



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO QUÍMICO DA RESINA DE *Amburana cearensis*
(FABACEAE)**

Geane Pereira de Oliveira

Recife
Fevereiro/2015

Geane Pereira de Oliveira

**ESTUDO QUÍMICO DA RESINA DE *Amburana cearensis*
(FABACEAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Lopes Bandeira Delmiro Santana

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Tania Maria Sarmiento da Silva

*** Bolsista FACEPE**

Recife

Fevereiro/2015

Ficha catalográfica

O48e Oliveira, Geane Pereira de
Estudo químico da resina de *Amburana cearensis*
(Fabaceae) / Geane Pereira de Oliveira. – Recife, 2015.
150 f. : il.

Orientadora: Andréa Lopes Bandeira Delmiro Santana.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química,
Recife, 2015.

Inclui referências e anexo(s).

1. Estudo químico, 2. HPLC-DAD 3. *Amburana cearensis*
4. Atividade antioxidante I. Santana, Andréa Lopes Bandeira
Delmiro, orientadora II. Título

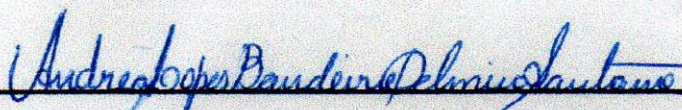
CDD 540

GEANE PEREIRA DE OLIVEIRA

**ESTUDO QUÍMICO DA RESINA DE *Amburana cearensis*
(FABACEAE)**

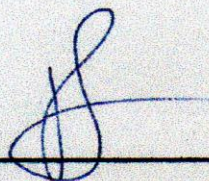
DISSERTAÇÃO AVALIADA E APROVADA PELA BANCA EM:

20 / 02 / 2015



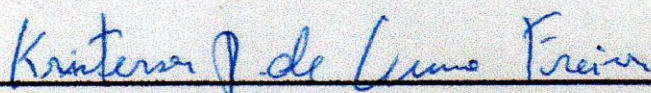
Prof.ª Dr.ª Andréa Lopes Bandeira Delmiro Santana (Departamento de Antibióticos - UFPE)

Orientadora



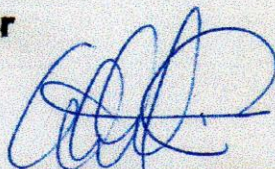
Prof.ª Dr.ª Tania Maria Sarmiento da Silva (DCM - UFRPE)

Coorientadora



Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire (CBIOTEC – UFPB)

1º Examinador



Prof. Dr. Celso de Amorim Camara (DCM – UFRPE)

2º Examinador

Dr.ª Girliane Regina da Silva (PNPD-PPGDITM-UFRPE)

Suplente

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

À Deus, pela força e coragem. Aos meus pais Edomício Antônio e Jucineide, pelo carinho incentivo e compreensão. Ao meu esposo Wagner Valença, pelo apoio, incentivo, compreensão e pela ajuda em todos os momentos. Aos meus irmãos, pelo apoio desde sempre.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Andréa Lopes Bandeira Delmiro Santana** e à minha coorientadora **Tania Maria Sarmiento da Silva** pela oportunidade, confiança, incentivo e contribuição em minha formação acadêmica. Meu eterno obrigada as duas!

À **Universidade Federal Rural de Pernambuco** e ao **programa de pós-graduação em química da UFRPE**, pela oportunidade.

A todos os amigos do Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica (BioFito), **Paulo Ricardo, Manuella, Panait, Neilton, Alexandre**, em especial a **Telma, Tamires, Girliane, Giani, Natália, Sillvana e Dário**, pelo apoio incondicional em todos os momentos, pela amizade, carinho e contribuição de todos. Muito grata a todos vocês meus amigos. Uma amizade construída em dois anos que, com certeza, levarei para a vida toda!

Ao meu esposo **Wagner Valença**, pelo apoio, carinho, paciência, dedicação e ajuda nessa caminhada. Obrigada meu amor!

Ao meu grande amigo e irmão, **Cícero** pelo apoio incondicional em todos os momentos. Obrigada meu querido amigo/irmão!

Ao meu amigo **Francielson**, pela ajuda nos momentos em que precisei.

Aos meus amigos **Carina e Hemerson**, por todo o apoio dado no início dessa jornada. Obrigada meus amigos!

Aos **professores** do PPGQ que contribuíram na minha formação acadêmica: *Celso Camara, Valberes Nascimento, Wagner Eduardo, André Lavorante, Claudete Fernandes, Hélcio Batista, Clécio Ramos e João Rufino.*

Ao **CENAPESQ** pelo apoio estrutural, em especial a **Patrícia**, pela realização dos espectros de IV.

À **FACEPE** pela bolsa de estudo concedida.

*A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho
original.*

(Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécie <i>Amburana cearensis</i> (Fr. All.) A.C. Smith.	17
Figura 2. Estruturas dos constituintes químicos isolados de <i>Amburana cearensis</i> . Cascas do caule (1-12,17-18), sementes (15-18), madeira (2,3,5,7).....	19
Figura 3. Constituintes químicos isolados da resina de <i>Amburana cearensis</i>	20
Figura 4. Esqueleto básico de flavonoide e suas subclasses.....	24
Figura 5. Resina de <i>Amburana cearensis</i>	27
Figura 6. Cromatogramas (CLAE-DAD, 254 nm) e espectros UV (λ em nm) dos picos correspondentes do extrato MeOH da resina de <i>A. cearensis</i>	36
Figura 7. Cromatogramas (CLAE-DAD, 280 (A), 320 (B), 380 (C) nm) e espectros UV (λ em nm) dos picos correspondentes do extrato MeOH da resina de <i>A.</i> <i>cearensis</i>	37
Figura 8. Esqueleto base de chalconas.....	38
Figura 9. Estruturas das chalconas isoladas da resina de <i>A. cearensis</i>	39
Figura 10. Posições dos grupamentos carbonilas em quinonas.....	46
Figura 11. Estrutura da quinona (Re-8) isolada da resina de <i>A. cearensis</i>	46
Figura 12. Esqueleto básico das isoflavonas.....	49
Figura 13. Estruturas das isoflavonas isoladas da resina de <i>A. cearensis</i>	50
Figura 14. Estrutura de compostos do grupo flavonolignanas.....	64
Figura 15. (2S,3S)-2,3- <i>trans</i> -3-(4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxifenil)-8-(3'-hidroxi-4'- metoxifenil)-2-hidroximetil-5-metoxi-2,3-di-hidro-7H-1,4-dioxino [2,3- <i>h</i>] cromen-7-ona	65
Figura 16. Atividade antioxidante (Sistema β -caroteno/ácido linoléico) do trolox (16 μ g/mL) e do extrato metanólico da resina de <i>Amburana Cearensis</i> (50 μ g/mL).	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações utilizadas para avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH'	32
Tabela 2. Concentrações utilizadas para avaliação da atividade sequestradora do radical ABTS ⁺	34
Tabela 3. Dados de RMN 1D e 2D de ¹ H e ¹³ C (300 e 75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , respectivamente) de Re-6 (2',3,4,4'-tetraidroxi- <i>trans</i> -chalcona) obtida de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.....	43
Tabela 4. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (90,0 e 22,5 MHz, acetona- <i>d</i> ₆ , respectivamente) de Re-11 (2',4,4'-triidroxi-3-metoxi- <i>trans</i> -chalcona) obtida de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.....	44
Tabela 5. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (90,0 e 22,5 MHz, acetona- <i>d</i> ₆ , respectivamente) de Re-10 (Isoliquiritigenina) obtida de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.....	45
Tabela 6. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de Re-8 obtida de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.....	48
Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) e ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da isoflavona Re-1 obtida de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.	56
Tabela 8. Dados de RMN 1D e 2D de ¹ H e ¹³ C (300 e 75 MHz, acetona- <i>d</i> ₆ , respectivamente) da isoflavona Re-3 obtida da resina de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.....	58
Tabela 9. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (300 e 75 MHz, acetona- <i>d</i> ₆ , respectivamente) da isoflavona Re-12 obtida da resina de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.	59
Tabela 10. Dados de RMN 1D e 2D de ¹ H e ¹³ C (300 e 75 MHz, acetona- <i>d</i> ₆ , respectivamente) da nova isoflavona Re-9 obtida da resina de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.....	60
Tabela 11. Dados de RMN 1D e 2D de ¹ H e ¹³ C (300 e 75 MHz, acetona- <i>d</i> ₆ , respectivamente) da isoflavona Re-4 obtida da resina de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.....	61

Tabela 12. Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) da isoflavona Re-5 obtida da resina de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.	62
Tabela 13. Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) da isoflavona Re-2 obtida da resina de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.	63
Tabela 14. Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) da isoflavonolignana Re-7 obtida da resina de <i>A. cearensis</i> . Deslocamentos químicos (δ) em ppm.	67
Tabela 15. Propriedades físicas das substâncias isoladas da resina de <i>Amburana cearensis</i>	68

LISTA DE ABREVIACOES

ABTS	cido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico]
ABTS ^{•+}	Cátion radical ABTS
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CE ₅₀	Concentração efetiva a 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Espectroscopia de correlação bidimensional ¹ H x ¹ H
d	Dupleto
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
dd	Duplo dupleto
dl	Dupleto largo
EAG	Equivalente de cido Gálico
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
IV	Infravermelho
m	Mutipleto
NP	cido difenilbrico etanolamina
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrognio-1
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
s	Simpleto
sl	Sinal largo
Trolox	cido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas universalmente.

RESUMO

ESTUDO QUÍMICO DA RESINA DE *Amburana cearensis* (FABACEAE)

Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Geane Pereira de Oliveira (geaneoliveira10@hotmail.com)

Amburana cearensis (Fr. All.) A.C. Smith (Fabaceae), popularmente conhecida como amburana de cheiro, cerejeira e cumaru é uma planta típica do bioma Caatinga com ampla distribuição no Nordeste brasileiro. É utilizada na medicina popular no tratamento de inflamações do trato respiratório como gripe, asma e bronquite. Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico da resina de *Amburana cearensis* e avaliar seu potencial antioxidante. A análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD mostrou a presença de compostos fenólicos. O fracionamento cromatográfico em coluna com Sephadex LH-20 seguido do fracionamento em CLAE resultou no isolamento de doze substâncias, compreendendo sete isoflavonas identificadas como 7,8,3'- triidroxi- 4'-metoxiisoflavona (**Re-1**), 7,8,3'- triidroxi-6,4'- dimetoxiisoflavona (**Re-2**), 7,3'- diidroxi- 8,4'-dimetoxiisoflavona (**Re-3**), 7,3'- diidroxi-4'-metoxiisoflavona (**Re-4**), 7,3'- diidroxi-6,4'-dimetoxiisoflavona (**Re-5**), 3'- Hidroxi-7,8,4'-trimetoxiisoflavona (**Re-9**) e 7,8,3',4'- tetrametoxiisoflavona (**Re-12**) e uma nova isoflavonolignana identificada como (2S,3S)-2,3-*trans*-3-(4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxifenil)-8-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil)-2-hidroximetil-5-metoxi-2,3-di-hidro-7H-1,4-dioxino [2,3-*h*] cromen-7-ona (**Re-7**), três chalconas identificadas como 2',3,4,4'-tetraidroxi-*trans*-chalcona (**Re-6**), 2',4,4'-triidroxi-3-metoxi-*trans*-chalcona (**Re-11**) e 2',4,4'-triidroxi-*trans*-chalcona (**Re-10**) e uma quinona identificada como 3',4'-dimetoxi-1'-(7-metoxi-4-oxo-4H-romen-3-il)benzo-2',5'-quinona (**Re-8**). As estruturas destes compostos foram estabelecidas com base em espectroscopia de RMN 1D (1H e APT) e 2D (1H-1H COSY, HMQC, HMBC e NOESY). Para avaliar o potencial antioxidante do extrato metanólico da resina foram realizados os ensaios com os radicais DPPH, ABTS e o sistema β -caroteno/ácido linoléico. Os resultados dos testes revelaram que a resina apresentou promissora atividade antirradicalar frente aos radicais DPPH ($CE_{50} = 6,1 \pm 0,06$) e ABTS ($CE_{50} = 10,42 \pm 0,11$), bem como boa atividade inibitória da oxidação frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico ($69,09 \pm 0,7$; T= 60 min).

Palavras chave: *Amburana cearensis*, CLAE-DAD, Atividade antioxidante.

ABSTRACT

CHEMICAL STUDY OF *Amburana cearensis* RESIN (FABACEAE)

Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Geane Pereira de Oliveira (geaneoliveira10@hotmail.com)

Amburana cearensis (Fr. All.) AC Smith (Fabaceae), popularly known as amburana de cheiro, cerejeira and cumaruis typical of the Caatinga and widely distributed in northeastern of Brazil. It is used in folk medicine to treat inflammations of the respiratory tract such as influenza, asthma and bronchitis. This work aimed the chemical investigation of the resin of *Amburana cearensis* and evaluate its antioxidant potential. Chromatographic profile analysis using HPLC-DAD showed the presence of phenolic compounds. Chromatographic fractionation with Sephadex LH-20 followed by HPLC resulted in the isolation of twelve substances, comprising seven isoflavones identified as 7,8,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone (**Re-1**), 7,8,3'-trihydroxy-6,4'-dimethoxyisoflavone (**Re-2**), 7,3'-dihydroxy-8,4'-dimethoxyisoflavone (**Re-3**), 7,3'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone (**Re-4**), 7,3'-dihydroxy-6,4'-dimethoxyisoflavone (**Re-5**), 3'-Hydroxy-7,8,4'-trimethoxyisoflavone (**Re-9**) and 7,8,3',4'-tetramethoxyisoflavone (**Re-12**), one new isoflavonolignan identified as (2S,3S)-2,3-*trans*-3-(4''-hydroxy-3'',5''-dimethoxyphenyl) - 8 - (3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)-2-hydroxymethyl-5-methoxy-2,3-dihydro - 7H-1,4 - dioxin [2,3h] chromen-7-one (**Re-7**) and three chalcones identified as 2',3,4,4'-tetrahydroxy-*trans*-chalcone (**Re-6**), 2',4,4'-trihydroxy-3-methoxy-*trans*-chalcone (**Re-11**) and 2',4,4'-trihydroxy-*trans*-chalcone (**Re-10**) and a quinone identified as 3',4'-dimethoxy-1'-(7-methoxy-4-oxo-4H-romen-3-yl) benzo-2',5'-quinone (**Re-8**). The structures of these compounds were established on the basis of 1D (¹H and APT) and 2D (¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC and NOESY) NMR spectroscopy. To evaluate the antioxidant potential of methanolic extract of the resin were carried out tests with DPPH, ABTS and the β-carotene / linoleic acid system. The test results showed that the resin showed promising activity antiradical front of DPPH (EC₅₀ = 6.1 ± 0.06) and ABTS (EC₅₀ = 10.42 ± 0.11), and good oxidation inhibitory activity across the β-carotene / linoleic acid system (69.09 ± 0.7, t = 60 min).

Keywords: *Amburana cearensis*, HPLC-DAD, Antioxidant activity.

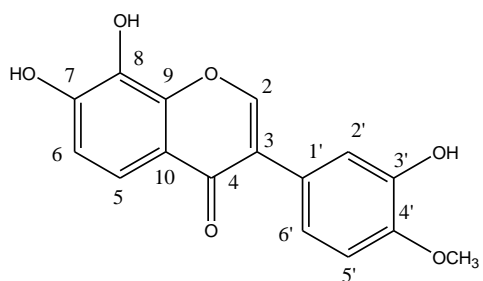
SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material vegetal	27
3.2 Equipamentos e Reagentes.....	27
3.3 Isolamento dos constituintes químicos	28
3.4 Análise por CLAE-DAD.....	29
3.5 Teor de fenólicos totais e avaliação da atividade antioxidante	31
3.5.1 Avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH'	32
3.5.2 Avaliação da atividade sequestradora do cátion radical ABTS ⁺	33
3.5.3 Ensaio da atividade antioxidante frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) da resina de <i>Amburana cearensis</i>	36
4.2 Identificação estrutural das substâncias isoladas da resina de <i>Amburana cearensis</i>	38
4.2.1 <i>Chalconas</i>	38
4.2.1.1 Identificação das chalconas (Re-6, Re-10 e Re-11)	39
4.2.2 <i>Quinonas</i>	46
4.2.2.1 Identificação da quinona Re-8.....	46
4.2.3 <i>Isoflavonas</i>	49
4.2.3.1 Identificação de Isoflavonas (Re-1, Re-2, Re-3, Re-4, Re-5, Re-9 e Re-12).....	50
4.2.4 <i>Isoflavonolignanas</i>	64
4.2.4.1 Identificação da Isoflavonolignana Re-7	65
4.3 Determinação do teor de fenólicos totais.....	68
4.4 Atividade antioxidante.....	69

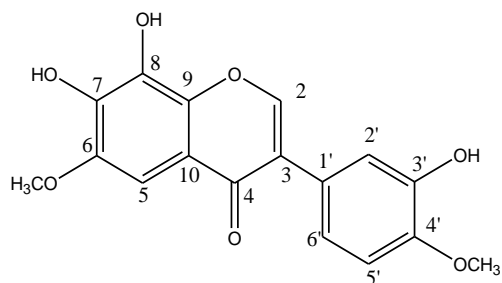
5 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	87

SUSBTÂNCIAS ISOLADAS DA RESINA DE *Amburana cearensis* (FABACEAE)

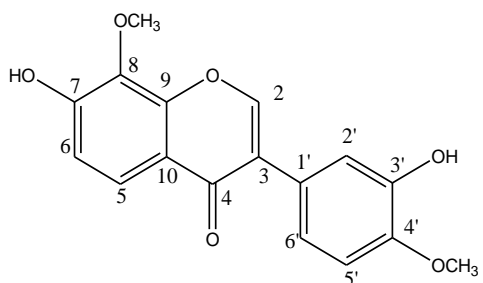
❖ Isoflavonas



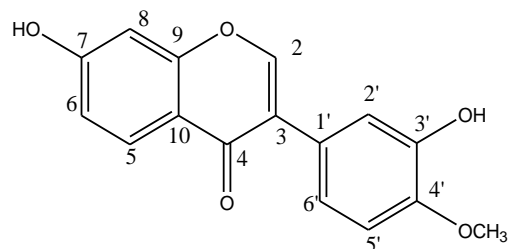
7,8,3'- triidroxi- 4'-metoksiisoflavona (**Re-1**)



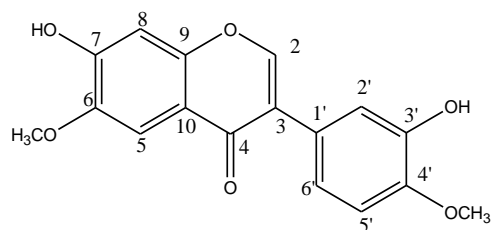
7,8,3'-triidroxi-6,4'-dimetoksiisoflavona (**Re-2**)



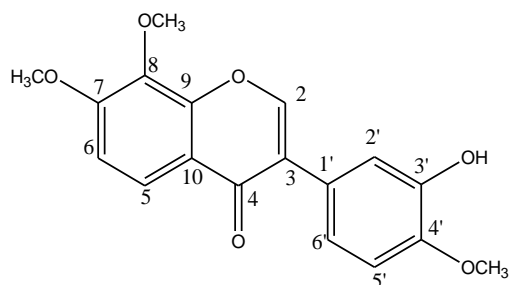
7,3'-diidroxi-8,4'-dimetoksiisoflavona (**Re-3**)



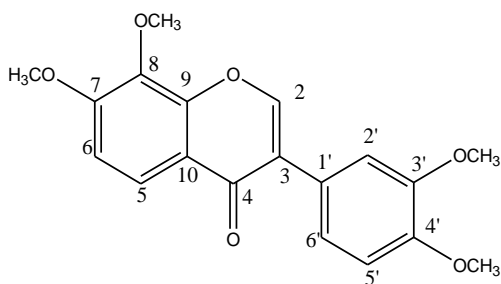
7,3'-diidroxi-4'-metoksiisoflavona (**Re-4**)



7,3'-diidroxi-6,4'-dimetoksiisoflavona (**Re-5**)

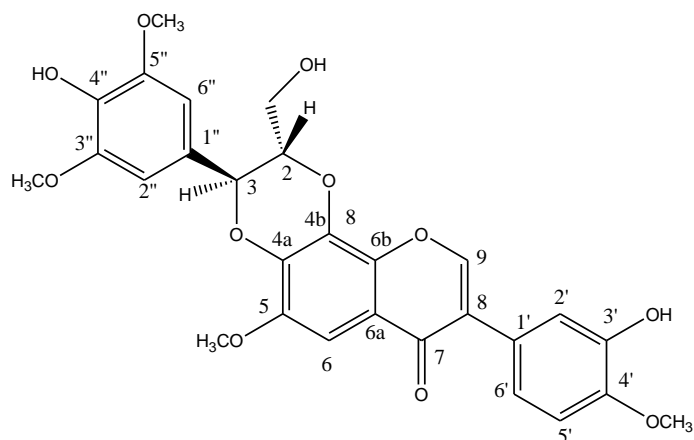


3'-hidroxi-7,8,4'-trimetoksiisoflavona (**Re-9**)



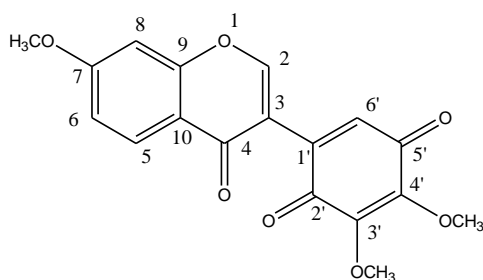
7,8,3',4'-tetrametoksiisoflavona (**Re-12**)

❖ Isoflavonolignana



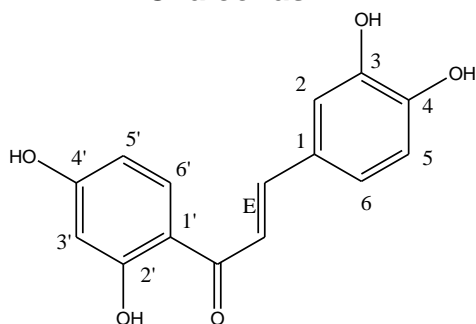
(2S,3S)-2,3-*trans*-3-(4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxifenil)-8-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil)-2-hidroxi-5-metoksi-2,3-di-hidro-7H-1,4-dioxino [2,3-*h*] cromen-7-ona (**Re-7**).

❖ Quinona

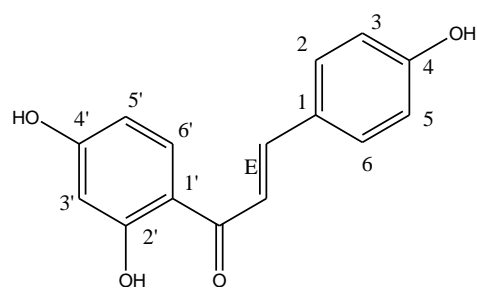


3',4'-dimetoksi-1'-(7-metoksi-4-oxo-4H-cromen-3-il)benzo-2',5'-quinona (**Re-8**)

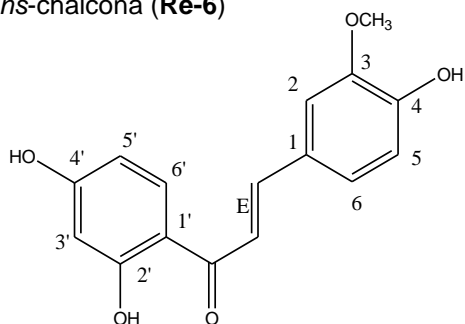
❖ Chalconas



2',3,4,4'-tetraidroxi-*trans*-chalcona (**Re-6**)



2',4,4'-triidroxi-*trans*-chalcona (**Re-10**)



2',4,4'-triidroxi-3-metoksi-*trans*-chalcona (**Re-11**)

1 INTRODUÇÃO

A busca por produtos naturais de espécies vegetais com propriedades medicinais vem se intensificando, uma vez que, as plantas produzem uma vasta gama de substâncias provenientes de rotas biossintéticas que têm fornecido a inspiração para grande parte dos princípios ativos em medicamentos (HARVEY, 2007).

Muitas famílias de espécies vegetais se destacam na área farmacêutica por proporcionarem diversos compostos com atividade biológica. Dentre elas destaca-se a família Fabaceae Lindl. ou Leguminosae Juss., considerada a terceira maior família das angiospermas compreendendo 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies. Fabaceae é a segunda maior família botânica em importância econômica, ficando atrás apenas de Poaceae (WOJCIECHOWSKI et al., 2004).

Estudos apontam que existe um consenso sobre o tratamento da família Fabaceae, com base em dados moleculares e não-moleculares, no qual é dividida nas subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Faboideae). Esta última é a maior com 476 gêneros e aproximadamente 14.000 espécies. Na subfamília Mimosoideae encontram-se 77 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies, enquanto a Caesalpinioideae é formada por 170 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies (LEWIS & SCHRIRE, 2003).

Dentre os gêneros compreendidos pela família Fabaceae destaca-se o gênero *Amburana* que é representado pelas espécies *Amburana cearensis* e *Amburana acreana*. *Amburana cearensis* (Fr. All.) A.C. Smith (Figura 1) é uma espécie típica da Caatinga com ocorrência observada em praticamente toda América do Sul (do Peru à Argentina), sendo popularmente conhecida por diversas designações como cumaru, cerejeira, imburana-de-cheiro, dentre outros. Apresenta-se como uma árvore frondosa, podendo atingir até 15 m de altura, com flores de cor branca, vagem achatada e casca do caule vermelho-pardacenta cujo odor agradável é devido à presença de cumarina. Suas sementes são pretas, aladas e também exalam forte cheiro de cumarina (CANUTO & SILVEIRA, 2006). Esta espécie tem como sinonímia científica *Torresea cearensis* (ALMEIDA et al., 2010).



Fonte: SILVA, T.M.S

Figura 1. Espécie *Amburana cearensis* (Fr. All.) A.C. Smith.

Sob o ponto de vista econômico, *A. cearensis* apresenta inestimável importância comercial, dadas suas várias aplicações, principalmente, na Região Nordeste do Brasil, onde sua madeira é utilizada na carpintaria para a fabricação de móveis, portas, janelas e caixotaria, devido à sua durabilidade reconhecida (CANUTO & SILVEIRA, 2006). Em virtude da riqueza de compostos fenólicos presentes na composição química da espécie é proposto a aplicação do pó da sua madeira em tonéis de aguardente de cana-de-açúcar com a finalidade de acelerar o processo de maturação da bebida (CANUTO et al., 2008).

Amburana cearensis é amplamente utilizada na medicina popular. As cascas do caule são usadas como emenagoga, anti-inflamatória, especialmente no tratamento de inflamações do trato respiratório como gripe, asma e bronquite (MARINHO et al., 2004), sendo tradicionalmente utilizadas na forma de lambedor

caseiro (ALMEIDA et al., 2010). Industrialmente, a forma farmacêutica disponível é o xarope de cumaru (CANUTO & SILVEIRA, 2006; CANUTO et al., 2010).

Estudos químicos de *A. cearensis* revelaram a presença de uma variedade de compostos como terpenos, esteroides, sacarose, flavonoides, cumarinas e outros compostos fenólicos (Figura 2). O estudo das cascas do caule de *A. cearensis* resultou no isolamento e na identificação de dois ácidos fenólicos: 3,4-diidroxi-benzóico (ácido protocatecuico) (1) e ácido vanílico (2), além de cumarina (3), um heterosídeo fenólico (amburosídeo A) (4), uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol glicosilados (5 e 6) e cinco flavonoides: afrormosina (7), quercetina (8), isocampferídeo (9), canferol (10) e 4'-metoxi-fisetina (11), dos quais quatro são flavonóis, sendo o isocampferídeo um derivado do canferol metilado na posição 3, isômero da 4'-metoxifisetina. Do extrato etanólico ainda se obteve sacarose (12) (CANUTO & SILVEIRA, 2006). Além dos compostos citados, ainda foram isolados, recentemente, das cascas do caule de *A. cearensis* os biflavonoides 3,5,7,4'-tetraidroxiflavanona-2',4',6',4-tetraidroxidiidrochalcona (amburanina A) (13) e 3,5,7,4'-tetraidroxiflavanona-3,4',5,7-tetraidroxiflavona (amburanina B) (14) (CANUTO et al., 2014). Das sementes de *A. cearensis* foram isolados a 6-hidroxicumarina (15), o ácido *orto*-cumárico (16) e um derivado esterificado do amburosídeo (17) e o ácido *p*-hidroxi-benzóico (18) (ALMEIDA et al., 2010). Enquanto na madeira além de cumarina, foram identificados 3,4-dimetoxicinamato de metila, ácido vanílico, afrormosina, 2,4-metilenocicloartenol e β -sistoterol (SANTOS & DANTAS, 2008).

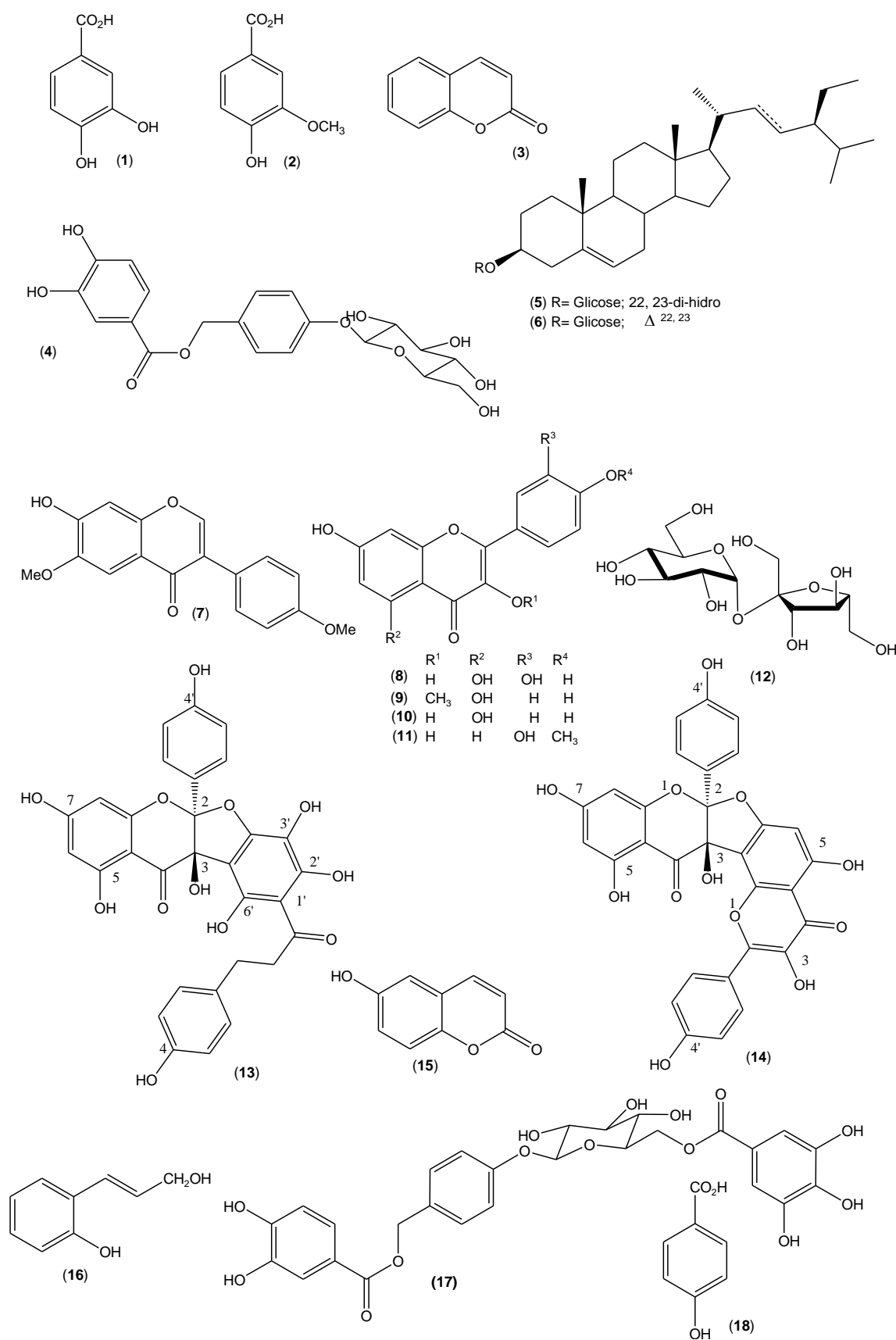


Figura 2. Estruturas dos constituintes químicos isolados de *Amburana cearensis*. Cascas do caule (1-12,17-18), sementes (15-18), madeira (2,3,5,7) (Adaptado de ALMEIDA et al., 2010).

Um estudo realizado com a resina de *A. cearensis* resultou no isolamento da substância inédita 3',4'-dimetóxi-1'-(7-metóxi-4-oxo-4H-cromen-3-il) benzo-2',5'-quinona (**19**), além de compostos conhecidos como 4,2',4'-triidroxichalcona (**20**), 4,2',4'-tri-idroxi-3-metoxichalcona (**21**), 3,4,5-trimetoxicinamaldeído (**22**), 3',4'-dimetoxi-7-hidroxi-isoflavona (**23**), 6,7,4'-trimetoxi-3'-hidroxi-isoflavona (**24**) e 7,8,3',4'-tetrametoxiisoflavona (**25**) (Figura 3) (BANDEIRA et al., 2011).

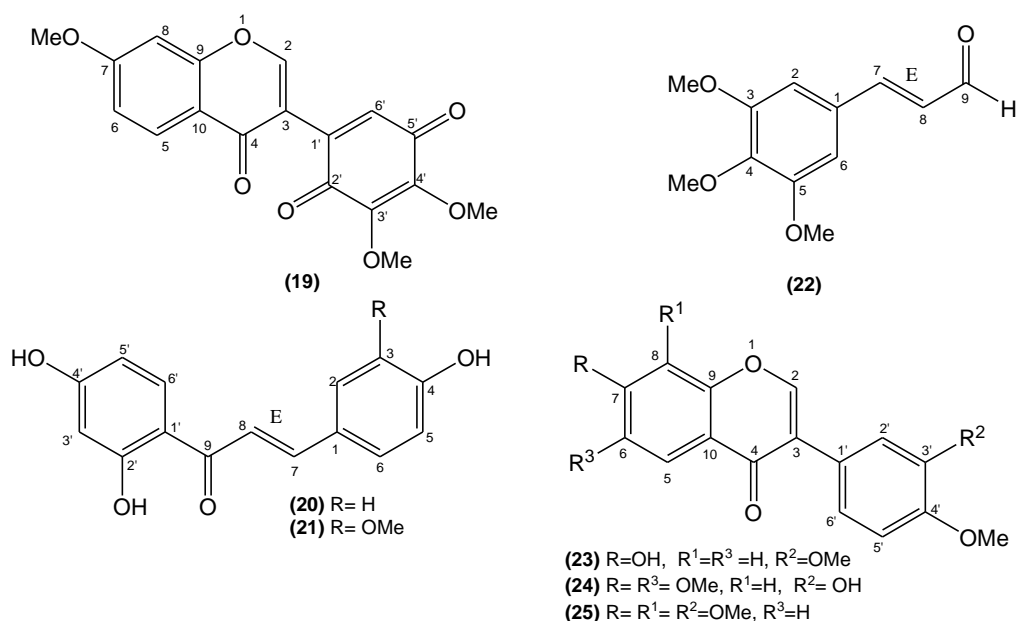


Figura 3. Constituintes químicos isolados da resina de *Amburana cearensis* (Adaptado de BANDEIRA et al., 2011).

Quanto ao potencial biológico, são relatados os efeitos anti-inflamatório, antioxidante, relaxante muscular, antinociceptivo, anticarcinogênico, neuroprotetor, hepatoprotetor, antiagregantes plaquetários, antiproliferativo, antimalárico, antiprotozoário, antifúngico, antibacteriano *in vitro*, atribuídos a extratos e/ou substâncias isoladas desta espécie (COSTA-LOTUFO et al., 2003; LEAL et al., 2003; 2008; 2009; 2011).

As substâncias amburosídeo A e isocampferídeo apresentaram atividade antiinflamatória (LEAL et al., 2009). O último também apresentou ação broncodilatadora pelo seu efeito relaxante muscular em traquéia de cobaias de camundongos (LEAL et al., 2006). Por outro lado o amburosídeo A mostrou ação

neuroprotetora (LEAL et al., 2005) em razão da sua ação antioxidante. A cumarina e o extrato hidroalcoólico das cascas de *A. cearensis* mostraram efeito imunomodulador sobre a produção de imunoglobulina em camundongos (MARINHO et al., 2004). Os flavonoides isocampferídio e canferol apresentaram significativo potencial antineoplásico, devido aos seus efeitos antiproliferativos contra ovos de ouriço-do-mar e linhagens de células tumorais em ensaios *in vitro* (COSTA-LOTUFO et al., 2003).

Os dados apresentados para a atividade biológica de *A. cearensis* e de seus compostos dão suporte ao uso popular como broncodilatador, analgésico, antiinflamatório e antirreumático. Embora a investigação farmacológica sobre *A. cearensis* tenha avançado, faz-se necessário uma melhor compreensão da química dessa espécie, anteriormente limitada a cumarina e alguns compostos fenólicos isolados das cascas do caule, sementes e madeira, a fim de descobrir seus princípios ativos. Embora a literatura registre o estudo das diversas partes desta espécie, há poucos registros de dados fitoquímicos da resina produzida pela mesma.

O estudo químico de compostos naturais está voltado principalmente para as atividades biológicas dentre as quais a atividade antioxidante tem ganhado destaque (ÂNGELO & JORGE, 2007). Visto que os vegetais são apontados como a principal fonte de antioxidantes naturais, estes têm sido objeto de estudos *in vitro* para avaliar seu potencial antioxidante, bem como o teor de fenólicos totais (MOURE et al., 2001; LEE et al., 2004; ALVES et al., 2010). O estudo de compostos fenólicos é justificado pelo fato de sua presença em alimentos e vegetais estar atrelada à atividade antioxidante apresentada pelos mesmos (BECKER et al., 2004).

Os compostos fenólicos são um dos mais importantes grupos de substâncias presentes nos vegetais que contribuem para as propriedades antioxidantes de frutas e vegetais (MOURE et al., 2001; SOUZA et al., 2011). Estes compostos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas ligadas a anéis aromáticos, sendo estes grupos os responsáveis pelo poder antioxidante. Nos vegetais estes podem estar presentes na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas. Dentre esses tipos de compostos, destacam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural (SOARES, 2002; ÂNGELO & JORGE, 2007). Estes atuam como eficientes captadores de

espécies reativas de oxigênio, além de reduzirem e quelarem íons Fe^{3+} que catalisam a peroxidação lipídica (ANDRADE et al., 2007).

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre em virtude da ação dos radicais livres no organismo. Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos que atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo (ALVES et al., 2010). Estas moléculas possuem um elétron desemparelhado que pode se ligar a qualquer outro elétron, e por isso são extremamente reativos (SOARES, 2002). O excesso de radicais livres apresenta efeitos destruidores, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, podendo assim levar o organismo ao estado de estresse oxidativo, provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, se encontram envolvidos no desenvolvimento de diversas patologias (ALVES et al., 2010).

Dentre as doenças desenvolvidas destacam-se doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças auto-imunes, envelhecimento, catarata, artrite reumatóide, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Os compostos antioxidantes, por sua vez, são capazes de retardar ou prevenir a oxidação de outros compostos, desenvolvendo uma importante função para o corpo humano, auxiliando na prevenção dessas doenças (ARUOMA, 1998).

De forma geral, os antioxidantes são *“qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”* (HALLIWELL, 2000). Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA et al., 2007).

As descobertas do efeito danoso dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas. Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de descobrir novos compostos com potencial antioxidante, sendo os extratos e as substâncias, isoladas de plantas, alvos para este tipo de pesquisa (SUN & HO, 2005; RATNAM

et al., 2006; DIMITRIOS, 2006; CHEDEA et al., 2010). Os efeitos defensivos de antioxidantes naturais presentes em frutas e vegetais estão relacionados a três grandes grupos: ácido ascórbico e fenólicos, como antioxidantes hidrofílicos e carotenoides, como antioxidantes lipofílicos (BORGES et al., 2011).

As substâncias com núcleo fenólico, como os flavonoides, são conhecidas por atuarem como antioxidantes. Os flavonoides constituem um grupo de pigmentos vegetais amplamente distribuídos na natureza. A presença desta classe de compostos nos vegetais parece ter relação com função de defesa, como proteção contra raios ultravioleta, ações antifúngica e antibacteriana, além de atração de polinizadores (LAVOLA, 1998). Esses compostos possuem como esqueleto básico dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbonos ($C_6C_3C_6$), resultante de rotas biossintéticas distintas: a via do ácido shiquímico e a via acetato/malonato (SIMÕES et al., 2007).

Mais de 4000 compostos fenólicos fazem parte dessa classe, incluindo diversos subgrupos tais como flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, flavanas, flavanóis, isoflavonas, chalconas, diarilpropanóides e outros. Os subgrupos diferenciam entre si pelas modificações na cadeia de três carbonos localizada entre os dois anéis aromáticos, podendo esta ser acíclica ou heterocíclica, saturada ou insaturada, podendo ou não apresentar grupos funcionais, como por exemplo, $-OH$ ou $=O$. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas de núcleos A, B e C (Figura 4). Se tratando das diferenças individuais dentro de cada subgrupo, isso ocorre devido uma variação no número e posição dos grupos hidroxila, pelo grau de metilação, glicosilação e prenilação (HARBONE et al, 1975).

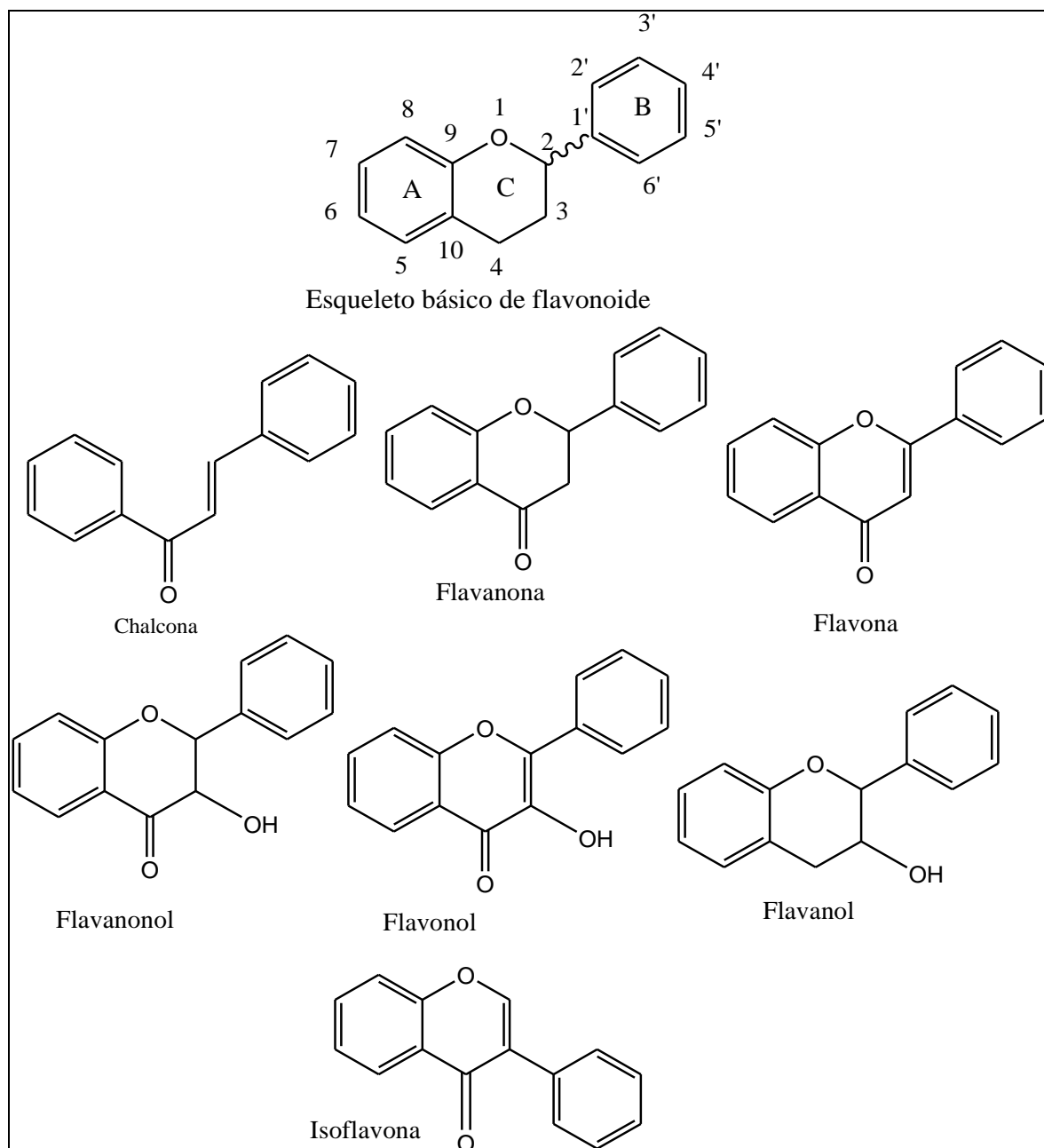


Figura 4. Esqueleto básico de flavonoide e suas subclasses

Devido à grande variedade de compostos fenólicos e as possibilidades de variação no número e posição de grupos substituintes, pode se esperar uma gama de compostos a serem descobertos, além dos milhares já conhecidos, à medida que se realiza o estudo químico de diferentes espécies de vegetais.

A ampla ocorrência de *Amburana cearensis* no bioma Caatinga, aliada as atividades biológicas relatadas na literatura, impulsiona a investigação da composição química de sua resina. Este trabalho visa contribuir com o estudo químico dessa espécie através do isolamento e identificação dos constituintes da resina por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, bem como avaliar o potencial antioxidante desta resina.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar o estudo químico da resina de *Amburana cearensis* usando técnicas cromatográficas e espectroscópicas e avaliar o seu potencial antioxidante.

2.2 Específicos

- Isolar os constituintes químicos da resina de *Amburana cearensis* através de técnicas cromatográficas;
- Identificar as substâncias através de técnicas espectroscópicas (espectros de Massas, IV, RMN de ^1H e ^{13}C e bidimensionais);
- Determinar o teor de fenólicos totais do extrato metanólico da resina de *A. cearensis* e avaliar a atividade antioxidante através dos testes DPPH, ABTS, e sistema ácido linoleico/ β -caroteno da resina de *A. cearensis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

A resina (Figura 5) de *Amburana cearensis* foi coletada no sítio Riacho, município de Vieirópolis, Paraíba, em fevereiro de 2013.



Figura 5. Resina de *Amburana cearensis*

3.2 Equipamentos e Reagentes

A análise cromatográfica em coluna foi realizada tendo como suporte Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Suécia). Para Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram usadas cromatofolhas de sílica gel 6GF₂₅₄ (Merck) e como revelador foi utilizado o reagente NP (ácido difenilbórico etanolamina-MeOH), além da detecção por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm). Para a solubilização da amostra foi utilizado banho ultrassônico 3,5 L modelo Unic 1600A (Unique). O Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE-DAD) utilizado consiste de duas bombas de solvente modelo LC-6AD, equipado com um detector de arranjo de diodos SPD-M20A (Shimadzu prominence, Corp., Kyoto, Japan). As amostras foram injetadas em um auto-injetor SIL-20AC HT (shimadzu). Para determinar o perfil cromatográfico foi usado coluna de fase reversa (Luna C-18 250 mm x 4.6 mm x 5 µm, Phenomenex) e pré-coluna Security Guard Holder (Phenomenex) e para a separação dos constituintes foi usado coluna semipreparativa Luna 5u C-18 100A (250 x 21,20 mm x 5µm, Phenomedex), pré-coluna C-18 Luna 21 mm, solvente

MeOH grau HPLC (Tedia), ácido acético (Vetec) e água Milli-Q. Foram usados filtros 0,45 µm de diâmetro (Supelco) para filtração das amostras e dos solventes.

Os pontos de fusão das substâncias foram determinados no equipamento BIO SAM-PFM II. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (incluindo experimentos bidimensionais) foram obtidos em espectrômetros Bruker DPX-300 (300 e 75 MHz, para ^1H e ^{13}C , respectivamente). Como referência interna foi usado tetrametilsilano ou resíduo de solvente DMSO e acetona deuterados.

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em KBr (6000-400 cm^{-1}), empregando-se um espectrômetro Varian 640-IR com transformada de Fourier.

A leitura de absorbância das soluções para as atividades antirradicalares foi realizada no aparelho espectrofotômetro UV-visível (OASYS-UVM 340) e a leitura para atividade antioxidante frente ao sistema ácido linoléico/ β -caroteno foi realizada no aparelho espectrofotômetro UV-visível – LAMBDA 45 (Perkin Elmer). Os solventes utilizados foram da marca Cinética e Tedia. Para a realização dos testes antioxidantes e teor de fenólicos totais foram utilizados os reagentes Sigma-Aldrich: DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), persulfato de potássio, *trans*- β -caroteno, Trolox (6-hidroxi- 2, 5, 7, 8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico 97%), Folin-Ciocalteu e persulfato de potássio e Merck: ABTS [2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)], ácido linoleico; ácido ascórbico e Tween 20.

3.3 Isolamento dos constituintes químicos

A resina (29,3 g) foi macerada em almofariz, solubilizada em MeOH (metanol) e ultrassom por 30 minutos. Em seguida foi filtrada e concentrada em rotavapor a 50 °C sob pressão reduzida. O extrato metanólico da resina foi analisado por CCDA e mostrou a presença de flavonoides quando revelada com o reagente NP. Com o intuito de concentrar os fenólicos em uma fração, parte do extrato obtido, 5,78 g, foi redissolvido em 60 mL de MeOH:H₂O (1:1) e foi particionado em Hexano e AcOEt (acetato de etila), originando 0,39 g, 19,80 mg e 5,32 g das frações MeOH:H₂O, Hexano e AcOEt, respectivamente. 5,0 g da fração AcOEt (fração rica em fenólicos) foi submetida a Cromatografia em coluna com Sephadex LH-20 utilizando MeOH como eluente, este fracionamento forneceu 72 frações que foram reunidas após

análise em CCDA (eluente CH₂Cl₂:MeOH 95:5) e luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. As frações 1-21 e 61-69 foram reunidas e renderam um precipitado branco nomeado **Re-7** (12,0 mg) e um composto de cor amarela nomeado **Re-6** (18,9 mg), respectivamente. As frações 30-36 foram reunidas após análise em CCDA e submetidas à análise por CLAE-DAD.

Tendo em vista que a fração rica em fenólicos (AcOEt) corresponde a mais de 92% em massa da resina, optou-se por realizar a cromatografia em coluna com Sephadex LH-20 diretamente com o extrato metanólico (12,0 g), visando obter maior quantidade das substâncias já isoladas. Foi utilizado como eluente MeOH, obtendo-se 41 frações que foram reunidas após análise em CCDA (eluente CH₂Cl₂:MeOH 95:5) e luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Novamente foram isolados os compostos **Re-7** (32,00 mg das frações 7-13) e **Re-6** (20,5 mg das frações 32-34). As frações de 7-13, além de fornecerem o composto **Re-7**, forneceram também uma mistura de precipitados que foi submetida à análise por CLAE-DAD. As frações 14-18 e 26-30 também foram reunidas e analisadas por CLAE-DAD para isolamento das substâncias.

3.4 Análise por CLAE-DAD

O extrato MeOH da resina de *A. cearensis* foi analisada por CLAE-DAD utilizando coluna analítica. Para isso foi preparada uma solução a 0,66 mg/mL (MeOH:água acidificada 0,1% ácido acético 80:20) e injetada com o seguinte sistema de eluição: 1-30 min, 45-50% B; e 30-35 min, 50-100% B. Como fase móvel foi utilizado água acidificada 0,1% ácido acético (solvente A) e metanol (solvente B) com fluxo 1,0 mL/min, temperatura 40 °C e volume de injeção 5 µL. Para o monitoramento foram utilizados os comprimentos de onda de 254 e 320 nm.

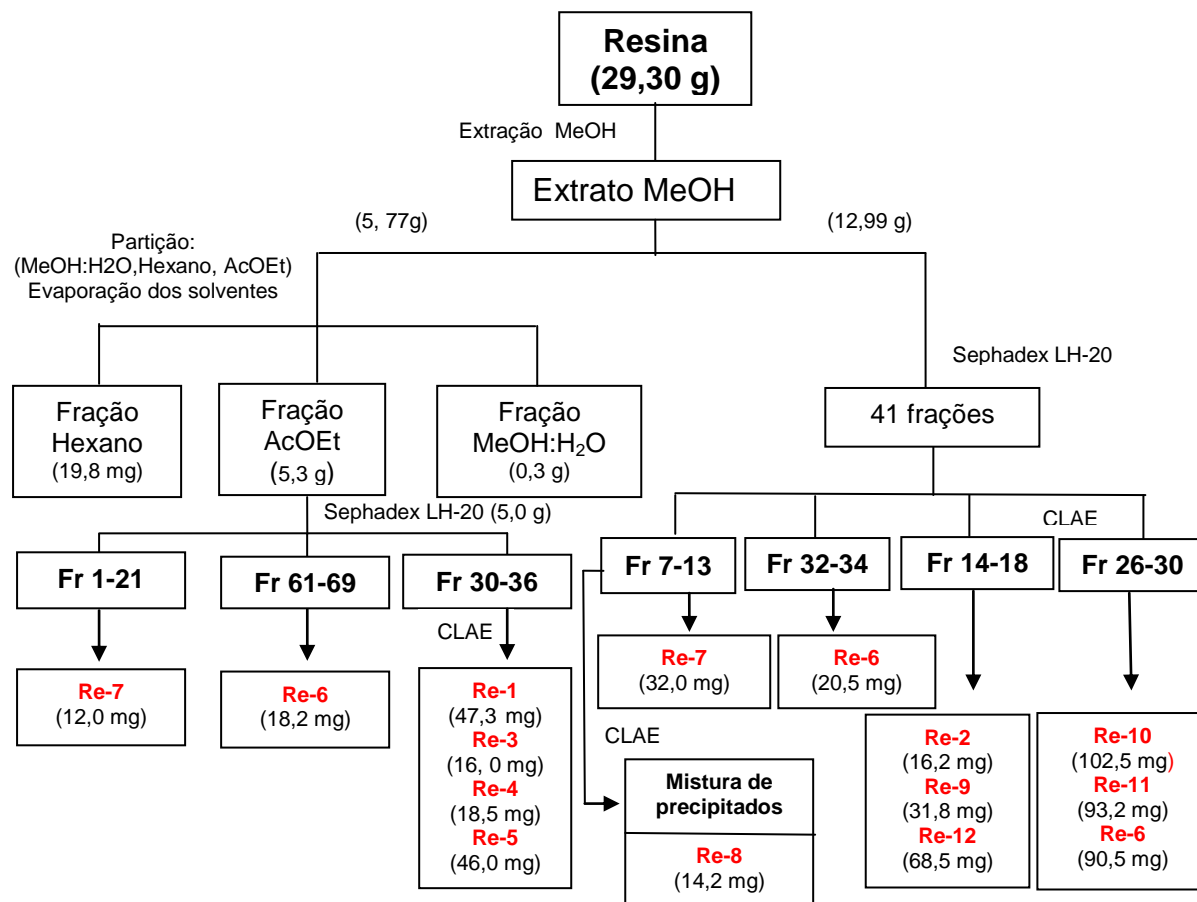
A fração 30-36 (obtida da coluna com Sephadex a partir da fração AcOEt) foi analisada por CLAE-DAD com coluna analítica utilizando o seguinte sistema de eluição: 1-20 min 35-40% de B, de 20-30 min 40-45% de B, de 30-40 min 45-100% de B. Como fase móvel foram utilizados água 1% ácido acético (solvente A) e metanol (solvente B) com fluxo de 1,0 mL/min. O cromatograma foi monitorado no comprimento de onda de 320 nm. Para o isolamento dos compostos dessa fração foi injetada uma solução na concentração de 300 mg/mL em uma coluna semi-

preparativa utilizando o mesmo sistema de eluição da injeção analítica, mudando o solvente A por água sem ácido, com fluxo de 16,0 mL/min. A análise resultou no isolamento de quatro compostos nomeados **Re-1** (47,3 mg), **Re-3** (16,0 mg), **Re-4** (18,5 mg) e **Re-5** (46,0 mg).

