



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

***Zornia brasiliensis*: ESTUDO DE DESREPLICAÇÃO, ISOLAMENTO E
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CONSTITUINTES QUÍMICOS.**

YURI MANGUEIRA DO NASCIMENTO

JOÃO PESSOA
2019

YURI MANGUEIRA DO NASCIMENTO

***Zornia brasiliensis*: ESTUDO DE DESREPLICAÇÃO,
ISOLAMENTO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CONSTITUINTES
QUÍMICOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

COORIENTADOR: Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa

**JOÃO PESSOA
2019**

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N244z Nascimento, Yuri Mangueira do.

Zornia brasiliensis: ESTUDO DE DESREPLICAÇÃO,
ISOLAMENTO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CONSTITUINTES
QUÍMICOS. / Yuri Mangueira do Nascimento. - João
Pessoa, 2019.

260 f. : il.

Orientação: Josean Fachine Tavares.

Coorientação: Vicente Carlos de Oliveira Costa.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Compostos fenólicos. 2. Diidrochalcona. 3.
Zorniosídeo. 4. Isoflavonoide. 5. Megastigmano
glicosilado. 6. Atividade citotóxica. 7. Saponinas
triterpênicas. 8. Soyasaponinas. 9. CLAE-IES-EM/EM. I.
Tavares, Josean Fachine. II. Costa, Vicente Carlos de
Oliveira. III. Título.

UFPB/BC

YURI MANGUEIRA DO NASCIMENTO

***Zornia brasiliensis*: ESTUDO DE DESREPLICAÇÃO, ISOLAMENTO E
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CONSTITUINTES QUÍMICOS.**

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba (Campus I)
(Orientador)



Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa

Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba (Campus I)
(Coorientador)

Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo

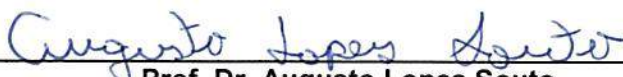
Doutor em Química Orgânica
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
(Examinador Externo)

Prof. Dr. Leandro De Santis Ferreira

Doutor em Ciências – Química Orgânica de Produtos Naturais
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
(Examinador Externo)

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhaes

Doutor em Farmacologia
Universidade Federal da Paraíba (Campus I)
(Examinador Interno)



Prof. Dr. Augusto Lopes Souto

Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba (Campus I)
(Examinador Interno)

Dedico este trabalho a minha família, em especial, aos meus pais: Daísio e Zenaide e meus irmãos: Caio e Larissa. Aqueles em quem me inspiro e que incansavelmente me estimulam a realizar todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela Sua enorme generosidade que se reflete em coragem e força para seguirmos na busca de nossos sonhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, um profissional exemplar e vocacionado a pesquisa e um ser humano de grande generosidade, com quem aprendi não apenas espectroscopia, cromatografia, etc., mas valores como a humildade e a gratidão.

Ao meu coorientador Dr. Vicente Carlos Oliveira Costa, pelos ensinamentos, pela ajuda diária no laboratório, pela amizade, pelos conselhos, enfim, por contribuir no processo de elaboração desse trabalho.

Aos professores Dr. Leandro De Santis Ferreira, Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhaes, Dr. Augusto Lopes Souto e a Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo, pelas relevantes contribuições prestadas neste trabalho e por participarem desta importante etapa da minha formação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva pelos ensinamentos diários, que nos faz sentir privilegiados em ter acesso a um ícone da pesquisa em Produtos Naturais no Brasil.

Ao Prof. Dr. José Iranildo Miranda de Melo pela identificação botânica da espécie estudada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral por disponibilizar o Laboratório ONCOFARM para realização dos testes de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho por toda disponibilidade em ajudar ao desenvolvimento do nosso trabalho.

Aos professores da pós-graduação por suas contribuições para minha carreira profissional.

A Lucas, vulgo Baiano, pelo companheirismo, por toda ajuda dada no decorrer desses quatro anos de pesquisa, com madrugadas inteiras no laboratório, com finais de semana dentro do laboratório para atingirmos nossos objetivos, pelo encorajamento a aprofundar o conhecimento em áreas que eram até então de difíceis compreensões, pelas aventuras vividas nas coletas de material botânico, pelas cervejas tomadas, que não foram poucas, enfim, que tantos outros desafios surjam e que possamos está juntos para encará-los.

A Ramon, aluno de iniciação científica, que se dedicou a me acompanhar na execução dos experimentos, foram dias árduos e dedicados, mas que no final conseguimos concluir nosso trabalho.

Ao amigo Evandro Ferreira por sua ajuda, disponibilidade e apoio, pelos conselhos e orações.

A Madalena, que sempre resolutiva e disponível sempre ajudou na solução das pendências, pelos conselhos e toda torcida.

A George, por sua amizade, pelo incentivo dado diariamente, pela torcida, pelas piadas que tornavam nosso dias mais sorridentes, pelas cervejas tomadas nos momentos de descontração.

A Antônio Marcos, que me ensinou a operar um cromatógrafo líquido de alta eficiência, que se tornou um grande amigo e esteve presente de maneira constante ao longo desse trabalho.

Ao técnico Raimundo Nonato por toda ajuda e ensinamentos necessários no laboratório de fitoquímica.

Aos técnicos Sócrates e Marcelo por sempre estar à disposição de ajudar e pelo aprofundamento das discussões científicas em torno dos experimentos desenvolvidos.

Aos colegas da turma de doutorado de 2016, Kaio, Rose, Márcio, Laiane, Andreza, Anderson e Diego pela convivência diária no laboratório, pelo compartilhamento de momentos alegres, pelos planejamentos científicos e troca de experiências, meu muito obrigado.

A todos que compõe o Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises, Ranna, Ana Rita, Gabriela, Pedro, Jociano, Arthur, Laisla, Natan, César, Edileuza, Joanda, Sabrina, Rodrigo, Juliana, Thallison, Nikole, Emilly, Andressa Nayara e Maíra, obrigado pelo apoio sempre encontrado em vocês.

A Junior, sempre solícito e disposto em nos ajudar, sempre nos cercando da sua prestação de serviço no LMCA, muito obrigado.

A Hidna e Lívia, pessoas que sempre me motivaram e estimularam a crescer cada dia mais, foram muito momentos alegres compartilhados ao longo desses anos.

A minha amiga Denise Leite que sempre me incentivou para que trilhasse os caminhos da pós-graduação, muito obrigado.

As amigas e parceiras que a pós-graduação me deu, Paula Benvindo, Tati Mota e Carol Lima, obrigado por sempre estarem presentes, apoiando, incentivando e torcendo pelo meu êxito.

Aos meus pais, Daísio e Zenaide. Por todo amor, compreensão, força, exemplo, por terem acreditado e me incentivado constantemente, afirmando que a vitória seria sempre vindoura como fruto dos nossos esforços. A minha eterna gratidão e admiração.

Aos meus irmãos Caio e Larissa, pelo carinho, compreensão, e incentivo.

A Maria de Fátima (Fafá), minha namorada, que tanto tem me apoiado ao longo desses anos, entendendo minhas ausências, me dando forças nos momentos difíceis, me incentivando a não desistir, a acreditar que é possível sonhar e realizar, muito obrigado.

À minha avó Maria Dalva (*in memoriam*), que com tanto amor me ensinou as primeiras letras e foi sempre uma grande incentivadora. E ao meu avô, Aluizio Batista, que tanto me cerca de cuidados, exemplos a serem seguidos, de reconhecimento e torcida.

Ao meu avô João Manguiera (*in memoriam*), a quem tanto admiro por sua sabedoria, inteligência e retidão.

A minha afilhada, Maria Fernanda, quem tanto se preocupou e torceu pelo sucesso nessa caminhada.

Aos tios, primos pelo apoio sempre encontrado, a confiança sempre depositada, e sem dúvidas ao estímulo para que pudesse chegar até aqui.

Aos amigos Fidélis, Valdinar, José Antônio, Itamar Júnior, Deusdedit Filho, Domingos, José Adriano e Pablo que sempre apoiaram, motivaram, que entenderam minhas ausências decorrentes da dedicação a este trabalho e que mesmo assim, me fizeram acreditar que tudo isto valeria a pena.

A Universidade Federal da Paraíba.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“Muitos pensam que ter talento é sorte; não vem à mente de ninguém que a sorte pode ser uma questão de talento.”.

(Jacinto Benavente y Martínez, *Vidas Cruzadas*)

RESUMO

Estudos com extratos de espécies vegetais refletem em pontos básicos, como: desenvolvimento de medicamentos, informações sobre eficácia e segurança daquelas espécies com uso etnomedicinais, descoberta de novos usos terapêuticos e contribuição ao conhecimento da memória químico-biológica de espécies vegetais. A espécie *Zornia brasiliensis* Vogel pertence à família Leguminosae, o gênero *Zornia* possui cerca de 80 espécies no mundo, com representantes na América, África, Oceania e a Ásia. *Z. brasiliensis* é conhecida popularmente como “urinária”, “urinana” e “carrapicho” e seu uso popular é relatado como diurética e para tratamento de doenças venéreas, encontra-se distribuída em vários estados do Brasil, sendo abundante no Nordeste. Este trabalho tem como objetivo contribuir com a ampliação do conhecimento químico do gênero *Zornia* através do isolamento, identificação e/ou caracterização de metabólitos secundários da espécie *Z. brasiliensis*. Partes aéreas de *Z. brasiliensis* foram coletadas no município de Serra Branca, estado da Paraíba. Uma exsiccata foi depositada no Herbário Arruda Câmara (HACAM) do Campus I da Universidade Estadual da Paraíba. O material vegetal, após seco e moído, foi submetido a uma maceração com etanol a 95% por 72 horas, sendo esse processo repetido por quatro vezes, obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB). Uma alíquota do EEB (100,0g) foi submetida a separação por cromatografia líquida à vácuo (CLV) com sílica utilizando como fase móvel os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Uma alíquota da fração acetato de etila-metanol 50% foi submetido ao processo de separação por cromatografia em coluna para realizar um novo fracionamento. Em seguida foi desenvolvido um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), posteriormente, transposto para uma escala preparativa, resultando no isolamento de nove compostos, o roseosídeo, 7-metoxiflavanona, 7,4'-dimetoxisoflavona, isoorientina-3'-O-metil éter, isovitexina, ácido (Z)-O-cumárico glicosilado, ácido (E)-O-cumárico glicosilado, diidromelilotosídeo e o zorniosídeo, uma diidrochalcona C-glicosilada relatada pela primeira vez na literatura. O zorniosídeo apresentou potencial citotóxico frente a linhagem celular HL-60. Outra alíquota da fração acetato de etila-metanol 50% foi submetido a uma metodologia específica de extração de saponinas, esta foi então submetida a CLAE-DAD preparativa, que resultou no isolamento da Soyasaponina II. Além disso, foi desenvolvida uma metodologia por CLAE-IES-DAD-EM/EM que possibilitou por desreplicação e/ou análise estrutural a caracterização putativa de 35 saponinas triterpênicas oleânicas. Sendo assim, esse trabalho contribui com o conhecimento químico e farmacológico desta espécie, pois corroborou com bioprodução de compostos fenólicos por *Zornia* através do estudo fitoquímico de *Zornia brasiliensis*, mostrou o potencial citotóxico do zorniosídeo e é o primeiro relato da presença de saponinas em *Zornia*, que é uma classe de metabólitos secundários com relevante importância biológica, farmacêutica, na indústria cosmética e agricultura.

Palavras chaves: Compostos fenólicos. Diidrochalcona. Zorniosídeo. Isoflavonoide. Megastigmano glicosilado. Atividade citotóxica. Saponinas triterpênicas. Soyasaponinas. CLAE-IES-EM/EM.

ABSTRACT

Studies with extracts of plant species reflect on basic points, such as: drug development, information on efficacy and safety of those species with ethnomedicinal use, discovery of new therapeutic uses and contribution to the knowledge of the chemical-biological memory of plant species. The *Zornia brasiliensis* Vogel species belongs to the Leguminosae family, the *Zornia* genus has about 80 species throughout the world, distributed in several continents, such as: America, Africa, Oceania and Asia. *Z. brasiliensis* is popularly known as “urinary”, “urinana” and “carrapicho” and its popular use is reported as a diuretic and for the treatment of venereal diseases. It occurs in several states of Brazil, being abundant in the Northeast. This work aims to contribute to the chemical knowledge expansion of the genus *Zornia* through the isolation, identification and/or characterization of secondary metabolites from the species *Z. brasiliensis*. Aerial parts of *Z. brasiliensis* were collected in the municipality of Serra Branca, state of Paraíba. A specimen was deposited in the Herbarium Arruda Câmara (HACAM) of Universidade Estadual da Paraíba Campus I. After drying and milling, the plant material was macerated with 95% ethanol for 72 hours; this process was repeated four times, in order to obtain the crude ethanol extract (CEE). An aliquot of CEE (100.0g) was subjected to vacuum liquid chromatography (VLC) with silica as stationary phase and hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol as mobile phase. An aliquot of the fraction of ethyl acetate-methanol 50% was subjected to column chromatography to carry out a prior fractionation of this fraction. An analytical method was then developed by HPLC-DAD, then transposed to a preparative scale, resulting in the isolation of nine compounds, roseoside, 7-methoxyflavanone, 7,4'-dimethoxyisoflavone, isoorientin-3'-O-methyl ether, isovitexine, glycosylated (*Z*)-O-coumaric acid, glycosylated (*E*)-O-coumaric acid, dihydroelylotoside and zornioside, a C-glycosylated dihydrochalcona first reported in the literature. Another aliquot of the fraction ethyl acetate-methanol 50% was submitted to a specific saponin extraction methodology, which afterwards was subjected to preparative HPLC-DAD, leading to the isolation of Soyasaponin II. In addition, a methodology was developed by HPLC-ESI-DAD-MS/MS, enabling the dereplication and/or structural analysis by the putative characterization of 35 oleanan-triterpene saponins. Finally, this work contributes to the chemical and pharmacological knowledge of this species, once it has corroborated with *Zornia*'s bioproduction of phenolic compounds through the *Zornia brasiliensis* phytochemical study, besides, it has demonstrated the cytotoxic potential of zornioside and has reported saponins in the *Zornia* genus for the first time, which is a class of secondary metabolites of relevant biological, pharmaceutical, cosmetic and agricultural importance.

Keywords: Phenolic compounds. Dihydrochalcone. Zornioside. Isoflavonoid. Glycosylated megastigmane. Cytotoxic activity. Triterpene saponins. Soyasaponins. HPLC-ESI-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa de calor da distribuição das espécies de Leguminosae no mundo.	29
Figura 2 Mapa de calor da distribuição geográfica do gênero <i>Zornia</i> no mundo.	31
Figura 3 <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel.	34
Figura 4 Distribuição de <i>Zornia brasiliensis</i> no Brasil.	34
Figura 5 Artículos do lomento do <i>Zornia brasiliensis</i>	35
Figura 6 Ilustração dos aspectos anatômicos de <i>Zornia brasiliensis</i>	38
Figura 7 Exemplos de saponinas: (A) triterpênica e (B) esteroidal. O tracejado divide as moléculas em parte apolar (sapogenina) e polar (açúcares).	44
Figura 8 Exemplos de triterpenos (sapogeninas) pentacíclicos.	45
Figura 9 Estruturas químicas dos compostos 1-9 de <i>Z. brasiliensis</i>	72
Figura 10 Correlações HMBC ($\rightarrow$) e a interação ^1H - ^1H COSY (ligação escura) para 1	75
Figura 11 Comparação de espectros de ECD de (βR) –Zornoside (a) e (βS) –Zornoside (b) simulados usando formas de banda Gaussianas ($\sigma = 0,4$ eV), ao espectro de EDC experimental (c).	75
Figura 12 Comparação dos espectros EDC de (2S) -7-metoxiflavona, simulado usando formas de banda Gaussiana ($\sigma = 0,4$ eV), ao espectro EDC experimental.	77
Figura 13 Comparação dos espectros de EDC de (6S, 9S) roseósido simulado usando formas de banda gaussianas ($\sigma = 0,6$ eV), ao espectro EDC experimental.	81
Figura 14. As estruturas dos compostos 1 – 9 isolados de <i>Zornia brasiliensis</i>	91
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	92
Figura 16. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	93
Figura 17. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	94
Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	95
Figura 19. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	96
Figura 20. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	97
Figura 21. Espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	98
Figura 22. Expansão do espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	99
Figura 23. Espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	100
Figura 24. Expansão do espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	101
Figura 25. Expansão do espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	102
Figura 26. Espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	103
Figura 27. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 1	104

Figura 28. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 1 .	105
Figura 29. Espectro de RMN - NOESY (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 1 .	106
Figura 30. Espectro de HR-IES-EM do composto 1 .	107
Figura 31. Espectro de IV do composto 1 .	108
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 2 .	109
Figura 33. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 2 .	110
Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 2 .	111
Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, 125 MHz, CDCl_3) do composto 2 .	112
Figura 36. Espectro de RMN - NOESY (500 MHz, CDCl_3) do composto 2 .	113
Figura 37. Espectro de EDC de (2 <i>R</i>)-7-metoxiflavanona simulado usando formas de banda Gaussianas (a, $\sigma = 0.4$ eV) (a), (4 <i>S</i>)-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(1 <i>E</i> ,3 <i>R</i>)-3- {[(2' <i>S</i> ,3' <i>S</i> ,4' <i>R</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy}but-1-en-1- yl]cyclohex-2-en-1-one (b, $\sigma = 0.6$ eV) (b), (4 <i>R</i>)-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(1 <i>E</i> ,3 <i>R</i>)-3- {[(2' <i>S</i> ,3' <i>S</i> ,4' <i>R</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy}but-1-en-1- yl]cyclohex-2-en-1-one (c, $\sigma = 0.6$ eV) (c), (4 <i>R</i>)-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(1 <i>E</i> ,3 <i>S</i>)-3- {[(2' <i>S</i> ,3' <i>S</i> ,4' <i>R</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy}but-1-en-1- yl]cyclohex-2-en-1-one (d, $\sigma = 0.6$ eV) (d).	114
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 3 .	115
Figura 39. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 3 .	116
Figura 40. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 3 .	117
Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 3 .	118
Figura 42. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 3 .	119
Figura 43. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 3 .	120
Figura 44. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 4 .	121
Figura 45. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 4 .	122
Figura 46. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 4 .	123
Figura 47. Espectro de ^{13}C -RMN (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 4 .	124
Figura 48. Espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 4 .	125
Figura 49. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 4 .	126
Figura 50. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 4 .	127
Figura 51. Espectro de RMN de ^1H - (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 5 .	128
Figura 52. Expansão do espectro de RMN de ^1H - (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 5 .	129
Figura 53. Expansão do espectro de RMN de ^1H - (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 5 .	130
Figura 54. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 5 .	131
Figura 55. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 6 .	132
Figura 56. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 6 .	133

Figura 57. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 6 . .	134
Figura 58. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 6	135
Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 7	136
Figura 60. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 7 . .	137
Figura 61. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 7 . .	138
Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 7	139
Figura 63. Espectro de IES-EM do composto 8	140
Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 8	141
Figura 65. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 8 . .	142
Figura 66. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 8 . .	143
Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 8	144
Figura 68. Espectro de IES-EM do composto 9	145
Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 9	146
Figura 70. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 9 . .	147
Figura 71. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 9 . .	148
Figura 72. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 9 . .	149
Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 9	150
Figura 74. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 9	151
Figura 75. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 9	152
Figura 76. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto 9	153
Figura 77. Espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 9	154
Figura 78. Espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 9	155
Figura 79. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto 9	156
Figura 80. Cromatograma do pico base (BPC) obtido por ESI-MS/MS em modo negativo da fração rica em saponinas.	159
Figura 81. Soyasaponin II (25) isolada de <i>Z. brasiliensis</i> .() indica algumas correlações chaves de HMBC para o composto 25	161
Figura 82. Agliconas tentativamente identificadas por espectrometria de massas de <i>Z.</i> <i>brasiliensis</i>	165
Figura 83. Via de fragmentação dos compostos 1 (m/z 925,4800) e 2 (m/z 779,4239) que possuem a Wistariasapogenol A (m/z 471) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.	166
Figura 84. Via de fragmentação dos compostos 3 (m/z 797,4310) e 4 (m/z 943,4912) que possuem a Kudzusapogenol A (m/z 485) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.	167

Figura 85. Via de fragmentação dos compostos 5 (<i>m/z</i> 957,5056), 8 (<i>m/z</i> 811,4459), 6 (<i>m/z</i> 927,4943), 7 (<i>m/z</i> 781,4350) e 14 (<i>m/z</i> 649,3933), que possuem a Soysapogenol A (<i>m/z</i> 473) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.	168
Figura 86. Via de fragmentação dos compostos 9 (<i>m/z</i> 985,4961) e 10 (<i>m/z</i> 839,4404) que possuem a Aglicona II (<i>m/z</i> 531) em ESI-MS/MS modo negativo.	168
Figura 87. Via de fragmentação dos compostos 11 (<i>m/z</i> 997,5022), 12 (<i>m/z</i> 851,4412), 13 (<i>m/z</i> 967,4901) e 15 (<i>m/z</i> 821,4303), que possuem a Aglicona II (<i>m/z</i> 513) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.	169
Figura 88. Via de fragmentação do composto 20 (<i>m/z</i> 837,4603) que possui 22-O-acetato-Soyasapogenol B (<i>m/z</i> 499) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.	170
Figura 89. Via de fragmentação dos compostos 16 (<i>m/z</i> 999,5135), 18 (<i>m/z</i> 853,4559), 17 (<i>m/z</i> 969,5074), 19 (<i>m/z</i> 823,4463) e 22 (<i>m/z</i> 691,4042), que possuem a Aglicona I (<i>m/z</i> 515) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.	170
Figura 90. Via de fragmentação dos compostos 21 (<i>m/z</i> 939,4935), 31 (<i>m/z</i> 793,4348), 32 (<i>m/z</i> 909,4843), 33 (<i>m/z</i> 763,4286) e 35 (<i>m/z</i> 631,3856), que possuem a Soysapogenol E (<i>m/z</i> 455) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.	171
Figura 91. Via de fragmentação dos compostos 23 (<i>m/z</i> 941,5123), 24 (<i>m/z</i> 795,4520), 25 (<i>m/z</i> 911,5006), 26 (<i>m/z</i> 765,4418) e 29 (<i>m/z</i> 633,3998), que possuem a Soysapogenol B (<i>m/z</i> 457) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.	172
Figura 92. Via de fragmentação dos compostos 28 (<i>m/z</i> 779,4562), 30 (<i>m/z</i> 895,5043) e 34 (<i>m/z</i> 749,4485) que possuem a Olean-12-eno-3 β ,24-diol (<i>m/z</i> 441 ou 439) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.	173
Figura 93. Via de fragmentação proposta para o composto 27 em ESI-MS/MS modo negativo. Via que se estende de maneira semelhante aos compostos 28 , 30 e 34 , gerando os íons fragmentos <i>m/z</i> 441 e <i>m/z</i> 439 atribuídos a aglicona Olean-12-eno-3 β ,24-diol. ...	173
Figura 94. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25	183
Figura 95. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25	184
Figura 96. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25	185
Figura 97. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25	186
Figura 98. Espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) de 25	187
Figura 99. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) de 25	188
Figura 100. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) de 25	189
Figura 101. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) de 25	190
Figura 102. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) de 25	191
Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135, 100 MHz, DMSO- d_6) de 25	192
Figura 104. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135, 100 MHz, DMSO- d_6) de 25	193
Figura 105. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135, 100 MHz, DMSO- d_6) de 25	194
Figura 106. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135, 100 MHz, DMSO- d_6) de 25	195
Figura 107. Espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25	196
Figura 108. Expansão do espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25	197

Figura 109. Expansão do espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25	198
Figura 110. Expansão do espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25	199
Figura 111. Espectro de RMN - HSQC (500 x 100 MHz, DMSO- d_6) de 25	200
Figura 112. Expansão do espectro de RMN - HSQC (500 x 100 MHz, DMSO- d_6) de 25 . .	201
Figura 113. Expansão do espectro de RMN - HSQC (500 x 100 MHz, DMSO- d_6) de 25 . .	202
Figura 114. Espectro de RMN - HMBC (500 x 125 MHz, DMSO- d_6) de 25	203
Figura 115. Expansão do espectro RMN - HMBC (500 x 125 MHz, DMSO- d_6) de 25	204
Figura 116. Expansão do espectro de RMN - HMBC (500 x 125 MHz, DMSO- d_6) de 25	205
Figura 117. Expansão do espectro de RMN - HMBC (500 x 125 MHz, DMSO- d_6) de 25 . .	206
Figura 118. Espectro de HR-IES-EM de 25	207
Figura 119. Espectro de IES-EM/EM no modo negativo com as fragmentações do íon m/z 911,4973, referente à ionização da saponina 25	208
Figura 120. O espectro de IES-EM/EM do composto 1 e 2	209
Figura 121. O espectro de IES-EM/EM do composto 3 e 4	210
Figura 122. O espectro de IES-EM/EM do composto 5 , 7 , 8 e 14	211
Figura 123. O espectro de IES-EM/EM do composto 9 e 10	212
Figura 124. O espectro de IES-EM/EM do composto 11 , 12 , 13 e 15	213
Figura 125. O espectro de IES-EM/EM do composto 16 , 18 , 19 e 22	214
Figura 126. O espectro de IES-EM/EM do composto 20	215
Figura 128. O espectro de IES-EM/EM do composto 24 , 26 , e 29	216
Figura 127. O espectro de IES-EM/EM do composto 21 , 31 , 32 , 33 e 35	217
Figura 129. O espectro de IES-EM/EM do composto 27 , 28 , 30 e 34	218

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Via do ácido chiquímico na biossíntese dos compostos fenólicos.	40
Esquema 2 Via mista da biossíntese de flavonoides e inter-relação entre as diferentes classes de flavonoides.	41
Esquema 3 Mecanismo de ação das reações de O-glicosilação e C-glicosilação dos flavonoides.	42
Esquema 4 Obtenção e fracionamento do EEB de <i>Z. brasiliensis</i>	54
Esquema 5 Obtenção da fração concentrada de saponinas (FrST).	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Substâncias isoladas de <i>Zornia diphylla</i>	33
Quadro 2 Substâncias isoladas de <i>Zornia brasiliensis</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividades farmacológicas descritas na literatura das espécies de <i>Zornia</i>	32
Tabela 2- Atividades farmacológicas de <i>Zornia brasiliensis</i>	36
Tabela 3. Classificação dos compostos fenólicos de acordo com seus esqueletos.	39
Tabela 4 Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 1	74
Tabela 5 Atividade citotóxica contra células tumorais e não tumorais do zornosídeo.	82
Tabela 6. Caracterização das saponinas tentativamente identificadas por HPLC-ESI-MS/MS em <i>Z. brasiliensis</i>	162
Tabela 7. Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de 25 em DMSO- d_6 (100 e 500 MHz, respectivamente) com o da sapogenina da Soyasaponina II em Piridina- d_5 (100 e 300 MHz) [30] e DMSO- d_6 (100 e 400 MHz) [31].	181
Tabela 8. Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de 25 em DMSO- d_6 (100 e 500 MHz, respectivamente) com os açúcares da Soyasaponina II em Piridina- d_5 (100 e 300 MHz) [30] e DMSO- d_6 (100 e 400 MHz) [31].	182

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

APT	<i>Attached Proton Test</i>
BB	<i>Broad band</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a espectrômetro de massas em <i>tandem</i>
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dubleto
DC	Dicroísmo circular
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsufóxido deuterado
IC₅₀	Concentração Inibitória Média
ECD	<i>Electronic Circular Dichroism</i>
EDC	Espectro de dicroísmo circular
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EM	Espectrometria de massas
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IES	Ionização por eletrospray
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MeOH	Metanol
<i>m</i>	Multiplete
MHz	Mega-hertz

NOESY	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
PPgPNSB	Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
ppm	Partes por milhão
<i>q</i>	Quarteto
Rfs	Fatores de retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
<i>s/</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Tripleto
Tab.	Tabela
T_R	Tempo de retenção
δ	Deslocamento químico em ppm

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	29
3.1 Considerações sobre a família Leguminosae	29
3.2 Considerações sobre o gênero <i>Zornia</i>	31
3.3 Considerações sobre <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel	34
3.4 Compostos fenólicos	39
3.5 Saponinas	44
3.6 Desreplicação: uma eficiente estratégia na identificação de saponinas	47
3.7 Atividade antitumoral e o uso de produtos naturais	49
4 PARTE EXPERIMENTAL	53
4.1 Estudo Fitoquímico	53
4.1.1 Coleta do material botânico	53
4.1.2 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB)	53
4.1.2.1 Materiais e métodos empregados no isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Zornia brasiliensis</i>	55
4.1.2.2 Processamento cromatográfico da fração diclorometano	56
4.1.2.3 Processamento cromatográfico da fração acetato-metanol 50%	57
4.1.3.4 Obtenção da fração concentrada de saponinas (FrST)	57
4.1.3.4.1 Processamento cromatográfico da FrST	59
4.1.3.4.2 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao Detector de Arranjos de Fotodiodo e ao Espectrômetro de Massas (CLAE-DAD- EM) da FrST	59
4.2 Ensaio de citotoxicidade	60
4.3 Cálculo teórico do Dicroísmo Circular (EDC)	60
5. RESULTADOS	63
5.1 Manuscrito intitulado: “Zornioside, uma diidrochalcona C-glicosilada, e outros compostos de <i>Zornia brasiliensis</i> ” submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia.	63

5.2 Manuscrito intitulado: “Rápida caracterização de saponinas triterpênicas por CLAE-ESI-EM/EM de <i>Zornia brasiliensis</i> ” submetido à <i>Molecules</i>	157
6 CONCLUSÕES	220
REFERÊNCIAS	222
APÊNDICE A – Artigo publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia	237
APÊNDICE B – Artigo publicado em <i>Molecules</i>	244

O1 | INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A busca pela cura ou o alívio de doenças pelo homem, desde tempos antigos, através do uso de ervas, folhas ou chás revelam o quão importante os produtos naturais foram para sociedades humanas, sendo sua utilização incorporada à cultura de cada povo. (SILVA; BEZERRA; FERNANDES, 2018; SIMÕES; ALMEIDA, 2015). Segundo Duarte et al. (2014), isso se deve a facilidade de acesso e principalmente ao conhecimento adquirido pela população sobre a eficácia terapêutica dos vegetais.

Há relatos sobre o uso de plantas medicinais no *Papyrus Ebers*, no Egito Antigo, em sociedades pré-históricas: europeia e pré-colombiana de 3000 a.C., na China, os registros de cultivo de plantas medicinais também datam desse período, o que de fato remonta à antiguidade o conhecimento das propriedades terapêuticas e a sua utilização. No Brasil, a prática de uso de plantas para tratamento de doenças, para ajudar na pesca e no preparo de corantes são anteriores a colonização (SILVA; BEZERRA; FERNANDES, 2018; SILVA, 2015).

Os vegetais produzem uma variedade de compostos químicos denominados fitoquímicos os quais são metabólitos. Cada espécie de planta sintetiza tipos e concentrações distintas de metabólitos que podem ser divididos em primários e secundários. Os compostos fitoquímicos além de manterem as atividades fisiológicas dos vegetais, ainda os protegem de agressões externas, a exemplo de fungos, insetos, bactérias e animais que se alimentam dessas plantas (DUARTE et al., 2014).

Os primeiros isolamentos desses fitoquímicos ocorreram no Reino Unido, no século XIX, com compostos da classe dos ácidos e bases orgânicos, que posteriormente foram denominados de alcaloides. Ainda nessa época, foram isolados de vegetais a morfina, quinina e estricnina. Esse fato colocou os produtos naturais em uma nova era, pois substâncias oriundas de vegetais poderiam ser purificadas, estudadas e administradas em doses precisas (MENEZES-FILHO; CASTRO, 2019; LI; VEDERAS, 2009).

Nesse contexto, as plantas medicinais assumem um papel relevante, ser uma importante alternativa terapêutica para recuperação e manutenção da saúde. Concentrando-se principalmente nas camadas sociais de baixa renda, sendo utilizada com a finalidade de auxiliar ou de substituir terapias convencionais no tratamento de doenças. Contudo, em países industrializados o uso de produtos da

medicina tradicional é igualmente significativa, como o Canadá, França, Alemanha e Itália, onde 70% a 90% de sua população têm usado esses recursos da medicina tradicional. O baixo custo e o grande potencial curativo tem favorecido o aumento do uso destas plantas medicinais pelas sociedades industrializadas ao longo dos anos (CORDEIRO, 2018; BRASIL, 2012).

No Brasil, cerca de 90 % da população já fez uso nos últimos anos de alguma planta medicinal. Uma explicação para este fato se deve aos hábitos herdados dos povos indígenas e da colonização portuguesa, que propiciou a importação de especiarias e ervas asiáticas (China e Índia). E o consumo dessas plantas medicinais é crescente, uma vez que existe a crença que são medicamentos mais “saudáveis”, entretanto, existe sérios riscos de contaminação para os consumidores devido a escassez de um adequado controle de qualidade (LACERDA, 2016).

Firmino e colaboradores (2011) são ainda mais contundentes, ao afirmar que a maioria das plantas medicinais possui informações técnicas insuficientes, sem garantir qualidade, eficácia e segurança de uso. Nesse sentido, é importante que as pesquisas possuam uma rigorosa identificação botânica, tenham parâmetros de qualidade bem estabelecidos para o uso, pois assim, podem-se evitar intoxicações, efeitos colaterais e uso inadequado (PAULA, et al., 2008).

Outro ponto relevante nos estudos fitoquímicos foi o aprimoramento das técnicas hífenadas de espectrometria e espectroscopia (CLAE-EM, CLAE-RMN, CLAE-RMN-EM), métodos de isolamento e identificação de substâncias, síntese orgânica, quimioinformática e genômica. O que trouxe solução para algumas limitações que existiam até então, a exemplo de manutenção da qualidade do extrato, isolamento em pequenas quantidades de substâncias e complexidade estrutural das moléculas. Deste modo, a pesquisa de produtos naturais voltou a ser uma área de sucesso no desenvolvimento de fármacos (MARTINS, 2017).

Com a capacidade de sintetizar vários compostos com propriedades terapêuticas a partir de seu metabolismo, os vegetais se tornam uma potencial fonte de obtenção de novos medicamentos. As pesquisas com vegetais podem contribuir para o desenvolvimento de novos fitoterápicos, isolamento e elucidação estrutural de novos compostos com potencial terapêutico, com o surgimento de modelos para modificações estruturais e organização de propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo de inspiração para químicos orgânicos na construção de

novos arranjos moleculares naturais. (CORDEIRO, 2018; MINGUZZI; BARATA; CORDELL, 2011).

Nesse cenário, o Brasil ocupa um lugar de destaque, pois é o país com a maior diversidade de espécies no mundo, distribuídas em três ecossistemas marinhos e seis biomas terrestres. São relatadas mais de 43.020 espécies vegetais. As diferentes zonas climáticas beneficiam o surgimento de diferentes zonas biogeográficas (biomas) como a floresta amazônica, o pantanal, o cerrado e a caatinga (BRASIL, 2019a).

Exclusivamente brasileiro, o bioma Caatinga ocupa quase 11% do país (844.453 km²), entretanto, ainda é o menos conhecido, já que as coletas ainda são escassas no mesmo. Foram catalogadas aproximadamente 930 espécies vegetais, com muitas ocorrências exclusivas. É o bioma semi-árido mais biodiverso do mundo (BRASIL, 2019b). Por se tratar do ecossistema/bioma maior da região Nordeste e a adaptação dos vegetais a fatores típicos como alta luminosidade, déficit hídrico e altas temperaturas, tornam esses vegetais pertencentes à caatinga extremamente atrativos para estudos sobre produção e acumulação de compostos químicos com potenciais atividades biológicas.

Gomes e colaboradores (2016) afirmam que estudos com extratos de espécies vegetais refletem em pontos básicos, como: desenvolvimento de medicamentos, informações sobre eficácia e segurança daquelas espécies com uso etnomedicinais, descoberta de novos usos terapêuticos e contribuição ao conhecimento da memória químico-biológica de espécies vegetais. Nesse âmbito, o estudo de caracterização fitoquímica tem grande valia, uma vez que a identificação de metabólitos secundários no vegetal podem nortear suas possíveis ações como, por exemplo, atividade citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (LACERDA, 2016).

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de aprofundamento científico principalmente nas drogas de origem vegetal que possuem uso etnofarmacológico, para que se possa atestar segurança, eficácia e qualidade. Nessa perspectiva, esse trabalho se concentrou na investigação química, utilizando técnicas analíticas modernas, e farmacológica de *Zornia brasiliensis* Vogel, uma planta que possui uso etnomedicinal para o tratamento de doenças venéreas e como diurética, por conseguinte, contribuindo para a valorização do conhecimento químico e farmacológico de espécies da Caatinga.

02 |

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir com a ampliação do conhecimento químico do gênero *Zornia* através do isolamento, identificação e/ou caracterização de metabólitos secundários e avaliar atividade biológica dos constituintes químicos de *Zornia brasiliensis* Vogel.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar compostos bioativos presentes no extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Zornia brasiliensis*;
- Desenvolver metodologia analítica por CLAE-DAD para o isolamento de constituintes químicos presentes nas frações oriundas do extrato etanólico bruto;
- Identificar metabólitos secundários de *Zornia brasiliensis* por métodos usuais de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e bidimensionais (HMBC, HMQC, COSY e NOESY), infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução;
- Desenvolver metodologias analíticas por CLAE-EM/EM para uma ampla caracterização dos constituintes químicos em menor concentração na matriz vegetal;
- Utilizar os dados do CLAE-EM/EM para desreplicação e análises estrutural;
- Avaliar a citotoxicidade de compostos isolados em células MCF-7 (adenocarcinoma da mama), HCC1954 (carcinoma de glândula mamária), T-47D (carcinoma de glândula mamária), 4T1 (carcinoma de glândula mamária), HL60 (leucemia promielocítica), células RAW264.7 (macrófagos).

03 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a família Leguminosae

A família Leguminosae é constituída por aproximadamente 770 gêneros e 19.500 espécies (Figura 1). Até então possuía apenas três subfamílias, mas um estudo recente reorganizou a família Leguminosae em seis subfamílias: Duparquetioideae (com 1 espécie), Cercidoideae (com 335 espécies), Detarioideae (com 760 espécies), Dialioideae (com 85 espécies), Caesalpinioideae (com 4400 espécies) incluindo o clado mimosoide, que então era classificado como uma subfamília, e Papilionoideae (com 14.000 espécies) permanecendo como a maior subfamília. Essa nova reorganização foi realizada com base em estudos filogenéticos e representa um consenso da comunidade internacional de sistemática de Leguminosae (AZANI et al., 2017).

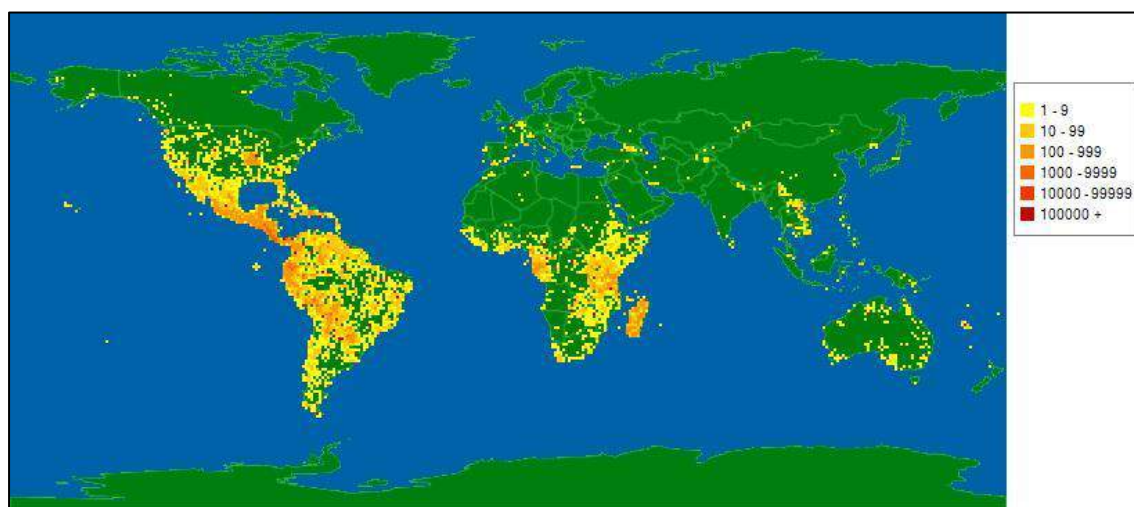


Figura 1 Mapa de calor da distribuição das espécies de Leguminosae no mundo.

Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 16 Nov 2019.

<http://www.tropicos.org/Name/42000184>.

No Brasil sua ocorrência é muito expressiva, encontra-se presente na maioria das vegetações brasileiras (LIMA et al, 2000). Na lista de espécies da flora do Brasil a família está representada por 223 gêneros (16 endêmicos) e detém o maior número de espécies, 2844, sendo 1956 restritas ao território brasileiro (Flora do Brasil 2020 em construção, 2019). Entre as angiospermas, a Leguminosae é família com maior número de espécies na flora brasileira (FORZZA et al., 2010).

Investigações sobre a composição química de diferentes membros desta família, a revelaram como bioprodutora de diversas classes de metabólitos secundários, a exemplo dos terpenoides, taninos, alcaloides pirrolizidínicos e quinozilidínicos, das antraquinonas, flavonas e flavonóis, chalconas e flavanonas, isoflavonoides, rotenoides e saponinas (SILVA, 2013).

As leguminosas possuem importância econômica, sendo extremamente utilizadas na forragem e no adubo verde, tanto em clima temperado quanto regiões tropicais e são utilizadas como madeira, são fontes de taninos, óleos e resinas, e na fabricação de vernizes, tintas, corantes, como medicamentos, no comércio de horticultura e ornamentais (AZANI et al., 2017).

Espécies dessa família já tiveram seus efeitos antidiabéticos, analgésicos, antifúngicos, antimicrobianos e anti-inflamatórios comprovados cientificamente (SILVA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

Porém, algumas leguminosas são tóxicas, sendo prejudiciais para o gado e para o homem, devido a sua composição química, outras são prejudiciais pela presença de acúleos, e algumas prejudicam por seus frutos pegajosos que atingem a lã das ovelhas (MIOTTO; LÜDTKE; OLIVEIRA; 2008).

No entanto, as espécies que compõe esta família se diferenciam entre as áreas, não só quanto à ocorrência, mas, sobretudo, quanto à abundância (TUCKER, 2003). O que fica evidente na microrregião 'Cariri Paraibano' que está situada no Planalto da Borborema, no estado da Paraíba, inserida na Caatinga, contém um total de 396 espécies, distribuídas em 90 famílias botânicas, sendo 85 famílias de Angiospermas. Leguminosea é a mais diversificada com 34 gêneros e 71 espécies, com destaque para os gêneros: *Acacia*, *Anadenanthera*, *Mimosa*, *Prosopis*, *Bauhinia*, *Caesalpinia*, *Chamaecrista*, *Senna*, *Amburana*, *Crotalaria*, *Desmodium*, *Dioclea*, *Erythrina*, *Indigofera*, *Lonchocarpus*, *Macroptilium*, *Poecilanthe*, *Rhynchosia*, *Stylosanthes*, *Tephrosia*, *Vigna* e *Zornia* (BARBOSA et al., 2007).

Diante desse potencial químico, farmacológico, diversidade e abundância na região do Nordeste, sobretudo na Caatinga, a família Leguminosae assume uma posição de destaque como uma fonte de descoberta de novas moléculas com interesse farmacêutico.

3.2 Gênero *Zornia*

É um gênero pertencente à subfamília Papilionoideae, que conta com cerca de 80 espécies distribuídas no mundo, sendo a América a maior detentora desses representantes, 41 espécies, seguida de 16 espécies no continente Africano, 13 espécies na Oceania e 7 espécies na Ásia. Está inserido no clado Adesmia como sendo o segundo mais numeroso. Em nosso país, *Zornia* possui distribuição desde o Rio Grande do Sul (“pampas”) até a região amazônica (MOHLENBROCK, 1961; SCIAMARELLI; TOZZI, 1996; FORTUNA-PEREZ, 2015).

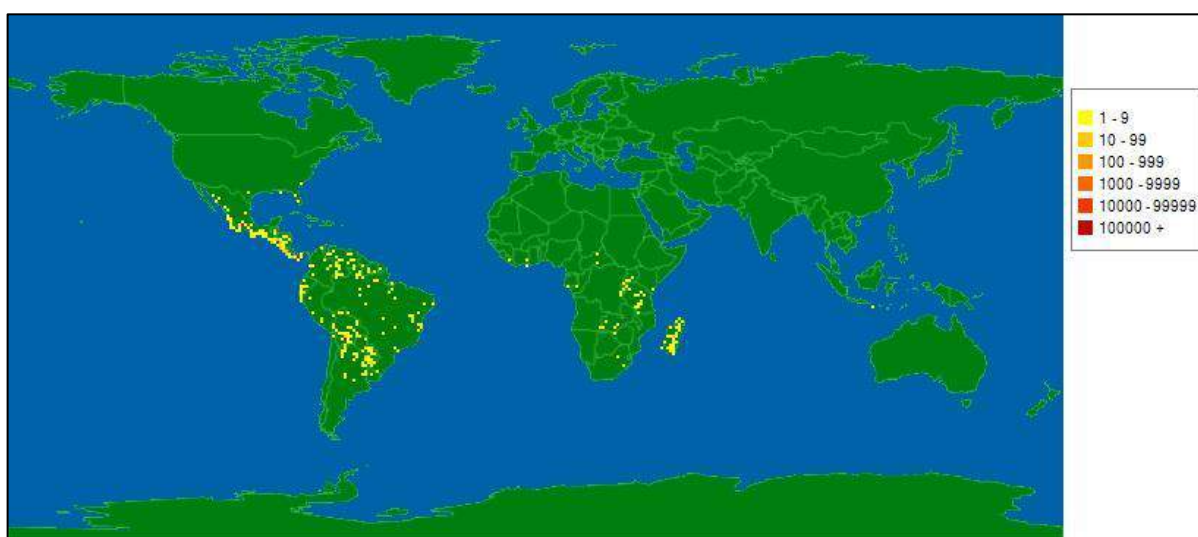


Figura 2 Mapa de calor da distribuição geográfica do gênero *Zornia* no mundo.

Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 17 Nov 2019.

<<http://www.tropicos.org/Name/40028793>>.

O gênero possui características botânicas peculiares, como as folhas bi- ou tetra-folioladas, com os folíolos opostos e muito próximos entre si, e suas flores são agrupadas em inflorescências especiformes (SCIAMARELLI, 1994). Das 36 espécies pertencentes à *Zornia* no Brasil, 15 são endêmicas. Desse total, apenas duas espécies possuem flores solitárias: *Zornia myriadena* e *Zornia echinocarpa*, quanto a suas folhas, 12 espécies (das quais 10 são endêmicas) são tetra-folioladas e 22 espécies são bi-folioladas (PEREZ, 2009).

É um gênero que está presente em todas as regiões geográficas do país. Os maiores números de espécies se concentram em Minas Gerais e na Bahia (20 espécies), sendo este último o único que possui toda diversidade do gênero *Zornia*, espécies com flores em inflorescência e solitárias, e folhas bi- e tetra-folioladas.

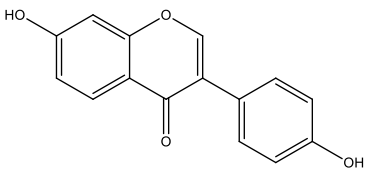
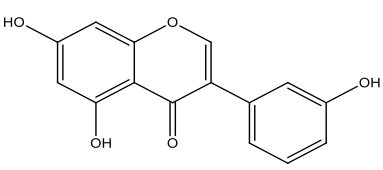
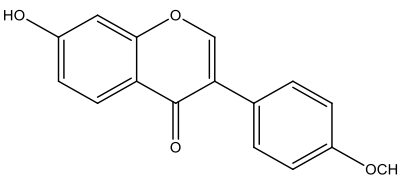
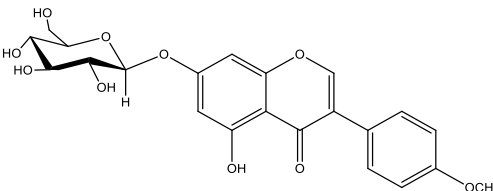
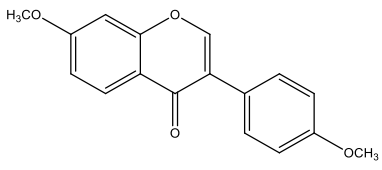
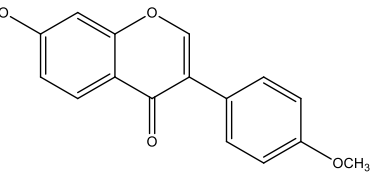
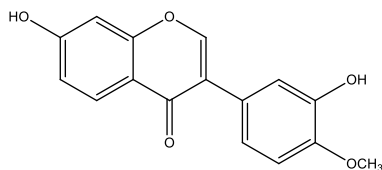
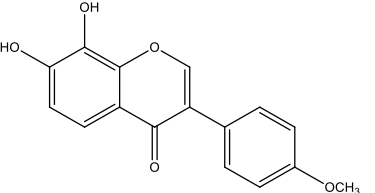
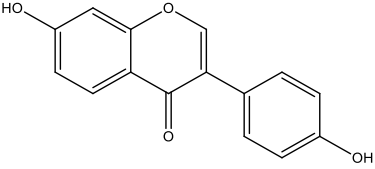
Outros estados representativos na ocorrência de espécies desse gênero é o Rio Grande do Sul (13 espécies), seguido de São Paulo (10 espécies) e Goiás (10 espécies) (SILVA, 2013).

Zornia diphylla possui uso popular para o tratamento de doenças venéreas e para o tratamento de desinterias na Índia (ARUNKUMAR; RAMESHKUMAR; SUBRAMONIAM, 2014). Estudos com espécies pertencentes à *Zornia* já foram desenvolvidos, investigações que se concentraram na avaliação farmacológica (descritos na Tabela 1, pág. 31) e fitoquímicas, contudo, os estudos químicos são recentes e com um número muito restrito de espécies (Quadro 1, pág. 32).

Tabela 1- Atividades farmacológicas descritas na literatura para espécies de *Zornia*.

Espécie	Atividade	Referência
<i>Zornia diphylla</i> (L) Perls.	Relaxante sobre músculo liso	ROJAS, et al., 1999
	Atividade citotóxica	BELCAVELLO, et al., 2012
	Atividade anticonvulsivante	GREETHA; SHILPA; MURUGAN, 2012
	Potencial antioxidante	BRAHMACHARI, et al., 2009
	Anti-inflamatória e antibacteriana (<i>Salmonella typhi</i>)	ARUNKUMAR; RAMESHKUMAR; SUBRAMONIAM, 2014
<i>Zornia elegans</i> (L) Perls.	Antitumoral	ARUNKUMAR; AJIKUMARAN; SUBRAMONIAM, 2012
	Antibacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus faecium</i>)	CHIAPPETA; DE MELLO, 1984
<i>Zornia setosa</i> Baker	Antimicobacteriana	
<i>Zornia tenuifolia</i> Moric.	Moluscicida	KLOOS, et al., 1987
	Antibacteriana (<i>S. aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>)	DO NASCIMENTO; DE MELLO; CHIAPPETA, 1985
<i>Zornia milneana</i> Mohlenbr.	Citotóxica	
	Antibacteriana (<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> e <i>A. caviae</i>)	OBI, et al., 2007
<i>Zornia gibbosa</i> Span.	Anti-inflamatória	LAXANE, et al, 2011
	Atividade antioxidante	LAXANE, et al, 2008

Fonte: NASCIMENTO, 2019.

Espécie	Substância isolada	Referência
<i>Zornia diphylla</i> (L) Perls	 (7,4'-diidroxiiisoflavona)  (5,7,3'-triidroxiiisoflavona)  (7-hidroxi-4'-metoxiiisoflavona)  (7-β-D-Glucosyl-5,7-dihydroxy-4'-metoxiiisoflavona)	LEUNER, et al., 2012
	 (7,4'-dimetoxiiisoflavona)  (7-hidroxi-4'metoxiflavona)  (7-3'-diidroxii-4'metoxiiisoflavona)  (7,8-dihidroxi-4'metoxiiisoflavona)  (7,4'diidroxiiisoflavona)	REN, et al., 2012

Quadro 1 Substâncias isoladas de *Zornia diphylla*.
Fonte: NASCIMENTO, 2019.

3.3 *Zornia brasiliensis* Vogel

Ocorre de maneira abundante no Nordeste brasileiro, contudo há relatos da sua presença em diversos estados, não se limitando apenas ao Brasil, mas extrapolando a fronteira e ocorrendo também na Venezuela (Figura 4) (AYMARD, 1999; MOHLENBROCK, 1961). Possui uso etnomedicinal para o tratamento de doenças venéreas e como diurética. É conhecida popularmente como “carrapicho”, “urinária” e “urinana” (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).



Figura 3 *Zornia brasiliensis* Vogel.
Imagem: Josean F. Tavares, 2009 (Serra Branca-PB, 2009).



Figura 4 – Distribuição de *Zornia brasiliensis* no Brasil. Fonte: *Zornia* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB29919>>. Acesso em: 17 Nov. 2019.

Um destaque nos aspectos botânicos (Figura 6, pág. 37), que torna ainda mais complexa a taxonomia do gênero, diz respeito aos artículos do lomento. Mohlenbrock (1961) ao revisar o gênero *Zornia* elencou essa parte do vegetal como um ponto característico de diferenciação entre as espécies tetra-folioladas, da qual *Z. brasiliensis* pertence, pois observou que nesta espécie são dorsalmente côncavos e não possuem glândulas (Figura 5). Um estudo realizado 54 anos após o estabelecimento do artículo do lomento como um diagnóstico de identificação, Fortuna-Perez e colaboradores (2015) atribuíram a distribuição limitada ao pequeno artículo e a presença de pequenas cerdas no mesmo, o que possivelmente diminui a dispersão de longas distâncias, tendo em vista que os artículos não aderem com tanto sucesso aos possíveis dispersores, diferentemente daqueles artículos que possuem cerdas longas e plumosas.

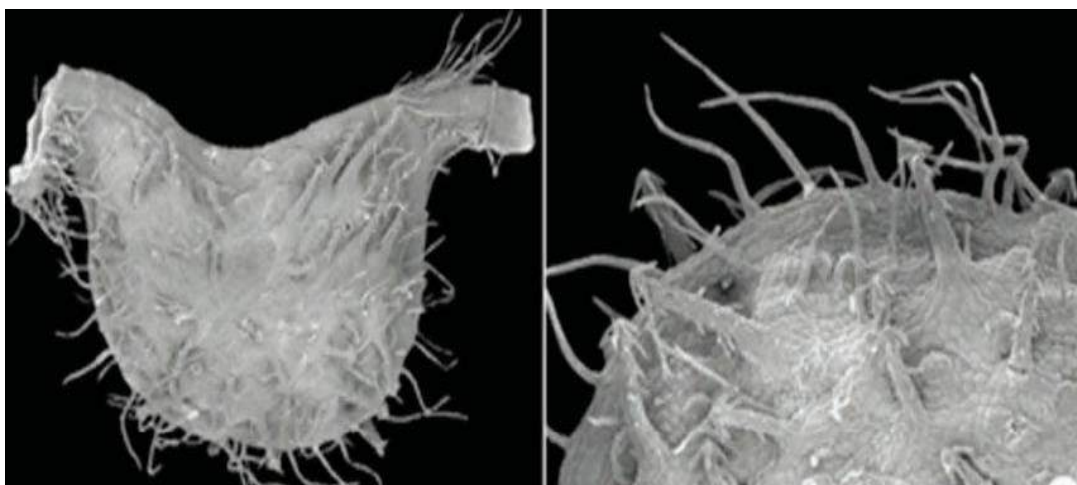


Figura 5 Artículos do lomento do *Zornia brasiliensis*.
Imagem: Fortuna-Perez et al, 2015.

A espécie *Z. brasiliensis* já foi objeto de estudos farmacológicos, toxicológico e químico. Os constituintes químicos pertencentes a diferentes classes como flavonas, chalconas, pterocarpanos, isoflavonas e ciclitóis já foram identificados e estão descritos no Quadro 2 (pág. 36). Estudos de atividade biológica foram realizados com compostos isolados ou com extrato etanólico bruto. A 7-metoxiflavona, isolada de *Z. brasiliensis* apresentou efeito antinociceptivo e efeito tocolítico, já a 5-7-dimetoxiflavona, outro isolado, mostrou efeito vasorrelaxante em aorta de rato. O extrato etanólico bruto revelou uma baixa toxicidade aguda e subcrônica e baixa genotoxicidade. O óleo essencial das folhas de *Z. brasiliensis*

possui efeito antitumoral (DAVID, et al., 2007; COSTA, et al, 2015; DA SILVA, et al, 2013; BATISTA, 2013; BRASILEIRO, 2018; FIGUEIREDO et al., 2018; NASCIMENTO, 2016) (Ver Tabela 2).

Diante dessa potencialidade química e farmacológica dos constituintes químicos de *Z. brasiliensis*, fica evidente a necessidade de um maior envolvimento científico afim de identificar os compostos presentes nessa espécie e assim compreender melhor as respostas biológicas promovidas pelos mesmos.

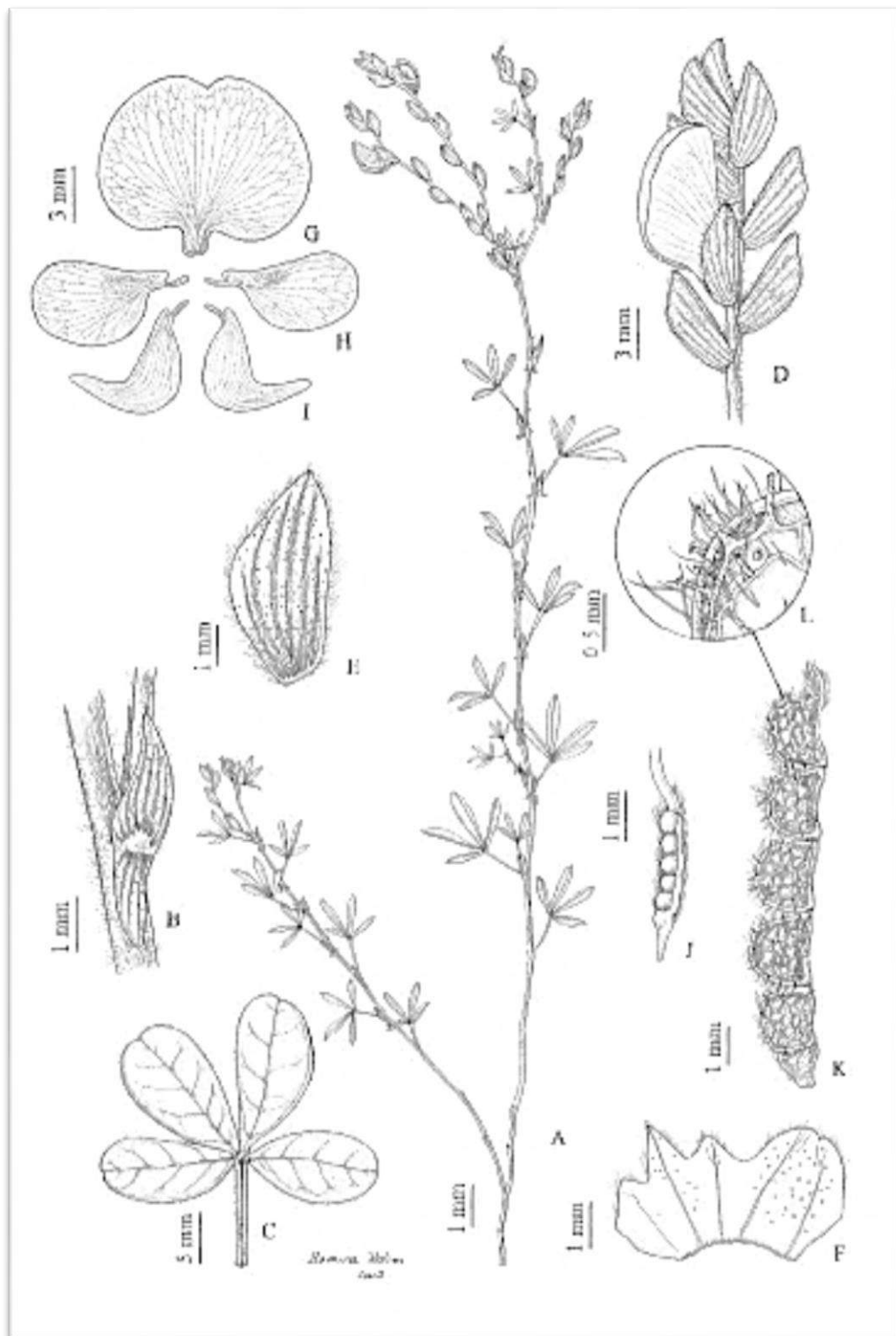
Tabela 2- Atividades farmacológicas de *Zornia brasiliensis*.

Espécie	Atividade	Referência
<i>Zornia brasiliensis</i> Vogel	Moluscicida	DAVID, et al., 2007
	Antitumoral	COSTA, et al, 2015
	Antinociceptiva ^a	DA SILVA, et al, 2013
	Toxicológica ^b	BATISTA, 2013.
	Efeito tocolítico ^b	BRASILEIRO, 2018
	Efeito vasorrelaxante ^b	FIGUEIREDO et al., 2018
	Antioxidante ^a	NASCIMENTO, 2016

Legenda: ^a Trabalho desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Josean Fachine Tavares. ^b Trabalho realizado por pesquisadores pertencentes ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – UFPB. Fonte: NASCIMENTO, 2019.

Espécie	Substância isolada	Referência
<i>Zornia brasiliensis</i> Vogel	(7-metoxiflavona) (5,7-dimetoxiflavona) (5- hidroxi-7-metoxiflavona) (2'-4'-dihidroxichalcona) (3-hidroxi-9- metoxipterocarpano)	SILVA, 2013
	(Isovitexina) (Isoorientina) (Ononina) (D-pinitol)	NASCIMENTO, 2016

Quadro 2 Substâncias isoladas de *Zornia brasiliensis*.
Fonte: NASCIMENTO, 2019.



Legenda: A. Detalhe do ramo. B. Detalhe da estípula. C. Folha. D. Detalhe da inflorescência mostrando as flores nas bractéolas. E. Bractéola. F. Cálice. G. Estandarte. H. Alas. I. Pétalas da quilha. J. Ovário. K. Lomento. L. Detalhe do artigo do lomento.

Figura 6 Ilustração dos aspectos anatômicos de *Zornia brasiliensis*. Fonte: PEREZ, 2009.

3.4 Compostos fenólicos

Por definição, os compostos fenólicos são metabólitos secundários constituídos por grupos benzênicos que possuam pelo menos um de seus hidrogênios substituído por um grupamento hidroxila. Na natureza são encontrados como moléculas simples, mas podendo se apresentar como estruturas complexas com alto grau de polimerização, possuem ainda uma grande abrangência e abundância nos vegetais (SCHAFRANSKI, 2019).

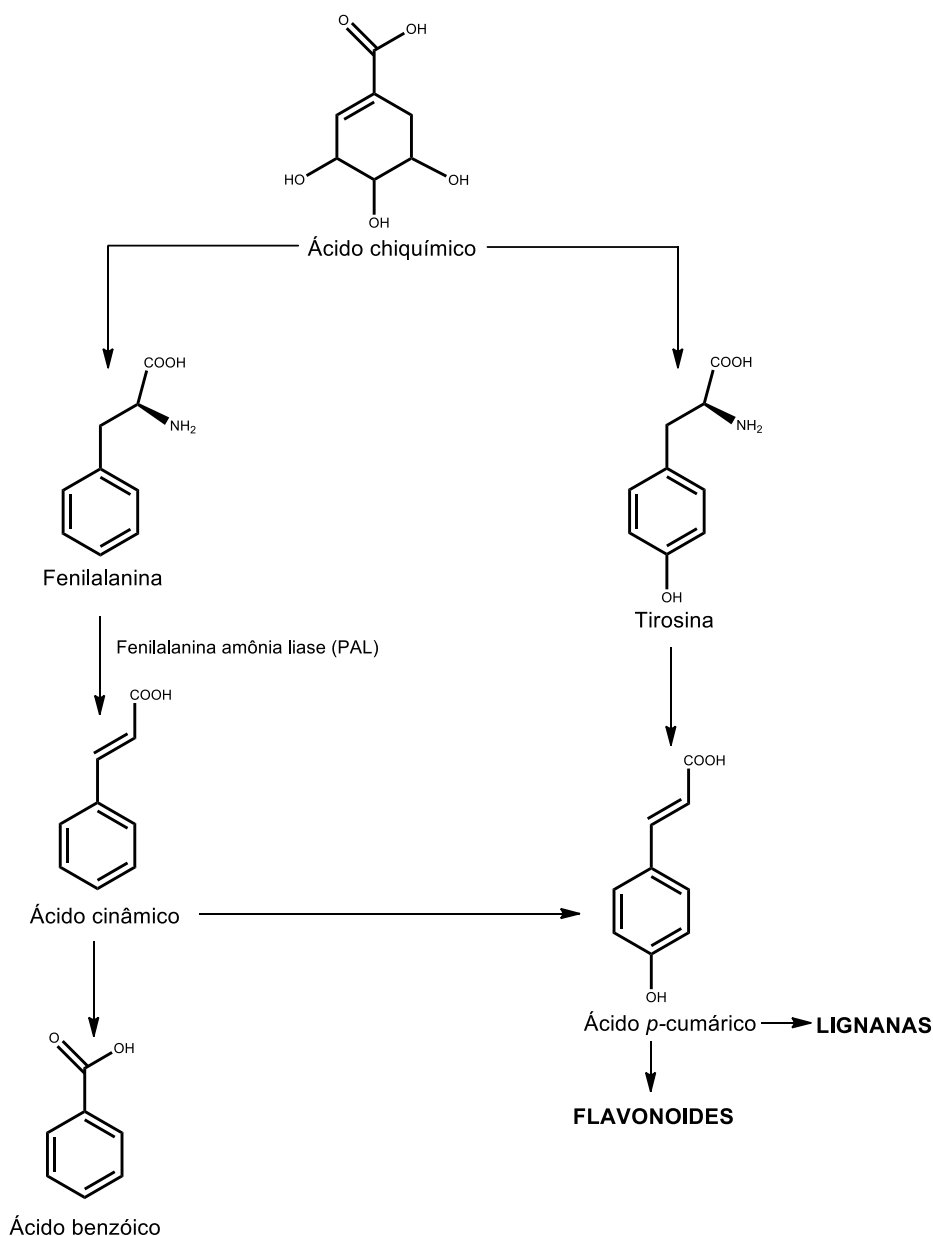
Os fenólicos são divididos em dois grandes grupos: os ácidos fenólicos (ácidos benzoicos, cinâmico e seus derivados), cumarinas, flavonoides e seus derivados. Apresentam-se na natureza de duas formas: livres ou ligados a proteínas e açúcares. Fato que tornam solúveis em água, quando estão glicosilados, e insolúveis quando livres ou conjugados. Grande parte dos compostos fenólicos possuem uma rota biosintética em comum, conhecida também como via mista, que possui precursores tanto da via do acetato-malonato quanto da via do ácido chiquímico (Esquemas 1 e 2, pág. 39 e 40) (SILVA, 2008; NASCIMENTO, 2016b).

Na tabela 3 (pág. 38) são expostas as principais classes de compostos fenólicos, que são organizadas com base em seus esqueletos principais, que por sua vez, variam a partir do anel benzênico (C_6) e dos substituintes que podem ter n-átomos de carbono (C_n).

Tabela 3. Classificação dos compostos fenólicos de acordo com seus esqueletos.

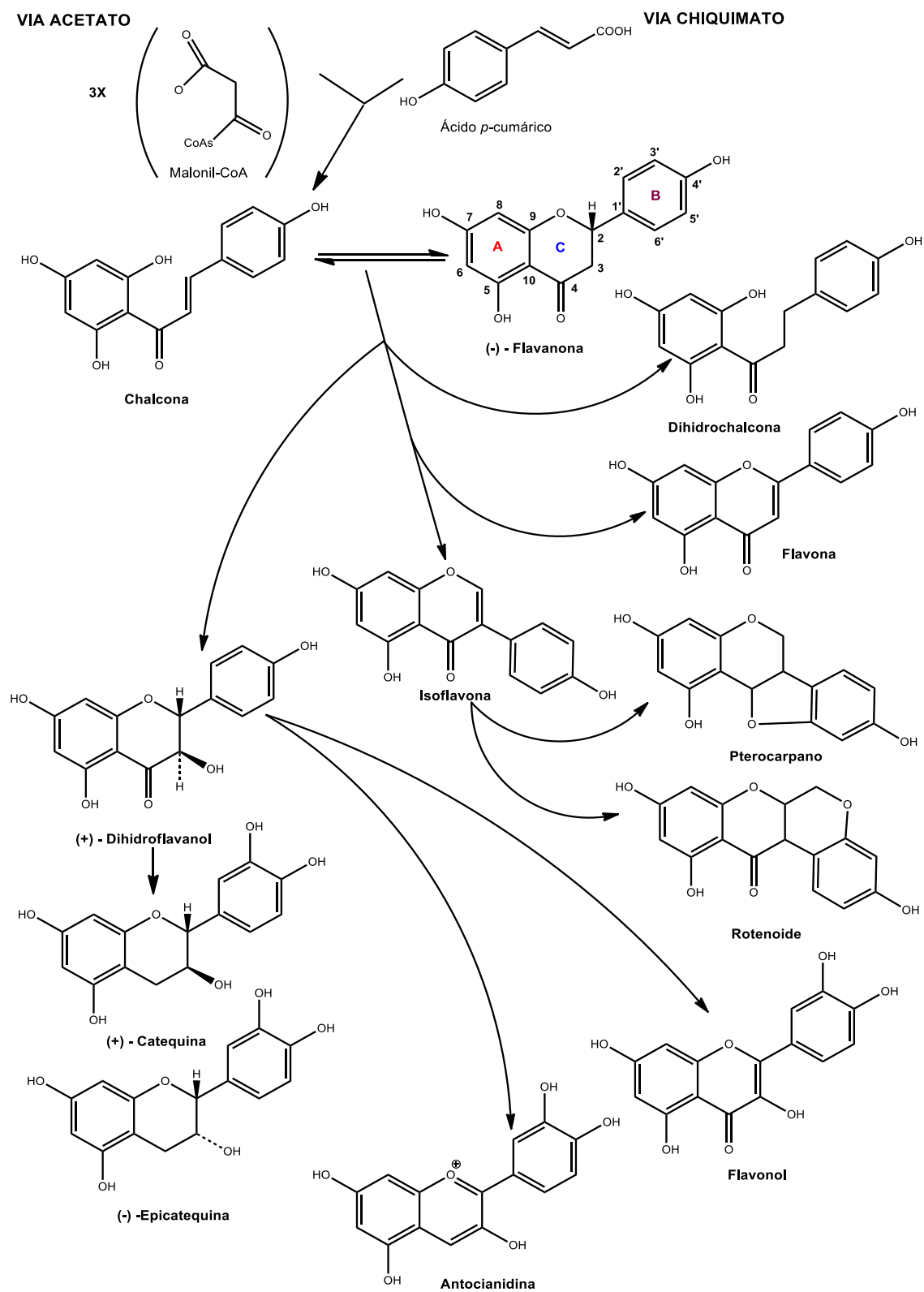
Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C_6	fenóis simples, benzoquinonas
C_6-C_1	ácidos fenólicos
C_6-C_2	acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C_6-C_3	fenilpropanoides: ácido cinâmico e análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C_6-C_4	naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$	xantonas
$C_6-C_2-C_6$	estilbenos e antraquinonas
$C_6-C_3-C_6$	flavonoides e isoflavonoides
$(C_6-C_3)_2$	lignanas
$(C_6-C_3-C_6)_2$	biflavonoides
$(C_6)_n$	melaninas vegetais
$(C_6-C_3)_n$	ligninas
$(C_6-C_1)_n$	taninos hidrolisáveis
$(C_6-C_3-C_6)_n$	taninos condensados

Fonte: (SIMÕES et al., 2007)



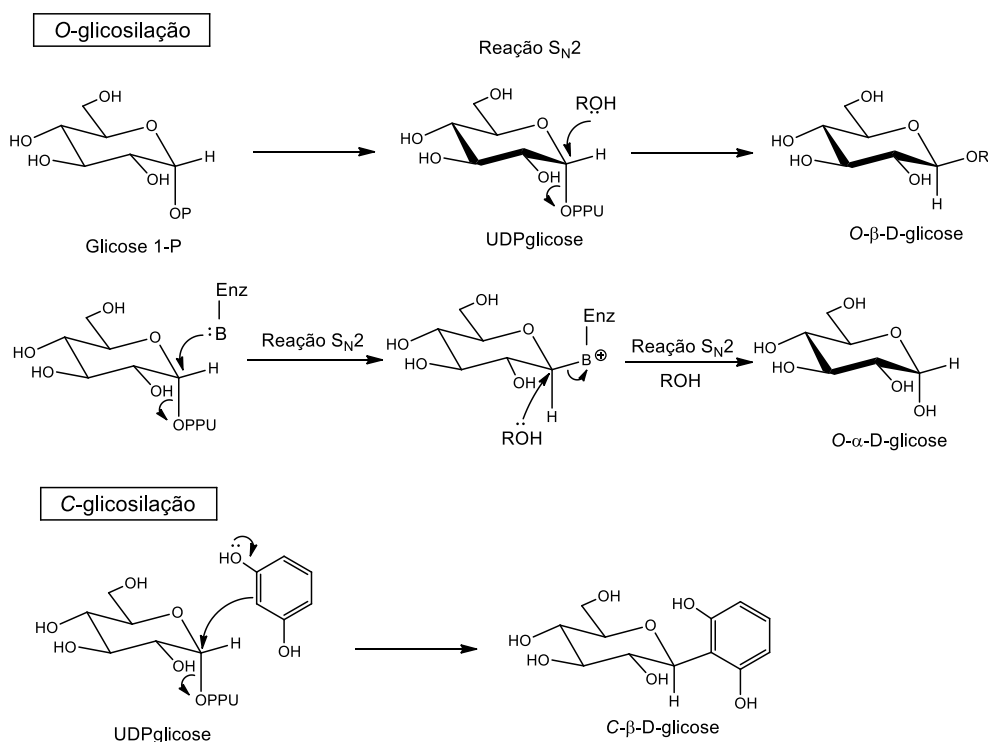
Esquema 1 Via do ácido chiquímico na biossíntese dos compostos fenólicos. (Adaptado: DEWIC, 2009)

Os flavonoides possuem um esqueleto do tipo C₆-C₃-C₆, como descrito anteriormente na Tabela 3 (pág. 38), desta forma, possuem dois anéis aromáticos (anel A e B) ligados entre si por uma cadeia de três carbonos formando um anel heterocíclico (anel C), também denominado de pirano. O anel A é derivado da via do acetato-malonato e o anel B é da via do ácido chiquímico (fenilalanina). Modificações nessa estrutura básica podem originar diversas classes de flavonoides (Esquema 2, pág. 40), a exemplo de metilação, glicosilação, acilação, hidroxilação, entre outras (MARTENS; MITHÖFER, 2005; MERKEN; BEECHER, 2000; LOPES-NETO, 2017; LOPES et al, 2000).



Esquema 2 Via mista da biossíntese de flavonoides e inter-relação entre as diferentes classes de flavonoides. Fonte: (Adaptado: DEWICK, 2009; OLDONI, 2007)

Os flavonoides muitas vezes podem estar na forma glicosilada nos vegetais, na forma de *O*-glicosídeos ou de *C*-glicosídeos. Os flavonoides possuem a unidade osídica inserida em um grupo hidroxilo (-OH) da aglicona, o mais comum são as inserções nos carbonos 3 ou 7 do esqueleto flavonoídico. Esse processo de glicosilação ocorre a partir de um agente conhecido como nucleosídeo difosfato de açúcar, como por exemplo, a uridina difosfato de glicose (UDPglicose). Diversos açúcares, incluindo ácidos urônicos, estão sujeitos a serem transferidos para agliconas por esse mecanismo. Trata-se de uma reação de deslocamento nucleofílico do tipo S_N2 . Se o UDPglicose for o grupo abandonador na configuração α , o produto formado é um glicosídeo com configuração β , a mais comumente encontrada nos glicosídeos naturais. Para obtenção de produtos com a configuração α são necessárias duas reações do tipo S_N2 (Esquema 3, pág, 41). Se os flavonoides são *C*-glicosídeos, eles possuem o açúcar ligado a aglicona por uma ligação do tipo carbono-carbono (C-C), normalmente nas posições C-6 e C-8 do esqueleto flavonoídico, isso porque essas posições são favorecidas pela biossíntese, uma vez que ambos são *orto* a grupos doadores, no caso as hidroxilas 7 e 9, o que tornam C-6 e C-8 carbonos nucleofílicos (SANDHAR et al., 2011; DEWIC, 2009).



Esquema 3 Mecanismo de ação das reações de *O*-glicosilação e *C*-glicosilação dos flavonoides. Fonte: (Adaptado: DEWIC, 2009).

Os fenólicos exercem papel importante na interação do vegetal com o meio ambiente, atuam combatendo o estresse oxidativo intracelular e na defesa contra radiação ultravioleta, insetos, fungos, bactérias e herbívoros (LOPES-NETO, 2017). Na fisiologia vegetal, os flavonoides regulam o crescimento pela inibição da exocitose do ácido indol-ácetico (auxina) e pela capacidade de induzir a expressão gênica. Outro papel dos flavonoides é favorecer a atração de agentes polinizadores. (HAVSTEEN, 2002; FERREIRA; OLIVEIRA; SANTOS, 2008).

Os compostos fenólicos também se apresentam bioativos em organismos humanos, com propriedades antitrombóticas, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, antidiabética, com efeito nas complicações oriundas da diabetes, a exemplo de retinopatia, nefropatia e neuropatia (APROTOSOAIE et al., 2013; BAHADORAN et al., 2013).

Uma atividade bastante avaliada nessa classe de compostos químicos é a antioxidante, da qual explica muitos mecanismos de ações relacionados a outros efeitos benéficos desses compostos, a exemplo reduzir a oxidação do colesterol LDL (processo que gera acúmulo de colesterol nos vasos sanguíneos), e assim acabam sendo benéficos para o sistema cardiovascular (VEGGI, 2013).

Os flavonoides possuem atividade antitumoral citotóxica, efeitos nos tratamentos de enfermidades neurodegenerativas, anti-inflamatória e vasorrelaxante. Atuam inibindo enzimas virais como proteases e a transcriptase reversa (ASIF; KHODADADI, 2013, HAVSTEEN, 2002).

3.5 Saponinas

O termo 'saponina' deriva do latim *sapo*, que significa sabão, isto devido a capacidade destas substâncias gerar espumas em solução aquosa sob agitação. São compostos que possuem caracterizados por uma parte não polar, a sapogenina, que pode ser um triterpeno ou um esteroide, e outra parte polar, formada por açúcares (pentoses, hexoses ou ácidos urônicos). Desta forma apresentam uma característica marcante desta classe de metabólitos secundários, que é a de serem anfifílicas, e esta característica que as tornam surfactantes em solução aquosa (CABRERA-OROZCO; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ; DÁVILA-ORTIZ, 2013).

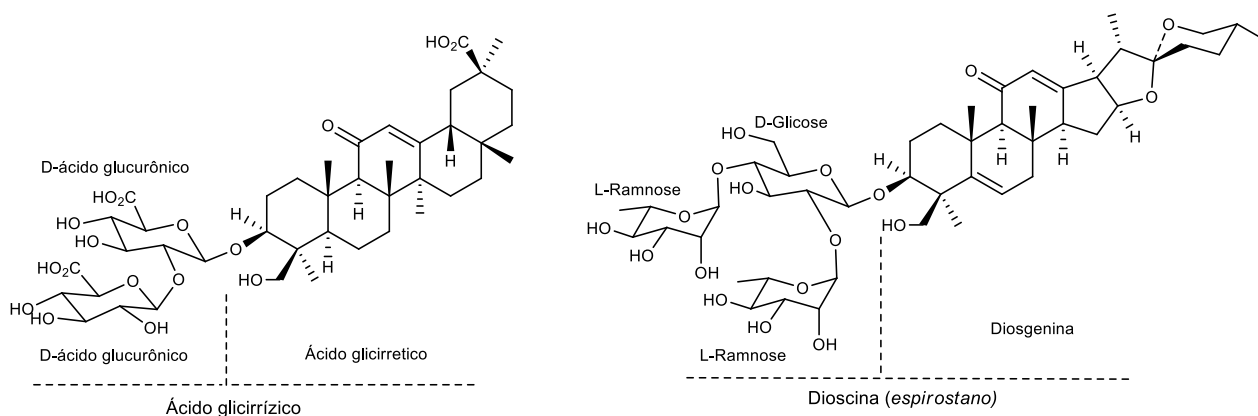


Figura 7 Exemplos de saponinas: (A) triterpênica e (B) esteroidal. O tracejado divide as moléculas em parte apolar (sapogenina) e polar (açúcares). (DEWIC, 2009).

As sapogeninas possuem origem biosintética da via do ácido mevalônico que dá origem aos triterpenos e aos esteroides. As saponinas esteriodais estão presentes apenas nas angiospermas monocotiledôneas, já as saponinas triterpênicas estão presentes nas angiospermas com flores dicotiledôneas. As saponinas esteriodais podem ter esqueleto de 27 átomos de carbono na sua sapogenina e possui seis anéis, conhecida como esqueleto espirostano, contudo o grupo hidroxila da posição C-26 (Figura 7) pode ser usado para sustentar unidades osídicas, assim formando um esqueleto com cinco anéis, conhecido como furostano. Já as saponinas triterpênicas possuem trinta átomos de carbono em suas sapogenina, onde geralmente são pentacíclicas, ocorrendo com maior frequência os núcleos lupanos, oleananos, fridelanos e seus derivados (Figura 8) (CABRERA-OROZCO; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ; DÁVILA-ORTIZ, 2013; DEWIC, 2009).

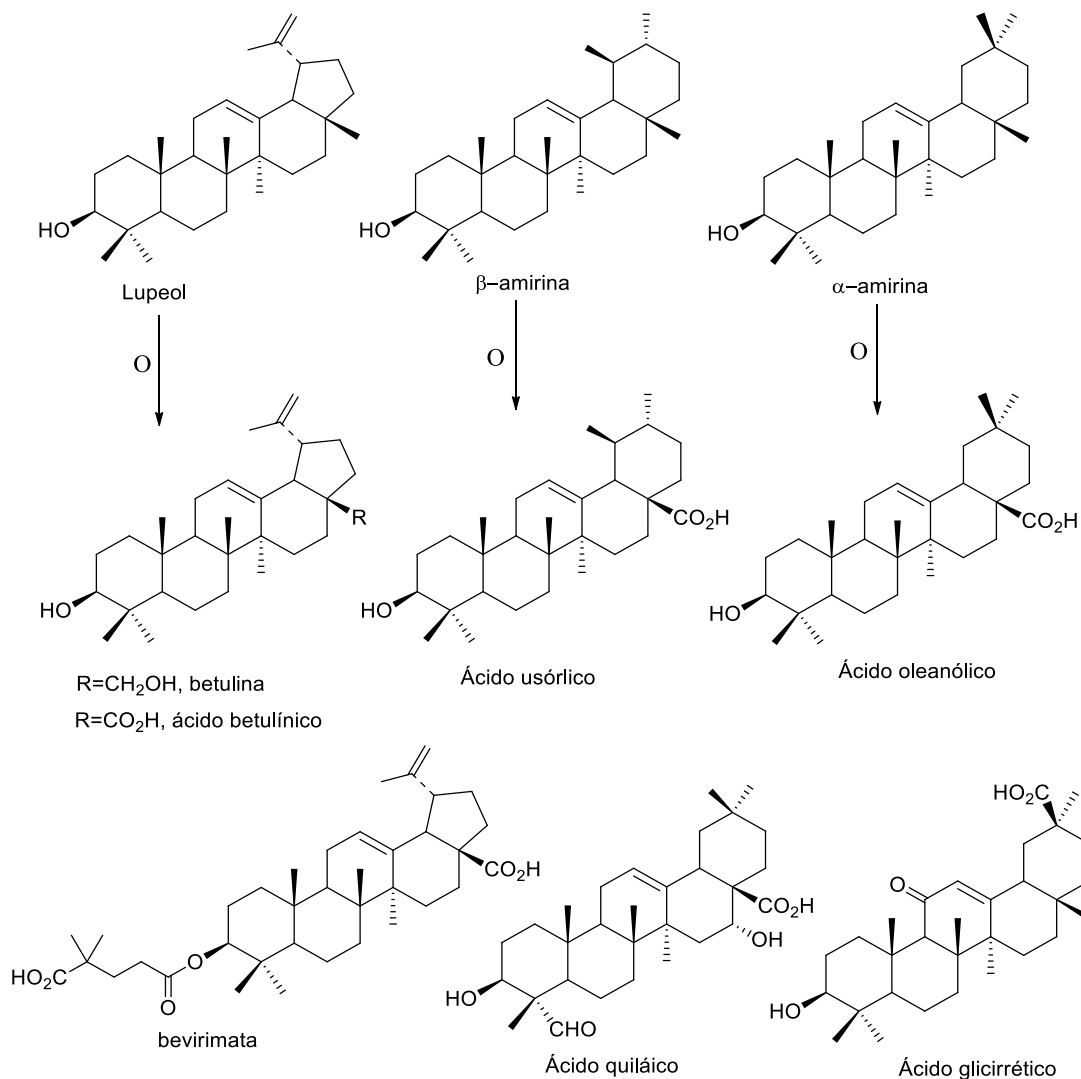


Figura 8 Exemplos de triterpenos (sapogeninas) pentacíclicos (DEWIC, 2009).

Além disso, variações nos níveis e na distribuição são relacionadas à proteção contra pragas ou herbívoros específicos (AUGUSTIN et al., 2011).

As saponinas são conhecidas também por fazerem parte de muitos extratos de vegetais utilizados na medicina popular (por exemplo, extratos de alcaçuz - *Glycyrrhiza* sp. ou ginseng - *Panax* sp.). Muitas saponinas se tornaram alvos de possíveis novos fármacos porque se descobriu que estas apresentam diversas atividades farmacológicas. Várias sapogeninas e saponinas apresentaram atividade anti-inflamatória (SULTANA; ATA, 2008; SUN et al., 2010; TAPONDJOU et al., 2008), anticancerígena (MUSENDE et al., 2009), antibacteriana (DE LEO et al., 2006), antifúngica (COLEMAN et al., 2010; ZHANG et al., 2005) e antiviral (CINATL et al., 2003; RATTANATHONGKOM et al., 2009; ZHAO et al., 2008). A utilização de

saponinas como adjuvantes em vacinas tem mostrado resultados promissores (SUN; XIE; YE, 2009).

Uma atividade bastante conhecida das saponinas é a sua capacidade de provocar hemólise. Este efeito ocorre em decorrência da interação entre a saponina e a bicamada lipídica dos eritrócitos, aumentando a permeabilidade desta camada e consequentemente perda da hemoglobina. Estudos realizados com eritrócitos humanos demonstrou que este aumento de permeabilidade da camada lipídica é irreversível (BAUMANN et al., 2000; DE GEYTER et al., 2012).

Contudo, esta capacidade tóxica é difícil ocorrer *in vivo*, pois não há evidências dessas complicações quando estas saponinas são consumidas por via oral. As saponinas têm pouca atividade anti-nutricional, dado que nenhum dano é produzido em seres humanos quando são consumidos nas quantidades regularmente encontradas após o processamento de alimentos. No entanto, altas concentrações de saponinas também são capazes de quebrar a membrana de outras células, como as da mucosa intestinal, que modifica a permeabilidade da membrana celular e, em seguida, afeta o transporte ativo e a absorção de nutrientes (CABRERA-OROZCO; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ; DÁVILA-ORTIZ, 2013).

Outra atividade biológica relevante desta classe de metabólitos é bastante estudada ao longo dos anos pelos pesquisadores de produtos naturais que isolaram e identificaram saponinas foi à atividade citotóxica. Centenas de trabalhos já foram publicados e mesmo assim, todos os anos aparecem novos dados a respeito desta atividade biológica. Fato que coloca as saponinas como promissores agentes terapêuticos devido a sua capacidade citotóxica e citostática. Mecanismos de ação foram propostos através do processo apoptótico pela via intrínseca e por processos não apoptóticos como parada do ciclo celular, estimulação de morte celular por autofagia, inibição da metástase e desintegração do citoesqueleto (THANKUR et al., 2011; PODOLAK, GALANTY; SOBOLEWSKA, 2010).

A capacidade de afetar membranas por parte das saponinas e as atividade citotóxica é dependente de algumas características estruturais desses compostos, como estrutura da aglicona, número de açúcares e quantidade de cadeias laterais destes açúcares (KENJI et al, 2000; PODOLAK; GALANTY; SOBOLEWSKA, 2010).

As saponinas das leguminosas têm efeitos de promoção da saúde no trato gastrointestinal, uma vez que estão envolvidos na redução da taxa de fissão celular da mucosa e, consequentemente, previnem câncer no intestino grosso. A dose

diária de saponinas recomendadas por nutrólogos é de 200 mg (SHI et al., 2004). Além disso, a presença de saponinas na dieta parece para diminuir o risco de doenças cardíacas, conforme demonstrado para expressar propriedades de redução do colesterol no sangue (SHI et al., 2004) e efeito protetor sobre o miocárdio (CHU et al., 2013).

3.6 Desreplicação: uma eficiente estratégia na identificação de saponinas

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que, em poucos anos, se tornou um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. O grande crescimento de sua utilização está relacionado à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, à possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina (TONHI et al., 2002). Apesar do fator limitante de um cromóforo para propiciar a detecção em ultravioleta, o desenvolvimento de detectores de arranjo de diodo (DAD) ou fotodiodo (PDA) estimulou o desenvolvimento de análises de misturas mais complexas por CLAE acoplado a estes detectores (GOBBO-NETO, 2007).

Contudo, a busca por mais informações sobre a estrutura de compostos causou o surgimento de novas técnicas acopladas como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), técnica que se destaca pela facilidade de manuseio e por não estar limitada à volatilidade ou estabilidade dos compostos da amostra (GOMES, 2009).

Nesse contexto, surge a “desreplicação” (do termo inglês, *desreplication*), que é descrito como uma etapa fundamental na triagem de extratos brutos, uma vez que é possível estipular o grau de ineditismo dos compostos químicos que compõe esse extrato bruto, dessa forma, direcionando as análises de tal forma que não se isole ou determine estruturalmente constituintes químicos já conhecidos. Entre as técnicas cromatográficas hifenadas utilizadas para desreplicação a CLAE-EM assume posição de destaque, sendo a mais empregada, uma vez que possui custos de

operação menores quando comparadas a ressonância magnética nuclear, além de ter tempo de análises e quantidade de amostras menores (PARRA, 2016).

Em estudos da composição química de extratos vegetais o isolamento, a purificação e a elucidação de saponinas triterpênicas são difíceis e demoradas devido à alta polaridade e similaridade estrutural (LING et al., 2016). Uma alternativa é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta (CLAE-UV), contudo requer um maior tempo de análise para uma separação adequada e, somado a este fato, as saponinas podem ser difíceis de detectar com um detector UV, pois possuem poucos cromóforos (CAO et al., 2017). A hifenização que tem se mostrado mais adequada para análises de saponinas é a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (EM, EM/EM e EM-Alta Resolução), pois possibilita razoavelmente uma rápida desreplicação ou identificação de novos constituintes, ainda que provisoriamente, pendentes de um rigoroso estudo de elucidação estrutural destas saponinas (GEVRENOVA et al., 2017).

A partir dessa desreplicação, se evita o isolamento de compostos conhecidos, além de possibilitar a adoção de estratégias para o isolamento de derivados e/ou metabólitos secundários inéditos. É imprescindível reconhecer compostos conhecidos precocemente para que se poupe tempo e recursos financeiros (DIAS et al., 2012)

Um exemplo da aplicação desta ferramenta é observado no trabalho de Pollier e colaboradores (2011) que identificaram 79 saponinas por LC-ESI-FT-ICR-MS em *Medicago truncatula* (Leguminosae), após a desreplicação constatou que 61 destas saponinas já haviam sido relatadas na literatura, toda via, eram descritas pela primeira vez na espécie e 15 saponinas, não possuíam relatos estruturais na literatura. Tanto CLAE-EM quanto a desreplicação são rotineiramente empregadas para análise estrutural e caracterização de saponinas (HUHMAN; SUMNER, 2002; LING et al., 2016; POLLIER et al, 2011; NEGRI; TABACH, 2013; PERRET; WOLFENDER; HOSTETTMANN, 1999; ZHANG; POPOVICH, 2009; BERHOW et al., 2006; JIN et al., 2006).

Uma ferramenta útil para desreplicação e que tem crescido na química de produtos naturais nos últimos anos, principalmente pelas diversas aplicações, é a molecular network (WANG et al., 2016). Esta abordagem fornece uma nova maneira de percorrer o metaboloma da amostra biológica, uma vez que é possível observar

analogias entre os metabólitos identificados (ALLARD et al., 2016). Ge e colaboradores (2017) aplicou a *molecular network* no extrato aquoso de *Eleutherococcus senticosus*, com finalidade de agrupar análogos estruturais. A partir dessa análise foi gerada uma lista de precursores alvos onde foi possível identificar 106 saponinas das quais 49 foram tentativamente identificadas como potencialmente novas.

Diante do exposto, o emprego de CLAE-EM/EM e da desreplicação em amostras biológicas complexas de origem vegetal se apresenta como ferramentas que podem ser aplicadas na identificação de saponinas presentes nesses extratos vegetais. Além de representar ganho de tempo nas investigações dos extratos, possibilita o não isolamento de compostos conhecidos, otimizando a busca por compostos inéditos e como consequência gerando redução de custos.

3.7 Atividade antitumoral e o uso de produtos naturais

O câncer é considerado a segunda causa de mortes no mundo, atingindo milhares de pessoas anualmente, fato que torna o câncer um sério problema de saúde. No decorrer da doença várias etapas são observadas: ao apresentar progressivas mutações genéticas nas células, os processos de proliferação, diferenciação e morte celular são alterados. Diante disso, proliferação celular sustentada, indução de angiogênese, estímulo para invasão, metástase e resistência à morte celular, são características do câncer (ANDRADE, 2018).

O tratamento utilizado no combate ao câncer, à quimioterapia, se baseia na citotoxicidade de compostos químicos, porém, essa capacidade tóxica por vezes afeta células saudáveis, o que causam graves efeitos colaterais aos pacientes, diminuindo ainda mais sua qualidade de vida. Na busca da melhoria desses tratamentos, pesquisas científicas são conduzidas para obtenção de novos fármacos antineoplásicos que possuam menos efeitos colaterais, que reduzam a resistência ao tratamento, a toxicidade e os desconfortos que os pacientes oncológicos apresentam no tratamento (BROWN et al., 2015; SOUHO et al., 2018; CALIXTO-CAMPOS et al., 2013; SAFARZADEH et al., 2014).

Nesse contexto, os estudos sobre atividade antitumoral utilizando extratos e substâncias puras isoladas oriundas de produtos naturais tem relevância na literatura. Estima-se que 60% dos fármacos utilizados na prática clínica teve sua

origem a partir de produtos naturais, como plantas, organismos marinhos ou microrganismos. Atualmente um número expressivo de compostos químicos oriundos de produtos naturais está tendo suas atividades antitumorais investigadas (MIRANDA, 2015; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014; NEWMAN; CRAGG, 2014).

O avanço das metodologias de isolamento e identificação dos compostos de fontes naturais tem gerado um grande número de estruturas químicas utilizadas para as mais diversas indicações terapêuticas, outro ponto de destaque nos avanços tecnológicos experimentais é a triagem automatizada (*High Throughput Screening* – HTS) que possibilita uma rápida análise de compostos frente a diversos alvos biológicos (BRANDÃO et al., 2010).

Alguns casos de sucesso terapêutico de fármacos oriundos de produtos naturais são descritos na literatura, a exemplo dos alcaloides da Vinca, isolados da espécie *Catharanthus roseus* (L.), que atuam se ligando as β -tubulinas e assim inibindo a polimerização dos microtúbulos. Possuem uso no tratamento de leucemia linfoblástica aguda infantil, sarcoma de Kaposi, câncer de testículo e ovário e linfoma de Hodking (BRANDÃO et al., 2010; MARQUES; LOPES, 2015).

Outro exemplo é o diterpeno isolado da espécie *Taxus brevifolia*, uma árvore do Pacífico, conhecido como paclitaxel, considerado um dos agentes antineoplásicos mais eficientes, mais ativo e com menor toxicidade usada na terapêutica (SOUZA, 2004; VIANA et al., 2017; ZHOU et al., 2010).

