

CARENINA VIDOTTE PLAZA

Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante das folhas e frutos de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae)

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

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

ARARAQUARA
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

P721i	Plaza, Carenina Vidotte Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante das folhas e frutos de <i>Eugenia jambolana</i> Lam. (Myrtaceae) / Carenina Vidotte Plaza. – Araraquara : [s.n], 2007 108 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva 1. Química orgânica. 2. Flavonóides. 3. Antioxidantes. 4. Antocianinas. I. Título.
-------	--

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Dedico este trabalho

Aos meus pais Beto e Marilei,

Aos meus irmãos Roberta, Conrado e Catarina,

E, à minha orientadora.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Beto e minha mãe Marilei pelo exemplo de vida, carinho e atenção em todos os momentos em que liguei chorando!!

Minhas tias Cris Cláu e Dri, aos meus tios Nemêncio e Sérgio pelo fã-clube, incentivo, enorme apoio e incontáveis dicas que contribuíram para meu crescimento. À minha avó Anésia pelo colo oferecido quando mais precisei e também minha avó Elvira.

Aos meus “irmãozinhos” Roberta e Conrado e minhas “priminhas” Catarina e Dora, pelo grude, brigas e muitas risadas juntos.

À minha grande amiga Gra que sempre me ouviu, deu bronca, carinho, força, sempre me empurrando para frente e me aturando nos momentos de “picos” de estresse!!

À mulherada da República Sobradinho (moradoras e agregadas), onde sempre encontrei conforto e carinho; Maíra, Jeje e Inna, que mesmo longe pude sempre contar; Josi e Mayra, sempre dispostas a jogarem horas de conversa fora. Aos meus amigos de Monte Azul, Ribeirão e Araraquara.

À Dulce pela orientação, paciência e carinho que teve comigo no decorrer desse trabalho, possibilitando não só a realização deste, como também minha evolução como pessoa.

Aos amigos Geraldo, Ioanis, Renata e Maisa, que muito colaboraram para a realização deste trabalho;

A todos os amigos que eu ganhei no NuBBE, e nos divertimos muito em congressos, viagens, churrascos, pizzadas, Bar Azul e até aulas de forró!!! Dessa turma tenho que destacar a Fêrrrr, Douglas, Amanda, Marcos, Luís, Fernando, Daniara e também Marina, Breno e Dani, que não são do Nubbe, mas estamos sempre juntos.

A toda a galera do laboratório NuBBE III, pós-graduandos e ICs, que transformam um ambiente fechado e saturado de solvente num lugar maravilhoso e de alto astral para se trabalhar, e até fazer faxina!!!!

Aos amigos Nivaldo e Albertinho pela realização dos espectros e ao Marcelo e prof^a. Lourdes por dedicarem seus tempos em emprestar e me ensinar a utilizar o aparelho para análises em HSCCC.

À todos os professores do Departamento de Química Orgânica pelos ensinamentos que colaboraram muito para minha formação profissional.

À FAPESP pela bolsa concedida.

E por último, a todos que torceram por mim para a conquista dessa nova etapa.

AMO TODOS VOCÊS!!

“HÁ METAFÍSICA BASTANTE EM NÃO PENSAR EM NADA”

(Alberto Caeiro)

“Passa uma borboleta por diante de mim

E pela primeira vez eu reparo

Que as borboletas não têm cor nem movimento,

Assim como as flores não têm perfume nem cor.

A cor é que tem cor nas asas da borboleta,

No movimento da borboleta o movimento é que se move,

O perfume é que tem perfume no perfume da flor.

A borboleta é apenas borboleta

E a flor é apenas flor.”

(Alberto Caeiro)

RESUMO

A família Myrtaceae apresenta ampla distribuição, ocorrendo, preferencialmente, nas zonas tropicais e subtropicais, e é considerada uma das mais importantes famílias da flora brasileira em função da larga ocorrência de espécies comestíveis e/ou usadas na medicina tradicional. *Eugenia jambolana* Lam. é conhecida no Brasil como jambolão, e é de grande interesse pelas aplicações medicinais, especialmente de suas folhas e frutos, no tratamento da diabetes.

O trabalho tem como objetivo a investigação fitoquímica das folhas e frutos de *E. jambolana* monitorado por testes para detecção de atividade potencialmente antioxidante, através dos métodos de descoramento do β -caroteno e seqüestro do radical DPPH.

Folhas e frutos da planta em estudo foram coletados na Faculdade de Ciências e Letras – UNESP/CAr. Foi obtido o extrato etanólico das folhas que foi particionado com solventes de diferentes polaridades. Para a obtenção do extrato bruto dos frutos (casca e polpa) foi utilizado MeOH (1% HCl).

O estudo fitoquímico das folhas através de técnicas cromatográficas usuais (cromatografia em coluna, CLAE e cromatografia em contra corrente de alta velocidade) resultou no isolamento de dois flavonóides que apresentaram atividade antioxidante em ensaio com solução de β -caroteno. Os flavonóides isolados foram identificados como 4'-*O*-ramnopiranosídeo-3',5,5',7-tetraidroxi-flavona (**1**) e miricetrina (**2**).

Análises em CLAE-DAD das frações provenientes do extrato bruto das frutas evidenciaram a presença de três antocianinas majoritárias e uma minoritária, que foram detectadas por análises de CLAE-DAD e CLAE-MS, e em comparação com dados da literatura, proporcionou a identificação das mesmas como cianidina-3-xilosídeo, cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-(6''-acetoil)-glicosídeo. As frações FrX-4, FrX-442, FrX-452 e FrX-5 foram avaliadas frente ao radical livre DPPH apresentaram forte atividade seqüestradora de radicais livres, os valores de IC₅₀ foram 0,065, 0,45, 0,038 e 0,044 mg.mL⁻¹ respectivamente. O resultado obtido mostrou que as frações analisadas têm atividade antioxidante bem maior que o padrão rutina, sugerindo que, possivelmente os extratos de *E. jambolana* poderão ser usados como agente quimiopreventivo.

Palavras chaves: jambolão, *Eugenia jambolana*, antioxidante, flavonóides, antocianinas.

ABSTRACT

The Myrtaceae family is widely distributed and occurs, mostly, in tropical and subtropical areas. It is one of the most important families of the Brazilian flora owing to the wide occurrence of edible species and/or species used in the traditional medicine. *Eugenia jambolana* Lam. is known in Brazil as jambolão and is of great interest for its folk medicinal applications, especially of their leaves and fruits, in the treatment of diabetes.

Leaves and fruits of this species have been collected at UNESP (University Campus). The ethanol extract of the leaves was partitioned with organic solvents and the crude extract of the fruits (skin and pulp) was obtained with acidified methanol (1% HCl).

The phytochemical study of the leaves extract using chromatographic techniques (column chromatography, TLC, HPLC and HSCCC) resulted in the isolation of two flavonoids which presented strong antioxidant activity in the TLC assay using β -carotene solution as revealing agent. The isolated flavonoids have been identified as 4'-*O*-ramnopyranoside-3',5',5,7-tetrahydroxy-flavone (**1**) and myricetrin (**2**). Their strong antioxidant activity could be related with the presence of hydroxy groups in ring B which provides increased stability to the radical formed after donation of a hydrogen radical, and also the presence of the α,β -unsaturated carbonyl moiety on C ring..

HPLC-DAD analyses of the fractions obtained from the crude extract of the fruits evidenced the presence of three major anthocyanins and a minor one, which been identified by analyses of HPLC-DAD and HPLC-MS data, and comparison with literature. They were identified as cyanidin-3-xyloside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside and cyanidin-3-(6"-acetyl)-glucoside. Anthocyanin-rich fractions were evaluated for their free radical scavenging activity towards the stable free radical DPPH and evidenced stronger activity when compared to standard compound rutin. These results suggest a possible use of the *E. jambolana* extracts or semipurified fractions as chemopreventive agents.

Keywords: jambolão, *Eugenia jambolana*, antioxidant, flavonoids, anthocyanins.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: PRINCIPAIS VIAS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO E SUAS INTERLIGAÇÕES (SIMÕES <i>ET AL</i> , 1999; PERES, 2007).	18
FIGURA 2: ROTA BIOSINTÉTICA GERAL PARA FLAVONÓIDES E SEUS PRINCIPAIS GRUPOS. (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; SIMÕES <i>ET AL</i> , 1999).	21
FIGURA 3: POSSÍVEIS MUDANÇAS ESTRUTURAIS DAS ANTOCIANINAS EM MEIO AQUOSO EM FUNÇÃO DO PH (TERCI & ROSSI, 2002).	22
FIGURA 4: MECANISMO DE AÇÃO ANTIOXIDANTE POR SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES DOS FLAVONÓIDES (ARORA, 1998).	23
FIGURA 5: FONTES DE ESPÉCIES REATIVAS E MECANISMO DE DEFESA (GUARATINI <i>ET AL</i> , 2007).	25
FIGURA 6: DIFERENTES FONTES DE AGENTES TERAPÊUTICOS DE 1981 A 2006 (NEWMAN & CRAGG, 2007).	30
FIGURA 7: FRUTOS E FOLHAS DE <i>E. jambolana</i> (FOTO: HTTP://WWW.MOTHERHERBS.COM/PCAT-GIFS/PRODUCTS-SMALL/SYZYGIUM-CUMINI1.JPG).	33
FIGURA 8: EXEMPLAR ADULTO DE <i>E. jambolana</i>	34
FIGURA 9: FLORES DE <i>E. jambolana</i> (FOTO DE A. MURRAY, COPYRIGHT 2000, UNIV. FLÓRIDA).	34
FIGURA 10: EXEMPLOS DE FLAVONÓIDES ISOLADOS DE <i>E. jambolana</i> (MAHMOUD <i>ET AL</i> , 2001).	35
FIGURA 11: CCDC DAS FRAÇÕES EBF-1-1 À EBF-1-21, ELUÍDAS NO SISTEMA ACOEt:ÁCIDO ACÉTICO:MeOH:H ₂ O (10:1:1:3) E REVELADAS COM A) ANISALDEÍDO E B) β -CAROTENO.	60
FIGURA 12: CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO EBF-1-14, C-18, H ₂ O:MeCN (9:1), 254nm.	60
FIGURA 13: ESTRUTURAS PARCIAIS PARA A SUBSTÂNCIA 1, ATRIBUÍDAS RESPECTIVAMENTE AOS ANÉIS A, B E C DE UMA FLAVONA.	61
FIGURA 14: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 1.	61
FIGURA 15: ALGUMAS CORRELAÇÕES OBSERVADAS EM EXPERIMENTO gHMBC E COSY DA SUBSTÂNCIA 1.	62
FIGURA 16: CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO EAF-167, H ₂ O:MeCN (85:15), 254nm.	63
FIGURA 7: ESTRUTURAS PARCIAIS PARA A SUBSTÂNCIA 2, ATRIBUÍDAS RESPECTIVAMENTE AOS ANÉIS A, B E C DE UM FLAVONOL.	64

FIGURA 18: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 2.	65
FIGURA 19: ALGUMAS CORRELAÇÕES OBSERVADAS EM EXPERIMENTO gHMBC E COSY DA SUBSTÂNCIA 2.	66
FIGURA 20: CROMATOGRAMA DE CC-7, C-18, GRADIENTE H₂O/MeOH (INICIANDO COM 5%MeOH), C-18, 350NM.	67
FIGURA 21: CROMATOGRAMAS DE CC-2 E CC-3, C-18, GRADIENTE H₂O/MeOH (INICIANDO COM 5%MeOH), C-18, 254NM.	67
FIGURA 22: CROMATOGRAMAS DE CC-10, CC-13 E CC-14, C-18, GRADIENTE H₂O/MeOH (INICIANDO COM 5%MeOH), C-18, 290NM.	68
FIGURA 23: CROMATOGRAMAS DE ALGUMAS FRAÇÕES ORIGINÁRIAS DO FRACIONAMENTO COM HSCCC E DA FRAÇÃO ACOEt-M, GRADIENTE H₂O/MeOH (INICIANDO COM 5%MeOH), C-18, 290NM.	69
FIGURA 24: CROMATOGRAMA DE FRX-4, C-18, GRADIENTE H₂O/MeOH (INICIANDO COM 5%MeOH), 254NM.	70
FIGURA 25: CROMATOGRAMA DE FRX-5, C-18, C-18, GRADIENTE H₂O/MeOH (INICIANDO COM 5%MeOH), 254NM.	71
FIGURA 26: CROMATOGRAMA DE FRX-442, C-18, GRADIENTE H₂O/MeOH (INICIANDO COM 5%MeOH).	71
FIGURA 27: CROMATOGRAMA DE FRX-442 0 A 15MIN 35% B, 16 A 18MIN 35-40% B, 19 A 35MIN 40% B, 35 A 40 MIN 40-100% B, EM COLUNA DE FASE REVERSA (FENIL-HEXILA), ONDE A É ÁGUA (0,5% H₃PO₄) E B É MeOH A 254NM.	72
FIGURA 28: MECANISMO DE REAÇÃO DO RADICAL DPPH COMO ANTIOXIDANTE (DOADOR DE H).	73
FIGURA 29: ATIVIDADE SEQÜESTRADORA DE RADICAIS LIVRES DE FRX-4, FRX-442, FRX-452 E FRX-5 FRENTE AO DPPH.	73
FIGURA 30: PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA FRX-4-2.	75
FIGURA 31: ESQUEMA DE FORMAÇÃO DE M/Z 244 PARA FRX-2.	75
FIGURA 32: PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA FRX-4-3.	76
FIGURA 33: REARRANJO PROPOSTO PARA JUSTIFICAR O ÍON M/Z 149.	76
FIGURA 34: PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA FRX-5.	76
FIGURA 35: CROMATOGRAMA DE FRX-4 (C18, GRAD H₂O/MeOH, 520NM) ANALISADO EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS E OS REFERENTES ESPECTROS DE UV.	77

FIGURA 36: ESPECTRO DE MASSAS DE FRX-4-1.	77
FIGURA 37: ESPECTRO DE MASSAS DE FRX-4-2.	77
FIGURA 38: ESPECTRO DE MASSAS DE FRX-4-3.	77
FIGURA 39: ESPECTRO DE MASSAS DE FRX-4-4.	78
FIGURA 40 ESPECTRO DE RMN ^1H DE EBF-1-14-E EM DMSO- D_6 A 500MHZ.....	87
FIGURA 41: AMPLIAÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H DE EBF-1-14-E EM DMSO- D_6 A 500MHZ	88
FIGURA 42: gHMQC DE EBF-1-14-E EM DMSO- D_6 A 500MHZ.	89
FIGURA 43: gHMBC DE EBF-1-14-E EM DMSO- D_6 A 500MHZ.....	90
FIGURA 44: gCOSY DE EBF-1-14-E EM DMSO- D_6 A 500MHZ.....	91
FIGURA 45: ESPECTRO DE RMN ^1H DE EAF-167R EM DMSO- D_6 A 500MHZ.....	92
FIGURA 46: AMPLIAÇÕES DO ESPECTRO DE RMN ^1H DE EAF-167R EM DMSO- D_6 A 500MHZ.....	93
FIGURA 47: ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE EAF-167R EM DMSO- D_6 A 500MHZ.....	94
FIGURA 48: ESPECTRO DE DEPT DE EAF-167R EM DMSO- D_6 A 500MHZ.....	95
FIGURA 49: ESPECTRO gCOSY DE EAF-167R EM DMSO- D_6 A 500MHZ.....	96
FIGURA 50: ESPECTRO gHMQC DE EAF-167R EM DMSO- D_6 A 500MHZ.....	97
FIGURA 51: ESPECTRO gHMBC DE EAF-167R EM DMSO- D_6 A 500MHZ.....	98
FIGURA 52: ESPECTRO DE RMN ^1H DE FRX-4 EM DMSO- D_6 A 500MHZ.....	99
FIGURA 53: ESPECTRO DE RMN ^1H DE FRX-5 EM DMSO- D_6 A 500MHZ	100
FIGURA 54: ESPECTRO DE RMN ^1H DE CC-3 EM DMSO- D_6 A 200MHZ	101

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1: PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>E. jambolana</i>	42
FLUXOGRAMA 2: PARTIÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>E. jambolana</i>	43
FLUXOGRAMA 3: FRACIONAMENTO DO EXTRATO N-BUTANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>E. jambolana</i>	44
FLUXOGRAMA 4: FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE <i>E. jambolana</i>	47
FLUXOGRAMA 5: PARTIÇÃO DO EXTRATO ACETATO DAS FOLHAS (EACF) DE <i>E. jambolana</i>	50
FLUXOGRAMA 6: PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS DE <i>E. jambolana</i>	52
FLUXOGRAMA 7: PARTIÇÃO DO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS DE <i>E. jambolana</i>	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PRINCIPAIS COMPOSTOS FUNCIONAIS INVESTIGADOS PELA CIÊNCIA DE ACORDO COM A SBAF (WWW.SBAF.ORG.BR/SBAF).....	27
TABELA 2: FRACIONAMENTO DO EXTRATO <i>N</i> -BUTANÓLICO (EBF) DAS FOLHAS DE <i>E. jambolana</i> POR CC EM FASE REVERSA (C-18).	45
TABELA 3: FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO (EAF) DAS FOLHAS DE <i>E. jambolana</i> POR CC EM FASE REVERSA (C-18).	47
TABELA 4: FRACIONAMENTO DE EAF-1-6 POR CC EM FASE REVERSA (C-18).	48
TABELA 5: FRACIONAMENTO DE ACOEt-M POR HSCCC.	51
TABELA 6: FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS (FrX) DE <i>E. jambolana</i> POR CC EM XAD-4.....	54
TABELA 6: FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES FrX-43, FrX-44, FrX-45, FrX-46, FrX-47 POR CC EM XAD-4.	55
TABELA 8: DADOS DE RMN ¹ H E RMN-2D (500 MHz, DMSO- <i>D</i> ₆) DA SUBSTÂNCIA 1	62
TABELA 9: DADOS DE RMN ¹ H E RMN-2D (500 MHz, DMSO- <i>D</i> ₆) DA SUBSTÂNCIA 2	65
TABELA 10: IDENTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS DE <i>E. jambolana</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
aq.	Aquosa
C18	Sílica Gel de Fase Reversa (octadecilsilano)
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlated spectroscopy
<i>d</i>	Dubleto
DAD	Detector em Arranjo de Diodos
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	Difenil-picril-hidrazila
EAcF	Extrato acetato das folhas
EAf	Extrato hidroalcoólico das folhas
EBF	Extrato n-butanólico das folhas
EHF	Extrato hexânico das folhas
EtOH	Ácool etílico
FrX	Extrato dos frutos
gCOSY	Gradient correlated spectroscopy
gHMBC	Gradient heteronuclear multiple bond coherence
gHMQC	Gradient heteron. Multiple quantum coherence
grad.	Gradiente
HCl	Ácido clorídrico
HSCCC	<i>High speed counter curent chromatography</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa/carga

MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MHz/Hz	Megahertz/Hertz
min.	Minuto
NuBBE	Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Eco-Fisiologia de Produtos Naturais
pg.	Página
pH	Potencial Hidrogeniônico
prep.	Preparativo(a)
Rf	Fator de Retenção
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN - 2D	Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional
s	Singleto
sl	Singleto largo
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
t _r	Tempo de Retenção
UV-Vis	Ultra Violeta - Visível
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	METABOLISMO	18
1.2	COMPOSTOS FENÓLICOS	19
1.2.1	FLAVONÓIDES	20
1.2.2	ANTOCIANINAS	22
1.3	ANTIOXIDANTES	23
1.4	RADICAIS LIVRES	24
1.5	ALIMENTO FUNCIONAL	26
1.6	PLANTAS MEDICINAIS	28
1.7	ESPÉCIE EM ESTUDO	32
1.7.1	MYRTACEAE	32
1.7.2	<i>Eugenia jambolana</i> LAM.	33
2	MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1	SOLVENTES E REAGENTES	37
2.2	CONCENTRAÇÃO	37
2.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	37
2.4	CROMATOGRAFIA EM COLUNA	38
2.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	38
2.6	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	39
2.7	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	39
2.8	ESPECTROFOTOMETRIA (LEITOR DE MICROPLACAS)	39
2.9	CROMATOGRAFIA EM CONTRA CORRENTE DE ALTA VELOCIDADE (HSCCC)	39
2.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR DESCORAMENTO DE SOLUÇÃO DE β-CAROTENO	40
2.11	METODOLOGIA DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES	40
2.12	COLETA E CLASSIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	41
2.13	PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS	41

2.14	PARTIÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS	42
2.15	FRACIONAMENTO DO EXTRATO N-BUTANÓLICO DAS FOLHAS (EBF)	44
2.16	FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS (EAF)	46
2.17	FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DAS FOLHAS (EACF).	49
2.18	PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS	52
2.19	FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS	53
2.20	FRACIONAMENTO DE FrX-4	55
2.21	FRACIONAMENTO DE FrX-442	56
2.22	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQÜESTRADORA DE RADICAL LIVRE POR REDUÇÃO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILA (DPPH) EM TESTE ESPECTROFOTOMÉTRICO	57
2.23	ANÁLISE DA FRAÇÃO FrX-4 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	58
3	<u>RESULTADOS E DISCUSSÕES</u>	59
3.1	PARTIÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>E. jambolana</i>	59
3.2	FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS DE <i>E. jambolana</i> .	70
4	<u>CONCLUSÕES</u>	79
5	<u>REFERÊNCIAS</u>	81
5.1	SITES CONSULTADOS	85
	<u>ANEXO A</u>	86
	<u>ANEXO B</u>	102

1 INTRODUÇÃO

O estudo químico de organismos vivos, como plantas e organismos marinhos, vem crescendo a cada dia, visto a importância das substâncias encontradas na descoberta de novos agentes terapêuticos para o homem.

Há muito tempo os produtos naturais são utilizados na cura de doenças do corpo. Cerca de 400 anos antes de Cristo, Aristóteles, o pai da medicina, já dizia “deixe o alimento ser sua medicina e a medicina ser seu alimento”.

Os alquimistas, benzedores, curandeiros e xamãs são conhecedores do poder curador das plantas encontradas na natureza, essa sabedoria foi conquistada através da herança do conhecimento e da observação do comportamento de animais e, claro, sempre preservando o caráter mágico, mítico e ritualístico. Os alquimistas tinham três objetivos principais: transformar qualquer metal em ouro, obter o elixir da longa vida e criar o homúnculo (vida humana artificial). O elixir da longa vida seria um remédio universal, que curaria todos os males, além de proporcionar a longevidade a quem o tomasse.

A veracidade das propriedades terapêuticas dos vegetais pode ser comprovada através de estudos realizados em laboratórios, com técnicas que envolvem o isolamento de substâncias e testes para a avaliação do potencial ativo dos extratos ou substâncias.

1.1 Metabolismo

Num organismo vivo ocorre um conjunto de reações químicas no interior das células denominado **metabolismo**, que, nos vegetais, pode se dividir entre primário e secundário, dependendo da função a ele designada. Metabolismo primário é o conjunto de processos que desempenham as funções essenciais, como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Já no metabolismo secundário são sintetizadas substâncias que a princípio, não possuem função essencial. Porém, são essas substâncias as responsáveis pela proteção do vegetal de diversos fatores. Com isso, o metabolismo secundário acaba exercendo um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, ou seja, representa uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, por tanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais. (PERES, 2007; DI STASI, 1996; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Dentre os fatores ambientais que influenciam o conteúdo dos metabólitos secundários pode-se citar a sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes (macro e micronutrientes), altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. Assim sendo, a constância de concentrações de metabólitos secundários praticamente não existe. Em plantas medicinais, outros fatores como condições de coleta, estabilização e estocagem também podem ter grande influência (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides, suas vias biossintéticas são mostradas na figura 1.

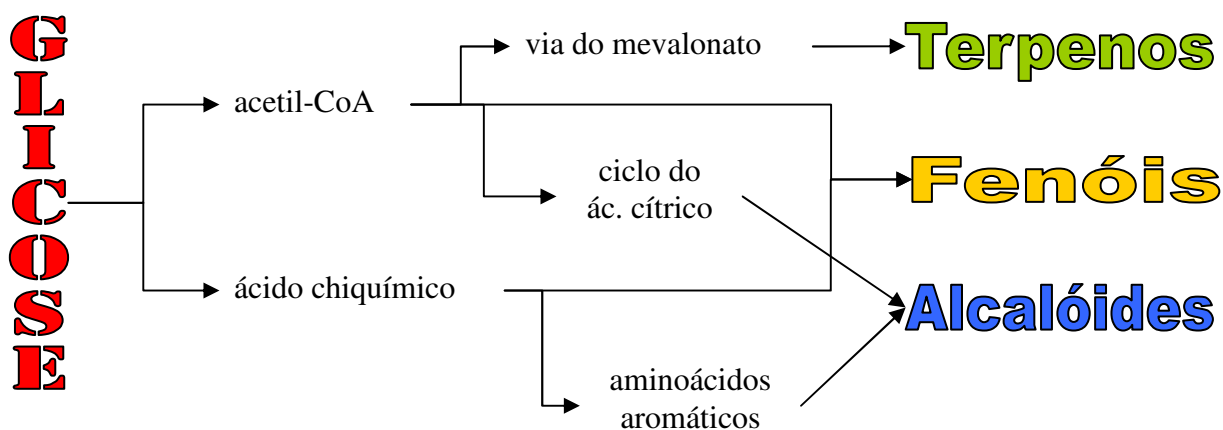


Figura 1: Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações (SIMÕES *et al*, 1999; PERES, 2007).

1.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico. São responsáveis pelo sabor, odor e coloração de diversos vegetais. Essa classe de substâncias é responsável pela proteção das plantas contra os raios ultravioletas, insetos, fungos, vírus e bactérias. A proteção contra a fotodestruição proporcionada por esses compostos é devida às suas propriedades de absorver ou dissipar a energia solar, principalmente devido à sua extensão de conjugação. Quimicamente dizendo, são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (PERES, 2007; GOBBONETO & LOPES, 2007).

Para a formação biossintética dos compostos fenólicos ocorre a combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste. O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose (SIMÕES *et al*, 1999).

Há vários relatos na literatura apontando os compostos fenólicos como substâncias potencialmente ativas frente a testes químicos e biológicos indicando que essa classe de substâncias é totalmente promissora na descoberta de novos fármacos. Eles são geralmente encontrados e ingeridos pelo homem através de alimentos originários de plantas.

Em sua composição, o vinho tinto possui misturas de polifenóis, principalmente antocianinas e flavan-3-óis, além de outros fenólicos como o resveratrol e o ácido gálico. A espécie encontrada em maior quantidade é o flavan-3-ol, em suas formas oligoméricas e poliméricas (procianidinas) que representam 25-50% do total de fenólicos constituintes (CORDER *et al*, 2006). Corder e colaboradores (2006), em seu trabalho, identificaram as procianidinas, que são taninos condensados, como sendo o principal polifenol vasoativo presente nos vinhos tintos, através da avaliação da dilatação dos vasos sanguíneos e a conseqüente supressão da síntese da endotelina-1, um peptídeo capaz de restringir os vasos sanguíneos.

Flavonóides, taninos, antocianinas e outros constituintes fenólicos possuem potencial antioxidante, impedindo o efeito danoso dos radicais livres. Visando a melhoria e sustentação da saúde, é de vital importância o consumo dessas fontes naturais de substâncias para nosso organismo, pois os fenólicos contribuem para a manutenção do equilíbrio pró e antioxidante de sistemas biológicos, desempenhando função essencial na prevenção de várias doenças.

1.2.1 Flavonóides

Os flavonóides foram descobertos em 1930 pelo prêmio Nobel Szent-György, que extraiu a citrina da casca do limão. Esta classe de compostos participa na fase dependente de luz da fotossíntese, durante a qual catalisam o transporte de elétrons. Estes desempenham um papel fundamental no organismo humano atuando na proteção contra agentes oxidantes como, por exemplo, os raios ultravioleta, a poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, entre outros, e atuam também como agentes terapêuticos num elevado número de patologias (SILVA, M. B. S., 2007).

Possuem uma unidade básica de 15 carbonos, que inclui dois anéis aromáticos hidroxilados, ligados entre si por um fragmento de três carbonos, sua rota biossintética pode ser observada na figura 2 (pg. 21). Dependendo da substituição e do nível de oxidação do anel C, os flavonóides podem ser divididos em 14 classes, sendo os que se incluem na dieta humana divididos essencialmente em seis grupos, flavanóis, flavonóis, flavonas, antocianidinas, isoflavonóides e flavanonas, dentro da mesma classe, diferem-se na substituição dos anéis A e B (DI STASI, 1996; SILVA, M. B. S., 2007).

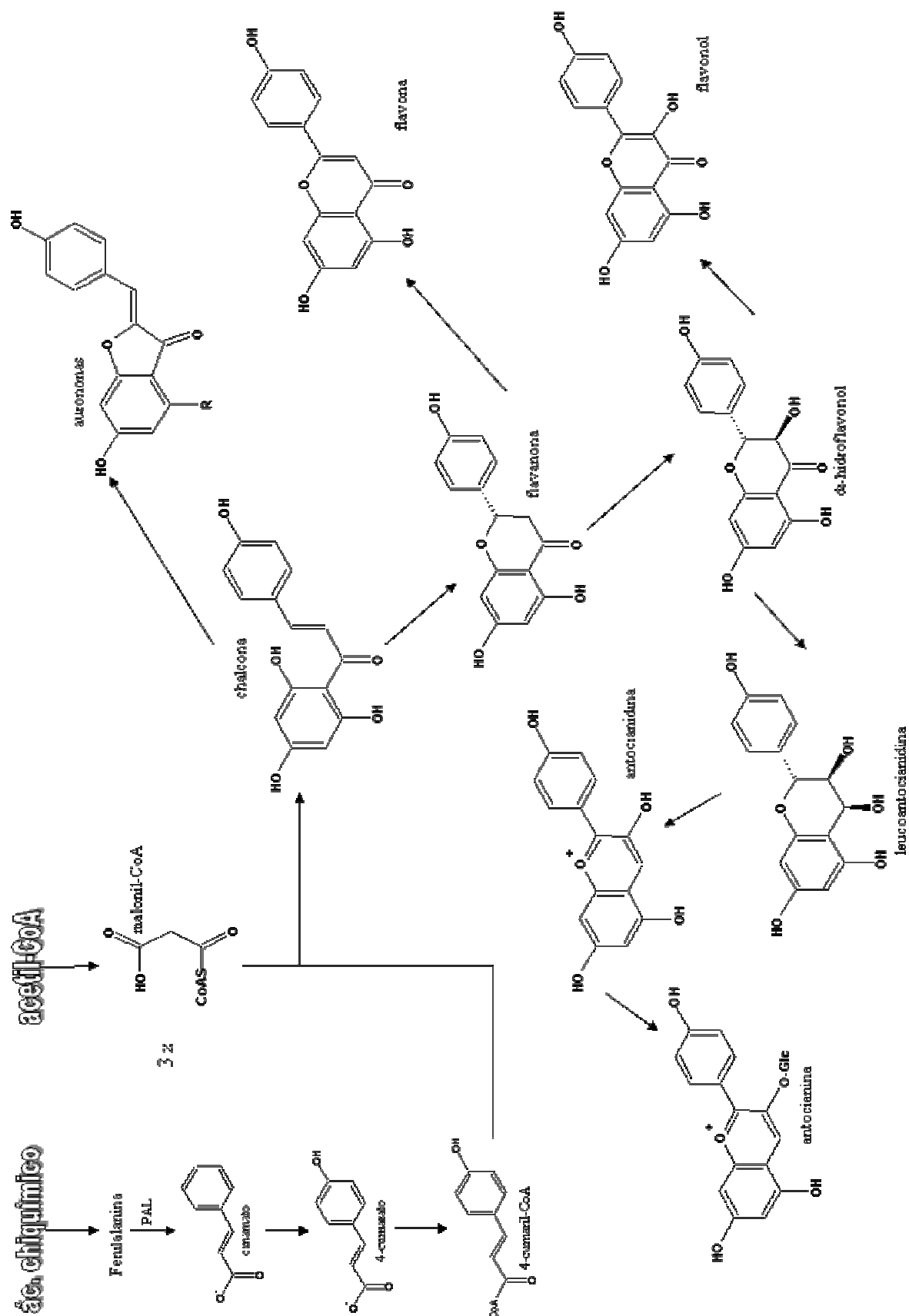


Figura 2: Rota biossintética geral para flavonóides e seus principais grupos. (ANDERSEN & MARKHAM, 2006; SIMÕES *et al*, 1999).