A mistura de precipitados (fornecida pela fração 7-13 da coluna com Sephadex LH-20 do extrato MeOH) 70,5 mg foi dissolvida em CHCl₃:MeOH (1:1) e injetada em CLAE-DAD com coluna analítica utilizando o seguinte sistema de eluição: 1-15 min 60-100% de B, como fase móvel foram utilizados água 1% ácido acético (solvente A) e MeOH (solvente B) com fluxo de 1,0 mL/min. O cromatograma foi monitorado no comprimento de onda de 320 nm. Para o isolamento dos compostos dessa fração foi utilizada uma coluna semi-preparativa com o mesmo sistema de eluição da injeção analítica, mudando o solvente A por água sem ácido, com fluxo de 16,0 mL/min. A análise resultou no isolamento do composto **Re-8** (14,2 mg).

A fração 14-18 (1,66 g), obtida da coluna com Sephadex LH-20 do extrato MeOH, foi injetada em coluna analítica com o seguinte sistema de eluição: 1-20 min 40-50% de B, 20-30 min 50-100% de B, como fase móvel foram utilizados água 1% ácido acético (solvente A) e ACN:MeOH 1:1 (solvente B) com fluxo de 1 mL/min. O cromatograma foi monitorado no comprimento de onda de 320 nm. Para o isolamento foi utilizado o mesmo sistema de eluição, mudando o solvente A por água sem ácido, com fluxo de 16 mL/min. A análise resultou no isolamento dos compostos **Re-2** (16,2 mg), **Re-9** (31,8 mg) e **Re-12** (68,5 mg).

A fração 26-30 (0,98 g), obtida da coluna com Sephadex LH-20 do extrato metanólico, também foi cromatografada em CLAE-DAD com as mesmas condições cromatográficas descritas para a fração 14-18, resultando no isolamento dos compostos **Re-6** (90,5 mg), **Re-10** (102,5 mg) e **Re-11** (93,2 mg). No esquema a seguir (Esquema 1) está descrito o isolamento das substâncias do extrato MeOH da resina *A. cearensis*.



Esquema 1. Esquema para isolamento das substâncias do extrato MeOH da resina de *Amburana cearensis*.

3.5 Teor de fenólicos totais e avaliação da atividade antioxidante

O teor de fenólicos totais do extrato MeOH da resina de *Amburana cearensis* foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SLINKARD & SINGLETON, 1977; GULCIN *et al.*, 2004) com modificações, empregando-se o ácido gálico como composto fenólico padrão. Inicialmente o extrato foi solubilizado em EtOH (1,0 mg/mL). Uma alíquota de 50 µL da solução do extrato foi transferida para um Eppendorf, adicionando-se 20 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 870 µL de água destilada, agitando-se por 1 min. Em seguida, 60 µL de Na₂CO₃ (15%) foram acrescentados a mistura e agitados por 30 segundos, resultando na concentração final de 50 µg/mL. Após duas horas, a absorbância de cada amostra foi medida em espectrofotômetro de Elisa UV-Vis em 760 nm, empregando-se placas de 96 poços. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de fenólicos totais (FT) foi

determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções do padrão do ácido gálico em várias concentrações (1 a 12,5 µg/mL) e expressos como miligrama equivalente ao ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g), considerando-se o erro padrão da média (E. P. M.). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi: $y = 0,076x - 0,063$, com o coeficiente de correlação de $r^2 = 0,998$, onde x é a concentração do ácido gálico e Y é a absorbância a 760 nm.

3.5.1 Avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH

O ensaio para atividade sequestradora do radical livre DPPH[·] se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Este método colorimétrico apresenta bons resultados para a avaliação da capacidade antiradicalar de compostos fenólicos, bem como para alguns extratos vegetais (ALVES et al., 2010).

A atividade foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Silva et al., (2006). A solução estoque da resina foi preparada nas concentrações 0,5 e 1,0 mg/mL.

Através de análise preliminar quantidades apropriadas das soluções estoque da resina e da solução de DPPH[·] (23,6 µg/mL em EtOH) foram transferidas para Eppendorfs de 0,5 mL e o volume foi completado para 500 µL com EtOH. As quantidades utilizadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações utilizadas para avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH[·]

Concentração da solução estoque	Concentração final da amostra (µg/mL)	Volume da amostra (µL)	Volume de Etanol (µL)	Volume da solução de DPPH (µL)
0,5 mg/mL	10,0	10	40	450
	20,0	20	30	450
	30,0	30	20	450
1,0 mg/mL	40,0	20	30	450
	50,0	25	25	450

Cada concentração foi analisada em triplicata. Após 30 minutos de agitação em aparelho de ultrassom a quantidade de radicais DPPH[·] foi registrada em aparelho

UV-Visível no comprimento de onda de 517 nm, utilizando-se placas de 96 poços. Foi utilizado como controle positivo o ácido ascórbico.

A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AS} = 100 \times (Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}$$

Onde A_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas a solução etanólica do radical DPPH \cdot , e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença da resina ou do padrão ácido ascórbico. A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora dos radicais DPPH mais ou menos o erro padrão médio ($CE_{50} \pm \text{E.P.M.}$).

3.5.2 Avaliação da atividade sequestradora do cátion radical ABTS $^{\cdot+}$

O teste para a atividade sequestradora do cátion ABTS $^{\cdot+}$ é muito útil devido, principalmente, a sua abrangência, podendo determinar antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, além da sua relativa simplicidade operacional. Trata-se da avaliação da habilidade dos antioxidantes em neutralizar o radical ABTS (PRIOR et al., 2005).

Essa análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Re et al., (1999). A solução do cátion radical ABTS $^{\cdot+}$ foi preparada pela mistura de uma solução de ABTS (7,0 mM) com uma solução de persulfato de potássio (140,0 mM), ambas em água destilada. A solução foi mantida sob abrigo da luz à temperatura ambiente durante um período de 14 horas antes do uso. Em seguida a solução do radical ABTS $^{\cdot+}$ foi diluída com etanol (1:100 v/v, aproximadamente) até uma absorbância (A) de $0,7 \pm 0,05$ no comprimento de onda de 734 nm, em UV-Visível, a uma temperatura de equilíbrio de 30 °C. As soluções estoque da resina foram preparadas em EtOH nas concentrações e 0,5 e 1,0 mg/mL. Através de triagem preliminar quantidades apropriadas das soluções da resina e da solução de ABTS $^{\cdot+}$ foram transferidas para Eppendorfs de 0,5 mL e o volume foi completado para 500 μL com EtOH. As quantidades utilizadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações utilizadas para avaliação da atividade sequestradora do radical ABTS^{•+}.

Concentração Solução estoque	Concentração final da amostra (µg/mL)	Volume da amostra (µL)	Volume de Etanol (µL)	Volume da solução de ABTS ^{•+}
0,1 mg/mL	1,0	5	45	450
	2,5	12,5	37,5	450
	5,0	5	45	450
0,5 mg/mL	10,0	10	40	450
	15,0	15	35	450
	20,0	20	30	450

As concentrações finais da resina variaram de 1,0 a 20,0 µg/mL. O Trolox, um análogo da vitamina E, solúvel em água, foi utilizado como composto padrão. Cada concentração foi testada em triplicata. As soluções foram agitadas e, após 6 minutos de reação, a absorbância das amostras e do padrão foram medidas em um espectrofotômetro de UV-Visível em comprimento de onda de 734 nm. A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AS} = 100 \times (Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}$$

Onde Abs_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas a solução alcoólica do radical ABTS^{•+}, e Abs_{amostra} é a absorbância do radical na presença resina ou do padrão. A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da $CE_{50} \pm \text{E.P.M.}$

3.5.3 Ensaio da atividade antioxidante frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico

O teste para atividade antioxidante utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico trata-se de um ensaio espectrofotométrico colorimétrico baseado na oxidação (descoloração) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico, ou seja, o método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (RUFINO et al., 2006).

Esse teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por EMMONS et al., (1999) com modificações. A solução do sistema β -caroteno/ácido linoléico foi preparada adicionando-se uma alíquota de 50 μ L da solução de β -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) em um Erlenmeyer de 250 mL a 80 μ L de ácido linoléico e 660 μ L de Tween 20 (monopalmitato de polioxietileno sorbitan). Ao Erlenmeyer foram adicionados 140 mL de água destilada (previamente submetida a tratamento em atmosfera de oxigênio durante 30 minutos). A absorbância da emulsão foi ajustada entre $0,7 \pm 0,05$ no comprimento de onda 470 nm. Uma alíquota de 150 μ L da solução (1,0 mg/mL) da resina foi transferida para tubos de ensaio onde foram adicionados 150 μ L de água destilada e 2700 μ L do sistema, obtendo-se uma concentração de 50 μ g/mL. As amostras foram comparadas ao sistema (sem amostra) e ao Trolox (16 μ g/mL) utilizado como antioxidante padrão. Uma leitura inicial da absorbância foi feita imediatamente após a adição das amostras e do padrão ao sistema visando à determinação do tempo zero. Posteriormente, a absorbância foi monitorada a cada 20 minutos, durante o período de 120 minutos. As amostras foram mantidas em banho-maria a 40 °C durante as leituras. A capacidade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição da oxidação. O decréscimo da leitura da absorbância das amostras foi comparado com o sistema e estabelece a porcentagem de oxidação:

$$\text{Redução da absorbância} = \text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}$$

$$\% \text{ Oxidação} = [(\text{Redução da Abs})_{\text{amostra}} \times 100] / (\text{Redução Abs})_{\text{sistema}}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) da resina de *Amburana cearensis*

A análise do cromatograma obtido por CLAE-DAD e os espectros de ultravioleta (Figuras 6 e 7) mostra que o extrato MeOH da resina de *Amburana cearensis* é rico em substâncias fenólicas, uma vez que foi possível visualizar bandas de absorção na região de UV entre 305-390 nm e 220-300 nm, características de compostos fenólicos (LIN et al., 2012).

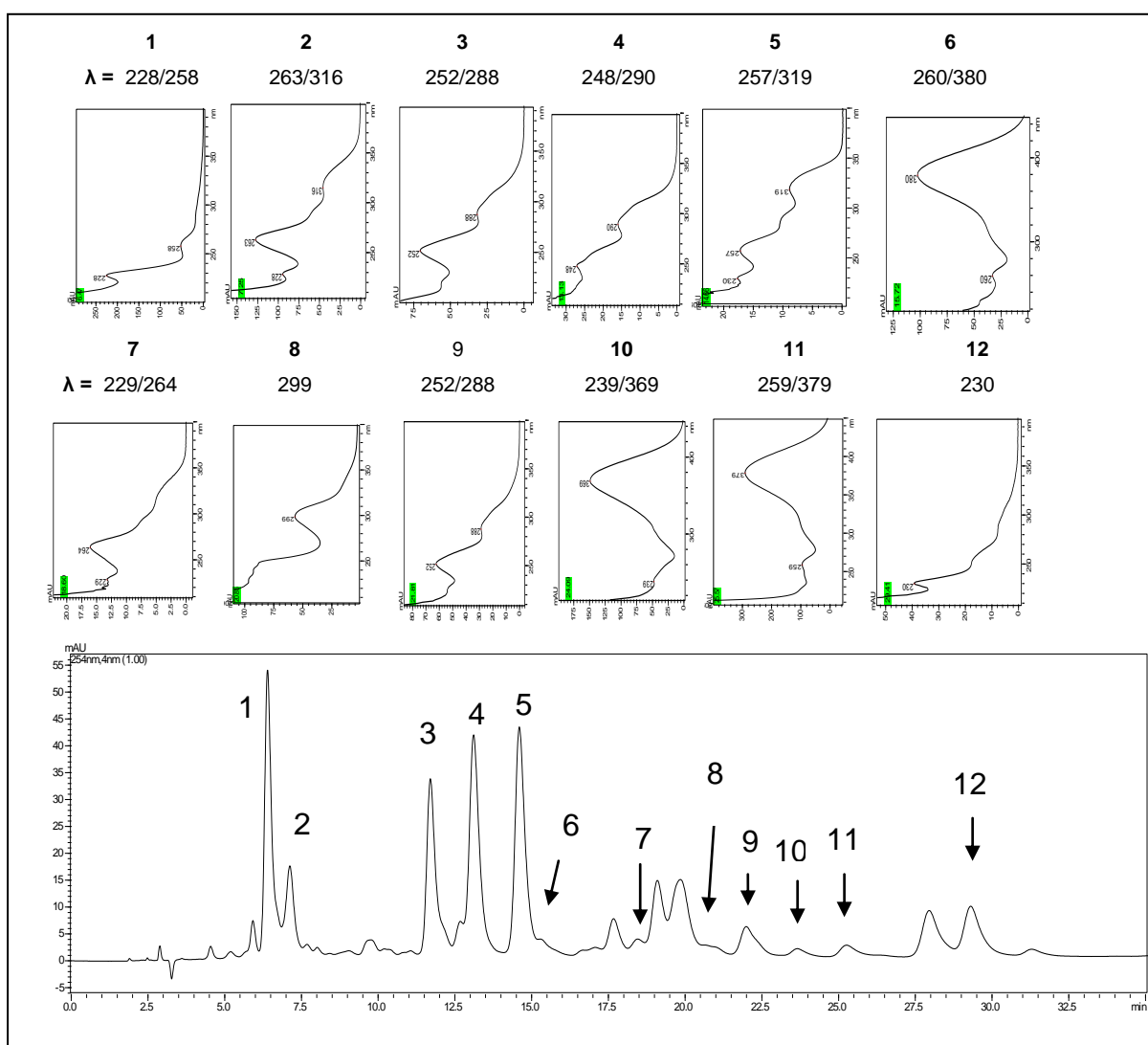


Figura 6. Cromatogramas (CLAE-DAD, 254 nm) e espectros UV (λ em nm) dos picos correspondentes do extrato MeOH da resina de *A. cearensis*.

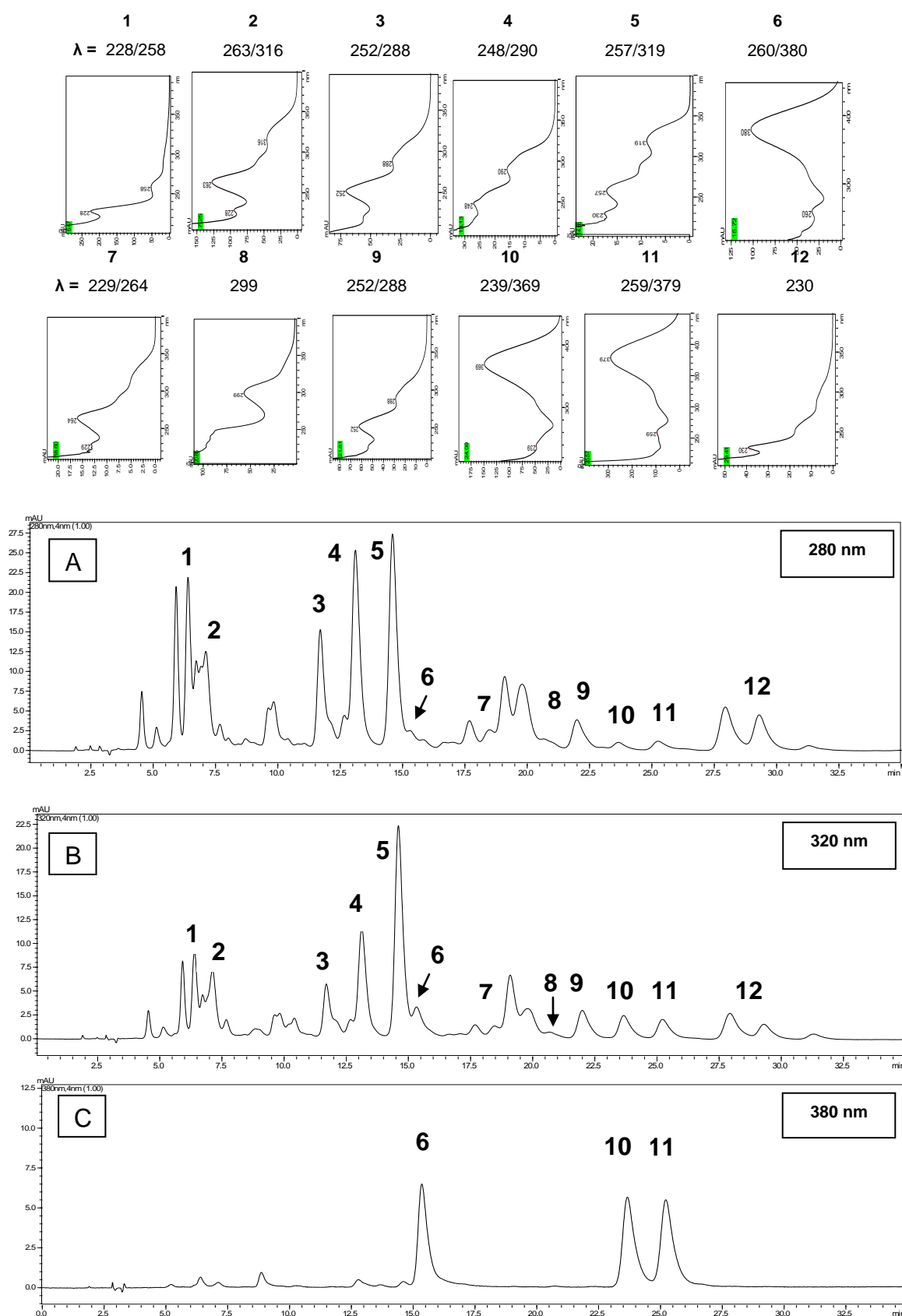


Figura 7. Cromatogramas (CLAE-DAD, 280 (A), 320 (B), 380 (C) nm) e espectros UV (λ em nm) dos picos correspondentes do extrato MeOH da resina de *A. cearensis*.

Todas as substâncias indicadas no cromatograma do extrato MeOH da resina foram isoladas e analisadas por CLAE-DAD nas mesmas condições cromatográficas do extrato (item 3.4, p.31). Os cromatogramas das substâncias e seus respectivos espectros de ultravioleta encontram-se no ANEXO A (cromatogramas 1-12).

4.2 Identificação estrutural das substâncias isoladas da resina de *Amburana cearensis*

A identificação estrutural das substâncias isoladas da resina de *Amburana cearensis* foi realizada com base nos dados obtidos por técnicas espectroscópicas de UV, IV, RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas bidimensionais (COSY ^1H - ^1H , HSQC e HMBC) e massas, como também por comparação com dados da literatura. Os espectros das substâncias isoladas neste trabalho encontram-se no ANEXO B. Foram isolados e identificados doze flavonóides, compreendendo um com núcleo quinona, três chalconas, sete isoflavonas e uma isoflavanolignana. A discussão relativa à elucidação estrutural de tais substâncias foi conduzida por subclasse independente da ordem de obtenção das mesmas.

4.2.1 Chalconas

Quimicamente, a chalcona tem sua estrutura fundamental descrita como uma cetona aromática α - β insaturada (1,3-difenil-2-propen-1-ona) formada por dois anéis aromáticos A e B conectados por uma cadeia aberta de três átomos de carbono com um grupamento carbonílico conjugado com uma porção olefínica, como é apresentado na Figura 8. A conjugação entre o anel B e o sistema carbonílico insaturado confere a chalcona sua coloração característica amarelada (NOWAKOVSKA, 2007).

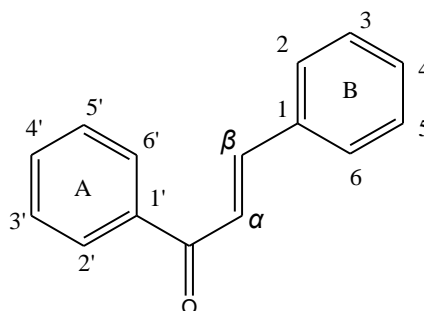


Figura 8. Esqueleto base de chalconas

As chalconas são encontradas naturalmente em vegetais como precursores dos flavonoides, e sinteticamente são obtidas pela reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, preferencialmente em meios fortemente alcalinos. As chalconas apresentam espectros no UV característico, com uma banda de absorção intensa entre 340-390 nm (Banda I) e uma banda de menor intensidade entre 220-270 nm (Banda II) (MARKHAM, 1982). Muitas atividades biológicas interessantes destes compostos têm sido relatadas, dentre as quais estão às atividades: antitumoral (CABRERA et al., 2007; SILVA et al., 2007; ORLIKOVA et al., 2012), anti-inflamatória (NOWAKOVSKA, 2007), antibacteriana (NIELSEN et al., 2004), antioxidante (WANG et al., 2009) e antifúngica (LAHTCHEV et al., 2008).

4.2.1.1 Identificação das chalconas (Re-6, Re-10 e Re-11)

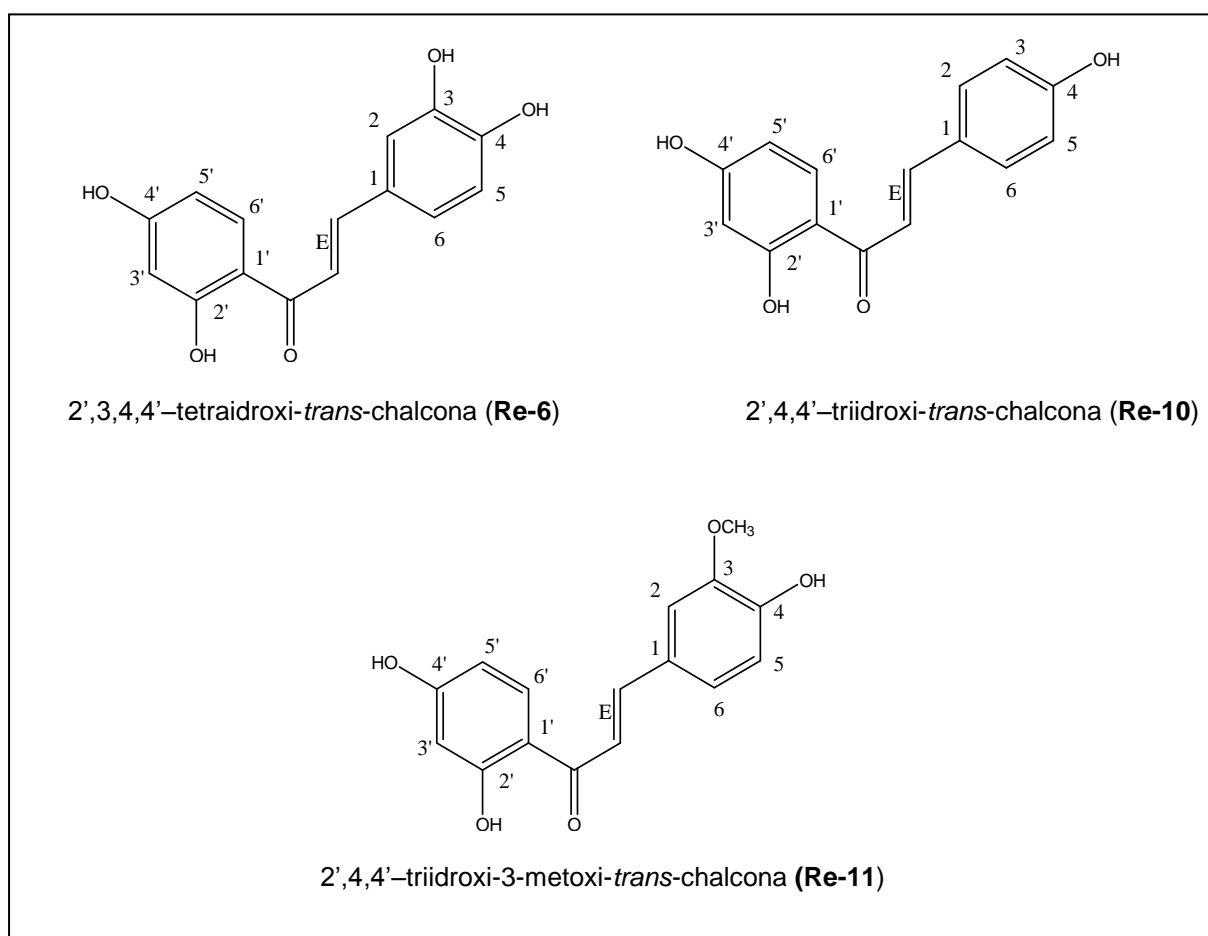


Figura 9. Estruturas das chalconas isoladas da resina de *A. cearensis*

A substância **Re-6** foi obtida como um sólido amarelo. A revelação com reagente NP em CCDA indicou sua natureza flavonoídica, mostrando coloração violácea. O cromatograma CLAE-DAD mostrou um tempo de retenção de 15,72 minutos. Baseado no espectro de ultravioleta (UV) da substância foi sugerido que se trata de um composto fenólico, uma vez que apresentou banda de absorção em 380 nm.

A análise do espectro de infravermelho (Espectro 1) apresentou bandas de absorção em torno de 3450 cm^{-1} característica de grupos hidroxila (OH) e em torno de 1640 cm^{-1} referente a estiramento C-O de carbonila α , β -insaturada. As bandas no espectro de IV e a absorção de UV em 380 nm foram indicativos de um esqueleto de chalcona com substituintes hidroxilas.

Os espectros de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ (Espectro 2) e em acetona- d_6 (Espectro 3) e o espectro de APT (Espectro 4) sugeriram que esta substância era de natureza aromática em virtude dos sinais na região de δ_{H} 6,36 a 8,14, no espectro de RMN de ^1H , e δ_{C} 103,05 a δ_{C} 165,63, no espectro APT.

O espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$ revelou a presença de um duplo duplete em δ_{H} 6,39 e dois dupletos em δ_{H} 6,27 e δ_{H} 8,15, que permitiram definir juntamente com os valores da constante de acoplamento entre os hidrogênios (J) o padrão de substituição do anel aromático. Desta forma, foi observada a interação *spin-spin* de hidrogênios mantendo entre si relação *meta* ($J= 2,1$) e *orto* ($J= 8,7\text{Hz}$). Foi observada ainda um duplo duplete em δ_{H} 7,21 e mais dois dupletos em δ_{H} 7,28 e δ_{H} 6,82, cujos valores das constantes de acoplamento permitiram identificar um segundo anel aromático com o mesmo padrão de substituição (*meta*: $J=1,5\text{ Hz}$; *orto*: $J=8,1\text{ Hz}$). Foi observado ainda um sinal característico de hidroxila OH-2' de caráter quelatogênico em δ_{H} 13.59 ppm.

Os espectros de RMN $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY (Espectro 5) confirmou os acoplamentos dos hidrogênios. Além desses sinais foi observado também no espectro de RMN de ^1H um simpleto em δ_{H} 7,66 com integral para dois hidrogênios. Esses hidrogênios geraram dois dupletos no espectro obtido em acetona- d_6 com deslocamentos químicos em δ_{H} 7,67 e δ_{H} 7,78 e constantes de acoplamento de 15,5 Hz, indicando acoplamento *trans* vicinal, sendo possível, assim, atribuir a presença de um sistema carbonílico α , β -insaturado.

O espectro de APT mostrou sinais para 15 carbonos, sendo 8 carbonos metínicos e 7 quaternários. Com base nas informações presentes no espectro de APT e nas correlações diretas ($^1J_{CH}$) estabelecidas no espectro de HSQC (Espectro 6) foi possível atribuir os sinais em δ_C 117,7 e δ_C 145,1 ppm aos carbonos α e β a carbonila, respectivamente. O sinal em δ_C 191,7 foi atribuído ao carbono da carbonila. As correlações estabelecidas no espectro HMBC (Espectro 8) permitiram fazer a atribuição completa dos valores de deslocamento químico desta substância.

O espectro de massas (ESI modo positivo) da substância (Espectro 9) mostrou pico em m/z 273 $[M+H]^+$, para a fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_5$. Os dados de RMN 1D e 2D estão apresentados na Tabela 3.

Com base nos dados obtidos e na comparação com os dados da literatura foi possível identificar a substância **Re-6** como 3,4,2',4'-tetraidroxi-*trans*-chalcona conhecida como buteína (Figura 9). Essa chalcona já foi isolada das espécies vegetais *Hydnophytum formicarum* Jack. (PRACHAYASITTIKUL et al., 2008), *Viburnum propinquum* Hemsl. (WANG et al., 2009), bem como sintetizada (LIN et al., 1997). No entanto, esse é o primeiro relato desta substância na resina de *Amburana cearensis*.

A substância **Re-11**, isolada da fração 26-30, foi obtida como um sólido de cor amarelo. A revelação com reagente NP em CCDA indicou sua natureza flavonoídica, mostrando coloração amarela. O cromatograma CLAE-DAD mostrou um tempo de retenção de 25,57 minutos. O espectro de UV da substância com banda de absorção máxima em $\lambda_{m\acute{a}x} = 379$ nm sugeriu tratar-se também de uma chalcona.

O espectro de infravermelho da substância (Espectro 9) mostrou bandas de absorção semelhantes as do espectro de infravermelho de **Re-6**, desta forma foi possível observar bandas de absorção em torno de 3400 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação OH e em 1630 cm^{-1} característica de estiramento C-O de carbonila α, β -insaturada.

A análise dos espectros de RMN 1H e ^{13}C em acetona- d_6 (90 MHz) (Espectro 10) da chalcona **Re-11**, com base nos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento, permitiu atribuir a presença de dois sistemas de spins ABX, da mesma forma que foi descrito para a chalcona **Re-6**. A existência de um simpleto em δ_H 3,96 no espectro de RMN de 1H e δ_C 56,69 no espectro de carbono ^{13}C (Espectro 11) indicou a presença de um grupo metoxila (OCH₃) na molécula, diferenciando da

substância **Re-6** que não apresentou sinal de metoxila. O efeito de desproteção em C-3 de **Re-11**, δ_c 150,03 ($\Delta \delta_c = 3,93$) em relação ao valor de deslocamento químico de C-3 em **Re-6** (δ_c 146,13) sugeriram que a metoxila encontrava-se na posição C-3. Assim como no espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 da substância **Re-6**, o espectro de RMN ^1H de **Re-11** também apresentou um simpleto semelhante em δ_H 7,83 com integral para dois hidrogênios, referente aos hidrogênios do sistema olefínico, o que contribuiu para a confirmação do esqueleto de chalcona. Além disso, a existência de um simpleto em δ_H 13,67 confirmou a presença de uma hidroxila quelatogênica (OH-2'). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 4. As informações espectrais obtidas, em conjunto com os dados da literatura possibilitou a identificação de **Re-11** como sendo a chalcona 2',4,4'-triidroxi-3-metoxi-*trans*-chalcona (homobuteína) (Figura 9), a qual foi isolada pela primeira vez de *Acaciaeoneo vernicosa* (CLARK-LEWIS & PORTER, 1972) e posteriormente de outras espécies, como *Dioclea violacea*, também pertencente à família Fabaceae (BARREIROS, 2005) e da própria resina de *Amburana cerensis* (BANDEIRA et al., 2011).

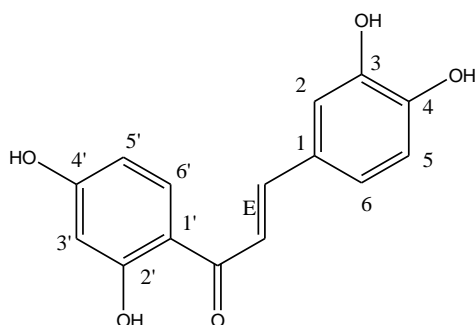
A substância **Re-10**, isolada da fração 26-30, apresentou características semelhantes a **Re-6** e **Re-11** (Espectros 12, 13 e 14), com tempo de retenção de 24,09 minutos.

O espectro de RMN de ^1H (Espectro 13) de **Re-10** apresentou sinais que caracteriza a existência de um anel trissubstituído formando um sistema de spins ABX como descrito para a substância **Re-6**, que foi atribuído ao Anel A, além de um simpleto largo em δ_H 7,83 atribuídos aos hidrogênios do sistema olefínico.

Esta chalcona se diferencia das chalconas **Re-6** e **Re-11** no espectro de RMN de ^1H pela integração dos sinais. Esta diferença está relacionada ao padrão de substituição do anel B, para o qual foram observados no espectro de RMN de ^1H um duplete em δ_H 6,98 ($J = 8,9$) e outro em δ_H 7,78 sobreposto ao sinal dos hidrogênios olefínicos indicativos da presença de um sistema de spins AA'BB', o que confirma a oxigenação no anel B na posição C-4. A proposição foi confirmada pela análise dos dados de RMN de APT (Espectro 14) que mostrou um sinal em δ_c 131,0 para os carbonos C-2 e C-6 e em δ_c 116,1 para os carbonos C-3 e C-5, além do carbono aromático oxigenado em δ_c 160,4 (C-4). Os dados espectrais obtidos, em conjunto com os da literatura levaram a definição de **Re-10** como sendo a chalcona 2',4,4'-triidroxi-*trans*-chalcona (Figura 9). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 5)

mostraram-se semelhantes aos da Isoliquiritigenina, isolada das raízes de *Glycyrrhiza glabra* (FABACEAE) (VAYA et al., 1997), *Hydnophytum formicarum* Jack. (PRACHAYASITTIKUL et al., 2008) e da madeira de *Anadenanthera colubrina* (SANTANA, 2011). Esta chalcona também já havia sido isolada da resina de *A. cerensis* (BANDEIRA et al., 2011).

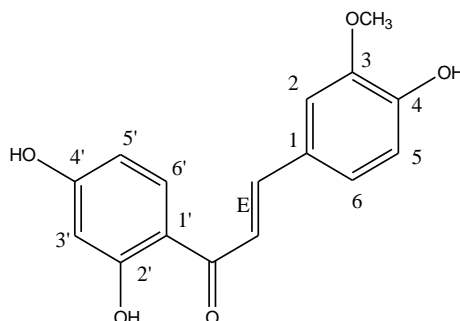
Tabela 3. Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, DMSO- d_6 , respectivamente) de **Re-6** (2',3,4,4'-tetraidroxi-*trans*-chalcona) obtida de *A. cerensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC (Re-6)		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Re-6)		$\delta^{13}\text{C}^*$
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
1	126,6		H- β	H- α , H-5	128,4
2	116,2	7,26; 1H (d, J = 1,5)		H- β , H-6	115,8
3	146,1		H-2	H-5	146,8
4	149,5		H-5	H-2, H-6	149,9
5	116,2	6,82; 1H (d, J = 8,1)	H-6		116,6
6	122,9	7,21; 1H (dd, J = 8,1; 1,5)		H- β , H-2	123,5
α	117,7	7,67; 1H (d, J = 15,5)			118,3
β	145,1	7,78; 1H (d, J = 15,5)		H-2, H-6	146,0
C=O	191,8		H- α	H-6', H- β	193,4
1'	113,4			H-3', H-5'	114,7
2'	166,2		H-3'	H-6'	166,4
3'	103,1	6,27; 1H (d, J = 2,1)		H-5'	103,8
4'	165,6		H-3'	H-6'	167,4
5'	108,7	6,39; 1H (dd, J = 8,7;= 2,1)		H-3'	109,1
6'	133,2	8,15; 1H (d, J = 8,7)			133,2

* (WANG et al., 2009)

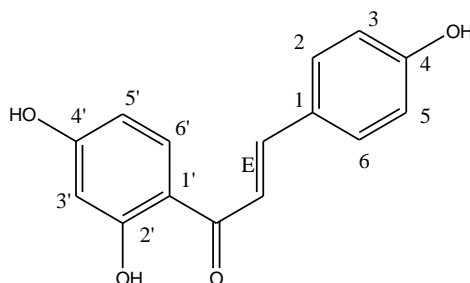
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (90,0 e 22,5 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) de **Re-11** (2',4,4'-triidroxi-3-metoxi-*trans*-chalcona) obtida de *A. cearensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



C	$\delta^{13}\text{C}$ (Re-11)	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)] (Re-11)	$\delta^{13}\text{C}^*$
1	124,5		128,4
2	111,4	7,55 (d, J = 1,8)	116,6
3	150,0		150,9
4	149,6		149,5
5	115,8	6,94 (d, J = 8,1)	112,3
6	118,1	7,42 (dd, J = 8,1; 1,8)	118,7
α	117,8	7,83 (sl)	124,9
β	145,2	7,83 (sl)	145,9
C=O	190,2		193,5
1'	113,8		114,7
2'	166,1		166,4
3'	103,4	6,42 (m)	103,8
4'	165,9		167,5
5'	108,1	6,53 (m)	109,1
6'	132,9	8,11 (d, J = 9,0)	133,5
OCH ₃	55,8	3,96 (s)	56,6

* (BARREIROS, 2005)

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (90,0 e 22,5 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) de **Re-10** (2',4,4'-triidroxi-*trans*-chalcona) obtida de *A. cearensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



C	$\delta^{13}\text{C}$ (Re-10)	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)] (Re-10)	$\delta^{13}\text{C}^*$ Isoliquiritigenina	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]** Isoliquiritigenina
1	126,6		125,8	
2	131,0	7,78 (d, sobreposição)	130,6	7,73 (d, J= 8,5)
3	116,1	6,98 (d, J = 8,9)	115,8	6,92 (d, J= 8,7)
4	160,3		159,9	
5	116,1	6,98 (d, J = 8,9)	115,8	6,92 (d, J= 8,7)
6	131,0	7,78 (d, sobreposição)	130,6	7,73 (d, J= 8,5)
α	117,4	7,83 (sl, sobreposição)	117,8	7,75 (d, J=15,3)
β	144,5	7,83 (sl, sobreposição)	143,8	7,79 (d, J=14,3)
C=O	192,1		191,4	
1'	113,6		113,2	
2'	165,0		164,6	
3'	103,0	6,45 (sl)	102,6	6,35 (d, J= 2,4)
4'	166,7		165,4	
5'	108,1	6,51 (sobreposição)	107,9	6,45 (dd, J= 8,9; 2,4)
6'	132,4	8,15 (d, J = 8,8)	132,3	8,11 (d, 8,9)

* (MARKHAM & TERNAI, 1976)

** (VAYA et al., 1997)

4.2.2 Quinonas

As quinonas são um grupo de substâncias orgânicas coloridas derivadas de compostos aromáticos como benzeno, naftaleno e antraceno. A estrutura das quinonas apresenta dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, situados relativamente em posições “orto” (adjacentes) ou “para” (Figura 10) (SIMÕES et al., 2007).

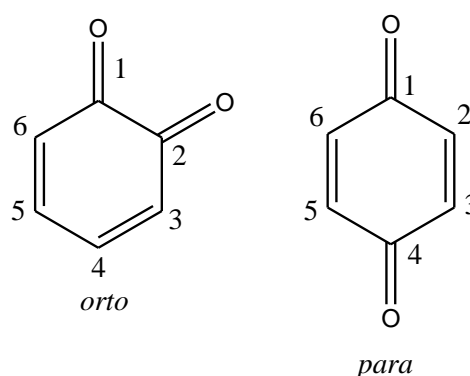


Figura 10. Posições dos grupamentos carbonilas em quinonas

Devido à sua importância farmacológica, nos últimos anos o interesse por estas substâncias foi intensificado. Várias atividades biológicas já são atribuídas as quinonas naturais e/ou sintéticas tais como antioxidante (WENG & GORDON, 1992; PRASETYO et al., 2012) antitumoral (SILVA et al., 2003; ASCHE, 2005), moluscicida (SANTOS et al., 2000; BARBOSA et al., 2005), leishmanicida (TEIXEIRA et al., 2001) anti-inflamatória (ALMEIDA et al., 1990) e antifúngica (GARNIER et al., 1996).

4.2.2.1 Identificação da quinona Re-8

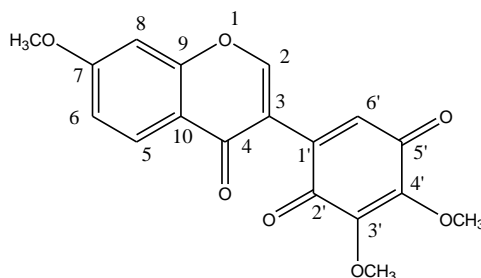


Figura 11. Estrutura da quinona (Re-8) isolada da resina de *A. cearensis*

A substância **Re-8** foi obtida da mistura de precipitados da fração 7-13 como um sólido de cor laranja. O cromatograma CLAE-DAD mostrou um tempo de retenção de 20,85 minutos. O espectro de ultravioleta da substância mostrou bandas absorção em 230 e 299 nm.

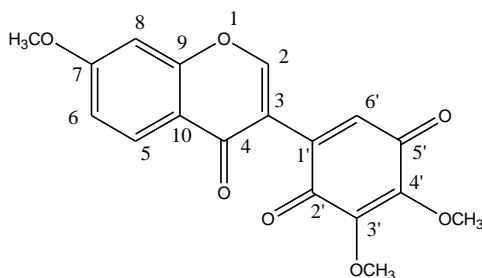
O espectro de infravermelho (Espectro 15) mostrou bandas de absorção característica de estiramento C-O em 1650, 1628 e 1594 cm^{-1} sugerindo a presença de três grupos carbonilas conjugados.

O espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (Espectro 16) apresentou um simpleto característico em δ_{H} 8,15 atribuído a H-2 de uma isoflavona. Além disso, o espectro de RMN de ^1H revelou a presença de um duplo duplete em δ_{H} 7,01 ($J_1 = 2,4$; $J_2 = 9,0$ Hz) e dois dupletos em δ_{H} 6,87 ($J = 2,40$ Hz) e δ_{H} 8,15 ($J = 8,7$ Hz) que permitiram definir o padrão de substituição de anel aromático. Desta forma, foi observada a interação spin-spin de hidrogênios mantendo entre si relação *meta* e *orto*. O espectro mostrou também a presença de um simpleto em δ_{H} 7,17 atribuído ao H-6' de um núcleo quinona.

Os sinais observados no espectro de APT (Espectro 17) em δ_{C} 183,9 e 182,8 foram atribuídos aos grupos carbonilas de uma 1,4-benzoquinona e em δ_{C} 174,4 foi conferido ao grupo carbonila de flavonoides. O espectro de APT permitiu o reconhecimento de sinais relativos a três grupos metoxilas e 15 carbonos sp^2 , sendo cinco metínicos (incluindo um ligado ao átomo de oxigênio em δ_{C} 156,5, compatível com o CH-2 característico de isoflavonas) e 10 não-hidrogenados (incluindo três grupos carbonilas em δ_{C} 174,4 (C-4), 182,8 (C-2') e 183,9 (C-5') e quatro ligados a átomos de oxigênio: δ_{C} 164,5 (C-7), δ_{C} 157,0 (C-9), δ_{C} 145,0 (C-3') e 157,5 (C-4'). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 6.

A comparação dos dados descritos acima com os dados obtidos da literatura permitiram identificar a substância **Re-8** como 3',4'-dimetoxi-1'-(7-metoxi-4-oxo-4H-cromen-3-il) benzo-2',5'-quinona (Figura 11). O espectro de massas de alta resolução (ESI modo positivo) (Espectro 18) mostrou um pico do íon pseudo molecular em m/z 343,0693 referente à fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_7$, confirmando a estrutura proposta. Esta substância já foi isolada, como inédita, da resina de *A. cearensis* em 2011 (BANDEIRA et al., 2011).

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **Re-8** obtida de *A. cearensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



C	$\delta^{13}\text{C}$ (Re-8)	$\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)] (Re-8)	$\delta^{13}\text{C}^*$	$\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)]*
2	156.5	8,15; 1H (s)	156.5	8,16; 1H (s)
3	116.2		116.3	
4	174.4		174.4	
5	127.9	8,15; 1H (d, $J=8,7$)	127.9	8,15; 1H (d, $J=8,9$)
6	115.1	7,04; 1H (dd, $J=9,0; 2,4$)	115.1	7,02; 1H (dd, $J=8,9; 2,3$)
7	164.5		165.0	
8	100.3	6,87; 1H (d, $J=2,4$)	100.4	6,88; 1H (d, $J=2,3$)
9	157.0		158.0	
10	117.9		118.0	
1'	135.4		135.0	
2'	183.9		183.9	
3'	145.0		145.0	
4'	157.5		158.2	
5'	182.8		183.9	
6'	133.9	7,17; 1H (s)	133.9	7,17; 1H (s)
MeO-7	55.9	3,93; 3H (s)	55.9	3,93; 3H (s)
MeO-3'	61.2	4,03; 3H(s)	61.2	4,03; 3H(s)
MeO-4'	61.5	4,08; 3H (s)	61.5	4,08; 3H (s)

*(BANDEIRA et al., 2011)

4.2.3 Isoflavonas

As isoflavonas, também chamadas isoflavonoides, como os demais flavonoides, são caracterizadas por uma cadeia arila-C3-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano (Figura 12). Ao contrário das outras classes de flavonoides, sua distribuição taxonômica é restrita. Salvo raríssimas exceções, são de ocorrência exclusiva em espécies da família Fabaceae. Biogeneticamente, os isoflavonoides são formados, como os demais flavonoides, via chalconas. Em vegetais, uma grande parte dos isoflavonoides comporta-se como fitoalexinas – substâncias produzidas pela planta em resposta a uma infecção por um agente patogênico. Os substituintes mais comuns são os grupamentos hidroxila e metoxila (SIMÕES et al., 2007).

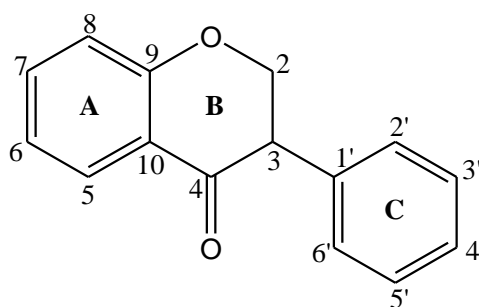


Figura 12. Esqueleto básico das isoflavonas

O maior interesse dos pesquisadores é na farmacologia e fisiologia das isoflavonas, pois apresentam estrutura não esteroidal, mas comportam-se como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, além de serem as mais abundantes dentre os fitoestrógenos. Em adição à sua atividade anti-estrogênica, estes compostos possuem diversas propriedades biológicas, tais como atividade antioxidante, inibição da atividade enzimática e outras (SETCHELL, 1998).

4.2.3.1 Identificação de Isoflavonas (Re-1, Re-2, Re-3, Re-4, Re-5, Re-9 e Re-12)

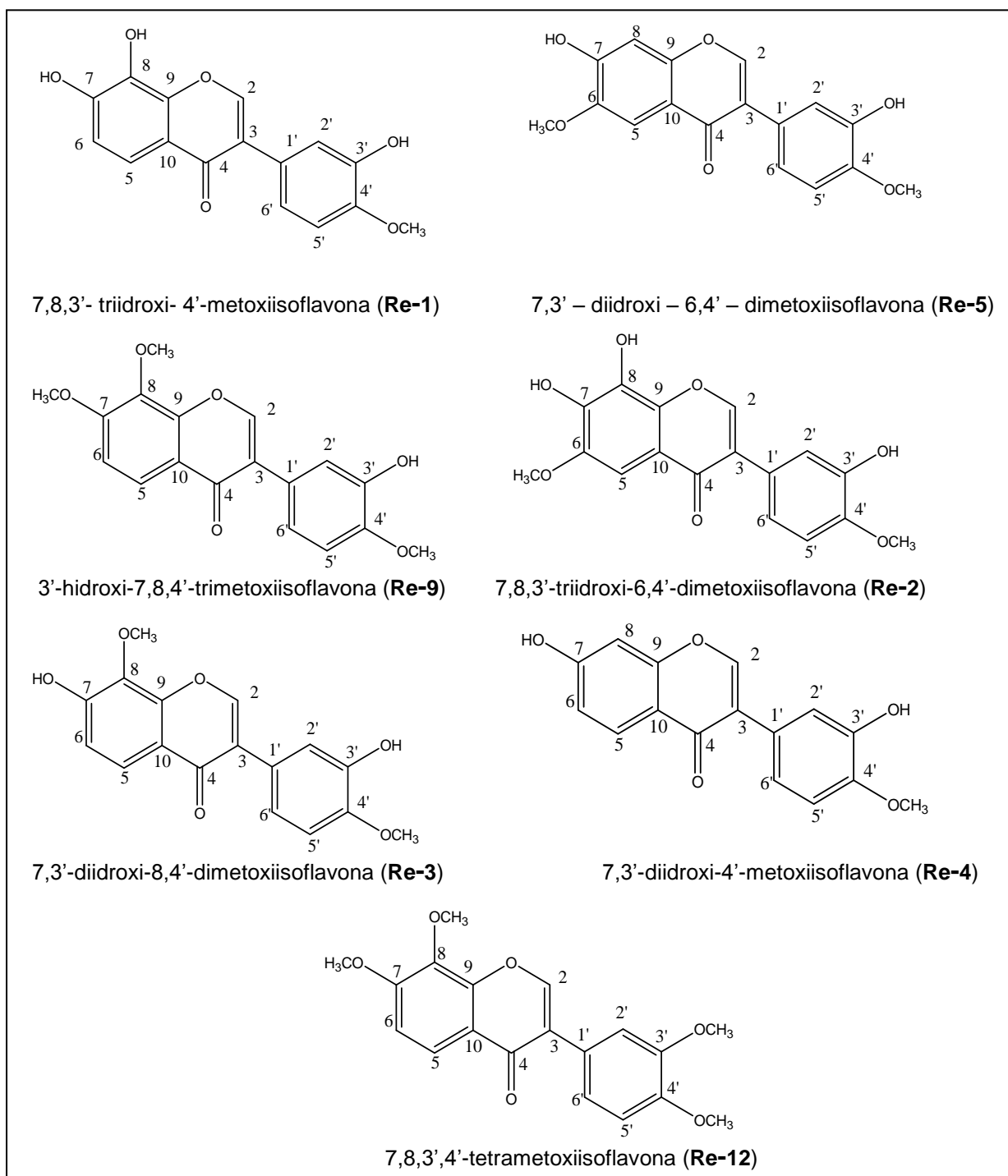


Figura 13. Estruturas das isoflavonas isoladas da resina de *A. cearensis*

A substância **Re-1** foi obtida como cristais em forma de agulhas. O cromatograma desta substância mostrou um tempo de retenção de 6,47 minutos. O espectro de UV indicou sua natureza fenólica, em virtude das bandas de absorção em 228 e 258 nm.

O espectro de infravermelho (Espectro 19) apresentou bandas de absorção em 3400 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação OH, em 1626 cm^{-1} para o estiramento da ligação CO de carbonila e um conjunto de bandas em 1594 e 1523 cm^{-1} e em 1460 cm^{-1} e 1442 cm^{-1} para estiramentos de ligação C=C de anel aromático.

No espectro de RMN de ^1H em acetona- d_6 (Espectro 20) foi observada a presença de um conjunto de sinais na região de hidrogênios aromáticos sugestivos de um flavonoide. Um duplo duplete em $\delta_{\text{H}} 7,08$ (1H, $J = 8,4$ e $2,1\text{ Hz}$) e dois dupletos em $\delta_{\text{H}} 7,16$ (1H, $J = 2,1\text{ Hz}$) e $\delta_{\text{H}} 6,98$ (1H, $J = 8,4\text{ Hz}$) atribuídos ao sistema ABX de um anel aromático trissubstituído (anel B). Desta forma, foi observada a interação *spin-spin* de hidrogênios mantendo entre si relação *orto/meta*, *meta* e *orto*, respectivamente. A existência de dois dupletos, com integração para um hidrogênio cada, em $\delta_{\text{H}} 7,02$ e $\delta_{\text{H}} 7,61$, cujos valores das constantes de acoplamento ($J = 9,0$ e $8,7\text{ Hz}$, respectivamente) permitiram identificar um segundo anel aromático (anel A) com os hidrogênios acoplado em *orto*. Estes dados aliados a presença de um simpleto característico em $\delta_{\text{H}} 8,18$ sugeriram que este composto tratava-se de uma isoflavona. Além disso, o espectro de RMN de ^1H apresentou um simpleto em $\delta_{\text{H}} 3,87$, indicativo da presença de um grupo metoxila ($-\text{OCH}_3$) na molécula.

O espectro de RMN 2D de correlação homonuclear $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (Espectro 21) foi usado para confirmação das interações *spin-spin* átomos de hidrogênio aromáticos.

O espectro de APT (Espectro 22) mostrou sinais para 16 carbonos, sendo 6 carbonos metínicos, 9 quaternários e um metílico. Com base nas informações presentes no espectro de APT e nas correlações diretas ($^1J_{\text{CH}}$) estabelecidas no espectro de HSQC (Espectro 23) foi possível atribuir ao carbono C-2 o valor de $\delta_{\text{C}} 153,27$ e ao carbono da carbonila o valor de $\delta_{\text{C}} 176,06$. Aos carbonos metínicos dos anéis aromático foram atribuídos os sinais em $\delta_{\text{C}} 117,30$ (C-5), $114,78$ (C-6), $117,07$ (C-2'), $112,23$ (C-5'), $21,27$ (C-6').

O sinal em $\delta_{\text{C}} 56,36$ no espectro APT confirmou a presença de um grupo metoxila na molécula. As interações heteronucleares a longa distância estabelecidas

no espectro HMBC (Espectro 24) permitiram fazer a atribuição completa dos valores de deslocamento químico desta substância. Tendo em vista a correlação $^3J_{CH}$ existente no espectro de HMBC entre os hidrogênios da metoxila e o carbono em δ_C 148,34 foi possível definir a posição do grupo metoxila em C-4'. Os dados de RMN 1D e 2D são apresentados na Tabela 7.

O espectro de RMN 2D 1H - 1H NOESY (Espectro 25) confirmou a interação espacial dos hidrogênios da metoxila com H-5', permitindo identificar a sua posição em C-4'. O espectro de massas (ESI modo positivo) da substância (Espectro 26) mostrou pico do íon pseudo molecular em m/z 301,2 $[M+H]^+$, indicativo da fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_6$.

Com base nos dados obtidos em conjunto com os dados da literatura foi possível identificar a substância **Re-1** como sendo 7,8,3'-triidroxi-4'-metoxiisoflavona (Figura 13). O primeiro relato de isolamento desta substância foi na espécie *Xanthocercis zambesiaca* da família FABACEAE (BEZUIDENHOUT et al., 1988). No entanto, está sendo relatada pela primeira vez na resina de *A. cerensis*.

Nos espectros de infravermelho das isoflavonas **Re-2** (Espectro 61), **Re-3** (Espectro 27), **Re-4** (Espectro 47), **Re-5** (Espectro 53), **Re-9** (Espectro 35) e **Re-12** (Espectro 43) também foram evidenciadas bandas de absorção semelhantes as bandas do espectro da substância **Re-1**.

Os valores dos deslocamentos químicos e as multiplicidades dos sinais nos espectros de RMN de 1H relativos aos hidrogênios dos anéis A e B de **Re-3** (Espectro 28), **Re-9** (Espectro 36) e **Re-12** (Espectro 44) revelaram o mesmo padrão de substituição já observado para a isoflavona **Re-1**. O espectro de 1H - 1H COSY de **Re-3** (Espectro 29), e **Re-9** (Espectro 37) confirmaram os acoplamentos dos hidrogênios.

