

## Estudo fitoquímico e propriedades de *Andira paniculata* Benth (Fabaceae) na inibição de linhagens tumorais de leucemia, próstata e carcinoma de cólon

*Phytochemical study and properties of Andira paniculata Benth (Fabaceae) in inhibiting tumor lines of leukemia, prostate and colon carcinoma*

Leandro Albano Alves<sup>1\*</sup>, Gracielle Oliveira Sabbag Cunha<sup>2</sup>, Danielle Coelho da Cruz<sup>1</sup>, Dayane Cláudia Ambrosio de Lima<sup>3</sup>, Cássia Kênia Garcia Santos<sup>1</sup>, Antônio Carlos Severo Menezes<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, Universidade Estadual de Goiás, UEG; <sup>2</sup>Doutora em Química pela Universidade Estadual de Goiás, UEG, Professora Titular, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás; <sup>3</sup>Mestranda em Ciências Moleculares pela Universidade Estadual de Goiás, UEG; <sup>4</sup>Doutor em Química pela Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, Docente da Universidade Estadual de Goiás, UEG

### Resumo

**Introdução:** o Cerrado brasileiro abriga inúmeras espécies de plantas, incluindo as do gênero *Andira*, ou angelins, conhecidas por suas propriedades anti-helmínticas e inseticidas. **Objetivo:** avaliar a atividade tóxica, antibacteriana e citotóxica das frações das folhas de *Andira paniculata* Benth e investigar os constituintes químicos presentes neste material. **Metodologia:** a toxicidade das frações foi avaliada frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Os ensaios antimicrobiano e citotóxico foram realizados *in vitro* através dos testes de microdiluição em caldo e MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio], respectivamente. O isolamento das substâncias foi realizado por meio de cromatografia em coluna e as estruturas foram identificadas por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) 1D e 2D e espectrometria de massas. **Resultados:** as frações metanólica, acetato de etila e diclorometânica foram atóxicas frente à *A. salina*. Não foi observado efeito inibitório ou bactericida das frações frente à nenhuma das bactérias testadas: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A fração diclorometânica apresentou inibição do crescimento de três linhagens de células tumorais: HL60 (leucemia, IC<sub>50</sub> 33,06 µg.mL<sup>-1</sup>), HCT-116 (carcinoma de cólon, IC<sub>50</sub> 70,07 µg.mL<sup>-1</sup>) e PC3 (próstata, IC<sub>50</sub> 80,04 µg.mL<sup>-1</sup>), e não inibiu o crescimento de células não tumorais (L929, fibroblasto murino). O estudo fitoquímico revelou a presença de três flavonoides na fração acetato de etila: (-)-epicatequina, engeletina e astilbina. **Conclusão:** os resultados obtidos demonstram o potencial da fração diclorometânica das folhas de *A. paniculata* em inibir o crescimento celular das linhagens tumorais de leucemia, próstata e carcinoma de cólon. Em relação ao estudo fitoquímico, trata-se do primeiro relato de ocorrência de flavonoides em *A. paniculata*.

**Palavras-chave:** Astilbina; Atividade Antibacteriana; Citotoxicidade; Engeletina; Epicatequina.

### Abstract

**Introduction:** the Brazilian Cerrado is home to numerous plant species, including the genus *Andira*, or angelins, known for their anthelmintic and insecticidal properties. **Objective:** to evaluate the toxic, antibacterial, and cytotoxic activity of *Andira paniculata* Benth leaf fractions and investigate the chemical constituents present in this material. **Methodology:** the toxicity of the fractions was evaluated against the microcrustacean *Artemia salina*. Antimicrobial and cytotoxic assays were performed *in vitro* using broth microdilution and MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] tests, respectively. The substances were isolated using column chromatography, and the structures were identified by 1D and 2D NMR (Nuclear Magnetic Resonance) and mass spectrometry. **Results:** the methanolic, ethyl acetate and dichloromethane fractions were non-toxic against *A. salina*. No inhibitory or bactericidal effect of the fractions was observed against any of the bacteria tested: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The dichloromethane fraction showed inhibition of the growth of three tumor cell lines: HL60 (leukemia, IC<sub>50</sub> 33.06 µg.mL<sup>-1</sup>), HCT-116 (colon carcinoma, IC<sub>50</sub> 70.07 µg.mL<sup>-1</sup>) and PC3 (prostate, IC<sub>50</sub> 80.04 µg.mL<sup>-1</sup>), and did not inhibit the growth of non-tumor cells (L929, murine fibroblast). The phytochemical study revealed the presence of three flavonoids in the ethyl acetate fraction: (-)-epicatechin, engeletin and astilbine. **Conclusion:** the results demonstrate the potential of the dichloromethane fraction from *A. paniculata* leaves to inhibit the cell growth of leukemia, prostate and colon carcinoma tumor lines. Regarding the phytochemical study, this is the first report of the occurrence of flavonoids in *A. paniculata*.

**Keywords:** Astilbine; Antibacterial Activity; Cytotoxicity; Engeletin; Epicatechin.

**Correspondente/Corresponding:** \*Leandro Albano Alves. – Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Br 153, Km 99, Zona Rural, Anápolis-GO, Brasil. CEP: 75132-903. – Tel: +55 62 99224-7060 – E-mail: leandroalves2000@gmail.com

## INTRODUÇÃO

A família Fabaceae destaca-se por ser a terceira maior em número de espécies no mundo, possuindo como subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae. Muitas de suas espécies são responsáveis pela geração de renda em diversas comunidades, apresentando potencial como plantas ornamentais e para produção de fármacos.<sup>1</sup> Os fitoquímicos da família Fabaceae ganharam reconhecimento significativo por suas propriedades anticancerígenas contra diversas formas de câncer em humanos.<sup>2</sup> A biodiversidade global desta família registra mais de 19 mil espécies abrangidas em cerca de 727 gêneros, entre eles o gênero *Andira*, conhecido popularmente como angelins, possuindo mais de 30 espécies distribuídas principalmente na América Tropical. No Brasil, foram encontradas 27 espécies e 7 variedades, identificadas em maior parte na Amazônia.<sup>3,4</sup>

O gênero *Andira* primeiramente chamou a atenção da comunidade científica da Europa devido ao uso de extratos de casca e sementes como anti-helmíntico pelos indígenas.<sup>4</sup> A primeira espécie catalogada para usos medicinais foi a *Andira inermis* na Jamaica.<sup>5</sup> Foram relatados usos do gênero como purgativo, febrífugo, narcótico, inseticida, piscicida e antimalárico, no entanto, as espécies do gênero *Andira* são conhecidas de forma mais abrangente como anti-helmíntico natural.<sup>6</sup> As espécies deste gênero são ricas em compostos fenólicos como pterocarpanos, arilbenzofuranos, flavanonois, rotenoides e isoflavonas. As isoflavonas são metabólitos com significado importante no gênero *Andira*, sendo investigadas anteriormente em diversas espécies e, portanto, importante para a quimiotaxonomia do gênero.<sup>6</sup>

A espécie *Andira paniculata* Benth (Fabaceae) possui poucos relatos em literatura científica, no que diz respeito a testes de bioatividade, sendo seu perfil fitoquímico ainda desconhecido, apesar do saber popular a respeito de suas propriedades anti-helmínticas e inseticidas.<sup>4</sup> O potencial inseticida dos extratos de folhas desta espécie revelou alta mortalidade frente às formigas *Atta sexdens rubropilosa* e lagartas *Spodoptera frugiperda*.<sup>7</sup> A toxicidade dos extratos de folhas também foi testada na lagarta *Helicoverpa armigera* resultando em 85% de mortalidade para a fração hexânica.<sup>8</sup> Os extratos de folhas de *Andira paniculata* Benth foram testados frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, apresentando-se atóxicos.<sup>9</sup>

Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial bioativo dos extratos de *Andira paniculata* Benth através dos ensaios antibacteriano, citotóxico e de toxicidade frente à *Artemia salina*; além de isolar e identificar metabólitos secundários presentes nas folhas da espécie.

## METODOLOGIA

### Material vegetal

As folhas de *Andira paniculata* Benth foram coletadas em setembro de 2008, na região de preservação do Cerrado da Base Aérea de Anápolis, Goiás, e a excisada foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Goiás (HUEG 7176). Posteriormente, foi realizado o cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético – SISGen – sob o número AC53623.

### Extração, fracionamento e isolamento

As folhas (531,58 g) foram secas por 24 horas em estufa de circulação de ar a 40 °C e pulverizadas em moinho de facas tipo Croton. A extração do material moído foi realizada por maceração em etanol 99,5%, à temperatura ambiente, seguida pela evaporação do solvente em rotaevaporador. O extrato etanólico bruto (APFE; 166,75 g) foi fracionado através de partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade: diclorometano, acetato de etila e metanol. Após o fracionamento, os solventes foram rotaevaporados, originando as frações diclorometânica (APFE-D; 2,45 g), acetato de etila (APFE-A; 59,11 g) e metanólica (APFE-M; 30,30 g).