1.2.2 Antocianinas

As antocianinas são compostos flavonoídicos, responsáveis pela cor evidenciada em algumas frutas, vegetais, cereais e flores, tal como o vermelho, roxo e azul. É de grande interesse para a indústria, pois são bons corantes para os alimentos, em plantas estão presentes, em grande maioria, na forma de compostos glicosilados (HOU *et al*, 2004). Possuem uma carga positiva no anel central da estrutura, a $\text{pH} < 3$, o que lhes confere, junto com o número e posição de grupos hidroxilas presentes, a coloração (figura 3, pg. 22). Possuem forte atividade antioxidante e efeitos inibitórios no desenvolvimento de algumas linhagens de células cancerígenas. Estudos de atividade-estrutura mostram que a atividade é potencializada devida à presença dos grupos hidroxila no anel B (HOU *et al*, 2004).

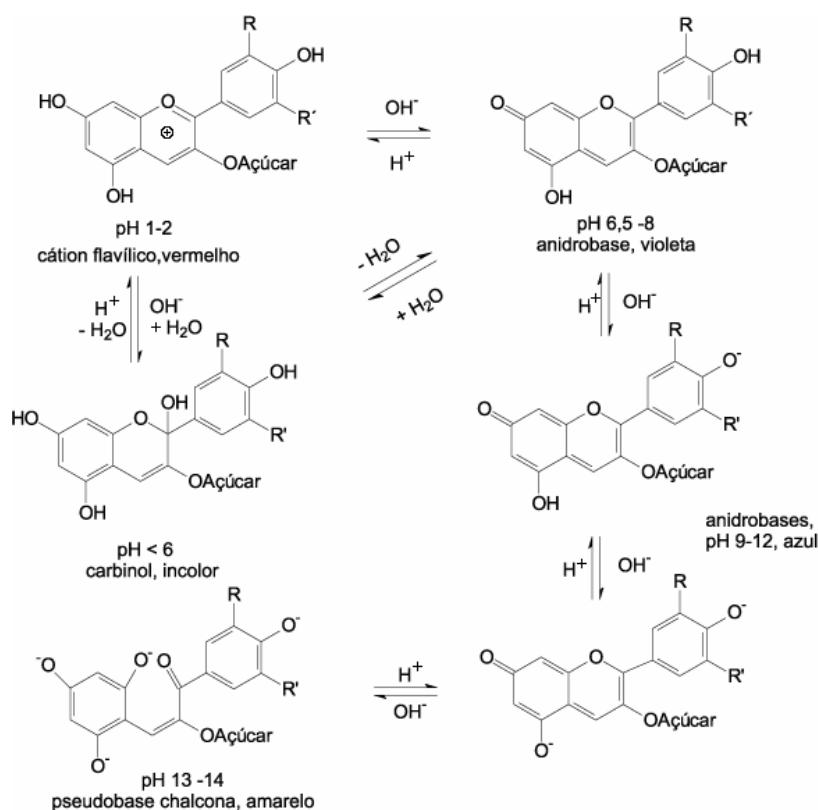


Figura 3: Possíveis mudanças estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH (TERCI & ROSSI, 2002).

1.3 Antioxidantes

Substâncias antioxidantes são necessárias para proteger o organismo contra o excesso de radicais livres, ou seja, contra o estresse oxidativo. Existem as enzimas (antioxidantes enzimáticos) que combatem esses radicais, mas também há compostos (antioxidantes não enzimáticos), geralmente ingeridos através dos alimentos, que também combatem esses radicais numa reação de óxido-redução, na qual o composto doa um hidrogênio para o radical e passa a ser a substância radicalar, porém, de maior estabilidade.

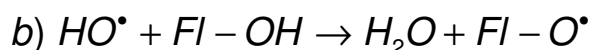
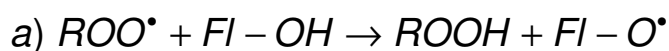


Figura 4: Mecanismo de ação antioxidante por seqüestro de radicais livres dos flavonóides (ARORA, 1998).

a) Espécie reativa de oxigênio (ERO);

b) Radical hidroxila.

1.4 Radicais Livres

Radicaais livres são espécies que contém elétrons desemparelhados. Podem-se citar como exemplo as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). Esses são seqüestrados e destruídos por enzimas específicas, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, protegendo os sistemas biológicos do estresse oxidativo. A superprodução de radicaais livres, junto com avitaminoses A, C e E e um nível reduzido das enzimas citadas, contribui com o estresse oxidativo, pois esses radicaais podem induzir dano oxidativo em biomoléculas como carboidratos, proteínas, lipídios e DNA, acelerando assim o envelhecimento cutâneo e de membranas lipídicas, e contribuindo para a indução de câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamações (BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

As EROs e ERNs participam da iniciação e progressão das reações em cadeia envolvendo a formação de espécies radicalares. A reatividade destes compostos com biomoléculas é variável, sendo alguns estáveis e pouco reativos, como por exemplo, o radical superóxido, $O_2^{\bullet-}$, e outros altamente reativos, apresentando velocidade de reação próxima à constante de colisão com moléculas-alvo, sendo o radical hidroxila, $HO^{\bullet}$, o principal exemplo (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Alimentos ricos em substâncias antioxidantes exercem uma função essencial na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas, incluindo mal de Parkinson e Alzheimer, assim como inflamações e problemas causados por envelhecimento cutâneo, pois as substâncias antioxidantes combatem os radicaais livres (BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005). Uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicaais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento (SOUSA *et al*, 2007).

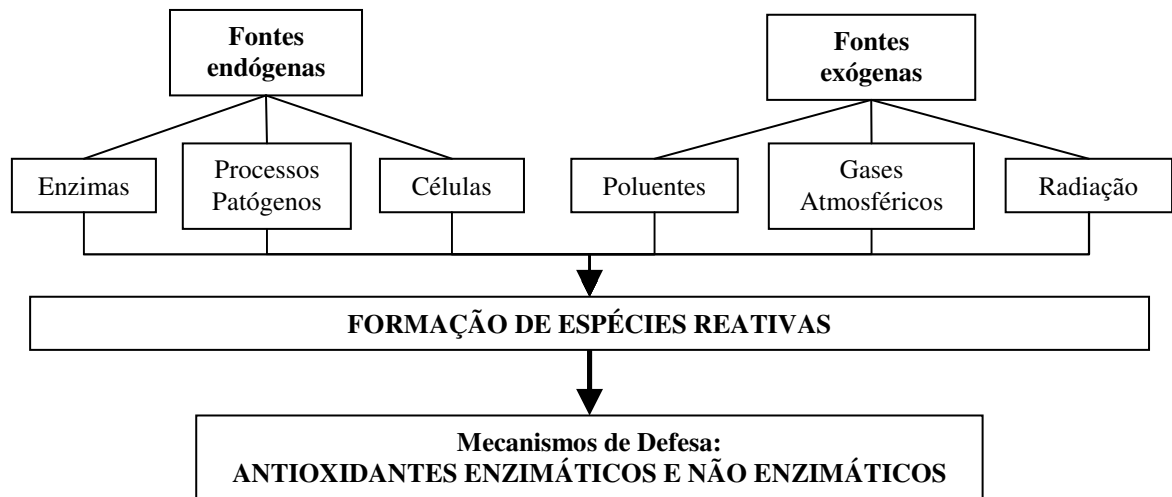


Figura 5: Fontes de espécies reativas e mecanismo de defesa (GUARATINI *et al*, 2007).

1.5 Alimento Funcional

É muito importante estreitar a relação entre alimentação e saúde. Há muito tempo acredita-se que o consumo de frutas e hortaliças auxilia na prevenção de diversas doenças, por isso, recomenda-se uma “alimentação ideal”, que deve conter doses balanceadas de proteínas, carboidratos, gorduras, fibras, vitaminas, minerais e água; é sabido também que a urbanização, a industrialização e a globalização exercem uma grande influência sobre o estilo de vida, a dieta e, conseqüentemente, o estado nutricional da população (CARVALHO *et al*, 2006).

O interesse nos alimentos específicos que podem prevenir, ou curar algum tipo de doença resultou no uso do termo “alimentos funcionais”. Este termo foi introduzido no Japão na década de 80 e até hoje não existe uma definição universalmente aceita, mas pode ser entendido como um alimento ou um componente do alimento que proporciona um benefício à saúde além da nutrição básica. Em outras palavras, são os alimentos extras à nutrição básica, que beneficiam uma ou mais funções orgânicas, contribuindo para melhorar o estado de saúde e bem-estar e/ou reduzir o risco de doenças, ou seja, fornece benefícios fisiológicos adicionais ao consumidor. Vale lembrar que nenhum alimento isolado deve ser ingerido em detrimento de outros para prevenir qualquer doença específica. O alimento funcional não deve ser utilizado para o tratamento de doenças nem cuidados paliativos (CARVALHO *et al*, 2006; JONES, 2002; www.ift.org/cms).

Segundo a Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais (SBAF), o mercado de alimentos funcionais tem crescido muito nos últimos anos e em 2000, no mundo todo, apresentava um potencial de vendas de cerca de US\$ 70 bilhões/ano. No Japão, o primeiro país que formulou um processo de regulação específico para os alimentos funcionais, conhecidos como Alimentos para Uso Específico em Saúde (FOSHU) já existem cerca de 200 tipos diferentes de alimentos funcionais. Além do mercado Japonês, o de países europeus e o norte americano a cada dia apresentam novidades nesse segmento. No Brasil, embora o mercado esteja em crescimento, ainda é tímido, ocupando uma posição defasada em relação a países como Japão, EUA e Europeus. A SBAF classifica as seguintes substâncias como sendo os principais compostos funcionais investigados pela ciência (tabela 1).

Tabela 1: Principais compostos funcionais investigados pela ciência de acordo com a SBAF (www.sbafe.org.br/SBAF).

COMPONENTES ATIVOS	PROPRIEDADES BENÉFICAS	EXEMPLOS DE ALIMENTOS FUNCIONAIS QUE CONTÉM O COMPONENTE
Isoflavonas	Ação estrogênica (reduz sintomas menopausa) e anti-câncer	Soja e derivados
Proteínas de soja	Redução dos níveis de colesterol	Soja e derivados
Ácidos graxos ômega-3 (EPA e DHA)	Redução do LDL-colesterol; ação antiinflamatória. Indispensável para o desenvolvimento do cérebro e retina de recém nascidos	Peixes marinhos como sardinha, salmão, atum, anchova, arenque, etc
Acido α -linolênico	Estimula o sistema imunológico e tem ação antiinflamatória	Óleos de linhaça, colza, soja; nozes e amêndoas
Catequinas	Reduzem a incidência de certos tipos de câncer, reduzem o colesterol e estimulam o sistema imunológico.	Chá verde, cerejas, amoras, framboesas, mirtilo, uva roxa, vinho tinto
Licopeno	Antioxidante, reduz níveis de colesterol e o risco de certos tipos de câncer como de próstata	Tomate e derivados, goiaba vermelha, pimentão vermelho, melancia
Luteína e Zeaxantina	Antioxidantes; protegem contra degeneração macular	Folhas verdes (luteína)Pequi e milho (zeaxantina)
Indóis e Isotiocianatos	Indutores de enzimas protetoras contra o câncer, principalmente de mama	Couve flor, repolho, brócolis, couve de bruxelas, rabanete, mostarda
Flavonóides	Atividade anti-câncer, vasodilatadora, antiinflamatória e antioxidante	Soja, frutas cítricas, tomate, pimentão, alcachofra, cereja, salsa, etc
Fibras solúveis e insolúveis	Reduz risco de câncer de cólon, melhora funcionamento intestinal. As solúveis podem ajudar no controle da glicemia e no tratamento da obesidade, pois dão maior saciedade.	Cereais integrais como aveia, centeio, cevada, farelo de trigo, etc, leguminosas como soja, feijão, ervilha, etc, hortaliças com talos e frutas com casca
Prebióticos - frutooligosacarídeos, inulina	Ativam a microflora intestinal, favorecendo o bom funcionamento do intestino	Extraídos de vegetais como raiz de chicória e batata yacon
Sulfetos alílicos (alil sulfetos)	Reduzem colesterol, pressão sanguínea, melhoram o sistema imunológico e reduzem risco de câncer gástrico	Alho e cebola
Lignan	Inibição de tumores hormônio-dependentes	Linhaça, noz moscada
Tanino	Antioxidante, anti-séptico, vaso-constritor	Maçã, sorgo, manjeriço, manjerona, sálvia, uva, caju, soja, etc
Estanois e esteróis vegetais	Reduzem risco de doenças cardiovasculares	Extraídos de óleos vegetais como soja e de madeiras
Probióticos - Bífidobactérias e Lactobacilos	Favorecem as funções gastrointestinais, reduzindo o risco de constipação e câncer de cólon	Leites fermentados, Iogurtes e outros produtos lácteos fermentados

Há a discussão a respeito dos alimentos funcionais, pois nestes existe a presença de produtos naturais com atividade farmacológica. A eficácia e segurança desses alimentos deve ser assegurada por estudos científicos. Os alimentos funcionais não curam doenças, ao contrário dos remédios. Eles apresentam componentes ativos capazes de reduzir o risco de certas doenças.

1.6 Plantas Medicinais

Vegetais que possuem atividade farmacológica são chamados de plantas medicinais. A definição da Organização Mundial de Saúde (OMS) para plantas medicinais diz que “são aquelas que têm uma história de uso tradicional como agente terapêutico”.

A OMS reconhece que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam-se de práticas tradicionais nos cuidados básicos de saúde. Deste universo, 85% utilizam plantas ou preparados. Nesse sentido, a OMS recomenda a difusão mundial dos conhecimentos necessários ao uso racional das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos (www.portal.saude.gov.br).

Em sua estratégia global sobre a medicina tradicional e a medicina complementar e alternativa para os anos de 2002 a 2005, a OMS reforçou o compromisso de estimular o desenvolvimento de políticas públicas com o objetivo de inseri-las no sistema oficial de saúde dos seus 191 estados-membros. E o Brasil, com sua diversidade genética vegetal estimada em 55 mil espécies catalogadas, possui ampla tradição de uso das plantas medicinais vinculado ao conhecimento popular e transmitido por gerações, além de tecnologia e, principalmente recursos humanos especializados para validar cientificamente este conhecimento (dados obtidos do site do Ministério da Saúde).

Estimativas do governo brasileiro dizem que 60% da população não têm acesso a qualquer tipo de medicamento convencional, utilizando apenas recursos terapêuticos naturais. Pensando nesse fato, a Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo criou o **Programa Estadual de Fitoterápicos, Plantas Medicinais e Aromáticas**, que tem como objetivo propor, elaborar e promover a implantação de políticas e diretrizes para a área de fitoterápicos, plantas medicinais e aromáticas no âmbito das instituições do Governo Estadual. Em outros estados, como Rio de Janeiro, Amapá e Mato Grosso já existe o Programa Estadual de Fitoterápicos regulamentados pelo poder executivo e em plena atividade.

O Brasil apresenta a mais rica biodiversidade do planeta, com mais de 20% do número total de espécies (considerando fauna e flora), tornando-se o principal país dentre os chamados países megadiversos. Possui várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido no norte, o semi-árido no nordeste e áreas temperadas no sul. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas formando zonas biogeográficas distintas, com cinco principais biomas: a maior floresta tropical úmida (Floresta Amazônica), com mais de 30 mil espécies vegetais, e a maior planície inundável (o Pantanal) do mundo, além do Cerrado

(savanas e bosques), da Caatinga (florestas semi-áridas) e da Mata Atlântica (floresta tropical pluvial). O Brasil possui uma costa marinha de 3,5 milhões km² com uma variedade de ecossistemas que incluem recifes de corais, dunas, manguezais, lagoas, estuários e pântanos. Com isso, os brasileiros poderiam se beneficiar mais desta situação. Porém, sabemos muito pouco sobre ela, uma vez que para seu conhecimento é importante a integração dos estudos de morfologia e composição química das espécies e, sobre esta última, temos ainda muito a desvendar (www.mme.gov.br; GIORGETTI *et al*, 2007).

Além dessa rica biodiversidade, o Brasil conta com uma grande herança cultural, com a presença de várias etnias que conhecem bem o poder “curador” das plantas, como os índios e negros, sem contar, é claro, os europeus, colonizadores das Américas.

Atualmente, grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias e lojas de produtos naturais, que em sua grande maioria não possuem certificado de qualidade, com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Mais atenção deveria ser dada a este fato, pois a toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública, além de muitos cuidados relevantes, como identificação errônea da planta, possibilidades de adulteração, interações entre plantas medicinais e medicamentos alopáticos, efeitos de superdosagens, reações alérgicas ou tóxicas (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2005).

A diferença entre planta medicinal e fitoterápico está na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2005). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) “fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais. Eles são obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros). Os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população. A eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos”.

O estudo de plantas medicinais envolve o isolamento de substâncias ativas, e tem proporcionado inúmeras descobertas importantes para a humanidade e seu desenvolvimento conta com um número cada vez maior de profissionais, estabelecendo um caráter multi e interdisciplinar para as pesquisas que visam referendar seu uso. Técnicas de descoberta de fármacos tem sido aplicadas para a padronização da medicina natural, principalmente para a elucidação analítica dos compostos. (BALUNAS & KINGHORN, 2005; SILVA, 2000).

As plantas são fontes de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. O número de novas substâncias ativas, também conhecidas com Novas Entidades Químicas (NCEs), considerando as substâncias biológicas e as vacinas, no ano de 2005, chega a um valor de 54, dos quais, 24% são de origem natural ou derivados de produtos naturais e 37% são biológicas ou vacinas. O campo de produtos naturais está produzindo ou envolvido em aproximadamente 50% de todas as NCEs entre os anos de 2000-2006 (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Produtos naturais proporcionam um ponto de início para novas substâncias sintéticas, com diversas estruturas e com vários estereocentros que podem ser trocados sinteticamente. Fármacos derivados de plantas medicinais podem servir não somente como novas drogas por si só, mas também como modelo para novas drogas otimizadas pela química medicinal e sintética (BALUNAS & KINGHORN, 2005).

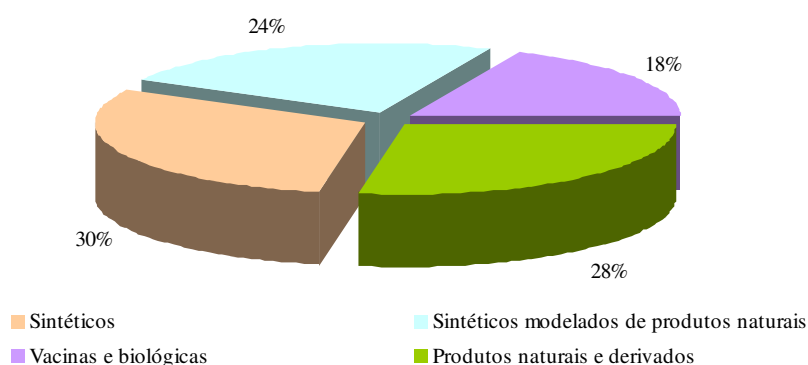


Figura 6: Diferentes fontes de agentes terapêuticos de 1981 a 2006 (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Segundo Newman & Cragg, (2007), as maiores áreas que têm sido investigadas pela indústria farmacêutica são as relacionadas com as doenças infecciosas, o câncer, antihipertensivos e antiinflamatórios. Na área antibacteriana, a grande maioria das NCEs são de origem naturais (10,2%), derivadas de produtos naturais (65,3%) e sintéticas porém modeladas a partir de produtos naturais (1%), ou seja, 76,5% do total de fármacos. Com as drogas anticancer, entre as não-biológicas, estão divididas entre produtos naturais (11,1%), derivados de produtos naturais (30,9%), sintéticas (22,2%) e modeladas a partir de produtos naturais (35,8%), ou seja, apenas 22,2% do total são totalmente sintéticas.

O avanço tecnológico propiciou rapidamente o surgimento de novos medicamentos. Entre os anos de 2000 e 2003 houve uma constante introdução de novos produtos naturais e medicamentos derivados destes nos EUA, Europa e Japão. Um total de 15 novos fármacos foi

lançado, os quais incluem os antiinflamatórios arteether, a caspofungina (derivado de ecnecandina), a droga galantamina (inibidor de acetilcolinesterase), o antibacteriano daptomicina, entre outros (BUTLER, 2004).

O processo de estudo de plantas medicinais começa, tipicamente, com um botânico, etnobotânico, etnofarmacologista ou ecólogo, que coleta e identifica a planta de interesse. A partir daí, o fitoquímico prepara extratos dos materiais da planta e começa o processo de isolamento e caracterização das substâncias ativas, caracterizando uma área de estudo multidisciplinar. A farmacognosia engloba todos esses campos dentro de uma distinta ciência interdisciplinar envolvendo um amplo estudo dos produtos naturais de várias fontes, incluindo plantas, bactérias, fungos e organismos marinhos. Farmacognosia pode ser definida como parte da farmacologia que trata das drogas ou substâncias medicinais antes de serem submetidas a qualquer manipulação (BALUNAS & KINGHORN, 2005; SIMÕES *et al*, 1999; WIKIPÉDIA).

Visto a importância dos produtos naturais e suas ações farmacológicas para o desenvolvimento de novos fármacos, o estudo de plantas medicinais se torna totalmente necessário no âmbito nacional. Com isso, devem-se selecionar espécies tanto de origem selvagem quanto de origem cultivada.

1.7 Espécie em estudo

1.7.1 Myrtaceae

A família Myrtaceae apresenta ampla distribuição, ocorrendo, preferencialmente, nas zonas tropicais e subtropicais, com número de espécies estimado entre 3.500 e 5.800, pertencentes à cerca de 100 gêneros. É considerada uma das mais importantes famílias da flora brasileira, com 23 gêneros e cerca de 820 espécies nativas ou subespontâneas. Os gêneros de maior riqueza são: *Eugenia* (108 spp.), *Myrcia* (57 spp.), *Marlierea* (27 spp.) e *Gomidesia* (25 spp.) (LIMA & GUEDES-BRUNI, 2004).

As mirtáceas têm sido organizadas tradicionalmente em duas subfamílias, Leptospermoideae e Myrtoideae, esta última incluindo todas as mirtáceas americanas, exceto o gênero monotípico *Tepualia*. Atualmente, a nova classificação infra-família reconhece duas subfamílias, Myrtoideae e Psiloxylloideae, e 17 tribos. Todas as mirtáceas brasileiras estão incluídas na Tribo Myrteae (GRESSLER *et al*, 2006).

A grande diversidade de espécies de Myrtaceae também se reflete nas restingas brasileiras sendo a família mais representativa nas restingas do Estado do Rio de Janeiro e *Eugenia*, o gênero com maior número de espécies. Na restinga de Grumari (Zona Oeste do Rio de Janeiro), Myrtaceae é representada por dois gêneros, na qual *Eugenia* é o mais representativo, com sete espécies (SILVA, A. L. G., 2007).

As mirtáceas brasileiras geralmente não produzem madeiras valiosas, restringindo-se ao fornecimento de lenha, à utilização em pequenas peças ou objetos e outras formas de uso local. Por outro lado, há numerosas espécies frutíferas, algumas exploradas comercialmente (e.g. a goiabeira, *Psidium guajava* L., a jabuticabeira, *Myrciaria cauliflora* Berg, e a pitangueira, *Eugenia uniflora* L.). Essas espécies representam apenas uma pequena fração do grande potencial econômico da família, tendo em vista o grande número de frutos comestíveis produzidos por espécies não comerciais (GRESSLER *et al*, 2006).

1.7.2 *Eugenia jambolana* Lam.

O gênero *Eugenia* é usado como antiinflamatório, analgésico, antipirético, antifúngico e no tratamento de úlceras pépticas, além de muitas espécies estarem relatadas como plantas ricas em polifenóis gálicos e derivados de ácidos elágicos, taninos e flavonóides glicosídeos. (MAHMOUD *et al*, 2001).

Eugenia jambolana Lam. (syns. *Syzygium cumini* Skeels *S. jambolanum* DC., *E. cumini* Druce, *E. djouat* Perr., *Myrtus cumini* L., *Calyptranthes jambolana* Willd.) é de grande interesse pelas aplicações medicinais de seu fruto (figura 7, pg. 33). No Brasil é conhecida como jambolão, jamelão, jalão ou jambol (MORTON, 1987) e, por seu fruto ser semelhante ao formato, cor e tamanho da azeitona, também pode assim ser chamado. (www.bibvirt.futuro.usp.br)



Figura 7: Frutos e folhas de *E. jambolana* (foto: <http://www.motherherbs.com/pcat-gifs/products-small/syzygium-cumini1.jpg>).

É uma árvore originária da Índia, chegando a 10 m de altura, com copa ampla e muito ramificada (figura 8, pg. 34). Multiplica-se por sementes, desenvolve-se bem em qualquer tipo de solo, porém permeáveis e profundos. Prefere climas quentes e úmidos, principalmente de regiões litorâneas. Suas flores são de coloração creme ou brancas; com pétalas arredondadas caracteristicamente em forma de capuz, possuem bastante néctar, o qual atrai as abelhas para a produção de mel (figura 9, pg 34). Frutifica de janeiro a maio e seus frutos maduros são empregadas para fazer conservas, suco e geléias enquanto o suco das frutas verdes é usado para preparar um vinagre que é considerado um medicamento estomacal, carminativo e diurético. (BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005; www.bibvirt.futuro.usp.br/).



Figura 8: Exemplar adulto de *E. jambolana*.

As folhas são utilizadas como alimento para gado e bicho da seda na Índia e a extração do óleo essencial é utilizado na fabricação de perfumes. A casca da árvore produz tintas marrons de várias tonalidades e bastante duráveis, elas são ricas em taninos e contém as enzimas esterase e galoil-carboxilase, as quais se presumem serem ativas na biossíntese de taninos (MORTON, 1987).



Figura 9: Flores de *E. jambolana* (foto de A. Murray, Copyright 2000, Univ. Flórida).

Folhas da *E. jambolana* são ricas em flavonóides glicosilados, como mostrado no trabalho de Mahmoud e colaboradores (2001) (figura 10, pg. 35), no qual foram isolados e identificados 17 polifenóis, incluindo flavonóides, taninos elágicos e ácidos fenólicos.

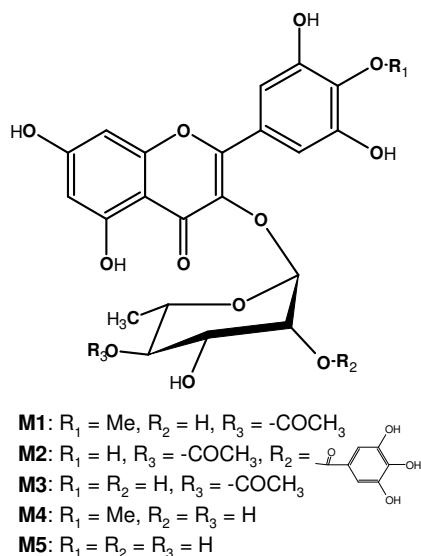


Figura 10: Exemplos de flavonóides isolados de *E. jambolana* (MAHMOUD *et al*, 2001).

Os frutos contêm vitamina C, ácido gálico, taninos e antocianinas;; as frutas maduras. Extrato de semente que é tradicionalmente usado em diabetes tem ação hipoglicêmica e propriedades antioxidantes em ratos diabéticos induzidos por aloxana, possivelmente devido à presença de taninos. (BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005)

Em vários estudos das sementes e frutos desta espécie, com vários métodos para preparar o remédio e administrá-lo em animais normais e diabéticos, foram observados os seguintes efeitos: redução de glicemia e glicosuria, atividade antioxidante e restauração parcial de fígado alterado e glicogênio contido na estrutura muscular e nos níveis de glucoquinase, hexoquinase, glicose-6-fosfato e fosfofrutoquinase do fígado. (PEPATO *et al*, 2005).

Administração do extrato etanólico das amêndoas das sementes *E. jambolana* na dosagem de 100 mg/kg.dia durante 30 dias resultou em uma diminuição nos níveis de glicose de sangue, uréia e açúcar da urina em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. (RAVI *et al*, 2003)

O extrato etanólico das cascas de *E. jambolana* foi analisado para atividade antiinflamatória em animais, não sendo evidenciado qualquer sinal de toxicidade até uma dose de 10,125 g/kg, p.o. em ratos, e apresentando uma ação antiinflamatória potente contra fases diferentes de inflamação, sem qualquer efeito colateral em mucosa gástrica (MURUGANANDAN *et al*, 2001).

