

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

DANIELE DE OLIVEIRA SILVA

BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATO E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Acacia polyphylla* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI- INFLAMATÓRIO

ALFENAS/MG

2023

DANIELE DE OLIVEIRA SILVA

BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATO E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Acacia polyphylla* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI- INFLAMATÓRIO

Dissertação apresentada à banca examinadora como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Orgânica
Orientadora: Profa. Dra. Marisi Gomes Soares

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Silva, Daniele de Oliveira.

Bioprospecção de extrato e substâncias isoladas de *Acacia polyphylla* e avaliação do potencial anti-inflamatório / Daniele de Oliveira Silva. - Alfenas, MG, 2023.

89 f. : il. -

Orientador(a): Marisi Gomes Soares.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Fabaceae. 2. Inibição de PGE2. 3. Ensaio ex vivo. 4. Flavonoide. 5. COX-2. I. Soares, Marisi Gomes, orient. II. Título.

DANIELE DE OLIVEIRA SILVA

BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATO E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Acacia polyphylla* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI- INFLAMATÓRIO

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 25 de janeiro de 2023

Profa. Dra. Marisi Gomes Soares
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Thiago Belarmino de Souza
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. Alessandra Regina Pepe Ambrozin
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Marisi Gomes Soares, Professor do Magistério Superior**, em 30/01/2023, às 12:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Belarmino de Souza, Usuário Externo**, em 01/02/2023, às 15:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Regina Pepe Ambrozin, Professor do Magistério Superior**, em 01/02/2023, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0908825** e o código CRC **8F99C66F**.

Dedico esta pesquisa aos meus queridos pais,
Antônio e Maria, pelo apoio incondicional em
todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido a oportunidade de realizar esse trabalho com saúde e forças para chegar até o final.

Agradeço minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Marisi Gomes Soares, por aceitar conduzir meu trabalho, por seu apoio e disponibilidade durante toda essa trajetória, e acima de tudo, pela contribuição para o meu desenvolvimento, não somente profissional, mas também pessoal.

À professora Dr.^a Karen J. Nicácio, por toda contribuição, orientação e aprendizagem proporcionada ao longo desse trabalho.

Ao professor Dr. Mário C. F. Santos, pela colaboração com meu trabalho, em especial na parte de isolamento e identificação estrutural.

Às professoras Dr.^a Daniela Chagas e Dr.^a Danielle Dias pela parceria no LFQM.

A todos os meus colegas do LFQM, em especial, Paula, Albert e Miller, pela amizade, e por toda troca de experiências durante a elaboração desse trabalho.

Agradeço também pelas amizades que fiz durante essa jornada, em especial a Laura e a Bárbara, que me acolheram nessa cidade que passa ser minha segunda casa.

Agradeço ao apoio incondicional dos meus pais, que foram meu suporte durante essa pesquisa, e estiveram sempre presentes com suas palavras de encorajamento e esperança. Aos meus irmãos, por serem presentes na minha vida e por tornarem ela muito mais leve.

Agradeço ao Julian, por ter me ouvido falar desse trabalho por horas e por todo seu apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, sem essa, não seria possível a realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), pela disponibilização do espaço e toda infraestrutura.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da “Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)” e a da “Pró-reitoria de Pesquisa

e Pós-graduação da UNIFAL-MG.

Por fim, agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

As plantas são uma grande fonte de estudo para obtenção de novas substâncias com atividades biológicas. Nesse contexto, mediante aos efeitos nocivos que o uso dos anti-inflamatórios trazem, surge a necessidade do estudo de novas substâncias alternativas. Em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa, avaliaram-se 47 espécies diferentes da família Fabaceae quanto ao seu potencial anti-inflamatório, dentre essas a *Acacia polyphylla* apresentou resultados significativos de atividade anti-inflamatória no ensaio *ex vivo* e também na inibição de edema de orelha *in vivo*. Portanto, nesse trabalho pretendeu-se realizar o estudo fitoquímico da espécie *A. polyphylla*, contribuindo para identificação de novos compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória. Para isso, utilizando-se de técnicas cromatográficas tradicionais obtiveram-se diversas frações da *A. polyphylla*, que foram avaliadas em um ensaio anti-inflamatório *ex vivo*, utilizando sangue humano. Entre as frações testadas, observou-se que a fração BH obteve o melhor percentual de inibição de PGE₂ (74,8%), se comparada aos fármacos de referência dexametasona e indometacina (90,5 e 98,4 %, respectivamente), demonstrando um bom potencial da atividade anti-inflamatória. A prostaglandina E₂ (PGE₂) é um dos principais mediadores da inflamação produzidos pelas vias das enzimas COX-1 e COX-2, que aumenta sob os estímulos inflamatórios, que incluem os processos infecciosos por bactéria, vírus, fungos e parasitas, necrose tecidual, corpos estranhos, reações imunológicas entre outros. Ademais, parte do extrato bruto da *A. polyphylla* foi analisado por HPLC, permitindo o isolamento de dois compostos, identificados como astragalina e um composto inédito. Outros três compostos foram isolados em bancada e confirmados por HPLC. Também foi investigada a atividade anti-inflamatória dos compostos isolados, onde a astragalina apresentou uma atividade significativa de inibição de PGE₂ (48.3%). Por meio desse estudo foi possível contribuir com o estudo fitoquímico da *A. polyphylla*, identificando dois compostos, entre eles um composto inédito e a astragalina, que pela primeira vez foi relatada nessa espécie, além de confirmar seu potencial anti-inflamatório através do ensaio *ex vivo*.

Palavras-chave: Fabaceae; Inibição de PGE₂; Ensaio *ex vivo*; Flavonoide; COX-2.

ABSTRACT

Plants are a great source of study for obtaining new substances with biological activities. In this context, due harmful adverse effects of current anti-inflammatory drugs, there is a need to identify new alternative substances. In recent studies by our research group, 47 different species of the Fabaceae family were evaluated for their anti-inflammatory potential, among which *Acacia polyphylla* showed significant results of anti-inflammatory activity in the *ex vivo* assay and also in the inhibition of edema of the ear *in vivo*. As a result, this work was intended to carry out a phytochemical study of the species *A. polyphylla*, contributing to the identification of new compounds responsible for the anti-inflammatory activity. For this, using traditional chromatographic techniques, several fractions of the *A. polyphylla* were obtained, which were evaluated in an *ex vivo* anti-inflammatory assay, using human blood. Among the sample tested, it was observed that the BH fraction had the best percentage of PGE₂ inhibition (74.8%) when compared to the reference drugs dexamethasone and indomethacin (90.5 and 98.4%, respectively), demonstrating a significant potential for anti-inflammatory activity. The prostaglandin E₂ (PGE₂) is one of the main mediators of inflammation produced by the COX-1 and COX-2 enzyme pathways, which increases under inflammatory stimuli, which include infectious processes by bacteria, viruses, fungi and parasites, tissue necrosis, foreign bodies, reactions immunology, among others. Furthermore, part of the crude extract of *A. polyphylla* was analyzed by HPLC, allowing the isolation of two compounds, identified as astragalin and an unpublished compound. Another three compounds were isolated on the bench and confirmed by HPLC. In addition, the anti-inflammatory activity of the isolated compounds was investigated, where astragalin showed a significant PGE₂ inhibition activity (48.3%). Through this study, it was possible to contribute to the phytochemical of *A. polyphylla*, identifying two compounds, including an unpublished compound and astragalin, reported for the first time in this specie, in addition to being able to confirming its anti-inflammatory potential through the *ex vivo* assay.

Keywords: Fabaceae; PGE₂ inhibition; *Ex vivo* assay; Flavonoid; COX-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura molecular da morfina	17
Figura 2 –	Ópio	17
Figura 3 –	Representação estrutural de diversas classes químicas	19
Figura 4 –	Classificação de flavonoides por subclasse	23
Figura 5 –	Estrutura básica das chalconas	25
Figura 6 –	Estruturas moleculares dos flavonoides isolados do gênero <i>Acacia</i> . (A – Catequina; B – Quercetina; C – Isoliquiritigenina; D – Miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo; E – Rutina)	25
Figura 7 –	Representação estrutural do Isopreno	26
Figura 8 –	Triterpenos lupano com atividade anti-inflamatória	27
Figura 9 –	Estruturas moleculares do Lupeol (à esquerda) e do linoleato de lupeol (à direita)	28
Figura 10 –	Estruturas moleculares dos triterpenoides isolados da <i>A. mellifera</i> . (A – Betulina, B – Lupenona, C – 3-(E)-trans-cumaroil betulina)	29
Figura 11 –	Estruturas do ácido gálico (A) e do ácido cumárico (B)	30
Figura 12 –	Outros compostos isolados do gênero <i>Acacia</i> . (A – saponina espirostanos; B – γ -glutamilasparagina; C – Triptamina; D – N-metilriptamina)	30
Figura 13 –	Estrutura do esteróide 3 β -acetoxi-17 β -hidroxi-androst-5-eno	31
Figura 14 –	<i>Acacia polyphylla</i> , popularmente conhecida como monjoleiro	32
Figura 15 –	Ocorrência natural da <i>Acacia polyphylla</i> no Brasil	33
Figura 16 –	Substâncias identificadas da <i>A. polyphylla</i> . (A – luteolina, B – isovitexina, C – n-nonacosano)	34
Figura 17 –	Esquema de produção e metabolismo do ácido araquidônico pelas principais vias (COX e LOX)	37
Figura 18 –	Esquema metodológico geral do ensaio <i>ex vivo</i>	48
Figura 19 –	CCD das frações C e D em hexano:acetona 6:4 (v/v)	49
Figura 20 –	CCD da fração H em hexano/acetona (1:1)	50
Figura 21 –	Esquema de uma separação por exclusão por tamanho	51
Figura 22 –	CCD das frações CH à KH em hexano/acetato (1:1) a 365 nm	51

Figura 23 – Perfil Cromatográfico da fração DEP no comprimento de onda 254 nm	52
Figura 24 – Cromatograma da Fração FH	52
Figura 25 – Cromatograma da Fração GH	53
Figura 26 – CCD da fração I em acetona/etanol 1:1 (v:v) a 365 nm	54
Figura 27 – Esquema geral do fracionamento e isolamento do extrato <i>A. polyphylla</i>	55
Figura 28 – Estrutura sugerida para P1	56
Figura 29 – Espectro de RMN de ¹ H (MeOD, 300 MHz) obtido para a astragalina	57
Figura 30 – Correlações HMBC (→) observadas para astragalina	60
Figura 31 – Estrutura sugerida para o composto 2	61
Figura 32 – Espectro de RMN de ¹ H (MeOD, 300 MHz) obtido para o composto P2	62
Figura 33 – Espectro de RMN ¹³ C (DMSO, 75 MHz) obtido para o composto P2	62
Figura 34 – Espectro de HSQC em DMSO ampliado do composto P2	63
Figura 35 – Correlações HMBC (→) observadas para o composto 2	65
Figura 36 – Avaliação da inibição de PGE ₂ nas frações da <i>A. polyphylla</i>	66
Figura 37 – Percentual de inibição de PGE ₂ dos compostos isolados	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais flavonoides estudados por classes	24
Tabela 2 –	Classes de terpenoides	26
Tabela 3 –	Escala de eluição utilizada no fracionamento 1 (CC)	43
Tabela 4 –	Escala de eluição utilizada no fracionamento das frações BH-CH-DH	44
Tabela 5 –	Escala de eluição utilizada no fracionamento 4 (C18)	45
Tabela 6 –	Dados de RMN para a astragalina (P1)	58
Tabela 7 –	Correlações HMBC e HSQC para astragalina em MeOD	59
Tabela 8 –	Dados de RMN para o composto 2 em DMSO (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C)	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AI	Anti-inflamatório
AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
CAP	Cloranfenicol
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
COX	Ciclooxigenases
EtOH	Etanol
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence Spectroscopy</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês, <i>High-performance Liquid Chromatography</i>)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
LT	Leucotrienos
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeos
MeOH	Metanol
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas (do inglês, <i>Multiple-reaction monitoring</i>)
MS	Espectrometria de Massa
NPPA	Peptídeo natriurético A (do inglês, <i>Natriuretic peptide A</i>)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PGI ₂	Prostaciclina
PG	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
QqQ	Triplo Quadrupolo

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	Extração em fase sólida (do inglês, <i>Solid phase extraction</i>)
TXA2	Tromboxano A2
UFLC	Cromatografia líquida ultra rápida (do inglês, <i>Ultrafast liquid chromatography</i>)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

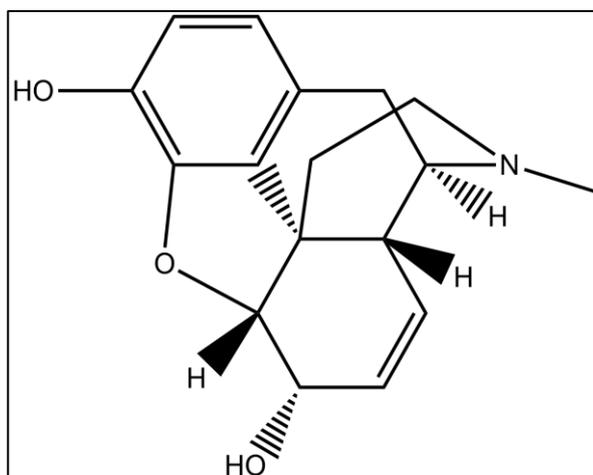
1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	FAMÍLIA FABACEAE.....	21
2.2	GÊNERO ACACIA.....	21
2.2.1	Flavonoides.....	22
2.2.2	Terpenoides.....	26
2.2.3	Outros compostos isolados do gênero Acacia.....	29
2.2.4	Atividade anti-inflamatória das espécies do gênero Acacia.....	31
2.3	<i>ACACIA POLYPHYLLA DC.</i>	31
2.4	DOR E A INFLAMAÇÃO	34
2.5	OS ANTI-INFLAMATÓRIOS	35
3	JUSTIFICATIVA.....	40
4	OBJETIVOS.....	41
4.1	OBJETIVO GERAL.....	41
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5	METODOLOGIA.....	42
5.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO BRUTO.....	42
5.2	SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA CLÁSSICA.....	42
5.2.1	Extrato bruto.....	42
5.2.2	Fração H.....	43
5.2.3	Fração I.....	44
5.3	SEPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO POR HPLC.....	45
5.4	PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES POR UFLC-UV.....	46
5.5	ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO <i>EX VIVO</i> DE PRODUÇÃO DE PGE ₂ ...	46
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
6.1	SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR HPLC.....	49
6.1.1	Extrato bruto.....	49
6.1.2	Fração CD.....	49
6.1.3	Fração H.....	50

6.1.4	Fração I.....	54
6.2	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR RMN.....	56
6.2.1	Composto P1 (<i>Acacia</i> P1).....	56
6.2.2	Determinação estrutural da substância P2 (<i>Acacia</i> P2).....	61
6.3	ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO <i>EX VIVO</i> DE PRODUÇÃO DE PGE ₂ ...	65
6.3.1	Avaliação da atividade anti-inflamatória das frações	65
6.3.2	Avaliação da atividade anti-inflamatória dos compostos isolados ..	67
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	APÊNDICES.....	80

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, os produtos naturais vêm contribuindo para o desenvolvimento de medicamentos, sendo que muitos medicamentos importantes foram obtidos através de fontes naturais, como por exemplo a morfina (Figura 1), que foi obtida pelo alemão Friedrich Sertürner, enquanto este trabalhava no isolamento do ópio (Figura 2) (CALIXTO *et al.*, 2001; DUARTE, 2005).

Figura 1 – Estrutura molecular da morfina.



Fonte: Do autor.

Figura 2 – Ópio.



Fonte: CANALTECH. Disponível em: <<https://canaltech.com.br/saude/10-drogas-mais-antigas-descobertas-e-usadas-pela-humanidade-193201/>>. Acesso 25 mar. 2022.

A química de produtos naturais abrange ainda outras fontes naturais como os micro-organismos e organismos marinhos, entretanto o reino vegetal é responsável pela maior parte da diversidade química conhecida e documentada na literatura (BERLINCK *et al.*, 2017; VIEGAS JR *et al.*, 2006).

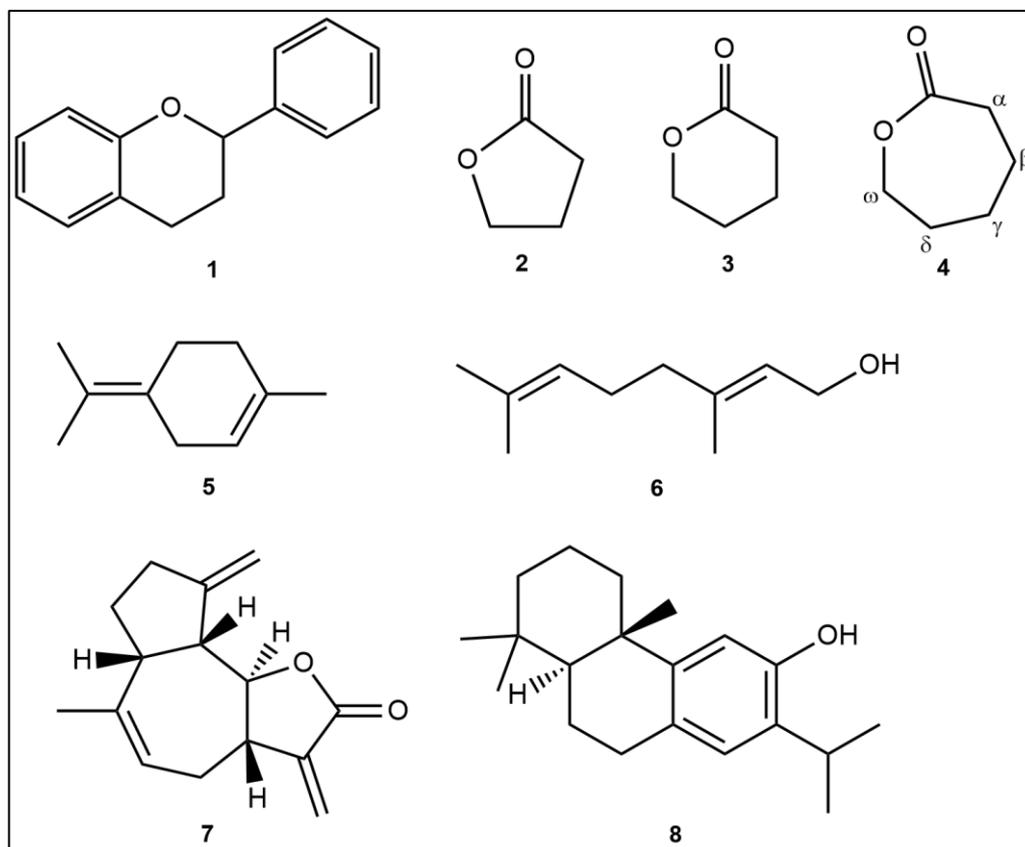
A utilização de plantas medicinais na antiguidade era um dos principais meios de tratamento da população, e esse conhecimento popular gerado no decorrer dos séculos auxiliou a descoberta de fármacos utilizados hoje na medicina tradicional, como os salicilatos, que são da classe de anti-inflamatórios não esteroidais (ARNOUS, *et al.*, 2005). Dessa forma, os produtos naturais exercem ainda na atualidade um papel muito importante para o desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2016).

A Fitoquímica, é uma área da química, que tem se dedicado à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos, sendo que a fitoquímica é responsável por estudar cada grupo da planta, desde a estrutura química molecular até as propriedades biológicas dos vegetais (BRAZ FILHO, 2010; FINÊNCIO; MININEL, 2019). Sendo assim, devido à grande diversidade da flora brasileira, a fitoquímica, tem permitido a progressão da bioprospecção aliado ao estudo de Produtos Naturais (SANTOS, 2013).

A metabolômica é uma subárea da Química de Produtos Naturais que permite o estudo sistemático de todos os metabólitos produzidos por um organismo vivo. Na Fitoquímica, o estudo metabolômico de extratos e frações permite a caracterização de diversos tipos de compostos de diferentes classes, como flavonóides(1), lactonas (2 – 4), terpenos (5 – 8), dentre outros (Figura 3) (SUMNER, MENDES, DIXON, 2003). Para tal, é necessário o emprego de técnicas robustas e extremamente sensíveis, uma vez que, o objetivo é identificar aqueles compostos mesmo presentes em concentrações mais baixas na amostra de estudo, diferentemente das técnicas fitoquímicas tradicionais, que visam isolar/caracterizar somente os compostos majoritários de uma matriz. Assim, as abordagens metabolômicas são realizadas com o emprego de técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (MS) e técnicas hífenadas como a cromatografia acoplada a detectores no ultravioleta ou MS, capazes de demonstrar a diversidade química das plantas

e que permitem o isolamento e obtenção de compostos para posterior estudo de atividade farmacológica, de diversos tipos de doenças e afecções, como a inflamação (SAFER, 2011).

Figura 3 – Representação estrutural de diversas classes químicas.



Fonte: Do autor.

Legenda: (1) Estrutura básica dos flavonoides; (2) γ -lactona; (3) δ -lactona; (4) ω -lactona; (5) Terpinoleno (monoterpeno); (6) Geraniol (monoterpeno); (7) Eremantina (sesquiterpenos); (8) Ferruginol (diterpenos).

A inflamação pode ser caracterizada por um conjunto de alterações teciduais e vasculares, em um organismo, em resposta a uma injúria causada ao mesmo. Muitas vezes, o próprio organismo libera diversos tipos de substâncias a fim de se amenizar os distúrbios causados, porém muitas das vezes, dependendo do trauma, não há condições do próprio organismo controlar essas reações inflamatórias, sendo necessário o uso de medicamentos anti-inflamatórios (MALINOVISKY, 1998).

Os anti-inflamatórios são os terapêuticos mais utilizados em todo o mundo, porém possuem algum tipo de limitação quanto à eficácia, potência e/ou efeitos colaterais (PARENTE, 2001). Neste sentido, faz-se necessário a busca por

novos compostos com potencial anti-inflamatório de baixo custo e menores efeitos adversos e que venham a suprir a ineficiência daqueles já existentes no mercado. Portanto, este trabalho, visa contribuir nesses âmbitos, utilizando-se de recursos naturais, como a flora da mata atlântica mineira, de forma discriminada e consciente, permitindo uma melhor compreensão de espécies vegetais pouco estudadas ou ainda, sem qualquer estudo químico.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar espécies da família Fabaceae, compreendida como a terceira maior família de espécies vegetais dentre as Angiospermas em todo o mundo, sendo a família de maior número de espécies no Brasil (ANDRADE, MIOTTO, SANTOS, 2009). Muitas destas espécies são citadas na literatura, com diversos potenciais farmacológicos, inclusive anti-inflamatório. Portanto, foi selecionada dentre a família Fabaceae espécie denominada *Acacia polyphylla*, estudada recentemente por nosso grupo de pesquisa (ROSA *et al.*, 2021), onde seu extrato apresentou bons resultados na inibição da produção da PGE₂, que aumenta sob os estímulos inflamatórios sejam eles de natureza química, física ou biológica. Assim, esse trabalho visou ampliar os conhecimentos e perfil fitoquímico dessa espécie vegetal, bem como sua atividade anti-inflamatória, para que se possam relacionar a presença de compostos com tal potencial biológico, visando a descoberta de novos terapêuticos anti-inflamatórios.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae ou Leguminosae, como também é conhecida, inclui leguminosas que são, por definição, grãos contidos em vagens, como o feijão ou ervilhas, que tem uma grande importância na alimentação (MOTTA *et al.*, 2016). A Leguminosae, é a terceira maior família no mundo, entre as famílias de plantas com flores, sendo 19.400 espécies e cerca de 730 gêneros. O maior gênero é o *Astragalus*, com cerca de 2.400 espécies (AHMAD *et al.*, 2016).

A família das leguminosas são ainda divididas em 3 subfamílias, a Papilionodae, com cerca de 470 gêneros e 14.000 espécies, Caesalpinioideae, com cerca de 170 gêneros e 2.000 espécies e a Mimosoideae, com cerca de 80 gêneros e 3.200 espécies. A Leguminosae, é conhecida por se desenvolver em diversos climas, incluindo árido, alpino, temperado, tropicais e subtropicais, mas as maiores diversidades são encontradas na região tropical e subtropical (BI, *et al.* 2018). No território brasileiro, existem cerca de 2.100 espécies e 188 gêneros, sendo que é considerada uma das maiores famílias no Brasil (ANDRADE, MIOTTO, SANTOS, 2009).

As características dessa família são extremamente diversas, que vão desde o uso na alimentação humana, como também a utilização como adubos verdes e forragens, além de serem usadas para sintetizar uma grande variedade de produtos naturais que incluem, sabores, venenos, corantes, além do potencial medicinal que essa família apresenta (AHMAD *et al.*, 2016).

É importante destacar a diversidade de metabólitos secundários dessa família. Entre os principais metabolitos secundários, estão os alcaloides, NPPA, cianogênicos, peptídeos, fenólicos, policetídeos e terpenoides. Outro aspecto considerável, é a capacidade que as leguminosas têm em fixar nitrogênio atmosférico (principalmente Papilionodae e Mimosoideae), assim, elas podem produzir metabólitos secundários contendo nitrogênio (WINK, 2013).