A fração APFE-A (2,03 g) foi submetida à cromatografia em coluna de vidro (Sephadex LH-20; 4 x 18 cm; MeOH 100%). Foram obtidas 31 frações: A1 – A31. As frações A5 a A10 foram agrupadas (0,50 g) e submetidas ao refractionamento em coluna de sílica gel (230-400 mesh; 2,5 x 13,5 cm; clorofórmio/MeOH; gradiente, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 2:8, 0:10). Foram obtidas 28 frações: A5-10.1 – A5-10.28.

As frações A5-10.5 e A5-10.6 foram agrupadas (65,1 mg) e recromatografadas em coluna de vidro (Sephadex LH-20; 2 x 18 cm; MeOH 100%), resultando em 11 frações. A fração 9-11 (9,4 mg) revelou se tratar da substância 1 e a fração 1-4 (18,3 mg) revelou se tratar da substância 2.

As frações A5-10.7 a A5-10.9 foram agrupadas (46,3 mg) e recromatografadas em coluna de vidro (Sephadex LH-20; 2 x 18 cm; MeOH 100%), resultando em 14 frações. A fração 10 (11,6 mg) revelou se tratar de uma mistura das substâncias 2 e 3.

### Identificação

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram adquiridos em espectrômetro Brüker Modelo Avance III – 500 (11,75 Tesla), operando a 500 MHz (<sup>1</sup>H) e 125 MHz (<sup>13</sup>C). Foi utilizado metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) como solvente para obtenção dos espectros, além do tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interno para os deslocamentos químicos (δ, ppm).

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos através de infusão direta no espectrômetro de massas Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific), equipado com fonte de ionização aquecida do tipo eletrospray (HESI) e analisador Orbitrap. As amostras foram prepa-

radas na concentração de 40 ppm em metanol e o fluxo de injeção foi de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . A fonte de íons foi operada no modo negativo a 4 kV. A temperatura do vaporizador da fonte foi ajustada em 37  $^{\circ}\text{C}$  e a do capilar em 350  $^{\circ}\text{C}$ .

## Bioensaios

### Toxicidade frente à *Artemia salina*

O artemilheiro foi preparado utilizando-se solução salina 3,6% (sal marinho comercial em água destilada) e 6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura, com esterilização e transferência para um funil de decantação. Foram adicionados 30 mg de cistos de *Artemia salina* comercial, e o sistema foi mantido em aeração e iluminação constantes por 36 h.

As soluções iniciais com concentração de 4000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foram preparadas utilizando-se 8 mg de cada fração (APFE-D, APFE-A e APFE-M) em 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (Synth) a 5% (em solução salina) e 1900  $\mu\text{L}$  de Tween 80 (Neon) a 0,02% (em solução salina). As diluições seriadas foram preparadas em frascos tipo Eppendorf (2 mL), partindo-se da solução de cada fração (4000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), que foram diluídas para 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Os náuplios de *Artemia salina* foram adicionados em microplacas de 96 poços (10 náuplios  $\pm$  1) contendo 100  $\mu\text{L}$  de solução salina e 100  $\mu\text{L}$  das frações nas diluições citadas. As diluições foram testadas em triplicata nas placas, sendo também utilizado um controle de viabilidade (solução salina 3,6%, dimetilsulfóxido 5% e Tween 80 0,02%) e controle positivo com dicromato de potássio,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , (Neon) nas diluições de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Após 24 h de repouso em temperatura ambiente e iluminação constante, realizou-se a contagem dos náuplios mortos e vivos.

O procedimento foi realizado em triplicata para cada fração, com três repetições independentes. A concentração letal média de cada fração,  $\text{CL}_{50}$ , foi calculada por meio do método estatístico de regressão por próbitos, PROBIT, através do *software* Statistica 7.1 (StatSoft, versão 2005).

### Atividade antibacteriana

O ensaio antibacteriano foi realizado de acordo com o teste de microdiluição em caldo, proposto pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2016), com a finalidade de avaliar a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) das frações testadas.<sup>10</sup> Foram utilizados 8 mg de cada fração em 5 mL de dimetilsulfóxido puro, 95 mL de caldo Miller Hinton (MH) e 1900 mL de Tween 80 0,02% (em caldo MH), obtendo-se uma solução estoque de concentração 4000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e, a partir desta, as diluições 2000, 1000, 500, 250 e 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Foram utilizadas as seguintes cepas padrão ATCC, *American Type Culture Collection: Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25312 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. O procedimento foi realizado em triplicata para cada fração, com três repetições independentes.

### Citotoxicidade in vitro

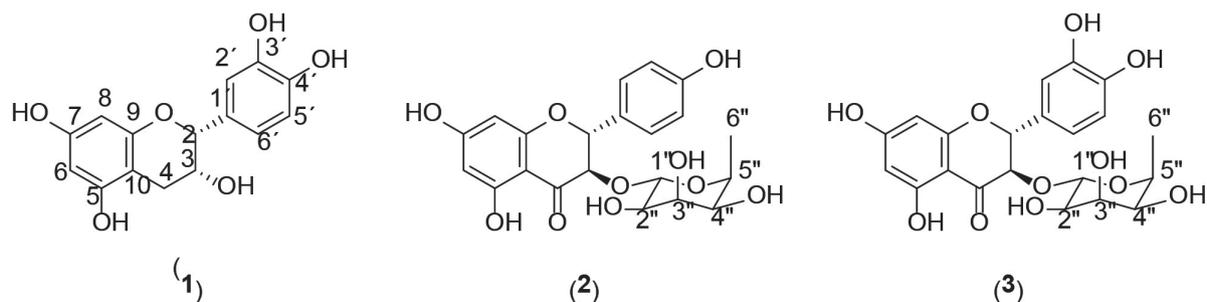
O ensaio de citotoxicidade foi realizado através da metodologia MTT, brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, conforme descrito por Mosman.<sup>11</sup> Foram utilizadas linhagens de células tumorais SNB-19 (Astrocitoma), HCT-116 (Carcinoma de cólon – humano), PC3 (Próstata) e HL60 (Leucemia promielocítica), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. As frações foram solubilizadas em dimetilsulfóxido e testadas na concentração única de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A leitura das amostras foi realizada a 595 nm utilizando-se um espectrofotômetro de microplaca (Beckman Coulter, modelo DTX 880 Multimode Detector). Foram calculadas as médias e desvios padrão das médias dos percentuais de inibição do crescimento celular, através do *software* GraphPad Prism versão 5.01.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estudo fitoquímico

O estudo fitoquímico da fração acetato de etila das folhas de *A. paniculata* levou à identificação de três flavonoides, cuja ocorrência está sendo relatada pela primeira vez na espécie: (-)-epicatequina (**1**), engeletina (**2**) e astilbina (**3**) (Figura 1).

**Figura 1** – Substâncias identificadas na fração acetato de etila das folhas de *A. paniculata*



A substância **1** apresentou-se como um sólido branco e foi identificada através da comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC com dados de literatura (Tabela 1).<sup>12</sup>

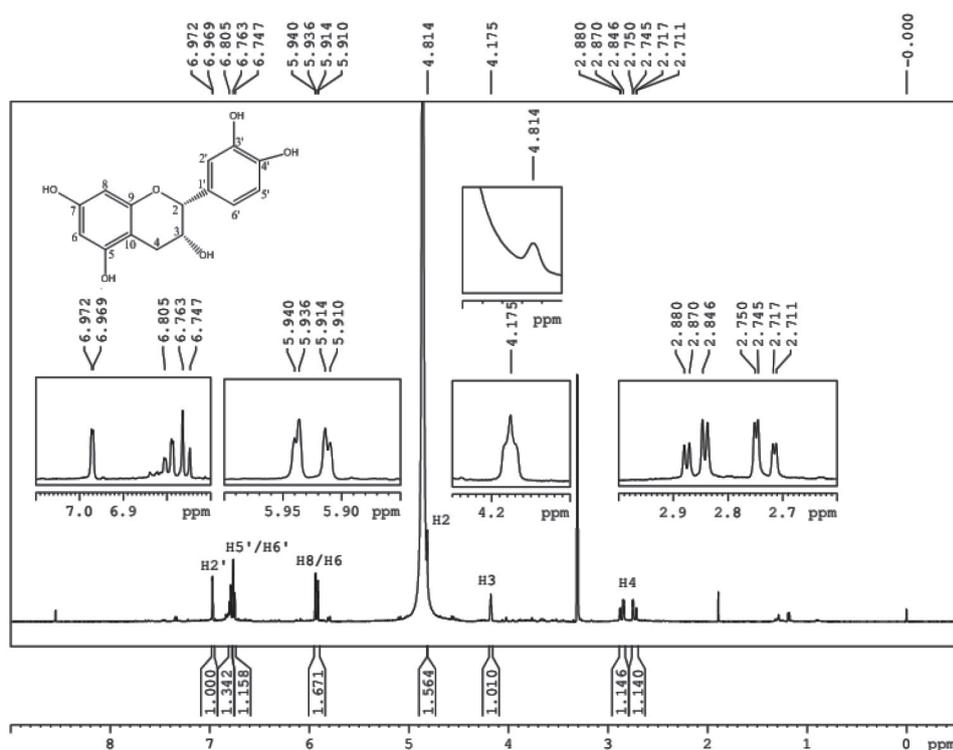
**Tabela 1** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) da substância **1** em comparação com os dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (acetona- $d_6$ +gotas  $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz) da literatura<sup>12</sup>.

