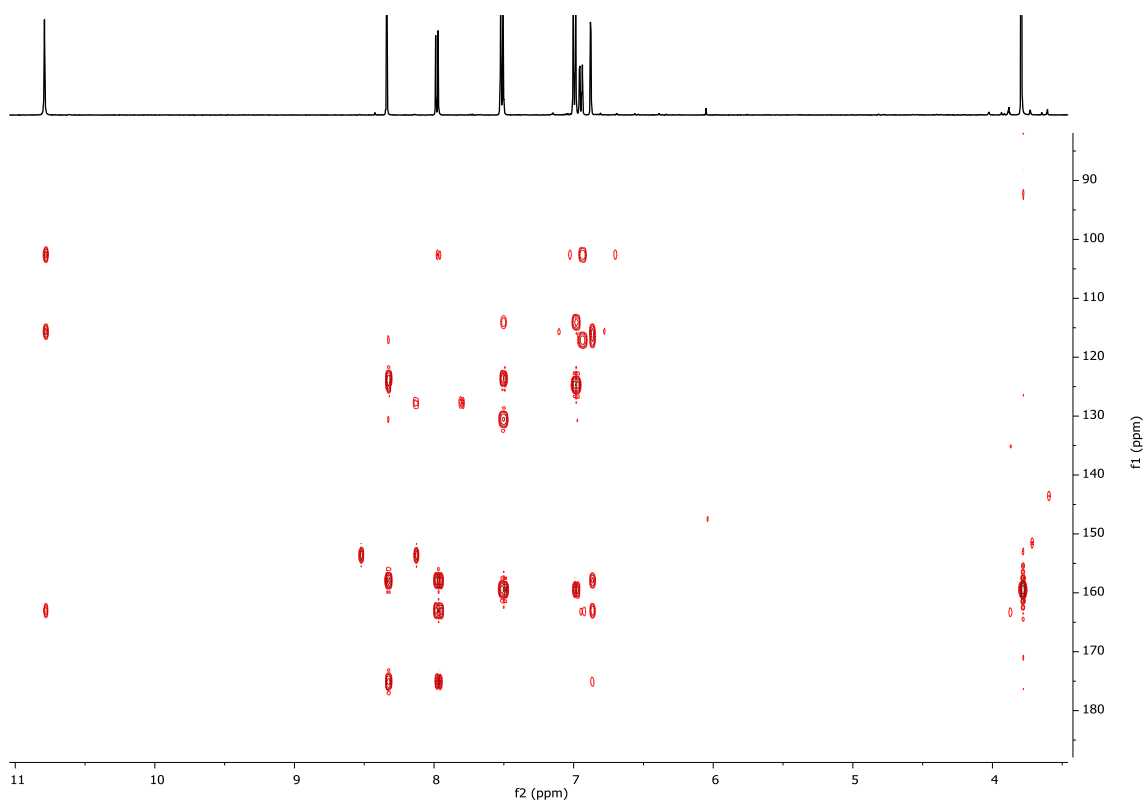


Figura 2.42 Espectro em HMBC contendo sinais atribuídos a formononetina obtida na fração BMF5A5 [125 MHz, MeOD, δ (ppm)]

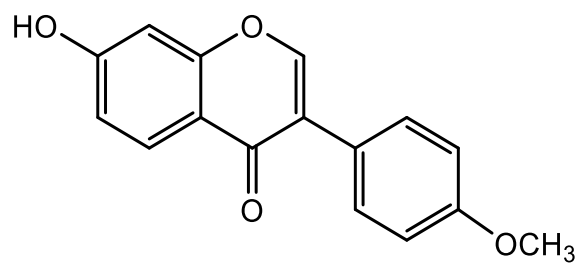


Figura 2.43 Estrutura da formononetina (7) obtida na fração BMF5A5

2.4.1.8 Identificação do santal da fração BMF5A3

A substância isolada e codificada como BMF5A3 foi submetida às análises de RMN de ^1H , HMBC e HSQC que indicou que se tratava de uma isoflavona. O espectro em RMN de ^1H revelou um padrão de sinais que sugerem a presença de dois grupos aromáticos (Figura 2.45). Os três sinais integrando para 1H cada em δ 7,07 (*d*, $J=8,2$), 6,39 (*m*) e 6,42 (*s*) são característicos de anel B de flavonoides, a multiplicidade e integral dos sinais sugerem a presença de mais dois substituintes nesse anel. Já os dubletos em δ 6,38 e 6,57 com integral para 1 hidrogênio são característicos de anel A de flavonoides e estão em relação meta entre eles devido ao valor característico de constante de acoplamento ($J= 2,2$ Hz).

O singlete em δ 3,91 com integral para 3 hidrogênios é indicativo de metoxila aromática. O singlete em δ 8,08 é indicativo da presença de hidrogênio olefinico de isoflavonas pois encontra-se registrado em uma região mais desprotegida.

Os espectros em HSQC e HMBC foram determinantes para o assinalamento de cada um dos sinais e determinação da estrutura (Figuras 2.46 e 2.47). Os dados relatados aliados ao espectro de HRESIMS para esta substância (Fig. 2.48), cujo íon molecular foi registrado em modo negativo em m/z 299,0489 permitiu determinar a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$ [M-H] (calculado para [M-H] $^-$ 299,0555 erro). O comparativo com os dados da literatura permitiu identificar essa substância como o santal, também encontrado nas folhas de *Wyethia mollis* (KNIGHT et al, 2014)

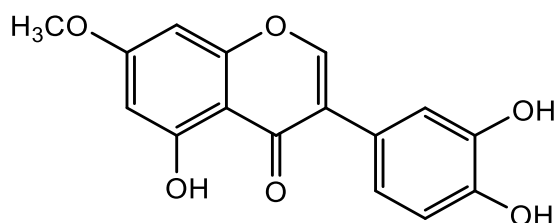


Figura 2.44 Estrutura do santal (**8**) obtido da fração BMF5A3

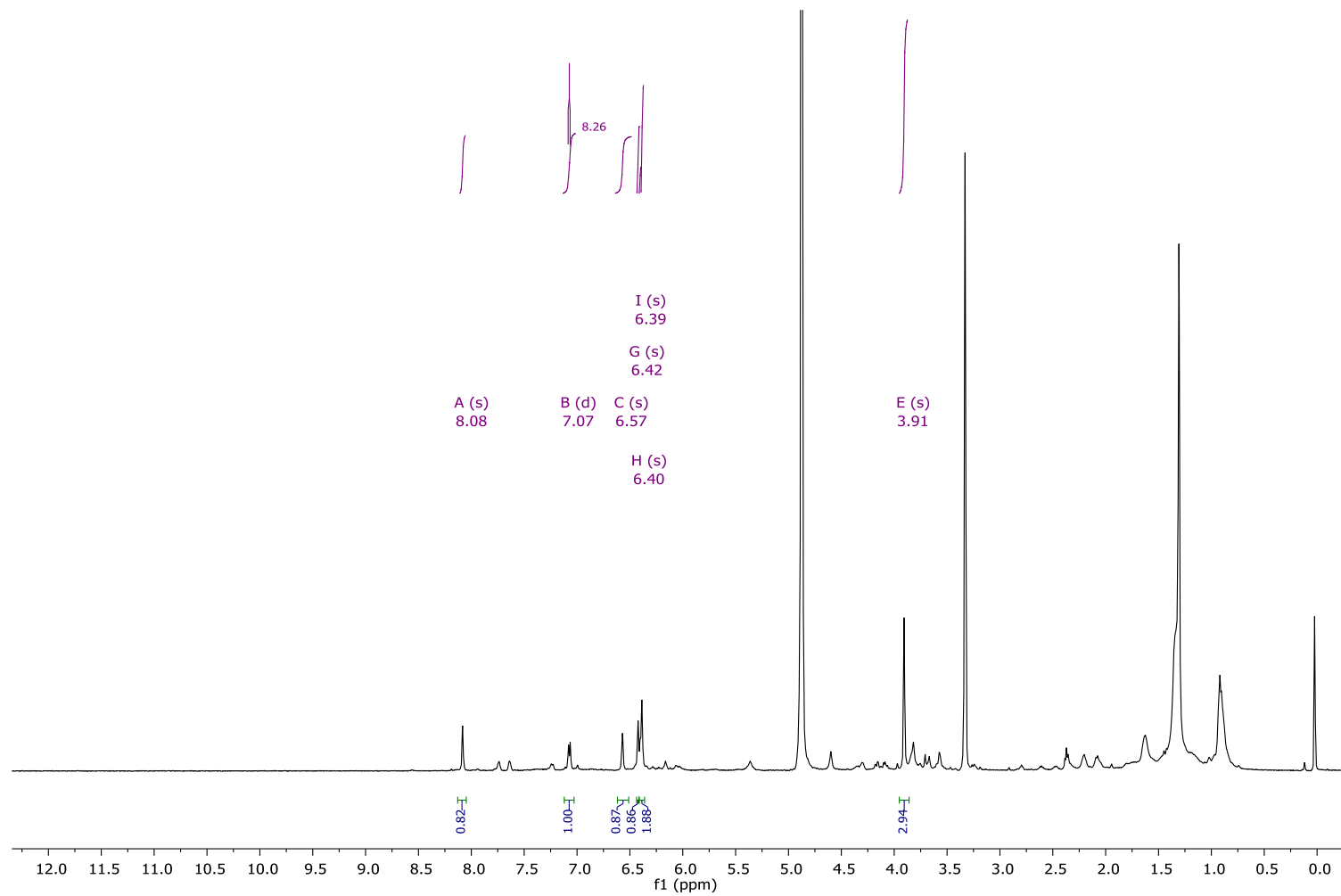


Figura 2.45 Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, MeOD, $\delta(\text{ppm})$] contendo sinais atribuídos ao santal (**8**) obtido da fração BMF5A3

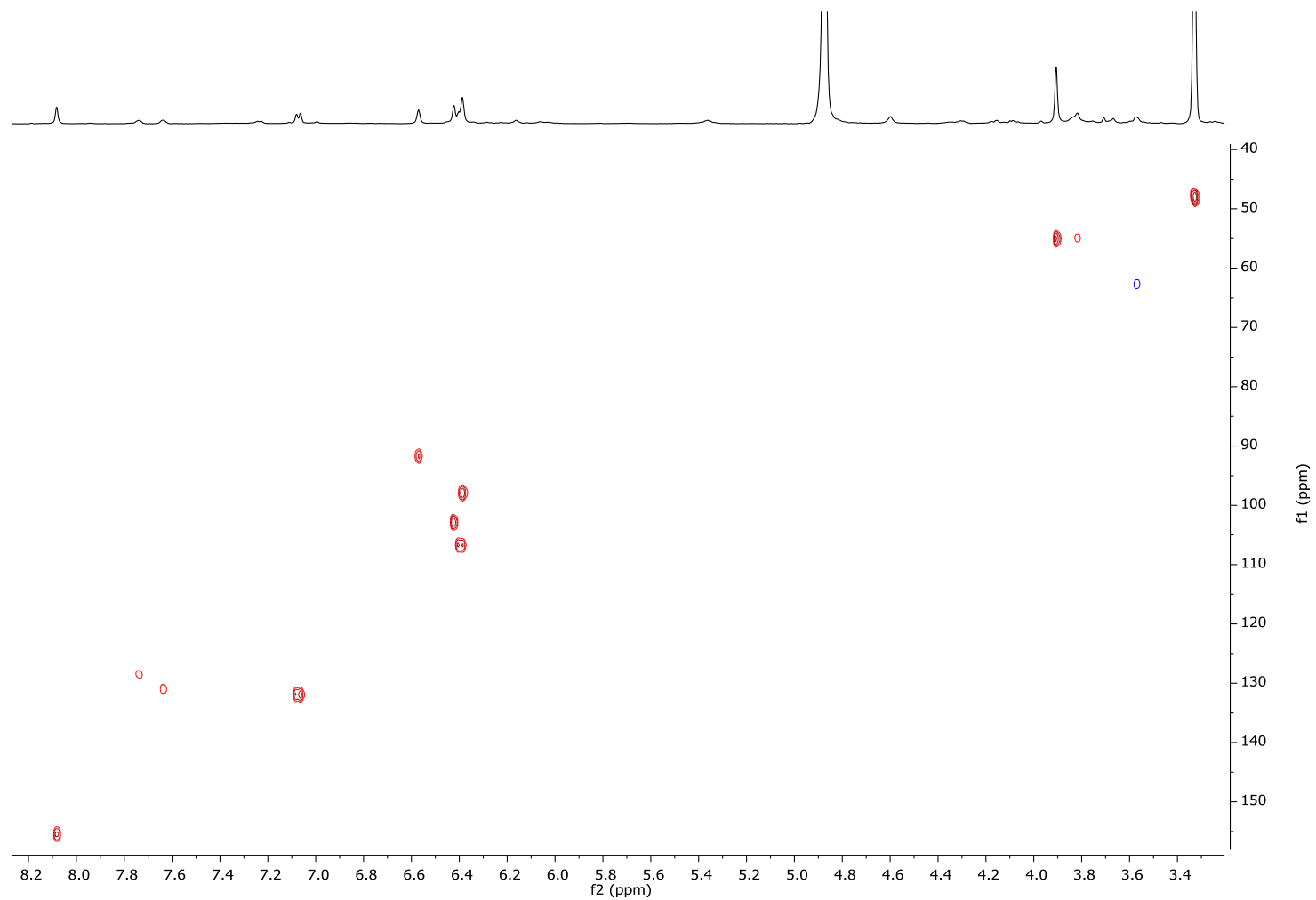


Figura 2.46 Espectro HSQC contendo sinais atribuídos à substância santal obtida da fração BMF5A3 [125 MHz, MeOD, δ (ppm)]

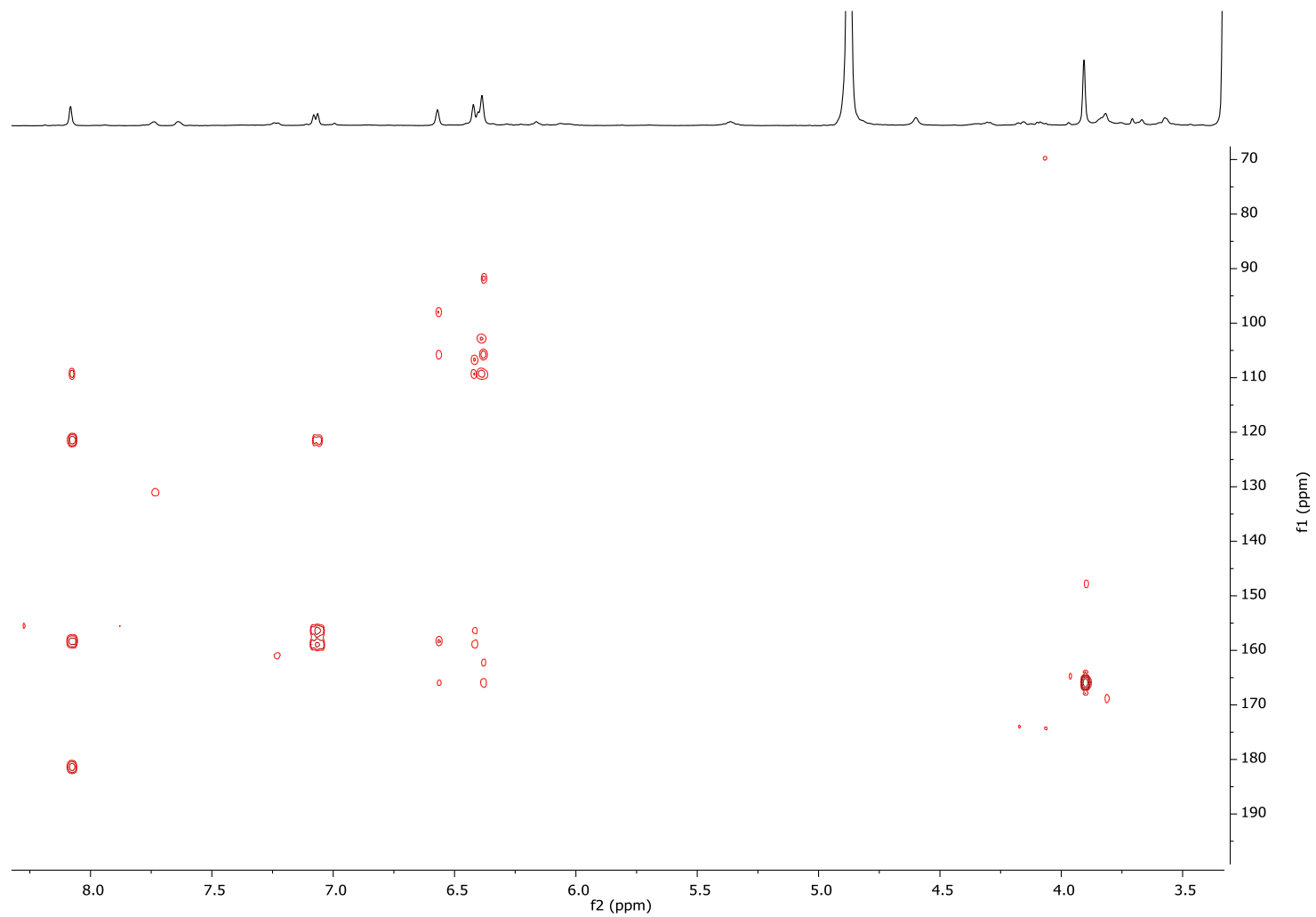


Figura 2.47 Espectro HMBC contendo sinais atribuídos à substância santal obtida da fração BMF5A3 [125 MHz, MeOD, δ (ppm)]

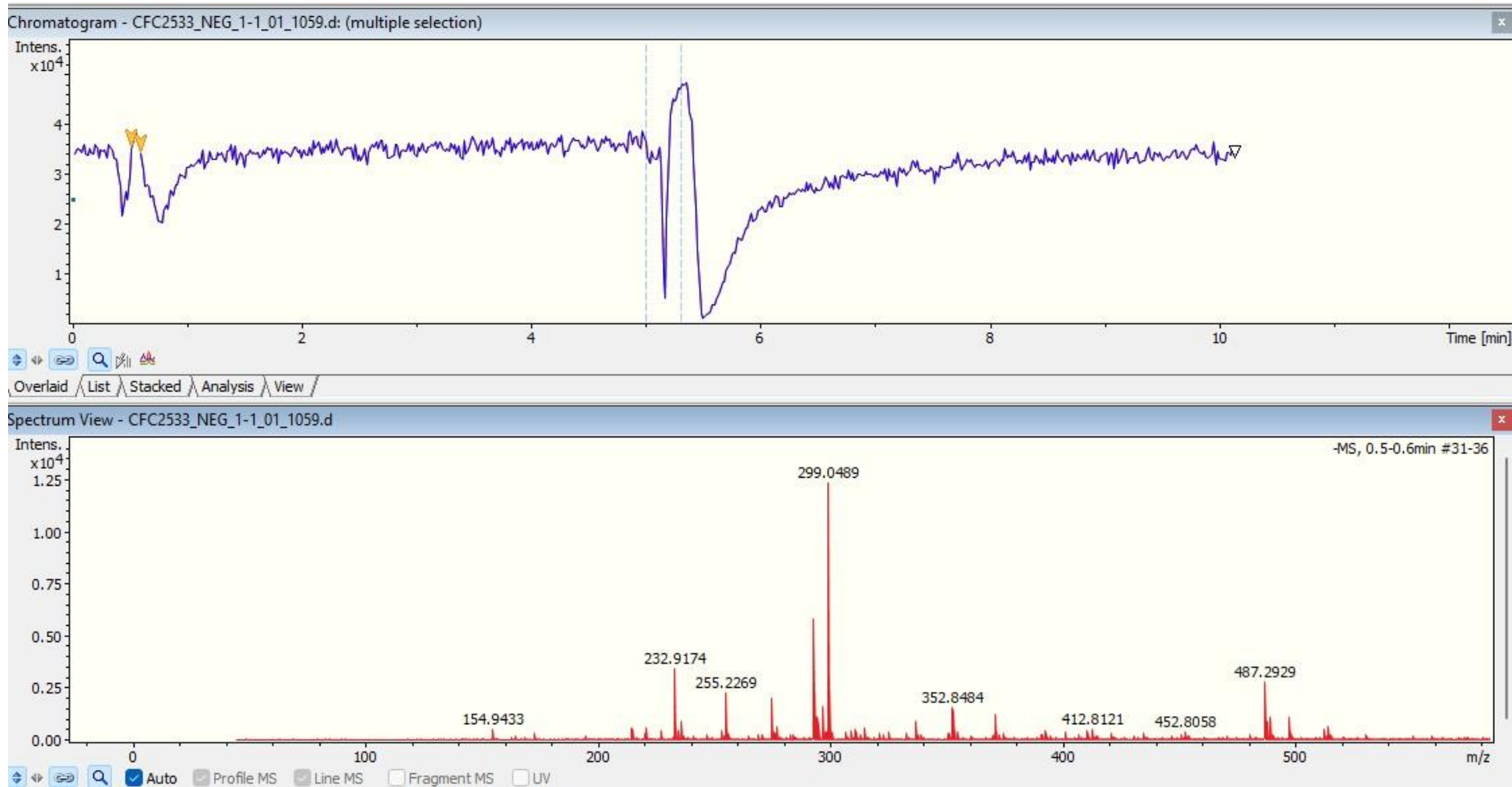


Figura 2.48 Espectro de massas em alta resolução (modo negativo) da substância santal obtida da fraçãoBMF5A3

2.4.1.9 Proposta de estrutura para a substância da fração CF5A12

A substância CF5A12 apresentou espectro de RMN de ^1H que revelou um padrão de sinais que sugerem a presença de dois grupos aromáticos (Figura 2.50). Os dubletos com integral para um hidrogênio cada em δ 6,46 ($J=2,2$ Hz) e 6,42 ($J=2,2$ Hz), estão em região característica de anel aromático e acoplados em meta devido ao valor da constante de acoplamento. Os outros dois sinais de hidrogênio em δ 6,71 (s, 1H) e 8,47 (s, 1H), em região de hidrogênios aromáticos e não apresentam constante de acoplamento, padrão característico de anel aromático (Figura 2.51).

A presença de um sinal desblindado em δ 12,88 (s, 1H) sugere a presença de ligação de hidrogênio intermolecular na estrutura, o que leva a sugestão de que um dos anéis aromáticos está vizinho a uma carbonila que permite tal interação. Os singletos em δ 3,98, 3,90, 3,65 e 3,94 indicam a presença de quatro grupos de hidrogênios metoxilicos na estrutura.

Por meio do espectro em HSQC (Figura 2.52) foram atribuídos, inicialmente, os carbonos ligados diretamente aos hidrogênios da estrutura. Foi identificado pelo espectro em HSQC que o sinal em δ 8,47 (s, 1H) numa região mais desprotegida está ligado a um carbono em região mais protegida, δ 109,6 e que o hidrogênio em δ 5,79 está ligado a um carbono registrado em 95,98.

Correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 2.53) permitiram que fosse feita uma proposta para essa estrutura. O sinal em δ 3,98 apresenta correlação com um carbono em δ 165,6 já a metoxila em δ 3,65 apresenta correlação com um carbono em δ 95,98, enquanto os outros dois sinais metoxilicos estão correlacionados aos carbonos δ 144,6 e 149,6. Esse conjunto de correlações distintas indicam que a metoxila que correlaciona com o carbono em δ 165,6 provavelmente é uma metoxila de éster, enquanto a que correlaciona com o sinal mais blindado dentre estes está ligada a um carbono alifático e que as outras duas são aromáticas.

Por meio das correlações observadas para os hidrogênios aromáticos foi possível identificar todos os carbonos não hidrogenados de ambos os anéis. A presença do grupamento éster e da metoxila em carbono alifático e correlação do hidrogênio em δ 5,79 permitiu que fosse proposto que essa estrutura se trata

de um derivado de ácido benzoico. Essa proposição também permite explicar a desproteção do hidrogênio aromático em δ 8,47, por cota deste estar no campo de desproteção da metoxila alifática.

Devido as correlações dos hidrogênios em δ 6,46 e 6,42, foi proposto que o grupamento de éster estaria ligado ao anel A. Todas as correlações observadas foram ilustradas na figura 2.49 bem como os sinais atribuídos aos carbonos e hidrogênios.

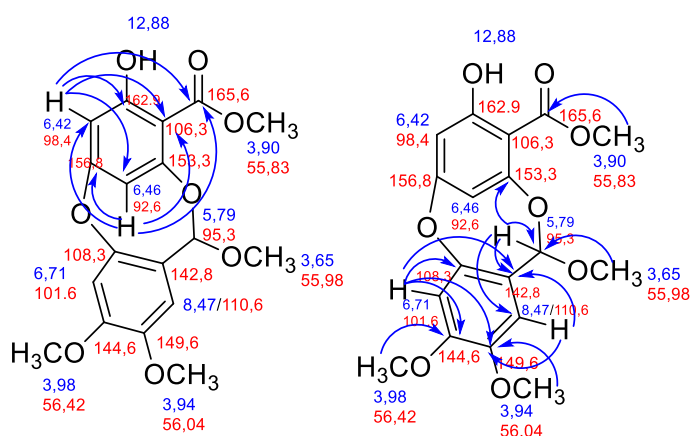


Figura 2.49 Correlações observadas no HMBC

Na literatura, derivados de ácido benzoico apresentam características similares com a estrutura proposta. A exemplo do derivado da depsidona, a hiperwightina A, isolado de *Hypericum wightianum* (YANG et al., 2019), onde o hidrogênio vizinho à carbonila 11 apresentou sinal em região mais desprotegida, δ 7,72, também desblindado quando comparado ao hidrogênio 9 da substância isolada.

Derivados de depsidona apresentam carbonila em sua estrutura e o anel de 7 membros ligado ao anel A em carbonos adjacentes, diferentemente do proposto para essa estrutura, cujo anel de sete membros está ligado ao anel aromático por carbonos não adjacentes. Apesar da congruência das informações encontradas com a estrutura proposta, ainda é necessário do registo do espectro de HRESIMS para determinação inequívoca. Na figura 2.54 é possível observar a estrutura sugerida para a substância obtida dessa fração.

Todos os sinais atribuídos a estrutura, bem como todas as correlações observadas estão descritas na tabela 2.16.

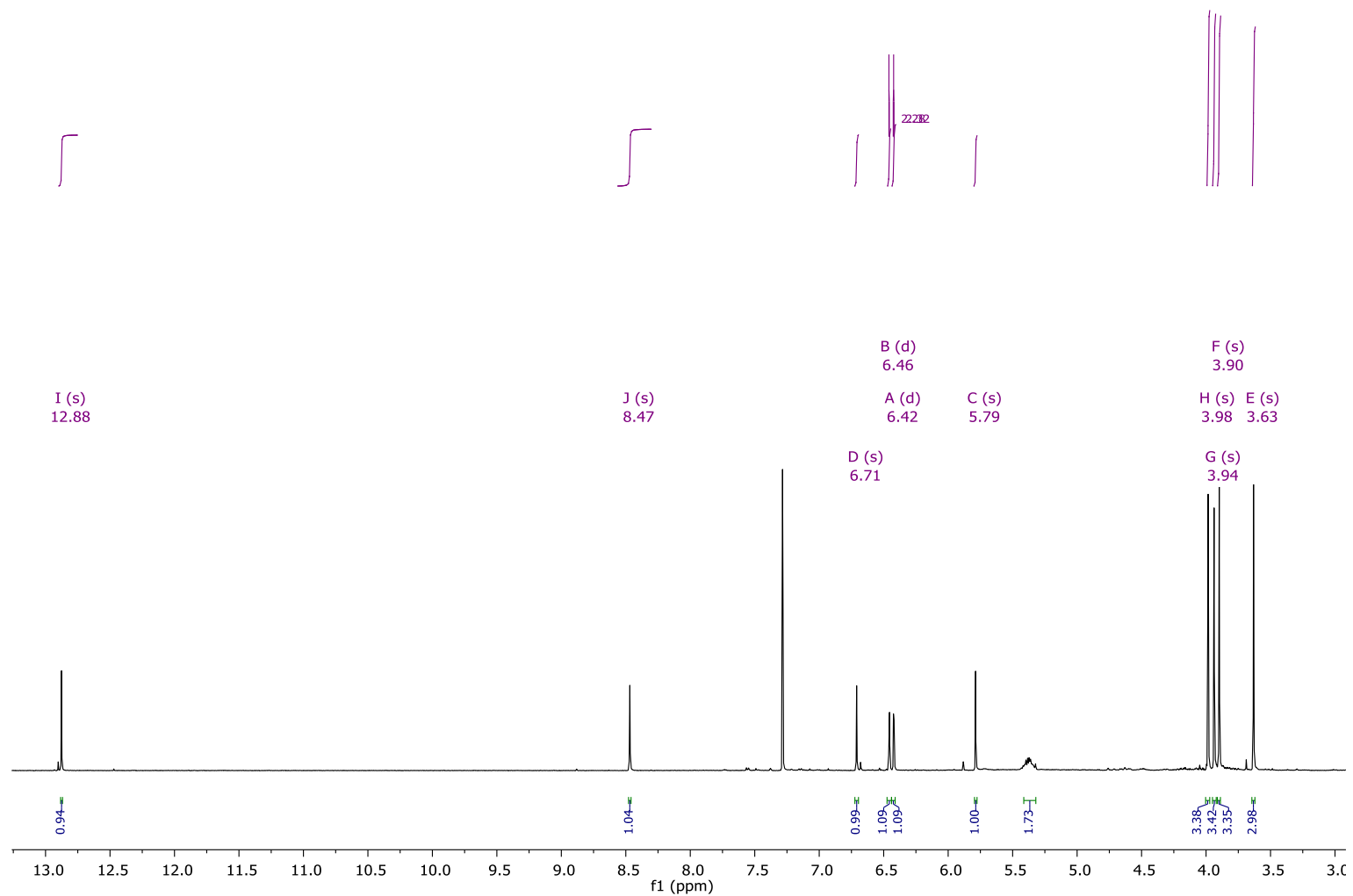


Figura 2.50 Região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos ao derivado de ácido benzoico obtido da fração CF5A12 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

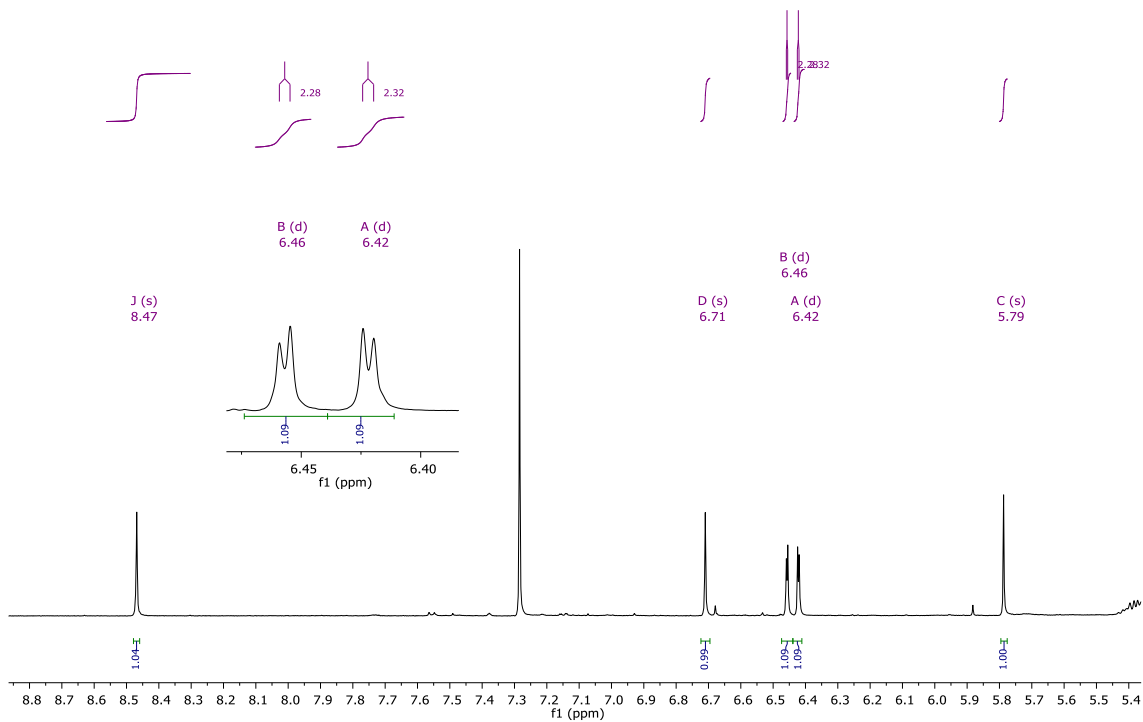


Figura 2.51 Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos ao derivado de ácido benzoico obtido da fração CF5A12 [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

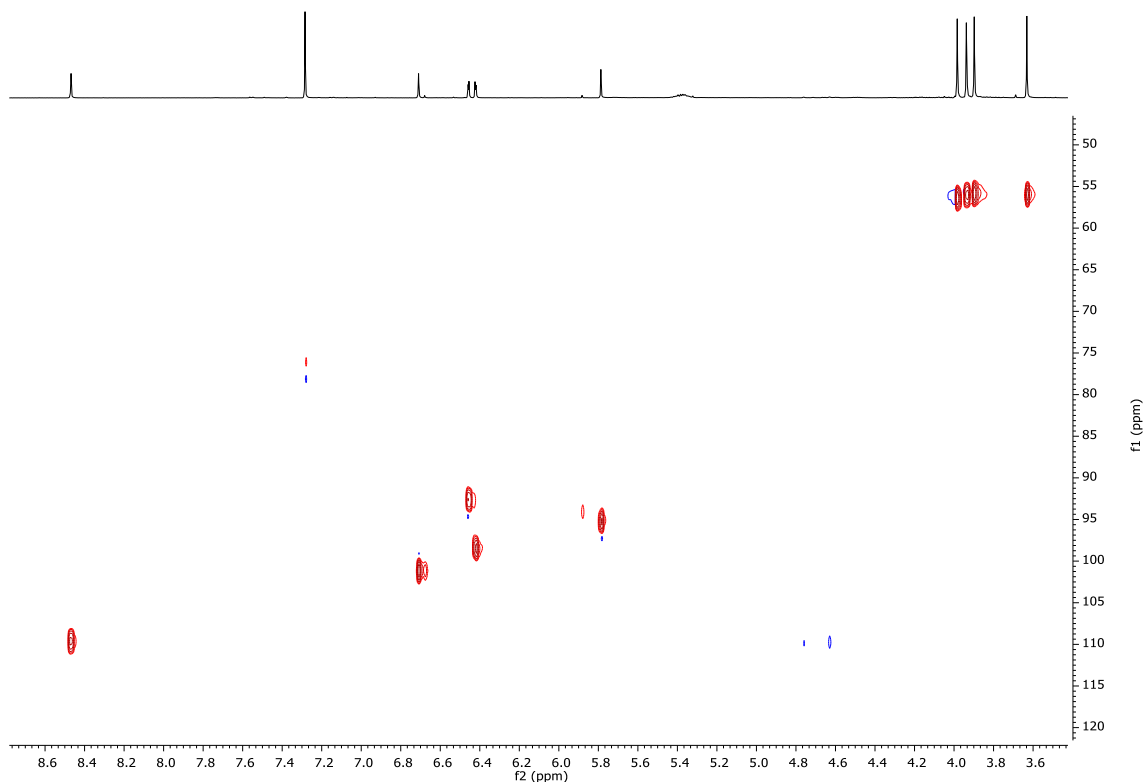


Figura 2.52 Espectro em HSQC contendo sinais atribuídos **Figura 2.51** Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos ao derivado de ácido benzoico obtido da fração CF5A12 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

