



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE
FLORES E FOLHAS DE *Macrolobium acaciifolium*
E ALGUMAS AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS DOS SEUS
EXTRATOS**

David Ribeiro da Silva

Manaus – AM
Fevereiro, 2018

David Ribeiro da Silva

**ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE
FLORES E FOLHAS DE *Macrolobium acaciifolium*
E ALGUMAS AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS DOS SEUS
EXTRATOS**

Trabalho de dissertação apresentado à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Dra. Cecilia Veronica Nunez
Orientadora

Manaus – AM

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586e Silva, David Ribeiro da
Estudo fitoquímico dos extratos metanólicos de flores e folhas de *Maclobium acaciifolium* e algumas avaliações biológicas dos seus extratos / David Ribeiro da Silva. 2018
163 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Cecilia Veronica Nunez
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. luteolina-4'-O--L-ramnosídeo. 2. luteolina-3'-O--L-ramnosídeo.
3. flavonoide. 4. apigenina. I. Nunez, Cecilia Veronica II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

**“ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS
METANÓLICOS DE FLORES E FOLHAS DE
Macrolobium acaciifolium E ALGUMAS
AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS DOS SEUS EXTRATOS”**

David Ribeiro da Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 15 de fevereiro de 2018.

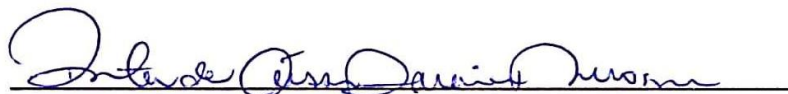
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Cecilia Veronica Nunez

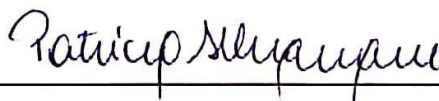
Universidade Federal do Amazonas

Orientador



Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Saraiva Nonomura

Membro UFAM



Prof.ª Dr.ª Patricia Melchionna Albuquerque

Membro Externo/UEA

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 15 de fevereiro de 2018.

À minha esposa Eduarda, companheira de todos os momentos, principalmente durante
esse período de mudanças grandiosas em nossas vidas;
Aos meus pais pelos socorros presentes;
Aos companheiros de laboratório pelo incentivo profissional;
À doutora Cecilia Veronica Nunez pela enorme aceitação do meu trabalho e confiança.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, meu confidente e Senhor, pois não conseguiria nada do que tenho sem sua presença. Agradeço por ter me amado antes de eu ter nascido, fato que não consigo compreender, mas confio porque que é verdadeiro. Por me perdoar quando falhei, por me consolar quando chorei, por me direcionar quando precisei. Obrigado Jesus, meu Deus, porque me ensinou a amar incondicionalmente.

À minha esposa Eduarda pelo companheirismo durante esses três anos de casamento e compartilhamento de alegrias e tristezas, inspirações e decepções, chegadas e despedidas, começos e términos de projetos. Obrigado por estar ao meu lado, segurando minha mão e seguindo comigo na construção de nossos objetivos, acreditando que sempre terei forças para terminá-los.

À minha família por ser meu apoio imediato, foi muito importante, pois me incentivaram a permanecer no caminho da pesquisa, mesmo até sem saber o que é a tal pesquisa, mas apenas por confiar que daria o meu melhor por ela.

À minha orientadora doutora Cecilia Veronica Nunez por me aceitar durante esses anos (e não são poucos), com resultados infelizmente mais baixos do que altos, mas tendo fé que os frutos iriam aparecer. Obrigado doutora Cecilia por tudo que me permitiu aprender da ciência, sendo meu espelho profissional e ético.

Aos meus companheiros de laboratório, agradeço a todos por me proporcionarem momentos muito bons, desde os aniversários, até às tardes de preparo de extratos. Obrigado aos meus companheiros do Lab2 e do Lab1, Alan, Aline, Ana Luisa, Andrei, Fabiele, Jeniffer, Juliana, Leomara, Luana, Maria Carolina, Sabrina, Sthefania, Vanessa Neves, Vanessa, Vítor, Weison, Sir Yuri.

Obrigado aos meus amigos do Programa de Química da UFAM. Foi muito bom ter conhecido vocês durante o curso. Espero que nos vejamos durante as próximas etapas de nossas carreiras.

Agradeço imensamente ao Magno, Sabrina e Zelina por darem todo o apoio da Central Analítica do INPA.

Sou muito grato ao INPA pelo espaço cedido para realização do projeto e à FAPEAM pela bolsa de estudo, assim como CNPq e Capes pelo custeio do projeto.

Muito obrigado

RESUMO

Muitas espécies de plantas e árvores ainda não foram estudadas e necessitam de dados químicos e biológicos para verificação de seus constituintes e atividades, buscando a descoberta de moléculas novas e meios de utilizá-las em benefícios da saúde. A Amazônia contém muitas espécies não estudadas e *Macrolobium acaciifolium* é uma delas, a qual é uma árvore da sub-família Caesalpinioideae (Fabaceae) e está presente não apenas na Amazônia, mas em outros estados do Brasil, além de países da América Central e do Sul. O objetivo deste trabalho foi estudar quimicamente os metabólitos secundários dos extratos de *M. acaciifolium* e testar o potencial antioxidante, tóxico e antibacteriano destes extratos. Os extratos hexânicos e metanólicos foram obtidos por maceração a frio com o auxílio do ultrassom e seus potenciais antioxidantes foram avaliados frente o radical DPPH e o complexo Fe^{3+} /Fenantrolina, assim como testes tóxicos contra *Artemia salina* e algumas cepas de bactérias. O estudo fitoquímico do extrato metanólico das flores permitiu o isolamento do flavonoide kaempferol-3-rutinosídeo e do extrato metanólico das folhas a apigenina, luteolina-3'-*O*- α -L-ramnosídeo e luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo. Os ensaios realizados indicaram que o extrato metanólico das folhas possui elevado potencial antioxidante e os extratos hexânico das folhas e metanólico dos galhos possui elevados potenciais bacteriostáticos, mas todos se mostraram não tóxicos contra *Artemia salina*. Luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo não possui relato na literatura consultada e a sua presença, junto com os outros flavonoides isolados, sugere o potencial antioxidante do extrato metanólico das folhas.

Palavras-chave: antioxidante, antibacteriano, flavonoides, luteolina-3'-*O*- α -L-ramnosídeo, luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo.

ABSTRACT

Many species of plants and trees have not yet been studied and require and chemical biological data for verification of its constituents and activities, seeking the discovery of new molecules and ways of using them in health benefits. The Amazon contains many species not studied and *Macrolobium acaciifolium* is one of them, which is a tree of the Caesalpinioidea (Fabaceae) subfamily and is present not only in the Amazon, but in other states of Brazil, as well as Central and South American countries. The objective of this work was to study chemically the secondary metabolites of *M.acaciifolium* and to test the antioxidant, toxic and antibacterial potential of this extracts. Hexanic and methanolic extracts were obtained by cold maceration with the aid of ultrasound and its potential antioxidants were evaluated by the DPPH radical and the Fe³⁺/Phenantroline complex, as well as toxic tests against *Artemia salina* and some strains of bacteria. The phytochemical study of the methanolic extract of the flowers allowed the isolation of the flavonoid kaempferol-3-*O*-rutinoside and of the methanolic extract of the leaves to apigenin, luteolin-3'-*O*- α -L-rhamnoside and luteolin-4'-*O*- α -L-rhamnoside. The assays performed indicated that the leaves' methanolic extract has a high antioxidant potential and the leaf hexanic and methanolic extracts of the branches have high bacteriostatic potentials, but all were nontoxic against *Artemia salina*. Luteolin-4'-*O*- α -L-rhamnoside is not reported in the literature consulted and its presence, together with the flavonoids isolated, suggest the antioxidant potential of the leaf methanolic extract.

Key-words: antioxidant, anti-bacterial, flavonoids, luteolin-3'-*O*- α -L-rhamnoside, luteolin-4'-*O*- α -L-rhamnoside.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Radical DPPH sendo resuzido pelo Antioxidante (AH).....	16
Figura 2. Fe ³⁺ complexado com 3 moléculas de 1,10-fenantrolina.....	16
Figura 3. Classes químicas encontradas em espécies de Fabaceae.	19
Figura 4. Fluxograma da preparação dos extratos de <i>M. acaciifolium</i>	49
Figura 5. Fluxograma do fracionamento e isolamento de (A) Mac1, (B) Mac2, Mac3 e Mac4.	65
Figura 6. Espectro de RMN de ¹ H de Mac1 em DMSO-d ₆ (300 MHz).....	85
Figura 7. Expansão das regiões dos hidrogênios aromáticos. (A) Hidrogênios H-2' e H-6'. (B) Hidrogênios H-3' e H-5'. (C) Hidrogênios H-8 e H-6 respectivamente.....	86
Figura 8. Expansão das regiões dos hidrogênios. Hidrogênio da hidroxila em 5C (A). Hidrogênio H-1'' da glicose (B). Hidrogênio H-1''' (C) H-6''' da ramnose (D).....	87
Figura 9. Espectro de RMN de ¹³ C de Mac1 em DMSO-d ₆ (75 MHz).....	88
Figura 10. Correlações encontradas no mapa de contorno HMBC para o flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo.	90
Figura 11. Correlações encontradas no espectro de COSY para o flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo.....	91
Figura 12. Cromatograma no HPLC do flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo.	91
Figura 13. Íon <i>quasi</i> -molecular do flavonoide (A) e perda da rutinose (B).	92
Figura 14. Proposta de fragmentação com perda de rutinose.....	93
Figura 15. Estrutura com deslocamentos químicos do flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo.	94
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H sem supressão do sinal de água do flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo em DMSO-d ₆ (300 MHz).	95
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H do flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo em DMSO-d ₆ (300 MHz).	97
Figura 19. Espectro de RMN de ¹³ C do flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo em DMSO-d ₆ (75 MHz).	98
Figura 20. Espectro de RMN de ¹³ C do flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo em DMSO-d ₆ (75 MHz).	99
Figura 21. Espectro de HSQC do flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).	100
Figura 22. Espectro de HSQC da região dos carbonos dos açúcares do kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo (300 e 75 MHz).	100
Figura 23. Espectro do mapa de contorno HMBC do flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo (300 e 75 MHz).	101
Figura 24. Expansão do HMBC na região dos aromáticos (300 e 75 MHz).....	101
Figura 25. Expansões do HMBC para correlações do H-1'' (A), H-1''' (B), outros hidrogênios dos açúcares (C) e H-6''' (D).	102

Figura 26. Espectro de COSY do flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo em DMSO-d ₆ (300 MHz).	102
Figura 27. Espectro de RMN de ¹ H de Mac1 em DMSO-d ₆ (300 MHz).	103
Figura 28. Duplete dos hidrogênios H-2' e H-6' (A). Duplete dos hidrogênios H-3' e H-5' (B). Dupletos dos hidrogênios H-8 e H-6 respectivamente (C).	104
Figura 29. Singletos dos hidrogênios H-3 e da hidroxila em 5C do flavonoide.	104
Figura 30. Correlações encontradas no mapa de contorno HMBC (A) e COSY (B) para o flavonoide Apigenina.	105
Figura 31. Retenção no HPLC do flavonoide Apigenina.	106
Figura 32. Íon <i>quasi</i> -molecular do flavonoide Apigenina.	106
Figura 33. Estrutura com os deslocamentos químicos do flavonoide Apigenina.	108
Figura 34. Espectro de RMN de ¹ H sem supressão do sinal da água do flavonoide Apigenina em DMSO-d ₆ (300 MHz).	109
Figura 35. Espectro de RMN de ¹ H do flavonoide Apigenina em DMSO-d ₆ (300 MHz).	110
Figura 36. Espectro de HSQC do flavonoide Apigenina em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).	111
Figura 37. Espectro do mapa de contorno HMBC do flavonoide Apigenina em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).	111
Figura 38. Expansão do HMBC para todas as correlações do flavonoide Apigenina em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).	112
Figura 39. Espectro de COSY do flavonoide Apigenina em DMSO-d ₆ (300 MHz)...	112
Figura 40. Espectro de ¹ H de Mac3 em DMSO-d ₆ (300 MHz).	113
Figura 41. Duplete dos hidrogênios H-2' e H-6' (A). Duplete do hidrogênio H-5' (B). Dupletos dos hidrogênios H-8 e H-6 respectivamente (C).	114
Figura 42. Sinais dos hidrogênios H-3 (A), H-1'' (B), H-2'' (C) e H-6'' (D).	115
Figura 43. Correlações encontradas no mapa de contorno HMBC para o flavonoide luteolina-3'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo.	116
Figura 44. Correlações encontradas no COSY para o flavonoide luteolina-3'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo.	117
Figura 45. Retensão no HPLC do flavonoide luteolina-3'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo.	117
Figura 46. Íon <i>quasi</i> -molecular do flavonoide (A) e perda da ramnose (B).	118
Figura 47. Proposta de fragmentação com perda de ramnose.	119
Figura 48. Estrutura com deslocamentos químicos do flavonoide luteolina-3'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo.	120
Figura 49. Espectro de RMN de ¹ H sem supressão do sinal da água do flavonoide luteolina-3'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 MHz).	121
Figura 51. Espectro de RMN de ¹ H do flavonoide luteolina-3'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 MHz).	123
Figura 52. Espectro de RMN de ¹ H da região dos aromáticos e hidrogênio do carbono anomérico da ramnose do flavonoide luteolina-3'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 MHz).	124

Figura 53. Mapa de contorno de HSQC do flavonoide luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 e 75MHz).	125
Figura 54. Mapa de contorno de HSQC da região dos aromáticos e hidrogênio do carbono anomérico em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).....	125
Figura 55. Mapa de contorno de HSQC da região dos açúcares do flavonoide luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).....	126
Figura 56. Mapa de contorno de HMBC do flavonoide luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).	126
Figura 57. Expansão do mapa de contorno de HMBC da região dos aromáticos e hidrogênio do carbono anomérico em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).	127
Figura 58. Expansão do mapa de contorno de HMBC da região do hidrogênio H-6'' da ramnose em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).....	127
Figura 59. Mapa de correlação de COSY do flavonoide luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).	128
Figura 60. Expansões do mapa de correlação de COSY na região do aromático (A e B) e açúcares (C e D) em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).	128
Figura 61. Espectro de RMN de ¹ H de Mac4 em DMSO-d ₆ (300 MHz).....	129
Figura 62. Hidrogênios H-2' e H-6' (A), H-5' (B), H-8 e H-6 respectivamente (C)..	130
Figura 63. Hidrogênios H-3' (A), hidrogênio da hidroxila em 5C (B), H-1'' (C) e H-2'' (D).....	131
Figura 64. Correlações encontradas no mapa de contorno de HMBC para o flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo.	132
Figura 65. Correlações encontradas no COSY para o flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo.	133
Figura 66. Retenção no UPLC do flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo.	133
Figura 67. Íon <i>quasi</i> -molecular do flavonoide (A) e perda da ramnose (B).	134
Figura 68. Proposta de fragmentação com perda da ramnose (B).....	135
Figura 69. Estrutura com deslocamentos químicos do flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo.	136
Figura 70. Espectro de RMN de ¹ H sem supressão do sinal da água do flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 MHz).	137
Figura 72. Espectro de RMN de ¹ H do flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 MHz).	139
Figura 73. Expansão do espectro de RMN de ¹ H na região do aromático e hidrogênio do carbono anomérico do flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 MHz).....	140
Figura 74. Mapa de correlação de HSQC do flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).....	141
Figura 75. Mapa de correlação de HSQC na região do aromático e hidrogênio do carbono anomérico do flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).....	141
Figura 76. Expansão do HSQC na região dos açúcares do flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).....	142

Figura 77. Mapa de correlação de HMBC do flavonoide luteolina-4'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).....	142
Figura 78. Expansão do mapa de correlação de HMBC na região dos aromáticos e hidrogênio do carbono anomérico do flavonoide luteolina-4'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).	143
Figura 79. Expansão do mapa de correlação de HMBC na região dos açúcares do flavonoide luteolina-4'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 e 75 MHz).	143
Figura 80. Mapa de correlação de COSY do flavonoide luteolina-4'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 MHz).	144
Figura 81. Expansões do mapa de correlação de e COSY na região dos aromáticos (A e B) e dos acoplamentos dos hidrogênios da ramnose (C e D) do flavonoide luteolina-4'- <i>O</i> - α -L-ramnosídeo em DMSO-d ₆ (300 MHz).	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Flavonoides em algumas espécies de Fabaceae.....	21
Tabela 2. Escala para interpretação da atividade antioxidante	51
Tabela 3. Lista de micro-organismos testados contra o potencial inibitório dos extratos de <i>M. acaciifolium</i>	53
Tabela 4. Absorbâncias dos extratos na concentração de 1000 µg/mL frente ao crescimento bacteriano.	54
Tabela 5. Absorbâncias dos extratos em várias concentrações.	55
Tabela 6. Sistemas da coluna de sílica da fração Mf2.10-13.	59
Tabela 7. Sistemas da coluna de sílica da fração Mf2.10-13.7-13.2.	60
Tabela 8. Sistemas da coluna de sílica da fase DCM do extrato metanólico das folhas.	61
Tabela 9. Sistemas da coluna de sílica da fração Mfo1.10.	61
Tabela 10. Sistemas da coluna de sílica da fração Mfo1.10.1-4.	62
Tabela 11. Sistemas da coluna de sílica da fração Mfo1.11.	62
Tabela 12. Sistemas da SPE em sílica C ₁₈ da fração Mfo1.11.2-4.	63
Tabela 13. Sistemas da coluna em Sephadex LH-20 da fase AcOEt.	63
Tabela 14. Sistemas da coluna em Sephadex LH-20 da fração Mfo2.3.	64
Tabela 15. Porcentagem de indivíduos mortos frente às diferentes concentrações dos extratos de folhas, flores e galhos de <i>M. acaciifolium</i>	67
Tabela 16. Resultado da atividade antioxidante dos extratos de folhas, flores e galhos de <i>M. acaciifolium</i> frente ao DPPH.....	68
Tabela 17. Resultado de equivalência antioxidante dos extratos frente ao complexo Fe ³⁺ /fenantrolina.	69
Tabela 18. Porcentagem de crescimento microbiano nos extratos na concentração de 1000 µg/mL.	71
Tabela 19. Porcentagem de crescimento microbiano nos extratos em várias concentrações.....	72
Tabela 20. Massas dos extratos vegetais de <i>M. acaciifolium</i>	73
Tabela 21. Massa e rendimento das fases do extrato metanólico das flores.....	75
Tabela 22. Massa e rendimento das fases do extrato metanólico das flores.....	78
Tabela 23. Deslocamentos químicos e correlações de kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo. ...	90
Tabela 24. Gradiente de concentração do sistema no HPLC.....	91
Tabela 25. Deslocamentos químicos e correlações do flavonoide Apigenina.....	105
Tabela 26. Gradiente de concentração do sistema no HPLC.....	106
Tabela 27. Deslocamentos químicos e correlações da luteolina-3'- <i>O</i> -ramnosídeo.....	116
Tabela 28. Gradiente de concentração do sistema no HPLC.....	117
Tabela 29. Deslocamentos químicos e correlações de Luteolina-4'- <i>O</i> -α-L-ramnosídeo.	132
Tabela 30. Gradiente de concentração do sistema no HPLC.....	133

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1. Extratos hexânicos das folhas (Fo), flores (Fl) e galhos (Ga) eluídos com hexano/acetato de etila 8:2 (v/v).....	58
Imagem 2. Extratos metanólicos das folhas (Fo), flores (Fl) e galhos (Ga) eluídos com AcOEt/MeOH/CH ₃ COOH/H ₂ O 9:1:1:2 (v/v/v/v).....	74
Imagem 3. Fases DCM (1) e AcOEt (2). Eluente DCM/AcOEt 8:2.	76
Imagem 4. Frações da fase AcOEt. Eluente DCM/MeOH 8:2.....	76
Imagem 5. Frações da Mf2.10-13. Eluente DCM/MeOH 8:2.	77
Imagem 6. Frações da Mf2.10-13.7-13. Eluente DCM/MeOH 8:2.....	77
Imagem 7. Frações da Mf2.10-13.7-13.2. Eluente DCM/MeOH 8:2.....	77
Imagem 8. Mac 1. Eluente DCM/MeOH 8:2 (esquerda nas comparações) e AcOEt/MeOH/CH ₃ COOH/H ₂ O 9:1:1:2 (direita nas comparações).	78
Imagem 9. Fase DCM do extrato metanólico das folhas. Eluente DCM/AcOEt 9:1.	79
Imagem 10. Frações com da Mfo1 com flavonoides. Eluentes CHCl ₃ /acetona 8:2 (A e B) e AcOEt/MeOH 95:05 (C e D).	79
Imagem 11. Frações da Mfo1.10. Eluente CHCl ₃ /acetona 9:1 (4x).	80
Imagem 12. Frações da Mfo1.10.1-4. Eluente CHCl ₃ /acetona 9:1 (4x).....	80
Imagem 13. Frações da Mfo1.11. Eluente AcOEt/MeOH 95:05.	81
Imagem 14. Frações da Mfo1.11.2-4. Eluente AcOEt/MeOH 95:05.	81
Imagem 15. Frações da Mfo1.11.2-4.1. Eluente CHCl ₃ /MeOH 8:2.....	82
Imagem 16. Fase AcOEt do extrato metanólico das folhas. Eluente AcOEt/MeOH 9:1.	82
Imagem 17. Frações da Fase AcOEt. Eluente CHCl ₃ /MeOH 7:3.	83
Imagem 18. Frações da Mfo2.3. Eluente CHCl ₃ /MeOH 7:3.....	83
Imagem 19. Frações da Mfo2.3.4. Eluente CHCl ₃ /MeOH 7:3.....	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Substâncias Antioxidantes	15
2.2 <i>Artemia salina</i>	17
2.3 Atividade antibacteriana	17
2.4 Fabaceae	18
2.5 Flavonoides em Fabaceae	21
2.6 <i>Macrobium acaciifolium</i>	47
3 JUSTIFICATIVA	48
4 OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo Geral	48
4.2 Objetivos Específicos	48
5 MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1 Coleta das Partes Vegetais	48
5.2 Preparo dos Extratos	49
5.3 Ensaio de Toxicidade Frente ao Microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	49
5.4 Atividade Antioxidante	50
5.4.1 Ensaio com o radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	50
5.4.2 Ensaio com o Fe ³⁺ em complexo com a fenantrolina	51
5.5 Atividade antibacteriana pelo método de microdiuição	52
5.6 Análise Cromatográfica dos Extratos	55
5.7 Fracionamento dos Extratos	55
5.7.1. Escolha dos extratos para o fracionamento	55
5.7.2 Extratos Metanólicos	56
5.8 Purificação e Isolamento dos Metabólitos Secundários	56
5.8.1 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)	57
5.8.2 Extração e análise cromatográfica dos extratos	57
5.8.3 Identificação das substâncias isoladas	64
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
6.1 Ensaio de Toxicidade Frente ao Microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	67
6.2 Atividade Antioxidante	68

6.2.1 Ensaio com o radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	68
6.2.2 Ensaio com o Fe ³⁺ em complexo com a fenantrolina.....	69
6.3 Atividade Antimicrobiana pelo método de microdiuição	70
6.4 Extração e análise cromatográfica dos extratos.....	73
6.5 Fracionamento do extrato metanólico das flores e isolamento de Mac1	75
6.6 Fracionamento do extrato metanólico das folhas e isolamento de Mac2, Mac3 e Mac 4	78
6.7 Identificação estrutural da fração Mac1.....	85
6.8 Identificação estrutural da fração Mac2.....	103
6.9 Identificação estrutural da fração Mac3.....	113
6.10 Identificação estrutural da fração Mac4	129
7 CONCLUSÃO.....	145
8 REFERÊNCIAS	146

1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários possuem várias funções nas plantas que vão desde a defesa contra herbivoria até atração de insetos para disseminação da espécie (MACIEL *et al.*, 2002; LORENZI & MATOS, 2002).

Procurar por esses metabólitos com potenciais biológicos continua a ser a finalidade da química de produtos naturais. A relevância da pesquisa se torna ainda maior ainda quando a espécie vegetal não tem relatos de estudos químicos na literatura, podendo levar ao isolamento de substâncias inéditas que possam ter um potencial biológico mais efetivo do que as conhecidas (VERPOORTE *et al.*, 2000; DEWICK, 2002).

Os extratos vegetais possuem bastante potencial antioxidante quando comparado a um agente redutor de referência. Esses resultados são promissores para a geração de produtos que reduzam os estresses oxidativos que afetam o nosso corpo, podendo ser usados externamente como os cosméticos e internamente com os fármacos.

Por meio de ensaios biológicos, os estudos com produtos naturais têm procurado avaliar o potencial de extratos contra os microrganismos patógenos mais comuns aos quais as pessoas são suscetíveis. Os resultados são altamente satisfatórios para muitos extratos das mais variadas espécies.

Dentre os metabólitos com maiores potenciais biológicos, estão os alcaloides e flavonoides. Os alcaloides são destaques por possuírem alta toxicidade e os flavonoides são destacados por seus potenciais anti-inflamatório e antioxidante (CHARLES, 2013).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Substâncias Antioxidantes

O corpo humano naturalmente produz radicais livres oxidantes altamente reativos, que degradam e interferem nas funções naturais dos sistemas fisiológicos. São átomos ou moléculas com elétrons desemparelhados, podendo ter carga positiva, negativa ou neutra. Essas espécies livres são resultantes do próprio metabolismo, mas também de processos externos, como exposição ao ar. Para reduzi-los ou inibi-los, as pessoas podem ser tratadas de forma natural, com ingestão de alimentos que possuam os chamados antioxidantes. Antioxidantes são as substâncias que inibem os radicais livres atuando geralmente com a doação de um hidrogênio na reação final, fazendo com que ela mesma se torne um radical livre, porém estável (ZAMPELA & MICHA, 2015).

Os antioxidantes são substâncias das mais diversas classes químicas, logo podem ter estruturas com sítios reacionais parecidos ou não. Da mesma forma, seus mecanismos de estabilização da própria estrutura de forma radicalar terão suas particularidades. Os antioxidantes são os que mesmo quando em menor concentração que o reagente oxidante, podem inibir uma mesma quantidade de teor oxidado quando comparado a outro antioxidante (CHARLES, 2013).

Diversas moléculas antioxidantes contêm em geral, a característica presença de anéis aromáticos com presença de hidroxila ou duplas ligações conjugadas. Muitos ensaios para quantificar a concentração de substância com potencial antioxidante têm sido realizados e usados como parâmetro para início de estudo e fracionamento de extratos vegetais (KANESHIMA, *et al.*, 2016; SEONG *et al.*, 2016; GANGOPADHYAY *et al.*, 2016).

Experimentos muito utilizados nas quantificações antioxidantes fazem uso do íon cátion ABTS, o qual tem uma absorção espectrofotométrica na região de 414 nm e após inibição pelos antioxidantes pela doação de hidrogênio em solução aquosa, pode ser detectada pela leitura da absorbância no comprimento de onda próxima da região do infravermelho, em 734 nm. O resultado antioxidante pode ser comparado com a equivalência do antioxidante sintético, trolox. O método de potencial antioxidante de redução férrica (FRAP – Ferric reducing antioxidante power) também é muito utilizada, sendo baseada na redução da ferroína $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$ (Fe^{3+} /tripiridiltriazina) para a $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$, de coloração azul intensa. O resultado expressa o potencial antioxidante em meio ácido, sendo obtido pelo aumento no comprimento de onda para 593 nm e avaliado pela

equivalência micromolar de Fe^{2+} em relação ao antioxidante padrão (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Um desses métodos é o sequestro do radical DPPH (Figura 1), onde ele é solubilizado em solvente orgânico e medido o comprimento de onda a 517 nm, porém quando ele é reduzido (capturando um hidrogênio), sua absorvância diminui e sua coloração muda (da cor roxa para o amarelo pálido), informando a concentração de agentes antioxidante presente no substrato em relação ao ácido ascórbico (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

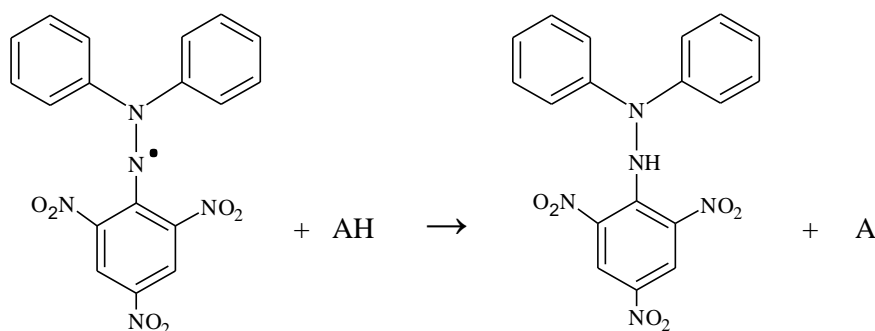


Figura 1. Radical DPPH sendo reduzido pelo Antioxidante (AH).

Outro ensaio utilizado constantemente é o método de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} , no qual as substâncias antioxidantes fazem com que o ferro em complexo com algum grupo ligante, mude a coloração no momento em que é reduzido. Muitos métodos com vários ligantes são aplicados de acordo com a literatura, porém nesse trabalho foi utilizado a *o*-fenantrolina (Fen) como grupo complexante (Figura 2), onde a cor vermelho-laranja passa para o transparente levemente azulado quando reduzido, o qual é monitorado no comprimento de onda de 508 nm, seguindo a metodologia de Novais (2007).

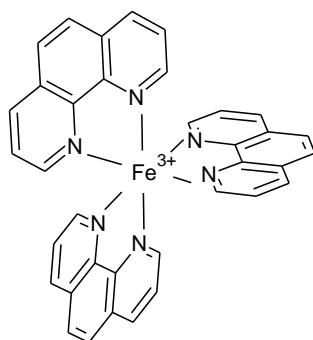


Figura 2. Fe^{3+} complexado com 3 moléculas de 1,10-fenantrolina.

2.2 Artemia salina

Artemia salina é um micro crustáceo de água salgada e tem sido utilizado para avaliar o potencial tóxico de extratos vegetais, onde são adicionadas concentrações de extratos em contato com os indivíduos eclodidos. O objetivo é tentar relacionar a toxicidade sobre *A. salina* com outros potenciais biológicos, principalmente o teste em células antitumorais, direcionando assim os estudos dos extratos para o metabólito ou grupo de metabólitos responsáveis pelo determinado potencial (ANDERSON *et al.*, 1991; MCLAUGHLIN *et al.*, 1998).

2.3 Atividade antimicrobiana

As bactérias e fungos são conhecidos por habitar o ser humano e causar malefícios à sua saúde, quando patógenas. Essa problemática é estudada muito antes dos avanços científicos conhecerem esses indivíduos fisicamente em detalhes. Dessa forma, tem-se procurado formas de combater essas bactérias patógenas ao homem, por meio de novas drogas que possam exterminá-las do corpo procurando evitar que no decorrer das gerações possam se tornar resistentes a essa droga (PEIRANO *et al.*, 2006).

Os estudos em produtos naturais têm se preocupado em achar nas plantas, substâncias que sejam ativas para morte ou inibição desses patógenos. Procurando testar extratos contra esses microrganismos, várias metodologias *in vitro* podem ser feitas para medir esse potencial, os mais empregados pela facilidade de teste são: o método de diluição e o método de difusão.

No método de difusão, uma concentração de extrato é colocada em contato com bactérias inoculadas em um meio sólido de crescimento. Após o tempo necessário, verifica-se a formação ou não de um halo onde não há o crescimento do microrganismo. No caso da microdiluição, é utilizado meio líquido ou sólido para crescimento do patógeno juntamente com uma concentração do extrato. Contudo, várias concentrações são testadas até que seja encontrada a concentração inibitória mínima, ou seja, a menor concentração que é capaz de neutralizar o crescimento bacteriano (SOUZA *et al.*, 2003).

2.3.1 *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* e *Enterococcus faecalis*

Algumas dessas bactérias são muito comuns em ambientes visitados pelo homem, são ingeridas ou absorvidas pelos mesmos por meio de ferimentos no decorrer de manuseio de material contaminado. Uma preocupação maior tem sido o fato desses micro-organismos passarem informações genéticas de resistência a multidrogas para as

linhagens posteriores, dificultando o tratamento de suas infecções. Exemplos de bactérias que comumente infectam seres humanos são *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* e *Enterococcus faecalis*, as quais tem-se buscado meios de inibi-las durante os efeitos de suas infecções.

Aeromonas hydrophila é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica, oportunista patógena em cultura de peixes, de ocorrência natural em águas correntes. Afeta animais aquáticos e conseqüentemente humanos que se alimentam desses animais ou entram em contato com eles. *A. hydrophila* é uma bactéria muito resistente tanto à multidrogas quanto mudanças severas no ambiente, podendo se reproduzir e propagar em escalas de temperaturas que podem variar de 4 – 40 °C, além da mudança de fatores como pH, nutrição e salinidade. Infecções nos humanos podem causar gastroenterites (AWAN *et al.*, 2018; BEBAK *et al.*, 2015; STRATEV & ODEYEMI, 2015).

Edwardsiella tarda é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa, geralmente relatada por infectar animais que vivem em água doce, como peixes, anfíbios e répteis, causando hemorragia ou lesões necróticas nos mesmos, gerando prejuízos na aquicultura (XU & ZHANG, 2014). Humanos e outros animais podem contrair essa bactéria por ingestão de carne de peixes contaminados e pode aderir à feridas que entram em contato com materiais infectados. Este micro-organismo está relacionado com infecções entéricas, meningites e abscessos hepáticos (ABRAHAM *et al.*, 2015; ALEXANDRINO *et al.*, 1999; NISHIDA *et al.*, 2016).

Enterococcus faecalis é uma bactéria gram-positiva, anaeróbica, encontrada na flora intestinal humana causadora de diversas doenças quando o indivíduo se encontra com imunidade baixa, geralmente em pacientes de casos hospitalares (RASMUSSEN *et al.*, 2010). Também é responsável por diversas infecções endodônticas (JAIN *et al.*, 2016), no trato urinário (ABAT *et al.*, 2016) e até meningite neonatal (MARTÍNEZ *et al.*, 2017). *E. faecalis* é responsável por pelos menos 75% de toda contaminação pelo gênero relatada, sendo conhecida por ser resistente à multidrogas (JAMET *et al.*, 2012).

2.4 Fabaceae

A família Fabaceae ou Leguminosae está entre as três maiores famílias do reino vegetal por apresentar até o momento, aproximadamente 946 gêneros e 24.505 espécies e outras espécies continuam a ser descobertas e adicionadas (Fabaceae em *The Plant List*, 2013). A família está subdividida três subfamílias: Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae. Suas espécies têm grande importância nos mais diversos campos de

interesse humano como o alimentício, industrial, medicinal, científico, etc. (VEITCH, 2007; CARDOSO *et al.*, 2012; BOATWRIGHT *et al.*, 2016; STIRTON & MUASYA, 2016).

Muitos estudos das espécies de Fabaceae têm comprovado potenciais para as mais diversas atividades biológicas. Trabalhos mais recentes demonstram atividade acaricida contra carrapato da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SINGH *et al.*, 2016), antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (AKTER *et al.*, 2016), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Agrobacterium tumefaciens* (CEYLAN *et al.*, 2016) e atividade inibitória contra o veneno de serpente da espécie *Bothrops atrox* (MOURA *et al.*, 2016) além de um filtro de celulose produzido do tronco de *Astragalus gummifer* para adsorção de proteínas (KAYA *et al.*, 2016).

Muitas substâncias fenólicas já foram isoladas de espécies da família Fabaceae, sendo os isoflavonoides e flavonoides os mais identificados, mas outros derivados e classes também são relatados, como dímeros de flavonoides, pterocarpanos, rotenoides, triterpenos, esteroides, cumarinas, antraquinonas, glucosídeos cianogênicos e alcaloides indólicos, pirrolinizidínicos e quinolizidínicos (WINK, 2013). Na Figura 3 abaixo são ilustradas algumas moléculas encontradas em espécies de estudos recentes.

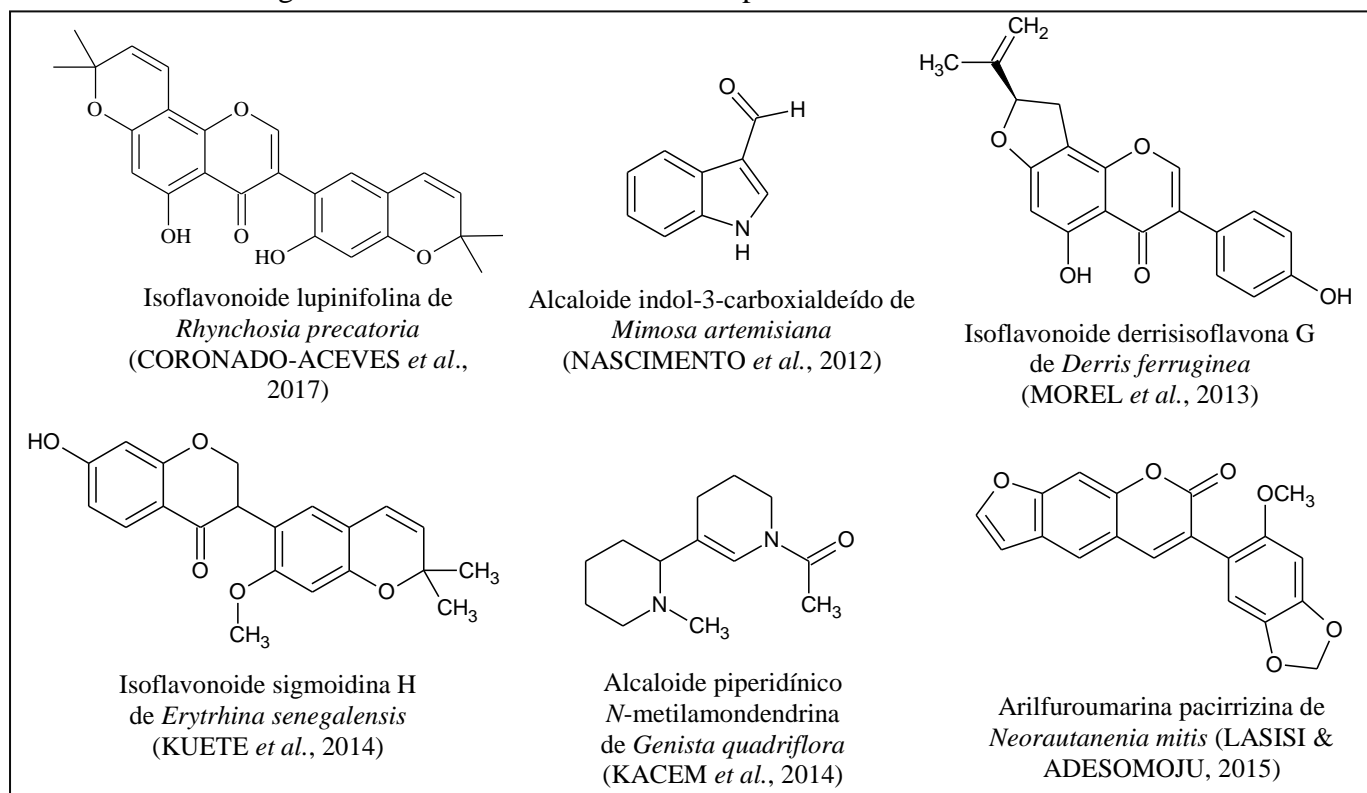
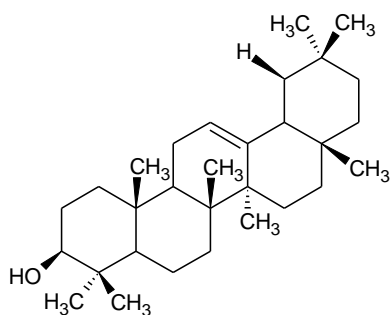
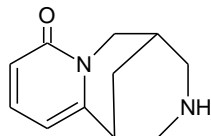


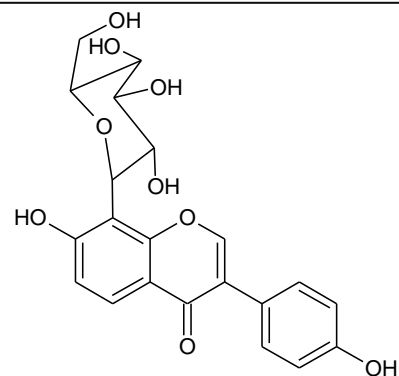
Figura 3. Classes químicas encontradas em espécies de Fabaceae.



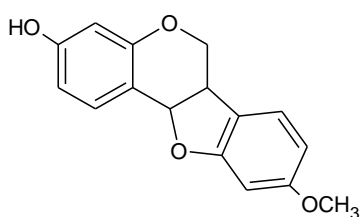
Triterpeno β -amirina de *Retama sphaerocarpa* (TOUATI *et al.*, 2015)



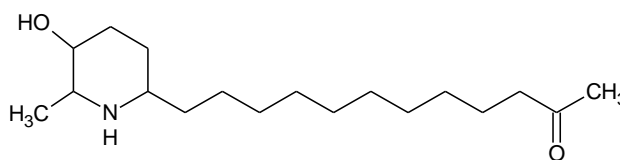
Alcaloide quinolisidínico citisina de *Retama monosperma* (HAMDANI *et al.*, 2015)



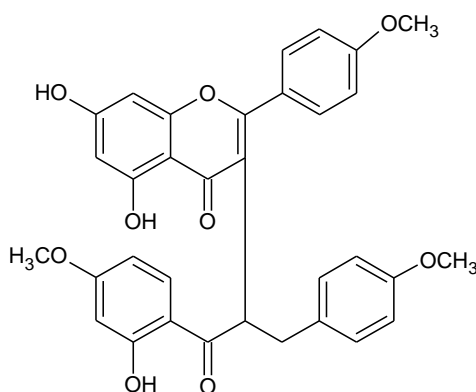
Isoflavonoide genisteina 8-C- β -D-glicosídeo de *Rafnia amplexicaulis* (KINFE *et al.*, 2015)



Pterocarpano maackiaina de *Ononis spinosa* (GAMPE *et al.*, 2016)



Alcaloide piperidínico (-)-cassina de *Senna spectabilis* (PEREIRA *et al.*, 2016)



Biflavonoide 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona-3 α -2'''-hidroxi-4''',4''- dimetoxidihidrochalcona de *Poincianellas pyramidalis* (OLIVEIRA *et al.*, 2016)

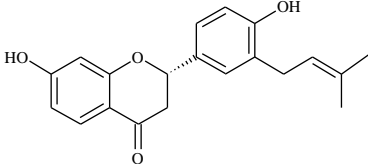
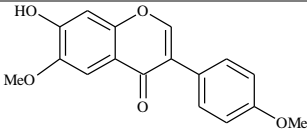
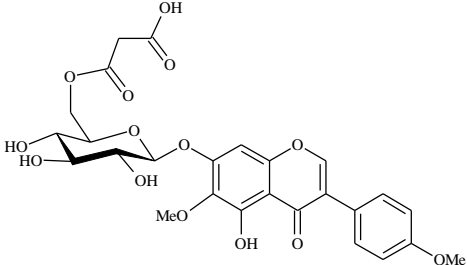
Continuação.... **Figura 3.** Classes químicas encontradas em espécies de Fabaceae.

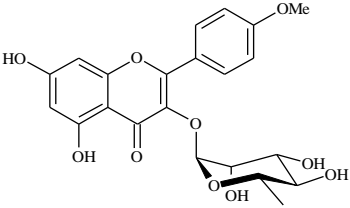
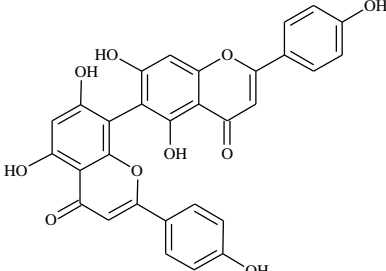
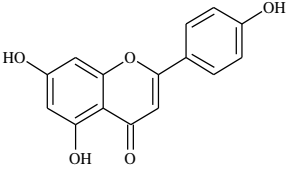
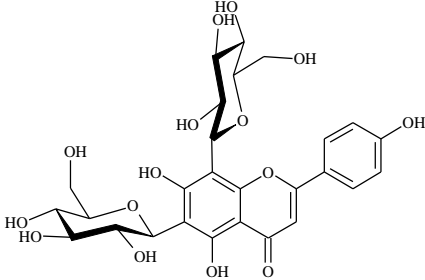
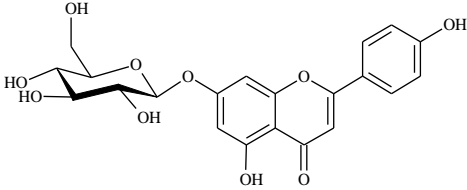
2.5 Flavonoides em Fabaceae

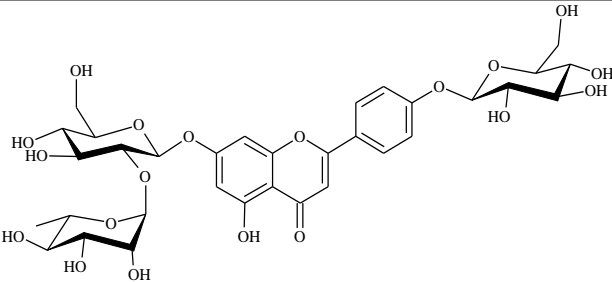
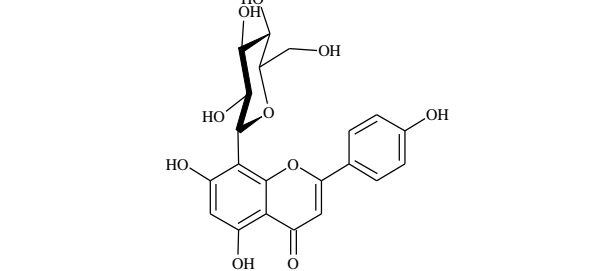
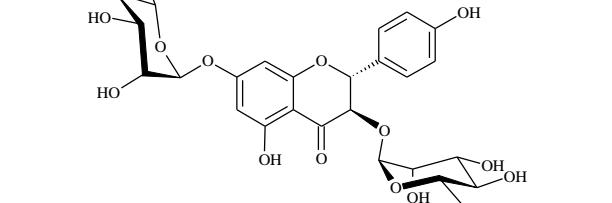
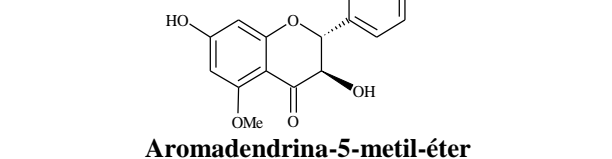
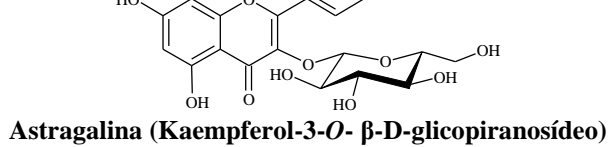
Os flavonoides são um grupo de metabólitos secundários presentes nas plantas e são umas das mais importantes substâncias presente na dieta humana, onde largamente estão distribuídos nas frutas, vegetais e bebidas. Muitos estudos indicam que os flavonoides podem diminuir os riscos de doenças crônicas e de cunho cancerígeno nas pessoas (RAFFA *et al.*, 2017), o que está associado à capacidade antioxidante comprovada dessa classe (GEORGE *et al.*, 2017), mas que não a limita apenas como preventora, visto que se conhece muito sobre a atividade dos flavonoides frente à microrganismos, como fungos (SELEEM *et al.*, 2017).

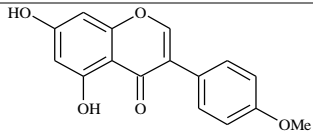
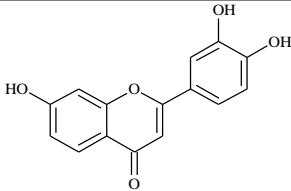
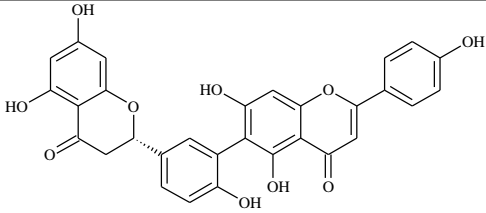
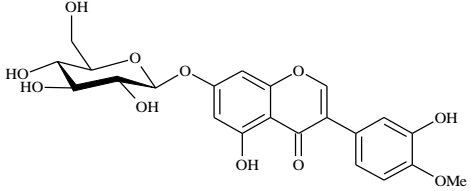
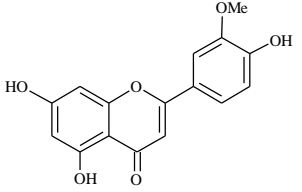
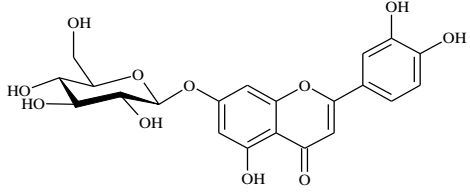
Essa classe química está largamente distribuída nas espécies da Fabaceae. Na Tabela 1 são apresentados vários flavonoides isolados de algumas dessas espécies, onde se observa que esses metabólitos estão divididos (em sua maioria) em flavonoides prenilados, mono, di e triglicosilados, com derivações de flavonois, dihidroflavonois, flavonas, flavanonas, isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanas e isoflav-3-enos.

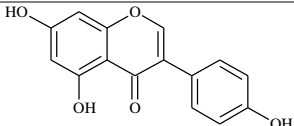
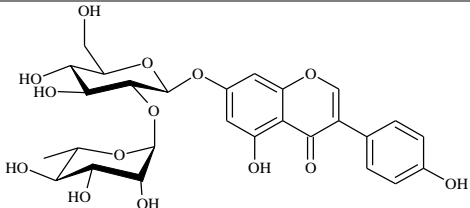
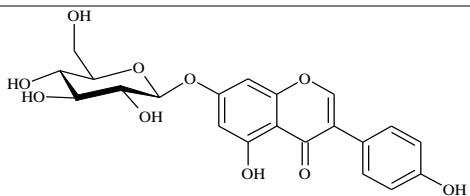
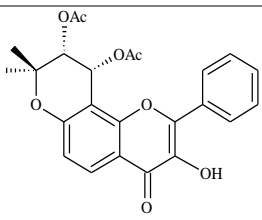
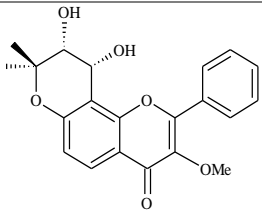
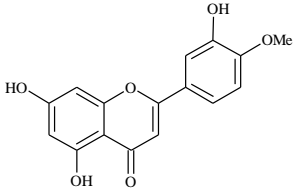
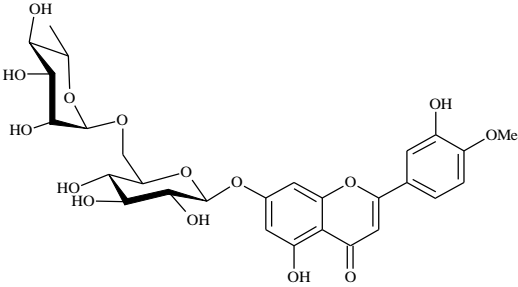
Tabela 1. Flavonoides em algumas espécies de Fabaceae.

Flavonoides	Espécies	Referências
 <p>Abissinona-II</p>	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Asada <i>et al.</i> , 1998
 <p>Afrososina</p>	<i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Onobrychis tanaitica</i> <i>Butea monosperma</i> <i>Cyclopia genistoides</i> <i>Mucuna pruriens</i>	Asada <i>et al.</i> , 1999 Ingham, 1978 Chokchaisiri <i>et al.</i> , 2009 Roza <i>et al.</i> , 2016 Dendup <i>et al.</i> , 2014
 <p>Afrososina-7-O-(-6''-malonil-β-D-glicopiranosídeo)</p>	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Li <i>et al.</i> , 2000

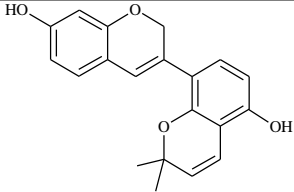
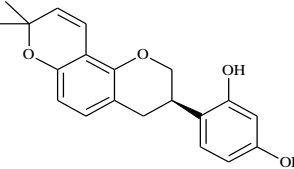
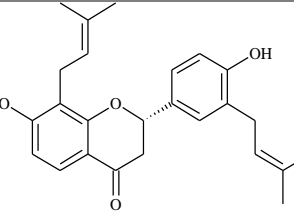
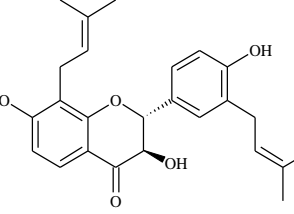
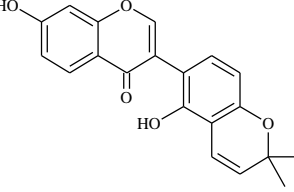
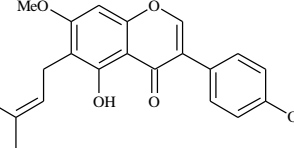
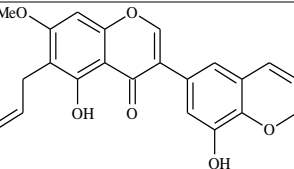
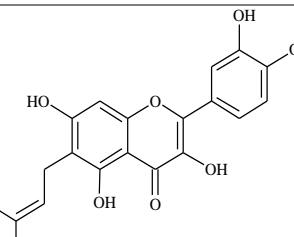
	<i>Podocarpium podocarpum</i> <i>Podocarpium podocarpum</i> <i>Vicia variabilis</i>	Ye <i>et al.</i> , 2015 Ma <i>et al.</i> , 2013 Tkachenko <i>et al.</i> , 1974	
Afzelina			
	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	Bahia <i>et al.</i> , 2005	
Agatisflavona			
	<i>Caesalpinia pyramidalis</i> <i>Genista cilentina</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Piptadenia gonoacantha</i> <i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Vicia subvillosa</i> <i>Anadenanthera colubrina</i>	Bahia <i>et al.</i> , 2005 Venditti <i>et al.</i> , 2016 Mohammed <i>et al.</i> , 2014 De Carvalho <i>et al.</i> , 2010 Faizieva <i>et al.</i> , 1999 Yuldashev, 2005 Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2003	
Apigenina	<i>Salvia pratensis</i>	Prokonenko & Chushenko, 1986	
<i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Vicia subvillosa</i> <i>Caragana spinosa</i> <i>Genista ferox</i> <i>Desmodium canadense</i> <i>Erythrina falcata</i>			Duchenko <i>et al.</i> , 2016 Yuldashev <i>et al.</i> , 2007 Olennikov <i>et al.</i> , 2012 Mekkiou <i>et al.</i> , 2012 Puodziunene <i>et al.</i> , 2009 Oliveira <i>et al.</i> , 2014
	<i>Canavalia gladiata</i> <i>Lepedeza buergeri</i> <i>Lepedeza japônica</i> <i>Lepedeza pilosa</i> <i>Sophora microphylla</i> <i>Sophora prostrata</i> <i>Sophora tetráptera</i> <i>Retama sphaerocarpa</i> <i>Desmodium canadense</i> <i>Erythrina falcata</i>	Kaneta <i>et al.</i> , 1980 Markcham, 1973 Louaar <i>et al.</i> , 2005 Puodziunene <i>et al.</i> , 2009 Oliveira <i>et al.</i> , 2014	
Apigenina-6,8-di-C-beta-D-glicopiranosídeo (Vicenin 2)			
	<i>Amphicarpaea edgeworthii</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Logonychium farctum</i> <i>Sophora microphylla</i> <i>Sophora prostrata</i> <i>Sophora tetráptera</i> <i>Vicia unijuga</i> <i>Wistaria floribunda</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Genista ferox</i> <i>Desmodium canadense</i>	Kaneta <i>et al.</i> , 1980 Mohammed <i>et al.</i> , 2014 Ikramov <i>et al.</i> , 1990b Markcham, 1973 Kaneta <i>et al.</i> , 1980 Duchenko <i>et al.</i> , 2016 Mekkiou <i>et al.</i> , 2012 Puodziunene <i>et al.</i> , 2009	
Apigenina-7-O-beta-D-glicopiranosídeo (Cosmosiina)			

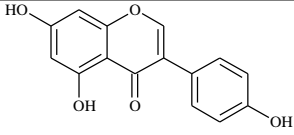
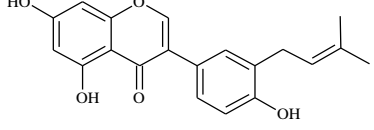
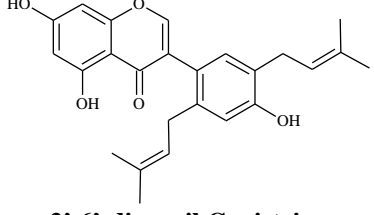
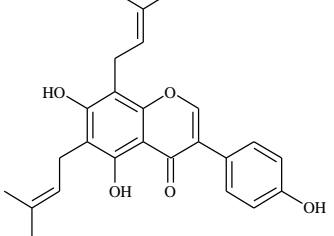
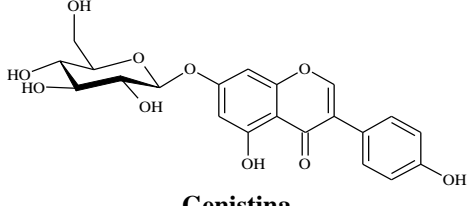
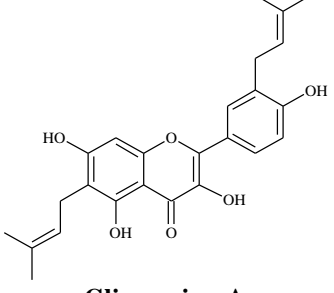
 <p>The structure shows an apigenin core with a 4'-O-β-D-glucopyranoside group at the 4' position and a 7-O-α-L-ranmosilglicoside group at the 7 position. The ramosilglicoside is a branched oligosaccharide consisting of a rhamnose unit linked to a glucose unit, which is further linked to another glucose unit.</p>	<p><i>Sophora microphylla</i> <i>Sophora prostrata</i> <i>Sophora tetraptera</i></p>	<p>Markcham, 1973</p>
<p>Apigenina-7-O-α-L-ranmosilglicosídeo-4'-O-β-D-glicopiranosídeo</p>	<p><i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Leucaena leucocephala</i> <i>Piptadenia gonoacantha</i> <i>Trigonella grandiflora</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Retama sphaerocarpa</i> <i>Desmodium canadense</i> <i>Erythrina falcata</i> <i>Desmodium heterocarpon</i></p>	<p>Mohammed <i>et al.</i>, 2014 Mohammed <i>et al.</i>, 2015 De Carvalho <i>et al.</i>, 2010 Yuldashev, 2002 Duchenko <i>et al.</i>, 2016 Louaar <i>et al.</i>, 2005 Puodziunene <i>et al.</i>, 2009 Oliveira <i>et al.</i>, 2014 Sahakitpichan, <i>et al.</i>, 2017</p>
 <p>The structure shows an apigenin core with a 4'-O-β-D-glucopyranoside group at the 4' position and a 8-C-β-D-glucopyranoside group at the 8 position.</p>	<p><i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Leucaena leucocephala</i> <i>Piptadenia gonoacantha</i> <i>Desmodium styracifolium</i> <i>Desmodium canadense</i> <i>Erythrina falcata</i> <i>Desmodium heterocarpon</i></p>	<p>Mohammed <i>et al.</i>, 2014 Mohammed <i>et al.</i>, 2015 De Carvalho <i>et al.</i>, 2010 Phan <i>et al.</i>, 2010 Puodziunene <i>et al.</i>, 2009 Oliveira <i>et al.</i>, 2014 Sahakitpichan <i>et al.</i>, 2017</p>
<p>Apigenina-8-C-β-D-glicopiranosídeo (Vitexin)</p>	<p><i>Genista celentina</i></p>	<p>Venditti <i>et al.</i>, 2016</p>
 <p>The structure shows an apigenin core with a 4'-O-β-D-glucopyranoside group at the 4' position and a 7-O-α-L-ranmosilglicoside group at the 7 position. The ramosilglicoside is a branched oligosaccharide consisting of a rhamnose unit linked to a glucose unit, which is further linked to another glucose unit.</p>	<p><i>Akschindlium godefroyanum</i></p>	<p>Chaipukdee <i>et al.</i>, 2013</p>
<p>Aromadendrina-3,7-O-α-L-di-ranmopiranosídeo</p>	<p><i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer macracanthum</i> <i>Cicer flexuosum</i> <i>Cicer songoricum</i></p>	<p>Luk'yanchikov, 1992a</p>
 <p>The structure shows an apigenin core with a 4'-O-β-D-glucopyranoside group at the 4' position, a 5-O-methyl ether group at the 5 position, and a 7-O-α-L-ranmosilglicoside group at the 7 position. The ramosilglicoside is a branched oligosaccharide consisting of a rhamnose unit linked to a glucose unit, which is further linked to another glucose unit.</p>	<p><i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer macracanthum</i> <i>Cicer flexuosum</i> <i>Cicer songoricum</i></p>	<p>Luk'yanchikov, 1992b Moniava & Kemertelidze, 1971a Ma <i>et al.</i>, 2013 Phan <i>et al.</i>, 2010 Alaniya & Chkadua, 2000</p>
<p>Aromadendrina-5-metil-éter</p>	<p><i>Onobrychis inermis</i> <i>Podocarpium podocarpum</i> <i>Desmodium styracifolium</i> <i>Astragalus tana</i> <i>Astragalus eupeplus</i> <i>Astragalus captiosus</i> <i>Lotus ucrainicus</i> <i>Lotus arvensis</i> <i>Astragalus levieri</i></p>	<p>Yasinov, 1986 Guzhva <i>et al.</i>, 1986 Kovalev, 2009 Guzhva <i>et al.</i>, 1983</p>
 <p>The structure shows a kaempferol core with a 3-O-β-D-glucopyranoside group at the 3 position.</p>	<p><i>Astragalus eupeplus</i> <i>Astragalus captiosus</i> <i>Lotus ucrainicus</i> <i>Lotus arvensis</i> <i>Astragalus levieri</i></p>	<p>Yasinov, 1986 Guzhva <i>et al.</i>, 1986 Kovalev, 2009 Guzhva <i>et al.</i>, 1983</p>
<p>Astragalina (Kaempferol-3-O-β-D-glicopiranosídeo)</p>	<p><i>Astragalus tana</i></p>	<p>Alaniya & Chkadua, 2000</p>

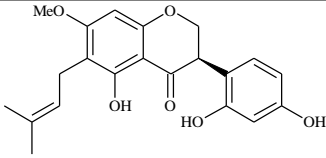
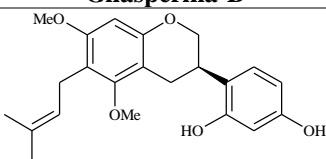
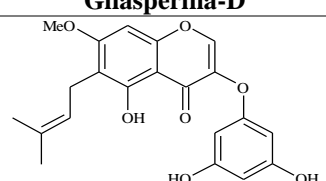
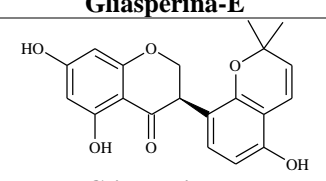
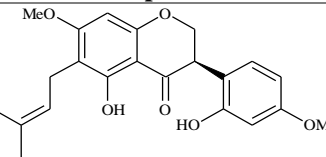
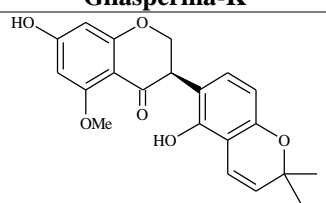
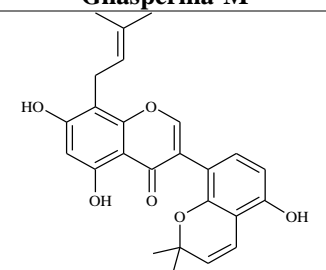
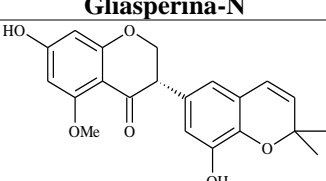
	<i>Astragalus sevangensis</i> <i>Astragalus galegiformis</i> <i>Oxytropis miriophylla</i> <i>Desmodium canadense</i> <i>Podocarpium podocarpum</i>	Alaniya <i>et al.</i> , 2006 Blinova & Tkhan', 1987 Puodziunene <i>et al.</i> , 2009 Ye <i>et al.</i> , 2015
	Biochanin A	<i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer flexuosum</i> <i>Cicer mogoltavicum</i> <i>Cicer songoricum</i> <i>Genista cilentina</i> <i>Moghania philippinensis</i> <i>Trigonella grandiflora</i> <i>Swartzia polyphylla</i> <i>Trifolium strepens</i>
	Butin (3',4',7-trihydroxiflavanona)	<i>Dipteryx odorata</i> <i>Glycyrrhiza uralensis</i> <i>Butea monosperma</i>
	Caesalflavona	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
	Calicosina-7-O-β-D-glicopiranosido	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
	Crisoeriol	<i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Astragalus abyssinicus</i>
	Cinarosido (Luteolin-7-O-β-D-glicopiranosido)	<i>Ammothamnus lehmannii</i> <i>Cassia tora</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Thermopsis dolichocarpa</i> <i>Thermopsis dolichocarpa</i> <i>Vicia subvillosa</i> <i>Vicia unijuga</i> <i>Wistaria floribunda</i> <i>Spartium junceum</i> <i>Vicia subvillosa</i>
		Bahia <i>et al.</i> , 2005 Li <i>et al.</i> , 2000 Yuldashev <i>et al.</i> , 1976 Faizieva <i>et al.</i> , 1999 Kattaev & Nikonov, 1975 El Dib <i>et al.</i> , 2014 Abdullaev <i>et al.</i> , 1983 A & Geetha, 2014 Mohammed <i>et al.</i> , 2014 Yuldashev <i>et al.</i> , 1976 Faizieva <i>et al.</i> , 1999 Yuldashev <i>et al.</i> , 1990 Yuldashev, 2005 Kaneta <i>et al.</i> , 1980 Ozimina, 1979 Yuldashev <i>et al.</i> , 2007