A podofilotoxina, uma lignana ariltetralínica presente no gênero *Podophyllum*, gerou dois compostos conhecidos como etoposídeo e teniposídeo que foram introduzidos na terapia do câncer a partir de experimentos realizados, sendo estabelecido seu mecanismo de ação sobre a Topoisomerase II, uma enzima que atua no DNA. Já a camptotecina, um alcaloide indólico extraído da espécie *Camptotheca acuminata*, atua na Topoisomerase I promovendo alterações no mecanismo de replicação do DNA causando a morte da célula. Análogos foram sintetizados a partir da camptotecina com finalidade de melhorar toxicidade e a solubilização em meio aquoso. Os análogos obtidos foram o topotecano, utilizado contra câncer de ovário e de pulmão de células pequenas, e o irinotecano, contra cânceres colo-retais (ANDRADE, 2018).

Com base nos resultados alcançados até hoje, com o sucesso na terapêutica clínica, com a possibilidade de servirem como modelos estruturais para novos

fármacos, os produtos naturais são definitivamente uma fonte inesgotável para obtenção de compostos/análogos bioativos com propriedades antitumorais e com potenciais de uso clínico, devendo esse potencial ser explorado, e assim, promovendo melhorias na qualidade de vida do pacientes em tratamento contra o câncer.

04



PARTE
EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Estudo Fitoquímico

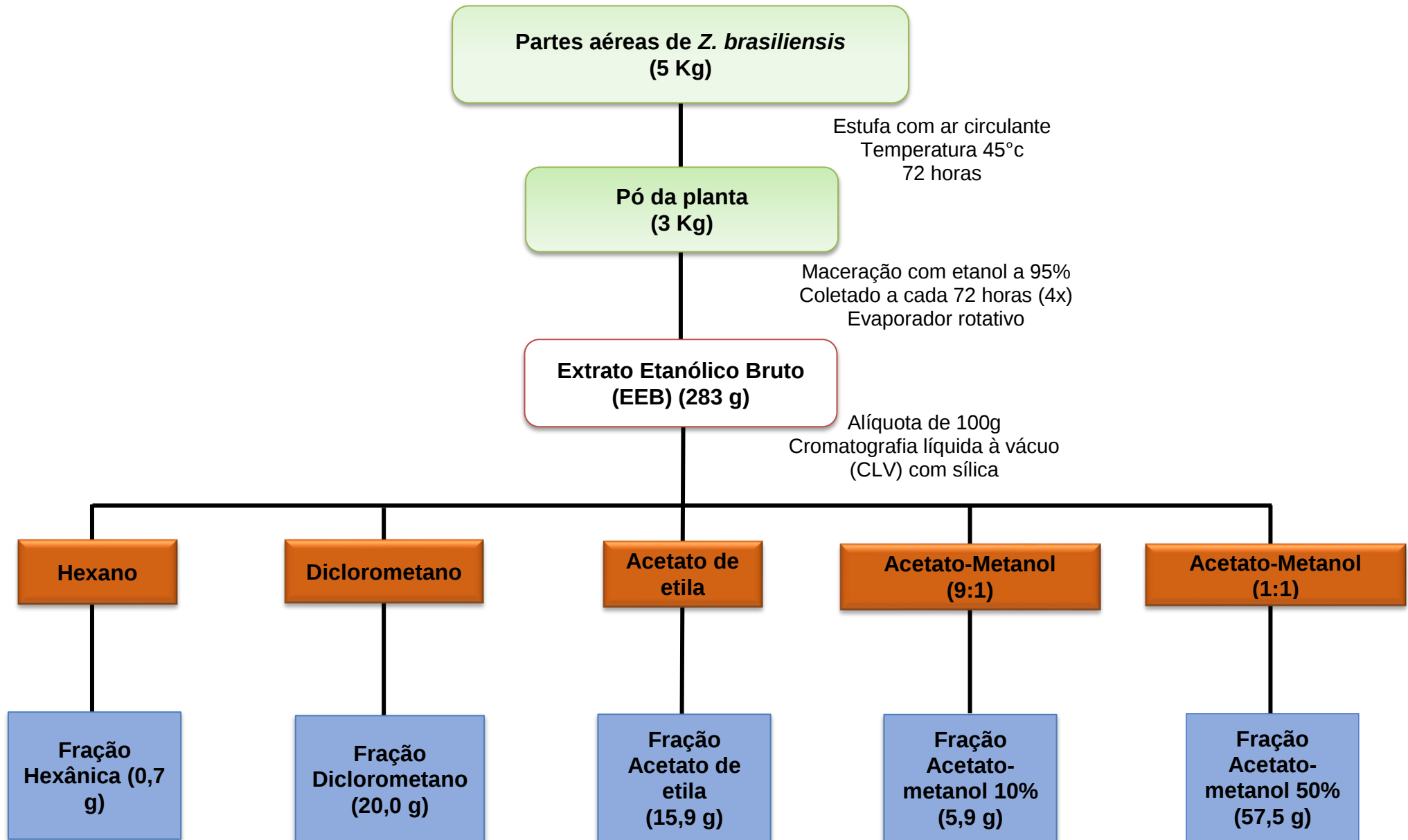
4.1.1 Coleta do material botânico

Foram selecionadas as partes aéreas de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) para realização do estudo devido a sua condição botânica, uma vez que suas falhas são escassas e o vegetal é arbustivo. A coleta foi realizada no município de Serra Branca (07° 29' 46 "S e 36° 44' 36" W, altitude 712 m), estado da Paraíba (PB), Brasil, em março de 2016. Autorização de coleta: N. 53894-1, concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO). Com cadastro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número: ADD107E. A espécie foi devidamente identificada pelo botânico Dr. José Iranildo Miranda de Melo, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Uma exsicata foi depositada no Herbário Arruda Câmara (HACAM), Campus I da Universidade Estadual da Paraíba, sob o código 1862.

4.1.2 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB)

O material botânico (5 Kg) foi desidratado utilizando uma estufa com ar circulante à temperatura de 45°C durante 72 horas. Após isto, o material (3 Kg) foi rasurado em moinho mecânico obtendo-se o pó. Em seguida, o pó foi submetido a uma maceração exaustiva com etanol (EtOH) 95% por 72 horas, em macerador de aço inoxidável, sendo esse processo repetido por quatro vezes, obtendo-se a solução extrativa. A solução extrativa foi concentrada sob pressão reduzida, em evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C para eliminação do solvente obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB) (283 g) (Esquema 4) (SILVA, 2013).

Uma alíquota do EEB (100 g) foi submetido a uma cromatografia líquida à vácuo (CLV) com 300 g de sílica e como eleuentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (Esquema 4) (SILVA, 2013).

Esquema 4 Obtenção e fracionamento do EEB de *Z. brasiliensis*.

4.1.2.1 Materiais e métodos empregados no isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Zornia brasiliensis*

O isolamento e a purificação dos constituintes químicos de *Z. brasiliensis* foram realizados através de técnicas cromatográficas clássicas, como a cromatografia em coluna (CC) de adsorção. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel (ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,060 – 0,200 mm e 70 - 230 mesh). Foram usadas colunas cilíndricas de vidro com comprimentos e diâmetros variáveis de acordo com a quantidade de amostra submetida à cromatografia.

O monitoramento do processo de isolamento e purificação das frações obtidas foi realizada em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), utilizando cromatofolha de alumínio – sílica gel 60 F254 da MERCK.

As substâncias em análise foram reveladas através da exposição das cromatoplasas à radiação ultravioleta (UV) sob os comprimentos de onda de 254 e 366 nm, em aparelho BOITTON (modelo BOIT-LUB01). Após análise da CCDA, as frações foram reunidas de acordo com os semelhantes fatores de retenção (R_fs).

Como fases móveis, foram utilizados solventes orgânicos comerciais (*n*-Hexano, Acetato de etila e Metanol) para eluição de placas e colunas, puros ou em misturas binárias obedecendo a uma ordem crescente de polaridade.

As análises cromatográficas analíticas foram realizadas utilizando um sistema de CLAE da Shimadzu (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AT, autoinjeter SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU-20A, detector SPD-M20A diode array e CBM-20A. A coluna utilizada foi Phenomenex Gemini[®] C18 (250 mm x 4,6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini[®] C18 (4 mm x 3 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm). As análises cromatográficas preparativas foram realizadas utilizando um sistema de CLAE da Shimadzu equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-6AD, injetor Rheodyne, detector SPD-M10A diode array e SCL-10A. A coluna utilizada foi ACE C18 (250 mm X 21,2 mm e 5 µm de tamanho de partícula). Em ambas as análises, os solventes orgânicos utilizados foram acetonitrila e metanol com grau CLAE (TEDIA[®], Brasil), água ultrapura obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore[®]) e ácido fórmico grau CLAE (J.T. Barker).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados em um VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz, operando a 500 MHz para RMN ^1H e 125 MHz para RMN ^{13}C e BRUKER ASCEND 400, operando a 400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para RMN ^{13}C . Os espectros foram registrados em CDCl_3 e $\text{DMSO}-d_6$.

Para obtenção dos espectros de massas por injeção direta foi utilizado para o IES-EM (baixa resolução) um espectrômetro Ion Trap-amaZonX (Bruker) e para o HRIESEM (alta resolução) um micrOTOF II (Bruker) operando com voltagem do capilar 3,5 kV, IES no modo negativo, offset da placa final 500 V, nebulizador 8,0 psi, gás seco (N_2) com fluxo de 5,0 L/h e temperatura de 200 °C. Os espectros (m/z 50-1000) foram registrados a cada 2 s. A fragmentação de CID foi conseguida no modo auto MS/MS utilizando o modo de resolução avançada para o modo MS e MS/MS.

Para os ensaios de dicróismo circular (DC) foi utilizado um espectropolarímetro de Absorbância em UV-Visível Jasco, modelo J-815 (as análises foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE). As análises de infravermelho foram obtidas na região (4000 a 400 cm^{-1}) utilizando aparelho de IRPrestige-21 (Shimadzu), utilizando-se de 1 mg de amostra em pastilhas de brometo de potássio (KBr), com frequência medida em cm^{-1} .

4.1.2.2 Processamento cromatográfico da fração diclorometano

A fração diclorometano (10,0g) foi submetida à cromatografia em coluna (CC) utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes: *n*-hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade (100 mL cada, Fr 1-Fr 30). A Fr 13 (63 mg), coletada com um sistema de eluição 90:10 de hexano:acetato de etila (v/v), foi submetida ao CLAE-DAD preparativo, utilizando sistema isocrático de água e acetonitrílica (55:45 v/v) durante 130 minutos, fluxo de 8,0 mL/min, 100 μL de volume de injeção e utilizando um comprimento de onda de 254 nm, dessa análise foi possível isolar o composto **2** [Tempo de retenção (T_R) = 45 min, 30 mg].

As Fr 25 e 26 (78 mg), coletada com uma sistema de eluição 80:20 de hexano:acetato de etila (v/v), foram reunidas e submetidas ao CLAE preparativo nas mesmas condições anteriormente descritas, obtendo a substância **3** (T_R = 36,6 min, 35,0 mg).

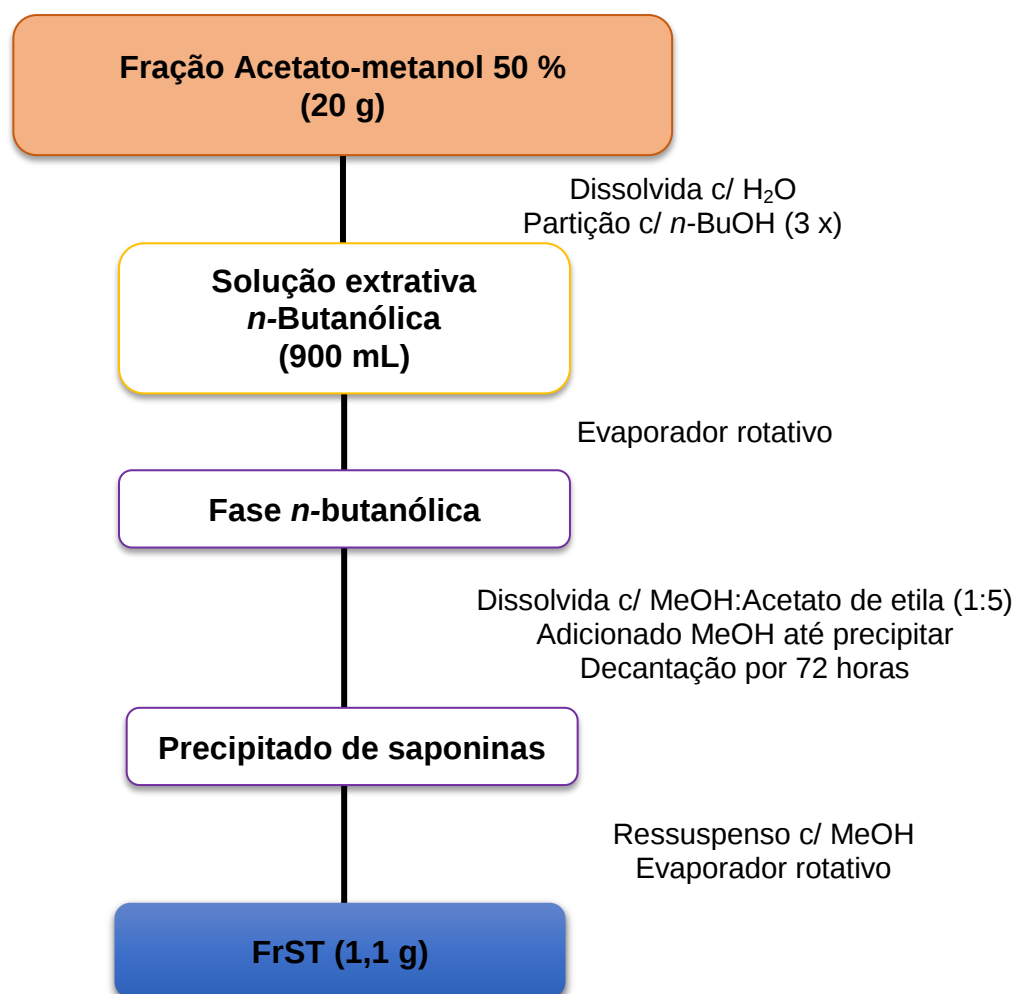
4.1.2.3 Processamento cromatográfico da fração acetato-metanol 50%

Uma alíquota da fração acetato de etila-metanol 50% (10 g) foi submetida à CC utilizando como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel *n*-hexano acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 21 frações de 250 mL cada, em seguida, foram analisadas através de CCDA utilizando diferentes sistemas de eluição e reveladas na luz UV.

A Fr 8-9 (205 mg) eluída com uma proporção de 90:10 de acetato de etila: metanol (v/v) foi submetida ao CLAE preparativo, utilizando um sistema isocrático composto por água (0,1 % e ácido fórmico) e metanol (65:35 v/v) durante 110 minutos, fluxo de 8,0 mL/min, 100 µL de volume de injeção e utilizando um comprimento de onda de 254 nm, resultando no isolamento dos compostos **1** (T_R = 31,6 min, 22,8 mg), **4** (T_R = 57,1 min, 33,8 mg), **5** (T_R = 51 min, 17,3 mg), **6** (T_R = 13,8 min, 16,0 mg), **7** (T_R = 28,5, 12,6 mg), **8** (T_R = 21,8 min, 13,7 mg) e **9** (T_R = 20,6, 19,1 mg).

4.1.3.4 Obtenção da fração concentrada de saponinas (FrST)

Uma alíquota de 20 g da fração acetato-metanol 50% foi dissolvida em 300 mL de água destilada. Em seguida foi particionada com *n*-butanol (300 mL) por três vezes. A solução extrativa da fase *n*-butanólica foi então concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a uma temperatura de 50° C. Após obtenção do material seco, foi dissolvido numa solução com metanol-acetato de etila (1:5, v/v) (500 mL) e então foi adicionado metanol até acontecer à precipitação das saponinas. Após a precipitação foi deixado o material decantar por 72 horas a temperatura ambiente. O precipitado foi então ressuspenso em metanol (200 mL) e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40° C. Desta forma obtendo uma fração rica em saponinas e sendo codificada com **FrST** (1,1 g) (BARBOSA; SILVA; PARENTE, 2012) (Esquema 5, pág. 57).

Esquema 5 Obtenção da fração concentrada de saponinas (FrST).

4.1.3.4.1 Processamento cromatográfico da FrST

O método analítico para separação cromatográfica por CLAE-DAD das substâncias presentes na **FrST** utilizou água (0,1% ácido fórmico) (A) e metanol (B). O gradiente utilizado foi: 70% de B (0,01 min) até 80% de B (50,0 min), retornando para 70% de B (65,0 min) e permanecendo com 70% de B até 80,0 min, com fluxo da fase móvel: 0,6 mL/min, com volume de injeção de 20 µL e detecção de 205 nm. As condições de gradiente, tempo total de eluição e detecção foram mantidas para escala preparativa, sendo modificado o volume de injeção e o fluxo da fase móvel. De tal modo que o volume de injeção na escala preparativa foi de 100 µL e o fluxo utilizado foi 8,0 mL/min. Desse procedimento resultou o isolamento do composto **25** (T_R = 33 min, 10 mg) discutido na seção 5.2 .

4.1.3.4.2 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao Detector de Arranjos de Fotodiodo e ao Espectrômetro de Massas (CLAE-DAD-EM) da FrST

O CLAE foi acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução da marca Bruker, modelo Ion Trap-amaZonX utilizando a técnica de Ionização por Eletrospray. O método cromatográfico utilizado foi o mesmo desenvolvido na análise analítica do perfil cromatográfico de **FrST** (Descrito na seção 4.1.3.4.1). Os parâmetros de análise do Ion-Trap foram: capilar 4,5 kV, IES no modo negativo, offset da placa final 500 V, nebulizador 35 psi, gás seco (N_2) com fluxo de 8 L/h e temperatura de 300 °C. A fragmentação de CID foi conseguida no modo auto MS/MS utilizando o modo de resolução avançada para o modo MS e MS/MS. Os espectros (m/z 200-1200) foram registrados a cada 2 s.

Para as análises de CLAE-DAD-EM de alta resolução, utilizou-se um CLAE idêntico ao descrito anteriormente, com exceção do detector SPDM-20A, com a mesma coluna cromatográfica, acoplado espectrômetro de massas de alta resolução da marca Bruker, modelo micrOTOF II utilizando a técnica de Ionização por Eletrospray. Os parâmetros de análise do micrOTOF II foram: capilar 4,0 kV, IES no modo negativo, offset da placa final 500 V, nebulizador 35 psi, gás seco (N_2) com fluxo de 8 L/h e temperatura de 300 °C. Os espectros (m/z 50-1000) foram registrados a cada 2 s. O formiato de sódio foi usado como calibrador interno durante

a corrida cromatográfica. O equipamento possui resolução de 15.000, quando operando em CLAE-EM, opera em torno de 11.000.

4.2 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de viabilidade celular MTT (MOSMANN, 1983) foi realizado para estudar o efeito citotóxico de **1**. MCF-7 (adenocarcinoma da mama), HCC1954 (carcinoma de glândula mamária), T-47D (carcinoma de glândula mamária), 4T1 (carcinoma de glândula mamária), HL60 (leucemia promielocítica), células RAW264.7 (macrófagos) foram cultivadas num meio RPMI 1640 ou meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS), 100 U / mL de penicilina e 100 µg / mL de estreptomicina em ar umidificado com 5% de CO₂ a 37 °C. Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 96 poços (100 µL de 2 x 10⁵ células / mL) e **1** (0,39 - 50 µg / mL) dissolvido em DMSO: Meio (1:99 v / v; 100 µL) foi adicionado a cada poço e incubado por 72 h. DMSO 1% foi usado como controle negativo. Adicionou-se MTT a uma concentração final de 0,5 mg / mL, incubou-se durante 4 h e depois solubilizou-se com 100 µL de DMSO. A produção de formazan foi medida a 570 nm num espectrofotômetro de placa.

4.3 Cálculo teórico do Dicroísmo Circular (EDC)

Todas as otimizações geométricas e pesquisas conformacionais foram realizadas usando o Spartan'16 para Windows (Wavefunction, Irvine, CA, EUA). A geometria da estrutura química do composto foi inicialmente otimizada com um campo de força Merck Molecular Force Field (MMFF) (HALGREN, 1996) e uma nova otimização geométrica foi então realizada com base no método semi-empírico, Austin Model 1 (AM1) (DEWAR, et al., 1985). Foi utilizado um método de busca sistemática que analisou os confórmeros e selecionou os conformadores com a mínima energia mínima usando AM1 e um algoritmo de Monte-Carlo (METROPOLIS; ULAM, 1949). Depois disso, as energias mínimas mais baixas foram selecionadas e otimizadas com base em um cálculo do modo vibracional usando DFT (teoria funcional da densidade) (BECKE, 1988). Os cálculos DFT foram realizados usando Spartan 16 (Wavefunction, Irvine, CA, EUA, VEREECKEN, et al., 1998). Cada estrutura foi examinada no nível B3LYP / 6-311G * e as estruturas de

energia mais baixas foram selecionadas para os cálculos. O mínimo global na superfície de energia potencial foi utilizado para a determinação de cada geometria. Os espectros de EDC calculados foram obtidos por teoria funcional de densidade (DFT) e DFT dependente do tempo (TD-DFT) usando Gaussian 09 e analisadas usando GUIs GaussSum v 3.0 (O'BOYLE, et al., 2008).

05 | RESULTADOS

5.1 Manuscrito intitulado: “Zornioside, uma diidrochalcona C-glicosilada, e outros compostos de *Zornia brasiliensis*” submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia.

Zornioside, uma diidrochalcona C-glicosilada, e outros compostos de *Zornia brasiliensis*

Yuri M. Nascimento¹, Lucas S. Abreu¹, Ramon L. Lima², Anne Dayse S. Silva³, Vicente Carlos O. Costa¹, José Iranildo M. Melo⁴, Marcus Tullius Scotti¹, Marianna V. Sobral¹, Silvany S. Araujo⁵, Manoel Adrião G. Filho⁵, Marcelo S. Silva¹, Josean F. Tavares^{1,*}.

¹ Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa, PB-Brasil; yurimanguiera@ltf.ufpb.br; lucas.abreu@ltf.ufpb.br; vicente@ltf.ufpb.br; mtscotti@gmail.com; mariannavbs@gmail.com; marcelosobral.ufpb@gmail.com; josean@ltf.ufpb.br.

² Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa, PB-Brasil; ramonlima.fr@hotmail.com.

³ Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, Departamento de Química, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900, Maceió, AL-Brasil; annedayse_@hotmail.com.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 58429-500, Campina Grande, PB-Brasil; tournefort@gmail.com.

⁵ Laboratório de Fisiologia Animal e Molecular Aplicada, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco., 52171-900, Recife – PE-Brasil ny_araujo@hotmail.com; handeladriao@yahoo.com.br.

Correspondente: Josean F. Tavares - josean@ltf.ufpb.br; Tel.: +55-83-3216-7427.

Abstract: Neste estudo, foi realizado a caracterização de metabólitos secundários das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* (Leguminosae) e atividade biológica de um destes metabólitos secundários. A investigação fitoquímica foi realizada através do emprego de técnicas cromatográficas, uma sequência de coluna, HPLC de fase reversa analítico e preparativo possibilitou o isolamento de 9 compostos: uma diidrochalcona C-glicosilada inédita (Zornioside) (**1**), um megastigmano glicosilado: roseosídeo (**9**) e sete compostos fenólicos: 7-metoxiflavanona (**2**), 7,4'-dimetoxisoflavona (**3**), isoorientina-3'-O- metil éter (**4**), isovitexina (**5**), Ácido (*Z*)-*O*-cumárico glicosilado (**6**), Ácido (*E*)-*O*-cumárico glicosilado (**7**), diidromelilotosídeo (**8**). As estruturas dos compostos isolados foram determinadas com base nas análises espectroscópicas de 1D e 2D-NMR, HR-IES-EM, IR e dicroísmo circular (DC) A atividade citotóxica do Zornioside (**1**) foi avaliada contra linhas de células tumorais (MCF-7, HCC1954, T-47D, 4T1, HL60) e uma linha celular não-tumoral (RAW264.7) utilizando o ensaio MTT. O composto (**1**) foi seletivamente citotóxico para células de leucemia HL60 (IC₅₀: 37,26 µM).

Palavras chaves: *Zornia brasiliensis*; Compostos fenólicos; Dihidrochalcona.

Conflito de interesse: todos os autores não têm nenhum para declarar.

Introdução

A espécie *Zornia brasiliensis* (Leguminosae) é conhecida popularmente como “urinária”, “urinana” e “carrapicho”, possui uso popular como diurética e para o tratamento de doenças venéreas (Agra et al., 2007). *Zornia brasiliensis* está distribuída nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil associadas aos domínios farmacêuticos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (BFG, 2015), mas principalmente no Nordeste brasileiro (Mohlenbrock, 1961), e Venezuela (Tropicos.org. Jardim Botânico de Missouri). Foram isoladas três flavonas das partes aéreas desta espécie, e uma delas, 7-metoxiflavona, demonstrou efeitos antinociceptivos (Silva et al., 2013). Um estudo prévio de *Z. brasiliensis* revelou a composição química e a atividade antitumoral do óleo essencial de suas folhas (Costa et al., 2015). Estudos fitoquímicos anteriores do gênero *Zornia* demonstraram a presença de várias isoflavonas (Ren et al., 2012; Leuner et al., 2013). Assim, é necessária uma maior exploração dos constituintes químicos que compõem essa espécie.

Neste artigo, relatamos os resultados do estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto de *Z. brasiliensis*. Nove compostos foram isolados e identificados (Figura 1), com exceção da isovitexina, todos relatados pela primeira vez nesta espécie. Entre estes compostos, isolou-se e identificou pela primeira vez uma dihidrochalcona, zorniosídeo. Os outros compostos conhecidos foram identificados comparando seus dados espectroscópicos com os dados relatados na literatura.

Material e Métodos

Procedimentos experimentais gerais

As análises cromatográficas analíticas foram realizadas utilizando um sistema de CLAE da Shimadzu (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AT, autoinjeter SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU-20A, detector SPD-M20A diode array e CBM-20A. A coluna utilizada foi Phenomenex Gemini[®] C18 (250 mm x 4,6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini[®] C18 (4 mm x 3 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm). As análises cromatográficas preparativas foram realizadas utilizando um sistema de CLAE da Shimadzu equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-6AD, injetor Rheodyne, detector SPD-M10A diode array e SCL-10A. A coluna utilizada foi ACE C18 (250 mm x 21,2 mm e 5 µm de tamanho de partícula). Os solventes orgânicos utilizados foram acetonitrila e metanol, ambos com grau CLAE (TEDIA[®], Brazil) e água ultrapura obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore[®]). As análises de RMN foram realizadas em espectrômetro VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz, operando a 500 MHz para RMN de ¹H e 125 MHz para RMN de ¹³C e BRUKER ASCEND 400, operando a 400 MHz para RMN de ¹H e 100 MHz para RMN de ¹³C. Foram utilizados clorofórmio deuterado (CDCl₃) e dimetilsufóxido deuterado (DMSO-*d*₆) (todos da Cambridge Isotope Laboratories) contendo TMS como padrão interno. Para obtenção dos espectros de massas das substâncias foram utilizados espectrômetros de massas de baixa e alta resoluções da marca Bruker, modelo Ion Trap-amaZonX e modelo micrOTOF II, respectivamente, pela técnica de Ionização por Eletrospray, modo positivo (IES⁺) ou negativo (IES⁻). As amostras foram diluídas em uma solução de água:acetonitrila ou água:metanol (Milli-Q Millipore[®]/ TEDIA[®], Brazil). Para os ensaios de dicroísmo circular

(DC) foi utilizado um espectropolarímetro de Absorbância em UV-Visível Jasco, modelo J-815. As análises de infravermelho foram obtidas na região (4000 a 400 cm^{-1}) utilizando aparelho de IRPrestige-21 (Shimadzu), utilizando-se de 1 mg de amostra em pastilhas de brometo de potássio (KBr), com frequência medida em cm^{-1} .

Material botânico

As partes aéreas de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) foram coletadas no município de Serra Branca (07° 29'46 "S e 36° 44'36" W, altitude: atingindo 712 m de altitude), estado da Paraíba (PB), Brasil, em março de 2016. Autorização de coleta: N. 53894-1, concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO). Com cadastro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número: ADD107E. A espécie foi devidamente identificada pelo botânico Dr. José Iranildo Miranda de Melo, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Uma exsicata foi depositada no Herbário Arruda Câmara (HACAM), Campus I da Universidade Estadual da Paraíba, sob o código 1862.

Extração e isolamento

As partes áreas de *Z. brasiliensis* (5 kg) foram submetidas a extração para obtenção extrato etanólico bruto e das frações hexânica, diclorometano, acetato de etila, acetato de etila-metanol (90:10) e acetato de etila-metanol (50:50) (Silva et al., 2013).

A fração diclorometano (10,0g) foi submetida à cromatografia em coluna (CC) utilizando sílica gel (ART 7734, MERCK, 0.060 – 0.200 mm e 70 - 230 mesh ASTM) como

fase estacionária e como eluentes: hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade (100 mL cada, Fr 1-Fr 30). A Fr 13 foi submetida ao HPLC preparativo, utilizando sistema isocrático de água e acetonitrila (55:45), obtendo assim o composto **2** (T_R = 45 min, 30,0 mg). As Fr 25 e 26 foram reunidas e submetidas ao HPLC preparativo nas mesmas condições anteriormente descritas, obtendo o composto **3** (T_R = 36,6 min, 35,0 mg).

Uma alíquota da fração acetato de etila-metanol (50:50) (10 g) foi submetida à CC em condições semelhantes à descrita anteriormente para fração diclorometano (250 mL cada, Fr 1-Fr 21). A Fr 8-9 foi submetida ao HPLC preparativo, utilizando um sistema isocrático composto por água (0,1 % e ácido fórmico) e metanol (65:35), obtendo os compostos **1** (T_R = 31,6 min, 22,8 mg), **4** (T_R = 57,1 min, 33,8 mg), **5** (T_R = 51 min, 17,3 mg), **6** (T_R = 13,8 min, 16,0 mg), **7** (T_R = 28,5 min, 12,6 mg), **8** (T_R = 21,8 min, 13,7 mg) e **9** (T_R = 20,6 min, 19,1 mg).

(3S)-1-{2',4'-dihydroxy-3'-[(2''R,3''S,4''S,5''R,6''S)-3'',4'',5''-trihydroxy-6''-(hydroxymethyl)oxan-2''-yl]phenyl}-3-hydroxy-3-phenylpropan-1-one (**1**): óleo amarelo; $IV_{\max}$ 1613, 3434 cm^{-1} , ^1H e ^{13}C RMN (500 MHz e 125 MHz, respectivamente, em $\text{DMSO-}d_6$), ver Tabela 1; HR-IES-EM m/z 421,1508 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_9$, 421,1493).

Cálculo teórico de EDC

Todas as otimizações geométricas e pesquisas conformacionais foram realizadas usando o Spartan'16 para Windows (Wavefunction, Irvine, CA, EUA). A geometria da estrutura química do composto foi inicialmente otimizada com um campo de força Merck Molecular Force Field (MMFF) (Halgren, 1996) e uma nova otimização geométrica foi então realizada com base no método semi-empírico, Austin Model 1 (AM1) (Dewar, et al., 1985).

Foi utilizado um método de busca sistemática que analisou os conformeros e selecionou os conformadores com a mínima energia mínima usando AM1 e um algoritmo de Monte-Carlo (Metropolis e Ulam, 1949). Depois disso, as energias mínimas mais baixas foram selecionadas e otimizadas com base em um cálculo do modo vibracional usando DFT (teoria funcional da densidade) (Becke, 1988). Os cálculos DFT foram realizados usando Spartan 16 (Wavefunction, Irvine, CA, EUA, Vereecken, et al., 1998). Cada estrutura foi examinada no nível B3LYP / 6-311G * e as estruturas de energia mais baixas foram selecionadas para os cálculos. O mínimo global na superfície de energia potencial foi utilizado para a determinação de cada geometria. Os espectros de EDC calculados foram obtidos por teoria funcional de densidade (DFT) e DFT dependente do tempo (TD-DFT) usando Gaussian 09 e analisadas usando GUIs GaussSum v 3.0 (O'Boyle, et al., 2008).

Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de viabilidade celular MTT (Mosmann, 1983) foi realizado para estudar o efeito citotóxico de **1**. MCF-7 (adenocarcinoma da mama), HCC1954 (carcinoma de glândula mamária), T-47D (carcinoma de glândula mamária), 4T1 (carcinoma de glândula mamária), HL60 (leucemia promielocítica), células RAW264.7 (macrófagos) foram cultivadas num meio RPMI 1640 ou meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS), 100 U / mL de penicilina e 100 µg/ mL de estreptomicina em ar umidificado com 5% de CO₂ a 37 ° C. Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 96 poços (100 µL de 2 x 10⁵ células/ mL) e 1 (0,39 - 50 µg/ mL) dissolvido em DMSO: Meio (1:99 v/ v; 100 µL) foi adicionado a cada poço e incubado por 72 h. DMSO 1% foi usado como controle negativo. Adicionou-se MTT a uma concentração final de 0,5 mg / mL, incubou-se durante 4 h e depois solubilizou-se com 100 µL de DMSO. A produção de formazan foi medida a 570 nm num espectrofotômetro de placa.

Resultados e Discussão

Elucidação estrutural e identificação dos compostos isolados (1-9)

Os compostos de 1-9 (Figura 9) foram isolados do extrato etanólico das partes aéreas por cromatografia de coluna seguida de HPLC preparativo. As substâncias conhecidas foram determinadas através da comparação de seus dados espectroscópicos com os da literatura. Os compostos conhecidos foram identificados como 7-metoxiflavanona (**2**) (Kostrzewa-Susłow and Janeczko, 2012), 7,4'-dimetoxisoflavona (**3**) (Veitch et al., 2003), isoorientina-3'-O-metil éter (**4**) (Delazar et al., 2006), isovitexina (**5**) (Peng et al., 2005), ácido (*Z*)-O-cumárico glicosilado (**6**) (Canuto et al., 2010), ácido (*E*)-O-cumárico glicosilado (**7**) (Canuto et al., 2010), diidromelilotosídeo (**8**) (Chana et al., 2012; Taskova et al., 2005), roseosídeo (**9**) (Shen and Terazawa, 2001; Rao, 2017).

O composto **1** apresentou o pico em m/z 421,1508 $[M+H]^+$ determinado por HRIESEM compatível com a fórmula molecular $C_{21}H_{24}O_9$ (calcd. 421,1493). Os espectros de 1H RMN e HSQC mostraram sinais referentes à existência de dois anéis aromáticos, um tetra substituído [δ_H 7,77 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,40 (1H, d, $J = 8,8$ Hz)], e outro monosubstituído [δ_H 7,42 (2H, m), 7,33 (2H, m), 7,24 (1H, m)], um hidrogênio carbinólico [δ_H 5,12 (1H, dd, $J = 4,4, 8,8$ Hz), δ_C 70,2(C- β)] (Tabela 4)

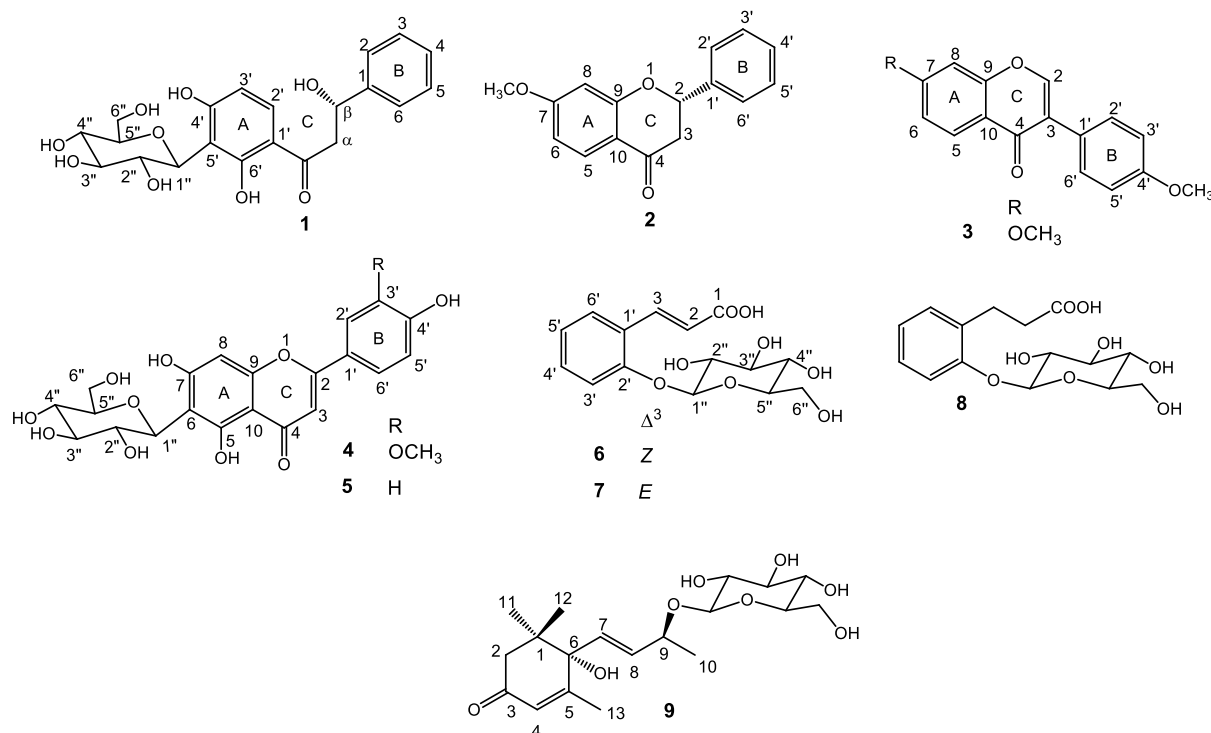


Figura 9 Estruturas químicas dos compostos 1-9 de *Z. brasiliensis*.

Além de dois hidrogênios metilênicos não equivalentes [δ_H 3,09 (1H, dd, $J = 4,4, 14,8$ Hz), 3,32 (1H, m), δ_C 47,1(C- α)], o 1H - 1H COSY (Figura 10) mostrou uma correlação entre os hidrogênios carbinólico e o metilênico, revelando que estes são vicinais, além disso, o experimento de HMBC revelou que existe uma correlação entre estes hidrogênios e a carbonila [δ_C 202,8(C=O)], contudo foi observada apenas a correlação entre o hidrogênio carbinólico com o C-2 [δ_C 125,9], desta forma sendo este β a carbonila [δ_C 202,8], já os hidrogênios metilênicos possuem uma correlação com o C-1 [δ_C 145,2] sendo assim α a carbonila [δ_C 202,8]. Os carbonos em [δ_C 108,1 (C-3'), 112,5 (C-1'), 112,7 (C-5'), 132,8 (C-2'), 164,1 (C-6'), 164,2 (C-4')] confirmaram a presença de um anel aromático tetra-substituído em **1**.

No HMBC foi observada outra correlação entre o H-2' [δ_H 7,77 (1H, d, $J = 8,8$), δ_C 132,8] com a carbonila [δ_C 202,8], confirmando que esta C=O encontra-se ligada ao anel aromático tetra substituído. Já os quatro sinais de carbonos [δ_C 145,2 (C-1), 125,9 (C-2),

127,0 (C-4) e 128,1 (C-5)] atribuídos à existência de seis carbonos confirma a presença do anel aromático monosubstituído. O HMBC mostrou uma correlação do H-2/6 [δ_H 7,42 (2H, m), δ_C 125,9(C-2/6)] com C- β [δ_C 70,2], confirmando a ligação do anel monossustituído ao C- β . A presença do sinal [δ_H 4,16 (1H, d, $J = 10,0$ Hz)], que associados a outros sinais de hidrogênios carbinólicos alifáticos [δ_H 4,01 (1H, t, $J = 8,8$ Hz), 3,66 (dd, 2H, $J = 1,2, 11,2$ Hz), 3,19-3,10 (3H, m)] revelaram a presença de uma unidade osídica em **1**, contudo a ausência do hidrogênio e do carbono anomérico mostra que trata-se de um C-glicosídeo. O HSQC mostrou existência de seis carbonos correlacionados a esses hidrogênios, e o valor da constante de acoplamento do H-1'' ($J = 10,0$ Hz) confirma que se trata da β -glicose. O HMBC revelou uma correlação entre o H-1'' [δ_H 4,16 (1H, d, $J = 10,0$ Hz), δ_C 73,6] com [δ_C 112,7 (C-5')], [δ_C 164,2 (C-4')], [δ_C 164,1 (C-6')] confirmando assim a inserção da β -glicose na posição 5' através de uma ligação do tipo C-C.

Os cálculos TD-DFT dos espectros EDC dos compostos foram comparados com o experimental. Foram feitas comparações de espectros simulados de EDC para os compostos (β S) - Zorniosídeo e (β R) - Zorniosídeo. Os espectros simulados de EDC do primeiro não mostrou picos em qualquer comprimento de onda de 800 nm até 200 nm que corroboram com os espectros de EDC experimental β S (Figura 11), como observado na figura, é diferente do espectro simulado da configuração β R. Esses resultados permitem propor a configuração da dihidrochalcona glicosilada isolada. Portanto, este é o primeiro relato desta dihidrochalcona na literatura.

Tabela 4Dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **1**.

No.	1		
	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J, Hz)	HMBC
1	145,2, C	-	-
2	125,9, CH	7,42, m	4, β
3	128,1, CH	7,33, m	1, 5
4	127,0, CH	7,24, m	2
5	128,1, CH	7,33, m	1, 2
6	125,1, CH	7,42, m	4, β
1'	112,5, C	-	-
2'	132,8, CH	7,77, d (8,8)	6', 4', C=O
3'	108,1, CH	6,40, d (8,8)	4', 5', 1'
4'	164,2, C	-	-
5'	112,7, C	-	-
6'	164,1, C	-	-
α	47,1, CH ₂	3,09, dd (4,4, 14,8) 3,32, m	β , C=O, 1
β	70,2, CH	5,12, dd (4,4, 8,8)	α , 1, 2
C=O	202,8, C	-	-
1''	73,2, CH	4,61, d (10,0)	5', 2'' 6', 4', 5'', 3''
2''	70,5, CH	4,01, t (8,8)	1'', 3''
3''	79,0, CH	3,19, m	-
4''	69,7, CH	3,19, m	2''
5''	81,5, CH	3,19, m	-
6''	61,4, CH ₂	3,66, dd (1,2, 11,2)	-

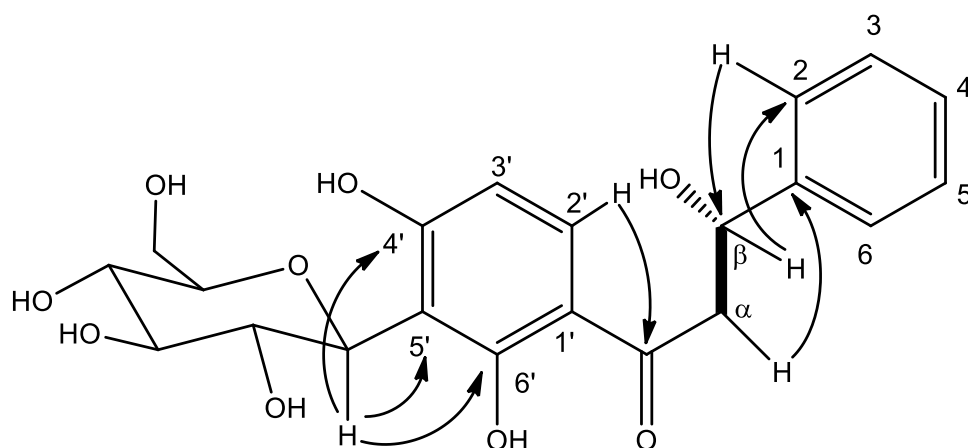


Figura 10 Correlações HMBC ($\rightarrow$) e a interação ^1H - ^1H COSY (ligação escura) para **1**.

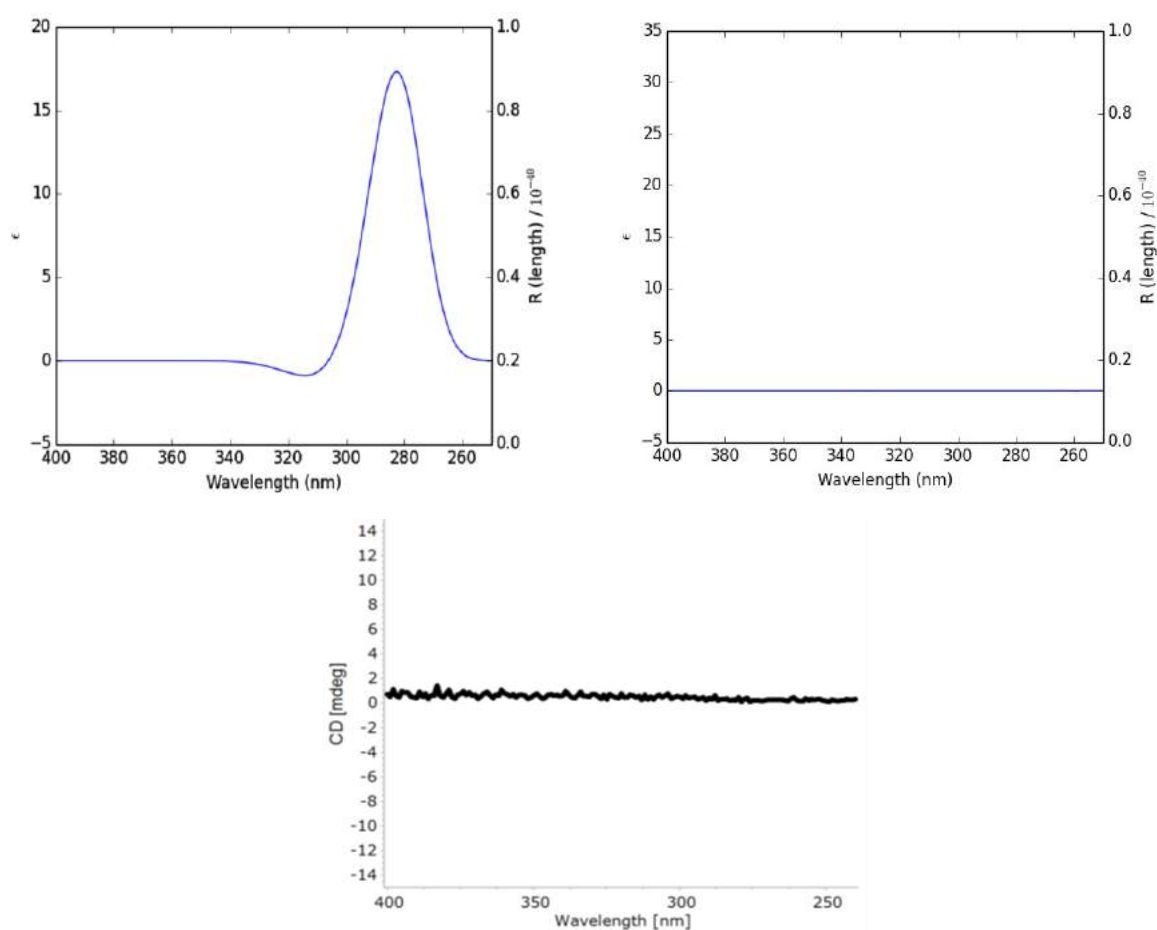


Figura 11 Comparação de espectros de EDC de (βR) -Zornoside (a) e (βS) -Zornoside (b) simulados usando formas de banda Gaussianas ($\sigma = 0,4 \text{ eV}$), ao espectro de EDC experimental (c).

O espectro de RMN ^{13}C do composto **2** revelou sinais compatíveis com a existência de dois anéis aromáticos [δ_{C} 114,0 (C-10), 128,8 (C-5), 110,2 (C-6), 100,9 (C-8), 138,7 (C-1'), 126,1 (C-2'/6'), 128,7 (C-3'/4'/5')] estando apenas dois desses carbonos aromáticos oxigenados, δ_{C} 166,2 (C-7) e δ_{C} 163,5 (C-9), esta proposta é corroborada pelos dados de RMN ^1H , onde é possível observar a existência de um padrão de hidrogenação do tipo ABX [δ_{H} 7,867 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 6,616 (1H, dd, $J = 2,5$ e $9,0$ Hz), 6,491 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)] e de um anel aromático monosubstituído [δ_{H} 7,471 (2H, m), 7,434 (2H, m), 7,383 (1H, m)], desta forma **2** é um flavonoide, contudo a existência de uma carbonila δ_{C} 190,5 (C-4) e dos sinais δ_{C} 80,0 (C-2) e 44,3 (C-2'), e dos seus respectivos sinais de RMN ^1H [δ_{H} 5,47 (1H, dd, $J = 3,0$ e $13,5$ Hz), 2,840 (1H, dd, $J = 3,0$ e $17,0$ Hz, H-3b)], 3,057 (1H, dd, $J = 13,5$ e $17,0$ Hz, H-3a). Este conjunto de sinais revelam que este flavonide é do tipo flavanona. A metoxila δ_{C} 55,5 (-OCH₃) teve sua posição determinada através do HMBC que mostrou uma correlação entre o hidrogênio δ_{H} 3,820 (3H, s) da metoxila com o δ_{C} 162,2 (C-7).

Os espectros de EDC calculados do composto **2**, (2*S*)-7-metoxiflavonas são semelhantes com o experimental (Figura 12), por outro lado (2*R*)-7-metoxiflavonas diferem significativamente do último (material suplementar - Figura 26). Os comprimentos de onda em torno de 330, 292 e 263 nm com sinais positivos, negativos e negativos, respectivamente, que estão em acordo qualitativo com o espectro experimental exibindo as mesmas características em 329, 304 e 268 nm, permitem atribuir a configuração absoluta (2*S*) deste composto. Diante destes dados e em comparação com os dados da literatura o composto **2** trata-se da (2*S*)-7-metoxiflavanona (Kostrzewa-Susłow and Janeczko, 2012), relatado pela primeira vez para o gênero *Zornia*.

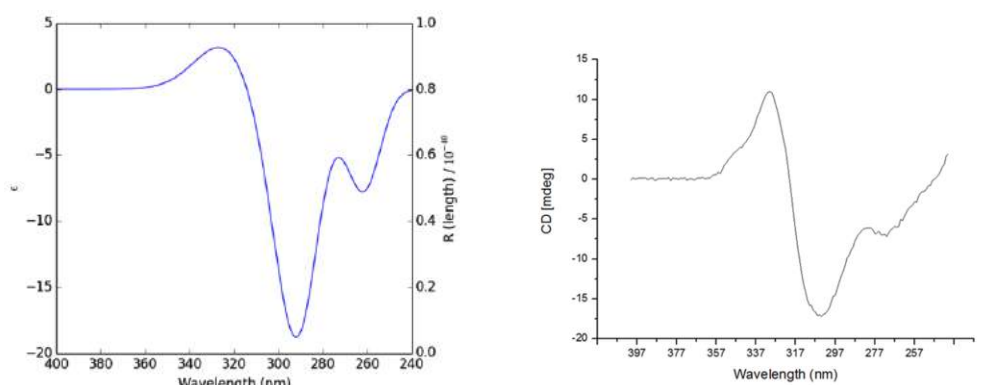


Figura 12 Comparação dos espectros EDC de (2S) -7-metoxiflavona, simulado usando formas de banda Gaussiana ($\sigma = 0,4$ eV), ao espectro EDC experimental.

O espectro de RMN ^{13}C do composto **3** apresentou uma similaridade com o composto **2**, com sinais compatíveis com a existência de dois anéis aromáticos [δ_{C} 118,8 (C-10), 127,8 (C-5), 114,5 (C-6), 100,1 (C-8), 124,2 (C-1'), 130,1 (C-2'/6'), 113,9 (C-3'/5')] estando três desses carbonos aromáticos oxigenados, δ_{C} 163,9 (C-7), δ_{C} 157,9 (C-9) e δ_{C} 159,6 (C-4'), é possível observar no espectro de RMN ^1H a existência de um padrão de hidrogenação do tipo ABX [δ_{H} 8,203 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 6,984 (1H, dd, $J = 2,0$ e 8,5 Hz), 6,839 (1H, d, $J = 2,5$ Hz)] e um outro anel aromático dissubstituído com um padrão de hidrogenação AA'BB' [δ_{H} 7,429 (2H, d, $J = 9,0$ Hz) e 6,961 (2H, d, $J = 9,0$ Hz)], desta forma **3** também é um flavonoide, porém com esqueleto diferente de **2**, uma vez que existe um sinal δ_{C} 152,0 (C-2) aliado ao seu respectivo sinal de RMN ^1H [δ_{H} 7,902 (1H, s, H-2)] e uma carbonila δ_{C} 175,9 (C-4) revelam que este flavonoide é do tipo isoflavona. Foi observada ainda a existência de duas metoxilas δ_{C} 55,3 e 55,8 (2 x -OCH₃), estas tiveram suas posições determinadas com o auxílio do HMBC que mostrou uma correlação entre o hidrogênio δ_{H} 3,899 (3H, s) e o δ_{C} 163,9(C-7) e a outra correlação foi entre o δ_{H} 3,8923 (3H, s) e o δ_{C} 159,6 (C-4'). Diante destes dados e em comparação com os dados da literatura o composto **3** trata-se da 7,4'-dimetoxisoflavona (Veitch et al., 2003), relatado pela primeira vez para *Zornia brasiliensis*.

O espectro de RMN ^{13}C do composto **4** apresentou uma similaridade com o composto **2** e **3**, contendo também dois anéis aromáticos [δ_{C} 103,3 (C-10), 109,5 (C-6), 94,5 (C-8),

121,7 (C-1'), 110,4 (C-2'), 116,3 (C-5') e 120,7 (C-6')] estando cinco desses carbonos aromáticos oxigenados, δ_C 161,1 (C-5), δ_C 163,6 (C-7), δ_C 156,9 (C-9) δ_C 148,6 (C-3') e δ_C 151,5 (C-4'), é possível observar no espectro de RMN 1H a existência de um padrão de hidrogenação do tipo ABX [δ_H 7,545 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,520 (1H, s) e 6,939 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)] e um outro anel aromático pentasubstituído δ_H 6,841 (1H, s), desta forma o composto **7** trata-se de flavonoide, porém com esqueleto diferente de **2** e **3**, uma vez que existe um sinal δ_C 103,1 (C-3) juntamente com seu respectivo sinal de δ_H 6,518 (1H, s) e uma carbonila δ_C 182,1 (C-4) revelam que este flavonide é do tipo flavona. A metoxila δ_C 56,4 (-OCH₃) teve sua posição determinada com o auxílio do HMBC que mostrou uma correlação entre o hidrogênio δ_H 3,872 (3H, s) e o δ_C 148,6 (C-3'). Foram ainda observados sinais [δ_C 71,0 (C-2''), 79,5 (C-3''), 70,6 (C-4''), 81,9 (C-5''), 61,9 (C-6'')] atribuídos a uma unidade osídica, contudo não foi possível observar a existência de um hidrogênio anomérico, o deslocamento do C-1'' é δ_C 73,7 (C-1''), sendo assim esta unidade osídica é a glicose e encontra-se ligada a aglicona através de uma ligação do tipo C-C. Além disso o H-1'' [δ_H 4,592 (1H, d, $J = 9,6$ Hz)] demonstra que trata-se da β -glicose. O HMBC revelou que a unidade osídica está inserida na posição C-6 da aglicona, uma vez que existe a correlação entre o H-1'' [δ_H 4,592 (1H, d, $J = 9,6$ Hz)] e o δ_C 109, (C-6). Diante destes dados e em comparação com os dados da literatura o composto **7** trata-se da isoorientina-3'-O- metil éter (Delazar et al., 2006), relatado pela primeira vez para o gênero *Zornia*.

O composto **5** diverge do composto **4** pela ausência de um sinal referente a metoxila em δ_C 56,4 (-OCH₃) desta forma estando apenas quatro carbonos aromáticos oxigenados, δ_C 161,1 (C-5), δ_C 163,6 (C-7), δ_C 156,9 (C-9) e δ_C 151,5 (C-4'), e no espectro de RMN 1H obervou-se a existência de um padrão de hidrogenação do tipo AA'BB' [δ_H 7,896 (2H, d, $J = 9,02$ Hz) e 6,921 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)]. Assim o composto **5** foi identificado como sendo a isovitexina (Peng et al., 2005).

O composto **6** apresentou revelou no espectro de RMN ^{13}C seis sinais aromáticos [δ_{C} 125,0 (C-1'), 129,6 (C-2'), 121,0 (C-3'), 130,0 (C-4'), 114,6 (C-5'), 154,9 (C-6')], outros dois sinais de carbonos olefínicos exocíclicos [δ_{C} 132,9 (C-3), 123,2 (C-2)] e um outro sinal de carbonila de ácido carboxílico em δ_{C} 168,6 (C-1), desta forma evidenciando que o composto **6** possui um esqueleto fenólico do tipo C6-C3. O RMN ^1H confirmou que **6** é o isômero geométrico cis, uma vez que o H-3 e H-2 apresentaram respectivamente os deslocamentos δ_{H} 7,032 (1H, d, $J = 12,8$ Hz) e 5,928 (1H, d, $J = 12,8$ Hz). Além disso, foi possível observar deslocamentos de RMN ^{13}C referente a existência de uma unidade osídica compátivel com a glicose [δ_{C} 100,7 (C-1''), 73,3 (C-2''), 76,5 (C-3''), 69,6 (C-4''), 77,10 (C-5''), 60,7 (C-6'')], além do próton anomérico δ_{H} 4,852 (1H, d, $J = 7,2$ Hz) que confirma trata-se da β -glicose. A inserção do açúcar na aglicona foi definida pela padrão de hidrogenação do anel aromático [δ_{H} 7,601 (1H, d, $J = 7,2$ Hz), 7,258 (1H, t, $J = 8,0$ Hz), 7,109 (1H, d, $J = 8,4$ Hz) e 6,936 (1H, $J = 7,6$ Hz)], desta forma o anel aromático está 1,2 disubstituído, e a β -glicose inserida no C-2'. Diante destes dados e em comparação com os dados da literatura o composto **6** trata-se do ácido (Z)-O-cumárico glicosilado (Canuto et al., 2010), relatado pela primeira vez para o gênero *Zornia*.

O composto **7** apresentou dados de RMN ^{13}C e ^1H semelhantes ao do composto **6**, contudo no composto **7** o H-3 e H-2 apresentaram respectivamente os deslocamentos δ_{H} 7,909 (1H, d, $J = 16,4$ Hz) e 6,541 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), assim o composto **7** trata-se do isômero trans do composto **6**. Logo, **7** foi identificado como sendo ácido (E)-O-cumárico glicosilado (Canuto et al., 2010), relatado pela primeira vez para o gênero *Zornia*.

O composto **8** revelou dados semelhantes as substâncias **6** e **7**, contudo não foram observados os sinais referentes aos carbonos e hidrogênios olefínicos C-2 e C-3. Esta proposta é corroborada pelo deslocamentos químicos de RMN do C-3, em δ_{H} 2,807 (2H, dl) e δ_{C} 27,2 (C-3), contudo os sinais referente ao C-2 não puderam ser detectados devido estarem com

mesmo intervalo de deslocamento do DMSO- d_6 no qual foram realizados os espectros de RMN ^{13}C e ^1H . O espectro de IESEM revelou uma $m/z = 327,91$ $[\text{M-H}]^-$ compatível com uma substância semelhante aos isômeros **6** e **7**, porém sem a dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3. Diante destes dados e em comparação com os descritos na literatura foi possível identificar **8** como diidromelilotosídeo (Chana et al., 2012; Taskova et al., 2005), relatado pela primeira vez no gênero *Zornia*.

O composto **9** apresentou uma $m/z = 386,82$ $[\text{M-H}]^-$. O espectro de RMN ^{13}C mostrou a presença de 4 metilas (Me) [δ_{C} 20,8 (C-10), 23,0 (C-11), 24,0 (C-12), 18,9 (C-13)] onde o deslocamento δ_{H} 1,802 (3H, d, $J = 1,2$ Hz) da Me-13 revelou que a mesma está ligada a um carbono olefínico. Foi observado ainda um sinal δ_{C} 197,4 (C-3) referente a uma carbonila $\alpha\beta$ -insaturada, além de sinais atribuídos a presença de uma ligação olefínica exocíclica [δ_{C} 130,3 (C-7) e 133,3 (C-8)] e de uma unidade osídica semelhante a presente nos compostos **6**, **7** e **8**. Desta forma, **9** se possui um esqueleto carbônico do tipo megastigmane glicosilado. O HMBC revelou duas correlações da Me-13 com δ_{C} 125,6 (C-4) e 164,2 (C-5) confirmando que a Me-13 está ligada a um carbono olefínico, ainda foi possível observar outra correlação da Me-13 com δ_{C} 77,8 (C-6), desta forma confirmando a posição da Me-13 no C-5. Ainda no HMBC foi observado uma correlação dos hidrogênios diasterotópicos de C-2 [δ_{H} 2,434 (1H, d, $J = 16,8$ Hz) e 2,062 (1H, t, $J = 16,8$ Hz)] com δ_{C} 197,4 (C-3), determinando a posição da carbonila em C-3. A Me-11 [δ_{H} 0,922 (3H, s)] e a Me-12 [δ_{H} 0,915 (3H, s)] apresentaram correlações no HMBC com os carbonos C-1 (δ_{C} 40,9), C-2 (δ_{C} 49,3) e C-6 (δ_{C} 77,8) confirmando assim que as Me-11 e 12 estão ligadas ao C-1. A Me-10 [δ_{H} 1,176 (3H, d, $J = 6,4$ Hz)] se correlaciona com o C-9 (δ_{C} 73,6) e com C-8 (δ_{C} 133,3) e hidrogênio anomérico mostrou uma correlação com o C-9 (δ_{C} 73,6), confirmando a inserção do açúcar na posição C-9. A estereoquímica absoluta dos carbonos quirais C-6 e C-9 foram determinadas através de EDC experimental e teórico. O EDC experimental e simulado mostra sinal positivo a 247 e

270 nm, respectivamente, logo 6S e 9S (Figura 13). O EDC simulado dos outros isômeros do roseosídeo é significativamente diferente do experimental (Figura 37). Desta forma **9** foi identificado como sendo roseosídeo (6S, 9S) (Shen and Terazawa, 2001; Rao, 2017), relatado pela primeira vez para o gênero *Zornia*.

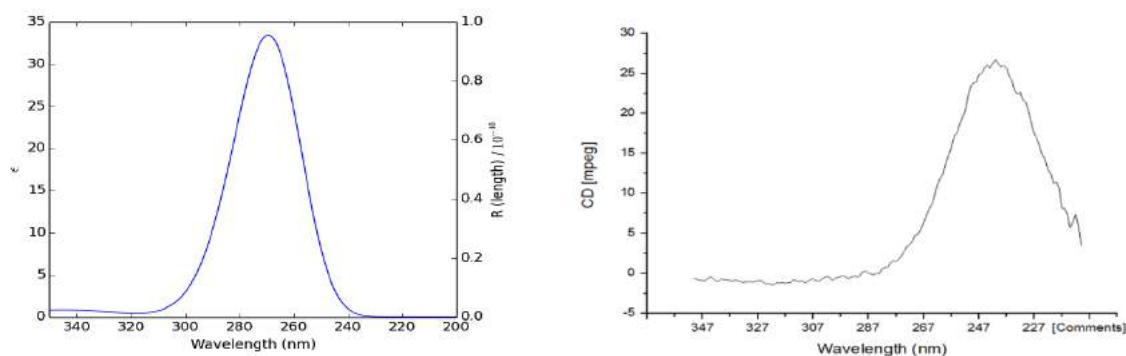


Figura 13 Comparação dos espectros de EDC de (6S, 9S) roseósido simulado usando formas de banda gaussianas ($\sigma = 0,6$ eV), ao espectro EDC experimental.

Atividade citotóxica do zornioside (1)

Os resultados do ensaio de actividade citotóxica são apresentados na Tabela 5. Os valores de IC_{50} (concentração de fármaco a que 50% das células são viáveis em relação ao controlo), calculados a partir das curvas dose-sobrevivência geradas pelos ensaios MTT realizados após o tratamento com zornioside, variou de 37,26 (27,28 – 43,00) μ M, para células HL60, até 93,42 (73,90 – 109,96) μ M, para células 4T1. Então, como pode ser visto, o composto foi seletivamente citotóxico para células de leucemia promielocítica HL60. Na linhagem celular não tumoral (macrófagos RAW 264.7), o zornioside mostrou citotoxicidade fraca, valor IC_{50} de 106,92 (96,52 – 118,78) μ M.

Tabela 5

Atividade citotóxica contra células tumorais e não tumorais do zornosídeo.

Linhagem celular	^aIC₅₀ (μM)	IC₅₀ (μM) Doxorubicina
MCF-7	76,26 (57,38 – 101,35)	1,9
T47D	76,09 (53,14 – 89,76)	1,43
4T1	93,42 (73,90 – 109,96)	2,0
HCC 1954	81,88 (68,57 – 97,74)	1,43
HL-60	37,26 (27,28 – 43,00)	0,3
RAW 264.7	106,92 (96,52 – 118,78)	2,8

^a Os dados são apresentados como valores IC₅₀ e intervalos de confiança de 95% obtidos por regressão não linear para todas as linhas celulares a partir de duas experiências independentes. Tempo de exposição: 72 h. MCF-7: adenocarcinoma de mama; HCC1954: carcinoma da glândula mamária; T-47D: carcinoma da glândula mamária; 4T1: carcinoma da glândula mamária; HL60: leucemia promielocítica; RAW264.7: macrófagos.

Com a exceção do composto **3** e **5**, todos os outros compostos são relatados pela primeira vez no gênero *Zornia*, sendo o composto **1** descrito pela primeira vez na literatura. O composto **1** demonstrou melhor atividade citotóxica contra a linhagem celular HL-60 (15,65 μg / mL). Assim, o estudo mostrou que a espécie *Zornia brasiliensis* é um bioprodutor de compostos fenólicos e o zornosídeo possui potencial citotóxico.

Contribuições dos autores

YMN, LAS, RLL, ADSS e CVOC participaram da análise fitoquímica. MSS e JFT participaram da interpretação dos espectros de RMN. JIMM participou de identificação botânica. A MTS participou da aquisição e interpretação de dados computacionais. MVS, SSA e MAGF participaram na aquisição e interpretação de ensaios biológicos.

Materiais Suplementares

Dados suplementares (dados espectroscópicos de infravermelho 1D e 2D RMN, EM, DC e IV dos dados espectroscópicos de compostos **1** e 1D e 2D RMN dos compostos discutidos nos resultados).

Referências

- Agra, M.F., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2007. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. bras. Farmacogn.* 17, 114-140.
- Baill, J.C.L., Champavier, Y., Chulia, A.J., Habrioux, G., 2000. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3β and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sci.* 66, 1281-1291.
- Becke A. D., 1988. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A.* 38, 3098-3100.
- BFG – The Brazil Flora Group., 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66, 1085-1113.
- Canuto, K.M., Silveira, E.R., Bezerra, A.M.E., 2010. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith). *Quím. Nova.* 33, 662-666.
- Chana, Y.Y., Wub, C.H., Wuc, S.J., Wud, T.S., 2002. The Constituents and Synthesis of Cryptamygin-A from the Stem Bark of *Cryptocarya amygdalina*. *J. Chin. Chem. Soc.* 49, 263-268.
- Costa, E.V., Menezes, L.R., Rocha, S.L., Baliza, I.R., Dias, R.B., Rocha, C.A., Soares, M.B., Bezerra, D.P., 2015. Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of *Zornia brasiliensis*. *Planta Med.* 81, 563-567.

- Delazar, A., Gibbons, S., Kosari, A.R., Nazemiyeh, H., Modarresi M., Nahar, L., Sarker S.D., 2006. Flavone c-glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *Daru*. 14, 109-114.
- Dewar, M.J.S.E., Zoebisch, G., Healy, E.F., Stewart, J.J.P., 1985. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 3902-3909.
- Fedoreyev, A.S., Bulgakov, V.P., Brishchenko, O.V., Veselova, M.V., Krivoschekova, O.E., Kulesh, N.I., Denisenko, V.A., Tchernoded, G.K., Zhuravlev, Y.N., 2008. Isoflavonoid Composition of a Callus Culture of the Relict Tree *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7023-7031.
- Halgren, T.A., 1996. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* 17, 490-519.
- Huang, D., Guo, W., Gao, J., Chen, J., Olatunji, J.O., 2015. *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau Ethanol Extract Inhibits Hepatoma in Mice through Upregulation of the Immune Response. *Molecules*. 20, 17405-17428.
- Kostrzewa-Susłow, E., Janeczko, T., 2012. Microbial Transformations of 7-Hydroxyflavanone. *Scientific World J.* 2012, 1-8.
- Leuner, O., Havlik, J., Hummelova, J., Prokudina, J.H.E., Novy, P., Kokoska, L., 2013. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. *J. Sci. Food Agr.* 93, 575-579.
- Metropolis N., Ulam S., 1949. The Monte Carlo method. *J. Am. Stat. Assoc.* 44, 335-341.
- Mikell, J. R., Khan, I. A., 2012. Bioconversion of 7-hydroxyflavanone: isolation, characterization and bioactivity evaluation of twenty-one phase I and phase II microbial metabolites. *Chem Pharm Bull.* 60, 1139-1145.
- Mohlenbrock, R.H., 1961. A monograph of the leguminous genus *Zornia*. *Webbia*. 16, 1-141.

- Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65, 55-63.
- O'Boyle, N. M., Tenderholt, A.L., Langner, K.M., 2008. Cclib: a library for package-independent computational chemistry algorithms. *J. Comp. Chem*. 29, 839-845.
- Peng, J., Fan, G., Hong, Z., Chai, Y., Wu, Y., 2005. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1074, 111-115.
- Rao, S.A., 2017. Isolation, absolute configuration and bioactivities of megastigmanes or C¹³ isonorterpinoides. *Chemistry International*. 3, 69-91.
- Ren, F.Z., Gao, Y.Q., Cheng, X.X., Li, L.H., Chen, S.H., Zhang, Y.L., 2012. Study on Chemical Constituents of *Zornia diphylla*. *Chin. Pharm. J*. 47, 179-181.
- Shen, Y., Terazawa, M., 2001. Dihydoroseoside, a new cyclohexanone glucoside, from the leaves of shirakamba (*Betula platyphylla* Sukatchev var.japonica Hara). *J Wood Sci*. 47, 145-148.
- Silva, A.D.S., Cavalcante-Silva, L.H.A., Da Matta, C.B.B., De Farias Silva, D., De Araújo, M.V., Tavares, J.F., Da Silva, M.S., Alexandre-Moreira, M.S., 2013. Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. *Nat. Prod. Res*. 27, 1695-1699.
- Taskova, R.M., Gotfredsen, C.H., Jensen, S.R., 2005. Chemotaxonomic markers in Digitalideae (Plantaginaceae). *Phytochemistry*. 66, 1440–1447.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/> (accessed 06 October 2017).
- Veitch, N.C., Sutton, P.S.E., Kite, G.C., Ireland, H.E., 2003. Six New Isoflavones and a 5-Deoxyflavonol Glycoside from the Leaves of *Ateleia herbert-smithii* J. *Nat. Prod*. 66, 210-216.

Vereecken L., Pierloot K., Peeters J., 1998. B3LYP-DFT characterization of the potential energy surface of the $\text{CH(X (2)Pi)+C}_2\text{H}_2$ reaction. J. Chem. Phys. 108, 1068-1080.

Wavefunction, Irvine, CA, USA. [http:// www.wavefun.com/products/windows/SpartanModel/win_model.html/](http://www.wavefun.com/products/windows/SpartanModel/win_model.html/) (accessed in 07 September 2017).

Yu, De-H., Bao, Y.M., Wei, C.L., An, L.J., 2005. Studies of Chemical Constituents and Their Antioxidant Activities From *Astragalus mongholicus* Bunge. Biomed. Environ. Sci. 18, 297-301.

Materiais Suplementares: Zornioside, uma diidrochalcona C-glicosilada, e outros compostos de *Zornia brasiliensis*

Yuri Manguiera do Nascimento, Lucas Silva Abreu, Ramon Leal Lima, Anne Dayse Soares Silva, Vicente Carlos Oliveira Costa, José Iranildo Miranda de Melo, Marcus Tullius Scotti, Marianna Vieira Sobral, Silvany de Sousa Araujo, Manoel Adrião Gomes Filho, Marcelo Sobral da Silva, Josean FechineTavares*.

* Correspondencia: josean@lft.ufpb.br ; Tel.: +55-83-3216-7427

Conteúdo:

Figura 14. As estruturas dos compostos **1 – 9** isolados de *Zornia brasiliensis*.

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 16. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 17. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 19. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 20. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 21. Espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**

Figura 22. Expansão do espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 23. Espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 24. Expansão do espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 25. Expansão do espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 26. Espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 27. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 28. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 29. Espectro de RMN - NOESY (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

Figura 30. Espectro de HR-IES-EM do composto **1**.

Figura 31. Espectro de IV do composto **1**.

Figura 32. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **2**.

Figura 33. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **2**.

Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 2.

Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, 125 MHz, CDCl_3) do composto 2.

Figura 36. Espectro de RMN - NOESY (500 MHz, CDCl_3) do composto 2.

Figura 37. Espectro de EDC de (2*R*)-7-metoxiflavanona simulado usando formas de banda Gaussianas (a, $\sigma = 0.4$ eV) (a), (4*S*)-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(1*E*,3*R*)-3-[(2'*S*,3'*S*,4'*R*,5'*R*,6'*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy}but-1-en-1-yl]cyclohex-2-en-1-one (b, $\sigma = 0.6$ eV) (b), (4*R*)-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(1*E*,3*R*)-3-[(2'*S*,3'*S*,4'*R*,5'*R*,6'*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy}but-1-en-1-yl]cyclohex-2-en-1-one (c, $\sigma = 0.6$ eV) (c), (4*R*)-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(1*E*,3*S*)-3-[(2'*S*,3'*S*,4'*R*,5'*R*,6'*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy}but-1-en-1-yl]cyclohex-2-en-1-one (d, $\sigma = 0.6$ eV) (d).

Figura 38. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 3.

Figura 39. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 3.

Figura 40. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 3.

Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 3.

Figura 42. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 3.

Figura 43. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 3.

Figura 44. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 4.

Figura 45. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 4.

Figura 46. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 4.

Figura 47. Espectro de ^{13}C -RMN (BB, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 4.

Figura 48. Espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 4.

Figura 49. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 4.

Figura 50. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 4.

Figura 51. Espectro de RMN de ^1H - (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 5.

Figura 52. Expansão do espectro de RMN de ^1H - (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 5.

Figura 53. Expansão do espectro de RMN de ^1H - (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 5.

Figura 54. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 5.

Figura 55. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 6.

Figura 56. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 6.

Figura 57. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 6.

Figura 58. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 6.

Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 7.

Figura 60. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 7.

Figura 61. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 7.

Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 7.

Figura 63. Espectro de IES-EM do composto 8.

Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 8.

Figura 65. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 8.

Figura 66. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **8**.

Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **8**.

Figura 68. Espectro de IES-EM do composto **9**.

Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

Figura 70. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

Figura 71. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

Figura 72. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

Figura 74. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

Figura 75. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

Figura 76. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

Figura 77. Espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

Figura 78. Espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

Figura 79. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

Composto 2

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 2,84 (1H, *dd*, $J = 3,4, 17,0$ Hz, H-3b), 3,05 (1H, *dd*, 1H, $J = 13,5, 17,0$ Hz, H-3a), 5,47 (1H, *dd*, 1H, $J = 3,0, 13,5$ Hz, H-2), 6,49 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-8), 6,61 (1H, *dd*, $J = 2,5, 9,0$ Hz, H-6), 7,38 (1H, *m*, H-4'), 7,43 (2H, *m*, H-3',5'), 7,47 (2H, *m*, H-2',6'), 7,86 (1H, *d*, $J = 9,0$ Hz, H-5); ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 44,3 (C-3), 55,6 (O-CH₃), 80,0 (C-2), 100,9 (C-8), 110,2 (C-6), 114,8 (C-10), 126,1 (C-6', 2'), 128,7 (C-3', 4', 5'), 128,8 (C-5), 138,7 (C-1'), 163,5 (C-9), 166,2 (C-7), 190,5 (C-4).

Composto 3

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 3,82 (3H, *s*, OCH₃-4'), 3,89 (3H, *s*, OCH₃-7), 6,83 (1H, *d*, $J = 2,5$ Hz, H-8), 6,98 (1H, *dd*, $J = 2,0, 8,5$ Hz, H-6), 6,95 (1H, *d*, $J = 9,0$ Hz, H-3', 5'), 7,90 (1H, *s*, H-2), 8,20 (1H, *d*, $J = 9,0$ Hz, H-5); ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 55,3 (4'-OCH₃), 55,8 (7'-OCH₃), 100,1 (C-8), 113,9 (C-3',5'), 114,5 (C-6), 118,4 (C-10), 124,2 (C-1'), 124,9 (C-3), 127,8 (C-5), 130,1 (C-2',6'), 152,0 (C-2), 157,9 (C-9), 159,6 (C-4'), 163,9 (C-7), 175,9 (C-4).

Composto 4

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3,11-3,20 (3H, *m*, H-3', 4', 5'), 3,42 (1H, *dd*, $J = 5,6, 11,6$ Hz, H-6"a), 3,68 (1H, *d*, $J = 10,8$ Hz, H-6"b), 3,87 (3H, *s*, OCH₃-3'), 4,07 (1H, *t*, $J = 9,2$ Hz, H-2"), 4,59 (1H, *d*, $J = 9,6$ Hz, H-1"), 6,51 (1H, *s*, H-3), 6,84 (1H, *s*, H-8), 6,93 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 7,52 (1H, *sl*, H-1'), 7,54 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'); ^{13}C RMN (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 56,5 (C-OH3-3'), 61,9 (C-6''), 70,6 (C-4''), 71,0 (C-2''), 73,7 (C-1''), 79,5 (C-3''), 81,9 (C-5''), 94,5 (C-8), 103,1 (C-3), 103,3 (C-10), 109,5 (C-6), 110,4 (C-2'), 116,3 (C-5'), 120,7 (C-6'), 121,7 (C-1'), 148,6 (C-3'), 151,5 (C-4'), 156,9 (C-9), 161,1 (C-5), 163,6 (C-2, 7), 182,1 (C-4).

Composto 5

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,12-3,21 (3H, *m*, H-3', 5'), 3,42 (1H, *dd*, $J = 5,6, 11,6$ Hz, H-6"a), 3,68 (1H, *d*, $J = 10,8$ Hz, H-6"b), 4,09 (1H, *t*, $J = 8,8$ Hz, H-2'), 4,59 (1H, *d*, $J = 9,6$ Hz, H-1"), 6,49 (1H, *s*, H-8), 6,71 (1H, *s*, H-3), 6,92 (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz, H-3', 5'), 7,89 (2H, *d*, $J = 9,2$ Hz, H-2', 6'); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ 61,47 (C-6''), 70,2 (C-4''), 70,6 (C-2''), 73,1 (C-1''), 79,0 (C-3''), 81,5 (C-5''), 93,8 (C-8), 102,57 (C-2), 102,8 (C-10), 109,0 (C-6), 116,0 (C-3', 5'), 120,9 (C-1'), 128,9 (C-2', 6'), 156,3 (C-9), 160,6 (C-5), 161,5 (C-4'), 163,3 (C-2, 7), 181,7 (C-4).

Composto 6

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,15-3,32 (4H, *m*, H-2", 3", 4", 5''), 3,48 (1H, *dd*, $J = 5,6, 12,0$ Hz, H-6"b), 3,68 (1H, *dd*, $J = 2,0, 12,0$ Hz, H-6"a), 4,85 (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H-2'), 5,92 (1H, *d*, $J = 12,8$ Hz, H-6'), 6,93 (1H, *t*, $J = 7,6$ Hz, H-3'), 7,03 (1H, *d*, $J = 12,8$ Hz, H-5'), 7,1 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz, H-3), 7,25 (1H, *t*, $J = 8,0$ Hz, H-4'), 7,60 (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H-6); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ 60,7 (C-6''), 69,6 (C-4''), 73,3 (C-2''), 76,5 (C-3''), 77,0 (C-5''), 100,7 (C-1''), 114,4 (C-3'), 121,0 (C-5'), 123,2 (C-6'), 125,0 (C-1'), 129,6 (C-2), 130,0 (C-4'), 132,9 (C-3), 154,9 (C-2'), 168,6 (C-1).

Composto 7

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,15-3,32 (4H, *m*, H-2", 3", 4", 5''), 3,47 (1H, *dd*, $J = 5,6, 11,6$ Hz, H-6"b), 3,68 (1H, *dd*, $J = 1,6, 11,6$ Hz, H-6"a), 5,0 (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz, H-1"), 6,54 (1H, *d*, $J = 16,0$ Hz, H-2), 7,03 (1H, *t*, $J = 7,6$ Hz, H-5'), 7,18 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz, H-3'), 7,37 (1H, *td*, H-4'), 7,68 (1H, *dd*, $J = 1,6, 8,0$ Hz, H-6'), 7,90 (1H, *d*, $J = 16,4$ Hz, H-3); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ 60,6 (C-6''), 69,6 (C-4''), 73,3 (C-2''), 76,8 (C-3''), 77,1 (C-5''), 100,0 (C-1''), 115,1 (C-3'), 120,1 (C-2), 122,0 (C-5'), 123,4 (C-1'), 128,1 (C-6'), 131,4 (C-4'), 138,5 (C-3), 155,6 (C-2'), 168,1 (C-1).

Composto 8

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2,80 (2H, *dl*, H-3), 3,16-3,31 (4H, *m*, H-2", 3", 4", 5''), 3,48 (1H, *dd*, $J = 5,6, 12,0$ Hz, H-6"b), 3,70 (2H, *d*, $J = 11,6$ Hz, H-6'a), 4,80 (1H, *d*, $J = 5,2$, H-1"), 6,87 (1H, *t*, H-5'), 7,06 (1H, *d*, $J = 8,0$, H-3'), 7,13 (2H, *t*, H-4', 6'); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ 27,2 (C-3), 62,5 (C-6''), 71,3 (C-4''), 74,9 (C-2''), 78,1 (C-3", 5"), 102,6 (C-1"), 116,2 (C-3'), 123,3 (C-5'), 128,6 (C-4'), 130,9 (C-6'), 131,6 (C-1'), 156,9 (C-2'), 178,0 (C-1).

Composto 9

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2,06 (1H, *d*, $J = 16,8$, H-2a), 2,43 (1H, *d*, $J = 16,8$, H-2b), 2,93 (1H, *t*, $J = 8,4$, H-9), 4,16 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz, H-1'), 5,74 (1H, *d*, H-7), 5,75 (1H, *s*, H-4), 5,79 (1H, *t*, H-8); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18,9 (C-13), 20,8 (C-10), 23,0 (C-11), 24,0 (C-12), 40,9 (C-1), 49,3 (C-2), 61,0 (C-6'), 70,0 (C-4'), 73,6 (C-9), 74,6 (C-2'), 76,8 (C-3', 5'), 77,8 (C-6), 100,8 (C-1'), 125,6 (C-4), 130,3 (C-7), 133,3 (C-8), 164,2 (C-5), 197,4 (C-3).

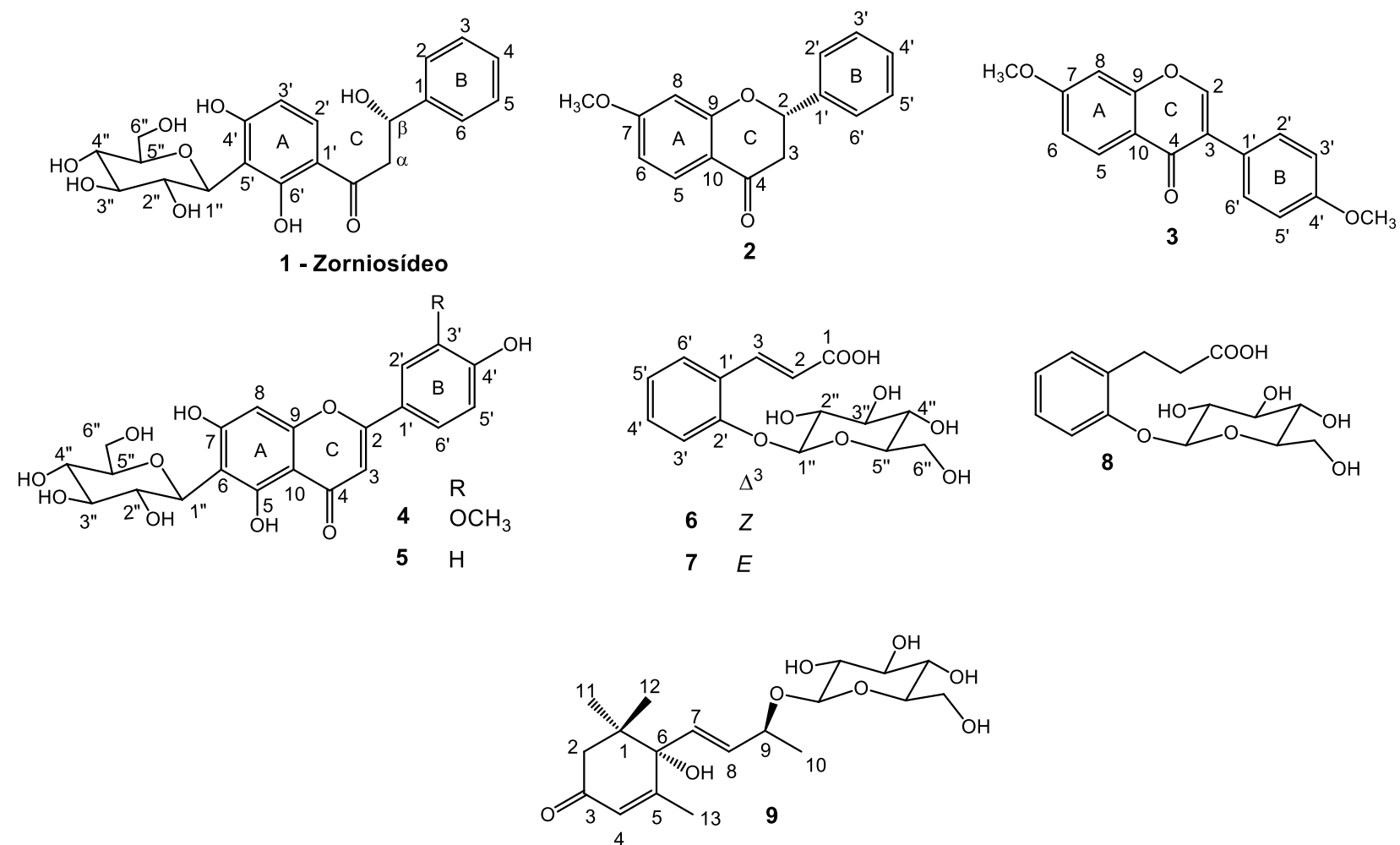


Figura 14. As estruturas dos compostos **1 – 9** isolados de *Zornia brasiliensis*.

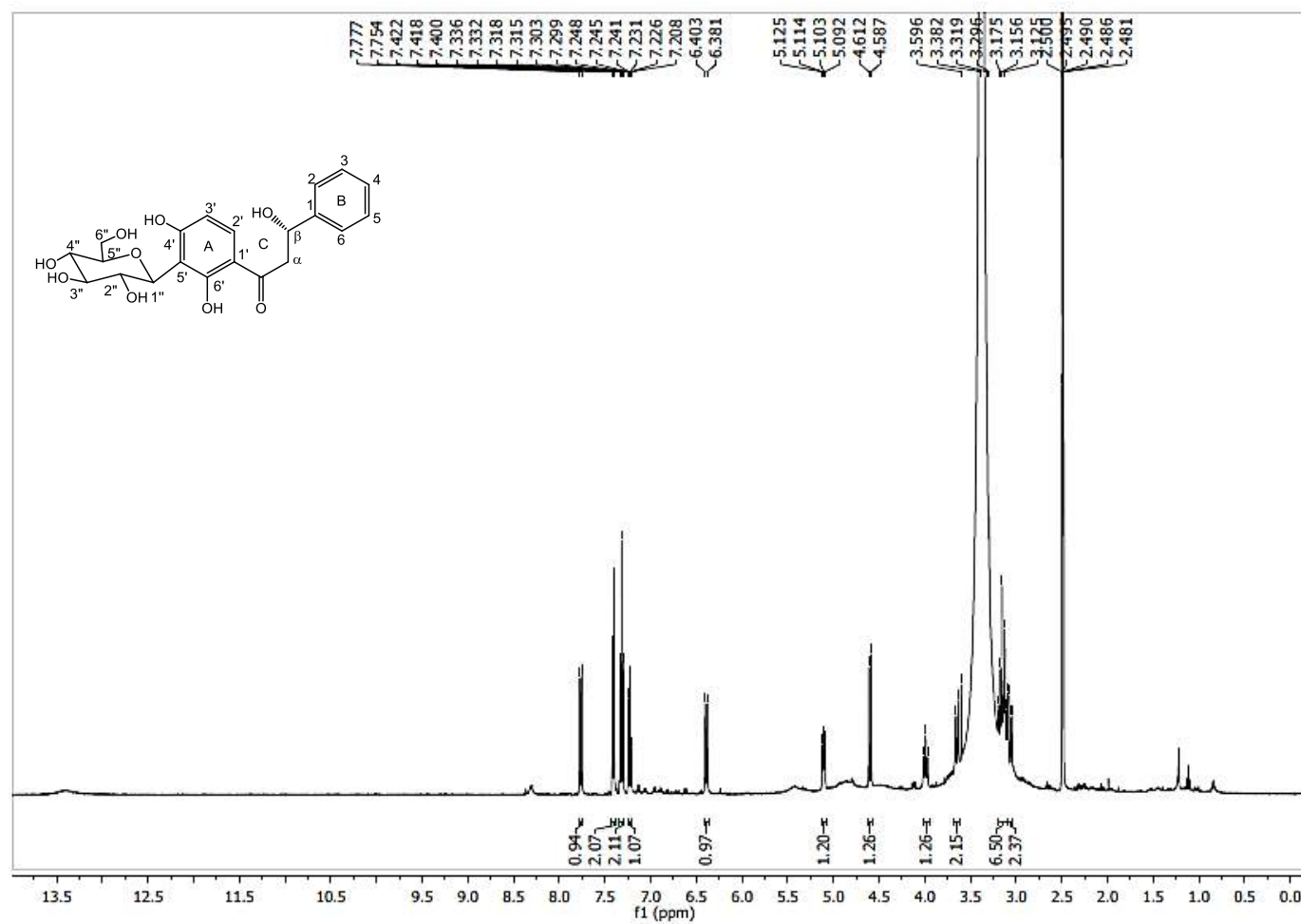


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **1**.

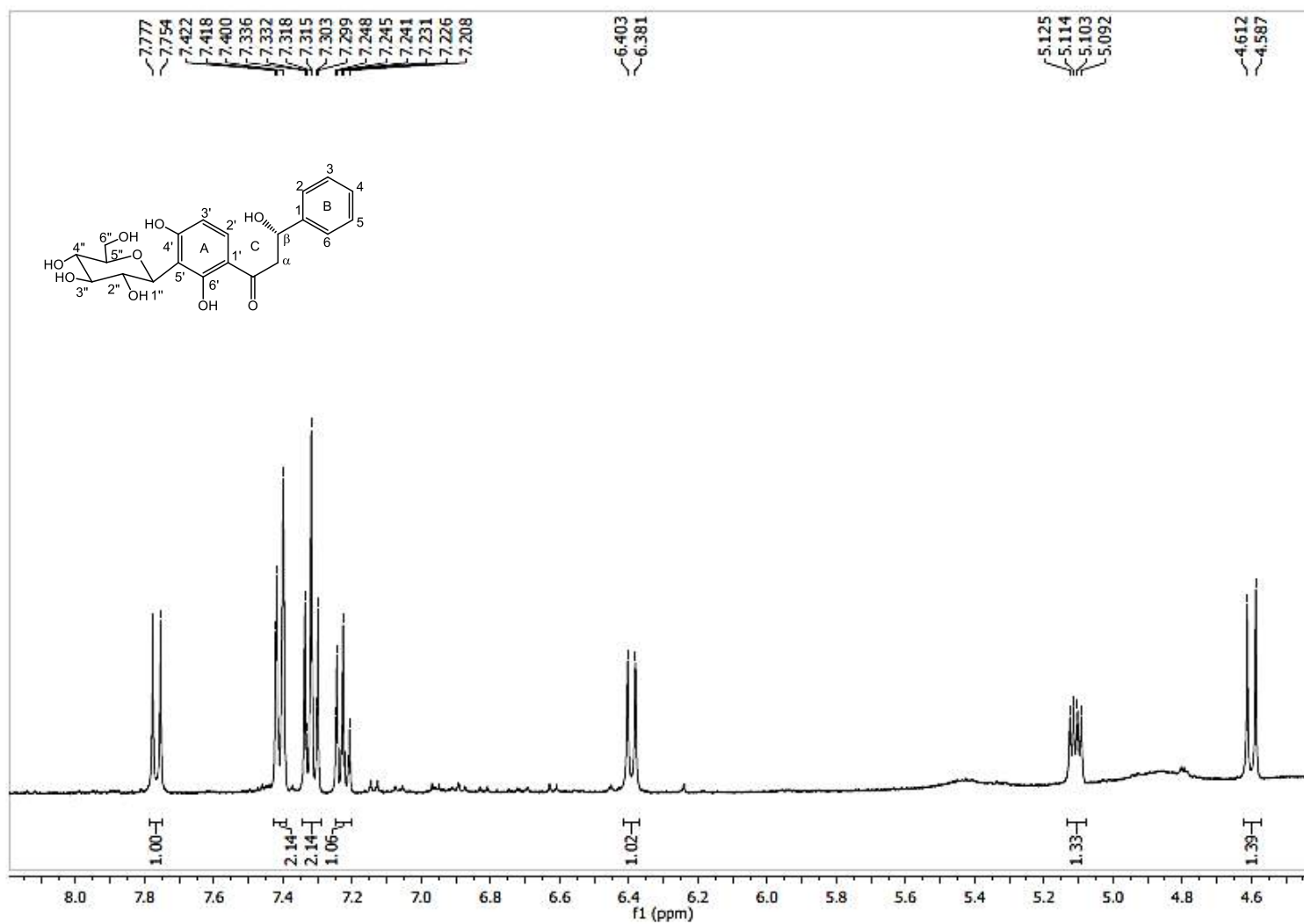


Figura 16. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 1.

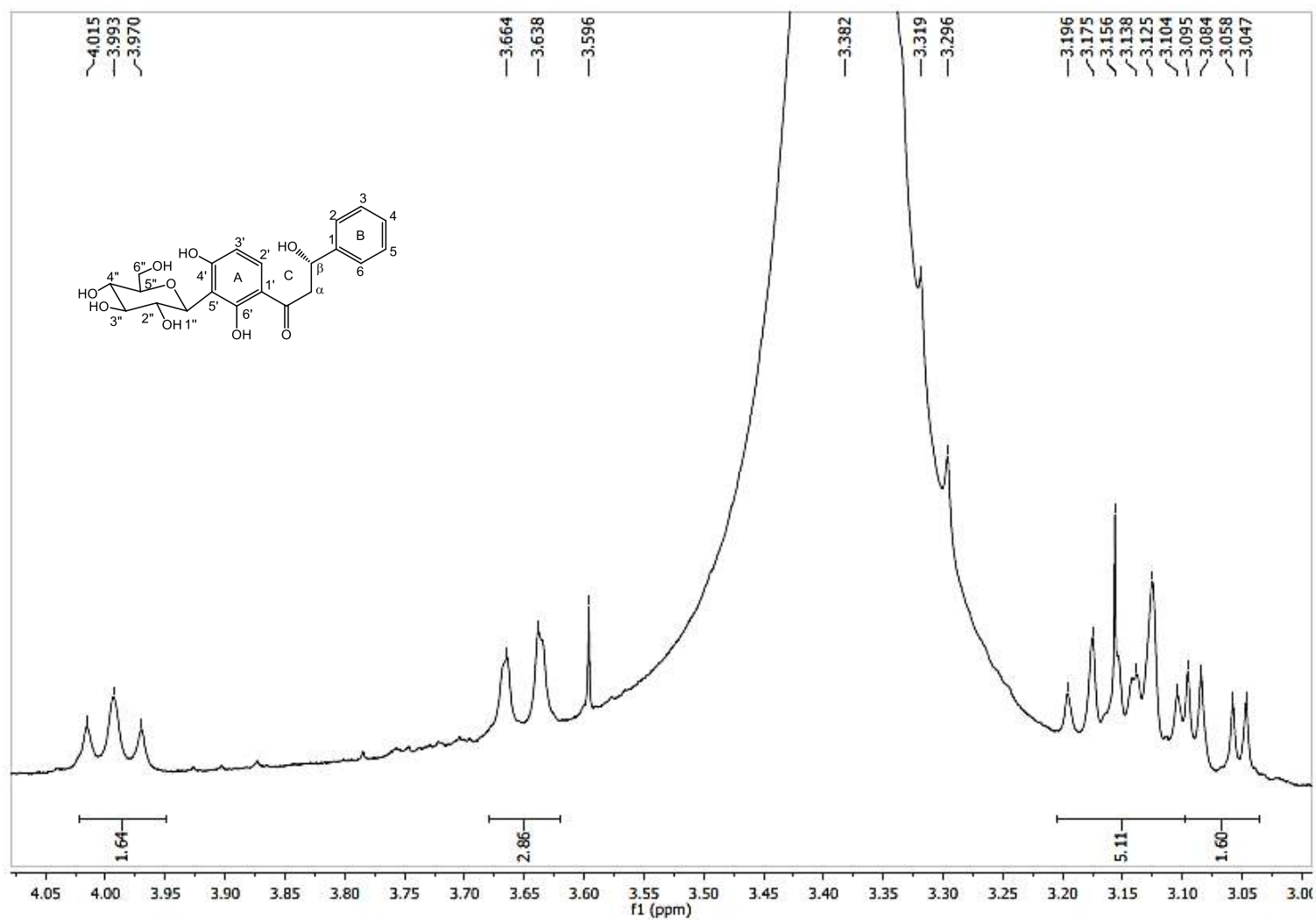


Figura 17. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 1.