No entanto, divergências foram encontradas para os sinais do grupo metoxila. No espectro de RMN de 1H de **Re-3** foram observados sinais para duas metoxilas, δ_H 3,88 e 3,98. No espectro de APT (Espectro 30) os valores em δ_C 55,40 e δ_C 60,83 confirmaram esta proposta. O valor em δ_C 60,83 indica que a metoxila está em posição com duas substituições em *orto*, podendo está na posição 8 do anel A. A correlação direta ($^1J_{CH}$) dos carbonos com os hidrogênios foram observadas no espectro de HSQC da substância (Espectro 31).

No espectro APT, os valores de deslocamentos químicos dos carbonos do anel B de **Re-3** revelaram-se praticamente idênticos aos apresentados pelos mesmos carbonos da isoflavona **Re-1**. Quanto à localização dos grupos metoxilas na estrutura de **Re-3**, a análise do espectro de HMBC (Espectro 32) mostrou correlações entre os hidrogênios das metoxilas em δ_H 3,88 e δ_C 3,98 e os carbonos C-4' (δ_C 148,06) e C-8 (δ_C 137,07), respectivamente, indicando a localização de uma metoxila no anel B em C-4' e outra no anel A em C-8. A interação espacial observada no espectro NOESY (Espectro 33) entre a metoxila em δ_H 3,88 e H-5', como também a ausência de interação espacial com o H-6 do anel A, confirmou a posição das metoxilas em C-4' e C-8. O espectro de massas de alta resolução (ESI modo positivo) (Espectro 34) mostrou pico do íon pseudo molecular em m/z 315,0833 $[M+H]^+$, para a fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_6$.

Estes dados aliados às correlações existentes no espectro HMQC e HMBC e a comparação com os dados da literatura (HARPER, et al., 1976) permitiram estabelecer a estrutura de **Re-3** como sendo 7,3'-diidroxí-8,4'-dimetoxiisoflavona (Figura 13). Os dados espectrais desta substância são descritos na Tabela de 8. Esta substância também já foi isolada da espécie *Xanthocercis zambesiaca* (HARPER, et al., 1976). Contudo, este é o primeiro relato da mesma na resina de *Amburana cearensis*.

Para as substâncias **Re-9** e **Re-12** foram observadas diferenças nos espectros de RMN 1H das substâncias pela presença de três simpletos em δ_H 3,88, δ_H 3,95 e δ_H 4,03, correspondentes a três grupos metoxilas para **Re-9** e quatro simpletos em δ_H 3,85, δ_H 3,86, δ_H 3,95 e em δ_H 4,03, para quatro grupos metoxilas em **Re-12**. Estes grupos foram confirmados nos espectros de APT (Espectro 38, **Re-9** e Espectro 45, **Re-12**). A substância **Re-12** difere de **Re-1** no anel B com um grupo metoxila em C-3'. Uma vez que o esqueleto de isoflavona foi caracterizado com base nas informações presente no espectro de RMN de 1H e APT e com os dados descritos na literatura (RAO et al., 1984). A substância **Re-12** foi identificada como 7,8,3',4'-tetrametoxiisoflavona (Figura 13), também conhecida como isocladrastina metil eter. O espectro de massas (ESI modo positivo) desta substância (Espectro 46) mostrou pico do íon pseudo molecular em m/z 343,1 $[M+H]^+$, para a fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_6$. Os dados de RMN de 1H e ^{13}C são apresentados na tabela 9.

Esta substância já foi isolada dos bulbos da espécie *Iris kashmiriana* (RAZDAN et al., 1996) e da própria resina de *A. cearensis* (BANDEIRA et al., 2011).

O espectro de HSQC de **Re-9** (Espectro 39) mostrou as correlações diretas dos hidrogênios com os carbonos. Tendo em vista a correlação $^3J_{CH}$ existente no espectro de HMBC desta substância (Espectro 40) entre os hidrogênios das metoxilas e os respectivos carbonos (δ_H 3,88 / δ_C 137,77, δ_H 3,95 / δ_C 153,50, δ_H 4,03 / δ_C 148,46) foi possível definir a localização das metoxilas em C-8, C-7 e C-4', respectivamente. O espectro de NOESY (Espectro 41) confirmou as posições das metoxilas em C-7 e em C-4', mostrando as interações espaciais com H-6 e H-5', respectivamente. Os dados reunidos permitiram estabelecer a estrutura **Re-9** como sendo 3'-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiisoflavona (Figura 13). O espectro de massas (ESI modo positivo) (Espectro 42) mostrou pico do íon pseudo molecular em m/z 329,1 $[M+H]^+$, para a fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_6$. Os dados de RMN 1H 1D e 2D e de ^{13}C são apresentados na Tabela de 10. Não foi encontrado nenhum relato na literatura para esta substância, sendo considerada inédita.

A comparação dos dados espectrais de RMN 1H e ^{13}C de **Re-1** com os das substâncias **Re-4** (Espectro 48), **Re-5** (Espectro 54) e **Re-2** (Espectro 62) indicou que suas estruturas são semelhantes apresentando inclusive os mesmos sinais característicos de uma isoflavona com o anel B com hidroxila em C-3' e metoxila em C-4'. Diferenças foram observadas no padrão de substituição do anel A.

O espectro de RMN de 1H da substância **Re-4** revelou para o anel aromático A um duplo duplete em δ_H 7,07 ($J= 8,4; 2,1$ Hz; H-6), além de dois dupletos em δ_H 6,98 ($J= 8,4$ Hz; H-5) e em δ_H 7,16 ($J= 2,1$ Hz; H-8), formando um sistema de spins ABX, indicativos de um anel trissubstituído. O sinal em 3,88 indicou a presença de um grupo metoxila que foi confirmado pela presença de um sinal em 55,40 no espectro de APT (Espectro 49). As correlações diretas dos hidrogênios com os carbonos foram estabelecidas no espectro de HSQC (Espectro 50). A localização do grupo metoxila na molécula foi evidenciada pela correlação a 3J dos hidrogênios do grupo metoxila com o carbono em δ_C 147,38 no espectro de HMBC (Espectro 51). O íon pseudo molecular em m/z 285,0755 $[M+H]^+$, presente no espectro de massas de alta resolução (Espectro 51), confirmando a fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_5$ e a correlação dos dados espectrais com os descritos na literatura para a 3'-hidroxiformononetina (KUROSAVA et al., 1978) levaram a identificar a substância

Re-4 como sendo 7,3'-diidroxí-4'-metoxiisoflavona (Figura 13), conhecida como calycosina. Os dados de RMN estão apresentados na Tabela 11. Esta substância já foi isolada da espécie *Muchaerium mucronulatum* Mart. (KUROSAVA et al., 1978). No entanto, este é o primeiro relato desta substância na resina de *Amburana cearensis*.

As substâncias **Re-2** e **Re-5** diferem de **Re-1** no anel A quanto ao padrão de substituição. No espectro de RMN ^1H de **Re-5** (Espectro 54) foi observado, além dos sinais referentes aos hidrogênios do anel B, a presença de dois simpletos, com integral para um hidrogênio cada, em δ_{H} 7,56 (H-5) e em δ_{H} 6,96 (H-8) atribuídos a dois hidrogênios no anel A, com orientação *para*. O espectro de RMN 2D ^1H - ^1H COSY (Espectro 55) confirmou os acoplamentos dos hidrogênios. Esta substância mostra a presença de dois grupos metoxilas confirmados pelo espectro de APT (Espectro 56) e HSQC (Espectro 57) que mostrou as correlações diretas dos hidrogênios com carbonos. As correlações a longa distância dos hidrogênios da metoxila δ_{H} 3,97 com o carbono em δ_{C} 147,6 e dos hidrogênios da metoxila em δ_{H} 3,88 com o carbono em δ_{C} 148,3, visualizadas no espectro de HMBC (Espectro 58), indicou a localização das metoxilas em C-6 e C-4', respectivamente. As localizações das metoxilas foram confirmadas pelas interações espaciais dos hidrogênios das metoxilas com H5 e H-5', respectivamente, evidenciadas no espectro de NOESY (Espectro 59). Tendo em vista que o esqueleto de isoflavona foi caracterizado, com base nestas informações aliados aos dados presentes no espectro de APT, HSQC, HMBC e massas (Espectro 60) (ESI modo positivo, que mostrou pico íon pseudo molecular em m/z 315,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, referente a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$) a substância **Re-5** foi identificada como 7,3'-diidroxí-6,4'-dimetoxiisoflavona, conhecida como odorotina (Figura 13), sendo um isômero de **Re-3**. Esta substância já foi isolada do cerne da espécie *Dipteryx odorata* (HAYASHI & THOMSON, 1974). Entretanto, está sendo relatada pela primeira vez na resina de *Amburana cearensis*.

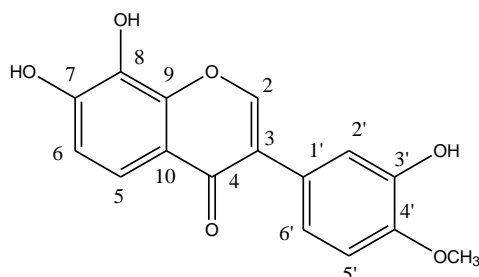
A substância **Re-2** apresentou no espectro de RMN de ^1H (Espectro 62) apenas um simpleto em δ_{H} 7,19, referente a um hidrogênio no anel A, indicativo de um anel aromático pentassubstituído. Os acoplamentos dos hidrogênios do anel B foram confirmados pelo espectro de RMN 2D ^1H - ^1H COSY (Espectro 63). A existência de dois sinais em δ_{H} 3,88 e δ_{H} 3,94 no espectro de RMN de ^1H mostrou a presença de dois grupos metoxilas na molécula confirmados pelo aparecimento de

sinais em δ_C 56,57 e δ_C 57,73 no espectro de APT (Espectro 63). Neste espectro foi possível observar sinais de carbonos oxigenados em δ_C 134,51 (C-7), δ_C 140,45 (C-8), δ_C 147,19 (C-3') e em δ_C 148,35 (C-4'). No espectro de HMBC (Espectro 65) foi possível observar as correlações a longa distância dos hidrogênios das metoxilas em δ_H 3,88 com o carbono em δ_C 148,35 e os da metoxila em δ_H 3,94 com o carbono em δ_C 147,68 confirmando a localização das metoxilas nas posições C4' e C-6, respectivamente. Estas posições também são confirmadas pelas interações espaciais dos hidrogênios das metoxilas em δ_H 3,88 e em δ_H 3,94 com H5' e H-5, respectivamente, presentes no espectro de NOESY (Espectro 66).

Os dados espectrais obtidos, juntamente com os dados descritos na literatura (SOCORRO et al., 2003), levaram a identificação da substância **Re-2** como sendo 7,8,3'-triidroxi-6,4'-dimetoxiisoflavona (Figura 13). O espectro de massas (ESI modo positivo) (Espectro 67) da substância revelou um pico do íon pseudo molecular em m/z 331,1 $[M+H]^+$ para a fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_7$. Esta substância foi isolada pela primeira vez da espécie *Dipterix odorata* (SOCORRO et al., 2003). Todavia, este é o primeiro relato da mesma na resina de *Amburana cearensis*.

Dentre as sete isoflavonas isoladas da resina de *A.cearensis* apenas **Re-12** já havia sido isolada da resina desta espécie, portanto, as outras seis estão sendo relatadas pela primeira vez nesta resina. Vale ressaltar que a isoflavona **Re-9** está sendo relatada pela primeira vez, sendo uma substância inédita.

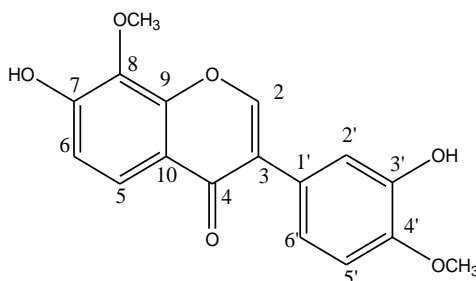
Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) e ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da isoflavona **Re-1** (7,8,3'-triidroxi-4'-metoxiisoflavona) obtida de *A. cearensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (Re-1)		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Re-1)		$\delta^{13}\text{C}^*$
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	
2	153,27	8,18 (s)			154,6
3	124,71		H-2	H-6'	125,3
4	176,06			H-2, H-5	178,5
5	117,30	7,61 (d, $J = 8,7$)	H-6		115,4
6	114,78	7,02 (d, $J = 9,0$)			112,6
7	150,41		H-6	H-5	151,0
8	133,73			H-6	134,1
9	147,13			H-5	147,4
10	119,33			H-6	118,8
1'	126,44		H-2'	H-2, H-5'	126,3
2'	117,07	7,16 (d, $J = 2,1$)		H-6'	117,3
3'	147,57		H-2'	H-5'	147,8
4'	148,34		H-5'	H-2', H-6', OCH ₃	149,2
5'	112,23	6,98 (d, $J = 8,4$)			-
6'	121,27	7,07 (dd, $J = 8,4; 2,1$)		H-2'	121,6
MeO-4'	56,36	3,87 (s)			56,4

*(PUEBLA et al., 2010)

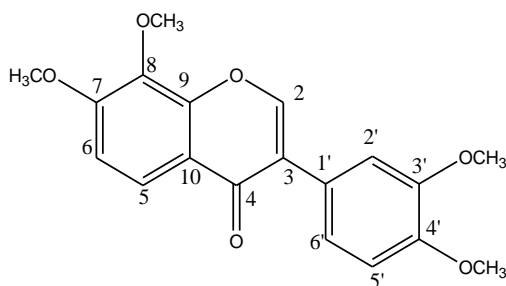
Tabela 8. Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) da isoflavona **Re-3** (7,3'-diidroxio-8,4'-dimetoxiisoflavona) obtida da resina de *A. cearensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC (Re-3)		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Re-3)		* δ ^1H [J (Hz)] (CDCl_3 - 50% CD_3OD , 60 MHz)
	$\delta^{13}\text{C}$	δ ^1H [m, J (Hz)]	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
2	152,37	8,25 (s)			7,97
3	125,30			H-2'; H-6'	
4	176,53			H-2; H-5	
5	121,18	7,83 (d, J= 9,0)			7,67 (d, J= 9)
6	114,59	7,05 (d, J= 9,0)			6,84 (d, J= 9)
7	154,74		H-6	H-5	
8	137,07			H6; OCH ₃ (4,03)	
9	151,19			H-5	
10	119,41			H-6	
1'	126,21		H-2'	H-2; H-5'	
2'	116,04	7,18 (d, J= 2,1)		H-6'	6,81
3'	147,43			H-5'	
4'	148,06		H-5'	H-6'; OCH ₃ (3,88)	
5'	111,27	6,99 (d, J= 8,4)			6,87(J= 8,0)
6'	120,24	7,00 (dd, J= 8,4; 2,1)	H-5'	H-2'	6,87 (J= 8,0)
OMe-4'	55,40	3,88 (s)			3,87
OMe-8	60,80	3,98 (s)			3,87

* (HARPER, et al., 1976)

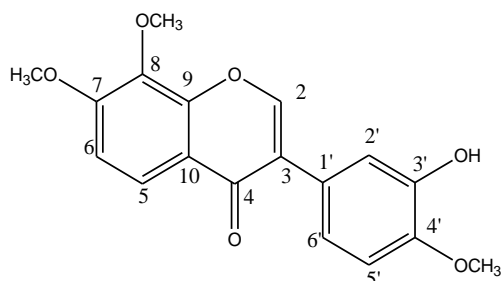
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) da isoflavona **Re-12** (7,8,3',4'-tetrametoxisoflavona) obtida da resina de *A. cearensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



C	$\delta^{13}\text{C}$ (Re-12)	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)] (Re-12)	* $\delta^{13}\text{C}$ (DMSO)	* $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)] (CDCl ₃)
2	154,03	8,30 (s)	153,63	8,02 (s)
3	124,82		123,01	
4	176,03		174,92	
5	122,01	7,93 (d, J= 9,3)	120,85	8,04 (s)
6	111,53	7,27 (d, J= 9,3)	110,95	7,06 (d, J=9)
7	157,56		156,07	
8	137,77		134,39	
9	151,45		149,79	
10	120,16		118,36	
1'	125,86		124,18	
2'	114,09	7,29 (d, J= 2,1)	112,71	7,21 (d, J=2)
3'	150,03		148,26	
4'	150,41		148,61	
5'	112,59	7,00 (d, J= 8,4)	111,57	6,92 (d, J= 8,0)
6'	122,31	7,18 (dd, J= 8,1; 2,1)	121,25	7,06 (dd, J= 8,0; 2,0)
OMe-3'	56,20 (s)	3,85 (s)	55,49	3,92 (s)
OMe-4'	56,25 (s)	3,86 (s)	55,49	3,93 (s)
Ome-7	57,02 (s)	3,95 (s)	56,44	4,01 (s)
OMe-8	61,57 (s)	4,03 (s)	60,95	4,01 (s)

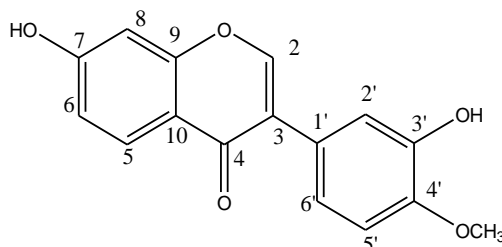
*(RAO et al., 1984)

Tabela 10. Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) da nova isoflavona **Re-9** (3'-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiisoflavona) obtida da resina de *A. cearensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



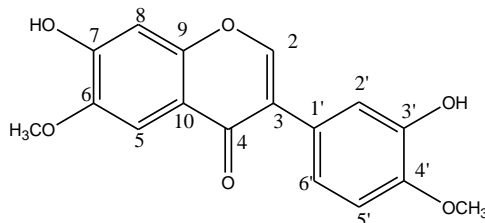
C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC (Re-9)		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Re-9)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	153,85	8,25 (s)		
3	124,85		H-2	H-2'; H-6'
4	175,53			H-2; H-5
5	121,99	7,92 (d, J= 9,0)	H-6	
6	111,48	7,26 (d, J= 9,0)	H-5	
7	157,53		H-6	H-5; OCH ₃ (4,03)
8	137,77			H-6; OCH ₃ (3,95)
9	151,46			H-5; H-2
10	120,20			H-6
1'	126,21		H-2'	H-5';H-2
2'	117,03	7,18 (d, J= 2,1)		H-6'
3'	147,21		H-2'	H-5'
4'	148,46		H-5'	H-6'; H-2'; OCH ₃ (3,88)
5'	112,27	6,99 (d, J= 8,4)	H-6'	
6'	121,18	7,08 (dd, J= 8,4; 1,8)	H-5'	H-2'
OMe-4'	56,37	3,88 (s)		
OMe-7	57,00	4,03 (s)		
OMe-8	61,55	3,95 (s)		

Tabela 11. Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) da isoflavona **Re-4** (7,3'-diidroxi-4'-metoxiisoflavona) obtida da resina de *A. cearensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



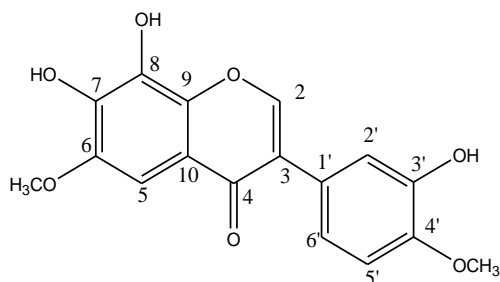
C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC (Re-4)}$		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} \text{ HMBC (Re-4)}$	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta ^1\text{H} [m, J (\text{Hz})]$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	152,58	8,16 (s)		
3	125,42		H-2	H-2'
4	174,14			H-2; H-5
5	127,64	8,07 (d, $J= 8,7$)	H-6	
6	114,75	7,00 (dd, $J= 8,7; 2,4$)		H-8
7	162,26		H-8	H-5
8	102,28	6,90 (d, $J= 2,1$)		H-6
9	157,40		H-8	H-2;H-5
10	118,17		H-8	H-6
1'	124,18		H-2'; H-6'	H-2'
2'	116,01	7,16 (d, $J= 2,1$)		H-6'
3'	147,35		H-2'	H-5'
4'	147,38		H-5'	H-2'; OCH ₃ (3,88)
5'	111,24	6,98 (d, $J= 8,4$)		
6'	121,21	7,07 (dd, $J= 8,4; 2,1$)	H-5'	
OMe	55,40	3,88 (s)		

Tabela 12. Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) da isoflavona **Re-5** (7,3'-diidroxí-6,4'-dimetoxiisoflavona) obtida da resina de *A. cearensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMQC}$ (Re-5)		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - \text{HMBC}$ (Re-5)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta ^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	153,3	8,16 (s)		
3	124,6		H-2	H-2'; H-6'
4	175,8			H-2; H-5
5	105,8	7,56 (s)		
6	147,6		H-5	H-8; OCH ₃ (3,97)
7	153,5		H-8	H-5
8	103,8	6,96 (s)		
9	153,2			H-5
10	118,4		H-5	H-8
1'	126,6			H-2; H-5'
2'	117,0	7,18 (d, J = 2,1)		H-6'
3'	147,1		H-2'	H-5'
4'	148,3		H-5'	H-2'; H-6'; OCH ₃ (3,88)
5'	112,2	6,98 (d, J = 8,4)		
6'	121,2	7,08 (dd, J = 2,1; 8,4)	H-5'	
OMe-6	56,4	3,97 (s)		
OMe-4'	56,6	3,88 (s)		

Tabela 13. Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) da isoflavona **Re-2** (7,8,3'-triidroxi-6,4'-dimetoxiisoflavona) obtida da resina de *A. cearensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.



C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC (Re-2)		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Re-2)		$^*\delta^{13}\text{C}$ (MeOH- d_4)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
2	153,19	8,19 (s)			154,48
3	126,72		H-2		126,60
4	178,29			H-2; H-5	178,17
5	96,57	7,19 (s)			96,49
6	147,68			OCH ₃ (3,94)	148,70
7	134,51			H-5	134,84
8	140,45				141,87
9	143,46			H-5; H-2	144,64
10	117,89				117,63
1'	124,38		H-2'	H-2	125,17
2'	117,12	7,18 (d, J= 2,1)		H-6'	117,58
3'	147,19		H-2'	H-5'; H-2'	147,34
4'	148,35		H-5'	H-2'; OCH ₃ (3,88)	149,25
5'	112,30	6,98 (d, J= 8,4)			112,76
6'	121,22	7,08 (dd, J= 8,4; 2,1)	H-5'		121,82
OMe-4'	56,57 (s)	3,88 (s)			55,49
OMe-6	57,73 (s)	3,94 (s)			56,44

*(SOCORRO et al., 2003)

4.2.4 Isoflavonolignanas

Uma combinação interessante de estruturas de flavonoides e lignanas é encontrada em um grupo de compostos chamados flavonolignanas (Figura 14). Eles surgem por processos de acoplamento oxidativo entre um flavonoide e um fenilpropanoide, este último normalmente álcool coniferílico (DEWICK, 2008).

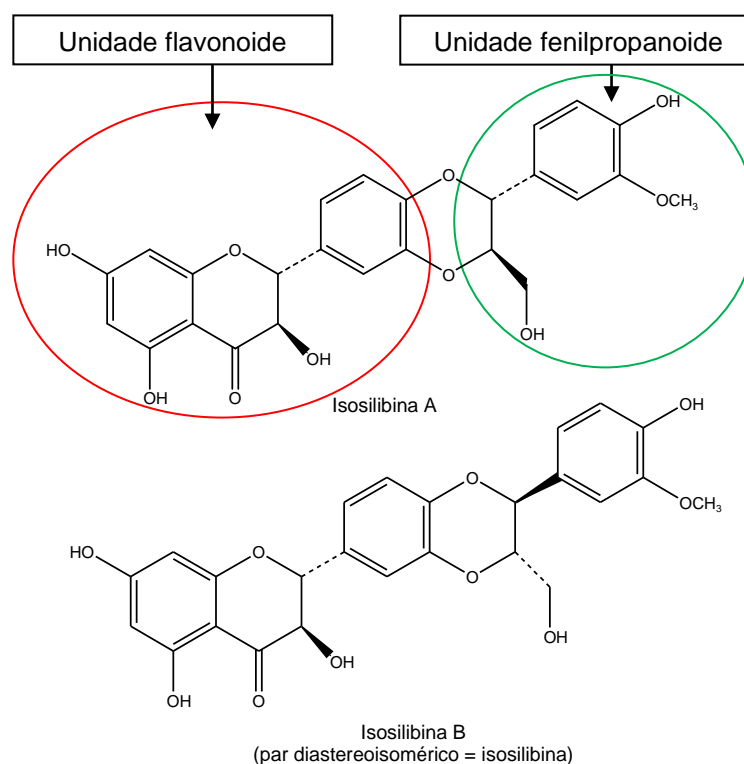


Figura 14. Estrutura de compostos do grupo flavonolignanas.

A combinação de uma isoflavona com um fenilpropanoide dá origem a uma isoflavonolignana que são lignoides do tipo benzodioxano. A grande maioria das isoflavonolignanas foram isolados como componentes característicos de espécies da família Leguminosae ou Fabaceae, como *Xanthocercis zambesiaca* (BEZUIDENHOUT et al., 1988), *Dipteryx odorata* (JANG et al., 2003), *Pueraria alopecuroides* Craib (ZHANG et al., 2007), *Butea superba* (MA et al., 2005), *Alhagi pseudalhagi* (M.B.) (Li et al., 2010) e *Sophora Tonkinensis* (YANG, et al., 2012).

As flavonolignanas possuem propriedade antihepatotóxica e pode fornecer proteção contra agentes que danificam o fígado. Devido à sua natureza fenólica, eles podem atuar como antioxidantes e captadores de radicais (DEWICK, 2008). Diversos estudos investigam a atividade deste tipo de composto frente a diferentes linhagens de células, principalmente células hepáticas cancerígenas, (JANG et al., 2003; LI et al, 2010; YANG, et al., 2012).

4.2.4.1 Identificação da Isoflavonolignana Re-7

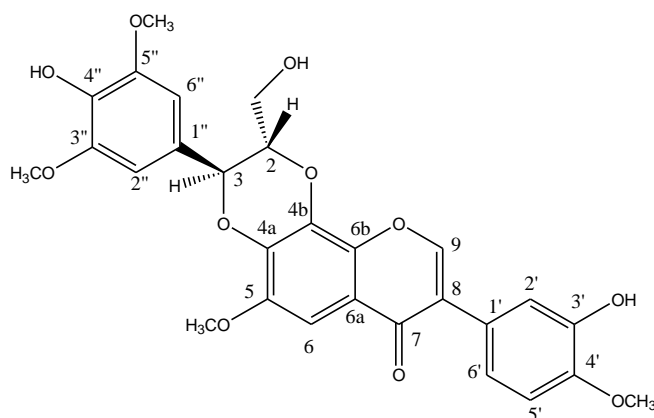


Figura 15. (2S-3S)-2,3-*trans*-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-8-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-2-hidroxi-5-metoxi-2,3-di-hidro-7H-1,4-dioxino [2,3-*h*] cromen-7-ona

A substância **Re-7** foi obtido como um sólido amorfo branco. O espectro de infravermelho (Espectro 68) apresentou banda de absorção larga em torno de 3.400 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação OH, além de banda intensa em 1603 cm^{-1} , referente a estiramento de ligação C-O de carbonila, em 1518 cm^{-1} referente a estiramento de ligação C=C de anel aromático e banda intensa em 1134 cm^{-1} , referente ao estiramento C-O.

Os espectros de RMN de ^1H (Espectro 69) e APT (Espectro 71) apresentou sinais característicos de isoflavonas, exibindo um simpleto característico em δ_{H} 8,44 (H-9) no espectro de RMN de ^1H e em 153,4 no espectro de APT. A região aromática do espectro apresentou um conjunto de sinais que levaram a indentificação de uma unidade isoflavona com padrão de substituição para os anéis A e B semelhantes aos da substância **Re-2**. Desta forma, foi possível observar um

simpleto, com integral para um hidrogênio, em δ_H 7,16, que foi atribuído a H-6 de **Re-7** e foi consistente com o padrão de substituição do anel A de **Re-2** (7,8,3'-diidroxí-6,4'-dimetoxiisoflavona). Também foram observados dois sinais sobrepostos, com integral para dois hidrogênios, em δ_H 6,99 e δ_H 6,98 e um simpleto largo, com integral para um hidrogênio, em δ_H 7,07, que foram designados para os hidrogênios H-5', H-6' e H-2', respectivamente, do anel B da parte isoflavonoide de **Re-7**. Além disso, foram observados sinais adicionais, sendo um simpleto com integração para dois hidrogênios em δ_H 6,78 (H-2''/H-6''), indicativo de um anel aromático simetricamente tetrasubstituído e outros na região alifática do espectro, que exibiu sinais para um sistema AMXY (em δ_H 5,02, 1H, d, $J= 6,0$ Hz; δ_H 4,44, 1H, m; δ_H 3,69, 1H, d largo, $J= 12,3$ Hz; δ_H 3,45, 2H, m). Ainda foram observados sinais para quatro grupos metoxilas aromáticas em δ_H 3,86, δ_H 3,81, e δ_H 3,78 (2x).

Uma análise minuciosa dos espectros de RMN 1H - 1H COSY (Espectro 70), APT (Espectro 71), HSQC (Espectro 72) e HMBC (Espectro 73) indicaram que **Re-7** contém uma unidade de fenilpropanoide. O duplete desblindado em δ_H 5,02 (H-3), típico de um metínico benzílico substituído por um átomo de oxigênio, e o multiplete em δ_H 4,44 (H-2), que acoplaram entre si, implicou na presença de um anel 1,4-dioxano entre uma porção isoflavonoide e um anel fenila.

Com base nesta observação, pôde-se propor que a substância **Re-7** é composta por uma unidade de fenilpropanoide 3,4,5-trioxigenada acoplada através da funcionalidade de diidroxí a uma unidade isoflavonoide pentaóxigenada. A ligação do isoflavonoide e a unidade fenilpropanoide através de uma ponte de 1,4-dioxano foi deduzida por experimentos de HMBC. Todas as posições dos grupos metoxilas e hidroxilas foram determinadas de forma inequívoca por experimentos de HMBC e NOESY (Espectro74). A comparação dos dados espectrais obtidos com aqueles descritos na literatura (JANG et al., 2003) indicaram que a estrutura de **Re-7** está intimamente relacionada à de uma isoflavonolignana, 5-metoxixantocercin A, com exceção da rotação específica, $[\alpha]^{25}_D - 47,62^\circ$ (c 0,02, $CHCl_3$ -MeOH, 1:1), (Lit. para 5-metoxixantocercin A: $[\alpha]^{20}_D +11^\circ$ (c 0,1, $CHCl_3$ -MeOH, 1:1), JANG et al., 2003), indicando que **Re-7** trata-se do enantiômero de 5-metoxixantocercina A. A constante de acoplamento ($J= 6,0$ Hz) entre H-2 e H-3 indica claramente uma configuração *trans* dos centros quirais do anel dioxano. Portanto, a estrutura desta nova isoflavonolignana, **Re-7**, foi elucidado como 2-(S),3-(S)-*trans*-3-(4''-hidroxí-

3'',5''-dimetoxifenil)-8-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil)-2-hidroximetil-5-metoxi-2,3-di-hidro-7H-1,4-dioxino [2,3-*h*] cromen-7-ona (Figura 15). Os dados espectrais de RMN desta substância são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, acetona- d_6 , respectivamente) da isoflavonolignana **Re-7** obtida da resina de *A. cearensis*. Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSBC (Re-7)		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC (Re-7)		* δ ^{13}C	* δ ^1H [m, J (Hz)]
	δ ^{13}C	δ ^1H [m, J (Hz)]	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$		
CH ₂ OH	60,4	3,45 (m) 3,69 (dl, J= 12,3)			59,8	3,42 m 3,67 (dl, J= 12,2)
2	78,4	4,4 (m)			77,8	4,44 (m)
3	77,2	5,02 (d, J= 6,0)		H-2''; H-6''	76,6	5,01 (d, J= 6,9)
4a	138,6			H-6	138,0	
4b	133,2				132,6	
5	147,3			OCH ₃ (3,86)	146,6	
6	96,3	7,13 (s)			95,7	7,16 (s)
6a	117,6				116,9	
6b	141,7			H-9; H-6	141,1	
7	174,6			H-6; H-9	141,1	
8	125,2			H-2'; H-6'	124,6	
9	153,4	8,44 (s)			152,8	8,45 (s)
1'	123,6		H-2';H-6'	H-9;H-5'	123,0	
2'	116,9	7,07 (sl)		H-6'	116,4	7,13 (sl)
3'	147,2		H-2'	H-5'	146,0	
4'	148,0		H-5'	H-2';H-6'; OCH ₃ (3,81)	147,5	
5'	112,4	6,99 (sobreposição)			111,9	6,98 (sobreposição)
6'	120,3	6,98 (sobreposição)	H-5'		119,7	6,98 (sobreposição)
1''	126,1		H-6	H-2''	125,5	
2''/6''	106,2	6,78 (s)		H-2''/H-6''; H-3	105,6	6,70 (s)
3''/5''	148,5		H-2''/6''	OCH ₃ (3,78)	147,9	
4''	136,8			H2''/H-6''	136,2	
OMe-5	56,16	3,81 (s)			55,58	3,89 (s)
OMe-4'	56,21	3,86 (s)			55,61	3,80 (s)
OMe-3''/5''	56,6	3,78 (s)			56,0	3,78 (s)
CH ₂ OH		5,07				5,08
OH-3'		9,07				9,05
OH-4''		8,62				8,60

*(JANG et al., 2003)

Na tabela 15 são apresentadas algumas propriedades físicas das substâncias isoladas neste trabalho.

Tabela 15. Propriedades físicas das substâncias isoladas da resina de *Amburana cearensis*.

Substância	Forma obtida	Ponto de fusão (°C)	Ponto de fusão da literatura (°C)
Re-1	Cristais brancos	261-262	Não encontrado
Re-2	Sólido branco	148-149	145-146 (SOCORRO et al., 2003)
Re-3	Cristais salmão	206-207	Não encontrado
Re-4	Cristais brancos	239-240	240-242 (KUROSAWA, et al., 1978)
Re-5	Cristais incolores	208-209	210-211 (HAYASHI & THOMSON, 1974)
Re-6	Sólido amorfo amarelo	204-205	211-212 (PRACHAYASITTIKUL et al., 2008)
* Re-7	Sólido branco	169-170	Para o enantiômero: 173-174 (JANG et al., 2003)
Re-8	Sólido laranja	200-202	196-198 (BANDEIRA et al., 2011)
* Re-9	Sólido marrom	188-189	-
Re-10	Sólido amarelo	139-140	182-183 (PRACHAYASITTIKUL et al., 2008)
Re-11	Sólido amarelo	200-201	Não encontrado
Re-12	Sólido marrom	163-164	168-170 (MURTHY et al., 1986)

*Substâncias inéditas

4.3 Determinação do teor de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (SLINKARD & SINGLETON, 1977). Trata-se da redução do reagente (ácidos fosfotúngstico e fosmomolibdico) pelos compostos fenólicos formando um

complexo azul (óxido de tungstênio e molibdênio). A intensidade da coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não precisam ter, necessariamente, natureza fenólica (HUANG et al, 2005; SOUSA et al., 2007).

O resultado obtido na determinação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu foi expresso em equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de extrato MeOH = $205,614 \pm 3,162$). Tendo em vista a quantidades de compostos fenólicos isolados da resina de *A. cearensis* é justificável o alto teor de fenólicos apresentado pela mesma. Não foi encontrado na literatura nenhum relato a respeito do teor de fenólicos totais com a resina de *A. cearensis*, sendo este resultado inédito.

4.4 Atividade antioxidante

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, não existe um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisamente e quantitativamente. Assim, a busca por testes mais rápidos e eficientes tem gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres (ALVES, et al., 2010). O potencial antioxidante do extrato MeOH da resina de *Amburana cearensis* foi analisado através dos testes antirradicalares, com o radical ABTS e DPPH \cdot e teste antioxidante, com o sistema β -caroteno/ácido linoleico.

O extrato MeOH da resina de *Amburana cearensis* apresentou um valor de CE₅₀ de $6,1 \pm 0,06$ $\mu\text{g/mL}$, frente ao teste da atividade sequestradora de radical livre DPPH \cdot . Considerando que a resina contém diversas substâncias e que o ácido ascórbico, uma substância pura, apresentou CE₅₀ de $3,4 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$, o resultado encontrado é bastante promissor. Para o teste com o cátion radical ABTS $^{+}$, o extrato MeOH da resina apresentou um valor de CE₅₀ de $10,42 \pm 0,11$. Este resultado é considerado bom, visto que o trolox (padrão positivo) apresentou CE₅₀ = $2,27 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$. Os resultados evidenciam o potencial antirradicar da resina de *Amburana cearensis*.

O potencial antioxidante do extrato MeOH da resina foi avaliado através do teste com sistema β -caroteno/ácido linoleico. Como pode ser observada na Figura 16, no tempo de 60 minutos (tempo médio de análise) a resina apresentou atividade inibitória ($69,09 \pm 0,7\%$) quando comparado com o controle positivo Trolox ($90,29 \pm 1,1 \%$). Este mostrou capacidade de inibição da oxidação do β -caroteno, demonstrando assim, seu potencial antioxidante.

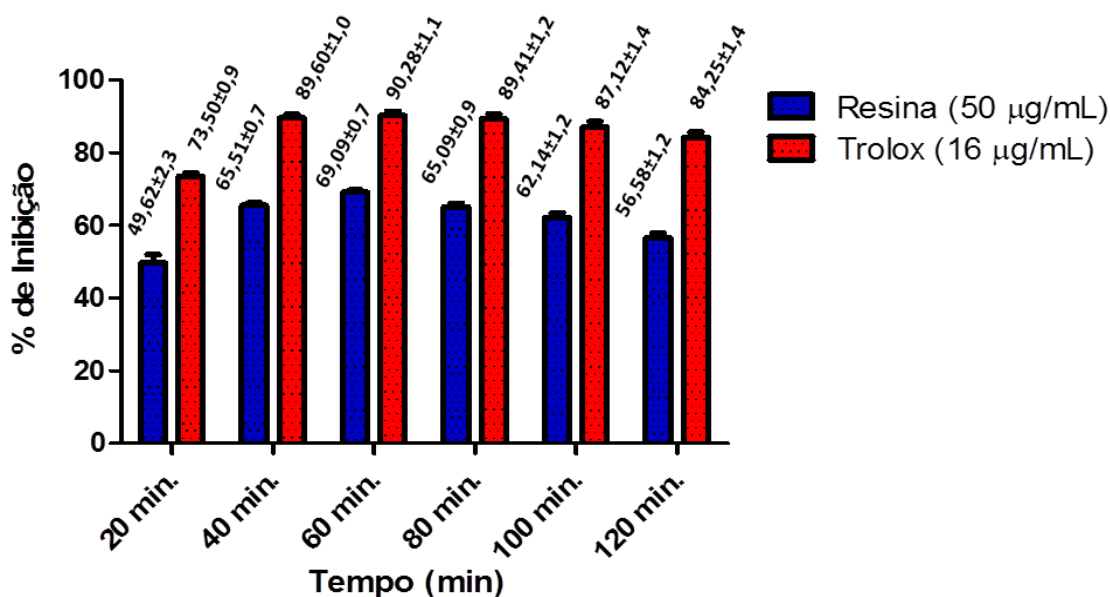


Figura 16. Atividade antioxidante (Sistema β -caroteno/ácido linoléico) do trolox (16 µg/mL) e do extrato metanólico da resina de *Amburana Cearensis* (50 µg/mL).

A atividade antioxidante apresentada pela resina pode ser atribuída à presença das chalconas, isoflavonas, quinona e isoflavonolignana isoladas neste trabalho, visto que diversos estudos já demonstraram o potencial antioxidante de chalconas (DOAN & TRAN, 2011; CAI et al., 2005; SIVAKUMAR et al., 2011; NARSINGHANI et al., 2013), incluindo isoliquiritigenina (**Re-10**) (VAYA et al., 1997), homobuteína (**Re-11**) (KOZLOWSKI et al., 2007) e buteína (**Re-6**). Esta última mostrou atividade frente aos radicais DPPH e hidroxila, além de atividade inibidora da peroxidação lipídica em fígado de rato (Wang et al., 2009).

A capacidade antioxidante de fenólicos, como isoflavonas, é relacionada ao número de grupos hidroxila presente na sua estrutura química e decresce com a

glicosilação ou a substituição do grupo hidroxila pelo grupo metoxila (NAIM et al., 1976). Compostos desta subclasse podem inibir a peroxidação lipídica *in vitro* por ação de sequestro de radicais livres ou por atuar como agentes quelantes de metais (COOK & SAMMAN, 1996). As isoflavonas odoratina (**Re-5**) e calicosina (**Re-4**) já são relatadas na literatura como antioxidantes (SHIRATAKI et al., 1997).

Estudos também propõem que compostos com núcleo quinona atuam como antioxidantes primários por adição do radical lipídico para formar um radical estabilizado, interrompendo a reação de cadeia de auto-oxidação (WENG & GORDON, 1992; PRASETYO et al., 2012). As substâncias da classe de flavonolignanas, como isoflavonolignanas também podem atuar como antioxidantes, em virtude da sua natureza fenólica (DEWICK, 2008).

Tendo em vista a quantidade de compostos fenólicos isolados neste trabalho e com base nos dados supracitados é justificável, portanto, a atividade antioxidante apresentada pela resina de *A. cearensis*.

5 CONCLUSÃO

A análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD da resina de *Amburana cearensis* mostrou que a mesma é rica em compostos fenólicos. O teor de fenólicos totais mostrou que a resina apresenta em sua constituição uma considerável quantidade de compostos fenólicos, como pôde ser comprovado pelo isolamento das substâncias.

O estudo da resina de *Amburana cearensis* resultou no isolamento de doze flavonoides, compreendendo um com núcleo quinona, três chalconas, sete isoflavonas e uma isoflavonolignana.

A isoflavona 3'- Hidroxi- 7,8,4'-trimetoxiisoflavona (**Re-9**) e a isoflavonolignana (**Re-7**) merecem destaque por serem inéditas.

Os testes antirradicais (radical livre DPPH[·] e cátion radical ABTS^{·+}) evidenciaram o potencial da resina de *A. cearensis* de sequestrar radicais livres e o teste antioxidante (Sistema β -caroteno/ácido linoléico) mostrou seu potencial de inibir a oxidação do β -caroteno.

Deve-se ressaltar também que até o momento não haviam sido relatados na literatura dados sobre teor de fenólicos totais da resina de *A. cearensis*.

Além da relevância dos resultados supracitados pode-se destacar ainda a contribuição dada para o conhecimento da composição química tanto da resina como da espécie de *A. cearensis*, assim como para aumentar o acervo de substâncias isoladas de produtos naturais.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, C. A. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do Conteúdo Fenólico e Avaliação da Atividade Antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(2): 231-235, 2007.

ALMEIDA, E. R.; SILVA-FILHO, A. A. A.; SANTOS, E. R.; LOPES, C. A. J. Antiinflammatory action of lapachol. **Journal of Ethnopharmacology**, 29(2): 239-241, 1990.

ALMEIDA, J. R. G. S.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, J. S.; SANTOS, R. V.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. *Amburana cearensis*– uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, 6(11): 1-8, 2010.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; MARCUS V. BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de Atividade Antioxidante *in Vitro* em substratos Orgânicos. **Quimica Nova**, 33(10): 2202-2210, 2010.

ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66(1): 232-240, 2007.

ARUOMA, O. I. Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants in Human Health and Disease. **Journal of American Oil Chemists Society**, 75(2): 199–212, 1998.

ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini reviews in Medicinal Chemistry**, 5(5): 449 - 467, 2005.

BANDEIRA, P. N.; FARIAS, S. S.; LEMOS, T. L. G; BRAZ-FILHO, R.; SANTOS, H. S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; COSTA, S. M. O. New Isoflavone Derivative and Other Flavonoids from the Resin of *Amburana cearensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 22(2): 372-375, 2011.

BARBOSA, T. P.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; MARTINS, R. M.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D. New 1,2,3,4-tetrahydro-1-aza-anthraquinones and 2-aminoalkyl compounds from norlapachol with molluscicidal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 13(23): 6464-6469, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S. **Constituintes químicos bioativos de *Dioclea violacea***. 2005. 307 p. Tese (Doutorado em Química) -Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, 219(6): 561-571, 2004.

BEZUIDENHOUT, S. C.; BEZUIDENHOUDT, B. C. B.; BRANDT, E. V.; FERREIRA, D. Oligomeric isoflavonoids. Part 2. Structure and synthesis of xanthocercin A and B, the first isoflavono-lignoids. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, 1237-1241, 1988.

BORGES, L. L.; LUCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E.F. Uma Abordagem sobre Metodos Analiticos para Determinacao da Atividade Antioxidante em Produtos Naturais. **Enciclopedia Biosfera**, 7(12): 1-20, 2011.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M.L.; PIRO, O.E.; CASTELLANO, E.E.; VIDAL, A. AZQUETA, A. MONGE, A. DE CERÁIN, A.L.; SAGRERA, G. SEOANE, G. CERECETTO, H. GONZÁLEZ, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15: 3356-3367, 2007.

CAI, Y. Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, 78: 2872 – 2888, 2006.

CANUTO, K. C.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E. Estudo Fitoquímico de Espécimens Cultivados de Cumaru (*Amburana cearensis* A. C. SMITH). **Quimica Nova**, 33 (3): 662-666, 2010.

CANUTO, K. M.; LEAL, L. K. A. M.; LOPES, A. A.; COLEMAN, C. M.; FERREIRA, D.; SILVEIRA, E. R. Amburanins A and B from *Amburana cearensis*: daphnodorin-Type Biflavonoids that Modulate Human Neutrophil Degranulation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 25(4): 639-647, 2014.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Constituintes Químicos da Casca do Caule de *Amburana cearensis* A.C. SMITH. **Quimica Nova**, 29(6): 1241-1243, 2006.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E.; LEAL, L. K. A. M. e VIANA, G. S. B. Uso de Plantas Jovens de *Amburana cearensis* A. C. Smith: Alternativa para Preservação e Exploração Econômica da Espécie. **Embrapa Semi-árido**. Documento 208, 24 p, 2008.

CHEDEA, V. S.; BRAICU, C.; SOCACIU, C. Antioxidant/prooxidant Activity of a Polyphenolic Grape seed Extract. **Food Chemistry**, 121: 132–139, 2010.

CLARK-LEWIS, J. W.; PORTER, L. J. Phytochemical survey of heartwood flavonoids of *Acacia* species from arid zones of Australia. **Australian Journal of Chemistry**, 25: 1943-1948, 1972.

COOK, N. S.; SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effect and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 7(2): 66-76, 1996.

COSTA-LOTUFO, L. V.; JIMENEZ, P. C.; LEAL, L. K. A. M.; CUNHA, G. M. A.; SILVEIRA, E. R.; DIEGO, V.; WILKE, D. V. W.; CANUTO, K. M.; GLAUCE, S. B.; VIANA, G. B. V.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, P. Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Zeitschrift Fur Naturforschung**, 58: 675-680, 2003.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3^a ed. Editora WILEY, 2009.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, 17: 505–512, 2006.

DOAN, T. N.; TRAN, D. T. Synthesis, Antioxidant and Antimicrobial Activities of a Novel Series of Chalcones, Pyrazolic Chalcones, and Allylic Chalcones. **Pharmacology & Pharmacy**, 2: 282-288, 2011.

EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. Antioxidant Capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro Antioxidant Activity and Contents of Phenolic and Tocol Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47: 4894–4898, 1999.

GARNIER, S.; WOLFENDER, J. L.; NIANGA, M.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. **Phytochemistry**, 42(5): 1315-1320, 1996.

GULCIN, I.; SAT, I. G.; BEYDEMIR, S.; ELMASTAS, M.; KUFREVIOGLU, O. I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**. 87 (3): 393-400, 2004.

HALLIWELL, B. The Antioxidant Paradox. **The Lancet**, 355: 1179-1180, 2000.

HARBONE, J. B.; MARY, T.; MABRY, H. The flavonoids. **Academic Press**, New York, 1975.

HARPER, S. H.; SHIRLEY, D. B.; TAYLOR, D. A. Isoflavones from *Xanthocercis zambesiaca*. **Phytochemistry**, 15: 1019-1023, 1976.

HARVEY, A. L. Natural Products as a Screening Resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, 11: 480–484, 2007.

HAYASHI, T.; THOMSON, R. H. Isoflavones from *Dipteryx odorata*. **Phytochemistry**, 13: 1943-1946, 1974.

HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53(6): 1841-1856, 2005.

JANG, D. S.; PARK, E.J. HAWTHORNE, M. E.; VIGO, J.S.; GRAHAM, J. G.; FERNANDO CABIESES, F.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D. HARRY H. S. FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; JOHN M. PEZZUTO, J. M.; A. DOUGLAS KINGHORN, A. Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Seeds of *Dipteryx odorata* (Tonka Bean). **American Chemical Society and American Society of pharmacognosia**, 66 (5): 583-587, 2003.

KOZLOWSKI, D.; TRUILLAS, P.; CALLISTE, C.; MARSAL, P.; LAZZARONI, R.; DUROUX, J. L. Density functional theory study of the conformational, electronic and antioxidant properties of natural chalcones. **Journal of Physical Chemistry A**, 111: 1138-1145, 2007.

KUROSAWA, K.; DAVID OLLIS, W.; SUTHERLAND, L.O.; GOTTLIEB, O.R.; DE OLIVEIRA, A.B. Mucronulatol, mucroquinone and mucronucarpin, isoflavonoides from *Machaerium mucronulatum* and *M. villosum*. **Phytochemistry**, 17: 1405-1411, 1978.

LAHTCHEV, K.L.; BATOVSKA, D.I.; PARUSHEV, S.P.; UBIYVOVK, V.M.; SIBIRNY, A.A. Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 43(10): 2220-2228, 2008.

LAVOLA, A. Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. **Tree Physiology**, 18: 53-58, 1998.

LEAL, L. K. A. M.; CANUTO, K. M.; COSTA, K. V. N.; NOBRE-JÚNIOR, H. V.; VASCONCELOS, S. M.; SILVEIRA, E. R.; FERREIRA, M. V. P.; FONTENELE, J. B.; ANDRADE, G. M.; VIANA, G. S. B. Effects of Amburoside A and Isokaempferide, Polyphenols from *Amburana cearensis*, on Rodent Inflammatory Processes and Myeloperoxidase Activity in Human Neutrophils. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 104: 198–205, 2009.

LEAL, L. K. A. M.; COSTA, M. F.; PITOMBEIRA, M.; BARROSO, V. M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B. Mechanisms Underlying the Relaxation Induced by Isokaempferide from *Amburana cearensis* in the Guinea-pig Isolated Trachea. **Life Sciences Elmsford**, 79: 98-104, 2006.

LEAL, L. K. A. M.; FONSECA, F. N.; FÁBIO AZEVEDO PEREIRA, F. A. P.; CANUTO, K. M.; FELIPE, C. F. B.; FONTENELE, J. B. F.; PITOMBEIRA, M. V.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, G. S. B. Protective Effects of Amburoside A, a Phenol Glucoside from *Amburana cearensis*, against CCl₄-Induced Hepatotoxicity in Rats. **Planta Medica**, 74: 497–502, 2008.

LEAL, L. K. A. M.; NOBRE-JÚNIOR, H. V.; CUNHA, G. M. A.; MORAES, M. O., PESSOA, C.; OLIVEIRA, R. A.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B.; Amburoside A, a Glucoside from *Amburana cearensis*, Protects Mesencephalic Cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Euroscience Letters Limerick**, 388: 86-90, 2005.

LEAL, L. K. A. M.; PIERDONÁ, T. M.; GÓES, J. G. S. FONSÊCA, K. S.; CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E.; VIANA, G. S. B. A comparative Chemical and Pharmacological Study of Standardized Extracts and Vanillic Acid from wild and Cultivated *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Phytomedicine**, 18: 230–233, 2011.

LEAL, L.K.M.; NECHIO, M.; SILVEIRA, E.R.; CANUTO, K.M.; FONTENELE, J.B.; RIBEIRO, R.A.; VIANA, G.S.B. Anti-inflammatory and Smooth Muscle Relaxant Activities of the Hydroalcoholic Extract and chemical Constituents from *Amburana cearensis*. **Phytotherapy Research**, 17: 335-340, 2003.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D.B. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. **Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety**. 3: 21-33, 2004.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D. Leguminosae or Fabaceae? In: B.B. Klitgaard and A. Bruneau (editors). *Advances in Legume Systematics*, part 10, Higher Level Systematics. **Royal Botanic Gardens**, Kew. pp 1-3, 2003.

LI, N.; ZHANG, G.; XIONG, Y.; MAKHABEL, B.; LI, X.; JIA, X. New isoflavonolignan with quinone reductase inducing activity from *Alhagi pseudalhagi* (M.B.). **Fitoterapia**, 81: 1058–1061, 2010.

LIN, C.-N.; LEE, T.-H.; HSU, M.-F.; WANG, J.-P.; KO, F.-N.; TENG, C.-M. 2',5'-Dihydroxychalcone as a Potent Chemical Mediator and Cyclooxygenase Inhibitor. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 49: 530–536, 1997.

LIN, L.-Z.; HARNLY, J.; ZHANG, R.-W.; FAN, X.-E.; CHEN, H.-J. Quantitation of the Hydroxycinnamic Acid Derivatives and the Glycosides of Flavonols and Flavones by UV Absorbance after Identification by LC-MS. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 60: 544–553, 2012.

MA, K.; ISHIKAWA, T.; SEKI, H.; FURIHATA, K.; UEKI, H.; NARIMATSU, S.; HIGUCHI, Y.; CHAICHANTIPYUTH, C. Isolation of new isoflavonolignans, butesuperins A and B, from a Thai miracle herb, *Butea superba*. **Heterocycles**, 65: 893-900, 2005.

MARINHO, M. G. V.; BRITO, A. G.; CARVALHO, K. A.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; ANDRADE, L. H. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R. *Amburana cearensis* e Cumarina Imunomodulam os Níveis de Anticorpos Antígeno-específico em Camundongos BALB/c Sensibilizados com Ovalbumina. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 23: 47-52, 2004.

MARKHAM, K. R. Techniques of Flavonoid Identification. London: Academic Press. 1982.

MARKHAM, K.R.; TERNAI, B. ^{13}C NMR Of Flavonoids – II: Flavonoids Other Flavone and Flavonol Aglycones. **Tetrahedron**, 32: 2607-2612, 1976.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, 72: 145-171, 2001.

MURTHY, M. S. R.; RAO, E. V.; WARD, R. S. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Isoflavones. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 24: 225-230, 1986.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; BONDI, A.; BIRK, Y. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 24(6): 1174-1177, 1976.

NARSINGHANI, T.; SHARMA, M. C.; SAKSHI, B. Synthesis, docking studies and antioxidant activity of some chalcone and aurone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, 22: 4059–4068, 2013.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHØNNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones – bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 12: 3047–3054, 2004.

NOWAKOVSKA, Z. "A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones", **European Journal of Medicinal Chemistry**, 42: 125-137, 2007.

ORLIKOVA, B.; SCHNEKENBURGER, M.; ZLOH, M.; GOLAIS, F.; DIEDERICH, M.; TASDEMIR, D. Natural chalcones as dual inhibitors of HDACs and NF-K κ B. **Oncology Reports**, 28: 797-805, 2012.

PRACHAYASITTIKUL, S.; BURAPARUANGSANG, P.; WORACHARTCHEEWAN, A.; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. **Molecules**, 13:904-921, 2008.