 <p style="text-align: center;">Daidzeina</p>	<p><i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer macracanthum</i> <i>Cicer flaxuosum</i> <i>Cicer pungen</i> <i>Cicer songoricum</i> <i>Sophora tonkinensis</i> <i>Thermopsis lupinoides</i> <i>Trigonella grandiflora</i> <i>Whitfordiodendron filipes</i></p>	<p>Luk'yanchikov, 1992a Luk'yanchikov, 1992b Chang-Ming <i>et al.</i>, 2013 Arisawa <i>et al.</i>, 1980 Yuldashev, 2002 Liu <i>et al.</i>, 2016b</p>
 <p style="text-align: center;">Daidzeina-7-O-α-L-ramnosilglucosídeo</p>	<p><i>Bituminaria bituminosa</i> <i>Sophora tonkinensis</i></p>	<p>Azzouzi <i>et al.</i>, 2014 Chang-Ming <i>et al.</i>, 2013</p>
 <p style="text-align: center;">Daidzina</p>	<p><i>Psoralea acaulis</i> <i>Psoralea drupacea</i> <i>Thermopsis lupinoides</i></p>	<p>Zapesochnaya & Samylina, 1974 Yuldashev <i>et al.</i>, 1996 Arisawa <i>et al.</i>, 1980</p>
 <p style="text-align: center;">Derrisina A</p>	<p><i>Derris indica</i></p>	<p>Anusiri <i>et al.</i>, 2014</p>
 <p style="text-align: center;">Derrisina B</p>	<p><i>Derris indica</i></p>	<p>Anusiri <i>et al.</i>, 2014</p>
 <p style="text-align: center;">Diosmetina (Luteolina-4'-metil-éter)</p>	<p><i>Crotalaria saharae</i> <i>Vicia variabilis</i> <i>Cyclopia genistoides</i></p>	<p>Aissaoui <i>et al.</i>, 2014 Tkachenko <i>et al.</i>, 1974 Roza <i>et al.</i>, 2016</p>
 <p style="text-align: center;">Diosmina (Diosmetina-7-rutinosídeo)</p>	<p><i>Crotalaria saharae</i> <i>Vicia variabilis</i> <i>Hedysarum setigerum</i></p>	<p>Aissaoui <i>et al.</i>, 2014 Tkachenko <i>et al.</i>, 1974 Neretina <i>et al.</i>, 2002</p>

	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Asada <i>et al.</i> , 1998
Euchrenona-a5		
	<i>Sophora exigua</i>	Ruangrunsi <i>et al.</i> , 1992
Exiguaflavona A		
	<i>Cicer arietinum</i> , <i>Cicer macracanthum</i> <i>Cicer flexuosum</i> <i>Cicer mogoltavicum</i> <i>Cicer songoricum</i> <i>Onobrychis tanaitica</i> <i>Sophora tonkinensis</i> <i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Thermopsis lupinoides</i> <i>Butea monosperma</i> <i>Cyclopia genistoides</i> <i>Mucuna prurieus</i> <i>Whitfordiodendron filipes</i> <i>Thermopsis alterniflora</i>	Luk'yanchikov, 1992a Yusupova, 1986 Luk'yanchikov, 1992b Ingham, 1978 Chang-Ming <i>et al.</i> , 2013 Yuldashev <i>et al.</i> , 1976 Faizieva <i>et al.</i> , 1999 Arisawa <i>et al.</i> , 1980 Chokchaisiri <i>et al.</i> , 2009 Roza <i>et al.</i> , 2016 Dendup <i>et al.</i> , 2014 Liu <i>et al.</i> , 2016b Kotenko <i>et al.</i> , 1993
Formononetina		
	<i>Cassia tora</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer macracanthum</i> <i>Cicer flexuosum</i> <i>Cicer mogoltavicum</i> <i>Cicer songoricum</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Thermopsis lupinoides</i> <i>Butea monosperma</i> <i>Trifolium strepens</i>	A & Geetha, 2014 Luk'yanchikov, 1992a Yusupova, 1986 Luk'yanchikov, 1992b Li <i>et al.</i> , 2000 Yuldashev <i>et al.</i> , 1976 Arisawa <i>et al.</i> , 1980 Chokchaisiri <i>et al.</i> , 2009 Luk'yanchikov & Kazakov, 1983
Formononetina-7-O-β-D-glicopiranosídeo (Ononina)		
	<i>Akschindlium godefroyanum</i>	Chaipukdee <i>et al.</i> , 2013
(+)-Fustina		
	<i>Tephrosia apollinnea</i>	Ammar <i>et al.</i> , 2014
(+)-Glabratefrina		

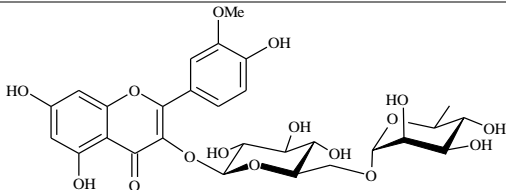
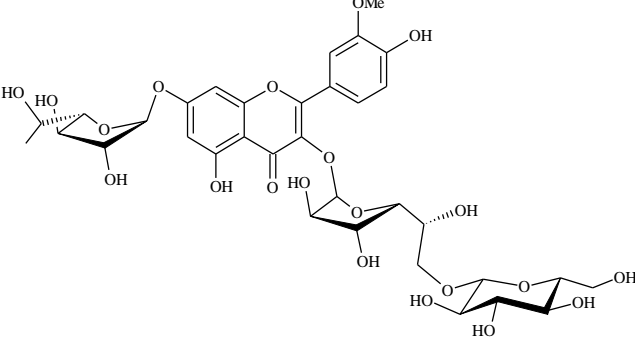
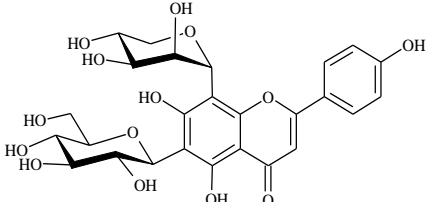
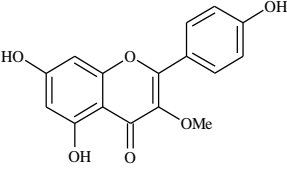
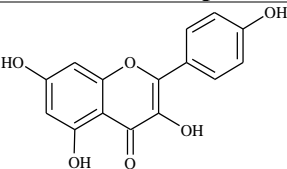
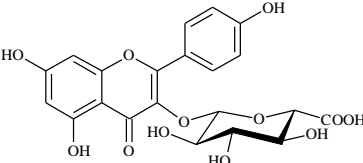
 <p>Glabreno</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i></p>	<p>Fukai <i>et al.</i>, 1996b Kinoshita <i>et al.</i>, 1975 Kitagawa <i>et al.</i>, 1994</p>
 <p>Glabridina</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Entada rheedii</i></p>	<p>Fukai <i>et al.</i>, 1996b Li <i>et al.</i>, 1998 Shafaat-Al-Mehedi <i>et al.</i>, 2015</p>
 <p>Glabrol</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Vixibia alopecuroides</i></p>	<p>Asada <i>et al.</i>, 1998 Fukai <i>et al.</i>, 1996b Kitagawa <i>et al.</i>, 1994 Yusupova <i>et al.</i>, 1983</p>
 <p>3-Hidroxi glabrol</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i></p>	<p>Asada <i>et al.</i>, 1998</p>
 <p>Glabrona</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i></p>	<p>Kinoshita <i>et al.</i>, 1975</p>
 <p>Gancaonina G</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i></p>	<p>Fukai <i>et al.</i>, 1996a</p>
 <p>Gancaonina H</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i></p>	<p>Fukai <i>et al.</i>, 1996a</p>
 <p>Gancaonina P</p>	<p><i>Pseudarthritis hookeri</i></p>	<p>Tchamgoue <i>et al.</i>, 2016</p>

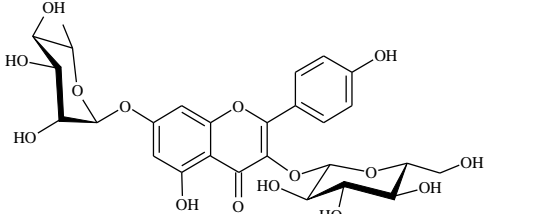
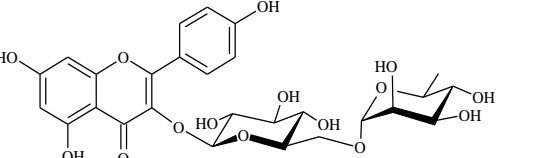
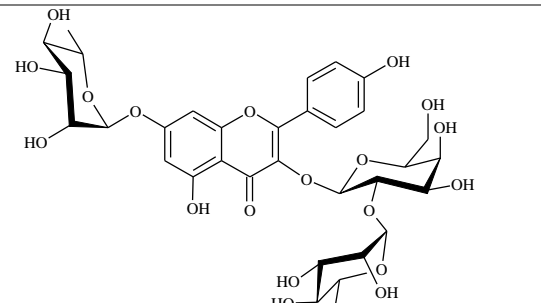
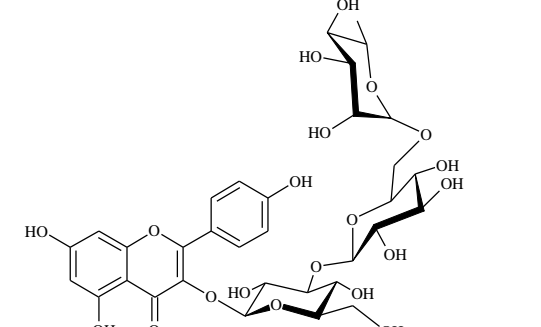
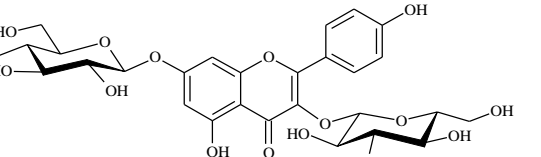
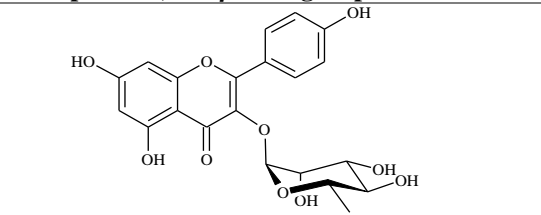
 <p style="text-align: center;">Genisteina</p>	<p><i>Genista cilentina</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Moghania philippinensis</i> <i>Podocarpium podocarpum</i> <i>Sophora tonkinensis</i> <i>Thermopsis dolichocarpa</i> <i>Thermopsis lupinoides</i> <i>Desmodium styracifolium</i> <i>Trifolium strepens</i></p> <p><i>Pseudosophora alopeuroides</i> <i>Genista tricuspidata</i> <i>Genista ferox</i> <i>Podocarpium podocarpum</i> <i>Cyclopia genistoides</i></p>	<p>Venditti <i>et al.</i>, 2016 Hayashi <i>et al.</i>, 1996 Ahn <i>et al.</i>, 2003 Ma <i>et al.</i>, 2013 Chang-Ming <i>et al.</i>, 2013 Faizieva <i>et al.</i>, 1999 Arisawa <i>et al.</i>, 1980 Phan <i>et al.</i>, 2010 Luk'yanchikov & Kazakov, 1983 Butayarov <i>et al.</i>, 1998</p> <p>Boumaza <i>et al.</i>, 2006 Mekkiou <i>et al.</i>, 2012 Ye <i>et al.</i>, 2015 Roza <i>et al.</i>, 2017</p>
 <p style="text-align: center;">3'-Prenilgenisteina</p>	<p><i>Glycyrrhiza aspera</i></p>	<p>Fukai <i>et al.</i>, 1994b</p>
 <p style="text-align: center;">3',6'-diprenil Genisteina</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i></p>	<p>Fukai <i>et al.</i>, 1996a</p>
 <p style="text-align: center;">6,8-diprenil Genistein</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i></p>	<p>Fukai <i>et al.</i>, 1996a</p>
 <p style="text-align: center;">Genistina</p>	<p><i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Thermopsis alterniflora</i></p> <p><i>Thermopsis dolichocarpa</i> <i>Thermopsis dolichocarpa</i> <i>Thermopsis lupinoides</i> <i>Desmodium styracifolium</i></p>	<p>Yuldashev <i>et al.</i>, 1976 Kattaev & Nikonov, 1972</p> <p>Faizieva <i>et al.</i>, 1999 Yuldashev <i>et al.</i>, 1990 Arisawa <i>et al.</i>, 1980 Phan <i>et al.</i>, 2010</p>
 <p style="text-align: center;">Giasperina-A</p>	<p><i>Glycyrrhiza aspera</i></p>	<p>Zeng <i>et al.</i>, 1992</p>

	<i>Glycyrrhiza aspera</i>	Zeng <i>et al.</i> , 1992
Gliasperina-B		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i>	Zeng <i>et al.</i> , 1992
Gliasperina-D		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i>	Zeng <i>et al.</i> , 1993
Gliasperina-E		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i>	Fukai <i>et al.</i> , 1994b
Gliasperina-F		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i>	Fukai <i>et al.</i> , 1994b
Gliasperina-K		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i>	Fukai <i>et al.</i> , 1994b
Gliasperina-M		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i>	Fukai <i>et al.</i> , 1994b
Gliasperina-N		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i>	Hatano <i>et al.</i> , 1988a Hatano <i>et al.</i> , 1988b
Glicirrisoflavanona		

	<i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i>	Hatano <i>et al.</i> , 1988a Hatano <i>et al.</i> , 1988b Hatano <i>et al.</i> , 1989
Glicirrisoflavona		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Hatano <i>et al.</i> , 1989
Glisoflavona		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Kitagawa <i>et al.</i> , 1994
Glicoliquiritina apiosídeo		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Entada rheedii</i>	Fukai <i>et al.</i> , 1996b Kitagawa <i>et al.</i> , 1994 Shafaat-Al-Mehedi <i>et al.</i> , 2015
Hispaglabridina - A		
	<i>Tephrosia apollinea</i>	Ammar <i>et al.</i> , 2014
Isoglabratefrina		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Ingham, 1977
Isomucronulatol		
	<i>Cicer flexuosum</i> <i>Cicer pungens</i> <i>Cicer songoricum</i> <i>Trifolium strepens</i> <i>Astragalus kabadianus</i>	Yuldashev, 1998 Luk'yanchikov, 1992a Luk'yanchikov, 1992b Luk'yanchikov & Kazakov, 1983 Yasinov & Khaitov, 1988 Neretina <i>et al.</i> , 2002 Artamova <i>et al.</i> , 1987 Duchenko <i>et al.</i> , 2016 Novruzov <i>et al.</i> , 2009 Kovalev, 2009
Isoramnetina		
<i>Hedysarum setigerum</i> <i>Genista aetnensis</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Alhagi pseudoalhagi</i> <i>Lotus ucrainicus</i>		

	<p><i>Lotus arvensis</i> <i>Alhagi kirghisorum</i> <i>Onobrychis angustifolia</i> <i>Astragalus kabadianus</i></p>	<p>Burasheva <i>et al.</i>, 1977 Moniava & Kemertelidze, 1971b Yasinov & Khaitov, 1988</p>
<p>Isoramnetina-3-O-β-galactopiranosídeo</p>	<p><i>Alhagi kirghisorum</i></p>	<p>Burasheva <i>et al.</i>, 1976</p>
<p>Isoramnetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo</p>	<p><i>Alhagi kirghisorum</i> <i>Astragalus annularis</i> <i>Caragana alaica</i> <i>Caragana alaica</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer mogoltavicum</i> <i>Cicer songoricum</i> <i>Astragalus captiosus</i> <i>Astragalus kabadianus</i> <i>Caragana alaica</i> <i>Astragalus adsurgens</i> <i>Genista tricuspidata</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Astragalus cicer</i> <i>Archidendron clypearia</i> <i>Astragalus sinicus</i></p>	<p>Burasheva <i>et al.</i>, 1977 El-Hawiet <i>et al.</i>, 2010 Yuldashev <i>et al.</i>, 1999; Yuldashev & Batirov <i>et al.</i>, 2000 Luk'yanchikov, 1992a Yuldashev, 1998 Luk'yanchikov, 1992b Guzhva <i>et al.</i>, 1986 Yasinov & Khaitov, 1988 Butayarov <i>et al.</i>, 1999 Komissarenko & Polyakova, 1987 Boumaza <i>et al.</i>, 2006 Duchenko <i>et al.</i>, 2016 Alaniya <i>et al.</i>, 1983 Tao <i>et al.</i>, 2016 Kaneta <i>et al.</i>, 1980</p>
	<p><i>Caragana alaica</i> <i>Caragana alaica</i> <i>Cicer mogoltavicum</i> <i>Cicer pungens</i> <i>Caragana alaica</i></p>	<p>Yuldashev <i>et al.</i>, 1999; Yuldashev & Batirov <i>et al.</i>, 2000 Yuldashev, 1998 Luk'yanchikov, 1992a Butayarov <i>et al.</i>, 1999</p>
<p>Isoramnetina-3-O-α-L-ramnopiranosídeo</p>		

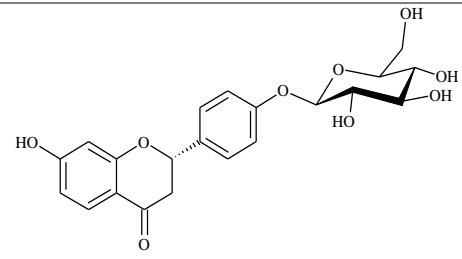
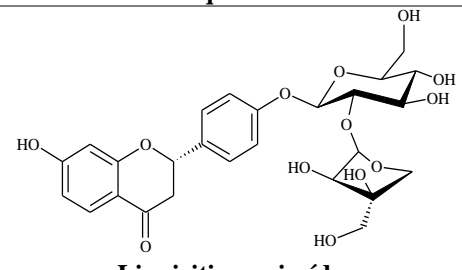
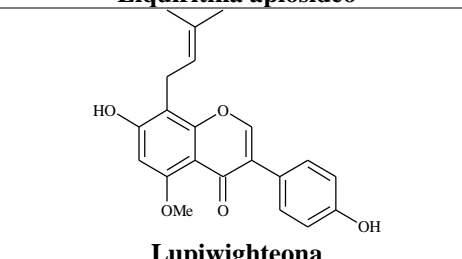
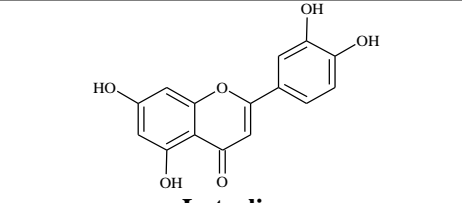
	<i>Alhagi kirghisorum</i> <i>Astragalus annularis</i> <i>Onobrychis arenaria</i> <i>Sophora immaturos</i> <i>Alhagi pseudoalhagi</i> <i>Caragana spinosa</i>	Burasheva <i>et al.</i> , 1975b El-Hawiet <i>et al.</i> , 2010 Yuldashev <i>et al.</i> , 1996 Xie <i>et al.</i> , 2014 Novruzov <i>et al.</i> , 2009 Olennikov <i>et al.</i> , 2012
Isoramnetin-3-O-rutinosido (Narcissina)	<i>Alhagi kirghisorum</i>	Burasheva <i>et al.</i> , 1975a
	<i>Alhagi kirghisorum</i>	Burasheva <i>et al.</i> , 1975a
Isoramnetin-7-O-α-L-ramnofuranosido-3-O-β-D-glicofuranosil-6'-β-D-glicofuranosido	<i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Desmodium styracifolium</i>	Li <i>et al.</i> , 2000 Phan <i>et al.</i> , 2010
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Desmodium styracifolium</i>	Li <i>et al.</i> , 2000 Phan <i>et al.</i> , 2010
Isochaftosido	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Hatano <i>et al.</i> , 1989
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Hatano <i>et al.</i> , 1989
3-O-Metil-kaempferol	<i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer flexuosum</i> <i>Cicer mogoltavicum</i> <i>Cicer songoricum</i> <i>Thephrosia cinérea</i> <i>Astragalus babatagi</i>	Luk'yanchikov, 1992a Luk'yanchikov, 1992a Gafurov <i>et al.</i> , 1987 Luk'yanchikov, 1992b Maldini <i>et al.</i> , 2011 Yasinov & Yakovlev, 1986
Kaempferol	<i>Astragalus eupeplus</i> <i>Astragalus melilotoides</i> <i>Astragalus Kabadianus</i>	Yasinov, 1986 Makbul' & Blinova, 1979
	<i>Hedysarum sericeum</i> <i>Hedysarum caucasicum</i> <i>Lotus ucrainicus</i> <i>Lotus arvensis</i> <i>Astragalus galegiformis</i> <i>Caragana spinosa</i> <i>Desmodium canadense</i>	Yasinov & Khaitov, 1988 Alaniya, 1983 Kovalev, 2009 Alaniya <i>et al.</i> , 2006 Olennikov <i>et al.</i> , 2012 Puodziunene <i>et al.</i> , 2009
	<i>Cicer mogoltavicum</i>	Gafurov <i>et al.</i> , 1987

<p>Kaempferol-3-O-β-D-glucuronídeo</p> 	<p><i>Dorycnium rectum</i> <i>Vicia sepium</i></p>	<p>Moreno <i>et al.</i>, 2012 Torck <i>et al.</i>, 1972</p>
<p>Kaempferol-3-O-β-D-glicopiranosídeo -7-α-L-ramnopiranosídeo</p> 	<p><i>Derris trifoliolata</i> <i>Onobrychis arenaria</i> <i>Sophora immaturos</i> <i>Astragalus abyssinicus</i> <i>Astragalus tana</i></p>	<p>Xu <i>et al.</i>, 2009 Yuldashev <i>et al.</i>, 1996 Xie <i>et al.</i>, 2014 El Dib <i>et al.</i>, 2015 Alaniya & Chkadua, 2000</p>
<p>Kaempferol-3-O-rutinosídeo (Nicotiflorin)</p> 	<p><i>Astragalus adsurgens</i> <i>Oxytropis miriophylla</i> <i>Phaseolus angularis</i> <i>Pueraria thumbergiana</i></p>	<p>Komissarenko & Polyakova, 1987 Blinova & Tkhuan', 1987 Kaneta <i>et al.</i>, 1980</p>
<p>Kaempferol-3-O-α-L-ramnosilgalactosídeo-7-α-L-ramnopiranosídeo</p> 	<p><i>Derris trifoliolata</i></p>	<p>Xu <i>et al.</i>, 2009</p>
<p>Kaempferol-3-O-α-L-ramnopiranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosil-(1→3)-β-D-glicopiranosídeo</p> 	<p><i>Vicia sepium</i> <i>Thephrosia cinérea</i> <i>Lotus ucrainicus</i> <i>Lotus arvensis</i></p>	<p>Torck <i>et al.</i>, 1972 Maldini <i>et al.</i>, 2011 Kovalev, 2009</p>
<p>Kaempferol-3,7-O-β-D-di-glicopiranosídeo</p> 	<p><i>Copaifera langsdorffii</i></p>	<p>Franco <i>et al.</i>, 2016</p>
<p>Kaempferol-3-O-α-L-ramnopiranosídeo</p>		

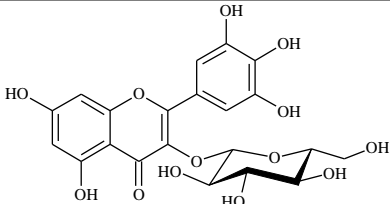
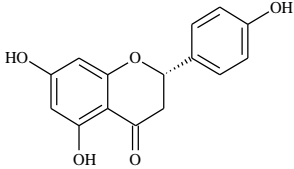
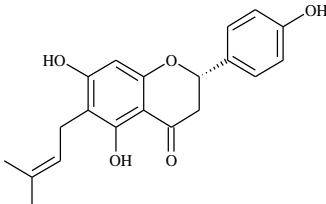
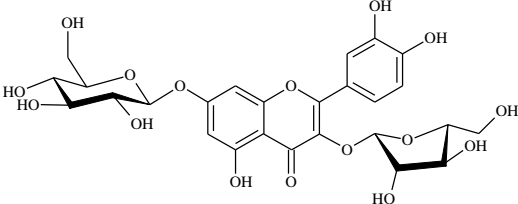
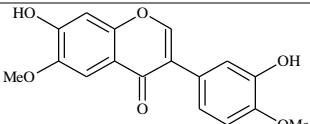
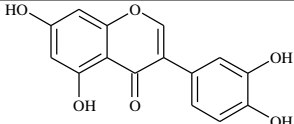
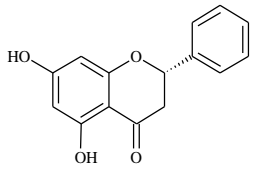
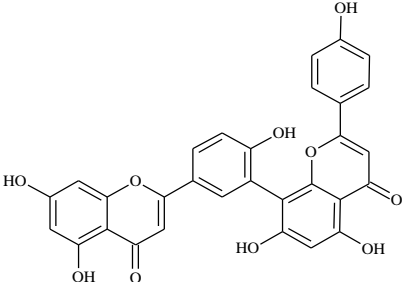
	<i>Dorycnium rectum</i> <i>Podocarpium podocarpum</i>	Moreno <i>et al.</i> , 2012 Ye <i>et al.</i> , 2015
<p align="center">Kaempferol-3,7-O-α-L-di-ramnopiranosídeo (Kaempferitrina)</p>		
	<i>Cicer arietinum</i> <i>Desmodium gangeticum</i> <i>Lotus ucrainicus</i> <i>Lotus arvensis</i>	Luk'yanchikov, 1992a Mishra <i>et al.</i> , 2005 Kovalev, 2009
<p align="center">Kaempferol-7-O-β-D-glicopiranosídeo</p>		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Asada <i>et al.</i> , 1999
<p align="center">Kanzonol D</p>		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Fukai <i>et al.</i> , 1996a
<p align="center">Kanzonol T</p>		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Fukai <i>et al.</i> , 1996b
<p align="center">Kanzonol X</p>		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i>	Fukai <i>et al.</i> , 1998
<p align="center">Kanzonol Z</p>		
	<i>Desmodium caudatum</i>	Sasaki <i>et al.</i> , 2012a
<p align="center">Kenusanona I</p>		

	<i>Tephrosia apollinea</i>	Ammar <i>et al.</i> , 2014
Lanceolatina-A		
	<i>Sophora davidii</i> <i>Sophora flavescens</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 2000 Hillerns & Wink, 2005
Leachianona-A		
	<i>Desmodium caudatum</i> <i>Podocarpium podocarpum</i>	Sasaki <i>et al.</i> , 2012a Ye <i>et al.</i> , 2015
Leachianona-G		
	<i>Ammothamnus lehmannii</i>	Bakirov <i>et al.</i> , 1987
Lehmannina		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Asada <i>et al.</i> , 1998
Licoagrocarpina		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i>	Li <i>et al.</i> , 2000
Licoagrosídeo A		

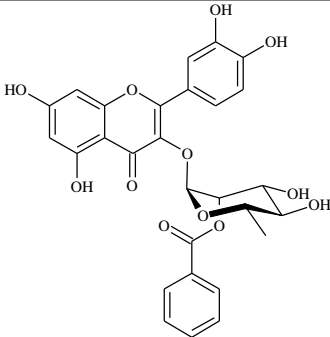
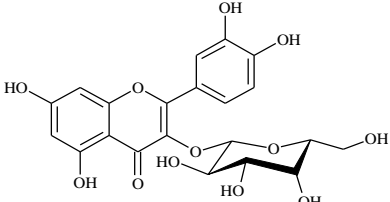
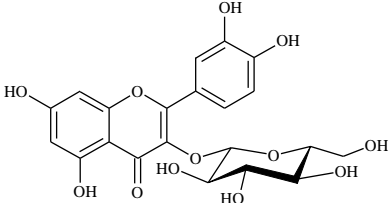
	<i>Glycyrrhiza aspera</i> <i>Glycyrrhiza aspera</i> <i>Demodium caudatum</i>	Fukai <i>et al.</i> , 1994b Hatano <i>et al.</i> , 1988a Sasaki <i>et al.</i> , 2012b
Licoflavonol		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 1996
Licoflavanona		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Kitagawa <i>et al.</i> , 1994
Licoflavona A		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i> <i>Glycyrrhiza aspera</i>	Fukai <i>et al.</i> , 1994b Zeng <i>et al.</i> , 1992
Licoisoflavanona		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i> <i>Glycyrrhiza aspera</i> <i>Glycyrrhiza aspera</i>	Fukai <i>et al.</i> , 1994b Hatano <i>et al.</i> , 1988a Kinoshita <i>et al.</i> , 1978
Licoisoflavone-A		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i> <i>Glycyrrhiza aspera</i>	Zeng <i>et al.</i> , 1992 Fukai <i>et al.</i> , 1996a
Licoisoflavona-B		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Saitoh & Shibata, 1975
Licoriconona		
	<i>Glycyrrhiza aspera</i> <i>Moghania philippinensis</i> <i>Butea monosperma</i> <i>Cyclopia genistoides</i> <i>Whitfordiodendron filipes</i> <i>Entada rheedii</i>	Hatano <i>et al.</i> , 1988a Ahn <i>et al.</i> , 2003 Chokchaisiri <i>et al.</i> , 2009 Roza <i>et al.</i> , 2016 Liu <i>et al.</i> , 2016b

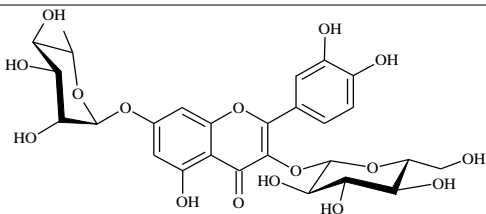
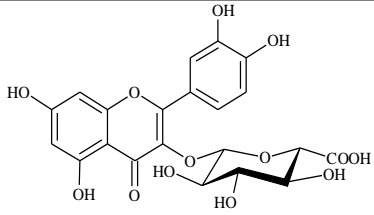
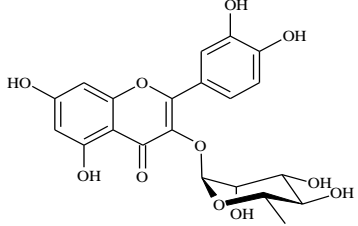
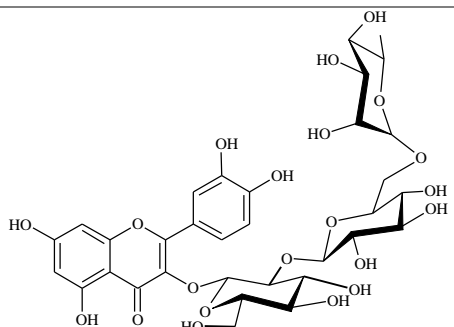
<p style="text-align: center;">Liquiritigenina</p>	<p style="text-align: center;"><i>Dalbergia cochinchinensis</i></p>	<p style="text-align: center;">Shafaat-Al-Mehedi <i>et al.</i>, 2015 Liu <i>et al.</i>, 2016a</p>
<p style="text-align: center;">Liquiritina</p> 	<p style="text-align: center;"><i>Glycyrrhiza aspera</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i></p>	<p style="text-align: center;">Hatano <i>et al.</i>, 1988a Kitagawa <i>et al.</i>, 1994</p>
<p style="text-align: center;">Liquiritina apiosídeo</p> 	<p style="text-align: center;"><i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Glycyrrhiza uralensis</i></p>	<p style="text-align: center;">Kitagawa <i>et al.</i>, 1994 Hatano <i>et al.</i>, 1998</p>
<p style="text-align: center;">Lupiwighteona</p> 	<p style="text-align: center;"><i>Glycyrrhiza glabra</i></p>	<p style="text-align: center;">Hayashi <i>et al.</i>, 1996</p>
<p style="text-align: center;">Luteolina</p> 	<p style="text-align: center;"><i>Ammothamnus lehmannii</i> <i>Cicer flexuosum</i> <i>Cicer mogoltavicum</i> <i>Dipteryx odorata</i> <i>Genista cilentina</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Podocarpium podocarpum</i> <i>Sophora microphylla</i> <i>Sophora prostrata</i> <i>Sophora tetráptera</i> <i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Thermopsis dolichocarpa</i> <i>Thermopsis dolichocarpa</i> <i>Trigonella grandiflora</i> <i>Vicia subvillosa</i> <i>Astragalus kadianus</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Salvia pretensis</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Lathyrus pratensis</i> <i>Spartium junceum</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Vicia subvillosa</i> <i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Caragana spinosa</i> <i>Genista ferox</i> <i>Desmodium canadense</i> <i>Podocarpium podocarpum</i> <i>Cyclopia genistoides</i></p>	<p style="text-align: center;">Abdullaev <i>et al.</i>, 1983 Yuldashev, 1998 Gafurov <i>et al.</i>, 1987 da Cunha <i>et al.</i>, 2016 Venditti <i>et al.</i>, 2016 Mohammed <i>et al.</i>, 2014 Ma <i>et al.</i>, 2013 Markcham, 1973</p> <p style="text-align: center;">Faizieva <i>et al.</i>, 1999</p> <p style="text-align: center;">Yuldashev <i>et al.</i>, 1990 Yuldashev, 2002 Yuldashev, 2005 Yasinov & Khaitov, 1988</p> <p style="text-align: center;">Prokonenko & Chushenko, 1986 Ikramov <i>et al.</i>, 1990a Ozimina, 1979 Duchenko <i>et al.</i>, 2016 Yuldashev <i>et al.</i>, 2007 Kotenko <i>et al.</i>, 1993 Olennikov <i>et al.</i>, 2012 Mekkiou <i>et al.</i>, 2012 Puodziunene <i>et al.</i>, 2009 Ye <i>et al.</i>, 2015 Roza <i>et al.</i>, 2017</p>

	<i>Bituminaria bituminosa</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Kummerowia striata</i> <i>Trigonella grandiflora</i> <i>Desmodium styracifolium</i>	<i>Azzouzi et al.</i> , 2014 <i>Mohammed et al.</i> , 2014 <i>Kaneta et al.</i> , 1979 <i>Yuldashev</i> , 2002 <i>Phan et al.</i> , 2010
Luteolina-6-C-β-D-glicopiranosídeo (Isoorientina)		
	<i>Lespedeza cuneata</i> <i>Sophora microphylla</i> <i>Sophora prostrata</i> <i>Sophora tetraptera</i>	<i>Kaneta et al.</i> , 1980 <i>Markcham</i> , 1973
Luteolina-6,8-C-β-D-di-glicopiranosídeo (Lucenina-2)		
	<i>Caragana alaica</i> <i>Caragana alaica</i> <i>Gleditsia triacanthos</i>	<i>Yuldashev et al.</i> , 1999; <i>Yuldashev & Batirov et al.</i> , 2000 <i>Mohammed et al.</i> , 2014
Luteolina-7-O-β-D-galactopiranosídeo		
	<i>Crotalaria lachnophora</i>	<i>Awoufack et al.</i> , 2011
Luteolina-7-O-α-L-ramnopiranosídeo		
	<i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Desmodium styracifolium</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Desmodium canadense</i>	<i>Mohammed et al.</i> , 2014 <i>Phan et al.</i> , 2010 <i>Duchenko et al.</i> , 2016 <i>Puodziunene et al.</i> , 2009
Luteolina-8-C-β-D-glicopiranosídeo (Orientina)		
	<i>Mimosa pigra</i>	<i>Okonkwo et al.</i> , 2016
Miricetina (2''-O-galloil)-3-O-α-L-ramnopiranosídeo		

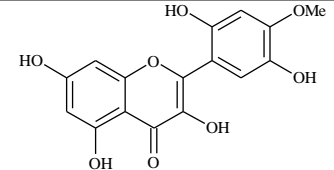
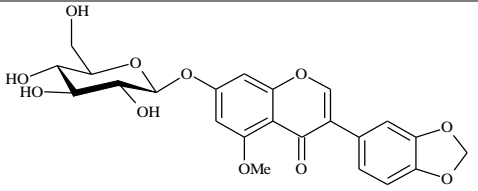
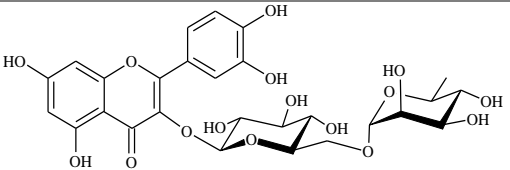
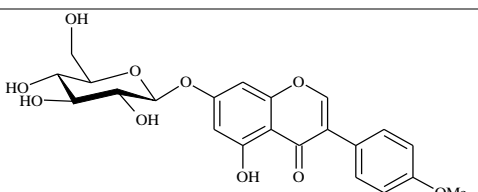
 <p>The structure shows a flavone core with a 3-O-beta-D-glucopyranoside group. The A-ring has a hydroxyl group at position 5, and the C-ring has a hydroxyl group at position 7. The B-ring is a 2,4,6-trihydroxyphenyl group.</p>	<p><i>Logonochium farctum</i> <i>Gleditsia triacanthos</i></p>	<p>Ikramov <i>et al.</i>, 1990 Duchenko <i>et al.</i>, 2016</p>
<p>Miricetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo</p>	<p><i>Desmodium caudatum</i> <i>Moghania philippinensis</i> <i>Podocarpium podocarpum</i> <i>Cyclopia genistoides</i> <i>Dalbergia cochinchinensis</i></p>	<p>Sasaki <i>et al.</i>, 2012a Ahn <i>et al.</i>, 2003 Ye <i>et al.</i>, 2015 Roza <i>et al.</i>, 2017 Liu <i>et al.</i>, 2016a</p>
 <p>The structure shows a flavone core with a 4-hydroxyphenyl group at position 7 and a hydroxyl group at position 5. The A-ring has a hydroxyl group at position 6.</p>	<p>Naringenina</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i> Hayashi <i>et al.</i>, 1996</p>
 <p>The structure shows a flavone core with a 4-hydroxyphenyl group at position 7, a hydroxyl group at position 5, and a prenyl group at position 6. The A-ring has a hydroxyl group at position 8.</p>	<p>6-Prenilnaringenina</p>	<p><i>Onobrychis sosnowskyi</i> Moniava & Kemertelidze 1971c</p>
 <p>The structure shows a flavone core with a 4-hydroxyphenyl group at position 7, a hydroxyl group at position 5, and a 4-hydroxyphenyl group at position 8. The A-ring has a hydroxyl group at position 6.</p>	<p>Ocrosídeo</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i> Asada <i>et al.</i>, 1999</p>
 <p>The structure shows a flavone core with a 4-methoxyphenyl group at position 7, a hydroxyl group at position 5, and a 3,4-dimethoxyphenyl group at position 8. The A-ring has a hydroxyl group at position 6.</p>	<p>Odoratina</p>	<p><i>Pseudarthria hookeri</i> Tchamgoue <i>et al.</i>, 2016 <i>Thermopsis dolichocarpa</i> Faizieva <i>et al.</i>, 1999 <i>Thermopsis dolichocarpa</i> Yuldashev <i>et al.</i>, 1990 <i>Eriosema glomerata</i> Awouafack <i>et al.</i>, 2008</p>
 <p>The structure shows a flavone core with a 4-hydroxyphenyl group at position 7, a hydroxyl group at position 5, and a 3,4-dihydroxyphenyl group at position 8. The A-ring has a hydroxyl group at position 6.</p>	<p>Orobol</p>	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i> Hayashi <i>et al.</i>, 1996 <i>Dalbergia cochinchinensis</i> Liu <i>et al.</i>, 2016a</p>
 <p>The structure shows a flavone core with a 4-hydroxyphenyl group at position 7, a hydroxyl group at position 5, and a hydroxyl group at position 8. The A-ring has a hydroxyl group at position 6.</p>	<p>Pinocembrina</p>	<p><i>Caesalpinia pyramidalis</i> Bahia <i>et al.</i>, 2005</p>
 <p>The structure shows a complex flavone structure with multiple hydroxyl groups and a 4-hydroxyphenyl group at position 7. The A-ring has a hydroxyl group at position 6.</p>	<p>Podocarpusflavona A</p>	

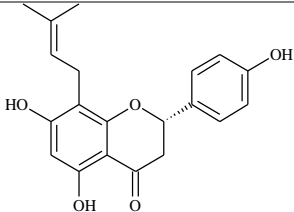
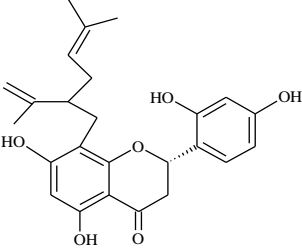
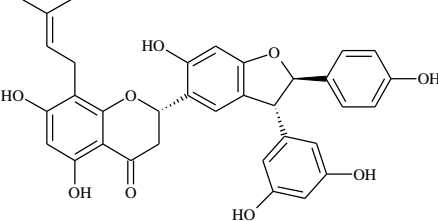
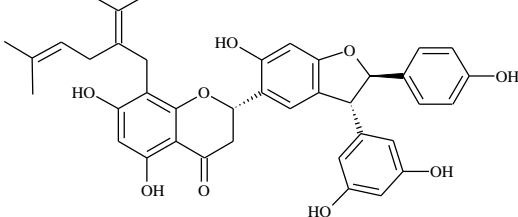
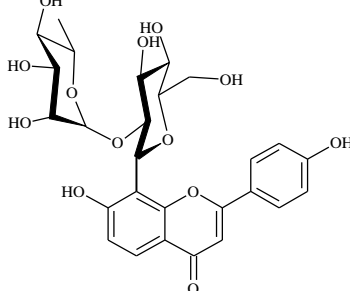
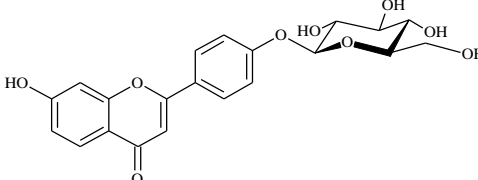
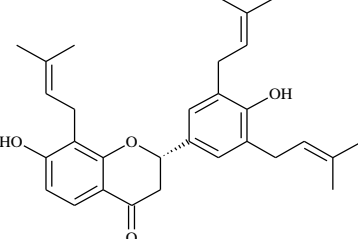
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Kitagawa <i>et al.</i> , 1994
6-Prenillicoflavona-A		
	<i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer mogoltavicum</i> <i>Cicer songoricum</i> <i>Podocarpium podocarpum</i> <i>Podocarpium podocarpum</i>	Luk'yanchikov, 1992a Yusupova, 1986 Luk'yanchikov, 1992b Ma <i>et al.</i> , 2013 Ye <i>et al.</i> , 2015
Pratenseina		
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Crotalaria lachnophora</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 1996 Awouafack <i>et al.</i> , 2011
Prunetina		
	<i>Pseudarthria hookeri</i>	Tchamgoue <i>et al.</i> , 2016
Pseudarflavona A		
	<i>Pseudarthria hookeri</i>	Tchamgoue <i>et al.</i> , 2016
Pseudarflavona B		
	<i>Ammothamnus lehmannii</i> <i>Cicer flexuosum</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer macracanthum</i> <i>Cicer pungen</i> <i>Leucaena leucocephala</i> <i>Logonochium farctum</i> <i>Sophora tonkinensis</i> <i>Trigonella grandiflora</i> <i>Vicia subvillosa</i> <i>Eriosema glomerata</i> <i>Astragalus babatagi</i> <i>Caragana aborescens</i> <i>Astragalus eupeplus</i> <i>Astragalus melilotoides</i> <i>Trifolium strepens</i> <i>Astragalus captiosus</i> <i>Astragalus kabadiabus</i> <i>Oxitropis strobilacea</i> <i>Hedysarum sericeum</i> <i>Hedysarum caucasicum</i> <i>Spartium junceum</i> <i>Gleditsia triacanthos</i>	Abdullaev <i>et al.</i> , 1983 Yuldashev, 1998 Luk'yanchikov, 1992a Mohammed <i>et al.</i> , 2015 Ikramov <i>et al.</i> , 1990b Chang-Ming <i>et al.</i> , 2013 Yuldashev, 2002 Yuldashev, 2005 Awouafack <i>et al.</i> , 2008 Yasinov & Yakovlev, 1986 Boinik & Batyuk, 1986 Yasinov, 1986 Makbul' & Blinova, 1979 Luk'yanchikov & Kazakov, 1983 Guzhva <i>et al.</i> , 1986 Yasinov & Khaitov, 1988 Pkhon-asa, 1991 Alaniya, 1983 Ozimina, 1979
Quercetina		

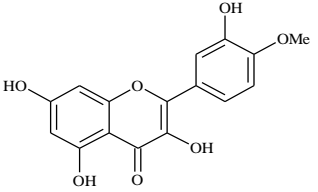
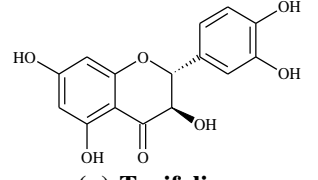
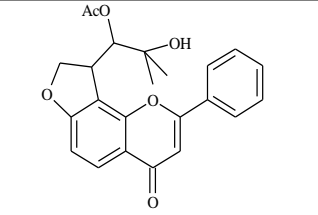
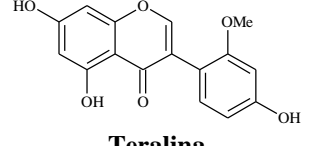
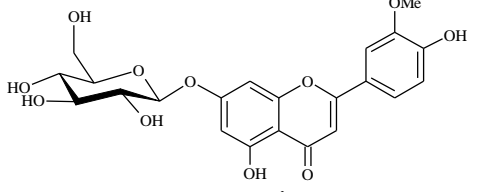
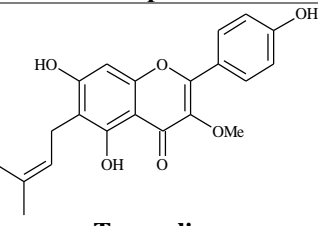
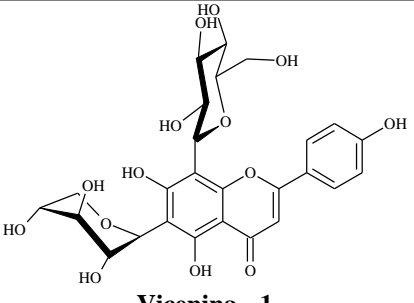
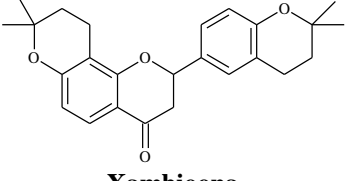
	<p><i>Alhagi pseudoalhagi</i> <i>Vicia subvillosa</i> <i>Lotus ucrainicus</i> <i>Lotus arvensis</i> <i>Caragana spinosa</i> <i>Bauhinia longifolia</i></p>	<p>Duchenko <i>et al.</i>, 2016 Novruzov <i>et al.</i>, 2009 Yuldashev <i>et al.</i>, 2007 Kovalev, 2009</p> <p>Olennikov <i>et al.</i>, 2012 Santos <i>et al.</i>, 2014</p>
	<p><i>Mimosa pigra</i></p>	<p>Okonkwo <i>et al.</i>, 2016</p>
 <p>Quercetina (2''-O-galloil)-3-O-α-L-ramnopiranosídeo</p>	<p><i>Albizia julibrissin</i> <i>Kummerowia striata</i> <i>Lespedeza cuneata</i> <i>Trifolium pratense</i> <i>Vicia amoema</i> <i>Vicia unijuga</i> <i>Cicer macracanthum</i> <i>Onobrychis tanaitica</i></p>	<p>Kaneta <i>et al.</i>, 1980</p>
 <p>Quercetina 3-O-galactopiranosídeo (Hiperosídeo)</p>	<p><i>Astragalus babatagi</i> <i>Astragalus eupeplus</i> <i>Trifolium strepens</i> <i>Hedysarum sericeum</i> <i>Lotus ucrainicus</i> <i>Lotus arvensis</i> <i>Astragalus levieri</i> <i>Astragalus sevangensis</i> <i>Caragana spinosa</i> <i>Desmodium canadense</i> <i>Bauhinia longifolia</i> <i>Archidendron clypearia</i></p>	<p>Luk'yanchikov, 1992a M.S. Luk'yanchikov & Kazakov, 1982 Yasinov & Yakovlev, 1986 Yasinov, 1986 Luk'yanchikov & Kazakov, 1983 Alaniya, 1983 Kovalev, 2009</p> <p>Guzhva <i>et al.</i>, 1983</p> <p>Olennikov <i>et al.</i>, 2012 Puodziunene <i>et al.</i>, 2009 Santos <i>et al.</i>, 2014 Tao <i>et al.</i>, 2016</p>
 <p>Quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (Isoquercitrina)</p>	<p><i>Cicer pungens</i> <i>Leucaena leucocephala</i> <i>Spartium juceum</i> <i>Ammothamnus lehmannii</i> <i>Caragana alaica</i> <i>Caragana alaica</i> <i>Thephrosia cinérea</i> <i>Desmodium styracifolium</i> <i>Caragana aborescens</i> <i>Trifolium strepens</i> <i>Astragalus captiosus</i> <i>Caragana alaica</i> <i>Lathyrus pratensis</i> <i>Hedysarum sericeum</i> <i>Spartium juceum</i> <i>Genista tricuspidata</i></p>	<p>Luk'yanchikov, 1992a Mohammed <i>et al.</i>, 2015 Yesilada <i>et al.</i>, 2000 Abdullaev <i>et al.</i>, 1983 Yuldashev <i>et al.</i>, 1999; Yuldashev & Batirov <i>et al.</i>, 2000</p> <p>Maldini <i>et al.</i>, 2011 Phan <i>et al.</i>, 2010 Boinik & Batyuk, 1986 Luk'yanchikov & Kazakov, 1983 Guzhva <i>et al.</i>, 1986 Butayarov <i>et al.</i>, 1999 Ikramov <i>et al.</i>, 1990a Alaniya, 1983 Ozimina, 1979 Boumaza <i>et al.</i>, 2006</p>

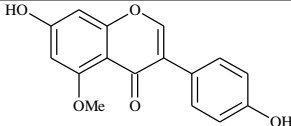
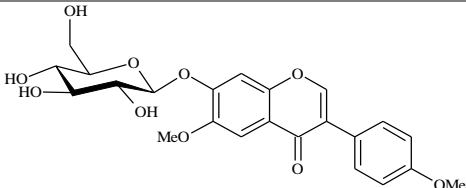
	<i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Vicia subvillosa</i> <i>Lotus ucrainicus</i> <i>Lotus arvensis</i> <i>Caragana spinosa</i> <i>Bauhinia longifolia</i> <i>Onobrychis kachetica</i>	Duchenko <i>et al.</i> , 2016 Yuldashev <i>et al.</i> , 2007 Kovalev, 2009 Olennikov <i>et al.</i> , 2012 Santos <i>et al.</i> , 2014 Moniava & Kemertelidze, 1971c Torck <i>et al.</i> , 1972 Maldini <i>et al.</i> , 2011
		
Quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo -7-O-α-L-rannopiranosídeo		
	<i>Cassia tora</i>	A & Geetha, 2014
		
Quercetina-3-O-β-D-glucuronídeo		
	<i>Caragana alaica</i> <i>Caragana alaica</i> <i>Copaifera langsdorffii</i> <i>Lespedeza buergeri</i> <i>Lespedeza cuneata</i> <i>Leucaena leucocephala</i> <i>Mimosa pigra</i> <i>Schotia brachypetala</i> <i>Vicia sylvatica</i> <i>Thephrosia cinerea</i> <i>Astragalus babatagi</i> <i>Astragalus melilotoides</i> <i>Caragana alaica</i> <i>Lotus ucrainicus</i> <i>Lotus arvensis</i> <i>Caragana spinosa</i> <i>Entada abyssinica</i> <i>Desmodium canadense</i> <i>Bauhinia longifolia</i> <i>Archidendron clypearia</i>	Yuldashev <i>et al.</i> , 1999; Yuldashev & Batirov <i>et al.</i> , 2000 Franco <i>et al.</i> , 2016 Kaneta <i>et al.</i> , 1980 Mohammed <i>et al.</i> , 2015 Okonkwo <i>et al.</i> , 2016 Sobeh <i>et al.</i> , 2016 Torck <i>et al.</i> , 1972 Maldini <i>et al.</i> , 2011 Yasinov & Yakovlev, 1986 Makbul' & Blinova, 1979 Butayarov <i>et al.</i> , 1999 Kovalev, 2009 Olennikov <i>et al.</i> , 2012 Dzoyem <i>et al.</i> , 2017 Puodziunene <i>et al.</i> , 2009 Santop <i>et al.</i> , 2014 Tao <i>et al.</i> , 2016
		
Quercetina 3-O-α-L-rannopiranosídeo (Quercitrina)		
	<i>Derris trifoliolata</i>	Xu <i>et al.</i> , 2009
		
Quercetina-3-O-α-L-rannopiranosil-(1 → 6)-β-D-glicopiranosil-(1 → 2)-β-D-glicopiranosídeo		

	<i>Derris trifoliolata</i>	Xu <i>et al.</i> , 2009
<p>Quercetina-3-O-α-L-ranopiranosil-(1 \rightarrow 6)-β-D-glicopiranosil -(1 \rightarrow 3)-β-D-glicopiranosídeo</p>	<p><i>Desmodium gangeticum</i> <i>Trigonella grandiflora</i> <i>Onobrychis inermis</i> <i>Podocarpium podocarpum</i></p>	<p>Mishra <i>et al.</i>, 2005 Yuldashev, 2002 Moniava & Kemertelidze, 1971a Ye <i>et al.</i>, 2015</p>
	<p>Quercetina-7-O-β-D-glicopiranosídeo (Quercimeritrina)</p>	<i>Retama sphaerocarpa</i>
	<p>Ramnazina-3-O-β-D-glicopiranosídeo -(1\rightarrow5)-α-arabinofuranosídeo</p>	<p>Martín-Cordero <i>et al.</i>, 1999</p>
	<p><i>Sophora microphylla</i> <i>Sophora prostrata</i> <i>Sophora tetraptera</i></p>	Markcham, 1973
<p>Ramnosilovitexina</p>	<p><i>Sophora microphylla</i> <i>Sophora prostrata</i> <i>Sophora tetraptera</i></p>	Markcham, 1973
	<p>Ramnosilvitexina</p>	<i>Eriosema robustum</i>
	<p>Robusflavona A</p>	Awoufack <i>et al.</i> , 2013

 <p style="text-align: center;">Robusflavona B</p>	<i>Eriosema robustum</i>	Awouafack <i>et al.</i> , 2013
 <p style="text-align: center;">Rotindina</p>	<i>Thermopsis alterniflora</i>	Yuldashev <i>et al.</i> , 1976
 <p style="text-align: center;">Rutina</p>	<p><i>Ammothamnus lehmannii</i> <i>Desmodium gangeticum</i> <i>Logonichium farctum</i> <i>Onobrychis altissima</i> <i>Onobrychis cyri</i> <i>Obobrychis iberica</i> <i>Onobrychis inermis</i> <i>Onobrychis inermis</i> <i>Onobrychis kachetica</i> <i>Onobrychis sosnowsky</i> <i>Onobrychis tanaitica</i> <i>Sophora immaturus</i> <i>Astragalus abyssinicus</i> <i>Astragalus babatagi</i> <i>Caragana aborescens</i> <i>Astragalus eupeplus</i> <i>Astragalus melilotoides</i> <i>Trifolium strepens</i> <i>Astragalus captiosus</i> <i>Astragalus kadianus</i> <i>Oxytropis strobilacea</i> <i>Lathyrus pratensis</i> <i>Spartium junceum</i> <i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Alhagi pseudoalhagi</i> <i>Astragalus levieri</i> <i>Astragalus sevangensis</i> <i>Caragana spinosa</i> <i>Podocarpium podocarpum</i></p>	<p>Abdullaev <i>et al.</i>, 1983 Mishra <i>et al.</i>, 2005 Ikramov <i>et al.</i>, 1990b Moniava & Kemertelidze, 1969 Moniava & Kemertelidze, 1971a Moniava & Kemertelidze, 1971c M.S. Luk'yanchikov & Kazakov, 1982 Xie <i>et al.</i>, 2014 El Dib <i>et al.</i>, 2015 Yasinov & Yakovlev, 1986 Boinik & Batyuk, 1986 Yasinov, 1986 Makbul' & Blinova, 1979 Luk'yanchikov & Kazakov, 1983 Guzhva <i>et al.</i>, 1986 Yasinov & Khaitov, 1988 Pkhon-asa, 1991 Ikramov <i>et al.</i>, 1990a Ozimina, 1979 Duchenko <i>et al.</i>, 2016 Novruzov <i>et al.</i>, 2009 Guzhva <i>et al.</i>, 1983 Olennikov <i>et al.</i>, 2012 Ye <i>et al.</i>, 2015</p>
 <p style="text-align: center;">Sissotrina (Biochanina A-7-O-β-D-glicopiranosídeo)</p>	<p><i>Cicer flexuosum</i> <i>Cicer mogoltavicum</i> <i>Trifolium strepens</i></p>	<p>Yuldashev, 1998 Gafurov <i>et al.</i>, 1987 Luk'yanchikov & Kazakov, 1983</p>

 <p style="text-align: center;">Soforaflavanona B</p>	<i>Desmodium caudatum</i>	Sasaki <i>et al.</i> , 2012a
 <p style="text-align: center;">Soforaflavanona-G (Vexibinol)</p>	<i>Sophora exigua</i> <i>Sophora pachycarpa</i> <i>Sophora davidii</i>	Ruangrunsi <i>et al.</i> , 1992 Muminova <i>et al.</i> , 2006 Tanaka <i>et al.</i> , 2000
 <p style="text-align: center;">Soforaflavanona-H</p>	<i>Sophora davidii</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 2000
 <p style="text-align: center;">Soforaflavanona-I</p>	<i>Sophora davidii</i> <i>Pseudosophora alopecuroides</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 2000 Butayarov <i>et al.</i> , 1998
 <p style="text-align: center;">Soforaflavona-A</p>	<i>Sophora subprostrata</i>	Shirataki <i>et al.</i> , 1986
 <p style="text-align: center;">Soforaflavona-B</p>	<i>Sophora subprostrata</i>	Shirataki <i>et al.</i> , 1986
 <p style="text-align: center;">Soforaflavanona-B</p>	<i>Sophora tonkinensis</i>	Chang-Ming <i>et al.</i> , 2013

<p style="text-align: center;">Soforanona</p> 	<p><i>Alhagi kirghisorum</i> <i>Genista aetnensis</i></p>	<p>Burasheva <i>et al.</i>, 1976 Artamova <i>et al.</i>, 1987</p>
<p style="text-align: center;">Tamarixetina</p> 	<p><i>Akschindlium godefroyanum</i></p>	<p>Chaipukdee <i>et al.</i>, 2013</p>
<p style="text-align: center;">(+)-Taxifolina</p> 	<p><i>Tephrosia apollinea</i></p>	<p>Ammar <i>et al.</i>, 2014</p>
<p style="text-align: center;">Tefroapollina-F</p> 	<p><i>Thermopsis alterniflora</i></p>	<p>Kattaev & Nikonov, 1975</p>
<p style="text-align: center;">Teralina</p> 	<p><i>Thermopsis alterniflora</i> <i>Thermopsis alterniflora</i></p>	<p>Faizieva <i>et al.</i>, 1999 Kattaev & Nikonov, 1973</p>
<p style="text-align: center;">Termososídeo</p> 	<p><i>Glycyrrhiza aspera</i></p>	<p>Zeng <i>et al.</i>, 1992</p>
<p style="text-align: center;">Topazolina</p> 	<p><i>Gleditsia triacanthos</i> <i>Erythrina falcata</i></p>	<p>Mohammed <i>et al.</i>, 2014 Oliveira <i>et al.</i>, 2014</p>
<p style="text-align: center;">Vicinina - 1</p> 	<p><i>Glycyrrhiza glabra</i></p>	<p>Asada <i>et al.</i>, 1998</p>
<p style="text-align: center;">Xambioona</p>		

	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 1996
Wighteona		
	<i>Caragana alatica</i> <i>Caragana alatica</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Caragana alatica</i>	Yuldashev <i>et al.</i> , 1999; Yuldashev & Batirov <i>et al.</i> , 2000 Li <i>et al.</i> , 2000 Butayarov <i>et al.</i> , 1999
Vistina (Afromosina-7-O-β-D-glicopiranosídeo)		

2.6 *Maclobium acaciifolium*

O gênero *Maclobium*, pertencente à Fabaceae, está classificado na subfamília Caesalpinioideae com cerca de 80 espécies arbóreas ou arbustivas. As espécies desse gênero podem ser encontradas na América Central (Honduras, Costa Rica e Panamá) e principalmente na América do Sul (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela) nas margens dos rios, igarapés, praias ou em terra firme. No Brasil, está presente nas regiões Norte, nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Roraima, no Nordeste com o estado do Maranhão e no Centro-Oeste, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Fabaceae em *Flora do Brasil 2020*).

Maclobium acaciifolium é conhecida popularmente como arapari, sendo descrita a sua presença em igapós e várzeas. É uma árvore de grande porte e vivência de aproximadamente 500 anos, podendo atingir até 30 m de altura e 150 cm de diâmetro (RIBEIRO, 2013).

Na última década, houve a produção de trabalhos destacando a influência do desmatamento de *M. acaciifolium* em relação com o meio ambiente, visando o controle da sua exploração por ser árvore madeireira (SHONGART, 2008; WITTMANN *et al.*, 2009) e mesmo sua morte quando seu habitat natural é modificado (ASSAHIRA, 2014). Barnett *et al.* (2015) descrevem em seu trabalho, a redução de macacos, papagaios e esquilos que se alimentam dos frutos de *M. acaciifolium* quando esses frutos se encontram infestados por colônias de formigas da espécie *Pseudomyrmex viduus*.

Na literatura atual, é encontrado somente um trabalho de caráter químico, onde Behrens *et al.* (2006) quantificaram os constituintes majoritários dos óleos das sementes

de *M. acaciifolium*, encontrando ácido palmítico, ácido linoléico, ácido lignocérico, ácido mirístico e ácido eicosanóico (C_{20:1}).

3 JUSTIFICATIVA

M. acaciifolium é uma das inúmeras espécies da Amazônia que não possuem estudo químico aprofundado e não se conhece nenhum efeito biológico dos seus constituintes. O estudo químico de seus extratos proporcionará a descoberta de substâncias para realizar estudos biológicos onde serão avaliados quanto ao teor tóxico antibacteriano, tóxico para *Artemia salina* e antioxidante, as quais poderão gerar patentes, além de publicação dos resultados em revistas científicas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar os metabólitos secundários dos extratos de flores e folhas de *Macrobium acaciifolium* e avaliar as atividades antioxidante, tóxica e antibacteriana de seus extratos.

4.2 Objetivos Específicos

- Fracionar os extratos de *M. acaciifolium* por meio de técnicas cromatográficas, isolar e identificar as substâncias presentes.
- Avaliar o potencial tóxico de extratos de *M. acaciifolium* sobre *Artemia salina*;
- Avaliar o potencial antioxidante de extratos, frações e substâncias isoladas frente aos ensaios químicos como o radical DPPH e o íon de Fe³⁺/Fenantrolina;
- Avaliar os extratos quanto ao potencial antibacteriano contra cepas de micro-organismos patógenos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta das Partes Vegetais

Foi realizada apenas uma coleta das folhas, galhos e flores de *Macrobium acaciifolium* na reserva Ducke – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em 17/06/09 e a exsicata foi depositada no Herbário do INPA sob o número 258676.

5.2 Preparo dos Extratos

As partes vegetais foram secas em estufa de ventilação a 50° até peso constante. Quando secaram, as folhas foram cortadas com tesoura e pulverizadas em moinho de facas, assim como as flores. Os galhos foram cortados com terçado e triturados em moinho dentado de grande porte.

