



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”



Instituto de Química
Campus de Araraquara

Departamento de Química Orgânica

**Estudo fitoquímico da fração AcOEt do extrato
etanólico das folhas de *Arrabidaea brachypoda* (DC)
Bureau – Bignoniaceae e atividades antioxidante e
inibitória da enzima mieloperoxidase das substâncias
isoladas**

Fernanda Garcia
(Mestranda)

Orientadora: Prof^a. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani
Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Viegas Junior

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Instituto de
Química – Campus de Araraquara
da Universidade Estadual
Paulista, como requisito para a
obtenção do título de Mestre, no
curso de pós-graduação em
Química, área de concentração
Química Orgânica.

Araraquara-2008

FICHA CATALOGRÁFICA

G216e	Garcia, Fernanda Estudo fitoquímico da fração AcOEt do extrato etanólico das folhas de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DC) Bureau – Bignoniaceae e atividades antioxidante e inibitória da enzima mieloperoxidase das substâncias isoladas / Fernanda Garcia. - Araraquara : [s.n], 2008 100 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani Co-orientador: Cláudio Viegas Júnior 1. Produtos Naturais. 2. Flavonóides. 3. Flavonóis. 4. Desreplicação. I. Título.
-------	--

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

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

FERNANDA GARCIA

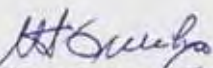
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Araraquara, 14 de março de 2008.

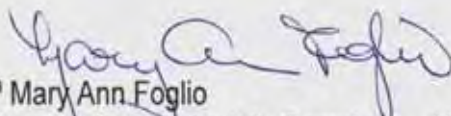
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Vanderlan da Silva Bolzani (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



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



Drª Mary Ann Foglio
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas

Dados Curriculares

Fernanda Garcia

1. Dados Pessoais

- 1.1 Nascimento: 13/10/1983
- 1.2 Nacionalidade: Brasileira
- 1.3 Naturalidade: Cosmópolis-SP
- 1.4 Estado Civil: Solteira
- 1.5 Filiação: Pai – Carlos André Garcia
Mãe – Ivonete de Fátima Garcia
- 1.6 Profissão: Química

2. Formação Acadêmica

- 2.1 Graduação: Bacharelado em Química Tecnológica
Data de Conclusão: 10/12/2005
Instituição: Instituto de Química de Araraquara – UNESP
- 2.2 Mestrado: Química, Área de Concentração – Química Orgânica
Data de Conclusão: 14/03/2008
Instituição: Instituto de Química de Araraquara – UNESP

3. Bolsas Concedidas

- 3.1 Bolsista do Grupo PET (Programa de Educação Tutorial). MEC-SESU.
2003 a 2005
- 3.2 Bolsista de Mestrado. CNPq. 04/2006 a 03/2008
Título do projeto: Estudo fitoquímico de *Arrabidaea brachypoda*

4. Apresentação de Estágio Supervisionado

GARCIA, F. Estágio Curricular Supervisionado na Indústria Sucocítrico Cutrale, Araraquara, 2005.

5. Participação em Congressos e Eventos Científicos

Workshop Pós-Graduação em Química da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti "Estratégias para maior entrosamento e fortalecimento dos Cursos de Pós-Graduação em Química do Interior Paulista". Instituto de Química – UNESP, Araraquara, 2006.

I Workshop "Pós-Graduação em Química: Formação de Recursos Humanos e Transferência de Tecnologia". Instituto de Química – UNESP, Araraquara, 2006.

PIVATTO, M.; GARCIA, F.; DANUELLO, A.; SERRANO, M. A. R.; LOPES, N. P.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Screening for alkaloids and biological evaluation of *Senna/Cassia* species.). In: First Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro-SP-Brasil.

GARCIA, F.; REGASINI, L. O.; FURLAN, M.; PAULETTI, P. M.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BRANDÃO, L. T.; YOUNG, M. C. M. Two new flavonols from the leaves of *Arrabidaea brachypoda* (Bignoniaceae). In: First Brazilian Conference on Natural Products, 2007, São Pedro-SP-Brasil.

XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM)

6. Prêmios

Diploma de honra ao mérito de melhor aluno do curso de Bacharelado em Química Tecnológica no período de 2002 a 2005.

Dedico esse trabalho...

à meu pai Carlos (In memorian).

“As pessoas têm estrelas que não são as mesmas; para uns, que viajam, as estrelas são guias; para outros, elas não passam de pequenas luzes; para outros, os sábios, são problemas; para o meu negociante, eram ouro, mas todas essas estrelas se calam. Tu, porém, terás estrelas como ninguém... Quando olhares o céu à noite, porque habitarei uma delas, porque numa delas estarei rindo, então será como se todas as estrelas te rissem! E tu terás estrelas que sabem rir! E quando te houveres consolado (a gente sempre se consola), tu te sentirás contente por me teres conhecido. Tu serás sempre meu amigo. Terás vontade de rir comigo. E abrirás às vezes a janela à toa, por gosto... E teus amigos ficarão espantados de ouvir-te rir olhando o céu. Tu explicarás então: “Sim, as estrelas, elas sempre me fazem rir!” E eles te julgarão maluco. Será uma peça que te prego...”

(Pequeno Príncipe – Antoine de Saint-Exupéry)

à minha mãe Ivonete:

*“Me desespero a procurar
Alguma forma de lhe falar
Como é grande o meu amor por você
Nunca se esqueça nem um segundo
Que eu tenho o amor maior do mundo
Como é grande o meu amor por você.”*
(Roberto Carlos/Erasmus Carlos)

à minha irmã Juliana:

*I was born a child of grace
Nothing else about the place
Everything was ugly but your beautiful face
And it left me no illusion*

*I saw you in the curve of the moon
In the shadow cast across my room
You heard me in my tune
When I just heard confusion*

*All because of you
All because of you
All because of you
I am... I am*
(Bono Vox)

Agradecimentos

À professora Dra. Vanderlan da Silva Bolzani pela orientação, pelo carinho e pela confiança depositada em mim.

Ao professor Dr. Cláudio Viegas pela atenção e co-orientação.

À professora Dra. Patrícia Pauletti pela ajuda dada em um momento decisivo do meu trabalho.

Aos funcionários do departamento de química orgânica, em especial Nivaldo e Albertinho pelo grande auxílio na realização deste trabalho.

Aos professores do departamento pela dedicação em transmitir o conhecimento e pela atenção.

Aos alunos do departamento de química orgânica que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos do NuBBE III Aline, Camila, Cristiano, Daniara, Fernando, Mike, Marília e Néia pelo apoio e carinho.

Aos meus amigos Amanda, Binha, Breno, Dani, Gra, Jana, Luis, Marina, Marcos, Nina pelo companheirismo, pelas loucuras e pela paciência. “Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”
(Charles Chaplin)

À CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.

*Sede como os pássaros que,
ao pousarem um instante sobre
ramos muito leves, sentem-nos ceder,
mas cantam! Eles sabem que possuem asas.*
Victor Hugo

Resumo

O presente trabalho visou o estudo químico da *Arrabidaea brachypoda*, uma espécie pouco estudada, possuindo somente um registro de trabalho sobre o seu estudo químico na literatura. Primeiramente foi feito um trabalho de desreplicação dos extratos etanólicos dos caules, das folhas e das inflorescências em HPLC-DAD usando padrões de xantonas isoladas da *A. samydoides*. Observou-se que a espécie estudada não possuía xantonas como seus principais constituintes. A fração AcOEt do extrato etanólico das folhas forneceu dois flavonóis derivados de quercetina inéditos: arrabidosídeo A e arrabidosídeo B, além dos flavonóis rutina e isoquercitrina. A atividade antioxidante desses flavonóis frente ao radical DPPH foi avaliada e os valores de CI_{50} foram: isoquercitrina 15,10 μ M, rutina 4,88 μ M, arrabidosídeo A 8,95 μ M e arrabidosídeo B 5,34 μ M. Além disso, essas substâncias foram ensaiadas para a atividade inibitória de mieloperoxidase (MPO). Os valores de CI_{50} para essa atividade foram: isoquercitrina 3,75 nM, rutina 3,60 nM, arrabidosídeo A 1,80 nM e arrabidosídeo B 4,82 nM e mostraram o potencial antiinflamatório desses flavonóis.

Abstract

The scope of this work was the phytochemical study of *Arrabidaea brachypoda* with only one previous chemical study reported in the literature. Initially a dereplication method was applied to the barks, leaves and flowers ethanolic extracts using xanthonones previously isolated from *A. samydoides* as standards. The crude extract of *A. brachypoda* did not show xanthonones as major constituents. The AcOEt fraction obtained from leaves ethanolic extract yielded two new flavonols: arrabidoside A and arrabidoside B, along with isoquercitrin and rutin. The antioxidant activity of these flavonols was evaluated using DPPH and IC_{50} values obtained were: isoquercitrin 15,10 μ M, rutin 4,88 μ M, arrabidoside A 8,95 μ M and arrabidoside B 5,34 μ M. Inhibitory activity of mieloperoxidase enzyme of the four flavonols was also evaluated. The values of IC_{50} obtained were: isoquercitrin 3,75 nM, rutin 3,60 nM, arrabidoside A 1,80 nM and arrabidoside B 4,82 nM and showed de anti-inflammatory potential of these flavonols.

Índice

1. Introdução.....	19
1.1 Família Bignoniaceae.....	20
1.2 Gênero <i>Arrabidaea</i>	21
1.3 <i>Arrabidaea brachypoda</i>	25
1.4 Flavonóides.....	26
1.4.1 Estrutura e biossíntese de flavonóides.....	26
1.4.2 Função dos flavonóides nas plantas.....	28
1.4.3 Propriedades medicinais dos flavonóides.....	29
1.4.4 Capacidade antioxidante dos flavonóides.....	29
1.5 Enzima mieloperoxidase (MPO).....	31
2. Objetivos.....	32
3. Metodologia.....	32
3.1 Instrumentação.....	32
3.2 Coleta e identificação do material vegetal.....	33
3.3 Preparo dos extratos etanólicos brutos.....	33
3.4 Preparo das amostras para HPLC analítico.....	34
3.5 Preparo da fração AcOEt das folhas para análise em HPLC preparativo....	34
3.6 Preparo de Fra3 e Fra8 para análise em HPLC preparativo.....	34
3.7 Atividade antioxidante.....	34
3.8 Atividade inibidora da enzima mieloperoxidase (MPO).....	35
4. Resultados e Discussões.....	36
4.1 Estudo químico de <i>A. brachypoda</i>	36
4.2 Estudo químico do extrato etanólico das folhas da <i>A. brachypoda</i>	43
4.3 Caracterização espectrométrica das substâncias de I – IV.....	47
4.3.1 Substâncias I e II.....	47
4.3.2 Substâncias III e IV.....	51
4.4 Potencial antioxidante dos flavonóis I – IV.....	58
4.5 Inibição da enzima mieloperoxidase (MPO).....	59
5. Considerações finais.....	60
Referências.....	61
Anexos.....	65

Lista de Figuras

Figura 1	Foto de um exemplar de <i>Arrabidaea brachypoda</i>	25
Figura 2	Estrutura básica dos flavonóides.....	26
Figura 3	Esqueleto químico dos a) flavonóides principais; b) isoflavonóides; c) neoflavonóides; d) flavonóides.....	27
Figura 4	Cromatograma do extrato etanólico das folhas; gradiente MeOH:H ₂ O, 5-100% MeOH em 50 min, solução 1,0 mg/mL, fluxo 1,0 mL/min, coluna Phenomenex LC ₁₈ 5 µm, 250 x 4,6 mm, λ = 254 nm, injeção de 20 µL.....	36
Figura 5	Cromatograma do extrato etanólico das inflorescências; gradiente MeOH:H ₂ O, 5-100% MeOH em 50 min, solução 1,0 mg/mL, fluxo 1,0 mL/min, coluna Phenomenex LC ₁₈ 5 µm, 250 x 4,6 mm, λ = 254 nm, injeção de 20 µL.....	36
Figura 6	Cromatograma do extrato etanólico dos caules; gradiente MeOH:H ₂ O, 5-100% MeOH em 50 min, solução 1,0 mg/mL, fluxo 1,0 mL/min, coluna Phenomenex LC ₁₈ 5 µm, 250 x 4,6 mm, λ = 254 nm, injeção de 20 µL.....	37
Figura 7	Espectros de absorção no UV dos picos com tempo de retenção tr = 34,1 min e tr = 38,9 min, respectivamente.....	37
Figura 8	Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (azul) e das inflorescências (verde), e da substância 10	38
Figura 9	Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (azul) e das inflorescências (verde), e da substância 12	38
Figura 10	Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (azul) e das inflorescências (verde), e da substância 13	39
Figura 11	Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (azul) e das inflorescências (verde), e da substância 14	39
Figura 12	Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (azul) e das inflorescências (verde), e da substância 16	40

Figura 13	Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (azul) e das inflorescências (verde), e da substância 17	40
Figura 14	Espectros de absorção no UV dos padrões de xantonas.....	41
Figura 15	Espectros de absorção no UV dos picos mais intensos do cromatograma do extrato etanólico das folhas.....	42
Figura 16	Espectros de absorção no UV dos picos mais intensos do cromatograma do extrato etanólico dos caules.....	42
Figura 17	Espectros de absorção no UV dos picos mais intensos do cromatograma do extrato etanólico das inflorescências.....	42
Figura 18	Partição do extrato etanólico das folhas.....	43
Figura 19	Cromatograma da fração AcOEt; gradiente MeOH:H ₂ O, 5-100% MeOH em 50 min; λ = 254 nm. Espectro de absorção no UV dos picos 1 e 2.....	44
Figura 20	Cromatograma da fração AcOEt, HPLC analítico, fase móvel MeOH:H ₂ O 0,1% HAc (52:48).....	45
Figura 21	Cromatograma da fração AcOEt, HPLC preparativo, fase móvel MeOH:H ₂ O 0,1% HAc (48:52).....	45
Figura 22	Purificação das frações Fra3 e Fra8.....	46
Figura 23	Cromatograma de Fra3 nas condições usadas para a purificação....	46
Figura 24	Cromatograma de Fra8 nas condições usadas para a purificação....	47
Figura 25	Espectro de ESI-MS-MS do íon molecular 785 da substância III	54
Figura 26	Espectro de ESI-MS-MS do íon molecular 815 da substância IV	54
Figura 27	Espectro de absorção no UV da substância III	55
Figura 28	Espectro de absorção no UV da substância IV	55
Figura 29	Gráfico da curva de determinação da % de seqüestro de DPPH.....	58

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Substâncias isoladas do gênero <i>Arrabidaea</i>	23
Tabela 2.	Massa do material seco e do extrato etanólico.....	34
Tabela 3.	Frações obtidas na separação em HPLC preparativo da fração AcOEt das folhas.....	45
Tabela 4.	Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (126 MHz) dos flavonóis I e II (DMSO- d_6).....	50
Tabela 5.	Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (126 MHz) do arrabidosídeo A (DMSO- d_6).....	56
Tabela 6.	Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (126 MHz) do arrabidosídeo B (DMSO- d_6).....	57
Tabela 7.	Potencial antioxidante dos flavonóis I – IV frente ao radical DPPH	59
Tabela 8.	Atividade inibitória dos flavonóis I – IV frente à enzima mieloperoxidase.....	59

Lista de Anexos

Anexo 1.	Espectro de RMN de ^1H de Fra3 (500 MHz – DMSO- d_6).....	66
Anexo 2.	Espectro de RMN de ^1H de Fra5 (500 MHz – DMSO- d_6).....	66
Anexo 3.	Espectro de RMN ^1H de Fra8 (500 MHz – DMSO- d_6).....	67
Anexo 4.	Ampliação do espectro de RMN ^1H de Fra8 (δ 6,0–7,7; 500 MHz, DMSO- d_6).....	67
Anexo 5.	Espectro de RMN de ^1H do flavonol I (500 MHz – DMSO- d_6).....	68
Anexo 6.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 0–4,0) do flavonol I.....	68
Anexo 7.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 5,4–7,7) do flavonol I.....	69
Anexo 8.	Espectro de RMN de ^{13}C do flavonol I (126 MHz – DMSO- d_6).....	69
Anexo 9.	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 60–105) do flavonol I.....	70
Anexo 10.	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 115–80) do flavonol I.....	70
Anexo 11.	Espectro de RMN de ^1H do flavonol II (500 MHz – DMSO- d_6).....	71
Anexo 12.	Ampliação do espectro de RMN (δ 2,5–4,0) de ^1H do flavonol II.....	71
Anexo 13.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 4,0–7,6) do flavonol II.....	72
Anexo 14.	Espectro de RMN de ^{13}C do flavonol II (126 MHz – DMSO- d_6).....	72
Anexo 15.	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 65–105) do flavonol II.....	73
Anexo 16.	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 115–178) do flavonol II...	73
Anexo 17.	Ampliação do mapa de contornos do <i>g</i> HMBC do flavonol II (500 MHz – DMSO- d_6).....	74
Anexo 18.	Espectro de RMN de ^1H do flavonol III (500 MHz–DMSO- d_6)	74
Anexo 19.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 3,0–5,7) do flavonol III	75
Anexo 20.	Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 6,0–7,7) do flavonol III	75
Anexo 21.	Espectro de RMN de ^{13}C do flavonol III (126 MHz–DMSO- d_6)	76
Anexo 22.	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 55–77) do flavonol III	76
Anexo 23.	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 9 –126) do flavonol III	77
Anexo 24.	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 130–180) do flavonol III	77
Anexo 25.	Mapa de contornos <i>g</i> HMQC do flavonol III (500 MHz–DMSO- d_6)	78
Anexo 26.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMQC (δ 53–75) do flavonol III	78
Anexo 27.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMQC (δ 70–78) do flavonol III	79
Anexo 28.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMQC (δ 91–103) do flavonol III.....	79

Anexo 29.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMQC (δ 110–145) do flavonol III.....	80
Anexo 30.	Mapa de contornos <i>g</i> HMBC do flavonol III (500 MHz–DMSO- <i>d</i> ₆)..	80
Anexo 31.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 14–23) do flavonol III	81
Anexo 32.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 40–75) do flavonol III	81
Anexo 33.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 65–78) do flavonol III	82
Anexo 34.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 145–175) do flavonol III.....	82
Anexo 35.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 90–106) do flavonol III.....	83
Anexo 36.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 124–142) do flavonol III.....	83
Anexo 37.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 110–128) do flavonol III.....	84
Anexo 38.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 140–152) do flavonol III.....	84
Anexo 39.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 154–169) do flavonol III.....	85
Anexo 40.	Mapa de contornos <i>g</i> COSY flavonol III (500 MHz - DMSO- <i>d</i> ₆).....	85
Anexo 41.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> COSY (δ 0–3,8) do flavonol III	86
Anexo 42.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> COSY (δ 4,0–7,8) do flavonol III.....	86
Anexo 43.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> COSY (δ 6,0–7,8) do flavonol III.....	87
Anexo 44.	Espectro de DEPT 135 ° do flavonol III (126 MHz - DMSO- <i>d</i> ₆).....	87
Anexo 45.	Espectro de NOESY 1D δ_{H} 3,83 do flavonol III(500 MHz–DMSO- <i>d</i> ₆)	88
Anexo 46.	Espectro de HOMODEC (500 MHz – DMSO- <i>d</i> ₆) de δ 5,60; δ 4,90, δ 4,41, δ 3,49, δ 3,31, δ 3,21 e δ 3,10 do flavonol III.....	88
Anexo 47.	Espectro de RMN de ¹ H do flavonol IV (500 MHz - DMSO- <i>d</i> ₆).....	89
Anexo 48.	Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (δ 3,0–5,0) do flavonol IV.....	89
Anexo 49.	Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (δ 5,6–7,7) do flavonol IV.....	90
Anexo 50.	Espectro de RMN de ¹³ C do flavonol IV (126 MHz–DMSO- <i>d</i> ₆).....	90
Anexo 51.	Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C (δ 55–77) do flavonol IV.....	91

Anexo 52.	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 90–140) do flavonol IV	91
Anexo 53.	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 140–178) do flavonol IV ..	92
Anexo 54.	Mapa de contornos <i>g</i> HMQC do flavonol IV (500 MHz–DMSO- <i>d</i> ₆)....	92
Anexo 55.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMQC (δ 66–77) do flavonol IV	93
Anexo 56.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMQC (δ 65–79) do flavonol IV	93
Anexo 57.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMQC (δ 90–130) do flavonol IV	94
Anexo 58.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMQC (δ 90–145) do flavonol IV	94
Anexo 59.	Mapa de contornos <i>g</i> HMBC do flavonol IV (500 MHz–DMSO- <i>d</i> ₆)	95
Anexo 60.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 62– 5) do flavonol IV	95
Anexo 61.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 64–80) do flavonol IV	96
Anexo 62.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC(δ 130–170) do flavonol IV	96
Anexo 63.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 90–125) do flavonol IV	97
Anexo 64.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> HMBC (δ 135–170) do flavonol IV	97
Anexo 65.	Mapa de contornos <i>g</i> COSY do flavonol IV (500 MHz–DMSO- <i>d</i> ₆).....	98
Anexo 66.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> COSY (δ 3,0–5,8) do flavonol IV	98
Anexo 67.	Ampliação do mapa de contornos <i>g</i> COSY (δ 6,0–7,8) do flavonol IV	99
Anexo 68.	Espectro de DEPT 135 ° do flavonol IV (126 MHz–DMSO- <i>d</i> ₆).....	99
Anexo 69.	Espectro de NOESY1D δ_{H} 3,80 do flavonol IV (500 MHz–DMSO- <i>d</i> ₆).....	100

Símbolos e Abreviaturas

ACN – acetonitrila

DEPT - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

DMSO- d_6 – dimetilsulfoxido deuterado

DPPH – 1,1 difenil -2-picril-hidrazila

ESI-MS – *Electrospray Ionization – Mass Spectrometry*

Fra – fração acetato de etila folhas *Arrabidaea brachypoda*

gHMQC – *Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*

gHMBC – *Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

gCOSY ^1H - ^1H – *Gradient Correlated Spectroscopy*

HAc – ácido acético

HOMODEC – *Homonuclear Decoupling*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

MHz – megahertz

MPO – mieloperoxidase

NOESY 1D – *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*

P.A. – para análise

RMN de ^1H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C – ressonância magnética nuclear de carbono

δ_{H} – deslocamento químico de hidrogênio

δ_{C} – deslocamento químico de carbono

d – dubleto

dd – duplo dubleto

sl – singleto largo

m – multipeto

J – constante de acoplamento

IV – infravermelho

UV – ultravioleta

Introdução

Mesmo com a falta de apoio das grandes indústrias farmacêuticas, os produtos naturais ainda mostram um impacto significativo no processo de descoberta de novos fármacos. Nesse contexto, 23 produtos naturais e derivados de produtos naturais foram lançados no mercado na Europa, no Japão e nos Estados Unidos desde 2001 a 2005. Além disso, um total de 136 produtos naturais e seus derivados foi submetido a vários estágios de testes clínicos para diversas finalidades terapêuticas (LAM, 2007).

O Brasil, com aproximadamente 22% de todas as angiospermas, possui a maior biodiversidade do planeta, mesmo contabilizando o alto índice de devastação que vem ocorrendo em todos os seus biomas. Apesar dessa enorme variedade de plantas, muitas das quais com aplicação medicinal, apenas uma pequena parcela teve algum estudo químico ou farmacológico. Assim, a exploração sustentável da biodiversidade brasileira, mesmo na era pós-genômica, é um tema recorrente e merece destaque na busca de novos fármacos (BOLZANI et al., 1999).

Desta forma, o estudo da flora paulista, em especial de espécies que acumulam substâncias bioativas já caracterizadas torna-se importante e estratégico na busca de modelos estruturais para o avanço da Química Medicinal (BOLZANI et al., 1999).

Nos últimos anos, o NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais) vem concentrando esforços na busca por substâncias com atividades antitumoral, antifúngica, antimalárica e antioxidante. Várias espécies coletadas nos biomas do Estado de São Paulo foram selecionadas devido a alguma atividade biológica apresentada constituindo-se uma extratoteca bastante representativa quanto ao número de extratos (aproximadamente 1780) (AGRIPINO et al., 2004; BOLZANI et al., 1999; PAULETTI, YOUNG, BOLZANI, 2003). Dentre as espécies selecionadas, *Arrabidaea samydoides* demonstrou especial interesse por acumular xantonas com forte atividade antioxidante (PAULETTI et al., 2003) e antimalárica (PAULETTI, 2004). Objetivando a continuidade das pesquisas com o gênero *Arrabidaea*, o presente trabalho visou a identificação de outras classes de metabólitos secundários na espécie *Arrabidaea brachypoda* de interesse do NuBBE. As plantas de Bignoniaceae apresentam uma variação química muito grande e o gênero *Arrabidaea* foi pouco estudado, tornando a busca de novos metabólitos promissora.

1.1 Família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae é representada por mais de 100 gêneros e por volta de 800 espécies, é encontrada em regiões tropicais e a maioria de seus membros encontra-se dispersados pela América do Sul e África (CRONQUIST, 1981). As suas espécies encontradas, principalmente, em regiões do Cerrado, ecossistema típico do centro e do sudeste do Brasil. O Cerrado, hoje, é um ecossistema ameaçado devido à introdução de monoculturas e criações de gado nessa área durante as últimas três décadas. Ele representa o segundo maior bioma da América do Sul depois da floresta tropical e inicialmente cobria um quarto do território brasileiro (BLATT et al., 1998).

Os exemplos mais representativos dessa família são jacarandá (*Jacaranda brasiliana*) e ipês amarelo e roxo (*Tabebuia alba* e *T. avellanedaea*) pois são empregados na construção civil, carpintaria e confecção de instrumentos musicais; sendo também amplamente utilizados como ornamentais devido à beleza de suas florações (LORENZI, 1988). Na América do Sul, o ipê roxo é amplamente usado na medicina popular como fitoterápico na prevenção e tratamento do câncer (FUJIMOTO et al., 1991).

Os gêneros da família Bignoniaceae encontram-se agrupados em 7 tribos: Tecomeae Endl., Bignonieae Dumort, Crescentieae G. Don., Oroxyleae, Eccremocarpeae Hogg, Tourrettieae G. Don. e Colleeae. No Brasil ocorrem 56 gêneros e cerca 338 espécies incluindo muitos táxons endêmicos (GENTRY, 1980) e estas se encontram nas três primeiras tribos (VON POSER et al., 2000).

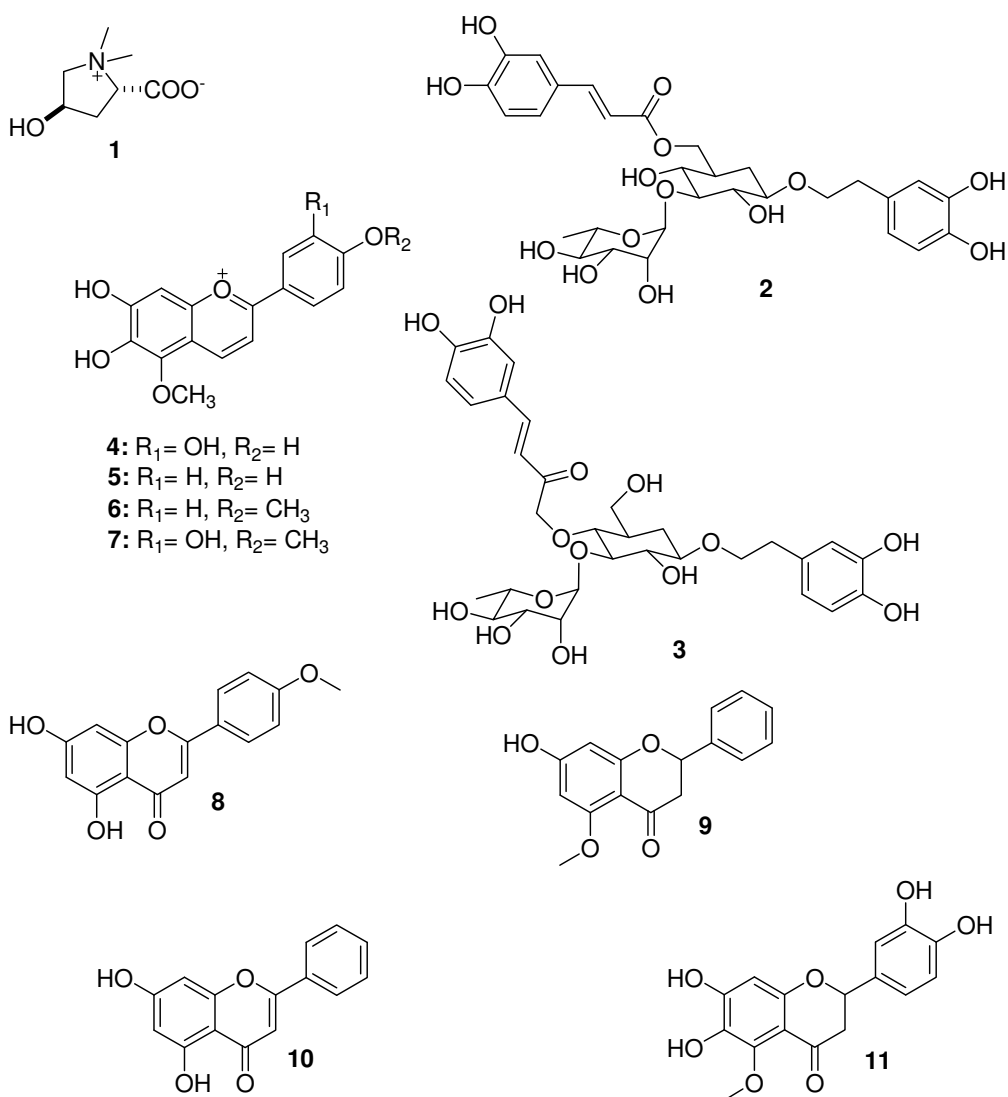
Os estudos químicos com Bignoniaceae demonstram uma diversidade grande de classes de metabólitos especiais entre os quais se incluem lignanas, flavonóides, iridóides, triterpenos, xantonas, naftoquinonas, ácidos cinâmicos e benzóicos e seus derivados. Os alcalóides são raramente encontrados, não se caracterizando como marcadores quimiotaxonômicos deste táxon (OLIVEIRA et al., 1990).

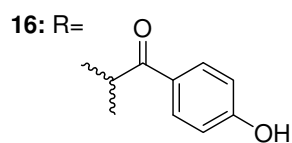
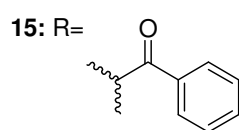
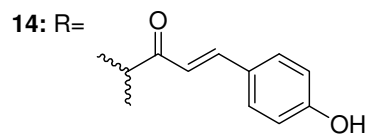
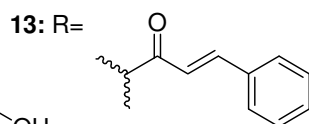
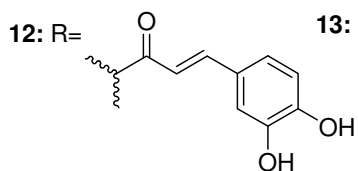
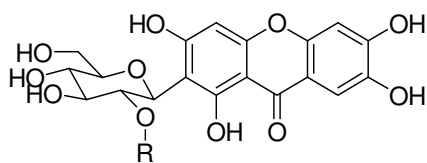
Um número de atividades biológicas vem sendo experimentalmente observado para os membros dessa família. No Brasil, as plantas desta família são usadas popularmente como adstringentes, antitérmicas e para tratar reumatismos, diarreias, câncer e infecções microbianas (OLIVEIRA et al., 1990; ROCHA et al., 2004).

1.2 Gênero *Arrabidaea*

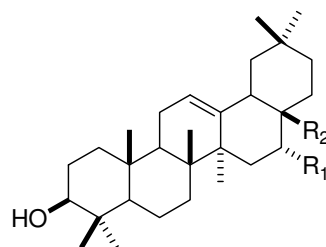
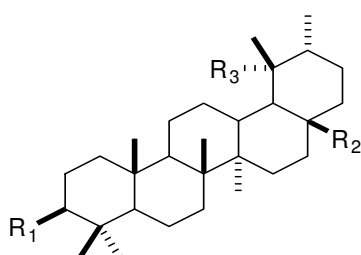
É o maior gênero da tribo Bignonieae, com aproximadamente 100 espécies. Sua taxonomia é complexa, pois muitas características diagnósticas de *Arrabidaea* são compartilhadas com espécies de outros gêneros. É caracterizado pela inflorescência em panícula ou tirso multifloro, mas também podem ser encontradas espécies com racemos paucifloros. As flores têm corola rósea a roxa, raramente alva, mas nunca amarela. O gênero mais próximo morfologicamente é *Cuspidaria*, que se diferencia de *Arrabidaea* pelos lacínios do cálice, mais alongados (SILVA & QUEIROZ, 2003).

Existem poucos relatos de estudos químicos desse gênero na literatura e abaixo estão listadas algumas substâncias já descritas (Tabela 1).





17: R= H



20: R₁= OH, R₂= CH₃
21: R₁= H, R₂=CH₂OH

18: R₁= OH, R₂= COOH, R₃= H
19: R₁= OH, R₂= COOH, R₃=OH

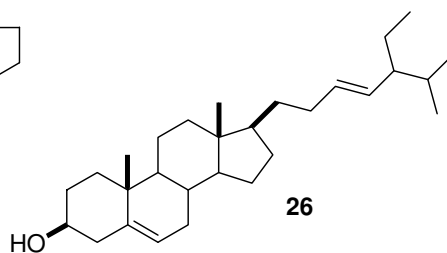
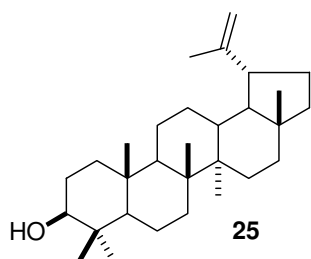
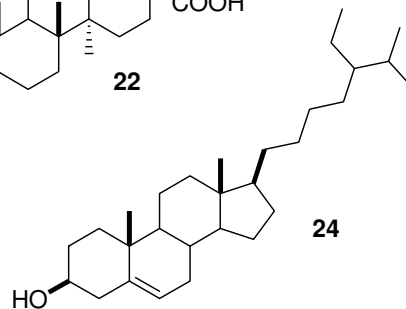
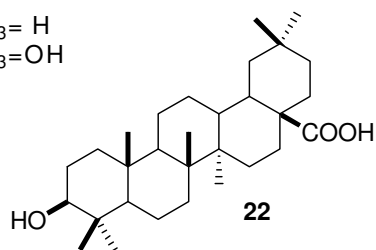
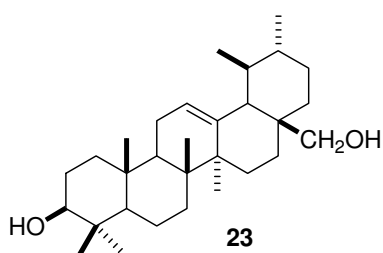


Tabela 1. Substâncias isoladas do gênero *Arrabidaea*.

Substância	Nome	Parte da planta	Espécie	Referência
1	<i>trans</i> -hidroxiprolinobetaína	-	<i>A. candidans</i>	ADRIAN-ROMERO et al., 2007
2	isoverbascoído	cascas do caule	<i>A. harleyi</i>	LIMA et al., 2003
3	verbascoído	cascas do caule	<i>A. harleyi</i>	LIMA et al., 2003
4	6,7,3',4'-tetraidroxi-5-metoxi-flavilium	folhas	<i>A. chica</i>	ZORN et al., 2001
5	carajurona	folhas	<i>A. chica</i>	ZORN et al., 2001
6	carajurina	folhas	<i>A. chica</i>	ZORN et al., 2001
7	6,7,3'-trihidroxi-5,4'-dimetoxi-flavilium	folhas	<i>A. chica</i>	ZORN et al., 2001
8	acacetina	folhas	<i>A. chica</i>	ZORN et al., 2001
9	alpinetina	folhas	<i>A. triplinervia</i>	LEITE et al., 2006
10	crisina	caules	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI, YOUNG, BOLZANI, 2003
11	carajuflavona	folhas	<i>A. chica</i>	TAKEMURA et al., 1995
12	2-(2'- <i>O-trans</i> -cafeoil)- <i>C</i> -β-D-glicopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona	caules	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI et al., 2003
13	2-(2'- <i>O-trans</i> -cinamoil)- <i>C</i> -β-D-glicopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona	caules	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI et al., 2003
14	2-(2'- <i>O-trans</i> -cumaroil)- <i>C</i> -β-D-glicopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona	caules	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI et al., 2003
15	2-(2'- <i>O-benzoil</i>)- <i>C</i> -β-D-glicopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona	caules	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI et al., 2003
16	muraxantona	caules	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI et al., 2003
17	mangiferina	caules	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI et al., 2003
18	ácido ursólico	folhas	<i>A. triplinervia</i>	LEITE et al., 2006;
19	ácido pomólico	folhas	<i>A. triplinervia</i>	PAULETTI et al., 2003 LEITE et al., 2006

Continuação da Tabela 1. Substâncias isoladas do gênero *Arrabidaea*.

Substância	Nome	Parte da Planta	Espécie	Referência
20	3 β , 16 α -diidroxi-olean-12-eno	caules	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI, YOUNG, BOLZANI, 2003
21	eritrodiol	folhas	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI, YOUNG, BOLZANI, 2003
22	ácido oleanólico	folhas	<i>A. chica</i> <i>A. samydoides</i>	ZORN et al., 2001, LEITE et al., 2006
23	uvaol	folhas	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI, YOUNG, BOLZANI, 2003
24	β -sitosterol	caules	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI, YOUNG, BOLZANI, 2003
25	lupeol	caules	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI, YOUNG, BOLZANI, 2003
26	estigmasterol	caules	<i>A. samydoides</i>	PAULETTI, YOUNG, BOLZANI, 2003

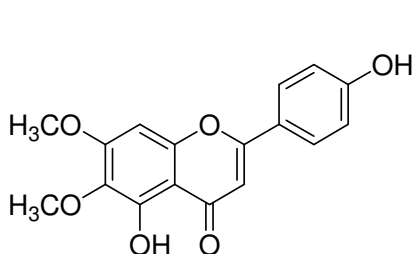
1.3 Espécie *Arrabidaea brachypoda*

A. brachypoda (Figura 1) pertence à tribo Bignonieae Dumort. É um arbusto nativo do Cerrado de até 0,70 m de altura. Caracteriza-se pelas folhas simples e flores róseas-roxas em inflorescências terminais (SILVA & QUEIROZ, 2003).

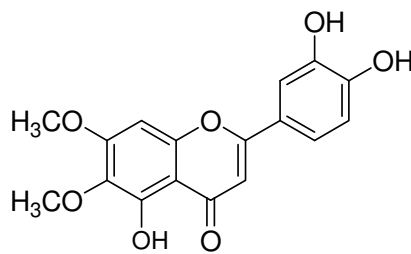


Figura 1. Foto de um exemplar de *Arrabidaea brachypoda*.