2.2 GÊNERO *Acacia*

O gênero *Acacia* foi descrito pela primeira vez por Phillip Miller em 1754. Atualmente, *Acacia*, é considerada um gênero cosmopolita, pertencente a

subfamília Mimosoideae, e contém mais de 1.350 espécies. A classificação atual compreende o gênero em três grandes subgêneros, que são *Acacia*, *Aculeiferum Vassal* e *Phyllodineae*, sendo o último o maior subgênero, porém, em sua grande parte confinada à Austrália. (MASLIN, *et al.*, 2003). Esse gênero é encontrado nas regiões tropicais da América, Ásia, África e Austrália, onde é encontrada em sua maior diversidade (CIALDELLA, 1984).

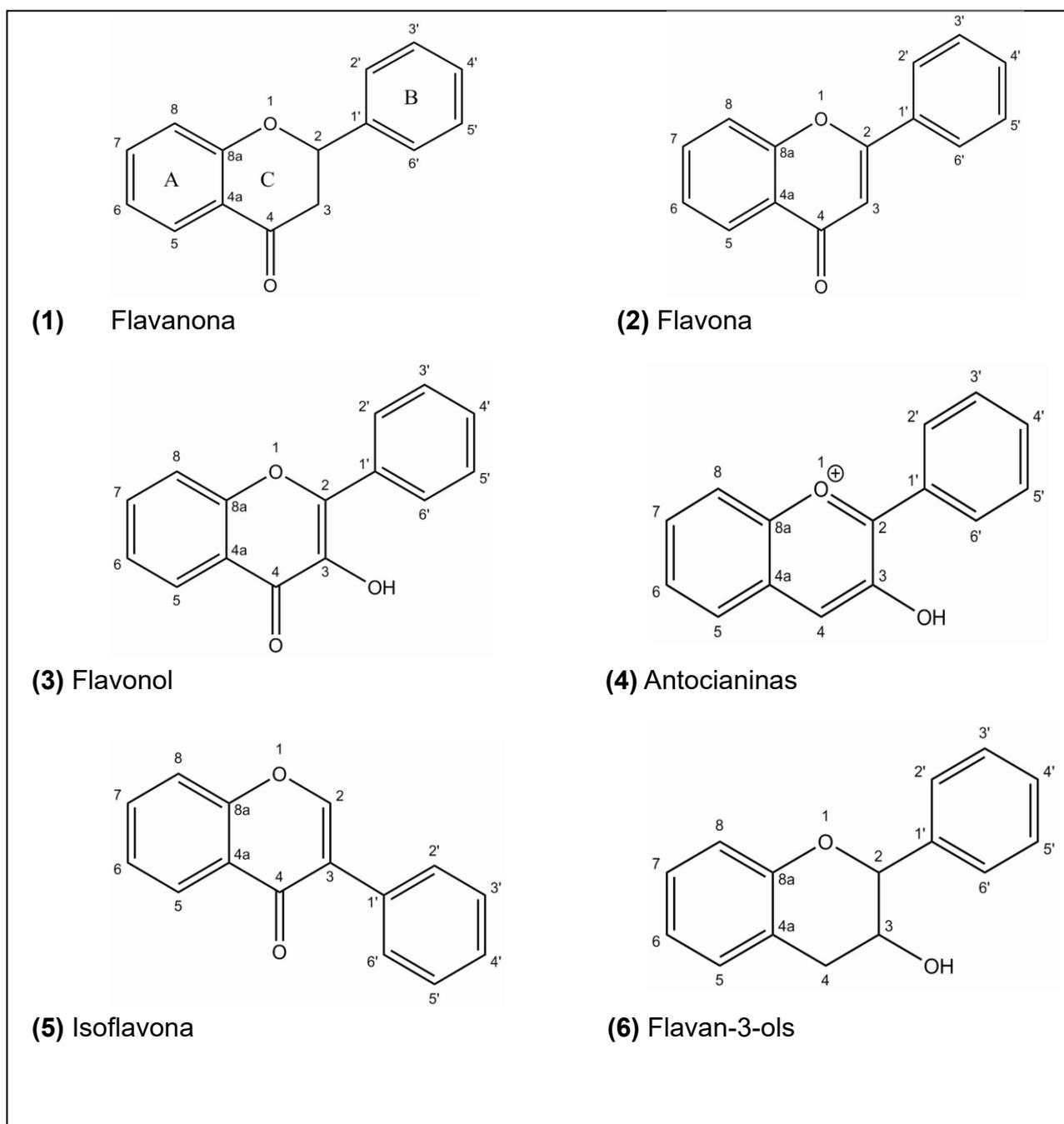
Diferentes partes das espécies desse gênero são usadas tradicionalmente para diarreia, diabetes, distúrbios gastrointestinais, doenças de pele e doenças inflamatórias. Além disso, os estudos fitoquímicos do gênero levaram ao isolamento de 152 constituintes químicos, entre esses estão os flavonoides, ácidos fenólicos, terpenoides, fitoesteróis, hidrocarbonetos etc. (AMOUSSA *et al.*, 2020).

2.2.1 Flavonoides

Os flavonoides consistem em um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos naturais (SIMÕES *et al.*, 2007, *apud* SANTOS *et al.*, 2017). São considerados metabólitos secundários muito abundantes em plantas, frutas e sementes, sendo responsáveis pelas características de cor, fragrância e sabor (DIAS, *et al.*, 2021). Eles vêm se destacando desde a década de 80, por suas propriedades farmacológicas (GEORGIEV *et al.*, 2014, *apud* RODRIGUES DA SILVA, *et al.*, 2015). Entre as atividades conhecidas associadas aos flavonoides estão a atividade antiviral, antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória. (RODRIGUES DA SILVA, *et al.*, 2015).

A estrutura básica de um flavonoide contém um núcleo flavano, constituído de quinze átomos de carbonos arranjados em três anéis (C6 – C3 – C6) sendo dois anéis aromáticos (geralmente designado como A e B) ligados por uma cadeia de três carbonos que combina-se com um átomo de oxigênio para formar o anel C. Com base na estrutura dos flavonoides, eles podem ser classificados em seis classes principais, sendo estas, flavanona (1), flavona (2), flavonol (3), antocianinas (4), isoflavonas (5), flavan-3-ols (6), (Figura 4) (DIAS, *et al.*, 2021).

Figura 4 – Classificação de flavonoides por subclasse.



Fonte: Do autor.

Na tabela abaixo, observam-se as substituições dos flavonoides das principais classes já estudadas (BIRT *et al.*, 2001; PANCHE *et al.*, 2016).

Tabela 1 – Principais flavonoides estudados por classe.

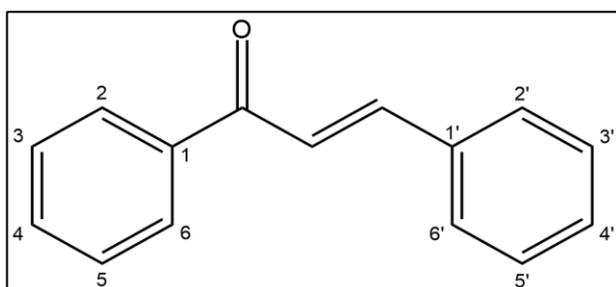
Classes	Flavonoides	Substituições						
		5	6	7	8	3'	4'	5'
Flavanona (1)	Eriodictiol	OH	H	OH	H	OH	OH	H
	Hesperetina	OH	H	OH	H	OH	OMe	H
	Naringenina	OH	H	OH	H	H	OH	H
Flavona (2)	Apigenina	OH	H	OH	H	H	OH	H
	Crisina	OH	H	OH	H	H	H	H
	Luteolina	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Flavonol (3)	Kaempferol	OH	H	OH	H	H	OH	H
	Miricetina	OH	H	OH	H	OH	OH	OH
	Quercetina	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Antocianinas (4)	Cianidina	OH	H	OH	H	OH	OH	H
	Malvidina	OH	H	OH	H	OMe	OH	OMe
	Pelargonidina	OH	H	OH	H	H	OH	H
	Peonidina	OH	H	OH	H	OMe	OH	H
Isoflavona (5)	Daidzeína	H	H	OH	H	H	OH	H
	Genisteína	OH	H	OH	H	H	OH	H
	Gliciteína	H	OMe	OH	H	H	OH	H
	Formononetina	H	H	OH	H	H	OMe	H
Flavan-3-ols (6)	(+)- Catequina	OH	H	OH	H	OH	OH	H
	Galocatequina	OH	H	OH	H	OH	OH	OH

Fonte: Do Autor

Os flavonoides constituem a maioria dos metabólitos secundários do gênero *Acacia*, entre eles estão as flavonas, os derivados de chalconas (Figura

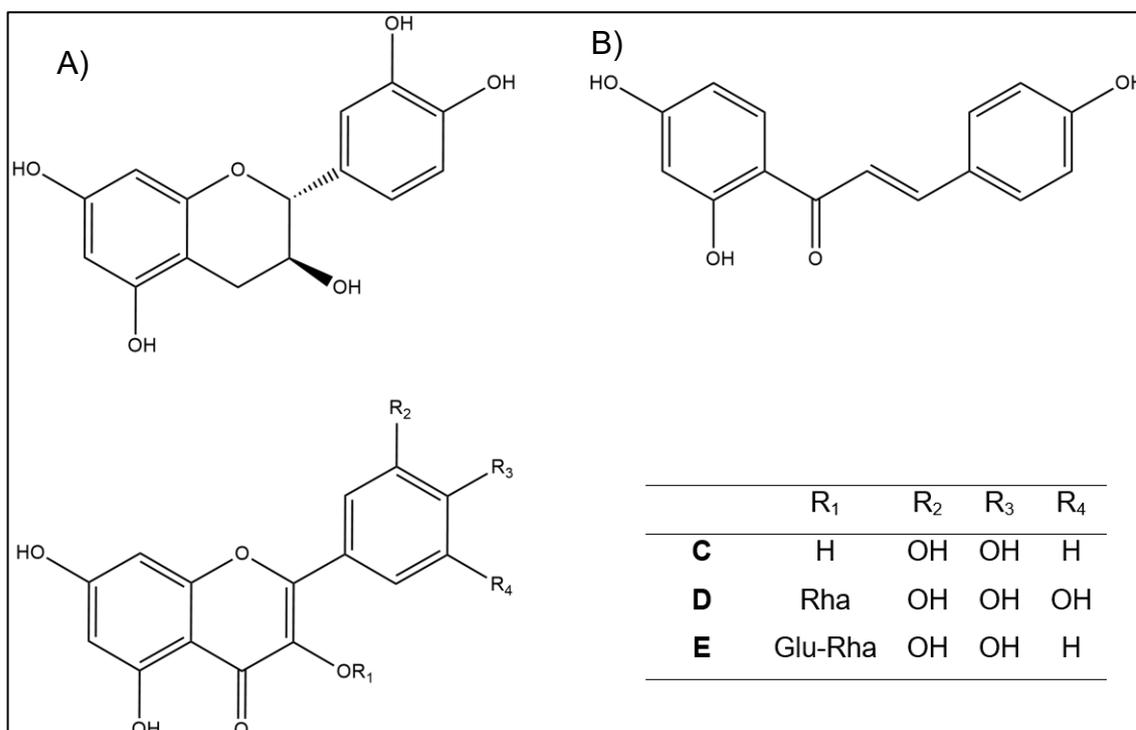
5) que constituem uma classe de flavonoides de cadeia aberta (FERREIRA *et al.*, 2018), flavan-3-ols e flavan-3,4-diols. Entre os flavonoides mais comuns encontrados na *Acacia*, estão a catequina, quercetina, isoliquiritigenina, miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo e rutina (Figura 6) (AMOUSSA *et al.*, 2020).

Figura 5 – Estrutura básica das chalconas.



Fonte: Do Autor.

Figura 6 – Estruturas moleculares dos flavonoides isolados do gênero *Acacia*. (A – Catequina; B – Isoliquiritigenina; C – Quercetina; D – Miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo; E – Rutina).



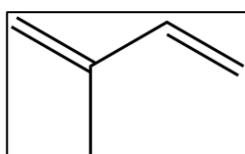
Fonte: Do Autor.

Legenda: Rha = ramnose; Glu-Rha = Glicose-ramnose.

2.2.2 Terpenoides

Os terpenos são substâncias construídas a partir do isopreno (Figura 7), podendo ser chamados de isoprenóides (GRASSMANN, 2005). A classificação de terpenos é de acordo com o número de moléculas estruturais dos isoprenos em mono-, sesqui-, di-, tri-, tetra- e politerpenos (Tabela 2) (DZUBAK *et al.*, 2006). Eles são uma das classes mais abundantes de metabólitos secundários produzidos pelas plantas (MIRANDA, *et al.*, 2022).

Figura 7 – Representação estrutural do Isopreno.



Fonte: Do Autor.

Tabela 2 – Classes de terpenoides

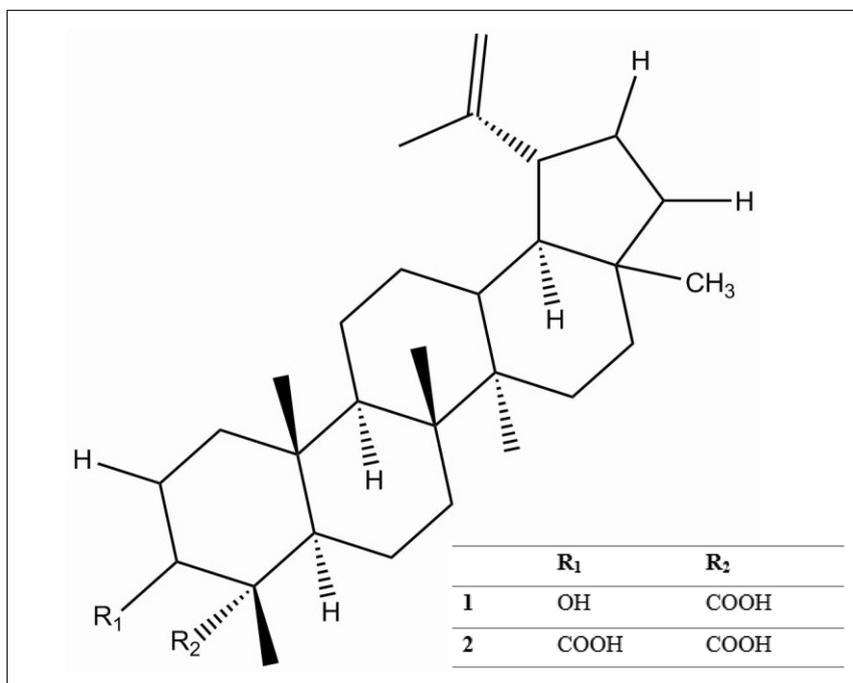
Terpenoide	Número de átomos de Carbono	Número de subunidades de isopreno
Monoterpeno	10	2
Sesquiterpeno	15	3
Diterpeno	20	4
Triterpeno	30	6
Tetraterpeno	40	8
Politerpeno	>40	>8

Fonte: GRASSMANN, 2005, (tradução nossa).

A principal classe isolada do gênero *Acacia* são os triterpenóides. (AMOUSSA *et al.*, 2020). Esses possuem uma gama de efeitos biológicos únicos, sendo os mais importantes os triterpenóides do tipo oleananos, ursanos, lupanos, damaranos (DZUBAK *et al.*, 2006). Para triterpenóides, já foram relatadas atividade anti-inflamatória, anti-adipogênica, antinociceptiva, antimicrobiana e anticâncer (SILVA, *et al.*, 2020).

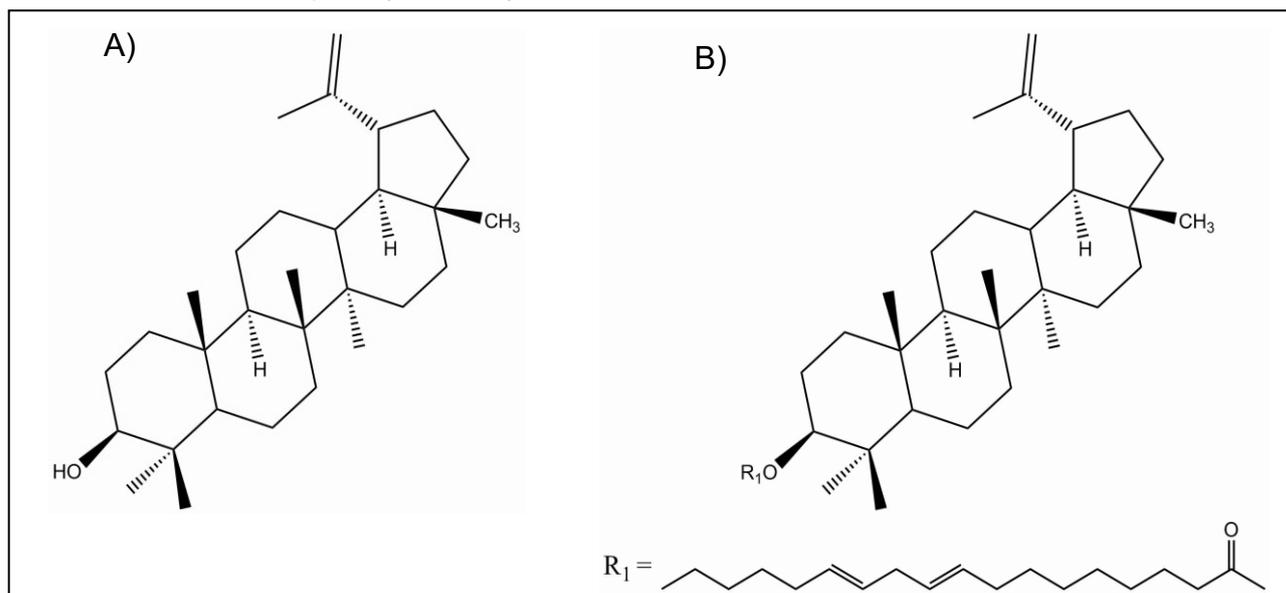
Triterpenos do tipo lupano (Figura 8), isolados de outras espécies, demonstraram um ótimo potencial anti-inflamatório, no ensaio de inflamação da orelha induzida por camundongos, sendo que em comparação ao controle positivo, indometacina, apresentaram um melhor resultado de inibição. É importante também, destacarmos a atividade anti-inflamatória do lupeol (Figura 9^a), que teve um efeito significativo na redução da espessura da inflamação da pata induzida por ratos em 39%, enquanto o linoleato de lupeol (Figura 9b), obtido através do processo de esterificação do lupeol, inibiu em 58%. (MIRANDA, *et al.*, 2022).

Figura 8 – Triterpenos lupano com atividade anti-inflamatória.



Fonte: Do Autor

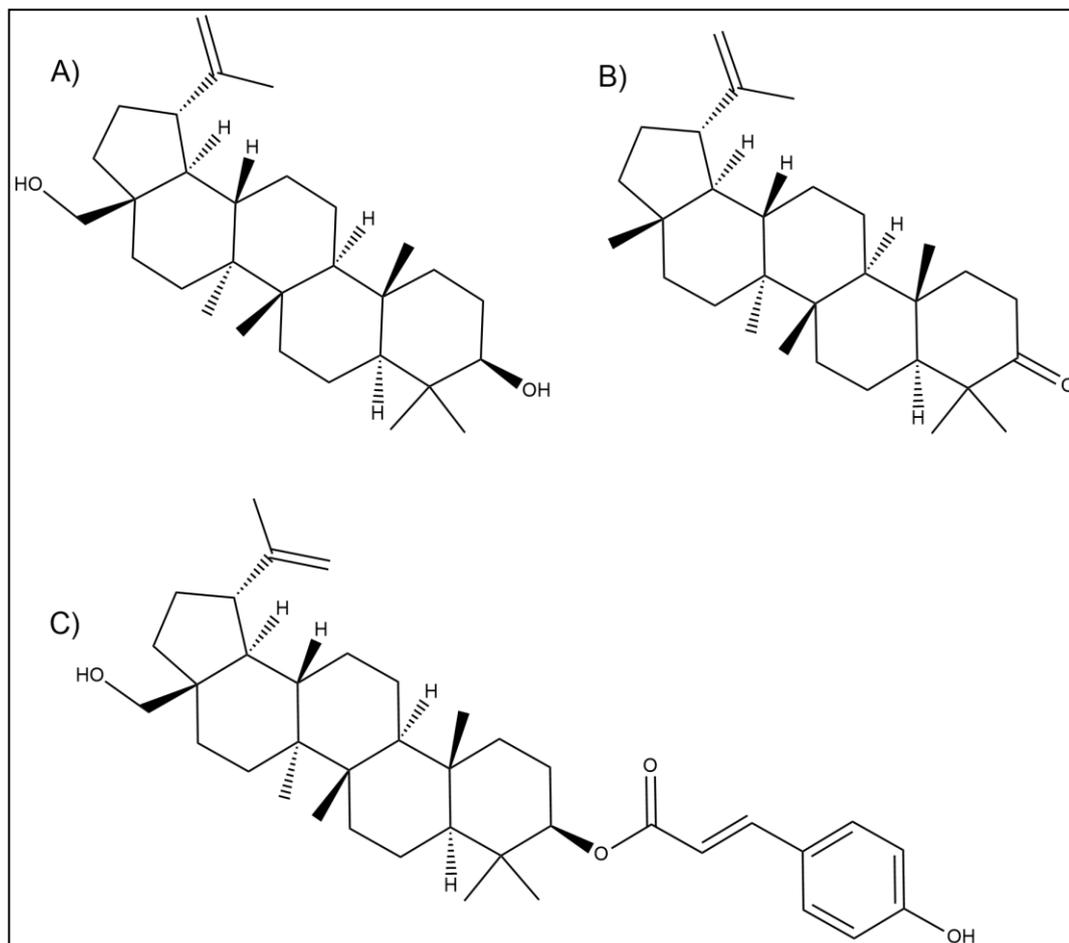
Figura 9 – Estruturas moleculares do Lupeol (à esquerda) e do linoleato de lupeol (à direita).



Fonte: Do Autor.

O Lupeol (Figura 9a) também já foi relatado em espécies do gênero *Acacia*, como por exemplo a *A. mellifera*. Outros triterpenóides isolados dessa mesma espécie estão representados na figura abaixo (MUTAI *et al.*, 2009).

Figura 10 – Estruturas moleculares dos triterpenoides isolados da *A. mellifera* (A – Betulina, B –Lupenona, C – 3-(E)-trans-cumaroil betulina).



Fonte: Do Autor.

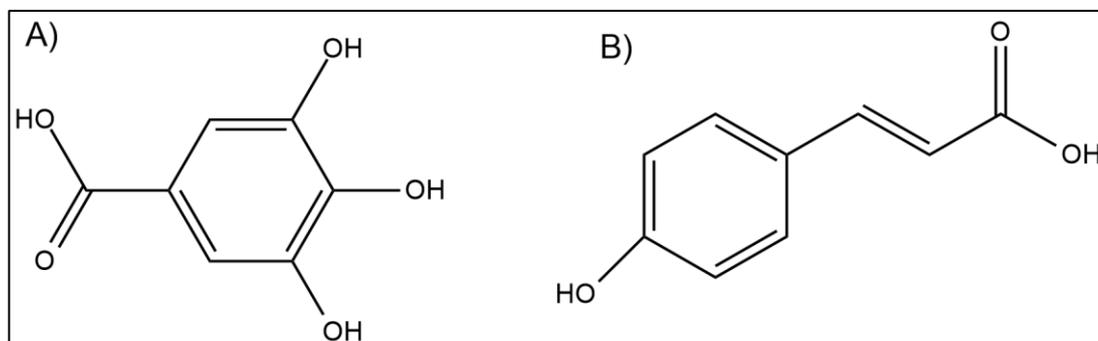
O potencial anti-inflamatório é uma das atividades biológicas mais relatadas para triterpenos naturais, que atuam inibindo a produção de alguns mediadores da inflamação, como por exemplo, a supressão da enzima COX-2 impedindo a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (MIRANDA, *et al.*, 2022).

2.2.3 Outros compostos isolados do gênero *Acacia*

Nos últimos anos muitos derivados fenólicos, principalmente derivados do ácido gálico e ácido cumárico (Figura 11) foram relatados do gênero *Acacia*, que foram predominantemente isolados da *A. nilotica* e *A. arabica*. Outras classes

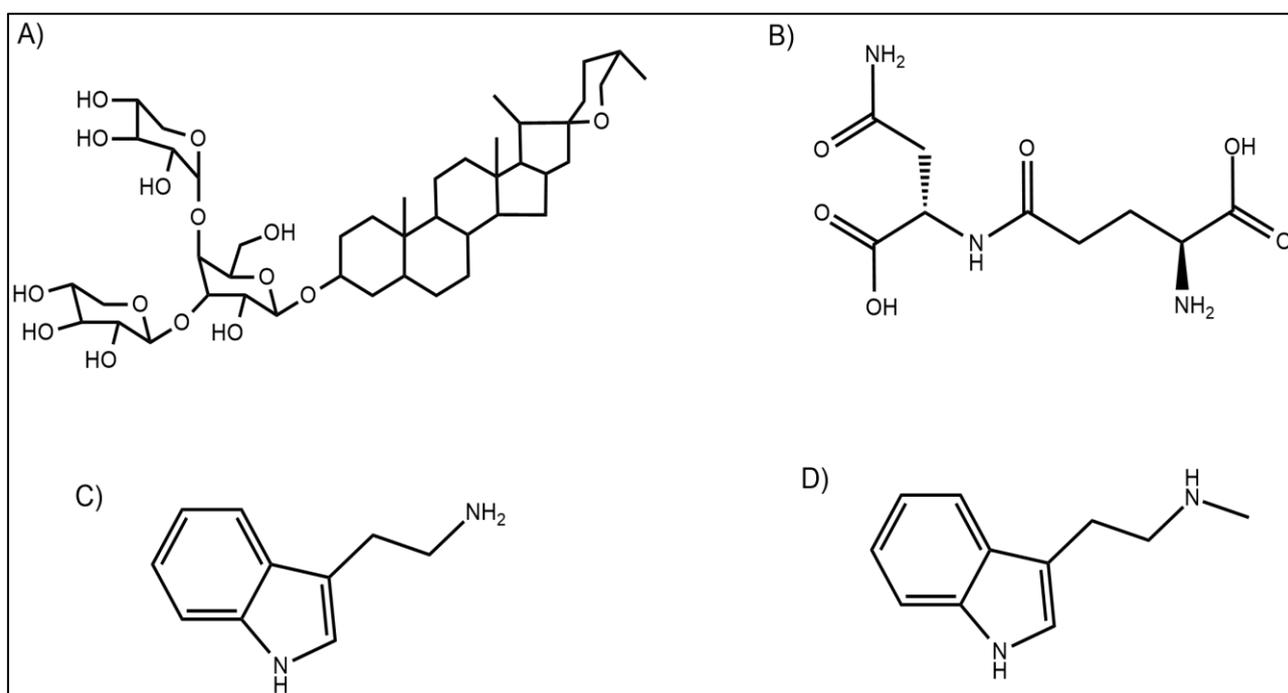
de compostos também foram relatadas, como as saponinas (saponina espirostando), alcaloides (N-metiltriptamina, Triptamina), e peptídeos (γ -glutamilasparagina) (Figura 12) (AMOUSSA *et al.*, 2020).

