

Adriana Candido da Silva Moura

Uso sustentável da biodiversidade brasileira:
Avaliação químico-farmacológica de plantas
superiores: *Indigofera hirsuta* (Fabaceae)

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

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

M929u	Moura, Adriana Candido da Silva Uso sustentável da biodiversidade brasileira : avaliação químico-farmacológica de plantas superiores : <i>Indigofera hirsuta</i> (Fabaceae) / Adriana Candido da Silva Moura. - Araraquara : [s.n], 2010 101 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Lourdes Campaner dos Santos 1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. 3. Flavonoides. 4. Chás. I. Título.
-------	--

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

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

ADRIANA CANDIDO DA SILVA MOURA

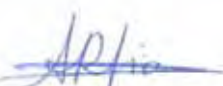
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 19 de fevereiro de 2010.

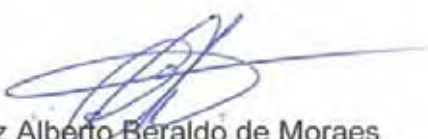
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Wagner Vilegas
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Ângela Regina Araujo
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto

DADOS CURRICULARES

ADRIANA CANDIDO DA SILVA MOURA

Dados pessoais

Nascimento: 29/01/1985
Nacionalidade: Brasileira
Naturalidade: São Paulo-SP
Estado civil: Solteira
Filiação: Ivani Candido da Silva
Ângelo Roberto Ferreira de Moura
Profissão: Química
Endereço Profissional: Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Unesp, Araraquara
R: Francisco Degni, s/n, Quitandinha, CEP: 14800-900
Telefone: (16) 3301-6600 Ramal 6792
Email: adrianacsmoura@yahoo.com.br

Formação acadêmica

Química – Licenciatura plena
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química, Araraquara
03/2003 – 12/2007

Mestrado em Química
Área de concentração: Química Orgânica
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química, Araraquara

Publicações

CALVO, T. R.; CARDOSO, C. R. P.; MOURA, A. C. S.; SANTOS, L. C.; COLUS, I. M. S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity of *Indigofera truxillensis* and *I. suffruticosa* aerial parts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-8, 2009. (online) Disponível em:< <http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/reprint/nep123v1>>

Trabalhos apresentados em Congressos

1. MOURA, A. C. S.; Tomaz, J. C.; Lopes, N. P.; Bolzani, S. S.; Vilegas, W.; Santos, L. C. HPLC-ESI-MS (TOF) to study the infusion and methanolic extract of the aerial parts from *Indigofera hirsuta* (Fabaceae). In: 3º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas – BrMASS, 12 a 15 de dezembro, Campinas-SP, 2009.
2. MOURA, A. C. S.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Compostos nitrogenados isolados de *Indigofera hirsuta*. In: 17º Encontro da Sociedade Brasileira de Química- Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 18 a 20 de outubro, Araraquara-SP, 2009.
3. MOURA, A. C. S.; Rodrigues, C. M.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Estudo fitoquímico de *Indigofera hirsuta* (Fabaceae). In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30 maio a 2 de junho, Fortaleza-CE, 2009.
4. MOURA, A. C. S.; Santos, L. C.; Vilegas, W.; Calvo, T. R. Um novo alcalóide de *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 26 a 29 de maio, Águas de Lindoia-SP, 2008
5. Gomes, C. N.; MOURA, A. C. S.; Calvo, T. R.; Santos, L. C. Estudo Fitoquímico do Extrato Metanólico das partes aéreas de *Indigofera suffruticosa*. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 26 a 29 de maio, Águas de Lindoia-SP, 2008.
6. MOURA, A. C. S.; Calvo, T. R.; Santos, L. C.; Vilegas, W. Estudo químico das partes aéreas de *Indigofera suffruticosa*. In: VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do programa Biota/Fapesp, 8 a 12 de julho, Araraquara-SP, 2008.

7. MOURA, A. C. S.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Estudo Químico do Chá das partes aéreas de *Indigofera suffruticosa*. In: XIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 22 a 26 de outubro, Presidente Prudente, 2007.
8. Calvo, T. R.; MOURA, A. C. S.; Santos, L. C.; Vilegas, W. Chemical Fingerprint of *Alchornea triplinervia* using flow injection electrospray ionisation tandem mass spectrometry. In: 6º International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2 a 5 de setembro, Ribeirão Preto – SP, 2007.
9. Calvo, T. R.; Cardoso, C. R. Pr.; MOURA, A. C. S.; Varanda, E. A.; Vilegas, W. Compounds and mutagenic activity from *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). In: XVI Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, 4 a 8 de setembro, La Plata – Argentina, 2007.
10. MOURA, A. C. S.; Calvo, T. R.; Rinaldo, D.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Perfil químico por HPLC-DAD do extrato metanólico e chá das partes aéreas de *Indigofera suffruticosa*. In: I Simpósio Paulista de Farmacognosia, 4 a 6 de junho, Araraquara, SP, 2007.
11. Calvo, T. R.; MOURA, A. C. S.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Estudo Químico das partes aéreas de *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 22 de maio, Águas de Lindoia-SP, 2006.
12. MOURA, A. C. S.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Alcaloides de *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). (Reapresentação) In: XXXVI Semana da Química, 25 a 29 de setembro, Araraquara - SP, 2006.
13. MOURA, A. C. S.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Alcaloides de *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). In: I Escola de Inverno do Depto. de química da Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 10 a 14 de julho, Ribeirão Preto - SP, 2006.
14. MOURA, A. C. S.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Estudo Químico das partes aéreas de *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). In: XVIII CIC Congresso de Iniciação Científica da Unesp, novembro, Bauru – SP, 2006.
15. MOURA, A. C. S.; Cardoso, P.; Silva, C. S.; Marques, R. N.; Oliveira, O. M. M. F.; Oliveira, L. A. A. Conceitos Prévios dos alunos do Ensino Fundamental sobre o tema Ar e Pressão Atmosférica - Uso da

- experimentação na ressignificação destes conteúdos. In: IV Evento de Educação em Química, 8 de maio, Araraquara – SP, 2006.
16. MOURA, A. C. S.; Calvo, T. R.; Santos, L. C.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Fracionamento e triagem Química de *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). In: XVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 8 e 9 de novembro, Araraquara – SP, 2005.
17. MOURA, A. C. S.; Capana, A. S.; Marques, R. N.; Oliveira, O. M. M. F.; Oliveira, L. A. A. Corantes Naturais: tema gerador para a contribuição de formação de professores. In: III Evento de Educação em Química, 20 de agosto, Araraquara – SP, 2005.
18. MOURA, A. C. S.; Silva, C. S.; Milaré, T.; Cardoso, P.; Schiavetto, M. G.; Giroto, Júnior G.; Rocha, Z. M.; Oliveira, L. A. A.; Marques, R. N.; Oliveira, O. M. M. F. A. Reciclagem de papel como ferramenta para o ensino de química e formação de cidadania. In: XII Encontro Nacional de Ensino de Química ENEQ, 27 a 30 de julho, Goiânia - GO, 2004.
19. Cardoso, P.; MOURA, A. C. S.; Boni, T. C.; Capana, A. S.; Schiavetto, M. G.; Medeiros, J. B.; Oliveira, L. A. A.; Marques, R. N.; Oliveira, O. M. M. F. A. Experimentação: uma ferramenta no ensino de ligações químicas. In: XII Encontro Nacional de Ensino de Química ENEQ, 27 a 30 de julho, Goiânia - GO, 2004.
20. Rocha, Z. M.; Capana, A. S.; MOURA, A. C. S.; Boni T. C.; Oliveira, L. A. A.; Oliveira, O. M. M. F.; Marques R. N. Um exemplo de aprendizagem significativa no ensino da atomística. In: XII Encontro Nacional de Ensino de Química ENEQ, 27 a 30 de julho, Goiânia - GO, 2004.
21. Medeiros, J. B.; Rocha, Z. M.; Schiavetto, M. G.; Giroto, Júnior G.; Silva, C. S.; MOURA, A. C. S.; Miura, C. E.; Oliveira, L. A. A.; Marques, R. N.; Oliveira, O. M. M. F. O Solo como tema organizador de aprendizagens no ensino fundamental. In: XII Encontro Nacional de Ensino de Química ENEQ, 27 a 30 de julho, Goiânia - GO, 2004.
22. Milaré, T.; MOURA, A. C. S.; Capana, A. S.; Medeiros, J. B.; Cardoso, P.; Marques, R. N.; Oliveira, L. A. A.; Oliveira, O. M. M. F. A Química no ensino fundamental como proposta do eixo temático, Tecnologia e

Sociedade dos PCNs. In: XII Encontro Nacional de Ensino de Química
ENEQ, 27 a 30 de julho, Goiânia - GO, 2004.

*Dedico este trabalho aos meus pais
Angelo e Ivani e às minhas irmãs
Andréia, Andreza e Alessandra,
que sempre compreenderam a minha ausência.
Amo vocês.*

Agradecimentos

À Deus.

À minha família por ser o meu alicerce e sempre apoiar as minhas decisões.

À minha orientadora Lourdes Campaner dos Santos por ter confiado no meu trabalho desde a iniciação científica, pelos ensinamentos, dedicação, disposição e amizade.

Ao meu coorientador Wagner Vilegas pelos ensinamentos, apoio, confiança e amizade.

Aos professores do Instituto de Química que contribuíram para minha formação.

Às professoras Ângela Regina Araújo e Isabele Rodrigues Nascimento que participaram do meu exame de qualificação contribuindo com sugestões interessantes para o meu trabalho.

Aos professores e alunos do nosso grupo de Produtos Naturais pelos ensaios farmacológicos.

Ao Nivaldo pelos ensinamentos, pelos espectros de RMN, pela convivência e amizade.

Aos funcionários do IQ em especial as meninas da seção de pós-graduação, por serem sempre atenciosas.

Às funcionárias da biblioteca pela colaboração.

Ao José C. Tomáz, pelos espectros de massas, dedicação e amizade.

Aos graduandos e pós-graduandos do IQ pela convivência.

Aos meus amigos de laboratório Aninha, Carolzinha, Jenildo, Carlos, Michelle, Guilherme, Rodrigo, Leonardo, Juliana Greb, Felipe, Juliana Moreno, Marina, Mayara, Tiago Nakamura, Júlia, Raissa, Fabiano, Ana Lúcia, Viviane, Clenilson, Daniel, Tati, Portes, Marcelo, Márcio, em especial Mariana, Juliana Rodrigues e Juliana Severi pelos diversos momentos juntos.

À Carol Gomes e Tiago, pela dedicação, empenho e amizade.

À Tamara, que me despertou o interesse pela fitoquímica, me ensinando os primeiros passos.

Às minhas amigas “Orgânicas” Rose, Daniara, Patrícia, Alessandra e Marília pelos estudos compartilhados, às muitas risadas e amizade.

Aos meus amigos “Inorgânicos” Jorge, Flávia, Igor, Renata e Marco pela contribuição e amizade.

À minha amiga e companheira de república Sheila Pasqualotto, pelos anos de convivência e amizade.

A todos os meus amigos que sempre me ouviram rir e chorar.

Ao Prof. Dr. Adalberto Farache Filho, pela compreensão enquanto eu redigia a dissertação.

À FAPESP e à Capes pelo suporte financeiro.

Resumo

As plantas medicinais utilizadas no tratamento de diversas doenças são fontes de uma infinidade de novas moléculas de interesse para a humanidade. Este trabalho investigou a composição química das partes aéreas do chá e do extrato metanólico de *Indigofera hirsuta* (Fabaceae), popularmente conhecida como “anileira” e encontrada no Cerrado brasileiro. O chá foi fracionado por cromatografia de permeação em gel e cromatografia líquida de média pressão, tendo-se isolado: kaempferol, ácido protocatecuico, kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo, triptofano e uracila. O extrato metanólico foi fracionado por cromatografia líquida de alta pressão, que possibilitou o isolamento de: ácido gálico, galato de metila, rutina e kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo. As substâncias foram identificadas por técnicas espectroscópicas (UV, IV e RMN) e as estruturas confirmadas pelo uso da técnica acoplada de HPLC-DAD-ESI-MS. O chá, extrato metanólico e as substâncias isoladas foram avaliados quanto à atividade antioxidante, utilizando-se DPPH. O extrato metanólico apresentou significativa atividade antioxidante, enquanto que o chá não apresentou atividade antioxidante considerável, quando comparados com o padrão ácido gálico. Das substâncias isoladas, o galato de metila apresentou a maior atividade antioxidante. O chá de *I. hirsuta* foi também avaliado quanto à atividade gastroprotetora em lesões induzida por etanol absoluto em 3 diferentes doses: 125 mg.Kg⁻¹, 250 mg.Kg⁻¹ e 500 mg.Kg⁻¹, sendo a menor dose a que apresentou melhor efeito. Contudo, o chá de *Indigofera hirsuta* não apresentou atividade gastroprotetora.

Palavras-chave: *Indigofera hirsuta*. Chá. Flavonoides. Fabaceae.

Abstract

Medicinal plants used in the treatment of various diseases and are source of many new molecules. This work investigates the chemical composition of the aerial parts of the infusion and methanol extract of *Indigofera hirsuta* (Fabaceae), popularly known as “anileira” and found in the Brazilian Cerrado. The infusion was fractionated by gel permeation chromatography and medium pressure liquid chromatography, it was possible to isolate kaempferol, protocatechuic acid, kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside, tryptophan and uracil. The methanol extract was fractionated by high pressure liquid chromatography, which allowed the isolation of gallic acid, methyl gallate, rutin and kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside. The substances were identified by spectroscopic techniques (UV, IR and NMR) and confirmed by the use of HPLC-DAD-ESI-MS coupling. The infusion, methanol extract and isolated compounds were evaluated for their antioxidant activity using DPPH. The methanol extract showed significant antioxidant activity, while the tea did not show significant antioxidant activity, when compared to gallic acid. Among the isolated substances methyl gallate presented the highest antioxidant activity. The *I. hirsuta* was also evaluated for its gastroprotective activity in lesions induced by absolute ethanol in 3 different doses (125 mg.Kg⁻¹, 250 mg.Kg⁻¹ and 500 mg.Kg⁻¹). The lowest dose showed the best effect. However, the infusion not active gastroprotective.

Keywords: *Indigofera hirsuta*. Tea. Flavonoids. Fabaceae.

Lista de abreviaturas

AcOEt -	Acetato de Etila
ACN –	Acetonitrila
CCDC –	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
DCCC –	Droplet Counter-Current Chromatography
<i>d</i> –	dublete
<i>dd</i> –	duplo dublete
<i>ddd</i> –	duplo duplo dublete
d.i. –	diâmetro interno
DMSO –	Dimetilsulfóxido
EM –	Espectrometria de massas
EMeOH –	Extrato metanólico
δ –	deslocamento químico
gli -	glicose
GPC –	Gel Permeation Chromatography
<i>g</i> HMBC –	<i>Gradient</i> Heteronuclear Multiple Bond Correlations
<i>g</i> HMQC -	<i>Gradient</i> Heteronuclear Multiple Quantun Coherence
<i>g</i> COSY -	<i>Gradient</i> Correlated Spectroscopy
HPLC-DAD –	High Performance Liquid Chromatography-Detector de Arranjo Diodo
HPLC-ESI-MS (TOF) -	High Performance Liquid Chromatography-Electrospray ionization-Mass spectrometry (Time of Flight)
HSCCC –	High Speed Counter Current Chhromatography
Ih –	<i>Indigofera hirsuta</i>
IV –	Infravermelho
<i>J</i> –	constante de acoplamento
<i>m</i> –	multiplete
<i>m/z</i> –	relação massa carga
MeOH –	Metanol
MPLC –	Medium Performace Liquid Chromatography
NP/PEG –	Difenilaminoborato/polietilenoglicol
MS -	Mass spectrometry
<i>n</i> -PrOH –	<i>n</i> -propanol
<i>n</i> -BuOH -	<i>n</i> -butanol
PA -	Padrão Analítico

PTFE -	Politetrafluoretileno
R_f –	Retention factor (Fator de retenção)
RMN –	Ressonância Magnética Nuclear
s –	singleto
TFA -	Ácido trifluoroacético
TMS –	Tetrametilsilano
t_r -	Tempo de retenção
TOCSY -	Total correlation spectroscopy
UV-	Ultravioleta
v -	Volume

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Indigofera hirsuta</i>	29
Figura 2. Mapa do Cerrado brasileiro. (disponível em: < http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/meio-ambiente-cerrado/cerrado-brasileiro-2.php > acesso em jan/2010).	30
Figura 3. Esquema geral simplificado de formação do flavonol quercetina (DEWICK, 1997).....	31
Figura 4. Flavonóis com atividades biológicas (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).....	32
Figura 5. Cromatogramas dos extratos de <i>I. hirsuta</i> e espectros de absorção no UV dos picos mais intensos: A) Precipitado amarelo; B) Extrato aquoso; C) EMeOH.....	44
Figura 6. Análise comparativa por CCDC de lh1 com o padrão quercetina. [Sílica gel; CHCl ₃ /MeOH (9:1, v/v)].....	46
Figura 7. Cromatograma do precipitado amarelo e identificação de lh1 e lh2 na caracterização deste.	47
Figura 8. Rendimento das extrações líquido-líquido com: A) AcOEt e B) <i>n</i> -BuOH.	48
Figura 9. CCDC da Fração G.	49
Figura 10. CCDC das frações obtidas da purificação da Fração D por MPLC.	49
Figura 11. Cromatograma do Extrato aquoso e identificação de lh3, lh4 e lh5	50
Figura 12. Cromatograma do EMeOH e identificação de lh3, lh6, lh7 e lh8 . .	51
Figura 13. Análise do padrão galato de metila por HPLC.....	74
Figura 14. Análise do padrão rutina por HPLC (<i>t_r</i> igual a 31,4 min).....	75
Figura 15. Cromatogramas obtidos por HPLC-MS, modo positivo.	80
Figura 16. Fragmentação Retro Diels-Alder do Kaempferol (lh1).....	87
Figura 17. Estrutura do DPPH.	88
Figura 18. Estrutura da forma reduzida do DPPH.	88
Figura 19. Resultado da avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>Indigofera hirsuta</i>	89

Figura 20. Resultado da avaliação da atividade antioxidante das substâncias isoladas de *Indigofera hirsuta*..... 90

Figura 21. Ensaio da atividade antiúlcera do chá de *Indigofera hirsuta*. 92

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estudos de algumas espécies de <i>Indigofera</i> descritos na literatura (CALVO, 2007).....	28
Tabela 2. Tempo de retenção e $\lambda_{\text{máximos}}$ de absorção das substâncias presentes nos extratos analisados.	45
Tabela 3. Frações do extrato aquoso obtidas após análise por CCDC, técnica cromatográfica de purificação e substâncias isoladas.	48
Tabela 4. Avaliação dos tempos de retenção e absorção no UV das substâncias isoladas de <i>I. hirsuta</i>	51
Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do Kaempferol (Ih1).....	53
Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ácido protocatecuico (Ih2).	57
Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) e ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo (Ih3).....	61
Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do Triptofano (Ih4).....	65
Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e ^1H (DMSO- d_6 , 500MHz) da Uracila (Ih5).	69
Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) da rutina (Ih8).....	78
Tabela 11. Dados espectrométricos das substâncias identificadas no EMeOH de <i>I. hirsuta</i>	83

Lista de fluxogramas

Fluxograma 1. Preparação dos extratos de <i>Indigofera hirsuta</i>	39
Fluxograma 2. Fracionamento do precipitado amarelo.	47

Lista de Espectros

Espectro 1. Espectro de absorção no UV do kaempferol (lh1).	52
Espectro 2. Espectro no IV do Kaempferol (lh1).	52
Espectro 3. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do kaempferol (lh1).	54
Espectro 4. Experimento bidimensional <i>g</i> HMQC (DMSO- d_6 , 125 MHz) do kaempferol (lh1).	54
Espectro 5. Experimento bidimensional <i>g</i> HMBC (Ampliação da região entre δ 6,0 - 8,5) (DMSO- d_6 , 125 MHz) do kaempferol (lh1).	55
Espectro 6. Espectro de absorção no UV do ácido protocatecuico (lh2).	55
Espectro 7. Espectro no IV do ácido protocatecuico (lh2).	56
Espectro 8. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ácido protocatecuico (lh2).	57
Espectro 9. Experimento bidimensional <i>g</i> HMQC (DMSO- d_6 , 125 MHz) do ácido protocatecuico (lh2).	58
Espectro 10. Experimento bidimensional <i>g</i> HMBC (DMSO- d_6 , 125 MHz) do ácido protocatecuico (lh2).	58
Espectro 11. Espectro de absorção no UV do Kaempferol-3-O- β -D- glucopiranosideo (lh3).	59
Espectro 12. Espectro no IV do Kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo (lh3).	60
Espectro 13. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) do kaempferol-3- O- β -D-glucopiranosideo (lh3).	62
Espectro 14. Experimento TOCSY-1D (DMSO- d_6 , 300 MHz) do kaempferol-3- O- β -D-glucopiranosideo (lh3).	62
Espectro 15. Experimento bidimensional <i>g</i> COSY (DMSO- d_6 , 300 MHz) do kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo (lh3).	63
Espectro 16. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 300 MHz) do kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo (lh3).	63
Espectro 17. Espectro de absorção no UV do Triptofano (lh4).	64
Espectro 18. Espectro no IV do Triptofano (lh4).	64
Espectro 19. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do Triptofano (lh4).	66

Espectro 20. Experimento bidimensional <i>g</i> COSY (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz) do Triptofano (Ih4).....	66
Espectro 21. Experimento bidimensional <i>g</i> HMQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz) do Triptofano (Ih4).....	67
Espectro 22. Experimento bidimensional <i>g</i> HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz) do Triptofano (Ih4).....	67
Espectro 23. Espectro de absorção no UV da Uracila (Ih5).....	68
Espectro 24. Espectro no IV da Uracila (Ih5).	68
Espectro 25. Espectro de RMN de ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz) da Uracila (Ih5). 70	
Espectro 26. Experimento bidimensional <i>g</i> COSY (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz) da Uracila (Ih5).....	70
Espectro 27. Experimento bidimensional <i>g</i> HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz) da Uracila (Ih5).....	71
Espectro 28. Espectro de RMN de ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 50 MHz) da Uracila (Ih5). 71	
Espectro 29. Espectro de absorção no UV do ácido gálico (Ih6).	72
Espectro 30. Espectro no IV do ácido gálico (Ih6).	72
Espectro 31. Espectro de absorção no UV do galato de metila (Ih7).....	73
Espectro 32. Espectro no IV do galato de metila (Ih7).	73
Espectro 33. Espectro de RMN de ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz) do galato de metila (Ih7).....	74
Espectro 34. Espectro de absorção no UV da rutina (Ih8).	75
Espectro 35. Espectro no IV da rutina (Ih8).	76
Espectro 36. Espectro de RMN de ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz) da rutina (Ih8)... 77	
Espectro 37. Espectro de massas (<i>M</i> s ²) da Uracila (Ih5).....	81
Espectro 38. Espectros de massas (<i>M</i> s ²) do Triptofano (Ih4) em diferentes energias.....	82
Espectro 39. Espectros de massas do Ácido gálico (Ih6) em diferentes energias (0 eV, 5 eV, 7 eV e 10 eV).....	83
Espectro 40. Espectros de massas do Galato de metila (Ih7) em diferentes energias (0 eV, 5 eV, 7 eV e 10 eV).....	84
Espectro 41. Espectros de massas da rutina (Ih8) em diferentes energias (0 eV, 10 eV, 20 eV e 30 eV).....	85
Espectro 42. Espectros de massas do Kaempferol-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopiranosideo (Ih3) em diferentes energias (0 eV, 10 eV, 20 eV e 30 eV).....	86

Espectro 43. Espectros de massas do Kaempferol (Ih1) em diferentes energias (0 eV, 10 eV, 25 eV e 30 eV).....	87
--	----

Sumário

1. Introdução	24
1.1 Plantas Medicinais e Fitoterápicos.....	24
1.2 Chás Medicinais.....	26
1.3 <i>Indigofera</i> (Fabaceae)	27
1.5 Flavonóides	31
2. Objetivos	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
3. Materiais e equipamentos	35
4. Desenvolvimento, resultados e discussões.....	38
4.1 Coleta do Material Vegetal e preparo dos extratos.....	38
4.2 Caracterização HPLC- DAD	40
4.3 Fracionamento dos extratos	46
4.3.1 Precipitado amarelo.....	46
4.3.2 Extrato aquoso	48
4.3.3 Extrato metanólico.....	50
4.4 Identificação estrutural.....	52
4.4.1 Kaempferol (Ih1)	52
4.4.2 Ácido protocatecuico (Ih2).....	55
4.4.3 Kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosídeo (Ih3)	59
4.4.4 Triptofano (Ih4)	64
4.4.6 Ácido gálico (Ih6).....	72
4.4.7 Galato de metila (Ih7)	73
4.4.8 Rutina (Ih8).....	75
5. Análise dos extratos por HPLC-DAD-ESI-MS (TOF).....	79
5.1 HPLC-DAD-ESI-MS (TOF).....	79
5.2 Inserção direta de amostra	86
6. Atividade antioxidante com DPPH.....	88
7. Atividade Antiúlcera.....	92
8. Considerações Finais.....	93

1 Introdução

1.1 Plantas Medicinais e Fitoterápicos

O uso de plantas no tratamento de doenças conhecido como fitoterapia é milenar. A fitoterapia, palavra de origem grega [fhtoi (planta) + qerapa (tratamento)] (MIGUEL; MIGUEL, 2004), surgiu do contínuo uso de plantas partindo-se de conhecimentos empíricos baseados na observação da natureza e no comportamento dos animais, sendo essas informações acumuladas no decorrer do tempo e transmitidas de geração a geração e utilizadas pelas comunidades (DI STASI, 1996).

O conhecimento popular sobre o uso de plantas é de extrema importância no sentido de orientar a busca por substâncias ativas que darão origem a novos medicamentos. O Brasil apresenta um grande potencial fitoterápico, pois além da extensa biodiversidade há ainda uma herança cultural de grande relevância devido influência de diversas populações (indígena, europeia, africana) que dispõem de amplo conhecimento sobre as plantas, sendo a população brasileira privilegiada nesse sentido (VIEIRA, 2007).

As plantas medicinais utilizadas em todos os continentes principalmente nos países em desenvolvimento apresentam uma grande importância econômica, uma vez que parte significativa da população tem acesso limitado aos medicamentos industrializados (AGRA et al., 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde 65 a 80% da população mundial utilizam plantas com finalidades terapêuticas mesmo com o desenvolvimento da indústria farmacêutica e o surgimento de novos medicamentos sintéticos (ILHA et al., 2008). Logo, percebemos uma crescente utilização de plantas no tratamento de diversos males (MIGUEL; MIGUEL, 2004).

Muitos dos benefícios proporcionados pelas plantas devem-se a substâncias com propriedades antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, como por exemplo os flavonoides encontrados em inúmeras plantas (SULTANA; ANWAR, 2008). Esses compostos protegem o organismo de reações oxidativas que podem causar uma série de doenças como problemas

do coração e câncer, portanto, é de extrema importância conhecer a origem desses antioxidantes naturais (LI et al., 2008).

Porém, existe a preocupação com o uso inadequado dessas plantas que por diversas vezes pode apresentar algum grau de toxicidade, como o caso do confrei (*Symphytum officinalis*), que durante muito tempo era utilizado no combate a diversos problemas de saúde, inclusive o câncer, e que após estudo químico e toxicológico descobriu-se que continha substâncias (alcaloides) extremamente tóxicas para o fígado, o que levou a proibição de seu uso interno (VILEGAS; CARDOSO, 2007), ou como, por exemplo, o chá das folhas de graviola (*Anona muricata* L.) que pode provocar problemas no pâncreas, podendo causar a diabetes (VIEIRA, 1992).

Sendo assim, é de extrema importância o conhecimento da composição química e da atividade farmacológica dessas plantas para que se possa estabelecer critérios e metodologias de análise, controle de qualidade e preparo de formulações fitoterápicas.

Devido ao crescimento do uso dos fitoterápicos surgiu a necessidade de padronização desses medicamentos originários de plantas, sendo necessário o conhecimento prévio dos princípios ativos presente nas formulações fitoterápicas. Para tanto a Legislação de Fitoterápicos vem sendo reformulada desde a primeira edição da Farmacopeia Brasileira (1929). Atualmente a resolução da ANVISA RDC nº 48 de 16 de março de 2004 estabelece algumas definições dentre elas a de *“fitoterápico: medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento e eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são avaliadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecno-científicas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais”*. Além disso, esse fitoterápico deve ser registrado e possuir uma série de documentos contendo as informações necessárias para

assegurar sua qualidade e evitar resultados indesejáveis (VILEGAS; CARDOSO, 2007).

As plantas medicinais são frequentemente consumidas pela população na forma de chás medicinais (WANG; PROVAN; HELLIWELL, 2000), portanto, o estudo químico e farmacológico de chás medicinais é de grande relevância.

1.2 Chás Medicinais

Chás medicinais são consumidos mundialmente, principalmente na Índia, China, Japão e Indonésia, a eles são atribuídas propriedades antioxidante e anticarcinogênica. O primeiro a ser consumido como chá medicinal foi o chá das folhas de *Camellia sinensis*, (WANG; PROVAN; HELLIWELL, 2000).

Os chás medicinais são classificados em 3 tipos (de acordo com tratamento realizados com as folhas): **Verde** (as folhas são apenas secas imediatamente após colheita, evitando, assim, a fermentação); **Preto** (as folhas sofrem um processo de fermentação em tanques fechados, depois elas são aquecidas e desidratadas); **Oolong** (as folhas são secas após a colheita, depois são levadas ao processo de fermentação, porém, este é interrompido no início) (WANG; PROVAN; HELLIWELL, 2000).

