

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química - Campus Araraquara

Glenda Marqueti Arantes

**Bioprospecção em espécies do gênero *Sclerolobium*
sp: Busca de agentes quimiopreventivos.**

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

A662b Arantes, Glenda Marqueti
Bioprospecção em espécies do gênero *Sclerolobium* sp :
busca de agentes quimiopreventivos. / Glenda Marqueti
Arantes. – Araraquara : [s.n], 2011
163 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Produtos naturais. 2. Flavonóides. 3. Cromatografia
líquida de alta eficiência. 4. Espectrometria de massa.
I. Título.

GLENDAMARQUETI ARANTES

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 20 de abril de 2011.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Dulce Helena Siqueira Silva (Orientadora)
Instituto de Química- UNESP, Araraquara



Profª Drª Ana Marisa Fusco Almeida
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Wilson Roberto da Cunha
Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca



Profª Drª Niegé Araçari Jacometti Cardoso Furtado
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Profª Drª Ana Luísa Lacava Lordello
Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais:

Nome: Glenda Marqueti Arantes

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Rua Francisco Degni, s/n

Quitandinha

14800-900 - Araraquara, SP - Brasil

Telefone: (16) 33016600

URL da Homepage: <http://www.iq.unesp.br>

Formação Acadêmica:

Pós-graduação

Doutorado: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Título: Bioprospecção em espécies do gênero *Sclerobim sp*: Busca de agentes quimiopreventivos.

Bolsista: CAPES

Período: 2007/2011

Orientadora: Prof^a Dr^a Dulce Helena Siqueira Silva.

Mestrado em Ciências: Universidade de Franca, UNIFRAN.

Título: Estudo fitoquímico e ensaios biológicos com *Leandra lacunosa* (Melastomataceae)

Bolsista: FAPESP

Período: 2005/2007

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Cunha.

Graduação

Licenciatura plena em Química.

Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.

Título: Estudo fitoquímico e ensaios biológicos com *Miconia ligustroides* (Melastomataceae).

Período: 2001/2004

Bolsista: FAPESP

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Cunha.

Publicações

1. CUNHA, W. R.; ARANTES, G. M.; FERREIRA, D. S.; LUCARINI, R.; SILVA, M. L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; CROTTI, A. E. M. Hypoglycemic effect of *Leandra lacunosa* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Fitoterapia* (Milano, 1934) (Cessou em 1960. Foi fundido com ISSN 1971-5498 *Fitoterapia*. Edizione Farmaceutica; ISSN 1971-5501 *Fitoterapia*. Edizione Me, v. 79, p. 356-360, 2008.
2. FERREIRA, D. S. ; CREVELIN, E. J. ; ARANTES, G. M. ; CROTTI, A. E. M. ; SILVA, M. L. A. ; ALBUQUERQUE, S. ; CUNHA, W. R. . A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. *Phytotherapy Research*, v. 20, p. 474-478, 2006.

Formação complementar

- 1 IV Workshop NuBBE.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
(2009). Carga horária: 16h.
- 2 Recentes avanços no isolamento e detecção de PN.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
(2008). Carga horária: 8h
- 3 Extensão universitária em Jornada de Química e Engenharia Química.
Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil. (2006). Carga horária: 20h
- 4 Estratégias em Química Medicinal. Sociedade Brasileira de
Química. (2006). Carga horária: 6h.
- 5 Extensão universitária em Simpósio sobre pesquisa e desenvolvimento de
novos.
Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil. (2003). Carga horária: 10h.
- 6 Extensão universitária em XIX Jornada de Química e VIII Jornada de
Engenharia Química.
Universidade de Franca, UNIFRAN, Brasil.(2003). Carga horária: 12h.

Trabalhos apresentados em congressos

1. ARANTES, G. M. ; SILVA, D. H. S. ; CAVALHEIRO, A. J. ; BOLZANI, V. S. .
Flavonóides isolados das folhas de *Sclerolobium aureum* e *Sclerolobium paniculatum* (Leguminosae). In: 17 Encontro da Sociedade Brasileira de Química - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009, Araraquara. 17 Encontro da Sociedade Brasileira de Química - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009.
2. ARANTES, G. M. ; SILVA, D. H. S. ; CAVALHEIRO, A. J. ; ALECIO, A. C. ; FLUMIGNAN, D. L. ; OLIVEIRA, J. E. ; BOLZANI, V. S. ; CASTRO-GAMBOA, I. .
Perfil cromatográfico do extrato hexânico das folhas de espécies de *Sclerolobium*

- (Leguminosae) por CG-EM. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.
3. ARANTES, G. M.; LUCARINI, R.; CROTTI, A. E. M.; FILHO, A. A. S.; SILVA, M. L. A. ; CUNHA, W. R. Potential hypoglycemic effects of *Leandra lacunosa* extract in alloxan-induced diabetics rats. In: 1st Brazilian Conference on Natural Products, 2007, Águas de São Pedro. 1st Brazilian Conference on Natural Products, 2007.
 4. CREVELIN, E. J. ; ARANTES, G. M. ; FERREIRA, D. S. ; CROTTI, A. E. M. ; SILVA, M. L. A. ; FURTADO, N. A. J. C. ; ALBUQUERQUE, S. ; CUNHA, W. R. . Atividade tripanocida de triterpenos ácidos isolados de espécies de Miconia. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, 2006. PN-047.
 5. MATA, A. I. O.; CREVELIN, E. J.; ARANTES, G. M.; CROTTI, A. E. M.; CUNHA, W. R. Triterpenos isolados de espécies de Miconia (Melastomataceae). In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas. Livro de Resumos, 2005. PN-143.
 6. ARANTES, G. M. ; FERREIRA, D. S. ; MATA, A. I. O. ; CROTTI, A. E. M. ; CUNHA, W. R. . Antidiabetic potential of *Leandra lacunosa* extract in rats. In: 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2005, Ribeirão Preto. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2005. v. 41. p. 301.
 7. ARANTES, G. M.; BETARELLO, H. L.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S.; CUNHA, W. R. In vitro trypanocidal activity of the aerial parts of *Miconia ligustroides* (Melastomataceae). In: 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador. Livro de Resumos, 2004. QB005.
 8. MATA, A. I. O.; CREVELIN, E. J.; ARANTES, G. M.; TURATTI, I. C. C.; CUNHA, W. R. Análise através de cromatografia de fase gasosa do extrato hexânico de *Miconia sellowiana* (Melastomataceae). In: 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004. Livro de Resumos. PN 021.
 9. CUNHA, W. R.; FERREIRA, D. S.; SPESSOTO, M. A.; ARANTES, G. M.; ALBUQUERQUE, S. In vivo trypanocidal activity of triterpenes isolated from Miconia species. In: 4th Congress of Pharmaceutical Sciences, 2003, Ribeirão Preto. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brasil, 2003. v. 39. p. 198.
 10. SPESSOTO, M. A.; CROTTI, A. E. M.; ALBUQUERQUE, S.; ARANTES, G. M.; LOPES, N. P.; CUNHA, W. R. Avaliação in vitro da atividade leishmanicida de triterpenos ácidos isolados de *Miconia pepericarpa* (Melastomataceae). In: Sociedade Brasileira de Química, 2003, Poços de Calda. Livro de Resumos, 2003. QB 001.
 11. ARANTES, G. M.; FERREIRA, D. S.; CUNHA, W. R.; ALBUQUERQUE, S. In vitro trypanocidal activity of *Leandra lacunosa* (Melastomataceae). In: XXIX Annual Meeting on basis research in chagas disease, 2002, Caxambu. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Brasil, 2002. v. 44. p. 106.

Dedico este trabalho...

Ao Autor da Existência...

Aquele que permite que todas as coisas se concretizem, nosso único e verdadeiro Deus.

Aos meus pais...

Pelo amor incondicional, apoio e incentivo em todos os dias da minha vida.

À minha filha Tammy...

*Princesa, você é minha dádiva!
Acredito que:
Só eu poderia ser a sua mãe e só você poderia ser minha filha!
Há nove anos e quatro meses os meus dias
têm sido muito mais felizes!*

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus por esse momento... Pelo final dessa etapa, assim como a sabedoria para chegar até aqui. Que Ele possa iluminar mais uma vez os meus caminhos nessa nova fase... Que se inicia hoje...

Em segundo lugar agradeço a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente, contribuíram para a construção dos meus valores: meus pais, os mestres do passado e todos os que compartilharam comigo um pouco de seus conhecimentos.

Obrigada mãe, pai, Tammy e Lú pela compreensão, quando minha presença não foi possível e quando minha preocupação e atenção pareciam voltar exclusivamente para este trabalho.

O meu agradecimento à direção, meus professores e aos funcionários do Instituto de Química da UNESP, pelo acolhimento, atenção e pelas condições de trabalho ideais para transformar este trabalho em uma produção acadêmica.

À professora Dra. Dulce Helena Siqueira Silva minha professora e orientadora, meus sinceros agradecimentos pela receptividade, confiança, orientação, pelos conselhos e pela compreensão nos momentos em que mais precisei.

Ao professor Dr. Alberto J. Cavalheiro pelas sugestões, disponibilidade, atenção e até pelas broncas!

Às professoras Dra. Isabele Rodrigues Nascimento e Dra. Márcia Nasser Lopes pela convivência e pelo aprendizado durante meu Estágio Docência.

Ao Dr. Nivaldo e ao Dr. Alberto Alcício pelos espectros, pela presteza e pela amizade.

À Luciana Polese, sempre dedicada, me ajudou com sua competência profissional e, principalmente com sua amizade!

Recebi ajudas preciosas de diversos amigos de laboratório, em especial, Marcos Marçal, Gerardo Magela, Daniel Rinaldo, Vânia, Denise e Alexander, sem os quais não teria sido capaz de distribuir e recolher os inquéritos que realizei. Obrigada pela disponibilidade, empenho, dedicação e amizade.

Às funcionárias da Biblioteca e Seção de pós-graduação pela atenção.

Aos professores e alunos que realizaram os ensaios biológicos.

As minhas amigas Carol, Paula e Vanessa por estarem presentes em todos os momentos... Seja pra rir ou pra chorar...

À minha avó Aparecida pela companhia, amizade, apoio, carinho... Ela sempre soube ser o meu porto seguro...

À minha tia Eneida pelo amor de mãe e pela dedicação.

Ao Lú, pela presteza, disposição, paciência, dedicação e pelo amor que sempre soube demonstrar...

À CAPES pela bolsa concedida.

À todos vocês, o meu MUITO OBRIGADA!

“A corrida para a excelência não tem linha de chegada”.

(David Rye)

Resumo

A família Fabaceae é subdividida em 3 subfamílias: Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae, que englobam mais de 700 gêneros e 18000 espécies, bem distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. Inclui espécies de alta relevância econômica, como a soja, feijão, cerejeira, angelim e sucupira, além do pau-brasil, de importância histórica para o Brasil. Neste trabalho, os extratos etanólicos das folhas de *Sclerolobium aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* mostraram forte potencial antioxidante, sendo selecionados para investigação fitoquímica detalhada. O fracionamento cromatográfico destes extratos evidenciou sua composição química, destacando-se a presença de esqualeno, tocoferóis e lupenona, identificados por CG-EM, predominantes nas frações de baixa polaridade. O extrato hidroalcoólico de *S. aureum* foi submetido a etapas de purificação, incluindo o uso de CLAE-UV-DAD, evidenciando a presença majoritária de ácido gálico, flavonoides monoglicosilados e catequina, identificados por RMN, EM e UV. Os extratos hidroalcoólicos de *S. denudatum* e *S. paniculatum* foram submetidos a partição líquido-líquido e as frações resultantes foram analisadas por CLAE-UV-DAD e CLAE-EM-EM para identificação dos seus constituintes por desreplicação, ou seja, evitando-se procedimentos de purificação de substâncias conhecidas. Esta estratégia permitiu conhecer os metabólitos secundários das três espécies, que apresentaram perfis químicos semelhantes com a predominância de flavonoides monoglicosilados.

As frações semipurificadas e substâncias isoladas mostraram elevado potencial de sequestro de radicais livres frente ao DPPH, destacando-se a presença de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, atrativa para aplicações em cosméticos. Adicionalmente, foi observado potencial imunomodulador, evidenciado pela inibição da liberação de nitrito de maneira dose-dependente, para as frações hexânica e acetato de etila de *S. denudatum*, o que reforça seu potencial de aplicação como antiinflamatório em processos redox. Estas frações foram ainda avaliadas frente a formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, porém com fraca atividade tripanocida; e frente a fungos patógenos humanos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. Os extratos de *S. paniculatum* e as frações acetato de etila e butanólica de *S. aureum* mostraram forte potencial antifúngico contra *C. krusei*, com CIM menor que 8 µg/mL, podendo ser considerados fonte potencial de substâncias para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Esses dados corroboram a importância de estudos de bioprospecção envolvendo técnicas modernas, contribuindo para a exploração racional da biodiversidade brasileira.

Palavras-chave: *Sclerolobium*, flavonoide, CLAE-EM, antifúngico, antioxidante.

Abstract

Fabaceae family comprises 3 subfamilies: Faboideae, Caesalpinoideae and Mimosoideae, with more than 700 genera and 18000 species, widespread in tropical and subtropical regions. It includes economically important species as soybean, beans, angelim, sucupira, in addition to pau-brasil (*Caesalpinea echinata*), which has historical importance in Brazil for its wood pigments. In this work, ethanol extracts of *Sclerolobium aureum*, *S. denudatum* and *S. paniculatum* leaves were investigated and showed strong antioxidant potential, and were selected for further investigation. Their chromatographic fractionation evidenced the presence of squalene, tocopherols and lupenone as major compounds in low polarity fractions, by GC-MS analysis. The hydroalcoholic extract of *S. aureum* was submitted to purification procedures, including the use of HPLC-UV-DAD, which evidenced gallic acid, flavonoid monoglucosides and catechin as major compounds, identified mainly by NMR, MS and UV techniques. HPLC-UV-DAD and LC-MS-MS analysis were further carried out on the hydroalcoholic extract of *S. denudatum* and *S. paniculatum*, leading to the identification of their major constituents by dereplication, avoiding the purification of known compounds. Such strategy evidenced a similar chemical profile for the three *Sclerolobium* species, with flavonoid monoglucosides as major compounds.

Strong free radical scavenging potential was observed for the fractions and isolated compounds towards DPPH, evidencing the presence of lipophilic and hydrophilic antioxidants, which might be important for cosmetics development. In addition, the immunomodulatory potential of the hexane and ethyl acetate fractions from *S. denudatum* were evidenced through the dose-dependent inhibition of nitrite release by pre-treated macrophages, which might be associated to anti-inflammatory properties related to redox processes in biological systems. Such fractions were also evaluated towards epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, evidencing weak tripanocidal activity; and towards human pathogens *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans*. Crude extracts from *S. paniculatum* and the ethyl acetate and butanol fractions from *S. aureum* displayed strong antifungal activity towards *C. krusei*, with MIC lower than 8 ug/mL., which might be considered for further development of therapeutic agents against fungal infections. Such data corroborate the importance of bioprospecting studies, involving state-of-the-art techniques, which represents major contributions for the rational exploration of biodiversity in Brazil.

Key-words: *Sclerolobium*, flavonoid, HPLC-MS, antifungal, antioxidant.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
ACN	Acetonitrila
BuOH	Butanol
C18	Fase reversa octadecilsilano
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia à Gás
CG-DIC	Cromatografia à Gás com Detecção por Ionização em Chama (Gas Chromatography - Flame Ionization Detector)
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (Gas Chromatography - Mass Spectrometry)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	CORrelated SpectroscopY
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DAD	Photodiode Array Detector (Detector com Arranjo de Fotodiodos)
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de Massas (Mass Spectrometry)
ELL	Extração Líquido-Líquido
ERO	Espécies reativas de oxigênio

ESI	Electrospray ionization (Ionização por <i>electrospray</i>)
EtOH	Etanol
Fr-Hex	Fração de partição hexânica
Fr-AcOEt	Fração de partição acetato de etila
Fr-BuOH	Fração de partição butanólica
Fr-AQ	Fração de partição aquosa
DPPH	2,2 difenil-1-picril-hidrazila
gCOSY	gradient Correlation Spectroscopy
gHMBC	gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlations
gHMQC	gradient Heteronuclear Multiple Quantun Coherence
HEX	Hexano
HCOOH	Ácido fórmico
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos (High Performance Chromatography with Diode Array Detector)
Liquid	Chromatography with Diode Array Detector)
DO	densidade ótica
Hz	Hertz
IC ₅₀	Avaliação do índice de citotoxicidade
J	Constante de acoplamento
LPS	Lipopolissacarídios
m	Multiplete
[M – H] ⁻	Molécula desprotonada
MeOH	Metanol
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dipentiltetrazolio bromideo]
<i>m/z</i>	Massa/carga
NOESY	Nuclear Overhause Effect Spectroscopy
RMN- ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
TOCSY-1D	Total Correlation Spectroscopy, 1D
tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Redução de radicais livres pelo grupo catecol (anel B).	4
Figura 2:	Estrutura do flavonol quercetina	5
Figura 3:	Sítios de ligação de metais em flavonoides	5
Figura 4:	Estruturas químicas dos tocoferóis e tocotrienóis.	7
Figura 5:	Etapas da lipoperoxidação e ação antioxidante do α -tocoferol	8
Figura 6:	Estratégia para identificação de novos princípios ativos utilizando a combinação da triagem biológica (I) combinada com a triagem química (II) de acordo com Queiroz et al., 2009	11
Figura 7:	Coluna do clareamento do extrato bruto hexânico de <i>S.aureum</i> .	23
Figura 8:	Ilustração do seqüestro do radical DPPH	33
Figura 9:	FHAC1	40
Figura 10:	FHAC2	40
Figura 11:	FHAC3	40
Figura 12:	Cromatograma CG-EM de <i>S. aureum</i> .	41
Figura 13:	Cromatograma CG-EM de <i>S. denudatum</i>	41
Figura 14:	Cromatograma CG-EM de <i>S. paniculatum</i>	41
Figura 15:	Espectro de massas de esqualeno	41
Figura 16:	Proposta de fragmentação para esqualeno	42
Figura 17:	Espectro de massas de α -tocoferol	42
Figura 18:	Proposta de fragmentação para α -tocoferol de acordo com Kalman et al.(2003).	43
Figura 19:	Espectro de massas de lupenona	44
Figura 20:	Proposta de fragmentação de acordo com Budzikiewicz et al. (1963) e Heizen et al. (1996).	44

Figura 21:	Cromatograma dos padrões: esqualeno, α -tocoferol, e lupenona	45
Figura 22:	Cromatogramas CG-DIC das frações obtidas no clareamento de <i>S. aureum</i> .	45
Figura 23:	Cromatograma do extrato hidroalcoólico de <i>S. denudatum</i> obtido por CLAE-UV-DAD e registrado a 254 nm e espectros no UV dos picos majoritários com tr: 23,39, 25,57 e 25,90 min. Coluna C18 eluida com 5% de MeOH até 100% de MeOH durante 40'.	47
Figura 24:	Cromatograma do extrato hidroalcoólico de <i>S. paniculatum</i> obtido por CLAE-UV-DAD e registrado a 254 nm e espectros no UV dos picos majoritários com tr: 22,06 e 23,39 min. Coluna C18 eluida com 5% de MeOH até 100% de MeOH durante 40'.	47
Figura 25:	Cromatograma do extrato hidroalcoólico de <i>S. aureum</i> obtido por CLAE-UV-DAD e registrado a 254 nm e espectros no UV dos picos majoritários com tr: 22,37, 23,37, 25,02 e 25,16 min. Coluna C18 eluida com 5% de MeOH até 100% de MeOH durante 40'.	48
Figura 26:	Cromatograma do extrato hidroalcoólico de <i>S. aureum</i> obtido por CLAE-UV-DAD registrado em 254 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'.	49
Figura 27:	Cromatograma do extrato hidroalcoólico de <i>S. denudatum</i> obtido por CLAE-UV-DAD registrado a 254 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'.	49
Figura 28:	Cromatograma do extrato hidroalcoólico de <i>S. paniculatum</i> obtido por CLAE-UV-DAD registrado a 254 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'.	49
Figura 29:	Cromatograma da fração Fr-AcOEt de <i>S. aureum</i> obtido por CLAE - DAD registrado a 254 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'.	50

Figura 30:	Cromatograma da fração Fr-AcOEt de <i>S. denudatum</i> obtido por CLAE-DAD registrado a 366 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'.	50
Figura 31:	Cromatograma da fração Fr-AcOEt de <i>S. paniculatum</i> obtido por CLAE-DAD registrado a 366 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'	51
Figura 32:	Estrutura do esqualeno (SPa-Hex-1)	52
Figura 33:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 410, obtido no modo negativo.	53
Figura 34:	Estrutura do α -tocoferol (SPa-Hex-2)	54
Figura 35:	Cromatograma de SA-3 obtido por CLAE-UV-DAD registrado a 254 nm. Coluna C18 eluída em gradiente exploratório: 5% de MeOH até 100% de MeOH durante 40'.	57
Figura 36:	Espectro de UV referente ao tr: 15,04	58
Figura 37:	Espectro de UV referente ao tr: 20,1.	
Figura 38:	Substância majoritária de SA-3 (tr: 15.04 min): catequina.	60
Figura 39:	Estrutura da miricetina-3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo (SPa-14-17-A).	61
Figura 40:	Estrutura da miricetina-3- <i>O</i> - α -ramnopiranosídeo (SPa-14-17-B)	62
Figura 41:	Estrutura da quercetina-3- <i>O</i> - β -arabinopiranosídeo (SA-FAc-7)	64
Figura 42:	Estrutura da miricetina-3- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -galoil)- α -ramnopiranosídeo (SA-FAc-9)	66
Figura 43:	Estrutura do ácido gálico (SPa-Fac-1-2)	68
Figura 44:	Espectro de massas de primeira-ordem com íon molecular de m/z 169, obtido no modo negativo.	68
Figura 45:	Estrutura da quercetina-3- <i>O</i> - α -arabinofuranosídeo (SD-FAc-9)	70

Figura 46:	Estrutura da quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (SD-Fac-10)	72
Figura 47:	Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos obtidos por CLAE-DAD registrados a 254 nm. Eluição: 17% para 19% de B em 30', 19% para 24% de B até 40', 24% para 35% de B até 50', 35% para 100% de B até 60'. Fluxo: 1mL/min. Coluna Shimadzu® C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m), HPLC (Shimadzu®)	75
Figura 48:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 479, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	76
Figura 49:	Estrutura da miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (Pico 2)	77
Figura 50:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 479, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	77
Figura 51:	Cromatograma de eluição do flavonóide miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo em CLAE-UV-DAD. Eluição: 17% para 19% de B em 30', 19% para 24% de B até 40', 24% para 35% de B até 50', 35% para 100% de B até 60'. Fluxo: 1mL/min. Coluna Shimadzu® C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m), HPLC (Shimadzu®)	78
Figura 52:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 449, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	79
Figura 53:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 463, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	80
Figura 54:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 463, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	81
Figura 55:	Estrutura da quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo (Pico 6).	82
Figura 56:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 463, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	83

Figura 57:	Cromatograma de eluição do flavonóide quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo em CLAE-UV-DAD. Eluição: 17% para 19% de B em 30', 19% para 24% de B até 40', 24% para 35% de B até 50', 35% para 100% de B até 60'. Fluxo: 1mL/min. Coluna Shimadzu® C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m), HPLC (Shimadzu®)	83
Figura 58:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 433, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	84
Figura 59:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 447, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	85
Figura 60:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 615, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	86
Figura 61:	Estrutura da miricetina-3-O-(3''-O-galoil)- α -raminopiranosídeo (Pico 10).	87
Figura 62:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 615, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	88
Figura 63:	Cromatograma de eluição do flavonóide quercetina-3-O- α -raminopiranosídeo em CLAE-UV-DAD. Eluição: 17% para 19% de B em 30', 19% para 24% de B até 40', 24% para 35% de B até 50', 35% para 100% de B até 60'. Fluxo: 1mL/min. Coluna Shimadzu® C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m), HPLC (Shimadzu®).	88
Figura 64:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 433, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	89
Figura 65:	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 599, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.	90
Figura 66:	Cromatograma de separação por HPLC-UV-DAD dos extratos hidroalcoólicos das folhas de: <i>S. aureum</i> , <i>S. denudatum</i> e <i>S. paniculatum</i> . Identificação: 1 miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo; 2 miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo; 3 miricetina-3-O- β -arabinopiranosídeo; 4 miricetina-3-O- α -raminopiranosídeo; 5 NI*; 6 quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo; 7 quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo; 8 quercetina-3-O- α -	91

ramnopiranosídeo; 9 miricetina-3-O-(2'' galoil)- α -ramnopiranosídeo; 10 miricetina-3-O-(3'' galoil)- α -ramnopiranosídeo; 11 quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo; 12 NI*. Eluição: 17% para 19% de B em 30', 19% para 24% de B até 40', 24% para 35% de B até 50', 35% para 100% de B até 60'. Coluna Shimadzu® C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m), HPLC (Shimadzu®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 254 nm.

Figura 67:	Avaliação da atividade seqüestradora do radical DPPH dos extratos hexânicos e hidroalcoólicos de <i>Sclerolobium sp.</i>	92
Figura 68:	Avaliação da atividade seqüestradora do radical DPPH das frações de partição obtidas dos extratos hidroalcoólicos <i>Sclerolobium sp.</i>	93
Figura 69:	Avaliação da atividade seqüestradora do radical DPPH das substâncias isoladas dos extratos hidroalcoólicos de <i>Sclerolobium sp.</i>	93
Figura 70:	Inibição da liberação de nitrito após estímulo por LPS na presença de concentrações de crescentes da amostra SD-Hex de <i>Sclerolobium denudatum</i> .	99
Figura 71:	Inibição da liberação de nitrito após estímulo por LPS na presença de concentrações de crescentes da amostra SD-Fr-AcOEt de <i>Sclerolobium denudatum</i> .	99
Figura 72:	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) do esqualeno (Spa-Hex-1).	114
Figura 73:	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (500 MHz) do esqualeno (Spa-Hex-1).	114
Figura 74:	Ampliação do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz) do esqualeno (Spa-Hex-1).	115
Figura 75:	Ampliação do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz) do esqualeno (Spa-Hex-1).	115
Figura 76:	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) do α -tocoferol (SPa-Hex-2).	116
Figura 77:	Ampliação do espectro de RMN ¹ H (500 MHz) do α -tocoferol (SPa-Hex-2).	116
Figura 78:	Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz) do α -tocoferol (SPa-Hex-2).	117

Figura 79:	Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do α -tocoferol (SPa-Hex-2).	117
Figura 80:	Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do α -tocoferol (SPa-Hex-2).	118
Figura 81:	Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do α -tocoferol (SPa-Hex-2).	118
Figura 82:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da catequina (SA-3).	119
Figura 83:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da catequina (SA-3).	119
Figura 84:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da catequina (SA-3).	120
Figura 85:	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da catequina (SA-3).	120
Figura 86:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (SPa-14-17-A).	121
Figura 87:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (SPa-14-17-A).	121
Figura 88:	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da substância miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (SPa-14-17-A).	122
Figura 89:	Ampliação do espectro de gHMBC da substância miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (SPa-14-17-A).	122
Figura 90:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (SPa-14-17-B).	123
Figura 91:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (SPa-14-17-B).	123
Figura 92:	Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da substância miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (SPa-14-17-B).	124
Figura 93:	Espectro de gHMBC da substância miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (SPa-14-17-B).	124
Figura 94:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância quecetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (SA-Fac-7).	125
Figura 95:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância quecetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (SA-Fac-7).	125

Figura 96:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância quecetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (SA-Fac-7).	126
Figura 97:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância quecetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (SA-Fac-7).	126
Figura 98:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (SA-Fac-9).	127
Figura 99:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (SA-Fac-9).	127
Figura 100:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (SA-Fac-9).	128
Figura 101:	Espectro de gHMBC da miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (SA-Fac-9).	128
Figura 102:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do ácido gálico (SPa-Fac-1-2).	129
Figura 103:	Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do ácido gálico (SPa-Fac-1-2).	129
Figura 104:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (SD-Fac-9)	130
Figura 105:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da quercetina-3-O- α arabinofuranosídeo (SD-Fac-9)	130
Figura 106:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (SD- Fac-10).	131
Figura 107:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (SD- Fac-10).	131
Figura 108:	Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da quercetina-3-O- α ramnopiranosídeo (SD- Fac-10).	132

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 3:	Inativação enzimática de espécies reativas de oxigênio (ERO).	9
Esquema 4:	Doenças associadas às ERO.	10

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Aplicações de técnicas hifenadas para a investigação de composição química de plantas medicinais.	12
Tabela 2:	Massa do material seco e do extrato bruto obtido.	21
Tabela 3:	Frações obtidas do fracionamento do extrato bruto hexânico de <i>S. paniculatum</i> .	22
Tabela 4:	Massas das frações obtidas das partições de <i>Sclerolobium aureum</i> .	25
Tabela 5:	Massas das frações obtidas das partições de <i>Sclerolobium denudatum</i> .	26
Tabela 6:	Massas das frações obtidas das partições de <i>Sclerolobium paniculatum</i> .	26
Tabela 7:	Gradiente exploratório para a análise dos perfis químicos dos extratos brutos das espécies de <i>Sclerolobim sp.</i>	27
Tabela 8:	Gradiente de eluição cromatográfica otimizado para a eluição dos metabólitos secundários das espécies de <i>Sclerolobium</i> .	27
Tabela 9:	Fracionamento do extrato hidroalcoólico <i>S. aureum</i> .	28
Tabela 10:	Fracionamento do extrato hidroalcoólico <i>S. aureum</i> .	28
Tabela 11:	Gradiente exploratório para a análise de SA-3.	29
Tabela 12:	Método utilizado no fracionamento da FrAcOet de <i>S. aureum</i> em CLAE preparativa.	29
Tabela 13:	Fracionamento do extrato hidroalcoólico <i>S. aureum</i> .	30
Tabela 14:	Método utilizado para CLAE preparativa de Fp5	31
Tabela 15:	Método utilizado no fracionamento da FrAcOet de <i>S. denudatum</i> em CLAE preparativa.	31
Tabela 16:	Gradiente de eluição cromatográfica otimizado para a eluição dos metabólitos secundários das espécies de <i>Sclerolobium</i> .	32

Tabela 17:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C para o esqualeno (Spa-Hex-1) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CDCl_3)	33
Tabela 18:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C para o α -tocoferol (Spa-Hex-2) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CDCl_3)	53
Tabela 19:	Dados de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 90 E 135° para a substância majoritária de SA-3 em comparação com dados da literatura (tr: 15.04 min - 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , $\text{DMSO-}d_6$)	58
Tabela 20:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C para miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (Spa-14-17-A) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , $\text{DMSO-}d_6$).	60
Tabela 21:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C para miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (Spa-14-17-B) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , $\text{DMSO-}d_6$).	62
Tabela 22:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C para quercetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (SA-Fac-7) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , $\text{DMSO-}d_6$).	64
Tabela 23:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C para miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (SA-Fac-9) (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , $\text{DMSO-}d_6$).	67
Tabela 24:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C para o ácido gálico (Spa-1-2) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , $\text{DMSO-}d_6$)	69
Tabela 25:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C para quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (SD- Fac-9) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , $\text{DMSO-}d_6$).	71
Tabela 26:	Dados de RMN ^1H e ^{13}C para quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (SD- Fac-10) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , $\text{DMSO-}d_6$).	73
Tabela 27:	Resultado da avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos das espécies de <i>Sclerolobium</i> .	94
Tabela 28:	Resultado da avaliação da atividade antifúngica das frações de partição do extrato hidroalcoólico de <i>S. aureum</i> .	95
Tabela 29:	Avaliação da atividade tripanocida dos extratos brutos de <i>S. aureum</i> , <i>S. denudatum</i> e <i>S. paniculatum</i> .	96

Tabela 30: Avaliação da atividade tripanocida das frações de partição do extrato hidroalcoólico de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*. 97

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Família Fabaceae	2
1.3 Gênero <i>Sclerolobium</i> (Fabaceae- Caesalpinioideae).....	2
1.3.1 <i>Sclerolobium aureum</i>	3
1.3.2 <i>Sclerolobium denudatum</i>	3
1.3.3 <i>Sclerolobium paniculatum</i>	3
1.4 Pesquisa de bioprospecção e busca por antioxidantes em espécies vegetais	4
1.5 Radicais livres	9
1.6 O uso de técnicas hifenadas na fitoquímica.....	10
2. OBJETIVOS	15
3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	17
3.1 Solventes	17
3.2 Especificações de instrumentos e colunas cromatográficas.....	17
3.4 Reveladores para CCDC	18
3.5 Reagentes utilizados em análises espectrofotométricas (DPPH)	18
3.6 Equipamentos de espectrometria.....	19
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	21
4.1 Obtenção do material vegetal	21
4.2 Obtenção dos extratos de <i>S. aureum</i> , <i>S. denudatum</i> e <i>S. paniculatum</i> ..	21
4.3 Análises dos extratos por CCDC.....	22
4.4 Extratos brutos hexânicos	22
4.4.1 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto hexânico de <i>S. paniculatum</i>	22
4.4.2 Clareamento do extrato hexânico de <i>S. aureum</i>	23
4.4.3 Análise por CG-EM	24
4.4.4 Análise por CG- DIC	24
4.5 Extratos brutos hidroalcoólicos	25
4.5.1 Extração líquido-líquido do extrato bruto hidroalcoólico de <i>S. aureum</i>	25

4.5.2	Extração líquido-líquido do extrato bruto hidroalcoólico de <i>S. denudatum</i>	25
4.5.3	Extração líquido-líquido do extrato bruto hidroalcoólico de <i>S. paniculatum</i>	26
4.5.4	Análises dos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies <i>S.aureum</i> , <i>S. denutadum</i> e <i>S. paniculatum</i> por CLAE-UV-DAD.....	27
4.5.5	Otimização das condições de análise dos extratos hidroalcoólicos e das frações de partição ACOEt das folhas das espécies <i>S.aureum</i> , <i>S. denutadum</i> e <i>S. paniculatum</i> por CLAE-UV-DAD.....	27
4.5.6	Fracionamento cromatográfico do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Sclerolobium aureum</i>	28
4.5.8	Fracionamento da FrACOEt obtida da partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico de <i>S. aureum</i>	29
4.5.9	Fracionamento da FrACOEt obtida da partição liquido-liquido do extrato hidroalcoólico de <i>S. paniculatum</i>	30
4.5.10	Fracionamento de Fp5 por CLAE-UV-DAD.....	30
4.5.11	Fracionamento da FrACOEt obtida da partição liquido-liquido do extrato hidroalcoólico de <i>S. denudatum</i>	31
4.5.12	Identificação dos metabólitos presentes nos extratos hidroalcoólicos de <i>S. aureum</i> , <i>S. denudatum</i> e <i>S. paniculatum</i> por CLAE-UV-EM.....	32
4.6	Ensaio biológicos.....	33
4.6.1	Atividade antioxidante dos extratos de <i>Sclerolobium sp</i> pelo método do DPPH.....	33
4.6.2	Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos e frações de partição dos extratos hidroalcoólicos de <i>S. aureum</i> , <i>S. paniculatum</i> e <i>S. denudatum</i>	34
4.6.3	Avaliação da atividade tripanocida dos extratos brutos e frações de partição dos extratos hidroalcoólicos de <i>S. aureum</i> , <i>S. paniculatum</i> e <i>S. denudatum</i>	35
4.6.4	Avaliação da atividade antiinflamatória dos extratos brutos e frações de partição dos extratos hidroalcoólicos de <i>S. aureum</i> , <i>S. paniculatum</i> e <i>S. denudatum</i>	35
5.4.5	Quantificação de Nitrito (NO ₂).....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1	Extratos hexânicos.....	40
5.1.2	Clareamento dos extratos brutos hexânicos de <i>S. aureum</i>	40
5.1.3	Análise dos extratos hexânicos de <i>Sclerolobium spp</i> por CG-EM	40

5.1.4	Espectro de massas e fragmentação do esqualeno	41
5.1.5	Espectro de massas e fragmentação de α -tocoferol.....	42
5.1.6	Espectro de massas e fragmentação de lupenona	43
5.1.7	CG-EM dos padrões esqualeno, α - tocoferol, e lupenona.	45
5.2	Extratos hidroalcoólicos	46
5.2.1	Análises por CLAE-UV-DAD dos extratos hidroalcoólicos de <i>S. aureum</i> , <i>S. denudatum</i> e <i>S. paniculatum</i>	46
5.2.2	Otimização por CLAE-UV-DAD dos extratos hidroalcoólicos <i>S. aureum</i> , <i>S. denudatum</i> e <i>S. paniculatum</i>	48
5.2.3	Análise por CLAE-UV-DAD das frações de partição FrACOEt de <i>S. aureum</i> , <i>S. denudatum</i> e <i>S. paniculatum</i>	50
5.3	Elucidação estrutural das substâncias isoladas	52
5.3.1	Elucidação estrutural de Spa-Hex-1	52
5.3.2	Elucidação estrutural de Spa-Hex-2	54
5.3.3	Elucidação estrutural de SA-3	56
5.3.4	Elucidação estrutural de Spa-14-17-A	59
5.3.5	Elucidação estrutural de Spa-14-17-B	61
5.3.7	Elucidação estrutural de Sa-Fac-9.....	65
5.3.8	Elucidação estrutural de Spa-Fac-1-2.....	68
5.3.9	Elucidação estrutural de SD- Fac-9	70
5.3.9	Elucidação estrutural de SD- Fac-10	72
5.4	Identificação dos metabólitos presentes nos extratos hidroalcoólicos de <i>S. aureum</i> , <i>S. denudatum</i> e <i>S. paniculatum</i> por CLAE-UV-EM.....	74
5.4.1	Identificação estrutural da substância associada ao Pico 1.....	76
5.4.2	Identificação estrutural da substância associada ao Pico 2.....	77
5.4.3	Identificação da substância associada ao Pico 3.....	79
5.4.4	Identificação estrutural da substância associada ao Pico 4.....	80
5.4.5	Identificação estrutural da substância associada ao Pico 5.....	81
5.4.6	Identificação estrutural da substância associada ao Pico 6.....	82
5.4.7	Identificação estrutural da substância associada ao Pico 7.....	84
5.4.8	Identificação estrutural da substância associada ao Pico 8.....	85
5.4.9	Identificação estrutural da substância associada ao Pico 9.....	86
5.4.10	Identificação estrutural da substância associada ao Pico 10.....	87
5.4.11	Identificação estrutural da substância associada ao Pico 11.....	89

5.4.12 Identificação estrutural da substância associada ao pico 12	90
5.4.13 Caracterização dos perfis dos extratos hidroalcoólicos de <i>S. aureum</i> , <i>S. denudatum</i> e <i>S. paniculatum</i>	91
5.5 Ensaio biológicos	92
5.5.1 Resultados da atividade antioxidante pelo método do DPPH dos extratos, frações de partição e substâncias isoladas de <i>Sclerolobium sp.</i>	92
5.5.2 Resultados da atividade antifúngica dos extratos brutos e frações das espécies de <i>Sclerolobium</i>	94
5.5.3 Resultados da atividade tripanocida dos extratos brutos e frações das espécies de <i>Sclerolobium</i>	96
5.5.4 Resultados da atividade anti-inflamatória dos extratos brutos e frações de partição dos extratos hidroalcoólicos de <i>S. aureum</i> , <i>S.</i> <i>paniculatum</i> e <i>S. denudatum</i>	98
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
REFERÊNCIAS	105
FIGURAS DE ESPECTROS MONO E BIDIMENSIONAIS	114

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A utilização de espécies vegetais com fins medicinais é uma prática bastante utilizada pela população, que há milênios vem sendo empregada, acumulando assim conhecimentos, embora empíricos, mas utilizados de geração em geração através de todos os tempos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal despertou e ainda desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial [MACIEL, 2002].

Durante séculos, as plantas medicinais constituíram o principal e às vezes o único recurso medicamentoso disponível, até o advento da síntese orgânica, através da qual são produzidos, em um curto período de tempo um número apreciável de compostos químicos farmacologicamente ativos e, a partir de então, a utilização de vegetais com finalidades terapêuticas, diminuiu. [TEMPESTH & STEVEN, 1994; SIMÕES *et al.*, 2001]. Entretanto, alguns indicadores têm mostrado um aumento significativo da fitoterapia na atualidade. A indústria farmacêutica motivada, em parte, pela descoberta de quimioterápicos eficazes como vimblastina (Velbana®), vincristina (Oncovina®), podofilotoxina e os análogos etoposídeo (VP-16-213; Vepesidea®) e teniposídeo (VM-26; Vumona®), camptotecina e taxol (paclitaxel; Taxola®), reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional [MONTANARI & BOLZANI, 2001].

Assim, o cenário atual aponta para a intensificação de estudos que visam a exploração sustentável de plantas visando a descoberta de novos agentes terapêuticos.

1.2 Família Fabaceae

Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas possuindo 642 gêneros e 18 mil espécies distribuídas pelo mundo todo, subdividida em 3 subfamílias: Faboideae (ou Papilionoideae), Caesalpinioideae (ou Caesalpinieae) e Mimosoideae. Na Amazônia brasileira está amplamente distribuída e ocorre em todos os ecossistemas tendo importância não só do ponto de vista ecológico quanto pelo valor econômico de suas espécies. [POLHILL & RAVEN, 1981; WATSON & DALLWITZ, 1992, DI STASI & HIRUMA, 2002;]

As leguminosas possuem a capacidade de associar-se com bactérias do gênero *Rhizobium*, que são fixadoras do nitrogênio atmosférico. Sendo predominantemente uma família de plantas lenhosas, parecem conter maiores teores de nitrogênio nas folhas do que a maioria das plantas lenhosas de outras famílias. Esta característica permite realizar taxas maiores de fotossíntese (desde que outros recursos estejam disponíveis) e, conseqüentemente, um maior crescimento, especialmente sob intensidades mais elevadas de luz. [DIAS, 1991]

Muitas espécies de Leguminosae têm sido usadas na medicina popular nos tratamentos de anemia, malária, como agente antitumoral, anti-helmíntico, antipirético e diurético. [HARBORNE, 1997; IQBAL, 1998]

1.3 Gênero *Sclerolobium* (Fabaceae- Caesalpinioideae)

O gênero *Sclerolobium* (Fabaceae-Caesalpinioideae), compreende cerca de 60 espécies com ocorrência predominante em regiões tropicais e subtropicais. Espécies de *Sclerolobium* foram pouco estudadas do ponto de vista fitoquímico, existindo apenas uma referência na literatura onde foi realizado um estudo dos constituintes químicos da madeira de *S. densiflorum* Benth, *S. aureum* Benth e *S. paniculatum* Vog, com o isolamento principalmente de triterpenos, esteróides e isoflavonas [BEZERRA, 1994].

Estudos anteriores realizados em nossos laboratórios evidenciaram a ocorrência de flavonoides, tocotrienóis e tocoferóis em folhas de espécies de *Sclerolobium*. Essas substâncias tiveram seu potencial antioxidante avaliado por diversos métodos, incluindo o descoramento de beta-caroteno em CCDC e o seqüestro do radical livre DPPH, mostrando forte atividade.

1.3.1 *Sclerolobium aureum*

Conhecida popularmente como gonçalo-do-campo, pau-bosta, fedefede, sucupira, tartarema, *S. aureum* é uma árvore do cerrado de porte médio possuindo casca áspera e descamante, clara; folhas alternas, 5 a 9 folíolos opostos ou subopostos, ovais e oblongos, base obtusa e arredondada, ápice agudo a arredondado, cerca de 7 cm de comprimento e 3,5 cm de largura; flores amarelo-ouro, aromáticas, dispostas em panículas terminais amplas, fruto indeiscente. Na medicina popular, *S. aureum* é utilizada como hepatoprotetor [COELHO et. al., 2005].

1.3.2 *Sclerolobium denudatum*

S. denudatum, conhecida popularmente como passariúva, passuré, angá, bascuaré e ingá-ferro, é uma árvore endêmica da Mata Atlântica. Apresenta altura de aproximadamente 20-30 m, com troncos de 60-80 cm de diâmetro. A árvore apresenta-se frondosa, podendo ser empregada com sucesso em paisagismo. É também utilizada em reflorestamentos e destinada a recomposição de áreas degradadas de preservação permanente [LORENZI, 1998].

1.3.3 *Sclerolobium paniculatum*

Conhecida popularmente como taxi-branco, pau-pombo e carvoeiro, é uma árvore de grande porte que varia de 8 a 30 metros de altura, tronco reto e cilíndrico. Flores amarelo-claras, numerosas, aromáticas, pequenas, dispostas em panículas terminais e fruto vagem. É uma espécie comum no Brasil, distribuindo-se na região amazônica, oeste da Bahia, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. A planta é rústica e apresenta bom potencial de crescimento nestas regiões, sendo recomendada para reflorestamentos heterogêneos em áreas degradadas [CARVALHO, 2003; LORENZI 1998; LORENZI 1992]. Tem se destacado pelo rápido crescimento e sua madeira é amplamente utilizada por comunidades rurais na confecção de mourões, esteios, embalagens e caibros, na construção civil, além de fonte para a produção de lenha e carvão vegetal, sendo inclusive indicada para

plantios energéticos [CARVALHO 2003; FRANKE 1999; LORENZI 1998; DIAS *et al.* 1992; DINIZ 1982;]. Na medicina popular, a casca do caule de *S. paniculatum* é utilizada como cicatrizante [FRANCO & BARROS, 2006].

1.4 Pesquisa de bioprospecção e busca por antioxidantes em espécies vegetais

O interesse pelos produtos "fitocêuticos" para inibição das doenças crônicas e o envelhecimento vem se fortalecendo, devido principalmente, ao grande número de doenças com o envolvimento de radicais livres ou das ERO.

De acordo com Halliwell (1994), "antioxidante é qualquer substância que quando presente em baixa concentração comparada ao substrato oxidável regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo".

Antioxidantes naturais incluem uma grande variedade de substâncias fenólicas. Os polifenóis e em particular os flavonoides, são potentes agentes antioxidantes, em geral hidrossolúveis, que possuem em sua estrutura básica 15 átomos de carbono dispostos em três anéis: A, B e C. Sua função antioxidante se define principalmente pela presença de um grupo catecol no anel B (Figura 1) capaz de doar elétrons, reduzindo os radicais livres e neutralizando a ação dos mesmos [PIETTA, 2000].

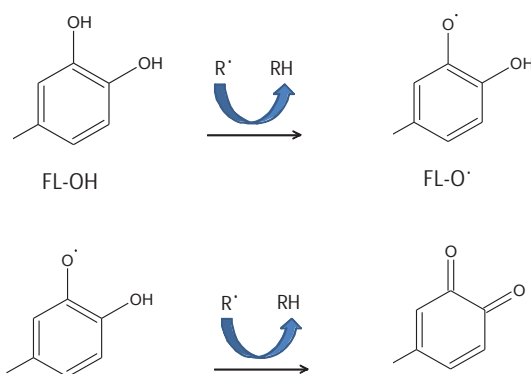


Figura 5: Redução de radicais livres pelo grupo catecol (anel B).

