

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA

Marina Maia Barbosa

USO SUSTENTÁVEL DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA:
PROSPECÇÃO QUÍMICO-FARMACOLÓGICA EM PLANTAS

SUPERIORES: Estudo Químico de *Astronium graveolens*

(Anacardiaceae)

Araraquara

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA

USO SUSTENTÁVEL DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA:
PROSPECÇÃO QUÍMICO-FARMACOLÓGICA EM PLANTAS

SUPERIORES: Estudo Químico de *Astronium graveolens*

(Anacardiaceae)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de Farmacêutico-Bioquímico.

Aluno: Marina Maia Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara

2012

SUMÁRIO

RESUMO	3
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Produtos Naturais	9
1.2 Técnicas de separação e análise de substâncias	11
1.3 O gênero <i>Astronium</i>	13
2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	16
3. OBJETIVOS	18
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	18
4.1 Coleta e identificação do material vegetal	18
4.2 Obtenção dos extratos de <i>Astronium graveolens</i>	18
4.3 Fracionamento do extrato e isolamento dos constituintes químicos das folhas de <i>Astronium graveolens</i>	20
4.4 Ensaio Antioxidante	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
5.1 Estudo do extrato em acetato de etila das folhas de <i>Astronium graveolens</i>	24
5.2 Avaliação do potencial antioxidante das folhas de <i>Astronium graveolens</i>	26
5.3 Identificação das substâncias isoladas de <i>Astronium graveolens</i>	28
5.4 Estudo das subfrações obtidas do fracionamento CLMP 2	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

O gênero *Astronium*, pertencente à família Anacardiaceae, é composto por cerca de 35 espécies, sendo típico das regiões norte e nordeste do Brasil. De acordo com a literatura, apenas a espécie *Astronium urundeuva* foi investigada sob o ponto de vista farmacológico, sendo detectada atividades antiulcerogênica, antiinflamatória e efeitos no trânsito gastrointestinal. Nas espécies *A. graveolens* e *A. fraxinifolium* foram avaliados somente os óleos essenciais, sendo que em *A. graveolens* um desses compostos voláteis mostrou atividade repelente a insetos. Desta forma, percebe-se que a investigação desse importante gênero vegetal ainda é incipiente. Estudos preliminares com o extrato em acetato de etila das folhas de *A. graveolens* mostraram grande concentração de compostos fenólicos, como derivados de ácido gálico e flavonoides, os quais estão descritos na literatura em geral como substâncias antioxidantes em potencial. As propriedades antioxidantes de diversas substâncias são alvo de interesse nos dias de hoje principalmente por estarem relacionadas à terapêutica de doenças degenerativas. Com o objetivo de dar continuidade aos estudos das espécies citadas, foram utilizadas neste trabalho técnicas de cromatografia como análise por cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo do perfil químico de *Astronium graveolens*, separação e identificação de metabólitos secundários. Baseado na literatura e na comparação com padrões, os espectros de ultravioleta observados, indicaram que os extratos em acetato de etila da espécie em estudo são compostos por substâncias derivadas do ácido gálico, derivadas do ácido cafeoilquínico e também por flavonóides. A substância **Ag1** foi identificada a partir de experimentos de comparação por CLAE usando banco de padrões, após verificação de similaridade entre tempo de retenção e máximo de absorção na região do UV, uma alíquota de **Ag1** foi misturada com padrão autêntico de galato de metila e sua identificação confirmada após experimento de co-injeção. Análise da substância **Ag2** por CLAE-DAD analítico exibiu

um único pico cromatográfico com máximo de absorção na região do UV de 275 nm, característico do ácido 3,4,5-triidroxi benzóico e a confirmação da identificação da substância **Ag2** como sendo ácido gálico foi feita com experimentos de co-injeção entre a amostra **Ag2** com padrão autêntico de ácido gálico. A substância **Ag3** foi obtida como um sólido de cor amarela. Sua estrutura foi determinada por análise do espectro de RMN de ^1H , mesmo estando impura, e por comparação do espectro de ultravioleta com padrão de flavonoides. A substância **Ag4** foi isolada como um sólido de cor amarela, característica de flavonoides e com o auxílio da análise do espectro de RMN ^1H , pode-se sugerir que a substância é um derivado da quercetina e possui uma unidade de rhamnose em sua estrutura. Na avaliação da atividade antioxidante dos extratos (acetato de etila, aquoso e hidroalcoólico) das folhas de *A. graveolens* demonstrou-se que o extrato em acetato de etila apresenta considerável atividade antioxidante, provavelmente devido a sua composição rica em flavonóides e derivados do ácido gálico como demonstrou o estudo de seu perfil químico. Assim, o isolamento dos metabólitos do extrato em acetato de etila das folhas de *Astronium graveolens* dá continuidade ao importante trabalho de conhecimento da química desse gênero de plantas, ao mesmo tempo em que contribui para o estudo químico-farmacológico de plantas medicinais além de permitir também, o contato e a familiarização com as técnicas cromatográficas empregadas no isolamento e identificação de substâncias presentes em plantas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto da espécie em estudo, <i>Astronium graveolens</i> .	15
Figura 2. Obtenção do extrato bruto e das frações de partição líquido-líquido das folhas de <i>Astronium graveolens</i> .	19
Figura 3. Fracionamento do extrato AcOEt das folhas de <i>A. graveolens</i> .	22
Figura 4. Cromatograma do extrato AcOEt das folhas de <i>A. graveolens</i> . Condições cromatográficas descritas na Metodologia Experimental. [*derivados de ácido gálico; #derivado do ácido cafeoilquínico; ◇ flavonóides)	24
Figura 5. Espectros no ultravioleta das classes de substâncias presentes em <i>A. graveolens</i> (A – derivados de ácido gálico; B – derivados de ácido cafeoilquínico; C – flavonoides).	25
Figura 6. Placa cromatográfica de algumas frações reunidas obtidas da CPG.	25
Figura 7. Gráfico da capacidade sequestradora de radicais livres dos extratos obtidos das folhas de <i>Astronium graveolens</i> , frente ao reagente DPPH.	27
Figura 8. Cromatograma de análise por CLAE-DAD do experimento de co-injeção de <i>Ag1</i> com padrão comercial de galato de metila. Condições cromatográficas descritas na Metodologia Experimental.	28
Figura 9. Espectro de absorção na região do infravermelho para a substância <i>Ag1</i> .	29
Figura 10. Cromatograma de análise por CLAE-DAD do experimento de co-injeção de <i>Ag2</i> com padrão comercial de ácido gálico. Condições cromatográficas descritas na Metodologia Experimental.	30
Figura 11. Espectro de absorção na região do infravermelho para a substância <i>Ag2</i> .	30
Figura 12. Espectro de RMN de ^1H da substância <i>Ag3</i> (500 MHz, DMSO-d ₆).	31
Figura 13. Expansões do espectro de RMN de ^1H da substância <i>Ag3</i> (500 MHz,	32

DMSO-d6) - região dos hidrogênios aromáticos e do hidrogênio anomérico.

Figura 14. Espectro de RMN de ^1H da substância **Ag4** (500 MHz, DMSO-d6). 33

Figura 15. Expansões do espectro de RMN de ^1H da substância **Ag4** (500 MHz, DMSO-d6): a) hidrogênios do anel B; b) hidrogênios do anel A; c) hidrogênio anomérico; d) hidrogênios metílicos da rhamnose. 33

Figura 16. Substância **Ag4**: a) cromatograma analítico; b) espectro no UV. Substância **Ag3**: c) cromatograma analítico; d) espectro no UV. Condições cromatográficas descritas Metodologia Experimental. 35

Figura 17. Estrutura química geral e específica das substâncias **Ag3** e **Ag4**. 36

Figura 18. a) Espectro no ultravioleta característico de flavonoides. b) Estrutura geral de um flavonoide, com os anéis A e B em destaque.

Figura 19. Cromatogramas analíticos obtidos para as subfrações de CLMP 2: a) 123-127 (45 mg); b) 130-132 (68 mg); c) 133-134 (64 mg); d) 143-155 (48 mg). Condições cromatográficas descritas na Metodologia Experimental. 37

Figura 20. Expansões e comparações dos cromatogramas analíticos obtidos para as subfrações de CLMP 2: b) 130-132 (68 mg) ; c) 133-134 (64 mg); d) 143-155 (48 mg). Condições cromatográficas descritas na Metodologia Experimental. 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN ^1H para as substâncias Ag3 e Ag4 (500 MHz, DMSO-d6).	34
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - acetonitrila

AcOEt - Acetato de etila

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CPG – Cromatografia de Permeação em Gel

d – dubleto

EtOH – Etanol

Ext. AcOEt – Extrato em acetato de etila

CLAE – Cromatografia líquida de alta pressão

J – constante de acoplamento

MeOH – Metanol

CLMP – Cromatografia líquida de média pressão

m - multipletto

DAD – Detector de Arranjo de Fotodiodos

PA - Padrão Analítico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

s – singleto

TMS - tetrametilsilano

t – tripleto

UV- Ultravioleta

δ – deslocamento químico

TFA – ácido trifluoroacético

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos Naturais

Durante séculos as plantas foram a única fonte de agentes terapêuticos para o homem, sendo no início do século XIX a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapia moderna (Hostettmann,Kurt; Queiroz,E.F.; Vieira,P.C. 2003).

A composição química das espécies vegetais, especialmente das plantas encontradas nas florestas tropicais (representando apenas 7% da superfície da Terra), ainda está longe de ser descrita em sua totalidade. Uma gama enorme de constituintes naturais ainda não foi isolada e estudada sob o ponto de vista químico. Além disso, uma grande quantidade de substâncias, já isoladas e com as estruturas químicas determinadas, ainda não foi avaliada quanto às atividades biológicas e/ou farmacológicas (Rates, 2001).

Ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada. Além disso, como produtos de organismos que possuem muitas similaridades com o metabolismo dos mamíferos, os produtos naturais muitas vezes exibem propriedades adicionais as antimicrobianas a eles associadas (Phillipson, 2001).

A grande diversidade de metabólitos em plantas ganha proporções ainda maiores ao considerarmos a rica biodiversidade em espécies do planeta.

Com uma extensão de mais de 8,5 milhões de km², o espaço geográfico brasileiro apresenta uma grande diversidade de clima, de fisiografia, de solo, de vegetação e de fauna, tendo pelo menos 10 a 20% do número total de espécies (fauna e flora) do planeta. A riqueza da flora e da fauna brasileiras são reflexos da variedade dos biomas ou zonas biogeográficas (Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal e Pampa) (Brasil, 1998).

Entretanto, com toda essa extensão e complexidade, a composição da diversidade biológica brasileira não é conhecida com precisão e talvez nunca venha a ser totalmente. A perda da biodiversidade é consequência direta de fatores como: perda e fragmentação dos habitats; introdução de espécies e doenças exóticas; exploração excessiva de espécies de plantas e animais, chegando ao nível da extinção; uso de híbridos e monoculturas na agroindústria e nos programas de reflorestamento; contaminação do solo, água e atmosfera por poluentes, e mudanças climáticas (Ministério do Meio Ambiente, 2008).