Figura 11 – Estruturas do ácido gálico (A) e do ácido cumárico (B).



Fonte: Do Autor.

Figura 12 – Outros compostos isolados do gênero *Acacia*. (A – saponina espirostando; B – γ -glutamilasparagina; C – Triptamina; D – N-metiltriptamina).

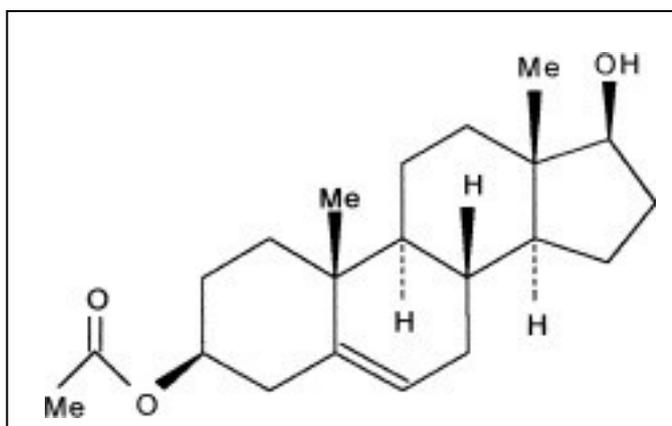


Fonte: Do Autor.

2.2.4 Atividade anti-inflamatória das espécies do gênero *Acacia*

Algumas espécies do gênero *Acacia* apresentaram propriedades anti-inflamatórias. Entre as quais podemos citar, a *Acacia nilotica* (L.), que demonstrou atividade tanto nos extratos avaliados, como também na substância isolada (Figura 13) com percentual de inibição de 82,43% (dosagem 2.0 mg/ear). (CHAUBAL, *et al.*, 2003).

Figura 13 – Estrutura do esteróide 3 β -acetoxi-17 β -hidroxi-androst-5-eno.



Fonte: CHAUBAL, *et al.*, 2003.

Os extratos das espécies *A. farnesiana*, *A. tortilis* e *A. longifolia* também demonstraram potencial anti-inflamatório, inibindo as enzimas COX-1 e COX-2, a análise por LC-MS revelou presença de rutina e catequina nas três espécies além de outros compostos fenólicos que podem estar relacionados a atividade (GABR, *et al.*, 2018).

Ademais, os fitoterápicos vêm sendo amplamente utilizados na medicina tradicional para tratar diversas condições inflamatórias (MALDINI, *et al.*, 2009) e nesse contexto as espécies do gênero *Acacia* podem ser uma rica fonte para busca de novos medicamentos anti-inflamatórios.

2.3 *Acacia polyphylla* DC.

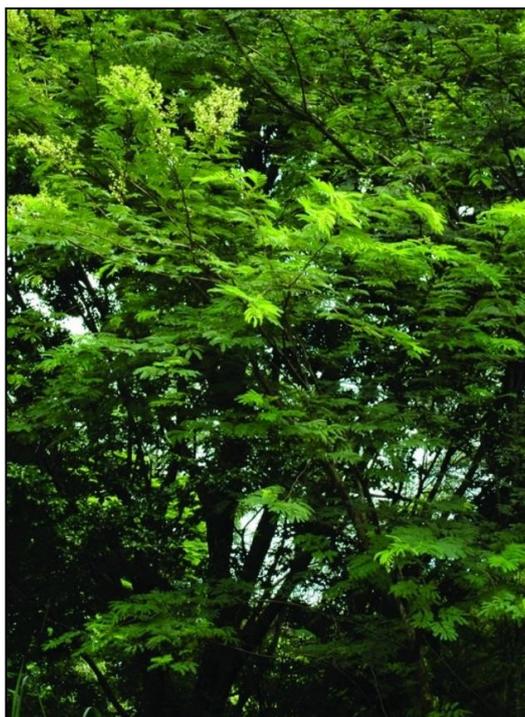
Acacia polyphylla ou monjoleiro (Figura 14), como é popularmente conhecida, é uma espécie arbórea de porte médio. Sua folhagem é composta e bipinadas e a maturação de seus frutos ocorre de agosto a setembro. (NETO,

2001). As flores da *Acacia polyphylla* (sinonímia de *Senegalia polyphylla*), são de coloração branca e ocorre no período de dezembro a abril. (INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS, 2020 *apud* VALERIANO, 2021). Sua madeira é comumente usada para marcenaria, torno e obras internas e a casca para curtição de couro (LORENZI, 1992 *apud* NETO *et al.*, 2002).

O nome “*Acacia*” vem do grego “*akakia*” ou “*achachia*”, e é dado devido aos espinhos no caule e ramos; já o nome específico “*polyphylla*” vem do grego “*polys*” (muito) e “*phyllon*”(folha), devido às muitas folhas (BURKART, 1979 *apud* CARVALHO, 2008).

De acordo com o sistema de classificação do “The Angiosperm Phylogeny Group” (APG), a *Acacia polyphylla* pertence à divisão Angiospermae, Clado: Eurosídeas I, Ordem: Fabales. (CARVALHO, 2008).

Figura 14 – *Acacia polyphylla*, popularmente conhecida como monjoleiro.

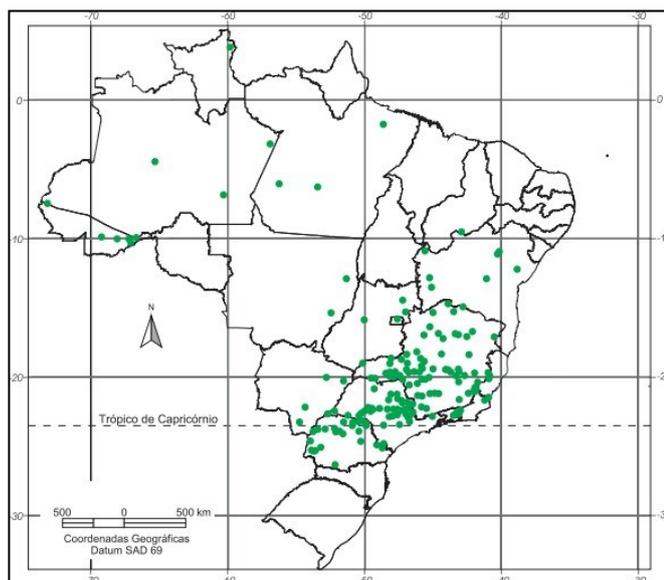


Fonte: GREEN NATION. Nossas árvores: Monjoleiro. Disponível em: <<https://greennation.com.br/mapa/>>. Acesso em 25 jan. 2022.

A espécie pode ocorrer naturalmente em diversos solos, porém os solos do tipo encharcados não são ideais para seu crescimento. A *A. Polyphylla* ocorre

de forma natural na Argentina, Bolívia, Colômbia, Paraguai e no Peru. No Brasil, ela pode ser encontrada naturalmente no Acre, Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima, São Paulo e Sergipe (Figura 15) (CARVALHO, 2008).

Figura 15 – Ocorrência natural da *Acacia polyphylla* no Brasil.



Fonte: CARVALHO, 2008.

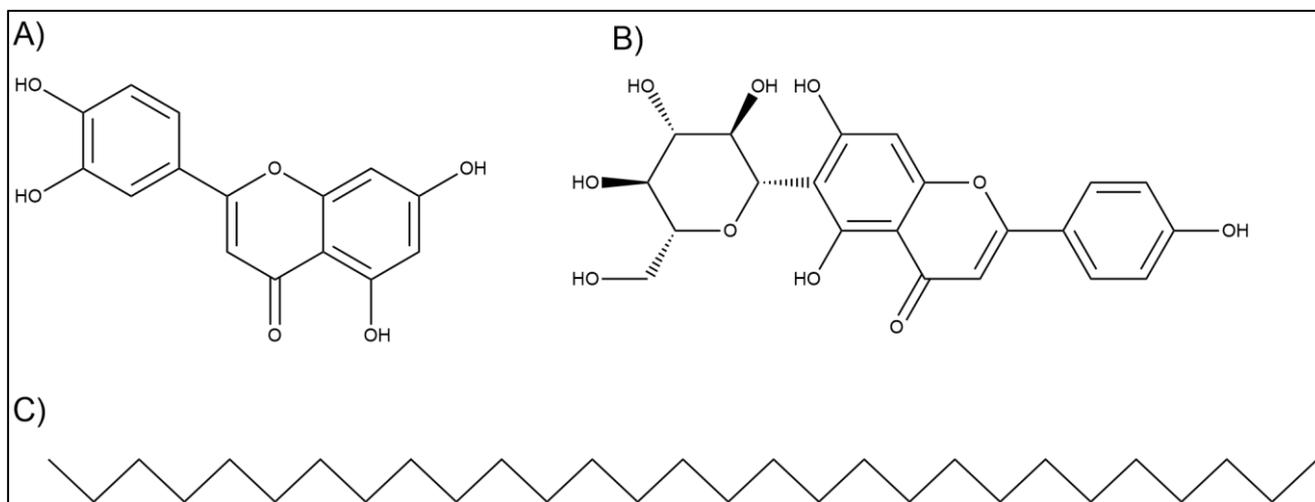
Na medicina popular, a resina do monjoleiro é usada no combate à tosse. (RONCHI *et al.*, 2016). Na casca da espécie foram encontrados a presença de saponinas, taninos, antraderivados, esteróides e triterpenóides e traços de glicosídeos; e no lenho, foram encontrados cumarina, antraderivados, esteróides e triterpenóides, e traços de glicosídeos. (SAKITA, *et al.*, 1990).

Em um estudo fitoquímico recente (CESARINO, 2019), foi demonstrado um grande potencial de atividade antioxidante, que podem vir a atuar em doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Nesse estudo, as classes de metabólitos de maior significância foram esteroides, triterpenos, saponinas, taninos e flavonoides.

A luteolina, isovitexina, n-nonacosano (Figura 16), foram isoladas e identificadas da *A. polyphylla*, além de misturas de flavonóides e isoprenóides (entre essas foram identificados a quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo, vitexina-2"-O-ramnosídeo, β -amirina,

lupeol, estigmast-22-en-3 β -ol, espinasterol, sitostanol β -sitosterol). (CESARINO *et al.*, 2020).

Figura 16 – Substâncias identificadas da *A. pollyphylla* (A – luteolina, B – isovitexina, C – n-nonacosano).



Fonte: Do autor.

2.4 A DOR E A INFLAMAÇÃO

A dor, que nas antigas sociedades era considerada como invasão do corpo por maus espíritos, foi conceituada em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável, que está associada a lesões reais ou potenciais” (HELLEBREKERS, 2002). A compreensão dos mecanismos fisiológicos da dor permite afirmar que os analgésicos podem atuar inibindo os impulsos aferentes no cérebro ou medula espinhal (como os opióides), interrompendo diretamente a condução do impulso (anestésicos locais); ou prevenindo a sensibilização do nociceptor que acompanha o processo inflamatório (anti-inflamatórios não-esteroidais) (MIDON, 2012).

A inflamação (*L. inflammare*, pôr fogo), é caracterizada por uma série complexa de alterações vasculares que se desenvolvem em resposta à injúria. Após a ocorrência da lesão do tecido, que pode ser causada por diversos fenômenos, são liberadas substâncias levando a mudanças teciduais, sendo esse processo denominado de inflamação. Dependendo do trauma, não há

condições do próprio organismo controlar a reação inflamatória, a dor e a febre, sendo que, nessas situações há necessidade do uso de drogas anti-inflamatórias (MALINOVISKY, 1998).

O processo inflamatório aponta para quatro sinais característicos da inflamação, sendo eles, dor, rubor, edema e calor, que foram definidos por Aulus Cornelius Celsus (30 a.C. – 36 d.C.), e posteriormente foi acrescentado o quinto sinal – ao qual não se sabe ao certo quem o atribuiu – que seria a perda de função (BECHARA, *et al.*, 2006; ETIENNE, R. *et al.*, 2021). Nesse sentido, se o organismo apresentar esses sinais é necessário realizar a intervenção farmacológica fazendo o uso de anti-inflamatórios (DA PAZ, A. S. *et al.*, 2020).

2.5 OS ANTI-INFLAMATÓRIOS

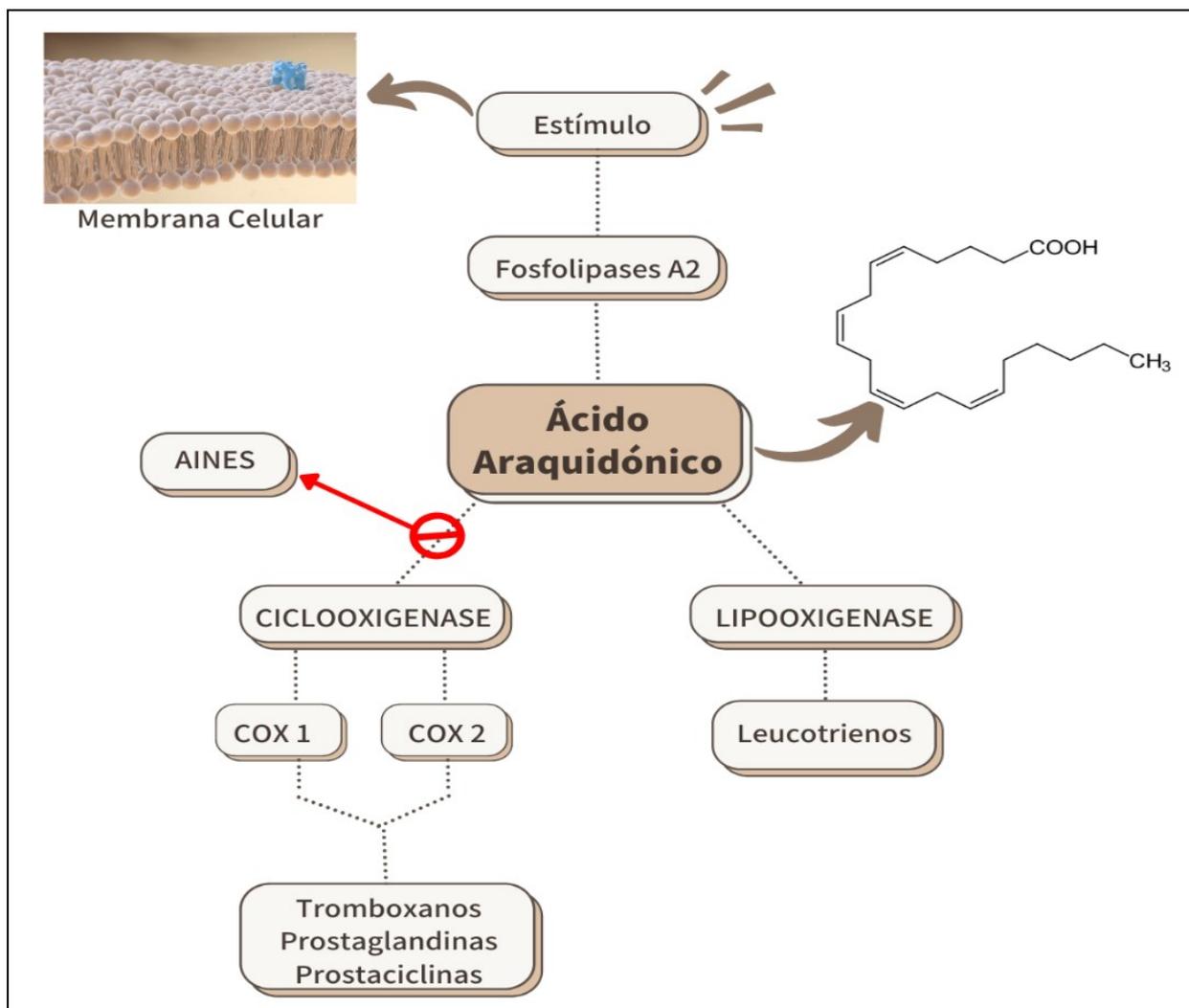
As doenças inflamatórias são, em sua maior parte, tratadas com fármacos desenvolvidos para controlar as lesões causadas pela inflamação, nesse contexto, os anti-inflamatórios (AI) estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo. Entre as classes principais de anti-inflamatórios estão os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e os glicocorticoides, também conhecidos como anti-inflamatórios esteroidais (AIES) (FREITAS, *et al.*, 2019). Entretanto, esses medicamentos trazem algumas limitações com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos, evidenciando a necessidade de uma busca por substâncias com potencial AI, que eventualmente possam dar origem a novos fármacos de baixo custo e com efeitos adversos reduzidos, ou mesmo para auxiliarem no processo de investigação de mecanismos de ação de substâncias (PARENTE, 2001; CALIXTO *et al.*, 2004; FIORUCCI *et al.*, 2001; HAWKEY, 1999).

O processo inflamatório ocorre em resposta ao estímulo lesivo, trauma ou infecção, essas respostas são moduladas pela interação entre os mediadores da inflamação e células inflamatórias (CALIXTO *et al.*, 2004). Dessa maneira, quando a membrana celular (Figura 17) – constituída em sua maior parte de fosfolipídios – é lesionada, a enzima fosfolipase A2, presente nos leucócitos e plaquetas, é ativada por citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-1. Essa enzima causa a degradação de fosfolipídios para produzir ácido araquidônico, um ácido graxo essencial metabolizado por diversas enzimas em

diferentes tecidos (HILÁRIO *et al.*, 2006). Nesse contexto, as ciclooxigenases (COX) e as lipooxigenases (LOX) são fundamentais no processo inflamatório, pois, tratam de enzimas que atuam na regulação do ácido araquidônico, o qual pode sofrer oxidação por essas enzimas, resultando na produção de eicosanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) na via COX-dependente, ou leucotrienos na via LOX-dependente (PARENTE, 2001; GADDI, CICERO, PEDRO, 2004; GODINHO, 2016). A COX-1 é expressa constitutivamente em todos tecidos do organismo, enquanto a COX-2 tem sua expressão aumentada especialmente durante os processos inflamatórios (ARAUJO *et al.*, 2005).

As prostaglandinas (PG) contribuem para os sintomas da inflamação aguda, tais como aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, formação de edema, produção de dor e febre. Já os leucotrienos (LC) causam danos gastrointestinais por estimular a infiltração de neutrófilos, que contribuem para a ulceração por oclusão de micro vasos, redução do fluxo sanguíneo e liberação de radicais livres e proteases que causam a necrose dos tecidos. Além disso, devido à estimulação do recrutamento de leucócitos pelos LC, estes precipitam crise de asma e conversão da inflamação aguda para crônica (PARENTE, 2001; GADDI, CICERO, PEDRO, 2004; FERREIRA, 1974). A principal PG e LC pró-inflamatórios são, respectivamente, a PGE₂ e o LTB₄.

Figura 17 – Esquema de produção e metabolismo do ácido araquidônico pelas principais vias (COX e LOX).



Fonte: Do autor.

Os primeiros AINEs foram considerados não específicos, já que inibiam ambas as isoformas da ciclooxigenase, apesar da eficiência comprovada quanto ao efeito anti-inflamatório, seu uso contínuo gera efeitos gastrointestinais adversos (ARAÚJO *et al.*, 2005). Atualmente, os anti-inflamatórios não esteroidais, são capazes de inibir a via COX, entretanto, não inibem a via LOX (Figura 17). Assim, há um desvio da via de metabolização do ácido araquidônico e ele passa a ser metabolizado apenas pela LOX, resultando em um aumento da formação de LC, sendo estes considerados como os responsáveis pelos principais efeitos adversos dos AINEs (PARENTE, 2001; FIORUCCI *et al.*, 2001). Por esse motivo, a necessidade de procurar agentes que sejam capazes de inibir tanto a COX-2

como a 5-LOX vem aumentando (SCHNEIDER, BUCAR, 2005; LI *et al.*, 2009). Tais agentes seriam úteis para o tratamento dos processos inflamatórios agudos e crônicos como, por exemplo, a artrite reumatoide, psoríase, asma, ulceração gástrica e até mesmo para o tratamento e prevenção de doenças de origem inflamatória como, por exemplo, a doença de Alzheimer, o mal de Parkinson, diabetes e aterosclerose (SCHMITZ, BACHER, 2005).

Todavia, sabe-se que a inibição específica da COX-2 impede que as prostaciclina (PCI2) sejam sintetizadas, dificultando o processo de vasodilatação e a regulação do tromboxano (TXA2), que intensifica a vasoconstrição, induzindo os efeitos trombóticos, favorecendo o aumento dos riscos de eventos cardiovasculares. Em conclusão, o risco de eventos tromboembólicos é aumentado, pois a inibição seletiva da COX-2 inclina a balança a favor dos tromboxanos, podendo causar trombose vascular, principalmente em indivíduos com outros fatores que aumentam esse risco (MARQUES *et al.*, 2022 *apud* KUMAR *et al.* 2018).

Na prática, ambas classes inibitórias da COX são válidas, sendo necessário avaliar cada paciente individualmente. No geral, para casos de dor aguda em pacientes com histórico de complicações gastrintestinais, os inibidores seletivos da COX-2 tornam-se uma excelente escolha, pois o uso dessas drogas em um curto período de tempo, não representam riscos de complicações cardiovasculares ou gastrintestinais (MENDES *et al.*, 2012).

Adicionalmente, tanto as COX quanto as LOX têm sido descritas como enzimas superexpressadas em muitos tipos de tumores, sendo que inibidores simultâneos dessas enzimas são candidatos potenciais a substâncias com propriedade anti-câncer ou mesmo como coadjuvantes no tratamento de tumores (PARENTE, 2001; LI *et al.*, 2009; YAMAMOTO, GAYNOR, 2001).

Existem atualmente no mercado kits capazes de detectar a inibição dessas enzimas em ensaios *in vitro*, que podem ser usados para realizar a triagem de substâncias ativas (WERZ, 2007; CHAGAS-PAULA, 2011). Porém, eles são importados e extremamente caros, sendo que, a importação destes kits demora de 6 meses a 1 ano o que implica em grande atraso na descoberta de substâncias com mecanismo de ação inovador, por pesquisadores brasileiros. Outro ponto é que um resultado positivo de ensaios *in vitro* podem não se reproduzir em experimentos *in vivo*. Isso ocorre devido às propriedades

farmacocinéticas e farmacodinâmica das substâncias. Experimentos *in vivo* são ideais pois demonstram o real potencial farmacológico das substâncias em organismos vivos (WERZ, 2007; VERPOORTE, CHOI, KIM, 2005). A detecção de atividade biológica em ensaios *in vivo* ocorre inclusive se a substância for uma pró-droga, e não revela falso potencial farmacológico caso a substância seja de difícil absorção e distribuição, ou se for degradada em substâncias inativas pelo metabolismo de organismos vivos (VERPOORTE, CHOI, KIM, 2005). Entretanto os ensaios *in vivo* tendem a ser demorados e de alto custo, além de muitas vezes limitados devido as restrições éticas (HUNG, 2019).

Dessa maneira, uma alternativa aos ensaios *in vivo* e *in vitro* são os modelos *ex vivo* que mantêm a estrutura dos tecidos mais próxima da realidade dos ensaios *in vivo*, proporcionando uma avaliação mais precisa do objeto de estudo (MOLEIRO, *et al.*, 2017). Esse modelo permite além de testar hipóteses diretamente de um sistema humano, encontrar novos alvos de drogas e testar o potencial terapêuticos antes de ensaios clínicos, além de ser economicamente viável (HUNG, 2019).

Vale ressaltar que produtos naturais e substâncias semissintéticas com grande potencial anti-inflamatório tem sido estudado por nosso grupo de trabalho (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2014). Algumas substâncias demonstraram potencial para inibição das vias da COX e LOX em ensaios *in vitro* (CHAGAS-PAULA, 2013; CHAGAS-PAULA *et al.*, 2011; CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015), sendo esse mecanismo de ação inovador, já que não existe no mercado nenhum anti-inflamatório com tal mecanismo. Ademais, recentemente uma nova metodologia para ensaio *ex vivo* foi desenvolvida e validada por nosso grupo (ROSA *et al.*, 2021) permitindo a triagem de grandes quantidades de amostras antes do ensaio *in vivo*.