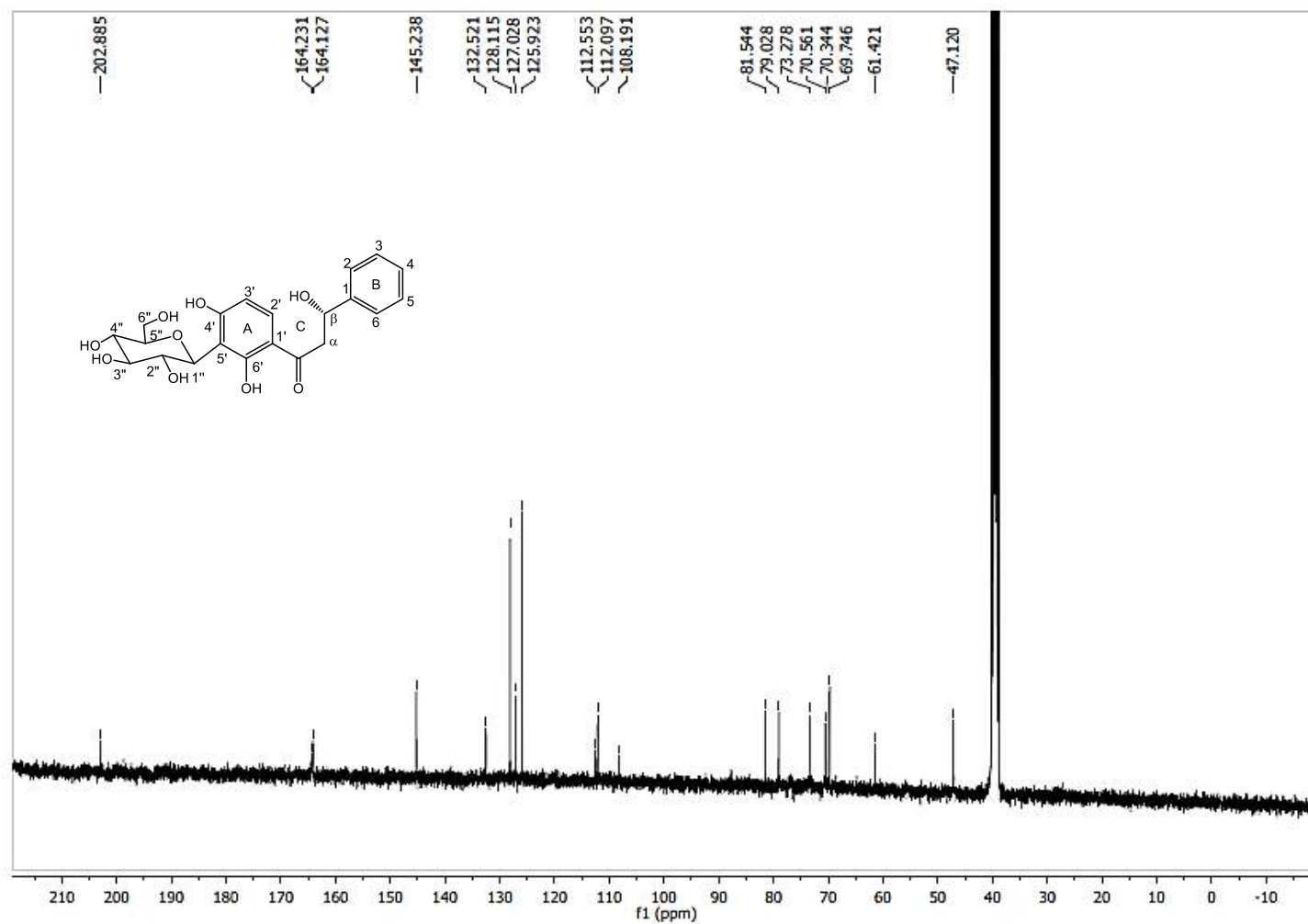


Figura 18. Espectro de RMN de ¹³C (BB, 100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **1**.

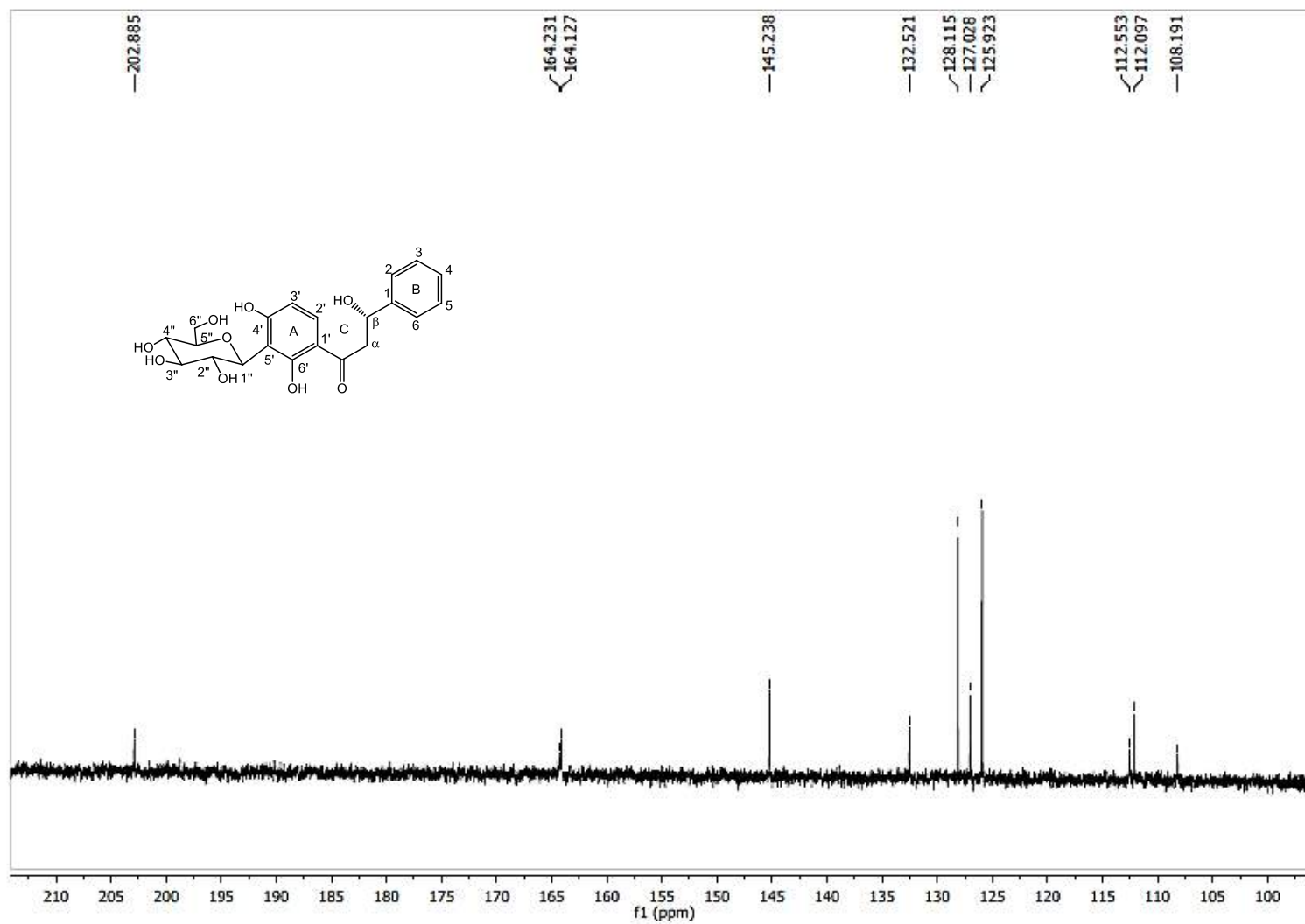


Figura 19. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 1.

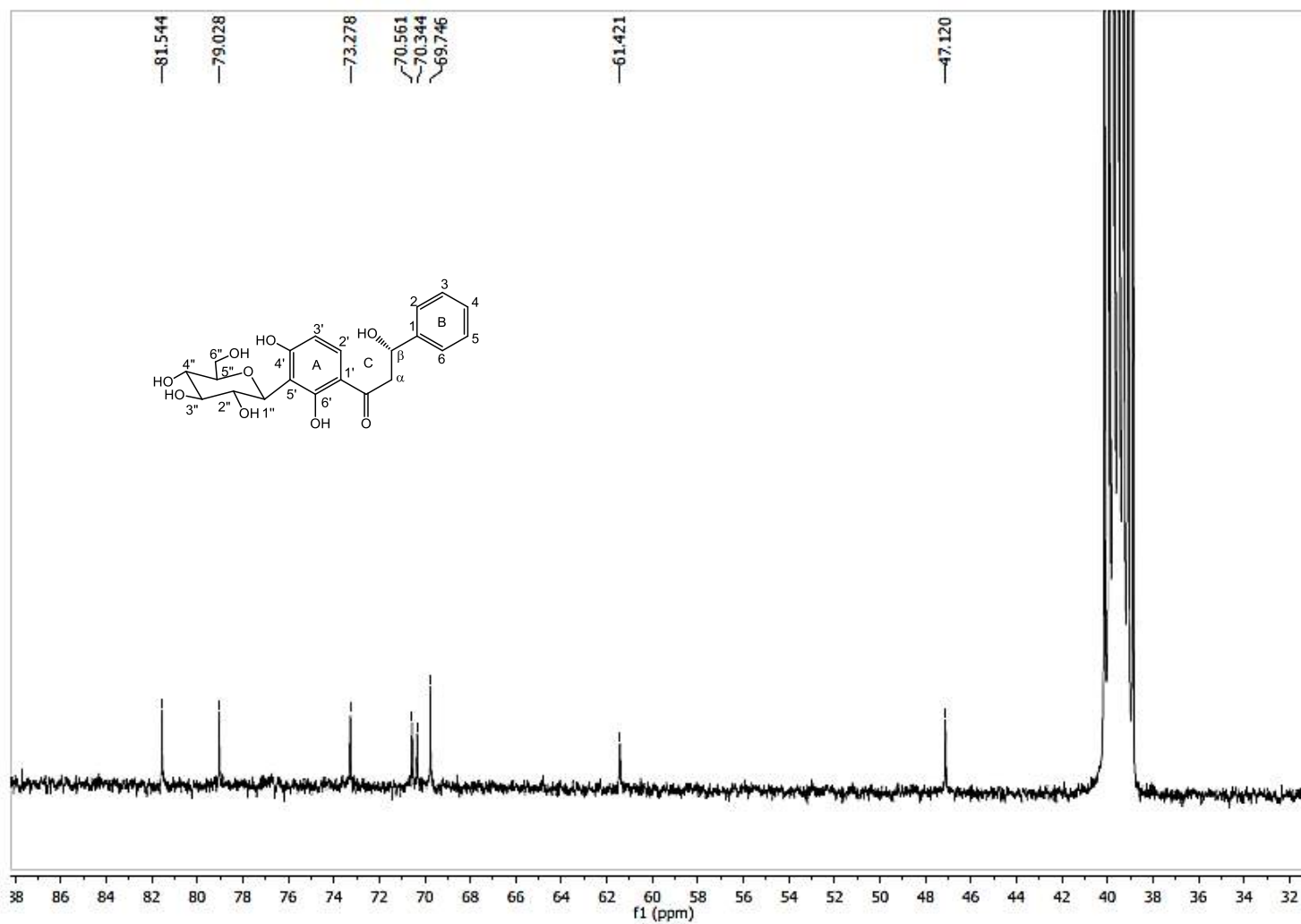


Figura 20. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **1**.

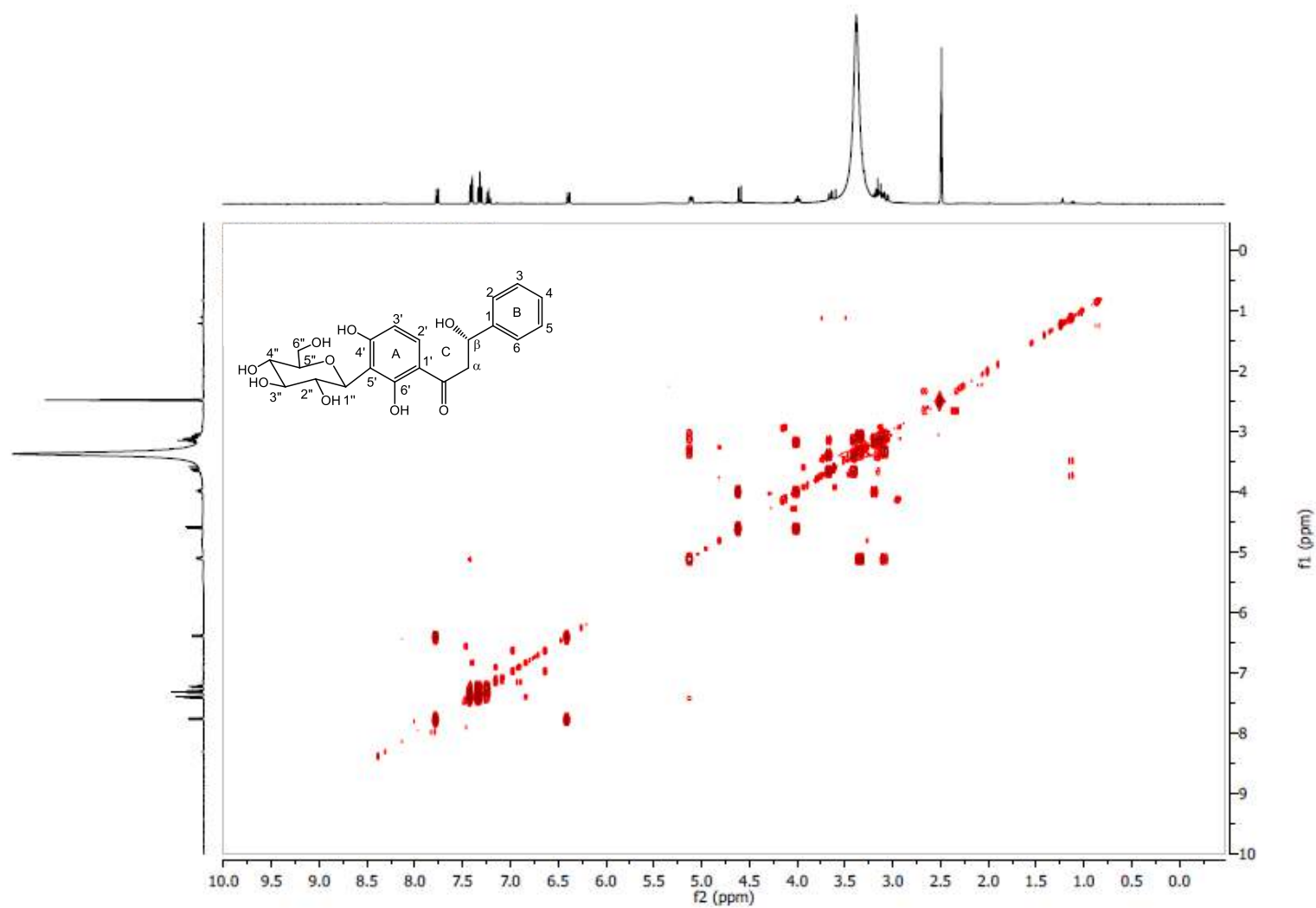


Figura 21. Espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **1**.

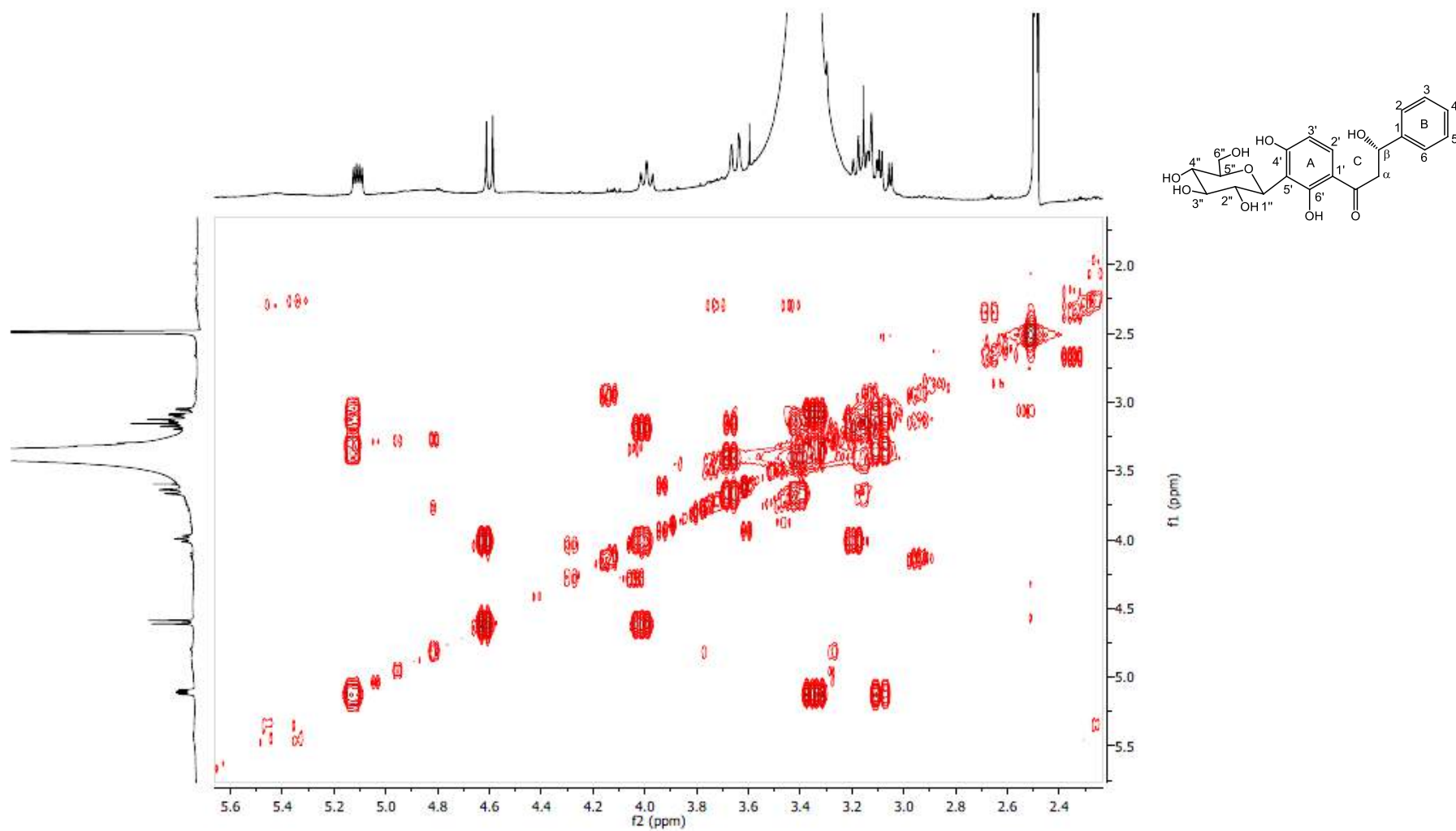


Figura 22. Expansão do espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **1**.

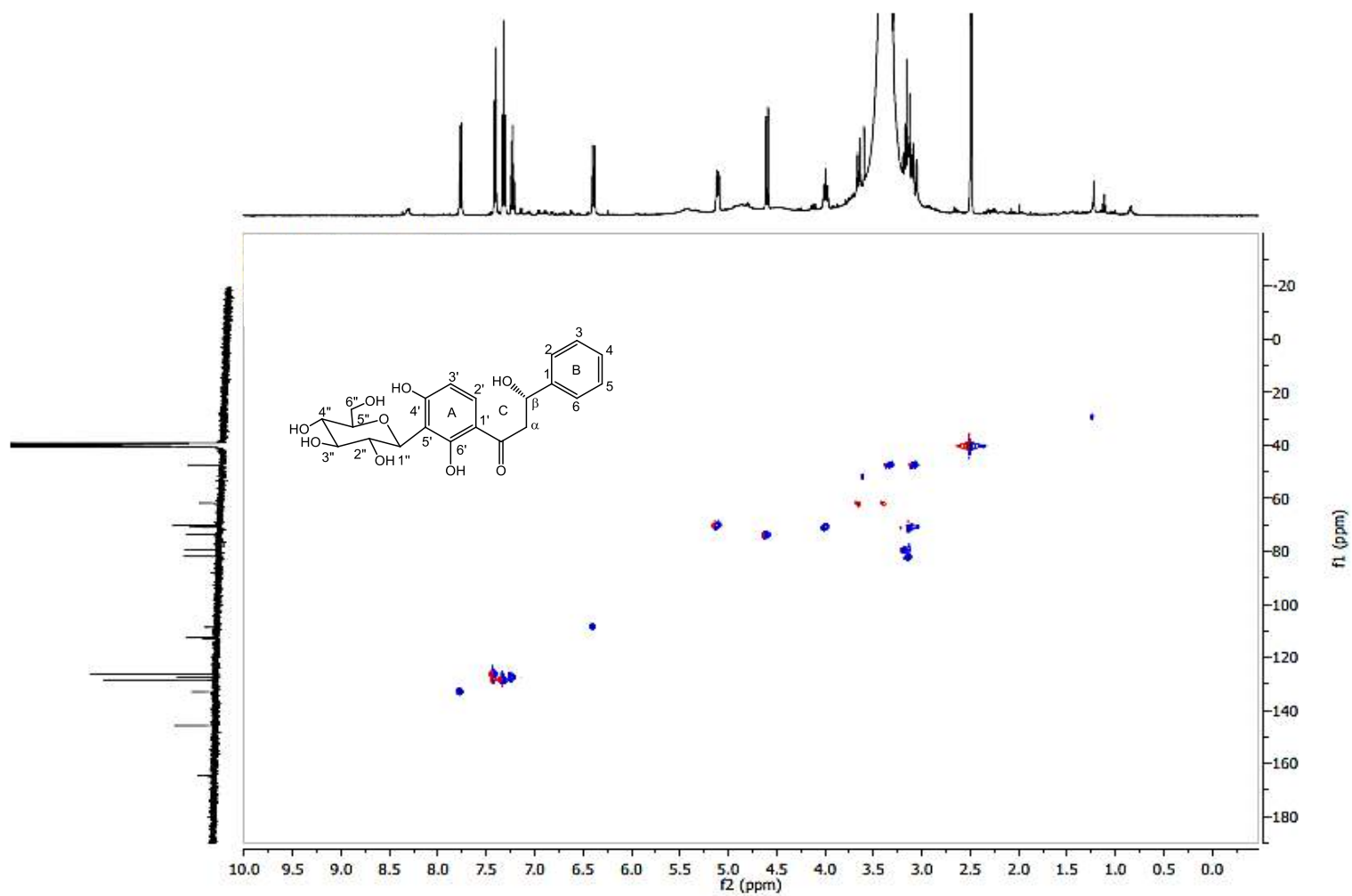


Figura 23. Espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 1.

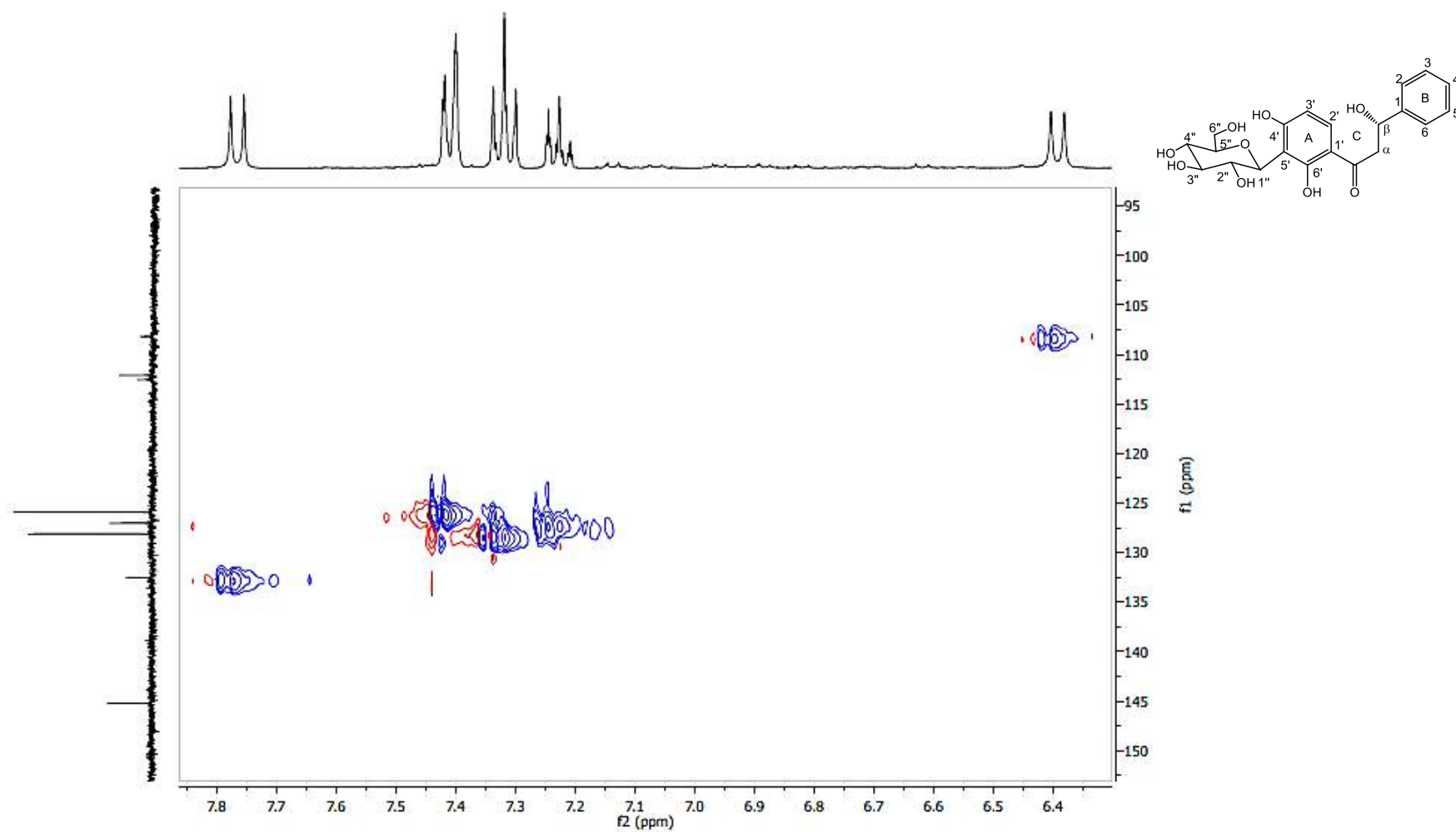


Figura 24. Expansão do espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **1**.

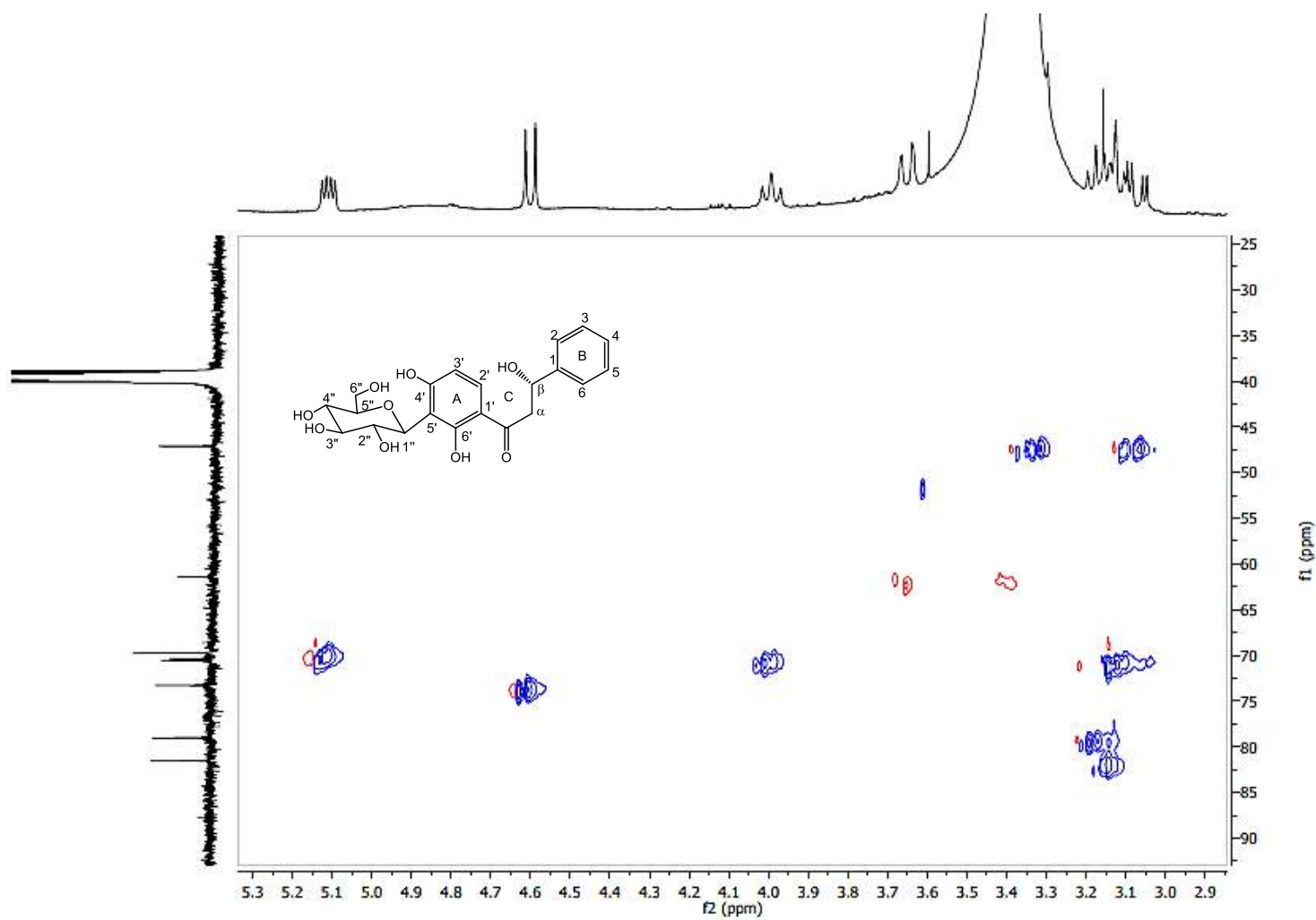


Figura 25. Expansão do espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

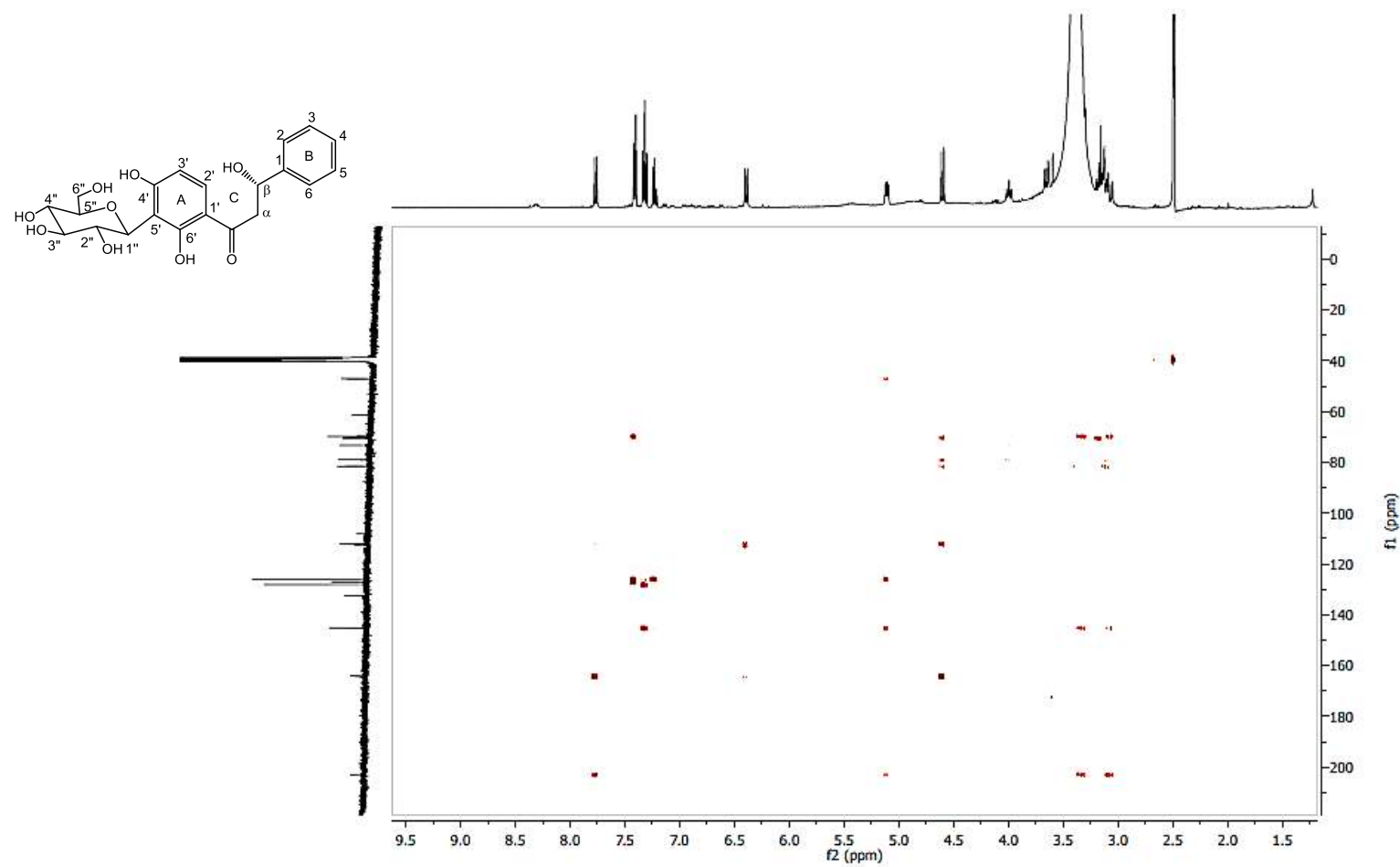


Figura 26. Espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **1**.

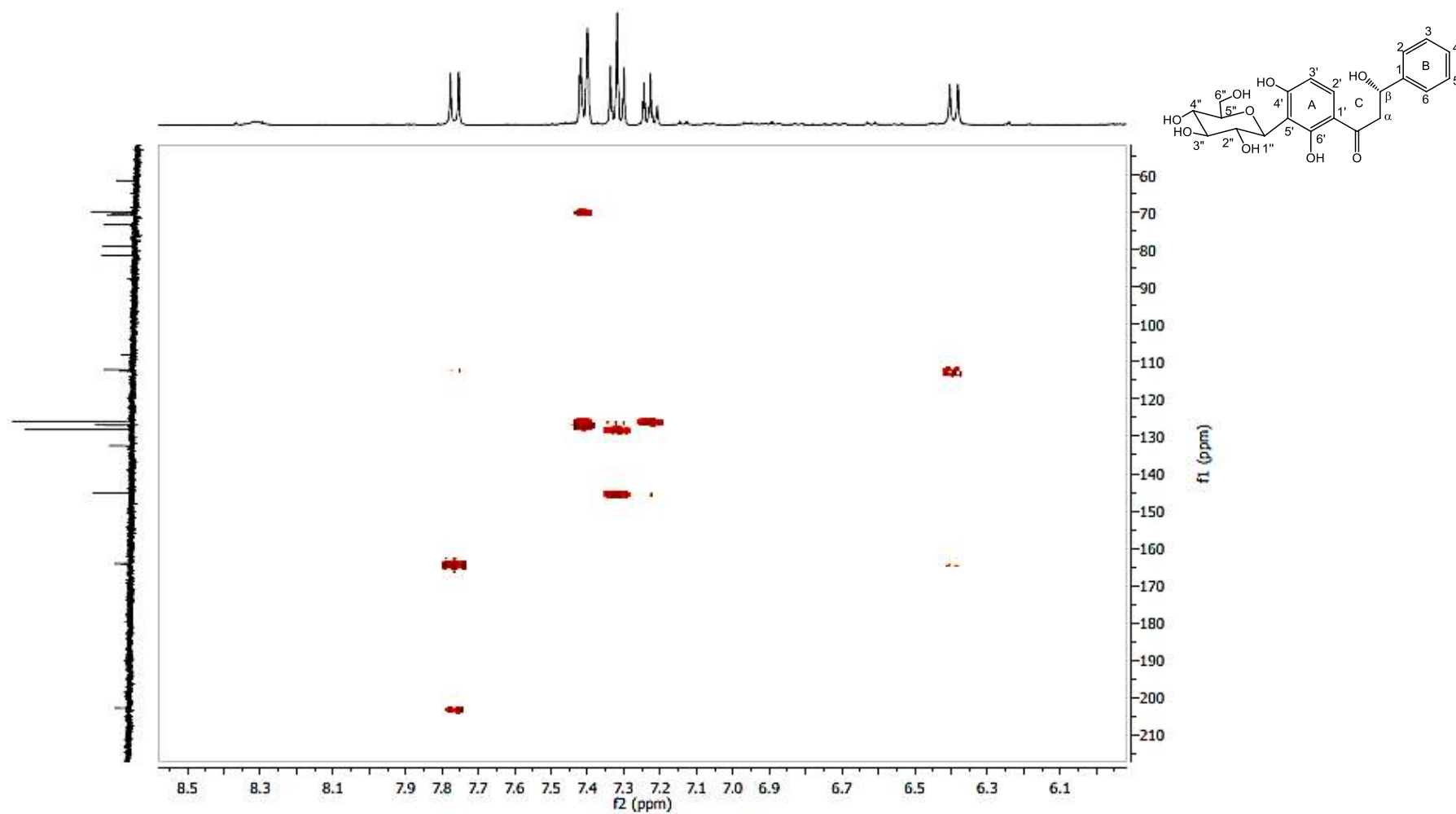


Figura 27. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

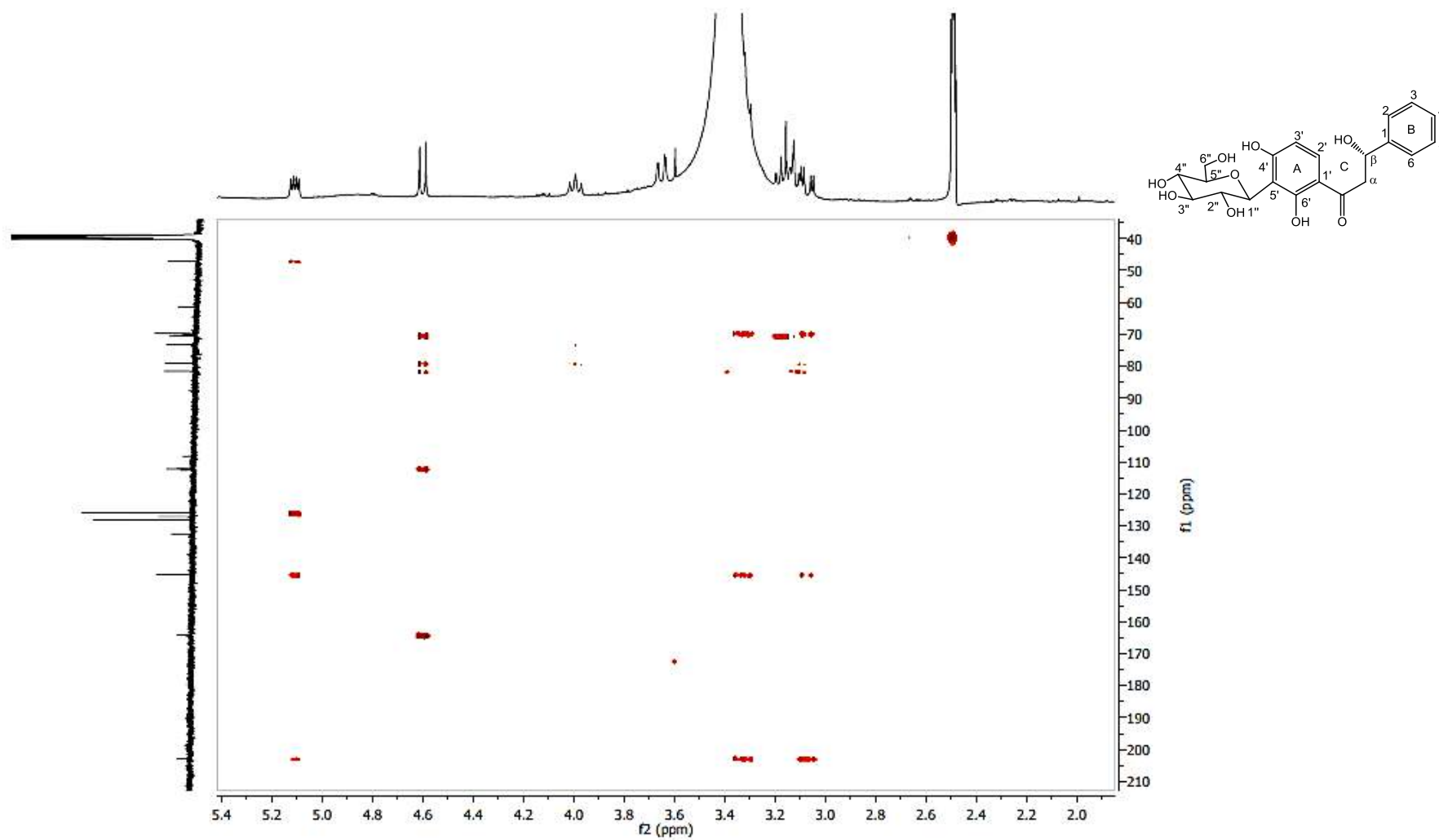


Figura 28. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 1.

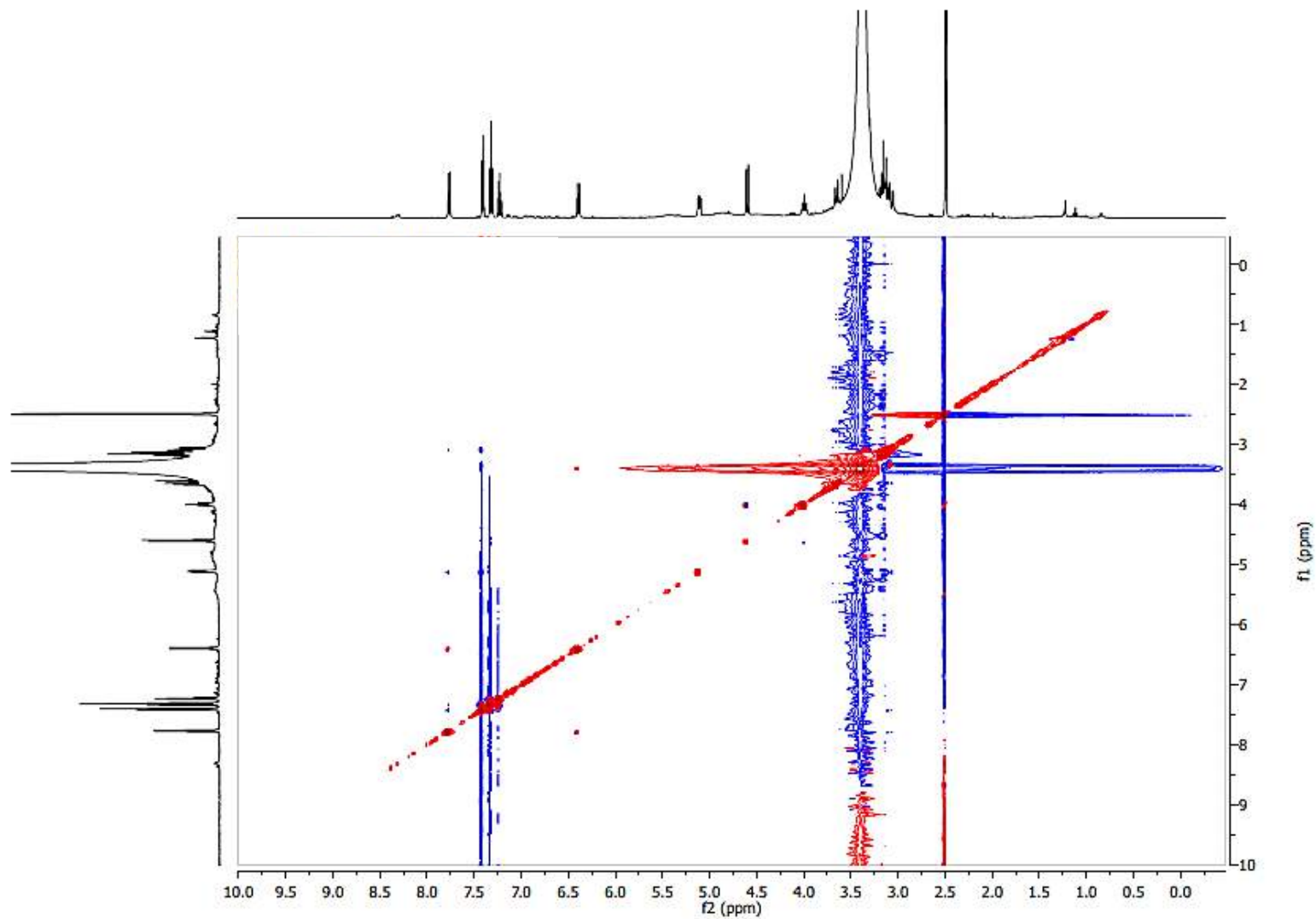


Figura 29. Espectro de RMN - NOESY (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **1**.

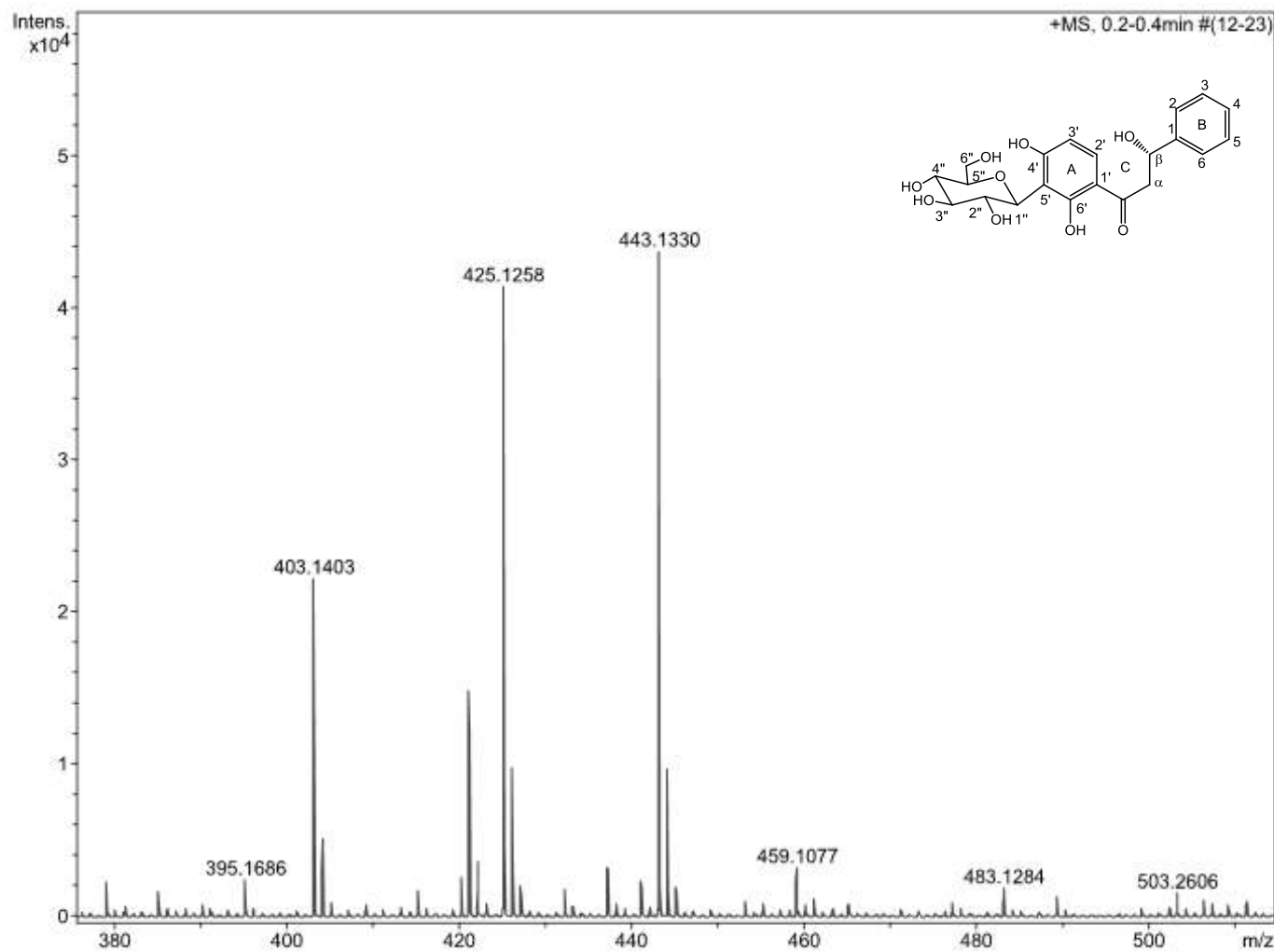


Figura 30. Espectro de HR-IES-EM do composto 1.

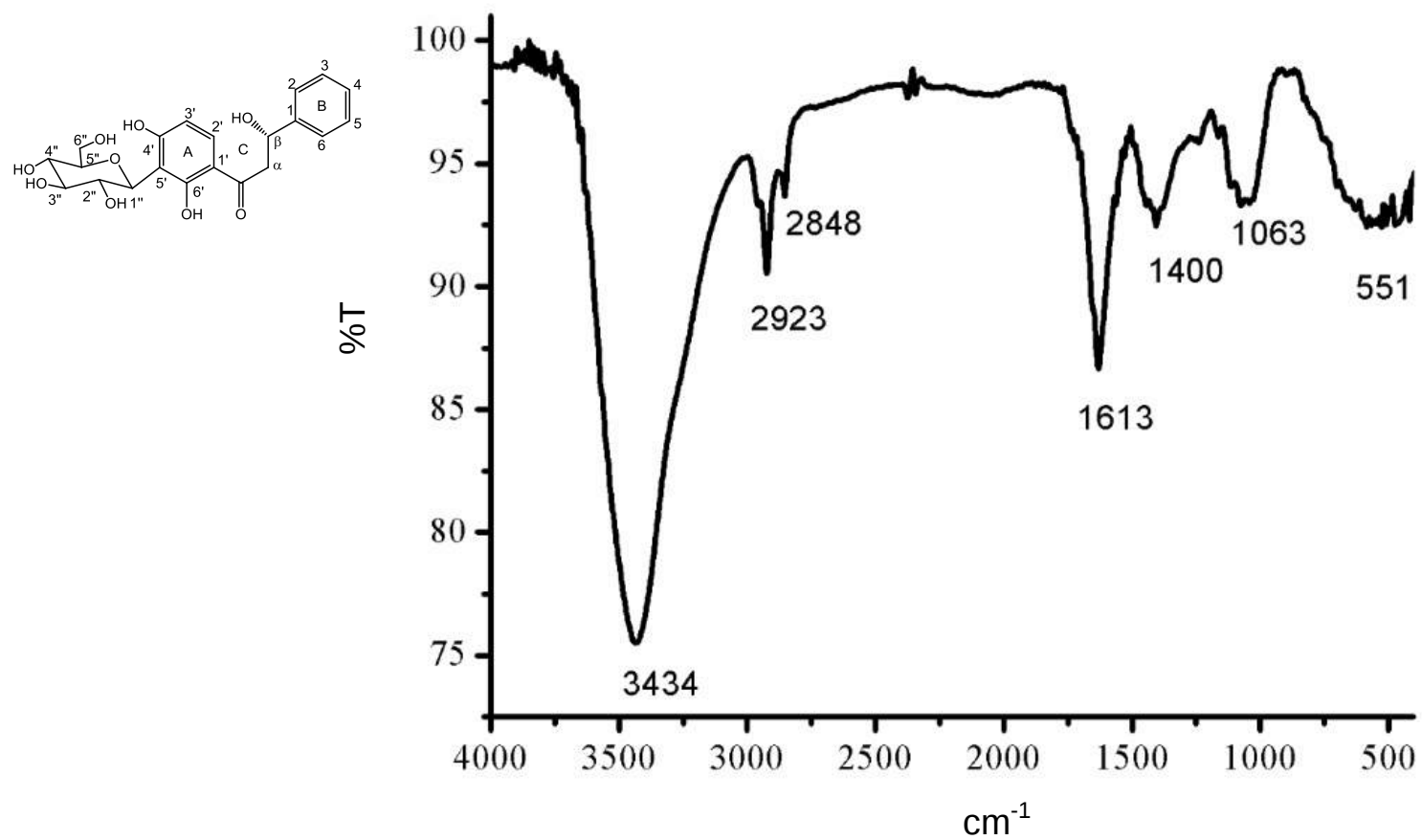


Figura 31. Espectro de IV do composto 1.

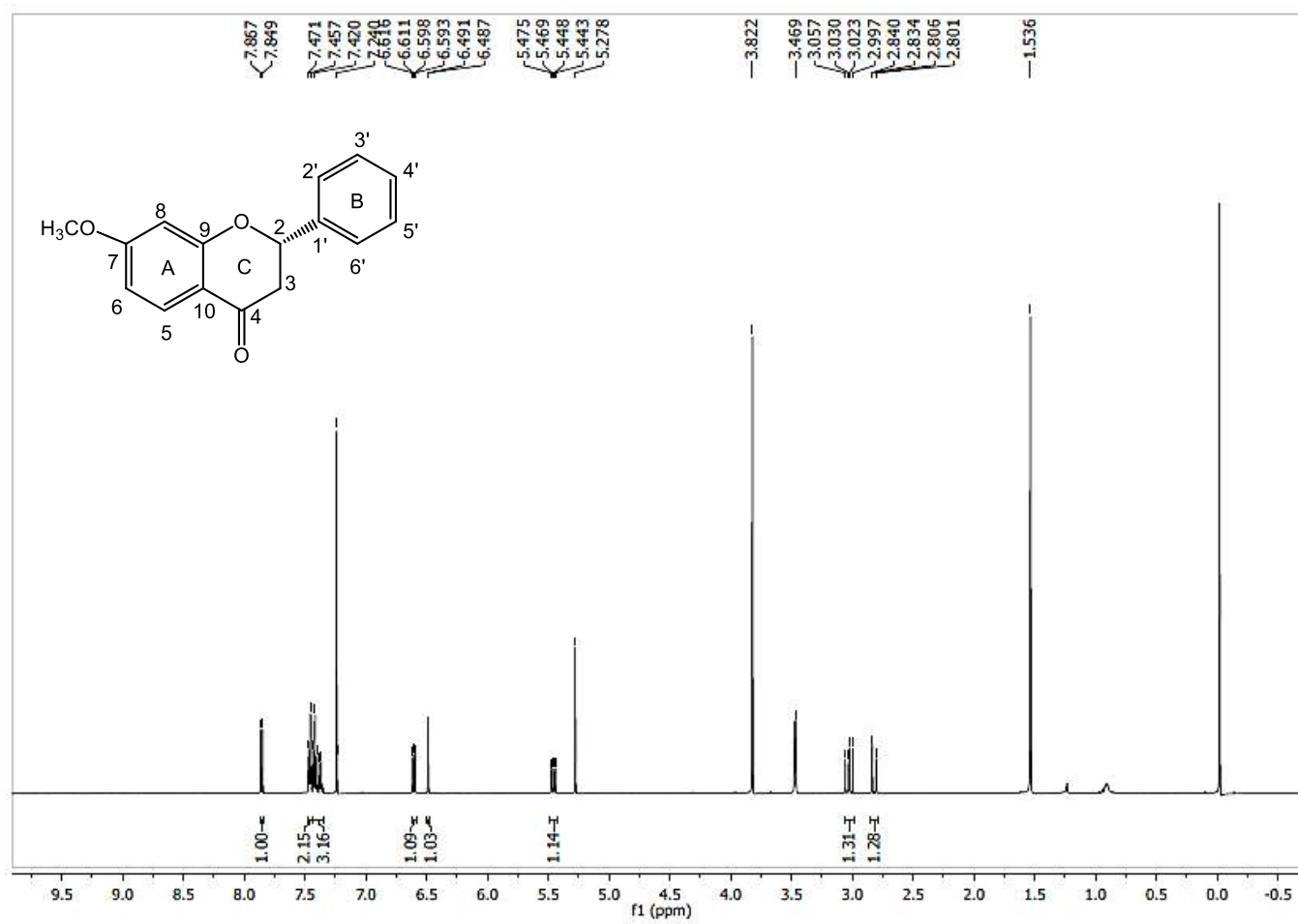


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 2.

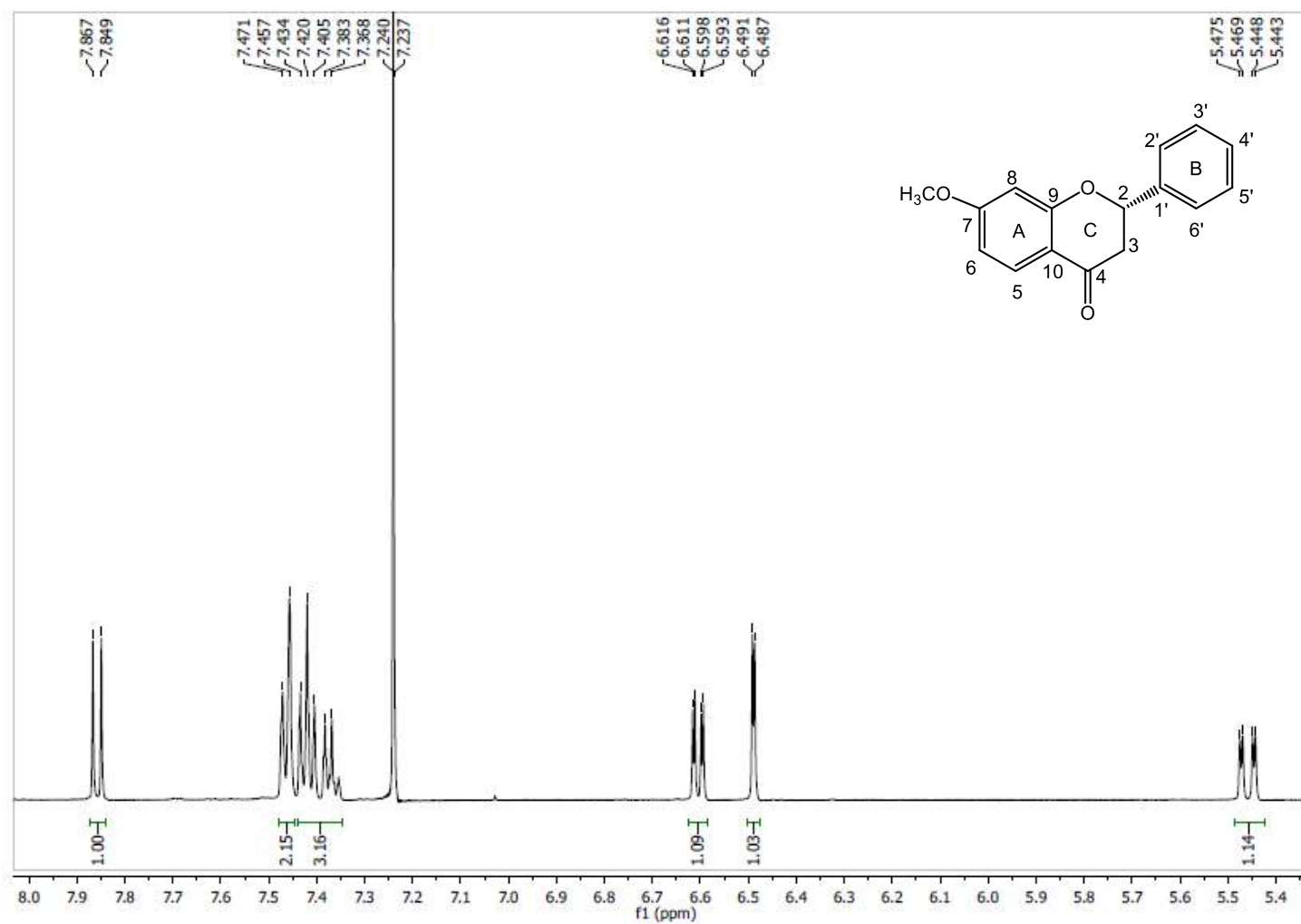


Figura 33. Expansão do espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **2**.

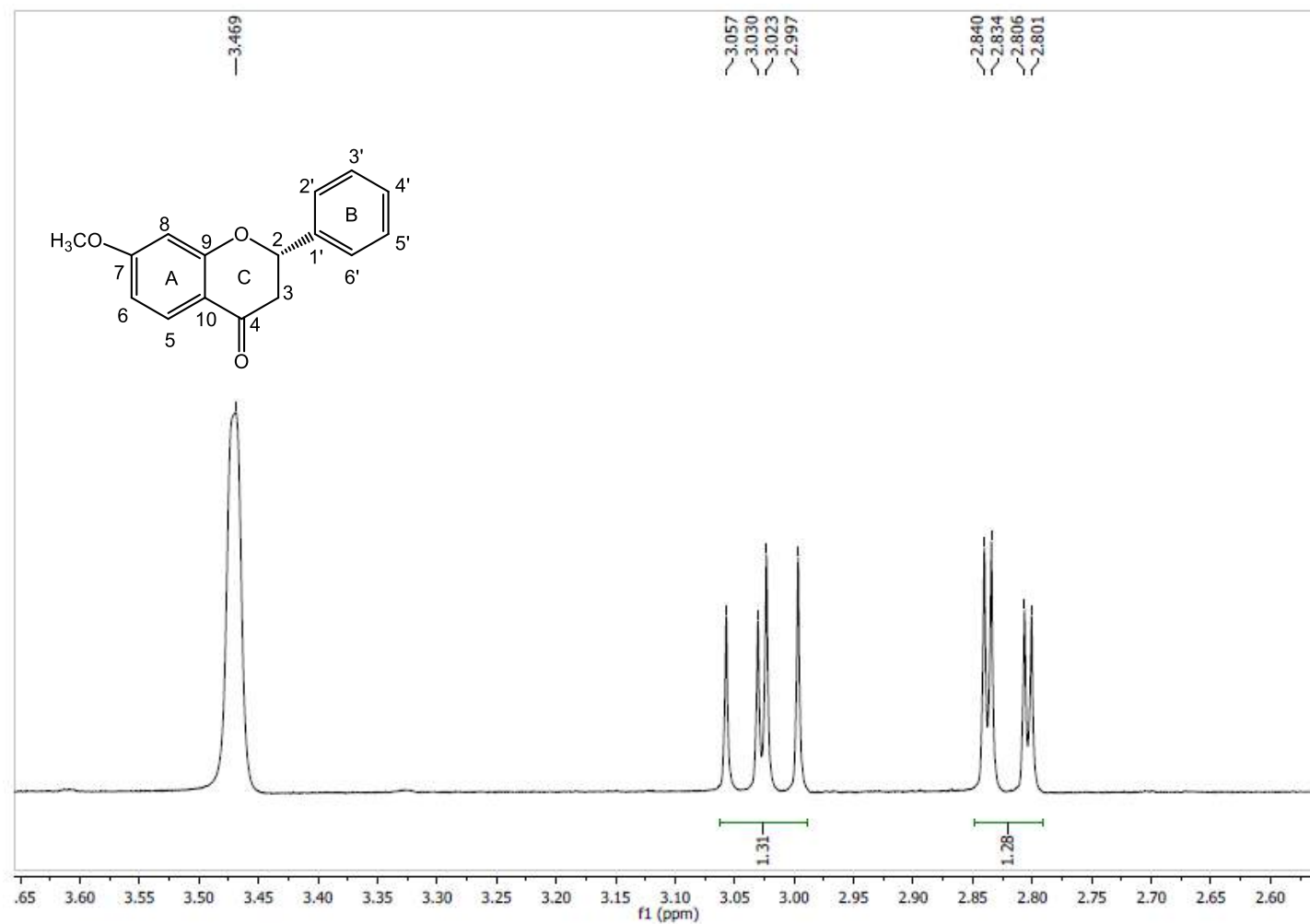


Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **2**.

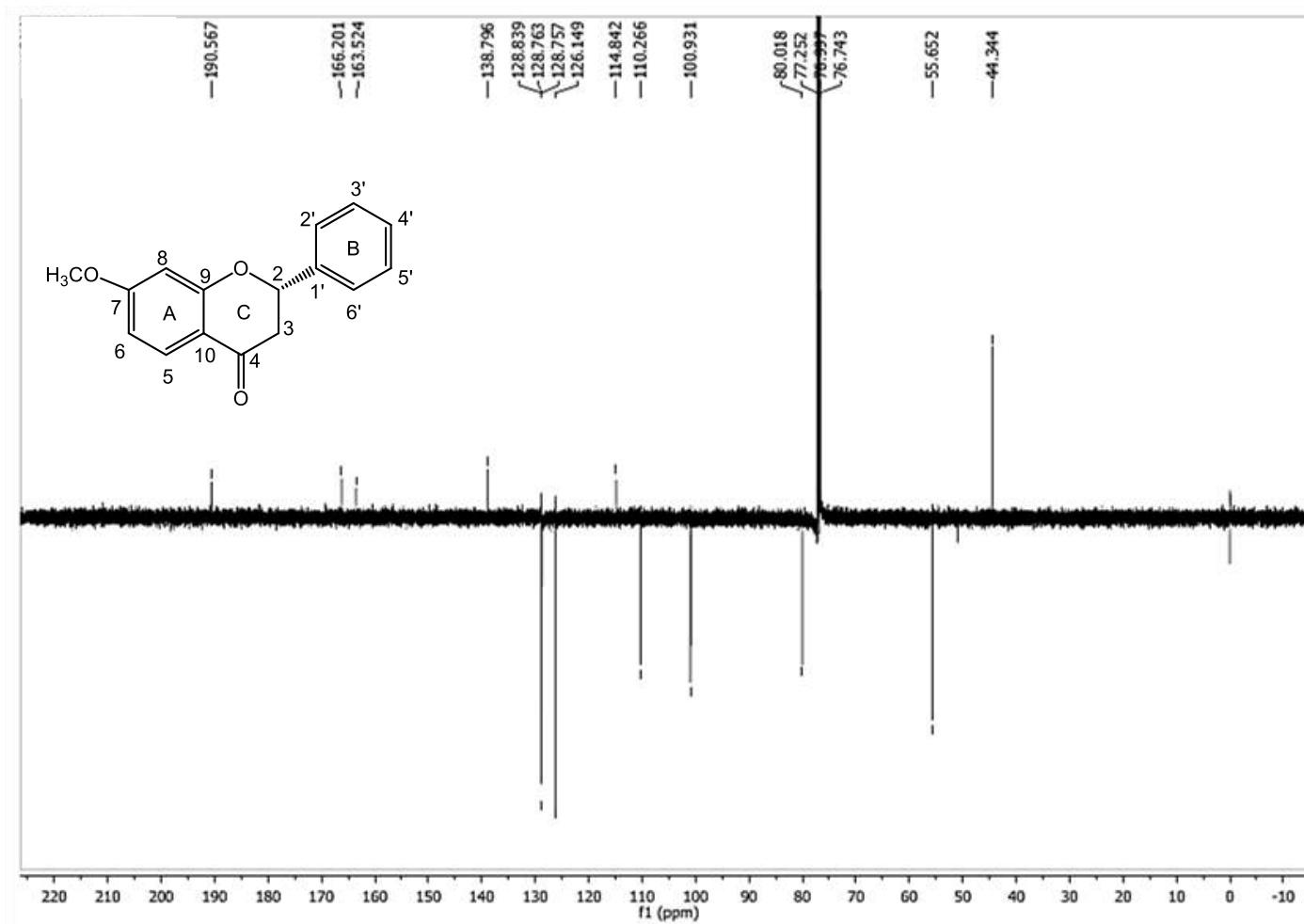


Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, 125 MHz, CDCl_3) do composto **2**.

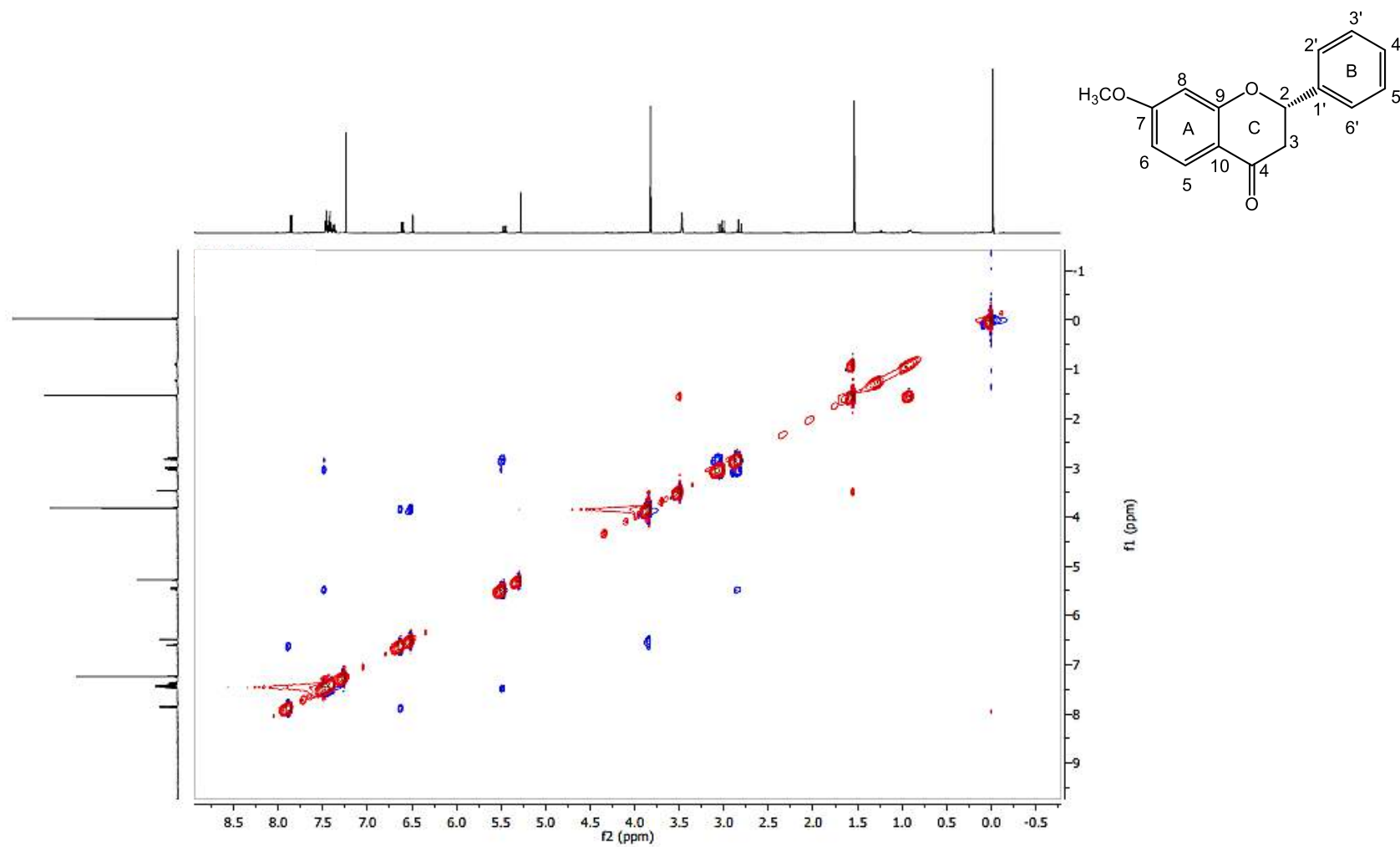


Figura 36. Espectro de RMN - NOESY (500 MHz, CDCl₃) do composto 2.

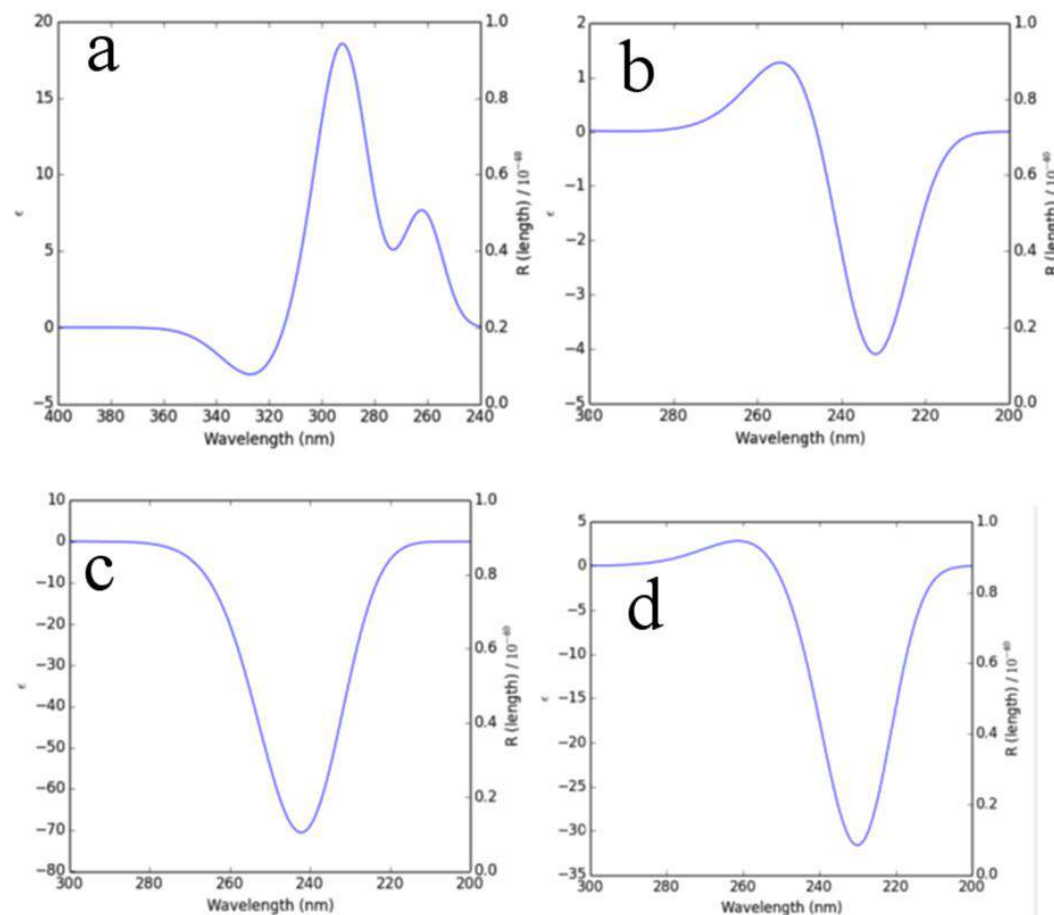


Figura 37. Espectro de EDC de (2*R*)-7-metoxiflavanona simulado usando formas de banda Gaussianas (a, $\sigma = 0.4$ eV) (a), (4*S*)-4-hidroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(1*E*,3*R*)-3-[(2'*S*,3'*S*,4'*R*,5'*R*,6'*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy}but-1-en-1-yl]cyclohex-2-en-1-one (b, $\sigma = 0.6$ eV) (b), (4*R*)-4-hidroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(1*E*,3*R*)-3-[(2'*S*,3'*S*,4'*R*,5'*R*,6'*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy}but-1-en-1-yl]cyclohex-2-en-1-one (c, $\sigma = 0.6$ eV) (c), (4*R*)-4-hidroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(1*E*,3*S*)-3-[(2'*S*,3'*S*,4'*R*,5'*R*,6'*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy}but-1-en-1-yl]cyclohex-2-en-1-one (d, $\sigma = 0.6$ eV) (d).

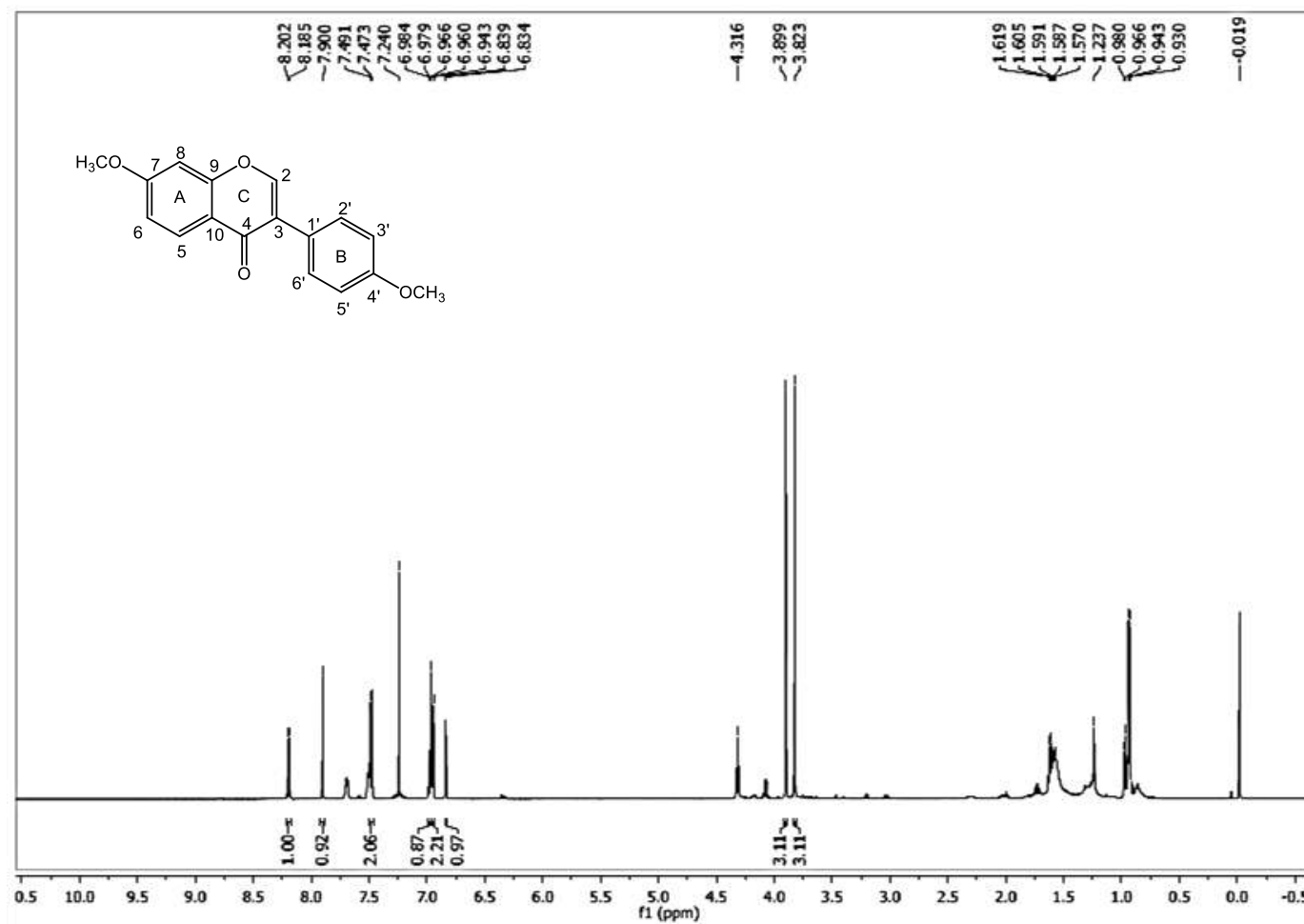


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 3.

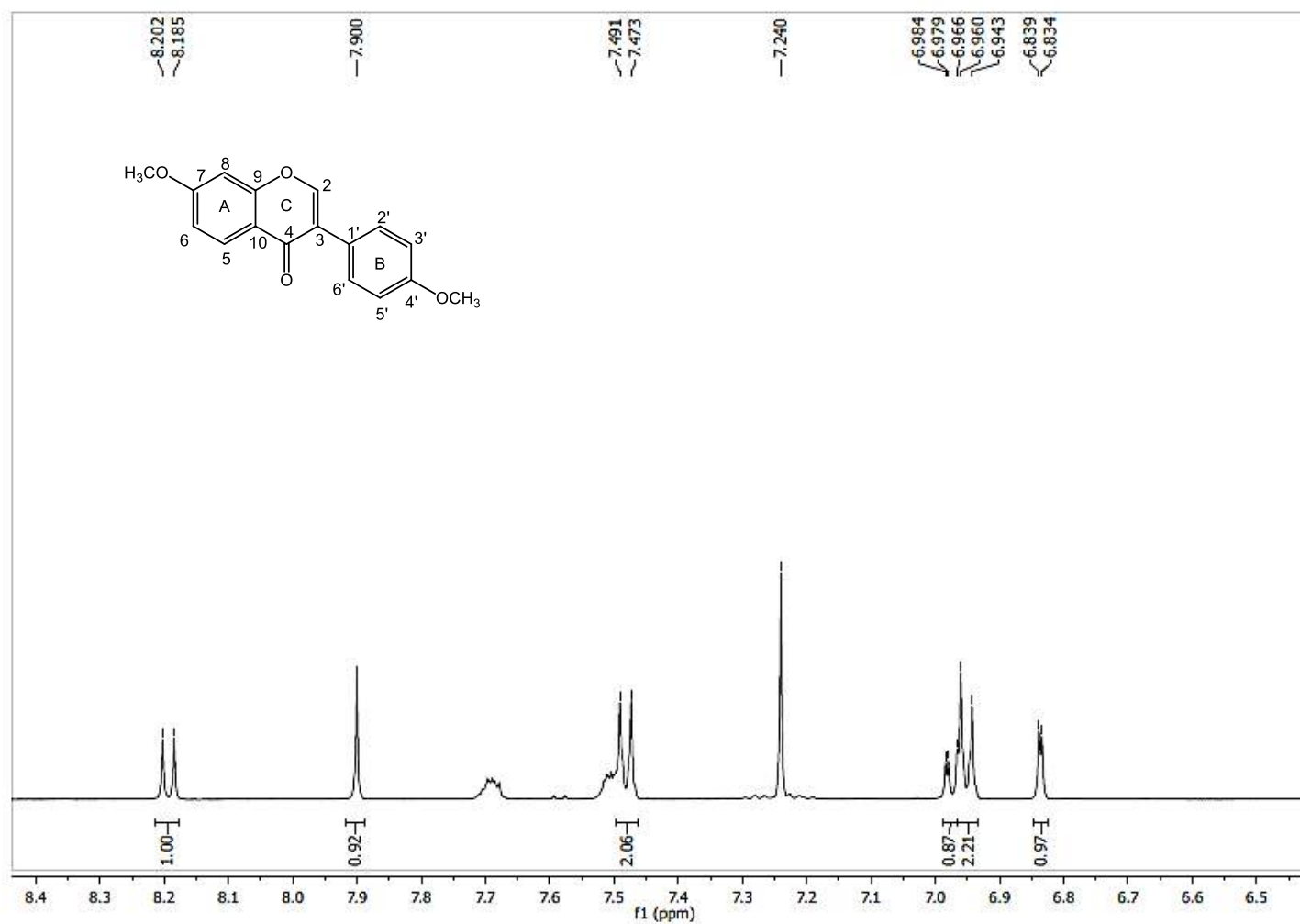
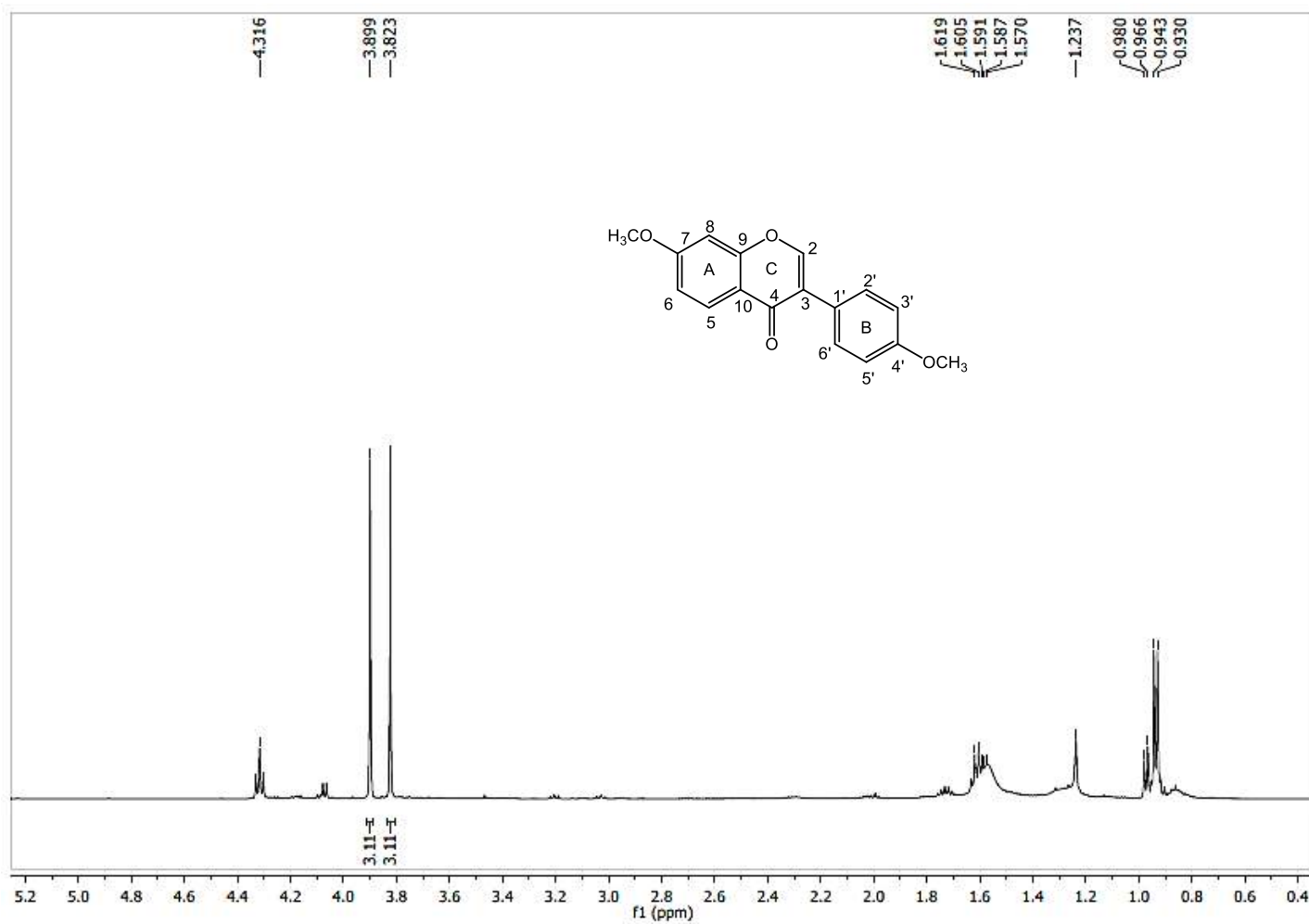


Figura 39. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 3.



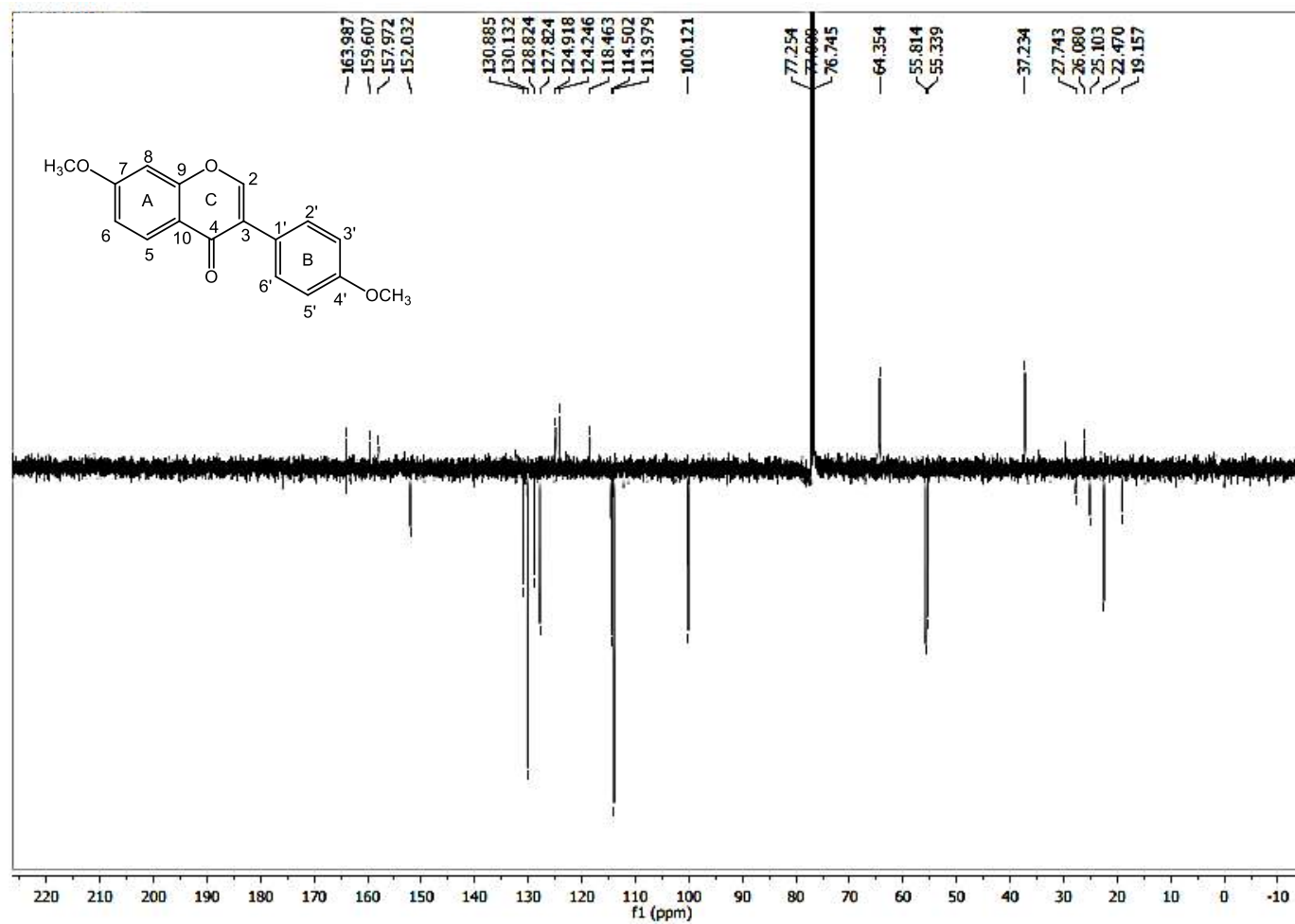


Figura 41. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) do composto 3.

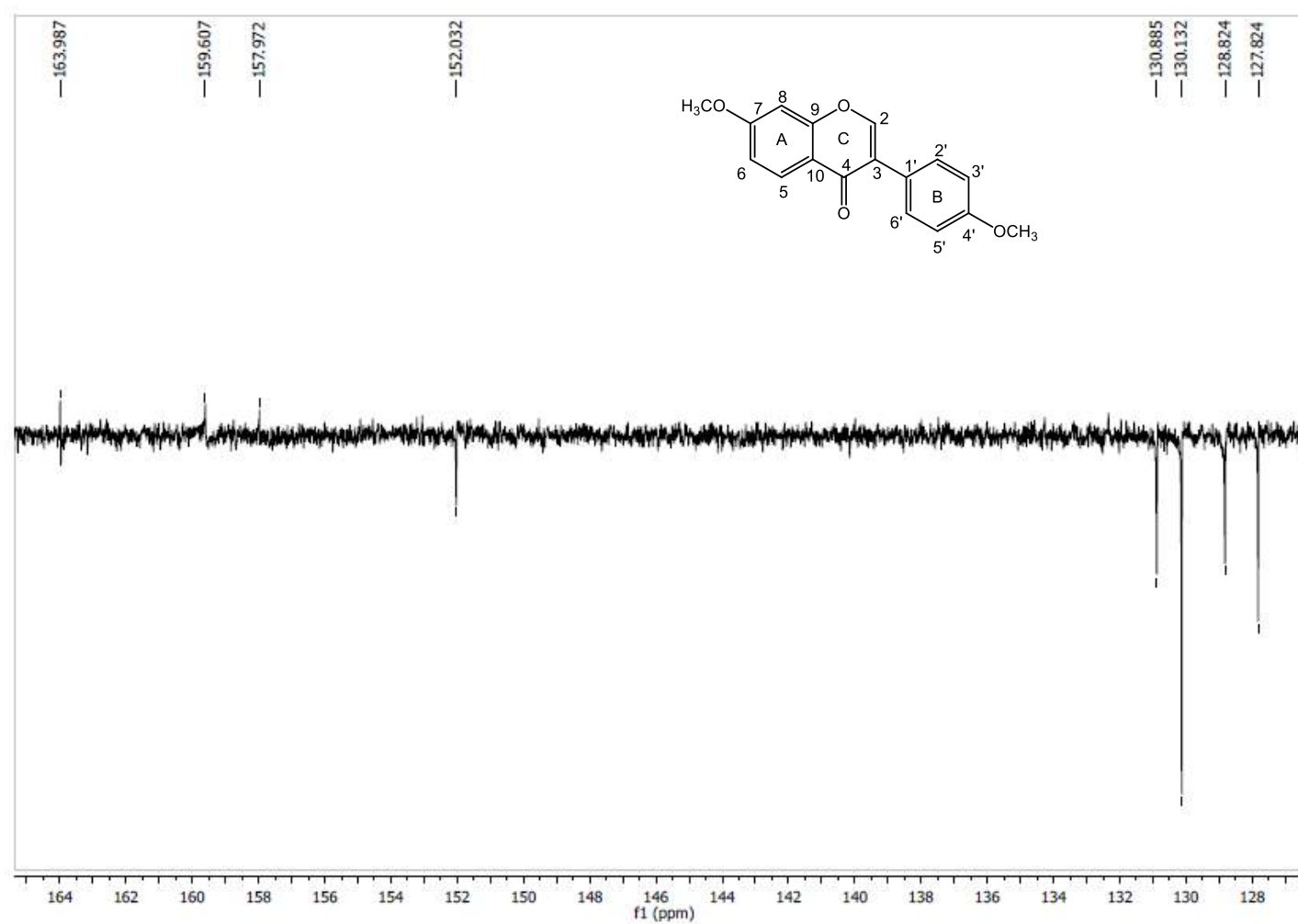


Figura 42. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **3**.