Diferentes classes de produtos naturais foram encontradas em chás: alcaloides, compostos voláteis, polifenóis (flavanoides e seus glicosídeos, ácidos fenólicos e ésteres, ácidos clorogênicos, teaflavinas, tearubiginas), pigmentos não fenólicos, aminoácidos, metais e vitaminas (FINGER; KURH; ENGELHARDT, 1992).

Estudos de chás verdes e chás pretos demonstraram que estes apresentam propriedades anticarcinogênica (WEISBURGER et al., 1996). Os mesmos autores atribuem estas propriedades a polifenóis identificados nestes tipos de chás: para o chá verde epigallocatequinas, enquanto que no chá preto foram identificadas teaflavinas e tearubinas.

Price, Rhodes e Barnes (1998) avaliou a distribuição de flavonoides glicosilados em onze tipos de chás, concluindo que os derivados glicosilados da quercetina são encontrados em maior quantidade em todos os tipos de chás, seguidos pelos derivados glicosilados do kaempferol e por último dos derivados glicosilados da miricetina. As agliconas existem em menor quantidade em todos os tipos de chás analisados.

Estudos realizados com o chá de espécies de *Indigofera* demonstraram que este apresenta atividade antitumoral (VIEIRA et al., 2006), antimicrobiana (LEITE et al., 2006) e embriotóxica (LEITE et al., 2004).

1.3 *Indigofera* (Fabaceae)

Para a família Fabaceae (Leguminosae) estão descritos aproximadamente 482 gêneros e cerca de 12000 espécies de ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais. Os principais gêneros estão distribuídos em 31 subfamílias, das quais pode-se citar Indigofereae, que possui espécies de *Indigofera* com importância medicinal (DI STASI; HIRUMALIMA, 2002).

O gênero *Indigofera* apresenta cerca de 700 espécies herbáceas e arbustivas que ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente na África, ocorrendo na Austrália, Argentina, China, Índia, Panamá, sudeste asiático e Tailândia. No Brasil foram identificadas 11 espécies, sendo algumas delas amplamente distribuídas no estado de São Paulo (MOREIRA; AZEVEDO TOZI, 1997; BARROS; TEIXEIRA, 2008).

Várias espécies deste gênero já foram estudadas química e farmacologicamente, sendo encontrados como metabolitos ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, nitrocompostos (CALVO, 2007), e apresentaram diversas atividades farmacológicas (**Tab. 1**) (CALVO, 2007; BARROS; TEIXEIRA, 2008).

Tabela 1. Estudos de algumas espécies de *Indigofera* descritos na literatura (CALVO, 2007).

Espécie	Sustância	Atividade Farmacológica
<i>I. aspalathoides</i>	Indigocarpana, mucronulatol, flavona glicosilada	anti-inflamatória, hepatoproteção, antitumoral, anti-hipoglicemiante
<i>I. dendroides</i>		gastrointestinal
<i>I. daleoides</i>		antidiarreica
<i>I. endecaphylla</i>	3-nitropropionato, 3-nitropropionato de etila, ácido 3-nitropropanóico, ácido succínico, metilglucopiranosídeo	antiparasitária para plantas, tóxica
<i>I. hartwegii</i>	indicana, apigenina, rutina, hesperidina	antiespasmódica
<i>I. hirsuta</i>	kaempferol 3,5-digalactosídeo	antiparasitária para plantas
<i>I. lespedezioides</i>		antiulcerogênica
<i>I. microcarpa</i>	taninos, flavanonas, esteróides, terpenóides, saponinas, 2-aril-3-metilbenzofuranos, 2-(2'-hidroxi-4'-metoxifenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano, 2-(2'-hidroxi-4'-metoxifenil)-3-metil-5,6-dioximetilenebenzofurano	antimicrobiana
<i>I. pulchra</i>		antiofídica
<i>I. suffruticosa</i>	Índigo, pinitol, sitosterol e lousifieserone, glicosídeos do ácido 3-nitropropanóico	antioxidante e antiulcerogênica, antitumoral, anti-inflamatória, embriotoxicidade, antimicrobiana, antiparasitária para plantas, tóxica, estimulante do sistema nervoso central,
<i>I. tinctoria</i>	flavonóides glicosilados e furano-flavonóides, rotenóides, histamina	anti-hipoglicemiante, hepatoproteção, antiparasitária para plantas, antiparasitária para seres humanos
<i>I. truxillensis</i>		antioxidante e antiulcerogênica, antiparasitária para plantas

Indigofera hirsuta (**Fig. 1**) (anileiro) é classificada como subarbusto, que ocorre predominantemente em Cerrado. Existe em diversos Estados brasileiros sendo amplamente distribuída no Estado de São Paulo (MOREIRA; AZEVEDO TOZI, 1997). Existem poucos estudos de *Indigofera hirsuta* na literatura (**Tab. 1**).



Figura 1. *Indigofera hirsuta*

A) Fonte: disponível em: <http://florabase.dec.wa.gov.au/browse/photo/3978>
acesso em 02 fev. 2009.

B) B) Aspecto do ramo (MOREIRA; AZEVEDO TOZI, 1997).

1.4 O Cerrado brasileiro

O Cerrado brasileiro (**Fig. 2**) ocupa 25% do território nacional, principalmente a região central, uma área de 200 milhões de hectares. É o segundo maior bioma brasileiro contendo cerca de 56 mil espécies vegetais (MIRANDA, 2006). Ainda não completamente conhecida, a flora do cerrado é riquíssima, as principais famílias encontradas são: Leguminosae (Mimosaceae, Fabaceae, Caesalpiniaceae), Popaceae e Asteraceae. O bioma Cerrado caracteriza-se por ter flora e fauna heterogêneos devido a sua localização, pois tem fronteiras com os outros biomas brasileiros (Cerrado brasileiro, disponível em www.portalbrasil.net/cerrado.html).



Figura 2. Mapa do Cerrado brasileiro. (disponível em: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/meio-ambiente-cerrado/cerrado-brasileiro-2.php> acesso em jan/2010).

1.5 Flavonoides

Flavonoide é o nome dado a um grande grupo de moléculas ou fitonutrientes. São polifenóis de baixo peso molecular, encontrados em diversas plantas, sendo responsáveis pela coloração das flores (DI STASI, 1996; HARBONE, 1996). Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída no reino vegetal (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

O esqueleto carbônico básico ($C_6-C_3-C_6$), biossintetizado a partir das vias do ácido chiquímico e ácido acético (**Fig. 3**), pode apresentar variações atribuídas ao nível de oxidação, sendo estas promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização, diversificando a estrutura dos flavonoides (TAHARA, 2007).

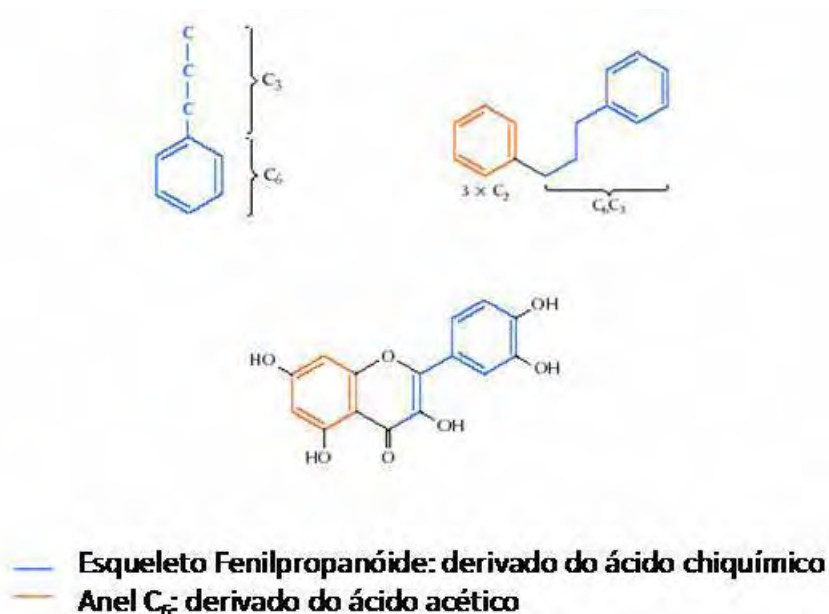


Figura 3. Esquema geral simplificado de formação do flavonol quercetina (DEWICK, 1997).

Quercetina e Kaempferol – flavonóis amplamente distribuídos pelo reino vegetal – apresentam significativa ação anti-inflamatória (KIM, 2004), antioxidante, antitumoral, antiviral, entre outras. Além destes, existem outros

flavonoides que apresentam diversas atividades biológicas (**Fig. 4**) (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

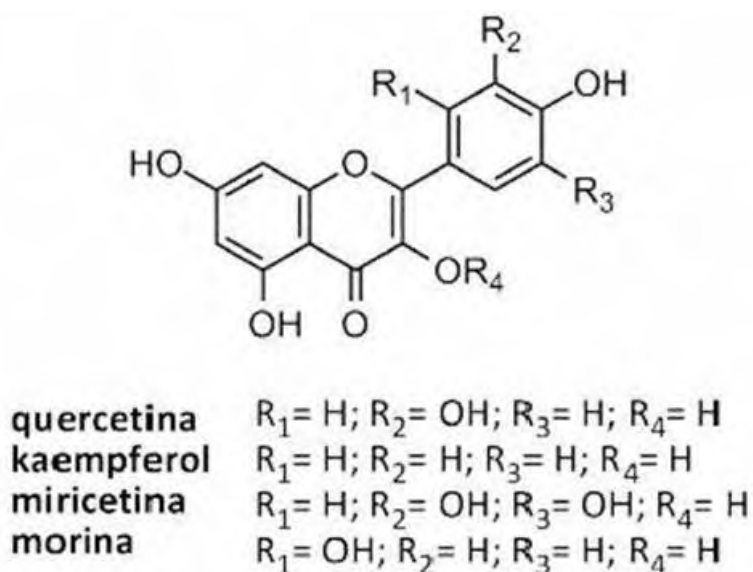


Figura 4. Flavonóis com atividades biológicas (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Flavonoides como a rutina, narigenina, quercetina, kaempferol e luteolina destacam-se por apresentarem atividade antiulcerogênica (MIRANDA, 2006).

São descritos na literatura diversos derivados do kaempferol e da quercetina para *I. truxillensis* e *I. suffruticosa*, os quais possuem atividade mutagênica (CALVO et al., 2009).

2 Objetivos

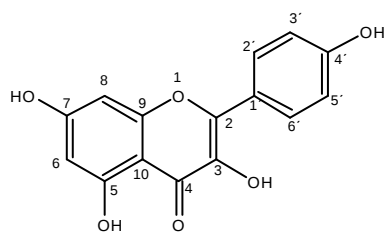
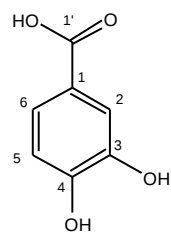
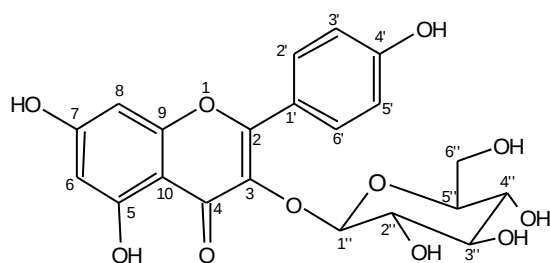
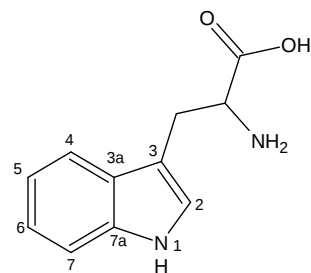
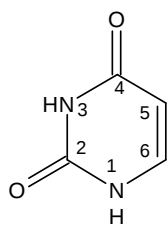
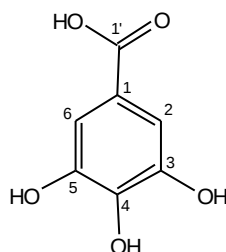
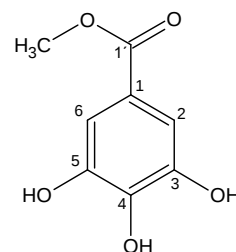
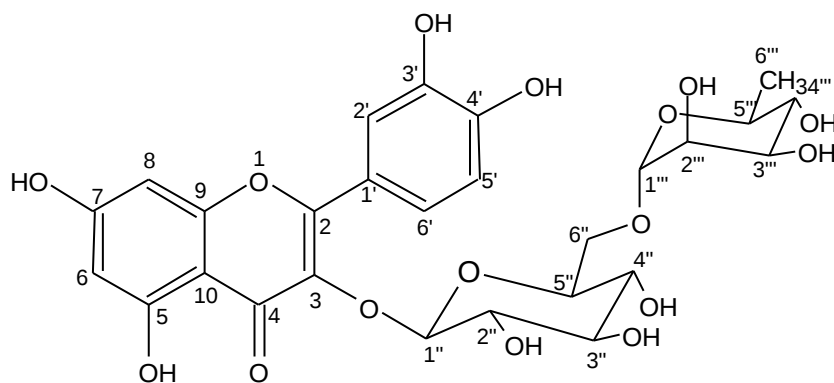
Os objetivos deste trabalho foram:

2.1 Objetivo Geral

- Contribuir para o uso sustentável do bioma do Estado de São Paulo.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a composição química do chá e do extrato metanólico das partes aéreas de *Indigofera hirsuta*;
- Dar continuidade ao estudo integrado químico-farmacológico de plantas medicinais.

Estruturas das substâncias isoladas das partes aéreas de Indigofera hirsuta.**lh1****lh2****lh3****lh4****lh5****lh6****lh7****lh8**

3 Materiais e equipamentos

- Solventes: Acetato de etila, butanol e metanol (Synthlab[®]) grau PA, água Milli-Q (Millipore[®]), metanol (Baker[®]) grau HPLC e dimetil sulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*₆) (Sigma Aldrich[®]), Ácido trifluoroacético (TFA) (Mallinckrodt[®]).
- Balanças: balança analítica (Marte[®], AL 200) com capacidade para 200g e precisão de 0,001g para pesagem das frações e balança (Quimis[®], BG 4000) com capacidade para 4.040g e precisão de 0,01g para pesagem dos extratos.
- Estufa Quimis[®].
- Filtro com membrana de PTFE (politetrafluoretileno, teflon[®], Millipore[®]) com poro de 0,45 e 0,20 µm para preparo de amostras para análise por HPLC.
- Centrifuga: Centrífuga (CELM[®], COMBATE, a 2500 rpm)
- Liofilizador (Savant[®], com bomba VLP200).
- Evaporador rotativo (Heidolph[®], Laborota 4001 – efficient) equipado com bomba à vácuo (Heidolph[®], Rotavac valve control).

Os procedimentos cromatográficos foram realizados em:

- Placas preparadas de sílica gel 60 (Merck[®]) (20 x 20 cm x 0,2 mm).
- Reveladores: - Luz UV (254-366 nm) (Chromatovue[®]);
 - Anisaldeído/H₂SO₄ (WAGNER; BLAT; ZGAINSKY, 1984): 0,85 mL de anisaldeído; 85 mL de MeOH; 10,0 mL de ácido acético e 5 mL de H₂SO₄;
 - NP/PEG (específico para flavonoides) (WAGNER et al., 1984): 100 mg de defenilaminoborato (NP); 500 mg de polietilenoglicol 2000 (PEG) e 20,0 mL de MeOH.
- Colunas de vidro preenchidas com Sephadex LH-20 (70 cm x 3,0 cm d.i.) e (30 cm x 3,0 cm d.i) acopladas a uma bomba peristáltica

modelo P1 18-1110-91 (Pharmacia[®]) e a um coletor automático Redifrac (Pharmacia[®]);

- Cromatógrafo Líquido de Média Performance Büchi Pump Manager C-615.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (analítico) modelo PU-2089 (Jasco[®]), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-20140 (Jasco[®]), com coluna de fase reversa RP18 imobilizadas com octadecilsilano, modelo Luna 2 (Phenomenex[®]) (250 x 4,6 mm d.i.) com partículas de tamanho médio de 5 µm e softwares *Star Chromatography Workstation* versão 5.31 (Varian[®]) e *EZChrom Elite Client/Server* versão 3.1.7 (Chromatec[®]) para o processamento dos dados cromatográficos;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (semi-preparativo) modelo ProStar 210/330 (Varian[®]) acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, com coluna de fase reversa RP18 imobilizadas com octadecilsilano, modelo Luna 2 (Phenomenex[®]) (250 x 10,0 mm d.i.) com partículas de tamanho médio de 10 µm.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (semi-preparativo) (Knauer[®]), acoplado a um detector de índice de refração, Smartline RI Detector 2300/2400 (Knauer[®]) com coluna de fase reversa C18 (Phenomenex[®]) (250 x 10 mm d.i.) com partícula de tamanho médio de 10 µm.

Os dados espectroscópicos e espectrométricos para determinação estrutural das substâncias foram obtidos dos equipamentos:

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 11,7 T (Varian[®] INOVA), operando a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C. O TMS foi usado como padrão interno para determinação dos deslocamentos químicos;
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Varian[®] INOVA), operando a 300 MHz para ¹H e 75 MHz para ¹³C.

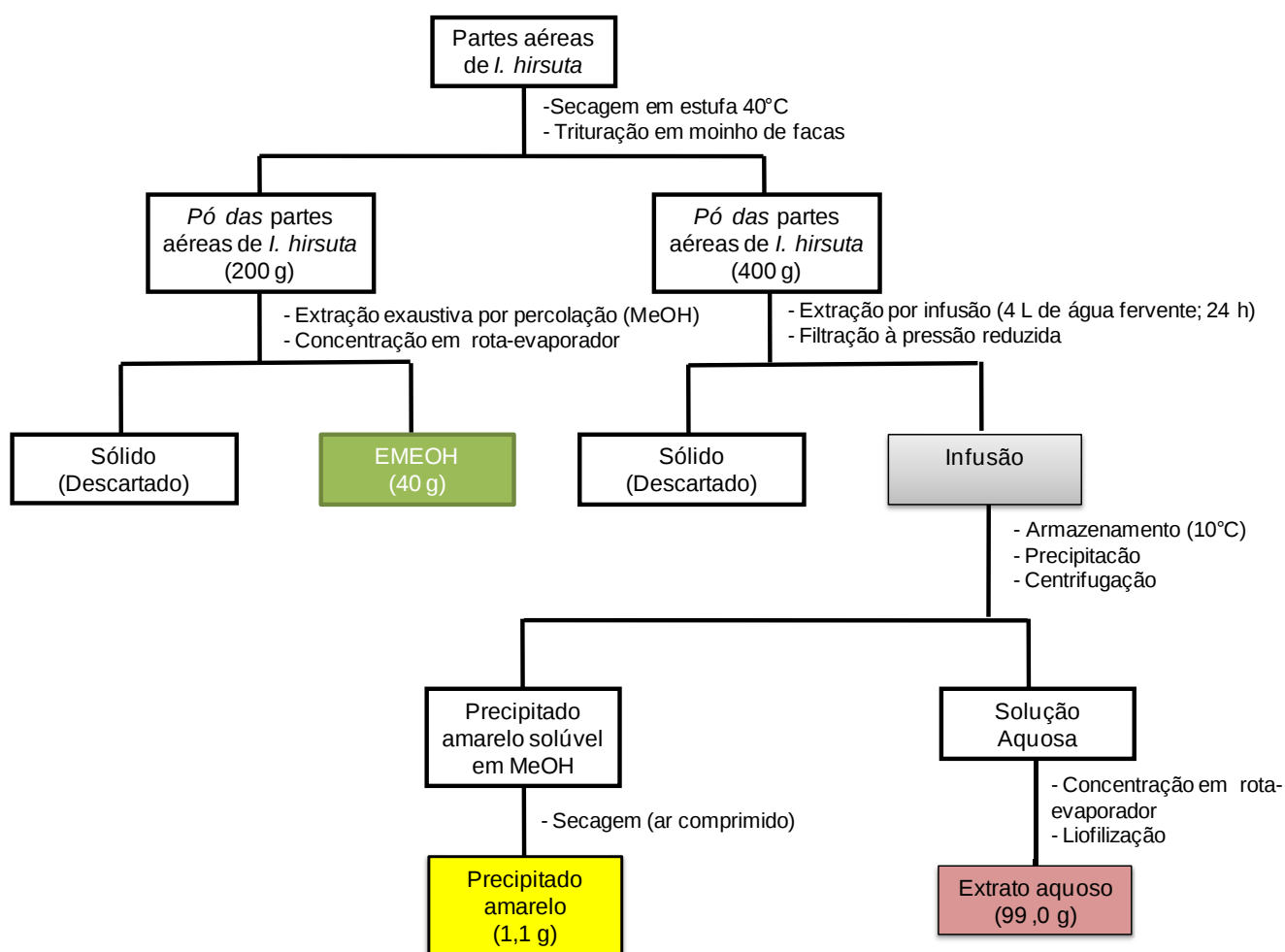
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker®), operando a 200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C .
- Espectrofotômetro de Infravermelho Jasco®, modelo FT/IR – 4100;
- Espectrofotômetro de Ultravioleta/Visível (Hach®), modelo DR/4000 U;
- Espectrômetro de massas de alta resolução (EM-ESI-QTOF) (FCF-USP-RP) ultrOTOFQ-ESI-TOF Bruker Daltonics® (Billerica, MA – USA); acoplado ao Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu® com detector de arranjo de foto diodos, com coluna de fase reversa C18 Shimadzu® (250 x 10,0 mm d.i.) com partículas de tamanho médio de 5 μm .
- Polarímetro Jasco®, modelo P-1020.

4 Desenvolvimento, resultados e discussões

4.1 Coleta do Material Vegetal e preparo dos extratos

As partes aéreas (galhos, folhas e sementes) de *Indigofera hirsuta* foram coletadas em dezembro de 2007 no Estado do Tocantins pelo Dr. Eduardo R. Santos (exsicata numero 389 depositada no herbário da Universidade Federal do Tocantins (UFT)) e identificadas pelo Prof. Dr. Jorge Y. Tamashiro. As partes aéreas foram secas em estufa (40 °C), depois trituradas em moinho de facas resultando um pó. Uma porção (400 g) do pó foi submetida à extração por infusão, sendo adicionado 4L de água fervente, o recipiente mantido fechado em repouso por 24 horas. Em seguida, a solução foi filtrada à pressão reduzida, o resíduo sólido descartado e o infuso armazenado a uma temperatura de 10°C ocorrendo a formação de um precipitado amarelo, o qual foi separado por centrifugação.

O precipitado foi inicialmente solubilizado em MeOH e depois seco em ar comprimido sendo obtido 1,079 g. O sobrenadante foi concentrado em evaporador rotativo e liofilizado, sendo obtido 99 g de extrato aquoso. Além do chá (extrato aquoso e precipitado amarelo) foi obtido o extrato metanólico (EMeOH) de *Indigofera hirsuta* por percolação (**Flux. 1**).



Fluxograma. 1. Preparação dos extratos de *Indigofera hirsuta*.

4.2 Caracterização dos extratos por HPLC- DAD

A caracterização de extratos polares por HPLC-DAD é muito utilizada em nosso laboratório, pois permite sugerir a presença de determinadas classes de substâncias ou mesmo a identificação destas nos extratos através da comparação com padrões conhecidos, comerciais ou já isolados pelo grupo de pesquisa. São comparados dois fatores: o tempo de retenção (t_r) e o espectro de absorção no UV.

Os três extratos obtidos (Extrato aquoso, Precipitado amarelo e EMeOH) foram submetidos a *clean-up* com cartucho de C_{18} , solubilizados em MeOH/H₂O (5:95, v/v) (20 mg.mL⁻¹), filtrados em membrana PTFE (politetrafluoretileno) e caracterizados por HPLC- DAD (Jasco®) (Coluna Phenomenex® Luna C_{18} 5 μ m (250 X 4,60 mm), 254 nm, 1 mL.min⁻¹, Modo Gradiente: Solvente A: H₂O acidificado com 0,05 % de TFA, Solvente B: MeOH acidificado com 0,05 % de TFA, 5% B – 100% B (60 min)).

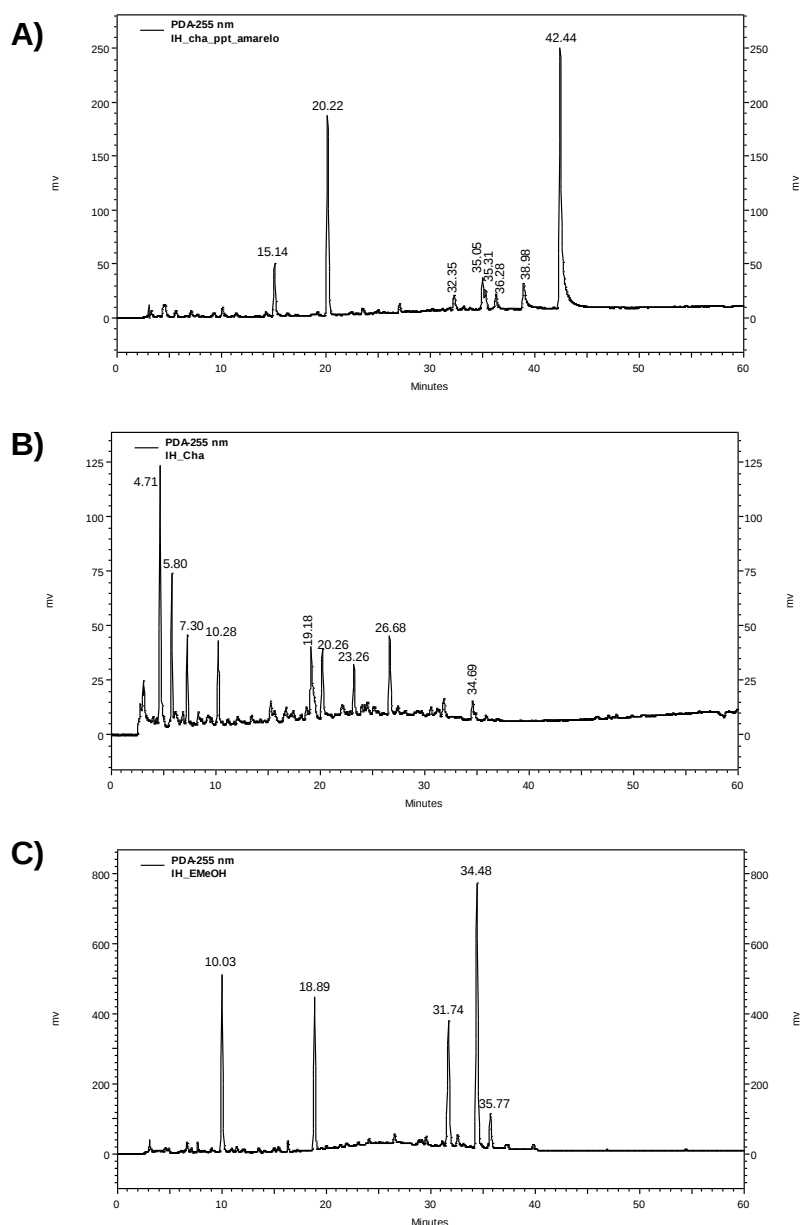
Os cromatogramas obtidos estão representados na **Fig. 5**. A **Tab. 2** apresenta os λ de absorção máxima dos picos majoritários dos cromatogramas.

Para o precipitado amarelo (**Fig. 5 (A)**) e para o EMeOH (**Fig. 5 (C)**) foram observados picos com espectros no UV característicos de flavonoides, com bandas de absorção entre 250 e 270 nm (Banda II) e entre 345 e 370 nm (Banda I) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Estes picos apresentaram tempo de retenção maior que 30 min. Além destes, outros picos com menor t_r foram observados (entre 10 e 20 min); estes apresentaram espectros de absorção no UV com banda em 273 nm sugerindo a presença de derivados de ácidos fenólicos (RINALDO, 2007).