3 JUSTIFICATIVA

A descoberta de substâncias que possam dar origem a novos fármacos com maior eficácia e menores efeitos adversos é de extrema importância para o tratamento de diversas patologias inflamatórias. Muitos compostos já estudados e confirmados como potenciais no tratamento anti-inflamatório têm apresentado inúmeros efeitos adversos, o que torna necessária a busca por novos candidatos com tal atividade biológica, cujo potencial seja mais efetivo e apresente menores efeitos adversos.

Nesse contexto, o estudo de espécies remanescentes da Mata Atlântica se faz necessário e urgente devido ao processo de extinção que estas espécies vêm sofrendo nos últimos tempos e à grande diversidade de compostos encontrada nelas, dessa maneira, o gênero *Acacia*, possui uma diversa gama de atividade biológica relatada nos últimos anos (AMOUSSA *et al.*, 2020), tendo potencial de ser uma fonte significativa para busca de novas moléculas com propriedades biológicas interessantes.

Em vista disso, nosso grupo de pesquisa tem uma vasta experiência nesta área, e, portanto, pretende-se com este trabalho aprimorar estes estudos complementando os dados já obtidos anteriormente (ROSA, 2021) com a espécie *A. polyphylla* que apresentou resultados significativos de inibição de PGE₂ (valores de concentração média de PGE₂ de 5,57 ng/mL para o extrato bruto de *A. polyphylla*, comparadas aos fármacos de referência dexametasona e indometacina, valores de concentração média de PGE₂ de 5,37 ng/mL e 3,86 ng/mL, respectivamente).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o conhecimento da composição fitoquímica da *Acacia polyphylla* e de seu potencial anti-inflamatório.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar e identificar metabólitos secundários da *A. polyphylla* fazendo uso de técnicas cromatográficas e espectroscópicas;
- b) Avaliação do potencial da atividade anti-inflamatória das frações de extratos e compostos isolados, por meio do ensaio *ex vivo*.

5 METODOLOGIA

5.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO BRUTO

A coleta do material vegetal a partir das folhas da espécie, foi realizada na Mata Atlântica da região de Alfenas-MG, com auxílio de uma equipe de pesquisadores responsáveis por fazer a identificação da espécie. Após identificada a espécie, registrou-se a exsicata no herbário da UNIFAL sob o número UALF 3050.

O material foi seco em estufa com circulação de ar, por 72 horas, a 50 °C. Após isso, o material vegetal foi triturado em moinho de facas e armazenado em sacos de papel, ao abrigo da luz e umidade. Para obtenção dos extratos brutos utilizou-se uma mistura de etanol:água (3:1, V/V) e 0,1% de ácido acético glacial, na proporção solvente:massa 1:50 de material vegetal (m/V, em g/mL). Posteriormente, o material foi conservado com a solução de extração, sob agitação, por 24 h, a 25 °C em incubadora Shaker SL222 a 125 rpm, sob ausência de luz (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015). Após esse período, o material foi separado por filtração a vácuo. Em sequência o solvente foi evaporado por meio de um rotaevaporador (40° C), e ao final, para eliminação completa da água, submeteu-se o extrato ao processo de liofilização.

5.2 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA CLÁSSICA

5.2.1 Extrato bruto

Um esquema geral do fracionamento da espécie *Acacia polyphylla* é encontrado na figura 25 da seção 6.1.

Utilizando-se aproximadamente 4 gramas do extrato bruto, da *Acacia polyphylla* em estoque, submeteu-se à técnica de cromatografia em coluna (CC), onde utilizou-se uma coluna de sílica comum com aproximadamente 5 cm de diâmetro e 26 cm de altura. Os eluentes estão indicados na tabela 3. Ao total foram obtidos 254 frascos com cerca de 30 mL cada.

Tabela 3 - Escala de eluição utilizada no fracionamento 1 (CC).

Solvente utilizado	Proporção (v/v)	Vol. do solvente (L)	Frações coletadas
Hexano	100%	1	1 – 30
Hexano/Acetato de Etila	95:5	0,30	31 – 41
Hexano/Acetato de Etila	90:10	0,2	42 – 49
Hexano/Acetato de Etila	80:20	0,4	50 – 64
Hexano/Acetato de Etila	50:50	0,4	65 – 79
Acetato de Etila/Hexano	70:30	0,5	80 – 97
Acetato de Etila/Hexano	80:20	0,4	98 – 112
Acetato de Etila/Hexano	90:10	0,4	113 – 127
Acetato de Etila	100%	0,6	128 – 148
Acetato de Etila/Metanol	90:10	0,2	149 – 159
Acetato de Etila/Metanol	70:30	0,2	160 – 174
Metanol/Acetato de Etila	70:30	0,5	175 - 192
Metanol/Acetato de Etila	80:20	0,2	193 – 199
Metanol	100%	1	200 – 254

Fonte: Do Autor.

Posteriormente, as amostras foram secas na capela e em seguida, realizou-se a cromatografia em camada delgada (CCD), para acompanhar o fracionamento, verificando quais frações poderiam ser agrupadas conforme o seu perfil cromatográfico.

5.2.2 Fração H

Após o fracionamento 1 e avaliação do perfil cromatográfico, a fração H foi submetida a uma coluna de diâmetro interno de 2,5 cm e 2,0 m de altura, empacotada com (1,8 metros) do polímero Sephadex® LH20 Sigma-Aldrich utilizando o metanol como eluente em modo isocrático (Fracionamento 2). Desse fracionamento, obtiveram-se 38 frascos de aproximadamente 30 mL. Novamente as amostras foram secas na capela e, em sequência, o perfil cromatográfico foi realizado por meio de CCD e feito o agrupamento das frações.

Em sequência, a fração EH (80 mg), proveniente da separação anterior,

apresentou uma baixa complexidade ao ser observada na CCD, dessa maneira, submeteu-se a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Utilizou-se a sílica como fase estacionária e a placa foi confeccionada em uma placa de vidro 25 cm X 25 cm. A amostra foi diluída em metanol, e, em seguida, aplicada à placa cromatográfica. Para fase móvel utilizou hexano/acetato 7:3 (v:v). Após o processo de eluição, a banda de interesse foi raspada da placa e solubilizada com metanol. Posteriormente, a amostra foi filtrada à vácuo, separando-se da sílica em gel, e levada para a secagem na capela, para eliminação do solvente. A CCD foi realizada para acompanhar o perfil da amostra.

O perfil cromatográfico das frações BH, CH e DH, provenientes da fração H (fracionamento 2), foi avaliado por meio do UHFLC, em seguida, as frações foram juntadas para realização de um novo fracionamento utilizando-se a extração em fase sólida, do tipo C18 (Octadecilsilano) (Fracionamento 3). A etapa de condicionamento da coluna, foi realizada utilizando-se 80 mL de metanol e 80 mL de água miliQ. O procedimento foi realizado utilizando-se um *manifold* e uma bomba de vácuo. As frações coletadas (80 mL) foram secas na capela e armazenadas.

Tabela 4 - Escala de eluição utilizada no fracionamento das frações BH-CH-DH.

Solvente utilizado	Proporção (v/v)	Fração	Massa obtida (mg)
Água	100%	1BH	310 mg
Água/Metanol	75:25	2BH	50 mg
Água/Metanol	50:50	3BH	87,7 mg
Metanol/Água	75:25	4BH	70 mg
Metanol	100%	5BH	60 mg

Fonte: Do Autor.

5.2.3 Fração I

A fração I, proveniente da primeira coluna cromatográfica realizada, foi submetida a extração em fase sólida, do tipo C18 (Octadecilsilano), o condicionamento da coluna, foi realizado anteriormente com 40 mL de metanol e 80 mL de água, utilizando-se um *manifold* e uma bomba de vácuo. Desse

procedimento obtiveram-se 10 frascos de 40 mL.

Tabela 5 - Escala de eluição utilizada no fracionamento 4 (C18).

Solvente utilizado	Proporção (v/v)	Frações	Massa obtida (mg)
Água	100%	-	-
Água/Metanol	90:10	1l	36,5
Água/Metanol	80:20	2l	87,2
Água/Metanol	70:30	3l	105,1
Água/Metanol	60:40	4l	103,8
Água/Metanol	50:50	5l	65,3
Metanol/Água	60:40	6l	98,8
Metanol/Água	70:30	6l	98,8
Metanol/Água	80:20	7l	125,30
Metanol/Água	90:10	8l	34
Metanol	100%	8l	34

Fonte: Do Autor.

As frações coletadas foram secas e após foi avaliado o perfil cromatográfico com auxílio da CCD. Todas as placas de CCD foram reveladas na luz ultravioleta nos comprimentos de $\lambda = 254$ e 365 nm.

5.3 SEPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO POR HPLC

Parte do extrato bruto da *A. polyphylla* (0,850 g) anteriormente reservado, foi separado pelo sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, que consistiu em um cromatógrafo Shimadzu de duas bombas modelo LC-20AR Prominence equipado com um amostrador automático SIL-10AF, um forno de coluna CTO-20A, um módulo de comunicação CBM-20A, um desgaseificador em linha DGU-20A3R, e um detector de arranjo de diodos (PDA)- SPD-M20A. Para processamento de dados utilizou-se o *software* Lab solution®.

As análises foram realizadas em uma coluna Shim-pack VP-ODS (250 × 4,6 mm id, 5 μ m; Shimadzu) com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e as separações preparativas por HPLC foram realizadas usando um Shim-pack VP Coluna - ODS (250 × 20 mm id, 10 μ m; Shimadzu) a um fluxo de 10 mL.min⁻¹ com detecção UV em 241 nm. Os solventes utilizados foram H₂O a 0,1% de ácido

acético em A e MeOH em C, no modo isocrático da seguinte forma: 25% de C em 23 minutos. Ao final, foi obtido o isolamento de duas substâncias; P1 (2,5 mg) e P2 (2 mg). O isolamento dessas substâncias, foi realizado em colaboração com o professor Dr. Mário dos Santos.

Os espectros de RMN das substâncias, foram obtidos no equipamento Bruker 300 (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C), pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LRMN) da Universidade Federal de Alfenas. As amostras foram dissolvidas em DMSO e/ou CD_3OD . A calibração foi realizada com o sinal do solvente.

5.4 PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES POR UFLC-UV

As análises cromatográficas das frações foram realizadas em um UFLC acoplado ao espectrofotômetro ultravioleta. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em MeOH, e, em seguida, realizou-se o *clean up*, em triplicata, com 300 μL de hexano. Ao final, elas foram filtradas em filtro de PVDF de 0,45 μm de diâmetro de poro. Para as análises, foi injetada uma alíquota de 20 μL via auto-injetor. As análises foram feitas utilizando-se a coluna de fase reversa C18 analítica, 250 x 4,6 mm, diâmetro de partícula de 5 μm , no primeiro momento, e depois esta foi substituída por uma coluna C18 analítica (Athena C18-WP), 150 x 4,6 mm, e um diâmetro de partícula de 5 μm . A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/min de um gradiente de ACN e H_2O a 0,1% de ácido acético. O gradiente foi de 5% de ACN à 100% em 40 min e ao final foram obtidos os cromatogramas.

5.5 ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO *EX VIVO* DE PRODUÇÃO DE PGE_2

A metodologia do ensaio anti-inflamatório *ex vivo* no sangue humano foi descrita pela primeira vez por ROSA e colaboradores (2021).

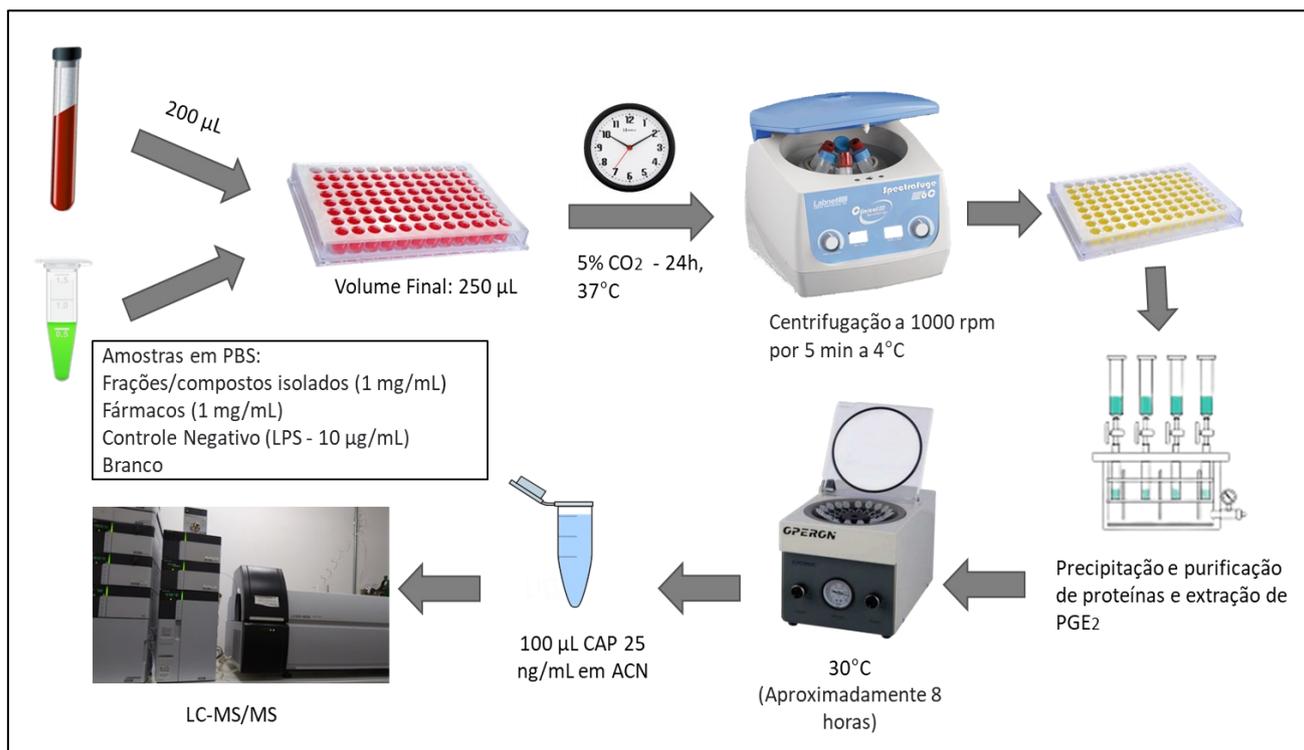
Inicialmente, as amostras foram solubilizadas em etanol:água 7:3 (v:v) e posteriormente, realizou-se o *clean up*, em triplicata, com 300 μL de hexano. O sangue humano, fresco e heparinizado, foi plaqueado em placas de 96 poços (200 μL por poço), e tratado com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS) para induzir a inflamação. Posteriormente, a placa foi incubada com amostras obtidas

do fracionamento e substâncias puras da *A. polyphylla* e controles. As drogas comerciais indometacina e dexametasona (1 mg/mL) foram utilizadas como controle positivo. Para o controle negativo, o LPS foi incubado com sangue sem qualquer tratamento. O volume final em cada poço foi de 250 µL e todas as diluições foram feitas utilizando-se PBS (*Phosphate Buffered Saline*), uma solução tampão de sais de fosfato utilizada como meio de cultura de células. O teste foi realizado em triplicata. Após incubação em estufa, a 37 °C, e atmosfera a 5% de CO₂, por 24 h, a placa foi centrifugada a 1000 rpm por 5 min e a 4°C, obtendo-se assim o plasma da replicata de cada amostra. Em sequência, as amostras de plasma foram submetidas à precipitação de proteínas e purificação. Para isso, foram adicionados inicialmente 500 µL de uma mistura MeOH: ACN (1:1, V:V) a 100 µL de plasma de cada replicata. As amostras foram homogeneizadas em um agitador do tipo vórtex e para completa precipitação das proteínas, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram diluídos em 4,5 mL de água ultrapura para redução da quantidade da mistura de MeOH:ACN. Posteriormente, foi realizada a purificação por SPE em três etapas, descritas abaixo.

- a) Etapa 1 – Condicionamento do cartucho: aplicou-se 2 mL de MeOH no cartucho e depois 2 mL de uma solução aquosa 0,1 % de ácido acético.
- b) Etapa 2 – Inserção da amostra no cartucho: após a inserção da amostra, aplicou-se mais 2 mL da solução 0,1 % de ácido acético para purificação e eliminação de interferentes da matriz do plasma.
- c) Etapa 3 – Eluição da amostra: por fim, passa-se 2 mL de MeOH contendo 0,1 % de ácido acético para eluição da amostra.

As amostras foram concentradas utilizando o equipamento *Speed Vacuum*, sob ausência de luz e calor, durante 8 horas. Ao final, as amostras secas foram ressuspensas em uma solução de ACN contendo o padrão interno cloranfenicol (CAP, 25 ng/mL) e analisadas por LC-MS/MS. A quantificação de PGE₂ foi realizada utilizando-se método MRM e comparação da área sobre a curva dos picos cromatográficos com uma curva de calibração linear.

Figura 18 – Esquema metodológico geral do ensaio *ex vivo*.



Fonte: Do autor.

O sangue coletado foi obtido de voluntários saudáveis, que não fizeram uso de anti-inflamatórios ou do antibiótico cloranfenicol (CAP) a pelo menos 15 dias antes da coleta. A participação foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) sob número 60344622.1.0000.5142, e os participantes assinaram o termo de consentimento para coleta.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR HPLC

6.1.1 Extrato bruto

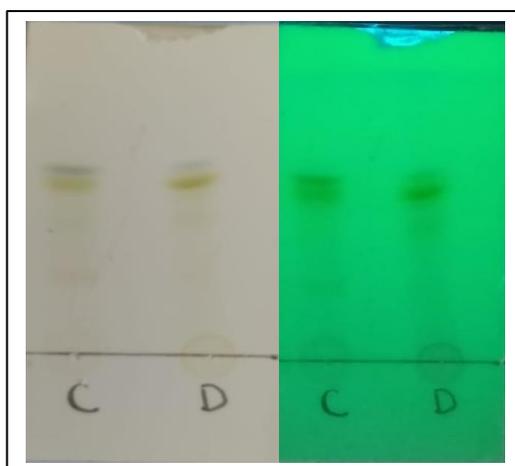
Um rendimento de 10,09% foi obtido a partir das folhas da *A. polyphylla* coletadas e submetidas aos procedimentos descritos anteriormente.

Posteriormente, o extrato bruto foi submetido à purificação por cromatografia em coluna que, após a avaliação por CCD, utilizando-se os comprimentos 254 nm e 365 nm, foram organizados nos seguintes grupos: A (1-36); B (37-44); C (45-65); D (66-73); E (74-77); F (78-131); G (132-175); H (176-199); I (200-254). Dentre as frações obtidas, foram preferencialmente escolhidas as de menor complexidade e/ou que possuíam maior massa para dar sequência ao fracionamento.

6.1.2 Fração CD

As frações C e D, foram analisadas por CCD e agrupadas devido a semelhança cromatográfica (Figura 19), obtendo-se uma massa maior do que inicialmente, a fração foi renomeada para CD.

Figura 19 – CCD das frações C e D em hexano:acetona 6:4 (v/v).



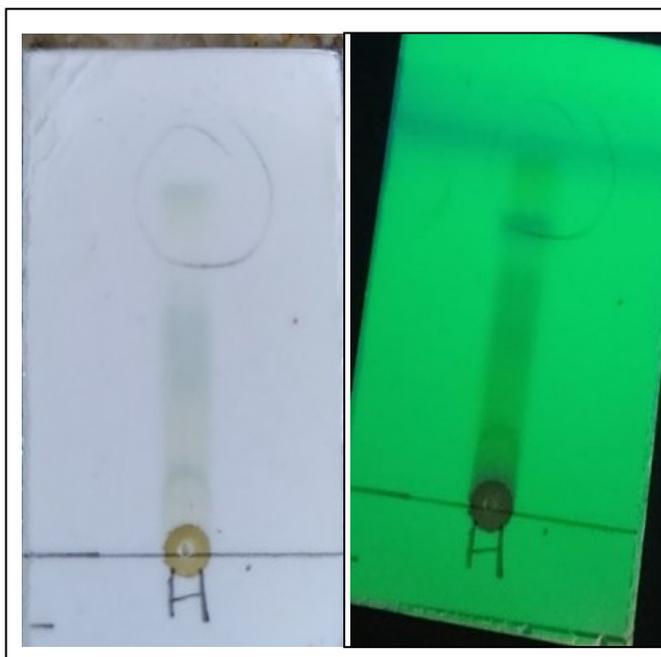
Fonte: Do Autor.

Legenda: A esquerda, a placa é vista a olho nu, e a direita a placa foi revelada no comprimento de onda de 254 nm.

6.1.3 Fração H

Por meio da CCD da fração H (1,13 g), foi possível avaliar a complexidade da fração (Figura 20).

Figura 20 – CCD da fração H em hexano/acetona (1:1).

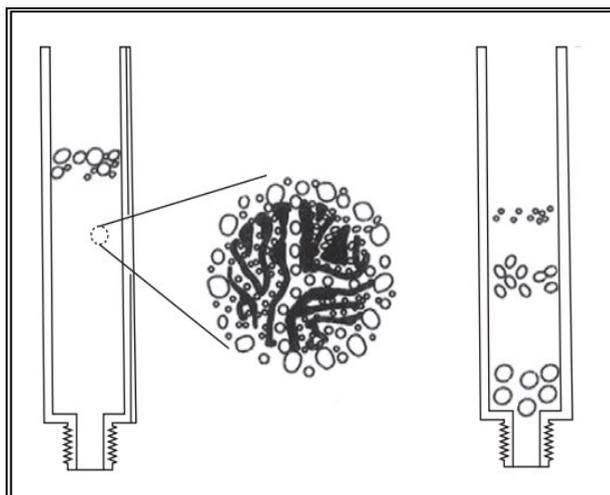


Fonte: Do Autor.

Legenda: A esquerda, a placa é vista a olho nu, e a direita a placa foi revelada no comprimento de onda de 254 nm.

Posteriormente, deu sequência ao fracionamento por meio da técnica de cromatografia por exclusão, que tem como fase estacionária um polímero ou gel, insolúvel na fase móvel, que contém poros de tamanhos bem controlados, regulando a entrada e saída das moléculas que podem permear parcialmente ou completamente a fase estacionária, de modo que, as moléculas grandes eluam primeiro e as pequenas tendem a permanecer nos poros da fase estacionária (COLLINS, 2011) (Figura 21).

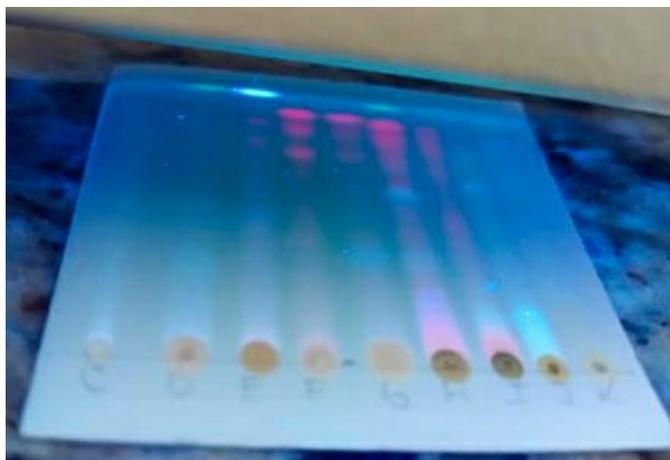
Figura 21 - Esquema de uma separação por exclusão por tamanho.



Fonte: COLLINS, 2011.

O perfil cromatográfico por CCD foi avaliado e as frações foram agrupadas em 11 grupos diferentes: AH (1); BH (2-12); CH (13-17); DH (18-19); EH (20-22); FH (23-24); GH (25); HH (26-27); IH (28); JH(29-32); KH (33-38). (Figura 22).

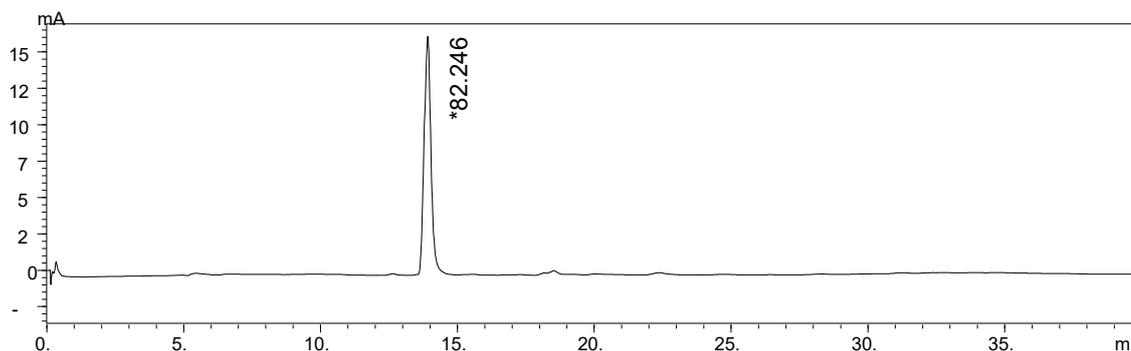
Figura 22 – CCD das frações CH à KH em hexano/acetato (1:1) a 365 nm.



Fonte: Do Autor.