Fonte: PIETTA (2000).

Muitos estudos têm sido realizados para estabelecer a relação entre estrutura-atividade de flavonoides e o seqüestro de radicais livres. Segundo Bors *et al.* (1999) as características estruturais determinantes para a capacidade de seqüestro de radicais são: a presença de um grupo catecol no anel B, o qual possui melhores propriedades de doação de elétrons; uma ligação dupla conjugada com a função 4-oxo e a presença de grupos funcionais, que formam sítios para a quelação de metais de transição (Figuras 2 e 3).

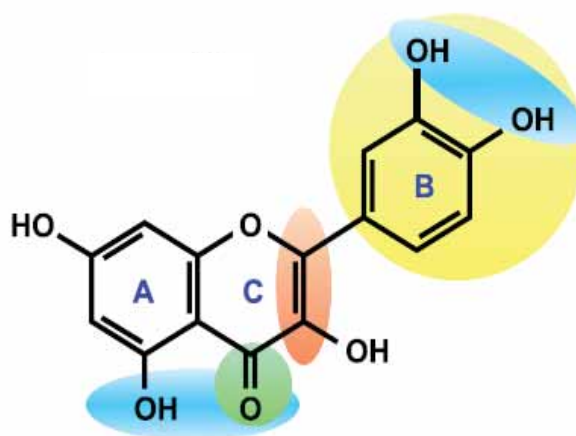


Figura 6: Estrutura do flavonol quercetina mostrando características importantes na definição do potencial antioxidante dos flavonoides. A mais importante destas é a presença do grupo catecol ou anel B dihidroxilado (sombreado amarelo). Outras características importantes incluem a presença de uma insaturação no anel C (sombreado vermelho) e a presença de uma função 4-oxo no anel C (sombreado verde). O grupo catecol e outras funções também podem contribuir para a quelação de metais de transição como ferro e cobre (sombreado azul), indutores de espécies radiculares. [SPENCER, KUHNLE, WILLIAMS & RICE-EVANS, 2003].

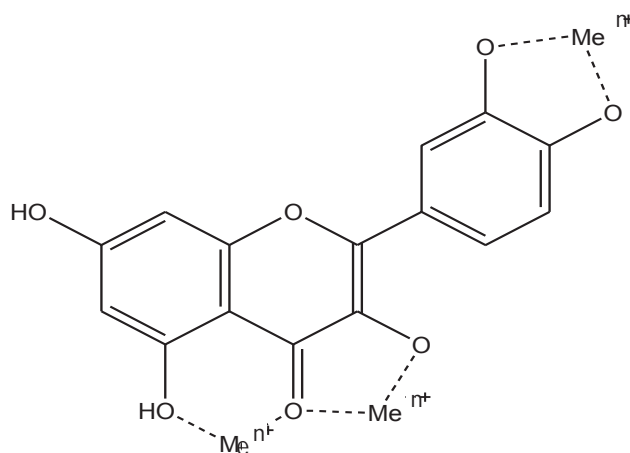


Figura 3: Sítios de ligação de metais em flavonoides.

Fonte: PIETTA (2000).

A presença de um grupo 3-hidroxílico no anel heterocíclico também aumenta a capacidade de seqüestro de radical, enquanto grupos adicionais metoxílicos ou hidroxílicos nas posições 5 e 7 do anel A são menos importantes. Essas características estruturais favorecem a estabilidade do radical fenoxílico. Assim, flavonóis e flavonas contendo o grupo catecol no anel B, são mais ativos. A presença do grupo 3-hidroxílico nos flavonóis os torna mais potentes que as correspondentes flavonas. Flavanonol e flavanonas não possuem a conjugação provida pela dupla ligação entre as posições 2 e 3 com o grupo 4-oxo, portanto são menos ativos. No caso das isoflavonas, a localização do anel B na posição 3 do anel heterocíclico reduz significativamente a capacidade de seqüestro de radicais livres por reduzir a extensão da conjugação do anel B até o grupo carbonila [PIETTA, 2000].

Outro fator que influi na atividade antioxidante dos flavonoides é a glicosilação, ou seja, quando os mesmos encontram-se conjugados a açúcares tornam-se menos ativos, em função da substituição de um ou mais grupos hidroxílicos [PIETTA, 2000].

Muitos flavonoides são também agentes quimiopreventivos. Eles agem como bloqueadores de formação de células cancerosas modulando os processos de absorção intestinal, biotransformação/bioativação microssomal, excreção renal e interação de substâncias cancerígenas com o material genético, impedindo, dessa maneira, a iniciação de formação de tumor pela replicação de células alteradas. A eficácia da quimioprevenção dos flavonoides está diretamente relacionada à sua capacidade antioxidante, pois eles agem na captura de formas reativas dos cancerígenos, impedindo sua interação com o DNA e outras moléculas celulares (lipídeos, proteínas e carboidratos), cuja oxidação leva potencialmente a carcinógeno [MORSE & STONER, 1993].

Exemplos de fenóis lipossolúveis com significativa atividade antioxidante são os tocoferóis e tocotrienóis (Figura 4). Estes compostos incluem um grupo cromanol com uma cadeia alifática lateral capaz de se posicionar ao longo das cadeias lipídicas favorecendo sua penetração e exercendo efetiva proteção às membranas celulares. Vitamina E é o termo genérico dado a estes compostos. [CHAN & DECKER, 1994]

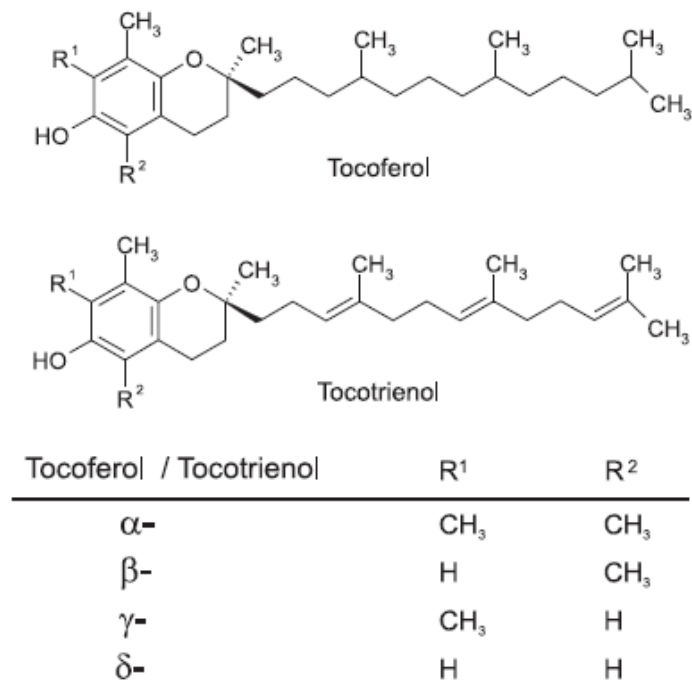


Figura 4: Estruturas químicas dos tocoferóis e tocotrienóis.

Fonte: CERQUEIRA et. al. (2007)

O potencial antioxidante dos tocoferóis em meio biológico é diferente, sendo $\alpha \gg \gamma > \delta > \beta$.

Um mecanismo bem estabelecido de ação do α -tocoferol é sua reação com o radical alquilperoxila. O α -tocoferol interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica (Figura 5) seqüestrando os radicais alquilperoxila por meio da seguinte reação:

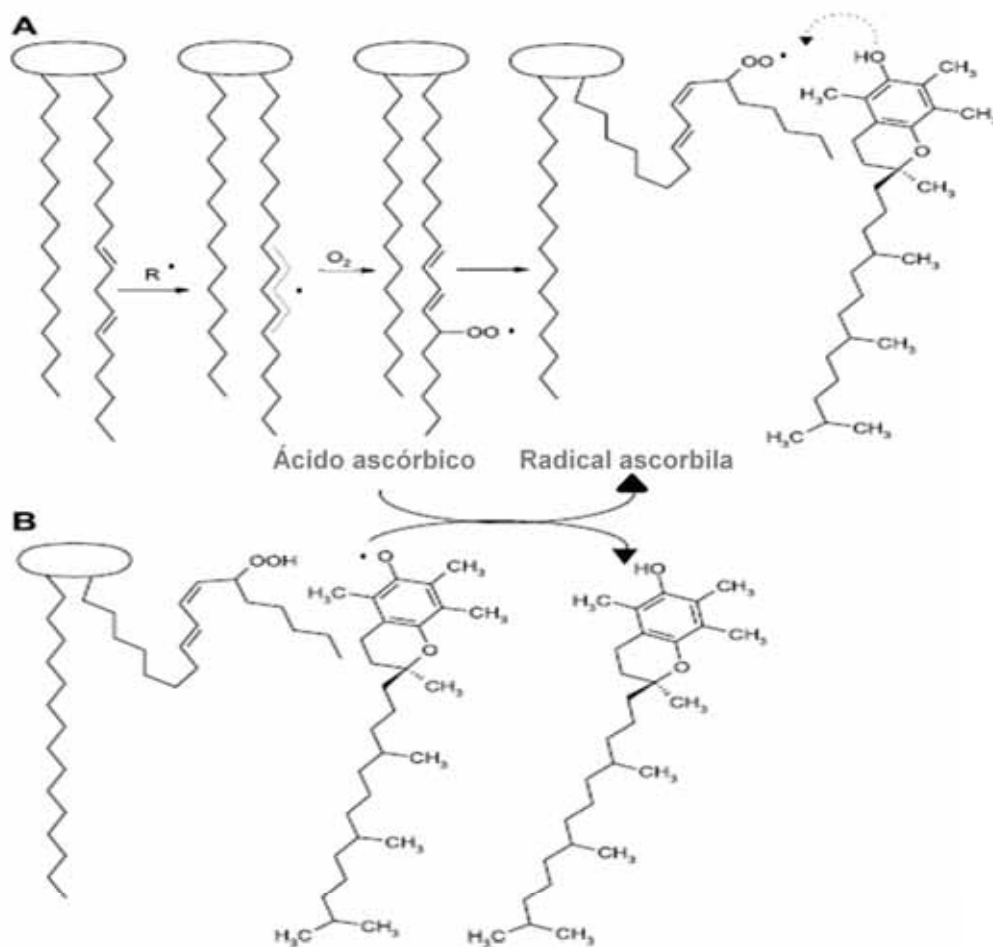


Figura 5: Etapas da lipoperoxidação e ação antioxidante do α -tocoferol. (A) Iniciação: o grupo metileno de ácidos graxos poliinsaturados é atacado por radicais livres, havendo o rearranjo das ligações duplas na forma de dieno conjugado. Simultaneamente há formação de um radical alquila (R^\bullet) no carbono central. O radical alquila reage com O_2 formando alquilperoxila (ROO^\bullet). Propagação: ROO^\bullet ataca outras moléculas de lipídios (não mostrado). Terminação: as reações em cadeia são interrompidas por interação entre os próprios radicais (não mostrado), ou (B) entre radicais e α -tocoferol, originando produtos não-radicalares e o radical tocoferila. O radical α -tocoferila é reduzido por ação do ácido ascórbico.

Fonte: CERQUEIRA et. al., 2007.

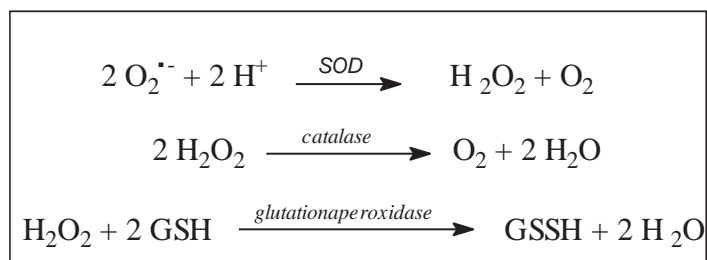
Alguns mecanismos podem converter α -T $^\bullet$ em α -TH regenerando a forma ativa do α -tocoferol, sendo a reação com ácido ascórbico na superfície das membranas e lipoproteínas a mais estudada (Figura 5). Estima-se que uma molécula de α -tocoferol estabilize cerca de 220 moléculas de ácidos graxos insaturados pela repetição do processo de oxidação (formação do α -T $^\bullet$) seguida de regeneração do α -TH até começar a se degradar.

1.5 Radicais livres

Denomina-se radical livre toda molécula que possui um elétron desemparelhado em sua camada externa. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. Os radicais hidroxílicos (HO•), peroxílicos (ROO•) e o ânion superóxido (O₂^{•-}) são exemplos de radicais livres, também chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO). [HALLIWELL, 1994]

Nos organismos aeróbios o transporte de elétrons no processo de respiração é uma importante fonte de geração de ERO, sendo esta uma fonte endógena. As fontes exógenas produtoras de radicais livres, incluem a fumaça, o tabaco, radiações ionizantes, solventes orgânicos e pesticidas. [YILDIRIM *et al.*, 2001]

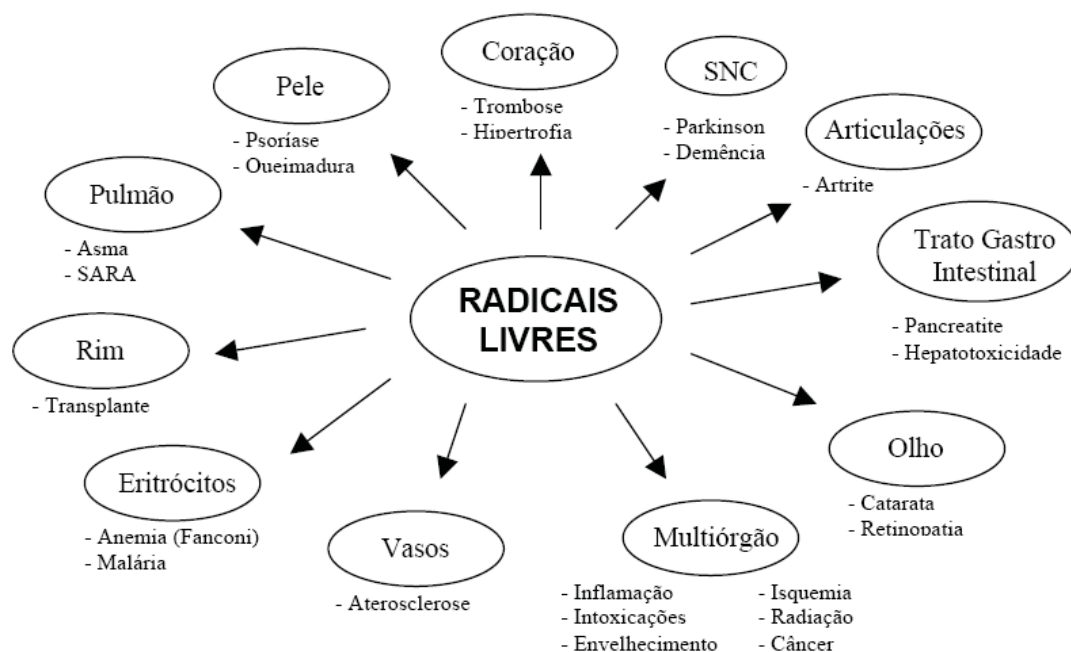
A produção de radicais livres nos seres vivos é controlada por diversos antioxidantes que podem ser de origem endógena, como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Esquema 1), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se micromoléculas como tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis e carotenóides. [SIES, 1997, HASLAM, 1996]



Esquema 1: Inativação enzimática de espécies reativas de oxigênio (ERO).

No entanto, quando a produção de radicais livres supera a capacidade antioxidante do organismo, essas espécies radicalares atacam lipídeos, proteínas, DNA, provocando danos estruturais à integridade e função das membranas celulares, enzimas e material genético [BARREIROS *et al.*, 2006]. Esses danos oxidativos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, envelhecimento precoce, doenças inflamatórias crônicas e problemas

pulmonares [PHAM-HUY *et al.*, 2008]. O Esquema 2 evidencia a significativa correlação que existe entre os efeitos deletérios provocados por radicais livres com várias doenças.



Esquema 2: Doenças associadas as ERO.

Fonte: RENZ (2003).

Em vista da enorme importância dos antioxidantes para a manutenção do equilíbrio pró/antioxidante em sistemas biológicos e a prevenção de diversas doenças, investe-se fortemente na descoberta de novos agentes antioxidantes naturais a partir da biodiversidade. Para tanto, faz-se necessário o uso de técnicas fitoquímicas clássicas, bem como de técnicas modernas, sofisticadas e mais poderosas, visando à detecção, isolamento e identificação das substâncias de interesse.

1.6 O uso de técnicas hifenadas na fitoquímica

Na procura por metabólitos secundários biologicamente ativos o procedimento padrão é o fracionamento bioguiado, em que os extratos, frações e substâncias obtidas por técnicas cromatográficas são submetidos aos ensaios farmacológicos para isolamento dos compostos responsáveis pela atividade. Bioensaios servem como guia durante o processo de isolamento,

porém a metodologia não faz a diferenciação entre compostos novos dos conhecidos, sendo bastante comum isolar compostos já descritos para uma atividade prospectada. Atualmente com o avanço extraordinário da química analítica, os extratos são submetidos simultaneamente a triagem química ou perfil metabólico e avaliação simultânea com vários ensaios biológicos. Desta forma pode-se distinguir entre compostos já descritos e novas moléculas diretamente nos extratos brutos de plantas. Assim, o custoso trabalho de isolamento de compostos já estudados pode ser evitado caracterizando a estratégia de desrepliação (WOLFENDER *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2009).

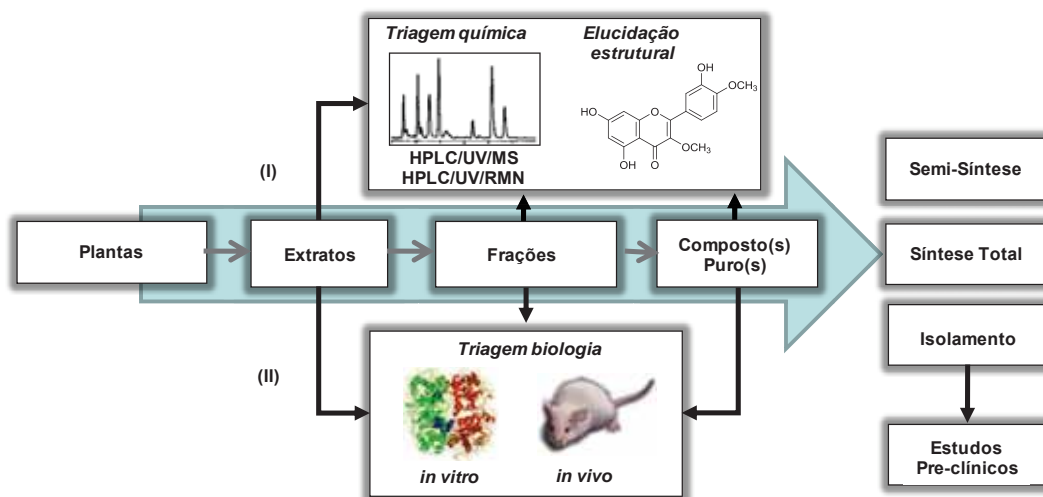


Figura 6: Estratégia para identificação de novos princípios ativos utilizando a combinação da triagem biológica (I) combinada com a triagem química (II) de acordo com Queiroz *et al.*, 2009.

O procedimento de desrepliação baseia-se nas técnicas hífenadas, por exemplo, no acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência às espectroscópicas e espectrométricas tais como CLAE-UV-DAD, CLAE-EM, CLAE-EMⁿ e CLAE-RMN [HUBER & GEORGE, 1993; NIESSEN, 1999, ALBERT, 1999].

A Tabela 1 apresenta as principais características e usos das técnicas hífenadas na análise de plantas, visando à determinação de seu perfil químico.

Tabela 1: Aplicações de técnicas hifenadas para a investigação de composição química de plantas medicinais.

Técnicas hifenadas	Características	Exemplos de aplicação na área de plantas medicinais
CG-EM	Identificação de compostos. Fornecer informação estrutural da molécula. Permite comparação com bibliotecas espectrais.	Estudo da sazonalidade de algumas classes de metabólitos secundários, caracterização de aromas, identificação de terpenoides [BRANCO & PIZZOLATTI, 2002]; Análise de flavonoides [FIAMEGOS <i>et al.</i> , 2004].
CG-EM-EM	Confirmação estrutural de moléculas.	Análise de fragrâncias [GRANERO <i>et al.</i> , 2004].
CLAE-DAD	Identificação de compostos conhecidos, através da comparação do tempo de retenção e espectro UV com o padrão analítico. Não fornece informação estrutural.	Análise de flavonoides [LI, & FITZLOFF, 2001]; Controle de qualidade de plantas medicinais, busca de metabólitos ativos, estudos de ecologia química e quimiosistemáticos [BRANCO & PIZZOLATTI, 2002].
CLAE-EM	Raramente resulta na identificação definitiva. Muitas vezes acoplado com CLAE-DAD para fornecer informações estruturais complementares.	Análise de antocianinas [COSTA <i>et al.</i> , 2000].
CLAE-EM-EM	Determinação de novos compostos, com a incrível vantagem da simplicidade no preparo da amostra e rapidez na obtenção dos resultados.	Determinação de flavonoides, saponinas [WOLFENDER <i>et al.</i> , 1998].
CLAE-RMN	Fornecer informações estruturais (espectro RMN- ¹ H). Constitui-se a técnica mais poderosa na determinação estrutural de substâncias inéditas com novos esqueletos e em misturas biologicamente ativas [BRANCO & PIZZOLATTI, 2002];	Determinação de alcaloides [ZANOLARI <i>et al.</i> 2003], flavonoides [FERRARI <i>et al.</i> , 2000].

Aplicações de espectrometria de massas em produtos naturais envolvem o uso de métodos de separação cromatográficos antes da detecção do analito. CLAE-EM e CG-EM são as técnicas mais comumente usadas, permitindo separar uma ampla variedade de compostos com uma grande diversidade de polaridade e um pequeno tratamento de amostra. Existem várias configurações da EM que podem ser otimizadas para a análise de matrizes complexas quando estamos falando em EM acoplado a cromatografia líquida (CLAE) como, por exemplo, interfaces de ionização (ESI, APCI, MALDI etc.) e analisadores (QTOF, FT, Q-ion Trap, etc). A otimização dessas condições fornece uma maior sensibilidade, resolução e precisão nas análises [KATAJAMAA & ORESIC, 2007]. A comparação dos dados obtidos a partir das referidas técnicas com os dados da literatura (base de dados), informações sobre as espécies estudadas e aspectos bioquímicos são informações relevantes para a identificação do(s) metabólito(s) analisado(s).

Assim é importante considerar o uso de técnicas hifenadas como uma ferramenta para acelerar o processo de descoberta de novas moléculas. No entanto, o processo de isolamento não pode ser excluído, uma vez que se necessita do composto puro para realizar ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo:

- Contribuir para o aumento do conhecimento sobre a composição química de espécies vegetais do gênero *Sclerolobium*;

- Traçar o perfil cromatográfico das espécies estudadas com a utilização de técnicas hífenadas (CLAE-DAD, CLAE-EM e EM-EM);

- isolar e determinar a estrutura química das substâncias presentes nas folhas das espécies *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* (Caesalpinieae) através de fracionamento cromatográfico e técnicas espectrométricas;

- avaliar a atividade potencialmente antioxidante, antifúngica, tripanocida e antiinflamatória dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*.

3. Materiais e equipamentos

3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

3.1 Solventes

Solventes PA: hexano, acetato de etila, ácido fórmico, clorofórmio, metanol, n-butanol, (Synthlab).

Solventes grau CLAE: metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), água purificada em sistema Milli Q.

Solventes deuterados: DMSO- d_6 , $CDCl_3$ (CIL).

3.2 Especificações de instrumentos e colunas cromatográficas.

Para cromatografia em coluna foram utilizadas fases estacionárias de acordo com a polaridade das amostras a serem analisadas, sendo utilizadas sílica-gel 60 (partículas de 80-230 mesh, Merck) e C18 (partículas de 40 μ m, Baker).

Para cromatografia em camada delgada foi utilizado como adsorvente sílica gel 60 com espessura de 0,25 mm para análises comparativas e 1 mm para fins preparativos.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em escala analítica foi realizada em um cromatógrafo da marca Shimadzu equipado com duas bombas, modelo LC-20AT240, amostrador automático modelo SIL-20A, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A e forno modelo CTO-20A. Nas análises foram utilizadas uma coluna C18 Shimadzu, com dimensões de 4,6 mm x 250 mm e partículas de 5 μ m.

Em escala preparativa foi utilizado um cromatógrafo Varian, equipado com duas bombas da marca Dynamax modelo SD-1 e detector UV-Visível modelo ProStar 320. A coluna utilizada foi uma C18 Phenomenex com dimensões de 21,20 mm x 250 mm e partículas de 12 μ m.

Para cromatografia a gás, foram utilizados:

- cromatógrafo a gás Shimadzu QP – 5000, injetor automático 5000, com fonte de impacto de elétrons, acoplado ao espectrômetro de massas com faixa de detecção de 50 a 500 daltons.

- cromatógrafo Varian CP 3800, equipado com detector de ionização de chamas e amostrador automático.

3.3 Procedimentos cromatográficos

Para traçar o perfil cromatográfico por CLAE-UV-DAD os extratos brutos hidroalcoólicos, frações de partição e substâncias purificadas foram submetidos à um *clean-up* utilizando filtro Millex 0,45 µm (Millipore), ativados com 2 mL de MeOH e ambientados com 2 mL de H₂O. Os analitos foram eluidos com MeOH/H₂O 1:1, e posteriormente, analisados por CLAE.

3.4 Reveladores para CCDC

Para revelar as placas cromatográficas, foram utilizados:

- Irradiação de luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 366 nm.
- Vapores de iodo ressublimado;
- Solução de β-caroteno;
- Anisaldeído sulfúrico:
 - 0,85 mL de anisaldeído
 - 85,0 mL de MeOH
 - 10,0 mL de ácido acético
 - 5,0 mL de H₂SO₄ concentrado

Pulveriza-se a placa cromatográfica com o revelador e, após aquecimento, pode-se observar manchas roxas para terpenos, avermelhadas para saponinas e catequinas, marrom para taninos e amarelas para flavonoides.

3.5 Reagentes utilizados em análises espectrofotométricas (DPPH)

- DPPH: 1,00 mg de DPPH (Sigma-Aldrich) dissolvido em 25 mL de MeOH em balão volumétrico encapado com papel alumínio.

- padrões α-tocoferol e rutina: 1,00 mg de cada padrão (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em 1 mL de MeOH, obtendo-se a solução-mãe. Em seguida, 300 µL desta solução foram adicionados a 2700 µL de MeOH, obtendo-se uma solução de α-tocoferol a 2,32 mM e 2,32 mM de rutina.

3.6 Equipamentos de espectrometria.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram registrados em:

- Espectrômetro Varian modelo INOVA 500 (IQ-UNESP-Araraquara) operando em 500 MHz para ^1H e 125 Hz para ^{13}C . O padrão empregado como referência foi TMS. Os deslocamentos químicos foram expressos em unidades δ e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

- Espectrômetro Varian modelo INOVA 300 (IQ-UNESP-Araraquara) operando em 300 MHz para ^1H e 75 Hz para ^{13}C . O padrão empregado como referência foi TMS. Os deslocamentos químicos foram expressos em unidades δ e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

- Espectrofotômetro leitor de placas: Synergy-HTS (Bio-Tek Instruments, INC. EUA).

- Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas LCQ Fleet (Thermo Scientific ®), equipado com um dispositivo de inserção direta a 20 mL/min. As matrizes estudadas foram analisadas no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS^2) realizadas em um analisador do tipo *ion-trap* (IT).

4. Procedimento experimental

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de *Sclerolobium aureum* foram coletadas próximo ao Km 376 da SP-333, no município de Assis no dia 18 de julho de 2003, enquanto que *Sclerolobium paniculatum* foi coletada no Instituto Florestal de Assis, em Assis-SP na mesma data. A espécie *Sclerolobium denudatum* foi coletada no campus da USP, na cidade de São Paulo em setembro de 2003.

A identificação botânica das espécies *S. aureum* e *S. denudatum* foram realizadas pela Dra. Giselda Durigan do Instituto Florestal de Assis, enquanto a espécie *S. denudatum* foi identificada pela Dra. Inês Cordeiro do Instituto Botânico, São Paulo.

4.2 Obtenção dos extratos de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*

Para a obtenção dos extratos das espécies foi realizado o seguinte procedimento: as folhas foram secas em estufa a 40° C por três dias e posteriormente pulverizadas.

O material pulverizado foi submetido à extração por maceração com hexano e depois concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Subsequentemente o material vegetal foi submetido ao mesmo procedimento de extração, utilizando-se etanol/ água 1:1(v:v) como solvente (Tabela 2).

Tabela 2: Massa do material seco e do extrato bruto obtido.

Espécie	Massa material seco (kg)	Massa extrato hexânico (g)	Massa extrato hidroalcoólico (g)
<i>S. aureum</i>	1,5	7,7	73,25
<i>S. denudatum</i>	0,1	1,7	13,18
<i>S. paniculatum</i>	1,3	9,8	61,40

4.3 Análises dos extratos por CCDC

Os extratos hexânicos e hidroalcoólicos foram solubilizados em hexano e metanol respectivamente e analisados por CCDC (sílica gel 60), sendo que para os extratos hexânicos utilizou-se como eluente hexano/ACOEt 9:1, e para os extratos hidroalcoólicos utilizou-se ACOEt/EtOH 4:6.

A revelação das placas foi realizada em luz UV nos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm e posteriormente nebulizados com anisaldeído e/ou iodo.

4.4 Extratos brutos hexânicos

4.4.1 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto hexânico de *S. paniculatum*

Parte do extrato hexânico (1,0 g) foi suspensa em 5 g de carvão ativo e posteriormente aplicada em uma coluna de vidro (3,5 cm x e 18,5 cm) utilizando sílica-gel 60 como fase estacionária. A eluição foi realizada utilizando hexano, acetato de etila, metanol e a mistura desses em gradiente crescente de polaridade.

Posteriormente as frações obtidas foram analisadas por CCDC, reveladas com iodo e agrupadas quando apresentavam semelhança cromatográfica (Tabela 3).

Tabela 3: Frações obtidas do fracionamento do extrato bruto hexânico de *S. paniculaum*.

Fração	Eluente	massa(mg)
FH 1	Hex	82
FH 2	Hex/AcOEt 90:10	45
FH 3	Hex/AcOEt 75:25	46
FH 4	Hex/AcOEt 50:50	36
FH 5	Hex/AcOEt 25:75	30
FH 6	AcOEt	69
FH 7	AcOEt/EtOH 90:10	35
FH 8	AcOEt/EtOH 75:25	29
FH 9	AcOEt/EtOH 50:50	44
FH 10	AcOEt/EtOH 25/75	60
FH 11	EtOH	65

Após o agrupamento das frações, essas foram submetidas à CCD e reveladas com solução de β -caroteno onde foi possível verificar que FH3 e FH6 apresentavam atividade antioxidante.

A fração FH3 (46 mg) como se apresentava impura, foi submetida à CCDP utilizando como fase móvel Hex/ACOEt 9:1, sendo possível isolar uma substância de Rf: 0,73 codificada como **Spa-Hex-1**(10 mg).

A fração FH6 (69 mg) também continha impurezas, portanto foi submetida à CCDP utilizando Hex/ ACOEt 9:1 como fase móvel, sendo possível isolar uma substância de Rf:0,44 codificada como **Spa-Hex-2** (7 mg)

4.4.2 Clareamento do extrato hexânico de *S. aureum*.

O extrato hexânico de *S. aureum* foi submetido a um clareamento tendo como objetivo obter frações ricas em metabólitos com pouco ou nenhum pigmento.

Utilizou-se uma coluna de vidro com 1,5cm de diâmetro, contendo 1 g de carvão ativo. Uma mistura contendo 1g do extrato hexânico de *S. aureum* e 5 g de carvão ativo foi suspensa em hexano e aplicada na coluna. A eluição da amostra foi realizada com: 60 mL de hexano, 53 mL de hexano/ ACOEt 9:1 e 146 mL de ACOEt , obtendo- se as frações FHAC1, FHAC2 e FHAC3 (Figura 7).



Figura 7: Coluna do clareamento do extrato bruto hexânico de *S.aureum*.

4.4.3 Análise por CG-EM

Os extratos hexânicos de *Sclerolobium sp* e os padrões: α -tocoferol, lupenona e esqualeno, foram submetidos à análise qualitativa por CG-EM, utilizando um cromatógrafo a gás Shimadzu, no modo de ionização positivo, operando a 70 eV. Foi utilizada coluna capilar SPB-50, e, como condição de trabalho, a seguinte programação de temperatura:

Rampa de aquecimento: 220 °C (1 min) 16 °C / min - 280 °C (40min)

Temperatura da interface: 290 °C

Temperatura do injetor: 220 °C

Volume de injeção: 1 μ L

Razão split: 1/20

Fluxo do gás de arraste (He): 1 mL / min

Dimensões da coluna: 30 m x 0,25 mm e 0,25 μ m de filme

4.4.4 Análise por CG- DIC

A análise das frações obtidas do clareamento do extrato hexânico de *S. aureum* (FHAC1, FHAC2 e FHAC3) teve como objetivo avaliar o perfil químico das mesmas por comparação com o tempo de retenção (tr) dos padrões: α -tocoferol, lupenona e esqualeno.

As condições cromatográficas em CG-DIC foram determinadas utilizando cromatógrafo a gás Varian CP- 3800 com coluna capilar SPB-50 e a seguinte programação de temperatura:

Taxa de aquecimento: 280 °C

Temperatura do detector: 290 °C

Temperatura do injetor: 280 °C

Volume de injeção: 2,0 μ L

Razão split: 1/20

Fluxo do gás de arraste (N₂): 1 mL / min

Dimensões da coluna: 30 m x 0,25 mm e 0,25 μ m de filme

4.5 Extratos brutos hidroalcoólicos

4.5.1 Extração líquido-líquido do extrato bruto hidroalcoólico de *S. aureum*.

O extrato bruto hidroalcoólico de *S. aureum* (21 g) foi solubilizado em 400 mL MeOH/H₂O 8:2. Em seguida, realizaram-se partições sucessivas (ELL) com hexano 1:1 v/v, seguido por acetato de etila (ACOEt) 1:1 v/v e butanol (BuOH) 1:1 v/v, obtendo-se quatro frações com polaridades distintas: fração hexânica (FrHex), fração acetato (FrACOEt), fração butanólica (FrBuOH) e fração aquosa (FrAq). Cada uma das frações obtidas da ELL foi seca em rotaevaporador, transferida para recipiente de vidro pesado e colocada em capela sob jato de ar comprimido (Tabela 4).

Tabela 4: Massas das frações obtidas das partições de *Sclerolobium aureum*.

Frações	Massa Obtida (g)
FrHex	1,84
FrAcOEt	4,61
FrBuOH	6,80
FrAq	3,67

4.5.2 Extração líquido-líquido do extrato bruto hidroalcoólico de *S. denudatum*.

O extrato bruto hidroalcoólico de *S. denudatum* (7 g) foi solubilizado em 250 mL MeOH/H₂O 8:2. Em seguida, realizaram-se partições sucessivas (Extração Líquido-Líquido - ELL) com hexano 1:1 v/v, seguido por acetato de etila (ACOEt) 1:1 v/v e butanol (BuOH) 1:1 v/v. Durante o processo de ELL formou-se um precipitado (PREC.) entre a fase butanólica e aquosa que foi separado da solução. Obteve-se quatro frações com polaridades distintas: fração hexânica (FrHex), fração acetato (FrACOEt), fração butanólica (FrBuOH), fração aquosa (FrAq). Essas frações e o precipitado formado foram secos em rotaevaporador, transferidos para recipientes de vidro pesados e colocados em capela sob jato de ar comprimido (Tabela 5).

Tabela 5: Massas das frações obtidas das partições de *Sclerolobium denudatum*.

Frações	Massa obtida (g)
FrHex	0,11
FrAcOEt	0,79
FrBuOH	0,55
FrAq	3,10
PREC.	1,54

4.5.3 Extração líquido-líquido do extrato bruto hidroalcoólico de *S. paniculatum*.

O extrato bruto hidroalcoólico de *S. paniculatum* (20 g) foi solubilizado em 400 mL MeOH:H₂O 8:2. Em seguida, realizaram-se partições sucessivas (Extração Líquido-Líquido - ELL) com hexano 1:1 v/v, seguido por acetato de etila (ACOEt) 1:1 v/v e butanol (BuOH) 1:1 v/v. Durante o processo de ELL formou-se um precipitado (PREC.) entre a fase butanólica e aquosa que foi separado da solução. Obteve-se quatro frações com polaridades distintas: fração hexânica (FrHex), fração acetato (FrACOEt), fração butanólica (FrBuOH), fração aquosa (FrAq). Essas frações e o precipitado formado foram secos em rotaevaporador, transferidos para recipientes de vidro pesados e colocados em capela sob jato de ar comprimido (Tabela 6).

Tabela 6: Massas das frações obtidas das partições de *Sclerolobium paniculatum*.

Frações	Quantidade obtida (g)
FrHex	0,93
FrAcOEt	3,77
FrBuOH	1,80
FrAq	4,38
PREC.	4,00

4.5.4 Análises dos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies *S.aureum*, *S. denutadum* e *S. paniculatum* por CLAE-UV-DAD.

Os extratos hidroalcoólicos de *S.aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* foram submetidos a um gradiente exploratório em CLAE-UV-DAD (Tabela 7) a fim de se avaliar os perfis químicos das espécies.

Tabela 7: Gradiente exploratório para a análise dos perfis químicos dos extratos brutos das espécies de *Sclerolobim sp.*

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	% B
H ₂ O	MeOH	0	5
		40	100

Fluxo: 1,5 mL/min. Volume de injeção: 20µL [2 mg/mL]. Coluna: C18 Shimadzu (250 x 4,6mm), partículas 5µm.

4.5.5 Otimização das condições de análise dos extratos hidroalcoólicos e das frações de partição ACOEt das folhas das espécies *S.aureum*, *S. denutadum* e *S. paniculatum* por CLAE-UV-DAD.

Um sistema eluente composto de ACN/H₂O foi otimizado para a separação cromatográfica os metabólitos secundários contidos nos extratos hidroalcoólicos e frações de partição de *Sclerolobium sp* (Tabela 8).

Tabela 8: Gradiente de eluição cromatográfica otimizado para a eluição dos metabólitos secundários das espécies de *Sclerolobium*.

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	% B
H ₂ O*	ACN*	0	17
		30	19
		40	24
		50	35
		60	100

Fluxo: 1,0 mL/min. Injeção: 40 µL [2 mg/mL]. Coluna: C18 Shimadzu (250 x 4,6 mm), partículas 5µm.

* fases acidificadas com 0,1% de HCOOH.

4.5.6 Fracionamento cromatográfico do extrato hidroalcoólico das folhas de *Sclerolobium aureum*.

Parte do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. aureum* (2 g) foi submetido à extração em fase sólida utilizando-se C18 como fase estacionária em uma coluna de vidro com 10 cm de altura e 8 cm de diâmetro. A eluição foi realizada com oito sistemas de solventes em ordem decrescente de polaridade obtendo-se oito frações (Tabela 9).

Tabela 9: Fracionamento do extrato hidroalcoólico *S. aureum*.

Fração	Eluente	Massa (mg)
FR-1	água/metanol 9:1	407
FR-2	água/metanol 8:2	353
FR-3	água/metanol 6:4	51
FR-4	água/metanol 4:6	150
FR-5	água/metanol 2:8	15
FR-6	água/metanol 1:9	15
FR-7	Metanol	13
FR-8	Acetato de etila	28

4.5.6.1 Fracionamento cromatográfico da fração FR-2

A fração FR-2 (353 mg), obtida do fracionamento em C18 do extrato hidroalcoólico de *S. aureum*, foi recromatografada em coluna aberta contendo silicagel 60 como fase estacionária, sendo a eluição realizada com hexano, acetato de etila, etanol e misturas destes em gradiente crescente de polaridade. Foram recolhidas 27 frações de 40 mL cada. As frações obtidas foram analisadas por CCDC e agrupadas por similaridade cromatográfica (Tabela 10).

Tabela 10: Fracionamento do extrato hidroalcoólico *S. aureum*.

Fração	Frações agrupadas	Massa obtida (mg)
Fa1	1 a 4	7
Fa2	5 a 11	49
Fa3	12 a 16	32
Fa4	17 a 21	40
Fa5	22 a 27	92

Do agrupamento das frações 1 a 4 (Fa1) foi possível obter um sólido amarelo codificado como **SA-3** (7 mg), enviado para análises de RMN de ^{13}C e ^1H mono e bidimensionais

4.5.7 Análise de SA-3 por CLAE-UV-DAD.

O sólido isolado e codificado como SA-3 foi submetido à análise qualitativa por CLAE-UV-DAD a fim de verificar sua pureza (Tabela 11).

Tabela 11: Gradiente exploratório para a análise de SA-3.

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	% B
H ₂ O	MeOH	0	5
		40	100

Fluxo: 1,5 mL/min. Injeção: 20µL [2 mg/mL]. Coluna: C18 Shimadzu (250 x 4,6mm), partículas 5µm.

4.5.8 Fracionamento da FrACOEt obtida da partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico de *S. aureum*.

Parte da fração FrACOEt (200 mg) foi submetida a análise qualitativa por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e posteriormente otimizada uma condição para ser aplicada em CLAE preparativa (Tabela 12).

Tabela 12: Método utilizado no fracionamento da FrACOEt de *S. aureum* em CLAE preparativa.

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	% B
H ₂ O*	ACN*	0	15
		40	15
		80	21
		90	100

Fluxo: 12 mL/min. Volume de injeção: 1 mL [10 mg/mL]. Coluna: C18 Phenomenex (25 x 2,1 cm), partículas 10 µm.

* fases acidificadas com 0,1% de HCOOH

Do fracionamento por CLAE preparativa da FrACOEt de *S. aureum* foi possível isolar 3 substâncias que foram codificadas como: **Sa-Fac-4** (16 mg), **Sa-Fac-7** (5 mg) e **Sa-Fac-9** (17 mg), que foram enviadas para análises de RMN de ^{13}C e ^1H mono e bidimensionais.

4.5.9 Fracionamento da FrACOEt obtida da partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico de *S. paniculatum*

Parte da fração FrACOEt (2 g) foi submetida a extração em fase sólida utilizando-se C18 como fase estacionária em uma coluna de vidro com 11cm de altura e 4,5 cm de diâmetro. A eluição foi realizada utilizando gradiente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95:5 até MeOH 100% obtendo-se 33 frações que foram agrupadas por semelhança cromatográfica (Tabela 13).

Tabela 13: Fracionamento do extrato hidroalcoólico *S. aureum*.

Fração	Frações agrupadas	Massa obtida (mg)
Fp1	1 a 2	39
Fp2	3 a 9	55
Fp3	10 a 12	29
Fp4	13	21
Fp5	14 a 17	166
Fp6	18	34
Fp7	19 a 20	35
Fp8	21	28
Fp9	22 a 25	29
Fp10	26	8
Fp11	27 a 32	49
Fp12	33	10

Do agrupamento das frações 1 e 2 (Fp1) obteve-se um sólido esbranquiçado que foi codificado como **Spa-Fac-1-2** e, posteriormente, enviado para análise por RMN de ^1H e ^{13}C .

4.5.10 Fracionamento de Fp5 por CLAE-UV-DAD

A fração Fp5 (166 mg) foi submetida a análise qualitativa por CLAE-UV-DAD apresentando-se impuro. Com o intuito de purificá-lo, o sólido foi submetido à CLAE preparativa nas condições otimizadas, mostradas na Tabela 14.

Tabela 14: Método utilizado para CLAE preparativa de Fp5.

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	% B
H ₂ O	MeOH	0	35
		60	65

Fluxo: 12 mL/min. Volume de injeção: 1 mL [10 mg/mL]. Coluna: C18 Phenomenex (25 x 2,1cm), partículas 10µm.

Do fracionamento por CLAE preparativa de Fp5 foi possível isolar um sólido amarelo (tr: 30 min) codificado como **Spa 14- 17 A** (8 mg) e um sólido amarelo (tr: 42 min) codificado como **Spa 14-17 B** (23 mg) , enviados para análises de RMN de ¹³C e ¹H mono e bidimensionais.

4.5.11 Fracionamento da FrACOEt obtida da partição liquido-liquido do extrato hidroalcoólico de *S. denudatum*.

Parte da fração FrACOEt (190 mg) foi submetida à análise qualitativa por CLAE e posteriormente otimizada uma condição para ser aplicada em CLAE preparativa (Tabela 15).

Tabela 15: Método utilizado no fracionamento da FrACOEt de *S. denudatum* em CLAE preparativa.

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	% B
H ₂ O*	ACN*	0	15
		42	19
		50	35
		60	100

Fluxo: 12 mL/min. Volume de injeção: 10 mL [10 mg/mL] Coluna: C18 Phenomenex (25 x 2,1 cm), partículas 10 µm.

* fases acidificadas com 0,1% de HCOOH

A partir do fracionamento por CLAE preparativa da FrACOEt de *S. denudatum* foi possível isolar 3 substâncias que foram codificadas como:

SD-Fac-4 (15 mg), **SD-Fac-9** (10 mg) e **SD-Fac-10** (5 mg) e posteriormente analisadas por RMN de ^{13}C e ^1H mono e bidimensionais.

4.5.12 Identificação dos metabólitos presentes nos extratos hidroalcoólicos de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* por CLAE-UV-EM.

Os extratos hidroalcoólicos das três espécies em estudo foram submetidos a técnica CLAE-UV-EM (modo *off line*) sob as condições da Tabela 16.

Tabela 16: Gradiente de eluição cromatográfica otimizado para a eluição dos metabólitos secundários das espécies de *Sclerolobium*.

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	% B
H ₂ O*	ACN*	0	17
		30	19
		40	24
		50	35
		60	100

Fluxo: 1,0 mL/min. Injeção: 40 μ L [3 mg/mL]. Coluna: C18 Shimadzu (250 x 4,6mm), partículas 5 μ m.

* fases acidificadas com 0,1% de HCOOH

Após cinco coletas sucessivas de cada substância presente nos extratos, os mesmos foram analisados por EM/EM no modo negativo sob as seguintes condições:

Voltagem do capilar 30 V, voltagem do spray 5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 20u (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 50-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. Os demais eventos foram experimentos

MS² realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30 V.

4.6 Ensaios biológicos

4.6.1 Atividade antioxidante dos extratos de *Sclerolobium sp* pelo método do DPPH.

A atividade antioxidante pelo método do DPPH baseia-se em um ensaio fotométrico onde o radical livre DPPH, que apresenta coloração roxa intensa em solução alcoólica, se reduz em presença de moléculas antioxidantes, formando o 2,2 difenil-1-picril-hidrazila, reduzindo consequentemente sua absorvidade molar em 517 nm, mudando sua coloração para amarela (Figura 8).