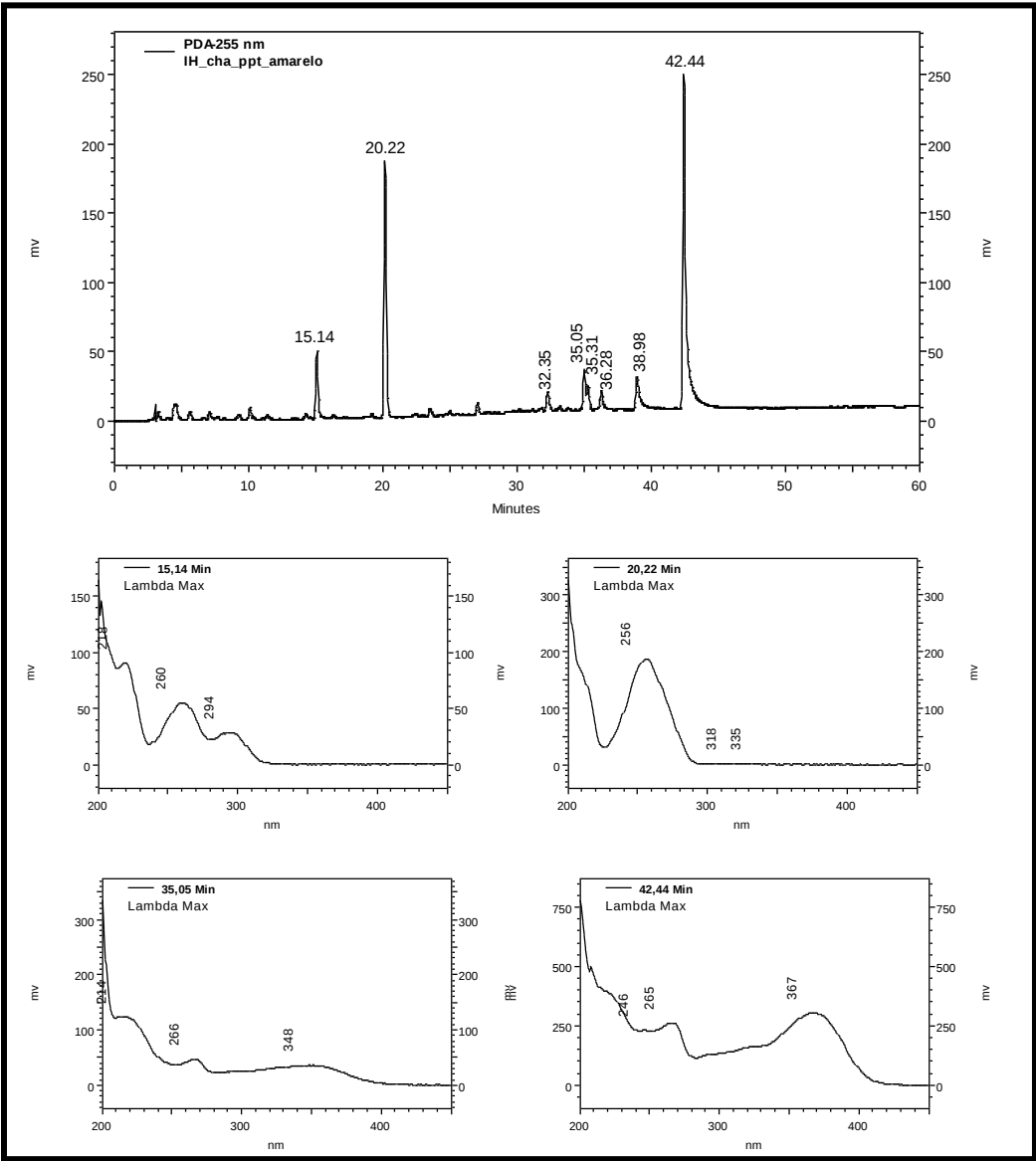
No extrato aquoso (**Fig. 5 (B)**) observamos a predominância de picos com menor t_r (entre 4 e 30 min), e seus espectros no UV apresentaram bandas de absorção entre 250 e 280 nm. A ausência de picos com espectros de absorção no UV característicos de flavonoides nesse extrato (foi observado um único pico de pequena intensidade em 34,69 min) evidenciou que estes foram

separados na etapa de centrifugação da infusão durante a obtenção dos extratos, ficando estas substâncias presentes no Precipitado amarelo (**Flux. 1; Fig. 5 (A)**). Evidenciou também a baixa solubilidade dos flavonoides em H₂O quando armazeandos em baixas temperaturas.

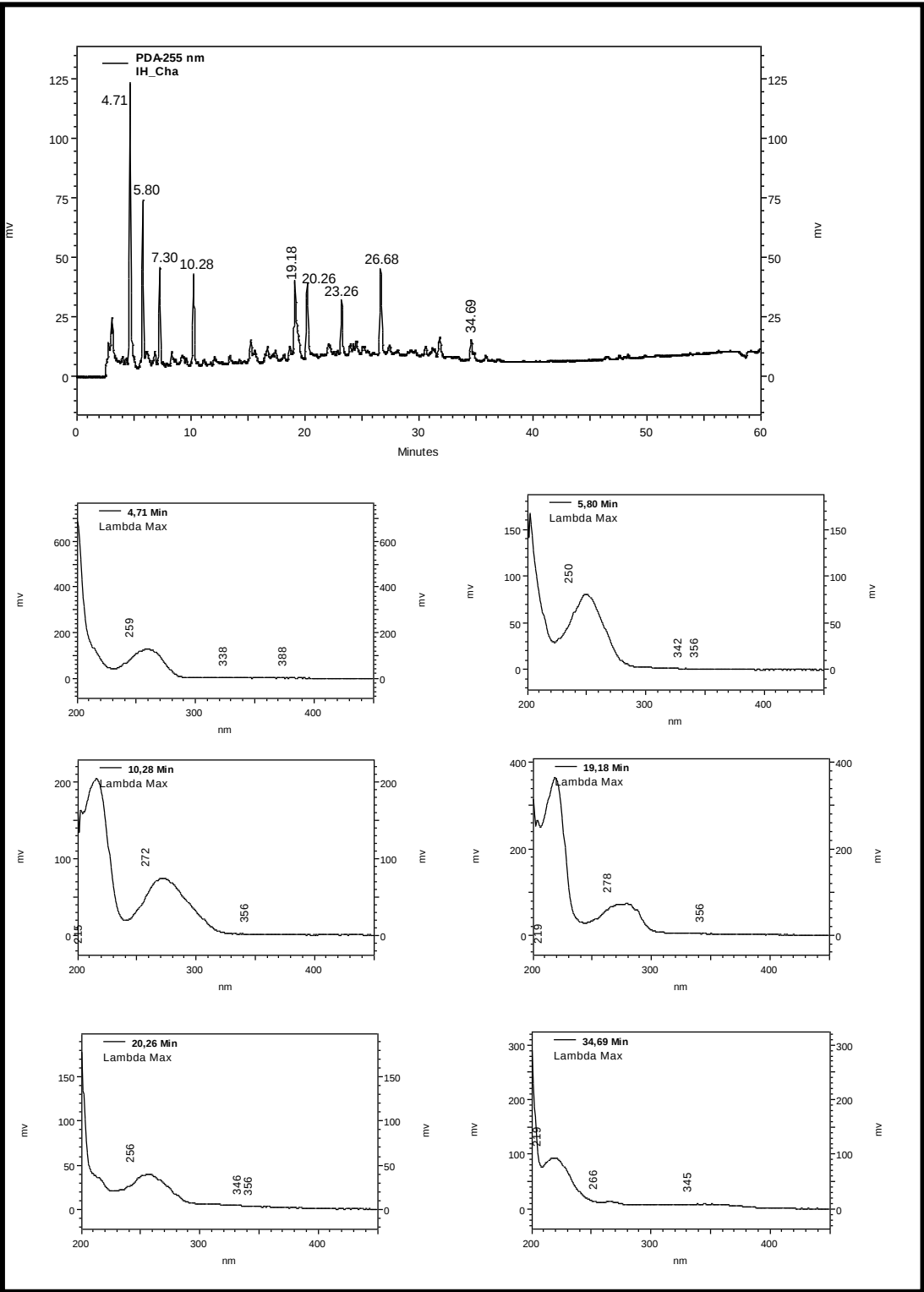
Outra característica observada nesse λ analisado é o fato de que no extrato aquoso a intensidade de absorção dos picos é da ordem de 125 mAu enquanto que no EMeOH é da ordem de 800 mAu. Esse fato sugere que há uma menor concentração dos metabólitos no extrato aquoso quando comparado ao EMeOH, pois ambos foram preparados na mesma concentração (20 mg.mL⁻¹). Por outro lado, no cromatograma do extrato aquoso observamos uma maior quantidade de picos, sugerindo a existência de maior quantidade de metabolitos nesse extrato.



A)



B)



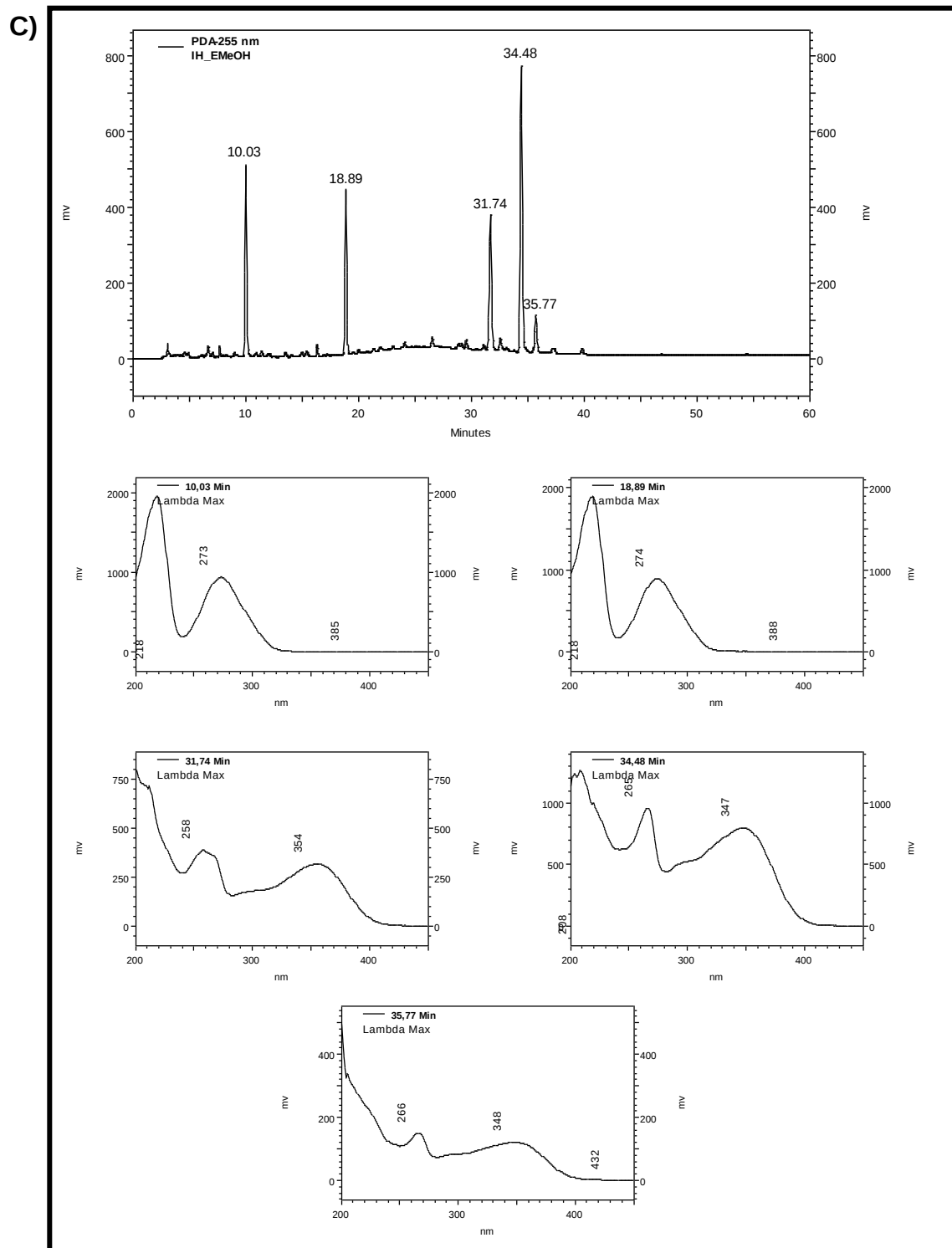


Figura 5. Cromatogramas dos extratos de *I. hirsuta* e espectros de absorção no UV dos picos mais intensos: **A)** Precipitado amarelo; **B)** Extrato aquoso; **C)** EMeOH.

Tabela 2. Tempo de retenção e $\lambda_{\text{máximos}}$ de absorção das substâncias presentes nos extratos analisados.

Precipitado amarelo		Extrato aquoso		EMeOH	
Tempo de retenção (min)	Absorção (nm)	Tempo de retenção (min)	Absorção (nm)	Tempo de retenção (min)	Absorção (nm)
15,14	260; 294	4,71	259	10,03	273
20,22	256	5,80	250	18,89	274
32,35	264; 355	7,30	267	31,74	258; 354
35,05	266; 348	10,28	272	34,48	265; 347
35,31	259; 355	19,18	278	35,77	266; 348
36,28	266; 350	20,26	256		
38,98	303; 371	23,25	275		
42,44	265; 367	26,68	280		
		34,69	266; 345		

4.3 Fracionamento dos extratos

4.3.1 Precipitado amarelo

Iniciou-se a separação cromatográfica com o fracionamento por GPC do precipitado amarelo. Para tanto, foi utilizada coluna de Sephadex LH-20 (30 cm x 3,0 cm d.i.) e eluição com MeOH. Foram obtidas 20 frações, após análise por CCDC [placas de sílica gel, eluídas em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5:6:1:4, v/v/v/v), fase orgânica], e revelação com solução de anisaldeído/ H_2SO_4). Uma dessas frações apresentou a substância pura **lh1**, de R_f 0,83. Essa substância foi analisada por CCDC com o padrão de quercetina utilizando NP-PEG como revelador (**Fig. 6**). Neste sistema [$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v)] **lh1** apresentou R_f 0,47, enquanto que o padrão de quercetina apresentou R_f 0,35. Portanto, **lh1** é menos polar que a quercetina (**Fig. 6**) (**Flux. 2**).

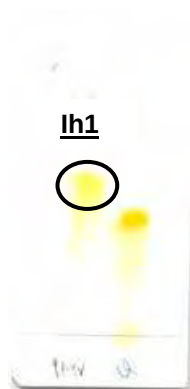
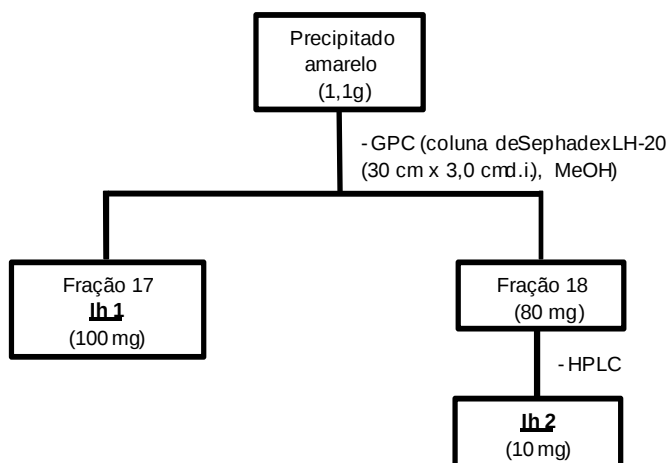


Figura 6. Análise comparativa por CCDC de **lh1** com o padrão quercetina. [Sílica gel; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1, v/v)].

Outra fração obtida a partir do fracionamento por Sephadex LH-20 foi purificada por HPLC [Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈ 10 μm (250 X 10 mm), 254 nm, 4,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, Modo Gradiente: Solvente A: H_2O acidificado com 0,05 % de TFA, Solvente B: ACN acidificado com 0,05 % de TFA, 5% B – 10% B (30 min), 10% B – 100% B (50 min); 80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; injeções de 80 μL], permitindo o isolamento e a identificação de **lh2** (**Flux. 2**).



Fluxograma 2. Fracionamento do precipitado amarelo.

Essas substâncias (**lh1** e **lh2**) purificadas foram injetadas no HPLC (Jasco®) nas mesmas condições de caracterização do Precipitado amarelo, sendo analisados os espectros de absorção no UV juntamente com o t_r , permitindo sua identificação no mesmo. Desse modo, concluímos que **lh1** é a substância com t_r de 42,44 min e **lh2** com t_r de 15,14 min (**Fig. 7**).

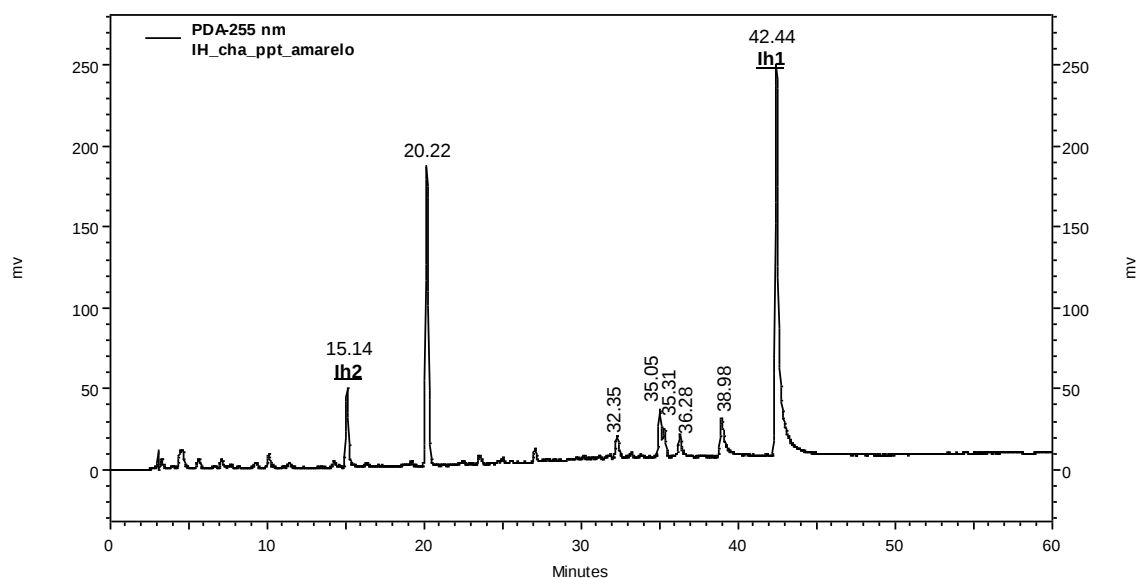


Figura 7. Cromatograma do precipitado amarelo e identificação de **lh1** e **lh2** na caracterização deste.

4.3.2 Extrato aquoso

O extrato aquoso (100 mg) foi submetido a extração líquido-líquido com: A) AcOEt e B) *n*-BuOH. Porém essas extrações apresentaram baixo rendimento, 5% e 17%, respectivamente (**Fig. 8**).

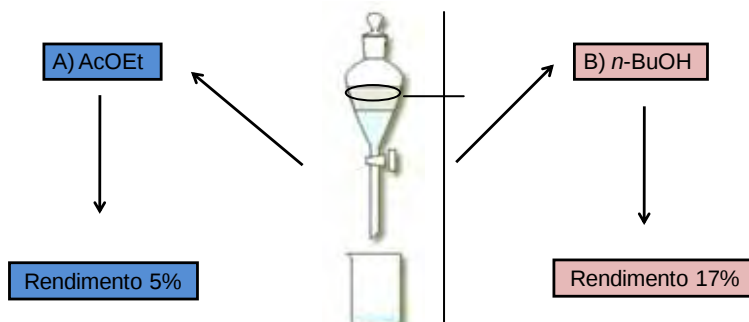


Figura. 8. Rendimento das extrações líquido-líquido com: A) AcOEt e B) *n*-BuOH.

Sendo assim, solubilizamos o extrato (3 g) em 20 mL de MeOH e fracionamos por GPC em coluna de Sephadex LH-20 (70 cm x 3,0 cm d.i.) eluída com MeOH. Este procedimento resultou em 300 frações que foram analisadas por CCDC [placas de sílica gel, eluídas em CHCl₃/MeOH/*n*-PrOH/H₂O, (5:6:1:4, v/v/v/v), (fase orgânica) e revelação com solução de anisaldeído/H₂SO₄] e reunidas em 7 grupos (**Tab. 3**). Esse fracionamento foi repetido sete vezes.

Tabela 3. Frações do extrato aquoso obtidas após análise por CCDC, técnica cromatográfica de purificação e substâncias isoladas.

Grupos	Purificação	Compostos obtidos
Fração A (1064 mg)	-	-
Fração B (1332 mg)	MPLC	-
Fração C (1666 mg)	MPLC	-
Fração D (241 mg)	MPLC	<u>lh4</u> e <u>lh5</u>
Fração E (73 mg)	MPLC	-
Fração F (54 mg)	MPLC	-
Fração G (10 mg)	-	<u>lh 3</u>

A **Fração G** apresentou uma substância de R_f 0,64 e coloração amarelada (**Fig. 9**), que após análise por RMN foi identificada como **lh3**.



Figura 9. CCDC da **Fração G**.

A **Fração D** foi purificada por MPLC (C_{18} , 15 cm x 1,5 cm, eluição gradiente $H_2O/MeOH$; $2,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). As frações resultantes foram analisadas por CCDC (placas de sílica gel, eluídas com $CHCl_3/MeOH/n\text{-}PrOH/H_2O$, (5:6:1:4, v/v/v/v) e revelação com solução de anisaldeído/ H_2SO_4) sendo possível observar a presença de duas substâncias isoladas **lh4** (R_f 0,28) e **lh5** (R_f 0,58) (**Fig. 10**).

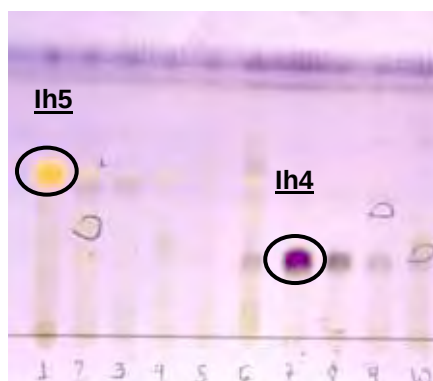


Figura 10. CCDC das frações obtidas da purificação da **Fração D** por MPLC.

Outras frações também foram purificadas por MPLC. Porém não obtivemos sucesso no isolamento e identificação de outras substâncias.

As três substâncias isoladas do extrato aquoso foram analisadas por HPLC nas mesmas condições de caracterização desse extrato, permitindo identificá-las no cromatograma da **Fig. 11**.

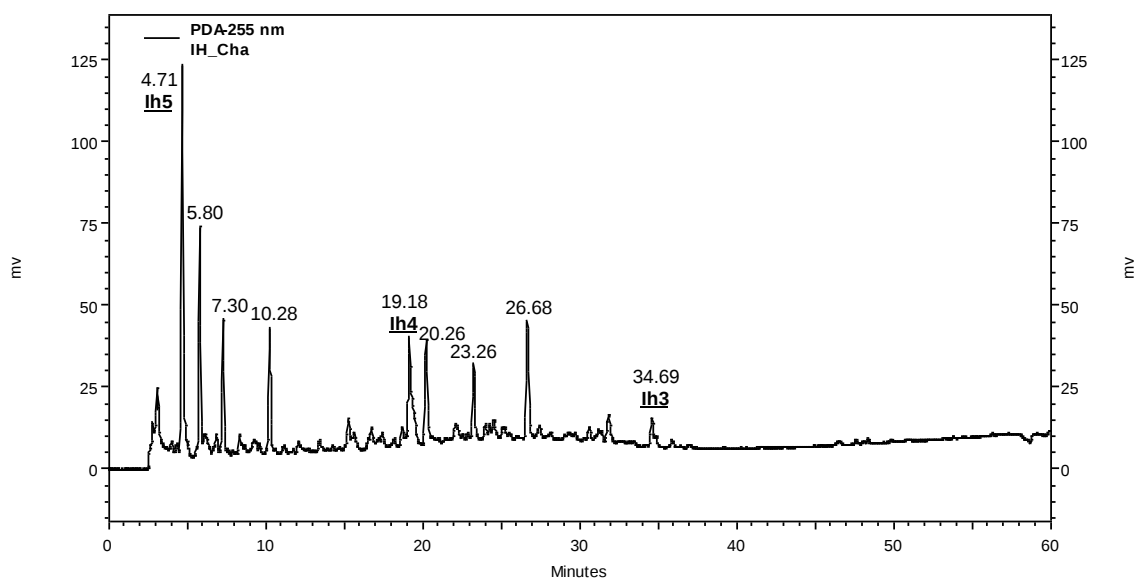


Figura 11. Cromatograma do Extrato aquoso e identificação de **lh3**, **lh4** e **lh5**.

4.3.3 Extrato metanólico

O EMeOH apresentou pequena quantidade de picos majoritários observados no cromatograma da **Fig. 5. C)**. Sendo assim, a condição de separação foi transformada para o modo semi-prepartivo (Coluna Phenomenex® Luna C₁₈ 10 µm (250 X 10,0 mm), 254 nm, 4 mL.min⁻¹, Modo Gradiente: Solvente A: H₂O acidificado com 0,05 % de TFA, Solvente B: MeOH acidificado com 0,05 % de TFA, 10% B – 40% B (10 min), 40% B – 60% B (30 min), 60% B – 100% B (35 min)). Esse extrato foi fracionado em uma única etapa, sendo obtidos as seguintes substâncias: **lh6**, **lh7**, **lh8** e **lh3**. Estas foram então identificadas na caracterização do EMeOH (**Fig. 12**).

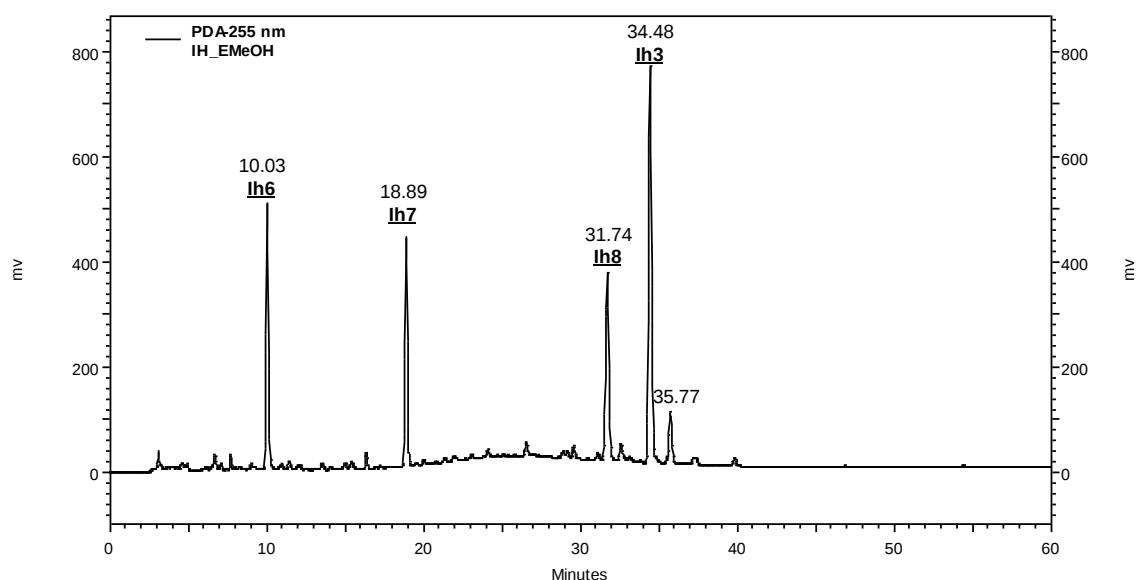


Figura 12. Cromatograma do EMeOH e identificação de **lh3**, **lh6**, **lh7** e **lh8** .

As substâncias isoladas de *Indigofera hirsuta* (**lh1** a **lh8**) foram identificadas pelas análises realizadas por HPLC avaliando-se os tempos de retenção e absorção no UV (**Tab. 4**) no método descrito no item **4.2**, juntamente com as análises dos espectros de RMN, IV e EM.

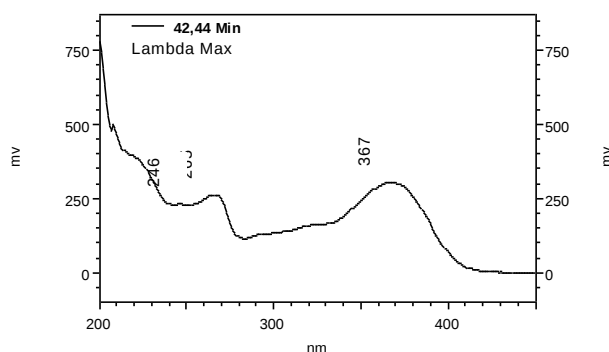
Tabela 4. Avaliação dos tempos de retenção e absorção no UV das substâncias isoladas de *I. hirsuta*.

Substância	Tempo de retenção (min)	Absorção (nm)
Ácido gálico	10,0	273
Ácido protocatecuico	14,9	260; 294
Galato de metila	18,8	274
Kaempferol	42,0	265; 367
Kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosídeo	34,7	265; 347
Rutina	31,4	257; 356
Triptofano	18,7	278
Uracila	4,7	259

4.4 Identificação estrutural

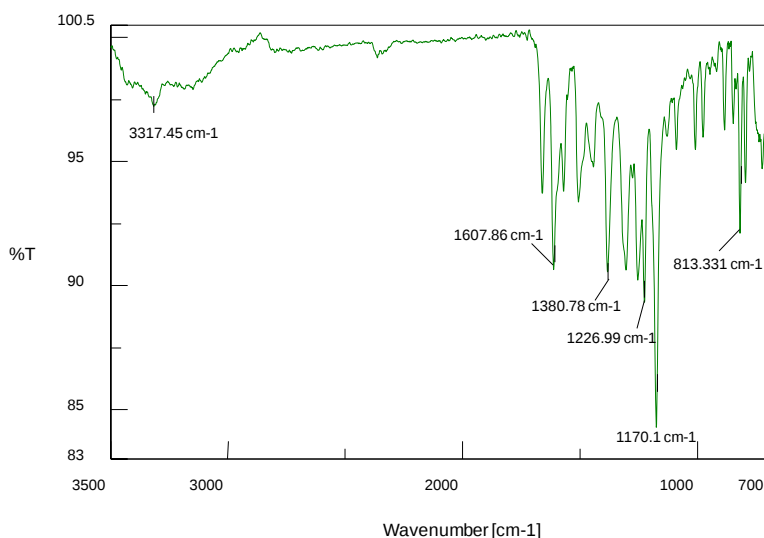
4.4.1 Kaempferol (lh1)

O espectro de absorção na região do UV dessa substância apresentou banda II em 265 nm atribuída ao anel A e a banda I em 367 nm atribuída a conjugação dos anéis B e C, típicas de flavonoides (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970) (**Espectro 1**).



Espectro 1. Espectro de absorção no UV do kaempferol (lh1).

O espectro vibracional na região do IV da substância lh1 (**Espectro 2**) apresentou banda atribuída ao estiramento ν_{O-H} em 3317 cm^{-1} , banda de estiramento $\nu_{C=C(\text{aromático})}$ em 1607 cm^{-1} , deformação angular no plano de δ_{O-H} em 1380 cm^{-1} , estiramento ν_{C-O} em 1170 cm^{-1} , e banda de deformação angular fora do plano $\delta_{C-H(\text{aromático})}$ em 813 cm^{-1} .