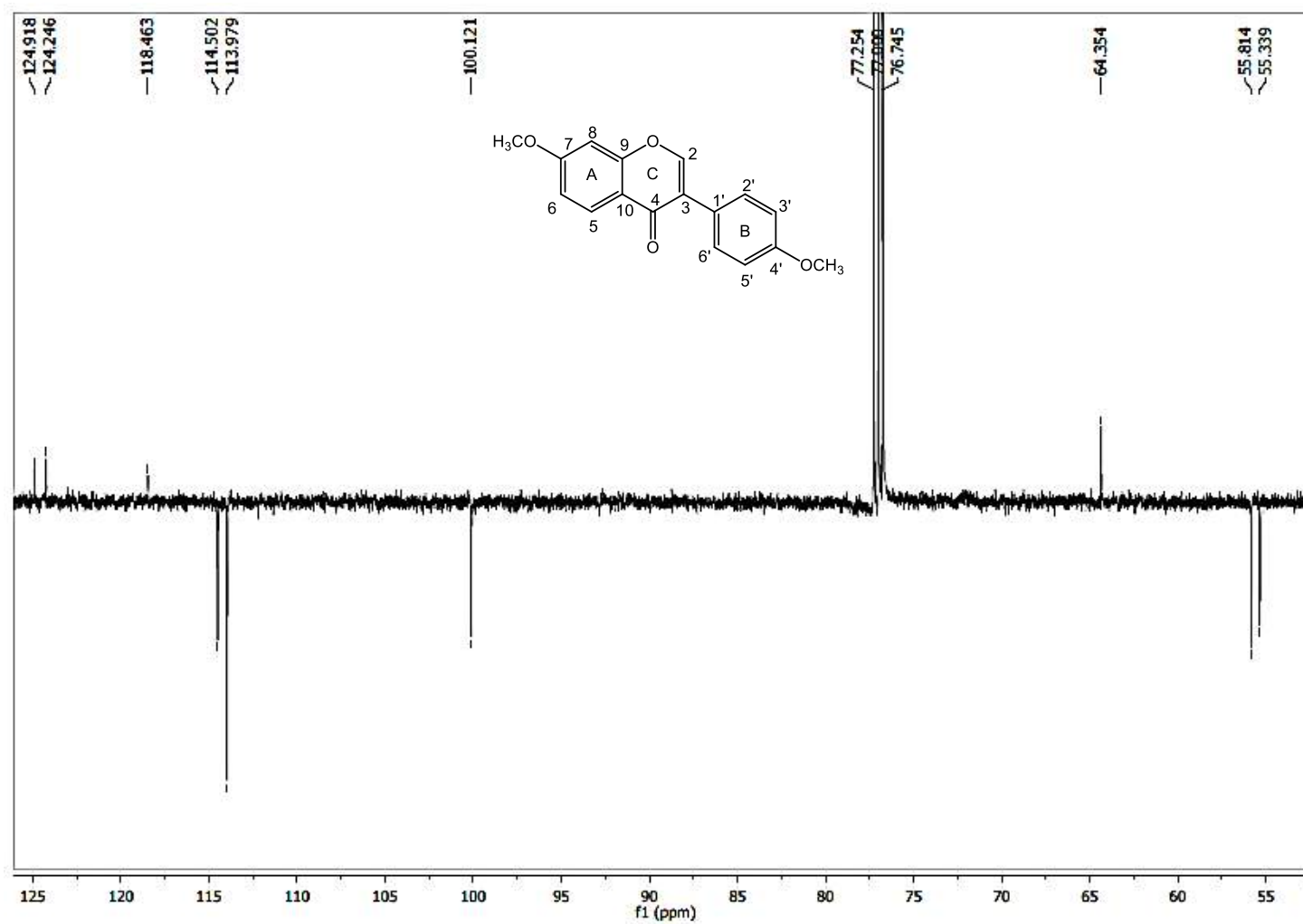


Figura 43. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto 3.

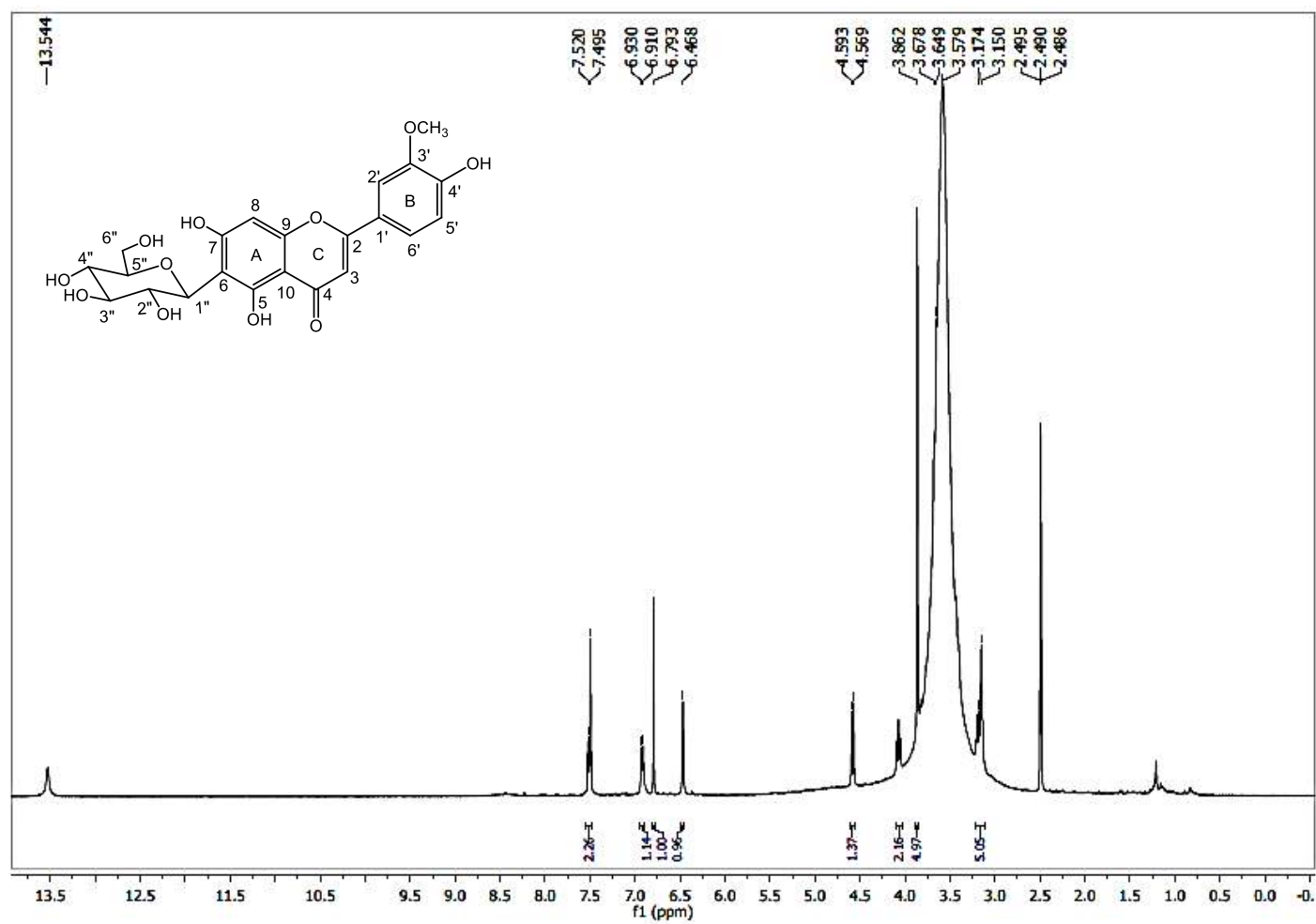


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **4**.

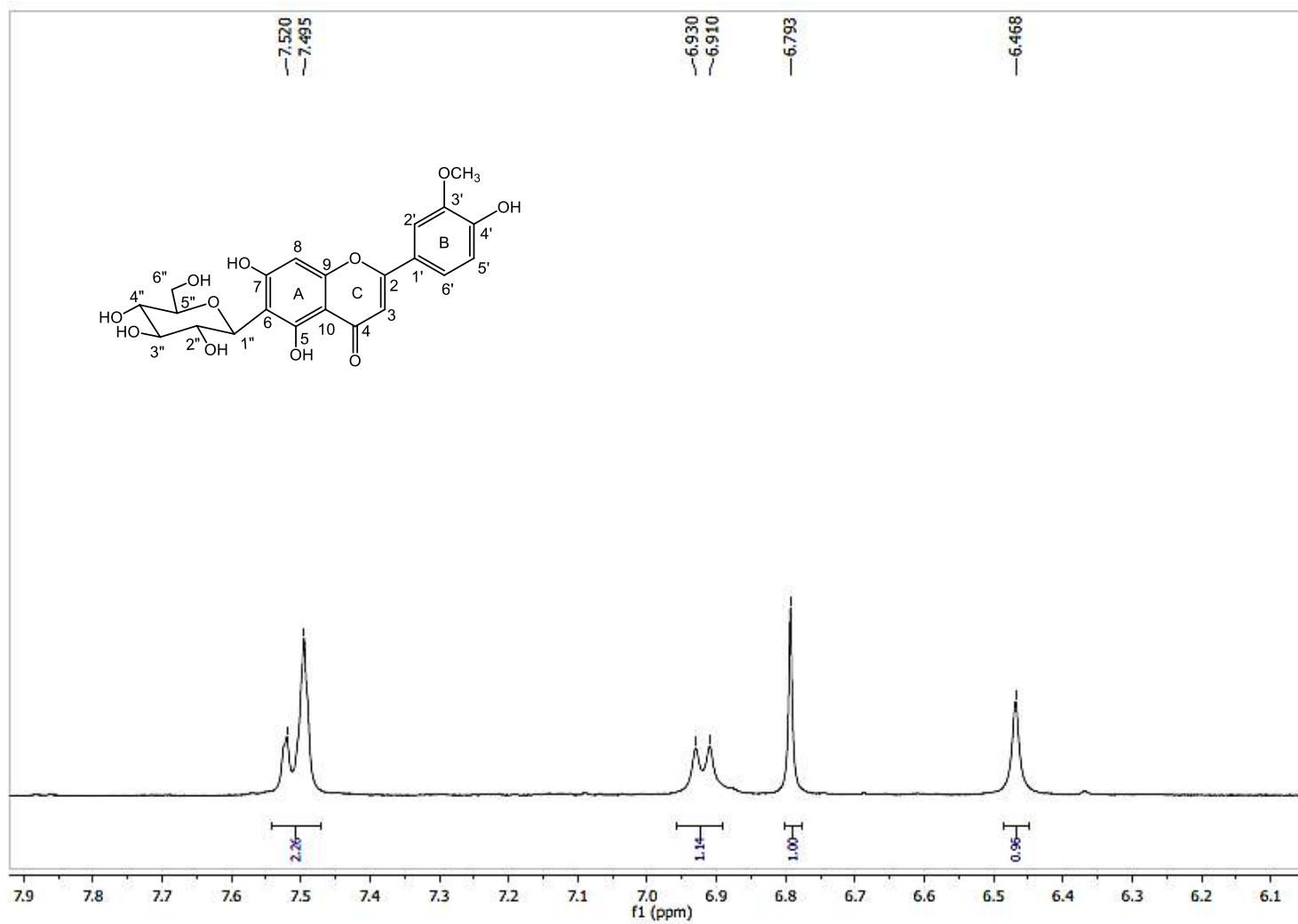


Figura 45. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 4.

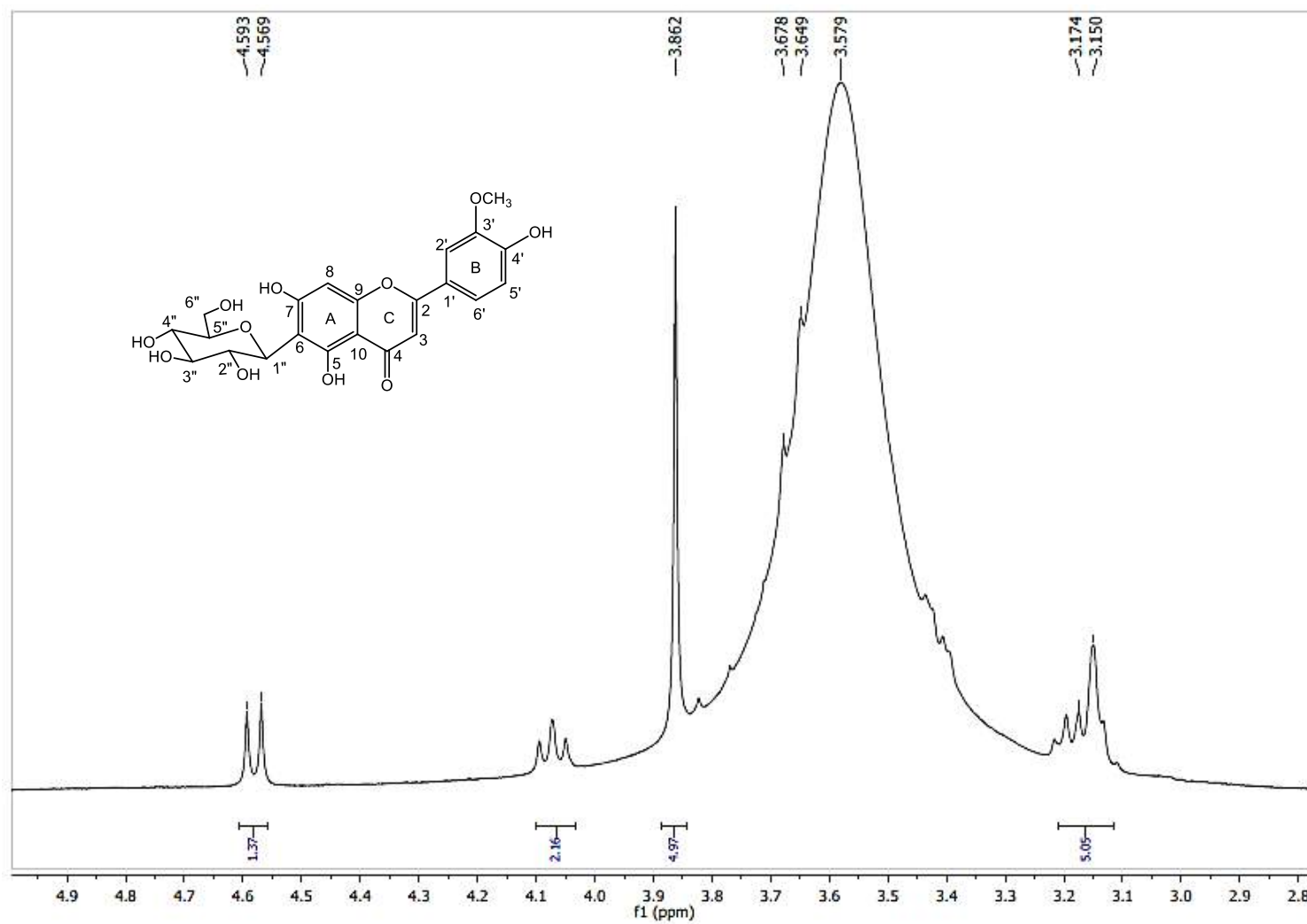


Figura 46. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **4**.

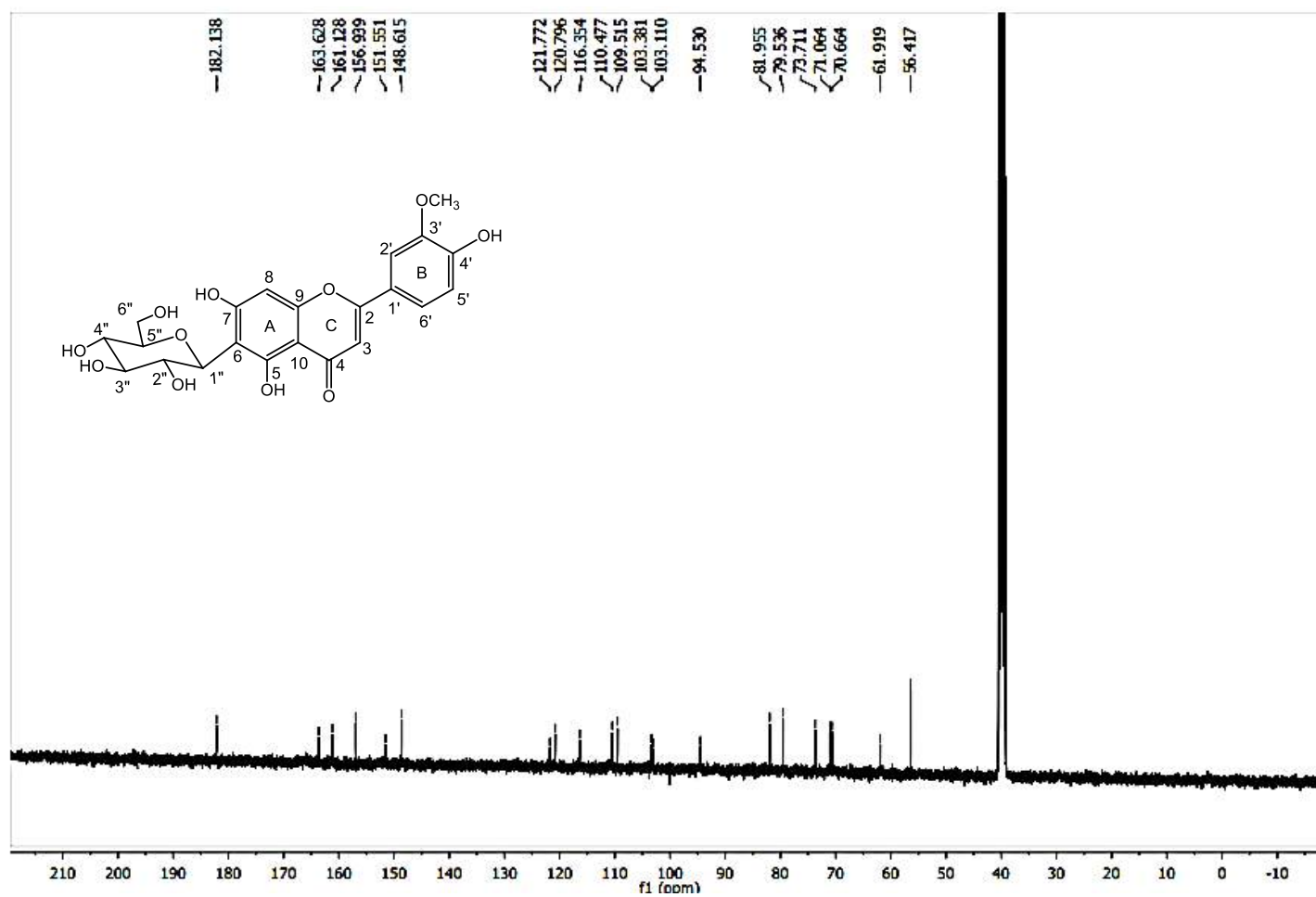


Figura 47. Espectro de ^{13}C -RMN (BB, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 4.

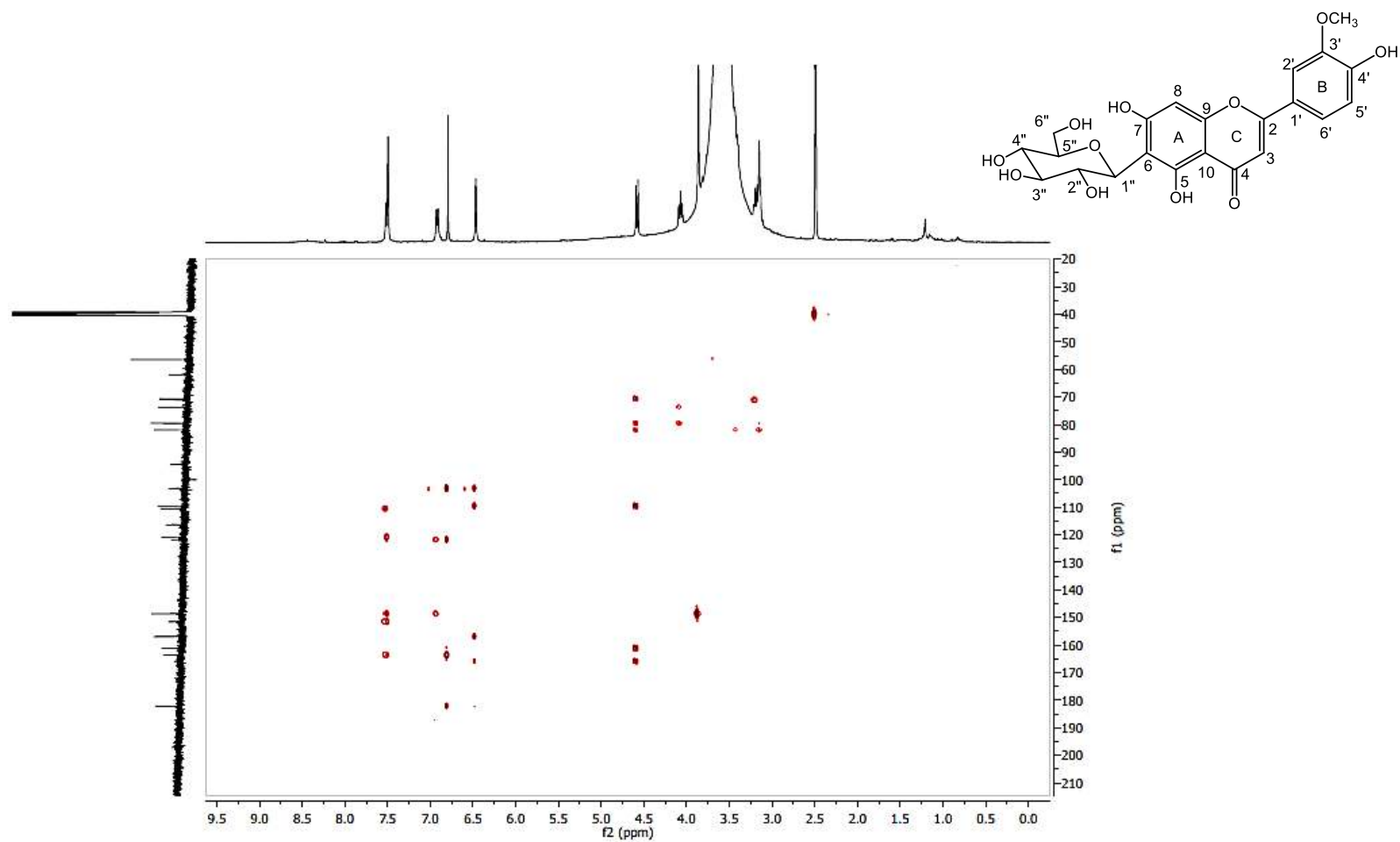


Figura 48. Espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **4**.

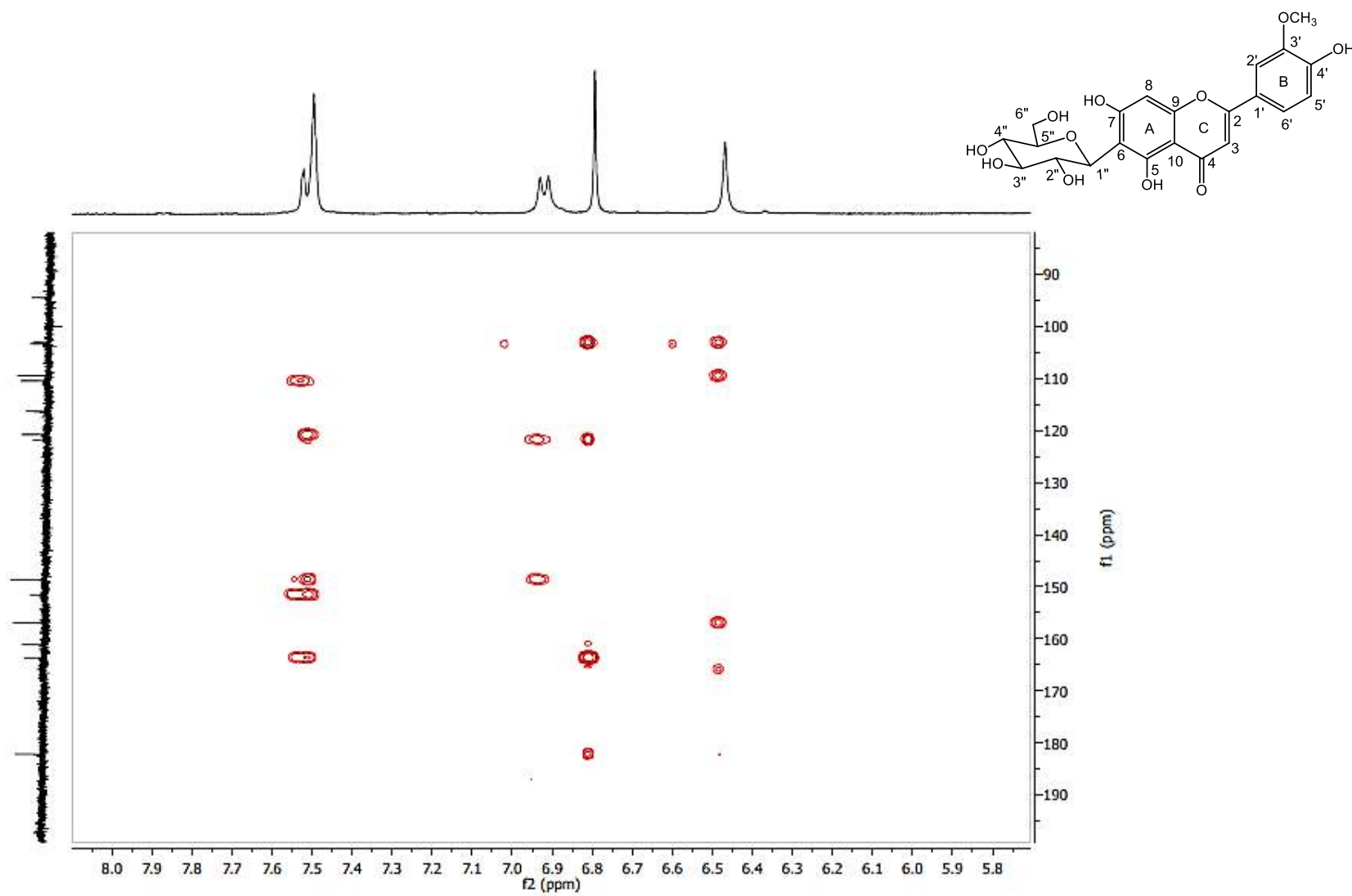


Figura 49. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto 4.

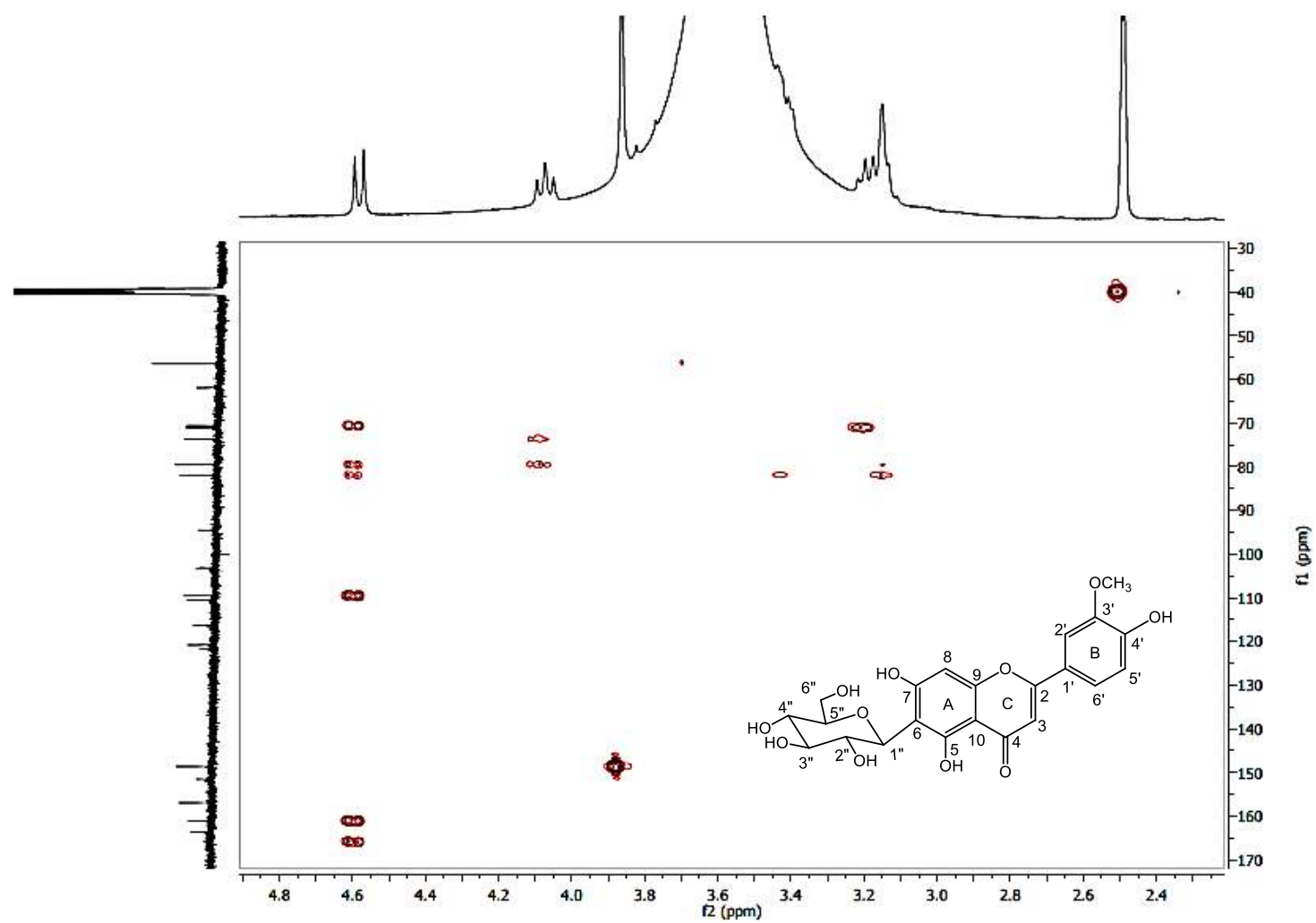


Figura 50. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 4.

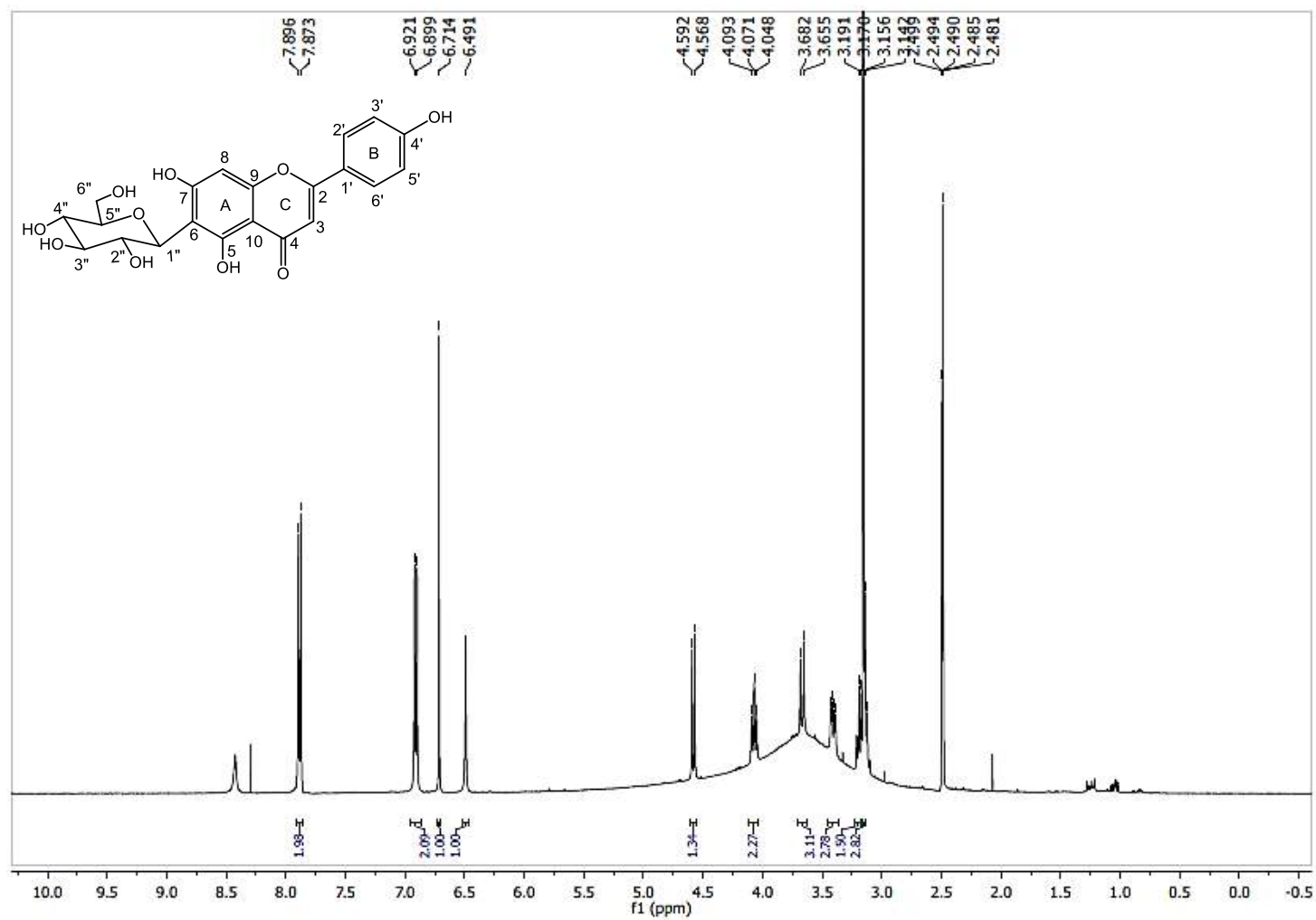


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H - (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 5.

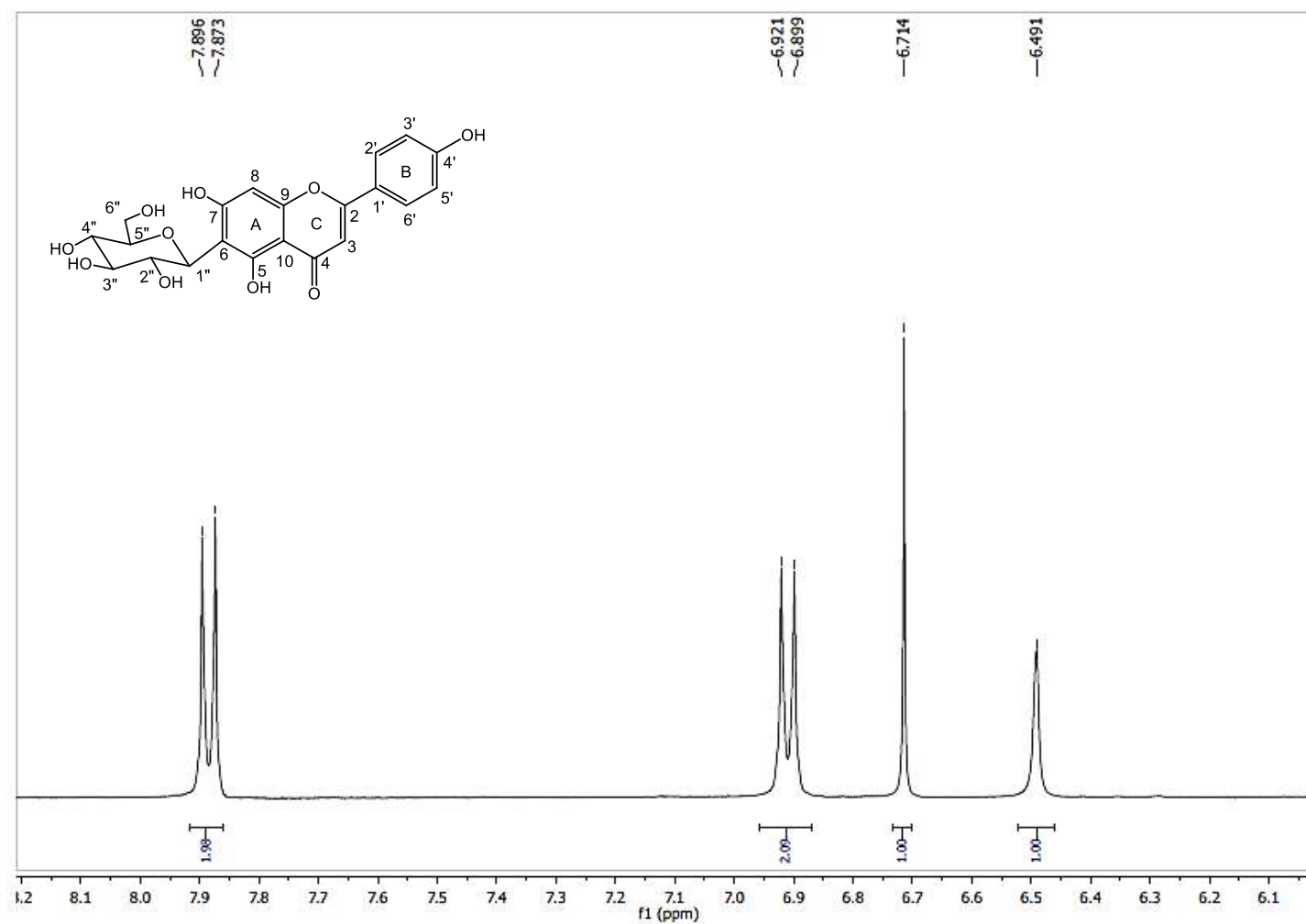


Figura 52. Expansão do espectro de RMN de ^1H - (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 5.

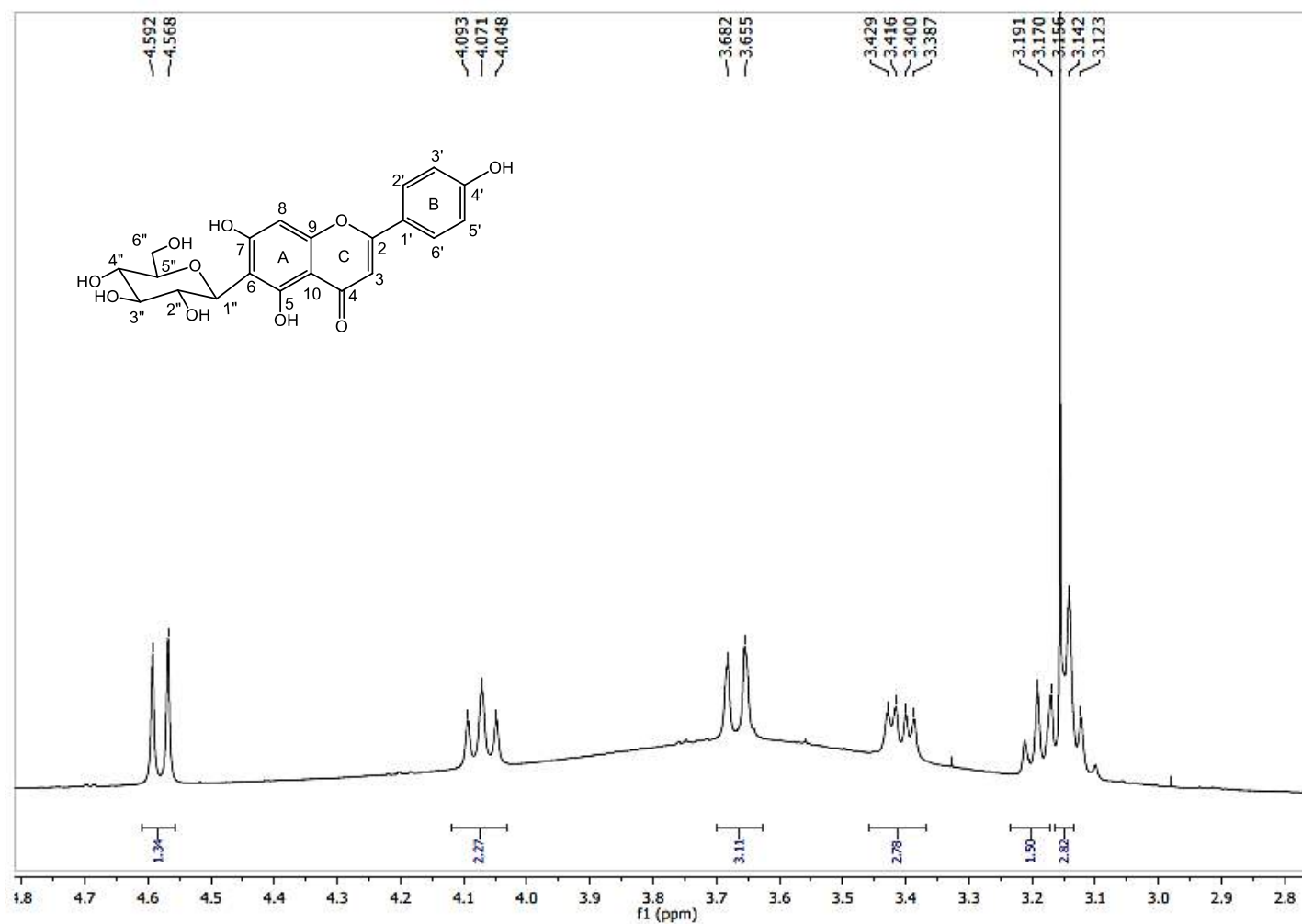


Figura 53. Expansão do espectro de RMN de ^1H - (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 5.

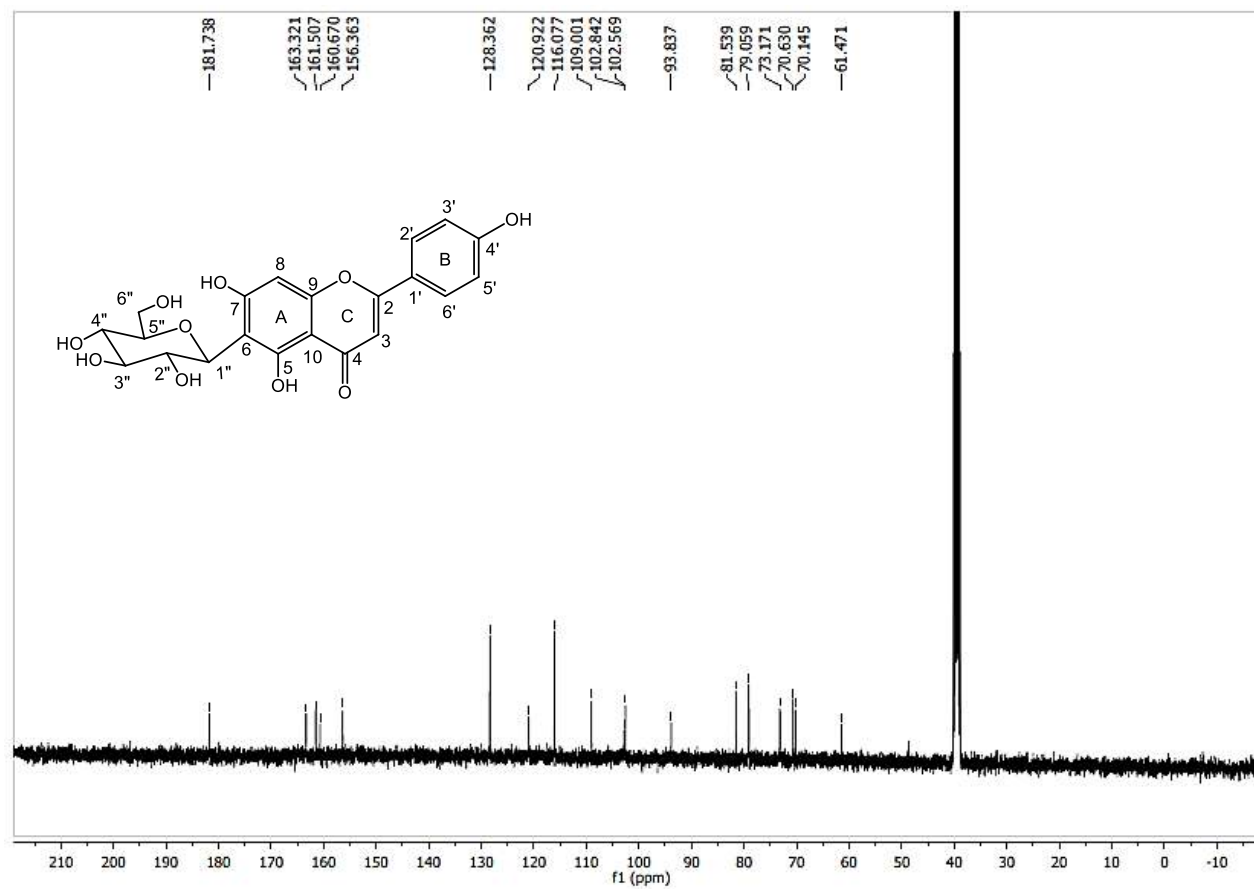


Figura 54. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 5.

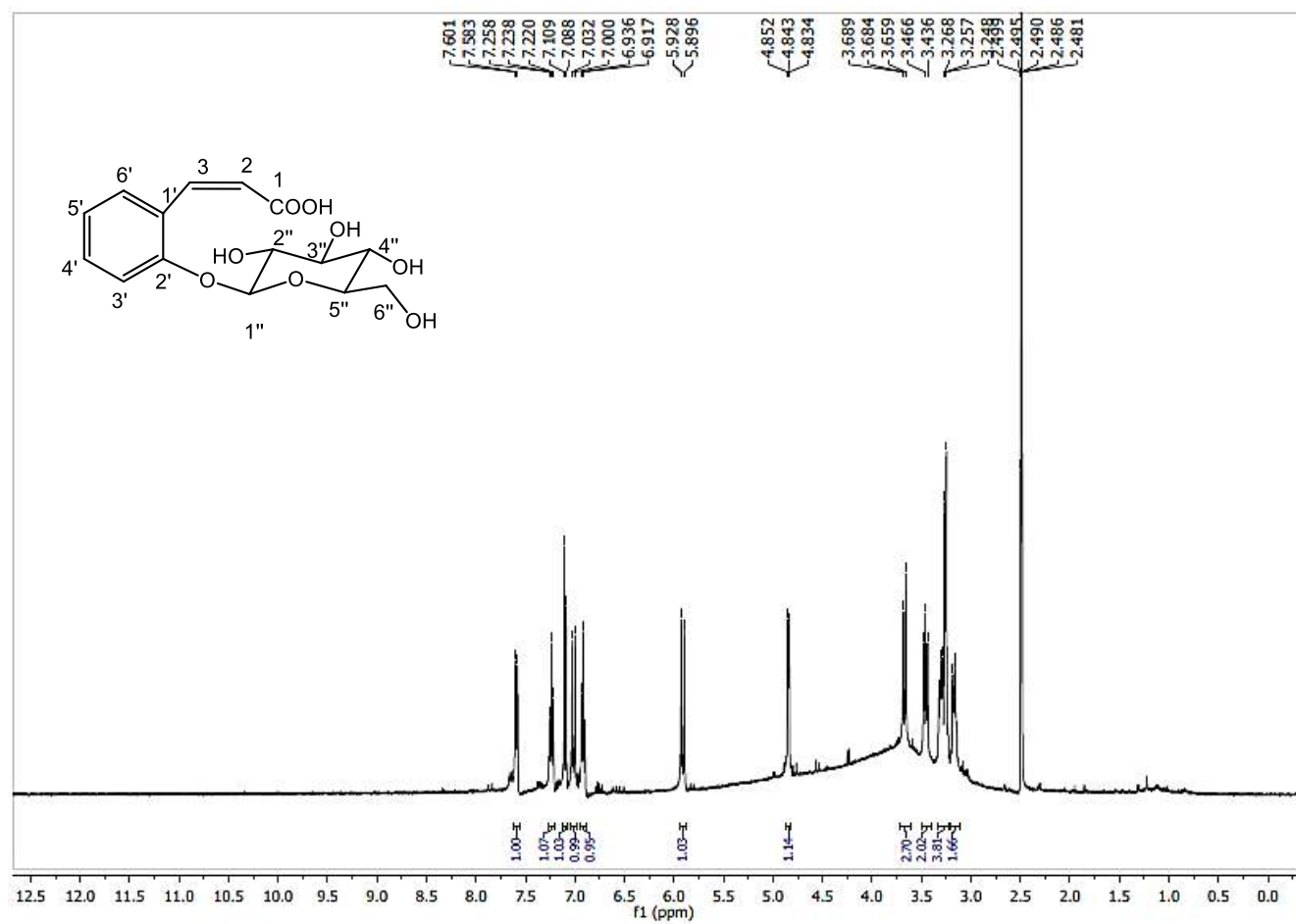


Figura 55. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **6**.

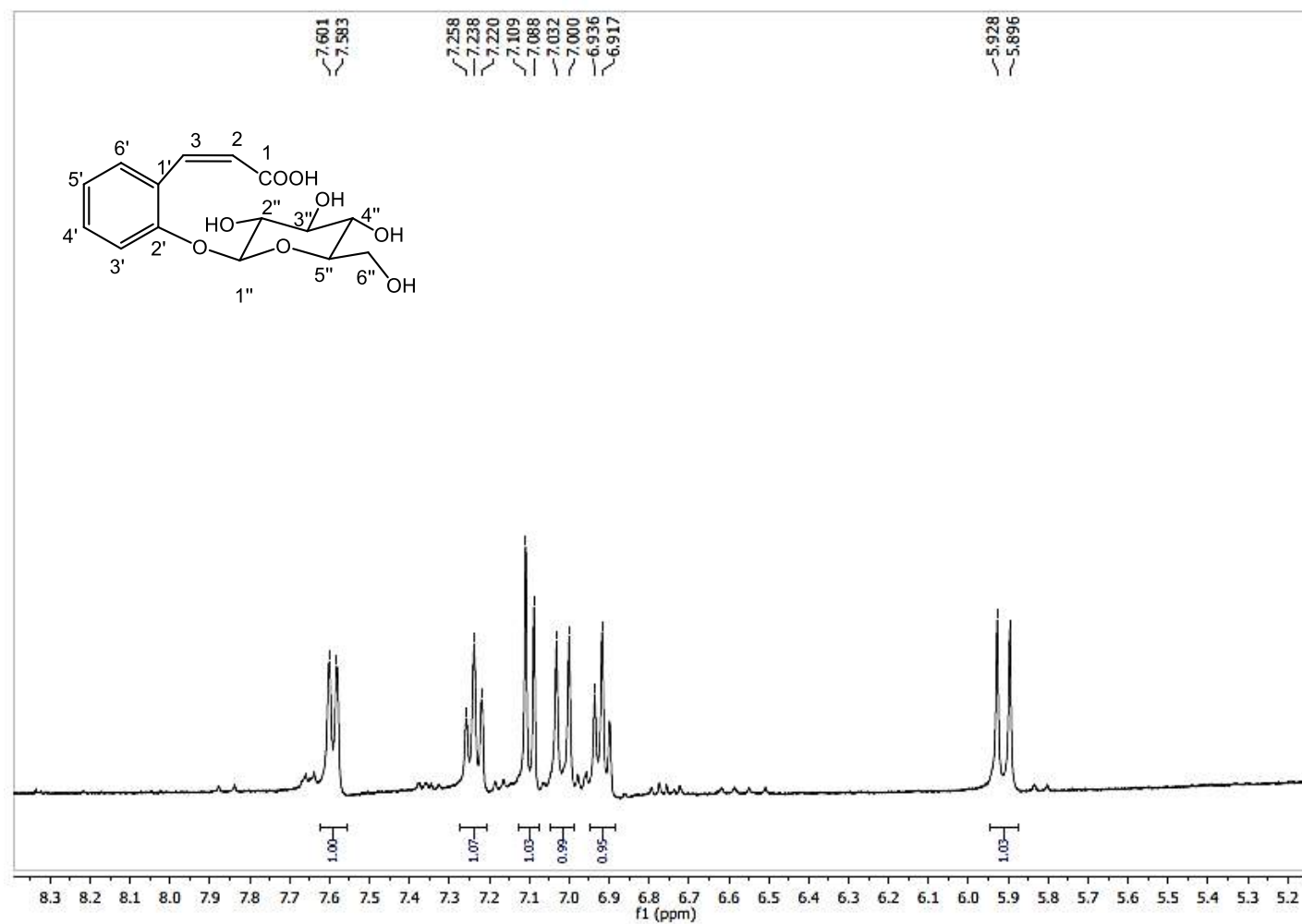


Figura 56. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 6.

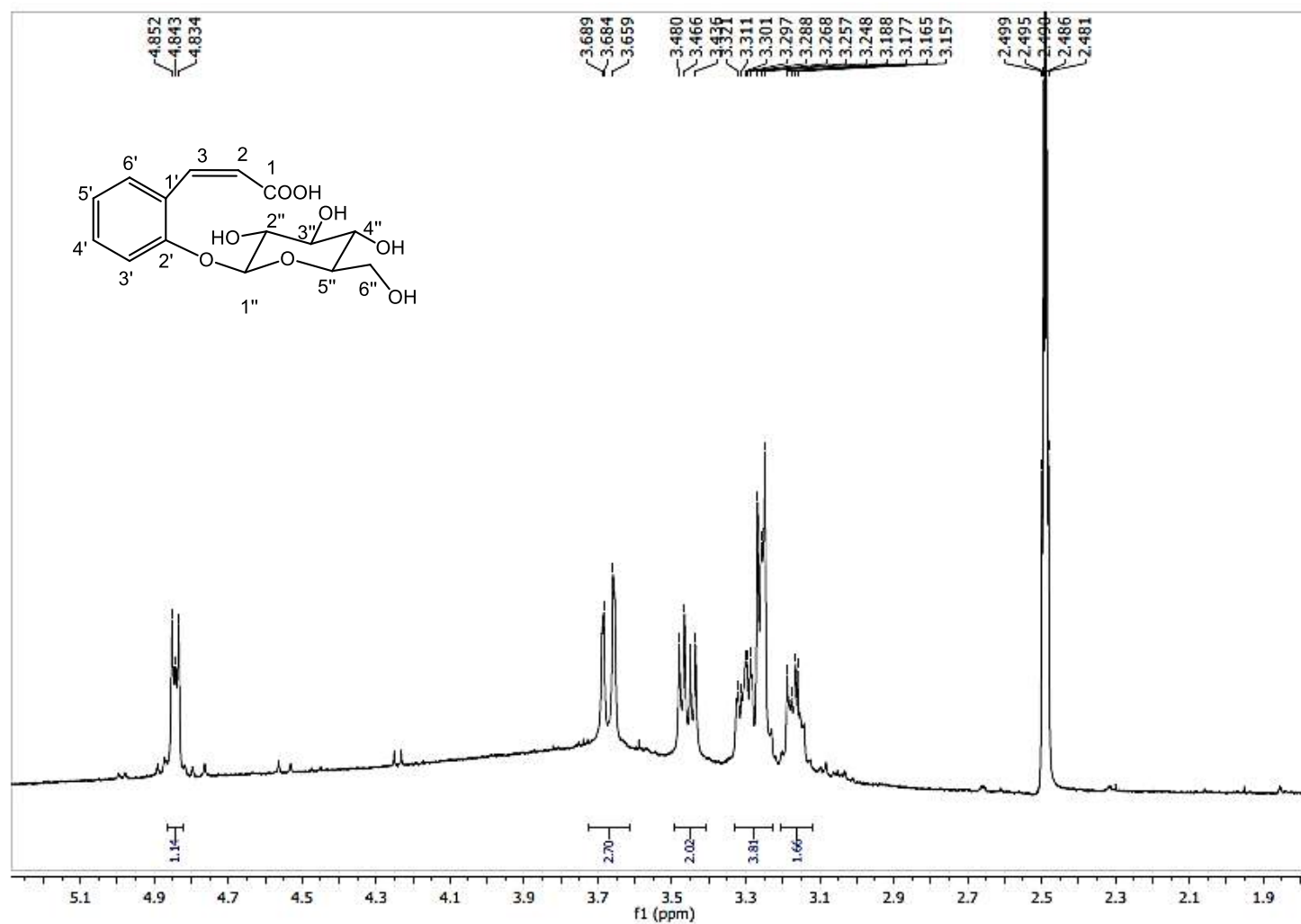


Figura 57. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 6.

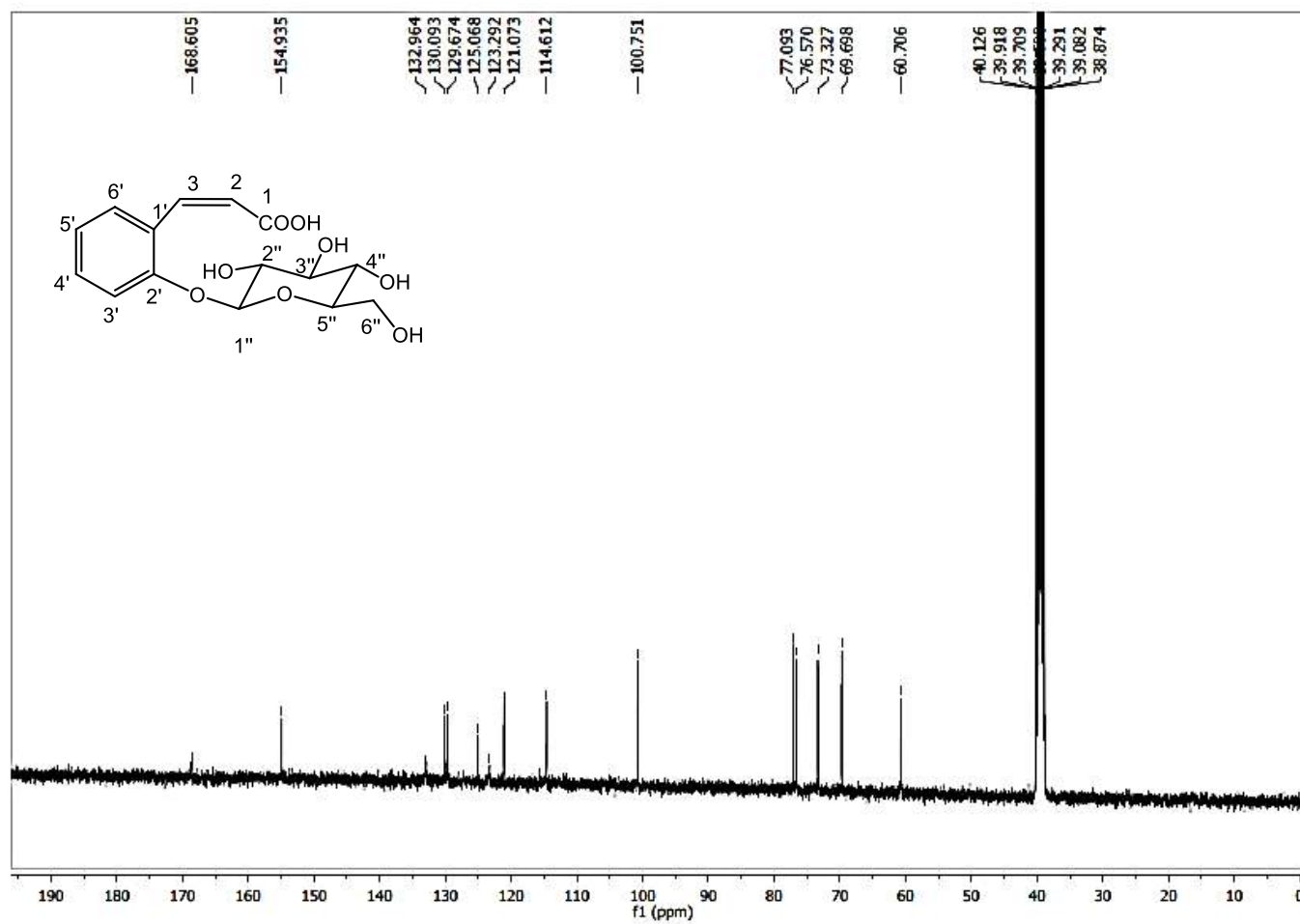


Figura 58. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **6**.

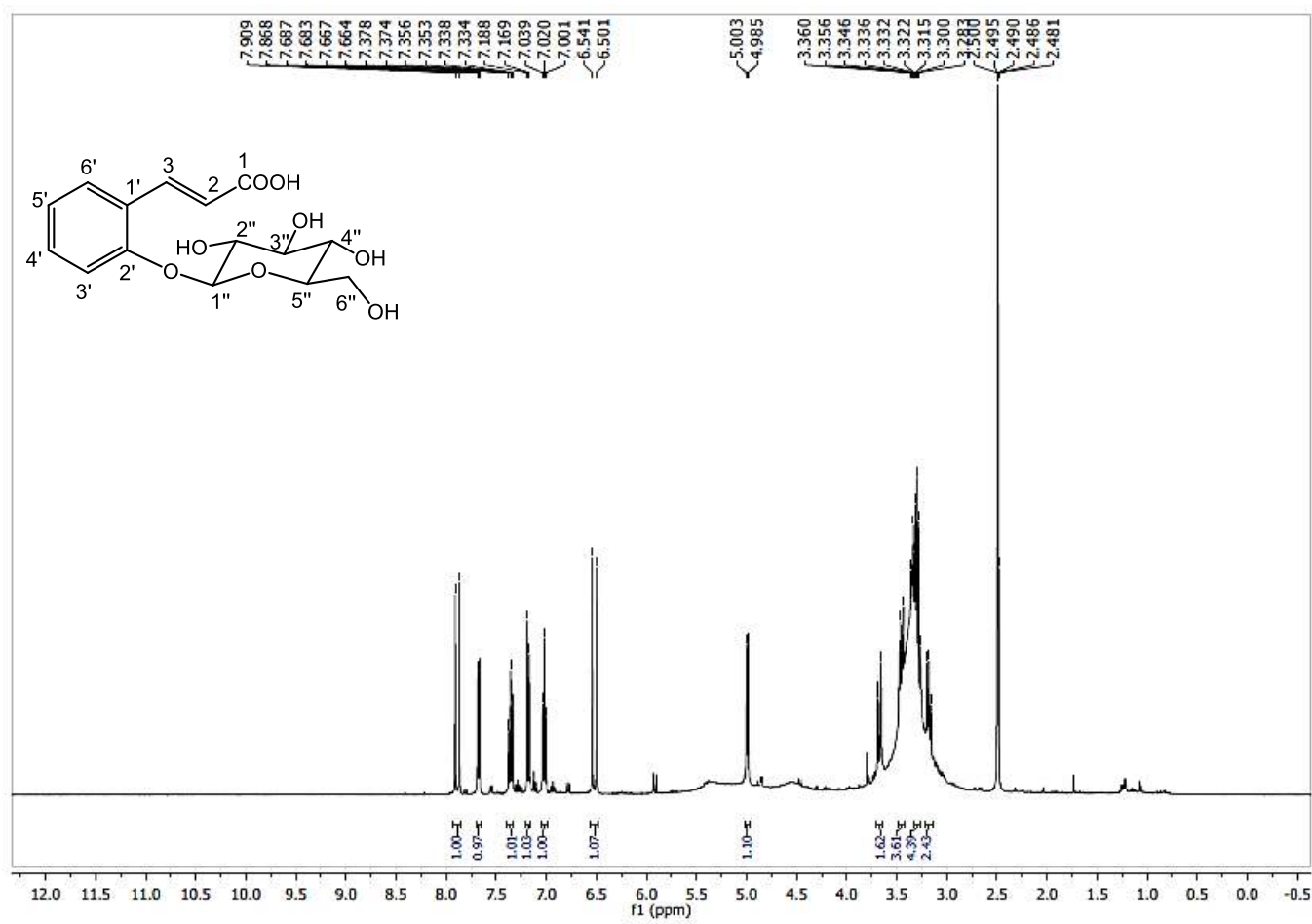


Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto 7.

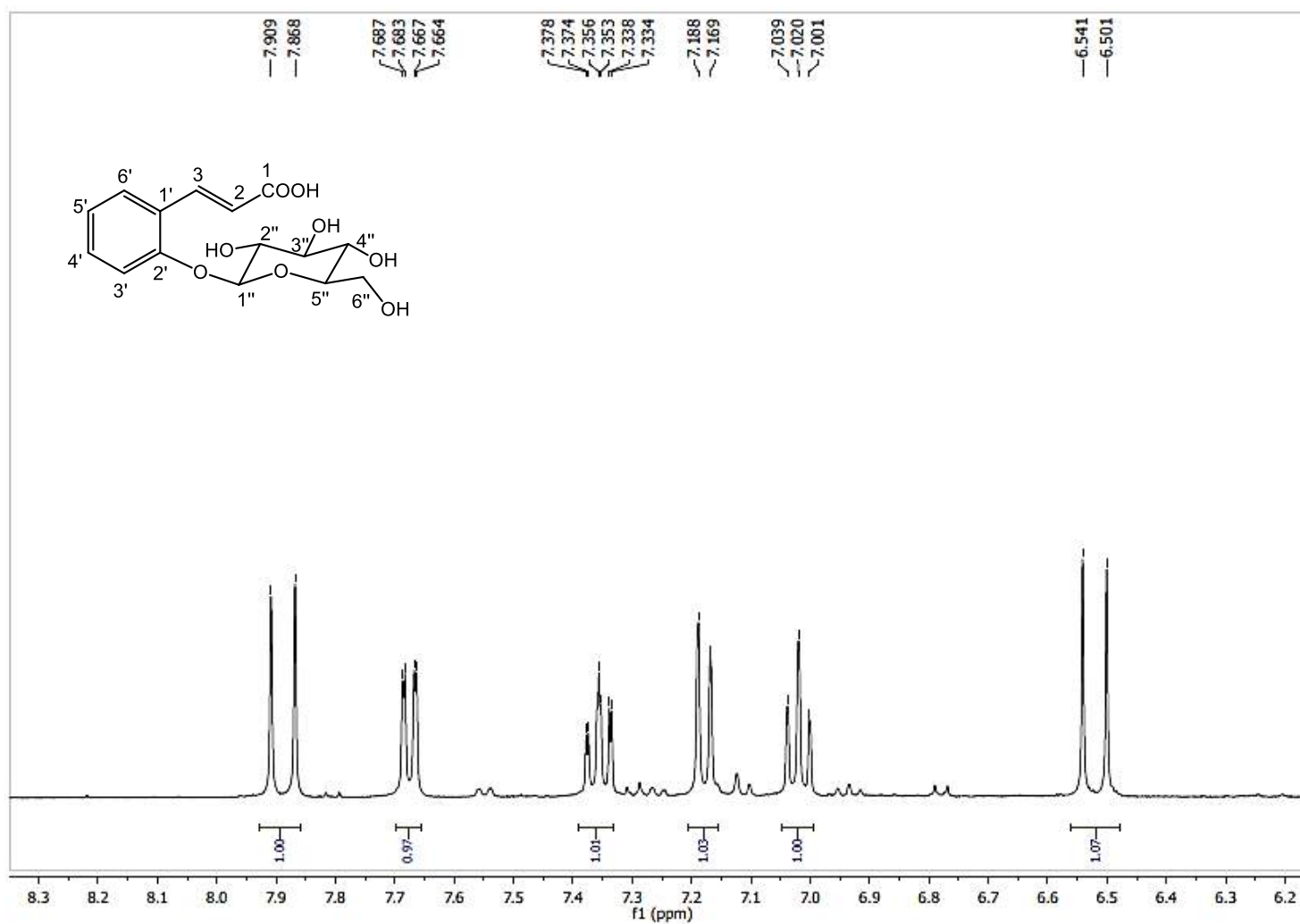


Figura 60. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 7.

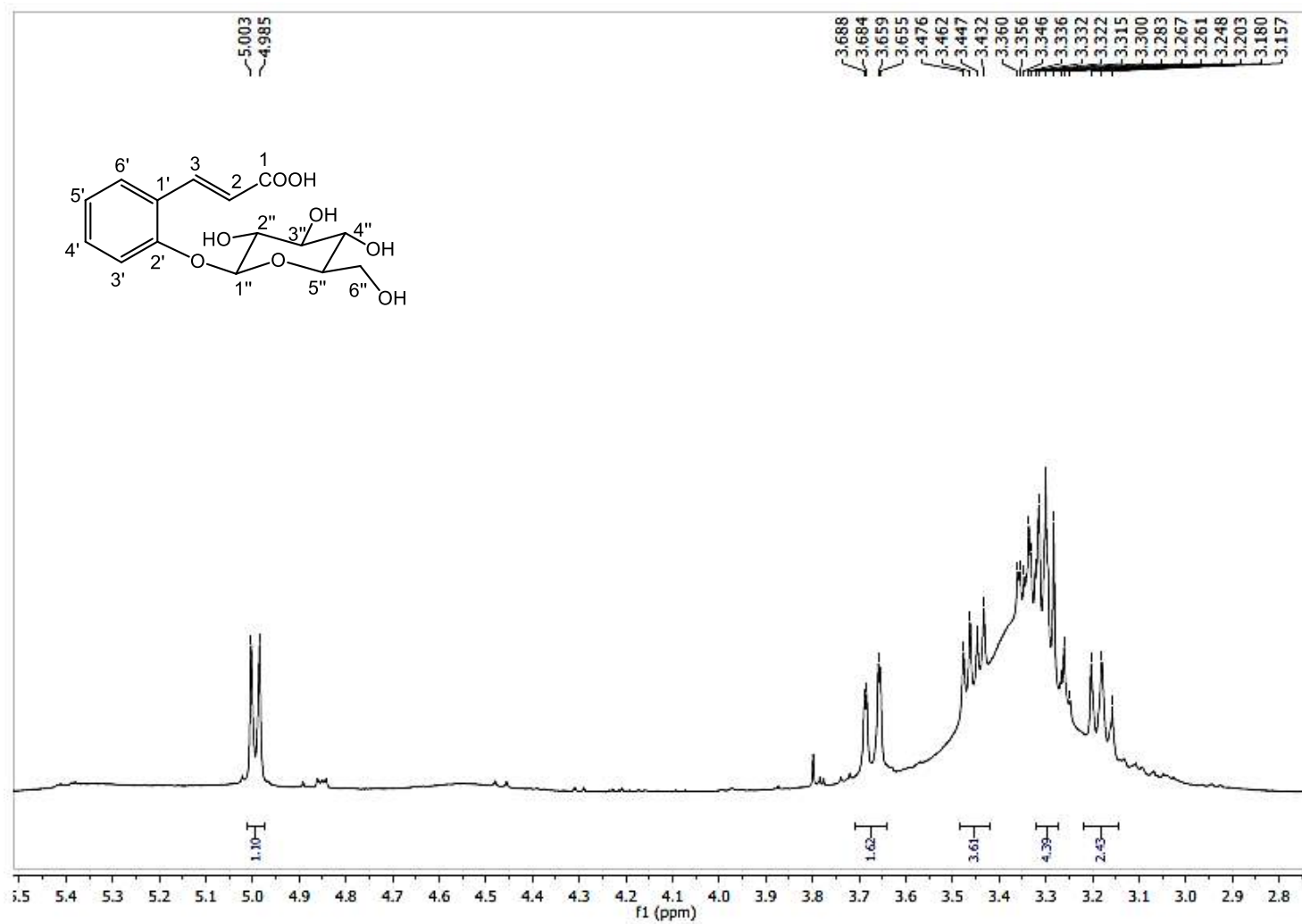


Figura 61. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 7.

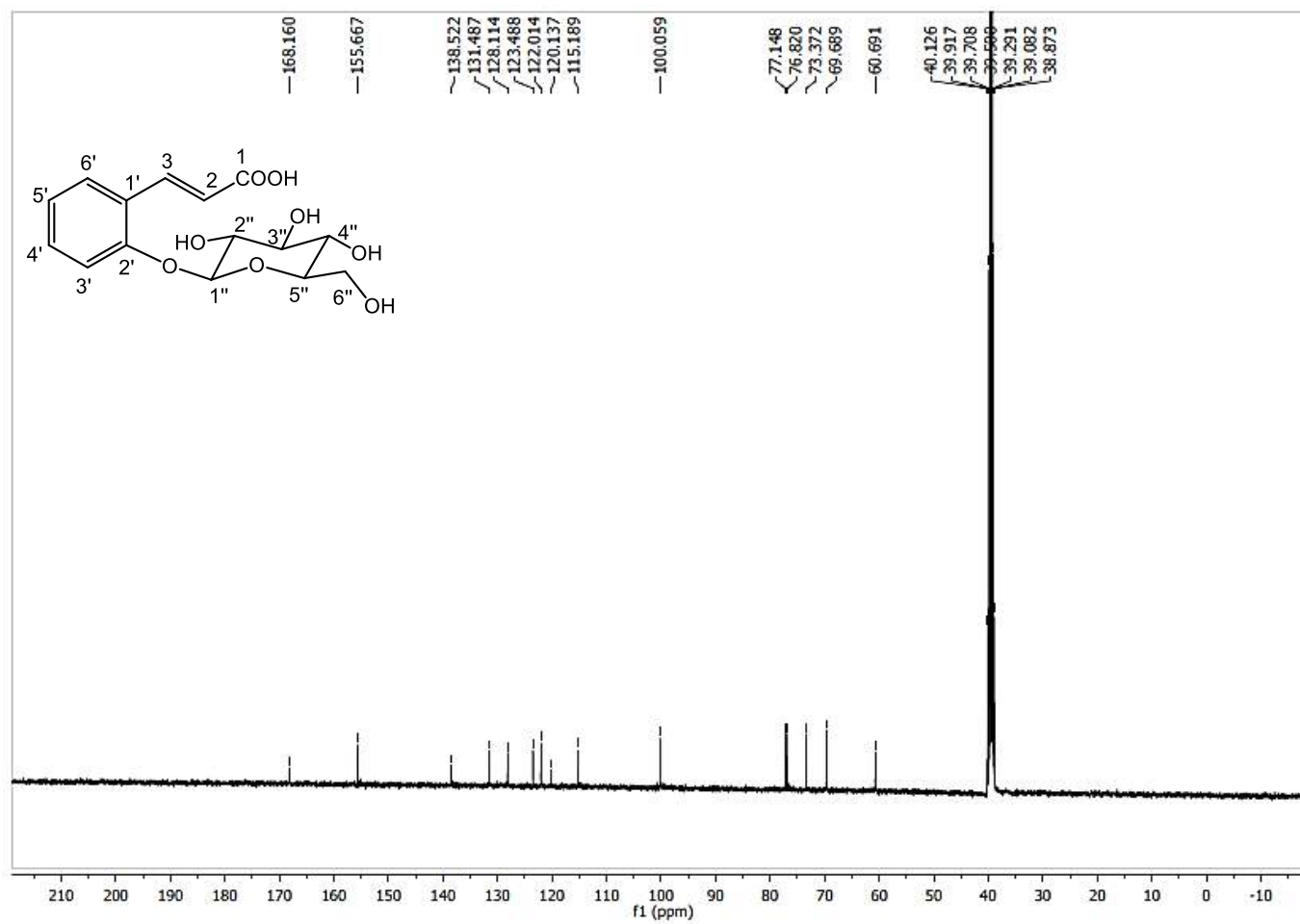


Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 7.

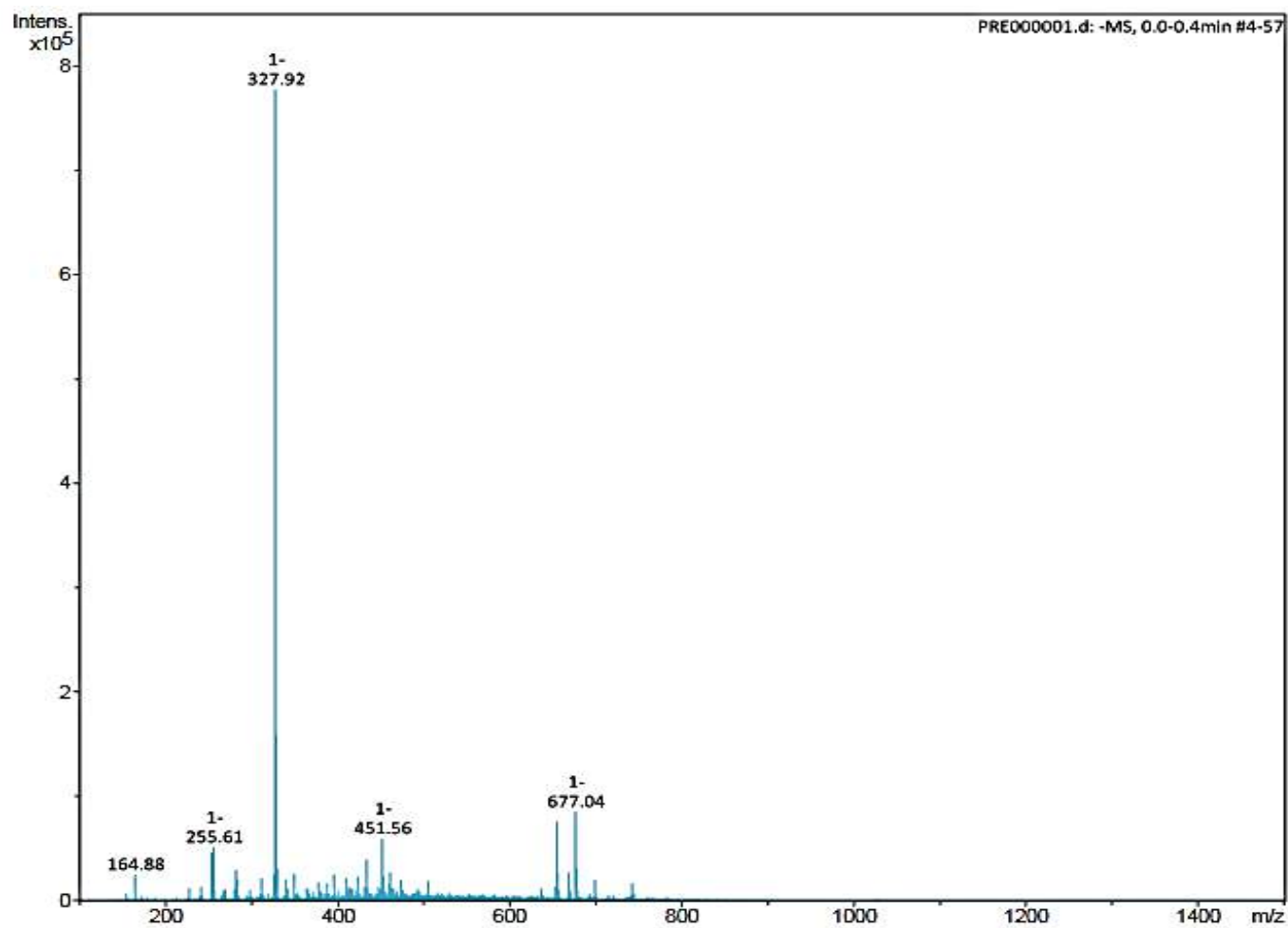


Figura 63. Espectro de IES-EM do composto **8**.

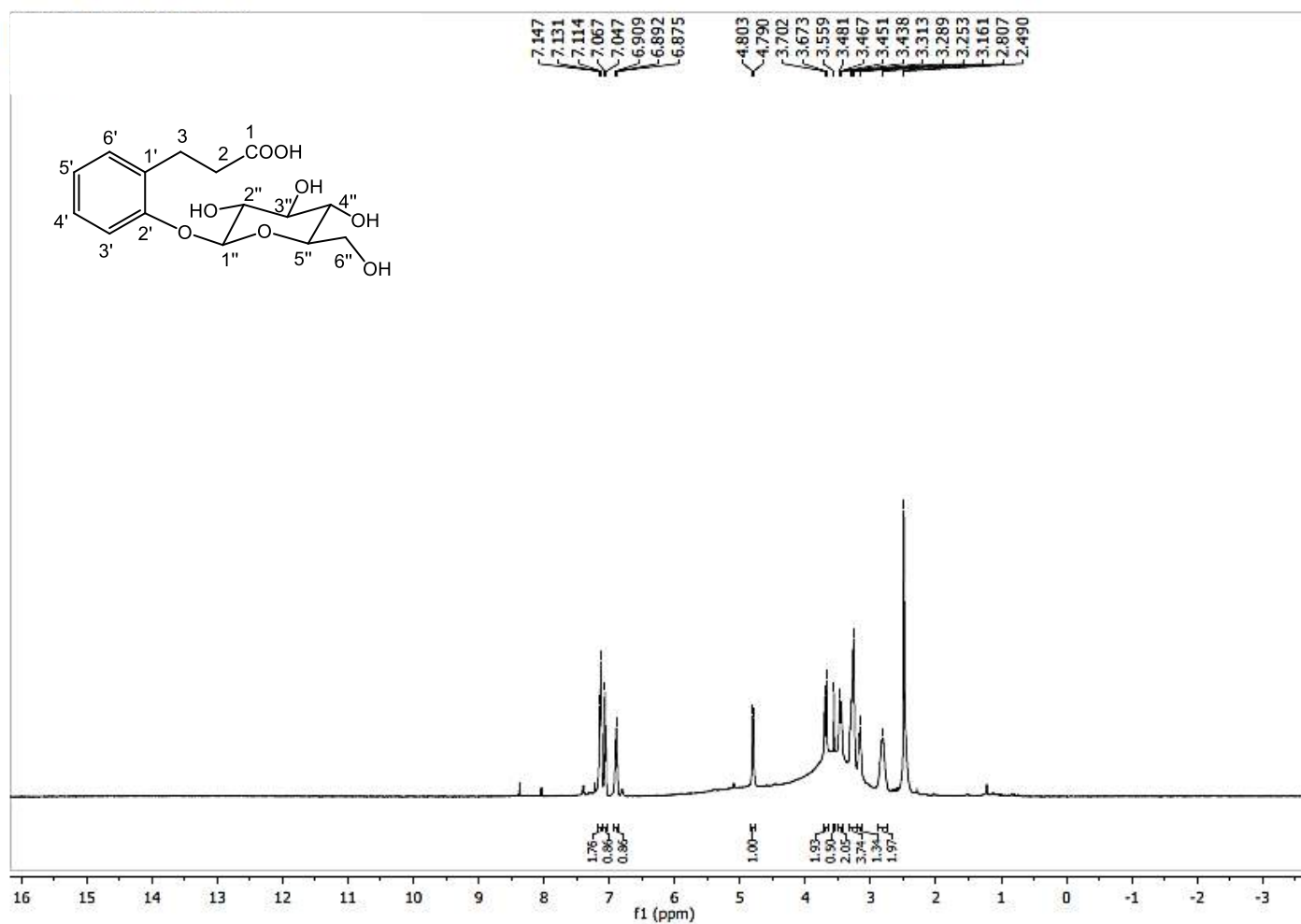


Figura 64. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **8**.

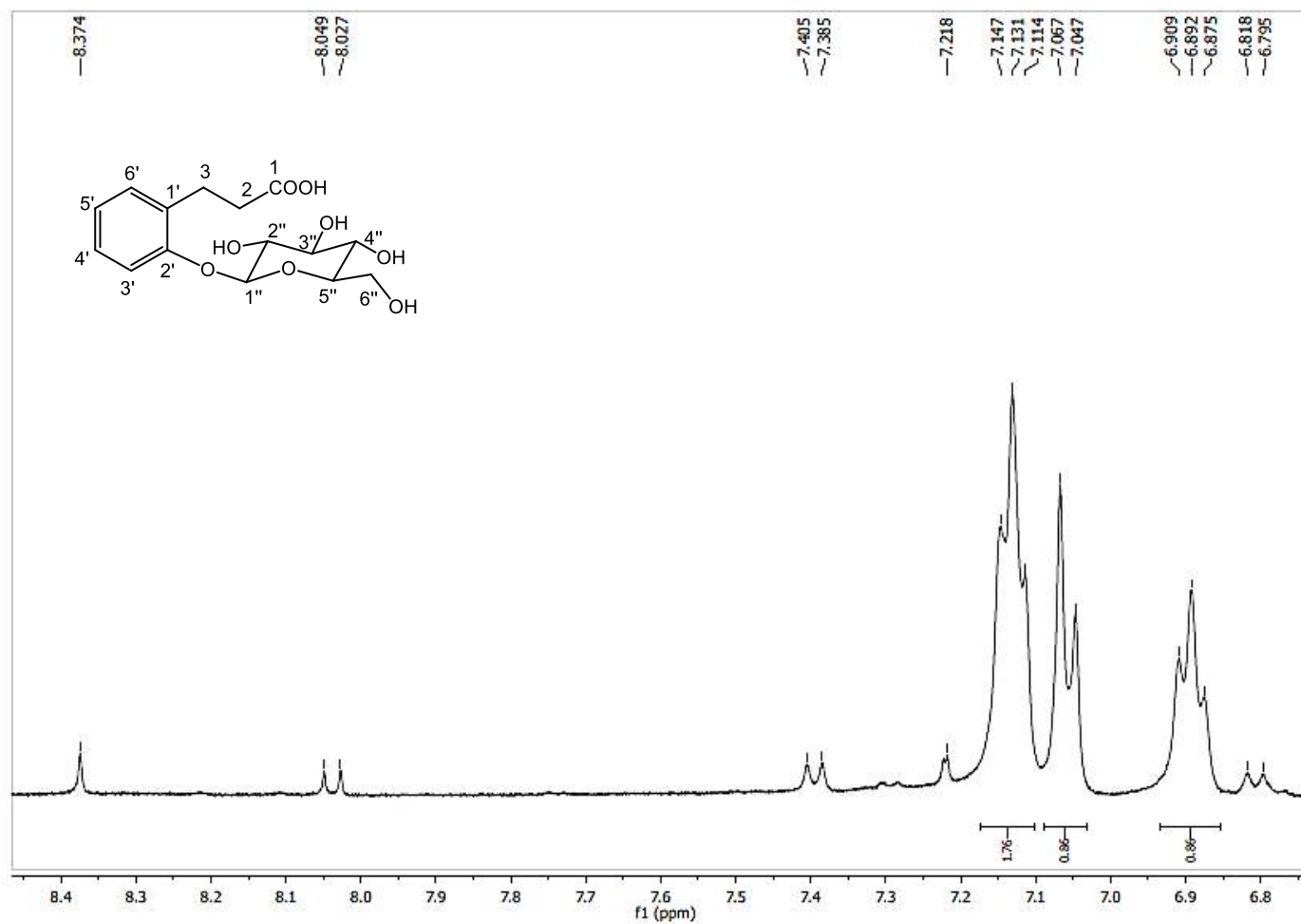


Figura 65. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **8**.

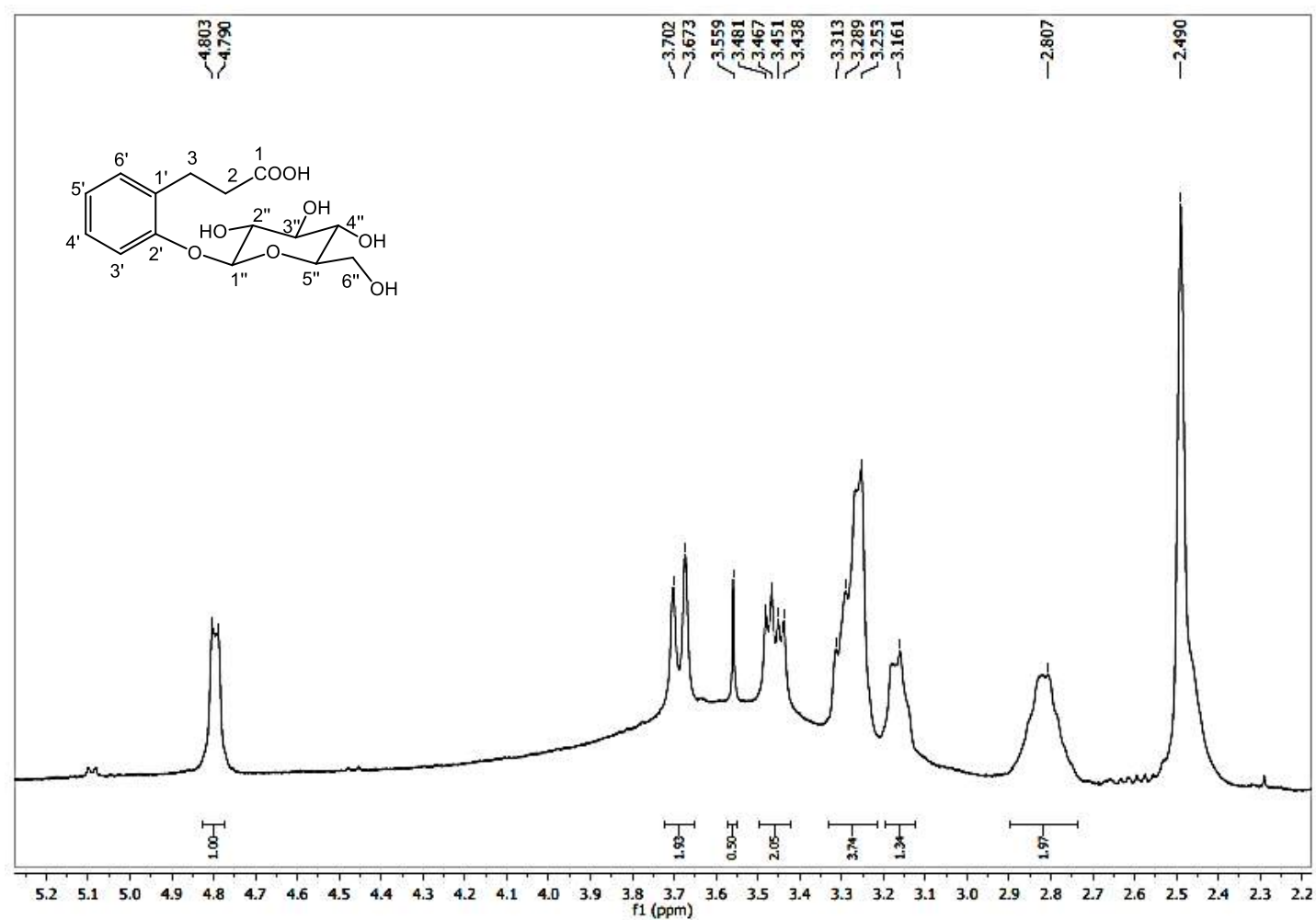


Figura 66. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **8**.

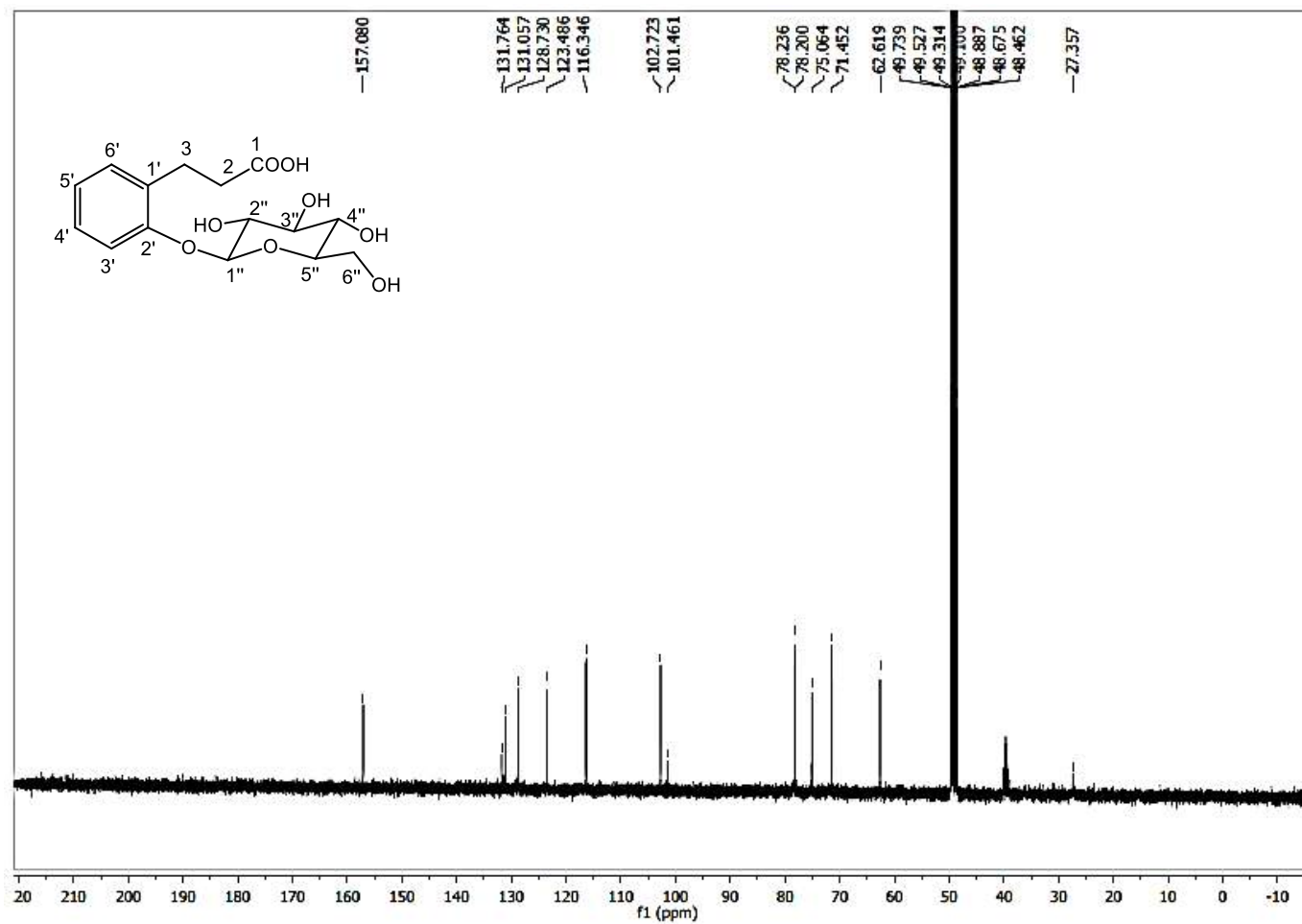


Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **8**.

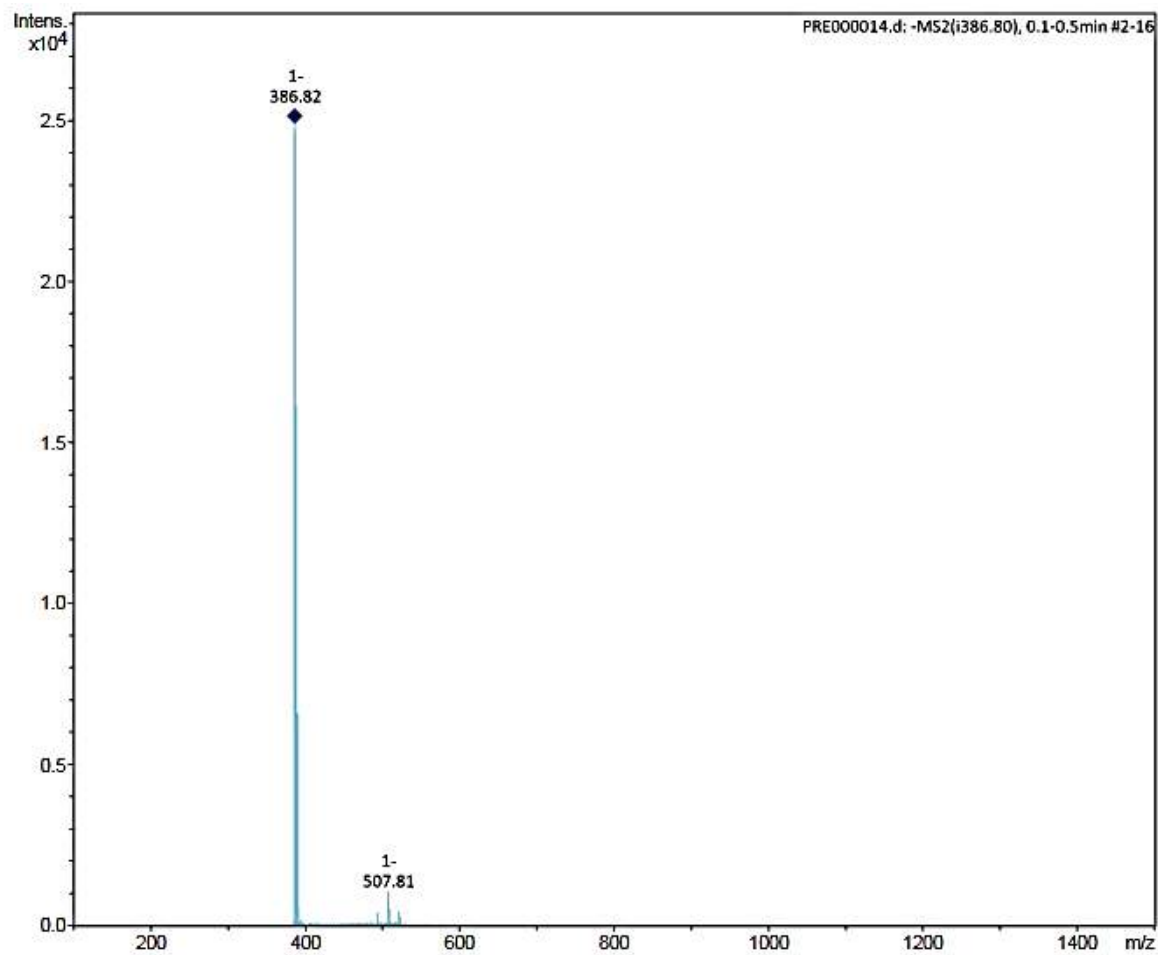


Figura 68. Espectro de IES-EM do composto **9**.