A fração EH, após submetida à cromatografia em camada delgada em placa preparativa permitiu obter uma subfração (DEP) de aproximadamente 2,50 mg, com alguns interferentes observados inicialmente por CCD e confirmados posteriormente por HPLC (Figura 23). Apesar da pequena quantidade de massa e os interferentes observados, optou-se por dar seguimento a identificação do composto majoritário utilizando a técnica de RMN.

Figura 23 – Perfil Cromatográfico do composto DEP no comprimento de onda 254 nm.

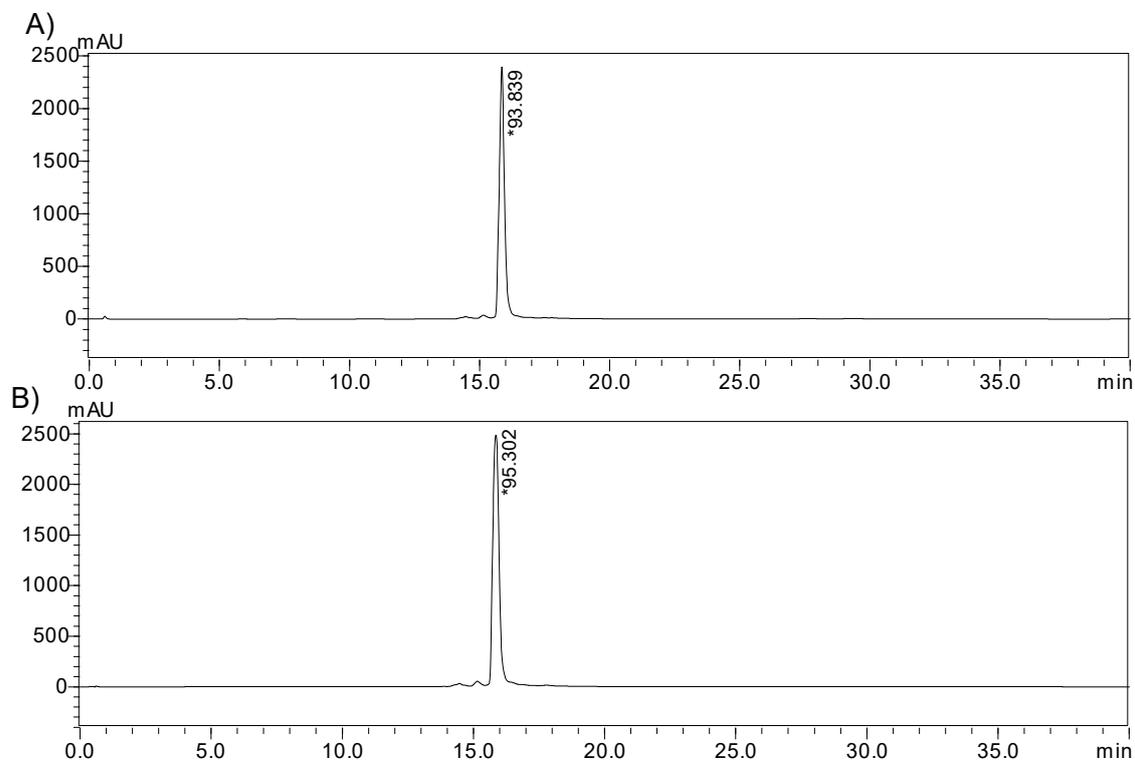


Fonte: Do Autor.

Legenda: Coluna de fase reversa C18 analítica, 250 x 4,6 mm, diâmetro de partícula de 5 µm. Método Gradiente de 5% de ACN à 100% em 40 minutos. *Valor de concentração do pico.

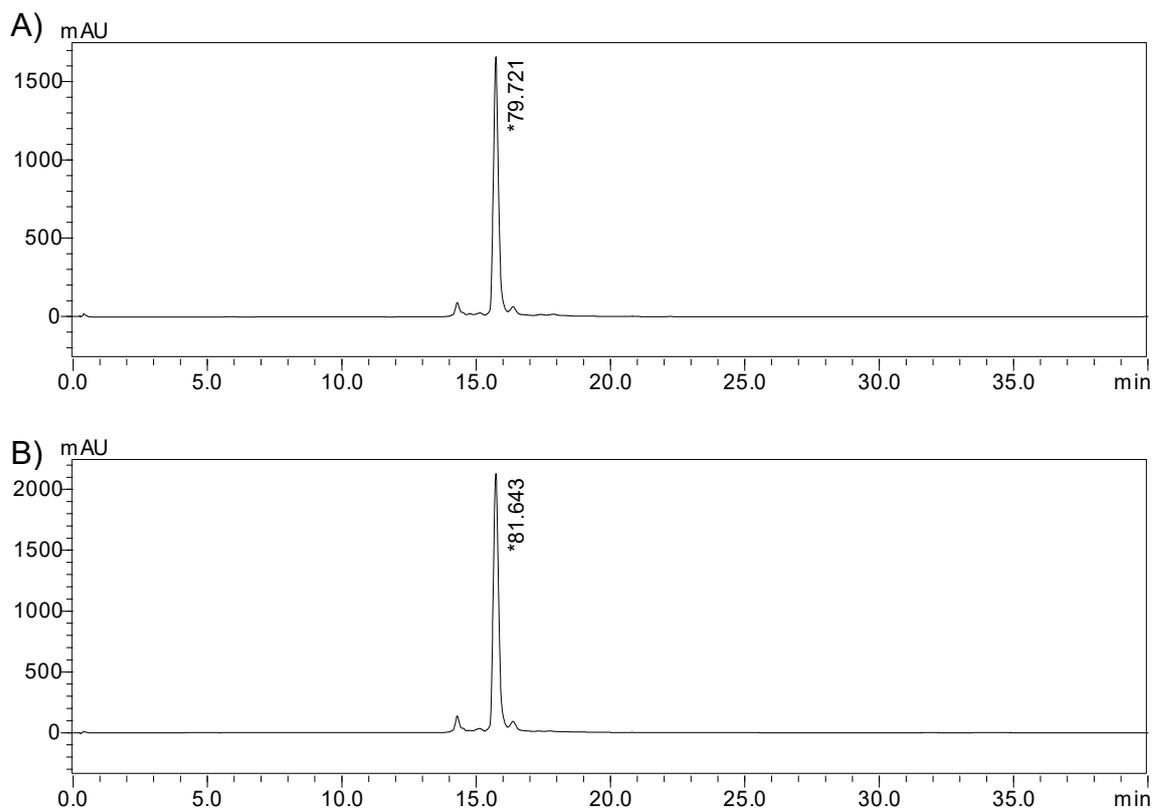
A avaliação do perfil cromatográfico da fração FH e GH por meio do UFLC (figura 24 e 25) demonstrou poucas impurezas, dessa maneira, decidiu-se dar seqüência a identificação do composto majoritário utilizando a técnica de RMN.

Figura 24 – Cromatograma do composto FH.



Fonte: Do Autor.

Legenda: a) Em 254 nm; b) Em 320 nm. Coluna de fase reversa C18 analítica, 250 x 4,6 mm, diâmetro de partícula de 5 µm. Método Gradiente de 5% de ACN à 100% em 40 minutos. *Valor de concentração do pico.

Figura 25 - Cromatograma do composto GH.

Fonte: Do Autor.

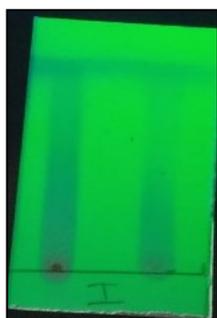
Legenda: a) Em 254 nm; b) Em 320 nm. Coluna de fase reversa C18 analítica, 250 x 4,6 mm, diâmetro de partícula de 5 μ m. Método Gradiente de 5% de ACN à 100% em 40 minutos. *Valor de concentração do pico.

As frações BH, CH e DH, após avaliadas por UFLC foram juntadas para obtenção de maior quantidade de massa, visto que, ainda se tratavam de frações complexas com alguns picos em comum. Posteriormente, realizou-se um novo fracionamento, por meio da extração em fase sólida. Desse fracionamento, foi possível obter cinco frascos, nomeados 1BH, 2BH, 3BH, 4BH e 5BH. Devido às limitações de tempo, essas amostras foram reservadas, a fim de dar-se sequência no isolamento de substâncias provenientes dessas frações em trabalhos futuros do nosso grupo de pesquisa, visto que, a fração BH demonstrou uma atividade significativa de inibição de PGE₂ (seção 6.3.1) aumentando as chances do isolamento de substâncias bioativas.

6.1.4 Fração I

O perfil cromatográfico da fração I (2,28 g), foi avaliado por CCD (Figura 26), podendo-se notar uma baixa resolução na separação dos compostos, devido à alta polaridade da amostra, optando-se em dar sequência ao fracionamento utilizando uma coluna reversa (C18).

Figura 26 – CCD da fração I em acetona/etanol 1:1 (v:v) a 365 nm.

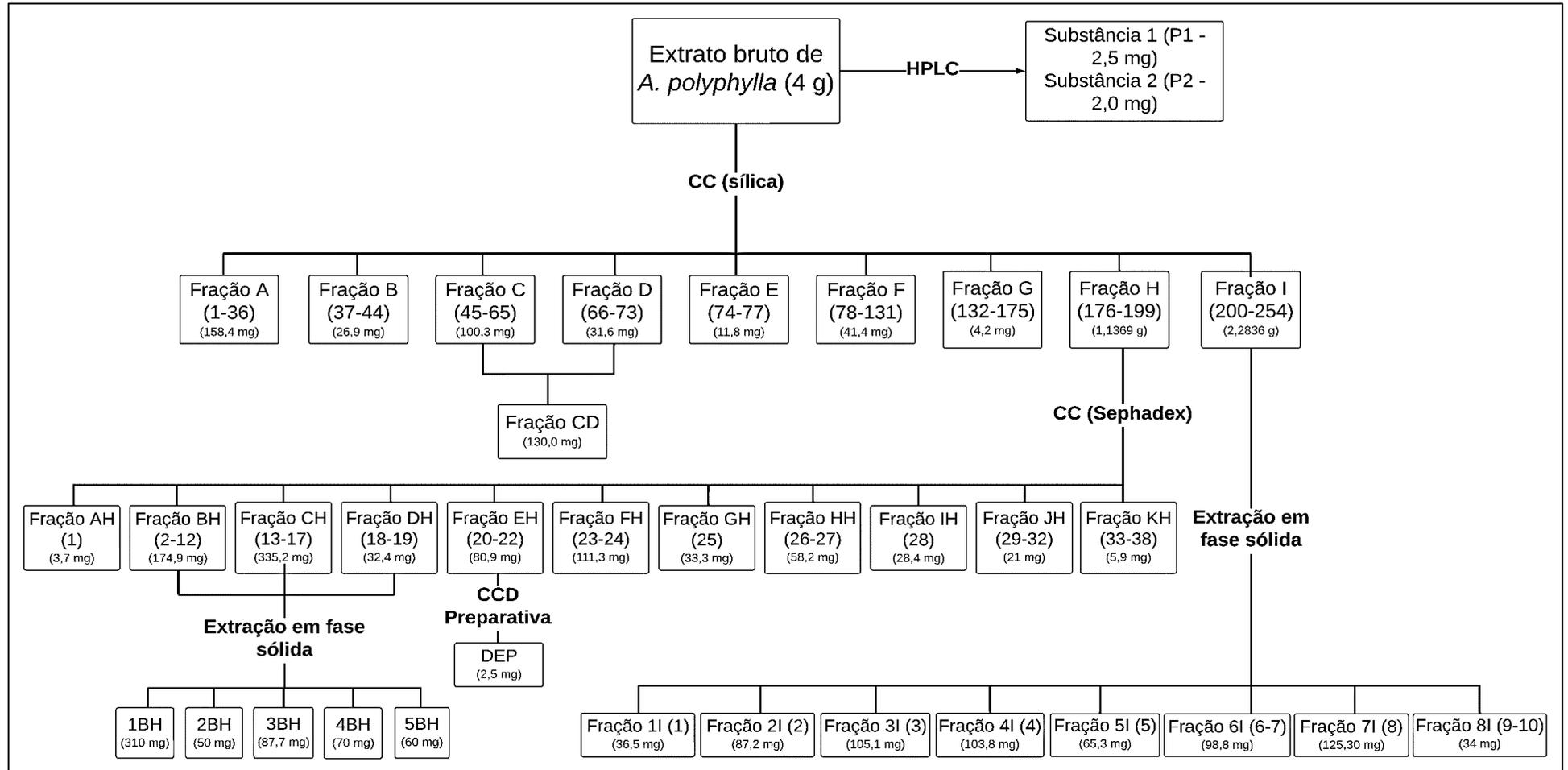


Fonte: Do Autor.

Portanto, após ser submetida a extração em fase sólida (SPE), agruparam-se as frações nos seguintes grupos: 1I (1); 2I (2); 3I (3); 4I (4); 5I (5), 6I (6-7), 7I (8); 8I (9-10).

Um resumo das análises por cromatografia realizadas no extrato, frações e subfrações está esquematizado no fluxograma da figura 27 a seguir.

Figura 27 – Esquema geral do fracionamento e isolamento de substâncias do extrato *A. polyphylla*.



Fonte: Do autor.

Legenda: A numeração das frações corresponde aos frascos que foram juntados por meio da CCD ou UFLC, portanto a fração A, corresponde a união do frasco 1 ao 36, por exemplo.

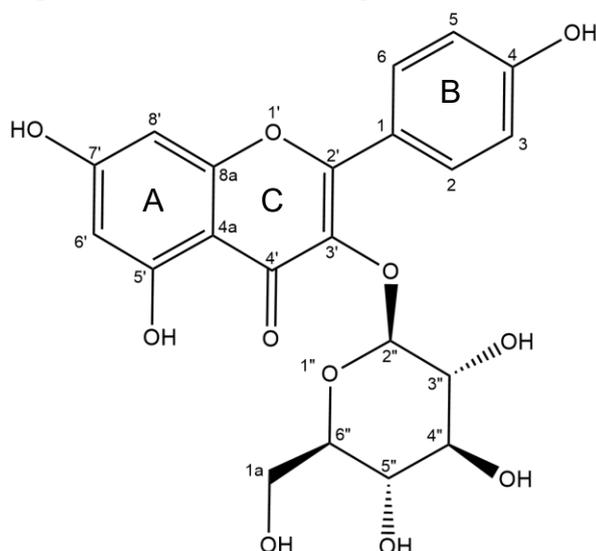
As frações de interesse foram armazenadas para posterior avaliação da atividade anti-inflamatória através do ensaio *ex vivo*.

6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR RMN

6.2.1 Composto 1 (Acacia P1)

O composto P1 (Figura 28) foi identificado como astragalina, por meio dos espectros de RMN obtidos experimentalmente (Apêndice 1 – 5) e com dados da literatura.

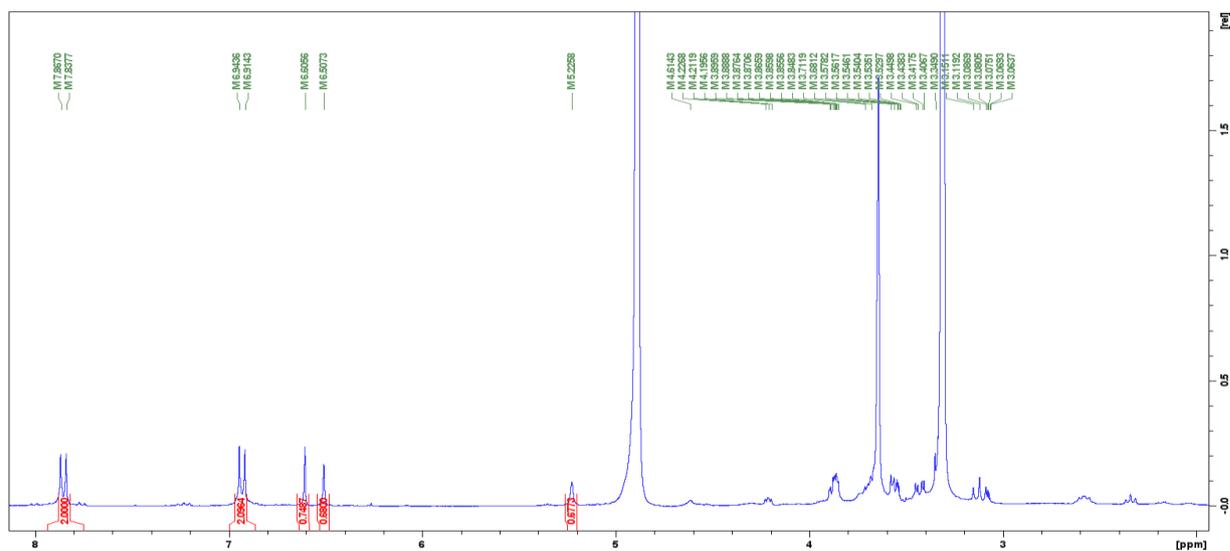
Figura 28 – Estrutura sugerida para P1.



Fonte: Do Autor.

O espectro de RMN de ^1H da astragalina (Figura 29) apresentou sinais característicos de esqueleto flavonoídico, como, por exemplo, os sinais em $\delta 6.50$ e $\delta 6.60$ no anel A, indicando que o anel aromático é tetrasubstituído, característico do anel A de flavonoide. Os dupletos em $\delta 6.92$ e $\delta 7.85$, são referentes aos hidrogênios quimicamente equivalentes das posições H-3,5 e H-2,6, respectivamente, indicando que o anel B é 1,4-dissubstituído.

Figura 29 – Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 300 MHz) obtido para a astragalina (P1).



Fonte: Do Autor.

Além dos sinais na região aromática, hidrogênios glicosídicos são encontrados em um deslocamento entre 3.57 – 3.88 (Figura 29), indicando a presença da glicose, que pode ser confirmada por meio do carbono oximetilênico em δ 61.52 atribuído ao C-1a, característico deste glicosídeo (SANTOS, 2016). A posição da ligação glicosídica ocorreu por meio de comparação com os dados da literatura. O sinal em δ 5.23 atribuído ao hidrogênio anomérico H-2" do β -glicosídeo, foi relatado na literatura como sendo um duplete com integração para 1 hidrogênio e uma constante de acoplamento de 7.2 Hz. Entretanto, não foi possível calcular a constante de acoplamento, pela baixa resolução do sinal e inconsistência na determinação da multiplicidade do sinal.

A atribuição dos carbonos com seu respectivo hidrogênio foi realizada com o auxílio do experimento HSQC (Apêndice 3). Na tabela 6, estão apresentados os dados obtidos pelos experimentos comparados com a literatura, já na tabela 7 são apresentadas as correlações HMBC e HSQC para a astragalina (P1).

Tabela 6 – Dados de RMN para a astragalina (P1).

Posição	Dados experimentais*		Dados da literatura**	
	¹³ C	¹ H	¹ H	¹³ C
1	117.23	–	–	122.6
2,6	128.04	7.85 (d, 2H, J = 8.79 Hz)	8.02 (d, J = 8,4 Hz)	132.1
3,5	115.65	6.92 (d, 2H, J = 8.79 Hz)	6.88 (d, J = 8,4 Hz)	116.0
4	161.41	–	–	161.4
2'	157.42	–	–	158.3
3'	136.28	–	–	135.3
4'	182.73	–	–	178.3
4a	103.84	–	–	104.9
5'	163.71	–	–	162.8
6'	102.43	6.60 (sl, 1H)	6.19 (sl)	99.7
7'	164.72	–	–	165.7
8'	94.13	6.50 (sl, 1H)	6.38 (sl)	94.6
8a	157.42	–	–	158.8
2''	101.40	5.23 (sl, 1H)	5.23 (d, J = 7.2 Hz)	104.0
3''	74.46	3.77 (m)	3.18 – 3.70 (m)	75.6
4''	76.95	3.61 (m)	3.18 – 3.70 (m)	78.3
5''	70.70	3.86 (m)	3.18 – 3.70 (m)	71.2
6''	80.0	3.57 (m)	3.18 – 3.70 (m)	77.9
1a	61.52	3.88; 3.72	3.18 – 3.70 (m)	62.5

Fonte: Do Autor.

Legenda: *300 MHz para ¹H e 75 MHz para ¹³C em MeOD.

**LEE, 2007. (MeOD-d6; 400 MHz).

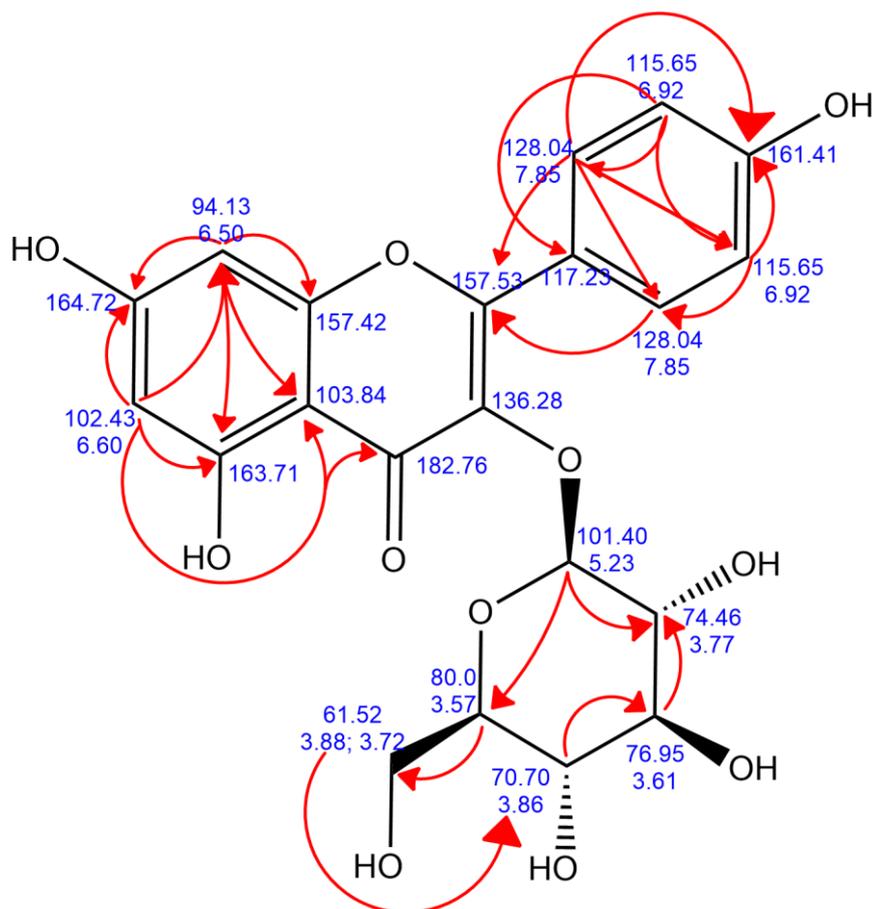
Tabela 7 – Correlações HMBC e HSQC para astragalina em MeOD.

Posição	¹³C	HMBC	HSQC
1	117.23	6.92	–
2,6	128.04	7.85	7.85
3,5	115.65	6.92; 7.85	6.92
4	161.41	6.92; 7.85	–
2'	157.42	7.85	–
3'	136.28	7.85	–
4'	182.73	6.60	–
4a	103.84	6.50; 6.60	–
5'	163.71	6.50; 6.60	–
6'	102.43	–	6.60
7'	164.72	6.50; 6.60	–
8'	94.13	6.60	6.50
8a	157.42	6.50	–
2''	101.40	–	5.23
3''	74.46	3.61; 5.23	3.77
4''	76.95	3.86	3.61
5''	70.70	3.88	3.86
6''	80.0	3.72	3.57
1a	61.52	3.57	3.88; 3.72

Fonte: Do Autor.

As correlações observadas no espectro de HMBC é apresentada na figura

Figura 30 – Correlações HMBC (\rightarrow) observadas para astragalina.



Fonte: Do Autor.

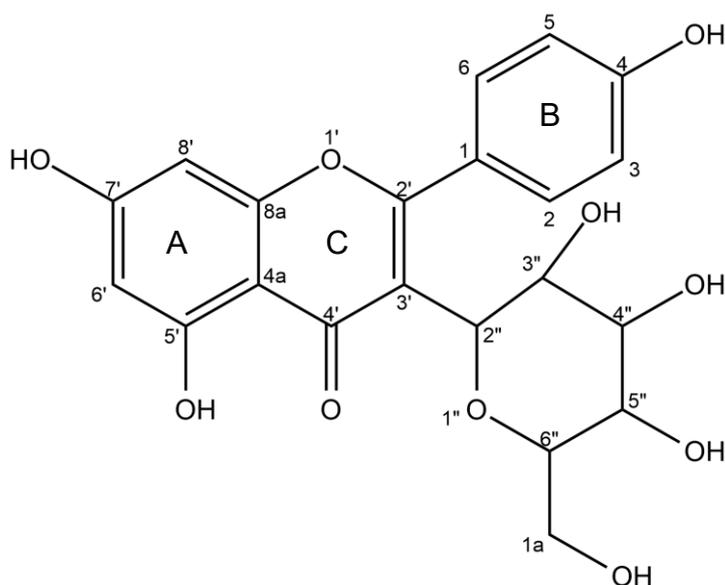
A astragalina é um composto bioativo identificado em uma variedade de plantas medicinais tradicionais. Possui uma ampla gama de características farmacológicas, relatadas na literatura, como anticâncer, anti-inflamatória, antioxidante, neuroprotetora, antidiabética, cardioprotetora, antiúlcera e antifibrótica. Diversas investigações *in vivo* e *in vitro*, explicaram o mecanismo de ação da astragalina (RIAZ, *et al.*, 2018).