Tendo como exemplo a devastação da Mata Atlântica, o ritmo atual de extinção pode fazer com que um grande número de plantas, com possíveis propriedades medicinais, desapareça antes de seu valor ser reconhecido uma vez que, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira e 15 a 17% das espécies no mundo foram estudadas sob este ponto de vista (Ministério do Meio Ambiente, 2008). Dada a importância econômica e ecológica, a biodiversidade brasileira é prioritária para a preservação, utilização sustentável e pesquisa.

A pesquisa fitoquímica, desta forma, auxilia no conhecimento dos constituintes químicos de espécies vegetais, e pode indicar os grupos de metabólitos secundários de interesse farmacológico. O conhecimento dos constituintes químicos de diversas partes da planta favorece o seu uso sustentável e contribui para sua preservação.

1.2 Técnicas de separação e análise das substâncias

O processo fitoquímico descrito neste trabalho envolve basicamente técnicas que se baseiam nos princípios da cromatografia. Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma, ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais desses componentes (Collins,C.H.; Braga,G.L. 1997).

São vários os critérios usados para classificação das diferentes modalidades de cromatografia, sendo os mais comuns relacionados à técnica empregada, ao mecanismo de separação envolvido e aos diferentes tipos de fases utilizadas.

Uma das classificações baseia-se na polaridade relativa das fases. Em cromatografia gasosa a fase móvel é inerte e a separação ocorre devido às interações das moléculas da amostra com a fase estacionária, enquanto que, na cromatografia líquida, a polaridade de ambas as fases é importante. Chama-se cromatografia líquida de fase normal quando a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, e cromatografia líquida de fase reversa quando se tem o inverso, ou seja, a fase móvel é mais polar e a fase estacionária mais apolar (Collins,C.H.; Braga,G.L. 1997).

A cromatografia em camada delgada (CCDC) foi amplamente utilizada devido às múltiplas vantagens que ela oferece como fácil compreensão e execução, separações em breve

espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo. Esta técnica consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. Entretanto, usando fases estacionárias tratadas pode ocorrer também por partição ou troca iônica, o que permite seu emprego tanto na separação de substâncias hidrofóbicas quanto hidrofílicas (Collins,C.H.; Braga,G.L. 1997).

O fenômeno de adsorção se baseia na competição entre moléculas da amostra e da fase móvel em ocupar os sítios ativos na superfície de um sólido (fase estacionária). Para que a molécula do soluto possa ser adsorvida na fase estacionária, primeiro uma molécula da fase móvel deve ser deslocada da superfície. Se assumir que o adsorvente possui uma superfície polar (por exemplo, sílica ou alumina), grupos apolares (por exemplo, hidrocarbonetos) terão pouca afinidade por esta superfície e não irão deslocar a molécula da fase móvel; por isso, não serão retidos. Grupos funcionais polares capazes de formar ligações de hidrogênio terão fortes afinidades pela superfície e serão fortemente retidos. Moléculas polarizáveis (por exemplo, moléculas aromáticas) irão apresentar interação dipolo induzido-dipolo com a superfície do adsorvente e, portanto, também serão retidas; o grau de retenção depende da polarização de cada molécula ou grupo funcional.

Muitas vezes, devido a uma forte adsorção ou retenção de alguns componentes da amostra no sólido ativo, é necessário aumentar a polaridade da fase móvel de uma maneira constante e uniforme, com o que se consegue um incremento de solubilidade dos componentes da amostra na fase móvel. A esta variação dá-se o nome de eluição por gradiente da fase móvel (Collins,C.H.; Braga,G.L. 1997).

A cromatografia por exclusão, ou permeação em gel, por possuir vantagens como simplicidade técnica, insensibilidade a solventes e temperatura, condições amenas e

versatilidade, também foi utilizada no estudo descrito nesse projeto. A propriedade que distingue a cromatografia por exclusão é que o gel é constituído de macromoléculas que têm ligações cruzadas, com afinidade pelos solventes, mas que neles são insolúveis. As partículas estacionárias compõem um gel, não carregado, inchado com o mesmo líquido que carrega as substâncias a serem separadas. O espaço entre as partículas é ocupado pelo líquido que flui pelo material levando, ou não, as substâncias a serem separadas. O caráter da fase estacionária controla o movimento das substâncias, variando suas velocidades e assim promovendo a separação (Collins,C.H.; Braga,G.L. 1997).

Comumente, a cromatografia convencional não é suficientemente eficaz para separar quantidades em gramas de estruturas químicas próximas. Por outro lado, técnicas de cromatografia líquida sob pressão, como a CLAE preparativa, com a fase estacionária de baixa granulometria, realizam separações mais difíceis graças a melhores fatores de separação (Hostettmann,K.; Queiroz,E.F.; Vieira,P.C. 2003).

1.3 O Gênero *Astronium*

O gênero *Astronium*, pertencente à família Anacardiaceae, é composto por cerca de 35 espécies, sendo típico das regiões norte e nordeste do Brasil. De acordo com a literatura, apenas a espécie *Astronium urundeuva* foi investigada sob o ponto de vista farmacológico, sendo detectada atividades antiulcerogênica (Bandeira, 1993; Rao,V.S.; Menezes,A.M.S. 1987), antiinflamatória (Menezes,A.M.S; Rao,V.S.; Fonteles,M.C. 1985) e efeitos no trânsito gastrointestinal (Menezes,A.M.S; Rao,V.S. 1988) e em colites (Rao,V.S; Menezes,A.M.S; Vasconcelos,F.A. 1986). A casca e entrecasca de *A. urundeuva* são indicadas na medicina popular contra diarreias. A casca também é usada no tratamento de hemorróidas. O chá das raízes é empregado contra reumatismo, das folhas no tratamento de úlceras da pele e dos frutos contra dor de dente (Almeida *et al.*, 1998; Desmarchelier *et al.*, 1999). Sob o ponto de

vista químico, foram detectados e isolados polifenóis (proantocianidinas) e ligninas da madeira (Morais,S.A.L; Nascimento,E.A.; Queiroz,C.R.A.A. 1999; Queiroz, 2001) e as chalconas urundeuvinas I, II e III, responsáveis pelas atividades analgésica e antiinflamatória (Viana,G.S.B; Bandeira,M.A.M; Matos,F.J.A 2003). Nas espécies *A. graveolens* e *A. fraxinifolium* foram avaliados somente os óleos essenciais (Maia,J.G.S; da Silva,M.H.L; Andrade,E.H.A. 2002; Chen,T.K.; Wiermer,E.D.; Howard,J.J. 1984), sendo que em *A. graveolens* um desses compostos voláteis mostrou atividade repelente a insetos.

Desta forma, percebe-se que a investigação desse importante gênero vegetal ainda é incipiente. O estudo de espécies de *Astronium* contribuirá de forma significativa para o conhecimento da química deste gênero, uma vez que quase não há dados sobre este aspecto.

A espécie escolhida para este estudo, *A. graveolens* (Figura 1), assim como outras espécies de várias famílias estudadas pelo grupo (Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Química- Unesp Araraquara), faz parte de um levantamento etnofarmacológico de plantas do cerrado dos Estados de São Paulo e Tocantins, realizado pela Prof. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima do Instituto de Biociências – Botucatu/ UNESP, bióloga do grupo de pesquisa, e são usadas pela população local como planta medicinal.

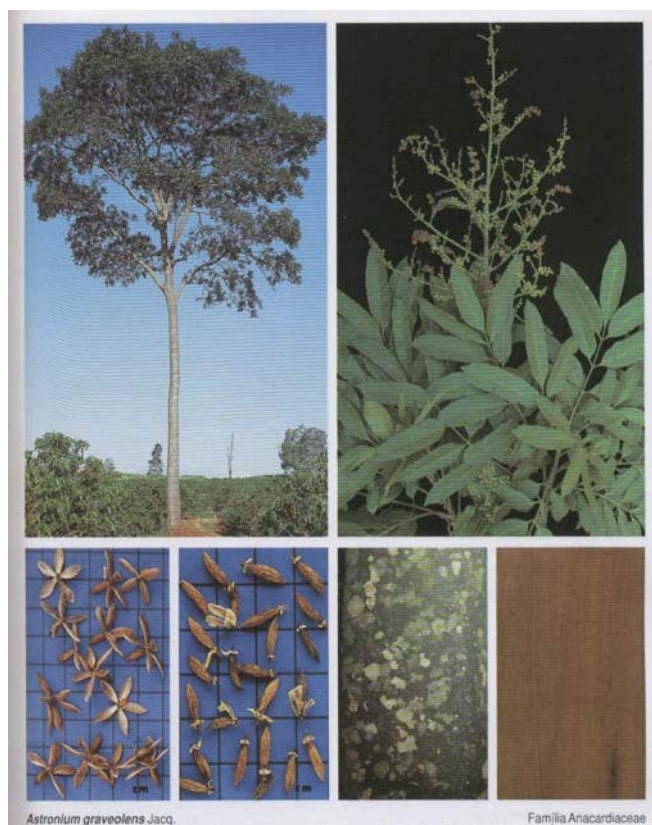


Figura 1. Foto da espécie em estudo, *Astronium graveolens* (Lorenzi, H., 1998.)

2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- **Solventes:** Solventes PA: Acetato de etila, hexano, metanol (Marca Synthlab). Metanol e acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt®), água purificada em sistema Milli Q e ácido trifluoroacético (TFA) (Riedel-de Haën®). Solvente deuterado: DMSO-d₆.
- **CCDC:** Placas preparadas de sílica gel 60 (Merck®) (20 x 20 cm x 0,2 mm). Como reveladores foram utilizados luz UV (254 e 366 nm) (Chromatovue®) e Anisaldeído/H₂SO₄, seguido de aquecimento em estufa,
- **Sistema de Permeação em Gel:** Coluna de vidro preenchida com Sephadex LH-20® (57 cm x 3,0 cm d.i.) acoplada a uma bomba peristáltica modelo P1 18-1110-91 (Pharmacia®) e a um coletor automático Redifrac (Pharmacia®). O solvente (metanol) foi bombeado para a coluna com o auxílio da bomba peristáltica em um fluxo de 0,5 mL/min. Foram coletadas frações com aproximadamente 10 mL cada uma;
- **Evaporador Rotativo:** As concentrações das soluções foram realizadas em evaporador rotativo modelo Laborota 4001 – efficient, marca Heidolph®, equipado com bomba a vácuo modelo Rotavac valve control Heidolph®.
- **Balança:** Balança (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.
- **Centrífuga:** CELM®, COMBATE, a 2500 rpm.
- **Espectrofotômetro Ultravioleta:** A leitura no ultravioleta-visível foi realizada no Espectrofotômetro Hach®, modelo DR/4000U, cubeta de quartzo de 1,0 cm³, para medição dos valores de absorbância das soluções no experimento com DPPH.