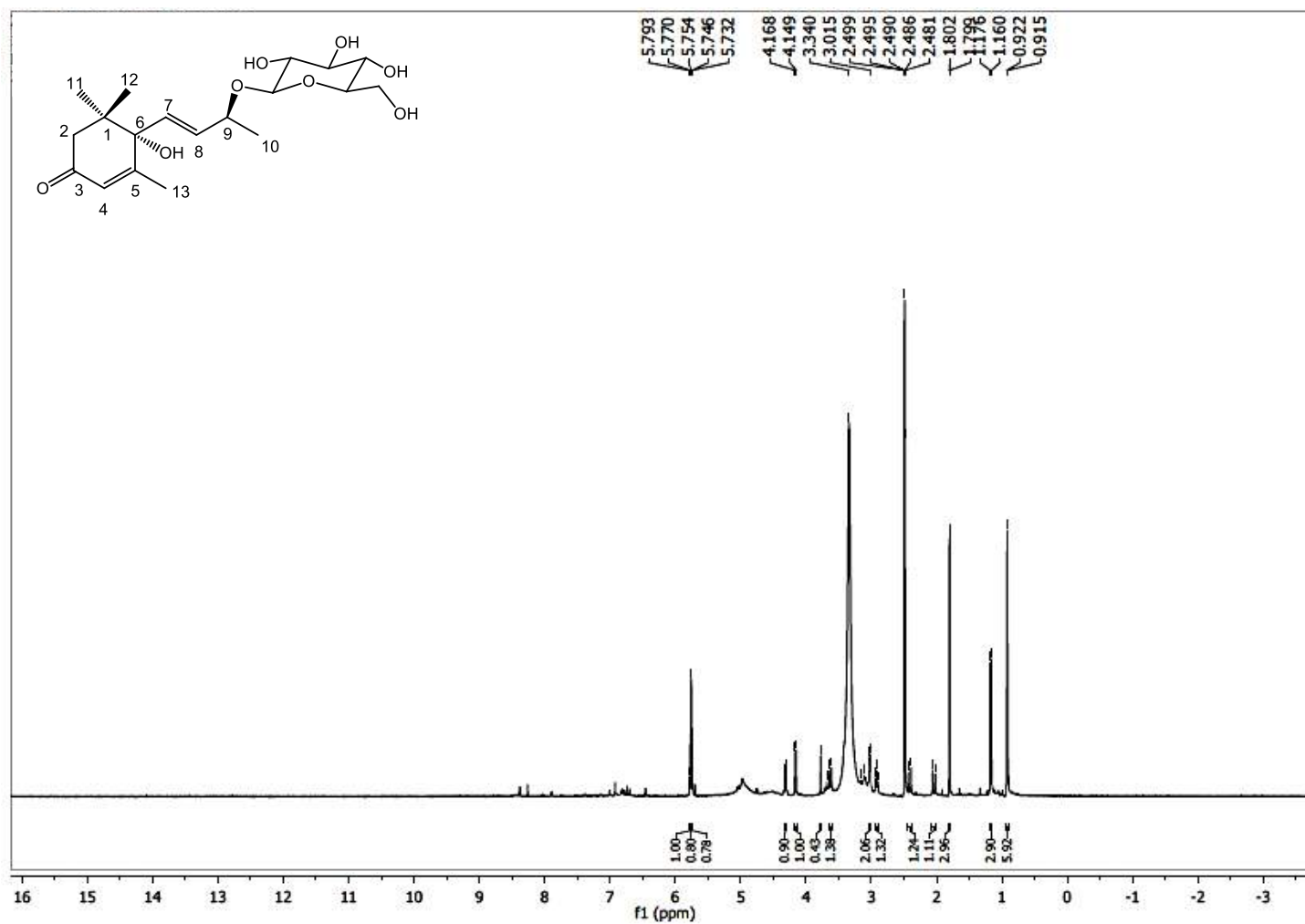


Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

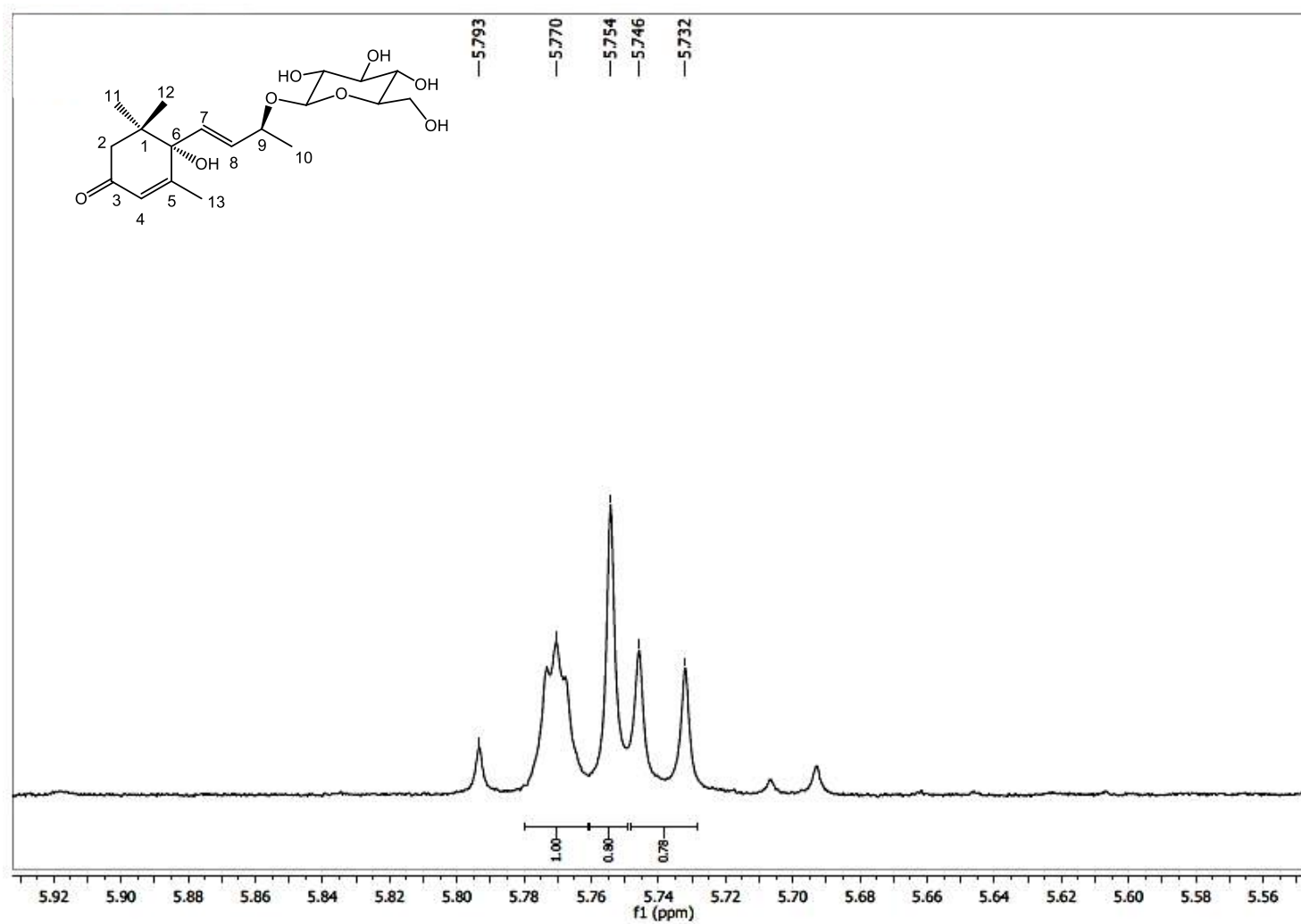


Figura 70. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

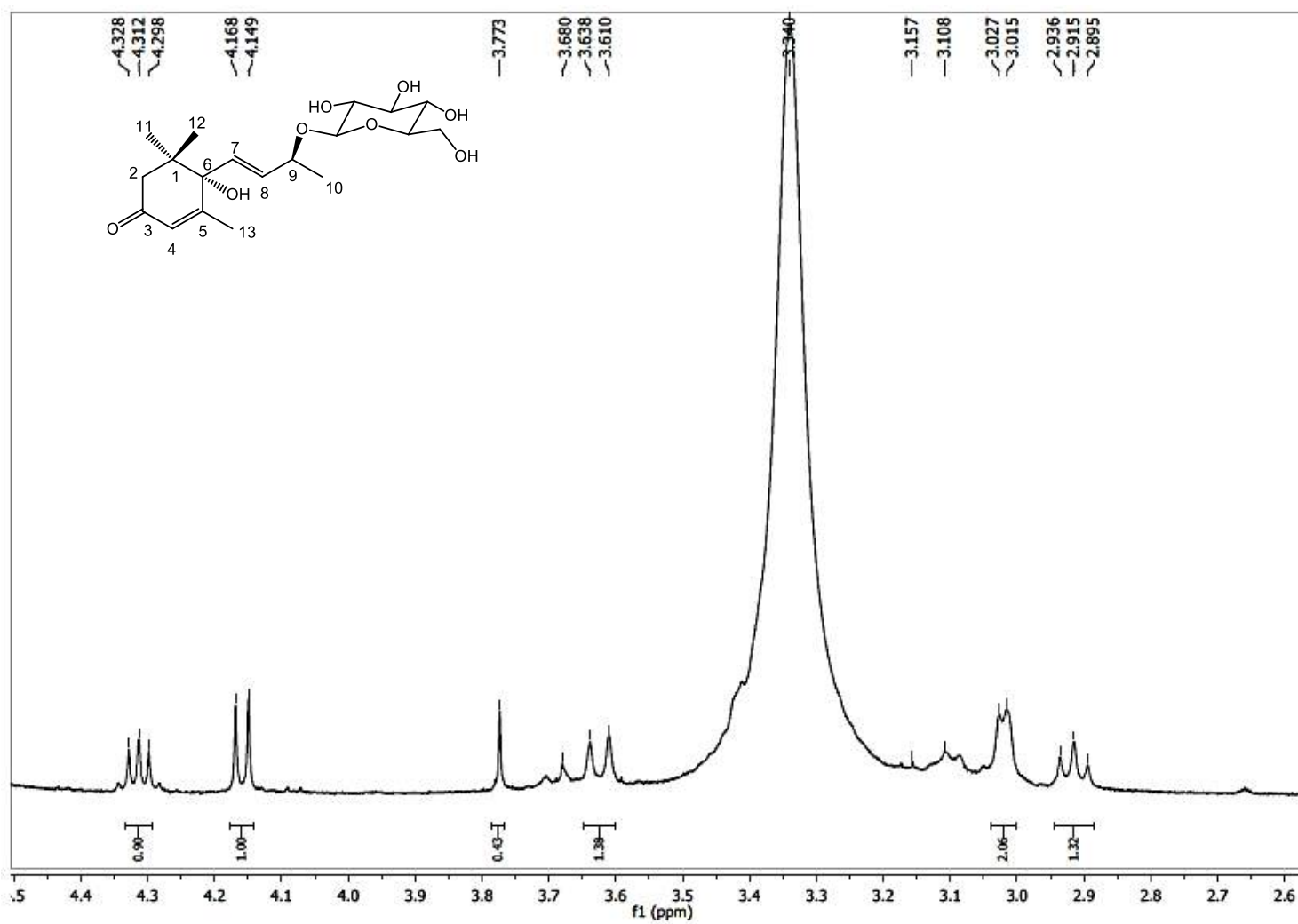


Figura 71. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

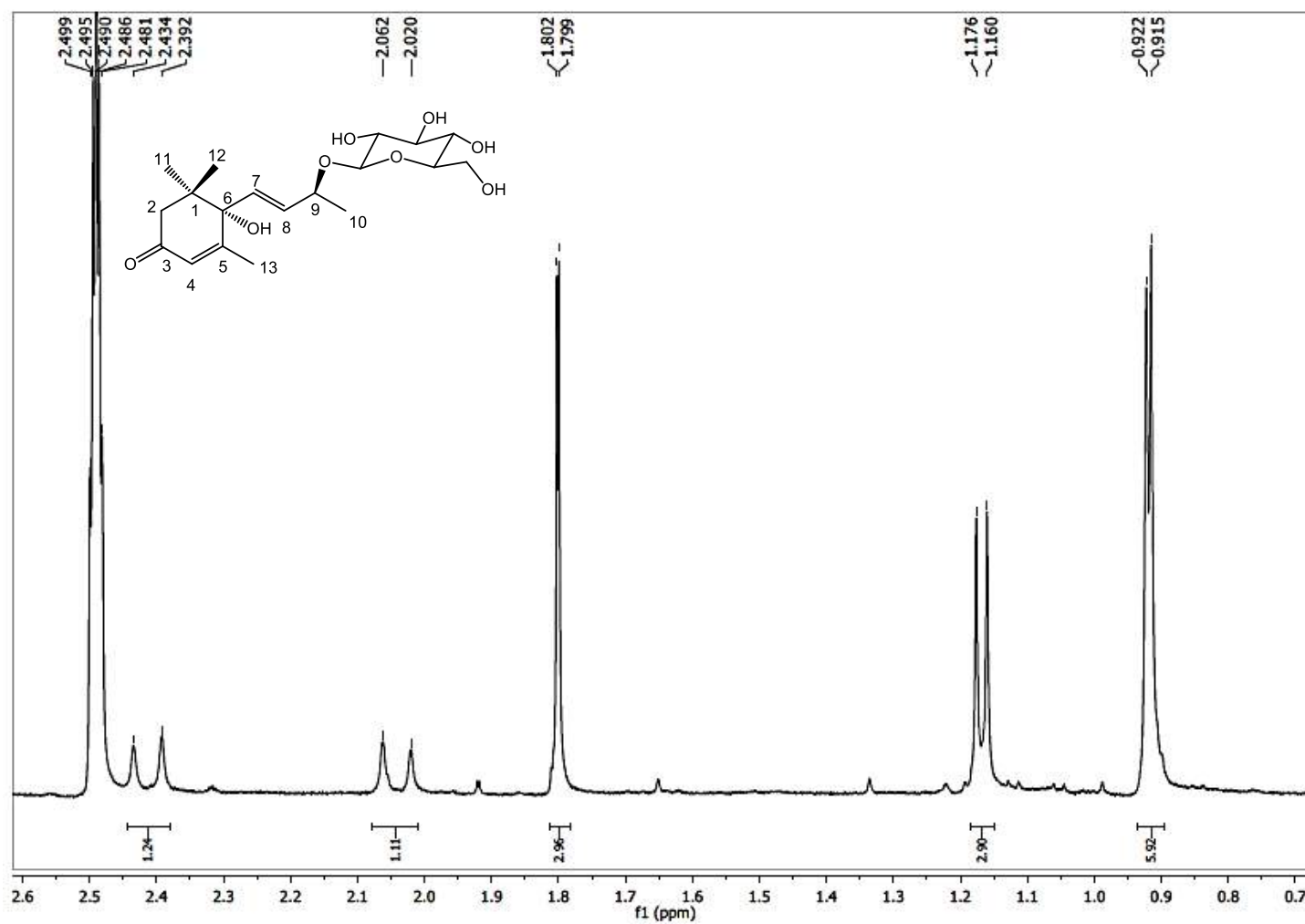


Figura 72. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **9**.

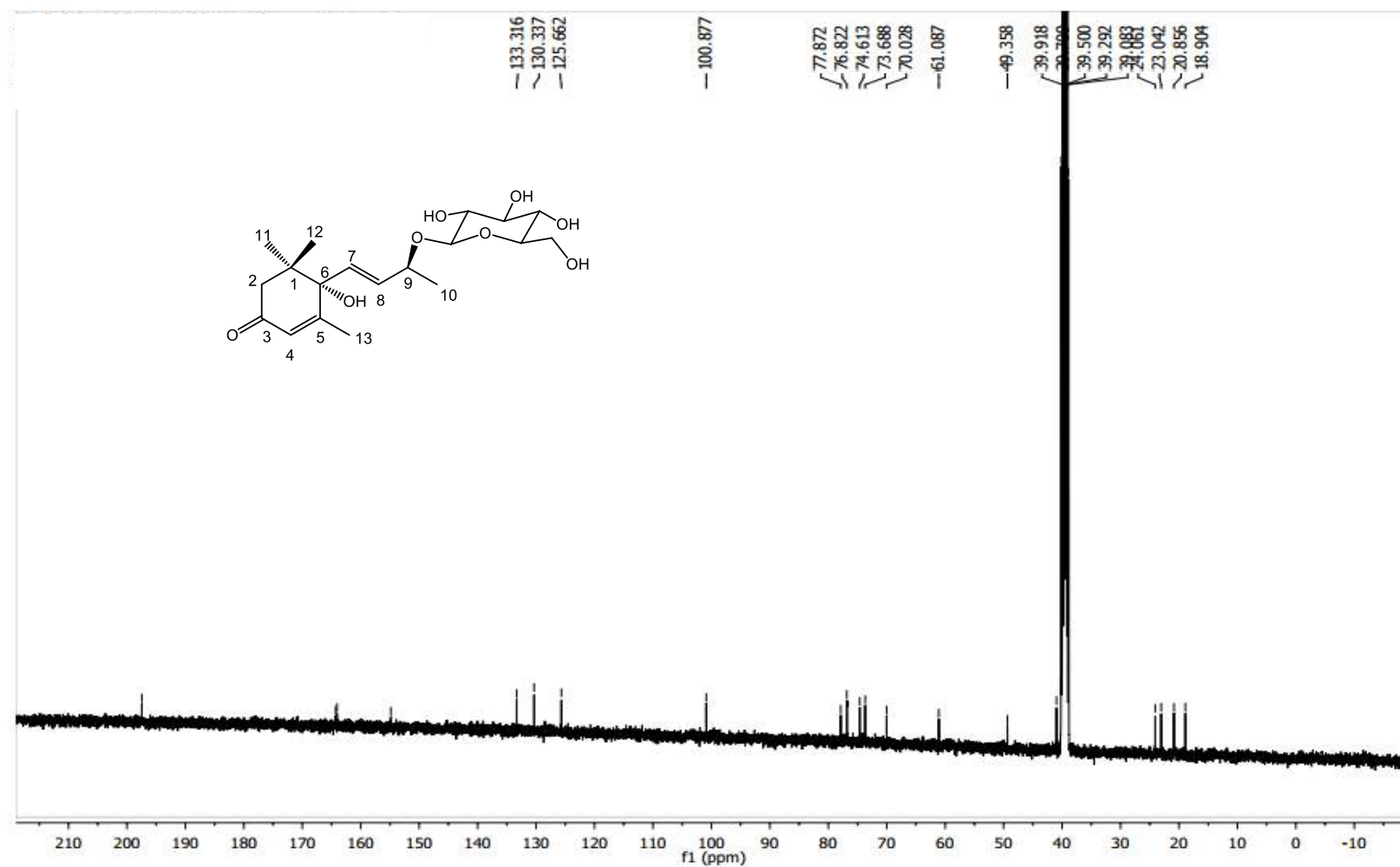


Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

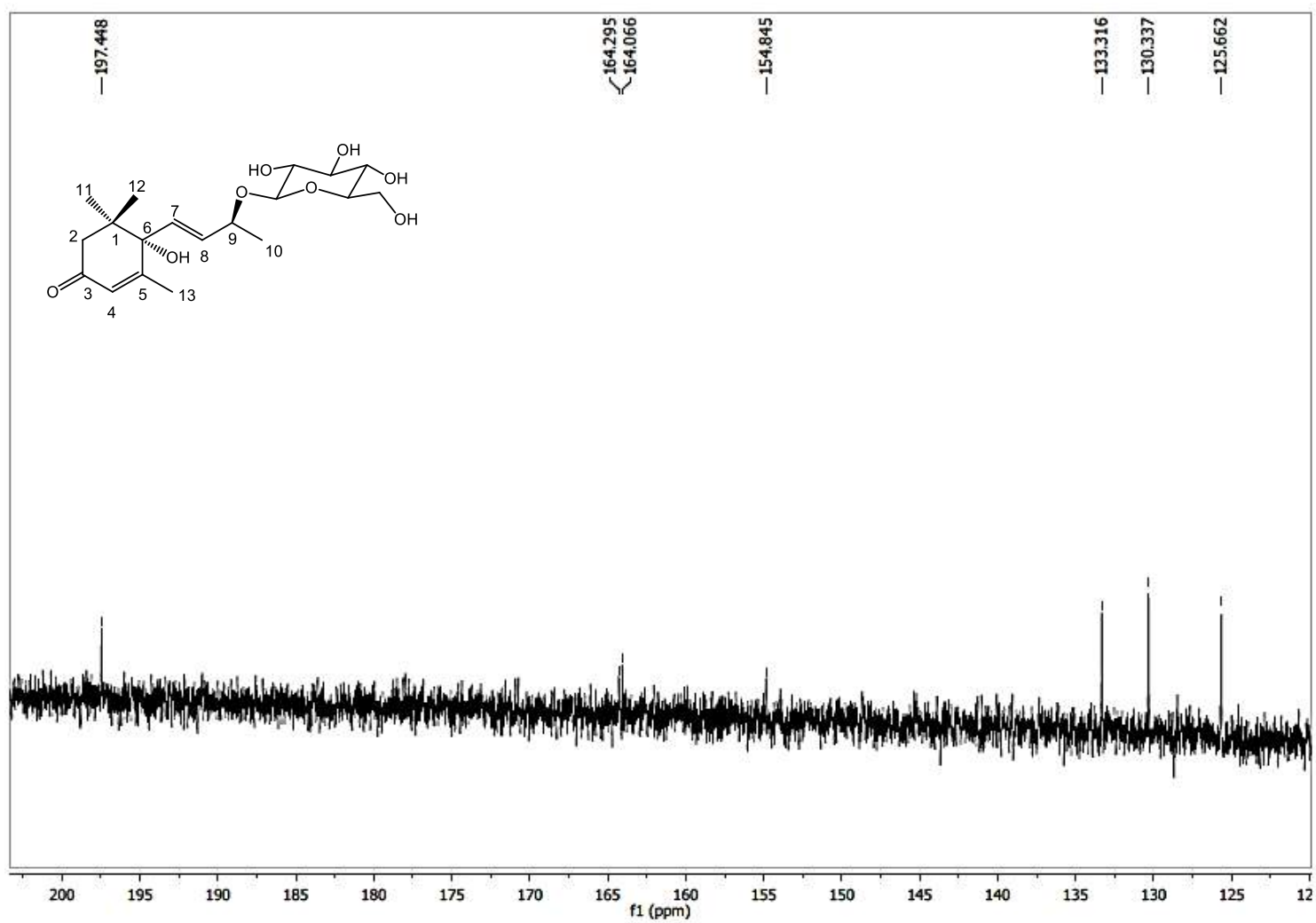


Figura 74. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9**.

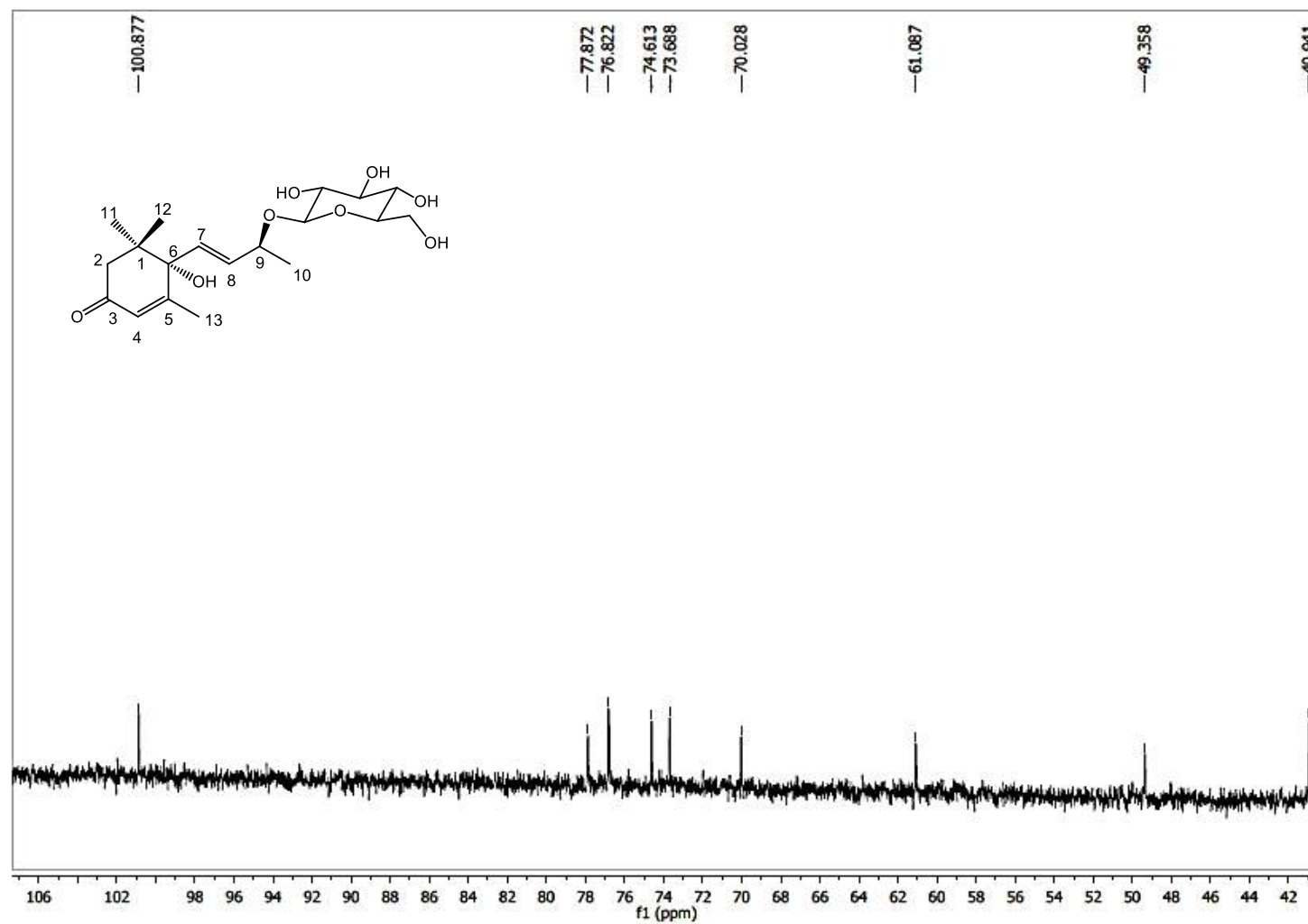


Figura 75. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 9.

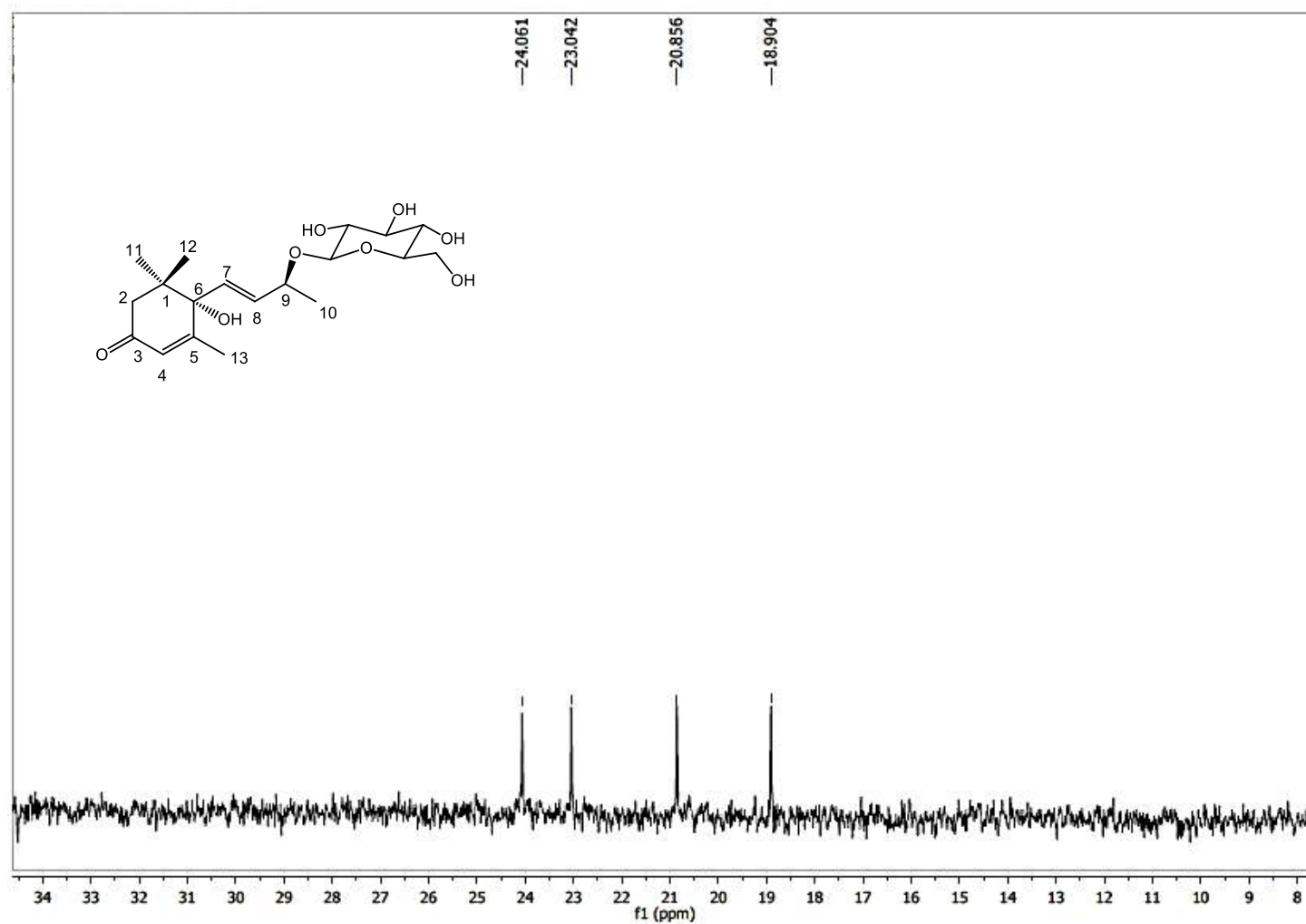


Figura 76. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **9**.

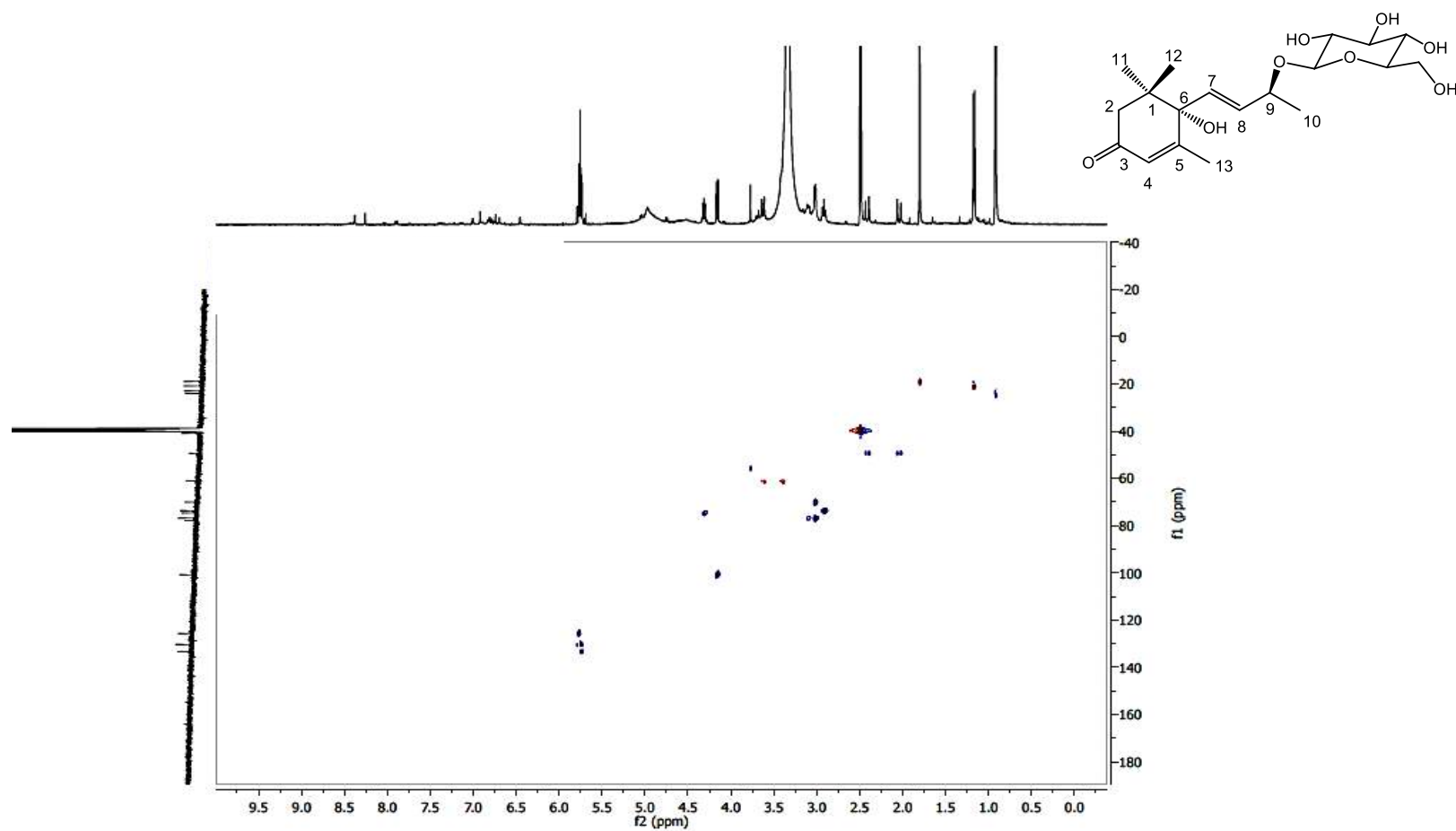


Figura 77. Espectro de RMN - HSQC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto 9.

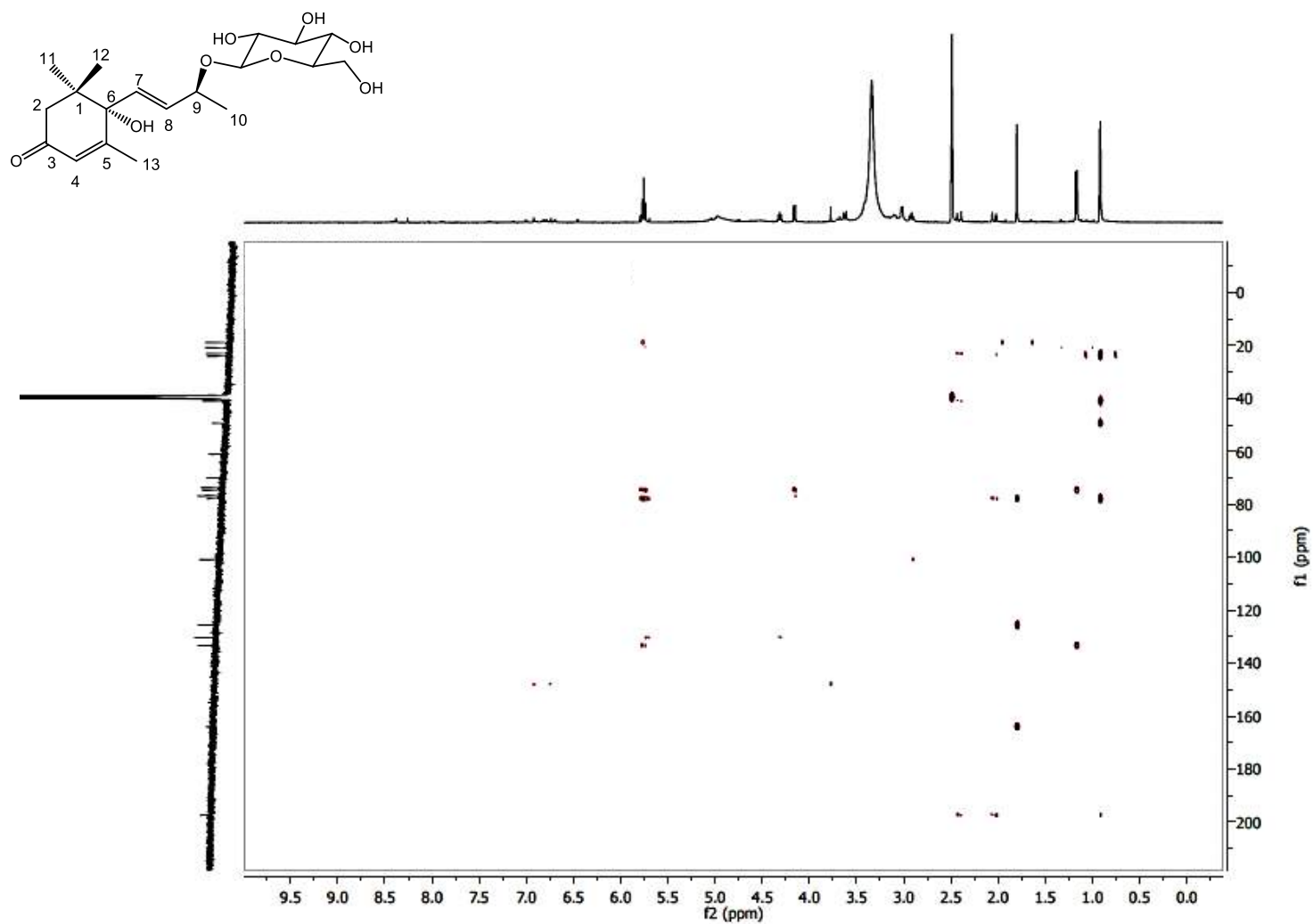


Figura 78. Espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **9**.

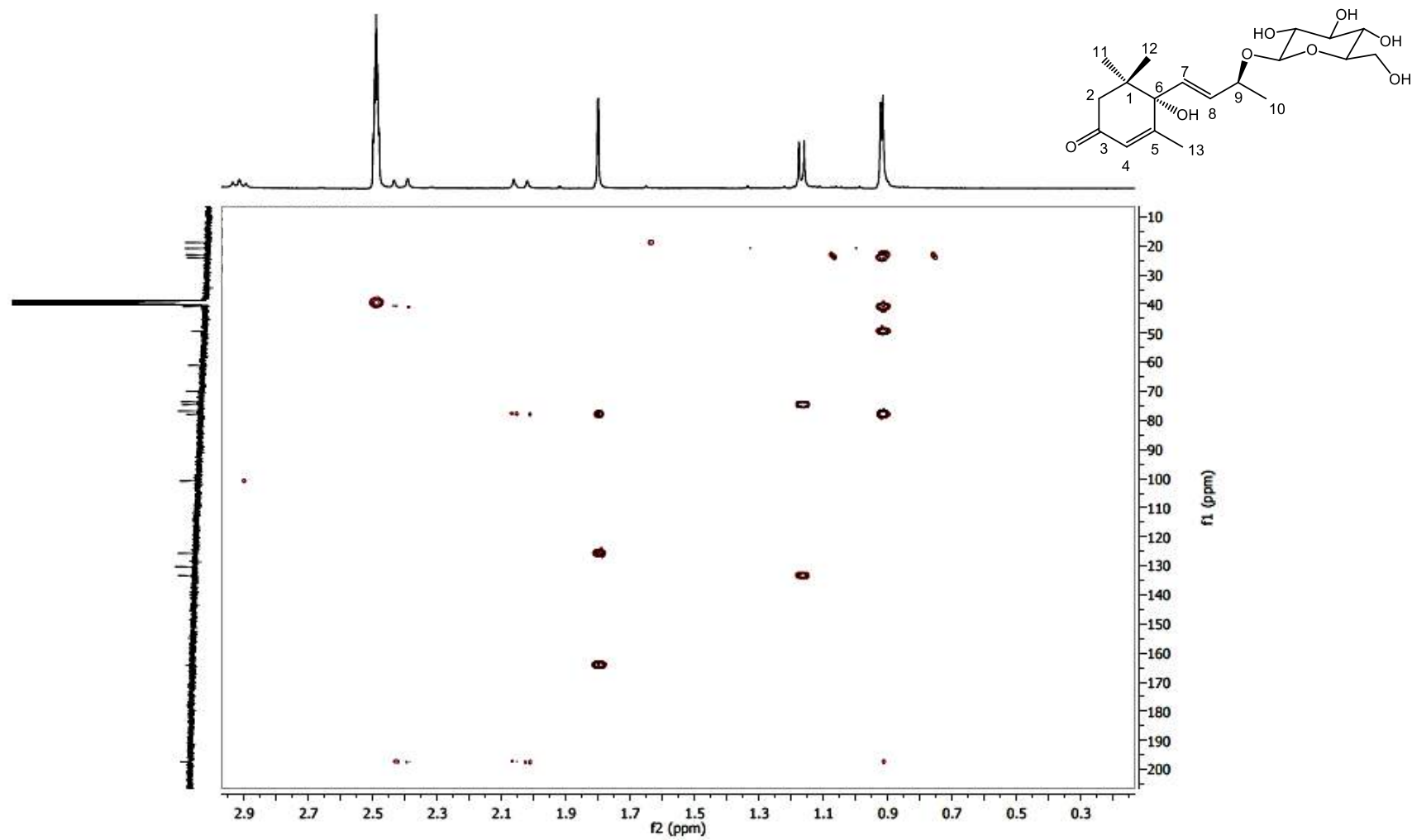


Figura 79. Expansão do espectro de RMN - HMBC (400 e 100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **9**.

5.2 Manuscrito intitulado: “Rápida caracterização de saponinas triterpênicas por CLAE-IES-EM/EM de *Zornia brasiliensis*” submetido à *Molecules*.



Article

Rápida caracterização de saponinas triterpênicas por CLAE-IES-EM/EM de *Zornia brasiliensis*

Yuri Manguiera Nascimento ¹, Lucas Silva Abreu ¹, Ramon Leal Lima ¹, Vicente Carlos O. Costa ¹, José Iranildo Miranda de Melo ², Raimundo Braz-Filho ³, Marcelo Sobral Silva ¹, and Josean Fechine Tavares ^{1,*}

¹ Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa, PB-Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 58429-500, Campina Grande, PB-Brasil

³ Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 28013-600 Campos dos Goytacazes, RJ - Brasil

* Correspondência: josean@ltf.ufpb.br; Tel.: +55-83-3216-7427.

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) é uma espécie popularmente conhecida no Brasil como “urinária”, “urinana” e “carrapicho”, e tem uso popular como diurético e no tratamento de doenças venéreas. Uma metodologia específica para obter uma fração enriquecida com saponina, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção de arranjo de diodos, espectrometria de massa de armadilha de íons e TOF-MS (HPLC-DAD-ESI-MS/MS) foi aplicada para a análise de saponinas triterpênicas. Os experimentos de EM e EM/EM foram realizadas por ionização em modo negativo. Dados da massa molecular e fragmentação foram utilizados para apoiar a caracterização estrutural das saponinas. Com base nos tempos de retenção, determinação da massa em alta resolução e fragmentação, 35 saponinas triterpênicas do tipo oleanano foram tentativamente identificadas em *Z. brasiliensis*.

Palavras-chaves: Saponinas triterpênicas; Soyasaponinas; *Zornia brasiliensis*; HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

1. Introdução

A família Leguminosae é constituída por aproximadamente 770 gêneros e 19.500 espécies. Até então possuía apenas três subfamílias, mas um estudo recente reorganizou a família Leguminosea em seis subfamílias [1]. Dentre estas, está a subfamília Papilionoideae, a que possui maior expressividade de gêneros, e cujo gênero *Zornia* se insere.

O gênero *Zornia* é composto por aproximadamente 80 espécies distribuídas no mundo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil o gênero é representado por 36 espécies, das quais 15 são endêmicas [2,3]. Já foram publicados trabalhos de investigação de atividade farmacológica envolvendo espécies deste gênero, dentre estas, atividade citotóxica, relaxante de musculo liso, atividade anticonvulsivante, antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória e potencial antioxidante [4-12]. Por outro lado, estudos fitoquímicos revelaram a presença isoflavonoides [13,14].

Zornia brasiliensis Vogel é uma espécie conhecida popularmente como “urinária”, “urinana” e “carrapicho”, possui uso popular como diurética e para tratamento de doenças venéreas [15]. *Z. brasiliensis* está distribuído nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, associado

aos domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica [16], mas principalmente no Nordeste brasileiro [17], e Venezuela [18]. Dois estudos farmacológicos envolvendo esta espécie foram relatados, a atividade antinociceptiva da 7-metoxiflavona isolada das suas partes aéreas [19], e a atividade antitumoral do seu óleo essencial [20]. Recentemente, estudo fitoquímico das partes aéreas dessa espécie resultou na identificação de 14 compostos, dentre estes, flavonas, flavanonas, isoflavonoides, pterocarponos, chalconas e uma diidrochalcona glicosilada inédita. Esta chalcona apresentou atividade citotóxica frente a células leucêmicas HL60 [21].

Técnicas hifenadas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a espectrometria de massas é rotineiramente aplicada a análise estrutural e caracterização de saponinas [22-29].

Este estudo representa a primeira contribuição para descrever a existência de saponinas triterpênicas do gênero *Zornia* (Leguminosae). Um total de 35 saponinas foram detectadas e tentativamente identificadas por EM e EM/EM.

2. Resultados

2.1 Identificação por RMN do compostos 25

Após análise por CLAE-DAD-EM/EM foi possível isolar o pico 25, uma vez que esse é o majoritário dessa fração rica em saponinas (Figura 80).

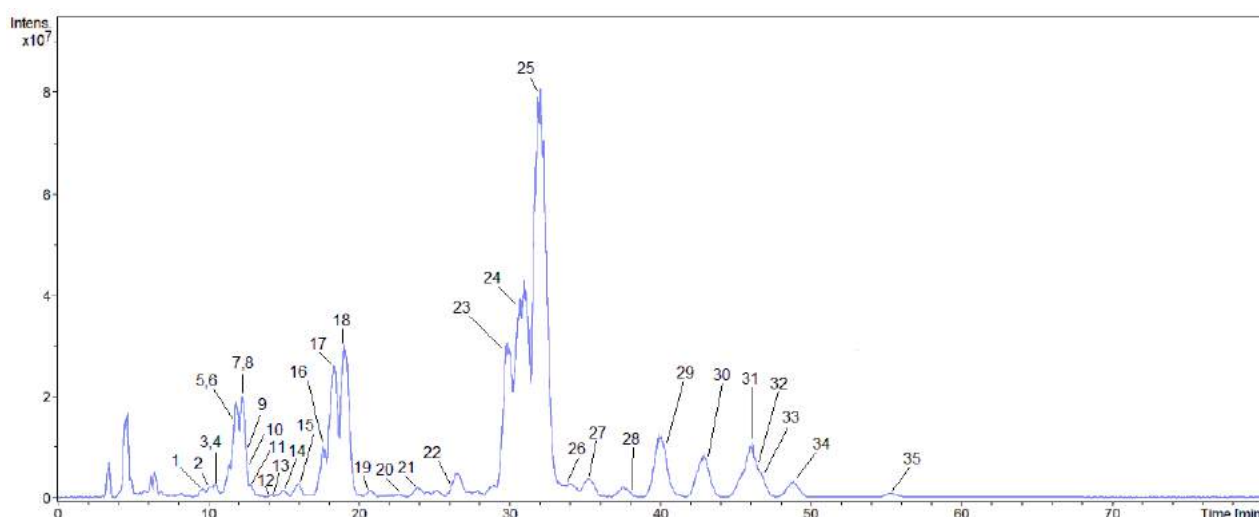


Figura 80. Cromatograma do pico base (BPC) obtido por ESI-MS/MS em modo negativo da fração rica em saponinas.

O espectro de RMN de ^{13}C -BB ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) de **25** revelou a presença de 45 sinais atribuídos a 47 carbonos, com sinais distribuídos na região de carbonos alifáticos. Sendo compatível com presença de um esqueleto triterpênico e com a presença de três unidade osídicas, desta forma sugerindo que **25** trate-se de uma saponina. Foi possível atribuir a presença de 7 metilas para sapogenina triterpênia [δ_c 22,3 (Me-23), 15,3 (Me-25), 16,7 (Me-26), 25,0 (Me-27), 20,4 (Me-28), 32,7 (Me-29), 28,4 (Me-30)], pode ser observado ainda um sinal em δ_c 61,6 (C-24) característico de carbono carbinólico, e assim revelando que nesta estrutura a Me-24 encontra-se oxigenado. Outros dois sinais observados foram δ_c 121,7 (C-12) e 144,1 (C-13) atribuídos as carbonos do tipo sp^2 onde C-12 é um carbono metínico e C-13 um carbono não hidrogenado, assim confirmando que a sapogenina de **25** é do tipo triterpênica oleanano. A existência de um carbonônico metilênico em C-19 (δ_c 46,4) e valor do deslocamento C-20 (δ_c 30,3) sugere que esta sapogenina trata-se da β -amirina. Foi ainda observado na expansão deste espectro outros dois sinais de carbonos oximetínicos em δ_c 74,2 (C-22) e 90,0 (C-3).

No espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) foi possível observar os sinais atribuídos às 7 metilas, todos com integrais para 3 hidrogênios [δ_{H} 1,08 (Me-23), 0,79 (Me-25), 0,88 (Me-26), 1,04 (Me-27), 0,74 (Me-28), 0,96 (Me-29), 0,96 (Me-30)], corroborando com os dados observado nos espectros de RMN de ^{13}C , da mesma maneira foi observado um singlete largo em δ_{H} 5,16 com integral para um hidrogênio, confirmando a existência de um carbono metínico sp^2 . Foram observados os sinais em δ_{H} 3,80 (d, $J = 11\text{ Hz}$, 1H) e 3,04 (m, 1H) atribuídos ao carbono oximetilênico na posição C-24, um δ_{H} 3,12 (m, 1H) atribuído ao C-3 e δ_{H} 3,23 (m, 1H) atribuído ao C-22, confirmando que estes carbonos são oximetínicos. Diante disto, e com a junção dos demais dados descritos na Tabela 7, foi possível concluir que a sapogenina de **25** é a β -amirina.

Ainda no espectro de RMN de ^{13}C -BB (DMSO- d_6 , 100 MHz) foi possível observar 3 sinais em δ_{C} 103,9 (C-1'), 100,2 (C-1'') e 100,3 (C-1'''), revelando a presença de unidades osídicas em **25**. Foram observados ainda os sinais em δ_{C} 172,3 (C-6') característico de carbonila de ácido carboxílico, sugerindo a presença de um açúcar do tipo ácido glucurônico, um sinal em δ_{C} 65,3 (C-5'') atribuído ao carbono metilênico da arabinose e um sinal δ_{C} 17,9 (C-6''') atribuído a metila de ramnose, assim sendo estes as três unidades osídicas presentes em **25** [30-32].

O espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) corroborou com a proposta da presença dos três açúcares distintos. Foi possível atribuir ao carbono anomérico do ácido glucurônico o hidrogênio em δ_{H} 4,13 (d, $J = 6,0\text{ Hz}$, 1H) revelando que este é o β -ácido glucurônico, já o hidrogênio em δ_{H} 4,68 (d, $J = 7,0\text{ Hz}$, 1H) foi atribuído ao hidrogênio anomérico da arabinose, desmosntrado que esta é a β -arabinose, por fim o sinal do hidrogênio anomérico da ramnose, apresentou-se como um singlete largo em δ_{H} 4,97 (sl, 1H), sendo esta a α -ramnose. Os sinais em δ_{H} 3,60 (dd, $J = 4,5$ e $11,0\text{ Hz}$, 1H) e 2,92 (t, $J = 11,0\text{ Hz}$, 1H) foram atribuídos ao C-5'' confirmando que este é um carbono metilênico. E a presença de um dublete em δ_{H} 1,06 (d, 3H) com integral para três hidrogênios confirmou a presença da metila na unidade de açúcar α -ramnose [30-32].

No espectro bidimensional $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (DMSO- d_6 , 500/125 MHz), em sua expansão, foi possível observar um mapa de contorno referente correlação do hidrogênio anomérico H-1' [δ_{H} 4,13 (d, $J = 6,0\text{ Hz}$, 1H)] do β -ácido glucurônico a três ligações com o C-3 (δ_{C} 90,0), confirmando a inserção do β -ácido glucurônico na posição 3 da sapogenina. No espectro bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY (DMSO- d_6 , 500/500 MHz) apresentou um mapa de contorno referente a correlação do hidrogênio anomérico do β -ácido glucurônico H-1' [δ_{H} 4,13 (d, $J = 6,0\text{ Hz}$, 1H)] com o seu hidrogênio vicinal o H-2' (δ_{H} 3,33, m). O HMBC revelou dois mapas de contorno atribuído a uma correlação deste hidrogênio H-2' (δ_{H} 3,33, m) a duas ligações com o C-1' (δ_{C} 103,9) e a três ligações com C-1'' (δ_{C} 100,7), desta forma confirmando que a β -arabinose se encontra ligada ao β -ácido glucurônico e está inserção ocorre no C-2'' do ácido glucurônico. No COSY, ainda foi possível observar um outro mapa de contorno atribuído a correlação dos hidrogênios vicinais H-1'' [δ_{H} 4,68 (d, $J = 7,0\text{ Hz}$, 1H)] e H-2'' (δ_{H} 3,16, m), ambos da β -arabinose. Semelhante ao descrito anteriormente, foi possível no HMBC ver dois mapas de contornos atribuídos a correlação do H-2'' (δ_{H} 3,16, m) a duas ligações com o C-1'' (δ_{C} 100,7) e a três ligações com C-1''' (δ_{C} 100,3) confirmando que a α -ramnose se encontra ligada ao C-2'' da β -arabinose. O COSY, revelou ainda um outro mapa de contorno atribuído a correlação entre os hidrogênios H-1''' [δ_{H} 4,97 (sl, 1H)] e H-2''' [δ_{H} 3,62 (m)], no espectro $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HSQC (DMSO- d_6 , 400/100 MHz) foi constatado uma correlação direta entre este hidrogênio H-2''' e o carbono δ_{C} 70,7 (C-2''').

No HMBC, ainda pode ser observado um mapa de contorno referente a correlação entre o H-1''' [δ_{H} 4,97 (sl, 1H)] a três ligações com C-2'' (δ_{C} 77,6) confirmando mais uma vez a inserção da α -ramnose no C-2'' da β -arabinose, uma correlação a duas ligações com o C-2''' (δ_{C} 70,7) e uma outra correlação a três ligações com o C-5''' (δ_{C} 68,1). Ainda no HMBC, pode ser observada uma correlação do hidrogênio δ_{H} 1,06 (s, 3H) a duas ligações com C-5''' (δ_{C} 68,1) e a três ligações com C-4''' (δ_{C} 72,6) confirmando que a metila se encontra na posição C-6'''.

Foi possível observar ainda no HMBC um mapa de contorno referente a correlação entre o H-24a [δ_{H} 3,80 (d, $J = 11\text{ Hz}$)] a três ligações com o C-3 (δ_{C} 90,0) e a três ligações com a Me-23 (δ_{C} 22,3), confirmando que o carbono 3 é de fato oxigenado e que o C-24 é o carbono oximetilênico. Ainda foi observado um no HMBC uma outra correlação do hidrogênio da Me-23 δ_{H} 1,08 (s, 3H) a duas

ligações com o C-4 (δ_c 43,3) e a três ligações com: o C-24 (δ_c 61,6), C-5 (δ_c 55,5) e C-3 (δ_c 90,0). Um outro mapa de contorno importante para definição da posição do outro carbono carbinólico presente na sapogenina foi observado entre a Me-28 δ_H 0,74 (s, 3H) e C-22 (δ_c 72,4) indicando que o C-22 sustenta a hidroxila, informação corroborada por outro mapa de contorno entre H-16a [δ_H 1,33 (m)] e C-22 (δ_c 72,4) referente a uma correlação a três ligações desse hidrogênio com o C-22, desta forma confirmando C-22 como um carbono oximentínico.

O pico **25** possui um [M-H]⁻ íon m/z 911,5006 (m/z 911,5010, calcd.) compatível com a fórmula molecular C₄₇H₇₅O₁₇. O experimento de MS² mostrou íons fragmentos m/z 765 [M-H-Rha]⁻, m/z 615 [M-H-Rha-Ara]⁻ e m/z 457 [M-H-Rha-Ara-Glu]⁻ referente à perda consecutiva de 146 Da, 150 Da e 158 Da, respectivamente. O que corrobora com os dados de RMN discutidos nessa seção. Diante destes dados e em comparação com os dados já descritos na literatura pode-se concluir que **25** é a Soyasaponina II [30-32].

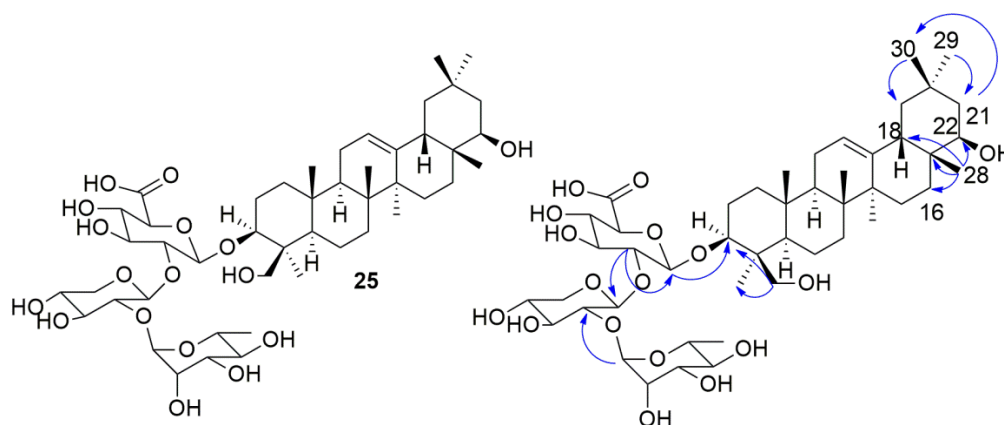


Figura 81. Soyasaponin II (**25**) isolada de *Z. brasiliensis*. () indica algumas correlações chaves de HMBC para o composto **25**.

2.2 Caracterização dos compostos por CLAE-IES-EM/EM

A identificação de saponinas triterpenênicas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas *in tandem* usando ionização por electrospray (CLAE-IES-EM/EM) com dissociação induzida por colisão (CID) sob IES-EM negativo é uma técnica bem estabelecida e amplamente empregada [24]. Para obter esses dados foi utilizado um espectrômetro de massa de baixa resolução e a massa exata foi obtida por um espectrômetro de alta resolução, ambos usando os mesmos parâmetros de ionização, e ambos acoplados a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência nas mesmas condições cromatográficas. As 35 saponinas tentativamente identificadas presentes nas partes aéreas de *Z. brasiliensis* são mostradas no cromatograma de pico de base (Figura 80).

De acordo com Pollier et al., Após dissociação induzida por colisão (CID) sob IES-EM negativo, as saponinas sofrem clivagens glicosídicas, mantendo a carga na extremidade redutora (por exemplo, fragmento contendo aglicona). No espectro EM/EM, os íons filhos fornecem informações sobre os resíduos de açúcar e a aglicona da saponina fragmentada. Os resíduos de açúcar são principalmente hexoses (por exemplo, glicose e galactose), 6-desoxi-hexoses (por exemplo, ramnose e fucose), pentoses (por exemplo, arabinose e xilose) e ácidos urônicos (por exemplo, ácido glucurônico e galacturônico).

Os resíduos de açúcar e a aglicona podem ser identificados a partir dos espectros de MS / MS. As perdas típicas representam água (-18 Da), e/ou resíduos de hexosídeos (-162), e/ou resíduo ramnosídeos (-146 Da); e/ou arabinose (-150 Da) e/ou resíduos de ácido glucurônico (-158 Da). Portanto, o íon filho da aglicona [Aglicona - H]⁻ é baseado nesse tipo ou padrão de análise. Com base nessa análise, 35 saponinas de *Zornia brasiliensis* puderam ser tentativamente identificadas por espectrometria de massas. Os dados de EM/EM das saponinas tentativamente identificadas são relatados na Tabela 6.

Tabela 6. Caracterização das saponinas tentativamente identificadas por HPLC-ESI-MS/MS em *Z. brasiliensis*.

Composto	T _R (min)	[M – H] ⁻	[M – H] ⁻ Calculado	Fórmula Molecular	Error (ppm)	Fragmentos (m/z)	Tentativa Identificação	Referência
1	10,5	925,4800	925,4802	C ₄₇ H ₇₃ O ₁₈	0,2	907, 863, 779, 717, 629, 567, 471, 453, 439, 407	Wistariasaponina A	[33]
2	11,1	779,4239	779,4223	C ₄₁ H ₆₃ O ₁₄	2,0	735, 629, 585, 567, 471, 439, 407	Pen-HexA-Wistariasapogenol A	-
3	11,2	797,4310	797,4329	C ₄₁ H ₆₅ O ₁₅	2,4	753, 647, 621, 603, 585, 489, 457, 307	Pen-HexA-Kudzusapogenol A	-
4		943,4912	943,4908	C ₄₇ H ₇₅ O ₁₉	-0,4	925, 881, 797, 735, 647, 585, 489, 457	Subprosideo II	[34]
5	12,5	957,5056	957,5065	C ₄₈ H ₇₇ O ₁₉	0,9	939, 895, 811, 749, 631, 569, 483, 473	Soyasaponina A ₃	[28,35]
6		927,4943	927,4959	C ₄₇ H ₇₅ O ₁₈	1,8	909, 865, 781, 719, 631, 569, 473, 453	dHex-Pen-HexA-Soyasapogenol A	-
7	13,0	781,4350	781,4380	C ₄₁ H ₆₅ O ₁₄	3,9	763, 631, 613, 569, 473, 307	Pen-HexA-Soyasapogenol A	-
8		811,4459	811,4485	C ₄₂ H ₆₇ O ₁₅	3,2	793, 631, 587, 473, 337	Hex-HexA-Soyasapogenol A	[36]
9	13,2	985,4961	985,5014	C ₄₉ H ₇₇ O ₂₀	5,3	967, 839, 821, 777, 689, 627, 531, 489, 457, 453	dHex-Pen-HexA-Aglycona III	-
10	13,7	839,4404	839,4435	C ₄₃ H ₆₇ O ₁₆	3,6	821, 689, 671, 627, 531, 489, 457, 307	Pen-HexA-Aglycona III	-
11	14,2	997,5022	997,5014	C ₅₀ H ₇₇ O ₂₀	-0,8	979, 935, 851, 789, 671, 609, 513, 483, 471	dHex-Hex-HexA-Aglycona II	-
12	15,1	851,4412	851,4435	C ₄₄ H ₆₇ O ₁₆	2,7	807, 671, 513, 471	Hex-HexA-Aglycona II	-
13	15,6	967,4901	967,4908	C ₄₉ H ₇₅ O ₁₉	0,7	949, 905, 821, 671, 653, 609, 513, 471, 453	dHex-Pen-HexA-Aglycona II	-
14	16,9	649,3933	649,3957	C ₃₆ H ₅₇ O ₁₀	3,8	631, 473	HexA-Soyasapogenol A	-

15	17,7	821,4303	821,4329	C ₄₃ H ₆₅ O ₁₅	3,2	689, 671, 653, 609, 513, 471, 307	Pen-HexA-Aglycona II	-
16	18,3	999,5135	999,5170	C ₅₀ H ₇₉ O ₂₀	3,6	981, 937, 853, 791, 673, 611, 515, 483, 473	dHex-Hex-HexA-Aglycona I	-
17	19,5	969,5074	969,5065	C ₄₉ H ₇₇ O ₁₉	-1,0	951, 907, 823, 761, 673, 611, 515, 473, 453	dHex-Pen-HexA-Aglycona I	-
18	19,9	853,4559	853,4591	C ₄₄ H ₆₉ O ₁₇	3,8	835, 673, 655, 611, 515, 473, 337	Hex-HexA-Aglycona I	-
19	20,2	823,4463	823,4485	C ₄₃ H ₆₇ O ₁₅	2,7	805, 673, 629, 611, 515, 473, 307	Pen-HexA-Aglycona I	-
20	23,9	837,4603	837,4642	C ₄₄ H ₆₉ O ₁₅	2,0	657,639, 595, 499, 497, 457, 455, 453	Hex-HexA-22-O-acetata- Soyasapogenol B	-
21	24,8	939,4935	939,4959	C ₄₈ H ₇₅ O ₁₈	2,6	921, 877, 793, 731, 613, 551, 483, 455	Soyasaponina Be	[22,24,25,27,29,37,38]
22	26,2	691,4042	691,4063	C ₃₈ H ₅₉ O ₁₁	3,1	673, 515, 473	HexA-Aglycona I	-
23	31,0	941,5123	941,5115	C ₄₈ H ₇₇ O ₁₈	-0,8	923, 879, 795, 733, 615, 553,	Soyasaponina I	[22,24,27,28,29,37,38]
24	32,6	795,4520	795,4536	C ₄₂ H ₆₇ O ₁₄	2,1	777, 733, 615, 553, 457, 337	Soyasaponina III	[27,28,29,38]
25	33,0	911,5006	911,5010	C ₄₇ H ₇₅ O ₁₇	0,5	893, 849, 765, 703, 615, 553,	Soyasaponina II ^a	[27,28,29,38]
26	34,0	765,4418	765,4431	C ₄₁ H ₆₅ O ₁₃	1,6	747, 615, 597, 553, 457, 307	Soyasaponina IV	[27,28,29,38]
27	36,9	925,5168	925,5166	C ₄₈ H ₇₇ O ₁₇	-0,2	907, 863, 779, 717, 599, 537, 483, 441, 439	dHex-Hex-HexA-Olean-12-ene-3β,24-diol	-
28	39,3	779,4562	779,4587	C ₄₂ H ₆₇ O ₁₃	3,2	599, 441, 439, 307	Hex-HexA-Olean-12-ene-3β,24-diol	-
29	41,3	633,3998	633,4008	C ₃₆ H ₅₇ O ₉	1,5	615, 457	Soyasapogenol B monoglucuronideo	[28,39]
30	44,1	895,5043	895,5061	C ₄₇ H ₇₅ O ₁₆	1,9	877, 833, 749, 687, 599, 537, 453, 441, 439, 337	dHex-Pen-HexA-Olean-12-ene-3β,24-diol	-
31	47,8	793,4348	793,4380	C ₄₂ H ₆₅ O ₁₄	4,0	775, 731, 613, 551, 455, 337	Soyasaponina Be'	[24,40]

32	48,0	909,4843	909,4853	C ₄₇ H ₇₃ O ₁₇	1,1	891, 847, 763, 701, 613, 551, 455, 453	Soyasaponina Bg	[25,40]
33	48,7	763,4286	763,4274	C ₄₁ H ₆₃ O ₁₃	-1,5	719, 613, 569, 455, 307	Soyasaponina Bg'	[40]
34	51,1	749,4485	749,4482	C ₄₁ H ₆₅ O ₁₂	-0,5	599, 537, 441, 439, 307	Pen-HexA-Olean-12-ene-3 β ,24-diol	-
35	58,8	631,3856	631,3852	C ₃₆ H ₅₅ O ₉	-0,7	613, 455	HexA-Soyasapogenol E	-

192 **Legenda:** HexA: ácido urônico (ácido glucurônico ou ácido galacturônico) Hex: hexose (glicose ou galactose); Pen: Pentose (arabinose ou xilose); dHex: 6-desoxi-hexose (ramnose
193 ou fucose).

194

195

2.2.1 Agliconas das saponinas de *Z. brasiliensis*

Nos espectros de fragmentação de EM/EM das 35 saponinas foi possível observar íons m/z 441 - 531 Da, característicos de agliconas triterpênicas. Através das relações dos íons desprotonados das saponinas, m/z 631,3856 - 999,5135 Da, e dos respectivos íons fragmentos, no intervalo m/z 441-531 Da, foram tentativamente identificadas 10 agliconas (Figura 82). Embora essas agliconas tenham sido detectadas apenas como íons filhas com valores nominais de m/z , suas fórmulas moleculares podem ser previstas pela fórmula molecular da massa exata do íon pai e pelas perdas observadas dos resíduos de açúcar [24].

Sete dessas agliconas são do tipo oleanano, a olean-12-eno-3 β ,24-diol, a soyasapogenol A, B e E, a kudzusapogenol A, a wistariasapogenol A e 22-O-acetato-Soyasapogenol B todas já relatadas na família Leguminosea (Figura 82) [28, 40-43].

As três sapogeninas restantes não possuem relatos na literatura. A aglicona I possui um íon fragmento em m/z 515 [Agli - H]⁻ e a fórmula molecular C₃₂H₅₂O₅, portanto, propomos que a aglicona seja um produto de acetilação da soyasapogenol A (m/z 473), pois é possível observar a perda de 42 Da (grupo acetoxi) após subtração de resíduos glicosídicos, sugerindo que o grupo acetoxi está presente na sapogenina.

A Aglicona II possui íon fragmento m/z 513 [Agli-H]⁻ e fórmula molecular C₃₂H₅₀O₅, foi observada a perda de 42 Da (acetoxi) semelhante ao observado na 21-acetoxi-soyasapogenol A (m/z 515), contudo, a Aglicona II possui duas unidades de massa a menos, sugerindo que o C-22 foi oxidado gerando uma cetona [44]. O íon resultante desta perda de 42 Da, m/z 471, apresentou fragmentação distinta da wistariasapogenol A, diferença esta, evidenciada na ausência do íon m/z 439 relativo a perda de 32 Da (CH₄O) (Figura 87). A Aglicona III possui uma m/z 531 [Agli-H]⁻ e uma fórmula molecular C₃₂H₅₂O₆, foi tentativamente identificada como um derivado acetilado da kudzusapogenol A, evidenciado pela a perda de 42 Da e o íon m/z 489 (Figura 86).

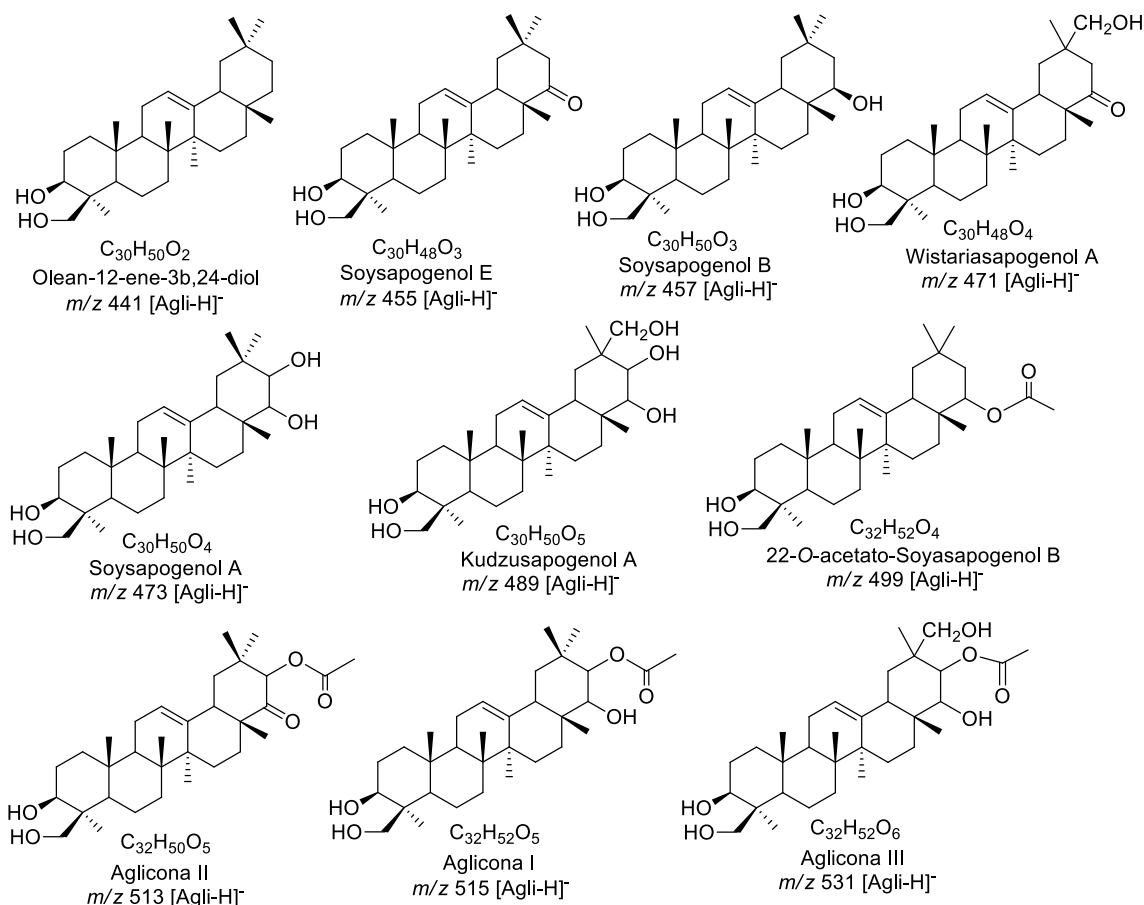


Figura 82. Agliconas tentativamente identificadas por espectrometria de massas de *Z. brasiliensis*.

Este estudo propôs a caracterização putativa de saponinas monodesmosídicas com a inserção de glicosídeos ou de suas cadeias na posição C-3, como observado na saponina isolada e identificada por RMN e apoiada na literatura que descreve saponinas presentes na família Leguminosae [28 40-45]. A possibilidade da presença de saponinas bidesmosídicas foi removida devido à presença dos fragmentos m/z 483 [M-H]⁻ referentes à união de um dHex + Hex + HexA, m/z 453 [M-H]⁻ dHex + Pen + HexA, m/z 337 [M-H]⁻ Hex + HexA e m/z 307 [M-H]⁻ Pen + HexA, demonstrando, assim, que a cadeia de açúcar está presa na posição única da sapogenina, excluindo a possibilidade de saponinas bidesmosídicas.

2.2.2 Saponinas de *Z. brasiliensis*

2.2.2.1 Derivados da Wistariasapogenol A

Os picos **1** e **2** apresentaram uma m/z 925,4814 e 779,4186, respectivamente, desta forma são isóbaros dos compostos **27** e **28**. Contudo, apresentaram um padrão de fragmentação distinto que possibilitou propor a diferença entre estes compostos nas suas agliconas. Na tentativa de identificação dos compostos **1** e **2**, a wistariasapogenol A, m/z 471 [Agli-H]⁻, foi proposta como aglicona com base na sua fragmentação, uma vez que o íon fragmento m/z 439 [Agli-H-CH₄O]⁻ é compatível com a perda de 32 Da referente a saída do metanol, sugerindo assim, a oxigenação na metila C-30 e não em C-21, e uma cetona na posição C-22 semelhante a soyasapogenol E e um outro íon fragmento m/z 407 [Agli-H-CH₄O-CH₄O]⁻ que é atribuído perca do metanol na posição C-23. O composto **1** foi putativamente identificado como Wistariasaponina A, que já foi isolado em uma espécie da família Leguminosae[33], e o **2** tentativamente identificado como Pen-HexA-Wistariasapogenol A. Os íons produtos e a via de fragmentação proposta são mostrados na Figura 83

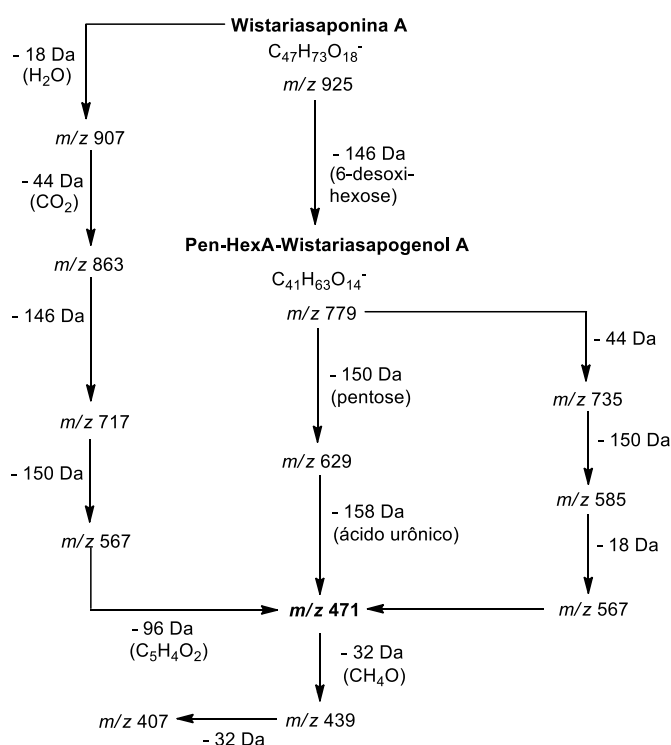


Figura 83. Via de fragmentação dos compostos **1** (m/z 925,4800) e **2** (m/z 779,4239) que possuem a Wistariasapogenol A (m/z 471) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.

2.2.2.2 Derivados da Kudzusapogenol A

Os picos 3 e 4 apresentaram o íon fragmento m/z 489 [Agli-H]⁻ referente a aglicona, que foi tentativamente identificada como a kudzusapogenol A, um triterpeno oleanânico penta-oxygenado, com oxigenações em C-21 e C-22 e a oxigenação em C-29 é sustentada pela perda de 32 Da (metanol) observado no íon fragmento m/z 457 [Agli-H-CH₃O]⁻. O composto 3 foi putativamente identificado como Pen-HexA-Kudzusapogenol A e o composto 4 como Subprosidade II, uma saponina isolada em *Saphora subprostrata* (Leguminosae) [34]. O esquema com a via de fragmentação destes compostos é mostrado na Figura 84.

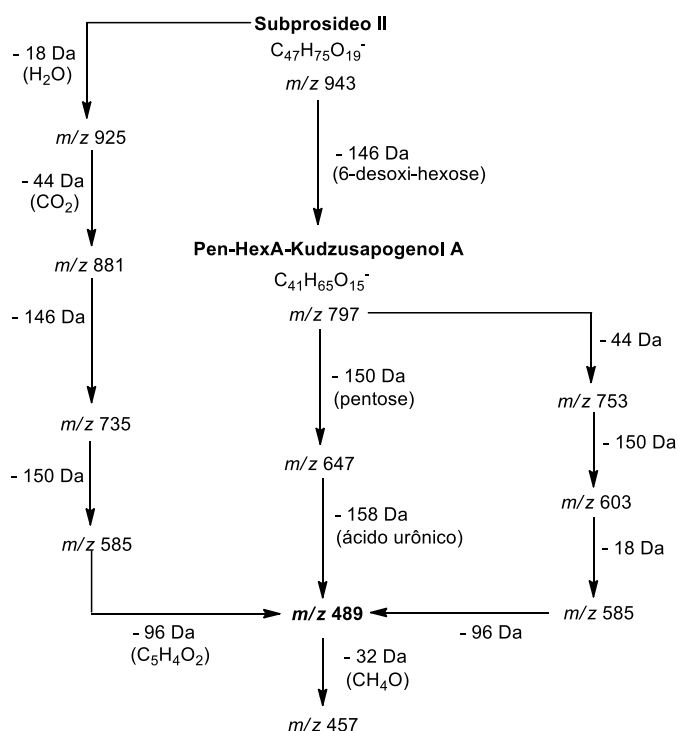


Figura 84. Via de fragmentação dos compostos 3 (m/z 797,4310) e 4 (m/z 943,4912) que possuem a Kudzusapogenol A (m/z 485) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.

2.2.2.3 Derivados da Soyasapogenol A

As soyasaponinas do grupo A são bidesmosídicas, com inserção das cadeias glicosídicas em C-3 e C-22, e podem ser divididas em acetiladas e não acetiladas [27]. Possuem como aglicona a soyasapogenol A, que difere estruturalmente da soyasapogenol B pela presença de um grupo hidroxilo em C-21 [46].

Cinco saponinas com soyasapogenol A (m/z 473) foram tentativamente identificadas. O composto 5 foi identificado como soyasaponina A₃ [34], descrito por Curl e colaboradores como um monodesmosídico da soyasapogenol A. O composto 8 identificado como Hex-HexA-Soyasapogenol A, já foi descrito porém, não nominado [36] e os compostos 6, 7 e 14 foram putativamente identificados como dHex-Pen-HexA-Soyasapogenol A, Pen-HexA-Soyasapogenol A e HexA-Soyasapogenol A, respectivamente. Todos os íons fragmentos desses compostos derivados da soyasapogenol A são mostrados na via de fragmentação na Figura 85.

2.2.2.4 Derivados da Aglicona III

Os picos 9 e 10 apresentaram o íon fragmento m/z 531 [Agli-H]⁻ atribuído a sua aglicona, aqui proposto como uma nova sapogenina, a Aglicona III. Ainda foi possível observar os íons fragmentos m/z 489 e 457 atribuídos à perda neutra de um resíduo acetoxi (42 Da) e um metanol (32 Da) da aglicona. Os picos 9 e 10 foram tentativamente identificados como dHex-Pen-HexA-Aglicona II e Pen-

HexA-Aglicona II, respectivamente. O esquema com a via de fragmentação contendo os íons produtos é proposto na Figura 86.

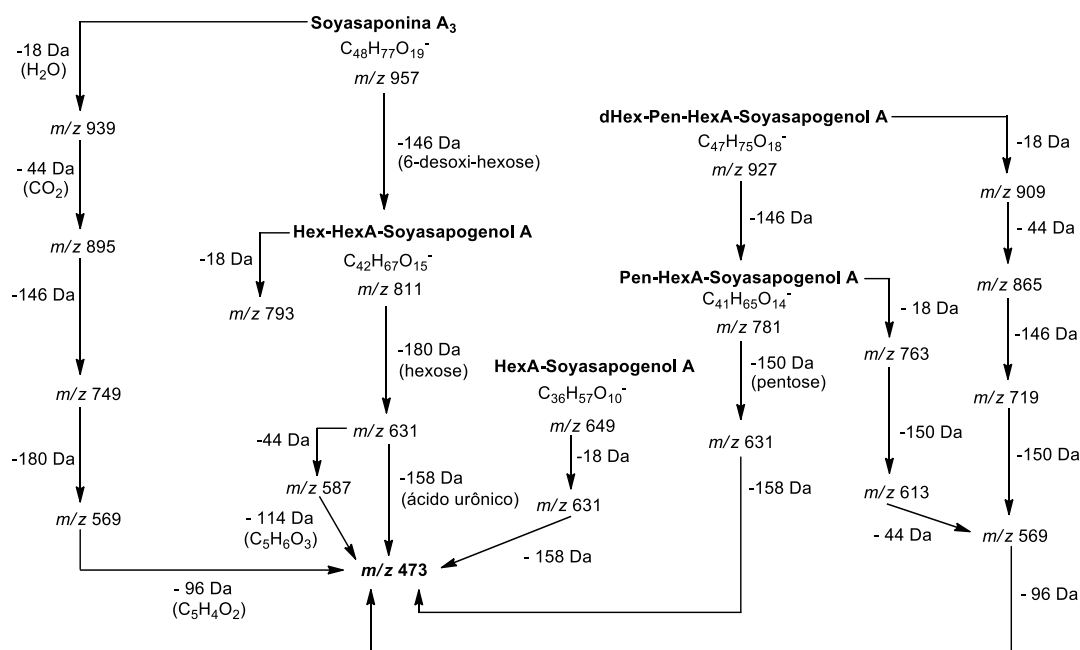


Figura 85. Via de fragmentação dos compostos 5 (m/z 957,5056), 8 (m/z 811,4459), 6 (m/z 927,4943), 7 (m/z 781,4350) e 14 (m/z 649,3933), que possuem a Soyasapogenol A (m/z 473) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.

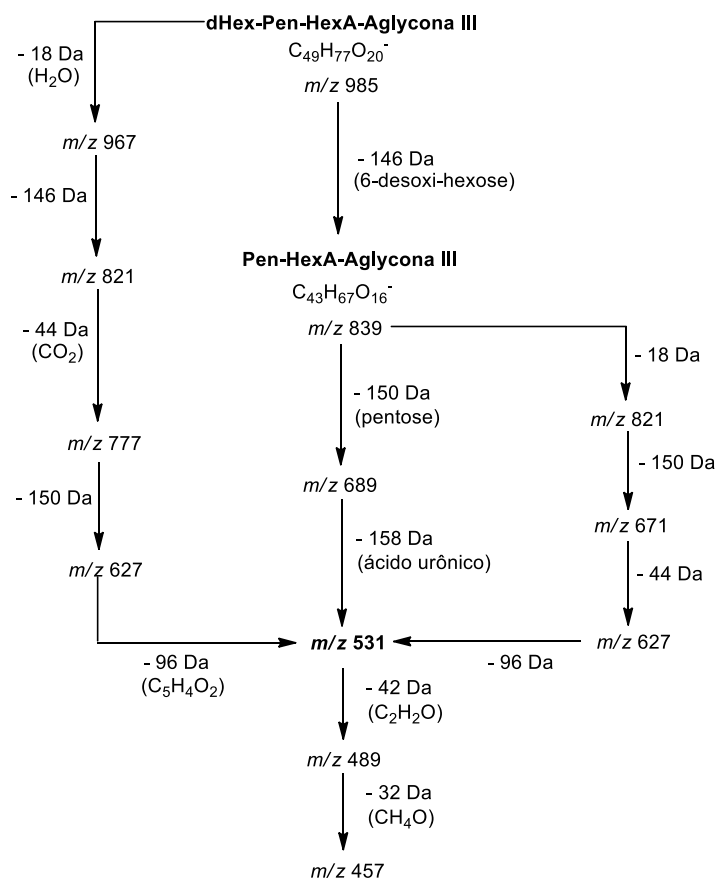


Figura 86. Via de fragmentação dos compostos 9 (m/z 985,4961) e 10 (m/z 839,4404) que possuem a Aglicona II (m/z 531) em ESI-MS/MS modo negativo.

2.2.2.5 Derivados da Aglicona II

Quatro saponinas foram tentativamente identificadas tendo a Aglicona II (m/z 513). Estas saponinas foram observadas nos picos **11**, **12**, **13** e **15**, que foram propostas como dHex-Hex-HexA-Aglicona I, Hex-HexA-Aglicona I, dHex-Pen-HexA-Aglicona I e Pen-HexA-Aglicona I, respectivamente. A via de fragmentação contendo os íons produtos das saponinas propostas derivadas da Aglicona II é mostrada na Figura 87.

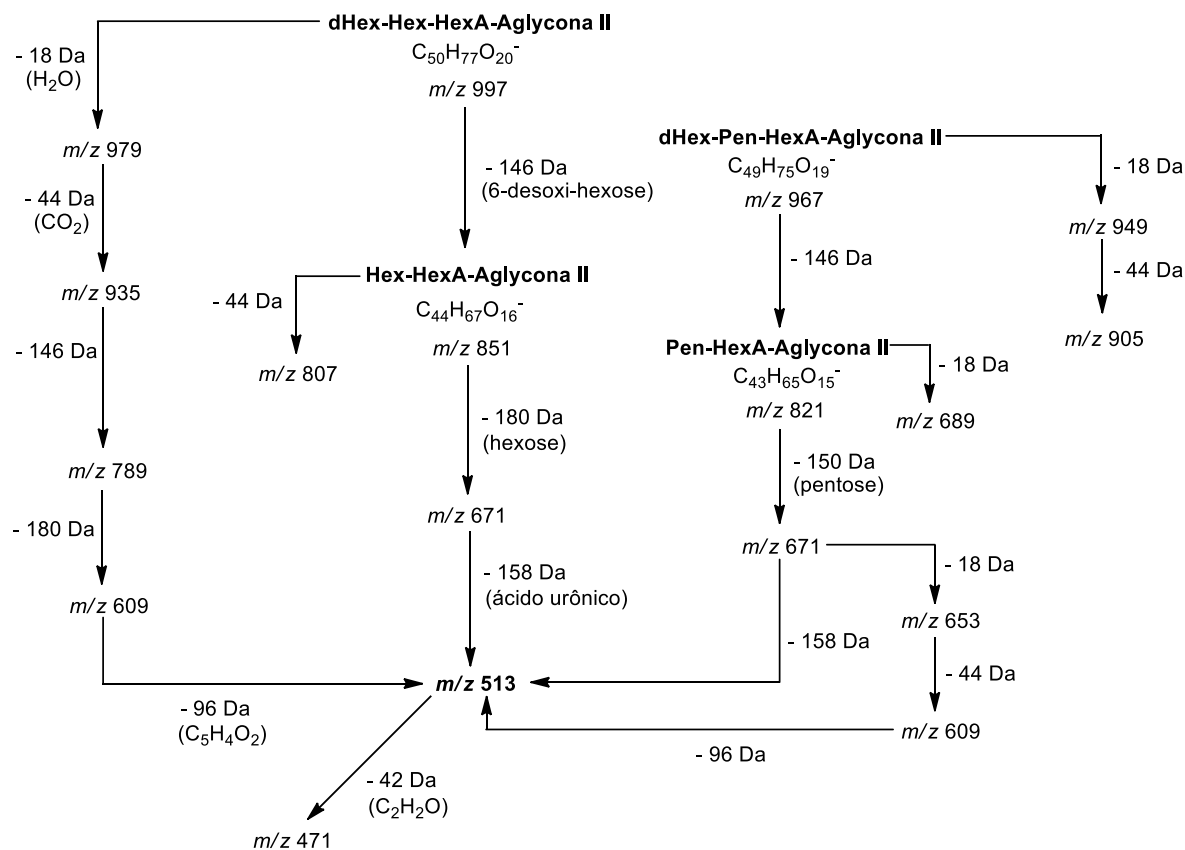


Figura 87. Via de fragmentação dos compostos **11** (m/z 997,5022), **12** (m/z 851,4412), **13** (m/z 967,4901) e **15** (m/z 821,4303), que possuem a Aglicona II (m/z 513) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.

2.2.2.6 Derivados da 22-O-acetato-Soyasapogenol B

O pico **20** foi tentativamente identificado como Hex-HexA-22-O-acetato-Soyasapogenol B, uma saponina desconhecida. Apresentou o íon fragmento m/z 499 [Agli-H] $^-$ atribuído a 22-O-acetato-Soyasapogenol B, além do íon fragmento m/z 457 da perda neutra do resíduo acetoxi (42 Da), na aglicona. A via de fragmentação com os íons produtos é proposta na Figura 88.

2.2.2.7 Derivados da Aglicona I

O íon fragmento m/z 515 [Agli-H] $^-$ foi atribuído a Aglicona I, cinco compostos, **16**, **17**, **18**, **19** e **22**, foram observados contendo o íon fragmento m/z 473 [Agli-H- C_2H_2O] $^-$ compatível com a perda neutra de 42 Da , relativo ao grupo acetoxi presente na aglicona m/z 515 [Agli-H] $^-$. Estes compostos foram tentativamente identificados como dHex-Hex-HexA-Aglicona I, dHex-Pen-HexA-Aglicona I, Hex-HexA-Aglicona I, Pen-HexA-Aglicona I e HexA-Aglicona I, respectivamente. Os íons produtos dos compostos derivados da 21-acetoxi-soyasapogenol A estão demonstrados na Figura 89.

Hex-HexA-22-O-acetato-Soyasapogenol B

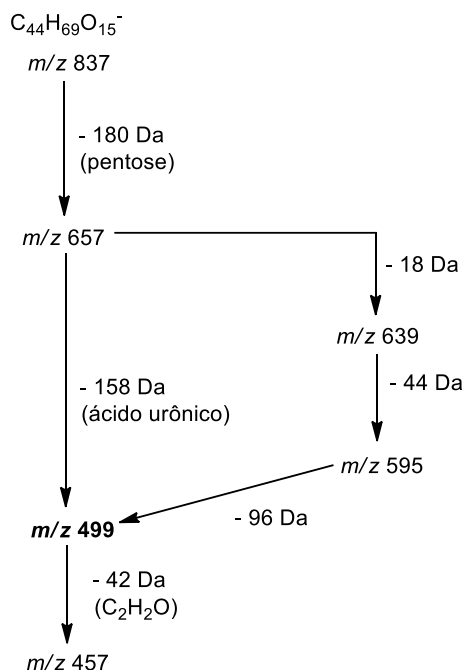


Figura 88. Via de fragmentação do composto 20 (m/z 837,4603) que possui 22-O-acetato-Soyasapogenol B (m/z 499) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.

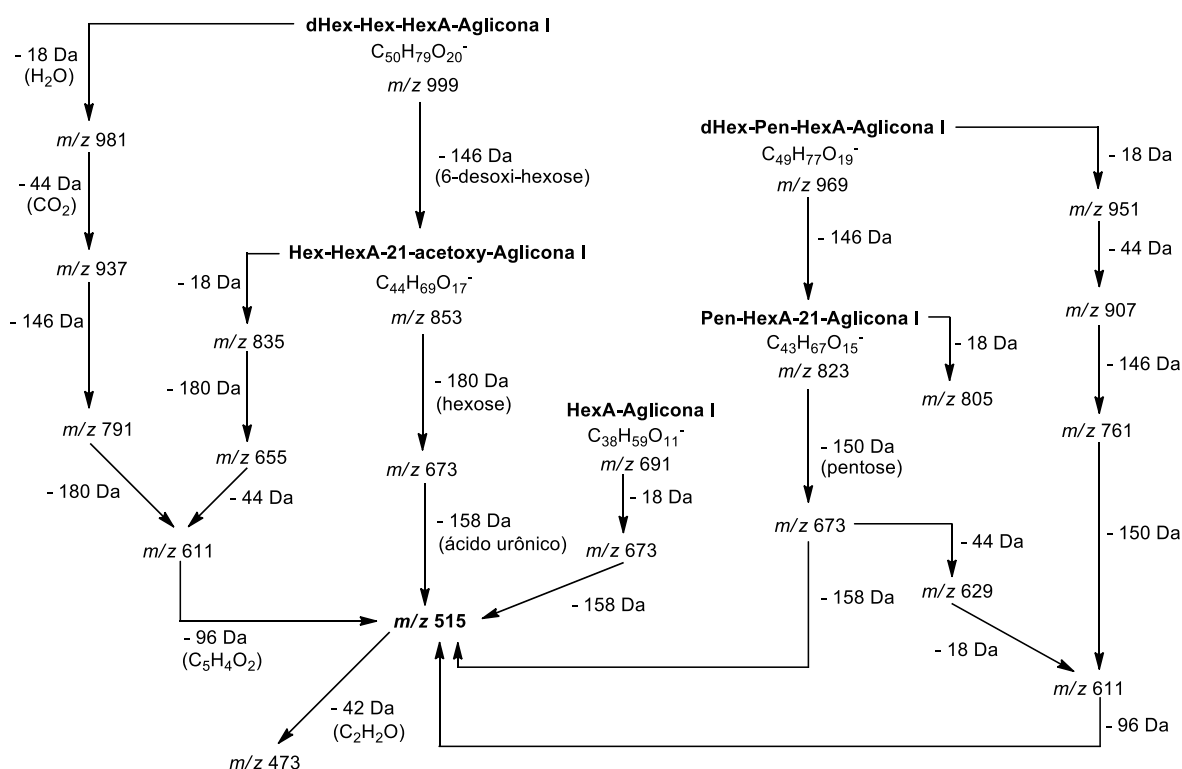


Figura 89. Via de fragmentação dos compostos 16 (m/z 999,5135), 18 (m/z 853,4559), 17 (m/z 969,5074), 19 (m/z 823,4463) e 22 (m/z 691,4042), que possuem a Aglicona I (m/z 515) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.

2.2.2.8 Derivados da Soyasapogenol E

As soyasaponinas do grupo E são as mais restritas entre as soyasaponinas A, B e E, pois são consideradas produtos de foto-oxidação de soyasaponinas do grupo B. A cadeia glicosídica na posição C-3 é a mesma para os grupos A, B e E [38].

Os picos **21**, **31**, **32**, **33** e **35** apresentaram o mesmo padrão de fragmentação proposto anteriormente para os derivados da Olean-12-eno-3 β ,24-diol, contudo o íon fragmento atribuído a aglicona, m/z 455 [Agli-H]⁻, foi proposto como sendo a soysapogenol E. O composto **21** foi tentativamente identificado como Soysaponina Be [38], bem como o **31**, **32** e **33** como Soysaponina Be', Soysaponina Bg e Soysaponina Bg', respectivamente [46]. O composto **35** foi tentativamente identificado como HexA-Soyasapogenol E. A via de fragmentação dos derivados da Soyasapogenol E é proposta na Figura 90.

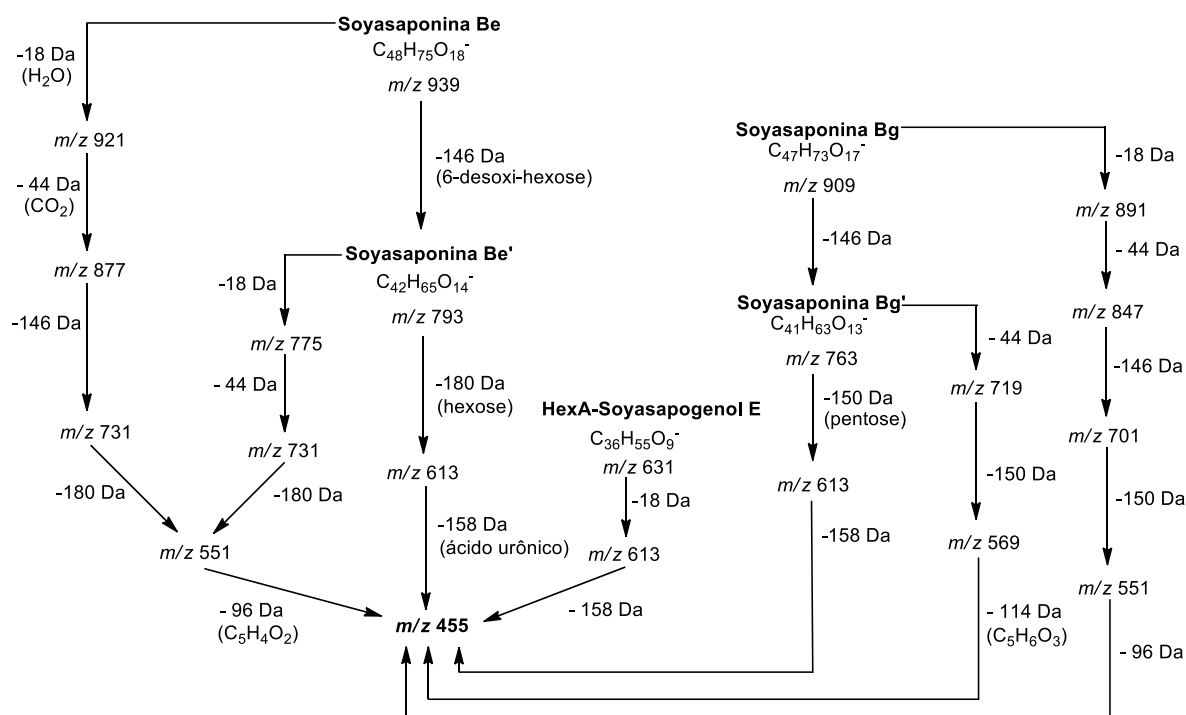


Figura 90. Via de fragmentação dos compostos **21** (m/z 939,4935), **31** (m/z 793,4348), **32** (m/z 909,4843), **33** (m/z 763,4286) e **35** (m/z 631,3856), que possuem a Soyasapogenol E (m/z 455) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.