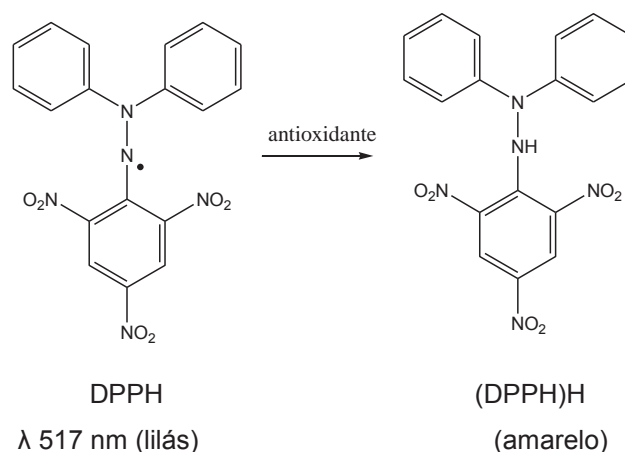


Figura 8: Ilustração do seqüestro do radical DPPH

O procedimento experimental descrito a seguir foi baseado em métodos descritos por COTINGUIBA, *et al.*, 2009:

- 200 µL de uma solução 101,4 µM de DPPH foram adicionados a amostras (extratos brutos hexânicos e hidroalcoólicos das três espécies de *Sclerolobium*) diluídas em MeOH, nas concentrações de 0.2, 0.1, 0.03, 0.02, 0.01, 0.008 e 0.005 mg/mL, distribuídas em placas de 96 cavidades, em triplicata. Como controle positivo, foi utilizada solução de α-tocoferol nas concentrações de 100, 80, 60, 40, 20, 10 e 5 µM. Para o branco do sistema, foi adicionado o mesmo volume de solução de DPPH a 1000 µL de MeOH.

Decorridos 30 minutos sob abrigo da luz, mediram-se as absorvâncias dos poços, a 517 nm, em espectrofotômetro leitor de placas acoplado a um computador. Os cálculos das porcentagens de seqüestro do radical livre foram efetuados a partir da equação:

$$\% = \frac{\Delta A_{controle} - \Delta A_{amostra}}{\Delta A_{controle}} * 100$$

4.6.2 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos e frações de partição dos extratos hidroalcoólicos de *S. aureum*, *S. paniculatum* e *S. denudatum*.

Para avaliação da atividade antifúngica, os extratos brutos e frações de partição foram diluídos assepticamente em quantidades adequadas de dimetilsulfóxido e solubilizados com o auxílio do vórtex.

Os testes de sensibilidade foram realizados em triplicata e de acordo com o documento M27-A2 (2002) do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com modificações (RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 1996). O meio de cultura utilizado para a realização dos testes de sensibilidade e diluição das drogas sintéticas foi RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0. A concentração do inóculo final na placa foi de $5,0 \times 10^2$ à $2,5 \times 10^3$. Foram utilizadas como padrões sintéticos duas drogas antifúngicas a anfotericina B e fluconazol como controle do teste. A faixa de concentração foi de 32 a 0,0625 µg/mL para fluconazol e de 16 a 0,0321 µg/mL para anfotericina B. Foram realizadas leituras visuais para cepas de *Cryptococcus neoformans* após 48 horas de incubação e para *Candida albicans*, *C. Krusei* e *C. parapsilosis* após 24 horas de incubação. A concentração inibitória mínima é considerada a menor em que se observou a inibição do crescimento fúngico. Os extratos e frações que apresentaram CIM menor que 75 µg/mL, a atividade antifúngica foi considerada forte, entre 75 a 150 µg/mL possuem atividade antifúngica moderada, entre 150 a 250 µg/mL, fraca e maior que 250 µg/mL inativo (SCORZONI *et al.*, 2007).

4.6.3 Avaliação da atividade tripanocida dos extratos brutos e frações de partição dos extratos hidroalcoólicos de *S. aureum*, *S. paniculatum* e *S. denudatum*.

O teste para verificação da atividade antiparasitária para formas epimastigotas (não infectantes de *T. cruzi*) foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara. Os parasitos foram cultivados em meio LIT - Liver Infusion Tryptose a 28 °C, com repiques a cada 15 dias para a manutenção da cultura no laboratório.

O teste colorimétrico utilizando hidróxido de tetrazolium (XTT) baseado na redução do mesmo em um produto colorido, *formazana*, pela enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias. Os testes, realizados em triplicata, para as concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1µg/mL, respectivamente, utilizando meio LIT contendo os parasitos, em fase log de crescimento, na concentração 1×10^7 parasitos/mL de meio. Foram realizados dois controles, um na ausência do parasita para cada poço teste, mas na presença da substância e outro na ausência dessa, mas contendo parasitas.

A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA – BioRad) a 595 nm, e procedeu-se o calculo da porcentagem de parasitas mortos em porcentagem de citotoxicidade (%C) [MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000].

Utilizou-se como padrão, o agente antiparasitário Benzonidazol[®] para o teste contra formas epimastigotas de *T. cruzi*.

4.6.4 Avaliação da atividade antiinflamatória dos extratos brutos e frações de partição dos extratos hidroalcoólicos de *S. aureum*, *S. paniculatum* e *S. denudatum*.

Macrófagos são as principais células residentes envolvidas na defesa contra agentes agressores e através da síntese de mediadores inflamatórios promovem a mudança do microambiente resultando no recrutamento de células inflamatórias para o local afetado. Lipopolissacarídeos (LPS), presentes em bactérias Gram-negativas, interagem com TLRs presentes em macrófagos

através do complexo CD14/LBP/TLR4 resultando na ativação de uma complexa cascata bioquímica promovendo o recrutamento de proteínas kinases e subseqüentemente a ativação de NFκB e AP-1. A ativação destes fatores de transcrição resulta na síntese de diferentes mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas, metabólitos do ácido araquidônico e expressão de moléculas de superfícies que orquestram o processo inflamatório. O *screening* de novas moléculas ou frações semipurificadas oriundas de plantas e microrganismos que apresentem potencial inibitório quanto à síntese de mediadores inflamatórios é de grande relevância na busca de novos fármacos para o tratamento de processos inflamatórios agudos e crônicos.

4.6.4.1 Avaliação de atividade imunomoduladora – anti-inflamatória

As etapas de avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos, frações e ou compostos foram realizadas junto ao departamento de Imunologia (Faculdade de Ciência Farmacêuticas-UNESP/Araraquara) sob orientação da Profa. Dr. Alexandra Ivo Medeiros.

4.6.4.2 Manutenção de linhagens celulares

A linhagem celular utilizada em todos os experimentos *in vitro* foi RAW 264.7 previamente obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). A RAW 264.7 é uma linhagem de macrófagos peritoneais aderentes derivados de camundongos Balb/c. As células foram armazenadas em nitrogênio líquido em solução de congelamento. Para os ensaios de citotoxicidade e atividade anti-inflamatória as células são descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular em meio DEMEM contendo 10% SBF e gentamicina (concentração) à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, conforme orientações do ATCC. Depois de formada a monocamada de células, as mesmas são desgrudadas através de raspagem com suportes plásticos (rodos) apropriados [MEDEIROS *et al.*, 2008].

4.6.4.3 Atividade citotóxica

Os extratos brutos e frações das espécies de *Sclerolobium* foram dissolvidos em meio de cultura (DEMEM completo), homogeneizados, em seguida centrifugados a 480 rpm, e esterilizados por filtração em membranas de 0,22 µm para a utilização experimental. Para avaliar a atividade citotóxica dos respectivos compostos utilizaremos o método colorimétrico de citotoxicidade pelo 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium-MTT. Assim, 5×10^4 células RAW 264.7 foram incubadas com as diferentes concentrações dos compostos isolados por 24 horas em placas de cultivo celular de 96 cavidades, e posteriormente colocadas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C. Após o período de incubação, 10 mL de MTT na concentração de 5 mg/mL, foram adicionados aos poços e mantidas por mais 3 horas nas mesmas condições em estufa umidificada. Em seguida foram acrescentados 50 µL de solução de dodecil sulfato de sódio 20%/HCl 0,01 N. As placas de cultivo celular foram mantidas por uma noite a temperatura ambiente, sob abrigo da luz. A avaliação do índice de citotoxicidade (IC₅₀) foi medida em espectrofotômetro, utilizando filtro de interferência de 595 nm [MOSMANN, 1983]. As frações ou substâncias puras que apresentaram atividade citotóxica superior a 10% não foram testados nos subseqüentes bioensaios.

4.6.4.4 Estimulação celular

Foram distribuídas 2×10^4 células RAW 264.7 em placas de 96 poços durante 2 horas para adesão das mesmas. Após determinação do IC₅₀ de cada um dos compostos, os mesmos foram testados quanto ao seu potencial imunomodulatório. As amostras foram incubadas em diferentes concentrações na presença ou ausência de LPS (1 µg/mL de LPS) (Sigma St. Louis, MO), previamente e/ou concomitantes aos estímulos, para avaliação da dose-resposta. As células foram incubadas por 48 h com os diferentes estímulos a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂. Em seguida os sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados para retirada de células em

suspensão e armazenados a -70°C até o momento de quantificação dos mediadores e fatores de interesse.

5.4.5 Quantificação de Nitrito (NO_2)

Para a dosagem de nitrito, 100 μL do reagente de Greiss (solução estoque de NEED a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e sulfanilamida a 1% em H_3PO_4 5%) foram adicionados a 100 μL de sobrenadante de cultura. Para análise quantitativa dos compostos foram adicionadas soluções contendo nitrito em concentrações entre 3 a 200 μM de nitrito de sódio, conforme descrito previamente por Lane *et al.*, 1993. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade ótica da solução foi medida em leitor de microplacas em filtro de 540 nm (Metertech Inc., modelo 960). A quantidade de nitrito dos compostos foi correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão.

5. Resultados e discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extratos hexânicos

5.1.2 Clareamento dos extratos brutos hexânicos de *S. aureum*

As frações FHAC1 (63,7 mg) (figura 9) e FHAC2 (55,5 mg) (figura 10) eluídas com hexano e hexano/ ACOEt 9:1 respectivamente, apresentaram visualmente ausência de pigmento e apenas a fração FHAC3 (92,3 mg) (Figura 11) apresentou pigmentação amarela após serem concentradas em rotaevaporador.



Figura 9: FHAC1



Figura 10: FHAC2



Figura 11: FHAC3

5.1.3 Análise dos extratos hexânicos de *Sclerolobium spp* por CG-EM

A técnica de CG-EM possibilitou a avaliação dos perfis químicos dos extratos hexânicos de *Sclerolobium sp* e permitiu identificar os metabólitos neles presentes.

As Figuras 12, 13 e 14 apresentam os cromatogramas dos extratos hexânicos de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* respectivamente, com as regiões onde se situam as principais substâncias identificadas no CG-EM.

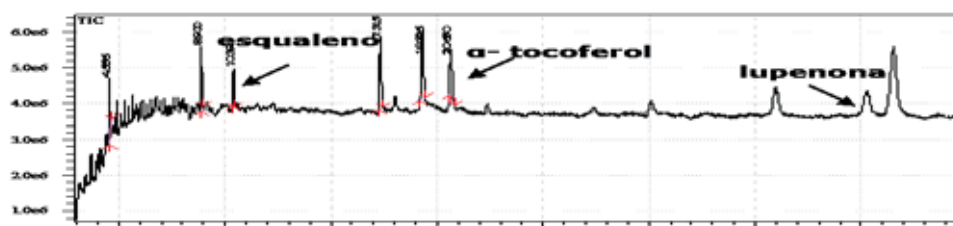


Figura 12: Cromatograma CG-EM de *S. aureum*.

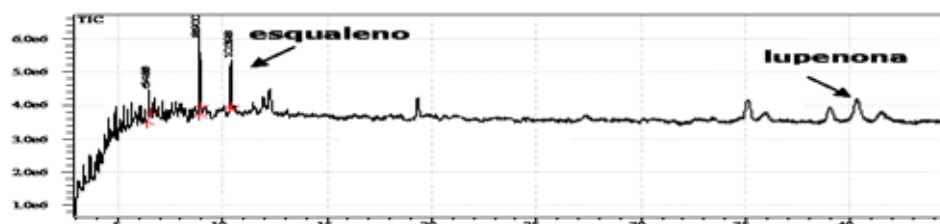


Figura 13: Cromatograma CG-EM de *S. denudatum*.

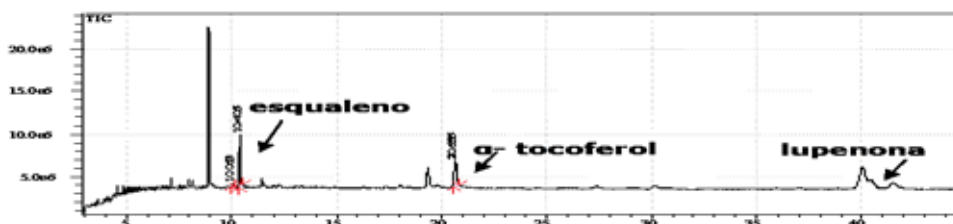


Figura 14: Cromatograma CG-EM de *S. paniculatum*.

5.1.4 Espectro de massas e fragmentação do esqualeno

A análise do espectro de massas (Figura 15) referente à substância de 10,4 min dos cromatogramas das espécies *S. aureum* (Figura 12), *S. denudatum* (Figura 13) e *S. paniculatum* (Figura 14) permitiu a identificação do esqualeno. O pico íon molecular m/z 69 corresponde ao fragmento isoprenila, enquanto que m/z 81 ao 2-metil penteno (Figura 16).

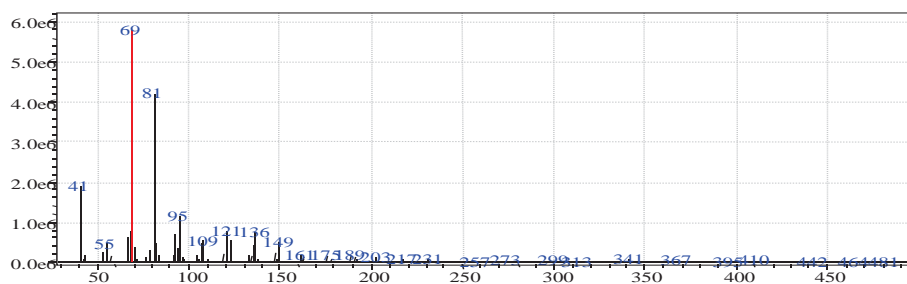


Figura 15: Espectro de massas de esqualeno

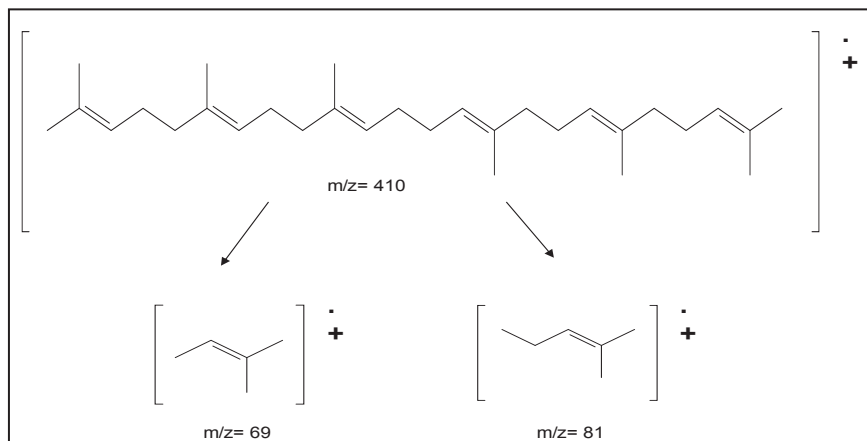


Figura 16: Proposta de fragmentação para esqualeno

5.1.5 Espectro de massas e fragmentação de α -tocoferol

A análise do espectro de massas (figura 17) referente ao tr: 20,7 min dos cromatogramas das espécies *S. aureum* (Figura 12) e *S. paniculatum* (Figura 14) permitiu a identificação de α -tocoferol. Os fragmentos típicos do α -tocoferol são os m/z 431 correspondente ao pico íon molecular e o m/z 165 formado pela perda da cadeia “fitílica”. [Figura 18; KALMAN *et al.*, 2003]

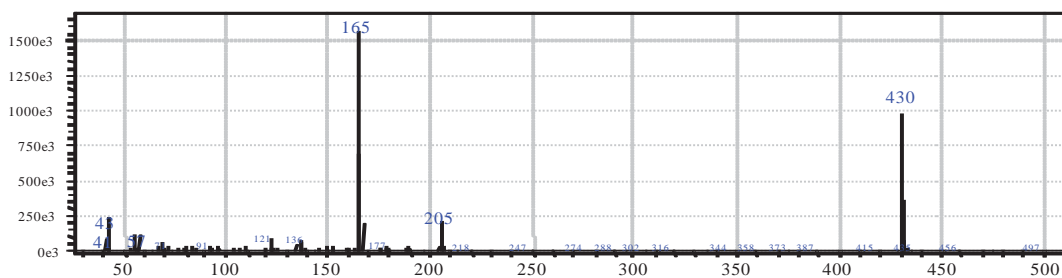


Figura 17: Espectro de massas de α -tocoferol.

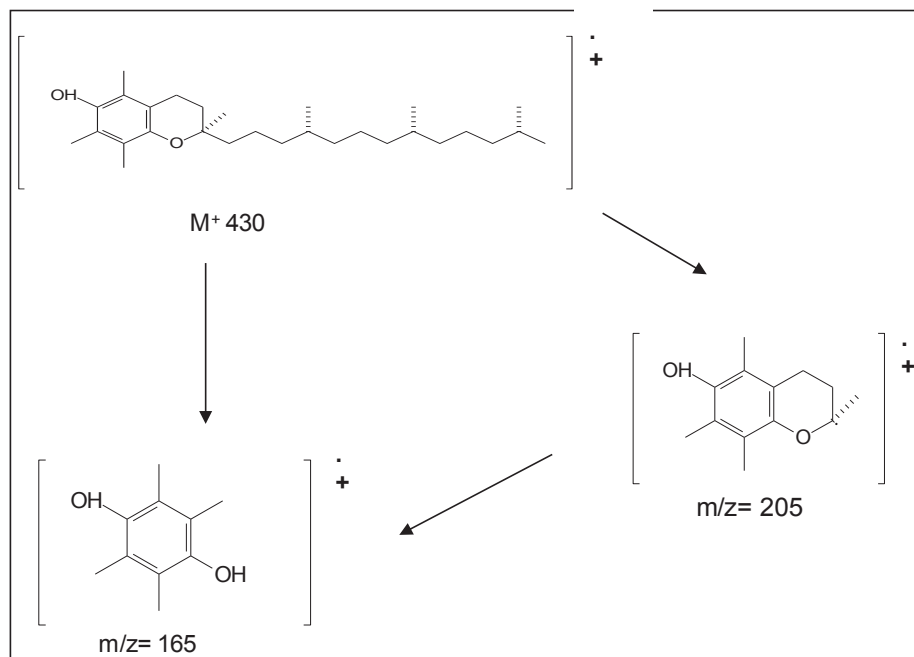


Figura 18: Proposta de fragmentação para α -tocoferol de acordo com Kalman *et al.*(2003).

5.1.6 Espectro de massas e fragmentação de lupenona

A análise do espectro de massas (Figura 19) referente ao tr: 40,4 min dos cromatogramas das espécies *S. aureum* (Figura 12), *S. denudatum* (Figura 13) e *S. paniculatum* (Figura 14) possibilitou a identificação do triterpeno lupenona. O espectro apresentou os fragmentos m/z 424 correspondente ao pico íon molecular; m/z 205 (pico íon base) contendo os anéis A e B do esqueleto triterpênico; m/z 189 correspondente ao fragmento 20b₁ contendo os anéis D e E e a cadeia lateral isoprenila; m/z 218 correspondente a duas propostas de fragmentação em que uma contém os anéis D e E (fragmentação 20d) e a outra os anéis A e B (fragmentação 20c); [Figura 20; BUDZIKIEWICZ *et al.*,1963].

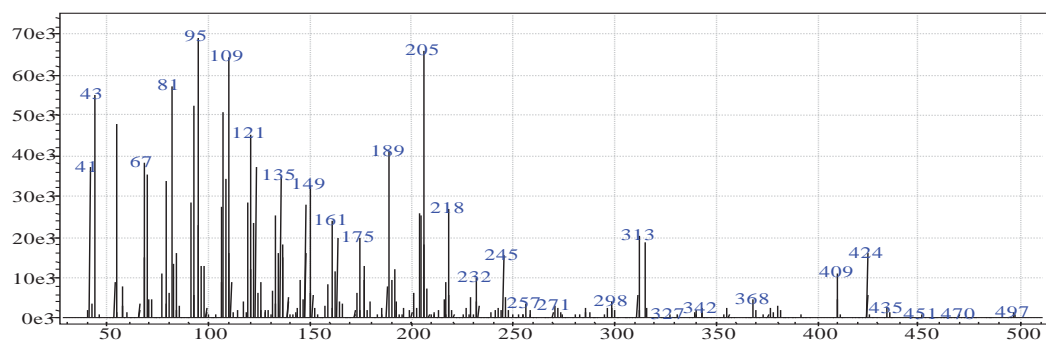


Figura 19: Espectro de massas de lupenona.

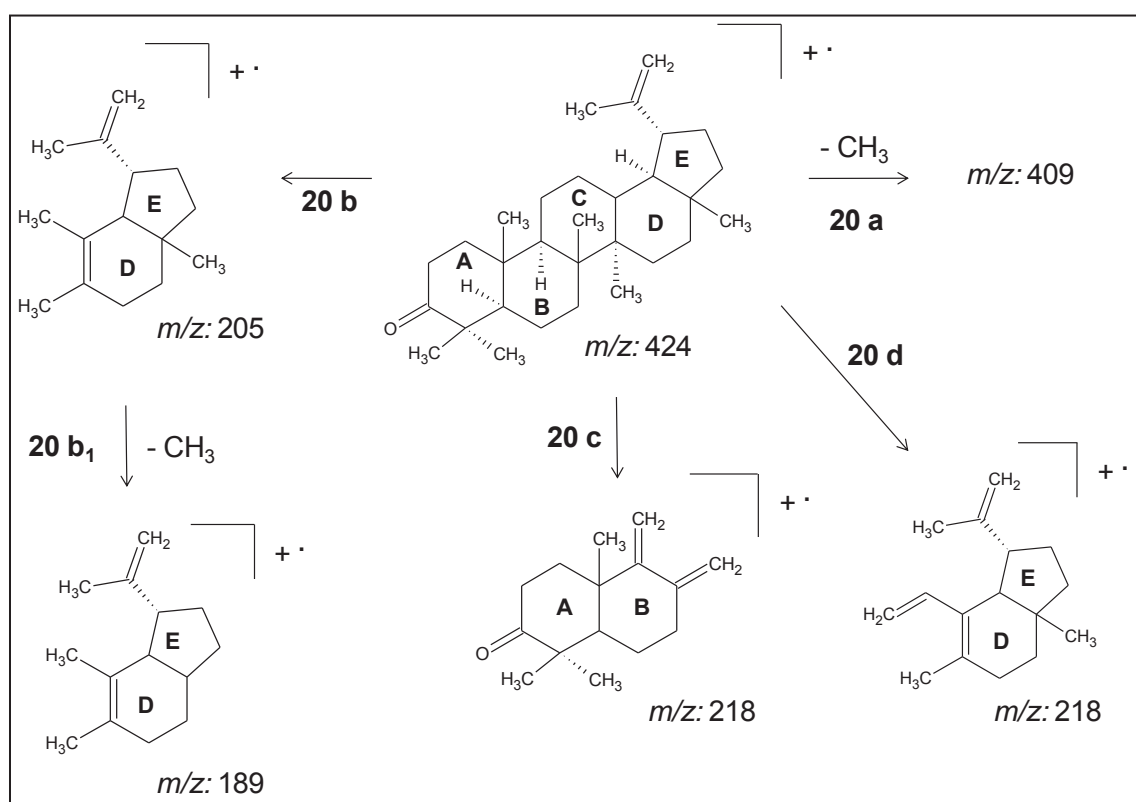


Figura 20: Proposta de fragmentação de acordo com Budzikiewicz *et al.* (1963) e Heizen *et al.*(1996).

Com os resultados obtidos do GG-EM dos extratos hexânicos de *Sclerolobium sp* juntamente o CG-EM dos padrões, foi possível identificar as substâncias: esqualeno, α -tocoferol e lupenona em *S. aureum* e *S. paniculatum*, sendo que em *S. denudatum* identificou-se somente esqualeno e lupenona.

5.1.7 CG-EM dos padrões esqualeno, α -tocoferol, e lupenona.

O cromatograma abaixo (Figura 21) refere-se aos padrões: esqualeno (tr: 10,4 min), α -tocoferol (tr: 20,7 min) e lupenona (tr: 40,4 min) injetados nas condições descritas no item 6.7 e comparados com os extratos hexânicos de *Sclerolobium sp.*

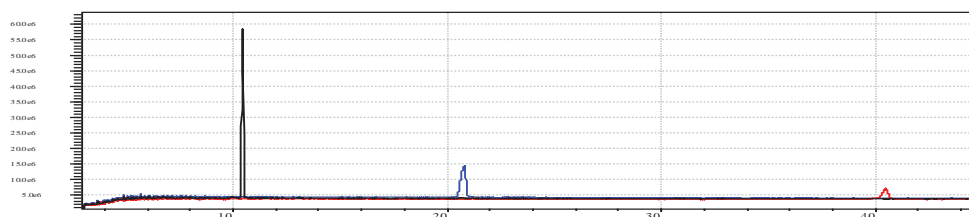


Figura 21: Cromatograma dos padrões: esqualeno, α -tocoferol, e lupenona.

5.1.8 Análise das frações obtidas do clareamento do extrato hexânico de *S. aureum* por CG-DIC.

A análise dos cromatogramas abaixo em comparação com os padrões (item 5.1.7) possibilitou confirmar a presença das substâncias: esqualeno e lupenona nas três frações analisadas, enquanto que α -tocoferol foi encontrado apenas na fração FHAC3 (Figura 22).

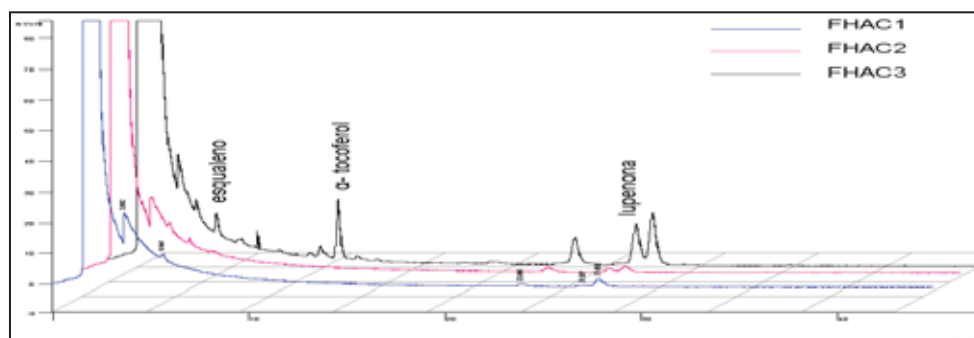


Figura 22: Cromatogramas CG-DIC das frações obtidas no clareamento de *S. aureum*.

A presença das três substâncias no extrato bruto hexânico de *S. aureum* (Figura 12, p. 41) e nas frações de clareamento, confirmam a eficácia do método visto que, obteve-se frações ricas em metabólitos com pouco ou nenhum pigmento.

5.2 Extratos hidroalcoólicos

5.2.1 Análises por CLAE-UV-DAD dos extratos hidroalcoólicos de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*

A técnica por CLAE-UV-DAD possibilitou a avaliação dos perfis químicos dos extratos hidroalcoólicos de *S. denudatum* (Figura 23), *S. paniculatum* (Figura 24) e *S. aureum* (Figura 25). Verificou-se que as espécies possuem perfis químicos semelhantes e que os principais picos nos cromatogramas indicam a presença de flavonoides que são substâncias que apresentam reconhecidamente atividade antioxidante.

O espectro de UV de um flavonoide consiste de dois máximos de absorção, sendo que a banda II está em um intervalo de comprimento de onda de 240-285 nm e a banda I entre 300-550 nm. A posição precisa e as intensidades relativas desses máximos fornecem informações valiosas da natureza do flavonóide e de seu padrão de oxigenação. Sendo assim, mudanças na substituição do anel A tendem a se refletir na banda II, enquanto alterações nos anéis B e C são aparentes na banda I. Quando o flavonol é substituído na posição 3, o valor da banda I passa a ser λ 328-357 nm. Assim, de acordo com os espectros de UV dos cromatogramas das três espécies de *Sclerolobium* pôde-se identificar principalmente derivados de flavonóis glicosilados na posição 3 [MABRY *et al.*, 1970; SIMÕES *et al.*, 2000; HARBONE, 1994].

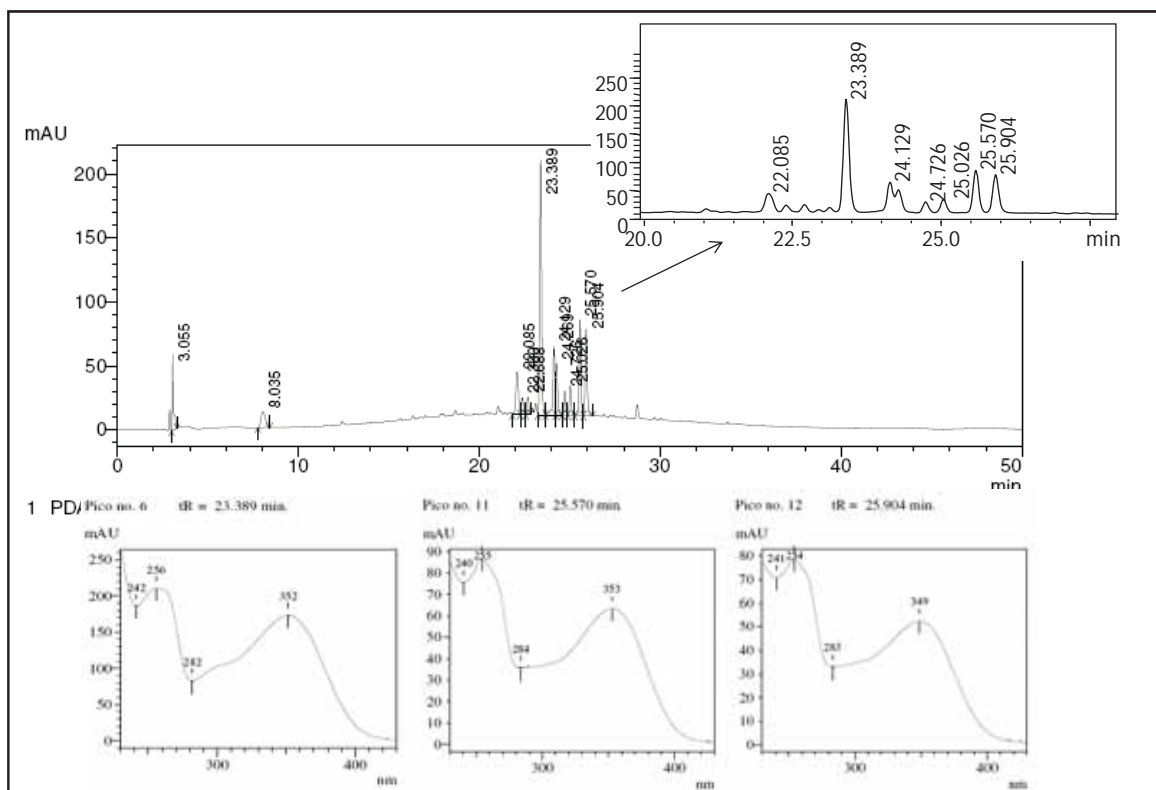


Figura 23: Cromatograma do extrato hidroalcoólico de *S. denudatum* obtido por CLAE-UV-DAD e registrado a 254 nm e espectros no UV dos picos majoritários com tr: 23,39, 25,57 e 25,90 min. Respectivamente. Coluna C18 eluida com 5% de MeOH até 100% de MeOH durante 40'.

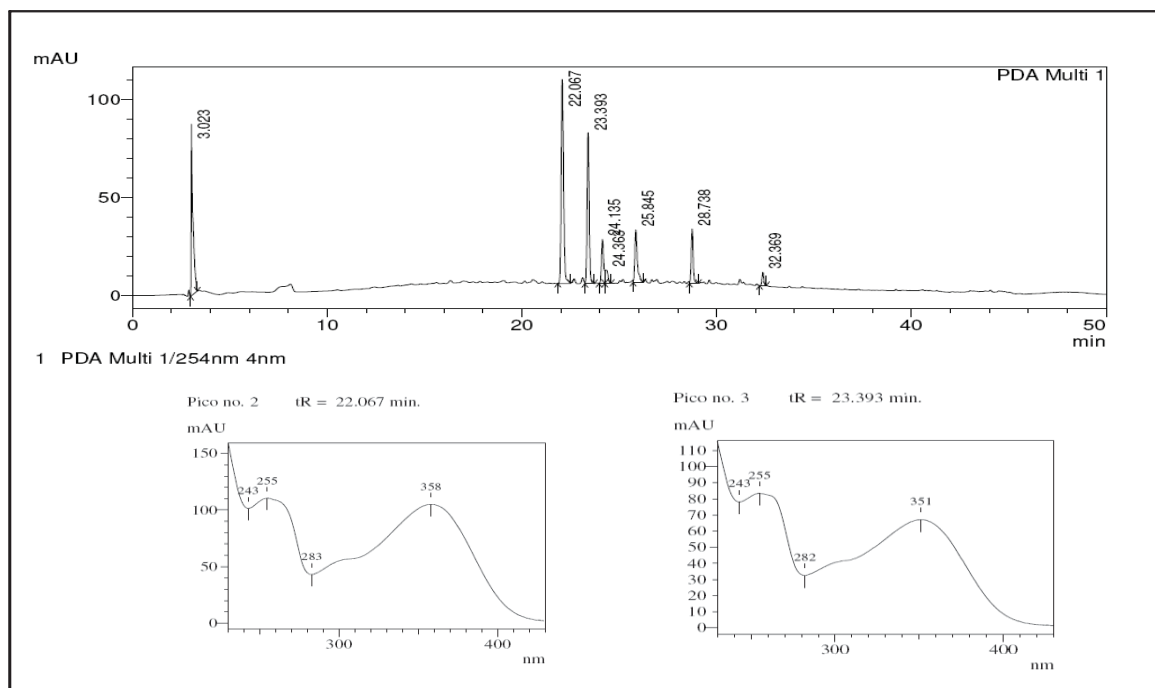


Figura 24: Cromatograma do extrato hidroalcoólico de *S. paniculatum* obtido por CLAE-UV-DAD e registrado a 254 nm e espectros no UV dos picos majoritários com tr: 22,06 e 23,39 min. Respectivamente. Coluna C18 eluida com 5% de MeOH até 100% de MeOH durante 40'.

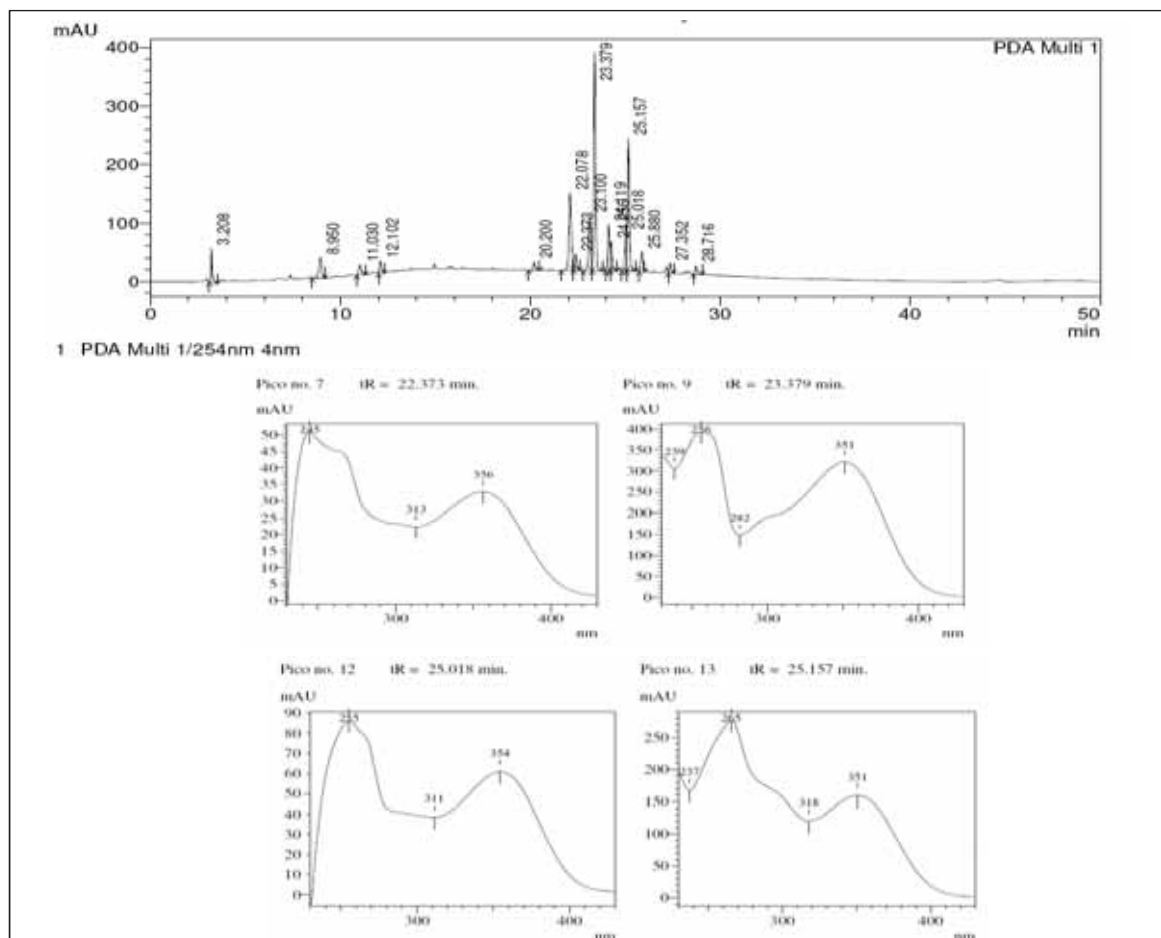


Figura 25: Cromatograma do extrato hidroalcoólico de *S. aureum* obtido por CLAE-UV-DAD e registrado a 254 nm e espectros no UV dos picos majoritários com tr: 22,37, 23,37, 25,02 e 25,16 min. Respectivamente. Coluna C18 eluída com 5% de MeOH até 100% de MeOH durante 40'.

5.2.2 Otimização por CLAE-UV-DAD dos extratos hidroalcoólicos *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*

A avaliação dos perfis cromatográficos obtidos (Figuras 26, 27 e 28) permitiu verificar que composição química dos extratos hidroalcoólicos das espécies de *Sclerolobium* evidenciou a presença majoritária de flavonoides. No entanto houve a necessidade de otimização cromatográfica, visto que, a eluição inicial não foi suficientemente para adequada análise de cada pico.

A otimização que apresentou melhor resolução para análise dos perfis cromatográficos de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* foi um sistema composto de ACN/H₂O acidificados com 0,1% de ácido fórmico (HCOOH), pois sistemas utilizando MeOH/H₂O levaram a resultados com pouca resolução.

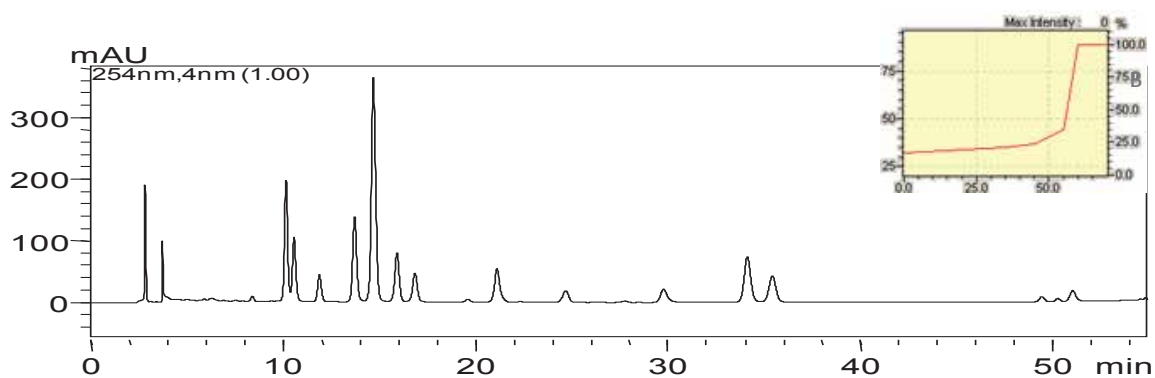


Figura 26: Cromatograma do extrato hidroalcoólico de *S. aureum* obtido por CLAE-UV-DAD registrado em 254 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'. Gradiente de eluição empregado na análise cromatográfica no detalhe.

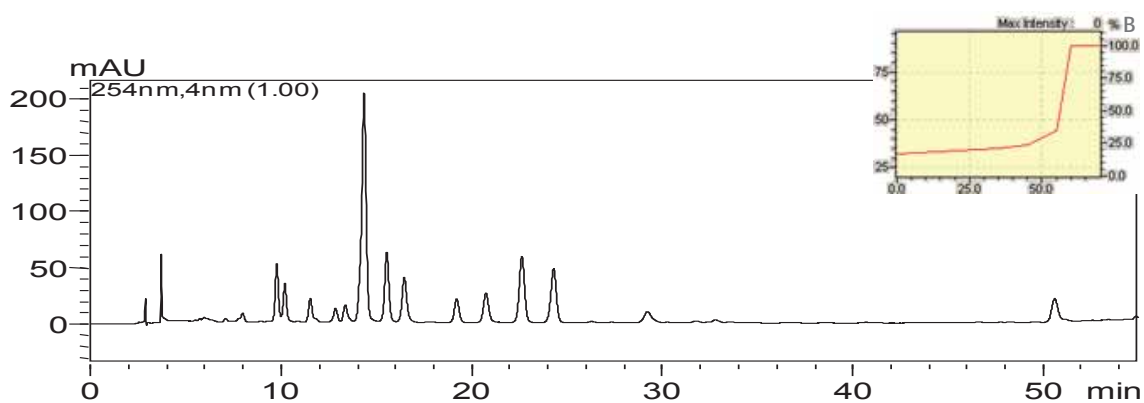


Figura 27: Cromatograma do extrato hidroalcoólico de *S. denudatum* obtido por CLAE-UV-DAD registrado a 254 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'. Gradiente de eluição empregado na análise cromatográfica no detalhe.

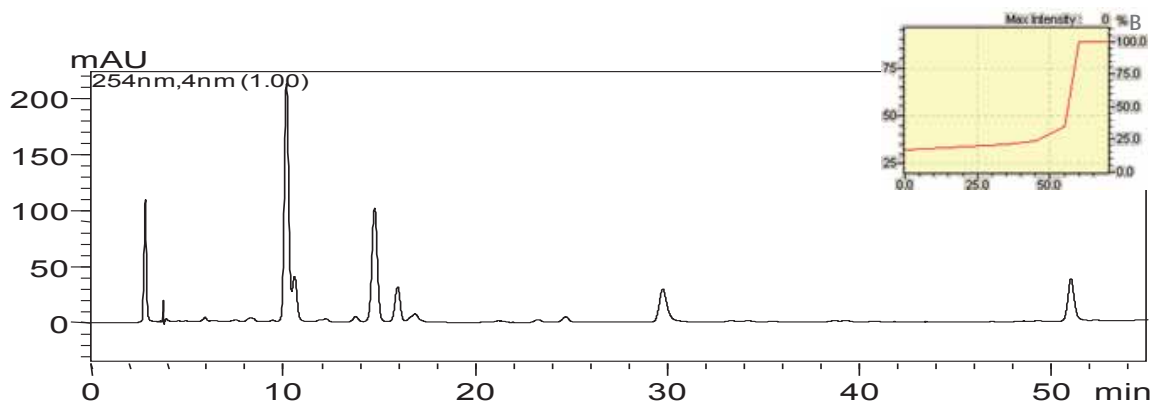


Figura 28: Cromatograma do extrato hidroalcoólico de *S. paniculatum* obtido por CLAE-UV-DAD registrado a 254 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'. Gradiente de eluição empregado na análise cromatográfica no detalhe.

Em todas as análises o fluxo utilizado foi de 1,0 mL min⁻¹, o volume injetado foi de 20 µL e a detecção monitorada na região do UV, principalmente em 254 e 366 nm.

5.2.3 Análise por CLAE-UV-DAD das frações de partição FrACOEt de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*.

As frações de partição de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* foram submetidas a CLAE-UV-DAD nas mesmas condições dos extratos brutos hidroalcoólicos (Figuras 29, 30 e 31), sendo que, as frações de partição FrACOEt apresentaram perfis químicos de grande semelhança a seus respectivos extratos brutos, em especial nas região de tr: 10 a 20 min.

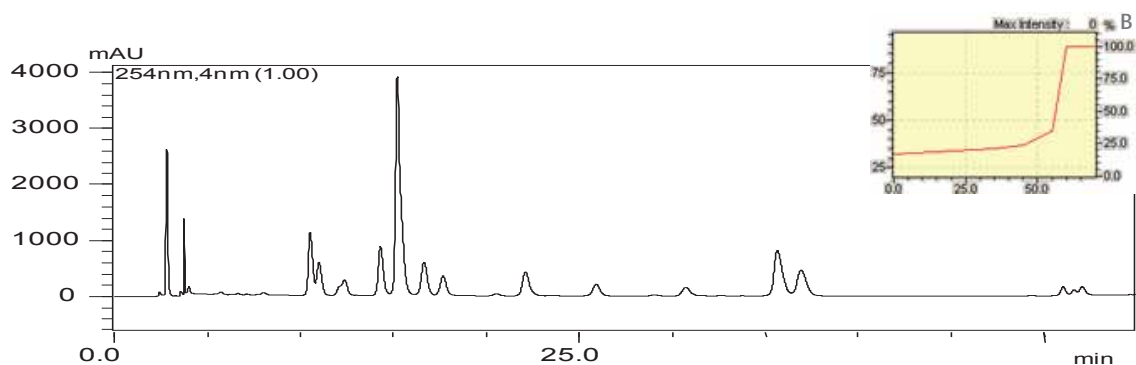


Figura 29: Cromatograma da fração Fr-ACOEt de *S. aureum* obtido por CLAE - DAD registrado a 254 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'. Gradiente de eluição empregado na análise cromatográfica no detalhe.