- **Espectrômetro de Infravermelho:** O espectro de infravermelho foi obtido em um aparelho Fourier Transform Infrared Spectrometer, modelo FT/IR – 4100 Jasco®, por reflectância difusa com inserção direta da amostra no compartimento de leitura.
- **RMN ^1H :** O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio foi obtido em espectrômetro Varian® INOVA 500, operando a 500 MHz para o hidrogênio em 11,7 T. Foi utilizado TMS como padrão interno.
- **CLMP:** O equipamento utilizado na cromatografia líquida de média pressão é da marca Buchi, acoplado a duas Bombas Módulo C-601 que possibilitam gradiente binário de solvente.
- **CLAE:** Cromatógrafo analítico modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (DAD, Jasco®), modelo MD-2010 e a um injetor automático modelo AS-2055, Rheadyne®. Coluna: ODS- C_{18} , fase reversa, Synergi Hydro (250 x 4.6 mm i.d.; 4 μm , Phenomenex®) e uma coluna de guarda (Phenomenex®) de 4x3 mm.

3. OBJETIVOS

- ✓ Contribuir para uso sustentável do bioma do Estado de São Paulo;
- ✓ Dar continuidade ao estudo integrado químico-farmacológico de plantas medicinais, através do fracionamento químico das folhas de *Astronium graveolens* Jacq (guaritá), ocorrente no Bioma do Estado de São Paulo.

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. Coleta e identificação do material vegetal

A espécie *Astronium graveolens* foi coletada no Bosque dos Jequitibás, município de Campinas/SP em outubro/2007. Foi identificada pelo botânico Jorge Tamashiro do Instituto de Biociências da UNICAMP e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário UEC, com o número de registro 148133.

4.2. Obtenção dos extratos de *Astronium graveolens*

O material vegetal, depois de separado em folhas e caule, foi seco em estufa à 40 °C com ventilação forçada e triturado em moinho de facas. 237 g de folhas foram, exaustivamente, extraídas com etanol por maceração, a temperatura ambiente, para que após concentração do extrato em evaporador rotativo à pressão reduzida, fornecesse 48,4 g de extrato bruto etanólico. Em seguida, o extrato bruto etanólico foi solubilizado em H₂O/MeOH (20:80, v/v) e submetido à partição líquido-líquido com hexano, seguido de acetato de etila, fornecendo ao final 3 extratos: de polaridades baixa (extrato hexânico), média (extrato em acetato de etila) e alta (extrato hidroalcólico), como está ilustrado na figura 2:

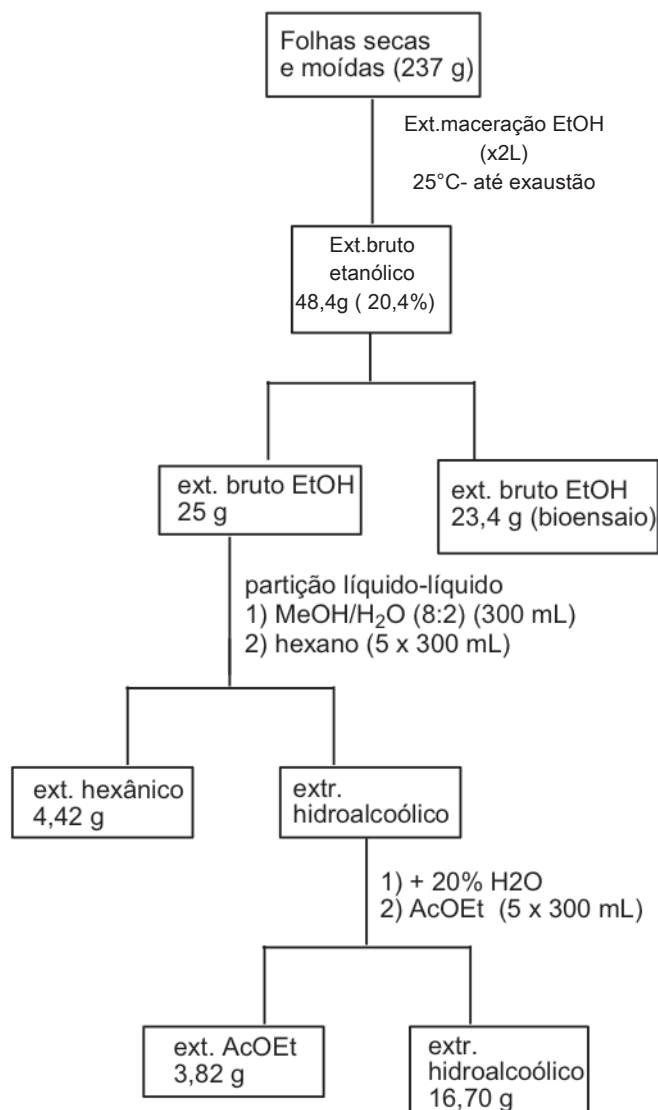


Figura 2. Obtenção do extrato bruto e das frações de partição líquido-líquido das folhas de *Astronium graveolens*.

Uma alíquota de 20,0 mg de extrato em AcOEt foi solubilizada em 1,0 mL de H₂O/MeOH 05:95 v/v para realização de *clean-up* e posterior análise em CLAE-DAD. O *clean-up* foi realizado em cartucho preenchido com sílica de fase reversa (C₁₈), ativado com 5,0 mL de MeOH e ambientados com 5,0 mL de H₂O/MeOH 05:95 v/v. Após a aplicação da amostra no cartucho e eluição do material aplicado, foi passado mais 1,0 mL do sistema

H₂O/MeOH 05:95 v/v. Todo o material eluído foi seguido de filtração em membrana de *teflon* (0,22 µm) e a solução da amostra acondicionada em *vial* de 2,0 mL.

O perfil cromatográfico foi avaliado utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos e a um injetor automático. A análise foi feita em Coluna ODS-C₁₈ Synergi Hydro (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm). Fase móvel: H₂O+TFA 0,05% (A); ACN+TFA 0,05% (B). Sistema de eluição gradiente: 1 - 30% B (50 min), 30-100% B (10 min) e 100% isocrático (5 min). Fluxo = 1 mL/min, volume de injeção 20 µL.

4.3. Fracionamento do extrato e isolamento dos constituintes químicos das folhas de *Astronium graveolens*

O extrato AcOEt das folhas (3,82 g) foi solubilizado em metanol (10,0 mL), utilizando-se banho ultra-som por 10 minutos, em seguida centrifugado por 10 minutos, separando-se o precipitado, do sobrenadante. O sobrenadante foi aplicado na coluna cromatográfica de permeação em gel, eluído com metanol, fornecendo 317 frações, as quais foram reunidas em 17 frações após análise por CCDC. Algumas frações foram selecionadas para continuar o fracionamento fitoquímico e isolamento das substâncias (figura 3):

>> A fração 51-76 (371 mg) foi diluída em 5,0 mL de CHCl₃, misturada a 150 mg de sílica e o solvente evaporado em rotaevaporador. A amostra impregnada no adsorvente foi aplicada no topo da coluna de sílica fase normal (15 cm) no momento de seu empacotamento. A coluna foi acoplada a sistema de CLMP e a eluição foi realizada em modo gradiente, iniciando-se com CHCl₃ 100% e aumentado-se a quantidade de metanol gradativamente até 100%. Foi utilizado um fluxo de 3,0 mL/min. Após análise por CCDC, foram obtidas 25 frações cuja análise está em andamento.

>> A fração 129-135 (126 mg) foi diluída em 5,0 mL de sistema MeOH/H₂O (5:95 v/v), filtrada em um pequeno chumaço de algodão e aplicada com auxílio de uma seringa de vidro no sistema CLMP, acoplado a uma coluna empacotada com C₁₈ (150 mm x 1,5 mm). A eluição das subfrações foi realizada em modo gradiente, iniciando-se com sistema MeOH/H₂O (5:95 v/v) e aumentado-se a quantidade de metanol gradativamente até 100% , foi utilizado um fluxo de 2,5 mL/min. Após análise por CCDC, foram obtidas 17 frações, das quais três foram caracterizadas como substâncias puras, sem etapas posteriores de purificação: subfração 46-51 como galato de metila (**Ag1** 16 mg); subfração 27-34 como ácido gálico (**Ag2** 13 mg) e subfração 85-99 como quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosideo (**Ag4** 17 mg). Embora em mistura, a partir da subfração 74-84, foi possível identificar a substância **Ag3** (14 mg). >> Condições cromatográficas para análise de **Ag1** e **Ag2**: Fase móvel: MeOH + TFA 0,05% (**C**), ACN + TFA 0,05% (**B**) e H₂O + TFA 0,05% (**A**). Coluna Phenomenex[®] Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 μ m), CLAE (Jasco[®]), fluxo 1,0 mL/min. Sistema de eluição isocrático terciário: 11% C + 2% B. >> Condições cromatográficas para análise de **Ag3** e **Ag4**: Coluna ODS-C₁₈ Synergi Hydro. Fase móvel: H₂O+TFA 0,05% (**A**); ACN+TFA 0,05% (**B**). Sistema de eluição gradiente: 15-22% B (25 min), 22-40% B (15 min), 40-78% B (5 min), 78-100% B (5 min) e 100% isocrático (5 min). Fluxo = 1 mL/min, loop 20 μ L.

>> A fração 136-177 (267 mg) foi submetida à fracionamento idêntico a fração anterior. Foram obtidas 20 subfrações, e algumas listadas no fluxograma abaixo foram analisadas por CLAE analítico. Condição de análise: Coluna ODS-C₁₈ Synergi Hydro (250 x 4.6 mm i.d.; 4 μ m, Phenomenex[®]). Fase móvel: H₂O+TFA 0,05% (**A**); ACN+TFA 0,05% (**B**). Sistema de eluição gradiente: 15-22% B (25 min), 22-40% B (15 min), 40-78% B (5 min), 78-100% B (5 min) e 100% isocrático (5 min). Fluxo = 1 mL/min, loop 20 μ L. Todas as amostras foram filtradas em membrana de *teflon* (0,22 μ m) e a solução (MeOH/H₂O, 10:90, v/v) da amostra acondicionada em *vial* de 2,0 mL.

>> A fração final da Sephadex (300 mg) foi submetida à fracionamento no sistema CLMP em condições idênticas as frações anteriores, obtendo 24 subfrações das quais duas foram analisadas por CLAE analítico. Condição de análise: Coluna ODS-C₁₈ Synergi Hydro (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm, Phenomenex®). Fase móvel: H₂O+TFA 0,05% (A); MeOH+TFA 0,05% (B). Sistema de eluição isocrático: 15% B (40 min). Fluxo = 1 mL/min, loop 20 µL. Todas as amostras foram filtradas em membrana de *teflon* (0,20 µm) e a solução (MeOH/H₂O, 10:90, v/v) da amostra acondicionada em *vial* de 2,0 mL. A subfração 4-10 foi identificada como a substância **Ag1** e a subfração 33-45 como a mistura das substâncias **Ag1** e **Ag2**.