2.2.2.9 Derivados da Soyasapogenol B

As soyasaponinas do grupo B possuem apenas uma cadeia glicosídica na posição C-3. São comumente divididas em dois grupos, as que possuem uma conjugação no C-22 com 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4-pyrone (DDMP), sendo este grupo mais abundante na soja, e outro grupo denominado de não conjugado ao DDMP [22].

Nesse trabalho foi possível observar os picos **23**, **24**, **25**, **26** e **29** possuindo o íon fragmento m/z 457 [Agli-H]⁻ atribuído a soysapogenol B. O composto **25** foi identificado por RMN como Soysaponina II [30-32]. Os compostos **23**, **24**, **26** e **29** puderam ser tentativamente identificados como soysaponina I, soysaponina III (ou soysaponina Bb'), soysaponina IV (ou soysaponina Bc') e soysapogenol B monoglucuronídeo, respectivamente [28,31,32,46]. A via de fragmentação dos compostos derivados da Soyasapogenol B com seus íons fragmentos é demonstrada na Figura 91.

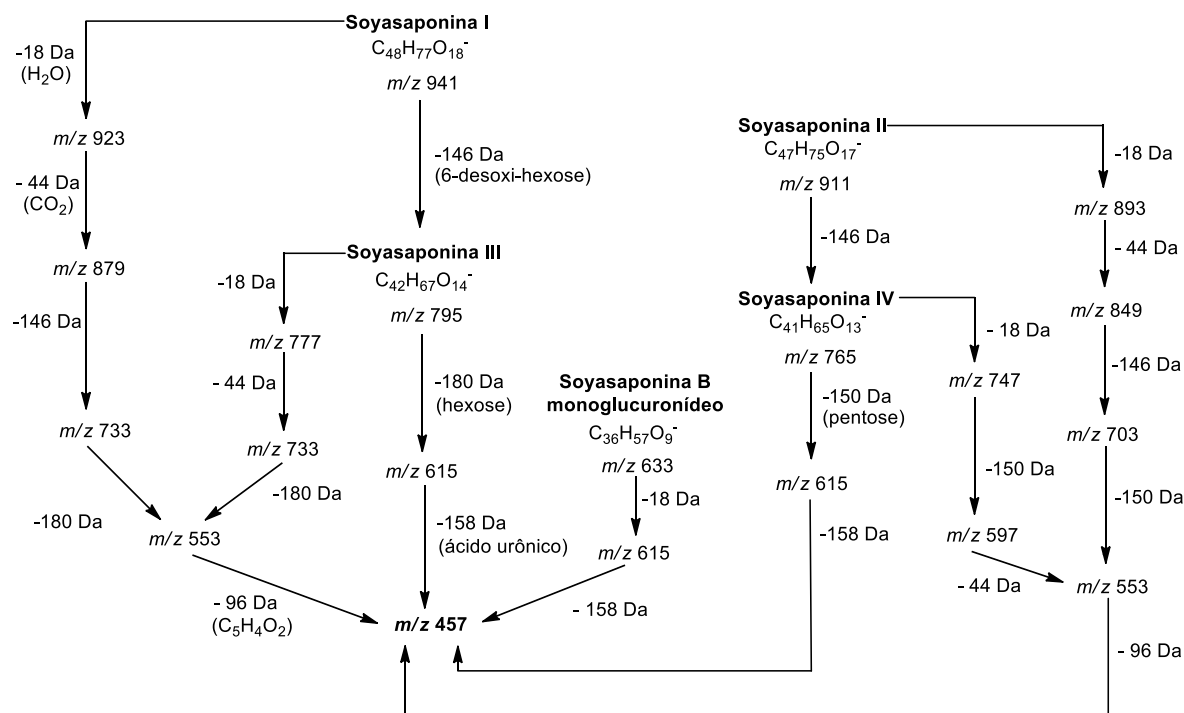


Figura 91. Via de fragmentação dos compostos **23** (m/z 941,5123), **24** (m/z 795,4520), **25** (m/z 911,5006), **26** (m/z 765,4418) e **29** (m/z 633,3998), que possuem a Soysapogenol B (m/z 457) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.

2.2.2.9 Derivados do Olean-12-eno-3 β ,24-diol

O pico **27** apresentou um íon precursor em m/z 925,5168 [M-H] $^-$ e sua fragmentação, os seguintes íons m/z 907 [M-H-H $_2$ O] $^-$, m/z 863 [M-H-H $_2$ O-CO $_2$] $^-$, m/z 779 [M-H-dHex] $^-$, m/z 717 [M-H-H $_2$ O-CO $_2$ -dHex] $^-$, m/z 599 [M-H-dHex-Hex] $^-$, m/z 537 [M-H-H $_2$ O-CO $_2$ -dHex Hex] $^-$, m/z 483 [M-H-Agli] $^-$, m/z 441 [M-H-dHex-Hex-HexA] $^-$ e m/z 439 [M-H-dHex-Hex-HexA] $^-$. Desta forma, foi observado o resíduo do ácido urônico gerando perda de 158 e/ou 160 Da (Figura 93). Os picos **28**, **30** e **34** foram tentativamente identificados como sendo Hex-HexA-Olean-12-eno-3 β ,24-diol, dHex-Pen-HexA-Olean-12-eno-3 β ,24-diol e Pen-HexA-Olean-12-eno-3 β ,24-diol, respectivamente. A via de fragmentação dos derivados dessas saponinas é proposta na Figura 92.

Considerando que o isolamento, purificação e elucidação de saponinas triterpênicas são difíceis e demoradas devido à alta polaridade e similaridade estrutural [23], o presente trabalho possibilitou, pela primeira vez, a obtenção e a análise química de uma fração rica em saponinas de *Z. brasiliensis*. Nesse estudo, 35 saponinas triterpênicas foram tentativamente identificadas por CLAE-ESI-EM/EM, sugerindo uma série homóloga. Além disso, as saponinas têm uma diversificação de aplicações como biológicas e farmacêuticas, por exemplo, propriedades imunoestimulantes, hipocolesterolêmicas e anticarcinogênicas, além de aplicações nas indústrias de alimentos, agricultura e cosméticos. Esse fato levou à extração e identificação de saponinas em inúmeras espécies [47] devido à sua relevância. Este é o primeiro relato da ocorrência de saponinas no gênero *Zornia*, colocando a espécie *Z. brasiliensis* na lista das espécies bioprodutoras dessa importante classe de metabólitos secundários que são as saponinas.

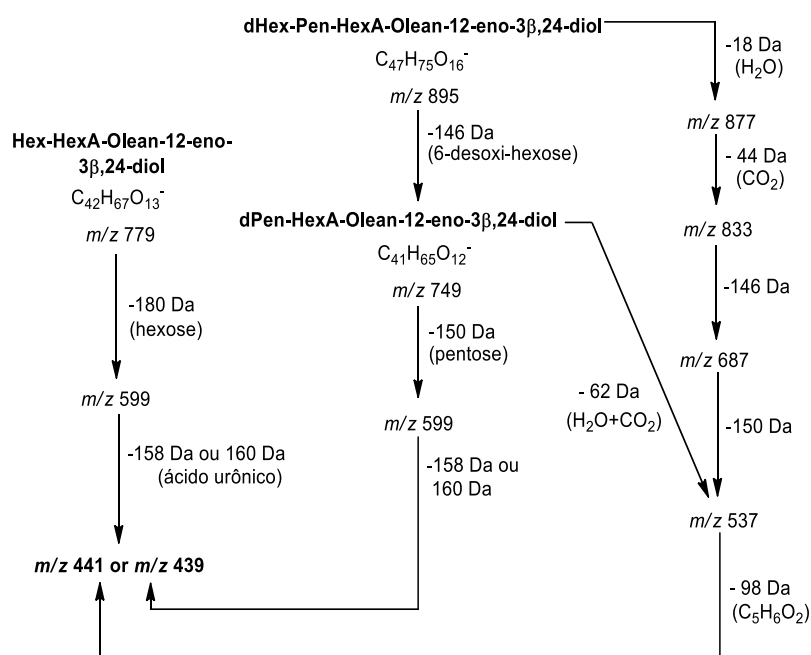


Figura 92. Via de fragmentação dos compostos 28 (m/z 779,4562), 30 (m/z 895,5043) e 34 (m/z 749,4485) que possuem a Olean-12-eno-3 β ,24-diol (m/z 441 ou 439) como aglicona, em ESI-MS/MS modo negativo.

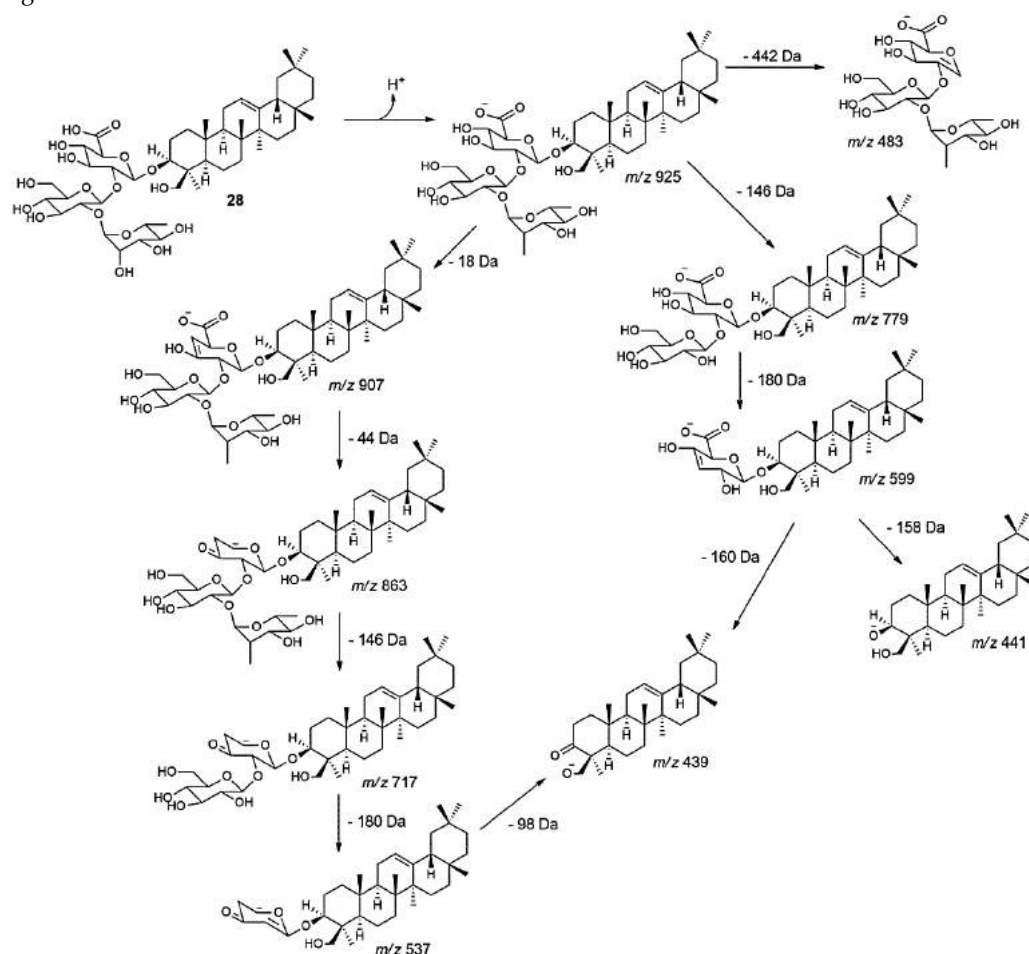


Figura 93. Via de fragmentação proposta para o composto 27 em ESI-MS/MS modo negativo. Via que se estende de maneira semelhante aos compostos 28, 30 e 34, gerando os íons fragmentos m/z 441 e m/z 439 atribuídos a aglicona Olean-12-eno-3 β ,24-diol.

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e Materiais

As análises de RMN foram realizadas em espectrômetro VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz, operando a 500 MHz para RMN ^1H e 125 MHz para RMN ^{13}C e BRUKER ASCEND 400, operando a 400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para RMN ^{13}C , e as amostras foram preparadas em dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) (Cambridge Isotope Laboratories) contendo TMS como padrão interno. Para obtenção do extrato bruto e fracionamento cromatográfico foram utilizados: etanol, hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e n-butanol (TEDIA). Para as análises em CLAE foram utilizados como fase móvel: metanol com grau CLAE (TEDIA), água ultrapura obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore) e ácido fórmico (QHEMIS). Para obtenção dos espectros de massas por injeção direta foi utilizado para o ESIMS (baixa resolução) um espectrômetro Ion Trap-amaZonX (Bruker) e para o HRESIMS (alta resolução) um micrOTOF II (Bruker) operando com voltagem do capilar 3,5 kV, ESI no modo negativo, offset da placa final 500 V, nebulizador 8,0 psi, gás seco (N_2) com fluxo de 5,0 L/h e temperatura de 200 °C. Os espectros (m/z 50-1000) foram registrados a cada 2,0 s. A fragmentação de CID foi conseguida no modo auto MS/MS utilizando o modo de resolução avançada para o modo EM e EM/EM.

3.2 Material botânico

As partes aéreas de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) foram coletadas no município de Serra Branca (07° 29'46 "S e 36° 44'36" W, altitude: atingindo 712 m de altitude), estado da Paraíba (PB), Brasil, em março de 2016. Collection authorization: N. 53894-1, granted by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) through the Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO). Com cadastro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número: ADD107E. A espécie foi devidamente identificada pelo botânico Dr. José Iranildo Miranda de Melo, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Uma exsiccata foi depositada no Herbário Arruda Câmara (ACAM), Campus I da Universidade Estadual da Paraíba, sob o código 1862.

3.3 Extração e isolamento de constituintes de *Z. brasiliensis*

As partes áreas secas e pulverizadas de *Z. brasiliensis* (5 kg) foram submetidas a extração para obtenção extrato etanólico bruto (CEE) e das frações hexânica, diclorometano, acetato de etila, acetato de etila-metanol (90:10, v/v) e acetato de etila-metanol (50:50, v/v) [21].

Uma alíquota de 20 g da fração acetato de etila-metanol 50% foi dissolvida em 300 mL de água destilada. Em seguida foi particionada com *n*-butanol (300 mL) por três vezes. A solução extrativa da fase *n*-butanólica foi então concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a uma temperatura de 50° C. Após obtenção do material concentrado, foi redissolvido em metanol-acetato de etila (1:5, v/v) e as saponinas precipitadas por adição de metanol. Este material foi decantando por 72 horas a temperatura ambiente. O precipitado foi então ressuspense em metanol (200 mL) e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40° C. Desta forma foi obtida uma fração rica em saponinas (1,1 g) [48].

3.4 Condições do CLAE-DAD

CLAE analítico (Prominence-Shimadzu) equipado com uma bomba: LC-20AT, um auto-injetor: SIL-20A HT, um forno: CTO – 20A, detector: SPD-20A e uma unidade controlador: CBM-20A. A coluna utilizada foi Phenomenex Gemini® C18 (250.0 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5.0 μm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4.0 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5.0 μm). Método desenvolvido utilizou água (0,1% ácido fórmico) (A) e metanol (B). O gradiente utilizado foi: 70.0% de B (0,01 min) até 80.0% de B (50,0 min), retornando para 70.0% de B (65,0 min) e permanecendo com 70.0% de B até 80,0 min, com fluxo da fase móvel: 0,6 mL/min, com volume de

injeção de 20,0 µL e detecção de 205 nm. As amostras foram filtradas em membranas de nylon de 0,45 µm (TEDIA).

As análises cromatográficas preparativas foram realizadas utilizando um sistema de CLAE (Shimadzu) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-6AD, injetor Rheodyne, detector SPD-M10A diode array e SCL-10A. A coluna utilizada foi ACE C18 (250,0 mm x 21,2 mm e 5,0 µm de tamanho de partícula). O método utilizado foi semelhante ao descrito anteriormente para as corridas analíticas. De tal modo que o volume de injeção na escala preparativa foi de 100,0 µL, fluxo: 8,0 ml/min e detecção 205 nm. As amostras foram filtradas em membranas de nylon de 0,45 µm (TEDIA).

3.5 Condições do CLAE-IES-EM/EM

Foi utilizado um CLAE da Shimadzu (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AT, autoinjeter SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU-20A, detector SPD-M20A diode array e CBM-20A. A coluna utilizada foi Phenomenex Gemini® C18 (250,0 mm x 4,6 mm d.i. preenchido com partículas 5,0 µm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4,0 mm x 3,0 mm d.i. preenchido com partículas 5,0 µm). O método cromatográfico utilizado foi o mesmo desenvolvido para análise CLAE analítica, descrito anteriormente. As amostras foram filtradas em membranas de nylon de 0,45 µm (TEDIA). Este CLAE foi acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução da marca Bruker, modelo Ion Trap-amaZonX utilizando a técnica de Ionização por Eletrospray. Os parâmetros de análise do Ion-Trap foram: capilar 4,5 kV, IES no modo íon negativo, offset da placa final 500 V, nebulizador 35,0 psi, gás seco (N₂) com fluxo de 8,0 L/h e temperatura de 300 °C. A fragmentação de CID foi conseguida no modo auto MS/MS utilizando o modo de resolução avançada para o modo MS e MS/MS. Os espectros (*m/z* 200-1200) foram registados a cada 2,0 s.

Para as análises de HPLC-IES-MS de alta resolução, utilizou-se um CLAE idêntico ao descrito anteriormente, com a mesma coluna e as mesmas condições cromatográficas, acoplado espectrômetro de massas de alta resolução da marca Bruker, modelo micrOTOF II utilizando a técnica de Ionização por Eletrospray. Os parâmetros de análise do micrOTOF II foram: capilar 4,0 kV, IES no modo íon negativo, offset da placa final 500 V, nebulizador 35,0 psi, gás seco (N₂) com fluxo de 8,0 L/h e temperatura de 300 °C. Os espectros (*m/z* 50-1000) foram registados a cada 2,0 s.

Material Suplementar: Dados suplementares (Figuras S63 – 98) associados a este artigo, incluindo dados espectrais EM de alta resolução, EM/EM, RMN 1D e 2D podem ser encontrados na versão online.

Contribuições dos Autores: Y.M.N., L.S.A., R.L.L., and V.C.O.C. desenvolvimento dos experimentos; J.I.M.M., coleta e identificação do material botânico; R.B.-F., M.S.S., and J.F.T. interpretação dos dados; Y.M.N., M.S.S., and J.F.T. escrita do manuscrito.

Financiamento: Esse estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001.

Agradecimentos: Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pelo suporte a execução desse trabalho;

Conflito de interesse: Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

Referências

1. Legume Phylogeny Working Group. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* **2017**, 66, 44–77.
2. Perez, A.P.F.; Lewis, G.P.; Queiroz, R.T.; Silva, J.S.; De Azevedo Tozzi, A.M.G.; Rodrigues, K.F. Fruit as diagnostic characteristic to recognize Brazilian species of *Zornia* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytotaxa* **2015**, 219, 27–42.
3. Fortuna-Perez, A.P. O gênero *Zornia* J.F. Gmel. (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae): Revisão taxonômica das espécies ocorrentes no Brasil e filogenia. Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Campinas—Campinas-SP, Campinas, Brazil, 2009.

4. Belcavello, L.; Cunha, M.R.H.; Andrade, M.A.; Batitucci, M.C.P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. *Nat. Line* **2012**, *10*, 140–145.
5. Rojas, A.; Bah, M.; Rojas, J.I.; Serrano, V.; Pacheco, S. Spasmolytic activity of some plants used by the otomi indians of Queretaro (Mexico) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine* **1999**, *6*, 367–371.
6. Greetha, K.M.; Shilpa, S.; Murugan, V. Anticonvulsant Activity of the Methanolic Extract of Whole Plant of *Zornia diphylla* (Linn) Pers. *J. Pharm. Res.* **2012**, *5*, 3670–3672.
7. Arunkumar, R.; Nair, S.A.; Subramoniam, A. Induction of cell-specific apoptosis and protection of mice from cancer challenge by a steroid positive compound from *Zornia diphylla* (L.) Pers. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2012**, *3*, 233–241.
8. Obi, C.L.; Ramalivhana, J.; Samie, A.; Igumbor, E.O. Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in-vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolated from stool samples of patients in the Venda region of South Africa. *J. Health Popul. Nutr.* **2007**, *25*, 428–235.
9. Laxane, S.N.; Swarnkar, S.K.; Setty, M.M. Antioxidant studies on the ethanolic extract of *Zornia gibbosa*. *Pharmacol. Online* **2008**, *1*, 319–330.
10. Laxane, S.N.; Swarnkar, S.K.; Zanwar, S.B.; Setty, M.M. Anti-inflammatory studies of the alcoholic extract of *Zornia gibbosa*. *Pharmacol. Online* **2011**, *1*, 67–76.
11. Brahmachari, G.; Ghosh, S.; Mondal, S.; Jash, S.K.; Mandal, L.C.; Mondal, A. Cyclic voltammetric studies with plant extracts of some traditionally used Indian medicinal plants to evaluate their antioxidant potential. *Biochem. Indian J.* **2009**, *3*, 32–35.
12. Arunkumar, R.; Nair, S.A.; Rameshkumar, K.B.; Subramoniam, A. The essential oil constituents of *Zornia diphylla* (L.) Pers., and anti-inflammatory and antimicrobial activities of the oil (Article). *Rec. Nat. Prod.* **2014**, *8*, 385–393.
13. Leuner, O.; Havlik, J.; Prokudina, E.; Novy, P.; Kokoska, L. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 575–579.
14. Ren, F.Z.; Gao, Y.Q.; Cheng, X.X.; Li, L.H.; Chen, S.H.; Zhang, Y.L. Study on Chemical Constituents of *Zornia diphylla*. *Chin. Pharm. J.* **2012**, *47*, 179–181.
15. Agra, M.F.; Freitas, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 114–140.
16. BFG – The Brazil Flora Group. Growing knowledge: An overview of Seed Plantdiversity in Brazil. *Rodriguésia* **2015**, *6*, 1085–1113.
17. Mohlenbrock, R.H. A monograph of the leguminous genus *Zornia*. *Webbia* **1961**, *16*, 1–141.
18. Missouri Botanical Garden, 2017. Available online: <http://www.tropicos.org/Name/13035232> (accessed on 22 October 2018)
19. Da Silva, A.D.S.; Cavalcante-Silva, L.H.A.; Da Matta, C.B.B.; Silva, D.D.F.; Araújo, M.V.D.; Tavares, J.F.; Alexandre-Moreira, M.S. Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *27*, 1695–1699.
20. Costa, E.V.; Menezes, L.R.; Rocha, S.L.; Baliza, I.R.; Dias, R.B.; Rocha, C.A.; Soares, M.B.; Bezerra, D.P. Antitumor properties of the leaf essential oil of *Zornia brasiliensis*. *Planta Med.* **2015**, *81*, 563–567.
21. Nascimento, Y.M.; Abreu, L.S.; Lima, R.L.; Silva, A.D.S.; Costa, V.C.O.; Melo, J.I.M. Zornioside, a dihydrochalcone C-glycoside, and other compounds from *Zornia brasiliensis*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2017**, *28*, 192–197.
22. Huhman, D.V.; Sumner, L.W. Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 347–360.
23. Ling, Y.; Lin, Z.; Zha, W.; Lian, T.; You, S. Rapid Detection and Characterisation of Triterpene Saponins from the Root of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel by HPLC-ESI-QTOFMS/MS. *Phytochem. Anal.* **2016**, *27*, 174–183.
24. Pollier, J.; Morreel, K.; Geelen, D.; Goossens, A. Metabolite Profiling of Triterpene Saponins in *Medicago truncatula* Hairy Roots by Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1462–1476.
25. Negri, G.; Tabach, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2013**, *23*, 851–860.
26. Perret, C.; Wolfender, J.L.; Hostettmann, K. LC/ES-MS Analysis of Triterpene Glycosides: Rapid Estimation of the Saponin Content of Dried Berries of *Phytolacca dodecandra*. *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 272–278.

27. Zhang, W.; Popovich, D.G. Chemical and Biological Characterization of Oleanane Triterpenoids from Soy. *Molecules* **2009**, *14*, 2959–2975.
28. Berhow, M.A.; Kong, S.B.; Vermillion, K.E.; Duval, S.M. Complete Quantification of Group A and Group B Soyasaponins in Soybeans. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2035–2044.
29. Jin, M.; Yang, Y.; Su, B.; Ren, Q. Rapid quantification and characterization of soyasaponins by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1108*, 31–37.
30. Sakamoto, S.; Kuroyanagi, M.; Ueno, A.; Sekuta, S. Triterpenoid saponins from *Sophora subprostrata*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1339–1342.
31. Kudou, S.; Tonomura, M.; Tsukamoto, C.; Uchida, T.; Sakabe, T.; Tamura, N.; Okubo, K. Isolation and Structural Elucidation of DDMP-Conjugated Soyasaponins as Genuine Saponins from Soybean Seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 546–550.
32. Dalluge, J.J.; Eliason, E.; Frazer, S. Simultaneous Identification of Soyasaponins and Isoflavones and Quantification of Soyasaponin B in Soy Products, Using Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3520–3524.
33. Konoshima, T.; Kozuka, M.; Haruna, M.; Ito, K.; Kimura, T.; Tokuda, H. Studies on the constituents of leguminous plants. XII. The structures of new triterpenoid saponins from *Wistaria brachybotrys* Sieb. et Zucc. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2731–2735.
34. Ding, Y.; Takeshita, T.; Yokoyama, K.; Kinjo, J.; Nohara, T. Triterpenoid Glycosides from *Sophorae Subprostratae* Radix. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 139–142.
35. Curl, C.L.; Price, K.R.; Fenwick, G.R. Soyasaponin A3, a New Monodesmosidic Saponin Isolated from the Seeds of *Glycine max* J. *Nat. Prod.* **1988**, *51*, 122–124.
36. Woldemichael, G.M.; Montenegro, G.; Timmermann, B.N. Triterpenoidal lupin saponins from the Chilean legume *Lupinus oreophilus* Phil. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 853–857.
37. Giuliana, B.; Raffaella, P.; Cecilia, F.C.; Maria, A.A.; Cataldi, T.R.; Philippe, S.K.; Alessandro, B.; Daniela, R.; Luigi, M. Determination of soyasaponins in Fagioli di Sarconi beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by LC-ESI-FTICR-MS and evaluation of their hypoglycemic activity. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 1561–1569.
38. Decroos, K.; Vincken, J.P.; Heng, L.; Bakker, R.; Gruppen, H.; Verstraete, W. Simultaneous quantification of differently glycosylated, acetylated, and 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one-conjugated soyasaponins using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1072*, 185–193.
39. Udayama, M.; Ohkawa, M.; Yoshida, N.; Kinjo, J.; Nohara, T. Structures of three new oleanene glucuronides isolated from *Lathyrus palustris* var. *Pilosus* and hepatoprotective activity. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1412–1415.
40. Takada, Y.; Sasama, H.; Sayama, T.; Kikuchi, A.; Kato, S.; Ishimoto, M.; Tsukamoto, C. Genetic and chemical analysis of a key biosynthetic step for soyasapogenol A, an aglycone of group A saponins that influence soymilk flavor. *Theor. Appl. Genet.* **2013**, *126*, 721–731.
41. Konoshima, T.; Kozuka, M.; Haruna, M.; Ito, K.; Kimura, T. The structures of New Triterpenoids from *Wistaria brachybotrys* Sieb. et Zucc. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 1550–1553.
42. Takeshita, T.; Hamada, S.; Nohara, T. New triterpenoid sapogenols from *Abrus cantoniensis* (I). *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 846–848.
43. Arao, T.; Idzu, T.; Kinjo, J.; Nohara, T.; Isobe, R. Oleanene-type triterpene glycosides from *puerariae* radix. III. Three new saponins from *Pueraria thomsonii*. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1970–1972.
44. Kitagawa, I.; Wang, H.K.; Taniyama, T.; Yoshikawa, M. Reinvestigation of the Structures of Soyasapogenols A, B and E, Oleanene-Sapogenols from Soybean. Structures of Soyasaponins I, II, and III. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 153–161.
45. Price, K.R.; Johnson, I.T.; Fenwick, G.R.; Malinow, M.R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1987**, *26*, 27–135.
46. Rupasinghe, H.V.; Jackson, C.J.C.; Poysa, V.; Di Berardo, C.; Bewley, J.D.; Jenkinson, J. Soyasapogenol A and B Distribution in Soybean (*Glycine max* L. Merr.) in Relation to Seed Physiology; Genetic Variability, and Growing Location. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5888–5894.
47. Güçlü-Ustündağ, O.; Mazza, G. Saponins: Properties, applications and processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 231–258.

823 Barbosa, A.P.; Silva, B.P.; Parente, J.P. A new complex triterpenoid saponin from *Samanea saman* with haemolytic
824 activity and adjuvant effect. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 626–631.

825 **Disponibilização de amostras:** Amostras dos compostos não são disponibilizadas pelos autores.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

826

827

Rápida caracterização de saponinas triterpênicas por CLAE-IES-EM/EM de *Zornia brasiliensis*

Yuri Nascimento ¹, Lucas Abreu ¹, Ramon Lima ¹, Vicente Costa ¹, José Melo², Raimundo Braz-Filho ³, Marcelo Silva ¹, Josean Tavares ^{1,*}

¹ Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa, PB-Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 58429-500, Campina Grande, PB-Brasil

³ Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 28013-600 Campos dos Goytacazes, RJ - Brasil

* Correspondência: josean@ltf.ufpb.br; Tel.: +55-83-3216-7427.

Informações Suplementares

	Sumário	Pág.
Figura 94.	Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25.	183
Figura 95.	Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25	184
Figura 96.	Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25..	185
Figura 97.	Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25.	186
Figura 98.	Espectro de RMN de ¹³ C (BB, 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25	187
Figura 99.	Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (BB, 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25.	188
Figura 100.	Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (BB, 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25	189
Figura 101.	Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (BB, 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25.	190
Figura 102.	Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (BB, 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25.	191
Figura 103.	Espectro de RMN de ¹³ C (DEPT 135, 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25.	192
Figura 104.	Expansão do espectro de ¹³ C (DEPT 135, 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25.	193
Figura 105.	Expansão do espectro de ¹³ C (DEPT 135, 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25.	194
Figura 106.	Expansão do espectro de ¹³ C (DEPT 135, 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25.	195
Figura 107.	Espectro de RMN – COSY - ¹ H- ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 25.	196

Figura 108.	Expansão do espectro de RMN – COSY - ^1H - ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25	197
Figura 109.	Expansão do espectro de RMN – COSY - ^1H - ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25.6	198
Figura 110.	Expansão do espectro de RMN – COSY - ^1H - ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25.	199
Figura 111.	Espectro de RMN - HSQC (500 x 100 MHz, DMSO- d_6) de 25.	200
Figura 112.	Expansão do espectro de RMN - HSQC (500 x 100 MHz, DMSO- d_6) de 25.	201
Figura 113.	Expansão do espectro de RMN - HSQC (500 x 100 MHz, DMSO- d_6) de 25.	202
Figura 114.	Espectro de RMN - HMBC (500 x 125 MHz, DMSO- d_6) de 25.	203
Figura 115.	Expansão do espectro de RMN - HMBC (500 x 125 MHz, DMSO- d_6) de 25.	204
Figura 116.	Expansão do espectro de RMN - HMBC (500 x 125 MHz, DMSO- d_6) de 25.	205
Figura 117.	Expansão do espectro de RMN - HMBC (500 x 125 MHz, DMSO- d_6) de 25.	206
Figura 118.	Espectro de IES-EM alta resolução de 25.	207
Figura 119.	Espectro de IES-EM/EM com as fragmentações de 25.	208
Figura 120.	O espectro de IES-EM/EM do composto 1 e 2	209
Figura 121.	O espectro de IES-EM/EM do composto 3 e 4	210
Figura 122.	O espectro de IES-EM/EM do composto 5, 7, 8 e 14	211
Figura 123.	O espectro de IES-EM/EM do composto 9 e 10	212
Figura 124.	O espectro de IES-EM/EM do composto 11, 12, 13 e 15	213
Figura 125.	O espectro de IES-EM/EM do composto 16, 18, 19 e 22	214
Figura 126.	O espectro de IES-EM/EM do composto 20	215
Figura 127.	O espectro de IES-EM/EM do composto 21, 31, 32, 33 e 35	216
Figura 128.	O espectro de IES-EM/EM do composto 24, 26, e 29	217
Figura 129.	O espectro de IES-EM/EM do composto 27, 28, 30 e 34	218

Tabela 7. Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de **25** em DMSO- d_6 (100 e 500 MHz, respectivamente) com o da sapogenina da Soyasaponina II em Piridina- d_5 (100 e 300 MHz) [30] e DMSO- d_6 (100 e 400 MHz) [31].

HSQC			HMBC		[30]		[31]	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
4	43,3	-	-	-	44,1	-	-	-
8	41,8	-	-	-	40,0	-	-	-
10	36,0	-	-	-	36,6	-	-	-
13	144,3	-	-	-	145,3	-	144,1	-
14	43,3	-	-	-	42,5	-	-	-
17	37,0	-	-	-	38,1	-	-	-
20	30,3	-	-	-	31,0	-	-	-
CH								
3	90,0	3,12 (m)	-	-	91,4	-	89,1	-
5	55,5	nd	-	-	56,3	-	-	-
9	46,9	1,47 (m)	C-8/C-10/ C-11	C-1/Me-25/ Me-26	48,0	-	-	-
12	121,7	5,16 (sl)	-	C-9/C-18	122,8	-	121,8	-
18	44,7	nd	-	-	45,4	-	-	-
22	74,2	3,23 (sl)	-	-	75,8	-	74,0	-
CH₂								
1	38,4	1,52 (m); 0,89 (m)	C-10	C-9	38,8	-	-	-
2	25,4	1,65 (d, $J = 9,5$ Hz); 0,92 (m)	-	-	26,5	-	-	-
6	18,1	1,52 (m); 1,30 (m)	C-7	C-10	18,6	-	-	-
7	32,7	1,44 (m); 1,28 (m)	C-8	Me-26	33,4	-	-	-
11	23,3	1,28 (m)	-	-	24,1	-	-	-
15	25,6	1,99 (m); 0,91 (m)	-	-	26,8	-	-	-
16	28,0	1,33 (m); 0,95 (m)	C-17	C-22	28,7	-	-	-
19	46,1	1,67 (m); 0,88 (m)	C-18	Me29/ Me-30	46,9	-	-	-
21	41,2	1,30 (m)	C-20	C-17/C-30	42,4	-	-	-
24	61,6	3,80 (d, $J = 11$ Hz); 3,04 (m)	-	C-3/C-23	64,0	-	62,1	-
CH₃								
23	22,3	1,08 (s)	C-4	C-3/C-5/ C-24	23,0	-	-	-
25	15,3	0,79 (s)	C-10	C-1/C-5	15,9	-	-	-
26	16,7	0,88 (s)	C-8	C-7	17,0	-	-	-
27	25,0	1,04 (s)	-	C-8	25,8	-	-	-
28	20,4	0,74 (s)	C-17	C16/C18/C-22	28,7	-	-	-
29	32,7	0,96 (s)	C-20	C-19/C-21	33,4	-	-	-
30	28,4	0,96 (s)	C-20	C-19/C-21	21,2	-	-	-

Tabela 8. Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de **25** em DMSO- d_6 (100 e 500 MHz, respectivamente) com os açúcares da Soyasaponina II em Piridina- d_5 (100 e 300 MHz) [30] e DMSO- d_6 (100 e 400 MHz) [31].

HSQC			HMBC		[30]		[31]	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1'	103,9	4,13 (d, $J = 6,0$ Hz)	-	C-3	105,8	-	104,0	4,22 (d, $J = 7,3$ Hz)
2'	77,2	3,33 (m)	C-1'	C-1''	78,2	-	76,4	-
3'	77,1	3,30 (m)	-	-	76,7	-	75,0	-
4'	73,8	3,17 (m)	-	-	74,6	-	73,5	-
5'	76,4	3,12 (m)	-	-	77,2	-	75,2	-
6'	172,8	-		-	171,0	-	170,5	-
1''	100,7	4,68 (d, $J = 7,0$ Hz)	-	-	102,2	-	100,2	4,68 (d, $J = 6,3$ Hz)
2''	77,6	3,16 (m)	-	C-1'''	77,9		75,7	-
3''	70,7	3,49 (m)	-	-	76,0	-	70,5	-
4''	69,5	3,23 (m)	-		70,8		68,7	-
5''	65,4	3,60 (dd, $J = 4,5$ e $11,0$ Hz) e 2,92 (t, $J = 11,0$ Hz)	-	-	67,2	-	65,4	-
1'''	100,3	4,97 (sl)	C-2'''	C-2'''/C-5'''	102,8	-	100,3	4,93 (sl)
2'''	70,7	3,65 (sl)	-	-	72,6	-	70,7	
3'''	72,5	3,05 (m)	-	-	73,0	-	72,0	-
4'''	72,6	3,13 (m)	-	-	74,0	-	72,3	-
5'''	68,1	3,51(m)	-	-	69,6	-	68,2	-
6'''	17,9	1,06 (d)	C-5'''	C-4'''	19,0	-)	17,9	-

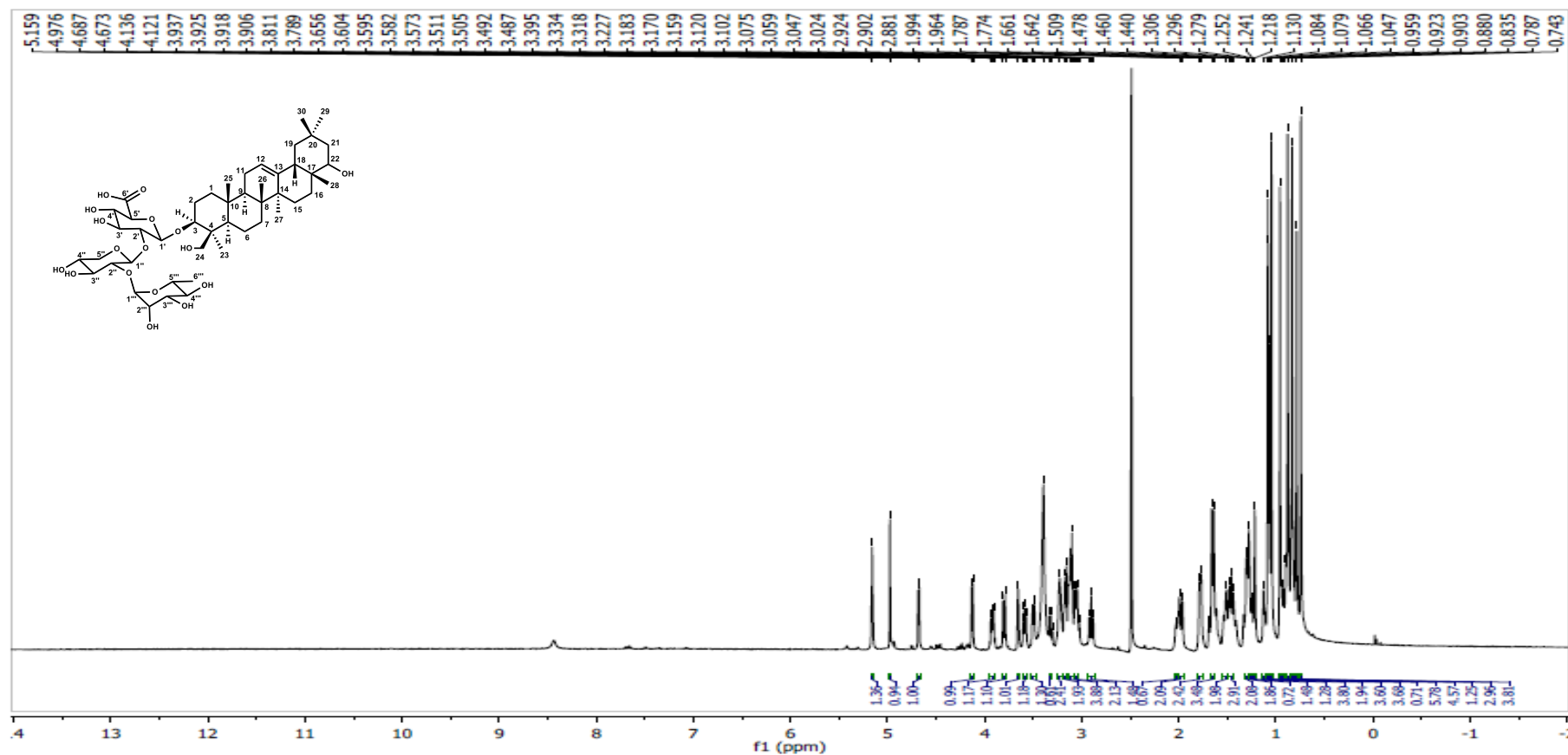


Figura 94. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

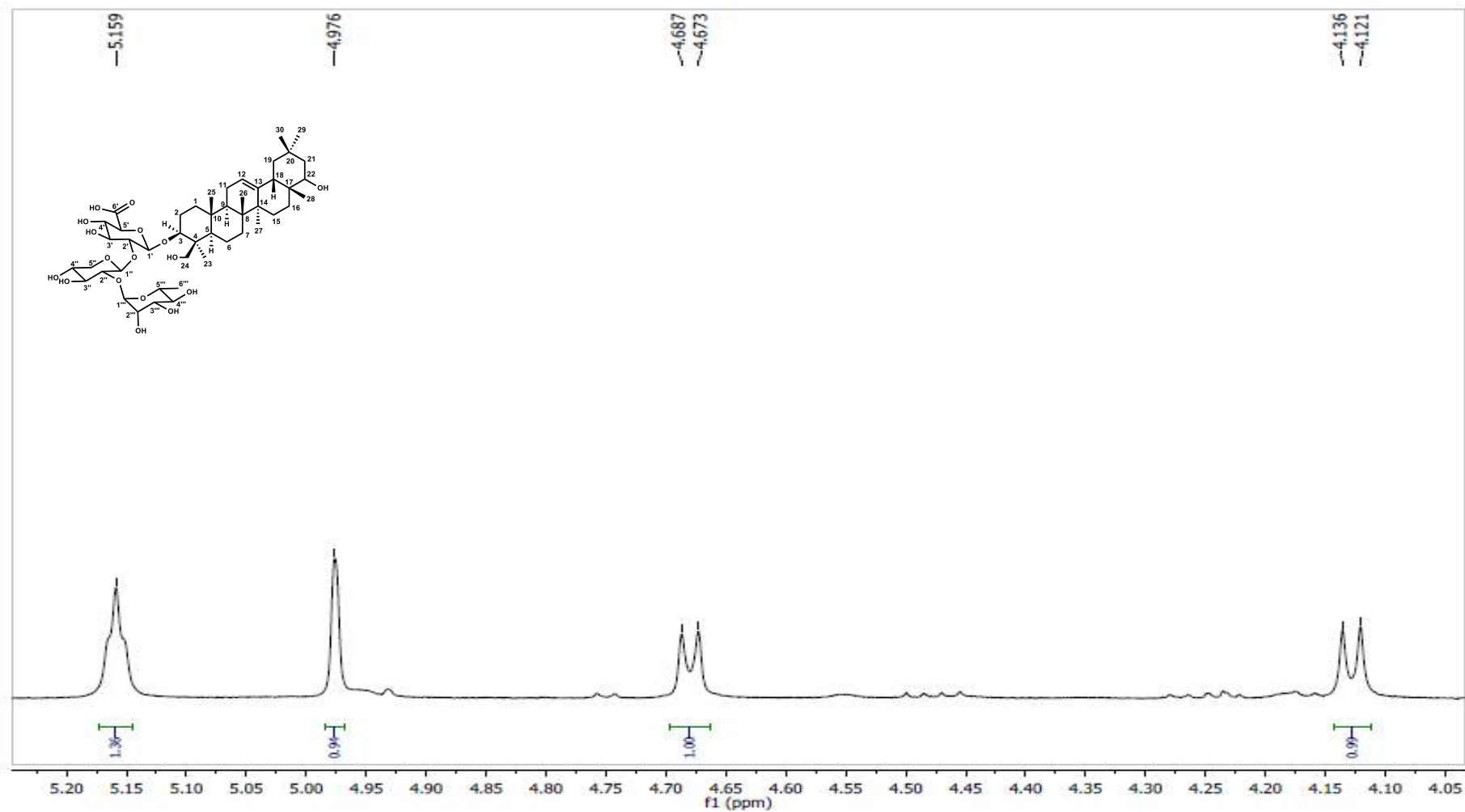


Figura 95. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

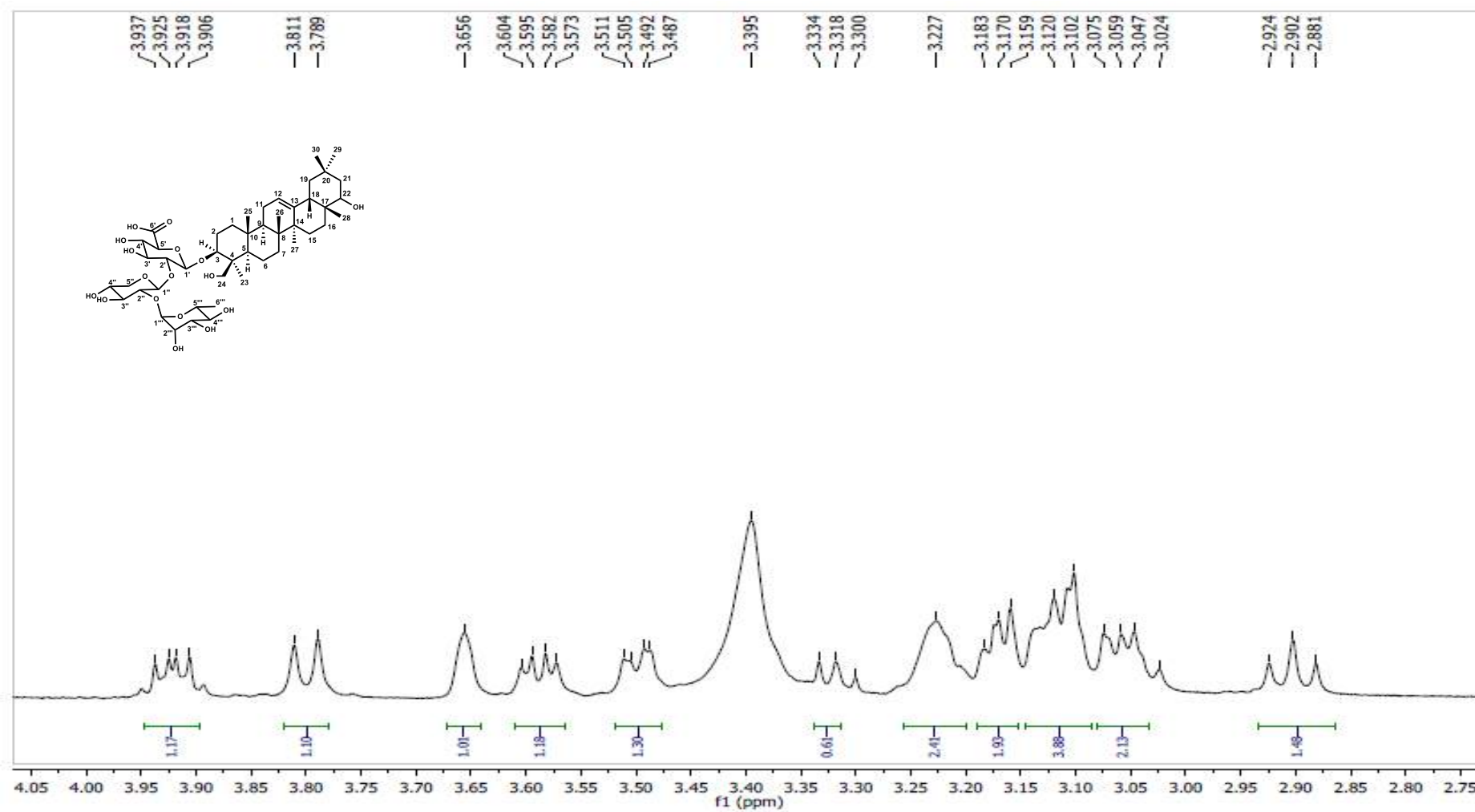


Figura 96. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

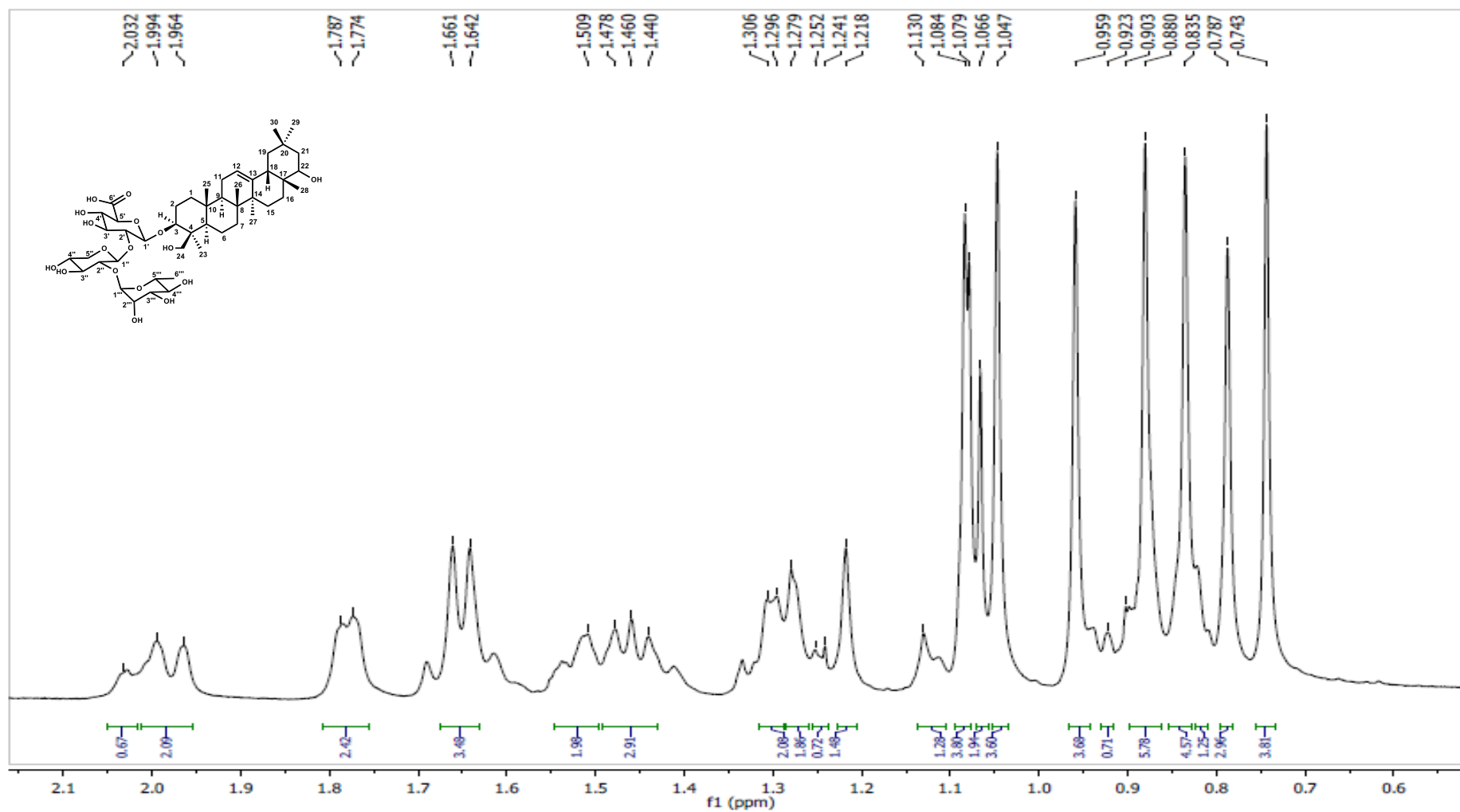


Figura 97. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

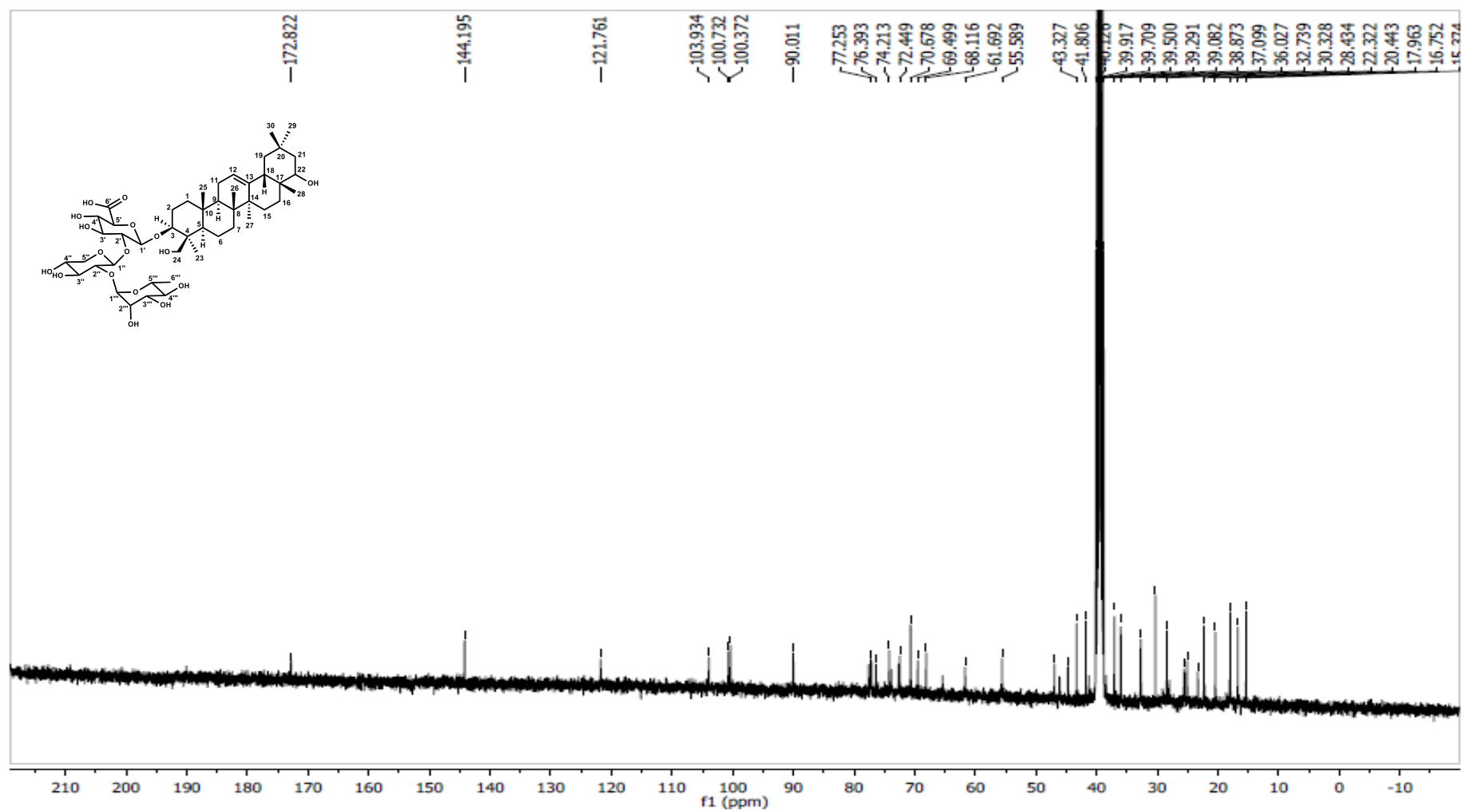


Figura 98. Espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

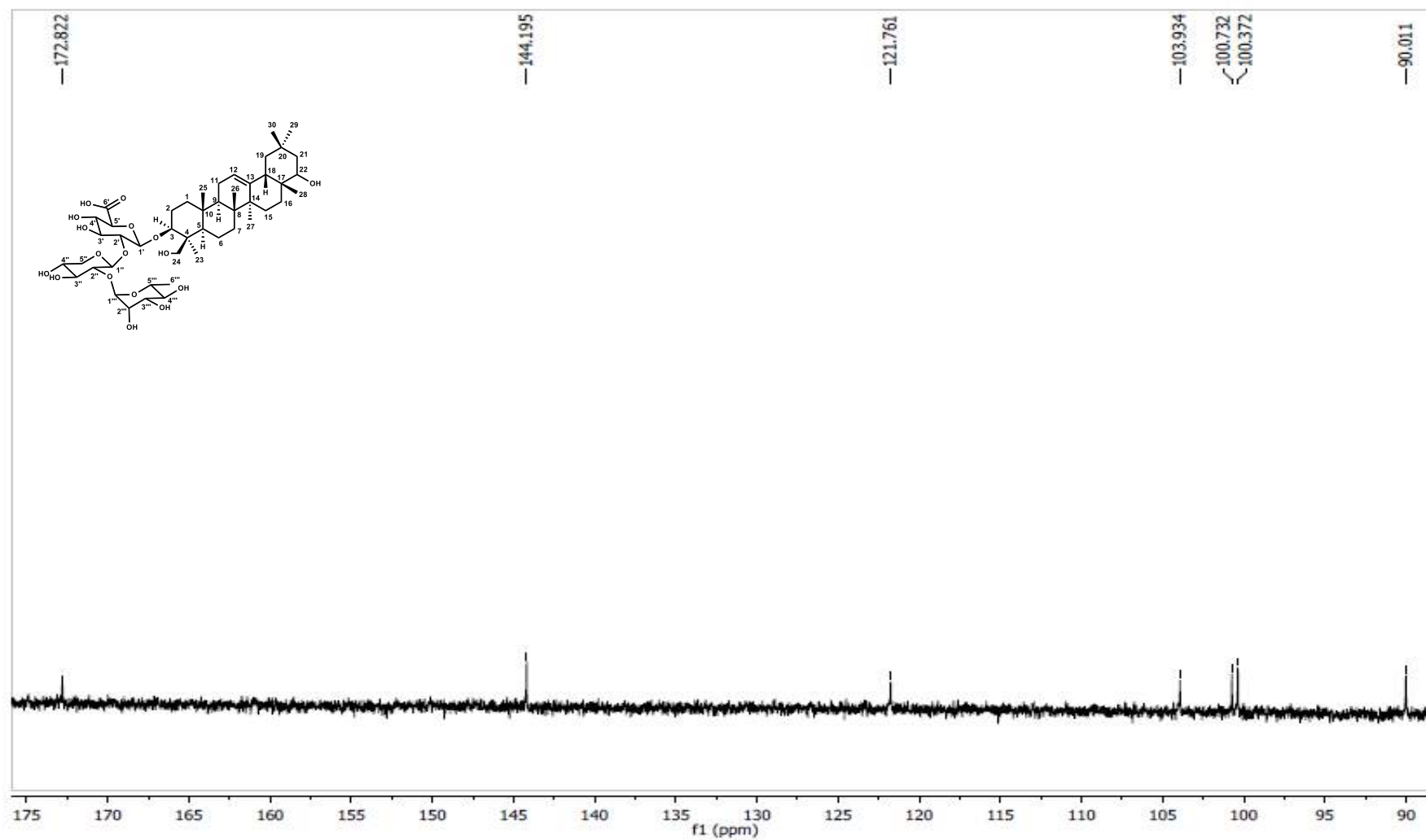


Figura 99. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

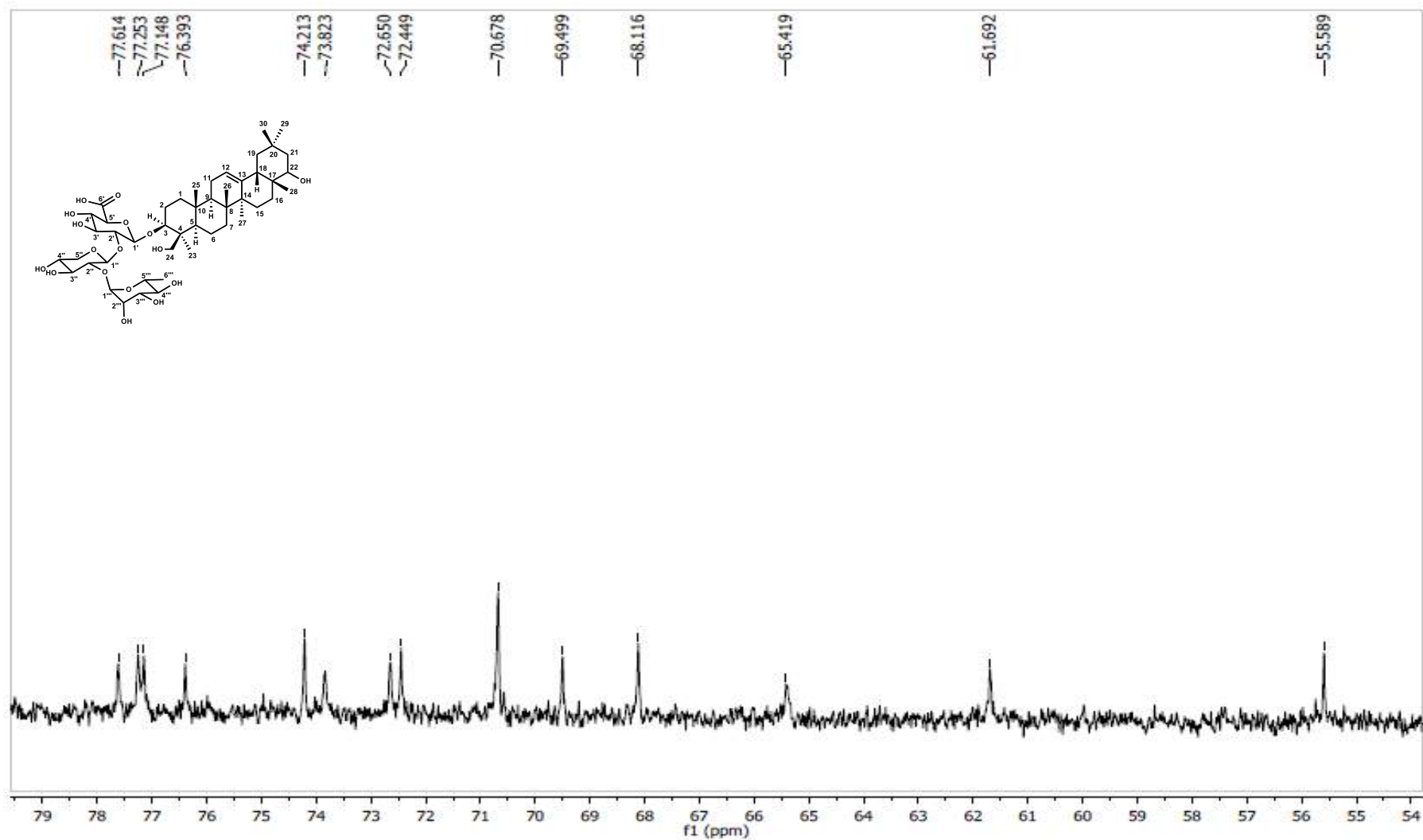


Figura 100. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

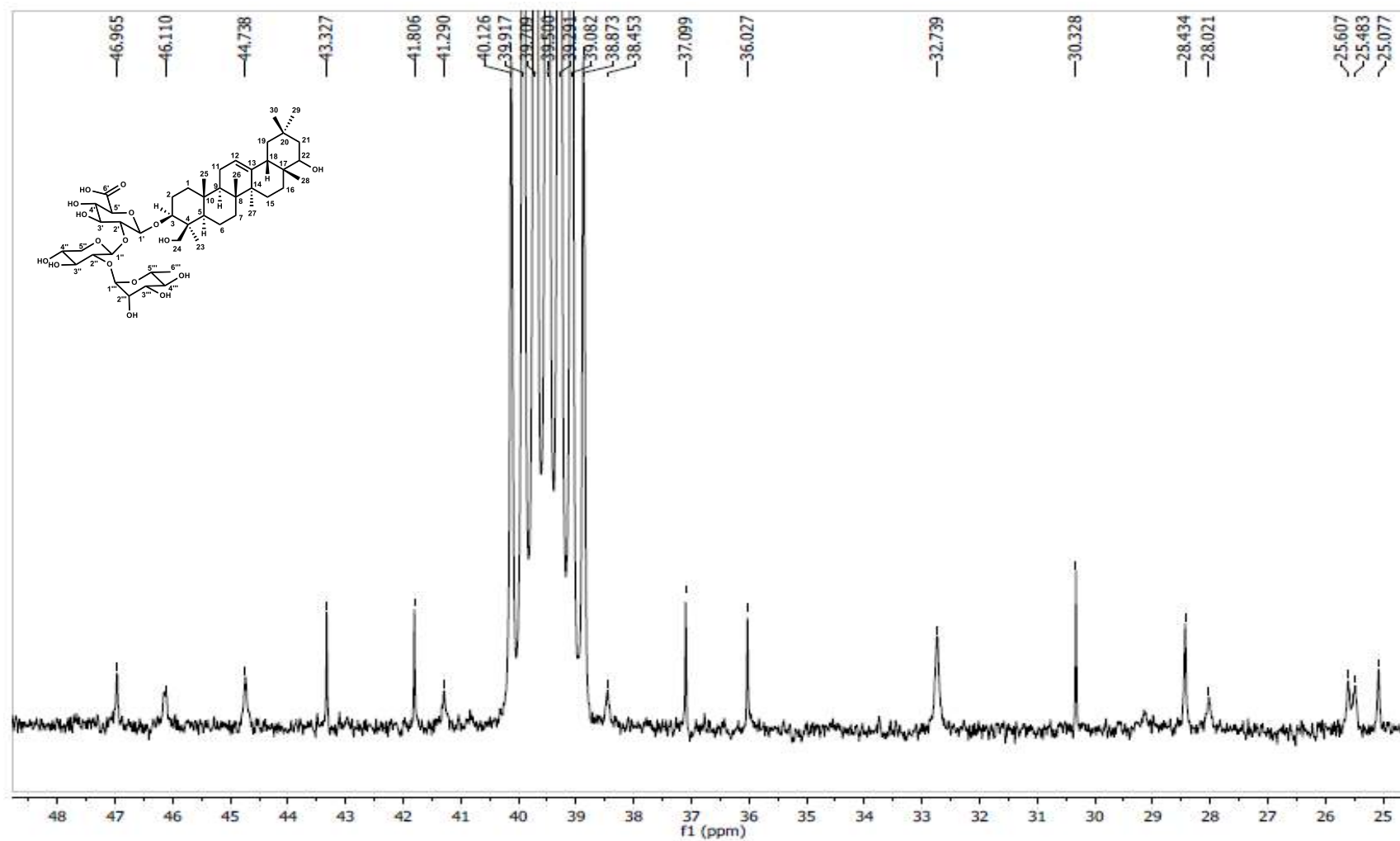


Figura 101. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

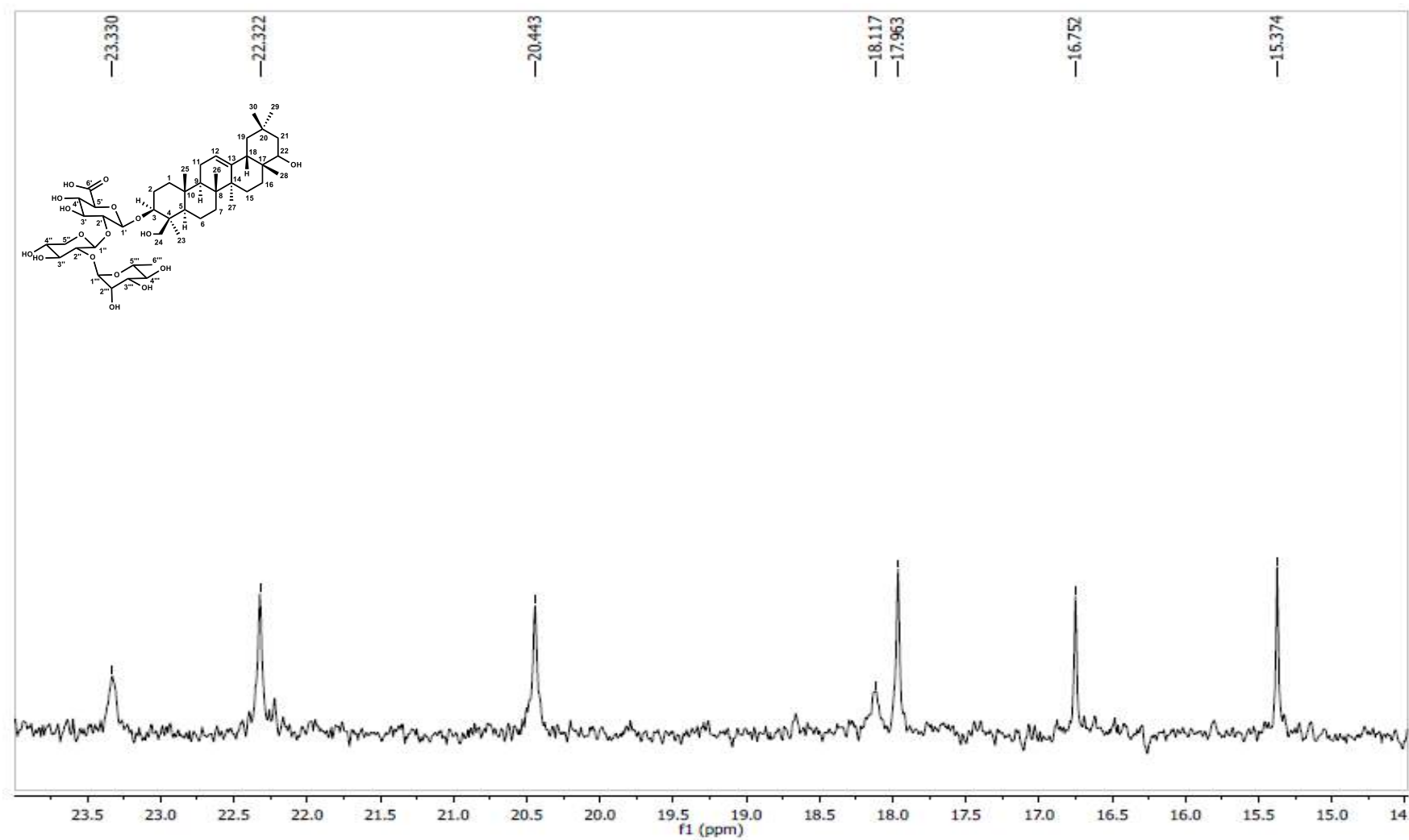


Figura 102. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (BB, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

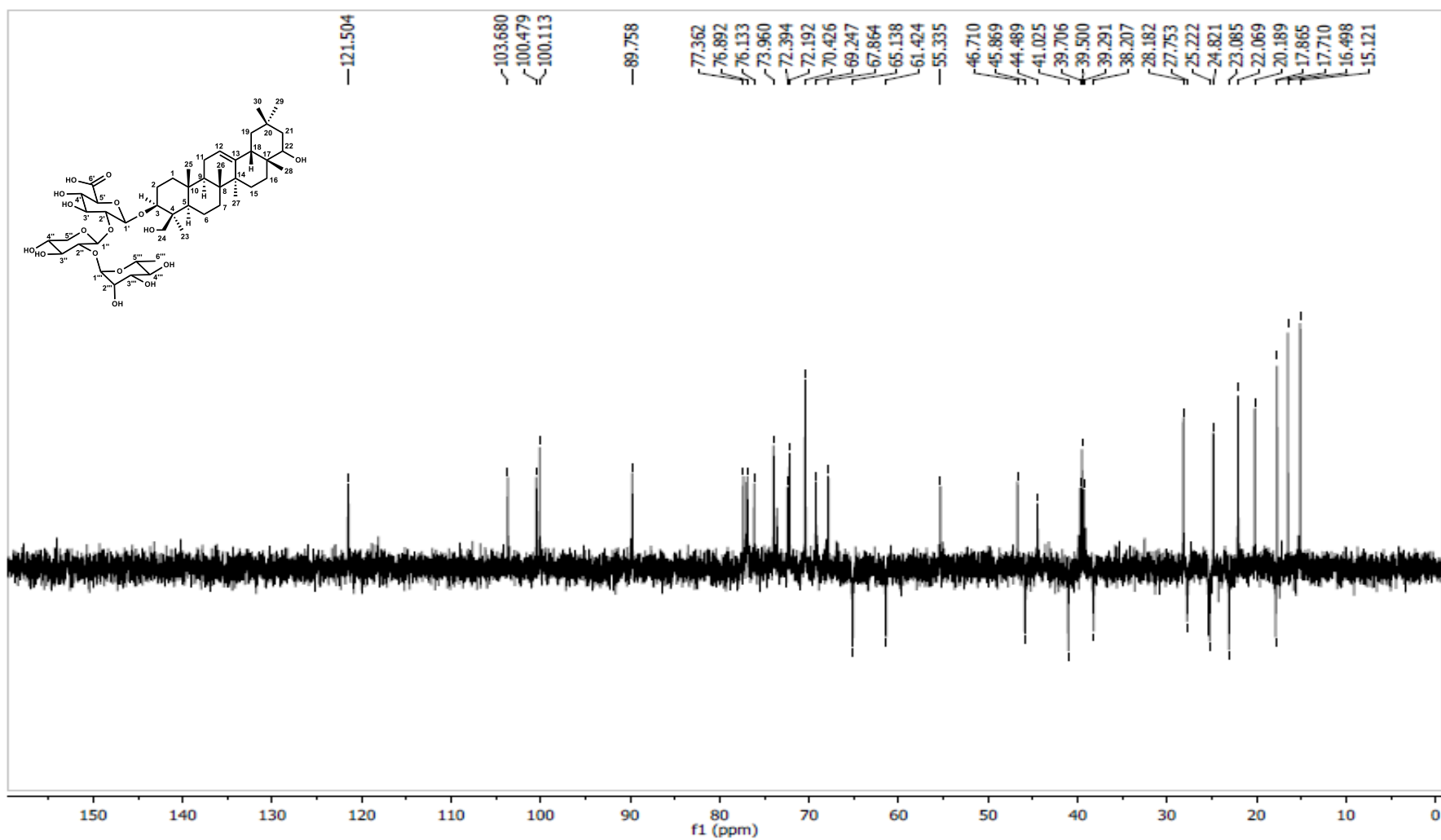


Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

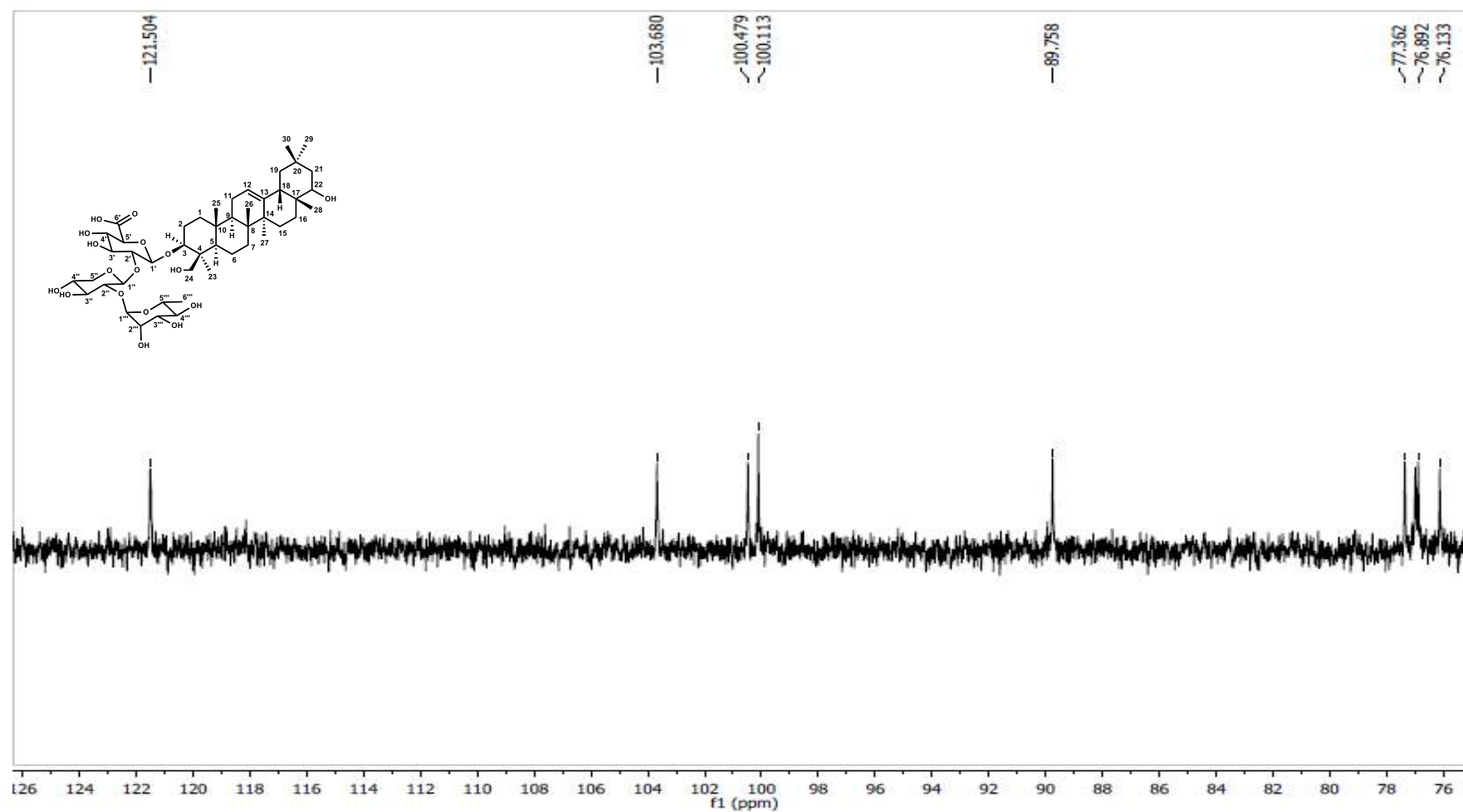


Figura 104. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

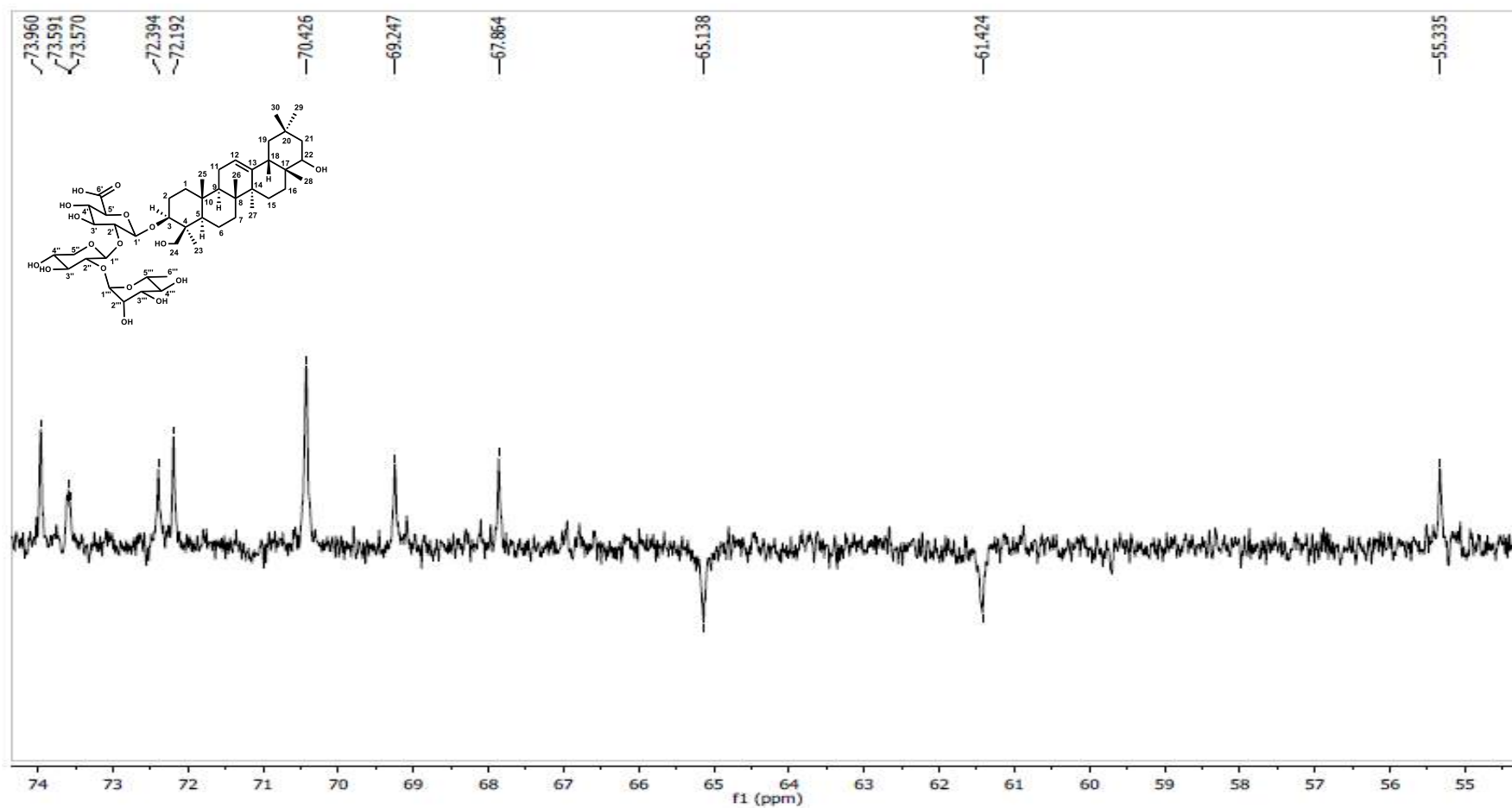


Figura 105. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

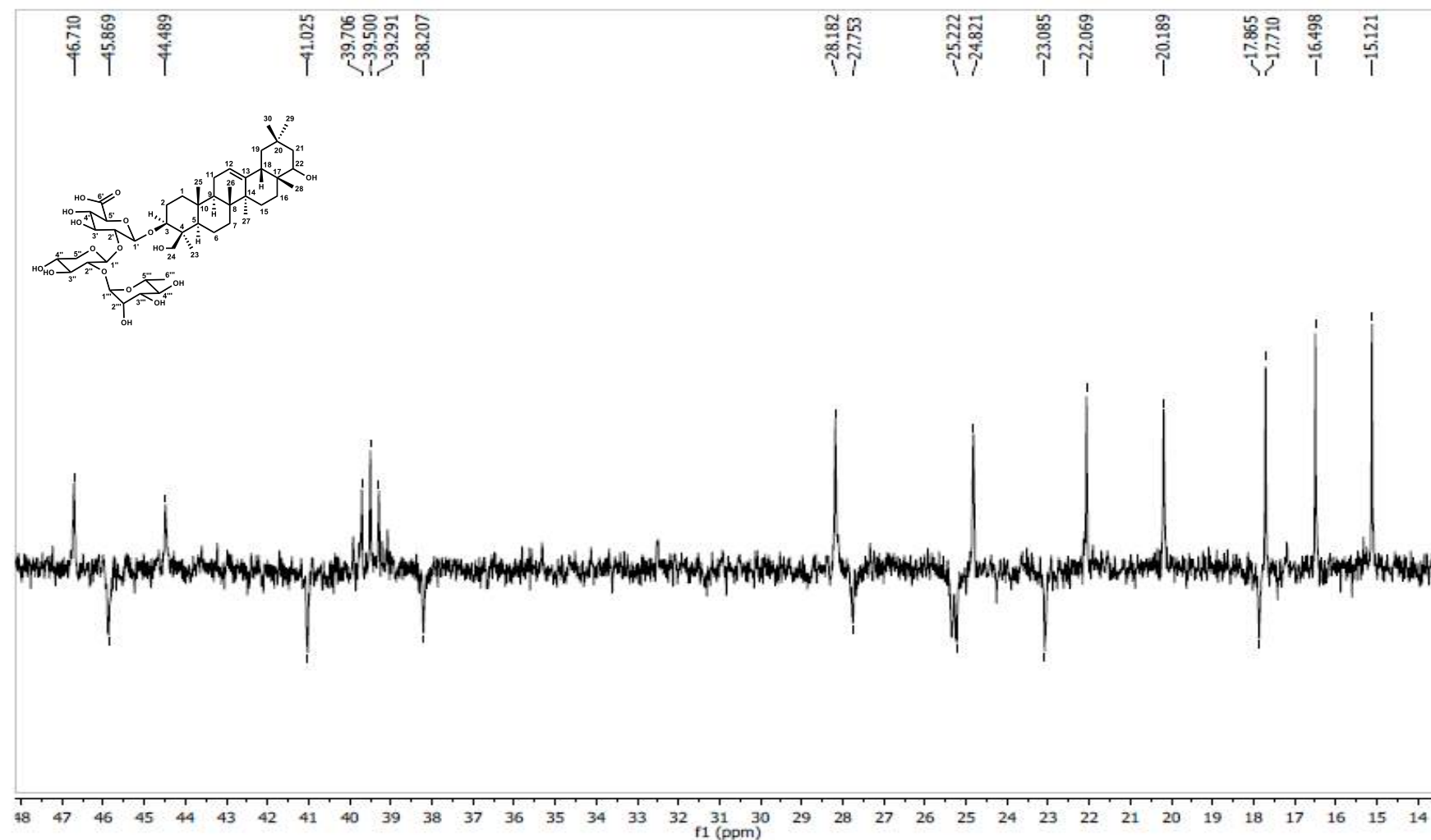


Figura 106. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135, 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

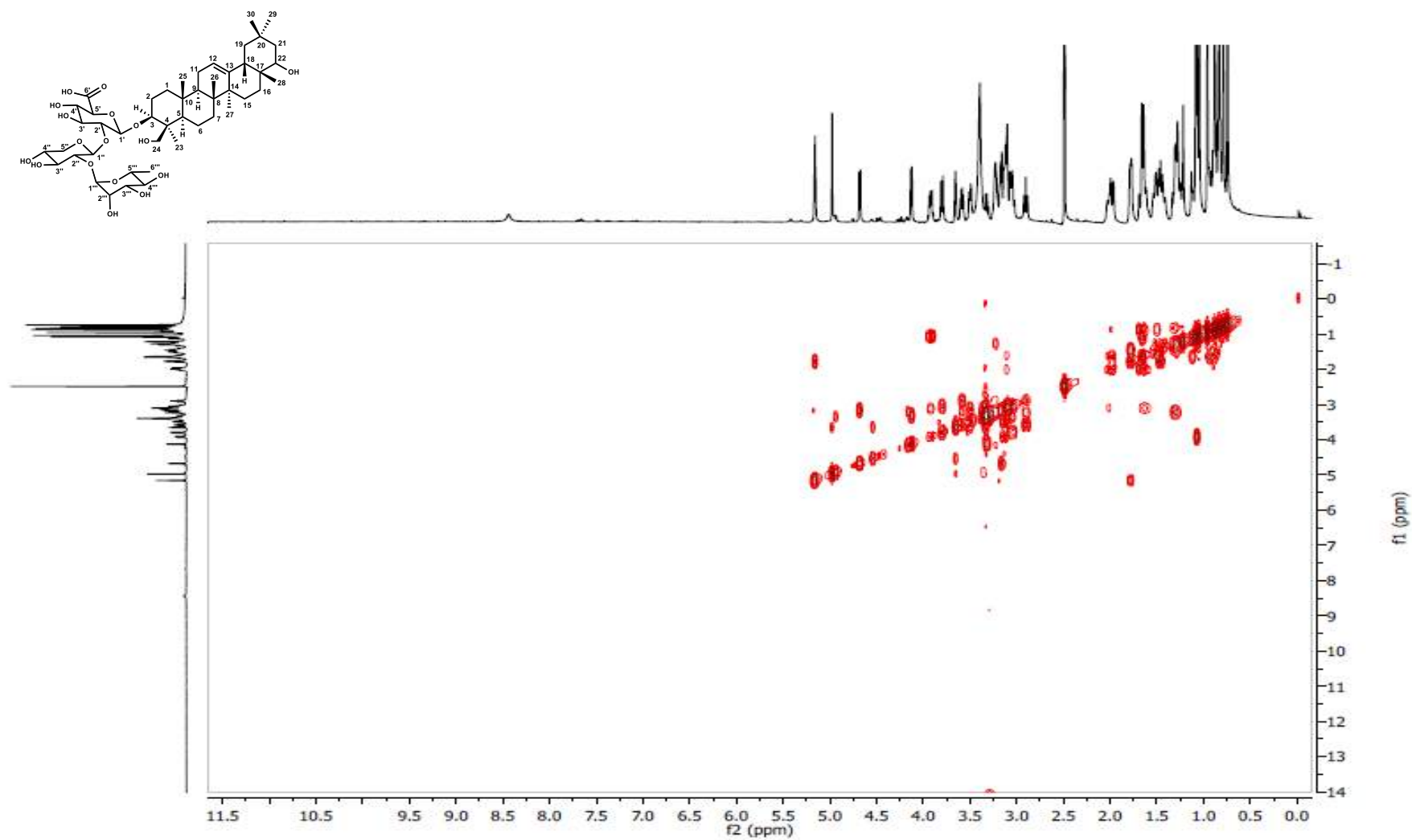


Figura 107. Espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

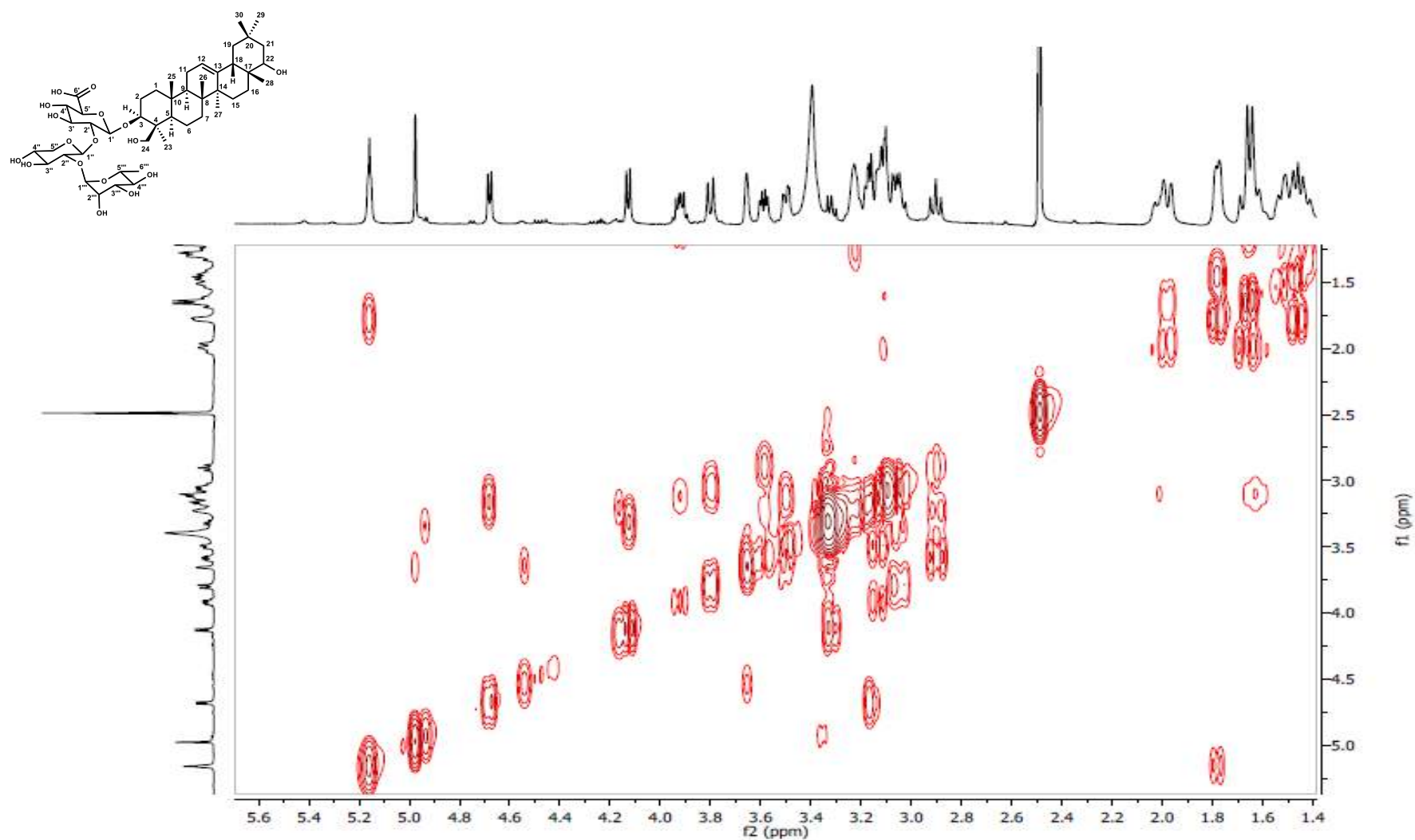


Figura 108. Expansão do espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de 25.

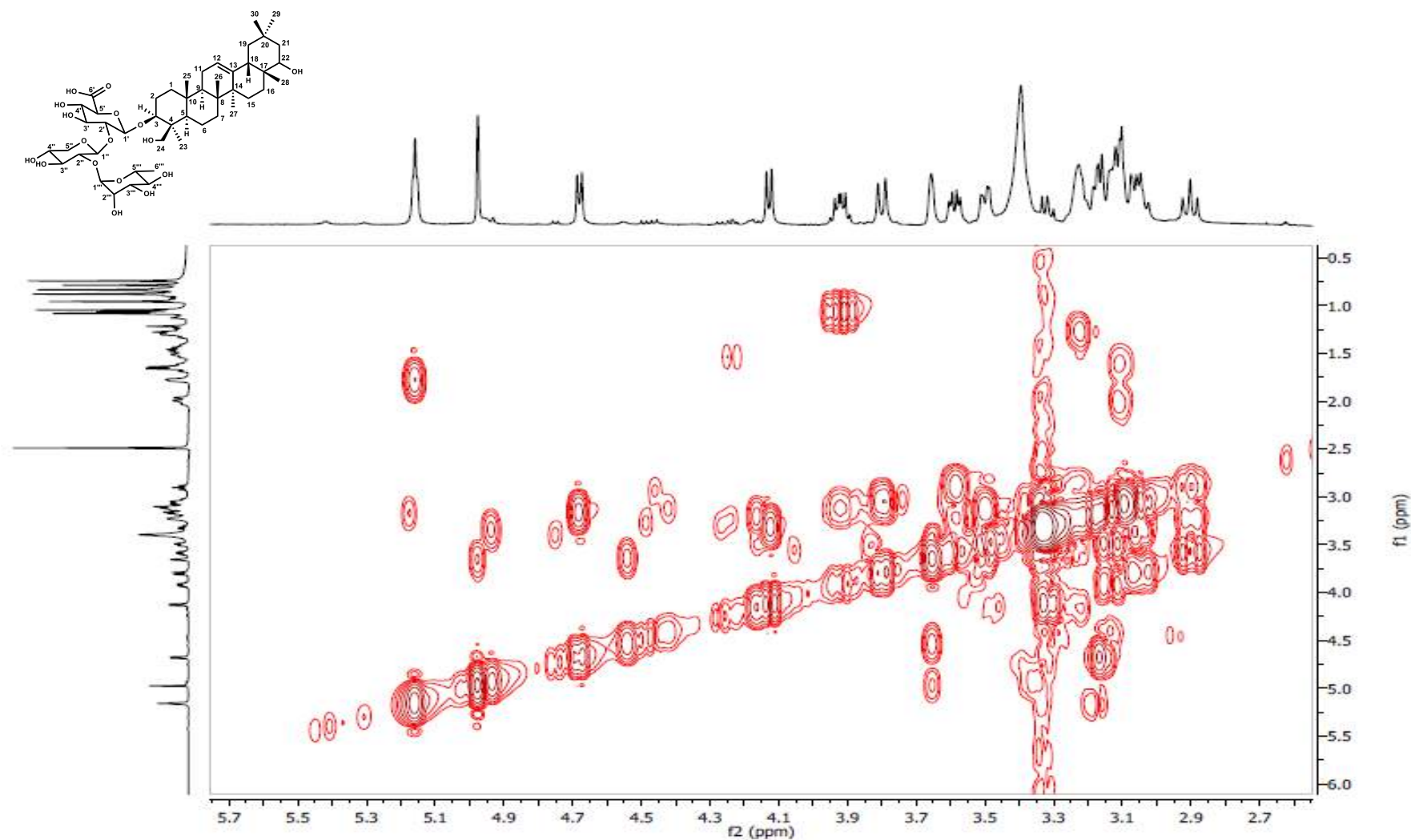


Figura 109. Expansão do espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

Figura 110. Expansão do espectro de RMN - COSY ^1H - ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 25.