Com o material moído (folhas, flores ou galhos) em um erlenmeyer, adicionou-se hexano (Hex) com volume suficiente para preencher todo o material, o qual em seguida, foi levado ao ultrassom por 20 min.

Terminados os 20 min. de extração, o material foi filtrado e esse processo foi realizado por 3 vezes no material vegetal moído (torta), o qual foi reservado para posterior extração com o próximo solvente (Figura 4).

Para a obtenção do extrato, o filtrado foi concentrado em evaporador rotativo e transferido para um frasco de vidro com a massa devidamente anotada e alocado na capela para a secagem final do restante de solvente, obtendo-se então, o extrato hexânico.

Visando obter a extração com o solvente metanol (MeOH), a torta foi submetida ao mesmo processo de extração, agora com esse solvente. E de modo semelhante, a extração com água destilada, gerando o extrato aquoso e o descarte do resíduo.

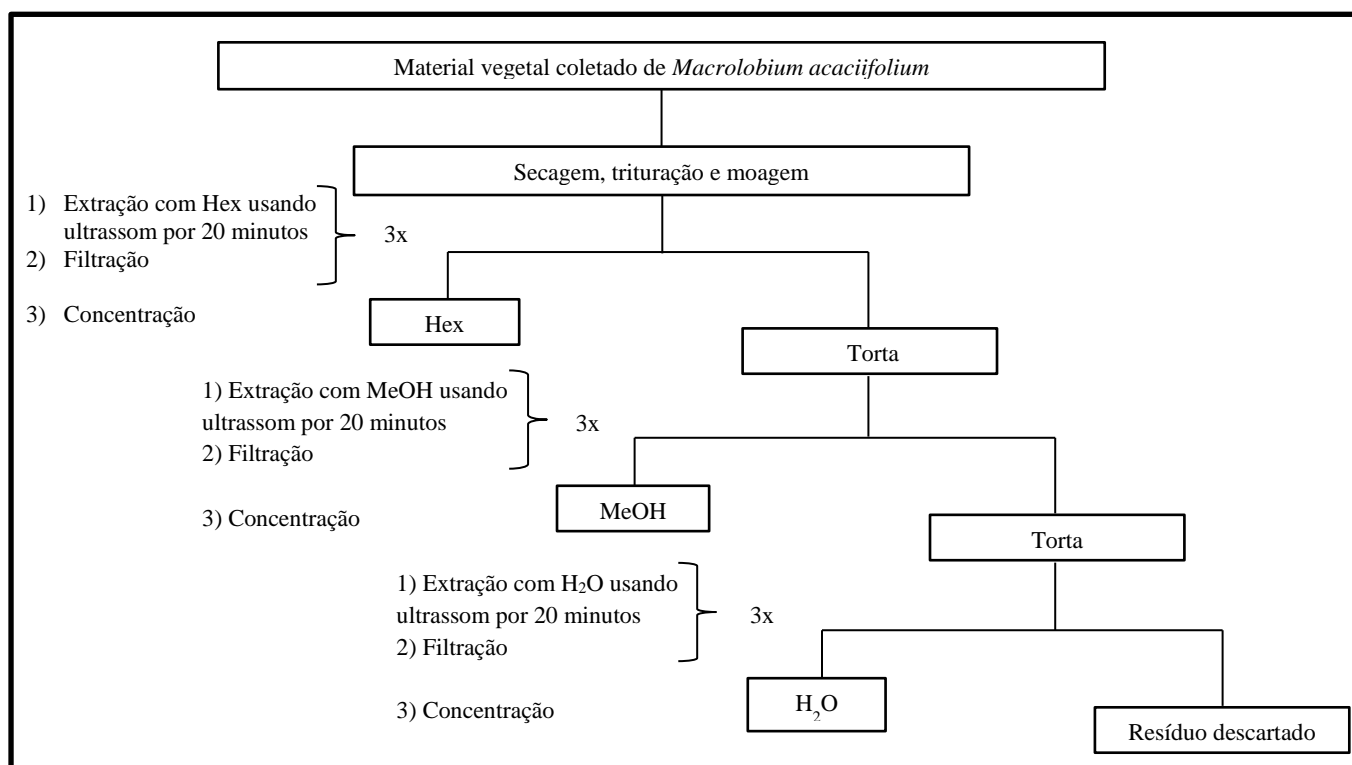


Figura 4. Fluxograma da preparação dos extratos de *M. acaciifolium*.

5.3 Ensaio de Toxicidade Frente ao Microcrustáceo *Artemia salina*

Para o ensaio foi utilizado como meio de crescimento uma solução salina (sal marinho) 3,8‰ e para a eclosão, adicionou-se 10 mg de cistos de *A. salina*. As condições de crescimento utilizadas foram: temperatura de 27 a 30 °C e iluminação em lâmpada fluorescente, por 48 horas. Após esse período, transferiram-se as larvas para microplacas de 24 poços, sendo distribuídas 10 larvas de *A. salina* para cada poço. Cada placa continha o controle da solução salina, o controle do solvente utilizado e os poços a que são adicionados os extratos em teste, todos em triplicata. As placas com as larvas de *A. salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente.

Após esse período, contabilizou-se o número de larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles quanto no teste. A análise foi feita na concentração de 1000 µg/mL, e não foi necessário encontrar a Concentração Letal de 50% (CL₅₀).

5.4 Atividade Antioxidante

5.4.1 Ensaio com o radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Preparou-se a solução solubilizando 2,8 mg do DPPH• em 1 mL de DCM e avolumando com MeOH até 100 mL. Dissolveu-se o ácido ascórbico (utilizado como parâmetro antioxidante) em água deionizada nas seguintes concentrações: 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL. Utilizou-se a solução de DPPH• na concentração de 28 µg/mL.

Para a preparação da curva do DPPH•, colocaram-se 990 µL da solução 2,8 mg/L do mesmo em 6 micro-tubos. A esses, adicionaram-se 10 µL da solução de ácido ascórbico respectivamente a 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL e no último micro-tubo, somente 10 µL de água deionizada. Após 30 min., realizaram-se as leituras (triplicata) das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm.

Após a verificação da linearidade da curva de calibração, adicionaram-se 10 µL do extrato em teste (concentração de 500 µg/mL) em 990 µL da solução 28 µg/mL de DPPH•. Realizaram-se as leituras das absorvâncias em 517 nm no espectrofotômetro, e após 30 minutos de reação, leram-se novamente. Comparou-se a variação da absorvância dos extratos com a do ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante. A atividade antioxidante é comparada com os valores da Tabela 2.

Tabela 2. Escala para interpretação da atividade antioxidante (Martins *et al.* 2014).

Análise da atividade antioxidante (mg de extrato/mg de ácido ascórbico)	Escala de comparação
Menor que 1,0	Muito ativo
Entre 1,1 e 2,0	Ativo
Entre 2,1 e 3,0	Atividade moderada
Maior que 3,1	Inativo

5.4.2 Ensaio com o Fe^{3+} em complexo com a fenantrolina

Para o ensaio, primeiramente preparou-se uma solução tampão com 4,7628 g de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) solubilizado em 950 mL de água deionizada em um balão volumétrico. Após a solubilização, adicionou-se 3,7 mL de ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) e completou-se o volume para 1 L (solução com pH 4,5).

Preparada a solução de acetato de sódio, solubilizou-se 0,25 g de 1,10-fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) com essa solução em balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com a solução tampão.

Em seguida, preparou-se em um balão volumétrico a solução de sulfato de ferro amoniacal [$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$] solubilizando 8,6344 g do mesmo em uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1% (v/v) o qual foi avolumada para 1 L com essa mesma solução.

Utilizou-se para a curva analítica as mesmas concentrações e volume de soluções de ácido ascórbico (agente antioxidante) do teste com o radical DPPH. Porém, colocou-se nos tubos de ensaio, 10 μL da solução de sulfato de ferro amoniacal com 980 μL de solução de fenantrolina 0,25%. Realizou-se as leituras no espectrofotômetro a 508 nm após o tempo de reação de 60 min.

Feita a calibração da curva analítica, testou-se os extratos com alíquotas de 10 μL , solubilizados com seus respectivos solventes a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Adicionou-se essas alíquotas aos tubos de ensaio com 10 μL da solução de ferro amoniacal a 1 mg/mL e 980 μL de fenantrolina 0,25%. Realizaram-se as leituras (triplicata) no espectrofotômetro a 508 nm após o tempo de reação de 60 min. As equivalências foram comparadas com a Tabela 2, para expressar o potencial.

5.5 Atividade antibacteriana pelo método de microdiuição

Os microrganismos utilizados nestes testes foram doados pelo Laboratório de Micro-Organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz.

O ensaio microbiológico foi realizado em triplicata para cada extrato e as leituras foram feitas em um período de dois dias. Foram testadas o potenciais microbiológico de 19 cepas, as quais estão listadas na Tabela 3, juntamente com suas siglas. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços e a determinação do crescimento microbiano, determinado por leitura em espectrofotômetro segundo metodologia adaptada de CLSI, 2012.

Prepararam-se os inóculos com o auxílio de uma alça calibrada descartável, onde colônias bacterianas provenientes de culturas puras de 24 horas foram inoculadas em caldo Müeller Hinton e homogeneizadas. Comparou-se e ajustou-se a turvação do inóculo à turvação do tubo 0,5 da escala de MacFarland, que corresponde à uma suspensão contendo aproximadamente $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

Em seguida, diluiu-se cada microrganismo-teste na proporção de 1:20 e 10 µL de cada foi inoculado nas placas. Efetuaram-se diluições sucessivas do extrato (500, 250, 125, 62,25, 31,12 e 15,5 µg/mL), e em seguida, adicionaram-se 100 µL de cada diluição em cada poço da placa. Incubaram-se as placas a 37°C por 24 horas e após esse período, foram lidas em espectrofotômetro a 625 nm e os valores de crescimento das bactérias obtidos e analisados.

Realizaram-se as leituras das absorbâncias antes das placas serem levadas à estufa por 24 horas e após este período de tempo. Utilizou-se como controle positivo o antibiótico oxitetraciclina a 125 µg/mL e como controle negativo, o próprio meio de cultura.

Tabela 3. Lista de micro-organismos testados contra o potencial inibitório dos extratos de *M. acaciifolium*.

ATCC	Micro-organismo	Sigla
19606	<i>Acinetobacter baumannii</i>	AB
11036	<i>Aeromonas hydrophila</i>	AH
10231	<i>Candida albicans</i>	CA
22019	<i>Candida parapsilosis</i>	CP
8090	<i>Citrobacter freundii</i>	CE
15947	<i>Edwardsiella tarda</i>	ET
13047	<i>Enterobacter cloacae</i>	EnCl
29212	<i>Enterococcus faecalis</i>	EnF
11775	<i>Eschericia coli</i>	EC
13883	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KP
8019	<i>Morganella morganii</i>	MM
10145	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA
6919	<i>Propionibacterium acnes</i>	PrAc
13525	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PF
13076	<i>Salmonella enterica</i>	SE
13880	<i>Serratia marcescens</i>	SM
12600	<i>Staphylococcus aureus</i>	StAu
12228	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	StEp
9610	<i>Yersinia enterocolitica</i>	YE

Os valores médios das absorvâncias dos extratos para a triagem na concentração apenas de 1000 µg/mL estão dispostos na Tabela 4, abaixo. Os resultados dos crescimentos microbiológicos (Cálculo 1) foram obtidos para cada extrato pela subtração do valor médio do segundo dia pelo primeiro dia (Etapa 1), no qual esse valor foi equiparado com o valor médio do controle negativo, onde houve 100% de crescimento (Etapa 2). Lembrando que o experimento foi realizado em triplicata, 3 valores de absorvâncias foram obtidos para cada extrato. Com esses valores foi possível obter a média das absorvâncias, representada em valor único para cada extrato contra uma cepa.

Cálculo 1. Obtenção da porcentagem de crescimento

Etapa 1:	$AA_{MD2} - AA_{MD1} = AA_{CR}$
Etapa 2:	$\% CR = \frac{100 * AA_{CR}}{Ctrl-}$

Legenda: AA = Absorvância, MD = Média do dia, CR = Crescimento, Ctrl - = Controle negativo.

Tabela 4. Absorbâncias dos extratos na concentração de 1000 µg/mL frente ao crescimento bacteriano.

Média das leituras		1	2	3	4	5	6	Ctrl -	Ctrl +
	AB	0,054	0,120	0,146	0,070	0,155	0,160	0,243	0,012
	AH	0,005	0,108	0,095	0,008	0,034	0,057	0,084	0,014
	CA	0,013	0,104	0,095	0,054	0,061	0,098	0,060	0,026
	CP	0,025	0,108	0,128	0,043	0,040	0,062	0,097	0,075
	CF	0,420	0,333	0,263	0,379	0,370	0,437	0,366	0,003
	ET	0,067	0,053	0,097	0,034	0,132	0,167	0,200	0,007
	EnCl	0,421	0,485	0,401	0,376	0,436	0,547	0,402	0,005
	EnF	0,006	0,045	0,079	0,017	0,017	0,052	0,034	0,015
	EC	0,535	0,278	0,378	0,450	0,292	0,377	0,317	0,005
	KP	0,391	0,181	0,216	0,173	0,176	0,221	0,277	0,012
	MM	0,410	0,120	0,139	0,248	0,189	0,193	0,232	0,013
	PA	0,511	0,286	0,343	0,423	0,289	0,394	0,298	0,008
	PF	0,448	0,207	0,405	0,374	0,355	0,385	0,266	0,018
	SE	0,402	0,213	0,379	0,319	0,327	0,356	0,269	0,017
	SM	0,661	0,753	0,616	0,684	0,687	0,886	0,573	0,015
	StAu	0,004	0,061	0,116	0,022	0,127	0,116	0,159	0,011
StEp	0,496	0,319	0,236	0,377	0,340	0,419	0,428	0,011	
YE	0,007	0,087	0,109	0,018	0,022	0,076	0,050	0,016	
PrAc	0,009	0,191	0,167	0,021	0,025	0,085	0,055	0,014	

Legenda: Extrato hexânico das folhas (1). Extrato metanólico das folhas (2). Extrato hexânico dos galhos (3). Extrato metanólico dos galhos (4). Extrato hexânico das flores (5). Extrato metanólico das flores (6).

Os valores médios das absorbâncias para o teste de microdiluição buscando a concentração inibitória mínima (CIM) estão dispostos na Tabela 5, abaixo.

Tabela 5. Absorbâncias dos extratos em várias concentrações.

		Concentração µg/mL								
		1000	500	250	125	62,5	31,25	Ctrl +	Ctrl -	
Média das leituras	1	AB	0,1894	0,1964	0,1862	0,1939	0,1918	0,1975	0,0165	0,2263
		AH	0,0472	0,2502	0,2315	0,3021	0,2630	0,2648	0,0148	0,3654
		CA	0,0824	0,0676	0,0813	0,0626	0,0685	0,0528	0,0670	0,0659
		CP	0,0577	0,0443	0,0328	0,0314	0,0317	0,0333	0,0438	0,0514
		ET	0,0907	0,2099	0,1871	0,1906	0,1896	0,1937	0,0037	0,1673
		EnF	0,0384	0,4283	0,3719	0,3673	0,3838	0,3968	0,0116	0,5334
	2	YE	0,1038	0,0695	0,0834	0,0772	0,0764	0,0801	0,0200	0,0528
		AB	0,2587	0,1904	0,1952	0,1962	0,2477	0,1948	0,0246	0,2063
	4	ET	0,1701	0,2281	0,2210	0,1985	0,1980	0,1981	0,0016	0,2463
		AB	0,2077	0,1862	0,2004	0,2036	0,2082	0,2082	0,0182	0,2246
		AH	0,1570	0,3564	0,2571	0,3383	0,1471	0,2868	0,0086	0,2498
		CP	0,0279	0,0318	0,0380	0,0301	0,0314	0,0310	0,0457	0,0406
		ET	0,0636	0,2442	0,2307	0,2148	0,2173	0,2266	0,0036	0,2649
		EnF	0,1540	0,4456	0,4508	0,4343	0,4284	0,4239	0,0125	0,5415
	5	YE	0,0442	0,0692	0,0759	0,0805	0,0759	0,0795	0,0056	0,0707
		AH	0,0633	0,2214	0,2101	0,2003	0,2270	0,1704	0,0052	0,2094
		CP	-0,0907	0,0404	0,1606	0,0320	0,0348	0,0367	0,0375	0,0307
		EnF	-0,1014	0,3983	0,2821	0,3988	0,3699	0,4063	0,0014	0,5076
		YE	-0,0029	0,0416	0,0664	0,0758	0,0693	0,0848	0,0147	0,0357

Legenda: Extrato hexânico das folhas (1). Extrato metanólico das folhas (2). Extrato metanólico dos galhos (4). Extrato hexânico das flores (5).

5.6 Análise Cromatográfica dos Extratos

Analisaram-se os extratos de *Macrolobium acaciifolium* por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC - Whatman™) e como eluente, fizeram-se uso dos diversos solventes orgânicos em diversas proporções, conforme a polaridade do extrato analisado.

Utilizou-se como reveladores físicos para visualização dos constituintes químicos dos extratos, as luzes ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm e como reveladores químicos, anisalaldeído sulfúrico, sulfato cérico [Ce(SO₄)₂], Reagente de Dragendorff, cloreto de alumínio (AlCl₃) e cloreto férrico (FeCl₃).

5.7 Fracionamento dos Extratos

5.7.1. Escolha dos extratos para o fracionamento

Após a análise em CCDC dos perfis químicos, os extratos que se apresentaram interessantes quimicamente (presença de terpenos, flavonoides ou alcaloides) ou atividades biológicas, foram fracionados.

5.7.2 Extratos Metanólicos

Iniciou-se o fracionamento dos extratos metanólicos por meio de partições líquido-líquido para obtenção de fases seletivas para substâncias com afinidade com cada solvente. Para as partições, solubilizaram-se os extratos metanólicos em MeOH na proporção 1:50, m/v (g/mL) e em seguida adicionou-se água destilada no mesmo volume de MeOH.

Colocou-se o extrato solubilizado em MeOH/H₂O em um funil de separação, no qual adicionou-se diclorometano no mesmo volume da solução do extrato (volume de MeOH + volume de H₂O). Em seguida, agitou-se levemente o funil (com a torneira para cima e aberta no sentido oposto do rosto) para promover o contato das substâncias que tenham afinidade com o solvente diclorometano. Feita a agitação, deixou-se o funil em repouso (com a torneira para baixo) até a visualização de duas fases: uma hidroalcoólica (superior) e outra diclorometânica (inferior).

Assim que separadas, removeu-se a fase diclorometânica primeiramente (por densidade, essa fase ficou embaixo) e reservou-a para concentração em evaporador rotativo. A fase hidroalcoólica (ainda dentro do funil de separação) foi extraída mais vezes com diclorometano ou até a visual falta de coloração do solvente (solvente transparente e claro), encerrando assim, a extração com diclorometano.

Para continuidade, fez-se o uso do solvente acetato de etila na extração, seguindo o mesmo modo, encerrando na terceira extração ou quando não fosse mais notada presença de substâncias extraídas no solvente. Por diferença de densidade, a fase hidroalcoólica ficou em baixo, enquanto que a acetato de etila ficou em cima.

Por último, utilizou-se na extração o *n*-butanol que gerou a fase *n*-butanólica (fase superior no funil de separação), devido à formação de espuma durante o processo de concentração em evaporador rotativo do extrato metanólico, o que caracteriza presença de saponinas. O que restou na fase hidroalcoólica foi concentrada assim como as demais fases.

Com as fases concentradas, efetuaram-se os fracionamentos nas colunas cromatográficas abertas ou filtrantes dependendo de uma análise prévia em CCDC.

5.8 Purificação e Isolamento dos Metabólitos Secundários

Após os fracionamentos cromatográficos em colunas abertas, outros processos para purificação das substâncias foram necessários, tais como a Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) ou High Performace Liquid Chromatography

(HPLC), esse último não foi utilizado para purificação neste trabalho, apenas para análise no espectrômetro de massas.

5.8.1 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

A CCDP é utilizada quando as substâncias têm absorções nos comprimentos de onda UV 254 nm e 365 nm. Prepararam-se as placas com Sílica gel 60 para cromatografia em camada fina preparativa da marca Macherey-Nagel e a quantidade de eluições dependeu da análise prévia em CCDC. Para a confecção das placas, solubilizaram-se 100 g da sílica em 300 mL de água destilada. Assim que solubilizados e sem visualização de bolhas, aplicou-se a sílica em placas de vidro de 20 x 20 cm.

Aplicada a sílica na placa, deixou-se a mesma em bancada para evaporação parcial da água. Antes de usar, levou-se a placa à estufa por 1 h a 100 °C para evaporação total da água, fazendo assim ativação da sílica. Após ativação, aplicou-se a amostra aplicada na sílica com o auxílio do capilar, deixando uma distância de 1 cm da base para não entrar em contato com o eluente.

É recomendado, no máximo 25 mg de amostra para a placa de 20x20 cm para camada de sílica com espessura de 0,5 mm. Após a eluição ou série de eluições, marcou-se as áreas onde as substâncias estiverem na placa para a remoção manual das substâncias presentes na sílica. Recolheram-se as mesmas separadamente e extraiu-se com os solventes mais adequados. Realizou-se a extração filtrando-as com auxílio de funil de placa porosa, kitassato e vácuo. Após a filtração, concentrou-se o filtrado ou alocou na capela para evaporação do solvente.

5.8.2 Extração e análise cromatográfica dos extratos

Após a coleta, as partes vegetais foram separadas e secas em estufa com ventilação à 50 °C por 3 dias para folhas e flores e por 5 dias para galhos. Quando secos, as folhas e flores foram cortados em partes menores para moagem em moinho de facas e os galhos foram triturados em moinho de grande porte. As massas dos materiais obtidos foram 464 g de folhas, 80 g de flores e 1.127 g de galhos.

Os extratos hexânicos (Imagem 1) foram eluídos com mistura de hexano/acetato de etila (hex/AcOEt) 8:2 (v/v). A luz visível (A) mostrou somente manchas com cores amarelas e verdes, similares a carotenoides e clorofilas citadas por Streit *et al.* (2005) como absorvedoras de radiação nos comprimentos de onda entre 390 e 760 nm. Quando visualizados no comprimento de onda de 254 nm (B), os extratos mostraram machas

azuladas, resultado da absorção de grupos com ligações duplas e/ou átomos com elétron livres. No comprimento de onda de 365 nm (C) foi possível verificar fluorescências de cor azul no mesmo Rf para os três extratos. As mesmas aparecem próximas ou em cima das manchas visualizadas no 254 nm, mas não parecem ser absorção das mesmas moléculas. Pela coloração das fluorescências, pode-se inferir tratar-se de cumarinas, no entanto, não com certeza, pois outros grupos cromóforos com duplas ligações conjugadas e/ou sem anéis aromáticos absorvem com essas características, como algumas classes de flavonoides, alcaloides, diterpeno e tocotrienóis (CHOUDHARY *et al.*, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*; DURIC *et al.*, 2015; HOUGHTON, 2008). A nebulização com AlCl_3 (D) visualizada na UV 365 nm apenas diminuiu a intensidade das fluorescências deixando levemente esverdeada.

Não ocorreu a mudança de cor para castanho, verde ou negro com o reagente FeCl_3 (E), indicando ausência de flavonoides ou uma baixíssima concentração dessa classe nos extratos hexânicos. As revelações com anisaldeído (F) e sulfato cérico (G) mostraram manchas no meio e na parte superior da placa, com cores roxas para anisaldeído e marrom para sulfato cérico. Essas cores indicam a presença de esteroides ou terpenoides. A revelação com reagente de Dragendorff para verificação de alcaloides ou moléculas nitrogenadas, não mostrou coloração alguma, nem para laranjado (que indicaria presença de alcaloides) nem para outra cor.

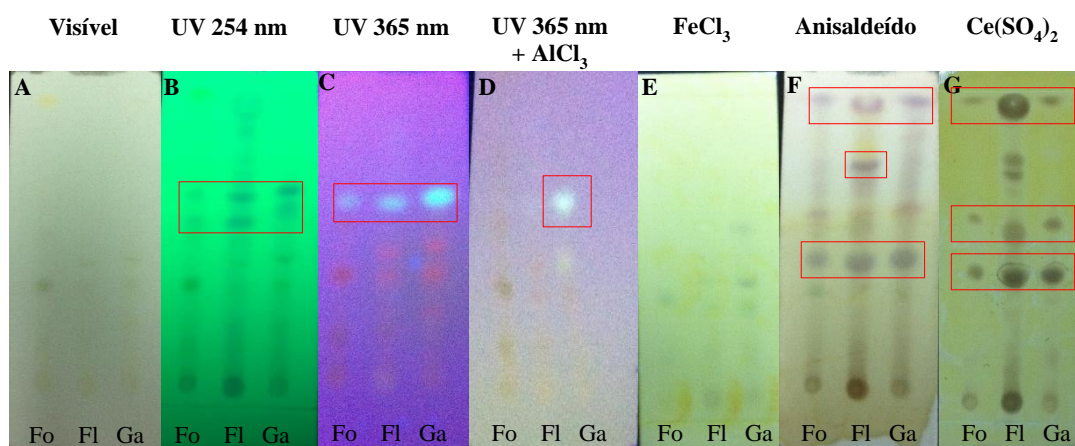


Imagem 1. Extratos hexânicos das folhas (Fo), flores (Fl) e galhos (Ga) eluídos com hexano/acetato de etila 8:2 (v/v).

5.8.2.1 Fracionamento do extrato metanólico das flores e isolamento de Mac1

O extrato metanólico foi o primeiro a secar após a extração, logo foi o primeiro a ser fracionado, visto que o biomonitoramento não foi o alvo deste trabalho, mas sim a bioprospecção.

O extrato metanólico das flores (4,38 g) foi submetido a uma partição líquido-líquido, onde foi solubilizado em 100 mL de uma solução com proporção de MeOH/H₂O 1:1. Para a extração com DCM, 300 mL foram usados, sendo 50 mL por extração, além da adição de 150 mL de MeOH/H₂O 1:1. Para a extração com AcOEt, 500 mL foram usados, sendo 100 mL por extração, além da adição de 150 mL de MeOH/H₂O 1:1.

Devido a presença de partículas insolúveis e com aspecto de espuma e gel, o processo de extração foi realizado com BuOH, onde 400 mL foram usados na extração além de 150 mL de MeOH/H₂O 1:1.

As fases BuOH e MeOH/H₂O não solubilizaram em nenhum solvente orgânico e água, logo não foi possível fazer a cromatografia dos mesmos. A fase DCM não mostrou concentração de substâncias de interesse químico frente aos reagentes químicos.

Devido à concentração de flavonoides a fase AcOEt foi fracionada em coluna aberta (1,8 x 88 cm) em Sephadex LH-20 de modo isocrático com MeOH 100%. Foram recolhidas 29 frações, das quais foram reunidas as frações 1-3, 4-5, 6-9, 10-13, 14-15, 16-18, 19-22, 23-25, e 26-29. Essas frações receberam as iniciais Mf2, pelo nome da espécie, *Macrolobium* (M), pela parte estudada, flores (f) e pela fase AcOEt (2).

A fração Mf2.10-13 (43 mg) foi fracionada em coluna aberta em sílica (17,9 g) com os sistemas DCM/MeOH 8:2 até MeOH/H₂O 9:1. Os volumes e frações correspondentes encontram-se na Tabela 6. Foram recolhidas 22 frações com 450 mL cada e 400 mL de sistema total, além de volume morto de 35 mL.

Tabela 6. Sistemas da coluna de sílica da fração Mf2.10-13.

SISTEMAS	VOLUMES (mL)	FRAÇÕES
DCM/MeOH 8:2	150	1-8
DCM/MeOH 7:3	50	9-11
DCM/MeOH 1:1	100	12-13
MeOH 100%	100	14-18
MeOH/H ₂ O 9:1	50	19-22

A fração Mf2.10-13.7-13 foi solubilizada em MeOH para refração e observou-se que uma quantidade não foi solúvel no solvente, mas solubilizou-se com água. O solubilizado em água (cor laranja) não mostrou presença de substâncias de interesse, enquanto que o solubilizado em MeOH (cor amarela intensa) ficou com a concentração de flavonoides frente aos reagentes FeCl₃ e AlCl₃ e foi fracionado em coluna aberta (1 cm x 30 cm) com Sephadex LH-20 em modo isocrático com MeOH 100% e 25,5 mg de amostra.

A fração Mf2.10-13.7-13.2 (11 mg) foi fracionada em coluna aberta de sílica (4 g e 1,2 cm x 7 cm) para possível purificação e remoção de substâncias que ficavam na origem da aplicação na placa cromatográfica. Os sistemas foram DCM/MeOH 8:2 até MeOH 100% e estão mostrados na Tabela 7 abaixo. O volume morto foi de 10 mL e os volumes das frações foram de 20 mL com exceção da fração 0, que foi de 10 mL.

Tabela 7. Sistemas da coluna de sílica da fração Mf2.10-13.7-13.2.

SISTEMAS	VOLUMES (mL)	FRAÇÕES
DCM/MeOH 8:2	60	0-3
DCM/MeOH 6:4	50	4-5
DCM/MeOH 1:1	20	6
MeOH 100%	20	7

Optou-se então, por reunir as frações de 2-4 (11 mg) de Mf2.10-13.7-13.2 e realizar uma CCD-P, o qual foi eluído com DCM/MeOH 8:2 por duas vezes, onde a fração 3 foi chamada de **Mac1**.

5.8.2.2 Fracionamento do extrato metanólico das folhas e isolamento de Mac2, Mac3 e Mac4

O extrato metanólico das folhas (47 g) foi submetido a uma partição líquido-líquido. O mesmo foi solubilizado em 1 L de uma solução MeOH/H₂O 1:1, no entanto apenas 1/3 da massa total aparentou solubilizar, o restante gerou partículas em forma de gel granuloso de cor marrom. Para a extração com DCM, 6 L foram necessários para não visualizar substâncias sendo extraídas com a coloração verde, assim como a adição de 600 mL de MeOH/H₂O 1:1. Para a extração com AcOEt, 11 L foram utilizados para a obtenção da fase AcOEt, além da adição de 2,4 L de MeOH/H₂O 1:1.

Devido a presença de fluorescências frente o AlCl_3 , a fase DCM (1,1 g) do extrato metanólico das folhas foi fracionado. Como primeiro fracionamento em coluna aberta (2,7 cm x 30 cm), a sílica (94,5 g) foi escolhida como adsorvente, além da fase móvel DCM/AcOEt 95:05 até AcOEt/MeOH 1:1. O volume morto foi de 200 mL e no total, 2,6 L de sistema foram passados na coluna e 12 frações foram recolhidas com 200 mL cada. O volume de cada sistema e as correspondentes frações estão representados na Tabela 8 abaixo. As frações receberam as iniciais Mfo1, recebendo o nome da espécie (M), a parte vegetal (fo) e a fase DCM (1).

Tabela 8. Sistemas da coluna de sílica da fase DCM do extrato metanólico das folhas.

SISTEMAS	VOLUMES (mL)	FRAÇÕES
DCM/AcOEt 95:05	400	0-1
DCM/AcOEt 9:1	400	2-3
DCM/AcOEt 8:2	400	4-5
DCM/AcOEt 7:3	400	6-7
DCM/AcOEt 1:1	400	8-9
AcOEt 100 %	400	10-11
AcOEt/MeOH 1:1	200	12

A fração Mfo1.7-9 (4 mg) foi submetida a uma CCD-P em CHCl_3 /acetona 9:1, eluída 3 vezes. Também realizada uma coluna aberta (1,7 cm x 23 cm) de sílica (25 g) da fração Mfo1.10 (30 mg). Os sistemas utilizados e as correspondentes frações estão apresentados na Tabela 9, iniciando com AcOEt 100% até MeOH 100%. O volume morto foi de 50 mL com o total de 480 mL de sistema passados pela coluna e 7 frações foram coletadas de volumes variados.

Tabela 9. Sistemas da coluna de sílica da fração Mfo1.10.

SISTEMAS	VOLUMES (mL)	FRAÇÕES
AcOEt 100%	80	0
AcOEt/MeOH 95:05	100	1-2
AcOEt/MeOH 9:1	100	3-4
AcOEt/MeOH 7:3	100	5-6
MeOH 100%	100	7

As frações de 1-4 de Mfo1.10.1-4 foram reunidas e refracionadas em coluna aberta (1,3 cm x 32 cm) de sílica (20 g) com massa de 14,2 mg. Os sistemas foram misturas de CHCl₃/acetona 9:1 até MeOH 100% com volume morto de 40 mL. O volume total de sistema passado pela coluna foi de 500 mL e os volumes das 10 frações coletadas foram de 50 mL e estão todos representados na Tabela 10.

Tabela 10. Sistemas da coluna de sílica da fração Mfo1.10.1-4.

SISTEMAS	VOLUMES (mL)	FRAÇÕES
CHCl ₃ /acetona 9:1	100	0-1
CHCl ₃ /acetona 8:2	50	2
CHCl ₃ /acetona 75:25	100	3-4
CHCl ₃ /acetona 6:4	50	5
CHCl ₃ /acetona 1:1	50	6
acetona 100 %	50	7
acetona/MeOH 1:1	100	8-9
MeOH 100%	50	10

Foi realizada uma CCD-P da fração Mfo1.10.1-4.3 (3 mg) apenas para separação das duas substâncias uma na fração 2 e outra na fração 4. O sistema de eluição foi CHCl₃/acetona 9:1 por 3. Dessa forma a fração Mfo1.10.1-4.2 foi chamada de Mfo1.10.1-4.2-3 após adição da substância que estava na fração 3. A fração Mfo1.10.1-4.2-3 foi chamada de **Mac2**.

Deu-se continuidade ao fracionamento da fase DCM com uma coluna aberta (2 cm x 27 cm) de sílica (50 g) da fração Mfo1.11 (240 mg). Os sistemas utilizados foram AcOEt 100% até MeOH 100%, com volume morto de 90 mL com volume total de sistema passado de 900 mL, onde seus volumes e as 7 frações correspondentes estão representados na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11. Sistemas da coluna de sílica da fração Mfo1.11.

SISTEMAS	VOLUMES (mL)	FRAÇÕES
AcOEt 100%	200	1
AcOEt/MeOH 95:05	100	2
AcOEt/MeOH 9:1	100	3
AcOEt/MeOH 7:3	200	4
AcOEt/MeOH 1:1	200	5-6
MeOH 100%	100	7

As frações 2, 3 e 4 (Mfo1.11.2-4, com 193 mg) foram reunidas e realizou-se uma SPE para separação dos prováveis flavonoides de outras substâncias que estavam em mistura na fração. A SPE foi feita em cartucho de sílica C₁₈ da qualidade Strada (Phenomenex) 50 g com os sistemas de MeOH até AcOEt/MeOH 95:05. Os volumes de cada sistema e suas 12 frações estão na Tabela 12. Cada fração foi recolhida com 25 mL.

Tabela 12. Sistemas da SPE em sílica C₁₈ da fração Mfo1.11.2-4.

SISTEMAS	VOLUMES (mL)	FRAÇÕES
MeOH 100%	100	1-4
Acetona 100%	100	5-8
CHCl ₃	100	9-12

Foi realizada uma CCD-P da fração Mfo1.11.2-4.1 (70 mg) no sistema AcOEt/CHCl₃/MeOH 47,5:47,5:0,5 recolhendo 7 frações, seguido de outro fracionamento em CCD-P da fração Mfo1.11.2-4.1.6 com o eluente CHCl₃/MeOH 8:2. A fração Mfo1.11.2-4.1.6.1 foi chamada de **Mac3**.

Continuou-se o fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico das folhas e as frações receberam as iniciais semelhantes às da fase DCM, mudando apenas o número, logo ficaram Mfo2. Foi realizado uma coluna aberta de Sephadex LH-20 (3 cm x 49 cm) da fase AcOEt (3 g) no modo isocrático com MeOH 100%. Foram recolhidas 11 frações com volumes variados e esses valores estão representados na Tabela 13.

Tabela 13. Sistemas da coluna em Sephadex LH-20 da fase AcOEt.

SISTEMA	VOLUMES (L)	FRAÇÕES
MeOH 100%	1,65	0 (150 mL), 1 (100 mL), 2 (150 mL), 3 (125 mL), 4 (100 mL), 5 (100 mL), 6 (200 mL), 7 (125 mL), 8 (250 mL), 9 (100 mL), 10 (250 mL)

A fração Mfo2.3 foi escolhida para ser fracionada em coluna aberta (2,5 cm x 32 cm) de Sephadex LH-20 em modo isocrático com MeOH 100%. Os volumes e suas respectivas 7 frações estão na Tabela 14.

Tabela 14. Sistemas da coluna em Sephadex LH-20 da fração Mfo2.3.

SISTEMA	VOLUMES (mL)	FRAÇÕES
MeOH 100%	375	0 (50 mL), 1 (15 mL), 2 (20 mL), 3 (60 mL), 4 (70 mL), 5 (60 mL), 6 (100 mL)

Foi realizado CCD-P das frações 3 e 4 (Mfo2.3.3 e Mfo2.3.4), separadamente, ambas com eluente CHCl₃/MeOH 85:15. Foram recolhidas 7 frações da Mfo2.3.3 e 6 frações da Mfo2.3.4. A fração Mfo2.3.4.3 foi chamada de **Mac4**.

5.8.3 Identificação das substâncias isoladas

O fluxograma dos fracionamentos e isolamentos das substâncias estão mostrados nas Figura 5A e 5B, respectivamente. Para as identificações estruturais, utilizou-se o equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 300 MHz (Fourier 300 - Bruker), presente no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. As substâncias foram dissolvidas em solventes deuterados. As massas exatas das substâncias foram obtidas por Espectrometria de Massas do modo positivo de ionização e com fonte Eletrospray (ESI). Os dados obtidos do RMN foram processados pelo software ACD/NMR Processor Academic Edition, da empresa Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs).

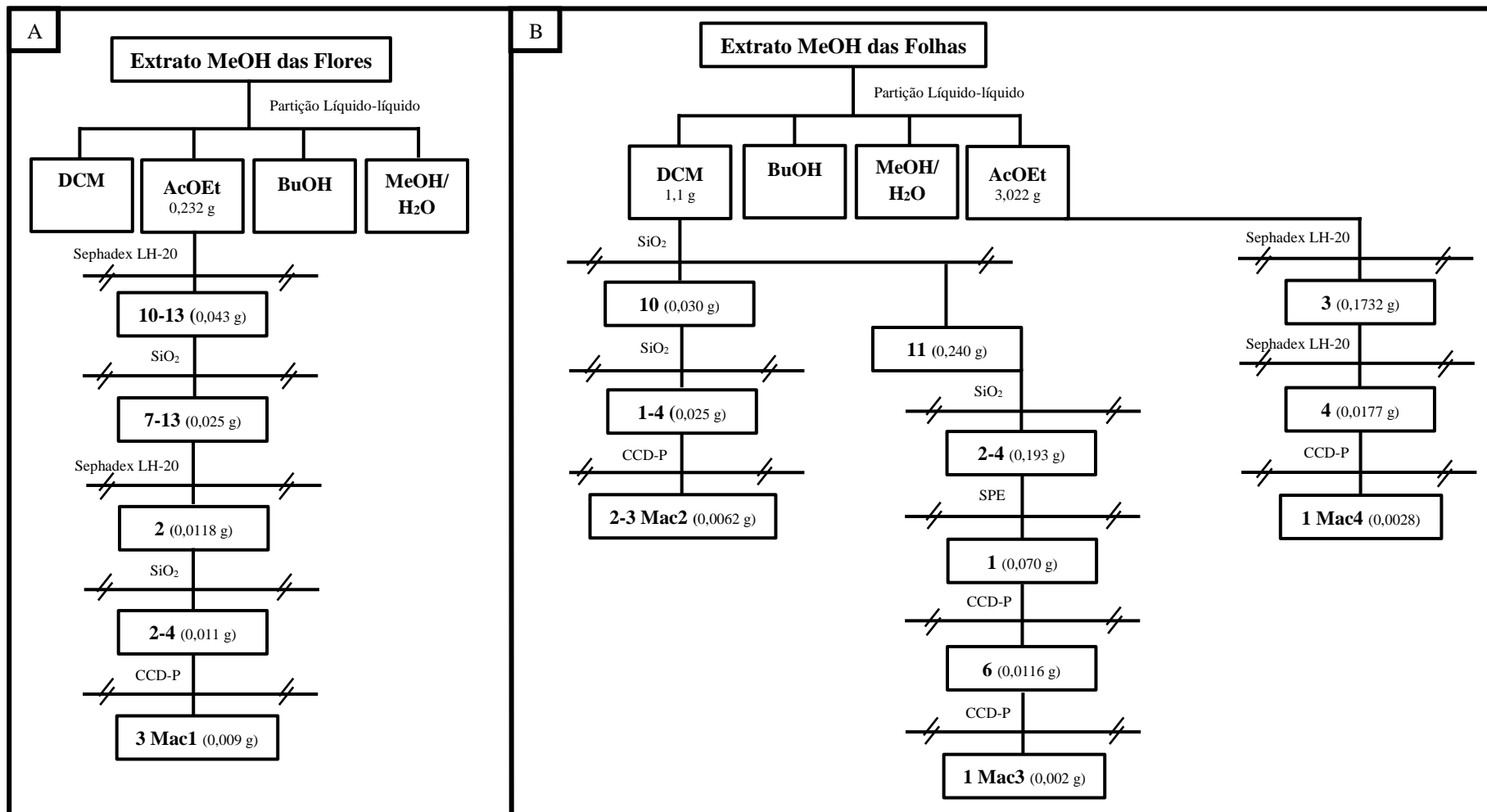


Figura 5. Fluxograma do fracionamento e isolamento de (A) Mac1, (B) Mac2, Mac3 e Mac4.

5.8.4 Lista de equipamentos utilizados

- Balança analítica AY220 (Shimadzu).
- Banho quente modelo 550, série 1012887 (Fisatom).
- Cromatógrafo modelo Prominense UFLC (Shimadzu), equipado com bomba injetora LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPDM-20A e injetor automático SIL-20A.
- Capela modelo Evolution (Permutation).
- Espectrômetro de massas modelo MicroTOF-Q II, fonte ESI (Electrospray), resolução de 17500 (full width at half maximum – FWHM).
- Estufa com circulação e renovação de ar modelo TE-394-2 (TECNAL).
- Lavadora ultrasônica (UNIQUE) modelo USC-2800, frequência de 40 KHz.
- Ressonância Magnética Nuclear (Fourrier-300).
- Rotaevaporador rotativo modelo 802, série 0936113 (Fisatom).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Ensaio de Toxicidade Frente ao Microcrustáceo *Artemia salina*

O ensaio mostrou resultados com baixa mortalidade dos microcrustáceos. A realização do experimento avaliou o potencial dos extratos e permitiu verificar que as maiores taxas não ultrapassaram 50% de mortalidade.

O teste foi realizado em triplicata e a maior mortalidade foi de 47% para o extrato hexânico das folhas (Folhas Hex) numa concentração de 1000 µg/mL, matando 4 indivíduos em dois poços e 5 indivíduos em um poço. A segunda maior porcentagem foi para o extrato metanólico das folhas (Folhas MeOH), com 20% de mortalidade e morte de 2 indivíduos por poço.

Nenhum dos extratos se mostrou ativo na concentração de 120 µg/mL e nas menores concentrações. Todas as porcentagens de mortalidade dos extratos estão na Tabela 15. Os controles negativos (DMSO e H₂O) não mataram indivíduos.

Tabela 15. Porcentagem de indivíduos mortos frente às diferentes concentrações dos extratos de folhas, flores e galhos de *M. acaciifolium*.

Extrato	Concentração (µg/mL)											
	1000		500		250		120		60		30	
Folhas MeOH	2		1		1		0		0		0	
	2	20%	0	7%	1	7%	0	0%	0	0%	0	0%
	2		1		0		0		0		0	
Flores MeOH	1		0		1		0		0		0	
	0	3%	0	0%	0	3%	0	0%	0	0%	0	0%
	0		0		0		0		0		0	
Galhos MeOH	1		0		0		0		0		0	
	0	7%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	1		0		0		0		0		0	
Folhas Hex	5		0		0		0		0		0	
	4	43%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	4		0		0		0		0		0	
Flores Hex	1		0		0		0		0		0	
	1	7%	1	3%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	0		0		0		0		0		0	
Galhos Hex	1		0		0		0		0		0	
	0	3%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	0		0		0		0		0		0	

No trabalho de Anderson *et al.* (1991) é apresentada uma correlação entre a atividade antitumoral e atividade frente a *Artemia salina*, onde extratos que tiveram boas

taxas de mortalidade dos crustáceos também tiveram boa atividade antitumoral. Dessa forma, extratos com boas atividades seriam enviados para testes antitumorais. No entanto, para poder submeter aos ensaios antitumorais, a atividade deveria ser maior que 60% de mortalidade na concentração de 1000 µg/mL. Como isso não ocorreu, os extratos não seguiram para testes antitumorais.

A não toxicidade dos extratos sugere que os mesmos possam ser usados, no futuro, como produtos cosméticos ou fármacos, caso possuam substâncias com tais potências. Esse fato irá ajudar nos futuros testes *in vivo* de possíveis produtos.

6.2 Atividade Antioxidante

6.2.1 Ensaio com o radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O resultado antioxidante frente ao radical DPPH mostrou uma equivalência próxima a do antioxidante padrão ácido ascórbico apenas para o extrato metanólico das folhas, com um valor de 0,749 (em destaque na Tabela 16). A avaliação do potencial antioxidante é feita em comparação com os valores da Tabela 2.

Tabela 16. Resultado da atividade antioxidante dos extratos de folhas, flores e galhos de *M. acaciifolium* frente ao DPPH.

Extrato	Valores médios		
	[DABS ₅₁₇]	[AA] _{eq}	Equiv. (mg extrato/mg ácido ascórbico)
Folhas Hex	0,000 ± 0,003	0,017 ± 0,020	N.A.
Flores Hex	-0,001 ± 0,003	0,015 ± 0,022	N.A.
Galhos Hex	-0,005 ± 0,002	-0,018 ± 0,011	N.A.
Folhas MeOH	0,955 ± 0,004	6,678 ± 0,028	0,749 ± 0,003
Flores MeOH	0,059 ± 0,006	0,433 ± 0,044	N.A.
Galhos MeOH	0,147 ± 0,003	1,047 ± 0,022	N.A.

Legenda: N.A. = não ativo.

Neste experimento, é verificada a capacidade das substâncias antioxidantes dos extratos, capturarem radicais livres e reduzi-los a espécies menos reativas com a adição de um hidrogênio no final da reação. Logo, é possível afirmar com base no resultado obtido, que o extrato metanólico das folhas possui altíssima capacidade de reduzir radicais

livres. Uma vez que a unidade da equivalência é mg extrato/mg ácido ascórbico, quanto mais próximo de 1 for a equivalência, maior a atividade. Neste ensaio, mede-se a equivalência em relação à quantidade de redução realizado pelo ácido ascórbico. Assim, o extrato metanólico das folhas foi o extrato com melhor potencial, tendo uma avaliação de muito ativo por comparação com a Tabela 2 e por isso foi escolhido para realizar o fracionamento.

6.2.2 Ensaio com o Fe³⁺ em complexo com a fenantrolina

Os resultados mostraram que novamente o extrato metanólico das folhas teve um bom potencial antioxidante, com o valor de equivalência 1,921. O extrato metanólico dos galhos mostrou-se inativo com valor de equivalência 3,113, mas é preciso notar que o extrato se encontra em forma bruta, com outros interferentes que podem não permitir o alcance aos sítios dos íons de ferro pelas substâncias antioxidantes. Os valores de todas as equivalências dos extratos estão na Tabela 17.

Tabela 17. Resultado de equivalência antioxidante dos extratos frente ao complexo Fe³⁺/fenantrolina.

Extrato	Valores médios		
	[Fe ²⁺]	[AA] _{eq}	Equiv. (mg extrato/mg ácido ascórbico)
Folhas Hex	0,099 ± 0,019	0,039 ± 0,030	N.A.
Flores Hex	0,064 ± 0,010	-0,017 ± 0,017	N.A.
Galhos Hex	0,072 ± 0,016	-0,004 ± 0,026	N.A.
Folhas MeOH	1,701 ± 0,237	2,605 ± 0,381	1,921 ± 0,018
Flores MeOH	0,551 ± 0,093	0,767 ± 0,147	N.A.
Galhos MeOH	1,074 ± 0,061	1,607 ± 0,095	N.A.

Legenda: N.A. = não ativo.

Assim como no teste frente ao DPPH, o resultado é refletido no valor da equivalência do ácido ascórbico e espera-se que os valores dessas equivalências sejam os mais próximos de 1. É preciso notar que o objetivo desse teste também é reduzir um agente oxidante, mas diferente do radical DPPH, o complexo Fe³⁺/fenantrolina não é um radical livre, o experimento visa introduzir um elétron no íon de Fe³⁺ do núcleo do complexo para reduzi-lo a Fe²⁺.

O extrato metabólico das folhas novamente mostrou-se ativo, mas ao comparar seu potencial, de acordo com a Tabela 2, verifica-se que ele mostrou apenas ativo e muito ativo como no teste com o radical DPPH. Esse resultado sugere que as substâncias antioxidantes presentes no extrato encontrem uma leve dificuldade para alcançar o núcleo do complexo, ou até mesmo as substâncias que não tenham potencial antioxidante possam estar dificultando o acesso das substâncias com potencial antioxidante ao serem atraídas pelo núcleo positivo do complexo apenas para coordená-lo, lembrando tratar-se de um extrato bruto, repleto de outras substâncias e classes químicas diversas.

6.3 Atividade Antimicrobiana pelo método de microdiluição

Os resultados dos extratos na concentração de 1000 µg/mL mostraram que o extrato hexânico das folhas foi ativo contra 9 cepas diferentes. A atividade mais significativa foi contra *Staphylococcus aureus* (StAu), onde a porcentagem de crescimento foi de apenas 3%, logo a inibição do extrato foi de 97%. O extrato metanólico das folhas mostrou atividade contra 3 cepas diferentes, sendo a porcentagem de crescimento de 26% (74% de inibição) contra *Edwardsiella tarda* a mais ativa.

O extrato metanólico dos galhos mostrou atividade contra 8 cepas diferentes, onde a porcentagem de crescimento foi de 10% (90% de inibição) para *Aeromonas hydrophila* foi a maior atividade. O extrato hexânico das flores mostrou atividade contra 5 cepas diferentes, porém as porcentagens de crescimentos foram mais altas, com 41% para crescimento tanto de *Aeromonas hydrophila* quanto *Candida parapsilosis*, sendo esses valores os mais significativos para esse extrato.

As porcentagens dos crescimentos (Tabela 18) foram obtidas em relação às absorbâncias dos controles negativos. No primeiro dia é realizada a leitura assim que inoculados os micro-organismos com os extratos, para obter a interferência da coloração de alguns extratos e no segundo dia seja esperado apenas interferência do crescimento dos micro-organismos. São usados como parâmetro de atividade os valores de $\geq 70\%$ (muito ativo) ou $\geq 50\% < 70\%$ (pouco ativo).

Tabela 18. Porcentagem de crescimento microbiano nos extratos na concentração de 1000 µg/mL.

	1	2	3	4	5	6	Ctrl -	Ctrl +
AB	22 ± 0,002	49 ± 0,014	60 ± 0,039	29 ± 0,023	64 ± 0,010	66 ± 0,012	100 ± 0,045	5 ± 0,000
AH	6 ± 0,004	129 ± 0,073	113 ± 0,002	10 ± 0,037	41 ± 0,010	68 ± 0,064	100 ± 0,070	17 ± 0,001
CA	22 ± 0,004	173 ± 0,085	158 ± 0,022	90 ± 0,002	102 ± 0,015	163 ± 0,014	101 ± 0,014	43 ± 0,005
CP	26 ± 0,009	112 ± 0,108	132 ± 0,055	44 ± 0,031	41 ± 0,015	64 ± 0,004	100 ± 0,039	78 ± 0,062
CF	115 ± 0,420	91 ± 0,333	72 ± 0,263	104 ± 0,379	101 ± 0,370	119 ± 0,437	100 ± 0,366	1 ± 0,003
ET	33 ± 0,067	26 ± 0,053	49 ± 0,079	17 ± 0,034	66 ± 0,132	83 ± 0,167	100 ± 0,200	4 ± 0,007
EnCl	105 ± 0,421	121 ± 0,485	100 ± 0,401	93 ± 0,376	108 ± 0,436	136 ± 0,547	100 ± 0,402	1 ± 0,005
EnF	17 ± 0,006	131 ± 0,045	232 ± 0,079	51 ± 0,017	50 ± 0,017	153 ± 0,052	99 ± 0,034	44 ± 0,015
EC	169 ± 0,535	88 ± 0,278	119 ± 0,378	142 ± 0,450	92 ± 0,292	119 ± 0,377	100 ± 0,317	2 ± 0,005
KP	141 ± 0,391	65 ± 0,181	78 ± 0,216	62 ± 0,173	64 ± 0,176	80 ± 0,221	100 ± 0,277	4 ± 0,012
MM	177 ± 0,511	52 ± 0,286	60 ± 0,343	107 ± 0,423	81 ± 0,289	83 ± 0,394	100 ± 0,232	6 ± 0,013
PA	172 ± 0,512	96 ± 0,286	115 ± 0,343	142 ± 0,423	97 ± 0,289	132 ± 0,394	100 ± 0,298	3 ± 0,008
PF	168 ± 0,448	78 ± 0,207	152 ± 0,405	141 ± 0,374	133 ± 0,355	145 ± 0,385	100 ± 0,266	7 ± 0,018
SE	150 ± 0,402	79 ± 0,213	141 ± 0,379	119 ± 0,319	122 ± 0,327	132 ± 0,356	100 ± 0,269	6 ± 0,017
SM	115 ± 0,661	131 ± 0,753	108 ± 0,616	119 ± 0,684	120 ± 0,687	155 ± 0,886	100 ± 0,573	3 ± 0,015
StAu	3 ± 0,004	38 ± 0,061	73 ± 0,116	14 ± 0,022	80 ± 0,127	73 ± 0,116	100 ± 0,159	7 ± 0,011
StEp	116 ± 0,496	74 ± 0,319	55 ± 0,236	88 ± 0,377	79 ± 0,340	98 ± 0,419	100 ± 0,428	3 ± 0,011
YE	13 ± 0,007	175 ± 0,087	219 ± 0,109	37 ± 0,018	43 ± 0,022	152 ± 0,076	101 ± 0,050	33 ± 0,016
PrAc	16 ± 0,009	347 ± 0,191	304 ± 0,197	38 ± 0,021	45 ± 0,025	154 ± 0,085	99 ± 0,055	25 ± 0,014

Porcentagem de crescimento

Legenda: Extrato hexânico das folhas (1). Extrato metanólico das folhas (2). Extrato hexânico dos galhos (3). Extrato metanólico dos galhos (4). Extrato hexânico das flores (5). Extrato metanólico das flores (6).
Muito ativo ———, Pouco ativo - - - .

Todos os extratos considerados ativos na concentração de 1000 µg/mL foram avaliados em concentrações menores para verificação da CIM, além da repetição com 1000 µg/mL. Os resultados mostraram que apenas em 1000 µg/mL ocorreu inibição do crescimento.

Também foi possível verificar que alguns extratos não repetiram seus potenciais microbiológicos. Um provável motivo para isso pode ter sido a inoculação de bactérias com células velhas, que acabaram morrendo ou a degradação das substâncias presentes nos extratos pela temperatura de armazenamento antes dos micro-organismos crescerem.

Os extratos que continuaram com potenciais microbiológicos foram os extratos hexânico das folhas (*Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Enterococcus faecalis*), metanólico dos galhos (*Edwardsiella tarda* e *Enterococcus faecalis*) e hexânico das flores (*Aeromonas hydrophila*). Na Tabela 19 é possível verificar os resultados em porcentagem de crescimento.

Nenhum dos extratos demonstrou atividade abaixo da concentração máxima, logo as CIM foram consideradas com concentração de 1000 µg/mL para as suas correspondentes bactérias.

Não ocorreu o crescimento de *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus* para realização do experimento da CIM, deixando os extratos sem avaliação. *Propionibacterium acnes* é capaz de crescer em diversas condições de oxigenação e pH ligeiramente ácido e *Staphylococcus aureus* cresce em pH = 7, logo pode-se supor que o pH do caldo estivesse um pouco mais básico e impediu o crescimento microbiológico.

Tabela 19. Porcentagem de crescimento microbiano nos extratos em várias concentrações.

		Concentração µg/mL								
		1000	500	250	125	62,5	31,25	Ctrl +	Ctrl -	
Porcentagem de crescimento	1	AB	84± 0,029	87± 0,007	82± 0,014	86± 0,004	85± 0,013	87± 0,018	7± 0,003	100± 0,030
		AH	13± 0,067	68± 0,141	63± 0,116	83± 0,127	72± 0,123	72± 0,156	4± 0,009	100± 0,162
		CA	125± 0,071	103± 0,024	123± 0,014	95± 0,004	104± 0,029	80± 0,012	102± 0,007	100± 0,010
		CP	112± 0,049	86± 0,018	64± 0,003	61± 0,008	62± 0,001	65± 0,004	85± 0,003	100± 0,016
		ET	54± 0,072	125± 0,008	112± 0,006	114± 0,011	113± 0,012	116± 0,003	2± 0,000	100± 0,012
		EnF	7± 0,020	80± 0,017	70± 0,021	69± 0,009	72± 0,016	74± 0,032	2± 0,006	100± 0,022
		YE	197± 0,056	132± 0,008	158± 0,015	146± 0,007	145± 0,004	152± 0,003	38± 0,002	100± 0,003
	2	AB	125± 0,028	92± 0,008	95± 0,007	95± 0,015	120± 0,059	94± 0,020	12± 0,005	100± 0,027
		ET	69± 0,000	93± 0,007	90± 0,005	81± 0,005	80± 0,001	80± 0,001	1± 0,001	100± 0,005
	4	AB	93± 0,004	83± 0,018	89± 0,022	91± 0,013	93± 0,020	93± 0,017	8± 0,003	100± 0,003
		AH	63± 0,024	143± 0,087	103± 0,125	135± 0,055	59± 0,010	115± 0,112	3± 0,003	100± 0,152
		CP	69± 0,002	78± 0,003	94± 0,004	74± 0,002	77± 0,003	76± 0,002	113± 0,005	100± 0,004
		ET	24± 0,001	92± 0,039	87± 0,026	81± 0,024	82± 0,024	86± 0,020	1± 0,003	100± 0,036
		EnF	28± 0,089	82± 0,061	83± 0,045	80± 0,061	79± 0,071	78± 0,040	2± 0,000	100± 0,024
5	YE	63± 0,001	98± 0,002	107± 0,006	114± 0,003	107± 0,004	113± 0,004	8± 0,000	100± 0,007	
	AH	30± 0,052	106± 0,115	100± 0,061	96± 0,052	108± 0,085	81± 0,083	2± 0,002	100± 0,059	
	CP	-295± 0,008	131± 0,003	522± 0,225	104± 0,001	113± 0,004	119± 0,006	122± 0,001	100± 0,005	
	EnF	-20± 0,015	78± 0,025	56± 0,244	79± 0,012	73± 0,010	80± 0,022	0± 0,009	100± 0,006	
		YE	-8± 0,009	117± 0,007	186± 0,010	213± 0,010	194± 0,010	238± 0,002	41± 0,007	100± 0,005

Legenda: Extrato hexânico das folhas (1). Extrato metanólico das folhas (2). Extrato metanólico dos galhos (4). Extrato hexânico das flores (5). Muito ativo **█** Pouco ativo **▬▬**

Infelizmente não foi possível afirmar nenhuma explicação sólida sobre a atividade dos extratos em relação aos micro-organismos. Isso porque os extratos ativos (hexânico das folhas, hexânico das flores e metanólico dos galhos) possuem moléculas com polaridades diferentes. Enquanto os hexânicos possuem moléculas apolares, os metanólicos possuem moléculas polares. Por esse motivo, se torna difícil relacionar porque que o extrato hexânico das folhas e o extrato metanólico dos galhos foram ativos para as mesmas cepas (*E. tarda* e *E. faecales*) se são extratos distintos por polaridade de moléculas.

Pode ser sugerido que os extratos possuem moléculas de diferentes polaridades, mas que tenham um sítio reacional em comum para as membranas das bactérias, caracterizado talvez, por uma classe química com modificações, onde esses sítios reacionais sejam parte do esqueleto principal e não das modificações. Não se pode desprezar o fato de que a abordagem do experimento antimicrobiano está relacionada com os extratos, que são misturas complexas de substâncias com classes químicas diferentes e concentrações variadas. Logo, as mesmas concentrações realizadas no experimento poderão mostrar resultados mais satisfatórios com a substância ou conjunto das mesmas que tenham a atividade antimicrobiana.

6.4 Extração e análise cromatográfica dos extratos

Das extrações realizadas, foram obtidos 6 extratos: 3 hexânicos e 3 metanólicos (Tabela 20).

Tabela 20. Massas dos extratos vegetais de *M. acaciifolium*.

EXTRATO	Hex (g)	Rend (%)	MeOH (g)	Rend (%)
Folhas	2,8615	0,62	47,5759	10,25
Flores	0,7432	0,93	5,5448	6,93
Galhos	1,69	0,15	75,31	6,68

Devido a complexidade de substâncias, somente um sistema quaternário (AcOEt/MeOH/CH₃COOH/H₂O 9:1:1:2 (v/v/v/v)) foi capaz de eluir com uma melhor resolução, pelo menos para o extrato das folhas (Imagem 2). Os extratos metanólicos não mostraram coloração diferente de um leve amarelo pálido no visível (H). No comprimento

de 254 nm (I), muitas manchas puderam ser visualizadas nos extratos das flores e folhas e somente na origem do extrato dos galhos, aparentemente em baixa concentração. Nenhuma das manchas da placa absorveram no comprimento de onda de 365 nm, mas revelaram as mesmas substâncias apresentadas pela UV 254 nm quando AlCl_3 foi borrifado na placa e visualizada na UV 365 nm (J). Essas substâncias podem ser classificadas previamente como flavonoides, visto que é características do AlCl_3 revelar essa classe química com o auxílio da UV 365 nm. Infelizmente não é capaz de confirmar qual sub-classe de flavonoides, apenas que podem ser agliconas (GAGE *et al.*, 1951).

O reagente FeCl_3 revelou de cor levemente negra-esverdeada (K) todas as substâncias que apareceram no comprimento de onda de 254 nm, mostrando muita intensidade nos extratos das flores e folhas. De acordo com a literatura, o reagente FeCl_3 é um revelador geral para substâncias fenólicas (BENJAMIN & MULCHANDANI, 1976; CHAWLA & CHIBBER, 1976; CHEXAL *et al.*, 1970; GAGE *et al.*, 1951; NAGARAJAN & PARMAR, 1977; POETHKE *et al.*, 1970; SCHMIDTLEIN & HERRMANN, 1976).

A revelação com anisaldeído mostrou as mesmas substâncias visualizadas com UV 254 nm e FeCl_3 , no entanto com coloração amarela na extensão eluída e laranja na origem da aplicação da amostra (L). O anisaldeído sulfúrico é um oxidante geral, mas que revela as classes químicas com cores bem intensas (STAHL & GLATZ, 1982; VAN DER HEIDE, 1966).

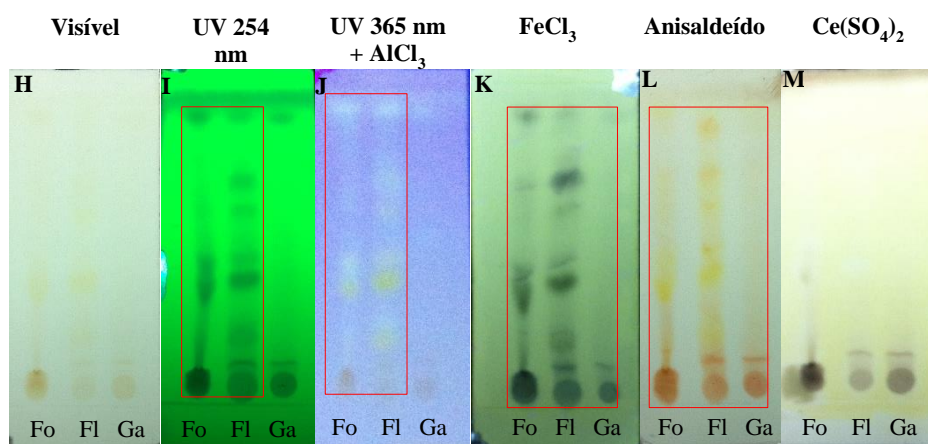


Imagem 2. Extratos metanólicos das folhas (Fo), flores (Fl) e galhos (Ga) eluídos com $\text{AcOEt/MeOH/CH}_3\text{COOH/H}_2\text{O}$ 9:1:1:2 (v/v/v/v).