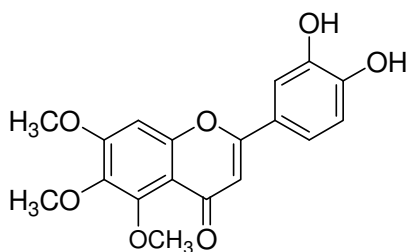
A literatura descreve apenas um estudo químico dessa espécie o qual relata a composição flavonoídica da cera epicuticular das folhas (ALCERITO et al., 2002):



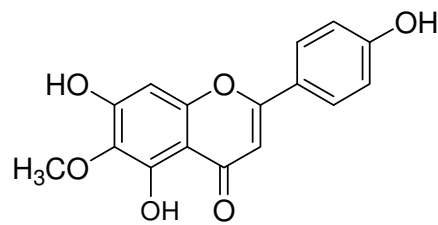
cirsimaritina



cirsiliol



3', 4'-diidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona



hispidulina

1.4 Flavonóides

O metabolismo fenilpropanóidico transforma fenilalanina em uma variedade de micromoléculas importantes, incluindo lignanas, ésteres derivados do ácido sinápico, estilbenos e flavonóides. Essas micromoléculas dão origem a um grande número de metabólitos especiais das plantas, compostos esses não requeridos para o crescimento e desenvolvimento normais, através de caminhos metabólicos comuns a todas as plantas. É esperado que exista entre 50.000 e 100.000 produtos de metabólitos especiais de plantas, e aproximadamente 20% do carbono fixado pela fotossíntese é direcionado para via dos fenilpropanóides, gerando a maioria das substâncias fenólicas encontradas na natureza, incluindo os flavonóides. Os flavonóides constituem a maior classe de grupos de produtos naturais. Muito do interesse crescente em flavonóides deve-se às propriedades medicinais que eles possuem com respeito à saúde humana (VERVERIDIS et al., 2007).

1.4.1 Estrutura e biossíntese de flavonóides

A estrutura básica de um flavonóide consiste de 15 átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6 - C_3 - C_6$), que são denominados A, C e B (Figura 2). Entre as muitas subclasses de flavonóides estão as flavonas, as flavanonas, as isoflavonas, os flavonóis, as flavan-3-óis, as antocianidinas, as biflavonas, as chalconas, as auronas e as cumarinas. Taninos hidrolisáveis, proantocianidinas, (oligômeros de flavan-3-óis), derivados do ácido cafeico e lignanas são todos compostos fenólicos e são classificados separadamente (PIETTA, 2000).

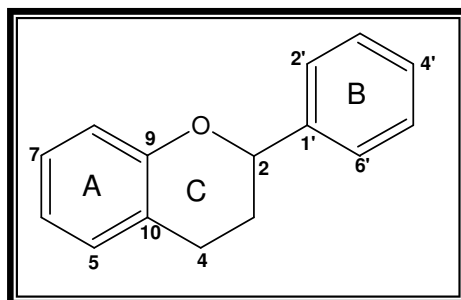


Figura 2. Estrutura básica dos flavonóides

Dependendo da posição da ligação do anel B ao anel C, o grupo flavonóide pode ser dividido em 4 classes:

- Flavonóides principais
- Isoflavonóides
- Neoflavonóides
- Flavonóides minoritários

O termo secundário é usado somente para distinguir casos em que a estrutura básica do flavonóide não é mantida como nas chalconas (anel C aberto) ou auronas (anel C substituído por um anel de 5 carbonos) (VERVERIDIS et al., 2007).

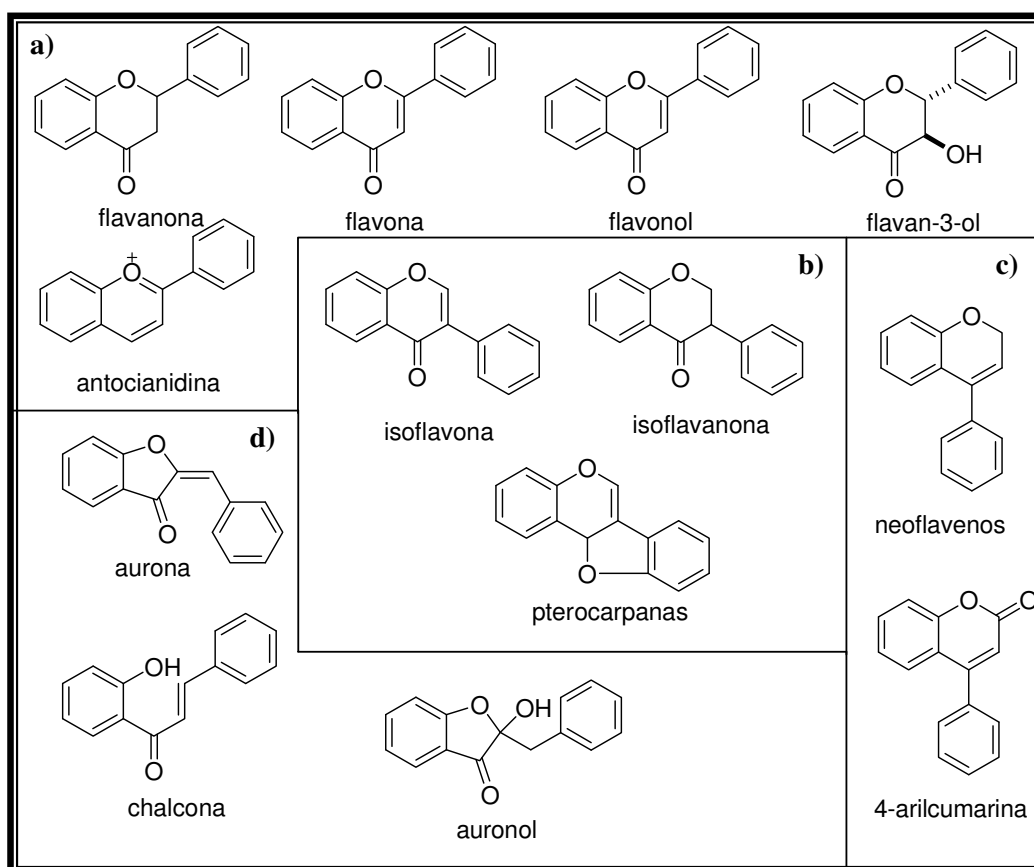


Figura 3. Esqueleto químico dos: a) flavonóides principais; b) isoflavonóides; c) neoflavonóides e d) flavonóides minoritários.

A maioria desses grupos compartilha um precursor chalcônico comum e por isso são biogeneticamente e estruturalmente relacionados. Eles diferem entre si pela saturação no anel C, na locação do anel B nas posições C-2, C-3, C-4 e no padrão de hidroxilação. Flavonóides podem ser modificados por hidroxilação, metoxilação, ou *O*- e *C*-glicosilações. Além disso, grupos prenila (isoprenilas, geranilas e farnesilas) podem se ligar covalentemente ao flavonóide e anéis adicionais podem ser conectados ao esqueleto básico do flavonóide. Flavonóides glicosilados podem ser acilados por moléculas alifáticas ou de ácidos aromáticos (VERVERIDIS et al., 2007).

Em plantas, os flavonóides apresentam-se glicosilados. O fato dos flavonóides serem encontrados em formas combinadas, geralmente como glicosídeos, sugere que a combinação com esses compostos é parte importante na economia da planta, pelo menos porque os glicosídeos possuem uma solubilidade maior e maior mobilidade que as agliconas. O armazenamento desses fenólicos na forma glicosídica pode bem ser um método das plantas para que esses compostos não interfiram em certos mecanismos celulares vitais (VERVERIDIS et al., 2007).

Apesar de a forma glicosilada ser a mais comum, flavonóides também são acumulados na forma de agliconas. Outro grupo de flavonóides substituídos é o de flavonóides sulfatados, que é, aparentemente, restrito a certas espécies de plantas (VERVERIDIS et al., 2007).

Esses compostos são biossintetizados a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, e também do malonato (HAHLBROCK, 1981). O anel B e parte do anel heterocíclico do esqueleto do flavonóide provém de 4-cumaroil-CoA enquanto que o anel A origina-se a partir de três unidades de acetato-malonato. A enzima chave para a formação do esqueleto do flavonóide é a chalcona sintetase, que catalisa a etapa de condensação das três unidades de acetato da via do malonato com 4-cumaroil-CoA formando um intermediário com 15 átomos de carbono (2',4',6',4'-tetraidroxichalcona) (HARBORNE, 1994).

1.4.2 Função dos flavonóides nas plantas

Estas substâncias têm papéis diferentes na ecologia das plantas. Devido a suas cores atraentes, flavonas, flavonóis e antocianidinas atuam como sinalizadores visuais para agentes polinizadores. Por causa da adstringência, catequinas e outros flavonóis podem representar um sistema de defesa contra parasitas. Flavonóides atuam como catalisadores na fase luminosa da fotossíntese e/ou como reguladores do canal de ferro envolvido na fosforilação (PIETTA, 2000). Eles também podem funcionar como protetores contra o estresse oxidativo nas células das plantas

seqüestrando espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidas pelo sistema de transporte eletrônico fotossintético (HARBORNE, 1994). Além disso, por causa de sua capacidade de absorção na faixa do UV, flavonóides protegem as plantas contra radiação solar e seqüestra as EROS gerados por essa radiação (PIETTA, 2000).

Além disso, muitos flavonóides como também outros fenólicos, são potencialmente citotóxicos e possuem atividade antimicrobiana. Por essas razões, eles são estocados nas plantas ligados à açúcares, sulfatos ou ambos, nos vacúolos como formas hidrossolúveis (VERVERIDIS et al., 2007).

1.4.3 Propriedades medicinais dos flavonóides

Nos últimos anos, o interesse pelas propriedades farmacológicas destas substâncias tem crescido bastante. Estudos com flavonóides mostraram um amplo espectro de ações biológicas, como antiviral, antiinflamatória, propriedades antialérgicas, efeitos cardioprotetores e anticarcinogênicos. A maioria dessas atividades está relacionada à capacidade antioxidante e quelante dos flavonóides (PIETTA, 2000).

1.4.4 Capacidade antioxidante dos flavonóides

Dentre as atividades medicinais mais investigadas pela literatura, destaca-se a capacidade dos flavonóides de seqüestrar espécies reativas de oxigênio (EROS). Apesar dessa atividade ser intensamente descrita, os flavonóides vem ganhando maior notoriedade devido aos impactos das EROS e dos processos de oxidação na espécie humana e no metabolismo e fisiologia das plantas (REDDY et al., 2007)

A oxidação é a transferência de elétrons de um átomo para outro e representa uma parte essencial da vida aeróbica e do metabolismo, uma vez que o oxigênio molecular é o último receptor de elétrons no sistema de fluxo eletrônico que produz energia na forma de ATP. Porém, podem surgir problemas quando o fluxo eletrônico se torna desacoplado (transferência de um único elétron desemparelhado), gerando radicais livres. Exemplos de radicais livres conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROS) são o superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peroxila ($ROO^{\cdot}$), alcóxila ($RO^{\cdot}$), hidroxila ($^{\cdot}OH$) e óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) (PIETTA, 2000). Os radicais livres hidroxila e alcóxila são muito reativos e rapidamente reagem com moléculas em células próximas, e provavelmente causam danos intensos nas estruturas celulares. Por outro lado, o ânion superóxido, lipídeos hidroxiperoxidasas e óxido nítrico são menos reativos. Além disso, em organismos vivos existem outras EROS que não são radicais como oxigênio

singleto ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl) (PIETTA, 2000).

As EROS possuem diferentes papéis nos organismos vivos. Alguns são positivos e estão relacionados aos seus envolvimento com a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento da célula e sinalização intercelular, e síntese de compostos biológicos importantes. No entanto, as EROS podem ser muito prejudiciais sendo que elas podem reagir com lipídeos da membrana celular, proteínas e consequentemente induzir danos nessas moléculas, carboidratos, DNA e lipoproteínas. Essas injúrias oxidativas acreditam-se serem responsáveis pelo envelhecimento precoce e muitas doenças degenerativas cardiológicas, catarata, deficiências cognitivas como Doença de Alzheimer e câncer (PIETTA, 2000).

Uma definição ampla para o termo antioxidante é: “uma substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada ao substrato oxidável (que inclui várias substâncias encontradas em tecidos vivos, incluindo proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos), impede ou previne, significativamente, a oxidação desse substrato” (VANNUCCHI, 1998).

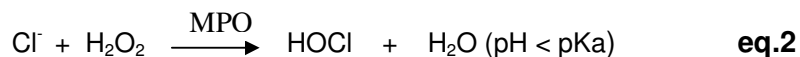
Os principais meios biológicos de defesa antioxidantes podem ser divididos em três grupos: antioxidantes enzimáticos, antioxidantes não enzimáticos e proteínas ligadoras de metais. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas redutase e oxidase da glutatona, particularmente a glutatona peroxidase, a superóxido dismutase e a catalase, que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A proteção não-enzimática por pequenas moléculas, dentre as quais as mais utilizadas são glutatona, ubiquinona, ácido úrico, bilirrubina, NADPH e NADH, flavonóides, vitamina C, vitamina E e carotenóides. Entre as proteínas ligadoras de metais podemos citar ceruloplasmina (cobre), metalotioneína (cobre), albumina (cobre), transferrina (ferro), ferritina (ferro) e a mioglobina (ferro) (YEN et al., 2001).

Está bem estabelecido que a capacidade que alguns flavonóides exercem na inibição de radicais livres depende do arranjo dos substituintes nas suas estruturas. Algumas propriedades de proteção contra o estresse oxidativo são reportadas como sendo dependente da estrutura e relacionadas à presença de um grupo catecol no anel B (hidroxilação em C-3' e C-4', propriedade de doação de próton), resultando na estabilidade da espécie reativa; à química do anel C, particularmente a presença do grupo carbonila em C-4 em conjugação com uma insaturação situada entre os carbonos C-2 e C-3 ou à presença de hidroxilas nas posições 3 e 5 ou outro grupo funcional na posição C-3 resultante da esterificação da hidroxila em C-3 com o ácido gálico em conjugação com a insaturação em C-2 e C-3 favorecendo a quelatação de metais e impedindo a catálise das reações dos radicais livres. Flavonóis e flavonas

possuem quase todas essas características e são abundantes em plantas. Isto é exemplificado pela quercetina que satisfaz todos os critérios acima, possuindo uma das atividades antioxidantes mais potentes entre os flavonóides. No entanto, se a hidroxila em C-3 estiver glicosilada como no caso da rutina a atividade seqüestradora de radicais livres é reduzida à 50%. Outros flavonóides candidatos a antioxidantes são os galatos de catequinas e as hidroxiflavonas. Antocianidinas, precursores de antocianinas, cianidinas e delfinidinas estruturalmente apresentam a maioria dos critérios citados acima e desmonstraram possuir um grande potencial antioxidante (VERVERIDIS et al., 2007).

1.5 Enzima mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase é uma enzima catiônica em pH fisiológico e, desta maneira, é capaz de se ligar a estruturas biológicas aniônicas, tais como: fosfolipídeos de membranas celulares. Esta enzima, também, catalisa a geração de HOCl, biomolécula que promove injúria celular (WEISS, 1989; eq. 1, eq. 2).



O HOCl pode ser considerado como o agente oxidante mais abundante gerado por leucócitos do sangue. O ácido hipocloroso é um agente oxidante extremamente reativo. Além de atacar biomoléculas de grande importância fisiológica, tais como: tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos e ascorbato, ele é capaz de gerar outras EROS, tais como: oxigênio singlete e radical hidroxila, através de uma reação com peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, respectivamente (WEISS, 1989).

A literatura correlaciona a injúria oxidativa promovida por MPO e HOCl com inúmeros processos inflamatórios, tais como: artrite reumatóide, fibrose cística, doença inflamatória intestinal, injúria pulmonar neonatal, etc (EDWARDS & HALLETT, 1997; DHANESHWAR et al., 2006). A mieloperoxidase foi encontrada em lesões de aterosclerose humana (DAUGHERTY et al., 1994), sugerindo, assim, possuir função de agente oxidante clorado nos processos aterogênicos (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996). Neste contexto, o HOCl pode modificar, por oxidação, lipoproteínas de baixa densidade para uma forma aterogênica, principal causa dos problemas vasculares. Aparentemente, ocorre a oxidação de resíduos de lisina da apoproteína B-100, constituinte da lipoproteína (HAZELL & STOCKER, 1993; HAZELL et al., 1994).

Apesar da MPO catalisar a formação de um importante microbicida (HOCl), indivíduos deficientes em MPO não apresentam maiores comprometimentos, a não ser uma aparente susceptibilidade à infecções fúngicas (SILVA, 2001). Dessa forma, a busca por inibidores de MPO a partir de fontes naturais torna-se de grande valia na descoberta de agentes antiinflamatórios, bem como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2. Objetivos

- avaliação do perfil de metabólitos secundários via *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) das frações obtidas para posterior estudo de *desreplicação*, uma das metas atuais do NuBBE.
- estudo químico de *A. brachypoda*, visando o isolamento e a determinação estrutural de substâncias fenólicas polares para posterior avaliação do efeito antitumoral, antimalárico, antioxidante e antifúngico visando contribuir com o projeto “Conservation and sustainable use of plant diversity from Cerrado and Atlantic forest: chemical diversity and prospection for potential drugs” (Programa Biota-FAPESP).

3. Metodologia

3.1 Instrumentação

- Os solventes utilizados foram da marca Merck ou Synth de qualidade P.A. e grau HPLC para as análises em HPLC;
- As concentrações das soluções foram efetuadas em rota-evaporador Büchi-RE 121 sob pressão reduzida;
- Cromatógrafo líquido da marca Varian ProStar®, consistindo de uma bomba ternária modelo 240, um detector de arranjo de diodo modelo 330 e um injetor automático modelo 410, controlados pelo programa Star Chromatography Workstation versão 5.3. A coluna utilizada foi Phenomenex LC₁₈ 5 µm, 250 x 4,6 mm;
- Cromatógrafo líquido da marca Varian ProStar® analítico, consistindo de uma bomba ternária modelo 310, um detector UV-visível modelo 233 controlados pelo programa Star Chromatography Workstation versão 5.3;

- injetor manual da marca Rheodyne modelo 7725i. A coluna utilizada foi Synergi Hydro – RP, 4 μm , 80 Å, 250 x 4,6 mm, fluxo de 1,0 mL/min;
- Cromatógrafo líquido da marca Varian PrepStar® preparativo, consistindo de duas bombas modelo SD-1, um detector UV-visível da marca ProStar modelo 320, controlados pelo programa Star Chromatography Workstation versão 5.3; injetor manual da marca Rheodyne modelo 7725i. A coluna utilizada foi Synergi Hydro – RP Axia Packed, 4 μm , 80 Å, 100 x 21,2 mm, fluxo de 8,5 mL/min;
 - Todas as análises nos cromatógrafos líquidos foram feitas com $\lambda = 254 \text{ nm}$, exceto no cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodo;
 - Espectrômetro de massas de alta resolução ESI-TOF, modelo ultrOTOF_Q (Bruker Daltonics®, Billerica, MA, EUA), bomba de infusão, fluxo de 100 $\mu\text{L/h}$. Fase móvel utilizada para a solubilização da amostra foi MeOH. Os dados de massa foram adquiridos no modo negativo.
 - Espectrômetro de RMN Varian INOVA 500 (11,7 Tesla), operando em frequência de 500 MHz para os núcleos de hidrogênio e 126 MHz para o carbono.

3.2 Coleta e identificação do material vegetal

O material botânico (folhas, caules e inflorescências) foi coletado em Assis – SP em fevereiro de 2006, identificado pela Dra. Inês Cordeiro e sua exsicata (col. Brumati 40) foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo. Este material foi seco em estufa a 40°C, pulverizado em moinho de facas e armazenado no NuBBE.

3.3 Preparo dos extratos etanólicos brutos

O material pulverizado foi submetido à extração exaustiva com etanol. Depois, fez-se a concentração do solvente a pressão reduzida obtendo o extrato etanólico das folhas, dos caules e das inflorescências (Tabela 2).

Tabela 2. Massa do material seco e do extrato etanólico.

Parte da Planta	Massa material seco (g)	Massa extrato bruto (g)	Rendimento
Folhas	39,9	6,00	15%
Caules	54,7	1,62	3%
Inflorescências	8,61	1,23	14%

3.4. Preparo das amostras para HPLC analítico

O pré-tratamento das amostras que foram analisadas em HPLC foi feito com um cartucho de C₁₈ da marca J.T.Baker®. As amostras foram solubilizadas em MeOH, passadas pelo cartucho e secas. Depois, as amostras foram solubilizadas em MeOH de modo a ter-se uma solução de concentração entre 1 a 5 mg/mL. Essa solução foi filtrada em uma seringa adaptada com uma membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), diâmetro de poro de 0,45 µm da marca Gelman®, coletando o filtrado em frasco de 1,5 mL.

3.5 Preparo da fração AcOEt das folhas para análise em HPLC preparativo

Para o pré-tratamento da fração, 1,00g da mesma foi solubilizada em MeOH e depois eluída em um cartucho de C₁₈ da marca J.T.Baker®. Depois de seca, a fração foi solubilizada na fase móvel utilizada na análise até concentração de 100 mg/mL e em seguida, foi feita uma filtração utilizando um sistema constituído de uma seringa adaptada com uma membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), diâmetro de poro de 0,45 µm da marca Gelman®.

3.6 Preparo de Fra3 e Fra8 para análise em HPLC preparativo

As duas frações foram solubilizadas na fase móvel que foi utilizada na análise de modo a se preparar um solução 10 mg/mL. Em seguida, foram filtradas com seringa adaptada com uma membrana de politetrafluoroetileno (PFTE), diâmetro de poro de 0,45 µm da marca Gelman®.

3.7 Atividade antioxidante

A solução de DPPH (200 µM) foi preparada em metanol. Para as substâncias que foram testadas e para o controle positivo (quercetina) foram preparadas soluções

de 1 mg/mL em metanol e depois essas soluções foram diluídas para as seguintes concentrações: 100, 80, 40, 20, 10 e 5 µM. Em uma placa de 96 poços foi adicionada uma alíquota de 100 µL de cada solução em triplicata e depois foi adicionado 200 µL de DPPH. Essa placa foi mantida durante 30 min no escuro e depois a absorbância foi medida no espectrofotômetro Bio-TEK® leitor de microplacas. A avaliação da forma reduzida do DPPH gerado foi determinada através da diminuição da absorbância a 517nm:

Fórmula: % de seqüestro do radical livre estável DPPH.

$$\% = \frac{(\text{absorbância do controle DPPH} - \text{absorbância da amostra teste ou controle positivo})}{\text{absorbância do controle DPPH}}$$

3.8 Atividade inibidora da enzima mieloperoxidase (MPO)

O ensaio envolvendo a inibição de mieloperoxidase foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Tecnologia do Instituto de Química, UNESP-Araraquara, sob supervisão da Profa. Dra. Olga Mascarenhas. O ensaio de inibição sobre mieloperoxidase (MPO) foi realizado em uma cubeta para espectrofotômetro, onde foram adicionados tampão fosfato de sódio (50 mM, pH = 7,4), guaiacol (70 mM), as substâncias dissolvidas em etanol e MPO (8 nM). A reação enzimática foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,3 mM) e logo realizou-se a primeira leitura da absorbância em 470 nm, sendo repetido esse processo a cada 5 segundos durante um minuto, determinando-se a velocidade inicial (v_o). Para isso, v_o foi calculada por meio da plotagem de um gráfico produto formado *versus* tempo de reação ($v_o = A/t$) foi comparada frente a diferentes concentrações das substâncias testadas por meio da construção de gráficos que correlacionam concentração *versus* resposta. Esse ensaio tem como princípio a oxidação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio (CAPEILLÈRE-BLANDIN, 1998).

4. Resultados e Discussões

4.1 Estudo químico da *A. brachypoda*

Primeiramente foi feita uma análise exploratória em HPLC com detector de arranjo de diodos (DAD) do extrato etanólico das folhas, dos caules e das inflorescências da *A. brachypoda* (Figura 4 – 6).

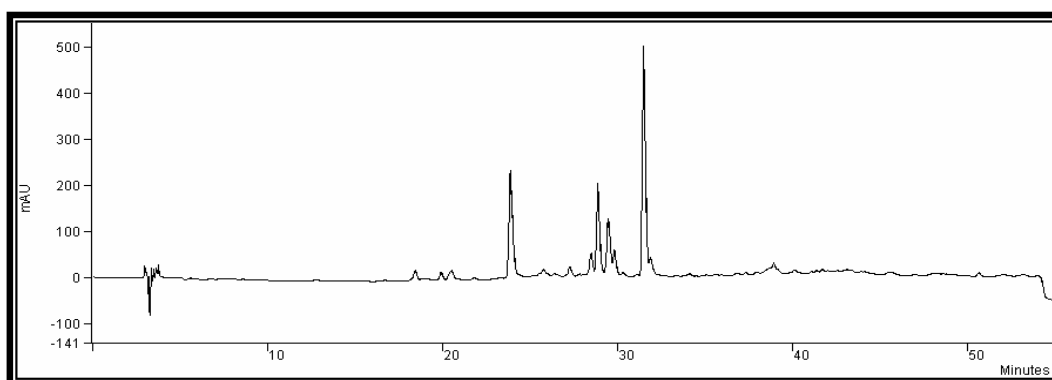


Figura 4. Cromatograma do extrato etanólico das folhas; gradiente MeOH:H₂O, 5-100% MeOH em 50 min, solução 1 mg/mL, fluxo de 1 mL/min, coluna Phenomenex LC₁₈ 5 μ m, 250 x 4,6 mm, λ = 254 nm, injeção de 20 μ L.

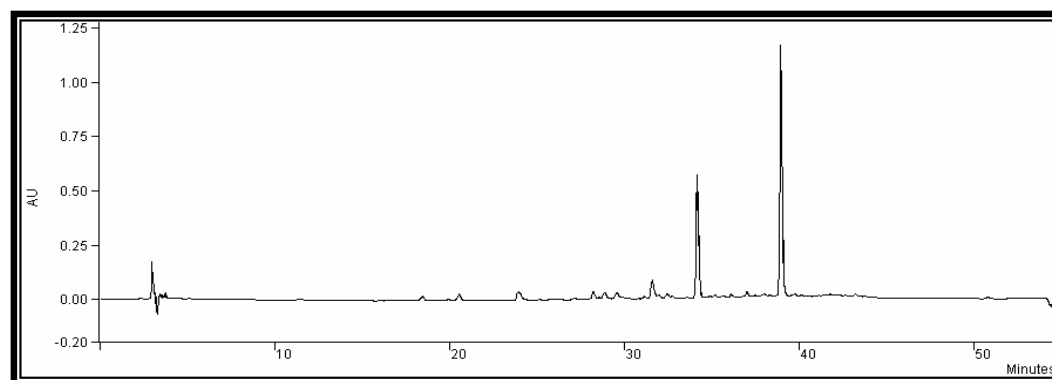


Figura 5. Cromatograma do extrato etanólico da inflorescência; gradiente MeOH:H₂O, 5-100% MeOH em 50 min, solução 1 mg/mL, fluxo de 1 mL/min, coluna Phenomenex LC₁₈ 5 μ m, 250 x 4,6 mm, λ = 254 nm, injeção de 20 μ L.

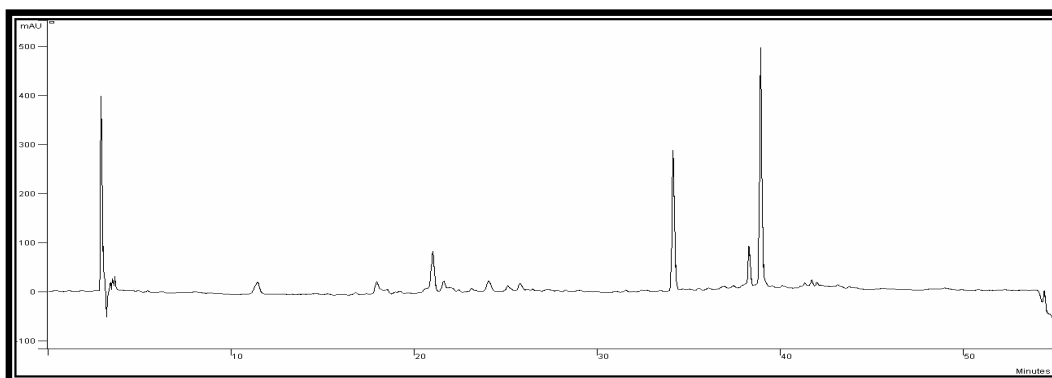


Figura 6. Cromatograma do extrato etanólico do caule; gradiente MeOH:H₂O, 5-100% MeOH em 50 min, solução 1 mg/mL, fluxo de 1 mL/min, coluna Phenomenex LC₁₈ 5 µm, 250 x 4,6 mm, λ = 254 nm, , injeção de 20 µL.

Observou-se que os perfis dos extratos do caule e da inflorescência eram muito parecidos e que apresentavam dois picos significantes com os mesmos tempos de retenção (34,1min e 38,9 min). O espectro de absorção no UV (Figura 7) indicou que podiam ser as mesmas substâncias.

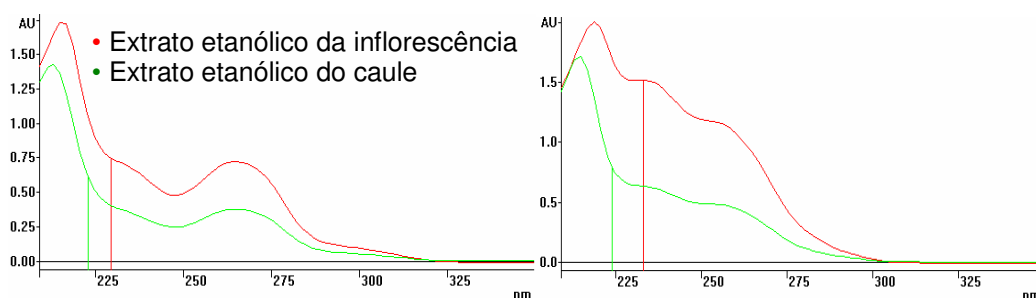


Figura 7. Espectros de absorção no UV dos picos com tempo de retenção tr = 34,1 min e tr = 38,9 min, respectivamente.

Logo em seguida, foram analisados em HPLC-DAD os padrões isolados da *A. samydoides* (substâncias **10**, **12**, **13**, **14**, **16** e **17**) nas mesmas condições em que foram obtidos os cromatogramas acima para que se pudesse comparar os espectros de absorção no UV dos picos com mesmo tempo de retenção dos extratos e dos padrões para analisar a composição do extrato (Figuras 8 – 13). Se existissem picos com mesmo tempo de retenção e, os espectros de absorção no UV fossem iguais, seria usada a técnica de espectrometria de massas para ver se as massas eram as mesmas e assim concluir se eram as mesmas substâncias, fazendo um pequeno trabalho de desreplicação.

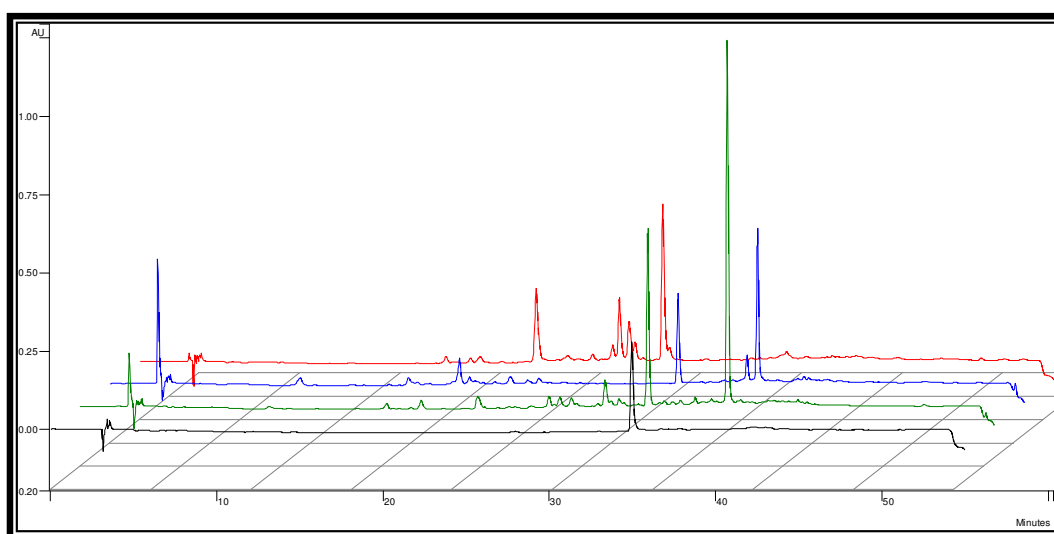


Figura 8. Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (amarelo) e das inflorescências (verde), e da substância 10.

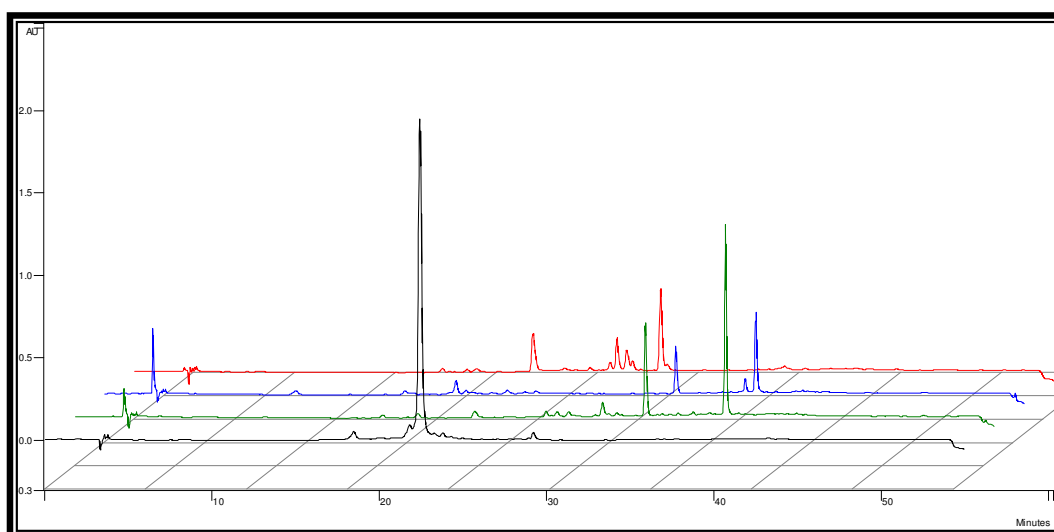


Figura 9. Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (amarelo) e das inflorescências (verde), e da substância 12.

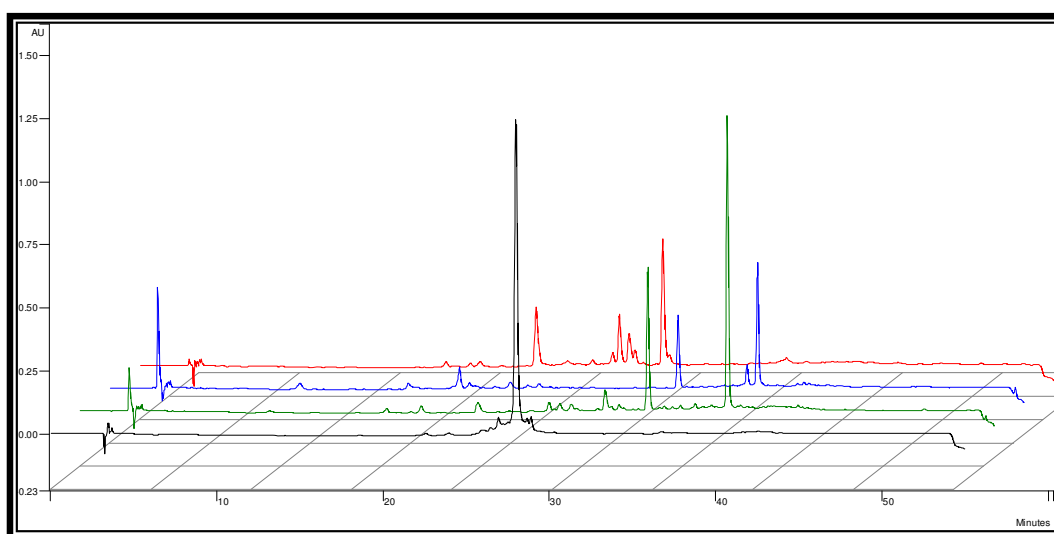


Figura 10. Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (amarelo) e das inflorescências (verde), e das substâncias **13**.

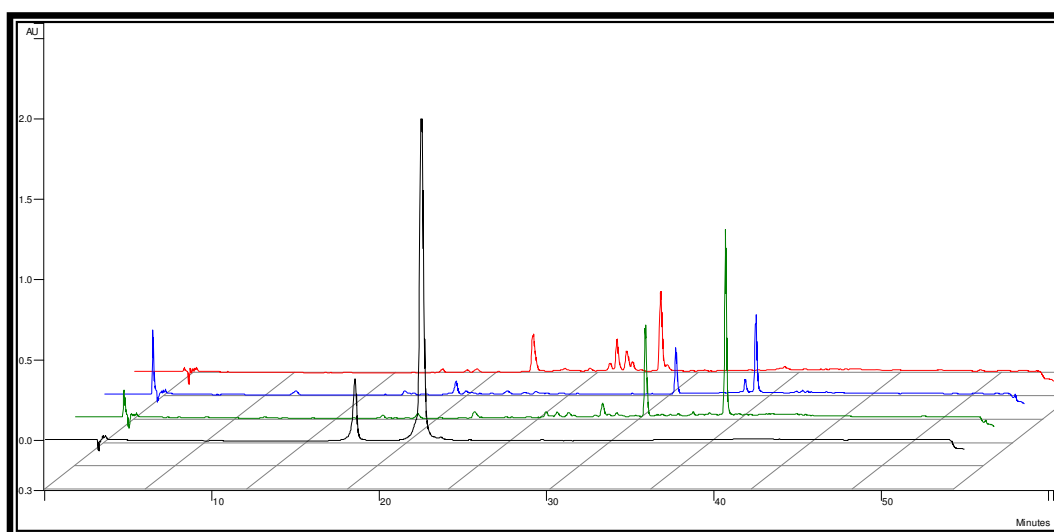


Figura 11. Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (amarelo) e das inflorescências (verde), e da substância **14**.

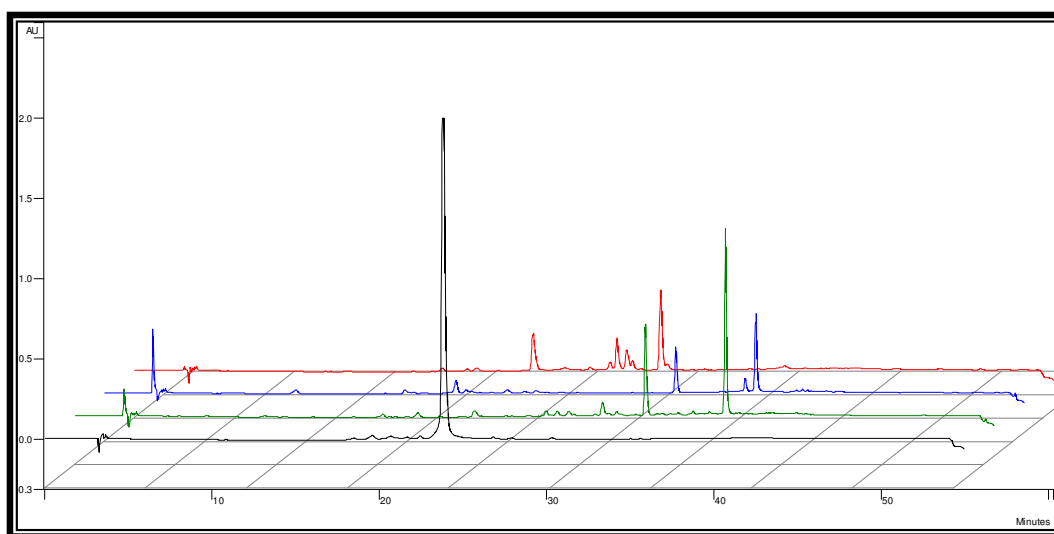


Figura 12. Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (azul) e das inflorescências (verde), e da substância **16**.