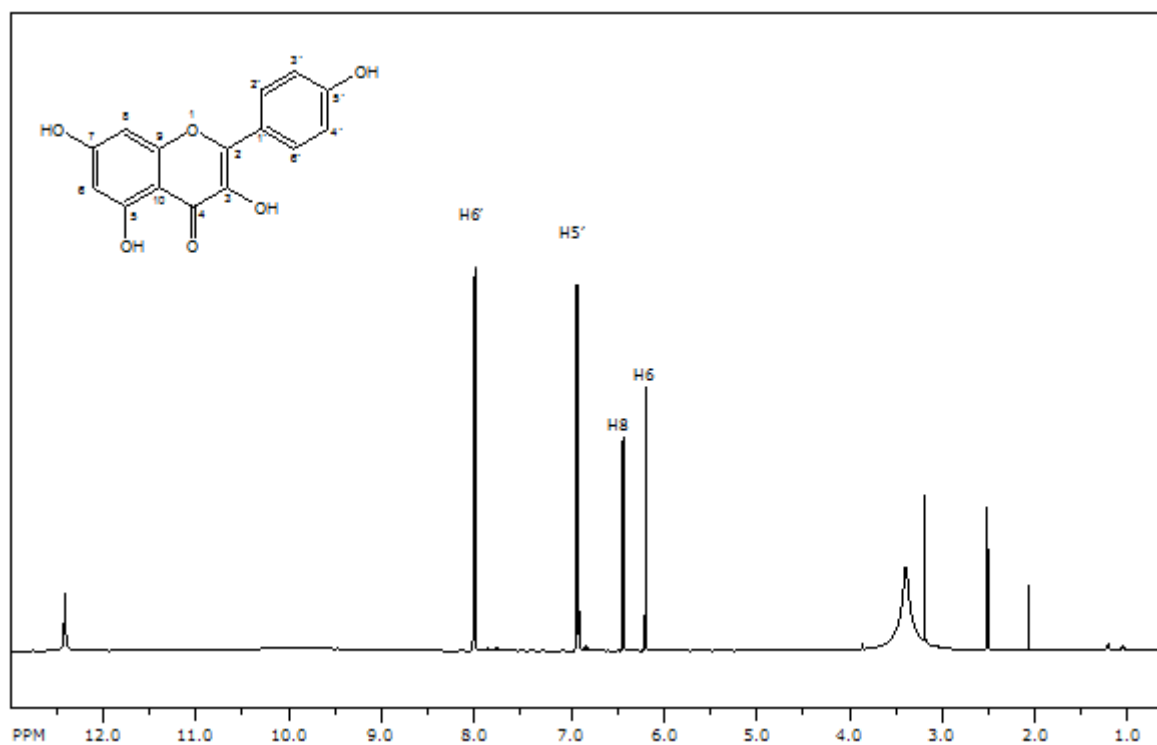
Espectro 2. Espectro no IV do Kaempferol (lh1).

O espectro de RMN de ^1H de **lh1** (**Espectro 3**) forneceu dubletos (2H, $J=8,5$ Hz) em δ 8,05 referente as posições H6'/H2' e em δ 6,94 (2H; H5'/H3'), evidenciando acoplamentos na posição *orto*, atribuídos ao anel B de um flavonoide. Além desses, observamos dubletos (1H, $J=2$ Hz) em δ 6,44 (H8) e em δ 6,20 (H6), evidenciando os acoplamentos *meta* dos hidrogênios ligados anel A do flavonoide. Os dados obtidos dos espectros de gHMQC (**Espectro 4**) e gHMBC (**Espectro 5**) estão na **Tab. 5**. Comparando-se os dados obtidos com os da literatura (HARBONE, 1996; AGRAWAL, 1989), concluímos que **lh1** é o Kaempferol.

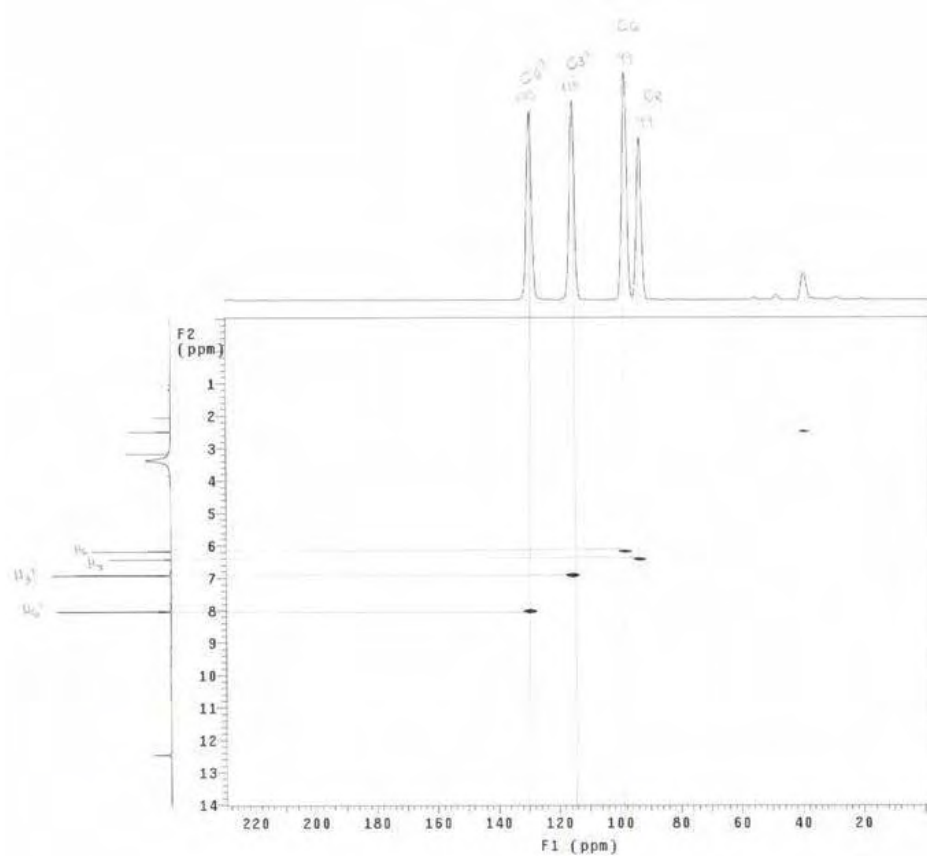
Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) do Kaempferol (**lh1**).

	lh1			HARBONE, 1996/ AGRAWAL, 1989	
Posição	^1H (ppm), J (Hz)	^{13}C (ppm)	gHMBC	^1H (ppm), J (Hz)	^{13}C (ppm)
1	-	-	-	-	-
2	-	147,0	-	-	146,8
3	-	*	-	-	135,9
4	-	*	-	-	175,9
5	-	*	-	-	160,9
6	6,20 <i>d</i> (2,0)	99,0	C8; C10; C7	6,20 <i>d</i> (2,0)	98,2
7	-	164,2	-	-	163,9
8	6,44 <i>d</i> (2,0)	94,0	C6; C10; C9; C7	6,45 <i>d</i> (2,0)	93,5
9	-	156,2	-	-	156,2
10	-	103,0	-	-	103,1
1'	-	122,0	-	-	121,7
2'	8,05 <i>d</i> (8,5)	130,0	-	8,06 <i>d</i> (8,5)	129,5
3'	6,94 <i>d</i> (8,5)	115,0	C5'; C1'; C4'	6,94 <i>d</i> (8,5)	115,4
4'	-	159,0	-	-	159,2
5'	6,94 <i>d</i> (8,5)	115,0	-	6,94 <i>d</i> (8,5)	115,4
6'	8,05 <i>d</i> (8,5)	130,0	C2'; C2; C4'	8,06 <i>d</i> (8,5)	129,5

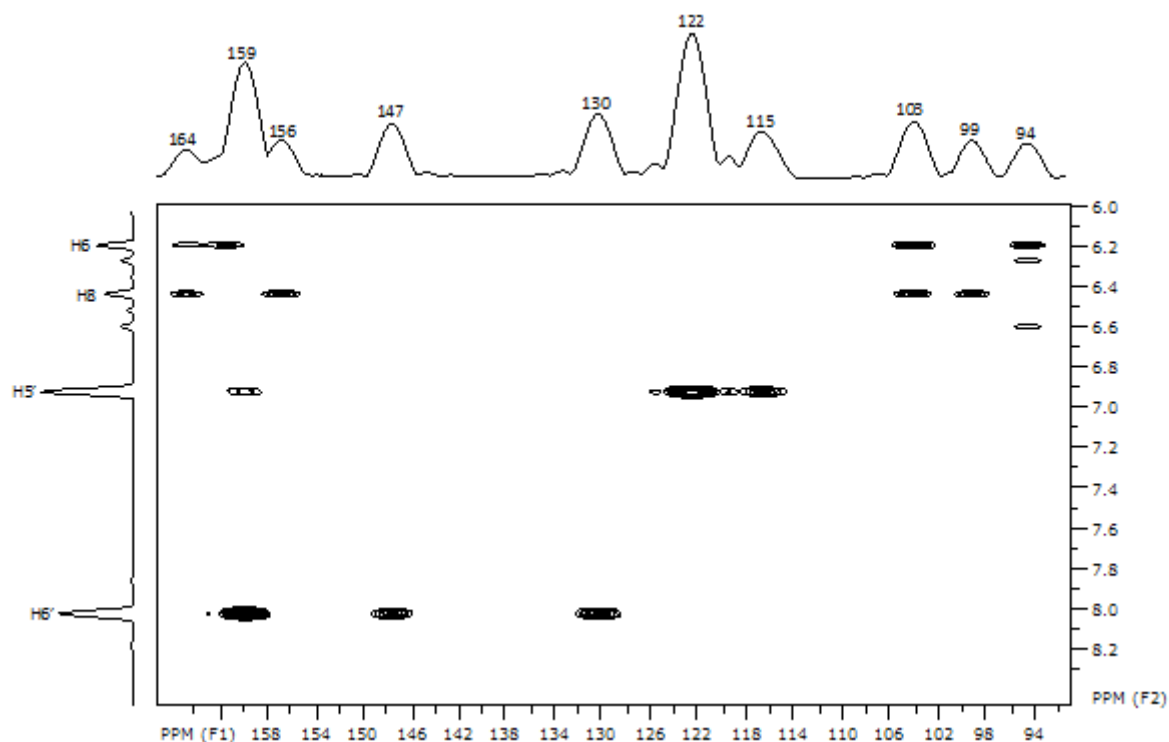
* não observado (^{13}C foram atribuídos através das interações observadas nos experimentos gHMQC e gHMBC).



Espectro 3. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) do kaempferol (**1h1**).



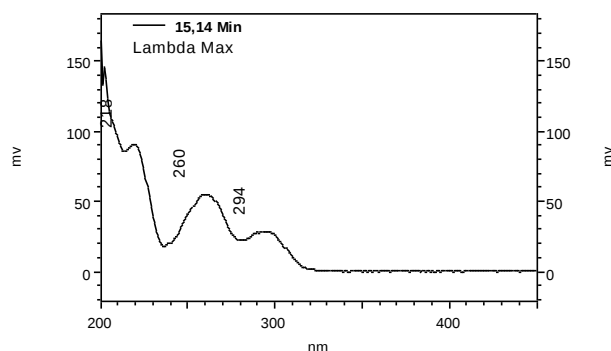
Espectro 4. Experimento bidimensional *g*HMQC ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) do kaempferol (**1h1**).



Espectro 5. Experimento bidimensional *g*HMBC (Ampliação da região entre δ 6,0 - 8,5) (DMSO-*d*₆, 125 MHz) do kaempferol (**Ih1**).

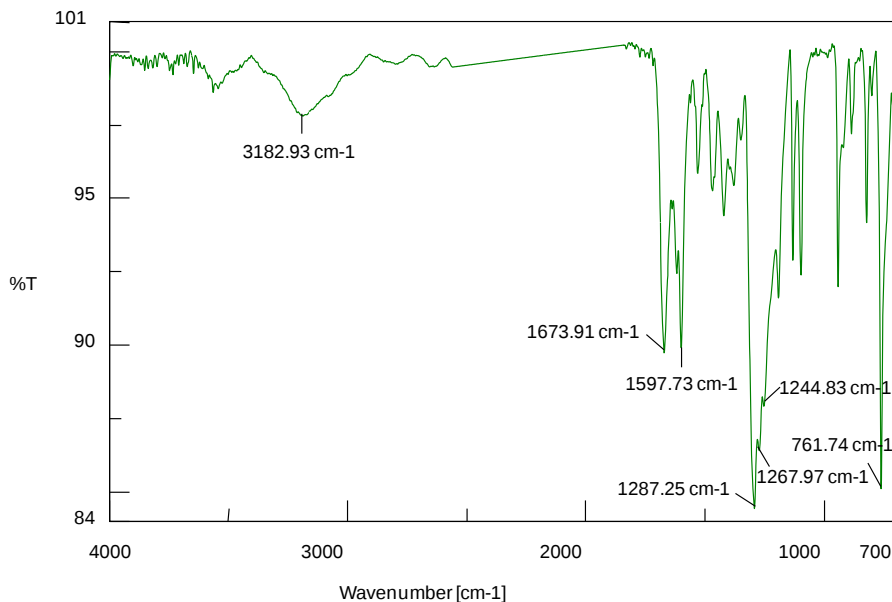
4.4.2 Ácido protocatecuico (**Ih2**)

O espectro de absorção na região do UV (**Espectro 6**) dessa substância apresentou bandas de absorção em 218, 260 e 294 nm, semelhantes aos dados da literatura para o ácido protocatecuico (AO et al., 2009).



Espectro 6. Espectro de absorção no UV do ácido protocatecuico (**Ih2**).

O espectro no IV de **lh2 (Espectro 7)** apresentou banda de estiramento $\nu_{\text{C-H(arámático)}}$ em 3182 cm^{-1} , banda de estiramento $\nu_{\text{C=O(conjugado)}}$ em 1673 cm^{-1} , e banda de estiramento $\nu_{\text{C=C(arámático)}}$ em 1597 cm^{-1} , coerentes com ácido carboxílico aromático (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

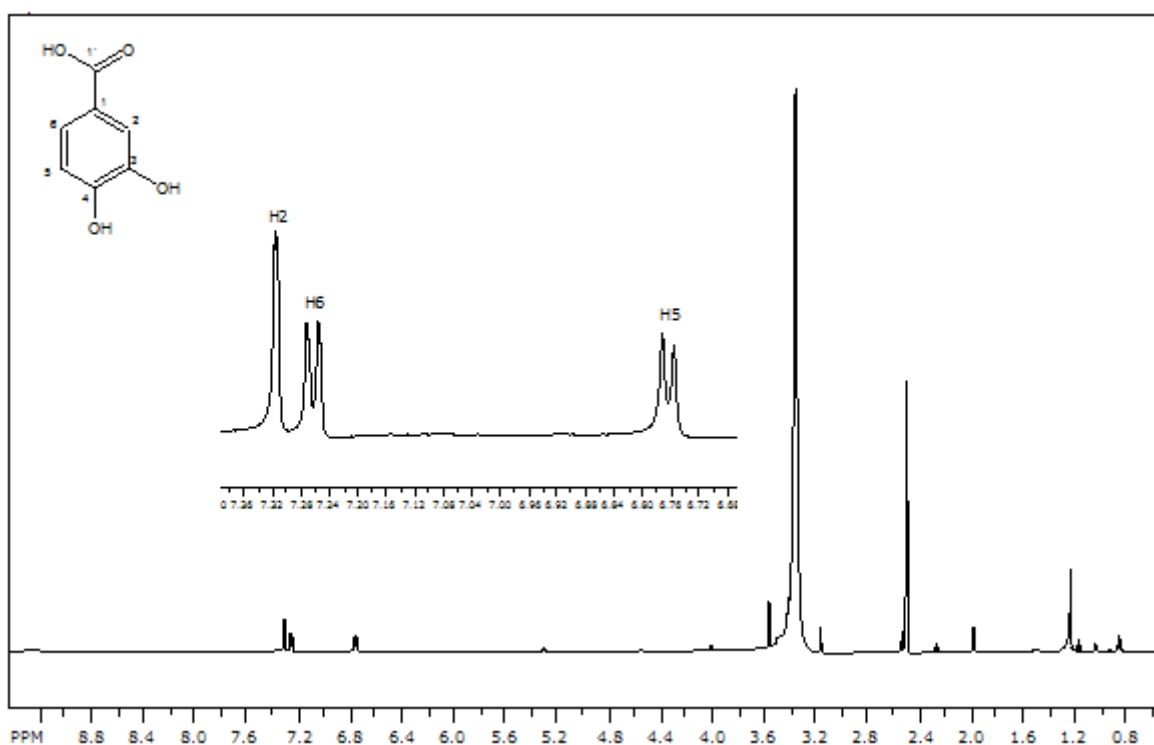


Espectro 7. Espectro no IV do ácido protocatecuico (**lh2**).

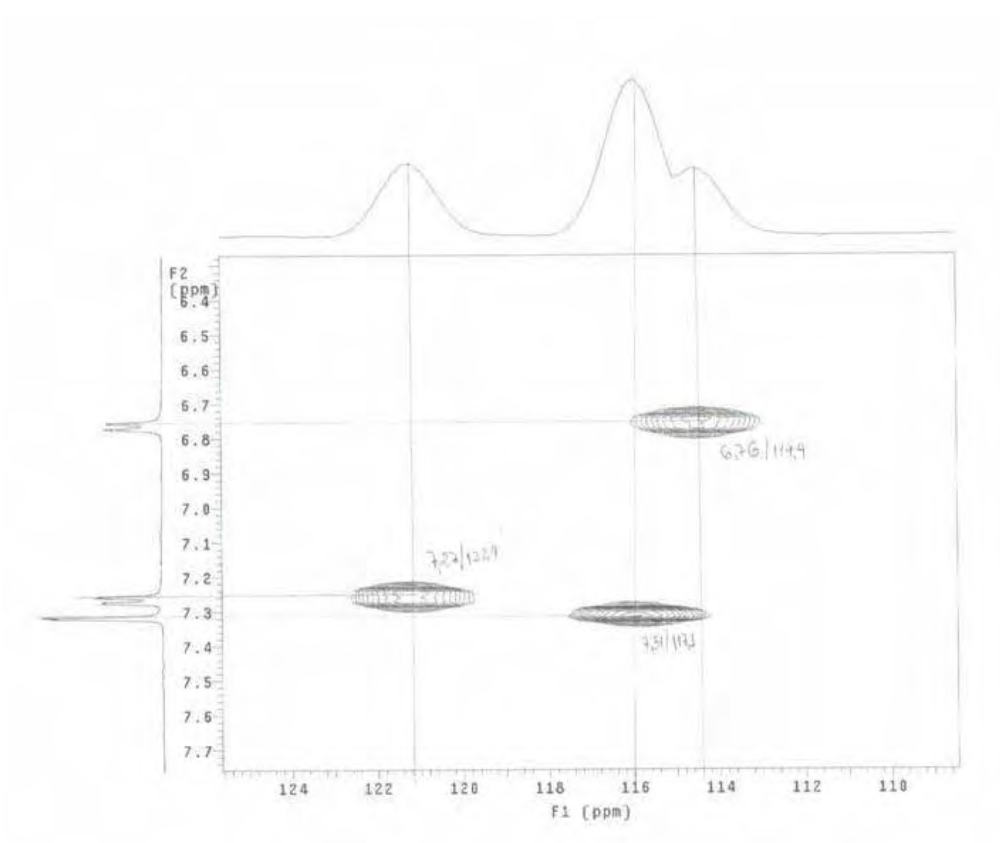
O espectro de RMN de ^1H de **lh2 (Espectro 8)** forneceu um dubleto (1H, $J=8,5\text{ Hz}$) em $\delta\ 6,76$ (H5), evidenciando o acoplamento *orto* com H6; um duplo dubleto (1H, $J=8,5$; $J=1,5$) em $\delta\ 7,27$ (H6), evidenciando acoplamentos *orto* e *meta* com os hidrogênios H5 e H2, respectivamente, e um dubleto (1H, $J=1,5\text{ Hz}$) em $\delta\ 7,32$ (H2), evidenciando o acoplamento *meta* com H6. Os dados obtidos dos espectros de *g*HMQC (**Espectro 9**) forneceram as correlações de todos os ^1H com seus respectivos carbonos (**Tab. 6**). O experimento *g*HMBC (**Espectro 10**), forneceu correlações a J^2 e J^3 , definindo a estrutura da molécula. No experimento *g*HMBC observa-se que o H2 ($\delta\ 7,32$) apresenta correlação com os carbonos em $\delta\ 167$ (Carbonila) (C1'), $\delta\ 150$ (C4), $\delta\ 145$ (C3) e $\delta\ 122,4$ (C6). O H5 ($\delta\ 6,76$) apresenta correlação com os carbonos em $\delta\ 145,0$ (C3) e $\delta\ 122,4$ (C6) e finalmente o H6 ($\delta\ 7,27$) apresenta correlação com os carbonos em $\delta\ 167,0$ (carbonila) (C1'), $\delta\ 150,0$ (C4) e $\delta\ 117,1$ (C2). Comparação dos dados obtidos com os da literatura (SOUZA FILHO et al., 2006) permitiu concluir que **lh2** se trata do ácido protocatecuico.

Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ácido protocatecuico (lh2).					
	lh2			SOUZA FILHO et al., 2006	
Posição	^1H (ppm), J (Hz)	^{13}C (ppm)	$g\text{HMBC}$	^1H (ppm), J (Hz) em CD_3OD	^{13}C (ppm) em CD_3OD
1	-	*	-	-	129,9
2	7,32 d (1,5)	117,1	C1'; C4; C3; C6	7,52 d (1,8)	117,8
3	-	145,0	-	-	146,0
4	-	150,0	-	-	151,4
5	6,76 d (8,5)	114,4	C3; C6	6,90 d (8,1)	115,7
6	7,27 dd (8,5; 1,5)	122,4	C1'; C4; C2	7,47 dd (8,1; 1,8)	123,7
1'	-	167,0	-	-	170,2

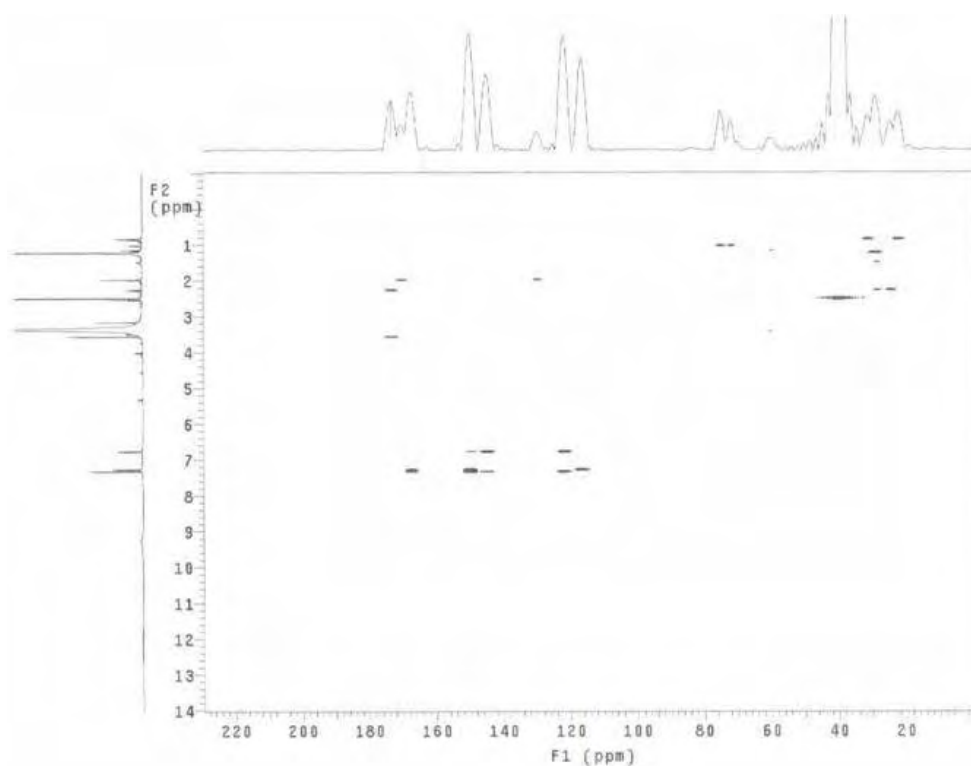
* não observado (^{13}C foram atribuídos através das interações observadas nos experimentos $g\text{HMQC}$ e $g\text{HMBC}$).



Espectro 8. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do ácido protocatecuico (**lh2**).



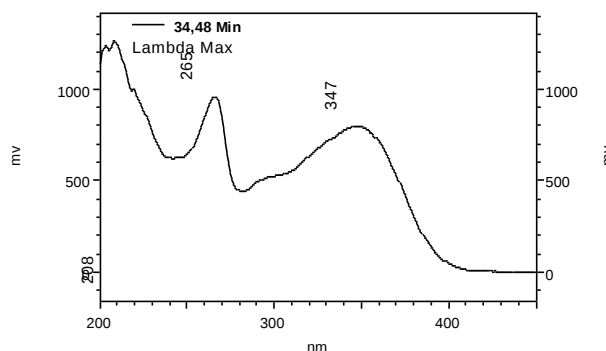
Espectro 9. Experimento bidimensional *gHMQC* (DMSO-*d*₆, 125 MHz) do ácido protocatecuico (**Ih2**).



Espectro 10. Experimento bidimensional *gHMBC* (DMSO-*d*₆, 125 MHz) do ácido protocatecuico (**Ih2**).

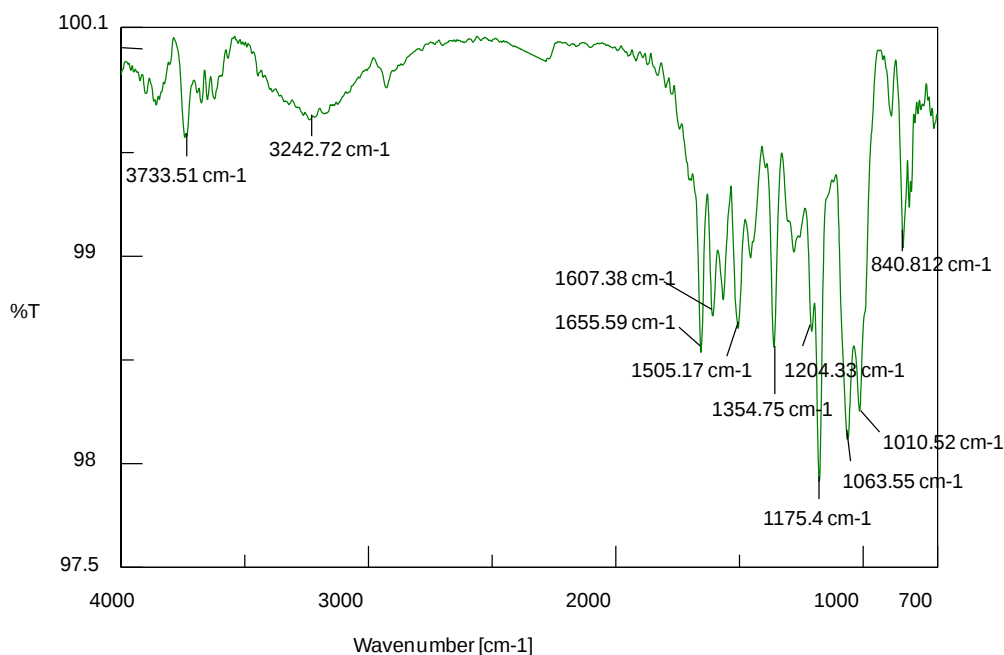
4.4.3 Kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo (**lh3**)

O espectro de absorção no UV (**Espectro 11**) de **lh3** apresentou a Banda II em 264 nm atribuída ao anel A e a Banda I em 345 nm atribuída à conjugação dos anéis B e C. Comparado ao kaempferol, observamos deslocamento hipsocrômico de 22 nm da Banda I causado pela presença do açúcar na posição 3. Conforme Mabry, Markham e Thomas (1970), mudanças na substituição do anel A tendem a se refletir na Banda II, enquanto alterações nos anéis B e C são aparentes na Banda I.



Espectro 11. Espectro de absorção no UV do Kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo (**lh3**).

O espectro no IV da substância **lh3** (**Espectro 12**) apresentou banda atribuída ao estiramento $\nu_{\text{O-H}}$ em 3242 cm^{-1} , banda de estiramento $\nu_{\text{C=O}}$ em 1655 cm^{-1} , bandas de estiramento $\nu_{\text{C=C(aromático)}}$ em 1607 cm^{-1} e em 1505 cm^{-1} , banda de deformação angular no plano $\delta_{\text{O-H}}$ em 1354 cm^{-1} , estiramento $\nu_{\text{C-O}}$ em 1175 cm^{-1} , e banda de deformação angular fora do plano $\delta_{\text{C-H(aromático)}}$ em 840 cm^{-1} .