Não ocorreu mudança de coloração quando os extratos foram revelados com $\text{Ce(SO}_4)_2$, apenas mostrou cores marrom (M) devido à degradação, natural do extremo

calor absorvido. Também não revelou para substâncias nitrogenadas com o reagente de Dragendorff.

6.5 Fracionamento do extrato metanólico das flores e isolamento de Mac1

Após a secagem, o peso da fase DCM foi de 273,2 mg, o da fase AcOEt foi 232,2 mg, o da fase BuOH foi 385,5 mg e a fase MeOH/H₂O foi 2,37 g, além de 1,03 g de material insolúvel, suspenso na fase MeOH/H₂O. O rendimento de cada fase está representado na Tabela 21 abaixo.

Tabela 21. Massa e rendimento das fases do extrato metanólico das flores.

FASE	Massa (g)	Rend (%)
DCM	0,2732	6,23
AcOEt	0,2322	5,30
BuOH	0,3855	8,80
MeOH/H ₂ O	2,37	54,10
Insolúvel	1,03	23,51

A fase AcOEt mostrou leve presença de esteroides frente ao anisaldeído por apresentar manchas de cor levemente roxa que ficaram rosa no decorrer do aquecimento (Imagem 3A). A revelação com FeCl₃ mostrou grande concentração de substâncias aromáticas de cor negra, levemente azulada em todas as regiões de eluição da placa cromatográfica (Imagem 3B), demonstrando presença de substâncias flavonoídicas. Frente ao reagente AlCl₃, as mesmas regiões também absorveram no comprimento de luz UV 254 nm (Imagem 3C) e revelaram presença de flavonoides devido a coloração amarela intensa no visível e fluorescente de cor amarela quando observadas no comprimento de onda 365 nm (Imagem 3D). A fase não demonstrou presença de substâncias nitrogenadas frente o reagente de Dragendorff (Imagem 3E).

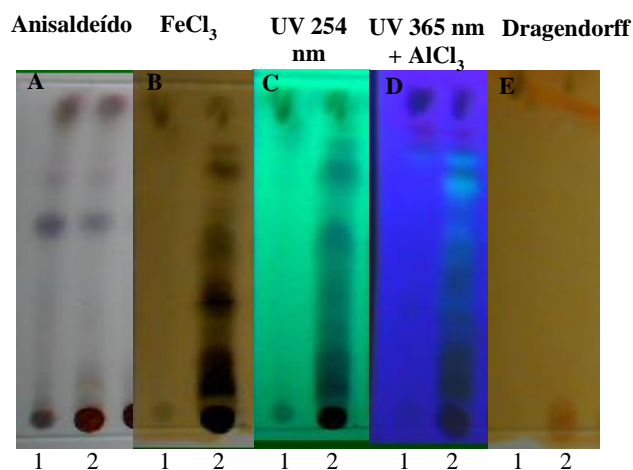


Imagem 3. Fases DCM (1) e AcOEt (2). Eluente DCM/AcOEt 8:2.

As substâncias de caráter flavonoídicas ficaram concentradas nas frações Mf2.10-13 e Mf2.14-15 quando reveladas com o FeCl₃ (Imagem 4A) e AlCl₃ (Imagem 4B). Também é possível notar forte absorção pelas mesmas substâncias frente a luz UV 254 nm (Imagem 4C).

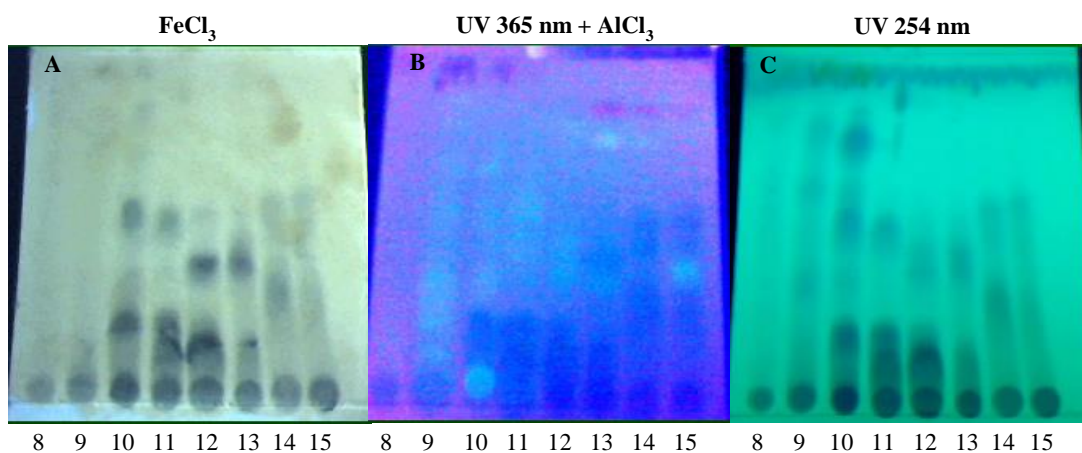


Imagem 4. Frações da fase AcOEt. Eluente DCM/MeOH 8:2.

Após fracionamento em coluna de sílica, as frações de MF2.10-13 foram submetidas à CCD-C, as quais mostraram que a concentração de flavonoides ficou presente nas frações de Mf2.10-13.7-13, que foram reunidas por comparação frente o FeCl₃ (Imagem 5A) e AlCl₃ (Imagem 5B).

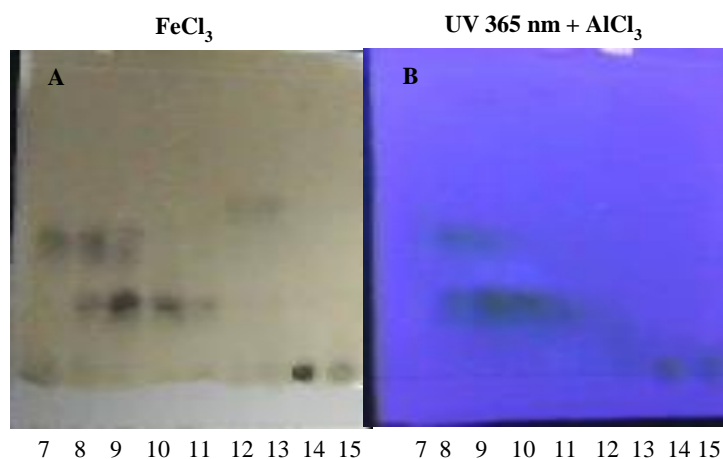


Imagem 5. Frações da Mf2.10-13. Eluente DCM/MeOH 8:2.

O fracionamento de Mf2.10-13.7-13 resultou em 5 frações. A primeira fração foi chamada de 0 (zero) por não apresentar substâncias. A fração Mf2.10-13.7-13.2 mostrou intensa atividade frente aos reveladores FeCl_3 e AlCl_3 (Imagens 6A e 6B, respectivamente), enquanto as outras, pouca atividade e pouca massa.

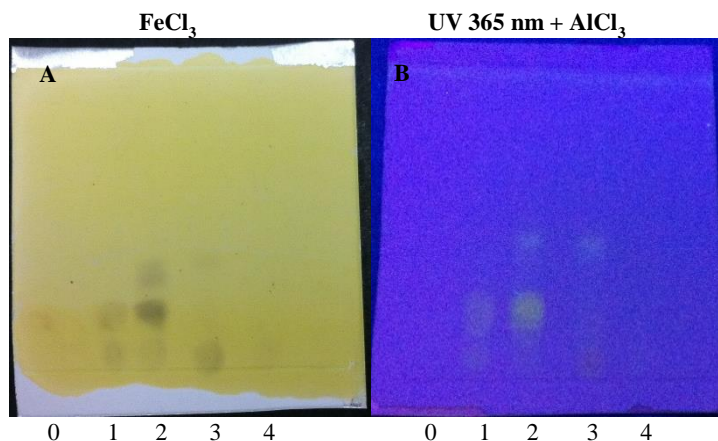


Imagem 6. Frações da Mf2.10-13.7-13. Eluente DCM/MeOH 8:2.

A comparação por CCD-C mostrou que o fracionamento de Mf2.10-13.7-13.2 não foi eficiente, mas ajudou a deixar apenas uma mancha de um flavonoide nas frações 3 e 4 além da mesma substância com outras duas acima dela na fração 1 (Imagens 7A e 7B).

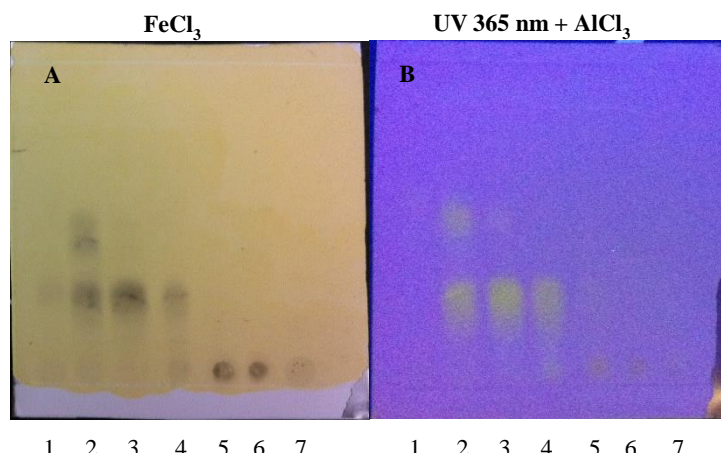


Imagem 7. Frações da Mf2.10-13.7-13.2. Eluente DCM/MeOH 8:2.

O resultado da CCD-P de Mf2.10-13.7-13.2.2-4 foi satisfatório, pois foi recolhido a substâncias de caráter flavonoídica separada da outra que tinha baixa intensidade frente aos reveladores e estava acima dela, além de uma pequena impureza na parte superior. A fração da substância foi a terceira a ser recolhida da CCD-P, logo suas iniciais foram Mf2.10-13.7-13.2.2-4.3, também chamada de Mac1. A Imagem 8 mostra as revelações da substância com FeCl₃ (A) e AlCl₃ (B) eluidas com DCM/MeOH 8:2 e AcOEt/MeOH/CH₃COOH/H₂O 9:1:1:2.

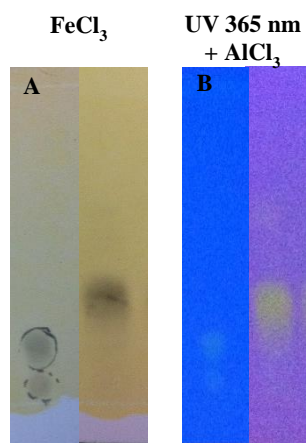


Imagem 8. Mac 1. Eluente DCM/MeOH 8:2 (esquerda nas comparações) e AcOEt/MeOH/CH₃COOH/H₂O 9:1:1:2 (direita nas comparações).

Foi possível isolar 9 mg da **Mac1**, tendo um rendimento de 3,88% em relação à fase AcOEt. A substância foi mandada para análise em Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H) e Carbono 13 (¹³C) para identificação, além da caracterização por Espectrometria de Massas.

6.6 Fracionamento do extrato metanólico das folhas e isolamento de Mac2, Mac3 e Mac 4

As massas obtidas para cada fase do extrato metanólico das folhas foram de 1,174 g para a fase DCM, 3,022 para a fase AcOEt e 11 g para a fase MeOH/H₂O. Esses dados com o rendimento então representados na Tabela 22 abaixo.

Tabela 22. Massa e rendimento das fases do extrato metanólico das flores.

FASE	Massa (g)	Rend (%)
DCM	1,174	2,5
AcOEt	3,022	6,43
MeOH/H ₂ O	11	23,40
Insolúvel	25	53,19

A cromatografia em camada delgada das fases mostrou aumento de fluorescência com o AlCl_3 na presença da luz UV 365 nm da fase DCM (Imagem 9A). O revelador anisaldeído mostrou duas manchas roxas no meio da placa, além de uma rosa na parte superior (Imagem 9B). O reagente FeCl_3 não mostrou presença de flavonoides e o reagente de Dragendorff não mostrou presença de substâncias nitrogenadas.

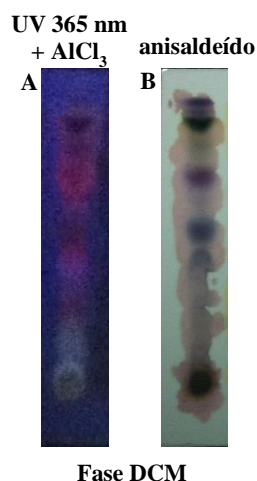


Imagem 9. Fase DCM do extrato metanólico das folhas. Eluente DCM/AcOEt 9:1.

Após o fracionamento de fase DCM, somente as frações Mfo1.7-9, 10, 11 e 12 mostraram fluorescência no UV 365 nm (Imagem 10C, para 10, 11 e 12), assim como mostraram coloração negra quando revelados com FeCl_3 (Imagem 10D, para 10, 11 e 12), mostrando indícios de flavonoides. A fração Mfo1.7-9 é mostrada na Imagem 10A e 10B, revelada com FeCl_3 e visualizada na luz UV 365 nm.

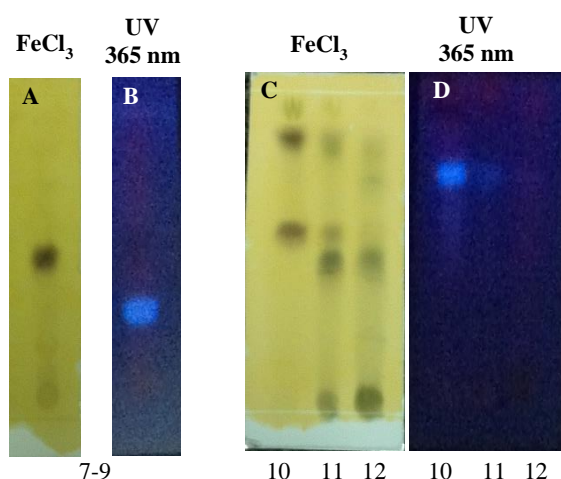


Imagem 10. Frações com da Mfo1 com flavonoides. Eluentes CHCl_3 /acetona 8:2 (A e B) e AcOEt/MeOH 95:05 (C e D).

Após CCD-P, a substância na parte superior (1, com 2,8 mg) de Mfo1.7-9 revelou com AlCl_3 e FeCl_3 , demonstrando ser um flavonoide. A substância da parte inferior

(Mfo1.7-9.2, com 0,8 mg) apenas mostrou forte fluorescência de cor azul na luz UV 365 nm, característico de cumarinas. Ambas foram enviadas para análise em RMN.

Seguido por fracionamento em coluna aberta por apresentar a presença de flavonoides na placa cromatográfica, a fração Mfo1.10 mostrou frente aos reveladores AlCl_3 e FeCl_3 (Imagens 11A e 11B) que a concentração de flavonoides ficou nas frações 1, 2, 3 e 4.

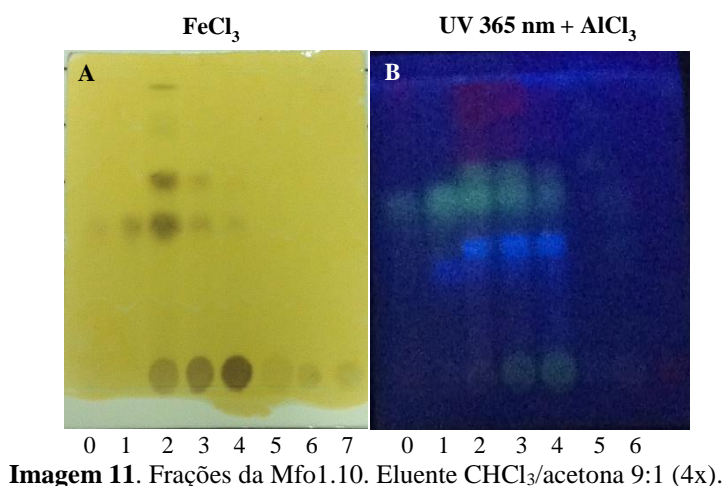


Imagem 11. Frações da Mfo1.10. Eluente CHCl_3 /acetona 9:1 (4x).

As frações Mfo1.10.1-4.4 e 5 foram reunidas pois apresentavam-se apenas com uma substância no mesmo Rf. A fração Mfo1.10.1-4.2 mostrava-se com uma substância isolada no Rf acima da Mfo1.10.1-4.4-5 e a Mfo1.10.1-4.3 continha a substância da fração 2 e a substância das frações 4 e 5, as quais estão apresentadas na Imagem 12A e Imagem 12B.

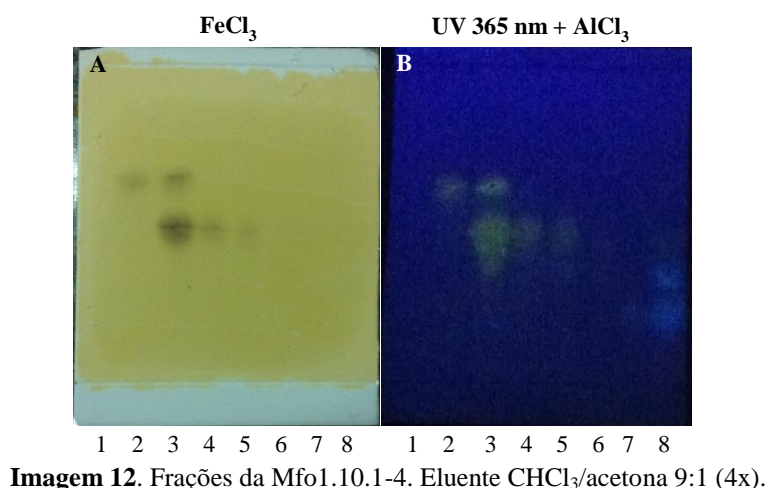


Imagem 12. Frações da Mfo1.10.1-4. Eluente CHCl_3 /acetona 9:1 (4x).

Assim, as substâncias separadas na CCD-P de Mfo1.10.1-4.3 foram reunidas de acordo com os seus Rf. A primeira (superior) foi reunida com a fração Mfo1.10.1-4.2-3 (6,2 mg) e a segunda (inferior) foi reunida com a Mfo1.10.1-4.4-5 (6,6 mg). Ambas foram

enviadas ao RMN de ^1H e bidimensionais e a fração Mfo1.10.1-4.2-3 foi chamada de **Mac2** com um rendimento de 0,56%.

Após fracionamento da fase DCM (Mfo1), as frações da Mfo1.11 apresentaram características de flavonoides frente aos reveladores AlCl_3 e FeCl_3 mostrados nas Imagens 13A e 13B. Quando eluídas com AcOEt/MeOH 95:05, mostraram a presença de pelo menos quatro flavonoides nas frações 2, 3 e 4.

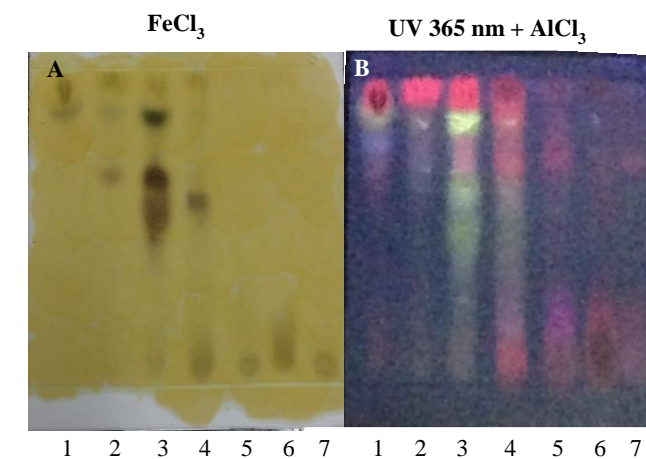


Imagem 13. Frações da Mfo1.11. Eluente AcOEt/MeOH 95:05.

A cromatografia em camada delgada mostrou que a maior parte dos flavonoides ficou nas frações de 1 – 4, sendo a 1, a mais concentrada (Imagens 14A e 14B). Da CCD-P realizada na fração Mfo1.11.2-4.1, observou-se que os reveladores AlCl_3 e FeCl_3 mostraram que a fração 6 (Mfo1.11.2-4.1.6, com 11,6 mg) estava com apenas uma mancha com Rf no meio da placa quando eluído com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 (Imagens 15A e 15B).

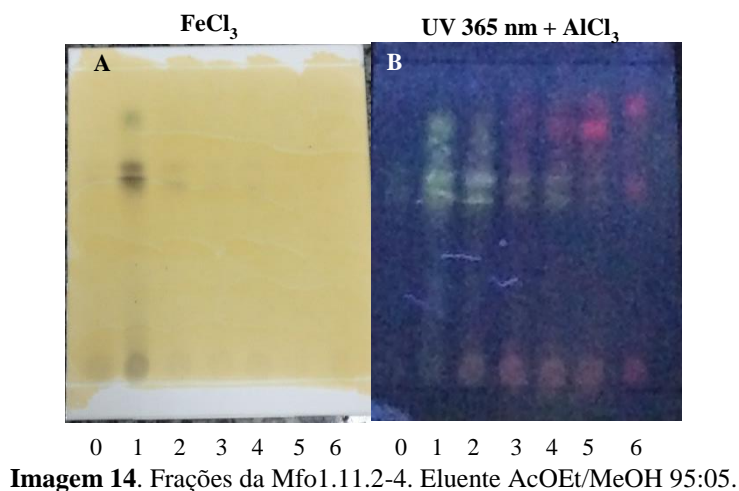


Imagem 14. Frações da Mfo1.11.2-4. Eluente AcOEt/MeOH 95:05.

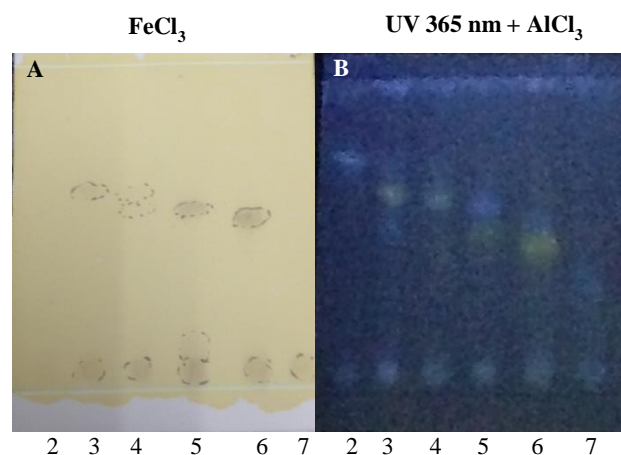


Imagem 15. Frações da Mfo1.11.2-4.1. Eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2.

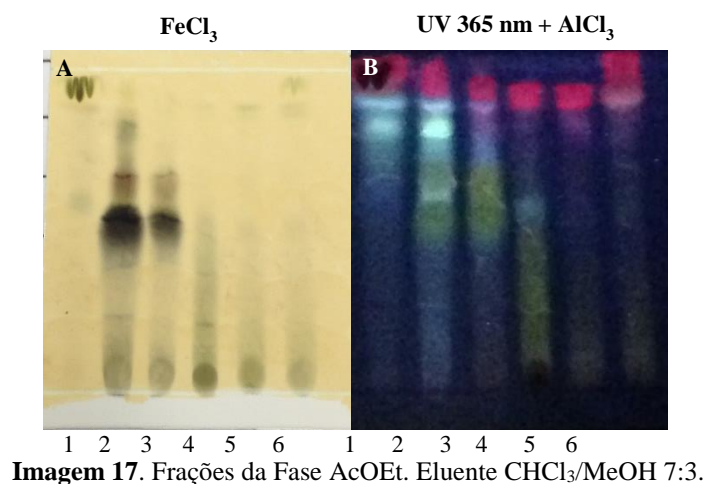
Na CCD-P realizada na fração Mfo1.11.2-4.1.6, foi possível separar uma substância que ficou no meio da placa e foi recolhida como Mfo1.11.2-4.1.6.1, chamada de **Mac3** com 2 mg e 0,18% de rendimento em relação a fase DCM.

Continuando o fracionamento, a fase AcOEt apresentou atividade de caráter flavonoídica frente ao FeCl_3 (Imagem 16A) e AlCl_3 (Imagem 16B).

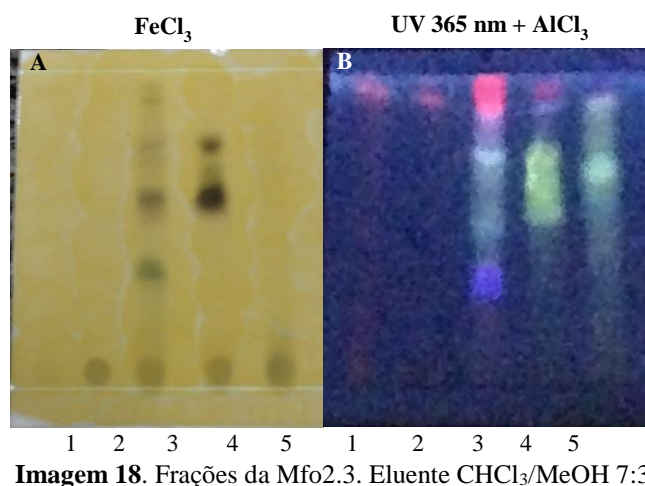


Imagem 16. Fase AcOEt do extrato metanólico das folhas. Eluente AcOEt/MeOH 9:1.

Após fracionamento em Sephadex LH-20 as frações da fase AcOEt foram eluídas com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 7:3 e mostraram grande concentração de possíveis flavonoides (Imagens 17A e 17B). As frações Mfo2.2 (865,4 mg) e Mfo2.3 (173,3 mg) eram bem parecidas, mas não foram reunidas por ambas terem boa massa para fracionamento.



Após coluna de Sephadex LH-20 da Mfo.2.3, a cromatografia em camada delgada das frações mostrou que a concentração de flavonoides ficou nas frações Mfo2.3.3 (44,7 mg) e Mfo2.3.4 (17,7 mg), com um pouco mais de intensidade na fração Mfo2.3.4, como é possível notar nas Imagens 18A e 18B.



Das frações obtidas das CCD-P das frações Mfo2.3.3 e Mfo2.3.4, observou-se muitas impurezas para ambas frações, numa concentração menor para as frações de Mfo2.3.4 (Imagens 19A e 19B).

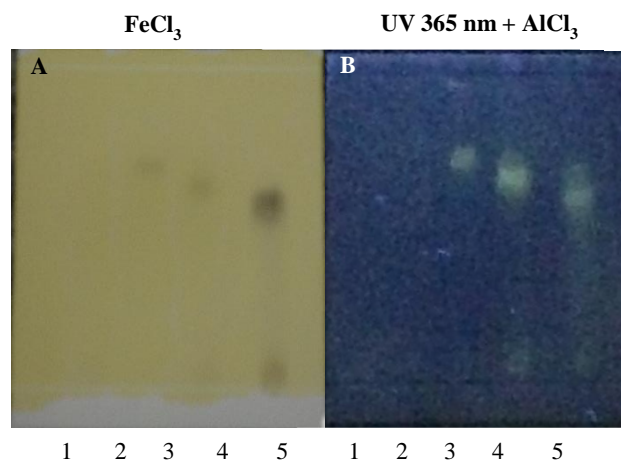


Imagem 19. Frações da Mfo2.3.4. Eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 7:3.

A fração Mfo2.3.4.3 foi identificada e chamada de **Mac4**, com 2,8 mg e rendimento de 0,09% em relação a massa usada para fracionamento da fase AcOEt. A substância foi mandada para análise em Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H) e Carbono 13 (^{13}C) para identificação, além da caracterização por Espectrometria de Massas.

6.7 Identificação estrutural da fração Mac1

O espectro de RMN de ^1H em 300 MHz (Figura 6) mostrou sinais de hidrogênios de anéis aromáticos com sinais de dupletos em 7,88 ppm ($J = 8,85$ Hz) e 6,76 ($J = 8,85$ Hz) ppm com integrais para dois hidrogênios (2H), cada duplete (Figura 7A e 7B). Esses dupletos são característicos de hidrogênios ligados aos carbonos 2', 3', 5' e 6' de anéis B de flavonoides, os quais são simetricamente separados por dois carbonos quaternários: o C-1' e o C-4' (4'C), que possui uma hidroxila ligada. Os dupletos são gerados a partir dos acoplamentos que um hidrogênio faz com o vizinho, produzindo sinal em 7,88 ppm para os hidrogênios ligados aos carbonos 2' (2'C) acoplando com o H-3' e 6' (6'C) acoplando com o H-5', assim como o sinal em 6,76 ppm para os hidrogênios ligados aos carbonos 3' (3'C) acoplando com o H-2' e 5' (5'C) com o H-6'. A presença de simetria do anel aromático é que origina somente dois dupletos visíveis e o reflexo da quantidade de hidrogênios é exposto na integral de 2H para cada duplete.

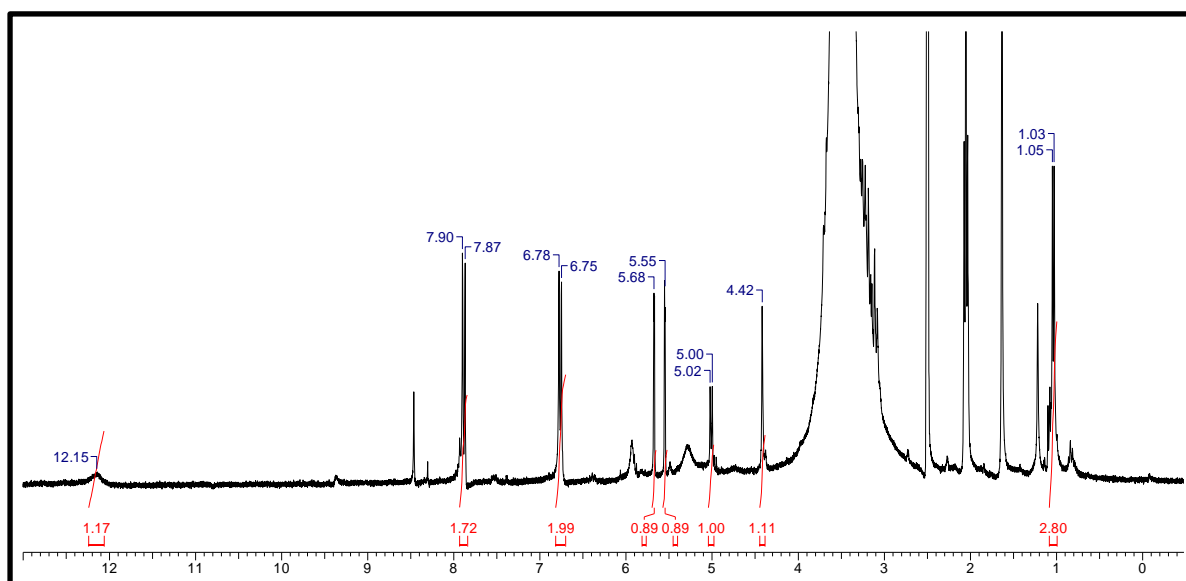


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H de Mac1 em DMSO- d_6 (300 MHz).

Para as correlações diretas entre ^1H e ^{13}C , o HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy) mostrou que os hidrogênios H-2' e H-6' estavam ligados nos átomos de carbono de valor 130,20 ppm, característico de carbonos 2'C e 6'C do anel B de flavonoides. Foi possível correlacionar as ligações entre os H-3' e H-5' com os carbonos de valor 115,24 ppm.

Dois outros dupletos, ambos com integrais para 1H e constante de acoplamento $J = 1,86$ Hz foram visualizados em 5,67 e 5,55 ppm (Figura 7C). Devido a constante de acoplamento de mesmo valor, foi possível afirmar que os hidrogênios estão acoplando entre si, no entanto a uma distância maior que três ligações. Esse tipo de acoplamento

acontece com hidrogênios dos carbonos 6 (H-6) e 8 (H-8) do anel A dos flavonoides, pois ambos estão separados pelo carbono 7 ao qual encontra-se geralmente ligado uma hidroxila ou açúcar.

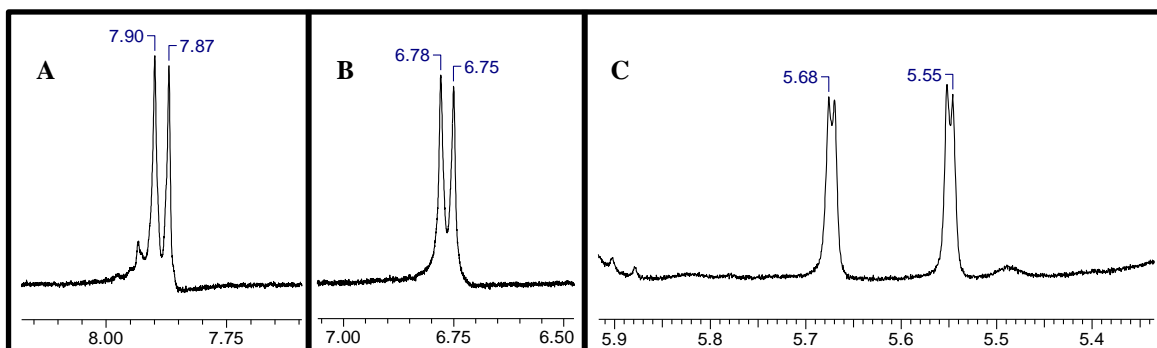


Figura 7. Expansão das regiões dos hidrogênios aromáticos. (A) Hidrogênios H-2' e H-6'. (B) Hidrogênios H-3' e H-5'. (C) Hidrogênios H-8 e H-6 respectivamente.

O espectro de HSQC indicou que os hidrogênios H-6 (5,55 ppm) e H-8 (5,67 ppm) estavam respectivamente ligados aos C 102,38 e 95,84 ppm. Devido a esses valores, confirmou-se a proposta de que esses sinais eram dos 6C e 8C do anel A de um flavonoide. Esses sinais aparecem geralmente pouco acima de 6 ppm para H-8 e até 6,4 ppm para o H-6, mas nesse caso foi possível observar um deslocamento para o campo mais alto do espectro para os dois hidrogênios, podendo estar relacionado com um forte efeito de blindagem exercido pelas duas hidroxilas dos carbonos 5C e 7C.

Também foi possível ver um singlete em 12,15 ppm (Figura 8A) com formato largo e baixo, característico de hidrogênios de hidroxilas na posição 5C do anel A de flavonoides. Esse sinal aparece desprotegido devido ao hidrogênio estar quelado com o oxigênio carbonílico em C-4. Os valores de hidrogênios podem variar em flavonóis e flavonas de 12-13 ppm e podem ultrapassar 14 ppm para isoflavonoides e chalconas (TAHARA *et al.*, 1991; FUKAI *et al.*, 1994a).

Não foram constatados sinais característicos de hidrogênios ligados em 2C e 3C do esqueleto C dos flavonoides. Esses sinais podem ser visualizados como singletos que podem variar de 7,65 – 8,1 ppm para H-2 em isoflavonoides (MARKHAM *et al.*, 1967), 6 – 8 ppm em flavonas (WANG *et al.*, 1998; AKDEMIR *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2013). Em flavanonas, seus deslocamentos estão próximos a 5,2 ppm (quartetos) para H-2, resultante do acoplamento com H-3, o qual aparece como dois quartetos sobrepostos aproximadamente em 2,8 ppm. Aparece com valores perto de 5,2 ppm para H-2 (duplete) 4,3 para H-3 em dihidroflavonóis (CLARK-LEWIS *et al.*, 1964). A ausência desses sinais

sugeriu que os carbonos H-2 e H-3 estivessem com uma insaturação entre eles e um substituinte em 3C.

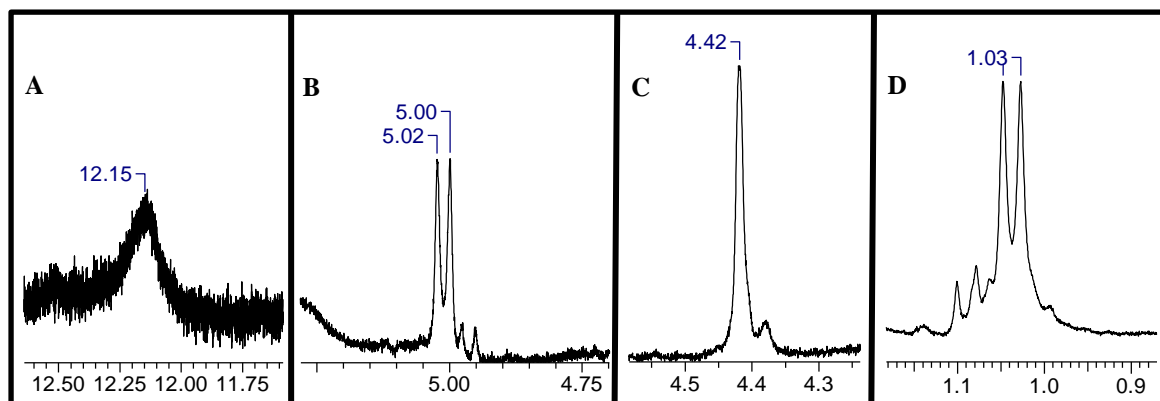


Figura 8. Expansão das regiões dos hidrogênios. Hidrogênio da hidroxila em 5C (A). Hidrogênio H-1'' da glicose (B). Hidrogênio H-1''' (C) H-6''' da ramnose (D).

Um duplete em 5,01 ppm (Figura 8B) com constante de acoplamento $J = 7,54$ Hz sugeriu a presença de um açúcar e um singlete em 4,42 ppm inicialmente parecia ser o H-2' do primeiro açúcar, mas se tratava de outro, tendo dois sinais de hidrogênios anoméricos. A constante $J = 7,54$ Hz é característico em glicoses e galactoses que aparecem entre 4,4 e 4,8 ppm quando estão na forma de monossacarídeo mas podem atingir até 5,3 ppm e constante $J = 6 - 8$ Hz quando estão ligados com um ou mais açúcar. Dessa forma foi possível afirmar que o primeiro açúcar estava na forma β , pois estava dentro da faixa de constante de acoplamento para a configuração, além de que a forma α desses dois açúcares possuem $J = 1 - 4$ Hz (AGRAWAL, 1992).

Os valores obtidos no experimento de ^{13}C mostraram que o carbono anomérico (1''C) tinha valor 103,61 ppm e o carbono 6''C tinha valor 66,95 ppm. Cardoso *et al.* (2005) obteve em seu trabalho um dímero de kaempferol onde um dos esqueletos flavonoídico continha uma galactose com uma ramnose ligada a ela e o valor dos 1''C e 6''C da galactose eram respectivamente 104,1 e 65,9 ppm respectivamente. E o outro esqueleto flavonoídico do dímero tinha uma rutinose (ramnosil (1 \rightarrow 6) glicosídeo) com os valores 103,1 e 67,1 ppm para os mesmos átomos 1''C e 6''C da fração da glicose. Essa comparação com literatura permitiu fazer a distinção entre a glicose e a galactose do primeiro açúcar, onde somente com ^{13}C foi possível afirmar a presença da glicose.

O segundo açúcar com sinal em 4,42 ppm (Figura 8C) foi resolvido como uma ramnose devido a presença de um duplete em 1,04 ($J = 6,05$ Hz) com integral para 3H (Figura 8D), mostrando ser uma metila. É mais comum que essa ramnose esteja ligada ou nos carbonos 2 (neohesperidose) ou 6 (rutinose) da glicose. O valor obtido pelo HSQC

para o ^{13}C da ramnose foi de 100,86 ppm, corroborando que se tratava de um segundo açúcar.

Os sinais de HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy) não mostraram a correlação do hidrogênio do carbono anomérico da ramnose com os carbonos 2 ou 6 da glicose e da mesma forma os hidrogênios desses dois últimos não mostraram correlação com o carbono anomérico da ramnose.

Só foi possível distinguir onde essa ligação estava com a informação dada no trabalho de Rosler *et al.* (1965) que observou em derivados éteres de TMS de flavonoides ramnoglicosídicos que os H-1''' das ramnosas apareciam entre 4,2 – 4,9 em rutinoses enquanto apareciam entre 4,9 e 5,0 ppm em neohesperidoses. Dessa forma é possível afirmar que o flavonoide tinha uma rutinose (ramnosil (1→6) glicosídeo) ligada a ele, visto que o sinal do H-1''' da ramnose estava em 4,42 ppm.

O espectro de HMBC mostrou uma correlação entre o H-1'' da rutinose e o carbono 132,12 ppm do flavonoide. Esse valor é característico de carbono 3C do esqueleto C de flavonóis, onde pode variar entre 132 – 136 ppm (AHMED *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012; SIKORSKA & MATLAWSKA, 2001; ZHANG *et al.*, 2014). Com essa informação foi o possível identificar que a rutinose estava ligada ao carbono 3C do esqueleto C do flavonoide.

O espectro de RMN de ^{13}C obtido (Figura 9) não deixou nítidos os valores dos deslocamentos químicos de átomos de carbonos quaternários do esqueleto flavonoídico. A solução foi resolvida com o espectro de HMBC, no qual se obtiveram as correlações do H-6 com o carbono 5C (159,96 ppm), H-8 com 9C (157,28 ppm) e 10C (98,08 ppm), H-2' e H-6' com 2C (153,67 ppm) e 4'C (160,75 ppm), assim como H-2' e H-5' com 1'C.

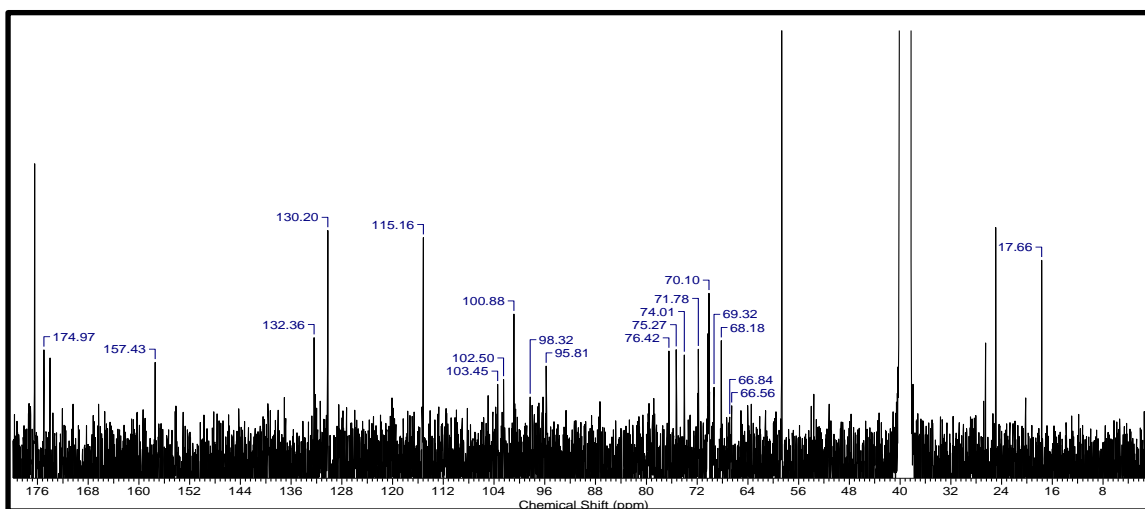


Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C de Mac1 em DMSO- d_6 (75 MHz).

O sinal em 12,15 ppm mostrou a existência de uma carbonila (4C) na molécula, no entanto, o espectro de HMBC não indicou nenhuma correlação com o carbono carbonílico. O espectro de ^{13}C forneceu 3 sinais na região de carbonos carbonílicos (174,01; 174,96 e 176,42). Foi possível ver pelo espectro de HMBC que dois carbonos naquela região estavam correlacionando com hidrogênios, mas esses hidrogênios não faziam parte da molécula, pois eram impurezas. Os carbonos eram 174,01 e 176,42 ppm, os quais correlacionavam com hidrogênio em 1,61, 2,05 e 3,64 ppm (resíduo de água) e não foram identificados segundo as listas de Gottlieb *et al.*, (1997) e Fulmer *et al.*, (2010). Dessa forma, foi possível assumir o valor de 174,96 ppm para o 4C do esqueleto flavonoídico, por não correlacionar com as impurezas e estava na faixa de valor característico para a localização na estrutura.

No espectro de COSY (Correlation Spectroscopy) foi possível correlacionar o sinal do H-6 (5,55 ppm) com H-8 (5,67 ppm) inferidos como os hidrogênios do anel A do flavonoide. Também H-2' e H-6' (130,20 ppm) com os H-3' e H-5' (6,76 ppm) inferidos como os hidrogênios do anel B do flavonoide. Para a glicose, foi possível ver as correlações de H-1'' (5,01 ppm) com H-2'' (3,18 ppm) e H-5'' (3,23 ppm) com H-6'' (3,67 ppm). As correlações para a ramnose foram H-1''' (4,42 ppm) com H-2''' (3,52 ppm) e H-5''' (3,29 ppm) com H-6''' (1,04 ppm).

Apenas o 7C do anel A do flavonoide não pôde ser inferido, mas deslocamentos químicos com valores pouco acima do 2C são obtidos da literatura. Estes deslocamentos estão próximos a 165 ppm (MARKHAM & TERNAI, 1976).

Os sinais que correlacionam os hidrogênios com seus respectivos átomos de ^{13}C foram adquiridos pelo espectro de HSQC e estão dispostos na Tabela 23 nas colunas de ^{13}C e ^1H .

Com base nos sinais e correlações obtidos pelos espectros de RMN da molécula, foi possível afirmar que se tratava do flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, também chamado no nikotiflorin. A estrutura do flavonoide com suas correlações pelo HMBC e COSY são apresentadas pelas Figuras 10 e 11, respectivamente.

Tabela 23. Deslocamentos químicos e correlações de kaempferol-3-*O*-rutinosídeo.

Posição	¹³ C – 75 MHz	¹ H – 300 MHz	HMBC	COSY
2C	153,67	-	H-2', H-6'	
3C	132,12	-	H-1''	
4C	174,96	-		
5C	159,96	-	H-6	
6C	102,55	5,55 (1H, d, <i>J</i> = 1,86 Hz)	H-8	H-8
7C	-	-		
8C	95,84	5,67 (1H, d, <i>J</i> = 1,86 Hz)	H-6	H-6
9C	157,28	-	H-8	
10C	98,08	-	H-8, H-6	
1'C	119,79	-	H-3', H-5'	
2'C	130,20	7,88 (2H, d, <i>J</i> = 8,85 Hz)	H-2', H-6'	H-3'
3'C	115,24	6,76 (2H, d, <i>J</i> = 8,85 Hz)		H-2'
4'C	160,75	-	H-2', H-6'	
5'C	115,24	6,76 (2H, d, <i>J</i> = 8,85 Hz)		H-6'
6'C	130,20	7,88 (2H, d, <i>J</i> = 8,85 Hz)	H-2', H-6'	H-5'
1''C	103,61	5,01 (1H, d, <i>J</i> = 7,54 Hz)		H-2''
2''C	74,08	3,18 (1H, m)	H-3''	H-1''
3''C	76,51	3,20 (1H, m)	H-2''	
4''C	69,41	3,08 (1H, m)		
5''C	75,31	3,23 (1H, m)		H-6''
6''C	66,95	3,71 (1H, m); 3,67 (1H, m)		H-5''
1'''C	100,86	4,43 (1H, s)		H-2'''
2'''C	70,16	3,52 (1H, m)	H-1'''	H-1'''
3'''C	66,80	3,25 (1H, m)	H-1'''	
4'''C	71,90	3,71 (1H, m)	H-6'''	
5'''C	68,30	3,29 (1H, m)	H-1''', H-4''', H-6'''	H-6'''
6'''C	17,74	1,04 (3H, d, <i>J</i> = 6,05 Hz)		H-5'''
OH/5C	-	12,15		

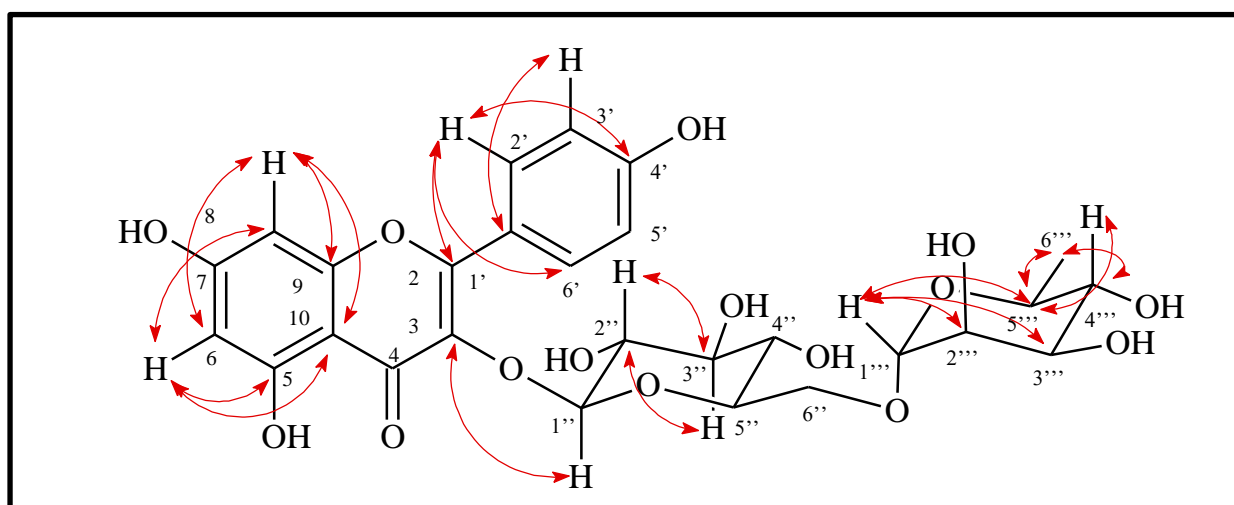


Figura 10. Correlações encontradas no mapa de contorno HMBC para o flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo.

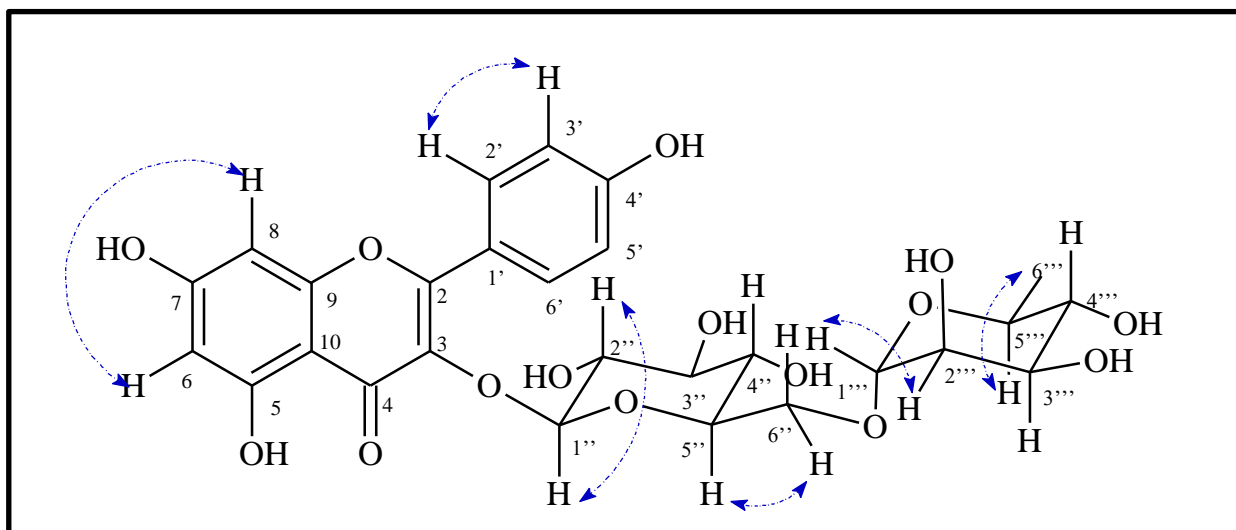


Figura 11. Correlações encontradas no espectro de COSY para o flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo.

O HPLC-MS mostrou a retenção do kaempferol-3-*O*-rutinosídeo em 3,4 min (Figura 12) com as misturas de solventes A(H₂O + 0,1% HCOOH)/B(ACN + 0,1% HCOOH) com sistema gradiente na Tabela 24, fluxo de 0,4 mL/min, split de 0,06 mL (MS)/0,34 mL (desc), concentração de 1,5 mg/mL em metanol, injeção de 2 μL, temperatura de 30 °C, injetor ACN e calibrante HCOONa.

Tabela 24. Gradiente de concentração do sistema no HPLC.

Tempo (min)	% de B no sistema
0 – 8	10 – 70
8 – 10	70 – 100
10 – 12	100
12 -14	100 – 10
14 – 16	10

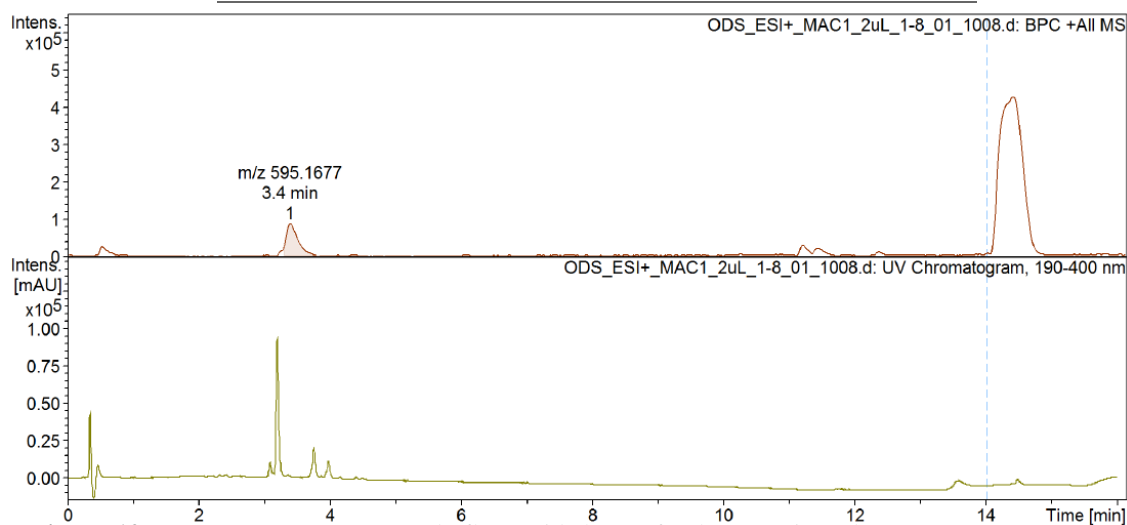


Figura 12. Cromatograma no HPLC do flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo.

A espectrometria de massas (MS) do kaempferol-3-*O*-rutinosídeo no modo positivo com fonte ionizadora Eletrospray (ESI) mostrou um íon *quasi*-molecular com m/z 595,1709 (Figura 13A) e MS/MS com m/z 287,0581 (Figura 13B). O valor do íon *quasi*-molecular confirmou o valor do flavonoide protonado $(M+H)^+$ e a fragmentação no MS/MS coincidiu com a perda neutra de uma rutinose (308 u) e da m/z 287 do kaempferol protonado.

A biblioteca do espectrômetro de massas inferiu fórmula molecular $C_{27}H_{31}O_{15}$ $(M+H)^+$ com m/z 595,1674. O erro para esse valor é igual a 1,96 ppm em relação a massa isotópica m/z 595,16623, calculada. O espectrômetro mediu o erro em -2,8 ppm para a massa isotópica m/z 595,1674. O erro é considerado aceitável para confirmação da fórmula molecular $C_{27}H_{31}O_{15}$.

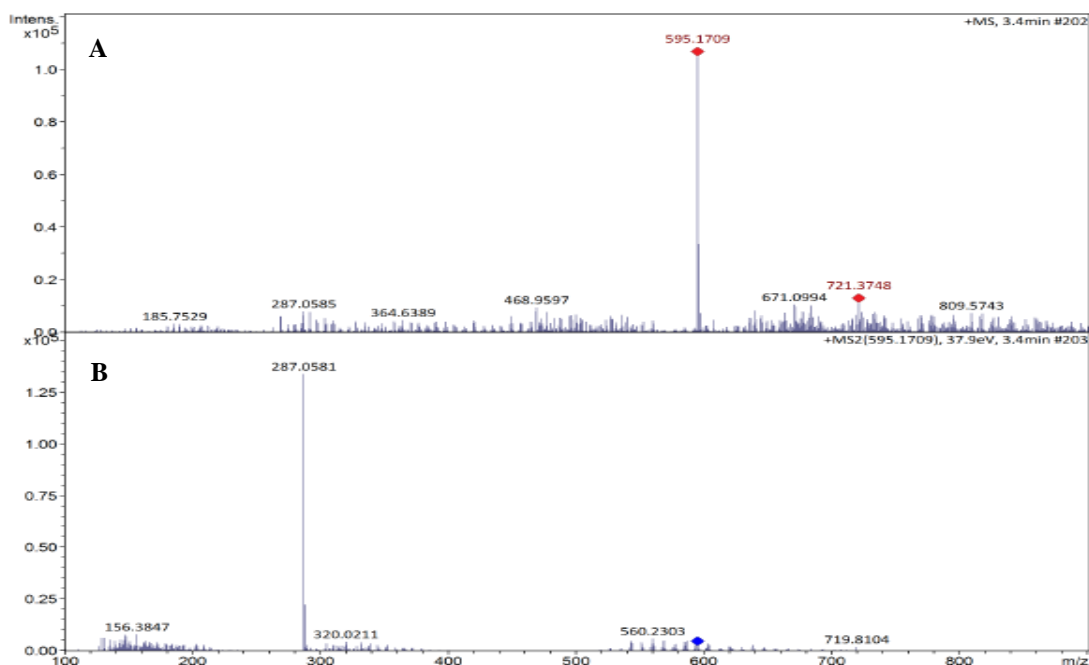


Figura 13. Íon *quasi*-molecular do flavonoide (A) e perda da rutinose (B).

Uma breve proposta para a perda de rutinose é apresentada na Figura 14, onde o oxigênio captura o hidrogênio do 2''C da glicose e é seguido pela formação da dupla ligação e liberação da ligação entre a o 1''C da glicose e o oxigênio do carbono 3C do kaempferol.

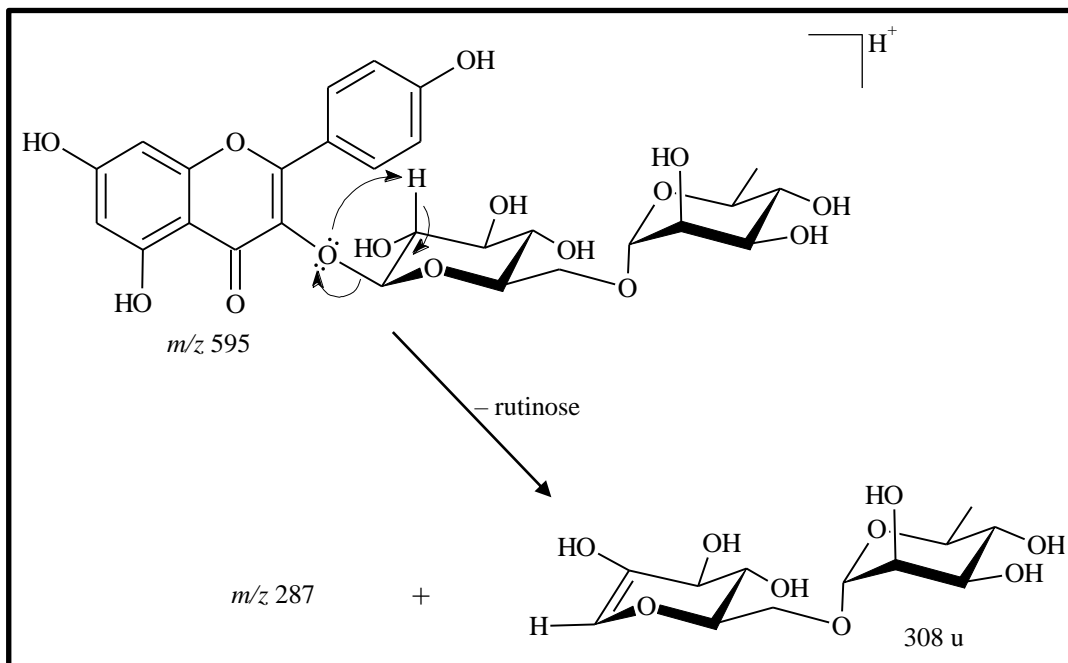


Figura 14. Proposta de fragmentação com perda de rutinose.

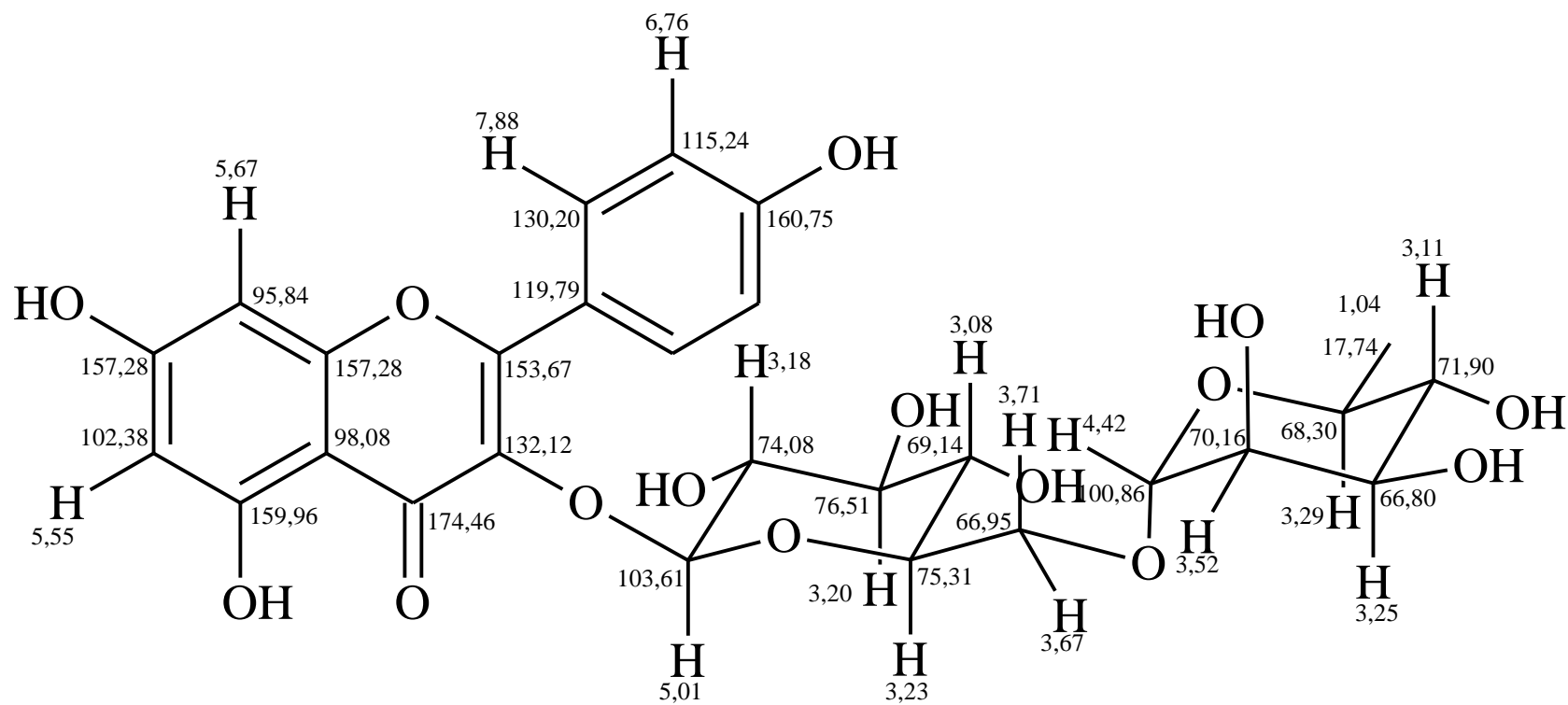


Figura 15. Estrutura com deslocamentos químicos do flavonoide kaempferol-3-O-rutinosídeo.