H/C	Referência <sup>12</sup>		Substância <b>1</b>		HSQC ( $^1\text{J}$ )	HMBC ( $^{2,3,4}\text{J}$ )
	$\delta_c$ ppm	$\delta_H$ ppm (mult., J Hz)	$\delta_c$ ppm	$\delta_H$ ppm (mult., J Hz)		
2	79,1	4,82 (1H, s)	78,3	4,81 (1H, s)	H2 – C2	$^2\text{J}$ – 2 ligações
3	66,6	4,17 (1H, sl)	65,9	4,17 (1H, m)	H3 – C3	H2'-C3'; H6-C5
4	28,5	$\alpha$ -2,85 (1H, dd, J = 4,5 e 16,8) $\beta$ -2,72 (1H, dd, J = 2,4 e 16,8)	27,6	2,86 (1H, dd, J = 4,7; 16,6) 2,73 (1H, dd, J = 2,9; 16,8)	H4a – C4 H4b – C4	H2-C1'; H4a-C3 H4a-C10; H4b-C3 H4b-C10
5	157,3		156,2			
6	96,0	5,93 (1H, d, J = 1,8)	94,8	5,93 (1H, d, J = 2,1)	H6 – C6	
7	156,7		156,6			$^3\text{J}$ – 3 ligações
8	95,3	5,91 (1H, d, J = 1,8)	94,3	5,91 (1H, d, J = 2,1)	H8 – C8	H2'-C2'; H6'-C2'
9	157,1		156,0			H5'-C1'; H5'-C3'
10	99,5		98,6			H2-C2'; H2-C6'
1'	131,7		130,8			H4a-C2; H4a-C5
2'	115,0	6,97 (1H, d, J = 1,2)	113,8	6,97 (1H, d, J = 1,8)	H2' – C2'	H4b-C2; H4b-C5
3'	145,0		144,3			
4'	145,1		149,4			$^4\text{J}$ – 4 ligações
5'	115,4	6,75 (1H, d, J = 8,1)	117,7	6,75 (1H, d, J = 8,1)	H5' – C5'	H2'-C5'; H6'-C3'
6'	119,0	6,79 (1H, dd, J = 1,2 e 8,1)	114,3	6,79 (1H, dd, J = 1,8 e 8,1)	H6' – C6'	H2-C5'

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **1** (Figura 2) apresentou picos correspondentes ao anel aromático A em  $\delta_H$  5,91 (d, J=2,1 Hz, H-8) e  $\delta_H$  5,94 (d, J=2,1 Hz, H-6). Observou-se a presença do anel aromático B em  $\delta_H$  6,79 (dd, J=8,1 e 1,8 Hz, H-6'),  $\delta_H$  6,75 (d, J=8,1 Hz, H-5') e  $\delta_H$  6,97 (d, J=1,8 Hz, H-2'). O anel C foi confirmado pela

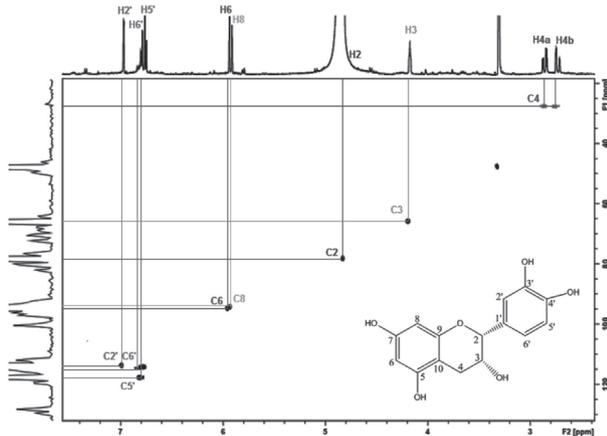
presença do duplete com característica de singlete em  $\delta_H$  4,81 (s, H-2), devido ao pequeno valor da constante de acoplamento, o que sugere a estereoquímica tipo cis entre H-2 e H-3, o multiplete em  $\delta_H$  4,17 (m, H-3) e o duplo duplete (H-4,  $\alpha$  e  $\beta$ ) em  $\delta_H$  2,86 (dd, J=16,6 e 4,7 Hz, H-4 $\alpha$ ) e  $\delta_H$  2,73 (dd, J=16,8 e 2,9 Hz, H-4 $\beta$ ).

**Figura 2** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **1**,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz

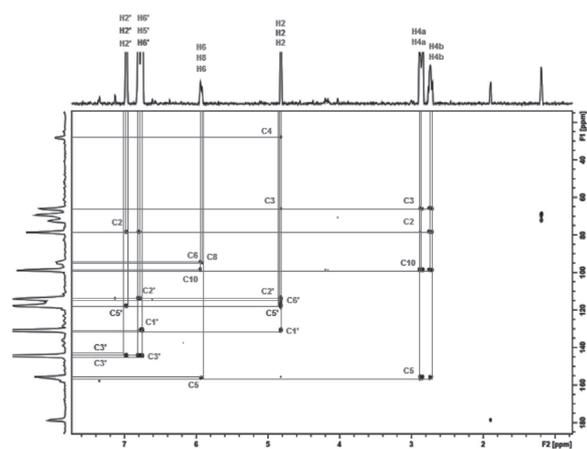


Os dados de  $^{13}\text{C}$  foram extraídos dos espectros de HSCQ e HMBC (Figuras 3 e 4), onde foi possível observar os deslocamentos químicos de 15 carbonos, distribuídos nos anéis A, B e C. Os valores de  $\delta_{\text{CH}}$  78,3 (C-2),  $\delta_{\text{CH}}$  65,9 (C-3) e  $\delta_{\text{CH}}$  27,6 (C-4) revelaram a presença dos carbonos metínicos saturados do anel C; em  $\delta_{\text{C}}$  156,2 (C-5),  $\delta_{\text{CH}}$  94,8 (C-6),  $\delta_{\text{C}}$  156,6 (C-7),  $\delta_{\text{CH}}$  94,3 (C-8),  $\delta_{\text{C}}$  156,0 (C-9) e  $\delta_{\text{C}}$  98,6 (C-10) foram constatados os carbonos do anel A; e em  $\delta_{\text{C}}$  130,8 (C-1'),  $\delta_{\text{CH}}$  113,8 (C-2'),  $\delta_{\text{C}}$  144,3 (C-3'),  $\delta_{\text{C}}$  149,4 (C-4'),  $\delta_{\text{CH}}$  117,7 (C-5') e  $\delta_{\text{CH}}$  114,3 (C-6') os valores referentes ao anel B. No mapa de contornos HSQC, foram encontradas todas as correlações diretas dos hidrogênios acoplados ao seu carbono respectivo em 1 ligação ( $^1J$ ): C2-H2, C3-H3, C4-H4 ( $\alpha$  e  $\beta$ ), C6-H6, C8-H8, C2'-H2', C5'-H5' e C6'-H6'. No mapa de contornos HMBC, foram observados os acoplamentos a longa distância, destacando-se: C10-H4 ( $\alpha$  e  $\beta$ ) em 2 ligações ( $^2J$ ), demonstrando a interligação entre os anéis A e C; e H2'-C2 em 3 ligações ( $^3J$ ), comprovando a conexão do anel B ao anel C.

**Figura 3** – Espectro de correlação heteronuclear ( $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ ), HSQC da substância **1**,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz



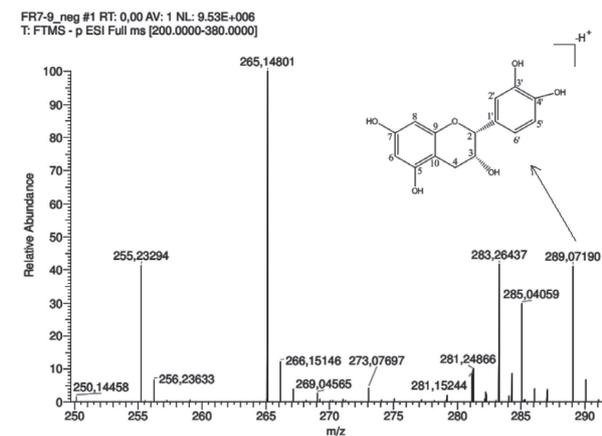
**Figura 4** – Espectro de correlação heteronuclear ( $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ ), HMBC da substância **1**,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz



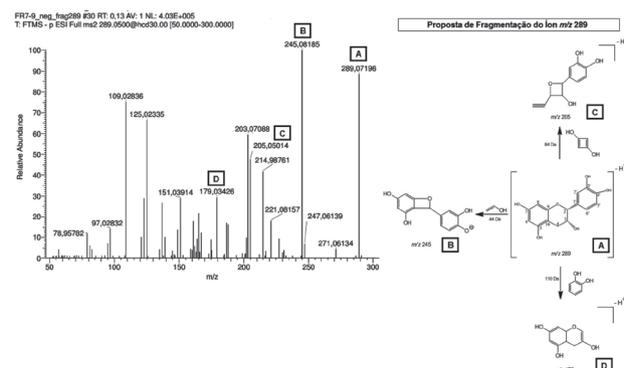
De acordo com as constatações obtidas nestes espectros, os valores de deslocamentos químicos e acoplamentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a substância **1** estão em consonância com os dados da literatura,<sup>12,13</sup> indicando o flavonoide (-)-epicatequina; (2*R*,3*R*)-2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,4-di-hidro-2*H*-cromeno-3,5,7-triol.