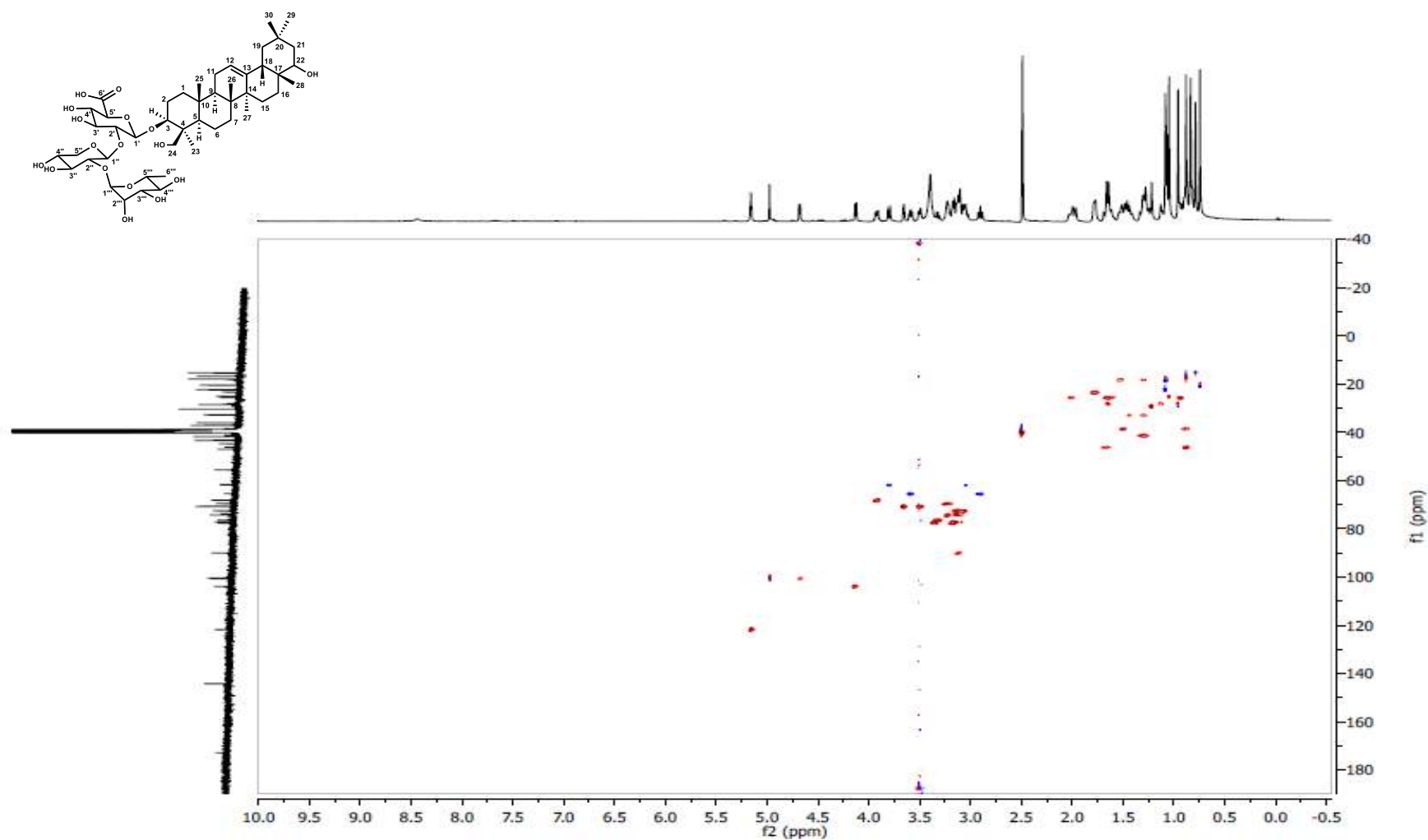


Figura 111. Espectro de RMN - HSQC (500 x 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

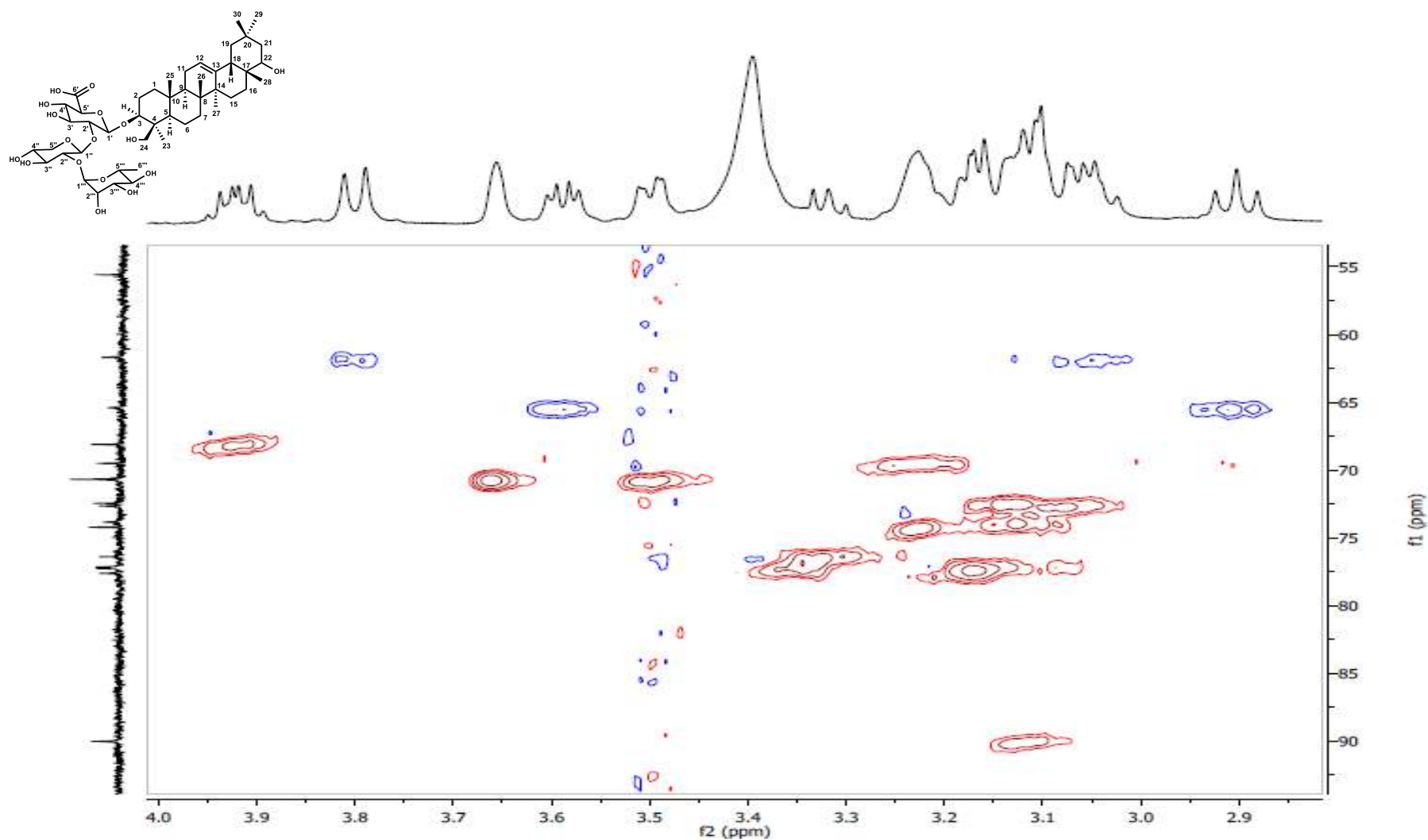


Figura 112. Expansão do espectro de RMN - HSQC (500 x 100 MHz, DMSO-*d*₆) de 25.

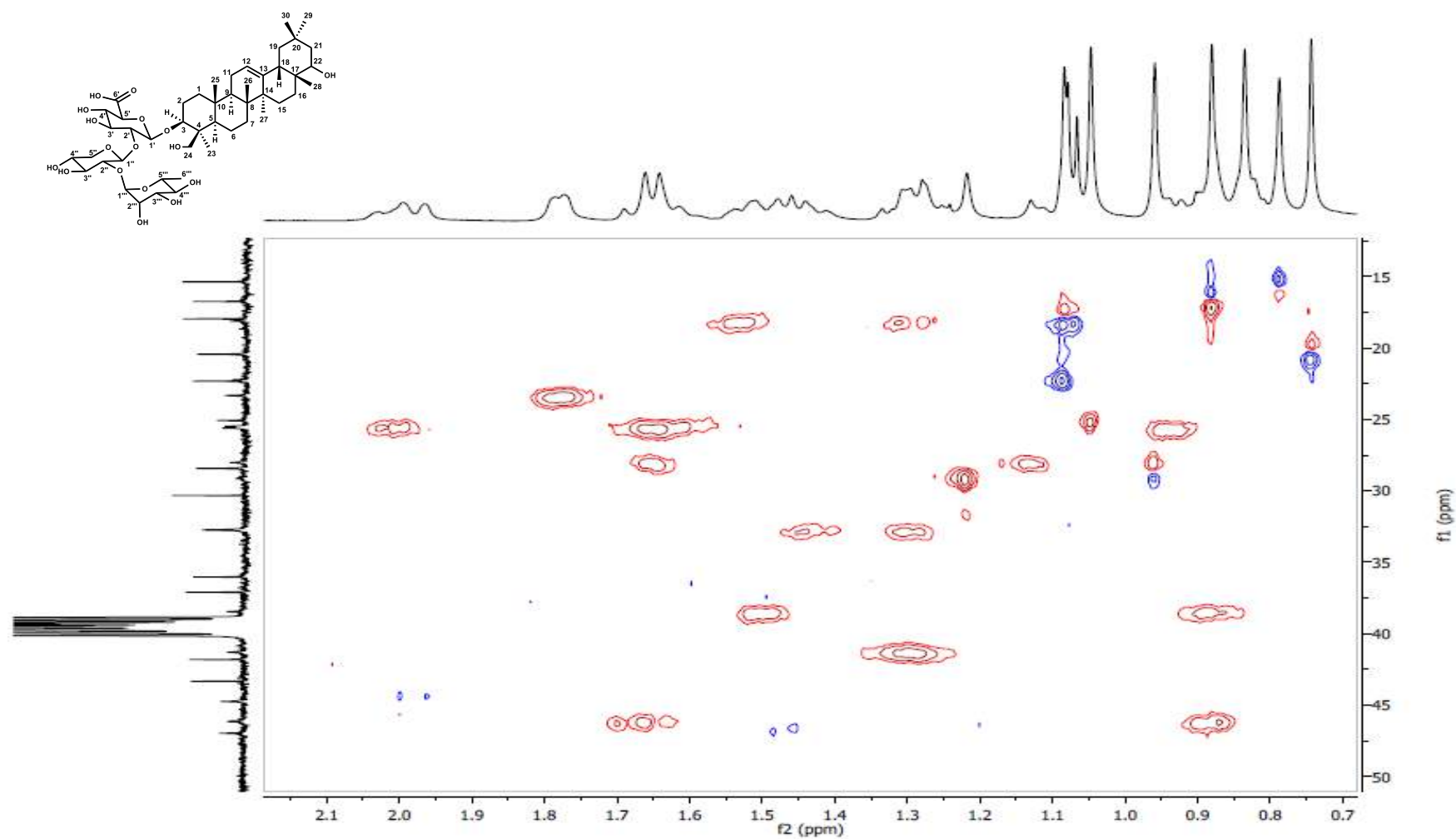


Figura 113. Expansão do espectro de RMN - HSQC (500 x 100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

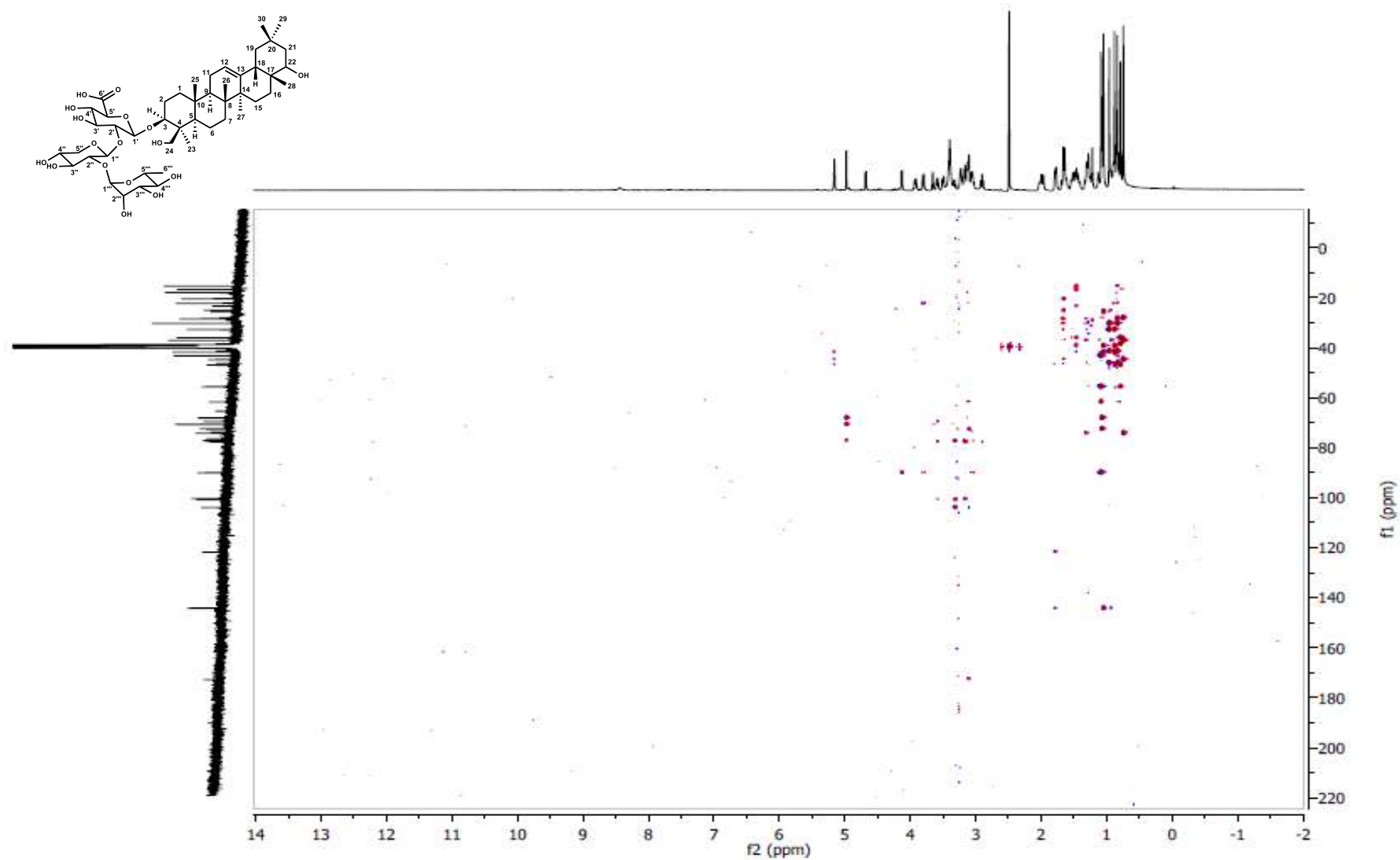


Figura 114. Espectro de RMN - HMBC (500 x 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

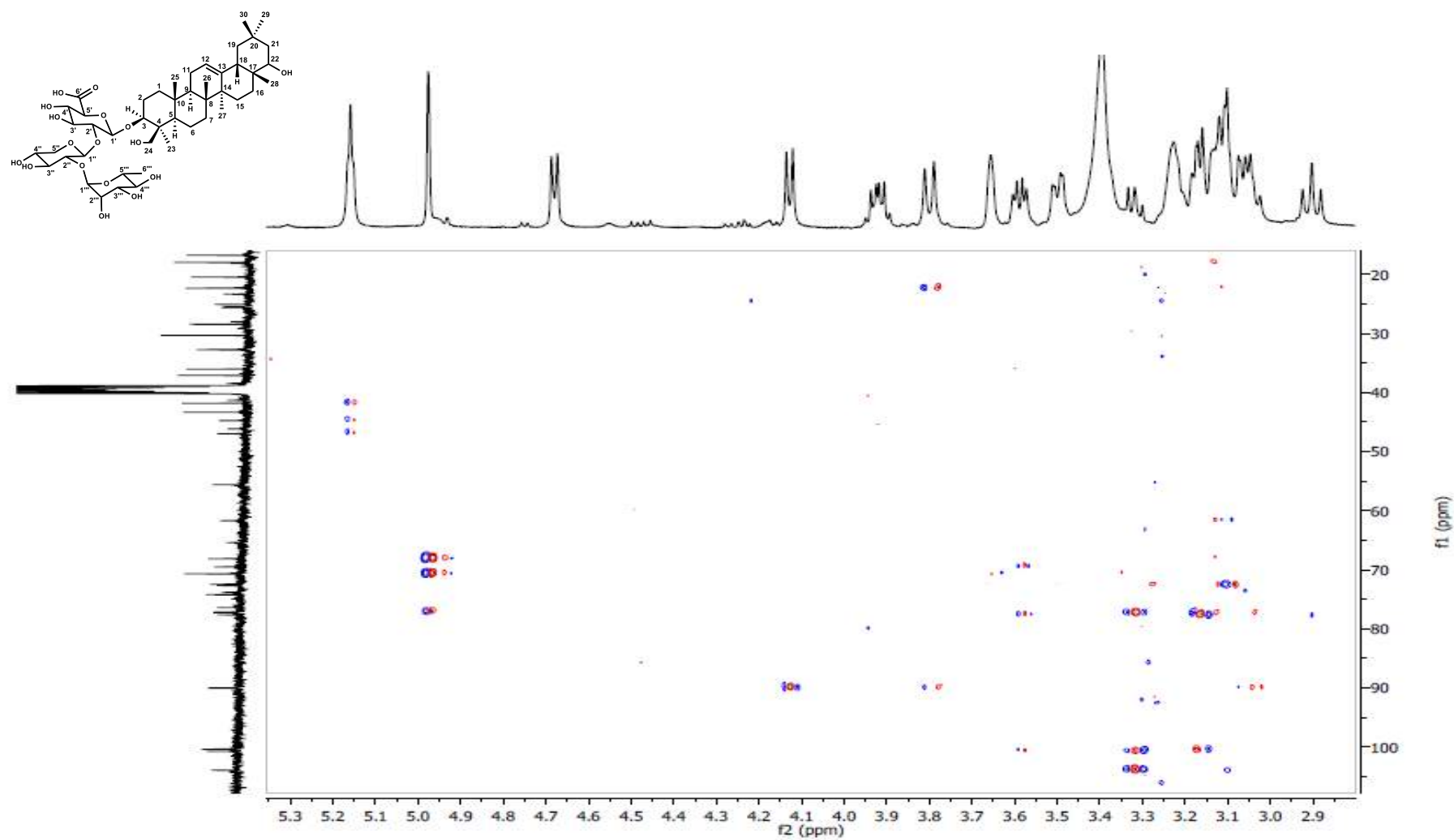


Figura 115. Expansão do espectro RMN - HMBC (500 x 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

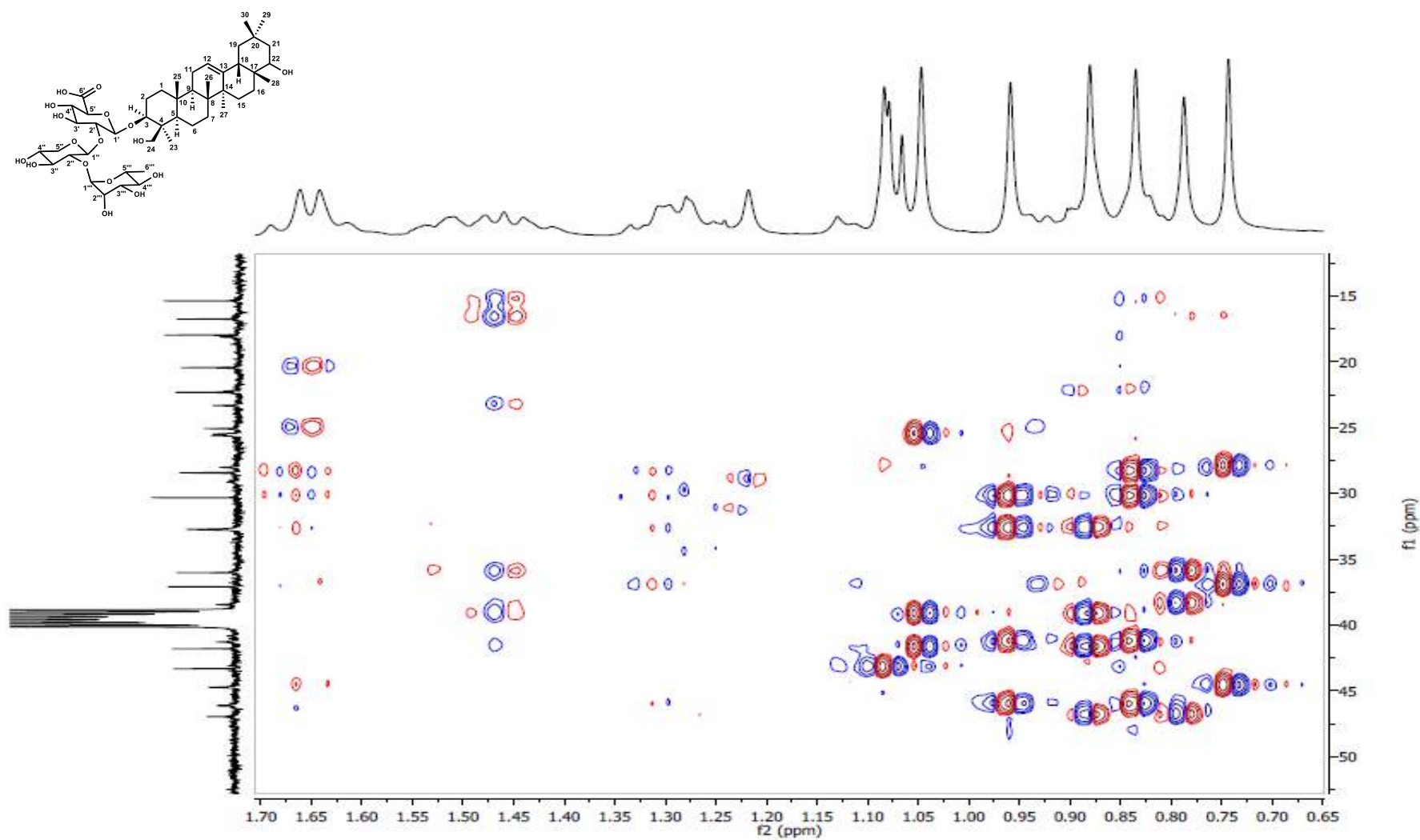


Figura 116. Expansão do espectro de RMN - HMBC (500 x 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

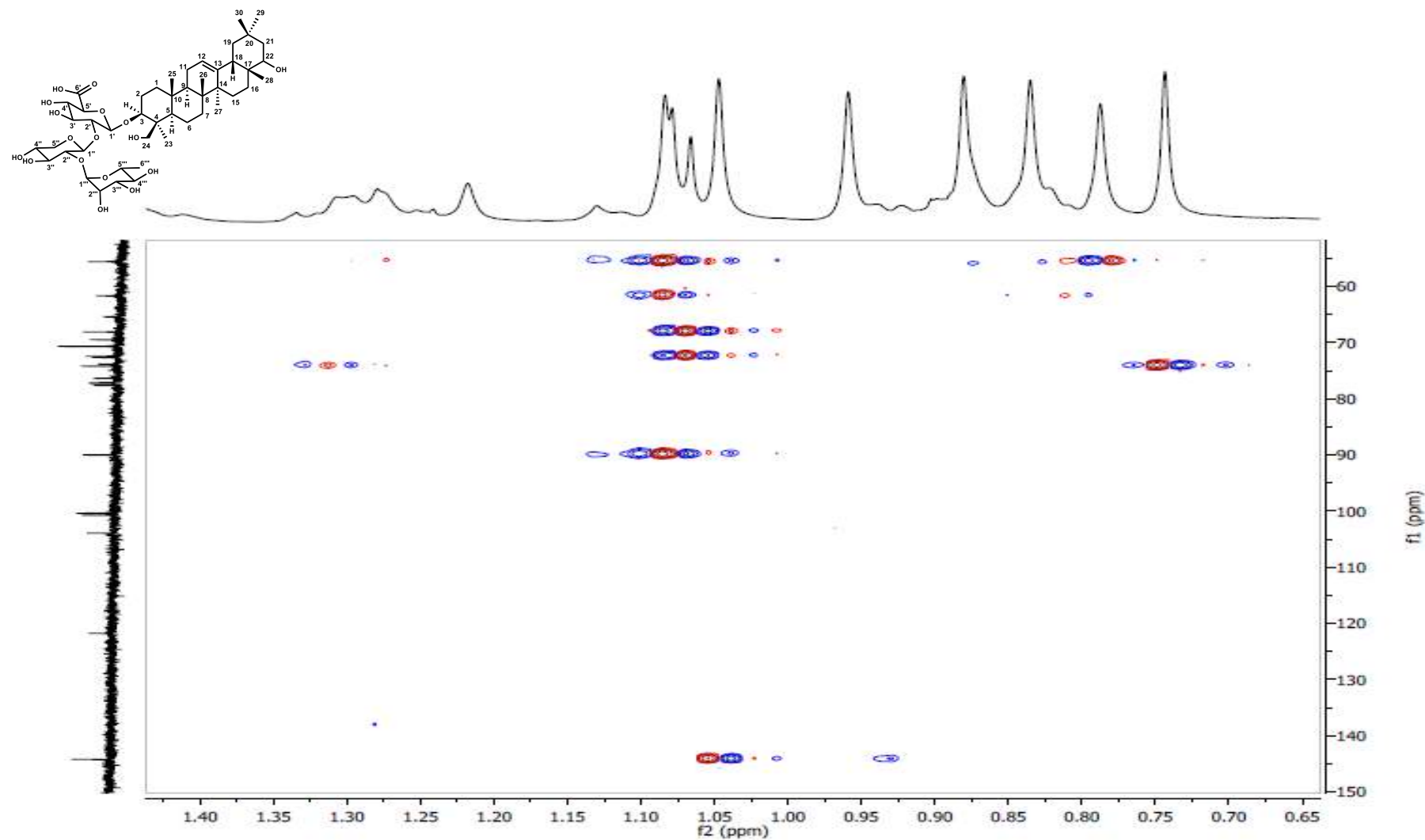


Figura 117. Expansão do espectro de RMN - HMBC (500 x 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 25.

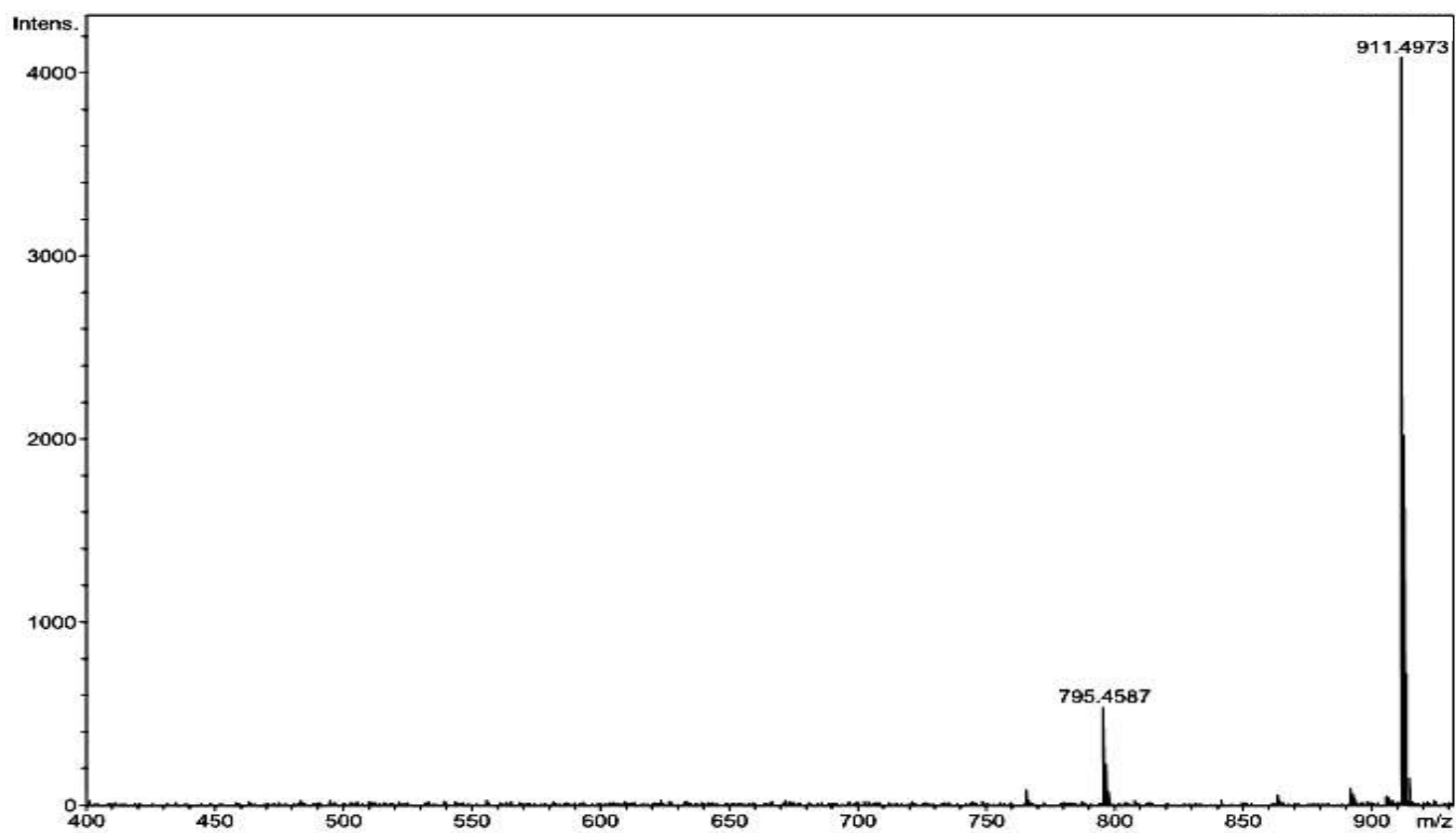


Figura 118. Espectro de HR-IES-EM de 25.

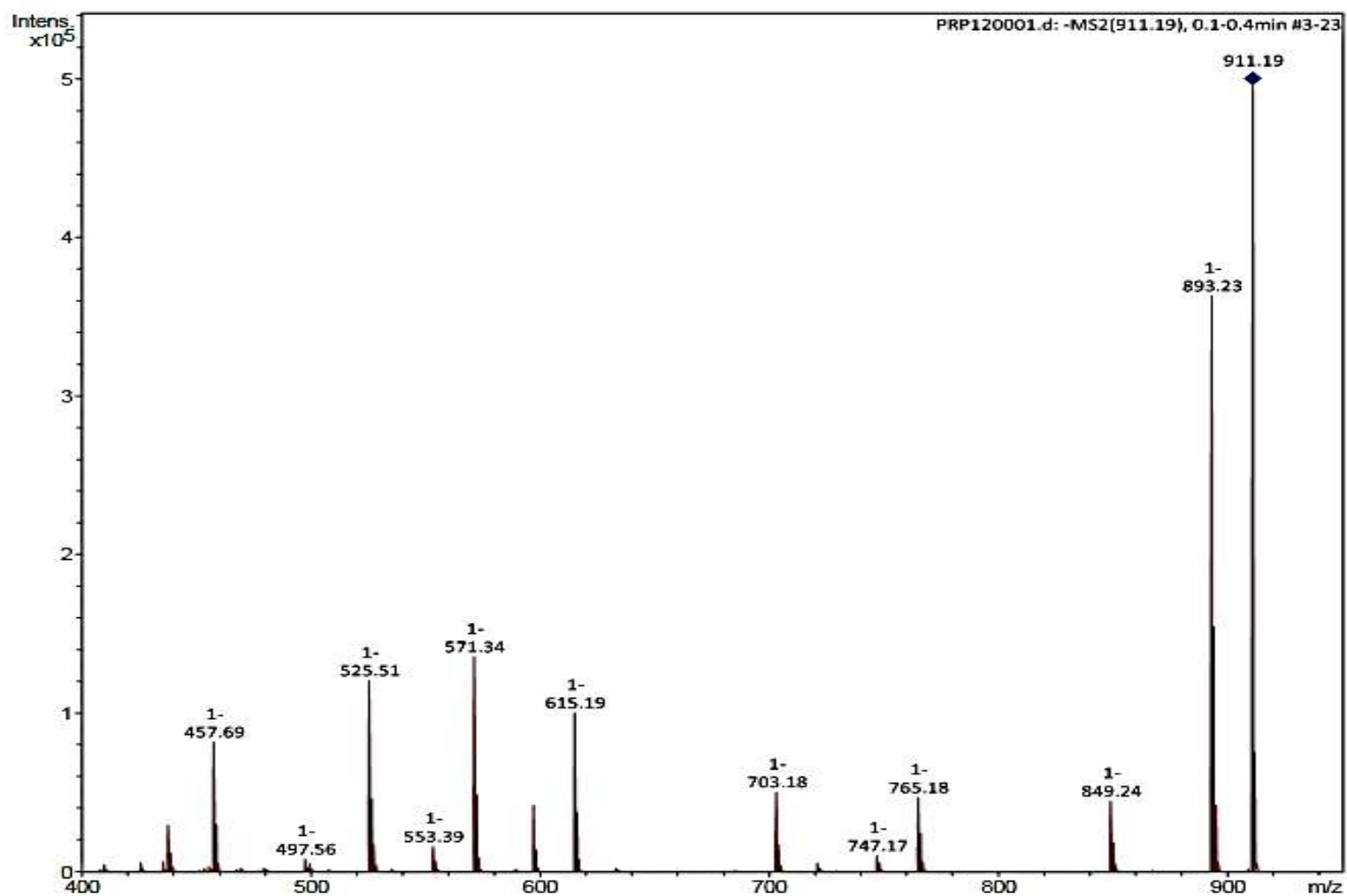


Figura 119. Espectro de IES-EM/EM no modo negativo com as fragmentações do íon m/z 911,4973, referente à ionização da saponina 25.

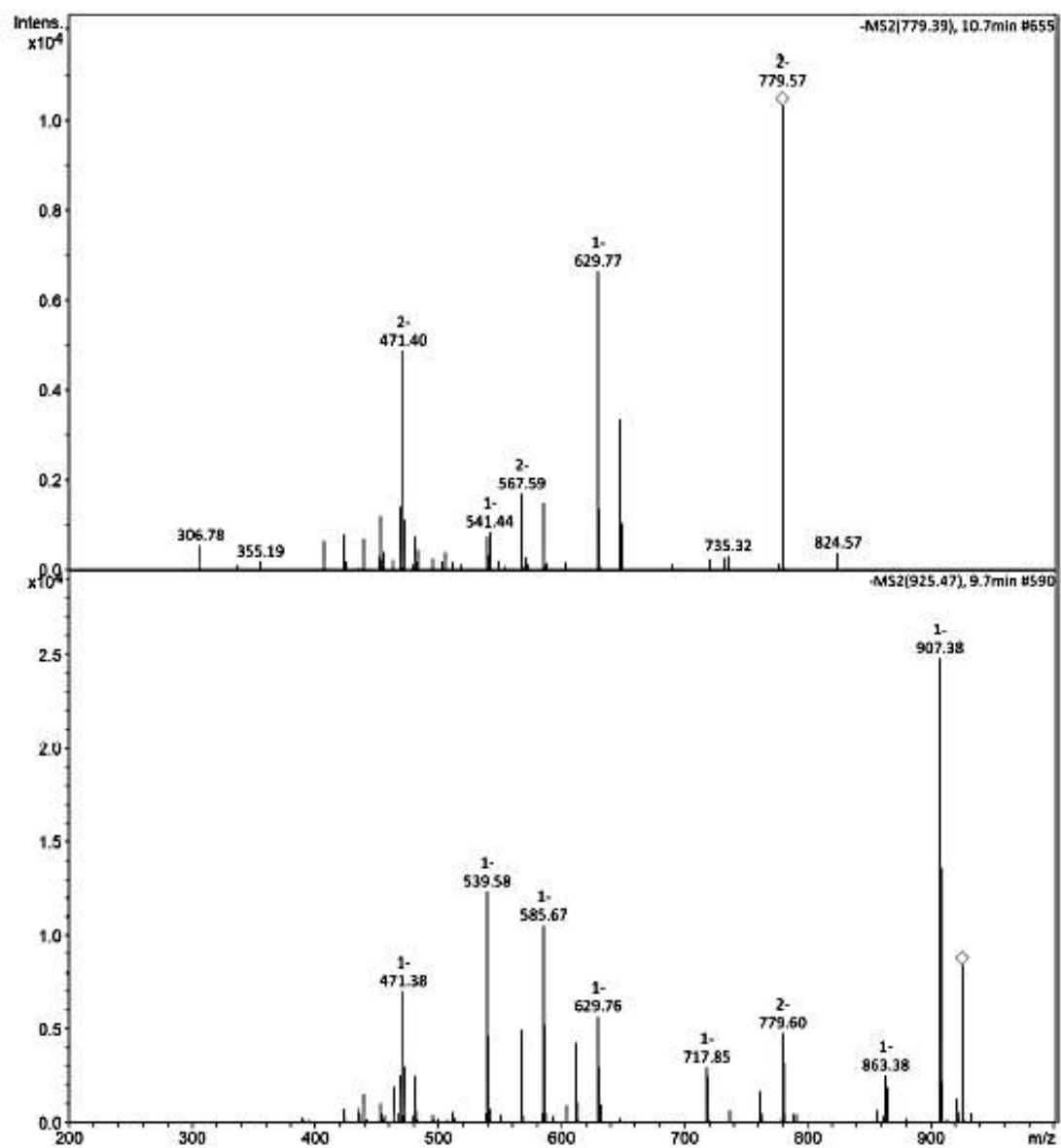


Figura 120. O espectro de IES-EM/EM do composto 1 e 2.

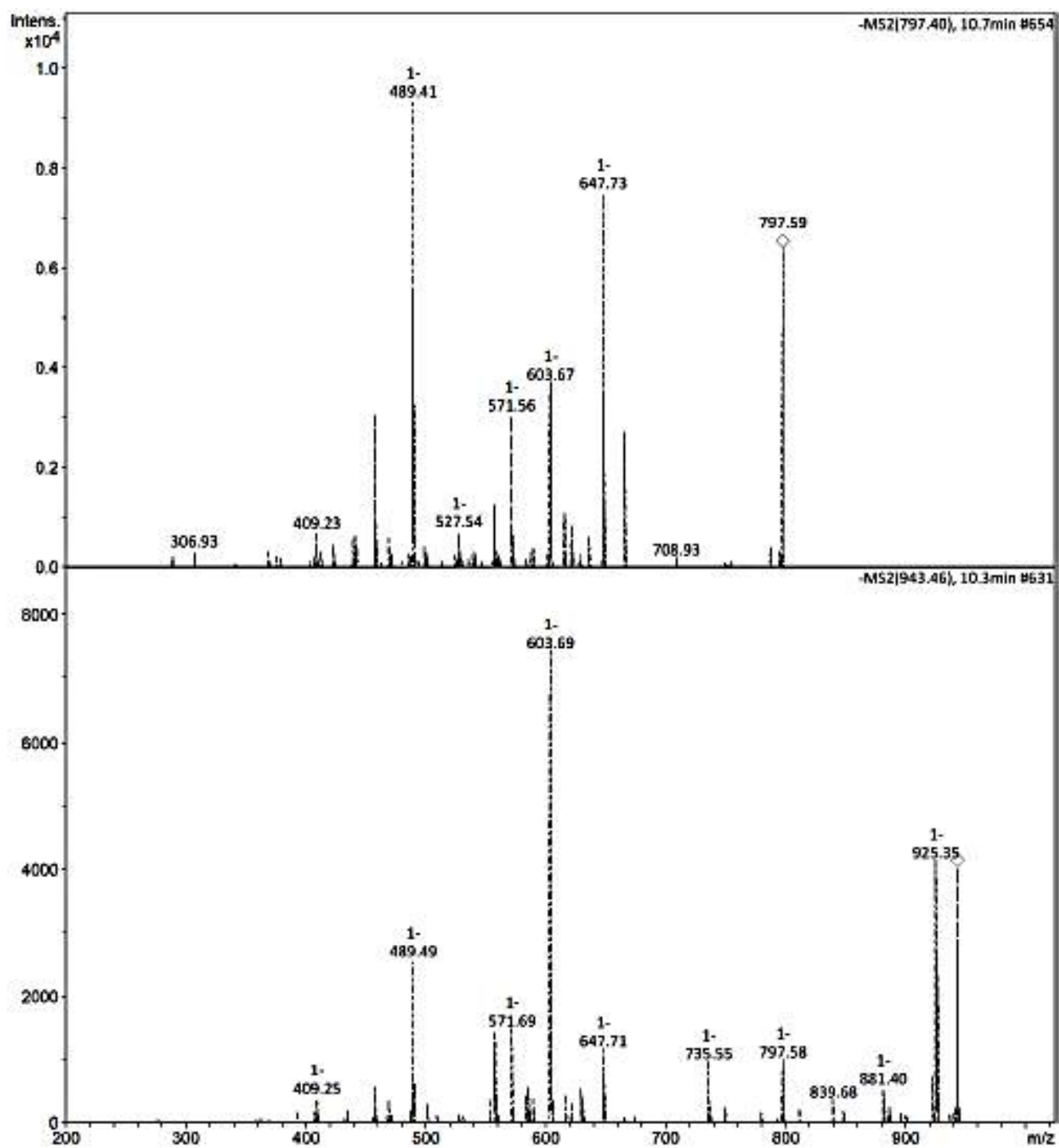


Figura 121. O espectro de IES-EM/EM do composto 3 e 4.

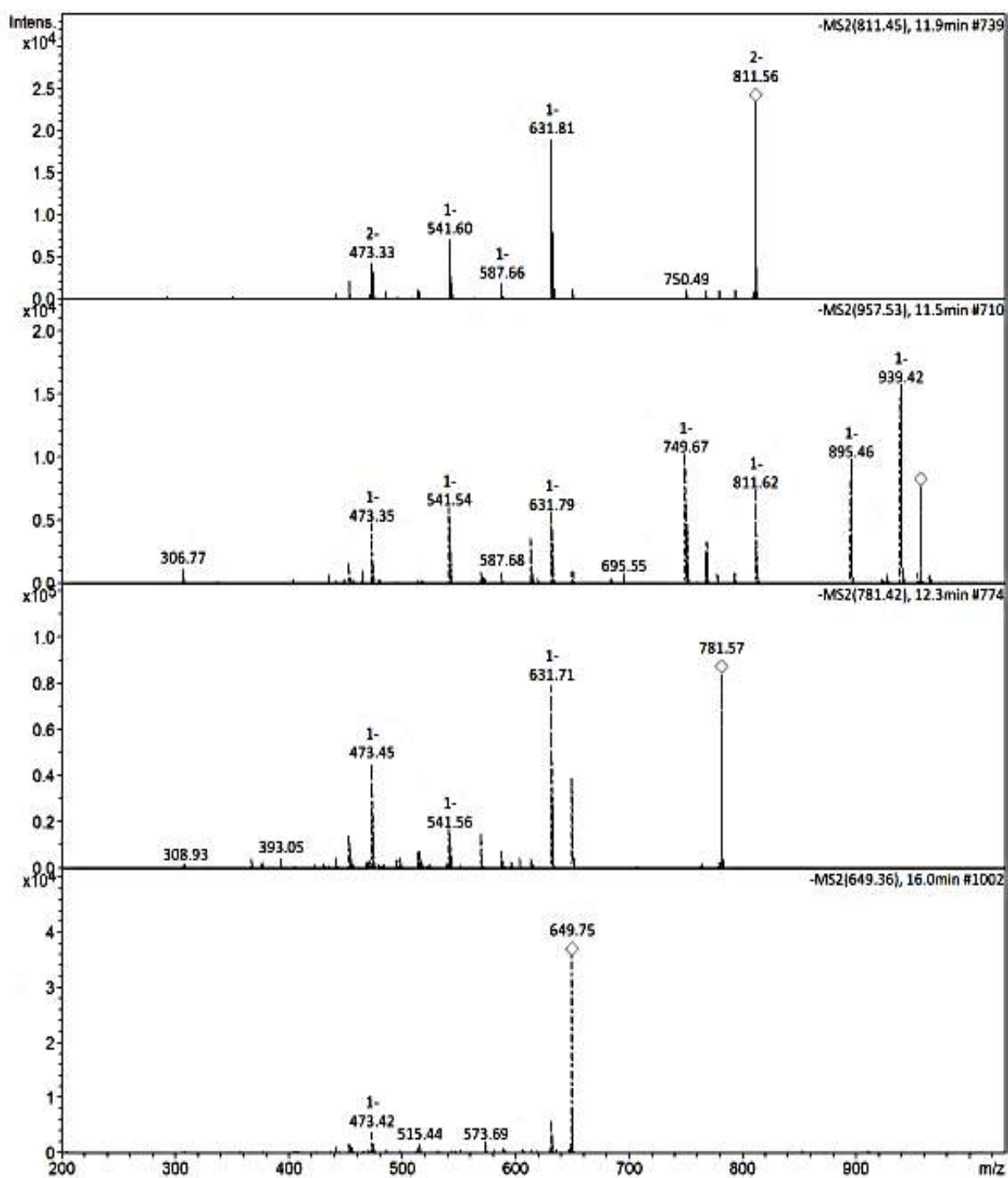


Figura 122. O espectro de IES-EM/EM do composto 5, 7, 8 e 14.

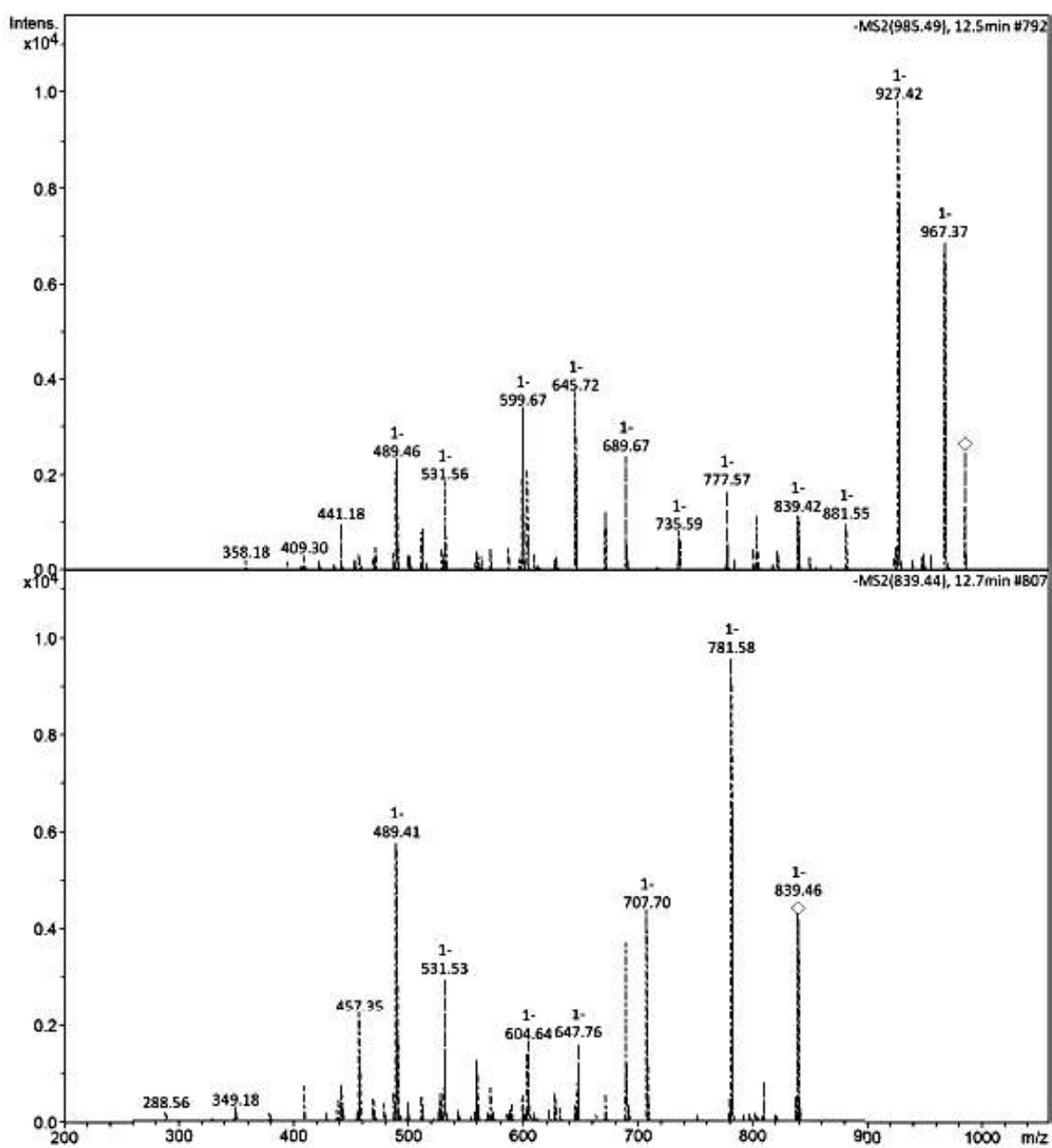


Figura 123. O espectro de IES-EM/EM do composto 9 e 10.

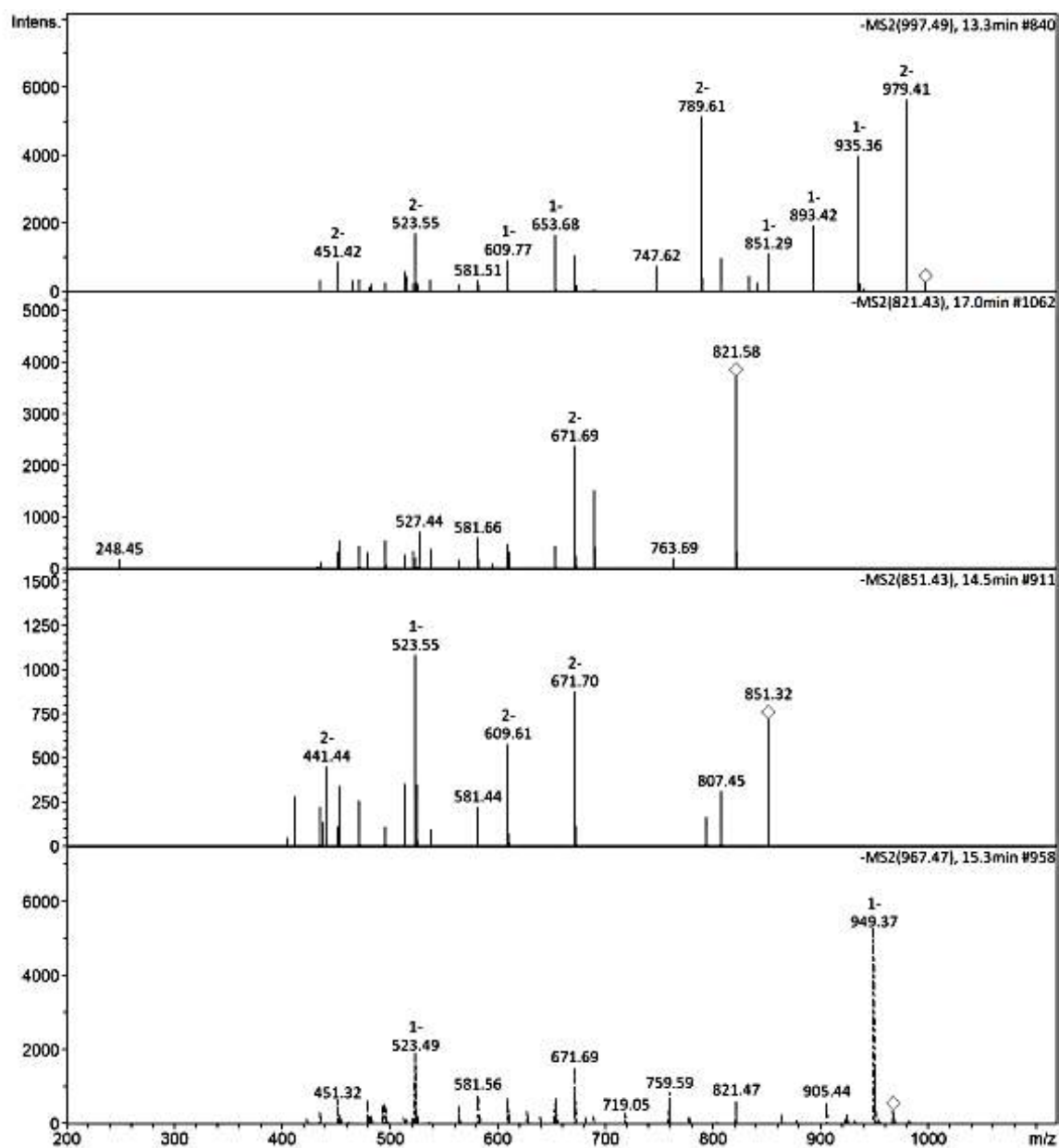


Figura 124. O espectro de IES-EM/EM do composto 11, 12, 13 e 15.

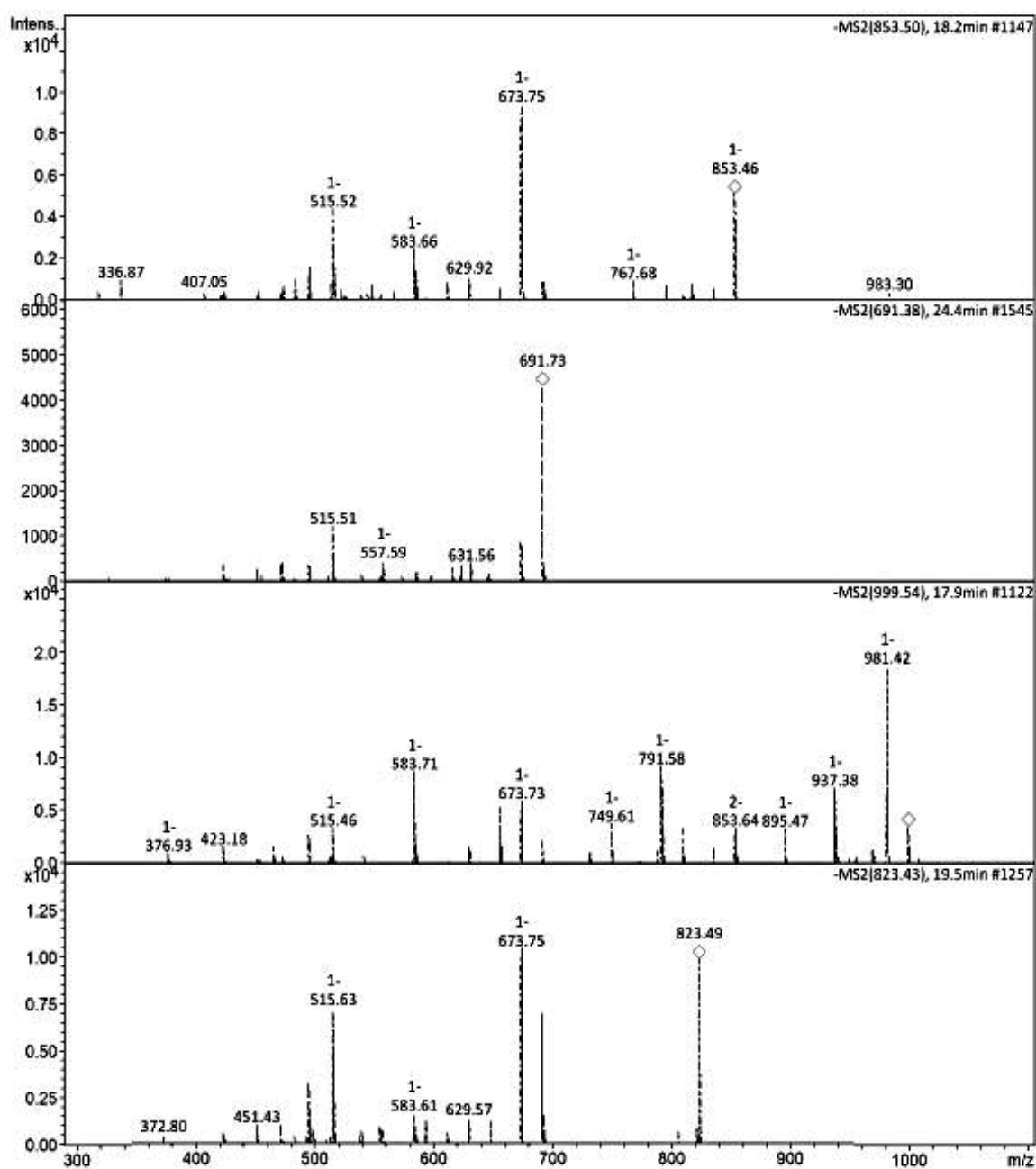


Figura 125. O espectro de IES-EM/EM do composto 16, 18, 19 e 22.

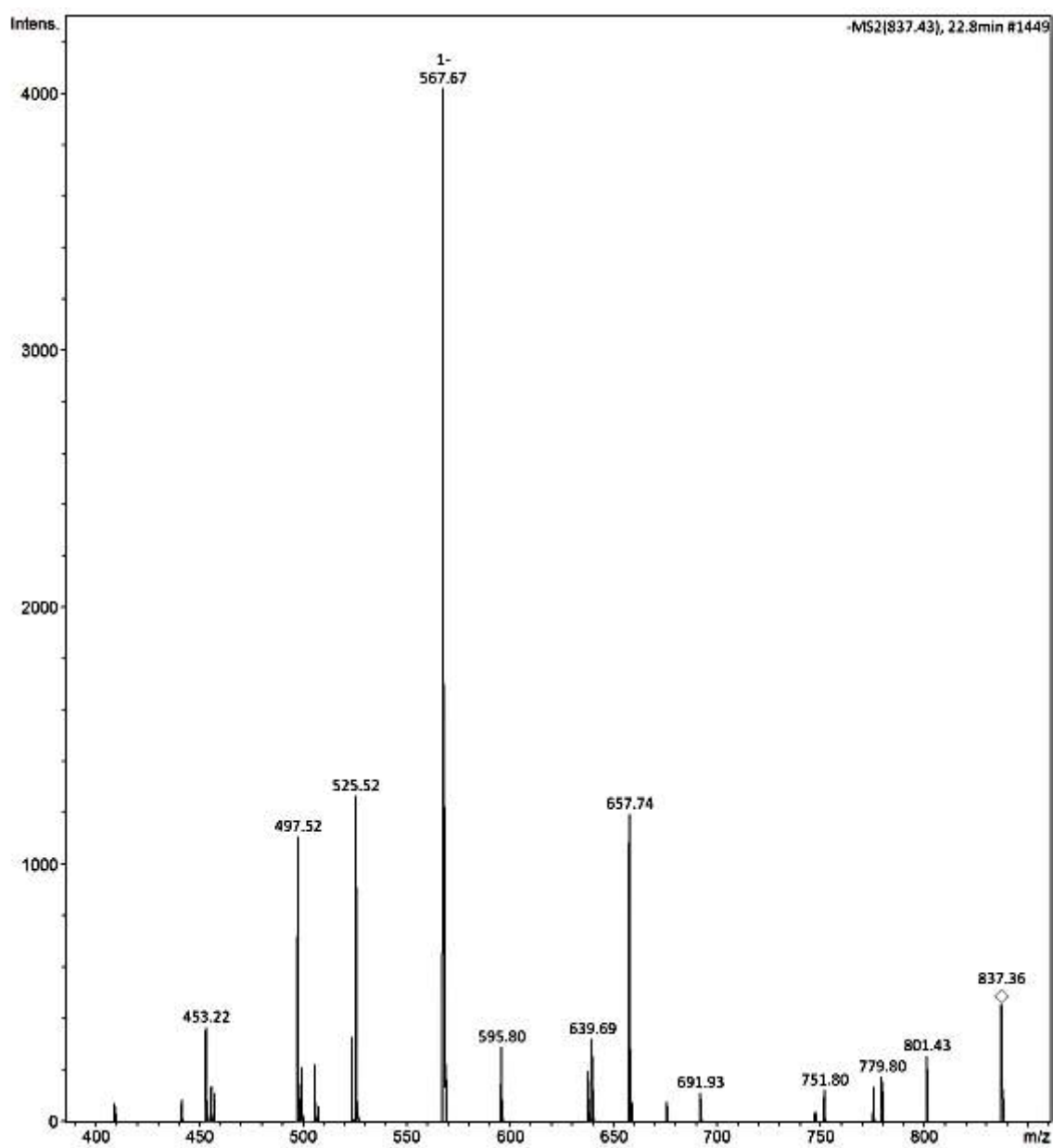


Figura 126. O espectro de IES-EM/EM do composto 20.

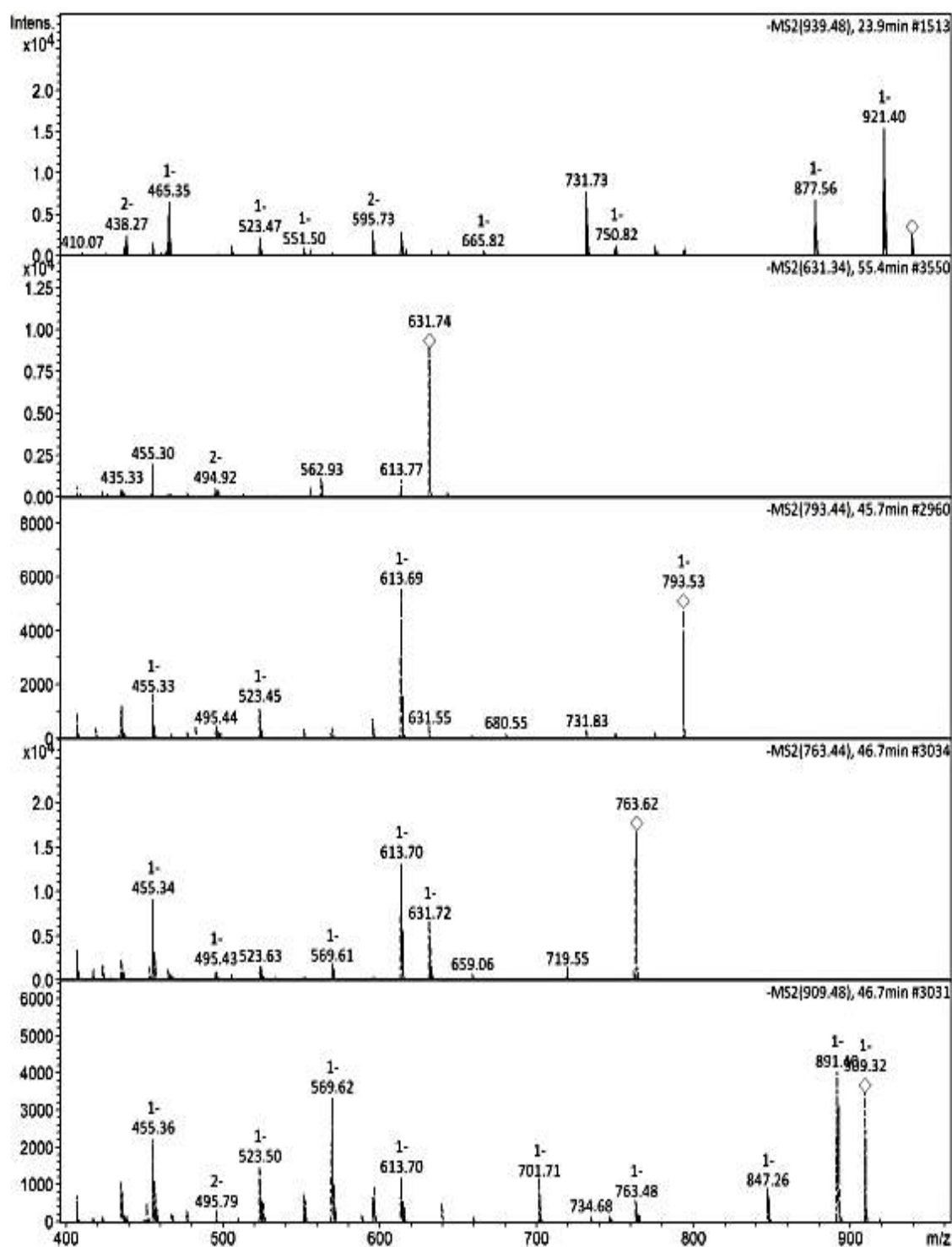


Figura 127. O espectro de IES-EM/EM do composto 21, 31, 32, 33 e 35.

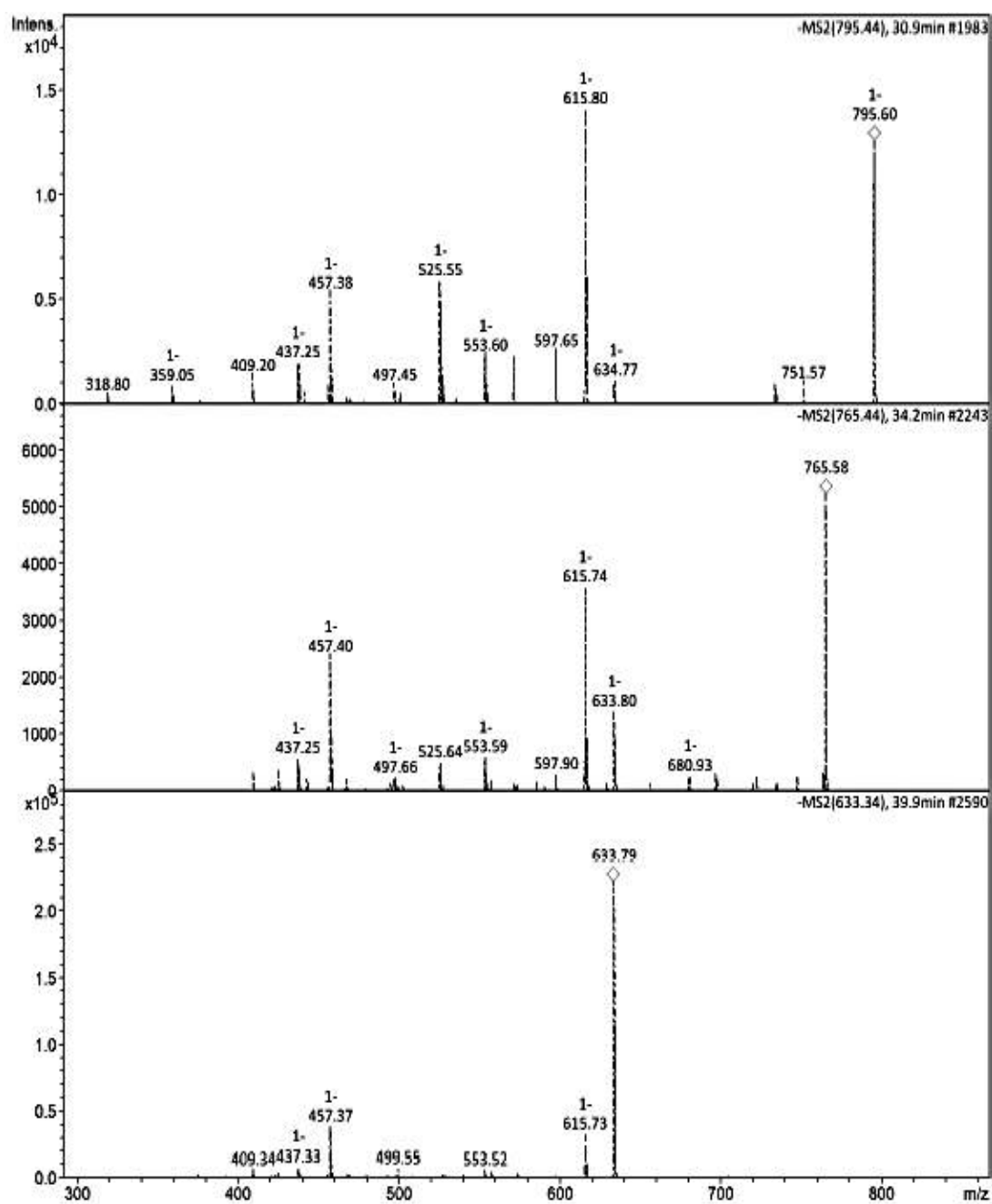


Figura 128. O espectro de IES-EM/EM do composto 24, 26, e 29.

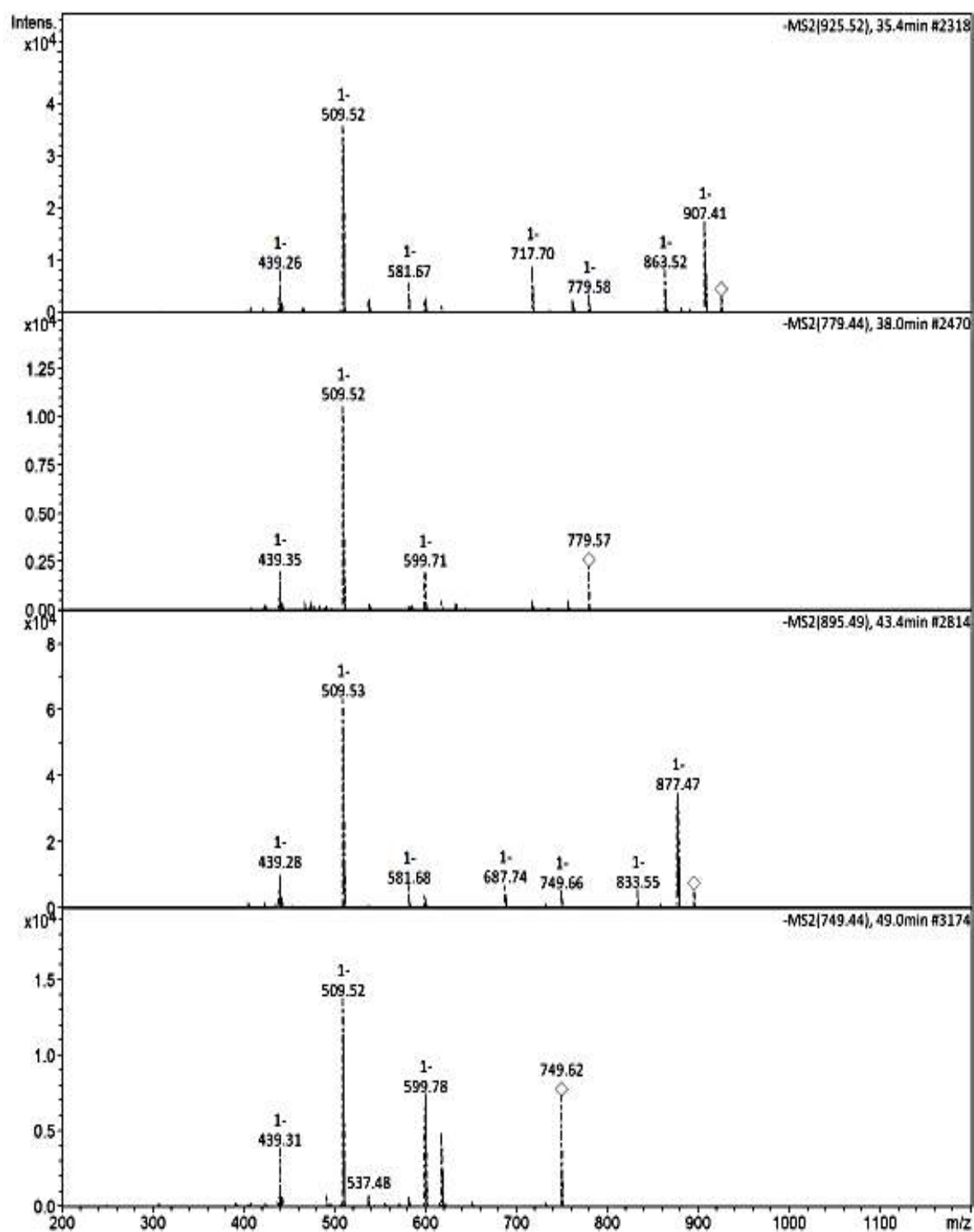


Figura 129. O espectro de IES-EM/EM do composto 27, 28, 30 e 34.

06 | CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Zornia brasiliensis* possibilitou o isolamento de nove compostos fenólicos, com exceção da isovitexina e da 7,4'-dimetoxisoflavona, todos são descritos pela primeira vez no gênero *Zornia*. Entre estes, o destaque é o zorniosídeo, uma diidrochalcona C-glicosilada, sendo este o primeiro relato na literatura desse composto químico e que teve sua atividade citotóxica demonstrada através da linhagem de células tumorais leucêmicas promielocítica (HL-60).

Além disso, ainda foi possível isolar uma saponina conhecida como soyasaponina II, fato relevante que coloca o gênero *Zornia* no reduzido grupo de plantas bioprodutoras de saponinas. Com base nesse achado foi desenvolvida uma metodologia por CLAE-IES-EM/EM para uma rápida caracterização de saponinas presentes em uma fração obtida a partir de uma metodologia específica de extração de saponinas em *Zornia brasiliensis* que a partir da desreplicação e/ou análises estrutural foram propostas 35 saponinas triterpênicas oleanânicas.

Por fim, esse trabalho contribuiu com o conhecimento químico e farmacológico desta espécie, pois corroborou com bioprodução de compostos fenólicos por *Zornia* através do estudo fitoquímico de *Zornia brasiliensis*, mostrou o potencial citotóxico do zorniosídeo e é o primeiro relato de saponinas em *Zornia*, que é uma classe de metabólitos secundários com relevante importância biológica, farmacêutica, na indústria cosmética e agricultura.

Os resultados desse estudo renderam a publicação de dois artigos em periódicos indexados e com fator de impacto relevante para área de Farmácia, foram estes: o artigo intitulado "*Zornioside, a dihydrochalcone C-glycoside, and other compounds from Zornia brasiliensis*" publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia (APÊNDICE A) e artigo "*Rapid Characterization of Triterpene Saponins from Zornia brasiliensis by HPLC-ESI-MS/MS*" publicado na *Molecules* (APÊNDICE B).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALLARD, P. M.; PÉRESSE, T.; BISSON, J.; GINDRO, K.; MARCOURT, L.; PHAM, V. C.; ROUSSI, F.; LITAUDON M.; WOLFENDER, J. L. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**. v. 88, p. 3317-3323, 2016.

ANDRADE, C.C.N. **Produtos naturais contra o câncer de pâncreas: uma atualização de 2000 a 2018**. 2018. p. 75. / Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia). Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

APROTOSOAIE, A. C.; RAILEANU, E.; ADRIANA, T.; CIONCĂ, O. The polyphenolic content of common Lamiaceae species available as herbal tea products in Romanian pharmacies. **Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalist Din Iasi**, v. 117, n. 1, p. 233–237, 2013.

ARUNKUMAR, R.; NAIR, S. A., SUBRAMONIAM, A. Induction of cell-specific apoptosis and protection of mice from cancer challenge by a steroid positive compound from *Zornia diphylla* (L.) Pers. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v.3, p.233-41, 2012.

ARUNKUMAR, R.; NAIR, S.A.; RAMESHKUMAR, K.B.; SUBRAMONIAM, A.The essential oil constituents of *Zornia diphylla* (L.) Pers, and anti-inflammatory and antimicrobial activities of the oil (Article). **Records of Natural Products**, v. 8, n. 4, p. 385-393, 2014.

ASIF, M.; KHODADADI, E. Medicinal uses and chemistry of flavonoid contents of some common edible tropical plants. **Journal of Paramedical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 119-138, 2013.

AUGUSTIN, J. M., KUZINA, V., ANDERSEN, S. B., BAK, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry** 72, 435–457, 2011.

AYMARD, G. A. *Zornia*. In STEYERMARK, J. A.; BERRY, P. E.; YATSKIEVYCH, K.; HOLST, B. K. (ed). **Flora of the Venezuela Guayana**. Missouri Botanic Garden Press. St. Louis. v. 5, 1999.

AZANI, N., et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **TAXON**. v. 66, p. 44–77, 2017.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v.12, n. 1, p. 43, 2013.

BARBOSA, A. P., SILVA, B. P., PARENTE, J. P. A new complex triterpenoid saponin from *Samanea saman* with haemolytic activity and adjuvant effect. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 626-631, 2012.

BARBOSA, M. R. V.; LIMA, I. B.; LIMA, J. R.; CUNHA, J. P.; AGRA, M. F.; THOMAS, W. W. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n. 3, p. 313-322, 2007.

BATISTA, T. M. **Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* Vog. (Fabaceae).** 2013. p. 36../ Trabalho de conclusão de curso (Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2013.

BAUMANN, E., STOYA, G., VÖLKNER, A., RICHTER, W., LEMKE, C., & LINSS, W. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. **Acta Histochemica**, 102(1), 21-35, 2000.

BECKE A. D., Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A**. v. 38, p. 3098-3100, 1988.

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza online**, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

BERHOW, M. A.; KONG, S. B.; VERMILLION, K. E.; DUVAL, S. M. Complete Quantification of Group A and Group B Soyasaponins in Soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 2035-2044, 2006.

BRAHMACHARI, G.; GHOSH, S.; MONDAL, S.; JASH, S. K.; MANDAL, L. C.; MONDAL, A. Cyclic voltammetric studies with plant extracts of some traditionally used Indian medicinal plants to evaluate their antioxidant potential. **Biochemistry: An Indian Journal**, v. 3, n. 1, p. 32-35, 2009.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL, 2019a. Biodiversidade Brasileira. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidadebrasileira>. Acesso em: 17/11/2019.

BRASIL, 2019b. Biodiversidade Brasileira. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas/caatinga/item/191.html>. Acesso em: 17/11/2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica ; n. 31).

BRASILEIRO, L. A. S. **A 7-metoxiflavona apresenta efeito tocolítico por modulação negativa da via Rho cinase e da calmodulina em ratas**. 2018. p.129 / Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2018.

BROWN, S.A.; SANDHU, N.; HERRMANN, J. Systems biology approaches to adverse drug effects: the example of cardio-oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**. v. 12, n. 12, p. 718–731, 2015.

CABRERA-OROZCO, A., JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C., DÁVILA-ORTIZ, G. Soybean: Non-Nutritional Factors and Their Biological Functionality, **Soybean - Bio-Active Compounds**, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), InTech, 2013.

CALIXTO-CAMPOS, C.; ZARPELON, A. C.; CORRÊA, M. A. B.; CARDOSO, R. D. R.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; CECCHINI, R.; MOREIRA, E. G.; CRESPIGIO, J.; BERNARDY, C. C. F.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR, W. A. The Ehrlich Tumor Induces Pain-Like Behavior in Mice: A Novel Model of Cancer Pain for Pathophysiological Studies and Pharmacological Screening. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

CAO, D.; WANG, Q.; JIN, J.; QIU, M.; ZHOU, L.; ZHOU, X.; LIA, H.; ZHAO, Z. Simultaneous Qualitative and Quantitative Analyses of Triterpenoids in *Ilex pubescens* by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Phytochemical Analysis**. v. 29, p. 168-179, 2017.

CHIAPPETA, A. D. A.; DE MELO, J. F.; Higher Plants with biological activity. Plants of Pernambuco. **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Recife**, v. 11, n.1/2, p. 99-111, 1984.

CHU H.-B., LI, D.M., SHI, B., HUANG, K. X.,; XIN, J. L. Effects of soybean saponin on NOX4 and p22phox expressions in diabetic rat myocardium tissues and its protective effect on myocardium. **Journal of Jilin University Medicine**, 39, 251–254, 2013.

CINATL, J., MORGENSTERN, B., BAUER, G., CHANDRA, P., RABENAU, H., DOERR, H.W. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS associated coronavirus. **The Lancet**, 361, 2045–2046, 2003.

COLEMAN, J.J., OKOLI, I., TEGOS, G.P., HOLSON, E.B., WAGNER, F.F., HAMBLIN, M.R., MYLONAKIS, E. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. **ACS Chemical Biology**, 5, 321–332, 2010.

CORDEIRO, M. L. S. **Caracterização fitoquímica e avaliação do efeito antioxidante e citotóxico de extratos das folhas de imburana de espinho (*Commiphora leptophloeos*) (Mart.)J.B. Gillett (Burseraceae)**. 2018. 84 p. / Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

COSTA, E. V.; MENEZES, L. R. A.; ROCHA, S. L. A.; BALIZA, I. R. S.; DIAS, R. B.; ROCHA, C. A. G.; SOARES, M. B. P.; BEZERRA, D. P.. Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 81, n.07, p. 563-567, 2015.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**. v. 77, n. 3, p. 703-723, 2014.

DA SILVA, A. D. S.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; DA MATTA, C. B. B.; DE FARIAS SILVA, D.; DE ARAÚJO, M. V.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, M. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1695-1699, 2013.

DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidante and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.

DE GEYTER, E., SWEVER, L., SOIN, T., GEELEN, D., & SMAGGHE, G. Saponins do not affect the ecdysteroid receptor complex but cause membrane permeation in insect culture cell lines. **Journal of Insect Physiology**, 58(1), 18-23, 2012.

DE LEO, M., DE TOMMASI, N., SANOGO, R., D'ANGELO, V., GERMANÒ, M.P., BISIGNANO, G., BRACA, A. Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. **Phytochemistry**, 67, 2623–2629, 2006.

DEWAR, M.J.S.E., ZOEBISCH, G., HEALY, E.F., STEWART, J.J.P., AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**. v. 107, p. 3902-3909, 1985.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products : a biosynthetic approach** / Paul M. Dewick. – 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd. 2009.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**. v. 2, p. 303-336, 2012.

DO NASCIMENTO, S. C.; DE MELO, J. F.; CHIAPPETA, A. D. A. Cytotoxic agentes. Experiments with KB cells. **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Recife**, v. 22, n. 1/2, p. 19-26, 1985.

DUARTE, J. L.; MOTA, L. J. T.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica das folhas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Ipê Amarelo). **Estação Científica (UNIFAP)**. V. 04, p. 33-43, 2014.

FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C.; SANTOS, N. S. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista Agro@mbiente**, v. 2, p. 57-60, 2008.

FIGUEIREDO, I. A. D.; FERREIRA, S. R. S.; SILVA, M. S.; CAVALCANTE, F. A. Atividade vasorrelaxante da 5,7-dimetoxiflavona isolada de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) e outros mecanismos de ação em aorta de rato. In: ONE, G. M. C.; PORTO, M. L. S. (Org.). **Farmácia Interativa**. João Pessoa: IMEA, 2018. p. 163-185.

FIRMINO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO-SANTOS, M.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**. v. 18, p. 90-95, 2011.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 17 Nov. 2019.

FORTUNA-PEREZ, A. P.; LEWIS, G. P.; QUEIROZ, R. T.; SANTOS-SILVA J.; TOZZI, A. M. G. A.; RODRIGUES, K. F. Fruit as diagnostic characteristic to recognize Brazilian species of *Zornia* (Leguminosae, Papilionoideae). **Phytotaxa**, v.219, n. 1, p.027–042, 2015.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO JÚNIOR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; LUGHADHA, E. N.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, S. de; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. **Síntese da diversidade brasileira**. In: FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CARVALHO JÚNIOR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. (Ed.). Catálogo de plantas e fungos do Brasil Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1 p. 21-42, 2010.

GE, Y. W.; ZHU, S.; YOSHIMATSU K.; KOMATSU, K. MS/MS similarity networking accelerated target profiling of triterpene saponins in *Eleutherococcus senticosus* leaves. **Food Chemistry**. v. 227, p. 444–452, 2017.

GEVRENOVA, R.; BARDAROV, V.; BARDAROV, K.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKOD, L.; HENRYE, M. Selective Profiling of Saponins from *Gypsophila trichotoma* Wend. By HILIC separation and HRMS Detection. **Phytochemical Analysis**. V. 29, p. 250-274, 2017.

GOBBO-NETO, L. **Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários *Lychnophora ercoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais**. 2007. p. 254. / Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Produtos Naturais e Sintéticos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007

GOMES, J. V. D.; FAITANIN, R. D.; BRASILEIRO, B. G.; SILVEIRA, D.; JAMAL, C. M. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades trombolítica e citotóxica de *Cecropia hololeuca* Miq. (Urticaceae), *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson (Verbenaceae) e *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (Rutaceae). **Infarma- Ciências Farmacêuticas**. v. 28, p. 10-15, 2016.

Gomes, S. V. F. **Desenvolvimento de método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para diferenciação de genótipos de *Lippia gracilis* Schauer.** 2009. p. 139. / Dissertação (Mestrado em Química) – Núcleo de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2009.

GREETHA, K. M.; SHILPA, S.; MURUGAN, V. Anticonvulsant Activity of the Methanolic Extract of Whole Plant of *Zornia diphylla* (Linn) Pers. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 7, p. 3670-3672, 2012.

HALGREN, T. A.; Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, p. 490-519, 1996.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HUHMANN, D. V.; SUMNER, L. W. Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. **Phytochemistry**. v. 59, p. 347–360, 2002.

JIN, M.; YANG, Y.; SU, B.; REN, Q. Rapid quantification and characterization of soyasaponins by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1108, p. 31-37, 2006.

KENJI, O., MATSUDA, H., MURAKAMI, T., KATAYAMA, S., OHGITANI, T., & YOSHIKAWA, M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. **Biological Chemistry**, 381(1), 67-74, 2000.

KLOOS, H.; THIONGO, F. W.; OUMA, J. H.; BUTTERWORTH, A. E. Preliminary evaluation of some wild and cultivated plants for snail control in machakos district, Kenya. **Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 197-204, 1987.

LACERDA, G. E. **Composição química, fitoquímica e dosagem de metais pesados das cascas das folhas secas e do gel liofilizado de *Aloe vera* cultivadas em hortas comunitárias da cidade de Palmas, Tocantins.** 2016. 51 p. / Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências da Saúde) Pós-graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2016.

LAXANE, S .N.; SWARNKAR, S. K., SETTY, M. M. Antioxidant studies on the ethanolic extract of *Zornia gibbosa*. **Pharmacologyonline**, v.1, p. 319-330, 2008.

LAXANE, S. N.; SWARNKAR, S. K.; ZANWAR, S. B.; MANJUNATH SETTY, M. Anti-inflammatory studies of the alcoholic extract of *Zornia gibbosa*. **Pharmacology online**, v. 1, p. 67-76, 2011.

LEUNER, O.; HAVLIK, J.; PROKUDINA, J. H. E.; NOVY, P.; KOKOSKA, L. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 92, n. 15, 2012.

LI, J.W.H.; VEDERAS, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**. v. 325, p. 161-165, 2009.

LIMA, H. C. **Leguminosas arbóreas da mata atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florística em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. 2000. p. 151 / Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2000.

LING, Y.; LIN, Z.; ZHA, W.; LIAN, T.; YOU, S. Rapid Detection and Characterisation of Triterpene Saponins from the Root of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel by HPLC-ESI-QTOFMS/MS. **Phytochemical Analysis**. v. 27, p. 174-183, 2016.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A. S. Flavonoides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 17, p. 18-22, 2000.

LOPES-NETO, J. J. **Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos de sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd (Polygonaceae)**. 2017. p. 95. / Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

MARQUES, J. P.; LOPES, G. C. Alcaloides como agentes antitumorais: considerações químicas e biológicas. **Revista Uningá Review**. v. 24, p. 56-61, 2015.

MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, v. 66, n. 20, p. 2399-407, 2005.

MARTINS, C. M. **Prospecção fitoquímica e caracterização dos compostos bioativos de *Inga laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae)**. 2017. 293 p. / Tese (Doutorado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

MENEZES-FILHO, A. C. P.; CASTRO, C. F. S. Classes fitoquímicas de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de espécies do cerrado brasileiro. **REVISTA SAÚDE & CIÊNCIA ONLINE**. v. 8, p. 45-61, 2019.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v. 48, n. 3, p. 577-99, 2000.

METROPOLIS N., ULAM S., 1 The Monte Carlo method. **Journal of the American Statistical Association**. v. 44, p. 335-34, 1949.

MINGUZZI, S.; BARATA, L. E. S.; CORDELL, G. A.. Derivados citotóxicos de vitanolidos isolados das folhas de *Acnistus arborescens*. **Química Nova** [online], v. 34, p. 237-241, 2011.

MIOTTO, S. T. S., LÜDTKE, R.; OLIVEIRA, M. L. A. A. A família Leguminosae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 3, p. 269-290, jul./set., 2008.

MIRANDA, M.A. ***Solanum cernuum*: estudo fitoquímico, avaliações das atividades gastroprotetoras, antimicrobiana, citotóxica e obtenção do extrato seco por spray dryer**. 2015. p. 54. / Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

MOHLENBROCK, R.H. A monograph of the leguminous genus *Zornia*. **Webbia**, v. 16, p. 1-141, 1961.

MUSENDE, A.G., EBERDING, A., WOOD, C., ADOMAT, H., FAZLI, L., HURTADO-COLL, A., JIA, W., BALLY, M.B., GUNS, E.T. Pre-clinical evaluation of Rh2 in PC-3 human xenograft model for prostate cancer in vivo: formulation, pharmacokinetics, biodistribution and efficacy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 64, 1085–1095, 2009.

NASCIMENTO, K. S. **Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e propriedades físico-químicas de méis de *Apis mellifera* do estado do Rio Grande de Sul**. 2016b. p. 82. / (Mestrado em Ciência do Alimento) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016b.

NASCIMENTO, Y. M. **Estudo fitoquímico e atividade antioxidante de *Zornia brasiliensis***. 2016a. p. 114. / Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2016.

NEGRI, G.; TABACH, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 23, p. 851-860, 2013.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Marine-Sourced Anti-Cancer and Cancer Pain Control Agents in Clinical and Late Preclinical Development. **Marine drugs**. v. 12, n. 1, p. 255-278, 2014.

OBI, C. L.; RAMALIVHANA, J.; SAMIE, A.; IGUMBOR, E. O. Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in-vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolated from stool samples of patients in the venda region of South Africa. **Journal Health Population Nutrition**, v, 25, n. 4, p. 428-235, 2007.

O'BOYLE, N. M., TENDERHOLT, A.L., LANGNER, K.M., CCLIB: a library for package-independent computational chemistry algorithms. **Journal of Computational Chemistry**. v. 29, p. 839-845, 2008.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis melífera***. 2007. p. 104. / Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, R. R. B.; GÓIS, R. M. O.; SIQUEIRA, R. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; OLIVEIRA, V. R.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n.3. João Pessoa, 2009.

PARRA, L. L. L. **Uso de Desreplicação por HPLC-UV-MS para a descoberta de metabólitos bioativos de invertebrados marinhos**. 2016. p. 107. / Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biologia) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

PAULA, J. A. M.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D. Estudo farmacognóstico das folhas de Pimenta *pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum – Myrtaceae. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.18, p. 265-278, 2008.

PEREZ, A. P. F. **O gênero *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae): Revisão taxonômica das espécies ocorrentes no Brasil e filogenia**. 2009. p. 271 / Tese (Doutorado em Biologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2009.

PERRET, C.; WOLFENDER, J.-L.; HOSTETTMANN, K. LC/ES-MS Analysis of Triterpene Glycosides: Rapid Estimation of the Saponin Content of Dried Berries of *Phytolacca dodecandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 10, p. 272–278, 1999.

PODOLAK, I., GALANTY, A., SOBOLEWSK, D. Saponins as cytotoxic agents: a review. **Phytochemistry Reviews**, 9, 425-474, 2010.

POLLIER, J.; MORREEL, K.; GEELLEN, D.; GOOSSENS, A. Metabolite Profiling of Triterpene Saponins in *Medicago truncatula* Hairy Roots by Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1462–1476, 2011.

RATTANATHONGKOM, A., LEE, J.B., HAYASHI, K., SRIPANIDKULCHAI, B.-O., KANCHANAPOOM, T., HAYASHI, T. Evaluation of Chikusetsusaponin IV a isolated from *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. **Planta Medica**, 75, 829–835, 2009.

REN, F. Z.; GAO, Y. Q.; CHENG, X. X.; LI, L. H.; CHEN, S. H.; ZHANG, Y. L. Study on Chemical Constituents of *Zornia diphylla*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 03, 2012.

ROJAS, A.; BAH, M.; ROJAS, J. I.; SERRANO, V.; PACHECO, S. Spasmolytic activity of some plants used by the otomi indians of queretaro (Mexico) for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine**, v. 6, n. 5, p. 367-371, 1999.

SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S.S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, p. 421-427, 2014.

SANDHAR, H.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 25–41, 2011.

SCHAFRANSKI, K. **Extração e caracterização de compostos fenólicos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) e encapsulamento em esferas de alginato**. 2019. p. 100. / Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

SCIAMARELLI, A. ***Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae – Papilionoideae – Aeschynomeneae) no estado de São Paulo**. 1994. / Dissertação (Mestrado em

Biologia Vegetal) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

SCIAMARELLI, A.; TOZZI, A. M. G. A. *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae – Papilionoideae – Aeschynomeneae) no estado de São Paulo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, p. 237-266, 1996.

SHI, J., ARUNASALAM, K., YEUNG D., KAKUDA Y., MITTAL G., JIANG Y. Saponins from edible legumes: Chemistry processing and health benefits. **Journal of Medicinal Food**, 7, 67–78, 2004.

SILVA, A. D. S. **Flavonoides de *Zornia brasiliensis* e atividade antinociceptiva da 7-metoxiflavona**. 2013. p. 151. / Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2013.

SILVA, C.L.; SILVA K.G.S.; FEITOSA A. C. S. A expansão do diabetes e o uso de fitoterápicos extraído das plantas do gênero *Bauhinia*. **Revista Digital de Pesquisa CONQUER da Faculdade São Francisco de Barreiras**, v.3, 2008.

SILVA, F. A.; BIZERRA, A. M. C.; FERNANDES, P. R. D. Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de *Bixa orellana* L (urucum). **Holos**, v. 02, p. 484-498, 2018.

SILVA, R. M. **Estudo farmacognóstico, prospecção fitoquímica e composição química do óleo essencial das folhas de *Bryophyllum calycinum* Salisb (Crassulaceae)**. 2015. 58 p. / Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) Pós-graduação em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente da UniEVANGÉLICA, Anápolis, 2015.

SIMÕES, C.M.O. [et al] (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS Editora, 2007.

SIMÕES, R. C.; ALMEIDA, S. S. M. S. Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae). **Biota Amazônia Macapá**, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2015.

SOUHO, T.; LAMBONI, L.; XIAO, L.; YANG, G. Cancer hallmarks and malignancy features: Gateway for improved targeted drug delivery. **Biotechnology advances**. v. 36, n. 7, p. 1928-1945, 2018.

SOUZA, M. V. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

SULTANA, N., ATA, A. Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 23, p. 739–756, 2008.

SUN, H.-X., XIE, Y., YE, Y.-P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine** v. 27, p. 1787–1796, 2009.

SUN, S.-X., LI, Y.-M., FANG, W.-R., CHENG, P., LIU, L., LI, F. Effect and mechanism of AR-6 in experimental rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Medicine**. v. 10, p. 113–121, 2010.

SZAKIEL, A., PACZKOWSKI, C., HENRY, M., in press. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. **Phytochemistry. Reviews**. v. 10, p. 471–491, 2011.

TAPONDJOU, L.A., PONOU, K.B., TEPONNO, R.B., MBIANTCHA, M., DJOUKENG, J.D., NGUELEFACK, T.B., WATCHO, P., CADENAS, A.G., PARK, H.J. In vivo antiinflammatory effect of a new steroidal saponin, mannioside A, and its derivatives isolated from *Dracaena mannii*. **Archives of Pharmacal Research**. v. 31, p. 653–658, 2008.

THAKUR, M., MELZIG, M. F., FUCHS, H. Weng, A. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. **Botanics: Targets and Therapy**. v. 1, p. 19-29, 2011.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**. v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TUCKER, S. C. Floral Development in Legumes. **Plant Physiology**, v.131. p. 911–926, 2003.

VEGGI, P. C. **Obtenção de compostos fenólicos de plantas brasileiras via tecnologia supercrítica utilizando cossolventes e extração assistida por ultrassom**. 2013. p. 200. / Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

VEREECKEN L., PIERLOOT K., PEETERS J., B3LYP-DFT characterization of the potential energy surface of the CH(X (2)Pi)+C2H2 reaction. **Journal of Chemical Physics**. v. 108, p. 1068-1080, 1998.