Visto toda a discussão da importância em trabalhar com plantas medicinais visando a descoberta de novos princípios bioativos, o presente trabalho tem como propósito o estudo

fitoquímico das folhas e frutos de *E. jambolana* Lam. a fim de isolar e determinar a estrutura química das substâncias presentes, através do fracionamento cromatográfico monitorado por testes para detecção de atividade potencialmente antioxidante.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Solventes e Reagentes

Os solventes utilizados para CLAE foram de grau HPLC das marcas *JT. Baker* e *Mallinckrodt*. Para outros fins, foram utilizados solventes *Merck* e *Synth* de qualidade p.a., após prévio tratamento. Para experimentos de RMN, foram utilizados os solventes deuterados CDCl_3 e $\text{DMSO-}d_6$ produzidos por *Merck*, *Aldrich* ou *Fluka*.

Para as revelações das placas cromatográficas foram utilizados reagentes das marcas *Synth*, *Vetec* e *Sigma*. Q

2.2 Concentração

As concentrações das soluções foram efetuadas em rotaevaporador da marca *Büchi* (modelo R-114 e banho-maria B-480) sob pressão reduzida a temperatura de 40°C.

2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Na análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), as placas foram empregadas dois tipos de placas cromatográficas: uma preparada no laboratório e outra adquirida. Na preparação das placas foi aplicado uma suspensão de sílica gel 60G (*Merck*) em água destilada, na proporção de 1:2 (p/v) sobre placas de vidro, obtendo-se 0,25 mm de espessura através da utilização de espalhador *Quickfitt*. Após a preparação das placas, estas foram deixadas em repouso por cerca de seis horas à temperatura ambiente e depois ativadas em estufa a 120°C por cerca de 30 minutos. As placas adquiridas foram de silicagel 60 F254, espessura de camada de 0,2 mm (10x20 cm) da marca *Riedel-de Hën AG*.

A visualização das manchas foi realizada através de métodos físicos ou químicos; como luz de ultravioleta 254-366 nm e reveladores específicos (p.e. solução de anisaldeído).

2.4 Cromatografia em coluna

Foram utilizadas colunas de vidro de diferentes diâmetros internos e comprimentos, compatíveis com a massa das amostras. Como adsorvente foram utilizadas sílica derivatizada de fase reversa C-18 (25-40 μ m; *Merck*) e Amberlite XAD-4 (20-60 μ m, poros de 40Å; *Sigma*).

2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os cromatogramas foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em aparelhos:

- *Varian Pro Star* (Solvent Delivery Module 240 e Auto Sampler 410) acoplado ao detector *Varian Pro Star Photodiode Array Ultra-violet* (PDA-UV) 330 e registrados em microcomputador de 500 MHz com processador *Pentium II*, utilizando o software *Varian Star Chromatography Workstation* versão 5.52 – Modo analítico – gradiente exploratório.
- *Varian Pro Star* (Solvent Delivery Module 230) acoplado ao detector *Varian Pro Star UV/Vis Detector* 310 e registrados em microcomputador de 350 MHz com processador *Pentium II*, utilizando o software *Varian Star Chromatography Workstation* versão 5.52 – Modo analítico – gradiente exploratório e isocrático.
- *Varian Pro Star* (Solvent Delivery Systeme) acoplado ao detector *Varian Pro Star UV/Vis Detector* 320 e registrados em microcomputador de 350 MHz com processador *Pentium II*, utilizando o software *Varian Star Chromatography Workstation* versão 5.52 – Modo preparativo – isocrático.
- *Shimadzu* (bomba *Shimadzu LC-10 AD*, auto injetor *Shimadzu SIL 10 A*) acoplado ao detector ultra-violeta em arranjo de diodos *Shimadzu SPD MX AVP* e registrados em microcomputador de 500 MHz com processador *Pentium II*, utilizando o software *Shimadzu CLASS-LC10* versão 1.64A – Modo analítico- gradiente exploratório.

Utilizou-se coluna analítica *Phenomenex* tipo LUNA (C-18 e Fenil-hexila, 250 x 4,6 mm, 5 μ m) e preparativas *Phenomenex* (C-18 e Fenil-hexila, 250 x 25 mm, 10 μ m).

2.6 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C foram registrados em espectrômetro *Bruker AC 200-F 4.7 T* operando a 200 MHz para o núcleo de ^1H e 50 MHz para o núcleo de ^{13}C . Experimentos uni e bidimensionais foram realizados em espectrômetro *Varian Inova 500 11.7 T* operando a 500 MHz para o núcleo de ^1H e em 125 MHz para o núcleo de ^{13}C . Foi utilizado TMS como referência interna.

2.7 Espectrometria de massas

Espectrômetro de massas de baixa resolução Fisons-Platform II, da *Micromass*; técnicas ionização por electrospray positivo (ESI +25V), utilizando como gás nebulizador o nitrogênio. Software *MassLink*.

2.8 Espectrofotometria (Leitor de microplacas)

A leitura da absorbância para a avaliação da atividade seqüestradora de radical livre foi realizada no aparelho *Synergy-HTS* (λ 517nm). Os valores de IC_{50} foram calculados através da regressão linear das curvas, obtidas pelo programa *MicrocalTM OriginTM vrs 5,0*

2.9 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (HSCCC)

O instrumento utilizado foi um *P.C. Inc., Potomac* (Buffalo, NY, USA), equipado com uma coluna helicoidal multicamadas com duas bobinas de diâmetro interno de 1,68mm de politetrafluoroetileno (PTFE), de aproximadamente 80mL e 240mL conectados em série com uma capacidade total de 320mL. O valor de β variou de 0,5 na parte interna da coluna a 0,85 na parte externa da coluna e raio médio de revolução de 10cm ($\beta=r/R$, onde r é o raio da bobina e R o raio orbital de revolução). A velocidade foi ajustada com um controlador a 850rpm. O fluxo foi controlado com a bomba de fluxo constante *Waters 4000* (Milford, MA-

USA). A amostra foi injetada através do *P.C. Inc. Injection Module* (Buffalo, NY, USA) com um *loop* de 16mL. A coluna foi inicialmente preenchida com a fase estacionária, e posteriormente a fase móvel, no sentido cabeça a calda, com um fluxo de $1,0\text{mLmin}^{-1}$. Após as fases entrarem em equilíbrio hidrodinâmico na coluna, 16mL de solução (8mL de fase orgânica e 8mL de fase estacionária) contendo a amostra foi injetado, fluxo de $1,0\text{mLmin}^{-1}$. As frações foram recolhidas com um coletor automático (*Pharmacia, Uppsala, Sweden*), 5mL em cada tubo.

Para a escolha do sistema de solvente a ser utilizado, testou-se inicialmente vários sistemas de solvente, tendo como base a literatura (ITO, 2005; CHEN *et al*, 2005; HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003; SANTOS *et al*, 2005). Verificou-se a eficiência do sistema analisando separadamente as duas fases formadas por CCDC em proporções iguais, após desenvolvimento da placa compararam-se as proporções dos compostos em cada fase analisada.

2.10 Avaliação da atividade antioxidante por descolorimento de solução de β -caroteno

A amostra a ser avaliada é aplicada e desenvolvida em placas cromatográficas, que são então nebulizadas com solução metanólica de β -caroteno na concentração de 0,02%. Após a secagem da placa, ela é posta sob iluminação natural até o descolorimento do fundo. As substâncias com propriedade antioxidante são evidenciadas em manchas amarelas (PRATT & MILLER, 1984).

2.11 Metodologia de preparo de amostras para as análises

ANÁLISES VIA CCDC: As amostras são aplicadas nas cromatoplasmas na forma de soluções, em solventes bastante voláteis (AcOEt, Hex, MeOH), que possam ser facilmente eliminados após a aplicação e desenvolvidas em cubas cromatográficas saturadas com a fase móvel escolhida.

ANÁLISES VIA CLAE: Para eliminação de interferentes apolares (material graxo) a amostra foi submetida a pré-tratamento por Extração em Fase Sólida (EFS) em cartucho

preenchido com sílica de Fase Reversa (C18), utilizando-se MeOH/H₂O 95:5 (v/v) como eluente. Inicialmente o adsorvente foi ativado com MeOH puro (2-3 V_m) e posteriormente equilibrado com o eluente escolhido (2-3 V_m).

A amostra foi solubilizada em 1mL de MeOH/H₂O 95:5 (v/v), aplicado no cartucho e eluído com 2 mL da fase móvel. A solução recolhida foi filtrada em disco de membrana polimérica e armazenada em *vial* para análise por CLAE. A limpeza do cartucho foi feita com MeOH puro e depois, quando necessário, com DCM. Por se tratar de estudo químico qualitativo, não foram feitos cálculos de concentração das amostras analisadas.

ANÁLISES VIA RMN: As amostras foram diluídas em 0,6 mL de solvente deuterado (CDCl₃ ou DMSO-d₆) e em seguida, as soluções foram filtradas em esfera de algodão e armazenadas em tubo de vidro próprio para RMN.

ANÁLISES VIA HSCCC: A amostra foi diluída em 16mL da mistura do sistema de solventes.

2.12 Coleta e classificação do material vegetal

Folhas da planta em estudo, *E. jambolana*, foram coletadas na Faculdade de Ciências e Letras – UNESP no dia 25 de março de 2005 e os frutos, no dia 17 de fevereiro de 2006, ambos na cidade de Araraquara, estado de São Paulo. A amostra foi identificada pela Dr^a. Maria Cláudia M. Young e a exsicata foi depositada no herbário do Instituto Botânico – SMA – São Paulo (nº)

2.13 Preparação do extrato bruto das folhas

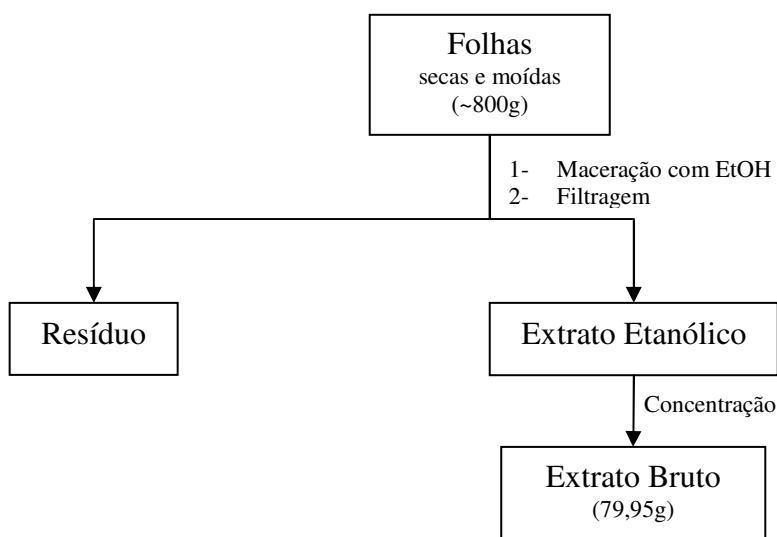
Separaram-se as folhas dos galhos, que foram secas em estufa a 40°C e, posteriormente trituradas em moinho de faca elétrico. As folhas moídas (aproximadamente 800 g) foram submetidas à extração exaustiva com etanol por maceração, e, após concentração do solvente a pressão reduzida, forneceu o extrato bruto etanólico das folhas (79,95g), apresentando um rendimento de aproximadamente 8,8% (fluxograma 1, pg. 42).

2.14 Partição do extrato bruto das folhas

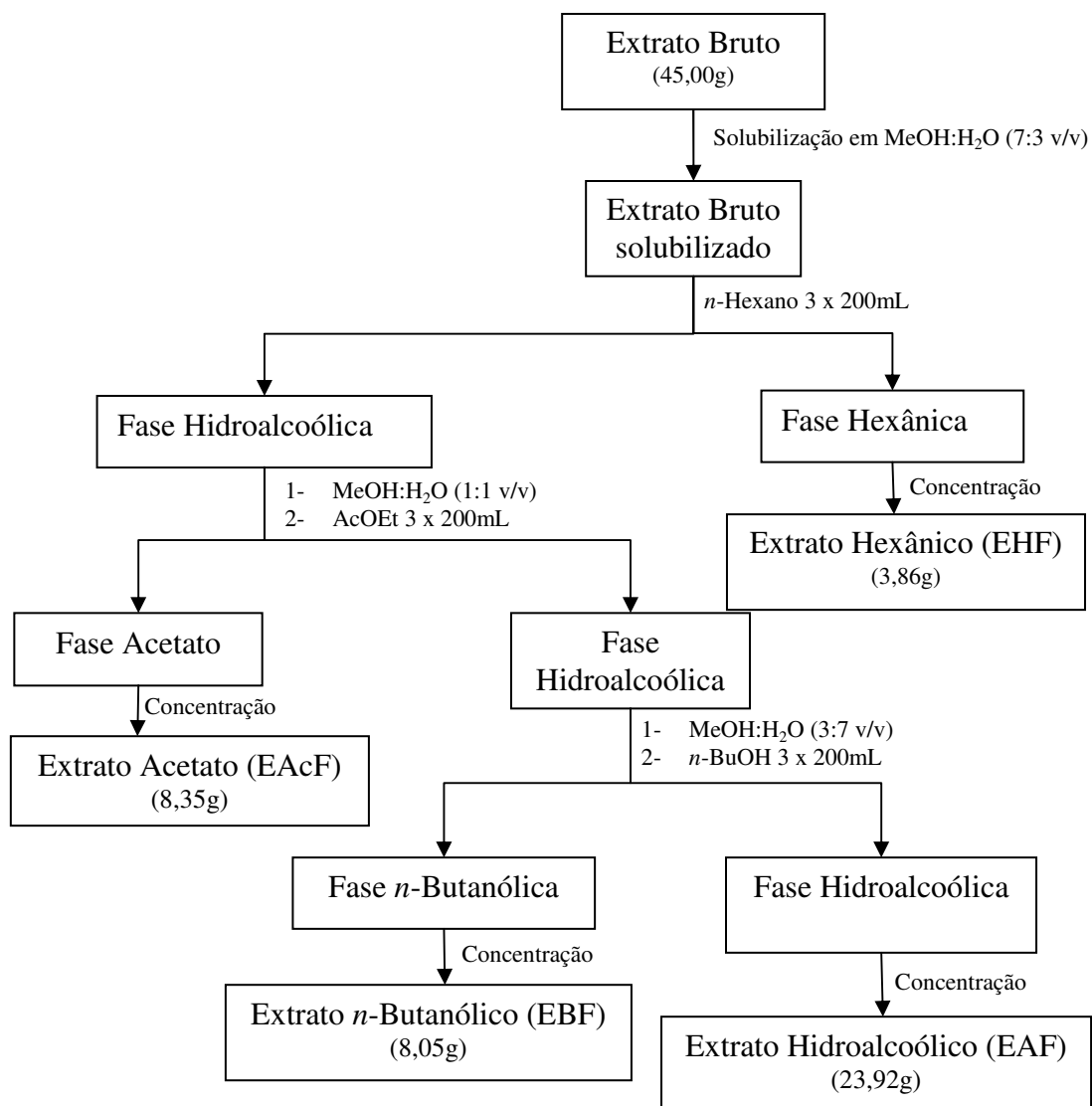
Parte do extrato etanólico bruto (45,00g) foi submetida à partição líquido-líquido solubilizando em MeOH:H₂O (7:3 v/v) e extraído inicialmente com hexano, solvente de baixa polaridade, após a separação das fases, foi adicionado H₂O à fase hidroalcoólica até que atingisse a proporção MeOH:H₂O 1:1 (v/v) e então extraída com AcOEt, solvente de média polaridade, e por fim, à fase hidroalcoólica foi adicionado mais H₂O, atingindo a proporção de 3:7 (v/v) de MeOH:H₂O e extraído com *n*-BuOH, fornecendo as fases correspondentes que, após serem concentrados em rotaevaporador, forneceram os extratos hexânico (3,86g), acetato de etila (8,35g), *n*-butanólico (8,05g) e hidroalcoólico (23,92g) conforme mostra o fluxograma 2 (pg. 43).

Os extratos foram monitorados através de CCDC e nebulizadas com solução metanólica de β -caroteno. Esta solução indica a propriedade antioxidante, pois após deixar as placas algumas horas sob luz natural ou após o descoramento do fundo.

Para os extratos hexano e acetato de etila, a CCDC foi desenvolvida em AcOEt 100%, enquanto que para os extratos *n*-butanólico e hidroalcoólico, o sistema utilizado para o desenvolvimento foi AcOEt/MeOH 4:1 (v/v).



Fluxograma 1: Preparação do extrato bruto das folhas de *E. jambolana*.

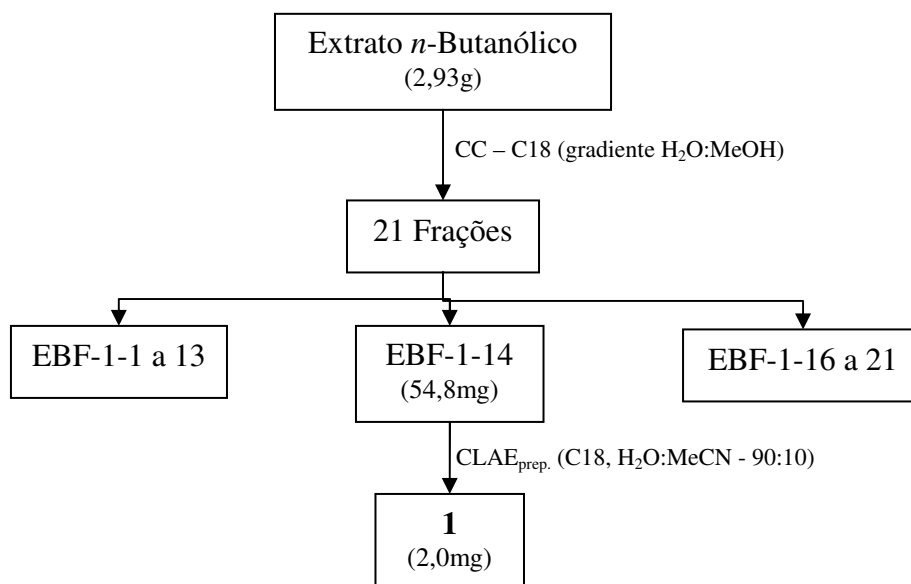


Fluxograma 2: Partição do extrato bruto das folhas de *E. jambolana*.

2.15 Fracionamento do extrato *n*-Butanólico das folhas (EBF)

O extrato *n*-butanólico (2,93g) foi fracionado através de uma coluna cromatográfica (19,5cm de altura e 3,0cm de diâmetro) de sílica derivatizada com unidades octadecil (fase reversa, C-18) em função da alta polaridade do extrato, com gradiente H₂O:MeOH, em ordem crescente de polaridade, resultando em 21 frações, conforme mostra o fluxograma 3 (pg. 44) e a tabela 2 (pg. 45).

A fração EBF-1-14 (54,8mg) apresentou forte atividade antioxidante, observada através do método do β -caroteno e características de flavonóides, como espectro de UV dos picos obtidos em análise por CLAE/DAD apresentando duas absorções características, uma em 252nm e outra em 360nm. Uma condição isocrática (H₂O:MeCN 9:1) foi otimizada para EBF-1-14 em CLAE analítico (fluxo de 1,0mLmin⁻¹, detecção a 254nm) seguida de fracionamento em CLAE semi-preparativo (fluxo de 10,0mLmin⁻¹, detecção a 254nm, cromatograma da figura 12, página 60), utilizando uma coluna cromatográfica de sílica derivatizada de fase reversa C-18, resultando no isolamento da substância **1**.



Fluxograma 3: Fracionamento do extrato *n*-butanólico das folhas de *E. jambolana*.

Tabela 2: Fracionamento do extrato *n*-butanólico (EBF) das folhas de *E. jambolana* por CC em fase reversa (C-18).

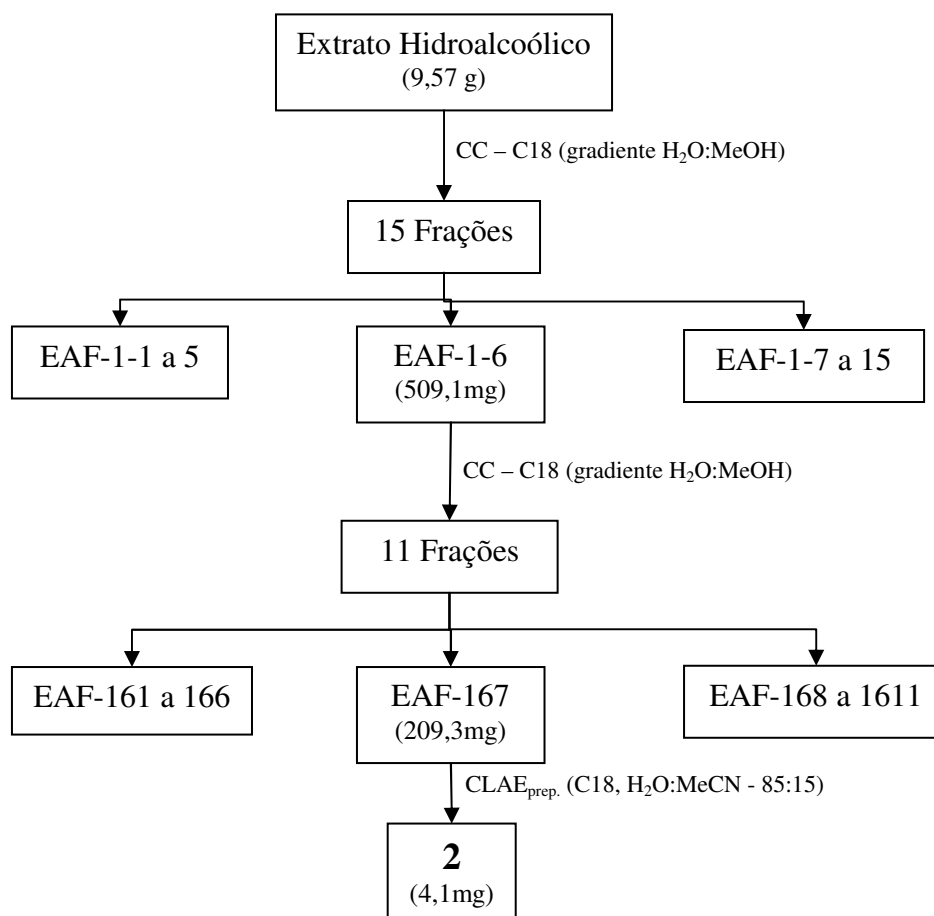
Frações	Eluente	Massa (mg)
EBF-1-1	H ₂ O	53,2
EBF-1-2	H ₂ O/MeOH (19:1)	92,0
EBF-1-3	H ₂ O/MeOH (9:1)	97,2
EBF-1-4	H ₂ O/MeOH (17:3)	163,0
EBF-1-5	H ₂ O/MeOH (4:1)	20,4
EBF-1-6	H ₂ O/MeOH (4:1)	24,0
EBF-1-7	H ₂ O/MeOH (4:1)	37,6
EBF-1-8	H ₂ O/MeOH (7:3)	95,7
EBF-1-9	H ₂ O/MeOH (3:2)	63,1
EBF-1-10	H ₂ O/MeOH (3:2)	114,3
EBF-1-11	H ₂ O/MeOH (3:2)	112,1
EBF-1-12	H ₂ O/MeOH (1:1)	37,7
EBF-1-13	H ₂ O/MeOH (1:1)	61,9
EBF-1-14	H ₂ O/MeOH (1:1)	54,8
EBF-1-15	H ₂ O/MeOH (2:3)	75,1
EBF-1-16	H ₂ O/MeOH (1:4)	21,7
EBF-1-17	MeOH	11,1
EBF-1-18	MeOH/Acetona (1:1)	14,2
EBF-1-19	Acetona	9,2
EBF-1-20	AcOEt	29,3
EBF-1-21	AcOEt	7,8

2.16 Fracionamento do extrato Hidroalcoólico das folhas (EAF)

O extrato hidroalcoólico (9,57g) foi fracionado através de uma coluna cromatográfica aberta (19,5cm de altura e 3,0cm de diâmetro) com sílica derivatizada para fase reversa (C-18), eluída com gradiente H₂O/MeOH, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 15 frações (fluxograma 4, pg. 47, tabela 3, pg. 47), esse método foi escolhido em função da alta polaridade do extrato.

A fração EAF-1-6 foi escolhida para fracionamento por apresentar forte atividade antioxidante, observada no teste com solução metanólica de β -caroteno e características de flavonóides, parte da fração (509,1 mg) foi submetida à coluna cromatográfica (13 cm de altura e 3,0cm de diâmetro) de fase reversa (C-18) com gradiente H₂O:MeOH, de 5 a 100% de MeOH, resultando em 11 frações (fluxograma 4, pg. 47, tabela 4, pg. 48).

Uma condição isocrática (H₂O:MeCN 17:3) foi otimizada para a fração EAF-167 (209,3mg) em CLAE analítico (fluxo de 1,0mLmin⁻¹, detecção a 254nm) seguida de fracionamento em CLAE semi-preparativo, utilizando uma coluna cromatográfica de fase reversa C-18 (fluxo de 10,0mLmin⁻¹, detecção a 254nm, cromatograma figura 16, página 63), resultando na substância **2**.



Fluxograma 4: Fracionamento do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. jambolana*.

Tabela 3: Fracionamento do extrato hidroalcoólico (EAF) das folhas de *E. jambolana* por CC em fase reversa (C-18).

Frações	Eluente	Massa (mg)
EAF-1-1	H ₂ O/MeOH (19:1)	600,2
EAF-1-2	H ₂ O/MeOH (9:1)	526,8
EAF-1-3	H ₂ O/MeOH (17:3)	267,4
EAF-1-4	H ₂ O/MeOH (4:1)	397,6
EAF-1-5	H ₂ O/MeOH (7:3)	257
EAF-1-6	H ₂ O/MeOH (1:1)	718,9
EAF-1-7	H ₂ O/MeOH (2:3)	591,6
EAF-1-8	H ₂ O/MeOH (1:4)	359,1
EAF-1-9	MeOH	728,1
EAF-1-10	MeOH	65,9
EAF-1-11	AcOEt	248,7

Tabela 4: Fracionamento de EAF-1-6 por CC em fase reversa (C-18).

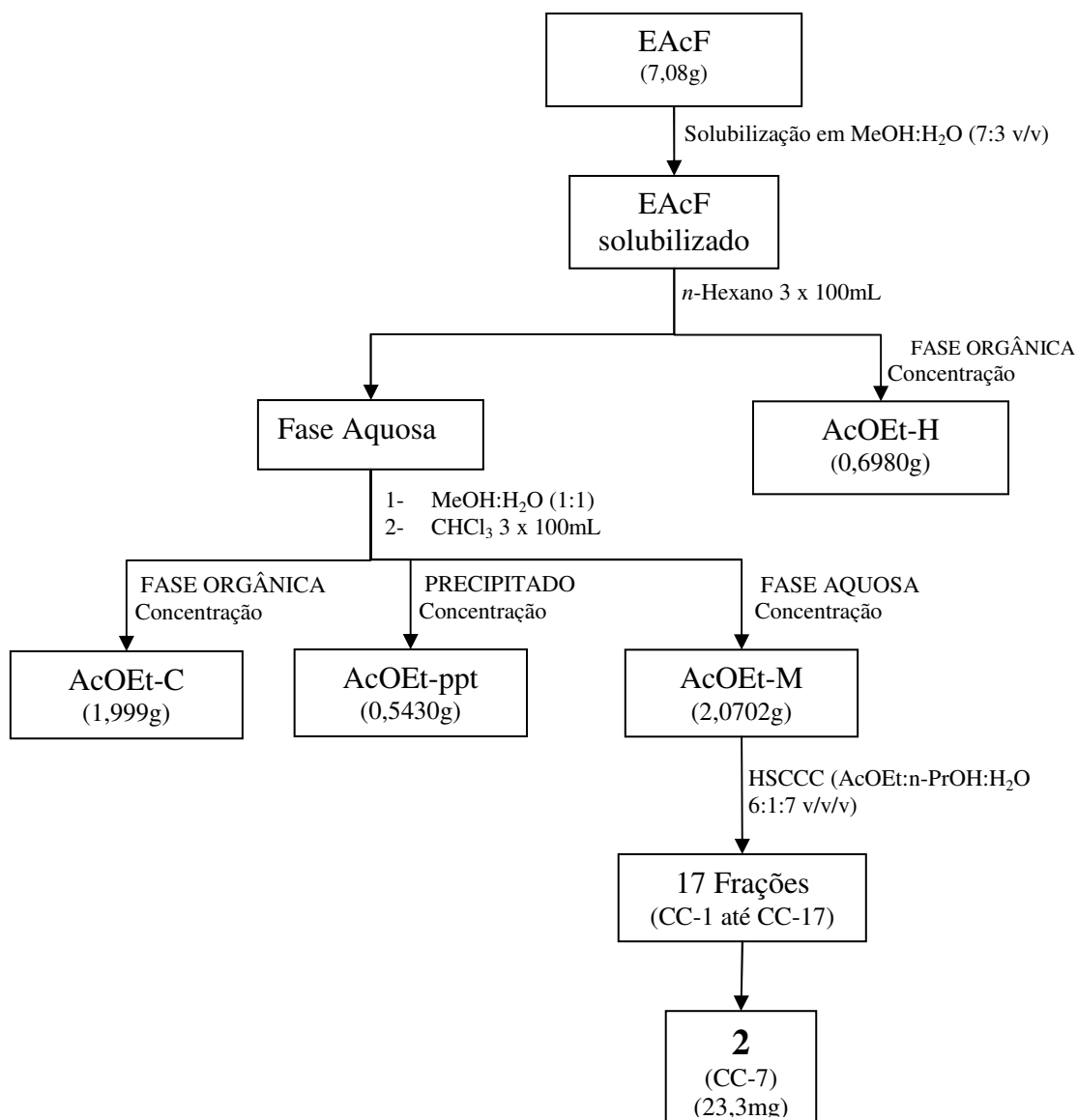
Frações	Eluente	Massa (mg)
EAF-161	H ₂ O/MeOH (19:1)	13,6
EAF-162	H ₂ O/MeOH (9:1)	26,3
EAF-163	H ₂ O/MeOH (17:3)	21,1
EAF-164	H ₂ O/MeOH (4:1)	13,3
EAF-165	H ₂ O/MeOH (7:3)	13,6
EAF-166	H ₂ O/MeOH (11:9)	29,2
EAF-167	H ₂ O/MeOH (11:9)	224,9
EAF-168	H ₂ O/MeOH (11:9)	20,3
EAF-169	H ₂ O/MeOH (2:3)	36,1
EAF-1610	H ₂ O/MeOH (1:4)	7,3
EAF-1611	MeOH	100,3

2.17 Fracionamento do extrato Acetato das folhas (EAcF).

O extrato acetato, composto por uma mistura de substâncias de polaridades baixas e altas, evidenciado em análise por CCDC, foi submetido a uma partição líquido-líquido, para separar as substâncias contidas por diferença de polaridade e afinidade em função dos solventes utilizados. Para essa partição foram utilizados hexano, CHCl_3 , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, que após a evaporação do solvente, resultaram nas frações AcOEt-H (fase hexânica, 0,698g), AcOEt-C (fase clorofórmica, 1,999g) e AcOEt-M (fase hidroalcoólica, 2,070g); observou a formação de um precipitado entre as fases AcOEt-C e AcOEt-M, que foi recolhido separadamente, atribuído o código AcOEt-ppt (0,543g) (fluxograma 5, pg. 50).