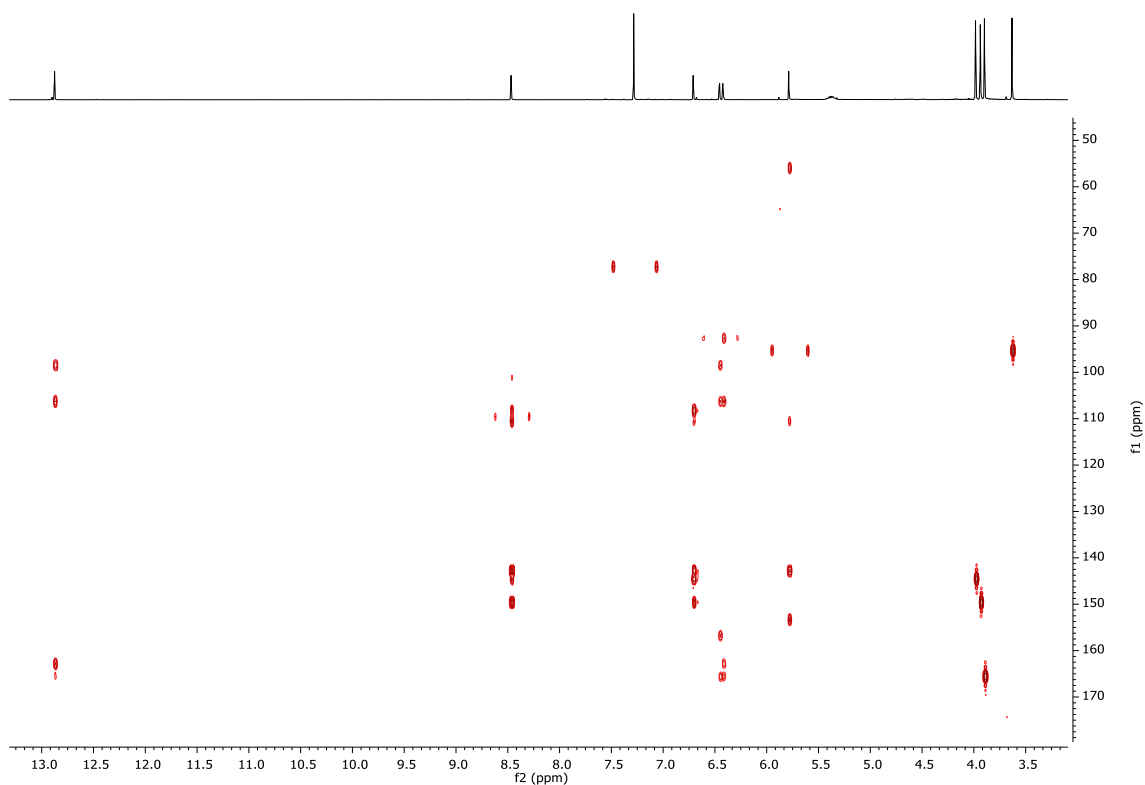


Figura 2.53 Espectro em HMBC contendo sinais atribuídos ao derivado de ácido benzoico obtido da fração CF5A12 [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

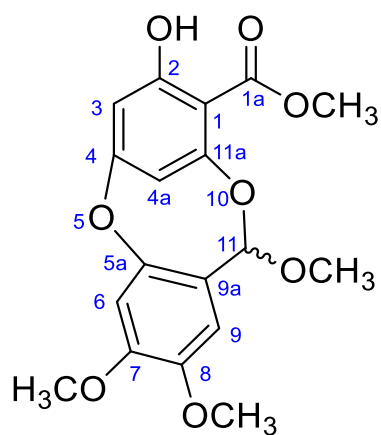


Figura 2.54 Estrutura proposta para o derivado de ácido benzoico obtido da fração CF5A12 (**9**)

Tabela 2.16 Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C [500 MHz (^1H) e ^{13}C por meio de HSQC e HMBC, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)] do novo derivado de ácido benzoico CF5A12 (**9**)

Nº	^{13}C	^1H	Correlações HMBC
1	106,3		
1a	165,6		
2	162,9		
3	98,4	6,42 (d, 2,3 Hz)	92,6; 106,3; 162,9; 165,6
4	156,8		
5	92,6	6,46 (d, 2,3 Hz)	98,4; 106,3; 156,8; 165,6
5a	108,3		
6	101,6	6,71 (s)	108,3; 142,8; 144,6; 149,6
7	144,6		
8	149,6		
9	109,6	8,47 (s)	142,8; 149,7
9a	142,8		
10	-		
11	95,98	5,79 (s)	55,98; 110,6; 142,8; 153,3
11a	153,3		
1'	-	-	-
2'	-	-	-
3'	-	-	-
4'	-	-	-
2-OH	-	12,88 (s)	98,4; 106,3; 162,9
7-OMe	56,42	3,98 (s)	144,6
8-OMe	56,04	3,94 (s)	149,6
11-OMe	55,98	3,65 (s)	95,98
1a-OMe	55,83	3,90 (s)	165,6

Tabela 2.17 Dados de RMN de ^1H das isoflavonas isoladas CFI5 (4), CFI9 (5), BMF5A5 (7) e BMF5A3 (8) [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)]

1H	Prunetina ¹	Biochanina A ²	CFI5 (4)	CFI9 (5)	BMF5A5 (7)	Formononetina ³ :	BMF5A3 (8)
2	8.41 (s)	8.37 (s)	7,88 (s)	7,88 (s)	8,34 (s)	8.34 (s)	8,08 (s)
5					8,0 (d, J=8,7 Hz)	7.97 (d, J=8.5 Hz)	-
6	6.41 (d, J= 2.1 Hz)	6.25 (d,J=2,0Hz)	6,32 (d, 1H, J=2,29Hz)	δ 6,36(m, 0,5H), δ 6,30(m, 0,5H),	6,95 (dd, J=8,7 e 2,2 Hz)	6.94 (dd, 8.5, 1.8 Hz)	6,57 (d, J=2,2 Hz)
8	6.66 (d, J= 2.1 Hz)	6.43 (d,J=2:0Hz)	6,39 (d,1H, J=2,26Hz)	δ 6,40 (d, 1H, J=2,42Hz)/ δ 6,38(d, 1H, J=2,26Hz)	6,88 (d, J=2,2 Hz)	6.87 (d, 1.8Hz)	6,38 (d, J= 2,2 Hz)
2'	7.39 (2H, d, J = 8.6, H-2', 6')	7.50 (d, J=8,6Hz)	7,48 (d, 2H, 8,80Hz)	7,45 (d, J=8,74Hz)/	7,5 (d, J=8,7 Hz)	7.51 (d, 8.5Hz)	6,39 (m)

3'	6.82 (2H, d, J = 8.6 Hz,	7.01 (d,J=8,6Hz)	7,01(d, 2H, 8,82Hz)	δ6,98 (d, 1H, J=8,83Hz)	6,9 (d, J=8,7 Hz)	6.99 (d, 8.5 Hz)	-
5'	6.82 (2H, d, J = 8.6 Hz,	7.01 (d,J=8,6Hz)	7,01(d, 2H, 8,82Hz)	δ6,90 (d, 2H, J=8,71Hz)	6,9 (d, J=8,7 Hz)	6.99 (d, 8.5 Hz)	6,42 (s)
6'	7.39 (2H, d, J = 8.6, H-2', 6')	7.50 (d, J=8,6Hz)	7,48 (d, 2H, 8,80Hz)	δ7,40 (d, 2H, J=8,61Hz)	7,5 (d, J=8,7 Hz)	7.51 (d, 8.5Hz)	7,07 (d, J=8,26 Hz)
5-OH	12.96		12,9	δ12,91 (s, 0,5H)/ δ12,83 (s, 1H)	-	-	-
7-OH					10,79 (s)	10.82 (s)	-
OMe	3.86 (s)	3.86	3,87	δ3,87 (s, 3H)/ δ3,84 (s, 1,5H)	3,79 (s)	3.79 (s)	3,91 (s)

¹(HYUN et al., 2002), ²(LIN et al., 2011), ³(PAN et al., 2021)

Tabela 2.18 Dados de RMN de ^{13}C das isoflavonas isoladas CFDI5 (4), CFDI9 (5), BMF5A5 (7) e BMF5A3 (8) [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)], e correlações (HSQC; HMBC) [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

^{13}C	Prunetina ¹ (100 MHz, DMSO-d6)	Biochanina A ² (DMSO-d6, 125 MHz)	CFDI5 (4)	CFDI9 (5)	BMF5A5 (7)	Formononetina ³ : 1H-NMR (DMSO- d6, 500 MHz).	BMF5A3 (8)	BMF5A3 (8) Correlações
							155,59	109,3/ 121,52/
2	154.4	154.6	-	152.7	153,9	153.7		158,05/ 181,16
3	122.5	122.6	-	130,1	124,2	124.0	121,52	
4	180.4	179.7	-		175,2	174.7	181,16	
5	161.7	161.4	-		128,0	127.0	158,05	
								97,97/158,05/
6	98.0	98.6	99,5	98.2	116,1	115.6	91,84	166,08/ 105,66
7	165.2	164.1	-		163,0	161.4	166,08	

								91,84/105,66/
8	92.4	94.0	94,0	92.4	102,5	103.4	97,97	166,08/ 162,24
9	157.4	157.8	-		158,1	159.0	162,24	
10	105.4	104.4	-	99,5	119,1	118.4	105,66	
1'	121.0	121.8	-	115,5	124,0	124.1	109,3	
2'	130.1	130.3	130,1	130.3	130,0	131.1	106,67	109,3/102,77
3'	115.0	113.5	114,1	114.1	114,5	114.5	156,26	
4'	157.5	-	-		159,3	161.0	158,98	
5'	115.0	113.5	114,1	114.1	114,5	114.5	102,77	
								121,52
6'	130.1	130.3	130,1	130.3	130,0	131.1	131,86	/156,26 / 158,98
OMe	56.1	55.6	55,4	55.8	56,2	55.2	55,23	166,08

¹(HYUN et al., 2002), ²(LIN et al., 2011), ³(PAN et al., 2021), ⁴(ARTHAN et al., 2022)

2.4.2 Estruturas isoladas de *C. fairchildiana*

Até o presente momento, apesar dos diversos relatos de isolamento de compostos das raízes dessa espécie o reestudo da mesma revelou novas estruturas ainda não relatadas nessa espécie ou pelo menos não relatadas nas raízes dessa espécie. O clitoriacetal, apesar de identificado como composto majoritário nas raízes (SANTOS; DAVID; DAVID, 2016), esse composto foi isolado somente após sucessivas etapas cromatográficas e uso de placa preparativa nas raízes da espécie, bem como o 6-desoxiclitoriacetal, segundo majoritário (SANTOS, 2014). O clitoriacetal também foi isolado somente após placa preparativa no seu primeiro relato de isolamento (TAGUCHI; KANCHANAPEE; AMATAYAKUL, 1977).

Isoflavonas que foram relatadas apenas nos galhos dessa espécie, foram isoladas nas raízes pela primeira vez. Neste trabalho uma série de isoflavonas foram isoladas e identificadas. Biochanina A e prunetina foram isoladas como mistura e também separadamente, formononetina, robustigenina e o santal.

É importante observar que isoflavonas, relacionadas a rota bioquímica de obtenção de rotenoides, até o momento, foram observadas apenas nos galhos dessa espécie. Na literatura está relatada a obtenção da biochanina A, e prunetina (GOMES et al., 2005) nesse trabalho identificada nas raízes.

O 6-desoxiclitoriacetal foi o composto obtido com maior rendimento por todas as metodologias testadas. Foi obtido dois epímeros possíveis dessa substância separadamente, um deles ainda não relatado na literatura.

Apesar de os rotenoides serem majoritários nessa espécie grande parte das estruturas isoladas foram isoflavonas. Como essas estruturas fazem parte da biossíntese de rotenoides pode ser um indicativo que esse espécime coletado pode ser um espécime jovem e na ocasião da coleta grande parte dos rotenoides ainda não haviam sido formados ou fatores externos interferiram na biossíntese das principais substâncias desta.

2.5 Considerações finais

Esse estudo revelou que a busca por diferentes rotas de isolamento para os compostos químicos presentes em espécies já estudadas foi oportuna ao passo que foram obtidos resultados inéditos como o isolamento de uma nova substância e o relato de diversas outras ainda não isoladas na espécie, no entanto buscar especificamente as substâncias majoritárias foi um grande desafio.

Ainda é preciso investigar se a dificuldade da obtenção do clitoriacetal por metodologias clássicas está ligada a interação desse com a fase estacionária ou se esse espécime ainda não produziu tal composto em quantidade expressiva para que este fosse isolado.

Capítulo 3: Determinação da configuração absoluta do 6-desoxiclitoriactal isolado de *Clitoria fairchildiana* por dicroísmo circular, síntese de derivados e modificação estrutural do principal composto isolado

Resumo

O 6-desoxiclitoriactal, é um rotenoide do tipo 12a-hidroxirotenóide e é um dos compostos mais abundantes presentes nas raízes de *Clitoria fairchildiana*, que tem estrutura inequívoca elucidada com base na análise de dados espectroscópicos e espectrométricos. Apesar de comumente, as configurações absolutas da maioria dos tipos de 12a-hidroxirotenóides naturais serem consideradas semelhantes às de (-)-rotenona, *cis*-(6aS,12aS), pelo comparativo do desvio da luz polarizada. Onde o sistema de anel B/C é fundido em uma configuração *cis* termodinamicamente favorável, o que é evidenciado pelo deslocamento químico de RMN do ^1H (δ 6,6-6,8) quando em solução de CDCl_3 . O primeiro relato do 6-deoxiclitoriactal estabeleceu que a configuração absoluta deste rotenóide era (+)-(6aR,12aR), com base na comparação da rotação óptica de outros 12a-hidroxirotenóides. O estudo da estrutura cristalina do 6-desoxiclitoriactal descreve informações importantes sobre a estrutura e tamanho de ligações, no entanto não há dados que resultem na determinação da estereoquímica absoluta. Por meio do dicroísmo circular é possível determinar a estereoquímica absoluta de estruturas químicas, e apesar dos deslocamentos químicos do 6-desoxiclitoriactal e tamanhos de ligações coincidirem com as propostas para a rotenona, a determinação da configuração absoluta da estrutura por CD ainda se faz necessária, dessa forma este trabalho descreve a atribuição da configuração absoluta do 6-desoxiclitoriactal comparando-se dados experimentais de DC com cálculos teóricos ECD. Ambos os espectros CD dos enantiômeros foram calculados juntamente com os espectros no UV e IR. Os espectros de CD para rotenóides geralmente mostram múltiplos CEs devido a vários cromóforos com absorção relativamente forte na faixa de 360-190 nm. A comparação do CD e UV experimental com o CD e UV calculados permitiu-nos concluir que a configuração absoluta do 6-deoxiclitoriactal é oposta à estabelecida na literatura. Assim, o rotenóide isolado de *C. fairchildiana* é (6aS,12aS)-6-desoxiclitoriactal. Esse trabalho, além de investigar a estrutura de tal composto, propôs a realização de reações de modificações estruturais, como de acilação, condensação e reação multicomponente. Foram preparados três derivados químicos, sendo que a reação com etanolamina levou a formação de um derivado não usual, com eliminação de uma unidade de floroglucinol.

3.1 Introdução

O 6-desoxiclitoriactal foi isolado pela primeira vez das raízes de *Clitoria fairchildiana* (LIN et al., 1992) e é um dos compostos mais abundantes. Da investigação fitoquímica da *C. fairchildiana* realizada neste trabalho, por meio de metodologias já descritas no capítulo 2, foi possível obter o 6-desoxiclitoriactal com rendimentos expressivos utilizando-se em poucas etapas, dessa forma viu-se que seria possível a investigação mais profunda dessa estrutura dada a disponibilidade e facilidade de obtenção. Além disso, presença de centros quirais destaca a necessidade de determinação da configuração absoluta da estrutura.

Devido a similaridade de tal estrutura com compostos reportados na literatura como o clitoriactal e rotenona, sendo apontado na literatura que alguns sinais característicos que esse grupo de estruturas apresentam evidência da estereoquímica em C-12a em rotenoides naturais está baseada na relação com a configuração (S)' em C-6a (CARLSON; WEISLEDER; TALLENT, 1973), muitos autores consideram que os substituintes nas posições C-12a e C-6a estão sempre apontando para o mesmo plano em estruturas com esse mesmo esqueleto base.

O estudo da estrutura cristalina do 6-desoxiclitoriactal descreve informações sobre a estrutura e tamanho de ligações (ROENGSUMRAN et al., 2003). No entanto, este estudo não menciona expressamente nada em relação a configuração absoluta.

As configurações absolutas de grande parte dos rotenóides naturais do tipo 12a-hidroxirotenóide conhecidos são consideradas similares a da (-)-rotenona, ou seja, *cis*-(6aS,12aS). Muitos autores justificam tal configuração devido aos rotenóides naturais apresentarem uma conformação onde o sistema de anel B/C está fundido em uma configuração *cis* termodinamicamente favorável, o que é evidenciado pelo deslocamento químico do de H1 no espectro de RMN de ¹H na faixa de δ 6,6-6,8 quando em solução de CDCl₃. No entanto, mesmo que considerada a estereoquímica *cis*, existe a possibilidade da formação do outro isômero, o que foi observado quando o primeiro rotenóide, (+)-eritinona, conhecido uma configuração absoluta *cis*-(6aS,12aS) foi isolado da casca da raiz de *Piscidia erythrina*. Mas vale ressaltar que quando um grupo

hidroxila está presente em C12, podem ocorrer tanto a geometria *cis* quanto a *trans*, sendo que a *trans* é caracterizada pelo sinal do H1 no espectro de RMN de ^1H fortemente desblindado em δ 7,6-7,9 em CDCl_3 em relação ao isômero *cis* (Tahara,1990).

Esse composto tem apresentado diferentes atividades biológicas, inclusive atividade anti-inflamatória *in vivo* ((PEREIRA DA SILVA; PARENTE, 2002). Nesses estudos, foi verificado que a integralidade da junção dos anéis B/C é importante para a existência da atividade biológica. Dessa maneira, obtenção de derivados químicos são importantes para obtenção de novos derivados bioativos.

Algumas estratégias de obtenção de derivados foram adotadas baseadas na análise da estrutura de tal composto e disponibilidade de material. De modo geral, substâncias heterocíclicas são predominantes entre as estruturas das substâncias que possuem ação terapêutica (CUNHA et al., 2015). Devido a presença da hidroxila fenólica na estrutura uma das metodologias empregadas foi a proposta por Hans von Pechmann (1883), na qual há a formação de mais um ciclo na estrutura, nesse caso levando a formação de uma cumarina, por meio de uma reação de condensação entre o composto fenólico e um composto dicarbonilado catalisada por ácido.

A acilação orto-dirigida também foi realizada de modo a inserir na estrutura mais um grupo carbonílico, o que possibilitaria a formação de outros compostos a partir desse composto intermediário, onde foi empregada a metodologia baseada na ortoacilação regioseletiva de fenol catalisada por FeCl_3 em micro-ondas (NAEIMI; MORADI, 2007). De modo a obter o derivado metoxilado, foi empregada as mesmas condições utilizadas na síntese de Williamson (DIAMANTI et al., 2021). Por fim, a reação multicomponente, também conhecida como Reação de Mannich, foi empregada de modo a levar a obtenção de aminoderivados substituídos na posição vizinha a hidroxila fenólica (JAIN et al., 2014).

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo Geral

Preparar derivados químicos e determinar a estereoquímica absoluta do 6-desoxiclitoriacetal, bem como determinar a estrutura dos derivados obtidos por meio de modificação estrutural espécie *C. fairchildiana*.

3.2.2 Objetivos específicos

- Determinar a configuração absoluta do 6-desoxiclitoriacetal por meio de dicroísmo circular eletrônico
- Preparar derivados do 6-desoxiclitoriacetal por meio de reações de modificação estrutural
- Determinar a estrutura dos derivados obtidos por meio de análise de RMN e espectrometria de massas

3.3 Fundamentação teórica

3.3.1 Determinação da configuração absoluta por dicroísmo circular

Existem diversas técnicas comumente utilizadas para determinação da configuração absoluta de moléculas e a escolha do uso de cada uma delas é baseada em critérios mínimos que são necessários para sua aplicação. A cristalografia de raio-X foi o primeiro método utilizado com tal finalidade, para utilizá-lo é necessário obter cristais únicos de alta qualidade. A RMN apesar de ser uma técnica insensível a quiralidade, ao combinar a estrutura em investigação com um auxiliar quiral, essa técnica passa a ser útil na determinação da configuração (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005). Outra estratégia é realizar a síntese estereocontrolada, onde um dos enantiômeros seria obtido com grande pureza enantiomérica. Espectroscopia de massas também pode fornecer informações importantes relacionadas a determinação da configuração quando combinada com a espectroscopia rotacional, apesar de ser menos comum essa aplicação (ALLENMARK; GAWRONSKI, 2008).

Muito tem se utilizado de comparações de rotação ótica para determinação da configuração absoluta de moléculas sintetizadas somado ao estudo de estrutura cristalina que descreve informações sobre conformação da estrutura e tamanho de ligações (ROENGSUMRAN et al., 2003), no entanto não é possível determinar expressamente nada em relação a configuração absoluta, pois os dados não são suficientes. Além disso os produtos naturais podem ser obtidos como misturas enantioméricas e conseqüentemente não apresentam atividade ótica (NOVAK; TRAUNER, 2020).

Métodos quirópticos, são métodos espectroscópicos sensíveis a quiralidade, que se baseiam na interação diferencial de uma molécula quiral em uma mistura não racêmica com a radiação circularmente polarizada, não podendo apresentar elementos de simetria. Existem alguns tipos de métodos quirópticos: Rotação ótica, Dispersão rotatória ótica, Dicroísmo circular eletrônico, Dicroísmo circular vibracional, Atividade ótica raman (JÄHNIGEN, 2023). De modo geral, a determinação da configuração absoluta por meio desses métodos ocorre em solução, sem necessidade de formação de cristais, derivatização da estrutura ou utilização de cromóforos (SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005).

3. 3.2 Determinação da configuração absoluta do 6-desoxiclitoriactal

O 6-desoxiclitoriactal (1) faz parte do grupo dos 12a-hidroxirotenóides e foi isolado pela primeira vez nas raízes de *Clitoria macrophylla* (LIN et al., 1992). É descrito na literatura que a confirmação da fusão do anel cis B/C em rotenóides ocorreu por meio da avaliação dos desvios químicos nos sinais observados nos espectros de RMN de ^1H para uma série de rotenóides. Estudos anteriores afirmam que a evidência da estereoquímica em C-12a em rotenóides naturais está baseada na relação com a configuração (S)' em C-6a.

Desde o primeiro relato de isolamento do 6-desoxiclitoriactal é considerado que essa estrutura apresenta uma conformação determinada e uma consequente estereoquímica pré-definida que provavelmente foi baseada em uma série de dados de estruturas similares (LIN et al., 1992). Por exemplo, em estudo anterior realizado por Crombie (CROMBIE, 1984) dados de biossíntese de rotenóides foram reunidos, nos quais todos apresentavam o mesmo padrão conformacional e consequentemente mesma estereoquímica. A investigação da estrutura cristalina e molecular da rotenona apresentou resultados que apontaram para as configurações 6aS, 12aS, 5'R deduzidas para essa estrutura (ARORA et al., 1975). No entanto, para rotenona (2), o padrão de prótons 6a não é claro no espectro de RMN de ^1H e o duplete de prótons 12a coincide com o sinal do grupo OMe, apesar de ter sido considerado o mesmo padrão de configuração (CARLSON; WEISLEDER; TALLENT, 1973).

Uma análise da estrutura cristalina do 6-desoxiclitoriactal revelou que a molécula adota uma conformação em forma de telhado, onde foi evidenciada que ambos os planos são quase achatados com planos médios de mínimos quadrados de 0,0035 Å e 0,0069 Å, respectivamente (ROENGSUMRAN et al., 2003).

Nesse estudo o plano basal é tido como referência para descrição do posicionamento dos átomos ou grupos de átomos na estrutura. Embora o anel central B (C1a a C12a) e o anel C (C12a a C12) exibam uma conformação distorcida em forma de meia cadeira, os átomos C6 e O1 estão apenas ligeiramente deslocados em relação ao plano basal, com valores de -0,303(3) Å e 0,023(3) Å, respectivamente. Já o átomo de oxigênio O2 no sistema de anéis

de quinolina se encontra quase no mesmo plano basal, a uma distância de 0,037(2) Å fora desse plano.

Outro ponto analisado pelos autores é que devido a influência da ligação de hidrogênio intramolecular entre O7 e O6, a distância da ligação C11a-C11, 1,430(2) Å, é aumentada quando comparada as distâncias das ligações C-C nos anéis de benzeno, que estão na faixa esperada de 1,377(2) Å a 1,414(2) Å. A análise da porção aromática da estrutura revelou que todos os grupos metoxil são aproximadamente coplanares aos anéis de benzeno.

Além das interações entre átomos adjacentes, a análise da estrutura cristalina também evidenciou interações entre as duas porções aromáticas, anéis A e B. Foi visto que o anel dimetoxil fenil (anel A; C1 a C1a) é posicionado exatamente acima do outro anel metoxil fenil (anel B) da molécula vizinha por meio de interações de Van der Waals em vez de interações π - π por conta do átomo de hidrogênio hidroxila, H3, apresentar uma ligação de hidrogênio bifurcada entre o O6 do sistema de anel de quinolina e o O1 do anel furano da molécula vizinha ($x-1, y, z$). Como consequência há a formação de uma pseudo cadeia polimérica infinita ao longo do eixo α (ROENGSUMRAN et al., 2003).

Os rotenoides isolados da casca das raízes de *Piscidia carthagenensis*, rotenona (**2**), miletone (**3**) e piscicartona (**4**) tiveram sua configuração absoluta determinada por dicroísmo circular vibracional (DCV). A configuração absoluta de uma das estruturas foi determinada por meio de comparação, considerado que os três rotenóides isolados por partilharem uma origem biogenética comum, deveriam ter a mesma configuração absoluta. Uma vez que as estruturas moleculares de alguns rotenoides sugere estruturas moleculares rígidas e, portanto, relativamente poucos conformeros de baixa energia, uma forma na qual a configuração absoluta de alguns rotenoides foram determinadas foi por meio da comparação da configuração experimental e espectros calculados de dicroísmo circular vibracional, onde foi confirmado o padrão *cis*-(6aS,12aS) normalmente encontrado (ORTEGA; PÉREZ-HERNÁNDEZ; JOSEPH-NATHAN, 2019). No entanto, mesmo que considerada a conformação *cis*, existe a possibilidade da formação de outro conformero, o que foi observado quando o primeiro rotenóide, (+)-eritinona (**5**), de configuração absoluta *cis*-(6aR,12aR) foi isolado da casca da raiz de *Piscidia erythrina* (TAHARA et al., 1990).

Apesar de que para um de rotenoide isolado a posição relativa dos substituintes em 12a e 6a indicarem comumente um padrão *cis*, vale ressaltar que quando um grupo hidroxila está presente em C12, podem ocorrer geometrias *cis* e *trans*, onde a geometria *trans* é caracterizada pelo H1 fortemente desblindado no espectro de RMN de ¹H registrado δ 7,6-7,9 em CDCl₃ (YENESEW et al., 2003). Para os rotenoides isolados das raízes de *Mirabilis multiflora*, o resultado da determinação da configuração absoluta por dicroísmo circular eletrônico (DCE) demonstrou que os dados obtidos para mirabijalona A (6), boeravinona C (7) e 6-metoxiboeravinona C (8) evidenciaram a presença de um anel trans-B/C incomum. Adicionalmente os dados de RMN de ¹H apresentaram um valor do desvio químico para H-1 [(δH 7,76 (6) 7,81 (7) e 7,84 (8) em metanol-d₄)] fortemente desblindado, o que implicaria numa configuração absoluta (6aR,12aS) ou (6aS,12aR). Esses dados de RMN foram consistentes com os dados dos espectros de ECD de **2**, **5** e **6**, que mostraram valores positivos e negativos sequenciais em 300-330 e 348-360nm demonstrando consistência com uma configuração absoluta trans (6aS,12aR) (SHARMA et al., 2021).

O espectro de dicroísmo circular eletrônico (ECD) da multiferona A (**9**) mostrou um efeito Cotton positivo (CE) em ca. 322 nm e um CE negativo em ca. 357 nm, consistente com uma configuração absoluta (6aS, 12aR), bem como o espectro de ECD da multiferona B que forneceu um CE positivo em ca. 313 nm e um CE negativo em ca. 348 nm, remanescente de uma configuração absoluta (6aS,12aR) (SHARMA et al., 2021).

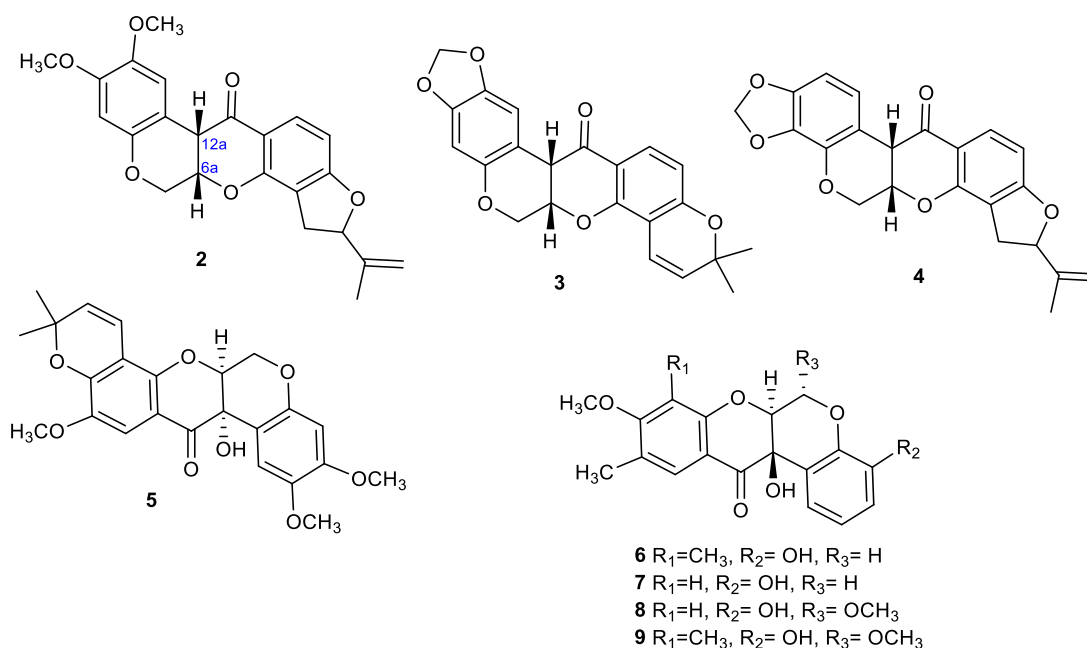


Figura 3.1 Rotenoides isolados com configuração absoluta determinada

3.3.3 Estratégias de obtenção de derivados

A condensação de Pechmann foi descoberta em 1883 por Hans von Pechmann (1883). A reação de condensação de Pechmann envolve um fenol e um éster/ácido carboxílico que contenha um grupo β -dicarbonílico e que na presença de um catalisador ácido leve a formação de um produto condensado. Esse tipo de reação é um dos métodos clássicos de obtenção de cumarinas e dependendo dos substituintes (CUNHA et al., 2015). Que além de fornecer bons rendimentos de cumarinas 4-substituídas, fornece conversão rápida, sendo o tempo de reação para alguns reagentes de apenas 10 minutos (POTDAR; MOHILE; SALUNKHE, 2001).

Reações de acilação em compostos aromáticos, especificamente a reação regioseletiva em compostos fenólicos leva a obtenção de compostos ceto-derivados muito úteis na formação de intermediários de síntese. Uma das rotas mais comuns de obtenção desses derivados é por meio da reação clássica de acilação de Friedel-Crafts de derivados fenólicos na presença de ácidos de Lewis (Moradi, 2007).

A reação de acilação de fenóis pode ser promovida ao passo que o derivado fenólico é posto em contato com ácidos carboxílicos na presença de

alguns ácidos de Lewis sob irradiação de microondas. Na literatura é relatada a obtenção de derivados *orto*-substituídos com o composto nafitol (**10**) quando compostos hidroxiarílicos reagem com ácido acético na presença de FeCl₃ sob irradiação de micro-ondas (NAEIMI; MORADI, 2007).

A síntese de Williamson é empregada de modo a se obter o produto de O-alkilação ou o produto O-metoxilado. Essa reação envolve um haloalcano (ou haletos de alquila) e um álcool em que na presença de uma base forte tem como resultado a formação de um éter e um sal como produtos secundários (DIAMANTI et al., 2021).

Uma das estratégias utilizadas na obtenção aminoderivados é por meio da reação multicomponente, também conhecida como Reação de Mannich. Tal metodologia permite a obtenção de aminoderivados substituídos na posição vizinha a hidroxila fenólica, sendo assim também é uma reação regioseletiva (JAIN et al., 2014).

3.4 Metodologia

3.4.1. Isolamento do 6-desoxiclitoriacetal de *C. fairchildiana*

Conforme descrito no capítulo 2 deste trabalho, o 6-desoxiclitoriacetal foi obtido do extrato das raízes de *C. fairchildiana*. Depois de obtido o extrato bruto em DCM, preparado por maceração durante o período de 48h, a partir de 600 g de raiz seca e moída., particionada com DCM, após a remoção de graxas com hexano, foi obtido o extrato em DCM (0,724g). Toda a massa desse extrato foi submetida a cromatografia flash automatizada num equipamento MPLC (Biotage, mod. Isolera) usando um cartucho de coluna flash pré-embalado com sílica de fase normal de 100g, cuja fase móvel utilizada foi a mistura binária em gradiente de Hexano/AcOEt num fluxo de 12 mL/min. Nessa etapa foram obtidas 14 frações onde a fração 1 correspondeu ao 6-desoxiclitoriacetal (116 mg e 16,02%, em relação a fração em DCM e 1,93% em relação ao material vegetal).

3.4.2. Cálculos teóricos de Dicroísmo Circular Eletrônico

Os cálculos foram realizados usando DFT wb97xd/6-311++g(d,p) em metanol (para a geometria das duas moléculas). E o ECD: TD DFT wb97xd/6-311++g(d,p) em etanol. O solvente foi usando modelo PCM (Polarizable Continuum Model). Também foram simulados os espectros no IV e UV. Os cálculos foram realizados no Instituto de Física da UFAL com colaboração do Prof. Dr. Vinicius Manzoni.

O espectro de DC foi registrado a partir de uma solução de 0,01 mg/mL num equipamento Espectropolarímetro de Dicroísmo Circular JASCO J-815 com um detector de PTM no modo fotométrico, num range de medidas de 500 – 190 nm.

3.4.3. Reações de modificação estrutural

3.4.3.1 Reação de Pechmann com o 6-desoxiclitoriacetal

Foi preparada uma solução equimolar entre 37,4 mg de 6-desoxiclitoriacetal em 15 mL de acetoacetato de etila em banho de gelo. Após a total solubilização foram adicionados 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado também gelado lentamente. Durante o gotejamento já foi possível observar a formação de um sólido laranja, mas o meio tornou-se homogêneo no decorrer do tempo. O conjunto foi mantido sob agitação durante 30 minutos. Posteriormente o material de síntese foi posto em água gelada havendo então a formação do precipitado, PR6DEO. O sólido obtido (27,3 mg, 91 %) foi filtrado e lavado com água gelada.

3.4.3.2 Acilação orto-dirigida do 6-desoxiclitoriacetal

A ortoacilação do 6-desoxiclitoriacetal foi realizada na presença de FeCl_3 sob irradiação de microondas. Uma mistura de 0,18 mmol do substrato (33,6 mg), 0,062 mmol de cloreto de ferro (III) e 11,4 mL de ácido orgânico foi irradiada num forno de microondas durante 3 minutos. O progresso da reação foi monitorizado por TLC. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura foi dissolvida em 10 mL de DCM e a solução foi lavada com aproximadamente 20 mL de água e, posteriormente 20 mL de NaHCO_3 para remoção do excesso de ácido orgânico, filtrada e evaporada. O material obtido, AO6DEO, foi purificado por CC utilizando o éter de petróleo como eluente obtendo-se 17,4 mg do produto (58%).

3.4.3.3 Obtenção de derivados do 6-desoxiclitoriacetal com iodeto de metila

Para obtenção do derivado metoxilado, 0,055 mmol do 6-desoxiclitoriacetal foi solubilizado em 5 mL de DMSO, juntamente com 0,8 mmol de K_2CO_3 (37,3 mg) e 0,8 mmol de iodeto de metila (35 μL). O progresso da reação foi monitorizado por TLC e após 2 horas não foi identificada a presença de reagente no meio, dessa forma foram adicionados ao meio 30 mL de água, no entanto como não foi observada a formação de precipitado, a mistura foi

concentrada em evaporador rotativo e o produto, RM6DEO, obtido por partição com clorofórmio fornecendo assim 15,6 mg do produto (52%).

3.4.3.4 Reação multicomponente do 6-desoxiclitoriacetal com etanolamina e formaldeído

Foram utilizadas 30 mg do 6-desoxiclitoriacetal, o que corresponde a 0,08 mmol, solubilizada em metanol. A quantidade equivalente da etanolamina utilizada foi de 0,008 mol, 4,9 µL. A quantidade de formaldeído utilizada foi de 35 µL. A solução foi agitada a 40 °C por 8 h, e o progresso da reação foi monitorizado por TLC, sendo necessário adicionar quantidade equivalente do aminoderivado mais uma vez, mantendo em meio reacional por mais 16h. A mistura foi concentrada e submetida a separação cromatográfica CC em coluna isocritica CHCl₃:MeOH 9:1 fornecendo 8,3 MG do produto REF6DEO (27,6%).