PRASETYOA, E. N.; KUDANGAA, T.; STEINERB, W.; MURKOVIC, M.; NYANHONGO, G. S.; GUEBITZ, G. M. Laccase-generated tetramethoxy azobismethylene quinone (TMAMQ) as a tool for antioxidant activity measurement. **Food Chemistry**, 118: 437–444, 2010.

PRIOR, R.L.; WU, X.L.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53(10): 4290-4302, 2005.

PUEBLA, P., OSHIMA-FRANCO, Y., FRANCO, L. M., SANTOS, M. G., SILVA, R. V., RUBEM-MAURO, L., FELICIANO, A. S. Chemical Constituents of the Bark of *Dipteryx alata* Vogel, an Active Species against *Bothrops jararacussu* Venom. **Molecules**, 15: 8193-8204, 2010.

RAO, E. V.; MURTHY, M. S. R.; WARD, R. S. Nine isoflavones from *Tephrosia máxima*. **Phytochemistry**, 23(7): 1493-1501, 1984.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. V. R. Role of Antioxidants in Prophylaxis and Therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, 113: 189-207, 2006.

RAZDAN, T. K.; KACHROO, P.K.; QADRI, B.; KALLA, A. K.; TANEJA, S. C.; KOUL, S. K.; DHAR, K. L. Isocladrastin and Kashmirigenin – two isoflavones from *iris kashmiriana*. **Phytochemistry**, 41 (3): 947-949, 1996.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorisation Assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26: 1231–1237, 1999.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; FILHO, M. J.; MOREIRA, A. V. B. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema β -caroteno/Ácido linoléico. **Comunicado Técnico 126 - EMBRAPA**, Fortaleza, 2006.

SANTANA, A. L. B. D. **Estudo Químico, Antitermítico e Antifúngico da madeira de lei *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb.) von Reis Alt. (Angico-de-Caroço)**. 2011. 187f. Tese (doutorado em Química) – Centro de Ciências Exatas da Natureza, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SANTOS, A. F.; FERRAZ, P. A. L.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. **International Journal for Parasitology**, 30(11): 1199- 1202, 2000.

SANTOS, A. M.; DANTAS, I. C. Possíveis Efeitos Tóxicos das Plantas que Constituem a Bebida “pau-do-índio”. **Biologia e Farmácia**, 2(2): 63-81, 2008.

SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 68 (6): 1333-1346, 1998.

SHIRATAKI, Y.; TAKAO, M.; YOSHIDA, S.; TODA, S. Antioxidative Components Isolated from the Roots of *Astragalus membranaceus* Bunge (*Astragali Radix*). **Phytotherapy Research**, 11: 603–605, 1997.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, 26(3): 407-416, 2003.

SILVA, T. H. A; BUTERA, A. P; LEAL, D. H. S; ALVES, R. J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese: modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta_3$. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 43(1): 1-17, 2007.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M.; SANTOS, F. A. R. Chemical Composition and Free Radical Scavenging Activity of Pollen loads from Stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19: 507–511, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. e PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre: editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SIVAKUMAR P. M., PRABHAKAR P. K., DOBLE M. Synthesis, antioxidant evaluation, and quantitative structure-activity relationship studies of chalcones. **Medicinal Chemistry Research**, 20(4): 482–492, 2011.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. **American Journal Enology and Viticulture**. 28: 49-55, 1977.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. 15: 71-81, 2002.

SOCORRO, M. P.; PINTO, A. C.; KAISER, C. R. New Isoflavonoid from *Dipterix odorata*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, 58b: 1206-1209, 2003.

SOUSA; C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR.; G. M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS; E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de cinco Plantas Mediciniais. **Química Nova**, 30: 2, 2007.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: coletânea científica**. Ouro Preto, editora: UFOP, 2011.

SUN, T.; HO, C. T. Antioxidant Activities of Buckwheat Extracts. **Food Chemistry**, 90: 743–749, 2005.

TEIXEIRA, M. J.; ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; HOLANDA FILHA, J. G.; RODRIGUES, T. P.; PRATA, J. R. C. JR.; COELHO, I. C. B.; RAO, V. S. POMPEU, M. M. L. In vitro and in vivo Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). **Phytotherapy Research**, 15(1): 44-48, 2001.

VAYA, J.; BELINKY, P. A.; AVIRAM, M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, Structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, 23(2): 302-313, 1997.

WANG, X. Y.; SHI, H. M.; ZHANG, L.; LI, X. B. A New Chalcone Glycoside, a New Tetrahydrofuranoid Lignan, and Antioxidative Constituents from the Stems and Leaves of *Viburnum propinquum*. **Planta Medica**, 75: 1262–1265, 2009.

WENG, X. C.; GORDON, M. H. Antioxidant Activity of Quinones Extracted from Tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40: 7331-1336, 1992.

WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M. J. A Phylogeny of Legumes (leguminosae) Based on Analysis of the Plastid Matk Gene Resolves many Well-supported Subclades Within the Family. **American Journal of Botany**, 91(11): 1846–1862, 2004.

YANG, R.; LAN, Y.; HUANG, Z.; SHAO, C.; LIANG, H.; CHEN, Z.; JUN LI. A New Isoflavonolignan Glycoside from the Roots of *Sophora Tonkinensis*. **Records of Natural Products**, 6 (3): 212-217, 2012.

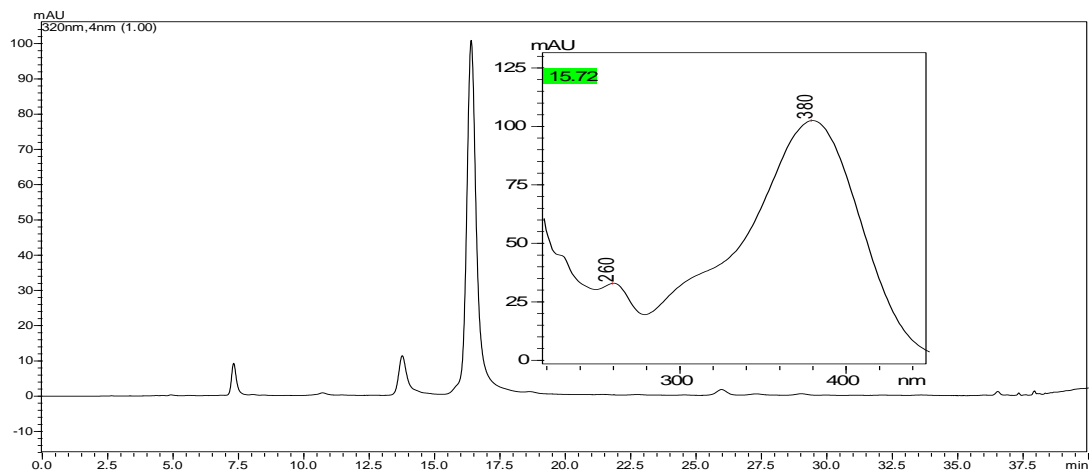
ZHANG, Z.; LIU, G. M.; WANG, Y. H.; LI, C. S.; REN, Y. L.; XIAO, H.; HAO, X. J.; HE, H. P. A new isoflavonolignan from *Pueraria alopecuroides* Craib. **Chinese Chemical Letters**, 18: 297–299, 2007.

ANEXOS

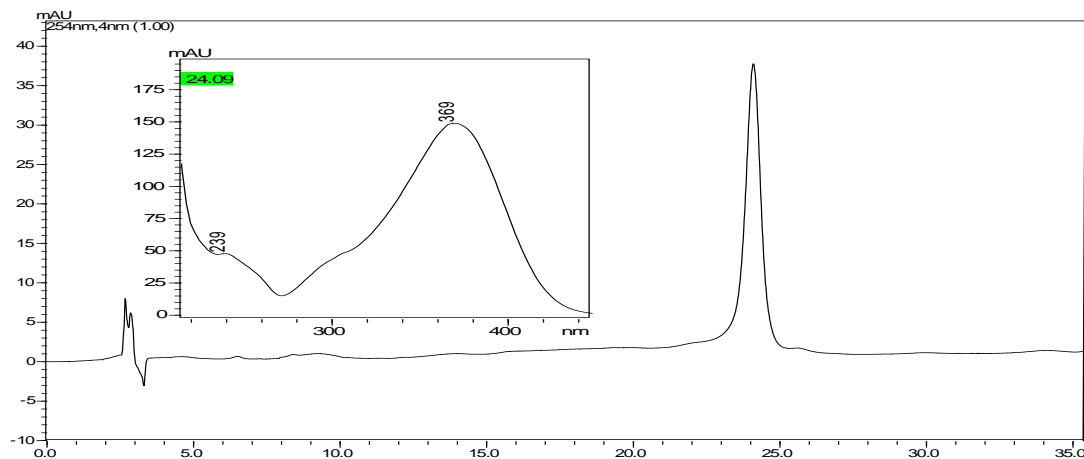
ANEXO A

(Cromatogramas das substâncias isoladas da resina de *Amburana cearensis*)

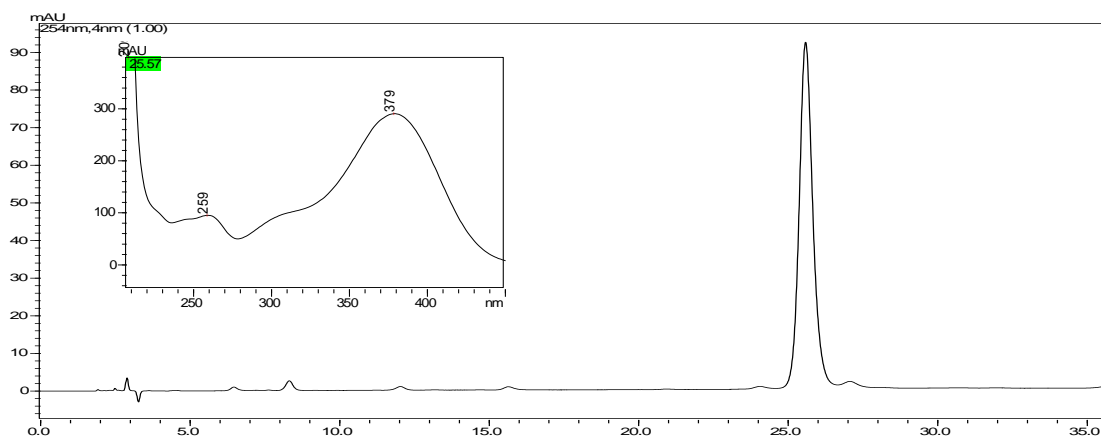
❖ Chalconas (Re-6, Re-11 e Re-10)



Cromatograma 1 - Cromatograma (CLAE-DAD, 320 nm) e UV da substância Re-6

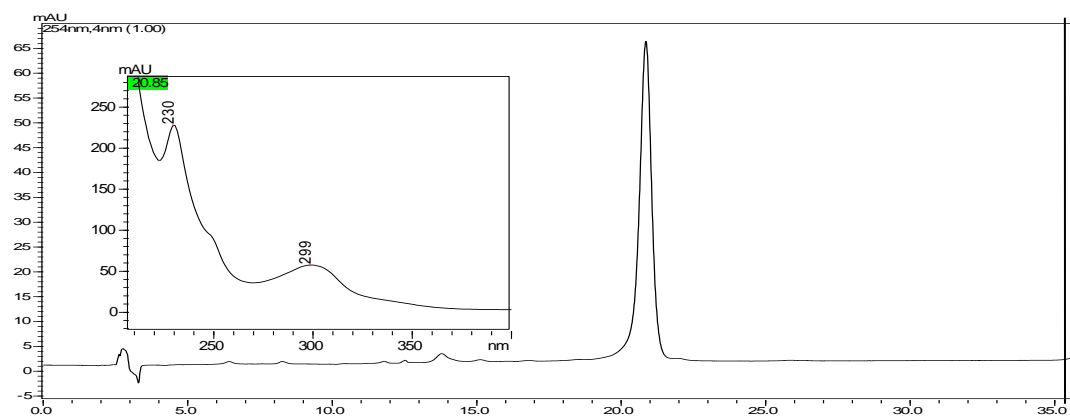


Cromatograma 2 - Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) e UV da substância Re-10.



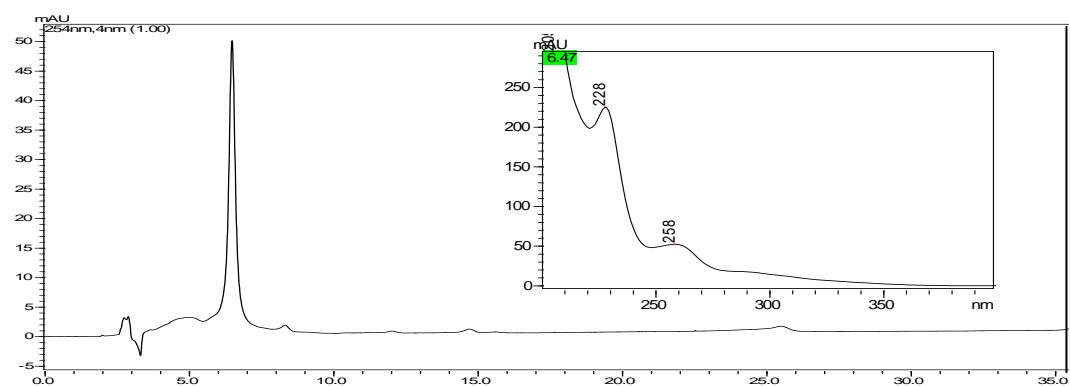
Cromatograma 3 - Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) e UV da substância Re-11.

❖ Quinona (Re-8)

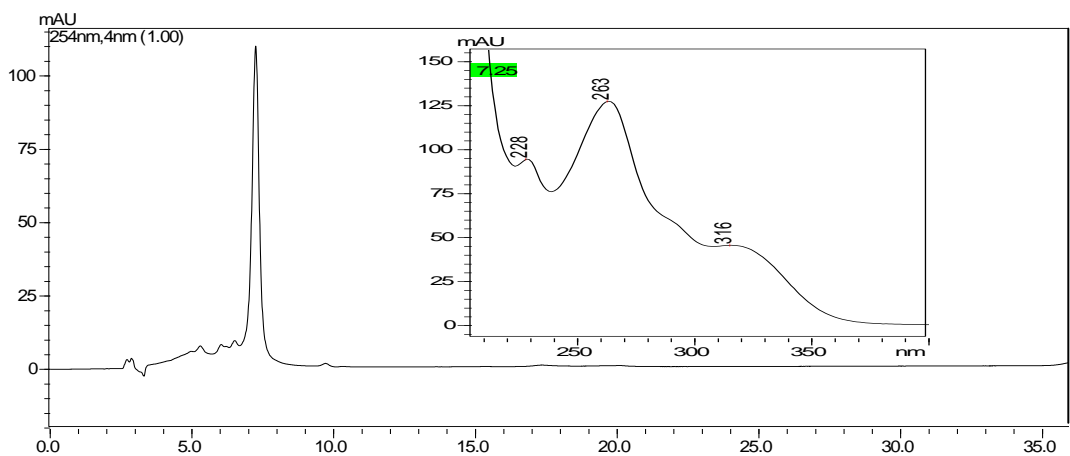


Cromatograma 4 - Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) e UV da substância Re-8.

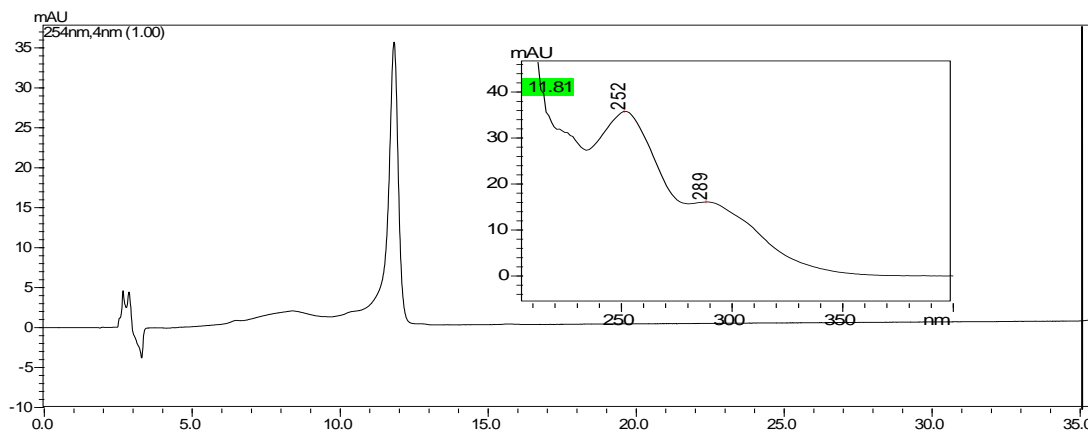
❖ Isoflavonas (Re-1, Re-2, Re-3, Re-4, Re-5, Re-9 e Re-12)



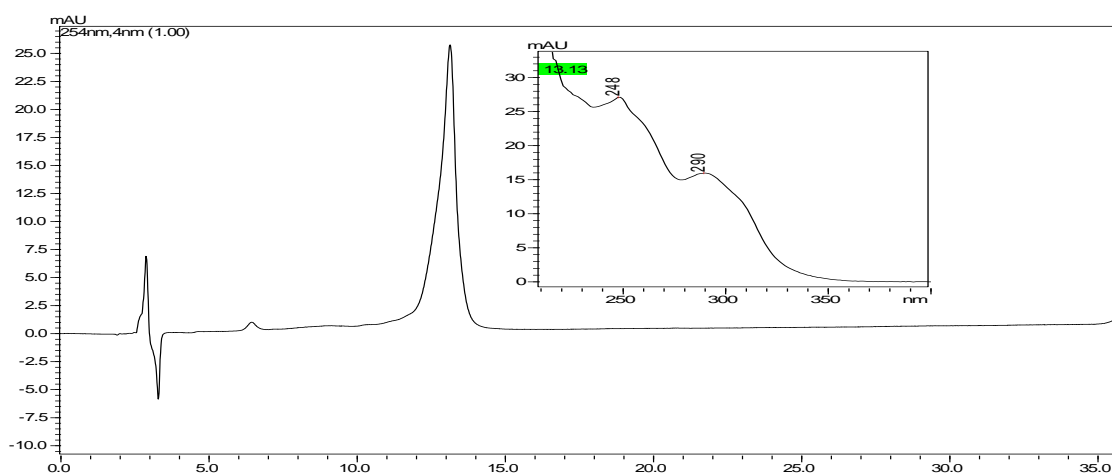
Cromatograma 5 - Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) e UV da substância Re-1.



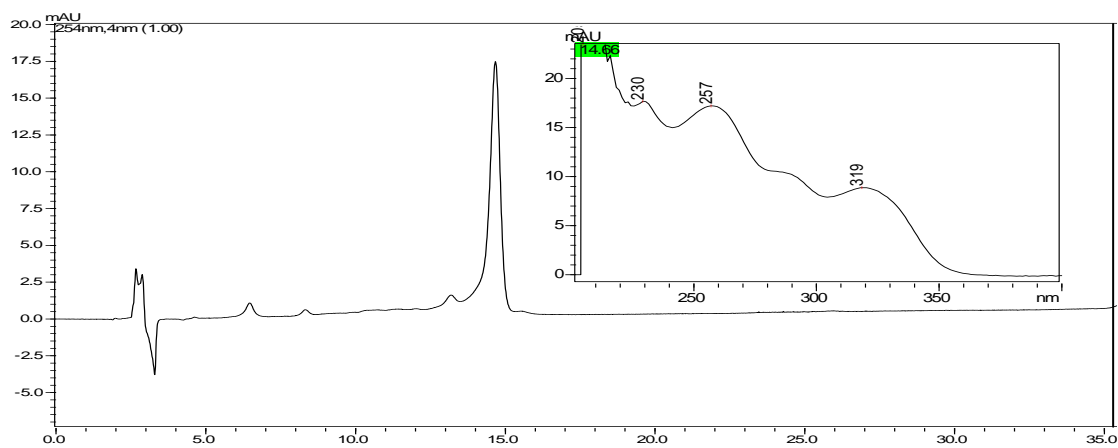
Cromatograma 6 - Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) e UV da substância Re-2.



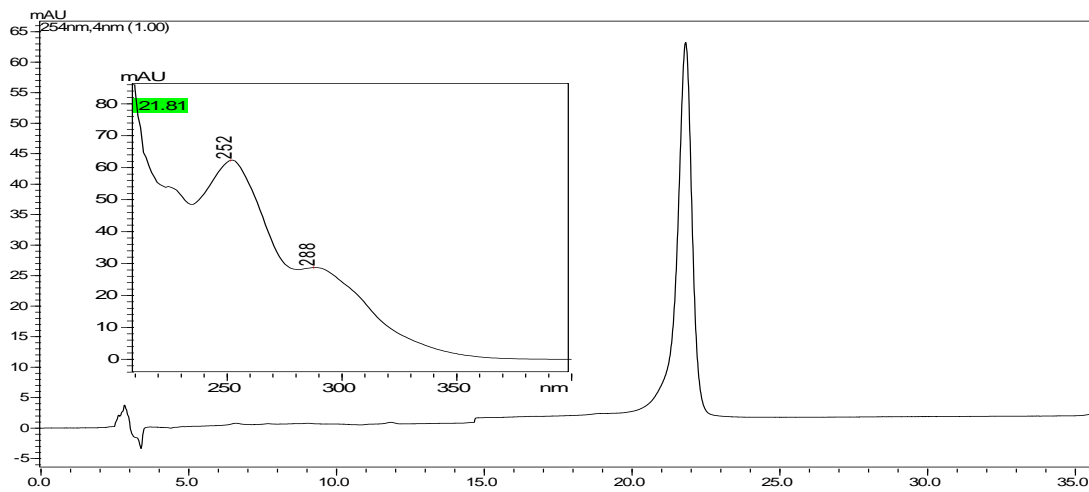
Cromatograma 7 - Cromatograma CLAE-DAD (254 nm) e UV da substância Re-3.



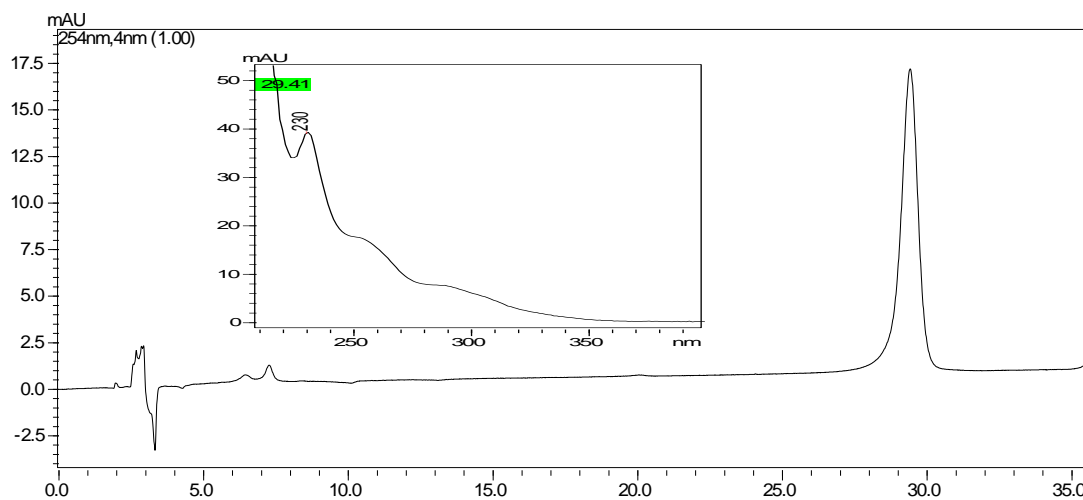
Cromatograma 8 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD (254nm) da substância Re-4.



Cromatograma 9 - Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) e espectro UV da substância Re-5.

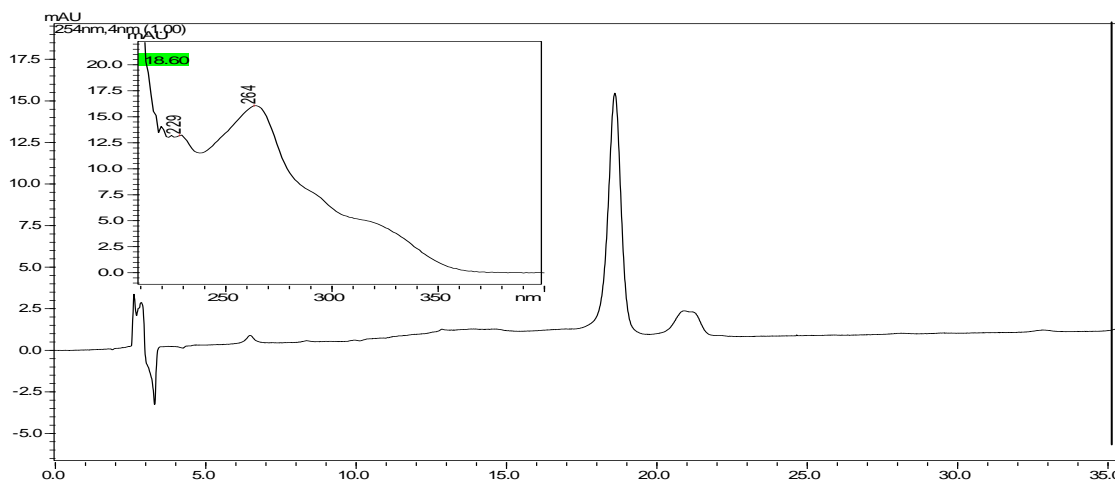


Cromatograma 10 - Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) da substância Re-9.



Cromatograma 11 - Cromatograma (CLAE-DAD 254 nm) e espectro UV da substância Re-12.

❖ Isoflavonolignana (Re-7)



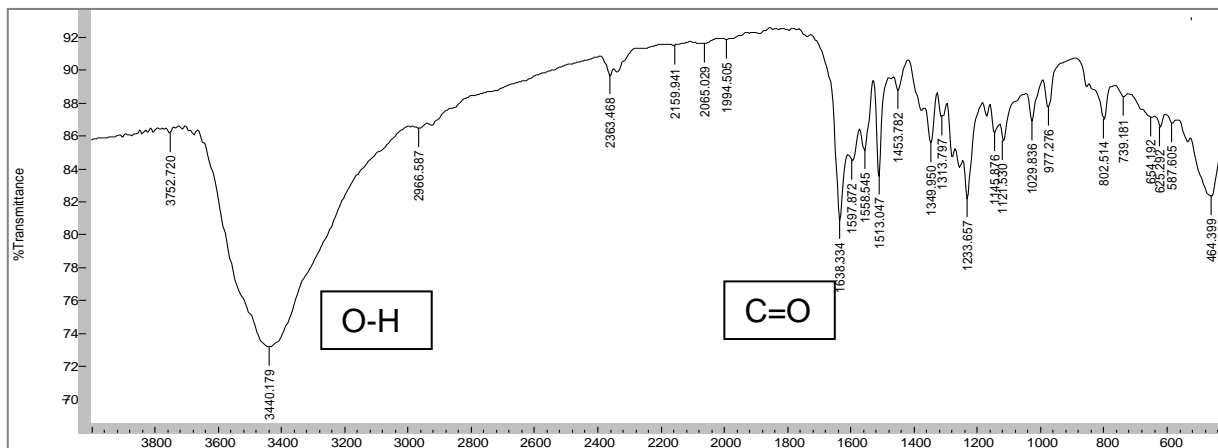
Cromatograma 12 - Cromatograma (CLAE-DAD 254 nm) e espectro UV da substância Re-7.

ANEXO B

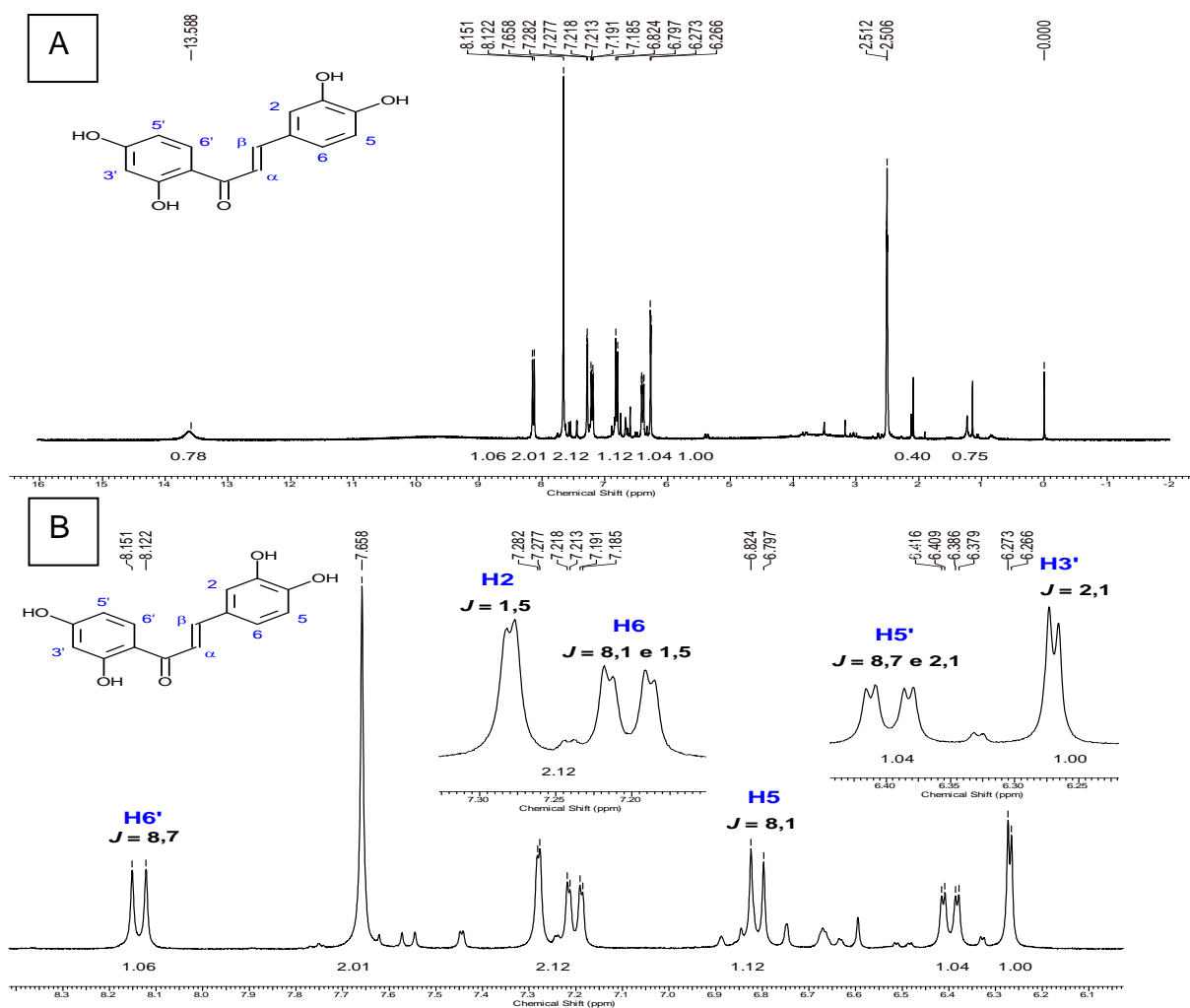
(Espectros das substâncias isoladas da resina de *Amburana cearensis*)

❖ Espectros das Chalconas (Re-6, Re-11 e Re-10)

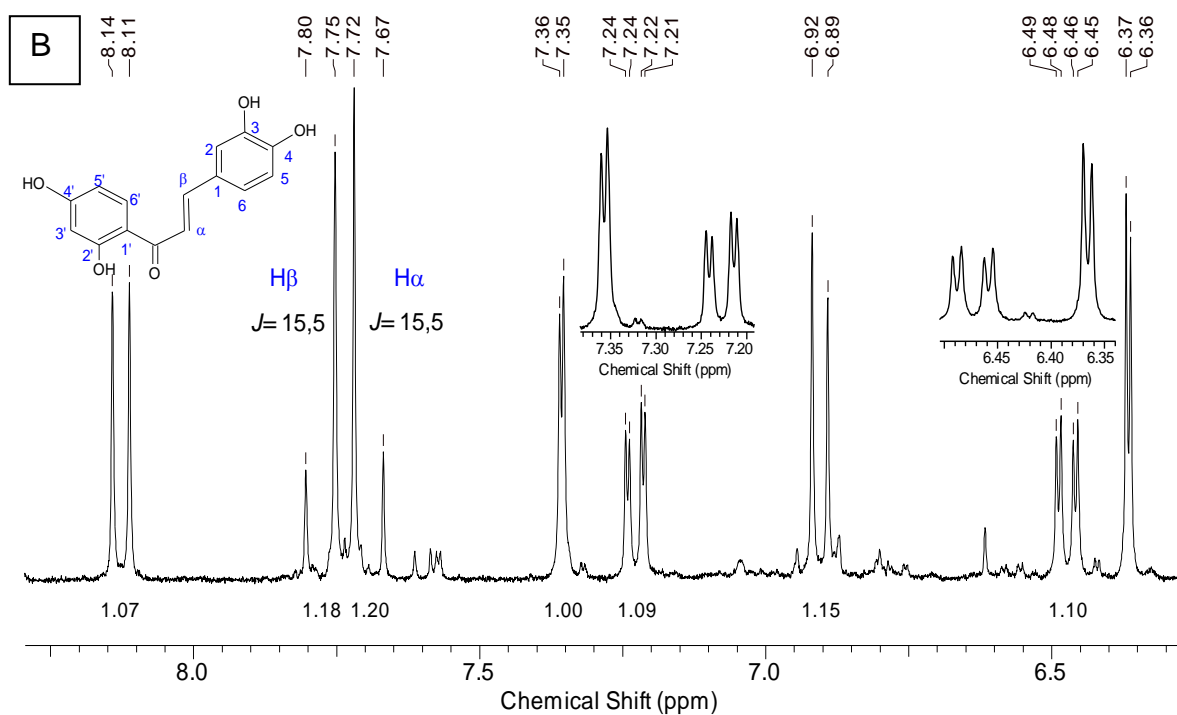
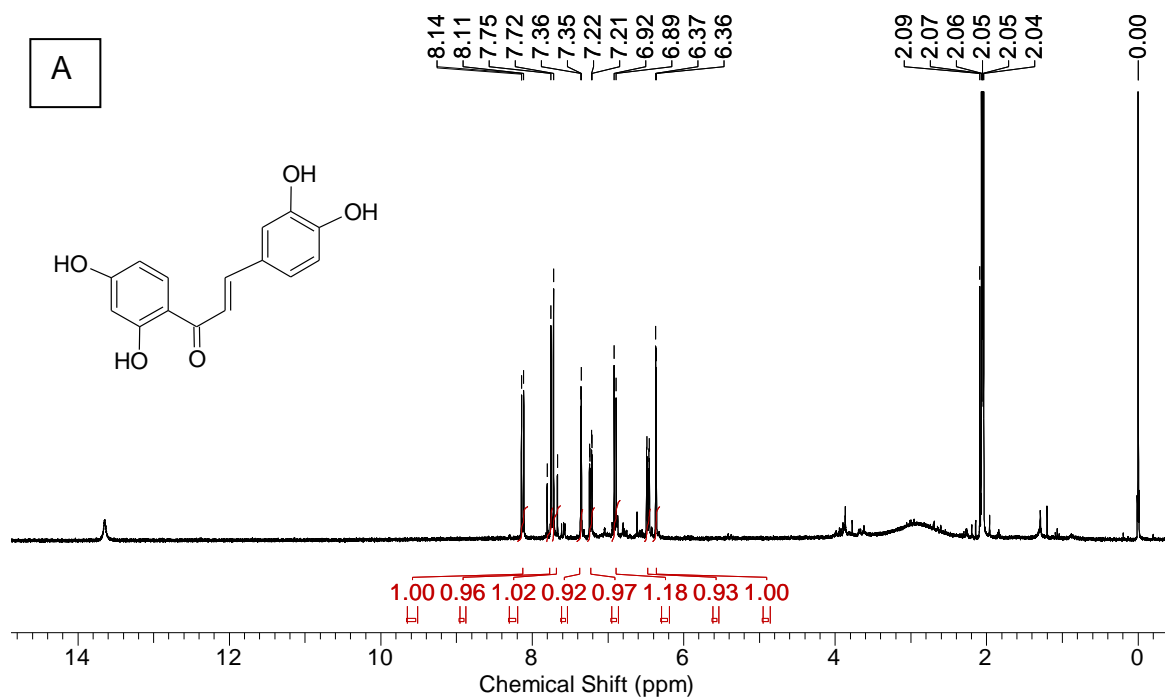
➤ Chalcona Re-6



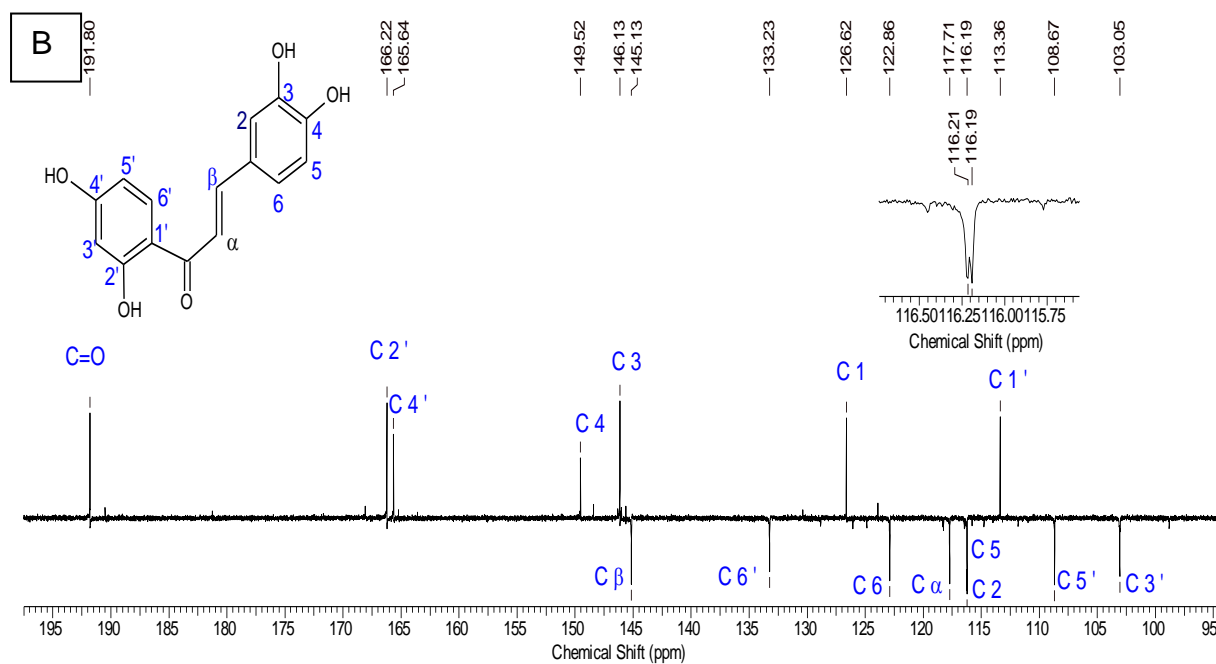
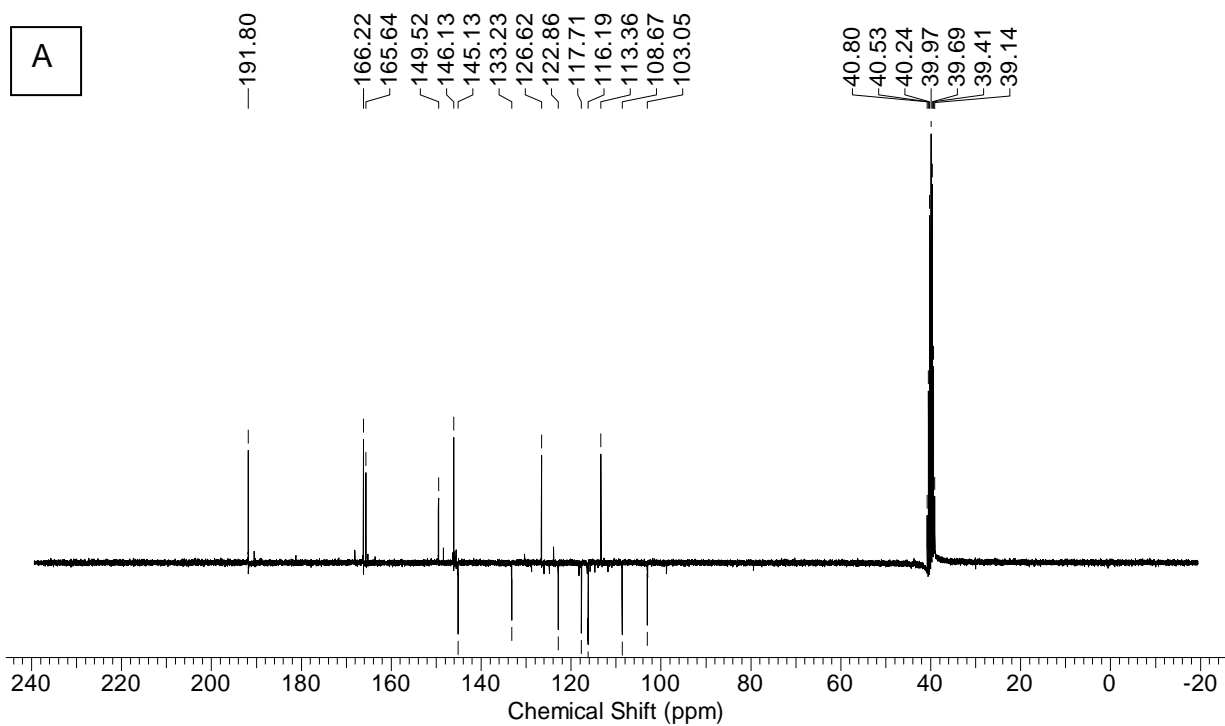
Espectro 1 - Espectro de IV (pastilha de KBr) da substância 6



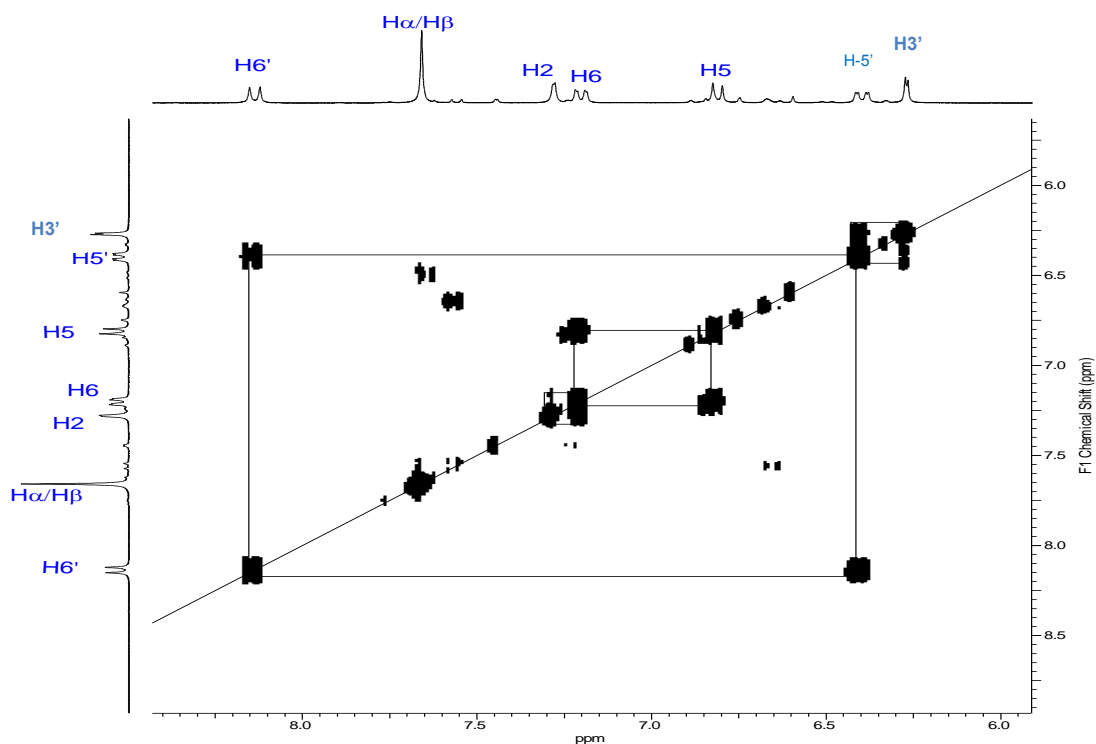
Espectro 3 - Espectro de RMN de ^1H de Re-6 em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) (A), expansão (B).



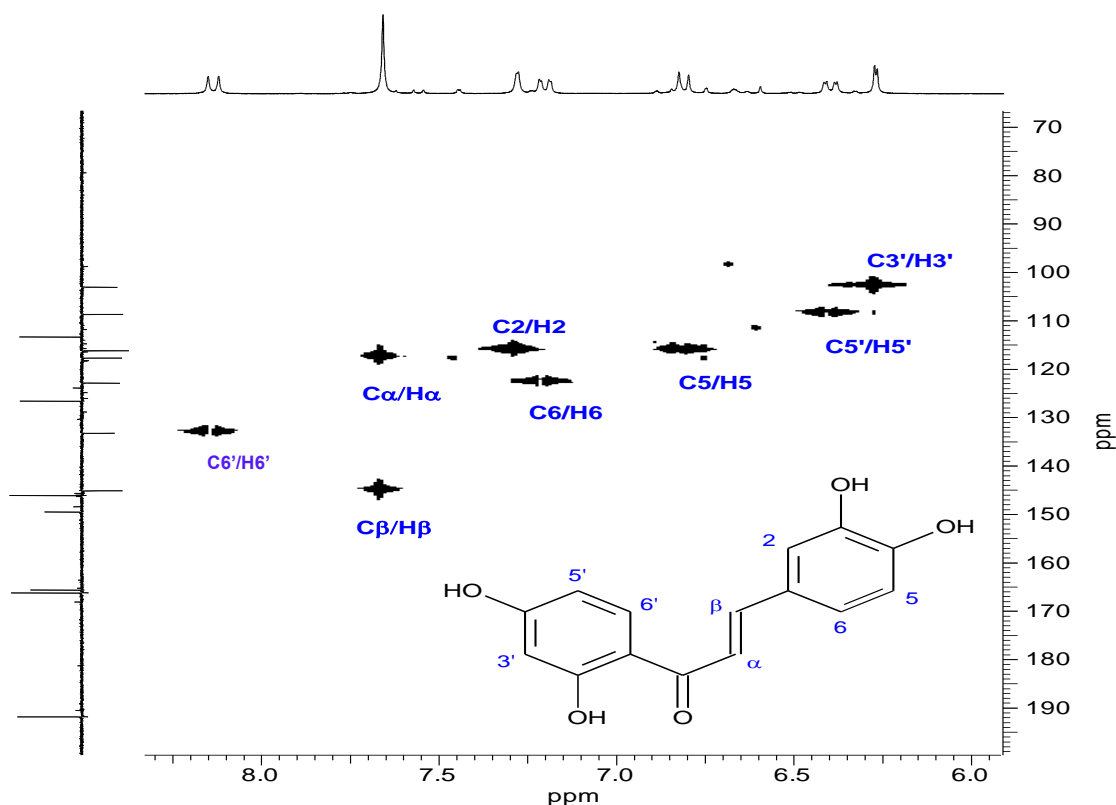
Espectro 3 - Espectro de RMN de ^1H de **Re-6** em Acetona- d_6 (300 MHz) (**A**). Expansão (**B**)



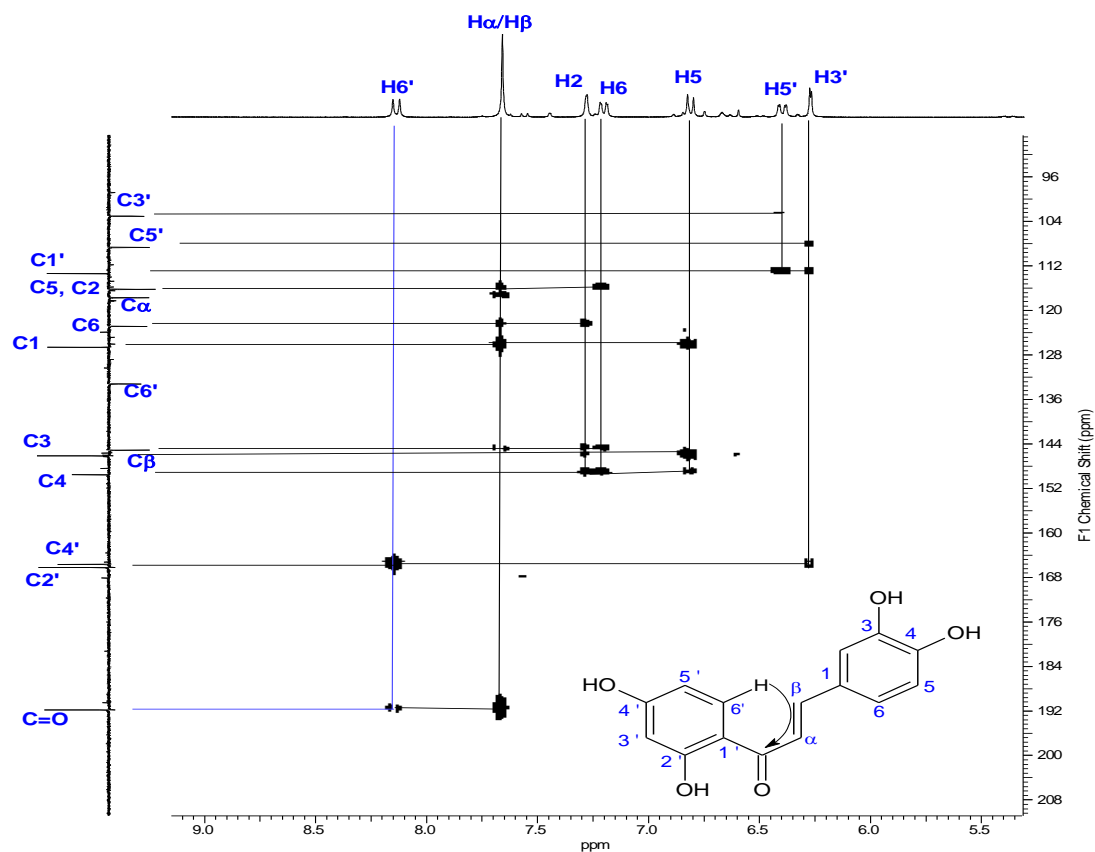
Espectro 4 - Espectro de APT de **Re-6** em $\text{DMSO-}d_6$ (75 MHz) (**C** – para cima e **CH** – para baixo)
(A). Expansão (B).



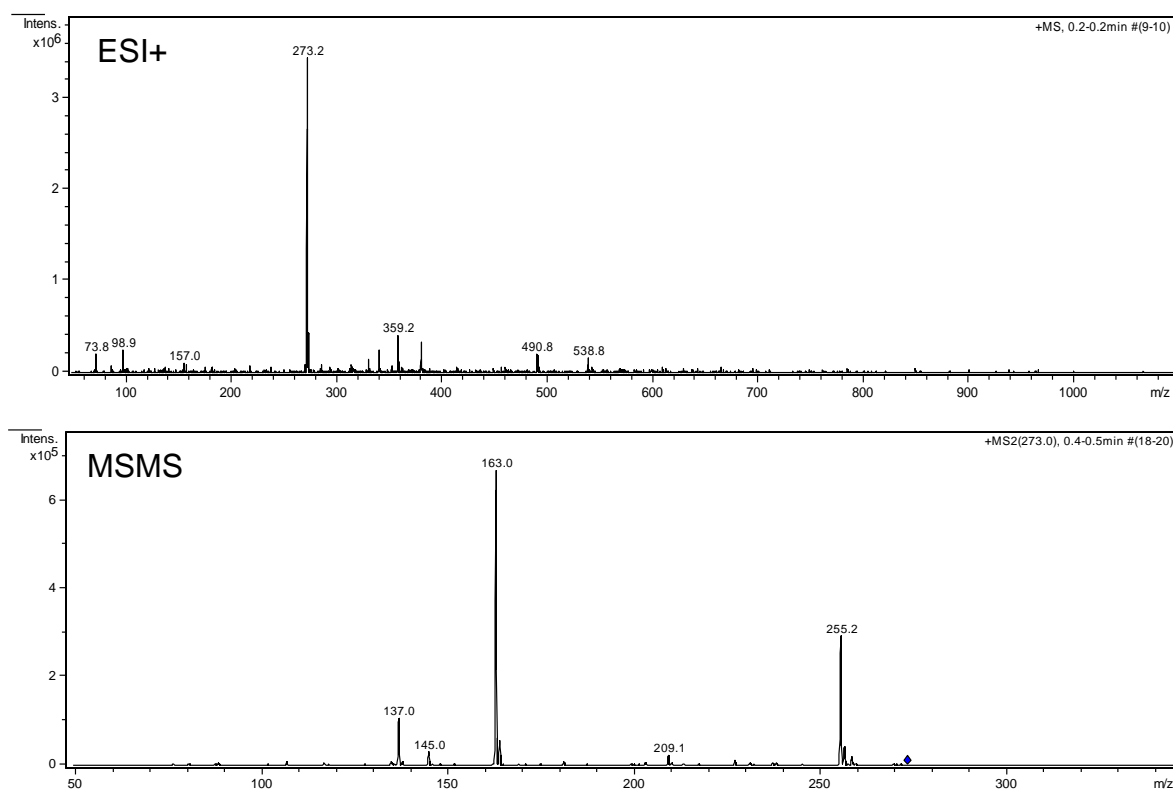
Espectro 5 - Espectro de COSY de **Re-6** em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz). Expansão em campo baixo.



Espectro 6 - Espectro de HMBC de **Re-6** em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

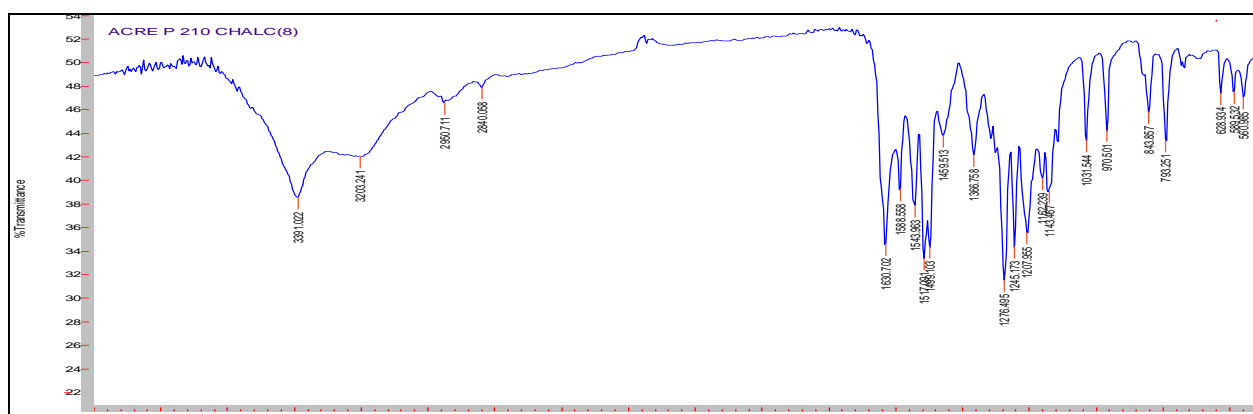


Espectro 7 - Espectro de HMBC de Re-6 em DMSO- d_6 (300 MHz).