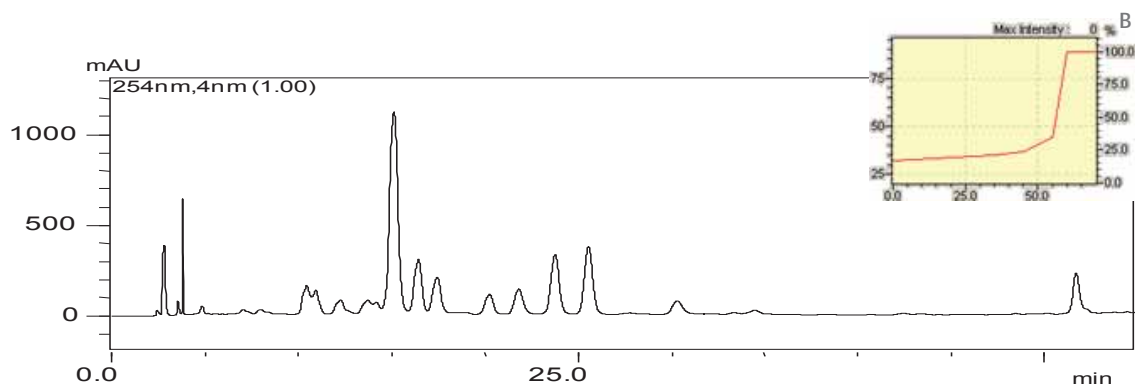


Figura 30: Cromatograma da fração Fr-ACOEt de *S. denudatum* obtido por CLAE-DAD registrado a 366 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'. Gradiente de eluição empregado na análise cromatográfica no detalhe.

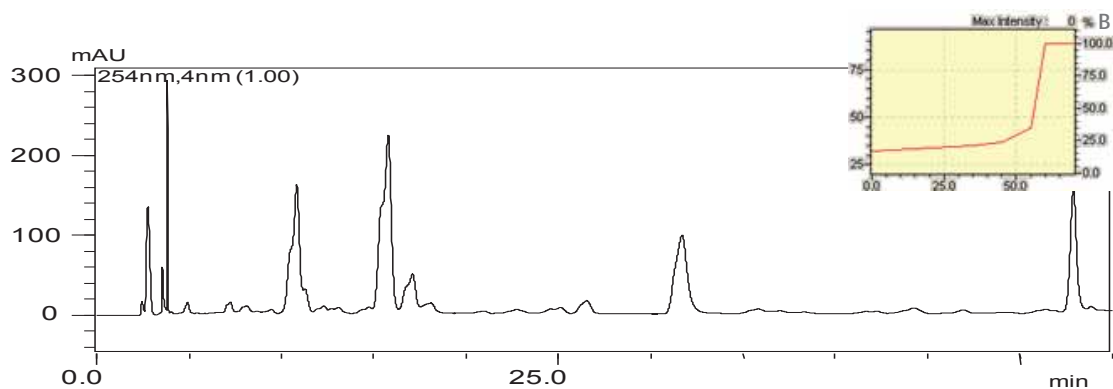


Figura 31: Cromatograma da fração Fr-ACOEt de *S. paniculatum* obtido por CLAE-DAD registrado a 366 nm. Eluição: 17% a 19% de B em 30', 19% a 24% de B até 40', 24% a 35% de B até 50', 35% a 100% de B até 60'. Gradiente de eluição empregado na análise cromatográfica no detalhe.

Em função do perfil químico das Fr-ACOEt apresentarem maior número de constituintes químicos em relação as demais frações de partição, conclusão obtida a partir do maior número de bandas no espectro CLAE-UV-DAD, e devido à características espectrais semelhantes aos extratos brutos hidroalcoólicos, essas frações foram priorizadas no estudo fitoquímico.

5.3 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

5.3.1 Elucidação estrutural de Spa-Hex-1

O espectro de RMN de ^1H (Figura 72, p. 114) substância Spa-Hex-1 apresentou um multipletto entre δ 5,08 e δ 5,14, sugerindo a presença de hidrogênios olefínicos. Os multipletos em δ 1,94 e δ 2,09 foram atribuídos a grupos metilênicos ligados a carbonos olefínicos e o singleto em δ 1,66 sugeriu a presença de hidrogênios metílicos em carbonos sp^2 (Tabela 17).

Os sinais em δ 135,0, δ 134,8 e δ 131,1 no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 74, p. 115) são referentes aos carbonos olefínicos de Spa-Hex-1. Já os sinais em δ 15,9, δ 16,0, δ 17,6 e δ 25,6 foram atribuídos aos grupos metílicos, enquanto os sinais em δ 26,6 e δ 39,7 sugeriram a presença de grupos metilênicos (Tabela 17).

Como foram apresentados apenas 14 sinais no espectro de RMN de ^{13}C impossibilitando a proposta de estrutura molecular consistente apenas com dados de RMN, Spa-Hex-1 foi submetida a análise por CG-EM. O espectro de massas (Figura 32) apresentou o pico íon molecular em m/z 410, compatível com uma substância de forma molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$. Adicionalmente foi observado o fragmento referente ao pico íon base m/z 69 correspondente ao fragmento isoprenila, indicativa da estrutura química terpenoídica (Figura 33).

A análise conjunta dos dados espectrométricos obtidos para Spa-Hex-1 e comparação com os dados da literatura [HE, 2002] permitiram identificar a substância como sendo o triterpeno **esqualeno** (Figura 32).

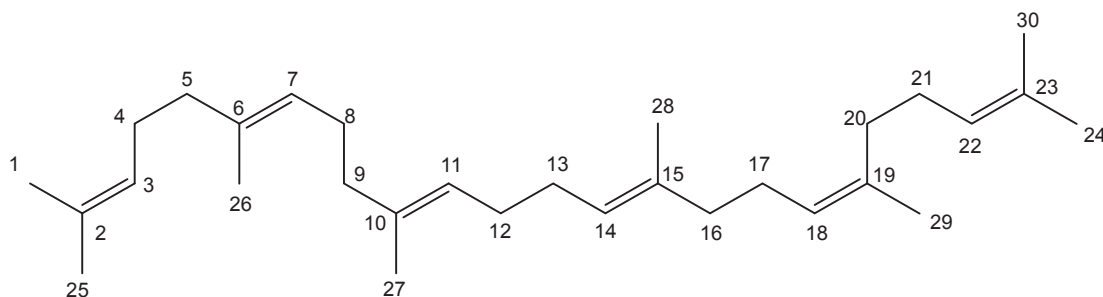


Figura 32: Estrutura do esqualeno (Spa-Hex-1)

Resultados e discussão

Tabela 17: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para o esqualeno (Spa-Hex-1) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CDCl_3)

Posição	δ_{C}	δ_{H}
1=24	25,6	1,66
2=23	131,2	-----
3=22	124,3	5,10 (m)
4=21	26,7	2,06 (m)
5=20	39,7	1,97
6=19	134,8	-----
7=18	124,3	5,10 (m)
8=17	28,2	1,97 (m)
9=16	28,3	1,97 (m)
10=15	124,3	5,10 (m)
11=14	135,0	-----
12=13	39,7	1,97
25=30	17,6	1,58
26=29	16,0	1,58
27=28	15,9	1,58

Dados: Deslocamentos químicos (δ) em 53PM, em relação ao TMS como padrão interno

Constantes de acoplamento (J), expressas em Hz

m = multiplicidade

* não observado

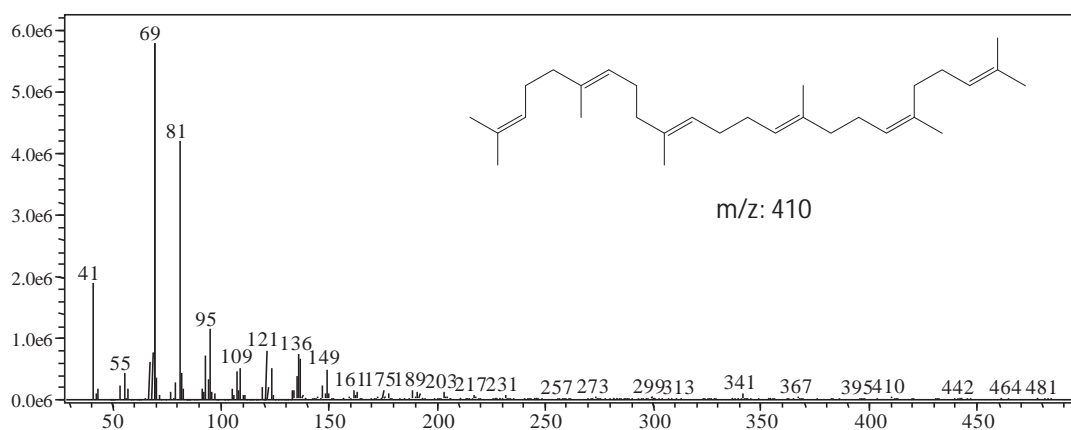


Figura 33: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 410, obtido no modo negativo.

5.3.2 Elucidação estrutural de Spa-Hex-2

A análise do espectro de RMN-¹H (Figura 76, p.116) de Spa-Hex-2 apresentou sinais característicos de tocoferol (Tabela 18): um singlete em δ 2,03, atribuído aos hidrogênios dos grupos metílicos nas posições 5 e 7 do anel aromático e um singlete em δ 2,08 atribuídos a metila em C-8; um tripleto em δ 2,53 ($J = 7$ Hz), correspondente aos hidrogênios ligados ao carbono metilênico C-4 [MATSUNO & URANO, 1976].

A análise conjunta do espectro de RMN ¹³C (Figura 78, p.117) e do DEPT 135° mostrou a presença de seis sinais referentes a carbonos aromáticos quaternários em δ 117,3, δ 118,4, δ 121,0, δ 122,6, δ 144,5 e δ 145,5, que foram atribuídos aos carbonos C-4a, C-5, C-7, C-8, C-6 e C-8a, respectivamente. Os sinais em δ 19,6 e δ 22,7 foram atribuídos aos carbonos metílicos em C-4', C-8' e C-12', respectivamente e o sinal em δ 74,5 foi atribuído a C-2. Os sinais em δ 11,2 e δ 12,2 são referentes às metilas ligadas aos carbonos aromáticos em C-5, C-7 e C-8 respectivamente enquanto que a metila ligada a C-2 apresentou sinal em δ 23,8. [MATSUNO & URANO, 1976; AYRES *et al.*, 2009]

A análise comparativa dos espectros com o auxílio dos dados obtidos na literatura permitiu identificar Spa-Hex-2 como sendo o α -tocoferol (Figura 34), constituinte majoritário de vitamina E, de reconhecida importância para as membranas lipídicas e organelas celulares contra o estresse oxidativo [HALLIWELL *et al.*, 1995; PIETTA, 2000]

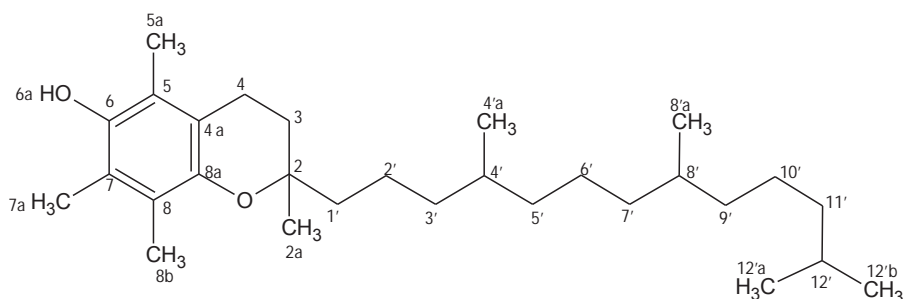


Figura 34: Estrutura do α -tocoferol (Spa-Hex-2)

Tabela 18: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para o α -tocoferol (Spa-Hex-2) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CDCl_3)

Posição	δ_{C}	δ_{H}	LIT. δ_{C}
2	74,5	-----	74,5
3	31,5		31,6
4	20,7	2,57 (t, J=7Hz)	20,8
4a	117,3	-----	117,4
5	118,4	-----	118,5
6	144,5	-----	144,5
7	121,0	-----	121,0
8	122,6	-----	122,6
8a	145,6	-----	145,5
1'	39,9	1,0-1,3 (m)	39,8
2'	21,0	***	21,0
3'	37,5	1,0-1,3 (m)	37,5
4'	32,7	1,0-1,3 (m)	32,8
5'	37,4	1,0-1,3 (m)	37,5
6'	24,8	1,0-1,3 (m)	24,4
7'	37,3	1,0-1,3 (m)	37,3
8'	32,8	1,3 (m)	32,8
9'	37,4	1,0-1,3 (m)	37,5
10'	24,4	1,0-1,3 (m)	24,8
11'	39,4	1,46 (m)	39,4
12'	28,0	***	28,0
2-a	23,8	1,20 (s)	23,8
5-a	11,2	2,08 (s)	11,3
7-a	12,2	2,08 (s)	12,2
8-b	11,7	2,13 (s)	11,8
4'-a	19,6	0,78-0,80 (d)	19,7
8'-a	19,7	0,78-0,80 (d)	19,7
12'-a	22,6	0,78-0,80 (d)	22,7
12'-b	22,7	0,78-0,80 (d)	22,7

Dados:

Literatura (LIT): Dados relatados por AYRES *et al.* (2009) em CDCl_3 para α -tocoferol.

Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno;

m = multiplicidade;

*** sinais não observados.

5.3.3 Elucidação estrutural de SA-3

O sólido codificado como SA-3 foi isolado por coluna aberta de sílica gel 60, da fração FR-2 obtida de coluna C18 do extrato hidroalcoólico de *S.aureum*, como descrito no item 4.5.6.1.

O espectro de RMN-¹H (Figura 82, p. 119) apresentou um dubleto em δ 6,71 (H2', J = 2,0 Hz) e em δ 6,67 (H6' J= 8,0 Hz) , além do duplo dubleto em δ 6,58 (H5', J= 2,0 Hz e 8,0 Hz), indicando a presença de um anel B flavanoídico trissustituído. Os deslocamentos em δ 5,88 (H8, J = 2,5 Hz) e δ 5,68 (H6, J = 2,0 Hz) atribuídos ao anel A juntamente com os sinais indicados acima (anel B) caracterizam um núcleo flavanoídico. Observaram-se quatro sinais na região de hidrogênios alifáticos: dois duplos dubletos integrando para um hidrogênio cada, centrados em δ 2,34 e δ 2,64 característicos de hidrogênios benzílicos de grupo metilênico ligado a carbono oximetínico; um multipletto em δ 3,97, atribuído a um hidrogênio ligado a carbono oximetínico e um dubleto, integrando para um hidrogênio, em δ 4,47, característico de hidrogênio oximetínico-benzílico (Tabela 19). Esse conjunto de sinais é típico do anel C de catequinas [SHEN *et al*, 1993]. A determinação da estereoquímica relativa de SA-3 dependeu da análise de dados de RMN ¹³C para o anel C.

Os valores da literatura mostram que a catequina e a epicatequina são diferenciadas pelo valor do C2, o qual para a catequina apresenta deslocamento químico em δ 81,0 [WENKERT & GOTTLIEB, 1977] e para a epicatequina em aproximadamente δ 78,0 [MARKHAM & TERNAL, 1976]. No espectro de RMN-¹³C de SA-3 (Figura 85, p. 120) observou-se um valor de δ 80,9 que foi atribuído ao carbono 2, permitindo identificar em SA-3 a presença majoritária do flavonoide **catequina** (Figura 38).

Com os dados obtidos dos espectros bidimensionais (gHMQC e gHMBC) pôde-se atribuir todos os sinais para hidrogênios e carbonos da sua estrutura química.

Outro detalhe que pôde ser observado nos espectros de ¹³C e DEPT 135 (Tabela 19), foi a presença de um sinal para carbono metínico de baixa intensidade em δ 105,9, não atribuído à molécula de catequina. Este sinal no espectro de gHMQC está correlacionado com um H singleto em δ 6,24 também não pertencente a catequina, evidenciando que, SA-3 constitui uma mistura,

sendo a catequina a substância majoritária. Esta análise foi confirmada submetendo-se o sólido a análise por CLAE-UV-DAD, através da qual foi possível confirmar que SA-3 trata-se de uma mistura (Figura 35).

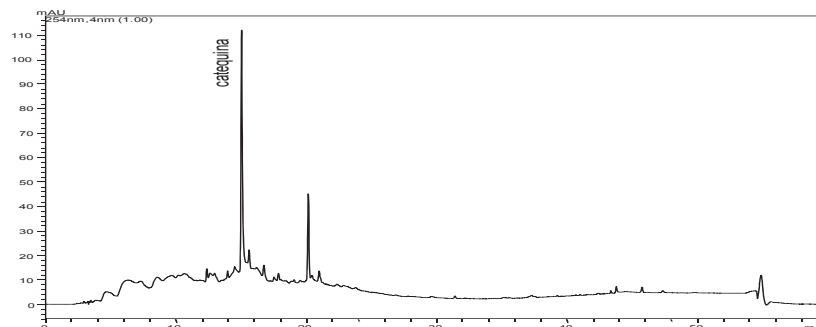


Figura 35: Cromatograma de SA-3 obtido por CLAE-UV-DAD registrado a 254 nm. Coluna C18 eluida em gradiente exploratório: 5% de MeOH até 100% de MeOH durante 40'.

O espectro de UV correspondente à banda com tr: 15,04 min (Figura 36), possui absorção máxima em 279 nm característicos de catequinas [GUYOT, ERCAUTEREN & CHEYNIER, 1996], evidenciando que a mesma é a substância majoritária de SA-3.

A substância em menor concentração referente ao pico com tr: 20,15 (Figura 37), apresentou duas bandas de absorção no UV sendo uma em 286nm e outra em 257nm, mas não foi possível identificá-la visto que a mesma se encontra em baixa concentração. A separação para possível identificação foi impossibilitada pela pouca massa disponível de SA-3 para este procedimento.

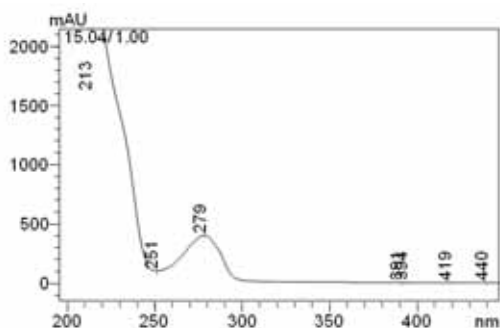


Figura 36:

Espectro de UV referente ao tr: 15,04.

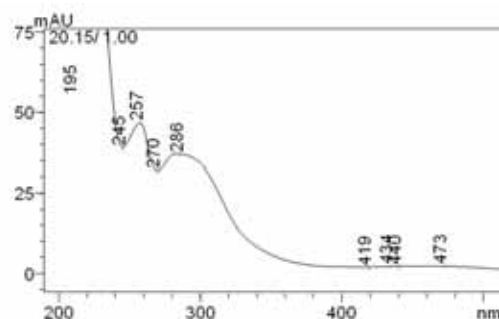


Figura 37:

Espectro de UV referente ao tr: 20,1.

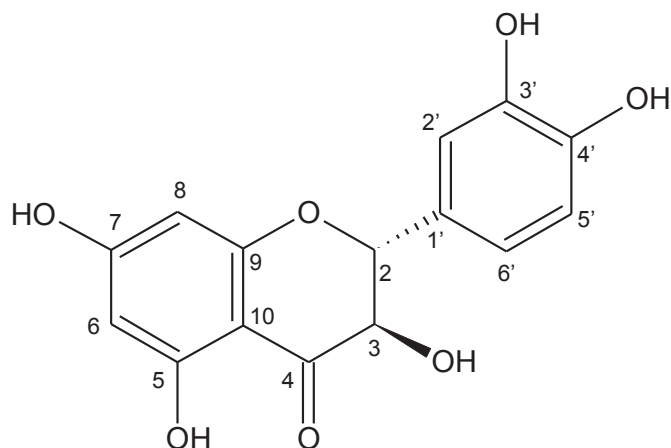


Figura 38: Substância majoritária de SA-3 (tr: 15.04 min): catequina

Tabela 19: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 90 E 135° para a substância majoritária de SA-3 em comparação com dados da literatura (tr: 15.04 min - 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , DMSO- d_6)

Posição	δ_{C}	δ_{H}	DEPT 90 e 135°	LIT. δ_{C}
2	80,9	4,46 (d; 7,5 Hz)	CH	81,2
3	66,2	3,79 (m)	CH	66,6
4	27,8	-----	CH ₂	28,1
4a	-----	2,64 (dd; 5 e 16 Hz)	-----	
4b	-----	2,34 (dd; 8 e 16 Hz)	-----	
5	156,3	-----	C	156,3
6	93,8	5,67 (d; 2,5 Hz)	CH	95,5
7	156,1	-----	C	156,6
8	95,0	5,87 (d; 2 Hz)	CH	94,4
9	155,3	-----	C	155,5
10	99,0	-----	C	99,4
1'	130,5	-----	C	130,8
2'	114,5	6,71 (d; 2 Hz)	CH	114,7
3'	144,8	-----	C	145,0
4'	145,5	-----	C	145,0
5'	115,0	6,67 (d; 8Hz)	CH	115,4
6'	118,3	6,58 (dd; 2 e 8 Hz)	CH	118,8

Dados:

Literatura (LIT): Dados relatados por AGRAWAL (1989) em DMSO- d_6 para catequina.

Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

Constantes de acoplamento (J), expressas em Hz.

M = multiplicidade.

* sinais sobrepostos.

5.3.4 Elucidação estrutural de Spa-14-17-A

Spa-14-17-A mostrou-se como um sólido amorfo de cor amarela. A análise do espectro de RMN-¹H (Figura 86, p. 121) evidenciou a presença de sinais de hidrogênios aromáticos típicos de flavonoides.

Foram observados dois dubletos em δ 6,18 (1H) e δ 6,85 (1H), ambos com $J= 2$ Hz, característicos de acoplamento meta entre H-6 e H-8 (anel A), um singlete em δ 7,19 (2H) atribuído aos hidrogênios 2' e 6' do anel B, um singlete em δ 12,6 (1H) atribuído ao hidrogênio da hidroxila em C-5 do anel A. Os sinais observados no espectro de RMN-¹H (Tabela 20) são característicos da aglicona miricetina, de acordo com a literatura [MARKHAM, 1978]

O dubleto em 5,32 com $J= 5$ Hz foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1" do açúcar, sendo esta constante de acoplamento típica de uma ligação β -glicosídica. Os multipletos na região em δ 3,33 e δ 3,61 foram atribuídos aos hidrogênios hidroximetilênicos e metínicos da porção glicosídica, conforme relatado na literatura.

A análise do espectro de ¹³C (Figura 88, p.122) apresentou sinais de carbonos aromáticos oxigenados em δ 136,6 (C-4'), δ 145,3 (C-3' e C-5'), δ 161,2 (C-5) e 164,1 (C-7). O sinal na região de δ 133,7 (C-3), bem como os sinais em 156,2 (C-2), δ 161,2 (C-5) e δ 177,4 (C-4) em relação à miricetina, são típicos da presença de uma unidade glicosídica no C-3 do anel C [AGRAWAL, 1989]. O sinal em δ 102,0 associado ao carbono C-1" anomérico, e os sinais em δ 60,0, δ 67,9, δ 71,2, δ 73,2 e δ 75,9 são sinais típicos de uma galactose.

O espectro de gHMQC permitiu estabelecer a correlação direta entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos. A localização da unidade de açúcar foi definida pelo experimento de gHMBC (Figura 89, p. 122). Observou-se a correlação a longa distância entre o H-1" (δ 5,32) e o C-3 (δ 133,7), permitindo confirmar que o açúcar está ligado na posição 3 da aglicona.

O estudo comparativo dos dados espectroscópicos com dados da literatura permitiu identificar Spa-14-17-A como sendo a **miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo** (Figura 39) [AGRAWAL, 1989; MARKHAM, 1978].

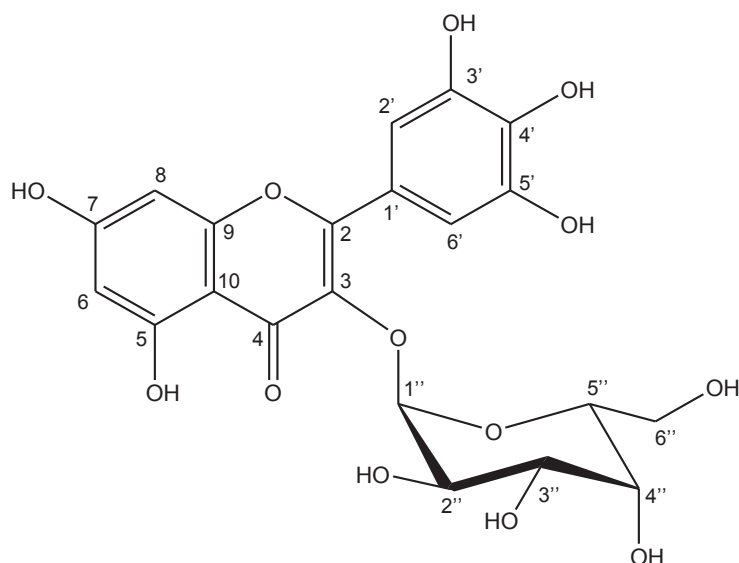


Figura 39: Estrutura da miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (Spa-14-17-A)

Tabela 20: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo (Spa-14-17-A) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , DMSO- d_6).

Posição	δ_{C}	δ_{H}	LIT. (δ_{C})
2	156,1	-----	156,2
3	133,7	-----	133,9
4	177,9	-----	177,4
6	98,8	6,19 (d, J=2 Hz)	98,6
7	165,7	-----	164,0
8	93,7	6,36 (d, J= 2 Hz)	93,3
9	156,2	-----	156,2
10	103,9	-----	104,0
1'	119,9	-----	120,2
2' e 6'	108,5	7,20 (s)	108,8
3' e 5'	145,3	-----	145,3
4'	136,7	-----	136,6
OH-5	161,2	12,6 (s)	161,2
Galactose			
1''	102,0	5,32 (d, J= 8,0 Hz)	102,0
2''	71,2	3,60 (m)	71,5
3''	73,2	3,37 (m)	73,4
4''	68,0	3,64 (m)	68,1
5''	75,9	3,38 (m)	75,9
6''	60,0	3,42 (m)	60,4

Dados:

Literatura (LIT): Dados relatados por AGRAWAL (1989) em DMSO- d_6 para miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo.

Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

Constantes de acoplamento (J), expressas em Hz.

M = multiplicidade.

5.3.5 Elucidação estrutural de Spa-14-17-B

Spa-14-17-B mostrou-se como um sólido amorfo de cor amarela. Os sinais observados no espectro de RMN ^1H (Figura 90, p.123) referentes à porção aglicona apresentaram deslocamentos e multiplicidades semelhantes àqueles apresentados pela substância Spa-14-17-A, sugerindo-se tratar da mesma aglicona, a miricetina.

Já o dubleto em δ 5,19 ($J = 1,2$ Hz) referente a porção glicosídica foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1" do açúcar, sendo esta constante de acoplamento típica de uma ligação α -glicosídica. O dubleto observado em δ 0,83 ($J = 6,5$ Hz) referente a H6" metílico é característico de ramnose e os multipletos presentes na região entre δ 3,30 e δ 3,60 foram atribuídos aos carbonos metínicos e metilênicos da porção glicosídica (Tabela 21).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 92, p. 124) apresentou 15 sinais referentes à aglicona semelhantes aqueles apresentados por Spa-14-17-A, confirmando-se tratar da mesma aglicona, a miricetina. O espectro também apresentou 6 sinais referentes a porção glicosídica. Os sinais em δ 101,9 e δ 17,5 referentes aos carbonos C-1" e C-6", respectivamente, confirmaram a unidade ramnose [AGRAWAL, 1989].

O espectro de gHMBC (Figura 93, p.124) permitiu estabelecer a correlação a longa distância entre o H-1" (δ 5,19) e o C-3 (δ 133,7), permitindo confirmar que o açúcar está ligado na posição 3 da aglicona.

Os dados obtidos mediante comparações com dados da literatura permitiram identificar Spa-14-17-B como sendo a **miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo** (Figura 40) [AGRAWAL, 1989; MARKHAM, 1978].

Os mesmos deslocamentos químicos foram observados para SD-FAc-4 nos espectros mono e bidimensionais podendo-se concluir que a mesma trata-se do flavonóide miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo.

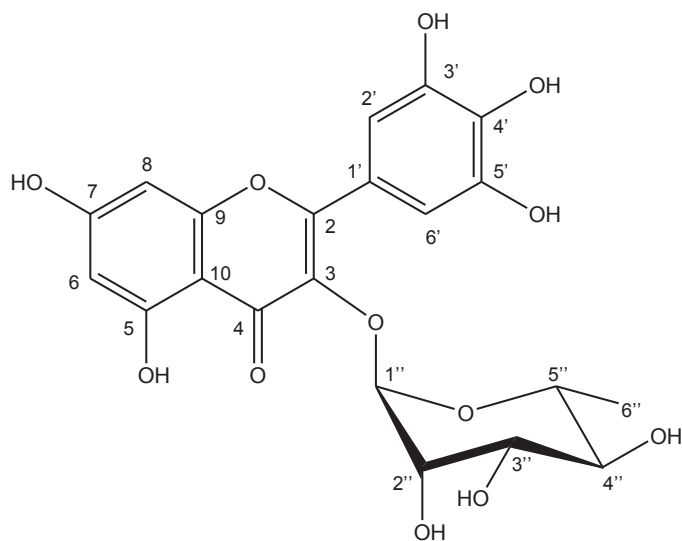


Figura 40: Estrutura da miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (Spa-14-17-B)

Tabela 21: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (Spa-14-17-B) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , DMSO- d_6).

Posição	δ_c	δ_H	LIT. δ_c
2	156,4*	-----	156,2
3	134,2	-----	134,2
4	177,7	-----	177,7
6	98,6	6,19 (d, J=2 Hz)	98,6
7	161,3	-----	161,2
8	93,5	6,36 (d, J= 2 Hz)	93,4
9	156,4*	-----	156,2
10	104,0	-----	104,0
1'	119,6	-----	119,6
2' e 6'	107,9	6,88 (s)	107,9
3' e 5'	145,7	-----	145,7
4'	136,4	-----	136,4
OH-5	161,3	12,6 (s)	161,2
Ramnose			
1''	101,9	5,19 (d, J= 1,2 Hz)	101,9
2''	70,4	3,30-3,60 (m)	70,4
3''	70,5	3,30-3,60 (m)	70,4
4''	71,3	3,30-3,60 (m)	71,2
5''	70,0	3,30-3,60 (m)	69,5
6''	17,5	0,83 (d, J=6,5 Hz)	17,4

Dados:

Literatura (LIT): Dados relatados por AGRAWAL (1989) em DMSO- d_6 para miricetina-3-O- α -ramnopyranosídeo.

Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

M = multiplicidade.

* sinais sobrepostos.

5.3.6 Elucidação estrutural de Sa-Fac-7

O espectro de RMN ^1H de Sa-Fac-7 (Figura 94, p. 125) apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos típicos de flavonoides: dois dubletos em δ 6,19 e δ 6,39 ($J= 2,0$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, respectivamente, um singlete em δ 12,6 (1H) atribuído ao hidrogênio da hidroxila em C-5, dois dubletos em δ 7,50 ($J=2,5$ Hz) e δ 6,83 ($J= 8,5$ Hz) referentes aos hidrogênios H-2' e H-5' do anel B respectivamente, além do duplo dubleto em δ 7,64, atribuído ao hidrogênio H-6' com constantes de acoplamento de 2,0 Hz indicando sua posição meta em relação ao H- 2", e $J= 8,5$ Hz referente ao acoplamento *orto* em relação ao hidrogênio H-5' no anel B (Tabela 22). Esses dados, associados aos observados no espectro de RMN ^{13}C , evidenciaram a aglicona quercetina.

O dubleto em δ 5,25 foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1" da porção glicosídica, sendo a constante de acoplamento observada ($J=5,5$ Hz), típica de uma ligação β -glicosídica. Os multipletos presentes na região entre δ 3,30 e δ 3,60 foram atribuídos aos carbonos metínicos e metilênicos da porção glicosídica [FRAISSE, 2000].

A análise do espectro de RMN de ^{13}C apresentou 15 sinais referentes à aglicona e seis sinais referentes a porção glicosídica. Os sinais na região entre δ 64,2, e δ 70,7 são típicos de uma pentose.

Os espectros de gHMQC permitiram estabelecer a correlação direta entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos. A localização da unidade de açúcar foi definida pelo experimento de gHMBC. Observou-se a correlação a longa distância entre o H-1" (δ 5,25) e o C-3 (δ 133,7), permitindo confirmar que o açúcar está ligado na posição 3 da aglicona.

Com os dados obtidos, mediante a comparação com dados na literatura [FRAISSE, 2000, MARKHAM, 1978] foi possível caracterizar a substância Sa-Fac-7 como sendo o flavonoide **quercetina-3-O- β -arabinopiranosídeo** (Figura 41).

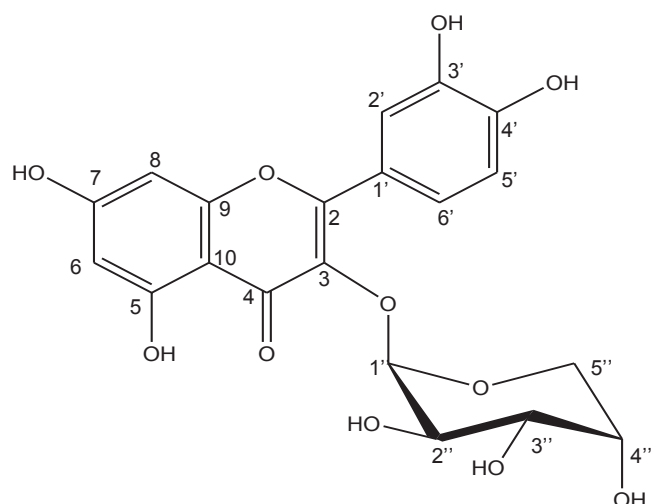


Figura 41: Estrutura da quercetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (Sa-Fac-7)

Tabela 22: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para quercetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (Sa-Fac-7) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , DMSO- d_6).

Posição	δ_{C}	δ_{H}	LIT. δ_{C}
2	156,2	-----	156,4
3	133,7	-----	133,5
4	178,0	-----	177,8
6	98,7	6,19 (d, J= 2 Hz)	98,7
7	***	-----	164,1
8	93,5	6,39 (d, J= 2 Hz)	93,5
9	156,2	-----	156,8
10	104,1*	-----	104,1
1'	120,8	-----	121,1
2'	115,6	7,50 (d, J= 2,5 Hz)	115,6
3'	145,0	-----	145,0
4'	148,4*	-----	148,4
5'	115,6	6,83 (d, J= 8,5 Hz)	118,8
6'	122,0	7,64 (dd, J= 2,0 e 8,5 Hz)	121,6
OH-5	161,2	12,6 (s)	161,2
Arabinose			
1''	101,4	5,25 (J= 5,5 Hz)	101,4
2''	70,7	3,30-3,60 (m)	70,7
3''	71,6	3,30-3,60 (m)	71,6
4''	66,0	3,30-3,60 (m)	66,0
5''	64,2	3,30-3,60 (m)	64,2

Dados:

Literatura (LIT): Dados relatados por MARKHAM (1978) em DMSO- d_6 para quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo.

Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

M = multiplicidade.

***sinais não observados.

* sinais sobrepostos.

5.3.7 Elucidação estrutural de Sa-Fac-9

Sa-Fac-9 mostrou-se como um sólido de cor amarela. A análise do espectro de RMN-¹H (Figura 98, p. 127) apresentou vários sinais característicos de flavonoides, porém com intensidades diferentes, permitindo detectar a presença de uma mistura. Assim, a identificação de Sa-Fac-9 foi realizada analisando-se os sinais de maior intensidade e suas correlações com dados obtidos nos espectros de gHMQC e gHMQC.

O espectro de RMN-¹H apresentou sinais com deslocamentos em δ 6,36 e δ 6,18, ambos com $J = 2$ Hz, característicos de acoplamento meta entre H-6 e H-8 (anel A). O singleto em δ 6,93 (2H) foi atribuído aos hidrogênios 2' e 6' do anel B e o singleto na região em δ 12,5 (1H) foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila em C-5 do anel A. Os sinais observados no espectro de RMN-¹H (Tabela 23) são característicos da aglicona miricetina, de acordo com a literatura [MARKHAM, 1978]

O dubleto em δ 5,02 (1H) foi atribuído ao hidrogênio anomérico da porção glicosídica, mediante comparação com dados obtidos no espectro de gHMQC. O dubleto observado em δ 0,91 ($J = 5,5$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-6" metílico da ramnose. Foi ainda observado um duplo dubleto em δ 5,47 ($J = 1,2$ e $3,3$ Hz) referente ao H-2" da porção glicosídica, e um singleto em δ 7,0 sugerindo a presença de uma unidade galoíla em C-2".

A análise do espectro de ¹³C para SA-Fac-9 apresentou sinais característicos da aglicona miricetina. (Tabela 23). Já a unidade glicosídica apresentou 6 sinais, dentre os quais, dois sinais em δ 102,7 e δ 17,5 atribuídos aos carbonos C-1" e C-6", respectivamente, sendo que este último é sinal característico de carbono metílico de ramnose [AGRAWAL, 1989].

Os sinais em δ 119,4 (1H); δ 107,9 (2H), δ 145,4 (2H) e δ 138,5 (1H) confirmaram a presença do grupo galoil, assim como o sinal em δ 164,9, típico de carbonila de éster.

O estudo comparativo dos dados obtidos com dados da literatura permitiu identificar Sa-Fac-9 como sendo o flavonóide miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (Figura 42) [LEE, 2000; NICOLLIER, 1983].

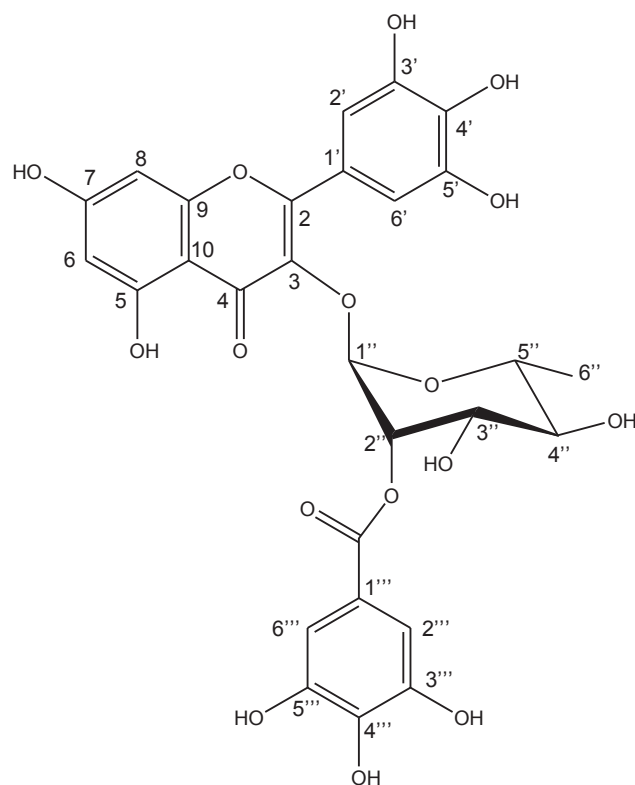


Figura 42: Estrutura da miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosideo (Sa-Fac-9)

O flavonol miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -rhamnopyranosídeo foi isolado pela primeira vez por NICOLLIER & THOMPSON (1983) da espécie *Desmanthus illionensis* (Leguminosae). Esse flavonol apresentou atividade alelopática e antibacteriana significantes, sugerindo ainda, que essas atividades estavam relacionadas à importância da ligação do grupo galoíla na posição 2'' da rhamnose.

Tabela 23: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo (Sa-Fac-9) (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , DMSO- d_6).

Posição	δ_{C}	δ_{H}
2	156,5	-----
3	133,3	-----
4	177,4	-----
6	98,7	6,18 (d, J=2,4 Hz)
7	164,9	-----
8	93,6	6,36 (d, J= 1,5 Hz)
9	156,5	-----
10	103,9	-----
1'	120,0	-----
2'e 6'	108,8	6,92 (s)
3' e 5'	145,8	-----
4'	108,8	-----
5-OH	161,2	12,6 (s)
Ramnose		
1''	98,3	5,02 (d, J= 1,2 Hz)
2''	71,7	5,47 (dd, J=1,2 e 3,3 Hz)
3''	70,6	3,30 (m)
4''	68,6	3,30 (m)
5''	70,8	3,60 (m)
6''	17,5	0,94 (d, J= 5,7)
2''-O-galoil		
1'''	119,4	-----
2''' e 6'''	107,9	7,0
3''' e 5'''	145,4	-----
4'''	138,5	-----
C=O	164,9	-----

Dados:

Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.
M = multiplicidade.

5.3.8 Elucidação estrutural de Spa-Fac-1-2

A análise do espectro de RMN ^1H de Spa-1-2 (Figura 102, p. 129) mostrou apenas um singlete intenso em δ 6,9 (2H) característico do ácido gálico, atribuído aos dois hidrogênios equivalentes (H-2 e H-6) do anel aromático.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 103, p. 129) apresentou sinais em δ 108,7 referentes aos carbonos equivalentes C-2 e C-6, outro sinal em δ 145,4 que foi atribuído a outros dois carbonos equivalentes C-3 e C-5, e o sinal em δ 167,5, característico do carbono carbonílico C-1' (Tabela 24).

A análise do espectro de massas permitiu determinar a massa molecular de 169,01u ($[\text{M}^-]$), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5$ (Figura 44).

Esses dados, em comparação aos da literatura [ANDERSEN *et al.*, 2003], levaram à identificação da substância Spa-Fac-1-2 como sendo o **ácido gálico** (Figura 43).

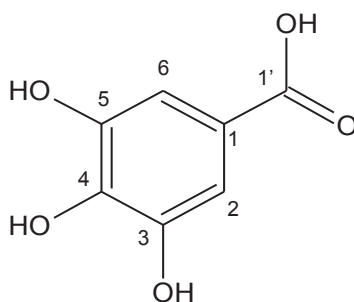


Figura 43: Estrutura do ácido gálico (Spa-Fac-1-2)

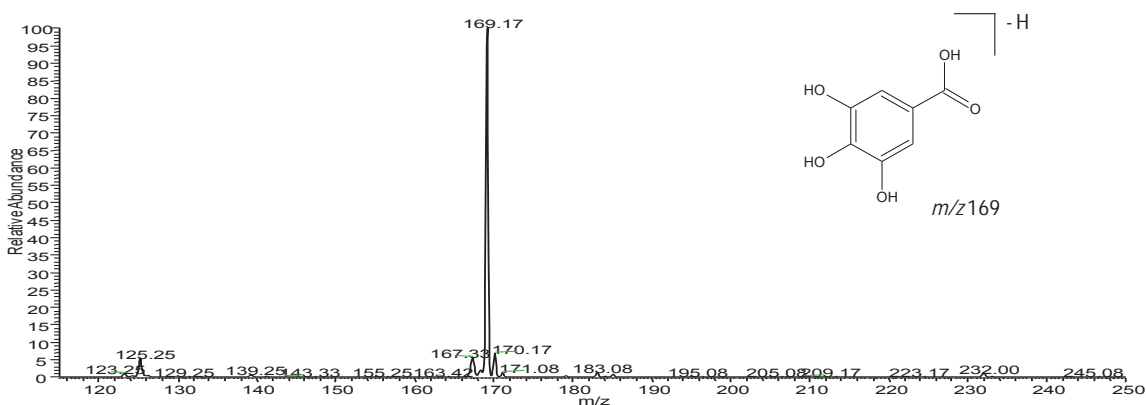


Figura 44: Espectro de massas de primeira-ordem com íon molecular de m/z 169, obtido no modo negativo.

Tabela 24: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para o ácido gálico (Spa-Fac-1-2) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , DMSO- d_6)

Posição	δ_{C}	δ_{H}	LIT. δ_{C}
1	120,4	-----	120,7
2 e 6	108,7	6,90	109,1
3 e 5	145,4	-----	145,1
4	137,9	-----	138,3
1'	167,5	-----	169,1

Dados:

Literatura (LIT): Dados relatados por ALMEIDA *et al.*, 2005 em DMSO- d_6

Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

m = multiplicidade

O ácido gálico é um derivado do ácido benzóico triidroxilado. Os ácidos fenólicos possuem comprovada atividade antioxidante e antiinflamatória [KROES *et al.*, 1992] . Foi relatada adicionalmente na literatura, a atividade anticarcinogênica do ácido gálico em várias linhagens de células cancerosas [DEDOUSSIS *et al.*, 2005] que está relacionada com suas propriedades antioxidantes.

5.3.9 Elucidação estrutural de SD- Fac-9

O espectro de RMN ^1H de SD-Fac-9 (Figura 104, p. 130) apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos típicos de flavonoides. Os singletos em δ 6,17 e δ 6,38 foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. O singlete em δ 12,6 foi atribuído ao hidrogênio hidroxila em C-5. Os dubletos em δ 7,45 ($J= 2,0$ Hz) e δ 6,83 ($J= 8,5$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-5' do anel B, respectivamente, e o duplo dubleto em δ 7,53 foi atribuído ao hidrogênio H-6' com constantes de acoplamento de 2,0 Hz indicando sua posição meta em relação ao H-2'' e 8,5 Hz referente ao acoplamento orto em relação ao hidrogênio H-5' no anel B. (Tabela 25).

O dubleto em δ 5,56 foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1'' da porção glicosídica, sendo que a constante de acoplamento observada ($J=1,0$ Hz) típica de uma ligação α -glicosídica. Os multipletos presentes na região entre δ 3,40 e δ 3,70 foram atribuídos aos carbonos metínicos e metilênicos da porção glicosídica. [FRAISSE, 2000]

Os dados fornecidos pelos espectros bi-dimensionais (gHMQC e gHMBC) permitiram a atribuição dos sinais para hidrogênios e carbonos, possibilitando verificar a presença de sinais na região entre δ 64,2, e δ 70,7 típicos de uma pentose.

Com os dados obtidos, mediante a comparação com dados na literatura [OSSIPOV *et al.*, 1995]) foi possível caracterizar a substância SD-Fac-9 como sendo o flavonoide **quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo** (Figura 45).

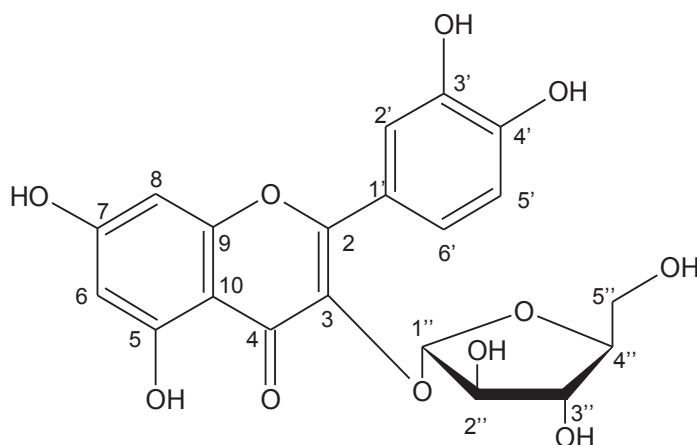


Figura 45: Estrutura da quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (SD-Fac-9)

Tabela 25: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para quercetina-3-*O*- α -arabinofuranosídeo (SD-Fac-9) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , DMSO- d_6).