3.4.4. Obtenção dos espectros

Os espectros na região do IV foram obtidos no equipamento IRAffinity-1 da Shimadzu, as leituras na região UV-vis foram feitas no espectrofotômetro de UV-vis Varian Cary 50, disponíveis nos laboratórios do Instituto de Química da UFBA.

Os espectros de RMN e de massas foram obtidos da Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP) e também no Instituto de Química da UFG, as análises de massas de alta resolução foram realizadas no equipamento Amazon Speed ETD da Bruker (LTF-UFPB), quando infusão direta, e as análises de RMN nos equipamentos de RMN de 300 MHz e 500 MHz também da Bruker.

3.5. Resultados e discussão

3.5.1. Dicroísmo circular

O 6-desoxiclitoriacetal, cujo número de registro no CAS é de 146163-05-5, tem estereoquímica dos carbonos 6a e 12a assinaladas como *R*. A literatura

referenciada não se refere a determinação de configuração absoluta dessa estrutura e sim a uma configuração relativa.

Dessa forma neste trabalho foi realizada a atribuição da configuração absoluta do 6-dexilitoriacetal pelo cálculo do DCE. Ambos os espectros DC dos enantiômeros foram calculados (Figuras 3.2 e 3.3), juntamente com os espectros UV e IV (Figuras 3.4 e 3.5, respectivamente). Os espectros de DC para rotenoides geralmente mostram múltiplos CEs devido a vários cromóforos com absorção relativamente forte na faixa de 360-190 nm.

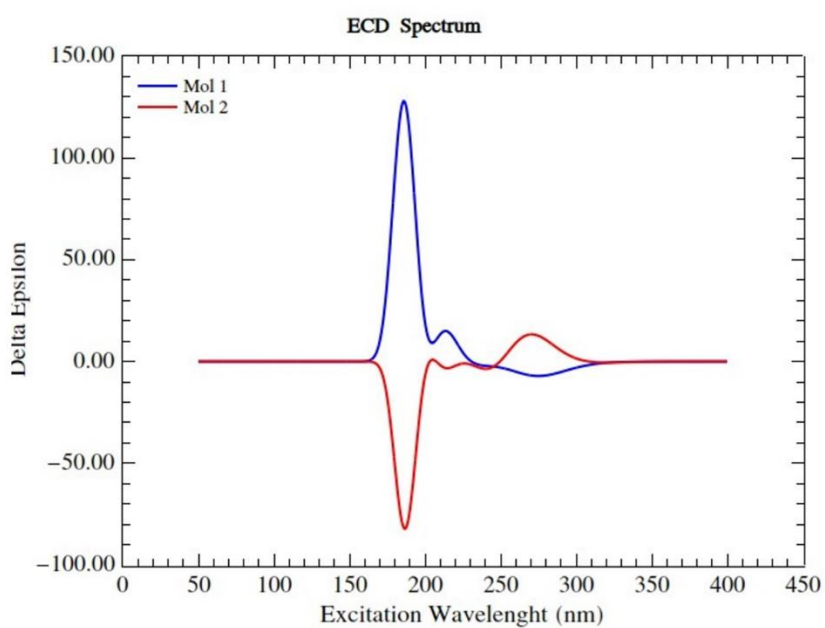


Figura 3.2 Espectro de EDC calculado para os enantiômeros 6aR12aR (azul) e 6aS,12aS (vermelho)

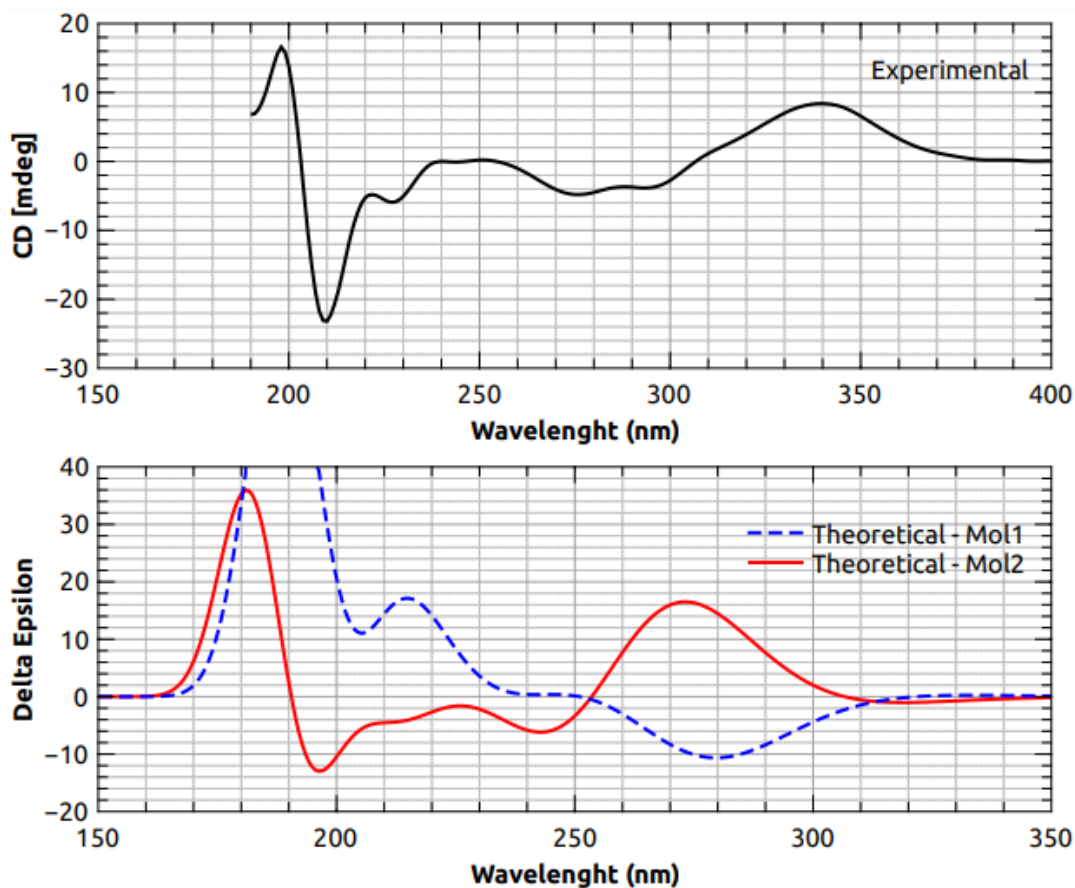


Figura 3.3 Espectro experimental e espectros teóricos calculados usando DFT wb97xd/6-311++g(d,p) em metanol (para a geometria das duas moléculas). E o ECD: TD DFT wb97xd/6-311++g(d,p) em metanol.

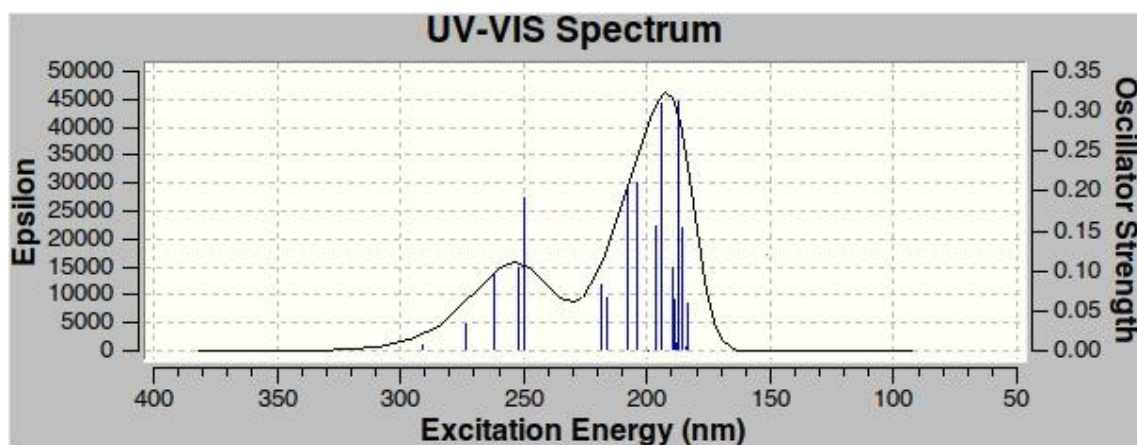


Figura 3.4 Espectro UV-VIS do 6-desoxyclitoriacetal calculado para o enantiômero 6aS,12aS

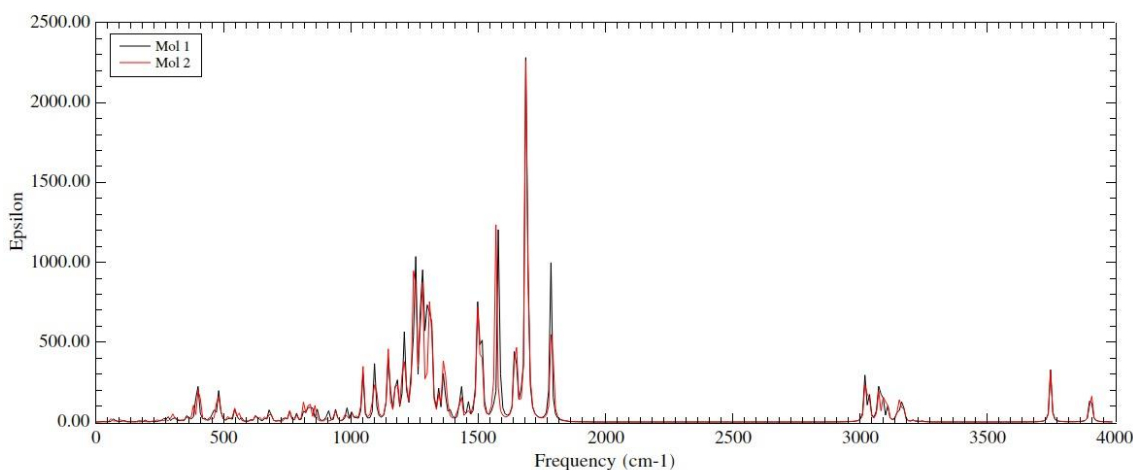


Figura 3.5 Espectro IV do 6-desoxiclitoriactal calculado para o enantiômero 6aS,12aS

Nota-se um pequeno deslocamento no espectro teórico para o enantiômero em questão, no entanto está dentro da precisão do método pois a energia teórica obtidas das primeiras bandas estão um pouco acima do valor experimental. A convolução do valor teórico foi obtida utilizando uma largura dos picos à meia altura de 2685.83 cm^{-1} ou 0.333 eV .

A comparação do DC e UV experimental (Figura 3.6) com o CD e UV calculados permitiu-nos concluir que a configuração absoluta do 6-desoxiclitoriactal é oposta à estabelecida na literatura. Assim, o rotenoide isolado de *C. farchildiana* é o (6aS,12aS)-6-desoxiclitoriactal.

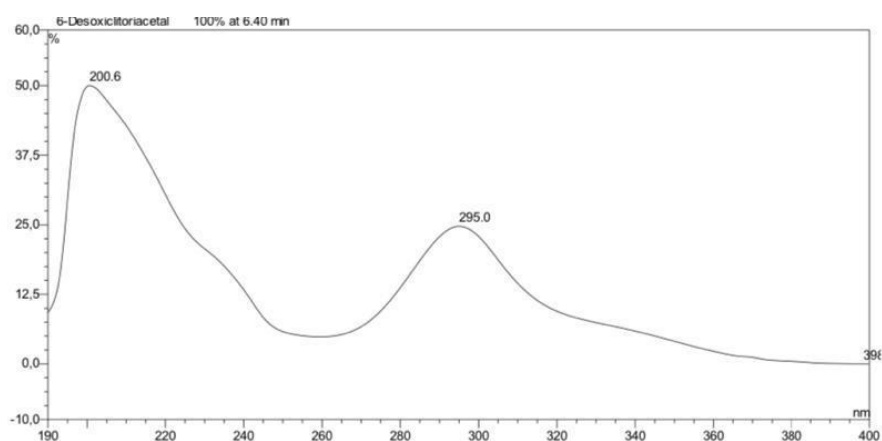


Figura 3.6 Espectro na região UV-VIS do 6-desoxiclitoriactal obtido experimentalmente

3.5.2. Reações de modificação estrutural

O primeiro indicativo de que a reação de Pechmann ocorreu foi constatado por meio do comparativo dos espectros do reagente e do produto na região do IV indica que houve reação por conta da supressão do sinal da hidroxila fenólica e surgimento do sinal em 1722 cm^{-1} que seria correspondente a carbonila do anel lactona. Sinal que foi observado nos espectros de ambos os produtos. Notou-se também que o sinal atribuído à carbonila do reagente também permanecia no produto, apesar de um pouco deslocado, para uma região de mais baixa energia. No reagente ele foi observado em 1633 e já no produto foi observado em 1656 cm^{-1} (Figuras 3.10 e 3.11).

Obtidos os espectros de RMN de ^1H (Figura 3.12), foi observado que tanto o produto da reação de Pechmann quanto o produto de acilação orto-dirigida apresentavam o mesmo padrão espectral de deslocamento e multiplicidade de sinais, o que indicou que o mesmo produto foi obtido apesar de aplicadas metodologias distintas. Pela análise dos dados de RMN pode-se concluir que não houve formação do derivado esperado.

No espectro de RMN de ^1H foi observada a presença de um singleto em δ 4,48 com integral para dois hidrogênios, que corresponde no produto aos hidrogênios anteriormente assinalados como diastereotópicos no substrato o que sugeriu que houve uma desidratação da espécie, levando a formação de uma ligação dupla, onde o hidrogênio do centro quiral anteriormente presente no reagente foi removido, o que explica a nova multiplicidade dos hidrogênios vizinhos, pois eles passaram a ser quimicamente equivalentes.

Outros dados observados corroboram com o fato de que houve apenas a desidratação do substrato. Todos os sinais de hidrogênios aromáticos com mesma multiplicidade e integrais também foram observados no produto. Além disso observa-se que o hidrogênio ligado ao carbono 1 para uma região mais desprotegida, o que foi atribuído ao efeito anisotrópico da carbonila, pois a estrutura passa a ser planar, o que resulta numa maior proximidade desse hidrogênio com os pares de elétrons não ligantes do oxigênio da carbonila, o que resulta numa maior desproteção quando comparado ao substrato. Outro efeito

observado foi o deslocamento do hidrogênio da hidroxila fenólica para uma região de maior desproteção. Esse fato também pode ser atribuído a planaridade do produto, o que resulta numa interação mais forte dessa ligação de hidrogênio intramolecular. Desse modo, para ambas as metodologias o produto obtido foi o 10 (Figura 3.8).

Por fim, nota-se que o estiramento observado em 1722 cm^{-1} corresponde na verdade a carbonila já existente no reagente e observá-la, no produto, numa região de mais baixa energia pode ser explicado pelo fato de que a presença da ligação dupla numa posição α, β em relação a essa carbonila resulta em híbridos de ressonância que demonstra que a ligação $\text{C}=\text{O}$ nesse produto apresenta um maior caráter de ligação simples do que quando comparado ao reagente (Figura 3.7). E o estiramento em 1656 cm^{-1} corresponde na verdade ao estiramento $\text{C}=\text{C}$ da nova ligação dupla na estrutura. Os produtos foram obtidos com 91% e 58% respectivamente para cada uma das metodologias empregadas.

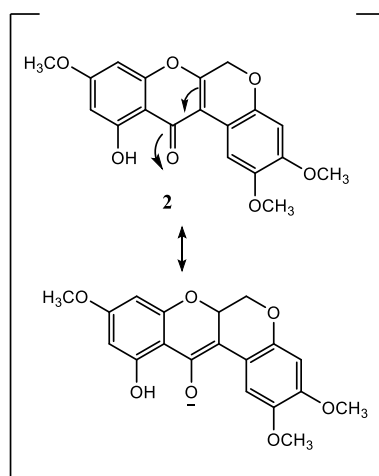


Figura 3.7 Estruturas de ressonância do produto de desidratação

Conforme afirmado, ambas as reações resultaram no mesmo produto, o que foi atribuído ao fato de que ambas foram realizadas em meio ácido.

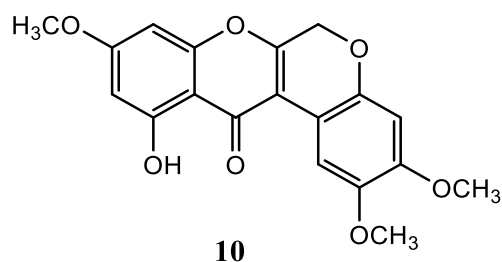


Figura 3.8 Estrutura do produto de desidratação (**10**)

De modo a avaliar a reatividade da hidroxila fenólica. Foi então preparado o derivado metilado, por meio da síntese de Williamson, devido as condições para essa reação ser o meio básico. O produto dessa reação foi obtido com 52% de rendimento, e o maior indicativo de formação do derivado metoxilado foi a presença de mais um sinal com integral para 3 hidrogênios na região de grupo metoxila ligado a anel aromático, evidenciado no espectro de RMN de ^1H (Figura 3.14). O grupo de sinais característicos dos hidrogênios diastereotópicos permaneceram no espectro do produto bem como todos os outros sinais de hidrogênios aromáticos.

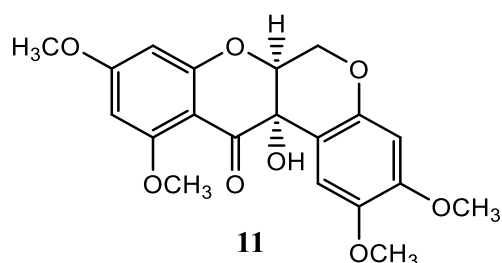


Figura 3.9 Estrutura do produto de metilação (**11**)

Tabela 3.1 Dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) das substâncias obtidas [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)]

^1H	Composto 10		Composto 11	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	8,28 (s)	110,9	6,54 (s)	109,3
1a	-	109,7		
2	-	156,6		151,8
3	-	157,3		
4	6,56 (s)	106,2	6,49 (s)	101,1
4a	-	149,2		
6	4,98 (<i>m</i>)	64,8	4,59 (<i>dd</i> , $J= 12,0$ e $2,5\text{Hz}$) 4,46 (<i>dd</i> , $J= 12,1$ e $1,0$ Hz)	
6a	-	146,3	4,53 (<i>m</i>)	75,6
8	6,38 (<i>m</i>)	92,6	6,05 (<i>d</i> , $J= 2,2$ Hz, 1H)	93,3
9		165,3		167,3
10	6,38 (<i>m</i>)	98,4	6,03 (<i>d</i> , $J= 2,2$ Hz, 1H)	144,1
11a	-	100,6		
12	-	179,2		189,9
12a	-	144,2		151,8
2-OMe	3,96 (s)	56,4	3,91 (s)	56,4
3-OMe	3,87 (s)	55,9	3,81 (s)	55,8
9-OMe	3,88 (s)	55,8	3,78 (s)	56,2
11-OH	12,93(s)	162,8	-	-
11-OMe	-	-	3,74 (s)	55,6

..

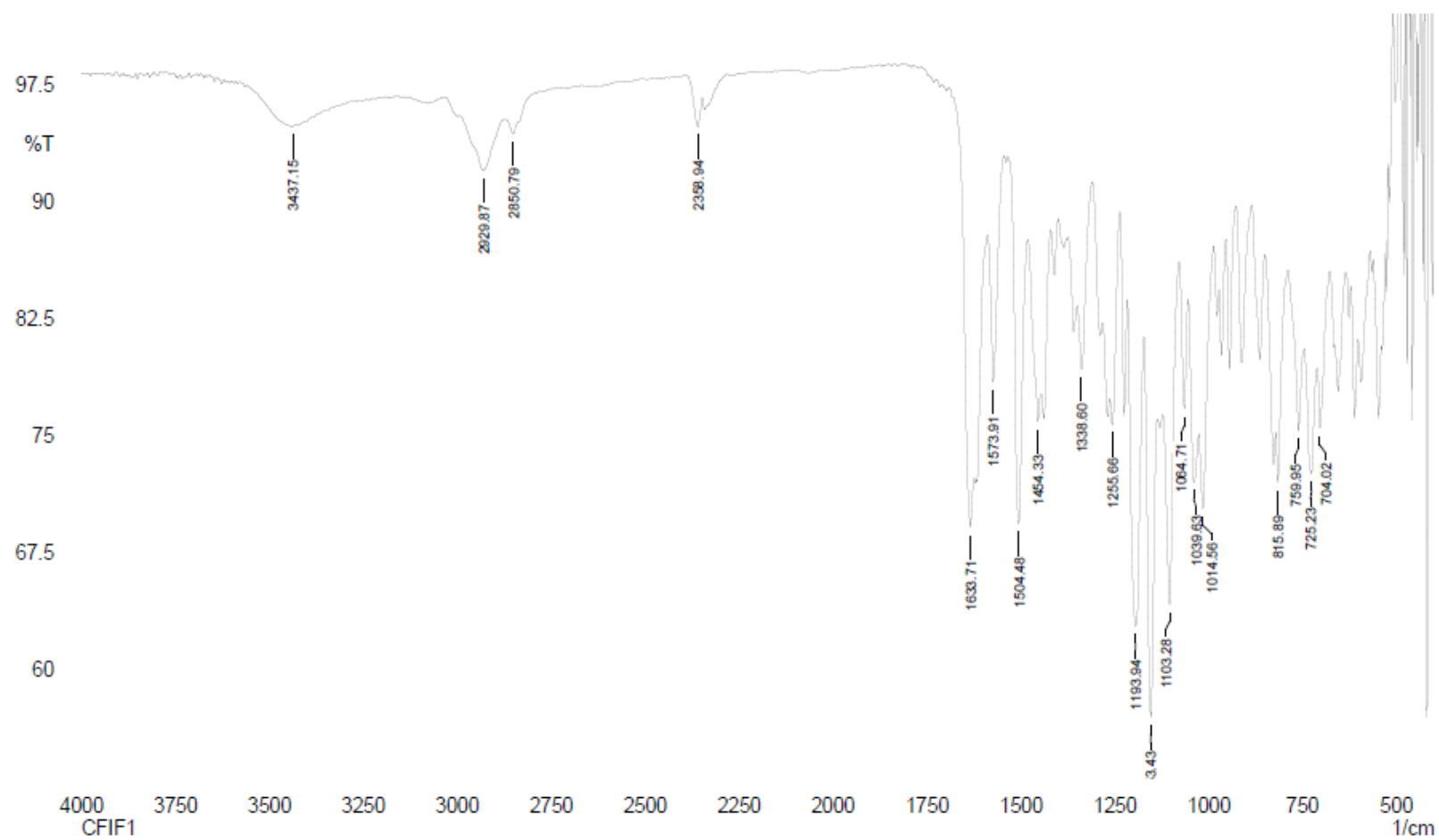


Figura 3.10 Espectro do 6-desoxiclitriacetal na região do IV feito em ATR

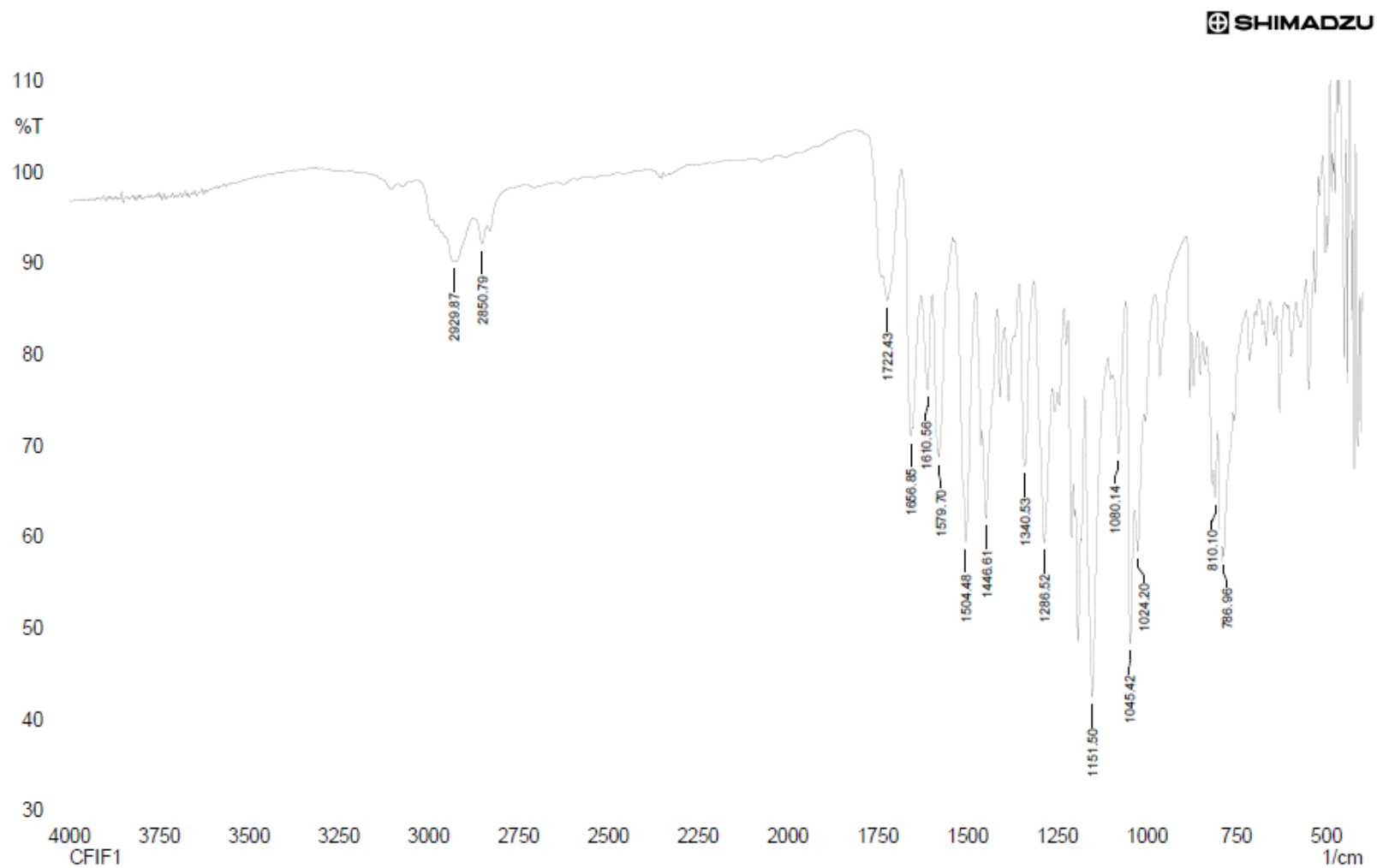


Figura 3.11 Espectro do produto de desidratação **10** obtido das reações em meio ácido na região do IV em ATR

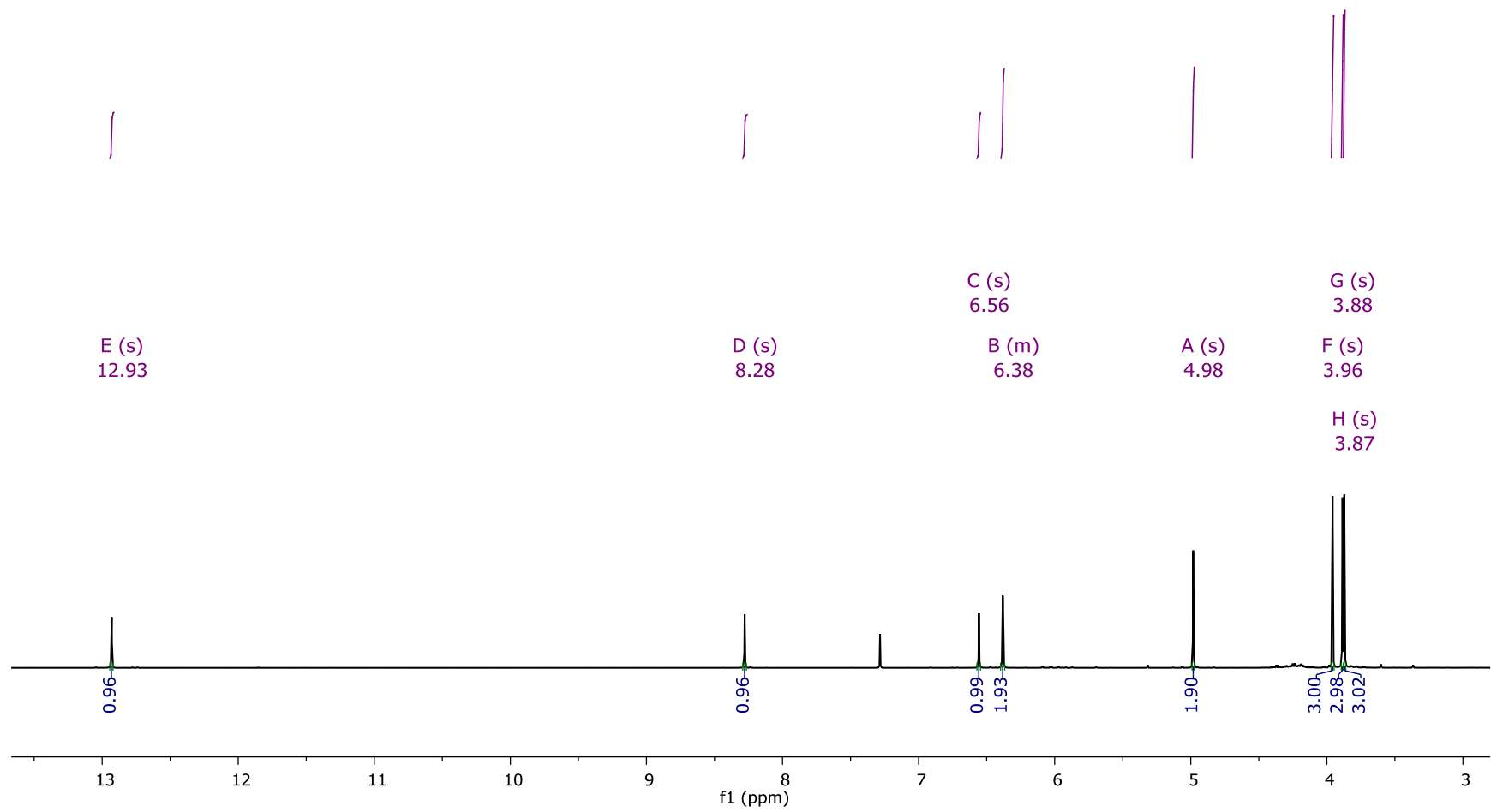


Figura 3.12 Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos ao produto de desidratação **11** [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

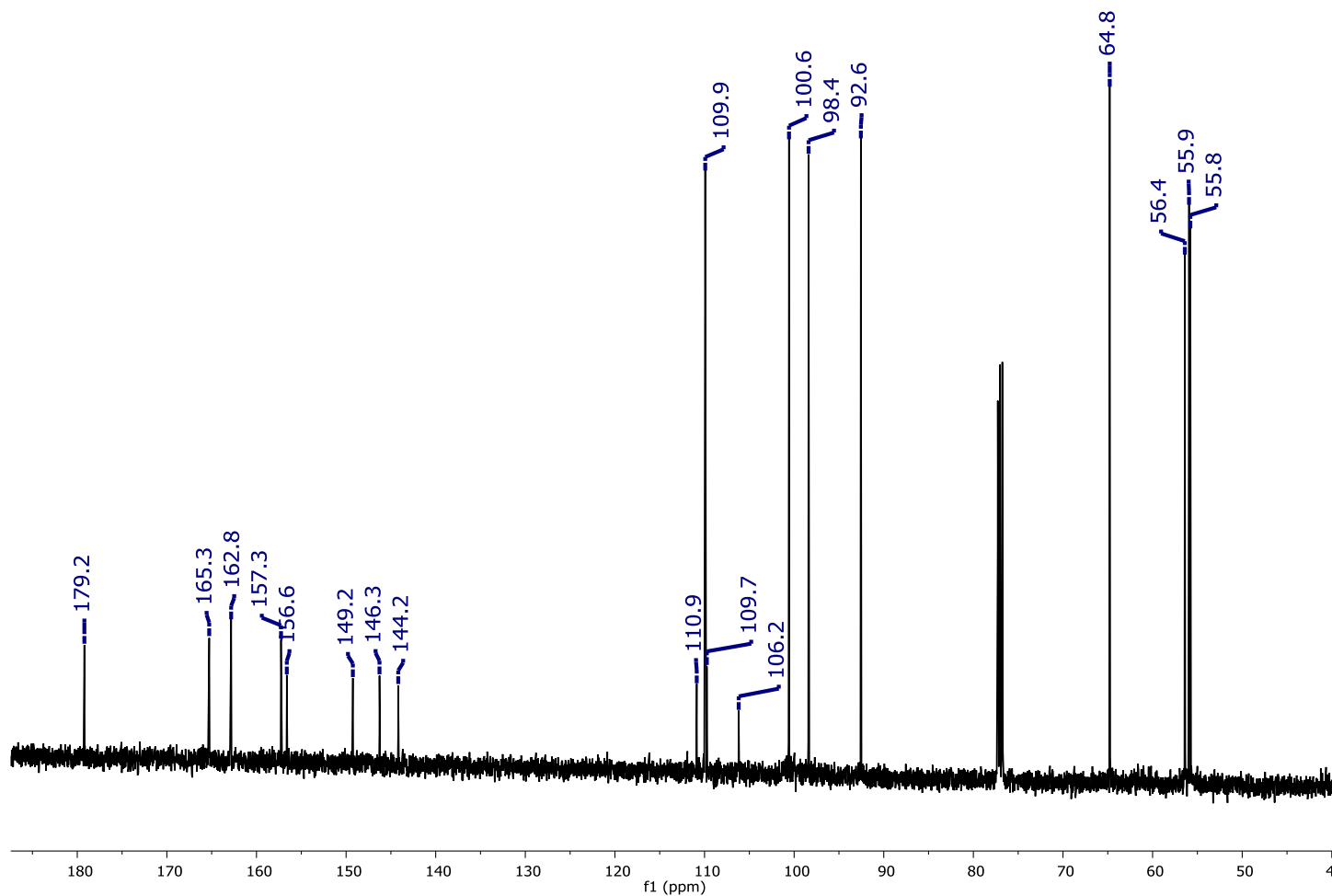


Figura 3.13 Região do espectro de RMN de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos ao produto de desidratação **10** [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

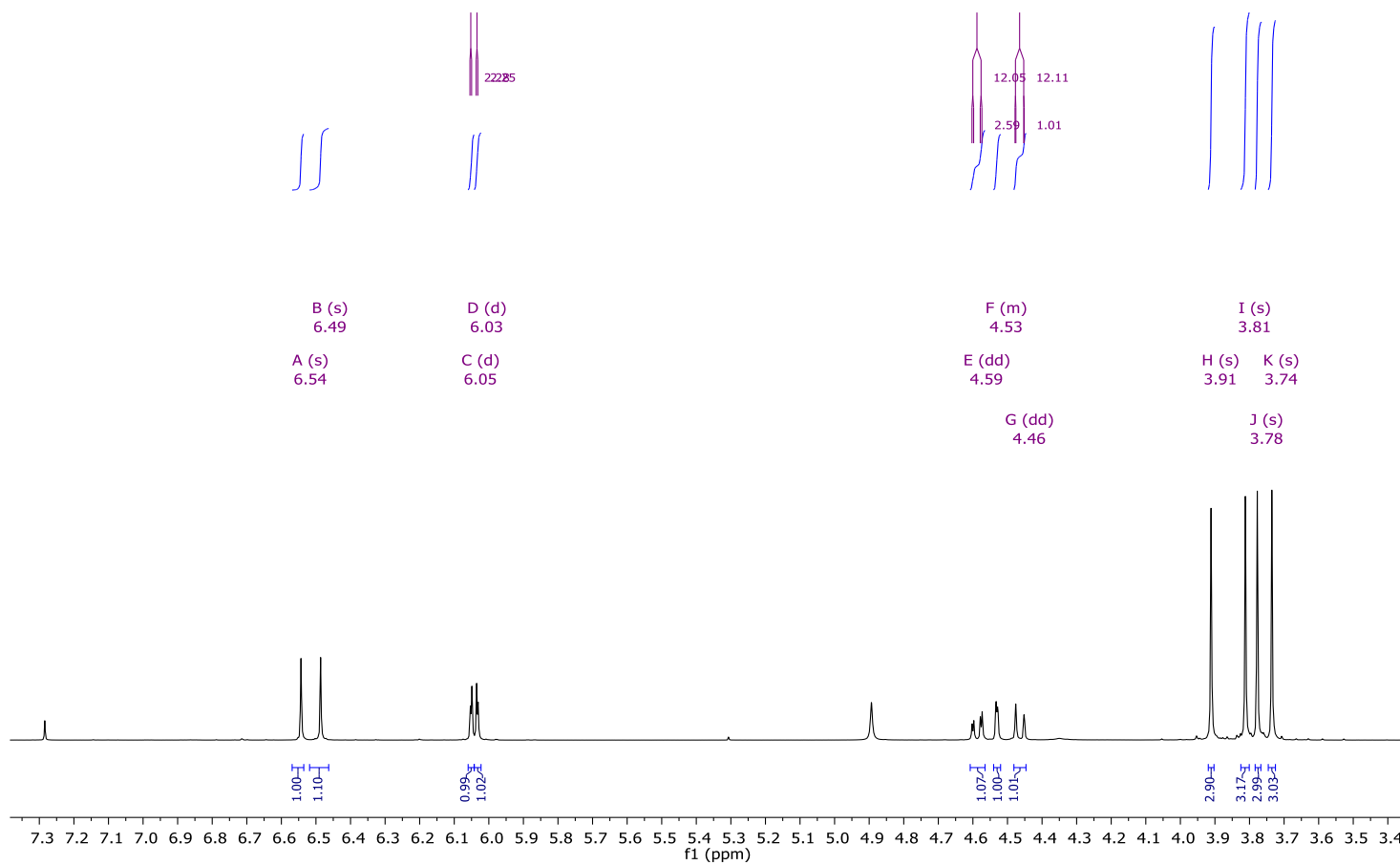


Figura 3.14 Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos ao produto de metilação **11** [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