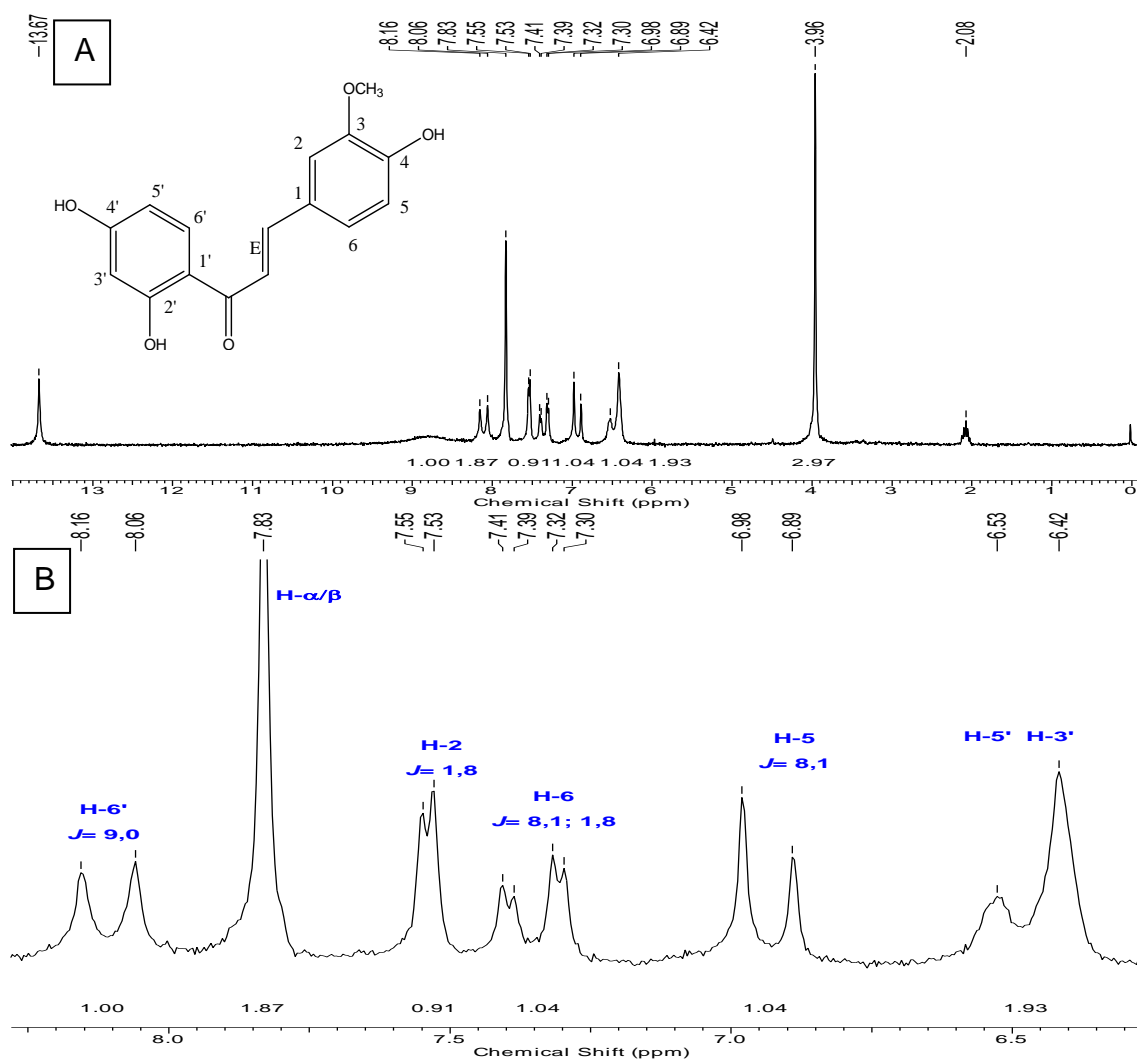


Espectro 8 - Espectro de massas (ESI⁺-MS) de Re-6.

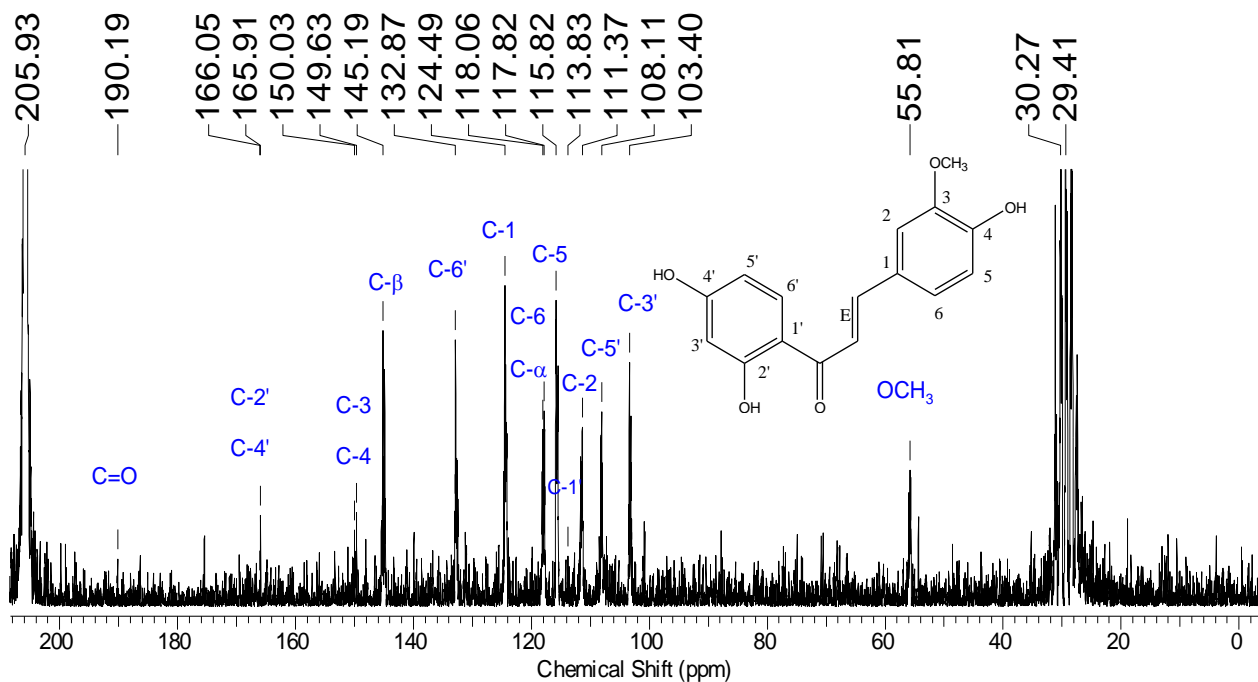
➤ Chalcona Re-11



Espectro 9 - Espectro de IV (pastilha de KBr) da substância Re-11.

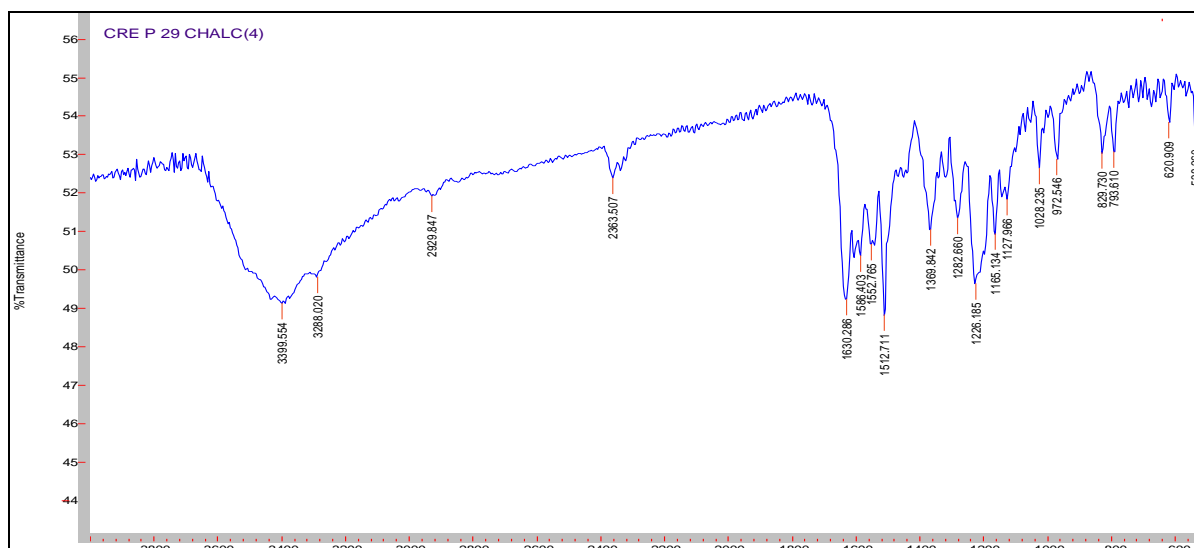


Espectro 10 - Espectro de RMN de ^1H de Re-11 em Acetona- d_6 (90 MHz) (A), expansão (B).

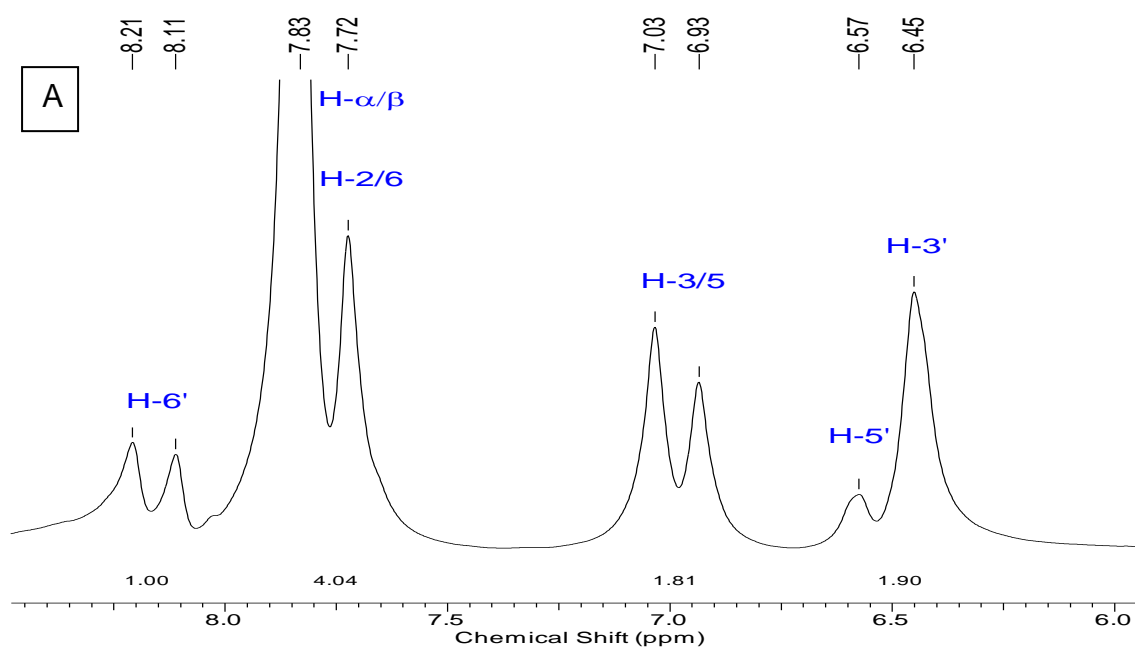
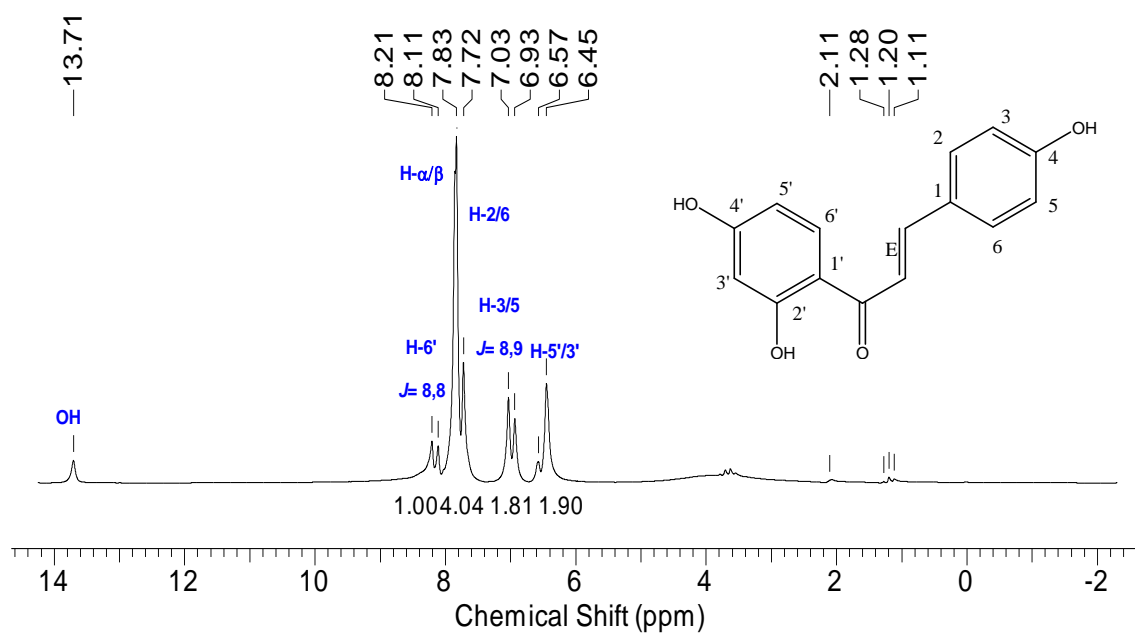


Espectro 11 - Espectro de ^{13}C de Re-11 em Acetona- d_6 (22,5 MHz).

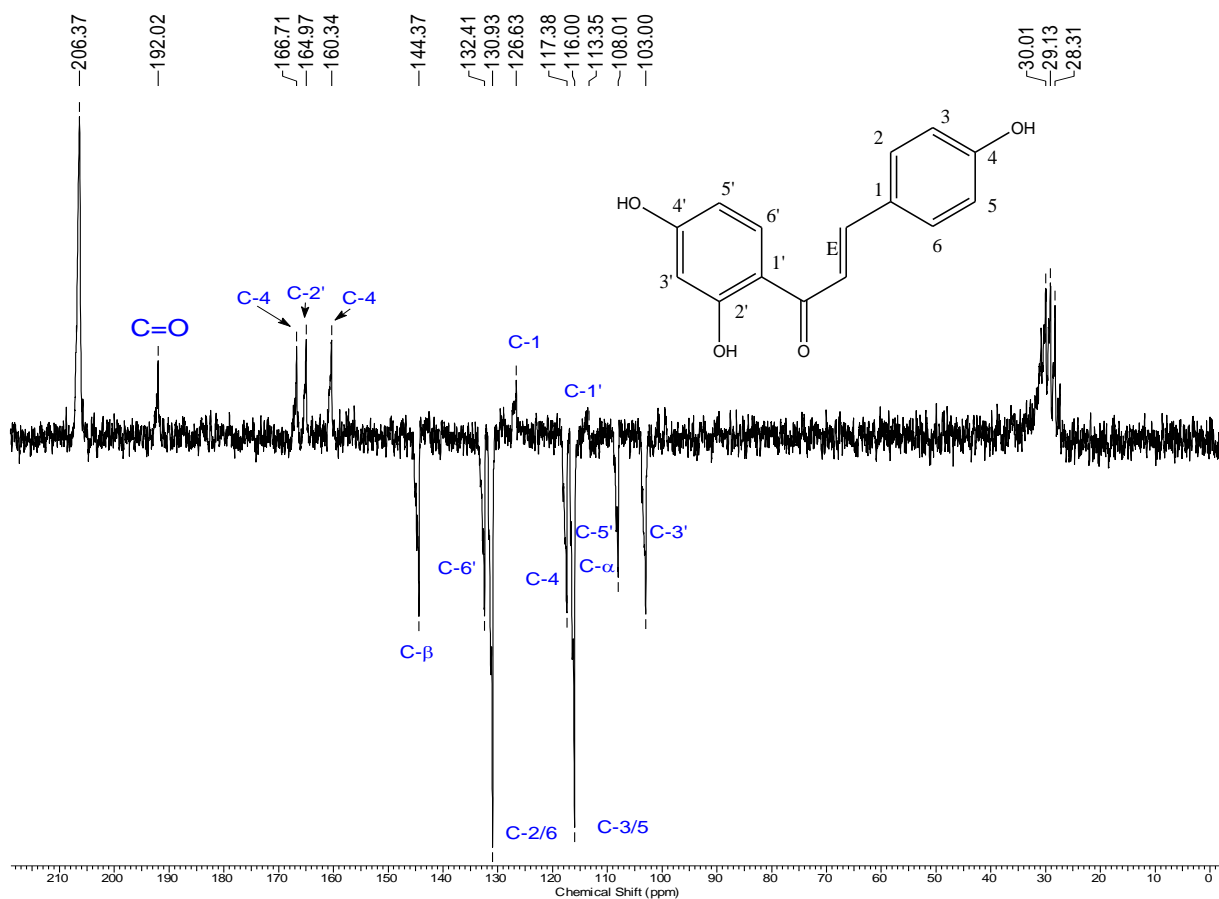
➤ Chalcona Re-10



Espectro 12 - Espectro de IV (pastilha de KBr) da substância Re-10.

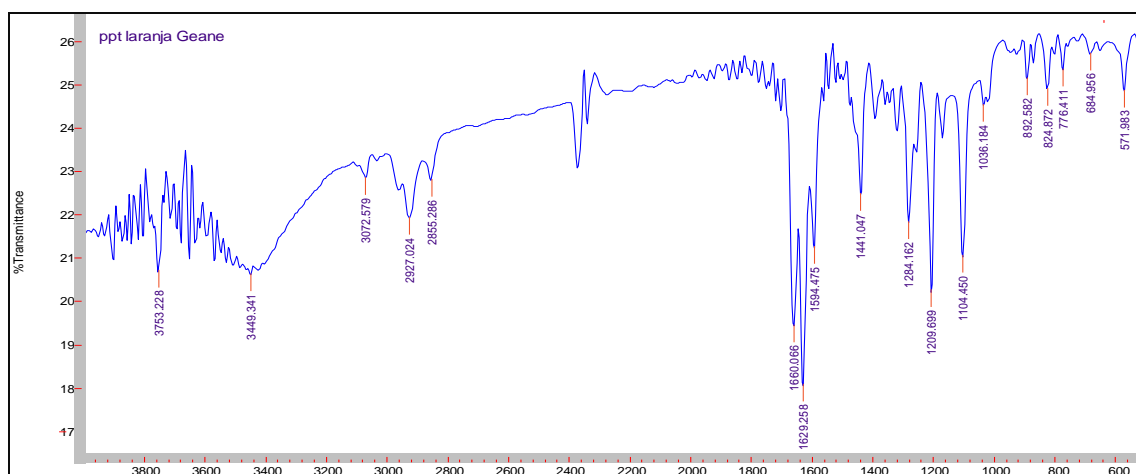


Espectro 13 - Espectro de RMN de ¹H de **Re-10** em Acetona-d₆ (90 MHz).

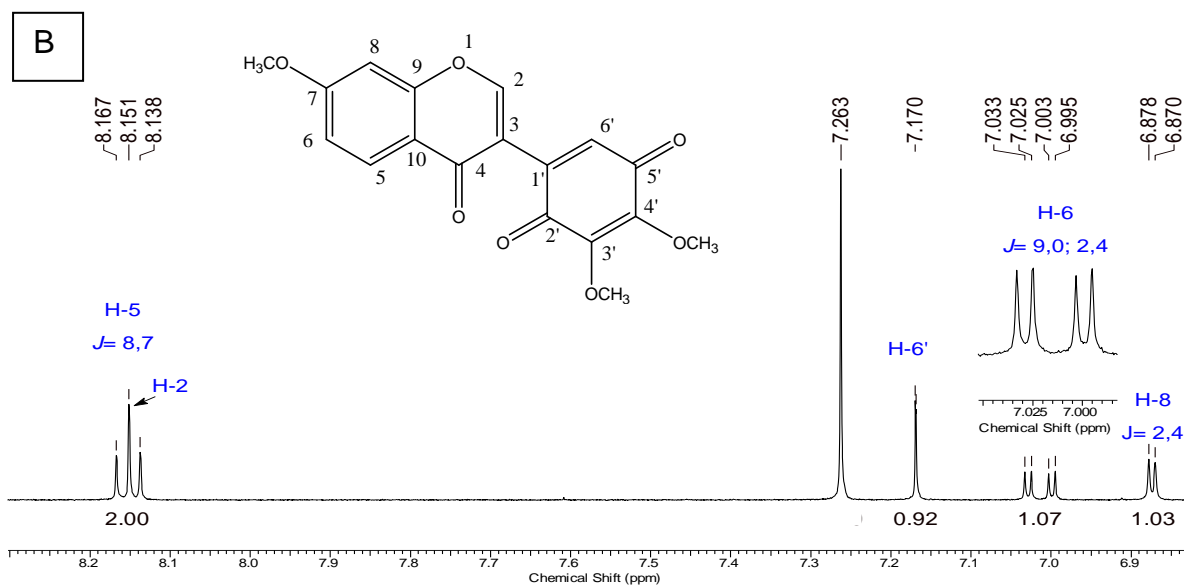
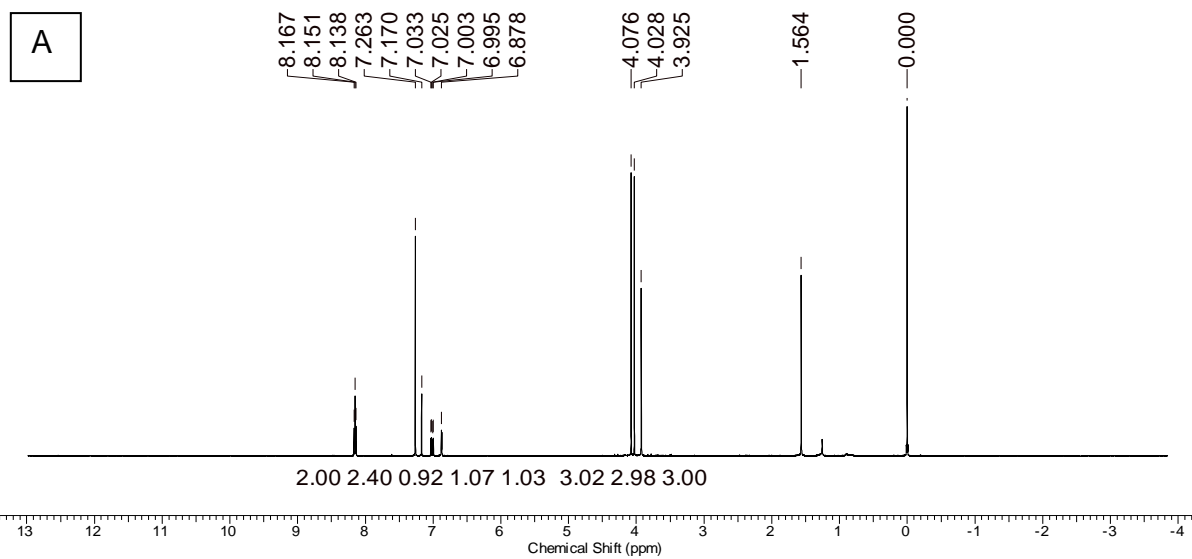


Espectro 14 - Espectro de APT de **Re-10** em Acetona- d_6 (22,5 MHz) (C – para cima e CH – para baixo).

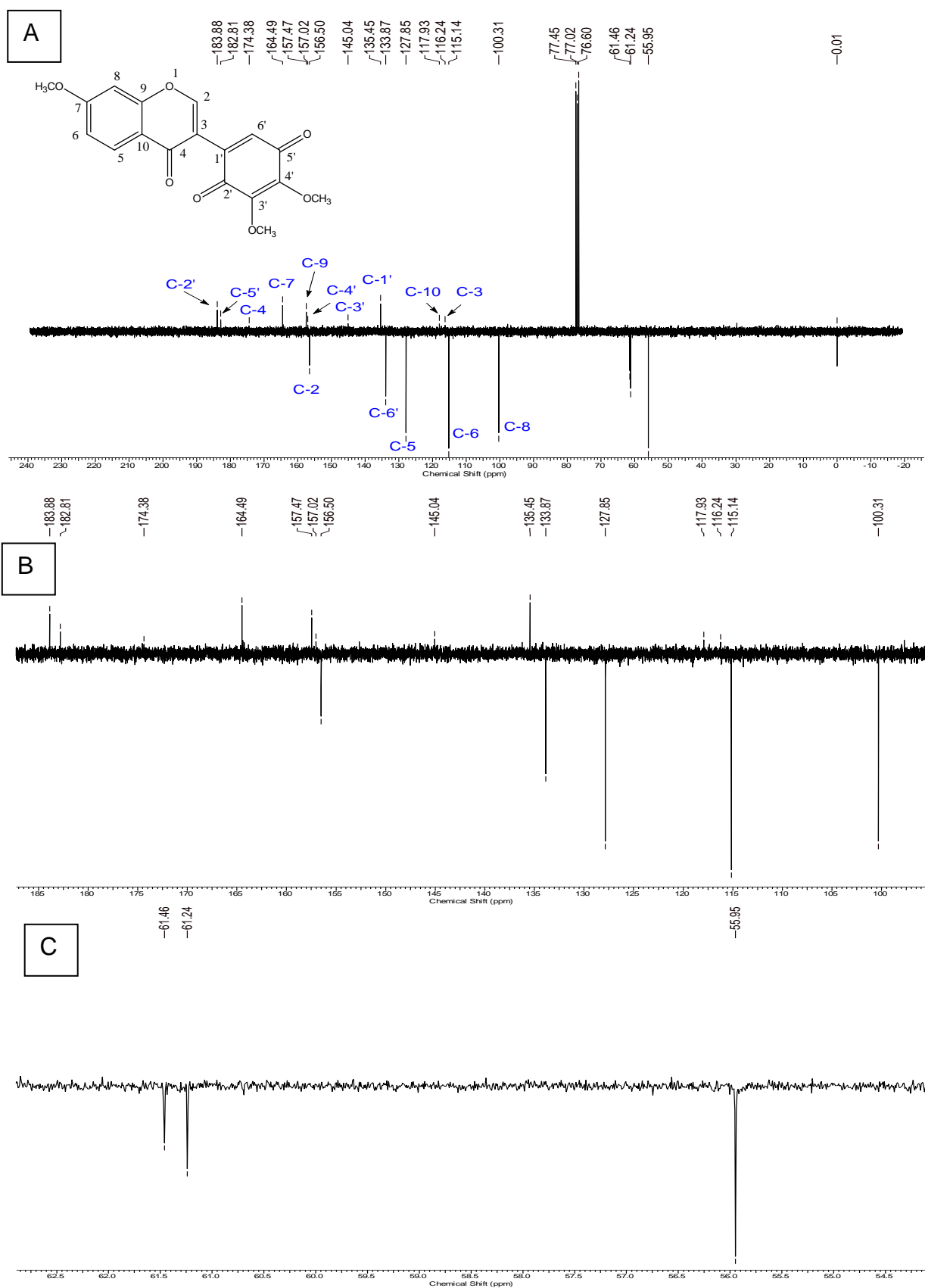
❖ Quinona (Re-8)



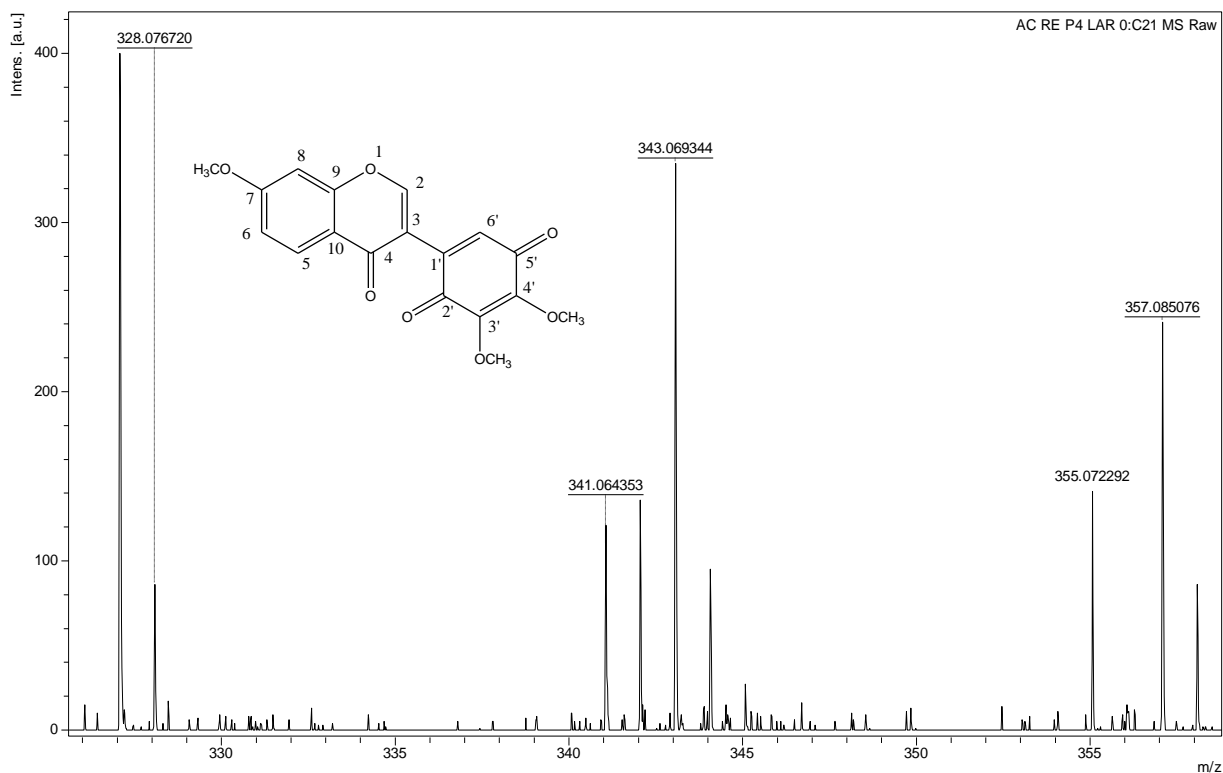
Espectro 15 - Espectro de IV (pastilha de KBr) da substância **Re-8**.



Espectro 16 - Espectro de RMN de ^1H de **Re-8** em CDCl_3 (300 MHz) (A). Expansão (B).



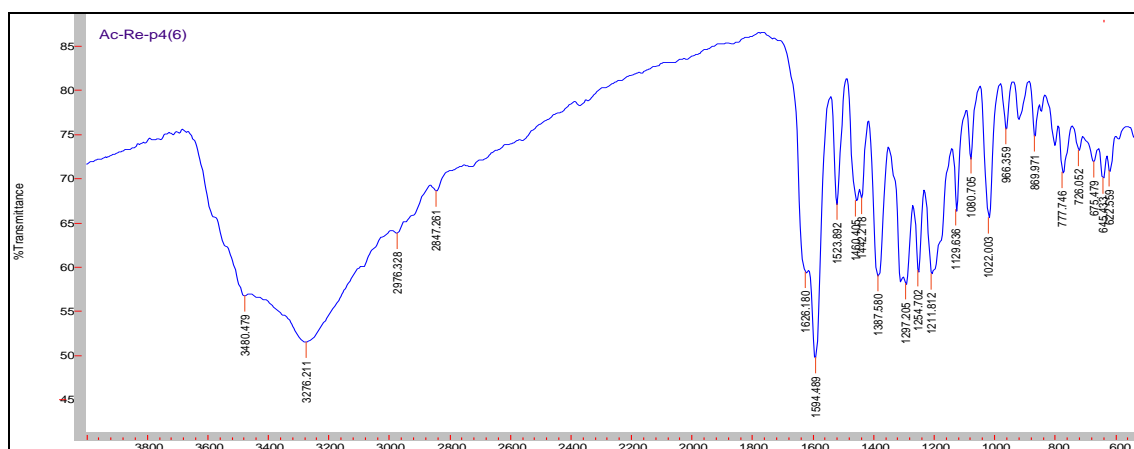
Espectro 17 - Espectro de APT de **Re-8** em CDCl_3 (75 MHz) (**C** – para cima e **CH** – para baixo) (**A**), expansão (**B** e **C**).



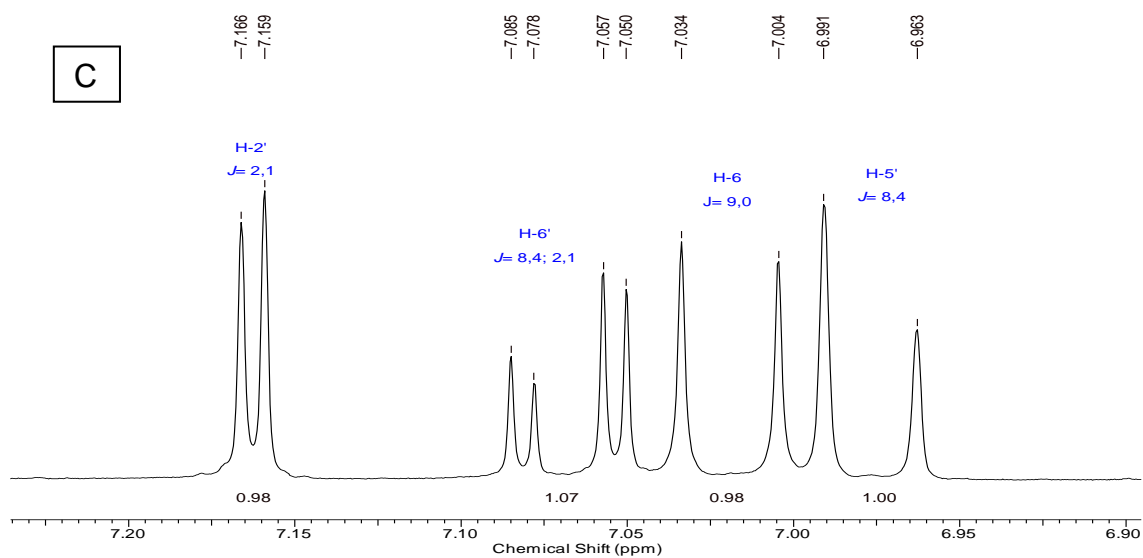
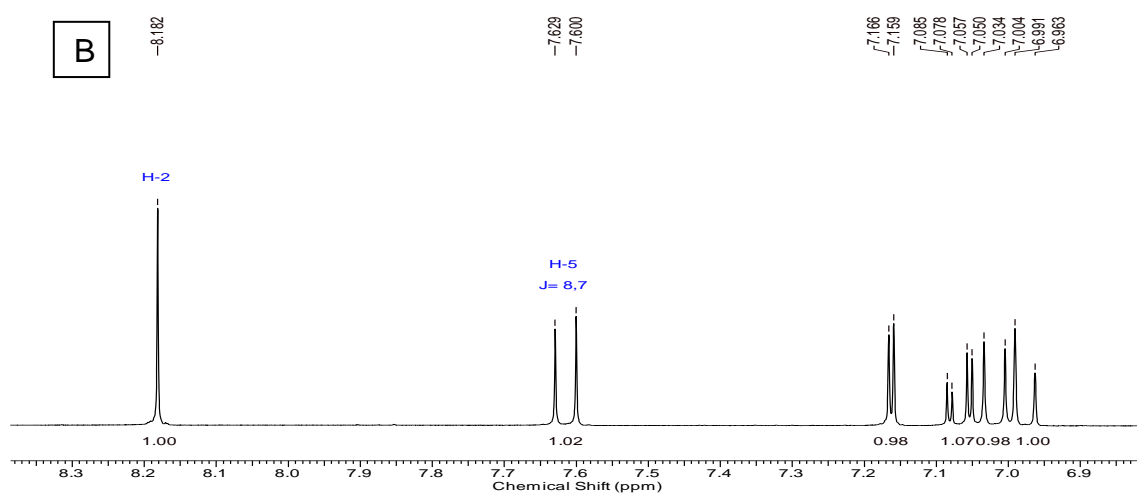
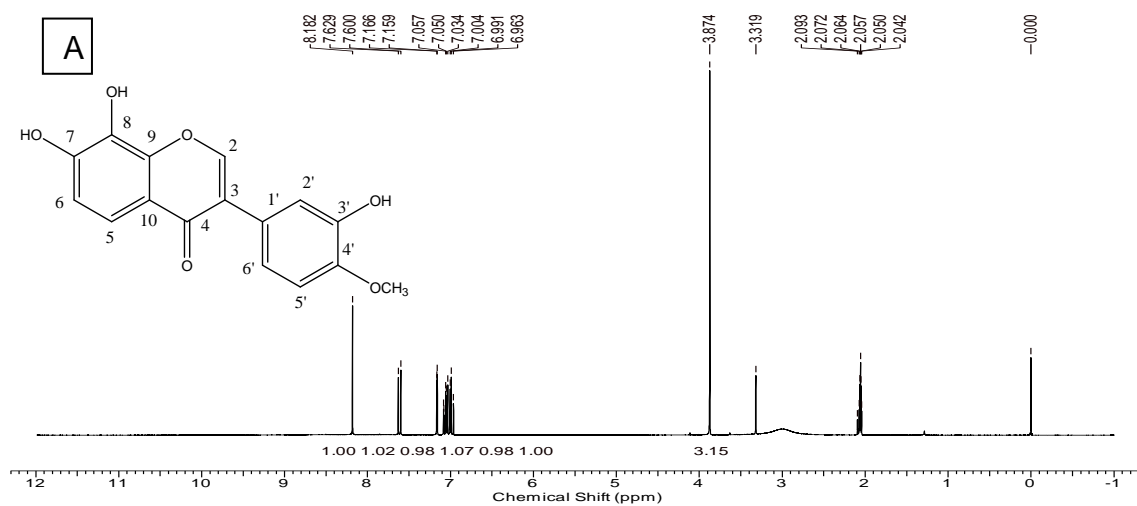
Espectro 18 - Espectro de massas (ESI⁺-MS) de **Re-8**

❖ **Espectros das Isoflavonas (Re-1, Re-2, Re-3, Re-4, Re-5, Re-9 e Re-12)**

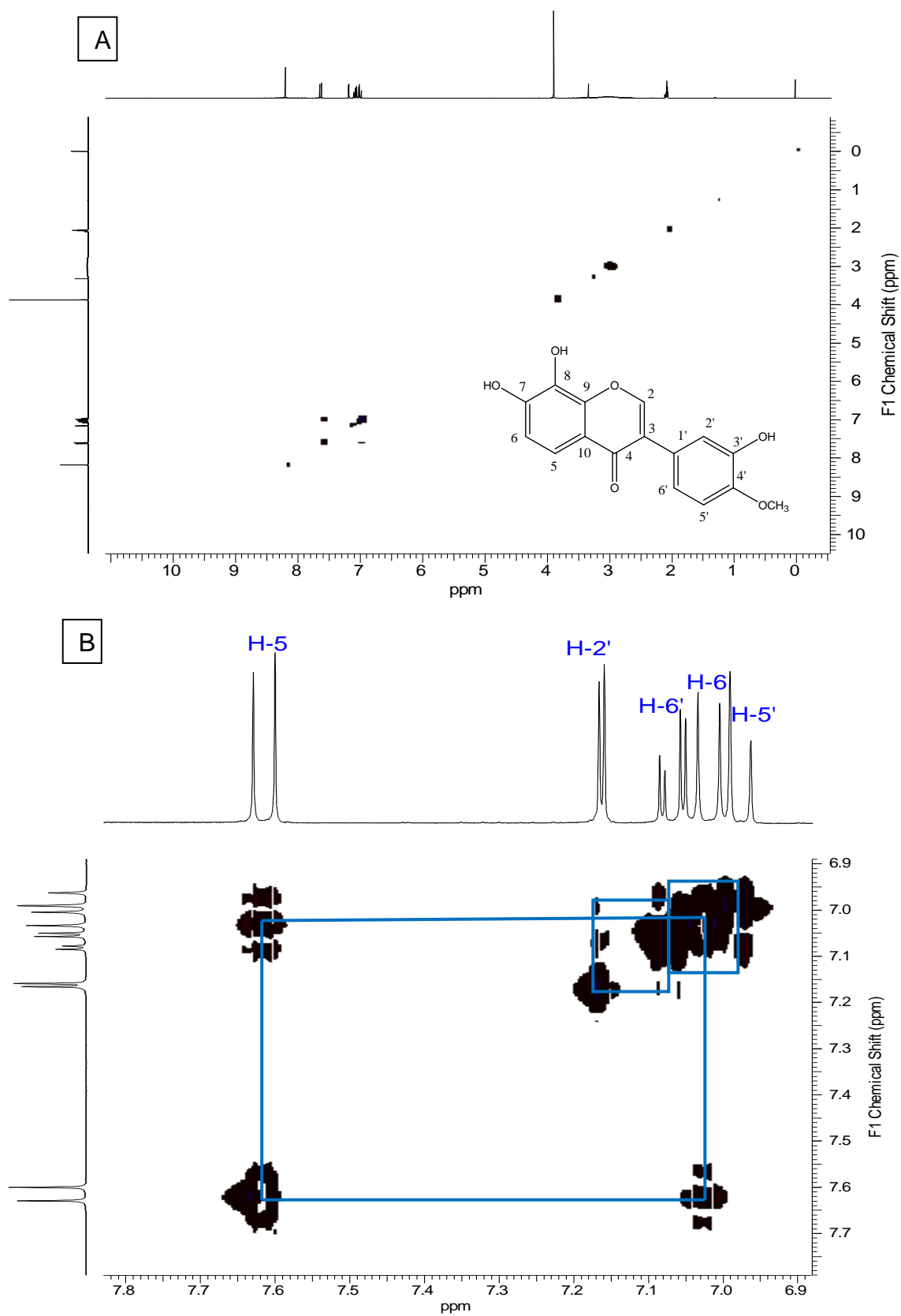
➤ **Isoflavona Re-1**



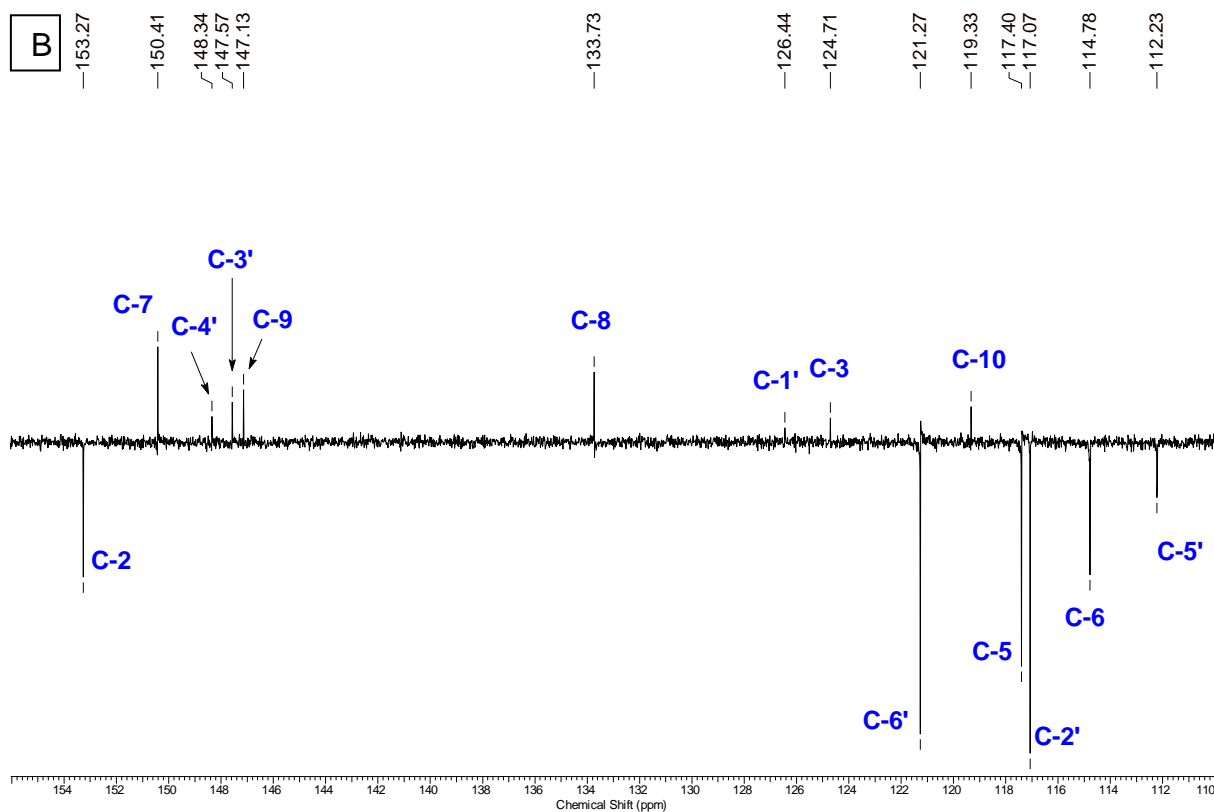
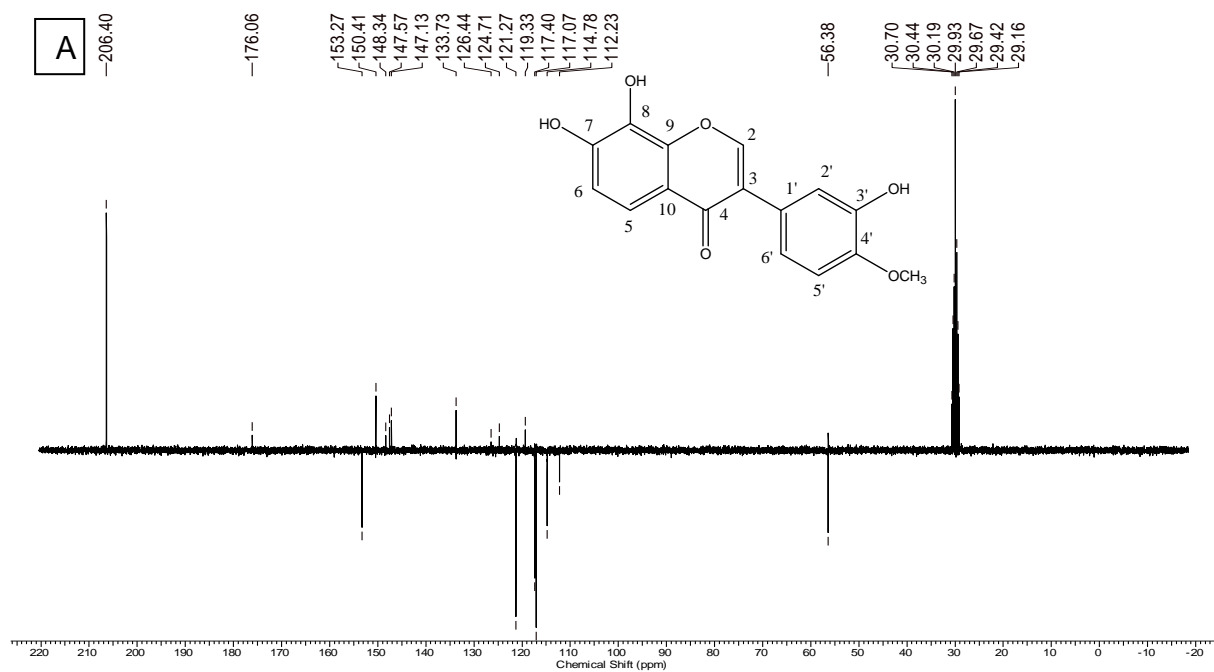
Espectro 19 - Espectro de IV (pastilha de KBr) da substância **Re-1**.



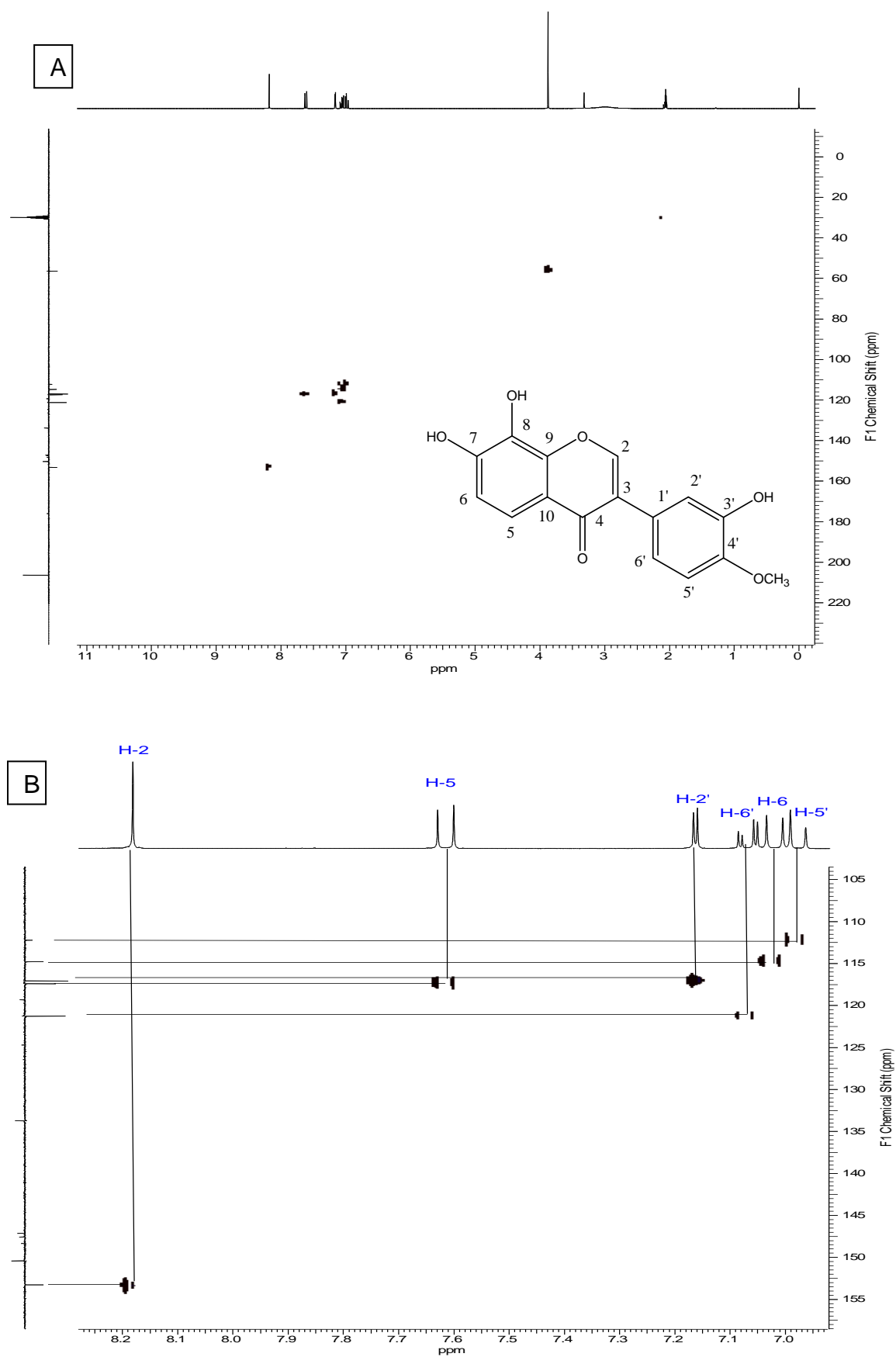
Espectro 20 - Espectro de RMN de ^1H de **Re-1** em Acetona- d_6 (300 MHz) (A), expansão (B, C e D).



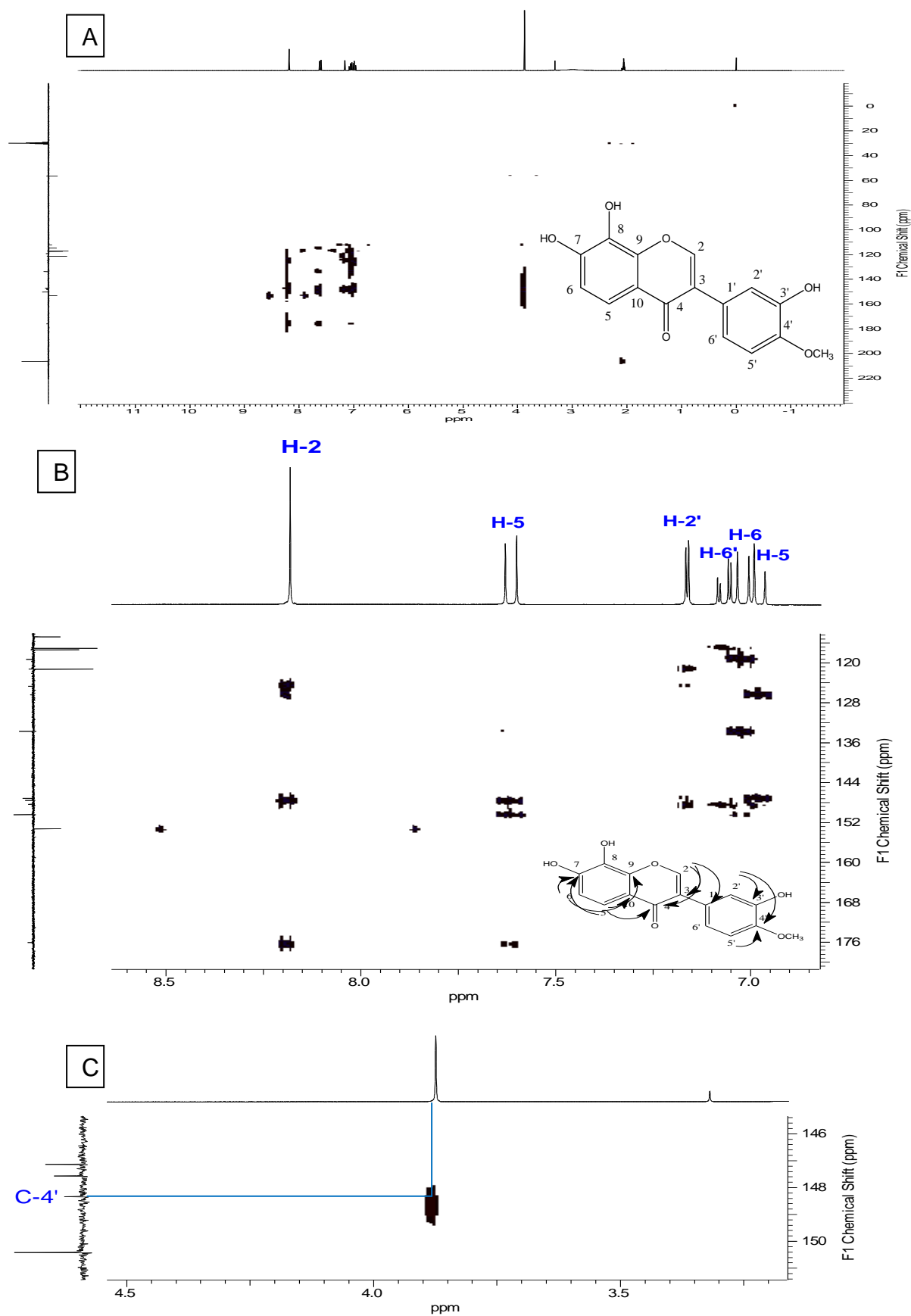
Espectro 21 - Espectro de COSY de **Re-1** em acetona- d_6 (300 MHz) (A). Expansão (B).