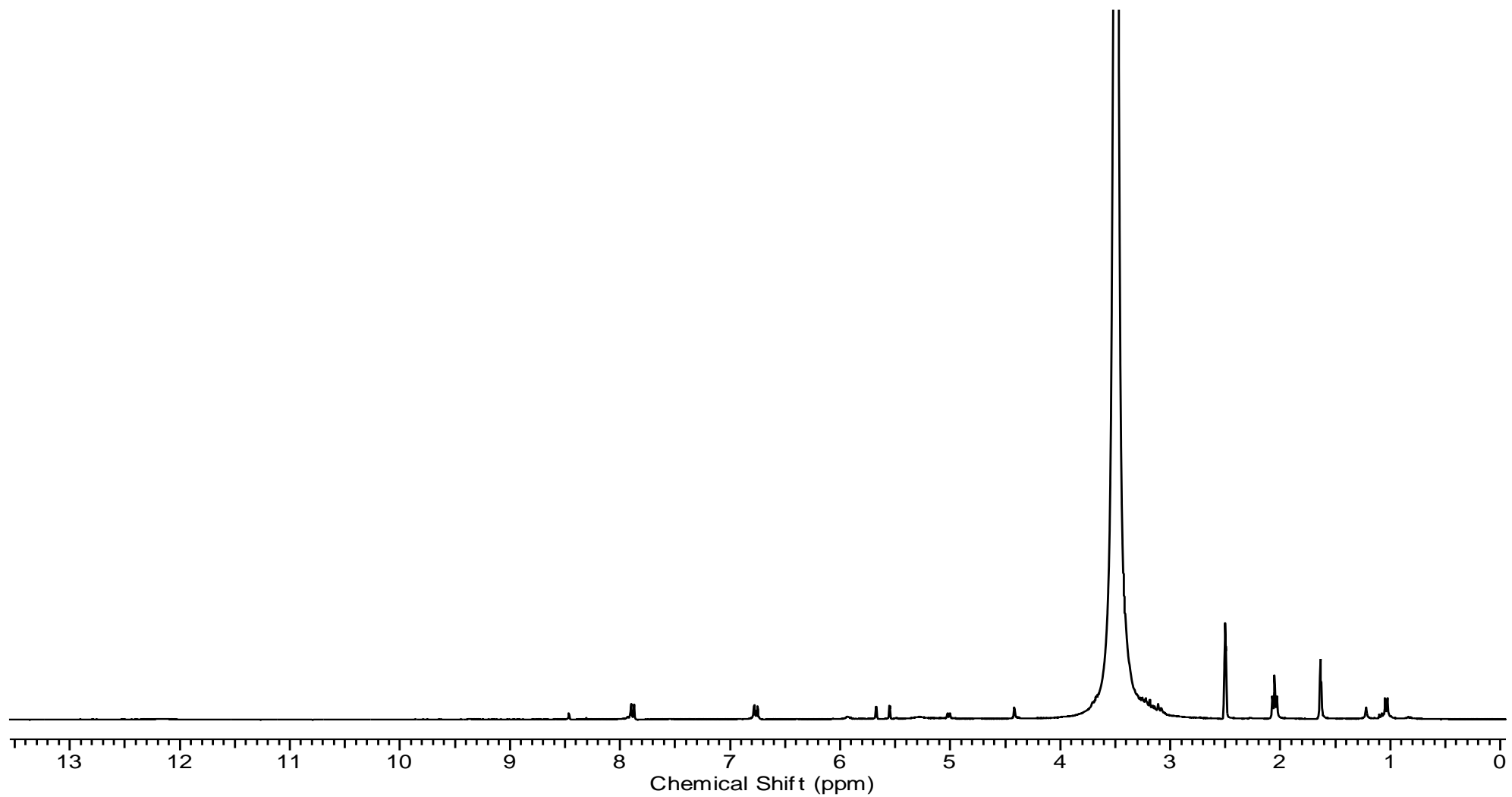


Figura 16. Espectro de RMN de ¹H sem supressão do sinal de água do flavonoide kaempferol-3-O-rutinosídeo em DMSO-d₆ (300 MHz).

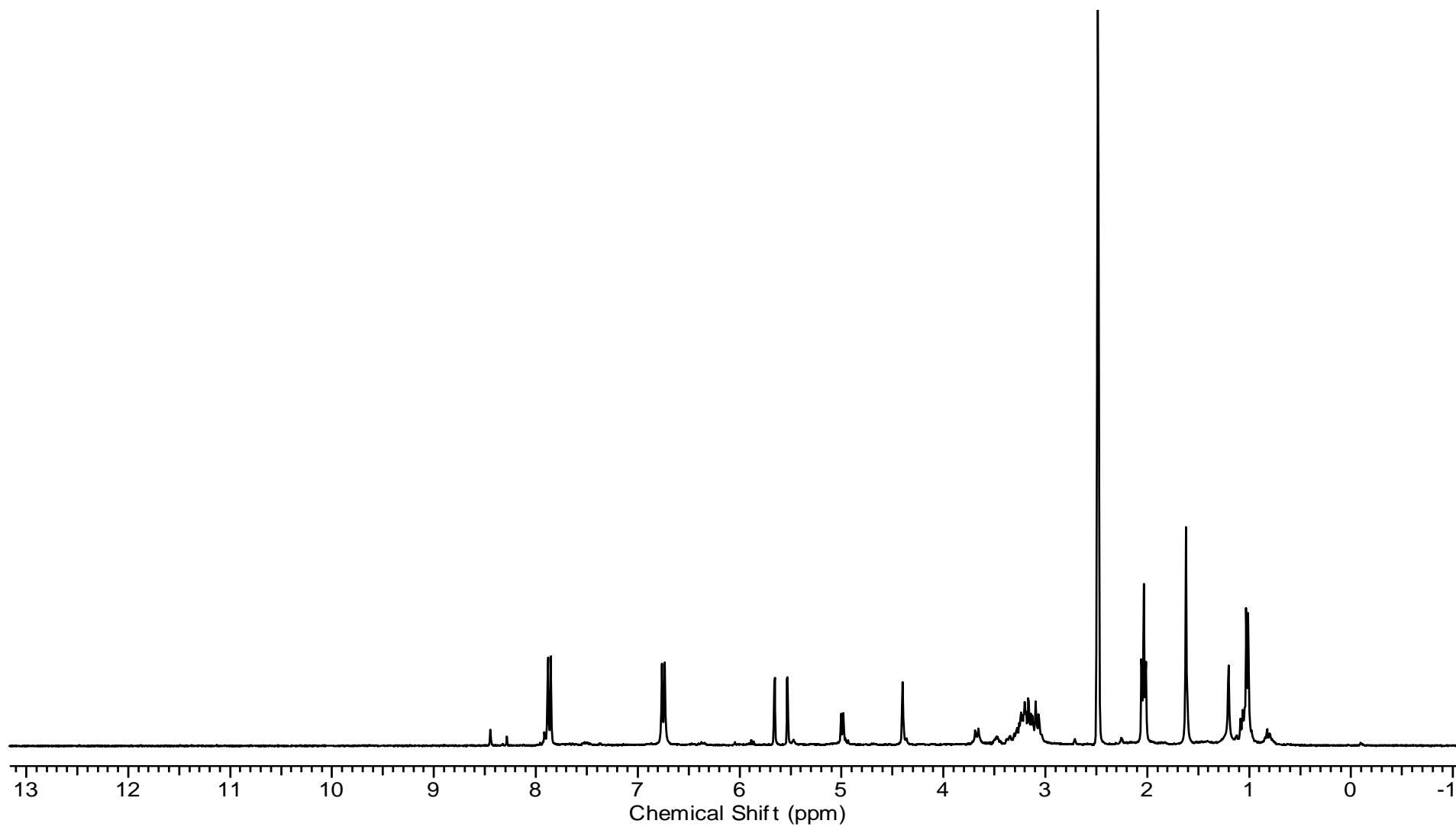


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H com supressão do sinal de água do flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo em DMSO-d_6 (300 MHz).

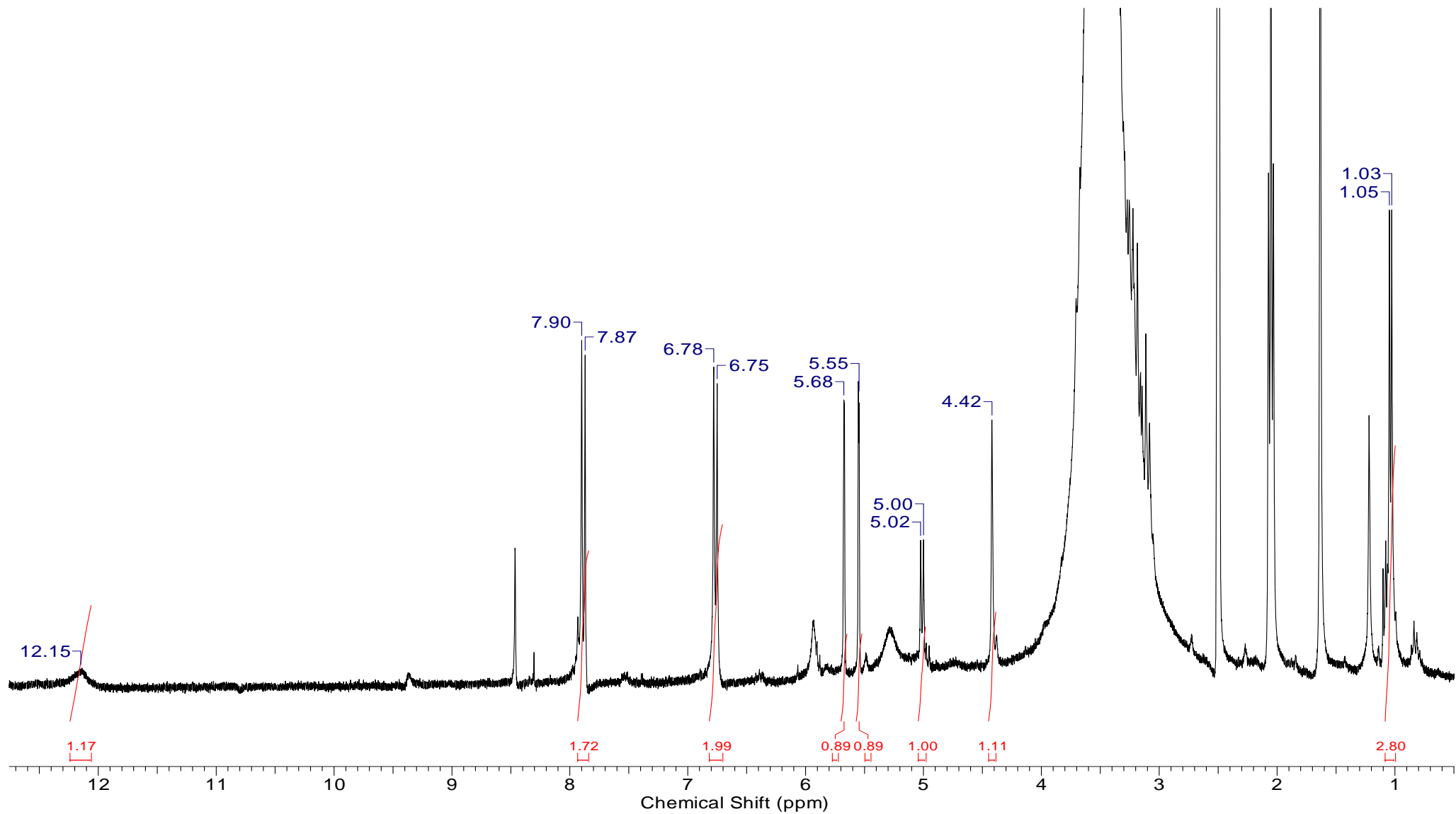


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H do flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo em DMSO-d_6 (300 MHz).

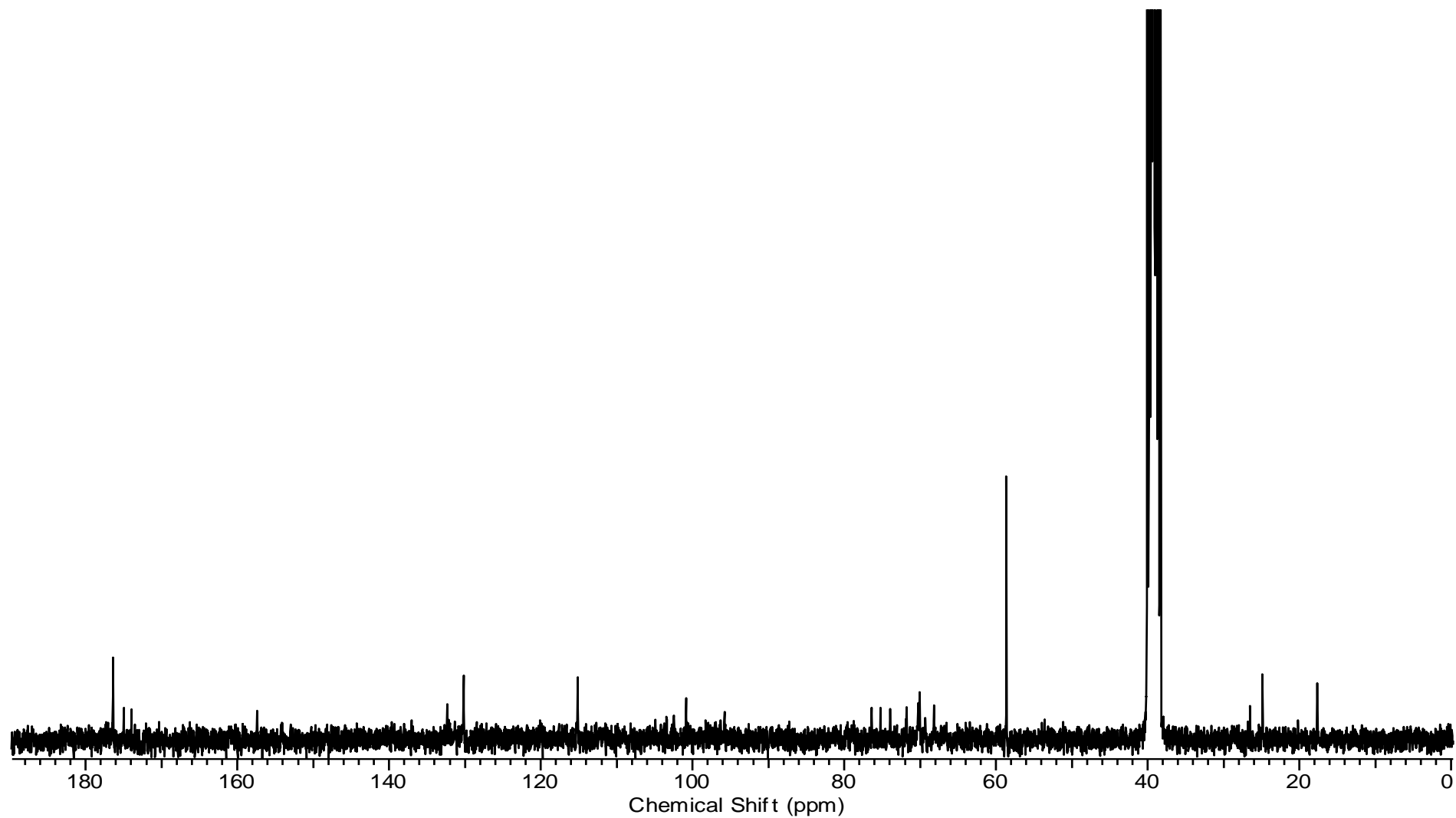


Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C do flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo em DMSO-d_6 (75 MHz).

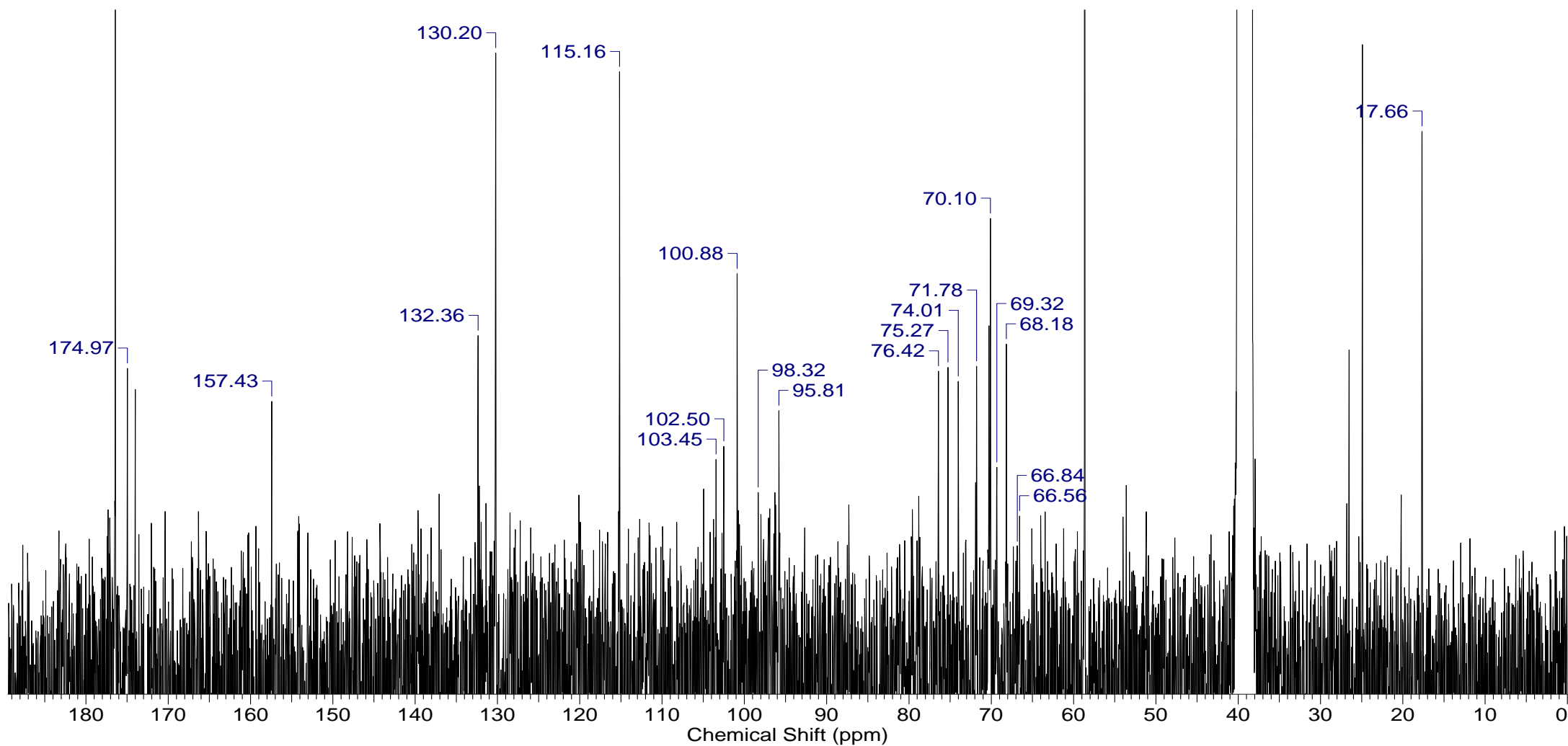


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C do flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo em DMSO-d_6 (75 MHz).

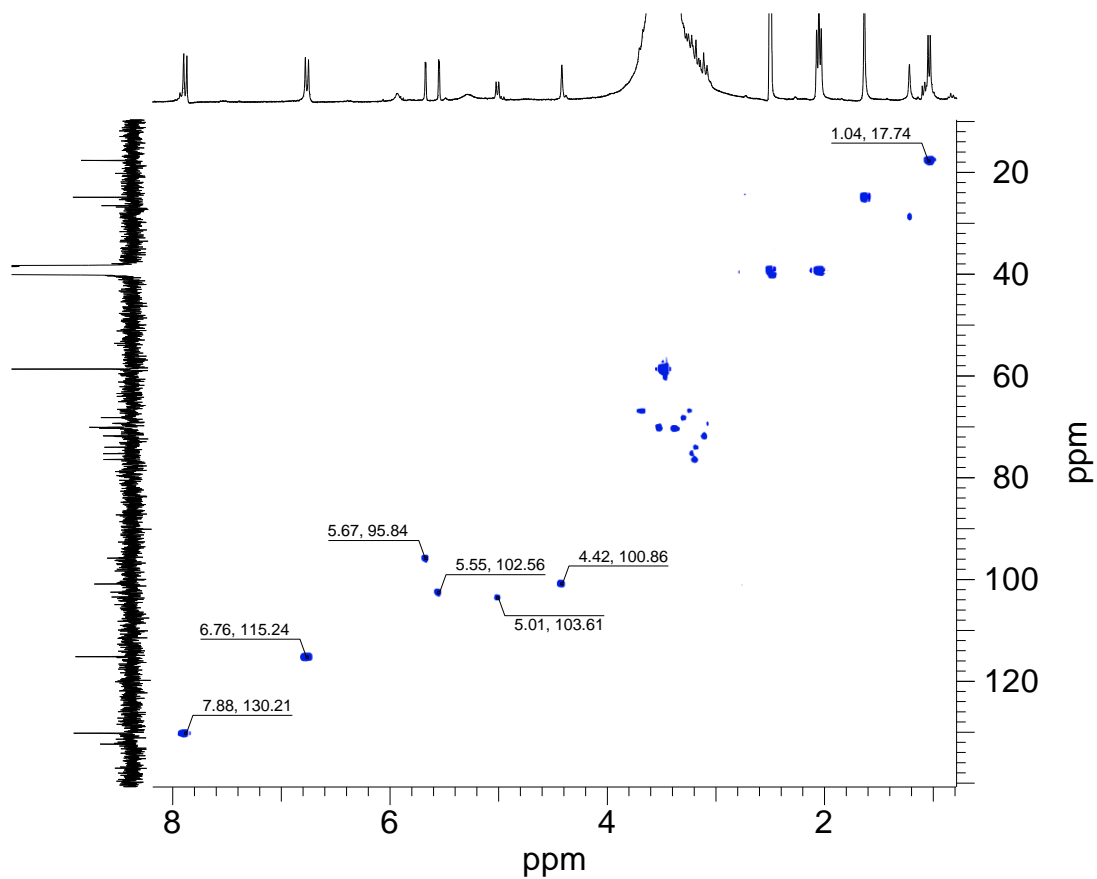


Figura 21. Espectro de HSQC do flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo em DMSO-*d*₆ (300 e 75 MHz).

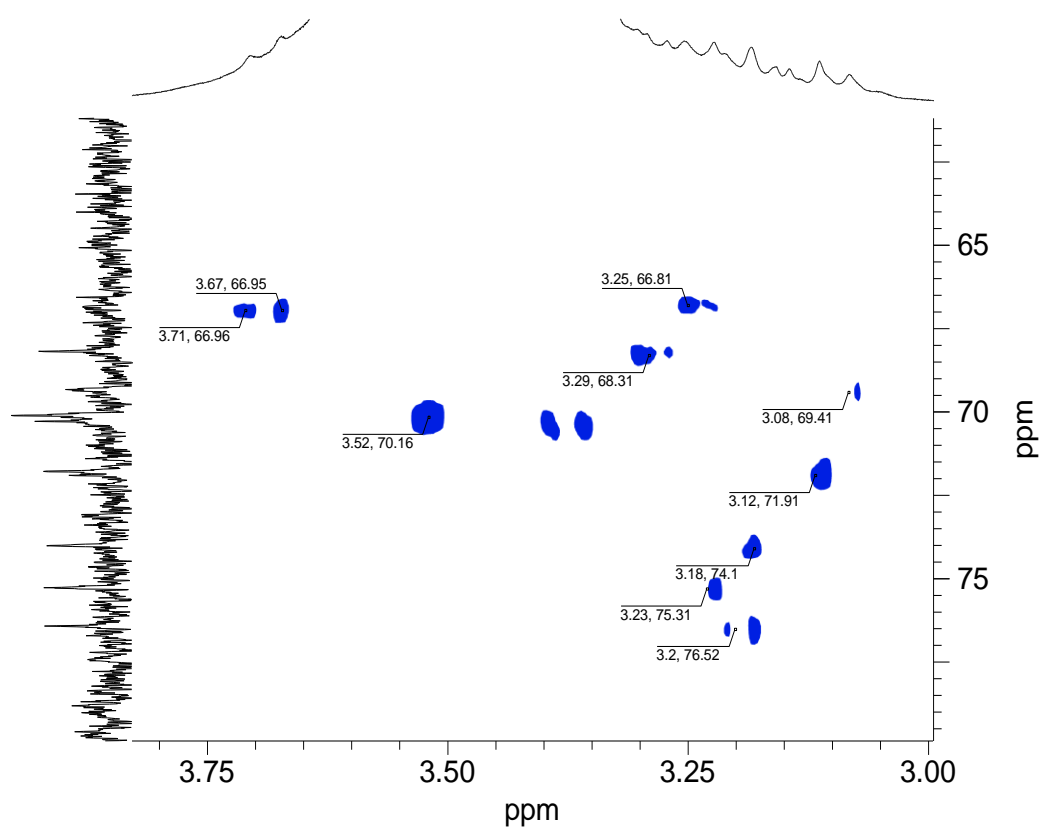


Figura 22. Espectro de HSQC da região dos carbonos dos açúcares do kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (300 e 75 MHz).

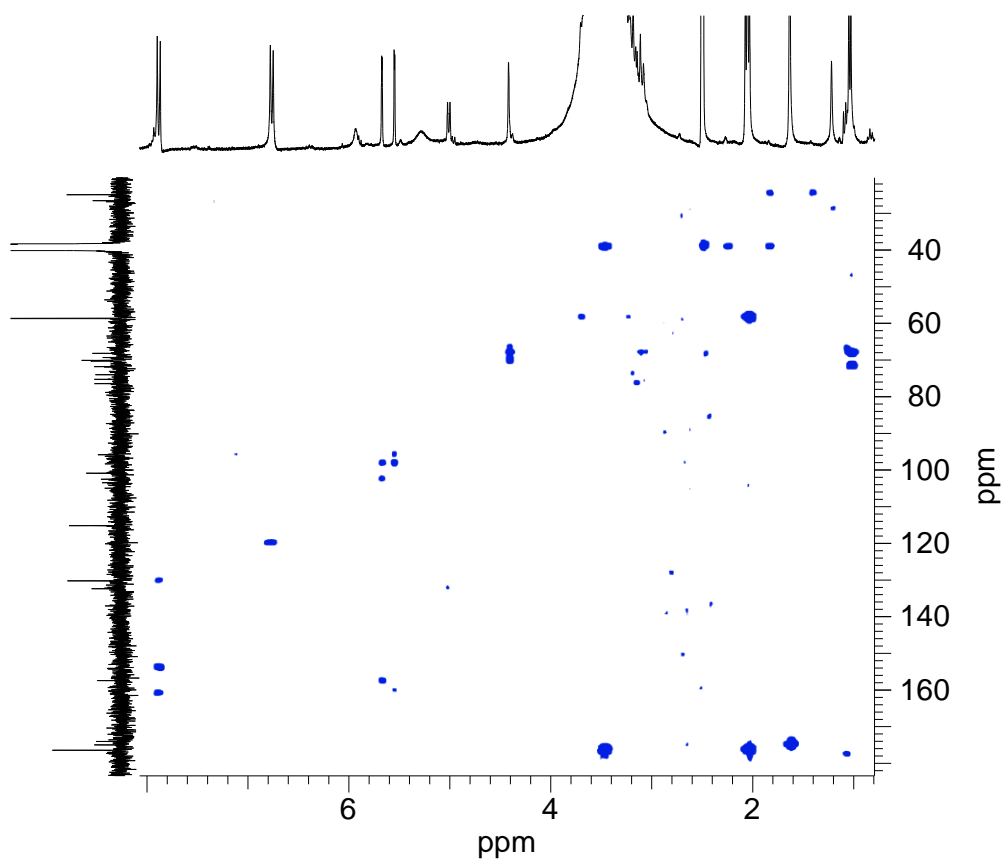


Figura 23. Espectro do mapa de contorno HMBC do flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (300 e 75 MHz).

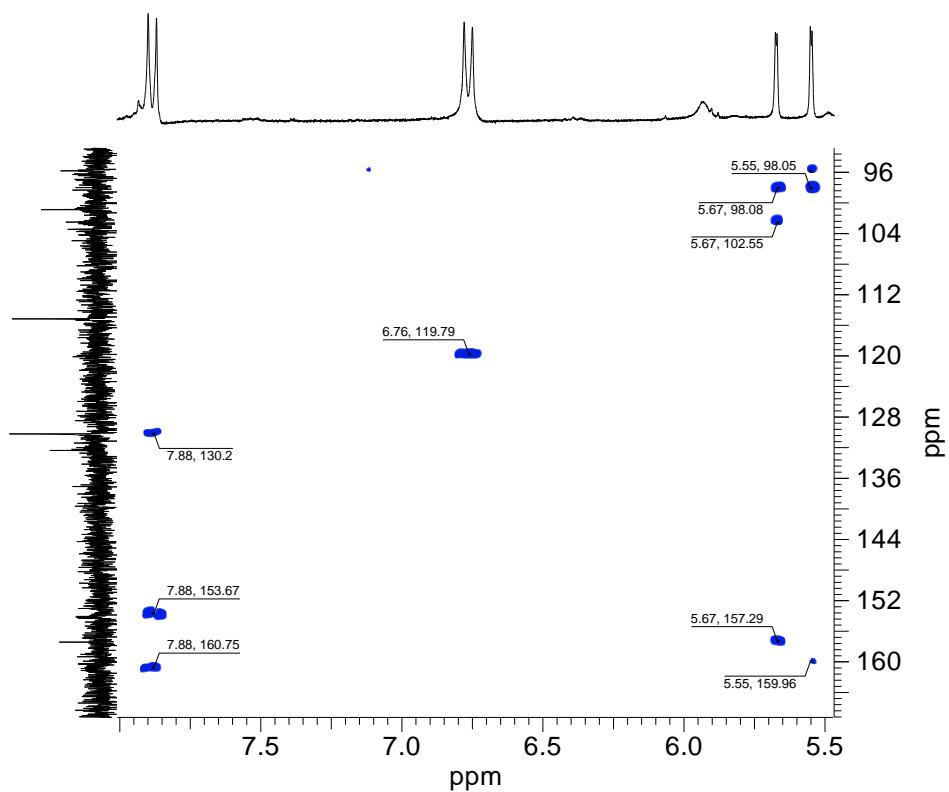


Figura 24. Expansão do HMBC na região dos aromáticos (300 e 75 MHz).

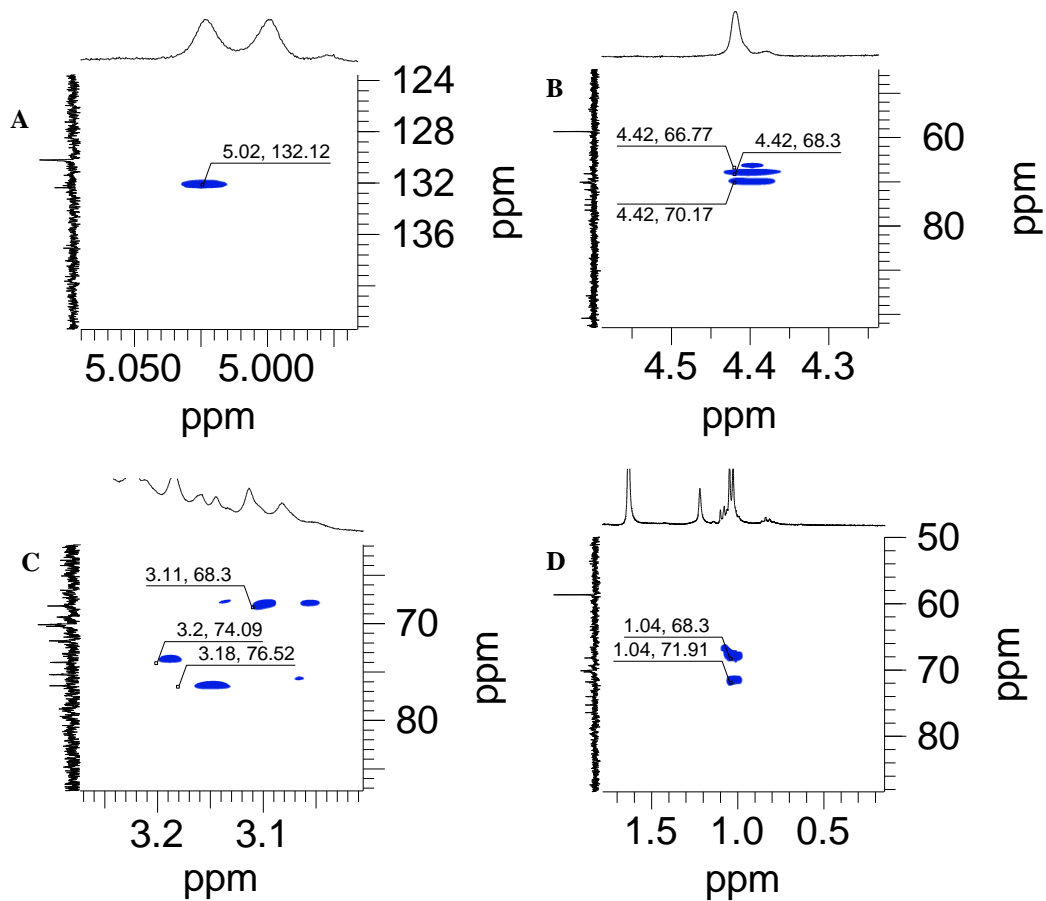


Figura 25. Expansões do HMBC para correlações do H-1'' (A), H-1''' (B), outros hidrogênios dos açúcares (C) e H-6''' (D).

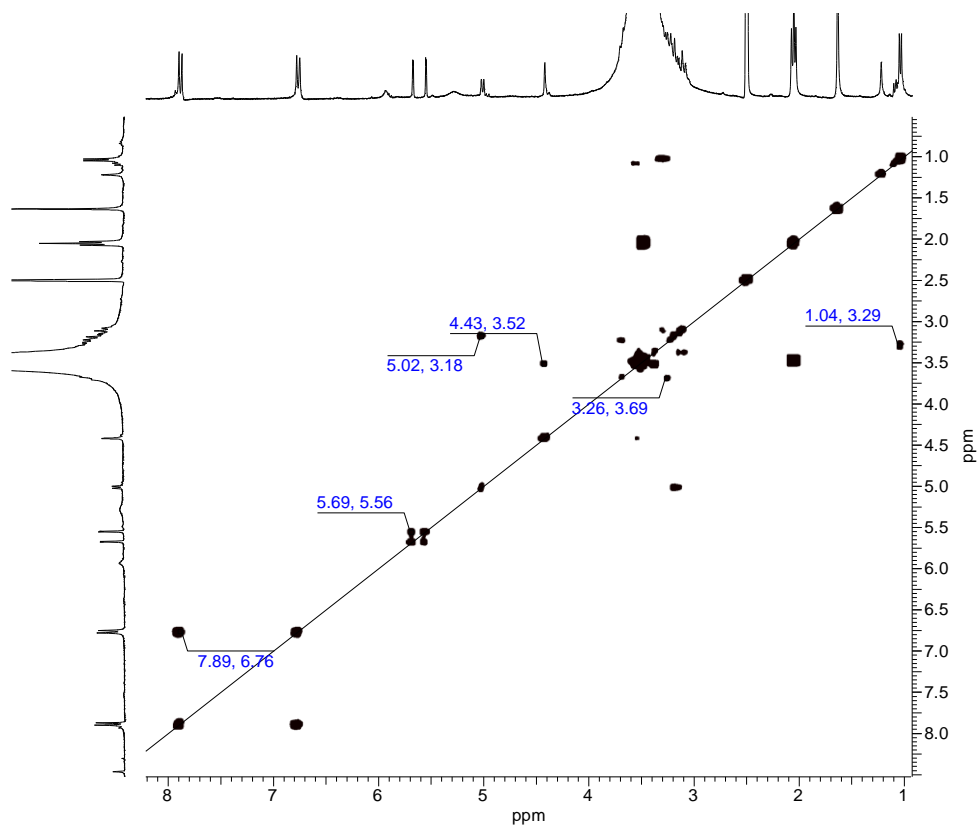


Figura 26. Espectro de COSY do flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo em DMSO- d_6 (300 MHz).

6.8 Identificação estrutural da fração Mac2

Assim como a Mac1, o espectro de RMN de ^1H (Figura 27) da fração Mac2 mostrou 2 dupletos. Um duplete estava em 7,76 ppm ($J = 8,85$ Hz) e o outro em 6,82 ppm ($J = 8,85$ Hz), ambos com integral para 2H (Figuras 28A e 28B). Através do espectro de HSQC, foi possível correlacionar o ^{13}C em 127 ppm com 7,76 ppm e 116,08 ppm com 6,82 ppm. Essas informações inferem novamente a presença de um anel aromático *p*-substituído no flavonoide e permitem concluir que o sinal 7,76 ppm representa os hidrogênios H-2' e H-6' do anel B, enquanto o sinal 6,82 ppm representa os hidrogênios H-3' e H-5' do mesmo anel.

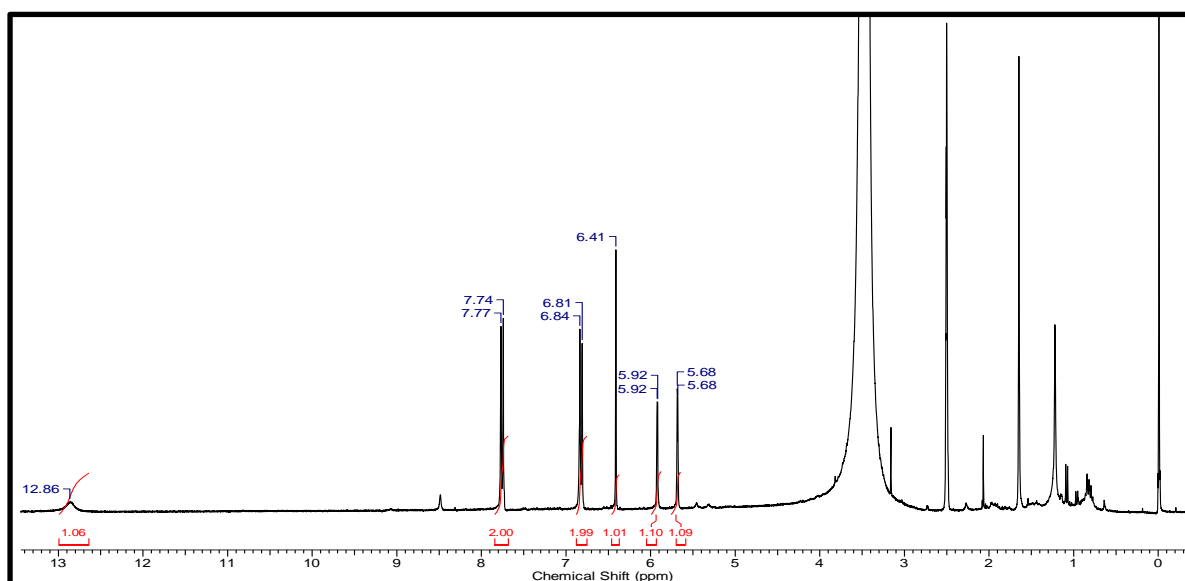


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H de Mac1 em DMSO- d_6 (300 MHz).

Dois outros dupletos em 5,92 ppm ($J = 1,77$ Hz) e 5,68 ppm ($J = 1,86$ Hz) com integral para 1H aparecem no espectro de ^1H (Figura 28C). Pelo espectro de HSQC, eles correlacionavam respectivamente com os ^{13}C 95,43 e 101,20 ppm e foram atribuídos com os carbonos 8C e 6C respectivamente do anel A do flavonoide.

Um sinal singlete em 6,41 ppm (Figura 29A) com integral para 1H, mostrou que esse hidrogênio não estava acoplado com nenhum outro na molécula. Esse deslocamento exclui qualquer possibilidade de ser um sinal de hidrogênio anomérico de açúcar, pois o mesmo apesar de estar ligado, deveria estar pelo menos até 5,3 ppm segundo uma lista de açúcares comparados por Agrawal (1992). Dessa forma, foi possível incluir esse sinal a estrutura do flavonoide, sugerindo a presença de um H-3 de flavona. O espectro que HSQC apontou ligação desse hidrogênio com o carbono em 101,33 ppm, compatível

com os carbonos 3C em flavonas (IMPERATO & NAZZARO, 1996; LIU *et al.*, 2010; ORHAN *et al.*, 2012).

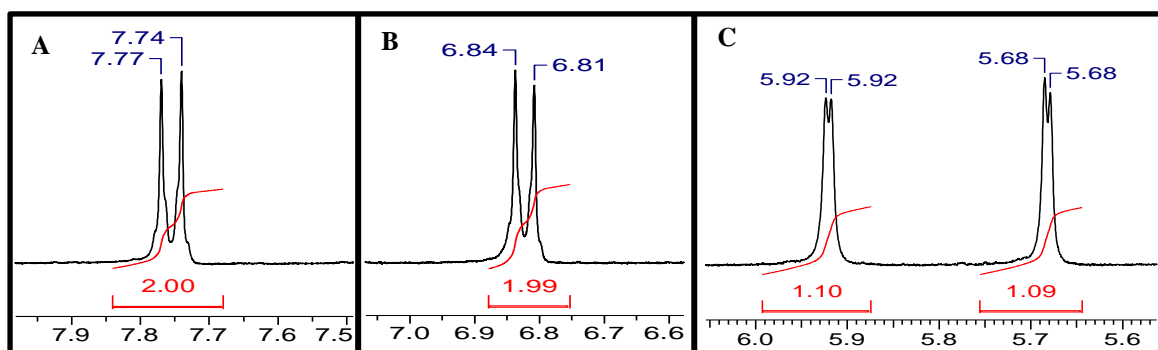


Figura 28. Dupletos dos hidrogênios H-2' e H-6' (A). Dupletos dos hidrogênios H-3' e H-5' (B). Dupletos dos hidrogênios H-8 e H-6 respectivamente (C).

Um último singlete largo em 12,86 ppm (Figura 29B), foi referente ao hidrogênio da hidroxila ligada ao 5C do anel A. Somente esses sinais apareceram no espectro de ^1H referente a molécula.

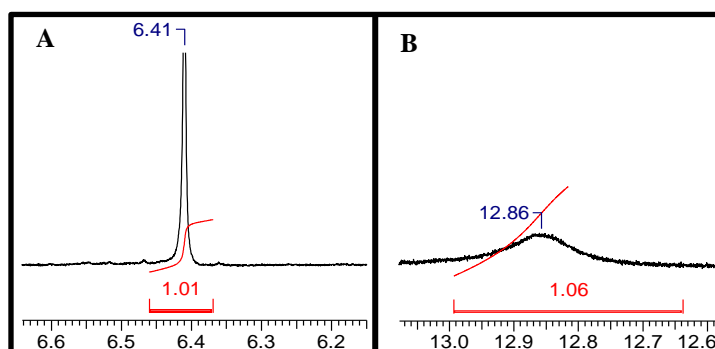


Figura 29. Singletos dos hidrogênios H-3 e da hidroxila em 5C do flavonoide.

Devido à ausência do experimento de RMN de ^{13}C , os carbonos quaternários foram inferidos pelas correlações do HMBC (Tabela 25). Com esses dados, confirmaram-se os deslocamentos dos carbonos ausentes pela correlação dos hidrogênios H-2', H-3', H-5' e H- com o 4'C (161,87 ppm), assim como os hidrogênios H-6' e H-3 com 1'C (120,35 ppm), H-3 com 2C (131,66 ppm), H-3 com 4C (179,49 ppm), H-6 com 5C (160,87 ppm), H-8 com 9C (157,74 ppm) e H-3, H-6 e H-8 com 10C (99,41 ppm).

As correlações do espectro de COSY forneceram o acoplamento entre os hidrogênios H-2' e H-6' (7,76 ppm) com os hidrogênios H-3' e H-5' (6,82 ppm), assim como o hidrogênio H-8 (5,92 ppm) com H-6 (5,68 ppm).

Apenas o carbono 7C não pôde ser inferido. Esse flavonoide apresentou o mesmo padrão de substituição do anel A do flavonoide kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, logo o valor do 7C está próximo a 165 ppm.

Com base em todas as informações obtidas, foi possível inferir que esse flavonoide se tratava da flavona apigenina. A estrutura do flavonoide com suas correlações pelo HMBC e COSY são mostrados nas Figuras 30A e 30B, respectivamente.

Tabela 25. Deslocamentos químicos e correlações do flavonoide apigenina.

Posição	¹³ C – 75 MHz	¹ H – 300 MHz	HMBC	COSY
2C	161,66	-	H-3	
3C	101,33	6,41 (1H, s)	-	
4C	179,49	-	H-3	
5C	160,87	-	H-6	
6C	101,20	5,68 (1H, d, <i>J</i> = 1,86 Hz)	H-6, H-8	H-8
7C	-	-		
8C	95,43	5,92 (1H, d, <i>J</i> = 1,86 Hz)	H-6	H-6
9C	157,74	-	H-8	
10C	99,41	-	H-3, H-8	
1'C	120,35	-	H-3, H-3', H-5'	
2'C	127,60	7,76 (2H, d, <i>J</i> = 8,85 Hz)	H-2', H-6'	H-3'
3'C	116,08	6,82 (2H, d, <i>J</i> = 8,85 Hz)	H-3', H-5'	H-2'
4'C	161,87	-	H-2', H-3', H-6', H-5'	
5'C	116,08	6,82 (2H, d, <i>J</i> = 8,85 Hz)	H-3', H-5'	H-6'
6'C	127,60	7,76 (2H, d, <i>J</i> = 8,85 Hz)	H-2', H-6'	H-5'
OH/C5	-	12,86 (1H, s,)	-	

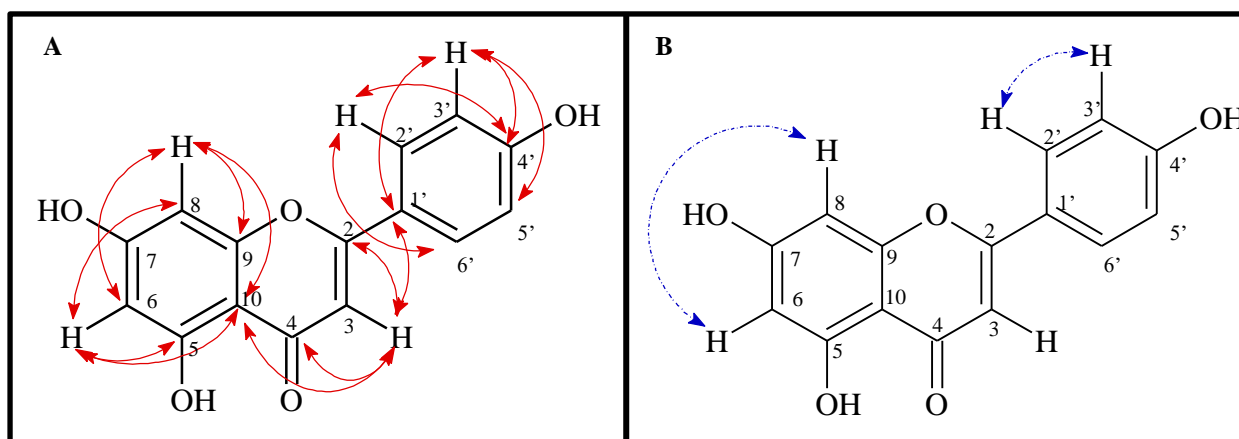


Figura 30. Correlações encontradas no mapa de contorno HMBC (A) e COSY (B) para o flavonoide apigenina.

O HPLC-MS mostrou a retenção da apigenina em 5,1 min (Figura 31) com as misturas de solventes A(H₂O + 0,1% HCOOH)/B(ACN + 0,1% HCOOH) com sistema

gradiente na Tabela 26, fluxo de 0,4 mL/min, split de 0,06 mL (MS)/0,34 mL (desc), injeção de 1 µL, temperatura de 30 °C, injetor ACN e calibrante HCOONa.

Tabela 26. Gradiente de concentração do sistema no HPLC.

Tempo (min)	% de B no sistema
0 – 8	10 – 70
8 – 10	70 – 100
10 – 12	100
12 -14	100 – 10
14 – 16	10

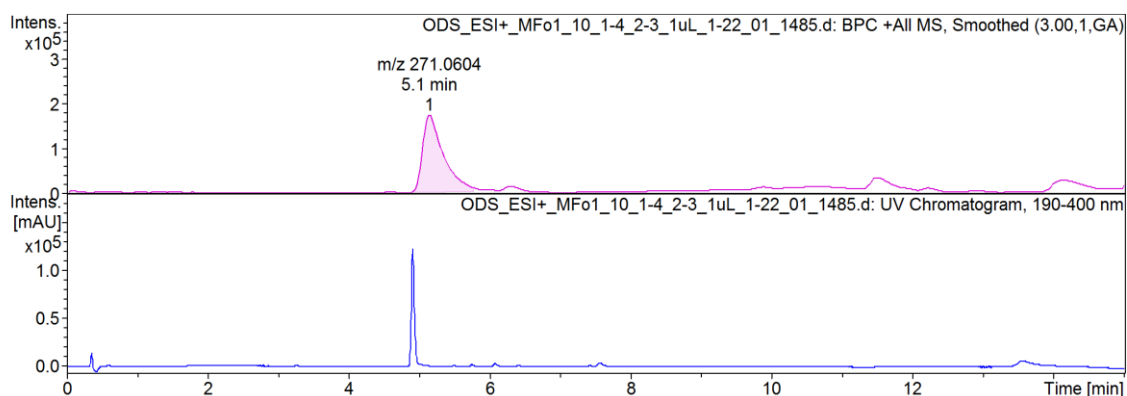


Figura 31. Retenção no HPLC do flavonoide apigenina.

A espectrometria de massas (MS) da apigenina no modo positivo com fonte ionizadora Eletrospray (ESI) mostrou um íon *quasi*-molecular com m/z 271,0604 (Figura 32). O valor do íon *quasi*-molecular confirmou o valor do flavonoide protonado $(M+H)^+$.

A biblioteca do espectrômetro de massas inferiu fórmula molecular $C_{15}H_{11}O_5$ $(M+H)^+$ com m/z 271,0604. O erro para esse valor é igual a 0,84 ppm em relação a massa isotópica m/z 271,06063, calculada. O erro é considerado aceitável para confirmação da fórmula molecular $C_{15}H_{11}O_5$.

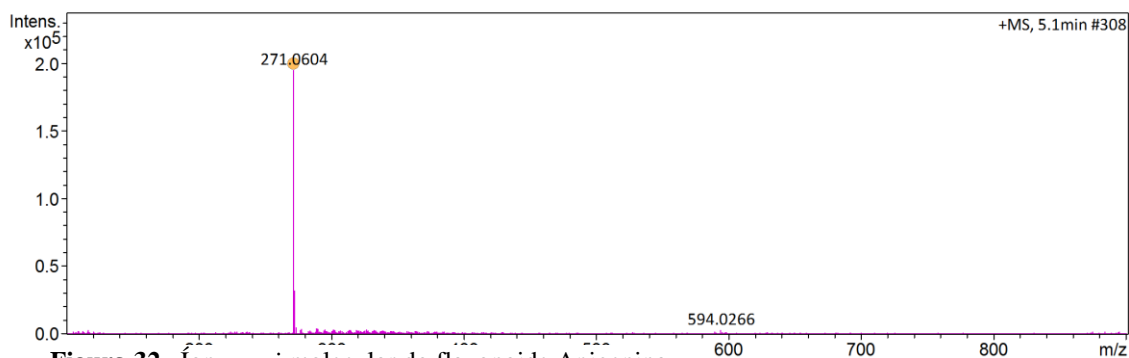


Figura 32. Íon *quasi*-molecular do flavonoide Apigenina.

A espectrometria de massas (MS) da apigenina no modo positivo com fonte ionizadora Eletrospray (ESI) mostrou um íon *quasi*-molecular com m/z 271,0604 confirmando o valor do flavonoide protonado $(M+H)^+$. Não foi realizado MS/MS da apigenina.

Esse flavonoide tem sido alvo de muitos estudos devido seus potenciais contra células tumorais, onde bons resultados são apontados para câncer no pescoço, cabeça, seios, próstata, colo retal, pele, pâncreas, fígado, coluna cervical e ovário, além de efeitos anti-inflamatório contra sepses induzidas em ratos. Todas essas atividades da apigenina, tem sido imputada à sua ação antioxidante (KARAMESE *et al.*, 2016; MADUNIC *et al.*, 2018). O ensaio realizado contra *A. salina*, não mostrou potencial tóxico do extrato metanólico das folhas, no entanto, as muitas substâncias presentes no extrato (principalmente por ser folhas) podem ter interferido na ação da apigenina, visto a grande presença de clorofilas no extrato.

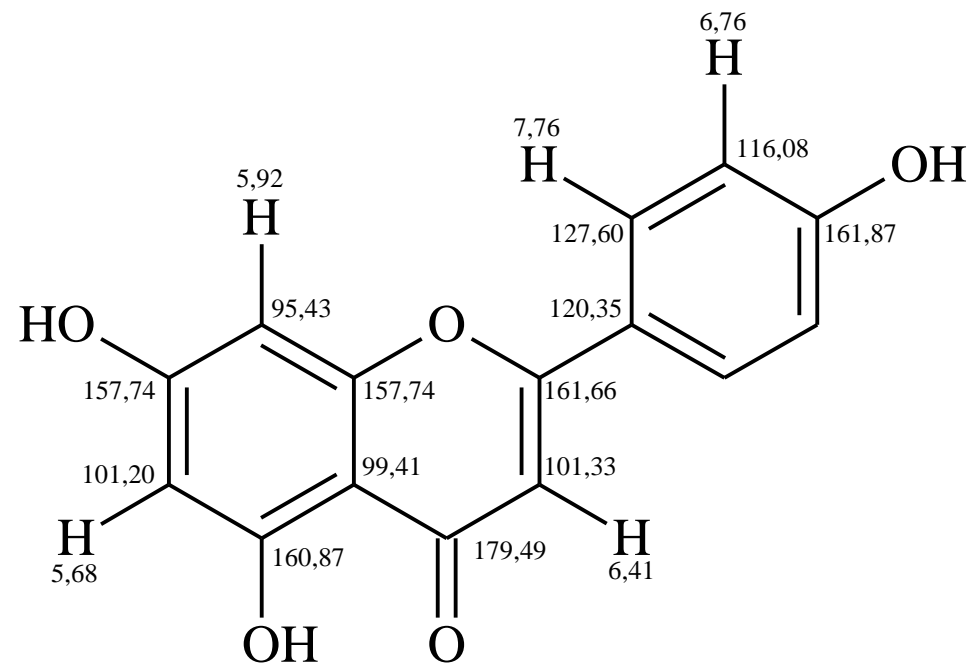


Figura 33. Estrutura com os deslocamentos químicos do flavonoide apigenina.

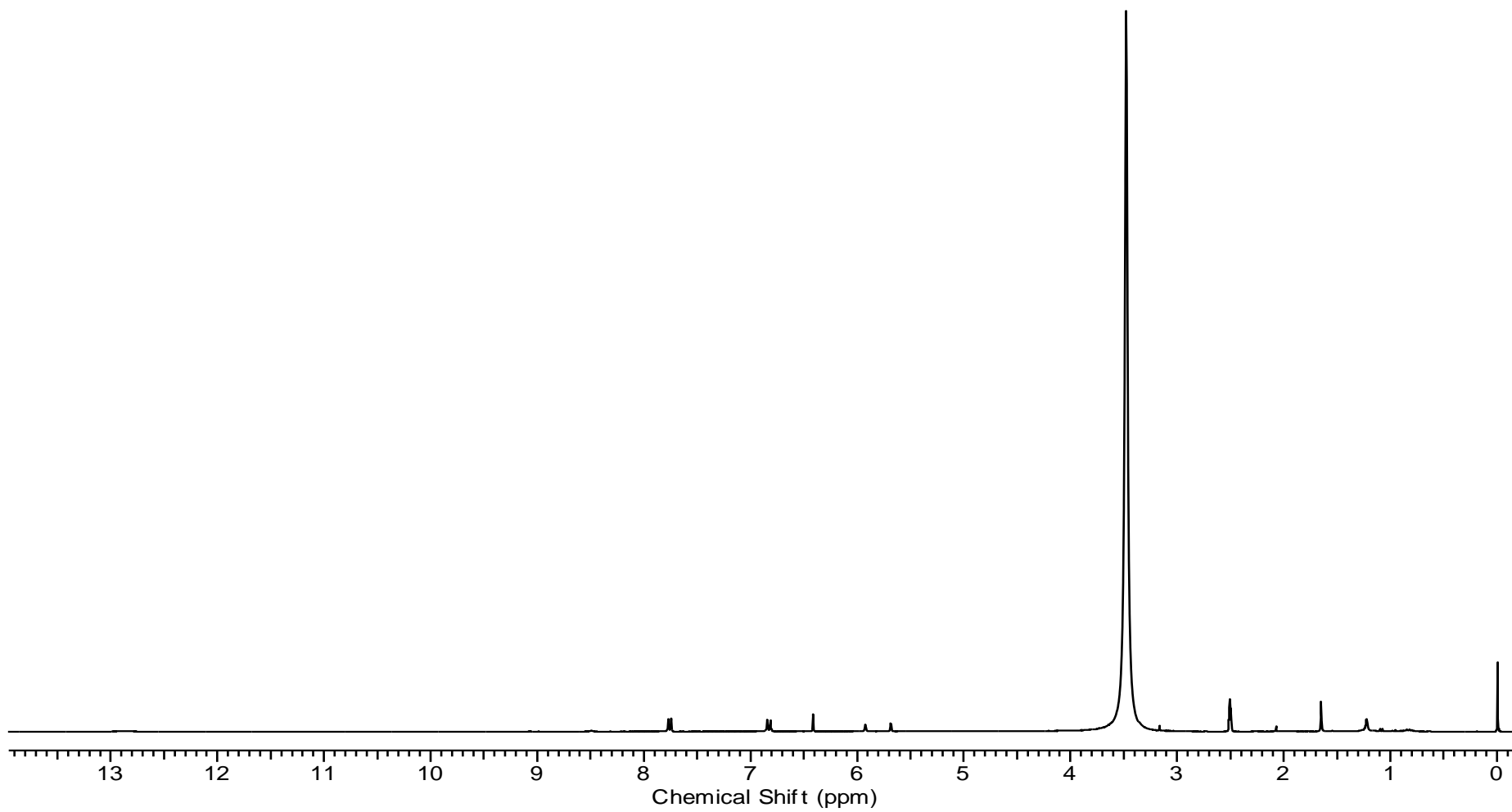


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H sem supressão do sinal da água do flavonoide apigenina em DMSO-d_6 (300 MHz).

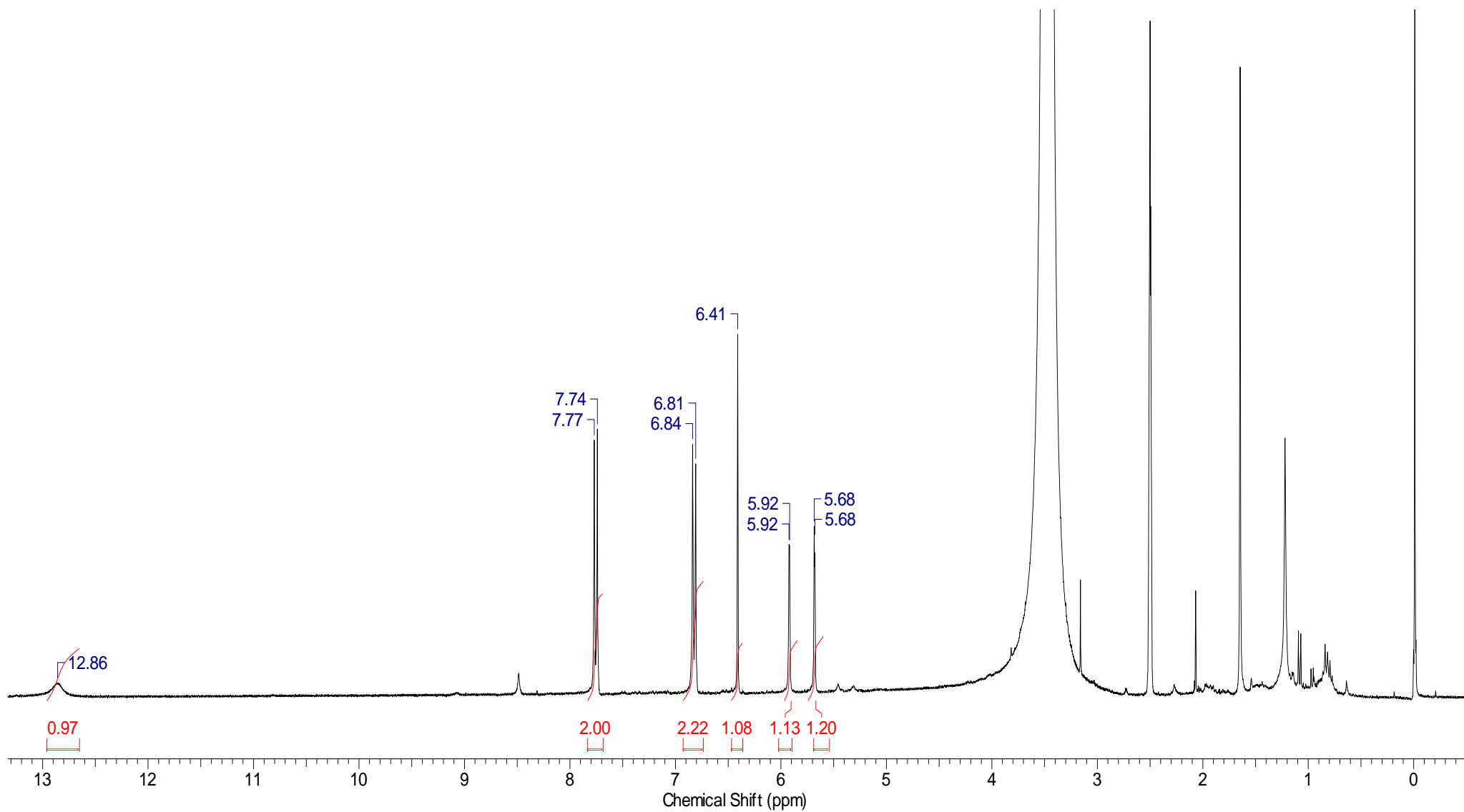


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do flavonoide apigenina em DMSO-d_6 (300 MHz).

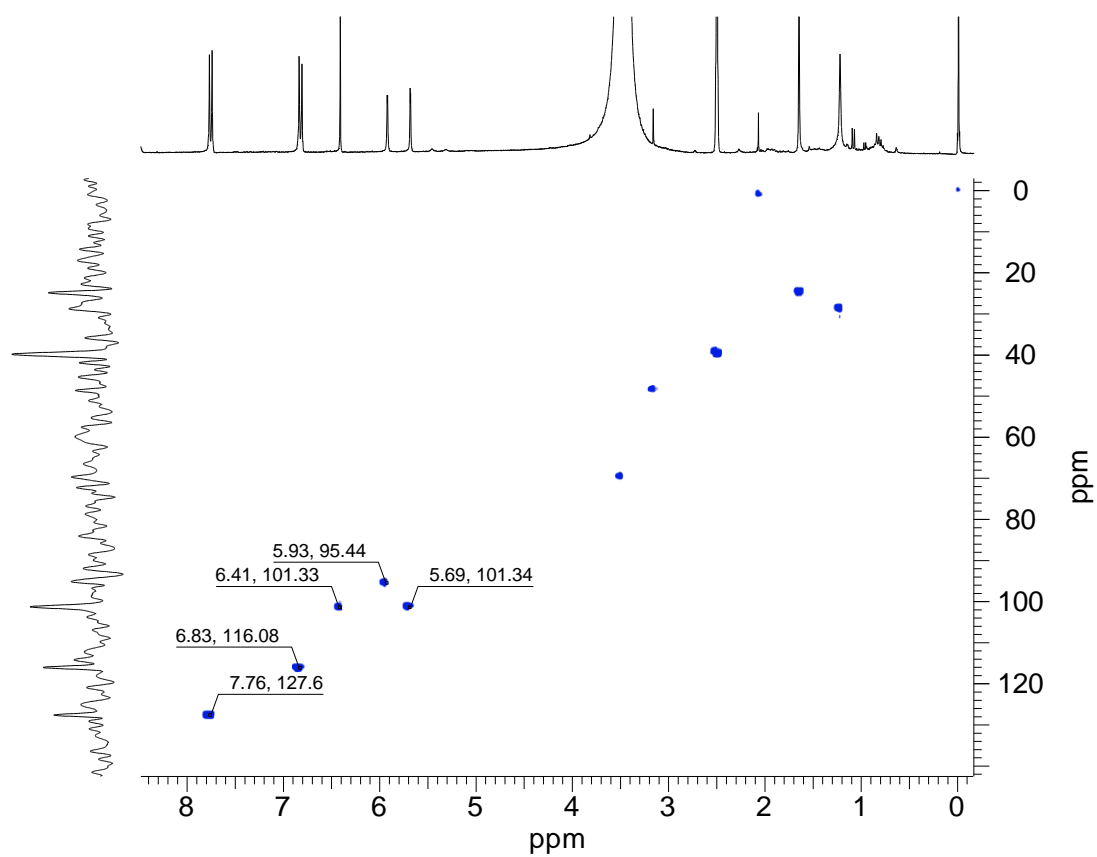


Figura 36. Espectro de HSQC do flavonoide apigenina em DMSO-d₆ (300 e 75 MHz).