Posição	δ_{C}	δ_{H}	LIT. δ_{C}
2	156	-----	156,3
3	***	-----	133,3
4	***	-----	177,7
6	98	6,17 (s)	98,7
7	164	-----	164,3
8	93	6,38 (s)	93,5
9	156	-----	156,3
10	104	-----	103,9
1'	121	-----	120,9
2'	115	7,45 (d, J= 2,5 Hz)	115,5
3'	145	-----	145,0
4'	148	-----	148,4
5'	119	6,83 (d, J= 8,5 Hz)	118,8
6'	121	7,53 (dd, J= 2,0 e 8,5 Hz)	121,7
OH-5	161	12,6 (s)	161,2
Arabinofuranose			
1''	108	5,56 (d, J= 0,6 Hz)	107,8
2''	82	3,30-3,60 (m)	82,1
3''	77	3,30-3,60 (m)	76,9
4''	85	3,30-3,60 (m)	85,8
5''	60	3,30-3,60 (m)	60,6

Dados:

Literatura (LIT): Dados relatados por OSSIPOV *et al.* (1995) em DMSO- d_6 para quercetina-3-*O*- α -arabinofuranosídeo.

Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

M = multiplicidade.

*** sinais não observados.

5.3.9 Elucidação estrutural de SD- Fac-10

Os sinais observados no espectro de RMN-¹H (Figura 106, p.131) referentes a aglicona apresentaram deslocamento e multiplicidades semelhante àqueles apresentados pela substância SD-Fac-9, sugerindo tratar-se da mesma aglicona, a quercetina.

O espectro de RMN-¹H apresentou um dubleto em δ 5,23 com constante de acoplamento de 1,0 Hz, o qual foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1'' do açúcar, típico de uma ligação α -glicosídica. O dubleto em δ 0,8 com constante de acoplamento de 6,5 Hz é típico de ramnose.

Os carbonos foram atribuídos de acordo com os dados obtidos dos espectros bi-dimensionais (gHMBC e gHMQC). Foi possível também observar a correlação de todos os hidrogênios com seus respectivos carbonos (Tabela 26).

Os dados de SD-Fac-10, comparados com os existentes na literatura (BILIA *et al.*, 1996) confirmam a identidade desta substância como sendo a quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (Figura 46).

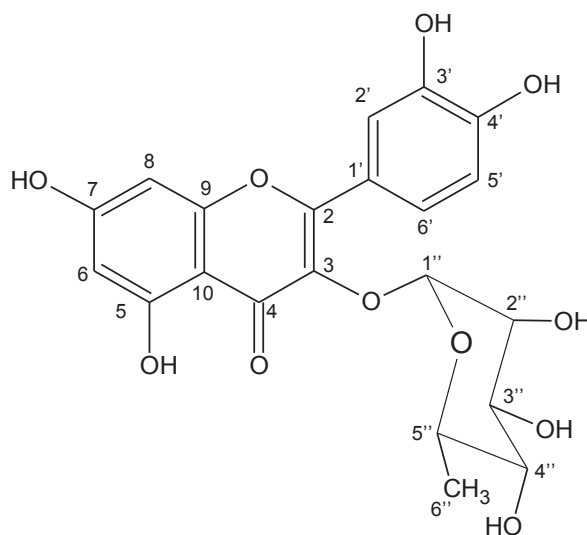


Figura 46: Estrutura da quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (SD-Fac-10)

Tabela 26: Dados de RMN ^1H e ^{13}C para quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (SD- Fac-10) (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , DMSO- d_6).

Posição	δ_{C}	δ_{H}	LIT. δ_{C}
2	157,0	-----	156,4
3	***	-----	133,4
4	***	-----	177,7
5	161,0		157,0
6	98,6	6,17 (s)	98,6
7	***	-----	164,0
8	93,4	6,35 (s)	93,5
9	***	-----	161,2
10	104,0	-----	104,2
1'	120,6	-----	120,3
2'	116,0	7,27 (d, J= 2,0 Hz)	115,4
3'	145,0	-----	145,1
4'	148,2	-----	148,3
5'	115,2	6,83 (d, J= 8,5 Hz)	115,8
6'	120,8	7,23 (dd, J= 2,5 e 8,5 Hz)	121,0
OH-5		12,63 (s)	
Ramnose			
1''	101,6	5,23 (d, J= 1,0 Hz)	101,9
2''	69,8	3,9 (s)	70,4
3''	70,3	3,30-3,60 (m)	70,6
4''	70,9	3,12 (t, J= 9,0 Hz)	71,5
5''	70,3*	3,21 (dd, J= 6,0 e 9,5 Hz)	70,1
6''	17,0	0,8 (d, J= 6,5 Hz)	17,3

Dados:

Literatura (LIT): Dados relatados por BILIA *et al.* (1996) em DMSO- d_6 para quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo.

Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

M = multiplicidade.

*** sinais não observados.

* sinais sobrepostos

5.4 Identificação dos metabólitos presentes nos extratos hidroalcoólicos de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* por CLAE-UV-EM.

A CLAE-EM tem se tornado cada vez mais utilizada no estudo fitoquímico [ZEEB *et al.*, 2000]. Esta técnica pode ser empregada em aplicações de ordem qualitativa e quantitativa, onde a cromatografia líquida de alta eficiência é o sistema empregado na separação dos constituintes e o espectrômetro de massas fornece a seletividade e sensibilidade que, além de gerar informação quantitativa, gera a informação estrutural do analito com nível de detalhes bem melhor que outros tipos de detectores [ARDREY, 2003].

Os extratos hidroalcoólicos *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* foram submetidos à técnica CLAE-UV-EM (modo *off line*) sob condições descritas no item 4.5.12, afim de identificar os metabólitos não isolados e caracterizar o perfil metabólico desses extratos.

As substâncias isoladas neste trabalho foram identificadas nos cromatogramas pela comparação com os espectros de UV, espectros de massas e pela comparação com os tempos de retenção. Já os metabólitos não isolados foram caracterizados de acordo com os seus espectros de massas, espectros de UV e comparação com o tempo de retenção de padrões de substâncias isoladas de outras espécies.

Foram realizadas cinco injeções de cada extrato, e coletados os principais picos eluídos, conforme a Figura 47.

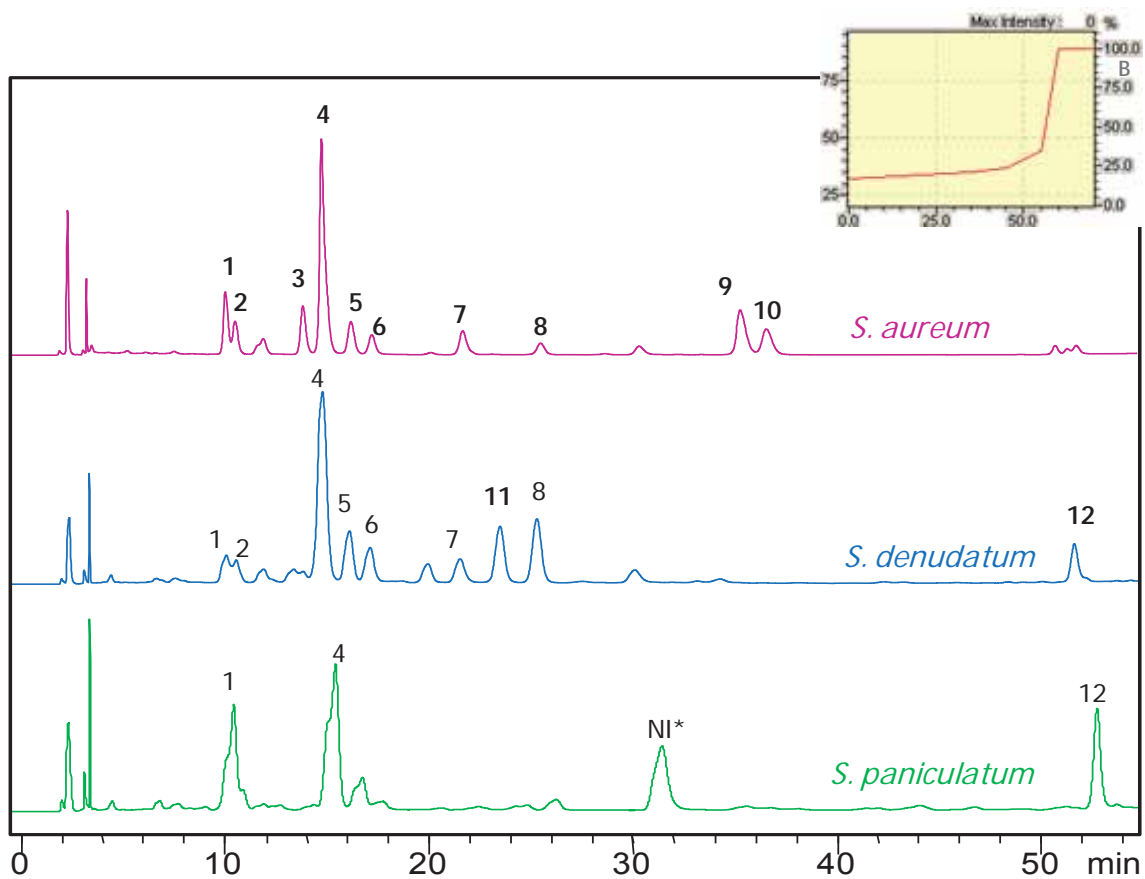


Figura 47: Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos obtidos por CLAE-DAD registrados a 254 nm. Eluição: 17% para 19% de B em 30', 19% para 24% de B até 40', 24% para 35% de B até 50', 35% para 100% de B até 60'. Fluxo: 1mL/min. Coluna Shimadzu® C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm), CLAE (Shimadzu®). Gradiente de eluição empregado na análise cromatográfica no detalhe (ver página 48).

5.4.1 Identificação estrutural da substância associada ao Pico 1

A análise do espectro de massas referente ao pico 1 (tr: 10,53 min, Figura 47) dos cromatogramas das espécies *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* apresentou o íon precursor de m/z 479. EM/EM deste íon levou a perda do íon m/z 163, referente a uma hexose, resultando no íon produto com m/z 316, referente à aglicona miricetina (Figura 48). O tempo de retenção do Pico 1 e o espectro de UV analisado por CLAE-UV-DAD foram compatíveis com a substância previamente isolada miricetina-3- β -galactopiranosídeo.

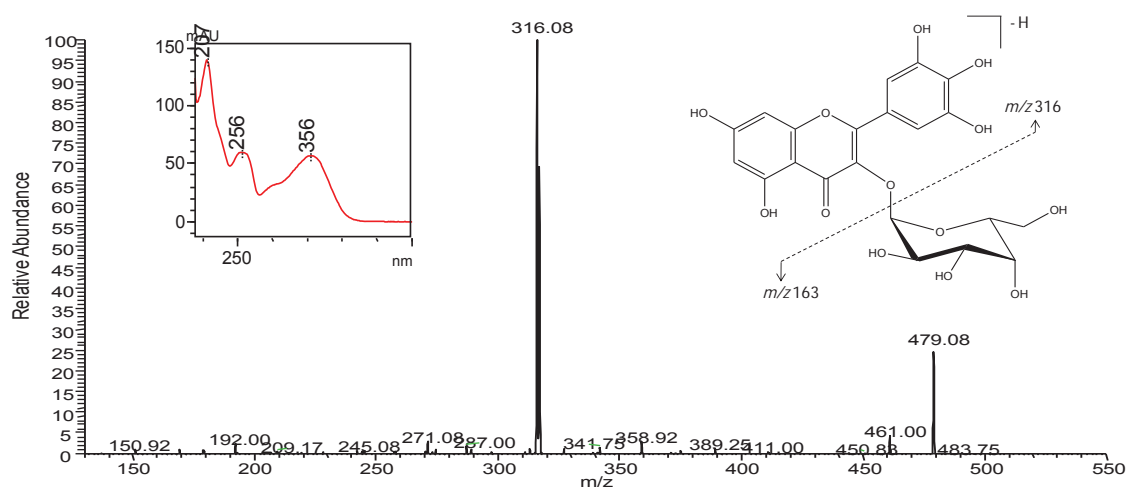


Figura 48: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 479, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

5.4.2 Identificação estrutural da substância associada ao Pico 2

A análise do espectro de massas referente ao Pico 2 (tr: 11,00 min, Figura 47) dos cromatogramas das espécies *S. aureum* e *S. denudatum* apresentou o íon precursor de m/z 479 (Figura 50). EM/EM deste íon levou a perda do íon m/z 163, referente a uma hexose, concluindo que o Pico 2 é um isômero de Pico 1. Partindo-se desses resultados, foi injetado em CLAE-UV-DAD (Figura 51) o flavonoide miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo nas mesmas condições descritas na Figura 46. Este apresentou mesmo tempo de retenção e as mesmas bandas de absorção no UV observados para a substância associada ao Pico 2, podendo sugerir que a mesma trata-se do flavonóide miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (Figura 49).

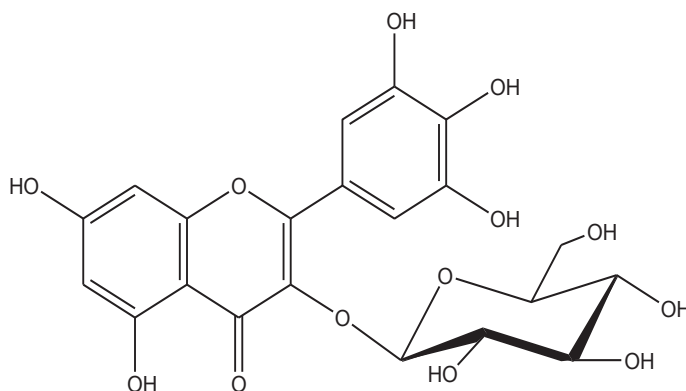


Figura 49: Estrutura da miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo (Pico 2)

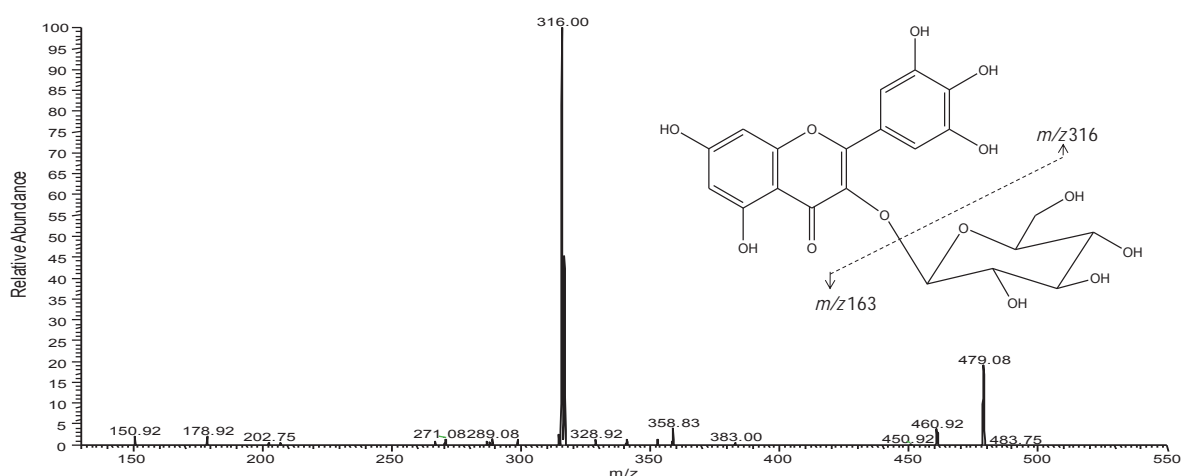


Figura 50: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 479, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

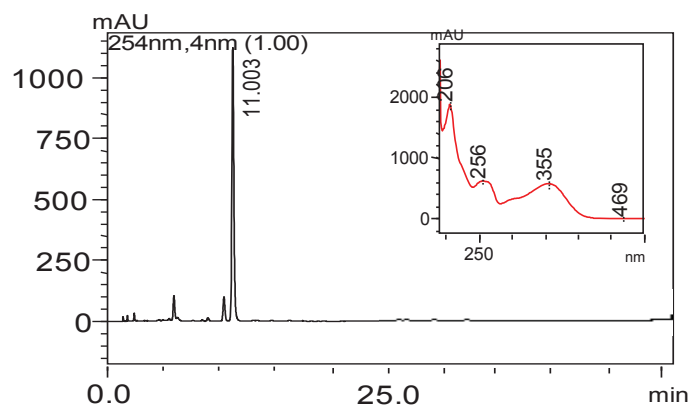


Figura 51: Cromatograma de eluição do flavonóide miricetina-3-O-β-glicopiranosídeo em CLAE-UV-DAD. Eluição: 17% para 19% de B em 30', 19% para 24% de B até 40', 24% para 35% de B até 50', 35% para 100% de B até 60'. Fluxo: 1mL/min. Coluna Shimadzu® C18 (250 x 4.6 mm; 5 μm), CLAE (Shimadzu®).

5.4.3 Identificação da substância associada ao Pico 3

O espectro de massas referente ao Pico 3 (tr: 14,31 min, Figura 47) dos cromatogramas das espécies *S. aureum* e *S. denudatum* apresentou o pico íon precursor de m/z 449. A análise por EM/EM deste íon mostrou a perda do íon m/z 133, característico de pentose resultando o íon produto de m/z 316, referente à aglicona miricetina (Figura 52). A análise conjunta do espectro de massas com as bandas de absorção no UV permitiu sugerir que a substância associada ao Pico 3 refere-se ao flavonóide miricetina-3- O - β -arabinopiranosídeo.

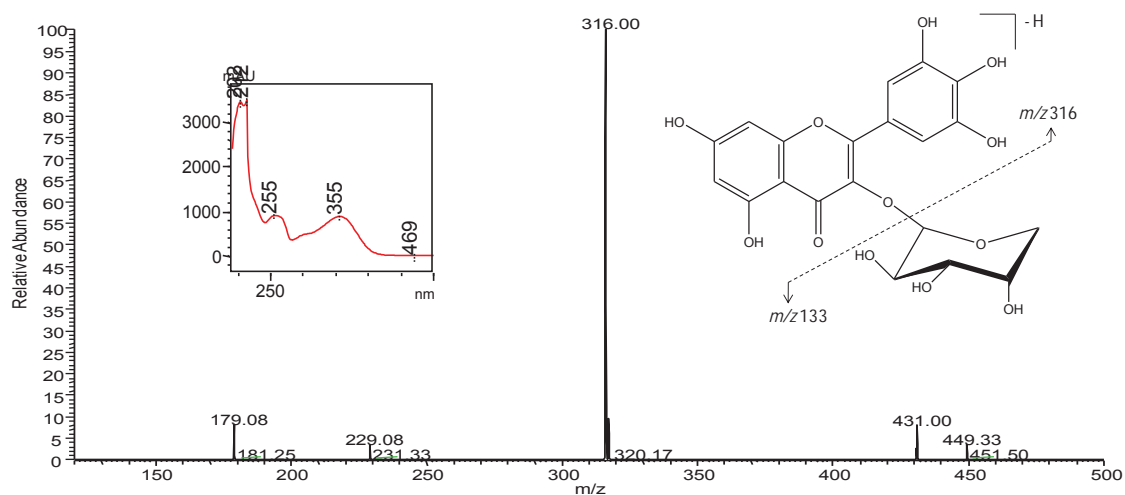


Figura 52: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 449, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

5.4.4 Identificação estrutural da substância associada ao Pico 4

A análise do espectro de massas referente ao Pico 4 (tr: 15,21 min, Figura 47) dos cromatogramas das espécies *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* apresentou o íon precursor de m/z 479. A análise por EM/EM deste íon mostrou a perda do íon m/z 147, referente a uma raminose, resultando íon produto de m/z 316, referente à aglicona miricetina (Figura 53). O tempo de retenção da substância associada ao Pico 5 e o espectro de UV obtido por CLAE-UV-DAD foram compatíveis com a substância previamente isolada miricetina-3-*O*- α -raminopiranosídeo

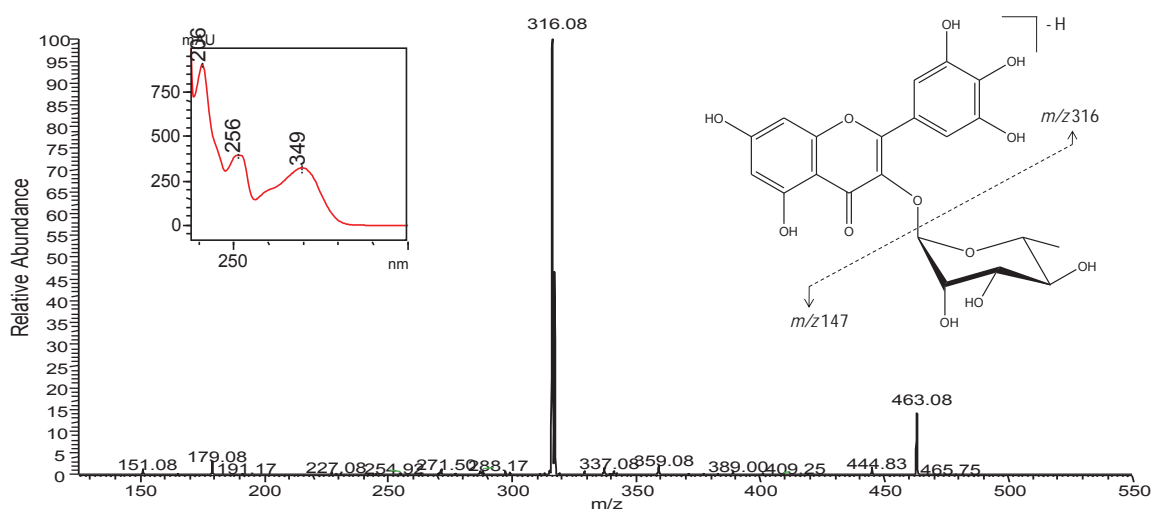


Figura 53: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 463, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

5.4.5 Identificação estrutural da substância associada ao Pico 5

A substância associada ao Pico 5 (tr: 16,65 min, Figura 47) dos cromatogramas das espécies *S. aureum* e *S. denudatum* apresentou grande similaridade quando comparado com o espectro de massas da substância associada ao Pico 6: a fragmentação do íon precursor de m/z 463 resultando na perda do íon m/z 147, característico de ramnose resultando no íon produto de m/z 316 (Figura 54). Porém verificou-se a perda de uma metila na unidade flavonoídica gerando o íon produto de m/z 301 referente perda de uma metila, podendo sugerir que a aglicona trata-se de uma miricetina *O*-monometilada. No entanto, apenas com os experimentos de MS não foi possível caracterizar a posição da metoxila nesta substância.

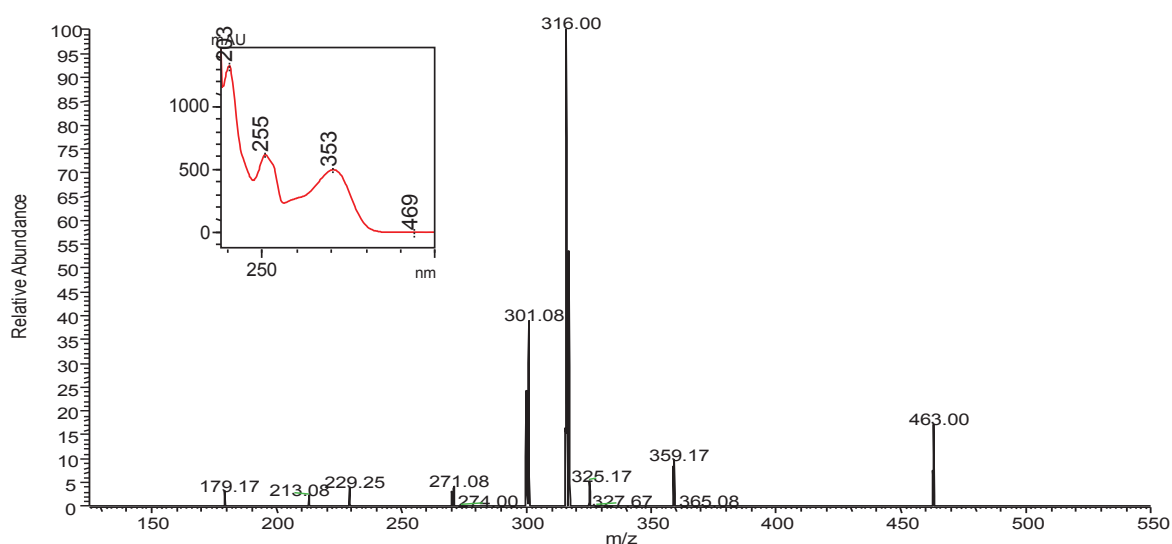


Figura 54: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 463, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

5.4.6 Identificação estrutural da substância associada ao Pico 6

A análise do espectro de massas referente ao Pico 6 (tr: 17,67 min, Figura 47) dos cromatogramas das espécies *S. aureum* e *S. denudatum* apresentou o íon precursor de m/z 463. A análise por EM/EM deste íon mostrou a perda do íon m/z 163 característico de hexose, resultando íon produto de m/z 300, referente à aglicona quercetina (Figura 56). Partindo-se desses resultados, foi avaliado por CLAE-UV-DAD um padrão do flavonoide quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo nas mesmas condições descritas na Figura 47. Este apresentou mesmo tempo de retenção e as mesmas bandas de absorção no UV (Figura 57), evidenciando que a substância referente ao Pico 6 trata-se do flavonóide quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo (Figura 55).

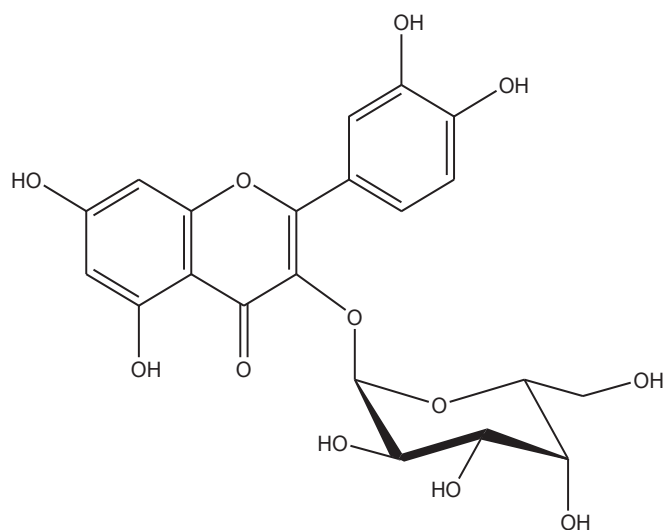


Figura 55: Estrutura da quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo (Pico 6).

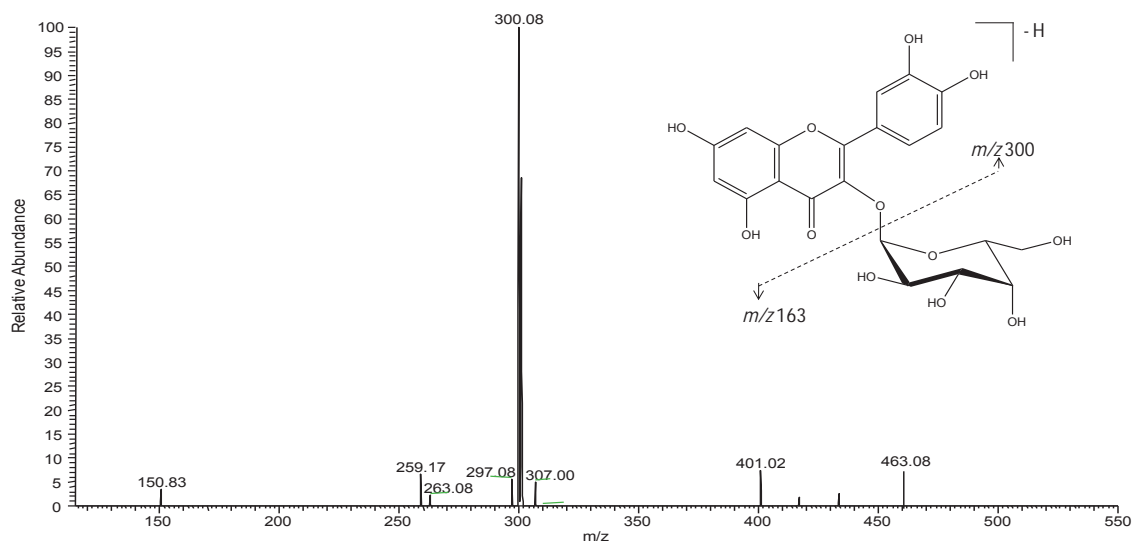


Figura 56: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 463, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

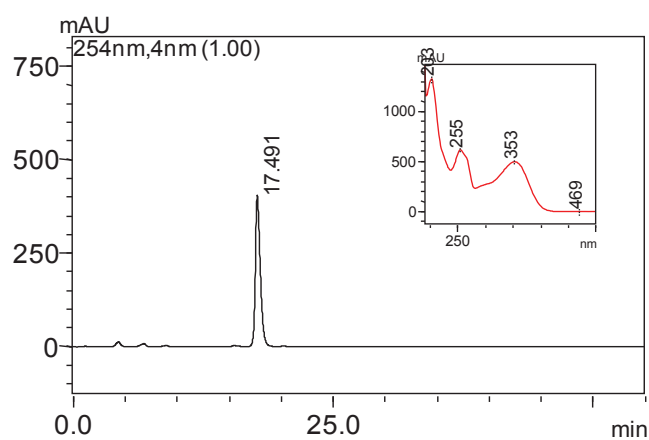


Figura 57: Cromatograma de eluição do flavonoide quercetina-3-O-β-galactopiranosídeo em CLAE-UV-DAD. Eluição: 17% para 19% de B em 30', 19% para 24% de B até 40', 24% para 35% de B até 50', 35% para 100% de B até 60'. Fluxo: 1mL/min. Coluna Shimadzu® C18 (250 x 4.6 mm; 5 μm), CLAE (Shimadzu®)

5.4.7 Identificação estrutural da substância associada ao Pico 7

A análise do espectro de massas referente ao Pico 7 (tr: 22,10 min, Figura 47) dos cromatogramas das espécies *S. aureum* e *S. denudatum* apresentou o íon precursor de m/z 479. A análise por EM/EM deste íon mostrou a perda do íon m/z 133 resultando no íon produto de m/z 300, referente à aglicona quercetina (Figura 58). O tempo de retenção do Pico 7 e o espectro de UV analisado por CLAE-UV-DAD foram compatíveis com a substância previamente isolada quercetina-3-*O*- β -arabinofuranosídeo.

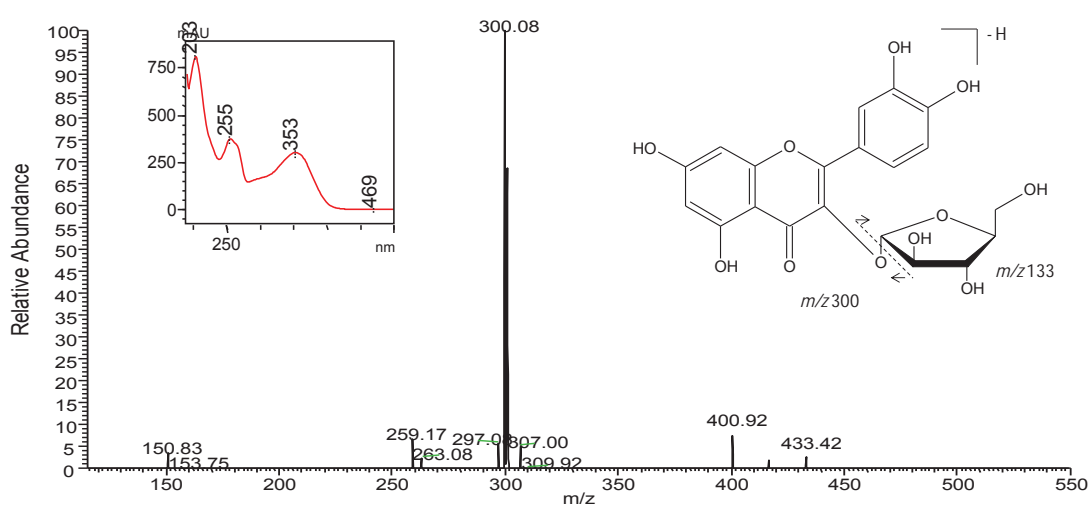


Figura 58: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 433, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

5.4.8 Identificação estrutural da substância associada ao Pico 8

A análise do espectro de massas referente ao Pico 8 (tr: 25,90 min, Figura 47) dos cromatogramas das espécies *S. aureum* e *S. denudatum* apresentou o íon precursor de m/z 447. EM/EM deste íon mostrou a perda do íon m/z 147, referente a uma ramnose, resultando íon produto de m/z 300, referente à aglicona miricetina (Figura 59). O tempo de retenção do Pico 8 e o espectro de UV analisado por CLAE-UV-DAD foram compatíveis com a substância previamente isolada quercetina-3-*O*- α -ramnopiranosídeo.

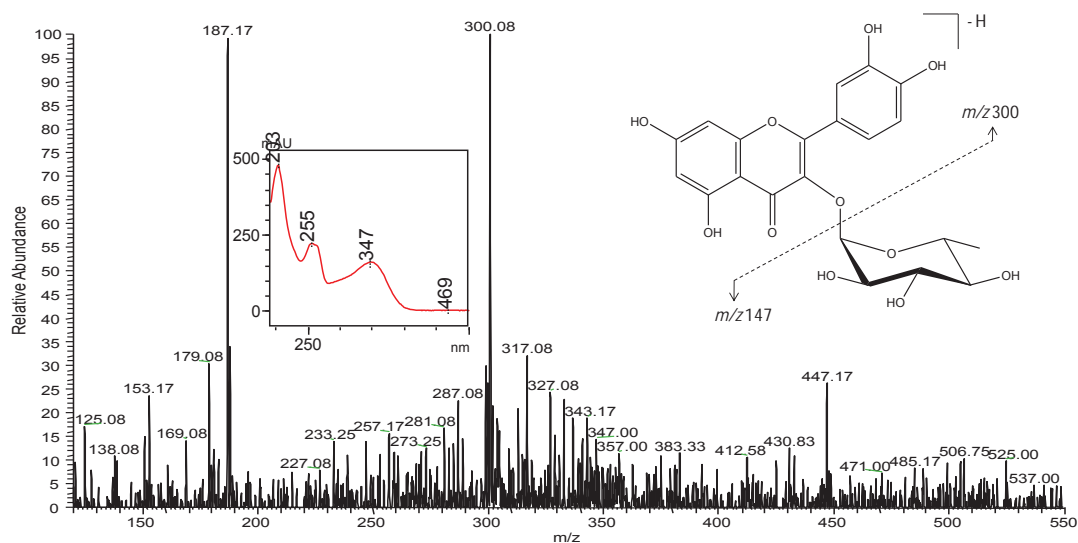


Figura 59: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 447, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

5.4.9 Identificação estrutural da substância associada ao Pico 9

A análise do espectro de massas referente ao Pico 9 (tr: 35,64 min, Figura 47) do cromatograma de *S. aureum* apresentou o íon precursor de m/z 615. EM/EM deste íon resultou no íon produto m/z 463, gerado pela eliminação de um grupo galoíla [$M - 152 - H$], e no pico íon base m/z 317 característico de miricetina (Figura 60). O tempo de retenção do Pico 9 e o espectro de UV analisado por CLAE-UV-DAD foram compatíveis com a substância previamente isolada miricetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo.

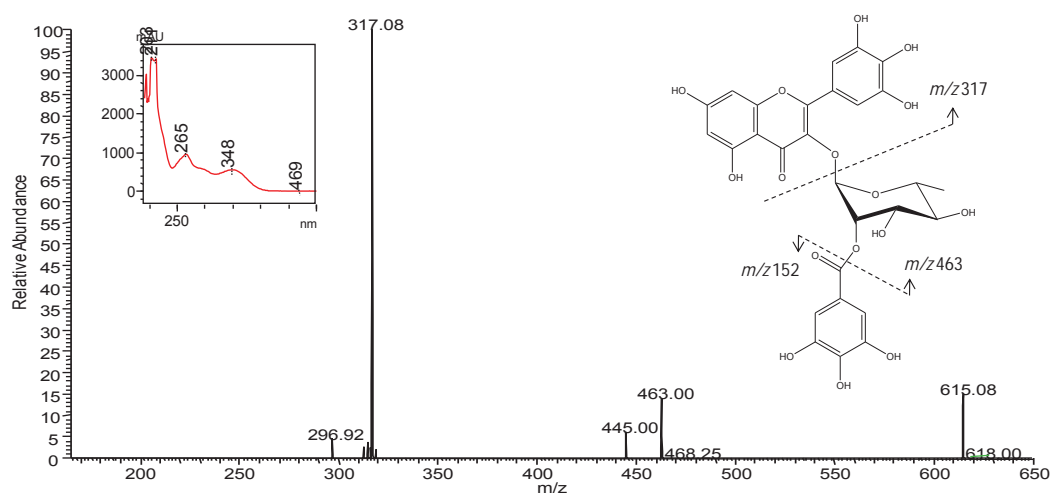


Figura 60: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 615, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

5.4.10 Identificação estrutural da substância associada ao Pico 10

A análise do espectro de massas da substância associada ao Pico 10 (tr: 36,92 min, Figura 47) do cromatograma de *S. aureum* apresentou grande similaridade quando comparado com o espectro de massas da substância referente ao Pico 9 (Figura 60). A fragmentação do íon m/z 615 resultou no íon produto m/z 463, gerado pela eliminação de um grupo galoíla $[M - 152 - H]^-$, e no pico íon base m/z 317 característico de miricetina (Figura 62). Partindo-se desses resultados, sugeriu-se que a substância referente ao Pico 10 tratava-se de um isômero de posição do flavonóide miricetina-3-O-(2"-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo. Portanto foi analisado por CLAE-UV-DAD o padrão do flavonóide miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -raminopiranosídeo (Figura 63) nas mesmas condições da Figura 47. Este apresentou mesmo tempo de retenção e as mesmas bandas de absorção no UV, sugerindo que a substância referente ao Pico 10 trata-se do flavonóide miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -raminopiranosídeo (Figura 61).

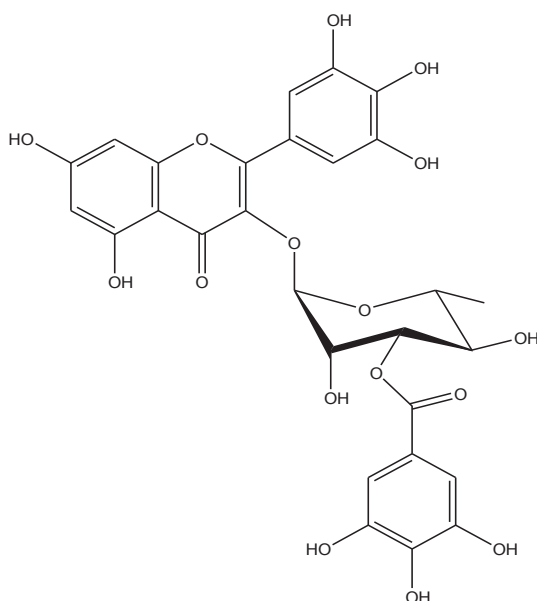


Figura 61: Estrutura da miricetina-3-O-(3"-O-galoil)- α -raminopiranosídeo (Pico 10).

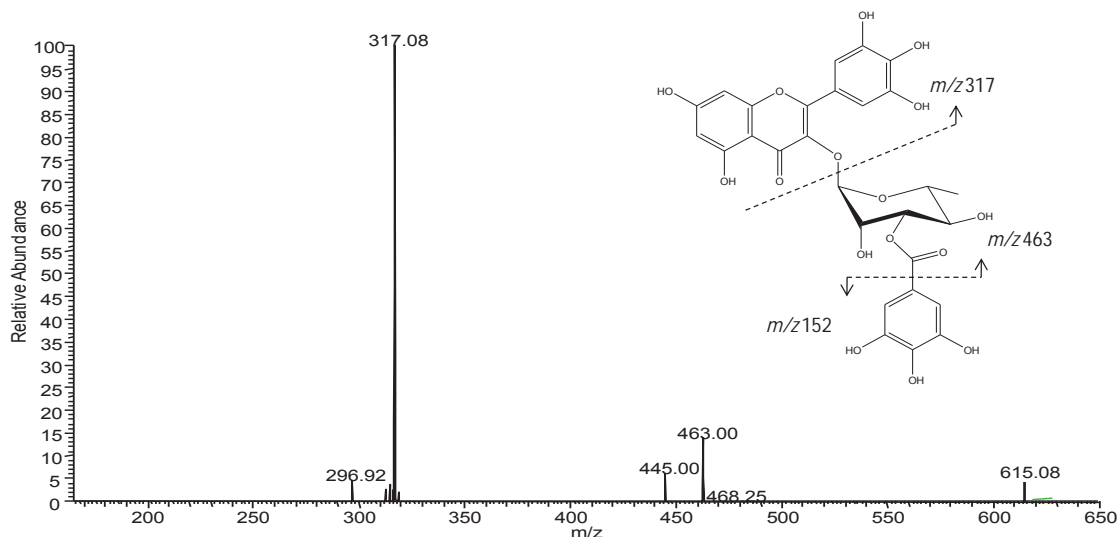


Figura 62: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 615, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

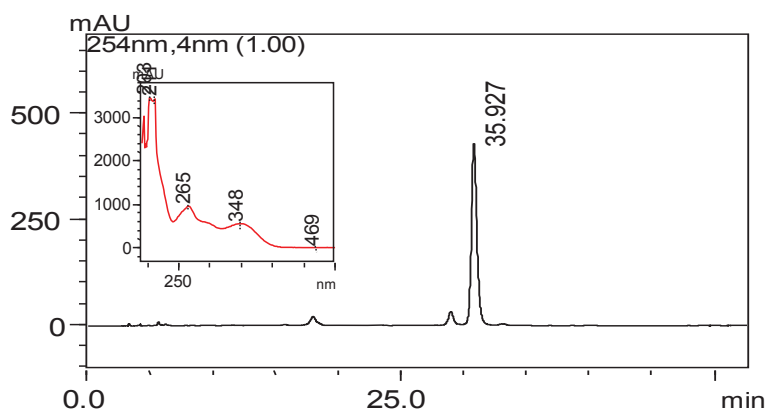


Figura 63: Cromatograma de eluição do flavonóide quercetina-3-O- α -raminopiranosídeo em CLAE-UV-DAD. Eluição: 17% para 19% de B em 30', 19% para 24% de B até 40', 24% para 35% de B até 50', 35% para 100% de B até 60'. Fluxo: 1mL/min. Coluna Shimadzu® C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m), CLAE (Shimadzu®).

5.4.11 Identificação estrutural da substância associada ao Pico 11

A análise do espectro de massas referente ao Pico 11 (tr: 23,8 min, Figura 47) dos cromatogramas da espécie *S. denudatum* apresentou o íon precursor de m/z 433. A análise por EM/EM deste íon mostrou a perda do íon m/z 132, resultando no íon produto de m/z 301, referente à aglicona quercetina (Figura 64). O tempo de retenção do Pico 11 e o espectro de UV analisado por CLAE-UV-DAD foram compatíveis com a substância previamente isolada quercetina-3-*O*- α -arabinopiranosídeo.

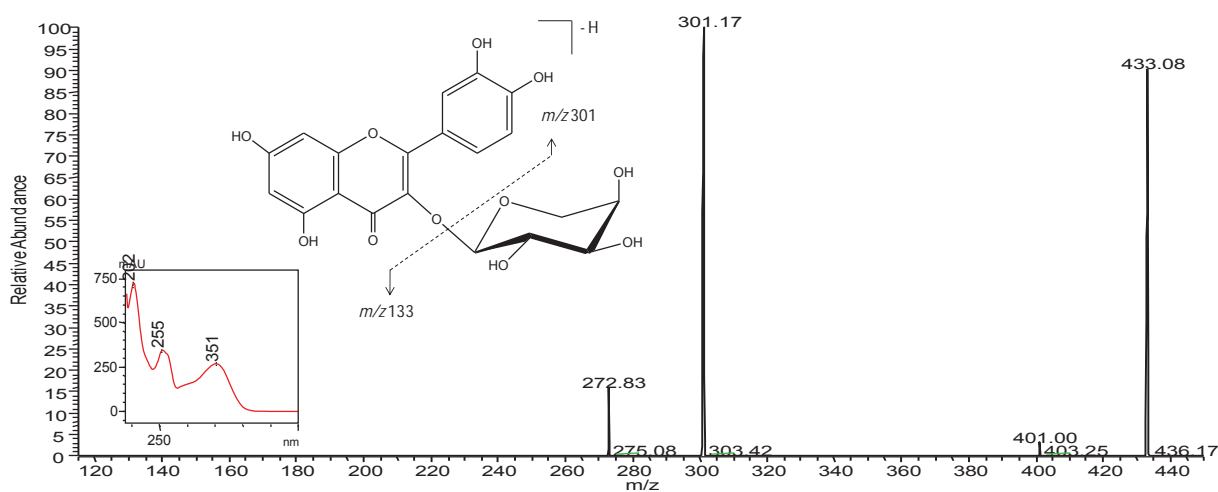


Figura 64: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 433, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

5.4.12 Identificação estrutural da substância associada ao pico 12

A análise do espectro de massas da substância associada ao Pico 12 (tr: 51,70 min, Figura 47) referente aos cromatogramas das espécies *S. denudatum* e *S. paniculatum* apresentou o íon precursor m/z 615. A fragmentação deste resultou no íon m/z 447, gerado pela eliminação de um grupo galoíla [$M - 152 - H$], e no pico íon base com m/z 301 característico de quercetina (Figura 65). Porém, apenas com os experimentos de EM não foi possível caracterizar as posições em que estão ligados os grupos galoíla e glicosídico nesta substância.

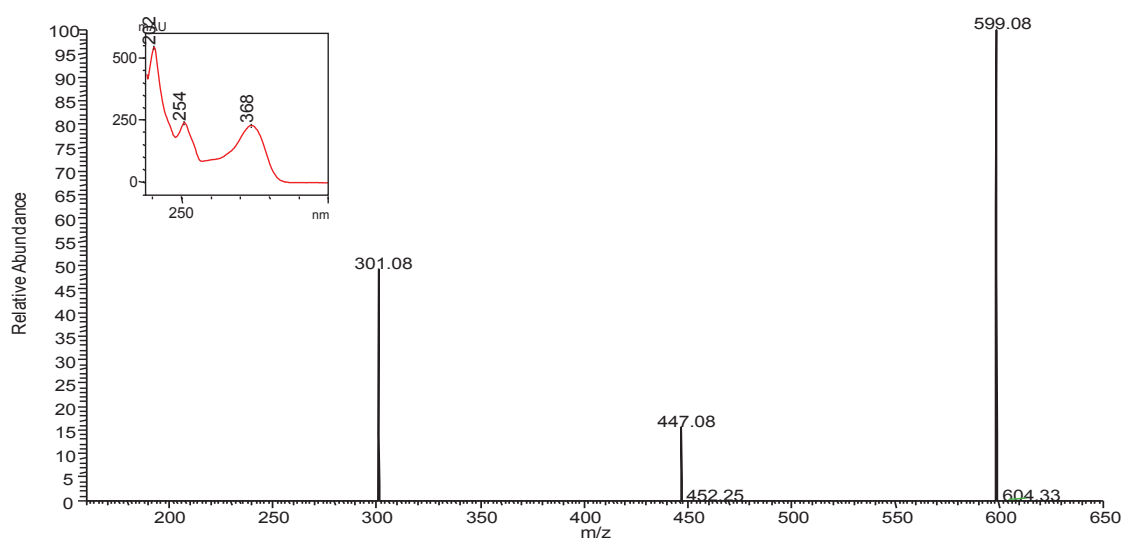


Figura 65: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 599, obtido em ESI, modo negativo. Condições espectrométricas: item 4.5.12.