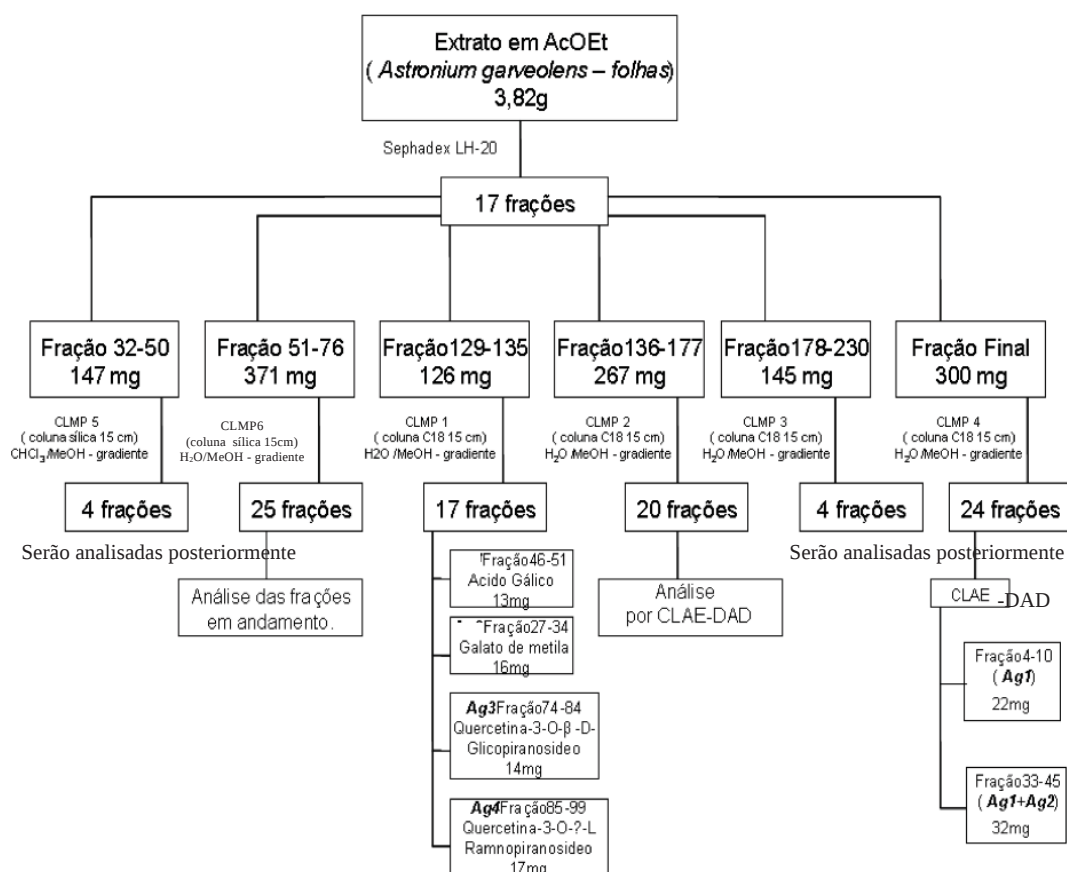


Figura 3. Fracionamento do extrato AcOEt das folhas de *A. graveolens*.

4.4 Ensaio antioxidante

O potencial antioxidante dos extratos em acetato de etila, aquoso e hidroalcolico das folhas de *A. graveolens* foram avaliados através de ensaio espectrofotométrico, modificado (Blois, 1958; Choi *et al.*, 2002), na região do visível, utilizando uma solução de DPPH 0,004% em metanol, o qual é adicionado à solução das amostras em análise. Soluções estoque dos extratos de partição e dos padrões são preparadas a partir de 2,5 mg da amostra em 10,0 mL de metanol. Em seguida, são feitas diluições para as concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 160 µg/mL. A cada 1,0 mL da amostra é adicionado 2,0 mL da solução de DPPH e após 30 minutos de reação, as absorbâncias das soluções são medidas a 517 nm. A solução referência é constituída de 2,0 mL da solução de DPPH acrescido de 1,0 mL de metanol. O espectrofotômetro foi calibrado com metanol. A atividade seqüestradora de radical livre de cada amostra foi calculada pela inibição do DPPH (diminuição da absorbância), de acordo com a equação: $\% \Delta = (A_0 - A / A_0) \times 100$ (A_0 – absorbância do DPPH em metanol; A – absorbância da amostra após 30 min). Os valores obtidos foram plotados em um gráfico de % de variação da absorbância *versus* concentração da amostra. Foram utilizados padrões de quercetina, ácido gálico, ácido elágico e rutina.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Estudo do extrato em acetato de etila das folhas de *Astronium graveolens*

Para avaliação do perfil químico, a fim de se determinar as principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato AcOEt de *A. graveolens*, foi realizada uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodos.

Dentre todos os comprimentos de onda o qual foi avaliado o extrato, aquele que se mostrou mais representativo foi 254 nm e o cromatograma resultante está mostrado na (figura 4):

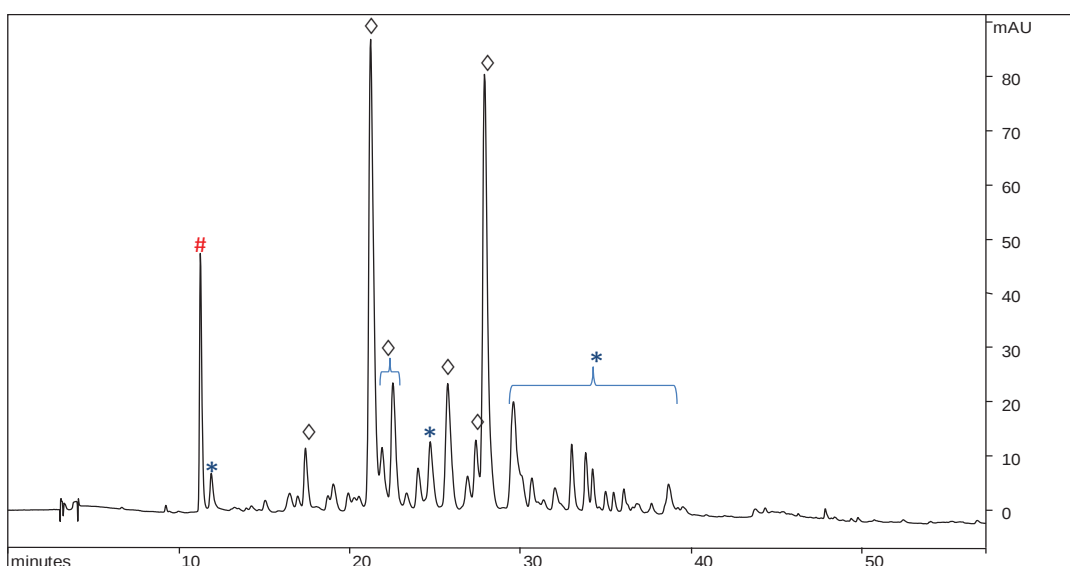


Figura 4. Cromatograma do extrato em acetato de etila das folhas de *A. graveolens*. Condições cromatográficas descritas na Metodologia Experimental. [*derivados de ácido gálico; # derivado do ácido cafeoilquínico; ◇ flavonoides)

Baseado na literatura (Salminen *et al.*, 1999) e na comparação com padrões, os espectros de ultravioleta observados (figura 5), sugerem que o extrato AcOEt é composto por substâncias derivadas do ácido gálico, derivadas do ácido cafeoilquínico e também por flavonoides.

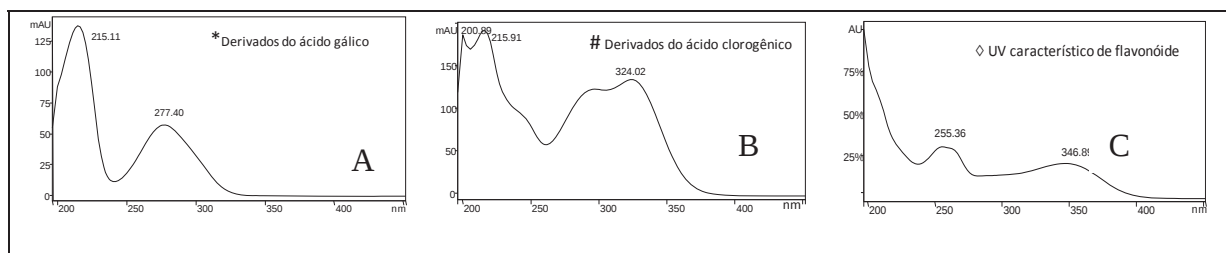


Figura 5. Espectros no ultravioleta das classes de substâncias presentes em *A. graveolens* (A – derivados de ácido gálico; B – derivados de ácido cafeoilquínico; C – flavonoides).

A cromatografia em camada delgada confirmou a presença de flavonoides, pela coloração amarelada desenvolvida antes e após a revelação das placas com solução de anisaldeído/ácido sulfúrico, como pode ser visto na placa de reunião das frações (**figura 6**):

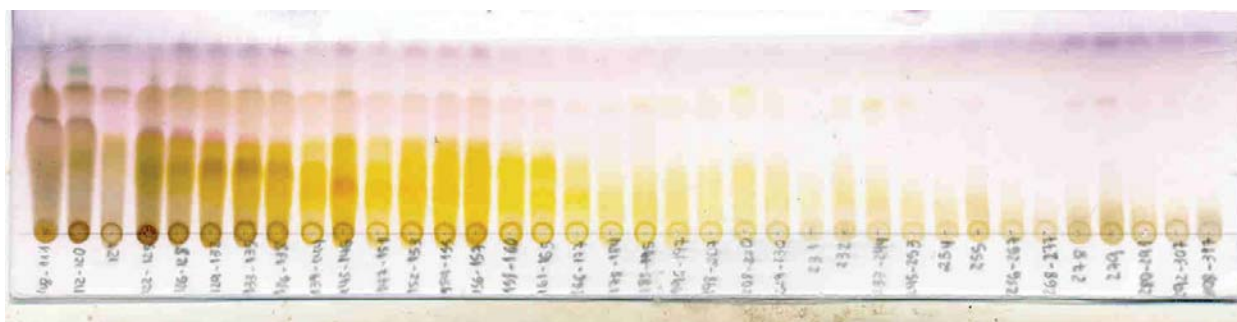


Figura 6. Placa cromatográfica de algumas frações reunidas obtidas da CPG.

A grande abundância e diversidade dos flavonoides sugerem que eles sejam importantes para as plantas superiores. Contudo não está claro que também o sejam para o homem. De fato, pode-se inferir que os seres humanos ingerem muitas gramas de flavonoides diariamente, sendo encontrados com frequência nas frutas e em muitas outras espécies vegetais, no vinho, em cereais e ocasionalmente em corantes alimentícios.

O emprego terapêutico de plantas contendo flavonoides é vasto e, em muitos casos, empírico. Embora alguns resultados tenham mostrado que os flavonoides possam apresentar

efeito mutagênico, em geral, são considerados como benéficos. Alguns medicamentos são elaborados a partir dessa classe de substâncias, em particular para doenças circulatórias, hipertensão e agindo como cofator da vitamina C. Outras pesquisas sugerem que alguns flavonóides são responsáveis por ação antitumoral considerável, podendo ainda agir como antivirais, anti-hemorrágicos, hormonais, antiinflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes, o que faz a pesquisa desses metabólitos importante do ponto de vista científico (Barreiros,A.L.B.S.; David,J.P.; David,J.M. 2006).

5.2 Avaliação do potencial antioxidante das folhas de *Astronium graveolens*

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-picrilhidrazila). Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando o difenilpicrilhidrazina, monitorado pelo decréscimo de absorbância.