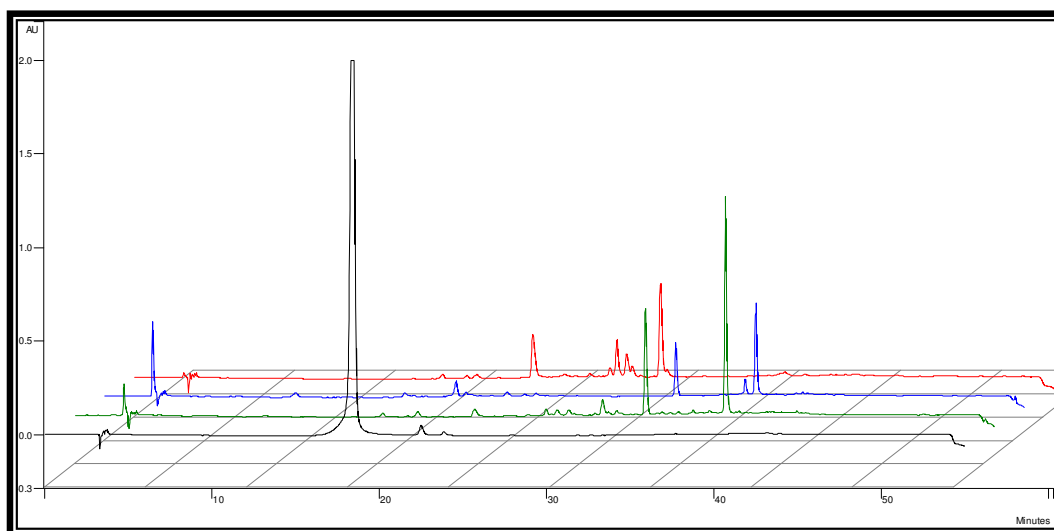


Figura 13. Comparação entre os cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas (vermelho), dos caules (azul) e das inflorescências (verde), e da substância **17**.

Nenhum dos padrões injetados apresentou tempo de retenção igual a algum outro pico dos cromatogramas dos extratos etanólicos dos caules, das inflorescências e das folhas da *A. brachypoda*, podendo-se afirmar a ausência dessas substâncias nos extratos.

Comparou-se os espectros de absorção no UV das xantonas (Figura 14) com os espectros de absorção no UV (Figuras 15 – 17) dos picos mais intensos dos cromatogramas dos extratos etanólicos das folhas, dos caules e das inflorescências e foi observado que os mesmos não possuíam as xantonas como seus principais constituintes. As xantonas apresentaram quatro bandas características de comprimentos de onda de absorção no UV: $\lambda_{\text{max}} = 230 - 240 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{max}} = 250 - 265 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{max}} = 305 - 330 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{max}} = 340 - 400 \text{ nm}$ (MOREL et al., 2000).

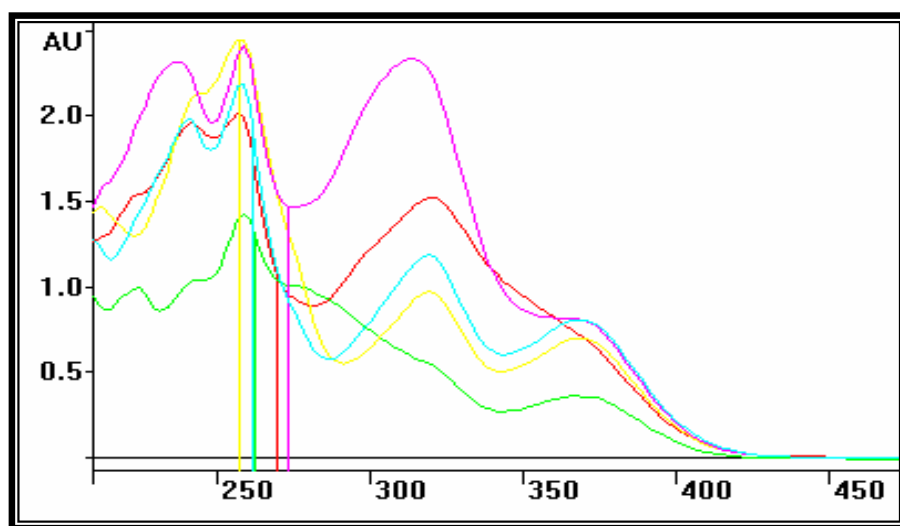


Figura 14. Espectros de absorção no UV dos padrões de xantonas.

O espectro de absorção no UV dos picos mais intensos do cromatograma do extrato etanólico das folhas (Figura 4) apresentou duas bandas características de flavonas e flavonóis indicando a presença de flavonóides no extrato (Figura 15). A banda I de comprimento de onda máximo entre 300 – 390 nm associada à extensão de conjugação do anel B e C e a banda II de comprimento de onda máximo entre 250 – 280 nm associada ao anel aromático A em conjugação com a carbonila. Já os espectros de absorção no UV (Figura 16 e 17) dos picos mais intensos dos cromatogramas do caule e da inflorescência (Figura 5 e 6) apresentaram bandas com comprimentos de ondas máximos entre 240 – 280 nm indicando a presença de anéis aromáticos substituídos.

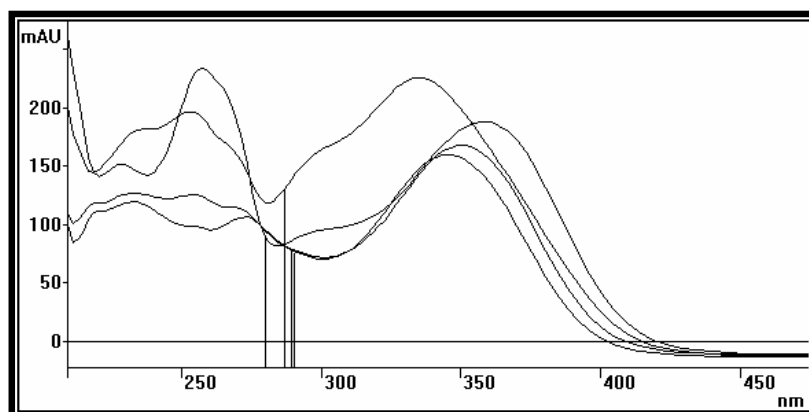


Figura 15. Espectros de absorção no UV dos picos mais intensos do cromatograma do extrato etanólico das folhas.

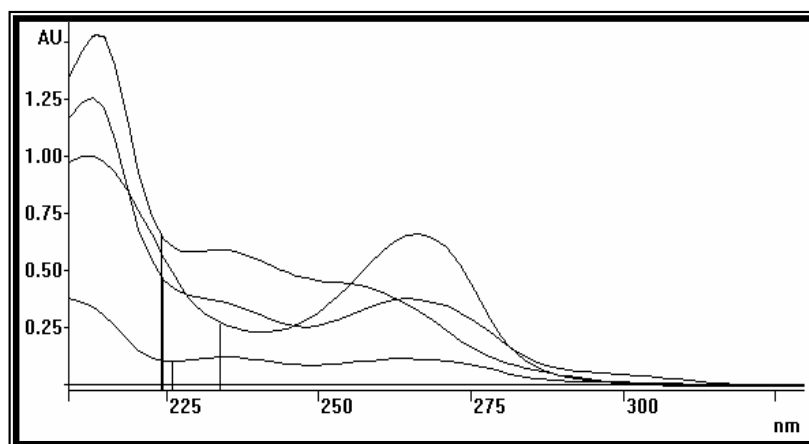


Figura 16. Espectros de absorção no UV dos picos mais intensos do cromatograma do extrato etanólico dos caules.

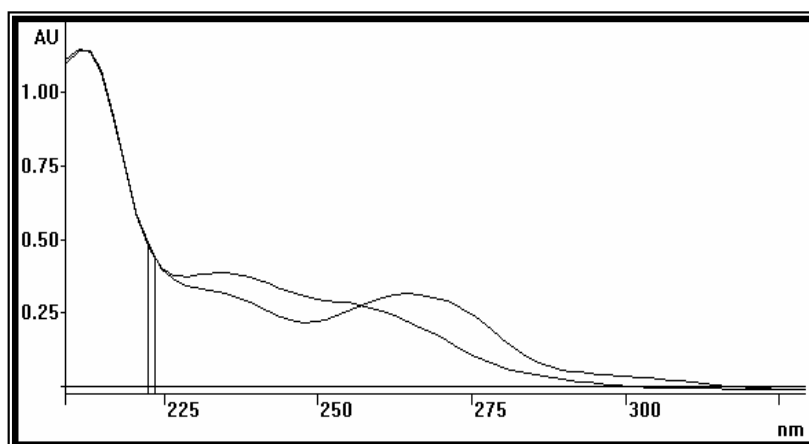


Figura 17. Espectros de absorção no UV dos picos mais intensos do cromatograma do extrato etanólico das inflorescências.

4.2 Estudo químico do extrato etanólico das folhas da *A. brachypoda*

O cromatograma do extrato etanólico das folhas mostrou-se mais complexo comparado com o dos caules e das inflorescências (Figuras 4 – 6), por isso decidiu-se começar com estudo químico deste.

O extrato etanólico das folhas foi, então, submetido à partição líquido-líquido (Figura 18) com solventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano e acetato de etila.

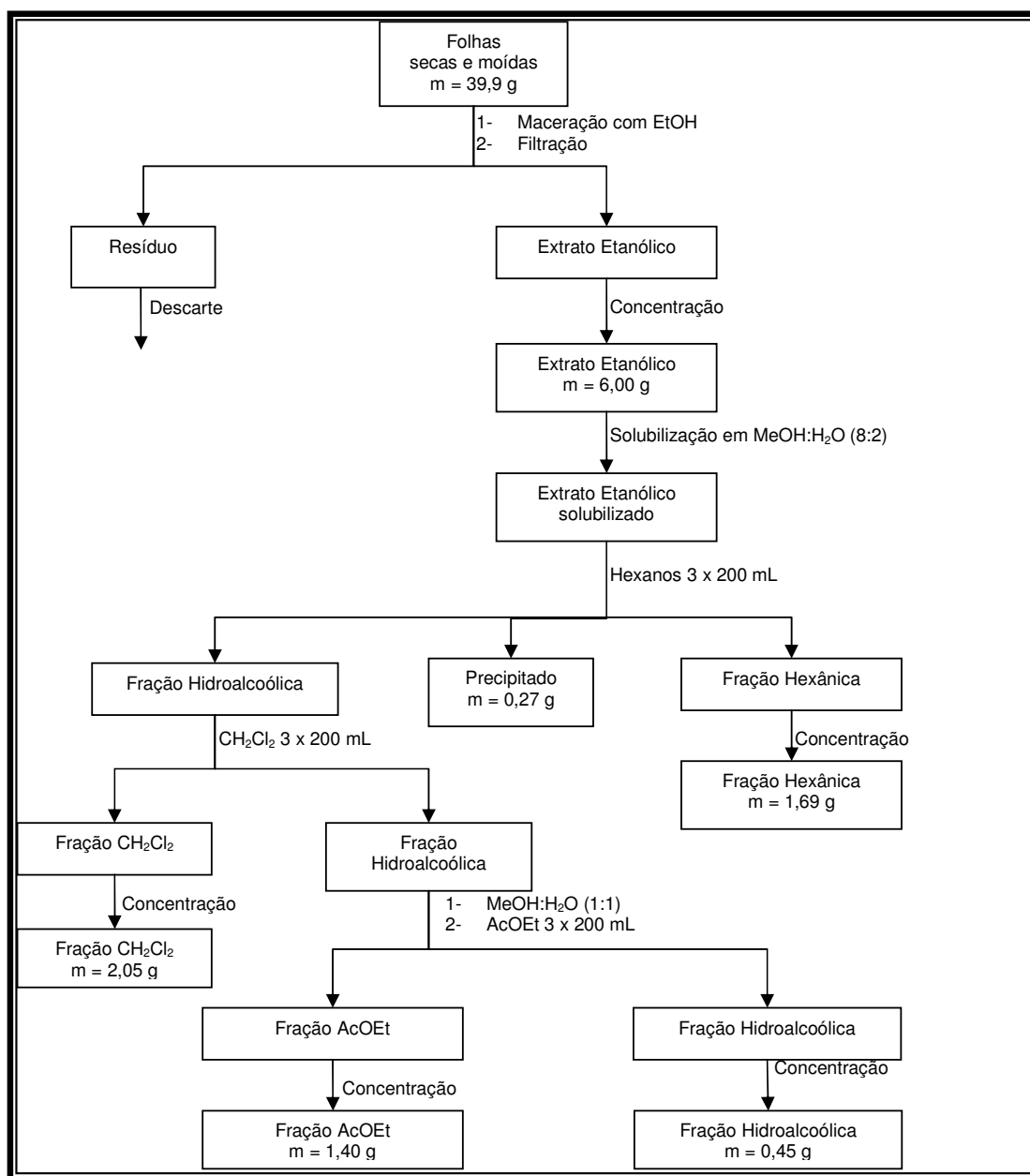


Figura 18. Partição do extrato etanólico das folhas

A primeira fração analisada foi a fração AcOEt, pois queria-se buscar os compostos mais polares incluindo os flavonóides.

Fez-se, então, uma análise exploratória em HPLC com detector de arranjo de diodos da fração AcOEt. O espectro de absorção no UV dos picos mais intensos confirmou a presença de flavonóides nessa fração (Figura 19).

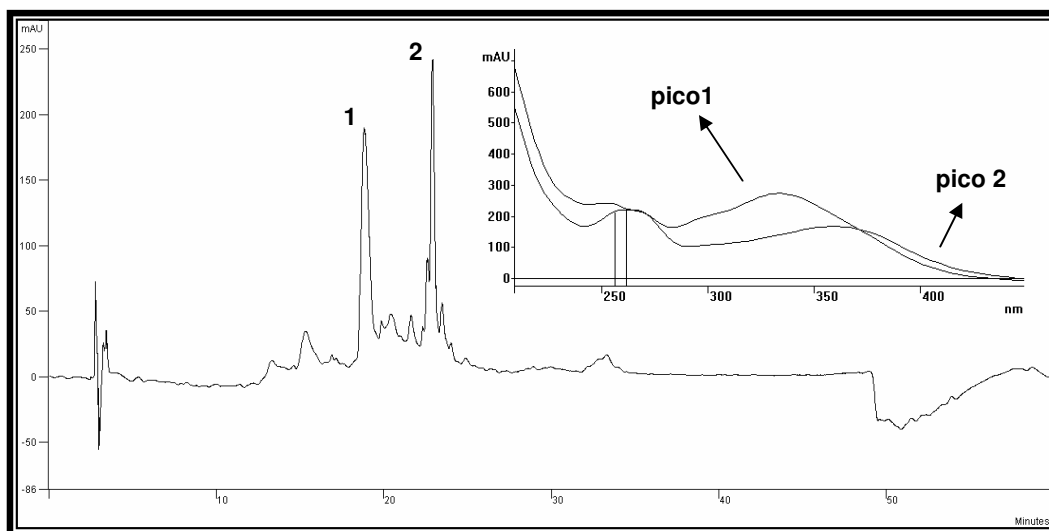


Figura 19. Cromatograma da fração AcOEt; gradiente MeOH:H₂O, 5 -100% MeOH em 50 min, $\lambda = 254$ nm. Espectro de absorção no UV dos picos 1 e 2.

Como a massa da fração era muito pequena optou-se pelo HPLC para se ter o mínimo de perda de massa possível. Desse modo a fração foi analisada em HPLC analítico e foi ajustado um modo de eluição isocrático para que os picos fossem coletados em posterior análise em HPLC preparativo.

A melhor separação foi obtida com fase móvel MeOH:H₂O 0,1% HAc (52:48) (Figura 20). Na transposição da HPLC analítico para o preparativo teve-se que diminuir a força de eluição da fase móvel para MeOH:H₂O 0,1% HAc (48:52) para melhor separação dos picos (Figura 21), com isso a eluição cromatográfica tornou-se um pouco mais longa indo de 30 min para 45 min, tendo um gasto maior de solvente. As frações foram coletas por tempo de retenção (Tabela 3) e não por picos para maior reprodutibilidade.

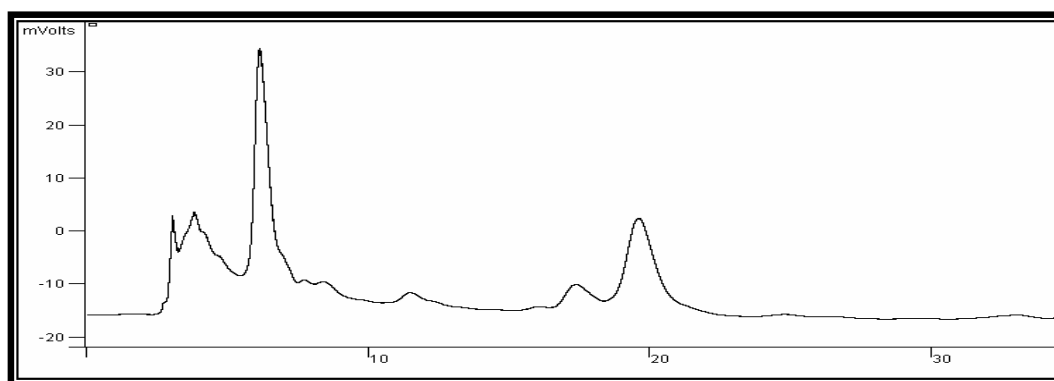


Figura 20. Cromatograma da fração AcOEt, HPLC analítico, fase móvel MeOH:H₂O 0,1%HAc (52:48).

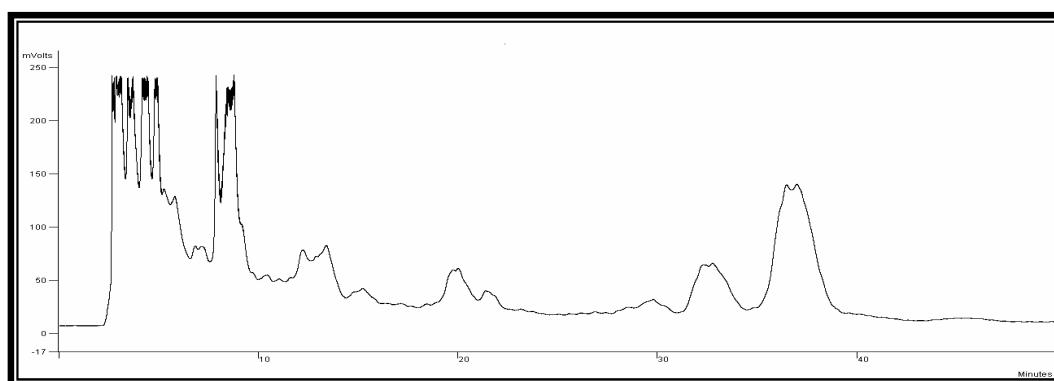


Figura 21. Cromatograma da fração AcOEt, HPLC preparativo, MeOH:H₂O 0,1%HAc (48:52).

Tabela 3. Frações obtidas na separação em HPLC preparativo da fração AcOEt das folhas.

Fração	Tempo de retenção (min)	Massa fração (mg)
Fra1	0 - 5	441,1
Fra2	5 - 8,15	86,4
Fra3	8,15 - 13	100,1
Fra4	13 - 18	41,5
Fra5	18 - 24	32,6
Fra6	24 - 29,5	10,1
Fra7	29,5 - 31	12,1
Fra8	31 - 35	27,6
Fra9	35 - 39,5	40,7
Final	39,5 - 45	20,0
Limpeza	-	81,5

Todas as frações coletadas foram analisadas em HPLC analítico com a mesma fase móvel usada para separação no HPLC preparativo. Fra5 e Fra8 apresentaram 2 picos no cromatograma e Fra3 e Fra9 apresentaram somente um. Fez-se o espectro de hidrogênio ^1H dessas quatro frações (anexos 1 – 4) e observou-se que Fra9 estava pura (substância **III**). As outras três possuíam mistura de substâncias e Fra3 e Fra8 foram purificadas em HPLC preparativo (Figura 22), desta vez usando ACN na fase móvel, pois proporcionou uma melhor separação dos picos com menor tempo de retenção e conseqüentemente, uso de menor quantidade de solvente orgânico. De Fra3 (Figura 23) foram isoladas as substâncias **I** e **II** e, de Fra8 (Figura 24) foi isolada a substância **IV** e reisolada a substância **III**.

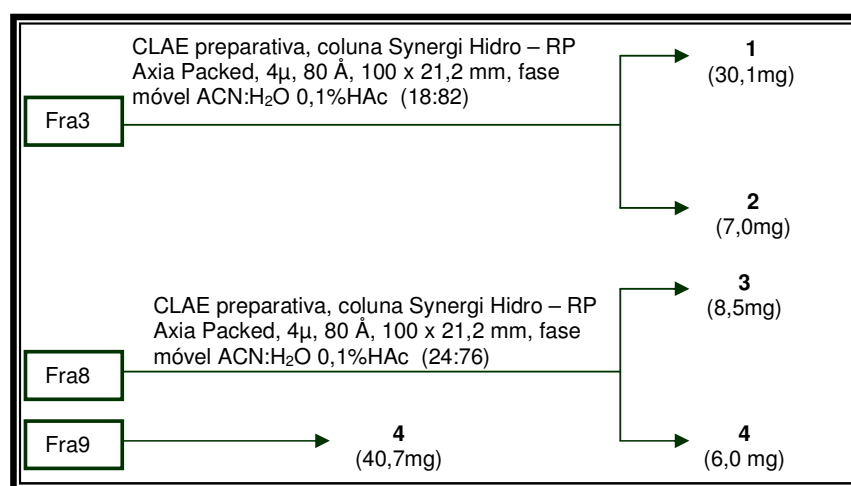


Figura 22. Purificação da frações Fra3 e Fra8.

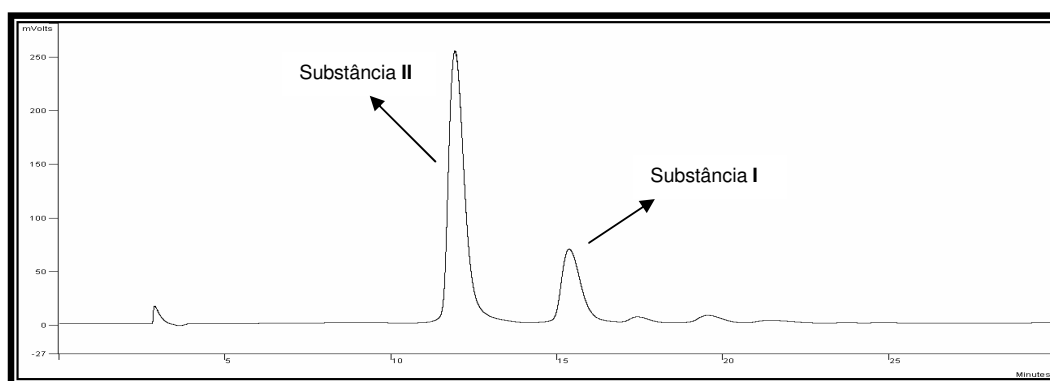


Figura 23. Cromatograma de Fra3 nas condições usadas para a purificação

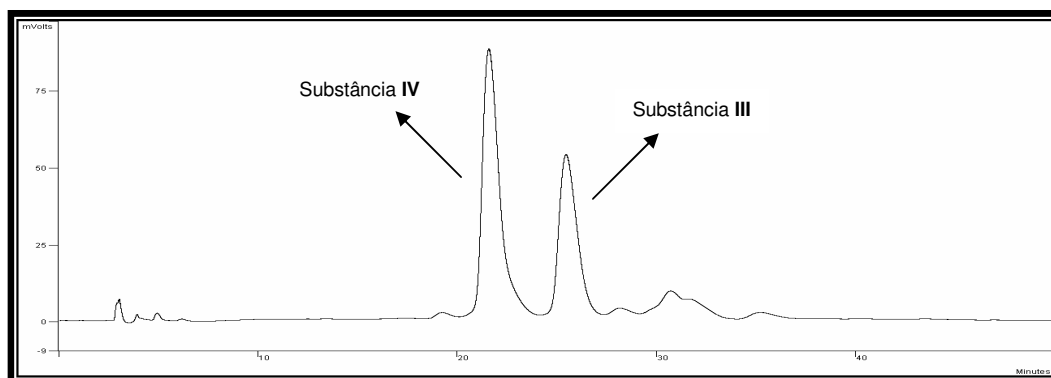
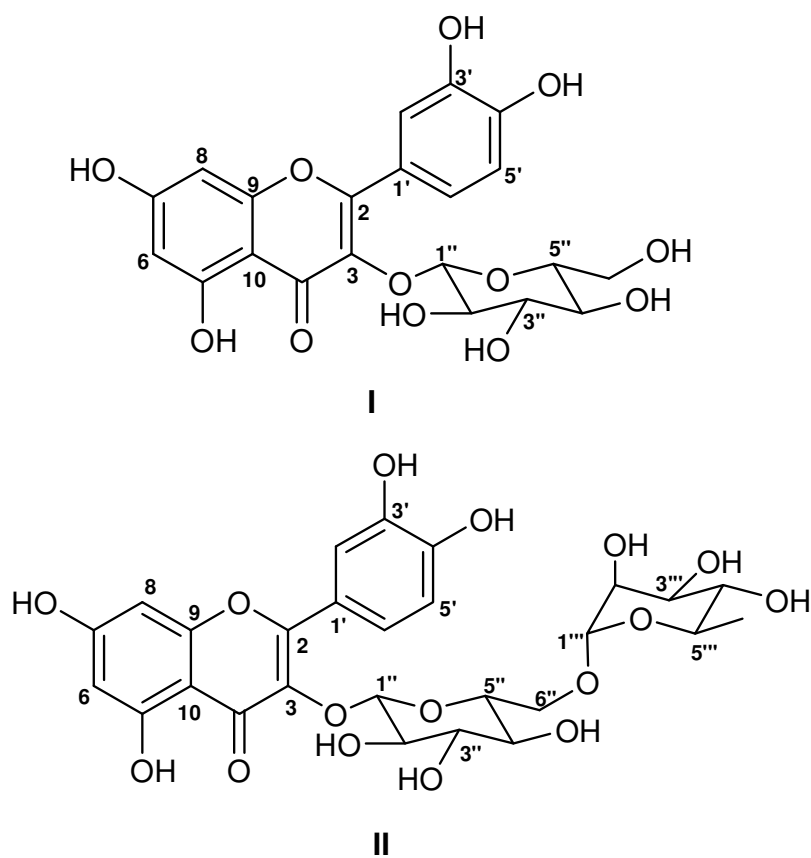


Figura 24. Cromatograma de Fra8 nas condições usadas para a purificação.

As substâncias foram elucidadas pela análise dos espectros de IES-EM, RMN de ^1H e ^{13}C e as técnicas bidimensionais $g\text{HMQC}$, $g\text{HMBC}$ e $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$.

4.3 Caracterização espectrométrica das substâncias de I – IV

4.3.1 Substâncias I e II



A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (anexos 5-10 e 21-26) permitiu caracterizar as substâncias **I** e **II** como pertencentes à classe dos flavonóides glicosilados.

Os espectros de RMN de ^{13}C de **I** e **II** apresentaram os sinais em δ_{C} 156,1/156,5, δ_{C} 133,3 e δ_{C} 177,3 atribuídos aos carbonos C-2, C-3 e C-4, respectivamente, permitindo inferir que tais substâncias pertenciam à subclasse dos flavonóis (AGRAWAL, 1989).

De uma maneira geral, os espectros de RMN de ^{13}C dos flavonóis **I** e **II** mostraram-se muito similares. Basicamente a diferença notada referiu-se ao número de sinais de carbonos carbinólicos apresentados pelo flavonol **II**, sugerindo que o mesmo apresentava mais uma unidade monossacarídica.

Pela análise dos espectros de RMN de ^1H das substâncias **I** e **II**, observou-se a presença de um singlete largo em δ_{H} 12,6, o qual estava relacionado a um hidrogênio pertencente a uma hidroxila capaz de estabelecer uma ligação de hidrogênio intramolecular com o carbono carbonílico (HARBORNE, 1994).

O espectro de RMN de ^1H da substância **I** revelou a presença de dois singletos largos em δ_{H} 6,19 e δ_{H} 6,39, os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, indicando um anel A tetrassubstituído. A substância **II** também apresentou o mesmo padrão de substituição para o anel A, no entanto para os hidrogênios H-6 e H-8 atribuiu-se o par de dubletos em δ_{H} 6,19 ($J = 2,0$ Hz) e δ_{H} 6,38 ($J = 2,0$ Hz).

Além destes sinais, os espectros de RMN de ^1H mostraram dubletos em δ_{H} 5,45 (flavonol **I**) e δ_{H} 5,34 (flavonol **II**), os quais foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos (H-1''), apresentando constantes de acoplamentos de 7,0 Hz e 7,5 Hz, respectivamente. Estes valores destas constantes de acoplamento indicaram um acoplamento do tipo axial-axial com H-2'' e, conseqüentemente sugerindo uma configuração β , para a unidade monossacarídica.

Outro fato que contribuiu com a idéia de que a diferença entre os flavonóis **I** e **II** era a existência de mais uma unidade de açúcar foi a presença de dois dubletos em δ_{H} 4,39 ($J = 1,0$ Hz) e δ_{H} 1,00 ($J = 6,0$ Hz) no espectro de RMN de ^1H da substância **II** (anexo 11), sendo o primeiro referente à presença de mais um hidrogênio anomérico e o outro referente aos hidrogênios metílicos, típicos de uma unidade de raminose. A presença de raminose pôde ser confirmada pelo sinal em δ_{C} 17,7, o qual foi atribuído ao carbono C-6''' (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1994).

Paralelamente, os espectros de RMN de ^{13}C das substâncias **I** e **II** revelaram sinais em δ_{C} 61,0 e δ_{C} 66,9 os quais foram atribuídos ao carbono C-6'' da unidade de glicose. O aumento do valor de deslocamento químico para o carbono C-6'' da

substância II, indicou que o mesmo está envolvido com uma ligação interglicosídica do tipo 6''→1''' (AGRAWAL, 1989).

O mapa de contornos do experimento de *g*HMBC para o flavonóide II (anexo 17) demonstrou a correlação entre o sinal em δ_C 133,3 (C-3) e o hidrogênio anomérico com sinal em δ_H 5,34 (d; $J = 7,5$ Hz), sugerindo que a glicosilação estava localizada em C-3. Todos os deslocamentos químicos dos carbonos foram comparados com os da literatura confirmando as duas estruturas (AGRAWAL, 1989; Tabela 4).

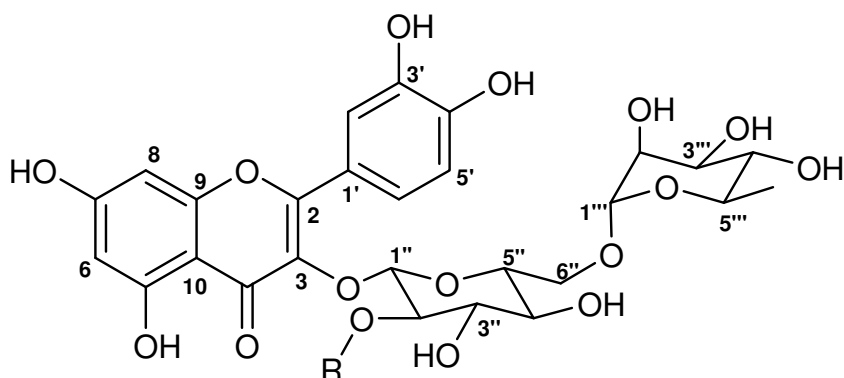
As substâncias isoladas I e II foram isoquercitrina e rutina, respectivamente.

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) dos flavonóis I e II ($\text{DMSO}-d_6$).

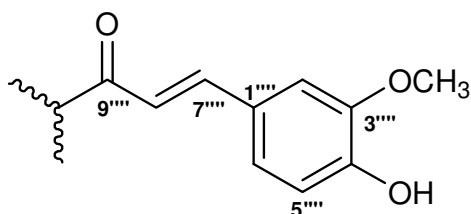
Posição	Flavonóide I		Flavonóide II	
	δ_c	δ_H ; multiplicidade; J (Hz)	δ_c	δ_H ; multiplicidade; J (Hz)
2	156,1	-	156,5	-
3	133,3	-	133,3	-
4	177,3	-	177,3	-
5	161,2	-	161,2	-
6	98,7	6,19; sl	98,6	6,19; d; 2,0
7	164,4	-	164,1	-
8	93,5	6,39; sl	93,5	6,38; d; 2,0
9	156,3	-	156,3	-
10	103,8	-	103,9	-
1'	121,1	-	121,1	-
2'	116,1	7,58; d; 1,5	116,2	7,54; sl ^a
3'	144,8	-	144,7	-
4'	148,5	-	148,4	-
5'	115,2	6,84; d; 9,0	115,2	6,84; d; 8,0
6'	121,5	7,57; dd; 1,5; 9,0	121,5	7,55; dd; 1,0; ^a
1''	100,9	5,45; d; 7,0	101,8	5,34; d; 7,5
2''	76,5	3,00 -3,60; m	74,0	3,00 -3,60; m
3''	77,5	3,00 -3,60; m	75,9	3,00 -3,60; m
4''	69,9	3,00 -3,60; m	70,0	3,00 -3,60; m
5''	74,0	3,00 -3,60; m	76,4	3,00 -3,60; m
6''	60,9	3,00 -3,60; m	66,9	3,00 -3,60; m
1'''	-	-	100,7	4,39; d; 1,0
2'''	-	-	70,3	3,00 -3,60; m
3'''	-	-	70,5	3,00 -3,60; m
4'''	-	-	71,8	3,00 -3,60; m
5'''	-	-	68,2	3,00 -3,60; m
6'''	-	-	17,7	3,00 -3,60; m
Hidroxila	-	12,6; sl	-	12,6; sl
quelatogênica				

^a O sinais do espectro de RMN ^1H referentes a esses hidrogênios coaleceram.

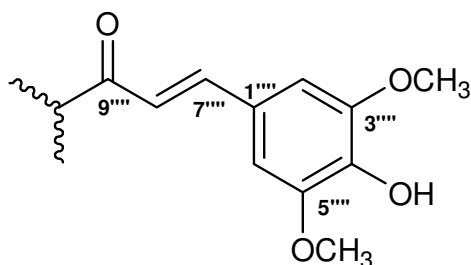
4.3.2 Substâncias **III** e **IV**



III: R =



IV: R =



Os flavonóides **III** e **IV** foram isolados na forma de sólido amorfo de coloração amarela.

Os valores observados no espectro de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C para a substância **III** (anexos 18 -24) indicaram tratar-se de uma substância da classe dos flavonóis glicosilados. Entre outras feições, os sinais em δ_{C} 156,5, δ_{C} 132,6 e δ_{C} 176,8 atribuídos aos carbonos C-2, C-3 e C-4, respectivamente, bem como os nove sinais compreendidos entre δ_{C} 67,0 e δ_{C} 75,9, indicaram a presença de duas unidades de açúcares (AGRAWAL, 1989).

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (anexo 20) foi constatada a presença de dois dubletos em δ_{H} 6,13 ($J = 2,0$ Hz) e δ_{H} 6,30 ($J = 2,0$ Hz), os quais revelaram um anel A tetrassubstituído. Por outro lado os sinais mais desblindados em δ_{H} 7,48

(d, $J = 2,5$ Hz), δ_H 6,84 (d, $J = 8,5$ Hz) e δ_H 7,53 (dd, $J = 2,5$ e $8,5$ Hz), atribuídos a H-2', H-5' e H-6', respectivamente, indicaram a presença de um anel B 1',3',4'-trissubstituído. Conjuntamente com os dados de RMN de ^{13}C , permitiu-se inferir a presença de uma unidade de quercetina (HARBORNE, 1994).

Além destes sinais, o espectro de RMN de ^1H mostrou dois sinais em δ_H 5,60 (d, $J = 8,0$ Hz) e em δ_H 4,41 (sl), os quais foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos H-1'' e H-1'''.

A posição de *O*-glicosilação foi determinada a partir da análise do mapa de contornos obtido pelo experimento de *g*HMBC (anexo 36), que revelou a correlação entre o sinal em δ_C 132,6 (C-3) e δ_H 5,60 (H-1'').

Paralelamente, o espectro de RMN de ^{13}C revelou um sinal em δ_C 67,0, atribuído C-6'' da unidade de glicose. Esse valor indicou que o mesmo está envolvido com uma ligação interglicosídica do tipo 6'' $\rightarrow$ 1''', uma vez que o deslocamento químico para esse carbono geralmente é δ_C 62 (AGRAWAL, 1989).

O mapa de contornos obtido por *g*COSY- ^1H - ^1H (anexos 40-43) conjuntamente com *g*HMBC (anexos 30-39) e *g*HMQC (anexos 25-29) colaboraram com atribuição correta dos valores de deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono da subunidade de rutinose. Os hidrogênios dos açúcares foram atribuídos com ajuda do experimento HOMODEC (anexo 46).

Dentre os sinais que levaram a caracterização parcial da estrutura molecular de III, como sendo um derivado do flavonol II, o valor de deslocamento químico de H-2'' apresentou-se bastante elevado (δ_H 4,90). Contudo, o espectro de RMN de ^{13}C apresentou mais nove sinais (anexo 21), os quais confirmaram a presença de um substituinte receptor de elétrons no carbono C-2'', capaz de gerar o incremento no valor do deslocamento químico do hidrogênio H-2'', significando uma desproteção deste núcleo.

Dentre estes sinais complementares, observou-se o sinal em δ_C 165,7, o qual pôde ser atribuído ao carbono de uma carbonila de um éster conjugado e oito sinais em δ_C 111,1, δ_C 114,6, δ_C 115,5, δ_C 122,9, δ_C 125,6, δ_C 145,1, δ_C 147,9 e δ_C 149,3 atribuídos aos carbonos sp^2 . Correlacionados a estes sinais, o espectro de RMN de ^1H apresentou mais cinco sinais, sendo um subconjunto de três sinais: dois dubletos δ_H 7,28 ($J = 1,0$ Hz), δ_H 6,80 ($J = 8,0$ Hz) e um duplo dubleto δ_H 7,09 ($J = 1,0$ e $8,0$ Hz) e outro subconjunto formado por dois dubletos δ_H 6,45 ($J = 16,0$ Hz) e δ_H 7,57 ($J = 16,0$ Hz). O primeiro subconjunto referiu-se a um anel aromático 1,3,4-trissubstituído e o segundo conjunto referiu-se a uma olefina com configuração *E*. Assim, inferiu-se que tal substituinte com ação electrón-receptora era compatível com uma unidade de fenilpropanóide (um derivado C_6C_3).