Essas frações foram analisadas por CCDC e, AcOEt-M mostrou-se mais interessante para iniciar o trabalho de fracionamento, por provavelmente ser a fração enriquecida em flavonóides.

Para investigar a fração AcOEt-M foi utilizado o HSCCC, que proporciona baixo consumo de solvente e perda de amostra praticamente nula, além de ampliar o conhecimento em técnicas de separação.



Fluxograma 5: Partição do extrato acetato das folhas (EAcF) de *E. jambolana*.

A escolha do sistema de solvente (descrito no item 2.9, pg. 39) é fundamental para que a separação dos constituintes seja eficiente; foi escolhido um sistema ternário, a fim de diminuir a diferença de polaridade entre as fases e aumentar a solubilidade da amostra em ambas, de maneira aproximadamente proporcional, ou seja, obtendo um coeficiente de partição igual ou aproximadamente igual a um; dessa maneira pode-se garantir a eficiência e capacidade de separar os componentes da fração analisada segundo diferenças de polaridade.

O sistema que resultou numa melhor resolução foi AcOEt:*n*-PrOH:H₂O, na proporção 6:1:7 (v/v/v). Foi preparado 840mL do sistema, deixado de um dia para outro num funil de separação a temperatura ambiente para que atingisse um equilíbrio e as fases fossem totalmente separadas. No equipamento, inicialmente foi introduzida a fase estacionária e posteriormente a fase móvel, já com a coluna em movimento para evitar perdas da fase

estacionária e garantir que não fosse formada bolhas no interior da coluna; após o equilíbrio estabelecido, na coluna havia 85% de fase estacionária; em seguida foram injetados 418,0mg de amostra. Foram obtidas 157 frações que após análise por CCDC foram reunidas em 17 frações (tabela 5, pg. 51). Algumas frações foram analisadas por CLAE-DAD e RMN de ^1H , resultando em frações semi-puras, contendo poucos picos, observados na análise por CLAE (cromatogramas das figuras 20, 21, 22 e 23, pg. 67, 67, 68 e 69 respectivamente) e no reisolamento da substância **2** (fração CC-7, 23,3mg), com um rendimento bem maior quando comparado com o obtido no isolamento através de CLAE_{prep.}, isso por que, o HSCCC não usa suporte sólido, minimizando a perda de massa.

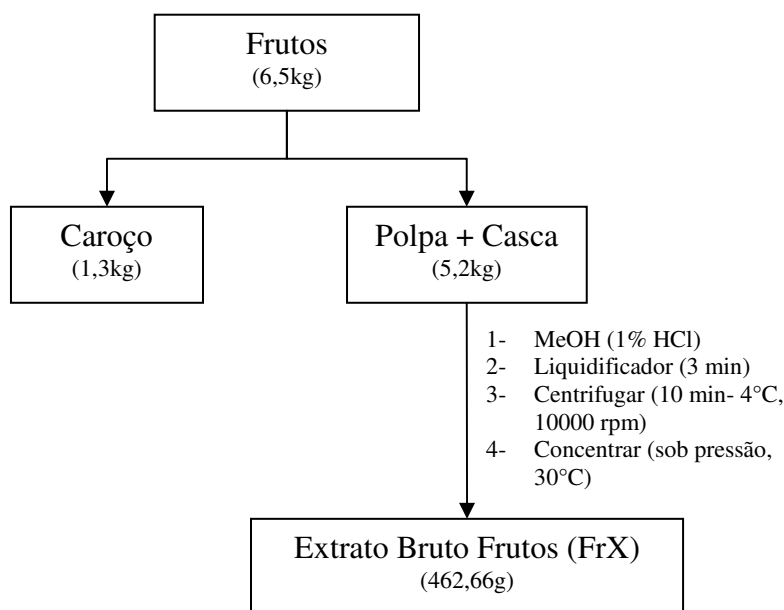
Tabela 5: Fracionamento de AcOEt-M por HSCCC.

Frações	Massa (mg)
CC-1	6,2
CC-2	40,8
CC-3	47,9
CC-4	30,8
CC-5	25,6
CC-6	5,8
CC-7	23,3
CC-8	20,6
CC-9	15,4
CC-10	25,6
CC-11	6,0
CC-12	4,6
CC-13	10,2
CC-14	25,2
CC-15	67,1
CC-16	53,2
CC-17	0,8

2.18 Preparação do extrato bruto dos frutos

Foram utilizados aproximadamente 6,5Kg de frutos maduros, que tiveram as sementes separadas e armazenadas. A polpa e casca rendeu 5,2Kg e é parte de interesse por provavelmente conter o grupo de substâncias conhecido como antocianinas. Num liquidificador, as cascas e polpas foram trituradas com 200 mL de solução MeOH (1% HCl) por três minutos, a escolha do ácido a ser utilizado foi feita comparando dados da literatura (LIU *et al*, 2004; SEERAM *et al*, 2002; LEE 2002; CHANDRA; NAIR; IEZZONI, 1992; WANG *et al*, 1997; EINBOND *et al*, 2004; LONGO & VASAPOLLO, 2005). Para separar a parte solúvel das partículas insolúveis, a mistura foi centrifugada a 10000 rpm por 10min a uma temperatura de 4°C, resultando em 5L de sobrenadante, já que a fruta contém muita água. O extrato bruto dos frutos (462,66g) foi obtido após a concentração do sobrenadante (5L) à pressão reduzida.

Na preparação do extrato bruto dos frutos foi muito importante conseguir que a integridade das antocianinas fosse mantida, por isso a adição de HCl (fluxograma 6, pg. 52). O interesse em obter esta classe de substâncias surgiu por apresentarem alto poder de combate a radicais livres e atividade antioxidante.



Fluxograma 6: Preparação do extrato bruto dos frutos de *E. jambolana*.

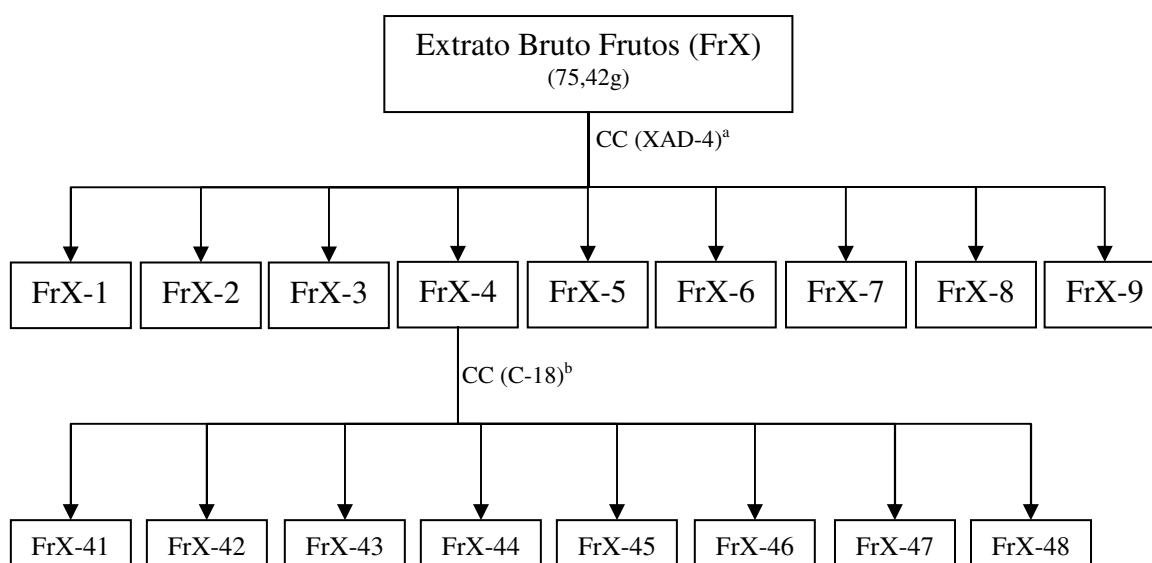
2.19 Fracionamento do extrato bruto dos frutos

Os frutos do jambolão possuem muito açúcar, então, foi necessário utilizar um método para enriquecer as frações em antocianinas, excluindo os açúcares livres, para minimizar as interferências nas análises cromatográficas. O aumento de polaridade da amostra decorrente da presença de açúcares, aumenta também sua solubilidade em água, e dificulta sua secagem, o que compromete etapas sequenciais de fracionamento.

Na primeira etapa de fracionamento do extrato bruto dos frutos, foi utilizada uma coluna cromatográfica com a resina Amberlite XAD-4 (32cm de altura e 7cm de diâmetro) para remoção dos açúcares livres (fluxograma 7, pg. 53 e tabela 6, pg. 54); a série eluotrópica (SAKAKIBARA *et al*, 1991) foi:

- H₂O
- H₂O/MeOH 1:1
- MeOH
- Hexano
- Acetona
- Acetato de Etila
- EtOH

Os açúcares não são adsorvidos e foram eluídos nas primeiras frações (H₂O). Posteriormente as outras substâncias foram eluídas, visto que este polímero (XAD-4) adsorve minimamente substâncias polifenólicas.



Fluxograma 7: Partição do extrato bruto dos frutos de *E. jambolana*.

- a. Eluição com H₂O, H₂O/MeOH 1:1, MeOH, Hexano, Acetona, Acetato de Etila, EtOH
- b. Gradiente H₂O → MeOH

Tabela 6: Fracionamento do extrato bruto dos frutos (FrX) de *E. jambolana* por CC em XAD-4.

Frações	Eluente	Massa (mg)
FrX-1	H ₂ O	3210,0
FrX-2	H ₂ O	3450,0
FrX-3	H ₂ O	62480,0
FrX-4	H ₂ O/MeOH (1:1)	2573,8
FrX-5	MeOH	386,0
FrX-6	Hexano	372,8
FrX-7	Acetona	272,0
FrX-8	AcOEt	59,5
FrX-9	EtOH	22,1

2.20 Fracionamento de FrX-4

Para o fracionamento da FrX-4 (1,95g) foi utilizada uma CC de fase estacionária com sílica derivatizada C-18 (15,5cm de altura e 3cm de diâmetro), eluída com gradiente H₂O (4% H₃PO₄)/MeOH, iniciando com 100% de H₂O e finalizando com 100% de MeOH. Foram obtidas oito frações (FrX-41 até FrX-48). As frações de FrX-43 à FrX-47 foram submetidas à partição com XAD-4 (12cm de altura e 7cm de diâmetro), utilizando como série eluotrópica H₂O, MeOH, EtOH e acetona, resultando assim em quatro frações cada (FrX-431 até FrX-434; FrX-441 à FrX-442 e assim por diante).

Tabela 7: Fracionamento das frações FrX-43, FrX-44, FrX-45, FrX-46, FrX-47 por CC em XAD-4.

Frações	Eluente	Massa (mg)
FrX-431	H ₂ O	--*
FrX-432	MeOH	213,2
FrX-433	EtOH	13,5
FrX-434	Acetona	10,2
FrX-441	H ₂ O	--*
FrX-442	MeOH	247,6
FrX-443	EtOH	2,9
FrX-444	Acetona	10,6
FrX-451	H ₂ O	--*
FrX-452	MeOH	197,9
FrX-453	EtOH	10,0
FrX-454	Acetona	12,6
FrX-461	H ₂ O	--*
FrX-462	MeOH	195,2
FrX-463	EtOH	10,8
FrX-464	Acetona	11,3
FrX-471	H ₂ O	--*
FrX-472	MeOH	93,6
FrX-473	EtOH	10,1
FrX-474	Acetona	4,9

* Secagem incompleta.

2.21 Fracionamento de FrX-442

Para o fracionamento da FrX-442 (99,7mg) foi utilizada uma coluna cromatográfica de fase reversa C-18 (10cm de altura e 2cm de diâmetro), eluída com gradiente H_2O (4% H_3PO_4)/MeOH, iniciando com 95% de H_2O e finalizando com 100% de MeOH.

Uma nova tentativa de fracionamento foi feita para esta fração, utilizou-se CLAE analítico, e a condição otimizada foi 0 a 15 min 35% B, 16 a 18 min 35-40% B, 19 a 35 min 40% B, 35 a 40 min 40-100% B, em coluna de fase reversa (fenil-hexila), onde A é água (0,5% H_3PO_4) e B é MeOH. Reduziu-se a concentração do ácido fosfórico da fase móvel para evitar possíveis danos ao aparelho e coluna, o que foi possível visto que o resultado obtido foi o mesmo para as duas concentrações.

2.22 Avaliação da atividade sequestradora de radical livre por redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) em teste espectrofotométrico

200 µL de uma solução 0,004% de DPPH foi misturada com soluções das frações FrX-4, FrX-442, FrX-452 e FrX-5 em diversas concentrações, aguardou-se 30 minutos ao abrigo da luz e então a leitura foi feita no leitor de microplacas *Synergy-HTS* (λ 517nm). Como solução padrão foi utilizada rutina, nas mesmas concentrações.

A porcentagem de seqüestro do radical livre foi obtida utilizando a seguinte equação:

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

Os valores de IC₅₀ foram calculados através da regressão linear das curvas, obtidas pelo programa *MicrocalTM OriginTM vrs 5,0*.

2.23 Análise da fração FrX-4 por espectrometria de massas

A técnica de análise por espectrometria de massas foi utilizada como ferramenta adicional para obter valiosas informações sobre as estruturas das antocianinas presentes nos frutos e suprir assim a obstância no processo de isolamento através do CLAE preparativo.

A amostra foi injetada em CLAE analítico em gradiente H₂O (0,5% H₃PO₄)/MeOH, de 5% a 100% de MeOH. Os picos foram coletados e analisados por espectrômetro de massas para a identificação dos constituintes químicos presentes na fração analisada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Partição do extrato bruto das folhas de *E. jambolana*

A partição do extrato bruto das folhas com solventes de diferentes polaridades resultou na separação de classes de substâncias de acordo com sua afinidade com o solvente extrator; assim, substâncias de baixa e média polaridade foram solúveis nos extratos hexânico e acetato de etila, enquanto nos extratos n-butanólico e hidroalcoólico estão as substâncias de maior polaridade.

As placas de CCDCs dos extratos foram nebulizadas com solução de β -caroteno para a escolha do ponto de partida do trabalho, ou seja, o extrato a ser fracionado inicialmente, todos, exceto o hexânico (EHF), apresentaram resultado positivo para o teste antioxidante, mas pelo fato dos extratos n-butanólico (EBF) e hidroalcoólico (EAF) estarem livres de substâncias de baixa polaridade, como clorofila e ácidos graxos, esses foram fracionados primeiro.

As CCDCs dos mesmos também foram reveladas com solução de Dragendorff, indicando a ausência de substâncias nitrogenadas, pois não foi observado manchas de coloração alaranjadas e, também, com solução ácida de anisaldeído, revelador universal.

O EBF foi fracionado através de uma coluna cromatográfica de fase reversa (C-18) para que as substâncias nele contidas fossem divididas em grupos de polaridade. Com a análise das 21 frações originárias dessa coluna em CCDC, reveladas com anisaldeído e β -caroteno (figura 11, pg. 60), foi possível selecionar algumas para a análise em CLAE-DAD. Após essa nova análise, pôde-se escolher a fração EBF-1-14 para novo fracionamento, já que ela apresentou forte atividade antioxidante e características de flavonóides, como espectro de UV dos picos apresentando duas absorções, uma em 252nm e outra em 360nm. De EBF-1-14 obtiveram-se nove sub-frações, originárias do fracionamento feito através de CLAE preparativo, utilizando coluna C-18, das quais apenas uma (EBF-1-14-E, 2,0mg, figura 14, pg. 61) aparentou estar pura e com massa suficiente para a obtenção de espectros RMN.

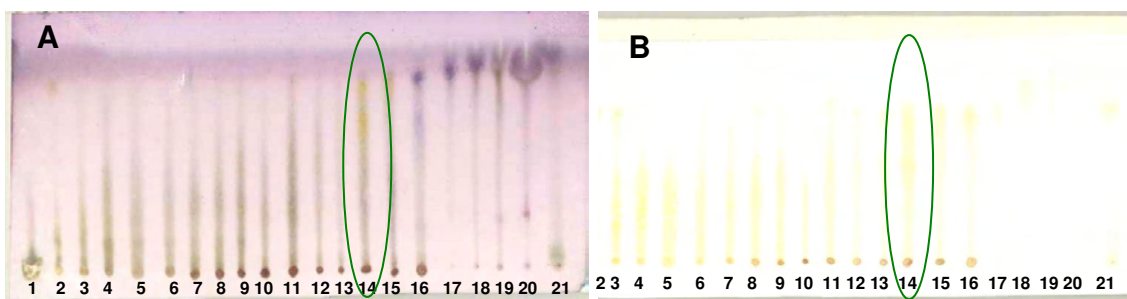


Figura 11: CCDC das frações EBF-1-1 à EBF-1-21, eluídas no sistema AcOEt:Ácido Acético:MeOH:H₂O (10:1:1:3) e reveladas com A) anisaldeído e B) β -caroteno.

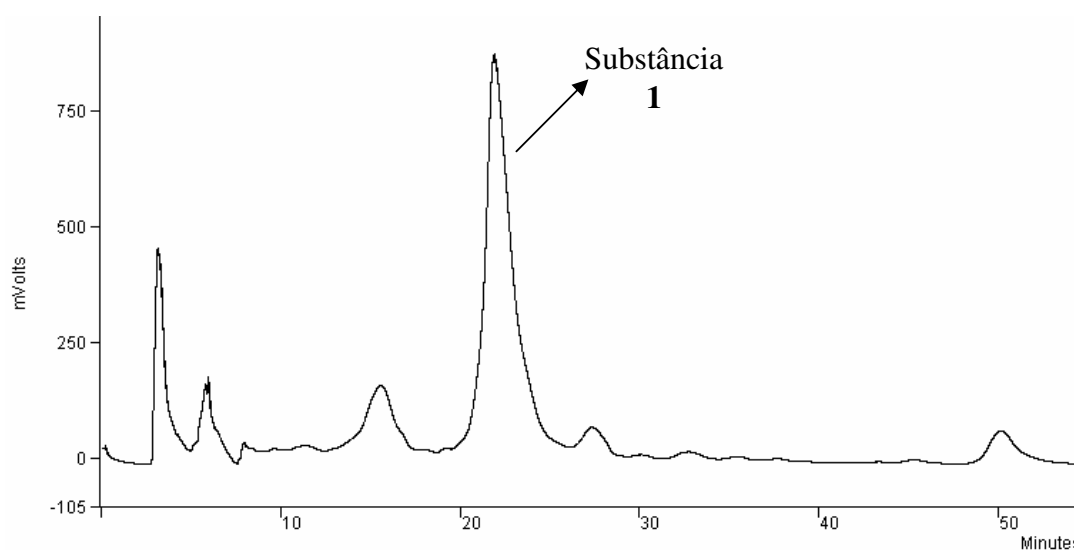


Figura 12: Cromatograma da fração EBF-1-14, C-18, H₂O:MeCN (9:1), 254nm.

A fração EBF-1-14-E foi submetida à análise por RMN permitindo sua identificação (substância 1). O espectro de RMN de ^1H mostrou perfil característico de flavonóides glicosilados, com sinais distribuídos ao longo da região aromática e um sinal em 12,7 atribuído a uma hidroxila quelada a uma carbonila, além de sinais em δ 3-4, indicativos de presença de açúcar; um singlete em 5,20 δ_{H} e um dubleto em 0,85 δ_{H} (6 Hz 3H) associados a uma unidade de ramnose como substituinte de aglicona.

No espectro de RMN ^1H foram observados sinais em 6,20 δ (*d*, 2,0 Hz, 1H) e 6,37 (*d*, 2,0 Hz, 1H) acoplando entre si, indicando um sistema *meta* substituído, atribuídos a H6 e H8 respectivamente, além de sinais em 6,89 δ (*s*, 1H) e 7,26 (*s*, 2H), atribuídos a H3 e H2'/H6'.

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou sinais em δ_{C} 16,8 e δ 70,5, confirmando uma unidade de ramnose como substituinte de aglicona.

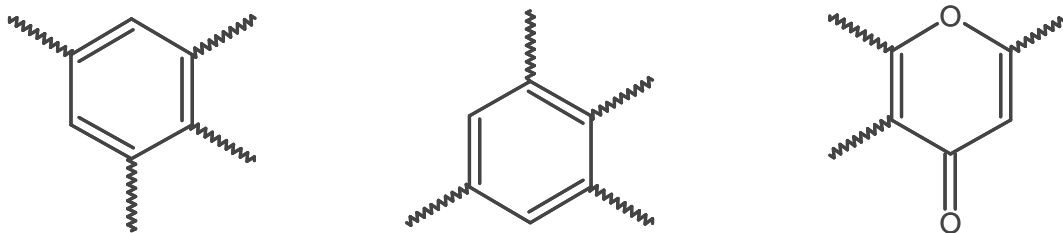


Figura 13: Estruturas parciais para a substância **1**, atribuídas respectivamente aos anéis A, B e C de uma flavona.

A posição da ramnose foi definida de acordo com o deslocamento químico de H6, H8 e H2'/H6' por comparação com dados da tricetina (aglicona não glicosilada), que junto com dados da literatura (HARBORNE, 1994) permitiu atribuir para a substância em questão a estrutura do flavonóide **1** (figura 14).

Os sinais em δ 113,0, δ 107,0, δ 145,4 e δ 136,0 foram atribuídos aos carbonos do anel B, caracterizando um anel 3',4',5'-trioxigenado. A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono, foi realizada após análise cuidadosa dos mapas de contorno no experimento gHMQC. As correlações observadas nos experimentos de gHMBC e COSY (tabela 8) foram fundamentais para a elucidação da estrutura da substância **1** e permitiu sua identificação como 5,7,3',5'-tetraidroxi-4'-ramnosil-flavona. Os espectros podem ser observados no Anexo A (pg. 85).

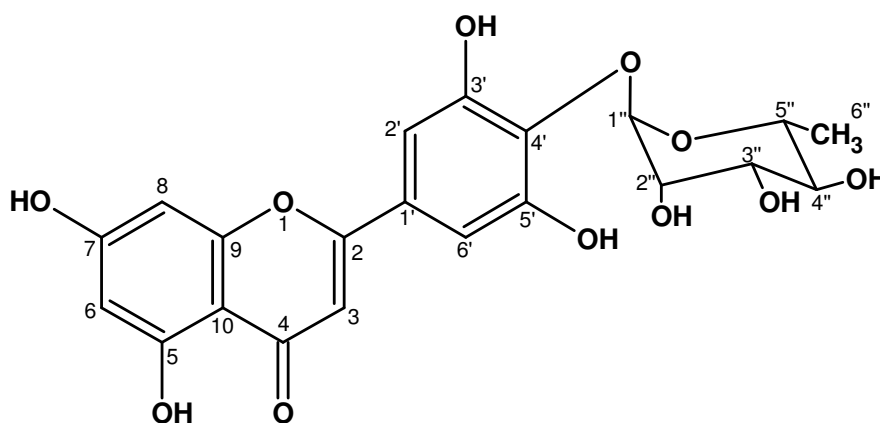
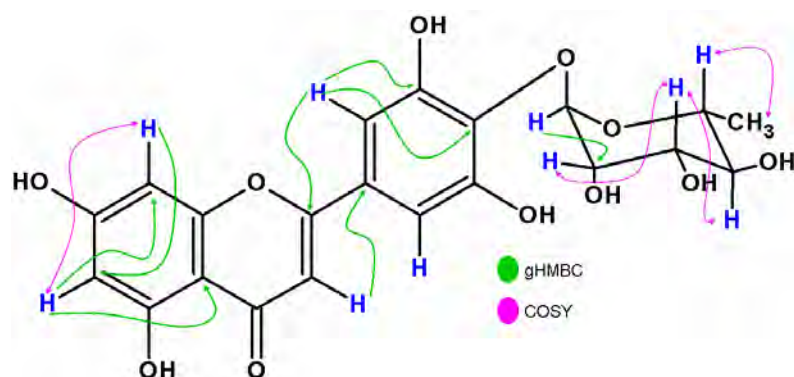


Figura 14: Estrutura da substância **1**.

Tabela 8: Dados de RMN ^1H e RMN-2D (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **1**.

H	δ (ppm), multiplic., J (Hz)	δ_{C}	$g\text{HMBC } (\delta)$	$g\text{COSY } (\delta)$
1	---	---	---	---
2	---	157,4	---	---
3	7,26 (s, 1H)	107,0	113,4	---
4	---	---	---	---
5	---	---	---	---
6	6,20 (d, 2,0Hz, 1H)	98,0	104,2 / 92,9	6,36
7	---	---	---	---
8	6,36 (d, 2,0Hz, 1H)	92,9	98,0	6,20
9	---	---	---	---
10	---	104,2	---	---
1'	---	113,0	---	---
2' e 6'	6,89 (s, 2H)	107,3	107,8 / 157,4/ 145,4 / 136,2	---
3' e 5'	---	145,4	---	---
4'	---	136,0	---	---
1''	5,20 (s, 1H)	101,4	69,8	---
2''	3,98 (m, 1H)	69,5	---	3,55
3''	3,55	69,8	---	3,17 / 3,98
4''	3,17 (s, 1H)	70,5	---	3,55
5''	3,40	70,0	---	0,85
6''	0,85 (d, 6,0Hz, 3H)	16,8	70,5	3,40

**Figura 15:** Algumas correlações observadas em experimento $g\text{HMBC}$ e COSY da substância **1**.

O EAF apresentava características parecidas com o EBF, por isso seu fracionamento foi similar, iniciando com seu fracionamento em coluna C-18. A análise da fração EAF-1-6 indicou a presença de flavonóides, pois apresentou espectro de RMN ^1H com sinais na região aromática, e com atividade antioxidante, observada através do teste com solução de β -caroteno.

EAF-1-6 foi fracionada através de coluna cromatográfica com C-18, obtendo-se 11 sub-frações, que também foram analisadas. Destas, selecionou-se a sub-fração EAF-167, em função da atividade antioxidante observada em teste com solução de β -caroteno, para fracionamento em CLAE preparativo, resultando em apenas uma sub-fração (EAF-167-R, 4,1mg, figura 18, pg. 65) com alto grau de pureza que foi submetida à análise por espectros de RMN para a elucidação estrutural (substância **2**).

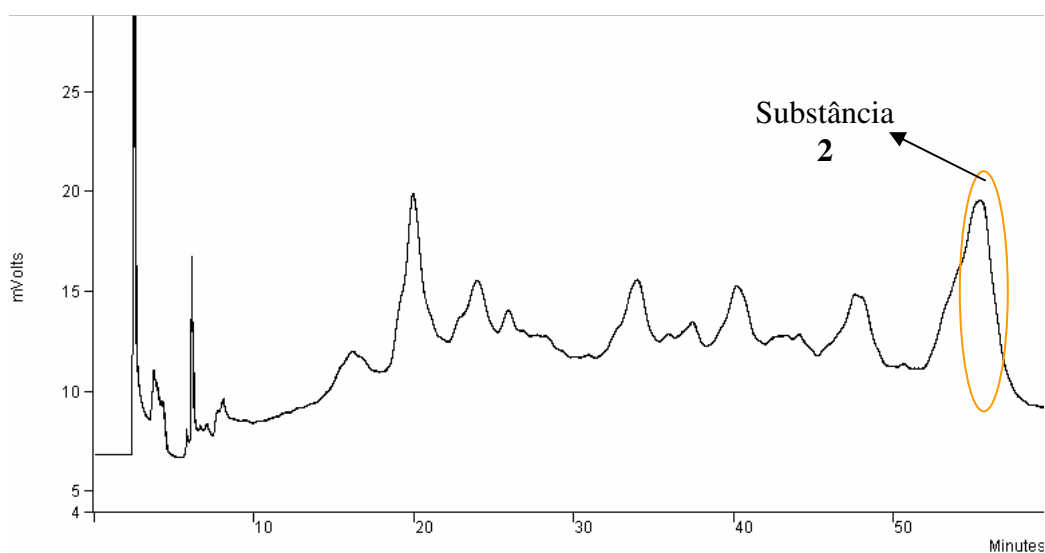


Figura 16: Cromatograma da fração EAF-167, $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (85:15), 254nm.

O espectro de RMN de ^1H apresentou semelhanças com o da substância **1**, indicando tratar-se de um flavonóide glicosilado, com algumas diferenças nos sinais da região aromática, como a ausência do sinal em δ 7,26, atribuído ao H3 do anel C, indicando haver um substituinte nesta posição. Mostrou também sinais em δ 3-4, indicativos de presença de açúcar, caracterizado como a ramnose, por mostrar um duplete em 5,19 δ_{H} (2Hz, 1H, H1'') e um duplete em 0,84 δ_{H} (6,5Hz, 3H, H6'') (HARBORNE, 1994).

Ainda no espectro de RMN¹H foram observados sinais em 6,19 δ (*d*, 2,0 Hz, 1H) e 6,35 δ (*d*, 2,0 Hz, 1H) acoplando entre si, indicando um sistema *meta* substituído para o anel A, além de sinal em 6,87 δ (*s*, 2H), atribuído aos hidrogênios do anel B 3,4,5-trioxigenado.

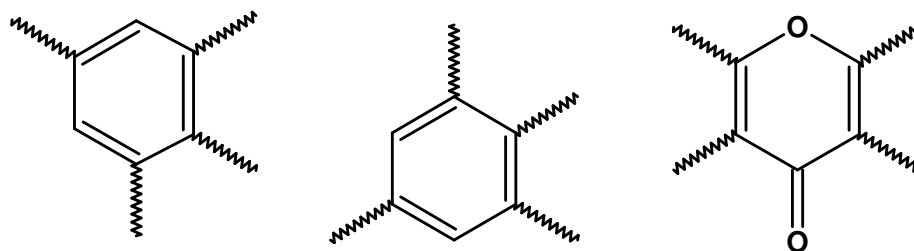


Figura 17: Estruturas parciais para a substância **2**, atribuídas respectivamente aos anéis A, B e C de um flavonol.

A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono, foi realizada após análise cuidadosa dos mapas de contorno no experimento gHMQC de **2**.

