Artigo

Composição Química e Atividade Antioxidante de *Acacia Polyphylla* (Fabaceae)

Cesarino, E. C.; Gomes, J. O. dos S.; Lessa, E. V.; Carvalho Junior, A. R. ; Vieira, I. J. C.; Carvalho, M. G.; Silva, T. M. S.; Ferreira, R. O.*

Rev. Virtual Quím., 2020, 12 (2), 424-432. Data de publicação na Web: 6 de Abril de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>

Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Acacia Polyphylla* (Fabaceae)

Abstract: This work describes the phytochemical study of the ethanol extract from the leaves of *Acacia polyphylla*, leading to the isolation and identification of five flavonoids (luteolin, isovitexin, quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside, quercetin 3-O- β -D-galactopyranoside and vitexin-2''-O-rhamnoside), three triterpenes (α -amirin, β -amirin and lupeol), four steroids (stigmast-22-en-3 β -ol, spinasterol, sitostanol and β -sitosterol) and an alkane (*n*-nonacosane). All compounds were identified by a combination of spectroscopic methods (^1H and ^{13}C NMR, including 2D, and UV), GC-MS, UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS and comparison with the literature data. Antioxidant activity, the total phenol content, the total flavonoid content and the scavenging activity against free radical DPPH were also evaluated. The ethyl acetate fraction presented the best result with EC_{50} value of $7.78 \pm 0.17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and total phenol and total flavonoid contents with values of $563.28 \pm 1.13 \text{ GAE.g}^{-1}$ and $217 \pm 0.17 \text{ QE.g}^{-1}$, respectively, suggesting the potential of *A. polyphylla* as a source of antioxidants.

Keywords: *Acacia polyphylla*; monjoleiro; phenolic; flavonoids; antioxidants.

Resumo

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Acacia polyphylla*, levando ao isolamento e identificação de cinco flavonoides (luteolina, isovitexina, quercetina 3-O- β -D-glicopiranosídeo, quercetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo e vitexina-2'-O-ramnosídeo), três triterpenos (α -amirina, β -amirina e lupeol), quatro esteroides (estigmast-22-en-3 β -ol, espinasterol, sitostanol e β -sitosterol) e um alceno (*n*-nonacosano). Todos os compostos foram identificados por uma combinação de métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo 2D e UV), CG-EM, UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS e comparação com dados da literatura. Na atividade antioxidante, teores de fenóis totais, flavonoides totais e atividade sequestradora frente ao radical livre DPPH foram avaliados. A fração acetato de etila apresentou o melhor resultado com valores de CE_{50} de $7,78 \pm 0,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e teores de fenóis totais e flavonoides totais com valores de $563,28 \pm 1,13 \text{ EAG.g}^{-1}$ e $217 \pm 0,17 \text{ EQ.g}^{-1}$, respectivamente, sugerindo o potencial de *A. polyphylla* como fonte de antioxidantes.

Palavras-chave: *Acacia polyphylla*; monjoleiro; fenólicos; flavonoides; antioxidantes.

* Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, CEP 44380-000, Cruz das Almas-BA, Brasil.

rafaelaoliveira@ufrb.edu.br
DOI: [10.21577/1984-6835.20200034](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200034)

Composição Química e Atividade Antioxidante de *Acacia Polyphylla* (Fabaceae)

Elaine C. Cesarino,^a Jakarta O. dos S. Gomes,^a Eliete V. Lessa,^a Almir R. de Carvalho Junior,^b Ivo J. C. Vieira,^c Mario G. de Carvalho,^d Tania M. S. da Silva,^e Rafaela O. Ferreira^{f,*}

^a Universidade Federal do Tocantins, Colegiado de Ciências Exatas e Biotecnológicas, CEP 77402-970, Gurupi-TO, Brasil.

^b Instituto Federal de Santa Catarina, Campus Criciúma, CEP 88813-600, Criciúma-SC, Brasil.

^c Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciência e Tecnologia, CEP 20000-000, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil.

^d Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, CEP 23851-970, Seropédica-RJ, Brasil.

^e Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

^f Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, CEP 44380-000, Cruz das Almas-BA, Brasil.