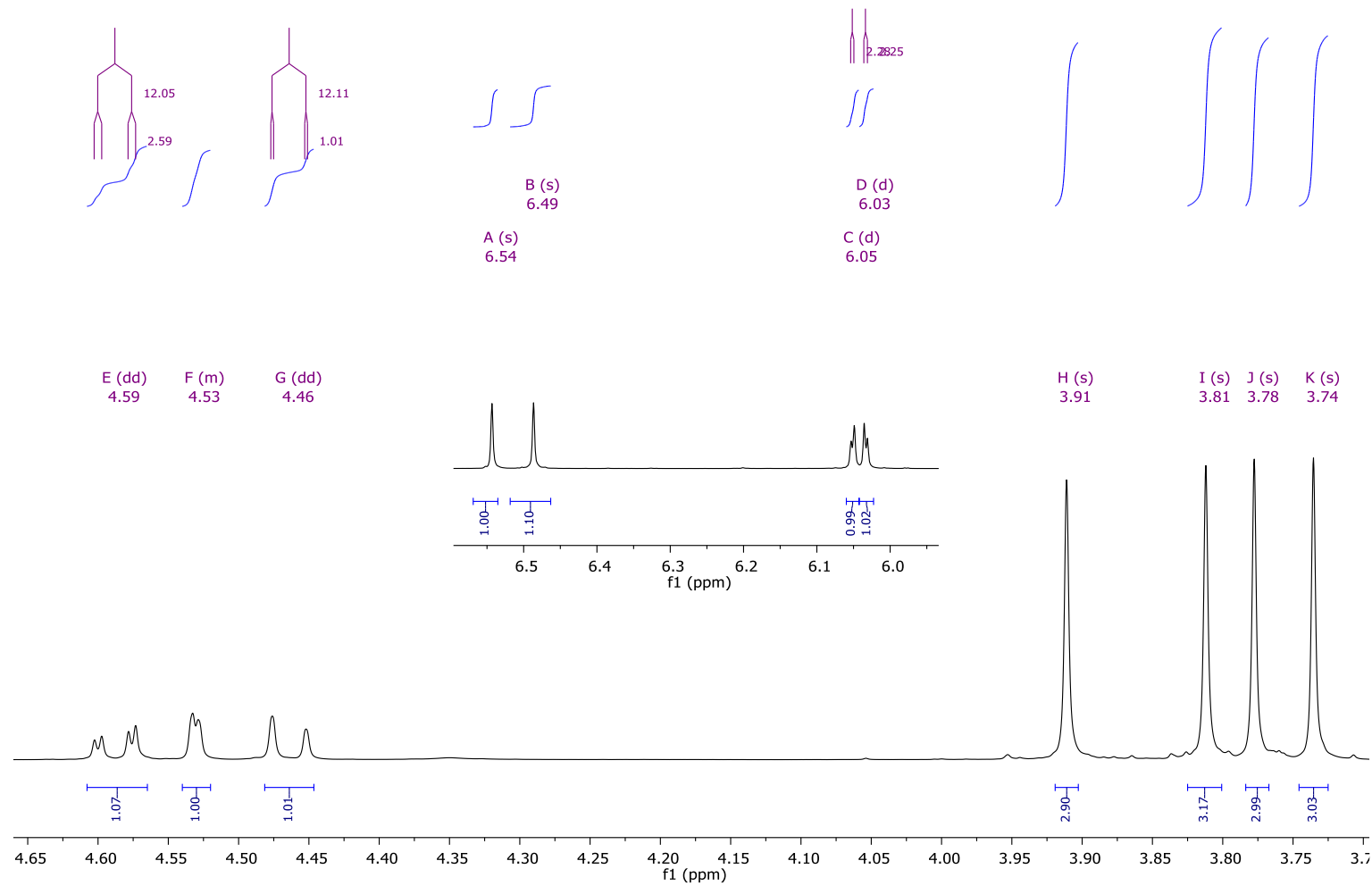


Figura 3.15 Expansão das regiões do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos ao derivado metilado **11**

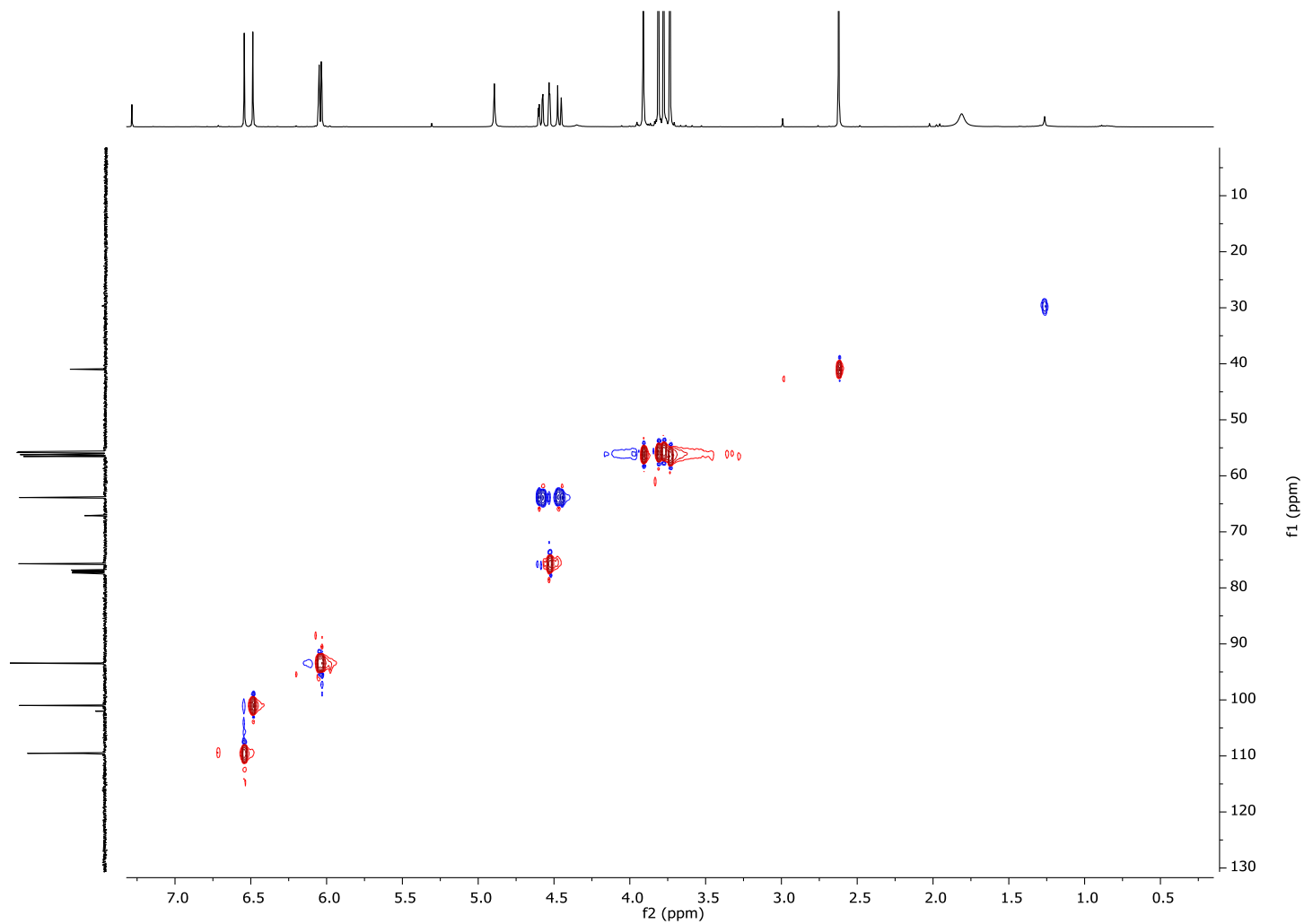


Figura 3.16 Região do espectro HSQC contendo todos os sinais atribuídos ao produto metilado **11** [500/125 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

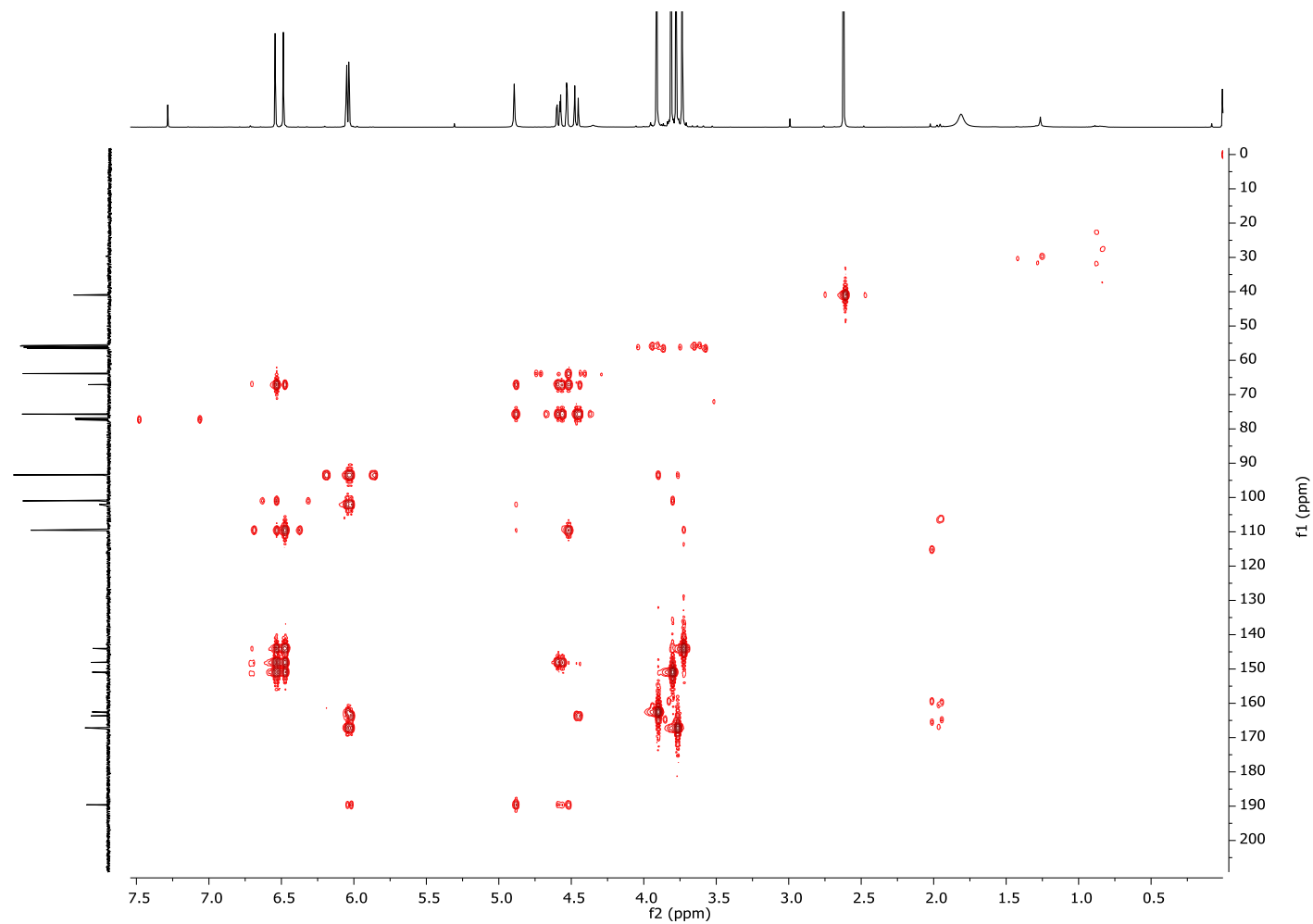


Figura 3.17 Região do espectro HMBC contendo todos os sinais de correlação atribuídos ao produto metilado **11** [500/125 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

O produto da reação de Mannich com o rotenoide foi submetido a análise de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 3.23, 3.24 e 3.25). A análise dos dados do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 3.25) permitiu identificar a presença de 14 sinais de carbonos no espectro possíveis de serem atribuídos a estrutura.

O espectro em RMN de ^1H revelou um padrão de sinais aromáticos similar ao anel B do substrato, onde os sinais registrados em δ 6,83 (s, 1H) e 6,47 (s, 1H) em região de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos não apresentam multiplicidades, o que sugere que eles estão em uma relação *para* entre eles em um anel aromático também substituído em quatro posições. Comparativamente ao substrato, o 6-desoxiclitoriacetal, foi identificada a presença de três sinais de hidrogênio em δ 4,43 (*m*, 1H), 4,19 (*m*), 3,96 (*m*, 1H) (Figura 3.24), que devido à complexidade de acoplamento e multiplicidade de sinais apresentados, foram atribuídos aos hidrogênios alifáticos também presentes no substrato, porém a multiplicidade diferenciada pode ser atribuída a uma provável mudança de planaridade da estrutura após a derivatização.

O sinal em δ 3,68 (*t*, 2H) e o sinal em δ 3,43 (*m*, 2H) com integrais correspondentes a 2 hidrogênios cada um na região onde é comum a presença de hidrogênios ligados a carbonos desblindados indicam a presença de mais dois hidrogênios ligados a carbonos alifáticos na estrutura. Considerando que na reação de Mannich é esperada a condensação dos reagentes, tais sinais sugerem a inserção da etanolamina a estrutura.

O espectro de RMN de ^{13}C registrou 14 sinais que podem ser atribuídos a estrutura. Por outro lado, o composto precursor apresenta 19 carbonos. Considerando que os três sinais de hidrogênios observados como similar ao da estrutura do substrato permanecem no produto, foi sugerida a permanência do anel D na estrutura e que a modificação ocorreu no anel C. No espectro de RMN de ^{13}C o sinal mais desblindado observado ocorreu em δ_{C} 174,4, o que sugere a presença de um carbono acila característico de esteres, ácidos e amidas. Tendo em vista que foi observada a diminuição de 5 carbonos a estrutura, tal defasagem poderia sugerir que ocorreu a perda do anel aromático A da estrutura do substrato, que continha 7 carbonos, o que resultaria na presença de apenas 12 carbonos, porém a inserção da etanolamina, sugerida por conta da presença dos

dois sinais em δ 3,68 (*t*, 2H) e δ 3,43 (*m*, 2H), garantiu o aumento de dois carbonos na estrutura coincidindo com o observado no espectro de RMN de ^{13}C .

O espectro na região do IV (Figura 3.22) evidenciou vibrações de estiramento e dobramentos que permitiram ratificar a formação do produto aminoderivado. Baseado na evidencia da formação de uma amida ou éster por conta do sinal atribuído à carbonila estar numa região menos desprotegida quando comparado ao substrato, o estiramento observado no espectro na região do IV em 1643 cm^{-1} é um importante indicativo de formação de uma amida na estrutura, já que o estiramento C=O de grupamento carbonila em amidas é observado na região de menor energia quando comparada à de carbonila de éster que ocorre em torno de 1735 cm^{-1} .

Além disso, é observado o estiramento N-H na banda registrada em 3371 cm^{-1} , indicativo de estiramento N-H de amidas secundárias nesse espectro também foi possível observar o estiramento N-H em 1512 cm^{-1} . É possível também observar os estiramentos assimétrico e simétrico atribuídas a grupamento metileno da porção amino proveniente da etanolamina, registrado em 2924 e 2854 cm^{-1} .

Os dados relatados aliados ao espectro de HRESIMS para esta substância (Figura 3.28), cujo íon molecular foi registrado em modo positivo em m/z 296,1124 permitiu determinar a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_6 + \text{H}$ (calculado para 294,1134), bem como o íon registrado em m/z : 336,1043 que permitiu determinar a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_6 + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}$ (calculado para 336,1059). Essa FM apresenta índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 7, cujo valor ratifica a presença de um núcleo aromático, a presença de mais de uma ligação dupla ou um ciclo insaturado e refere-se também a inserção de uma parte cíclica na estrutura.

O espectro em HSQC (Figura 3.26) permitiu correlacionar os hidrogênios ligados a carbonos. Foi possível correlacionar todos os hidrogênios identificados no espectro de ^1H RMN com os carbonos respectivos: δ_{H} 6,47 e δ_{C} 100,25, δ_{H} 6,83 e δ_{C} 110,98, δ_{H} 4,43 e 4,19 com δ_{C} 66,4, δ_{H} 3,94 e δ_{C} 70,2, δ_{H} 3,68 (2H) e δ_{C} 60,39, δ_{H} 3,44 e δ_{C} 41,3. O espectro em HMBC (Figura 3.27) permitiu identificar diversas correlações entre os hidrogênios e carbonos hidrogenados e não hidrogenados. As correlações observadas entre os hidrogênios e carbonos

da estrutura obtidas pela análise do espectro em HMBC foi esquematizada na figura 3.18.

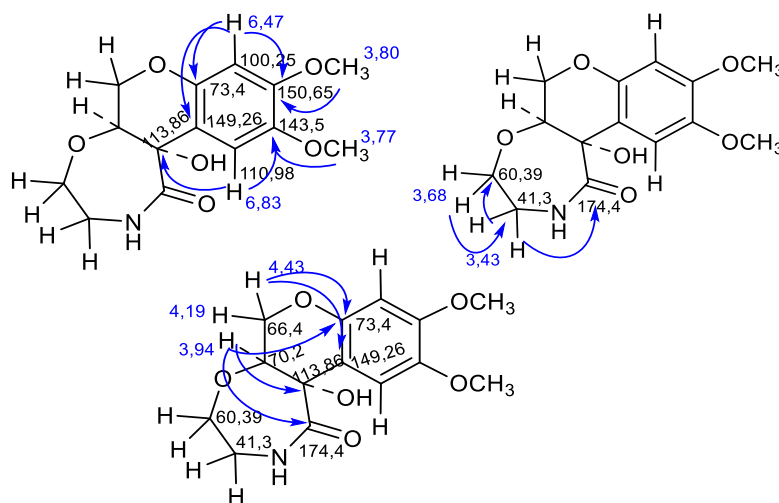


Figura 3.18 Correlações observadas no espectro em HMBC

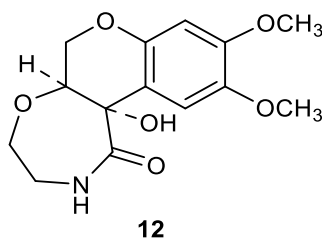


Figura 3.19 Estrutura da substância obtida a partir da reação multicomponente

Reações multicomponentes são realizadas de modo a se obter produtos de condensação, nos quais há a inserção de mais carbonos na estrutura. Na reação multicomponente de Mannich um aldeído ou cetona, reage com uma amina não terciária e um aldeído não enolizável, levando a obtenção de aminas alquiladas que são conhecidas como bases de Mannich (ROGERIO et al., 2016). A reação da berginina com diversas aminas secundárias substituídas por meio da reação de Mannich levou a obtenção de diversos produtos de substituição eletrofílica, no anel aromático dessa estrutura na posição alfa a hidroxila, com rendimentos que variaram de 80 a 95% (JAIN et al., 2014).

Nesse trabalho, de acordo com a interpretação dos espectros de RMN e massas obtidos do derivado, foi visto que a estrutura obtida foi diferente da esperada.

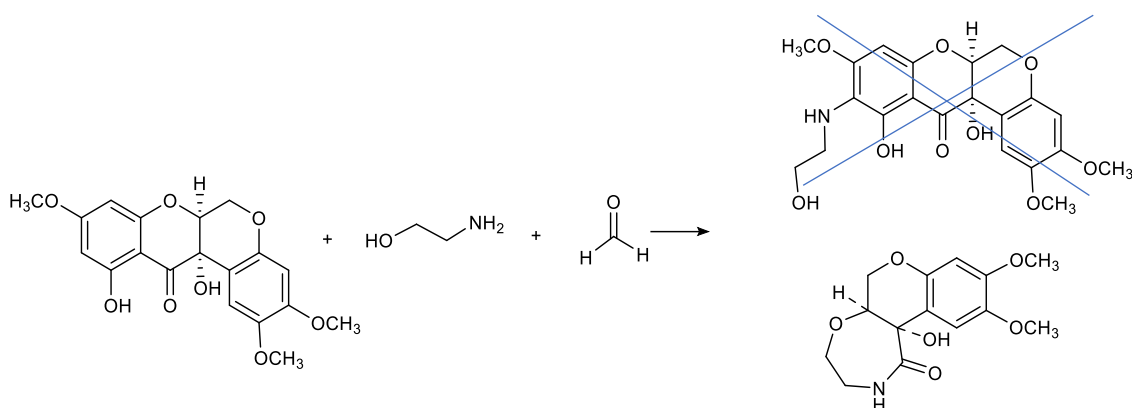


Figura 3.20 Esquema da formação do produto da reação multicomponente

Foi sugerido um mecanismo para formação do produto da reação multicomponente (Figura 3.21). Devido a eletrofilicidade do carbono carbonílico foi sugerido que o nitrogênio da etanolamina reage com esse centro levando a obtenção de um intermediário tetraédrico. Devido a carga positiva no nitrogênio após o ataque, no reestabelecimento da ligação dupla da carbonila foi sugerido que há a quebra da ligação com o carbono aromático levando a abstração de um dos prótons ligado ao nitrogênio. Na etapa seguinte devido a eletrofilicidade do carbono ligado a hidroxila na etanolamina, da densidade de elétrons no oxigênio ligado ao anel aromático e a possibilidade de formação de um anel de 7 membros, foi sugerido o ataque nucleofílico pelo oxigênio mencionado ao carbono eletrofilico e estabilização das cargas pela presença do formaldeído e também pelo meio ser o metanol. Todavia, aparentemente, este é o primeiro relato de uma reação que ocorre eliminação de um derivado do fluoroglucinol através de uma reação de substituição nucleofílica. Há necessidade de estudar a reatividade dessa molécula com outros reagentes e sem a presença do formaldeído.

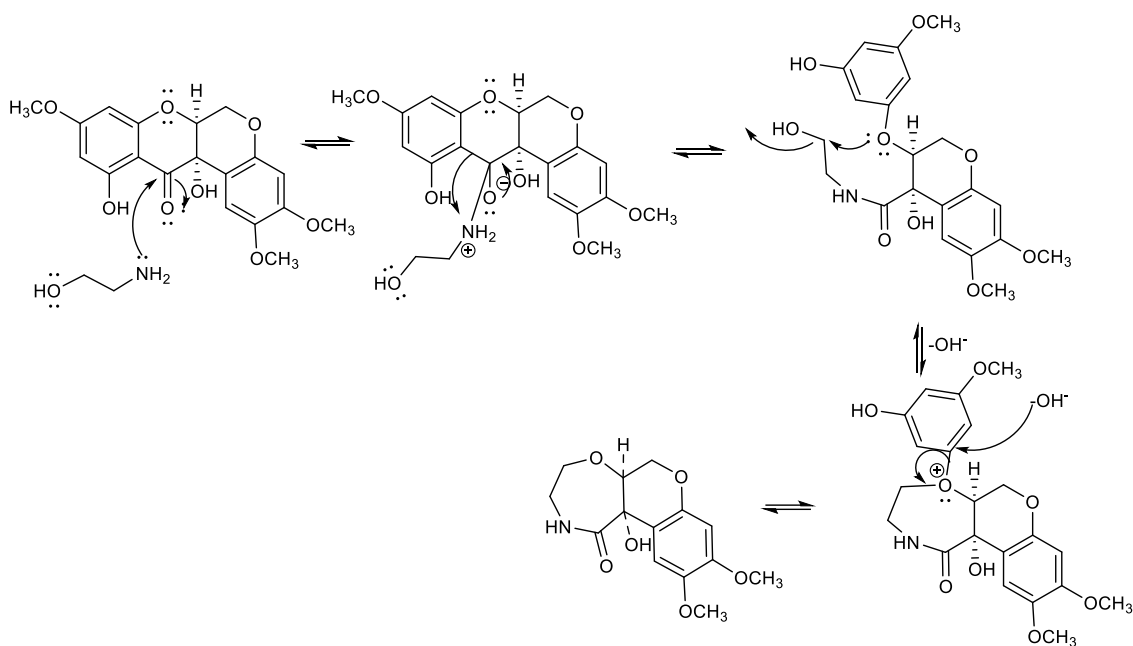
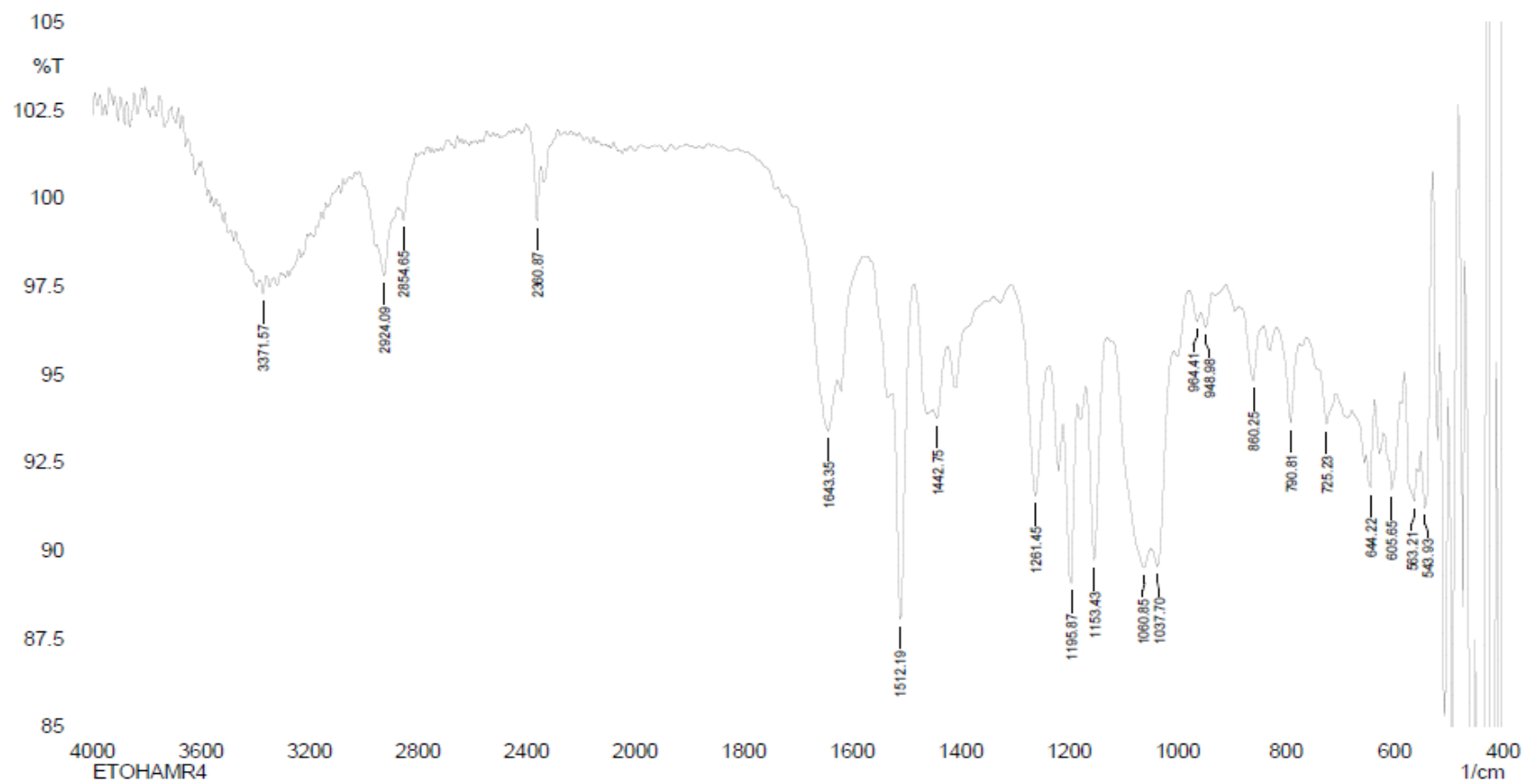


Figura 3.21 Mecanismo de formação do produto da reação multicomponente

Tabela 3.2 Dados de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)] e RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 12 [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), J (Hz)]

	^1H	^{13}C
1	6,83 (s)	110,9
1a	-	149,26
2	-	143,5
3	-	150,65
4	6,47 (s)	100,2
4a	-	73,4
6	4,19 (m) e 4,43 (m)	66,4
6a	3,94 (m)	70,2
12	-	174,4
12a	-	113,8
1'	3,43	41,3
2'	3,68	60,3



Comment:
ETOHAMR4

No. of Scans: 20
Resolution: 8 [1/cm]
Apodization: Happ-Genzel

Date/Time: 02/05/2022 14:32:56
User: FTIR

Figura 3.22 Espetro na região do IV em ATR de 13

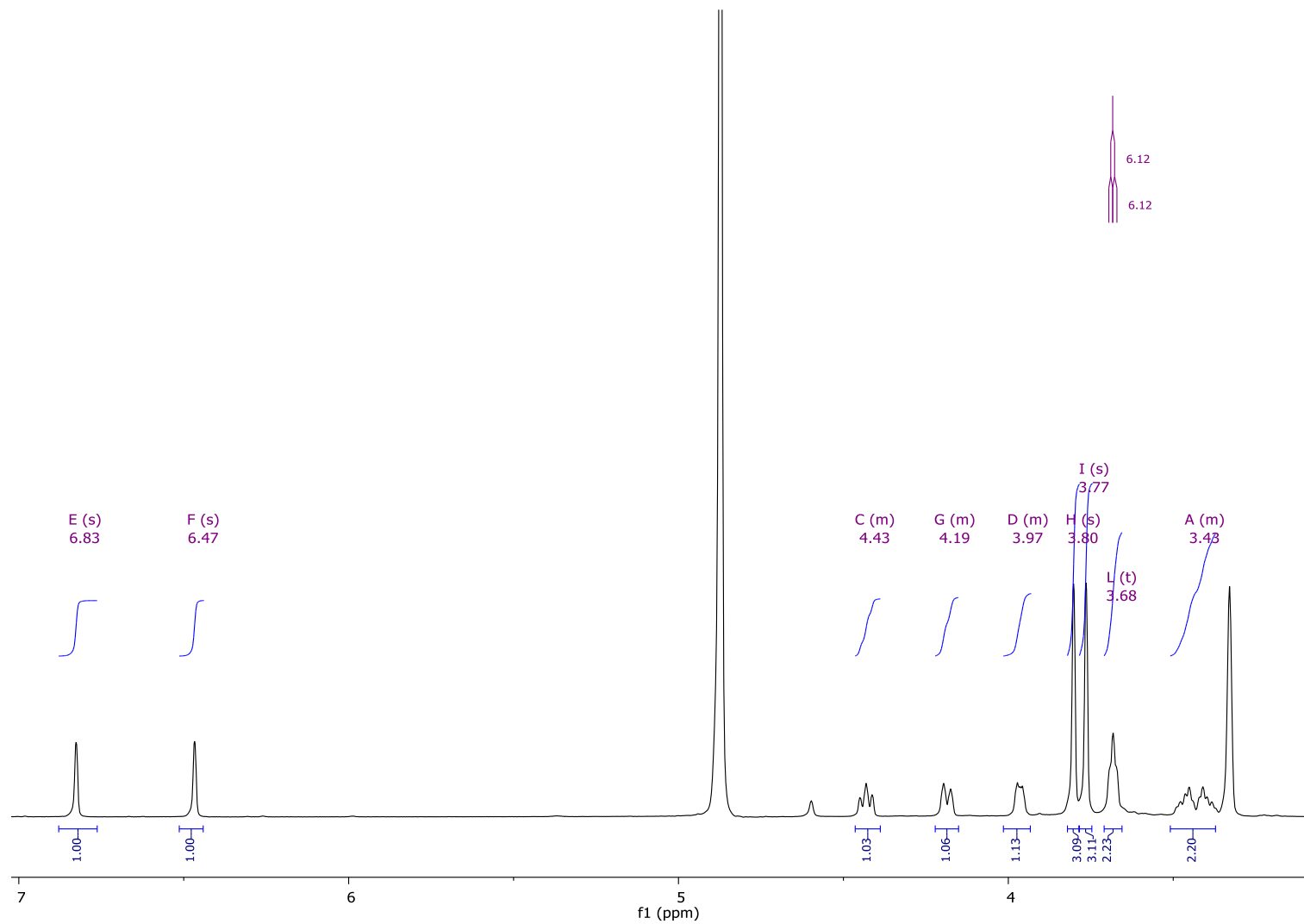


Figura 3.23 Região do espectro de RMN de ^1H de **13** [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

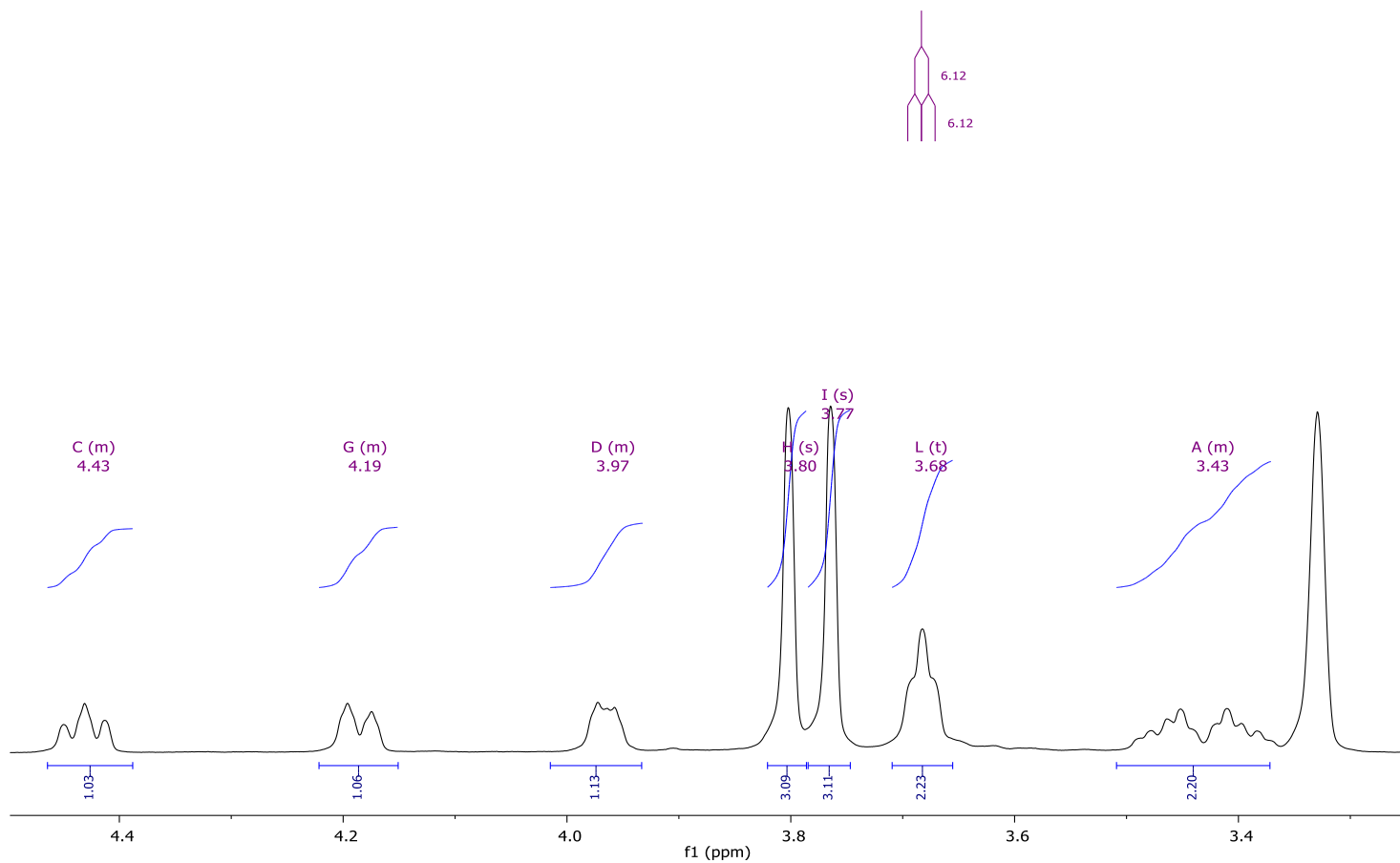


Figura 3.24 Expansão da região do espectro de RMN de ^1H contendo sinais atribuídos ao produto da reação multicomponente [500 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{ppm})$]