O espectro de RMN de ¹³C mostrou sinais para C aromáticos (δ 92-150) que foram atribuídos a uma unidade de flavonol, e sinais em δ 17,4 e na região de δ 69-72, sugerindo uma unidade de ramnose como substituinte da aglicona.

Os sinais em δ 119,6, δ 107,9, δ 145,7 e δ 136,4 foram atribuídos aos carbonos do anel B, 1', 2'/6', 3'/5' e 4' respectivamente, caracterizando um anel 3',4',5'-triidroxilado.

A presença do sinal em 5,2 δ_H (101,9 δ_C) correlacionando a longa distância (³*J*) pelo gHMBC com o carbono em δ 134,3 atribuído ao C-3, indica que a substância **2** é um flavonol na qual a ramnose encontra-se na posição 3. Outras correlações observadas no gHMBC e COSY estão relatadas na tabela 9 e figura 19.

A análise dos dados obtidos e comparação com a literatura (MAHMOUD *et al*, 2001) permitiram atribuir à substância em questão a estrutura da miricetrina.

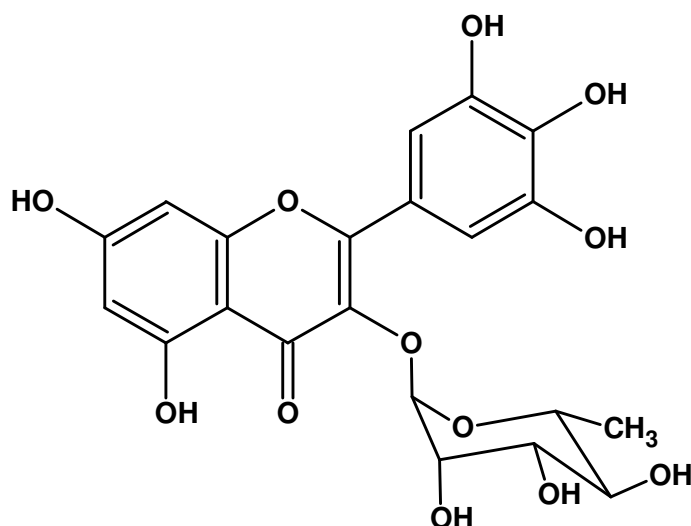


Figura 18: Estrutura da substância 2.

Tabela 9: Dados de RMN ^1H e RMN-2D (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância 2.

H	δ (ppm), multiplic., J (Hz)	δ C	$g\text{HMBC}$ (δ)	$g\text{COSY}$ (δ)
1	---	---	---	---
2	---	157,4	---	---
3	---	134,3	---	---
4	---	177,7	---	---
5	---	161,3	---	---
6	6,19 (<i>d</i> , 2,0Hz, 1H)	98,6	103,9 / 93,5	6,35
7	---	164,1	---	---
8	6,35 (<i>d</i> , 2,0Hz, 1H)	93,5	164,1 / 98,6 / 156,4 / 103,9	6,19
9	---	156,4	---	---
10	---	103,9	---	---
1'	---	119,6	---	---
2' e 6'	6,87 (<i>s</i> , 2H)	107,9	157,4 / 145,7 / 136,4	---
3' e 5'	---	145,7	---	---
4'	---	136,4	---	---
1''	5,19 (<i>d</i> , 1H)	101,9	70,5 / 134,3	---
2''	3,97 (<i>dd</i> , 1,5;3,5Hz; 1H)	70,0	---	3,54
3''	3,54 (<i>dd</i> , 3,0;9,0Hz, 1H)	70,3	---	3,97 / 3,15
4''	3,15 (1H)	71,3	70,5	3,54
5''	3,33 (1H)	70,5	---	0,84
6''	0,85 (<i>d</i> , 6,5Hz, 3H)	17,4	70,5	3,33

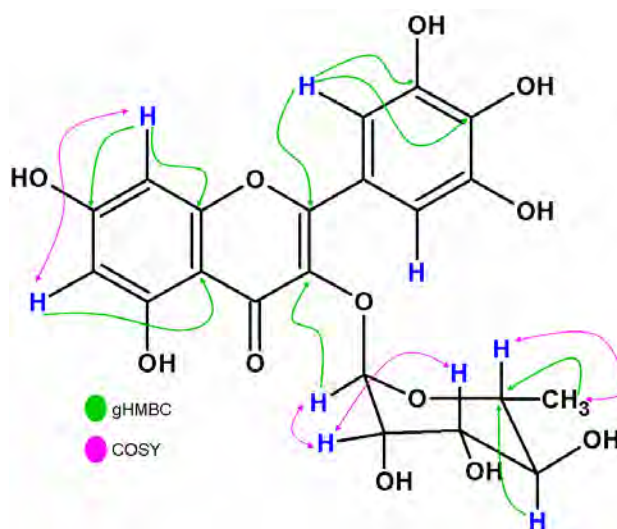


Figura 19: Algumas correlações observadas em experimento gHMBC e COSY da substância **2**.

Para o fracionamento de AcOEt-M utilizou-se a cromatografia em contra corrente de alta velocidade em escala preparativa, já que muitas classes de substâncias podem ser separadas através desta técnica.

O mecanismo de separação do HSCCC é baseado principalmente na diferença de solubilidade dos componentes entre as duas fases, então as substâncias separam-se de acordo com seus coeficientes de partição. Além das vantagens já citadas na parte de materiais e métodos, podemos ainda ressaltar que é uma técnica onde a fração ou o próprio extrato pode ser injetado diretamente, podendo assim, utilizar grande quantidade de amostra e assim, poupar etapas de purificação.

O sistema de solvente escolhido foi a mistura AcOEt:*n*-PrOH:H₂O (6:1:7, v/v/v), que distribuiu as substâncias presentes em AcOEt-M de maneira proporcional nas duas fases, ou seja, resultou num coeficiente de partição aproximadamente igual a um. A fase orgânica (superior) foi escolhida como sendo a fase móvel, e, portanto, a fase aquosa (inferior) para ser a fase estacionária.

O processo resultou na coleta de 17 frações (CC-1 à CC-17). A análise do cromatograma de CC-7 mostra a presença de um flavonóide majoritário, identificado como o flavonol miricetrina (substância **2**), através de RMN ¹H em comparação com o já isolado anteriormente, e dois minoritários (cromatograma na figura 20, pg.67).

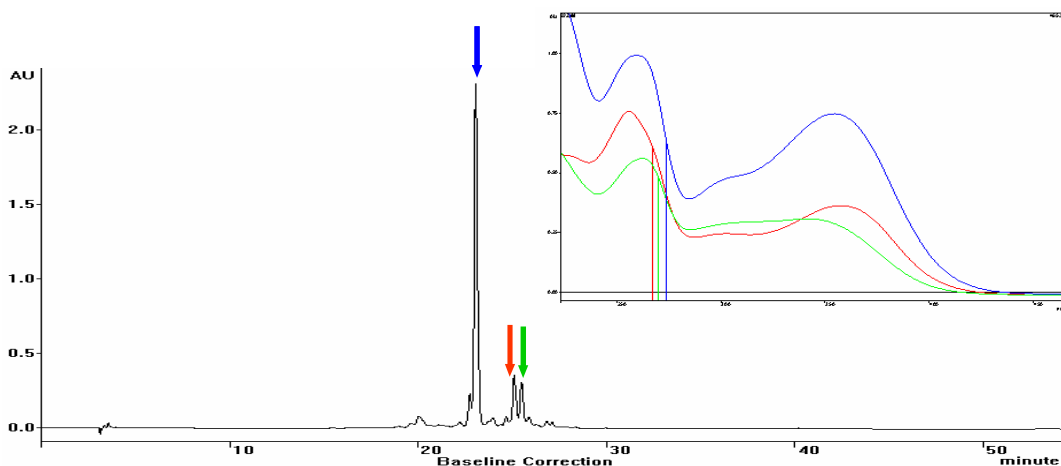


Figura 20: Cromatograma de CC-7, gradiente H₂O/MeOH (iniciando com 5%MeOH), C-18, 350nm.

Os cromatogramas de CC-2 e CC-3, figura 21, com perfis bem parecidos, mostraram a presença de dois flavonóides majoritários. O espectro de RMN de ¹H da fração CC-3 (figura 49, pg. 98) mostrou se tratar de uma mistura de flavonol e flavona, já que foi observado um sinal em δ_H 7,42 característico do hidrogênio na posição 3 de uma flavona. Pelo espectro de ultravioleta pôde-se distinguir o flavonol e a flavona, já que os flavonóis possuem valores para a banda I entre 352-385, enquanto que as flavonas possuem valores entre 304-350 (ANDERSEN & MARKHAM, 2006), provavelmente devido à presença de um substituinte na posição 3 (anel C). O flavonol foi atribuído primeiro pico, pois possui $\lambda_{m\acute{a}x}$ em 354,58 (banda I), e a flavona ao segundo pico, pois seu valor de $\lambda_{m\acute{a}x}$ para a banda I é de 334,34. Nos cromatogramas pôde-se observar que CC-3 está enriquecida com o flavonol e CC-2 contém aproximadamente a mesma quantidade das duas substâncias.

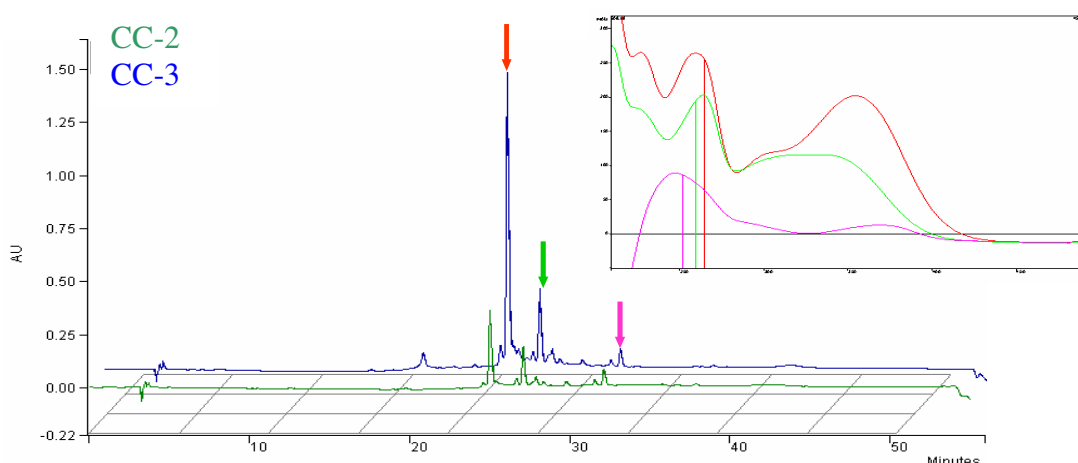


Figura 21: Cromatogramas de CC-2 e CC-3, gradiente H₂O/MeOH (iniciando com 5%MeOH), C-18, 254nm.

A análise dos cromatogramas das frações CC-10, CC-13 e CC-14 (figura 22) indica a presença de vários picos com grupos cromóforos semelhantes, com bandas no espectro de UV entre 215 e 240nm.

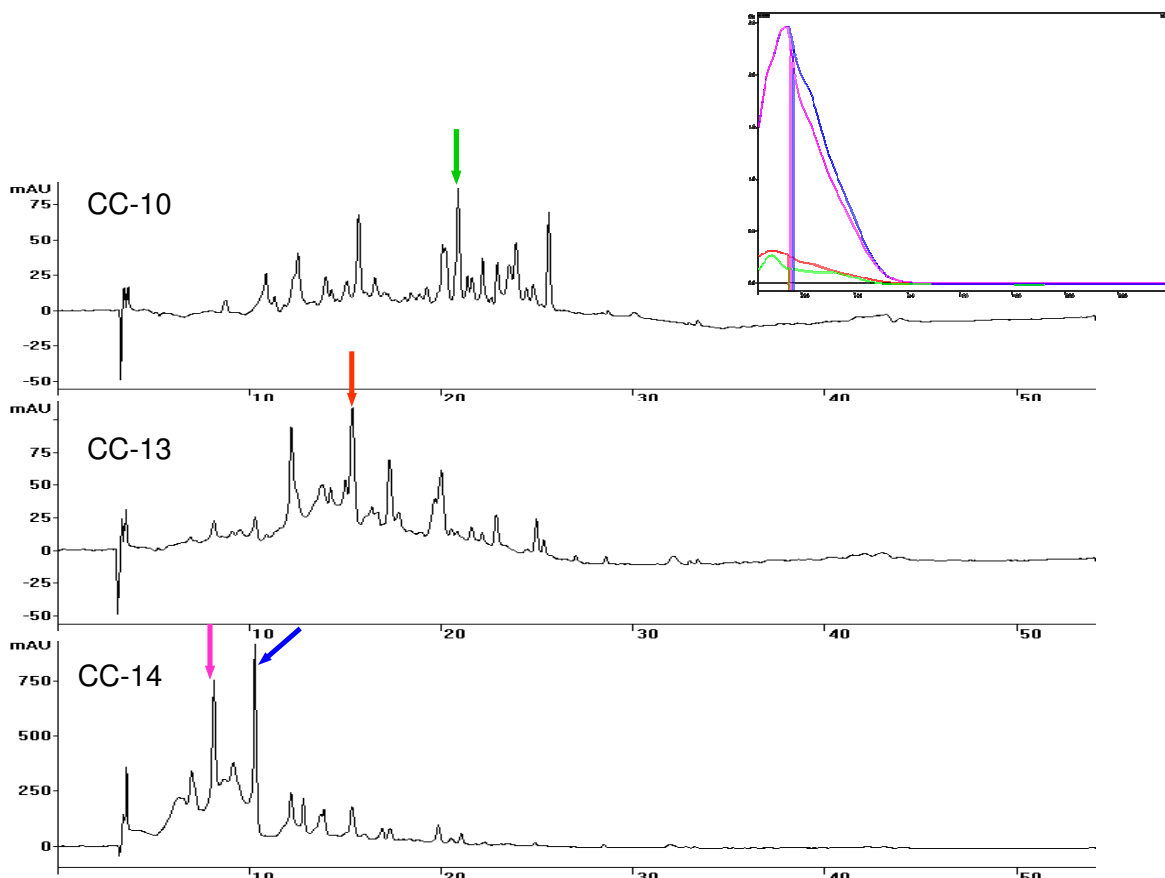


Figura 22: Cromatogramas de CC-10, CC-13 e CC-14, gradiente H₂O/MeOH (iniciando com 5%MeOH), C-18, 290nm.

A comparação das frações obtidas através da técnica de cromatografia em contra corrente com a matriz de partida (figura 23, pg. 69), mostra que se trata de uma ótima ferramenta para um fracionamento inicial, visto que as sub-frações obtidas contêm poucos constituintes, facilitando sua separação, podendo até resultar em alguma substância com alto grau de pureza, como foi o caso de CC-7, contendo o flavonol miricetrina.

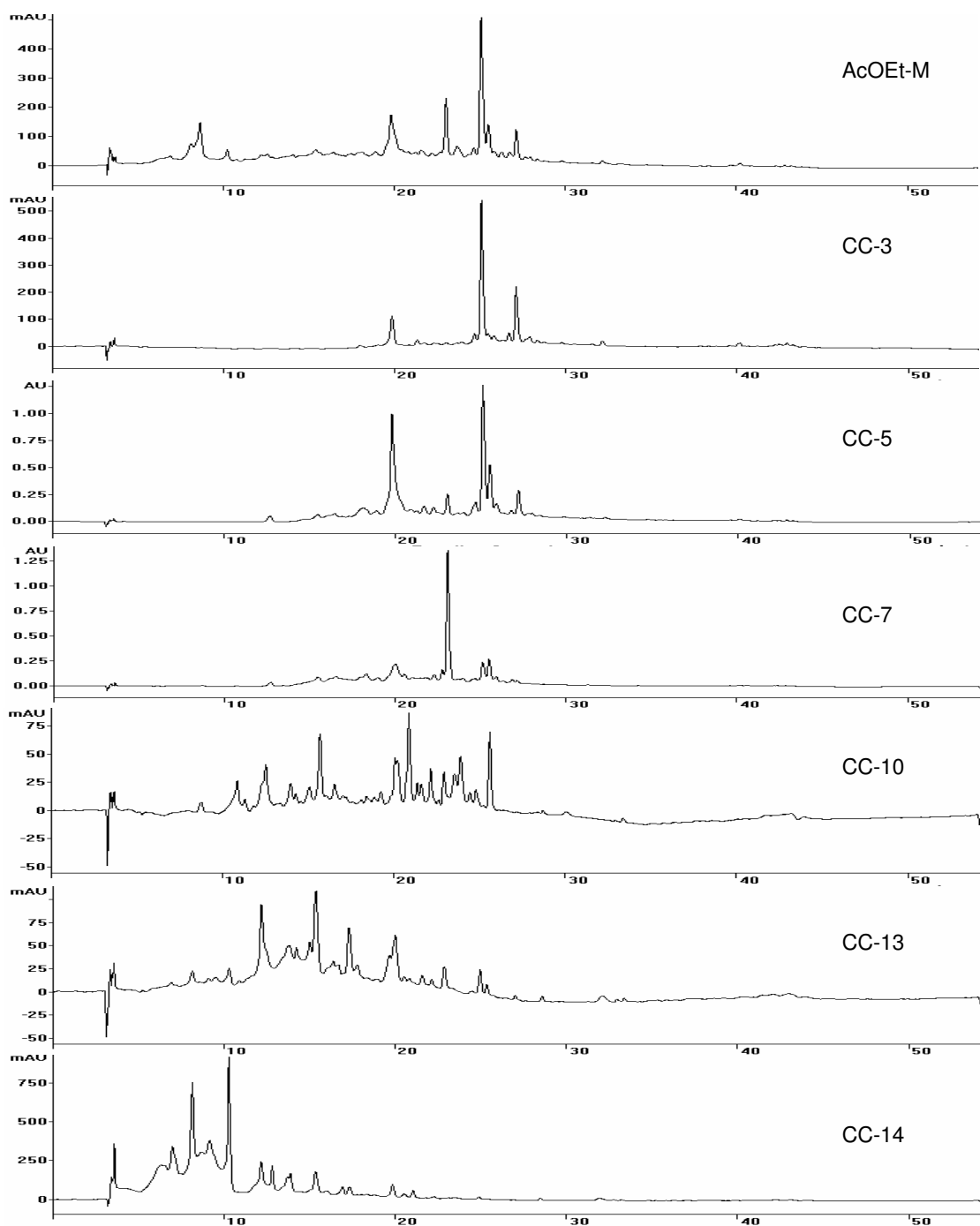


Figura 23: Cromatogramas de algumas frações originárias do fracionamento com HSCCC e da fração AcOEt-M, gradiente H₂O/MeOH (iniciando com 5%MeOH), C-18, 290nm.

3.2 Fracionamento do extrato bruto dos frutos de *E. jambolana*.

Após vários estudos para a preparação do extrato bruto dos frutos enriquecidos em antocianinas, a condição escolhida foi a solução de MeOH acidificada (1% HCl), que se mostrou muito eficiente, pois permitiu a extração e manteve a integridade das antocianinas, como pode ser visto nos cromatogramas das frações FrX-4 e FrX-5 (figuras 24 e 25).

O fracionamento do extrato bruto dos frutos em CC com XAD (tabela 2), resultou em nove frações. Na eluição com água, foram obtidas três frações, e uma fração para cada eluente adicional.

Espectros de RMN ^1H indicaram que, apesar da forte coloração vermelha (indicativo de antocianinas), as frações FrX-1, FrX-2 e FrX-3 contêm majoritariamente açúcares. O espectro de RMN ^1H das frações FrX-4 e FrX-5 mostraram que contêm substâncias aromáticas e grande quantidade de açúcares.

As análises em CLAE-DAD das frações FrX-4 e FrX-5 indicaram a presença de três antocianinas majoritárias e uma minoritária (figuras 24 e 25), observadas pelo espectro UV, com duas bandas características, uma em cerca de 274nm e outra ao redor de 524nm. Os demais picos apresentaram bandas com λ . máx próximos a 250nm no espectro de UV, sugerindo uma provável presença de outros substituintes fenólicos.

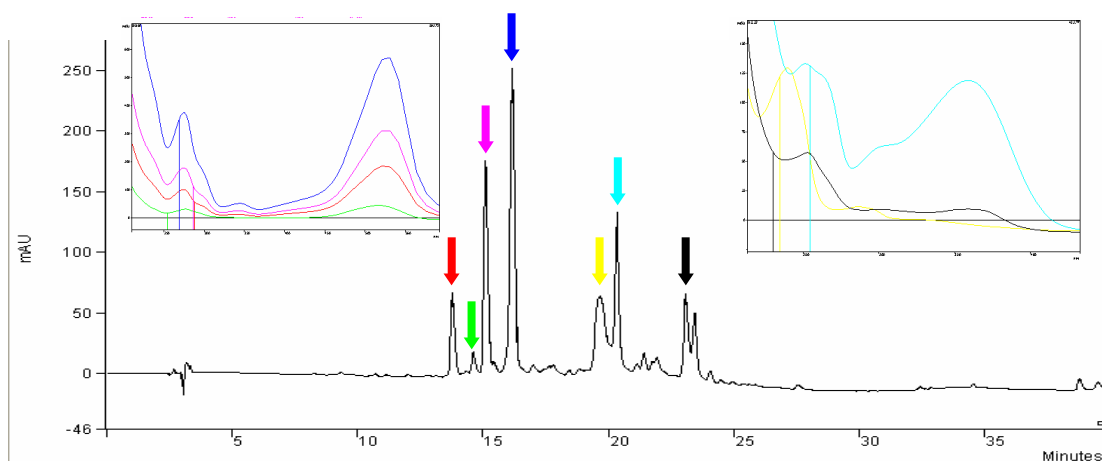


Figura 24: Cromatograma de FrX-4, gradiente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (iniciando com 5% MeOH), 254nm.

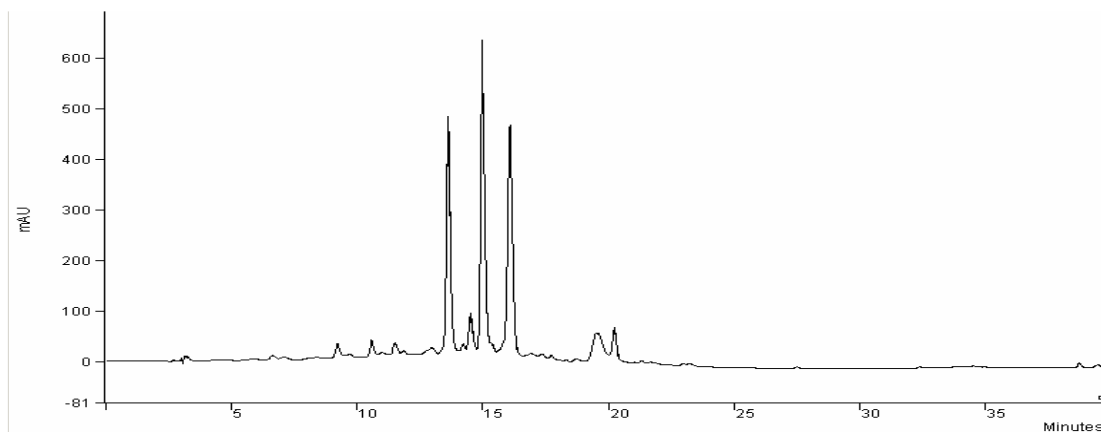


Figura 25: Cromatograma de FrX-5, gradiente H₂O/MeOH (iniciando com 5%MeOH), 254nm.

Após a análise em CLAE das frações resultantes do procedimento para o fracionamento de FrX-4 (tabela 7), verificou-se que as antocianinas estavam presentes nas sub-frações FrX-432, FrX-442 e FrX-452, como mostrado no cromatograma de FrX-442 em 254 e 510nm (figura 26), mas com tempos de retenção diferente aos das figuras 24 e 25, provavelmente devido às alterações causadas pelo uso de diferentes colunas.

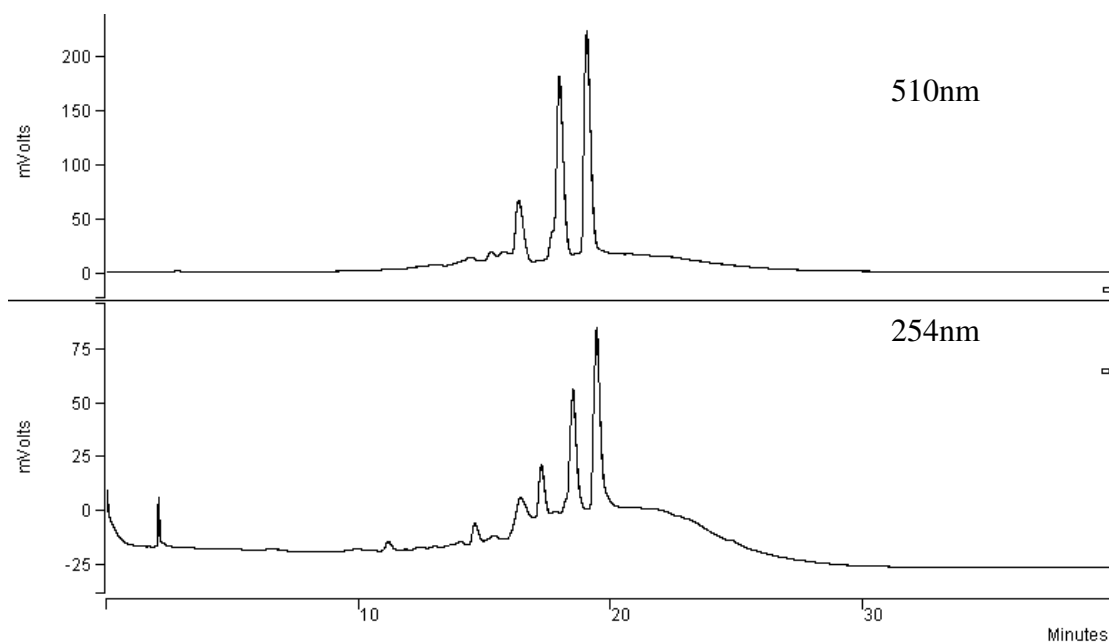


Figura 26: Cromatograma de FrX-442, C-18, gradiente H₂O/MeOH (iniciando com 5%MeOH).

O fracionamento de FrX-442 através da coluna cromatográfica de fase reversa C-18 não foi eficiente. Mesmo observando as “faixas” eluindo, as sub-frações apresentavam o mesmo perfil, observados através de CCDC e CLAE.

Após várias pesquisas na literatura e adaptações pode-se chegar a uma condição de análise para que a FrX-442 fosse fracionada em CLAE preparativo, porém a maioria da massa ficou retida na coluna, como podemos observar no cromatograma da figura 27, no qual os picos selecionados representam as antocianinas, já que foram observados a λ 520nm.

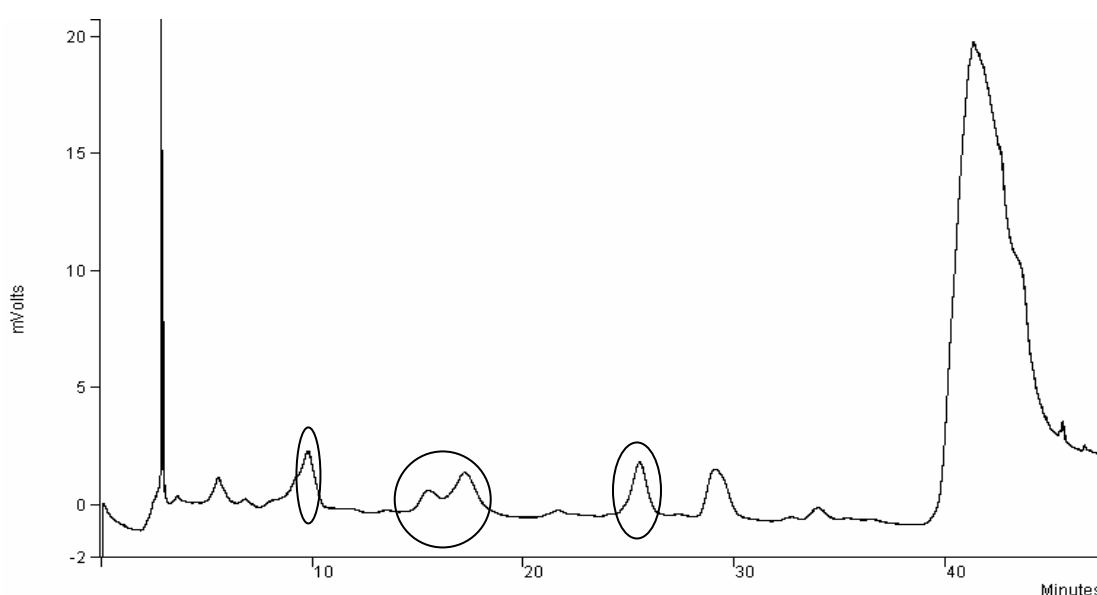


Figura 27: Cromatograma de FrX-442 0 a 15min 35% B, 16 a 18min 35-40% B, 19 a 35min 40% B, 35 a 40 min 40-100% B, em coluna de fase reversa (fenil-hexila), onde A é água (0,5% H_3PO_4) e B é MeOH a 254nm.

A avaliação da atividade anti-radicalar das rações semi-purificadas de *E. jambolana* foi realizado pelo ensaio que determina a porcentagem de seqüestro de radicais livres da molécula de DPPH. Os radicais livres são formados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular através de reações de óxido-redução, isto é, as moléculas cedem ou recebem um elétron para a formação radicalar. Compostos polifenólicos, como as antocianinas, são antioxidantes não-enzimáticos, e agem inibindo o processo de peroxidação lipídica (BIANCHI & ANTUNES, 1999) doando um átomo de hidrogênio para o radical, evitando assim as reações em cadeias.

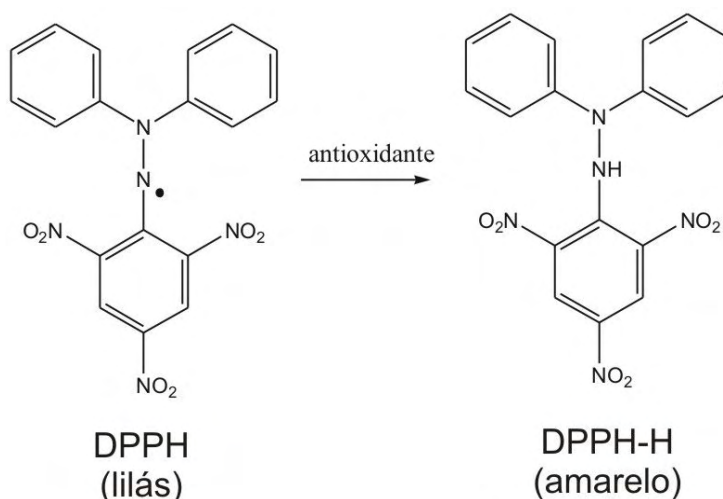


Figura 28: Mecanismo de reação do radical DPPH como antioxidante (doador de H⁺).