A análise por espectrometria de massas da amostra revelou o pico do íon molecular em  $m/z$  289,07190 (Figura 5). A fragmentação do pico em  $m/z$  289,07193 revelou a presença de íons estáveis em  $m/z$  245,08185, referente a perda de hidroxilas no anel B e C, e abertura do anel B,  $m/z$  205,05014 referente a perda de grupos metilênicos e metínicos no anel B, pós abertura; e  $m/z$  179,03426 após perda completa do anel B (Figura 6). Os dados apresentaram-se compatíveis com a literatura, onde o composto epicatequina foi identificado em  $m/z$  289, com fragmentos similares em  $m/z$  245;  $m/z$  205 e  $m/z$  179.<sup>14</sup> Trata-se do primeiro relato do isolamento de epicatequina em espécies do gênero *Andira*.

**Figura 5** – Espectro de massas de alta resolução, modo negativo, fração 7-9, substância **1**



**Figura 6** – Espectro de massas de alta resolução em modo negativo com proposta de fragmentação da substância **1**

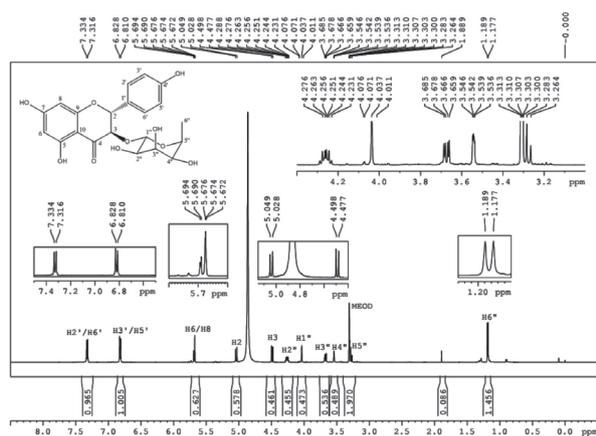


A substância **2** apresentou-se como um sólido branco levemente amarelado e foi identificada através da comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC com dados de literatura (Tabela 2).<sup>15</sup>

**Tabela 2** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) da substância **2** em comparação com os dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 600 MHz) e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) da literatura.<sup>15</sup>

H/C	Referência <sup>15</sup>		Substância 2			
	$\delta_c$ ppm	$\delta_H$ ppm (mult., J Hz)	$\delta_c$ ppm	$\delta_H$ ppm (mult., J Hz)	HSQC ( $^1\text{J}$ )	HMBC ( $^{2,3,4}\text{J}$ )
<b>Aglicona</b>						
<b>2</b>	82,47	5,29 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,2)	81,93	5,04 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,4)	H2 – C2	
<b>3</b>	77,31	4,75 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,2)	77,13	4,49 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10,4)	H3 – C3	$^2\text{J}$ – 2 ligações
<b>4</b>	194,67		191,46			H3'–C2'; H5'–C6'
<b>5</b>	164,12		164,24			H8–C9; H2–C3
<b>6</b>	96,01	5,91 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,4)	97,93	5,69 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,8)	H6 – C6	H3–C2; H1''–C2''
<b>7</b>	167,16		177,67			H4''–C3''; H5''–C6''
<b>8</b>	94,88	5,88 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,4 Hz)	97,93	5,67 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,0)	H8 – C8	
<b>9</b>	162,74		162,39			$^3\text{J}$ – 3 ligações
<b>10</b>	100,84		100,48			H2'–C2; H6'–C2'
<b>1'</b>	127,22		127,92			H2'–C4'; H6'–C4'
<b>2'</b>	128,65	7,32 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	128,53	7,33 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	H2' – C2'	H6–C8; H8–C6
<b>3'</b>	115,05	6,78 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	114,98	6,82 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	H3' – C3'	H2–C4; H2–C2'
<b>4'</b>	158,06		157,89			H2–C6'; H3–C1''
<b>5'</b>	115,05	6,78 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	114,98	6,82 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	H5' – C5'	H1''–C3; H3''–C5''
<b>6'</b>	128,65	7,32 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	128,53	7,33 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	H6' – C6'	H5''–C3''
<b>Ramnose</b>						
<b>1''</b>	101,14	3,96 (1H, <i>s</i> )	98,61	4,02 (1H, <i>s</i> )	H1'' – C1''	
<b>2''</b>	70,38	3,90 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,6; 6)	68,98	4,28 (1H, <i>m</i> )	H2'' – C2''	$^4\text{J}$ – 4 ligações
<b>3''</b>	70,78	3,38 (1H, <i>m</i> )	70,74	3,70 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,3; 3,3)	H3'' – C3''	H6–C9; H3–C2'
<b>4''</b>	72,40	3,26 (1H, <i>m</i> )	70,46	3,56 (1H, <i>m</i> )	H4'' – C4''	H3–C6'; H6''–C3''
<b>5''</b>	69,14	3,11 (1H, <i>m</i> )	72,52	3,30 (1H, <i>m</i> )	H5'' – C5''	
<b>6''</b>	16,45	1,04 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0)	16,46	1,18 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2)	H6'' – C6''	

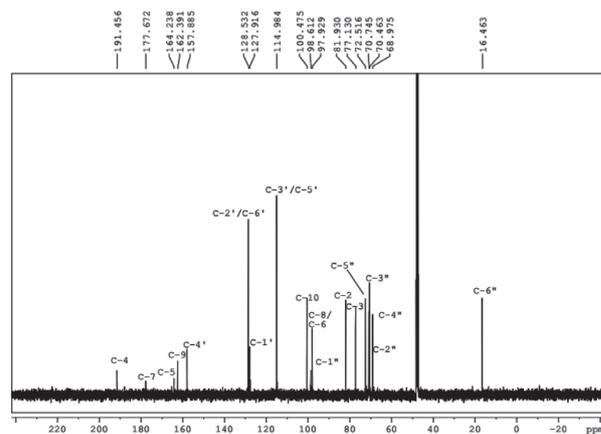
**Figura 7** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **2**,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **2** (Figura 7) apresentou dois dubletos em  $\delta_H$  5,67 (*d*, *J*=2,4 Hz, H-8) e  $\delta_H$  5,69 (*d*, *J*=2,4 Hz, H-6), que confirmam a presença do anel A de um flavonoide substituído nas posições 5 e 7, além dos dubletos em  $\delta_H$  6,82 (*d*, *J*=8,4, H-3' e H-5') e  $\delta_H$  7,33 (*d*, *J*=8,4 Hz, H-2' e H-6'), característicos de sinais de hidrogênios aromáticos *ortho*-acoplados. Os dubletos em  $\delta_H$  4,49 (*d*, *J*=10,4 Hz, H-3) e  $\delta_H$  5,04 (*d*, *J*=10,4 Hz, H-2) em posição *trans*, conforme a constante de acoplamento *J*, confirmaram a presença do anel C tipo pirona, presente

em flavanóis. O dubleto com características de singlete em  $\delta_H$  4,02 refere-se ao hidrogênio (H-1'') ligado a carbono anomérico (acetal), com respectivos sinais na região de açúcar em  $\delta_H$  3,26 a 4,28. A presença de uma ramnose foi confirmada pelo dubleto referente a metila em  $\delta_H$  1,18 (*d*, *J*=6,2 Hz, H-6'').

**Figura 8** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **2**,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz

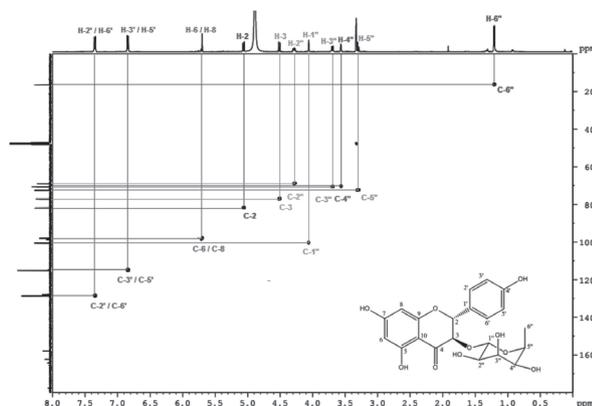


Os dados do espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 8) demonstraram os deslocamentos de 21 carbonos, distribuídos

em regiões específicas que caracterizaram a presença dos 3 anéis (A, B e C). Em  $\delta_c$  191,46 (C-4) observou-se a carbonila do anel C tipo pirona; em  $\delta_{CH}$  77,13 e  $\delta_{CH}$  81,93 pôde-se observar os carbonos metínicos saturados; em  $\delta_c$  164,24 (C-5),  $\delta_{CH}$  97,93 (C-6 e C-8),  $\delta_c$  177,67 (C-7),  $\delta_c$  162,74 (C-9) e  $\delta_c$  100,48 (C-10) observou-se os carbonos correspondentes ao anel A; em  $\delta_c$  127,92 (C-1'),  $\delta_{CH}$  128,53 (C-2' e C-6'),  $\delta_{CH}$  114,98 (C-3' e C-5') e  $\delta_c$  157,89 (C-4') caracterizaram-se os carbonos do anel B. Para a unidade do açúcar observou-se em  $\delta_{CH}$  98,61 (C-1'') o carbono anomérico, em  $\delta_{CH}$  68,98 (C-2''),  $\delta_{CH}$  70,74 (C-3''),  $\delta_{CH}$  70,46 (C-4'') e  $\delta_{CH}$  72,52 (C-5'') os demais carbonos saturados e, em  $\delta_{CH_3}$  16,46 (C-6'') o sinal do carbono metílico, caracterizando-se assim a presença da ramnose. O deslocamento de C-7,  $\delta_c$  177,67, do anel A apresentou-se superior ao encontrado na literatura ( $\delta_c$  167,16),<sup>22</sup> sugerindo um possível distanciamento referencial em relação ao anel C tipo pirona, que, por não ser planar, pode ter assumido uma conformação diferente durante o ensaio.