O experimento de *g*HMBC (anexo 34) revelou uma correlação de δ_H 4,90 com o δ_C 165,7. Desta maneira concluiu-se que a unidade de glicose estava ligada ao derivado fenilpropanoídico através do oxigênio em C-2".

O espectro de RMN de 1H (anexo 19) revelou um singlete em δ_H 3,83 (3H), permitindo inferir a presença de uma metoxila (δ_C 55,6). O mapa de contornos de *g*HMBC (anexo 34) apresentou um contorno que correlacionou o sinal em δ_H 3,83 e δ_C 147,9, sendo este pertencente a subunidade fenilpropanoídica. A fim de se determinar a posição de *O*-alquilação, realizou-se um experimento de NOESY 1D (anexo 45), o qual observou-se a correlação entre o sinal irradiado em δ_C 3,83 e o duplete δ_H 7,28 (subunidade fenilpropanoídica). Esta observação permitiu inferir a interação espacial entre o grupo metoxílico e o hidrogênio H-2"". Logo, deduziu-se que a substância **III** (arrabidosídeo A) encontrava-se acilada por uma unidade de ácido ferúlico (FATTORUSSO et al., 2001; Tabela 5).

Uma vez caracterizados os dados espectrométricos de RMN mono e bidimensionais da substância **III**, a elucidação estrutural da substância **IV** foi facilitada, uma vez que essa apresentava grande similaridade estrutural com o flavonol **III**.

O espectro de RMN de 1H (anexo 49) revelou o desaparecimento do subconjunto de sinais que foram atribuídos ao anel aromático do grupo feruloíla, havendo apenas um singlete em δ_H 6,99 (2H), sugerindo um anel 1,3,4,5 tetrassubstituído e com um eixo de simetria capaz de revelar a equivalência magnética dos hidrogênios H-2"" e H-6"". Outro fato que contribuiu para confirmar esta proposição foi a diminuição de sinais de carbonos do espectro de ^{13}C (anexo 50), tendo este somente 4 sinais atribuídos a 6 carbonos, sendo estes δ_C 106,1 (C-2"" e C-6""), δ_C 124,4 (C-1""), δ_C 138,3 (C-4"" e C-5"" e C-7") e δ_C 148,0 (C-3"" e C-8").

Além disso, observou-se a presença de um singlete δ_H 3,81 (6H), o qual foi atribuído a seis hidrogênios metílicos de dois grupos metoxílicos. O mapa de contornos de *g*HMBC (anexo 62) indicou a correlação deste singlete com o sinal em δ_C 148,0, indicando que os dois grupos metoxílicos pertenciam a subunidade fenilpropanoídica. Com o intuito de confirmar tal substituição realizou-se um experimento de NOESY 1D (anexo 69), pelo qual observou-se a correlação entre o singlete δ_H 3,81 e o singlete em δ_H 6,99 (H-2"" e H-6").

Assim sendo, concluiu-se que a substância **IV** (arrabidosídeo B) apresentava-se acilada por uma unidade de ácido sinapínico (TEWTRAKUL et al., 2002; Tabela 6).

A análise do espectro de massas, RMN de ^{13}C (anexo 21 e anexo 50) e DEPT (anexo 44 e anexo 68), conduziram à fórmula molecular $C_{37}H_{38}O_{19}$ e $C_{38}H_{40}O_{20}$ para as substâncias **III** e **IV** respectivamente. O experimento de massas foi realizado no modo negativo. O espectro das substâncias **III** apresentou o pico base em $m/z = 785$ e o da

substância **IV**, o pico base $m/z = 815$, que correspondiam ao íon molecular $[M - H]^-$. Ambos os íons quando submetidos ao MS-MS (Figura 25 – 26) apresentaram um fragmento em $m/z = 609$, o qual foi atribuído à eliminação dos derivados ferúlico e sinapínico dos flavonóis **III** e **IV**, respectivamente.

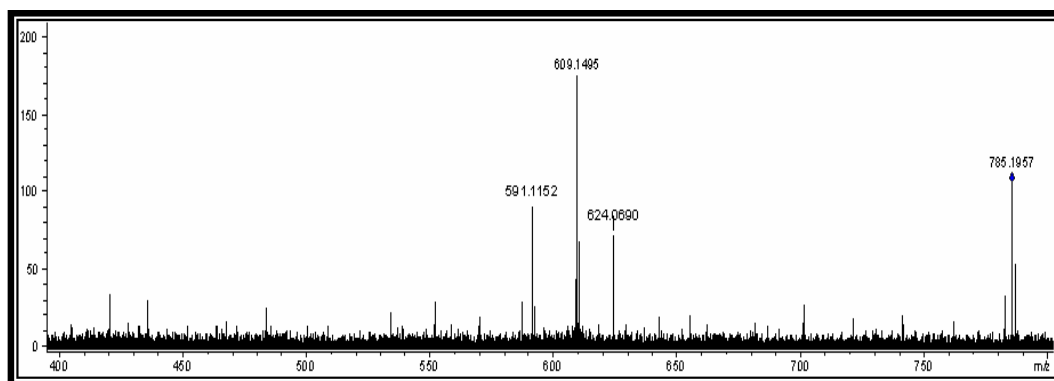


Figura 25. Espectro de ESI-MS-MS do íon molecular 785 da substância **III**.

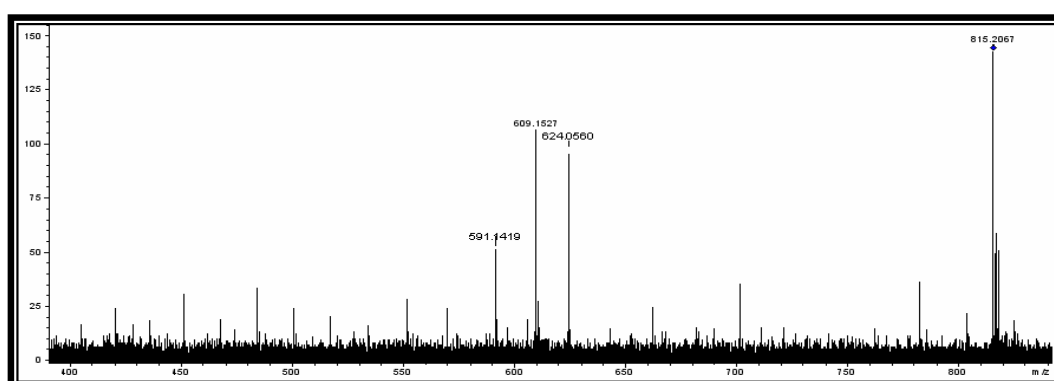


Figura 26. Espectro de ESI-MS-MS do íon molecular 815 da substância **IV**.

Os espectros de absorção no UV das substâncias **III** e **IV** (Figura 27 e 28, respectivamente) apresentaram duas bandas, características de flavonóis: banda I de $\lambda_{\text{max}} = 333$ e 337 nm e banda II de $\lambda_{\text{max}} = 250$ e 240 nm, respectivamente.

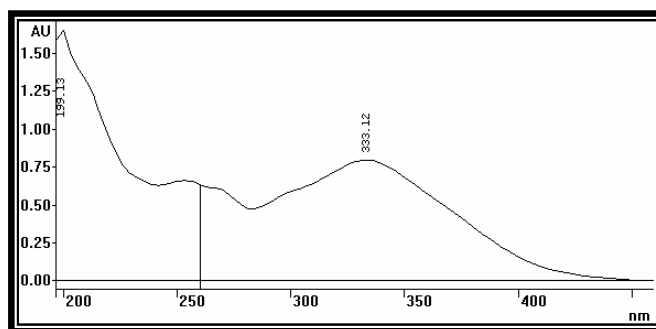


Figura 27. Espectro de absorção no UV da substância III.

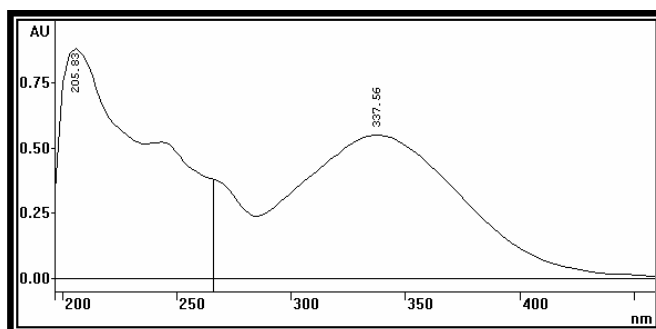


Figura 28. Espectro de absorção no UV da substância IV.

Pesquisas recentes na base de dados SciFinder Scholar, as quais correlacionaram as propostas de fórmulas moleculares das substância III e IV, com fórmulas estruturais já descritas, indicaram que estas substâncias são inéditas na literatura.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (126 MHz) do arrabidosídeo A ($\text{DMSO}-d_6$).

Posição	δ_c	δ_H ; multiplicidade; J (Hz)	$g\text{HMBC}$
2	156,5	-	H-2', H-6'
3	132,6	-	H-1''
4	176,8	-	-
5	161,1	-	H-6
6	98,9	6,13; d; 2,0	H-8
7	165,2	-	H-6
8	93,7	6,31; d; 2,0	H-6
9	156,4	-	H-8
10	103,5	-	H-6, H-8
1'	120,8	-	H-6
2'	116,0	7,48; d; 2,5	H-6
3'	144,9	-	H-2', H-5''
4'	148,7	-	H-2'', H-5'', H6''
5'	115,2	6,84; d; 8,5	-
6'	121,7	7,53; dd; 2,5; 8,5	H-2
1''	98,6	5,60d; 80	H-2''
2''	73,9	4,90; dd; 9,5; 9,5	H-3''
3''	74,1	3,49; dd; 9,5; 9,5	H-2'', H-4''
4''	70,5	3,21; dd; 9,5; 9,5	H-3''
5''	75,9	3,30; m	H-6'' a
6''	67,0	a: 3,35; d; 2,0 b: 3,76; d; 10,5	-
1'''	100,8	4,41; sl	-
2'''	70,3	3,44; d; 3,0	-
3'''	70,2	3,31; dd; 3,0; 9,5	-
4'''	71,8	3,10; dd; 9,5; 9,5	-
5'''	68,3	3,29; d; 6,5	-
6'''	17,7	1,00; d; 6,5	H-4'''
1''''	125,6	-	H-5''''', H-8''''
2''''	111,1	7,28; d; 1,5	H-6''''', H-7''''
3''''	147,9	-	3''''- MeO
4''''	149,3	-	H-2''''', H-6''''
5''''	115,5	6,80; d; 8,0	-
6''''	122,9	7,09; dd; 1,5; 8,0	H-2''''', H-7''''
7''''	145,1	7,57; d; 16	H-2''''', H-6''''
8''''	114,6	6,45; d; 16	H-7''''
9''''	165,7	-	H-2''
3''''- MeO	55,6	3,83, s	-
Hidroxila quelatogênica	-	12,6; sl	-

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (126 MHz) do Arrabidosídeo B ($\text{DMSO}-d_6$).

Posição	δ_c	δ_H ; multiplicidade; J (Hz)	$g\text{HMBC}$
2	156,5	-	H-2', H-6'
3	132,6	-	H-1''
4	176,8	-	-
5	161,1	-	H-6
6	98,8	6,12; d; 1,5	H-8
7	165,1	-	H-6
8	93,6	6,30; d; 1,5	H-6
9	156,4	-	H-8
10	103,5	-	H-6, H-8
1'	120,8	-	H-5'
2'	116,0	7,48; d; 2,5	H-6'
3'	144,8	-	H-2', H-5'
4'	148,7	-	H-2', H-5', H-6'
5'	115,2	6,83; d; 8,5	-
6'	121,7	7,53; dd; 2,5; 8,5	H-2'
1''	98,6	5,61; d; 8,0	H-2''
2''	73,9	4,90; dd; 9,0; 9,0	H-3''
3''	74,1	3,49; dd; 9,0; 9,0	H-2'', H-4''
4''	70,2	3,20; dd; 9,0; 9,0	H-3''
5''	75,9	3,35; m	-
6''	67,0	a: 3,37; m b: 3,76; d; 10,5	H-4'''
1'''	100,8	4,41; sl	-
2'''	70,3	3,44; sl	H-3'''
3'''	70,5	3,31; dd; 3,0; 9,5	-
4'''	71,8	3,10; dd; 9,5; 9,5	H-3''', H-6'''
5'''	68,2	3,28; d; 6,5	H-6'''
6'''	17,6	1,00; d; 6,0	H-4'''
1''''	124,4	-	H-2''', H-6''', H-8'''
2''''	106,1	6,99; sl	H-6''', H-7'''
3''''	148,0	-	5''' - MeO, H-2'''
4''''	138,3	-	H-2''', H-6'''
5''''	148,0	-	3''' - MeO, H-6'''
6''''	106,1	6,99; sl	H-2''', H-7'''
7''''	145,4	7,59; d; 16	H-2''', H-6'''
8''''	115,1	6,51; d; 16	H-7'''
9''''	165,6	-	H-2'', H-7'''
3''' e 5''' - MeO	56,0	3,81, s	-
Hidroxila quelatogênica	-	12,6; sl	-

4.4 Potencial antioxidante dos flavonóis I – IV

Foi testado o potencial antioxidante dos flavonóis **I** – **IV** frente ao radical DPPH.

Os flavonóides têm essa qualidade relacionada com sua estrutura e relata-se a importância da presença de núcleos catecólicos na atividade antioxidante destas substâncias. A relação estrutura-atividade desse núcleo relaciona-se com a capacidade de estabilizar os radicais livres formados após a doação de hidrogênios pelas substâncias antioxidantes em potencial. A maior estabilidade relaciona-se com o maior número de estruturas mesoméricas formadas nesses novos radicais (BORS et al., 1990). Nas substâncias da classe dos flavonóides atribuiu-se aos três anéis a atividade antioxidante.

Os resultados observados no gráfico (Figura 29) e na tabela abaixo corroboram a importância da presença dos grupos catecólicos em antioxidantes potenciais. As substâncias com tal característica estrutural mostraram os melhores resultados, com Cl_{50} (concentração necessária para sequestrar 50% do radical livre DPPH) comparável ao da quercetina (Tabela 7). Os grupos feruloíla e sinapicoíla não aumentaram a atividade antioxidante dos flavonóides **III** e **IV** comparados com o controle positivo quercetina. O valor discrepante do flavonol **I** foi atribuído ao fato dessa substância não estar completamente pura.

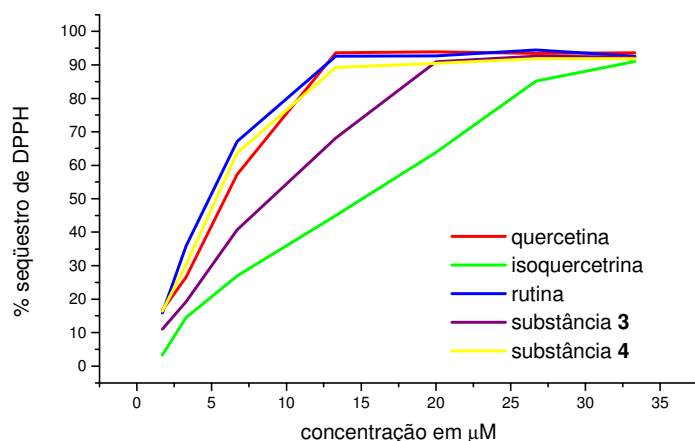


Figura 29. Gráfico da curva de determinação da % de seqüestro de DPPH

Tabela 7. Potencial antioxidante dos flavonóis I – IV frente ao radical DPPH

Substâncias	CI ₅₀ (μM)
quercetina ^a	5,81
Isoquercitrina (I)	15,10
Rutina (II)	4,88
arrabidosídeo A (III)	8,95
Arrabidosídeo B (IV)	5,34

^a Controle positivo

4.5 Inibição da enzima mieloperoxidase (MPO)

As substâncias isoladas foram testadas frente à inibição da enzima mieloperoxidase (MPO) e comparadas ao controle positivo quercetina.

Pôde-se observar que os valores de CI₅₀ para as substâncias I e II foram muito próximos e maiores que o do controle positivo, sugerindo que a hidroxila em C-3 é importante para a atividade inibitória. A presença do grupo ferúlico na substância III aumentou a atividade inibitória e a presença do grupo sinapínico na substância IV diminui. Esse fato pôde ser explicado pelo impedimento estérico no grupo sinapínico da hidroxila em para pelas metoxilas, uma vez que não ocorreu com o grupo ferúlico.

Esse ensaio foi realizado com os ácidos ferúlico e sinapínico e estes apresentaram atividade inibitória muito pequena em comparação com o controle positivo quercetina.

Tabela 8. Atividade inibitória dos flavonóis I – IV frente à enzima mieloperoxidase.

Substâncias	MPO (nM)
arrabidosídeo A (III)	1,80 ± 0,07
arrabidosídeo B (IV)	4,82 ± 0,06
isoquercitrina (I)	3,75 ± 0,02
rutin (II)	3,60 ± 0,02
quercetina ^a	1,22 ± 0,01
ácido ferúlico	> 50
ácido sinapínico	> 50

^a Controle positivo

5. Considerações finais

O desenvolvimento do trabalho com o extrato etanólico das folhas da *A. brachypoda* e a fração AcOEt resultou no isolamento de dois flavonóis inéditos: arrabidosídeo A e arrabidosídeo B e também dos flavonóis rutina e isoquercitrina, contribuindo para a descrição dos constituintes químicos dessa espécie, ainda pouco estudada, mas com potencial para exploração sustentável.

O potencial antioxidante dos flavonóis **I**, **II**, **III**, **IV** frente ao radical DPPH foi testado e como era esperado, eles apresentaram CI_{50} parecidos e próximos ao do controle positivo quercetina. O único que apresentou um valor muito discrepante foi a isoquercitrina e esse fato foi atribuído a sua pureza.

A atividade inibitória dos flavonóis **I**, **II**, **III**, **IV** frente à enzima mileoperoxidase (MPO) também foi testada e apresentaram valores de CI_{50} igual a 3,75, 3,60, 1,80, 4,82 nM. Esses dados mostraram o potencial antiinflamatório dessas substâncias tornando a busca por inibidores de MPO à partir de fontes naturais de grande valia na descoberta de agentes antiinflamatórios, bem como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Arrabidaea chica é utilizada pela indústria de cosméticos e, essa pesquisa indicou o potencial da *A. brachypoda* para esse fim, considerando sua constituição micromolecular rica em derivados fenólicos antioxidantes.

Outro fato interessante de destaque é a ausência de xantonas nesta espécie, tendo em vista que esta classe ocorre em outras espécies de *Arrabidaea*.

Referências

- ADRIAN-ROMERO, M.; BLUNDEN, G.; PATEL, A. V.; ARMSTRONG, N.; MELENDEZ, P.; CUERVO, A. C. Betaines and N-methylprolines from Venezuelan plants. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 8, p. 863–868, 2007.
- AGRAWAL, P. K. (Ed.). **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.
- AGRIPINO, D. G.; LIMA, M. E. L.; SILVA, M. R.; MEDA, C. I.; BOLZANI, V. S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M.; MERENO, P. R. H. Screening of brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. Atlantic rain forest – Ecological Station Juréia – Itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1–15, 2004.
- ALCERITO, T.; BARBO, F. E.; NEGRI, G.; SANTOS, D. Y. A. C.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; CHÁVEZ, D.; BLATT, C. T. T. Foliar Epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 67–683, 2002.
- BLATT, C. T. T.; SANTOS, M. D.; SALATINO, A. Flavonoids of Bignoniaceae from the “cerrado” and their possible taxonomic significance. **Plant Systematic and Evolution**, v. 210, p. 289–292, 1998.
- BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H.; LOPES, M. N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of cerrado and Atlantic Forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 2, p. 181–189, 1999.
- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 343–355, 1990.
- CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a twoelectron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. **Biochemical Journal**, v. 336, p. 395–404, 1998.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.
- DAUGHERTY, A.; DUNN, J. L.; RATERI, D. I.; HEINECKE, J. W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, p. 437–444, 1994.

DHANESHWAR, S. S.; KANDPAL, M.; VANDNERKAR, G.; RATHI, B.; KADAM, S. S. Synthesis, kinetic studies and pharmacological evaluation of mutual azo prodrug of 5-aminosalicylic acid for colon-specific drug delivery in inflammatory bowel disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 885–890, 2007.

EDWARDS, S. W.; HALLETT, M. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Immunology Today**, v. 18, n. 7, p. 320–324, 1997.

FATTORUSSO, E.; LANZOTTI, V.; TAGLIALATELA - SCAFATI, O.; CICALA, C. The flavonoids of leek *Allium porrum*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 565–569, 2001.

FUJIMOTO, Y.; EGUCHI, T.; MURASAKI, C.; OHASHI, Y.; KAKINUMA, K.; TAKAGAKI, H.; ABE, M.; INAZAWA, K.; YAMAZAKI, K.; IKEKAWA, N.; YOUSHIKAWA, O.; IKEKAWA, T. Studies on the structure and stereochemistry of cytotoxic furanonaphthoquinones from *Tabebuia impetiginosa*: 5- and 8-hydroxy-2-(1-(hydroxyethyl)naphtha[2,3-b]furan-4,9-diones). **Journal of Chemical Society Perkin Transactions 1**, v. 10, p. 2323–2327, 1991.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae. Part I. Tribes *Crescentieae* and *Tourrentieae*. **Flora Neotropica**, v. 25, n. 1, p. 1–130, 1980.

HAHLBROCK, K. Flavonoids. **The Biochemistry of Plant Products**, v. 7, p. 425–456, 1981.

HARBORNE, J. B. (Ed.). **The Flavonoids**: advances in research since 1986. London: Chapman and Hall, 1994. 676 p.

HAZELL, L. J.; STOCKER, R. Oxidation of low density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. **Biochemical Journal**, v. 290, p. 165–172, 1993.

HAZELL, L. J.; VAN DEN BERG, J. J. M.; STOCKER, R. Oxidation of low density lipoprotein with hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residue rather than lipid peroxidation. **Biochemical Journal**, v. 302, p. 297–304, 1994.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279–289, 2007.

LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: in update picture. **General Pharmacology**, v. 27, p. 1145–1147, 1996.

LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; LOMBARDI, J. A.; S. FILHO, J. D.; CHIARI, E. Trypanocidal activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2307–2309, 2006.

LIMA, C. S. A.; CAVALCANTI DE AMORIM, E. L.; XIATO DA FONSECA, K.; SENA, R. de; CHIAPPETA, A. A.; NUNES, X. P.; AGRA, M. F.; LEITÃO DA CUNHA, E. V.; SOBRAL DA SILVA, M.; BARBOSA FILHO, J. M. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1 p. 77–81, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1988. v.1. 352 p.

MOREL, C.; SÉRAPHIN, D.; OGER, J.; LITAUDON, M.; SÉVENET, T.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. New Xanthone from *Calophyllum caledonicum*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1471–1474, 2000.

OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L.; ZANI, C. L.; FERREIRA, D. T.; MAIA, J. G. S. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniaceas brasileiras. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 302–307, 1990.

PAULETTI, P. M.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 641–643, 2003.

PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; BOLZANI, V. S. New Antioxidant C – Glucosylxanthones from the stems of *Arrabidaea samydoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1382–1387, 2003.

PAULETTI, P. M. **Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae)**: uma contribuição para a pesquisa de bioprospecção da flora paulista. 2004. 139 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035–1042, 2000.

REDDY, A. M.; REDDY, V. S.; SCHEFFLER, B. E.; WIENAND, U.; REDDY, A. R. Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential. **Metabolic Engineering**, v. 9, p. 95–111, 2007.

ROCHA, A. D.; OLIVEIRA, A. B. de; SOUZA FILHO, J. D. de; LOMBARDI, J. A.; BRAGA, F. C. Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 6, p. 463–467, 2004.

SILVA, M. M.; QUEIROZ, L. P. A família Bignoniaceae na região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 3, n. 1/2, p. 3–21, 2003.

SILVA, O. S. **Oxidação da melatonina catalisada por mieloperoxidase em neutrófilos ativado**s. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

TAKEMURA, O. S.; IIUMA, M.; TOSA, H.; MIGUEL, O. G.; MOREIRA, E. A.; NOZAWA, Y. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* F. Cuprea. **Phytochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1299–1300, 1995.

TEWTRAKUL, S.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; FUJIWARA, T.; SUPAVITA, T. Flavone and Flavonol Glycosides from the leaves of *Thevetia peruviana* and Their HIV-1 Reverse Transcriptase and HIV-1 Integrase Inhibitory Activities. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 5, p. 630–635, 2002.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FERNACO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO JÚNIOR, A. A. Role of nutrients on lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 31–44, 1998.

VERVERIDIS, F.; TRANTAS, E.; DOUGLAS, C.; VOLLMER, G.; KRETZSCHMAR, G.; PANOPOULOS, N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: chemical diversity, impacts on plant biology and human health. **Plant Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1214–1234, 2007.

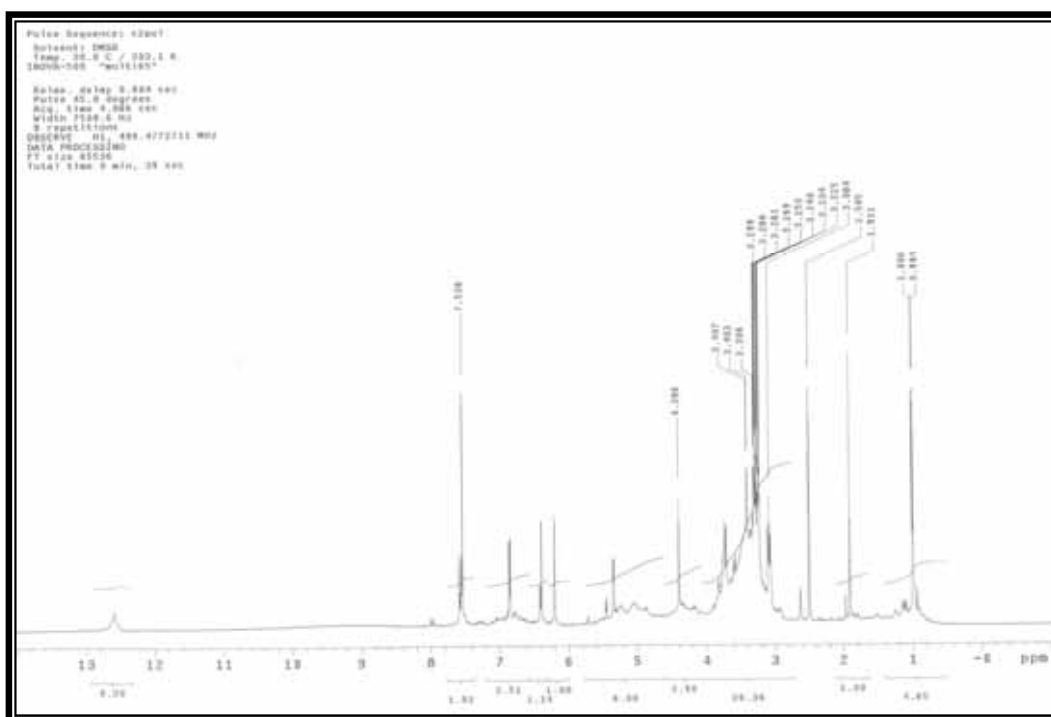
VON POSER, G. L.; SCHRIPEMA, J.; HENRIQUES, A. T.; JENSEN, S. R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 28, p. 351–366, 2000.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 365–376, 1989.

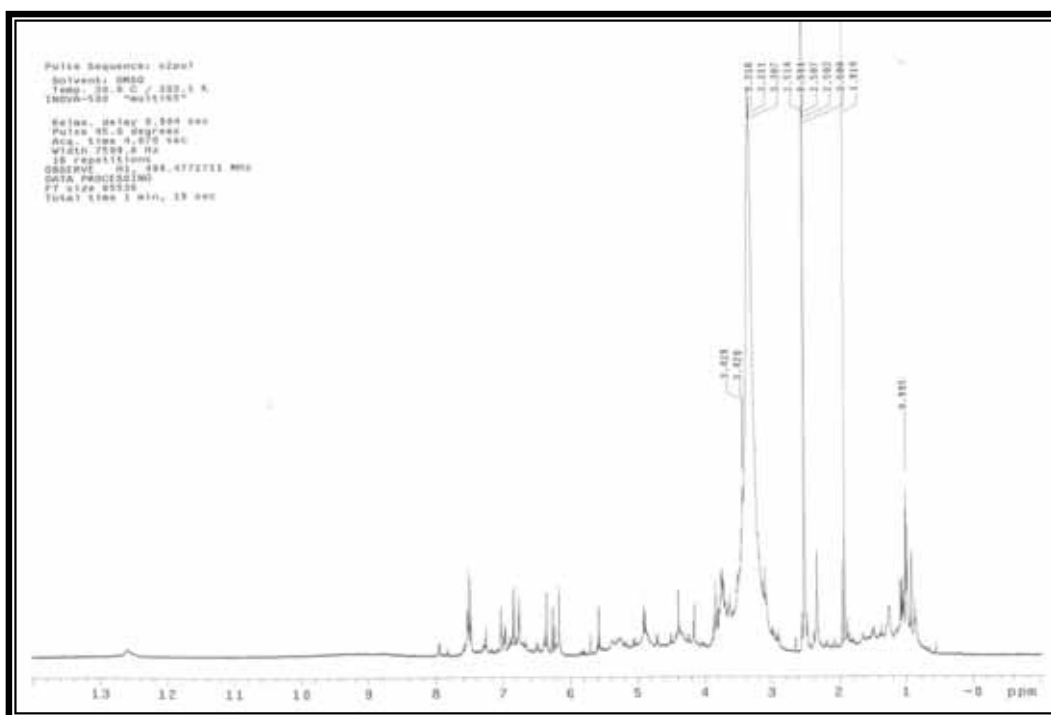
YEN, G. C.; LAI, H. H.; CHOU, H. Y. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. **Food Chemistry**, v. 74, p. 471–478, 2001.

ZORN, B.; GARCIA-PIÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; MORA, G.; MERFORT, I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 831–835, 2001.

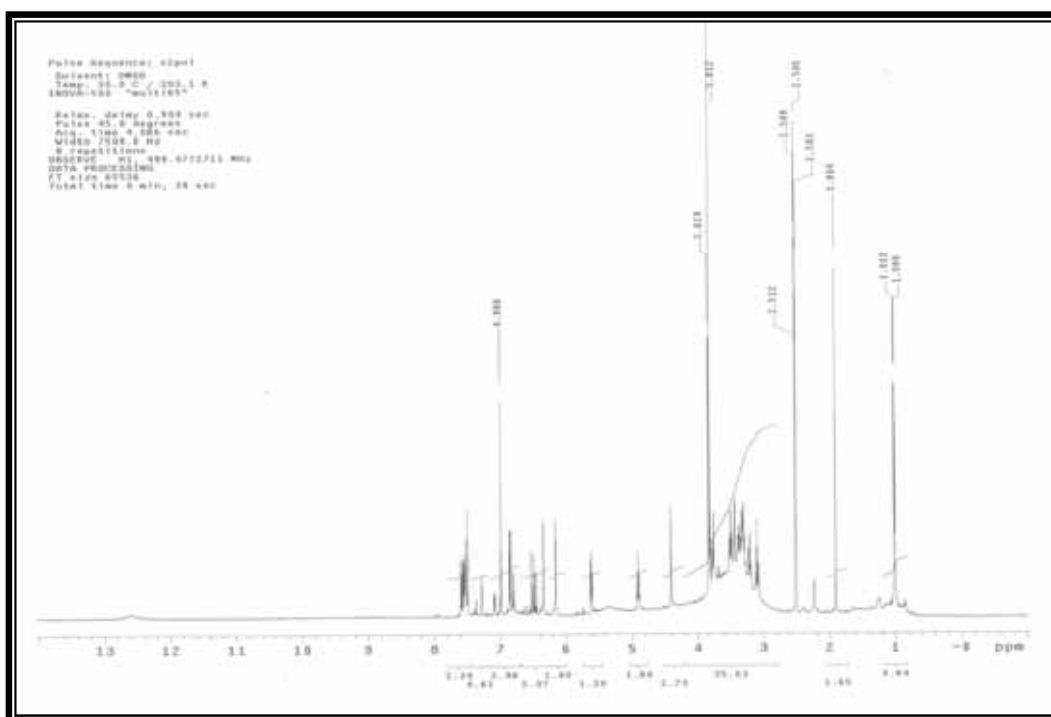
Anexos



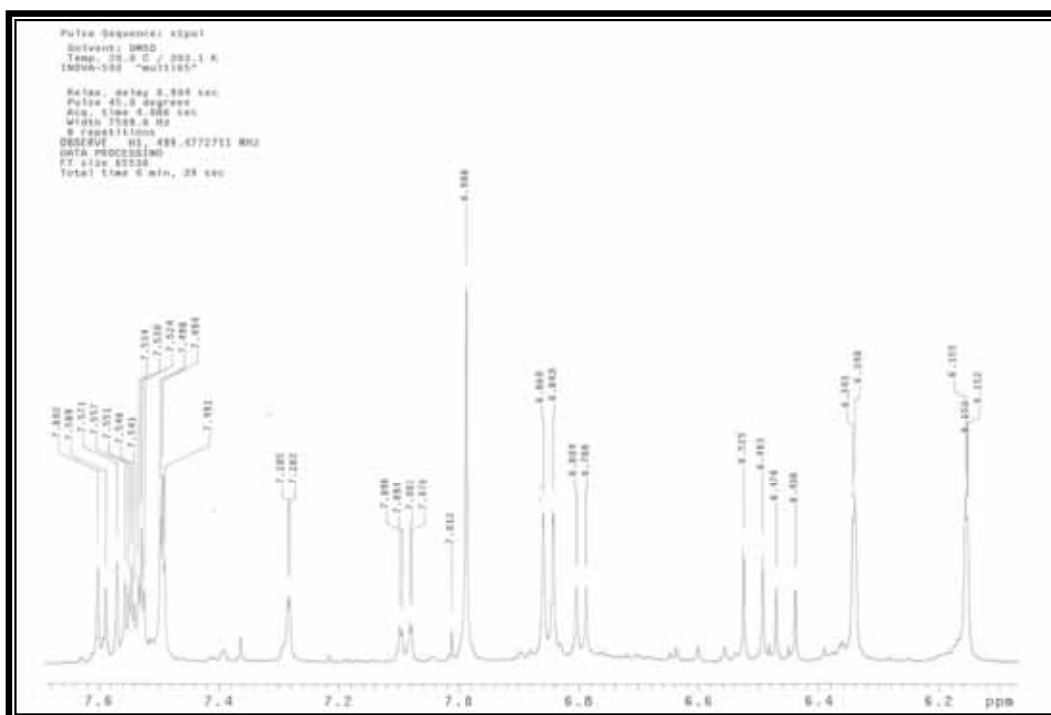
Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H de Fra3 (500 MHz – $\text{DMSO}-d_6$)



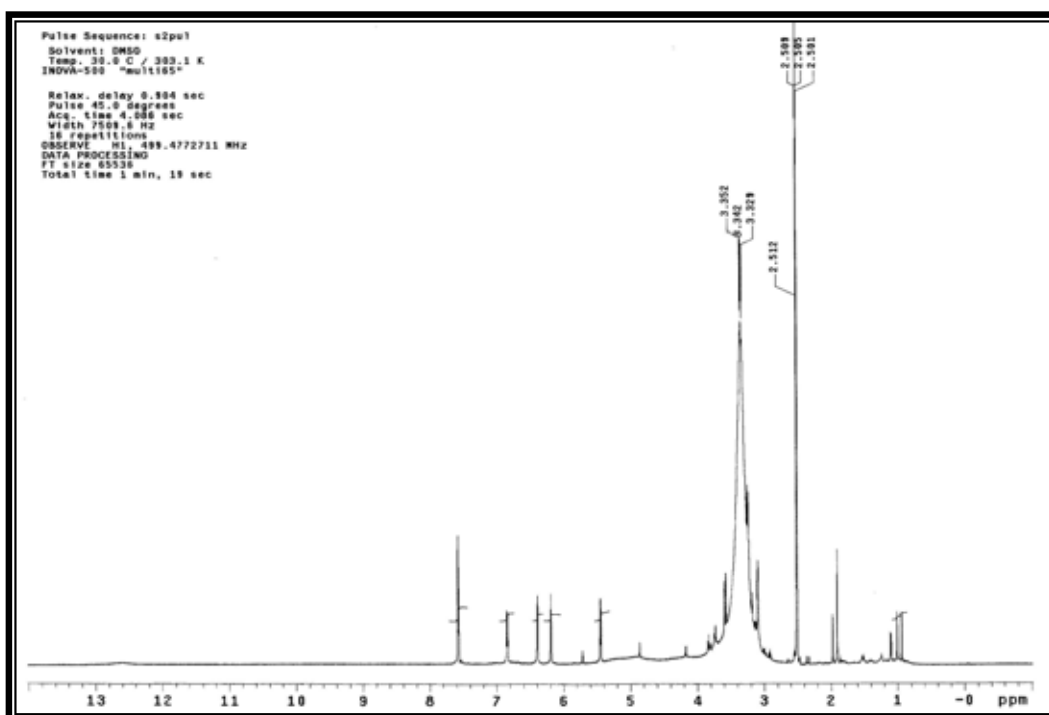
Anexo 2. Espectro de RMN de ^1H de Fra5 (500 MHz – $\text{DMSO}-d_6$)



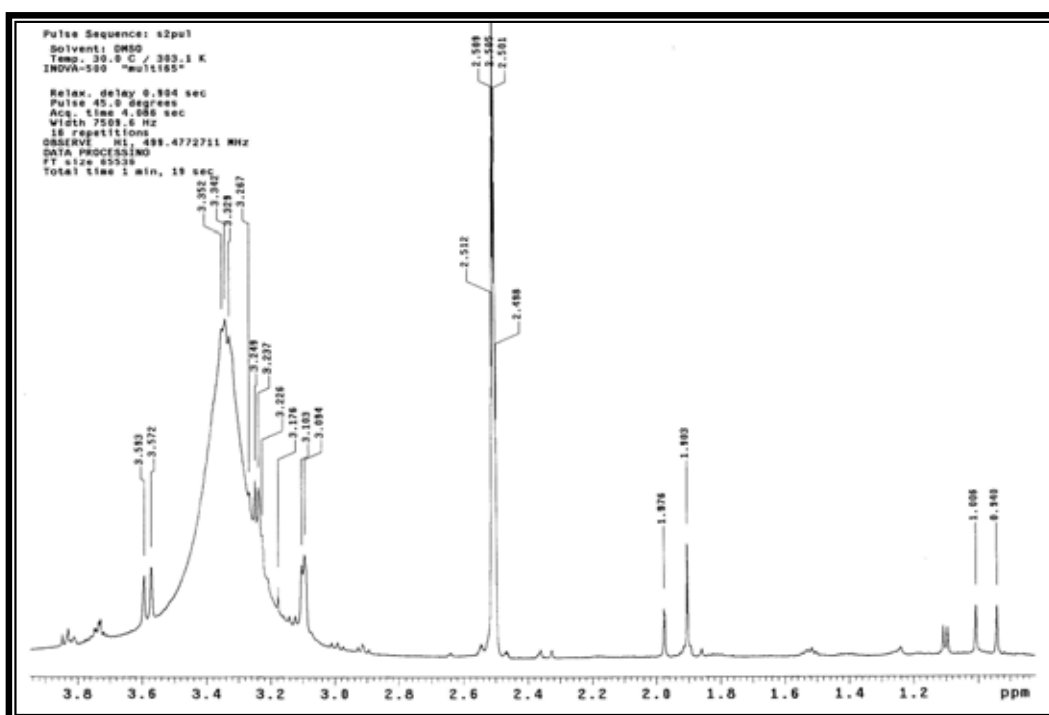
Anexo 3. Espectro de RMN ^1H de Fra8 (500 MHz – $\text{DMSO}-d_6$)