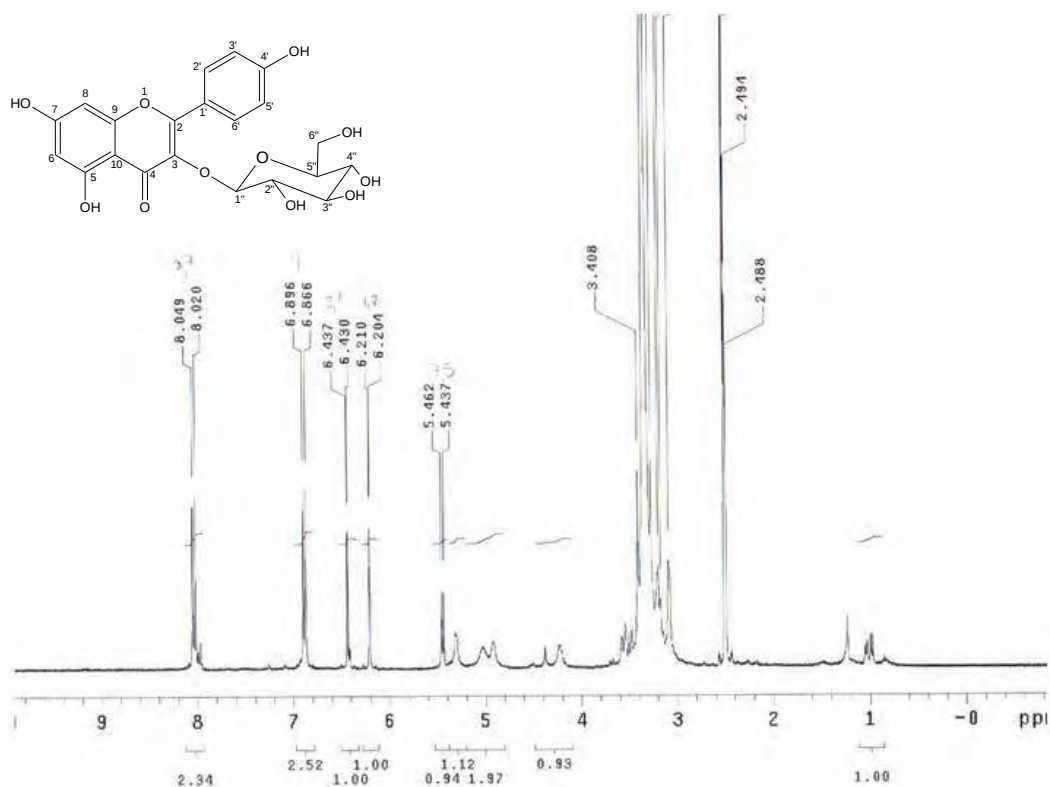


Espectro 12. Espectro no IV do Kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo (**Ih3**).

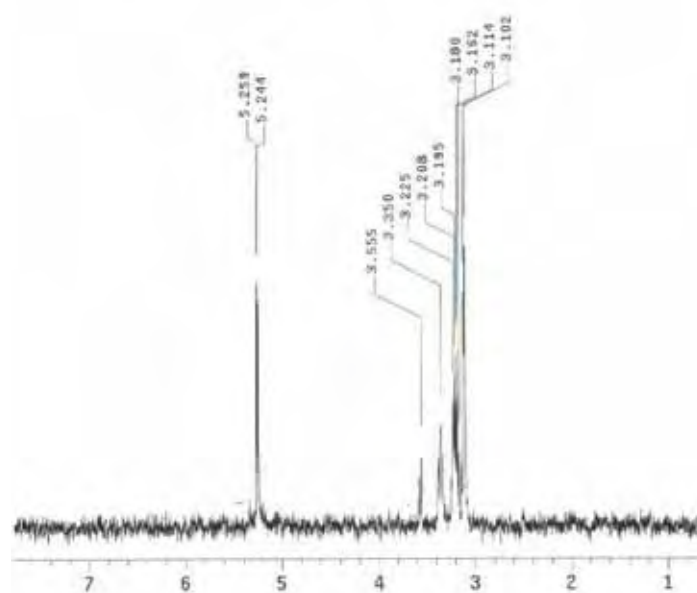
O espectro de RMN de ^1H de **Ih3** (**Espectro 13**, **Tab. 7**) forneceu dubletos (2H, $J=8,7$) Hz em δ 8,05 referente às posições H6' e H2' e em δ 6,89 (H5'/H3') evidenciando acoplamentos na posição *orto*. Estes hidrogênios foram atribuídos ao anel B de um flavonoide. Além desses, observamos dubletos (1H, $J=2,1$ Hz) em δ 6,43 (H8) e em δ 6,20 (H6), evidenciando o acoplamento *meta* do anel A do flavonoide. Em δ 5,45 (1H) observamos um dubleto ($J=7,5$ Hz) referente ao hidrogênio anomérico de uma unidade sacarídica em configuração β . Verificando o espectro TOCSY-1D (**Espectro 14**), identificamos o sistema de spin da β -glucopiranosose. O experimento bidimensional *g*COSY (**Espectro 15**) mostrou as correlações entre os hidrogênios H2'/H3' e H6'/H5'. O espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 16**, **Tab. 7**) mostrou 12 sinais referentes ao esqueleto flavonoídico e mais outros 5 sinais na região dos açúcares. Comparando-se os dados obtidos com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989) foi possível concluir que essa substância trata-se do flavonoide kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo (**Ih3**).

Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) e ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo (**lh3**).

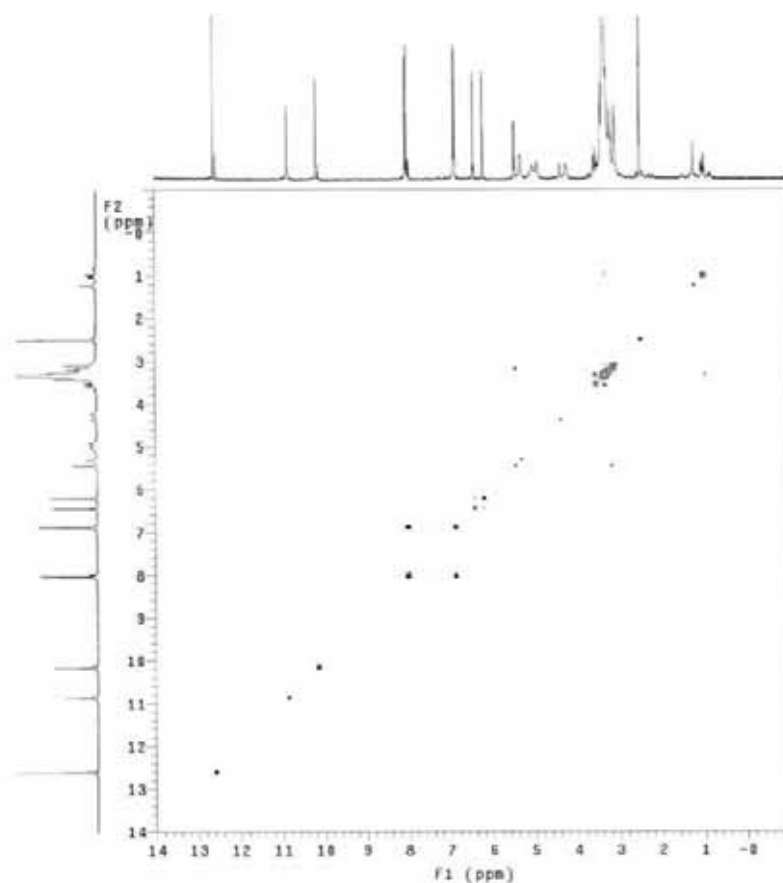
	lh3		kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo
Posição	^1H (ppm), J (Hz)	^{13}C (ppm)	AGRAWAL, 1989 ^{13}C (ppm)
1	-	-	-
2	-	156,2	156,3
3	-	133,2	133,0
4	-	177,4	177,4
5	-	161,2	161,1
6	6,20 <i>d</i> (2,1)	98,6	98,7
7	-	164,1	164,1
8	6,43 <i>d</i> (2,1)	93,6	93,6
9	-	156,4	156,3
10	-	104,0	104,1
1'	-	120,8	121,0
2'	7,97 <i>d</i> (8,5)	130,8	130,7
3'	6,84 <i>d</i> (8,5)	115,1	115,0
4'	-	159,9	159,8
5'	6,84 <i>d</i> (8,5)	115,1	115,0
6'	7,97 <i>d</i> (8,5)	130,8	130,7
Glicose			
1''	5,28 <i>d</i> (7,5)	100,8	101,4
2''	3,18	74,2	74,2
3''	3,20	76,4	76,5
4''	3,10	69,9	70,1
5''	3,13	77,4	77,2
6''	3,55; 3,35	60,8	61,0



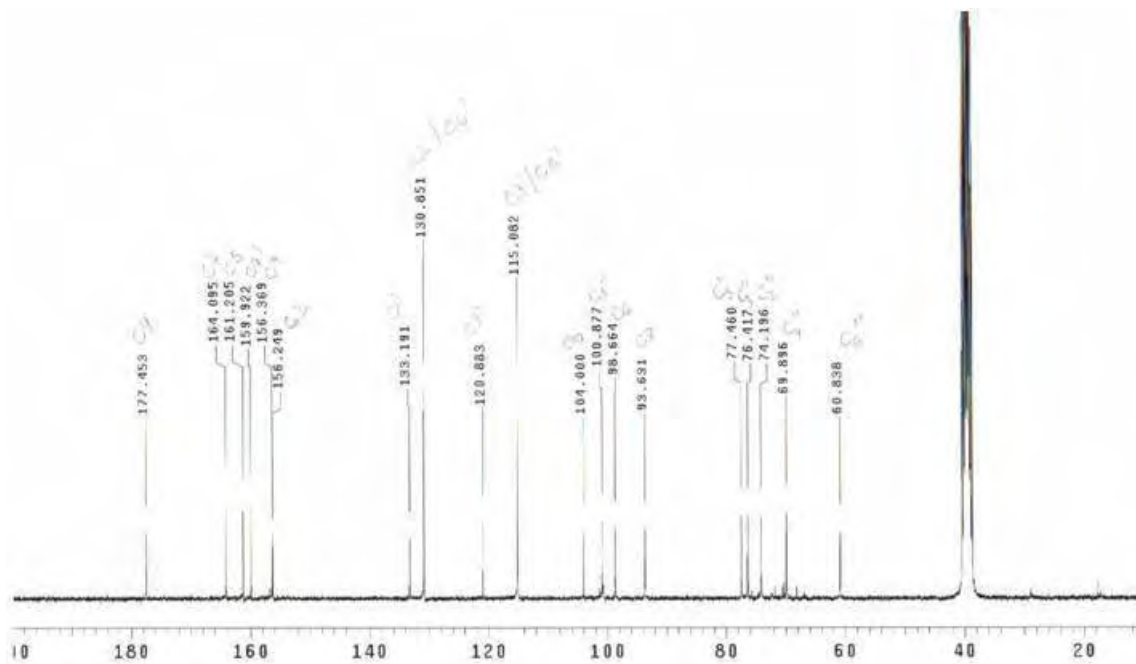
Espectro 13. Espectro de RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz) do kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosideo (**lh3**).



Espectro 14. Experimento TOCSY-1D (DMSO-*d*₆, 300 MHz) do kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosideo (**lh3**).



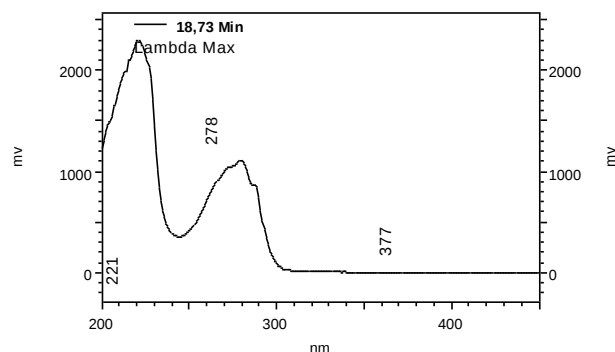
Espectro 15. Experimento bidimensional *g*COSY (DMSO-*d*₆, 300 MHz) do kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosideo (**1h3**).



Espectro 16. Espectro de RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 300 MHz) do kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosideo (**1h3**).

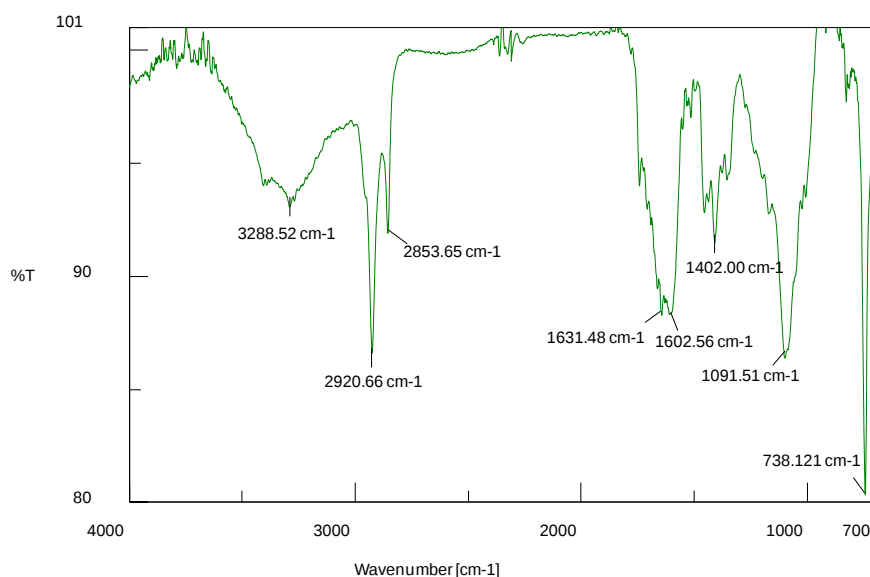
4.4.4 Triptofano (lh4)

O espectro de absorção no UV da substância lh4 (**Espectro 17**) apresentou banda de absorção em 278 nm, semelhante ao descrito para o Triptofano (KADHANE et al., 2008).



Espectro 17. Espectro de absorção no UV do Triptofano (lh4).

O espectro no IV (**Espectro 18**) da substância lh4 apresentou bandas de estiramento assimétrico e simétrico ν_{NH_2} em 3288 cm^{-1} (banda larga), bandas de estiramento $\nu_{\text{C-H}}$ em 2920 cm^{-1} e ν_{CH_2} em 2853 cm^{-1} , banda de deformação angular assimétrica $\delta_{\text{N-H}}$ em 1631 cm^{-1} , bandas de estiramento $\nu_{\text{C=C(arámatico)}}$ e $\nu_{\text{C=N(arámatico)}}$ em 1602 cm^{-1} , estiramento simétrico $\nu_{\text{C-O}}$ em 1402 cm^{-1} , e banda de estiramento $\nu_{\text{C-N}}$ em 1091 cm^{-1} . Estes dados estão de acordo com a estrutura de um aminoácido aromático (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).



Espectro 18. Espectro no IV do Triptofano (lh4).

O espectro de RMN de ^1H de **lh4** (**Espectro 19**) forneceu dois dubletos ($J=8$ Hz) em δ 7,58 (1H; H4) e δ 7,35 (1H; H7); um singlete em δ 7,22 (N-H) e dois duplos duplos dubletos ($J=8, 8, 0,5$ Hz) em δ 7,07 (1H; H6) e em δ 6,98 (1H; H5) na região dos hidrogênios aromáticos. Observamos também sinais em δ 3,50 (1H); δ 3,32 (1H); δ 2,99 (1H). O espectro $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$ (**Espectro 20**) apresentou correlações correspondentes aos acoplamentos entre δ 7,58/6,98 (H4/H5) e δ 7,35/7,07 (H7/H6). Os experimentos bidimensionais $g\text{HMQC}$ (**Espectro 21**) e $g\text{HMBC}$ (**Espectro 22**) (**Tab. 8**) permitiram observar as correlações que levaram a identificação da substância **lh4**.

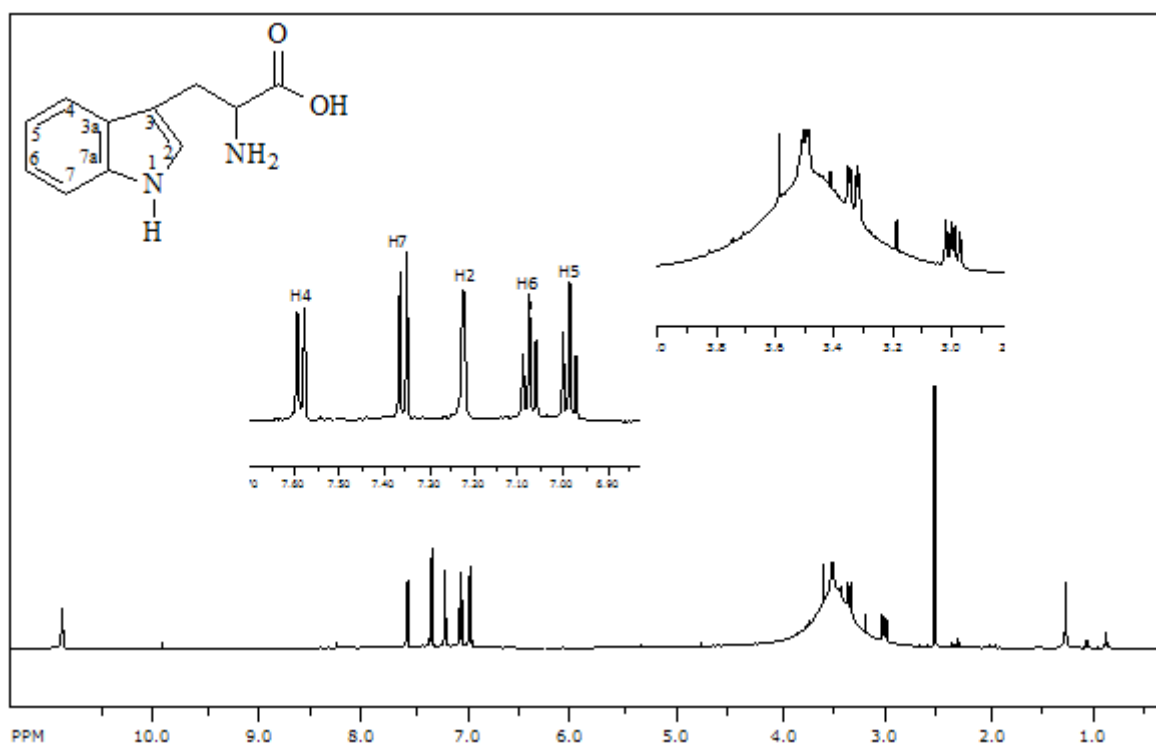
Foi realizado o experimento de rotação ótica em metanol, o qual forneceu o valor de $[\alpha_D]^{26,8} -39,0714$ (1,4 mg.mL $^{-1}$), semelhante ao valor encontrado para o L-Triptofano ($[\alpha_D]^{20} -30,5$ (1 mg.mL $^{-1}$) em água) (Aldrich®).

Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do Triptofano (**lh4**).

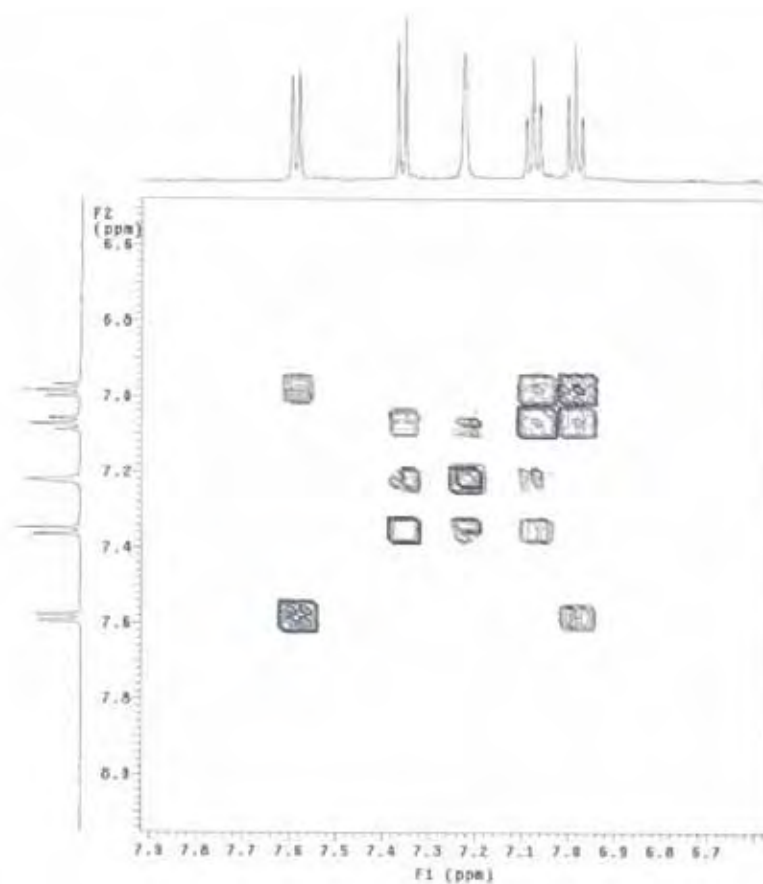
Posição (IUPAC-IUBMB)*	^1H (ppm), J (Hz)	^{13}C (ppm)**	$g\text{HMBC}$
1 (N-H)	-	-	-
2	7,22 s	124,0	C3; C3a; C7a
3	-	110,0	-
4	7,58 d (8,0)	118,0	C3; C5; C7a
5	6,98 ddd (8,0; 8,0; 0,5)	118,0	C7; C3a
6	7,07 ddd (8,0; 8,0; 0,5)	121,0	C4; C7a
7	7,35 d (8,0)	111,0	C5; C3a
3 a	-	127,0	-
7 a	-	136,0	-
α	3,50	54,0	C β
β	3,32	27,0	C α
	2,99	27,0	C α
N-H	10,91	-	C3a

*IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature. [Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides](#). Recommendations on Organic & Biochemical Nomenclature, Symbols & Terminology etc. Disponível em <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>> acesso em 02 fev. 2009.

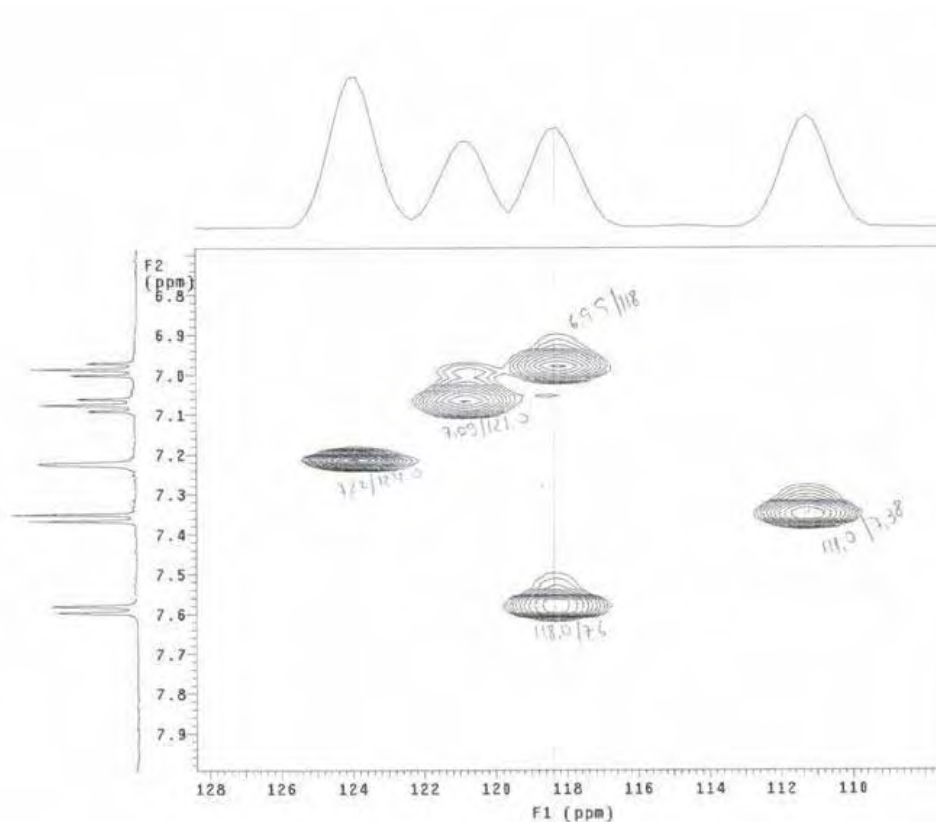
** ^{13}C foram atribuídos através das interações observadas nos experimentos $g\text{HMQC}$ e $g\text{HMBC}$



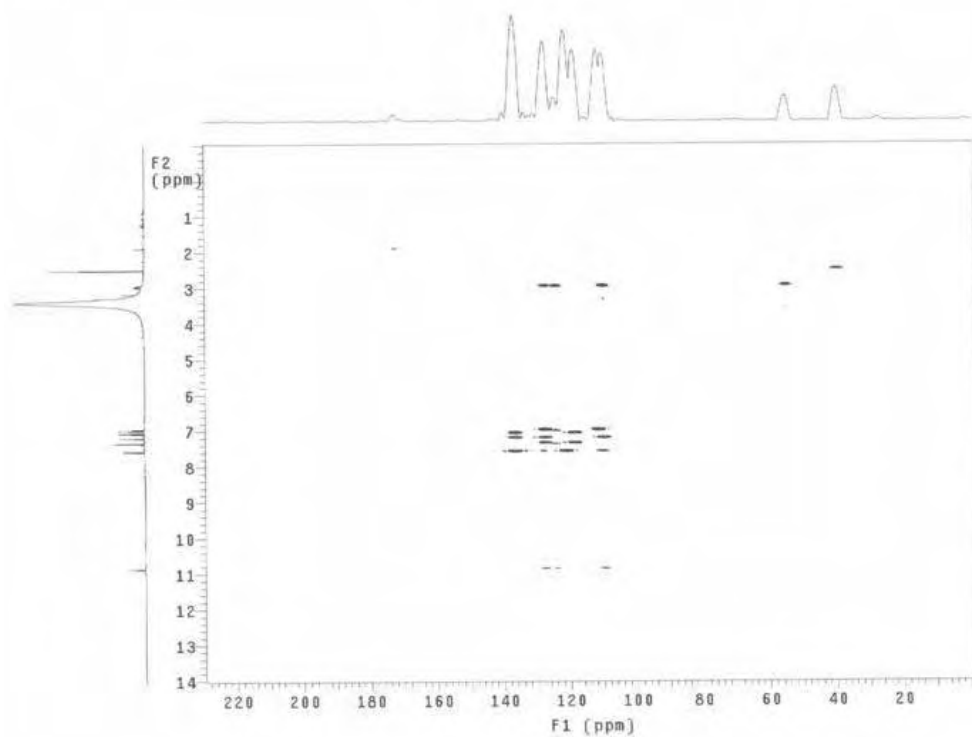
Espectro 19. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) do Triptofano (**lh4**).



Espectro 20. Experimento bidimensional $g\text{COSY}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) do Triptofano (**lh4**).



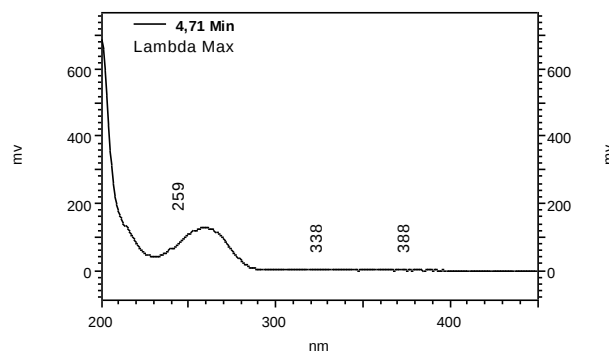
Espectro 21. Experimento bidimensional *gHMQC* (DMSO-*d*₆, 500 MHz) do Triptofano (1h4).



Espectro 22. Experimento bidimensional *gHMBC* (DMSO-*d*₆, 500 MHz) do Triptofano (1h4).

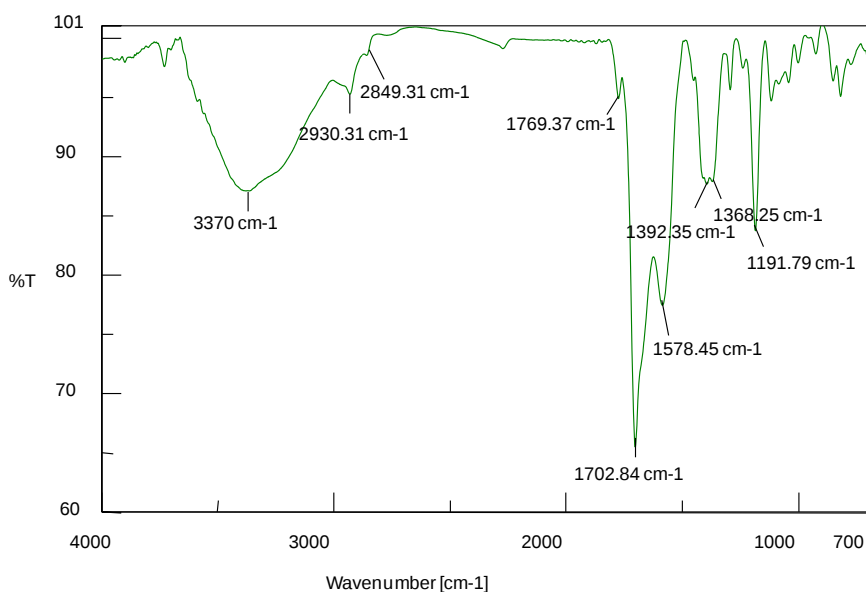
4.4.5 Uracila (lh5)

O espectro de absorção no UV da substância lh5 (**Espectro 23**) apresentou banda em 259 nm, idêntico ao descrito para a uracila (GUSTAVSSON et al., 2007).



Espectro 23. Espectro de absorção no UV da Uracila (lh5).