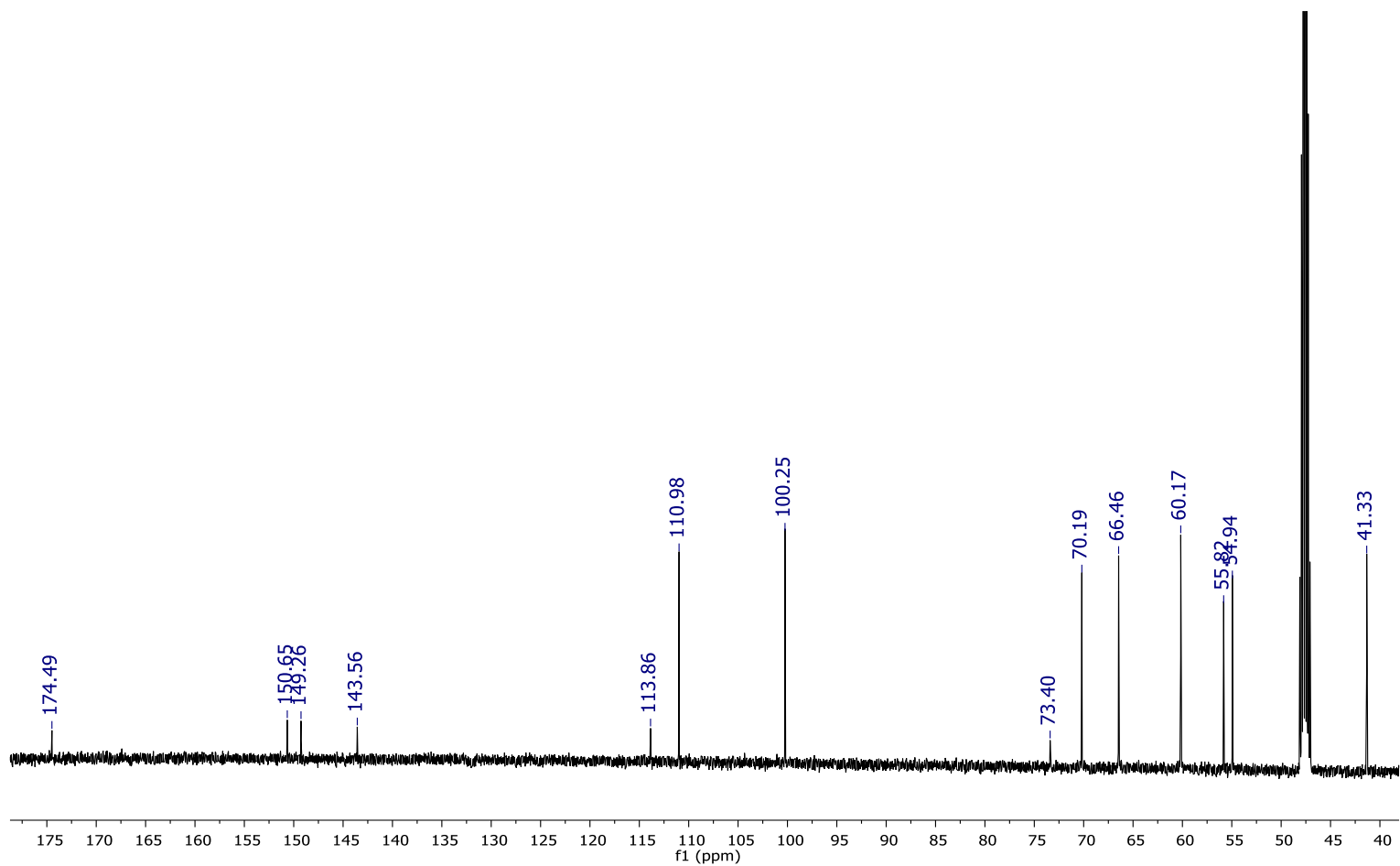


Figura 3.25 Região do espectro de RMN de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos ao produto da reação multicomponente [125 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{ppm})$]

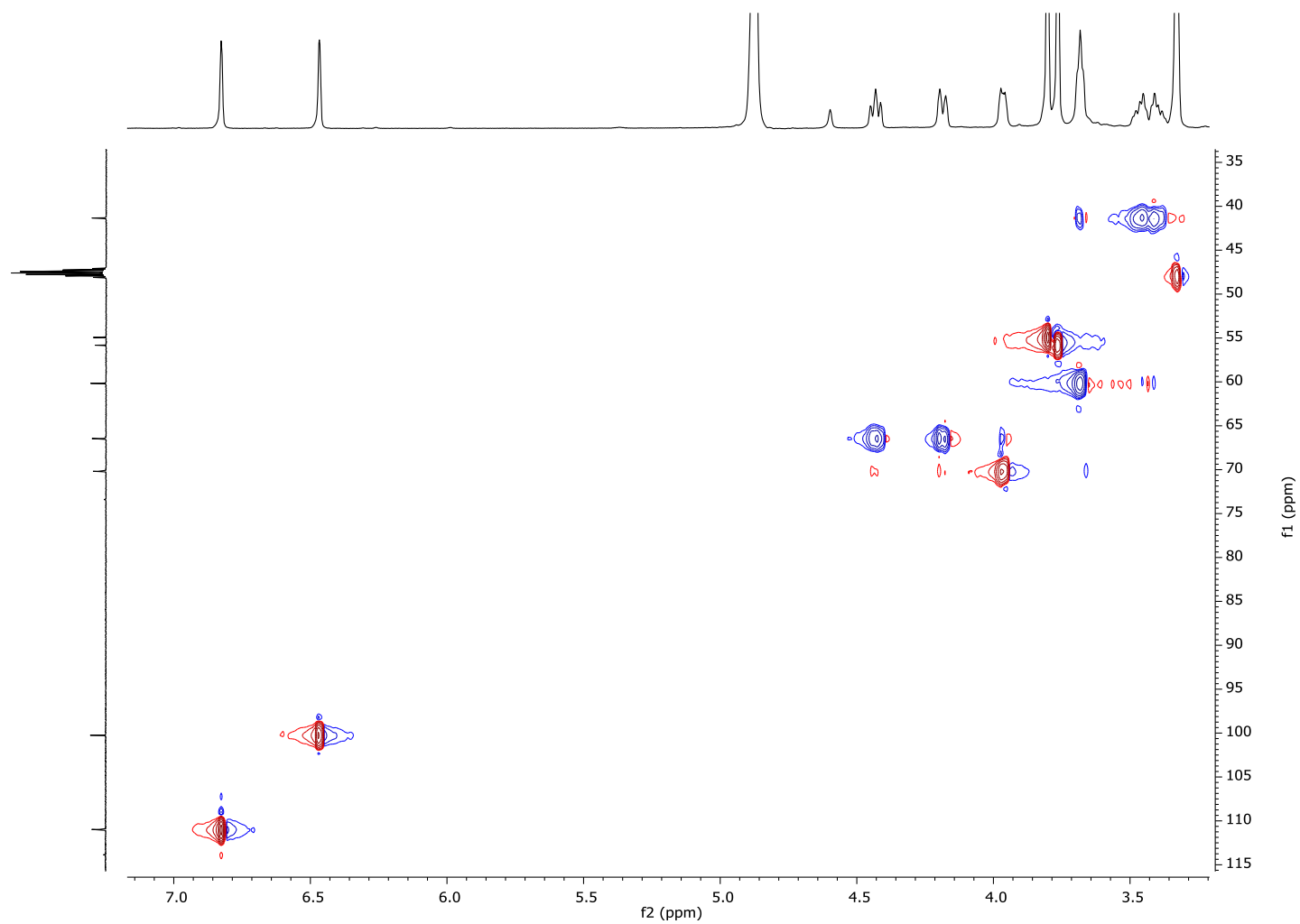


Figura 3.26 Região do espectro HSQC contendo todos os sinais atribuídos ao produto da reação multicomponente [125 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{ppm})$]

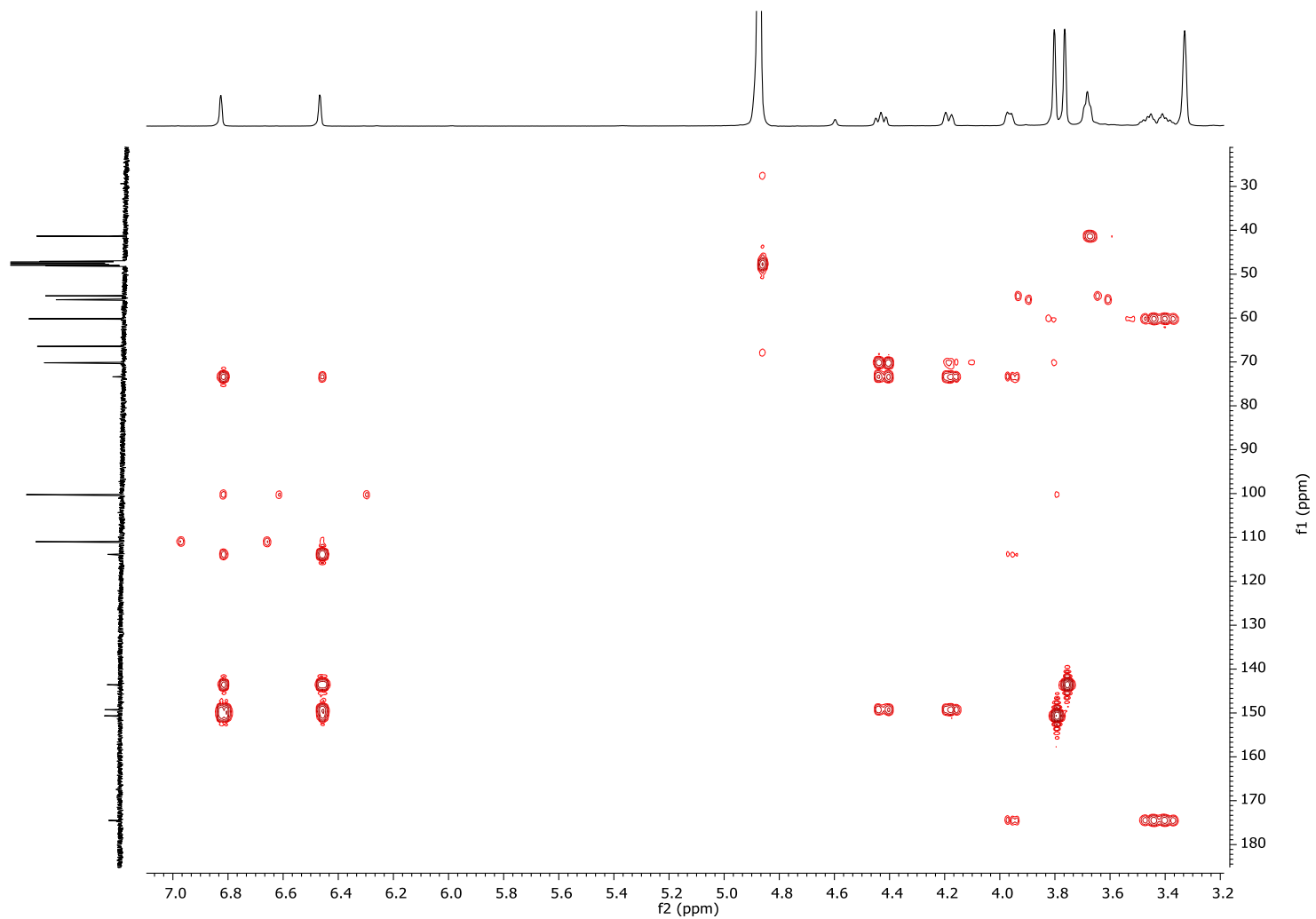


Figura 3.27 Região do espectro HMBC contendo todos os sinais atribuídos ao produto da reação multicomponente [125 MHz, CD₃OD, δ(ppm)]

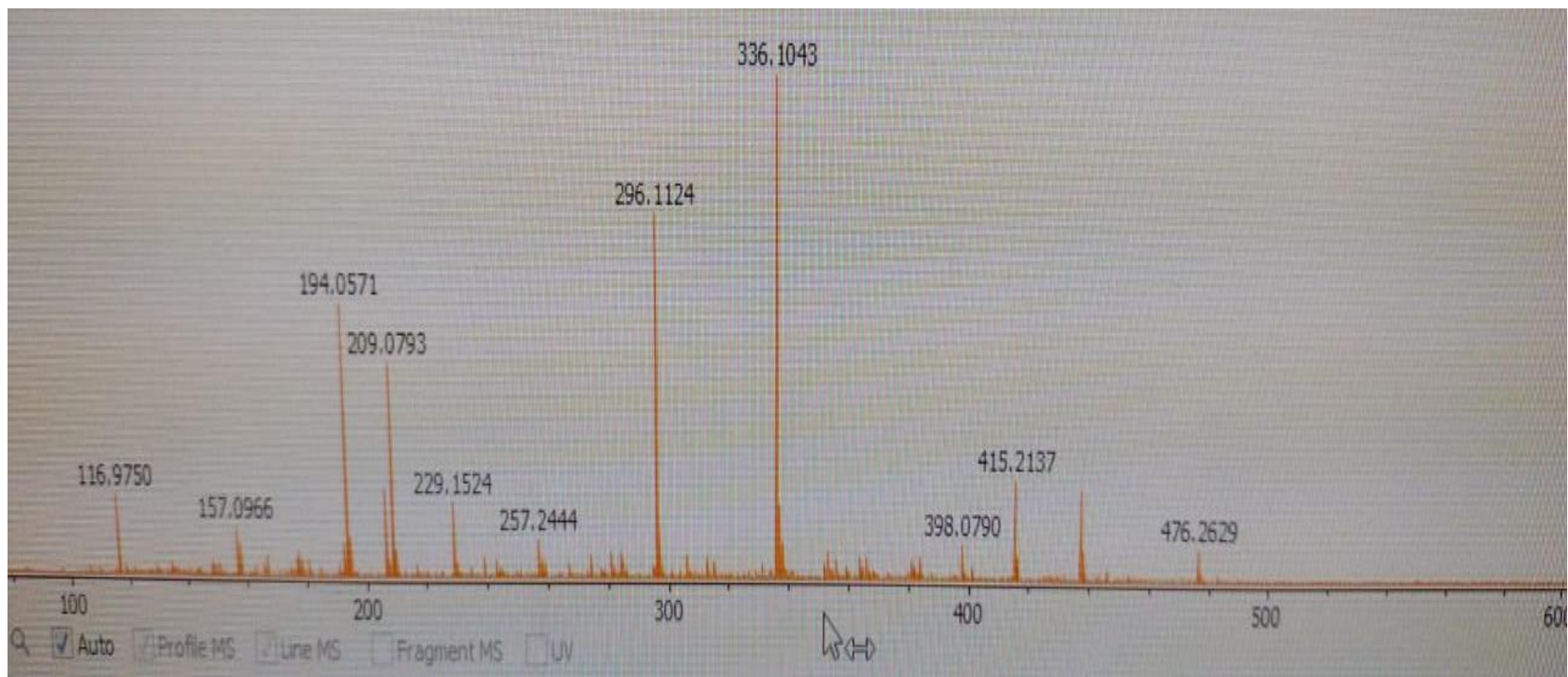


Figura 3.28 Espectro de HRESIMS do produto da reação multicomponente

3.6 Considerações finais

Este trabalho evidenciou que é plausível a investigação estruturas de compostos já conhecidos cujos dados relatados foram deduzidos de acordo com dados comparativos. Técnicas como o DCE são ferramentas importantes na determinação da configuração absoluta de uma estrutura.

Reações de obtenção de derivados de produtos naturais são desafiadoras e podem envolver mecanismos distintos dos usualmente esperados em reações clássicas, como a de Mannich. É importante que sejam realizadas investigações futuras e realização de ensaios biológicos para acrescentar mais informações ao composto obtido.

Capítulo 4: Métodos de isolamento da agathisflavona de *Cenostigma pyramidale* e obtenção de outros constituintes

Resumo

Agathisflavona é uma biflavona natural com ocorrência restrita em plantas. Essa biflavona apresenta diversas atividades biológicas e pode ser de grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos. A obtenção dessa molécula em larga escala para testes *in vivo* é um desafio. Até o momento, não há relatos sobre sua síntese; portanto, é de extrema importância aprimorar e desenvolver métodos para a purificação desse composto bioativo a partir de fontes naturais. Estudos anteriores indicaram que as folhas de *Cenostigma pyramidale* (Leguminosae) continham predominantemente agathisflavona. No entanto, a obtenção deste composto requer algumas etapas de procedimentos cromatográficos e extração com solventes orgânicos. Neste trabalho, foram comparados quatro procedimentos de purificação da agathisflavona de suas folhas, dois utilizando técnicas cromatográficas tradicionais e dois por meio de complexação com bases inorgânicas. A purificação realizada pela cromatografia flash automática em duas etapas proporcionou uma extração de alto rendimento; os dois procedimentos utilizando extração alcalina e o método tradicional reduzido a três etapas forneceram o composto com rendimentos semelhantes. A biflavona foi identificada por TLC, e a análise por HPLC mostrou que ela foi isolada com uma pureza superior a 99%. Assim, as metodologias aplicadas permitiram a purificação deste composto empregando um menor volume de solventes e um número menor de procedimentos em coluna cromatográfica, tornando o processo mais eficiente e rápido, com maiores rendimentos. Nesse procedimento, além da agathisflavona foram obtidos o lupeol, lupenona e 5,7-dihidroxi-4-metil cumarina, ainda não relatado em fontes vegetais.

4.1 Introdução

A agathisflavona (**1**) é um biflavonoide formado pela junção de duas flavonas, que foi primeiramente isolada da espécie *Agathis palmerstonii* (Araucariaceae) (PELTER et al., 1969), apresenta ocorrência ainda restrita a algumas outras famílias de plantas como Anacardiaceae, Burseraceae, Clusiaceae, Leguminosae e Ochnaceae. Em *Cenostigma pyramidale* este composto apresenta diferentes atividades biológicas, e é importante para o desenvolvimento de novos fármacos devido diversas atividades biológicas e farmacológicas, incluindo a neuroprotetor, modulando a resposta de lesão astrocítica e glial formação de cicatriz, estimulando a recomposição neural (DOS SANTOS SOUZA et al., 2018; ISLAM et al., 2019; DE AMORIM et al., 2020). Além disso, *in vivo* e estudos *in vitro* indicam a ausência de toxicidade para esta biflavona (LOPES ANDRADE et al., 2019). Além de sua importância na descoberta de fármacos, a obtenção deste biflavonoide em quantidades substanciais para testes *in vivo* ainda é um desafio. Até hoje não existem estudos reportando a sua síntese. Uma única tentativa de síntese total levou a um derivado totalmente metilado e apresentando baixos rendimentos (MORIYAMA; OKIGAWA; KAWANO, 1974). Conseqüentemente, a única maneira de obtê-lo é de fontes naturais.

Cenostigma pyramidale (Leguminosae) é uma planta medicinal brasileira planta conhecida popularmente como “catingueira”, devido a sua predominância a vegetação de “caatinga” da região nordeste do Brasil (Kirmse et al., 1987; Queiroz, 2009). Esta planta foi anteriormente nomeada como *Caesalpinia pyramidale*, e, após a segregação do gênero *Caesalpinia*, esta espécie passou a pertencer ao gênero *Cenostigma* (GAGNON et al., 2016).

Estudos que tratam com as folhas de composição química de *C. pyramidale* indicaram que contêm produtos naturais usuais, como saponinas triterpênicas, flavonóides, derivados cinâmicos, e os principais compostos, os bioflavonoides (Bahia et al., 2005; Mendes et al., 2000).

Uma análise LC-APCI-MS do extrato de folha demonstrou que apenas os espécimes coletados no estado da Bahia mostraram coletivamente a presença

predominantemente de agathisflavona (**1**) com concentrações variando de 0,01 a 1% (massa seca), além de mentoflavona (**2**), sequoiaflavona (**3**) e podocarpusflavona A (**4**) (Figura 4.1) (Bahia et al., 2010). Nesses estudos, a agathisflavona foi obtida de *C. pyramidale* após alguns procedimentos cromatográficos após extração das folhas da espécie com solventes orgânicos (Bahia et al., 2005, 2010).

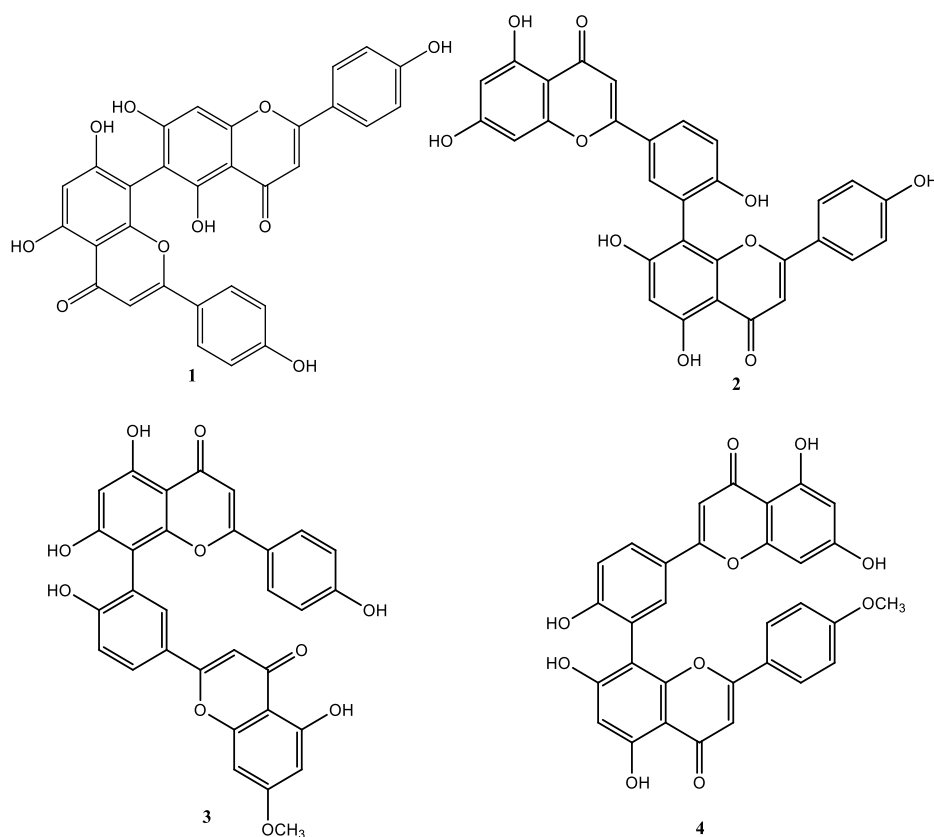


Figura 4.1 Biflavonoides isolados das folhas de *C. pyramidale*

Em geral, a obtenção metabólitos de fontes naturais requer uma análise demorada e laboriosa procedimentos nas etapas de extração e isolamento devido ao baixo concentração desses metabólitos presentes nos tecidos vegetais (Zhang et al., 2018). Apesar a variedade de métodos usados para obter compostos de fontes, ainda há uma necessidade urgente de melhorar e desenvolver alto rendimento, métodos seletivos e rápidos para purificar compostos bioativos de organismos. Este trabalho compara quatro procedimentos para a purificação de agathisflavona das folhas de *C. pyramidale*, dois por técnicas cromatográficas tradicionais e duas por complexação com bases inorgânicas.

4.2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Obter a agathisflavona das folhas de *Cenostigma pyramidale* com bons rendimentos e em poucas etapas

2.2 Objetivos específicos

- Comparar diferentes procedimentos para a purificação de agathisflavona das folhas de *C. pyramidale*;
- Calcular o rendimento do produto obtido por meio de cada uma das metodologias testadas;
- Avaliar a pureza do produto obtido;
- Investigar a presença de outros compostos presentes na metodologia de extração e purificação empregadas

4.3 Metodologia

4.3.1 Procedimentos gerais

O MeOH e o DCM foram fornecidos pela TEDIA, e o ácido clorídrico e o hidróxido de cálcio foram fornecidos pela Vetec e Sigma-Aldrich. Os procedimentos de isolamento foram monitorados por placas de sílica CCD (Macherey-Nagel ou Fluka) através da visualização de lâmpada UV de 254 nm (Cabinet Spectroline). A agathisflavona também foi purificada por equipamento Biotage totalmente automatizado de cromatografia flash (mod. Isolara One System) usando colunas flash pré-empacotadas e um detector interno de comprimento de onda (200–400 nm). Os espectros de RMN de ^1H foram registrados a 500 MHz e os espectros de RMN de ^{13}C a 125 MHz em um equipamento Bruker mod Avance III 500 (11,75T), os desvios químicos foram registrados em δ (ppm) do pico do solvente residual em relação ao TMS. A avaliação da pureza dos biflavonoides isolados foi realizada pelo equipamento HPLC–DAD Shimadzu© (mod. Nexera XR) com faixa de varredura de 200 a 400 nm. Uma coluna comercial de grupo octadecil (C18) (Shim-pack PREP-ODS (H) KIT; 250,0 × 4,6 mm ID, 5 μm , Shimadzu) foi empregada.

4.3.2 Preparação do material vegetal

As folhas de *C. pyramidale* foram coletadas nos arredores de Feira de Santana (12°15'55.1" S 38°56'54.7" W) e Valente (11°25'49.8" S 39°29'53.1" W), Bahia, Brasil. O comprovante foi depositado no Herbário Alexandre Leal da Costa do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia sob o número 240291. Os autores obtiveram autorização para acessar a planta através do Sistema Brasileiro de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN (# A55D19D).

4.3.3 Extração e Isolamento

As folhas de *C. pyramidale* foram secas em estufa a 45 °C por 72 h e depois moídas em misturador. Todos os métodos descritos utilizaram o extrato MeOH obtido por maceração por 48 h em temperatura ambiente das folhas secas e moídas.

4.3.3.1 Método A: Purificações cromatográficas

4.3.3.1.1 Isolamento por partição e cromatografia em coluna A.1

Este procedimento é considerado a técnica tradicional para isolamento fitoquímico e purificação de metabólitos especializados. A maceração em MeOH (2x 1 L) de 200 g de folhas do material vegetal forneceu 20,8 g de extrato metanólico. O extrato MeOH foi submetido à partição entre hexano, sendo que a fração solúvel alcoólica foi diluída com 30% de água e posteriormente fracionada com CHCl₃ (759 mg). A fase hidrometanólica foi concentrada no rotaevaporador para retirar o excesso de MeOH e, sequencialmente, foi extraída com EtOAc, fornecendo 1,58 g de fração solúvel em EtOAc. Essa fração foi cromatografada em coluna sobre sílica gel (Sigma-Aldrich, tamanho de partícula de 40–63 µm) e eluída com misturas de CHCl₃:MeOH. As frações eluídas com CHCl₃:MeOH (9:1) forneceram 428,0 mg de agathisflavona com rendimentos de 0,21% das folhas secas e 26,4% da fração solúvel em EtOAc do extrato MeOH.

4.3.3.1.2 Cromatografia líquida de média pressão automatizada (MPLC) - A.2

A partir de 25 g de folhas secas e moídas, 1 g de 2,5197 g do extrato de MeOH obtido por maceração foi submetido a cromatografia flash automatizada usando um cartucho de coluna flash pré-embalado C-18 de fase reversa de 25 g (Figura 4.2a). A amostra diluída em MeOH (15 mL), após a adsorção para a mesma fase C-18, foi adicionada ao espaço amostral do cartucho (Figura 4.2b), e então o cartucho foi conectado ao equipamento (Figura 4.2c). A eluição com misturas binárias de H₂O:MeOH de 9:1; 6:4, 1:1 e 100% MeOH resultaram em quatro frações de 300 mL cada, coletadas no modo manual com vazão de 50 mL min⁻¹. O monitoramento desta eluição através do detector UV em 254 nm permitiu a identificação da fração rica em componentes fenólicos; neste caso, a

terceira fração foi eluída em 1:1 (Figura 4.2d). A fração eluída com MeOH:H₂O 1:1, após a remoção do metanol no rotaevaporador, foi particionada com EtOAc, fornecendo 244 mg de fração solúvel em EtOAc. Sua placa de TLC comparativa empregando um padrão revelou a presença de agathisflavona.

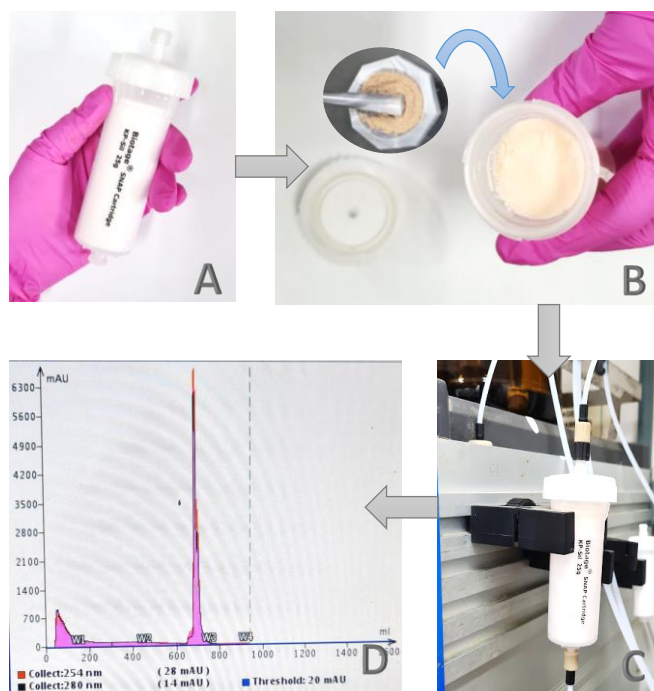


Figura 4.2 Esquema de obtenção da fração rica em agathisflavona pelo método A2. A- Cartucho de 25 g com fase reversa C-18, B- A adição da amostra seca adsorvida em C-18 na amostra do cartucho, C- O cartucho conectado ao equipamento e D- A tela do equipamento com separação monitorada em 254 nm indicando o sinal alto na terceira fração que corresponde à fração rica em componentes.

Portanto, esta fase foi submetida a um flash de sílica gel CC utilizando misturas de CHCl₃:MeOH em polaridades crescentes (sete frações de 30 mL cada) que permitiram obter 14,8 mg de agathisflavona na fração eluída com 9:1 com rendimentos de 1,48% referente ao extrato bruto e 0,0592% referente ao material vegetal seco.

4.3.3.2 Método B: Extração alcalina de biflavona

4.3.3.2.1 Tratamento direto do extrato com base B.1

O extrato metanólico (2,5 g) obtido de 25 g de folhas foi solubilizado em 50 mL de solução aquosa de hidróxido de cálcio a 10%, e a mistura foi deixada durante a noite em temperatura ambiente, resultando em uma suspensão que foi filtrada sequencialmente através de um funil contendo uma camada fina de Celite no filtro de papel. O filtrado amarelo obtido foi lentamente acidificado com ácido clorídrico concentrado até o pH atingir 4-5. Após alguns minutos, esses procedimentos forneceram um precipitado, e o TLC indicou que é agathisflavona comparado com um padrão puro. O sólido foi então filtrado e lavado com água destilada. Esta técnica permitiu a obtenção de 3,5 mg de agathisflavona com rendimento de 0,0136% em relação ao material vegetal e 0,136% em relação ao extrato bruto.

4.3.3.2.2 Tratamento do extrato particionado com base B.2

A partir de 50 g de material vegetal, 3,5 g de extrato bruto foram obtidos por maceração com MeOH. O extrato foi solubilizado em MeOH:H₂O (7:3) e submetido à partição com CHCl₃, fornecendo 857 mg de fração solúvel de CHCl₃. Na sequência, esta fração também foi submetida ao mesmo procedimento aplicado ao extrato metanólico bruto descrito no item B1. Este procedimento forneceu 6,5 mg de agathisflavona, 0,013% de rendimento em relação ao material vegetal, 0,185% em relação ao extrato bruto e 0,758% em relação à fração solúvel de CHCl₃.

4.3.3.3 Tratamento do material residual do filtro da metodologia B.2

No material residual insolúvel do filtro do tratamento com base B.2 foram escoados 300 mL de metanol, que levou a obtenção de um material solúvel na fase orgânica. Esse material foi seco levando a obtenção de 450g de um material intermediário. Esse material foi submetido a separação em CC no sistema gradiente de polaridade CHCl₃:AcOEt, onde foram obtidas 11 frações proveniente do agrupamento das 27 frações obtidas, descritas na Tabela 1

Tabela 4.1 Resumo das etapas e rendimentos da purificação de agathisflavona por extrações cromatográficas (A) e de base direta (B)

Código	Frações reunidas	Massa obtida (mg)	Sistema	Volume (mL)
PPEAFM1	1	121,1	CHCl ₃	50
PPEAFM2	2	19,6	CHCl ₃	80
PPEAFM3	3-6	36,2	CHCl ₃	80
PPEAFM4	7	138,6	CHCl ₃	50
PPEAFM5	8-11	46,9	CHCl ₃	200
PPEAFM6	12	40,2	CHCl ₃	125
PPEAFM7	13	58,2	95:5	100
PPEAFM8	14-19	24,5	95:5	120
PPEAFM9	20-23	6,9	9:1	50
PPEAFM10	24	14,3	8:2	50
PPEAFM11	25-27	32,3	1:1	100

Após a análise por CCD verificou-se que as frações PPEAFM1, PPEAFM4 e PPEAFM11 aparentavam estar puras. As amostras foram enviadas para análise de RMN de carbono 13 e hidrogênio.

4.3.4 Análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para agathisflavona

Para avaliar a pureza da agathisflavona obtida, o biflavonoide isolado pelos quatro métodos foi submetido à análise HPLC-DAD usando o seguinte método: 10 min de tempo de corrida, eluído em gradiente, 0-8 min, 90-100%,

0,1% ácido acético aquoso:MeOH como fase móvel (v/v) e 2 min 100% MeOH, 0,5 mL min⁻¹ de vazão e 2 µl de cada injeção de amostra (Figura 4.3).

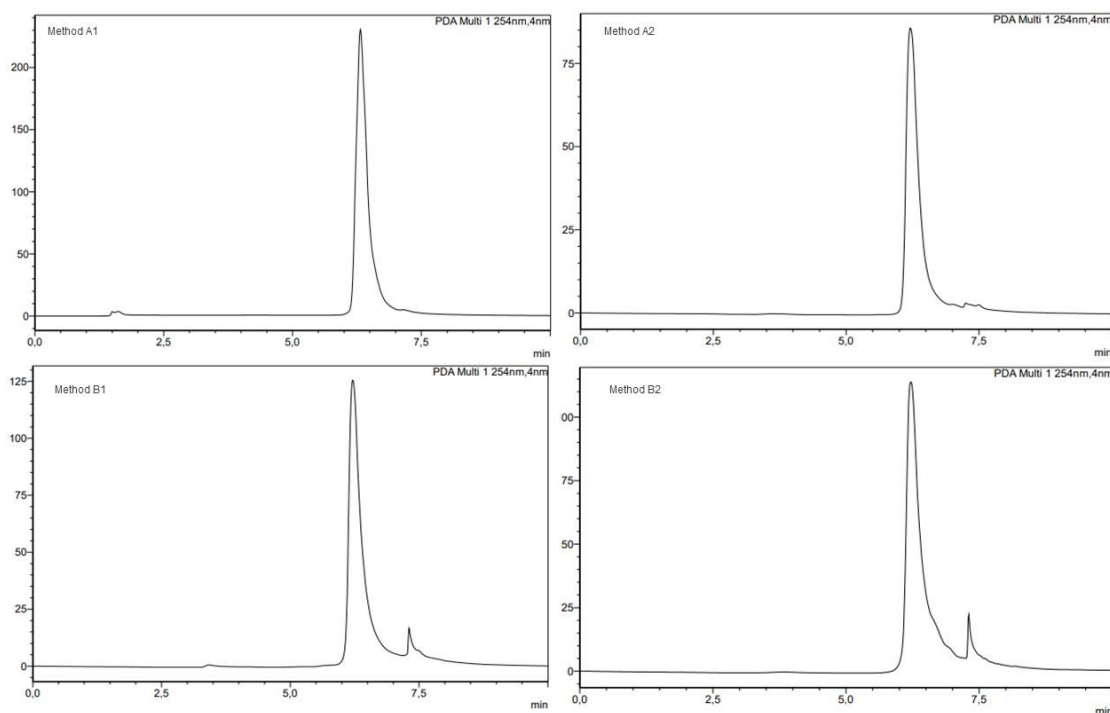


Figura 4.3 Cromatograma das diferentes amostras de agathisflavona obtidas por meio de cada um dos métodos aplicados

4.4. Resultados e discussão

4.4.1 Métodos de extração da agathisflavona de *Cenostigma pyramidale*

Como estudos anteriores indicaram que agathisflavona era o principal composto no conteúdo de biflavonas em diferentes espécimes de *C. pyramidale* (Bahia et al., 2010), outras estratégias foram aplicadas para obter esse composto com altos rendimentos e poucas etapas de purificação. Anteriormente, os melhores resultados para isolar agathisflavona, entre outros bioflavonoides, de folhas de *C. pyramidale* eram obtidos após pelo menos três colunas cromatográficas convencionais. Após a partição do em MeOH obtido das folhas com hexano, a fase hidrálcolica residual foi particionada com clorofórmio, fornecendo as frações solúveis de CHCl₃ submetidas a CCs de sílica gel e uma

coluna de permeação Sephadex LH-20 usando uma mistura de diferentes solventes. Esses procedimentos forneceram frações fenólicas enriquecidas e permitiram a obtenção de 0,015% de agathisflavona referente às folhas (Bahia et al., 2010). Neste estudo, foi levada em consideração que a forte interação da agathisflavona com a fase estacionária normal em separações cromatográficas CC devido à presença de seis grupos hidroxila fenólicos dificultava a sua eluição, esperava-se, então, que no emprego da coluna de fase reversa este biflavonóide poderia ser isolado mais rapidamente. Posteriormente, sem utilizar nenhum pré-tratamento ou partição, o extrato foi submetido à coluna de fase reversa. Com isso, uma fase com esse composto impuro obtido exigiu apenas mais uma etapa rumo à purificação final.