*rafaelaoliveira@ufrb.edu.br

Recebido em 27 de Julho de 2019. Aceito para publicação em 23 de Março de 2020

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

- 2.1. Procedimentos experimentais gerais
- 2.2. Coleta e identificação do material vegetal
- 2.3. Extração, isolamento e identificação dos constituintes químicos
- 2.4. Teor de fenóis totais
- 2.5. Teor de flavonoides totais
- 2.6. Atividade sequestradora do radical livre DPPH
- 2.7. Análise estatística

3. Resultados e Discussão

4. Conclusão

1. Introdução

Fabaceae ou Leguminosae é considerada, entre as plantas terrestres, a terceira maior família, com 730 gêneros e 19.400 espécies. É constituída pelas subfamílias Mimosoideae, Faboideae e

Caesalpinioideae, cujas espécies estão distribuídas por quase todos os continentes terrestres, com a exceção da Antártida.^{1,2} Corresponde a uma das famílias mais importantes da flora brasileira, com 178 gêneros e 3.170 espécies.³ Estas espécies despertam interesse econômico, por produzirem grãos comestíveis, como feijão e soja, madeiras

de qualidade, pelo uso medicinal e ornamental, dentre outros.^{4,5} Apesar de apresentarem um metabolismo secundário diversificado,⁶ a biossíntese de flavonoides e isoflavonoides é uma característica marcante destas espécies.⁷

Acacia Mill (subfamília Mimosoideae) é um gênero cosmopolita constituído por cerca de 1350 espécies, sendo um dos maiores gêneros da família Fabaceae.⁸ Os estudos químicos destas plantas levaram à caracterização de metabólitos secundários pertencentes a várias classes, tais como: flavonoides, cumarinas, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, triterpenos e esteroides.^{9,10} Entre as atividades biológicas relatadas destacam-se as propriedades antimicrobiana,¹¹ antioxidante,¹² alelopática,¹³ anti-inflamatória e analgésica.¹⁴

Acacia polyphylla DC, popularmente conhecida como monjoleiro, é uma espécie arbórea nativa do Brasil, muito utilizada na recuperação de áreas degradadas, em marcenaria e na curtição de couro.^{5,15} Há registros do uso medicinal da resina desta espécie no combate à tosse.^{16,17} Das suas sementes foi extraída uma proteína que apresentou atividade inseticida frente a *Anagasta kuehniella*.¹⁸ Com todo esse potencial, poucos são os dados relativos ao estudo químico e biológico desta espécie. Desta forma, são apresentados neste trabalho os resultados do estudo fitoquímico e da avaliação da atividade antioxidante de extratos de folhas de *A. polyphylla*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Procedimentos experimentais gerais

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de sílica gel PF₂₅₄ (Merck), as quais foram visualizadas sob luz UV 254 nm e reveladas com solução de cloreto férrico a 2 % e reagente de *Liebermann-Burchard*. As separações cromatográficas em coluna (CC) foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 (Vetec, 70-230 mesh) e Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences). As análises espectrofotométricas foram registradas em espectrofotômetro UV-VIS T60 (PG instruments). Os experimentos de RMN de ¹H e ¹³C (uni e bidimensionais) foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE II (500/125 MHz), utilizando-se CDCl₃ e CD₃OD como solventes e os sinais residuais destes em relação ao TMS

como referência. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos no espectrômetro GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu). As análises por cromatografia a líquido de ultra-eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas tipo triploquadropolo e tempo de voo (UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS) foram realizadas utilizando espectrômetro de massas XEVO-G2XSQTOF (Waters) conectado ao sistema ACQUITY UPLC (Waters) via ionização por eletrospray (ESI) e detector analítico DAD (Waters Acquity), comprimento de onda 200-400 nm.

2.2. Coleta e identificação do material vegetal

Folhas de *A. polyphylla* foram coletadas no campus da Universidade Federal do Tocantins (UFT) no município de Gurupi – TO, em agosto de 2017. Uma exsicata (n° 7485) desta espécie foi depositada no herbário HUTO, da Universidade Estadual do Tocantins (UNITINS). O procedimento de acesso ao patrimônio genético foi realizado e o projeto foi registrado no SisGen (Cadastro A02AEAF).

2.3. Extração, isolamento e identificação dos constituintes químicos

Folhas secas (200,0 g) foram trituradas e submetidas à extração com etanol (EtOH), através de maceração a temperatura ambiente. O material extraído após filtração foi concentrado sob pressão reduzida, fornecendo o extrato bruto em EtOH (APE - 8,2 g). Uma alíquota do extrato APE (7,0 g) foi solubilizada em uma solução de MeOH/H₂O (3:7) e submetido a partições líquido/líquido com solventes orgânicos de polaridade crescente, e foram obtidas as frações em *n*-hexano (APH - 2,9 g), CHCl₃ (APC - 0,2 g) e AcOEt (APAE - 1,3 g), respectivamente.

Uma alíquota da fração APAE (1,2 g) foi aplicada em cromatografia em coluna (CC) de Sephadex LH-20 usando MeOH como eluente, e foram obtidas 8 frações, após monitoramento por CCD. A sétima fração forneceu a substância **1** (20,0 mg). A sexta fração foi cromatografada novamente em Sephadex LH-20 usando MeOH como eluente e forneceu, respectivamente, a substância **2** (20,0 mg) e a mistura **M1** (**3** + **4** + **5**, 60,0 mg).