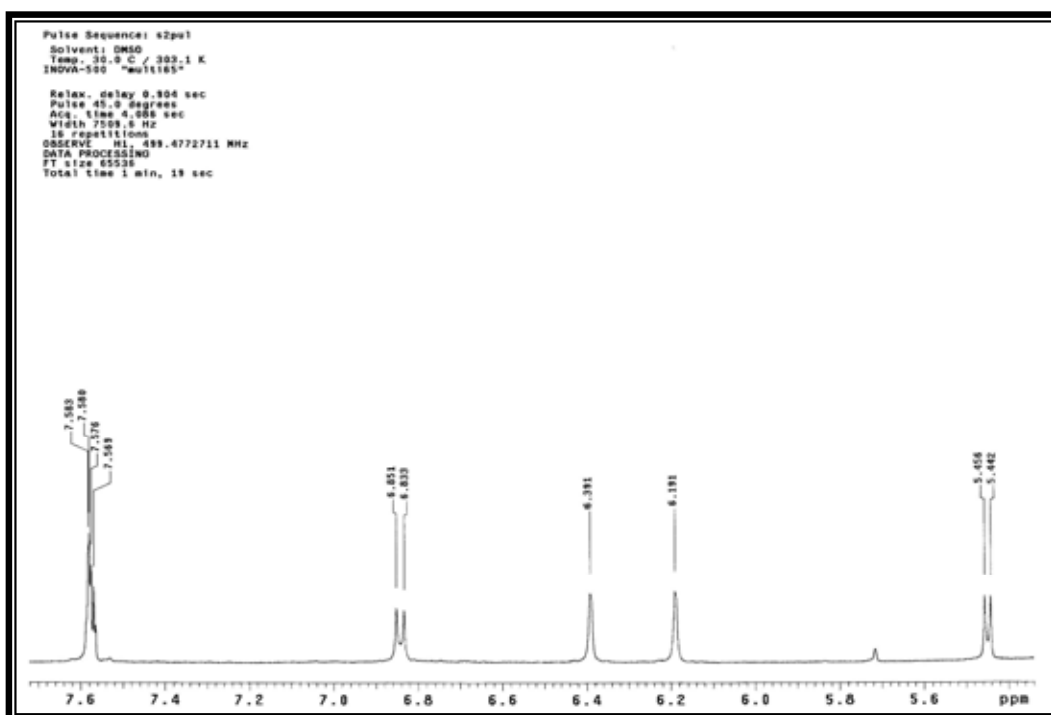
Anexo 4. Ampliação do espectro de RMN ^1H de Fra8 (δ 6,0 – 7,7; 500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)



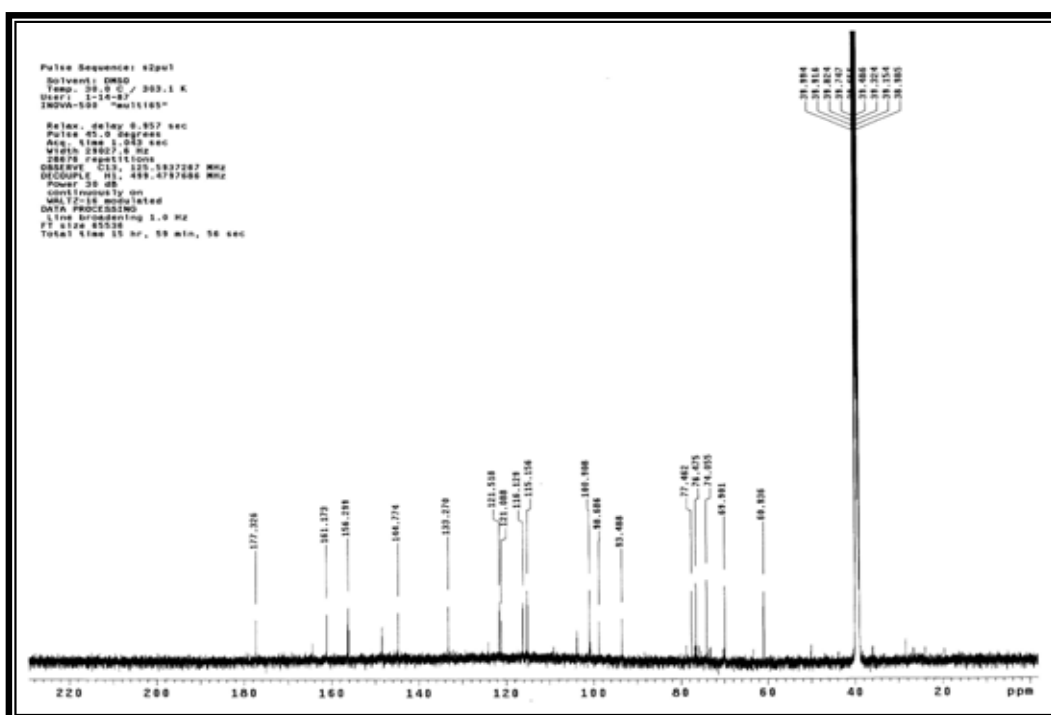
Anexo 5. Espectro de RMN de ^1H do flavonol I (500 MHz – DMSO- d_6)



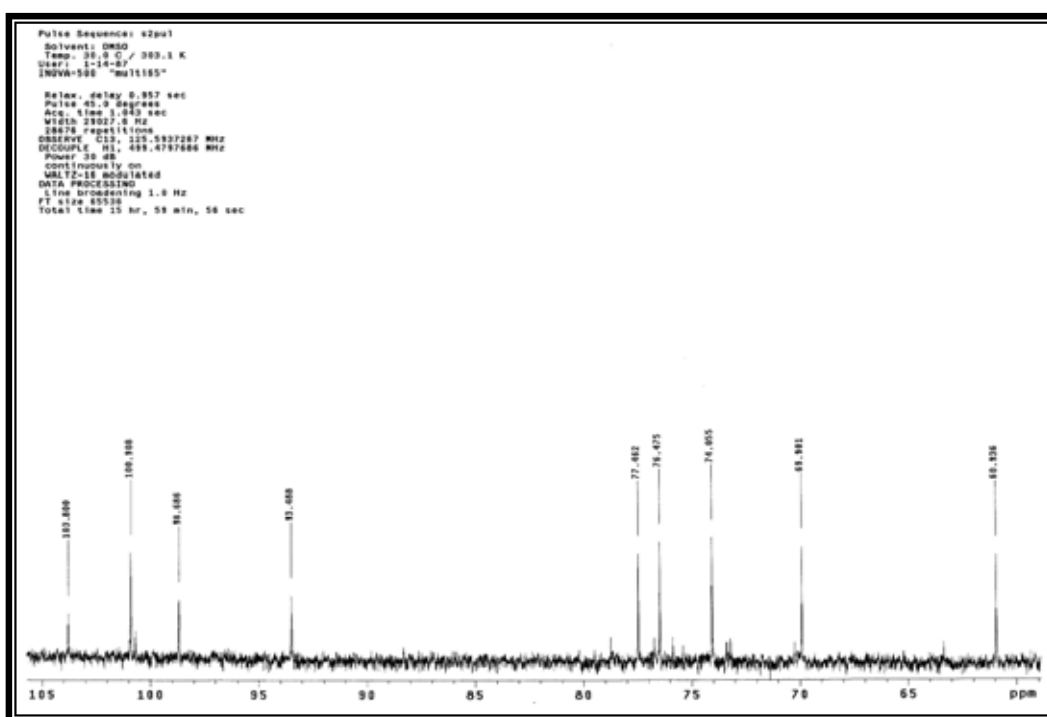
Anexo 6. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 0 – 4,0) do flavonol I



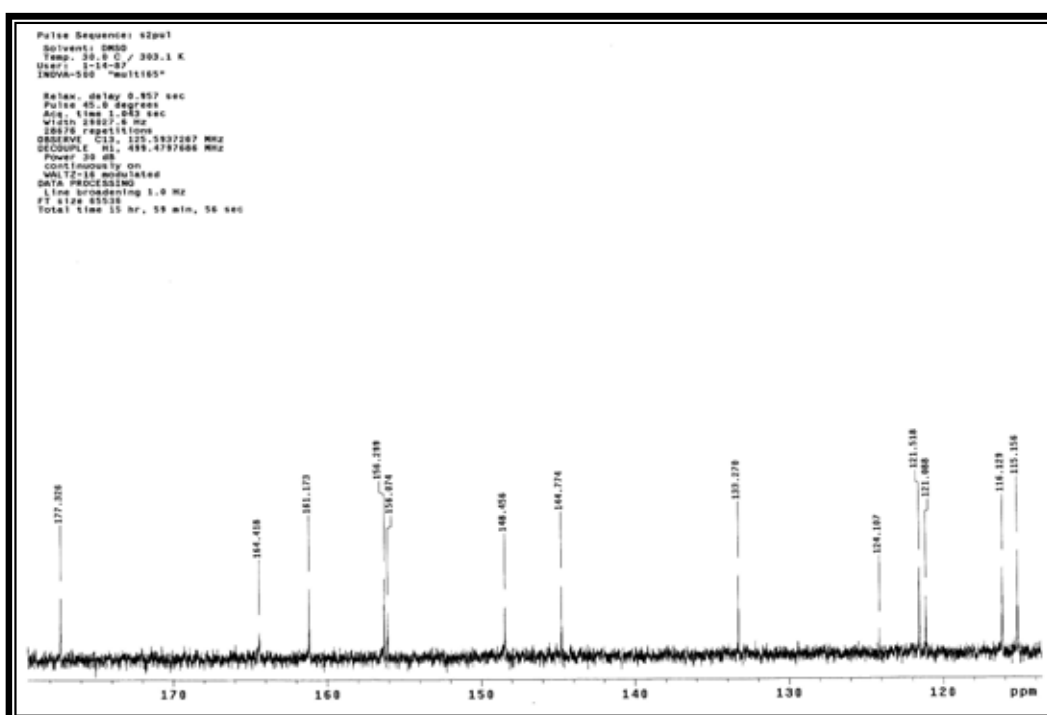
Anexo 7. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 5,4 – 7,7) do flavonol I



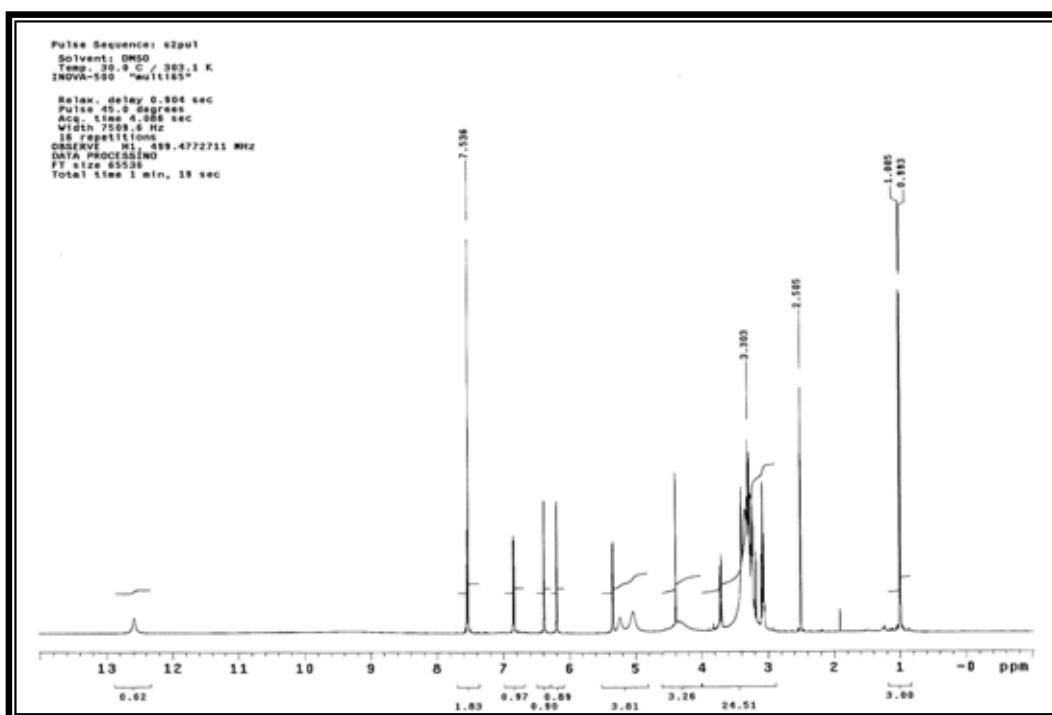
Anexo 8. Espectro de RMN de ^{13}C do flavonol I (126 MHz – DMSO- d_6)



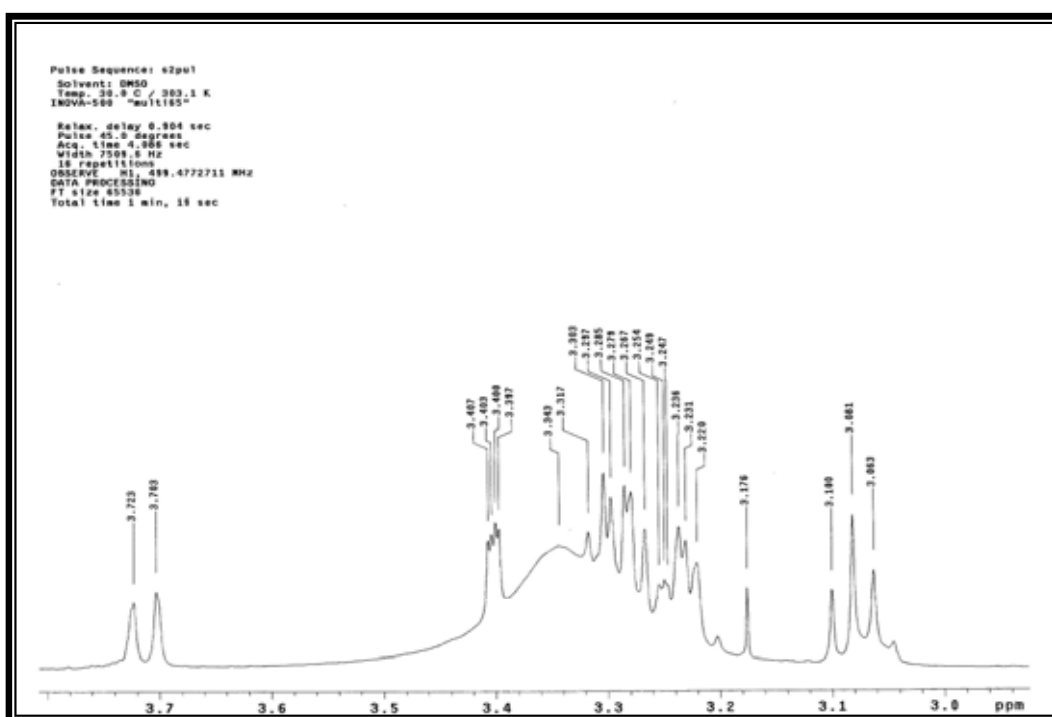
Anexo 9. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 60 – 105) do flavonol I



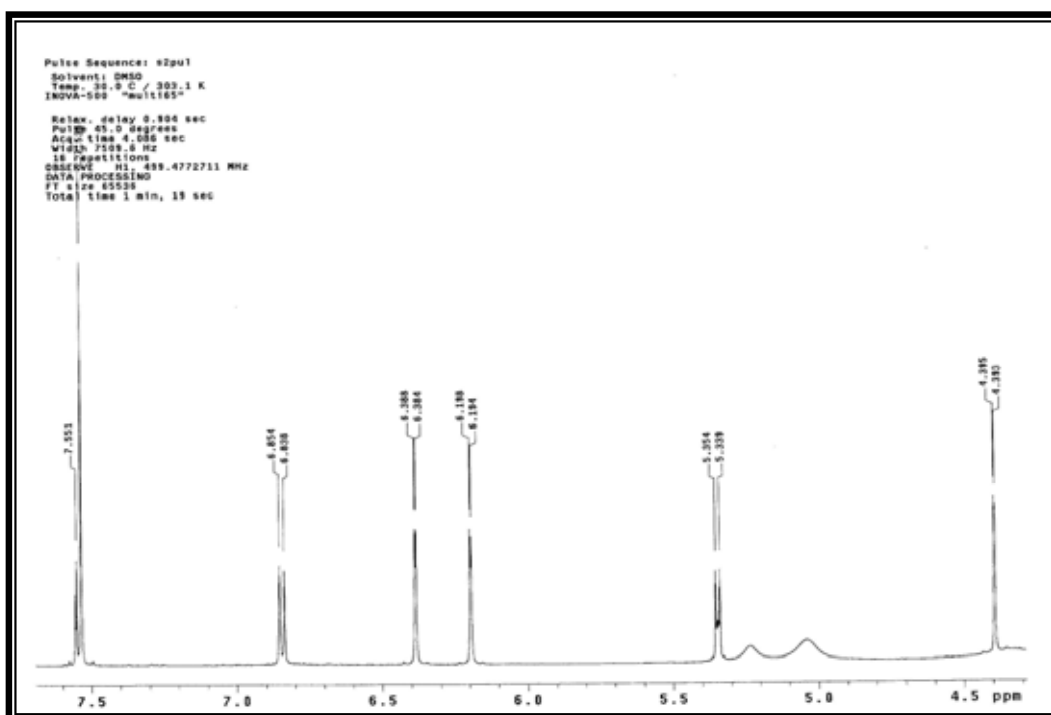
Anexo 10. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 115 – 180) do flavonol I



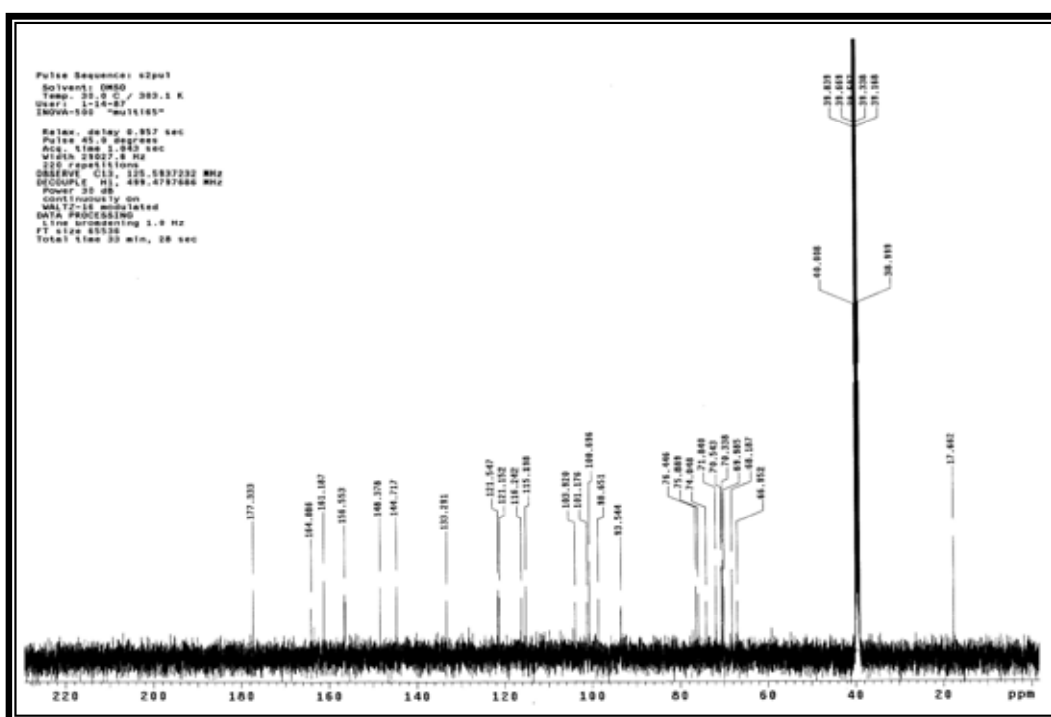
Anexo 11. Espectro de RMN de ^1H do flavonol II (500 MHz – $\text{DMSO}-d_6$)



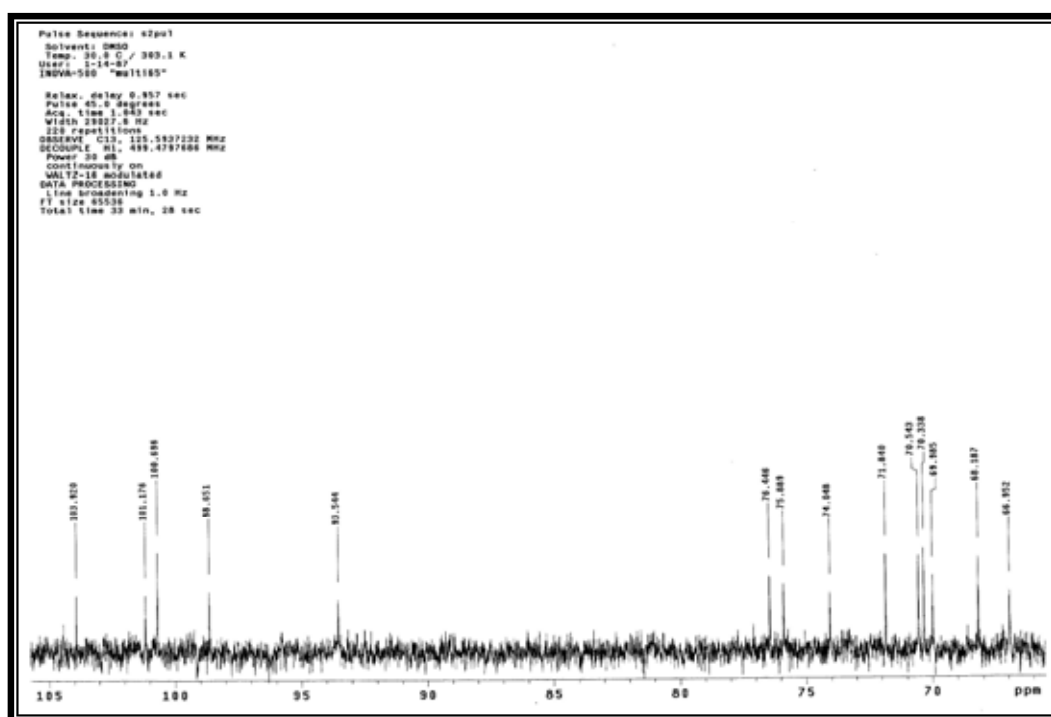
Anexo 12. Ampliação do espectro de RMN (δ 2,5 – 4,0) de ^1H do flavonol II



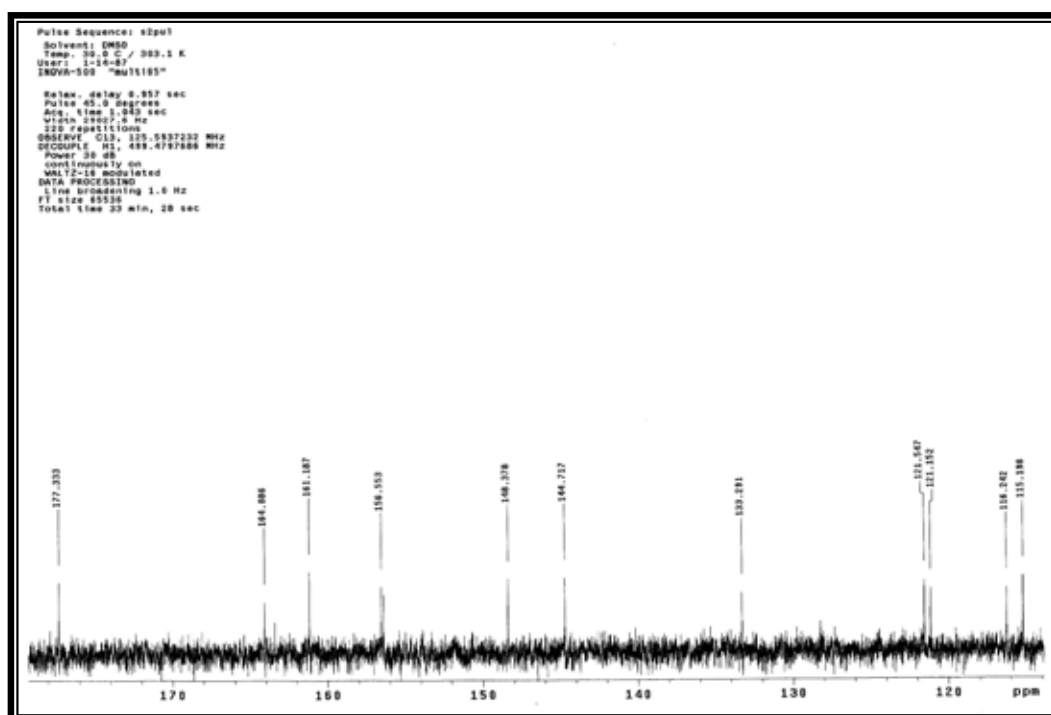
Anexo 13. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 4,0 – 7,6) do flavonol II



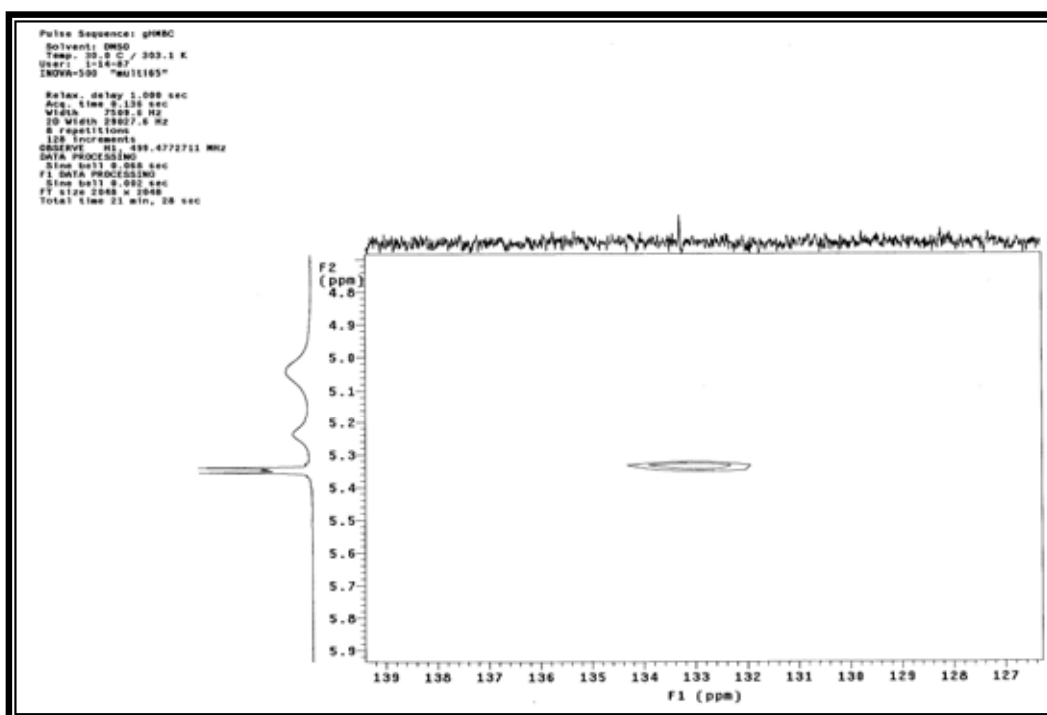
Anexo 14. Espectro de RMN de ^{13}C do flavonol II (126 MHz – $\text{DMSO}-d_6$)



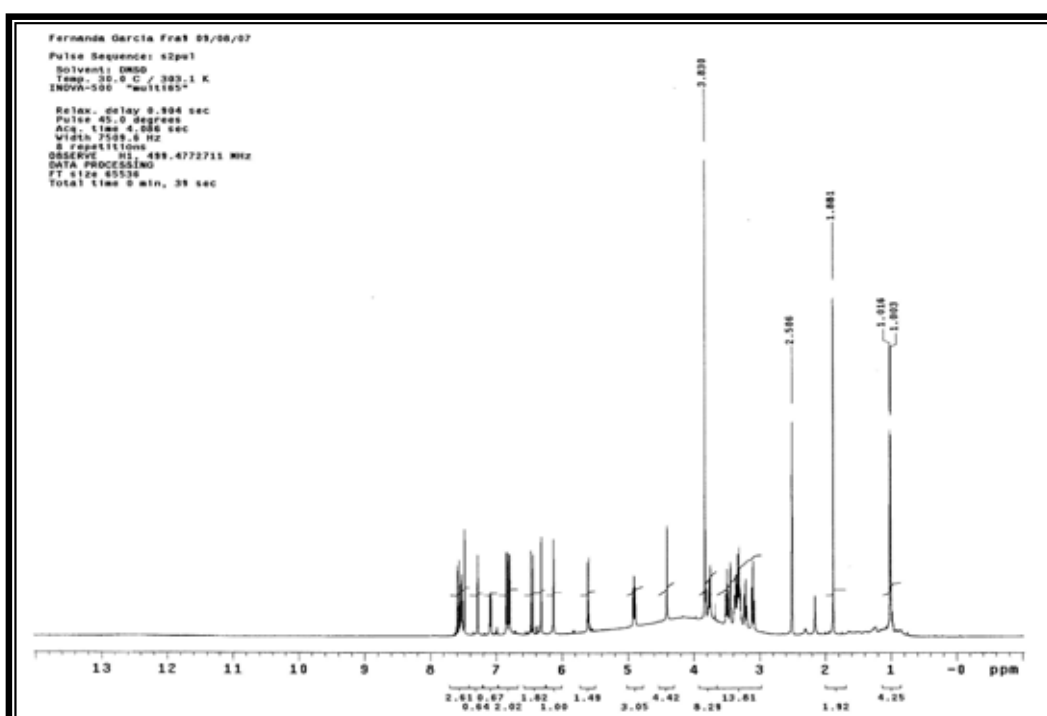
Anexo 15. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 65 – 105) do flavonol II



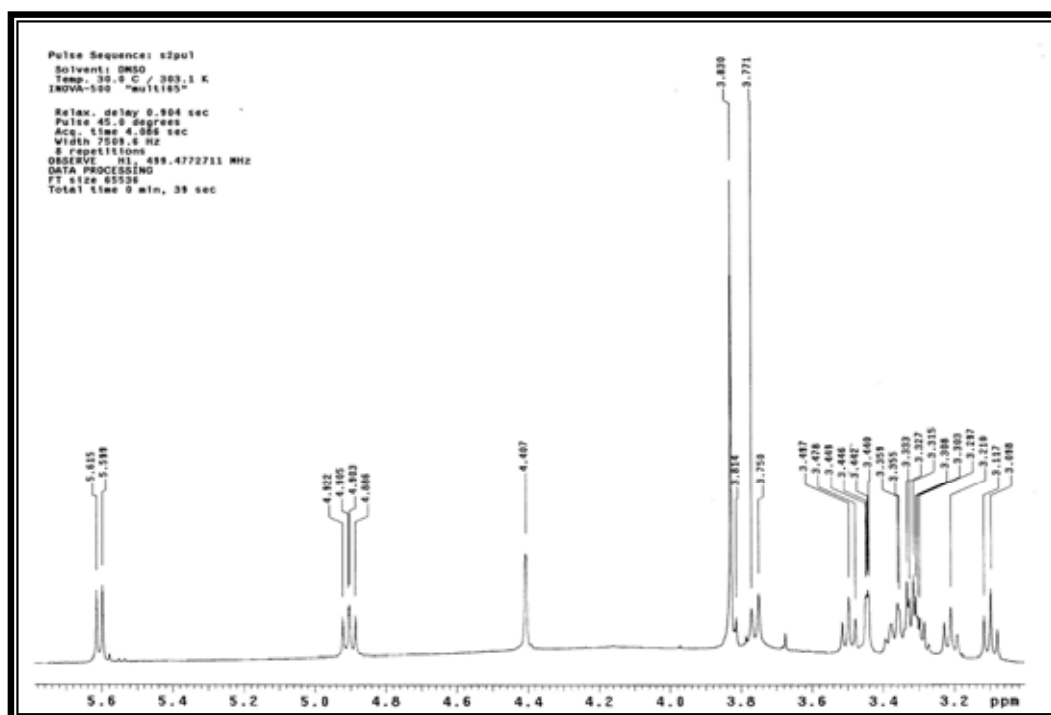
Anexo 16. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 115 – 178) do flavonol II



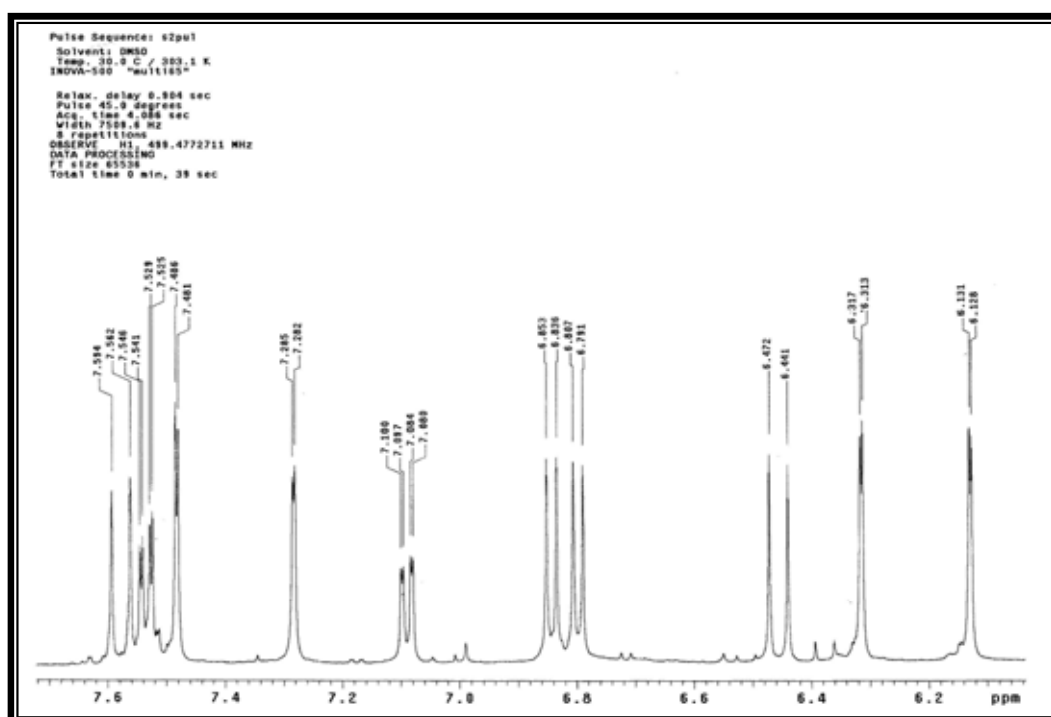
Anexo 17. Ampliação do mapa de contornos do gHMBC do flavonol II (500 MHz – DMSO- d_6)



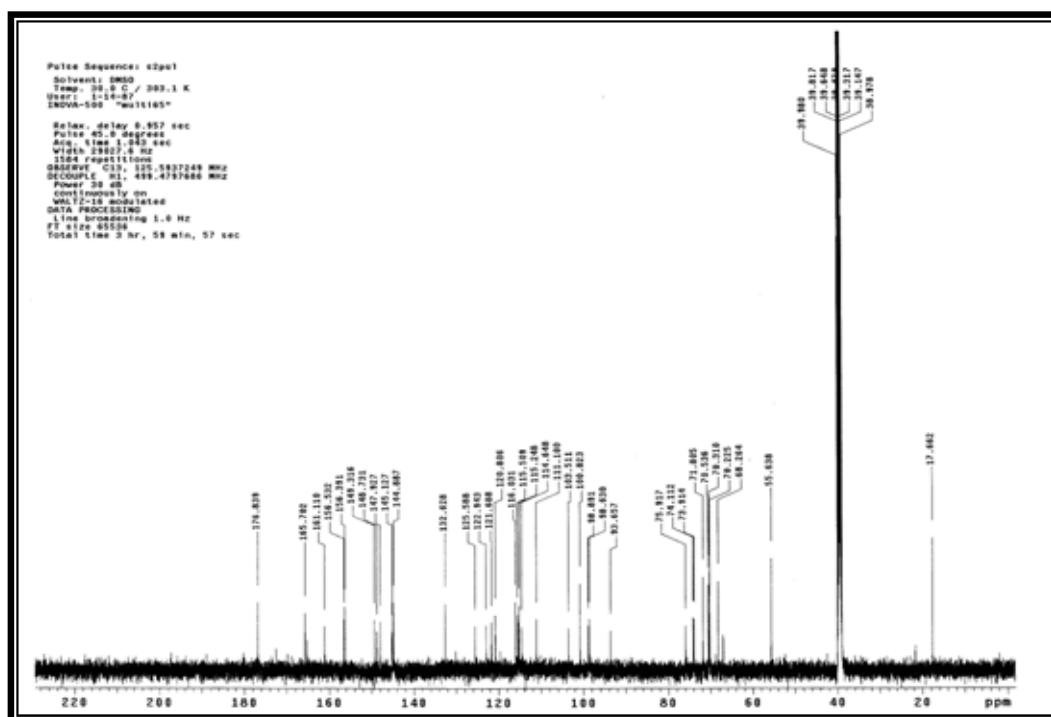
Anexo 18. Espectro de RMN de ^1H do flavonol III (500 MHz - DMSO- d_6)



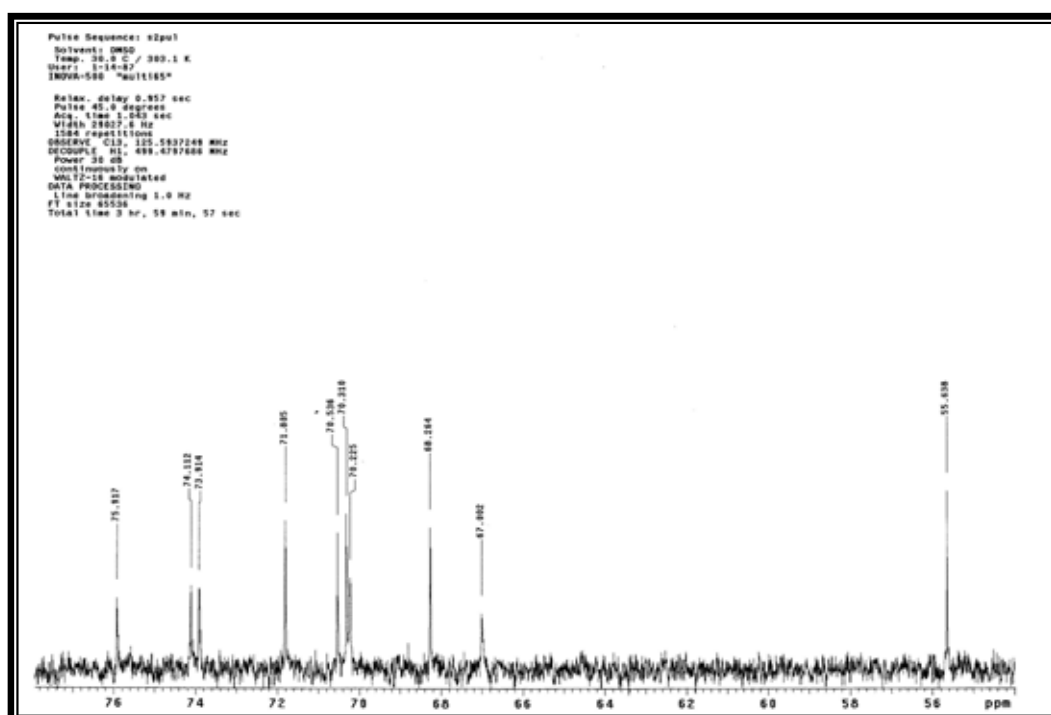
Anexo 19. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 3,0 – 5,7) do flavonol III