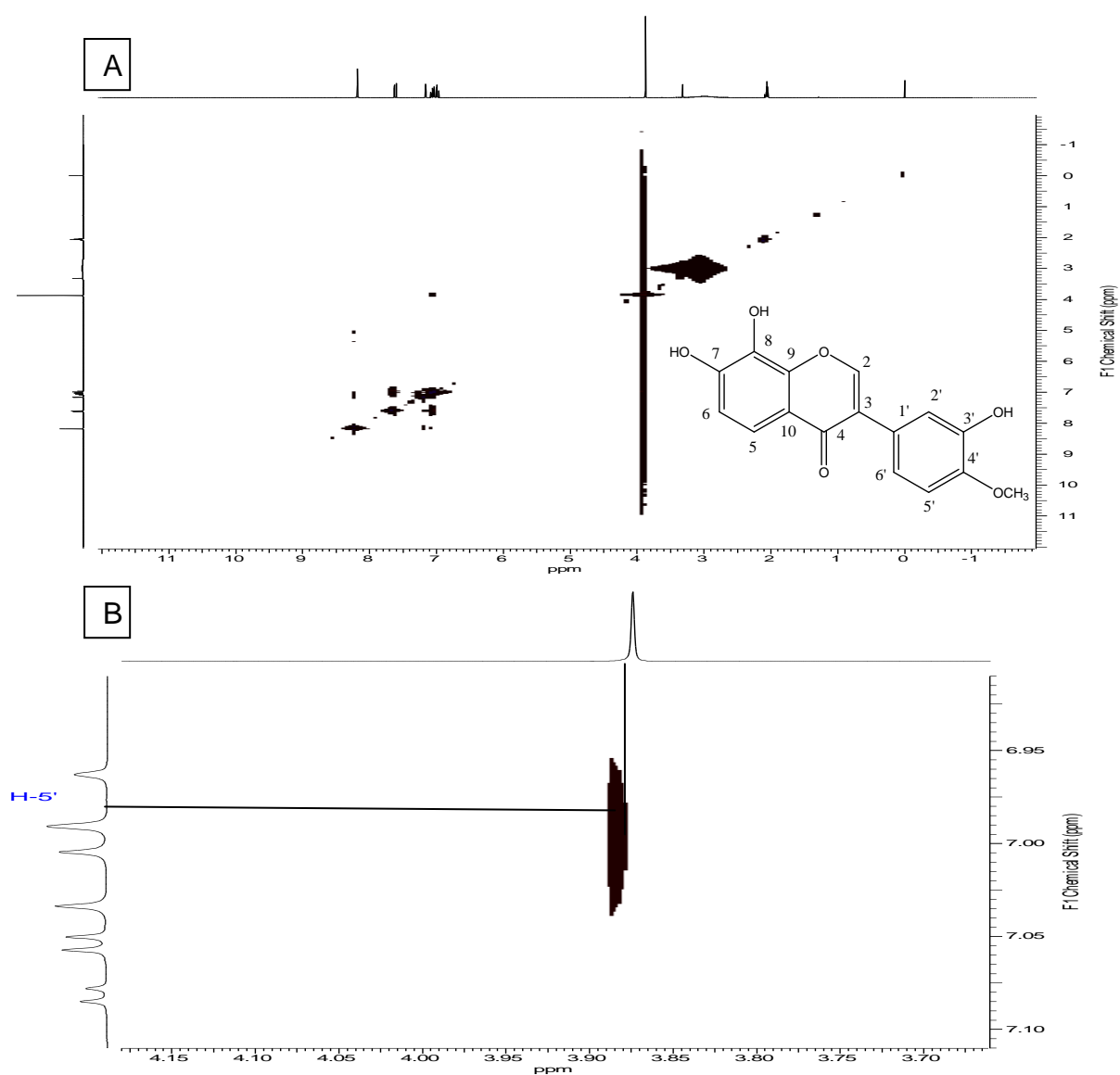
Espectro 22 - Espectro de APT de **Re-1** em acetona- d_6 (75 MHz) (C – para cima ; CH e CH_3 – para baixo) (A), expansão (B).



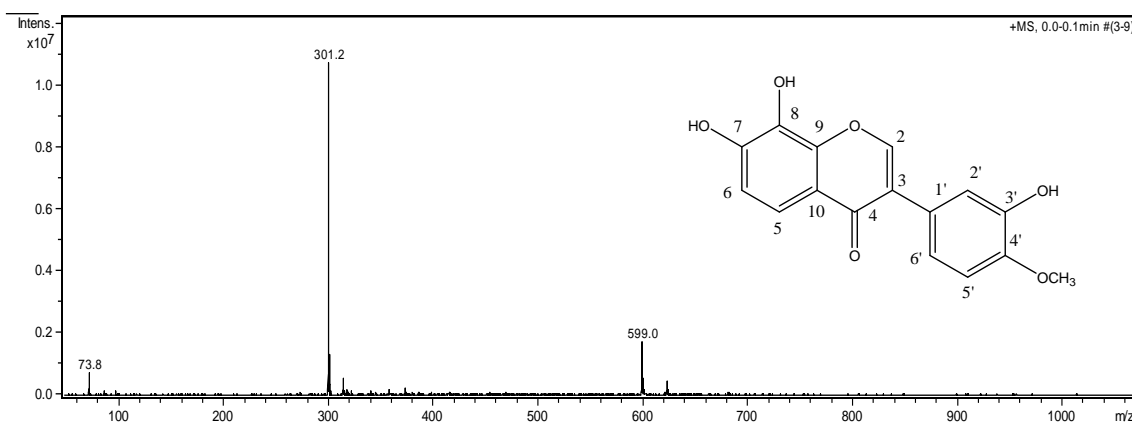
Espectro 23 - Espectro de HSQC de **Re-1** em acetona - d_6 (300 MHz) (A). Expansão (B).



Espectro 24 - Espectro de HMBC de **Re-1** em acetona- d_6 (300 MHz) (A). Expansão (B, C).

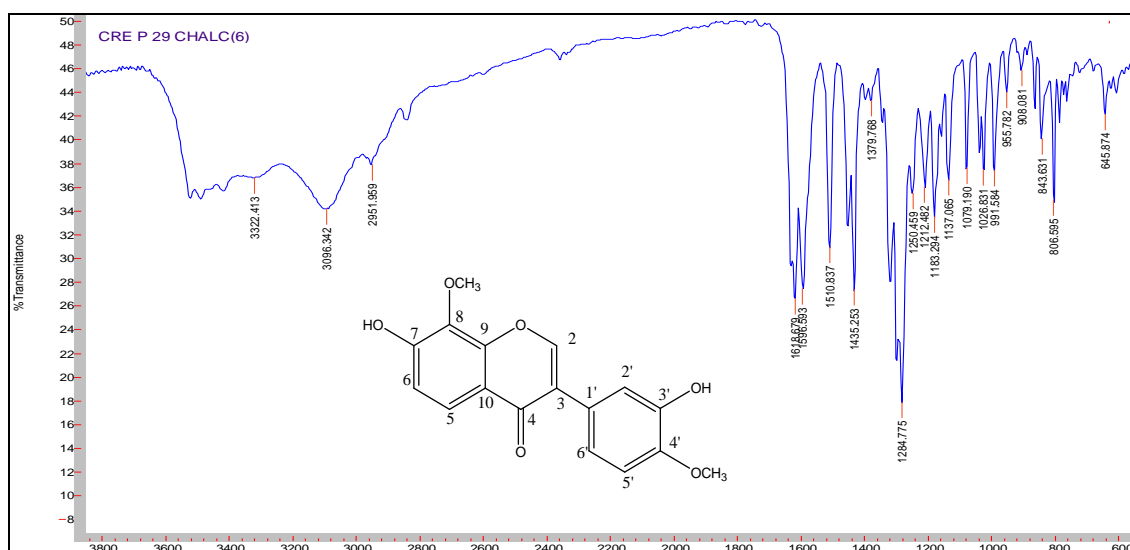


Espectro 25 - Espectro de NOESY de **Re-1** em acetona- d_6 (A). Expansão (B).

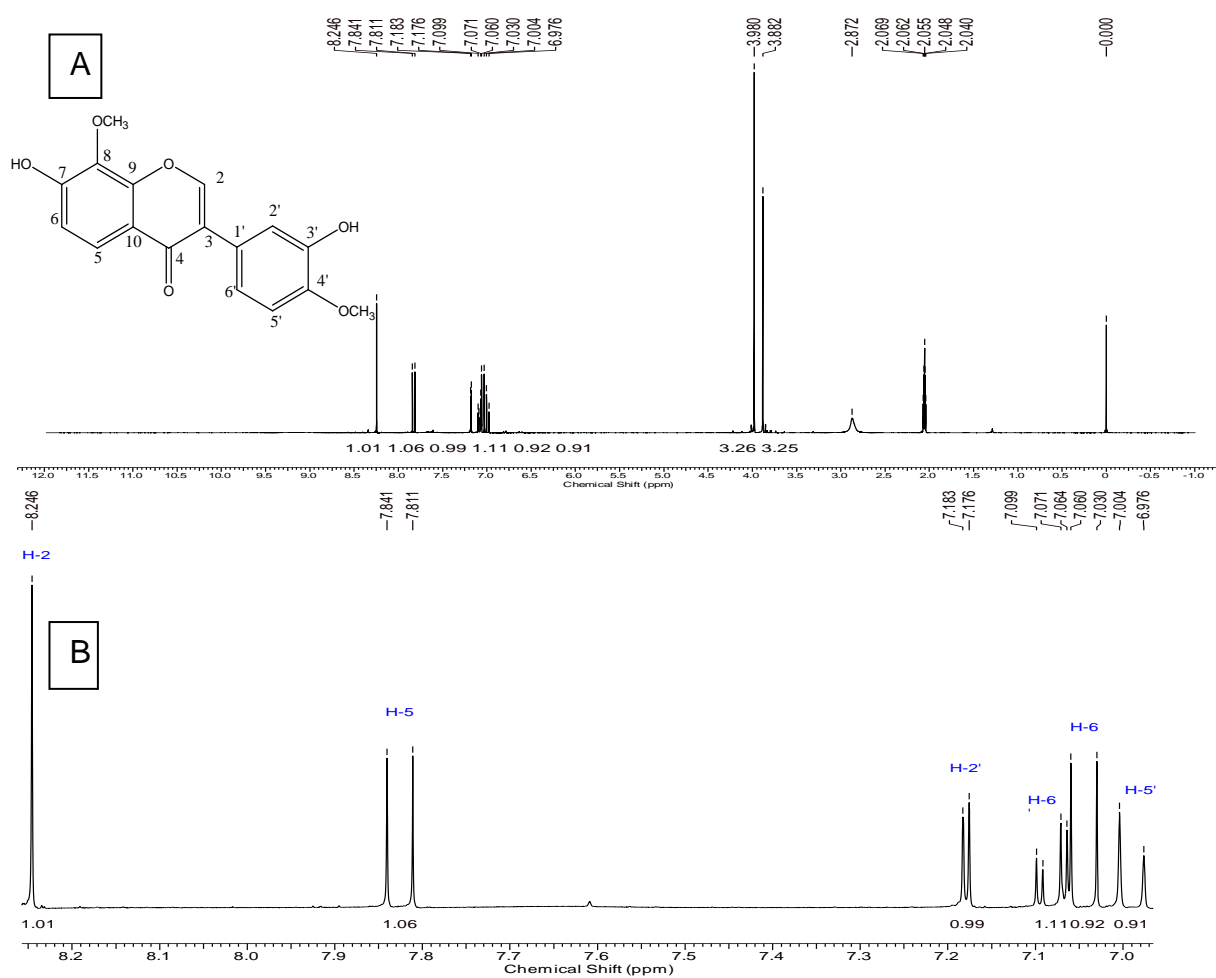


Espectro 26 - Espectro de massas (ESI⁺-MS) de **Re-1**.

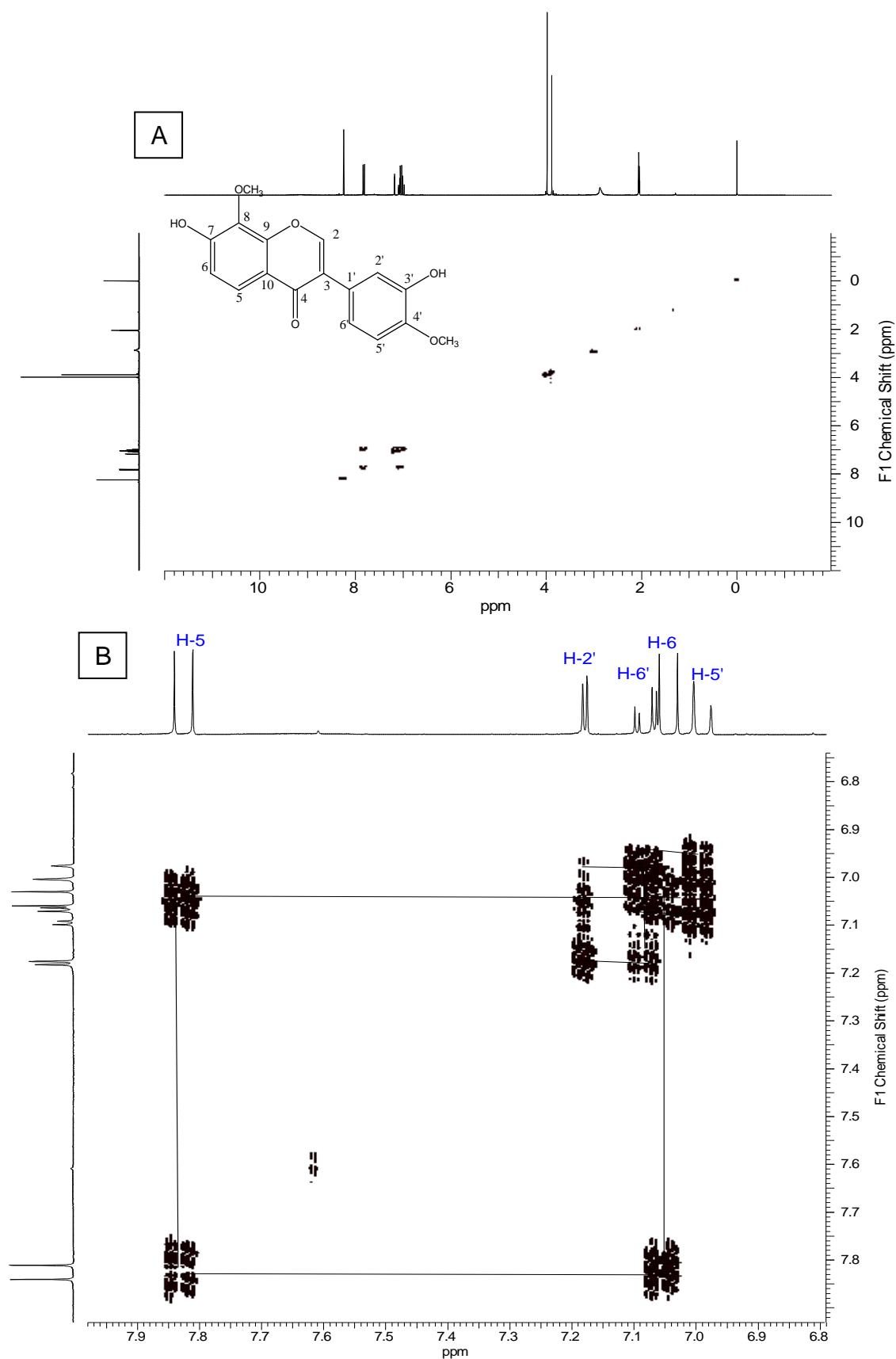
➤ Isoflavona Re-3

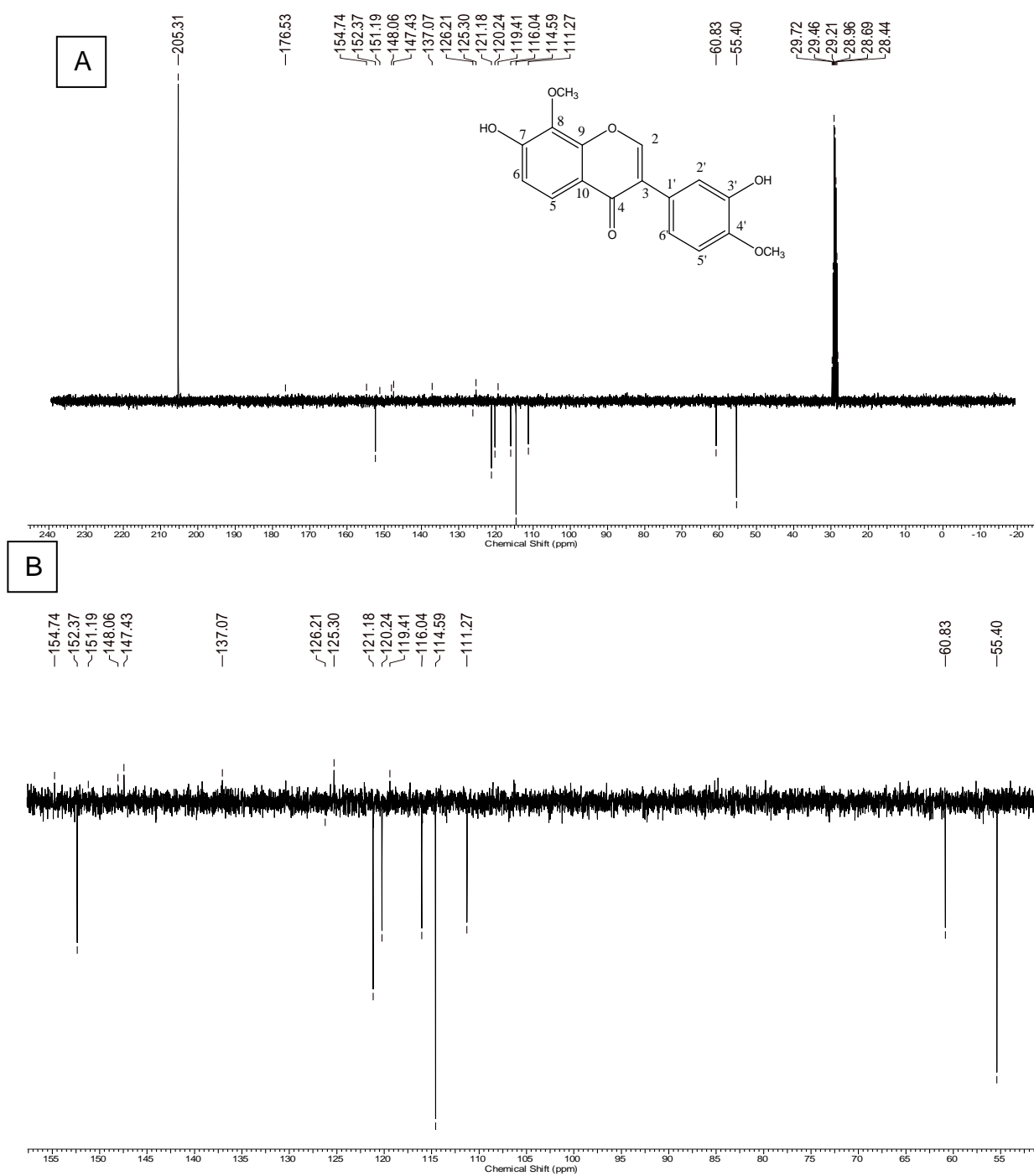


Espectro 27 - Espectro de IV (pastilha de KBr) de Re-3.

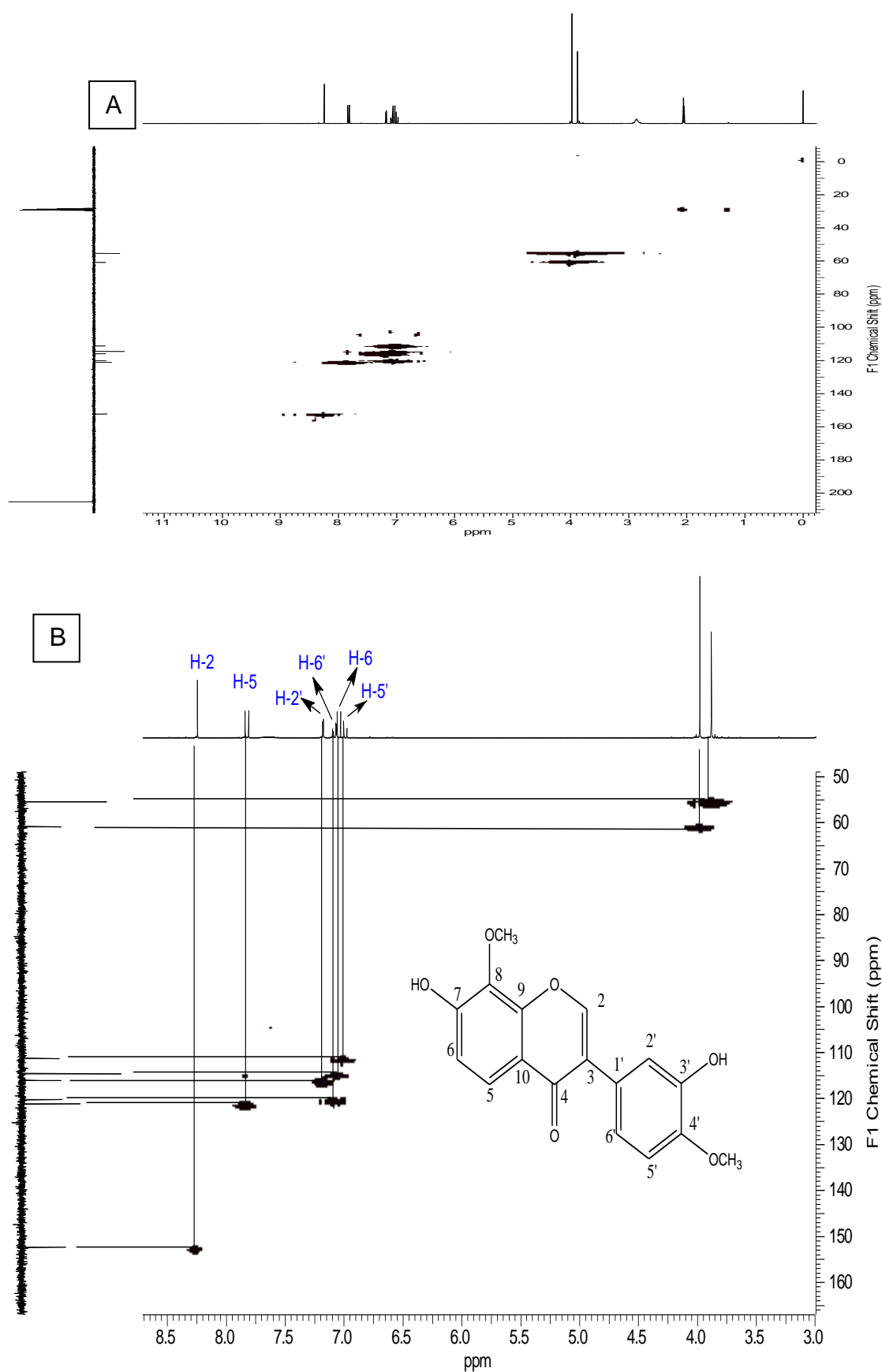


Espectro 28 - Espectro de RMN de ^1H de Re-3 em Acetona- d_6 (300 MHz) (A). Expansão (B).

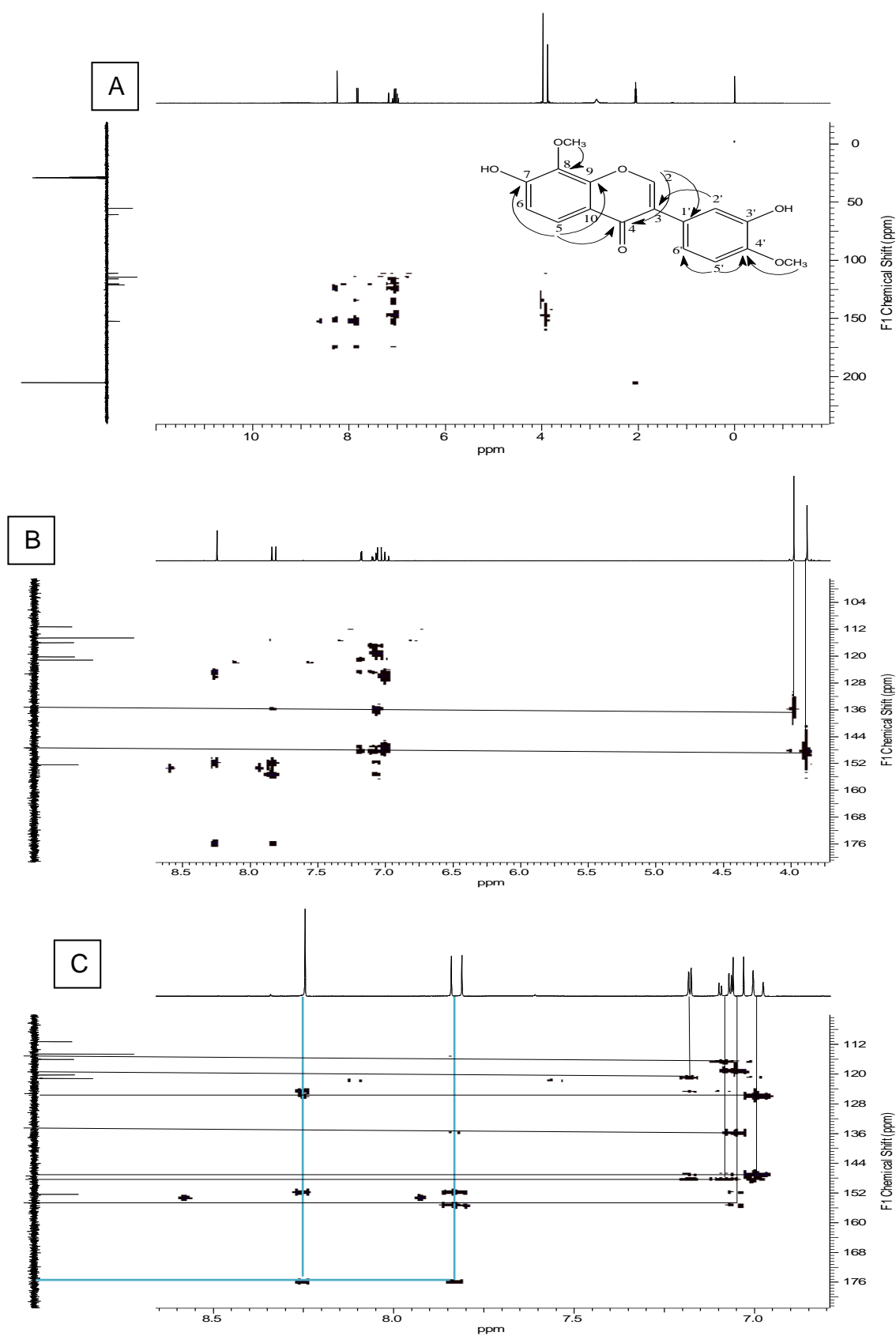




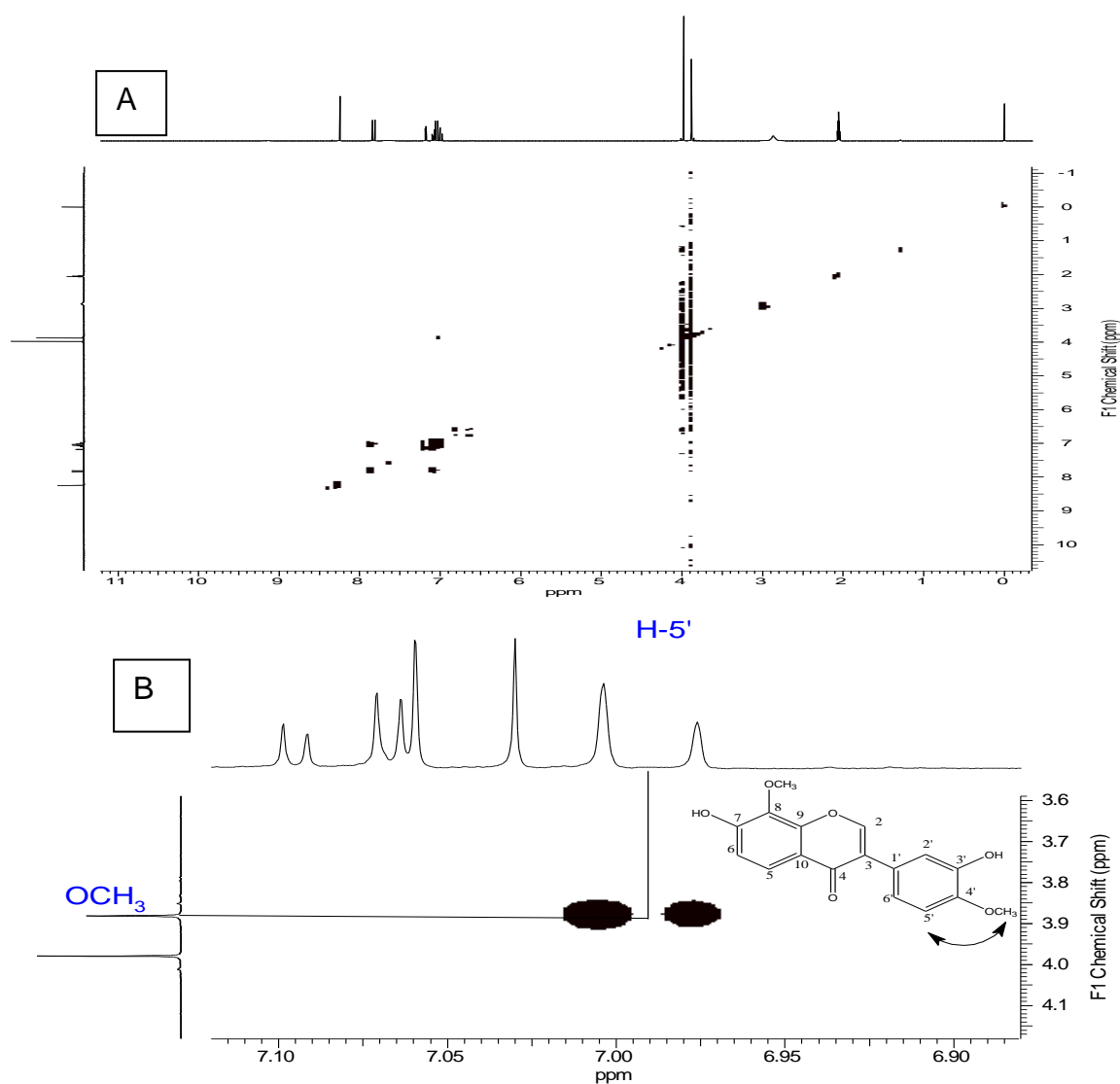
Espectro 30 - Espectro de APT em acetona- d_6 (300 MHz) de **Re-3** (A). Expansão (B).



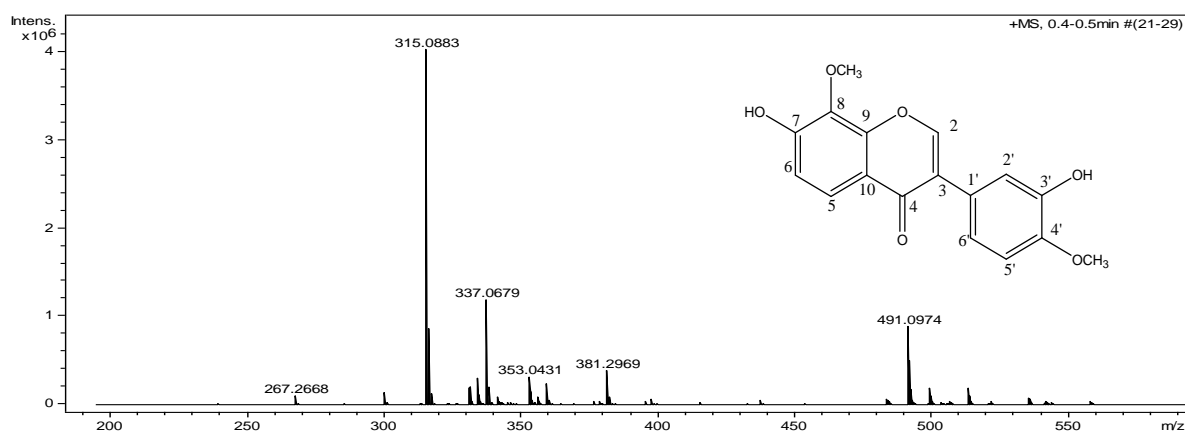
Espectro 31 - Espectro de HSQC em acetona- d_6 (300 MHz) de **Re-3** (A). Expansão (B)



Espectro 32 - Espectro de HMBC em acetona- d_6 (300 MHz) de **Re-3** (A). Expansão (B, C).

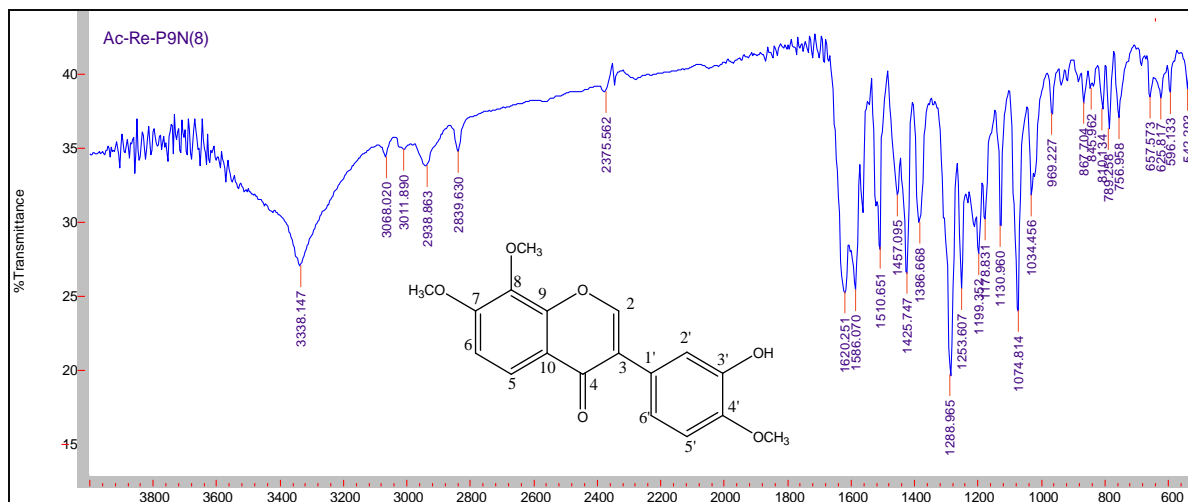


Espectro 33 - Espectro de NOESY em acetona- d_6 (300 MHz) de **3** (A). Expansão (B)

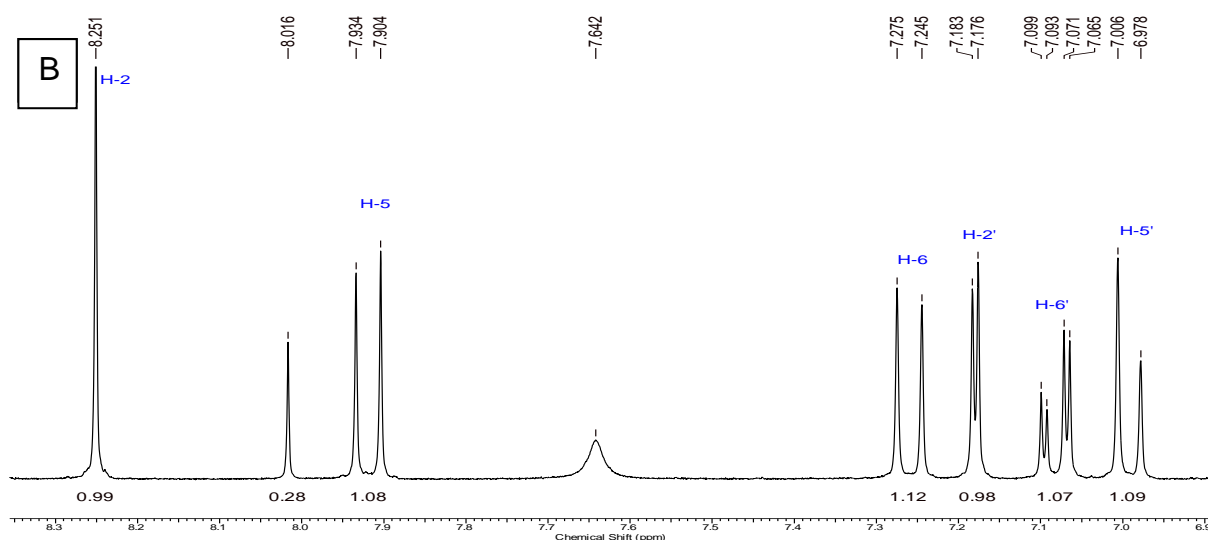
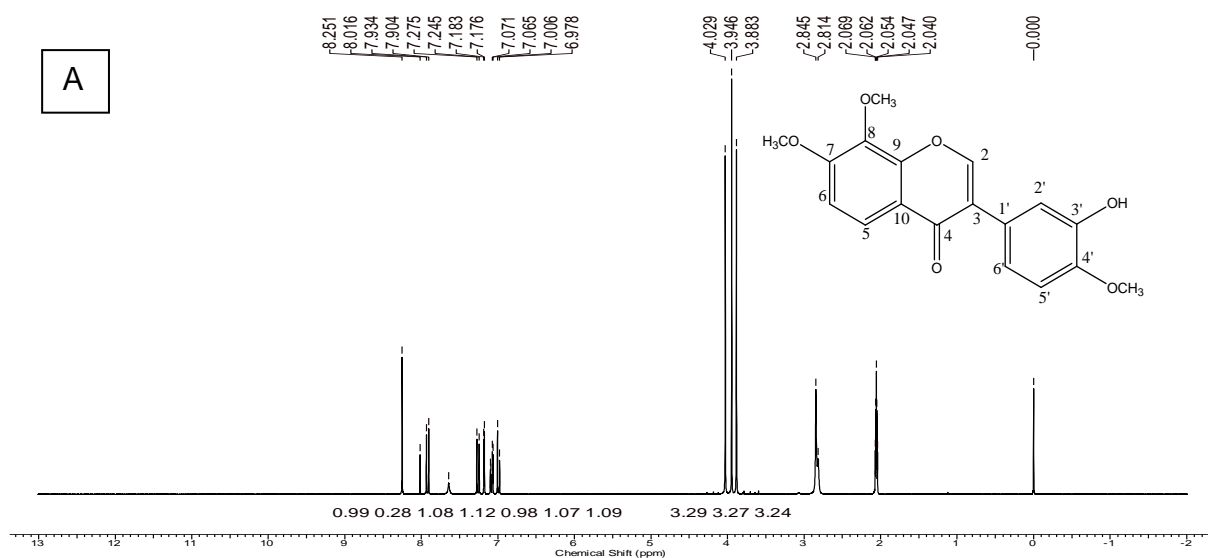


Espectro 34 - Espectro de massas (ESI no modo positivo) da substância **Re-3**.

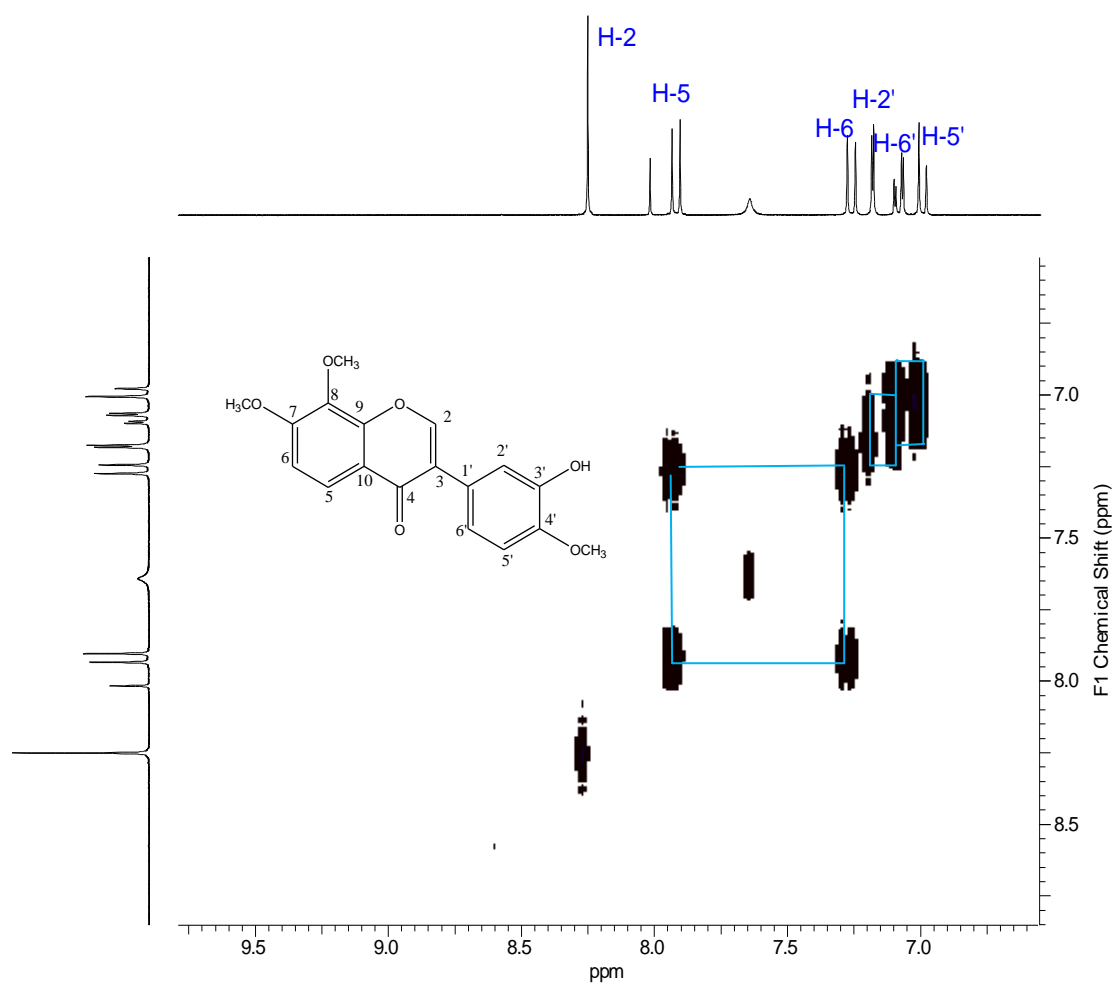
➤ Isoflavona Re-9



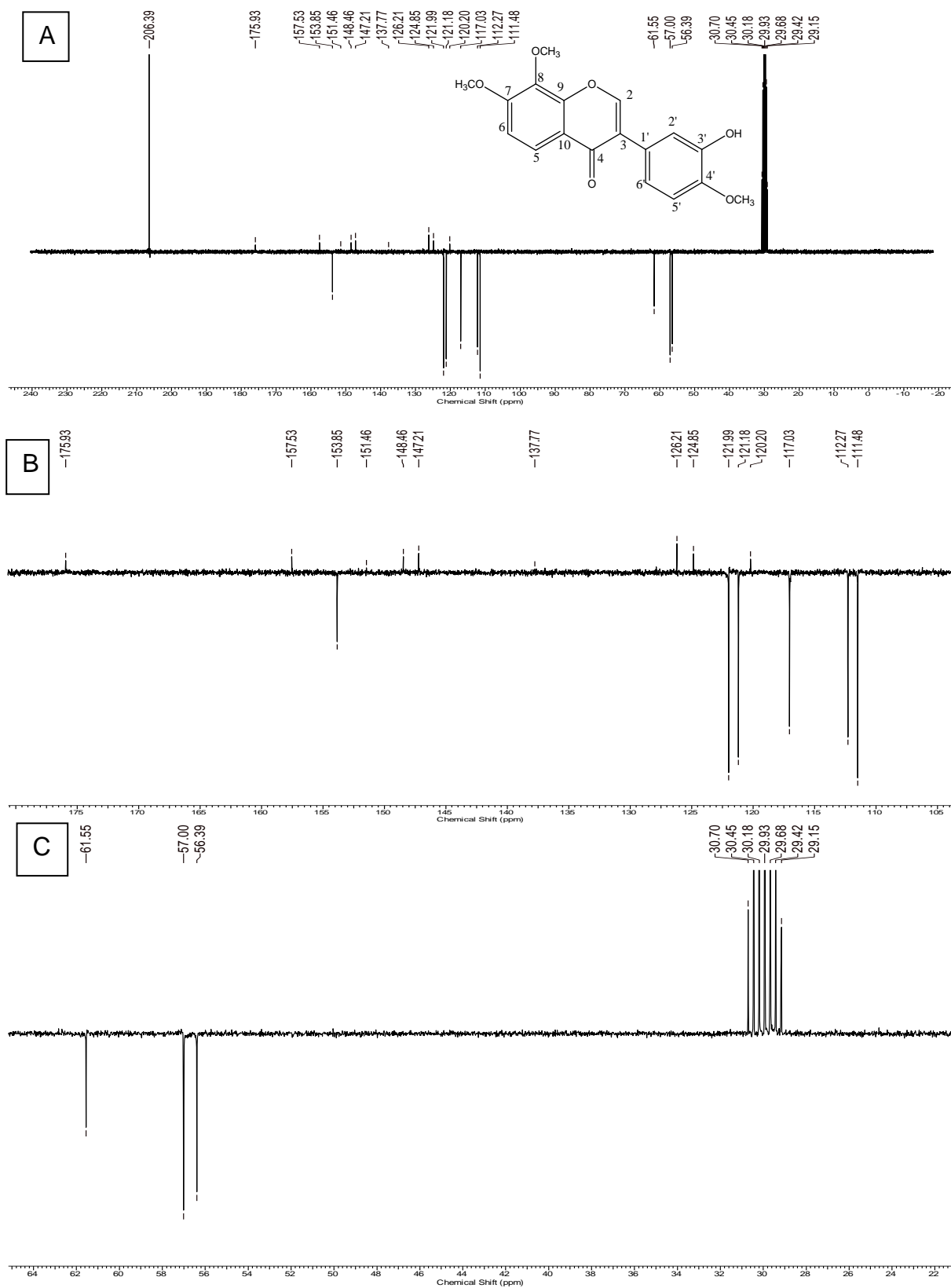
Espectro 35 - Espectro de IV (pastilha de KBr) da substância Re-9.



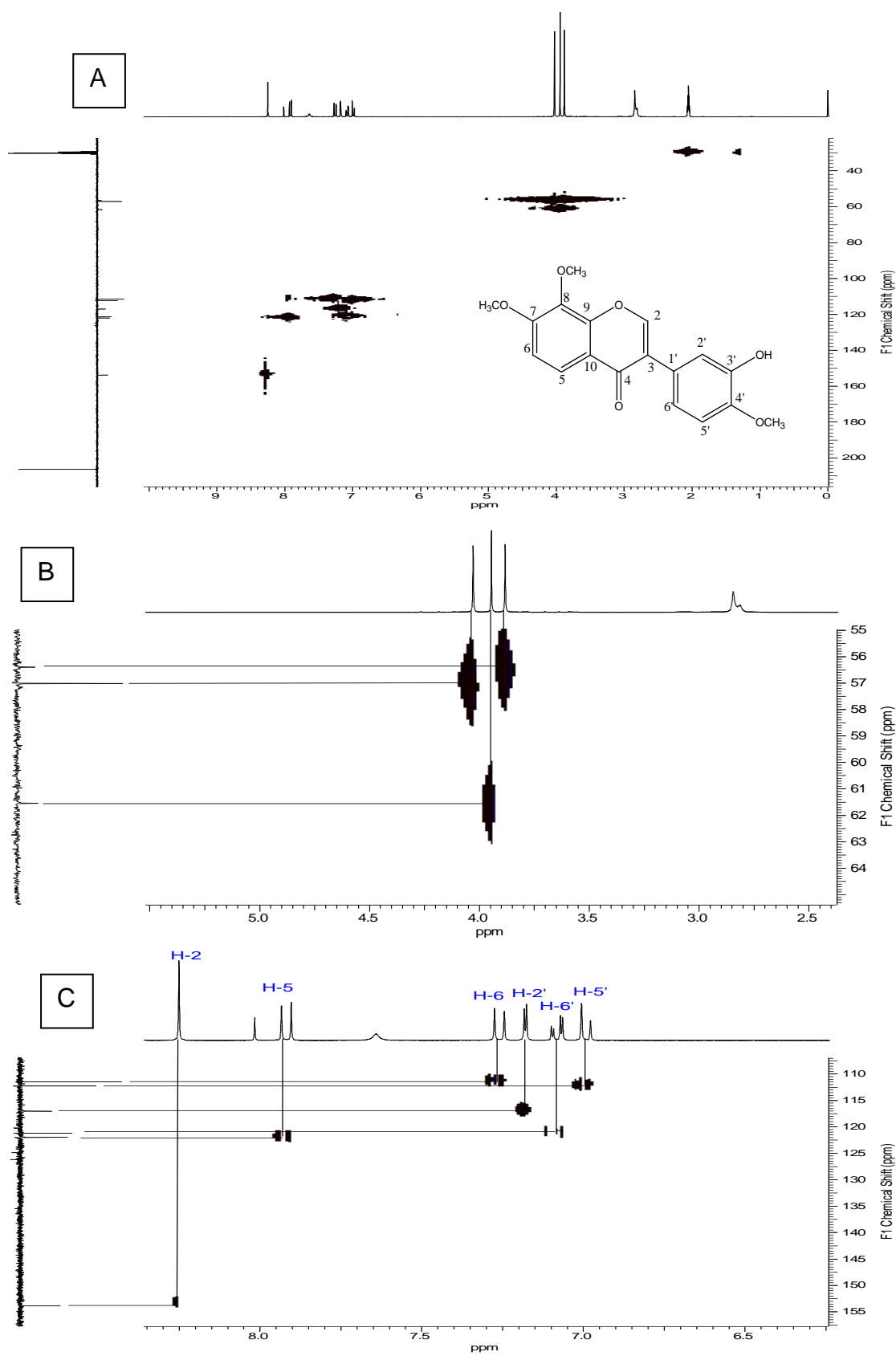
Espectro 36 - Espectro de RMN ¹H em acetona (300 MHz) de Re-9 (A). Expansão (B).

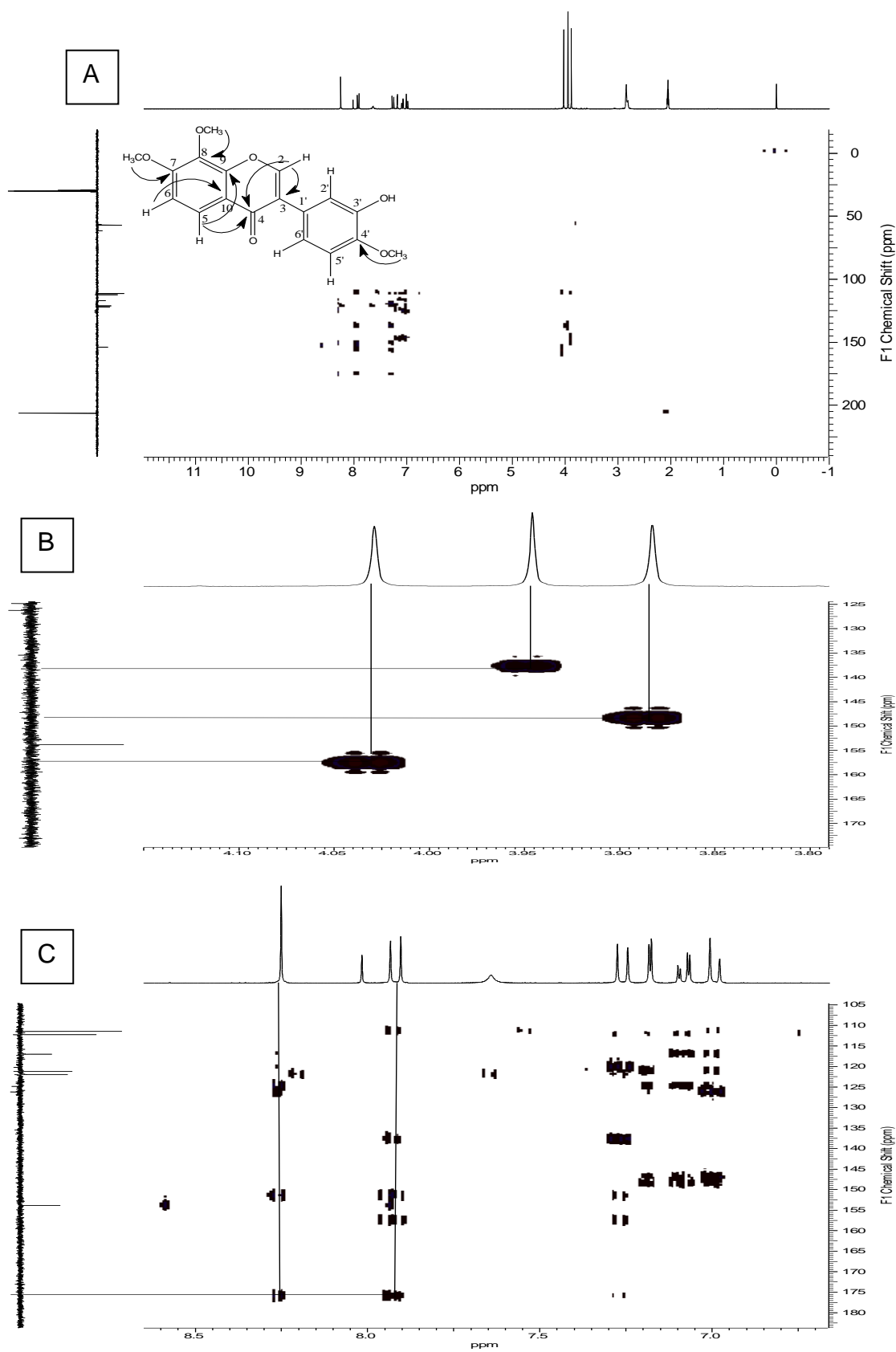


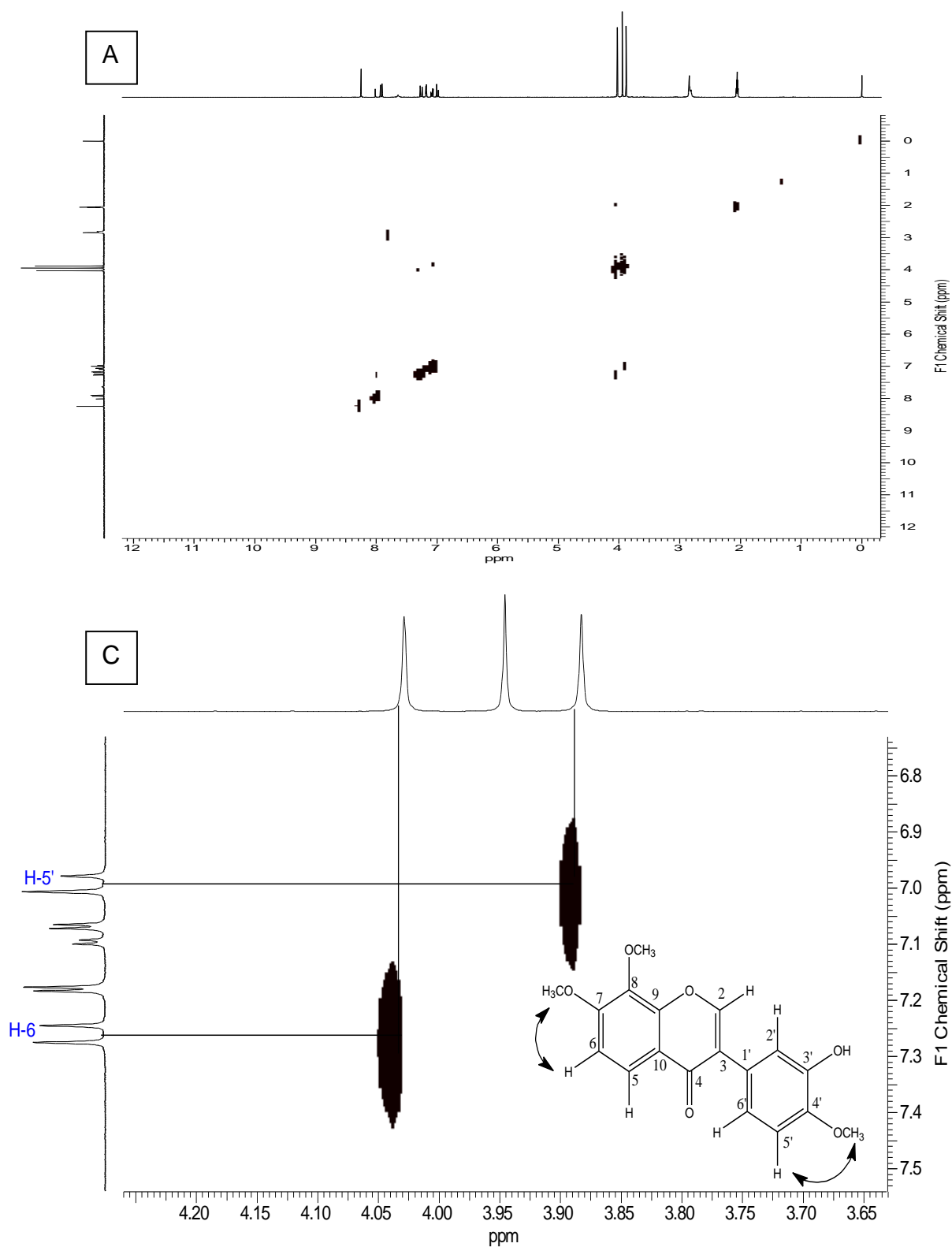
Espectro 37 - Espectro de COSY em acetona (300 MHz) de **Re-9** (A). Expansão (B).