A fração APH (2,0 g) foi fracionada através de CC em sílica gel 60, empregando-se como eluentes *n*-hexano e AcOEt em gradiente crescente de

polaridade, fornecendo a substância **13** (125,0 mg) e as misturas **M2** (**6** + **7** + **8**, 128,0 mg) e **M3** (**9** + **10** + **11** + **12**, 70,0 mg). Além da técnica analítica de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , foram utilizadas técnicas acopladas para identificação das substâncias nas misturas **M1** (UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS) e **M2-M3** (CG-EM).

A análise dos triterpenos e esteroides por CG-EM foi realizada em cromatógrafo equipado com coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e espectrômetro de massas operando com ionização por elétrons (EI 70 eV) com faixa de massas m/z 40 a 550 Da, utilizando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL.min $^{-1}$. As condições de operação da análise cromatográfica das substâncias foram: temperatura inicial do forno de 150 °C por 1 minuto, com taxa de aquecimento de 10 °C.min $^{-1}$ até 290 °C, permanecendo por 10 minutos. A temperatura do injetor foi de 270 °C, da interface 310 °C e da fonte 250 °C. As substâncias foram identificadas por comparação dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca NIST.

A análise dos flavonoides por UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS foi realizada em cromatógrafo equipado com coluna Acquity BEH C18 (2,1 m x 50 mm x 1,7 μm) a 40 °C. A fase móvel binária consistiu de água com 0,1 % de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B). O fluxo foi de 0,4 mL.min $^{-1}$ e o volume de injeção foi de 5,0 μL . O programa de eluição por gradiente foi o seguinte: 0,0 – 5,0 min, 5 %-10 % B; 5,0 – 9,0 min, 10 %-95 %, o monitoramento foi feito em 340 nm. O espectrômetro de massas foi operado em modo negativo de ionização (ESI $^{-}$) no modo sensibilidade. A detecção foi realizada no modo centroide MS E em uma faixa de massa escolhida entre os valores de m/z 50-1200 Da. Todas as análises foram realizadas em lockspray, garantindo precisão e reprodutibilidade. Leucina-encefalina (10 ng.mL $^{-1}$) foi usada como substância de referência para calibração. Toda a aquisição e análise dos dados foram controladas utilizando o software Waters MassLynx.

Luteolina (1): Sólido marrom. RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} (mult.; J em Hz; H): 6,55 (s; H-3), 6,22 (d; J = 2,0; H-6), 7,38 (sl; H-2'), 6,92 (d; J = 8,8; H-5'), 7,40 (dd, J = 8,8 e 1,8; H-6'). RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) δ_{C} : 164,9 (C-2), 102,4 (C-3), 182,5 (C-4), 161,8 (C-5), 98,7 (C-6), 164,6 (C-7), 93,6 (C-8), 158,0 (C-9), 103,9 (C-10), 122,3 (C-1'), 112,7 (C-2'), 145,6 (C-3'),

149,6 (C-4'), 115,4 (C-5'), 118,9 (C-6'). EM m/z : 285,0286 [M-H].

Isovitexina (2): Sólido amarelo. RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} (mult.; J em Hz; H): 6,51 (s; H-3), 6,60 (s; H-8), 7,38 (sl; H-2'), 7,84 (d; J = 8,5; H-2'; H-6'), 6,93 (d; J = 8,5; H-3', H-5'), 4,92 (d; J = ; H-1'). RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) δ_{C} : 163,7 (C-2), 102,4 (C-3), 182,6 (C-4), 157,3 (C-5), 107,8 (C-6), 164,7 (C-7), 93,9 (C-8), 161,4 (C-9), 103,7 (C-10), 121,7 (C-1'), 128,0 (C-2'), 115,6 (C-3'), 160,6 (C-4'), 115,6 (C-5'), 128,0 (C-6'), 73,9 (C-1''). EM m/z : 431,0905 [M-H].

Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (3): Sólido amarelo. RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} (mult.; J em Hz; H): 6,22 (d; J = 2,1; H-6), 6,42 (d; J = 2,1; H-8), 7,86 (d; J = 2,2; H-2'), 6,88 (d; J = 8,5; H-5'), 7,60 (dd; J = 8,5 e 2,1; H-6'), 5,18 (d; J = 7,8; H-1'). RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) δ_{C} : 157,6 (C-2), 134,4 (C-3), 178,1 (C-4), 161,6 (C-5), 98,5 (C-6), 164,8 (C-7), 93,3 (C-8), 157,0 (C-9), 104,2 (C-10), 121,8 (C-1'), 116,3 (C-2'), 144,5 (C-3'), 148,5 (C-4'), 114,6 (C-5'), 121,5 (C-6'), 104,0 (C-1''). EM m/z : 463,0821 [M-H].

Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (4): Sólido amarelo. RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} (mult.; J em Hz; H): 6,22 (d; J = 2,1; H-6), 6,41 (d; J = 2,1; H-8), 7,72 (d; J = 2,2; H-2'), 6,89 (d; J = 8,5; H-5'), 7,60 (dd; J = 8,5 e 2,1; H-6'), 5,27 (d; J = 7,6; H-1'). RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) δ_{C} : 157,3 (C-2), 134,2 (C-3), 178,1 (C-4), 161,6 (C-5), 98,5 (C-6), 164,8 (C-7), 93,3 (C-8), 157,1 (C-9), 104,0 (C-10), 121,7 (C-1'), 116,1 (C-2'), 144,4 (C-3'), 148,4 (C-4'), 114,6 (C-5'), 121,4 (C-6'), 102,9 (C-1''). EM m/z : 463,0815 [M-H].

2.4. Teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Dennis,¹⁹ com modificações. Adicionou-se 2,5 mL do reagente de Folin-Denis em uma alíquota de 0,5 mL de solução de extrato (0,25 mg.mL $^{-1}$) e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução aquosa de Na_2CO_3 14 %. Após 2 horas, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro de UV-VIS em 760 nm. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado pela interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrão de ácido gálico (0 – 0,022 mg.mL $^{-1}$) e expressos como miligramas de equivalente ao ácido gálico por grama de extrato (mg EAG.g $^{-1}$).

2.5. Teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo metodologia descrita por Meda et al. (2005).²⁰ Neste ensaio, 3,0 mL de solução metanólica de AlCl_3 a 2 % foram adicionadas a 3,0 mL de solução de extrato ($0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Após 30 minutos de incubação, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro UV-VIS em 415 nm. O teor de flavonoides totais foi determinado pela interpolação da absorbância das amostras em uma curva de calibração construída com padrão de quercetina ($0 - 0,020 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e expressos como miligramas de equivalente de quercetina por grama de extrato.

2.6. Atividade sequestradora do radical livre DPPH

O ensaio da atividade sequestradora do radical livre DPPH foi realizado de acordo com Sousa et al. (2007),²¹ com modificações. Adicionou-se uma alíquota de 2,7 mL de solução de DPPH ($40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) a 0,3 mL de solução metanólica de extrato e frações, concentrações finais variaram de 2,0 a $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Após 30 minutos ao abrigo de luz, as absorbâncias foram lidas em 517 nm em espectrofotômetro UV-VIS. A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação (1):

$$\% \text{ AS} = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}} \quad (1)$$

Onde A_{amostra} é a absorbância do radical na presença do extrato e A_{controle} é a absorbância do radical na ausência do extrato. Os resultados foram expressos pelo valor de CE_{50} . A quercetina foi utilizada como controle positivo.

2.7. Análise estatística

As análises foram efetuadas em três repetições e os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Nas análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0 (DEMO).

3. Resultados e Discussão

A investigação fitoquímica das frações em hexano e acetato de etila das folhas de *Acacia polyphylla*, por técnicas cromatográficas clássicas,

resultou no isolamento e identificação da luteolina (**1**),²² isovitexina (**2**)²³ e *n*-nonacosano (**13**) e três misturas (**M1-M3**) de flavonoides e isoprenoides. A mistura **M1** é constituída pelos flavonoides quercetina-3-*O*- β -*D*-galactopiranosídeo (**3**),²⁴ quercetina-3-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo (**4**)²⁴ e vitexina-2''-*O*-ramnosídeo (**5**).²⁵ A mistura **M2** é formada pelos triterpenos pentacíclicos α -amirina (**6**), β -amirina (**7**) e lupeol (**8**)²⁶ e a mistura **M3** contém os esteroides estigmast-22-en-3 β -ol (**9**, 26 %), espinasterol (**10**, 41 %), sitostanol (**11**, 22 %) e β -sitosterol (**12**, 9 %).^{26,27} As estruturas das substâncias **1-4** e **6-11** foram elucidadas através de dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C , EM e comparação com dados da literatura. O flavonoide **5**, o esteroide **12** e o alcano **13** foram identificados pela análise dos espectros de massas e comparação com dados da literatura. As estruturas das substâncias identificadas são mostradas na figura 1.