De acordo com os dados obtidos (Figura 7) o extrato AcOEt das folhas de *A. graveolens* mostrou propriedades antioxidantes semelhantes aos padrões utilizados, mesmo em baixas concentrações. Provavelmente a presença de flavonoides é responsável pela atividade observada. Os extratos aquoso e hidroalcolico tem capacidade de sequestrar radicais livres somente em altas concentrações.

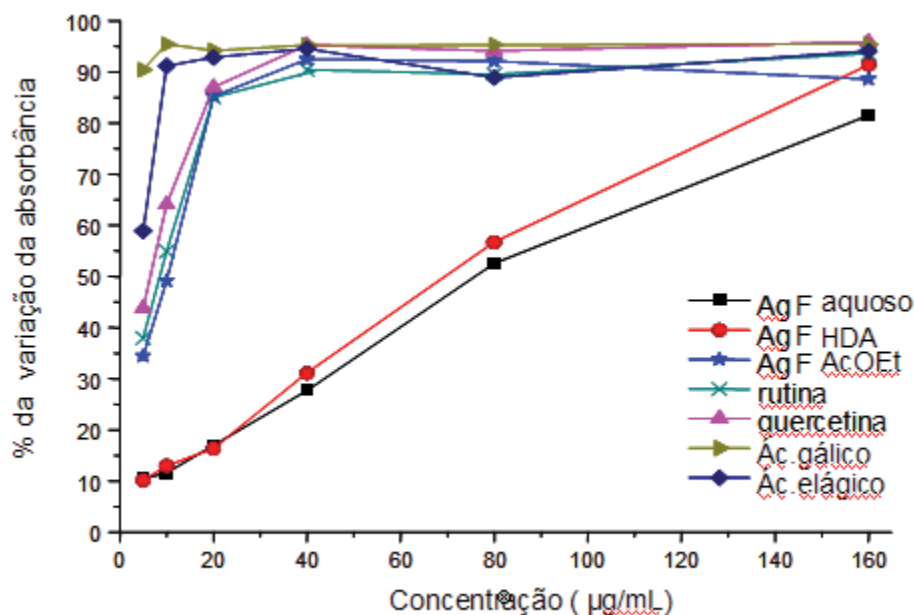


Figura 7. Gráfico da capacidade sequestradora de radicais livres dos extratos obtidos das folhas de *Astronium graveolens*, frente ao reagente DPPH.

De modo geral, os polifenóis e em particular os flavonoides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade com agente doador de H e elétrons; estabilidade do radical flavonoil formado; reatividade frente a outros antioxidantes; capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com membranas (Barreiros,A.L.B.S.; David,J.P.; David,J.M 2006). Quanto maior o numero de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e elétrons. Flavonoides monoidroxilados apresentam atividade muito baixa, por exemplo, a 5-hidroxi-flavona tem atividade não detectável (Cao,G.H.; Sofic,E.; Prior,R.L. 1997). Entre os flavonoides diidroxilados destacam-se aqueles que possuem o sistema catecol (3', 4"-diidroxil) no anel B. Os flavonoides com múltiplas hidroxilas como a quercetina e a luteolina possuem forte atividade antioxidante quando comparados ao α - tocoferol , β - caroteno e ácido ascórbico (Yang *et al* , 2001).

5.3 Identificação das substâncias isoladas de *Astronium graveolens*

Ag1 galato de metila

A substância **Ag1** foi identificada a partir de experimentos de comparação por CLAE usando banco de padrões, após verificação de similaridade entre tempo de retenção e máximo de absorção na região do UV, uma alíquota de **Ag1** foi misturada com padrão autêntico de galato de metila e sua identificação confirmada após experimento de co-injeção (figura 8):

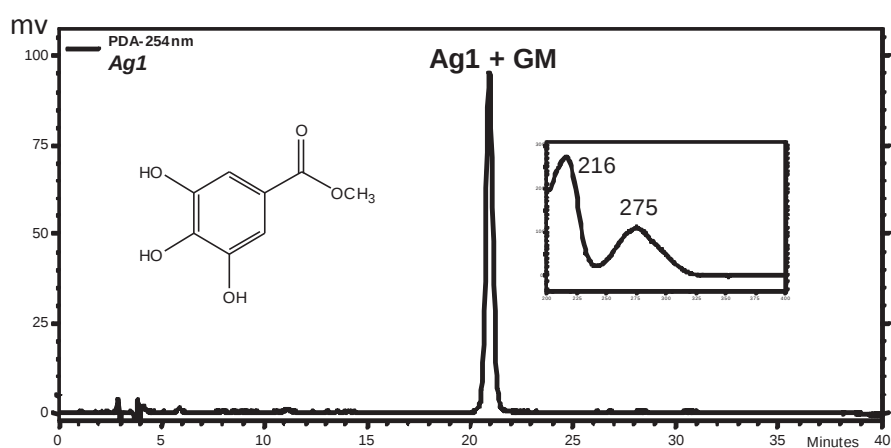


Figura 8. Cromatograma de análise por CLAE-DAD do experimento de co-injeção de **Ag1** com padrão comercial de galato de metila. Condições cromatográficas descritas na Metodologia Experimental.

Foi realizado também, experimento de espectrometria de absorção na região do infravermelho para as substâncias **Ag1** e **Ag2**.

Para a substância **Ag1** foram observadas as absorções em $\nu(\text{cm}^{-1})$ (figura 9): 3286, 1666, 1603, 1535, 1431, 1306, 1259, 1202, 1035, 994 e 775, as quais estão de acordo com dados da literatura (Sigma-Aldrich, 2009).

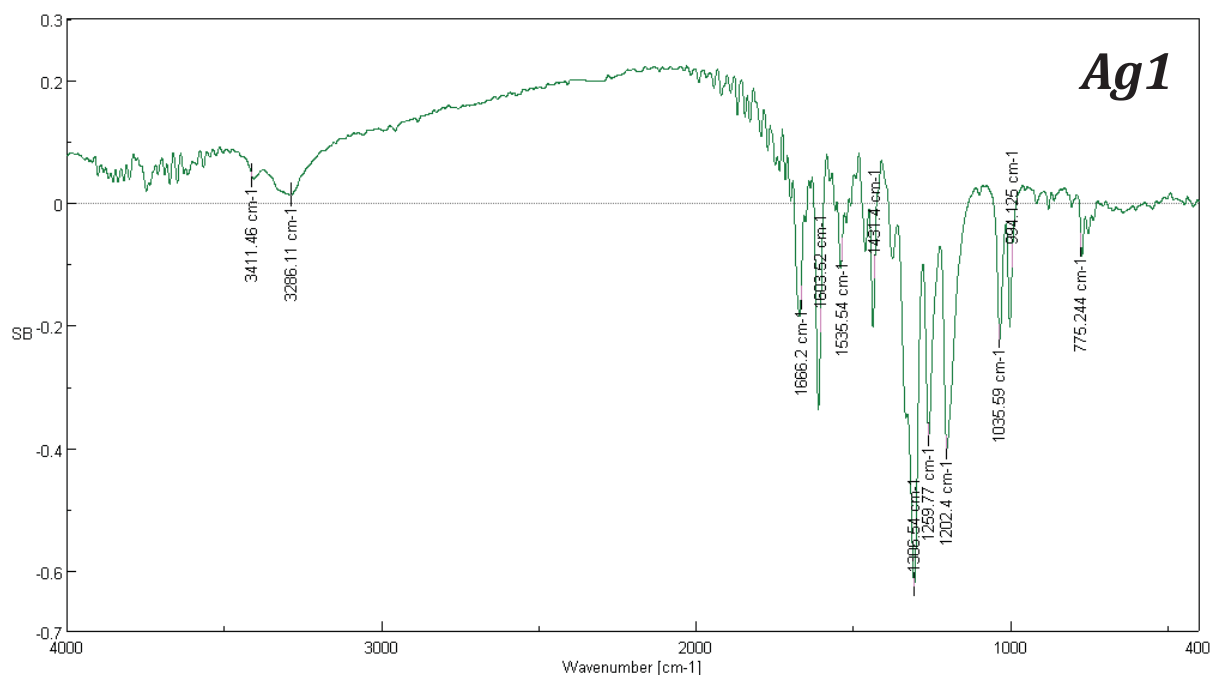


Figura 9. Espectro de absorção na região do infravermelho para a substância **Ag1**.

Ag2 ácido gálico

Análise da substância **Ag2** por CLAE-DAD analítico exibiu um único pico cromatográfico com máximo de absorção na região do UV de 275 nm, característico do ácido 3,4,5-triidroxi benzóico e a confirmação da identificação da substância **Ag2** como sendo ácido gálico foi feita com experimentos de co-injeção entre a amostra **Ag2** com padrão autêntico de ácido gálico (figura 10).

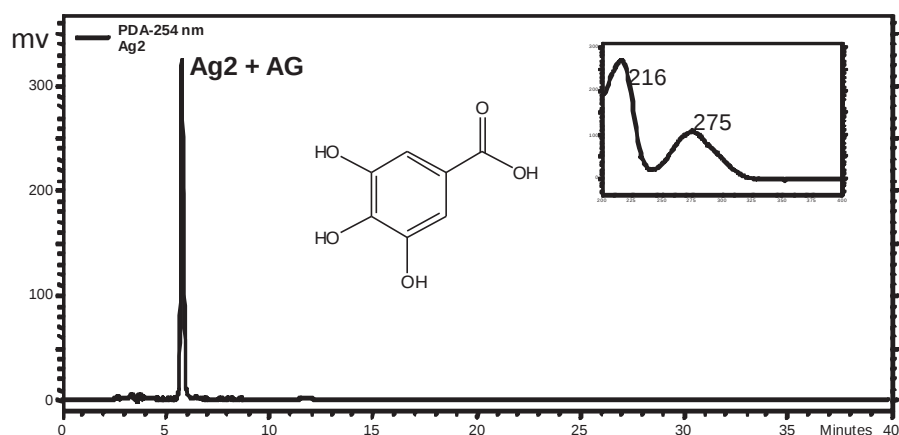


Figura 10. Cromatograma de análise por CLAE-DAD do experimento de co-injeção de *Ag2* com padrão comercial de ácido gálico. Condição cromatográfica descrita na parte Metodologia Experimental.

Para a substância *Ag2* foram observadas as seguintes absorções em $\nu(\text{cm}^{-1})$ (figura 11): 3277, 1663, 1604, 1536, 1424, 1382, 1307, 1259, 1222, 1026, 866 e 734, as quais estão de acordo com dados da literatura (Sigma-Aldrich, 2009).