A atividade anti-inflamatória da astragalina nesse trabalho, pode ser confirmada experimentalmente pelo ensaio *ex vivo* (Seção 6.3.2) demonstrando a capacidade da astragalina em inibir a PGE₂, corroborando com a literatura, que já havia demonstrado uma inibição significativa de PGE₂ em um estudo de periodontite induzida por patógenos periodontais, uma condição patológica inflamatória destrutiva, em células epiteliais gengivais humanas (INABA, *et al.*, 2008).

6.3.2 Determinação estrutural da substância P2 (Acacia P2)

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 32 – 33), bem como os de correlação COSY, HSQC e HMBC (Apêndice 6 - 10) indicam que o composto P2 isolado se trata de um flavonoide do tipo apigenina-3-C-glicosilada (Figura 31).

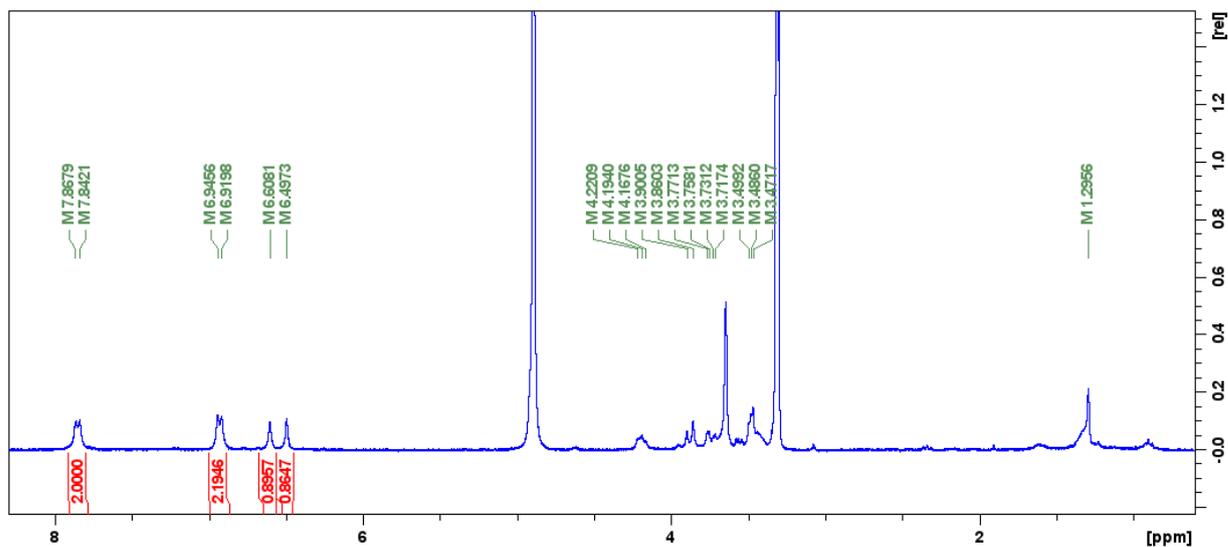
Figura 31 - Estrutura sugerida para o composto 2.



Fonte: Do Autor.

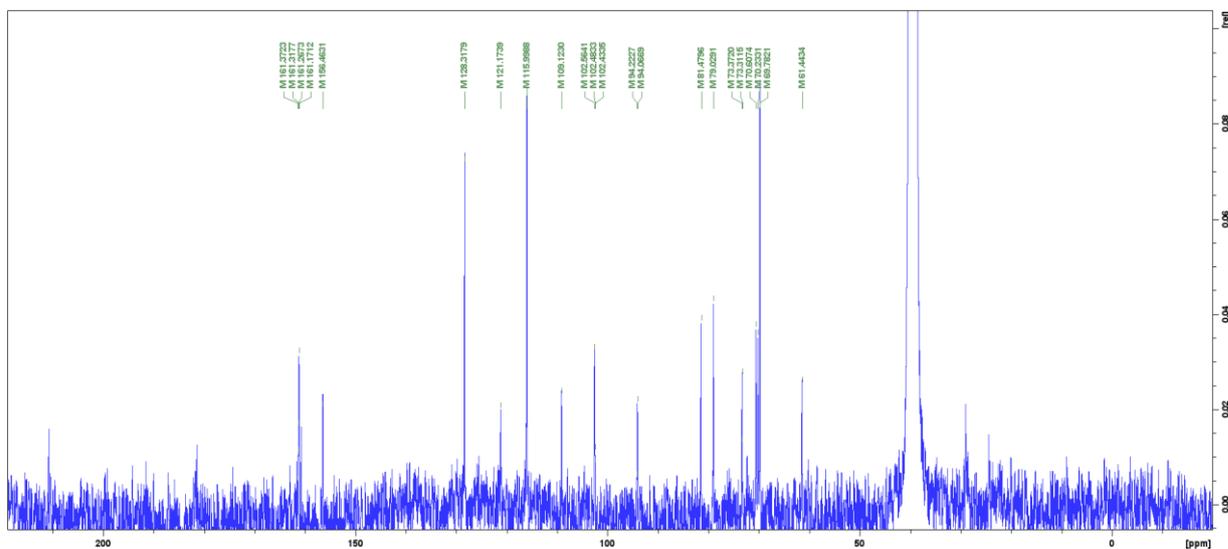
O espectro de RMN de ^1H (Figura 32), apresenta sinais na região entre δ 6 e δ 8 (região de aromáticos) indicando a presença de anéis p-substituídos (Tabela 8). Os sinais em δ 7.89 (8.7 Hz) e δ 6.92 (8.7 Hz), ambos dupletos com integração para dois hidrogênios evidencia a presença de dois pares de hidrogênios quimicamente equivalentes, presentes no anel B. Por meio do espectro de HSQC (Apêndice 9) é possível observar que esses hidrogênios (δ 7.89 e δ 6.92) estão ligados aos carbonos δ 128.84 e δ 116.46 respectivamente.

Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H (MeOD, 300 MHz) obtido para o composto P2.



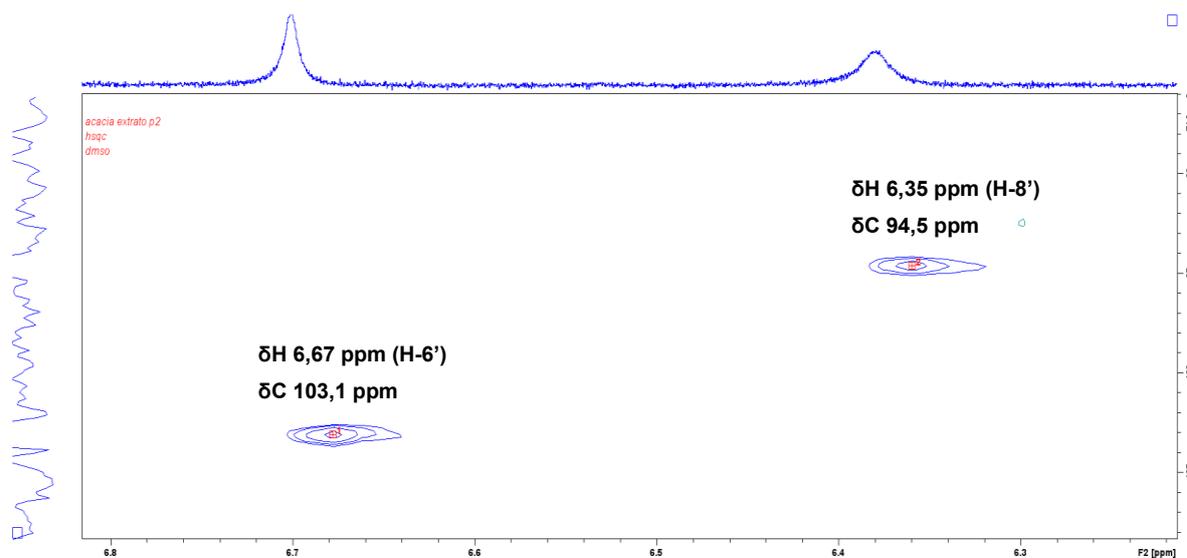
Fonte: Do Autor.

Figura 33 – Experimento de RMN ^{13}C (DMSO, 75 MHz) obtido para o composto P2.



Fonte: Do Autor.

Os sinais de hidrogênio observados nas posição 6' e 8' (Figura 31), como um singlete largo com integração para um hidrogênio, em δ 6.67 e δ 6.35, respectivamente. Ademais, no espectro de HSQC é possível observar a relação entre o H-6 e H-8 com seus respectivos carbonos (Figura 34).

Figura 34 – Espectro de HSQC em DMSO ampliado do composto P2.

Fonte: Do Autor.

A tabela 7 a seguir traz os dados de RMN para o composto 2 bem como as correlações HMBC, HSQC e COSY.

Tabela 8 – Dados de RMN para o composto 2 em DMSO (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C).

(continua)

Posição	^{13}C	^1H	HMBC	HSQC	COSY
1	94.06	–	–	–	–
2,6	128.8	7.89 (d, 2H, sb, J = 8.7 Hz)	6.92; 7.89	7.89	6.92
3,5	116.2	6.92 (d, 2H, sb, J = 8.7 Hz)	6.92; 7.89	6.92	7.89
4	162.0	–	6.92; 7.89	–	–
2'	161.3	–	4.57; 7.89	–	–
3'	109.12	–	4.57	–	–
4'	181.43	–	6.67	–	–
4a	102.71	–	6.67	–	–
5'	161.2	–	6.35; 6.67	–	–

Tabela 7 – Dados de RMN para o composto 2 em DMSO (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C).

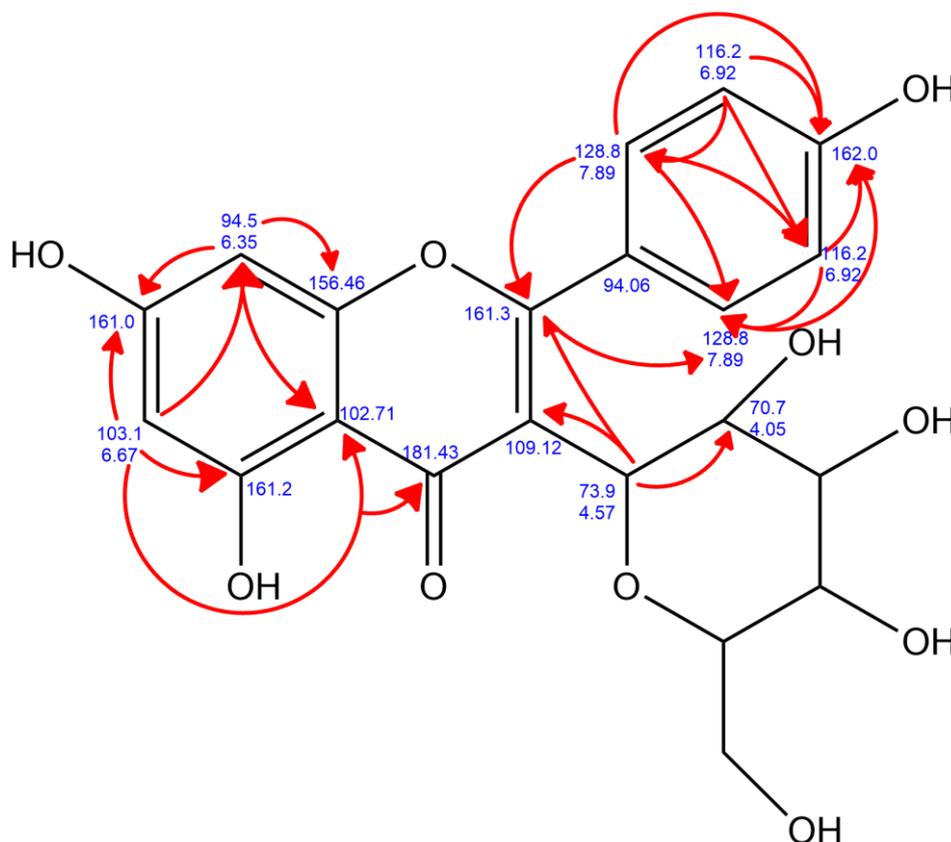
					(conclusão)
6'	103.1	6.67 (sl, 1H)	6.35	6.67	–
7'	161.0	–	6.35; 6.67	–	–
8'	94.5	6.35 (sl, 1H)	6.67	6.35	–
8a	156.46	–	6.35	–	–
2''	73.9	4.57 (d, 2H, J = 9,79 Hz)	–	4.57	–
3''	70.6	4.05 (t, 3H)	4.57	4.05	–
4''	69.8	3.69 (m)	–	3.50	–
5''	81.5	3.12 (m)	–	3.50	–
6''	79.1	3.15 (m)	–	3.18	–
1a	62.2	3.60;3.40 (m)	–	3.66; 3.41	–

Fonte: Do Autor.

A maioria dos sinais de prótons de açúcar encontrados em flavonoides ocorre na região espectral entre 4.5 a 3.0 ppm (ANDERSEN, *et al.*, 2005) como observado nos experimentos de RMN realizados. Por meio do experimento HMBC, foi atribuído a ligação da unidade de glicosídeo na posição 3', devido a correlação entre o hidrogênio em δ 4.54, característico de prótons de açúcar e os carbonos em δ 161.3 e δ 109.4, posições 2' e 3', respectivamente. Além disso, foi possível distinguir a ligação do açúcar como sendo C-glicosídica, devido ao sinal do carbono anomérico em δ 73.9, característico de ligação C-glicosídica (região espectral de δ_c 60-82), em contraste com O-glicosídeos, onde esse carbono fica na região entre δ 98-112 (ALVES, 2012) como observado para astragalina.

Na figura 35, abaixo, são observadas algumas correlações obtidas por meio do espectro de HMBC (Apêndice 10).

Figura 35 – Correlações HMBC (\rightarrow) observadas para o composto 2.



Fonte: Do autor.

Depois da confirmação da estrutura por meio da técnica de RMN, realizou-se uma busca na literatura para confirmar se a estrutura já havia sido reportada anteriormente. Foi encontrada apenas uma referência vinculada a essa estrutura (KUMAMOTO *et al.*, 1986), entretanto, o composto relatado é a 2''-O- β -Xylosylvitexin (Vitexina 2''-O- β -xilósídeo), e apresenta o glicosídeo na posição 8' ligada a um grupo xilose, diferente do composto P2. Dessa forma, o composto isolado da espécie *Acacia polyphylla* é inédito.

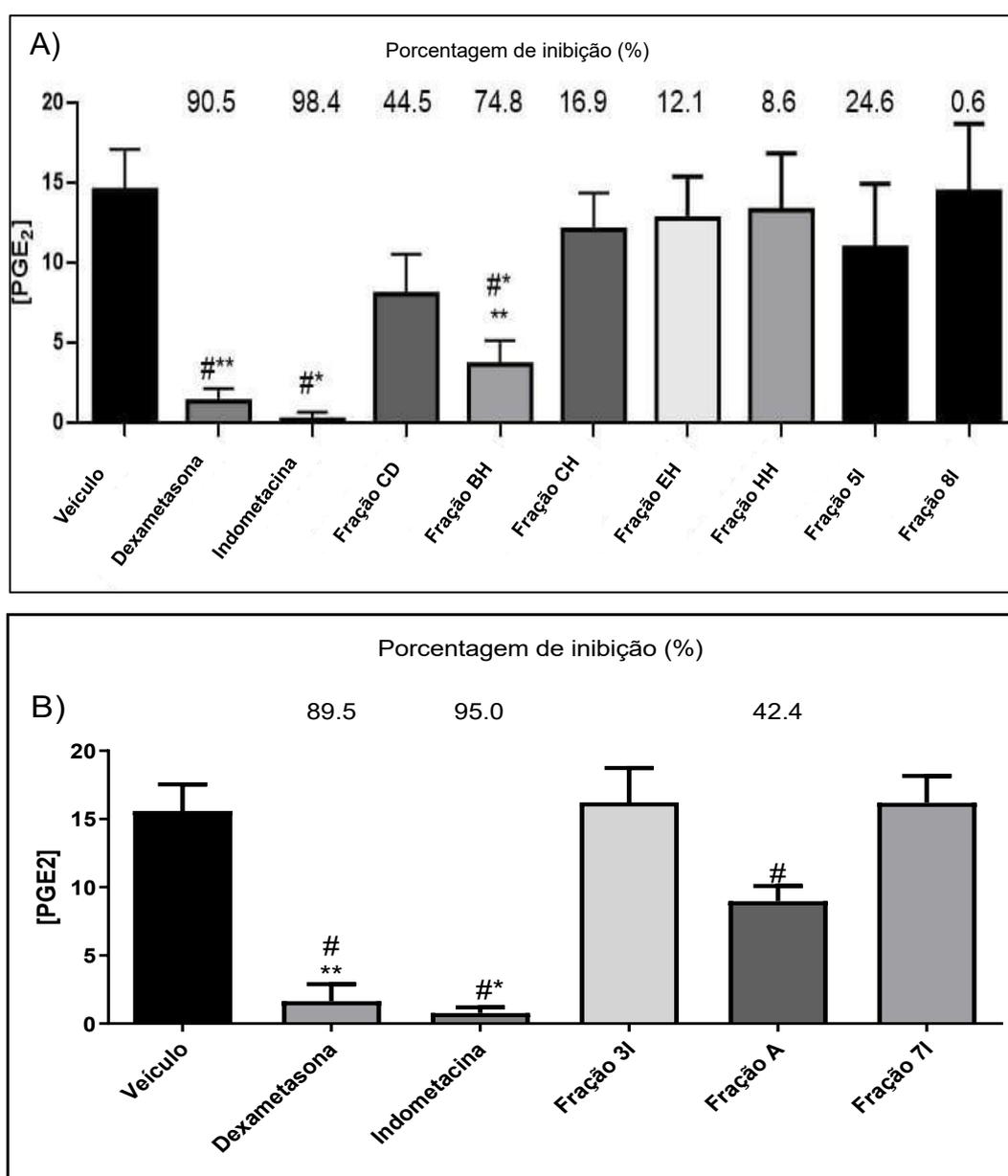
6.3 ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO *EX VIVO* NO SANGUE HUMANO

6.3.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória das frações

Das frações previamente obtidas, foram selecionadas apenas algumas, provenientes das diversas partes do fracionamento priorizando as de maiores massas, e avaliou-se quanto a sua atividade anti-inflamatória. Os resultados

foram obtidos comparando a produção de PGE₂ entre as frações e os controles (negativos e positivos). Entre as frações avaliadas, a BH demonstrou um percentual de inibição de PGE₂ (74,8%) significativo (Figura 36a), sendo estatisticamente diferente do controle negativo e comparável aos fármacos de referência dexametasona e indometacina (90,5 e 98,4 %, respectivamente), revelando um grande potencial anti-inflamatória, atuando na cascata inflamatória da via ciclooxigenase (COX), semelhante a outros anti-inflamatórios atualmente disponíveis.

Figura 36 – Avaliação da inibição de PGE₂ nas frações da *A. polyphylla*.



Fonte: Do autor.

Legenda: Os resultados foram analisados pela análise de variância ANOVA one-way. #

P<0.05 diferente quando comparado ao veículo, ** P<0.05 semelhante a dexametasona, *P<0.05 semelhante a indometacina.

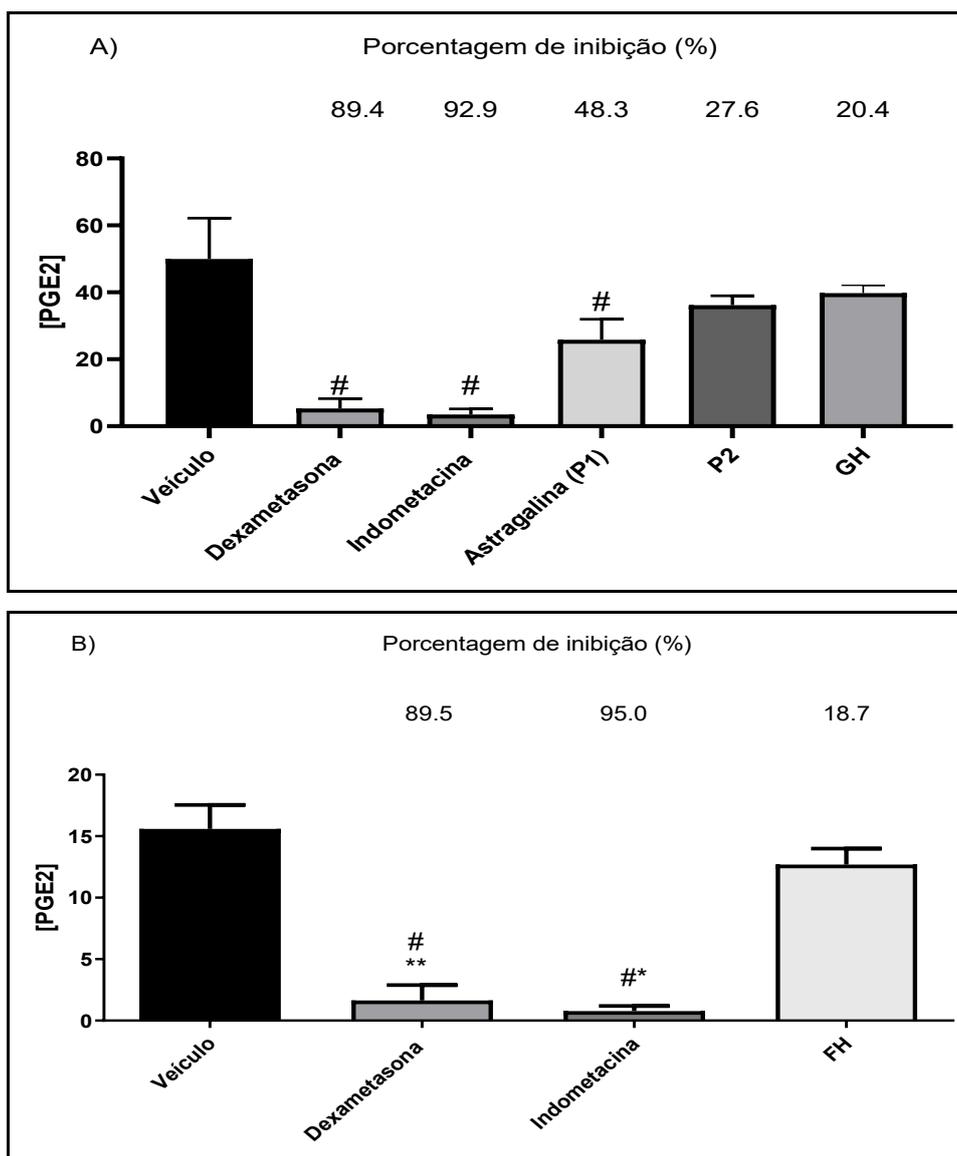
As frações A e CD, também apresentaram um valor de inibição razoável, 42,4% e 44,5%, respectivamente, sendo interessante a continuação do fracionamento e purificação das frações em trabalhos futuros, a fim de identificar compostos mais bioativos.

Nas frações 3I e 7I, observou-se uma produção de PGE₂ semelhante ao controle negativo (valores de concentração média de PGE₂ de 16,2 ng/mL para 3I e 7I comparadas a 15,6 ng/mL para o controle negativo). Esses resultados sugerem que essas frações podem apresentar propriedades pró-inflamatórias no sangue. Portanto, como o ensaio *ex vivo* proposto visa selecionar apenas frações com maior atividade anti-inflamatória, essas amostras não são consideradas promissoras para dar continuação ao estudo e possível identificação das substâncias.

6.2.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória de compostos isolados

Os compostos isolados também foram testados, a fim de associar os componentes responsáveis pela atividade anti-inflamatória na espécie *A. polyphylla*, avaliando o seu potencial anti-inflamatório, por meio da comparação entre os níveis de PGE₂ produzidas nas amostras testadas e nos controles positivo e negativo. Entre os compostos isolados, o composto P1 apresentou um percentual considerável de inibição de PGE₂ (48,3%), com valores estatisticamente diferentes ($p > 0.5$) do grupo controle negativo (veículo). Os compostos P2, GH e FH, apresentaram atividade moderada de inibição de PGE₂, sendo estatisticamente diferente do grupo veículo (Figura 37).

Figura 37- Percentual de inibição de PGE₂ dos compostos isolados.



Fonte: Do Autor.

Legenda: A) Ensaio anti-inflamatório dos compostos P1, P2 e GH. B) Ensaio anti-inflamatório do composto FH. Os resultados foram analisados pela análise de variância ANOVA one-way. #P<0.05 diferente quando comparado ao veículo, ** P<0.05 semelhante a dexametasona, P<0.05 *semelhante a indometacina.

Em todas as análises, tanto dos compostos isolados quanto das frações, os controles positivos e negativos foram estatisticamente diferentes um dos outros, dando confiança às análises.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem poucas referências na literatura sobre os metabólitos secundários isolados da *A. polyphylla*. Deste modo, esse trabalho contribuiu com seu estudo fitoquímico, permitindo o isolamento de cinco compostos e identificação de dois deles, sendo um composto inédito (P2) e a astragalina, que pela primeira vez foi relatada nessa espécie, mas que já foi reportada anteriormente na literatura. Além disso, a atividade anti-inflamatória da espécie também foi investigada, apresentando resultados significativos na inibição de PGE₂, sendo que a fração BH teve um percentual de 74,8% e a astragalina apresentou um percentual de 48,3%, sendo estatisticamente diferentes do grupo veículo e comparáveis aos fármacos de referência.