VIANA, A.R.; MARZARI, J.; WERGUTZ, J.; KRAUSE, L.M.F. Produtos bioativos na prevenção e no tratamento do câncer, em especial o melanoma. **Disciplinarum Scientia| Saúde**. v. 18, n. 3, p. 511-528, 2017.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; WATROUS, J.; KAPONO, C. A.; LUZZATTO-KNAAN, T.; PORTO, C.; BOUSLIMANI, A.; MELNIK, A. V.; MEEHAN, M. J.; LIU, W.-T.; CRÜSEMANN, M.; BOUDREAU, P. D.; ESQUENAZI, E.; SANDOVAL-CALDERÓN, M.; KERSTEN, R. D.; PACE, L. A.; QUINN, R. A.; DUNCAN, K. R.; HSU, C.-C.; FLOROS, D. J.; GAVILAN, R. G.; KLEIGREWE, K.; NORTEN, T.; DUTTON, R. J.; PARROT, D.; CARLSON, E. E.; AIGLE, B.; MICHELSEN, C. F.; JELSBK, L.; SOHLENKAMP, C.; PEVZNER, P.; EDLUND, A.; MCLEAN, J.; PIEL, J.; MURPHY, B. T.; GERWICK, L.; LIAW, C.-C.; YANG, Y.-L.; HUMPF, H.-U.; MAANSSON, M.; KEYZERS, R. A.; SIMS, A. C.; JOHNSON, A. R.; SIDEBOTTOM, A. M.; SEDIO, B. E.; KLITGAARD, A.; LARSON, C. B.; BOYA P, C. A.; TORRES-MENDOZA, D.; GONZALEZ, D. J.; SILVA, D. B.; MARQUES, L. M.; DEMARQUE, D. P.; POCIUTE, E.; ' , E. C.; BRIAND, E.; HELFRICH, E. J. N.; GRANATOSKY, E. A.; GLUKHOV, E.; RYFFEL, F.; HOUSON, H.; MOHIMANI, H.; KHARBUSH, J. J.; ZENG, Y.; VORHOLT, J. A.; KURITA, K. L.; CHARUSANTI, P.; MCPHAIL, K. L.; NIELSEN, K. F.; VUONG, L.; ELFEKI, M.; TRAXLER, M. F.; ENGINE, N.; KOYAMA, N.; VINING, O. B.; BARIC, R.; SILVA, R. R.; MASCUCH, S. J.; TOMASI, S.; JENKINS, S.; MACHERLA, V.; HOFFMAN, T.; AGARWAL, V.; WILLIAMS, P. G.; DAI, J.; NEUPANE, R.; GURR, J.; RODRÍGUEZ, A. M. C.; LAMSA, A.; ZHANG, C.; DORRESTEIN, K.; DUGGAN, B. M.; ALMALITI, J.; ALLARD, P.-M.; PHAPALE, P.; NOTHIAS, L.-F.; ALEXANDROV, T.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J.-L.; KYLE, J. E.; METZ, T. O.; PEREYEA, T.; NGUYEN, D.-T.; VANLEER, D.; SHINN, P.; JADHAV, A.; MÜLLER, R.; WATERS, K. M.; SHI, W.; LIU, X.; ZHANG, L.; KNIGHT, R.; JENSEN, P. R.; PALSSON, B.; POGLIANO, K.; LININGTON, R. G.; GUTIÉRREZ, M.; LOPES, N. P.; GERWICK, W. H.; MOORE, B. S.; DORRESTEIN, P. C.; BANDEIRA, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**. v. 34, p. 828–837, 2016.

YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X.; BOUDREAU, P. D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; DE FELICIO, R.; FENNER, A.; WONG, W. R.; LININGTON, R. G.; ZHANG, L.; DEBONSI, H. M.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. C. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**. v. 76, p. 1686-1699, 2013.

ZHANG, J.-D., CAO, Y.-B., XU, Z., SUN, H.-H., AN, M.-M., YAN, L., CHEN, H.-S., GAO, P.-H., WANG, Y., JIA, X.-M., JIANG, Y.-Y. In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 28, p. 2211–2215, 2005.

ZHANG, W.; POPOVICH, D.G. Chemical and Biological Characterization of Oleanane Triterpenoids from Soy. **Molecules**. v. 14, p. 2959-2975, 2009.

ZHAO, Y.-L., CAI, G.-M., HONG, X., SHAN, L.-M., XIAO, X.-H. Anti-hepatitis B virus activities of triterpenoid saponin compound from *Potentilla anserina* L. **Phytomedicine**. v. 15, p. 253–258, 2008.

ZHOU, X.; WANG, J. L.; SONG, LU J. Y. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. **Cell**, v. 142, n. 4, p. 531-543, 2010

A

APÊNDICE – Artigo
publicado na Revista Brasileira
de Farmacognosia



Brazilian Journal of Pharmacognosy

REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA



Original Article

Zornioside, a dihydrochalcone C-glycoside, and other compounds from *Zornia brasiliensis*

Yuri M. Nascimento^a, Lucas S. Abreu^a, Ramon L. Lima^b, Anne Dayse S. Silva^c,
Vicente Carlos O. Costa^a, José Iranildo M. Melo^d, Marcus Tullius Scotti^a, Marianna V. Sobral^a,
Silvany S. Araujo^e, Manoel Adrião G. Filho^e, Marcelo S. Silva^a, Josean F. Tavares^{a,*}

^a Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^b Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, Departamento de Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

^d Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brazil

^e Laboratório de Fisiologia Animal e Molecular Aplicada, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2017

Accepted 9 February 2018

Available online 15 March 2018

Keywords:

Phenolic

compounds

Dihydrochalcone

Pterocarpin

Isoflavonoid

Glycosylated megastigmane

Cytotoxic activity

ABSTRACT

The secondary metabolites of the aerial parts of *Zornia brasiliensis* Vogel, Fabaceae, and the biological activity of one of these secondary metabolites were characterized in this study. A phytochemical investigation was performed using chromatographic techniques including analytical and preparative reverse-phase HPLC column sequences, which resulted in the isolation of fourteen compounds: one previously undescribed C-glycosylated dihydrochalcone (zornioside), one cyclitol (D-pinitol), one glycosylated megastigmane (roseoside) and eleven phenolic compounds: 7-methoxyflavanone, 7,4'-dimethoxyisoflavone, medicarpin, 2'-4'-dihydroxychalcone, ononin, isoorientin-3'-O-methyl ether, isovitexin, glycosylated (Z)-O-coumaric acid, glycosylated (E)-O-coumaric acid, dihydromelilotoside, and isoorientin. The structures of the isolated compounds were determined based on 1D and 2D-NMR, HRES-IMS, IR and CD spectroscopic analyses. The cytotoxic activity of zornioside was assessed against tumor cell lines (MCF-7, HCC1954, T-47D, 4T1, HL60), and a non-tumor cell line (RAW264.7) using MTT assay. The compound zornioside was selectively cytotoxic for HL60 leukemia cells (IC₅₀: 37.26 μM).

© 2018 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

The genus *Zornia*, Fabaceae, has about eighty species distributed in the world (Sciamarelli and Tozzi, 1996), 36 species are in the Brazilian territory, among which, fifteen species are endemic (Perez, 2009). Some specimens of *Zornia* have already been studied for their pharmacological activity: relaxing on smooth muscle, cytotoxic activity, anticonvulsant activity, antioxidant potential, anti-inflammatory and antibacterial and antitumor (Rojas et al., 1999; Brahmachari et al., 2009; Arunkumar et al., 2012; Belcavello et al., 2012; Greetha et al., 2012; Arunkumar et al., 2014). Previous phytochemical studies of the genus *Zornia* demonstrated the presence of several isoflavones (Ren et al., 2012; Leuner et al., 2013).

The species *Zornia brasiliensis* Vogel is commonly known as “urinária”, “urinana” and “carrapicho” in Brazil, and it is typi-

cally used as a diuretic and for the treatment of venereal diseases (Agra et al., 2007). *Z. brasiliensis* is distributed in the North, Northeast, Midwest, and Southeastern regions from Brazil associated to the Amazonian, Caatinga, Cerrado, and Atlantic Rain Forest phytogeographical domains (BFG, 2015), but mainly in the Brazilian Northeast (Mohlenbrock, 1961), and Venezuela (Missouri Botanical Garden, 2017). Three flavones have been isolated from the aerial parts of this species, and one of these, 7-methoxyflavone, demonstrated antinociceptive effects (Silva et al., 2013). A previous study of *Z. brasiliensis* revealed the chemical composition and antitumor activity of the essential oil of its leaves (Costa et al., 2015). In this article, we report the results of the phytochemical study of the crude ethanolic extract of *Z. brasiliensis*. Fourteen compounds were isolated and identified, all reported for the first time in this species. Among these compounds, a dihydrochalcone, zornioside (1), was isolated and identified for the first time. The other known compounds were identified by comparing their spectroscopic data with data reported in the literature.

* Corresponding author.

E-mail: josean@lft.ufpb.br (J.F. Tavares).

Materials and methods

General experimental procedures

For semi-preparative HPLC, a SHIMADZU 10AVP Series system was used with a SPD-M10AVP detector, two LC-6AD pumps and a Rheodyne injector with a SCL-10A VP interface. A Shimadzu Shim-Pack C18 (250 mm 10 mm and 5 μ m particle size) column was used. Analytical chromatographic analyses were performed using a Shimadzu Prominence HPLC system equipped with a LC-20AT binary solvent pump, an SIL-20A autoinjector, a DGU-20A degassing system, a SPD-M20A diode array detector and a CBM-20A system controller. The column used was a Phenomenex Gemini[®] C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm ID filled with 5- μ m particles) with a SecurityGuard Gemini[®] C18 (4 mm 3.0 mm ID filled with 5- μ m particles) pre-column. Preparative chromatographic analyses were performed using a Shimadzu HPLC system equipped with a LC-6AD binary solvent pump, a Rheodyne injector, a SPD-M10A diode array detector and a SCL-10A system controller. The column used was an ACE C18 (250 mm 21.2 mm and 5 μ m particle size). The organic solvents used were acetonitrile and methanol, both HPLC grade (TEDIA[®], Brazil), and ultrapure water obtained with a Milli-Q purification system (Millipore[®]). The NMR analyses were performed on a 500 MHz Varian NMR spectrometer operating at 500 MHz for ¹H NMR and 125 MHz for ¹³C NMR, on a 200 MHz Varian Mercury NMR spectrometer operating at 200 MHz for ¹H NMR and 50 MHz for ¹³C NMR and on a Bruker Ascend 400 spectrometer operating at 400 MHz for ¹H NMR and 100 MHz for ¹³C NMR. Deuterated chloroform (CDCl₃), deuterated acetone (CD₃COCD₃), deuterated methanol (CD₃OD) and deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*₆) (all from Cambridge Isotope Laboratories) containing TMS as an internal standard were used.

To obtain mass spectra, low and high resolution Bruker mass spectrometers, model Ion Trap-amaZonX and model micrOTOF II, respectively, were used in electrospray ionization positive (ESI⁺) or negative (ESI⁻) modes. Samples were diluted in a water:acetonitrile or water:methanol solution (Milli-Q Millipore[®]/Tedea[®], Brazil). For CD assays, a Jasco J-815 UV-Visible absorbance spectropolarimeter was used. Infrared analyses were obtained in the 4000–400 cm⁻¹ region using a Shimadzu IRPrestige-21 spectrophotometer with 1 mg of sample in potassium bromide (KBr) tablets and frequency measured in cm⁻¹.

Plant material

parts) was collected in the municipality of Serra Branca (07 29 46 S and 36 44'36"W, altitude: reaching 712 m elevation), Paraíba state, Brazil, in March 2016. Collection authorization: N. 53894-1, granted by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade through the Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade. This material was identified by the botanist Dr. José Iranildo Miranda de Melo from the Universidade Estadual da Paraíba. An exsiccata is deposited at the Herbarium Arruda Câmara, Campus I of the, Universidade Estadual da Paraíba, under code 1862.

Extraction and isolation

The aerial parts of *Z. brasiliensis* (5 kg) were extracted by maceration with 95% ethanol at room temperature to obtain the crude ethanol extract (CEE). An aliquot of the CCE was subjected to a liquid vacuum chromatography with silica deactivated using as eluent the solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethyl acetate-methanol (9:1, v/v) and ethyl acetate-methanol (1:1, v/v). After fractionation,

The plant material of *Zornia brasiliensis* Vogel, Fabaceae (aerial process were concentrated in rotary evaporator, obtaining the respective fractions (Silva et al., 2013).

The dichloromethane fraction (10 g) was subjected to column chromatography (CC) using silica gel (ART 7734, MERCK, 0.060–0.200 mm and 70–230 mesh ASTM) as the stationary phase and hexane, ethyl acetate and methanol, either pure or in binary mixtures, as eluents in increasing order of polarity (collected a total of thirty fractions with 100 ml each). Fr 13 (hexane:ethyl acetate: 9:1, v/v) was subjected to preparative HPLC using an isocratic system of water and acetonitrile (55:45), thus obtaining substance 2 (*R*_T 45 min, 30 mg). Fr 25 and 26 (hexane:ethyl acetate: 8:2, v/v) were pooled and subjected to preparative HPLC under the same conditions, obtaining substance 3 (*R*_T 36.6 min, 35 mg).

The ethyl acetate fraction (10 g) was subjected to CC under conditions analogous to those described previously for the dichloromethane fraction (collected a total of fifty fractions with 100 ml each). Fractions 25–29 (hexane:ethyl acetate: 8.5:1.5, v/v) were subjected to CC using the same conditions indicated for the dichloromethane fraction, yielding 59 fractions of 50 ml each, and fractions 11–16 (hexane:ethyl acetate: 95:5, v/v) were pooled on a preparative plate and eluted in a hexane-ethyl acetate (80:20, v/v) system five times. The presence of three stains with different retention factors was observed under ultraviolet light. The stain with the highest retention factor was separated from the other stains and filtered in an ethyl acetate-methanol (80:20, v/v) system using a porous funnel. The fraction obtained from the filtration was subjected to semi-preparative HPLC using an isocratic system of water and acetonitrile (38:62, v/v), thus obtaining substances 4 (*R*_T 17.3 min, 31 mg) and 5 (*R*_T 22.6 min, 27 mg).

An aliquot of the ethyl acetate-methanol (9:1, v/v) fraction (3 g) was subjected to CC using Sephadex[®] LH-20 (GE Healthcare) as stationary phase and pure methanol as a mobile phase (yielding 29 fractions). Fractions 9–16 were subjected to a new CC using Sephadex[®] LH-20 (GE Healthcare) and methanol as the mobile phase. Thus, 9 were obtained, while fractions Fr 2–7 were submitted to a third CC under the same conditions previously described. From this column, 19 fractions were obtained, and fraction 8 generated substance 6 (21.0 mg).

An aliquot of the ethyl acetate-methanol fraction (1:1, v/v) (10 g) was subjected to CC under conditions similar to those described previously for the dichloromethane fraction (collected a total of 21 fractions with 250 ml each). Fractions 8–9 were subjected to preparative HPLC using an isocratic system consisting of water (0.1% and formic acid) and methanol (65:35, v/v) to obtain substances 1 (*R*_T 31.6 min, 22.8 mg), 7 (*R*_T 57.1 min, 33.8 mg), 8 (*R*_T 51 min, 17.3 mg), 9 (*R*_T 13.8 min, 16 mg), 10 (*R*_T 28.5 min, 12.6 mg), 11 (*R*_T 21.8 min, 13.7 mg) and 12 (*R*_T 20.6 min, 19.1 mg). The fraction

the extractive solutions resulting from this 14 was subjected to CC using Sephadex[®] LH-20 (GE Healthcare) and pure methanol (yielding twenty fractions) the fraction 12 obtained from this column resulted in substance 13 (18.5 mg), and the fraction 20 resulted in substance 14 (16 mg). (3S)-1-[(2',4'-dihydroxy-3'-[(2R,3'S,4'S,5'R,6'S)-3",4",5"-trihydroxy-6"-(hydroxymethyl)oxan-2"-yl]]phenyl]-3-hydroxy-3-phenylpropan-1-one (1): yellow oil; IR_{max} 1613, 3434 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data (500 MHz and 125 MHz, respectively, in DMSO-*d*₆), see Table 1; HRESIMS *m/z* 421.1508 [M+H]⁺ (calcd. for C₂₁H₂₅O₉, 421.1493).

Electronic circular dichroism (ECD) calculation

All geometric optimizations and conformational searches were performed using Spartan[®]16 for Windows (Wavefunction, Irvine, CA, USA). The geometry of the chemical structure of the compound was initially optimized with a Merck Molecular Force Field (MMFF) force field (Halgren, 1996) and a new geometric optimization was then performed based on the semi-empirical method, Austin Model

Table 1
¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic data for compound **1**.

No.	δ_C , type	δ_H (J, Hz)	HMBC
1	145.2, C	–	–
2	125.9, CH	7.42, m	4, p
3	128.1, CH	7.33, m	1, 5
4	127.0, CH	7.24, m	2
5	128.1, CH	7.33, m	1, 2
6	125.1, CH	7.42, m	4, p
1'	112.5, C	–	–
2'	132.8, CH	7.77, d (8.8)	6', 4', C=O
3'	108.1, CH	6.40, d (8.8)	4', 5', 1'
4'	164.2, C	–	–
5'	112.7, C	–	–
6'	164.1, C	–	–
a	47.1, CH ₂	3.09, dd (4.4, 14.8) 3.32, m	p, C=O 1
p	70.2, CH	5.12, dd (4.4, 8.8)	a, 1 2
C=O	202.8, C	–	–
1''	73.2, CH	4.61, d (10.0)	5', 2', 6', 4', 5', 3'
2''	70.5, CH	4.01, t (8.8)	1', 3'
3''	79.0, CH	3.19, m	–
4''	69.7, CH	3.19, m	2''
5''	81.5, CH	3.19, m	–
6''	61.4, CH ₂	3.66, dd (1.2, 11.2)	–

1 (AM1) (Dewar et al., 1985). A systematic search method was used which analyzed conformers and selected the conformers with the lowest minimum energy using AM1 and a Monte-Carlo algorithm (Metropolis and Ulam, 1949). After that, the lowest minimum energies were selected and optimized based on a vibrational mode calculation using DFT (density functional theory) (Becke, 1988). DFT calculations were performed using Spartan 16 (Wavefunction, Irvine, CA, USA; Vereecken et al., 1998). Each structure was examined at the B3LYP/6-311G* level and the lowest energy structures were selected for the calculations. The global minimum on the potential energy surface was used for the determination of each geometry. The calculated ECD spectra were obtained by density functional theory (DFT) and time-dependent DFT (TD-DFT) using Gaussian 09 and analyzed using GUIsGaussSum v3.0 (O'Boyle et al., 2008).

Cytotoxicity assay

MTT cell viability assay (Mosmann, 1983) was performed to study the cytotoxic effect of zornoside. MCF-7 (breast adenocarcinoma), HCC1954 (mammary gland carcinoma), T-47D (mammary gland carcinoma), 4T1 (mammary gland carcinoma), HL60 (promyelocytic leukemia), RAW264.7 (macrophage) cells were cultured in a RPMI 1640 or DMEM medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin in humidified air with 5% CO₂ at 37 °C. Briefly, cells were seeded in 96-well plates (100 µl of 2 × 10⁵ cells/ml) and zornoside (0.39–50 µg/ml) dissolved in DMSO:Medium (1:99 v/v; 100 µl) was added to each well and incubated for 72 h. DMSO 1% was used as negative control. MTT was added at a final concentration of 0.5 mg/ml, incubated for 4 h, and then solubilized with 100 µl of DMSO. Formazan production was measured at 570 nm in a plate spectrophotometer.

Results and discussion

Structural elucidation and identification of the isolated compounds (**1–14**)

Compounds **1–14** were isolated from the ethanolic extract of the aerial parts of *Z. brasiliensis* by column chromatography followed by preparative and semi-preparative HPLC. Known substances were determined by comparing their spectroscopic data with those

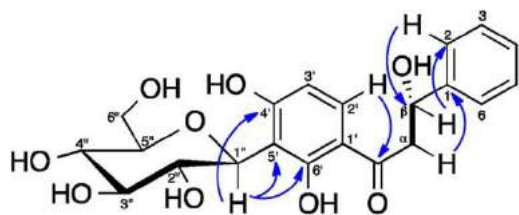


Fig. 1. HMBC correlations (→) and the interaction ¹H-¹H COSY (dark bond) for **1**.

in the literature. The known compounds were identified as 7-methoxyflavanone (**2**) (Kostrzewa-Suslow and Janeczko, 2012), 7,4'-dimethoxysoflavone (**3**) (Veitch et al., 2003), medicarpin (**4**) (Baill et al., 2000), 2'-4'-dihydroxychalcone (**5**) (Mikell and Khan, 2012), onionin (**6**) (Fedoreyev et al., 2008), isoorientin-3'-O-methyl ether (**7**) (Delazar et al., 2006), isovitexin (**8**) (Peng et al., 2005), glycosylated (Z)-O-coumaric acid (**9**) (Canuto et al., 2010), glycosylated (E)-O-coumaric acid (**10**) (Canuto et al., 2010), dihydromelilotoside (**11**) (Taskova et al., 2005; Wu et al., 2002), roseoside (**12**) (Shen and Terazawa, 2001; Rao, 2017), D-pinitol (**13**) (Yu et al., 2005), and isoorientin (**14**) (Huang et al., 2015).

Compound **1** showed a peak at *m/z* 421.1508 [M-H]⁺, as determined by high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HRESIMS), that is compatible with the molecular formula C₂₁H₂₄O₉ (calcd. 421.1493). The ¹H NMR and Heteronuclear Single-Quantum Coherence (HSQC) spectra showed signals of two aromatic rings, one tetra-substituted [δ_H 7.77 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 6.40 (1H, d, *J* = 8.8 Hz)] and another monosubstituted [δ_H 7.42 (2H, m), 7.33 (2H, m), 7.24 (1H, m)], and one carbinolic hydrogen [δ_H 5.12 (1H, dd, *J* = 4.4, 8.8 Hz), ¹³C 70.2 (C-p)] (Table 1). In addition to two non-equivalent methylene hydrogens [δ_H 3.09 (1H, dd, *J* = 4.4, 14.8 Hz), 3.32 (1H, m), δ_C 47.1 (C-a)], the ¹H-¹H COSY (Fig. 1) showed a correlation between the carbinolic and methylenic hydrogens, revealing that these are vicinal, and a Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (HMBC) experiment revealed a correlation between these hydrogens and the carbonyl δ_C 202.8 (C-O)]; however, the only correlation identified was between the carbinolic hydrogen and C-2 (δ_C 125.9). Therefore, this p is the carbonyl (δ_C 202.8), whereas the methylenic hydrogens have a correlation with C-1 (δ_C 145.2), and a is thus the carbonyl (δ_C 202.8).

The carbons at [δ_C 108.1 (C-3'), 112.5 (C-1'), 112.7 (C-5'), 132.8 (C-2'), 164.1 (C-6'), 164.2 (C-4')] confirmed the presence of a tetra-substituted aromatic ring in **1**. In HMBC, another correlation was observed between H-2' [δ_H 7.77 (1H, d, *J* = 8.8), δ_C 132.8] and the carbonyl (δ_C 202.8) confirming that this C-O is bonded to the tetra-substituted aromatic ring. The four carbon signals [δ_C 145.2 (C-1), 125.9 (C-2), 127.0 (C-4) and 128.1 (C-5)], attributed to the existence of six carbons, confirm the presence of a monosubstituted aromatic ring. HMBC showed a correlation of H-2/6 [δ_C 7.42 (2H, m), δ_C 125.9 (C-2/6)] with C-p (δ_C 70.2), confirming the binding of the monosubstituted ring to C-p. The presence of the signal [δ_H 4.16 (1H, d, *J* = 10.0 Hz)] associated with other signals from aliphatic carbinolic hydrogens [δ_H 4.01 (1H, t, *J* = 8.8 Hz), 3.66 (dd, 2H, *J* = 1.2, 11.2 Hz), 3.19–3.10 (3H, m)] revealed the presence of an osidic unit in **1**; however, the absence of the hydrogen and of the anomeric carbon shows that this unit is a C-glycoside. HSQC showed the existence of six carbons correlated with these hydrogens, and the value of the H-1'' coupling constant (*J* = 10.0 Hz) confirms that it is β -glucose. HMBC showed a correlation between H-1'' [δ_H 4.16 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), δ_C 73.6] and [δ_C 112.7 (C-5'), [δ_C 164.2 (C-4')], [δ_C 164.1 (C-6')], thereby confirming the insertion of β -glucose at the 5'-position through a C-C bond. Electronic circular dichroism (ECD) has been used for decades successfully as a powerful tool for the absolute configuration assignment of natural products with various chromophores

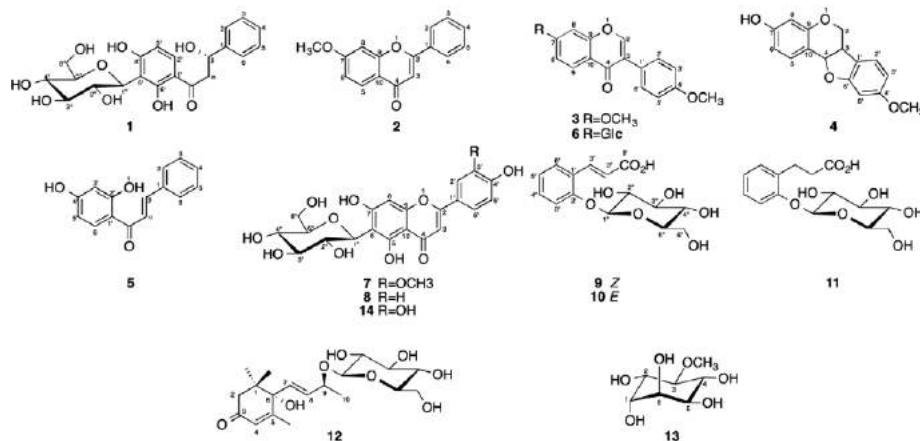


Table 2
Cytotoxic activity against tumor and non-tumor cells of zornioside.

Cell lines	^a IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM) Doxorubicin
MCF-7	76.26 (57.38–101.35)	1.9
T47D	76.09 (53.14–89.76)	1.43
4T1	93.42 (73.90–109.26)	2.0
HCC 1954	81.88 (68.57–97.74)	1.43
HL-60	37.26 (27.28–43.00)	0.3
RAW 264.7	106.92 (96.52–118.78)	2.8

^a Data are presented as IC₅₀ values and 95% confidence intervals obtained by non-linear regression for all cell lines from two independent experiments. Exposure time: 72 h. MCF-7, breast adenocarcinoma; HCC1954, mammary gland carcinoma; T-47D, mammary gland carcinoma; 4T1, mammary gland carcinoma; HL-60, promyelocytic leukemia; RAW264.7, macrophage.

(Slade et al., 2005). The calculated ECD can be used to validate the empirical rules deduced previously, but it is also widely used to aid to determine the absolute configuration of a chiral molecule, comparing the calculated and experimental ECD spectra, the similarity of the spectra is crucial for the absolute configuration assignment. The development of the computational technologies has allowed use some quantum chemical calculations to simulate the ECD spectra (Li et al., 2010). The TD-DFT (Time Dependent Density Functional Theory) has been widely used to aid to determine the absolute configuration of several secondary metabolites (Gan et al., 2009; Kamel et al., 2009; Li et al., 2010). The TD-DFT method was successful in calculating ECD spectra of chiral flavonoids thanks to its feasibility (Ding et al., 2007; Ding et al., 2009).

The TD-DFT calculations of the ECD spectra of the compounds were compared with the experimental. This analysis can be done to determine the absolute configuration of diastereoisomers (Kwit et al., 2009). Then, were made comparisons of simulated ECD spectra were performed for the compounds (βS)-zornioside and (βR)-zornioside. The simulated ECD spectra of the former show no peaks in any wavelength from 800 nm until 200 nm that corroborate with the experimental ECD spectra (Fig. 2) that is different from the simulated spectra of the configuration βR, these results allow to propose the configuration of the isolated dihydrochalcone. Therefore, this is the first report of this dihydrochalcone in the literature.

Cytotoxic activity of zornioside (1)

The results of the cytotoxic activity assay are shown in Table 2. The IC₅₀ (drug concentration at which 50% of the cells are viable relative to the control) values, calculated from the dose-survival curves generated by the MTT assays performed after the zornioside treatment, ranged from 37.26 (27.28–43.00) μM, for HL-60 cells, to 93.42 (73.90–109.26) μM, for 4T1 cells. Then, as can be viewed,

the compound was selectively cytotoxic for HL60 promyelocytic leukemia cells. On non-tumor cell line (macrophage RAW 264.7), zornioside showed weak cytotoxicity, IC₅₀ value of 106.92 (96.52–118.78) μg/ml.

With the exception of compounds 3 and 6, all other compounds are reported for the first time in the genus *Zornia*, the compound 1 being first described in the literature. Compound 1 demonstrated better cytotoxic activity against the HL-60 (37.26 μM) cell line. Thus, the study showed that specie *Z. brasiliensis* is a bioproducer of phenolic compounds and zornioside has cytotoxic potential.

Supplementary materials

Supplementary data (1D and 2D NMR, MS, CD and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic data of compound 1 and 1D NMR spectroscopic data of compounds 2–14).

Ethical disclosures

Protection of human and animal subjects. The authors declare that no experiments were performed on humans or animals for this study.

Confidentiality of data. The authors declare that no patient data appear in this article.

Right to privacy and informed consent. The authors declare that no patient data appear in this article.

Authors' contributions

YMN, LSA, RLL, ADSS and CVOC participated in phytochemical analysis. MSS and JFT participated in interpretation of the NMR spectra. JIMM participated in botanical identification. MTS participated in acquisition and interpretation of computational data. MVS, SSA and MAGF participated in acquisition and interpretation of biological assays.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgment

This study was supported by the Graduate Degree Program in Natural Products and Bioactive Synthetic Compounds and sponsored by CAPES.

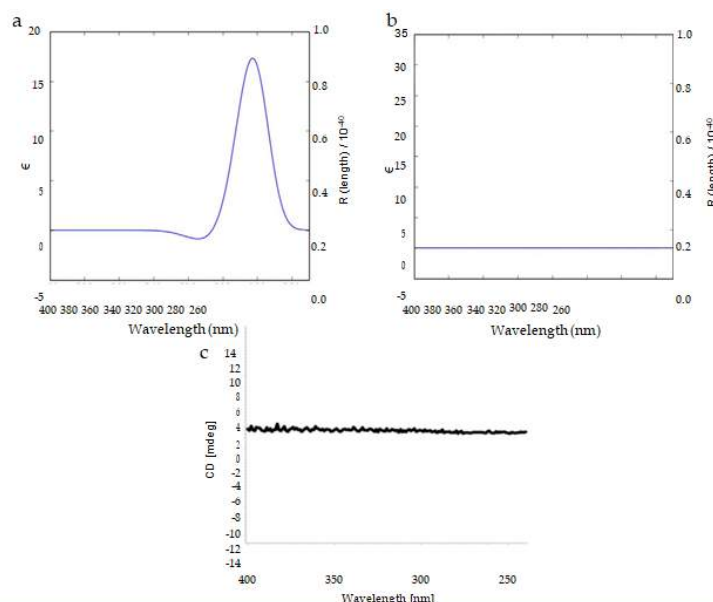


Fig. 2. Comparison of ECD spectra of (βR)-zornoside (a), (βS)-zornoside (b), simulated using Gaussian band shapes ($\sigma = 0.4$ eV), and to the experimental ECD spectrum (c).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bjp.2018.02.003](https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.02.003).

References

- Agra, M.F., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2007. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 114–140.
- Arunkumar, R., Nair, S.A., Subramoniam, A., 2012. Induction of cell-specific apoptosis and protection of mice from cancer challenge by a steroid positive compound from *Zornia diphylla* (L.) Pers. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 3, 233–241.
- Arunkumar, R., Nair, S.A., Rameshkumar, K.B., Subramoniam, A., 2014. The essential oil constituents of *Zornia diphylla* (L.) Pers. and anti-inflammatory and antimicrobial activities of the oil. *Rec. Nat. Prod.* 8, 385–393.
- Baill, J.C.L., Champavier, Y., Chulia, A.J., Habrioux, G., 2000. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3 β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sci.* 66, 1281–1291.
- Becke, A.D., 1988. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A: Gen. Phys.* 38, 3098–3100.
- Belcavello, L., Cunha, M.R.H., Andrade, M.A., Batitucci, M.C.P., 2012. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. *Natureza on line* 1, 140–145.
- BFG - The Brazil Flora Group, 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66, 1085–1113.
- Brahmachari, G., Ghosh, S., Mondal, S., Jash, S.K., Mandal, L.C., Mondal, A., 2009. Cyclic voltammetric studies with plant extracts of some traditionally used Indian medicinal plants to evaluate their antioxidant potential. *BCAJ* 3, 32–35.
- Canuto, K.M., Silveira, E.R., Bezerra, A.M.E., 2010. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith). *Quim. Nova* 33, 662–666.
- Costa, E.V., Menezes, L.R., Rocha, S.L., Baliza, I.R., Dias, R.B., Rocha, C.A., Soares, M.B., Bezerra, D.P., 2015. Antitumor properties of the leaf essential oil of *Zornia brasiliensis*. *Planta Med.* 81, 563–567.
- Delazar, A., Gibbons, S., Kosari, A.R., Nazemiyeh, H., Modarresi, M., Nahar, L., Sarker, S.D., 2006. Flavone C-glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrullus colo-cynthis*. *Daru* 14, 109–114.
- Dewar, M.J.S.E., Zoebisch, G., Healy, E.F., Stewart, J.J.P., 1985. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 3902–3909.
- Ding, Y., Li, X.-C., Ferreira, D., 2007. Theoretical calculation of Electronic Circular Dichroism of the rotationally restricted 3,8'-biflavonoid morelloflavone. *J. Org. Chem.* 72, 9010–9017.
- Ding, Y., Li, X.-C., Ferreira, D., 2009. Theoretical calculation of Electronic Circular Dichroism of a hexahydroxydiphenyl-containing flavanone glycoside. *J. Nat. Prod.* 72, 327–335.
- Fedoreyev, A.S., Bulgakov, V.P., Brishchenko, O.V., Veselova, M.V., Krivoschekova, O.E., Kulesh, N.I., Denisenko, V.A., Tchernoded, G.K., Zhuravlev, Y.N., 2008. Isoflavonoid composition of a callus culture of the relict tree *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7023–7031.
- Gan, L.-S., Zheng, Y.-L., Mo, J.-X., Liu, X., Li, X.-H., Zhou, C.-X., 2009. Sesquiterpene lactones from the root tubers of *Lindera aggregata*. *J. Nat. Prod.* 72, 1497–1501.
- Greetha, K.M., Shilpa, S., Murugan, V., 2012. Anticonvulsant activity of the methanolic extract of whole plant of *Zornia diphylla* (Linn) Pers. *J. Pharm. Res.* 5, 3670–3672.
- Halgren, T.A., 1996. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* 17, 490–519.
- Huang, D., Guo, W., Gao, J., Chen, J., Olatunji, J.O., 2015. *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau ethanol extract inhibits hepatoma in mice through upregulation of the immune response. *Molecules* 20, 17405–17428.
- Kamel, H.N., Ding, Y., Li, X.-C., Ferreira, D., Fronczek, F.R., Slatery, M., 2009. Beyond polymaxenolide: cembrane-africanane terpenoids from the hybrid soft coral *Sinularia maxima* S. *polydactyla*. *J. Nat. Prod.* 72, 900–905.
- Kwit, M., Rozwadowska, M.D., Gawroński, J., Grajewska, A., 2009. Density functional theory calculations of the optical rotation and Electronic Circular Dichroism: the absolute configuration of the highly flexible *trans*-isocytosaxone revised. *J. Org. Chem.* 74, 8051–8063.
- Kostrzewa-Suslow, E., Janeczko, T., 2012. Microbial transformations of 7-hydroxyflavanone. *Sci. World J.*, <http://dx.doi.org/10.1100/2012/254929>.
- Leuner, O., Havlik, J., Hummelova, J., Prokudina, J.H.E., Novy, P., Kokoska, L., 2013. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. *J. Sci. Food Agric.* 93, 575–579.
- Li, X.C., Ferreira, D., Ding, Y.Q., 2010. Determination of absolute configuration of natural products: theoretical calculation of Electronic Circular Dichroism as a tool. *Curr. Org. Chem.* 14, 1678–1697.
- Metropolis, N., Ulam, S., 1949. The Monte Carlo method. *J. Am. Stat. Assoc.* 44, 335–341.
- Mikell, J.R., Khan, I.A., 2012. Bioconversion of 7-hydroxyflavanone: isolation, characterization and bioactivity evaluation of twenty-one phase I and phase II microbial metabolites. *Chem. Pharm. Bull.* 60, 1139–1145.
- Missouri Botanical Garden, 2017. <http://www.tropicos.org/Name/13035232> (accessed 06.10.17).
- Mohlenbrock, R.H., 1961. A monograph of the leguminous genus *Zornia*. *Webbia* 16, 1–141.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- O'Boyle, N.M., Tenderholt, A.L., Langner, K.M., 2008. Cclib: a library for package-independent computational chemistry algorithms. *J. Comp. Chem.* 29, 839–845.
- Peng, J., Fan, G., Hong, Z., Chai, Y., Wu, Y., 2005. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1074, 111–115.
- Perez, A.P.F., Thesis (PhD in Plant Biology) 2009. O gênero *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergiaceae): Revisão taxonômica das espécies

ocorrentes no Brasil e filogenia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, pp. 271.

Rao, S.A., 2017. Isolation, absolute configuration and bioactivities of megastigmanes or C¹³ isonorterpinoides. *Chem. Int.* 3, 69–91.

Ren, F.Z., Gao, Y.Q., Cheng, X.X., Li, L.H., Chen, S.H., Zhang, Y.L., 2012. Study on chemical constituents of *Zornia diphylla*. *Chin. Pharm. J.* 47, 179–181.

Rojas, A., Bah, M., Rojas, J.I., Serrano, V., Pacheco, S., 1999. Spasmolytic activity of some plants used by the otomi indians of queretaro (Mexico) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine* 6, 367–371.

Sciamarelli, A., Tozzi, A.M.G.A., 1996. *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae – Papilionoideae – Aeschynomeneae) no estado de São Paulo. *Acta Bot. Bras.* 10, 237–266.

Shen, Y., Terazawa, M., 2001. Dihydrosesioside, a new cyclohexanone glucoside, from the leaves of shirakamba (*Betula platyphylla* Sukatchev var. japonica Hara). *J. Wood Sci.* 47, 145–148.

Silva, A.D.S., Cavalcante-Silva, L.H.A., Da Matta, C.B.B., De Farias Silva, D., De Araújo, M.V., Tavares, J.F., Da Silva, M.S., Alexandre-Moreira, M.S., 2013. Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. *Nat. Prod. Res.* 27, 1695–1699.

Slade, D., Ferreira, D., Marais, J.P.J., 2005. Circular dichroism, a powerful tool for

the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry* 66, 2177–2215.

Taskova, R.M., Gotfredsen, C.H., Jensen, S.R., 2005. Chemotaxonomic markers in Digitalideae (Plantaginaceae). *Phytochemistry* 66, 1440–1447.

Veitch, N.C., Sutton, P.S.E., Kite, G.C., Ireland, H.E., 2003. Six new isoflavones and a 5-deoxyflavonol glycoside from the leaves of *Ateleia herbert-smithii*. *J. Nat. Prod.* 66, 210–216.

Vereecken, L., Pierloot, K., Peeters, J., 1998. B3LYP-DFT characterization of the potential energy surface of the CH(X (2)Pi)+C2H2 reaction. *J. Chem. Phys.* 108, 1068–1080.

Wavefunction, Irvine, CA, USA. <http://www.wavefun.com/products/windows/SpartanModel/winmodel.html/> (accessed 07.09.17).

Wu, Y.Y., Wu, C.H., Wu, S.J., Wu, T.S., 2002. The constituents and synthesis of cryptamygin-A from the stem bark of *Cryptocarya amygdalina*. *J. Chin. Chem. Soc.* 49, 263–268.

Yu, D.-H., Bao, Y.M., Wei, C.L., An, L.J., 2005. Studies of chemical constituents and their antioxidant activities from *Astragalus mongholicus* Bunge. *Biomed. Environ. Sci.* 18, 297–301.

B



APÊNDICE – Artigo
publicado em *Molecules*



Article

Rapid Characterization of Triterpene Saponins from *Zornia brasiliensis* by HPLC-ESI-MS/MS

Yuri Manguiera Nascimento¹, Lucas Silva Abreu¹, Ramon Leal Lima¹, Vicente Carlos O. Costa¹, José Iranildo Miranda de Melo², Raimundo Braz-Filho³, Marcelo Sobral Silva¹ and Josean Fechine Tavares^{1,*}

¹ Graduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Health Sciences Center, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, Paraíba, Brazil

² Graduate Program in Ecology and Conservation, Department of Biology, Center for Biological and Health Sciences, Campina Grande 58429-500, Paraíba, Brazil

³ Center of Sciences and Technologies, Darcy Ribeiro Norte Fluminense State University, Campos dos Goytacazes 28013-600, Rio de Janeiro, Brazil

* Correspondence: josean@ltf.ufpb.br; Tel.: +55-83-3216-7427

Academic Editors: David Popovich and Valeria Patricia Sülsen

Received: 2 May 2019; Accepted: 9 July 2019; Published: 10 July 2019



Abstract: *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) is a species popularly known in Brazil as “urinária”, “urinana”, and “carrapicho”, it is popularly used as a diuretic and in the treatment of venereal diseases. A specific methodology to obtain a saponin-enriched fraction and high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection, ion trap mass spectrometry, and TOF-MS (HPLC-DAD-ESI-MS/MS) was applied for the analysis of triterpene saponins. The MS and MS/MS experiments were carried out by ionization in negative mode. Molecular mass and fragmentation data were used to support the structural characterization of the saponins. Based on retention times, high-resolution mass determination and fragmentation, 35 oleanane-triterpene saponins were tentatively identified in *Z. brasiliensis*.

Keywords: triterpene saponins; soyasaponins; *Zornia brasiliensis*; HPLC-DAD-ESI-MS/MS

1. Introduction

The family Leguminosae consists of approximately 770 genera and 19,500 species. It previously included only three subfamilies, but a recent study reorganized the Leguminosae into six subfamilies [1]. These include the subfamily Papilionoideae, which contains the greatest number of genera, including the genus *Zornia*.

The genus *Zornia* contains approximately 80 species that are distributed throughout the world, mainly in tropical and subtropical regions. In Brazil, the genus is represented by 36 species, 15 of which are endemic [2,3]. Studies have investigated the pharmacological activities of compounds present in species of this genus, including cytotoxic, smooth muscle-relaxing, anticonvulsant, antibacterial, antitumor, anti-inflammatory, and antioxidant activities [4–12]. In turn, phytochemical studies have revealed the presence of isoflavonoids [13,14].

Zornia brasiliensis Vogel, a species popularly known in Brazil as “urinaria”, “urinana”, and “carrapicho”, is adopted in the alternative medicine as a diuretic and in the treatment of venereal diseases [15]. *Z. brasiliensis* is distributed in the North, Northeast, Center-West and Southeast regions of Brazil. It is associated with the Amazon, Caatinga, Cerrado, and Atlantic Forest phytogeographic domains [16], but is found mainly in the Brazilian Northeast [17] and Venezuela [18]. Two pharmacological studies of this species have reported the antinociceptive activity of 7-methoxyflavone isolated from its aerial parts [19] and the antitumor activity of its essential oil [20].

A recent phytochemical study of the aerial parts of this species resulted in the identification of 14 compounds, including flavones, flavanones, isoflavonoids, pterocarpan, chalcones, and a novel glycosylated dihydrochalcone—and this chalcone showed cytotoxic activity against HL-60 leukemic cells [21].

Hyphenated techniques, such as high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry (MS) were used for the structural analysis and characterization of saponins [22–29]. This study represents the first contribution to describe the existence of triterpene saponins from the genus *Zornia* (Leguminosae). A total of 35 saponins were detected and tentatively identified by MS and MS/MS.

2. Results

2.1. Characterization of the Compounds by HPLC-ESI-MS/MS

Identification of triterpene saponins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) with collision-induced dissociation (CID) under negative ESI-MS is a well-established and widely employed technique [24]. To obtain these MS/MS data, a low-resolution mass spectrometer was used; and the accurate mass was obtained by a high-resolution spectrometer, both using the same ionization parameters, and both coupled to a high-performance liquid chromatography system under the same chromatographic conditions. The 35 saponins that are present in the aerial parts of *Z. brasiliensis* and tentatively identified are shown on base peak chromatogram (Figure 1).

According to Pollier et al., after collision-induced dissociation (CID) under negative ESI-MS, the saponins undergo glycosidic cleavages, retaining the charge at the reducing end (e.g., aglycone containing fragment). In the MS/MS spectrum, daughter ions provide information on the sugar residues and the aglycone of the fragmented saponin. Sugar residues are mainly hexoses (e.g., glucose and galactose), 6-deoxyhexoses (e.g., rhamnose and fucose), pentoses (e.g., arabinose and xylose), and uronic acids (e.g., glucuronic acid and galacturonic).

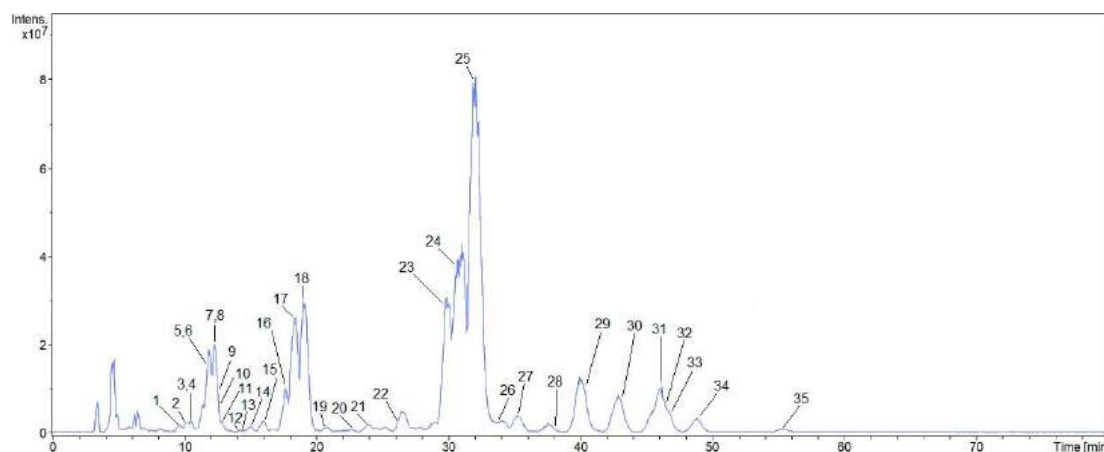


Figure 1. Base peak chromatogram (BPC) of the concentrated fraction of saponins obtained by ESI-MS/MS in negative mode.

The sugar residues and the aglycone could be identified from the MS/MS spectra. The typical losses represent water (-18 Da); and/or rhamnoside residue (-146 Da); and/or arabinose (-150 Da); and/or glucuronic acid (-158 Da). Therefore, the daughter aglycone ion, $[\text{Aglycone} - \text{H}]^-$ is based on this type or pattern of analysis. Based on this analysis, thirty-five saponins from *Zornia brasiliensis* could be tentatively identified by mass spectrometry. The MS/MS data of the tentatively identified saponins are reported in Table 1.

2.1.1. Aglycones of Saponins of *Z. Brasiliensis*

In the MS/MS fragmentation spectra obtained for the 35 saponins, ions m/z 441–531 Da, characteristic of triterpene aglycones, were observed. Through the relationships of the deprotonated ions of the saponins— m/z 631.3856–999.5135 Da, and the respective fragment ions at the m/z 441–531 Da interval—10 aglycones were tentatively identified (Figure 2) [24]. Although these aglycones have been detected only as daughter ions with nominal m/z values, their molecular formulas can be predicted by the molecular formula of the exact mass of the parent ion and by the observed losses of the sugar residues [24]. Seven of these aglycones (olean-12-ene-3 β ,24-diol; soysapogenol A, B, and E; kudzusapogenol A; wistariasapogenol A; and 22-O-acetate-soyasapogenol B) are of the oleanane type and have been previously reported in the family Leguminosae (Figure 2) [28,30–33].

No previous report of three of these sapogenins was found in the literature. Aglycone I has a fragment ion at m/z 515 [Agly – H][–] and molecular formula C₃₂H₅₂O₅, thus, we propose that aglycone would be an acetylation product of soysapogenin A (m/z 473), since it is possible to observe the loss of 42 Da (acetoxy) after subtraction of glycosidic residues, suggesting that acetoxy group is present in the sapogenin.

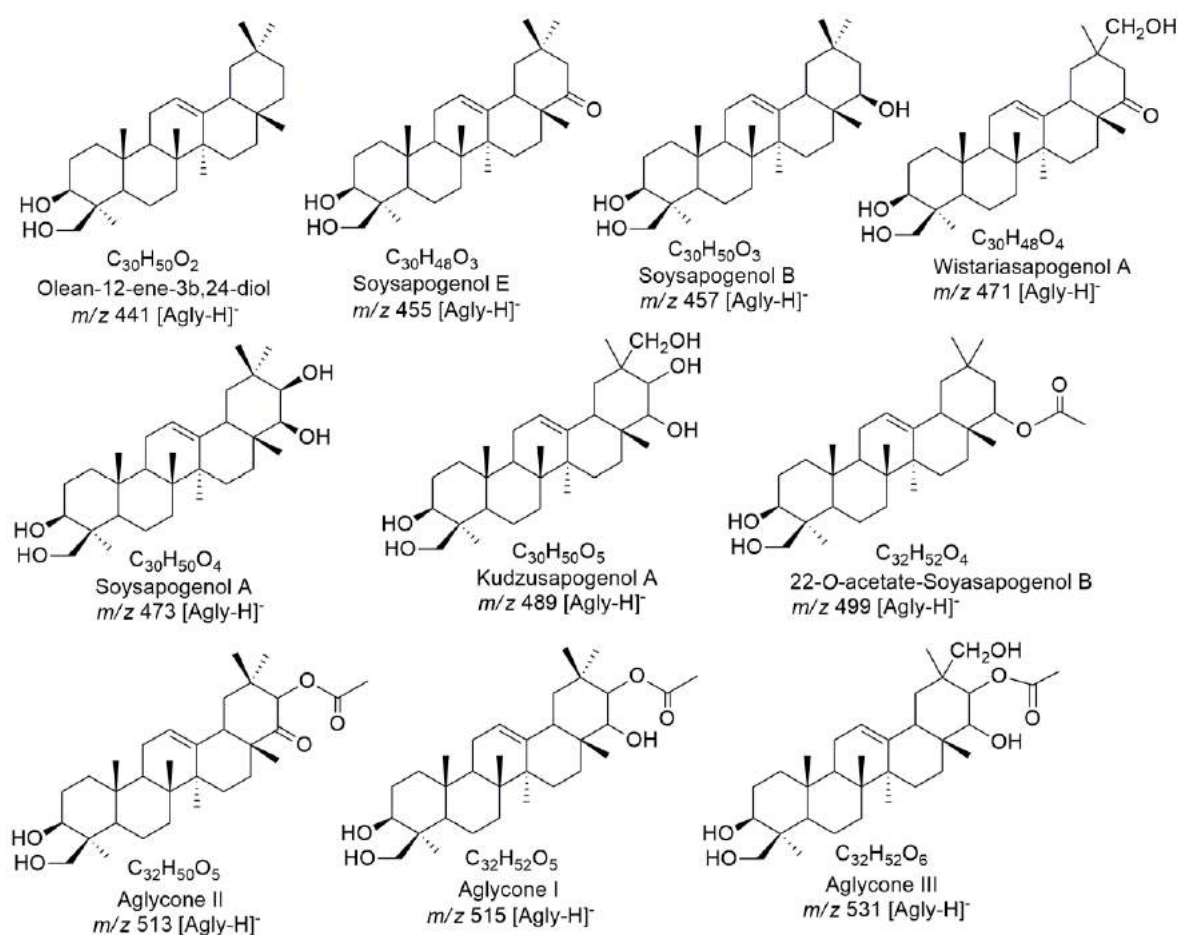


Figure 2. Aglycones of *Z. brasiliensis* saponins tentatively identified by mass spectrometry.

Aglycone II has a fragment ion m/z 513 [Agly – H][–] and the molecular formula C₃₂H₅₀O₅. The loss of 42 Da (acetoxy), similar to that observed in 21-acetoxy-soyasapogenol A (m/z 515), was observed. However, aglycone II has two fewer mass units, suggesting that C-22 was oxidized to generate a ketone [34]. The ion resulting from this loss of 42 Da, m/z 471, showed distinct fragmentation of wistariasapogenol A, a difference suggested by the absence of ion m/z 439 relative to the loss of 32 Da (CH₄O) (Figure 2). Aglycone III has an m/z 531 [Agly – H][–] and the molecular formula C₃₂H₅₂O₆, it

has been tentatively identified as an acetylated derivative of kudzusapogenol A, as evidenced by the 42 Da loss and the presence of the ion at m/z 489 (Figure 2).

This study has proposed the putative characterization of monodesmosidic saponins with the insertion of glycosides or its chains at the C-3 position, as observed in the saponin isolated and identified by NMR and supported by the literature which describes saponins present in the Leguminosae family [28,30,30,35]. The possibility of the presence of bidesmosidic saponins was removed due to the presence of fragments m/z 483 $[M - H]^-$ referring to the union of a dHex + Hex + HexA, m/z 453 $[M - H]^-$ dHex + Pen + HexA, m/z 337 $[M - H]^-$ Hex + HexA, and m/z 307 $[M - H]^-$ Pen + HexA, thus, demonstrating that the sugar chain is attached in the one position of the sapogenin, thus, excluding the possibility of bidesmosidic saponins.

2.1.2. Saponins of *Z. brasiliensis*

Peaks **1** and **2** showed ions at m/z 925.4814 and 779.4186, respectively, thus, they are isobars of compounds **27** and **28**. However, they presented distinct fragmentation patterns that made it possible to propose that the difference between these compounds lies in their aglycones. In the tentative identification, compounds **1** and **2** have wistariasapogenol as an aglycone m/z 471 $[Agly - H]^-$, this is proposed based on their fragmentation, since the fragment ion m/z 439 $[Agly - H - CH_4O]^-$ is compatible with the loss of 32 Da corresponding to the loss of methanol. This suggests oxygenation in methyl C-30 rather than C-21, a ketone in the C-22 position similar to soyasapogenol E, and one other fragment ion m/z 407 $[Agly - H - CH_4O - CH_4O]^-$, which is supposedly attributed to methanol at the C-23 position. Compound **1** was putatively identified as wistariasaponin A, which was previously isolated from a species of the family Leguminosae [35]; and compound **2** was tentatively identified as Pen-HexA-wistariasapogenol A.

Table 1. Characterization of the saponins tentatively identified by HPLC-ESI-MS/MS in *Z. brasiliensis*.

Compound	T _R (min)	[M – H] [–]	[M – H] [–] Calculated	Molecular Formula	Error (ppm)	Fragments (<i>m/z</i>)	Tentative Identification	Reference
1	10.5	925.4800	925.4802	C ₄₇ H ₇₃ O ₁₈	0.2	907, 863, 779, 717, 629, 567, 471, 453, 439, 407	Wistariasaponin A	[36]
2	11.1	779.4239	779.4223	C ₄₁ H ₆₃ O ₁₄	2.0	735, 629, 585, 567, 471, 439, 407	Pen-HexA-Wistariasapogenol A	-
3	11.2	797.4310	797.4329	C ₄₁ H ₆₅ O ₁₅	2.4	753, 647, 621, 603, 585, 489, 457, 307	Pen-HexA-Kudzusapogenol A	-
4		943.4912	943.4908	C ₄₇ H ₇₅ O ₁₉	–0.4	925, 881, 797, 735, 647, 585, 489, 457	Subprosides II	[37]
5	12.5	957.5056	957.5065	C ₄₈ H ₇₇ O ₁₉	0.9	939, 895, 811, 749, 631, 569, 483, 473	Soyasaponin A ₃	[28,38]
6		927.4943	927.4959	C ₄₇ H ₇₅ O ₁₈	1.8	909, 865, 781, 719, 631, 569, 473, 453	dHex-Pen-HexA-Soyasapogenol A	-
7	13.0	781.4350	781.4380	C ₄₁ H ₆₅ O ₁₄	3.9	763, 631, 613, 569, 473, 307	Pen-HexA-Soyasapogenol A	-
8		811.4459	811.4485	C ₄₂ H ₆₇ O ₁₅	3.2	793, 631, 587, 473, 337	Hex-HexA-Soyasapogenol A	[39]
9	13.2	985.4961	985.5014	C ₄₉ H ₇₇ O ₂₀	5.3	967, 839, 821, 777, 689, 627, 531, 489, 457, 453	dHex-Pen-HexA-Aglycone III	-
10	13.7	839.4404	839.4435	C ₄₃ H ₆₇ O ₁₆	3.6	821, 689, 671, 627, 531, 489, 457, 307	Pen-HexA-Aglycone III	-
11	14.2	997.5022	997.5014	C ₅₀ H ₇₇ O ₂₀	–0.8	979, 935, 851, 789, 671, 609, 513, 483, 471	dHex-Hex-HexA-Aglycone II	-
12	15.1	851.4412	851.4435	C ₄₄ H ₆₇ O ₁₆	2.7	807, 671, 513, 471	Hex-HexA-Aglycone II	-
13	15.6	967.4901	967.4908	C ₄₉ H ₇₅ O ₁₉	0.7	949, 905, 821, 671, 653, 609, 513, 471,	dHex-Pen-HexA-Aglycone II	-

						453		
14	16.9	649.3933	649.3957	C ₃₆ H ₅₇ O ₁₀	3.8	631, 473	HexA-Soyasapogenol A	-
15	17.7	821.4303	821.4329	C ₄₃ H ₆₅ O ₁₅	3.2	689, 671, 653, 609, 513, 471, 307	Pen-HexA-Aglycone II	-
16	18.3	999.5135	999.5170	C ₅₀ H ₇₉ O ₂₀	3.6	981, 937, 853, 791, 673, 611, 515, 483, 473	dHex-Hex-HexA-Aglycone I	-
17	19.5	969.5074	969.5065	C ₄₉ H ₇₇ O ₁₉	-1.0	951, 907, 823, 761, 673, 611, 515, 473, 453	dHex-Pen-HexA-Aglycone I	-
18	19.9	853.4559	853.4591	C ₄₄ H ₆₉ O ₁₇	3.8	835, 673, 655, 611, 515, 473, 337	Hex-HexA-Aglycone I	-
19	20.2	823.4463	823.4485	C ₄₃ H ₆₇ O ₁₅	2.7	805, 673, 629, 611, 515, 473, 307	Pen-HexA-Aglycone I	-
20	23.9	837.4603	837.4642	C ₄₄ H ₆₉ O ₁₅	2.0	657, 639, 595, 499, 497, 457, 455, 453	Hex-HexA-22-O-acetate- Soyasapogenol B	-
21	24.8	939.4935	939.4959	C ₄₈ H ₇₅ O ₁₈	2.6	921, 877, 793, 731, 613, 551, 483, 455	Soyasaponin Be	[22,24,25,27,29,40,41]
22	26.2	691.4042	691.4063	C ₃₈ H ₅₉ O ₁₁	3.1	673, 515, 473	HexA-Aglycone I	-
23	31.0	941.5123	941.5115	C ₄₈ H ₇₇ O ₁₈	-0.8	923, 879, 795, 733, 615, 553,	Soyasaponin I	[22,24,27,28,29,40,41]
24	32.6	795.4520	795.4536	C ₄₂ H ₆₇ O ₁₄	2.1	777, 733, 615, 553, 457, 337	Soyasaponin III	[27,28,29,41]
25	33.0	911.5006	911.5010	C ₄₇ H ₇₅ O ₁₇	0.5	893, 849, 765, 703, 615, 553,	Soyasaponin II ^a	[27,28,29,41]
26	34.0	765.4418	765.4431	C ₄₁ H ₆₅ O ₁₃	1.6	747, 615, 597, 553, 457, 307	Soyasaponin IV	[27,28,29,41]
27	36.9	925.5168	925.5166	C ₄₈ H ₇₇ O ₁₇	-0.2	907, 863, 779, 717, 599, 537, 483, 441, 439	dHex-Hex-HexA-Olean-12-ene- 3 β ,24-diol	-
28	39.3	779.4562	779.4587	C ₄₂ H ₆₇ O ₁₃	3.2	599, 441, 439, 307	Hex-HexA-Olean-12-ene-3 β ,24-diol	-

29	41.3	633.3998	633.4008	C ₃₆ H ₅₇ O ₉	1.5	615, 457	Soyasapogenol B monoglucuronide	[28,42]
30	44.1	895.5043	895.5061	C ₄₇ H ₇₅ O ₁₆	1.9	877, 833, 749, 687, 599, 537, 453, 441, 439, 337	dHex-Pen-HexA-Olean-12-ene- 3 β ,24-diol	-
31	47.8	793.4348	793.4380	C ₄₂ H ₆₅ O ₁₄	4.0	775, 731, 613, 551, 455, 337	Soyasaponin Be'	[24,30]
32	48.0	909.4843	909.4853	C ₄₇ H ₇₃ O ₁₇	1.1	891, 847, 763, 701, 613, 551, 455, 453	Soyasaponin Bg	[25,30]
33	48.7	763.4286	763.4274	C ₄₁ H ₆₃ O ₁₃	-1.5	719, 613, 569, 455, 307	Soyasaponin Bg'	[30]
34	51.1	749.4485	749.4482	C ₄₁ H ₆₅ O ₁₂	-0.5	599, 537, 441, 439, 307	Pen-HexA-Olean-12-ene-3 β ,24-diol	-
35	58.8	631.3856	631.3852	C ₃₆ H ₅₅ O ₉	-0.7	613, 455	HexA-Soyasapogenol E	-

Legend: HexA, uronic acid (glucuronic acid or galacturonic acid); Hex, hexose (glucose or galactose); Pen, pentose (arabinose or xylose); dHex, 6-deoxyhexose (rhamnose or fucose), ^a Identified by ¹H and ¹³C-NMR. Accurate mass obtained by HPLC-HRESIMS and fragments obtained by HPLC-ESI-MS/MS.

Peaks **3** and **4** presented the fragment ion m/z 489 $[\text{Agly} - \text{H}]^-$ were tentatively identified as derivatives of kudzusapogenol A, a penta-oxygenated oleanane triterpene with oxygenations at C-21 and C-22, the oxygenation at C-29 is supported by the loss of 32 Da (methanol) observed in the fragment ion m/z 457 $[\text{Agly} - \text{H} - \text{CH}_3\text{O}]^-$. Compound **3** was putatively identified as Pen-HexA-kudzusapogenol A and compound **4** as subproside II, a saponin isolated from *Sophorae subprostrata* (Leguminosae) [36,43]. Group A soyasaponins are bidesmosidic, with insertion of the glycosidic chains in C-3 and C-22, and can be divided into acetylated and non-acetylated [22]. They have soyasapogenol A as the aglycone, which differs structurally from soyasapogenol B in the presence of a hydroxyl group at C-21 [44]. Five saponins that possess this aglycone were putatively identified (m/z 473). Compound **5** was identified as soyasaponin A₃ [37], which was described by Curl et al. as a monodesmosidic derivative of soyasapogenol A. Compound **8**, identified as Hex-HexA-soyasapogenol A, has already been described but not named [33], and compounds **6**, **7**, and **14** were putatively identified as dHex-Pen-HexA-soyasapogenol A, Pen-HexA-soyasapogenol A, and HexA-soyasapogenol A, respectively.

Peaks **9** and **10** showed the fragment ion m/z 531 $[\text{Agly} - \text{H}]^-$, attributed to their aglycone and are here proposed as derivatives of aglycone III. It was also possible to observe the fragment ions m/z 489 and 457, which were attributed to the neutral loss of an acetoxy residue (42 Da) and a methanol (32 Da) of the aglycone. Peaks **9** and **10** were tentatively characterized as dHex-Pen-HexA-aglycone III and Pen-HexA-aglycone III, respectively.

Four saponins tentatively proposed possess aglycone II (m/z 513). These saponins were observed in peaks **11**, **12**, **13**, and **15** and were proposed as dHex-Hex-HexA-aglycone II, Hex-HexA-aglycone II, dHex-Pen-HexA-aglycone II, and Pen-HexA-aglycone II, respectively.

Peak **20** was tentatively identified as Hex-HexA-22-O-acetate-soyasapogenol B. It presented fragment ion at m/z 499 $[\text{Agly} - \text{H}]^-$, attributed to 22-O-acetate-soyasapogenol B; and fragment ion m/z 457, attributed to the neutral loss of the acetoxy residue (42 Da) in the aglycone.

Fragment ion at m/z 515 $[\text{Agly} - \text{H}]^-$, attributed to this aglycone I, was observed in five compounds, **16**, **17**, **18**, **19**, and **22**, all of which had the fragment ion at m/z 473 $[\text{Agly} - \text{H} - \text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^-$, compatible with the neutral loss of 42 Da relative to the acetoxy group present in the aglycone m/z 515 $[\text{Agly} - \text{H}]^-$. These compounds were tentatively identified as dHex-Hex-HexA-aglycone I, dHex-Pen-HexA-aglycone I, Hex-HexA-aglycone I, Pen-HexA-aglycone I, and HexA-aglycone I, respectively.

Among soyasaponins A, B, and E, the soyasaponins of group E are the most restricted since they are considered photooxidation products of the soyasaponins of group B. The glycosidic chain at the C-3 position is the same for groups A, B, and E [41]. Peaks **21**, **31**, **32**, **33**, and **35** showed the same fragmentation pattern as that proposed for the olean-12-ene-3 β ,24-diol derivatives, however, the fragment ion attributed to the aglycone, m/z 455 $[\text{Agly} - \text{H}]^-$, was proposed to be soyasapogenol E.

Compound **21** was tentatively identified as soyasaponin Be [41], and **31**, **32**, and **33** were tentatively identified as soyasaponin Be', soyasaponin Bg, and soyasaponin Bg', respectively [44]. Compound **35** was tentatively characterized as hexA-soyasapogenol E.

The soyasaponins of group B have only one glycosidic chain at the C-3 position. They are commonly divided into two groups, one group has a conjugation in C-22 with 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4-pyrone (DDMP) and is more abundant in soybean, and the members of the other group are DDMP-nonconjugated [22]. In this study, it was possible to observe peaks **23**, **24**, **25**, **26**, and **29**, all of which had the fragment ion at m/z 457 $[\text{Agly} - \text{H}]^-$ attributed to soyasapogenol B. Compounds **23** and **25** were tentatively identified as soyasaponins I and II, respectively [44–46]. Compounds **24**, **25**, and **29** could be tentatively identified as soyasaponin III (or soyasaponin Bb'), soyasaponin IV (or soyasaponin Bc'), and soyasapogenol B monoglucuronide [28,38]. Peak **27** showed a precursor ion in m/z 925.5168 $[\text{M} - \text{H}]^-$ and its fragmentation, the ions at m/z 907 $[\text{M} - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^-$, m/z 863 $[\text{M} - \text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}_2]^-$, m/z 779 $[\text{M} - \text{H} - \text{dHex}]^-$, m/z 717 $[\text{M} - \text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}_2 - \text{dHex}]^-$, m/z 599 $[\text{M} - \text{H} - \text{dHex} - \text{Hex}]^-$, m/z 537 $[\text{M} - \text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}_2 - \text{dHex} - \text{Hex}]^-$, m/z 483 $[\text{M} - \text{H} - \text{Agly}]^-$, m/z 441 $[\text{M} - \text{H} - \text{dHex} - \text{Hex} - \text{HexA}]^-$, and m/z 439 $[\text{M} - \text{H} - \text{dHex}$

– Hex – HexA][–]. Thus, the uronic acid residue was observed, generating a loss of 158 and/or 160 Da (Figure 3). Peaks **28**, **30**, and **34** were tentatively identified as Hex-HexA-Olean-12-ene-3 β ,24-diol, dHex-Pen-HexA-Olean-12-ene-3 β ,24-diol, and Pen-HexA-Olean-12-ene-3 β ,24-diol, respectively (See proposed fragmentation pathways for all compounds in the Supplementary Materials).

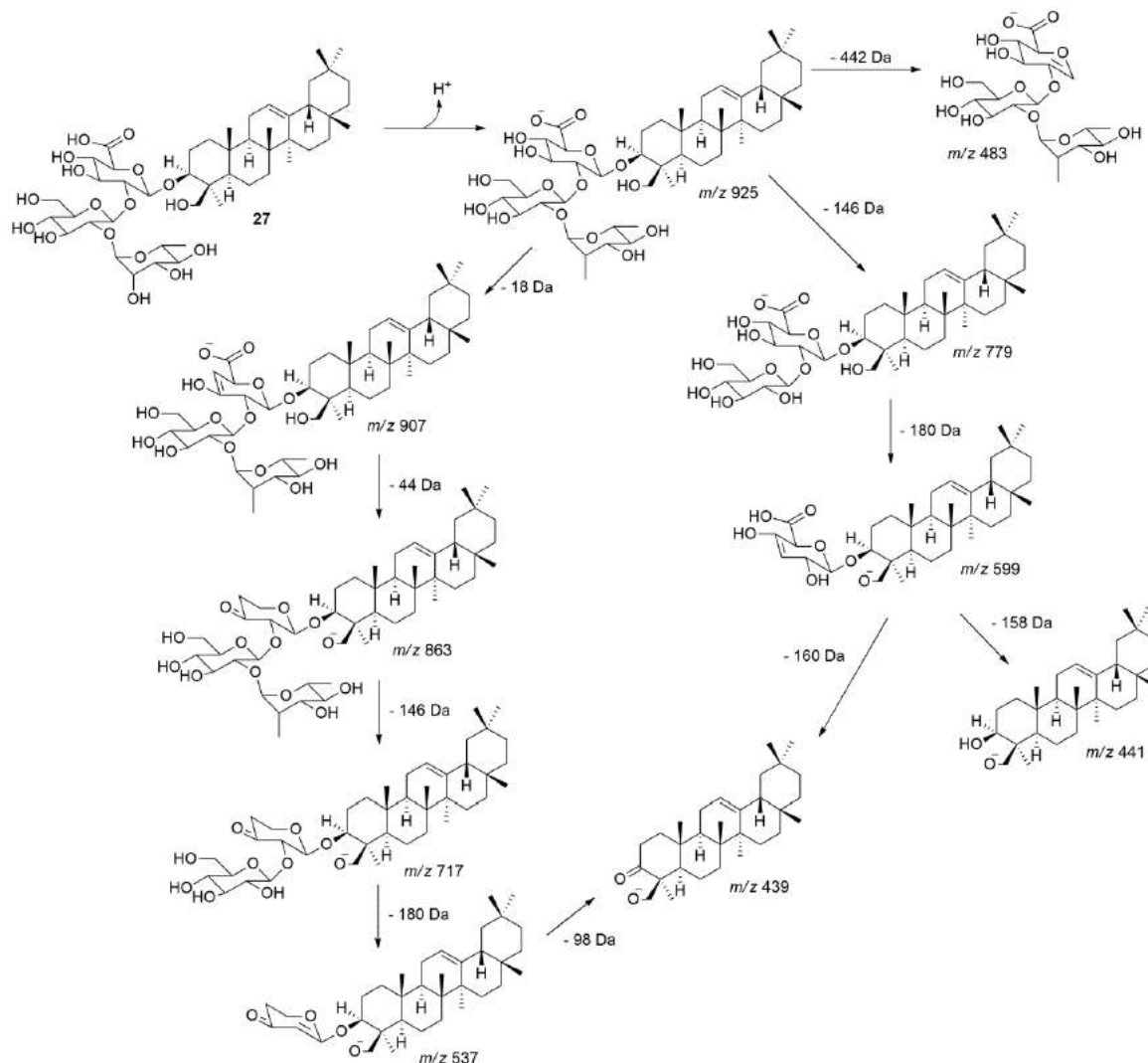


Figure 3. Proposed fragmentation pathway for compound **27** in negative mode ESI-MS/MS. The pathway extends similarly to that for compounds **28**, **30**, and **34**, generating the fragment ions m/z 441 and m/z 439 attributed to the aglycone olean-12-ene-3 β ,24-diol.

2.2. NMR Identification of Compound 25

After analysis of the saponin-enriched fraction by HPLC-DAD, the major peak observed in the chromatogram was peak **25**, enabling its isolation. The compound **25** (Figure 4) has an $[M - H]^-$ ion at m/z 911.5006 (m/z 911.5010, calcd.), compatible with the molecular formula $C_{47}H_{75}O_{17}$. The MS^2 experiment showed m/z 765 $[M - H - Rha]^-$, m/z 615 $[M - H - Rha - Ara]^-$, and m/z 457 $[M - H - Rha - Ara - Glu]^-$ fragment ions corresponding to the consecutive losses of 146, 150, and 158 Da, respectively. In the C NMR spectrum, 7 methyls were observed attributed to the triterpene sapogenin [δ_C 22.3 (Me-23), 15.3 (Me-25), 16.7 (Me-26), 25.0 (Me-27), 20.4 (Me-28), 32.7 (Me-29), 28.4 (Me-30)], a signal in δ_C 61.6 (C-24) characteristic of oxygenated carbon was also observed, showing that, in this structure, a Me-24 is oxygenated. Two other signals were observed in δ_C 121.7 (C-12) and 144.1 (C-13), attributed to the sp^2 carbons—C-12 (methine) and C-13 (nonhydrogenated), thus,

this sapogenin is a triterpenic oleanane-type. The presence of a C-19 methylene carbon (δ_C 46.4) and C-20 (δ_C 30.3) suggests that this sapogenin is β -amyrin, which is oxygenated at the C-22 positions (δ_C 74.2) and C-3 (δ_C 90.0). In the ^1H -NMR it was possible to observe the signals of 7 methyls [δ_H 1.08 (23-Me), 0.79 (25-Me), 0.88 (26-Me), 1.04 (Me-27), 0.74 (Me-28), 0.96 (Me-29), 0.96 (Me-30)], at the same time, a broad singlet at δ_H 5.16 with integral for one hydrogen, attributed to a sp^2 methyl carbon. The signals at δ_H 3.80 (d, J = 11.0 Hz, 1H) and 3.04 (m, 1H) were assigned to Ha and Hb-24, respectively, δ_H 3.12 (m, 1H) to H-3, and δ_H 3.23 (m, 1H) to H-22. In the ^1H x ^{13}C -HMBC spectrum, a correlation of the anomeric proton H-1' [δ_H 4.13 (d, J = 7.5 Hz, 1H)] of β -glucuronic acid was observed with C-3 (δ_C 90.0), confirming the insertion of β -glucuronic acid in the C-3-position of the sapogenin. Another contour map between H-1''' [δ_H 4.97 (brs, 1H)] at three bonds distance with C-2'' (δ_C 77.6) confirming the insertion of α -rhamnose into C-2'' of β -arabinose. The HMBC also attributed a correlation of the proton H-2' [δ_H 3.33 (m)] at two bonds distance with C-1' (δ_C 103.9) and three bonds with C-1'' (δ_C 100.7), thus confirming that β -arabinose is bonded to β -glucuronic acid and this insertion occurs at C-2' glucuronic acid. Another contour map present in HMBC attributed Me-28 [δ_H 0.74 (s, 3H)] with C-22 (δ_C 74.2), C-16 (δ_C 28.0), C-17 (δ_C 37.0), and C-18 (δ_C 44.7) indicating that C-22 supports the hydroxyl. This information was corroborated by another contour map between H-16a [δ_H 1.33 (m)] and C-22 (δ_C 74.2). A cross-correlation was also observed between Me-29/30 [δ_H 0.96 (s, 6H)] with C-19 (δ_C 46.1), C-20 (δ_C 30.3), C-21 (δ_C 41.2), and C-29 (δ_C 32.7); H-19 [δ_H 1.67 (m) and 0.88 (m)] with C-20 (δ_C 30.3), C-29 (δ_C 32.7) and C-30 (δ_C 28.4) and H-21 [δ_H 1.30 (m)] with C-17 (δ_C 37.0), C-22 (δ_C 74.2) and C-30 (δ_C 28.4). It was also possible to observe, in HMBC, a three-bond correlation between H-24a [δ_H 3.80 (d, J = 11.0 Hz)], C-3 (δ_C 90.0) as well as Me-23 (δ_C 22.3). Thus, **25** corresponds to soyasaponin II (Figure 4). Comparison of the ^1H and ^{13}C -NMR spectral data of compound **25** with data from the literature corroborate this proposal. Thus, the m/z 457 fragment ion corresponds to the sapogenin soyasapogenol B (Figure 2) [44,45].

Considering that the isolation, purification, and elucidation of triterpene saponins are difficult and time-consuming due to the high polarity and structural similarity of these compounds [23], the present study enabled us to obtain and chemically analyze a concentrated fraction of saponins of *Z. brasiliensis* for the first time. In this study, 35 triterpene saponins were tentatively identified by HPLC-ESI-MS/MS, suggesting a homologous series. In addition, saponins have a diversification of applications such as biological and pharmaceutical, for example, immunostimulating, hypocholesterolemic, and anticarcinogenic properties, as well as applications in the food, agriculture, and cosmetics industries. This fact led to the extraction and identification of saponins in numerous species [47] due to their relevance. This is the first report of the occurrence of saponins in the genus *Zornia*, placing the species *Z. brasiliensis* in the list of the bioproducing species of this important class of secondary metabolites that are the saponins.

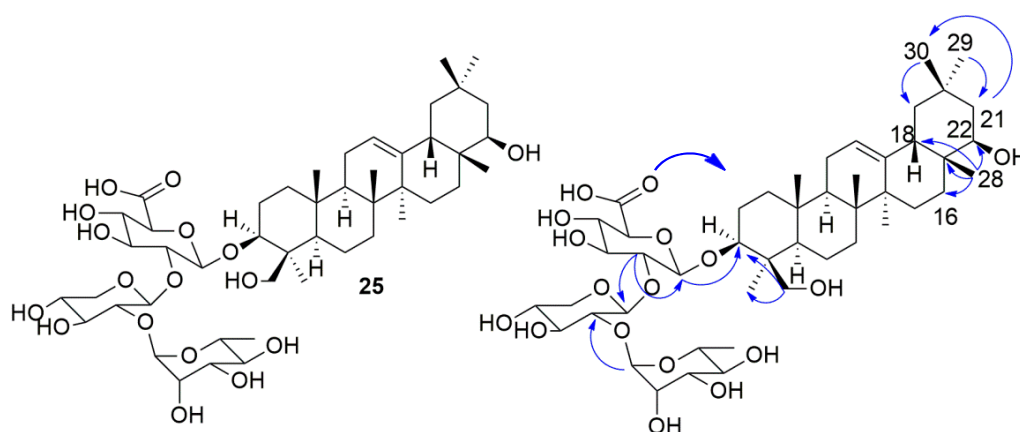


Figure 4. Soyasaponin II (**25**) isolated from *Z. brasiliensis*. () indicates some key HMBC correlations for compound **25**.

3. Materials and Methods

3.1. Reagents and Materials

The NMR analyses were performed on a Varian NMR system 500-MHz spectrometer (Palo Alto, CA, USA) operated at 500 MHz for ^1H -NMR and at 125 MHz for ^{13}C -NMR; and on a Bruker Ascend 400 spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) operated at 400 MHz for ^1H -NMR and at 100 MHz for ^{13}C NMR. The samples were prepared in deuterated dimethyl sulfoxide ($\text{DMSO-}d_6$) (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA) containing TMS as internal standard. Silica gel (ART 7734, Merck, Darmstadt, Germany; particle size 0.060–0.200 mm and 70–230 mesh) was used for column chromatography (CC). To obtain the crude extract and in chromatographic fractionation, the following solvents were used: Ethanol, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, and *n*-butanol (Tedia, Fairfield, CT, USA). For the HPLC analyses, the following solvents were used as the mobile phase: HPLC-grade acetonitrile (Tedia), ultrapure water obtained using a Milli-Q purification system (Millipore, Burlington, NJ, USA), and formic acid (Qhemis, Indaiatuba, Brazil). To obtain mass spectra by direct injection, an Ion Trap-amaZonX spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) was used for electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS, low resolution), and a micrOTOF II spectrometer was used for high-resolution ESIMS (HRESIMS, Bruker, Billerica, MA, USA) at 3.5 kV capillary voltage, ESI in negative mode, 500 V end plate offset, 8.0 psi nebulizer, dry gas (N_2) at a flow rate of 5.0 L/h, and a temperature of 200 °C. Spectra (m/z 50–1000) were recorded every 2.0 s. Collision-induced dissociation (CID) fragmentation was achieved in auto MS/MS mode using the advanced resolution mode for MS and MS/MS mode.

3.2. Plant Material

The aerial parts of *Z. brasiliensis* Vogel (Leguminosae) were collected in the municipality of Serra Branca (07°29'46"S and 36°44'36"W; altitude, 712 m) in the state of Paraíba, Brazil, in March 2016. Collection authorization No. 53894-1 was granted by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio, Brasília, Brazil) through the System of Authorization and Information on Biodiversity (SISBIO, Brasília, Brazil), and access registration in the National Management System of Genetic Patrimony and Associated Traditional Knowledge (SISGEN, Curitiba, Brazil) was obtained under number ADD107E. The species was identified by botanist Dr. José Iranildo Miranda de Melo of the Paraíba State University (UEPB, Campina Grande, Brazil). An exsiccatae was deposited at Arruda Câmara Herbarium (ACAM, Campina Grande, Brazil), *Campus* I, UEPB, under the number of registration 1862.

3.3. Extraction and Isolation of *Z. brasiliensis* Constituents

The dry and pulverized aerial parts of *Z. brasiliensis* (5 kg) were extracted with ethanol to obtain a crude ethanolic extract (CEE) which was partitioned with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethyl acetate-methanol (90:10, *v/v*) and ethyl acetate-methanol (50:50, *v/v*) in order to obtain its respective fractions [21].

An aliquot (20.0 g) of the 50% ethyl acetate-methanol fraction was dissolved in 300 mL of distilled water, followed by partition with *n*-butanol (300 mL) three times. The extractive solution of the *n*-butanol phase was then concentrated on a rotary evaporator under reduced pressure at a temperature of 50 °C. The concentrated material was redissolved in methanol-ethyl acetate (1:5, *v/v*), and the saponins were precipitated by the addition of methanol. This material was decanted for 72 hours at room temperature. The pellet was then resuspended in methanol (200 mL) and concentrated on a rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C. In this way, a concentrated fraction of saponins (1.1 g) was obtained [48].

3.4. HPLC-DAD Conditions

An analytical HPLC instrument (Shimadzu-Prominence, Kyoto, Japan) equipped with an LC-20AT pump, an SIL-20A HT auto injector, a CTO-20A oven, an SPD-M20A detector, and a CBM-20A controller unit was employed. The columns used were a Phenomenex Gemini® C18 (250.0 mm 4.6 mm internal diameter [id], filled with 5.0- μ m particles, Torrance, CA, USA) and a Security Guard Gemini® C18 precolumn (4.0 mm $\times$ 3.0 mm id, filled with 5.0- μ m particles, Torrance, CA, USA). The elution method used water (0.1% formic acid) (A) and methanol (B). The gradient was 70.0% B (0.01 min) to 80.0% B (50 min), returning to 70.0% B (65 min), and remaining at 70.0% B until 80 min with a mobile phase flow rate of 0.6 mL/min, an injection volume of 20.0 μ L, and a detection wavelength of 205 nm. The applied samples were filtered through 0.45- μ m nylon membranes (Tedia, Fairfield, CT, USA).

Preparative chromatographic analyses were performed using an HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an LC-6AD binary solvent pump, a Rheodyne injector, an SPD-M10A diode array detector, and an SCL-10A system controller. An ACE C18 column (250.0 mm $\times$ 21.2 mm id, 5.0- μ m particle size) was used. The method used was similar to the method used in the analytical runs. The preparative scale injection volume was 100.0 μ L, flow was conducted at 8.0 mL/min, and the detection wavelength was 205 nm. The applied samples were filtered through 0.45- μ m nylon membranes (Tedia).

3.5. HPLC-ESI-MS/MS Conditions

A Shimadzu (Prominence, Kyoto, Japan) HPLC instrument equipped with an LC-20AT binary solvent pump, an SIL-20A auto injector, a DGU-20A degassing system, an SPD-M20A diode array detector, and a CBM-20A controller was used. A Phenomenex Gemini® C18 column (250.0 mm $\times$ 4.6 mm id, filled with 5.0- μ m particles) and a SecurityGuard Gemini® C18 precolumn (4.0 mm $\times$ 3.0 mm id, filled with 5.0- μ m particles) were used. The chromatographic method was the same as the method developed for analytical HPLC. The applied samples were filtered through 0.45- μ m nylon membranes (Tedia). This HPLC instrument was coupled to an Ion Trap-amaZonX low-resolution mass spectrometer (Bruker) that used the electrospray ionization technique. The analysis parameters of the Ion-Trap spectrometer were 4.5 kV capillary, ESI in negative ion mode, a 500 V end plate offset, a 35.0 psi nebulizer, a dry gas (N_2) flow rate of 8.0 L/h, and a temperature of 300 °C. CID fragmentation was achieved in auto MS/MS mode with the advanced resolution mode for MS and MS/MS mode. Spectra (m/z 200–1200) were recorded every 2.0 s.

For high-resolution HPLC-ESI-MS analyses, we used the HPLC instrument described above with the same column and the same chromatographic conditions. The instrument was coupled to a micrOTOF II high-resolution mass spectrometer (Bruker) that used the electrospray ionization technique. The micrOTOF II spectrometer analysis parameters were 4.0 kV capillary, ESI in negative ion mode, a 500 V end plate offset, a 35.0 psi nebulizer, a dry gas (N_2) flow rate of 8.0 L/h, and a temperature of 300 °C. Spectra (m/z 50–1000) were recorded every 2.0 s. The sodium formate was used as the internal calibrator during the chromatographic run. The equipment resolution is ~15,000, however, when operating in HPLC-HRESIMS mode it drops to ~11,000.

Supplementary Materials: Supplementary data (Figures S1–S27) associated with this article, including HRESIMS, MS/MS, 1D, and 2D-NMR spectra data and the proposed fragmentation pathways of the tentatively identified compounds can be found in the online version.

Author Contributions: Y.M.N., L.S.A., R.L.L. and V.C.O.C. performed the experiments; J.I.M.d.M., botanic material collection; R.B.-F., M.S.S. and J.F.T. analyzed the data; Y.M.N., M.S.S. and J.F.T. wrote the paper.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001.

Acknowledgments: We thank the Graduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products for their support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Legume Phylogeny Working Group. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* **2017**, 66, 44–77. [CrossRef]
2. Perez, A.P.F.; Lewis, G.P.; Queiroz, R.T.; Silva, J.S.; De Azevedo Tozzi, A.M.G.; Rodrigues, K.F. Fruit as diagnostic characteristic to recognize Brazilian species of *Zornia* (Leguminosae, Papilionoideae). *Phytotaxa* **2015**, 219, 27–42. [CrossRef]
3. Fortuna-Perez, A.P. O gênero *Zornia* J.F. Gmel. (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae): Revisão taxonômica das espécies ocorrentes no Brasil e filogenia. Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Campinas – Campinas-SP, Campinas, Brazil, 2009.
4. Belcavello, L.; Cunha, M.R.H.; Andrade, M.A.; Batitucci, M.C.P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. *Nat. Line* **2012**, 10, 140–145.
5. Rojas, A.; Bah, M.; Rojas, J.I.; Serrano, V.; Pacheco, S. Spasmolytic activity of some plants used by the otomi indians of Queretaro (Mexico) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine* **1999**, 6, 367–371. [CrossRef]
6. Greetha, K.M.; Shilpa, S.; Murugan, V. Anticonvulsant Activity of the Methanolic Extract of Whole Plant of *Zornia diphylla* (Linn) Pers. *J. Pharm. Res.* **2012**, 5, 3670–3672.
7. Arunkumar, R.; Nair, S.A.; Subramoniam, A. Induction of cell-specific apoptosis and protection of mice from cancer challenge by a steroid positive compound from *Zornia diphylla* (L.) Pers. *J. Pharmacol. Pharmacother* **2012**, 3, 233–241.
8. Obi, C.L.; Ramalivhana, J.; Samie, A.; Igumbor, E.O. Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in-vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolated from stool samples of patients in the Venda region of South Africa. *J. Health Popul. Nutr.* **2007**, 25, 428–435. [PubMed]
9. Laxane, S.N.; Swarnkar, S.K.; Setty, M.M. Antioxidant studies on the ethanolic extract of *Zornia gibbosa*. *Pharmacol. Online* **2008**, 1, 319–330.
10. Laxane, S.N.; Swarnkar, S.K.; Zanwar, S.B.; Setty, M.M. Anti-inflammatory studies of the alcoholic extract of *Zornia gibbosa*. *Pharmacol. Online* **2011**, 1, 67–76.
11. Brahmachari, G.; Ghosh, S.; Mondal, S.; Jash, S.K.; Mandal, L.C.; Mondal, A. Cyclic voltammetric studies with plant extracts of some traditionally used Indian medicinal plants to evaluate their antioxidant potential. *Biochem. Indian J.* **2009**, 3, 32–35.
12. Arunkumar, R.; Nair, S.A.; Rameshkumar, K.B.; Subramoniam, A. The essential oil constituents of *Zornia diphylla* (L.) Pers., and anti-inflammatory and antimicrobial activities of the oil (Article). *Rec. Nat. Prod.* **2014**, 8, 385–393.
13. Leuner, O.; Havlik, J.; Prokudina, E.; Novy, P.; Kokoska, L. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, 93, 575–579. [CrossRef] [PubMed]
14. Ren, F.Z.; Gao, Y.Q.; Cheng, X.X.; Li, L.H.; Chen, S.H.; Zhang, Y.L. Study on Chemical Constituents of *Zornia diphylla*. *Chin. Pharm. J.* **2012**, 47, 179–181.
15. Agra, M.F.; Freitas, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, 17, 114–140. [CrossRef]
16. BFG – The Brazil Flora Group. Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* **2015**, 6, 1085–1113.
17. Mohlenbrock, R.H. A monograph of the leguminous genus *Zornia*. *Webbia* **1961**, 16, 1–141. [CrossRef]
18. Missouri Botanical Garden. 2017. Available online: <http://www.tropicos.org/Name/13035232> (accessed on 22 October 2018).
19. Da Silva, A.D.S.; Cavalcante-Silva, L.H.A.; Da Matta, C.B.B.; Silva, D.D.F.; Araújo, M.V.D.; Tavares, J.F.; Alexandre-Moreira, M.S. Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. *Nat. Prod. Res.* **2013**, 27, 1695–1699. [CrossRef] [PubMed]
20. Costa, E.V.; Menezes, L.R.; Rocha, S.L.; Baliza, I.R.; Dias, R.B.; Rocha, C.A.; Soares, M.B.; Bezerra, D.P. Antitumor properties of the leaf essential oil of *Zornia brasiliensis*. *Planta Med.* **2015**, 81, 563–567. [CrossRef]
21. Nascimento, Y.M.; Abreu, L.S.; Lima, R.L.; Silva, A.D.S.; Costa, V.C.O.; Melo, J.I.M. Zornioside, a dihydrochalcone C-glycoside, and other compounds from *Zornia brasiliensis*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2017**, 28, 192–197. [CrossRef]

22. Huhman, D.V.; Sumner, L.W. Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 347–360. [[CrossRef](#)]
23. Ling, Y.; Lin, Z.; Zha, W.; Lian, T.; You, S. Rapid Detection and Characterisation of Triterpene Saponins from the Root of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel by HPLC-ESI-QTOFMS/MS. *Phytochem. Anal.* **2016**, *27*, 174–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pollier, J.; Morreel, K.; Geelen, D.; Goossens, A. Metabolite Profiling of Triterpene Saponins in *Medicago truncatula* Hairy Roots by Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1462–1476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Negri, G.; Tabach, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2013**, *23*, 851–860. [[CrossRef](#)]
26. Perret, C.; Wolfender, J.L.; Hostettmann, K. LC/ES-MS Analysis of Triterpene Glycosides: Rapid Estimation of the Saponin Content of Dried Berries of *Phytolacca dodecandra*. *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 272–278. [[CrossRef](#)]
27. Zhang, W.; Popovich, D.G. Chemical and Biological Characterization of Oleanane Triterpenoids from Soy. *Molecules* **2009**, *14*, 2959–2975. [[CrossRef](#)]
28. Berhow, M.A.; Kong, S.B.; Vermillion, K.E.; Duval, S.M. Complete Quantification of Group A and Group B Soyasaponins in Soybeans. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2035–2044. [[CrossRef](#)]
29. Jin, M.; Yang, Y.; Su, B.; Ren, Q. Rapid quantification and characterization of soyasaponins by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1108*, 31–37. [[CrossRef](#)]
30. Takada, Y.; Sasama, H.; Sayama, T.; Kikuchi, A.; Kato, S.; Ishimoto, M.; Tsukamoto, C. Genetic and chemical analysis of a key biosynthetic step for soyasapogenol A, an aglycone of group A saponins that influence soymilk flavor. *Theor. Appl. Genet.* **2013**, *126*, 721–731. [[CrossRef](#)]
31. Konoshima, T.; Kozuka, M.; Haruna, M.; Ito, K.; Kimura, T. The structures of New Triterpenoids from *Wistaria brachybotrys* Sieb. et Zucc. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 1550–1553. [[CrossRef](#)]
32. Takeshita, T.; Hamada, S.; Nohara, T. New triterpenoid sapogenols from *Abrus cantoniensis* (L). *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 846–848. [[CrossRef](#)]
33. Arao, T.; Idzu, T.; Kinjo, J.; Nohara, T.; Isobe, R. Oleanene-type triterpene glycosides from *puerariae radix*. III. Three new saponins from *Pueraria thomsonii*. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1970–1972. [[CrossRef](#)]
34. Kitagawa, I.; Wang, H.K.; Taniyama, T.; Yoshikawa, M. Reinvestigation of the Structures of Soyasapogenols A, B and E, Oleanene-Sapogenols from Soybean. Structures of Soyasaponins I, II, and III. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 153–161. [[CrossRef](#)]
35. Price, K.R.; Johnson, I.T.; Fenwick, G.R.; Malinow, M.R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1987**, *26*, 27–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Konoshima, T.; Kozuka, M.; Haruna, M.; Ito, K.; Kimura, T.; Tokuda, H. Studies on the constituents of leguminous plants. XII. The structures of new triterpenoid saponins from *Wistaria brachybotrys* Sieb. et Zucc. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2731–2735. [[CrossRef](#)]
37. Ding, Y.; Takeshita, T.; Yokoyama, K.; Kinjo, J.; Nohara, T. Triterpenoid Glycosides from *Sophorae Subprostratae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 139–142. [[CrossRef](#)]
38. Curl, C.L.; Price, K.R.; Fenwick, G.R. Soyasaponin A3, a New Monodesmosidic Saponin Isolated from the Seeds of *Glycine max*. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 122–124. [[CrossRef](#)]
39. Woldemichael, G.M.; Montenegro, G.; Timmermann, B.N. Triterpenoidal lupin saponins from the Chilean legume *Lupinus oreophilus* Phil. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 853–857. [[CrossRef](#)]
40. Giuliana, B.; Raffaella, P.; Cecilia, F.C.; Maria, A.A.; Cataldi, T.R.; Philippe, S.K.; Alessandro, B.; Daniela, R.; Luigi, M. Determination of soyasaponins in Fagioli di Sarconi beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by LC-ESI-FTICR-MS and evaluation of their hypoglycemic activity. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 1561–1569.
41. Decroos, K.; Vincken, J.P.; Heng, L.; Bakker, R.; Gruppen, H.; Verstraete, W. Simultaneous quantification of differently glycosylated, acetylated, and 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one-conjugated soyasaponins using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1072*, 185–193. [[CrossRef](#)]
42. Udayama, M.; Ohkawa, M.; Yoshida, N.; Kinjo, J.; Nohara, T. Structures of three new oleanene glucuronides isolated from *Lathyrus palustris* var. *Pilosus* and hepatoprotective activity. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1412–1415. [[CrossRef](#)]

43. Sakamoto, S.; Kuroyanagi, M.; Ueno, A.; Sekuta, S. Triterpenoid saponins from *Sophora subprostrata*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1339–1342. [[CrossRef](#)]
44. Rupasinghe, H.V.; Jackson, C.J.C.; Poysa, V.; Di Berardo, C.; Bewley, J.D.; Jenkinson, J. Soyasapogenol A and B Distribution in Soybean (*Glycine max* L. Merr.) in Relation to Seed Physiology; Genetic Variability, and Growing Location. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5888–5894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kudou, S.; Tonomura, M.; Tsukamoto, C.; Uchida, T.; Sakabe, T.; Tamura, N.; Okubo, K. Isolation and Structural Elucidation of DDMP-Conjugated Soyasaponins as Genuine Saponins from Soybean Seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 546–550. [[CrossRef](#)]
46. Dalluge, J.J.; Eliason, E.; Frazer, S. Simultaneous Identification of Soyasaponins and Isoflavones and Quantification of Soyasaponin B in Soy Products, Using Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3520–3524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Güçlü-Ustündağ, O.; Mazza, G. Saponins: Properties, applications and processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 231–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Barbosa, A.P.; Silva, B.P.; Parente, J.P. A new complex triterpenoid saponin from *Samanea saman* with haemolytic activity and adjuvant effect. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 626–631. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