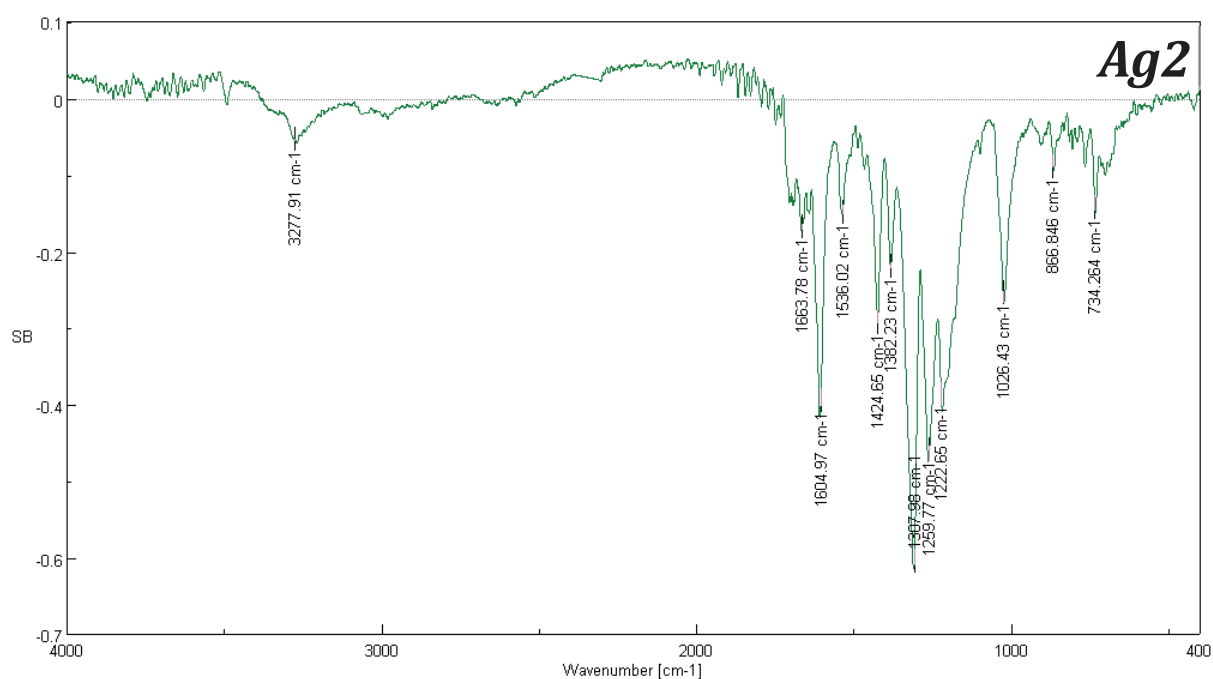


Figura 11. Espectro de absorção na região do infravermelho para a substância *Ag2*.

Ag3 Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo

A substância **Ag3** foi obtida como um sólido de cor amarela. Sua estrutura foi determinada por análise do espectro de RMN de ^1H , mesmo estando impura, e por comparação do espectro no ultravioleta com padrão de flavonoides.

O espectro de RMN ^1H de **Ag3** (figuras 12 e 13) apresentou sinais característicos de anéis aromáticos de um flavonoide. O anel B foi caracterizado pela presença de dubleto em δ 6,85 ($J = 9,0$ Hz) e de um multipeto em δ 7,57 – 7,59. O anel A foi caracterizado pelos dubletos em δ 6,21 e 6,41 de $J = 2,0$ Hz, típico de hidrogênios em posição *meta*. Ainda com relação ao espectro de RMN ^1H , foi observado sinal em δ 5,45 ($J = 7,5$ Hz) e característico de hidrogênio anomérico de açúcar. Como resultado da análise do espectro de RMN ^1H , pode-se sugerir que a substância é um derivado da quercetina e está substituída por um glicosídeo (Tabela 1). Para confirmação da substância foi realizada análise por CLAE, descrita após determinação estrutural de **Ag4**.

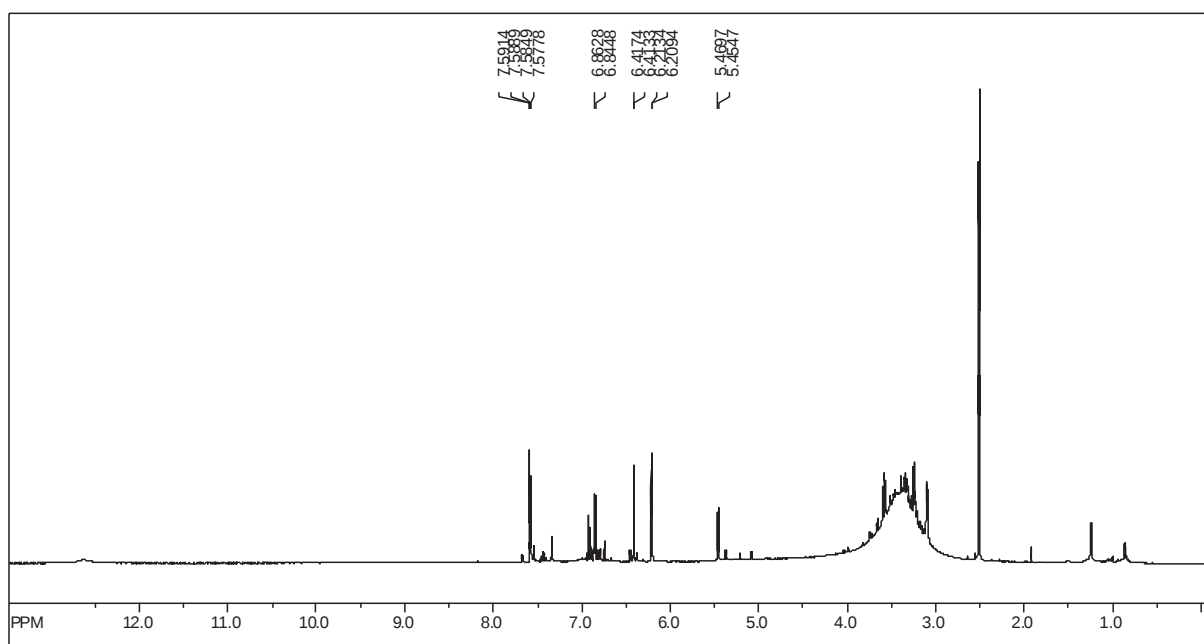


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H da substância **Ag3** (500 MHz, DMSO-d_6).

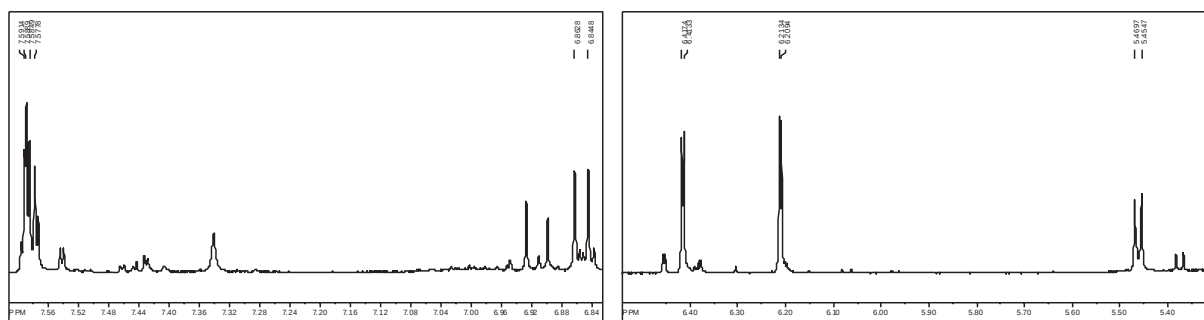


Figura 13. Expansões do espectro de RMN de ^1H da substância **Ag3** (500 MHz, DMSO-d_6) - região dos hidrogênios aromáticos e do hidrogênio anomérico.

Ag4 Quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (Quercitrina)

A substância **Ag4** foi isolada como um sólido de cor amarela, característica de flavonoides.

O espectro de RMN ^1H da substância **Ag4** (figuras 14 e 15) apresentou vários sinais na região de hidrogênios aromáticos, cujos acoplamentos são característicos de um flavonoide. O anel B foi caracterizado pela presença de dubleto em δ 7,31 ($J = 2,0$ Hz), duplo dubleto em δ 7,26 ($J = 2,0$ e 8,4 Hz) e dubleto em δ 6,87 ($J = 8,4$ Hz). O anel A foi caracterizado pelos dubletos em δ 6,39 e 6,21, de $J = 2,0$ Hz, típico de hidrogênios em posição *meta*. Ainda com relação ao espectro de RMN ^1H , foi observado sinal em δ 5,26 ($J = 1,5$ Hz) e característico de hidrogênio anomérico de açúcar em posição equatorial. A determinação de qual açúcar se trata, foi evidenciada pela presença de um dubleto em δ 0,82 ($J = 6$ Hz) referente aos hidrogênios metílicos de rhamnose.

Como resultado da análise do espectro de RMN ^1H , pode-se sugerir que a substância é um derivado da quercetina e possui uma unidade de rhamnose em sua estrutura (Tabela 1).

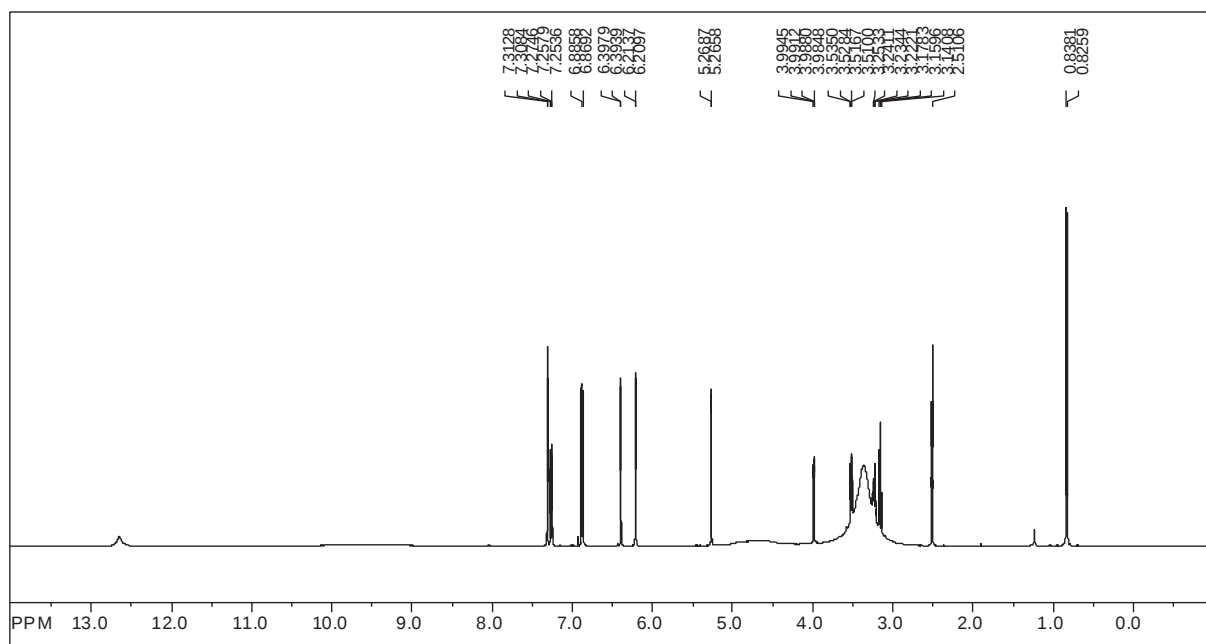


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H da substância **Ag4** (500 MHz, DMSO-d_6).