No mapa de contorno HSQC (Figura 9) foi possível identificar todas as correlações diretas dos carbonos metínicos do anel A e B, com seus respectivos hidrogênios: C6-H6, C8-H8, C3'-H3', C5'-H5', C2'-H2', C6'-H6'. O mapa também apresentou os carbonos metínicos: C1''-H1'', C2''-H2'', C-3''-H3'', C4''-H4'', C5''-H5'' e metílico (C-6'') do açúcar. Além disso, foi possível observar a correlação de C2-H2 e C3-H3 do grupo pirona, complementando assim a estrutura da substância **2**.

**Figura 9** – Espectro de correlação heteronuclear ( $^1H - ^{13}C$ ), HSQC da substância **2**,  $CD_3OD$ ,  $^1H$  500 MHz,  $^{13}C$  125 MHz

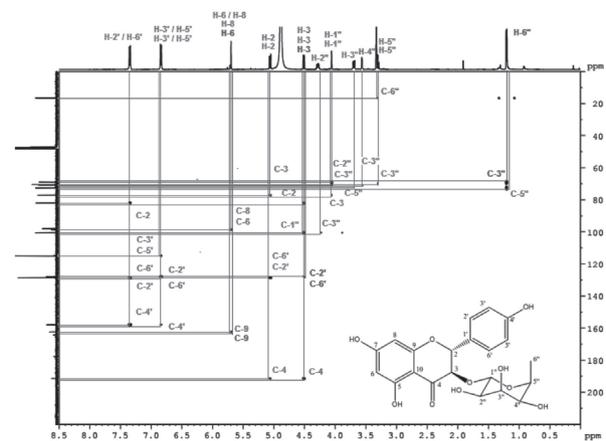


O mapa de contorno HMBC (Figura 10) confirmou os principais acoplamentos à longa distância, destacando-se entre eles: o acoplamento H6-C9 em quatro ligações, definindo o anel A; o acoplamento em duas ligações entre H2-C3 e H3-C2, confirmando o anel C tipo pirona; o acoplamento em quatro ligações entre H3-C2' e H3-C6', confirmando a interligação do anel B; e o acoplamento em três ligações de H3 com o carbono anomérico C1'', confirmando a conexão da ramnose ao anel C tipo pirona.

Os dados dos espectros unidimensionais e bidimensionais de RMN da substância **2** assemelharam-se aos dados de literatura,<sup>15</sup> sugerindo-se a estrutura do

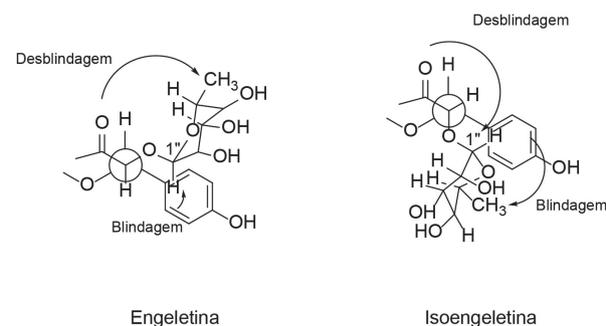
flavonoide engeletina; (2*R*, 3*R*)-5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxi-fenil)-3-[(2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*R*, 6*S*)-3,4,5-tri-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-2,3-di-hidrocromen-4-ona.

**Figura 10** – Espectro de correlação heteronuclear ( $^1H - ^{13}C$ ), HMBC da substância **2**,  $CD_3OD$ ,  $^1H$  500 MHz,  $^{13}C$  125 MHz



Os prótons metílicos H-2 e H-3 da engeletina configuram-se em posição *trans*, com base na constante de acoplamento  $J=10,4$  Hz observada. Na isoengeletina, diastereoisômero da engeletina, estes prótons estão na posição *cis*, apresentando constante de acoplamento ( $J$ ) próximo a 2 Hz. Os valores diferentes de deslocamentos químicos observados para o hidrogênio anomérico do açúcar ramnose (H-1'') nas duas moléculas, são explicados através do efeito anisotrópico exercido pelo anel B. Devido a esta conformação da engeletina, a desproteção anisotrópica exercida pelos grupos carbonílicos sobre os prótons metílicos e a proteção anisotrópica do anel aromático B sobre o próton anomérico, fazem com que o deslocamento químico de H-1'' apresente valor próximo a 4 ppm. Por outro lado, na isoengeletina, o efeito anisotrópico dos grupos carbonílicos é exercido sobre o próton anomérico e o anel aromático B possui anisotropia com os prótons metílicos, conduzindo a valor de deslocamento químico de H-1'' em torno de 4,7 ppm. A projeção de Newman (Figura 11), demonstra esta estereoquímica envolvendo os dois isômeros.

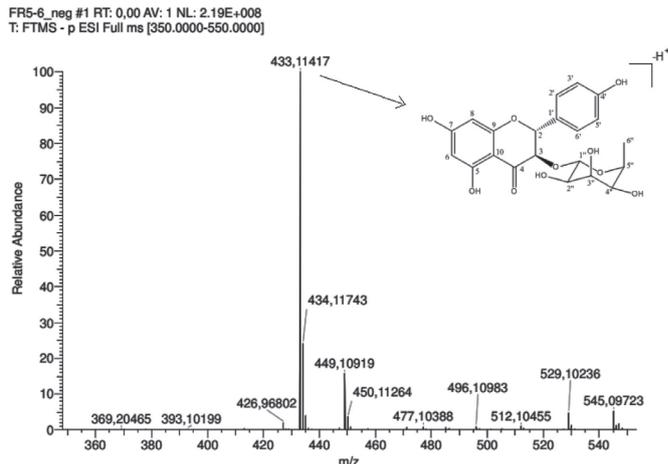
**Figura 11** – Projeção de Newman para os diastereoisômeros engeletina e isoengeletina



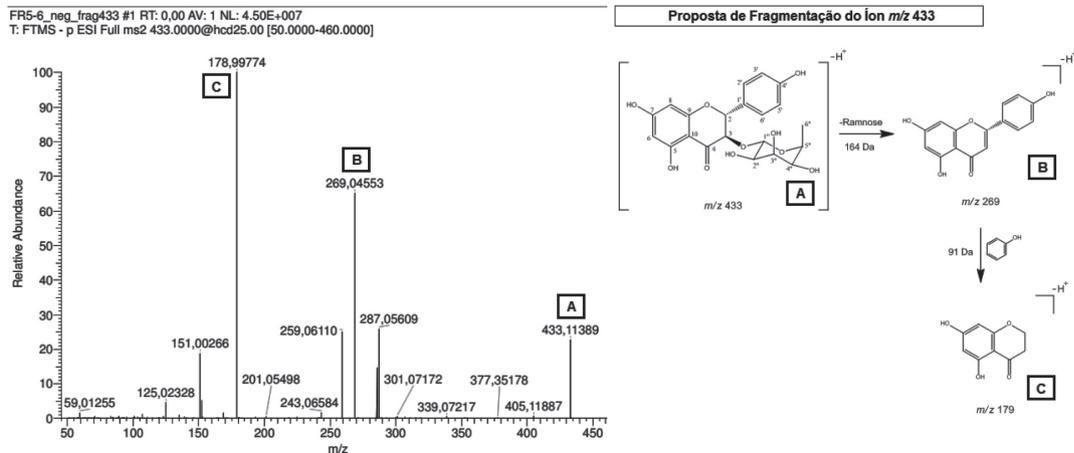
A análise por espectrometria de massas da amostra apresentou o sinal do íon molecular em  $m/z$  433,11417 (Figura 12). A fragmentação do pico em  $m/z$  433,11417 revelou a presença de íons instáveis principais em  $m/z$  269,04553, referente a perda da molécula de ramnose e

$m/z$  178,99774 referente a perda do anel B (Figura 13). Os dados foram compatíveis a literatura, onde a engeletina apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  433,1132 e fragmentos em  $m/z$  287,05;  $m/z$  269,04;  $m/z$  259,06;  $m/z$  178,99 e  $m/z$  152,01.<sup>16</sup>

**Figura 12** – Espectro de massas de alta resolução, modo negativo, fração 5-6, substância 2



**Figura 13** – Espectro de massas de alta resolução em modo negativo com proposta de fragmentação da substância 2



A substância engeletina foi identificada anteriormente em folhas de *Andira inermis*<sup>17</sup> e raízes de *Andira antihelmia*.<sup>18</sup> Este é o primeiro relato da presença desta substância em *Andira paniculata* Benth.