A análise por UPLC-DAD da mistura **M1** contendo as substâncias **3** e **4** mostrou a presença de dois picos com espectros de UV exibindo duas bandas com máximos de absorção em 353 (banda I) e 255 (banda II), típicos de derivados de quercetina. Os espectros de massas de alta resolução destes picos apresentaram íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ com m/z 463,0821 e m/z 463,0815, respectivamente, compatíveis com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ destes isômeros. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para **M1** indicaram a presença de dois conjuntos de sinais com diferentes proporções, a comparação destes dados com a literatura sugeriu a presença da mistura de quercetina-3-*O*- β -*D*-galactopiranosídeo (**3**) e quercetina-3-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo (**4**).²⁴ No espectro de RMN de ^1H foram observados sinais de hidrogênios *meta* acoplados, característicos de anel A, atribuídos aos H-6/H-8 [δ_{H} 6,22/6,42 d, $J = 2,1 \text{ Hz}$ (**3**) e δ_{H} 6,22/6,41 d, $J = 2,1 \text{ Hz}$ (**4**)] e sinais característicos de sistema ABX, típicos de anel B de flavonoides 3', 4'-disubstituídos, atribuídos aos H-2'/H-5'/H-6' [δ_{H} 7,86 d, $J = 2,2 \text{ Hz}$ /6,88 d, $J = 8,5 \text{ Hz}$ /7,60 dd, $J = 8,5$ e $2,1 \text{ Hz}$ (**3**) e δ_{H} 7,72 d, $J = 2,2 \text{ Hz}$ /6,89 d, $J = 8,5 \text{ Hz}$ /7,60 dd, $J = 8,5$ e $2,1 \text{ Hz}$ (**4**)]. Estes grupos de sinais sugerem dois compostos polifenólicos derivados da aglicona quercetina. As unidades de carboidratos foram identificadas como galactopiranosídeo e glicopiranosídeo com deslocamentos químicos para H-1''/C-1'' em δ_{H} 5,18 d, $J = 7,8$ / δ_{C} 104,0 e δ_{H} 5,27 d, $J = 7,6$ / δ_{C} 102,9, respectivamente. A conectividade do

Figura 1. Estruturas das substâncias isoladas de *A. polyphylla*

carboidrato na molécula, em ambos os casos em C-3, foi confirmada com base nos deslocamentos químicos dos hidrogênios anoméricos, nas correlações $^3J_{\text{HC}}$ observadas no HMBC entre os sinais em δ 5,18/134,4 (H-1''/C-3) e δ 5,27/134,2 (H-1''/C-3), respectivamente, e comparação com dados da literatura.²⁴ A análise da mistura **M1** por UPLC-DAD-QTOF-MS/MS sugeriu a presença de outros componentes minoritários nesta fração. A tentativa de identificação do componente **5** foi proposta com base nas análises dos dados de UV, perfil de fragmentação e comparação com dados da literatura.²⁵ A substância **5** (T_R 4,30 min, $\lambda_{\text{máx}}$ 339 e 271) apresentou pico referente à molécula desprotonada em m/z 577,1356 [M-H]⁻ e os íons produtos característicos em m/z 431 [M-H-146]⁻, 413 [M-H-146-18]⁻ e 293 [M-H-284]⁻ permitiram identificá-la como vitexina-2''-O-ramnosídeo (**5**).²⁵ O íon produto em m/z 431 corresponde à perda de resíduo de ramnose (146 Da) e à perda posterior de uma molécula de água (18 Da) forma o íon produto em m/z 413.

A mistura **M2** de **6**, **7** e **8** revelou por injeção no sistema CG-EM dois picos, ambos com íons moleculares em m/z 426 (M⁺) e respectivos padrões de fragmentação similares aos da α -amirina, β -amirina e lupeol, estes, possivelmente coeluídos, conforme sugestão

da biblioteca NIST e dados da literatura.²⁶ O espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ) apresentou sinais em δ_C 124,4 e 139,6; 121,7 e 145,2; 109,3 e 150,9 característicos de α -amirina, β -amirina e lupeol, respectivamente. O espectro de RMN de ^1H confirmou as identificações destas substâncias através dos sinais δ_H 5,21 (t) e 5,15 (t) próprios do H-12 de α -amirina e β -amirina; δ_H 4,71 (sl) e 4,59 (sl) característico dos dois H-29 do lupeol; e δ_H 3,23 (m) do H-3, comum às três substâncias.

A mistura **M3** foi detectada em cromatoplacas de sílica e com injeção em CG-EM, que apresentou quatro picos com íons moleculares (M⁺) em m/z 414, 412, 416 e 414. A sugestão oferecida pela biblioteca NIST do sistema de injeção e a comparação dos dados de massas e RMN de ^1H e ^{13}C (DEPTQ) com dados da literatura^{26,27} permitiram propor as estruturas do estigmast-22-en-3 β -ol (**9**), espinasterol (**10**), sitostanol (**11**) e β -sitosterol (**12**).