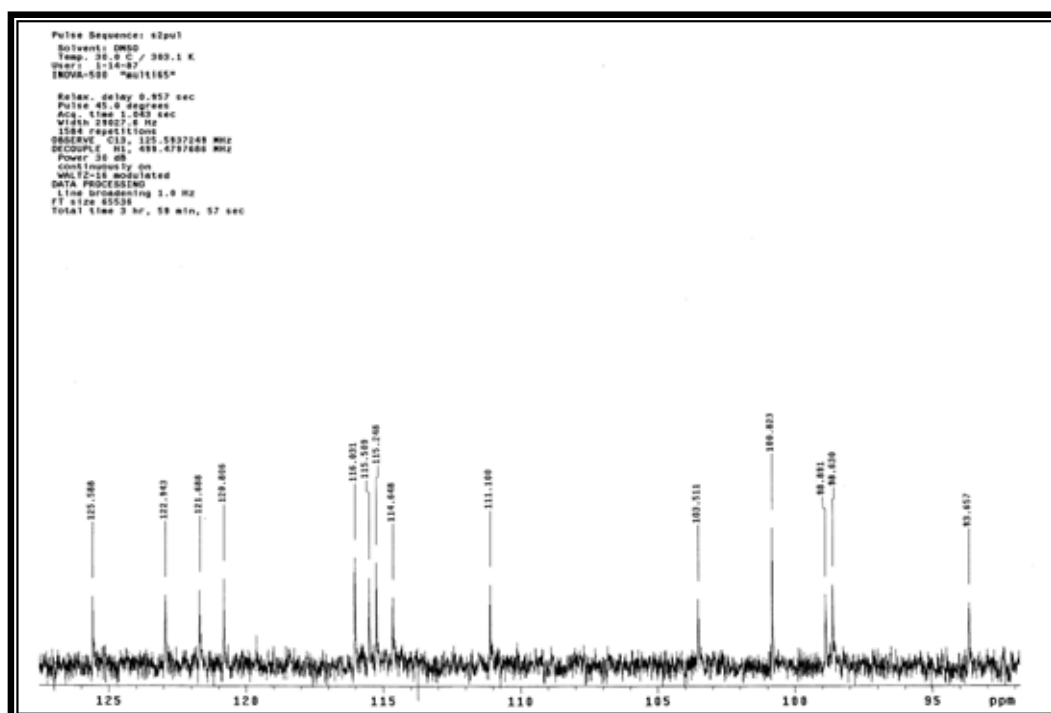
Anexo 20. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 6,0 – 7,7) do flavonol III



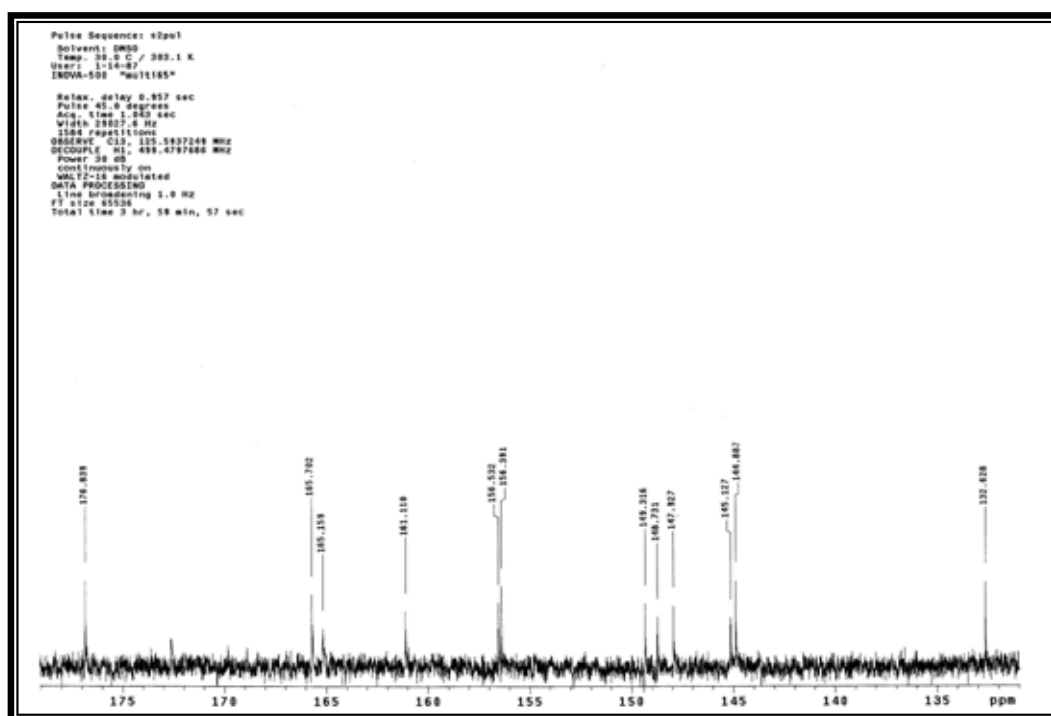
Anexo 21. Espectro de RMN de ^{13}C do flavonol III (126 MHz - $\text{DMSO}-d_6$)



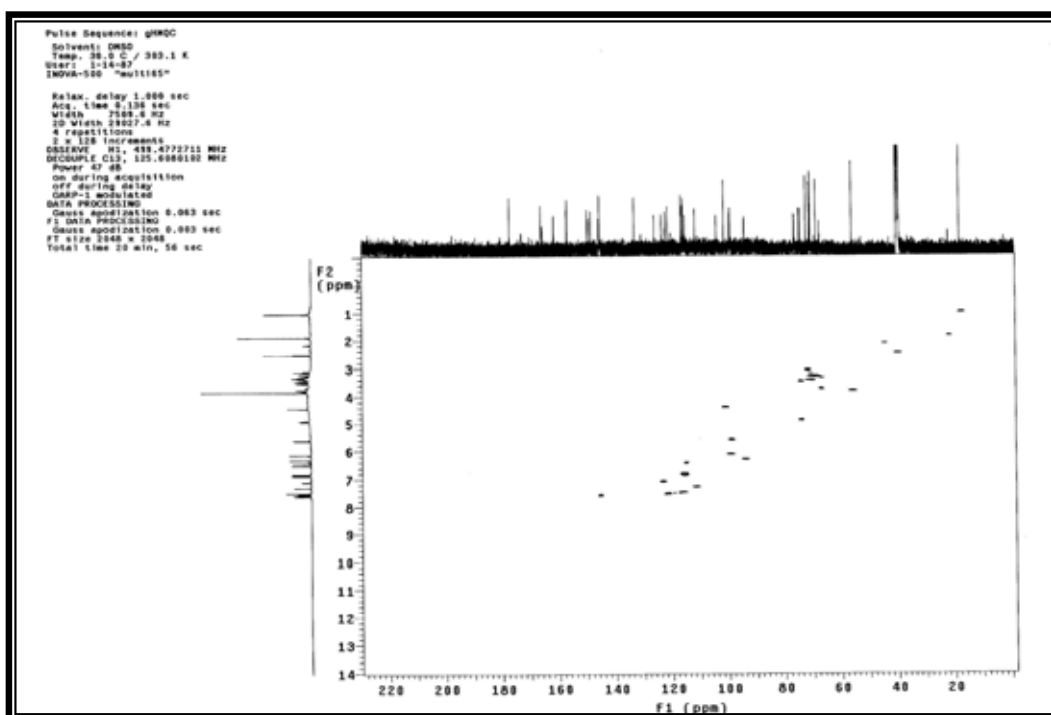
Anexo 22. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 55 – 77) do flavonol III



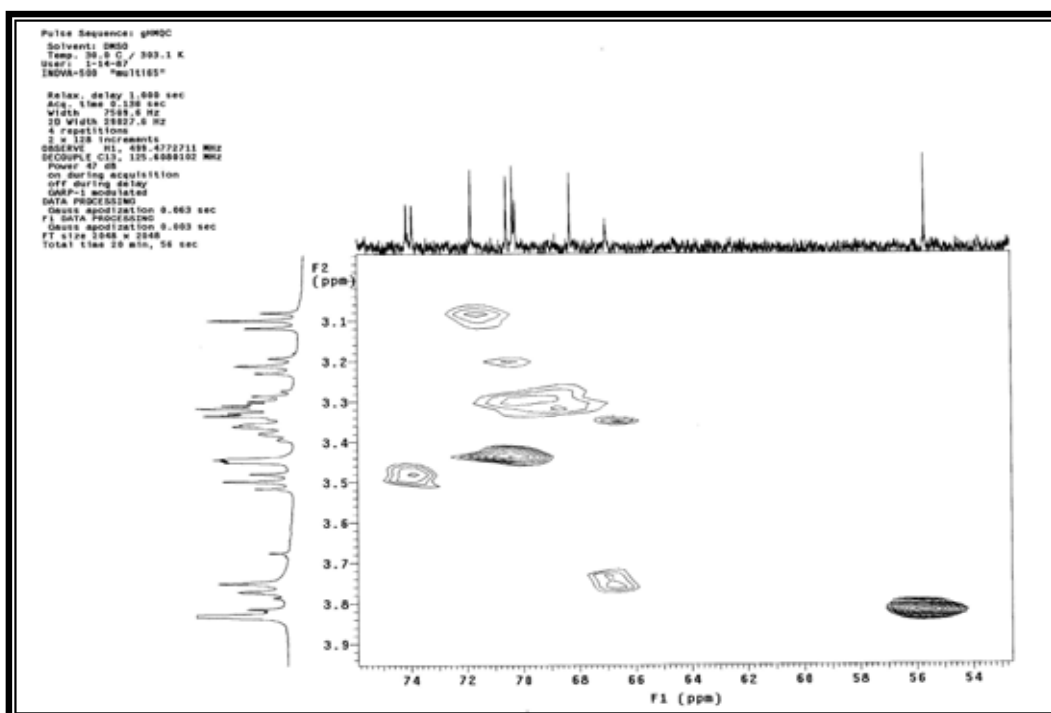
Anexo 23. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 90 – 126) do flavonol III



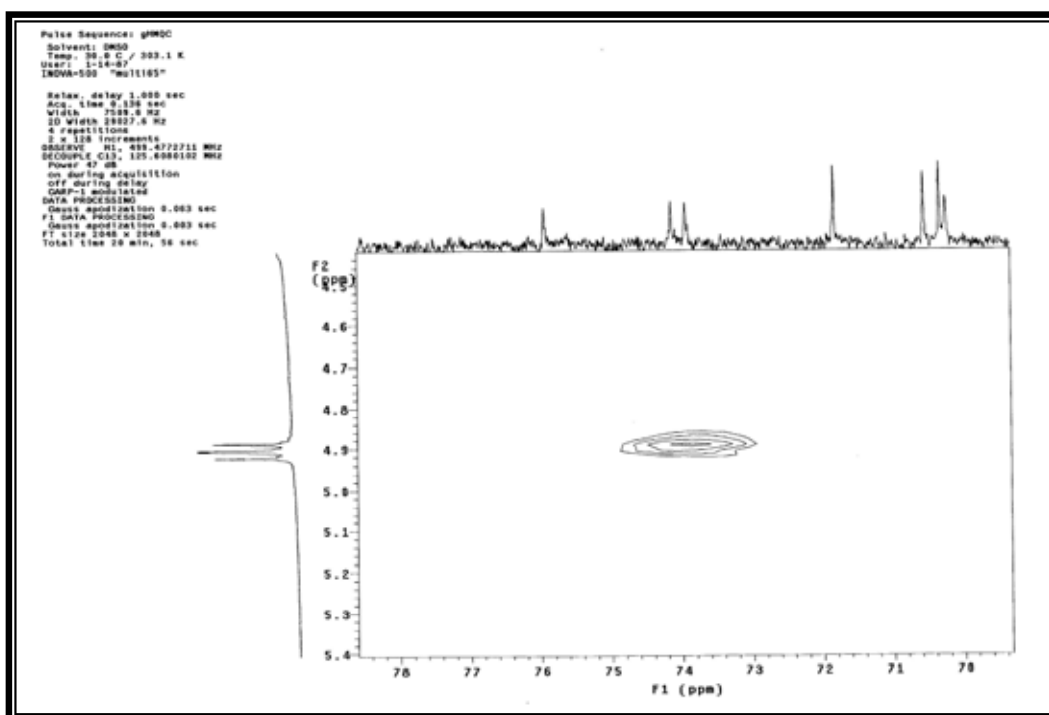
Anexo 24. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 130 – 180) do flavonol III



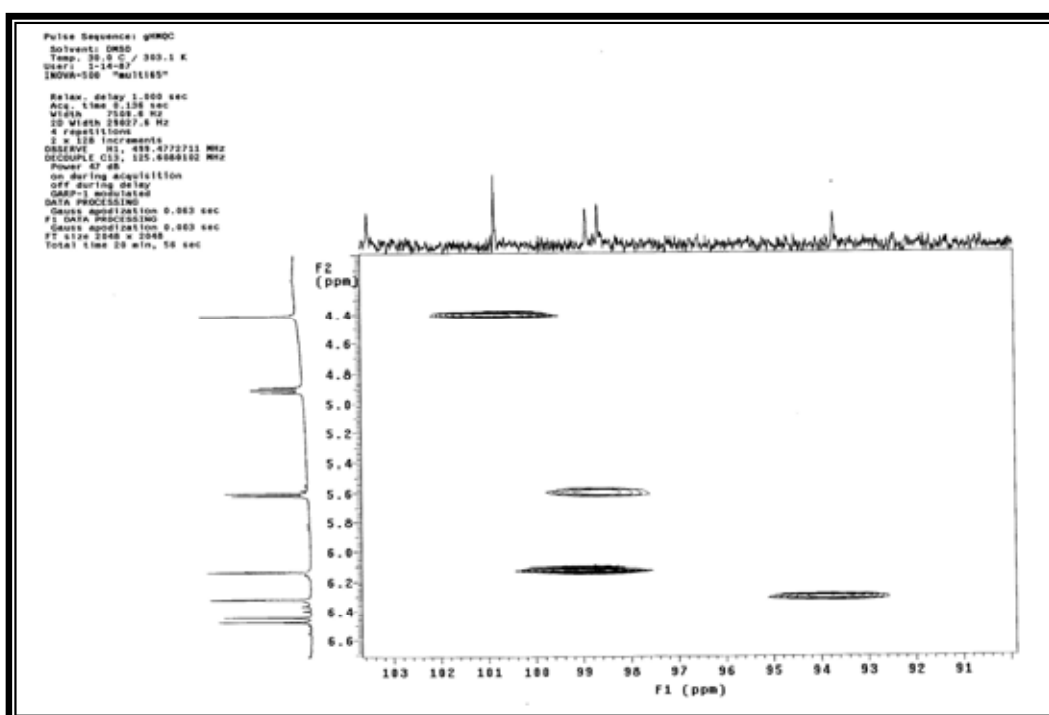
Anexo 25. Mapa de contornos *g*HMQC do flavonol III (500 MHz - DMSO-*d*₆)



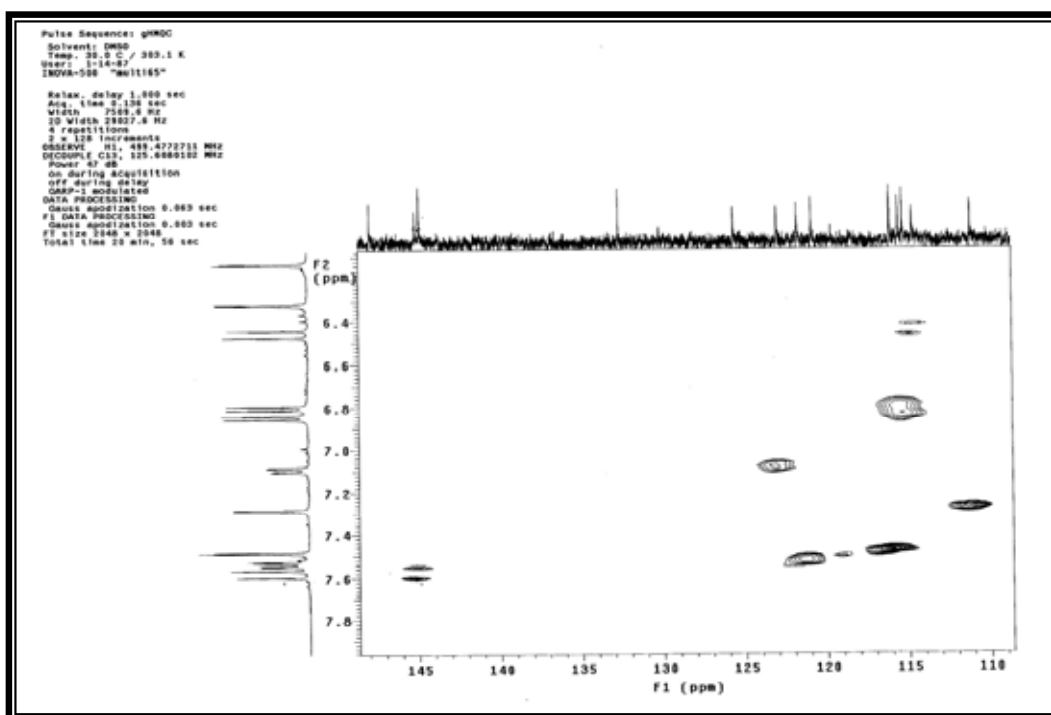
Anexo 26. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC (δ 53 – 75) do flavonol III



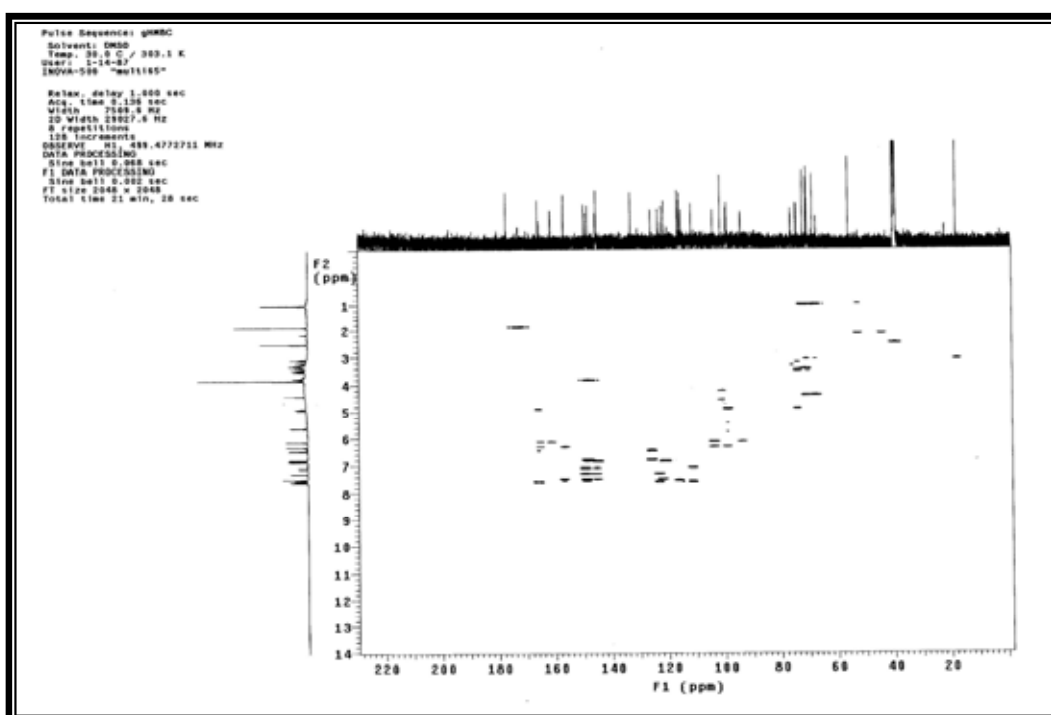
Anexo 27. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC (δ 70 – 78) do flavonol III



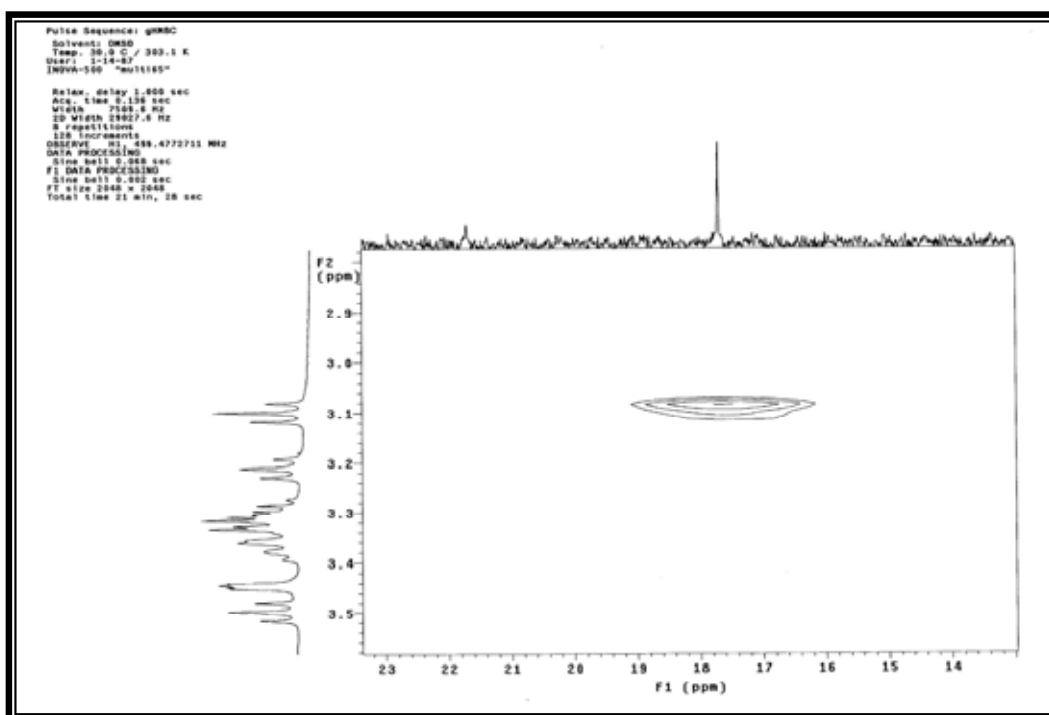
Anexo 28. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC (δ 91 – 103) do flavonol III



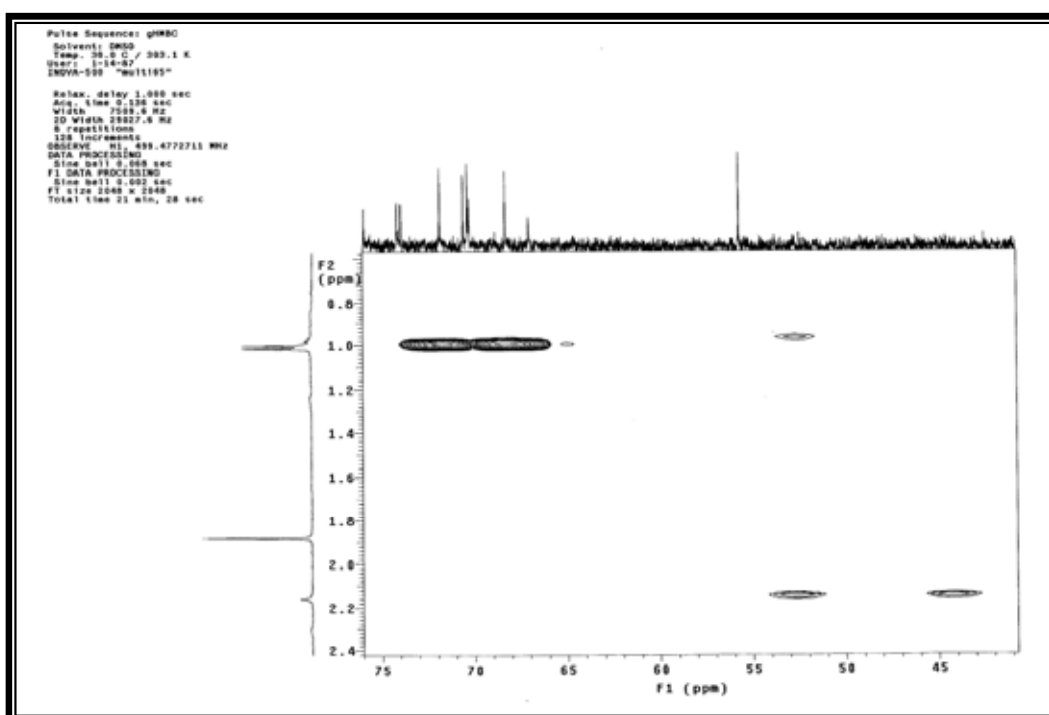
Anexo 29. Ampliação do mapa de contornos *g*HMQC (δ 110 – 145) do flavonol III



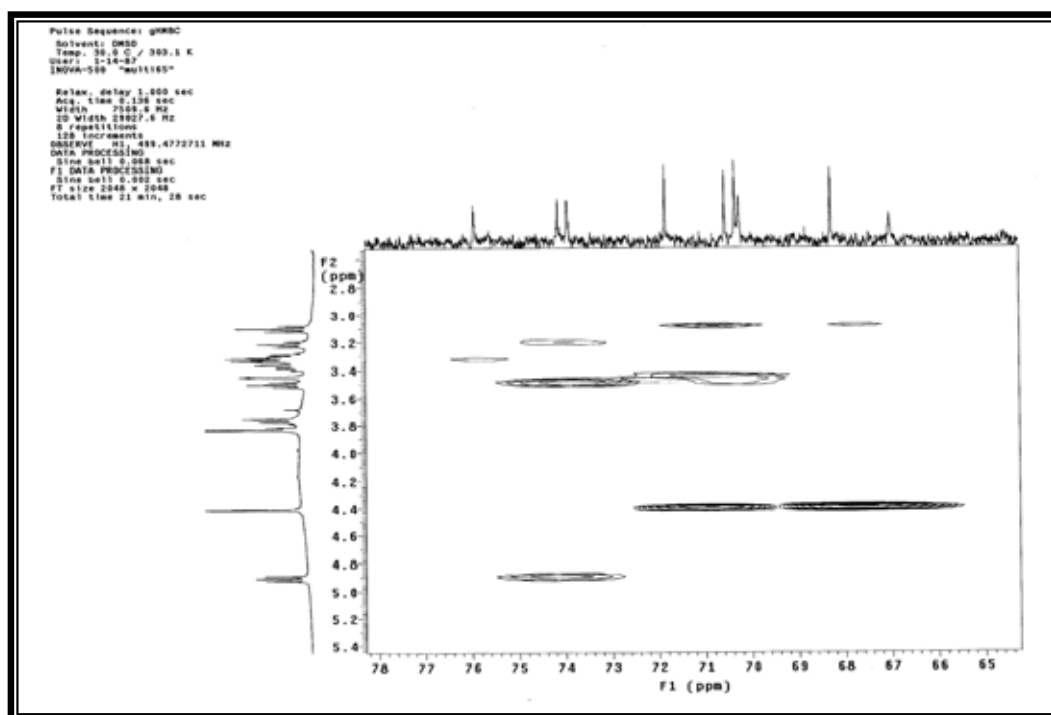
Anexo 30. Mapa de contornos *g*HMBC do flavonol III (500 MHz - DMSO-*d*₆)



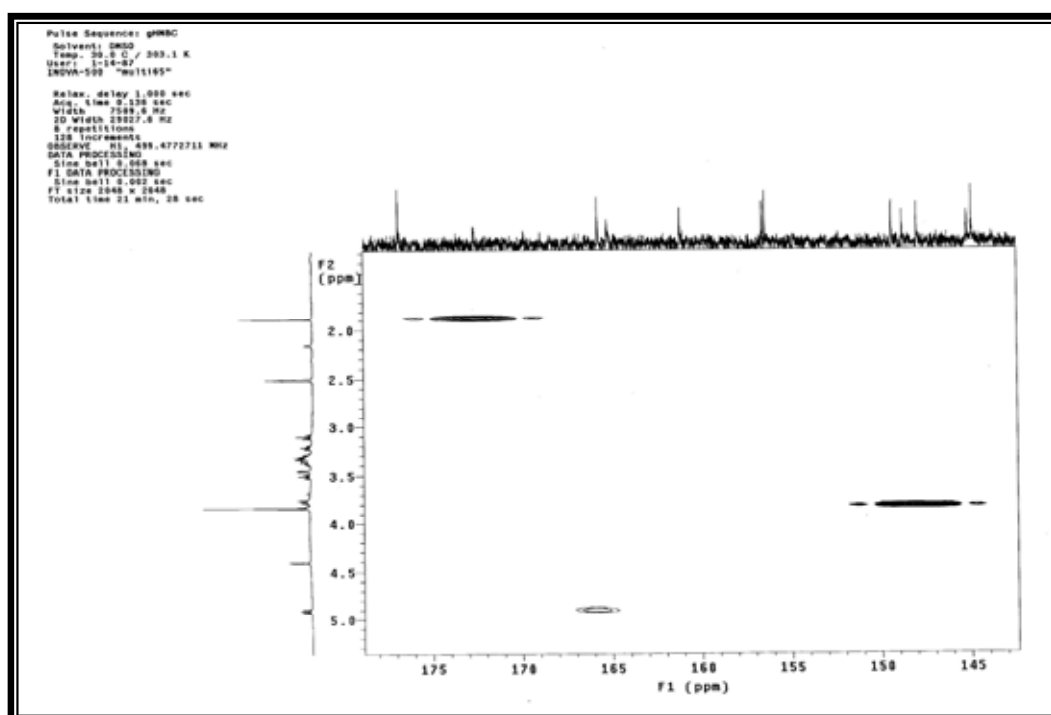
Anexo 31. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC (δ 14 – 23) do flavonol III



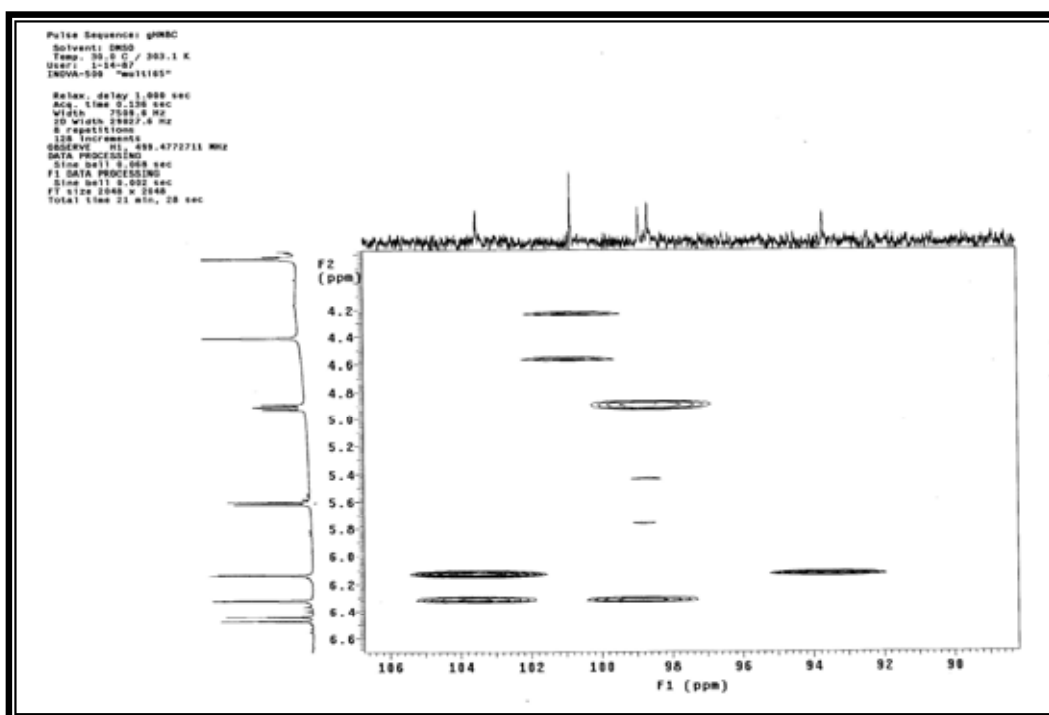
Anexo 32. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC (δ 40 – 75) do flavonol III



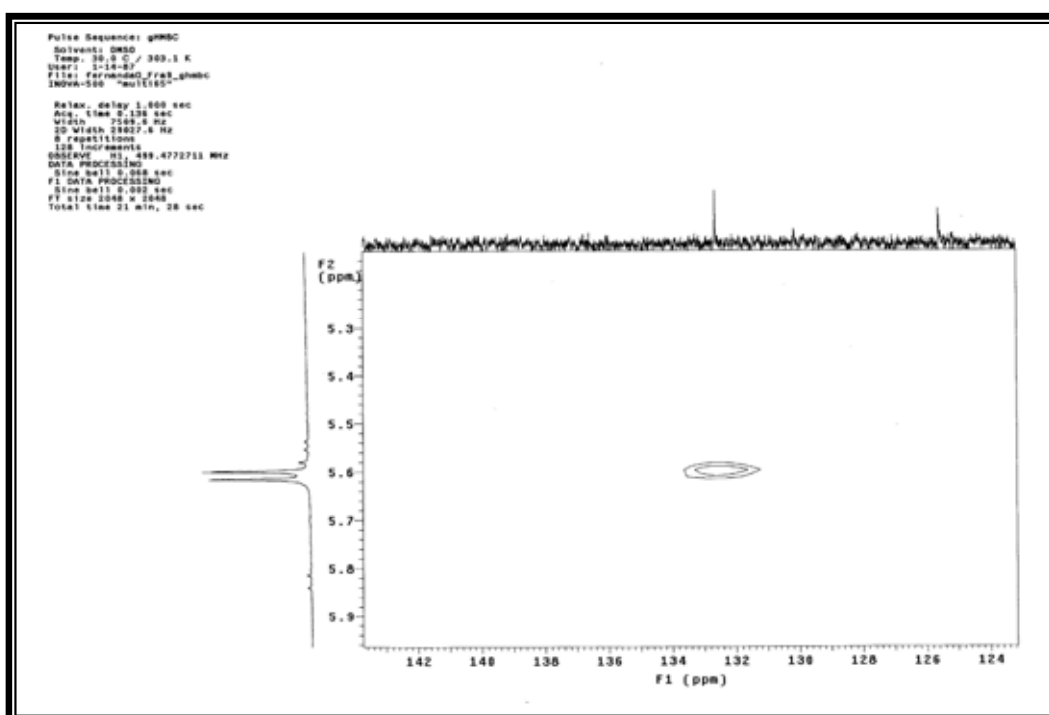
Anexo 33. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 65 – 78) do flavonol III



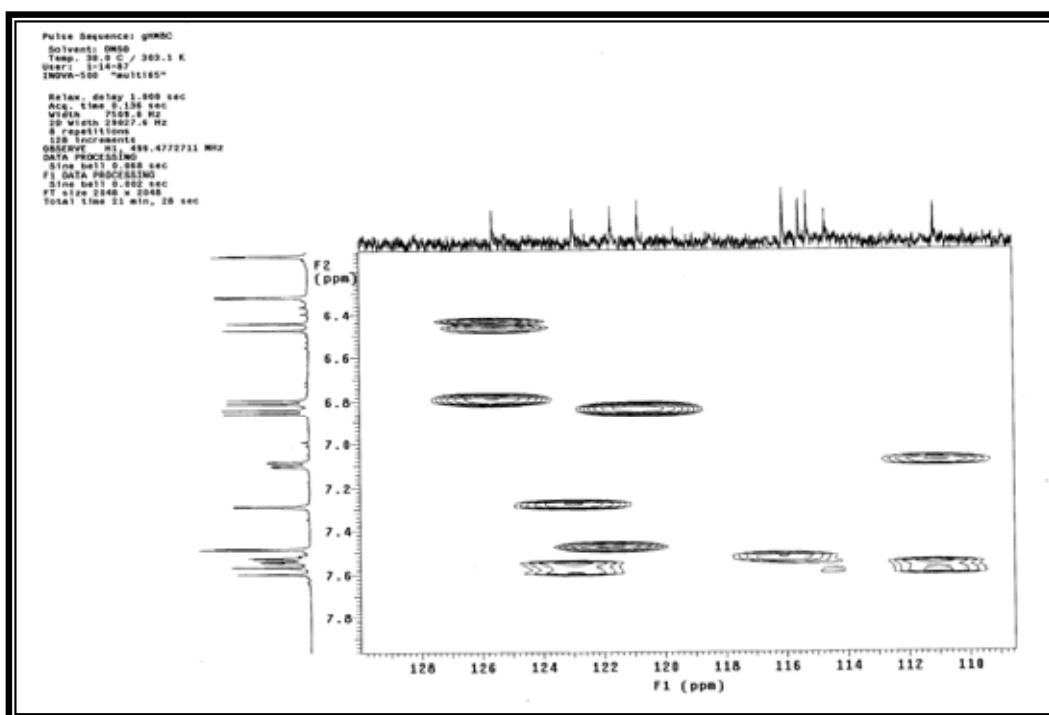
Anexo 34. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 145 – 175) do flavonol III