5.4.13 Caracterização dos perfis dos extratos hidroalcoólicos de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*

Ao final das etapas de isolamento, purificação e caracterização usando as técnicas de elucidação estrutural comumente empregadas, tais como UV, RMN e CLAE-EM foi possível obter o perfil cromatográfico ou “fingerprint dos extratos hidroalcoólicos das espécies *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*.

Os cromatogramas na Figura 66 mostram a identificação das substâncias das frações flavonoídicas eluídas durante a separação cromatográfica.

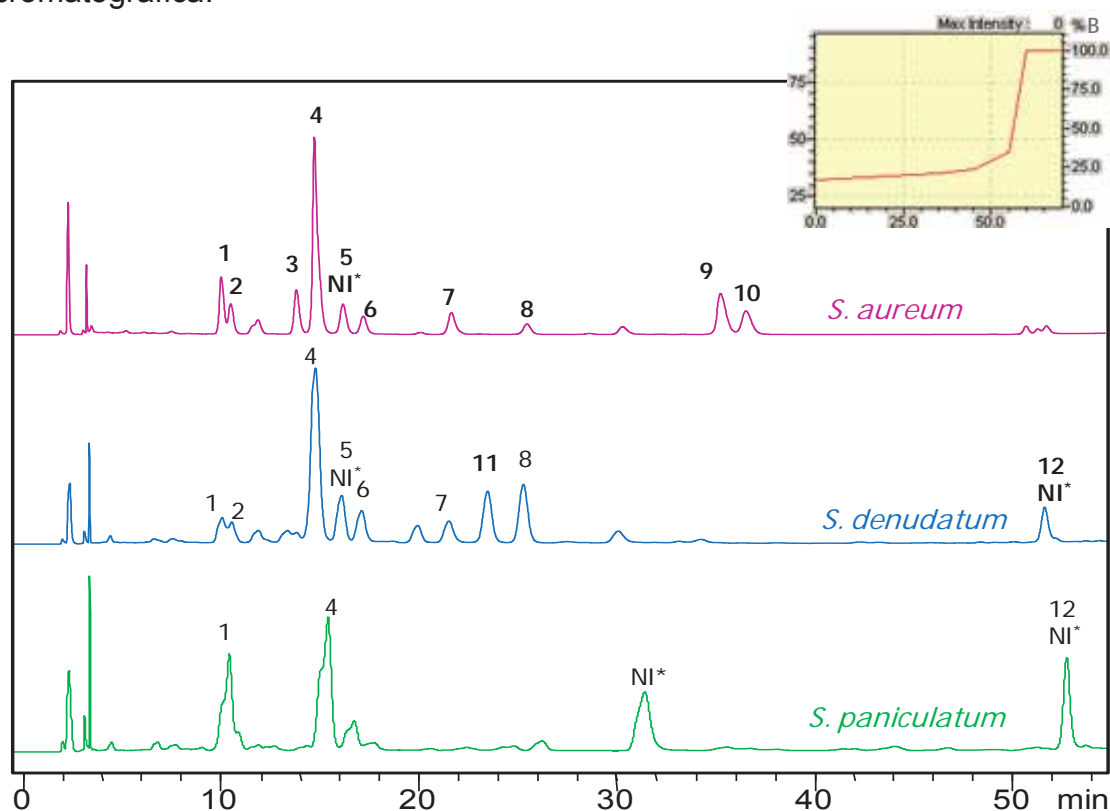


Figura 66: Cromatograma de separação por CLAE-UV-DAD dos extratos hidroalcoólicos das folhas de: *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*. **Identificação:** 1 miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo; 2 miricetina-3-O- β -glicopiranosídeo; 3 miricetina-3-O- β -arabinopiranosídeo; 4 miricetina-3-O- α -raminopiranosídeo; 5 NI*; 6 quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo; 7 quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo; 8 quercetina-3-O- α -raminopiranosídeo; 9 miricetina-3-O-(2" galoil)- α -raminopiranosídeo 10 miricetina-3-O-(3"galoil)- α -raminopiranosídeo; 11 quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo; 12 NI*. Eluição: 17% para 19% de B em 30', 19% para 24% de B até 40', 24% para 35% de B até 50', 35% para 100% de B até 60'. Coluna Shimadzu® C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m), CLAE (Shimadzu®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, λ = 254 nm. Gradiente de eluição empregado na análise cromatográfica no detalhe. NI*: substância não identificada.

5.5 Ensaios biológicos

5.5.1 Resultados da atividade antioxidante pelo método do DPPH dos extratos, frações de partição e substâncias isoladas de *Sclerolobium* sp.

De acordo com a Figura 67, podemos observar que a atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* apresentaram grande capacidade seqüestradora de radical DPPH. Já os extratos hexânicos não apresentaram atividades relevantes neste teste.

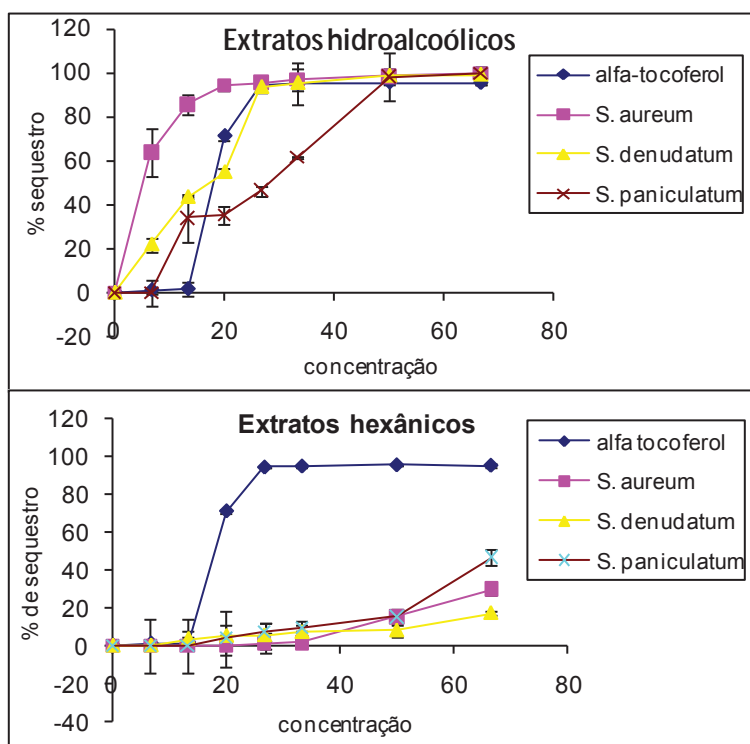


Figura 67: Avaliação da atividade seqüestradora do radical DPPH dos extratos hexânicos e hidroalcoólicos de *Sclerolobium* sp.

As frações de partição ACOEt, BuOH e AQ de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum* apresentaram um potencial de inibição de oxidação próximos e/ou até mesmo superiores àqueles obtidos com a substância utilizada como padrão (α -tocoferol) (Figura 68).

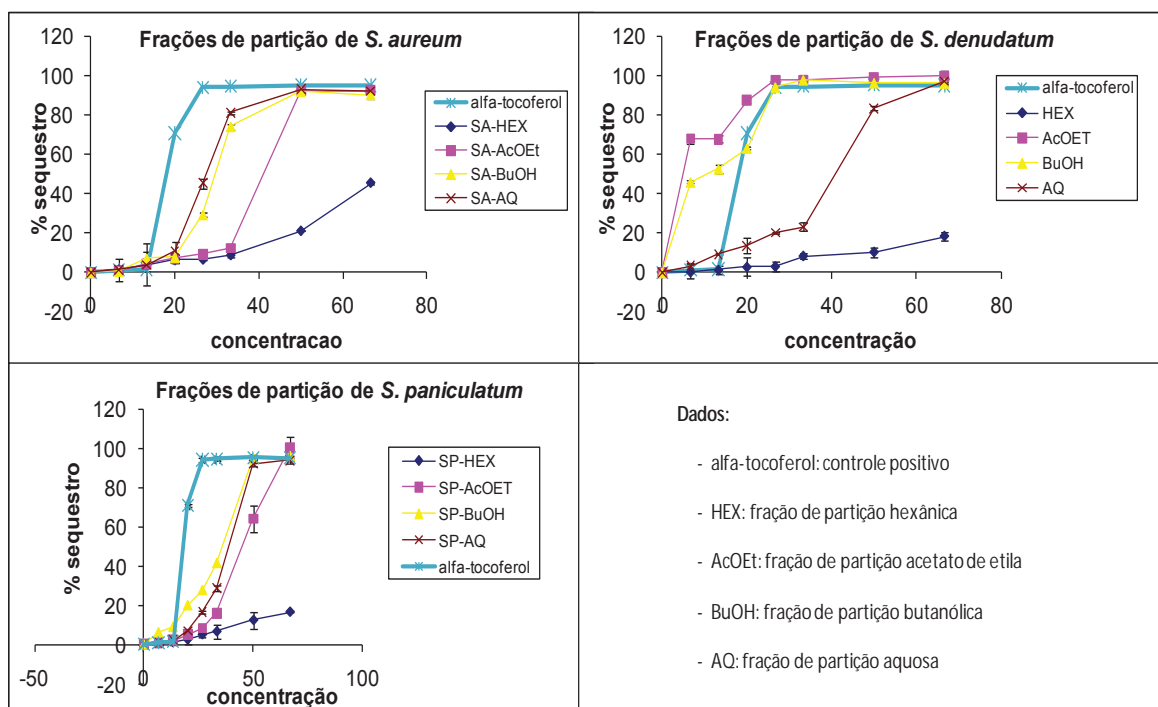


Figura 68: Avaliação da atividade seqüestradora do radical DPPH das frações de partição obtidas dos extratos hidroalcoólicos *Sclerolobium sp.*

As substâncias isoladas: miricetina 3-O- β -galactopiranosídeo, miricetrina e quercetina-3-O- β -arabinopiranosídeo apresentaram atividade antioxidante significativa quando comparados com a substância padrão (rutina) (Figura 69).

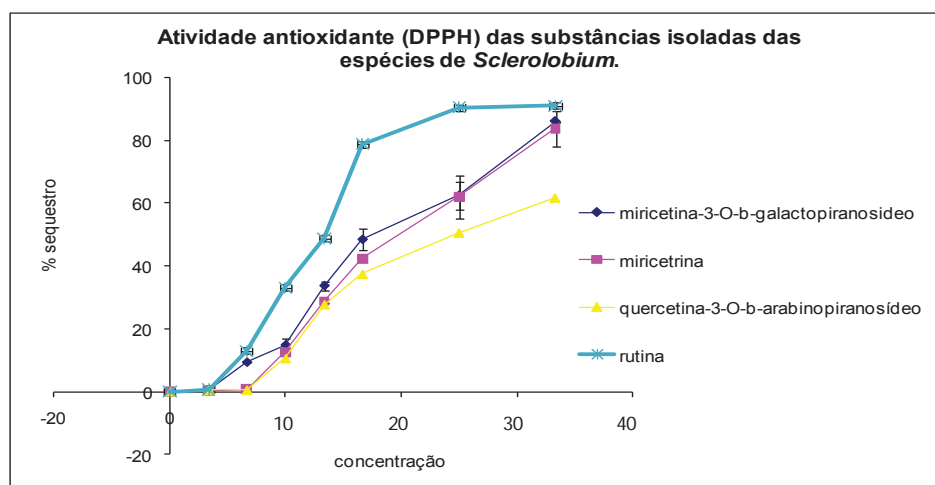


Figura 69: Avaliação da atividade seqüestradora do radical DPPH das substâncias isoladas dos extratos hidroalcoólicos de *Sclerolobium sp.*

5.5.2 Resultados da atividade antifúngica dos extratos brutos e frações das espécies de *Sclerolobium*.

Os resultados das avaliações da atividade antifúngica dos extratos brutos e frações de partição de *S. aureum*, *S. paniculatum*, *S. denudatum* frente aos fungos *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*, estão mostrados nas tabelas 27 e 28 respectivamente.

Tabela 27: Resultado da avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos das espécies de *Sclerolobium*.

Extratos brutos e padrões	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	CIM* (ug/mL)	CIM* (ug/mL)	CIM* (ug/mL)	CIM* (ug/mL)
SA – Hexânico	>250	125	>250	125
SA – Hidroalcoólico	>250	250	>250	250
SP - Hexânico	>250	7,81	250	62,5
SP – Hidroalcoólico	>250	1,95	125	62,5
SD – Hexânico	>250	>250	>250	>250
SD – Hidroalcoólico	>250	>250	>250	>250
Fluconazol (controle positivo)	2,0	64,0	8,0	4,0
Anfotericina B (Controle positivo)	2,0	2,0	1,0	0,06

Dados: SA= *S. aureum*; SP= *S. paniculatum*; SD= *S. denudatum*

*CIM= Concentração Inibitória Mínima.

Os extratos brutos hexânico e hidroalcoólico *S. paniculatum*, e a fração aquosa obtida da partição, apresentaram excelentes resultados em cepas de *Candida krusei*, inibindo o crescimento de todas as cepas analisadas.

Tabela 28: Resultado da avaliação da atividade antifúngica das frações de partição do extrato hidroalcoólico de *S. aureum*.

Fração de partição	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	CIM* (µg/mL)	CIM* (µg/mL)	CIM* (µg/mL)	CIM* (µg/mL)
SA – fração hexânica	125	15,6	250	125
SA – fração acetato de etila	62,5	7,8	125	62,5
SA – fração butanólica	62,5	3,9	125	7,8
SA – fração aquosa	>250	>250	>250	>250
SD – fração hexânica	250	250	250	125
SD – fração acetato de etila	62,5	31,2	250	15,6
SD– fração butanólica	62,5	31,2	250	15,6
SD – fração aquosa	62,5	31,2	250	31,2
SP – fração hexânica	250	250	>250	125
SP – fração acetato de etila	250,0	125	250	62,5
SP– fração butanólica	31,25	15,6	62,5	31,25
SP – fração aquosa	15,6	7,8	31,25	62,5
Fluconazol (controle positivo)	2,0	64,0	8,0	4,0
Anfotericina B (Controle positivo)	2,0	2,0	1,0	0,06

Dados: SA= *S. aureum*; SP= *S. paniculatum*; SD= *S. denudatum*

*CIM= Concentração Inibitória Mínima.

Os extratos brutos hexânico e hidroalcoólico de *S. aureum* não apresentaram atividade antifúngica como visto na tabela 7, porém algumas das

frações obtidas da partição do extrato hidroalcoólico apresentaram atividades promissoras. A fração acetato de etila apresentou CIM de 7,8 ug/mL contra cepas de *Candida krusei* e a fração butanólica apresentou CIM de 3,9 ug/mL e 7,8 ug/mL contra cepas de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* respectivamente.

O extrato bruto de *S. denudatum* não apresentou atividade significativa, já suas frações de partição apresentaram atividade antifúngica promissora.

5.5.3 Resultados da atividade tripanocida dos extratos brutos e frações das espécies de *Sclerolobium*.

Todos os extratos e frações de partição foram avaliados pelo método colorimétrico (XTT) padronizado frente à forma epimastigota da cepa Y de *T. cruzi*. A atividade tripanocida de cada substância testada pôde ser analisada a partir do seu resultado de IC₅₀ (concentração de substância que mata 50% dos parasitos), comparativamente com o resultado do benzonidazol (controle positivo), conforme Tabelas 29 e 30.

Tabela 29: Avaliação da atividade tripanocida dos extratos brutos de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*.

Extratos brutos	IC ₅₀
SA – hexânico	ND
SA – hidroalcoólico	> 500
SD – hexânico	ND
SD – hidroalcoólico	> 500
SP – hexânico	480,5
SP – hidroalcoólico	> 500
Benzonidazol (controle positivo)	9,01

Dados: SA= *S. aureum*; SP= *S. paniculatum*; SD= *S. denudatum*

ND: não determinado (parcialmente insolúvel em DMSO)

Tabela 30: Avaliação da atividade tripanocida das frações de partição do extrato hidroalcoólico de *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*.

Fração de partição	IC ₅₀
SA – fração hexânica	> 500
SA – fração acetato de etila	307,5
SA – fração butanólica	355,6
SA – fração aquosa	ND
SD – fração hexânica	ND
SD – fração acetato de etila	> 500
SD – fração butanólica	> 500
SD – fração aquosa	> 500
SP – fração hexânica	488,5
SP – fração acetato de etila	> 500
SP – fração butanólica	> 500
SP – fração aquosa	> 500
Benzonidazol (controle positivo)	9,01

Dados: SA= *S. aureum*; SP= *S. paniculatum*; SD= *S. denudatum*

ND: não determinado

De acordo com os resultados obtidos nas tabelas 29 e 30 verificou-se que os extratos brutos e frações de partição das três espécies de *Sclerolobium* apresentaram um valor de IC₅₀ muito alto quando comparados com o controle positivo benzonidazol, não apresentando portanto, atividade tripanocida promissora.

5.5.4 Resultados da atividade anti-inflamatória dos extratos brutos e frações de partição dos extratos hidroalcoólicos de *S. aureum*, *S. paniculatum* e *S. denudatum*.

A avaliação dos extratos hexânico e hidroalcoólico de *S. denudatum* (SD-Hex e SD-Hidro), de *S. aureum* (SA-Hex e SA-Hidro) e de *S. paniculatum* (SP-Hex e SP-Hidro) em linhagem de células de macrófagos peritoneais aderentes RAW 264.7 (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) de camundongos Balb/c evidenciou citotoxicidade inferior a 10%, orientando a seleção destas amostras para avaliação do potencial imunomodulatório, através da quantificação do mediador inflamatório nitrito. Adicionalmente, as frações de partição Fr-ACOEt, Fr-BuOH e Fr-Aq das três espécies em estudo também não apresentaram citotoxicidade significativa (<10%) e, portanto, foram também selecionadas para quantificação de nitrito.

As células foram incubadas por 48h após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS), com diferentes concentrações das amostras teste a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂. Em seguida os sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados e a quantificação de mediador inflamatório nitrito foi realizada.

Para as amostras de *S. denudatum* SD-Hex e SD-Fr-ACOEt, foi observada inibição da liberação de nitrito de forma dose-dependente, no intervalo de concentrações de 50 ug/mL até a concentração mínima testada de 1,56 ug/mL na presença de LPS (1 ug/mL), evidenciando o potencial imunomodulatório destas amostras (Figuras 70 e 71).

As outras amostras testadas mostraram inibição moderada da liberação de nitrito e de forma não dose-dependente, sendo, portanto descartado seu potencial imunomodulatório frente a este mediador inflamatório.

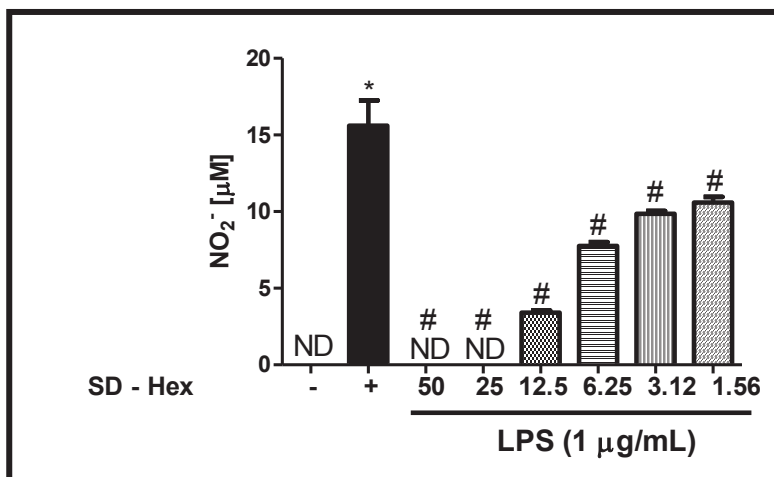


Figura 70: Inibição da liberação de nitrito após estímulo por LPS na presença de concentrações de crescentes da amostra SD-Hex de *Sclerolobium denudatum*.

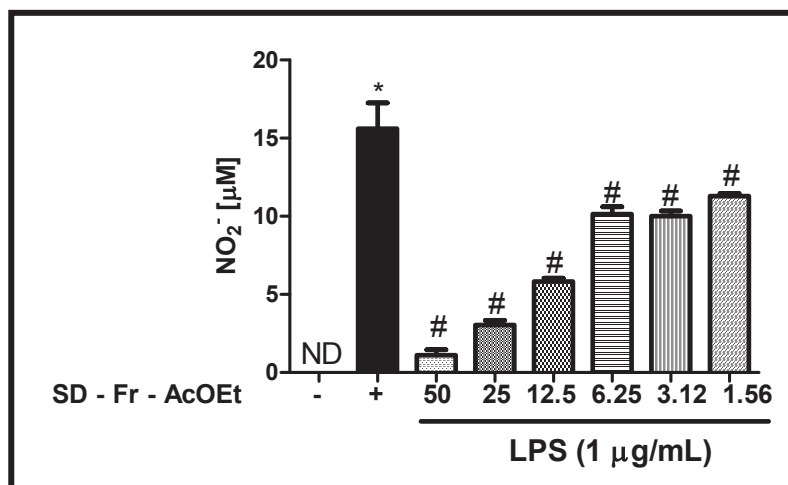


Figura 71: Inibição da liberação de nitrito após estímulo por LPS na presença de concentrações de crescentes da amostra SD-Fr-ACOEt de *Sclerolobium denudatum*.

6. Considerações finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação de metabólitos secundários de origem vegetal com fins terapêuticos tem recebido destaque crescente, sendo área de relevada importância para a saúde humana. Considerando informações da literatura sobre o potencial de bioatividade e perfil químico de algumas espécies do gênero *Sclerolobium*, foram selecionadas 3 espécies: *S. aureum*, *S. denudatum* e *S. paniculatum*, para estudo químico-farmacológico.

Após preparo dos extratos hexânicos e hidroalcoólicos, foram realizadas análises cromatográficas para estabelecimento de seu perfil químico. Os extratos hidroalcoólicos analisados por CLAE-UV-DAD com varredura na faixa de λ 200-500 nm forneceram informações importantes sobre a composição química dos extratos hidroalcoólicos das três espécies de *Sclerolobium*, evidenciando principalmente a presença de flavonoides glicosilados, como constituintes majoritários.

As frações de partição obtidas dos extratos hidroalcoólicos das três espécies foram submetidas a fracionamentos cromatográficos incluindo o uso de colunas abertas com sílica gel ou sílica derivatizada C18, e/ou através da técnica CLAE preparativa, o que levou ao isolamento de flavonoides monoglicosilados derivados de quercetina e miricetina, além da catequina e ácido gálico. Todas estas substâncias apresentam características estruturais que promovem a atividade antioxidante, o que foi confirmado pela avaliação do potencial sequestrador de radicais livres usando ensaio espectrofotométrico com DPPH.

Os dados de CLAE-UV-DAD analisados em conjunto com os dados de CLAE-EM-EM, e comparados com tempos de retenção e absorção no UV de substâncias padrões, possibilitaram a caracterização dos perfis flavonoídicos das três espécies em estudo, evidenciando, além de flavonoides glicosilados, catequina e ácido gálico, a presença de flavonoides glicosilados esterificados com ácido gálico. O potencial antioxidante dos extratos brutos hidroalcoólicos, frações de partição e substâncias isoladas de *Sclerolobium spp* foram avaliados pelo método DPPH, evidenciando sua elevada capacidade antioxidante. Os extratos hexânicos, apesar de conterem alfa-tocoferol, de reconhecida atividade antioxidante, não apresentaram atividade relevante

nesse teste, possivelmente em função do seu teor presente nos extratos analisados.

O experimento realizado visando obter o extrato bruto hexânico de *S. aureum* clareado e enriquecido com substâncias lipofílicas antioxidantes foi possível através do tratamento do extrato com carvão ativo por extração em fase sólida, que pode ser confirmado pela comparação da análise por CG-EM do extrato bruto com a análise das frações enriquecidas por CG-DIC, comprovando a eficácia da metodologia. O estudo dos extratos brutos hexânicos por CG-DIC também permitiu verificar que as três espécies possuem perfis lipofílicos similares, com a presença majoritária de alfa-tocoferol, lupenona e esqualeno.

A atividade antifúngica dos extratos e frações de partição das três espécies de *Sclerobium* também foi avaliada sendo que, os extratos brutos hexânico e hidroalcoólico de *S. paniculatum* apresentaram potencial atividade contra cepas de *Candida krusei*. As frações de partição acetato de etila e butanólica de *S. aureum*, apresentaram atividade contra as cepas de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* respectivamente. O extrato bruto de *S. aureum* não apresentou atividade significativa, porém suas frações de partição ACOEt e BuOH apresentaram atividade relevante contra cepas de *Candida krusei* e/ou *Cryptococcus neoformans*, confirmando o potencial destas espécies de *Sclerobium* como fonte de substâncias para o desenvolvimento de agentes terapêuticos antifúngicos. As frações de partição de *S. denudatum* também apresentaram atividade antifúngica promissora.

A atividade anti-inflamatória foi avaliada através da inibição da produção de nitrito por macrófagos peritoneais em função da adição dos extratos brutos e frações de partição das três espécies de *Sclerobium*, associado ao potencial imunomodulatório. Foi observada atividade relevante e de forma dose-dependente para o extrato bruto hexânico de *S. denudatum* e para a fração de partição SD-FrACOEt, obtida do extrato hidroalcoólico de *S. denudatum*, evidenciando o seu potencial imunomodulatório. Estes resultados merecem destaque pela observação de que efeitos antioxidantes e antiinflamatórios são em muitos casos associados ao potencial de quimioprevenção, e dessa forma confirmam os extratos e frações de *S. denudatum*, ricos em flavonoides

antioxidantes e com potencial imunomodulador, como muito atrativos para estudos mais aprofundados e seu possível aproveitamento no desenvolvimento de agentes quimiopreventivos.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho conclui-se que as espécies estudadas apresentaram em sua composição química, antioxidantes hidro e lipossolúveis que de acordo com a literatura são capazes de inibir a deterioração oxidativa dos ingredientes lábeis, como ácidos graxos insaturados ou outros ingredientes ativos da pele, propensos a oxidação. Os ensaios antifúngicos e antiinflamatório também apresentaram resultados promissores, abrindo-se aqui perspectivas para futuros estudos.

Além disso, a investigação química das três espécies de *Sclerolobium* deve contribuir para estudos de outras espécies dessa família e principalmente deste gênero, propiciando uma estratégia rápida e de alta confiabilidade para o estabelecimento da sua composição química.

De maneira global, os dados obtidos neste trabalho corroboram a importância de estudos de bioprospecção envolvendo técnicas modernas, contribuindo para a exploração racional da biodiversidade brasileira.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, R. B. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989, p. 564.
- ALBERT, K. Liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chromatography**, v. 856, p.199-211, 1999.
- ANDERSEN, M. O. M.; REIERSEN, B.; KIREMIRE, B. T.; BYAMUKAMA, R. Anthocyanins acylated with galic acid from chenille plant *Acalypha hispida*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 867-871, 2003.
- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. San Francisco: John Wiley and Sons, 2003. p. 289.
- AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; VIEIRA JÚNIOR, G. M. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, v. 32, n. 6, 1509-1512, 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BEZERRA, M. Z. B.; CAMPELO, P.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A.; BRAZ, R. F. Constituintes de três espécies do gênero *Sclerolobium*. **Química Nova**, v. 17, n. 2, p. 205-209, 1994.
- BILIA, A. R.; CIAMPI, L.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania genus*. Flavonoids from *Licania pyrifolia*. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 71, n. 3, p. 199-204, 1996.
- BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 15-19, 2002.
- BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J. M.; DJERASSI, C. Mass chromatography and gas chromatography-mass spectro- spectrometry in structural and stereochemical problems: pentacyclic triterpenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 3688-3699, 1963.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. **Embrapa**, v.1, p. 877-881, 2003.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.441-449, 2007.

CHAN, W. K. M.; DECKER, E. A. Endogenous skeletal muscle antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 403-426, 1994.

COELHO, F. B. R.; DAL BELO, C. A.; LOLIS, S. F.; SANTOS, M. G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 52-55, 2005.

COSTA, C. T.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 403-410, 2000.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O. ; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential antitrypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, p. 703-711, 2009.

DEDOUSSIS, G. V. Z.; KALIORA, A. C.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Effect of phenols on natural killer (NK) cell-mediated death in the K562 human leukemic cell line. **Cell Biology International**, v. 29, n. 11, p. 884-889, 2005.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Ed. UNESP, 2002. 604 p.

DIAS, L. E.; JUCKSCH, J.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; BRIENZA JUNIOR, S. Formação de mudas de táxi-branco (*Sclerolobium paniculatum* Vogel): resposta a nitrogênio, potássio e enxofre. **Revista Árvore**, v. 16, p. 135-143, 1992.

DINIZ, J. A. F. **A área centro-ocidental do nordeste**. Recife: Ed. Sudene, 1982. 229 p.

FERRARI, J.; TERREAUX, C.; SAHPAZ, S.; WOLFENDER, J.; HOSTETTMANN, K. Benzophenone glycosides from *Gnidia involucreta*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 883-889, 2000.

FIAMEGOS, Y. C.; NANOS, C. G.; VERVOORT, J.; STALIKAS, C. D. Analytical procedure for the in-vial derivatization-extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass selective detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, p. 11-18, 2004.

FRAISSE, D.; HEITZ, A.; CARNAT, A.; CARNAT, A. P.; LAMAISON, J. L. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 463-46, 2000.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006.

FRANKE, I. L. **Principais usos e serviços de árvores e arbustos promissores que ocorrem em pastagens no estado do Acre**. Rio Branco: Ed. Embrapa Acre, 1999. 6 p.

GRANERO, A. M.; GONZÁLEZ, F. J. E.; FRENICH, A. G.; SANZ, J. M. G.; VIDAL, J. L. M. Single step determination of fragrances in Cucurbita flowers by coupling headspace solid-phase microextraction low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 173-179, 2004.

GUYOT, S.; VERCAUTEREN, J.; CHEYNIER, V. Structural determination of colorless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalyzed by grape polyphenoloxidase. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1279-1288, 1996.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 33, p. 601-617, 1995.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids advances in research since 1986**. London: Chapman and Hall, 1994. p. 589-618.

HARBORNE, J. Plant secondary metabolism. In: CRAWLEY, M. J. (Ed.). **Plant ecology**. Oxford : Blackwell Science, 1997. 715 p.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HE, H.; CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* Grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 368-372, 2002.

HEINZEN, H.; VRIES, J. X.; MOYNA, O. P.; REMBERG, G.; MARTINEZ, R.; TIETZET, L. F. Mass spectrometry of labelled triterpenoids: thermospray and electron impact ionization analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 7, p. 237-244, 1996.

HUBER, L.; GEORGE, S. A. **Diode array detection in CLAE**. New York: Marcel Dekker, 1993. 400 p.

IQBAL, A.; ZAFAR, M.; FAIZ, M. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 183-193, 1998.

KALMAN, A.; MUJAHID, C.; MOTTIER, P.; HEUDI, O. Determination of a-tocopherol in infant foods by liquid chromatography combined with atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, v. 17, p. 723- 727, 2003.

KATAJAMAA, M.; ORESIC, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 318-328, 2007.

KROES, B. H.; BERG, A. J. J.; UFFORD, H. C. Q. VAN DIJK, H.; VAN LABADIE, R. P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Medica**, v. 58, n. 6, p. 499-504, 1992.

LANE, T. E.; WU-HSIEH, B. A.; HOWARD, D. H. Gamma interferon cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 1468-1473, 1993.

- LEE, T.; QIU, F.; WALLER, G. R.; CHOU, C. Three new flavonol galloylglycosides from leaves of *Acacia confuse*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 710-712, 2000.
- LI, W.; FITZLOFF, J. F. High performance liquid chromatographic analysis of St. John's Wort with photodiode array detection. **Journal of Chromatography B**, v. 765, p. 99-105, 2001.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 2, 352 p.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MARKHAM, K. R.; TERNAI, B. ^{13}C NMR of flavonoids II. Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. **Tetrahedron**, v. 32, n. 21, p. 2607-2612, 1976.
- MARKHAM, K. R.; TERNAI, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T. J. ^{13}C -NMR studies of flavonoids II. **Tetrahedron**, v. 34, p.1391-1397, 1978.
- MATSUNO, M.; URANO, S. ^{13}C NMR spectra of tocopherols and 2,2-dimethylchromanols. **Tetrahedron**, v. 32, p. 229-231, 1976.
- MEDEIROS, A. I.; SA-NUNES, A.; TURATO, W. M.; SECATTO, A.; FRANTZ, F. G.; SORGI, C. A.; SEREZANI, C. H.; DEEPE, G. S. Jr.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. **Journal of Immunology**, v. 181, p. 8544-8551, 2008.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n.1, p.105-111, 2001.
- MORSE, M. A.; STONER, G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 1737-1746, 1993.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUELAS-SERRANO S.; NOGAL-RUIZ J.; GÓMEZ-BARRIO A. Setting of a colorimetric method to determine de viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, p. 999-1002, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard M27-P**. Kew, 1992.

NICOLLIER, G.; THOMPSON, A. C. Flavonoids of *Desmanthus illinoensis*. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 113 -117, 1983.

NIESSEN, W. M. State of the art in liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatograph A**, v. 856, p. 179-197, 1999.

OSSIPOV, V.; NURMI, K.; LOPONEN, J.; PROKOPIEV, N.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. CLAE isolation and identification of flavonoids from white birch *Betula pubescens* leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 3, p. 213-222, 1995.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n.2, p. 89-96, 2008.

PIETTA , P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63. n. 7, p. 1035-1042, 2000.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.; STIRTON, C. H. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN P. H. (Org.). **Advances in legumes systematic: part 1**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 1-26.

QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K. Modern approaches in the search for new lead antiparasitic compounds from higher plants. **Current Drug Targets**, v. 10, p. 202-211, 2009.

RENZ, S. V. **Oxidação e antioxidantes**. 2003. Disponível em: <http://www.6ufrgs.br/bioquímica/posgrad/BTA/oxid_antiox.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2011.

- RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; BERENQUER, J.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V.; SANCHEZ R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI - 2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p.1998-2003, 1996.
- SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeast *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 25-34, 2007.
- SHEN, X.; ISOGAI, A.; FURIHATA, K.; SUN, H.; SUZUKI, A. An abietane diterpenoid glycoside from *Rabdosia eriocalyx*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 1595-1598, 1993.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, 291-295, 1997.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2000. Cap. 15, p. 291-332.
- SPENCER J. P. E.; KUHNLE G. G. C.; WILLIAMS R. J.; RICE-EVANS C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its *in vivo* metabolites. **Biochemical Journal**: Part. 1, v. 15, n. 372, p. 173-181, 2003.
- TEMPESTH, M. S.; STEVEN , R. K. Ethnobotany as a source for new drugs. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 33, p. 325-330, 1994.
- WATSON, L.; DALLWITZ, M. **The families of flowering plants leguminosae (Caesalpinioideae)**. Disponível em: <<http://biodiversity.uno.edu/delta/angio/www.caesalpi.htm>>. Acesso em: 23 jan. 2008.
- WENKERT, E.; GOTTLIEB, H. E. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoid and isoflavonoid compounds. **Phytochemistry**, v. 16, n. 11, p. 1811-1816, 1977.

WOLFENDER, J. L.; QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. Phytochemistry in the microgram domain-A LC/NMR perspective. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 697-709, 2005.

WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. **Journal of Chromatography A**, v. 794, p. 299-316, 1998.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.

ZANOLARI, B.; WOLFENDER, J.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. Q.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection multiple mass spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1020, p. 75-79, 2003.

ZEEB, D. J.; NELSON, B. C.; ALBERT, K.; DALLUGE, J. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 20, p. 5020-5026, 2000.

Figuras de espectros Mono e Bidimensionais

Figuras de espectros

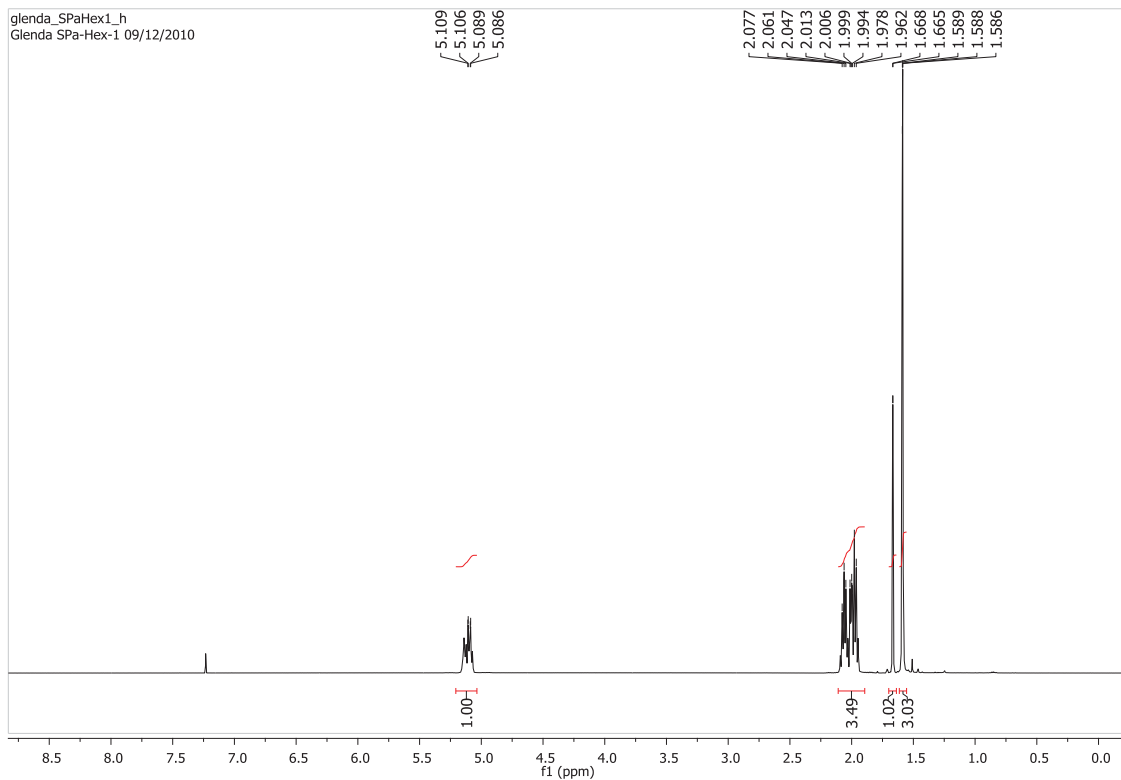


Figura 72: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do esqualeno (Spa-Hex-1).

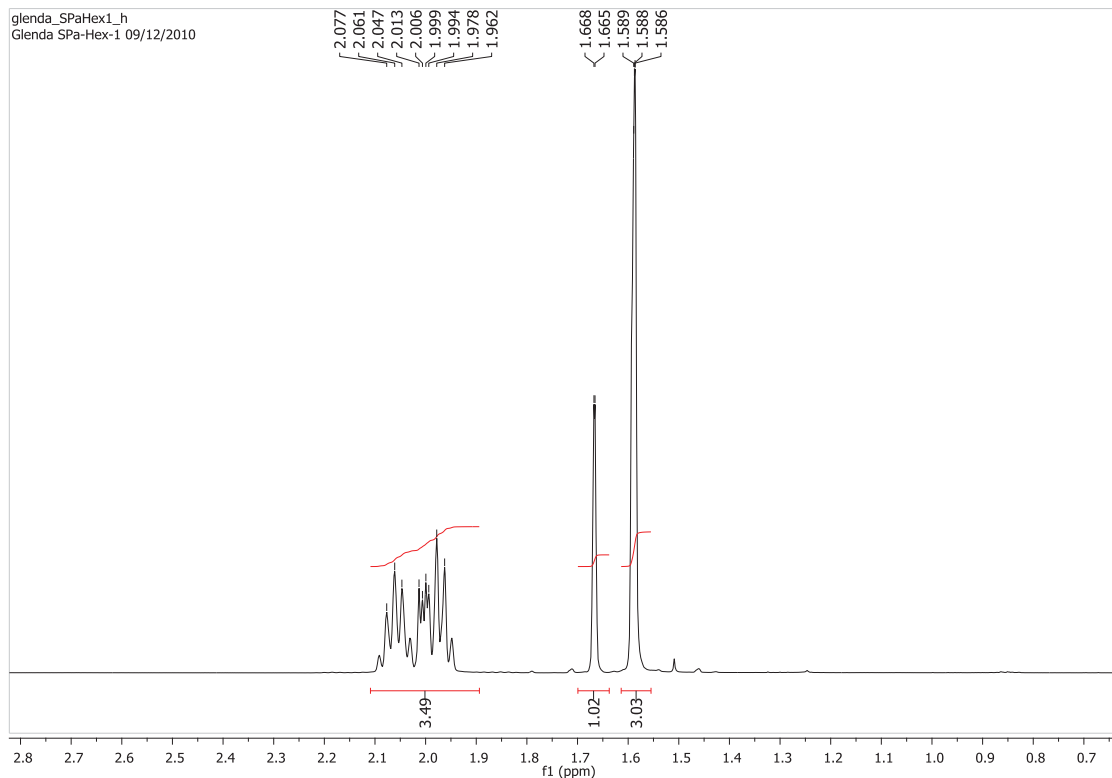


Figura 73: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) do esqualeno (Spa-Hex-1).

Figuras de espectros

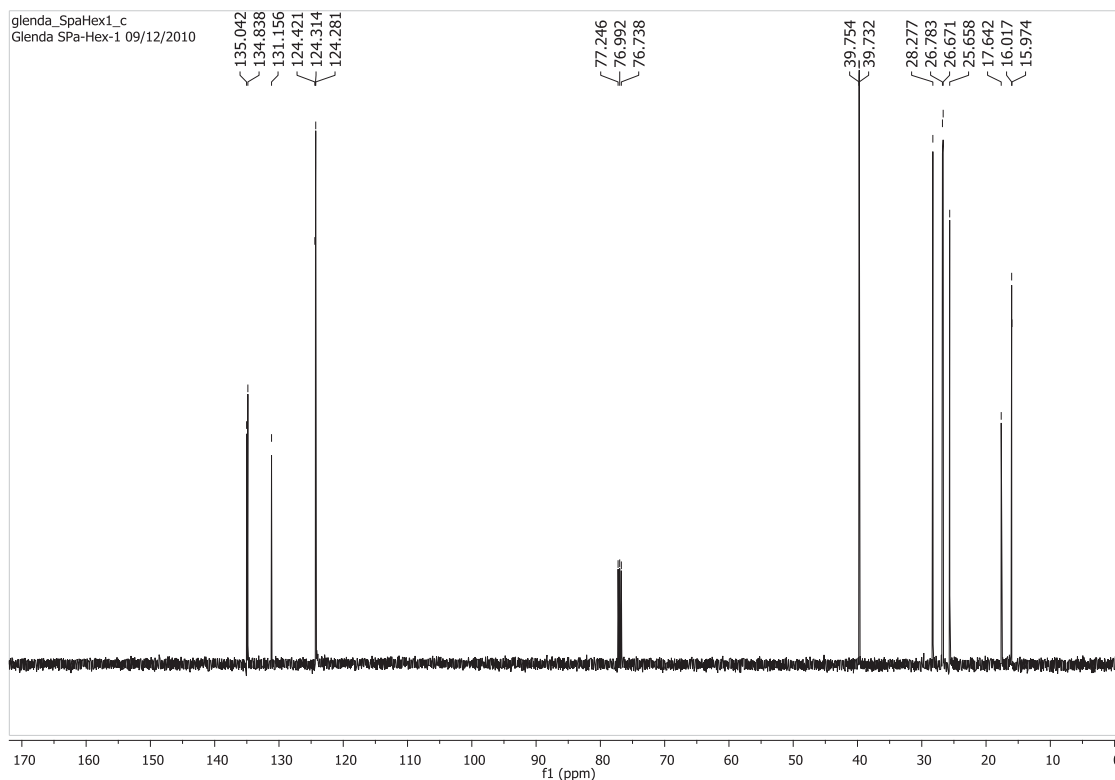


Figura 74: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do esqualeno (Spa-Hex-1).

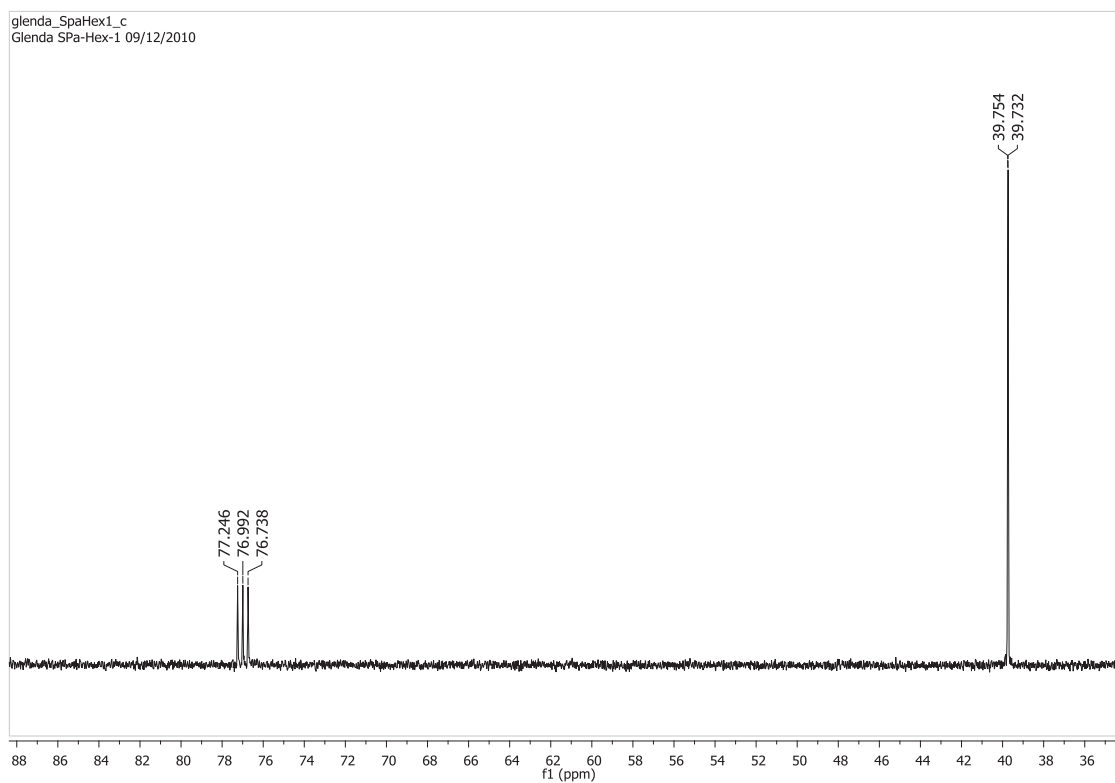


Figura 75: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do esqualeno (Spa-Hex-1).