O espectro no IV da substância lh5 (**Espectro 24**) apresentou banda de estiramento ν_{N-H} em 3370 cm^{-1} , banda de estiramento $\nu_{C=O}$ em 1702 cm^{-1} , banda de deformação angular no plano δ_{N-H} em 1578 cm^{-1} e banda de estiramento ν_{C-N} em 1392 cm^{-1} . Todas essas bandas estão de acordo com as de uma amida (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

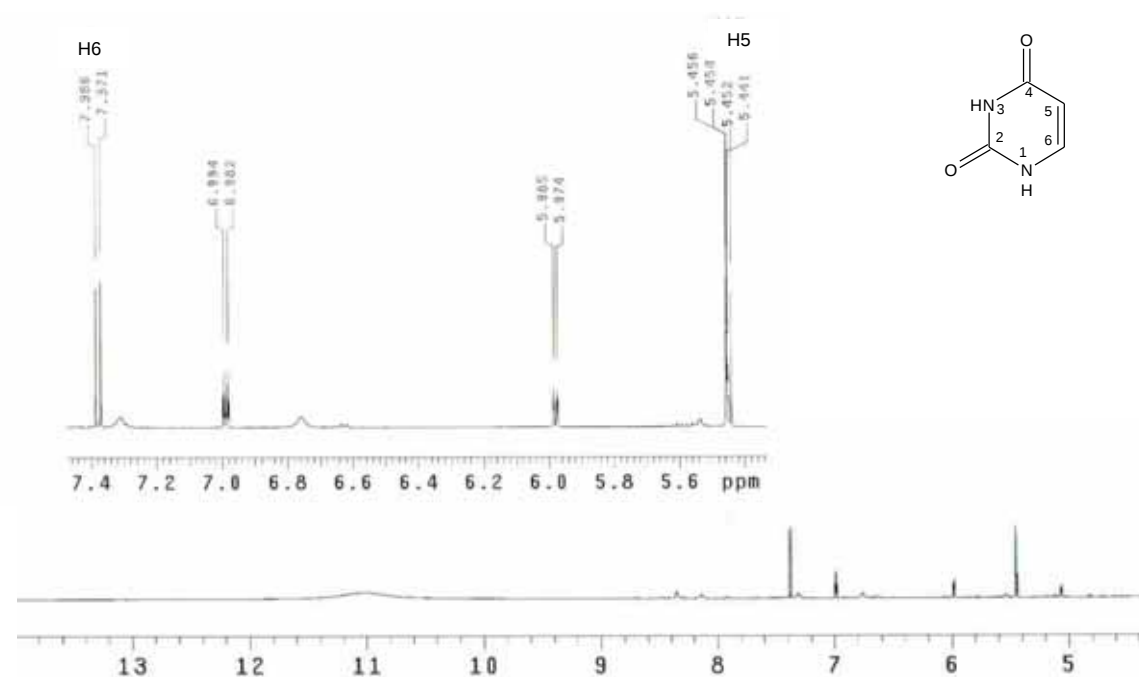


Espectro 24. Espectro no IV da Uracila (lh5).

O espectro de RMN de ^1H (**Espectro 25, Tab. 8**) de **lh5** forneceu dois dubletos de $J=7,5$ Hz em δ 5,45 (H5) e em δ 7,38 (H6). No experimento $g\text{COSY}$ (**Espectro 26**) foi observado o acoplamento destes dois sinais indicando que estes hidrogênios estão *orto*-acoplados. No experimento $g\text{HMBC}$ (**Espectro 27**) foi possível observar as seguintes correlações: H6/C2 e H6/C4. O espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 28**) apresentou sinais em δ 164,4 (C4), δ 151,6 (C2), δ 142,3 (C6), δ 100,2 (C5) (**Tab. 9**). Os dados obtidos comparados com as dados encontrados na literatura (LEPTOKARYDIS, 2008) levaram à identificação de **lh5** como Uracila.

Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e ^1H (DMSO- d_6 , 500MHz) da Uracila (lh5).					
	lh5			Uracila (LEPTOKARYDIS, 2008)	
Posição	^1H (ppm), J (Hz)	^{13}C (ppm)	$g\text{HMBC}$	^1H	^{13}C
1 (N-H)	*	*	*	10,95 s	-
2 (C=O)	-	151,6	-	-	151,5
3 (N-H)	*	*	*	10,79 s	-
4 (C=O)	-	164,4	-	-	164,3
5	5,45 <i>d</i> (7,5)	100,2	*	5,43 <i>d</i> (7,5)	100,2
6	7,38 <i>d</i> (7,5)	142,3	C2/C4	7,35 <i>d</i> (7,5)	142,1

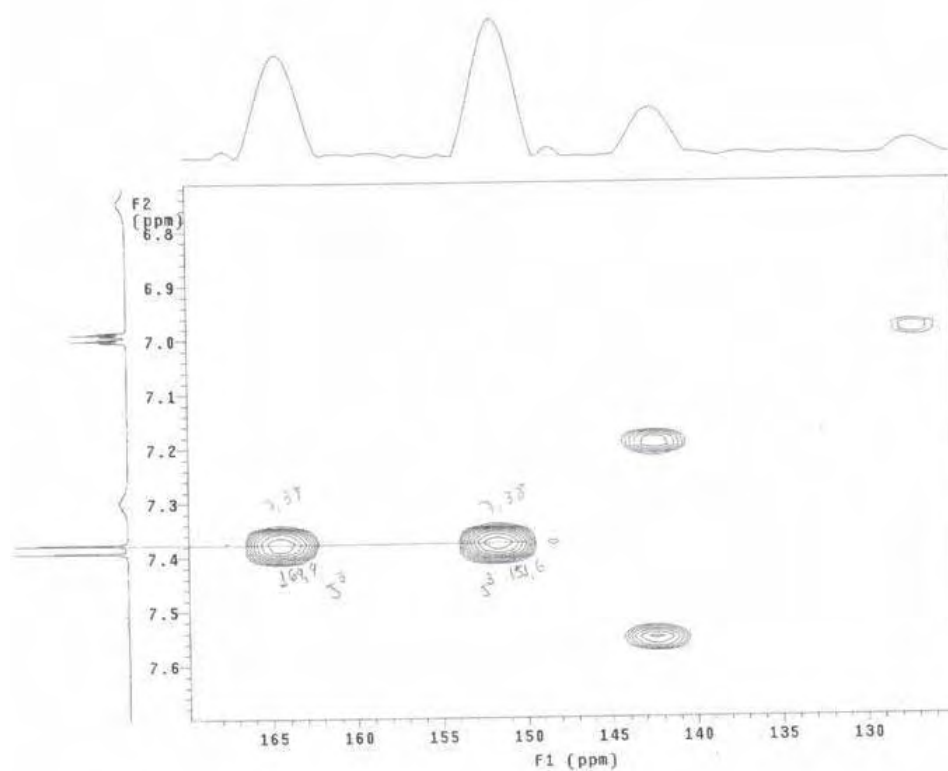
*não detectado



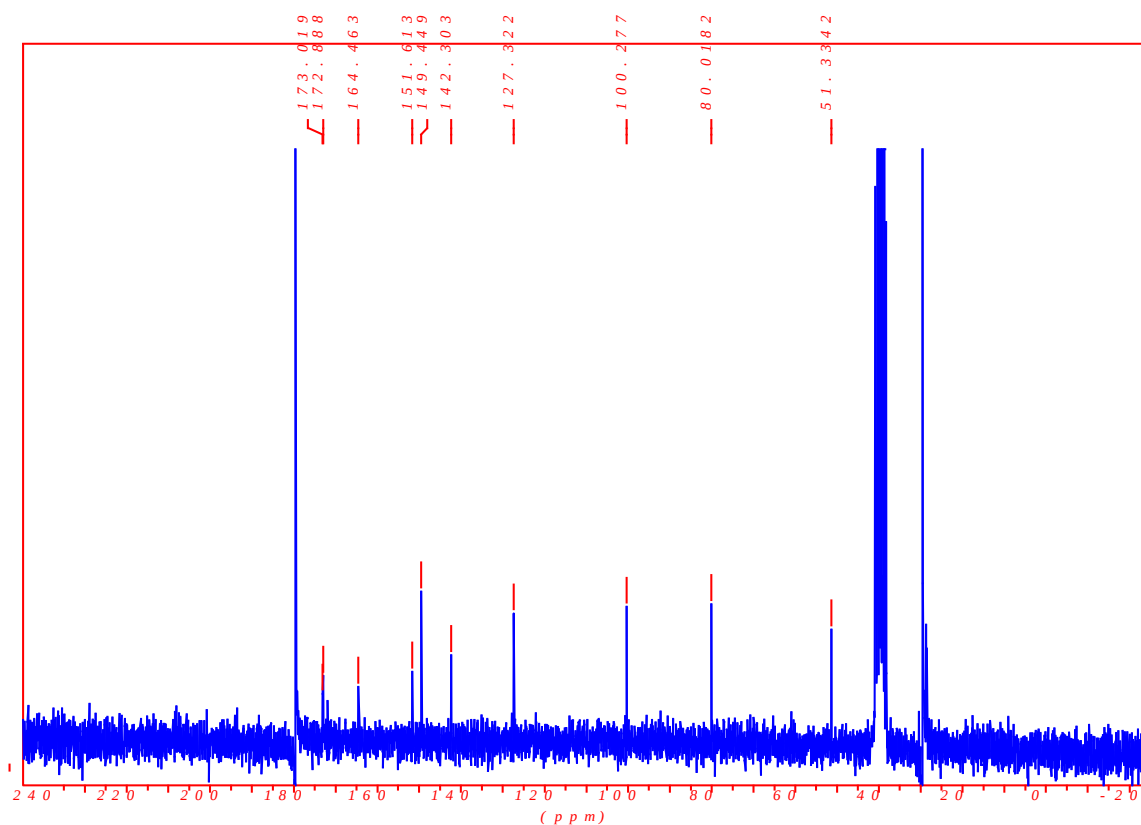
Espectro 25. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) da Uracila (lh5).



Espectro 26. Experimento bidimensional $g\text{COSY}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) da Uracila (lh5).



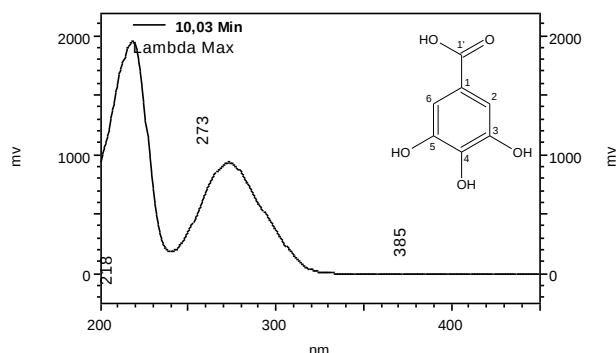
Espectro 27. Experimento bidimensional gHMBC (DMSO- d_6 , 500 MHz) da Uracila (lh5).



Espectro 28. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 50 MHz) da Uracila (lh5).

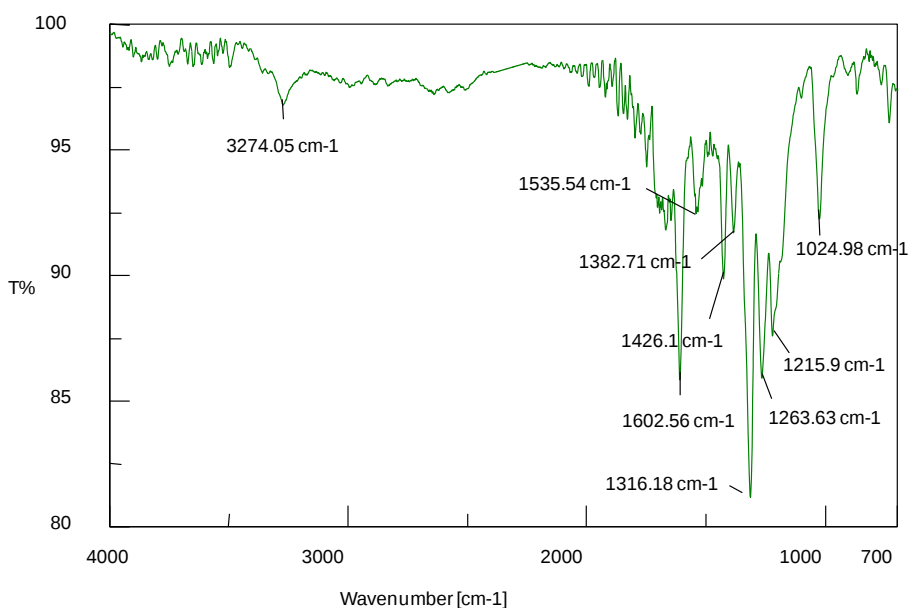
4.4.6 Ácido gálico (lh6)

A substância lh6 apresentou mesmo tempo de retenção (10 mim) do padrão ácido gálico, quando analisado por HPLC nas condições descritas no item 4.2. Além disso, o espectro de absorção no UV dessa substância (**Espectro 29**) apresentou uma banda em 273 nm, também idêntico ao padrão do ácido gálico (RINALDO, 2007).



Espectro 29. Espectro de absorção no UV do ácido gálico (lh6).

O espectro no IV de lh6 (**Espectro 30**) apresentou banda de estiramento $\nu_{\text{O-H}}$ em 3274 cm^{-1} , banda de estiramento $\nu_{\text{C=O}}$ (conjugado) em 1602 cm^{-1} , e banda de estiramento $\nu_{\text{C=C}}$ (aromático) em 1535 cm^{-1} , coerentes para a descrição de um ácido carboxílico aromático (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

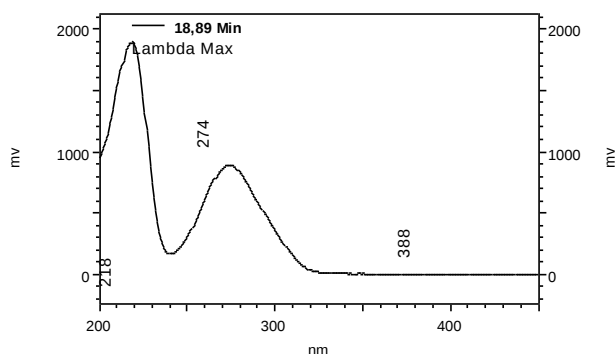


Espectro 30. Espectro no IV do ácido gálico (lh6).

Estes dados mais os obtidos por Espectrometria de Massas (item 5) levaram à identificação de **lh6** como ácido gálico.

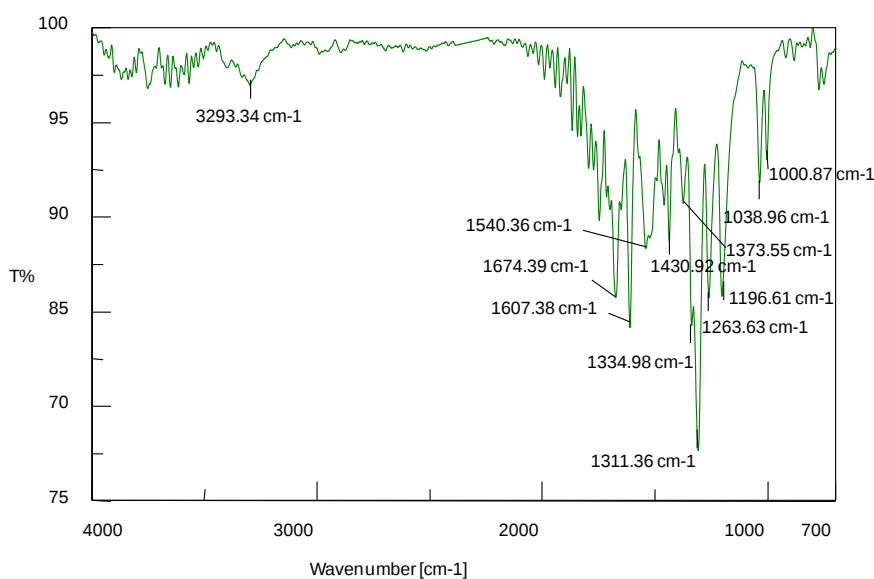
4.4.7 Galato de metila (**lh7**)

A substância **lh7** apresentou banda de absorção no UV (**Espectro 31**) em 274 nm e t_r de 18,8 min nas condições de análise utilizadas. Estes dados são idênticos aos de padrão galato de metila.



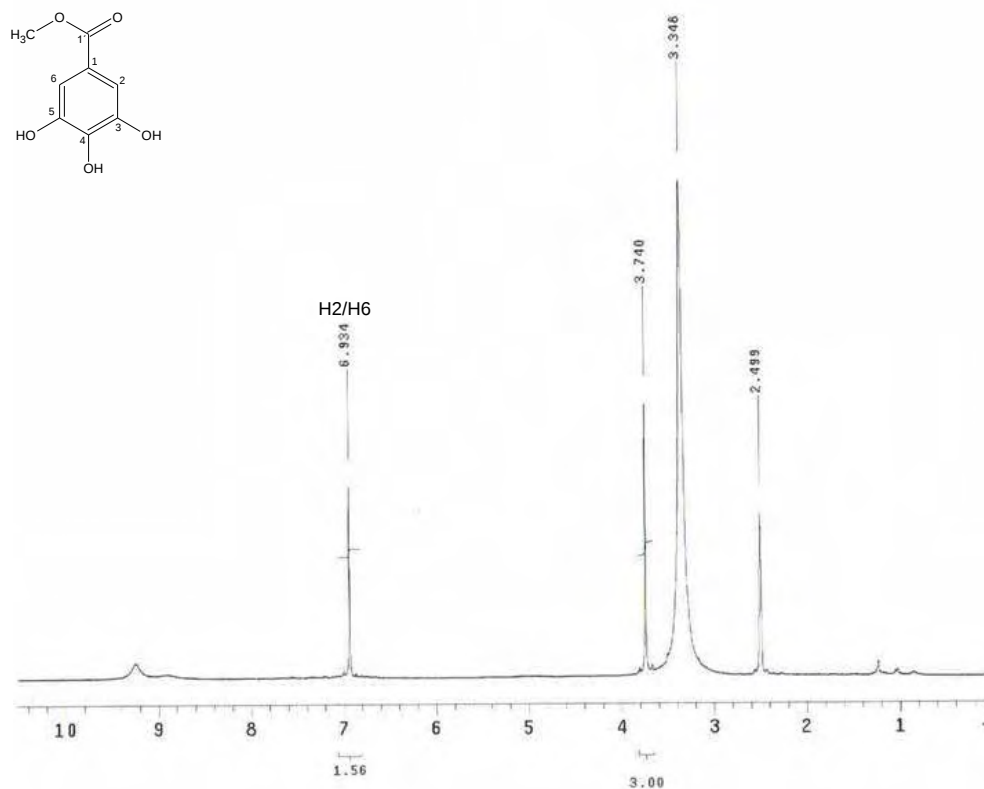
Espectro 31. Espectro de absorção no UV do galato de metila (**lh7**).

O espectro no IV de **lh7** (**Espectro 32**) apresentou banda de estiramento ν_{O-H} em 3293 cm^{-1} , banda de estiramento $\nu_{C=O(\text{conjugado})}$ em 1674 cm^{-1} , e banda de estiramento $\nu_{C=C(\text{aromático})}$ em 1540 cm^{-1} . Essas bandas são coerentes com as descritas para um éster conjugado ao anel aromático (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).



Espectro 32. Espectro no IV do galato de metila (**lh7**).

O espectro de RMN de ^1H de **lh7** (**Espectro 33**) apresentou dois singletos: um em δ 6,93 (2H), correspondente aos hidrogênios H2 e H6 e outro em δ 3,74 (3H), correspondente a uma metoxila. Comparação com dados de RMN de ^1H da literatura (CERUKS et al., 2007) e injeção de padrão no HPLC (**Fig. 13**) possibilitaram confirmar que **lh7** é o galato de metila, pois ambos apresentaram o mesmo t_r (18,8 min) e absorção em 274 nm.



Espectro 33. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) do galato de metila (**lh7**).

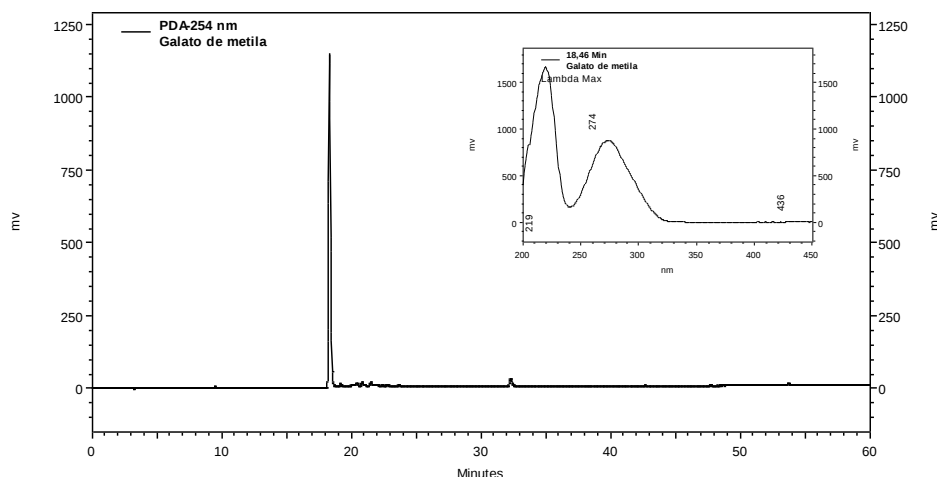
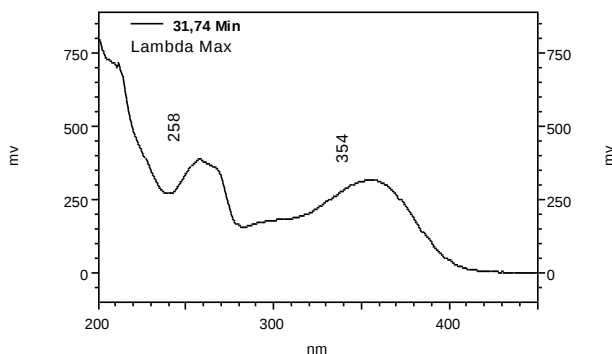


Figura 13. Análise do padrão galato de metila por HPLC.

4.4.8 Rutina (lh8)

A substância lh8 apresentou bandas de absorção na região do UV em 258 nm e 354 nm (**Espectro 34**), semelhantes as descritas para o flavonoide rutina (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Essa substância apresentou também t_r (31,7 min) semelhante ao padrão de rutina quando analisado nas mesmas condições cromatográficas (31,4 min) (**Fig. 14**).



Espectro 34. Espectro de absorção no UV da rutina (lh8).

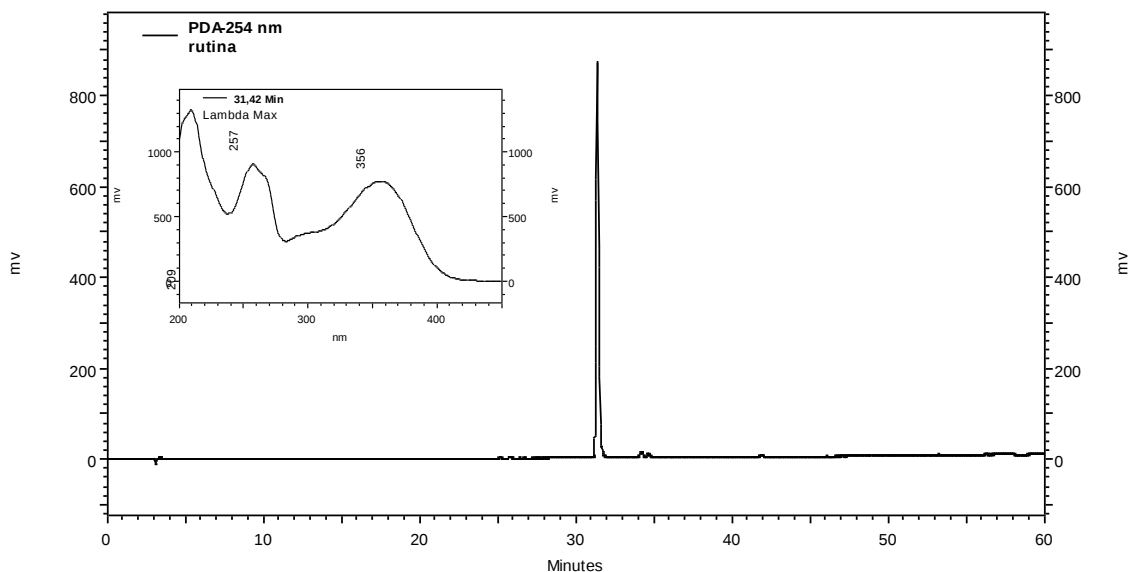
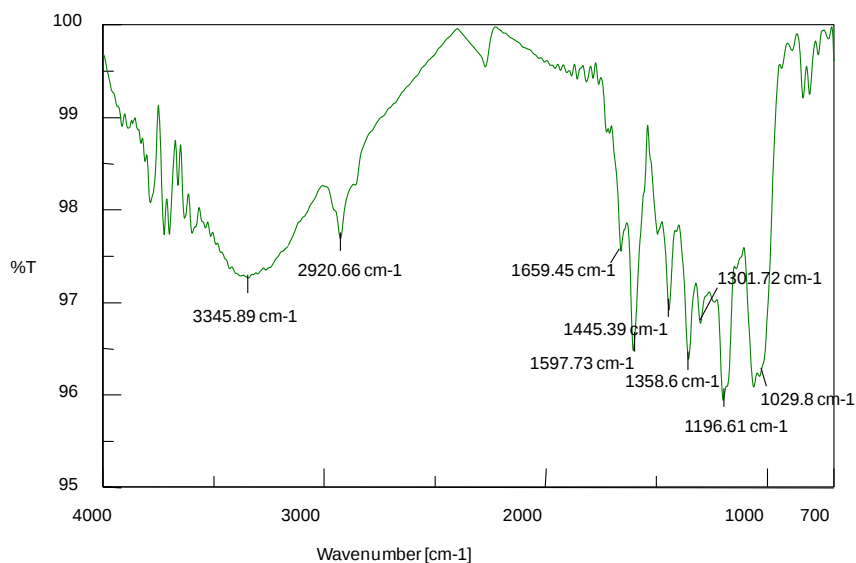


Figura 14. Análise do padrão rutina por HPLC (t_r igual a 31,4 min).

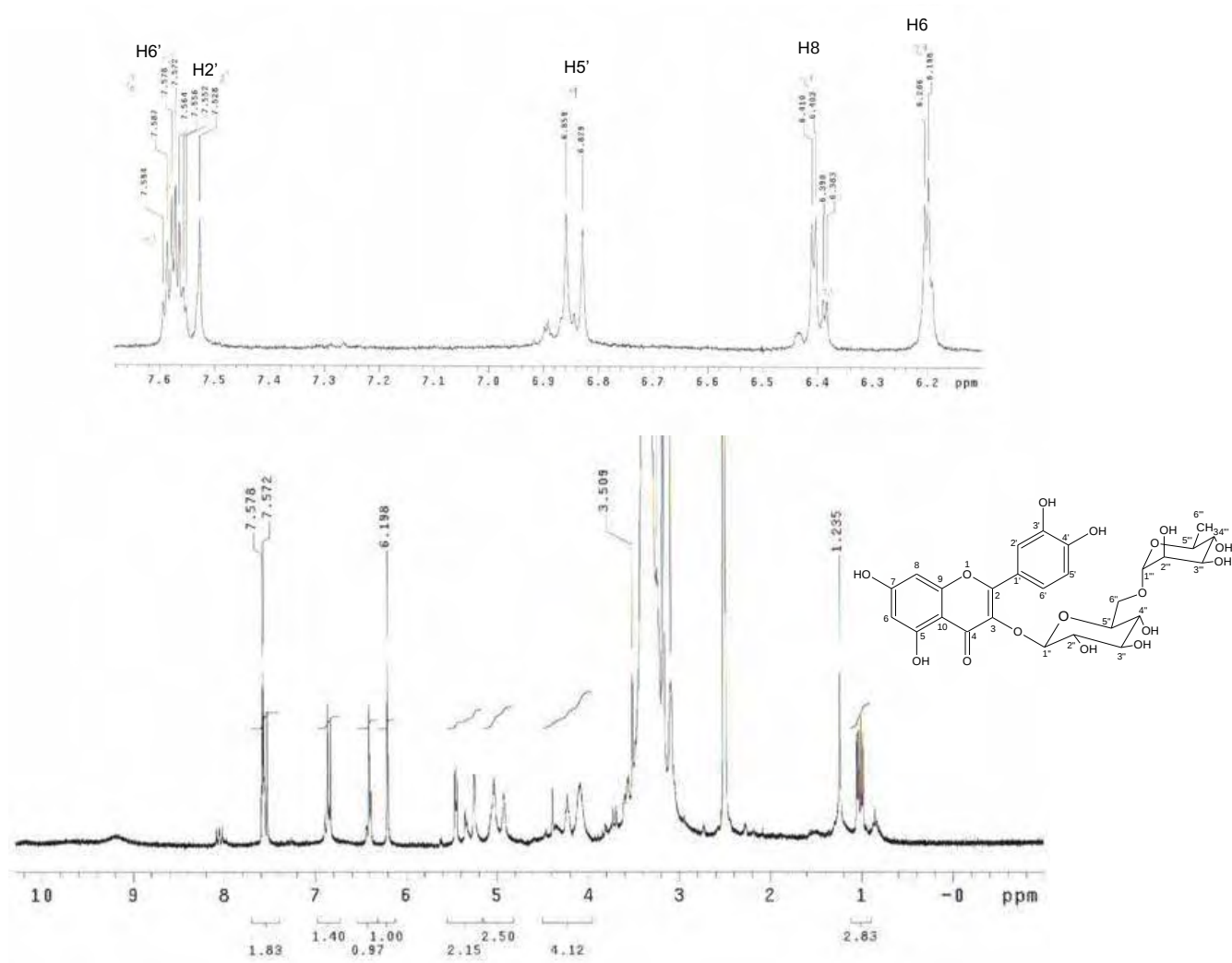
O espectro no IV da substância lh8 (**Espectro 35**) apresentou banda atribuída ao estiramento ν_{O-H} em 3345 cm^{-1} , banda de estiramento ν_{C-H} em 2920 cm^{-1} , banda de estiramento $\nu_{C=O}$ em 1659 cm^{-1} , bandas de estiramento

$\nu_{\text{C}=\text{C}(\text{aromático})}$ em 1597 cm^{-1} e em 1445 cm^{-1} , banda de deformação angular no plano $\delta_{\text{O}-\text{H}}$ em 1358 cm^{-1} , e banda de estiramento $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ em 1196 cm^{-1} .



Espectro 35. Espectro no IV da rutina (**lh8**).