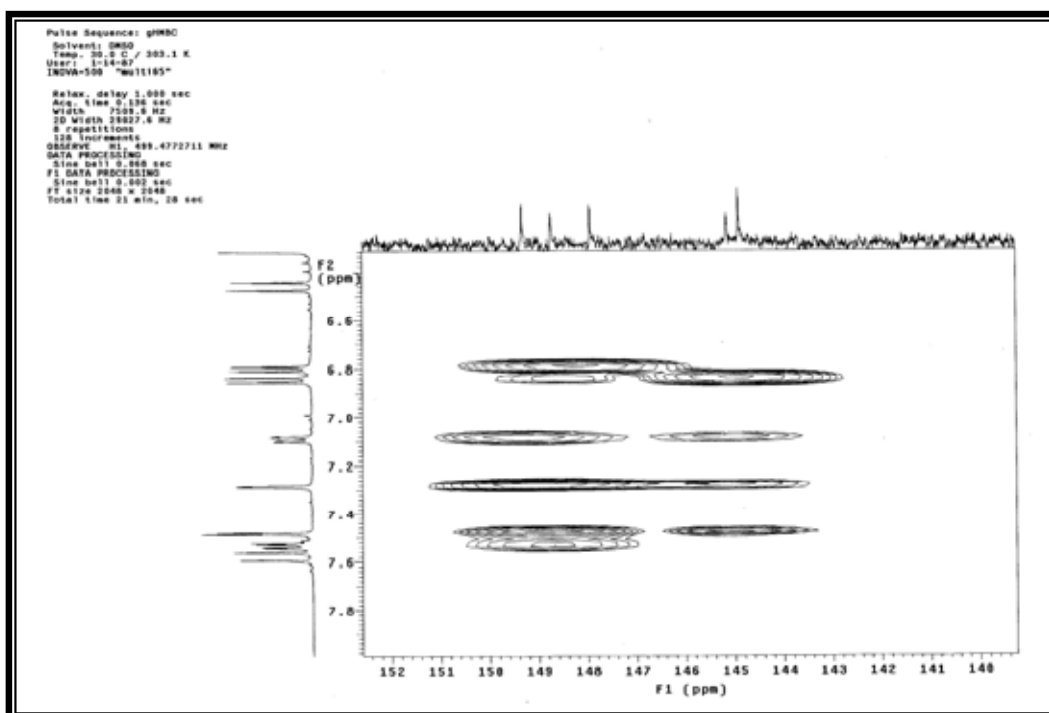
Anexo 35. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 90 – 106) do flavonol III



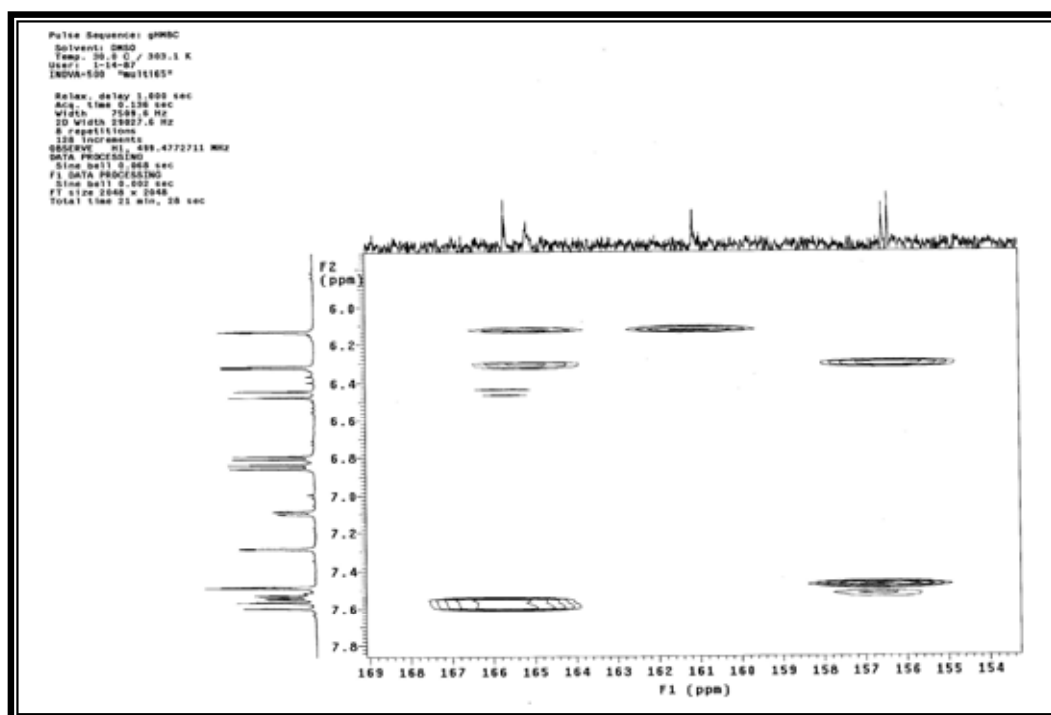
Anexo 36. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 124 – 142) do flavonol III



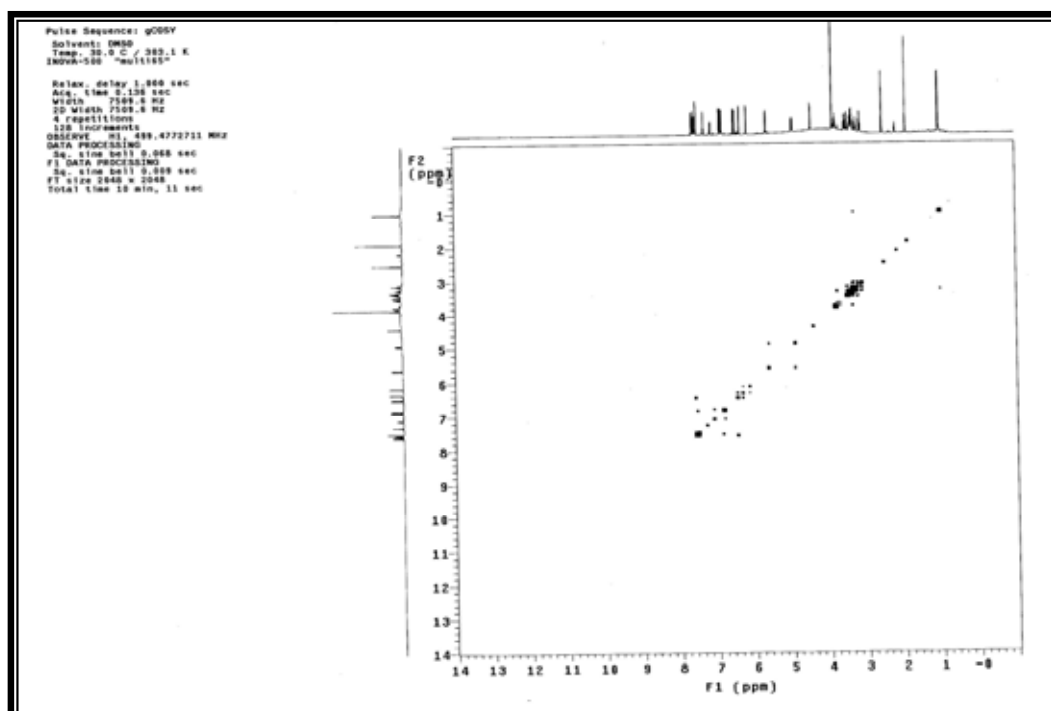
Anexo 37. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC (δ 110 – 128) do flavonol III



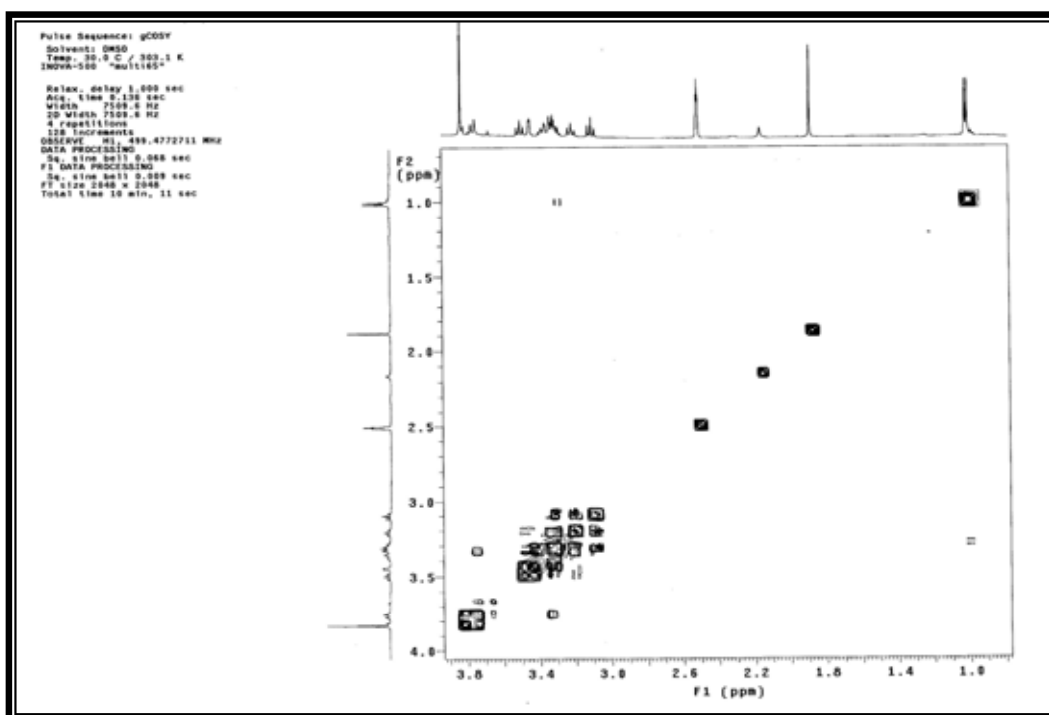
Anexo 38. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC (δ 140 – 152) do flavonol III



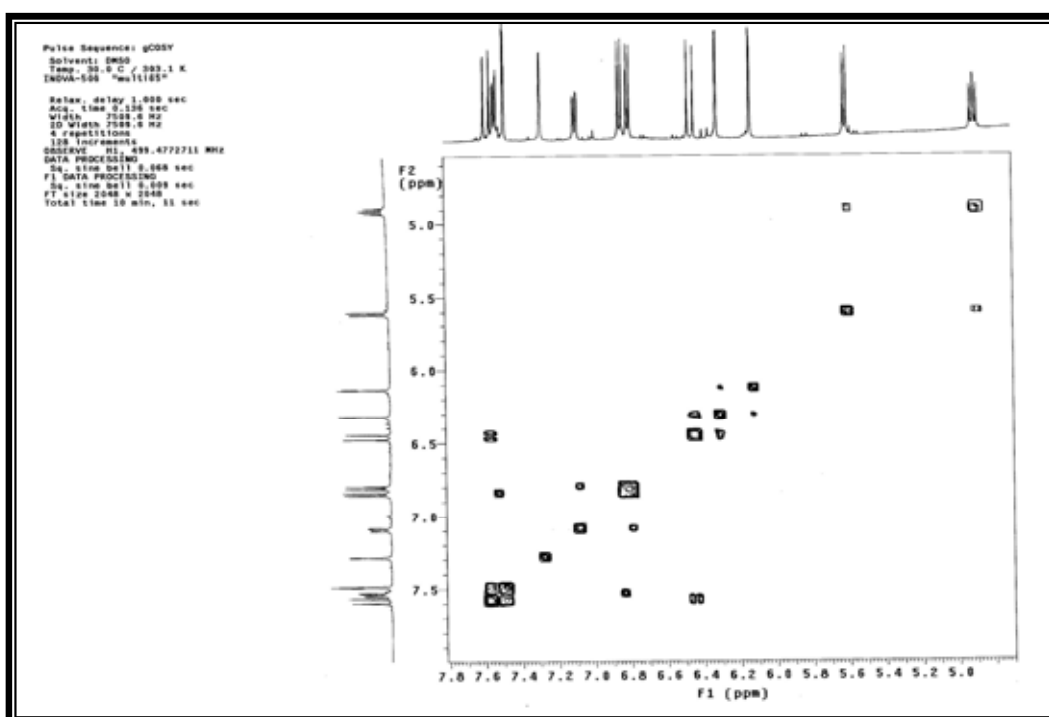
Anexo 39. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC (δ 154 – 169) do flavonol III



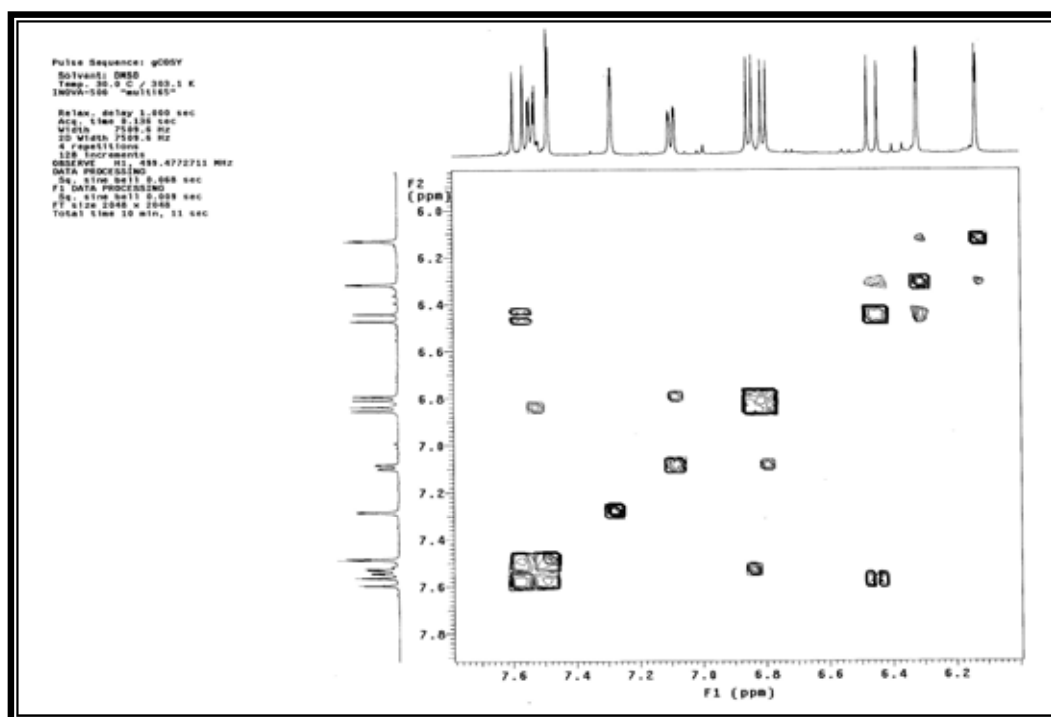
Anexo 40. Mapa de contornos *g*COSY flavonol III (500 MHz - DMSO-*d*₆)



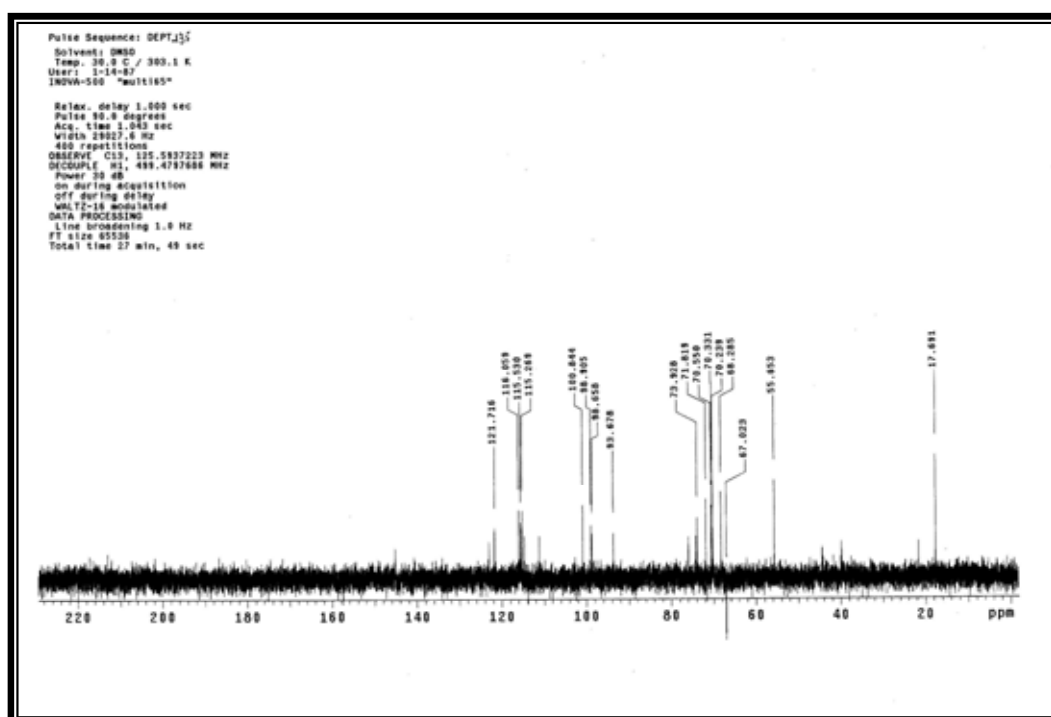
Anexo 41. Ampliação do mapa de contornos *g*COSY (δ 0 – 3,8) do flavonol III



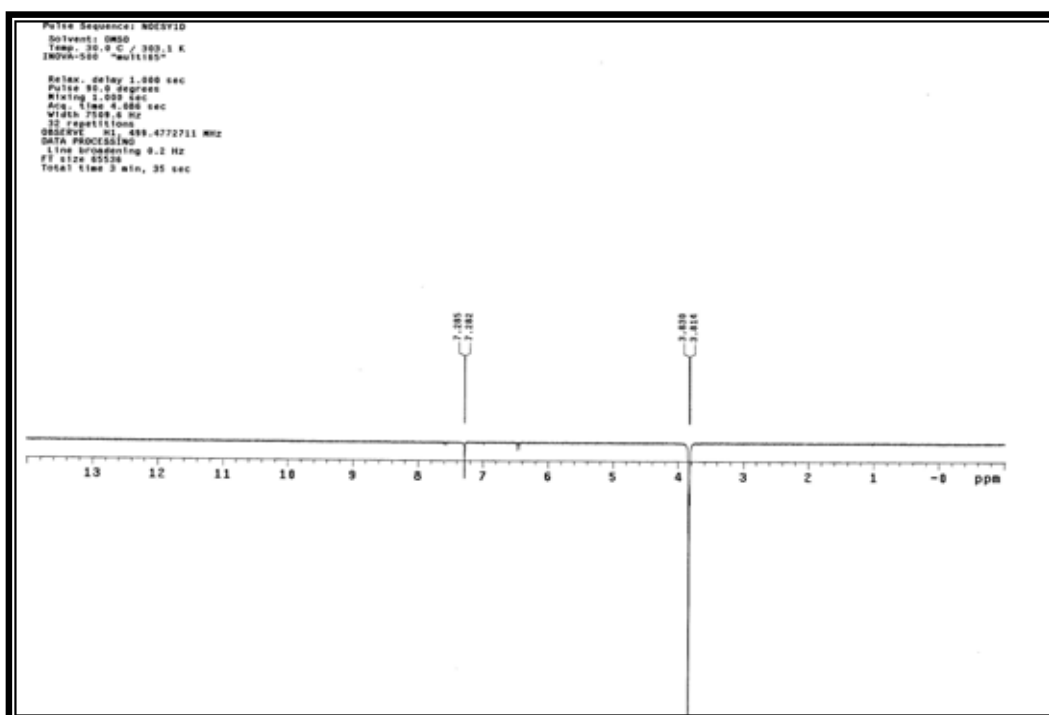
Anexo 42. Ampliação do mapa de contornos *g*COSY (δ 4,0 – 7,8) do flavonol III



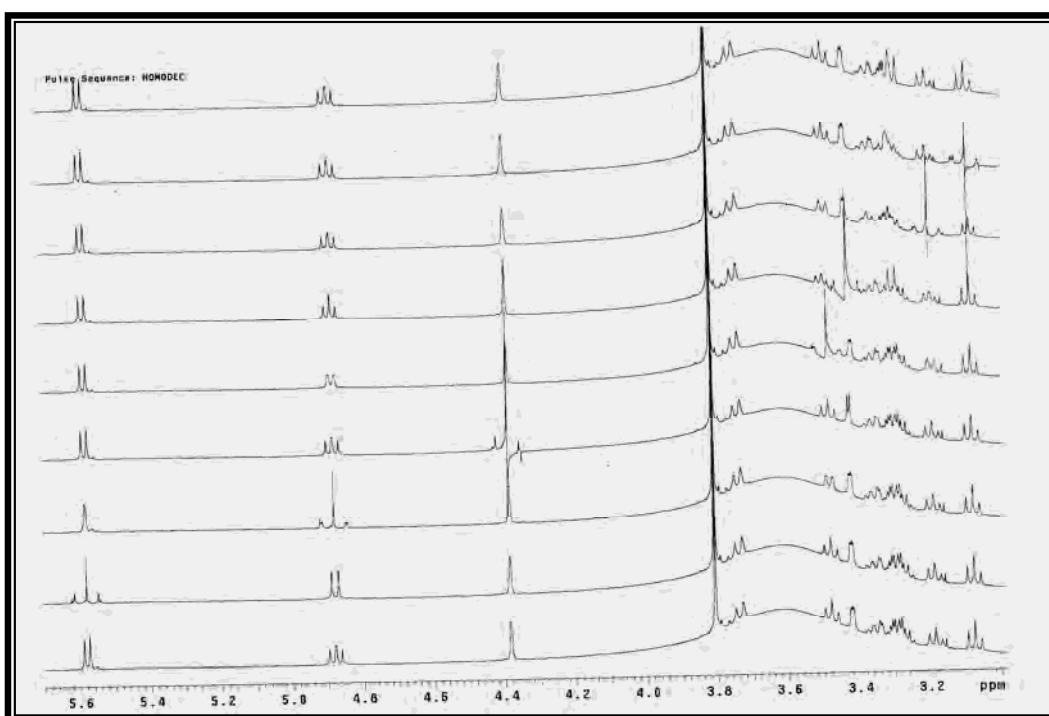
Anexo 43. Ampliação do mapa de contornos $g\text{COSY}$ (δ 6,0 – 7,8) do flavonol III



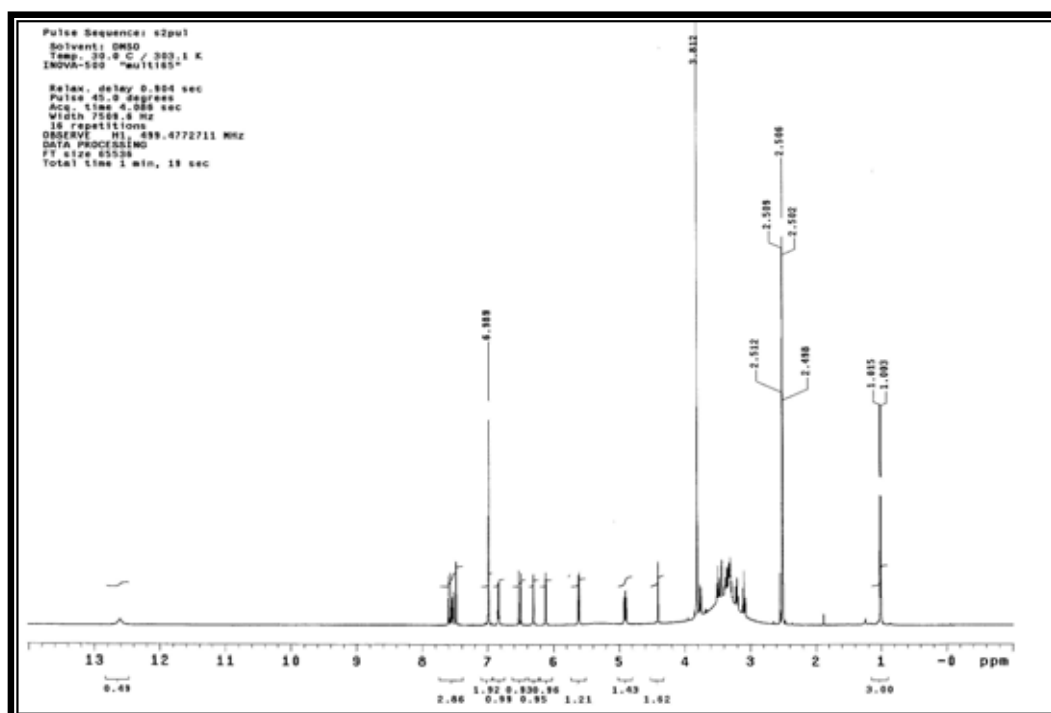
Anexo 44. Espectro de DEPT 135 ° do flavonol III (126 MHz - DMSO- d_6)



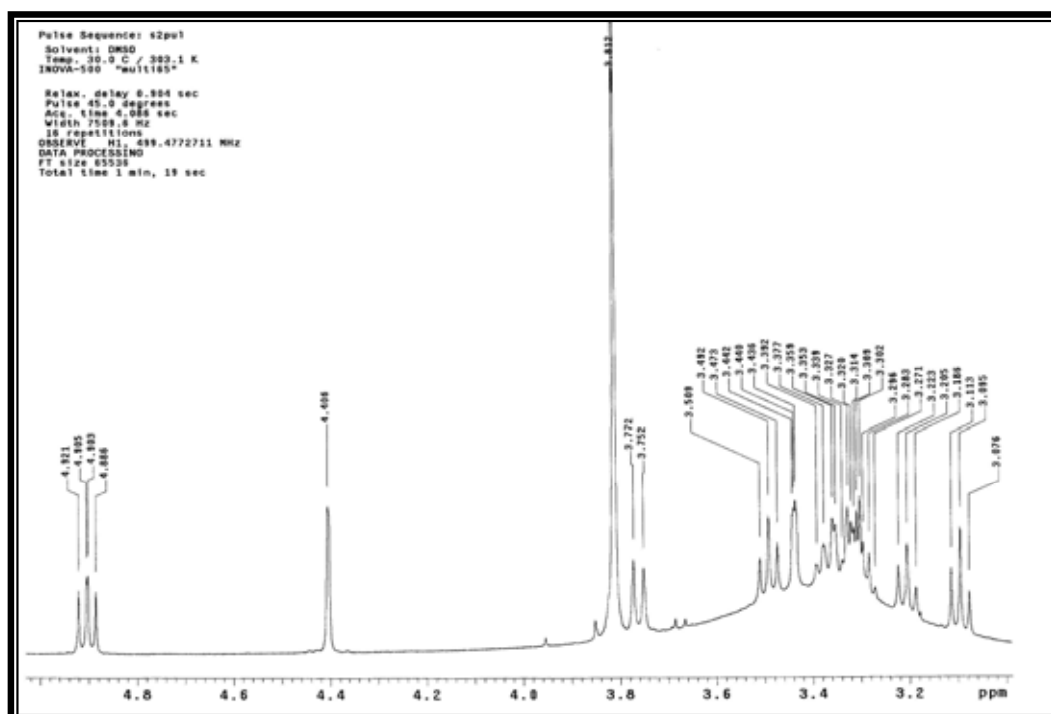
Anexo 45. Espectro de NOESY 1D δ_H 3,83 do flavonol **III** (500 MHz - DMSO- d_6)



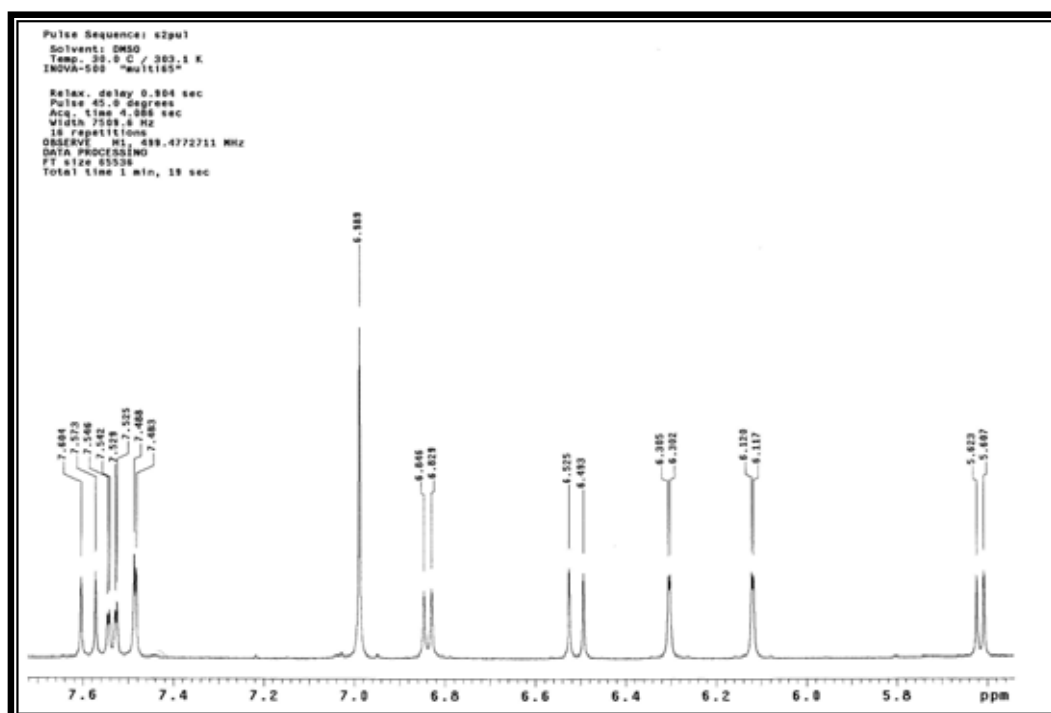
Anexo 46. Espectro de HOMODEC (500 MHz – DMSO- d_6) de δ 5,60; δ 4,90, δ 4,41, δ 3,49, δ 3,31, δ 3,21 e δ 3,10 do flavonol **III**



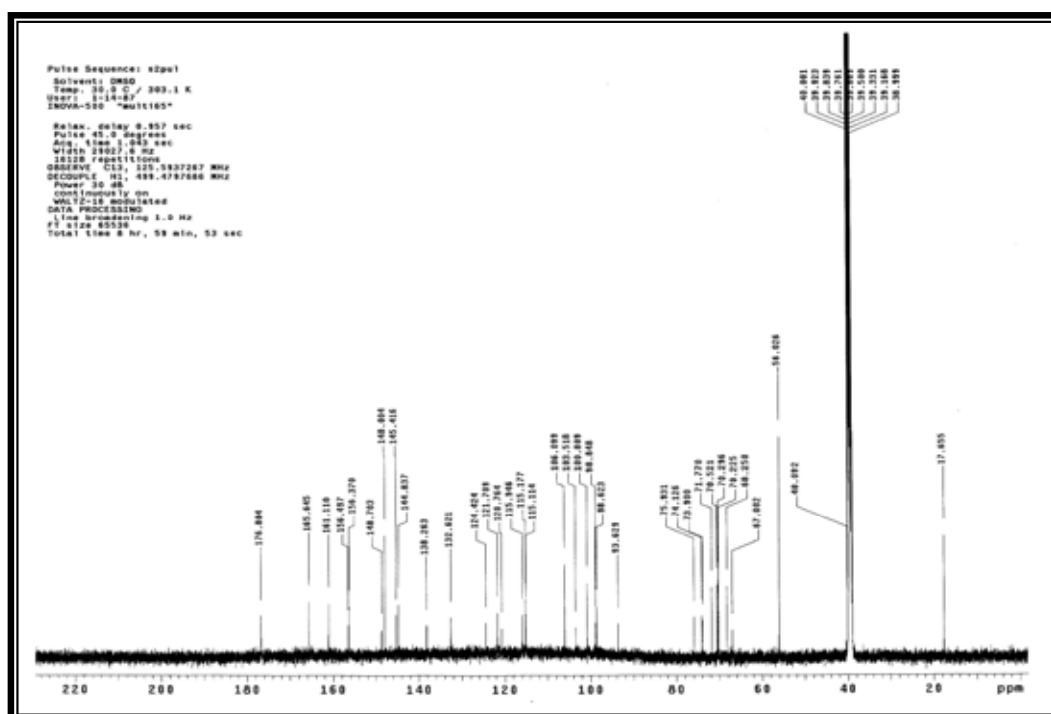
Anexo 47. Espectro de RMN de ^1H do flavonol IV (500 MHz - $\text{DMSO}-d_6$)



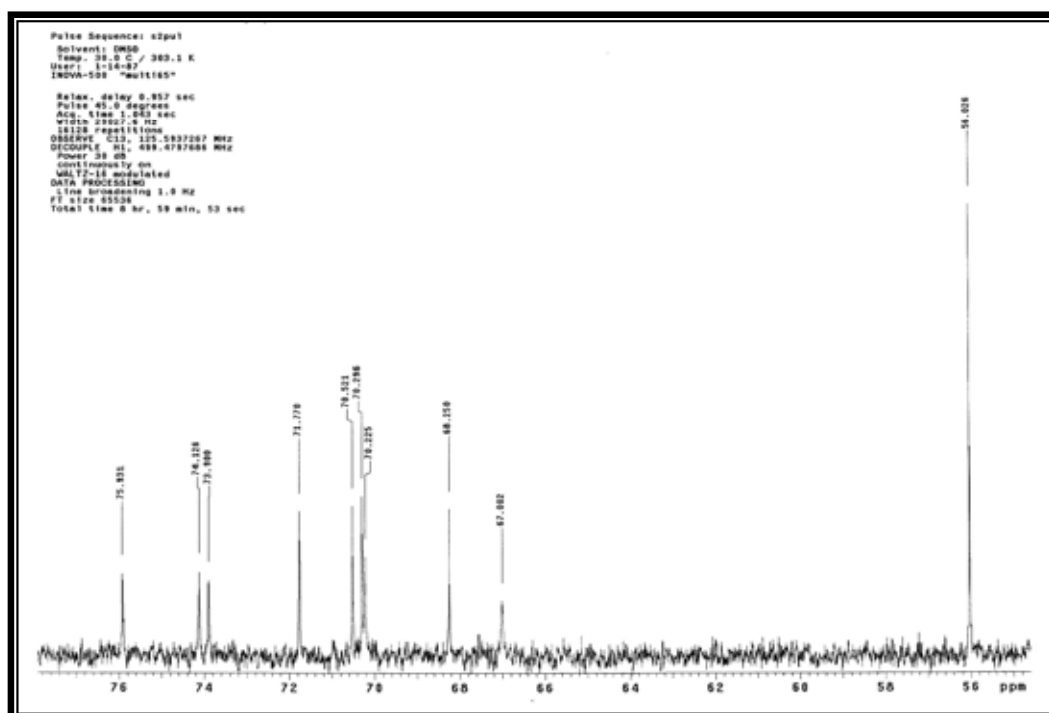
Anexo 48. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 3,0 – 5,0) do flavonol IV



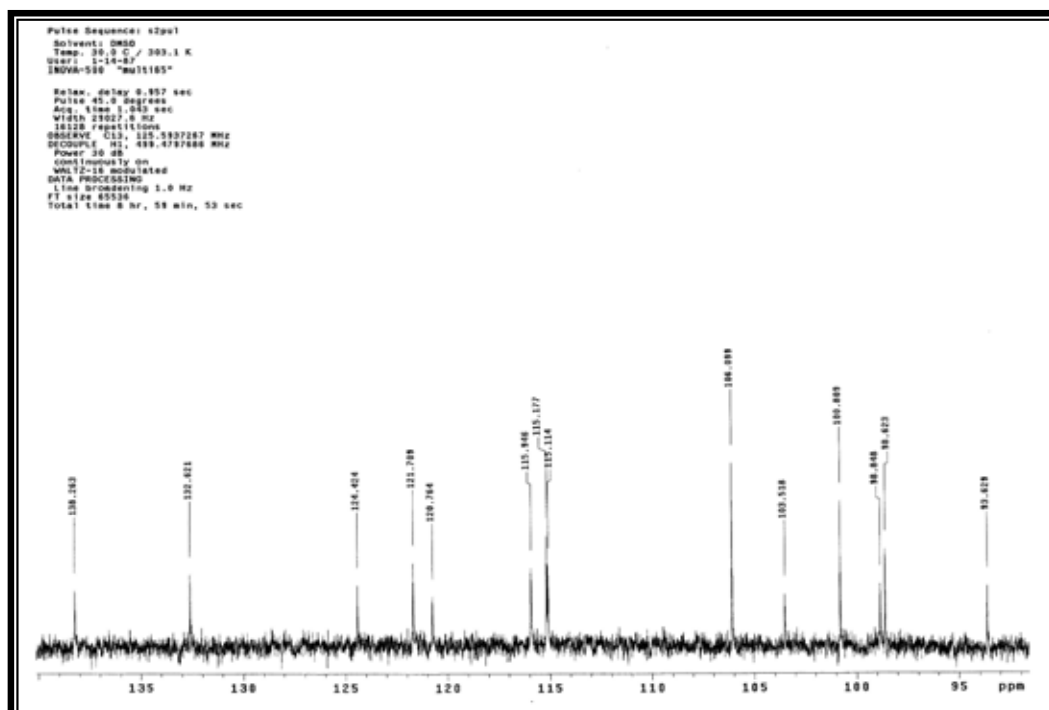
Anexo 49. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 5,6 – 7,7) do flavonol IV



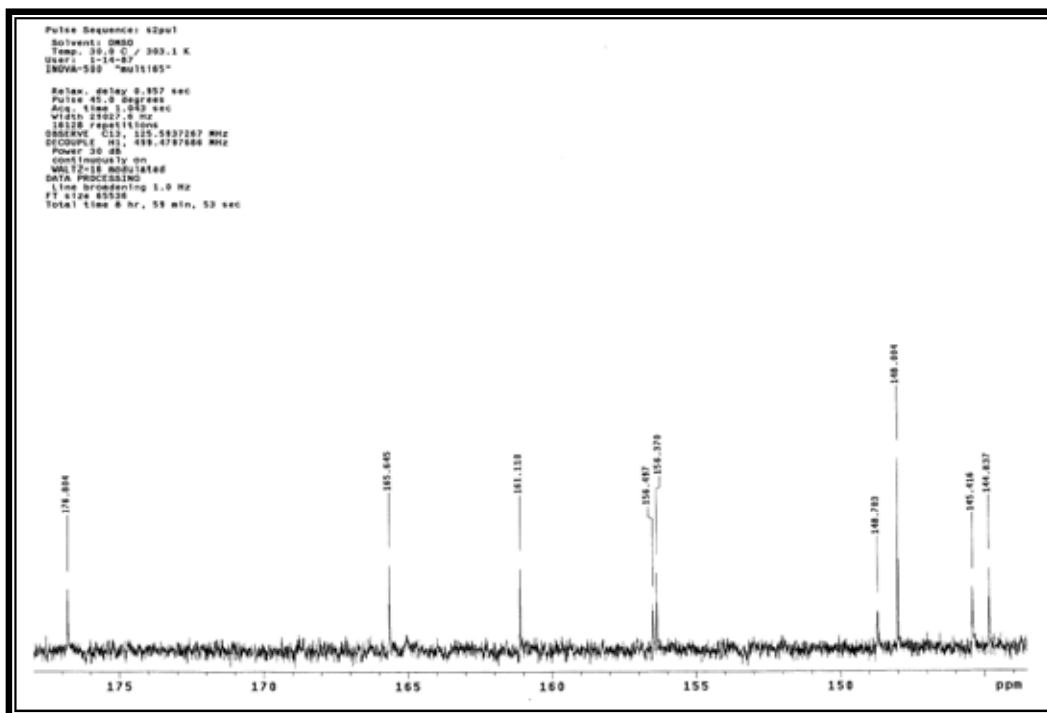
Anexo 50. Espectro de RMN de ^{13}C do flavonol IV (126 MHz - DMSO- d_6)