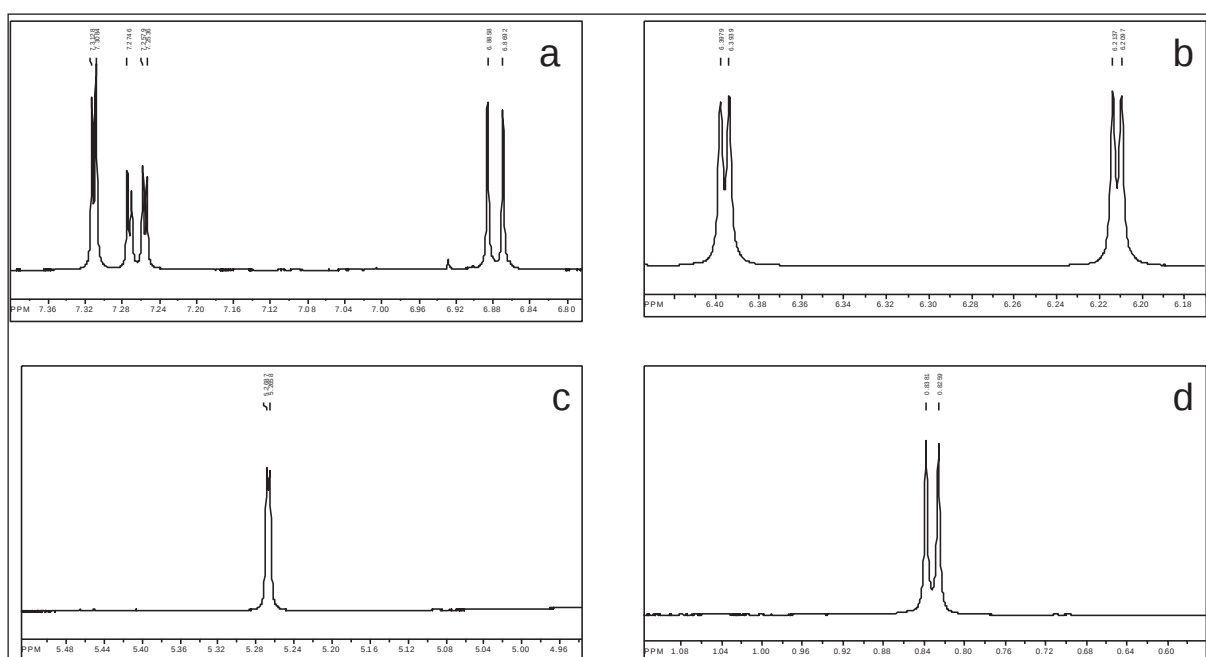


Figura 15. Expansões do espectro de RMN de ^1H da substância **Ag4** (500 MHz, DMSO-d_6):

a) hidrogênios do anel B; b) hidrogênios do anel A; c) hidrogênio anomérico; d) hidrogênios metílicos da rhamnose.

Tabela 1. Dados de RMN ^1H para as substâncias **Ag3** e **Ag4** (500 MHz, δ em ppm, $\text{DMSO-}d_6$).

Posição	^1H (δ) - Ag3	^1H (δ) - Ag4
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	6,21 (d, $J = 2$ Hz)	6,21 (d, $J = 2$ Hz)
7	-	-
8	6,41 (d, $J = 2$ Hz)	6,39 (d, $J = 2$ Hz)
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	7,57 – 7,59 (m)	7,31 (d, $J = 2$ Hz)
3'	-	-
4'	-	-
5'	6,85 (d, $J = 9,0$ Hz)	6,87 (d, $J = 8,4$ Hz)
6'	7,57 – 7,59 (m)	7,26 (dd, $J = 2$ e 8,4 Hz)
1''	5,45 (d, $J = 7,5$ Hz)	5,26 (d, $J = 1,5$ Hz)
2''	3,24 (m)	3,99 (dd, $J = 1,5$ e 3,2 Hz)
3''	3,33 (m)	3,52 (dd, $J = 3,2$ e 9,2 Hz)
4''	3,10 (m)	3,16 (t, $J = 9,2$ Hz)
5''	3,24 (m)	3,20-3,27 (m)
6''	3,58 (dl, $J = 11,3$ Hz)	0,82 (d, $J = 6$ Hz)

A confirmação das estruturas das substâncias **Ag3** e **Ag4** foi realizada por análise em CLAE-DAD, por comparação com padrões através do tempo de retenção e espectro no ultravioleta (figura 16).

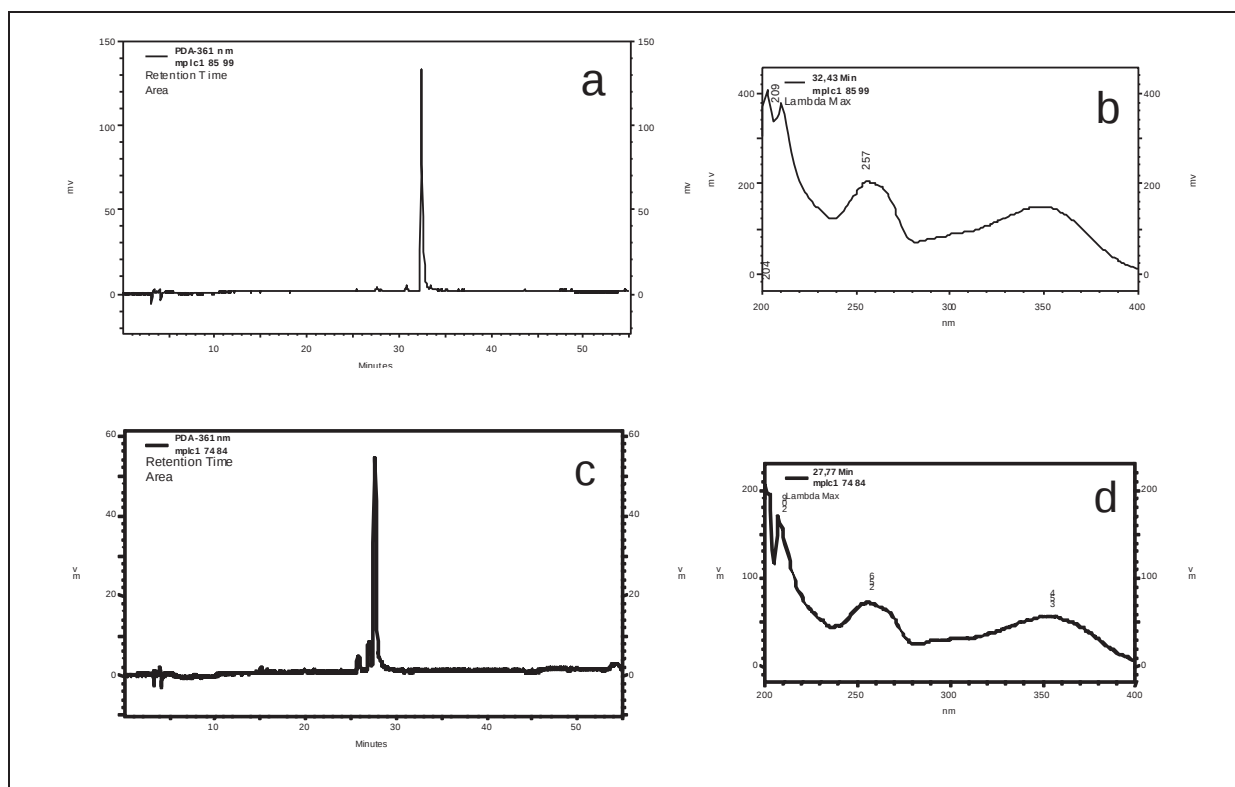


Figura 16. Substância **Ag4**: a) cromatograma analítico; b) espectro no UV. Substância **Ag3**: c) cromatograma analítico; d) espectro no UV. Condições cromatográficas descritas na Metodologia Experimental.

O conjunto dos dados obtidos confirma a substância **Ag3** como sendo quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (quercitrina) e a substância **Ag4** como quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo.

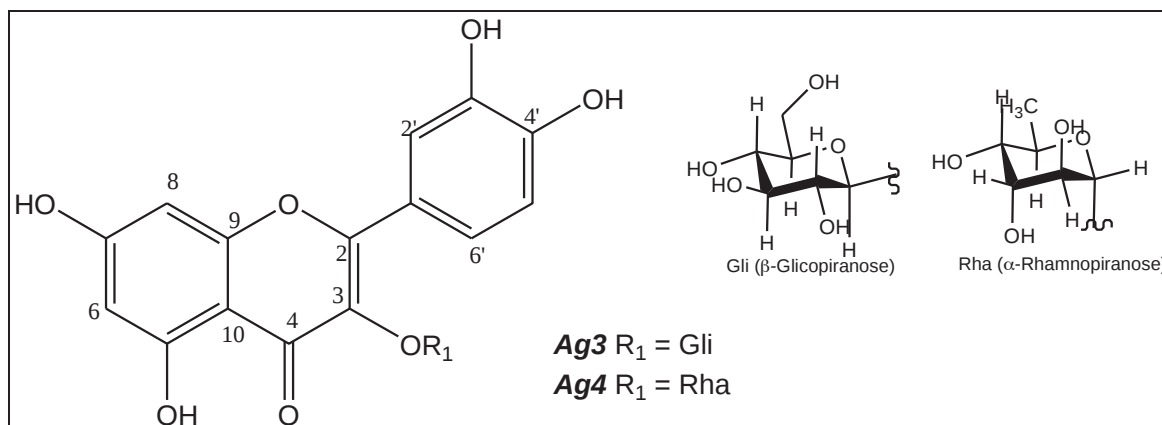


Figura 17. Estrutura química geral e específica das substâncias **Ag3** e **Ag4**.

Flavonoides são reconhecidos por apresentarem, no geral, duas bandas de absorção referentes aos dois sistemas aromáticos encontrados nas agliconas: a Banda II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel A e a Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel B (figura 18a) (Merken & Beecher, 2000). A Banda I é associada a absorção do Anel B, que possui o sistema cinamoil com maior extensão da conjugação eletrônica. A Banda II é atribuída ao Anel A, que envolve a absorção do sistema benzoil de menor conjugação (figura 18b).

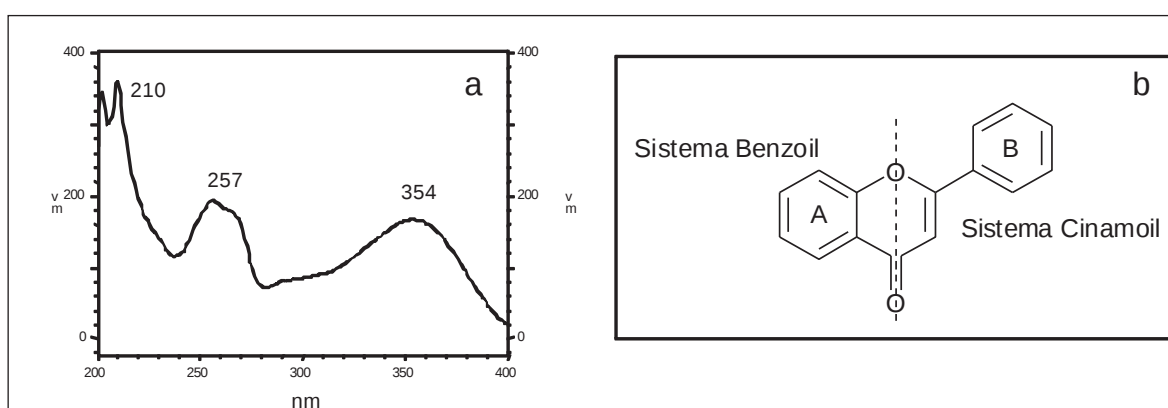


Figura 18. a) Espectro no ultravioleta característico de flavonoides. b) Estrutura geral de um flavonoide, com os anéis A e B em destaque.