O ensaio *ex vivo* em sangue demonstrou uma ótima aplicabilidade e viabilidade, sendo capaz de analisar várias frações da *A. polyphylla* e observar aquelas com maior atividade, capazes de atuar na redução da produção de PGE₂, aumentando assim as chances do isolamento de compostos com alto potencial biológico contra a inflamação. Ademais, os ensaios *in vivo*, por exemplo, exigem quantidades maiores de amostra, causando limitações à pesquisas de produtos naturais. Desta forma o ensaio *ex vivo* foi de grande interesse para esse trabalho visto a pequena quantidade obtida dos compostos isolados.

Salienta-se também, que devido às limitações de tempo para conclusão do trabalho, alguns resultados não puderam ser explorados. Entretanto, tais resultados poderão ser abordados em trabalhos futuros do nosso grupo de pesquisa.

Por fim, este trabalho permitiu obter informações importantes sobre a composição química da espécie *A. polyphylla*, que se mostrou bastante promissora no tratamento contra a inflamação.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F. *et al.* Review on medicinal importance of fabaceae family. **Pharmacology Online**, v. 3, p. 151-156, 2016. Disponível em: https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2016/vol3/PhOL_2016_3_A023_47_Ahmad.pdf. Acesso em 22 fev. 2021.
- ALBERT, K. On-line LC-NMR and Related Techniques. **Wiley**, London, 2002.
- AMOUSSA, A. *et al.* Chemical diversity and pharmacological properties of genus *Acacia*. **Asian J. Appl. Sci.**, [s.l.], v. 13, p. 40-59, 2020.
- ANDRADE, A. L. P. *et al.* A subfamília Faboidea (Fabaceae Lindl.) no parque estadual do Guartelá, Paraná, Brasil. **Hoehnea**. Brasil. V. 36, No. 4, p.737-768, 2009.
- ANDRADE, C. *et al.* Revisão do gênero *Acacia* atividades biológicas e presença de fenóis derivados do núcleo flavânico. **Visão Acadêmica**, [s.l.], june 2003. ISSN 1518-8361. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/522>. Acesso em 23 fev. 2021.
- ARAUJO, L. F. *et al.* Eventos cardiovasculares: um efeito de classe dos inibidores de COX-2. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, Brasil, v. 85, p. 222-229, 2005.
- ARNOUS, A. H. *et al.* Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista espaço para a saúde**, Brasil, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.
- BAILEY, N. J. C. *et al.* Prediction of anti-plasmodial activity of *Artemisia annua* extracts: application of ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. **J. Pharm. Biomed. Anal.** [s.l.]. V. 35, p. 117–126, 2004.
- BECHARA, G. H. *et al.* Processo inflamatório. **Componente e Eventos Celulares**, [s.l.], 2006.
- BEDAIR, M. *et al.* Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. **Trends Anal. Chem.** [s.l.]. V. 27, p. 238–250, 2008.
- BERLINCK, R. G. S. *et al.* A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova [online]**. Brasil, 2017, v. 40, n. 6, pp. 706-710. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170070>. Acesso em 08 ago. 2022.
- BI, N. *et al.* Documentation, Ethno-botanical and Ethno-medicinal Survey of Wild Leguminous Plants from Some Areas of District Rajouri, J&K State, India.

European Journal of Medicinal Plants, 22(3), 1-11. Disponível em: <<https://doi.org/10.9734/EJMP/2018/39262>>. Acesso em 22 fev. 2021.

BIRT, D. F. *et al.* Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, [s.l.], v. 90, n. 2-3, p. 157-177, 2001.

BRAIN, P. *et al.* A serological investigation of the classification of Acacia subgenus Phyllodineae (Leguminosae: Mimosoideae). **Biochemical Systematics and Ecology**, [s.l.], v. 24, n. 5, p. 379-392, 1996.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova [online]**. Brasil, 2010, v. 33, n. 1, pp. 229-239. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100040>. Acesso em 08 ago. 2022.

CALIXTO, J. B. *et al.* Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med**, [s.l.], 70: 93–103, 2004.

CALIXTO, J. B. *et al.* Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert opinion on emerging drugs**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 261-279, 2001.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasil, 2014.

CARR, K. *et al.* High performance liquid chromatography of prostaglandins biological applications. **Prostaglandins**. [s.l.]. V. 11, p. 3–14, 1976.

CESARINO, E. C. Contribuição ao estudo químico de Acacia Polyphylla e avaliação da atividade antioxidante. 2019. 65f. Dissertação (Mestrado em Química Ambiental) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Química Ambiental, Gurupi, 2019. Disponível em: <https://repositorio.uft.edu.br/handle/11612/1287>. Acesso em 23 fev. 2021.

CESARINO, E. C. *et al.* Composição Química e Atividade Antioxidante de Acacia Polyphylla (Fabaceae). **Rev. Virtual Quim.**, [s.l.], 2020, 12 (2), 424-432. Disponível em: <<http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v12n2a13.pdf>>. Acesso em 23 fev. 2021.

CIALDELLA, A. "El genero acacia (*leguminosae*) en la argentina." **Darwiniana**, Argentina, no. 1/4 (1984): 59-111. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/23218068>. Acesso em 22 fev. 2021.

CHAGAS-PAULA, D. A. Estudos metabólicos de Astedraceae por UPLC-UV-RFTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório in vitro e suas correlações através de métodos *in silico*. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade

de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2013.

CHAGAS-PAULA, D.A. *et al.* Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. **J. Ethnopharmacol**, [s.l.], V. 136, p. 355–362, 2011.

CHAGAS-PAULA, D. A. *et al.* Prediction of Anti-inflammatory Plants and Discovery of Their Biomarkers by Machine Learning Algorithms and Metabolomic Studies. **Planta Med**, [s.l.], V. 81, p. 450–458, 2015.

CHAUBAL, R. *et al.* Isolation and X-ray study of an anti-inflammatory active androstene steroid from *Acacia nilotica*. **Planta Med**, [s.l.], v. 69, n. 03, p. 287-288, 2003.

COLLINS, Carol H. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 3(2), p. 107-114, 2011.

DA PAZ, A. S. *et al.* O papel da atenção farmacêutica no uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroides (AINES). **Revista Expressão Da Estácio**, Brasil, v. 3, 2020.

DOS SANTOS, D. S. *et al.* Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, Brasil, v. 7, n.3, p. 29-35, 2017.

DUARTE, D. F.. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Brasil, v. 55, p. 135-146, 2005.

DZUBAK, P. *et al.* Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural product reports**, [s.l.], v. 23, n. 3, p. 394-411, 2006.

ETIENNE, R. *et al.* Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. **Revista Virtual de Química**, Brasil, v. 13, n. 1, 2021.

FERREIRA, M. K. A *et al.* Potencial Farmacológico de Chalconas: Uma Breve Revisão. Potencial farmacológico de chalconas: Uma breve revisão. **Revista virtual de química**, Brasil, v. 10, n. 5, 2018.

FERREIRA, S.H. *et al.* New Aspects of the Mode of Action of Nonsteroid Anti-inflammatory Drugs. **Annu Rev Pharmacol**, [s.l.], V.14, p. 57–73, 1974.

FIORUCCI, S. *et al.* Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biochem Pharmacol**, [s.l.], 62: 1433–8, 2001.

FREITAS, P. R. *et al.* Abordagens terapêuticas nas doenças inflamatórias: uma revisão. **Revista Interfaces**, Brasil, v. 7, n. 2, p. 318-324, 2019.

GABR, S. *et al.* Characterization and optimization of phenolics extracts from Acacia species in relevance to their anti-inflammatory activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s.l.], v. 78, p. 21-30, 2018.

GADDI, A. *et al.* Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. **Arch Gerontol Geriatr**, [s.l.], V. 38: 201–12, 2004.

GODINHO, C. C. Análise metabolômica da bioatividade em vias COX e LOX-dependentes de plantas da subtribo Lychnophorinae. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2016. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-03102016-143050/publico/Dissertacao_corrigida_completa.pdf. Acesso em 30 abr. 2022.

HAWKEY, C. COX-2 inhibitors. **Lancet**, [s.l.], 353: 307–14, 1999.

HELLEBREKERS, L. J. Dor em animais: uma abordagem com orientação prática para um controle eficaz da dor em animais. São Paulo: **Manole**, 166p., 2002.

HENKE, D.C. *et al.* Analysis of leukotrienes, prostaglandins, and other oxygenated metabolites of arachidonic acid by liquid chromatography. **Anal Biochem.** [s.l.]. V. 140, p. 87–94, 1984.

HERDERICH, M. *et al.* Application of atmospheric pressure ionisation HPLC-MS-MS for the analysis of natural products. **Chromatographia**. [s.l.]. V. 45, p. 127–132, 1997.

HILÁRIO, M. O. E. *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de pediatria**, [s.l.], v. 82, p. S206-S212, 2006.

HOLČAPEK, M. *et al.* Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. **J. Chromatogr. A**. [s.l.]. 1259, p. 3–15, 2012.

HUNG, L. *et al.* Human ex vivo and in vitro disease models to study food allergy. **Asia Pacific Allergy**, [s.l.], v. 9, n. 1, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6365658/#:~:text=Human%20in%20vitro%20and%20ex%20vivo%20models%20may%20be%20the,models%20significantly%20reduce%20patient%20risk>. Acesso em 15 jan. 2022.

INABA, H. *et al.* Identification of hop polyphenolic components which inhibit prostaglandin E2 production by gingival epithelial cells stimulated with

periodontal pathogen. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 527-530, 2008.

JINNO, K. *et al.* An interface for the combination of microhigh-performance liquid-chromatography and infrared spectrometry. **Appl. Spectrosc.** [s.l.], V. 36, p. 67–69, 1982.

KLAUMANN, P. R. *et al.* Patofisiologia da dor. **Arquivos de ciência veterinária**, [s.l.], v. 13, n. 1, 2008.

KIM *et al.* Syk/Src-targeted anti-inflammatory activity of *Codariocalyx motorius* ethanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**. [s.l.], V. 155, p.185-193, 2014.

KUMAMOTO, H. *et al.* Structures and Hypotensive Effect of Flavonoid Glycosides in Unshiu Peeling. II. **Journal of Japan Oil Chemists' Society**, [s.l.], v. 35, n. 5, p. 379-381, 1986.

LANG, G. *et al.* Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **J. Nat. Prod.**, [s.l.], V. 71, p. 1595–1599, 2008.

LI, Q. *et al.* COX-2/12-LOX dual pathway, a novel strategy for treatment of multiple myeloma? **Biosci Hypotheses**, [s.l.], V. 2, p. 81–84, 2009.

LINDON, J. C. *et al.* Biomedical and Pharmaceutical Applications of HPLC-NMR and HPLC-NMR-MS. In: Albert, K. On-Line LC-NR and Related Techniques. **John Wiley & Sons**. England. p.45-87. 2002.

LOUDEN, D. *et al.* Spectroscopic characterisation and identification of ecdysteroids using high-performance liquid chromatography combined with on-line UV-diode array, FT-infrared and ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy and time of flight mass spectrometry. **J. Chromatogr.**, [s.l.], V. 910, p. 237–246, 2001.

MADSEN, R. *et al.* Chemometrics in metabolomics - a review in human disease diagnosis. **Anal. Chim. Acta**. [s.l.]. V. 659, p. 23–33, 2010.

MALINOVISKY, J.M. *et al.* The effects of intravenous opioids and ketoprofen in humans. **Anaesthesia and Analgesia**, [s.l.], V.87, p.456-461, 1998.

MALDINI, M. *et al.* Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of ethnopharmacology**, [s.l.], v. 122, n. 3, p. 430-433, 2009. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874109000725?casa_token=Awi6jmTuZXIAAAAA:0L3wn5yh7ZTP3-0G-iAq9LSKNGKCzfCAxC162QJvEin0mtRfVwJ2QAo847FvKk9_2RbZZVU_w#pre-view-section-introduction. Acesso em 20 jan. 2022.

MARCHIORPI, J. N. *et al.* A segregação do gênero *Acacia* (*tourn.*) Mill., sob o ponto de vista da anatomia da madeira de espécies nativas e cultivadas no rio grande do sul. **Balduinia**. Brasil. n. 30, p. 25-36, 30-VII-2011.

MARQUES, A. *et al.* Impactos do uso indiscriminado dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) na saúde cardiovascular: revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, Brasil, v. 15, n. 11, p. e11189-e11189, 2022.

MASLIN, B. R. *et al.* Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). **Australian Systematic Botany**, Australia, v. 16, n. 1, p. 1-18, 2003.

MENDES, R. T. *et al.* Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Brasil, v. 52, p. 774-782, 2012.

MIRANDA, R. S. *et al.* Antiinflammatory activity of natural triterpenes — An overview from 2006 to 2021. **Phytotherapy Research**, [s.l.], 2022.

MOLEIRO, A. F. *et al.* A critical analysis of the available in vitro and ex vivo methods to study retinal angiogenesis. **Journal of ophthalmology**, [s.l.], v. 2017, 2017. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/joph/2017/3034953/>. Acesso em 20 jan. 2022.

MOREIRA, M. E. C. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of the 2,8-dihydroxy-1,6-dimethoxyxanthone from *Haploclathra paniculata* (Mart) Benth (Guttiferae). **J Med Food**, [s.l.], V. 17, p. 686–693, 2014.

MOTTA, C. *et al.* A importância das leguminosas na alimentação, nutrição e promoção da saúde. 2016. **Instituto Nacional da Saúde**. Brasil. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/80518969.pdf>. Acesso em 22 fev. 2021.

MURPHY, D. J. *et al.* Molecular phylogeny of *Acacia* subgenus *Phyllodinea* (Mimosoideae: Leguminosae) based on DNA sequences of the internal transcribed spacer region. **Australian Systematic Botany**, Australia, 16, 19-26.

MUTAI, C. *et al.* Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. **Journal of ethnopharmacology**, [s.l.], v. 123, n. 1, p. 143-148, 2009. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109000786?casa_token=xRcCvCldrXEAAAAA:ORZ_B4j7-iD4tpeYMO9n5ltiyDzixYRMPyHeSrt5_zP5hdTWGBzlhYJqldOOQBZ_jAmndIAOfw. Acesso em 20 jan. 2022.

NETO, J. C. A. Aspectos fenológicos, caracterização, germinação e armazenamento de sementes de *Acacia polyphylla* DC. 109 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal. Disponível em: <https://bv.fapesp.br/pt/dissertacoes-teses/86534/aspectos-fenologicos-caracterizacao-germinacao-e-armazenam>. Acesso em 23 fev. 2021.

NETO, J. C. A. *et al.* Caracterização morfológica de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de monjoleiro (*Acacia polyphylla* DC.). **Rev. bras. sementes**, [s.l.], Londrina, v. 24, n. 1, p. 203-211, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-31222002000100029&lng=en&nrm=iso. Acesso em 23 fev. 2021.

NEWMAN, D. J. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, [s.l.], v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NGHONJUYI *et al.* Acute and sub-chronic toxicity studies of three plants used in Cameroonian ethnoveterinary medicine: *Aloe vera* (L.) *Burm. f.* (Xanthorrhoeaceae) leaves, *Carica papaya* L. (Caricaceae) seeds or leaves, and *Mimosa pudica* L. (Fabaceae) leaves in Kabir chicks. **Journal of Ethnopharmacology**. [s.l.]. V.178, p.40-49, 2016.

OJEWOLE, J. A. O. *et al.* Anti-inflammatory and hypoglycaemic effects of *Tetrapleura tetraptera* (Taub) [fabaceae] fruit aqueous extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. [s.l.]. V. 95, p. 177-182, 2004.

PANCHE, A. N. *et al.* Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, [s.l.], v. 5, 2016.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? **J Rheumatol**, [s.l.], V. 28, 2375– 82, 2001.

PEREIRA, G. S. Ação inibitória dos flavonoides quercetina e rutina sobre a ativação de neutrófilos humanos. (2017). 63 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2017.

QUEIROZ, A. C. *et al.* The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. [s.l.]. V. 128, p.377-383, 2010.

RIAZ, A. *et al.* Astragalín: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. **Advances in pharmacological sciences**, [s.l.], v. 2018, 2018.

RODRIGUES DA SILVA, L. *et al.* Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica Argentina**, Argentina v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

RONCHI, H. S. *et al.* Potencial medicinal de espécies arbóreas de um remanescente florestal da floresta estacional semidecidual, na região central do estado São Paulo. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer Goiânia, v.13 n.23. Disponível: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2016a/agrarias/potencial%20medicinal.pdf>. Acesso em 22 fev. 2021.

ROSA, W. Bioprospecção em espécies vegetais da família Fabaceae, da mata

atlântica mineira, visando a obtenção de substâncias com potencial anti-inflamatório. 210 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2021. Disponível em: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1814>. Acesso em 30 jul. 2021.

ROSA, W. *et al.* *In vivo* anti-inflammatory activity of Fabaceae species extracts screened by a new *ex vivo* assay using human whole blood. **Phytochemical analysis: PCA**, [s.l.], vol. 32,5 (2021): 859-883. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.3031>. Acesso em 22 fev. 2021.

SAFER, S. *et al.* Metabolic fingerprinting of *Leontopodium* species (Asteraceae) by means of ¹H NMR and HPLC-ESI-MS. **Phytochemistry**. [s.l.]. V. 72, p. 1379–1389, 2011.

SANTANA, D. G. *et al.* Activity of Fabaceae species extracts against fungi and *Leishmania*: vatacarpan as a novel potent anti-*Candida* agent. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brasil. V. 25, p. 401-406, 2015.

SANTOS, A. S. R. Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e o futuro da vida. **Revista de Informação e Tecnologia**. Brasil. Disponível em <<http://www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>>. Acesso em 17 fev. 2021.

SANTOS, R. A. F. Estudo fitoquímico e avaliação biológica dos flavonoides isolados de *Clitoria fairchildiana* RA Howard. 2016. 137 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Bahia. Bahia. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/19139>. Acesso em 08 jan. 2023.

SAKITA, M.N. *et al.* Estudos fitoquímicos preliminares em espécies florestais do Parque Estadual do Morro do Diabo, Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.2, n.2, p.215-226, 1990. Disponível em: https://smastr16.blob.core.windows.net/iflorestal/ifref/RIF2-2/RIF2-2_215-226.pdf. Acesso em 29 jan. 2022.

SCHMITZ, M.L. *et al.* Novel molecular targets in the search for anti-inflammatory agents. **Phytochem Rev.** [s.l.]. V. 4, p. 19–25, 2005.

SCHNEIDER, I. *et al.* Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase/cyclooxygenase. **Phyther Res**, [s.l.], 19: 81–102, 2005.

SEIGLER, D. S. Phytochemistry of *Acacia* – *sensu lato*. **Biochemical systematics and ecology**, [s.l.], v. 31, n. 8, p. 845-873, 2003.

SIBUL, F. *et al.* Phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory potential of herb and root extracts of seven selected legumes. **Industrial Crops and Products**. [s.l.]. V.83, p.641-653, 2016.

SILVA, M. C *et al.* Plantas medicinais, fitoterápicos, anti-inflamatórios: aspectos

químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Tecmedd**. Ribeirão Preto, SP, p.480, 2004.

SILVA, F. C. O. *et al.* Bioatividades de Triterpenos isolados de plantas: Uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, Brasil, v. 12, n. 1, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Helcio-Santos-2/publication/339833317_Bioactivities_of_plant-isolated_Triterpenes_A_brief_review/links/5e9b0b6b92851c2f52ac4325/Bioactivities-of-plant-isolated-Triterpenes-A-brief-review.pdf. Acesso em 27 jan. 2022.

SUMNER, L. W. *et al.* Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**. [s.l.]. V. 62, p. 817–836, 2003.

TERRAGNO, A. *et al.* High performance liquid chromatography and UV detection for the separation and quantitation of prostaglandins. **Prostaglandins**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 101-112, 1981.

TRYGG, J. *et al.* Chemometrics in metabonomics. **J. Proteome Res.** [s.l.]. V. 6, p. 469–479, 2007.

VAN DER KOOY, F. *et al.* Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. **Planta Med.** [s.l.]. V. 75, p. 763–75, 2009.

VALERIANO, B. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de monjoleiro (*Senegalia polyphylla* (DC.) Britton & Rose) classificadas por tamanho. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal – SP, 2021. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/215215>>. Acesso em 29 jan. 2022.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **J Ethnopharmacol**, [s.l.]. V. 100, p. 53–56, 2005.

VIEGAS JR, C. *et al.* Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova** [online]. Brasil, 2006, v. 29, n. 2, pp. 326-337. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>. Acesso em 08 ago. 2022.

VILLAS-BÔAS, S. G. *et al.* Metabolomics or metabolite profiles? **Trends Biotechnol.** [s.l.]. V. 23, p. 385–386, 2005.

WANG, Q. Z. *et al.* Integrating metabolomics into a systems biology framework to exploit metabolic complexity: strategies and applications in microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** [s.l.]. V. 70, p. 151–161, 2006.

WANG, B. *et al.* The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. **Fitoterapia**. [s.l.]. V. 82, p. 1141–1151, 2011.

WERZ, O. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. **Planta Med.**, [s.l.], V. 73, p. 1331–1357, 2007.

WILSON, I. D.; BRINKMAN, U. A. Hyphenation and hypernation: the practice and prospects of multiple hyphenation. **J. Chromatogr. A.** [s.l.], V. 1000, p. 325–356, 2003.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, [s.l.], v. 89, p. 164-175, 2013.

WHORTON, A.R. *et al.* Reversed-phase high-performance liquid chromatography of prostaglandins biological applications. **J Chromatogr**, [s.l.], V. 163, p. 64–71, 1979.

WOLFENDER, J. *et al.* Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. **Curr. Org. Chem.**, [s.l.], V. 14, p. 1808–1832, 2010.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. **J Clin Invest**, [s.l.], V.107, p. 135– 142, 2001.

YULIANA, N. D. *et al.* Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. **Analytical Chemistry**, [s.l.], V. 83, p. 6902–6906, 2011.

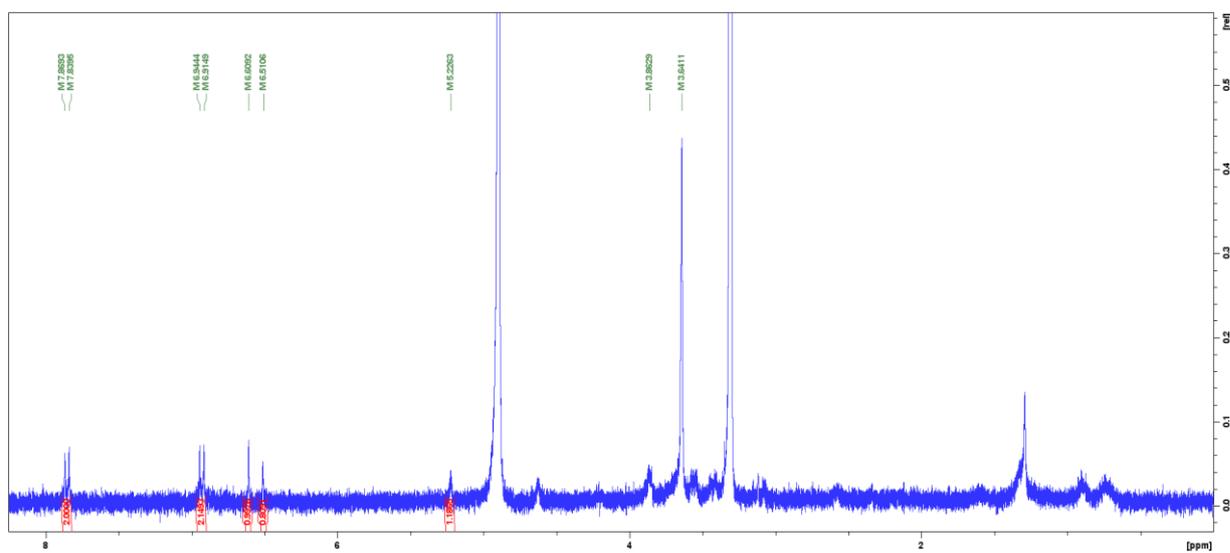
YULIANA, N. D. *et al.* Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phyther. Res.**, [s.l.], V. 25, p. 157–169, 2011.

ZHENG, L. *et al.* A chemometric study of chromatograms of tea extracts by correlation optimization warping in conjunction with PCA, support vector machines and random forest data modeling. **Anal. Chim. Acta.** [s.l.], 642, p. 257–65, 2009.