O espectro de RMN de ^1H (**Espectro 36**; **Tab. 10**) apresentou 5 sinais na região de ^1H aromáticos: um dubleto em δ 6,20 de $J=2,1\text{ Hz}$ (1H; H6); um dubleto em δ 6,40 de $J=2,1\text{ Hz}$ (1H; H8); um dubleto em δ 7,53 de $J=2,0\text{ Hz}$ (1H; H2'); um dubleto em δ 6,83 de $J=9\text{ Hz}$ (1H; H5') e um duplo dubleto em δ 7,57 de $J=9,0$ e $2,0\text{ Hz}$ (1H; H6'), evidenciando que se tratava de um derivado da quercetina (HARBONE, 1986). Em δ 5,44 (1H; H1'') observamos um dubleto de $J=7,2\text{ Hz}$ referente ao hidrogênio anomérico em configuração β da glicose, e em δ 4,38 ($J=1,0$) (1H; H1''') observamos o sinal referente ao hidrogênio anomérico em configuração α . Observa-se ainda a presença do dubleto em 0,99 ($J=6,0$) que foi atribuído a metila de uma raminose. O espectro de massas (**Espectro 41**) discutido na página 78, possibilitou identificar as perdas de 146 referente a raminose e 162 referente a glicose. A comparação desses dados com a literatura (HARBONE, 1986; CALVO, 2007) e a comparação por HPLC com o padrão permitiu concluir que **lh8** trata-se da rutina (quercetina-3-O- β -D-glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)- α -L-raminopiranosídeo).



Espectro 36. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) da rutina (Ih8).

Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) da rutina (**lh8**).

Posição	lh8 ^1H (ppm), <i>J</i> (Hz)	rutina (HARBONE, 1996) ^1H (ppm), <i>J</i> (Hz)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	6,20 <i>d</i> (2,1)	6,18 <i>d</i> (2,0)
7	-	-
8	6,40 <i>d</i> (2,1)	6,38 <i>d</i> (2,0)
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	7,53 <i>d</i> (2,0)	7,53 <i>d</i> (2,0)
3'	-	-
4'	-	-
5'	6,83 <i>d</i> (9,0)	6,84 <i>d</i> (8,0)
6'	7,57 <i>dd</i> (7,8; 2,4)	7,55 <i>dd</i> (8,0; 2,0)
Glicose		
1''	5,44 <i>d</i> (7,2)	5,34 <i>d</i> (7,5)
2''	*	3,23 <i>m</i>
3''	*	3,26 <i>m</i>
4''	*	3,06 <i>m</i>
5''	*	3,28 <i>m</i>
6''	*	3,70; 3,72 <i>m</i>
ramnose		
1'''	4,38 <i>d</i> (1,0)	4,39 <i>d</i> (1,0)
2'''	*	3,42 <i>m</i>
3'''	*	3,28 <i>m</i>
4'''	*	3,08 <i>m</i>
5'''	*	3,30 <i>m</i>
6'''	0,99 <i>d</i> (6,0)	1,0 <i>d</i> (6,5)

*não detectado

5 Análise dos extratos por HPLC-DAD-ESI-MS (TOF)

5.1 HPLC-DAD-ESI-MS (TOF)

O extrato aquoso e o EMeOH foram analisados por HPLC-DAD-ESI-MS (TOF), a fim de confirmar as estruturas das substâncias encontradas nesses extratos.

A análise combinada de HPLC-DAD e HPLC-ESI-MS é muito utilizada na identificação de compostos orgânicos. Liang et al. (2009) descreve alguns fatores como t_r , $\lambda_{\max}$ de absorção e os íons moleculares para ácido gálico e flavonóides. Gabbo Neto e Lopes (2008) utilizaram os mesmos fatores para uma diversidade de substâncias como: flavonoides e terpenos. Além dessas, outras como, ácidos clorogênicos (MARQUES; FARAH, 2009) e alcaloides (coptisina e berberrubina) (LIANG et al., 2006) também foram identificados usando-se de técnicas acopladas, sendo úteis também na caracterização estrutural de novos compostos (SHAHAT et al., 2005).

A preparação dos extratos foi idêntica à realizada para caracterização por HPLC-DAD (item 4.2). As condições de análise foram semelhantes. Foi utilizado sistema HPLC-DAD (Shimadzu®) (Coluna Shimadzu® NST18 5 μ m (250 X 4,60 mm), 254 nm, 1 mL.min⁻¹, Gradiente: Solvente A: H₂O acidificado com 0,05 % de TFA, Solvente B: MeOH acidificado com 0,05 % de TFA, 5% B – 100% B (60 min)).

Inicialmente os extratos foram injetados sendo obtidos os cromatogramas monitorados por DAD ($\lambda=254$ nm) e por MS. Esses cromatogramas foram então analisados (t_r e massas) a fim de que fossem selecionados os íons de interesse para realização da fragmentação de segunda ordem (Ms^2). Escolhidos os íons, os extratos foram novamente injetados, sendo obtidos os cromatogramas (*full scan*) e a fragmentação de segunda ordem (**Fig. 15**).

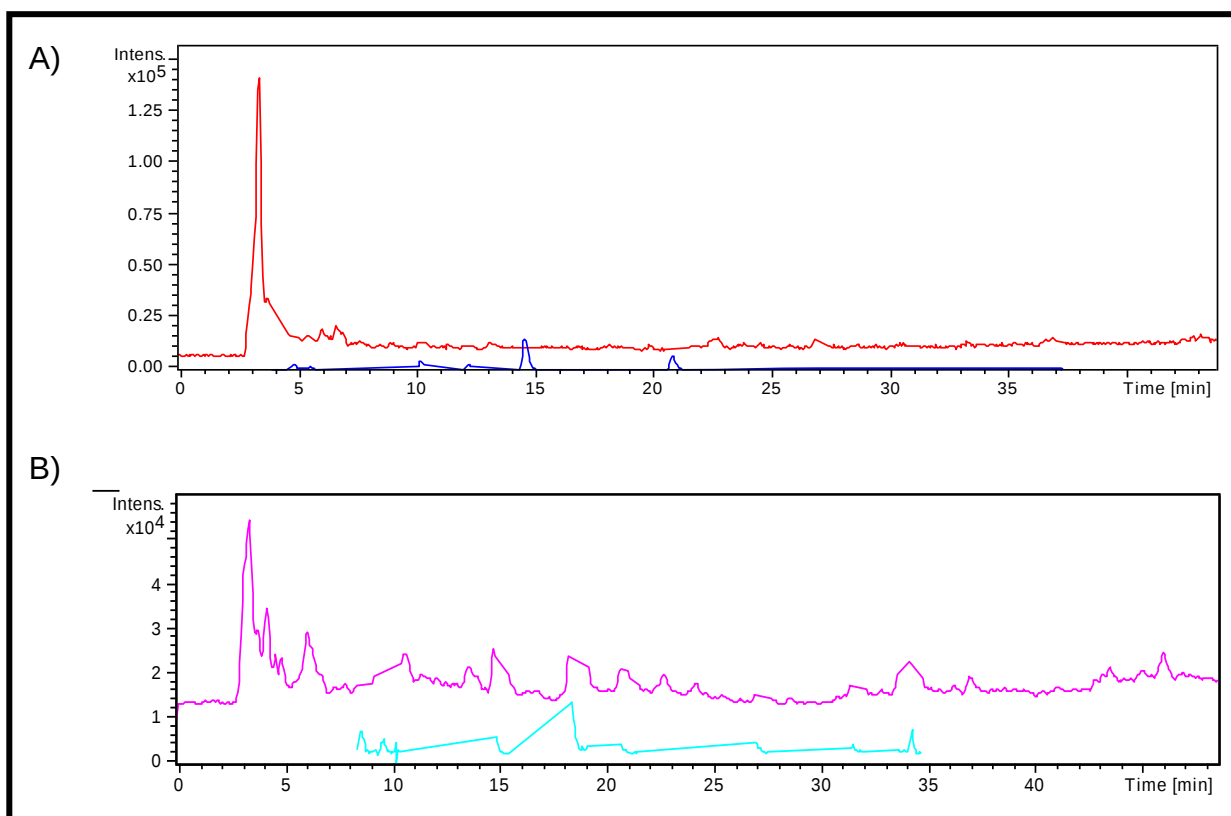


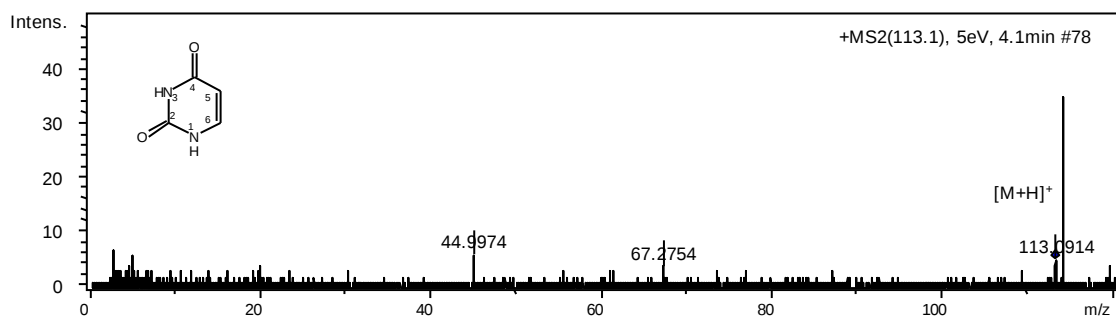
Figura 15. Cromatogramas obtidos por HPLC-MS, modo positivo.

A) Extrato aquoso  Fragmentação de primeira ordem
 Fragmentação de segunda ordem

B) EMeOH:  Fragmentação de primeira ordem
 Fragmentação de segunda ordem

Os espectros de massas foram selecionados tomando-se como referência os t_r das substâncias.

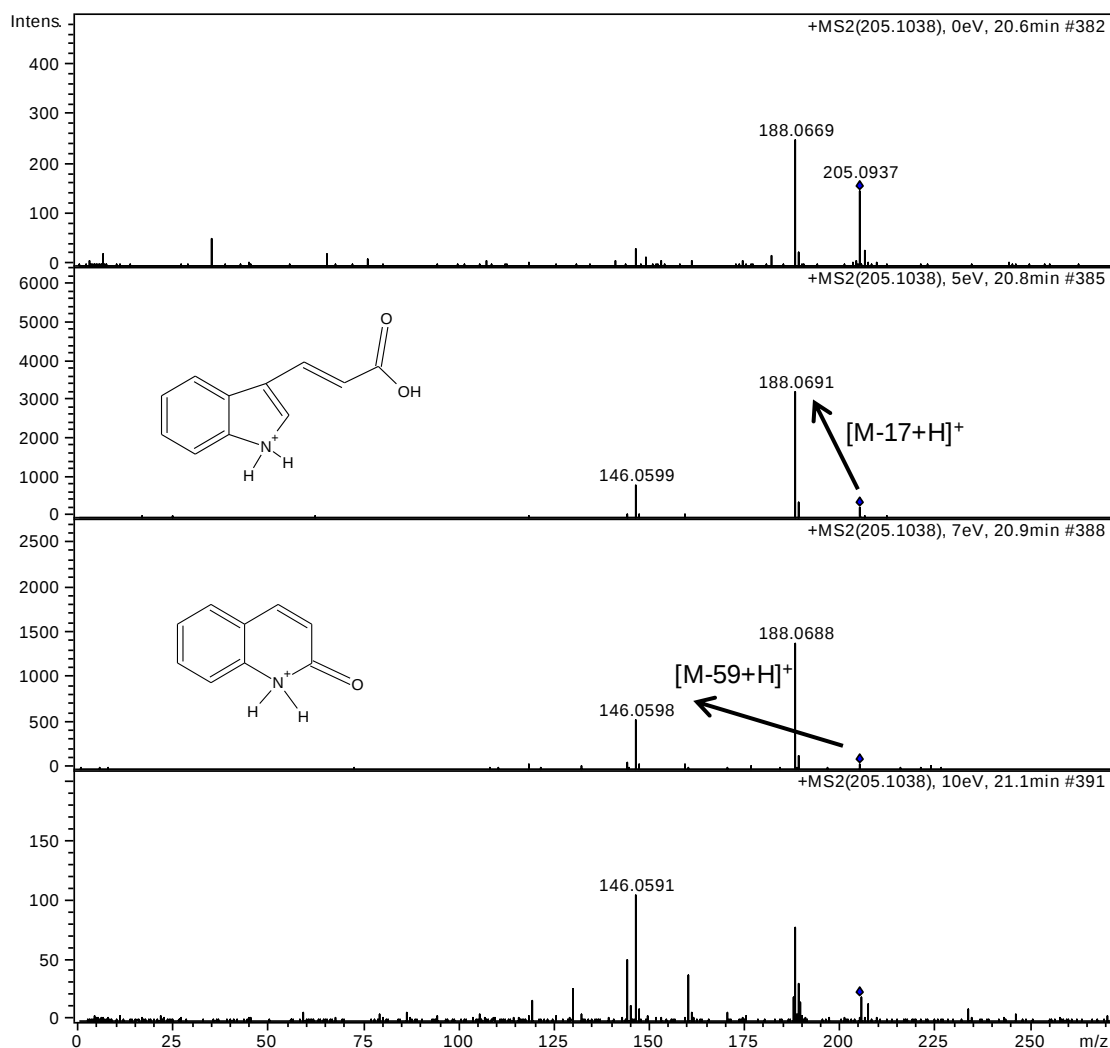
No extrato aquoso, analisamos o espectro de massas da substância com t_r de 4 min (**Espectro 37**). Foi possível observar a molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 113 ($C_4O_2H_5N_2$). Esse resultado, juntamente com os dados de RMN, IV e UV, discutidos anteriormente, confirmam a estrutura da Uracila (**1h5**).



Espectro 37. Espectro de massas (Ms^2) da Uracila (Ih5).

Ainda no extrato aquoso, no espectro de massas da substância com t_r de 20 min, observamos a molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 205 ($C_{11}O_2H_{13}N_2$) (**Espectro 38**). A fragmentação de segunda ordem (Ms^2) dessa molécula gerou os íons m/z 188 referente à perda de NH_3 (fragmento $C_{11}O_2H_{10}N$) e m/z 146 referente ao fragmento C_9OH_8N .

Para essa molécula foi possível observar o efeito do aumento da energia fornecida à molécula protonada. Seleccionamos os espectros com 0 eV, 5 eV, 7 eV e 10 eV e observamos o aumento da intensidade dos fragmentos m/z 188 e m/z 146 e a diminuição do íon precursor em m/z 205 (**Espectro 38**). Os resultados da fragmentação estão de acordo com a estrutura proposta para Ih4 (Tryptofano) (DOMINGUES et al., 2003; WEERT et al., 1998).

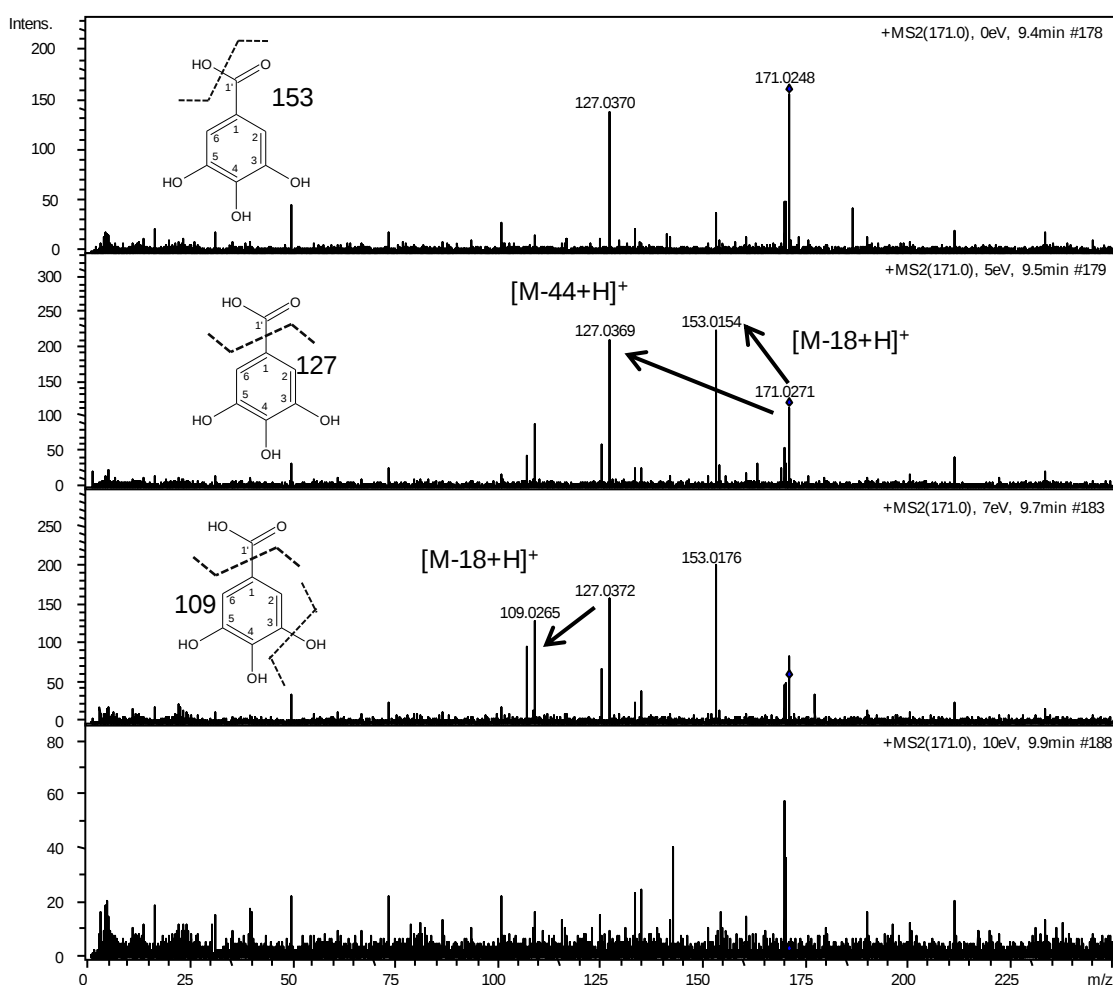


Espectro 38. Espectros de massas (Ms^2) do Triptofano (**Ih4**) em diferentes energias.

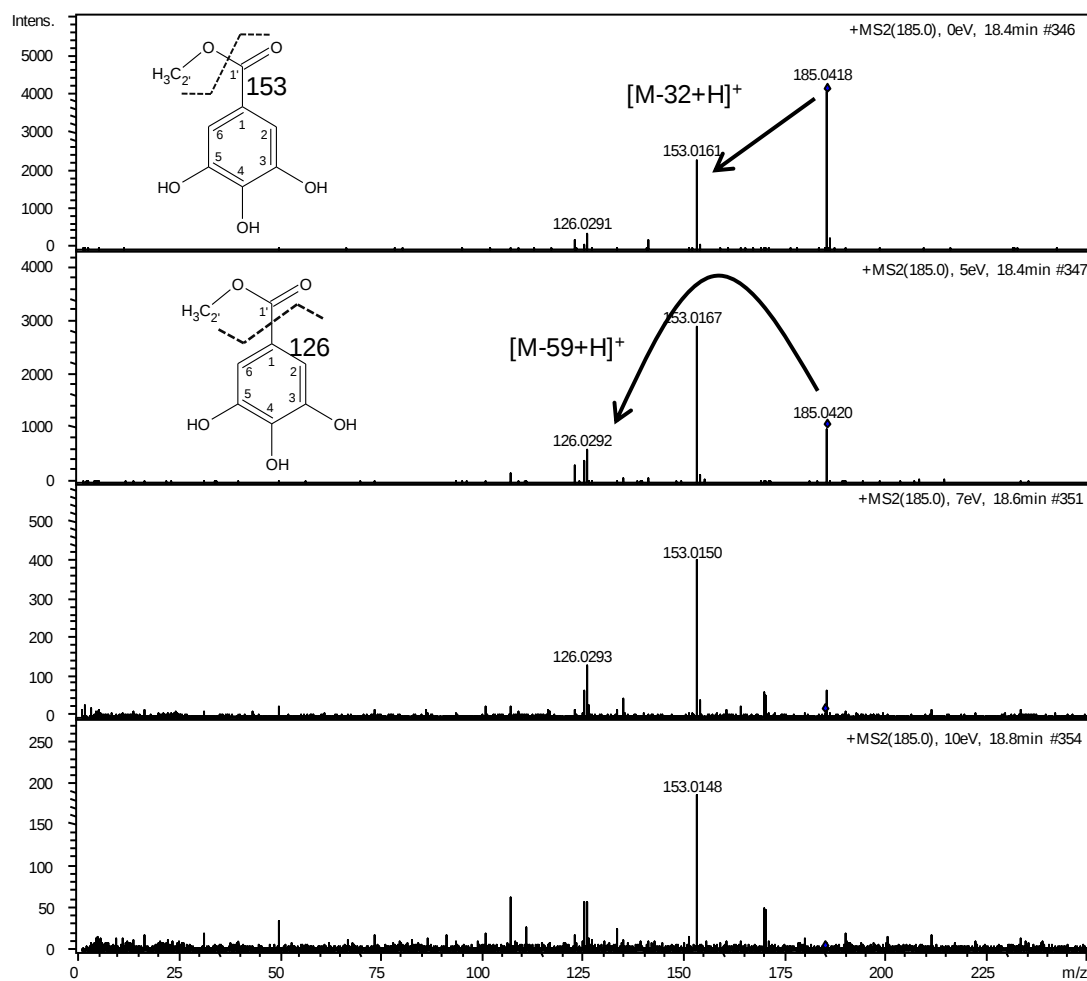
No EMeOH analisamos os espectros de massas das substâncias com t_r em 9 min (**Espectro 39**), 18 min (**Espectro 40**), 31 min (**Espectro 41**) e 34 min (**Espectro 42**). Nestes espectros observamos os íons moleculares $[M+H]^+$ em m/z 171, m/z 185, m/z 611 e m/z 449 respectivamente. A partir da fragmentação de segunda ordem (Ms^2) desses íons observamos a formação dos íons produtos (**Tab. 11**). Com esses dados confirmamos as estruturas das substâncias isoladas e identificadas no EMeOH de *Indigofera hirsuta*.

Tabela 11. Dados espectrométricos das substâncias identificadas no EMeOH de *I. hirsuta*.

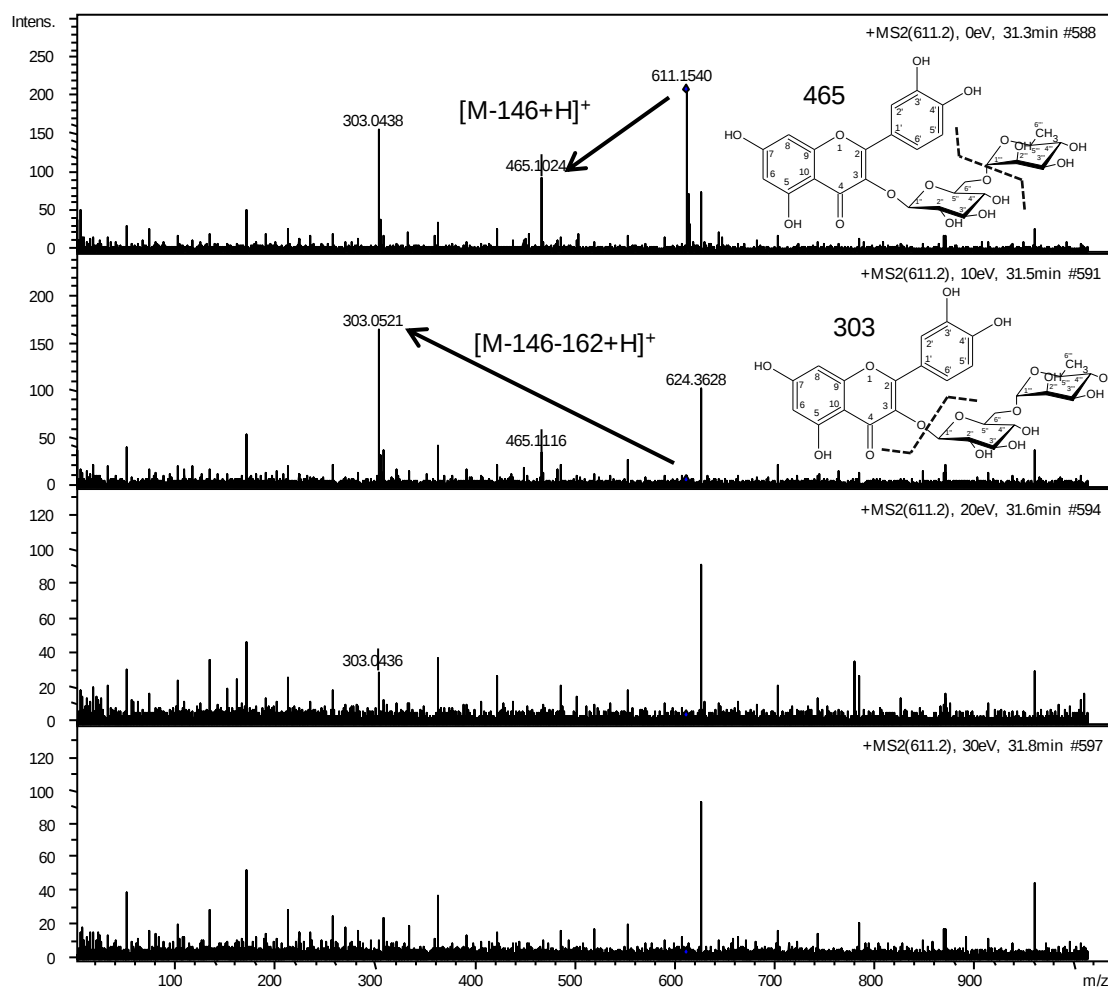
Substância	t _r (min)	Íon precursor ([M+H] ⁺) m/z	Íons produtos (Ms ²) m/z
Ácido gálico (lh6)	9	171	153, 127, 109
Galato de metila (lh7)	18	185	153, 126
Rutina (lh8)	31	611	465, 303
Kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosideo (lh3)	34	449	287



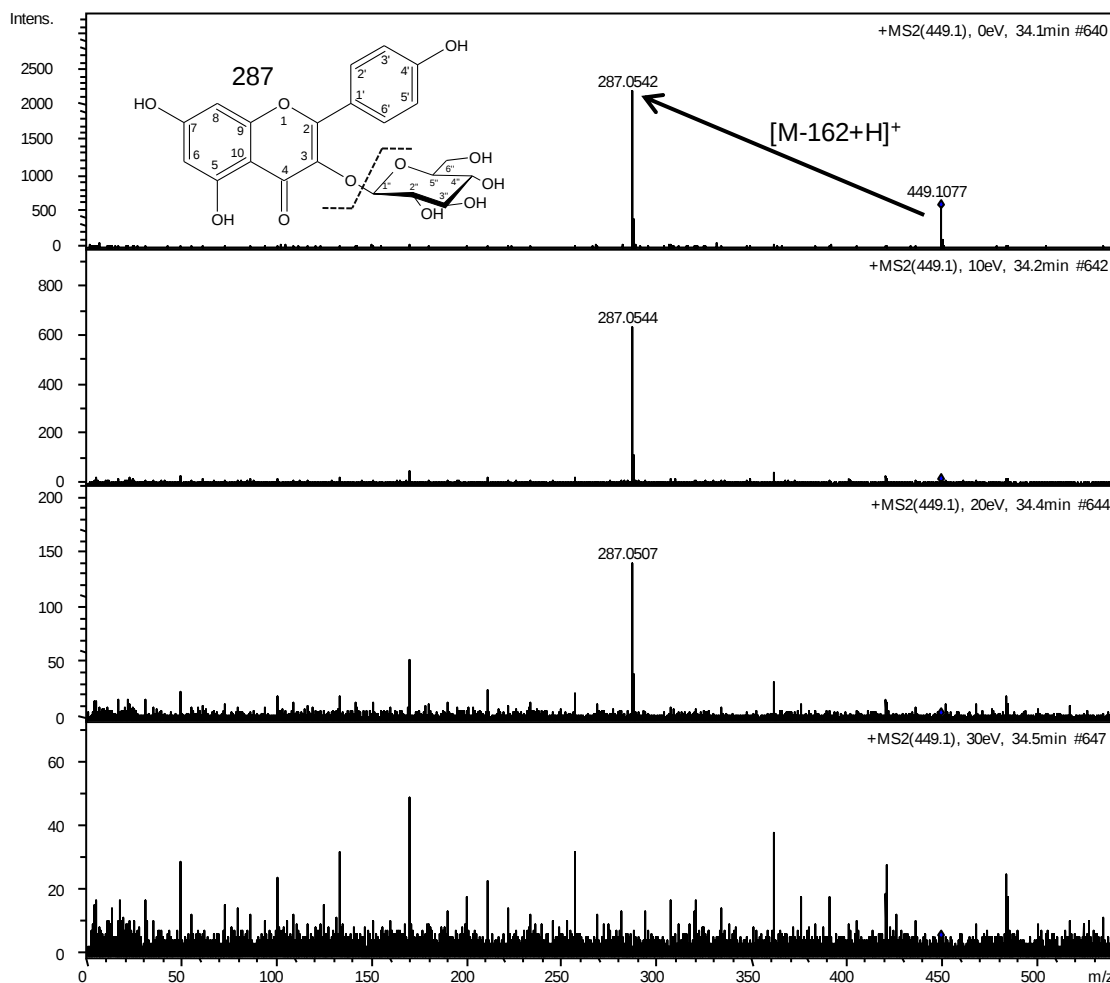
Espectro 39. Espectros de massas do Ácido gálico (**lh6**) em diferentes energias (0 eV, 5 eV, 7 eV e 10 eV).



Espectro 40. Espectros de massas do Galato de metila (**1h7**) em diferentes energias (0 eV, 5 eV, 7 eV e 10 eV).