5.4 Estudo das subfrações obtidas do fracionamento CLMP 2

Algumas subfrações obtidas da fração 136-177 foram analisadas por CLAE-DAD para verificação de complexidade e confirmação da constituição química, já que, por CCDC, as subfrações se mostraram ricas em flavonóides.

Na figura 19, encontram-se os cromatogramas analíticos obtidos, seguindo as condições cromatográficas estabelecidas por Rodrigues *et al* (2008), e desta forma, os flavonoides eluídos na faixa de 25 a 35 minutos podem ser considerados monoglicosídicos. Isto se confirmou na análise das substâncias **Ag3** e **Ag4** em que seus tempos de retenção foram 27,7 e 32,4 min, respectivamente. As subfrações analisadas são constituídas de flavonoides, de acordo com os espectros no ultravioletas observados, e apresentaram pouca complexidade cromatográfica (figura 19).

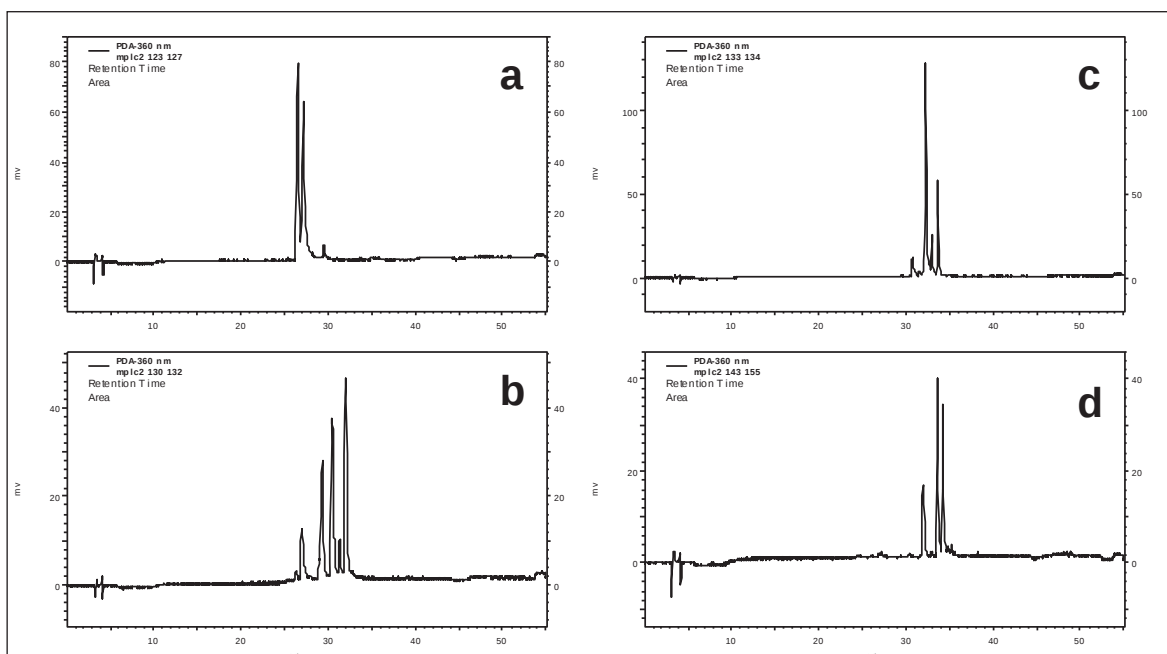


Figura 19. Cromatogramas analíticos obtidos para as subfrações de CLMP 2: a) 123-127 (45 mg); b) 130-132 (68 mg); c) 133-134 (64 mg); d) 143-155 (48 mg). Condições cromatográficas descritas na Metodologia Experimental.

Ainda, pode-se verificar que a cromatografia de média pressão foi eficiente na separação de grupos de substâncias e não em isolamento de substâncias puras. Todavia, nos grupos de metabólitos, algumas substâncias se repetem, variando apenas sua concentração (figura 20).

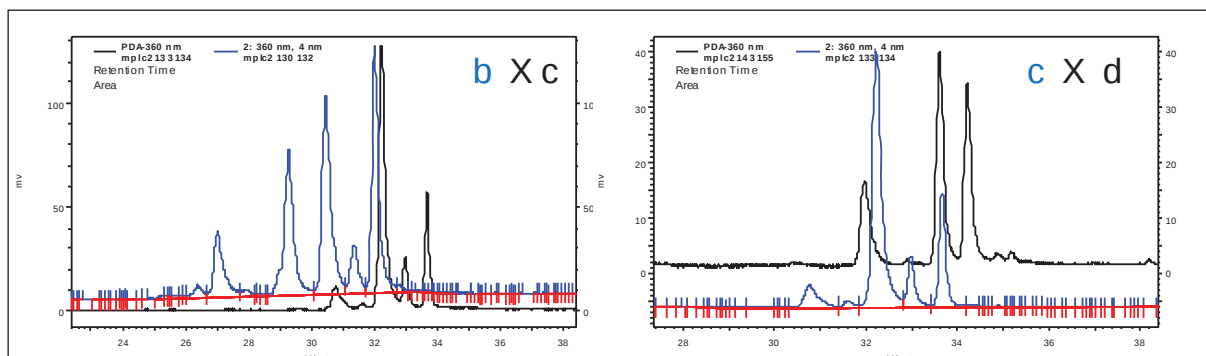


Figura 20. Expansões e comparações dos cromatogramas analíticos obtidos para as subfrações de CLMP 2: b) 130-132 (68 mg) ; c)133-134 (64 mg); d)143-155 (48 mg). Condições cromatográficas descritas na Metodologia Experimental.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fracionamento do extrato em questão em equipamento de CLMP se mostrou bastante eficiente já que através dessa técnica foram obtidas frações enriquecidas das substâncias: **Ag1** – galato de metila; **Ag2** – ácido gálico; **Ag3** – quercetina-3-O- β -D glicopiranosídeo; **Ag4** – quercetina-3-O- α -L ramnopiranosídeo. Sendo que **Ag3** e **Ag4** são flavonóides monoglicosilados.

Na avaliação da atividade antioxidante dos extratos (acetato de etila, aquoso e hidroalcoólico) das folhas de *A. graveolens* demonstrou-se que o extrato em acetato de etila apresenta considerável atividade antioxidante, provavelmente devido a sua composição rica em flavonóides e derivados do ácido gálico como demonstrou o estudo de seu perfil químico.

Assim, o isolamento dos metabólitos do extrato AcOEt das folhas de *Astronium graveolens* dá continuidade ao importante trabalho de conhecimento da química desse gênero de plantas, ao mesmo tempo em que contribui para o estudo químico-farmacológico de plantas medicinais. Permitiu também, o contato e a familiarização com as técnicas cromatográficas empregadas no isolamento e identificação de substâncias presentes em plantas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. (1998) **Cerrado: espécies vegetais úteis**. EMBRAPA, CPAC.
- Bandeira, M.A.M. (1993). **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste**, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (= *Astronium urundeuva* Engl.) aroeira-do-sertão. Mestrado. Instituto de Química – Universidade Federal do Ceará.
- Barreiros, A.L.B.S.; David, J.P.; David, J.M. **Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo**. (2006) *Quimica Nova* v. 29 ,p.113-126.
- Brasil. (1998) **Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal**. Brasília: MMA, 283 p.
- Cao, G. H.; Sofic, E. ; Prior ,R. L. **Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships**. (1997) *Free Radical Biology & Medicine* v.22,p.749-760.
- Chen, T.K.; Wiermer, E.D.; Howard, J.J. (1984) *Naturwissenschaften* v. 71, p. 97-98.
- Collins, C. H.; Braga, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**, 7.ed. Campinas: Unicamp, 1997.
- Desmarchelier, C.; Romão, R.L.; Coussio, J.; Ciccía, G. (1999) *J Ethnopharmacol* v. 67, p. 69-77.
- Hostettmann, Kurt; Queiroz, Emerson F.; Vieira, Paulo C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores** (2003), EdUFSCAR.
- Lorenzi, H. (1998) **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª ed. Nova Odessa-SP, Editora Plantarum.
- Maia, J.G.S.; da Silva, M.H.L.; Andrade, E.H.A. (2002) *Flavour and fragrance Journal* v. 17, p. 72-74.

- Menezes, A.M.S.; Rao, V.S.; Fonteles, M.C. (1985) *Braz. J. Med. Biol. Res* v.18, p. A727-A727.
- Menezes, A.M.S.; Rao, V.S. (1988) *Braz. J. Med. Biol. Res* v.21, p. 531-533.
- Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade brasileira**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/capa/index.html>>. Acesso em: 21 fev. 2009.
- Merken, H.M.; Beecher, G.R. (2000) *J. Agric. Food Chem* v.48, p. 577-599.
- Moraes, S.A.L.; Nascimento, E.A.; Queiroz, C.R.A.A.(1999) *J. Braz. Chem. Soc.* v.10, p. 447-452.
- Phillipson, J.D (2001) *Phytochemistry* v.56, p. 237-243.
- Queiroz, C.R.A.A.(2001) **Análise da lignina e dos polifenóis de aroeira-preta** (*Astronium urundeuva*). Mestrado. Instituto de Química. Universidade Federal de Uberlândia.
- Rao, V S.; Menezes, A.M.S.; Vasconcelos, F.A. (1986) *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.19, p. A568-A568.
- Rao, V S.; Viana, G.S.B.; Menezes, A.M.S. (1987) *Braz. J. Med. Biol. Res.*v.20, p. 803-805.
- Rates, S.M.K. (2001) *Toxicon* v.39, p. 603-613.
- Rodrigues, C. M.; Rinaldo, D.; Sannomiya, M.; Dos Santos, L. C.; Montoro, P.; Piacente, S.; Pizza, C.; Vilegas, W. (2008) *Phytochem. Anal.*v.19, p. 17-24.
- Salminen, J. P.; Ossipov, V.; Lojonen, J.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. (1999) *J. Chromatogr. A* 864, 283-291.
- Sigma-Aldrich (2009). Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html>>. Acesso em: 13 set. 2009.
- Viana, G. S. B.; Bandeira, M. A. M.; Matos, F. J. A. (2003) *Phytomedicine* v.10, p. 189-195.

- Yang, B.;Koiani, A.;Arai, K.; Kusu, F. **Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation.**(2001) *Chemical Pharmaceutical Bulletin* v.49,p.747-751.