Porém, neste procedimento, poucas etapas foram empregadas para obtenção do biflavonoide puro. Também foi desenvolvido um procedimento cromatográfico tradicional com menos etapas; neste caso, a fração solúvel EtOAc do extrato MeOH foi empregada (A.1), e o rendimento foi menor que a pré-concentração com a fase reversa de sílica (A.2).

O tratamento alcalino para obtenção de flavonoides como precipitado é conhecido, mas comumente empregado para cascas de frutas cítricas e aboeto (Lo Curto et al., 1992). No entanto, para extratos de folhas, esse procedimento é incomum. O tratamento com Ca(OH)_2 remove os hidrogênios ácidos dos grupos fenólicos das flavonas, e o sal resultante pode ser solúvel em meio aquoso. Essas duas metodologias aplicadas forneceram uma rápida forma de isolamento de agathisflavona com rendimento semelhante ao procedimento cromatográfico tradicional (Tabela 4.1).

A agathiflavona obtida foi identificada por análise de TLC e HPLC comparada com o padrão previamente isolado. Além disso, os espectros de UV obtidos do detector DAD (200-400 nm) na análise de HPLC também foram comparados (Figura 4.4).

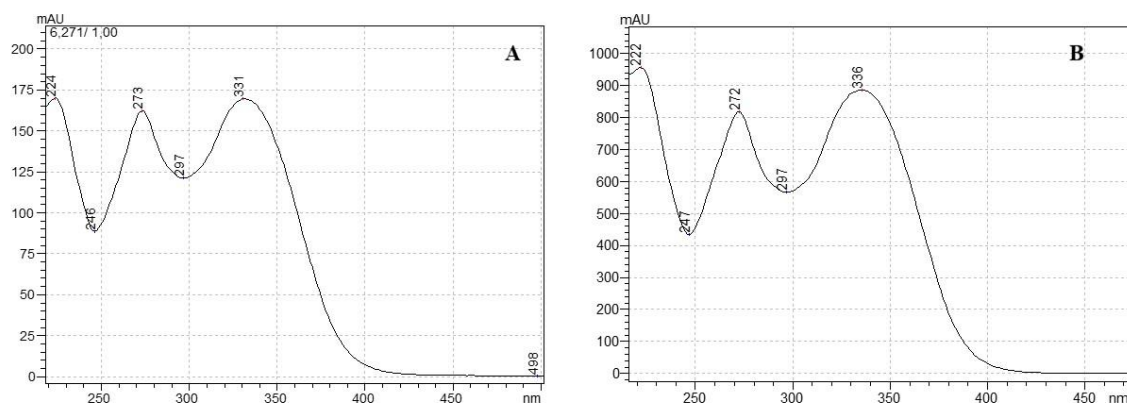


Figura 4.4 Espectros ultravioleta de agasthi-flavona obtidos a partir dos procedimentos isolados (A) e padrão (B)

Tabela 4.2 Resumo das etapas e rendimentos da purificação de agasthi-flavona por extrações cromatográficas (A) e de base direta (B)

	Método A			Método B	
	Literatura	1	2	1	2
Partição de extratos brutos	+	++	-	-	+
Tratamento com base	-	-	-	+	+
colunas	+++	+	++	-	-
Total de etapas	4	3	3	1	2
Rendimento (%)	0.015	0.014	0.060	0.014	0.014

Os isolados também foram identificados por dados de RMN (técnicas mono e bidimensionais), e os dados obtidos são semelhantes aos publicados anteriormente. ¹H NMR é mais específico para identificar compostos orgânicos, mas a análise HPLC ou GC é comumente empregada para determinação de pureza orgânica, especialmente para compostos naturais. A análise por HPLC

da agathisflavona isolada por meio dos quatro procedimentos indicam que essa biflavona foi obtida pelos procedimentos A.1, B.1 e B.2 com 99,838%, 99,302% e 99,088% de pureza, respectivamente. Além disso, o procedimento A.2 permitiu obtê-lo com > 99,9% de pureza. Esses dados foram obtidos relativamente pela integral dos picos exibidos na análise cromatográfica.

O material residual retido no filtro em conjunto com a celite apresentava alguns pontos brancos que levaram a pensar que poderia ser algum outro composto extraído seletivamente por meio da partição e não solúvel tanto na solução alcalina quanto em água. Então foi adicionado metanol diretamente ao filtro e o material residual após apenas uma purificação em coluna forneceu 3 frações puras, cujos espectros obtidos foram interpretados e aqui descrito na sequência.

4.4.2 Identificação estrutural de PPEAFM1.

A fração PPEAFM4 isolada do material residual do filtro do MPLC insolúvel no meio utilizado, foi identificada a partir da análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C . A análise dos dados de RMN de ^{13}C (Figura 4.9) permitiu comprovar a natureza triterpênica desta substância por conta da presença de trinta sinais de carbonos característicos registrado no espectro. Os sinais em δ_{C} 109,41 e 150,90 referentes a uma de ligação dupla (Figura 4.10), é sugestivo que o triterpeno seja da classe dos lupanos. Sendo que o sinal em δ_{C} 218,26 foi atribuído ao carbono carbonílico de uma cetona não conjugada (C-3).

Os dois sinais em δ_{H} 4,57 (1H; d, J= 2,43) e 4,69 (1H, dd, J=2,5 e 1,3) registrados no espectro de RMN de ^1H (Figura 4.6) corroboraram com a presença de hidrogênios olefínicos geminais, confirmando a presença de uma ligação dupla terminal. A análise do espectro em HSQC confirma tal hipótese já que é possível identificar a relação entre ambos hidrogênios mencionados com o carbono em δ_{C} 109,41. Além disso, pode ser verificado a presença de sete singletos em δ_{H} 0,82; 0,95; 0,98; 1,05; 1,09 (s, 6H) e 1,71 (Figura 4.7) atribuídos a sete grupos metilas ligados a carbonos quaternários que também indicaram que a estrutura apresenta um esqueleto lupano (Figura 4.8).

Dessa maneira, comparando-se os deslocamentos químicos obtidos por meio dos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H , principalmente da dupla ligação e das metilas presentes nos espectros com os dados da literatura permitiram identificar a substância como a lupenona (Figura 4.5). Apesar de ser um triterpeno comum, esse é o primeiro relato do isolamento dessa estrutura nas folhas de *Cenostigma pyramidale*.

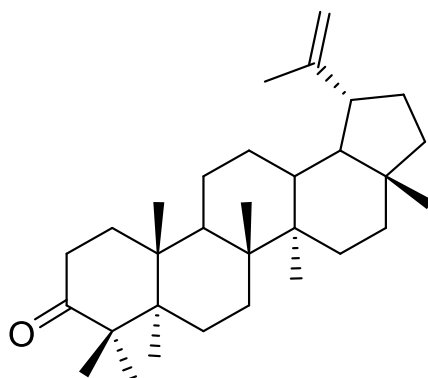


Figura 4.5 Estrutura da lupenona

RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]: 39,63 (C-1), 34,18 (C-2), 218,26 (C-3), 47,35 (C-4), 54,94 (C-5), 19,69 (C-6), 33,58 (C-7), 42,91 (C-8), 49,81 (C-9), 36,90 (C-10) 21,48 (C-11), 25,17 (C-12), 38,18 (C-13), 43,01 (C-14), 27,44 (C-15), 35,53 (C-16), 43,01 (C-17), 48,26 (C-18), 47,97 (C-19), 150,90 (C-20), 29,84 (C-21), 40,80 (C-22), 26,66 (C-23), 21,05 (C-24), 15,80 (C-25), 15,99 (C-26), 14,49 (C-27), 18,03 (C-28), 109,41 (C-29), 19,32 (C-30). RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]: 1,91 (H-1), 1,94 (H-1), 2,51 (H-2) e 2,44 (H-2), 1,09 (H-4), 2,38 (H-18), 1,95 (H-19), 1,04 (H-21), 0,95 (H-25), 1,09 (H-26), 0,98 (H-27), 0,82 (H-28), 4,71 (H-29), 4,59 (H-29).

RMN de ^{13}C [CDCl_3 , δ (ppm)]: 39,61 (C-1), 34,1 (C-2), 218,22 (C-3), 47,33 (C-4), 54,91 (C-5), 19,67 (C-6), 33,55 (C-7), 42,88 (C-8), 49,78 (C-9), 36,87 (C-10) 21,46 (C-11), 25,17 (C-12), 38,16 (C-13), 42,99 (C-14), 27,42 (C-15), 35,51 (C-16), 42,99 (C-17), 48,23 (C-18), 47,95 (C-19), 150,87 (C-20), 29,82 (C-21), 40,77 (C-22), 26,64 (C-23), 21,03 (C-24), 15,78 (C-25), 15,97 (C-26), 14,47 (C-27), 18,01 (C-28), 109,39 (C-29), 18,31 (C-30). RMN de ^1H [CDCl_3 , δ (ppm)]: 1,25 (H-5), 1,35 (H-5), 1,68 (H-6) , 2,14 (H-18), 1,02 (H-21), 0,94 (H-25), 0,95 (H-27), 0,79 (H-28), 4,57 (H-29), 4,69 (H-29) (TAVARES DE OLIVEIRA et al., 2019).

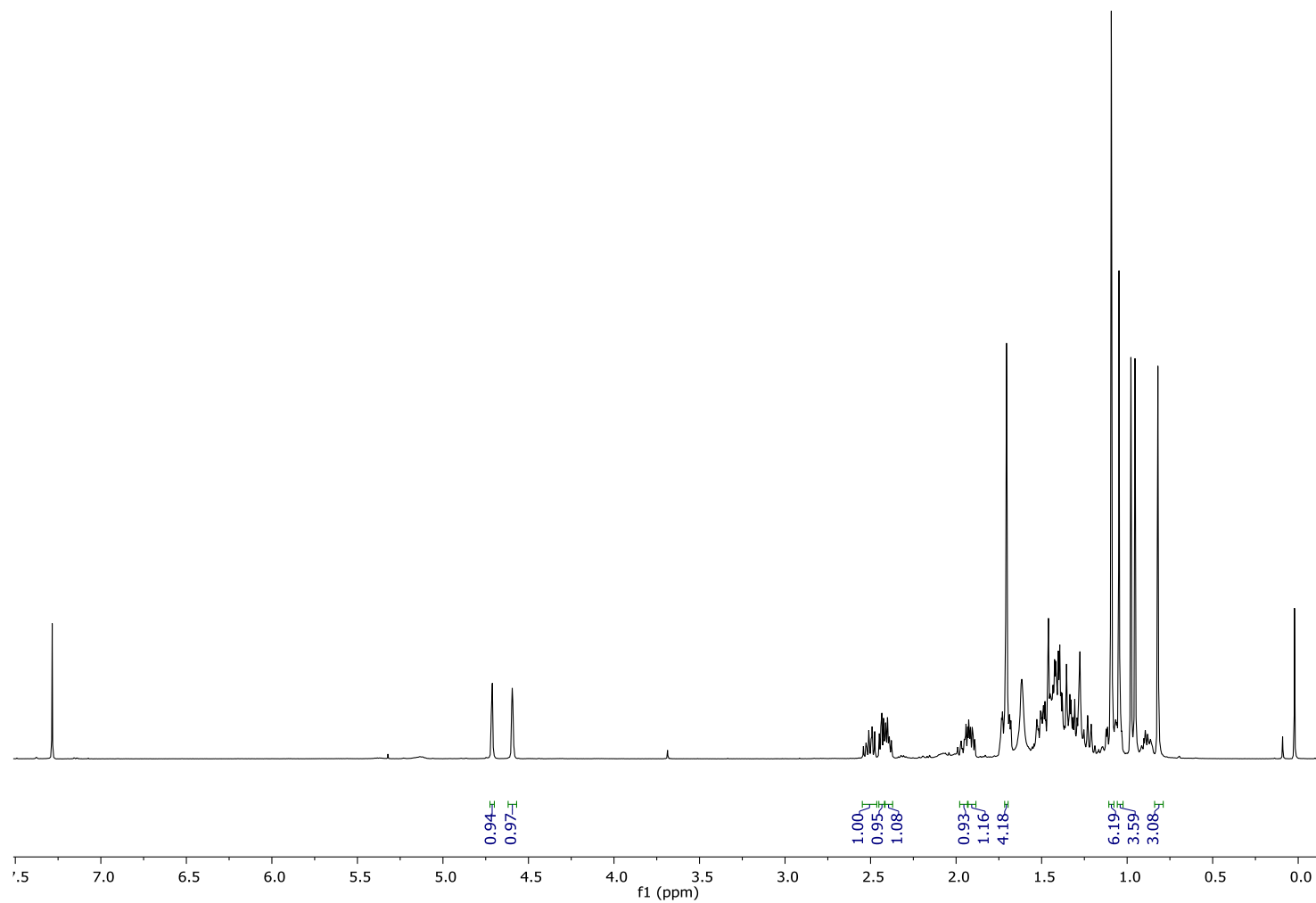


Figura 4.6 Espectro de RMN de ^1H da lupenona [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

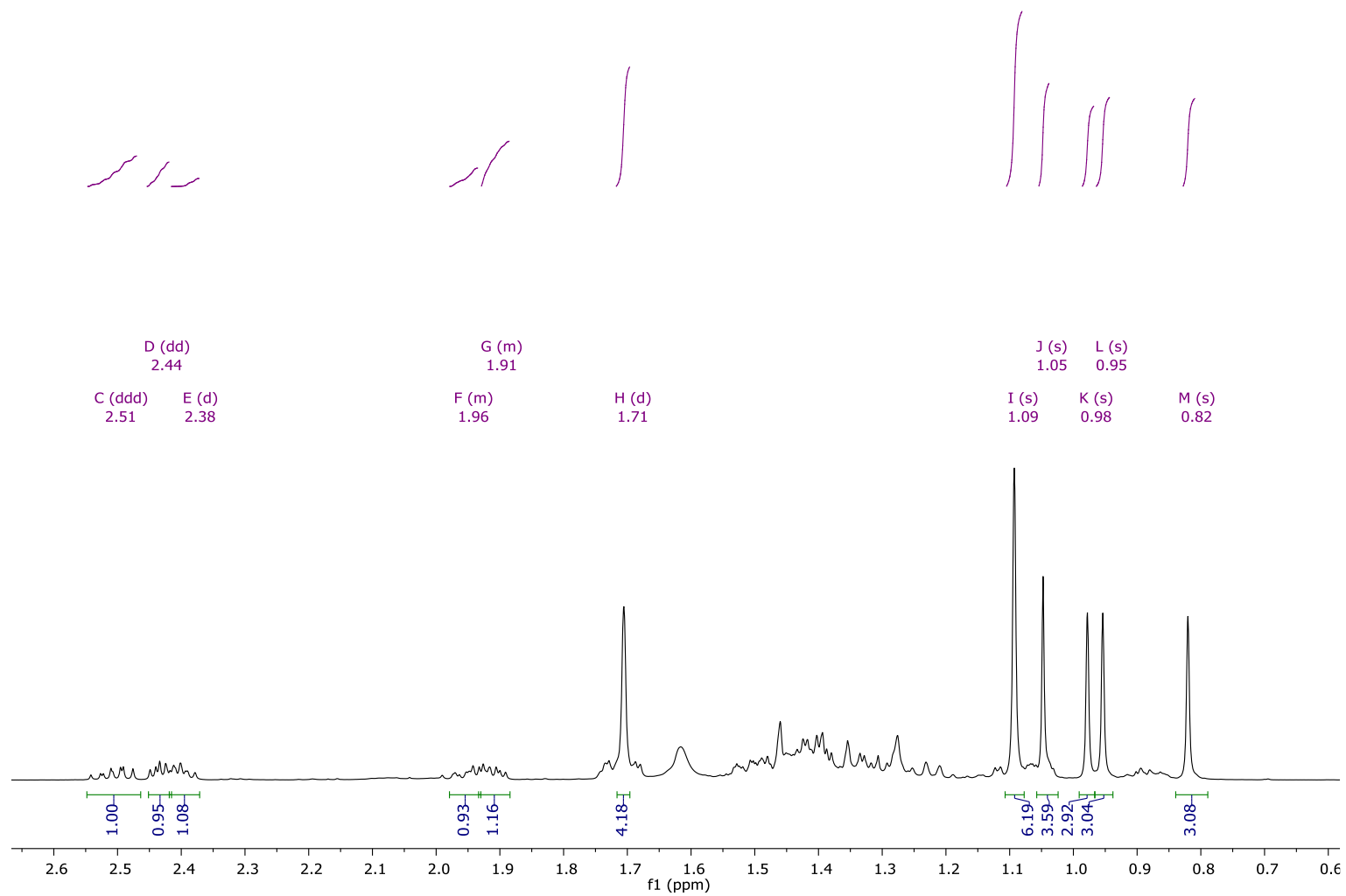


Figura 4.7 Ampliação de região do espectro de RMN de ^1H da lupenona [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

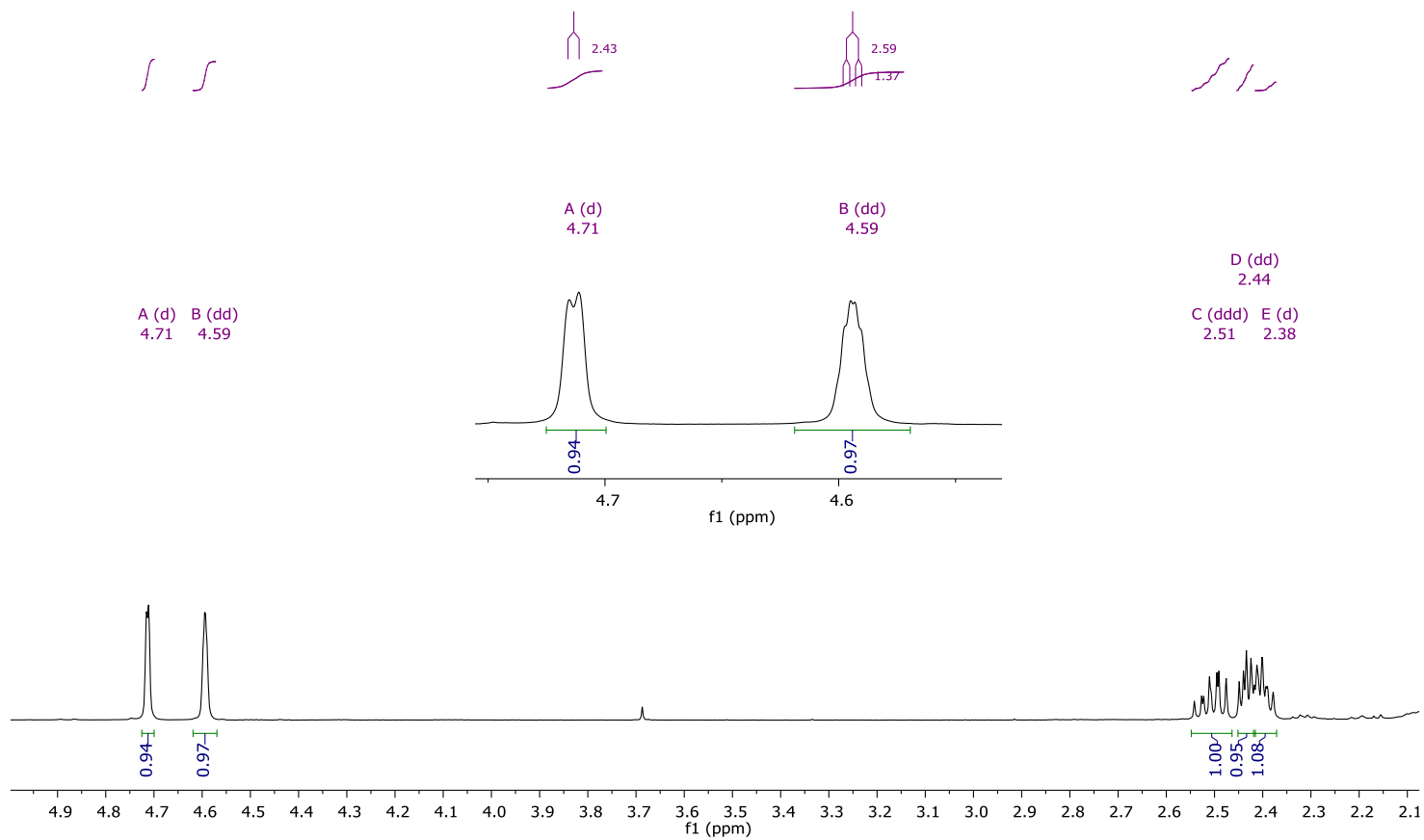


Figura 4.8 Ampliação de região do espectro de RMN de ^1H da lupenona [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

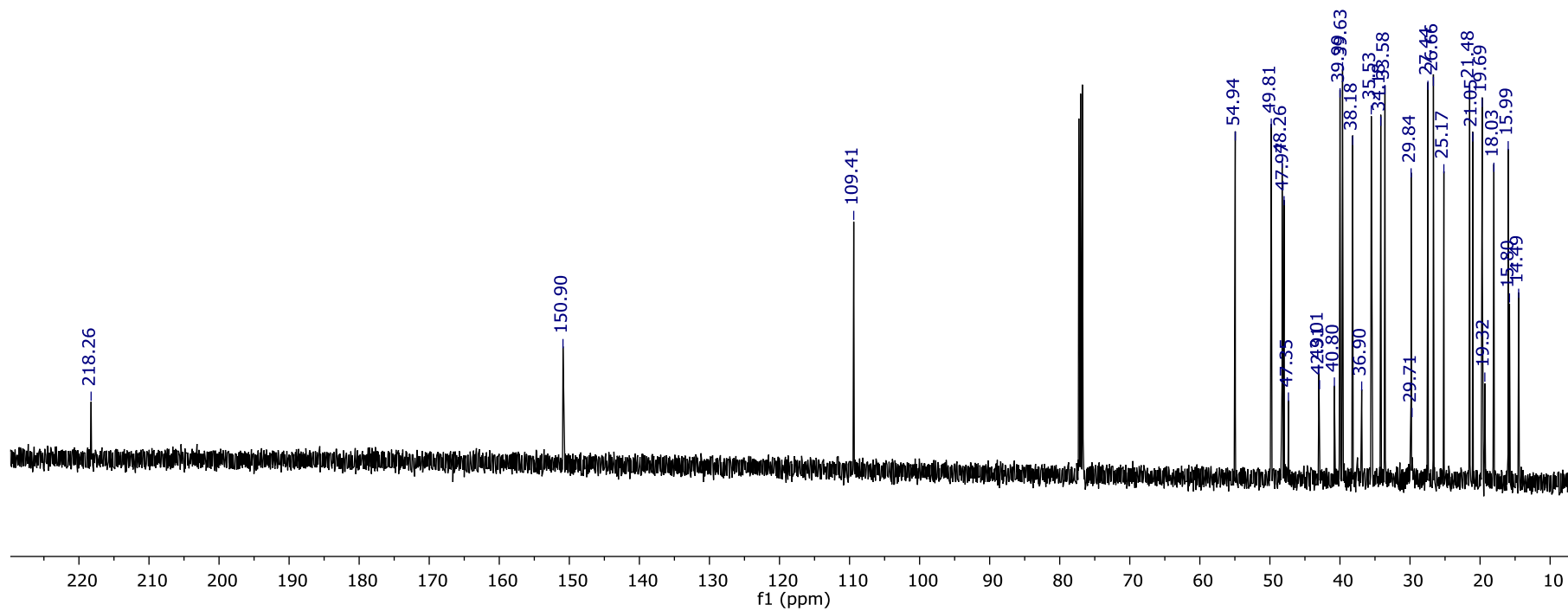


Figura 4.9 Espectro de RMN de ^{13}C da lupenona [125 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

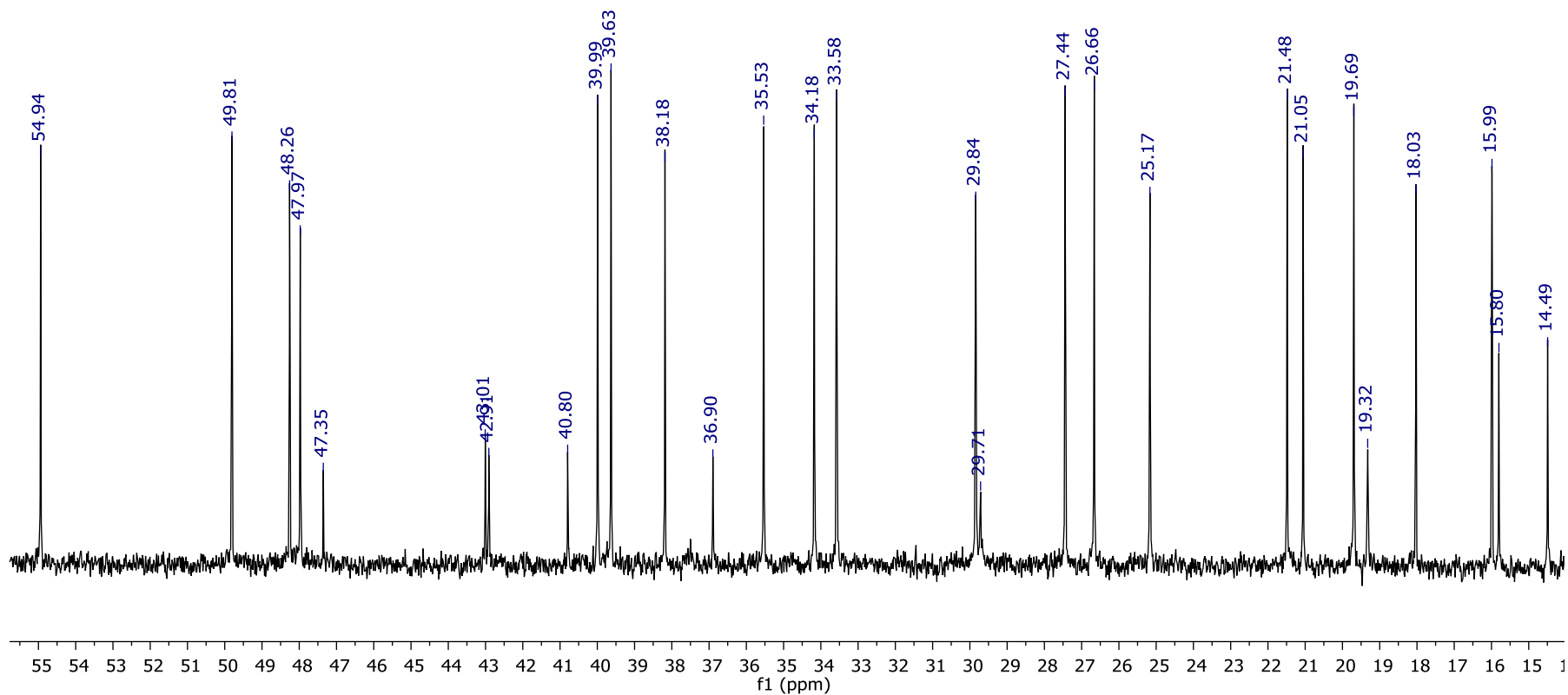


Figura 4.10 Ampliação de região do espectro de RMN de ¹³C da lupenona [125 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

4.4.3 Identificação estrutural da substância PPEAFM4.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.12) de PPEAFM4 revelou um padrão de sinais muito similar ao da fração PPEAFM2. Os sinais registrados em δ 4,71 (d, 1H, $J=2,5\text{Hz}$) e δ 4,79 (dd, 1H, $J= 2,6$ e $1,4\text{Hz}$) sugerem a presença de ligação dupla terminal. O conjunto de seis sinais δ 0,78(s, 3H), 0,81(s, 3H), 0,85(s, 3H), 0,97(s, 3H), 0,99(s, 3H), 1,05(s, 3H) com integrais correspondentes a 3 hidrogênios na região entre 0,7 e 1,1 indicam a presença de grupamentos metílicos ligados a carbonos sp^3 . Apesar da baixa diferenciação de deslocamentos químicos entre os sinais atribuídos a esta estrutura quando comparados com os sinais atribuídos a um esqueleto triterpeno da série dos lupenos, o sinal em δ 3,21 (dd, 1H, $J=11,4$ e $4,7$ Hz) pode ser atribuído ao H-3 na estrutura, o que sugere a presença de uma hidroxila em equatorial na estrutura ao invés de uma carbonila como na anterior. Assim, sendo considerado que seu esqueleto base poderia ser similar ao da estrutura atribuída a fração, a lupenona, foi feita a comparação com dados da literatura de forma direcionada.

A comparação dos deslocamentos químicos obtidos por meio dos espectros de RMN de ^1H , principalmente da dupla ligação, das metilas presentes e do sinal desblindado em δ 3,21 (d, 1H, $J= 11,4$ e $4,7$ Hz), cujo deslocamento químico foi atribuído como consequência da presença de hidroxila ligada a esse mesmo carbono, com os dados da literatura permitiram identificar a substância como sendo o lupeol, metabólito previamente isolado nas folhas dessa espécie (MENDES et al., 2000).

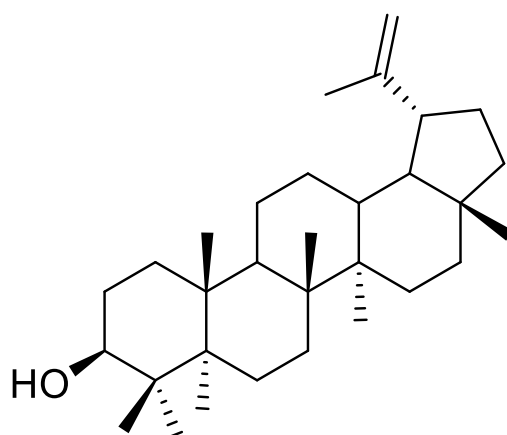


Figura 4.11 Estrutura do lupeol

RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]: δ 4,71 (d, 1H, $J=2,5\text{Hz}$) e δ 4,59 (dd, 1H, $J= 2,6$ e $1,4\text{Hz}$), δ 3,21 (d, 1H, H-3), δ 2,40 (m, 1H, H-19), δ 1,94 (m, 1H, H-21), δ 1,68 (t, 1H, H-13), δ 1,70 (s, 3H, H-30), δ 1,63 (d, 2H, H-14), δ 1,38 (d, 1H, H-6), δ 1,31 (t, 1H, H-21), δ 1,28 (d, 1H, H-12), δ 1,24 (s, 1H, H-9), δ 1,05 (s, 1H, H-23), δ 0,99 (s, 3H, H-23), δ 0,97 (s, 3H, H-27), δ 0,85 (t, 1H, H-18), δ 0,81 (s, 3H, H-25), δ 0,78 (s, 3H, H-28), δ 0,71 (d, 1H, H-5)

RMN de ^1H : δ 4,71 (s, 1H, H-29), δ 4,56 (s, 1H, H-27), δ 3,21 (d, 1H, H-3), δ 2,37 (m, 1H, H-19), δ 1,91 (m, 1H, H-21), δ 1,69 (s, 3H, H-30), δ 1,67 (t, 1H, H-13), δ 1,61 (s, 3H, H-2A), δ 1,54 (s, 3H, H-30), δ 1,53 (t, 1H, H-11), δ 1,42 (d, 1H, H-14), δ 1,39 (q, 1H, H-6), δ 1,33 (s, 1H, H-21), δ 1,29 (q, 1H, H-12), δ 1,28 (s, 1H, H-9), δ 1,04 (s, 1H, H-23), δ 1,01 (d, 1H, H-15), δ 0,98 (s, 3H, H-23), δ 0,97 (s, 3H, H-27), δ 0,91 (t, 1H, H-18), δ 0,84 (s, 3H, H-25), δ 0,79 (s, 3H, H-28), δ 0,69 (d, 1H, H-5) (TAVARES DE OLIVEIRA et al., 2019).