A substância 3 foi obtida em mistura com a substân-

cia 2. A mistura apresentou-se como um sólido branco e as substâncias foram identificadas através da comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC e HMBC com dados de literatura (Tabela 3).<sup>15</sup>

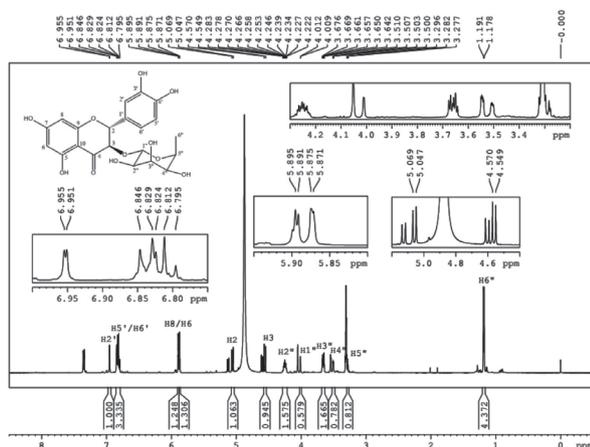
**Tabela 3** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) e <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) da substância 3 em comparação com os dados de RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 600 MHz) e <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz) da literatura.<sup>15</sup>

H/C	Referência <sup>15</sup>		Substância 3			
	$\delta_c$ ppm	$\delta_H$ ppm (mult., J Hz)	$\delta_c$ ppm	$\delta_H$ ppm (mult., J Hz)	HSQC ( <sup>1</sup> J)	HMBC ( <sup>2,3,4</sup> J)
<b>Aglicona</b>						
2	83,96	5,08 (1H, d, J = 10,8)	83,67	5,05 (1H, d, J = 10,6)	H2 – C2	
3	78,56	4,58 (1H, d, J = 10,4)	78,31	4,56 (1H, d, J = 10,6)	H3 – C3	<sup>2</sup> J – 2 ligações
4	196,00		195,41			H2'-C3' ; H6'-C1'

5	165,52		165,83			H2-C3 ; H3-C2
6	97,37	5,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	96,55	5,87 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	H6 - C6	H1''-C2'' ; H5''-C4''
7	168,62		169,32			
8	96,25	5,91 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	97,32	5,89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2,0)	H8 - C8	
9	164,11		164,01			<sup>3</sup> <i>J</i> - 3 ligações
10	102,48		101,9			H2'-C6' ; H6'-C2'
1'	129,18		129,81			H6'-C4' ; H5'-C1'
2'	116,30	6,95 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,6)	115,23	6,95 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,8)	H2' - C2'	H8-C6 ; H8-C10
3'	146,54		146,28			H6-C8 ; H2-C2'
4'	147,38		147,04			H2-C6' ; H3-C1''
5'	115,46	6,85 (1H, <i>m</i> )	116,04	6,81 (1H, <i>m</i> )	H5' - C5'	
6'	120,48	6,85 (1H, <i>m</i> )	120,27	6,81 (1H, <i>m</i> )	H6' - C6'	
<b>Ramnose</b>						
1''	102,14	4,04 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,6)	101,92	4,01 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1,3)	H1'' - C1''	
2''	71,77	4,28 (1H, <i>m</i> )	70,17	4,25 (1H, <i>m</i> )	H2'' - C2''	<sup>4</sup> <i>J</i> - 4 ligações
3''	72,15	3,67 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,6; 3,2)	70,74	3,65 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,2 e 7,2)	H3'' - C3''	H6-C9 ; H1''-C4''
4''	73,79	3,53 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,2; 1,6)	71,55	3,51 (1H, <i>m</i> )	H4'' - C4''	
5''	70,50	3,32 (overlap, <i>m</i> )	73,61	3,28 (1H, <i>m</i> )	H5'' - C5''	
6''	17,85	1,18 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0)	17,65	1,18 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2)	H6'' - C6''	

O espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância **3** foi avaliado (Figura 14), excetuando-se os picos correspondentes à substância **2**, engeletina, já caracterizada anteriormente. Confirmou-se o anel A nos dubletos em  $\delta_H$  5,87 (*d*, *J*=2,0 Hz, H-6) e  $\delta_H$  5,89 (*d*, *J*=2,0 Hz, H-8). O anel B foi visualizado em  $\delta_H$  6,95 (*d*, *J*=1,8 Hz, H-2') e  $\delta_H$  6,81 (*m*, H-5' e H-6'). Os dubletos em  $\delta_H$  4,56 (*d*, *J*=10,6 Hz, H-3) e  $\delta_H$  5,05 (*d*, *J*=10,6 Hz, H-2) em posição *trans* conforme a constante de acoplamento *J*, confirmam a presença do anel C tipo pirona presente em flavanois. O dubleto em  $\delta_H$  4,01 (*d*, *J*=1,3 Hz, H-1'') refere-se ao hidrogênio ligado a carbono anomérico (acetal), com respectivos sinais na região de açúcar em  $\delta_H$  3,28 a 4,25 e, confirmando a presença do açúcar, ramnose, observa-se o dubleto referente a metila em  $\delta_H$  1,18 (*d*, *J*=6,2 Hz, H-6'').

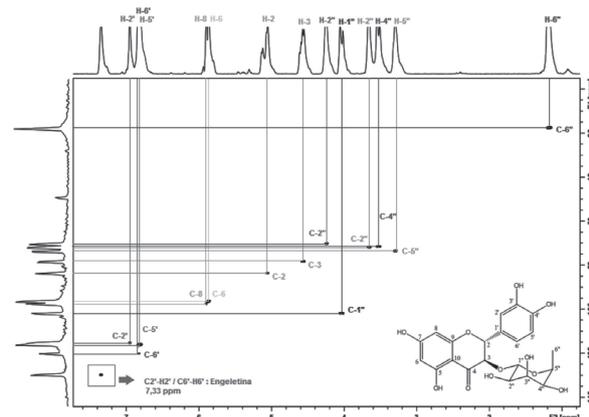
**Figura 14** – Espectro de <sup>1</sup>H para a mistura de **2** e **3**, CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H 500 MHz



Os dados de <sup>13</sup>C foram extraídos dos espectros de HSCQ e HMBC (Figuras 15 e 16). Os deslocamentos dos 21 carbonos foram determinados através da análise destes espectros em relação aos hidrogênios associados ou

vizinhos. Alguns contornos apresentaram sobreposição em relação aos deslocamentos químicos da substância **2**, engeletina, no entanto, pôde-se diferenciar a presença de carbonos específicos da substância **3**, como por exemplo, o valor de  $\delta_{CH}$  115,23 (C-2') que tem deslocamento distinto ao da engeletina ( $\delta_{CH}$  128,53; C-2'). Outro deslocamento de carbono característico observado na substância **3** foi o  $\delta_{CH}$  120,27 (C-6'), em oposição ao do composto engeletina ( $\delta_{CH}$  128,53; C-6'), caracterizando-se assim o anel B de uma substância diferente do flavonoide engeletina.

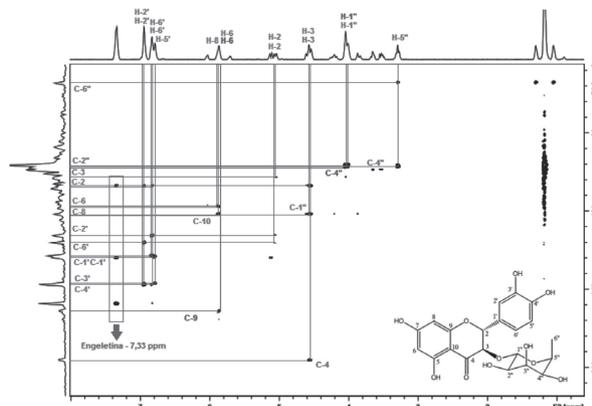
**Figura 15** – Espectro de correlação heteronuclear (<sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C), HSQC da substância **3** em mistura com a substância **2**, CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz



No mapa de contorno HSQC foi possível observar as correlações diretas entre os hidrogênios acoplados aos seus respectivos carbonos para a substância **3** e para a engeletina, com as devidas sobreposições por tratar-se de substâncias com fórmula estrutural próximas. No mapa de contorno HMBC foi possível identificar os principais acoplamentos à longa distância, destacando-se para a substância **3** os acoplamentos de H2-C2' em três ligações e C3'-H2' em duas ligações, caracterizando-se assim a

diferenciação do anel B deste composto.