Muitos heterosídeos de flavonóis e flavonas foram isolados de folhas, cascas e cerne de espécies de *Acacia*. Estudos com espécies australianas conduziram ao isolamento de flavonoides 7,3,4 e 7,8,4-substituídos, sendo uma característica da família Fabaceae a biossíntese de flavonoides com ausência do grupo 5-OH.¹⁰ Apesar dos flavonoides **1**, **2**, **3** e **4** já terem sido relatados em

espécies deste gênero,⁹ este é o primeiro relato da ocorrência da flavona **5** em *Acacia*. Todas as substâncias estão sendo descritas pela primeira vez nesta espécie.

Atividade antioxidante

As doenças neurodegenerativas como Alzheimer, aterosclerose, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica estão relacionadas com os radicais livres.²⁸ Estudos demonstraram que dietas enriquecidas com substâncias que combatem os radicais livres, como os polifenóis, parecem prevenir ou atenuar a deterioração orgânica causada pelo estresse oxidativo.²⁹

Na tabela 1 encontram-se o teor de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos de *A. polyphylla*. A fração em AcOEt de *A. polyphylla* apresentou o maior teor de fenóis totais ($563,28 \pm 1,13$ mg EAG.g⁻¹) e flavonoides totais ($217 \pm 6,46$ mg EQ.g⁻¹) em comparação às demais frações das folhas analisadas. Estudos com outras espécies de *Acacia* demonstraram que o teor de fenóis totais pode variar de acordo com o órgão da planta, solvente extrator e estação do ano.^{14,30} Os resultados obtidos sugerem que as folhas de *A. polyphylla* apresentam um moderado teor de fenóis totais em comparação a outras espécies deste gênero.

A atividade antioxidante medida através do radical estável DPPH mostra a capacidade de substâncias presentes nos extratos de *A. polyphylla* em sequestrar radicais livres do meio existente. O extrato e frações de folhas de *A. polyphylla* apresentaram atividade sequestradora de radical livre com CE₅₀ variando de $7,78 \pm 0,17$ a $263,98 \pm 14,10$ µg.mL⁻¹. Desta forma, podemos afirmar que todas as amostras analisadas apresentaram promissora atividade antioxidante. A fração em AcOEt das folhas apresentou a maior atividade

antioxidante dentre as amostras analisadas (CE₅₀ = $7,78 \pm 0,17$ µg.mL⁻¹), entretanto foi menos ativa que o padrão quercetina (Teste de Tukey, P<0,05). Extratos em EtOH de folhas de outras espécies do gênero *Acacia* (ex. *A. nilotica*, *A. catechu*, *A. salicina*, *A. laeta* e *A. hamulosa*) exibiram atividade antioxidante frente ao ensaio com DPPH com valores de CE₅₀ entre 18,26 e 255,83 mg.mL⁻¹.^{31,32}

A atividade antioxidante observada para a fração em AcOEt de folhas de *A. polyphylla* pode estar relacionada aos teores de fenóis e flavonoides quantificados nesta amostra. Os flavonoides luteolina, quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo, quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo, isovitexina e vitexina-2''-O-ramnosídeo identificados nesta fração apresentaram atividade antioxidante em modelos *in vitro* e *in vivo*.³³⁻³⁵ Estes resultados sugerem que *A. polyphylla* é uma nova fonte de antioxidantes naturais, que podem vir a atuar em doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

4. Conclusão

Este é o primeiro estudo fitoquímico da espécie *A. polyphylla* que resultou no isolamento e identificação de 13 substâncias, sendo uma inédita no gênero *Acacia*, o flavonoide vitexina-2''-O-ramnosídeo (**5**). Adicionalmente, relatamos o elevado teor de fenóis totais e flavonoides totais presentes no extrato e frações de folhas desta espécie e a promissora atividade sequestradora de radicais livres no ensaio do DPPH.

Agradecimentos

CNPq - UFT pela bolsa de iniciação científica.