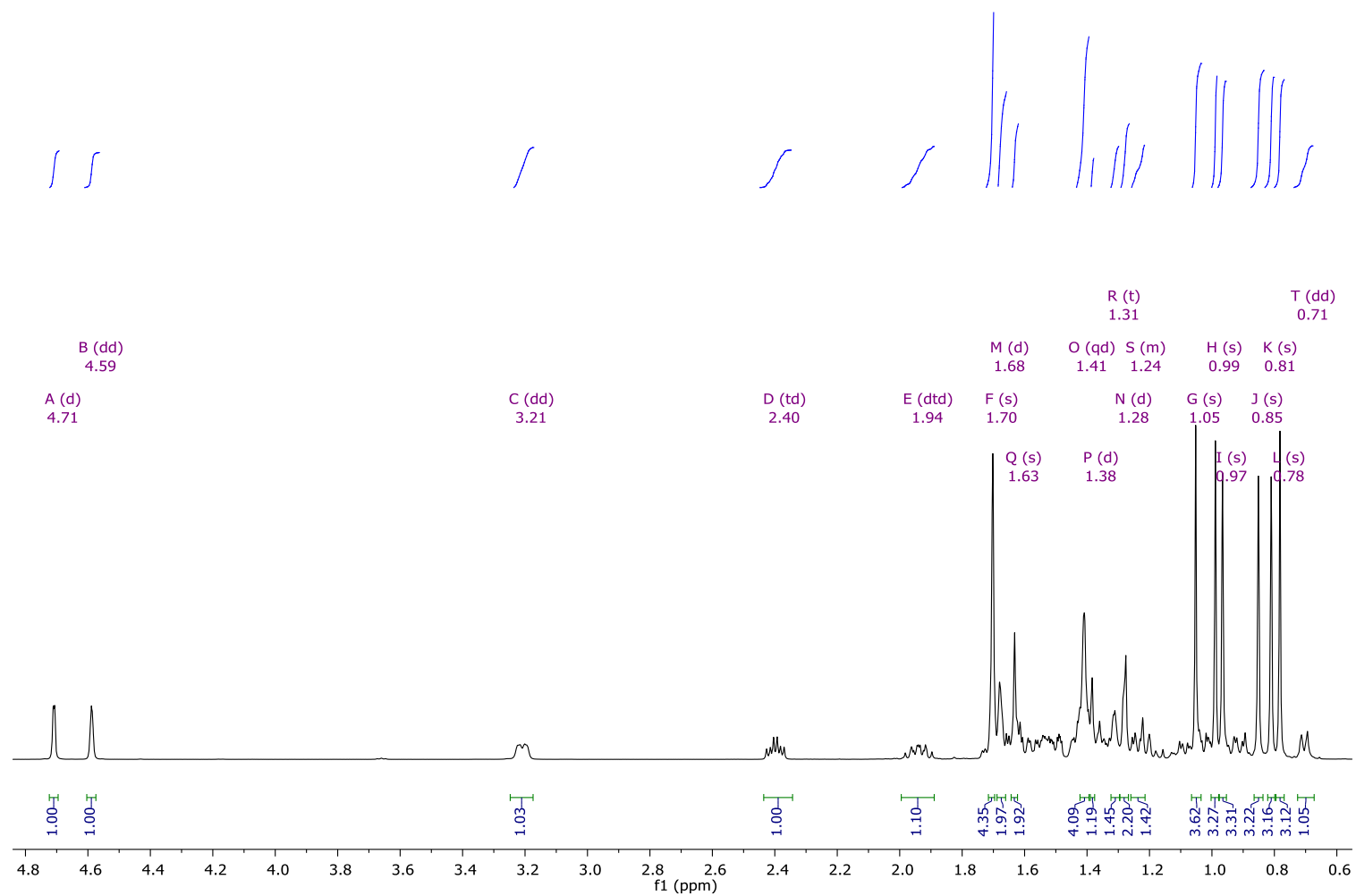


Figura 4.12 Região do espectro de RMN de ^1H do lupeol [500 MHz, CDCl_3 , $\delta(\text{ppm})$]

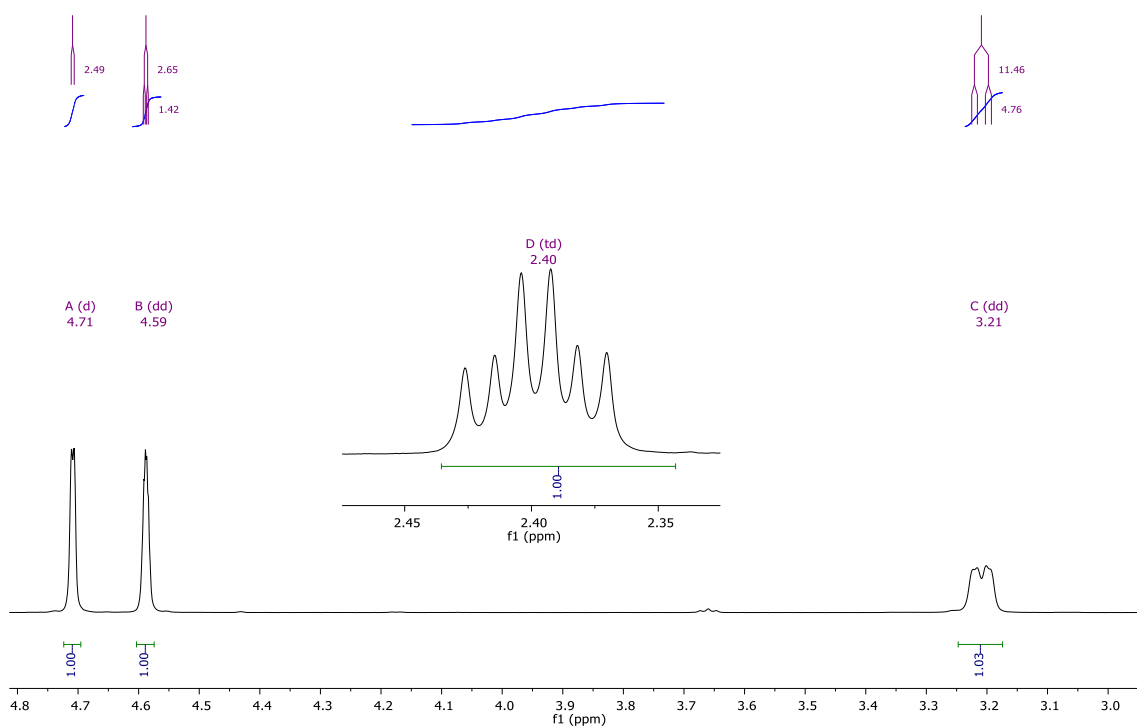


Figura 4.13 Ampliação de região do espectro de RMN de ¹H do lupeol [500 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

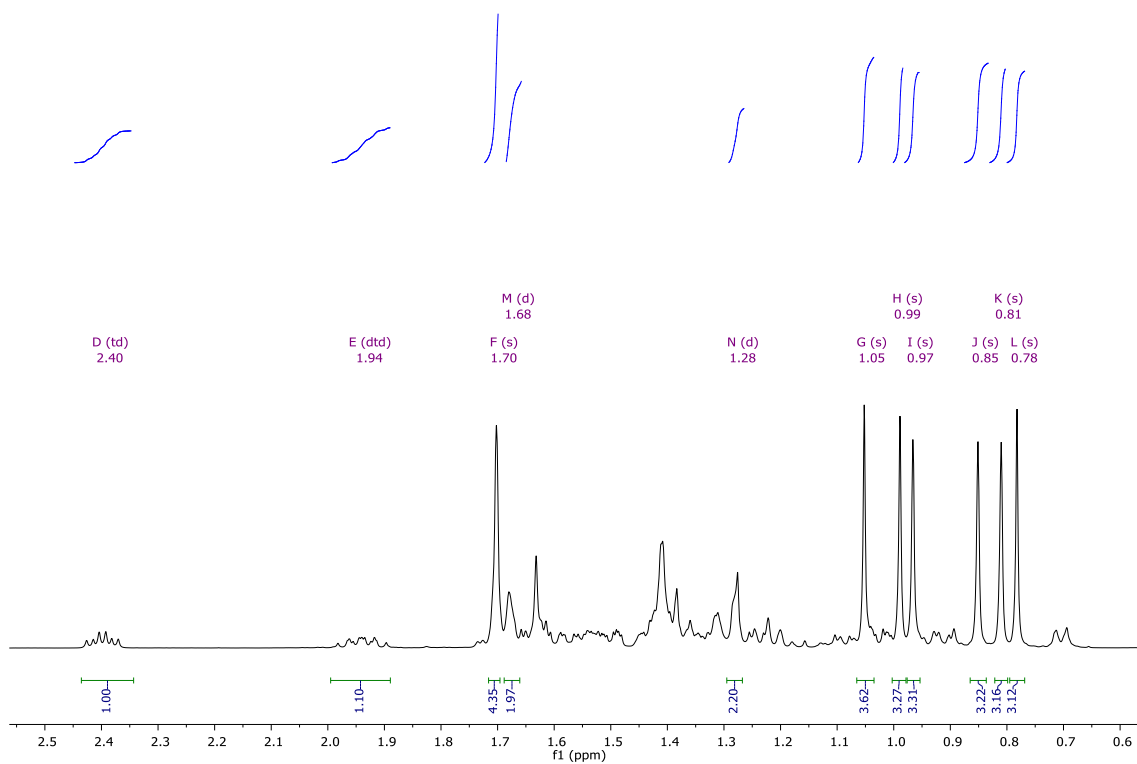


Figura 4.14 Ampliação de região do espectro de RMN de ¹H do lupeol [500 MHz, CDCl₃, δ(ppm)]

4.4.4 Identificação do composto PPEAFM11

A fração PPEAFM11 foi também identificada a partir da análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C . A análise dos dados do espectro de RMN de ^1H (Figura 4.16) indicou presença de apenas 4 sinais de hidrogênio, dentre eles, os dois sinais em δ 6,24 (d, $J=2,2$ Hz, 1H) e 6,25 (d, $J=2,3$ Hz, 1H), com deslocamento químico numa região indicativa de hidrogênio ligado a anel aromático cuja constante de acoplamento de ambos indica que eles acoplam em *meta*.

Além desses foram registrados um quarteto referente a um hidrogênio olefinico registrado em δ 5,86 ($J=1,4$ Hz) e um duplete de uma metila registrado δ 2,60 ($J=1,4$ Hz, 3H), pelo valor da constante de acoplamento é indicativo que acoplam a três ligações.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.17) forneceu 10 sinais que confirmaram a presença de um grupo aromático na estrutura. Além disso, esse espectro permitiu corroborar com a presença de uma dupla ligação conjugada a um carbono acílico, característico de grupo éster conjugado. Esses dados permitiram identificar a substância como uma 3-metil cumarina, uma vez que o hidrogênio em δ 5,86 é característico de hidrogênio alfa em carbonilas conjugadas Tal espectro é característico de uma cumarina comumente sintetizada, a 5,7 dihidroxi 4 metil cumarina.

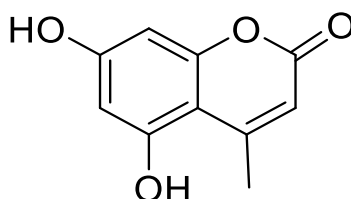


Figura 4.15 Estrutura da 5,7 dihidroxi 4 metil cumarina

RMN de ^1H [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]: δ 6,24 (d, $J=2,2$ Hz, 1H), 6,25 (d, $J=2,3$ Hz, 1H), δ 5,86 (d, $J=1,4$ Hz, 1H) e δ 2,60 (d, $J=1,2$ Hz, 3H). RMN de ^{13}C [500 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]: 162,67 (C-2), 108,25 (C-3), 102,74 (C-4), 158,22 (C-5), 98,92 (C-6), 161,61 (C-7), 94,42 (C-8), 156,94 (C-9), 156,71 (C-10), 22,76 (C-11).

RMN de ^1H : δ_{H} RMN de ^1H : δ 6,23 (d, $J=2,2$ Hz, 1H), 6,25 (d, $J=2,3$ Hz, 1H), δ 5,83 (s, 1H) e δ 2,57 (s, 3H) (Aguiar, 2023).

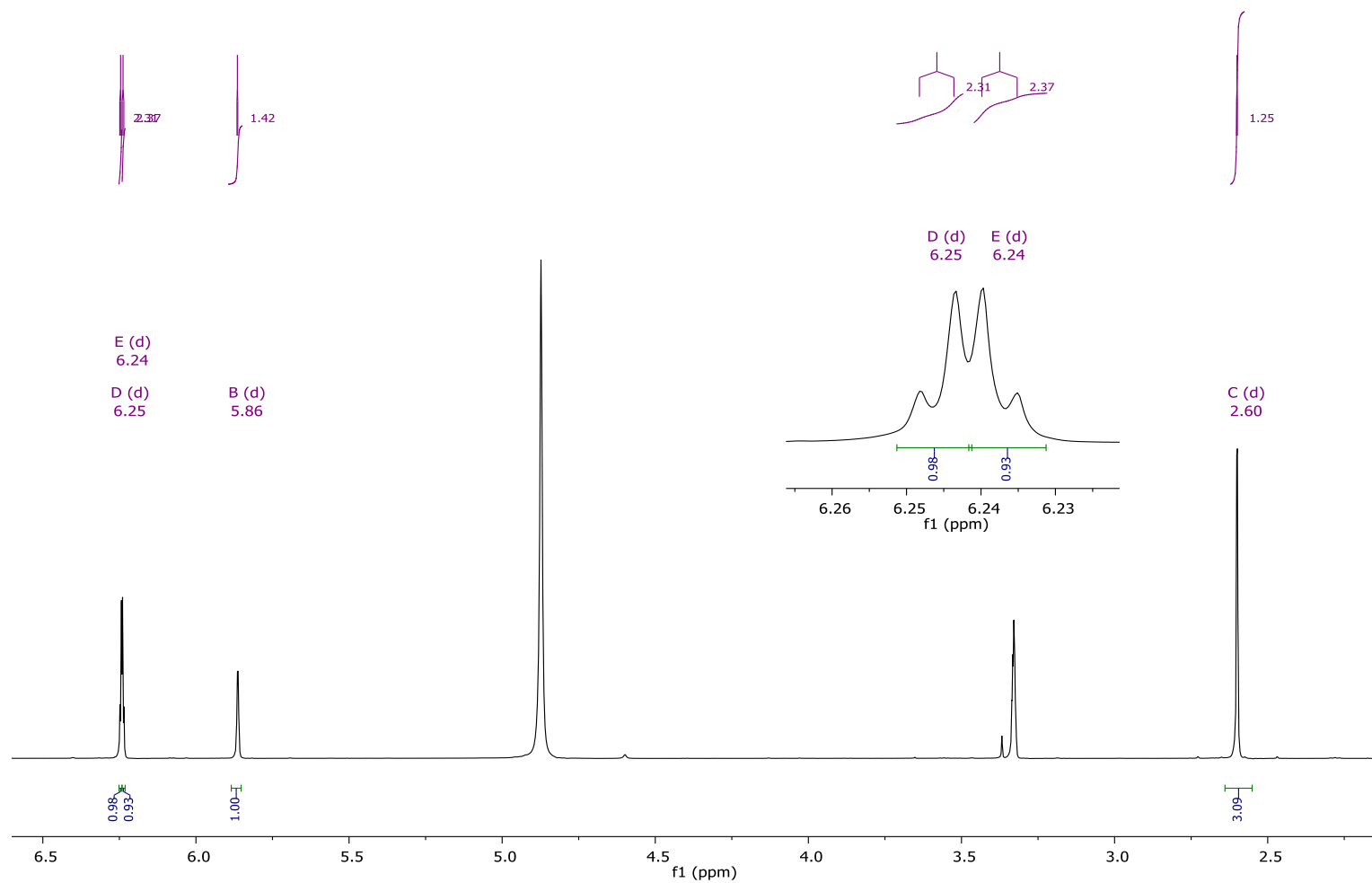


Figura 4.16 Região do espectro de RMN de ^1H contendo todos os sinais atribuídos a cumarina isolada e ampliação da região característica de H aromático [500 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{ppm})$]

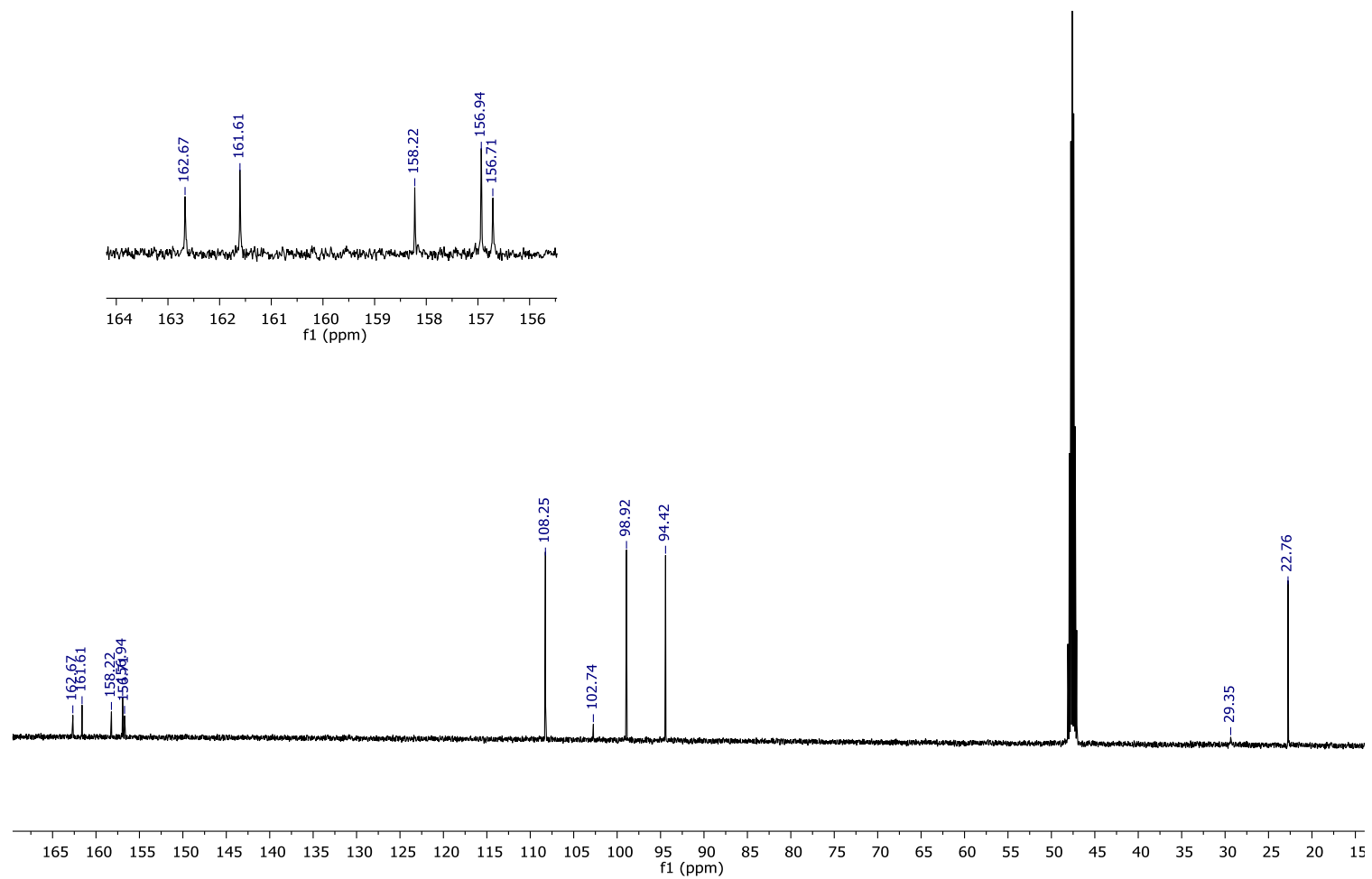


Figura 4.17 Região do espectro de RMN de ^{13}C contendo todos os sinais atribuídos a estrutura [125 MHz, CD_3OD , $\delta(\text{ppm})$]

4.5 Considerações finais

O emprego dessas metodologias com etapas reduzidas mostrou que a purificação de agathisflavona de extratos metanólicos de folhas de *C. pyramidale* na cromatografia automática RP flash proporciona maior rendimento, em apenas duas etapas. No entanto, este tipo de equipamento nem sempre está disponível. A extração alcalina com Ca(OH)_2 é uma opção, visto que o rendimento com ou sem partição apresentou-se em torno de 0,014% de rendimentos, semelhante a estudos anteriores. A vantagem das bases em meio aquoso é a redução do emprego de mais solventes e sílica, que é mais verde. Assim, as metodologias aplicadas mostraram vantagens sobre o isolamento de agathisflavona menos solvente empregado devido ao número de procedimentos de coluna cromatográfica, menos demorado e o rendimento do produto acabado foi aumentado.

Este trabalho evidenciou a necessidade de se reestudar metodologias de isolamento, principalmente para obtenção de compostos com bioatividades promissoras como a agathisflavona. Além disso, a investigação mais minuciosa do material obtido levou a obtenção de mais três compostos, um já isolado na espécie, e outros dois ainda não relatados na literatura.

Capítulo 5: Untargeted phenolic profiling workflow

Abstract

This study explores the chemical diversity and metabolomic profiles of three plant species, namely *Cenostigma pyramidale*, *Cenostigma microphylla*, and *Canavalia brasiliensis*, native to the Caatinga biome in Brazil. The Caatinga biome, characterized by dry forests, houses a unique biodiversity adapted to high temperatures and low humidity. The Leguminosae family, particularly the genus *Cenostigma*, plays a prominent role in this region, with species such as *C. pyramidale* and *C. microphyllum* demonstrating adaptation to the harsh environmental conditions. The investigation focuses on the phytochemical composition of these plants, highlighting the presence of various flavonoids, isoflavonoids, and other secondary metabolites. Specifically, the biflavonoid agathisflavone is identified as a key compound in *C. pyramidale*, exhibiting neuroprotective properties. Additionally, the study provides the first report on the chemical composition of *Canavalia brasiliensis*, revealing the presence of flavonols, anthocyanins, and lignans, including the rare occurrence of schisandrol in the Leguminosae family. Metabolomic profiling through UHPLC-QTOF-MS analysis is employed, allowing for a comprehensive comparison of the three species. Multivariate data analysis, including PCA and OPLS-DA, highlights both similarities and differences in the metabolomic profiles. The results indicate distinct metabolic signatures for each species, emphasizing the importance of considering the chemical diversity within the Caatinga biome. The findings contribute valuable insights into the chemotaxonomy of *Cenostigma* species and the lesser-known *Canavalia brasiliensis*. Moreover, the study underscores the potential of UHPLC-QTOF-MS as a powerful tool for the rapid and detailed characterization of plant metabolomes, paving the way for future investigations into the ecological and pharmaceutical applications of these unique plant species in the Caatinga biome.

5.1 Introduction

The Brazilian Caatinga biome covers about 11% of its territory and presents biodiversity adapted to high temperatures and low humidity, it is an environment characterized by dry forests (Barbosa & Gomes Filho, 2022). This biome is characterized by many endemic plants, and a consequent abundant biodiversity, but still little explored (Queiroz, 2009; Silva et al., 2020a). The Leguminosae family presents the largest number of species and the genus *Cenostigma* is an endemic genus in this region (BFG et al., 2015). Leguminous species have diverse uses, whether ornamental, as a raw material in the manufacture of paints, varnishes, dyes, but also as folk medicines and, especially in developing countries, they are important in food (Azani et al., 2017).

Some species are present exclusively in this biome such as *Cenostigma microphyllum* (Mart. ex G.Don) E.Gagnon & G.P.Lewis, popularly known as Catingueira-rasteira, Catingueirinho, and is present in a relatively restricted area, found only in southern Piauí, southern Pernambuco and northern Bahia States (Aecyo et al., 2021; Queiroz, 2009). *Cenostigma pyramidale* (Mart. ex G.Don) E.Gagnon & G.P.Lewis known as catingueira, catingueira-verdadeira, is considered one of the species most adapted to the dry climate densely found in this territory (Frosi et al., 2021).

Although they are mostly used for medicinal and food purposes, some aspects associated with reproductive losses are also linked to the consumption of *Cenostigma pyramidale* in its hay form even at low doses. It was concluded that the consumption of *C. pyramidale* would not be recommended in the diet of ewes during the first 60 days of pregnancy (Reis et al., 2020). Unlike what occurs in goats, the consumption of *C. pyramidale* has no toxic effect on testicular parameters, in fact this species is an alternative to feed this animal category during periods of scarcity, as it promoted improvement in the animals' body development (Santos et al., 2020).

Cenostigma pyramidale has a protective function in acclimatization to the different environmental conditions of the Caatinga. This characteristic was

evidenced when this species was investigated regarding its physical and chemical defenses against xeromorphic conditions and defense against herbivores. It was observed that the concentration of total phenolic compounds was higher in samples that showed herbivory, and in relation to the xeric environment, it was observed that the leaves presented an adaptive response observed through a decrease in the total structure and tissues (Ribeiro et al., 2021). In addition to its traditional use, *Cenostigma microphyllum* is a species that can be used in restoration of seasonally dry forests, as it is resistant to acute water deficiency, in addition to faster recovery of water status and gas exchange after rehydration (Pereira et al., 2021).

Another species also found in the caatinga biome is *Canavalia brasiliensis* (Leguminosae, Tribe Phaseoleae, Sub tribe Diocleinae), popularly known as black bean, wild bean or wild bean from Ceará, it is a predominant species in the American continent occurring in the biome of the caatinga (Perrazo de Souza Barbosa, n.d.; Queiroz, 2009). *C. brasiliensis* is a climbing species, which reaches 0.5 to 5 m, has a long-lasting flowering pattern with periods of greater flowering in the dry season. In general, this species is used as a biosensor, in the control of ants, in green manure and in medicine (Guedes, 2009). Several chemical compounds have been isolated in this genus, including terpenoids, flavonoids and alkaloids, but there are no reports on secondary metabolites of *C. Brasiliensis* (Hong et al., 2022; Jeon et al., 2005; Pattamadilok et al., 2008).

From the chemical point of view, *Cenostigma* is characterized by the presence of bioflavonoids (do Nascimento & David, 2023), and, in general species from Caatinga region presents in their composition a large amount of phenolics compounds (de Albergaria et al., 2021). Studies on the chemical composition of *C. pyramidale* leaves indicate the presence of usual natural products such as triterpene saponins, flavonoids, cinnamic derivatives, and the main compounds, less common in nature, the bioflavonoids (Bahia et al., 2005, 2010; J. C. S. de Oliveira et al., 2016; J. C. S. D. Oliveira et al., 2016). In this species, agathisflavone is the biflavonoid that is present in higher concentration in the leaves, but is not found in the stems (BAHIA, 2010). This compound, in addition to not causing toxic side effects (Andrade, 2019), has a neuroprotective

effect and stimulates neural recombination and is considered a promising compound in the development of new drugs (Souza, 2018, Islam 2019, de Amorim, 2020). To date, there are no reports regarding its synthesis of this compound but there is a report describing an extraction with Ca(OH)₂ in just one step showed that the applied methodology has advantages over the agathisflavone isolation because it requires less solvent employed, less time-consuming, and good yield when compared with the traditional methodology (do Nascimento & David, 2022).

Perhaps due to its presence in a restricted environment, there are few chemical studies on *Cenostigma microphyllum*. The investigation of the aqueous extract of *C. microphyllum* seeds by LC-DAD-MS allowed the determination of possible bioactive compounds against *T. vaginalis*, since the fractions enriched with tannins were those that showed anti-*Trichomonas* activity and no toxicity in the in vivo model from *Galleria mellonella*. In this work, twenty-six compounds were detected in the fractions of *C. microphyllum*, where the main compounds identified were hydrolysable tannins, O-digalloyl hexoside, O-digalloyl HHDP-hexoside, tri-O-galloyl HHDP-hexoside, O-galloyl HHDP-DHHDP-hexoside and its isomers, in addition to these, procyanidin dimer, epicatechin, ellagic acid and O-(digalloyl)quinic acid were also identified. However, some compounds were not possible to identify, so among the twenty-six, only twelve were identified (Silva et al., 2020b).

Plants exhibit complex responses to external and internal factors such as environmental conditions, and the study of the Metabolic profiling permit to monitor and analyze the responses in a molecular level. The identification of specific metabolites associated to the defense of dryness provides valuable insights about the resilient and adaptable form of the species in a specific place. For example, phenolic compounds, commonly found in plant, contribute to the color, taste, and aroma, are a large and diverse group of secondary metabolites that can play essential roles in the defense against herbivores, but also contribute to the protection against environmental stresses, as dryness (Melgarejo et al., 2022).

The metabolic fingerprints can add a lot of information about the identification and determination of plant varieties (Pilon et al., 2020), and can provide insights about the expectation of the type of metabolite is expected in different species from the same biome, for example. Based on this, we profiled the different extracts of three species from the Caatinga biome and compared the variability of one of them collected in different locations.

5.2. Material and methods

5.2.1. Plant material

The leaves of *Cenostigma pyramidale* were collected in the surroundings of Feira de Santana (12°15'55.1 "S 38°56'54.7 "W) and Valente (11°25'49.8 "S 39°29'53.1 "W), Bahia, Brazil. The voucher was deposited at Herbário Alexandre Leal da Costa of Instituto de Biologia of Universidade Federal da Bahia under number 240291. The authors obtained the authorization to access the plant through the Brazilian System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge – SISGEN (#A55D19D). The species *Cenostigma microphylla* was collected in the Campo Experimental Caatinga – Embrapa Semiárido – Petrolina-PE (9°05'12.6"S 40°19'30.1"W) and *Canavalia brasiliensis* was also collected in the university campus. The voucher was deposited at Herbário Alexandre Leal da Costa of Instituto de Biologia of Universidade Federal da Bahia.

5.2.2 Extraction

The leaves of all species were dried in an oven at 45 °C for 72 h and then grounded in a mixer. The extracts were obtained using MeOH as solvent by maceration for 48 h at room temperature of 25g of the dried and grounded leaves, in triplicate for each species. For analysis on UHPLC-QTOF-MS solutions of the extracted material were prepared with 1mg of extract in 1mL of methanol.

5.2.3. Instrumental conditions

The samples were analysed in an Agilent ultra-high-performance liquid chromatography equipment (mod. Xxx) coupled to a quadrupole-time-of-flight mass/mass spectrometer (UHPLC-QTOF-MS; Agilent Technologies, Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA, USA), equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The chromatographic separation was performed in reverse phase on an Agilent Poroshell 120 PFP column (100 mm × 2.1 i.d., 1.9 µm) and the injection volume was 6 µL for each sample (1 mg mL⁻¹). The mobile phase consisted of ultrapure water (A) and acetonitrile (B), both acidified with formic acid (0.1 % v/v). A gradient elution mode was employed starting from 6 % to 94 % B in 32 min. The electrospray conditions and the HRMS acquisitions were previously optimized. The MassHunter Qualitative Analysis software (version B.06.00, Agilent Technologies) was used for chromatogram processing.

5.2.4. Data processing

Raw data generated from the LC-MS analysis were further processed by the MassHunter Profinder 10.0 software (Agilent Technologies) using the “find-by-formula” algorithm. The metabolomics workflow included peak finding, retention time and mass alignment, and peak annotation using a mass tolerance of 5 ppm. For feature detection, a filter for data reduction was applied, which consisted of removing features not detected in at least 80 % of replications within the same sample group. The feature annotations were based on accurate mass obtained from the full-scan MS data with a 5-ppm tolerance for mass accuracy. The annotation process considered the isotope pattern, including monoisotopic mass, isotopic spacing, and isotopic ratio.

5.2.5. Statistical Analysis

Data normalization was performed using the Mass Profiler Professional 15.1 software (Agilent Technologies). Briefly, features were filtered (area threshold > 10,000 counts), Log₂-transformed, normalized at 75th percentile and baselined against the median of all samples. Then, unsupervised hierarchical

cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were carried out using the same software.

The resulting peak areas of phenolic metabolites highlighted in the samples were exported for multivariate data analysis by SIMCA version 16 software (Umetrics, Malmo, Sweden). Then, supervised orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) was performed. The performance of the model was evaluated by the following parameters: the goodness-of-fit (R^2Y) and the goodness-of-prediction (Q^2), establishing a Q^2 predictive ability > 0.5 as an acceptable threshold. The statistical model was comprehensively validated by permutation tests ($N=100$) to exclude model overfitting.

The variable importance in projection (VIP) approach was then used to select the most discriminant metabolites from the OPLS-DA model considering a VIP score threshold > 1 . Fold change (FC) analysis, expressed as $\text{Log}_2(\text{FC})$ values, was also carried out using the Mass Profiler Professional 15.1 software with a cut-off value of $\text{FC} > 1.0$ for each possible comparison.

5.3. Results (untargeted approach)

5.3.1 Metabolomic profiling

The comprehensive phenolic profiling of the different specimens of *C. pyramidale* were investigated using UHPLC-QTOF-MS untargeted metabolomic analysis. The same was applied to *C. microphyllum* and to *Canavalia brasiliensis*. This analysis revealed a total of 212 metabolites putatively annotated across samples, some of them common to all species included in this study. This approach confirmed the diverse phenolic profile of this species, that included a variety of anthocyanins, flavones, flavanols and flavonols but did not confirm the presence of the expressive number of bioflavonoids in the leaves of the *Cenostigma* species already related. A detailed list of all the compounds annotated is reported in the table (supplementary material, file excel dataset untargeted), together with their raw abundance and exact mass.

5.3.2 Multivariate data analysis following phytochemical profiling

Thereafter, multivariate statistics based on both unsupervised and supervised methods were carried out in order to group samples according to their similarity and differences regarding to their metabolomic composition. Firstly, Principal component analysis (PCA) was carried out to inspect (Fig. 1) the dispersion of each sample according to the sample classification and the corresponding score plot of the first PCs (i.e., PC1 vs PC2). The separation occurs along the first principal component and the higher distance was detected between Canavbras (*C. brasiliensis*) and the other samples, with Canavbras samples that are generally at positive values on PC1. This result was expected since Canavbras is a species from a different genus of the other two species of *Cenostigma*. Regarding PC2, another cluster can be observed, with *Cenomicro* (*C. microphyllum*) samples that are grouped together in the positive region, far away from the *Cenopyra*-based leaf samples (*C. pyramidale*). Despite *Cenomicro* and *Cenopyra* are from the same genus, *Cenostigma*, they present some differences. It's worth to mentioned that the different specimens of *C. pyramidale*, however they are from different locations, they are very similar indicating small edaphic influence in the metabolism of this plant.

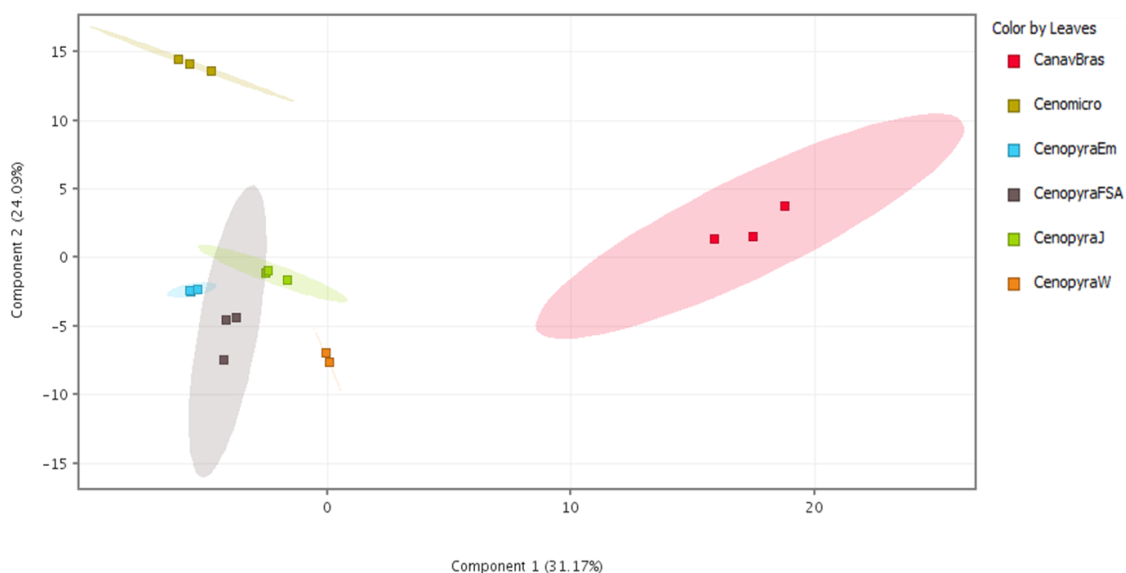


Figure 5.1 Principal component analysis of Leguminosae species

Furthermore, similar results can be observed from the unsupervised clustering analysis (HCA) based on the fold-change variations of each metabolite detected in all the samples. The same untargeted results of PCA were reproduced by HCA analysis (Fig. 5.3.2.2). Canavbras presents different metabolic profile respect to the other and this is the first main cluster option dividing (or separating) your samples. As can be observed, six main clusters were obtained, with Canavbras leaves that are grouped together respect to the other samples in the left part of the plot. It is important to mention that species of the same genera, as all Cenopyra has similar metabolite profile, they are plotted together, as expected. Another information extracted is that Cenomicro, also from Cenostigma genera, possesses a metabolite profile most similar to all Cenopyra species then Canavbras that is from another genera.

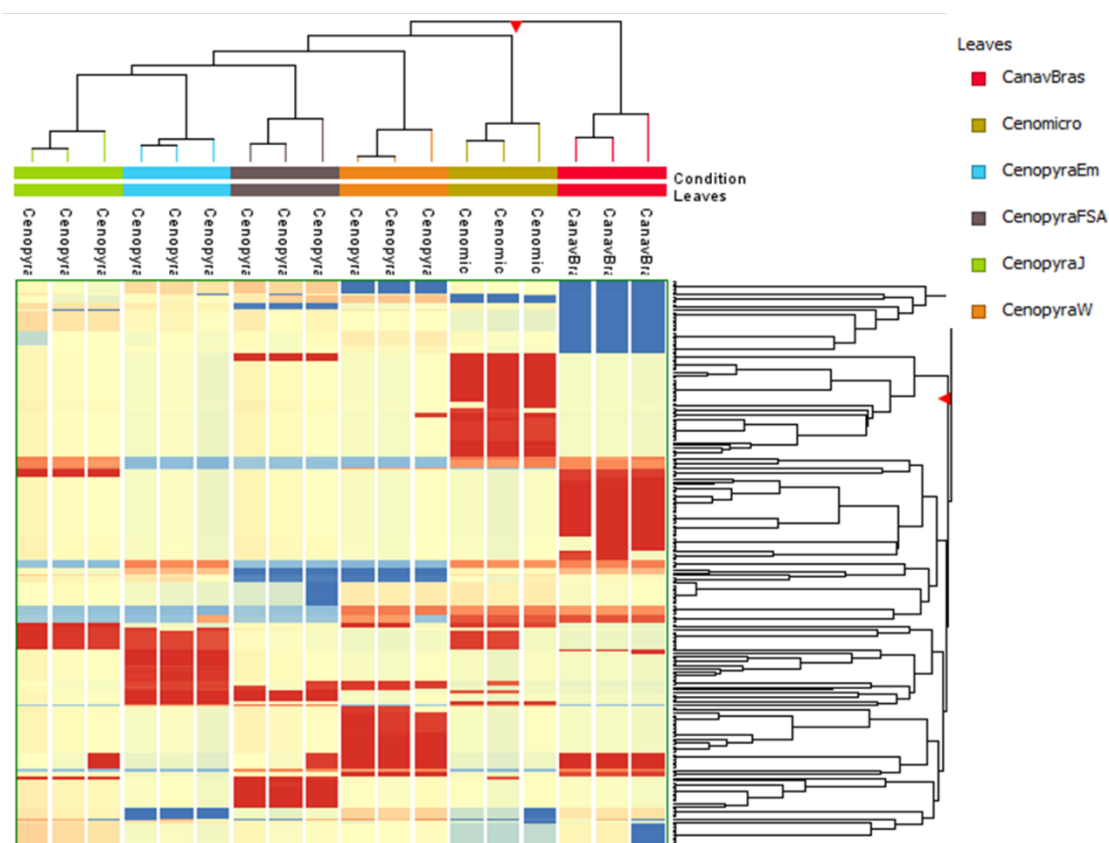


Figure 5.2 Unsupervised hierarchical cluster analysis (HCA) built according to the fold-change heatmap based on phenolics in the extracts from different specimens of *C. pyramidale*, *C. microphyllum* and *C. brasiliensis*.