**Figura 16** – Espectro de correlação heteronuclear ( $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ), HMBC da substância **3**, em mistura com a substância (**2**),  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $^1\text{H}$  500 MHz,  $^{13}\text{C}$  125 MHz



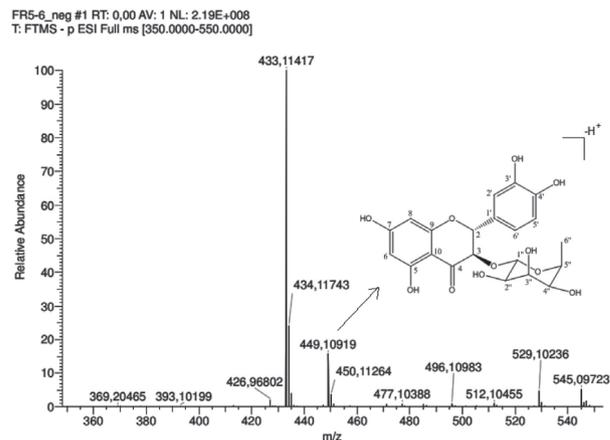
Os dados dos espectros de RMN desta mistura, contendo a substância **2**, identificada como engeletina e a substância **3** assemelham-se aos dados de outros autores.<sup>15,18-22</sup> Os valores de deslocamentos químicos para a substância **3** sugerem o flavonoide astilbina; (2*R*,3*R*)-2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3-[(2*S*,3*R*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi-2,3-di-hidrocro-men-4-ona.

A molécula da astilbina possui dois centros quirais, em C-2 e em C-3, resultando em quatro possíveis estereoisômeros: astilbina, neoastilbina, isoastilbina e neoisoastilbina.<sup>23</sup> Durante a avaliação dos espectros e elucidação da estrutura da astilbina, considerou-se esta hipótese, no entanto, o deslocamento químico do hidrogênio anomérico (H-1') da astilbina apresentou valor específico, próximo a 4,00 ppm, enquanto para os outros isômeros este valor oscila entre 4,75 a 4,96 ppm.<sup>22</sup>

Além disso, a diferenciação pode ser observada nos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos prótons H-2 e H-3 das agliconas. A isoastilbina, por exemplo, apresenta o valor aproximado de H-2 em 5,52 ppm e H-3 em 4,20 ppm,<sup>22</sup> enquanto a astilbina apresenta valor de H-2 em 5,08 e 4,58 ppm.<sup>23</sup> Estes valores de deslocamento oscilam com base nos efeitos anisotrópicos exercidos pelo anel aromático B e grupos carbonílicos, sobre os prótons anoméricos e metílicos.

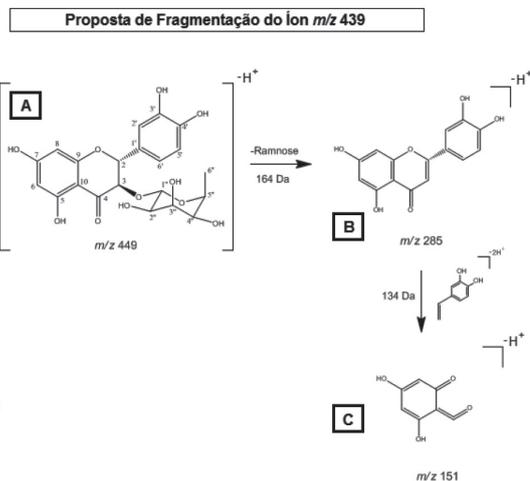
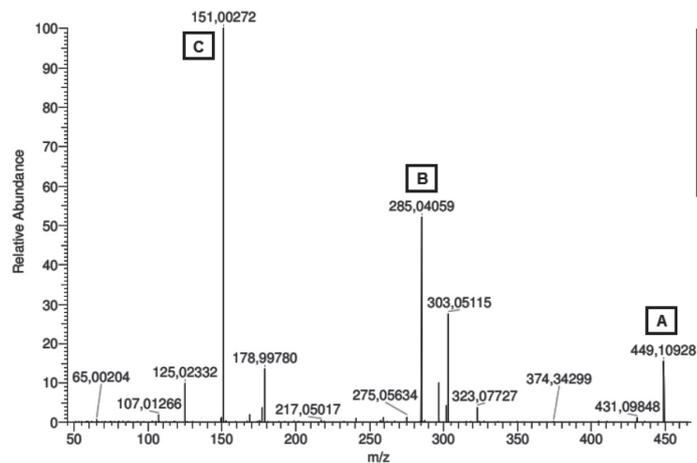
A análise por espectrometria de massas amostra apresentou o íon molecular em  $m/z$  449,10919 (Figura 17). A fragmentação do pico em  $m/z$  449,10928 revelou a presença dos íons estáveis principais em  $m/z$  285,04059, referente a perda da ramnose, e  $m/z$  151,00272 referente a perda do anel B e abertura do anel C (Figura 18). Os dados foram similares aos valores relatados em literatura,<sup>24</sup> onde a engeletina foi identificada com íon molecular em  $m/z$  449 e fragmentos em  $m/z$  285 e 151.

**Figura 17** – Espectro de massas de alta resolução, modo negativo, fração 5-6, substância **3**



**Figura 18** – Espectro de massas de alta resolução em modo negativo com proposta de fragmentação da substância **3**

FR5-6\_neg\_frag449 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 7.63E+006  
T: FTMS - p ESI Full ms 2 449.1000@hcd20.00 [50.0000-460.0000]



A presença da astilbina já foi relatada anteriormente em outras espécies de *Andira*, como nas folhas de *Andira*

*inermis*<sup>17</sup> e nas raízes de *Andira antihelmia*.<sup>18</sup> Entretanto, este é o primeiro relato da presença da molécula em

*Andira paniculata*.

### Toxicidade frente à *Artemia salina*

A toxicidade frente à *Artemia salina* foi classificada como forte ( $CL_{50}$  entre 0 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), moderada ( $CL_{50}$  entre 100 e 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), fraca ( $CL_{50}$  entre 500 e 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ou inexistente ( $CL_{50} > 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), conforme proposto por Nguta e colaboradores.<sup>25</sup> As frações APFE-D, APFE-A e APFE-M apresentaram valores de  $CL_{50}$  superiores a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo consideradas, portanto, atóxicas para o microcrustáceo. Os resultados foram compatíveis com os encontrados na literatura para as folhas da espécie *Andira paniculata* Benth.<sup>9</sup>

Outros estudos revelaram o potencial inseticida de frações de extrato de folhas de *Andira paniculata* Benth. A fração em diclorometano apresentou 100% de mortalidade em 8 dias, frente às formigas *Atta sexdens rubropilosa*.<sup>7</sup> A fração hexânica de folhas de *Andira paniculata* Benth foi testada frente à lagarta *Helicoverpa armigera*, resultando em 85% de mortalidade.<sup>8</sup> A baixa toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e o alto potencial inseticida, possibilita a extensão de outros estudos com objetivo da obtenção de métodos alternativos para o controle de insetos-pragas.

### Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi classificada como boa (CMI < 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), moderada (CMI entre 100 e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Tabela 4** – Percentual de inibição do crescimento (IC%) das amostras frente as linhagens tumorais e não tumoral nas concentrações únicas de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Amostra	Inibição de crescimento celular (IC% $\pm$ DP)				
	PC3	SNB-19	HCT-116	HL60	L929
APFE-D	88,61 $\pm$ 0,83	91,06 $\pm$ 0,00	90,72 $\pm$ 3,01	94,12 $\pm$ 0,06	14,20 $\pm$ 3,51
APFE-A	37,85 $\pm$ 3,19	44,70 $\pm$ 1,75	9,25 $\pm$ 5,96	NT	NT
APFE-M	29,06 $\pm$ 3,12	4,09 $\pm$ 4,80	17,47 $\pm$ 1,57	NT	NT

PC3: Células tumorais – Próstata; SNB-19: Células tumorais – Astrocitoma; HCT-116: Células tumorais – Carcinoma de cólon; HL60: Células tumorais – Leucemia promielocítica; DP: Desvio padrão; NT: Não testado.

Para a fração APFE-D, a concentração inibitória média,  $IC_{50}$ , foi determinada nas linhagens tumorais e normal

(mL), fraca (CMI entre 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou inexistente (CMI > 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), conforme proposto por Holetz e colaboradores.<sup>26</sup> Com base nessa classificação, as frações APFE-D, APFE-A e APFE-M não apresentaram atividade antibacteriana frente às quatro cepas testadas, uma vez que os valores de CMI foram superiores a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os resultados foram compatíveis com os obtidos por Santos<sup>27</sup>, que, ao avaliar o potencial antimicrobiano de *Andira retusa* (Poir.) Kunth, demonstrou baixa ou nenhuma atividade frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Não foram encontrados relatos de estudo antibacteriano com frações de *Andira paniculata* Benth, sendo este, portanto, um resultado inédito para a espécie.

### Citotoxicidade *in vitro*

O potencial citotóxico das frações foi classificado de acordo com a seguinte escala de intensidade: baixa (inibição do crescimento celular, IC%, variando de 1 a 50%); moderada (IC% de 50,1 a 75%); alta (IC% superior a 75%).<sup>28,29</sup>

As frações APFE-A e APFE-M não apresentaram atividade citotóxica para as células tumorais PC3, SNB-19 e HCT-116, resultado em valores de IC% entre 4,09 e 44,70%. A fração APFE-D revelou alto potencial de inibição, com IC% entre 88,61 e 94,12% para todas as linhagens tumorais e baixa atividade para a linhagem de células normais, L929, com IC% de 14,20% (Tabela 4).