Tabela 1. Teor de fenóis totais, flavonoides totais e atividade sequestradora do radical DPPH de extrato e frações de folhas de *A. polyphylla*

Extrato e frações	Teor de fenóis	Teor de flavonoides	DPPH
	mg EAG.g ⁻¹ de extrato	mg EQ.g ⁻¹ de extrato	(CE ₅₀ , µg.mL ⁻¹)
EtOH	262,72 ± 2,54	86,81 ± 0,42	48,18 ± 2,18
Hexano	259,95 ± 9,89	70,96 ± 2,03	263,98 ± 14,10
CHCl ₃	282 ± 14,32	40,50 ± 1,61	140,07 ± 4,05
AcOEt	563,28 ± 1,13	217 ± 6,46	7,78 ± 0,17
Quercetina	-	-	1,95 ± 0,01

Referências Bibliográficas

- ¹ Paula, O. C.; Oliveira, D. M. T. Ocorrência de coléteres em embriões de três espécies de *Chamaecrista* Moench (Fabaceae: Caesalpinioideae) *Revista Brasileira de Biociências* **2007**, *5*, 348. [Link]
- ² Dutra, V. F.; Garcia, F. C. P.; Lima, H. C. Caesalpinioideae (Leguminosae) nos Campos Rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **2008**, *22*, 547. [CrossRef]
- ³ Barroso, G.M.; Guimarães, E.F.; Ichaso, C.L.F.; Costa, C.G.; Peixoto, A.L.; Lima, H.C.; *Sistemática de Angiospermas do Brasil*, 3º Ed., Editora UFV: Viçosa, 1991.
- ⁴ Brandão, M. Plantas forrageiras do Cerrado. *Revista Informe Agropecuário* **1992**, *16*, 36.
- ⁵ Lorenzi, H; Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum: Nova Odessa, 1992.
- ⁶ Wink, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany* **2013**, *89*, 164. [CrossRef]
- ⁷ Veitch, N. C. Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Product Reports* **2013**, *30*, 988. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Maslin, B. R.; Miller, J. T.; Seigler, D. S. Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Australian Systematic Botany* **2003**, *16*, 1. [CrossRef]
- ⁹ Andrade, C. A.; Silva, V. C.; Peitz, C.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G.; Kerber, V. A. Revisão do gênero *Acacia* - atividades biológicas e presença de fenóis derivados do núcleo flavânico. *Visão Acadêmica* **2003**, *4*, 47. [Link]
- ¹⁰ Seigler, D. S. Phytochemistry of *Acacia* - Sensu lato. *Biochemical Systematic and Ecology* **2003**, *31*, 845. [CrossRef]
- ¹¹ Khalida, M.; Hassania, D.; Bilalb, M.; Buttc, Z. A.; Hamayunc, M.; Ahmadd, A.; Huang, D.; Hussainc, A. Identification of oral cavity biofilm forming bacteria and determination of their growth inhibition by *Acacia arabica*, *Tamarix aphylla* L. and *Melia azedarach* L. medicinal plants. *Archives of Oral Biology* **2017**, *81*, 175. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Singh, S.; Sharma, N. Evaluation of in vitro anti arthritic activity of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. Ex. Benth stem bark. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2016**, *5*, 1659. [Link]
- ¹³ Jelassi, A.; Ayeb-Zakhama, A. El; Nejma, A. B.; Chaari, A.; Fethia Harzallah-Skhiri, F.; Jannet, H. B. Phytochemical composition and allelopathic potential of three Tunisian *Acacia* species. *Industrial Crops and Products* **2016**, *83*, 339. [CrossRef]
- ¹⁴ Faujdar, S.; Sharma, S.; Sati, B.; Pathak, A.K.; Paliwal, S. K. Comparative analysis of analgesic and anti-inflammatory activity of bark and leaves of *Acacia ferruginea* DC. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* **2016**, *5*, 70. [CrossRef]
- ¹⁵ Araújo Neto, J. C.; Aguiar, I. B.; Ferreira, V. M.; Rodrigues, T. J. D. Armazenamento e requerimento fotoblástico de sementes de *Acacia polyphylla* DC. *Revista Brasileira de Sementes* **2005**, *27*, 115. [CrossRef]
- ¹⁶ Ronchi, H. S.; Bonfim, F. P. G.; Coutinho, E. T.; Martins, L. A.; Engel, V. L. Potencial medicinal de espécies arbóreas de um remanescente florestal da Floresta Estacional Semidecidual, na região central do estado São Paulo. *Enciclopédia Biosfera* **2016**, *13*, 986. [CrossRef]
- ¹⁷ Marreiros, N. De A.; Ferreira, E. da C.; Lucena, C. M.; Lucena, R. F. P. Conhecimento botânico tradicional sobre plantas medicinais no semiárido da Paraíba (Nordeste, Brasil). *Revista Ouricuri* **2015**, *5*, 110. [Link]
- ¹⁸ Machado, S. W.; Oliveira, C. F. R.; Bezerra, C. S.; Freire, M. G. M.; Kill, M. R.; Machado, O. L. T.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R. Purification of a Kunitz-type inhibitor from *Acacia polyphylla* DC seeds: characterization and insecticidal properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 2469. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **1999**, *299*, 152. [CrossRef]
- ²⁰ Meda, A.; Lamien, C. E.; Romito, M.; Millogo, J.; Nacoulma, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* **2005**, *91*, 571. [CrossRef]
- ²¹ Sousa; C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr., G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* **2007**, *30*, 351. [CrossRef]