Therefore, LC-MS analysis demonstrated to have a good ability in highlighting the chemical fingerprint provided by the leaf species, thus justifying the further application of a supervised statistical approach. Then, OPLS-DA models were built with the six different leaf species as factor for sample classification. Interestingly, unsupervised statistics showed excellent goodness of fitting ($R^2 = 0.977$) and prediction ability ($Q^2 = 0.936$). Then, the variable importance in projection (VIP) combined with Fold-change analysis were used to select the most significant metabolites and to find information about their abundance in each factor. A comprehensive list containing all the discriminant metabolite (having a VIP score >1) collected in chemical classes (according to the classification provided by the Phenol database) for each class of information is reported in the Table 5.1.

Table 5. 1 VIP marker compounds (organized in metabolic classes) following OPLS-DA discriminant modelling, together with Log Fold-Change values for comparison of the species with the most expressive log FC value.

Class	Subclass	VIP metabolites	VIP score	Log FC ([Canav Bras] vs [Cenomi cro])	Log FC ([Cenomicr o] vs [Cenopyra FSA])	Log FC ([Cenopyr aFSA] vs [Cenopyra W])
Flavonoids	Anthocyanins	Cyanidin	1,058 ± 0,267	15,047954	-0,9506178	-12,8576
		Pelargonidin 3-O-glucosyl-rutinoside	0,995 ± 0,485	15,439044	-0,9506175	0,736235
		Delphinidin 3-O-galactoside	0,991 ± 0,266	13,816888	-0,9506175	-15,0545
		Cyanidin 3-O-(6"-p-	0,974 ±	15,4857855	-0,9506175	0,736235

	coumaroyl- glucoside)	0,75 8			
Flavanones	Naringin 4'-O- glucoside	0,98 6 ± 0,29 3	- 0,08688 778	- 0,9506175	-14,8699
	7,3',4'- Trihydroxyflavo ne	1,09 1 ± 0,32 1	- 16,0775 01	-2,056827	0,696837
	Hispidulin	1,06 5 ± 0,26 7	- 18,6849 29	- 2,9629357	21,34659
	Tetramethylscu tellarein	1,02 3 ± 0,17 8	4,13895 6	16,123545	0,736234
	Cirsimaritin	1,00 4 ± 0,41 5	- 21,5613 33	4,114708	17,14536
	Pebrellin	0,99 8 ± 0,17 4	0,29930 78	17,735567	-8,3104
	Apigenin 7-O- apiosyl- glucoside	0,99 8 ± 0,51 7	16,8728 89	- 0,9506175	0,736235
	Apigenin 7-O- (6''-malonyl- apiosyl- glucoside)	0,97 6 ± 0,60 9	- 16,7970 6	15,759556	0,736235
	Gardenin B	0,97 5 ± 0,83 6	- 0,08688 778	- 0,9506175	0,736235
Flavanols	(+)-Catechin	1,07 ±	- 14,8133 45	13,77584	-10,0618

		0,29 8			
	Rhamnetin	1,18 9 ± 0,38 4	14,1250 48	- 0,9506175	0,736235
	Kaempferol	1,09 9 ± 0,37 6	- 1,73662 04	-4,388574	0,096214
	Isorhamnetin 3- O-rutinoside	1,01 3 ± 0,40 4	- 0,08688 778	- 16,374666	16,16028
	Kaempferol 3- O-rutinoside	1,00 6 ± 0,39 9	19,7114 03	- 0,9506175	0,736235
	3,7- Dimethylquercetin	1,00 3 ± 0,45 2	- 15,7465 55	14,70905	0,736235
	Kaempferol 3- O-xylosyl- rutinoside	1,00 3 ± 0,42 1	18,4010 85	- 0,9506175	0,736235
	Quercetin	1,00 1 ± 0,22	17,7461 28	- 5,7581444	-12,7936
	Kaempferol 3,7- O-diglucoside	0,98 ± 0,71	16,5480 48	- 0,9506175	0,736235
Isoflavonoids	7-Hydroxy-4'- methoxyisoflavone	1,16 3 ± 0,23 1	- 0,08688 761	- 17,184492	16,97011
	7,8,3',4'- Tetrahydroxyisoflavone	1,09 9 ± 0,37 6	- 1,73662 04	-4,388574	0,096214

		Glycitein	1,00 5 ± 0,42 4	- 20,9801 64	19,94266	0,736235
		2',7-Dihydroxy- 4',5'- dimethoxyisofla vone	1,00 4 ± 0,41 5	- 21,5613 33	4,114708	17,14536
		Dihydroglycitein	1,00 3 ± 0,44 6	- 18,3629 99	17,325495	0,736235
		Formononetin	0,99 ± 0,27 1	- 4,54622 6	- 1,1993068	-9,61417
		Violanone	0,98 7 ± 0,28 6	- 0,08688 778	- 0,9506175	-15,0414
Lignan s	Lignans	Tigloylgomicin H	1,13 5 ± 0,45 7	- 0,08688 761	-16,65109	16,43671
Lignan s	Lignans	Conidendrin	1,09 1 ± 0,18 1	- 15,7165 03	14,678997	-13,6646
Lignan s	Lignans	1- Acetoxypinoresi nol	1,02 7 ± 0,47 4	- 15,5420 01	14,504496	0,736235
Lignan s	Lignans	Schisanhenol	1,01 4 ± 0,37 5	- 0,08688 778	- 0,9506175	0,736235
Lignan s	Lignans	Enterolactone	1,01 ± 0,41 7	- 0,08688 778	- 0,9506175	0,736235

		2-Hydroxyenterolactone	0,98 9 ± 0,57 7	- 14,2962 04	13,258698	0,736235
Non-phenolic	Non-phenolic	Vanilloylglycine	1,07 8 ± 0,94 2	- 0,08688 761	- 19,791487	19,57711
Other phenolics	Tyrosols	Oleuropein-aglycone	1,06 7 ± 1	- 0,08688 761	- 15,015316	14,80093
	Phenolic terpenes	Carnosol	1,02 1 ± 0,42 3	- 4,53473 76	- 10,619989	14,85346
	Other polyphenols	Pyrogallol	1,00 3 ± 0,26 4	5,41053 87	-7,015702	0,764381
	Phenolic terpenes	Thymol	0,99 9 ± 0,50 3	16,4466 57	- 0,9506175	0,736235
	Alkylphenols	4-Vinylphenol	0,99 5 ± 0,37 3	4,94610 07	- 0,9506175	0,736235
	Curcuminoids	Curcumin	0,98 ± 0,33 5	- 0,08688 778	- 0,9506175	-14,1877
Phenolic acids	Hydroxyphenylpropanoic acids	Dihydroferulic acid 4-O-glucuronide	1,09 1 ± 0,18 1	- 15,7165 03	14,678997	-13,6646
	Hydroxybenzaldehydes	Vanillin	1,07 3 ± 0,68 6	- 0,08688 761	- 16,413446	16,19906

Hydroxyphenylpropanoic acids	Dihydrocaffeic acid 3-O-glucuronide	1,02 8 ± 0,16 3	3,93313 05	16,100805	0,736234
Hydroxycinnamic acids	Rosmarinic acid	1,02 3 ± 0,16 9	15,3711 19	- 0,9506175	0,736235
	3,4-Diferuloylquinic acid	1,01 8 ± 0,42 6	- 0,08688 778	- 0,9506175	0,736235
Hydroxyphenylpropanoic acids	Dihydroferulic acid	1,01 2 ± 0,46 3	- 0,08688 778	- 0,9506175	0,736235
Hydroxybenzoic acids	Ellagic acid glucoside	1,01 ± 0,19 2	- 14,1231 12	- 2,0147347	-0,56141
	Punicalin	1,00 3 ± 0,39 7	- 16,2413 54	15,20385	0,736235
Hydroxycinnamic acids	Avenanthramide 2c	1,00 3 ± 0,45 3	- 17,9470 08	16,909504	0,736235
Hydroxyphenylacetic acids	4-Hydroxymandelic acid	1,00 3 ± 0,24 2	1,03766 29	14,471459	0,736235
Hydroxycinnamic acids	p-Coumaroyl malic acid	1,00 1 ± 0,22	17,7461 28	- 5,7581444	-12,7936
	Avenanthramide 2p	1,00 1 ± 0,47 6	- 17,7335 43	16,69604	0,736235

Hydroxybenzoic acids	Galloyl glucose	0,987 ± 0,286	-	-	-15,0414
		0,08688		0,9506175	
		778			
		6			
Hydroxyphenylpropanoic acids	5-(3',5'-dihydroxyphenyl)-3-O-glucuronide	0,98 ± 0,335	-	-	-14,1877
		0,08688		0,9506175	
		778			
		5			
Hydroxyphenylpropanoic acids	Dihydroferulic acid 4-sulfate	0,974 ± 0,229	-	-9,850993	-4,97996
		0,08688			
		761			
		9			

The OPLS-DA score plot clearly showed the few distinct phytochemical signatures across the different specimens of *Cenostigma*. It was expected that these species, from the same genera, presents more similarities than differences. However, it is possible highlight some interesting different contribution of VIP metabolites in the comparison under investigation.

The selection of the discriminant variables in the orthogonal projection (VIP) was conducted, and a comprehensive summary of this selection is presented in Table 1. In general, the 57 VIP marker compounds that were identified can be regarded as the variables that make the most significant contributions to the observed class discrimination. The discriminant variables were combined with Log FC values obtained from fold change (FC) analysis. The FC analysis involved examining potential pairwise comparisons between *C. brasiliensis* and *C. microphyllum*, *C. microphyllum* and *C. pyramidale* and two specimens from different places of *C. pyramidale*, because the Log FC between each of them was more expressive to differentiate the species.

In general, upon closer examination of the marker compounds identified by VIP, the *Cenostigma pyramidale*, *Cenostigma microphyllum* and *Canavalia brasiliensis* were mostly represented by flavonoids, almost with the same contribution with VIP higher than 1.0 including 7-hydroxy-4'-methoxyisoflavanone (VIP score 1.163), kaempferol (VIP score 1.099), 7,8,3',4'-tetrahydroisoflavone

(VIP score 1.099), 7,3',4'-trihydroxyflavone (VIP score 1.091). They highlight the diversity of chemical structure present in this species, because they are isoflavonoids, flavonols and flavones. Rhamnetin (VIP score = 1.189) is the first most discriminant VIP compound, the 7-O-methyl quercetin derivative also identified with a VIP marker 1.001. In the comparison Canavbras vs Cenomicro, a positive value is observed, it means that this compound explains more Canavbras respect to Cenomicro because you have a positive Log FC value. Otherwise, a negative value in the comparison Cenomicro vs CenopyraFSA, means that is more abundant in the CenopyraFSA samples respect to the other.

In previous study dealing with the leaves of *Cenostigma macrophyllum* (Alves et al., 2013; Moreira et al., 2019), quercetin and quercetin derivatives, including quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside, quercetin-3-O-(6''-O-galoyl)- β -D-glucopyranoside (telimoside), quercetin-3-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside (helichrisoside) were also described. However in *Cenostigma pyramidale* there are reports about the isolation of apigenin and kaempferol, also identified in all *Cenostigma* spp, but with no expressive VIP value (Bahia et al., 2005, 2010), presents the same nucleus of quercetin. Despite the difference of abundance of quercetin that differentiate the species, they are structure that involves the same structural nucleus in some species of this genus.

Besides structural complex compounds, considered the chemotaxonomic markers of the genus *Cenostigma*, identified with expressive amount in *Cenostigma pyramidale* species, formed from the union of two units of flavonoids, called biflavonoids (do Nascimento & David, 2023; Kim et al., 2008), are derived from the main compounds identified in this study. Agathisflavone, the biflavonoid reported in the literature as the main compound of *C. pyramidale* (Bahia, 2010) is a biflavonoid derived from the union of two apigenin units, just like amentoflavone. Other bioflavonoids isolated in this species as sequioflavone, podocarpusflavone A, loniflavone, 3'-O-methyl-loniflavone and 5'-hydroxy-amentoflavone (Bahia et al., 2005, 2010) are also derived from two units linked of this type of chemical structure.

A serie of isoflavonoids were identified and classified as marker compounds according the VIP such as, 7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavanone (VIP score 1.163), 7,8,3',4'-tetrahydroxyisoflavone (VIP score 1.099), Glycitein (VIP score 1.005), 2',7-Dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (VIP score 1.004) and dihydroglycitein (VIP score 1.003). They are most likely to be found in *Cenostigma* than in *Canavalia*, and all of them are most likely present in *C. microphyllum* than in *C. pyramidale*. This result is importante because the unique study with *C. microphyllum* describes only the identification of hydrolysable tannins in the aqueous extract of this species (Silva et al., 2020c).

Regarding *Canavalia brasiliensis*, due to the metabolic composition similarities, perhaps in consequence of its presence in Caatinga biome (Snak, 2013, 2016), as the other two species here studied, it was expected that this species presented some chemotaxonomic similarities between them. Considering the VIP marker compounds with the most significant contributions to the observed class discrimination, it was found that anthocyanin, such as cyanidin (1.058 VIP marker), the flavonols rhamnetin (1.189 VIP marker), caempferol 3-O-rutinoside (1.006 VIP marker), Kaempferol 3-O-xylosyl-rutinoside (1.003 VIP marker), and quercetin (1.001 VIP marker), for this last one structure, to all comparisons possible, it was highlighted that it is more abundant in all cases for this species. This result showed that in the leaves of this species flavonols can be found. However, further studies are required to confirm the presence of more type of structural compounds, this is the first report of chemical composition of *C. brasiliensis* leaves.

Although there are descriptions of lignans in legumes, they are rare. Compounds as dehydrodiconiferyl alcohol, lariciresinol, isolariciresinol and pinoresinol isolated in the leaves of *Caesalpinia bonduc*, were also identified as phytochemicals from some genera in the Leguminosae Family (THI et al., 2022). There are no reports on the occurrence of schisandrol in this Family, this idetification is the first report.

5.4 Conclusions

The UHPLC-QTOF-MS metabolomic profile of different species from the Caatinga biome revealed some similarities between their phytochemical profiles. In addition, the metabolic profile of *Canavalia brasiliensis* and *Cenostigma microphyllum* furnished information about the chemical composition of these two species, specially to *C. brasiliensis*, it was the first report about chemical composition. However, more studies are required, this study highlighted the evaluation of different species considering the presence of them in the same biome can provide a worthful information about the chemical diversity.

Referências

- AECYO, P. et al. **Plastome evolution in the Caesalpinia group (Leguminosae) and its application in phylogenomics and populations genetics.** *Planta*, v. 254, n. 2, 1 ago. 2021.
- ALLENMARK, S.; GAWRONSKI, J. **Determination of Absolute Configuration—an Overview Related.** *Chirality*, v. 20, p. 606–608, 2008.
- ALVES, C. Q. et al. **Flavonoids and other bioactive phenolics isolated from *Cenostigma macrophyllum* (LEGUMINOSAE)** *Quim. Nova*, v. 35, p. 1137-1140, 2012.
- ALVES, C. Q. **Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de leguminosae: *Dioclea virgata* e *Cenostigma macrophyllum*.** p. 202, 2012. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/11596>>.
- ALVES, M. M. et al. **Germinação e vigor de sementes de *Clitoria fairchildiana* howard (fabaceae) em função da coloração do tegumento e temperaturas seed germination and vigor of *Clitoria fairchildiana* howard (fabaceae) depending of the coloration of seedcoat and temperatures** *Original Article Biosci. J.* [s.l.: s.n.].
- ANNEGOWDA, H. V. et al. **The free radical scavenging and antioxidant activities of pod and seed extract of *Clitoria fairchildiana* (Howard)- An underutilized legume.** *Journal of Food Science and Technology*, v. 50, n. 3, p. 535–541, 1 jun. 2013.
- ARORA, S. K. et al. **Crystal and Molecular Structure of the One to One Complex of Rotenone and Carbon Tetrachloride.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 97, n. 20, p. 5752–5755, 1975.
- ARTHAN, S. et al. **Structural modification of olibergin A, an isoflavonoid, from *Dalbergia stipulacea* Roxb. and its cytotoxicity.** *RSC Advances*, v. 12, n. 28, p. 17837–17845, 2022.
- ASSREUY, A. M. S. et al. **Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the**

Canavalia genus. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 380, n. 6, p. 509–521, dez. 2009.

BAHIA, M. V et al. **Biflavonoids and other Phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae).** *Quimica Nova*, v. 16, n. 6, p. 1402–1405, 2005.

BAHIA, M. V et al. **Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens.** *Química Nova*, v. 33, n. 6, p. 1297–1300, 2010.

BARBOSA, P. P. de S. **“Purificação, caracterização e atividade biológica de lectinas do extrato de sementes de *canavalia brasiliensis* (feijão-bravo-do-ceará)”** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da. 2013. 2013.

BARBOSA, T. A.; GOMES FILHO, R. R. **Biodiversidade e conservação da Caatinga: revisão sistemática.** *Journal of Environmental Analysis and Progress*, v. 7, n. 4, p. 177–189, 11 nov. 2022.

BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Utilização de RMN de 1H na determinação da configuração absoluta de álcoois.** *Quimica Nova*, v. 28, n. 6, p. 1061–1065, 2005.

BERTONCELI, M. A. A. et al. **A vicilin-like protein extracted from *Clitoria fairchildiana* cotyledons was toxic to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae).** *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 184, 1 jun. 2022a.

BERTONCELI, M. A. A. et al. **Rotenoids from *Clitoria fairchildiana* R. Howard (Fabaceae) seeds affect the cellular metabolism of larvae of *Aedes aegypti* L. (Culicidae).** *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 186, p. 1–7, 1 ago. 2022b.

BFG. **Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil.** *Rodriguesia*, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 1 out. 2015.

BFG. **Brazilian flora 2020: Innovation and collaboration to meet target 1 of the global strategy for plant conservation (GSPC)** *Rodriguesia* Instituto de

Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1 out. 2018.

BUENO, F. G. et al. **Enhanced cutaneous wound healing in vivo by standardized crude extract of *Poincianella pluviosa***. *PLoS ONE*, v. 11, n. 3, p. 1–14, 2016.

CARLSON, D. G.; WEISLEDER, D.; TALLENT, W. H. **NMR investigations of rotenoids Laboratory on rotenoidst from *Tephrosia vogelii*PP**. [s.l.] Pergimon Press, 1973. .

COELHO, P. M. de F. et al. ***Cenostigma macrophyllum* Tul. on the healing of skin wounds in rats with Diabetes mellitus 1 *Cenostigma macrophyllum Tul.* on the healing of skin wounds in rats with *Diabetes mellitus***. *Acta Cirúrgica Brasileira* v. 28, p. 594-600, 2013.

CROMBIE, L. **Rotenoids and their biosynthesis**. *Natural Product Reports*, v. 1, n. 1, p. 3–19, 1984.

CUNHA, S. et al. **Synthesis of 3-coumarin-carboxylic acids and their application in the total synthesis of Aiapin, Coumarin, and Umbeliferone**. *Quimica Nova*, v. 38, n. 8, p. 1125–1131, 1 set. 2015.

DA SILVA, A. M. B. et al. **Removal of rhodamine 6G from synthetic effluents using *Clitoria fairchildiana* pods as low-cost biosorbent**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 3, p. 2868–2880, 1 jan. 2020.

DA SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, P. ~ ***Pergamon 11-O-fl-D-glucopyranoside from *Clitoria fairchildiana****. *Phytochemistry*. [s.l: s.n.].

DE ALBERGARIA, E. T.; DE OLIVEIRA, A. F. M.; ALBUQUERQUE, U. P. **Effect of rainfall and soil fertility on total phenol and tannin contents in *Cenostigma microphyllum* (Mart. ex G. Don) E. Gagnon & G.P. Lewis (Fabaceae)**. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 43, n. 4, 1 abr. 2021.

DE AMORIM, V. C. M. et al. **Agathisflavone modulates astrocytic responses and increases the population of neurons in an in vitro model of traumatic brain injury**. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 393, n. 10,

p. 1921–1930, 2020.

DE FREITAS PIRES, A. et al. **Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*.** *Fundamental and Clinical Pharmacology*, v. 27, n. 2, p. 201–209, abr. 2013.

DE SOUSA ARAÚJO, T. A. et al. **Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species?** *Industrial Crops and Products*, v. 76, p. 550–556, 5 dez. 2015.

DIAMANTI, A. et al. **Mechanism, kinetics and selectivity of a Williamson ether synthesis: Elucidation under different reaction conditions.** *Reaction Chemistry and Engineering*, v. 6, n. 7, p. 1195–1211, 1 jul. 2021.

DINDA, B.; BANIK, R. **Gladiatin, new 5-deoxyflavonol from *Canavalia gladiata*.** v. 49, p. 1001-1002, 2014.

DO NASCIMENTO, B. O.; DAVID, J. M. **Chemical composition, biological activities and traditional uses of plants from the segregated genus *Caesalpinia sensu lato*.** *Phytochemistry Reviews*. v. 23, n. 1, p. 1-93, 2024.

DOS SANTOS SOUZA, C. et al. **Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity.** *NeuroToxicology*, v. 65, p. 85–97, 1 mar. 2018.

ESCHER, G. B. et al. ***Clitoria ternatea* L. petal bioactive compounds display antioxidant, antihemolytic and antihypertensive effects, inhibit α -amylase and α -glucosidase activities and reduce human LDL cholesterol and DNA induced oxidation.** *Food Research International*, v. 128, 1 fev. 2020.

FAHEINA-MARTINS, G. V. et al. **Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines.** *Toxicology in Vitro*, v. 26, n. 7, p. 1161–1169, out. 2012.

FANTZ, P. R. **Ethnobotany of *Clitoria* (Leguminosae).** *Journal Series of the*

North Carolina Agricultural Research Service, v. 45, n. 4, p. 511–520, 1991.

FROSI, G. et al. **Transcriptome of *Cenostigma pyramidale* roots, a woody legume, under different salt stress times.** *Physiologia Plantarum*, v. 173, n. 4, p. 1463–1480, 1 dez. 2021.

GAGNON, E. et al. **A new generic system for the pantropical *Caesalpinia* group (Leguminosae).** *PhytoKeys*, v. 71, n. 1, p. 1–160, 2016.

GOMES, M. S. da R. et al. **Flavonóides Isolados de *Clitoria fairchildiana* Howard (Leguminosae).** Mario. [s.l: s.n.], 2005.

GUEDES, R. S.; QUIRINO, S. G. M.; GONÇALVES, E. P. **Fenologia reprodutiva e biologia da polinização de *Canavalia brasiliensis* Mert. ex Benth (Fabacea).** *Revista Biotermas*, v. 22, n. 1, p. 27–37, 2009.

HONG, S. J. et al. **Anti-Inflammatory Activity of Cajanin, an Isoflavonoid Derivative Isolated from *Canavalia lineata* Pods.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 16, 1 ago. 2022.

HYUN, A. J. et al. **In vitro antioxidant activity of some selected *Prunus* species in Korea.** *Archives of Pharmacal Research*, v. 25, n. 6, p. 865–872, 2002.

ISLAM, M. T. et al. ***Agathisflavone: Botanical sources, therapeutic promises, and molecular docking study*** IUBMB Life Blackwell Publishing Ltd, , 1 set. 2019. .

JÄHNIGEN, S. **Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy of Chiral Molecular Crystals: Insights from Theory.** *Angewandte Chemie International Edition*, v. 202303595, p. 1–11, 2023.

JAIN, S. K. et al. **Pyrano-isochromanones as IL-6 inhibitors: Synthesis, in vitro and in vivo antiarthritic activity.** *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, n. 16, p. 7085–7097, 2014.

JEON, K. S. et al. **Antiangiogenic activity of 4-O-methylgallic acid from**

***Canavalia gladiata*, a dietary legume.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 330, n. 4, p. 1268–1274, 20 maio 2005.

KAEFER, C. et al. **Binding pattern and toxicological effects of lectins from genus *Canavalia* on bovine sperm.** *Reproductive Toxicology*, v. 38, p. 72–80, jul. 2013.

KHORPHUENG, P. et al. **Total synthesis of 6-deoxyclitoriacetal isolated from *Stemona collinsae* Craib.** *Tetrahedron Letters*, v. 47, n. 33, p. 5989–5991, 2006.

KREUCH, D. et al. **Estudo fitoquímico e biológico de canavalia rósea.** 2003. 2003.

LIN, L.-J. et al. **6-deoxyclitoriacetal from *Clitoria macrophylla*.** v. 31, n. 12, p. 4329-4331, 1992.

LIN, V. C. et al. ***In Vitro* and *in Vivo* melanogenesis inhibition by biochanin a from *Trifolium pratense*.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 75, n. 5, p. 914–918, 2011.

LOPES ANDRADE, A. W. et al. **Toxicological evaluation of the biflavonoid, agathisflavone in albino Swiss mice.** *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 110, n. November 2018, p. 68–73, 2019.

LPWG. **A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny.** *Taxon*, v. 66, n. 1, p. 44–77, 2017a.

LPWG. **A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny.** *Taxon*, v. 66, n. 1, p. 44–77, 1 fev. 2017b.

MACHADO, E. C. et al. **A New Rotenoid Glucoside, 6-Deoxyclitoriacetal 11-O-J3-D-GluCo-pyranoside, from the Roots of *Clitoria fairchildiana*.** *Planta medica*, v. 64, n. 03, p. 285-285, 1998.

- MATHIAS, L. et al. **Isolation and structural elucidation of a novel rotenoid from the seeds of *Clitoria fairchildiana***. *Natural Product Research*, v. 19, n. 4, p. 325–329, jun. 2005.
- MENDES, C. C. et al. **Constituents of *Caesalpinia pyramidalis***. *Fitoterapia*, v. 71, n. 2, p. 205–207, 2000.
- MIYOSHI, H. **Structure-activity relationships of some complex I inhibitors**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v. 1364, n. 2, p. 236-244, 1998.
- MORADI, H.; GHAVAM, M.; TAVILI, A. **Study of antioxidant activity and some herbal compounds of *Dracocephalum kotschy* Boiss. in different ages of growth**. *Biotechnology Reports*, v. 25, 1 mar. 2020.
- MOREIRA, B. O. et al. **Evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and biological activities of: *Cenostigma macrophyllum* standardized extracts and determination and quantification of the main metabolites**. *RSC Advances*, v. 9, n. 70, p. 41256–41268, 2019.
- MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. **Lectin from *Canavalia brasiliensis* Characterization and Behavior during Germination**. *Biologia Plantarum (Praha)*, v. 26, n. 2, p. 113–120, 1984.
- MORIYAMA, S.; OKIGAWA, M.; KAWANO, N. **Synthesis of hexa-O-methyl-cupressuflavone and -agathisflavone**. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, p. 2132–2135, 1974.
- NAEIMI, H.; MORADI, L. **Regioselective ortho-acylation of phenol and naphthol derivatives catalyzed by FeCl₃ under microwave conditions**. *Russian Journal of Organic Chemistry*, v. 43, n. 12, p. 1757–1759, dez. 2007.
- NGUYEN, X. M. A. et al. **Ethnobotanical study of medicinal plants used by K'Ho-Cil people for treatment of diarrhea in Lam Dong Province, Vietnam**. *Journal of Herbal Medicine*, v. 19, 1 fev. 2020.
- NOGUEIRA, L. H. D. **Germinação das sementes da espécie *Cenostigma***

microphyllum com potencial para a restauração ecológica da Caatinga. 2022.

NOVAK, A. J. E.; TRAUNER, D. **Reflections on Racemic Natural Products.** *Trends in Chemistry*, v. 2, n. 12, p. 1052–1065, 2020.

OGUIS, G. K. et al. **Insecticidal diversity of butterfly pea (*Clitoria ternatea*) accessions.** *Industrial Crops and Products*, v. 147, 1 maio 2020.

OLIVEIRA, J. C. S. de; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Chemical composition of root barks and flowers of *Poincianella pyramidalis* (FABACEAE) .** *Química Nova*, v. 39, p. 189-193, 2016a.

OLIVEIRA, J. C. S. de; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. **Biflavonoids from the bark roots of *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae).** *Phytochemistry Letters*, v. 16, p. 18–22, 1 jun. 2016b.

OLIVEIRA, W. et al. **Aridity mediates the effect of wood extraction on the reproductive output of an endemic disturbance-adapted woody species (*Cenostigma microphyllum*, Leguminosae) in the Caatinga dry forest.** *Austral Ecology*, v. 48, n. 2, p. 251–265, 1 abr. 2023.

ORTEGA, A. R.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; JOSEPH-NATHAN, P. **Piscicartone, a Rotenoid from *Piscidia carthagenensis*.** *Natural Product Communications*, v. 14, n. 5, p. 1–7, 2019.

PAN, C. et al. **Preparative Isolation and Purification of Calycosin and Formononetin from *Astragali Radix* using Hydrolytic Extraction Combined with High Speed Countercurrent Chromatography.** *Journal of Chromatographic Science*, v. 59, n. 5, p. 412–418, 2021.

PATTAMADILOK, D. et al. **Canarosine: A new guanidine alkaloid from *Canavalia rosea* with inhibitory activity on dopamine D1 receptors.** *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 10, n. 10, p. 915–918, out. 2008.

PATTARO-JÚNIOR, J. R. et al. **Antiviral activity of *Cenostigma pluviosum* var. *peltophoroides* extract and fractions against SARS-CoV-2.** *Journal of*

Biomolecular Structure and Dynamics, 2022.

PELTER, A. et al. **The isolation and characterization of two members of a new series of naturally occurring biflavones.** *Experientia*, v. 25, n. 4, p. 351–352, 1969.

PEREIRA DA SILVA, B.; PARENTE, J. P. **Antiinflammatory activity of rotenoids from *Clitoria fairchildiana*.** *Phytotherapy Research*, v. 16, n. SUPPL. 1, 2002.

PEREIRA, S. et al. **Arbuscular mycorrhizal inoculation increases drought tolerance and survival of *Cenostigma microphyllum* seedlings in a seasonally dry tropical forest.** *Forest Ecology and Management*, v. 492, 15 jul. 2021.

PITAKPAWASUTTHI, Y. et al. **Quality evaluation with reference to clitoriacetal and in vitro antioxidant activities of *Clitoria macrophylla* root.** *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, v. 10, n. 4, p. 169–177, 1 out. 2019.

POTDAR, M. K.; MOHILE, S. S.; SALUNKHE, M. M. 2001 **Coumarin syntheses via Pechmann condensation in Lewis acidic chloroaluminate ionic liquid.** *Tetrahedron Letters*, v. 42, n. 52, p. 9285-9287, 2001.

QUEIROZ et al. **Diversity and Evolution of Flowering Plants of the Caatinga Domain.** In: *Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America*. [s.l.: s.n.]p. 23–63.

QUEIROZ, L. P. de. **Leguminosas da caatinga.** 1ª ed. [s.l.] Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

REIS, S. D. S. et al. **Embryonic loss, abortion, and malformations in ewes caused by the ingestion of hay leaves of *Cenostigma pyramidale*.** *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 40, n. 10, p. 750–757, 1 out. 2020.

RIBEIRO, I. M. C. et al. **Physical and chemical defenses of *Cenostigma pyramidale* (Fabaceae): A pioneer species in successional caatinga areas.**

Revista Caatinga, v. 34, n. 2, p. 398–409, 10 maio 2021.

RIEGER, D. K. et al. **Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 122, p. 53–60, 2014.

ROENGSUMRAN, S. et al. **Crystal structure of 6-deoxyclitoriacetal, C₁₉H₁₈O₈.** *Zeitschrift für Kristallographie-New Crystal Structures*, v. 208, p. 105–106, 2003.

ROGERIO, K. R. et al. **Multicomponent reactions: A brief history and their versatility for the synthesis of biologically active molecules.** *Revista Virtual de Quimica*, v. 8, n. 6, p. 1934–1962, 1 nov. 2016.

SANTOS, M. V. B. et al. **Testicular and seminal evaluation of goats fed hay *Cenostigma pyramidale*.** *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 40, n. 12, p. 963–969, 1 dez. 2020.

SANTOS, R. A. F. **Estudo fitoquímico e avaliação biológica dos flavonoides isolados de *Clitoria fairchildiana*.** 2014.

SANTOS, R. A. F. et al. **Atividade antifúngica dos rotenoides das sementes e raiz de *Clitoria fairchildiana*.** *Revista Fitos*, v. 12, n. 1, 2018.

SANTOS, R. A. F.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Detection and Quantification of Rotenoids from *Clitoria fairchildiana* and its Lipids Profile.** *Natural Product Communications*, v. 11, n. 5, p. 631–632, 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29540>>.

SCALON, S. et al. **Desenvolvimento de mudas de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e sombreiro (*Clitoria fairchildiana*) sob condições de *sombreamento*.** *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, p. 166-169, 2006.

SHARMA, V. K. et al. **Rotenoids and Other Specialized Metabolites from the Roots of *Mirabilis multiflora*: Opioid and cannabinoid receptor radioligand binding affinities.** *Journal of Natural Products*, v. 84, n. 4, p. 1392–1396, 2021.

SILVA, J. L. de S. e. et al. **High richness of exotic trees in tropical urban green spaces: Reproductive systems, fruiting and associated risks to native species.** *Urban Forestry and Urban Greening*, v. 50, 1 abr. 2020a.

SILVA, L. N. et al. **Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation.** *Pharmaceutical Biology*, v. 53, n. 3, p. 464–468, 2015.

SILVA, L. N. et al. **Hydrolyzable tannins from Poincianella (Caesalpinia) microphylla fruits: Metabolite profiling and anti-*Trichomonas vaginalis* activity.** *Food Research International*, v. 134, 1 ago. 2020b.

SLADE, D.; FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J. **Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids** *Phytochemistry*. v. 66, n. 18, p. 2177-2215, 2005.

SNAK, C.; QUEIROZ, L. P. de. **Flora of Bahia: Leguminosae – Canavalia (Papilionoideae: Diocleae).** *SITIENTIBUS série Ciências Biológicas*, v. 16, 24 ago. 2016. Disponível em: <<http://periodicos.uefs.br/index.php/sitientibusBiologia/article/view/1136>>.

SNAK, C.; QUEIROZ, L. P. De. **O gênero canavalia no brasil (leguminosae, papilionoideae).** [s.l: s.n.].

TAGUCHI, H.; KANCHANAPEE, P.; AMATAYAKUL, T. **The constituents of *Clitoria macrophylla* Wall. Cat, a Thai Medicinal plant. The structure of a new rotenoid, Clitoriacetal.** *Chemical pharmacy Bull*, v. 25, n. 5, p. 1026–1030, 1977.

TAHARA, S. et al. **New rotenoids from the root bark of Jamaican Dogwood (*Piscidia erythrina* L.).** *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 45, n. 3–4, p. 154–160, 1990.

TAVARES DE OLIVEIRA, N. et al. **Antifungal activity of latex and Lupenone from *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae).** *Revista Virtual de Química*, v. 11, n. 5, p. 1579–1590, 2019.

TEIXEIRA, E. H. et al. **Renal effects of the lectin from canavalia brasiliensis seeds** *Protein and Peptide Letters*. v. 8, n. 6, p. 477-484, 2001.

VIANA, A. F. S. C. et al. **Gastroprotective activity of *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire leaves on experimental ulcer models.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, n. 1, p. 316–323, 28 out. 2013.

VIANA, A. F. S. C. et al. ***Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire Fraction Leaves Stimulate Gastric Healing in Rats and Human Cell Cultures.** *Journal of Medicinal Food*, v. 24, n. 3, p. 248–257, 1 mar. 2021.

YANG, L. et al. **Phenolic constituents with neuroprotective activities from *Hypericum wightianum*.** *Phytochemistry*, v. 165, n. June, p. 112049, 2019.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112049>>.

YENESEW, A. et al. **Anti-plasmodial activities and X-ray crystal structures of rotenoids from *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis*.** *Phytochemistry*, v. 64, n. 3, p. 773–779, 2003.

ZANIN, J. L. B. et al. **Caesalpinioflavone, a new cytotoxic biflavonoid isolated from *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, n. 4, p. 804–809, 2015.