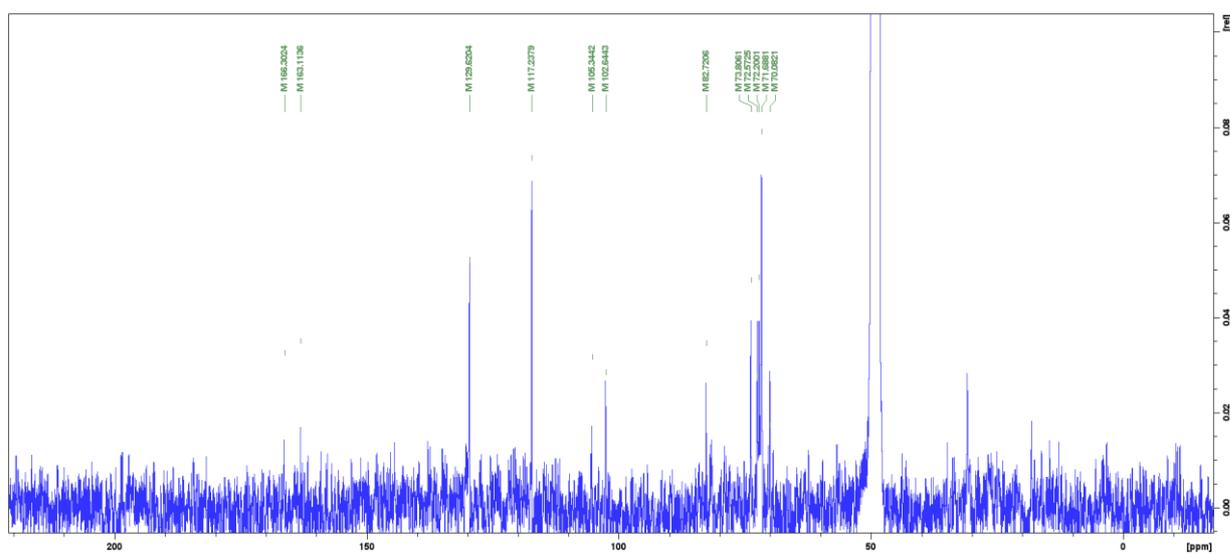
ZUBAREV, R. A. *et al.* Orbitrap mass spectrometry. **Anal. Chem.**, [s.l.], V. 85, p. 5288–5296, 2013.

APÊNDICES

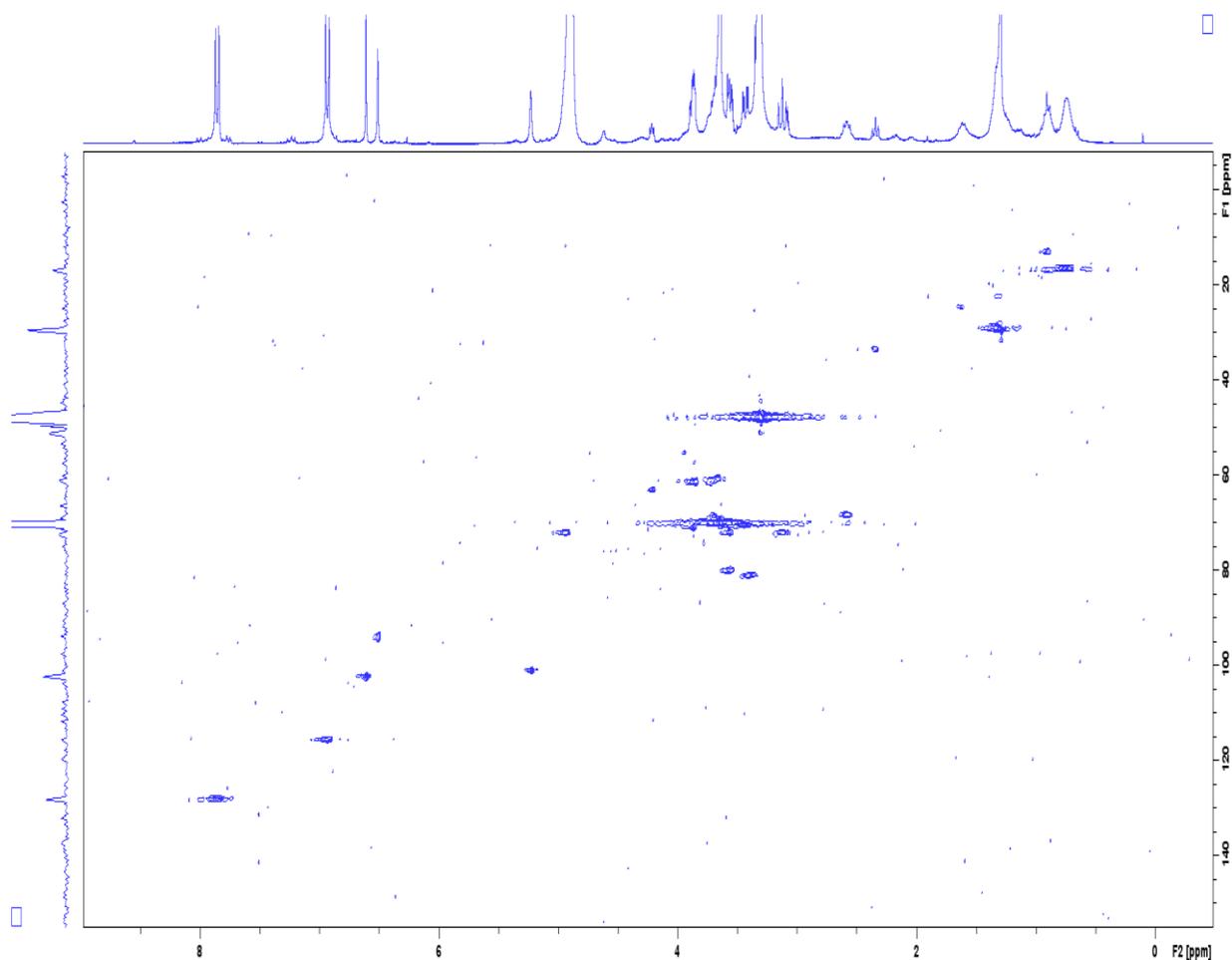
APÊNDICE A – Experimento 1D NOESY ¹H (MeOD, 300 MHz) obtido para o composto 1 (Acácia P1).



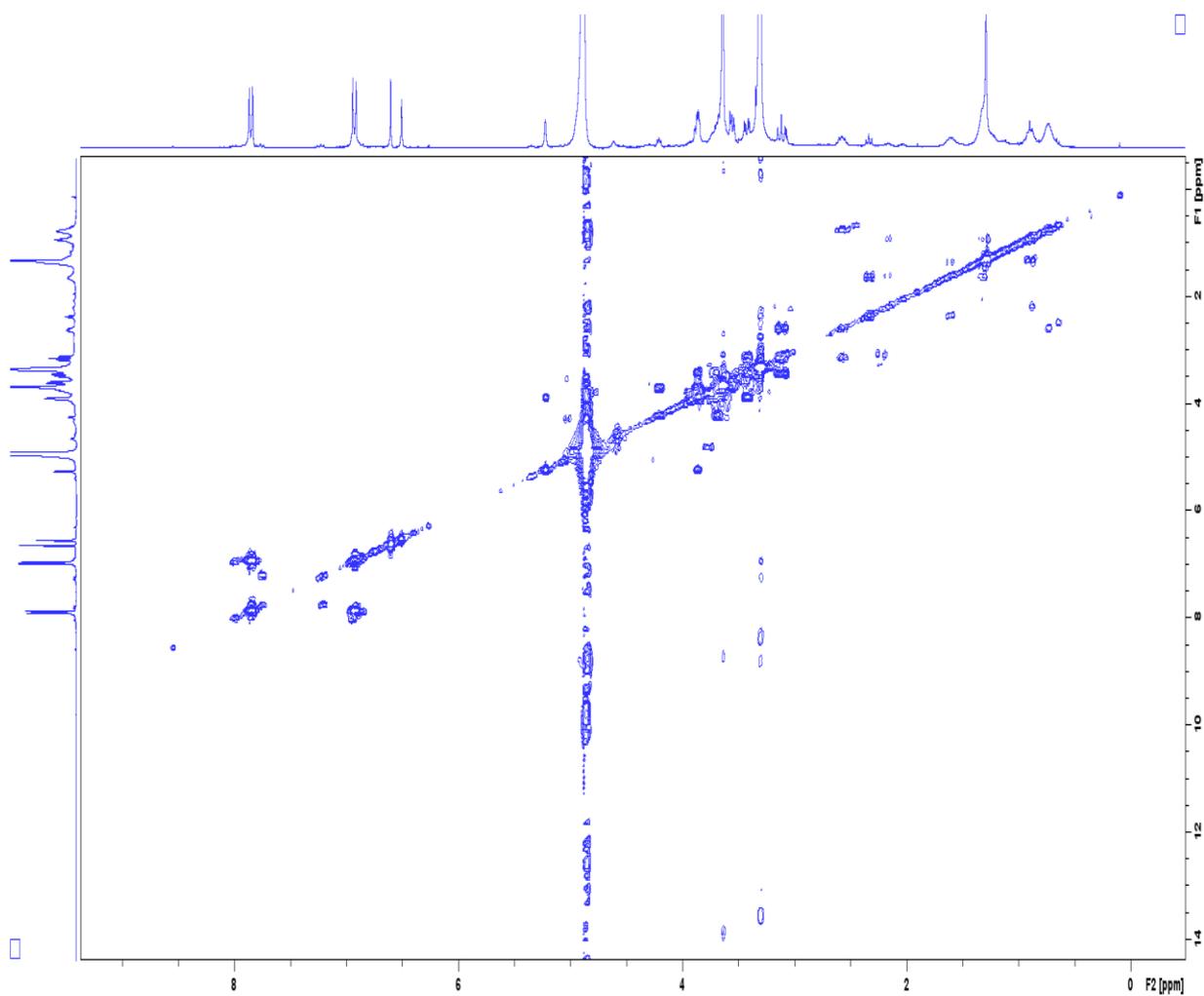
APÊNDICE B – Experimento de RMN ^{13}C (MeOD, 75 MHz) obtido para o composto 1 (Acácia P1).



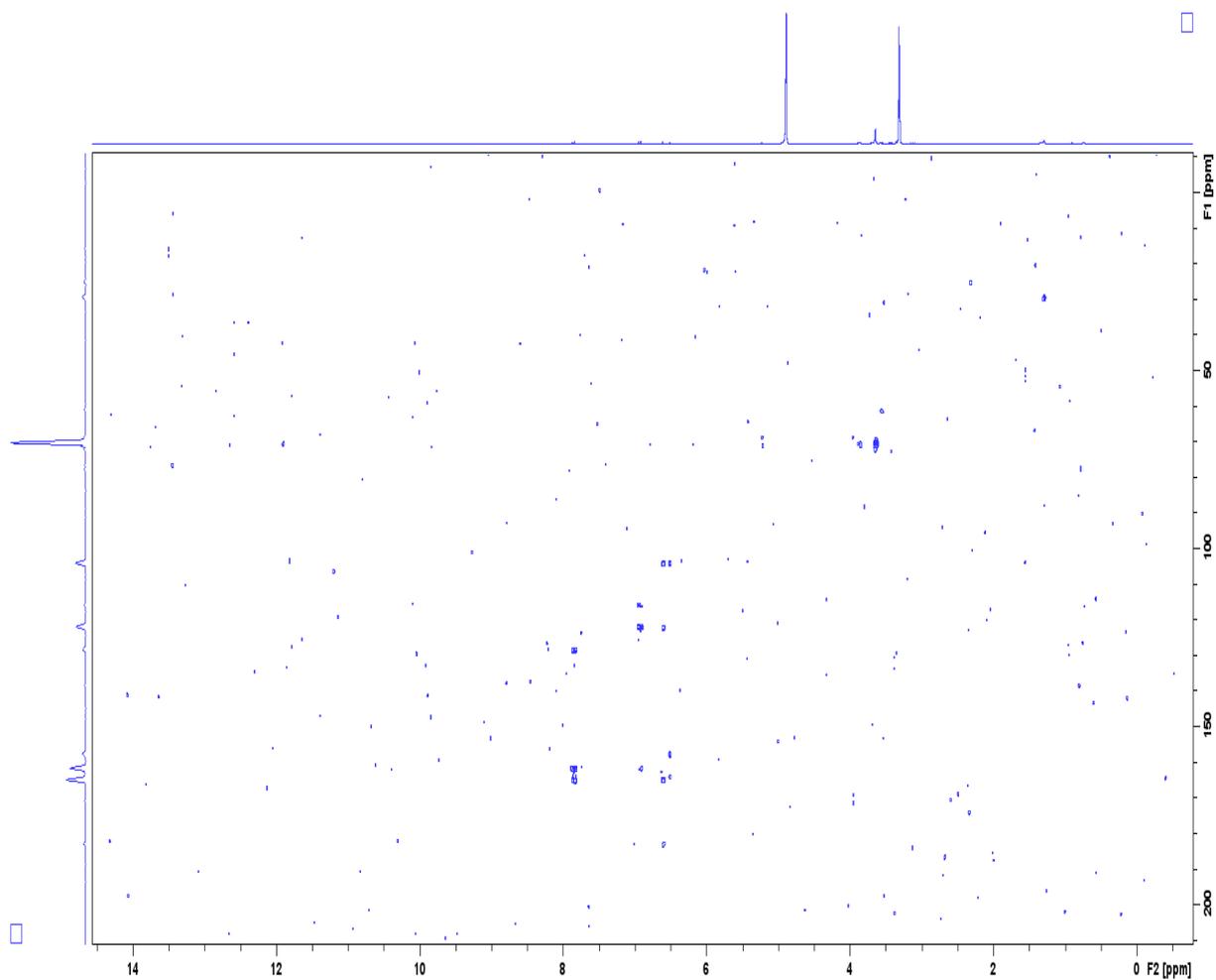
APÊNDICE C – Espectro de HSQC em MEOD obtido para o composto 1
(Acácia P1).



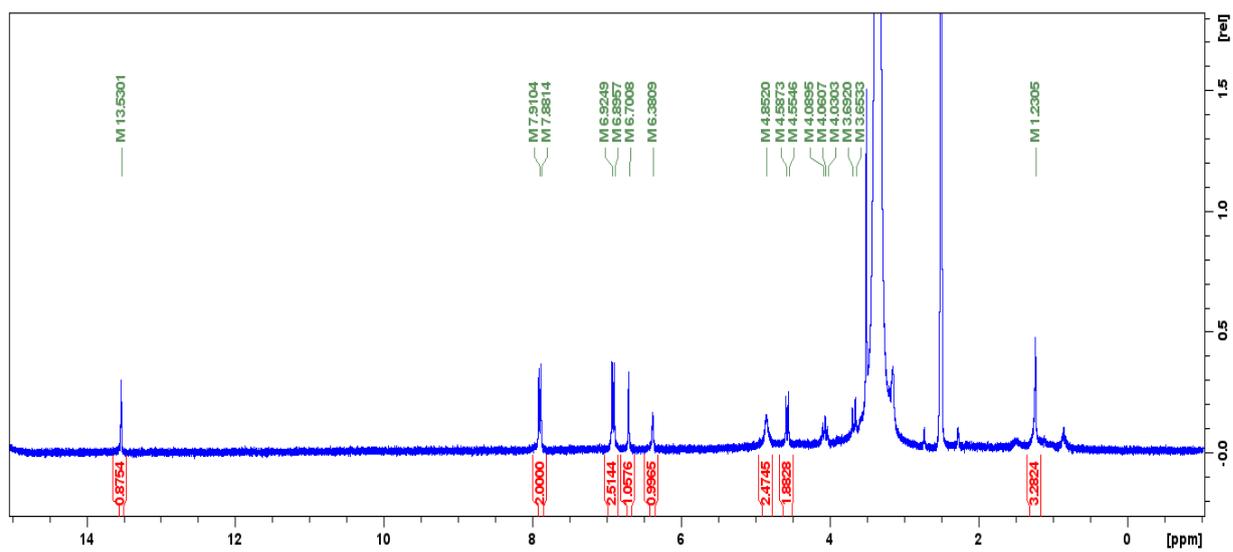
APÊNDICE D – Espectro de COSY em MEOD obtido para o composto 1
(Acácia P1).



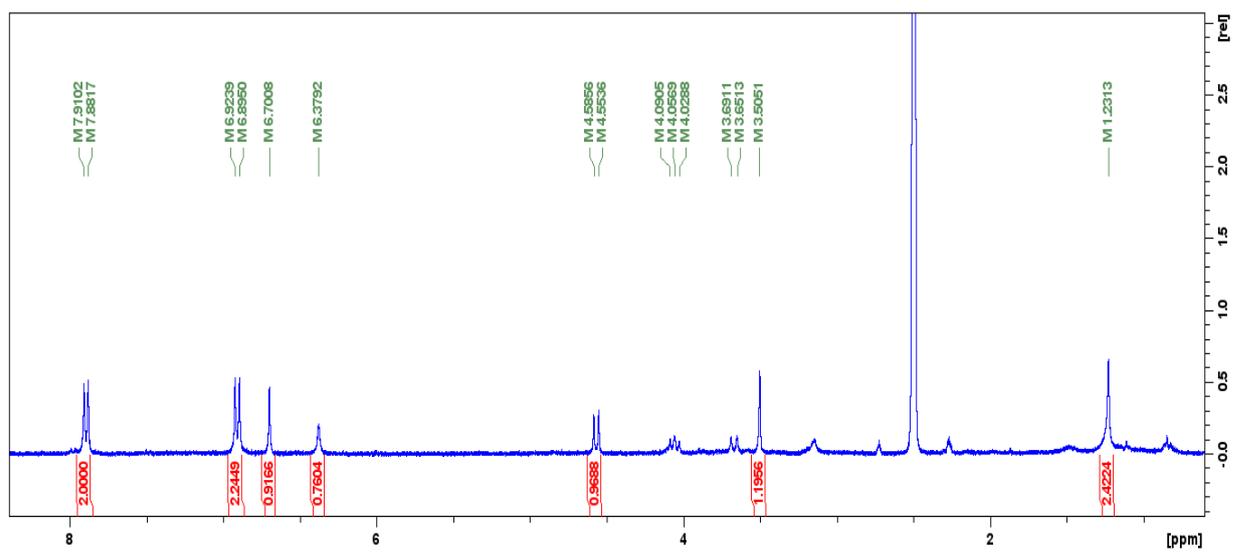
APÊNDICE E – Espectro de HMBC em MEOD obtido para o composto 1
(Acácia P1).



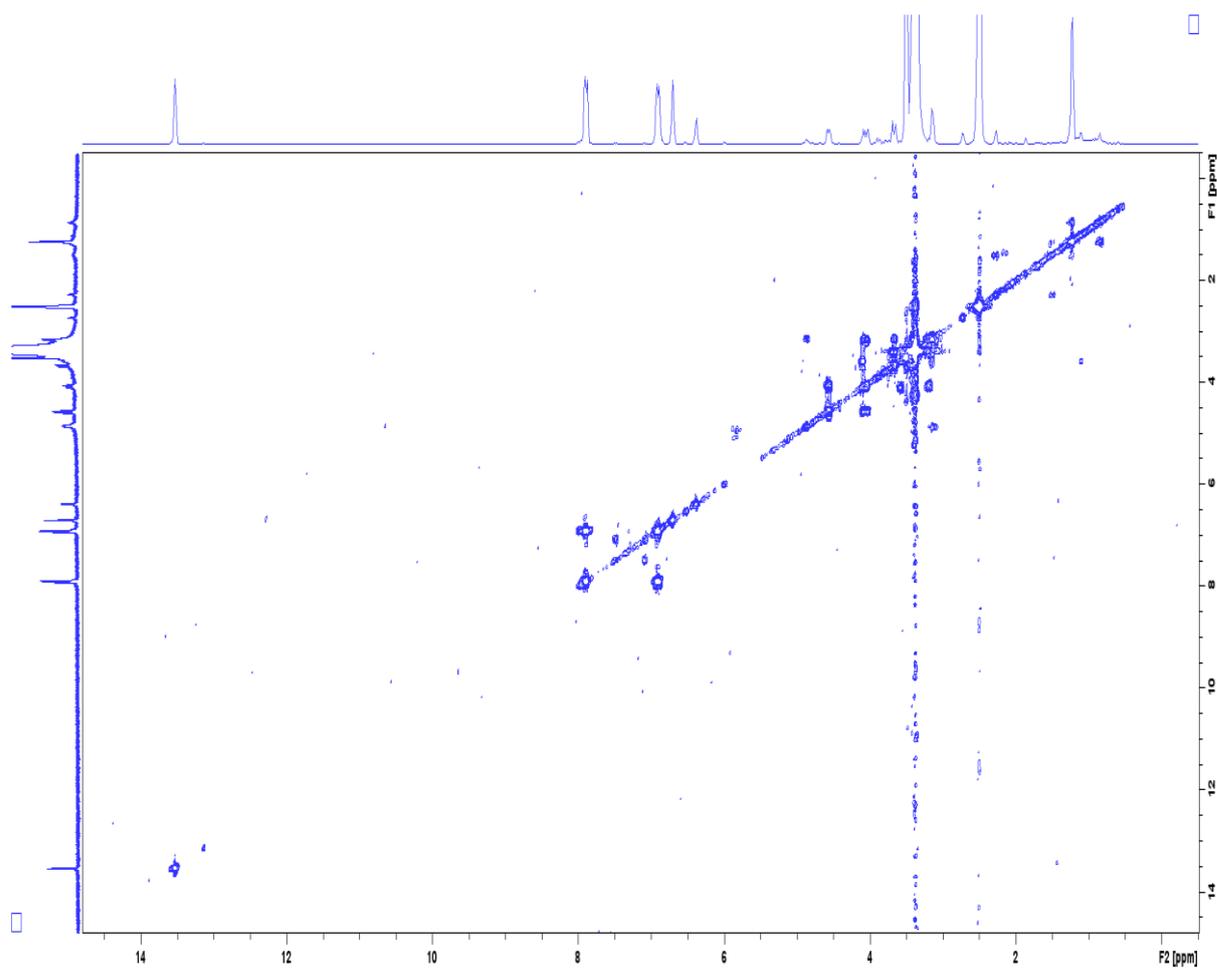
APÊNDICE F – Espectro de RMN de ^1H (DMSO, 300 MHz) obtido para o composto 2 (Acácia P2).



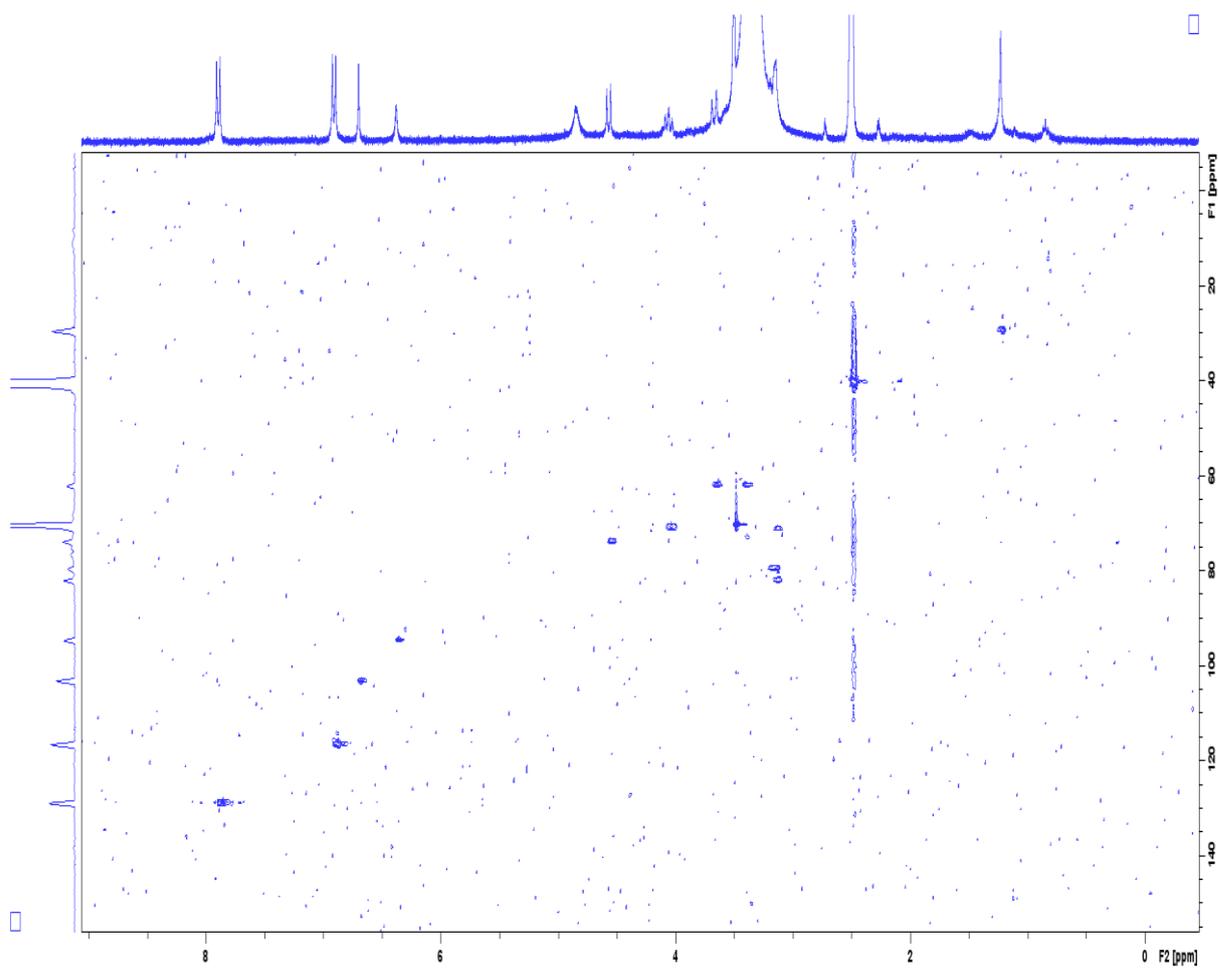
APÊNDICE G – Experimento 1D NOESY (DMSO, 300 MHz) obtido para o composto 2 (Acácia P2).



APÊNDICE H – Espectro de COSY em DMSO obtido para o composto 2
(Acácia P2).



APÊNDICE I – Espectro de HSQC em DMSO obtido para o composto 2
(Acácia P2).



APÊNDICE J – Espectro de HMBC em DMSO obtido para o composto 2
(Acácia P2).