Figuras de espectros

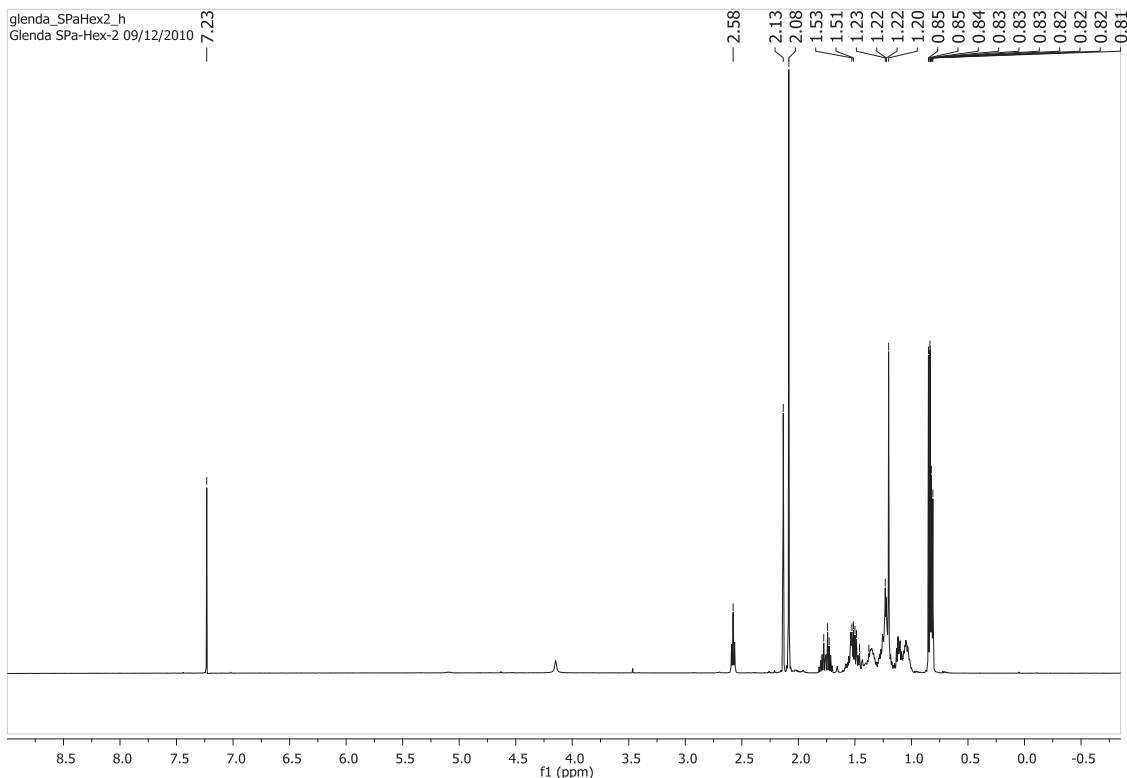


Figura 76: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do α - tocoferol (SPa-Hex-2).

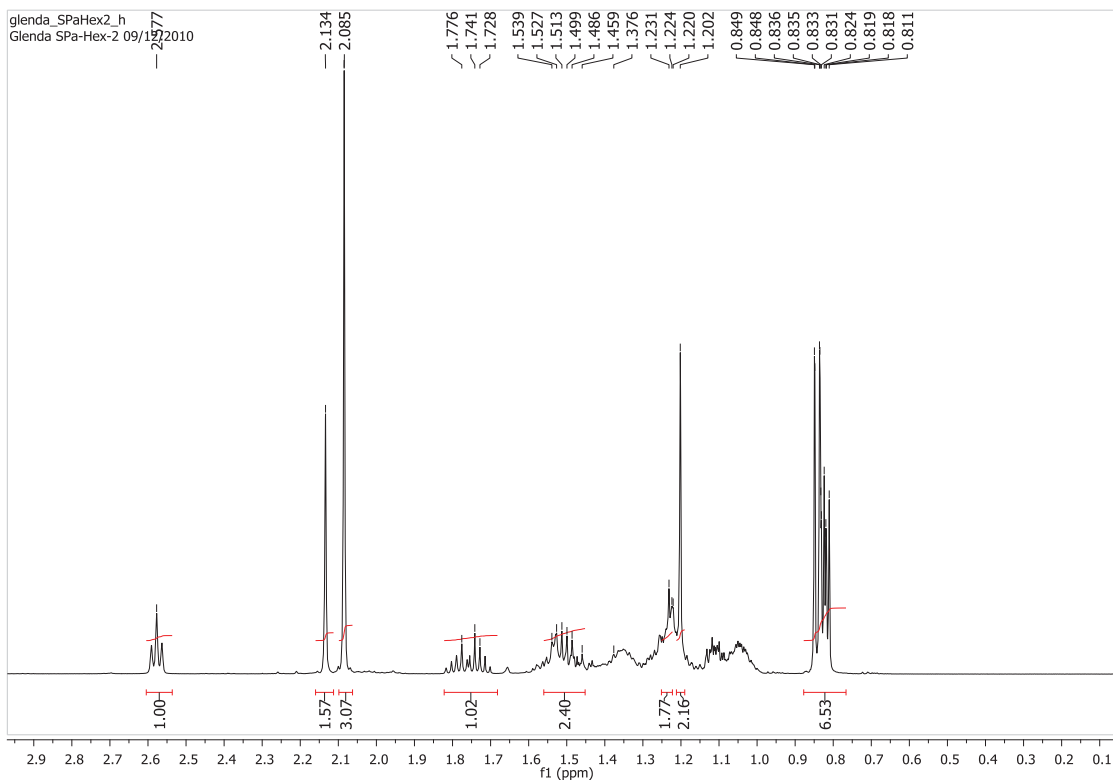


Figura 77: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) do α - tocoferol (SPa-Hex-2).

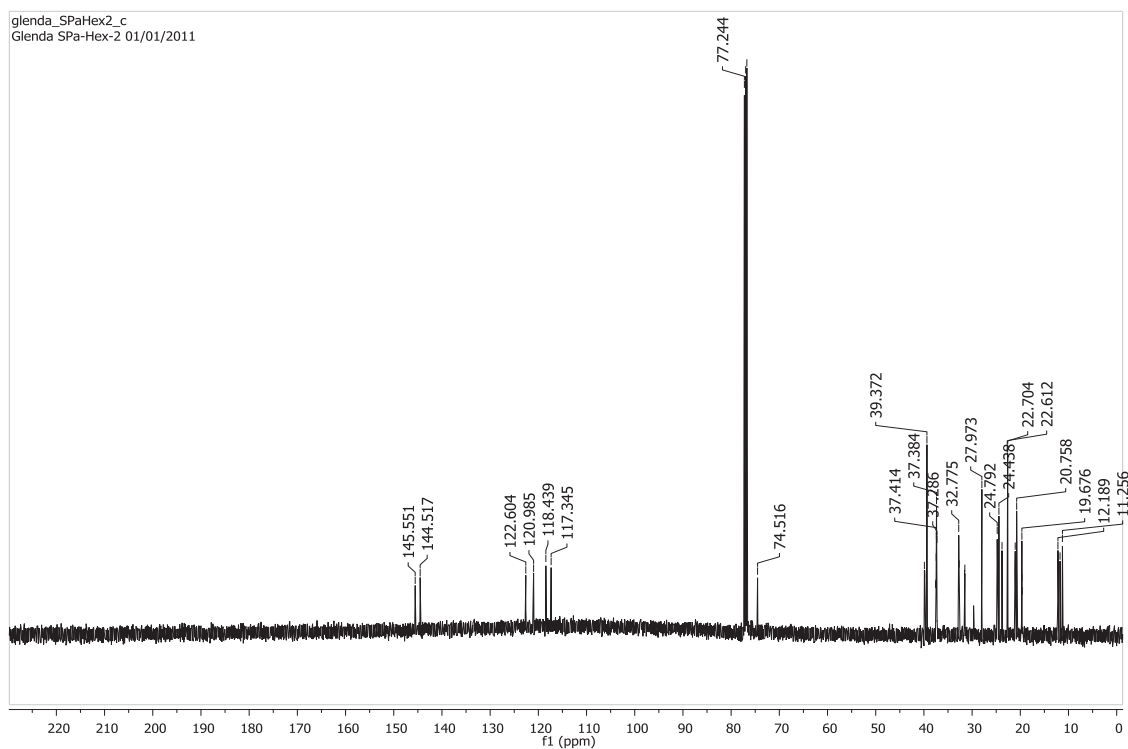


Figura 78: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do α - tocoferol (SPa-Hex-2).

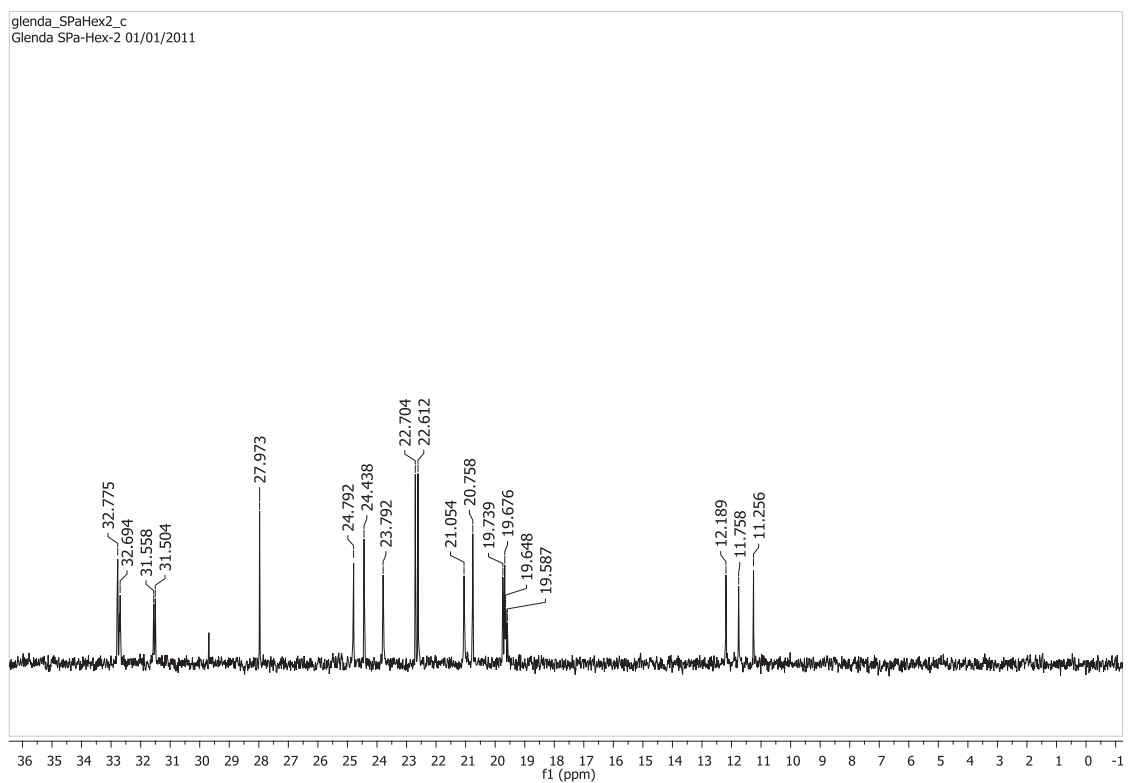


Figura 79: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do α - tocoferol (SPa-Hex-2).

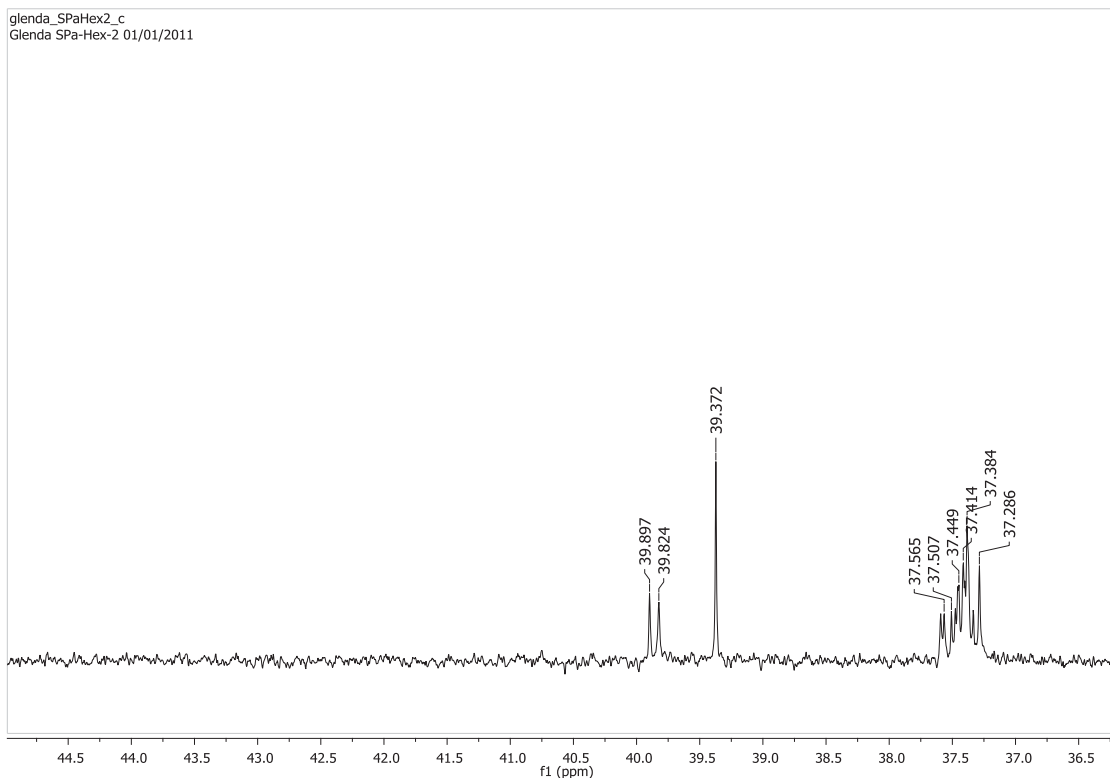


Figura 80: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do α -tocoferol (SPa-Hex-2).

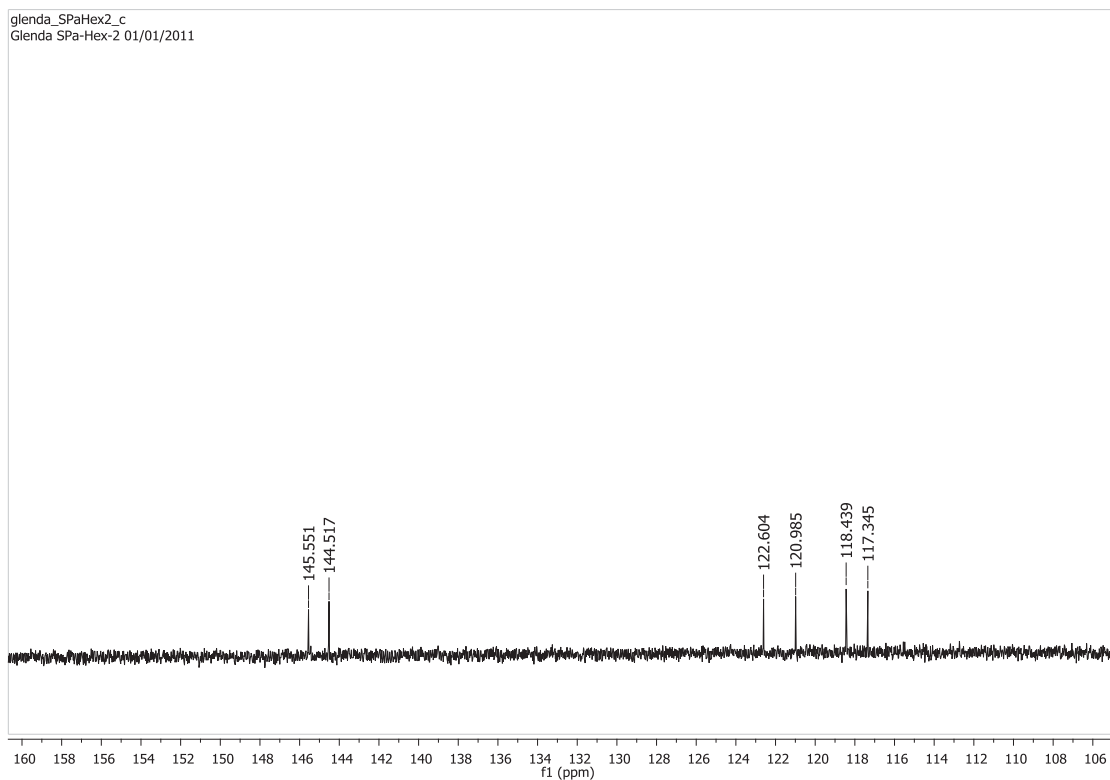


Figura 81: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do α -tocoferol (SPa-Hex-2).

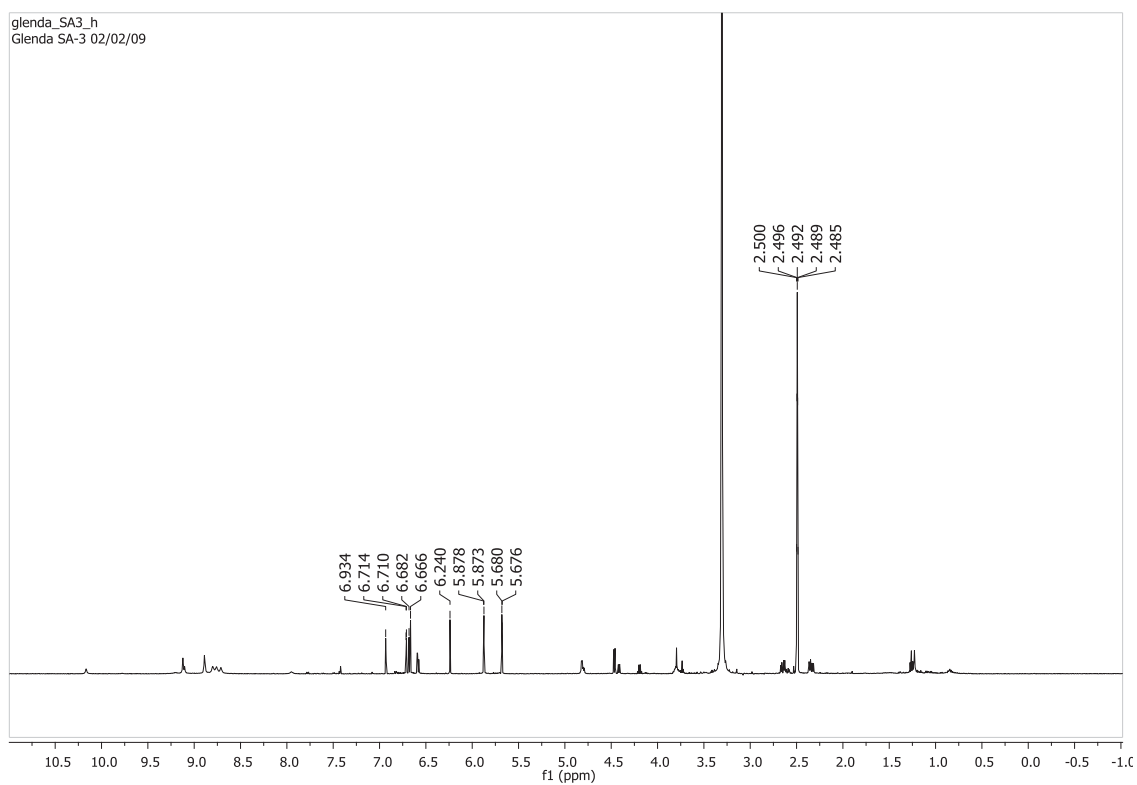


Figura 82: Espectro de RMN ¹H (500 MHz) da catequina (SA-3).

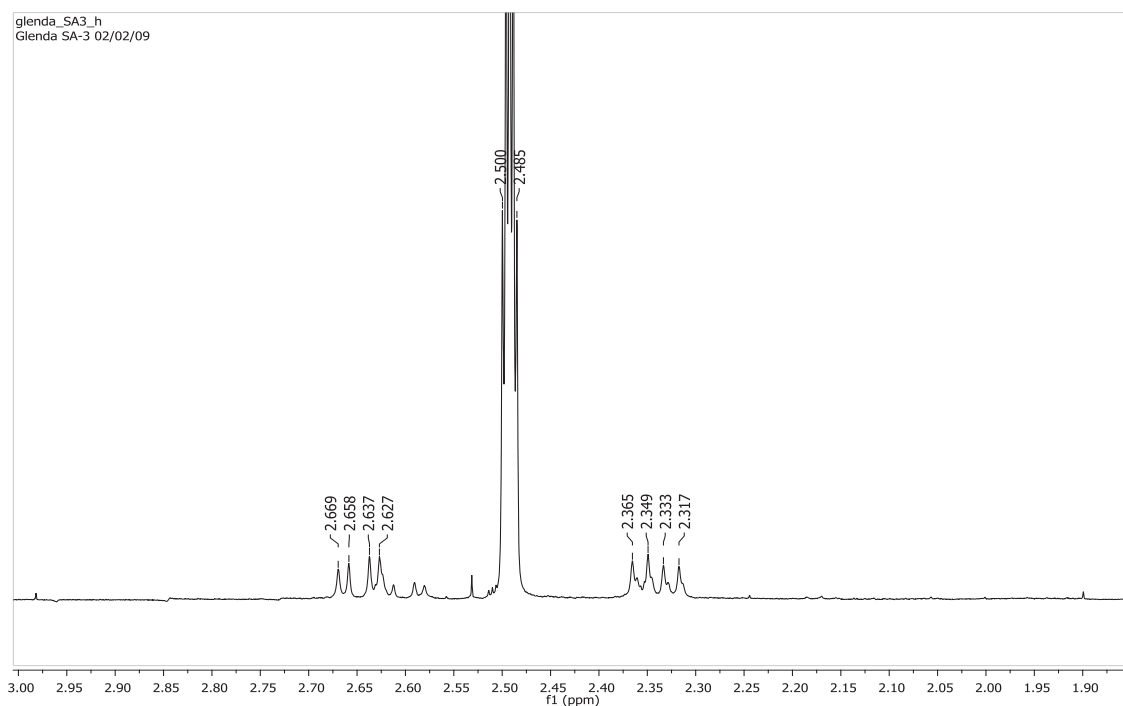


Figura 83: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz) da catequina (SA-3).

Figuras de espectros

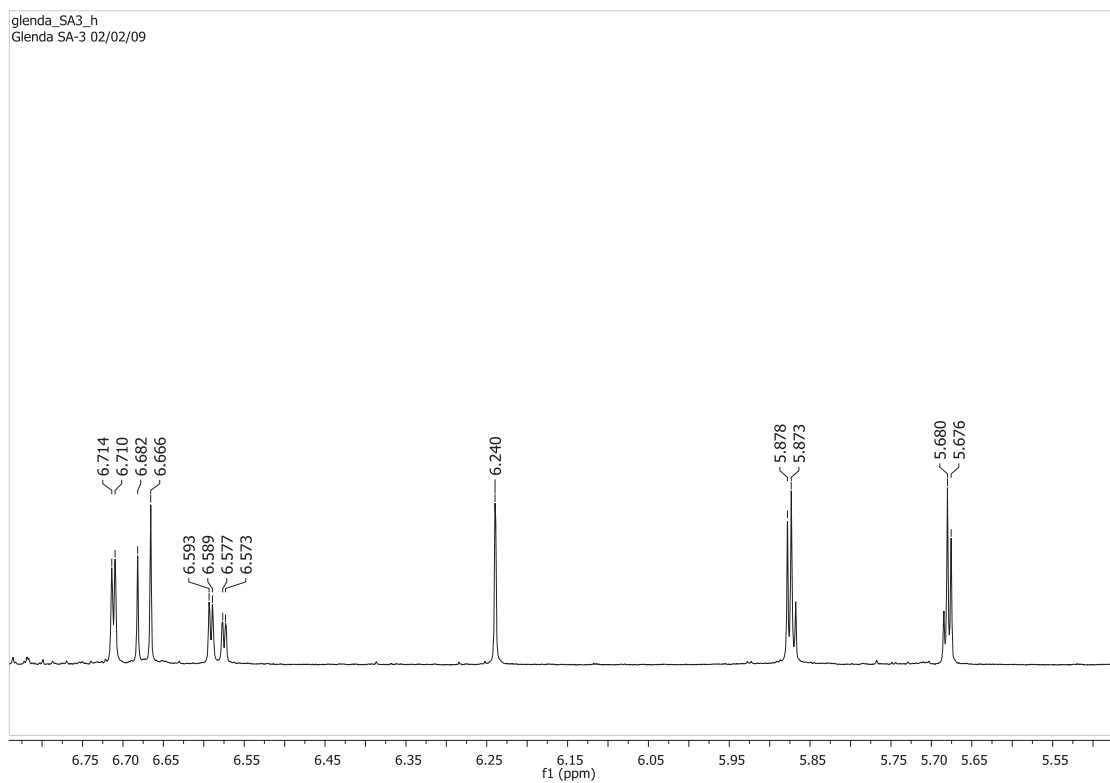


Figura 84: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da catequina (SA-3).

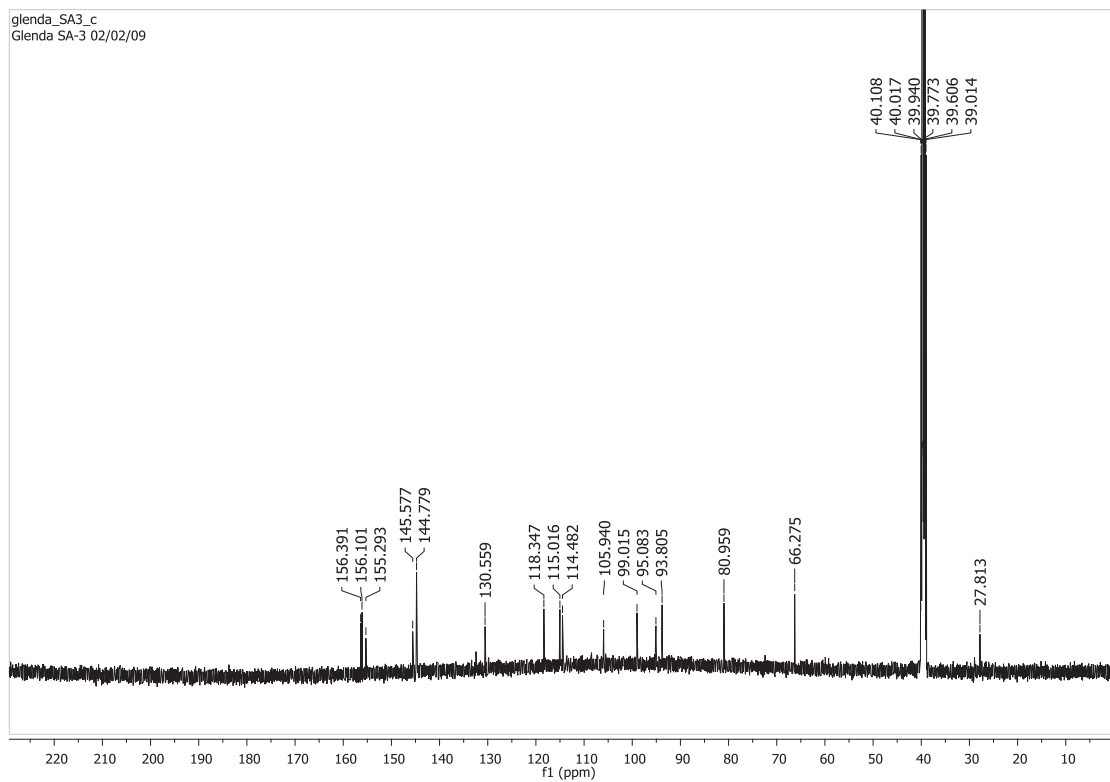


Figura 85: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da catequina (SA-3).

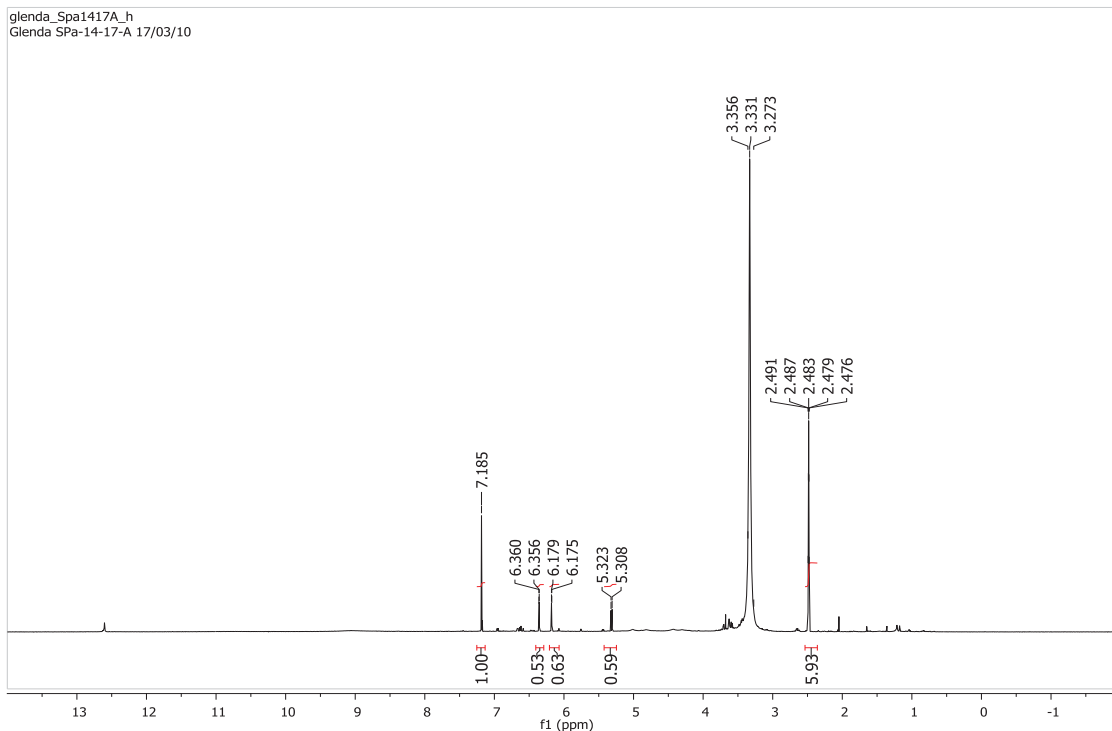


Figura 86: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância miricetina-3- O - β -galactopiranosideo (SPa-14-17-A).

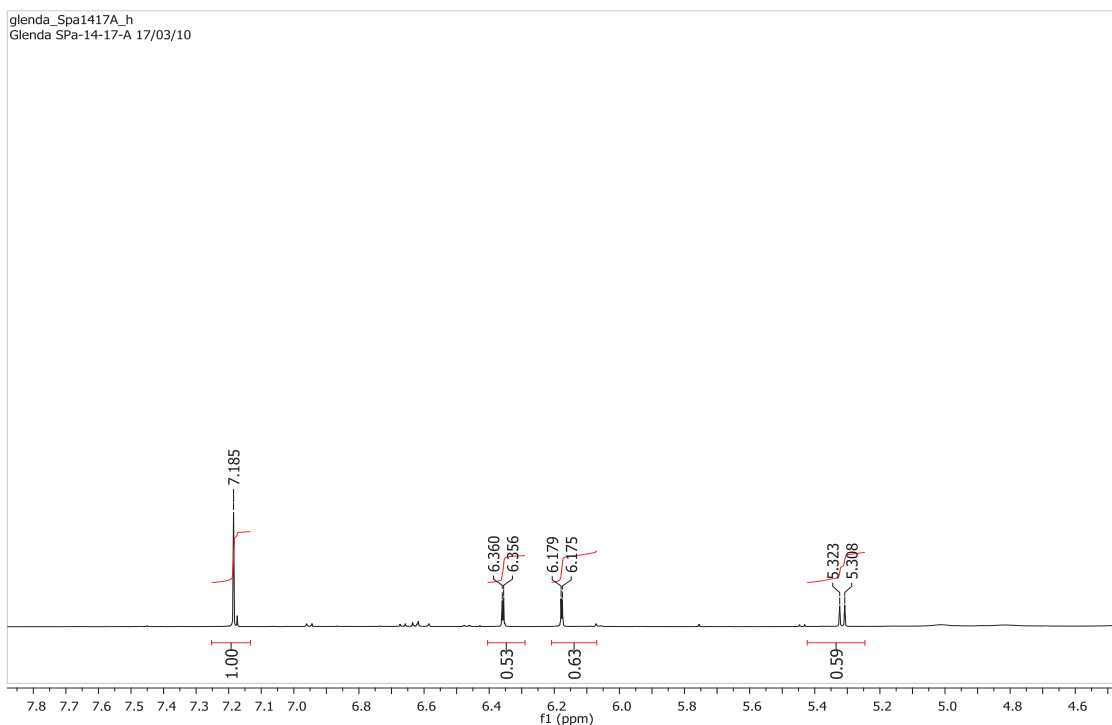


Figura 87: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância miricetina-3- O - β -galactopiranosideo (SPa-14-17-A).

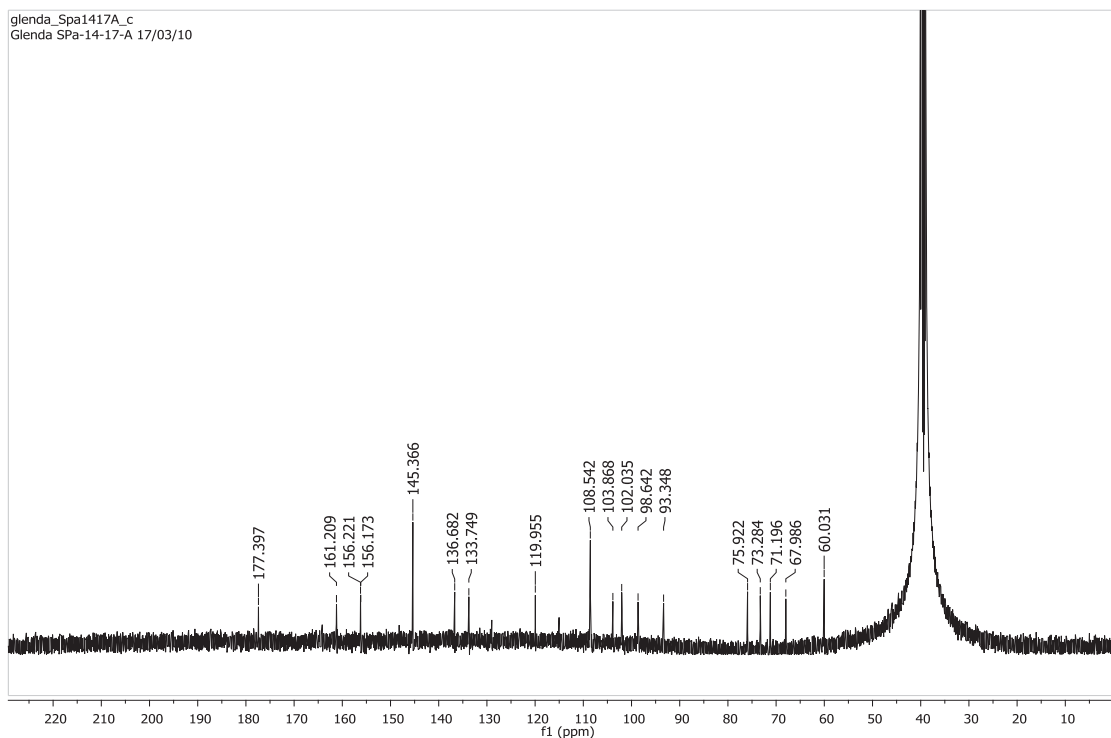


Figura 88: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da substância miricetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo (SPa-14-17-A).

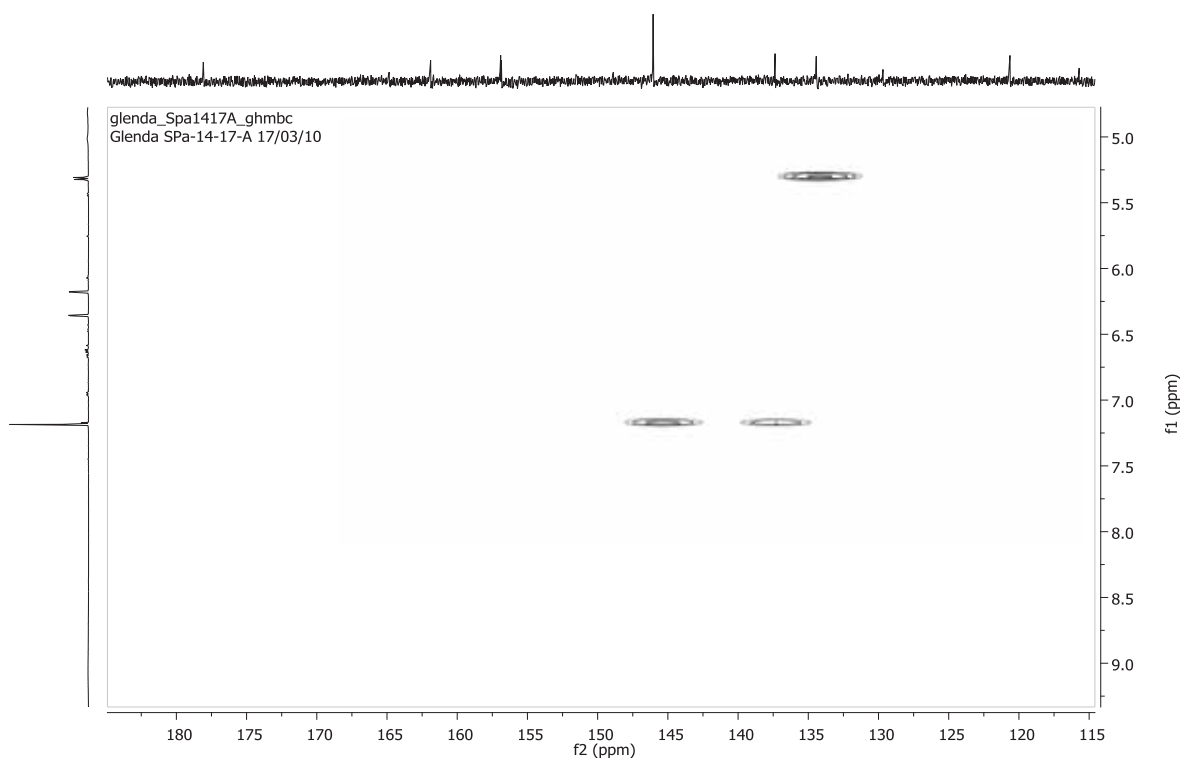


Figura 89: Ampliação do espectro de gHMBC da substância miricetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo (SPa-14-17-A).

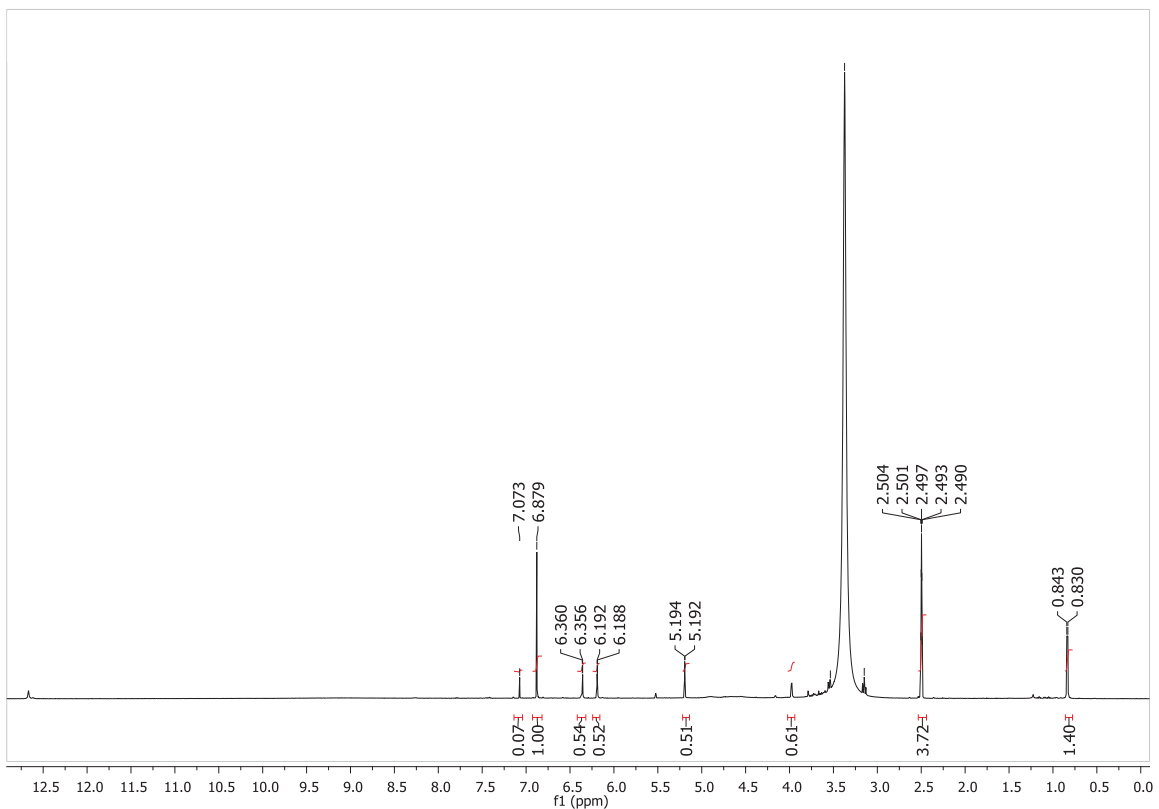


Figura 90: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância miricetina-3-*O*- α -ramnopyranosideo (SPa-14-17-B).

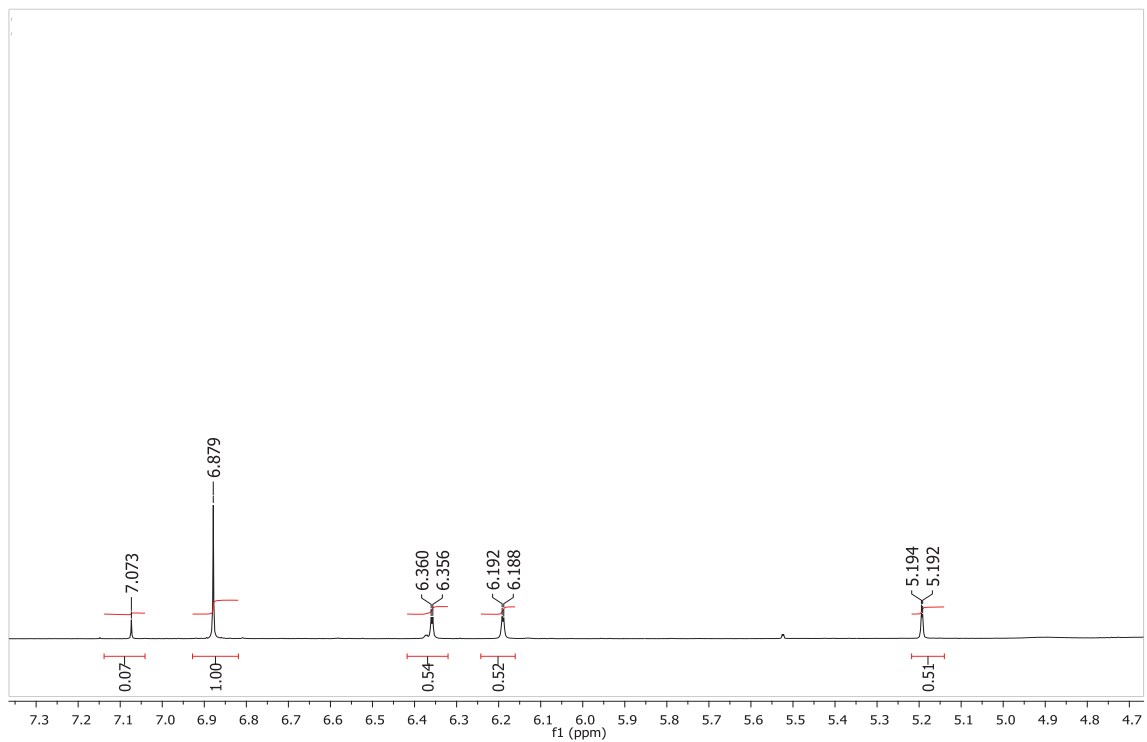


Figura 91: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância miricetina-3-*O*- α -ramnopyranosideo (SPa-14-17-B).

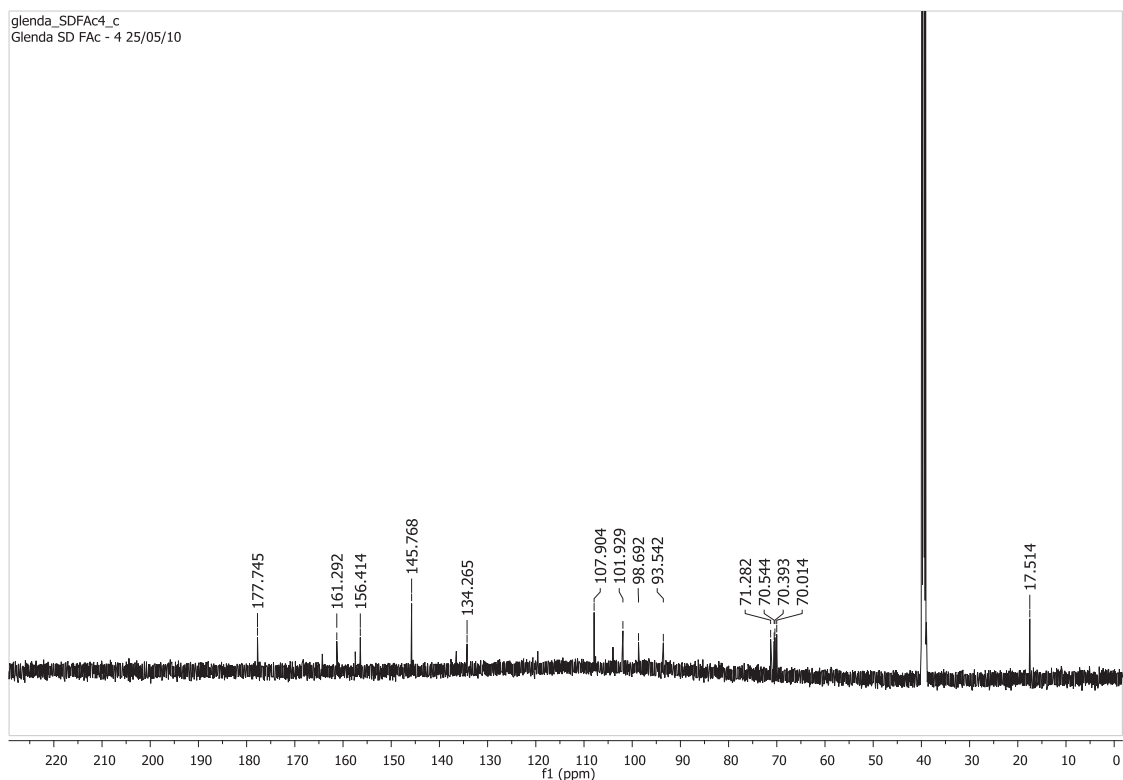


Figura 92: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) da substância miricetina-3-*O*- α -ramnopyranosideo (SPa-14-17-B).