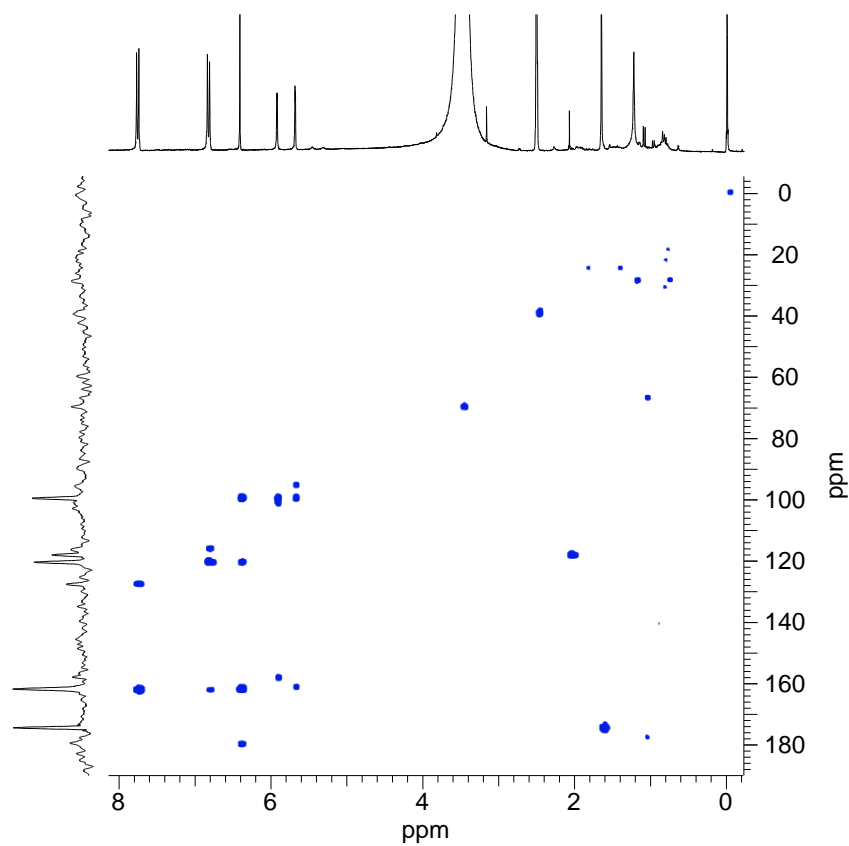


Figura 37. Espectro do mapa de contorno HMBC do flavonoide apigenina em DMSO-d₆ (300 e 75 MHz).

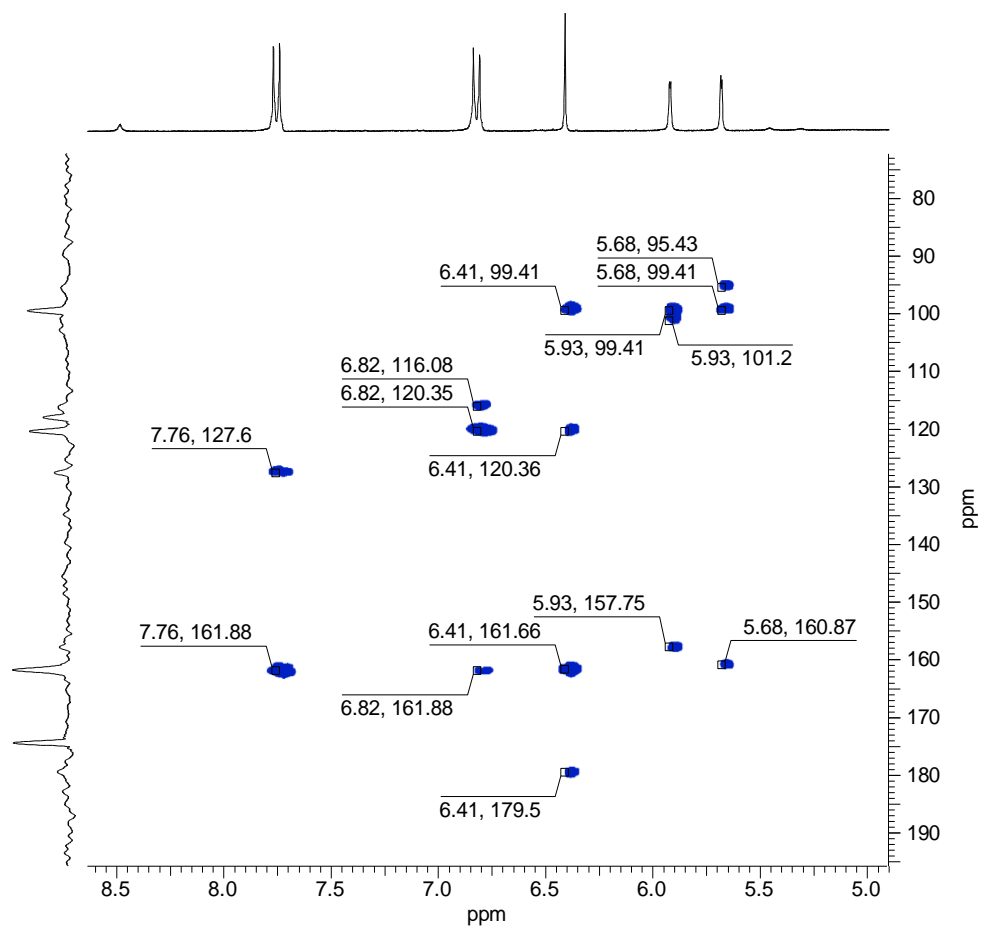


Figura 38. Expansão do HMBC para todas as correlações do flavonoide apigenina em DMSO-d₆ (300 e 75 MHz).

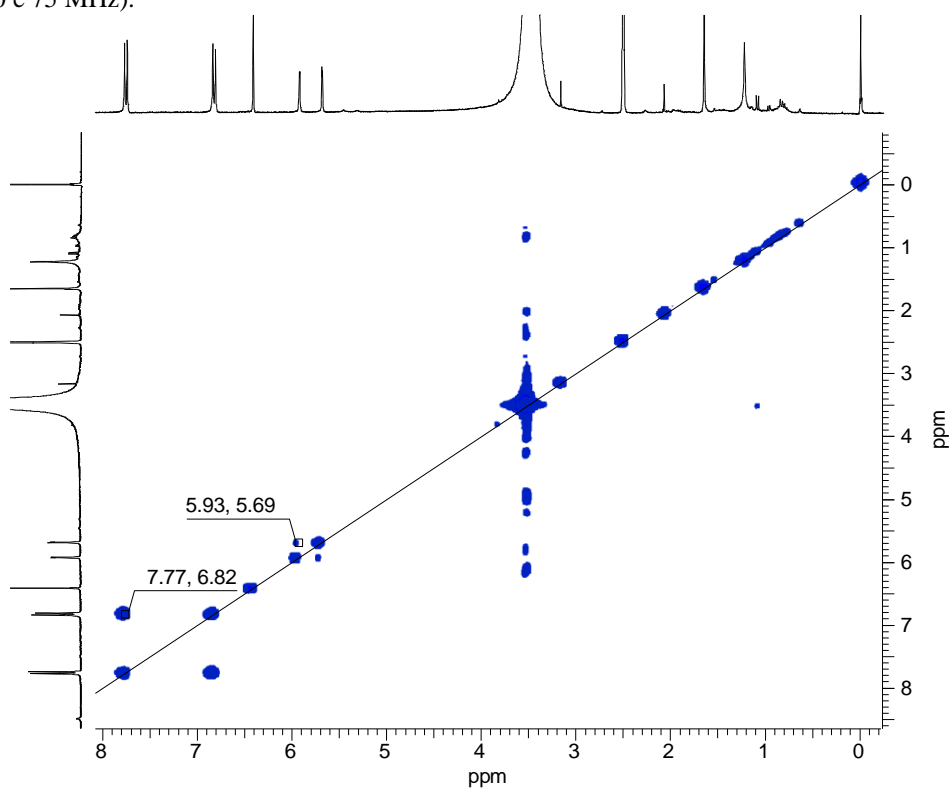


Figura 39. Espectro de COSY do flavonoide apigenina em DMSO-d₆ (300 MHz).

6.9 Identificação estrutural da fração Mac3

Todos os sinais foram melhores visualizados com o espectro de ^1H com supressão do sinal da água. Sendo assim, espectro de ^1H (Figura 40) dessa fração mostrou um duplete em 7,49 ppm ($J = 2,14$ Hz) com integral para 1H (Figura 41A) e um duplo duplete em 7,45 ppm ($J = 8,66; 2,14$ Hz) também com integral para 1H (Figura 41A). A presença de outro duplete em 6,79 ppm ($J = 8,66$ Hz) com integral para 1H (Figura 41B) mostrou estar acoplado com o sinal em hidrogênio em 7,45 ppm, separados apenas por três ligações. Devido a pequena constante de acoplamento ($J = 2,14$ Hz), o hidrogênio em 7,49 ppm mostrou estar acoplado também com o hidrogênio em 7,45 ppm, porém distantes por quatro ligações. Diferente das duas primeiras moléculas, esse flavonoide apresentou uma estrutura do anel meta (*m*-) *p*-dissubstituído, onde estão ligados aos carbonos 3'C e 4'C dois substituintes.

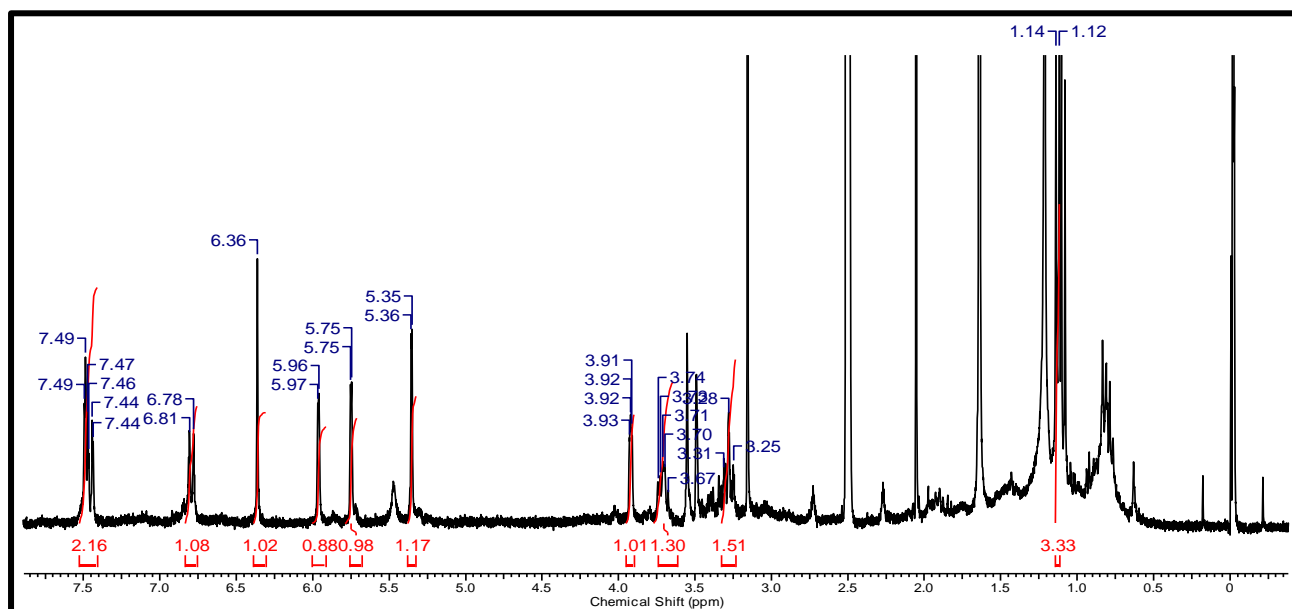


Figura 40. Espectro de ^1H de Mac3 em DMSO-d_6 (300 MHz).

O mapa de contorno de HSQC permitiu inferir que os valores dos ^{13}C ligados aos hidrogênios eram 116,48 ppm para o hidrogênio em 7,49 ppm (H-2'), 122,23 ppm para o 7,45 ppm (H-6') e 117,64 ppm para o 6,79 ppm (H-5'). Essas informações foram importantes para confirmação do padrão *m*- *p*-dissubstituído, visto que as hidroxilas atuam fazendo um efeito de blindagem para os carbonos vizinhos, diminuindo seus valores em ppm. Logo, um carbono localizado em 2'C do anel B, tem valores que atingem até 130 ppm se o carbono vizinho (3'C) estiver ligado a um hidrogênio, mas que caem

para os mesmos valores que carbonos 3'C e 5'C em anéis *p*-substituídos, entre 115 e 118 ppm (LEE *et al.*, 2008; YOON *et al.*, 2011).

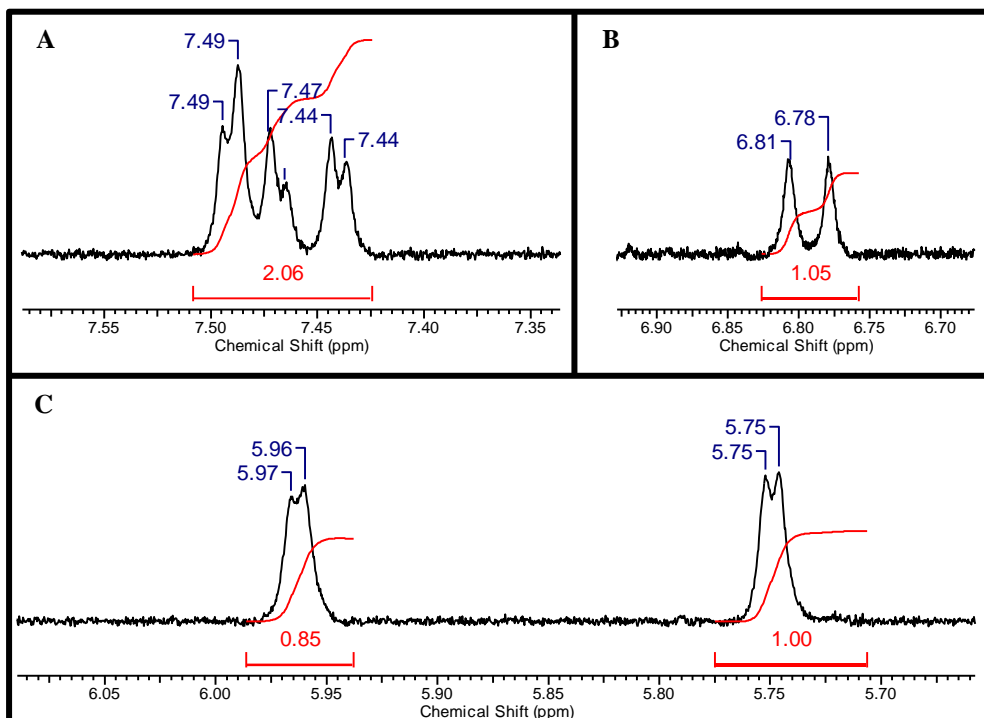


Figura 41. Duplete dos hidrogênios H-2' e H-6' (A). Duplete do hidrogênio H-5' (B). Dupletos dos hidrogênios H-8 e H-6 respectivamente (C).

Dois dupletos em 5,96 ppm ($J = 1,86$ Hz) e 5,75 ($J = 1,86$ Hz), ambos com integrais para 1H, permitiram inferir tratar-se respectivamente dos hidrogênios H-8 e H-6 (Figura 41C), do anel A do flavonoide, visto que estavam ligados aos ¹³C 95,11 ppm para 5,96 ppm e 100,78 ppm para 5,75 ppm.

Um singlete em 6,36 ppm (Figura 42A) no espectro de hidrogênio ligado ao carbono 100,9 ppm (pelo HSQC) confirmou tratar-se de mais uma flavona, sendo afirmado como o H-3 do anel C dessa estrutura. Outro sinal na forma de morro em 12,91 ppm mostrou a presença de uma hidroxila no 5C do anel A. Com esses dados, o flavonoide possui a estrutura da luteolina (OKAMURA *et al.*, 1994). O sinal em 12,91 ppm possuía uma baixa intensidade devido a pouca massa, mas foi possível inferir a presença do mesmo na molécula apenas com o espectro com sinal da água.

O espectro de hidrogênio também permitiu inferir a presença de um açúcar através do duplete em 5,35 ppm ($J = 1,49$ Hz) com integral para 1H (Figura 42B) e o mesmo estava ligado ao ¹³C em 99,55 ppm, pelo HSQC. Após o prévio indicativo do H-1'' do carbono anomérico desse açúcar, um sinal em 3,92 ppm com um formato semelhante a um quarteto (Figura 42C), inferiu ser o H-2'' desse açúcar. A presença de um duplete em

1,13 ppm ($J = 6,15$ Hz) com integral para 3H (Figura 42D) ligado ao ^{13}C em 17,36 ppm confirmou tratar-se da metila de uma ramnose. Essas informações foram importantes para indentificar o açúcar como uma ramnose de acordo com o trabalho de Agrawal (1992).

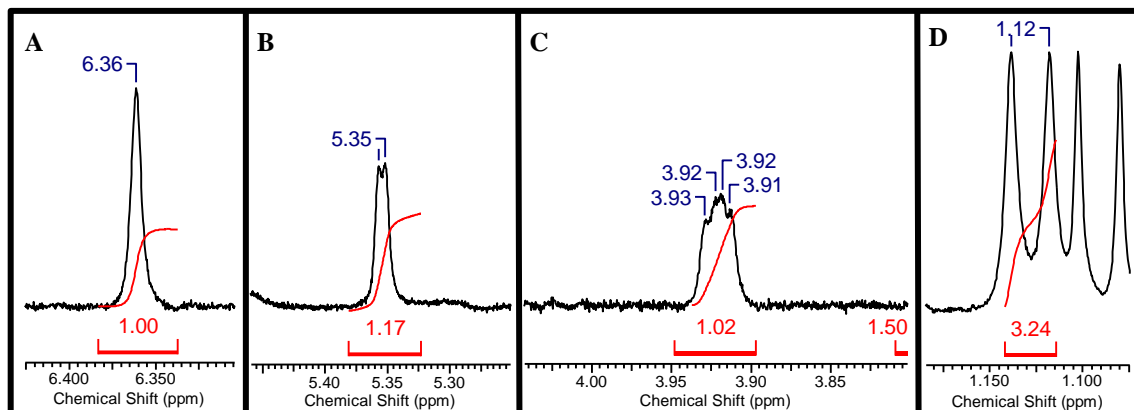


Figura 42. Sinais dos hidrogênios H-3 (A), H-1'' (B), H-2'' (C) e H-6'' (D).

deslocamentos químicos dos carbonos quaternários foram resolvidos com as correlações do HMBC. A informação obtida pela correlação do H-1'' do carbono anomérico foi crucial para identificar onde o açúcar estava ligado. Esse hidrogênio correlacionava com o ^{13}C de deslocamento químico em 144,74 ppm enquanto que os hidrogênios H-3' e H-6' acoplavam com um ^{13}C em 144,99. Os valores desses carbonos permitiram dizer que o açúcar estava ligado na posição 3'C, visto que em flavonoides com duas hidroxilas nas posições 3'C e 4'C do anel B, os carbonos 4'C apresentam um deslocamento levemente maior até 6 ppm em relação ao 3'C.

Também foi possível inferir a partir do HMBC, os deslocamentos químicos dos carbonos 162,26 ppm (2C), 179,67 ppm (4C), 158,04 ppm (9C) e 100,16 ppm (10C). Os carbonos 1'C, 5C e 7C não mostraram correlação com nenhum hidrogênio.

O espectro de COSY forneceu as correlações entre o H-6' (7,45 ppm) com o H-5' (6,79 ppm), H-1'' (5,35 ppm) com H-2'' (3,92 ppm), H-3'' (3,73 ppm) com H-4'' (3,28 ppm), assim como H-5'' (3,67 ppm) com H-6'' (1,13 ppm). As correlações de HMBC e COSY são apresentadas nas Figuras 43 e 44 respectivamente.

Com essas informações foi possível afirmar que a substância Mac3 se tratava da luteolina-3'-*O*- α -L-ramnosídeo, com registros raros nos trabalhos de Markham *et al.* (1985) e Hernández *et al.* (2012). Seus deslocamentos químicos e correlações encontram-se na Tabela 27, abaixo.

Tabela 27. Deslocamentos químicos e correlações da luteolina-3'-*O*-ramnosídeo.

Posição	¹³ C – 75 MHz	¹ H – 300 MHz	HMBC	COSY
2C	162,26	-	H-3, H-6'	
3C	100,90	6,36 (1H, s)		
4C	179,67	-	H-3	
5C	-	-		
6C	100,78	5,75 (1H, d, <i>J</i> = 1,86 Hz)		H-8
7C	-	-		
8C	95,11	5,96 (1H, d, <i>J</i> = 1,86 Hz)	H-6	H-6
9C	158,04	-	H-8	
10C	100,16	-	H-3, H-6, H-8	
1'C	-	-		
2'C	116,48	7,49 (1H, d, <i>J</i> = 2,14 Hz)	H-6'	
3'C	144,74	-	H-5'	
4'C	144,99	-	H-6', H-1''	
5'C	117,64	6,79 (1H, d, <i>J</i> = 8,66 Hz)		H-6'
6'C	122,23	7,45 (1H, dd, <i>J</i> = 8,66; 2,14 Hz)	H-2''	H-5'
1''C	99,55	5,35 (1H, d, <i>J</i> = 1,49 Hz)		H-2''
2''C	69,86	3,92 (1H, m)		H-1''
3''C	69,95	3,73 (1H, m)	H-1''	H-4''
4''C	71,92	3,28 (1H, m)	H-6''	H-3''
5''C	69,33	3,68 (1H, m)	H-6''	
6''C	17,36	1,13 (3H, d, <i>J</i> = 6,15 Hz)		H-5''
OH/5C	-	12,91 (1H, s)		

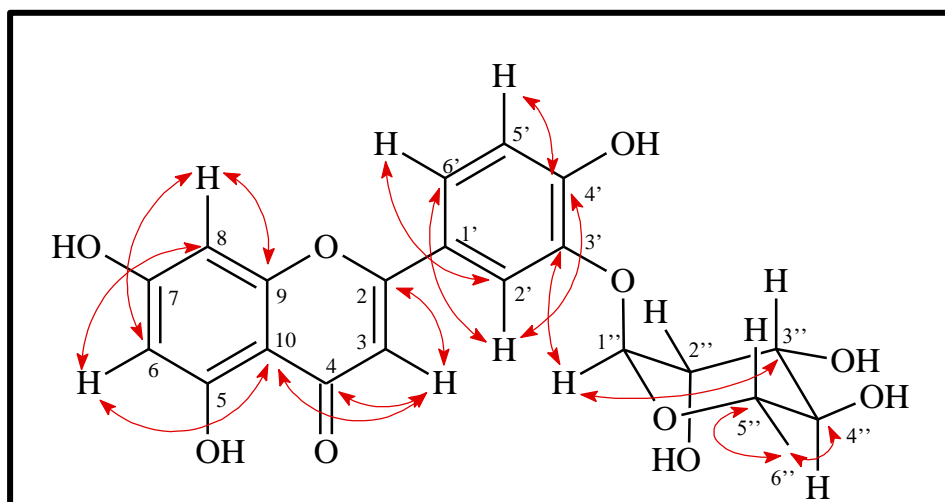


Figura 43. Correlações encontradas no mapa de contorno HMBC para o flavonoide luteolina-3'-*O*- α -L-ramnosídeo.

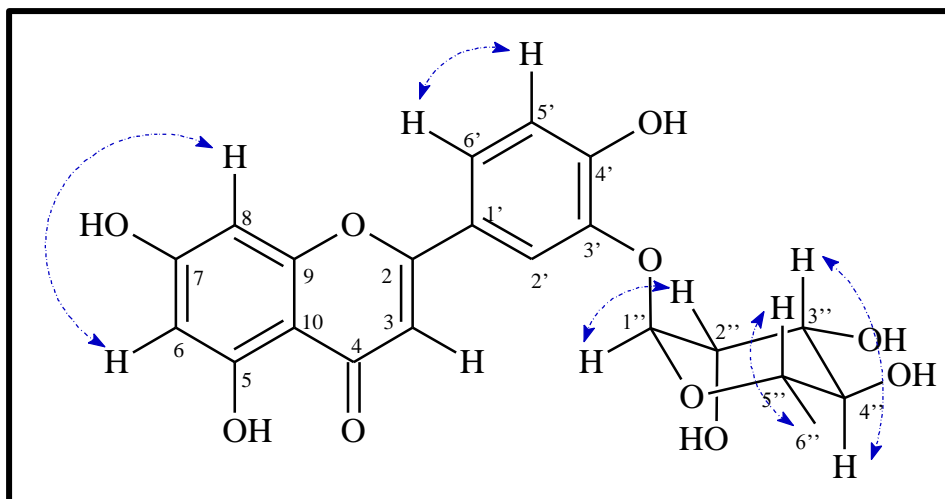


Figura 44. Correlações encontradas no COSY para o flavonoide luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo.

O HPLC-MS mostrou a retenção da luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo em 7,8 min (Figura 45) com as misturas de solventes A(H₂O + 0,1% HCOOH)/B(ACN + 0,1% HCOOH) com sistema gradiente na Tabela 28, fluxo de 0,4 mL/min, split de 0,06 mL (MS)/0,34 mL (desc), concentração de 1,5 mg/mL em metanol, injeção de 2 μ L, temperatura de 30 °C, injetor ACN e calibrante HCOONa.

Tabela 28. Gradiente de concentração do sistema no HPLC.

Tempo (min)	% de B no sistema
0 – 10	5 – 90
10 – 12	90
12 – 13	90 – 100
13 – 14	100
14 – 16	100 – 5
16 – 18	5

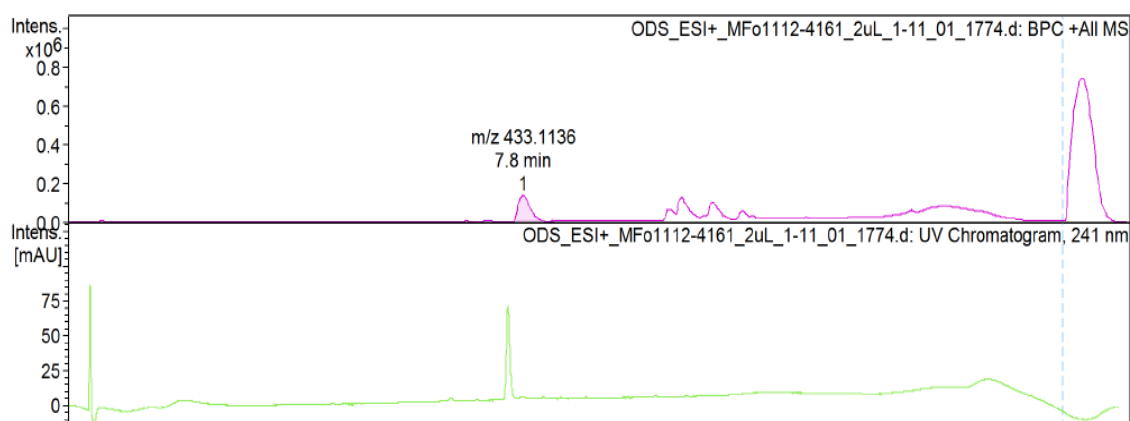


Figura 45. Retensão no HPLC do flavonoide luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo.

A espectrometria de massas (MS) da luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo no modo positivo com fonte ESI mostrou um íon *quasi*-molecular com m/z 433,1183 (Figura 46A) e MS/MS com m/z 287,0545 (Figura 46B). O valor do íon *quasi*-molecular confirmou o valor do flavonoide protonado (M+H)⁺ e a fragmentação no MS/MS coincidiu com a perda neutra de uma ramnose (146 u) e da m/z 287 da luteolina protonada.

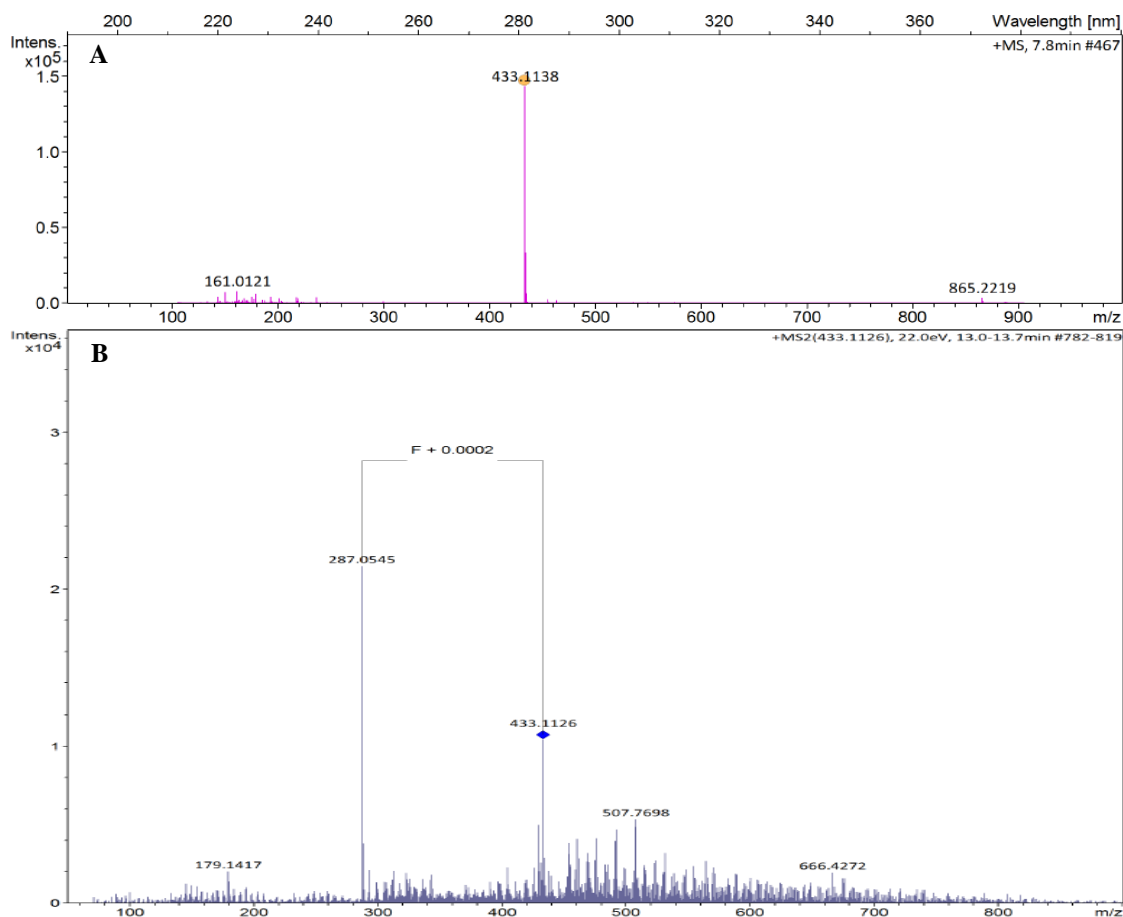


Figura 46. Íon *quasi*-molecular do flavonoide (A) e perda da ramnose (B).

A biblioteca do espectrômetro de massas inferiu fórmula molecular C₂₁H₂₁O₁₀ (M+H)⁺ com m/z 433,1183. O erro para esse valor é igual a 1,1 ppm em relação a massa isotópica m/z 433,11343, calculada. O erro é considerado aceitável para confirmação da fórmula molecular C₂₁H₂₁O₁₀.

Uma breve proposta para a perda de ramnose é apresentada na Figura 47, onde o oxigênio captura o hidrogênio do 2''C da glicose e é seguido pela formação da dupla ligação e liberação da ligação entre a o 1''C da glicose e o oxigênio do carbono 3'C da luteolina.

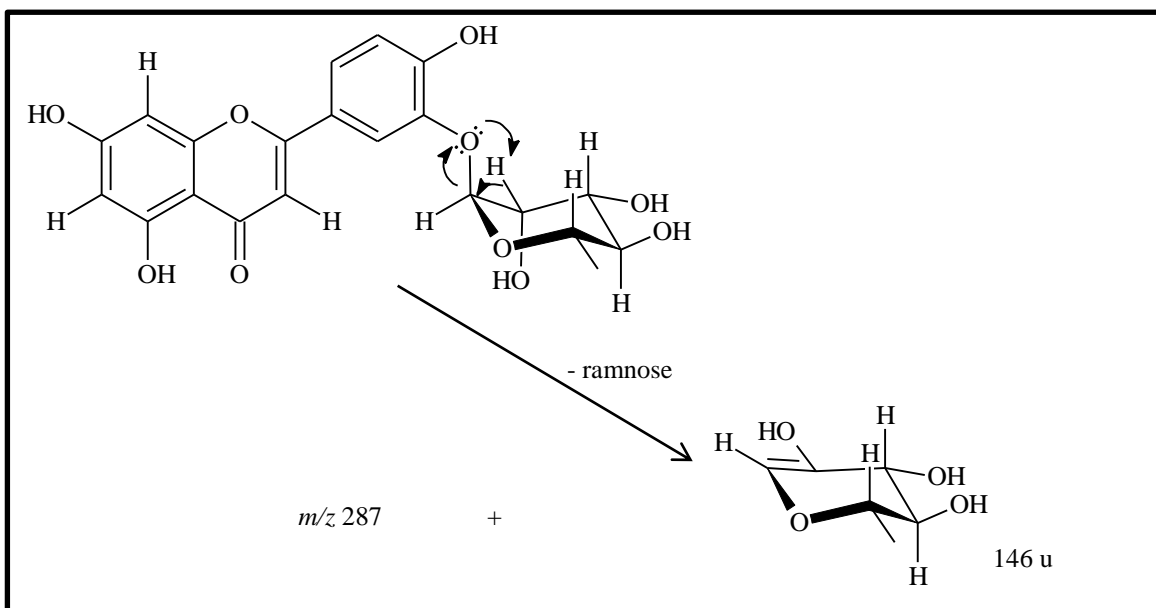


Figura 47. Proposta de fragmentação com perda de ramnose.

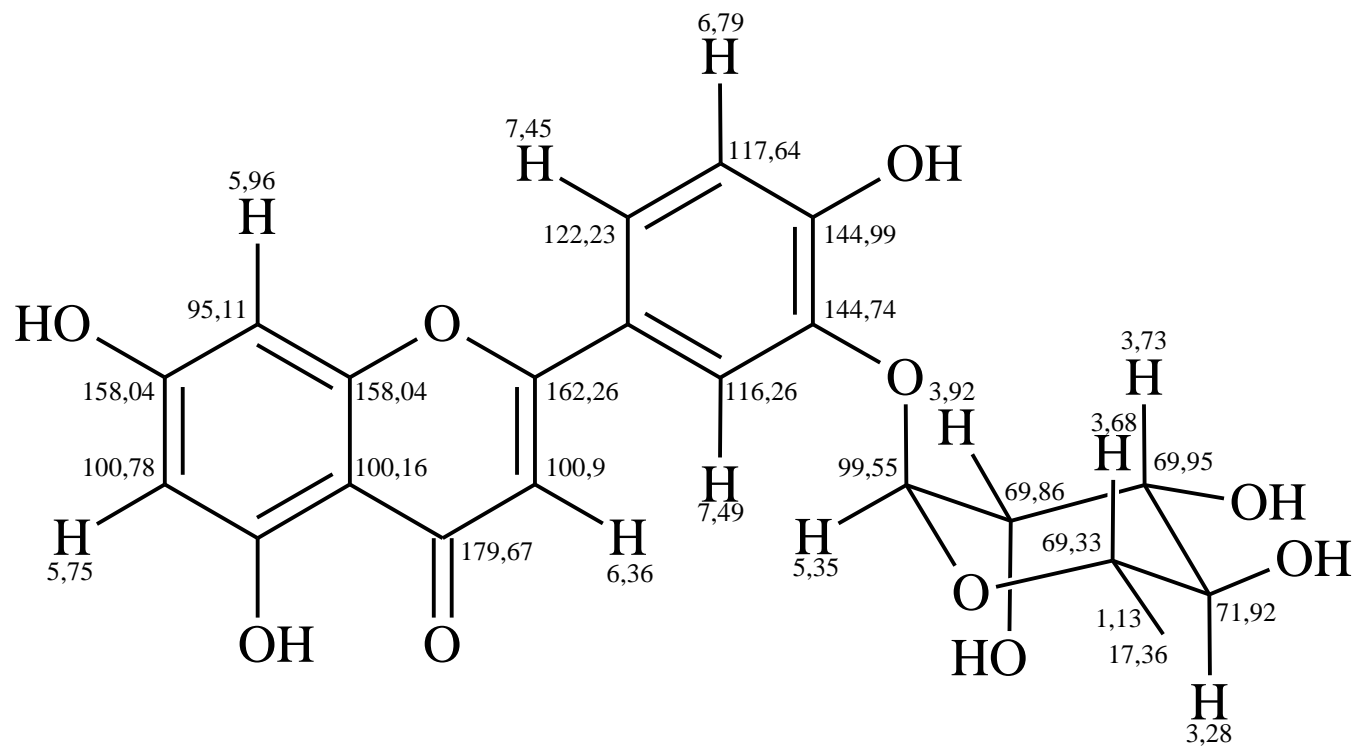


Figura 48. Estrutura com deslocamentos químicos do flavonoide luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo.

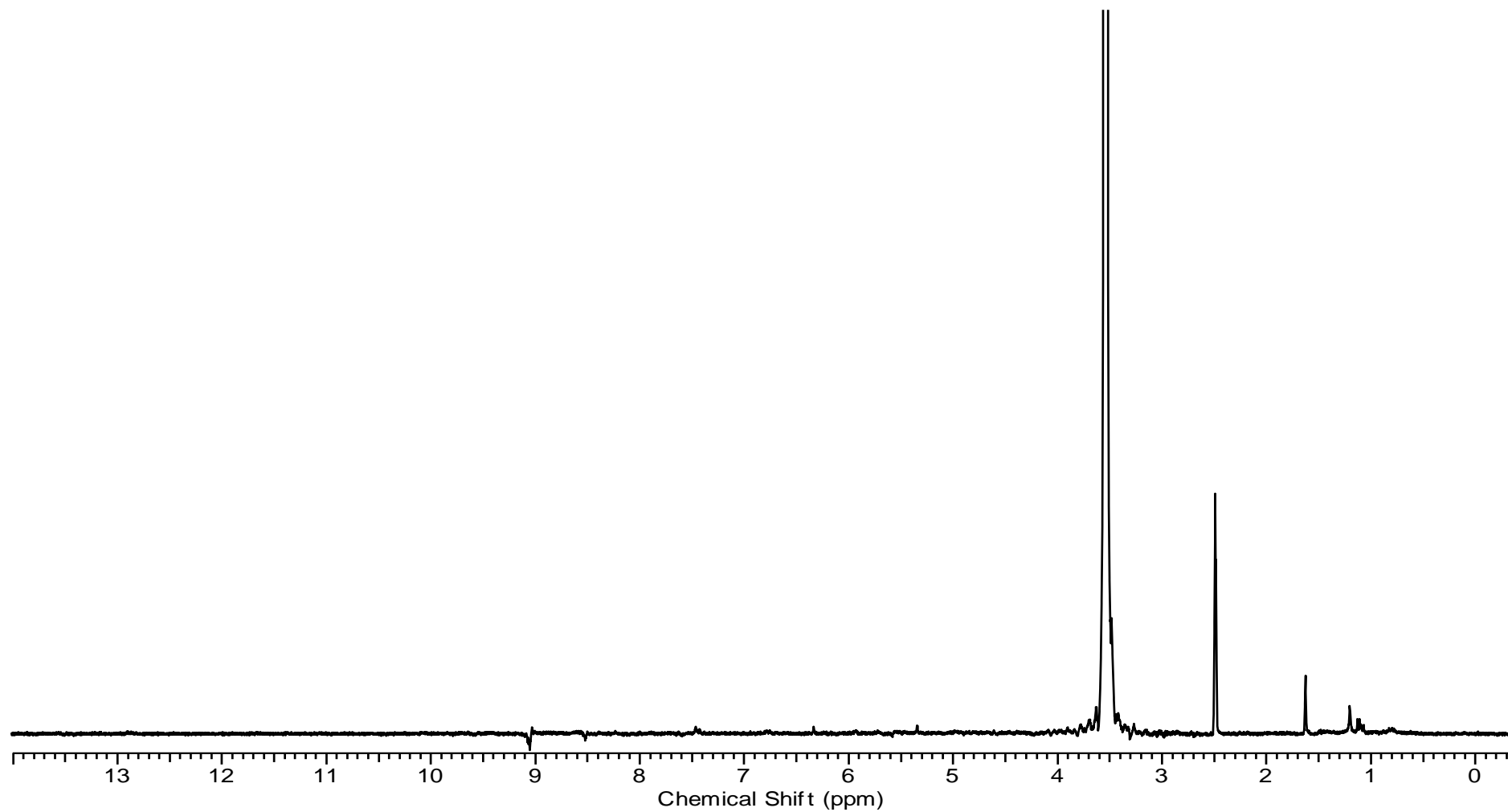


Figura 49. Espectro de RMN de ¹H sem supressão do sinal da água do flavonoide luteolina-3'-*O*- α -L-ramnosídeo em DMSO-d₆ (300 MHz).

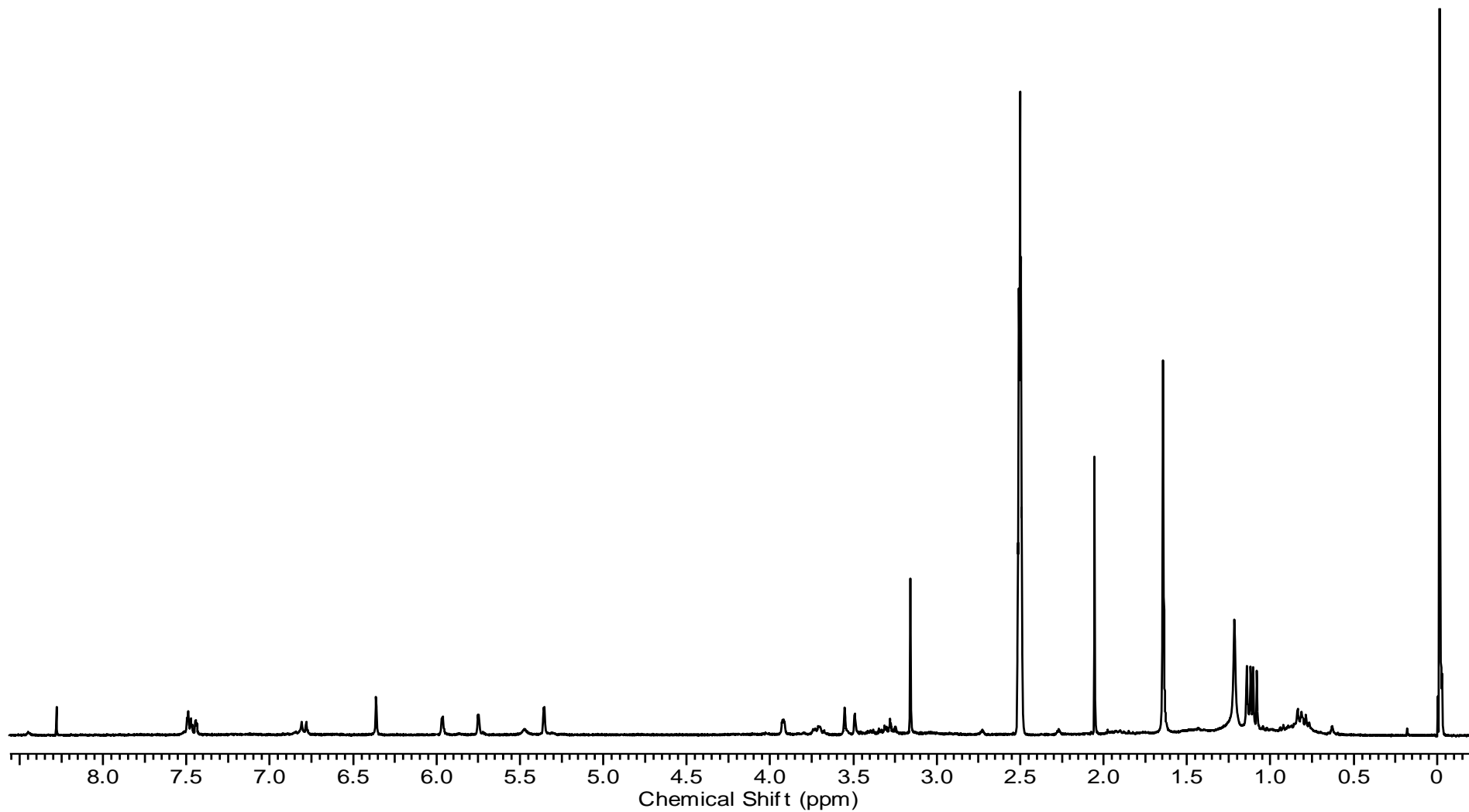


Figura 50. Espectro de RMN de ¹H com supressão do sinal da água do flavonoide luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d₆ (300 MHz).

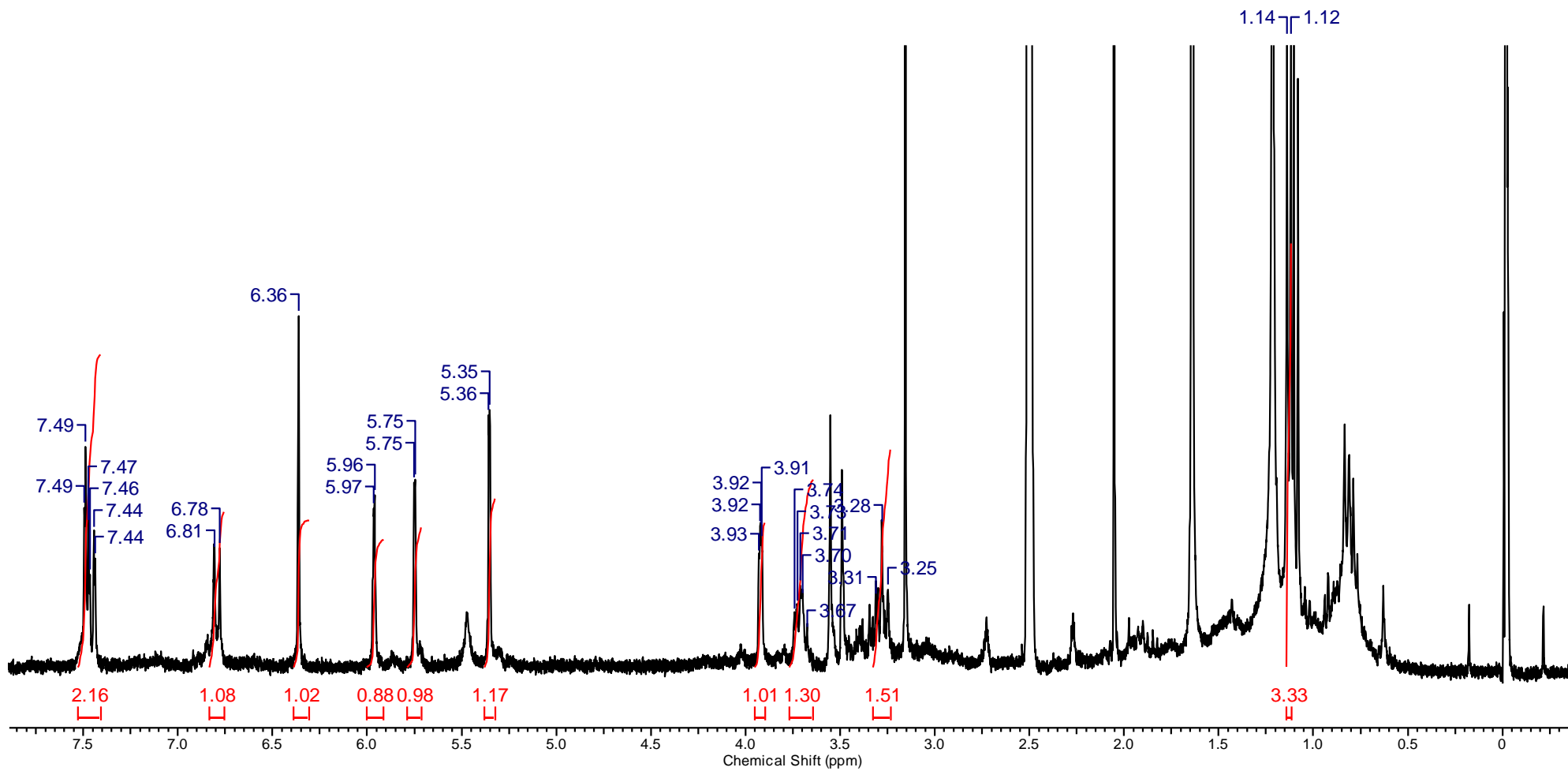


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H do flavonoide luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d_6 (300 MHz).

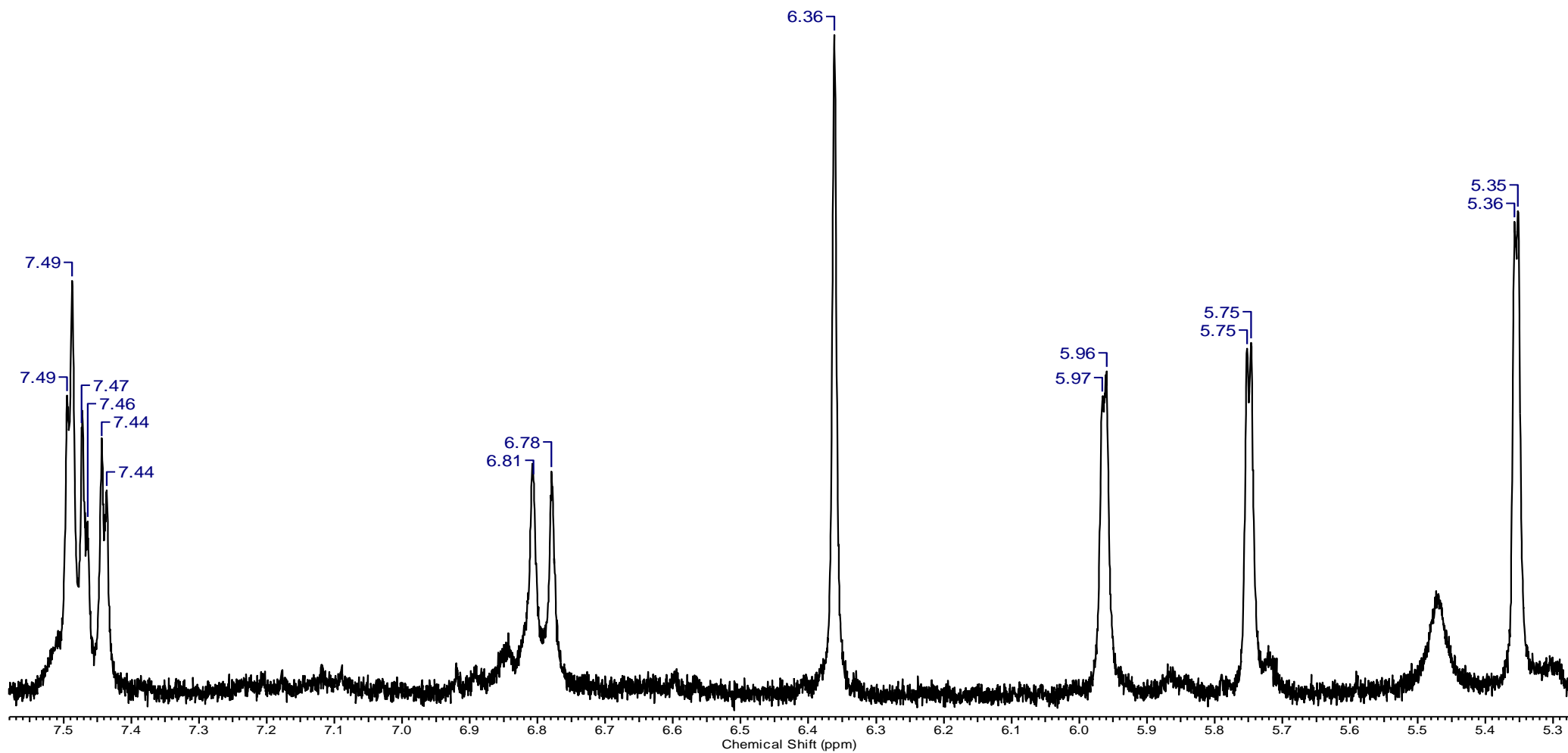


Figura 52. Espectro de RMN de ¹H da região dos aromáticos e hidrogênio do carbono anomérico da ramnose do flavonoide luteolina-3'-O-α-L-ramnosídeo em DMSO-d₆ (300 MHz).

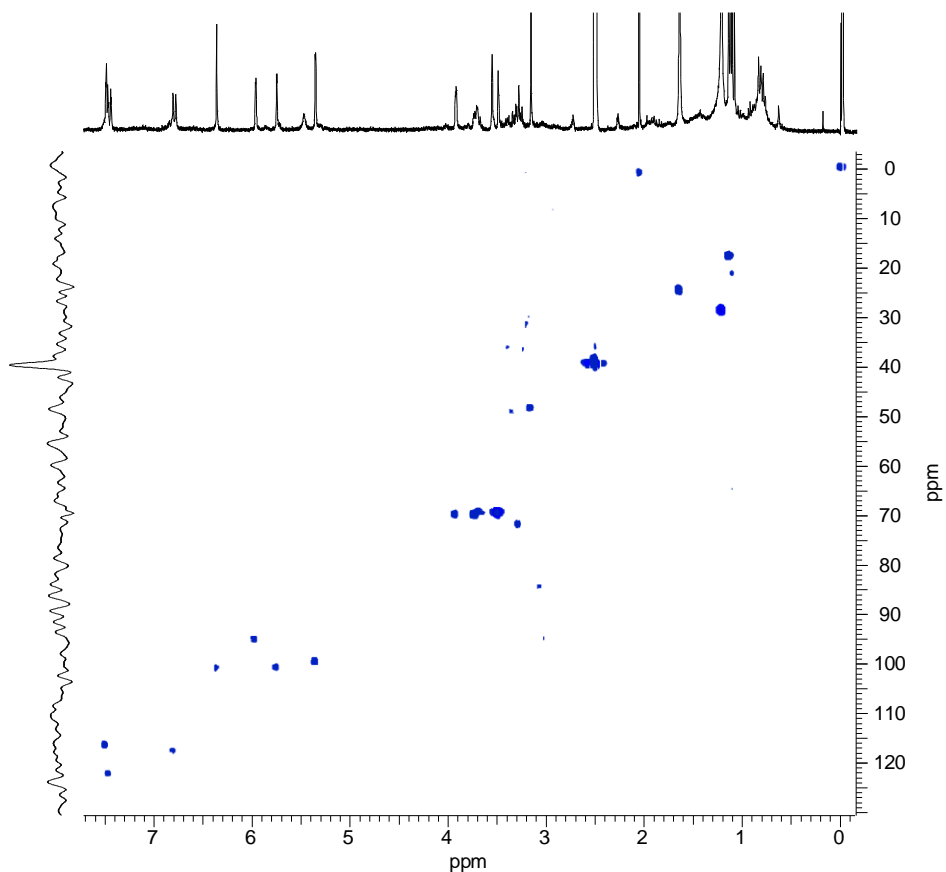


Figura 53. Mapa de contorno de HSQC do flavonoide luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d₆ (300 e 75MHz).

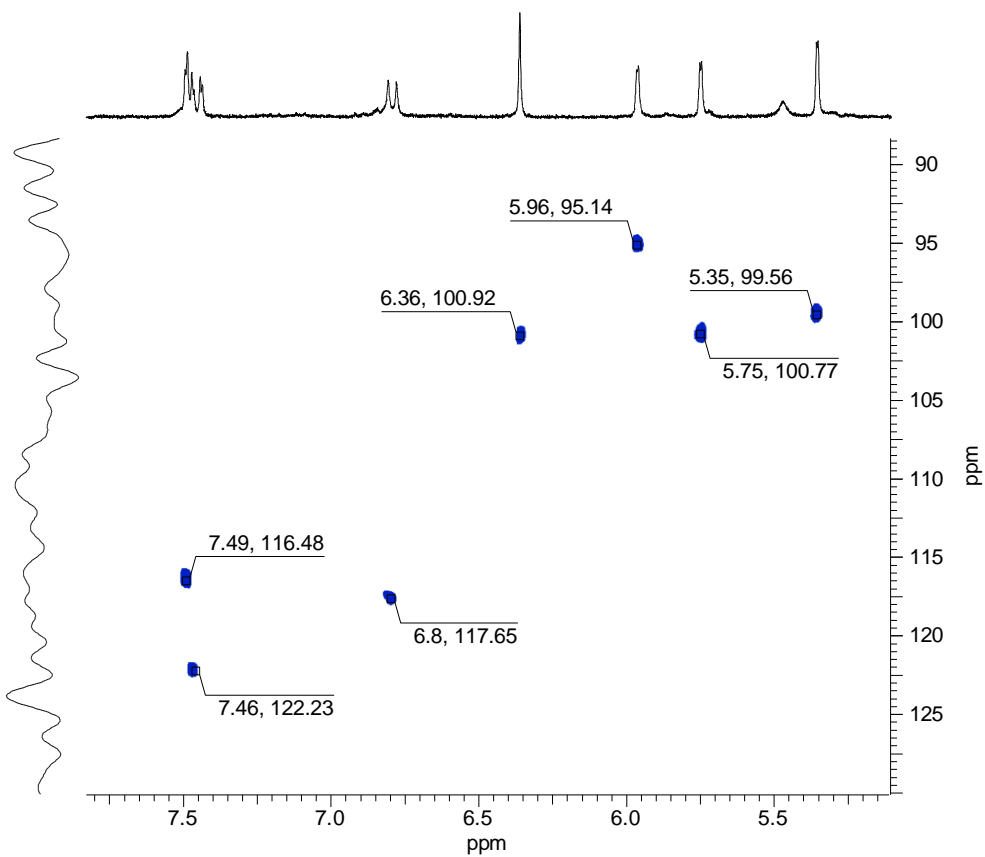


Figura 54. Mapa de contorno de HSQC da região dos aromáticos e hidrogênio do carbono anomérico em DMSO-d₆ (300 e 75 MHz).

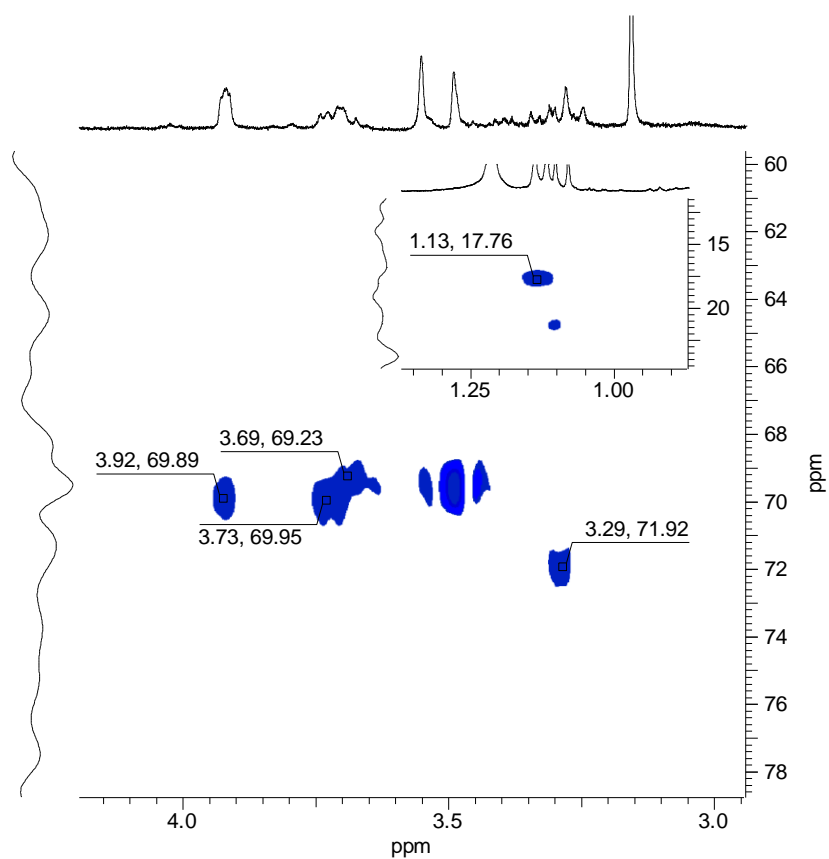


Figura 55. Mapa de contorno de HSQC da região dos açúcares do flavonoide luteolina-3'-O-α-L-ramnosídeo em DMSO-d₆ (300 e 75 MHz).

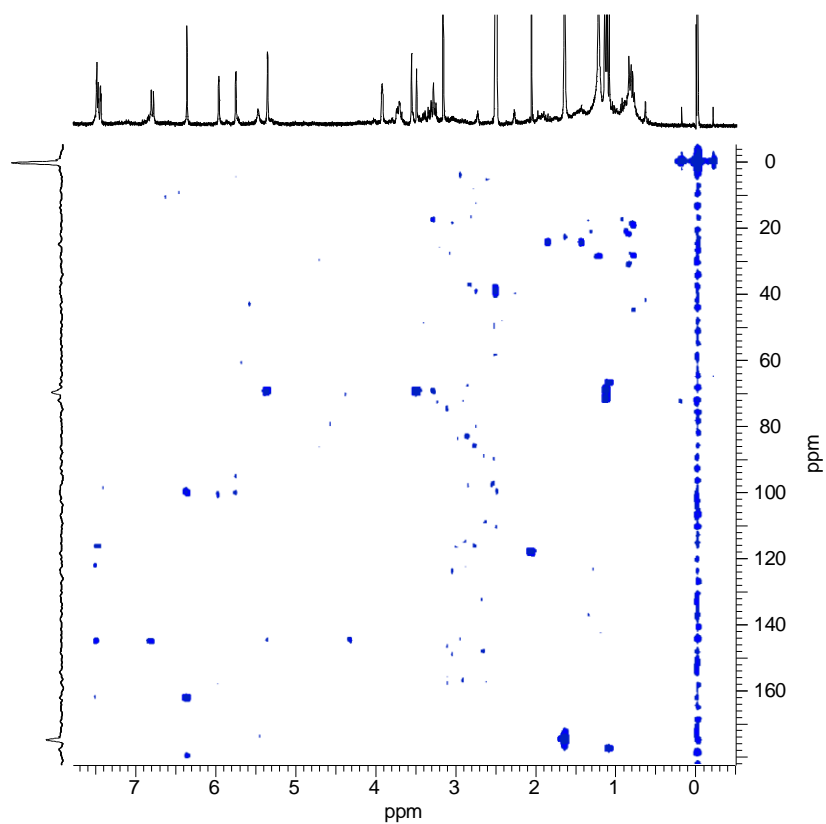


Figura 56. Mapa de contorno de HMBC do flavonoide luteolina-3'-O-α-L-ramnosídeo em DMSO-d₆ (300 e 75 MHz).

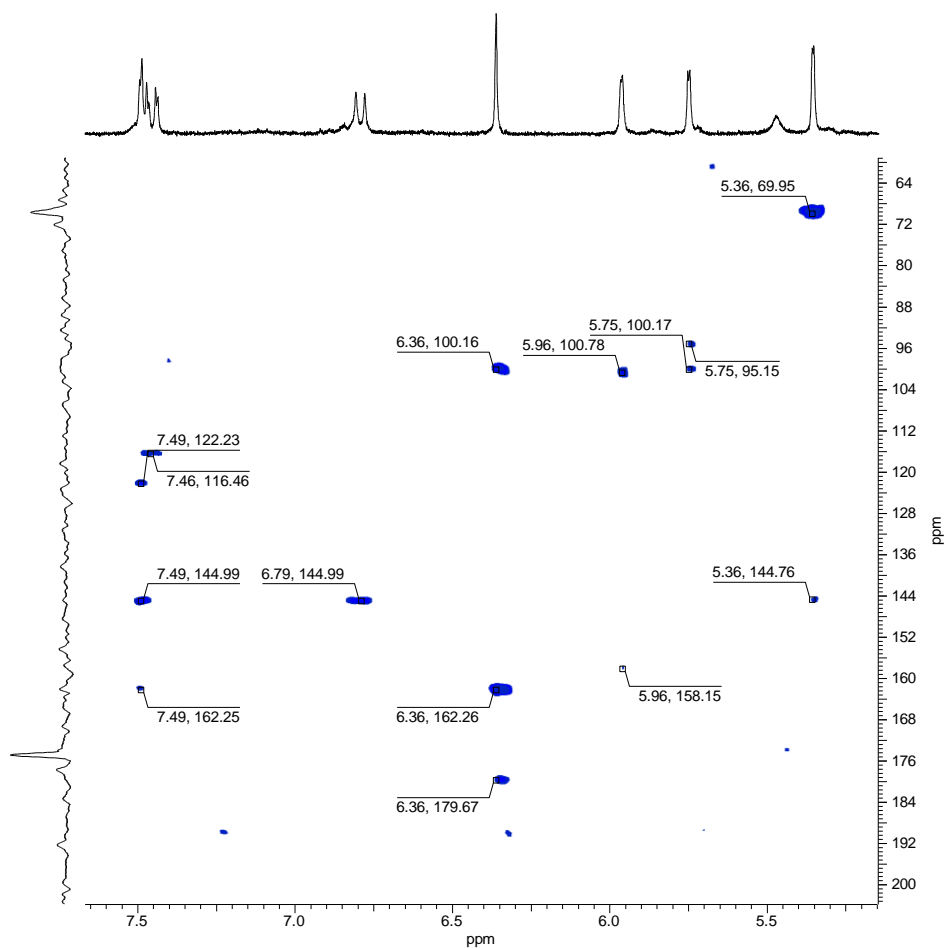


Figura 57. Expansão do mapa de contorno de HMBC da região dos aromáticos e hidrogênio do carbono anomérico em DMSO-d_6 (300 e 75 MHz).