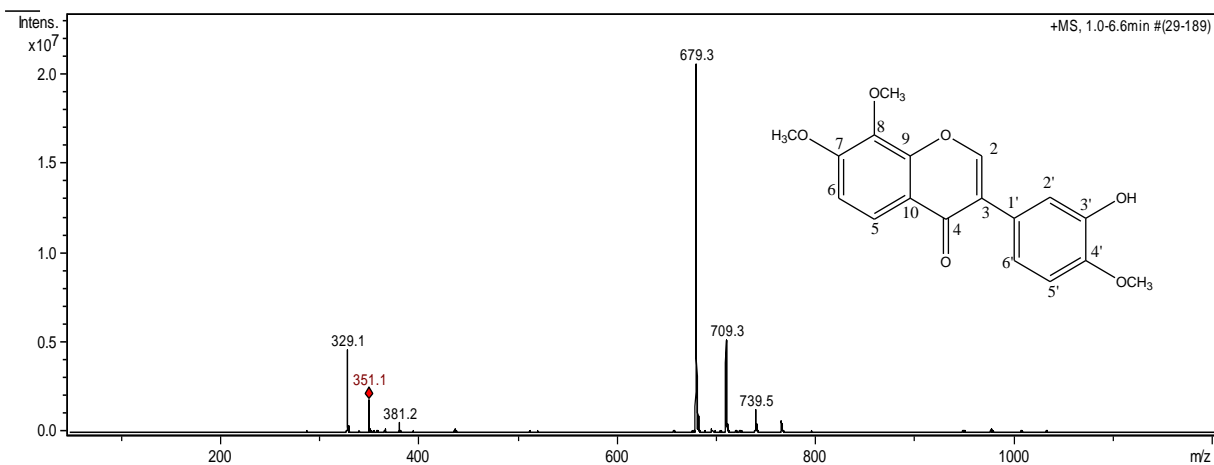
Espectro 38 - Espectro de APT em acetona (75 MHz) de **Re-9** (A). Expansão (B,C).





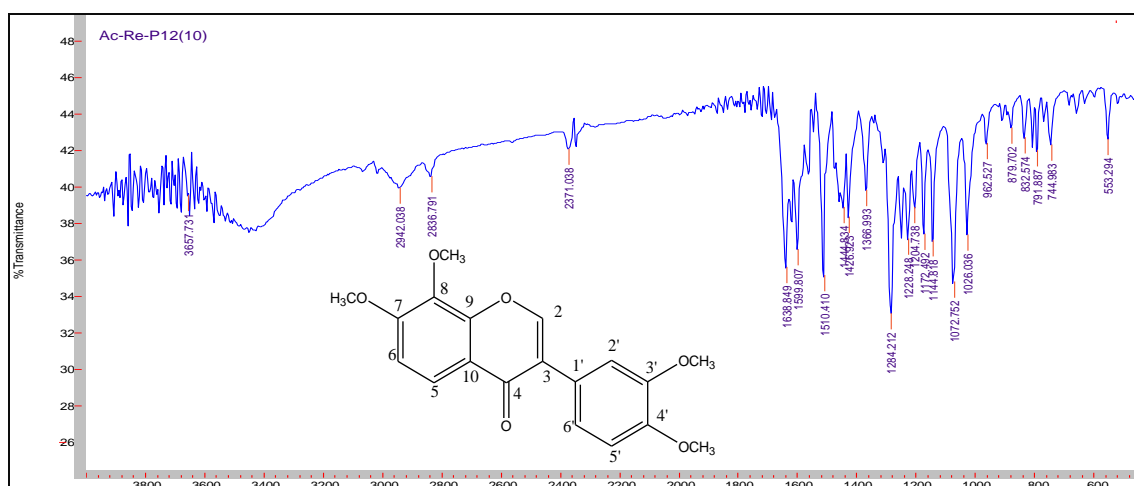


Espectro 41- Espectro de NOESY em acetona (300 MHz) de **Re-9** (A). Expansão (B).

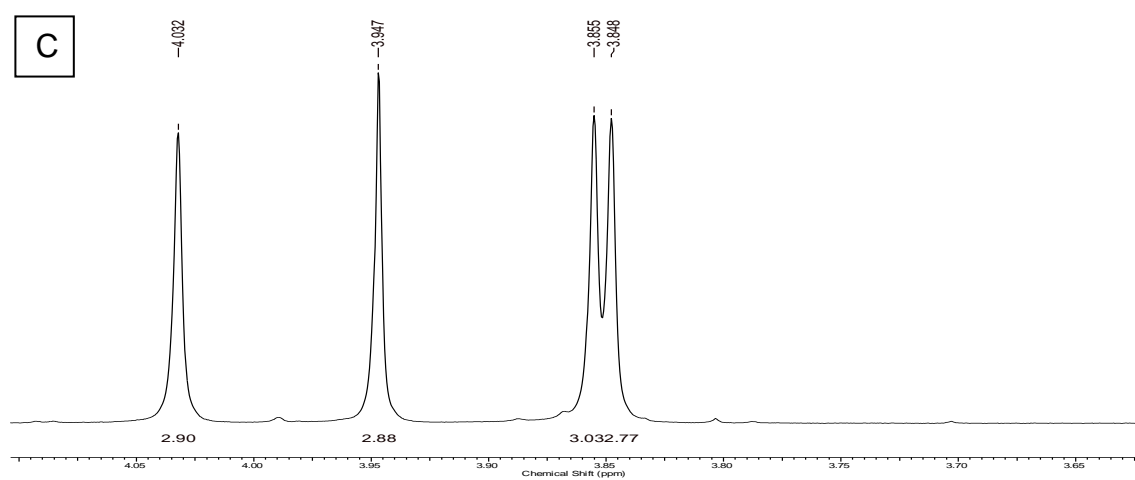
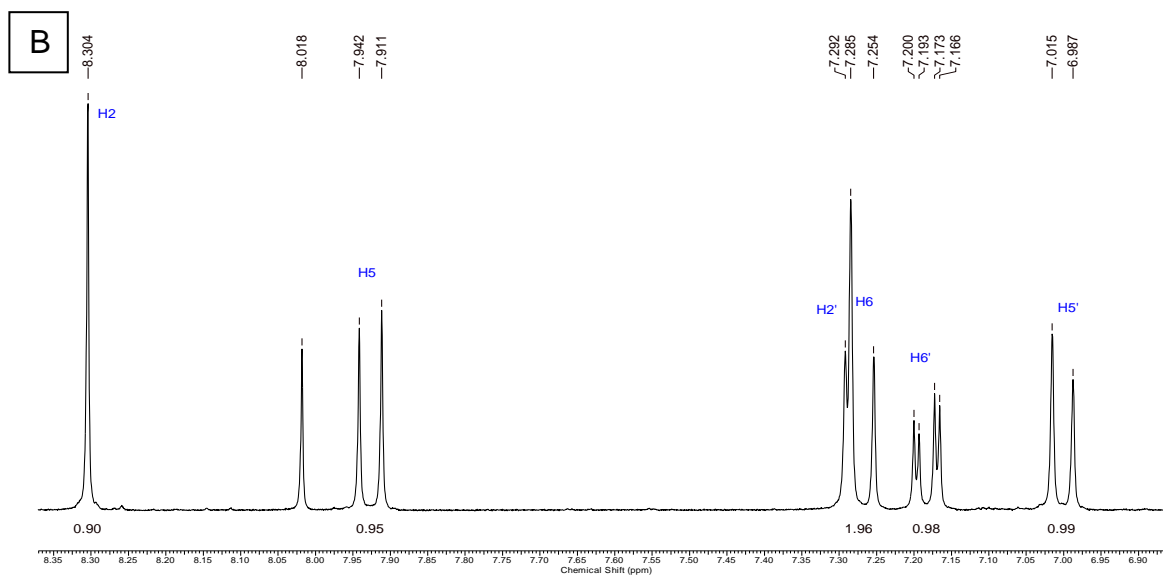
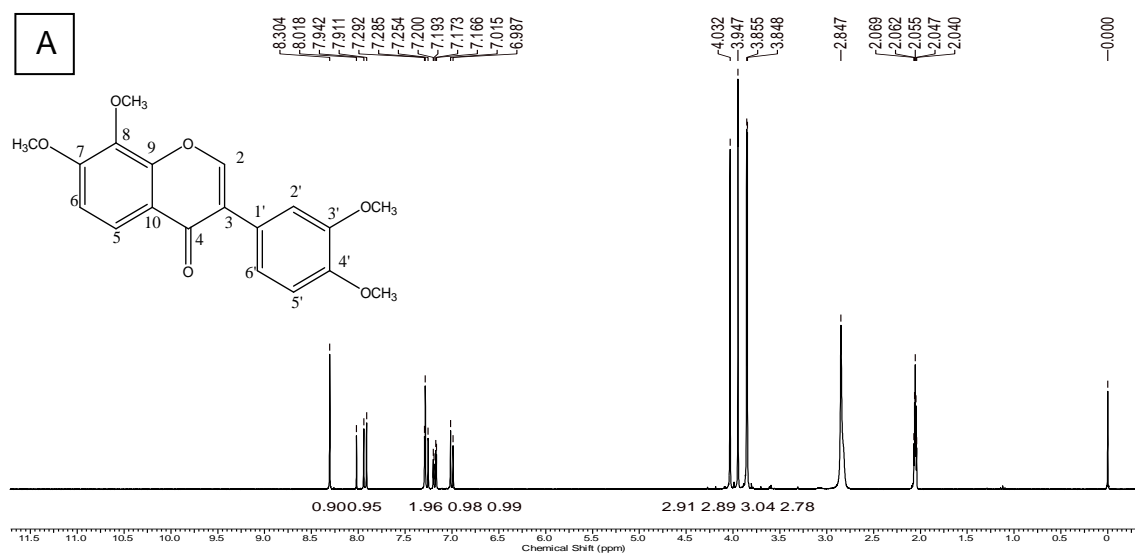


Espectro 42- Espectro de massas (ESI no modo positivo) de **Re-9**.

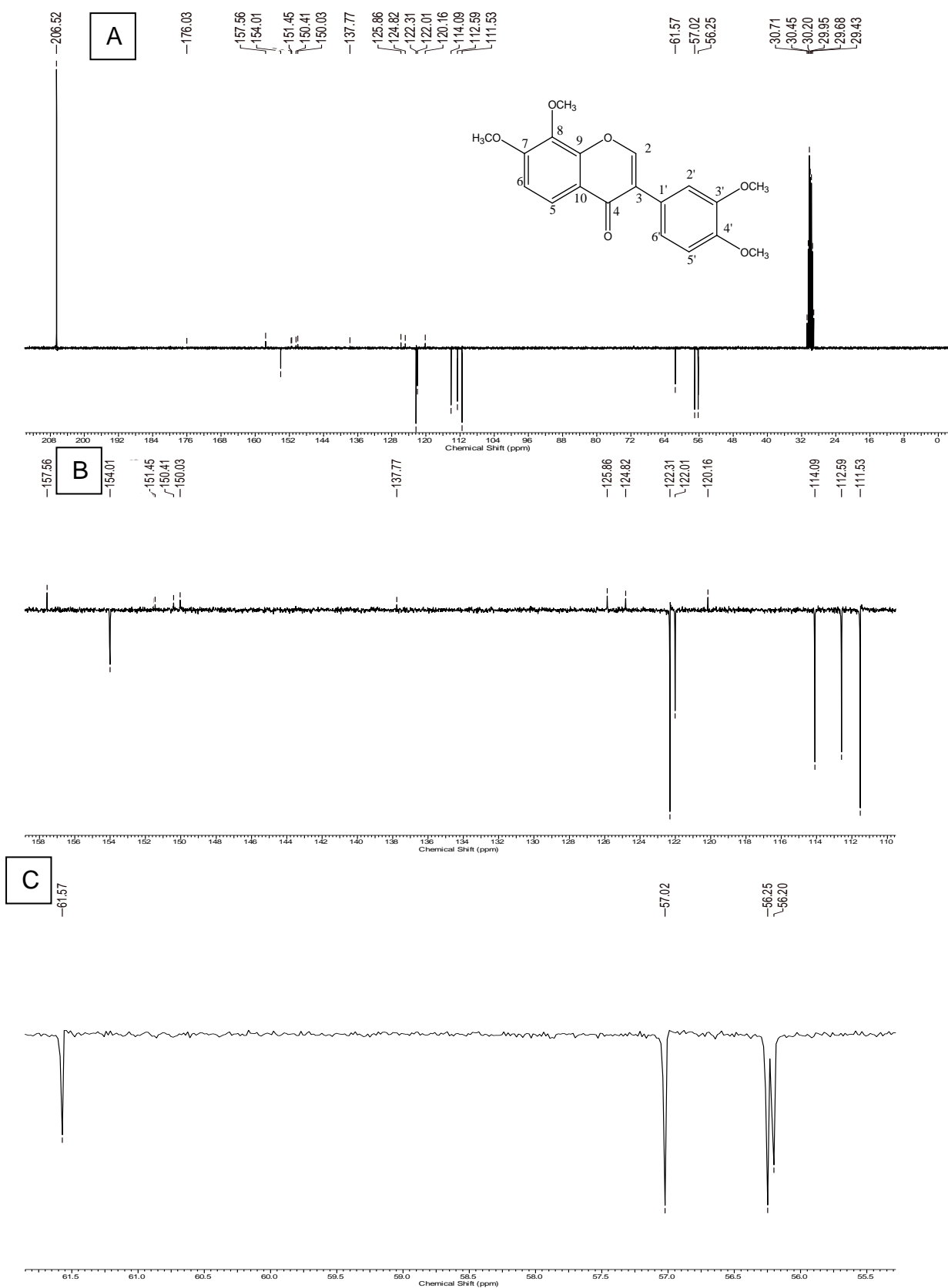
➤ **Isoflavona Re-12**



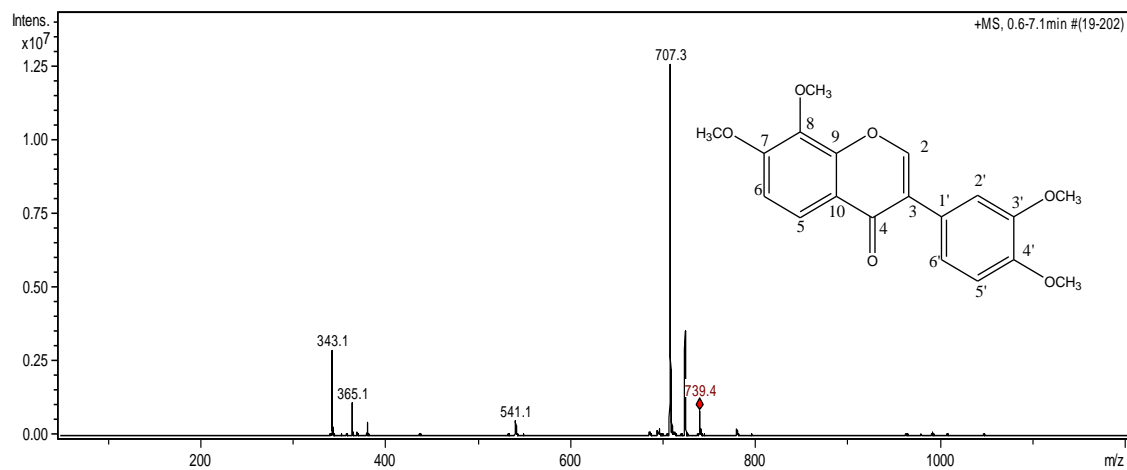
Espectro 43 - Espectro de IV (pastilha de KBr) da substância **Re-12**.



Espectro 44 - Espectro de RMN de ^1H de **Re-12** em Acetona- d_6 (300 MHz) (**A**), expansão (**B**, **C**).

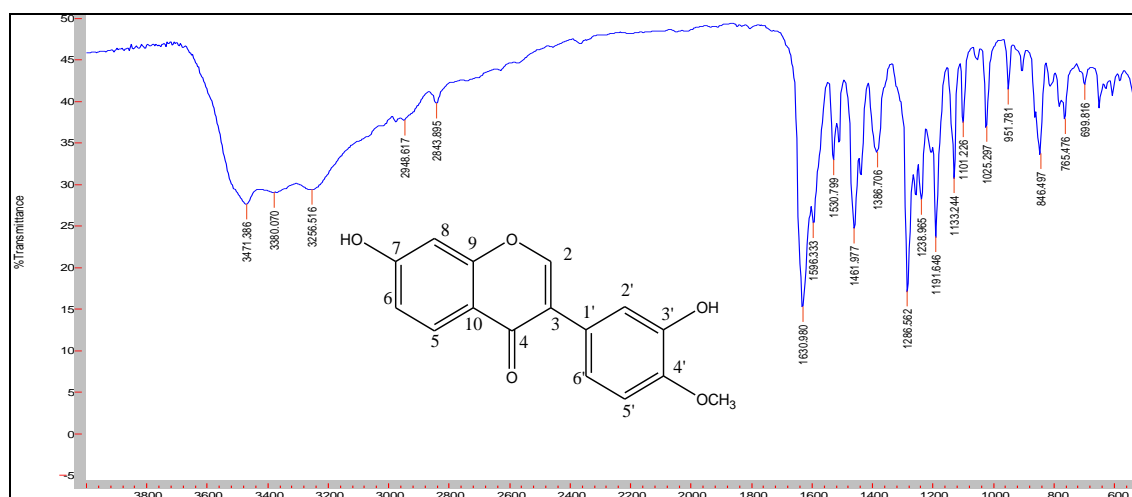


Espectro 45 - Espectro de APT em acetona (75 MHz) de **Re-12** (A). Expansão (B,C).

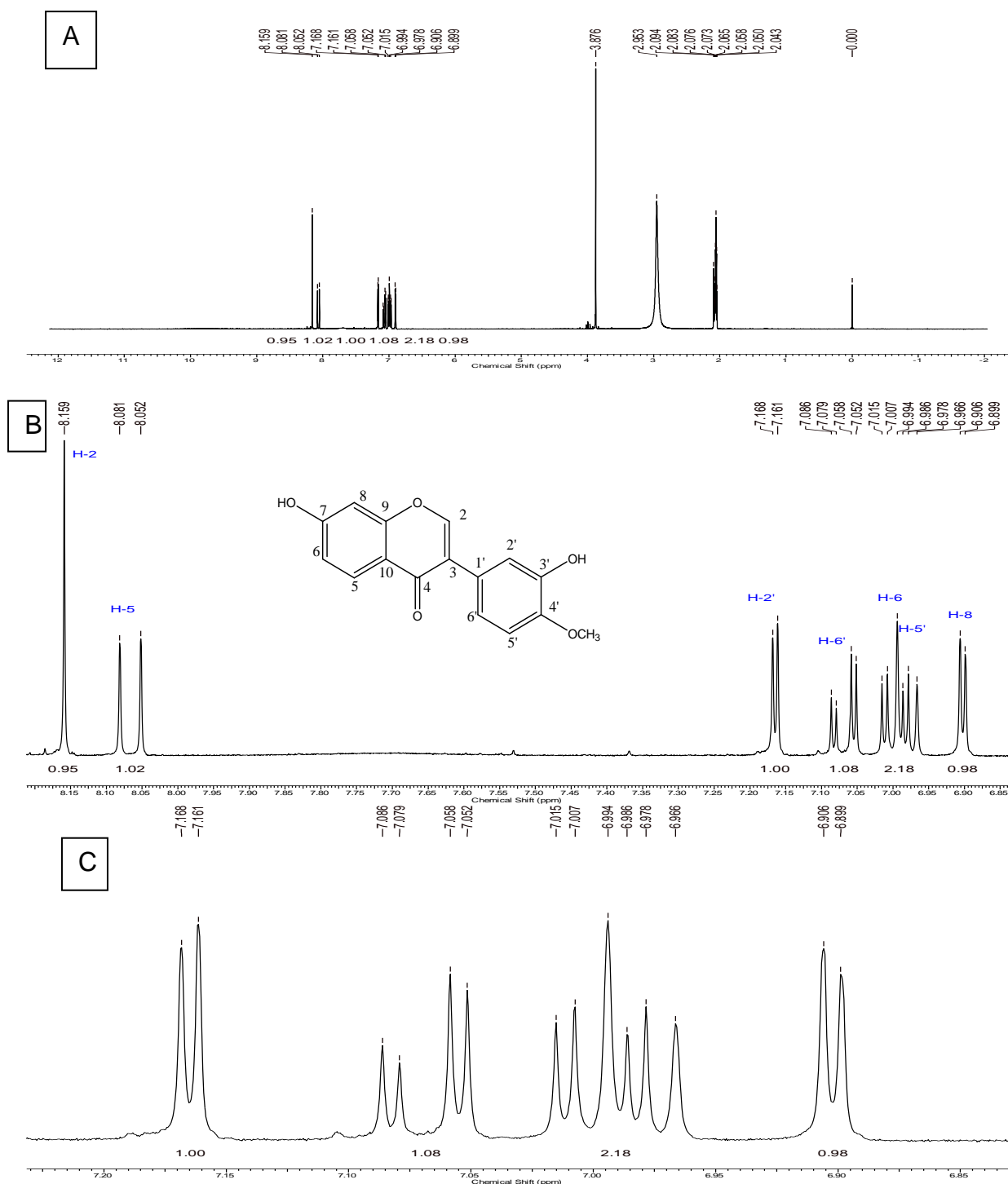


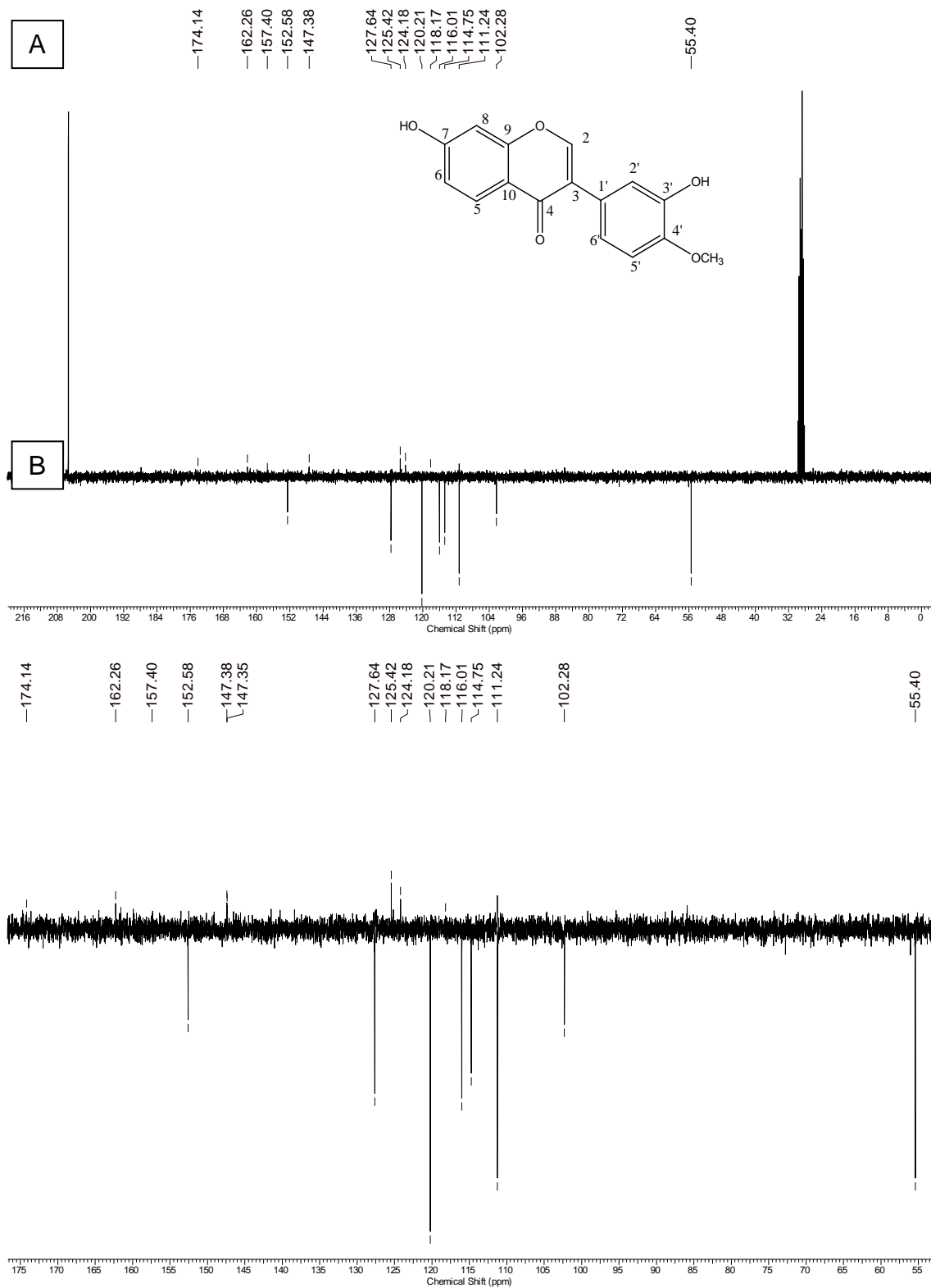
Espectro 46 - Espectro de massas (ESI⁺-MS) de **Re-12**.

➤ **Isoflavona Re-4**

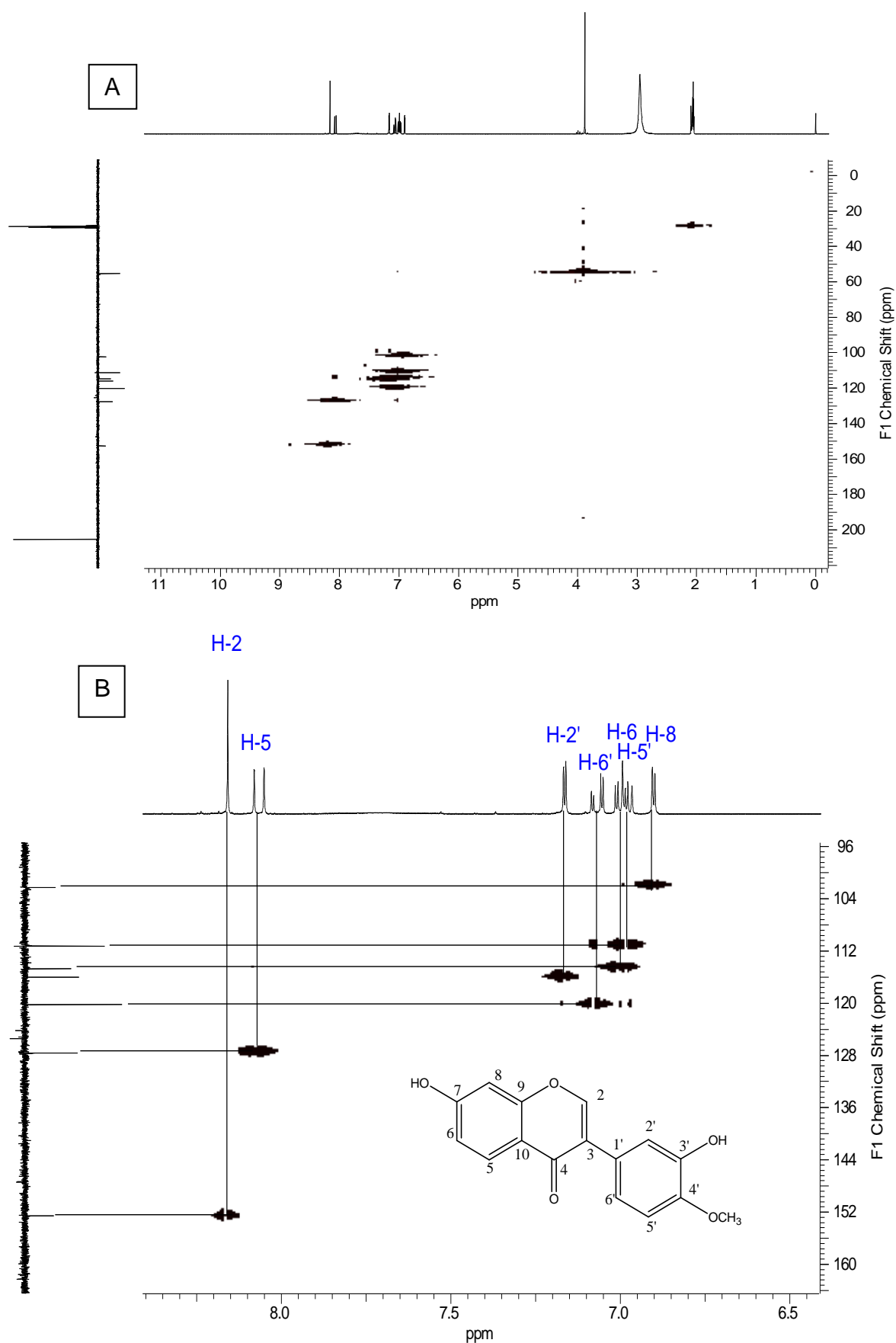


Espectro 47 - Espectro de IV (pastilha de KBr) de **Re-4**.

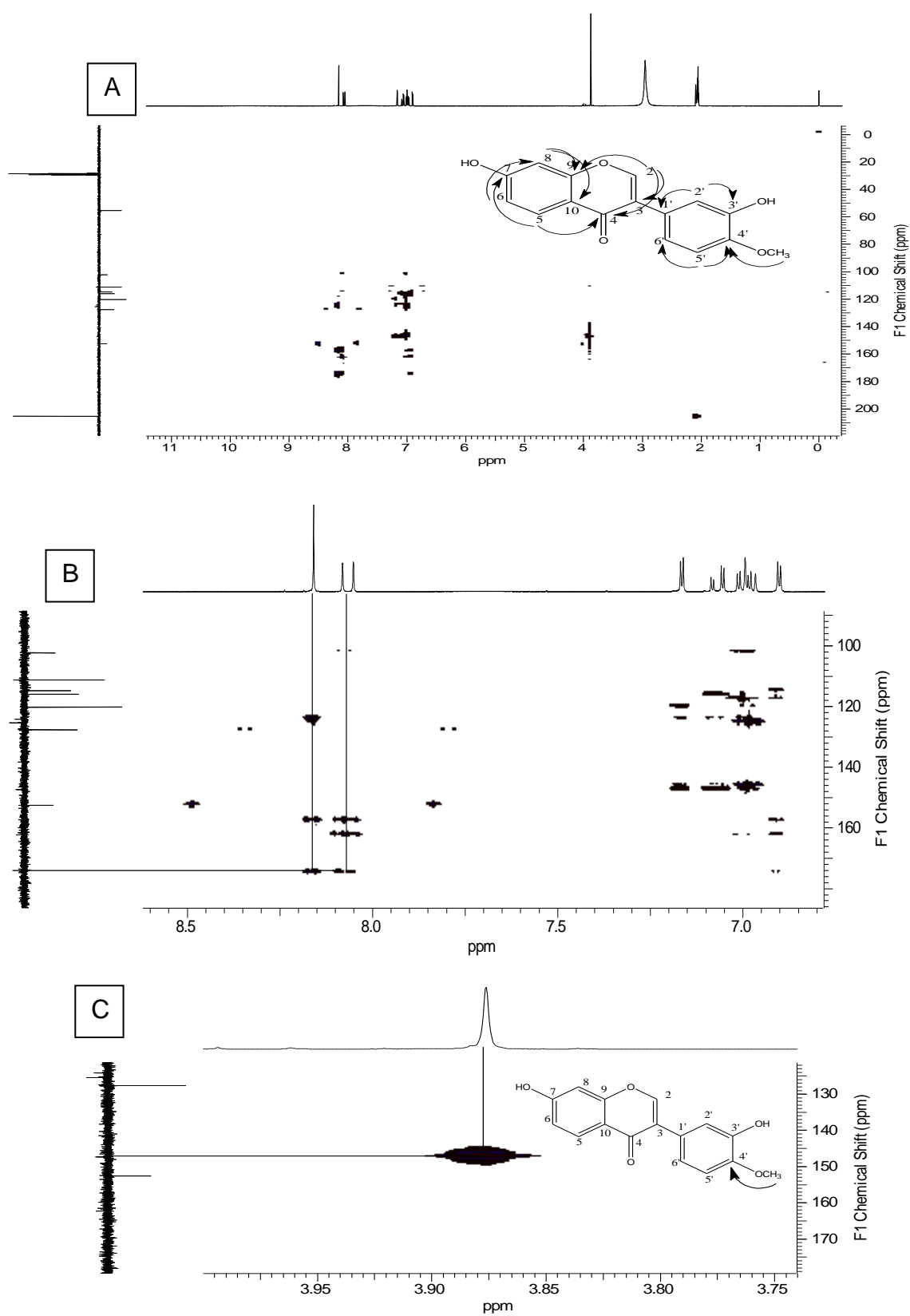




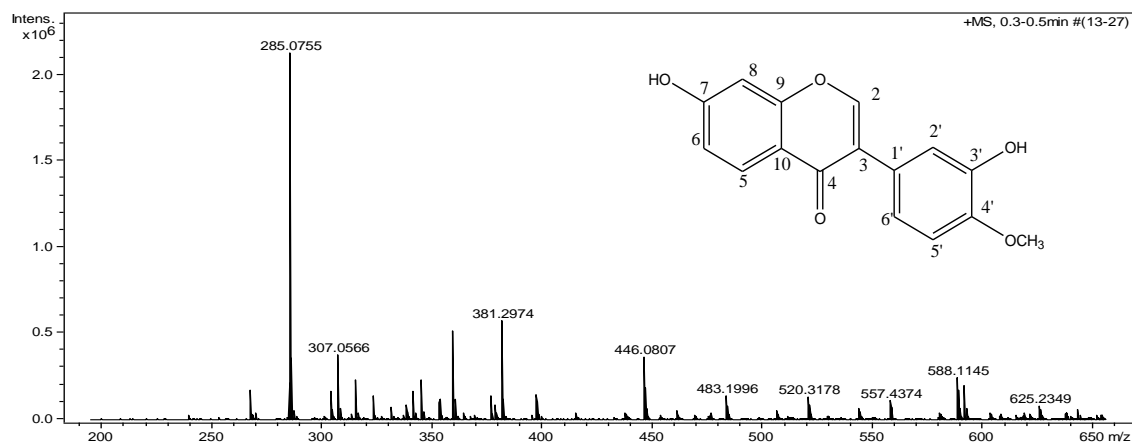
Espectro 49 - Espectro de APT em acetona (75 MHz) de **Re-4** (A). Expansão (B).



Espectro 50 - Espectro de HSQC em acetona (300 MHz) de **Re-4** (A). Expansão (B).

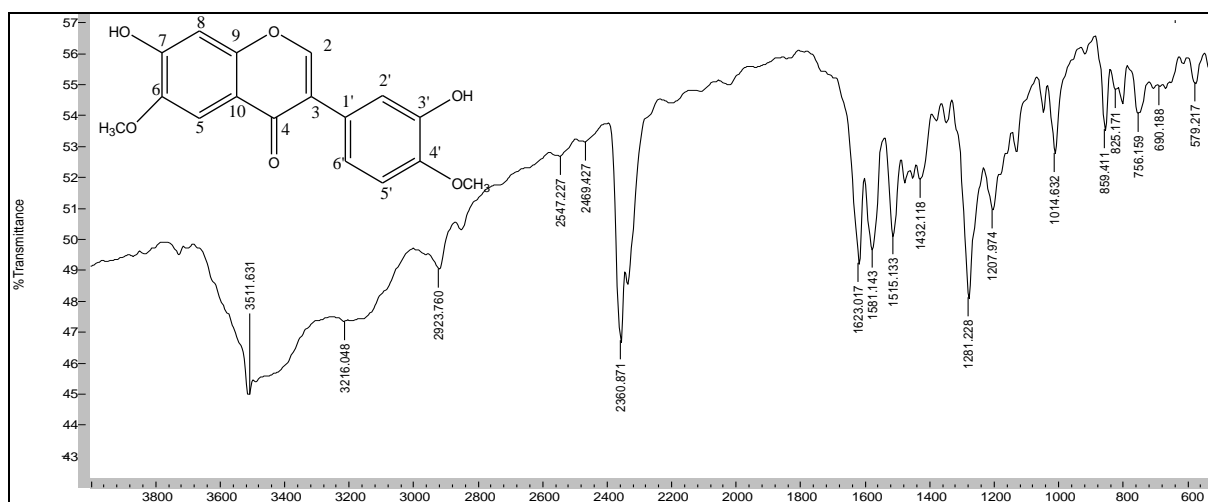


Espectro 51 - Espectro de HMBC em acetona (300 MHz) de **Re-4** (A). Expansão (B, C).

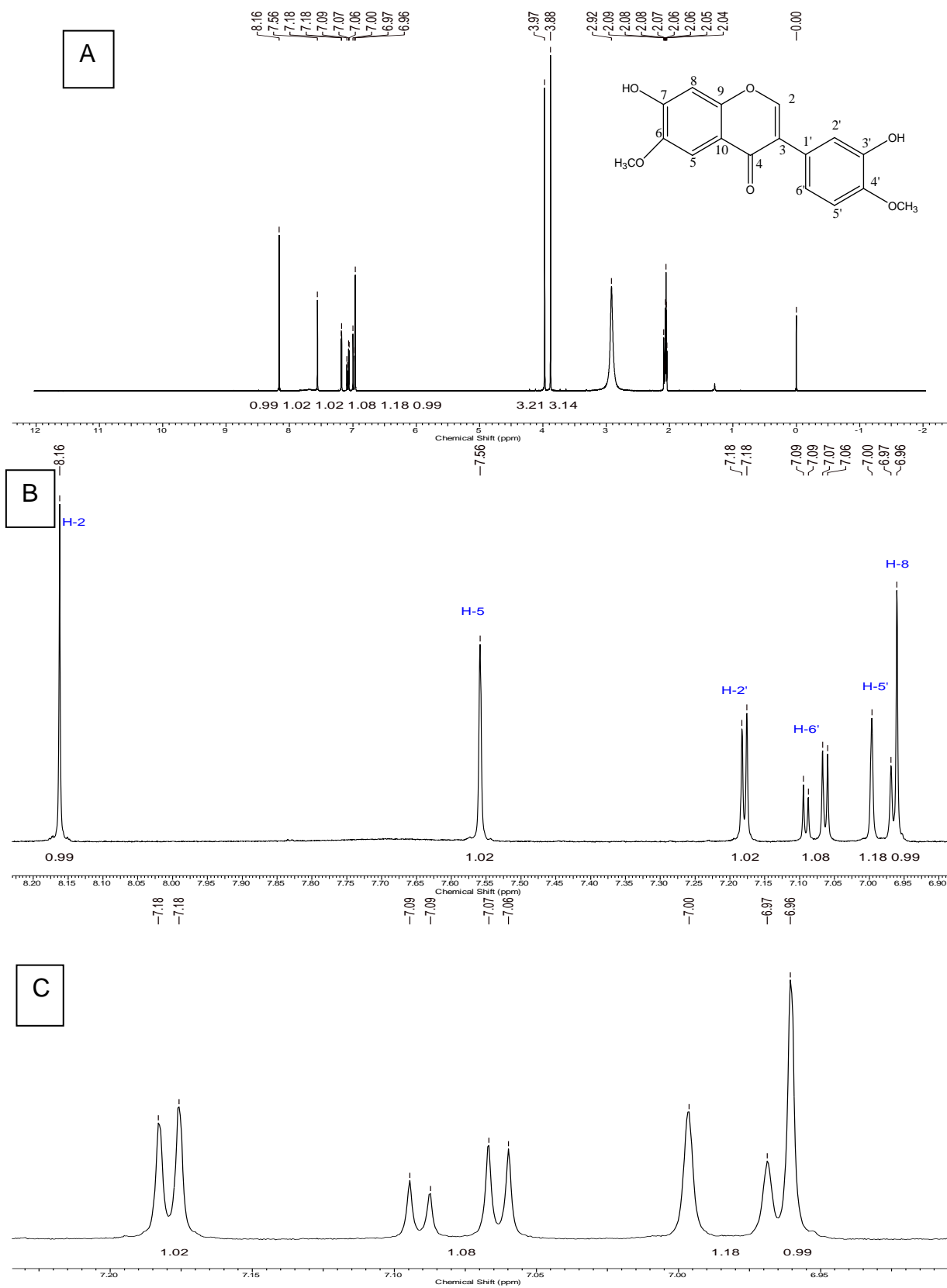


Espectro 52 - Espectro de massas (ESI no modo positivo) de **Re-4**.

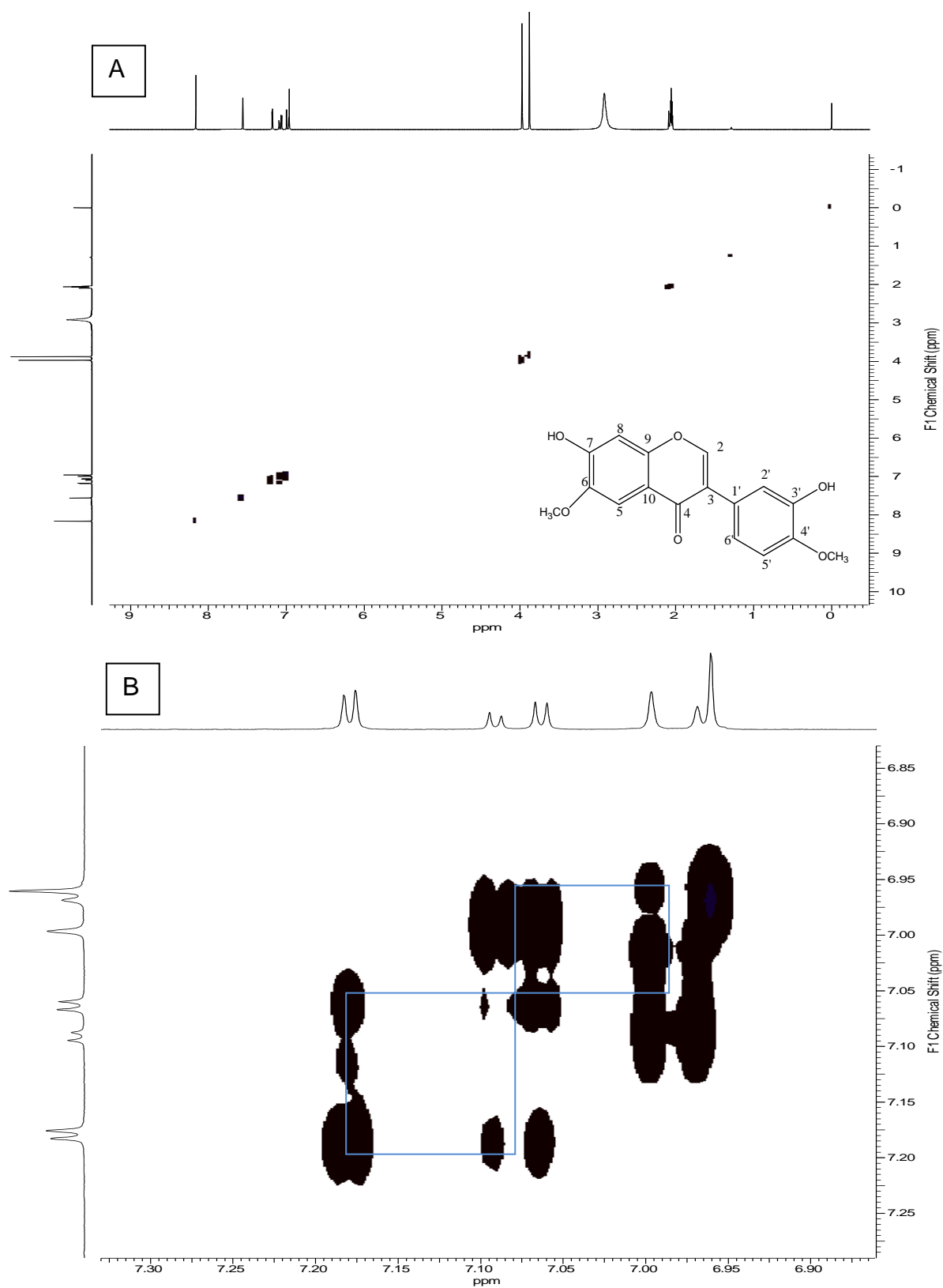
➤ **Isoflavona Re-5**

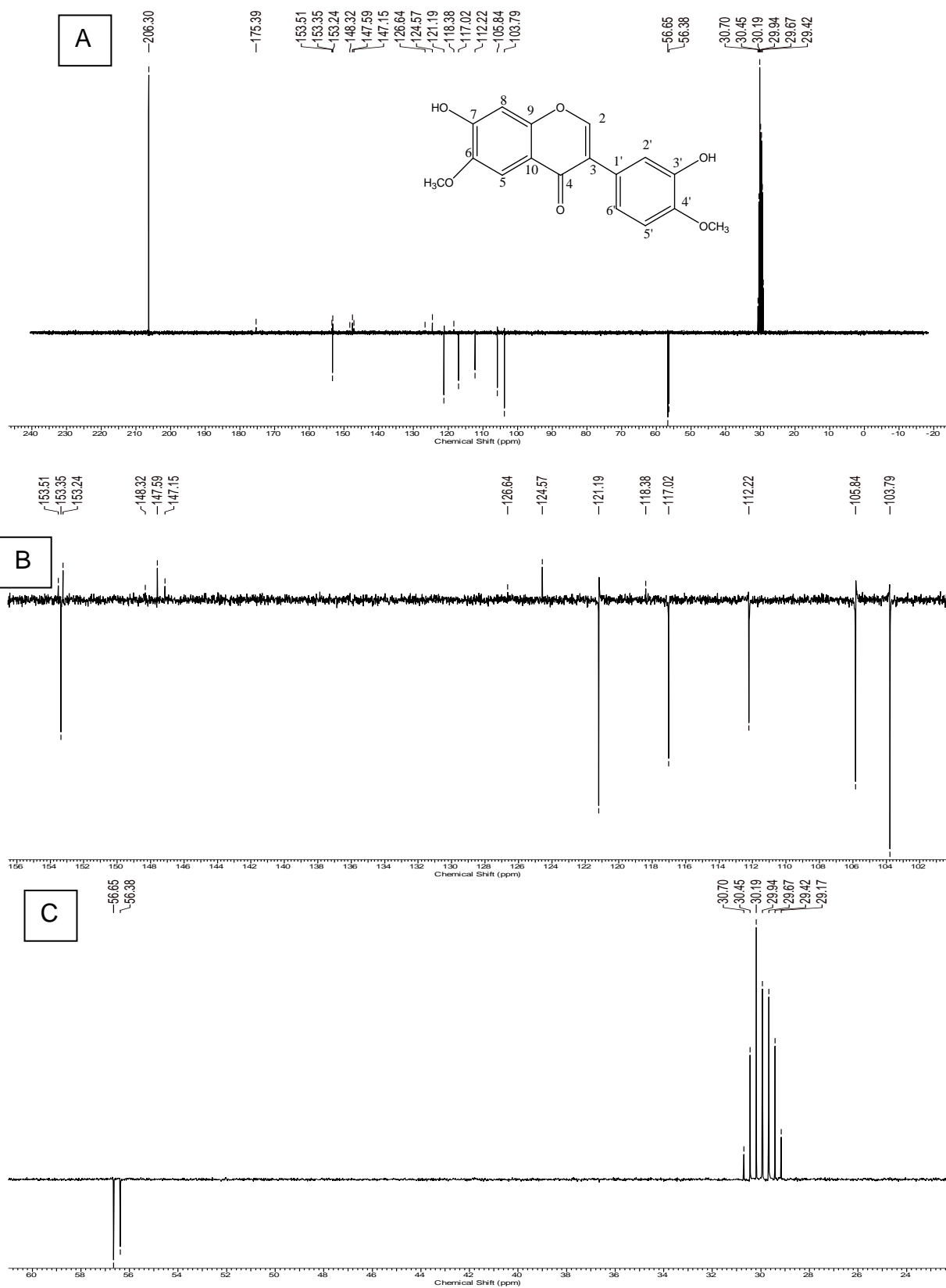


Espectro 53 - Espectro de IV (pastilha de KBr) da substância **Re-5**.

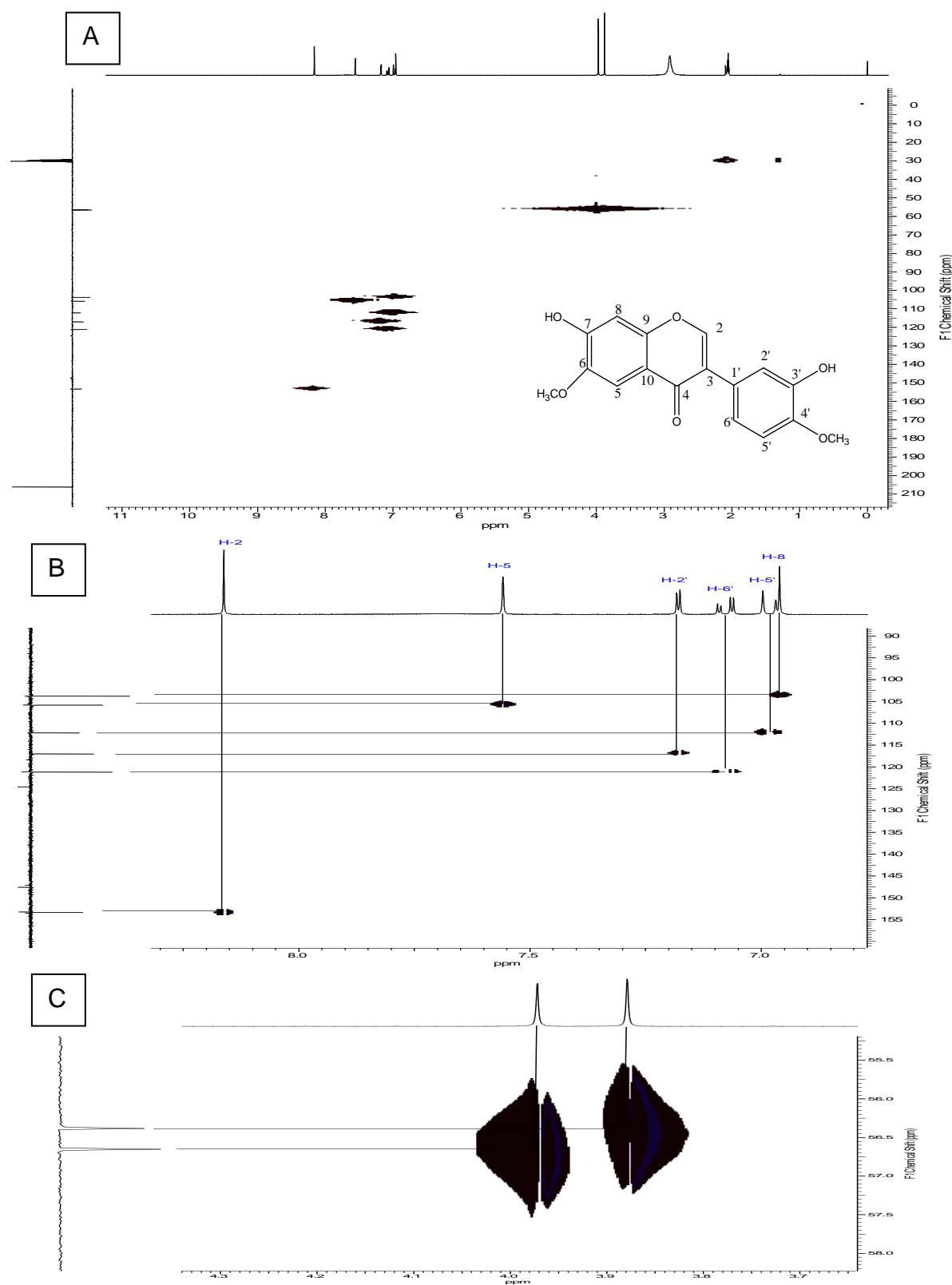


Espectro 54 - Espectro de RMN 1H em acetona-d₆ (300 MHz) de **Re-5** (A). Expansão (B, C).