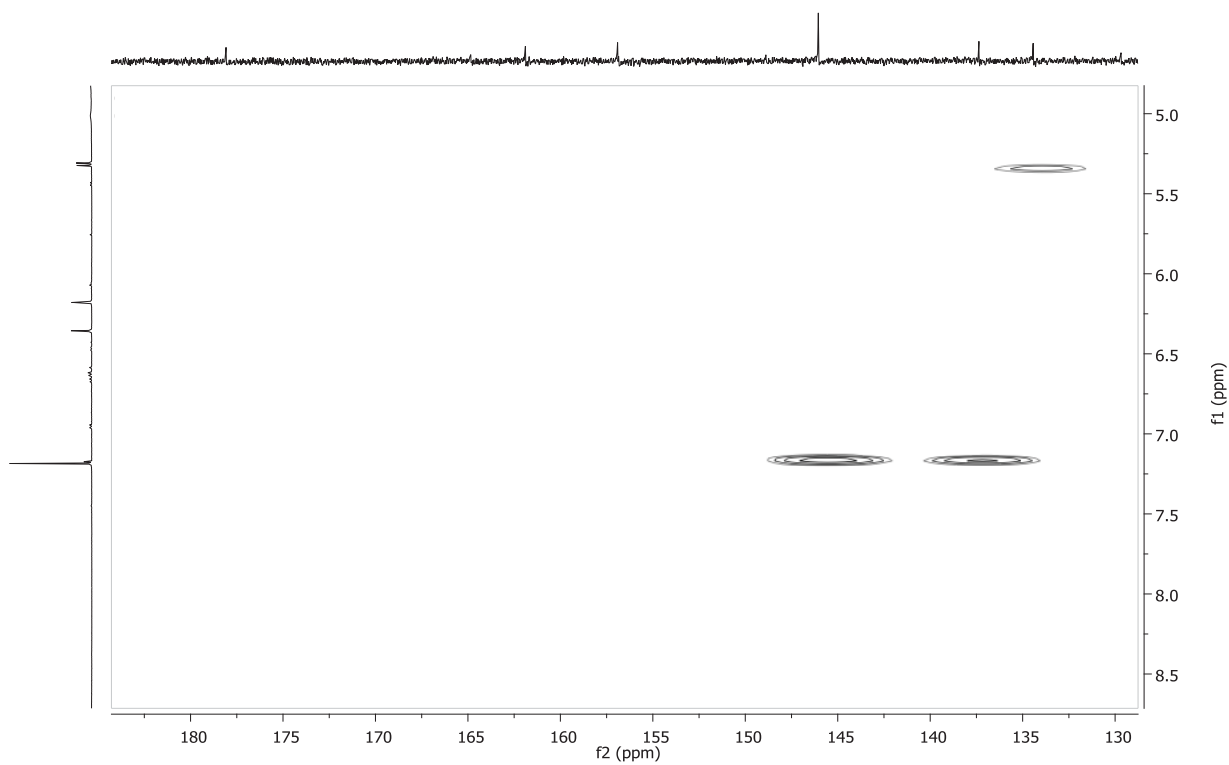


Figura 93: Espectro de gHMBC da substância miricetina-3-*O*- α -ramnopyranosideo (SPa-14-17-B).

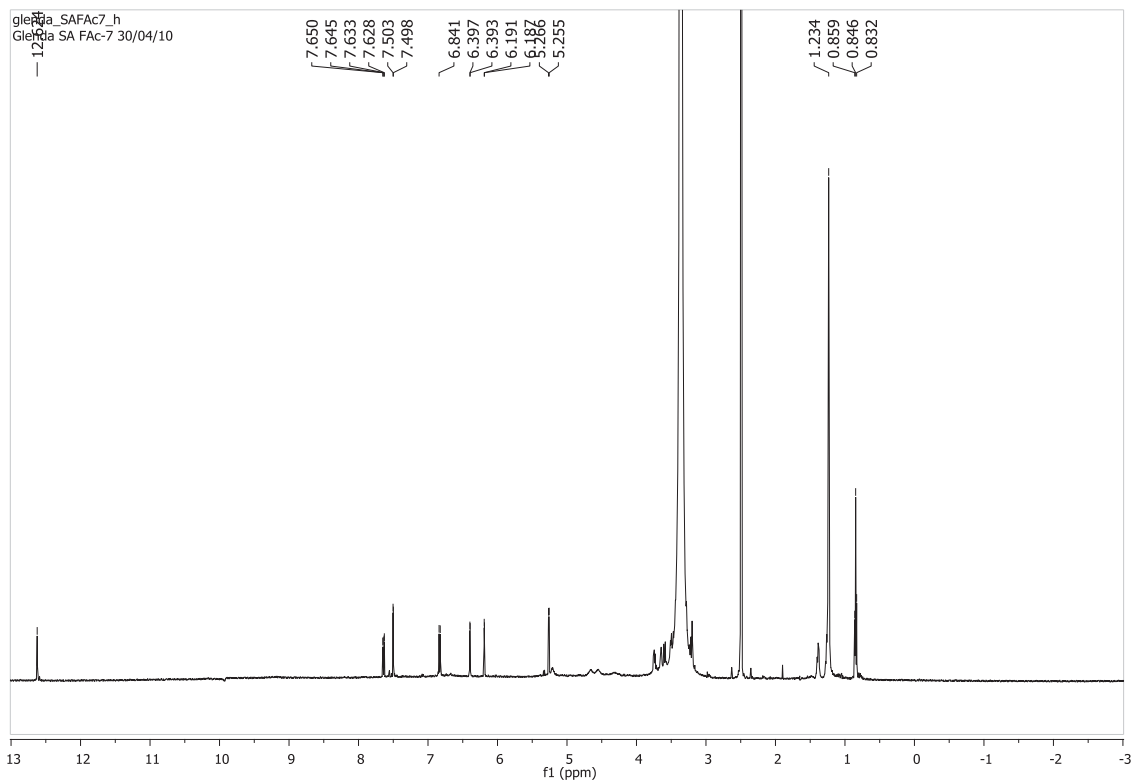


Figura 94: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância quecetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (SA-Fac-7).

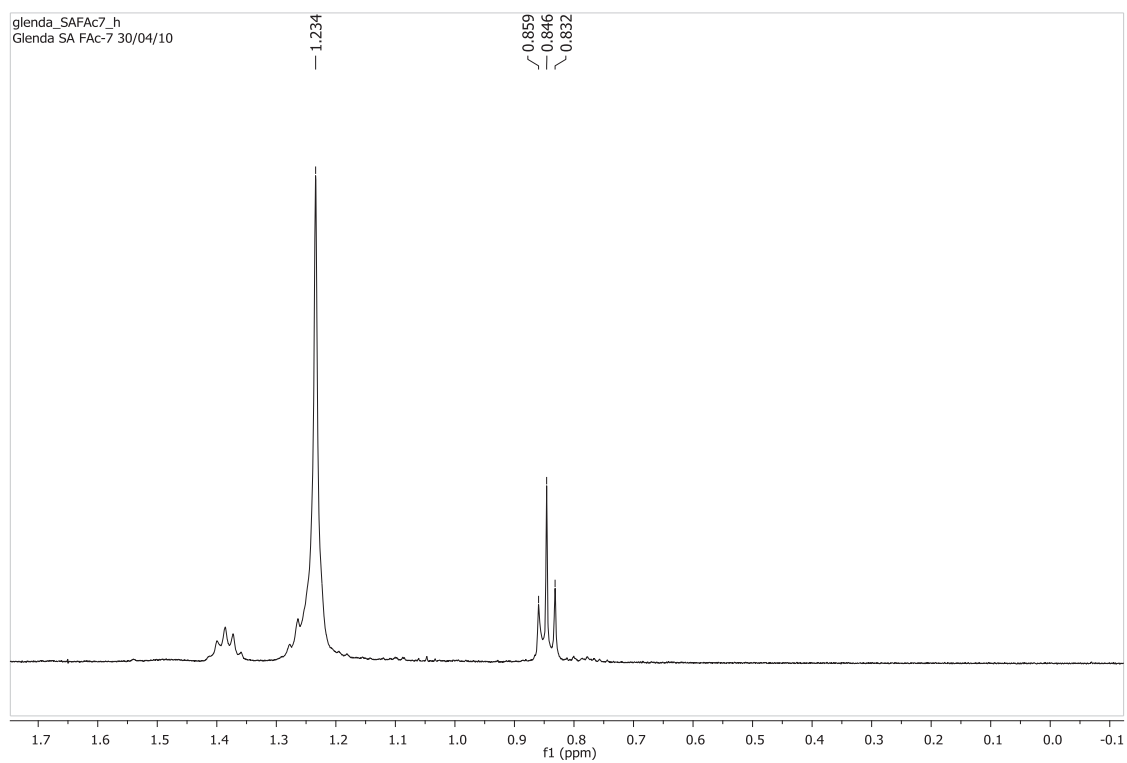


Figura 95: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância quecetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (SA-Fac-7).

Figuras de espectros

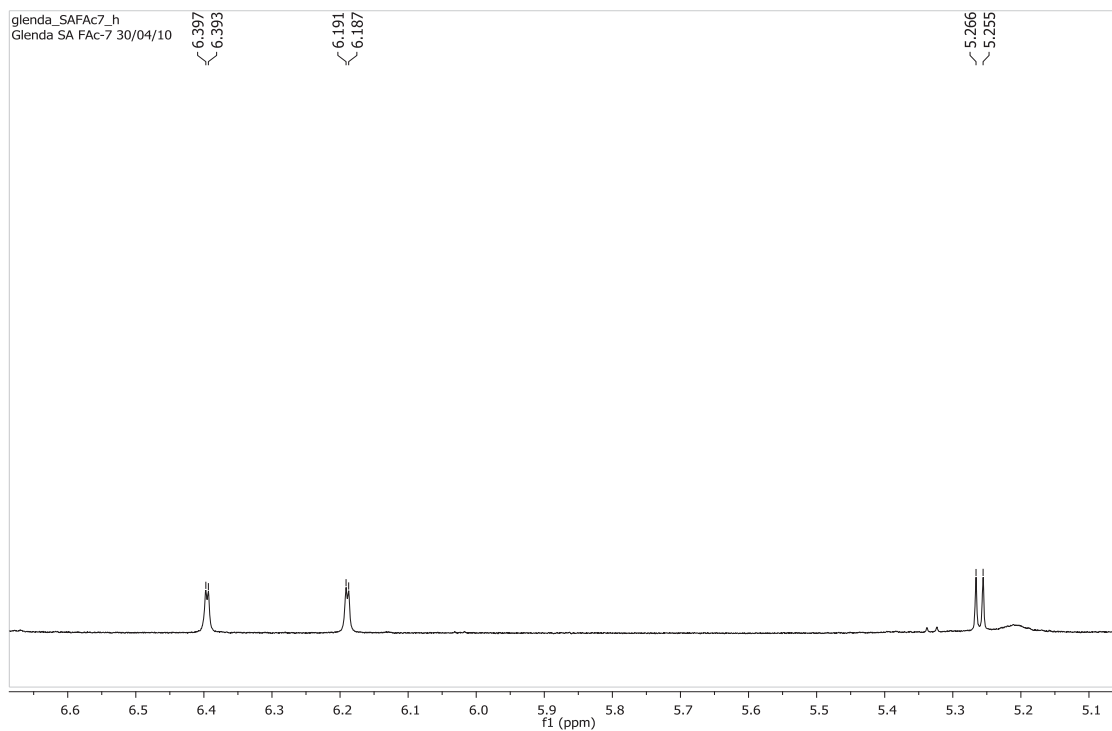


Figura 96: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância quecetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (SA-Fac-7).

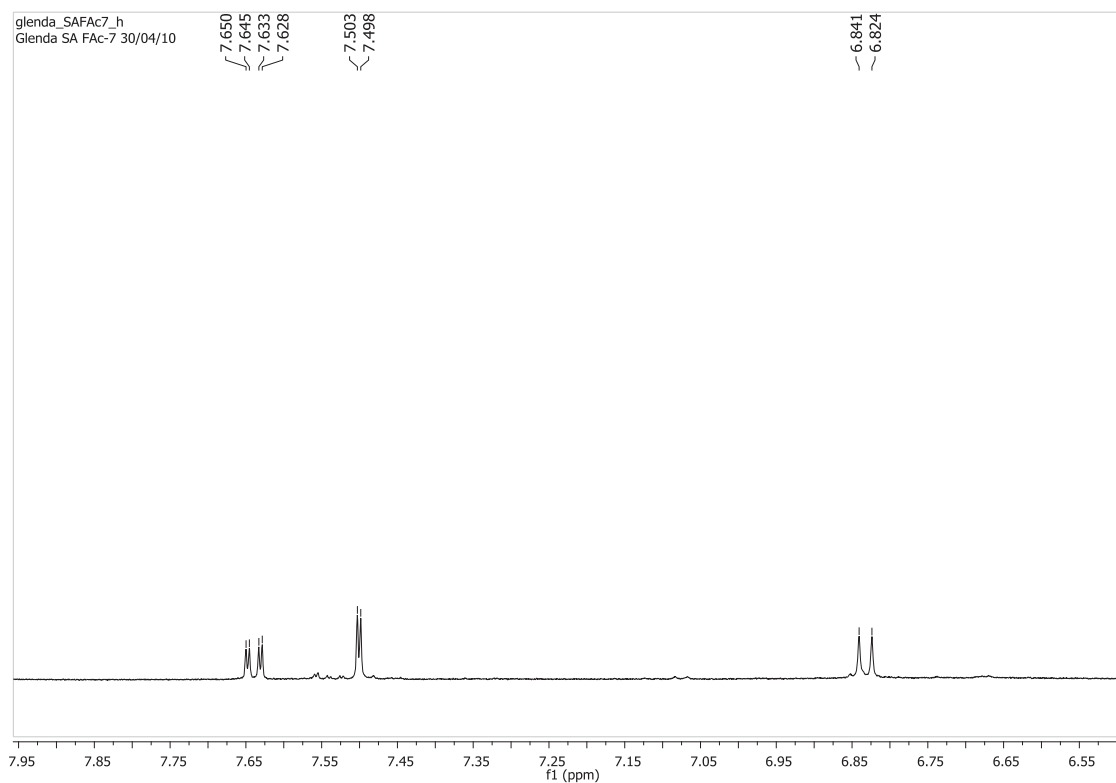


Figura 97: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância quecetina-3-O- β -arabinopiranosídeo (SA-Fac-7).

Figuras de espectros

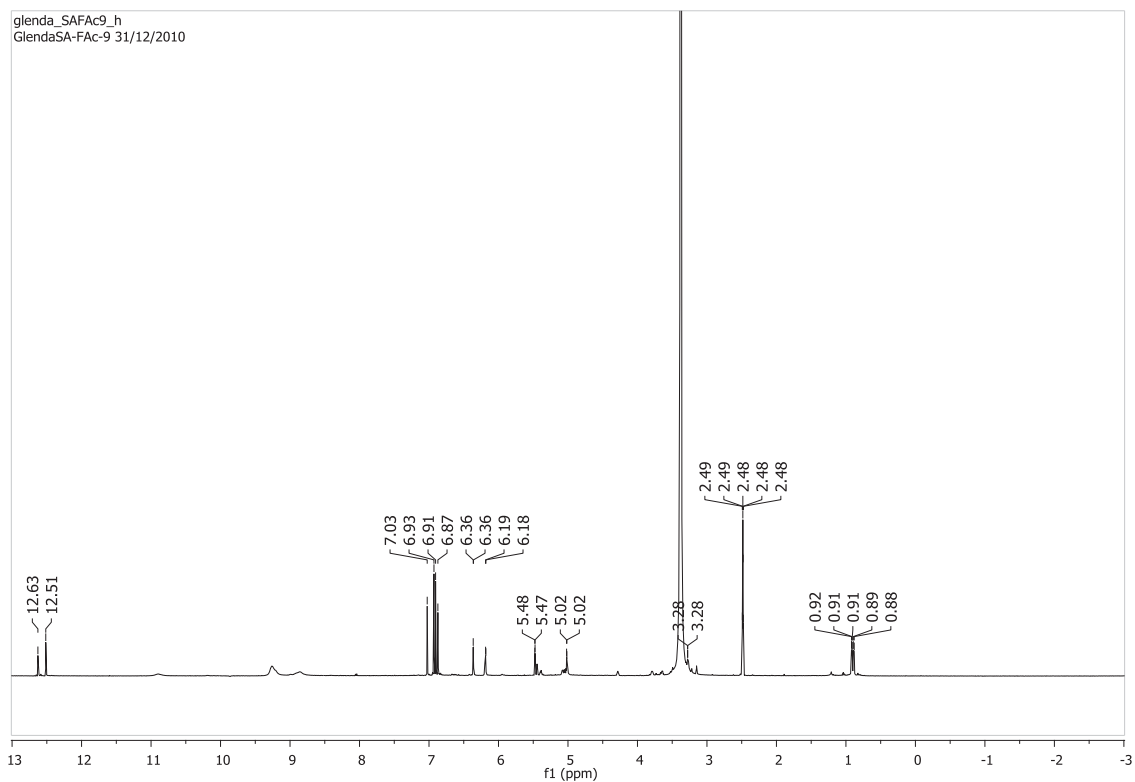


Figura 98: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da miricetina-3-*O*-(2''-*O*-galoil)- α -ramnopiranosideo (SA-Fac-9).

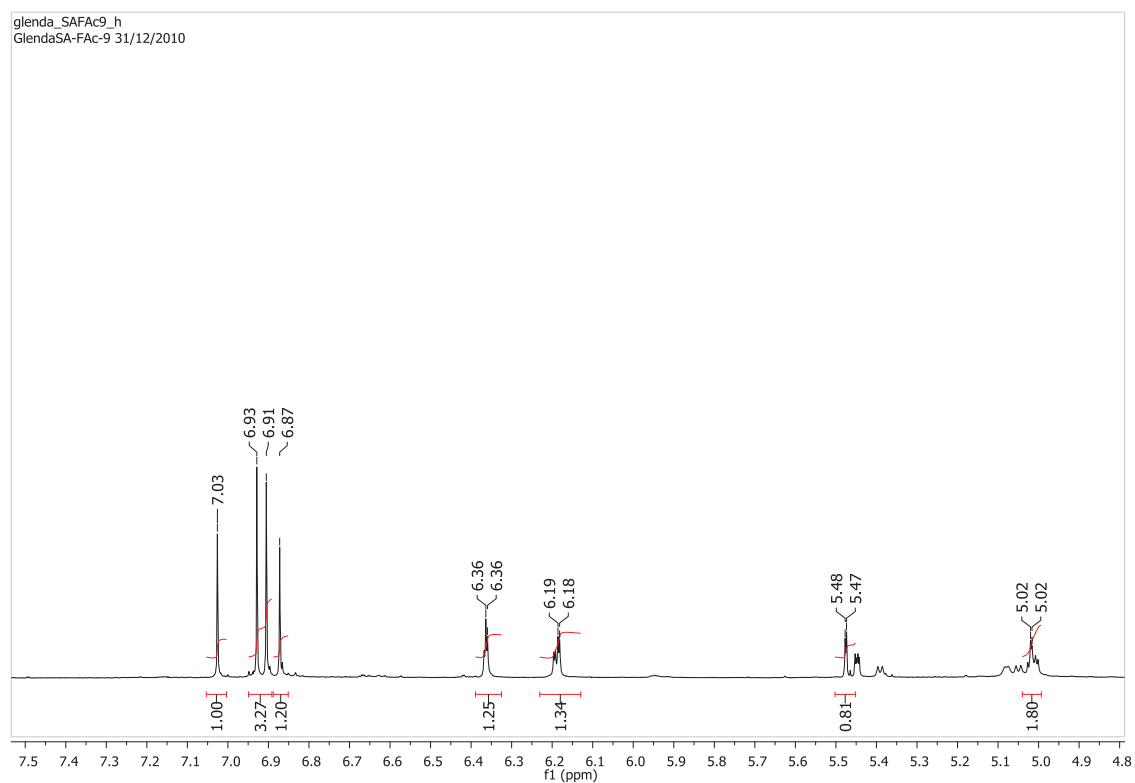


Figura 99: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da miricetina-3-*O*-(2''-*O*-galoil)- α -ramnopiranosideo (SA-Fac-9).

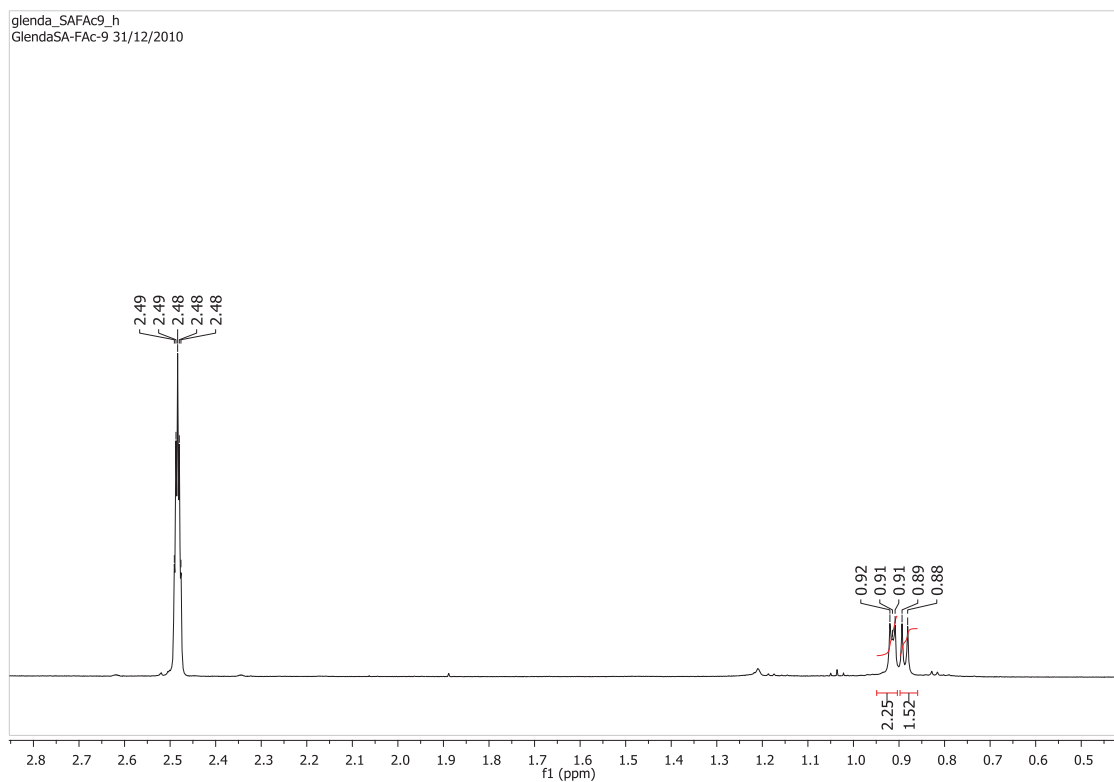


Figura 100: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da miricetina-3-*O*-(2''-*O*-galoi)- α -ramnopiranosideo (SA-Fac-9).

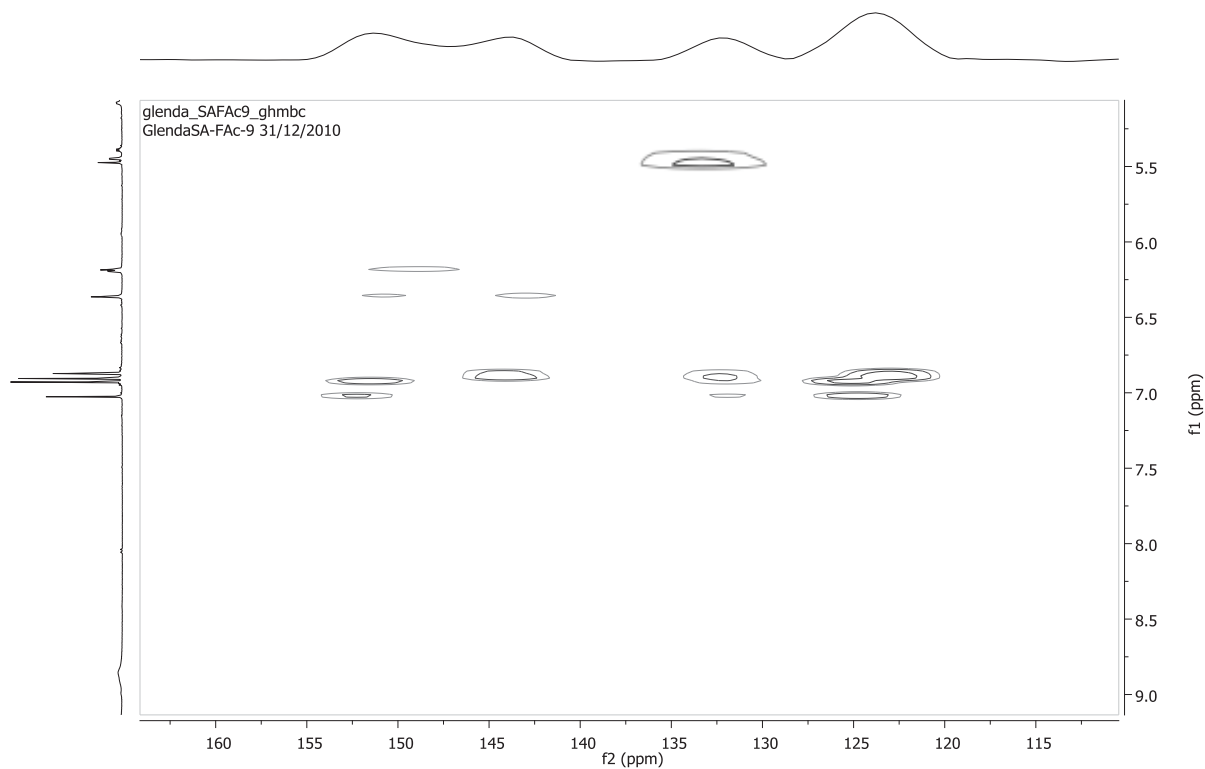


Figura 101: Espectro de gHMBC da miricetina-3-*O*-(2''-*O*-galoi)- α -ramnopiranosideo (SA-Fac-9).

Figuras de espectros

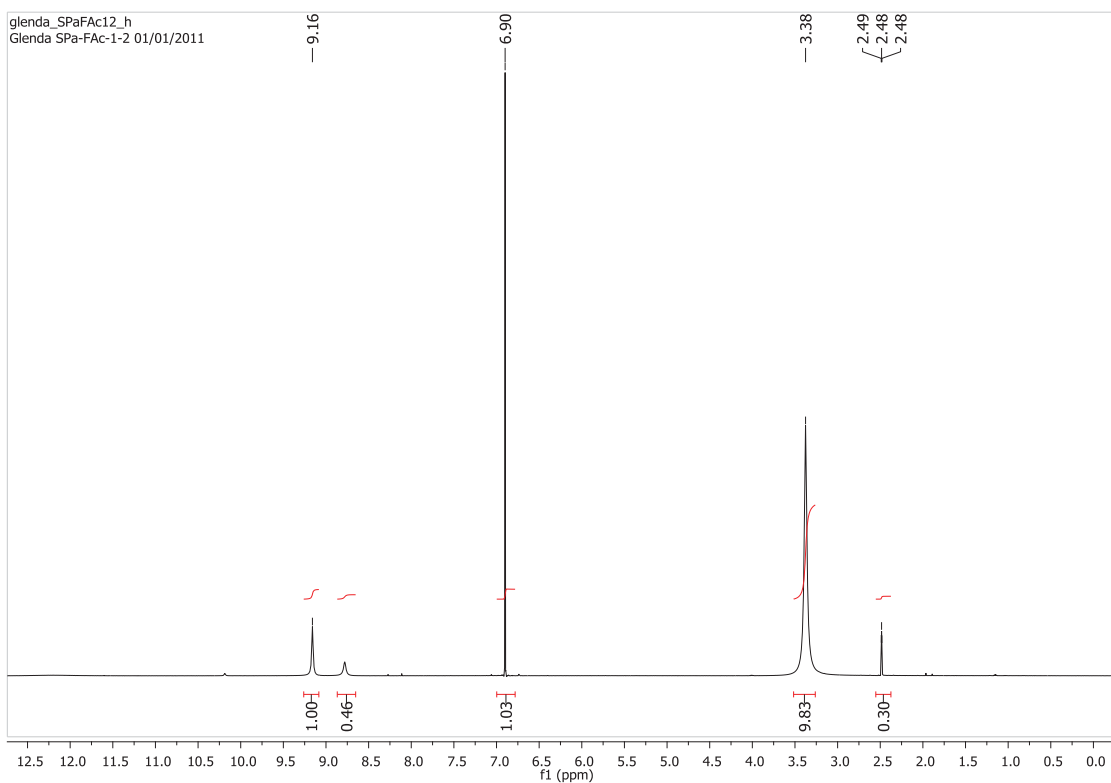


Figura 102: Espectro de RMN ¹H (500 MHz) do ácido gálico (SPa-Fac-1-2).

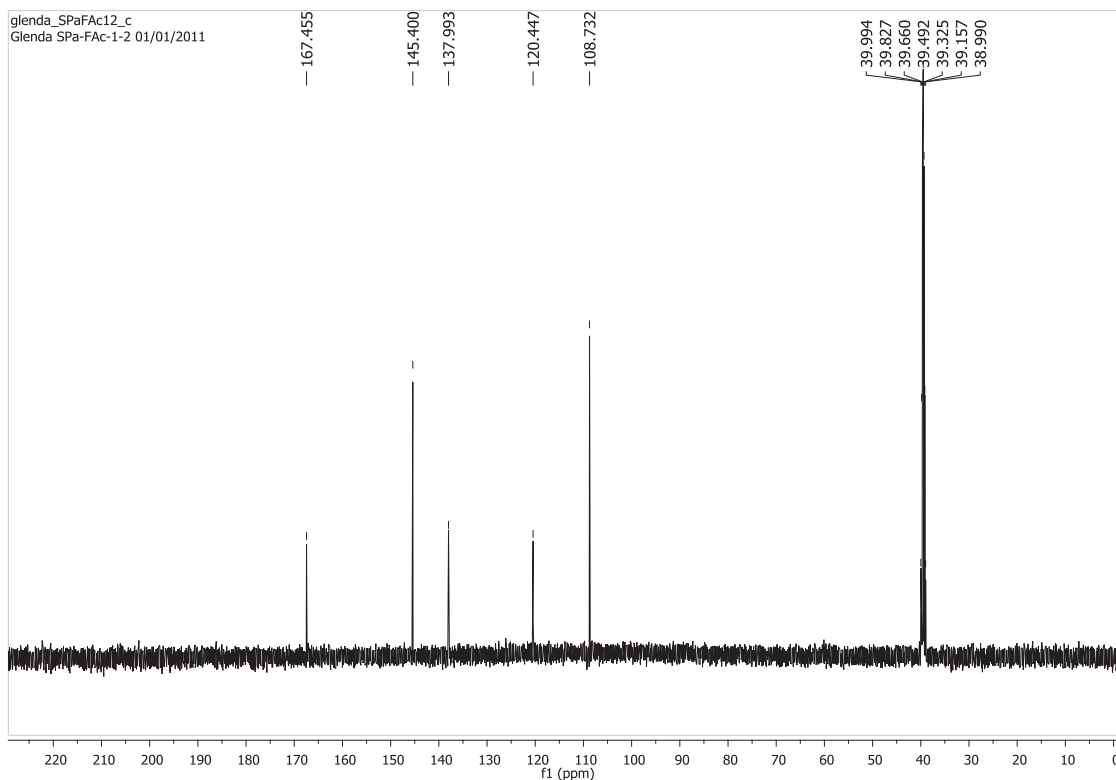


Figura 103: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz) do ácido gálico (SPa-Fac-1-2).

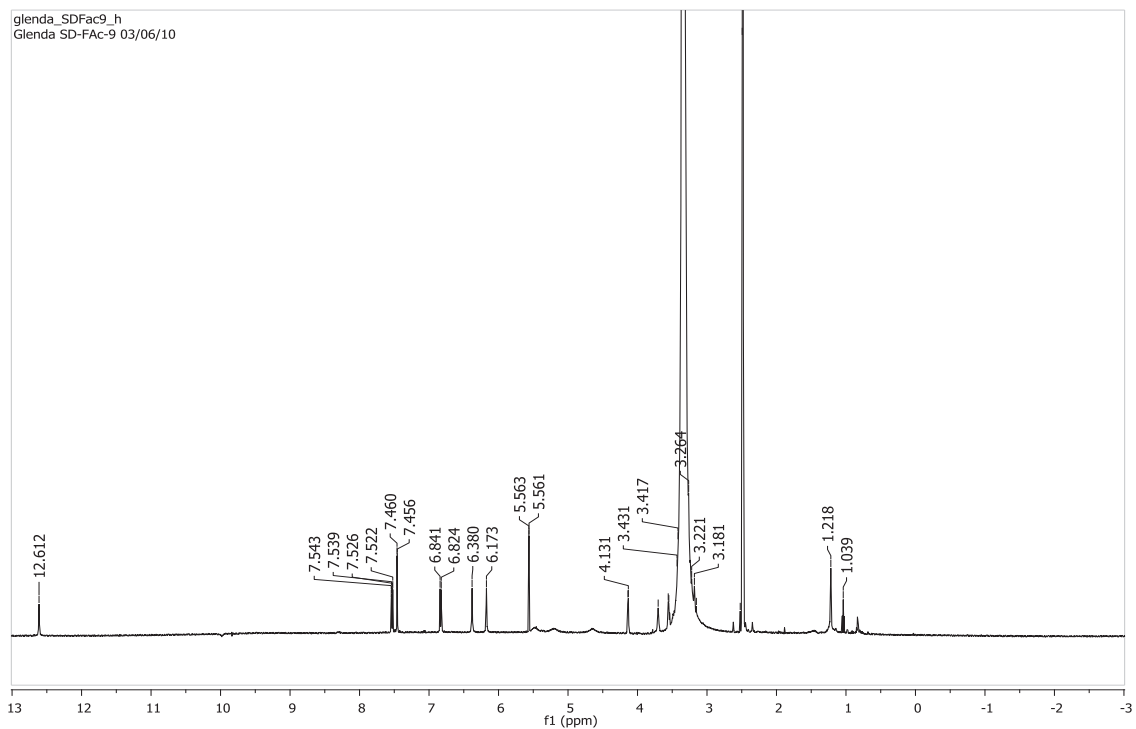


Figura 104: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (SD-Fac-9)

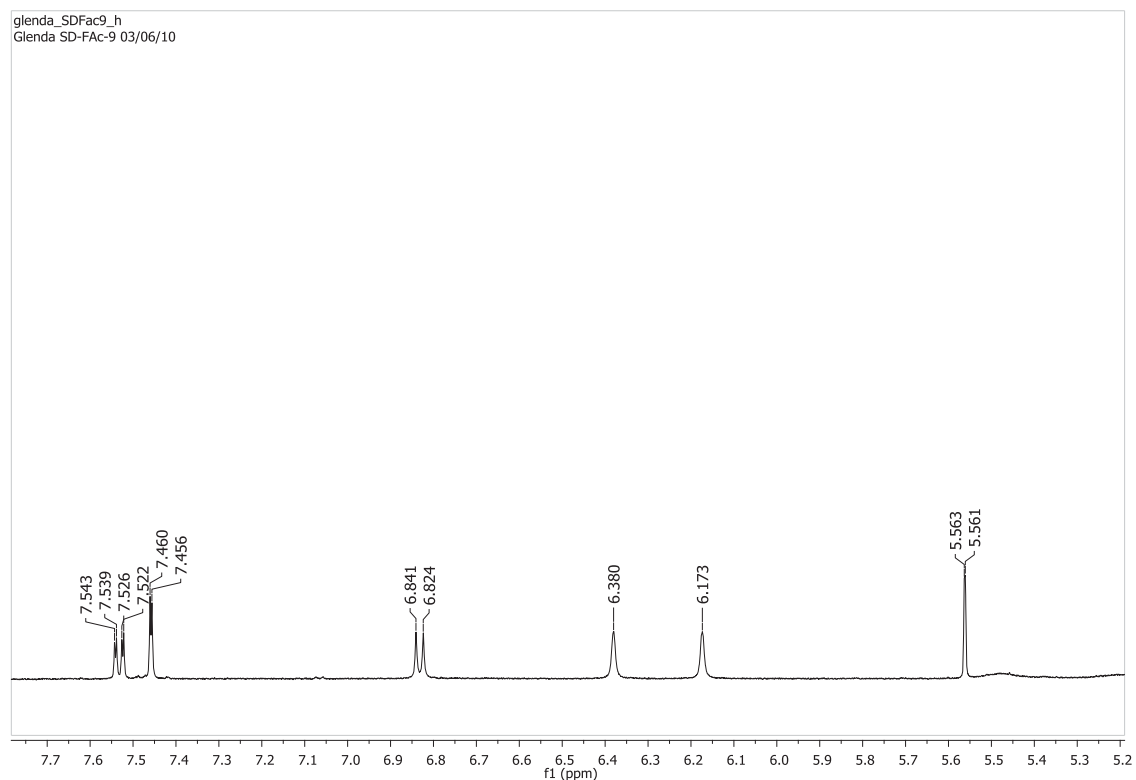


Figura 105: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo (SD-Fac-9)

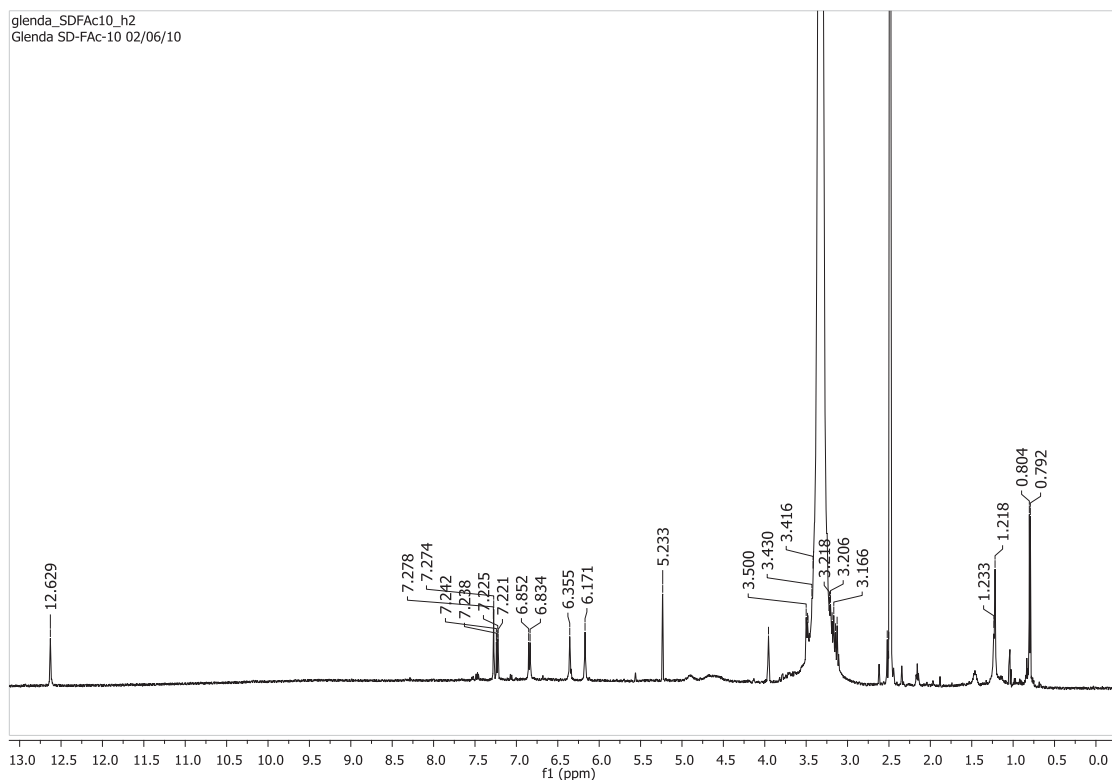


Figura 106: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da quercetina-3-O- α -ramnopiranosideo (SD- Fac-10).

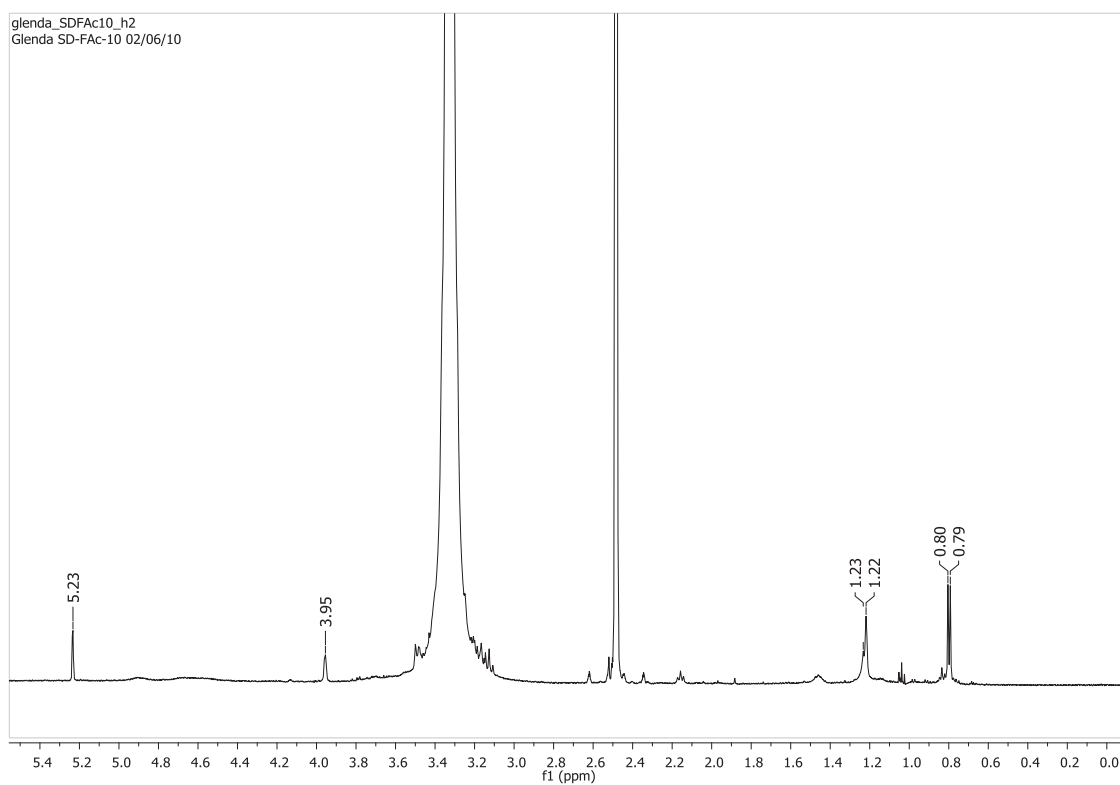


Figura 107: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz) da quercetina-3-O- α -ramnopiranosideo (SD- Fac-10).

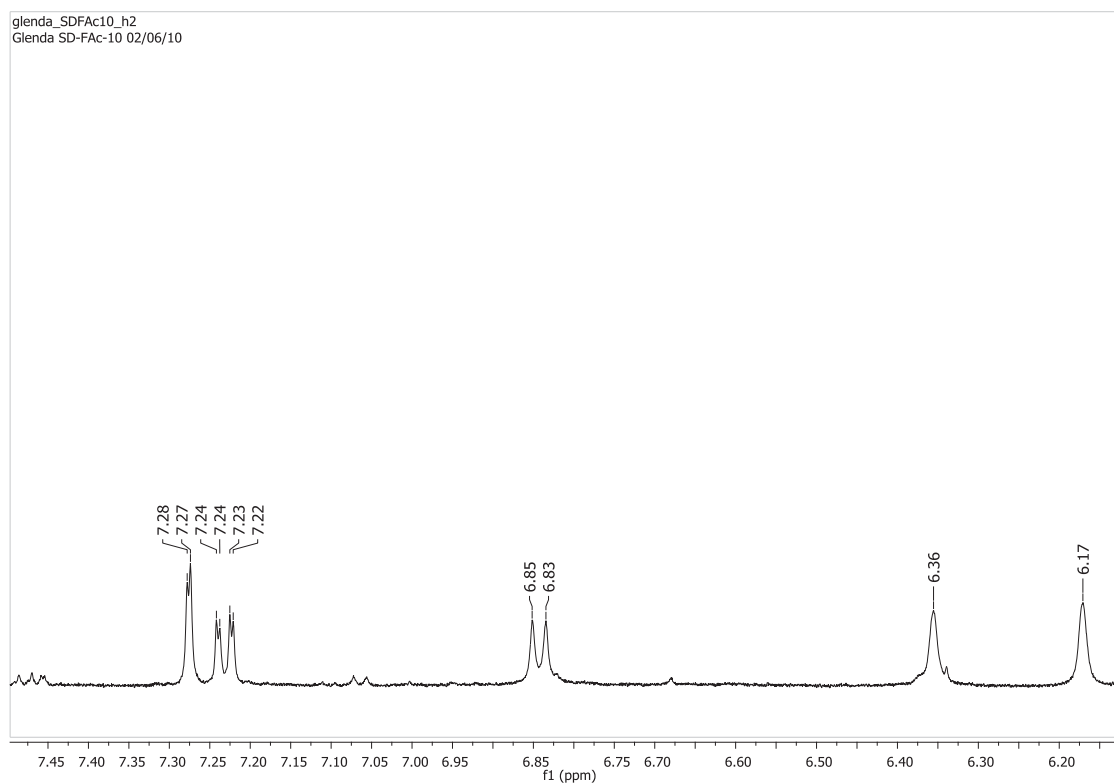


Figura 108: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz) da quercetina-3-O-α ramnopiranosídeo (SD- Fac-10).