Todas as frações testadas frente ao radical livre DPPH apresentaram forte atividade quando comparada à rutina.

O valor de IC₅₀ é a concentração efetiva na qual 50% dos radicais DPPH são seqüestrados, e esses valores das frações FrX-4, FrX-442, FrX-452 e FrX-5 foram 0,065, 0,45, 0,038 e 0,044 mg.mL⁻¹ respectivamente. O valor para a rutina foi de 21μmolmL⁻¹ (12,81mgmL⁻¹), evidenciando um potencial antiradicalar marcadamente superior ao observado para a rutina, usada como controle positivo.

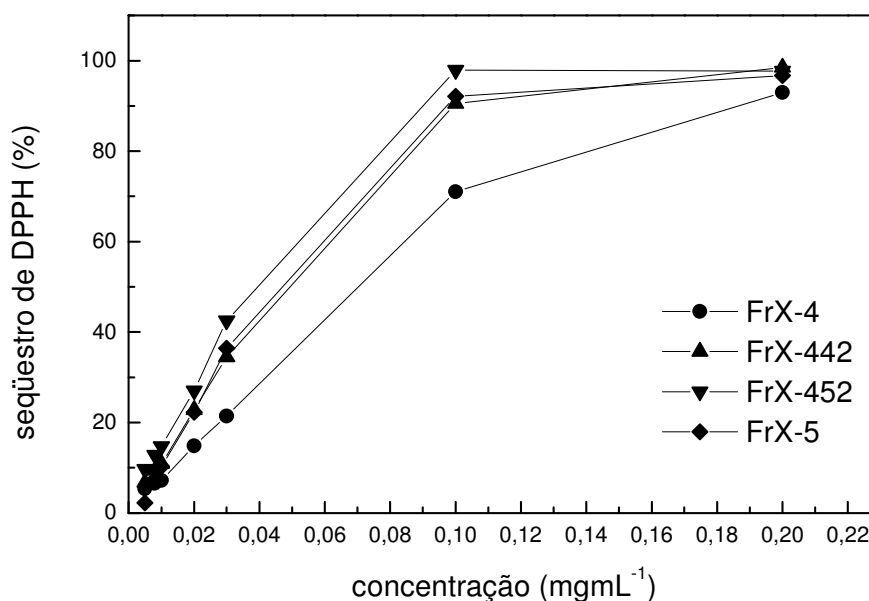


Figura 29: Atividade seqüestradora de radicais livres de FrX-4, FrX-442, FrX-452 e FrX-5 frente ao DPPH.

Como o cátion flavilium é muito estável e não possui lugar de fácil ruptura da ligação, o espectro de massas das antocianinas apresenta um cátion intenso $[M]^+$. O íon de m/z 288 presente em todos os espectros de massas obtidos foi atribuído à aglicona cianidina.

Aparecem íons no espectro que correspondem aos íons resultantes da fragmentação que envolve a clivagem de ligações C-C no anel C, típico de flavonóides agliconas. Quebra na ligação C2-C3, do anel C, figura 33, resulta no íon de m/z 149, observado para todas as substâncias.

Na região de maior massa, todo o espectro é dominado por perdas de radicais e/ou moléculas pequenas que podem proporcionar informações adicionais sobre grupos funcionais presentes nas moléculas.

O mecanismo de fragmentação de antocianinas O-glicosiladas envolve a quebra de ligações glicosídicas acompanhadas de transferências de um hidrogênio envolvendo perda de unidade de açúcar e resultando em íons contendo somente a aglicona (OLIVEIRA; ESPERANÇA; FERREIRA, 2001).

Tabela 10: Identificação das antocianinas de *E. jambolana*.

Pico	t_r (min)	$[M]^+$	$[M - \text{açúcar}]^+$	Antocianina
FrX-4-1	13,7	419	288	cianidina-3-xilosídeo
FrX-4-2	14,6	449	288	cianidina-3-glucosídeo
FrX-4-3	15,1	595	288	cianidina-3-rutinosídeo
FrX-4-4	16,2	491	288	cianidina-3-(6''-acetoil)-glicosídeo

Foi observado o íon m/z 131 no espectro de FrX-4-1 referente ao íon do açúcar xilose. No espectro de massas de FrX-4-2 foi observado um fragmento m/z 345 resultante da clivagem do açúcar (figura 30), também observada para FrX-4-5. O fragmento m/z 244 foi gerado de acordo com a figura 31, onde ocorre a perda de uma molécula de CO.

A substância atribuída para FrX-4-3 possui dois açúcares, uma glicose ligada ao C-3 e uma ramnose ligada à glicose, ou seja, um rutinosídeo; então observou-se no espectro de massas o íon m/z 309, resultante da perda do açúcar total e o íon em m/z 449 resultante da perda da ramnose. Em m/z 477 observa o pico do fragmento gerado de acordo com a figura 32.

Com os dados observados e comparação com a literatura, que apresenta algumas antocianinas presentes na espécie (WU & PRIOR, 2005), foi possível sugerir às substâncias observadas as estruturas citadas na tabela 10, referentes ao cromatograma da figura 35.

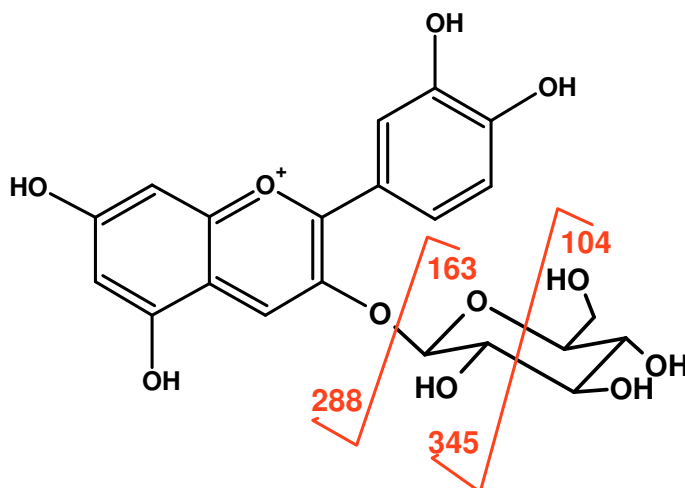


Figura 30: Proposta de fragmentação para FrX-4-2.

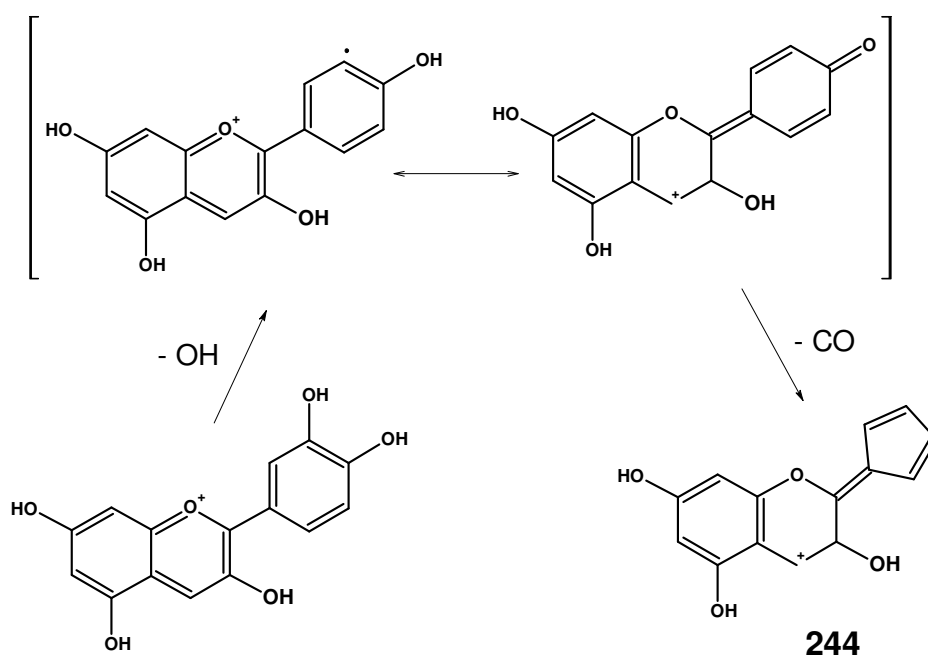


Figura 31: Esquema de formação de m/z 244 para FrX-2.

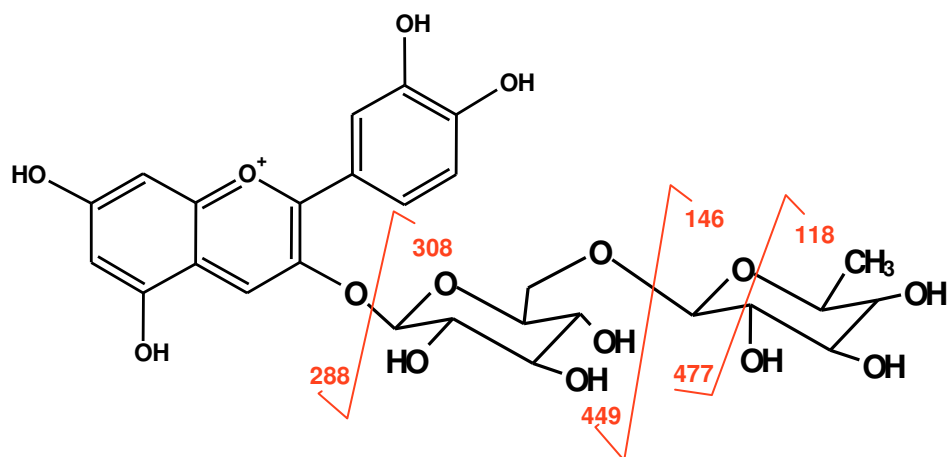


Figura 32: Proposta de fragmentação para FrX-4-3.

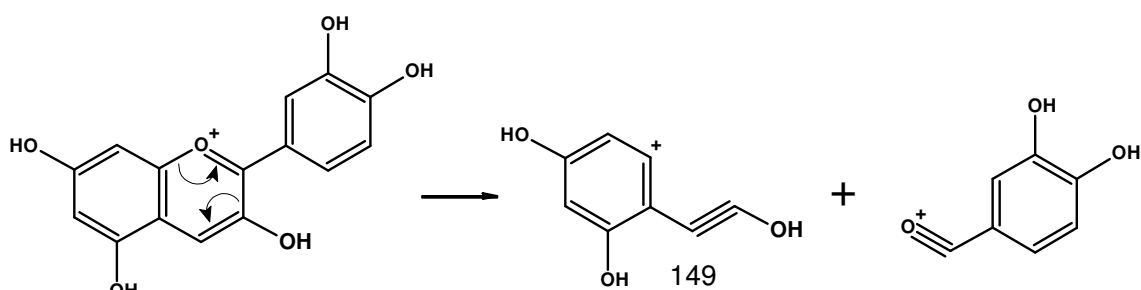


Figura 33: Rearranjo proposto para justificar o íon m/z 149.

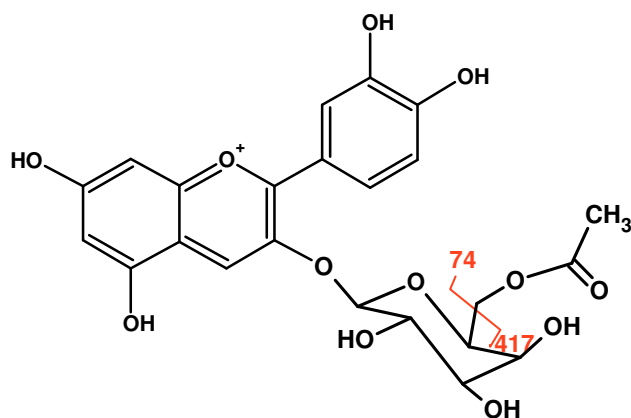


Figura 34: Proposta de fragmentação para FrX-5.

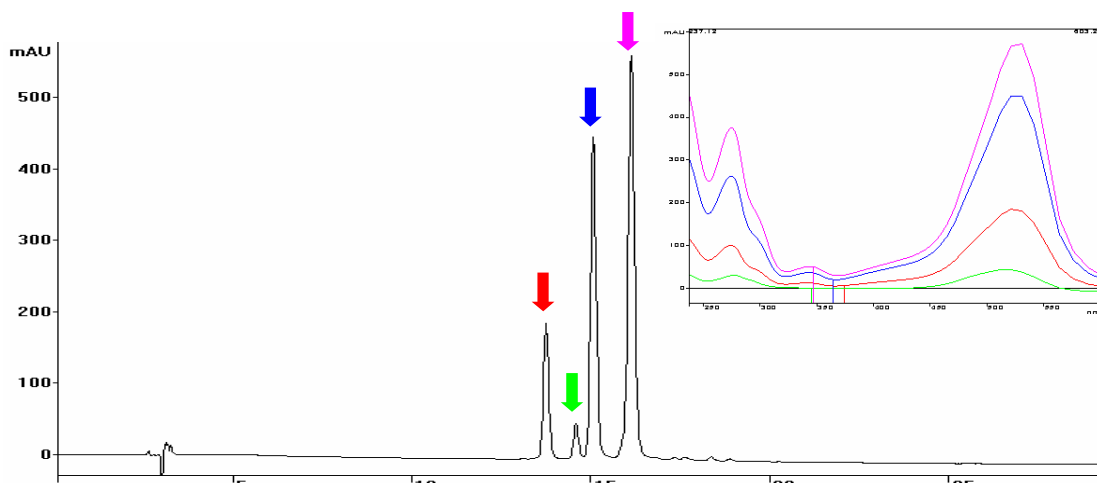
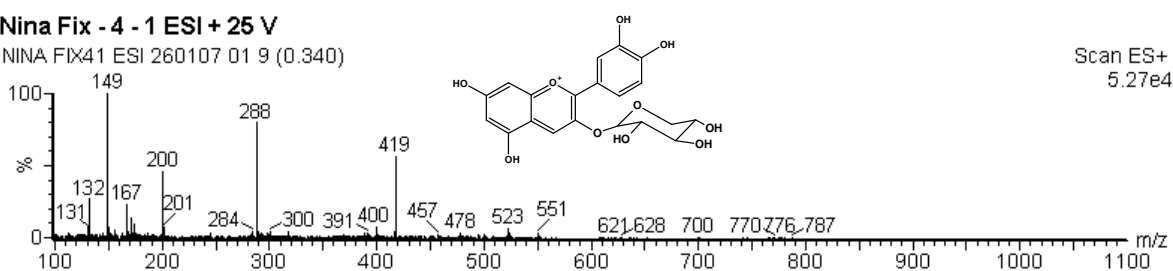


Figura 35: Cromatograma de FrX-4 (C18, grad H₂O/MeOH, 520nm) analisado em espectrometria de massas e os referentes espectros de UV.

Nina Fix - 4 - 1 ESI + 25 V

NINA FIX41 ESI 260107 01 9 (0.340)

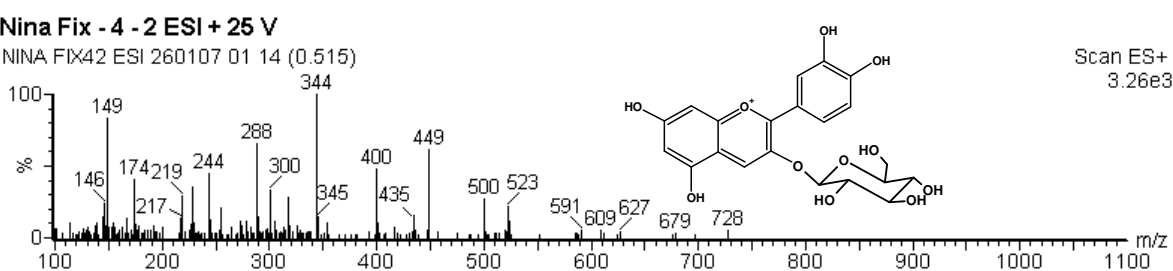


Scan ES+
5.27e4

Figura 36: Espectro de massas de FrX-4-1.

Nina Fix - 4 - 2 ESI + 25 V

NINA FIX42 ESI 260107 01 14 (0.515)

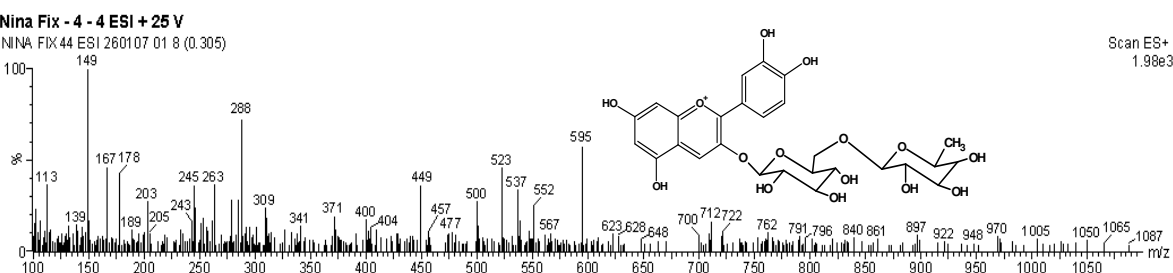


Scan ES+
3.26e3

Figura 37: Espectro de massas de FrX-4-2.

Nina Fix - 4 - 4 ESI + 25 V

NINA FIX44 ESI 260107 01 8 (0.305)

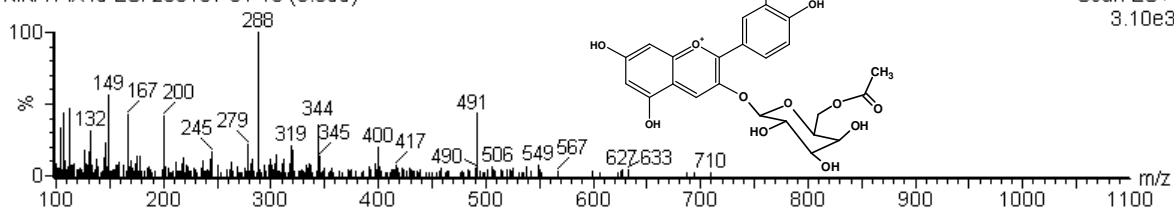


Scan ES+
1.98e3

Figura 38: Espectro de massas de FrX-4-3.

Nina Fix - 4 - 5 ESI + 25 V

NINA FIX45 ESI 260107 01 18 (0.655)

Scan ES+
3.10e3**Figura 39:** Espectro de massas de FrX-4-4.

4 CONCLUSÕES

O fracionamento cromatográfico das folhas de *E. jambolana*, através de técnicas cromatográficas usuais (colunas cromatográficas e CLAE) conduziu ao isolamento de dois flavonóides, um inédito, 5,7,3',5'-tetraidroxi-4'-ramnosil-flavona (**1**) e o flavonol miricetrina (**2**) com forte atividade antioxidante, observada através do método de descoramento do β -caroteno em CCD. O flavonol miricetrina também foi isolado através de HSCCC em grande quantidade, favorecida pela ausência de suporte sólido, e, portanto, da perda de massa por adsorção.

A forte atividade antioxidante observada para miricetrina pode ser relacionada com a presença dos grupos hidroxila no anel B que proporciona uma maior estabilidade ao radical formado após a doação de um hidrogênio radicalar em processos redox, já que contribui para a deslocalização dos elétrons. Adicionalmente, a atividade antioxidante é intensificada pela presença de um sistema carbonílico α , β -insaturado do anel C, que faz com que a deslocalização eletrônica a partir do anel B aumente.

Uma ferramenta muito útil no processo cromatográfico foi a utilização de CLAE com detector em arranjo de diodos (DAD), que possibilitou a visualização dos cromatogramas em diversos comprimentos de onda e também a comparação das curvas de absorção na região de ultravioleta dos picos de interesse, fornecendo informações importantes sobre as estruturas dos constituintes químicos com grupos cromóforos.

O método de extração utilizado para os frutos foi bem selecionado, já que o objetivo de conseguir frações ricas em antocianinas foi alcançado. Apesar do método estabelecido em CLAE analítico ter fornecido cromatogramas com boa resolução, a transposição do método para escala preparativa através de cromatografia em coluna e CLAE com C-18 e fenil-hexila não foram eficientes para o isolamento das substâncias presentes em FrX-442.

Os espectros de massas forneceram importantes informações sobre as estruturas das antocianinas presentes nos frutos que, aliados às informações obtidas através da análise em CLAE-DAD e em comparação com dados da literatura, proporcionou a identificação das mesmas como cianidina-3-xilosídeo, cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-(6''-acetoil)-glicosídeo.

Os testes de seqüestro do radical DPPH mostraram que todas as frações enriquecidas em antocianinas analisadas têm uma maior atividade antioxidante quando comparado com a rutina. Esses resultados confirmaram que as antocianinas possuem um poder antiradicalar

muito forte, por vezes bastante superior ao substância de referência rutina, considerado um ótimo agente antioxidante. Os dados obtidos sugerem um possível uso dos extratos enriquecidos com antocianinas de *E. jambolana* como agente quimiopreventivo, principalmente se complementados com outras informações relevantes, como por exemplo, a avaliação da toxicidade.

5 REFERÊNCIAS

AGRAWAL, P. K. *Carbon – 13 NMR of flavonoids*. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 183-235. (Studies in Organic Chemistry, v. 39).

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 1197 p.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 24, n. 9, p. 1355–1363, 1998.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit. *Food Chemistry*, v. 90, n. 4, p. 727–733, 2005.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Revista de Nutrição*, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CALIXTO, J. B. Biopirataria: a diversidade biológica na mira da indústria farmacêutica. *Ciência Hoje*, v. 28, n. 167, p. 36-43, 2000.

CARVALHO, P. G. B.; MACHADO, C. M. M.; MORETTI, C. L.; FONSECA, M. E. de N. Hortaliças como alimentos funcionais. *Horticultura Brasileira*, v. 24, n. 4, p. 397-404, 2006.

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

CHANDRA, A.; NAIR, M. G.; IEZZONI, A. Evaluation and characterization of the anthocyanin pigments in tart cherries (Prunus cerasus L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, n. 6, p. 967-969, 1992.

CHEN, L. J.; SONG, H.; LI, J.; DU, Q. Z.; ITO, Y. Analysis of flavonoids in extracts from the seeds of Oroxylum indicum using high speed countercurrent chromatography / mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 28, n. 10, p. 1549-1555, 2005.

CORDER, R.; MULLEN, W.; KHAN, N. Q.; MARKS, S. C.; WOOD, E. G.; CARRIER, M. J.; CROZIER, A. Red wine procyanidins and vascular health. *Nature*, v. 444, n. 7119, p. 566, 2006.

CORSINO, J.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, M. V. B.; BOLZANI, V. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. *Phytotherapy Research*, v. 17, n. 8, p. 913–916, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997.

DI STASI, L. C. (Org). *Plantas medicinais: arte e ciência, um guia para uma pesquisa interdisciplinar*. São Paulo: Fundação Editora Unesp, 1996. 230 p.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X. D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system: a study of historical sources from the 16th to 19th century. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, n. 2, p. 338–347, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICCOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

HAMBURGUER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. *Princípios ativos de plantas superiores*. São Carlos: EdUFSCar, 2003. 152 p. (Série de textos da Escola de Verão em Química, v. 4).

HOU, DE-X.; FUJII, M.; TERAHARA, N.; YOSHIMOTO, M. Molecular mechanisms behind the chemopreventive effects of anthocyanidins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2004, n. 5, p. 321-325, 2004.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1065, n. 2, p. 145-168, 2005.

JONES, P. J. Functional foods: more than just nutrition. *Canadian Medical Association*, v. 166, n. 12, p. 1555-1563, 2002.

LEE, H. S. Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed budd blood orange (*Citrus sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 5, p. 1243-1246, 2002.

LIMA, W. G.; GUEDES-BRUNI, R. R. *Myrceugenia* (Myrtaceae) ocorrentes no Parque Nacional do Itatiaia, Rio de Janeiro. *Rodriguésia*, v. 55, n. 85, p. 73-94, 2004.

- LIU, X.; XIAO, G.; CHEN, Y. X.; WU, J. Quantification and purification of mulberry anthocyanins with macroporous resins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2004, n. 5, p. 326-331, 2004.
- LONGO, L.; VASAPOLLO, G. Determination of anthocyanins in Ruscus aculeatus L. berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 2, p. 475-479, 2005.
- MAHMOUD, I. I.; MARZOUK, M. S. A.; MOHARRAM, F. A.; EL-GIND, M. R.; HASSAN, A. M. K. Acylated flavonol glycosides from Eugenia jambolana leaves. *Phytochemistry*, v. 58, n. 8, p. 1239-1244, 2001.
- MORTON, J. F. Jambolan. In: _____. *Fruits of warm climates*. Miami: Florida Flair Books, 1987. p. 375-378.
- MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; CHANDRA, S.; TANDAN, S. K.; LAL, J.; RAVIPRAKASH, V. Anti-inflammatory activity of Syzygium cumini bark. *Fitoterapia*, v. 72, n. 4, p. 369-375, 2001.
- NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.
- OLIVEIRA, M. C.; ESPERANÇA, P.; FERREIRA P. M. A. A. Characterization of anthocyanidins by electrospray ionisation and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 15, n. 17, p. 1525-1532, 2001.
- PEPATO, M. T.; MORI, D. M.; BAVIERA, A. M.; HARAMI, J. B.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. Fruit of the jambolan tree (Eugenia jambolana Lam.) and experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, n. 1/2, p. 43-48, 2005.
- PERES, L. E. P. Metabolismo secundário. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2007.
- PHILIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.
- PRATT, D. E.; MILLER, E. E. A flavonóide antioxidante em Spanish peanuts (*Arachia-Hipogaea*). *Journal of American Oil Chemistry Society*, v. 61, n. 6, p. 1064-1067, 1984.
- RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Hypoglycemic effect of Eugenia jambolana seed kernels on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmaceutical Biology*, v. 41, n. 8, p. 598-603, 2003.

- SAKAKIBARA, I.; KATSUHARA, T.; IKEYA, Y.; HAYASHI, K.; MITSUASH, H. Cannabisin A, an arylnaphtalene lignanamide from fruits of Cannabis sativa. *Phytochemistry*, v. 30, n. 9, p. 3013-3016, 1991.
- SANTOS, L. C.; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Fast preparative separation of flavones from capitula of Eriocaulon ligulatum (Vell.) L. B. Smith (Eriocaulaceae) by high-speed countercurrent chromatography (HSCCC). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 26, n. 2, p. 101-103, 2005.
- SEERAM, N. P.; SCHUTZKI, R.; CHANDRA, A.; NAIR, M. G. Characterization, quantification, and bioactivities of anthocyanins in Cornus species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 9, p. 2519-2523, 2002.
- SILVA, A. L. G. da; PINHEIRO, M. C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de Eugenia L. (Myrtaceae). *Acta Botânica Brasileira*, v. 21, n. 1, p. 235-247, 2007.
- SILVA, M. B. S. Flavonóides com capacidade antioxidante. Química aplicada. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Disponível em: <<http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos%20DI%20PDF/Artigo%20Marisa.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2007.
- SILVA, R. V. Estudo biomonitorado das folhas de Piper arboreum Aublet (Piperaceae). 191 f. 2000. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2000.
- 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/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 1999. 821 p.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M. ; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 684-688, 2002.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO A. C. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005
- WANG, H.; NAIR, M. G.; IEZZONI, A. F.; STRASBURG, G. M.; BOOREN, A. M.; GRAY, J. I. Quantification and characterization of anthocyanins in balaton tart cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 7, p. 2556-2560, 1997.
- WU, X.; PRIOR R. L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 8, p. 3101-3113, 2005.

5.1 Sites consultados

<http://www.anvisa.gov.br/> - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

<http://www.bibvirt.futuro.usp.br> - Biblioteca Virtual dos Estudantes de Língua Portuguesa.

<http://www.google.com.br> - Google.

<http://www.ibpm.org.br/> - Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais.

<http://www.ift.org/cms/> - Institute of Food Technologists.

<http://www.mme.gov.br/> - Ministério de Meio Ambiente.

<http://www.portal.saude.gov.br/> - Ministério da Saúde.

<http://www.sbafe.org.br/SBAF/> - Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais (SBAF).

ANEXO A

Espectros de RMN das substâncias isoladas.