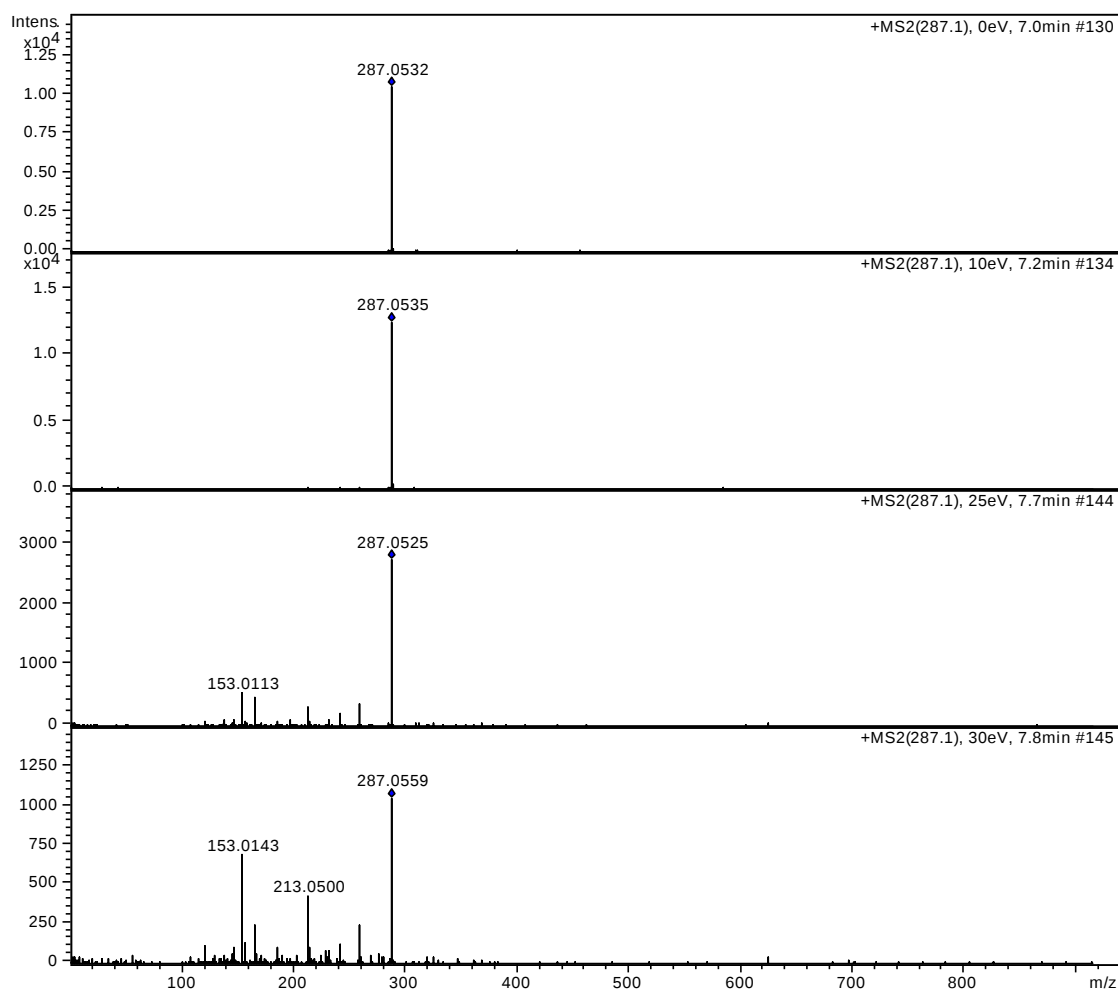
Espectro 41. Espectros de massas da rutina (**lh8**) em diferentes energias (0 eV, 10 eV, 20 eV e 30 eV).



Espectro 42. Espectros de massas do Kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosideo (**Ih3**) em diferentes energias (0 eV, 10 eV, 20 eV e 30 eV).

5.2 Inserção direta de amostra

O flavonoide kaempferol (**Ih1**) foi analisado por espectrometria de massas por inserção direta. A análise dos espectros de massas (**Espectro 43**) de **Ih1** permitiu observarmos a molécula protonada $[M+H]^+$ em *m/z* 287. A fragmentação de segunda ordem gerou o íon produto em *m/z* 153 ($C_7H_5O_4$) referente à fragmentação Retro Diels-Alder do flavonoide (MABRY; ULUBELEN, 1980) (**Fig.16**).



Espectro 43. Espectros de massas do Kaempferol (Ih1) em diferentes energias (0 eV, 10 eV, 25 eV e 30 eV).

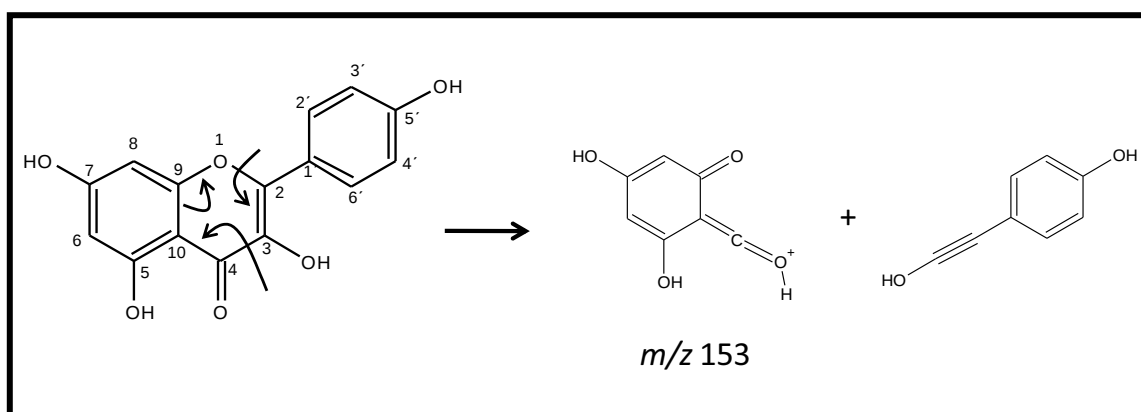


Figura 16. Fragmentação Retro Diels-Alder do Kaempferol (Ih1).

6 Atividade antioxidante com DPPH

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a propriedade antioxidante em extratos e substâncias isoladas consiste em utilizar a atividade sequestradora do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila). O DPPH é caracterizado como um radical livre estável em consequência da deslocalização do elétron livre (**Fig. 17**), que dá à molécula uma absorção máxima em 517 nm, fornecendo coloração violeta em solução (MeOH grau HPLC) (MOLYNEAUX, 2004).

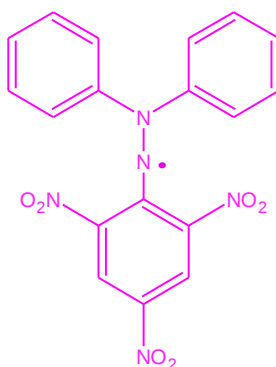


Figura 17. Estrutura do DPPH.

Em presença de um antioxidante, o DPPH tem a capacidade de sequestrar um hidrogênio radicalar formando o difenilpicrilhidrazina (**Fig. 18**) (forma reduzida), que apresenta coloração amarela. Com isso, é observado diminuição da absorção em 517 nm (SILVA, 2008).

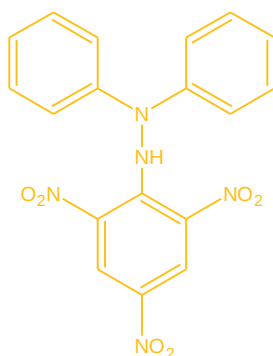


Figura 18. Estrutura da forma reduzida do DPPH.

Essa diferença de absorção é monitorada através de ensaio utilizando-se espectrofotômetro no qual são medidas as absorbâncias das amostras analisadas. Para cada amostra são preparadas soluções de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A solução de DPPH (4 mg.mL^{-1}) deve ser preparada preferencialmente minutos antes das medidas de absorbância e armazenada em recipiente recoberto por papel alumínio (MOLYNEAUX, 2004; SILVA, 2008). As soluções são misturadas na seguinte proporção: 2 mL da solução de DPPH e 1 mL da amostra analisada. O branco, solução de referencia, é a mistura de 2 ml de DPPH mais 1 ml de metanol. As leituras das absorbâncias são realizadas após 30 min de reação e a atividade antioxidante medida através da equação: $(\% \Delta_0) = 100 \times (A_0 - A)/A_0$ (Jang et al., 2010), na qual, $(\% \Delta_0)$ é a medida da variação de absorbância, A_0 é a absorbância da solução de referência e A é absorbância da amostra após 30 min de reação. Todas as medidas são realizadas em 517 nm que é o máximo de absorção do DPPH (JANG et al., 2010).

Utilizando esta metodologia, foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos de *Indigofera hirsuta* (Fig. 19).

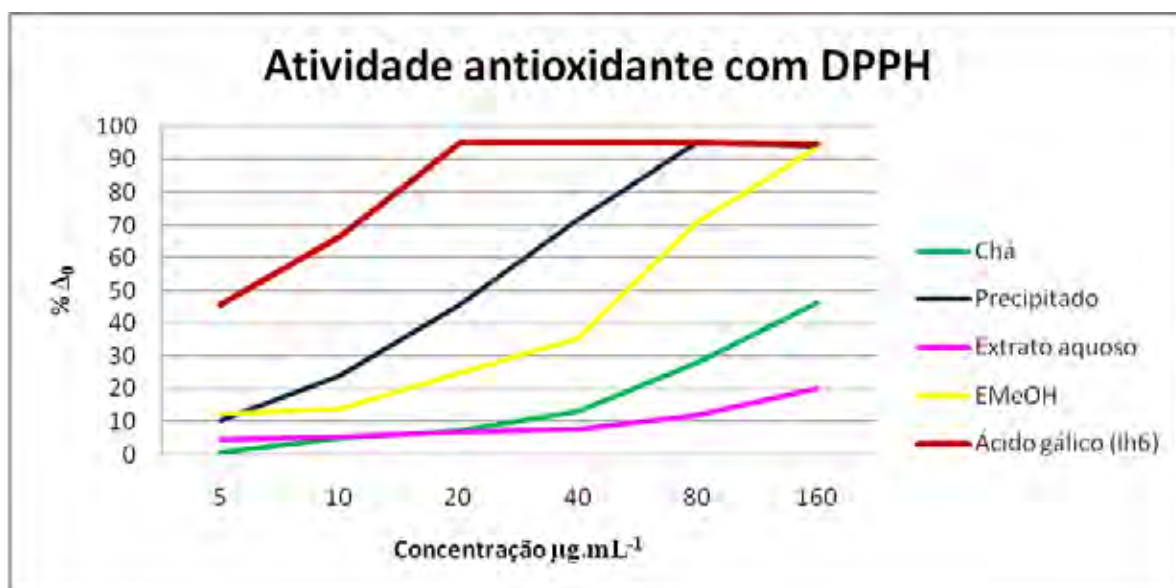


Figura 19. Resultado da avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Indigofera hirsuta*.

Além dos extratos, avaliamos também a atividade antioxidante das substâncias isoladas (**lh1** a **lh8**) de *Indigofera hirsuta* (**Fig. 20**).

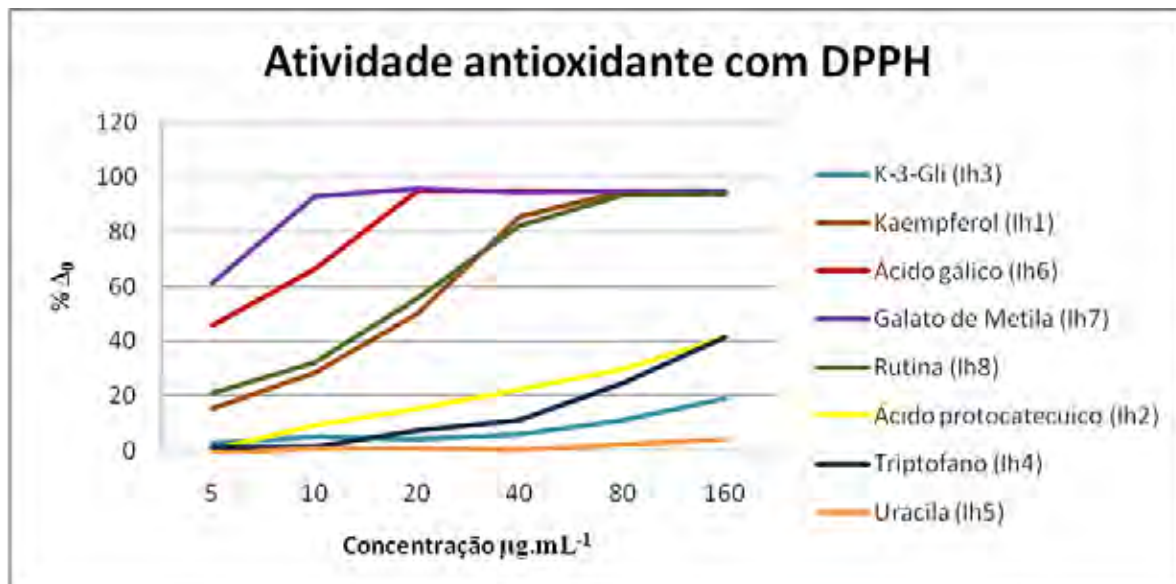


Figura 20. Resultado da avaliação da atividade antioxidante das substâncias isoladas de *Indigofera hirsuta*.

Podemos observar (**Fig. 19**) que o Precipitado amarelo e o EMeOH apresentam significativa atividade antioxidante quando comparados à referência (ácido gálico). Isso está de acordo com as substâncias encontradas nesses extratos:

- ✓ Precipitado amarelo: Kempferol (**lh1**), ácido protocatecuico (**lh2**) e outros flavonoides minoritários não identificados (**Fig. 5 A**). Dentre estes, observamos elevada atividade antioxidante para o kaempferol e atividade média para o ácido protocatecuico (**Fig. 20**).
- ✓ EMeOH: Ácido gálico (**lh6**), galato de metila (**lh7**), rutina (**lh8**) e kempferol-3-gli (**lh3**). Dentre esses, os três primeiros com elevada atividade antioxidante e o último (**lh3**) com baixa atividade (**Fig. 20**).

Entretanto, o extrato aquoso e o chá (extrato aquoso + precipitado amarelo) não apresentaram atividade antioxidante significativa (**Fig. 19**). Ainda assim, o chá apresentou uma atividade maior que o extrato aquoso, justificado pela presença dos flavonoides encontrados no precipitado, enquanto que no

extrato aquoso foram encontrados triptofano (**lh4**) e uracila (**lh5**), que apresentaram pouca ou nenhuma atividade antioxidante, quando comparados com o padrão (ácido gálico) (**Fig. 20**).

7 Atividade Antiúlcera

A atividade antiúlcera do chá de *Indigofera hirsuta* foi avaliada pela Profa. Clélia Akiko Hiruma-Lima (IB-Unesp-Botucatu).

O efeito protetor da mucosa gástrica depende do bloqueio da secreção ácida da mucosa e também da citoproteção (defesa da mucosa) (DAJANI; KLAMUT, 2000). A ingestão aguda de etanol pode estar associada à geração de espécies reativas de oxigênio que desequilibram os processos oxidante e antioxidante celular, modificando a permeabilidade da membrana da mucosa, alterando a resistência aos íons H^+ secretados (VAZQUEZ-RAMIREZ et al., 2006).

A atividade do chá foi avaliada em 3 diferentes doses: 125 mg.Kg⁻¹, 250 mg.Kg⁻¹ e 500 mg.Kg⁻¹ (Fig. 21).

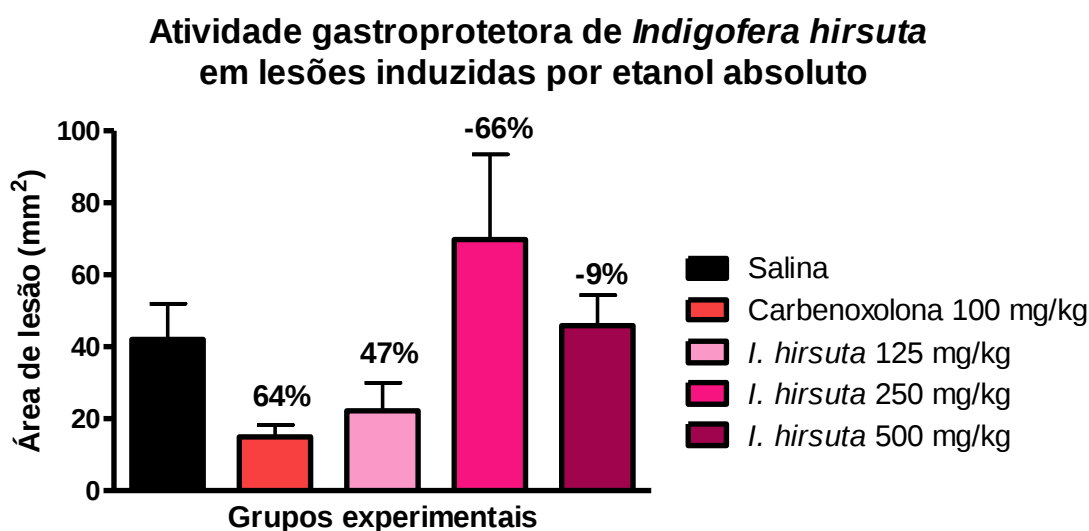


Figura 21. Ensaio da atividade antiúlcera do chá de *Indigofera hirsuta*.

O chá das partes aéreas de *I. hirsuta* não foi efetivo na redução das lesões promovidas pelo etanol. A menor dose foi a que apresentou melhor efeito, o que pode significar um possível efeito gastroprotetor com a redução dessas doses, já que compostos fenólicos podem apresentar efeito pró-oxidante em grandes concentrações.

8 Considerações Finais

Espécies do gênero *Indigofera* apresentam na literatura diversos estudos em que são descritos seus constituintes químicos e atividades farmacológicas. *Indigofera hisruta*, porém, é pouco conhecida, tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico, há somente a descrição de um flavonoide diglicosilado (kaempferol 3,5-digalactosídeo) e atividade antiparasitária para plantas.

Este trabalho visou o estudo fitoquímico do chá e do EMeOH das partes aéreas de *Indigofera hirsuta* e o fornecimento de extratos, frações e substâncias isoladas para ensaios farmacológicos.

Obtivemos a caracterização do extrato aquoso e do EMeOH por HPLC-DAD, estes apresentaram cromatogramas diferenciados, sendo que o primeiro apresentou um cromatograma com diversas substâncias com baixo t_r e grande número de picos, já o segundo apresentou um cromatograma com pequena quantidade de picos e substâncias com espectros de absorção no UV característicos de flavonoides e ácido fenólicos.

O fracionamento do chá iniciado pela centrifugação da infusão gerou dois materiais de partida: o precipitado amarelo e o extrato aquoso. O fracionamento do primeiro levou ao isolamento de kaempferol (**Ih1**) e ácido protocatecuico (**Ih2**). Foi obtido uma grande porção de kaempferol (**Ih1**), diferentemente dos chás analisados por Price et al. (1998), onde as agliconas estão em menor quantidade. Apesar de não ter sido realizado um trabalho quantitativo, podemos ter uma idéia da quantidade das substâncias a partir das massas obtidas.

O fracionamento do extrato aquoso resultou no isolamento de Kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo (**Ih3**), triptofano (**Ih4**) e uracila (**Ih5**). Apesar de termos observado diversos outros picos no cromatograma desse extrato não foi possível o isolamento dessas substâncias, visto que, estão pouco concentrados, dificultando sua purificação.

O triptofano (**Ih4**) é o aminoácido precursor dos alcaloides indólicos encontrados em espécies de *Indigofera* (CALVO et al., 2009). Esses alcaloides são corantes de interesse industrial no qual há o envolvimento de um processo

biossintético de obtenção de índigo e indirubina a partir da fermentação do triptofano usando *Escherichia coli* (BERRY et al., 2002).

O fracionamento do EMeOH foi realizado somente por HPLC devido à pequena quantidade de picos no cromatograma representativo (**Fig. 5 (C)**). Resultou no isolamento de ácido gálico (**lh6**), galato de metila (**lh7**), rutina (**lh8**) e Kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo (**lh3**).

O extrato aquoso apresentou baixíssima atividade antioxidante ($\% \Delta_0$ 20,2), enquanto que o EMeOH ($\% \Delta_0$ 93,5) apresentou uma atividade significativa quando comparado ao padrão ácido gálico (concentração de 160 mg.mL⁻¹). Esse dado é coerente com as substâncias presentes nesses extratos, bem como com as diferenças observadas nos cromatogramas.

O ensaio antiúlcera e o antioxidante foram realizados com o chá, tomando-se o cuidado em enviar amostras sem que houvesse a separação do precipitado amarelo. Portanto, a avaliação do chá leva em consideração as substâncias presentes no precipitado amarelo (Kaempferol (**lh1**) e ácido protocatecuico (**lh2**)) e no extrato aquoso (Kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosideo (**lh3**), triptofano (**lh4**) e uracila (**lh5**)).

Para atividade antiúlcera, o chá de *Indigofera hirsuta* não foi efetivo, muito provavelmente devido ao fato de os flavonoides estarem presentes em baixas concentrações, uma vez que estudos com frações acetato do EMeOH de *I. suffruticosa* e *I. truxillensis*, que contem derivados do kaempferol e da quercetina (CALVO, 2007), apresentaram significativa atividade antiulcerogênica (MIRANDA, 2006). No entanto, a fração aquosa de *I. suffruticosa* assim como o chá analisado neste trabalho não apresentaram essa atividade (MIRANDA, 2006). Possivelmente, os derivados do kaempferol e da quercetina que possuem atividade antiúlcera não são efetivamente extraídos com água, ficando presentes em frações e extratos de solventes com média polaridade como metanol e acetato de etila.

Com relação à atividade antioxidante, o chá apresentou uma atividade intermediária ($\% \Delta_0$ 46,3) entre o precipitado amarelo (atividade elevada, $\% \Delta_0$ de 94,1%) e o extrato aquoso (atividade baixa, $\% \Delta_0$ de 20,2%).

O estudo por HPLC-DAD e por HPLC-ESI-MS acoplados foi fundamental para confirmar as estruturas das substâncias isoladas, além de ser uma ferramenta na qual fazendo-se uso de análises comparativas, contribui para

possível identificação de substâncias conhecidas em extratos vegetais sem que haja necessidade de uso de técnicas de isolamento e purificação, permitindo análises rápidas e economia de solventes orgânicos.

Finalmente, todas as substâncias descritas nesse trabalho estão sendo pela primeira vez relatadas em *Indigofera hirsuta*.

Referências

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AGRAWAL, P. K. **Carbon 13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989.

AO, C.; DEBA, F.; TAKO, M.; TAWATA, S. Biological activity and composition of extract from aerial root of *Ficus microcarpa* L. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 349-358, 2009.

BARROS, G. M. C. C.; TEIXEIRA, S. P. Estudo farmacobontânico de duas espécies de anileira (*Indigofera suffruticosa* e *Indigofera truxillensis*) com propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 287-294, 2008.

BERRY, A.; DODGE, T. C.; PEPSIN, M.; WEYLER, W. Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. **Journal of Industrial Microbiology a Biotechnonoly**, v. 28, n. 3, p. 127-133, 2002.

CALVO, T. R. **Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Alchornea* ssp (Euphorbiaceae) e *Indigofera* ssp (Fabaceae)**. 2007. 216 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CALVO, T. R.; CARDOSO, C. R. P.; MOURA, A. C. S.; SANTOS, L. C.; COLUS, I. M. S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity of *Indigofera truxillensis* and *I. suffruticosa* aerial parts. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, 2009. Disponível em: < <http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/reprint/nep123v1> >. Acesso em: 18 jan. 2010.

CERRADO brasileiro. Portal Brasil: biblioteca virtual. Disponível em: < <http://www.portalbrasil.net/cerrado.htm> >. Acesso em: 23 out. 2008.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; LAGO, J. H. G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 597-599, 2007.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

DAJANI, E. Z.; KLAMUT, M. J. Novel therapeutic approaches to gastric and duodenal ulcers: an update. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, n. 7, p. 1537-1544, 2000.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. London: John Wiley & Sons, 1997.

DI STASI L. C. **Plantas medicinais**: arte e ciência. São Paulo: Ed. UNESP, 1996.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNESP, 2002.

DOMINGUES, M. R. M.; DOMINGUES, P.; FONSECA, A. R. C.; AMADO, F. M. L.; FERRER-CORREIA, A. J. V. Identification of oxidation products and free radicals of tryptophan by mass spectrometry. **Journal American Society Mass Spectrometry**, v. 14, p. 406-416, 2003.

FINGER, A.; KURH, S.; ENGELHARDT, U. H. Chromatography of teas constituents. **Journal of Chromatography A**, v. 624, n.1-2, p 293-315, 1992.

GABBO NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian Arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1193-1204, 2008.

GUSTAVSSON, T.; SARKAR, N.; BÁNYÁSZ, Á.; MARKOVITSI, D.; IMPROTA, R. Solvent effects on the steady-state absorption and fluorescence spectra of uracil, thymine and 5-fluorouracil. **Photochemistry and Photobiology**, v. 28, n. 3, p. 595-599, 2007.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. London: Chapman and Hall, 1996.

ILHA, S. M.; MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B.; BRUNETTI, I. L.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 387-393, 2008.

JANG, H. D.; CHANG, K. S.; CHANG, T. C.; HSU, C. L. Antioxidant potentials of buntan pumelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its ethanolic and acetified fermentation products. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 554-558, 2010.

KADHANE, U.; ANDERSEN, J. U.; EHLERDING, A.; HVELPLUND, P.; KIRKETERP, M. S.; LYKKEGAARD, M. K.; NIELSEN, S. B.; PANJA, S.; WYER, J. A.; ZETTERGREN, H. Photodissociation of protonated tryptophan and alteration of dissociation pathways by complexation with crown ether. **The Journal of Chemical Physics**, v. 129, n. 18, p. 184-304, 2008.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.

LEITE, S. P.; MEDEIROS, P. L.; SILVA, E. C.; MAIA, M. B. S.; LIMA, V. L. M.; SAUL, D. E. Embryotoxicity *in vitro* with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. **Reproductive Toxicology**, v. 18, n. 5, p. 701-705, 2004.

LEITE, S. P.; VIEIRA, J. R. C.; MEDEIROS, P. L. de; LEITE, R. M. P.; LIMA, V. L. L.; XAVIER, H. S.; LIMAS, E. D. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 3, n. 2, p. 261-265, 2006.

LEPTOKARYDIS, I. H. **Busca de substâncias bioativas em fungos associados com a espécie *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae)**. 2008. 262 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

LI, H. B.; WONG, C.; CHENG, K.; CHEN, F. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 385-390, 2008.

LIANG, M.; ZHANG, W.; HU, J.; LIU, R.; ZHANG, C. Simultaneous analysis of alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* by high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 178-183, 2006.

LIANG, X.; ZHANG, X.; DAÍ, W.; LV, Y.; YAN, S.; ZHANG, W. A combined HPLC-PDA and HPLC-MS method for quantitative and qualitative analysis of 10 major constituents in the traditional Chinese medicine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 931-936, 2009.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MABRY, T. J.; ULUBELEN, A. Flavonoids and related plant phenolics. In: WALLER, G. R.; DERMER, O. C. **Offprints from biochemical applications of mass spectrometry**. London: John Wiley & Sons, 1980. Cap. 35.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370-1376, 2009.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

MIRANDA, M. C. **Atividade antiulcerogênica de plantas do cerrado do estado de São Paulo – pertencentes ao gênero *Indigofera***. 2006. 207 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MOREIRA, J. L. A.; AZEVEDO-TOZZI, A. N. G. *Indigofera* L. (Leguminosae) no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 20, n. 1, p. 97-117, 1997.

MOLYNEUX, P. The use of stable free radical diphenilpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal Science Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

PRICE, K. R.; RHODES, M. J. C.; BARNES, K. A. Flavonol glycoside and composition of tea infusions made from commercially available teas and tea products. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2517-2522, 1998.

RINALDO, D. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira**: prospecção químico farmacológica de plantas superiores – *Neea theifera* Oersted (Nyctaginaceae). 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

SHAHAT, A. A.; CUYCKENS, F.; WANG, W.; ABDEL-SHAFAEEK, K. A.; HUSSEINY, H. A.; APERS, S.; MIERT, S. V.; PIETERS, K.; VLIETINCK, A. J.; CLAEYS, M. Structural characterization of flavonol di-O-glycosides from *Farsetia aegyptia* by electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2172-2178, 2005.

SILVA, M. A. **Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae**. 2008. 157 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7th ed. London: John Wiley & Sons, 2005.

SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

SULTANA, B.; ANWAR, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 879-884, 2008.

TAHARA, S. A. Journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 6, p. 1387-1404, 2007.

VÁZQUEZ-RAMÍREZ, R.; OLGUÍN-MARTÍNEZ, M.; KUBLI-GARFIA, S. C.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 27, p. 4318-4324, 2006.

VIEIRA, J. R. C. ***Indigofera suffruticosa* Mill**: um meio terapêutico alternativo anti-câncer. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

VIEIRA, J. R. C.; SOUZA, I. A.; NASCIMENTO, S. C.; LEITE S. P. *Indigofera suffruticosa*: an alternative anticancer therapy. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, 2006. Disponível em: <<http://acam.oxforjournals.org/cgi/reprint/net11.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2007.

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da amazônia**: manual de plantas medicinais. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (Org.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Ed. UNIVALI, 2007. Cap 7.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984.

WANG, H.; PROVAN, J. G.; HELLIWELL, K. Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 4-5, p. 152-160, 2000.

WEERT, M. V.; LAGERWERF, F. M.; HAVERKAMP, J.; HEERMA, W. Mass spectrometric analysis of oxidized tryptophan. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 33, p. 884-891, 1998.

WEISBURGER, J. H.; HARA, Y.; DOLAN, L.; LUO, F.; PITTMAN, B.; ZANG, E. Tea polyphenol as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. **Genetic Toxicology**, v. 371, n. 1-2, p. 57-63, 1996.