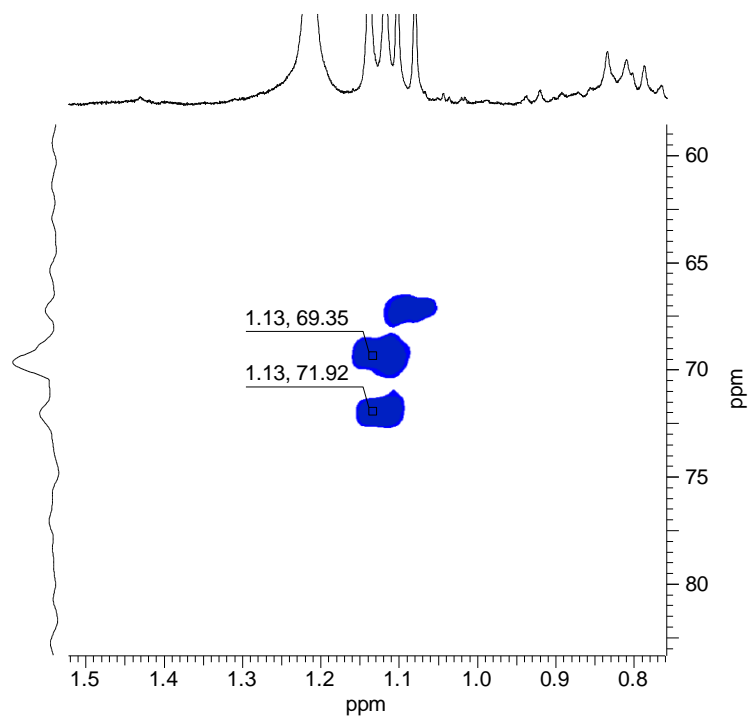


Figura 58. Expansão do mapa de contorno de HMBC da região do hidrogênio H-6'' da ramnose em DMSO-d_6 (300 e 75 MHz).

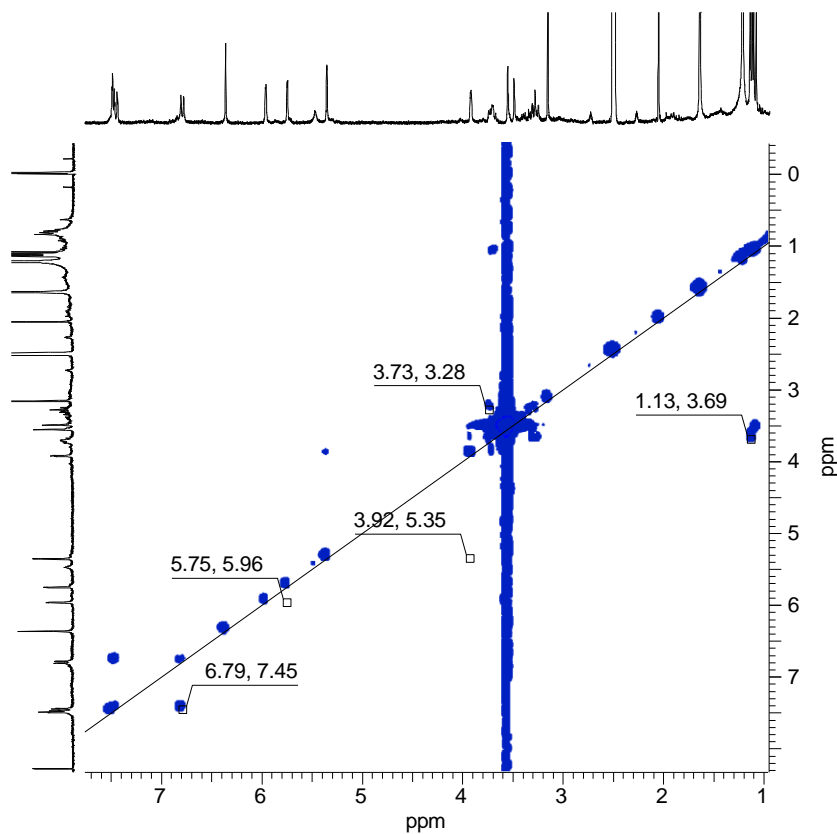


Figura 59. Mapa de correlação de COSY do flavonoide luteolina-3'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d₆ (300 e 75 MHz).

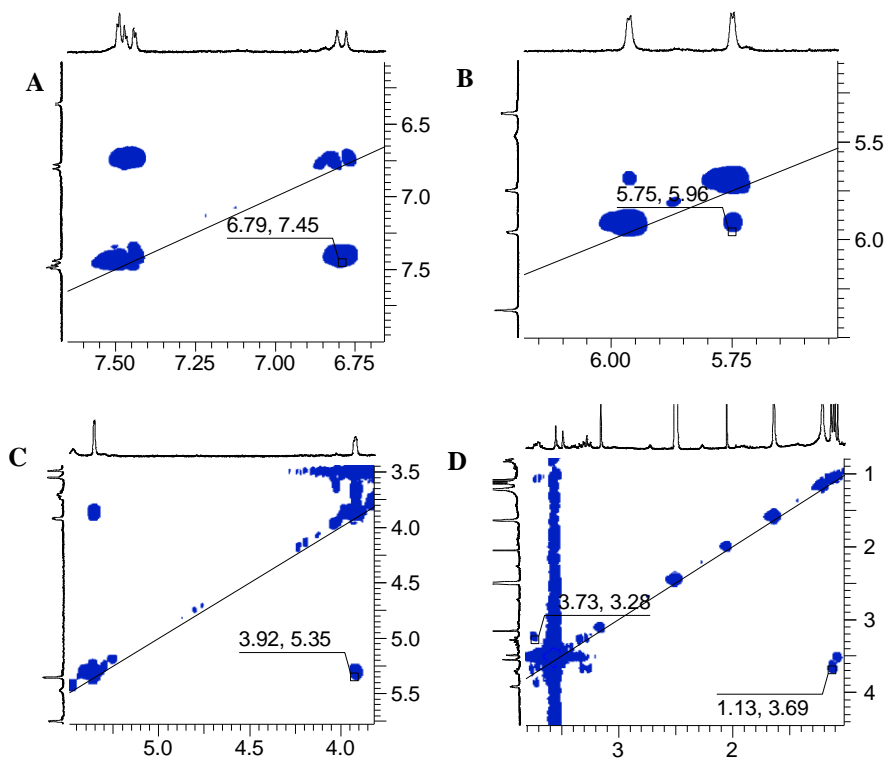


Figura 60. Expansões do mapa de correlação de COSY na região do aromático (A e B) e açúcares (C e D) em DMSO-d₆ (300 e 75 MHz).

6.10 Identificação estrutural da fração Mac4

Assim como na Mac3, todos os sinais foram melhores visualizados com o espectro de RMN de ^1H com supressão do sinal da água. A fração Mac4 foi análoga da Mac3 e seus sinais no espectro de ^1H (Figura 61) foram muito próximos ao da luteolina-3'-*O*- α -L-ramnosídeo. No entanto, devido à pouca massa, os sinais no espectro de ^1H não ficaram tão claros quanto aos valores dos acoplamentos.

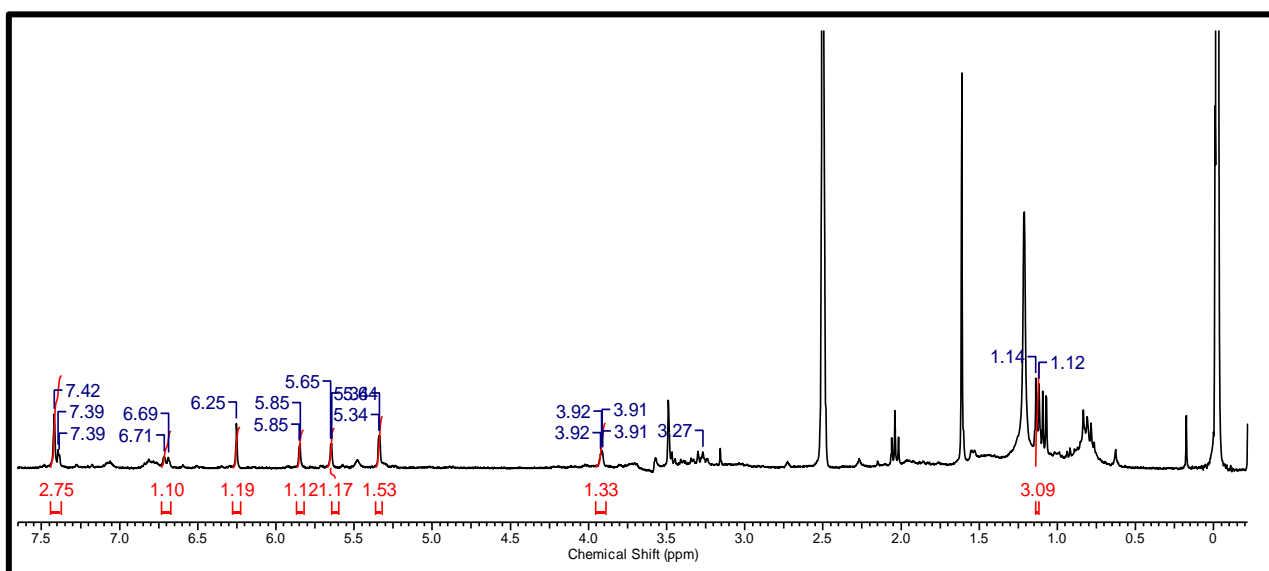


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H de Mac4 em DMSO-d_6 (300 MHz).

Um sinal entre 7,37 e 7,46 ppm mostrou integral para 2H (Figura 62A). O mesmo tinha um pico alto na forma de singleto em 7,42 ppm e um duplete baixo centralizado em 7,39 ppm ($J = 2,24$ Hz). Esse padrão pareceu muito com os sinais 7,48 ppm (H-2') e 7,45 ppm (H-6') do anel B da luteolina-3'-*O*- α -L-ramnosídeo, mas como se 7,48 ppm estivesse deslocado um pouco para a direita e ficasse sobreposto o lado esquerdo do duplo duplete do sinal 7,45. O espectro de HSQC mostrou que o singleto em 7,42 ppm estava ligado ao ^{13}C em 116,68 ppm e em 7,41 ppm estava ligado ao ^{13}C em 122,36 ppm. Esses valores foram quase indênticos aos dos H-2' e H-6' da luteolina-3'-*O*- α -L-ramnosídeo e foram assumidos como os mesmos desse novo flavonoide, mas com resolução menor e com valores de 7,43 ppm para o singleto e 7,41 ppm para o possível duplo duplete.

Um duplete em 6,70 ppm ($J = 7,92$ Hz) com integral para 1H (Figura 62B) foi atribuído ao H-5' do anel B do flavonoide, pois o mesmo estava ligado ao ^{13}C em 118,18 ppm (pelo HSQC) e estaria dando um duplete pelo acoplamento com o H-6' em 7,41 ppm, potencializando a afirmativa do formato duplo duplete para esse sinal discutido anteriormente.

Dois dupletos em 5,85 ppm ($J = 1,77$ Hz) e 5,64 ($J = 1,77$ Hz), ambos com integrais para 1H (Figura 62C), permitiram inferir tratar-se respectivamente dos hidrogênios H-8 e H-6, do anel A do flavonoide, visto que estavam ligados aos ^{13}C 95,50 ppm para 5,85 ppm e 101,36 ppm para 5,64 ppm.

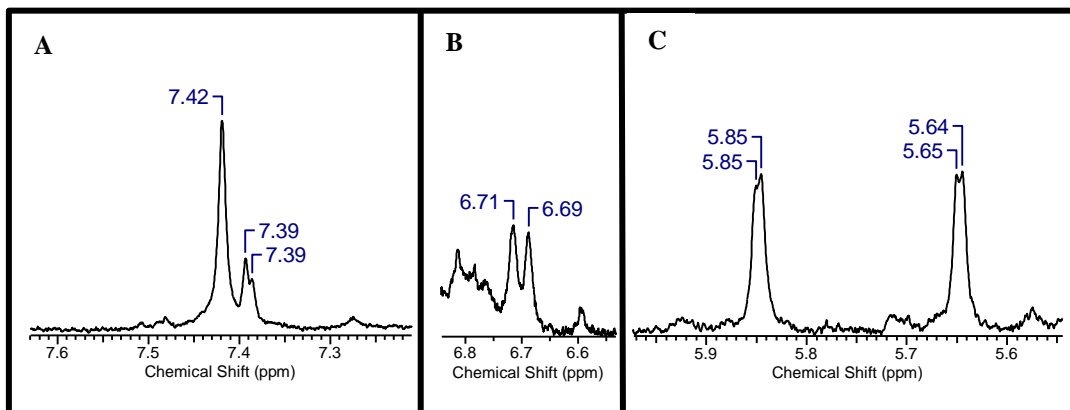


Figura 62. Hidrogênios H-2' e H-6' (A), H-5' (B), H-8 e H-6 respectivamente (C).

O espectro de RMN de ^1H também mostrou um singlete em 6,25 ppm (Figura 63A). Pelo espectro de HSQC foi possível ver que esse hidrogênio estava ligado ao ^{13}C em 100,37 ppm e dessa forma foi possível dizer que se tratava do H-3 do anel C do flavonoide por comparação com o mesmo valor para esse ^1H e ^{13}C da luteolina-3'- O - α -L-ramnosídeo, logo sendo outra flavona. Um singlete em 12,91 ppm (Figura 63B) confirmou uma hidroxila em 5C do anel A do flavonoide. Esse sinal também foi percebido apenas no espectro sem supressão do sinal da água.

Pelo espectro de hidrogênio, foi possível inferir a presença de um açúcar através do duplete em 5,34 ppm ($J = 1,21$ Hz) com integral para 1H (Figura 63C) e o mesmo estava ligado ao ^{13}C em 99,54 ppm, pelo HSQC. Um sinal em 3,92 ppm (Figura 63D) com um formato semelhante a um quarteto ligado ao ^{13}C em 70,17 ppm inferiu ser o H-2'' desse açúcar, mesmo valor da ramnose da luteolina-3'- O - α -L-ramnosídeo. A presença de um duplete em 1,13 ppm ($J = 6,15$ Hz) com integral para 3H ligada ao ^{13}C em 17,93 ppm confirmou a presença da metila de uma ramnose. Dessa forma, foi confirmada a presença de mais uma flavona ramnosídica.

A posição da ramnose na estrutura do flavonoide foi confirmada a partir da correlação do H-1'' em 5,34 com o ^{13}C em 145,08 ppm (4'C), no espectro HMBC. Assim como discutido na luteolina-3'- O - α -L-ramnosídeo, o ^{13}C na posição 4'C aparece em valores levemente maior que em 3'C. Para essa estrutura, a diferença também foi pequena, pois o 3'C teve deslocamento químico em 144,92 ppm enquanto o 4'C, 145,08 ppm.

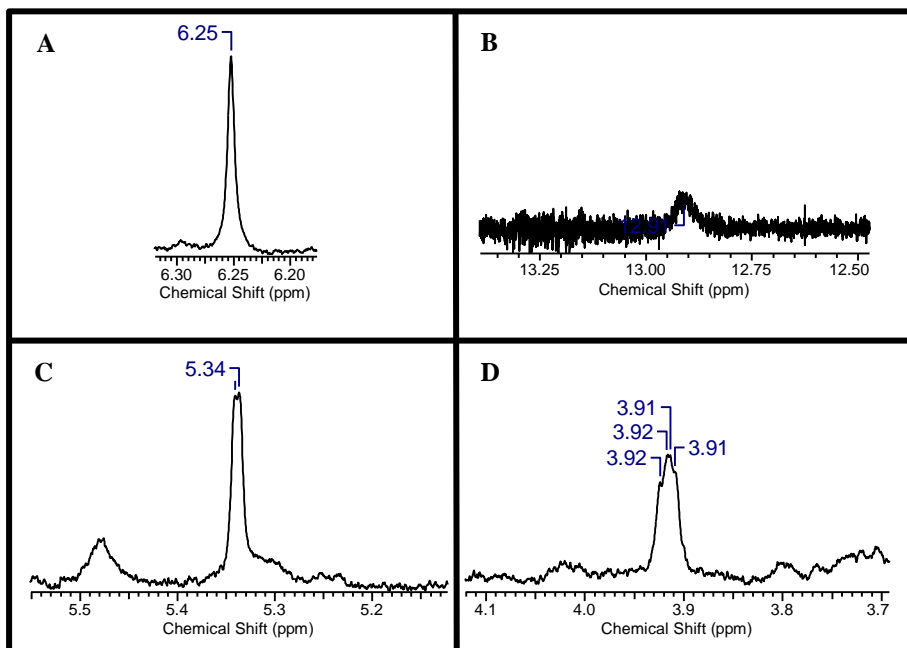


Figura 63. Hidrogênios H-3' (A), hidrogênio da hidroxila em 5C (B), H-1'' (C) e H-2'' (D).

A ausência do experimento de ^{13}C não permitiu a aferição dos carbonos quaternários. Logo o HMBC foi importante também para essa solução. As correlações foram do H-5' com o 3'C (144,92 ppm), H-6' e H-1'' com o 4'C (145,08 ppm), H-3 com 2C (162,27 ppm), 4C (179,30) e 10C (99,64 ppm), H-6 com 10C e 8C (95,50ppm) e H-8 com 9C (157,88 ppm).

O espectro de COSY mostrou acoplamento entre o H-6' (7,41 ppm) e H-5' (6,72 ppm), H-8 (5,87 ppm) e H-6 (5,66 ppm), H-1'' (5,34 ppm) e H-2'' (3,92 ppm), assim como H-6'' (1,13 ppm) e H-5'' (3,71).

Assim foi confirmada a estrutura do flavonoide como sendo da luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo e os deslocamentos químicos e correlações encontram-se na Tabela 29. A estrutura com suas correlações obtidas pelo HMBC e COSY estão nas Figuras 64 e 65, respectivamente. Essa estrutura da luteolina com ramnose na posição 4'C não foi reportada pela literatura ainda e se trata de uma estrutura inédita.

Tabela 29. Deslocamentos químicos e correlações de luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo.

Posição	$^{13}\text{C} - 75$ MHz	$^1\text{H} - 300$ MHz	HMBC	COSY
2C	162,27	-	H-3, H-6'	
3C	100,37	6,25 (1H, s)		
4C	179,30	-	H-3	
5C	-	-		
6C	101,36	5,64 (1H, d, $J = 1,77$ Hz)		H-8
7C	-	-		
8C	95,50	5,85 (1H, d, $J = 1,77$ Hz)	H-6	H-6
9C	157,88	-	H-8	
10C	99,64	-	H-3, H-6, H-8	
1'C	-	-		
2'C	116,68	7,42 (1H, s)	H-6'	
3'C	144,92	-	H-5'	
4'C	145,08	-	H-6', H-1''	
5'C	118,18	6,70 (1H, d, $J = 7,92$ Hz)		H-6'
6'C	122,36	7,41 (1H, dd, $J = 2,4$ Hz)	H-2''	H-5'
1''C	99,54	5,34 (1H, d, $J = 1,21$ Hz)		H-2''
2''C	70,17	3,92 (1H, m)	H-1''	H-1''
3''C	70,50	3,72 (1H, m)	H-4''	
4''C	72,16	3,26 (1H, m)	H-6''	H-5''
5''C	69,28	3,71 (1H, m)	H-6''	H-4''
6''C	17,93	1,13 (3H, d, $J = 6,15$ Hz)	-	H-5'', H-4''
OH/5C	-	12,91 (1H, s)		

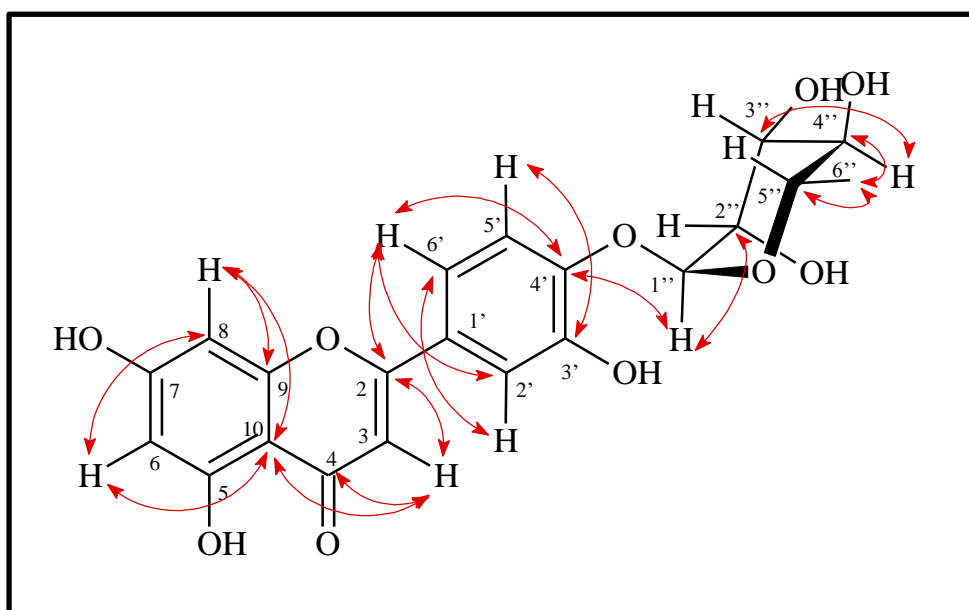


Figura 64. Correlações encontradas no mapa de contorno de HMBC para o flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo.

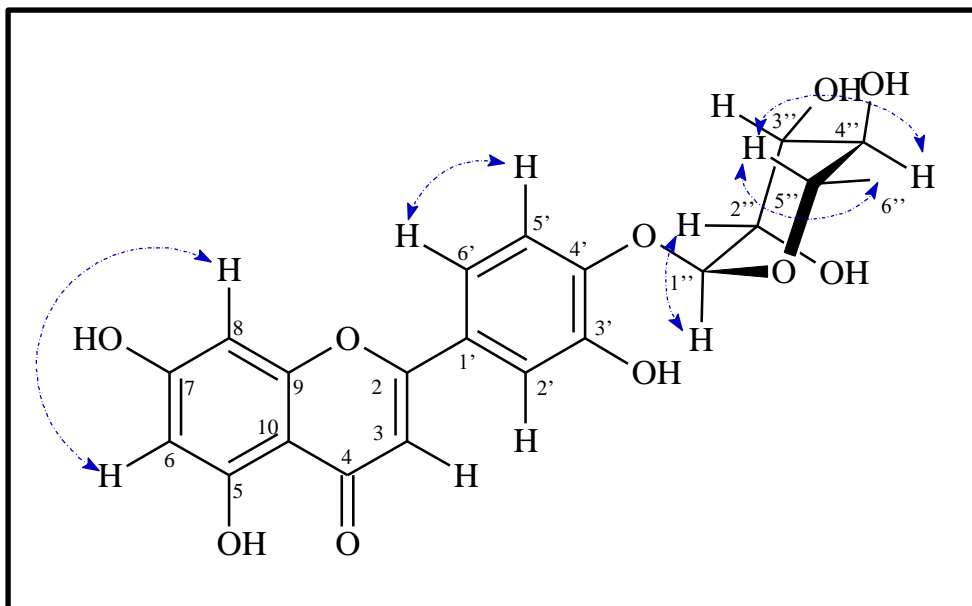


Figura 65. Correlações encontradas no COSY para o flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo.

O HPLC-MS mostrou a retenção da luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo em 4,7 min (Figura 66) com as misturas de solventes A(H₂O + 0,1% HCOOH)/B(ACN + 0,1% HCOOH) com sistema gradiente na Tabela 30, fluxo de 0,4 mL/min, split de 0,06 mL (MS)/0,34 mL (desc), concentração de 1,5 mg/mL em metanol, injeção de 2 μ L, temperatura de 30 °C, injetor ACN e calibrante HCOONa.

Tabela 30. Gradiente de concentração do sistema no HPLC.

Tempo (min)	% de B no sistema
0 – 10	5 – 90
10 – 12	90
12 – 13	90 – 100
13 – 14	100
14 – 16	100 – 5
16 – 18	5

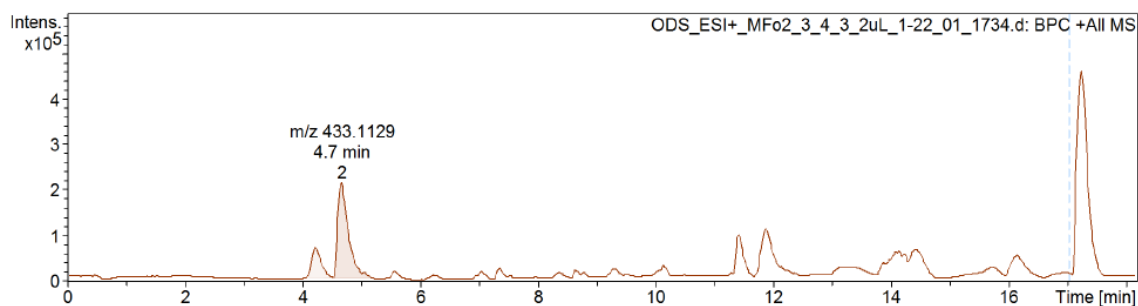


Figura 66. Retenção no UPLC do flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo.

A espectrometria de massas (MS) da luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo no modo positivo com fonte ESI mostrou um íon *quasi*-molecular com m/z 433,1129 (Figura 67A) e MS/MS com m/z 287,0547 (Figura 67B). O valor do íon quase-molecular confirmou o valor do flavonoide protonado (M+H)⁺ e a fragmentação no MS/MS coincidiu com a perda neutra de uma ramnose (146) e da m/z 287 do luteolina protonada.

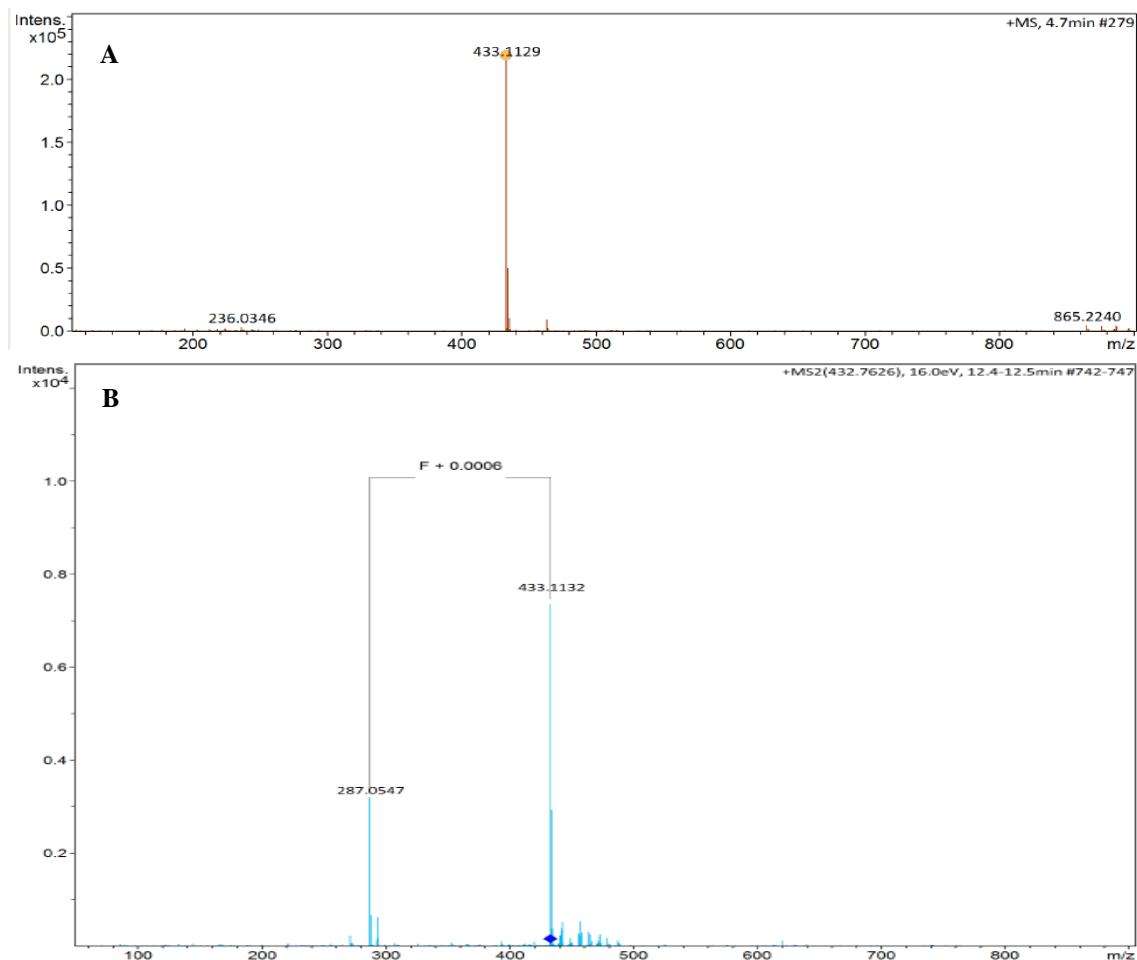


Figura 67. Íon *quasi*-molecular do flavonoide (A) e perda da ramnose (B).

A biblioteca do espectrômetro de massas inferiu fórmula molecular $C_{21}H_{21}O_{10}$ (M+H)⁺ com m/z 433,1129 para a luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo. O erro para esse valor é igual a -0,1 ppm em relação a massa isotópica m/z 433,11343, calculada. O erro é considerado aceitável para confirmação da fórmula molécula $C_{21}H_{21}O_{10}$.

Também é apresentada uma proposta para a perda de ramnose na Figura 68, onde o oxigênio captura o hidrogênio do 2''C da glicose e é seguido pela formação da dupla ligação e liberação da ligação entre a o 1''C da glicose e o oxigênio do carbono 4'C da luteolina.

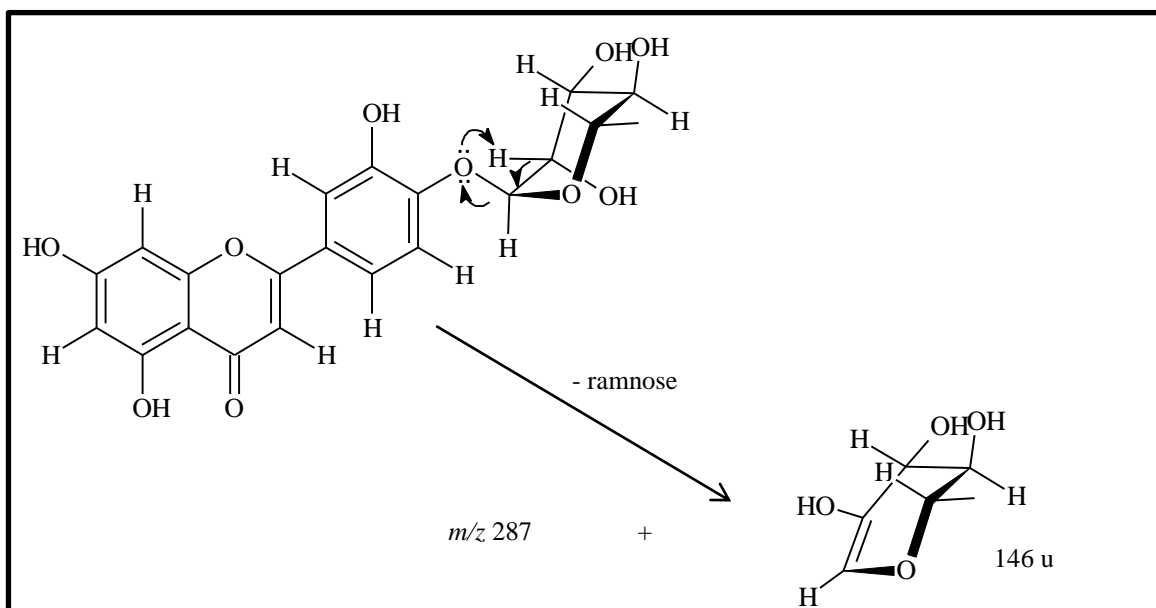


Figura 68. Proposta de fragmentação com perda da ramnose (B).

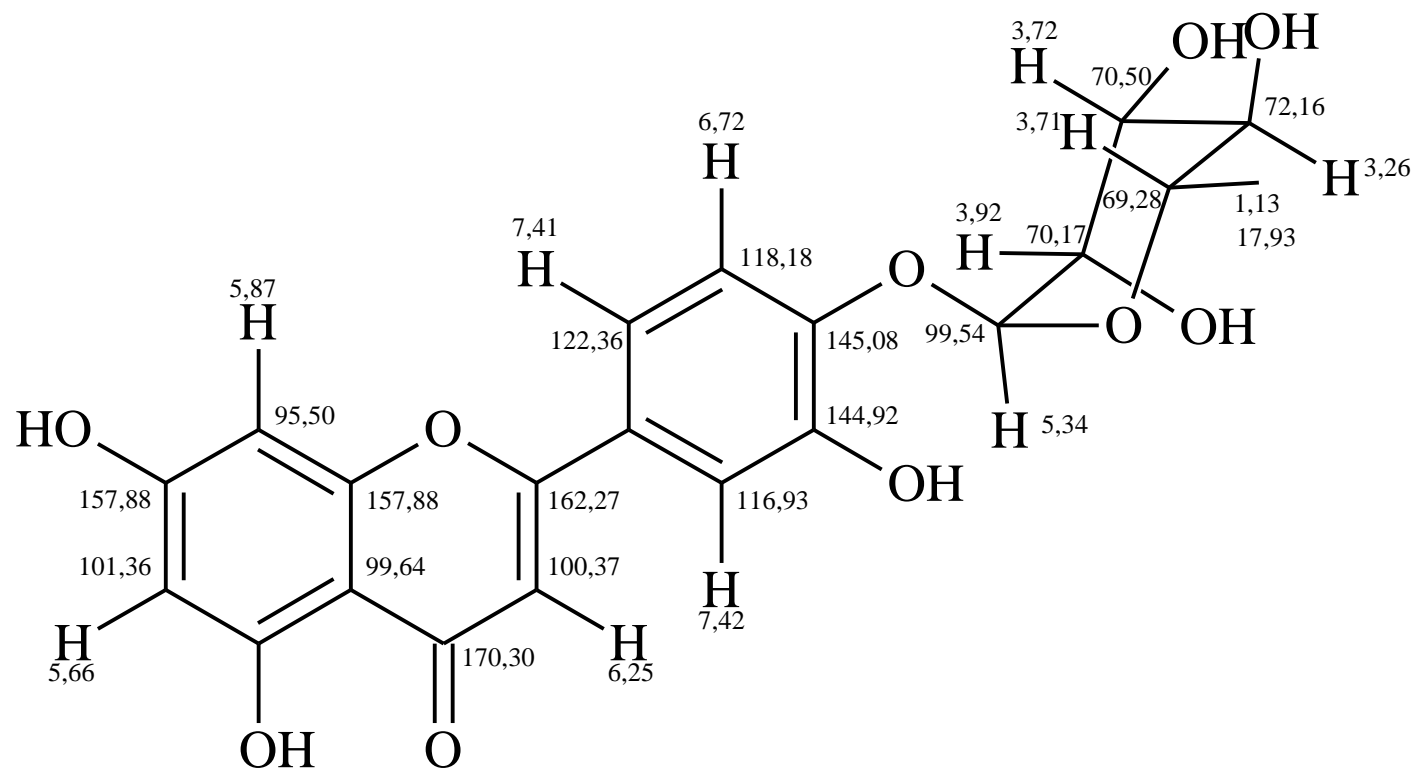


Figura 69. Estrutura com deslocamentos químicos do flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo.

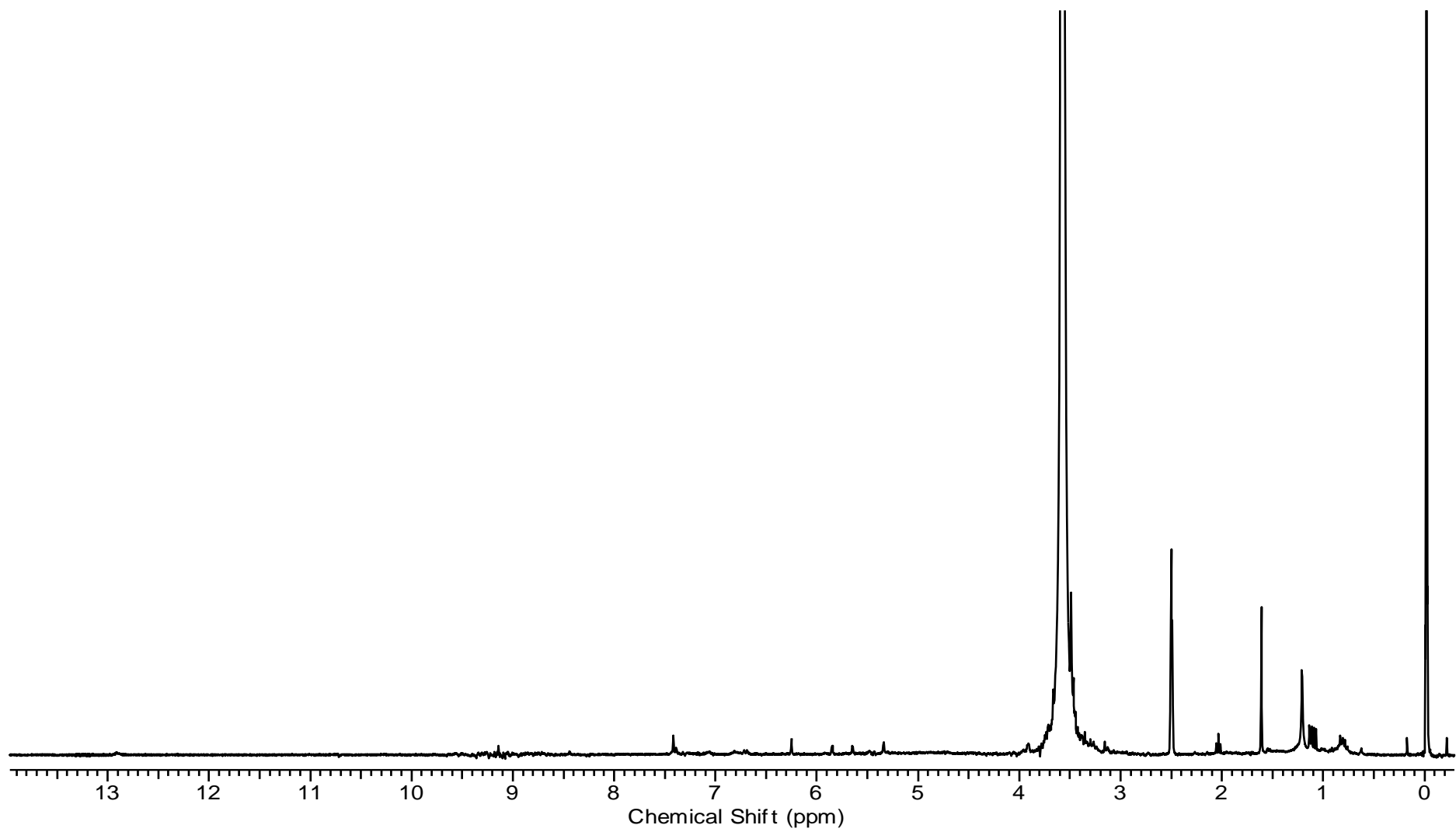


Figura 70. Espectro de RMN de ¹H sem supressão do sinal da água do flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo em DMSO-d₆ (300 MHz).

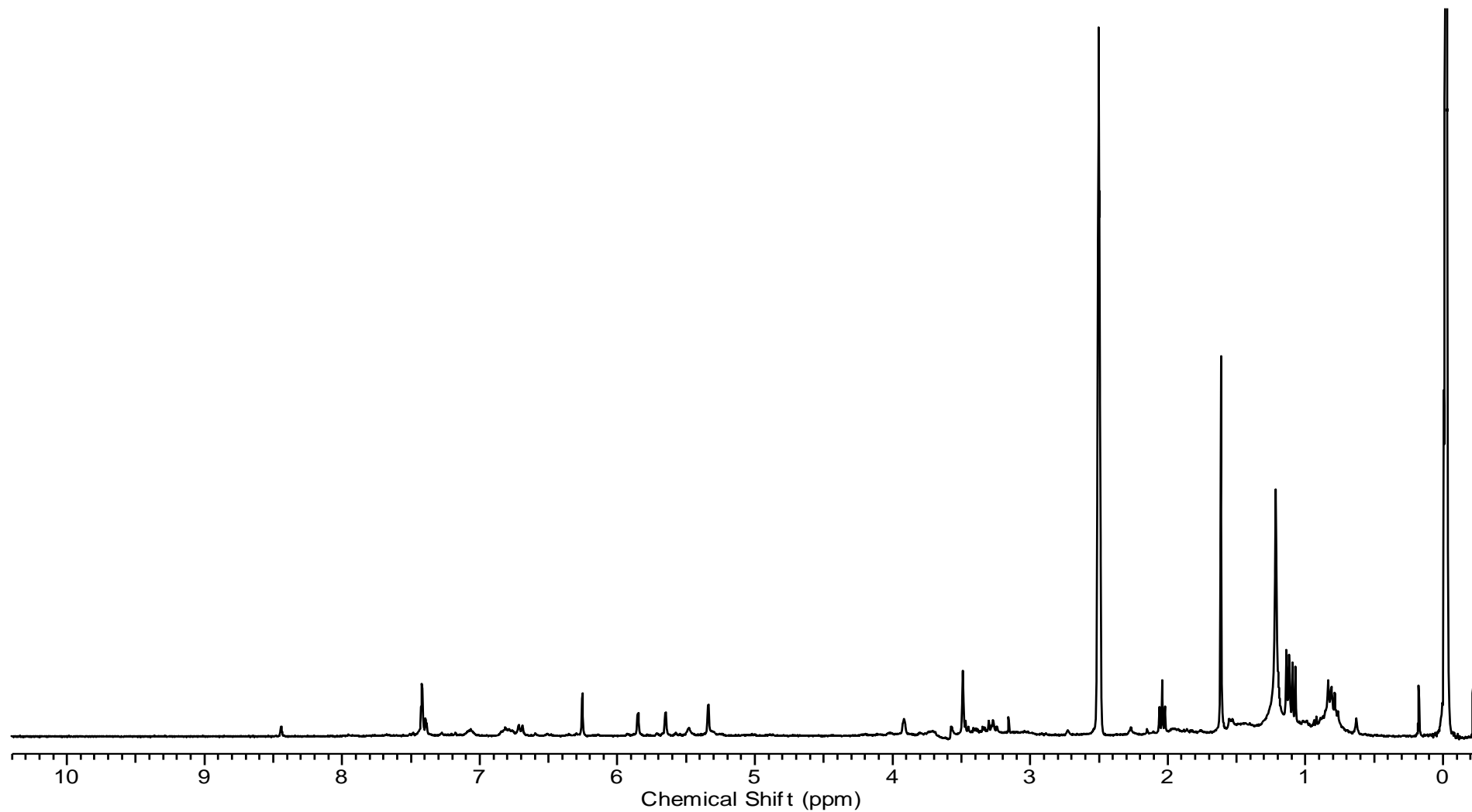


Figura 71. Espectro de RMN de ^1H com supressão do sinal da água do flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo em DMSO-d_6 (300 MHz).

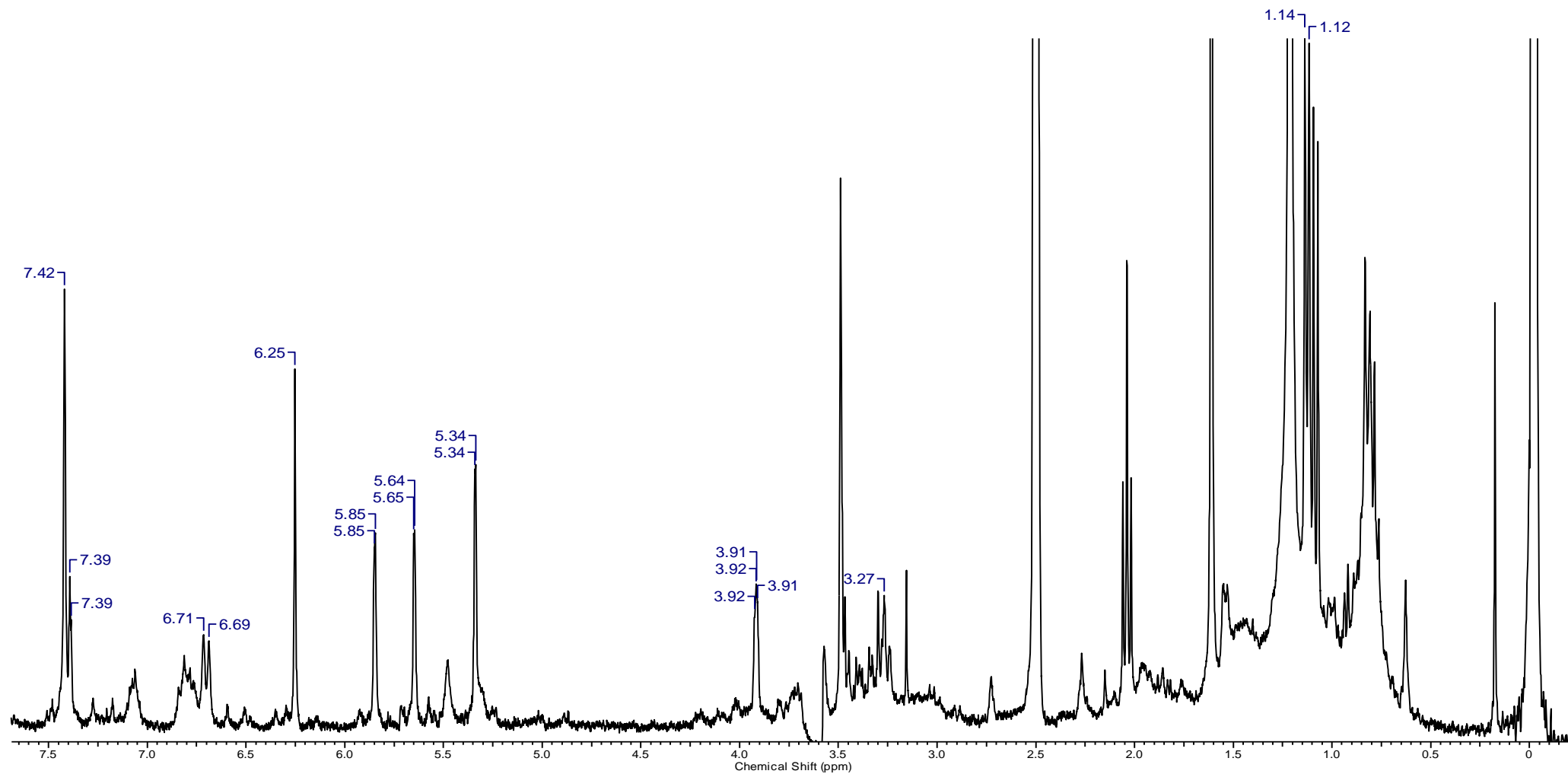


Figura 72. Espectro de RMN de ^1H do flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo em DMSO-d_6 (300 MHz).

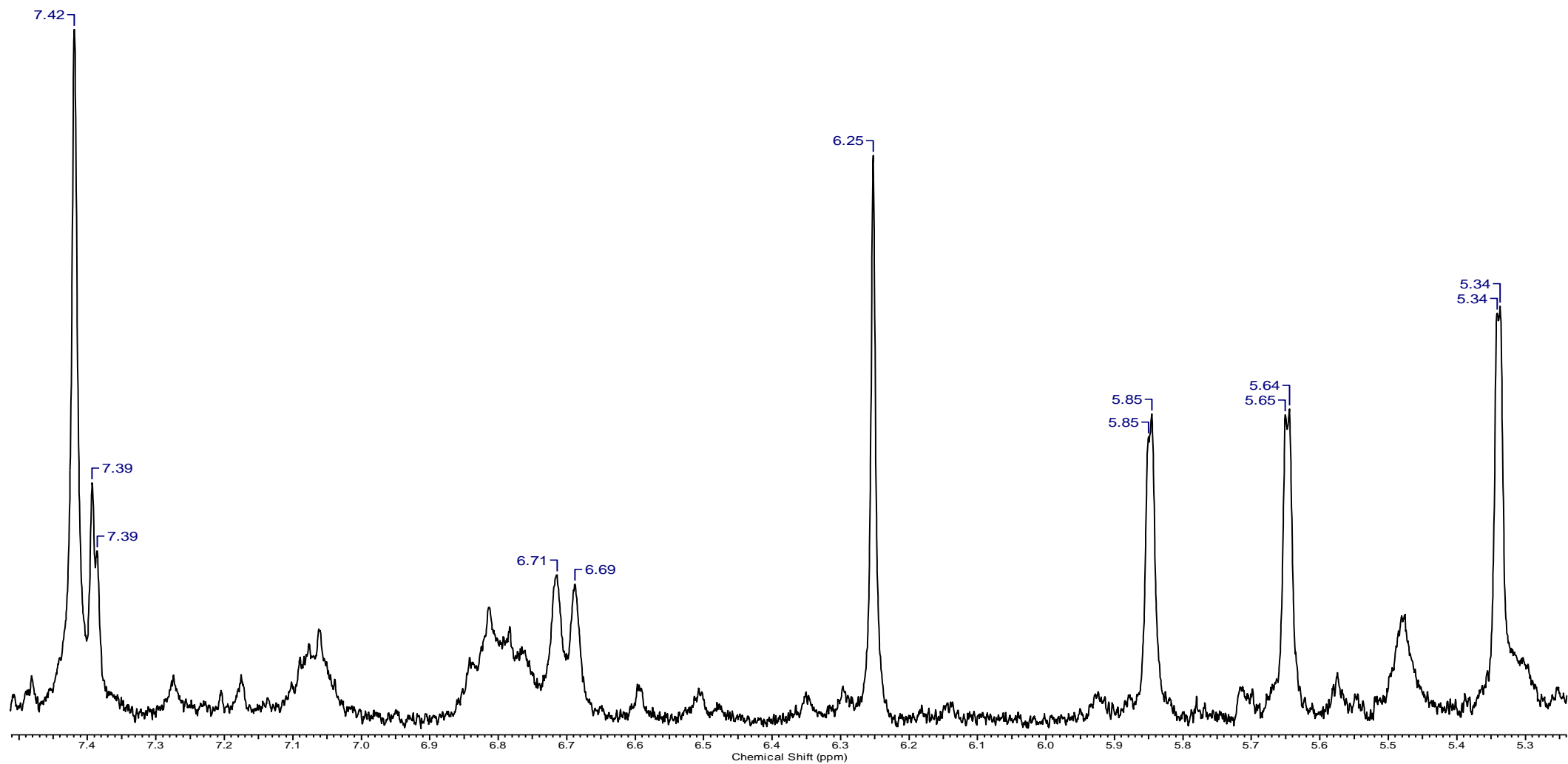


Figura 73. Expansão do espectro de RMN de ¹H na região do aromático e hidrogênio do carbono anomérico do flavonoide luteolina-4'-O- α -L-ramnosídeo em DMSO-d₆ (300 MHz).

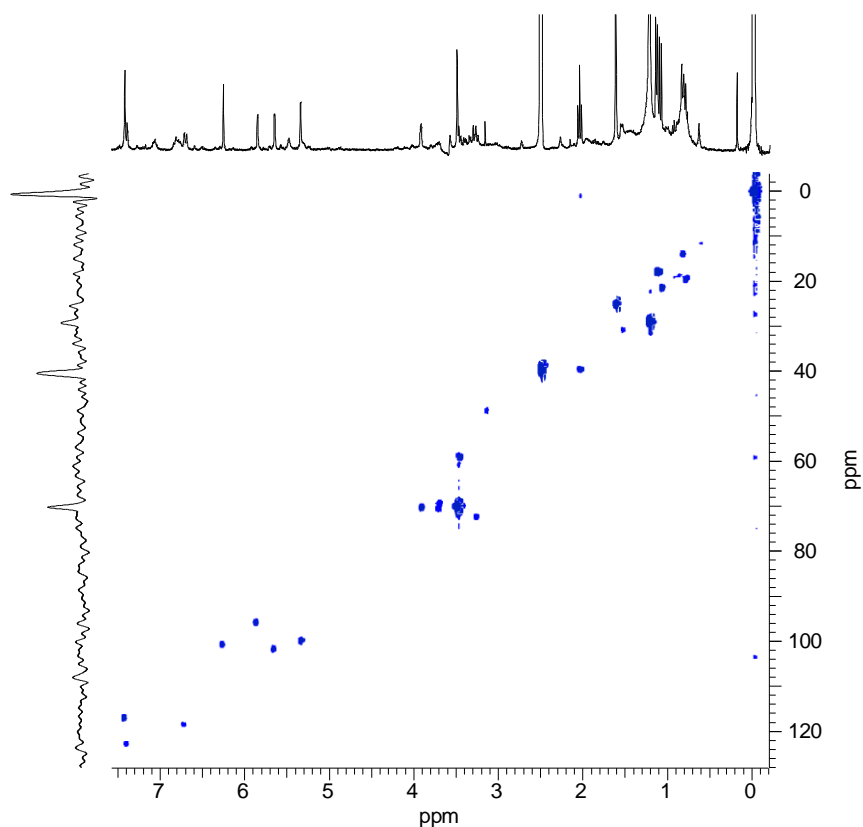


Figura 74. Mapa de correlação de HSQC do flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo em DMSO- d_6 (300 e 75 MHz).

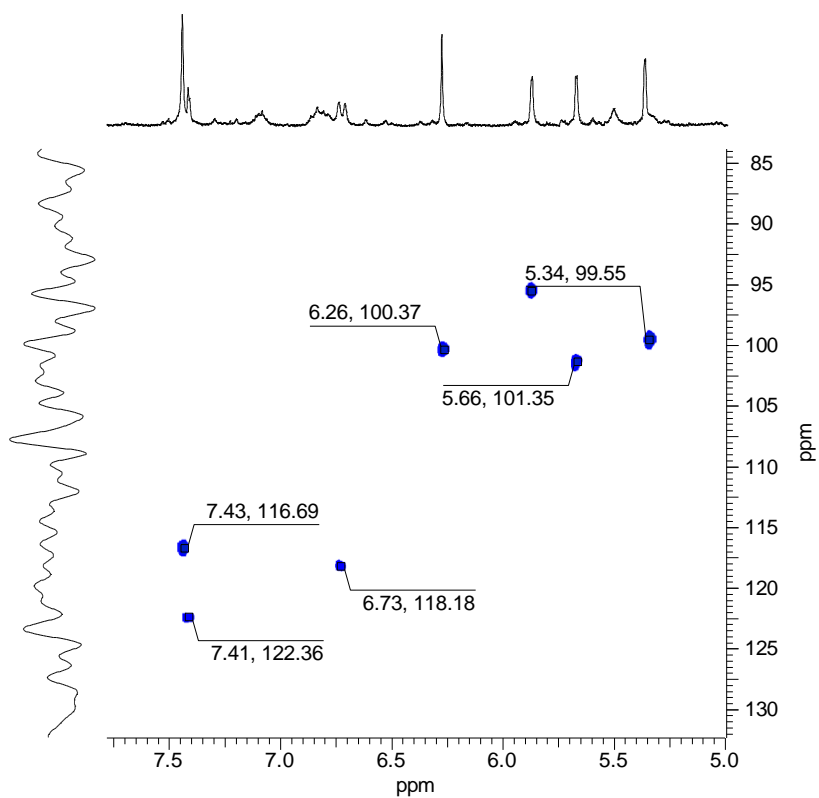


Figura 75. Mapa de correlação de HSQC na região do aromático e hidrogênio do carbono anomérico do flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo em DMSO- d_6 (300 e 75 MHz).

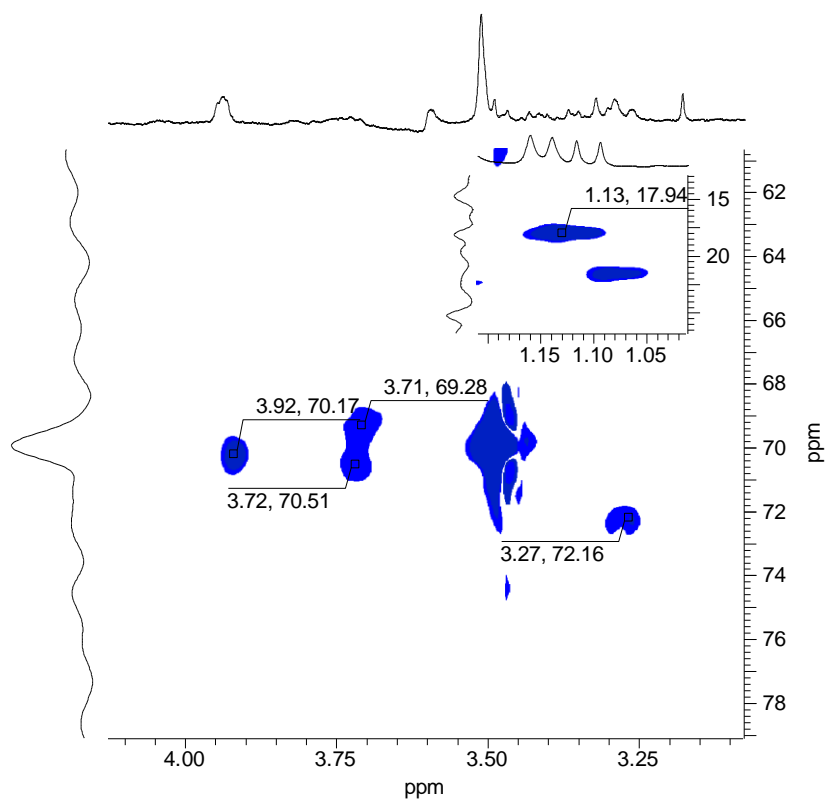


Figura 76. Expansão do HSQC na região dos açúcares do flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo em DMSO-*d*₆ (300 e 75MHz).

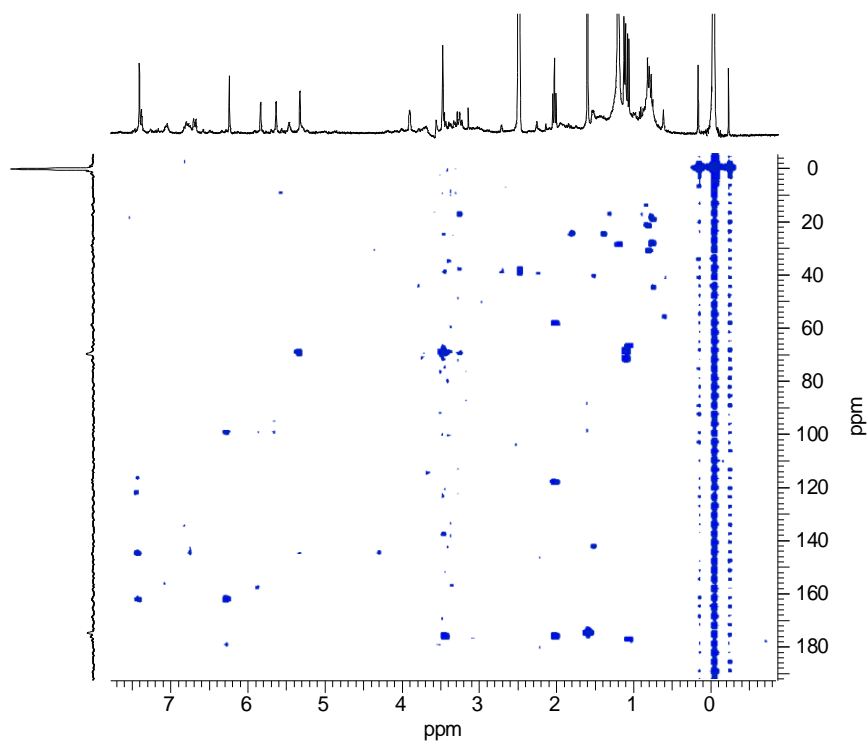


Figura 77. Mapa de correlação de HMBC do flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo em DMSO-*d*₆ (300 e 75MHz).

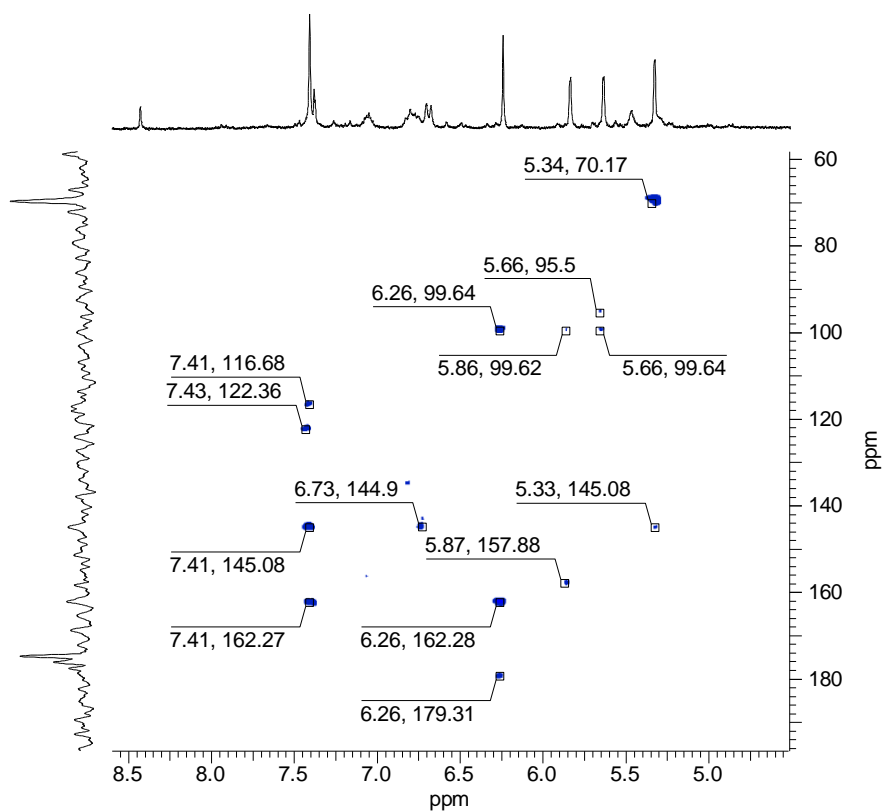


Figura 78. Expansão do mapa de correlação de HMBC na região dos aromáticos e hidrogênio do carbono anomérico do flavonoide luteolina-4'- O - α -L-ramnosídeo em DMSO- d_6 (300 e 75MHz).

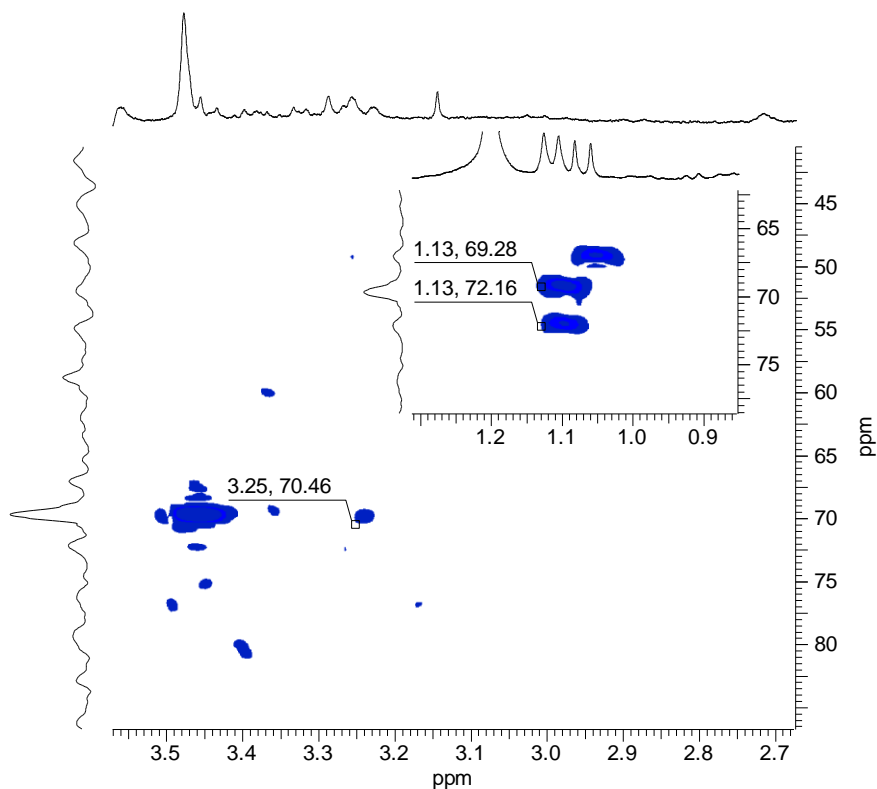


Figura 79. Expansão do mapa de correlação de HMBC na região dos açúcares do flavonoide luteolina-4'- O - α -L-ramnosídeo em DMSO- d_6 (300 e 75MHz).