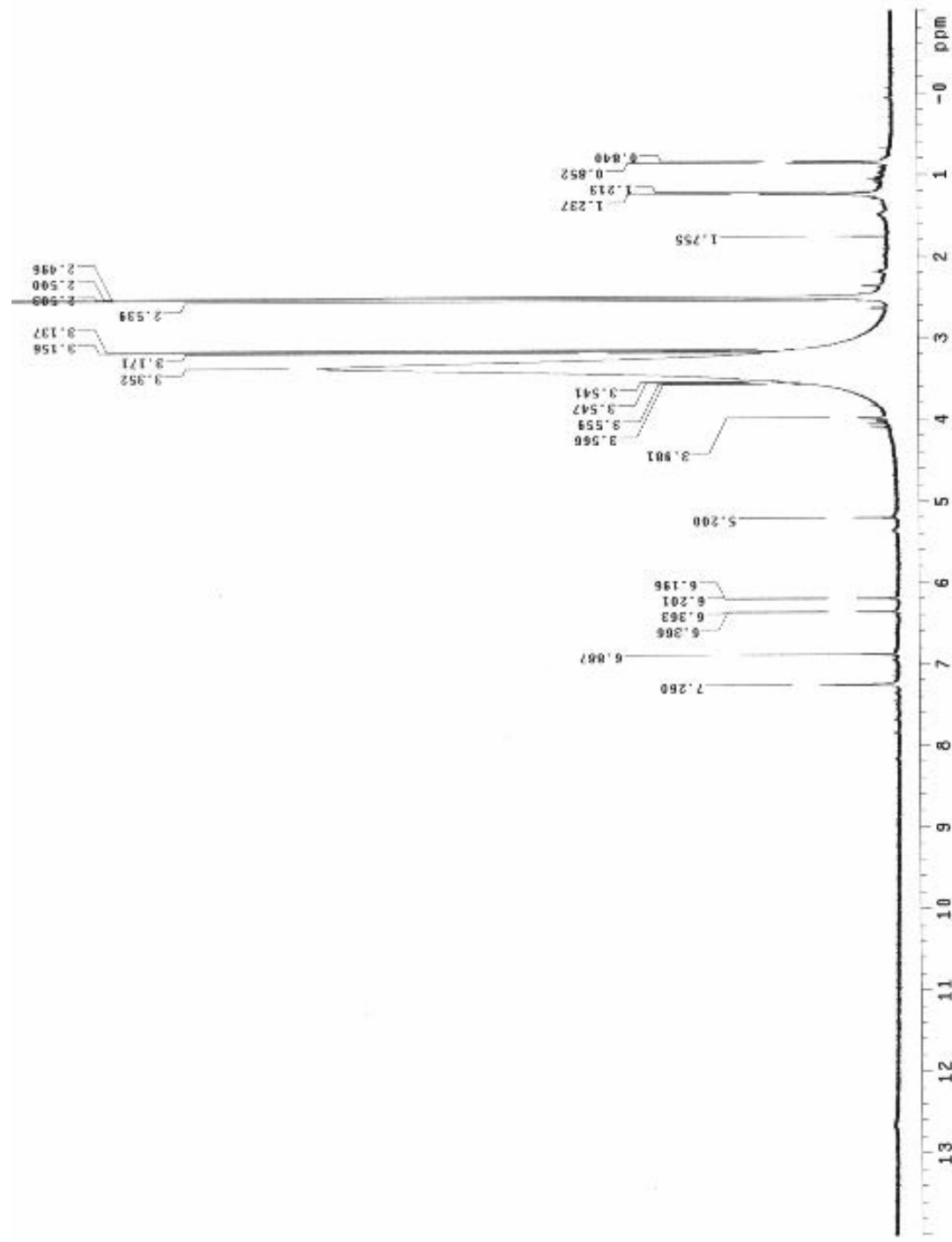


Figura 40 Espectro de RMN ^1H de EBF-1-14-E em $\text{DMSO}-d_6$ a 500MHz

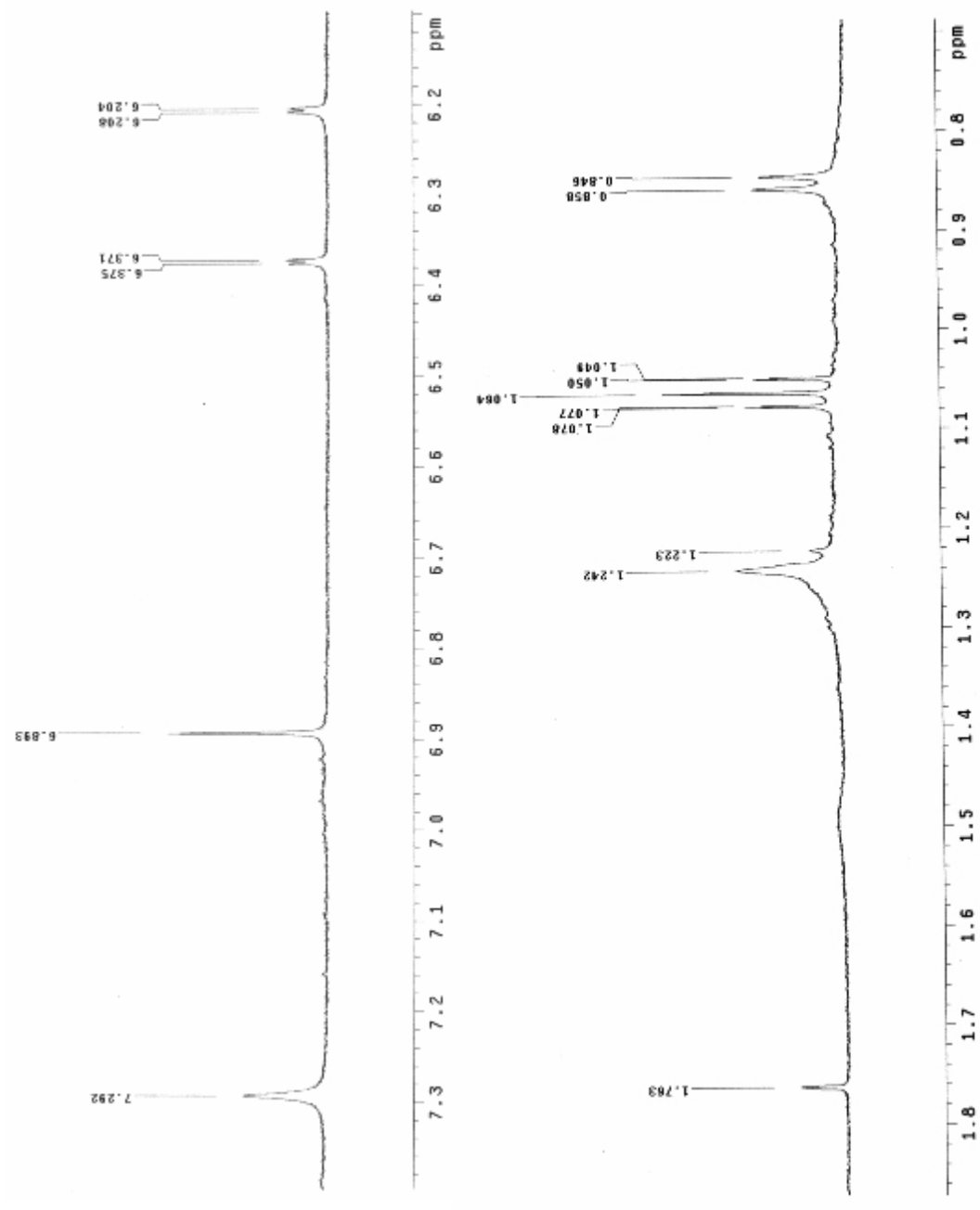


Figura 41: Ampliações do espectro de RMN ^1H de EBF-1-14-E em $\text{DMSO}-d_6$ a 500MHz

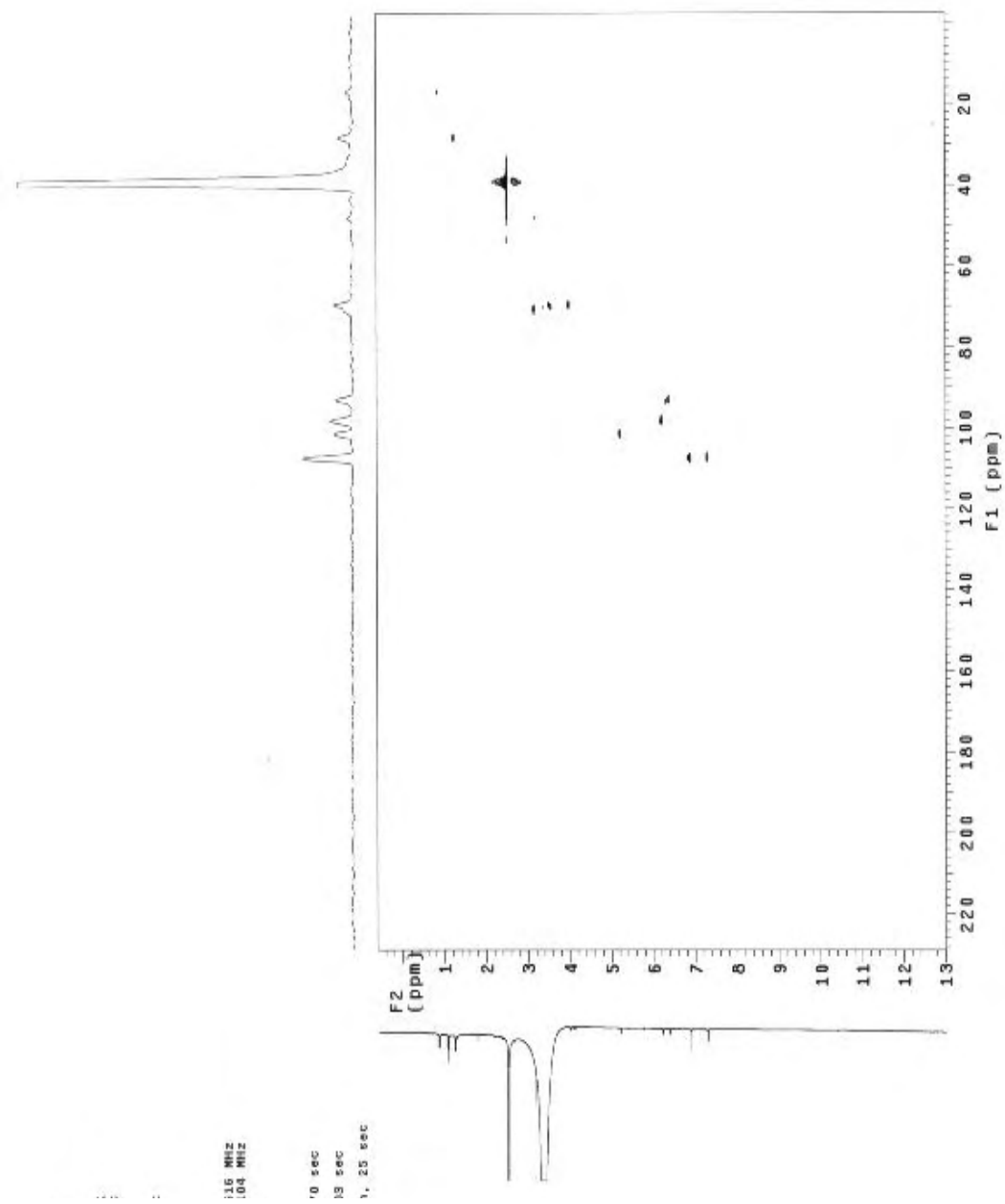


Figura 42: gHMQC de EBF-1-14-E em DMSO- d_6 a 500MHz.

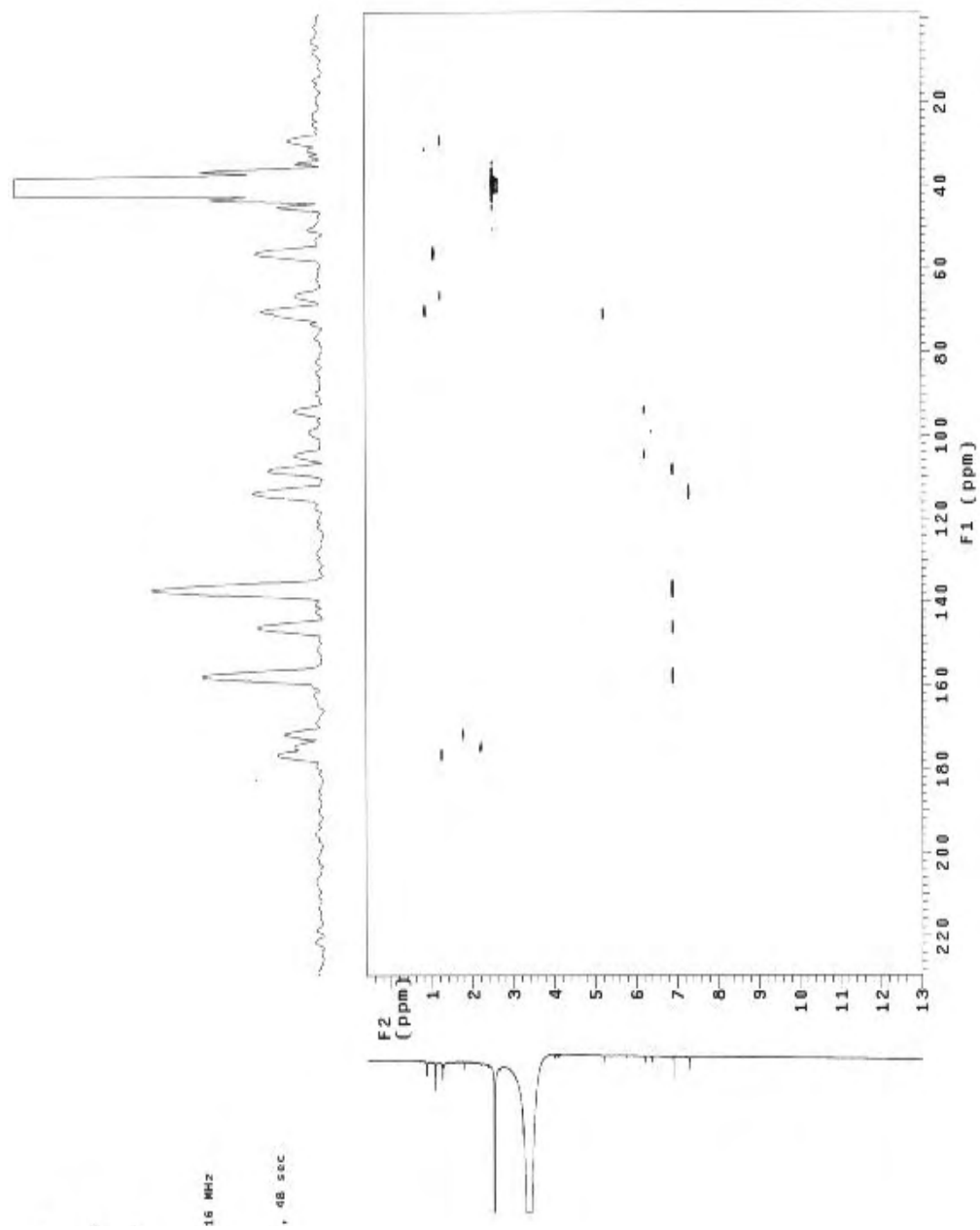


Figura 43: gHMBC de EBF-1-14-E em DMSO-d_6 a 500MHz.

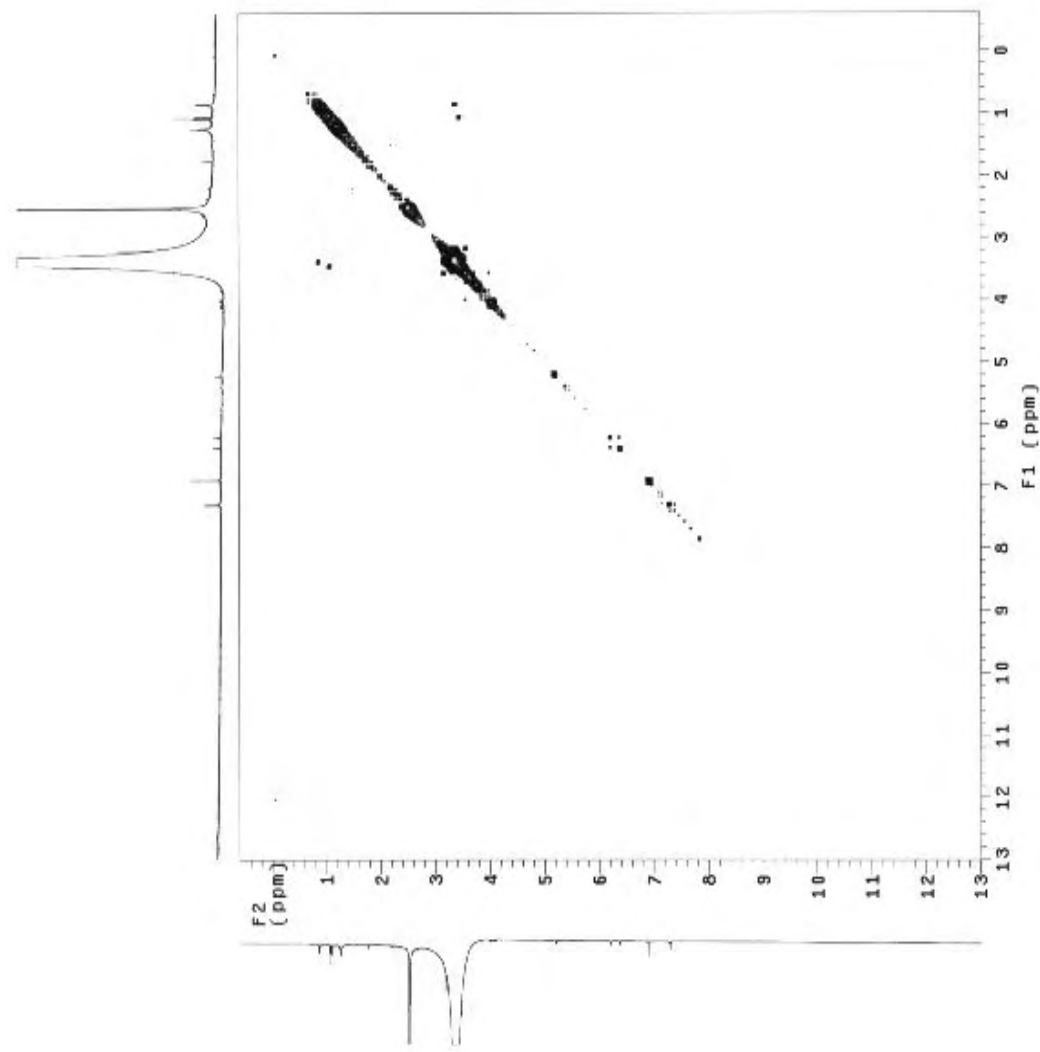


Figura 44: gCOSY de EBF-1-14-E em DMSO-d₆ a 500MHz

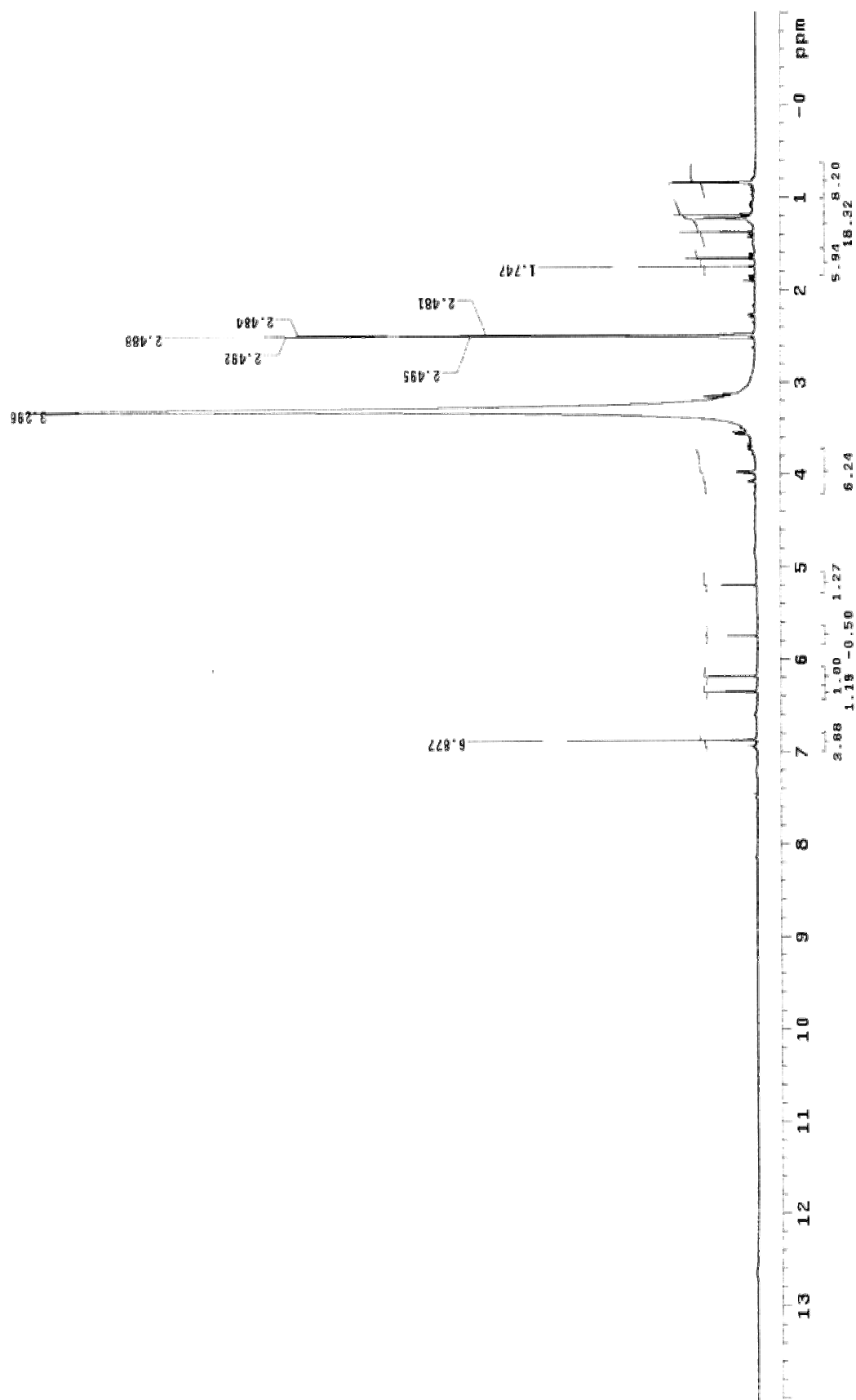


Figura 45: Espectro de RMN ¹H de EAF-167R em DMSO-*d*₆ a 500MHz

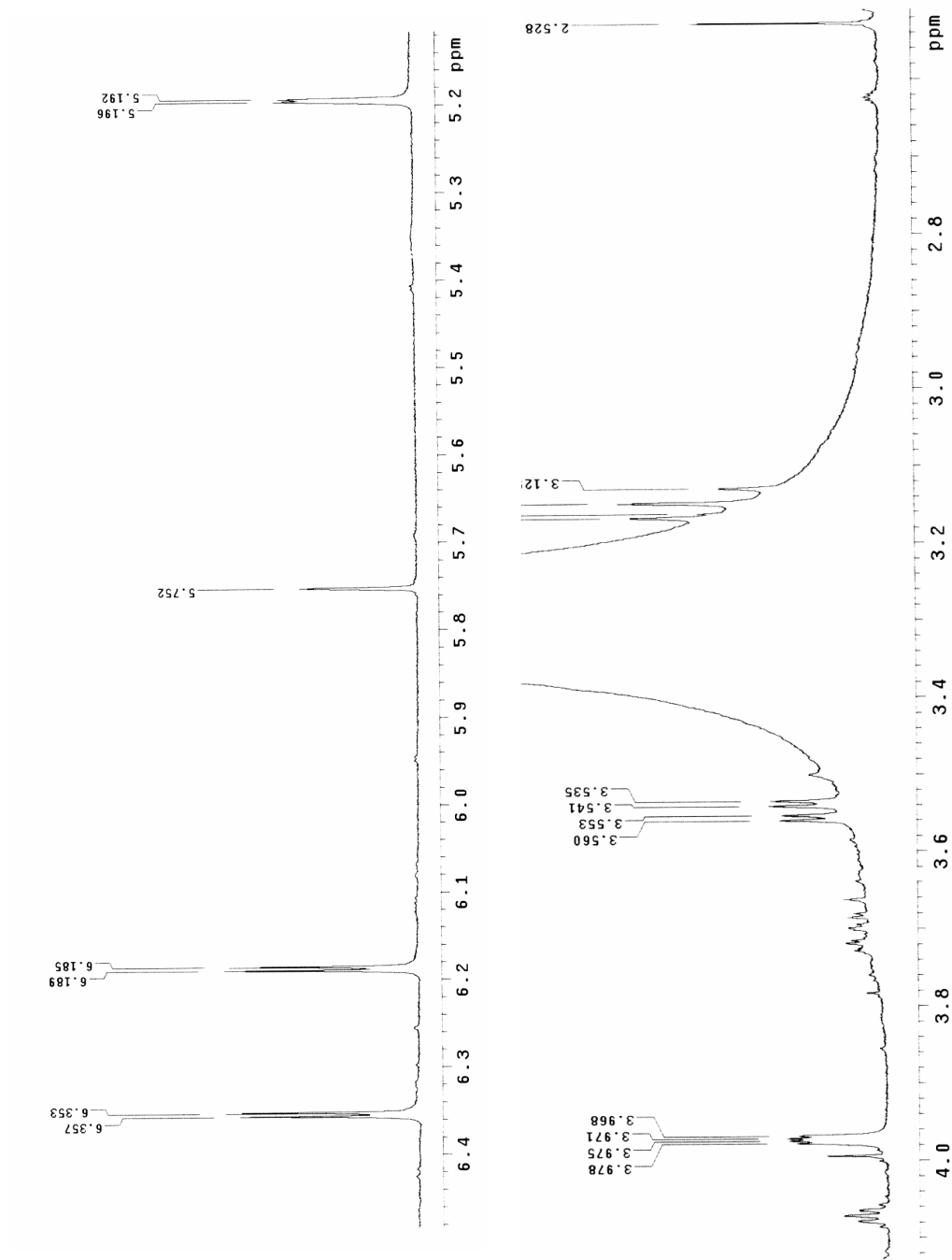


Figura 46: Ampliações do espectro de RMN ^1H de EAF-167R em $\text{DMSO}-d_6$ a 500MHz

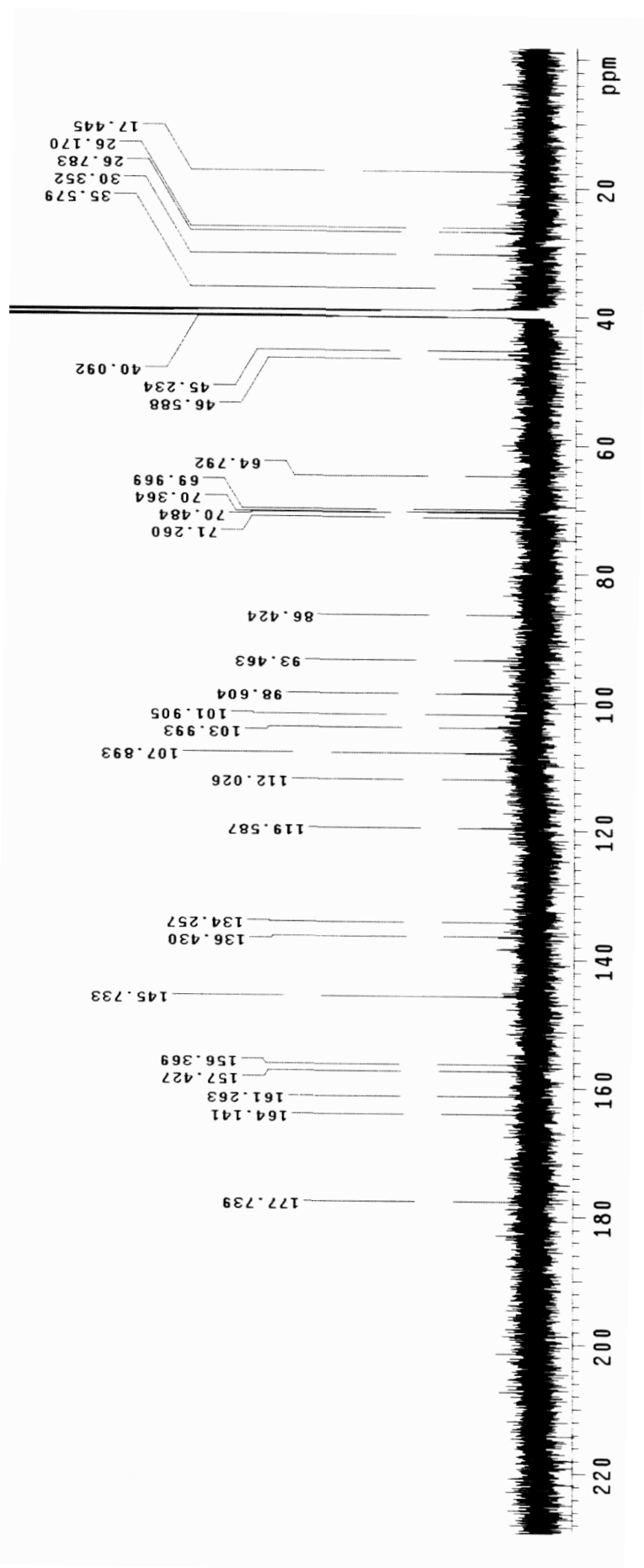


Figura 47: Espectro de RMN ^{13}C de EAF-167R em DMSO- d_6 a 500MHz.

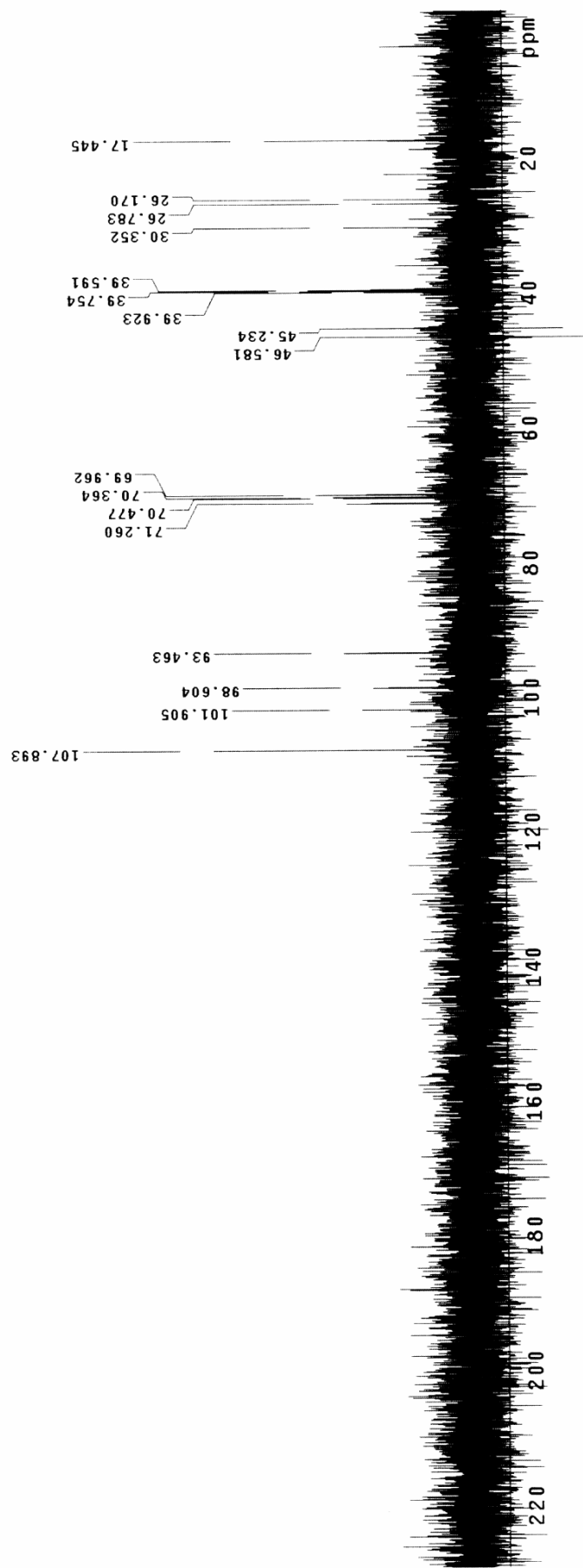


Figura 48: Espectro de DEPT de EAF-167R em DMSO-d₆ a 500MHz.