- ²² Wahab, A.; Tahira; Begum, S.; Mahmood, I.; Ayub, A.; Mahmood, T.; Ahmad, A.; Fayyaz, N. Luteolin and Kaempferol from *Cassia Alata*. Antimicrobial and antioxidant activity of its Methanolic extracts. *FUUAST Journal of Biology* 2014, 4, 1. [Link]
- ²³ Girish, T. K.; Anil Kumar, K.; Prasada Rao, U. J. S. C-Glycosylated flavonoids from black gram husk: Protection against DNA and erythrocytes from oxidative damage and their cytotoxic effect on HeLa cells. *Toxicology Reports* 2016, 3, 652. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Pereira, C.; Barreto Júnior, C. B.; Kuster, R. M.; Simas, N. K.; Sakuragui, C. M.; Porzel, A.; Wessjohann, L. Flavonoids and a neolignan glucoside from *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Química Nova* 2012, 35, 1123. [CrossRef]
- ²⁵ Ferreira, R. O.; Carvalho Junior, A. R.; Silva, T. M. G.; Castro, R. N.; Silva, T. M. S.; Carvalho, M. G. Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2014, 24, 617. [CrossRef]
- ²⁶ Souza, A. D. L.; Rocha, A. F. I.; Pinheiro, M. L. B.; Andrade, C. H. S.; Galotta, A. L. A. Q.; Santos, M. P. S. S. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (Lecythidaceae). *Química Nova* 2001, 24, 439. [CrossRef]
- ²⁷ Lavoie, J. M.; Stevanovic, T. Selective ultrasound-assisted extractions of lipophilic constituents from *Betula alleghaniensis* and *B. papyrifera* wood at low temperatures. *Phytochemical Analysis* 2007, 18, 291. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Pôrto, W. G. Radicais Livres e Neurodegeneração. Entendimento Fisiológico: Base para Nova Terapia? *Revista Neurociências* 2001, 9, 70. [Link]
- ²⁹ Martins, G. V.; Alves, D. R.; Viera-Araújo, F. M.; Rondon, F.; Braz-Filho, R.; Morais, S. M. Estudo Químico e Avaliação das Atividades Antioxidante, Antiacetilcolinesterase e Antileishmanial de Extratos de *Jatropha gossypifolia* L. (Pião Roxo). *Revista Virtual de Química* 2018, 10, 21. [CrossRef]
- ³⁰ Gabr, S.; Nikles, S.; Wenzig, E. M. P.; Ardjomand-Woelkart, K.; Hathout, R. M.; El-Ahmady, S.; Motaal, A. A.; Singab, A.; Bauer, R. Characterization and optimization of phenolics extracts from *Acacia* species in relevance to their anti-inflammatory activity. *Biochemical Systematic and Ecology* 2018, 78, 21. [CrossRef]
- ³¹ Saha, M. R.; Kar, P.; Sen, A. Assessment of phytochemical, antioxidant and genetic diversities among selected medicinal plant species of Mimosoideae (Mimosaceae). *Indian Journal Traditional Knowledge* 2018, 17, 132. [Link]
- ³² Alam, P.; Alajmi, M. F.; Arbab, A. H.; Parvez, M. K.; Siddiqui, N. A.; Alqasoumi, S. I.; Al-Rehaily, A. J.; Al-Dosari, M. S.; Basudan, O. A. Comparative study of antioxidant activity and validated RP-HPTLC analysis of rutin in the leaves of different *Acacia* species grown in Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2017, 25, 715. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Lv, H.; Yu, Z.; Zheng, Y.; Wang, L.; Qin, X.; Cheng, G.; Ci, X. Isovitexin Exerts Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activities on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting MAPK and NF-κB and Activating HO-1/Nrf2 Pathways. *International Journal of Biological Sciences* 2016, 12, 72. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Ferreira, R. O.; Carvalho Junior, A. R.; Riger, C. J.; Castro, R. N.; Silva, T. M. S.; Carvalho, M. G. Constituintes químicos e atividade antioxidante *in vivo* de flavonoides isolados de *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). *Química Nova* 2016, 39, 1093. [CrossRef]
- ³⁵ Valentová, K.; Vrba, J.; Bancířová, M.; Ulrichová, J.; Křen, V. Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology* 2014, 68, 267. [CrossRef] [PubMed]