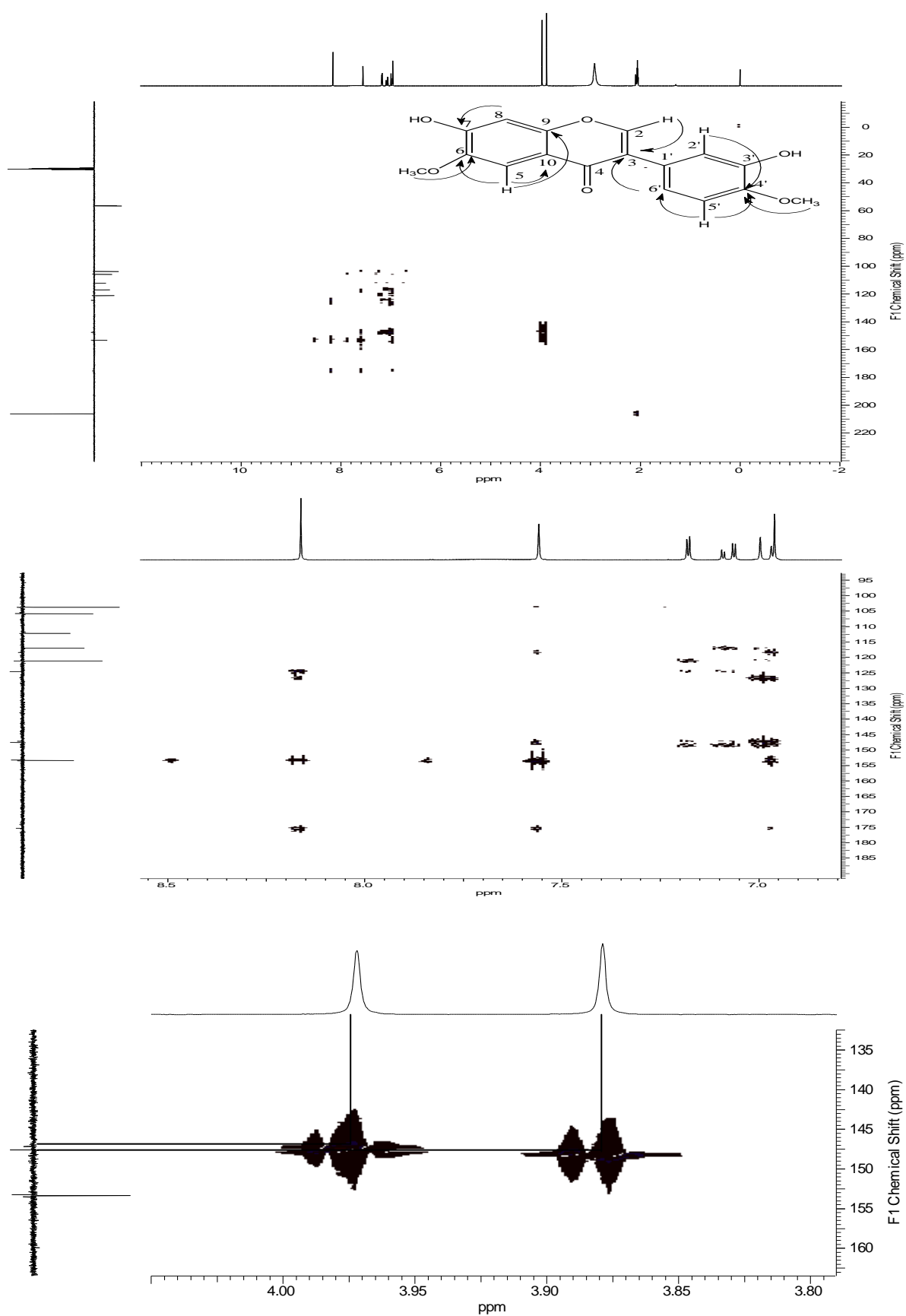




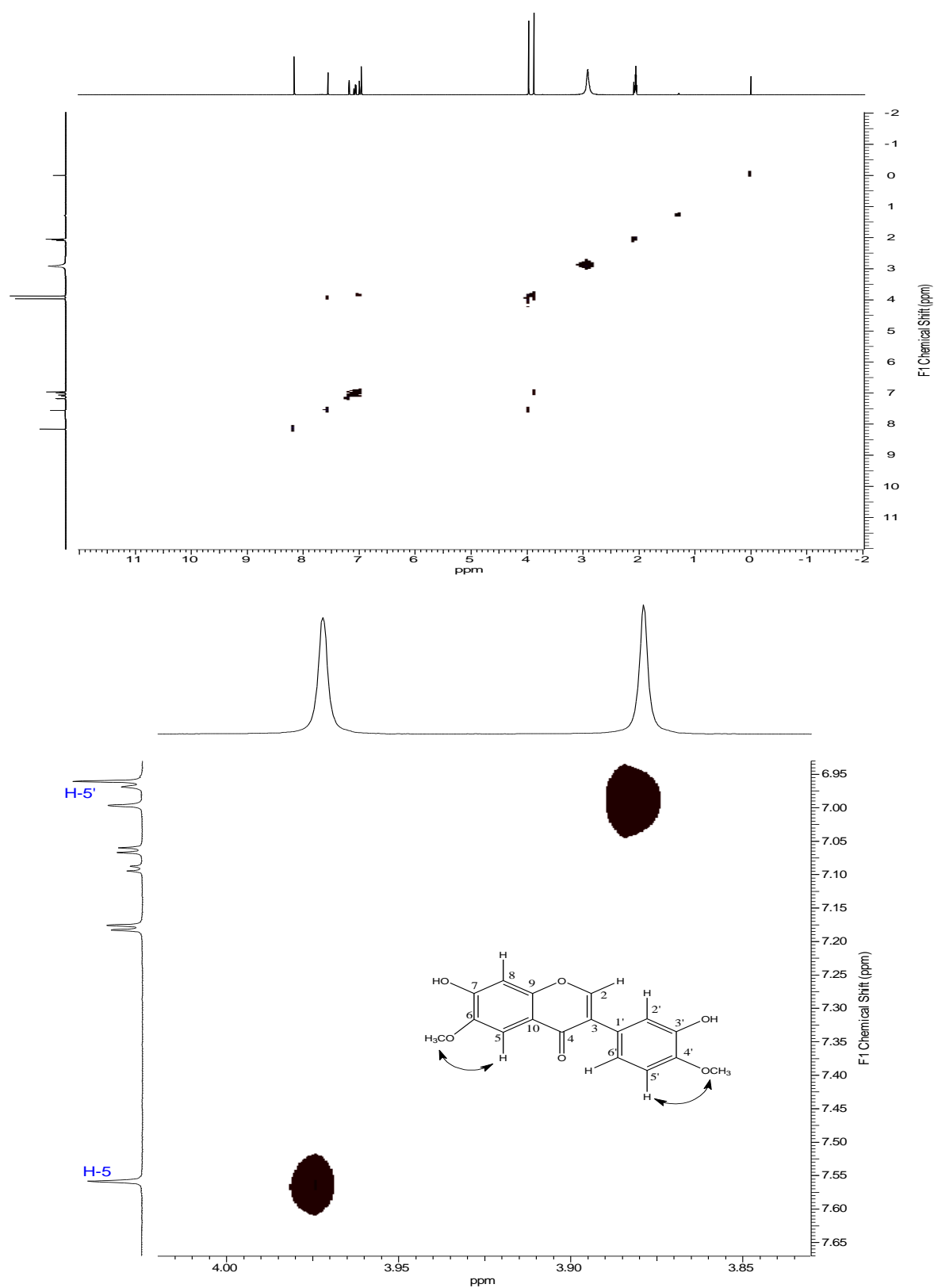
Espectro 56 - Espectro de APT em acetona- d_6 (75 MHz) de **Re-5** (A). Expansão (B,C)



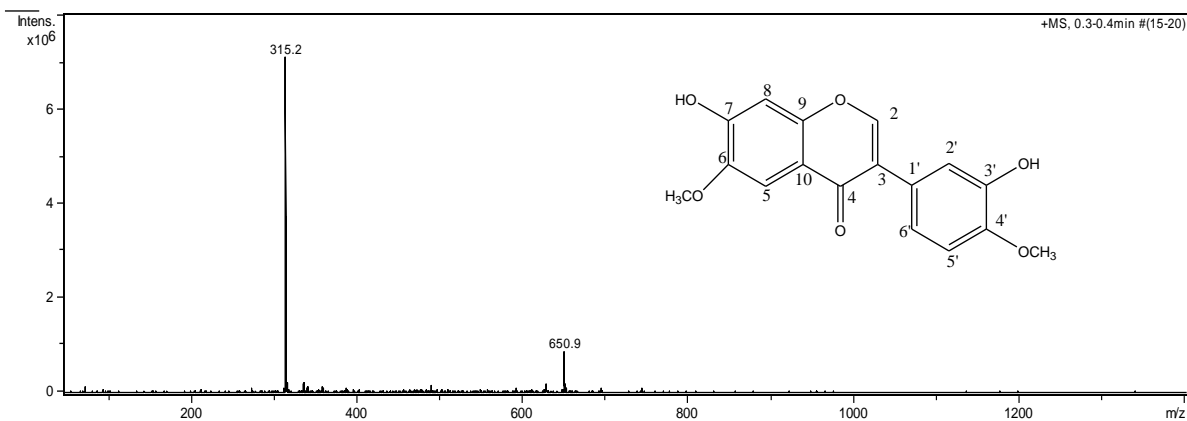
Espectro 57 - Espectro de HSQC em acetona (300 MHz) de **Re-5** (A). Expansão (B,C)



Espectro 58 - Espectro de HMBC em acetona (300 MHz) de **Re-5** (A). Expansão (B).

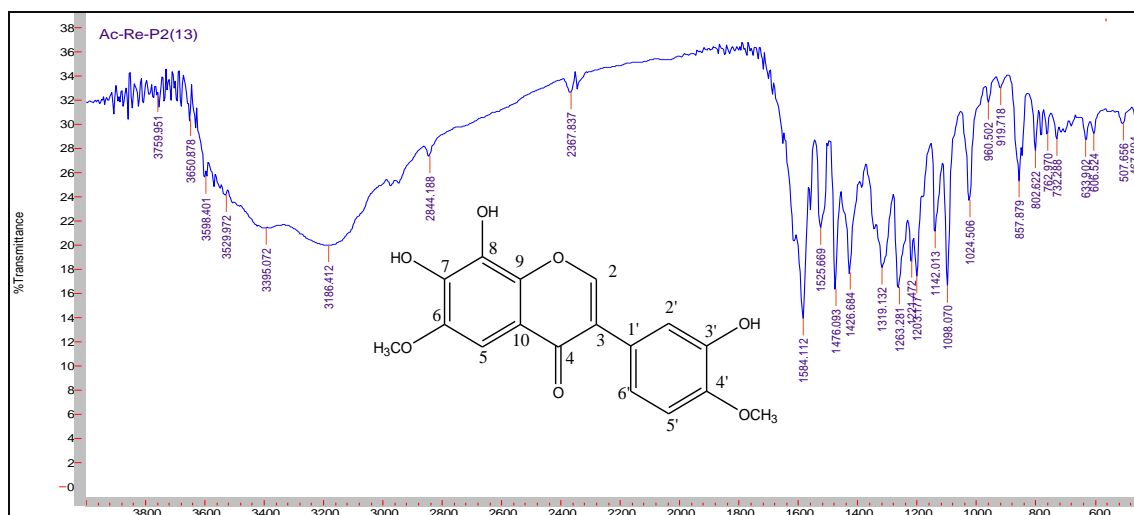


Espectro 59 - Espectro de NOESY em acetona (300 MHz) de **Re-5** (A). Expansão (B)

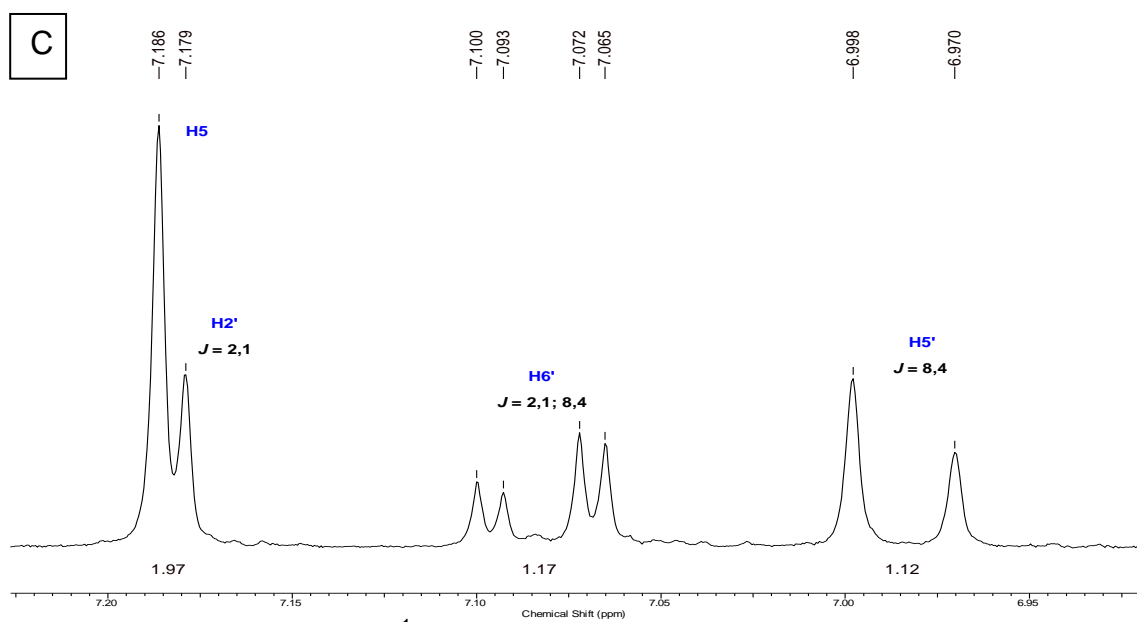
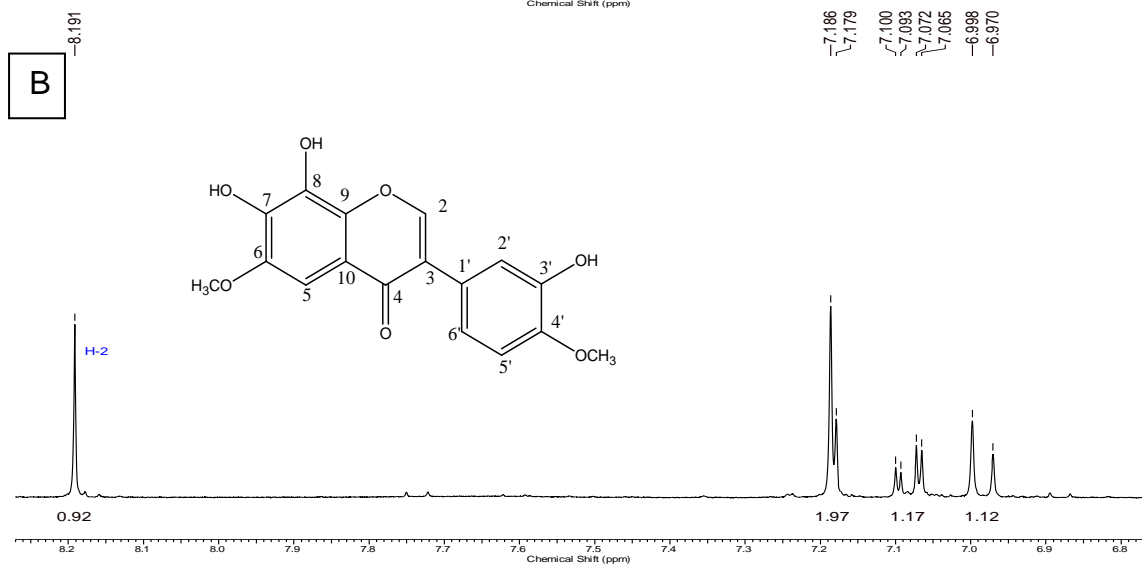
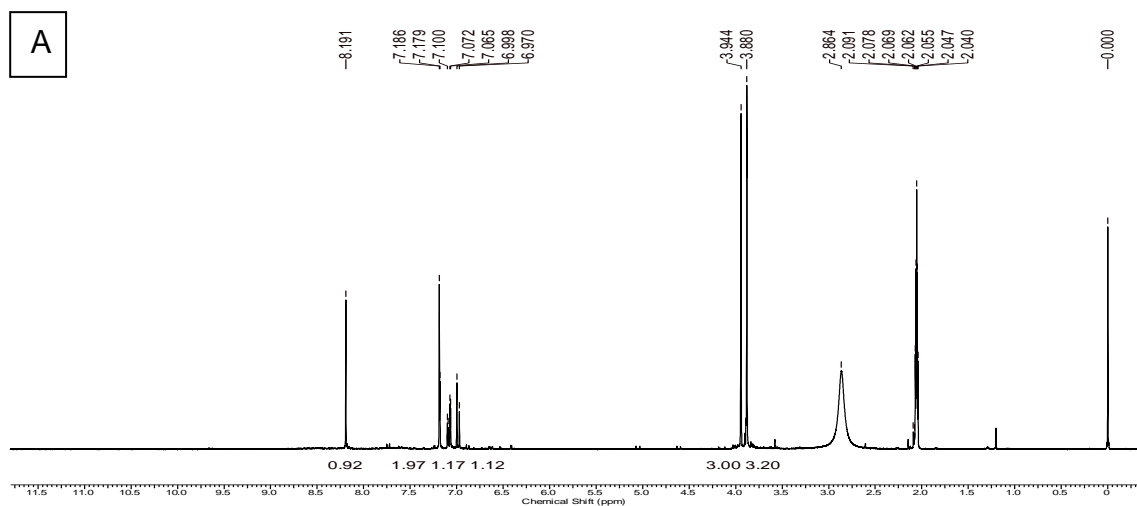


Espectro 60 - Espectro de massas (ESI⁺-MS) de **Re-5**.

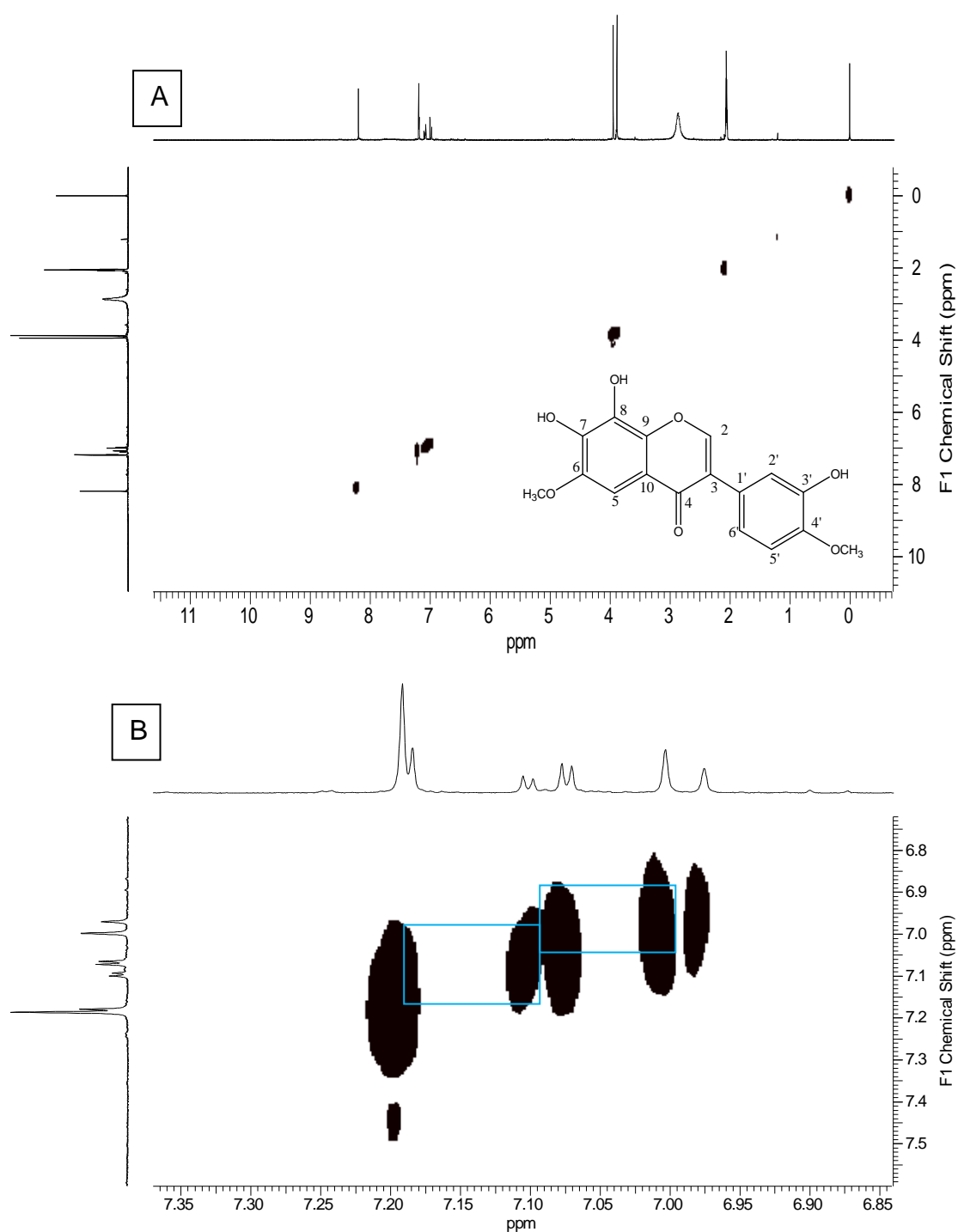
➤ **Isoflavona Re-2**



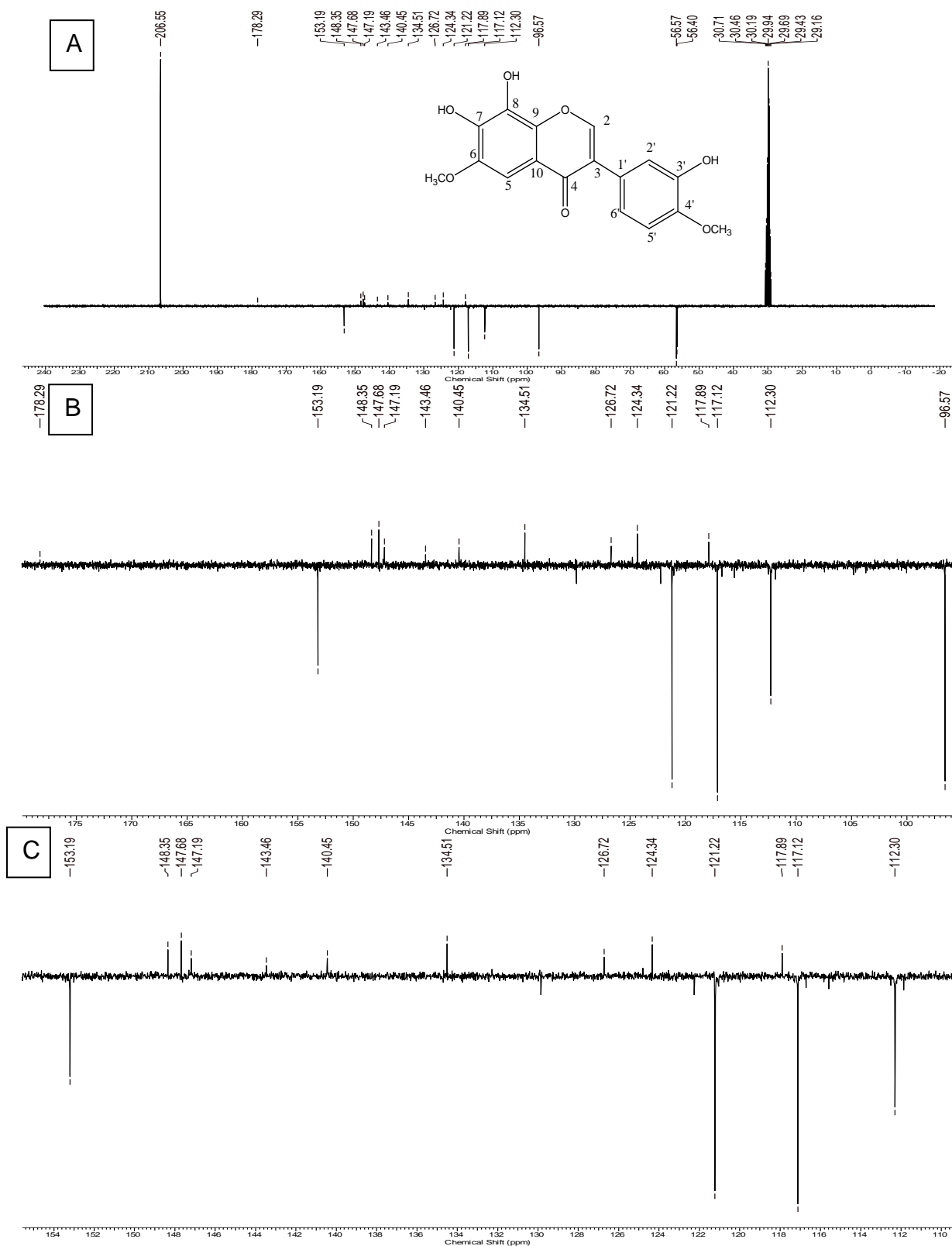
Espectro 61 - Espectro de IV (pastilha de KBr) da substância **Re-2**.



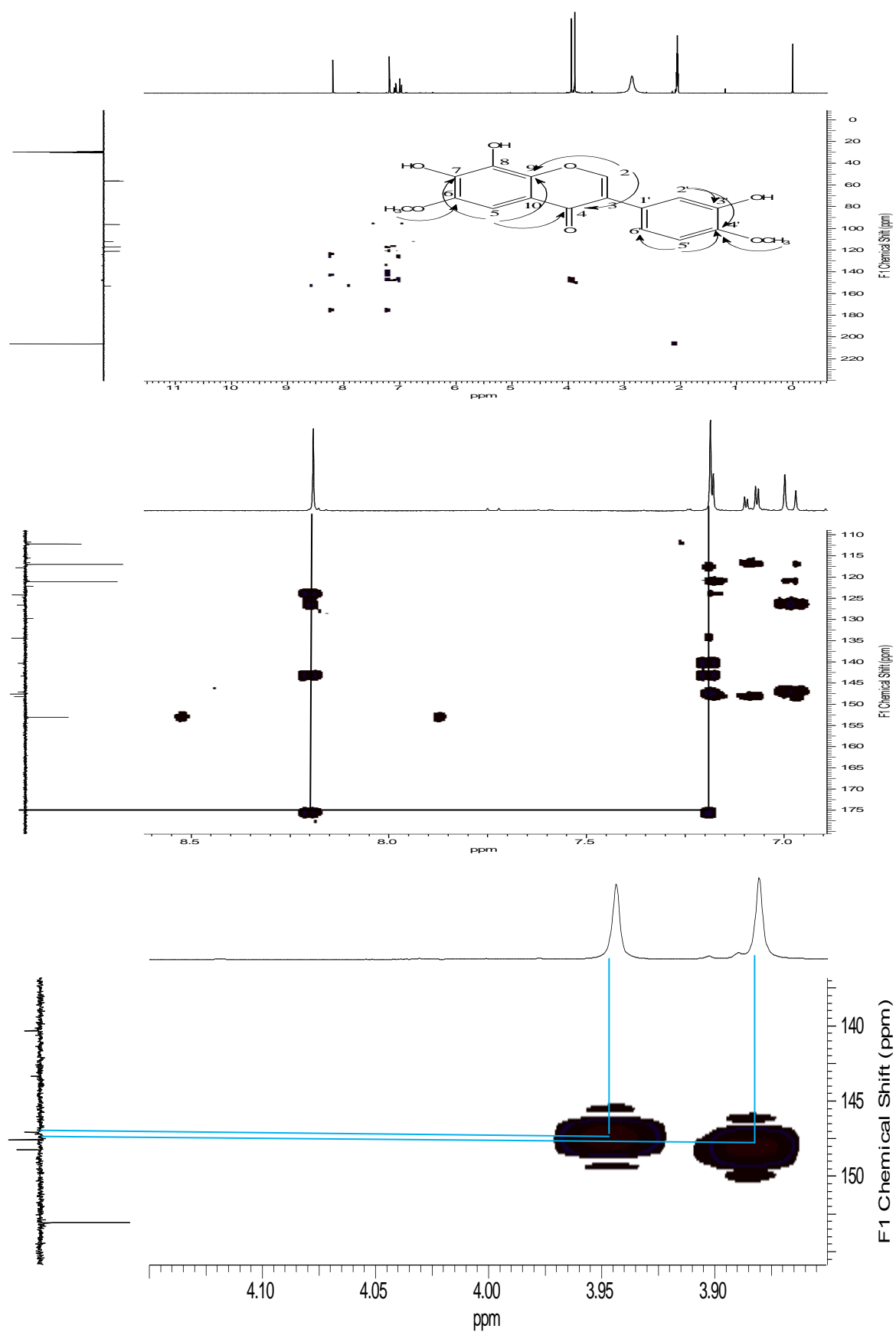
Espectro 62 - Espectro de RMN ^1H em acetona- d_6 (300 MHz) de **Re-2** (A). Expansão (B, C).



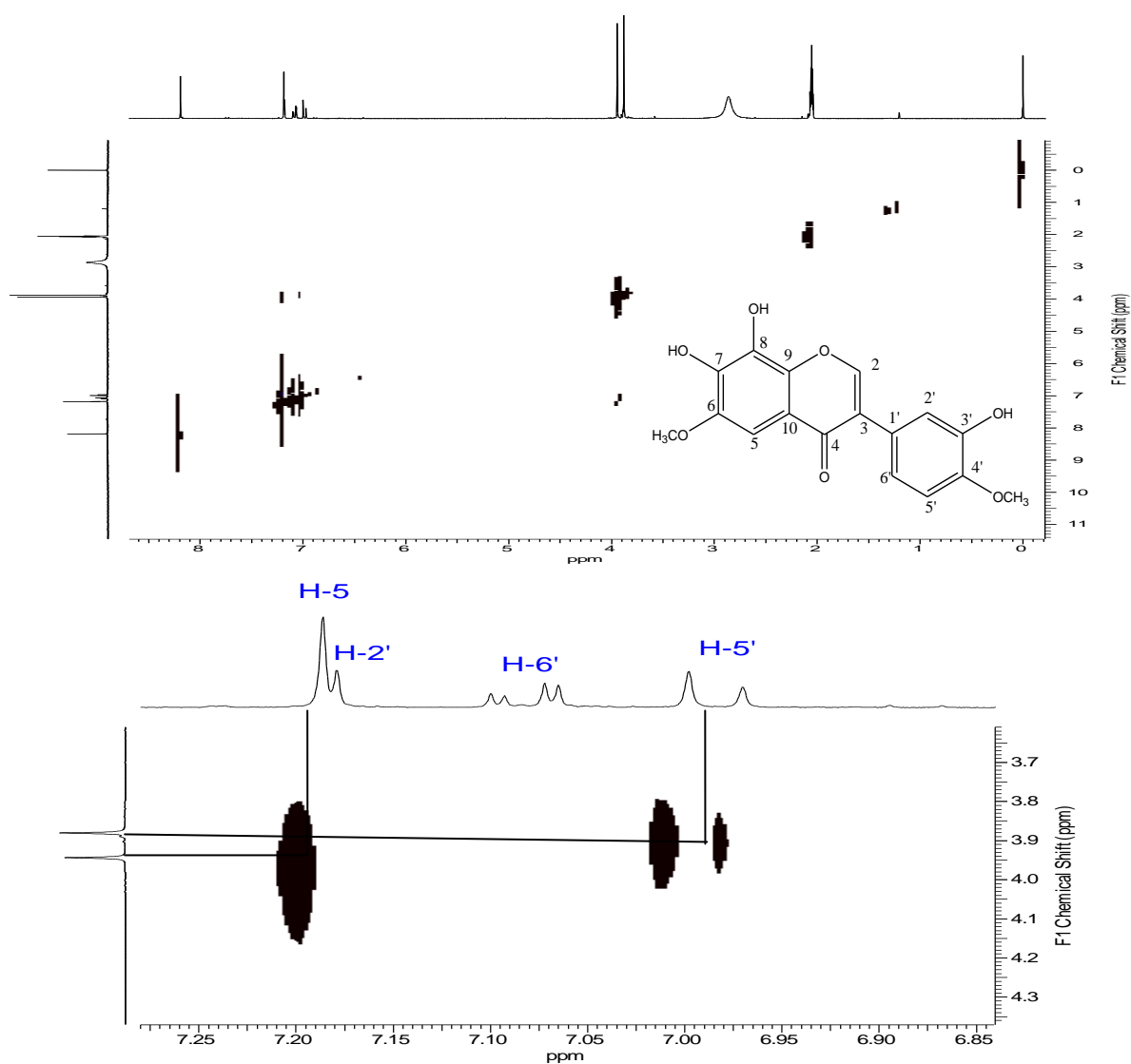
Espectro 63 - Espectro de COSY em acetona- d_6 (300 MHz) de **Re-2** (A). Expansão (B).



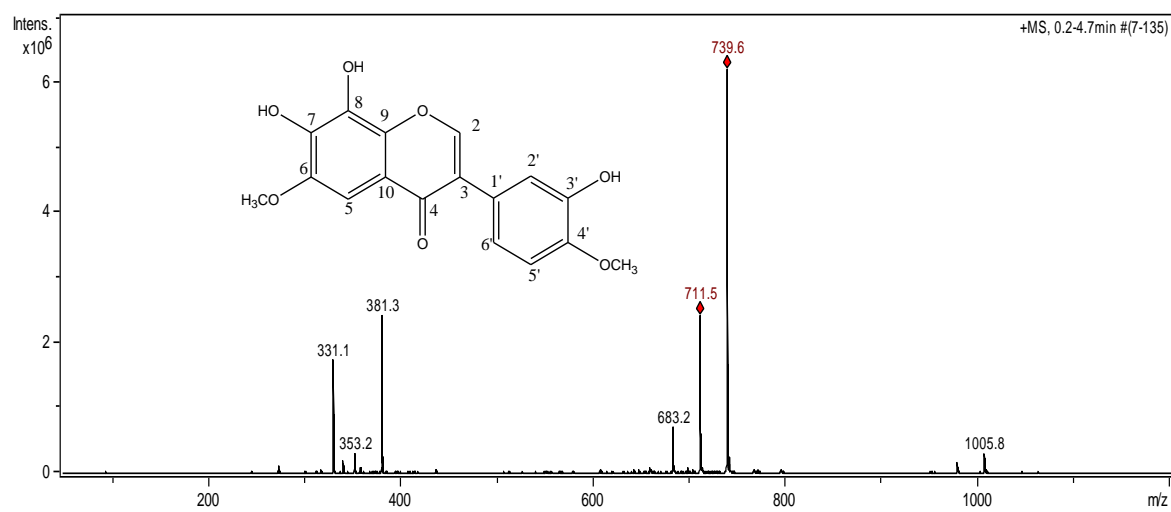
Spectro 64 - Espectro Espectro de APT em acetona- d_6 (75 MHz) de **Re-2** (A). Expansão (B, C).



Espectro 65 - Espectro de HMBC em acetona- d_6 (300 MHz) de **Re-2** (A). Expansão (B,C)

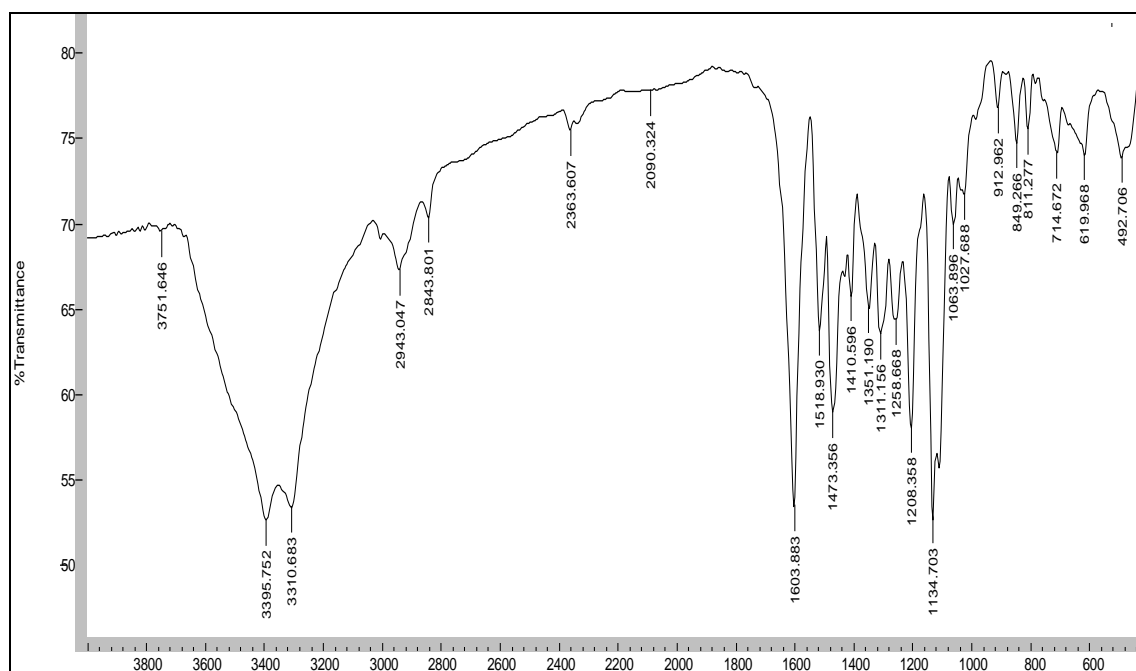


Espectro 66 - Espectro de NOESY em acetona (300 MHz) de **Re-2** (A). Expansão (B, C).

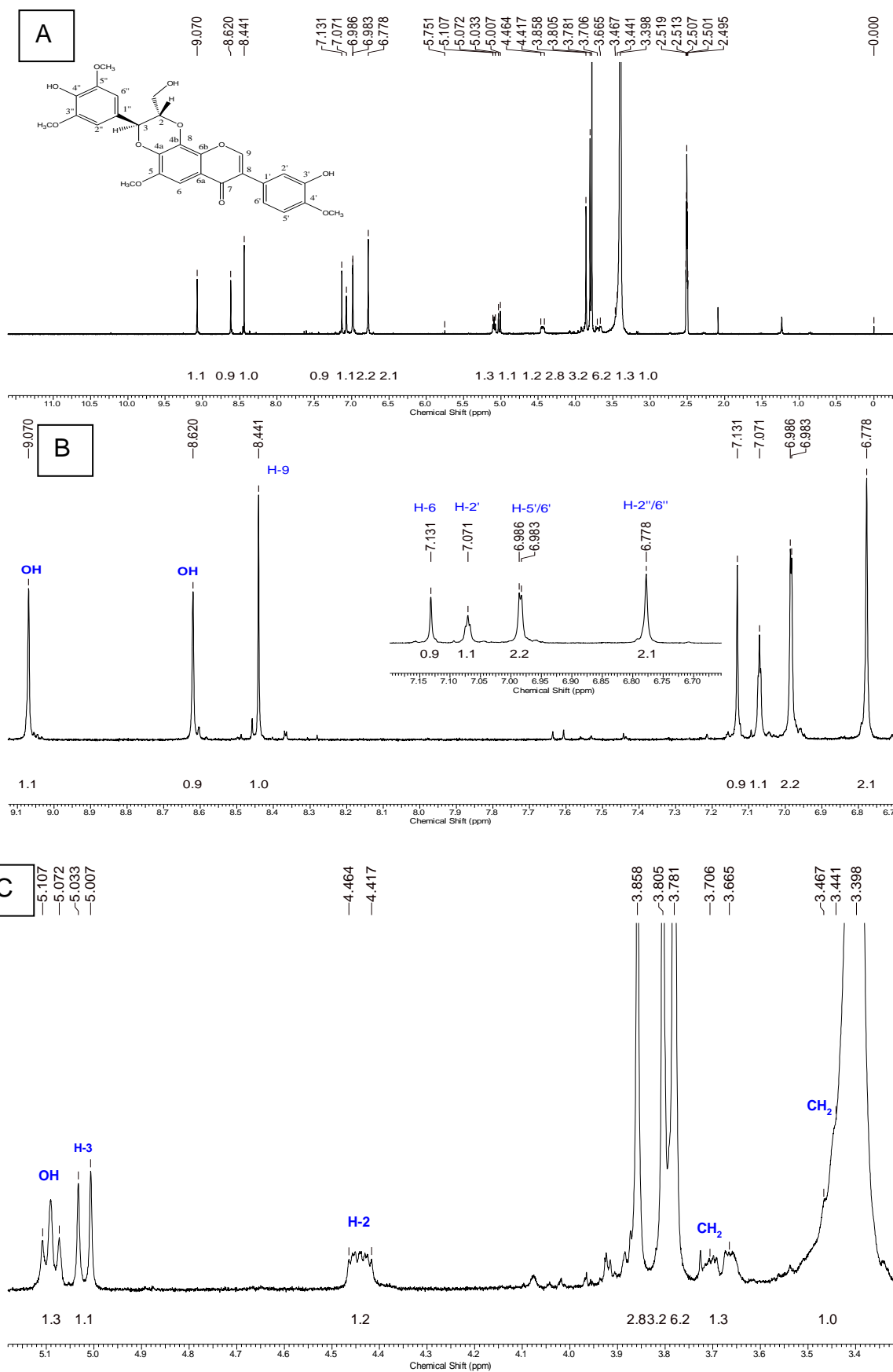


Espectro 67 - Espectro de massas (ESI+-MS) de **Re-2**.

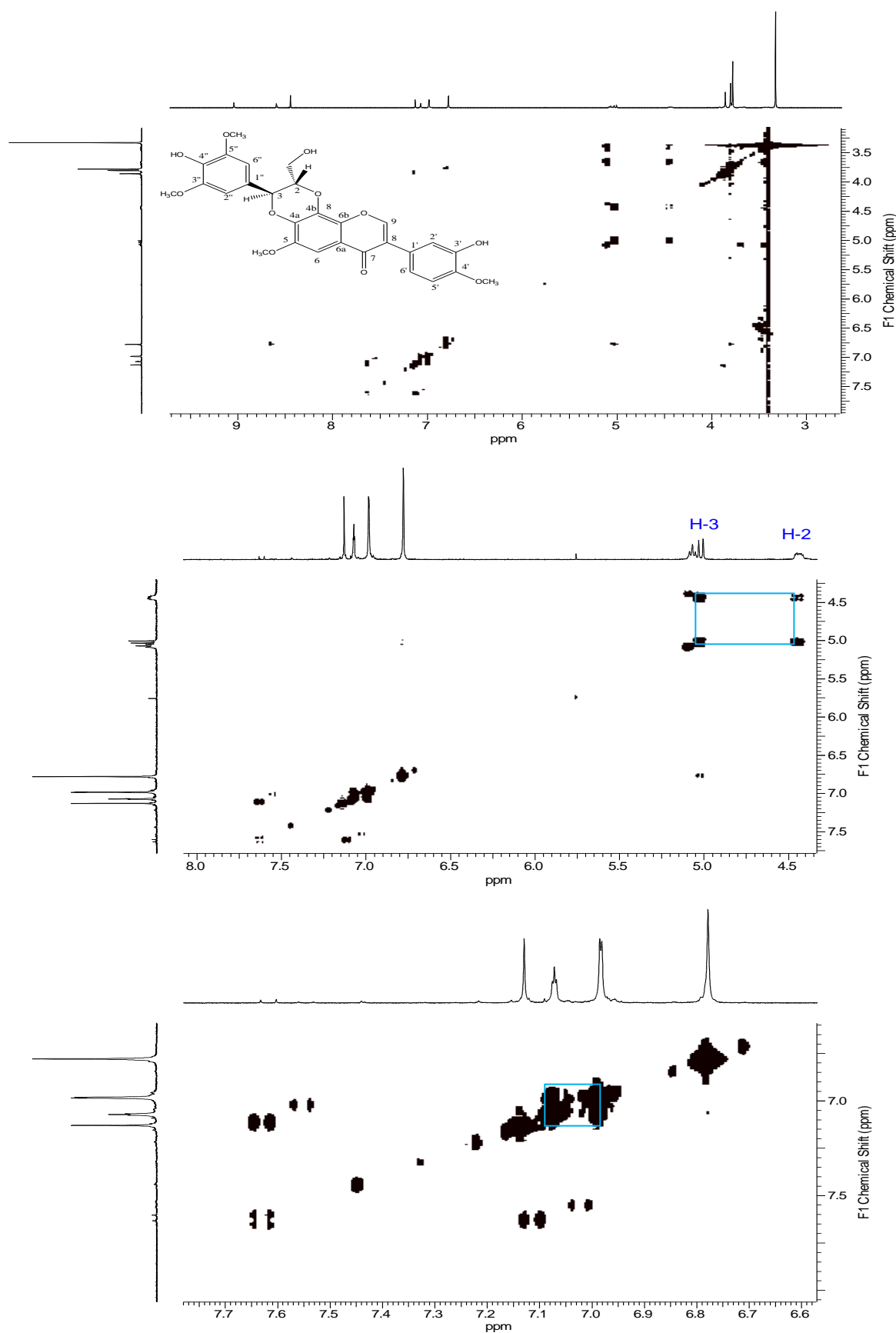
❖ Espectros da isoflavonolignana Re-7



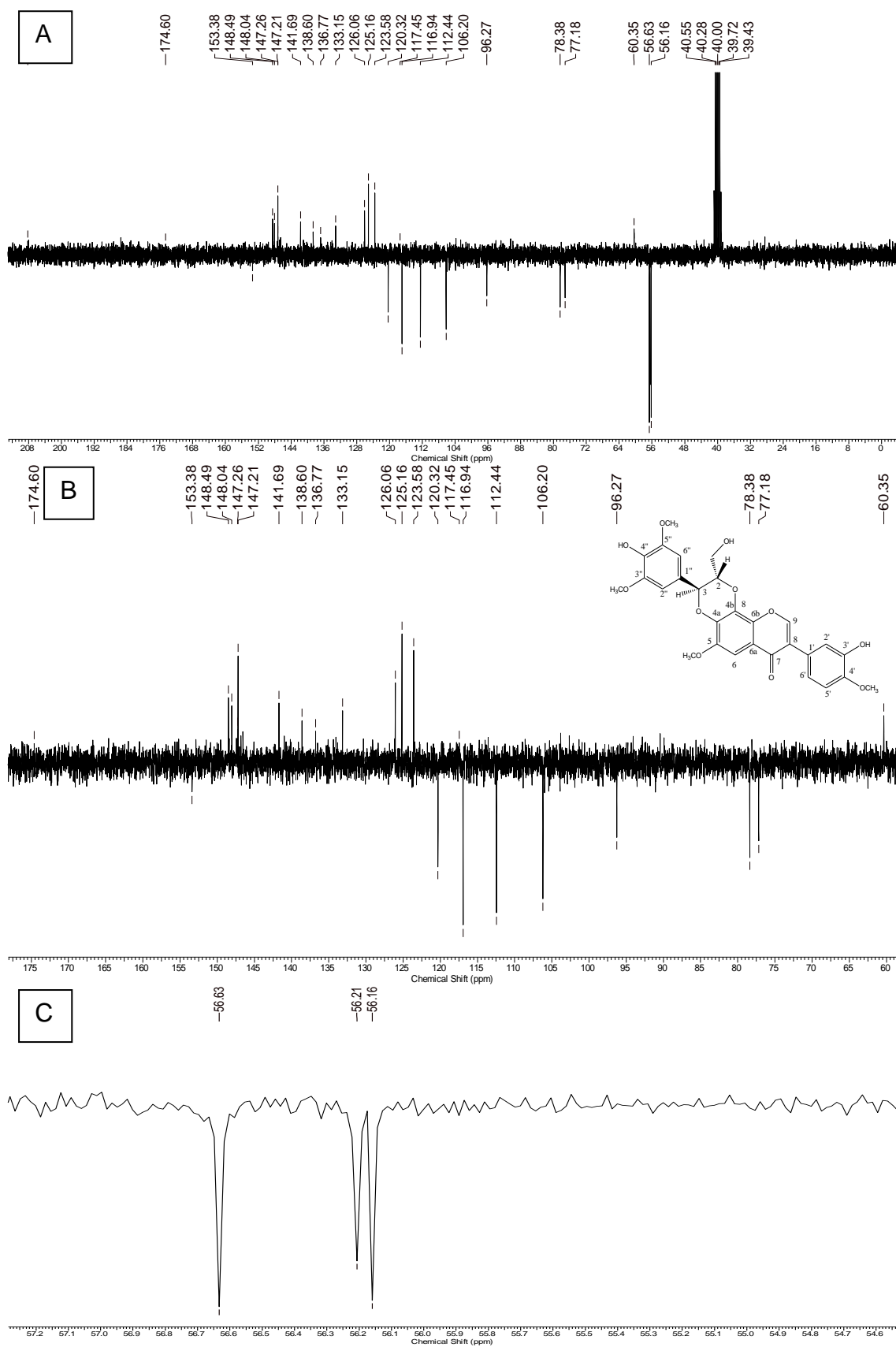
Espectro 68 - Espectro de IV (pastilha de KBr) da substância **Re-7**.



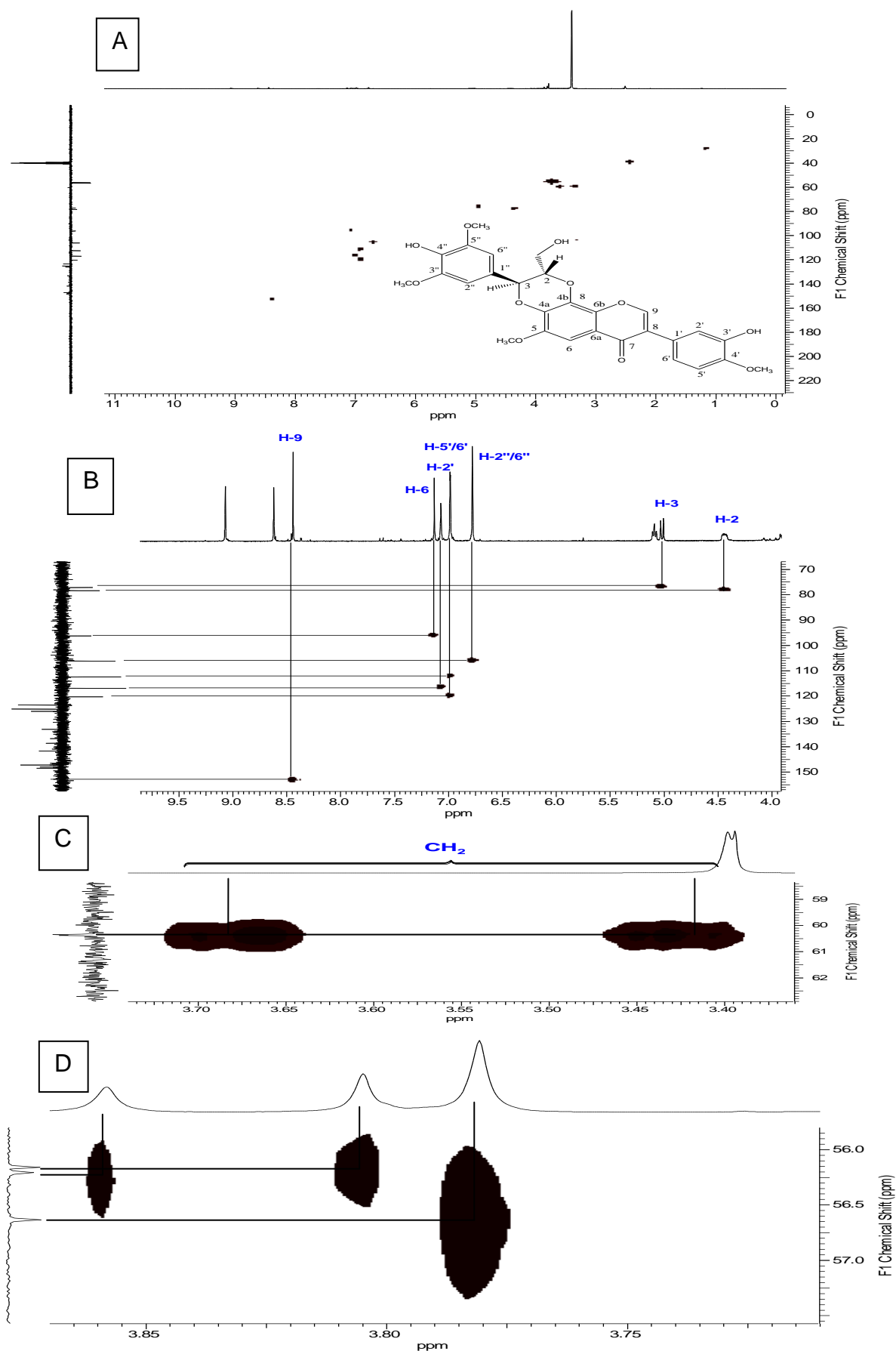
Espectro 69 – Espectro de RMN ^1H em $\text{DMSO}-d_6$ (300 MHz) de **Re-7** (A). Expansão (B, C).



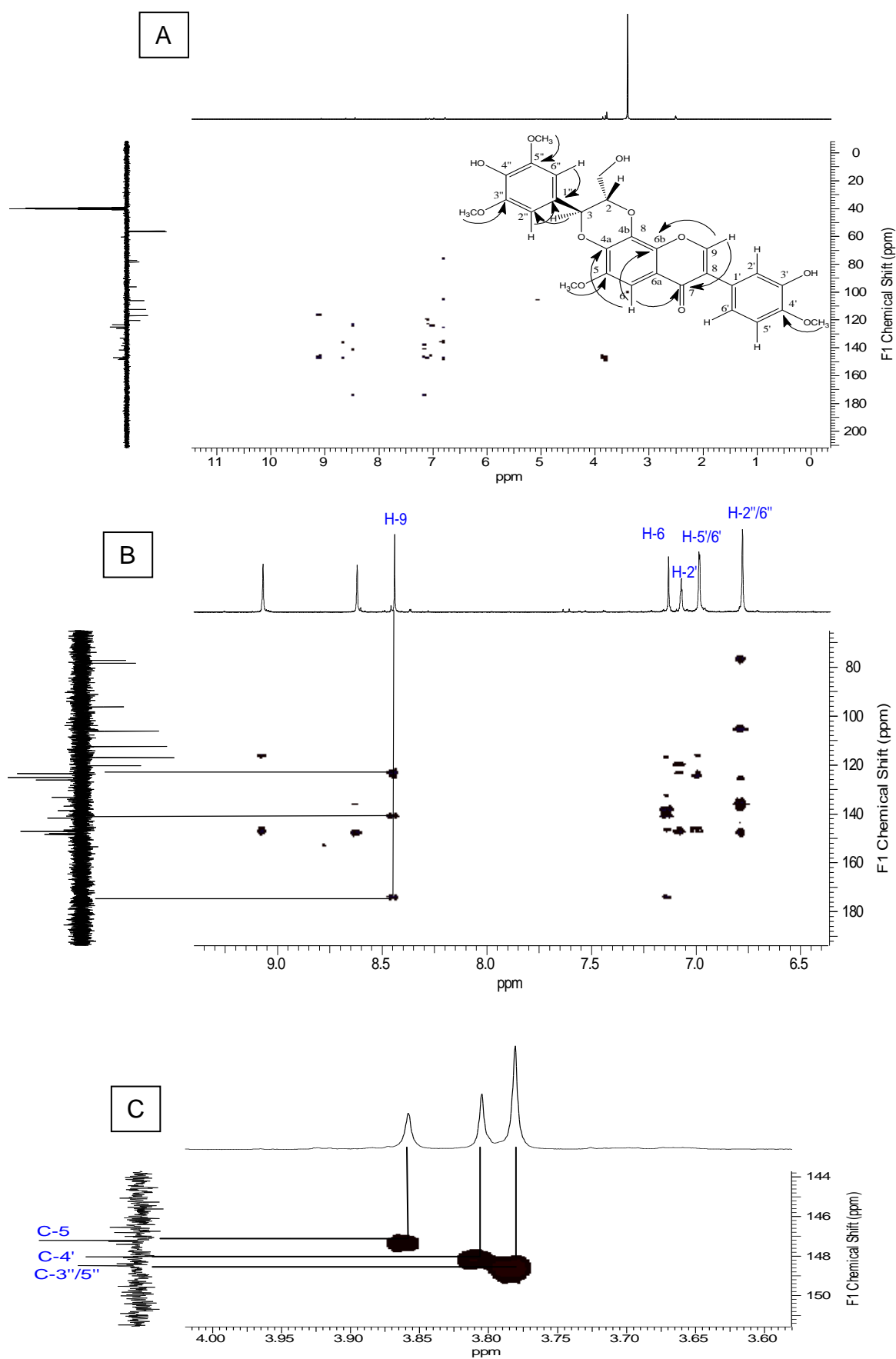
Espectro 70 - Espectro de COSY em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de **Re-7** (A). Expansão (B).



Espectro 71 - Espectro de APT em DMSO- d_6 (75 MHz) de Re-7 (A). Expansão (B, C).



Espectro 72 - Espectro de HSQC em DMSO- d_6 (300 MHz) de **Re-7** (A). Expansão (B, C, D)



Espectro 73 - Espectro de HMBC em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz) de **Re-7** (A). Expansão (B, C)