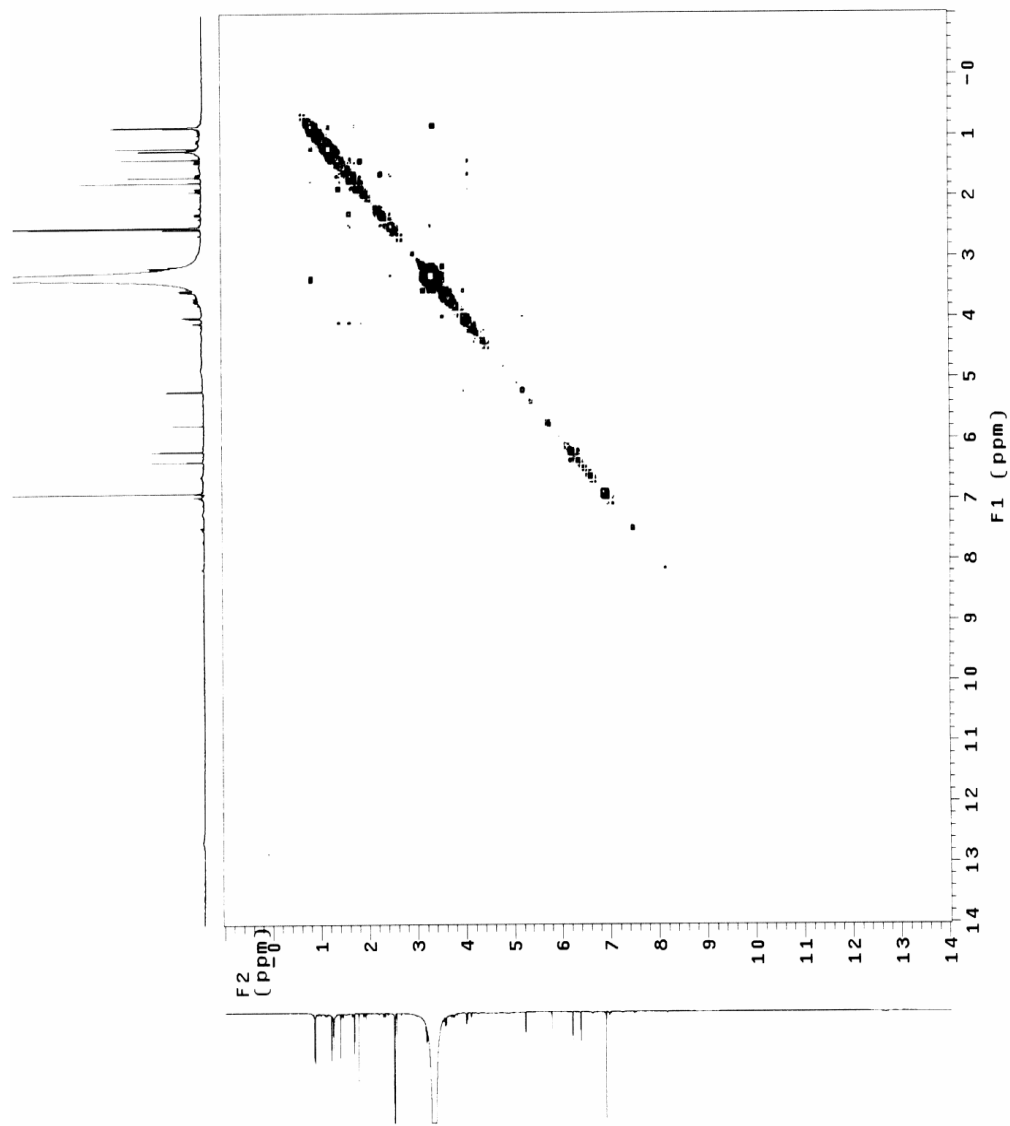


Figura 49: Espectro gCOSY de EAF-167R em DMSO-d₆ a 500MHz.

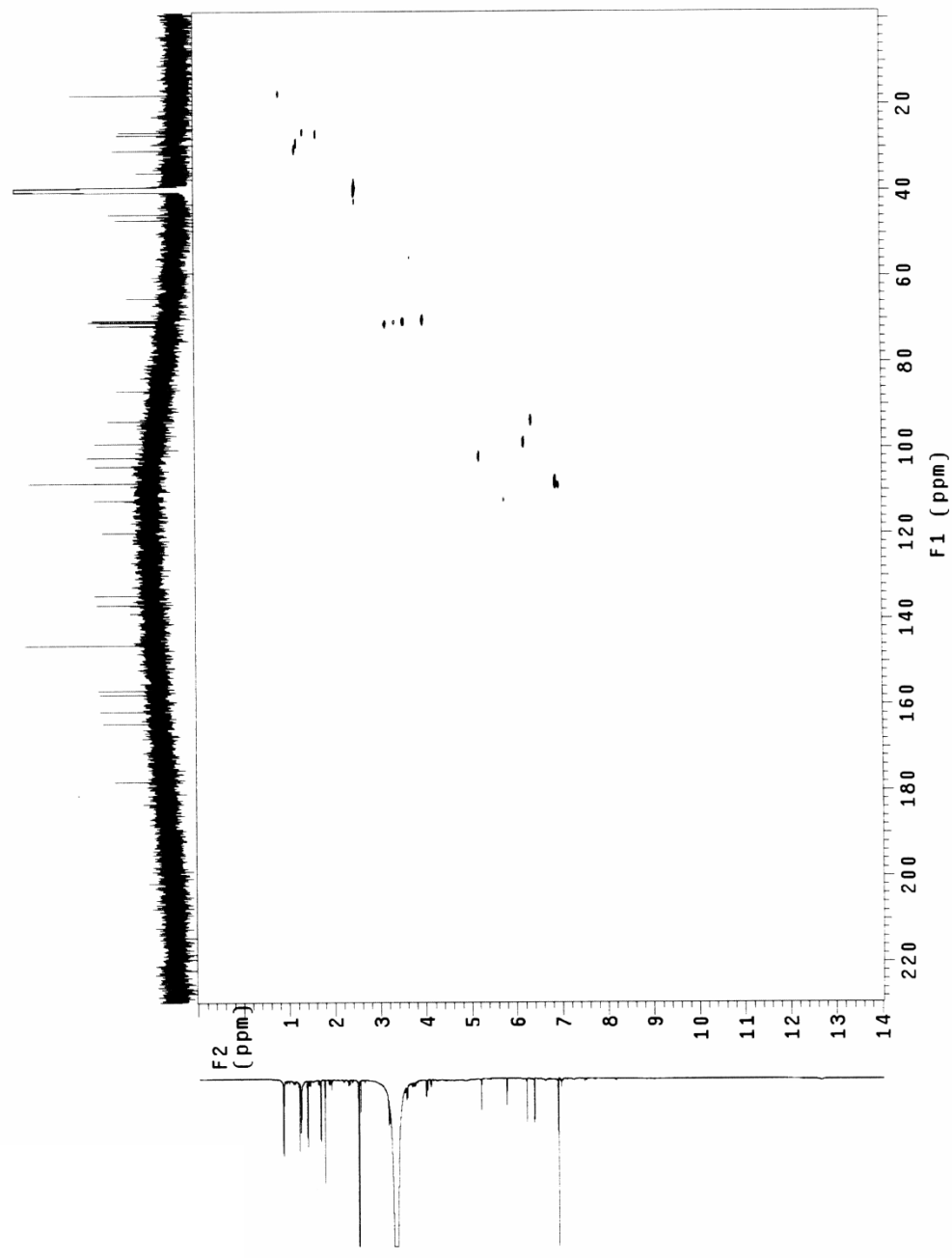


Figura 50: Espectro gHMQC de EAF-167R em DMSO- d_6 a 500MHz.

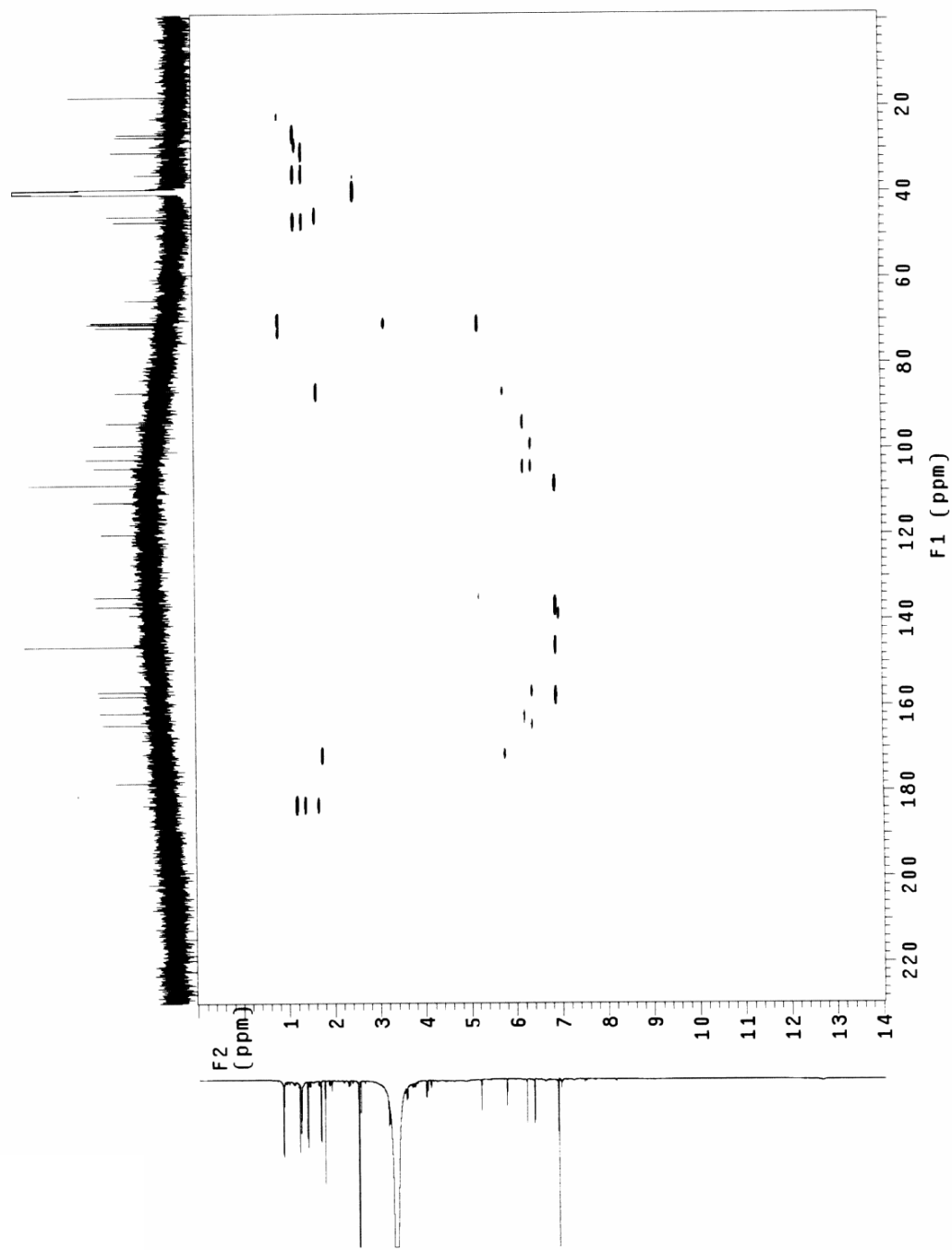


Figura 51: Espectro gHMBC de EAF-167R em DMSO-d₆ a 500MHz.

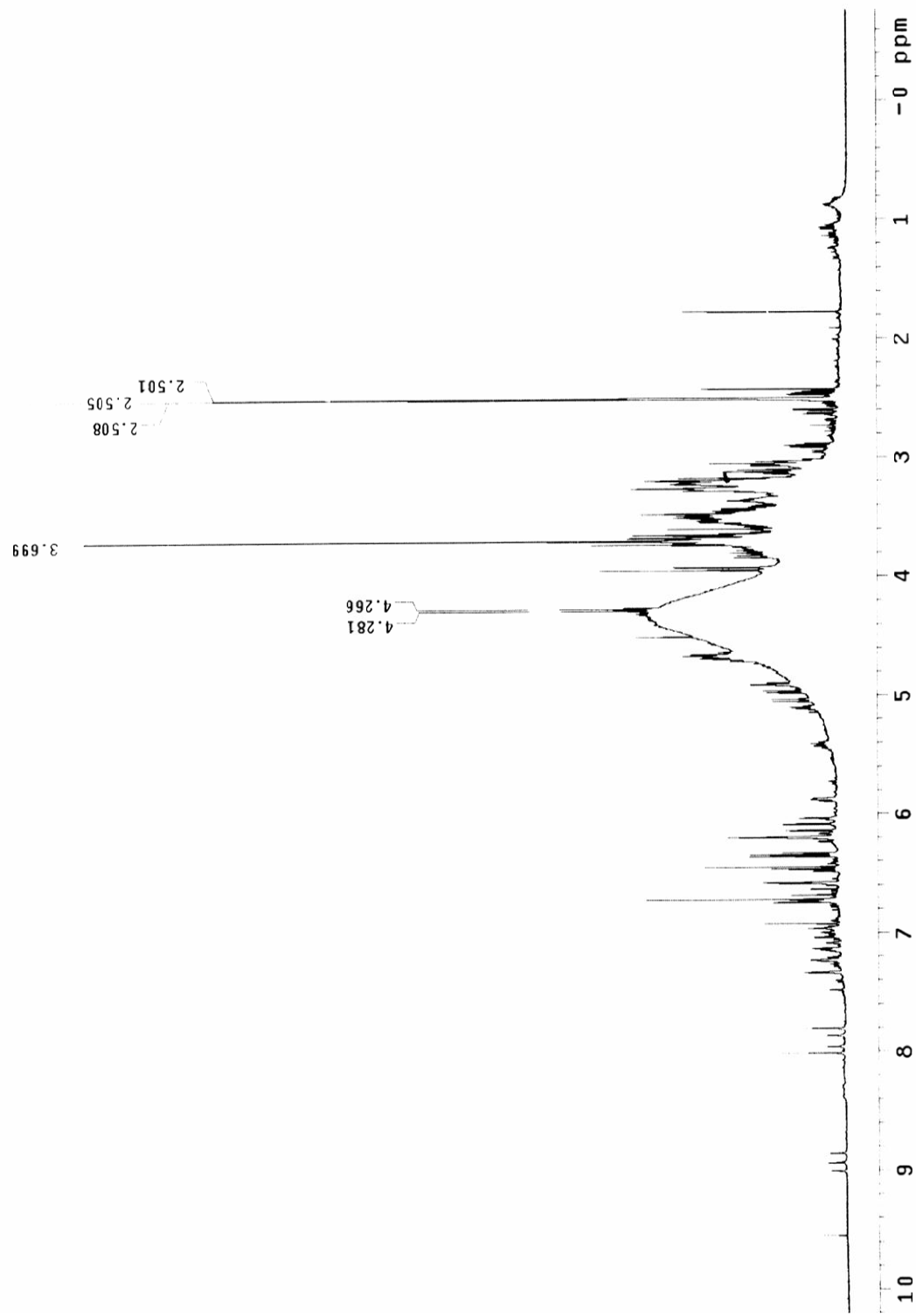


Figura 52: Espectro de RMN ^1H de FrX-4 em $\text{DMSO}-d_6$ a 500MHz

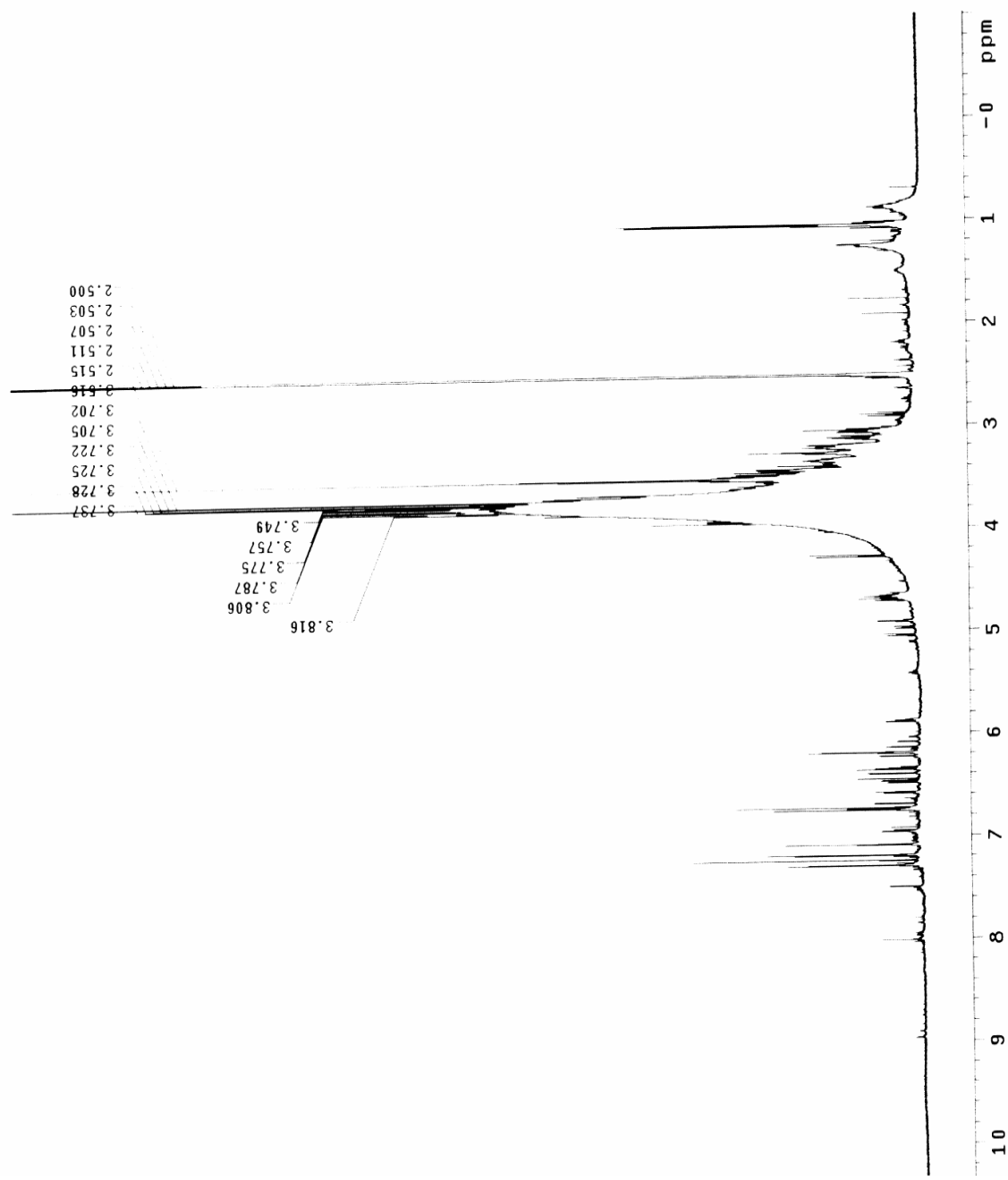


Figura 53: Espectro de RMN ^1H de FrX-5 em DMSO-d_6 a 500MHz

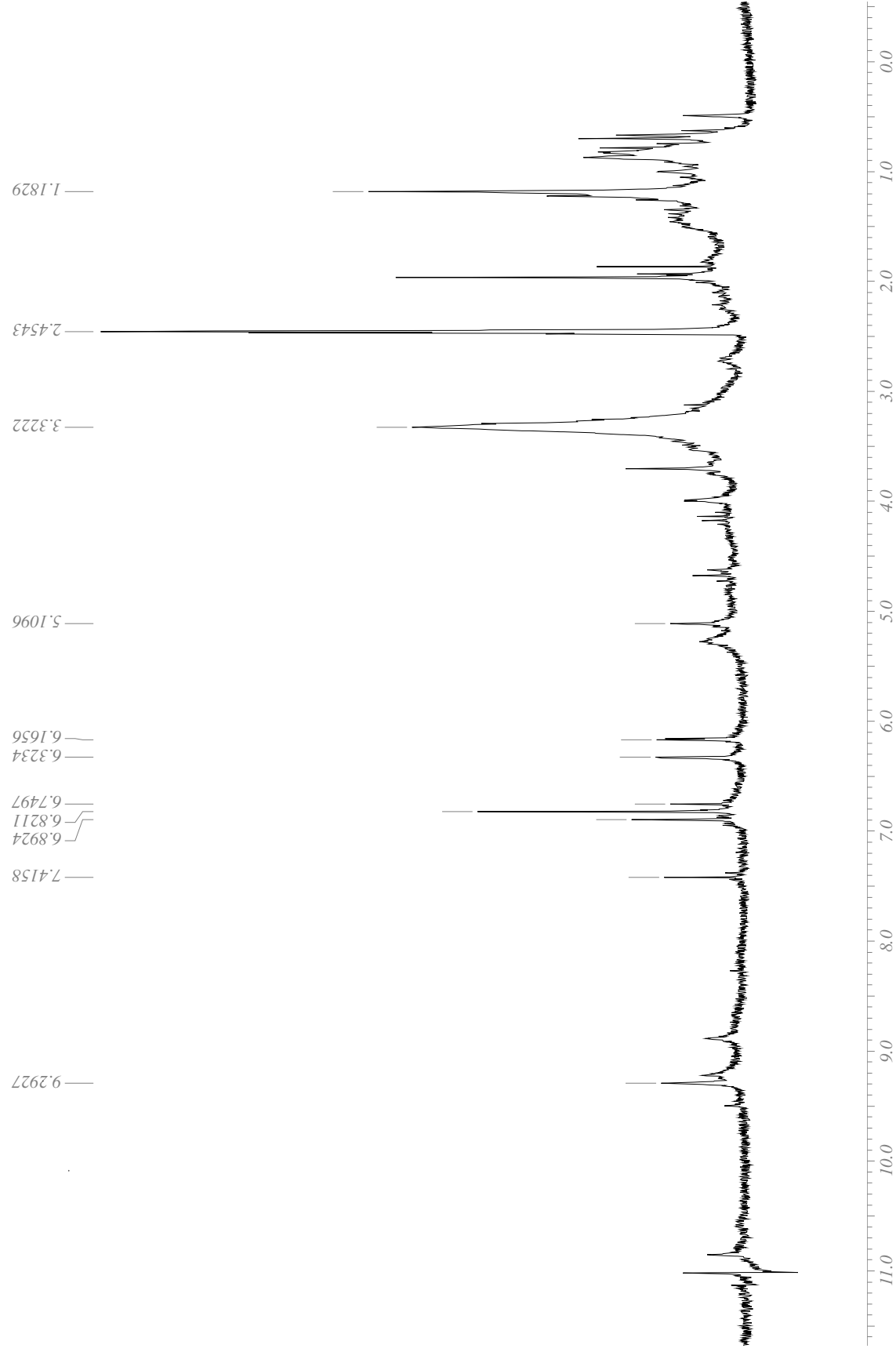


Figura 54: Espectro de RMN 1H de CC-3 em DMSO-*d*₆ a 200MHz

ANEXO B

Atividades Extras e Curriculares

Disciplinas Cursadas

Disciplina	Ano	Semestre	Créditos	Conceito
Química Orgânica Avançada	2005	1	12	B
Métodos Espectrométricos	2005	1	12	B
Teoria e Método de Separação, Isolamento e Purificação de Compostos Orgânicos	2005	2	12	A
Estágio de Docência (Química Orgânica III)	2006	1	4	A
Estereoquímica de Fármacos	2007	1	3	A
TOTAL GERAL DE CRÉDITOS			43	

Carenina Vidotte Plaza

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Carenina Vidotte Plaza

Filiação José Roberto Plaza e Marilei Vidotte Plaza

Nascimento 31/05/1983 - Monte Azul Paulista/SP - Brasil

Carteira de Identidade 294684554 SSP - SP - 17/05/2000

CPF 30424538806

Endereço residencial Avenida Major Walter Carlson, 06

Jd Santa Lúcia - Araraquara

14800125, SP - Brasil

Telefone: 16 33335794

Celular: 16 97069516

Endereço profissional Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara

Rua Professor Francisco Degni

Quitandinha - Araraquara

14800-060, SP - Brasil

Telefone: 16 33016600 r. 6793

Endereço eletrônico

e-mail para contato : careninavp@uol.com.br

e-mail alternativo : ninaplaza@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

2005 Mestrado em Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de *Eugenia jambolana* Lam.

Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

2001 - 2004 Graduação em Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Estudo Fitoquímico dos Galhos de *Erythrina speciosa* Andrews

Orientador: Ângela Regina Araújo

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

2002 - 2002 Curso de curta duração em Aditivos Alimentícios.

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC-PR, Curitiba, Brasil

2002 - 2002 Curso de curta duração em Conservação e Uso Sustentável da Diversidade de Pl.

Instituto de Química - Unesp - Araraquara, IQ, Brasil, Ano de obtenção: 2002

2003 - 2003 Curso de curta duração em A escola diante das mudanças: os desafios contempo.

Instituto de Química - Unesp - Araraquara, IQ, Brasil

2003 - 2003 Curso de curta duração em Comunicação Oral e Escrita.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

2003 - 2003 Curso de curta duração em Publicação Científica.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 06/08/2007 às 10:35:11 Página 3 de 5

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

2003 - 2003 Curso de curta duração em Atualização de Cachaça Artesanal de Qualidade.
Universidade Federal de Viçosa, UFV, Vicoso, Brasil
2004 - 2004 Curso de curta duração em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Sao Carlos, Brasil
2005 - 2005 Curso de curta duração em Atividades Anímicas e Biodiversidade.
Instituto de Química - Unesp - Araraquara, IQ, Brasil

Áreas de atuação

1. Química
 2. Química Orgânica
 3. Química dos Produtos Naturais
-

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
Espanhol Compreende Bem , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Bem

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. PLAZA, C. V., SILVA, D. H. S., CAVALHEIRO, A J, BOLZANI, V. S., CASTROGAMBOA, I.
Antioxidants from fruits and leaves of *Eugenia jambolana*, an edible Myrtaceae species from Atlantic Forest.
Planta Medica (Stuttgart). , v.72, p.1038 - , 2006.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (completo)

1. PLAZA, C. V., SILVA, D. H. S., CAVALHEIRO, A. J., BOLZANI, V. S., CASTROGAMBOA, I.
Antioxidants from fruits and leaves of *Eugenia jambolana*, an edible Myrtaceae species from Atlantic Forest
In: 54th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, 2006, Helsinki.
Book of Abstracts of the 54th. GA congress, 2006.

Demais produções bibliográficas

1. PLAZA, C. V., Chiba, J., SILVA, D. H. S.
Antioxidant phenolic compounds from *Eugenia jambolana* leaves and fruits, 2006.
(Congresso, Apresentação de Trabalho)
2. PLAZA, C. V., SILVA, D. H. S., CAVALHEIRO, A. J., BOLZANI, V. S., CASTROGAMBOA, I.
Antioxidants from fruits and leaves of *Eugenia jambolana*, an edible Myrtaceae species from Atlantic Forest, 2006. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 06/08/2007 às 10:35:11 Página 4 de 5
3. PLAZA, C. V., SILVA, Geraldo Humberto, LOPES, Márcia Nasser, ARAÚJO, Angela Regina
Alcalóides eritrínicos dos galhos de *Erythrina speciosa* Andrews, 2004.
(Congresso, Apresentação de Trabalho)

4. PLAZA, C. V., SILVA, Geraldo Humberto, LOPES, Márcia Nasser, ARAÚJO, Angela Regina **Estudo Fitoquímico dos Galhos de *Erythrina speciosa* Andrews Biomonitorado por Linhagens Mutantes de *Sachromyces cerevisiae***, 2003. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

5. PLAZA, C. V., PAULETTI, P. M., SILVA, D. H. S. **Antioxidantes Presentes em Folhas e Frutos de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae)**, 2007. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. PLAZA, C. V. **V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp**, 2005. (Congresso, Organização de evento)

2. PLAZA, C. V. **XXXIV Semana da Química**, 2004. (Congresso, Organização de evento)

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007. (Congresso)
Antioxidantes presentes em folhas e frutos de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae).

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VI Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, 2006. (Encontro)
Antioxidants phenolic compounds from *Eugenia jambolana* leaves and fruits.

3. **I Workshop Pós-Graduação em Química: Formação de Recursos Humanos e Transferência de Tecnologia**, 2006. (Encontro)

4. **Workshop Pós-Graduação em Química da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemir Saffioti "Estratégias para maior entrosamento e fortalecimento dos Cursos de Pós-Graduação em Química do Interior Paulista"**, 2006. (Encontro)

5. Apresentação (Outras Formas) no(a) **V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp**, 2005. (Simpósio)

X.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVI Congresso de Iniciação Científica**, 2004. (Congresso)
Iniciação Científica.

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV Congresso de Iniciação Científica**, 2003. (Congresso)
Estudo Fitoquímico dos Galhos de *Erythrina speciosa* Andrews Biomonitorado por Linhagens Mutantes de *Sachromyces cerevisiae*.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 06/08/2007 às 10:35:11 Página 5 de 5

Outras informações relevantes

Bolsista FAPESP/Mestrado, de agosto/2005 a julho/2007. Estágio de dois anos no Dep. de Química Orgânica do IQ/CAr com bolsa PIBIC/CNPq de março/2003 a dezembro/2004. Representante discente junto ao Conselho do departamento de Química Analítica do Instituto de Química - UNESP/CAr (suplente) no período de 15/04/2002 a 14/04/2003. Representante discente junto à Congregação do Instituto de Química - UNESP/CAr (suplente) no período de 09/09/2004 a 02/11/2004. Membro da

Comissão Eleitoral para proceder a condução do processo eleitoral 2004 e o recebimento e apuração dos votos da eleição para escolha do diretor e do Vice-Diretor do Instituto de Química. Membro da Comissão Receptora dos votos da eleição para escolha do Reitor e Vice-Reitor da UNESP realizada nos dias 23, 24 e 25/11/2005. Participação no Diretório Acadêmico Prof. Waldemar Saffioti, 2003/2004 (vice-presidente, CNPJ: 50400647/0001-89) e Associação dos Pós-Graduandos do Instituto de Química 2006/2007. Organização de eventos: XXXIV Semana da Química (24 a 19/10/2004) e V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp - 2005 (15 a 20/11/2005). Participação na Comissão de Formatura 2004 (tesoureira).