(Tabela 5), verificando-se maior potencial citotóxico para as HL60 (leucemia), com  $IC_{50}$  33,06  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para a linhagem de células normais, L929 (fibroblasto murino), a  $IC_{50}$  de APFE-D foi >100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , resultando em um índice de seletividade,<sup>30</sup> IS, de 3,02 para a linhagem HL60.

**Tabela 5** – Concentração Inibitória Média,  $IC_{50}$ , de APFE-D com concentração máxima de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Amostra	Linhagens tumorais, $IC_{50}$ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (intervalo)				
	PC3	SNB-19	HCT-116	HL60	L929
APFE-D	80,04 (65,89 – 97,23)	>100	70,07 (61,55 – 79,77)	33,06 (25,16 – 43,43)	>100
Doxorrubicina	0,76 (0,59 – 0,93)	2,07 (1,78 – 2,40)	0,19 (0,14 – 0,24)	0,02 (0,01 – 0,02)	1,71 (1,59 – 1,86)

Não há relatos de estudos de citotoxicidade com a espécie *Andira paniculata* Benth. Em relação ao gênero

*Andira*, Lôbo e colaboradores<sup>12</sup> relataram redução da atividade mitocondrial ao tratar células L929 com fra-

ções diclorometânicas de *Andira retusa* (Poir.) Kunth na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

## CONCLUSÃO

Relatamos aqui o primeiro estudo fitoquímico da espécie *Andira paniculata* Benth, que resultou na identificação de três flavonoides: (-)-epicatequina, engeletin e astilbina. As frações obtidas das folhas de *A. paniculata* foram atóxicas frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, com valores de CL<sub>50</sub> superiores a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. A investigação do potencial antimicrobiano das frações revelou inatividade frente aos microrganismos testados, com valores de CMI e CMB superiores a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. No ensaio de citotoxicidade, a fração diclorometânica apresentou alta inibição do crescimento celular das linhagens tumorais de leucemia, próstata e carcinoma de cólon, enquanto as frações acetato de etila e metanólica apresentaram baixa atividade, com inibição do crescimento celular menor que 50%. Embora a fração diclorometânica tenha apresentado os melhores resultados no ensaio de citotoxicidade, não foi possível realizar o isolamento de substâncias desta fração devido ao alto teor de ácidos graxos presentes.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelos recursos disponibilizados, ao Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC) pelos testes citotóxicos, ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Goiás (UFG) pelos espectros de RMN e ao Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da Universidade Federal de Goiás (CRTI/UFG) pelos espectros de massas.

## REFERÊNCIAS

1. Cantuária PC, Santos JUM, Barros F, Cantuária MF, Medeiros TDS, Silva RBLE. Conhecimento e Manejo Sustentável da Biodiversidade Amapaense. São Paulo: Blucher; 2017. 210 p.
2. Usman M, Khan WR, Yousaf N, Akram S, Murtaza G, Kudus KA, et al. Exploring the phytochemicals and anti-cancer potential of the members of Fabaceae family: a comprehensive review. *Molecules* 2022;27(12):3863. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27123863>
3. Souza LA G. Guia da biodiversidade de Fabaceae do Alto Rio Negro. Manaus; 2012. 118 p.
4. Mattos NF. O Gênero *Andira* Lam. (Leguminosae Papilionoideae) no Brasil. *Acta Amaz.* 1979;9:241-66. doi: <https://doi.org/10.1590/1809-43921979092241>
5. Pennington RT. Monograph of *Andira* (Leguminosae-Papilionoideae). *Syst Bot Monogr.* 2003;64:1-143. doi: <https://doi.org/10.2307/25027903>
6. Almeida JGL, Silveira ER, Pessoa ODL. NMR spectral assignments of a new [C-O-C] isoflavone dimer from *Andira surinamensis*. *Magn Reson Chem.* 2008;46:103-6. doi: <https://doi.org/10.1002/mrc.2138>

7. Pereira APN. Dissertação Mestrado, Universidade Estadual de Goiás, Brasil, 2012.
8. Neto MS, Silva FC, Almeida ACS, Menezes ACS, Araujo MS, Jesus FG. Toxicity of *Andira paniculata* (Fabaceae) extracts to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Agric Sci.* 2018;10(6):264-71. <https://doi.org/10.5539/jas.v10n6p264>
9. Campos JB, Correia AR, Cruz DC, Menezes ACS. VII Congr. Ens., Pesq. Ext. da Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Brasil, 2020.
10. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100S. 26. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016. 251 p.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65: 55-63. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
12. Lôbo LT, Castro KCF, Arruda MSP, Silva MN, Arruda AC, Müller AH, et al. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophylla* (Leguminosae). *Quim Nova* 2008;31:493-97. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300005>
13. Anouhe JBS, Niamké FB, Faustin M, Virieux D, Pirat JL, Adima AA, et al. The role of extractives in the natural durability of the heartwood of *Dicorynia guianensis* Amsl: new insights in antioxidant and antifungal properties. *Ann For Sci.* 2018;75(15):1-10. doi: <https://doi.org/10.1007/s13595-018-0691-0>
14. Jug U, Vovk I, Glavnik V, Makuc D, Naumoska K. Off-line multidimensional high performance thin-layer chromatography for fractionation of Japanese knotweed rhizome bark extract and isolation of flavan-3-ols, proanthocyanidins and anthraquinones. *J Chromatogr A.* 2021;1637:461802. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461802>
15. Zhao X, Chen R, Shi Y, Zhang X, Tian C, Xia D. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids from *Smilax glabra* Roxb. *Molecules.* 2020;25(22):5295. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25225295>
16. Yang W, Jiang X, Liu J, Qi D, Luo Z, Yu G, et al. Integrated strategy from in vitro, in situ, in vivo to in silico for predicting active constituents and exploring molecular mechanisms of tongfengding capsule for treating gout by inhibiting inflammatory responses. *Front Pharmacol.* 2021;12:1-17. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.759157>
17. Kraft C, Jenett-Siems K, Siems K, Solis PN, Gupta MP, Bienzle U, et al. Andinermals A–C, antiparasitoid constituents from *Andira inermis*. *Phytochemistry* 2001;58(5):769-74. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00295-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00295-3)
18. Silva VC, Carvalho G, Silva SLC. Chemical constituents from roots of *Andira anthelmia* (Leguminosae). *Rev Latinoam Quim.* 2007;35:13-19.
19. Huang H, Cheng Z, Shi H, Xin W, Wang TTY, Yu L. Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of *Engelhardtia roxburghiana* and their potential anti-inflammatory properties. *J Agric Food Chem.* 2011;59(9):4562-69. doi: <https://doi.org/10.1021/jf2002969>
20. Sampaopan Y, Kitprapiumpun N, Kongkiatpaiboon S, Duangdee N, Wongyai S. Isolation and HPLC analysis of astilbin in *Lysiphylum strychnifolium* (syn. *Bauhinia strychnifolia*) Stems. *Sci Technol. Asia.* 2021;26:208-15. doi: <https://doi.org/10.14456/scitechasia.2021.19>
21. Jusoh S, Zakaria Z, Din LB. Isolation of astilbin from leaves of *Craetoxylum arborescens*. *Malaysian J. Anal. Sci.* 2013;17:430-35.
22. Silva DHS, Yoshida M, Kato MJ. Flavonoids from *Iryanthera sago-*

- tiana*. *Phytochemistry* 1997;46(3):579-82. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00306-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00306-3)
23. Lucas-Filho MD, Silva GC, Cortes SF, Mares-Guia TR, Ferraz VP, Serra CP, et al. ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz *Phytomedicine* 2010;17(5):383-87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.09.008>
24. Zhao M, Xu J, Qian D, Guo J, Jiang S, Shang E, et al. Identification of astilbin metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS. *Biomed. Chromatogr.* 2014;28(7):1024-29. doi: <https://doi.org/10.1002/bmc.3111>
25. Nguta JM, Mbaria JM, Gakuya DW, Gathumbi PK, Kabasa JD, Kiama SG. Cytotoxicity of antimalarial plant extracts from Kenyan biodiversity to the brine shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). *Drugs Ther Stud.* 2012;2:e12. doi: <https://doi.org/10.4081/dts.2012.e12>
26. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez AG, Nakamura CV, Prado B, et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97(7):1027-31.
27. Santos VNC. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 2012.
28. Almeida JRGS, Araújo CS, Pessoa CO, Costa MP, Pacheco AGM. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona venetorum* Mart. (Annonaceae). *Rev Bras Frutic.* 2014;36:258-64. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500030>
29. Technical Committee ISO/TC 194. Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. ISO Guide 10993-5, 2009.
30. Suffness M, Pezzuto JM. *Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity*. London: Academic Press; 1991. 360 p.

---

**Submetido em:** 05/05/2023

**Aceito em:** 01/11/2023