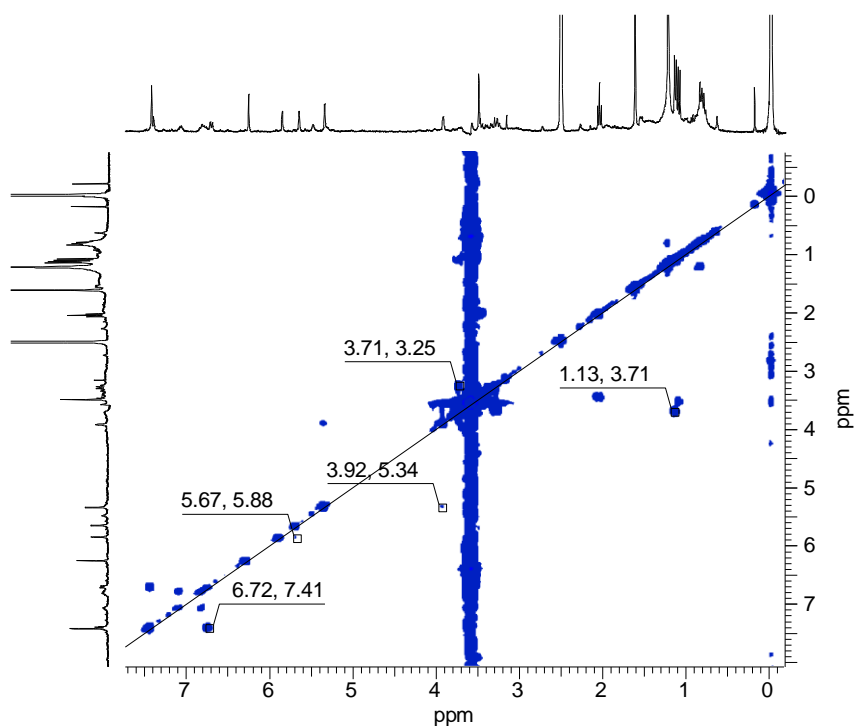


Figura 80. Mapa de correlação de COSY do flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo em DMSO-d₆ (300 MHz).

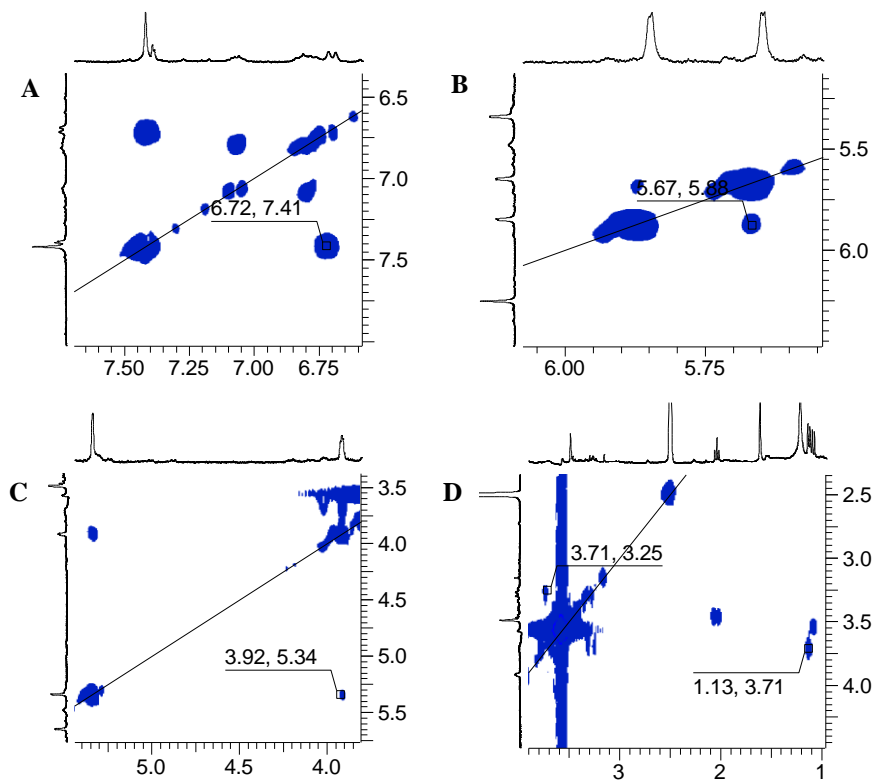


Figura 81. Expansões do mapa de correlação de e COSY na região dos aromáticos (A e B) e dos acoplamentos dos hidrogênios da ramnose (C e D) do flavonoide luteolina-4'-*O*- α -L-ramnosídeo em DMSO-d₆ (300 MHz).

7 CONCLUSÃO

Foi abordado neste trabalho o estudo fitoquímico e avaliação biológica dos extratos de *M. acaciifolium*, do qual foi possível isolar quatro flavonoides: o kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, do extrato metanólico das flores, assim como uma aglicona (apigenina) e dois flavonoides ramnosilados (luteolina-3'-*O*-ramnosídeo e luteolina-4'-*O*-ramnosídeo) do extrato metanólico das folhas. O flavonoide luteolina-3'-*O*-ramnosídeo possui apenas dois relatos na literatura consultada. Luteolina-4'-*O*-ramnosídeo está sendo relatada pela primeira vez como isolada de uma espécie vegetal, além de não haver registros de síntese, com apenas dados empíricos encontrados na plataforma SciFinder, calculados pelo software Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs) Software V11.01 (© 1994-2018 ACD/Labs), sendo tratada nesse trabalho como uma molécula nova para literatura científica.

Devido inatividade dos extratos de *M. acaciifolium* contra *A. salina*, é possível sugerir que os mesmos poderiam ser úteis para utilização em cosméticos e talvez menos ou nada agressivos para ingestão. Isso apenas para testes anteriores à descoberta de substância ou conjunto de substâncias que possam causar o efeito ativo desejado.

Sobre os testes antioxidantes, é possível sugerir que o potencial observado é reflexo da grande concentração de flavonoides presentes no extrato metanólico das folhas. Isso corrobora com os resultados obtidos pelo fracionamento do extrato, onde quatro flavonoides foram isolados e identificados. Há relatos de que flavonoides com açúcares possuem menos atividades antioxidante que suas respectivas agliconas, logo os outros extratos que quase foram ativos segundo comparação com a Tabela 2, podem ter flavonoides glicosilados, mas em menos concentração que o extrato metanólico das folhas.

Enquanto às atividades antimicrobianas dos extratos, é preciso realizar vários testes para verificação de qual substância ou conjuntos de substâncias são os responsáveis pelo potencial biológico.

8 REFERÊNCIAS

- A, V.; GEETHA, M. Anti-psoriatic activity of flavonoids from *Cassia tora* leaves using the rat ultraviolet B ray photodermatitis model. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 24, p. 322, 2014.
- ABDULLAEV, S. V.; SATTIKULOV, A.; BATIROV, E. K.; KURBATOV, V.; MALIKOV, V. M. Flavonoids from *Ammothamnus lehmannii*. **Chemistry of Natural Compounds**, 19, p. 100, 1983.
- ABRAHAM, T. J.; MALLICK, P. K.; ADIKESAVALU, H.; BANERJEE, S. Pathology of *Edwardsiella tarda* infection in Africa catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), fingerlings. **Archives of Polish Fisheries**, 23, p. 141, 2015.
- AGRAWAL, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, 31, p. 3307, 1992.
- AHMED, F. A.; KHAMMIS, I. M. A. E.; DESOUKEY, S. Y. Flavonoids of *Neotorularia aculeolata* plant. **Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences**, 1, p.134, 2011.
- AHN, E.; NAKAMURA, N.; AKAO, T.; KOMATSU, K.; QUI, M.; HATTORI, M. Prenylated flavonoids from *Moghania philippinensis*. **Phytochemistry**, 64, p. 1389, 2003.
- AISSAOUI, M.; LÉON, F.; BROUARD, I.; BENAYACHE, F.; BENAYACHE, S.; Secondary metabolites from *Crotalaria saharae* (Fabaceae). **Der Pharmacia Lettre**, 6 (1), p. 186, 2014.
- AKDEMIR, Z. S.; TATLI, I. I.; BEDIR, E.; KHAN, I. A. Antioxidant flavonoids from *Verbascum salviifolium* Boiss. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, 28, p. 71, 2003.
- AKKOL, E. K.; SUNTAR, I.; KELES, H.; SEZIK, E.; GURLER, G. Bioassay-guided isolation and characterization of wound healer compounds from *Morus nigra* L. (Moraceae). **Records of Natural Products**, 9, p. 484, 2015.
- AKTER, K.; BARNES, E. C.; LOA-KUM-CHEUNG, W. L.; YIN, P.; KICHU, M.; BROPHY, J. J.; BARROW, R. A.; IMCHEN, I.; VEMULPAD, S. R.; JAMIE, J. F. Antimicrobial and antioxidant activity and chemical characterization of *Erythrina stricta* Roxb. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 185, p. 171, 2016.
- ALANIYA, M. D.; CHKADUA, N. F. Flavonoids of *Astragalus tana*. **Chemistry of Natural Compounds**, 36, p. 537, 2000.
- ALANIYA, M. D.; ANELI, D. N.; PATUDIN, A. V.; KOMELIN, R. V. Flavonoids glycosides of *Astragalus cicer*. **Chemistry of Natural Compounds**, 19, p. 528, 1983.
- ALANIYA, M. D.; KAVTARADZE, N. S.; BASSARELLO, C.; SKHIRTLDADZE, A. V.; PIZZA, C.; KUTATELDADZE, I. Flavonoids glycosides from *Astragalus galegiformis* leaves. **Chemistry of Natural Compounds**, 42, p. 681, 2006.
- ALANIYA, M. D. Flavonoids of *Hedysarum sericeum* an *H. caucasicum*. **Chemistry of Natural Compounds**, 19, p. 612, 1983.
- ALBUQUERQUE, C. L. C.; SANTENA, Á. D.; MEIRELES, M. A. A. Thin layer chromatography analysis of Annato extracts obtained using supercritical fluid. **Food and Public Health**, 5, p. 127, 2015.
- ALEXANDRINO, A. C.; OKUMURA, M. P. M.; BALDASSI, L.; TABATA, Y. A.; DE PAULI, A. O. S.; DE ARAÚJO, A. P.; ROSA, M. G. Ocorrência de infecção por *Edwardsiella tarda* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intensivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, 25, p. 131, 1998.

- AMMAR, I. M.; NENAAH, G. E.; MOHAMED, A. H. Antifungal activity of prenylated flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, 49, p. 21, 2013.
- ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; MCLAUGHLIN, J. L. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical Analysis**, 2, p. 107, 1991.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MACDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, 127, p. 183, 2002.
- ANUSIRI, P.; CHOODEJ, S.; CHUMRIANG, P.; ADISAKWATTANA, S.; PUDHOM, K. Inhibitory effects of flavonoids from stem bark of *Derris indica* on the formation of advanced glycation end products. **Journal of Ethnopharmacology**, 158, p. 437, 2014.
- ARISAWA, M.; KYOZUKA, Y.; HAYASHI, T.; SHIMISU, M.; MORITA, N. Isoflavonoids in the roots of *Thermopsis fabacea* D. C. (Leguminosae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 28, p. 3686, 1980.
- ARTAMOVA, N. A.; NIKONOV, G. K.; NUSIOBEKOVA, K.; NOSUL'CHAK. Flavonoids of the seeds of *Genista aetnensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, 23, p. 632, 1987.
- ASADA, Y.; LI, W.; YOSHIKAWA, T. Isoprenylated flavonoids from hairy root cultures of *Glycyrrhiza glabra*. **Phytochemistry**, 47, p. 389, 1998.
- ASADA, Y.; LI, W.; YOSHIKAWA, T. The first prenylated bioaurone, licoagrone from hairy root cultures of *Glycyrrhiza glabra*. **Phytochemistry**, 50, p. 1015, 1999.
- ASSAHIRA, C. **A relação entre a usina hidroelétrica de Balbina e a morte de árvores de *Macrolobium acaciifolium* (Benth) Benth. (Fabaceae) nas florestas alagáveis a jusante do Rio Uatuã, Amazônia Central**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, 2014.
- AWAN, F.; DONG, Y.; WANG, N.; LIU, J.; MA, K.; LIU, Y. The fight for invincibility: Environmental stress response mechanisms and *Aeromonas hydrophila*. **Microbiological Pathogenesis**, 116, p. 135, 2018.
- AWOUAFACK, M. D.; KOUAM, S. F.; HUSSAIN, H.; NGAMGA, D.; TANE, P.; SCHULZ, B.; KROHN, K. Antimicrobial prenylated dihydrochalcones from *Eriosema glomerata*. **Planta Medica**, 74, p. 50, 2008.
- AWOUAFACK, M. D.; SPITELLER, P.; LAMSHOFT, M.; KUSARI, S.; IVANOVA, B.; TANE, P.; SPITELLER, M. Antimicrobial Isopropenyldihydrofuranoisoflavones from *Crotalaria lachnophora*. **Journal of Natural Products**, 74, p. 272, 2011.
- AWOUAFACK, M. D.; TANE, P.; ELOFF, J. N. Two new antioxidant flavones from the twigs of *Eriosema robustum* (Fabaceae). **Phytochemistry Letters**, 6, p. 62, 2013.
- AZZOUZI, S.; ZAABAT, N.; MEDJROUBI, K.; AKKAL, S.; BENLABED, K.; SMATI, S.; DIJOUX-FRANCA, M. Phytochemical and biological activities of *Bituminaria bituminosa* L. (Fabaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 7, p. 481, 2014.
- BAHIA, M. V.; SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids and other Phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 16, p. 1402, 2005.
- BAKIROV, É. K.; YUSUPOVA, S. S.; SATTIKULOV, A.; VDOVIN, A. D.; MALIKOV, V. M.; YAGUDAIEV, M. R. Flavonoids of *Ammothamnus*

- lehmannii*. Structure of lehmanning and ammothamnidin. **Chemistry of Natural Compounds**, 23, p. 429, 1987.
- BARNETT, A. A.; ALMEIDA, T.; ANDRADE, R.; BOYLE, S.; LIMA, M. G.; MACLARNON, A.; ROSS, C.; SILVA, W. S.; SPIRONELLO, W. R.; RONCHI-TELES, B. Ants in their plants: *Pseudomyrmes* ants reduce primate, parrot and squirrel predation on *Macrolobium acaciifolium* (Fabaceae) seeds in Amazonian Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society**. 114, p. 260, 2016.
- BEBAK, J.; WAGNER, B.; BURNES, B.; HANSON, T. Farm size, seining practices, and salt use: Risk factors for *Aeromonas hydrophyla* outbreaks in farm-raised catfish, Alabama, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, 118, p. 161, 2015.
- BEHRENS, M. D.; TAPPIN, M. R. R.; FAVORETO, R.; SILVA, V. P.; NAKAMURA, M. J.; BARBOSA, A. P.; SOUSA, L. A.; SIANI, A. C. Estudo prospectivos de Leguminosas da Amazônia Central. II. Composição química dos óleos das sementes. **Fitos**, 1, p. 58, 2006.
- BENJAMIN, B. D.; MULCHANDANI, N. B. Effects of gamma irradiation on biosynthetic potential of callus cultures of *Tylophora indica*. **Planta Medica**, 29, p. 37, 1976.
- BLINOVA, K. F.; TKHUAN', B. Oxytroside from *Oxytropis myriophylla*. **Chemistry of Natural Compounds**, 22, p. 89, 1986.
- BOATWRIGHT, J. S.; ROUX, A.; MANNING, J. C. *Amphithalea ornate* (Podalyrieae, Fabaceae), a rare new species from the Western Cape Province, South Africa. **South African Journal of Botany**, 102, p. 217, 2016.
- BOINIK, V. V.; BATYUK, N. V.; KOVALEV, V. N. Flavonoids of *Caragana arborescens*. **Chemistry of Natural Compounds**, 22, p. 351, 1986.
- BOUMAZA, O.; MEKKIOU, R.; SEGUIRI, R.; SARRI, D.; BENAYACHE, S.; GARCIA, V. P.; BERMEJO, J.; BENAYACHE, F. Flavonoids and isoflavonoids from *Genista tricuspidata*. **Chemistry of Natural Compounds**, 42, p. 730, 2006.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. **Labensmittel-Wissenschaft & Technologie**, 28, p. 25, 1995.
- BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. **Phytochemistry**, 25, p. 563, 1986.
- BURASHEVA, G. S.; MUKHAMED'YAROVA, M. M.; CHUMBALOV, T. K. Flavonoids of *Alhagi kirgisorum*. **Chemistry of Natural Compounds**, 11, p. 261, 1975a.
- BURASHEVA, G. S.; MUKHAMED'YAROVA, M. M.; CHUMBALOV, T. K. Flavonoids of *Alhagi kirgisorum*. **Chemistry of Natural Compounds**, 11, p. 441, 1975b.
- BURASHEVA, G. S.; MUKHAMED'YAROVA, M. M.; CHUMBALOV, T. K. Flavonoids of *Alhagi kirgisorum*. III. **Chemistry of Natural Compounds**, 12, p. 596, 1976.
- BURASHEVA, G. S.; MUKHAMED'YAROVA, M. M.; CHUMBALOV, T. K. Polyphenols of *Alhagi kirgisorum*. IV. **Chemistry of Natural Compounds**, 13, p. 242, 1977.
- BUTAYAROV, A. V.; BARITOV, É. K.; TADBZHIBAEV, M. M.; MALICOV, V. M. Flavonoids of *Pseudosophora alopecuroides*. **Chemistry of Natural Compounds**, 34, 102, 1998.

- BUTAYAROV, A. V.; BATIROV, É. K.; TADBZHIBAEV, M. M.; YULDASHEV, M. P. Flavonoids of *Caragana alaica*. **Chemistry of Natural Compounds**, 35, p. 628, 1999.
- CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. New biflavonoids from the leaves of *Chimarris turbinata* and their antioxidant activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 16, p. 1353, 2005.
- CARDOSO, D.; QUEIROZ, L. P.; PENNINGTON, T.; LIMA, H. C.; FONTY, È.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M. Revisiting the phylogeny of Papilionoid legumes: New insights from comprehensively sampled early-branching lineages. **American Journal of Botany**, 99, p. 1991, 2012.
- CARDOSO, L. C. A.; COELHO, R. G.; HONDA, N. K.; POTT, A.; PAVAM, F. R.; LEITE, C. Q. S. Phenolic compounds and antioxidant, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Serjania erecta* Radlk. (Sapindaceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 49, p. 775, 2013.
- CEYLAN, R.; KATANIC, J.; ZENGİN, G.; MATIC, S.; AKTUMSEK, A.; BOROJA, T.; STANIC, S.; MIHAİLOVIC, V.; GULER, G. O.; BOGA, M. YILMAZ, M. A. Chemical and biological fingerprints of two Fabaceae species (*Cytisopsis dorycniifolia* and *Ebenus hirsute*): Are they novel sources of natural agents for pharmaceutical and food formulations? **Industrial Crops and Products**, 84, p. 254, 2016.
- CHAIPPUKDEE, N.; KANOKMEDHAKUL, S.; LEKPHROM, R.; KANOKMEDHAKUL, K. Two new flavanoneols from the bark of *Akschindlium godefroyanum*. **Natural Product Research**, 28, p. 191, 2004.
- CHANG-MING, H.; ZHI-HONG, C.; DAO-FENG, C. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in *Sophora tonkinensis* by LC/MS and HPLC. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 11, 690, 2013.
- CHARLES, D. J. **Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Others Sources**. Iowa. Springer. p. 3-6, 2013.
- CHAWLA, H. M.; CHIBBER, S. S. TLC separation and identification of some flavonoid C-glycosides. **Chromatographia**, 9, p. 408, 1976.
- CHEXAL, K. K.; HANDA, B. K.; RAHMAN, W. Thin-layer chromatography of biflavonoyls on silica gel structure – chromatographic behaviour correlation. **Journal of Chromatography**, 48, p. 484, 1970.
- CHOKCHAISIRI, R.; SUAISOM, C.; SRIPHORA, S.; CHINDADUANG, A.; CHUPRAJOB, T.; SUKSAMRARN, A. Bioactive Flavonoids of the *Butea monosperma*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 57, p. 428, 2009.
- CHOUDHARY, N. SIDDIQUI, M. B.; KHATOON, S. Pharmacognostic evaluation of *Tinospora cordifolia* (Wild.) Miers and identification of biomarkers. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, 13, p. 543, 2014.
- CLARCK-LEWIS, J. W.; JACKMAN, L. M.; SPOTSWOOD, T. M. Nuclear magnetic resonance spectra, stereochemistry, and conformation of flavan derivatives. **Australian Journal of Chemistry**, 17, p. 632, 1964.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M07-A8—Ninth Edition, 2012.
- CORONADO-ACEVES, E. W.; GIGLIARELLI, G.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; ZEPEDA, R. E. R.; CURINI, M.; CERVANTES, J. L.; ESPITIA-PINZÓN, C. I. I.; SUPERCHI, S.; VERGURA, S.; MARCOTULLIO, M. C. New isoflavonoids from the extract of *Rhychosia precatória* (Humb. & Bonpl. ex

- Willd) DC. and their antimycobacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 206, p. 92, 2017.
- DA CUNHA, C. P.; GODOY, R. L. O.; BRAZ FILHO, R. Isolation of Flavonoids from *Dipteryx odorata* by High Performance Liquid Chromatography. **Revista Virtual de Química**, 8, p. 43, 2016.
- DE CARVALHO, M. G.; CARDOZO, M. A. R.; JUNIOR, F. E. A. C.; DE CARVALHO, A. G. Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr (pau jacaré). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, 82, p. 561, 2010.
- DE OLIVEIRA, D. R.; ZAMBERLAM, C. R.; GAIARDO, R. B.; RÊGO, G. M.; CERUTTI, J. M.; CAVALHEIRO, A. J.; CERUTTI, S. M. Flavones from *Erythrina falcata* are modulators of fear memory. **BioMed Central Complementary & Alternative Medicine**, 14, p. 288, 2014.
- DENDUP, T.; PRACHYWARAKOM, V.; PANSANIT, A.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTA KOOP, P. α -Glucosidase inhibitory activities of isoflavanones, isoflavones, and pterocarpanes from *Mucuna pruriens*. **Planta Medica**, 80, p. 604, 2014.
- DEWICK, P. M., **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester; 2^a ed. John Wiley & Sons, Ltda. 2002.
- DOS SANTOS, A. E.; KUSTER, R. M.; YAMAMOTO, K. A.; SALLES, T. S.; CAMPOS, R.; DE MENESES, M. D. F.; SOARES, M. R.; FERREIRA, D. Quercetin and quercetin 3-*O*-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. Show anti-Mayaro virus activity. **Parasites & Vectors**, 7, p. 130, 2014.
- DUCHENKO, M. A.; DEMESHKO, O. V.; KOVALEV, V. N. Flavonoids from *Gleditsia triacanthos*. **Chemistry of Natural Compounds**, 52, p. 1093, 2016.
- DURIC, K.; KOVAC-BESOVIC, E. E.; NIKSIC, H.; MURATOVIC, S.; SOFIC, E. Anticoagulant activity of some *Artemisia dracunculus* leaf extracts. **Bosnia Journal of Basic Medicinal Sciences**, 15, p. 9, 2015.
- DZOYEM, J. P.; MELONG, R.; TSAMO, A. T.; TCHINDA, A. T.; KAPCHE, D. G. W. F.; NGADJUI, B. T.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Cytotoxicity, antimicrobial and antioxidant activity of eight compounds isolated from *Entada abyssinica* (Fabaceae). **BioMed Central Research Notes**, 10, p. 118, 2017.
- EL DIB, R. A.; SOLIMAN, H. S. M.; HUSSEIN, M. H.; ATTIA, H. G. Two New Flavonoids and Biological Activity of *Astragalus abyssinicus* (Hochst.) Steud. ex A. Rich. Aerial Parts. **Drug Research**, 65, 259, 2015.
- EL-HAWIET, A. M.; TOAIMA, S. M.; ASSD, A. M.; RADWAN, M. M.; EL-SEBAKHY, N. A. Chemical constituents from *Astragalus annularis* Forssk. and *A. trimestris* L., Fabaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 20, p. 860, 2010.
- Fabaceae em **Flora do Brasil** 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>. Acesso em: 06 Set. 2017.
- Fabaceae em **The plant List** (2016). Versão 1.1. Disponível em: <http://www.theplantlist.org>. Acesso em: 06 Jul. 2016
- FAIZIEVA, S. K.; KHUSHBAKTOVA, Z. A.; YULDASHEV, M. P.; BATIROV, É. K.; SAGDULLAEV, S. S. The total flavonoids from *Themopsis alterniflora*, *Th. dolichocarpa*, *Vexibia alopecuroides*, and *Rhaponticum carthamoides* and their hypolipidemic activity. **Chemistry of Natural Compounds**, 35, p. 155, 1999.
- FRANCO, D. M.; SALDANHA, L. L.; NETO, J. S. L.; SANDOS, L. C.; DOKKEDAL, A. L.; ALMEIDA, L. F. R. Seasonal variation in allelopathic potential of the

- leaves of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Acta botanica Brasilica**, 30, p. 157, 2016.
- FUKAI, T.; NISHIZAWA, J.; NOMURA, T. Five isoprenoid-substituted flavonoids from *Glycyrrhiza eurycarpa*. **Phytochemistry**, 35, p. 515, 1994a.
- FUKAI, T.; ZENG, L.; NISHIZAWA, J.; WANG, Y.; NOMURA, T. Four isoprenoid-substituted flavonoids from *Glycyrrhiza aspera*. **Phytochemistry**, 36, p. 233, 1994b.
- FUKAI, T.; TANTAI, L.; NOMURA, T. Isoprenoid-substituted flavonoids from *Glycyrrhiza glabra*. **Phytochemistry**, 43, p. 531, 1996a.
- FUKAI, T.; SHENG, C.; HORIKOSHI, T.; NOMURA, T. Isoprenylated flavonoids from underground parts of *Glycyrrhiza glabra*. **Phytochemistry**, 43, p. 1119, 1996b.
- FUKAI, T.; CAI, B.; MARUNO, K.; MIYAKAWA, Y.; KONISHI, M.; NOMURA, T. An isoprenylated flavanone from *Glycyrrhiza glabra* and rec-assay of licorice phenols. **Phytochemistry**, 49, p. 2005, 1998.
- FULMER, G. R.; MILLER, A. J. M.; SHERDEN, N. H.; GOTTLIEB, H. E.; NUDELMAN, A.; STOLTZ, B. M.; BERCAW, J. E.; GOLDBERG, K. Y. NMR chemistry shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. **Organometallics**, 29, p. 2176, 2010.
- GAFUROV, A. Z.; SATTIKULOV, A.; YULDASHEV, M. P.; BOTIROV, É, K. Flavonoids of epigeal part of *Cicer mogoltavicum*. **Chemistry of Natural Compounds**, 33, p. 496, 1997.
- GAGE, T. B.; DOUGLASS, C. D.; WENDER, S. H. Identification of flavonoids compounds by filter paper chromatography. **Analytical Chemistry**, 23, p. 1582, 1951.
- GAMPE, N.; DARCSI, A.; LOHNER, S.; BÉNI, S.; KURSINSZKI, L. Characterization and identification of isoflavonoid glycosides in the root of Spiny restharrow (*Ononis spinosa* L.) by HPLC-QTOF-MS, HPLC-MS/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 123, p. 74, 2016.
- GANGOPADHYAY, N.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. P.; GALLAGHER, E.; HOSSAIN, M. B. Antioxidant-guided isolation and mass spectrometric identification of the major polyphenols in barley (*Hordeum vulgare*) grain. **Food Chemistry**, 210, p. 212, 2016.
- GEORGE, V. C.; DELLAIRE, C.; RUPASINGHE, H. P. V. Plants flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 45, p. 1, 2017.
- GONZÁLEZ, A. M.; PRESA, M.; LATORRE, M. G.; LURÁ, M. C. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. **Revista Iberoamericana de Micología**, 24, p. 59, 2007.
- GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **The Journal of Organic Chemistry**, 62, p. 7512, 1997.
- GUCHU, S. M.; YENESEW, A.; TSANUO, M. K.; GIKONYO, N. K.; ICKETT, J. A., HOOPER, A. M.; HASSANALI, A. C-methylated and C-prenylated isoflavonoids from root extract of *Desmodium uncinatum*. **Phytochemistry**, 68, p. 646, 2007.
- GUTIERREZ-LUGO, M.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. D.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B. N. Lipxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. **Planta Medica**, 70, 263, 2004.

- GUZHVA, N. N.; LUK'YANCHIKOV, M. S.; KAZAKOV, A. L. Flavonoids of *Astragalus levieri* and *Astragalus sevagensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, 19, p. 501, 1983.
- GUZHVA, N. N.; LUK'YANCHIKOV, M. S.; USHAKOV, V. V.; SARKISOV, L. S. Flavonoids of *Astragalus captiosus*. **Chemistry of Natural Compounds**, 12, p. 729, 1986.
- HAMDANI, N. E.; FDIL, R.; TOURABI, M.; JAMA, C.; BENTISS, F. Alkaloids extract of *Retama monosperma* (L.) Boiss. seeds used as novel eco-friendly inhibitor for carbon steel corrosion in 1 M HCl solution: Electrochemical and surface studies. **Applied Surface Science**, 357, p. 1294, 2015.
- HATANO, T.; KAGAWA, H.; YASUHARA, T.; OKUDA, T. Two new flavonoids and others constituents in licorice roots: their relative astringency and radical scavenging effects. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 36, p. 2090, 1988a.
- HATANO, T.; YASUHARA, T.; MIYAMOTO, K.; OKUDA, T. Anti-human immunodeficiency virus phenolics from licorice. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 36, p. 2286, 1988b.
- HATANO, T.; YASUHARA, T.; FUKUDA, T.; NORO, T.; OKUDA, T. Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoaryl coumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 37, p. 3005, 1989.
- HATANO, T.; TAKAGI, M.; ITO, H.; YOSHIDA, T. Acylated flavonoids glycosides and accompanying phenolics from licorice. **Phytochemistry**, 47, p. 287, 1998.
- HAYASHI, H.; YASUMA, M.; HIRAOKA, N.; IKESHIRO, Y.; YAMAMOTO, H.; YESILADA, E.; SEZIK, E.; HONDA, G.; TABATA, M. Flavonoid variation in the leaves of *Glycyrrhiza glabra*. **Phytochemistry**, 42, p. 701, 1996.
- HERNÁNDEZ, J. D.; HERNÁNDEZ, L. G. A.; ALVAREZ, R.; ROMÁN, L. U. Glicosídeos de luteolina y mirecetina de Burseraceae. **Revista de la Sociedad Química del México**, 46, p. 295, 2002.
- HILLERNS, P. I.; WINK, M. Binding of flavonoids from *Sophora flavescens* to the rat uterine estrogen receptor. **Planta Medica**, 71, p. 1065, 2005.
- HOUGHTON, P. J. TLC of indole Alkaloids. In: Waksmundzka-Hajnos, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**, p. 630, 2008.
- HU, S. H.; WANG, J. C.; KUNG, H. F.; WANG, J. T.; LEE, W. L.; YANG, Y. H. Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. **Kaohsiung Journal of Medical Science**, 12, p. 591, 2004.
- IKRAMOV, M. T.; MAVASHEVA, F. A.; BATIROV, É. K.; MALIKOV, V. M. Flavonoids of *Lathyrus pratensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, 26, p. 225, 1990a.
- IKRAMOV, M. T.; MAVASHEVA, F. A.; BATIROV, É. K.; MALIKOV, V. M. Flavonoids of *Logonichium farctum*. **Chemistry of Natural Compounds**, 26, p. 226, 1990b.
- IMPERATO, F.; NAZZARO, R. Luteolin 7-O-sophoroside from *Pteris cretica*. **Phytochemistry**, 41, p. 337, 1996.
- INGHAM, J. L. An isoflavan phytoalexin from leaves *Glycyrrhiza glabra*. **Phytochemistry**, 16, p. 1457, 1977.
- INGHAM, J. L. Flavonoids end isoflavonoids compounds from leaves of Sainfoin (*Onobrychis vicii folia*). **Zeitschrift für Naturforschung**, 33c, p. 146, 1978.

- JAIN, H.; MULAY, S.; MULLANY, P. Persistence of endodontic infection and *Enterococcus faecalis*: Role of horizontal gene transfer. **Gene Reports**, 5, p. 112, 2016.
- JAMET, E.; AKARY, E.; POISSON, M.; CHAMBA, J.; BERTRAND, X.; SERRON, P.; Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheese. **Food Microbiology**, 31, p. 191, 2012.
- KACEM, N.; GOOSSENS, J.; DUHAL, N.; ROUMY, V.; HENNEBELLE, T.; CHRISTEN, P.; HOSTETTMANN, K.; RHOUATI, S. Determination of alkaloids in endemic *Genista quadriflora* Munby (Fabaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 56, p. 83, 2014.
- KANESHIMA, T.; MYODA, T.; NAKATA, M.; FUJIORI, T.; TOEDA, K.; NISHIZAWA, M. Antioxidant activity of C-glycosidic ellagitannins from the seeds and peel of camu-camu (*Myrciaria dubla*). **Food Science and Technology**, 69, p. 76, 2016.
- KANETA, M.; HIKICHI, H.; ENDO, S.; SUGIYAMA, N. Identification of flavones in sixteen *Leguminosae* species. **Agricultural and Biological Chemistry**, 44, p. 1407, 1980.
- KARAMESE, M.; EROL, H. S.; ALBAYRAK, M.; GUVENDI, G. F.; AYDIN, E.; KARAMESE, S. A. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of apigenin in a rat model of sepsis: an immunological, biochemical, and biopathological study. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 38, p. 228, 2016.
- KATTAEV, N. S.; NIKONOV, G. K.; Flavonoids of *Thermopsis alterniflora*. **Chemistry of Natural Compounds**, 8, p. 618, 1972.
- KATTAEV, N. S.; NIKONOV, G. K.; The structure of the thermopsoside – A new Flavonoid of *Thermopsis alterniflora*. **Chemistry of Natural Compounds**, 9, p. 108, 1973.
- KATTAEV, N. S.; NIKONOV, G. K.; Flavonoids of *Thermopsis alterniflora*. **Chemistry of Natural Compounds**, 10, p. 157, 1975.
- KAYA, M.; ODABASI, M.; MUJTABA, M.; SEN, M. BULUT, E.; AKYUS, B. Novel three-dimensional cellulose produced from trunk of *Astragalus gummifer* (Fabaceae) tested for protein adsorption performance. **Materials Science and Engineering C**, 62, p.144, 2016.
- KESHARI, A. K.; KUMAR, G.; KUSHIWAHA, P. S.; BHARDWAJ, M.; KUMAR, P.; RAWAT, A.; KUMAR, D.; PRAKASH, A.; GHOSH, B.; SAHA, S. Isolated flavonoids from *Ficus racemosa* stem bark possess antidiabetic, hypolipidemic and protective effect in albino Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 181, p. 252, 2016.
- KINFE, H. H.; LONG, H. S.; STANDER, M. A.; WYK, B. E. V. The major phenolic compound of the roots and leaves of *Rafnia amplexicaulis* (Fabaceae), a liquorice substitute and traditional tea used in Cape Herbal Medicine. **South African Journal of Botany**, 100, p. 75, 2015.
- KINOSHIDA, T.; SAITOH, T.; SHIBATA, S. The occurrence of an isoflavene and the corresponding isoflavone in licorice root. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 24, p. 991, 1976.
- KINOSHIDA, T.; SAITOH, T.; SHIBATA, S. A new isoflavone from licorice root. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 26, p. 141, 1978.
- KITAGAWA, I.; CHEN, W.; HORI, K.; HARADA, E.; YASUDA, N.; YOSHIKAWA, M.; REN, J. Chemical studies of Chinese licorice-roots. I. Elucidation of a five new constituents from the roots of *Glycyrrhiza glabra* L. collected in Xinjiang. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 42, p. 1056, 1994.

- KOMISSARENKO, N. F.; POLYAKOVA, L. V. Flavonoids of *Astragalus adsurgens*. **Chemistry of Natural Compounds**, 23, p. 256, 1987.
- KOTENKO, L. D.; MAMATKHAMOV, A. U.; TURAKHOZHAEV, M. T. Spectrometric determination of flavonoids in *Thermopsis alterniflora*. **Chemistry of Natural Compounds**, 29, p. 590, 1993.
- KOVALE, S. V. Flavonoids from *Lotus ucrainicus* and *L. arvensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, 45, p. 550, 2009.
- KUETE, V.; SANDJO, L. P.; HWAMOU, G. M. N; WIENCH, B.; NKENGFAK, A. E.; EFFERTH, T. Activity of three cytotoxic isoflavonoids from *Erythrina excels* and *Erythrina senegalensis* (neobavaisoflavone, sigmoidin H and isoneorautenol) toward multi-factorial drug resistant cancer cells. **Phytomedicine**, 21, p. 682, 2014.
- LASISI, A. A.; ADESOMOJU, A. Neoraudiol, a new isoflavonoid and other antimicrobial constituents from the tuberous root of *Neorautanemia mitis* (A. Rich) Verdcourt. **Journal of Saudi Chemical Society**, 19, p. 404, 2015.
- LEE, E.; MOON, B.; PARK, Y.; HONG, S.; LEE, S.; LEE, Y.; LIM, Y. Effects of hydroxy and methoxy substituents on NMR data in flavonols. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 29, p. 507, 2008.
- LI, W.; ASADA, Y.; YOSHIKAWA, T. Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* hairy roots cultures. **Planta Medica**, 64, p. 746, 1998.
- LI, W.; ASADA, Y.; YOSHIKAWA, T. Flavonoids constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy roots cultures. **Phytochemistry**, 55, p. 447, 2000.
- LIU, H.; MOU, Y.; ZHAO, J.; WANG, J.; ZHOU, L.; WANG, M. WANG, D.; HAN, J.; YU, Z.; YANG, F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. **Molecules**, 15, p. 7933, 2010.
- LIU, R.; WEN, X.; SHAO, F.; ZHANG, P.; HUANG, H.; ZHANG, S. Flavonoids from heartwood of *Dalbergia cochinchinensis*. **Chinese Herbal Medicines**, 8, p. 89, 2016a.
- LIU, Y.; WU, J.; LI, H.; MA, Q.; CHEN, Y. Alkaloids and flavonoids from the seeds of *Whitfordiodendron filipes*. **Chemistry of Natural Compounds**, 52, p. 188, 2016b.
- LOPES, M. N.; DE OLIVEIRA, A. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Flavonoids from *Chiococca braquiata* (Rubiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 15, p. 468, 2004.
- LOUAAR, S.; AKKAL, S.; BOUSETLA, A.; MEDJROUBI, K.; DJARRI, L.; SEGUIN, E. Phytochemical study of *Retama sphaerocarpa*. **Chemistry of Natural Compounds**, 41, p. 107, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. eds. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, p. 60-63. 2002.
- LUK'YANCHIKOV, M. S.; KAZAKOV, A. L. Flavonoids of *Onobrychis tanaitica*. II. **Chemistry of Natural Compounds**, 18, p. 238, 1982.
- LUK'YANCHIKOV, M. S. Flavonoids of some species of *Cicer* of the Central Asian flora. **Chemistry of Natural Compounds**, 28, p. 117, 1992a.
- LUK'YANCHIKOV, M. S. Flavonoids of *Cicer songoricum*. **Chemistry of Natural Compounds**, 28, p. 118, 1992b.
- LUK'YANCHIKOV, M. S.; KAZAKOV, A. L. Flavonoids of *Trifolium strepens*. **Chemistry of Natural Compounds**, 19, p. 103, 1983.
- MA, X.; ZHENG, C.; ZHANG, Y.; HU, C.; LIN, B.; FU, X.; HAN, L.; XU, L.; RAHMAN, K.; QIN, L. Antiosteoporotic flavonoids from *Podocarpium podocarpum*. **Phytochemistry Letters**, 6, p. 118, 2013.

- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 23, p. 429, 2002.
- MADUNIC, J.; MADUNIC, I. V.; GAJSKI, G.; POPIC, J.; GARAJ-VRHOVAC, V. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse properties. **Cancer Letters**, 413, p. 11, 2018.
- MAKBUL', M. A.; BLINOVA, K. F. Flavonoids of *Astragalus melilotoides*. **Chemistry of Natural Compounds**, 15, p. 640, 1979.
- MALDINI, M.; MONTORO, P.; MACHIA, M.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Profiling of phenolics from *Tephrosia cinerea*. **Planta Medica**, 77, p. 1861, 2011.
- MARKHAM, K. R.; RAHMAN, W.; JEHAN, S.; MABRY, T. J. NMR analysis and synthesis of 6- and 8-C-methylisoflavones. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 4, p. 61, 1967.
- MARKHAM, K. R.; TERNAL, B. ¹³C NMR of flavonoids II. Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. **Tetrahedron**, 32, p. 3207, 1976.
- MARKHAM, K. R. VILAIN, C.; MOLLOY, P. J. Uniformity and distinctness of *Phyllocladus* as evidenced by flavonoid accumulation. **Phytochemistry**, 24, p. 2607, 1985.
- MARTÍN-CORDERO, C.; LÁZARO, M. L.; GIL-SERRANA, A.; CARVAJAL, M. A. L.; GONZÁLEZ, M. J. A. novel flavonol glycoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier. **Phytochemistry**, 51, p. 1129, 1999.
- MARTÍNEZ, L. C.; ÁLVAREZ, C. E. G.; ÁLVAREZ, M. P.; DEL RÍO, R. F.; VELASCO, C. G.; ENCISO, B. S. Meningitis neonatal por *Enterococcus faecalis*. **Revista del Laboratorio Clínico**, 2017, <http://doi.org/10.1016/j.labcli.2017.11.007>.
- MARTINS, D.; FACHIN-ESPINAR, M. T.; OLIVEIRA, T. A.; LIMA, K. S. C.; CAVALCANTI, R. M.; TELES, B. R.; NUNEZ, C. V. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, 2, p. 158, 2014.
- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate. **Drug Information Journal**, 32, p. 513, 1998.
- MEKKIOU, R.; SEGHIRI, R.; BOUMAZA, O.; SARRI, D.; CHEBBAH, K.; BENAYACHE, S.; BERMEJO, J.; BENAYACHE, F. Secondary metabolites from *Genista ferox*. **Chemistry of Natural Compounds**, 48, p. 710, 2012.
- MISHRA, P. K.; SINGH, N.; AHMAD, G.; DUBE, A.; MAURYA, R. Glycolipids and others constituents from *Desmodium gangeticum* with antileishmanial and immunomodulatory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 15, p. 4543, 2005.
- MOHAMMED, R. S.; ABOU ZEID, A. H.; EL HAWARY, S. S.; SLEEM, A. A.; ASHOUR, W. E. Flavonoids constituents, cytotoxic and antioxidant activities of *Gleditsia triacanthos* L. leaves. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 21, p. 547, 2014.
- MOHAMMED, R. S.; EL SOUDA, S. S.; TAIE, H. A. A.; MOHARAM, M. E.; SHAKER, K. H. Antioxidant, antimicrobial activities of flavonoids glycosides from *Leucaena leucocephala* leaves. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 5, p. 138, 2015.
- MONIAVA, I. I.; KEMERTELIDZE, E. P. Rutin in some species of *Onobrychis* Adans. **Chemistry of Natural Compounds**, 5, p. 152, 1969.
- MONIAVA, I. I.; KEMERTELIDZE, E. P. Flavonoids from the flowers of *Onobrychis inermis*. **Chemistry of Natural Compounds**, 7, p. 510, 1971a.

- MONIAVA, I. I.; KEMERTELIDZE, E. P. Isorhamnetin 3-galactoside from *Onobrychis angustifolia*. **Chemistry of Natural Compounds**, 7, p. 809, 1971b.
- MONIAVA, I. I.; KEMERTELIDZE, E. P. Quercetin glycosides from *Onobrychis sosnowskyi* and *O. kachetica*. **Chemistry of Natural Compounds**, 7, p. 810, 1971c.
- MOREL, S.; HELESBEUX, J.; SÉRAPHIN, D.; DERBRÉ, S.; GATTO, J.; AUMOND, M.; ABATUCI, Y.; GRELLIER, P.; BENIDDIR, M. A.; PAPE, P.; PAGNIEZ, F.; LITAUDON, M.; LANDREAU, A.; PICHOMME, P. Anti-AGEs and antiparasitic activity of an original prenylated isoflavonoid and flavanones isolates from *Derris ferruginea*. **Phytochemistry Letters**, 6, p. 498, 2013.
- MORENO, A.; MARTÍN-CORDERO, C.; IGLESIAS-GUERRA, F.; TORO, M. V. Flavonoids from *Dorycnium rectum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 20, p. 73, 2002.
- MOURA, V. M.; SILVA, W. C. R.; RAPOSO, J. D. A.; FREITAS-DE-SOUSA, L. A.; DOS-SANTOS, M. C.; OLIVEIRA, R. B.; MOURÃO, R. H. V. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothops atrox* envenomation. **Journal of ethnopharmacology**, 183, p. 136, 2016
- MUMINOVA, B. A.; BATIROV, E. K.; YUDASHEV, M. P.; INAMOVA, Z. G. flavonoids from *Sophora griffithii* and *Goebelia pachycarpa*. **Chemistry of Natural Compounds**, 42, p. 108, 2006.
- NAGARAJAN, G. R.; PARMAR, V. S. Chemical examination of the heartwood of *Prunus domestica*. **Planta Medica**, 31, p. 146, 1977.
- NASCIMENTO, I. A.; BRAZ-FILHO, R.; DE CARVALHO, M. G.; MATHIAS, L.; FONSECA, S. A. Flavonoides e outros compostos isolados de *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula. **Química Nova**, 11, p. 2159, 2012.
- NERETINA, O. D.; FERODOV, S. D.; GROMOVA, A. S.; LUTSKII, V. I.; EL'KIN, Y. N. Flavonoids of *Hedysarum setigerum*. **Chemistry of Natural Compounds**, 38, p. 194, 2002.
- NISHIDA, K.; KATO, T.; YUZAKI, I.; SUGANUMA, T. Edwardsiella tarda bacteremia with metastatic gastric cancer. **IDCases**, 5, p. 76, 2016.
- NOVAIS, J. A. P. **Desenvolvimento e validação de método para quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais secos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2007.
- NOVRUZOV, E. N.; ABDULLAEVA, G. A.; SHAMSIZADE, L. A.; MUSTAFAEV, N. S. Flavonoids and anthocyanins from *Alhagi pseudoalhagi*. **Chemistry of Natural Compounds**, 45, p. 249, 2009.
- NUGROHO, A.; HERYANI, H.; CHOI, J. S.; PARK, H. identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 7, p. 208, 2017.
- OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; HASHIMOTO, K.; YAGI, A. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. **Phytochemistry**, 37, p. 1463, 1994.
- OKONKWO, C. J.; NJOKU, O. U.; OKONKWO, T. J. N.; AFIEROHO, O. E.; PROKSCH, P. Two new acylated flavonol glycoside from *Mimosa pigra* L. leaves sub-family Mimosoideae. **Future Journal Pharmaceutical Science**, 2, 71, 2016.
- OLENNIKOV, D. N.; TANKHAEVA, L. M.; PARTILKHAEV, V. V. chemical investigation of Caragana spinose Runners. **Chemistry of Natural Compounds**, 47, p. 998, 2012.

- OLIVEIRA, J. C. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids from the bark roots of *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae). **Phytochemistry Letters**, 16, p. 18, 2016.
- ORHAN, F.; BARIS, O.; YANMIS, D.; BAL, T.; GUVENALP, Z.; GULLUCE, M.; Isolation of some luteolin derivatives from *Menta longifolia* (L.) Hudson subs. *longifolia* and determination of their genotoxic potencies. **Food Chemistry**, 135, p. 764, 2012.
- OZIMINA, I. I. Flavonoids of *Spartium junceum*. I. Flavones and flavonols. **Chemistry of Natural Compounds**, 15, p. 763, 1979.
- PEIRANO G, SOUZA F.D.S. RODRIGUES, D.D.P. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella spp.* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 101, n. 3, p. 245-250, 2006.
- PEREIRA, C.; JÚNIOR, C. B. B.; KUSTER, R. M. Flavonoids and a neolignan glucoside from *Guarea macrophylla* (Meliaceae). **Química Nova**, 35, p. 1123, 2012.
- PEREIRA, R. M.; FERREIRA-SILVA, G. A.; PIVATTO, M.; SANTOS, L. Á.; BOLZANI, V. S.; PAULA, D. A. C.; OLIVEIRA, J. C.; JÚNIOR, C. V.; IONTA, M. Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*, (–)-cassine and (–)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression. **Toxicology in Vitro**, 31, p. 96, 2016.
- PHAN, M. G.; PHAN, T. S.; MATSUNAME, K.; OTSUKA, H. Flavonoid compounds from *Desmodium styracifolium* of vietnamese origin. **Chemistry of Natural Compounds**, 46, p. 797, 2010.
- POETHKE, V. W.; SCHWARZ, C.; GERLACH, H. Über die Inhaltsstoffe von *Passiflora bryonioides*. 2. Mitt.: Flavonderivate. *Planta Medica*, 6, p. 177, 1977.
- PKHON-ASA, S. Flavonoids of *Oxytropis strobilacea*. **Chemistry of Natural Compounds**, 27, p. 637, 1991.
- PROKONENKO, S. A.; CHUSHENKO, I. V. Flavonoids of *Salvia pratensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, 22, p. 226, 1986.
- PUODZIUNENE, G.; JANULIS, V.; IVANAUSKAS, L.; LUKOSIUS, A.; BARSTEIGENE, Z.; RIBOKAITE, V. Quantitative estimation of flavonoids in the vegetative and reproductive organs of showy tick trefoil (*Desmodium canadense*). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, 43, p. 324, 2009.
- RAFFA, D.; MAGGIO, B.; RAIMONDI, M. V.; PLESCIA, F.; DAIDONE, G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 142, p.213, 2017.
- RASMUSSEN, M.; JOHANSSON, D.; SOBIRK, S. K.; MORGELIN, M.; SHANNON, O. Clinical isolates of *Enterococcus faecalis* aggregate human platelets. **Microbes Infection**, 12, p. 295, 2010.
- RIBEIRO, R. T. M. **Mobilização de reservas durante a germinação e estabelecimento de plântulas de *Macrolobium acaciifolium* Benth. (Leguminosae) e seu papel na adaptação aos pulsos de alagamento na Amazônia.** Dissertação (Mestrado em Biociências) –Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.
- ROJAS, R.; BUSTAMENTE, B.; VENTOSILLA, P.; FERNÁNDEZ, I.; CAVIEDES, L.; GILMAN, R. H.; LOCK, O.; HAMMOND, G. B. Larvicidal, antimycobacterial and antifungal compounds from the bark of the Peruvian plant *Swartzia polyphylla* DC. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 54, p. 278, 2006.
- ROSLER, H.; MABRY, T. J.; CRANMER, M. F.; KAGAN, J. The nuclear magnetic resonance analysis of the disaccharide in flavonoid rhamnoglucosides. **The Journal of Organic Chemistry**, 30, p. 4346, 1965.

- ROZA, O.; MARTINS, A.; HOHMANN, J.; LAI, W.; ELOFF, J.; CHANG, F.; CSUPOR, D. Flavonoids from *Cyclopia genistoides* and their xanthine oxidase inhibitory activity. **Planta Medica**, 82, p. 1274, 2016.
- ROZA, O.; LAI, W.; HOHMANN, J.; JEDLINSZKI, N.; CHANG, F.; CSUPOR, D.; ELOFF, J. N. Bioactivity guided isolation of phytoestrogenic compounds from *Cyclopia genistoides* by the pER8:GUS reporter system. **South African Journal of Botany**, 110, p. 201, 2017.
- RUANGRUNGSI, N.; IINUMA, M.; TANAKA, T.; OHYAMA, M.; YOKOYAMA, J.; MIZUNO, M. Three flavones with a lavandulyl group in the roots of *Sophora exigua*. **Phytochemistry**, 32, p. 999, 1992.
- SAHAKITPICHAN, P.; CHADMUK, P.; CHIMNOI, N.; NAMSA-AID, A.; RUCHIRAWAT, S.; KANCHANAPOOM, T. 2-Carboxy-dihydrostilbene and flavan glycosides from *Desmodium heterocarpon*. **Phytochemistry Letters**, 19, p. 94, 2017.
- SAITOH, T.; SHIBATA, S. New type chalcones from licorice root. **Tetrahedron Letters**, 50, p. 4461, 1975.
- SASAKI, H.; KASHIWADA, Y.; SHIBATA, H.; TAKAISHI, Y. Prenylated flavonoids from *Desmodium caudatum* and evaluation of their anti-MRSA activity. **Phytochemistry**, 82, p. 136, 2012a.
- SASAKI, H.; KASHIWADA, Y.; SHIBATA, H.; TAKAISHI, Y. Prenylated flavonoids from the roots of *Desmodium caudatum* and evaluation of their antifungal activity. **Planta Medica**, 78, p. 1851, 2012.
- SCHMIDTLEIN, H.; HERRMAN, K. Quantitative analysis of flavanones and 3-hydroxyflavanones by thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography**, 123, p. 385, 1976.
- SCHONGART, J. Growth-Oriented Logging (GOL): A new concept toward sustainable forest management in Central Amazonian várzea floodplain. **Forest Ecology and Management**, 256, p. 46, 2008.
- SELEEN, D. PARDI, V.; MURATA, R. M. Review of flavonoids: a diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. **Archives of Oral Biology**, 76, p. 76, 2017.
- SEONG, G.; HWANG, I.; CHUNG, S. Antioxidant capacities and polyphenolics of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*) leaves. **Food Chemistry**, 199, p. 612, 2016.
- SHAFAT-AL-MEHEDI, M.; HASAN, C. M.; HAQUE, M. R. Isolation of flavonoids from the bark of *Entada rheedii* Spreng. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, 15, p. 347, 2015.
- SHIRATAKE, Y.; YOKOE, I.; KOMATSU, M. Two new flavone glycosides from the roots of *Sophora subprostrata*. **Journal of Natural Products**, 49, p. 645, 1986.
- SIKORSKA, M.; MATLAWSKA, I. Kaempferol, isorhamnetin and their glycosides in the flowers of *Asclepias syriaca* L. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, 58, p. 269, 2001.
- SINGH, N. K.; VEMU, J. B.; PRENA, M. SINGH, H.; BUNKA, V. K.; SHARMA, S. K. Research in Veterinary Science, 106, 1, 2016.
- SOBEH, M.; ELHAWARY, E.; PEIXOTO, H.; LABIB, R. M.; HANDOUSSA, H.; SWILAN, N.; EL-KHATIB, A. A.; SHARAPOV, F.; MOHAMED, T.; KRSTIN, S.; LINSCHIED, M. W.; SINGAB, A. N.; WINK, M.; AYOUB, N. Identification of phenolic secondary metabolites from *Schotia brachypetala*

- Sond. (Fabaceae) and demonstration of their antioxidant activities in *Caenorhabditis elegans*. **PeerJ**, 4, p. e2404, 2016.
- SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A. SCHUHMACHER, M. B. KREUGER, M. R. O. FREITAS, R. A.; BELLA CRUZ, R. C. M. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL, V. F. **Ciências Farmacêuticas; Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí - SC: Univali, p. 107–166. 2003.
- STAHL, E.; GLATZ, A. Zur farbreaktion der anisaldehyd-schwefelsaure als reagenz inder dunnschicht – chromatographie. **Journal of Chromatography**, 240, p. 518, 1982.
- STIRTON, C. H.; MUASYA, A. M. Seven new species and notes on the genus *Aspalathus* (Crotarieae, Fabaceae). **South African Journal of Botany**, 104, p. 35, 2016.
- STRATEV, D.; ODEYEMI, O. A. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hidrophila* isolated diferent food sources: A mini-review. **Journal of infection and Public Health**, 9, p. 535, 2016.
- STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; DO CANTO, M. V.; HECKTHEUER, L; H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, 35, p. 748, 2005.
- TAHARA, S.; INGHAM, J. L.; HANAWA, F.; MIZUTANI, J. ¹H NMR chemical shift value of the isoflavone 5-hydroxyl proton as a convenient indicator of 6-substitution or 2'-hydroxylation. **Phytochemistry**, 30, p. 1683, 1991.
- TANAKA, T.; ITO, T.; IINUMA, M.; OHYAMA, M.; ICHISE, M.; TATEISHI, Y. Stilbene oligomers in roots os *Sophora davidii*. **Phytochemistry**, 53, p. 1009, 2000.
- TAO, N. P.; LUYEN, B. T. T.; KIM, J. H.; JO, A. R.; DAT, N. T.; KIEN, P. V.; MINH, C. V.; KIM, Y. H. Identification, characterization, kinetics, and molecular docking of flavonoid constituents from *Archidendron clypearia* (Jack.) Nielsen leaves and twigs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 24, p. 3125, 2016.
- TCHAMGOUE, J., HAFIZUR, R. M.; TCHOUANKEU, J. C.; KOUAN, S. F.; ADHIKARI, A.; HAMEED, A.; GREEN, I. R.; CHOUDHARY, M. I. Flavonoids and other constituents with insulin secretion activity from *Pseudarthria hookeri*. **Phytochemistry Letters**, 17, p. 181, 2016.
- TKACHENKO, P. F.; SAMOKISH, I. I.; DZHUMYRKO, S. F.; KOMPANTSEV, V. A. Flavonoids of *Vicia variabilis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 10, p. 675, 1974.
- TORCK, M.; PINKAS, M.; BÉZANGER-BEAUQUESNE, L. Etude des heterosides flavoniques de *Vicia sylvatica* et *V. sepium*. **Phytochemistry**, 11, p. 3065, 1972.
- TOUATU, R.; SANTOS, S. A. O.; ROCHA, S. M.; BELHAMEL, K.; SIILVESTRE, A. J. D. *Retama sphaerocarpa*: An unexploited and rich source of alkaloids, unsaturated fatty acids and others valuable phytochemical. **Industrial Crops and Products**, 69, p. 238, 2015.
- VAN DER HEIDE, R. F. Reagents fpr the detection of antioxidants on thin layers of silica. **Journal of Chromatography**, 24, p. 239, 1966.
- VEITCH, N. C. Isoflavonoids of the Leguminosae. **Natural Products Reports**. 24, p. 417, 2007.
- VENDITTI, A.; FREZZA, C.; FODAI, S.; SERAFINI, M.; BIANCO, A. A rare bis-ramnopiranosil-aromadendrin derivative and other flavonoids from the flowers of *Genista cilentina* Vals. An endemic species of Southern Italy. **Arabian Journal of Chemistry** (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.02.012>.

- VERPOORTE, R.; VEN DER HEIHEDEN, R.; MEMLINK, J. General Strategies In: **Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic Publishers.** Netherlands, 2000.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, 89, p.164, 2013.
- WANG, M.; LI, J.; RANGARAJAN, M.; SHAO, Y.; LAVOIE, E. J.; HUANG, T.; HO, C. Antioxidant phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, p. 4869, 1998.
- WITTMANN, F.; SCHONGART, J.; QUEIROZ, H. L.; WITTMANN, A. O.; CONSERVA, A. S.; PIEDADE, M. T. F.; KESSLMEIER, J.; JUNK, W. J. The Amazon floodplain demonstration site: Sustainable timber and management of Central Amazonian white-water floodplains. **Ecohydrology & Hydrobiology**, 9, p. 41, 2009.
- XIE, Z.; SUN, Y.; LAM, S.; ZHAO, M.; LIANG, Z.; YU, X.; YANG, D.; XU, X. Extraction and isolation of flavonoid glycosides from Flos Sophorae Immaturus using ultrasonic-assisted extraction followed by high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Separation Science**, 37, 957, 2014.
- XU, L.; ZHOU, P.; ZHI, Y.; WU, J.; ZHANG, S. Three new flavonol triglycosides from *Derris trifoliata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, 11, p. 79, 2009.
- YASINOV, R. K.; KHAITOV, I. K. Flavonoids of *Astragalus kabadianus*. **Chemistry of Natural Compounds**, 24, p. 386, 1988.
- XU, T.; ZHANG, X. *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture. **Aquaculture**, 431, p. 129, 2014.
- YASINOV, R. K.; YAKOVLEV, G. P.; Flavonoids of *Astragalus batatagi*. **Chemistry of Natural Compounds**, 22, p. 349, 1986.
- YASINOV, R. K. Flavonoids of *Astragalus eupeplus*. **Chemistry of Natural Compounds**, 22, p. 353, 1986.
- YE, Q.; MA, X.; HU, C.; LIN, B.; XU, L.; ZHENG, C.; QIN, L. Antiosteoporotic activity and constituents of *Podocarpium podocarpum*. **Phytomedicine**, 22, p. 94, 2011.
- YESILADA, E.; TSUCHIYA, K.; TAKAISHI, Y.; KAWAZOE, K. Isolation and characterization of free radical scavenging flavonoid glycosides from the flowers of *Spartium junceum* by activity-guided fractionation. **Journal of Ethnopharmacology**, 79, p. 471, 71.
- YOON, H.; EOM, S.; HYUN, J.; JO, G.; HWANG, D.; LEE, S.; YONG, Y.; PARK, J. C.; LEE, Y. H.; LIM, Y. ¹H and ¹³C NMR data on hydroxy/methoxy flavonoids and the effects of substituents on chemical shifts. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 32, p. 2101, 2011.
- YUDASHEV, M. P.; BATIROV, E. K. A novel isoflavone glycoside of *Caragana alaica*. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, 26, p. 787, 2000.
- YUDASHEV, M. P.; BATIROV, E. K.; VDOVIN, A. D.; MALIKOV, V. M.; YUGADAEV, M. R. Flavonoids of *Thermopsis alterniflora*. Crotonoylthermopsoside and crotonoylcosmosiin – New acylated flavone glycosides. **Chemistry of Natural Compounds**, 12, p. 303, 1976.
- YUDASHEV, M. P.; BATIROV, E. K.; MALIKOV, V. M. Flavonoids of *Thermopsis dolichocarpa*. **Chemistry of Natural Compounds**, 26, p. 465, 1990.
- YUDASHEV, M. P.; BATIROV, E. K.; MALIKOV, V. M. Flavonoids of epigeal part of *Onobrychis arenaria*. **Chemistry of Natural Compounds**, 32, p. 590, 1996a.

- YUDASHEV, M. P.; BATIROV, E. K.; MALIKOV, V. M., YUDASHEVA, N. P. Flavonoids of *Psoralea drupaceae* and *Reseda Luteola*. **Chemistry of Natural Compounds**, 32, p. 923, 1996b.
- YUDASHEV, M. P.; MUMINOVA, B. A.; DRENIN, A. A.; BOTIROV, E. K. Flavonoids from the aerial part of *Vicia subvillosa*. **Chemistry of Natural Compounds**, 43, p. 34, 2007.
- YUDASHEV, M. P. Flavonoids of the epigeal part of *Cicer flexuosum* and *C. mogoltavicum*. **Chemistry of Natural Compounds**, 34, p. 195, 1998.
- YUDASHEV, M. P. Flavonoids of the aerial part of *Trigonella grandiflora*. **Chemistry of Natural Compounds**, 38, p. 291, 2002.
- YUDASHEV, M. P. Flavonoids from the aerial part of *Vicia subvillosa*. **Chemistry of Natural Compounds**, 41, p. 34, 2005.
- YUSUPOVA, S. S.; BATIROV, E. K.; ABDULLAEV, S. V.; MALIKOV, V. M. Flavonoids of *Vexibia alopecuroides*. **Chemistry of Natural Compounds**, 19, p. 233, 1983.
- YUSUPOVA, S. S.; BATUROV, E. K.; KIYAMITDNOVA, F.; MALIKOV, V. M. Flavonoids of *Cicer mogoltavicum*. **Chemistry of Natural Compounds**, 22, p. 603, 1986.
- ZAPESOCHNAYA, G. G.; SAMYLINA, I. A. Daidzin from *Psoralea acaulis*. **Chemistry of Natural Compounds**, 10, p. 692, 1974.
- ZAMPELAS, A.; MICHA, R. **Antioxidants in Health and Disease**. Floride. Taylor & Francis Group. p. 3-4. 2015.
- ZENG, L.; FUKAI, T.; NOMURA, T.; ZHANG, R.; LOU, Z. Four new prenylated flavonoids, glyasperins A, B, C, and D from the roots of *Glycyrrhiza aspera*. **Heterocycles**, 34, p. 575, 1992.
- ZHANG, Y.; WANG, D.; YANG, L.; ZHOU, D.; ZHANG, J. Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity. **PLOS ONE**, 9, p. 1, 2014.