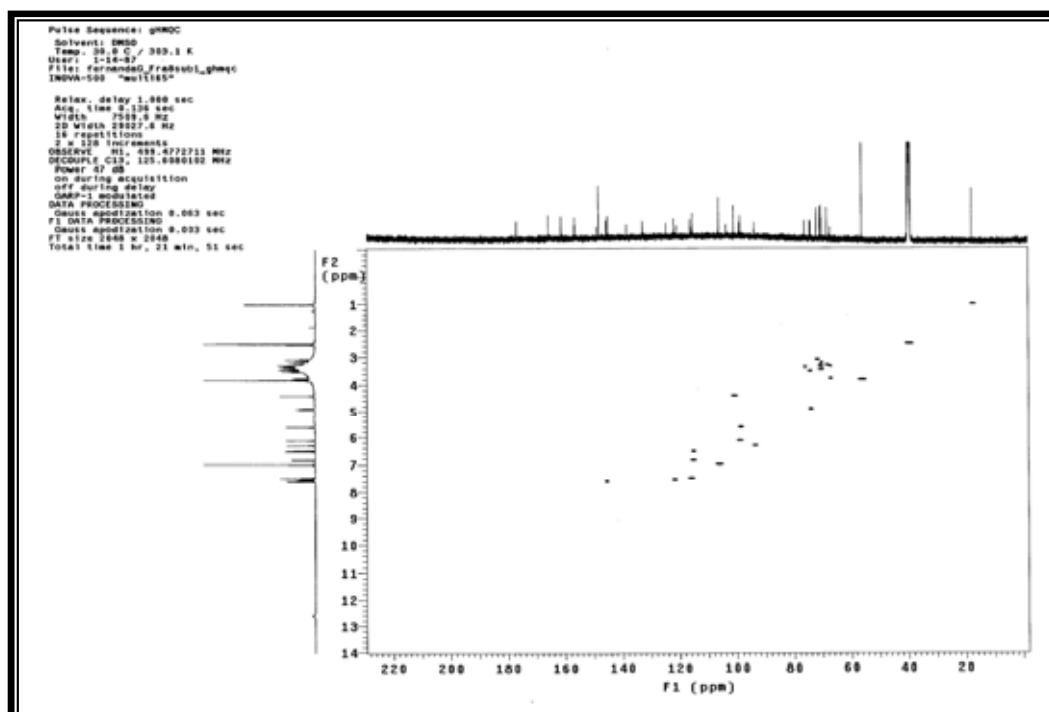
Anexo 51. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 55 – 77) do flavonol IV



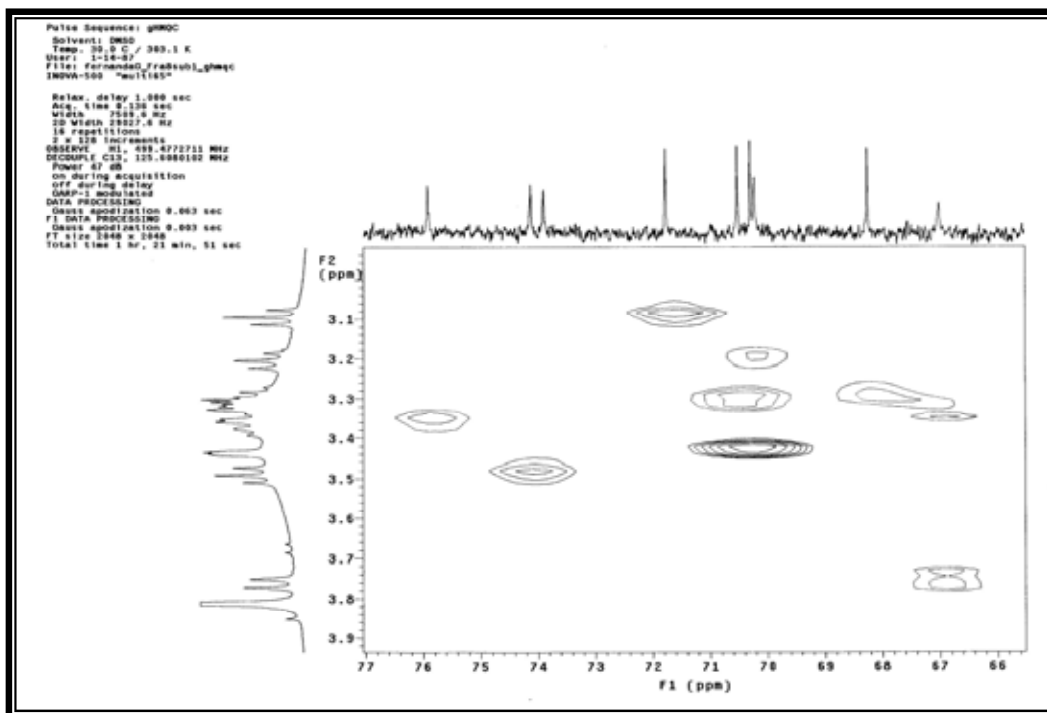
Anexo 52. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 90 – 140) do flavonol IV



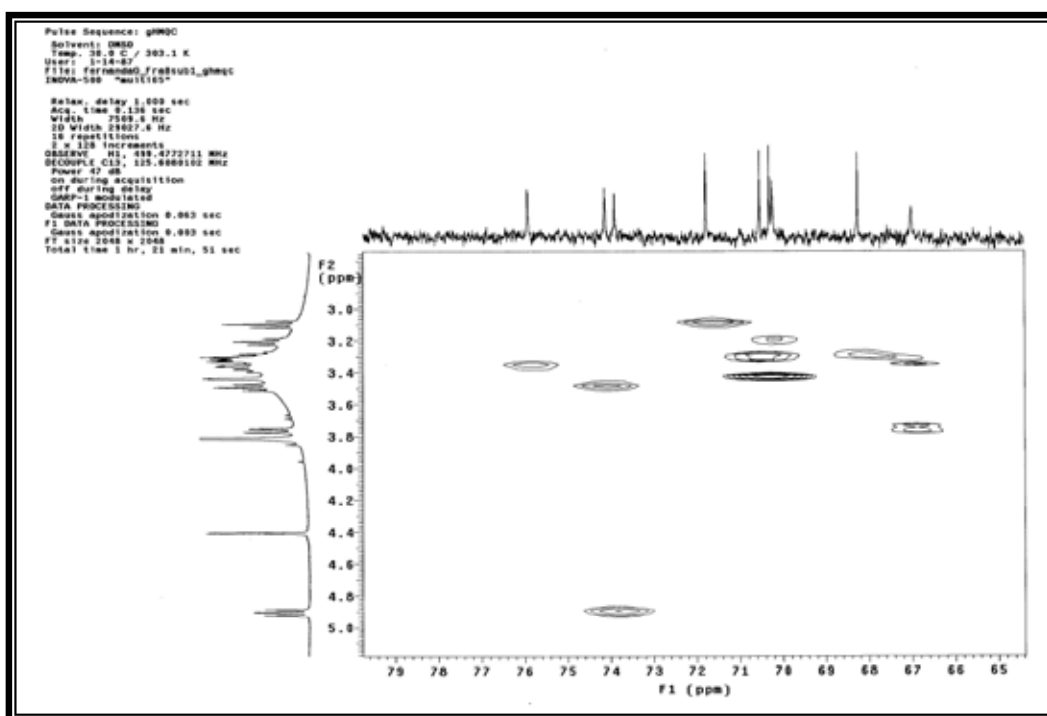
Anexo 53. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (δ 140 – 178) do flavonol IV



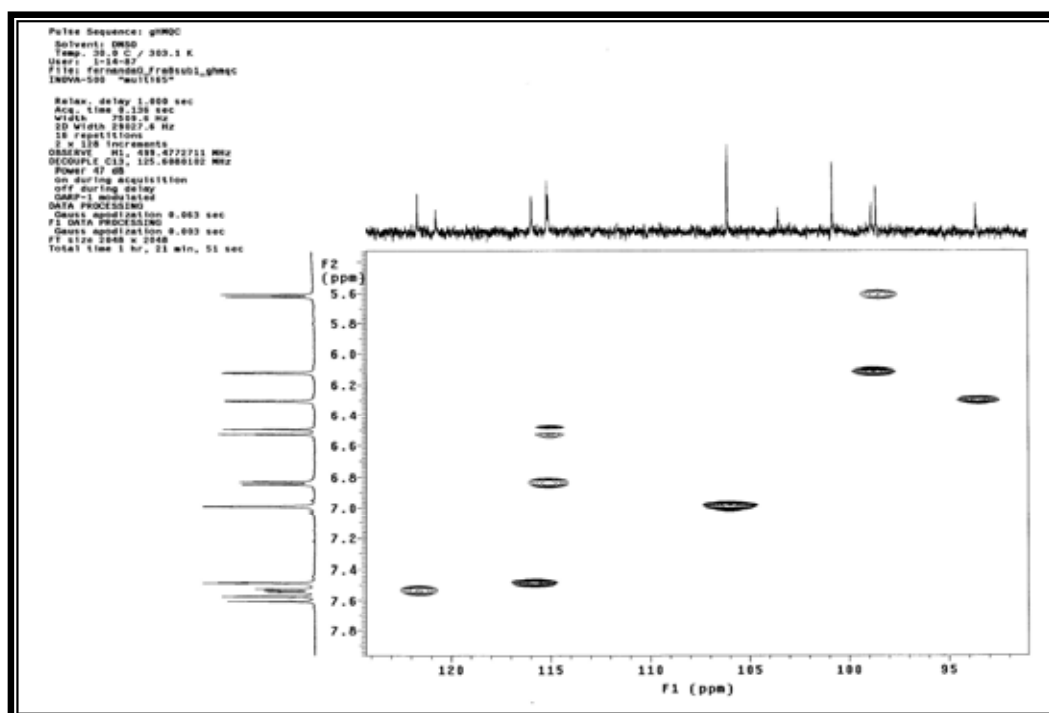
Anexo 54. Mapa de contornos gHMBC do flavonol IV (500 MHz – DMSO- d_6)



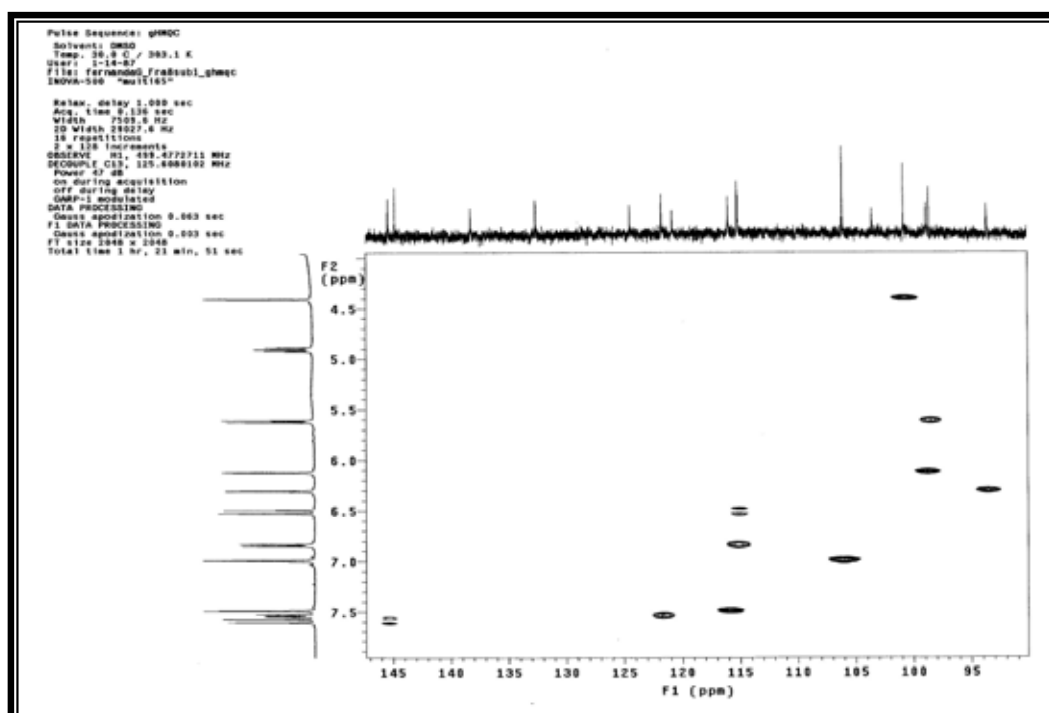
Anexo 55. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 66 – 77) do flavonol IV



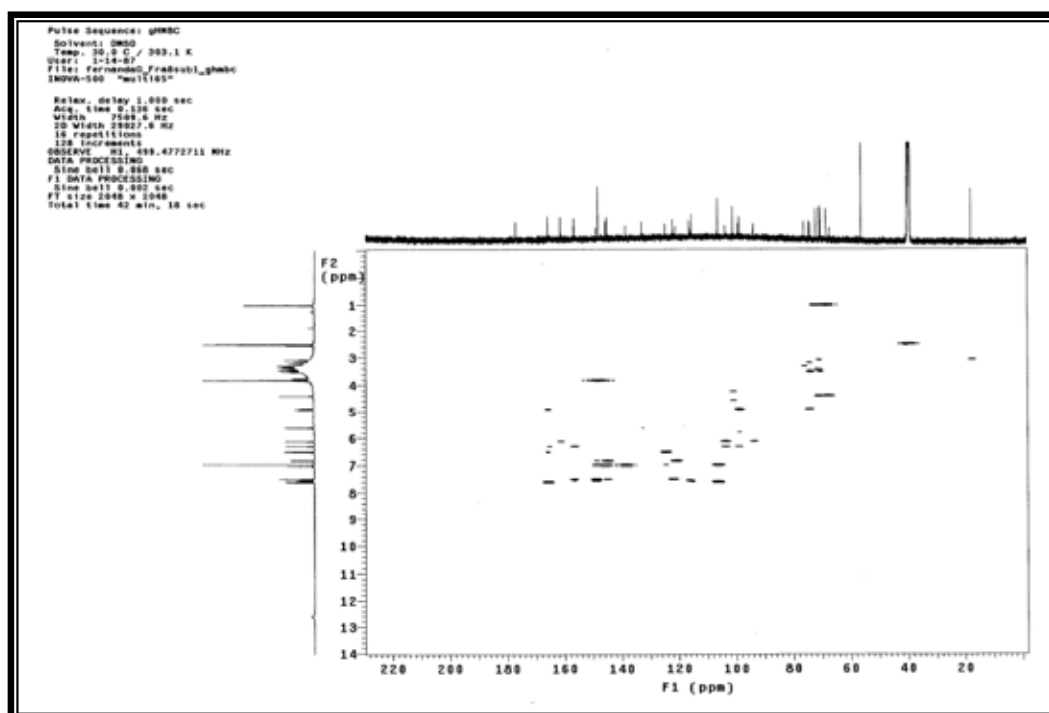
Anexo 56. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 65 – 79) do flavonol IV



Anexo 57. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 90 – 130) do flavonol IV

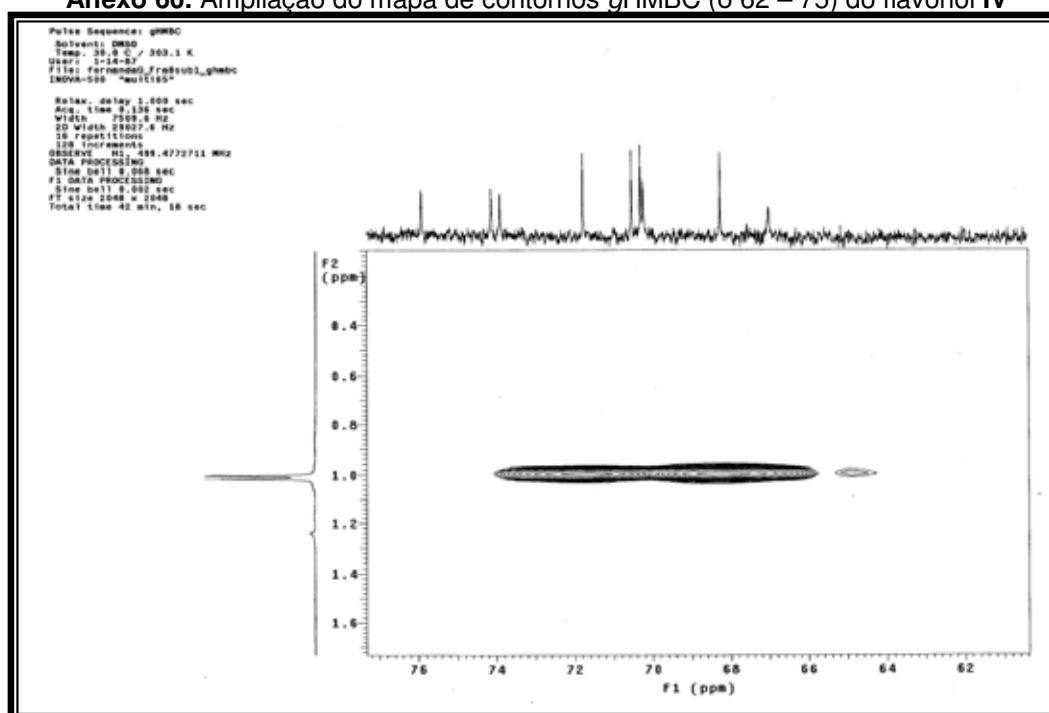


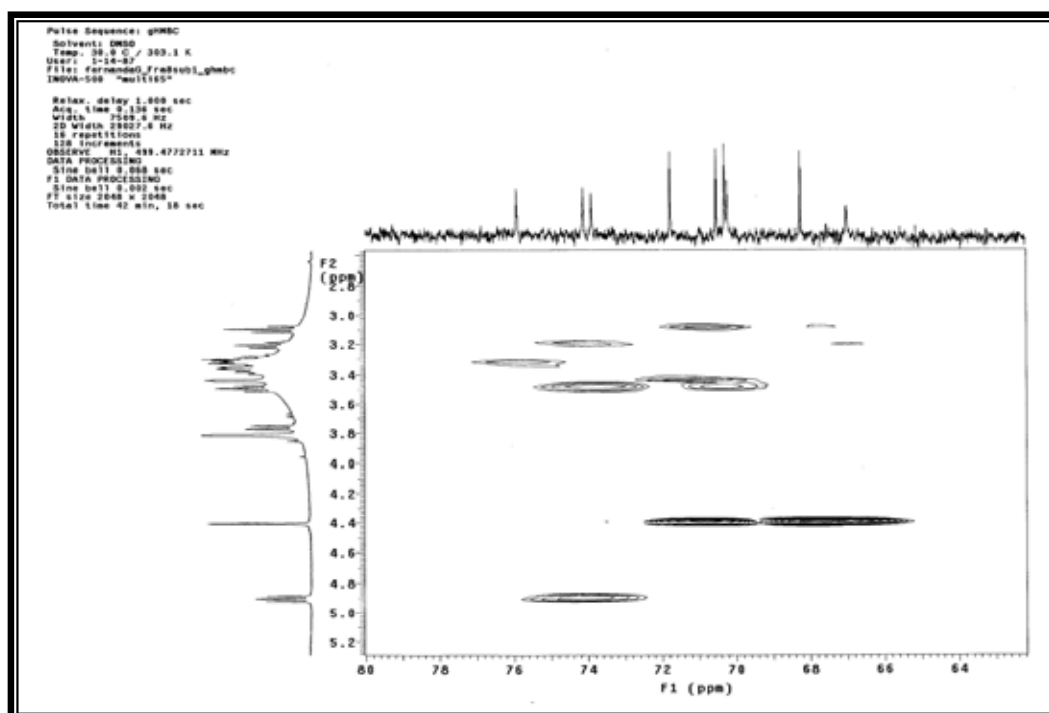
Anexo 58. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 90 – 145) do flavonol IV



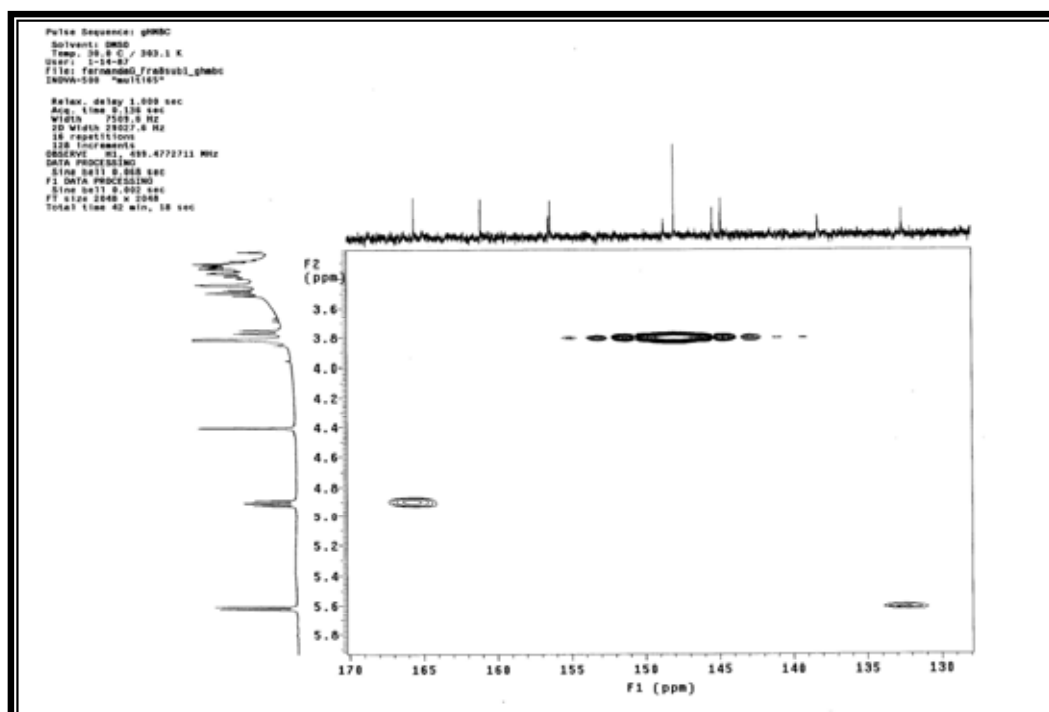
Anexo 59. Mapa de contornos *g*HMBC do flavonol IV (500 MHz – DMSO-*d*₆)

Anexo 60. Ampliação do mapa de contornos *g*HMBC (δ 62 – 75) do flavonol IV

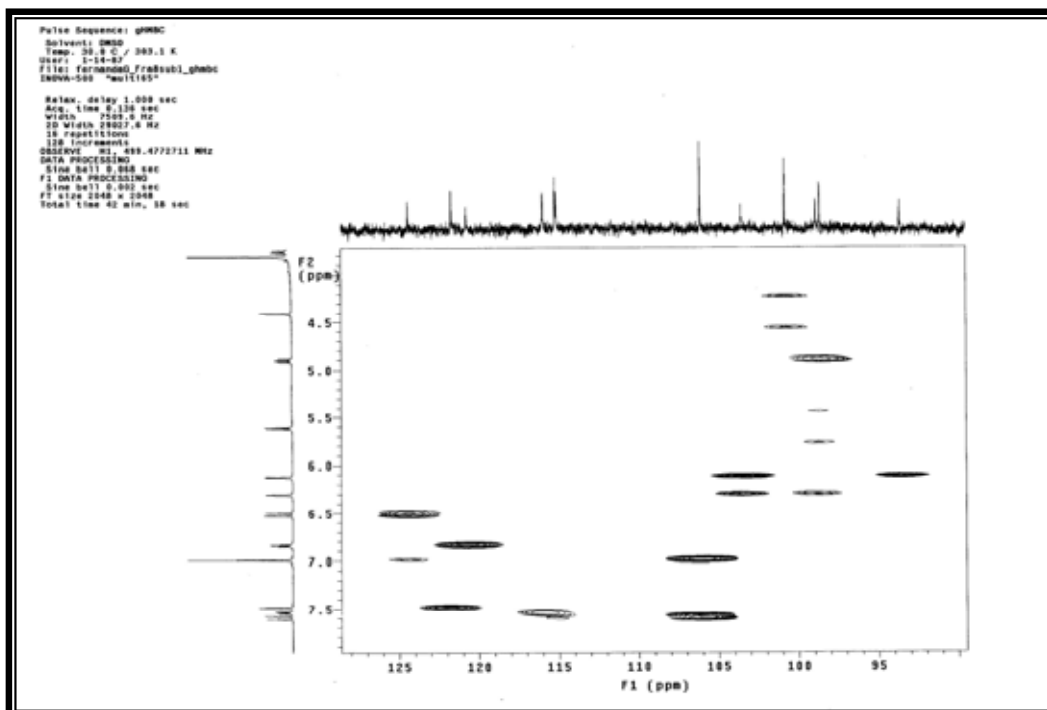




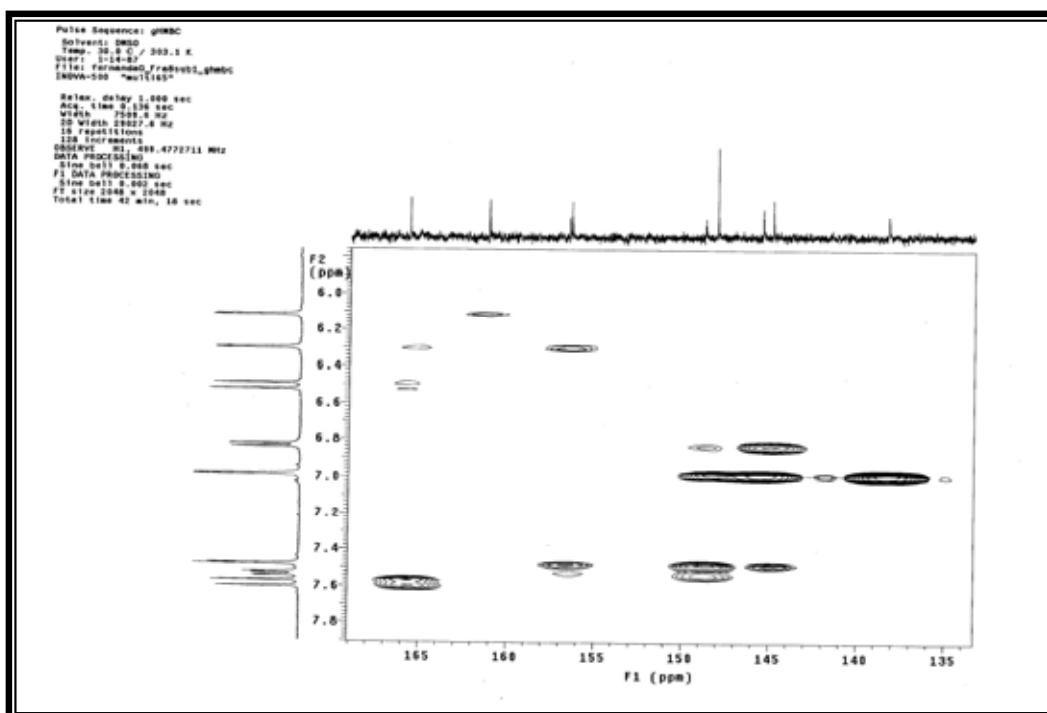
Anexo 61. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 64 – 80) do flavonol IV



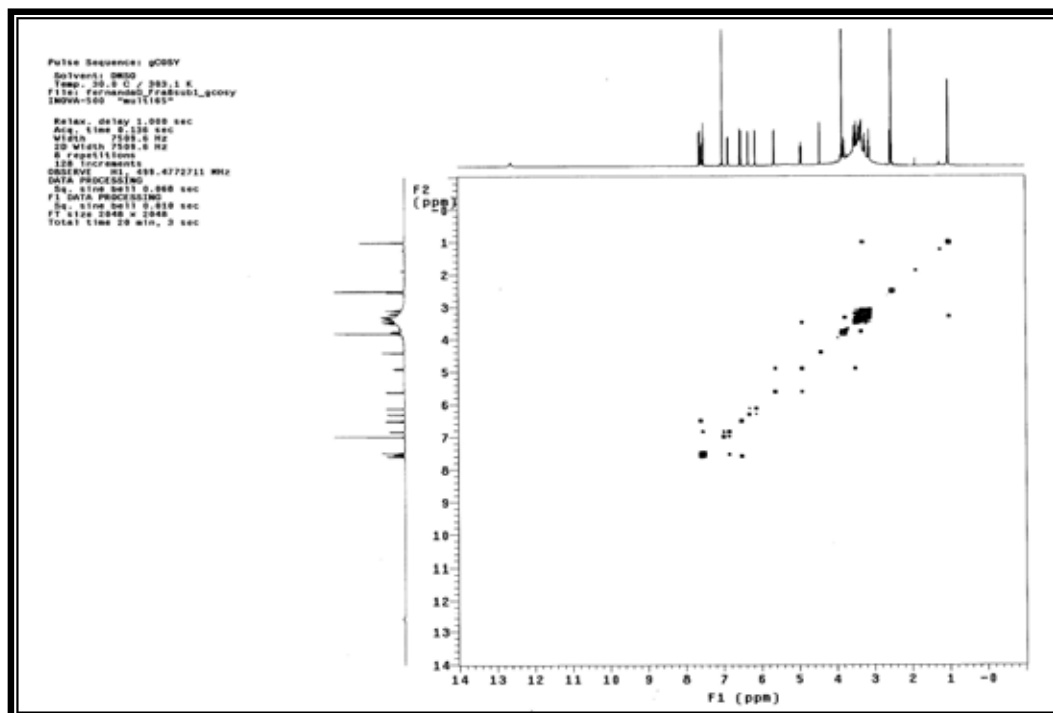
Anexo 62. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 130 – 170) do flavonol IV



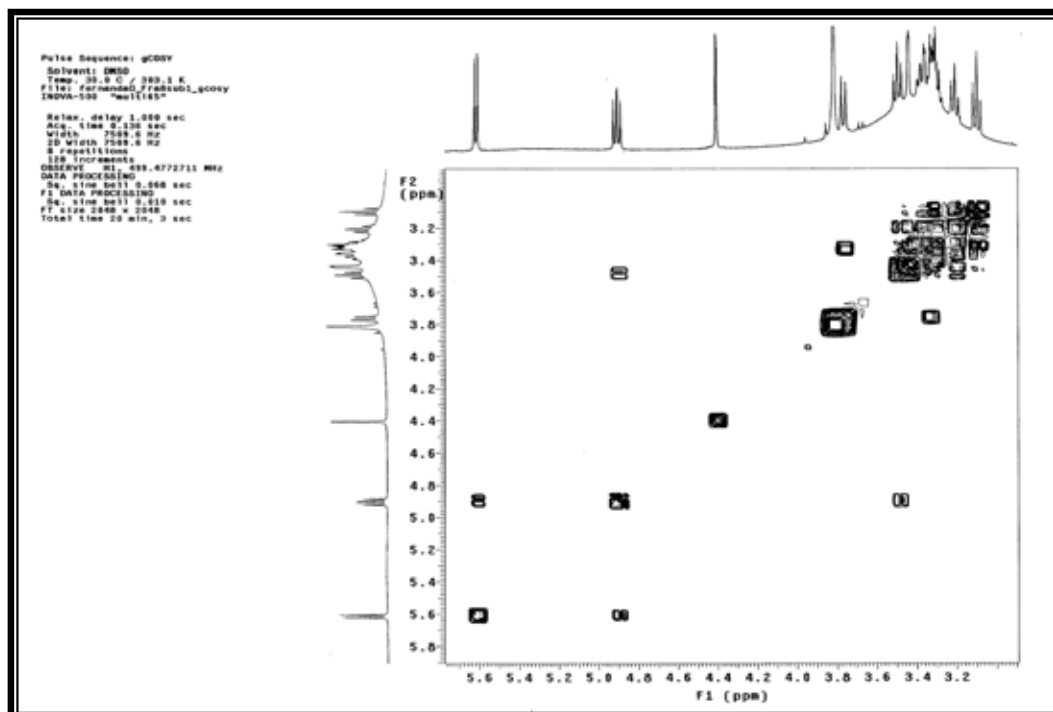
Anexo 63. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 90 – 125) do flavonol IV



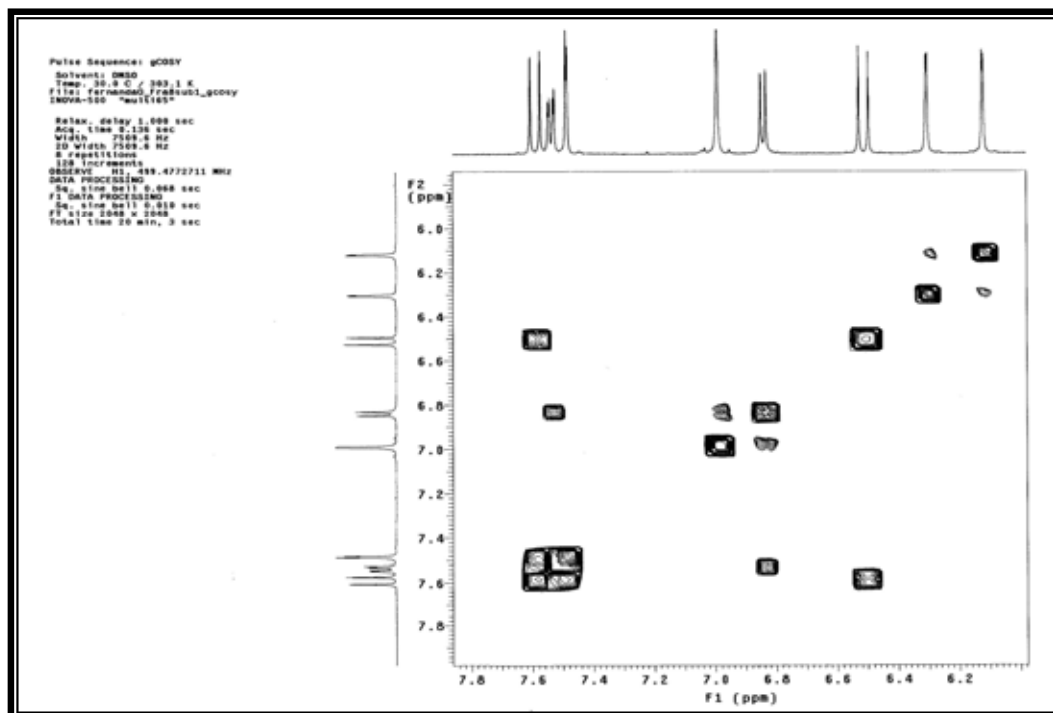
Anexo 64. Ampliação do mapa de contornos gHMBC (δ 135 – 170) do flavonol IV



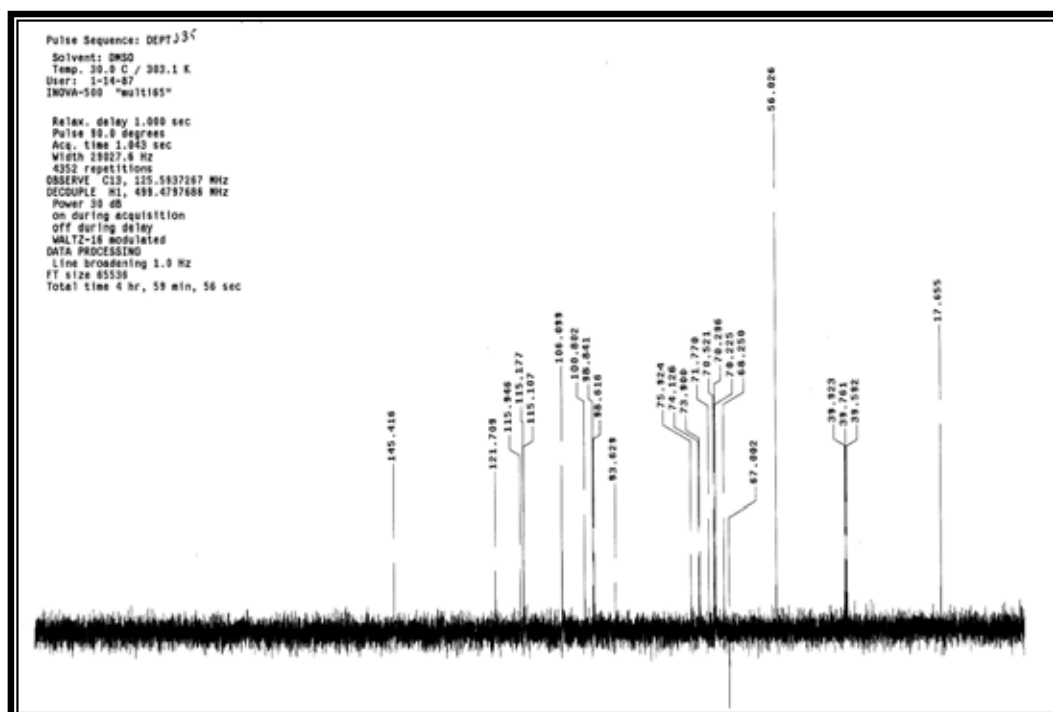
Anexo 65. Mapa de contornos gCOSY do flavonol IV (500 MHz - DMSO- d_6)



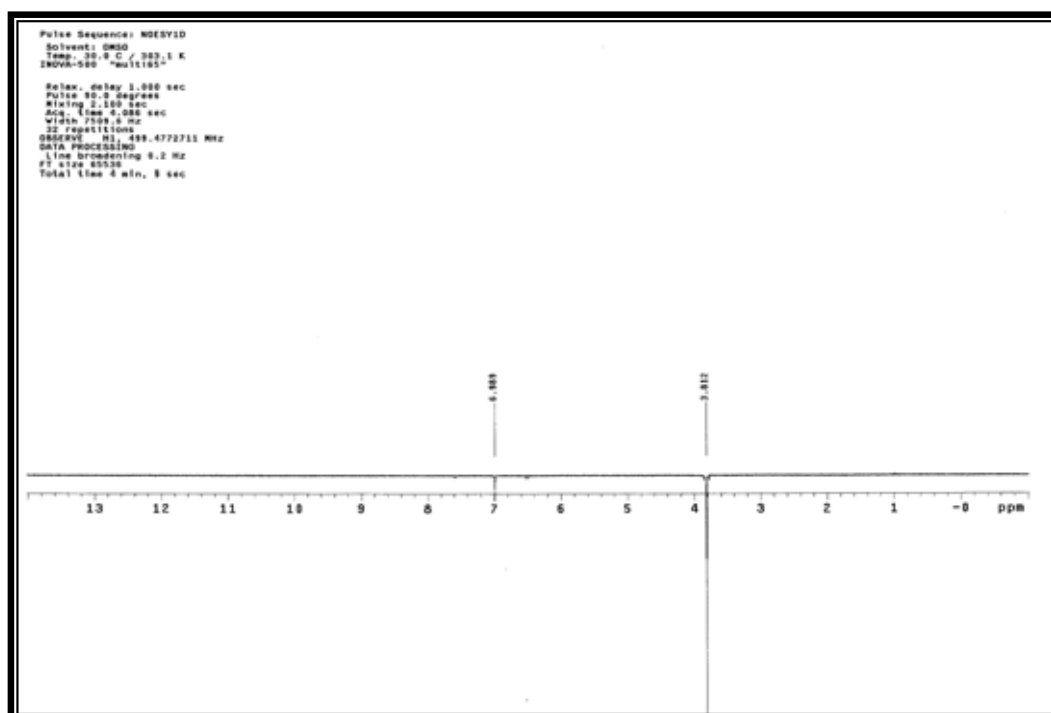
Anexo 66. Ampliação do mapa de contornos gCOSY (δ 3,0 – 5,8) do flavonol IV



Anexo 67. Ampliação do mapa de contornos gCOSY (δ 6,0 – 7,8) do flavonol IV



Anexo 68. Espectro de DEPT 135 ° do flavonol IV (126 MHz – DMSO-*d*₆)



Anexo 69. Espectro de NOESY 1D δ_{H} 3,80 do flavonol **IV** (500 MHz – DMSO- d_6)